



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Cuna de héroes, crisol de pensadores



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“Estudio Químico del Tallo de
Eupatorium aff cardiophyllum”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

PRESENTA

EVA ESTHEFANY SOTO GUZMÁN

DIRECTORAS

Doctora en Ciencias Químicas
ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES

Doctora en Química
LIDIA BEIZA GRANADOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 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 la D.Q. Lidia Beiza Granados, con apoyo económico de la CIC-UMSNH.

Esta tesis dio lugar a participación en dos congresos:

1. “Presencia del *p*-cumarato de bornilo en *Eupatorium aff cardiophyllum*”, Eva E. Soto Guzmán, Gabriela Servín García, Mario A. Gómez Hurtado, Gabriela Rodríguez García, Concepción Armenta Salinas, Juan D. Hernández Hernández, Juan P. García Merinos, Rosa E. del Río, presentado en la XII Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica, celebrado en la ciudad de Silao, Guanajuato, del 7 al 11 de Marzo de 2016.
2. “Estudio Químico de *Eupatorium aff cardiophyllum*”, Eva E. Soto Guzmán, presentado en el 5° Verano Nicolaita de Investigación de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, celebrado en la ciudad de Morelia, Michoacán, del 27 de Junio al 12 de Agosto de 2016.
3. “Componentes minoritarios de los tallos de *Eupatorium aff cardiophyllum*”, Eva E. Soto-Guzmán, Lidia Beiza-Granados, Mario A. Gómez-Hurtado, Gabriela Rodríguez-García, Hugo A. García-Gutiérrez, Carlos M. Cerda-García-Rojas, Pedro Joseph-Nathan, Rosa E. del Río, presentado en la 13ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, celebrado en la ciudad de Morelia, Michoacán, del 17 al 20 de Mayo de 2017.

ÍNDICE

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS.....	iii
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Medicina tradicional.....	1
1.2 Fitoquímica y Farmacognosia.....	2
1.3 Productos naturales.....	4
1.3.1 Compuestos nitrogenados: Alcaloides.....	6
1.3.2 Terpenoides.....	6
1.3.3 Compuestos fenólicos.....	7
1.3.3.1 Fenilpropanoides.....	7
2. ANTECEDENTES.....	9
2.1 Familia Asteraceae.....	9
2.2 Género <i>Eupatorium</i>	10
2.2.1 Clasificación botánica.....	10
2.2.2 Distribución geográfica.....	11
2.2.3 Descripción morfológica.....	11
2.2.4 Composición química y su papel en la medicina tradicional.....	12
2.3 Biosíntesis de terpenos.....	13
2.3.1 Monoterpenos.....	15
2.3.2 Diterpenos.....	16
2.3.3 Kauranos.....	16

2.4	Análisis químicos descritos del género <i>Eupatorium</i> y otros géneros.....	17
2.4.1	Monoterpenos con esqueleto de borneol y derivados.....	17
2.4.2	Diterpenos, triterpenos y derivados del ácido cinámico.....	20
2.5	Interés terapéutico de derivados del borneol.....	25
2.6	<i>Eupatorium aff cardiophyllum</i>	27
3.	JUSTIFICACIÓN.....	28
4.	OBJETIVOS.....	29
4.1	Objetivo general.....	29
4.2	Objetivos específicos.....	29
5.	METODOLOGÍA GENERAL.....	30
6.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	31
6.1	Colecta de la especie y tratamiento.....	31
6.2	Análisis del extracto hexánico de tallo.....	31
6.3	Purificación de los compuestos.....	33
7.	CONCLUSIONES.....	43
8.	PARTE EXPERIMENTAL.....	44
8.1	Muestra vegetal.....	44
8.2	Obtención de extractos.....	44
8.3	Espectroscopia y métodos físicos (RMN, EMIE, IR, p.f.).....	44
8.4	Análisis químico.....	45
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	49

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

δ	Desplazamiento químico en ppm
°C	Grados Celsius
1D	Una dimensión
2D	Dos dimensiones
a.C.	Antes de Cristo
AcOEt	Acetato de etilo
ATP	Trifosfato de adenosina
cm	Centímetro
COSY	COrelated SpectroscopY
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Cin	Cinamato
d	Señal doble
da	Señal doble ancha
d.C.	Después de Cristo
dd	Señal doble de dobles
dda	Señal doble de dobles ancha
ddd	Señal doble de doble de dobles
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMAPP	Difosfato de dimetilalilo
dt	Señal doble de triples

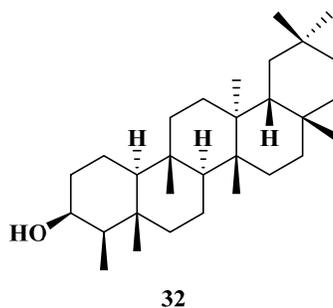
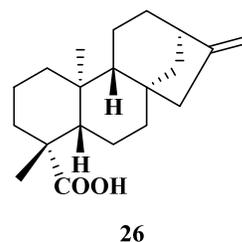
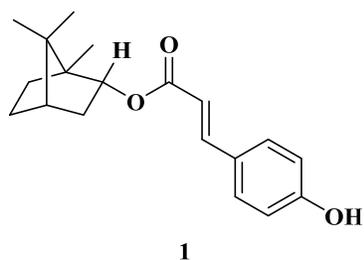
EMIE	Espectro de masa de impacto electrónico
<i>ent</i>	Enantiómero
FPP	Difosfato de farnesilo
g	Gramo
GFPP	Difosfato de geranilfarnesilo
GGPP	Difosfato de geranilgeranilo
GPP	Difosfato de geranilo
HETCOR	HETeronuclear CORrelation
Hz	Hertz
Int. Rel.	Intensidad relativa
IPP	Difosfato de isopentenilo
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
km	Kilómetro
L	Litro
m	Señal múltiple
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MHz	Mega Hertz
MVA	Ácido mevalónico
<i>m/z</i>	Masa/carga

NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
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
t	Señal triple
ta	Señal triple ancha
td	Señal triple de dobles
TMS	Tetrametilsilano
$\mu\text{g/mL}$	Microgramo/mililitro
uma	Unidad de masa atómica

RESUMEN

En el presente trabajo se describe el primer estudio fitoquímico de *Eupatorium aff cardiophyllum* del extracto hexánico de tallo, una especie perteneciente a la extensa familia Asteraceae distribuida principalmente en América. Este género endémico de México cuenta con amplios estudios químicos que describen la presencia de compuestos con importante actividad biológica.

El compuesto mayoritario aislado e identificado fue el monoterpeno denominado *p*-cumarato de bornilo (**1**), junto con los componentes minoritarios el ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**26**) y el 3 β -friedelinol (**32**), los cuales fueron caracterizados por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de 1D y 2D y por comparación con datos de la literatura.

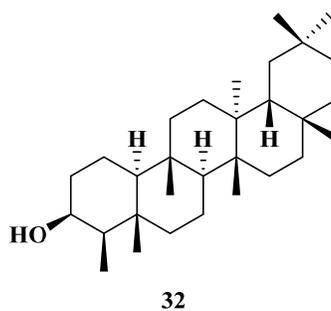
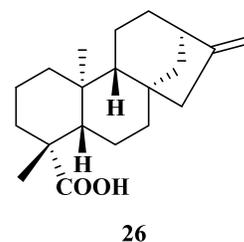
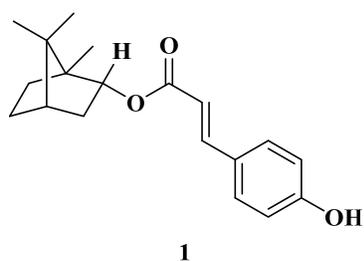


Palabras clave: Asteraceae, *Eupatorium aff cardiophyllum*, Monoterpenos, Diterpenos, Triterpenos.

ABSTRACT

In the present work the first preliminary phytochemical study of the hexane stem extract of *Eupatorium aff cardiophyllum* is described, it is a specie belonging to the extensive Asteraceae family distributed mainly in America. This genus endemic to Mexico has extensive chemical studies that describe the presence of compounds with important biological activity.

The isolated and identified major compound was the monoterpene characterized as bornyl *p*-coumarate (**1**), along with the minor components the *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (**26**) and 3 β -friedelinol (**32**), which were characterized by 1D and 2D nuclear magnetic resonance spectroscopy and by comparison with literature data.



Keywords: Asteraceae, *Eupatorium aff cardiophyllum*, Monoterpenes, Diterpenes, Triterpenes.

1. INTRODUCCIÓN

A través del tiempo, la naturaleza ha contribuido para satisfacer las necesidades básicas de los seres humanos, como son la alimentación y la provisión de medicamentos para el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades.

1.1 Medicina tradicional

Un papel fundamental en los sistemas de medicina tradicional lo han desarrollado las plantas, que son fuente de una gran diversidad de productos metabólicos de importancia comercial, usados actualmente en la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética.

El uso esencial de los productos naturales ha sido documentado ampliamente a lo largo de la historia, los primeros registros escritos son de Mesopotamia y fueron realizados en tablas de arcilla que datan de alrededor de 2600 años a.C.; mientras que la medicina egipcia se remonta a 2900 años a.C. con uno de los documentos más conocido, el "Papiro de Ebers" que data de 1500 años a.C., donde se documentan más de 700 fármacos, la mayoría de origen vegetal. Así mismo, se ha generado una extensa documentación de medicina tradicional china destacando obras como Wu Shi Er Bing Fang (1100 años a.C., 52 recetas), seguido de obras como el Shennong Herbal (100 años a.C., 365 fármacos) y el Tang Herbal (659 años d.C., 850 medicamentos).

Los griegos y los romanos también hicieron aportaciones sustanciales al uso racional de plantas medicinales con Dioscórides y Galeno, mientras que en México se desarrolló el conocido código Badiano, cuyo título real es *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* (Libro sobre las hierbas medicinales de los pueblos indígenas) que fue escrito en el año de 1552 por el médico indígena náhuatl llamado Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano, en el cual se describen las propiedades curativas de 227 plantas (Petersen & Amstutz, 2008; Pérez-Alonso & Jiménez, 2011; Somolinos, 1990).

En la actualidad la Organización Mundial de la Salud estimó que aproximadamente el 65% de la población mundial depende de la medicina tradicional derivada de vegetales para el cuidado primario de la salud, esto hace que el estudio de los metabolitos sintetizados por las plantas sea de gran importancia, de ahí la necesidad de utilizar tecnologías diversas para su extracción, caracterización e identificación (Cragg et al., 2009).

1.2 Fitoquímica y Farmacognosia

La Fitoquímica es la disciplina que tiene como principal objetivo el estudio de los constituyentes químicos de las plantas, se basa en la extracción de compuestos químicos del material vegetal que ha sido recolectado, secado y molido de acuerdo a los procedimientos establecidos. El estudio de tales compuestos comprende: sus estructuras químicas, metabolismo (biosíntesis y degradación), distribución natural, función biológica, extracción y evaluación cuali-cuantitativa. El proceso de extracción de los componentes químicos utiliza disolventes orgánicos como el hexano, éter etílico, cloruro de metileno, cloroformo, acetato de etilo, metanol y agua, entre otros. El subsecuente proceso de fraccionamiento y purificación implica cristalización directa del extracto en crudo y técnicas cromatográficas (Ocampo-Sánchez, 1994).

El análisis químico de las plantas ha llevado a la identificación y purificación de importantes metabolitos secundarios, proporcionando herramientas firmes para el progreso de otras ciencias como la farmacognosia, que se encarga del estudio de los principios activos de origen natural que pueden poseer un potencial terapéutico o aplicación en la industria, contribuyendo en gran parte en el descubrimiento y desarrollo de nuevos y potentes fármacos para enfermedades que anteriormente carecían de un tratamiento adecuado. Por ejemplo en el periodo de 1981-2014 fueron aceptadas 174 moléculas para el tratamiento del cáncer, de las cuales 49 (25%) son productos naturales o derivan directamente de ellos, lo que hace que los productos naturales sean de gran interés como fuente de materia prima para mantener la salud y el bienestar del ser humano (**Figuras 1.2.1 y 1.2.2**) (Newman & Cragg, 2016; Cortez-Gallardo et al., 2004).

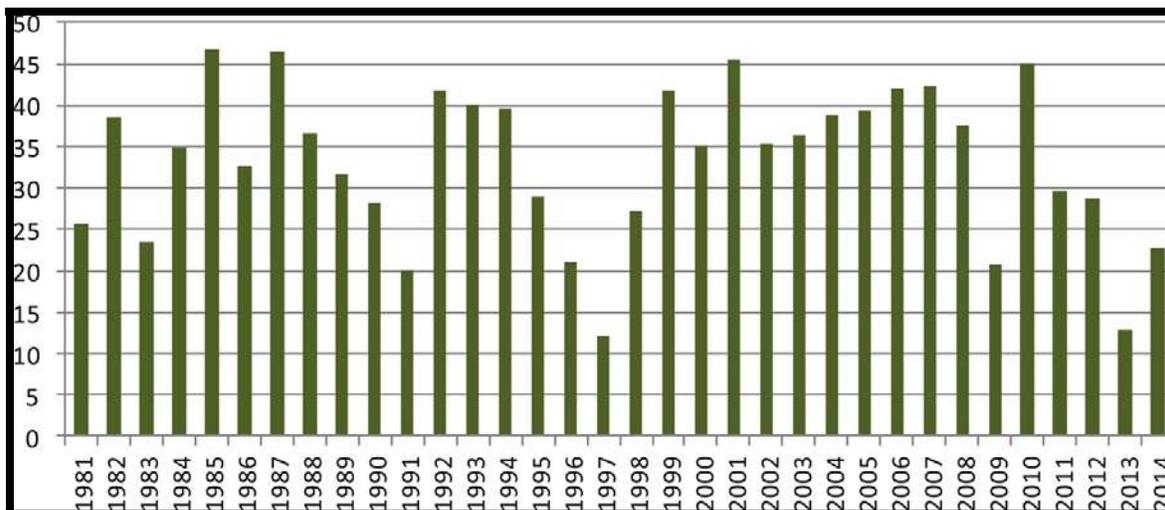


Figura 1.2.1 Porcentaje de productos naturales aceptados como nuevas drogas del año 1981-2014 (Tomado de Newman & Cragg, 2016).

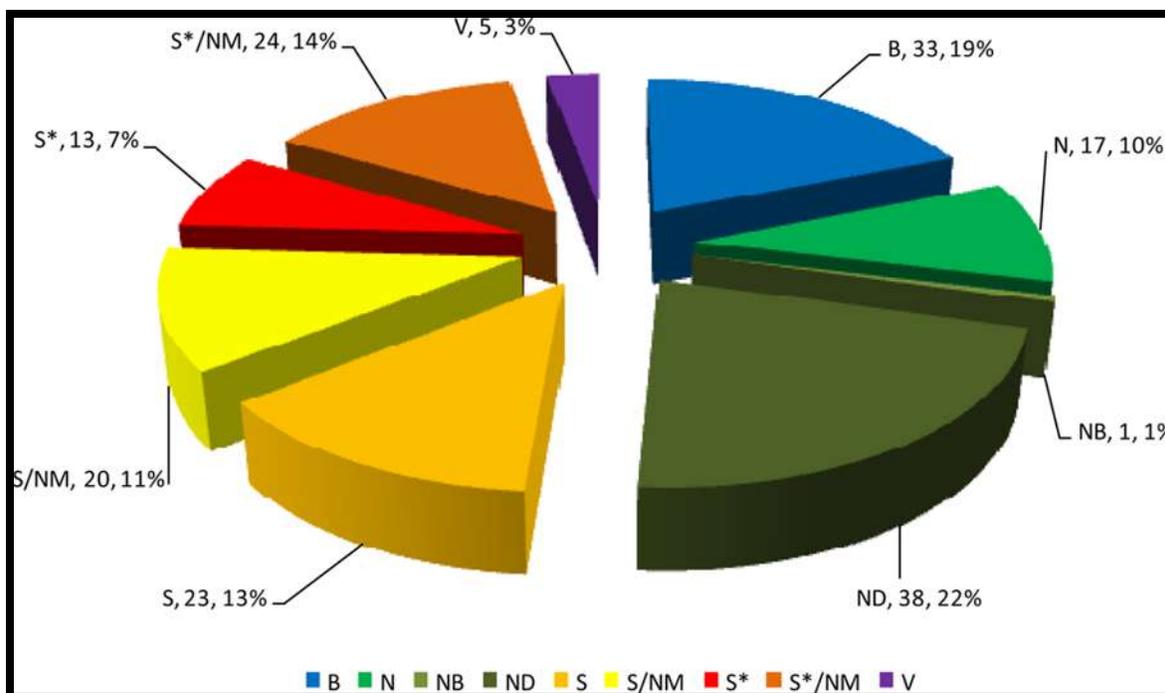


Figura 1.2.2 Nuevas drogas aprobadas contra el cáncer del año 1981-2014, n=174 (B: Macromolécula biológica, N: Producto natural inalterado, NB: Producto natural “droga botánica”), ND: Derivado de producto natural modificado semi-sintéticamente, S: Fármaco totalmente sintético, S*: Sintético con farmacóforo de un producto natural, NM: Simulación de producto natural, V: Vacuna) (Tomado de Newman & Cragg, 2016).

1.3 Productos naturales

Los productos naturales se obtienen de diversas fuentes: plantas, microorganismos (bacterias, hongos) y animales, estos pueden provenir de un organismo completo o de una parte de él. En la práctica, el término producto natural se refiere a metabolitos secundarios; moléculas pequeñas (peso molecular <1500 uma), producidos por un organismo, pero no necesarios para la supervivencia del mismo, siendo una expresión de la individualidad de las especies (Sarker & Nahar, 2007).

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de metabolitos secundarios que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos; pero sí tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores o a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas.

Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes y pesticidas naturales, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas.

Los metabolitos secundarios se sintetizan en pequeñas cantidades y presentan una distribución limitada en el reino vegetal, su producción generalmente está restringida a un determinado género de plantas, a una familia o incluso a algunas especies.

Los precursores de la biosíntesis de los metabolitos secundarios se derivan de rutas del metabolismo primario del carbono, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs, el ciclo de la pentosa fosfato y la vía del metileritritol fosfato (**Figura 1.3.1**) (Sepúlveda-Jiménez et al., 2003; Shilpa et al., 2010).

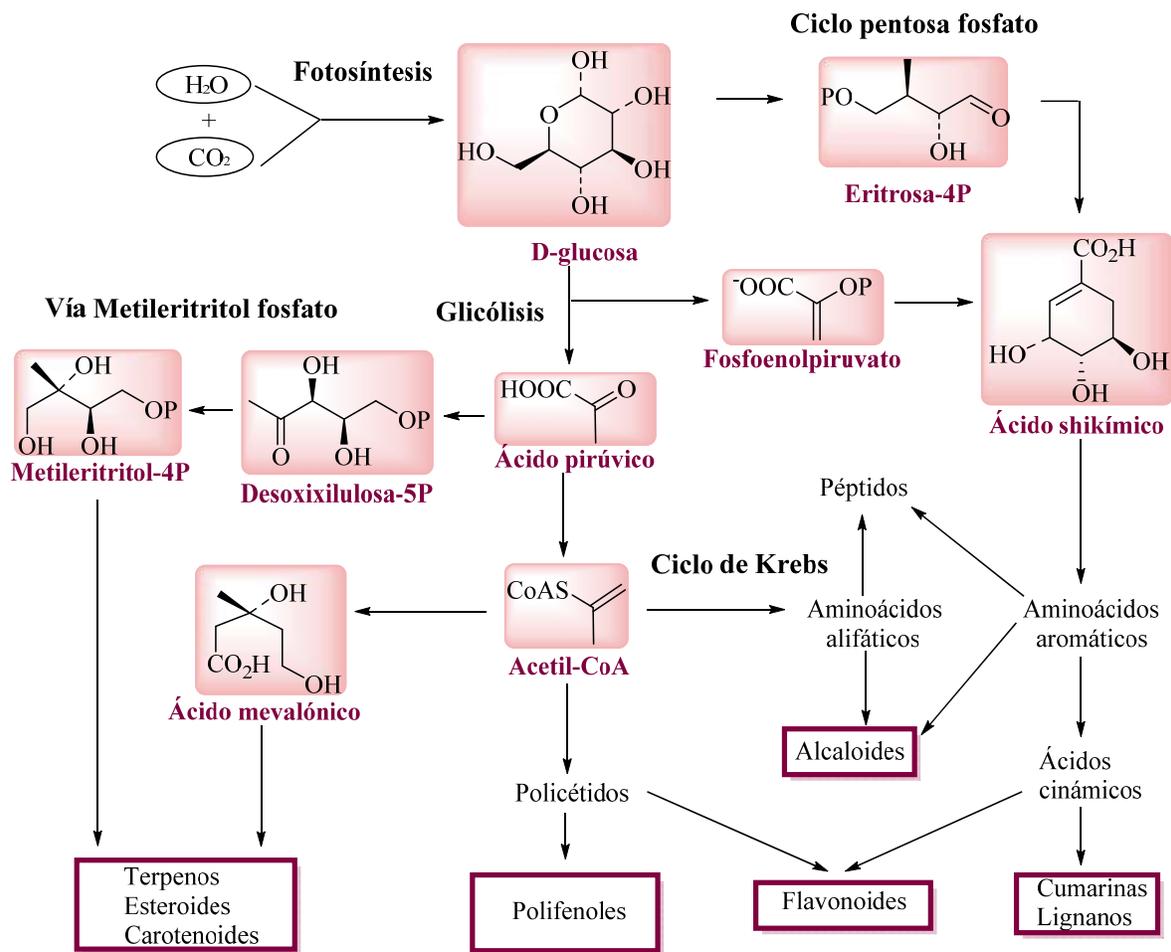


Figura 1.3.1 Rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios (Modificado de Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

Los metabolitos secundarios producidos por las plantas se dividen en base a su origen biosintético en: compuestos nitrogenados, terpenoides y compuestos fenólicos.

1.3.1 Compuestos nitrogenados: Alcaloides

El término alcaloide fue introducido por el farmacéutico alemán, Carl Meissner a principios del siglo XIX, para designar sustancias naturales que reaccionan como los álcalis (del árabe *al qaly*, la sosa y del griego *eidōs*, el aspecto). Estructuralmente contienen uno o varios átomos de nitrógeno, regularmente formando parte de un anillo heterocíclico.

De acuerdo con la estructura molecular y su ruta biosintética, los alcaloides se dividen en tres grupos:

- 1) Verdaderos
- 2) Protoalcaloides
- 3) Pseudoalcaloides

Actualmente se conocen alrededor de 15,000 alcaloides obtenidos de plantas.

1.3.2 Terpenoides

Los terpenoides constituyen el grupo de mayor número de productos naturales con más de 35,000 componentes conocidos. De acuerdo a la regla del isopreno propuesta por Leopold Ruzicka, los terpenos se generan por la unión de una, dos o más unidades de isopreno (**Figura 1.3.2.1**), por lo que también se les denomina isoprenoides (Sarker & Nahar, 2007; Dewick, 2009).

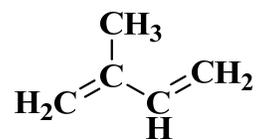


Figura 1.3.2.1 Estructura química del isopreno.

Las estructuras típicas de los terpenos contienen esqueletos de carbono representados por $(C_5)_n$ y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que formen su estructura en: hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) y politerpenos ($C > 40$).

1.3.3 Compuestos fenólicos

Se caracterizan por poseer uno o más grupos hidroxilo ($-OH$), de reacción ácida, unidos generalmente a un anillo aromático (grupo fenol) (**Figura 1.3.3.1**). Los compuestos fenólicos simples abarcan tres grupos de relevancia: los fenilpropanoides simples, las cumarinas y los derivados del ácido benzoico.

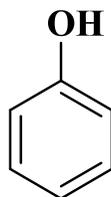


Figura 1.3.3.1 Estructura química del fenol.

1.3.3.1 Fenilpropanoides

La estructura general de los fenilpropanoides presenta una cadena lateral de tres átomos de carbono unida a un anillo de benceno (C_6-C_3) (**Figura 1.3.3.1.1**), estos son la unidad básica para la formación de compuestos fenólicos de mayor complejidad.

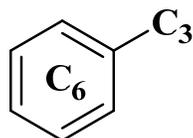


Figura 1.3.3.1.1 Estructura general de los fenilpropanoides.

Algunos ejemplos considerados dentro de este grupo corresponden a los ácidos cinámico, *p*-cumárico, cafeico y ferúlico (**Figura 1.3.3.1.2**) (Ringuelet & Viña, 2013).

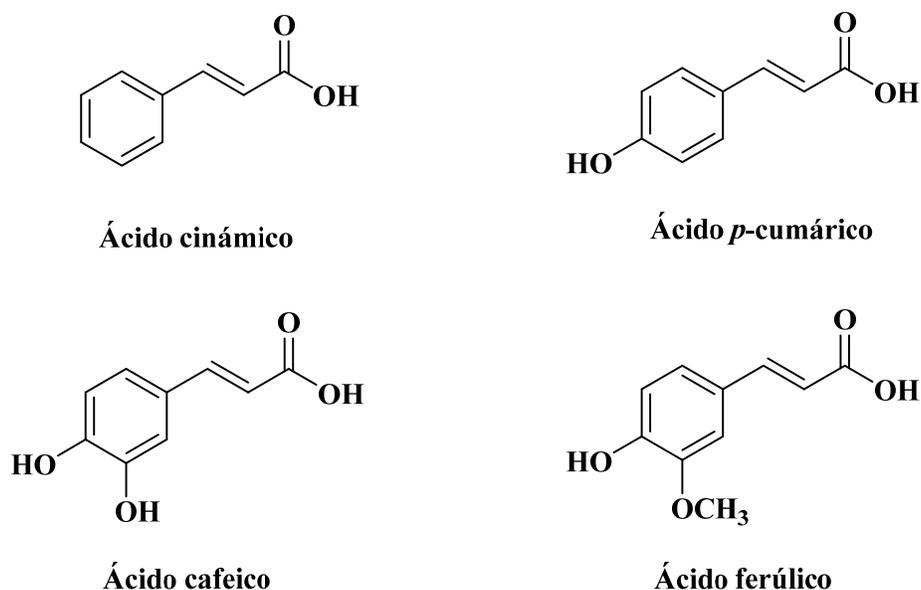


Figura 1.3.3.1.2 Ejemplos de fenilpropanoides.

Las contribuciones de los metabolitos secundarios a la medicina moderna han sido relevantes; sin embargo, la investigación de las propiedades farmacológicas y fitoquímicas de las plantas se lleva a cabo en un bajo porcentaje del 5% y 15%, respectivamente; considerando que se han examinado menos del 20% de las especies de plantas superiores del planeta, se infiere que la química de productos naturales permanece como un área activa de investigación y se espera que se descubran innumerables sustancias con propiedades potencialmente útiles (Cragg et al., 2009; McMurry, 2012).

El género *Eupatorium* es un taxón endémico de México, clasificado dentro de la familia Asteraceae, el cual ha sido ampliamente estudiado, encontrándose una riqueza y diversidad de metabolitos secundarios conocidos por sus potenciales actividades biológicas mencionadas más adelante; incentivando a continuar con estudios para aislar nuevos compuestos y contribuir con su quimiotaxonomía.

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio fitoquímico de *Eupatorium aff cardiophyllum* del extracto hexánico de tallos, del cual hasta la fecha no existe ningún reporte de análisis químico y/o biológico.

2. ANTECEDENTES

México es uno de los países más ricos en biodiversidad, su flora incluye cerca de 21,777 especies diferentes y en su territorio se concentra una pluralidad de grupos taxonómicos; dentro de estas familias se sitúa la Asteraceae, que representa del 8-10% de la flora global y abarca 22,750 taxones específicos e infraespecíficos, la cual cuenta con una riqueza mundial que se estima entre 1,500 y 1,700 géneros y unas 24,000 a 30,000 especies.

Dentro de México destaca el Estado de Michoacán que ocupa el quinto lugar en la biodiversidad nacional, teniendo cerca de 5,000 especies vegetales, convirtiéndolo en un recurso natural invaluable (Cartón & Cruz, 2007).

2.1 Familia Asteraceae

La familia Asteraceae constituye el grupo de mayor diversidad de plantas vasculares sobre el planeta; su distribución es cosmopolita, 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; encontrándose la mayor concentración en zonas tropicales, subtropicales y templadas; abundantes en biomas de montaña y en regiones áridas y semiáridas (Del Vitto & Petenatti, 2009; García-Sánchez et al., 2014).

En el caso particular de México se cuenta con la existencia de 361 géneros y 3,012 especies de este grupo de plantas, considerándose la concentración más importante del planeta. Debido a su gran diversidad Funk et al. (2009) presentaron un compendio actualizado de su clasificación y evolución, en el que se reconocen 43 tribus, 24 de ellas con especies nativas de México.

La Familia de plantas Asteraceae corresponde al Orden Asterales, Suborden Asteridae y destaca por sus inflorescencias racimosas en capítulos, con flores individuales epíginas rodeadas de una o varias hileras de brácteas involucrales, sobre el receptáculo común en que remata el escapo o rama florífera. Sus características morfológicas lo catalogan como un grupo natural, uniforme, altamente evolucionado; también conocido con

el nombre Compositae. Así mismo, todos los géneros de la familia presentan los estambres fusionados por un tejido conectivo a nivel de las anteras (estambres singenesios); su cáliz (cuando presenta) está modificado en una estructura muy variable denominada vilano y un fruto seco, indehiscente con una sola semilla, conocido como aquenio (Villaseñor et al., 2016).

Algunas especies de esta familia se han utilizado tradicionalmente como astringentes, antipiréticos, antiinflamatorios, hepatoprotectores, diaforéticos en fiebres, relajantes de músculos lisos, como tónicos para enfermedades nerviosas, laxantes, entre otros; estos efectos medicinales se deben a la presencia de metabolitos secundarios bioactivos como flavonoides (apigenina, quercetina), ácidos fenólicos (ácido salicílico), terpenos (estevisido) y esteroides (Achika et al., 2014).

2.2 Género *Eupatorium*

2.2.1 Clasificación botánica

El género *Eupatorium* cuenta con las siguientes jerarquías taxonómicas:

Reino	Plantae	Plantas
Subreino	Tracheobionta	Plantas vasculares
Superdivisión	Espermatophyta	Plantas con semillas
División	Magnoliophyta	Plantas con flores
Clase	Magnoliopsida	Plantas dicotiledóneas
Subclase	Asteridae	
Orden	Asterales	
Familia	Asteraceae	
Género	<i>Eupatorium</i>	

2.2.2 Distribución geográfica

El género *Eupatorium* comprende cerca de 1,200 especies distribuidas principalmente en regiones tropicales de América, Europa, África y Asia; el mayor número de especies se encuentra en América en las regiones tropicales, subtropicales y templadas (**Figura 2.2.2.1**) (Zhang et al., 2008).

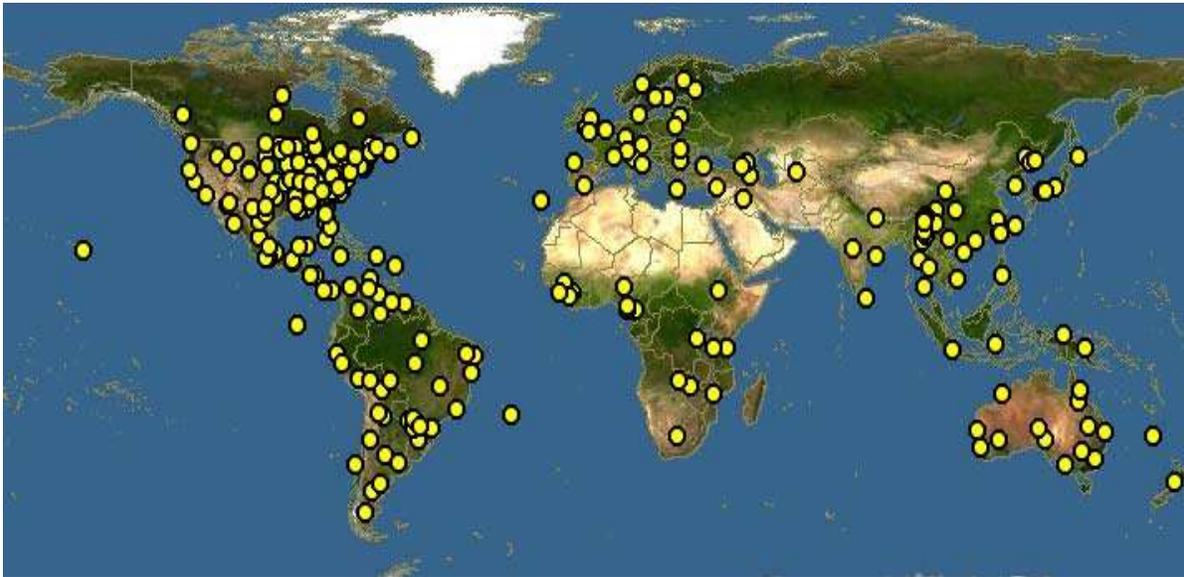


Figura 2.2.2.1 Distribución geográfica del género *Eupatorium* (Discoverlife, 2016).

2.2.3 Descripción morfológica

El género *Eupatorium* se distingue por características morfológicas de la flor, pero generalmente el grupo se puede reconocer en campo por sus cabezuelas pequeñas, carentes de flores liguladas, pero con los estambres exertos, colores entre blanco y lila, brácteas del involucreo imbricadas y de varios tamaños (series), involucros más o menos campanulados, hojas casi siempre opuestas, y aquenios con 4-5 costillas más un vilano de cerdas capilares. La mayoría son arbustos perennes, habitantes comunes de bosques pino-encino, pero también hay varias especies que se comportan como maleza (**Figura 2.2.3.1**) (Vibrans, 2011).



Figura 2.2.3.1 Morfología de flores y hojas de *Eupatorium purpureum*, *E. altissimum* y *E. aromaticum* (Discoverlife, 2016).

Las características morfológicas de las especies de este género frecuentemente son indistinguibles debido a la similitud que presentan, lo que ha generado una gran sinonimia entre ellas, por ejemplo *Eupatorium albicaule* Sch. Bip. ex Klatt es sinónimo de *Eupatorium leucoderme* B. L. Rob.

El género *Eupatorium* es muy amplio y complejo, debido a esto algunos autores lo subdividen en géneros más pequeños, lo que ha llevado a la reclasificación de varias especies, como: *Chromolaena collina* (*Eupatorium collinum* DC.), *Ageratina adenophora* (Spreng.) (*Eupatorium adenophorum* Spreng.), *Dyscritogyne adenosperma* (*Eupatorium adenospermum* Sch. Bip.), *Ageratina areolaris* (*Piptothrix areolare* DC., *Eupatorium areolare* DC.), *Critonia hebebotrya* DC. (*Eupatorium hebebotryum* DC.), *Brickellia pedunculosa* DC. (*Eupatorium longipes*) y *Fleischmannia pycnocephala* Less. (*Eupatorium pycnocephalum* Less.) (Rzedowski et al., 2005).

2.2.4 Composición química y su papel en la medicina tradicional

Se estima que en los diferentes preparados farmacéuticos nativos mexicanos existe un núcleo de aproximadamente 3,000 plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades comunes, de estas únicamente 1,000 se han usado por más de 400 años, dentro de las cuales se encuentran varias especies del género *Eupatorium*.

Un análisis químico preliminar por RMN de los extractos hexánicos de las flores de nueve *Eupatorium* spp colectadas en Michoacán, permitió establecer que las familias químicas principales de este género son terpenos y cromenos; también se han reportado flavonoides, alcaloides de pirrolizidina, fenilpropanoides, aceites esenciales y algunos otros, en total más de 300 compuestos (García-Sánchez et al., 2011).

Estudios han demostrado que los componentes principales de este género poseen un amplio rango de actividades farmacológicas como: citotóxica, antifúngica, insecticida, antibacterial, antiinflamatoria y antinociceptiva. Recientemente se han revelado otras actividades como antiplasmódica, antioxidante, inmunomoduladora; así como actividad de complemento hemolítico en una revisión realizada por Liu et al., 2015.

2.3 Biosíntesis de terpenos

La síntesis de terpenos se lleva a cabo a partir del metabolismo primario por dos rutas diferentes: la del ácido mevalónico activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar difosfato de isopentenilo (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que se lleva a cabo en los cloroplastos y genera también IPP.

El difosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero difosfato de dimetilalilo (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por enzimas prenil transferasas (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

La unión del IPP y del DMAPP produce difosfato de geranilo (GPP), el precursor inmediato de los monoterpenos (C10). El GPP puede condensarse con otra unidad de IPP para producir el intermediario difosfato de farnesilo (FPP), precursor de los sesquiterpenos (C15). Éste FPP puede sufrir una extensión de su cadena al unirse con otra unidad de IPP para producir el intermediario difosfato de geranilgeranilo (GGPP), precursor de los diterpenos (C20). Dos moléculas del intermediario FPP pueden condensarse, actuando como catalizador la escualenosintasa, para formar el escualeno, precursor de los triterpenos

(C30). Los tetraterpenos (C40) se sintetizan a partir del fitoeno, producido por la condensación de dos moléculas de GGPP y la participación de la fitoenosintasa a través de un mecanismo similar a la escualenosintasa (Ringuelet & Viña, 2013).

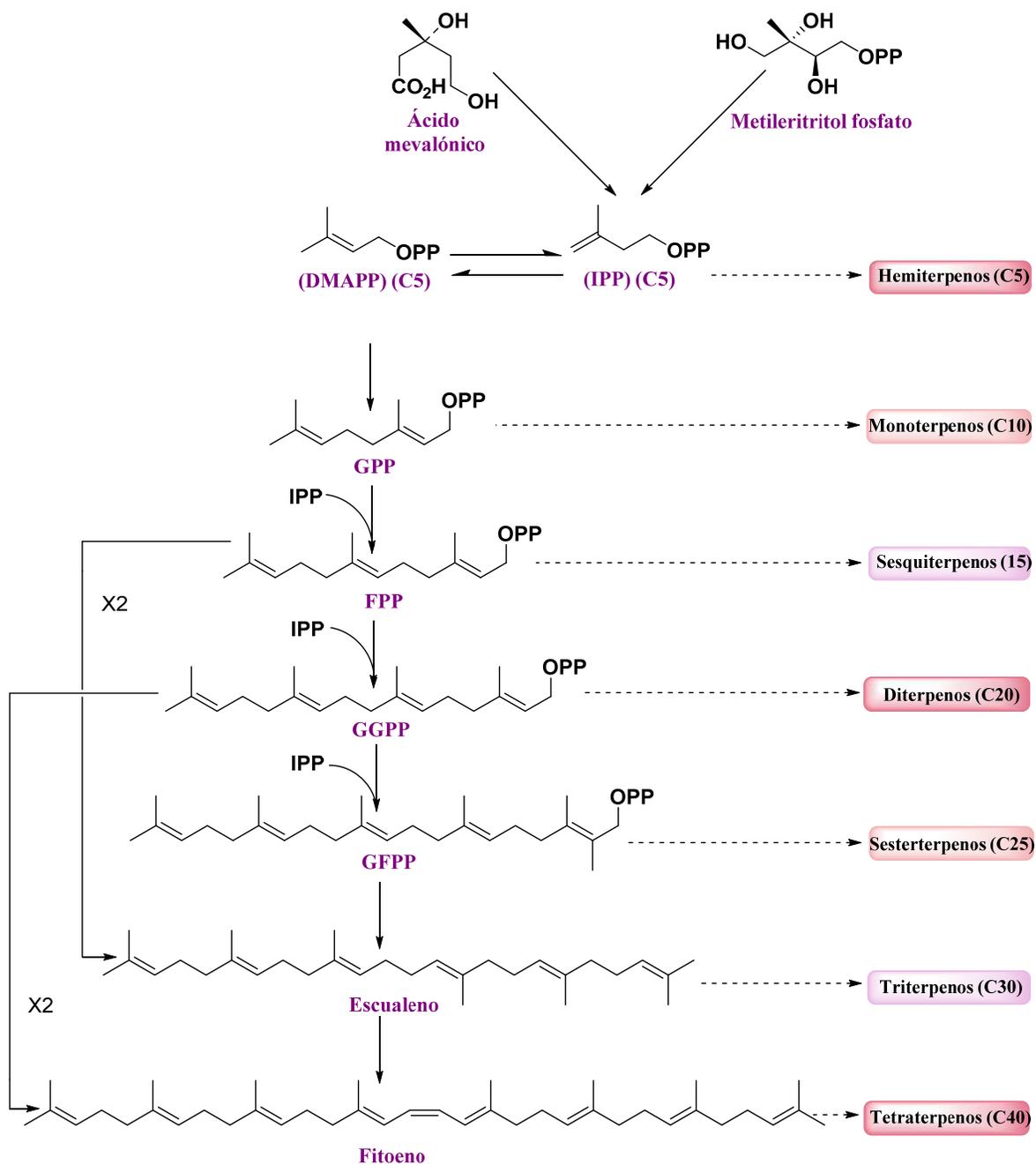


Figura 2.3.1 Biosíntesis de terpenos (Modificado de Dewick, 2009).

2.3.1 Monoterpenos

Los monoterpenos se caracterizan por presentar diez átomos de carbono y por lo tanto dos unidades de isopreno en su esqueleto base. Son sustancias lipofílicas y volátiles, responsables del olor característico de diversas plantas.

Encontrados en el reino vegetal en distintas formas estructurales, algunos son cíclicos (monocíclicos o bicíclicos), mientras que otros son acíclicos. También pueden tener diversos tipos de grupo funcional en su esqueleto, dependiendo de esto pueden ser clasificados como: hidrocarburos simples, alcoholes, cetonas, aldehídos, ácidos o aromáticos (**Figura 2.3.1.1**) (Palá, 2002; Romo, 2006).

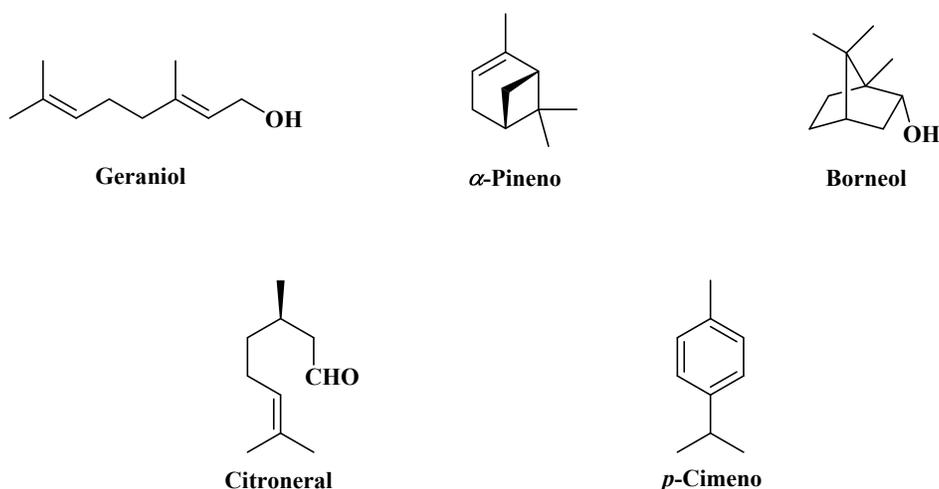


Figura 2.3.1.1 Diversos tipos de estructura de monoterpenos.

2.3.2 Diterpenos

Los diterpenos constituyen un grupo amplio de compuestos formados por 20 carbonos derivados del difosfato de geranylgeranilo (GGPP). Se dividen en acíclicos (fitones), monocíclicos (cembrenoides), bicíclicos (labdanos, clerodanos), tricíclicos (pimaranos, abietanos, cassanos, rosanos,), tetracíclicos (kauranos, beyeranos, vouacapanos), pentacíclicos (traquilobanos) y compuestos mixtos, de acuerdo con el número y los patrones de ciclación mostrados en su esqueleto.

2.3.3 Kauranos

Los kauranos representan un importante grupo de diterpenos tetracíclicos, los cuales están constituidos por una unidad de perhidrofenantreno (A, B y C) fusionado con un ciclopentano (D) formado por un puente entre el C-8 y el C-13 (**Figura 2.3.3.1**).

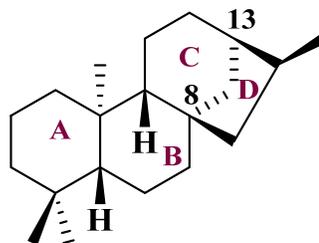


Figura 2.3.3.1 Esqueleto básico de un kaurano.

El ácido kaurenico es un diterpeno *ent*-kaurano que posee un amplio espectro de actividad biológica como antiinflamatorio, antibacterial y antifúngico, entre otras; es relativamente abundante en algunas especies de los géneros *Wedelia*, *Mikania*, *Annona* y *Xylopia*. Hasta el año 2007 el ácido kaurenico no se encontraba comercialmente disponible pero actualmente ya está a la venta (Sarker & Nahar, 2007; García et al., 2007).

2.4 Análisis químicos descritos de especies del género *Eupatorium* y otros géneros

2.4.1 Monoterpenos con esqueleto de borneol y derivados

Eupatorium deltoideum

En el año de 1986 Hernández et al. aislaron por primera vez al monoterpeno *p*-cumarato de bornilo (**1**) de una especie de *Eupatorium*, del extracto de acetato de etilo de las raíces de *Eupatorium deltoideum*, siendo elucidada su estructura por comparación de los espectros de ^{13}C del acetato de bornilo y del ácido *p*-cumárico.

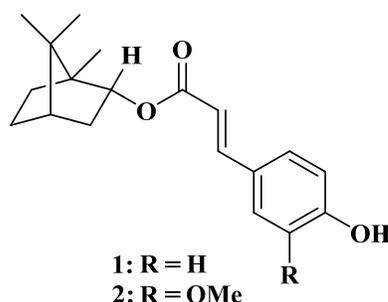


Figura 2.4.1.1 Monoterpenos **1** y **2** aislados de *Eupatorium deltoideum* y *Verbesina rupestris*, respectivamente.

Verbesina rupestris

El compuesto *p*-cumarato de bornilo (**1**) fue encontrado previamente en *Verbesina rupestris* junto con el ferulato de bornilo (**2**) en el extracto de acetona de hojas y ramas, posteriormente obtuvieron por hidrólisis el borneol y su respectivo ácido, el ácido cumárico, además tras la cromatografía del extracto soluble en éter de petróleo aislaron por primera vez de forma natural el isoepicamferenol (**3**) sintetizado previamente por Hodgson et al. en 1973 (Box & Chan, 1975).

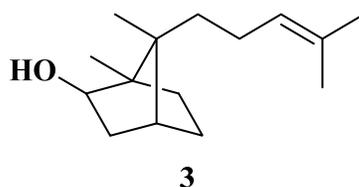


Figura 2.4.1.2 Isoepicamferenol (3) aislado de *Verbesina rupestris*.

Estos monoterpenos funcionalizados con un fenilpropanoide (1, 2) han sido descritos como constituyentes de especies de *Myodocarpus* (Montagnac et al., 1997), *Coreopsis* (Maldonado et al., 1998), *Piper* (Setzer et al., 1999) y *Bolax* (Mongelli et al., 2003).

Piper caninum

Del extracto de cloroformo de la corteza de *Piper caninum* obtuvieron al *p*-cumarato de bornilo (1) y al cafeato de bornilo (4), descritos en *Coreopsis mutica* variante *mutica* junto con el ferulato de bornilo (2); mientras que del aceite esencial de *Piper methysticum* identificaron al cinamato de bornilo (5) (Setzer et al., 1999).

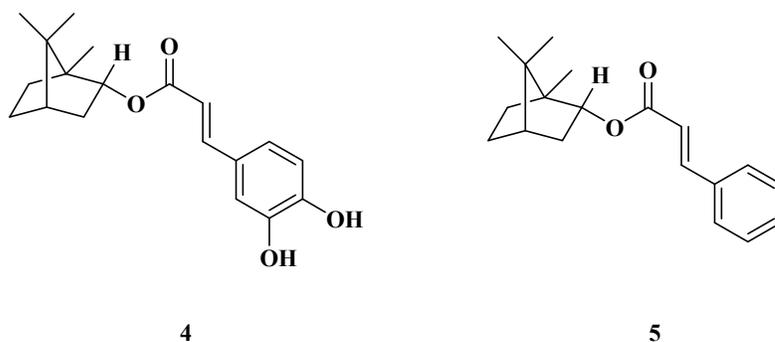


Figura 2.4.1.3 Monoterpenos 4 y 5 aislados de *P. caninum* y *P. methysticum*, respectivamente.

2.4.2 Diterpenos, triterpenos y derivados del ácido cinámico

Eupatorium betonicaeforme

Un nuevo diterpeno tipo kaurano caracterizado como 15 α -decanoiloxi-kaur-16-en-19-oico (**9**), conjuntamente con otros componentes conocidos como el ácido 15 α -hidroxi *ent*-kaur-16-en-19-oico (**10**) fueron aislados del extracto hexánico de flores de *Eupatorium betonicaeforme*. Adicionalmente, del extracto de las partes aéreas aislaron el acetato de taraxasterol (**11**) y la α - y β -amirina (**12**, **13**); en cuanto a la raíz identificaron una mezcla de β -sitosterol (**14**) y β -estigmasterol (**15**). Cabe mencionar que estos dos últimos esteroides son comunes en varias especies de *Eupatorium* como: *odoratum*, *lindleyanum* y *glutinosum* (Albuquerque et al., 2006).

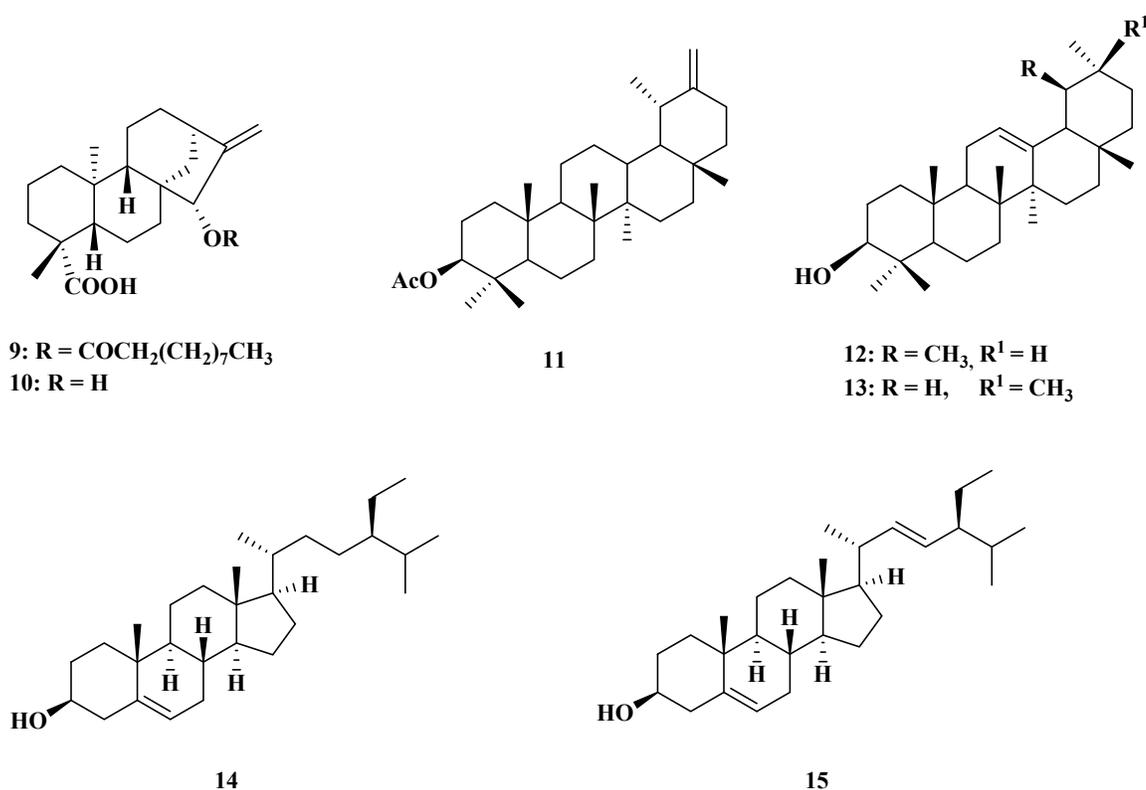


Figura 2.4.2.1 Diterpenos y triterpenos aislados de *Eupatorium betonicaeforme*.

Eupatorium macrocephalum Less

Del estudio químico de esta especie aislaron e identificaron el diterpeno (-)-9,15-dihidroxi kauranato de β -D-glucopiranosil (**16**), los triterpenos lupeol (**17**), acetato de lupeño (**18**) (componentes mayoritarios) y taraxasterol (**19**) junto con los compuestos **11-15** y seis derivados del ácido cinámico **20-25** (García-Vega, 2007).

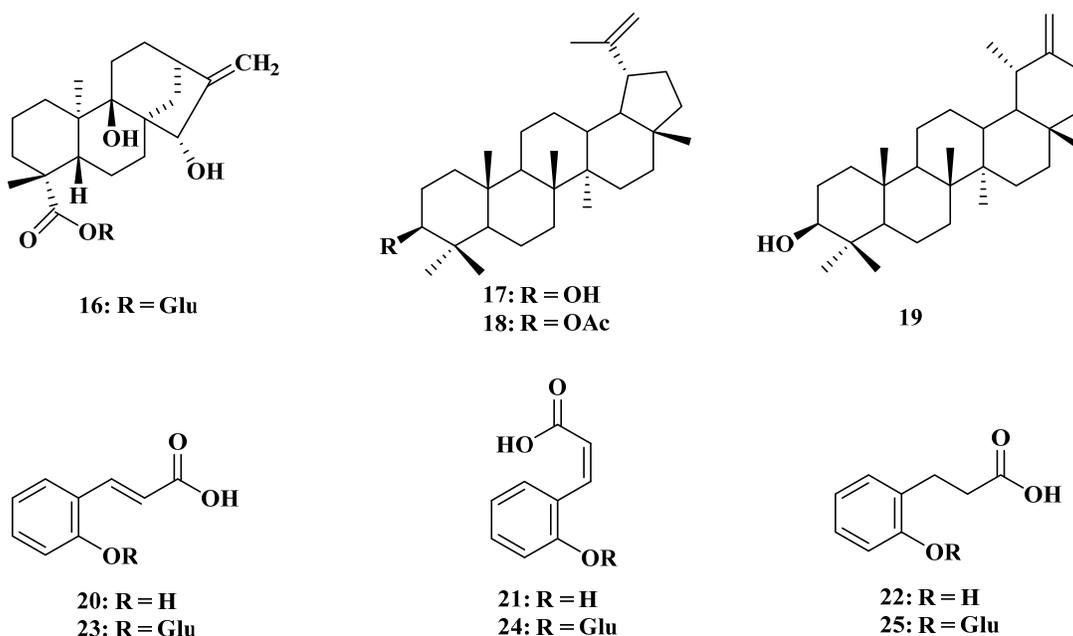


Figura 2.4.2.2 Estructuras del kaurano **16**, triterpenos **17-19** y derivados del ácido cinámico **20-25** aislados de *Eupatorium macrocephalum* Less.

Eupatorium tinifolium

De esta especie aislaron a los diterpenos: ácido (-)-*ent*-kaur-16-en-19-oico (**26**), ácido (-)-17-hidroxi-16 β H-*ent*-kauran-19-oico (**27**), dimetil éster del ácido-16 β H-*ent*-kauran-17,19-dioico (**28**) y el ácido (-)-16 β ,17-dihidroxi-*ent*-kauran-19-oico (**29**) (Moreno et al., 1979).

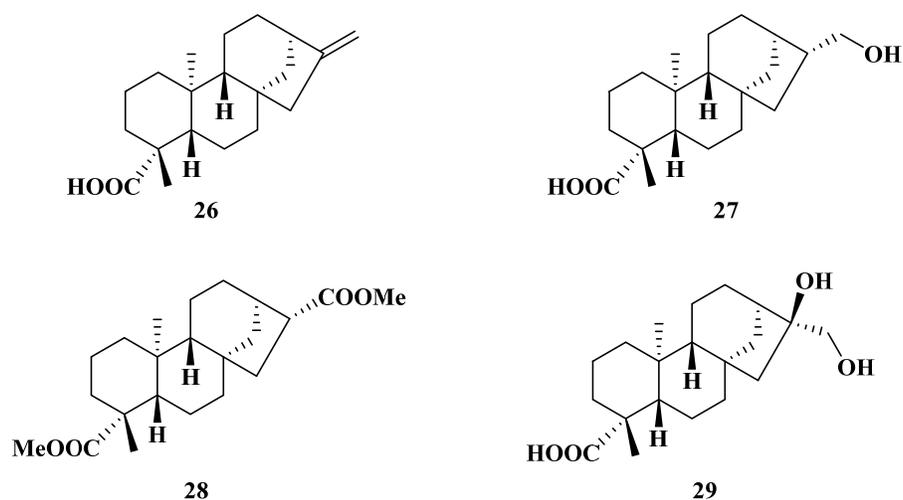


Figura 2.4.2.3 Diterpenos tipo *ent*-kaurano aislados de *Eupatorium tinifolium*.

El ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**26**) fue aislado como componente mayoritario del extracto de la corteza de cuatro especies de *Smallanthus* (*S. sonchifolius*, *S. siegesbeckius*, *S. connatus* y *S. macroscyphus*) con otros nueve compuestos minoritarios con esqueleto de tipo *ent*-kaurano (Coll et al., 2010).

Wedelia trilobata

Dos nuevos diterpenos de tipo *ent*-kaurano fueron aislados de las partes aéreas de *Wedelia trilobata*, conocidos como wedelidina A (**30**) que fue determinado como ácido (3 α)-3-(cinamoiloxi)-17-hidroxi-*ent*-kaur-15-en-19-oico y la wedelidina B (**31**) como ácido (3 α)-3-(cinamoiloxi)-17-oxo-*ent*-kaur-15-en-19-oico, junto con dos triterpenos el 3 β -friedelinol (**32**) y la friedelina (**33**) (Qiang et al., 2011).

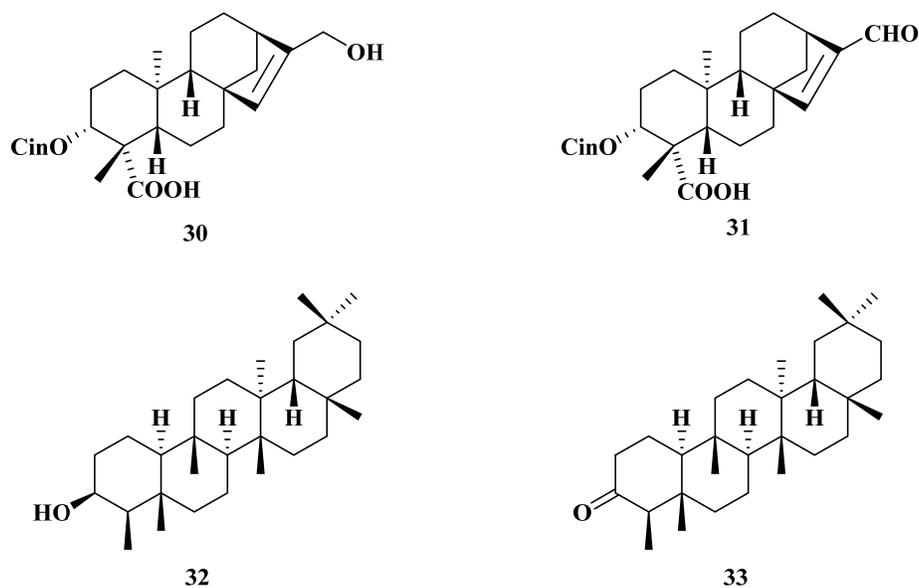


Figura 2.4.2.4 *ent-isokauranos* y triterpenos aislados de *Wedelia trilobata*.

Eupatorium glutinosum

Del extracto hexánico de las partes aéreas de esta planta aislaron e identificaron el ácido 15-hidroxi-7-labden-17-oico (**34**) y su acetato **35**, junto con el damara-20,24-dien-3-acetato (**36**), la friedelina (**33**) y el palmitato de lupeól (**37**), así como el lupeol (**17**) por hidrólisis catalizada con base (El-Seedi et al., 2002).

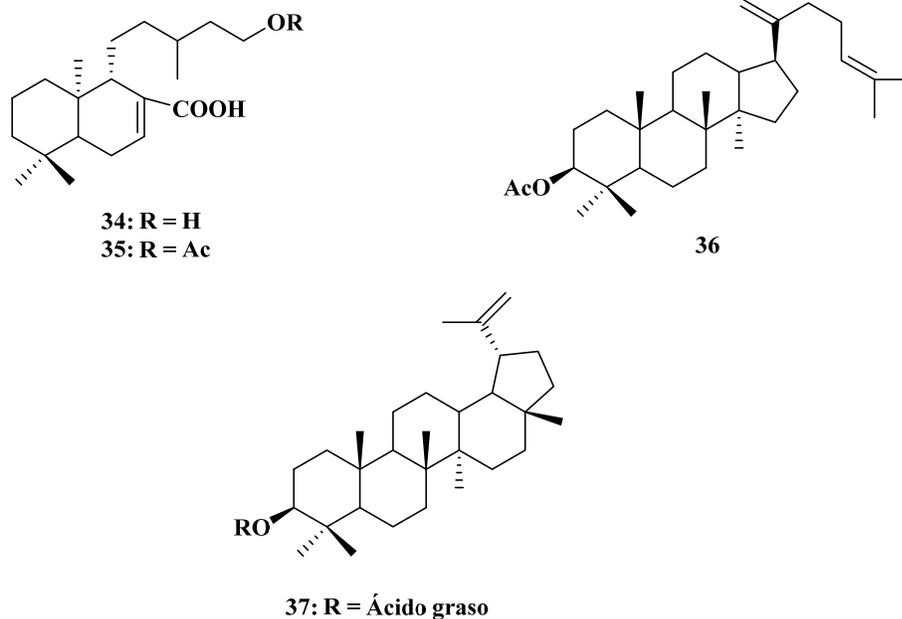


Figura 2.4.2.5 Estructuras de los compuestos aislados de *Eupatorium glutinosum*.

Eupatorium ballotifolium

Del extracto hexánico de raíz de *Eupatorium ballotifolium* obtuvieron los triterpenos 3β -friedelinol (**32**) y el damara-20,24-dien- 3β -ol (**38**) (Albuquerque et al., 2010).

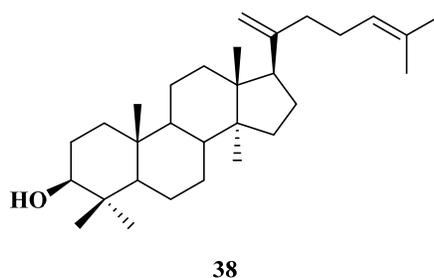


Figura 2.4.2.6 Damaradienol aislado de *Eupatorium ballotifolium*.

Como se puede apreciar éstas investigaciones revelan la diversidad de componentes químicos que pueden ser aislados de este género.

2.5 Interés terapéutico de los derivados del borneol

El uso tópico del monoterpeno (-)-borneol (**39**) comenzó a describirse a principios del siglo XX, este compuesto ha presentado propiedades neuroprotectoras, genoprotectoras y analgésicas (Costa-Vasconcelos et al., 2012).

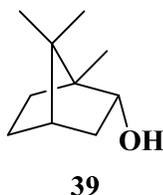


Figura 2.5.1. Estructura química del borneol (**39**).

El *p*-cumarato de bornilo (**1**) y el ferulato de bornilo (**2**) aislados de las hojas y la corteza de *Myodocarpus gracilis* mostraron actividad citotóxica moderada contra células KB (sublínea de la queratina formadora de células tumorales de las células Hela) con una CMI₅₀ de 2.5 µg/mL (Montagnac et al., 1997).

Los tres fenilpropanoides *p*-cumarato de bornilo (**1**), ferulato de bornilo (**2**) y cafeato de bornilo (**4**) aislados del extracto de las partes aéreas de *Coreopsis mutica* variante *mutica* presentaron actividad inhibitoria del ATP inducido por el edema agudo del oído del ratón. Sus efectos antiinflamatorios fueron similares a los exhibidos por la inhibición de la ciclooxigenasa selectiva generada por la indometacina. La actividad antiinflamatoria mayor la obtuvieron en el cafeato de bornilo (**4**); estos resultados fueron concordantes con los descritos en estudios *in vitro* (Maldonado et al., 1998).

El extracto crudo de cloroformo de la corteza de *Piper caninum* mostró actividad contra bacterias gram positivas: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, los metabolitos secundarios aislados responsables del efecto fueron el (+)-*p*-cumarato de bornilo (**1**) y el cafeato de bornilo (**4**) (Setzer et al., 1999).

Los ésteres de bornilo *p*-cumarato de bornilo (**1**) y ferulato de bornilo (**2**) aislados del extracto metanólico de *Bolax gummifera* y los alcoholes de *iso*-bornilo **40** y **41** previamente sintetizados fueron probados contra células CK usando la prueba de toxicidad contra *Artemia* sp. En el estudio realizado con base en su estructura obtuvieron que los isómeros (+) son más activos que los isómeros (-) y que el grupo metoxilo en posición 3 no afecta la citotoxicidad contra *Artemia* sp (Mongelli et al., 2003).

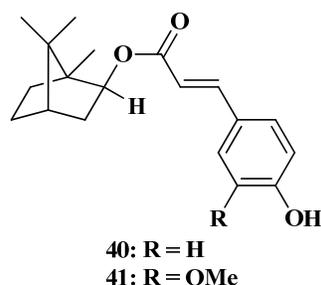


Figura 2.5.2 *p*-cumarato de *iso*-bornilo (**40**) y ferulato de *iso*-bornilo (**41**).

El salicilato de bornilo (**42**) sintetizado por esterificación del borneol con el ácido salicílico fue evaluado en modelos experimentales para medir su actividad antiinflamatoria aguda, los resultados mostraron que este compuesto no genera toxicidad aguda y tiene un sistema de efecto antiinflamatorio, relacionado con la disminución de mediadores como prostaglandinas E2, óxido nítrico y citosinas pro-inflamatorias (Costa et al., 2012).

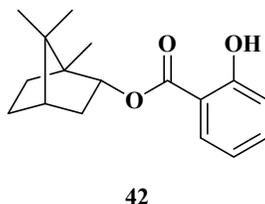


Figura 2.5.3 Estructura química del salicilato de bornilo (**42**).

2.6 *Eupatorium aff cardiophyllum*

Es una planta herbácea de 1.5-1.80 m de longitud, con hojas grandes con forma de corazón, flores rosáceas y tallo vellosa. Se encuentra en bosques de pino-encino; hasta el momento no existe ningún estudio químico sobre ella, lo que nos incita a realizar su análisis químico, ya que se trata de una nueva fuente de materia prima.



Figura 2.6.1 Tallo, flor y hoja de *Eupatorium aff cardiophyllum*.

3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas son una fuente importante de productos naturales originados por el metabolismo secundario, gran parte de ellos presentan aplicaciones farmacológicas, por lo cual, el estudio fitoquímico representa una herramienta clave para el descubrimiento de nuevos compuestos, el desarrollo de investigaciones y el progreso de diversas áreas de las ciencias médicas.

Estudios realizados del género *Eupatorium* han puesto de manifiesto la presencia de compuestos conocidos por su relevante actividad biológica, por lo que resulta de gran interés continuar con el estudio químico de este género, especialmente de especies que no cuentan con reportes previos, como *Eupatorium aff cardiophyllum*, con el objetivo de aislar y caracterizar los principales grupos de metabolitos secundarios y contribuir a la quimiotaxonomía del género.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

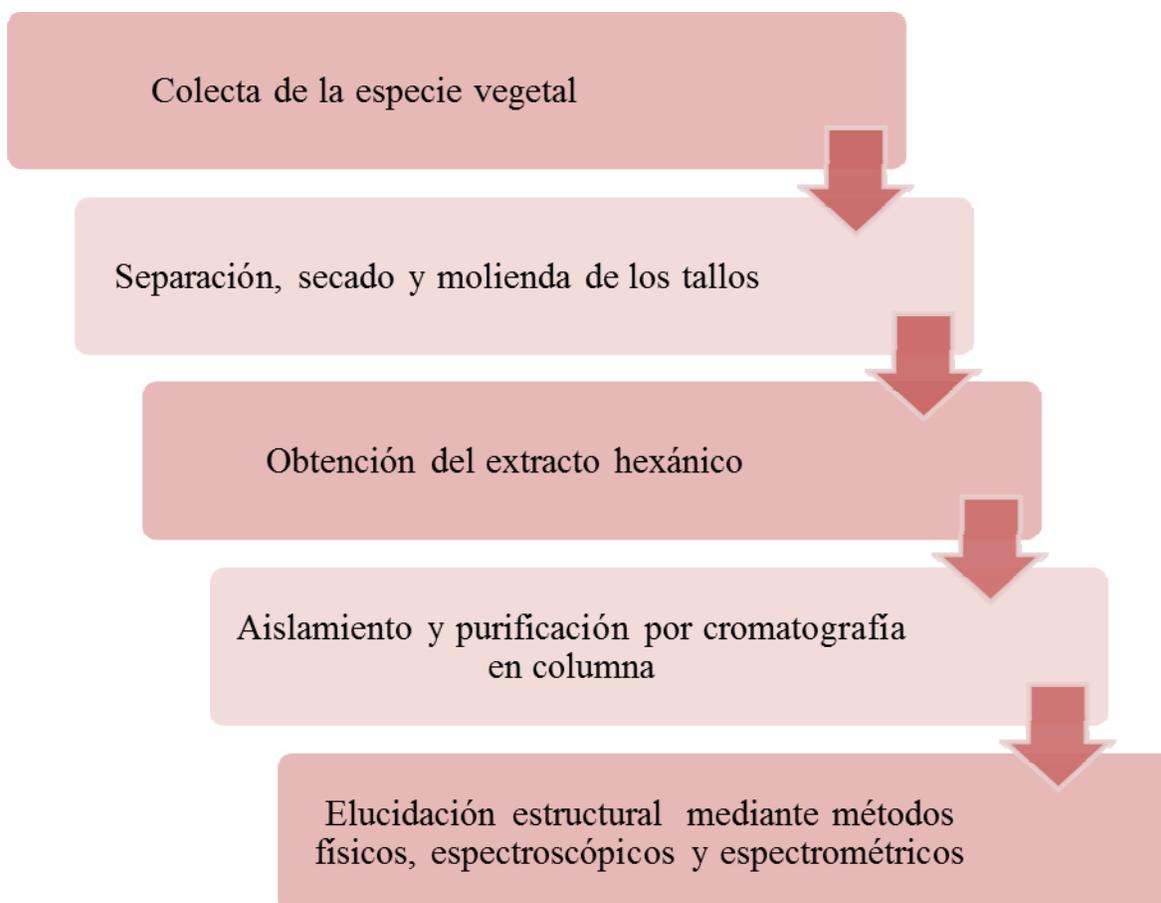
Realizar el estudio químico del extracto hexánico del tallo de *Eupatorium aff cardiophyllum*

4.2 Objetivos específicos

- Obtener el extracto hexánico del tallo de *Eupatorium aff cardiophyllum*.
- Aislar y purificar mediante técnicas cromatográficas los componentes mayoritarios.
- Caracterizar los compuestos purificados mediante métodos físicos y espectroscópicos.

5. METODOLOGÍA GENERAL

El estudio de los compuestos presentes en los tallos de *Eupatorium aff cardiophyllum* se muestra de manera gráfica en el siguiente esquema:



6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Colecta de la especie y tratamiento vegetal

La especie vegetal *Eupatorium aff cardiophyllum* se colectó a orilla de la carretera Tiripetío-Villa Madero, Michoacán, en el kilómetro 21.

Posteriormente se llevó a cabo la separación de sus partes aéreas y un lote de 700 g de tallos, previamente secados a la sombra y molidos, fueron colocados en maceración con 2.6 litros de hexanos como disolvente, durante tres días. Transcurrido este tiempo el extracto se filtró y concentró en rotavapor, éste procedimiento se realizó tres veces. El extracto hexánico obtenido presentó un aspecto de aceite denso de color amarillo, obteniéndose 3 g.

6.2 Análisis del extracto hexánico de tallo

Una muestra del extracto hexánico total se analizó por medio de resonancia magnética nuclear de ^1H , como estudio preliminar para determinar la naturaleza y abundancia de los componentes. El espectro (**Figura 6.2.1**) mostró entre δ 7.7 y 6.2 un conjunto de señales correspondientes a hidrógenos aromáticos y vinílicos, en δ 5.0 se localizó una señal que indica la presencia de un éster, de δ 2.4 a 1.0 se observaron varias señales de protones alifáticos; por último se ubicaron tres señales simples características de metilos terciarios, lo que indicó claramente la presencia de un terpeno como componente mayoritario.

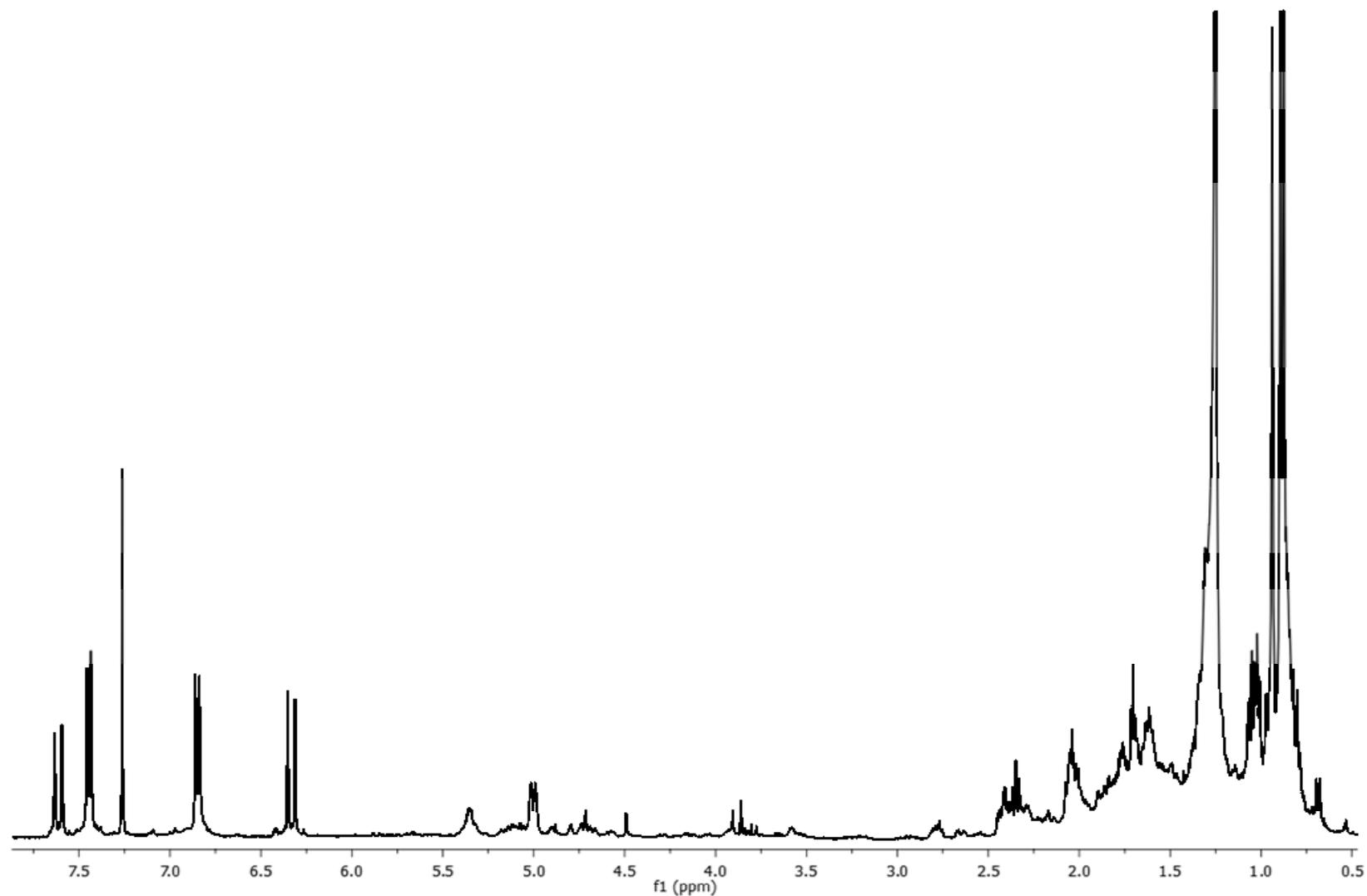


Figura 6.2.1 Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto hexánico de tallo de *Eupatorium aff cardiophyllum*.

6.3 Purificación de los compuestos

La purificación de los compuestos se llevó a cabo fraccionando por cromatografía en columna 2 g de extracto hexánico, utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil mezclas hexanos-AcOEt en orden ascendente de polaridad, obteniéndose fracciones de 10 mL, siendo monitoreada a través de cromatografía en capa fina bajo el mismo sistema de disolventes.

En las fracciones 14-16 obtenidas con polaridad 9:1 hexanos-AcOEt se obtuvieron mieles cristalinas. Se juntaron las fracciones y disolvieron en la menor cantidad de CH_2Cl_2 , posteriormente se agregó la misma cantidad de hexanos y se colocó a baño maría hasta la evaporación del 50% del solvente, nuevamente se agregó la misma cantidad de hexanos y se repitió el proceso dos veces. Una vez realizado esto se retiró la muestra del baño maría y se filtró en caliente. Al tercer día se observó la formación de un precipitado, del cual se retiraron las aguas madres.

En las aguas madres recuperadas se observó la formación de cristales, los cuales se separaron y lavaron con hexano frío obteniéndose cristales en forma de agujas con un punto de fusión de 282-284 °C.

En su espectro de RMN de ^1H (**Figura 6.3.1**) se observó una señal múltiple en δ 3.74 correspondiente al H-3 del carbono base del alcohol y dos señales dobles de triples en δ 1.90 con $J = 10.0, 2.4$ Hz y en δ 1.73 con $J = 12.8, 3.2$ Hz correspondientes a los protones H-2a y H-6a, respectivamente. En campos altos destacaron siete señales simples en δ 1.17, 1.00, 0.99, 0.98, 0.96, 0.94, y 0.85 características de los metilos terciarios CH_3 -28, CH_3 -27, CH_3 -30, CH_3 -26, CH_3 -24, CH_3 -29 y CH_3 -25, respectivamente.

Los datos obtenidos fueron comparados con los descritos previamente (Ragasa et al., 2015), coincidiendo para el triterpeno 3β -friedelinol (**32**).

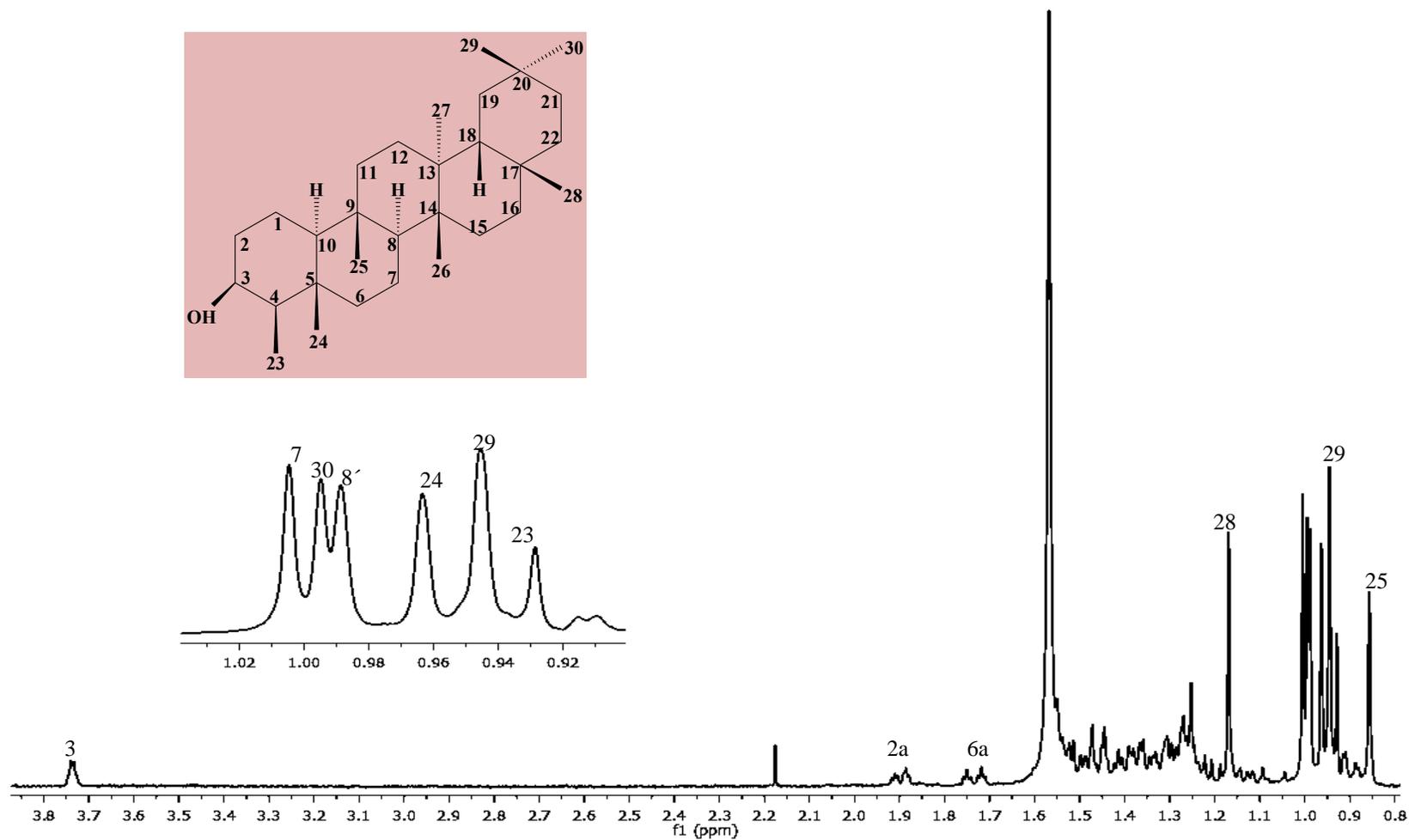


Figura 6.3.1 Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del 3β-friedelinol (32).

Continuando con la purificación de los compuestos el sedimento recuperado de las sucesivas cristalizaciones de las fracciones 14-16 fue recromatografiado en columna obteniéndose mieles cristalinas en la polaridad 95:5 hexanos-AcOEt.

Las mieles fueron analizadas por RMN de ^1H (**Figura 6.3.2**), su espectro mostró dos señales simples en δ 4.80 y 4.74 de los protones vinílicos H-17a y H-17b características de un doble enlace exocíclico. En δ 2.64 se ubicó una señal triple ancha con $J = 4.0$ Hz correspondiente al protón alílico H-13. Entre δ 2.17 y 1.40 se encontraron señales de protones alifáticos, adicionalmente en campos altos se observaron dos señales simples en δ 1.24 y 0.95 características de los metilos terciarios CH₃-18 y CH₃-20, respectivamente.

El espectro de RMN de ^1H obtenido se comparó con los datos previamente descritos por nuestro grupo de investigación (Cruz-Corona, 2015; Villagómez-Guzmán, 2016) mostrando una completa similitud con los datos correspondientes para el compuesto denominado ácido *ent*-kau-16-en-19-oico (**26**).

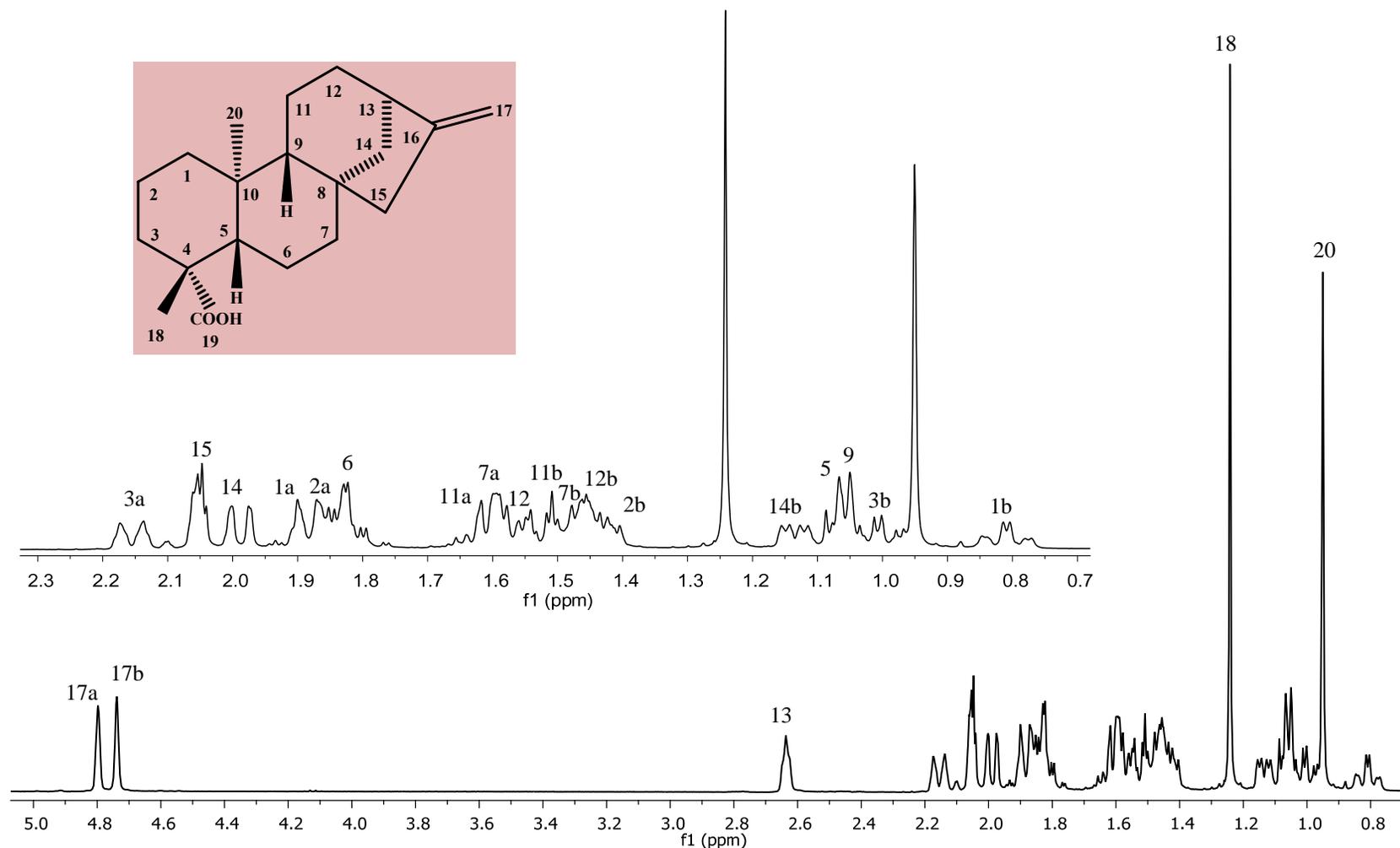


Figura 6.3.2 Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (26).

En la polaridad hexanos-AcOEt 4:1 a partir de las fracciones 22-37 se obtuvo un aceite denso amarillo que fue cristalizado con hexanos/acetona en proporción 1:1, obteniéndose 500 mg (25%) de un sólido amorfo blanco, con un punto de fusión de 150-152 °C.

El espectro de infrarrojo (**Figura 6.3.3**) mostró dos bandas en 3259 y 2878 cm^{-1} debidas al OH y al enlace C-H de alifático, respectivamente y en 1671 cm^{-1} se observó una señal característica de carbonilo de éster. En 1628 cm^{-1} se detectó una banda debida al enlace doble C=C del alqueno, mientras que en 1604 cm^{-1} se ubicó la señal característica del enlace doble C=C del grupo aromático.

En el cromatograma general de gases (**Figura 6.3.4 a**) se observó un compuesto con abundancia mayor del 81.85% con un tiempo de retención de 20.64 min, en el espectro de masa (**Figura 6.3.4 b**) se detecta un ion molecular de 300.21 m/z ., el cual concuerda con la fórmula condensada $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_3$.

,

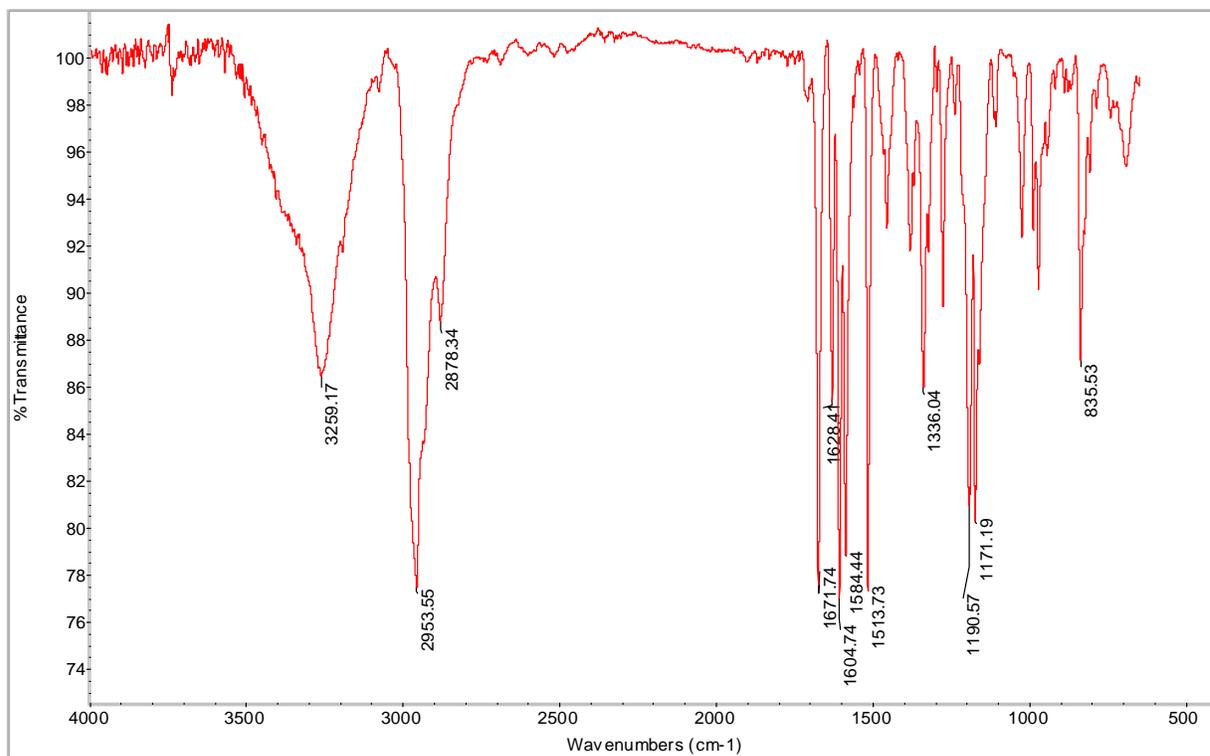


Figura 6.3.3 Espectro de infrarrojo del *p*-cumarato de bornilo (1).

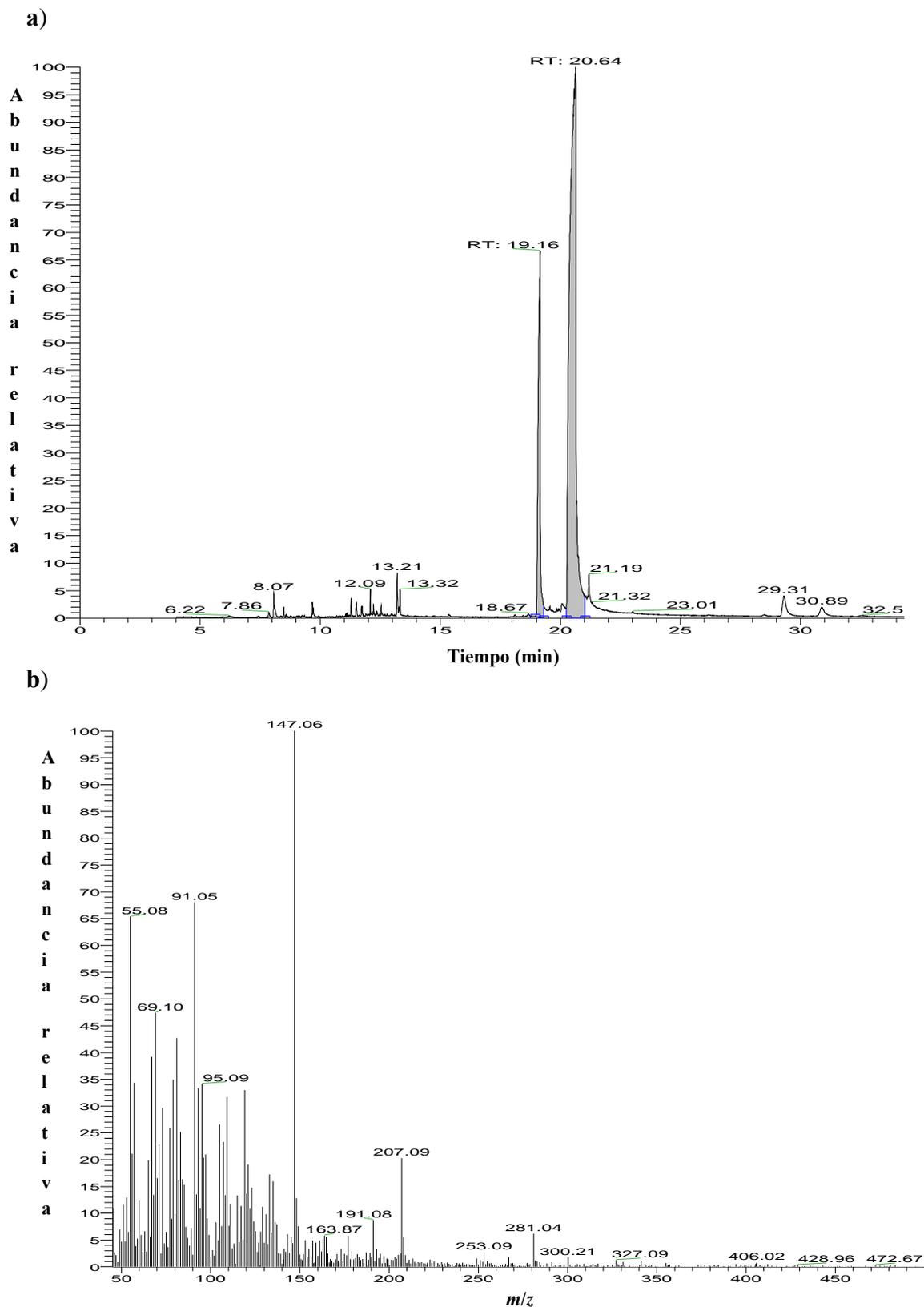


Figura 6.3.4 a) Cromatograma de gases b) Espectro de masa del *p*-cumarato de bornilo (1).

Su espectro de RMN de ^1H (**Figura 6.3.5**) mostró en δ 7.43 y 6.88 dos señales dobles características de un sistema de benceno *p*-sustituido con $J = 8.6$ Hz correspondientes a los protones bencílicos H-5', H-9' y H-6', H-8', respectivamente. En δ 7.62 y 6.33 se ubicaron dos señales dobles con $J = 15.9$ Hz características de los hidrógenos vinílicos H-3' y H-2', indicando la presencia de un doble enlace *trans*, las cuales demuestran la presencia de un fragmento derivado del fenilpropanoide correspondiente al cumarato. En δ 7.14 se localizó una señal simple ancha correspondiente al hidroxilo fenólico y en δ 5.01 se observó una señal doble de doble de dobles con $J = 9.9, 3.3, 2.1$ Hz característica del protón base de éster correspondiente al H-2. Entre δ 2.45 y 1.00 se encontraron varias señales múltiples características de los protones alifáticos. Por último, se encontraron tres señales simples en δ 0.92, 0.89 y 0.88 correspondientes a los metilos terciarios CH₃-8, CH₃-9 y CH₃-10, respectivamente.

En el espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 6.3.6**) se observó en δ 168.55 una señal correspondiente al carbono del carbonilo del éster C-1' y en δ 158.35 la señal del carbono base de fenol C-7'. En δ 144.64 y 115.48 se observaron las señales de los carbonos vinílicos C-3' y C-2', respectivamente; las señales traslapadas de los carbonos *sp*² correspondientes al anillo de benceno se ubicaron en δ 129.98 para C-5', C-9', en δ 115.91 para C-6', C-8' y en δ 126.7 para C-4'. La señal del carbono base de éster C-2 se observó en δ 80.29. El resto de las señales de los carbonos correspondientes al esqueleto del bornilo se observaron entre δ 48.94 y 13.53, ubicándose las señales de los metilos en δ 19.67, 18.8 y 13.53 correspondientes a los CH₃-9, CH₃-8, y CH₃-10, respectivamente. Del experimento DEPT se corroboraron las multiplicidades de los carbonos.

Los datos físicos y espectroscópicos obtenidos fueron comparados con los descritos en la literatura como se observa en la **tabla 6.3.1** mostrando una buena concordancia e indicando que se trata del compuesto denominado *p*-cumarato de bornilo (**1**).

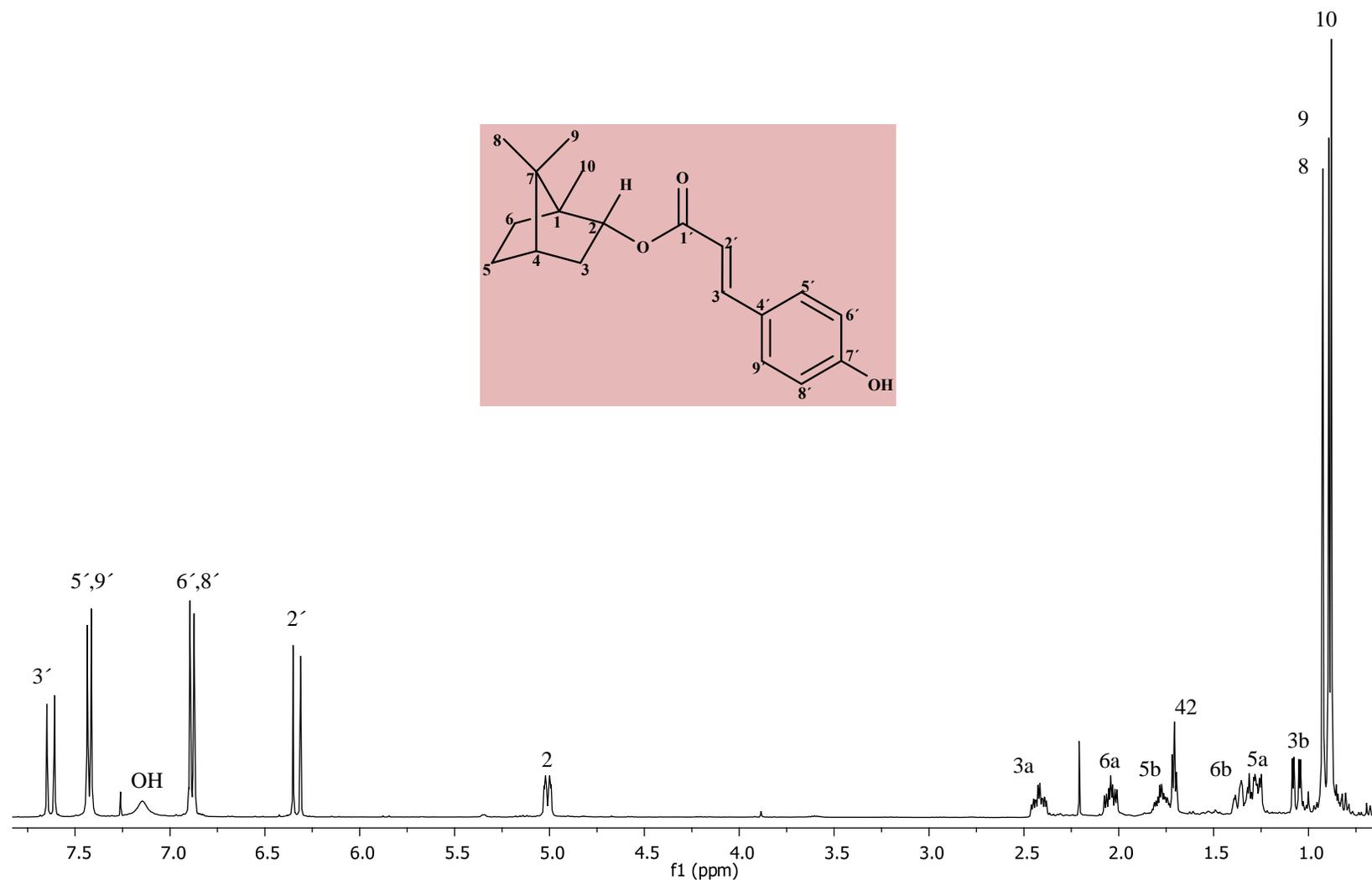


Figura 6.3.5 Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del *p*-cumarato de bornilo (1).

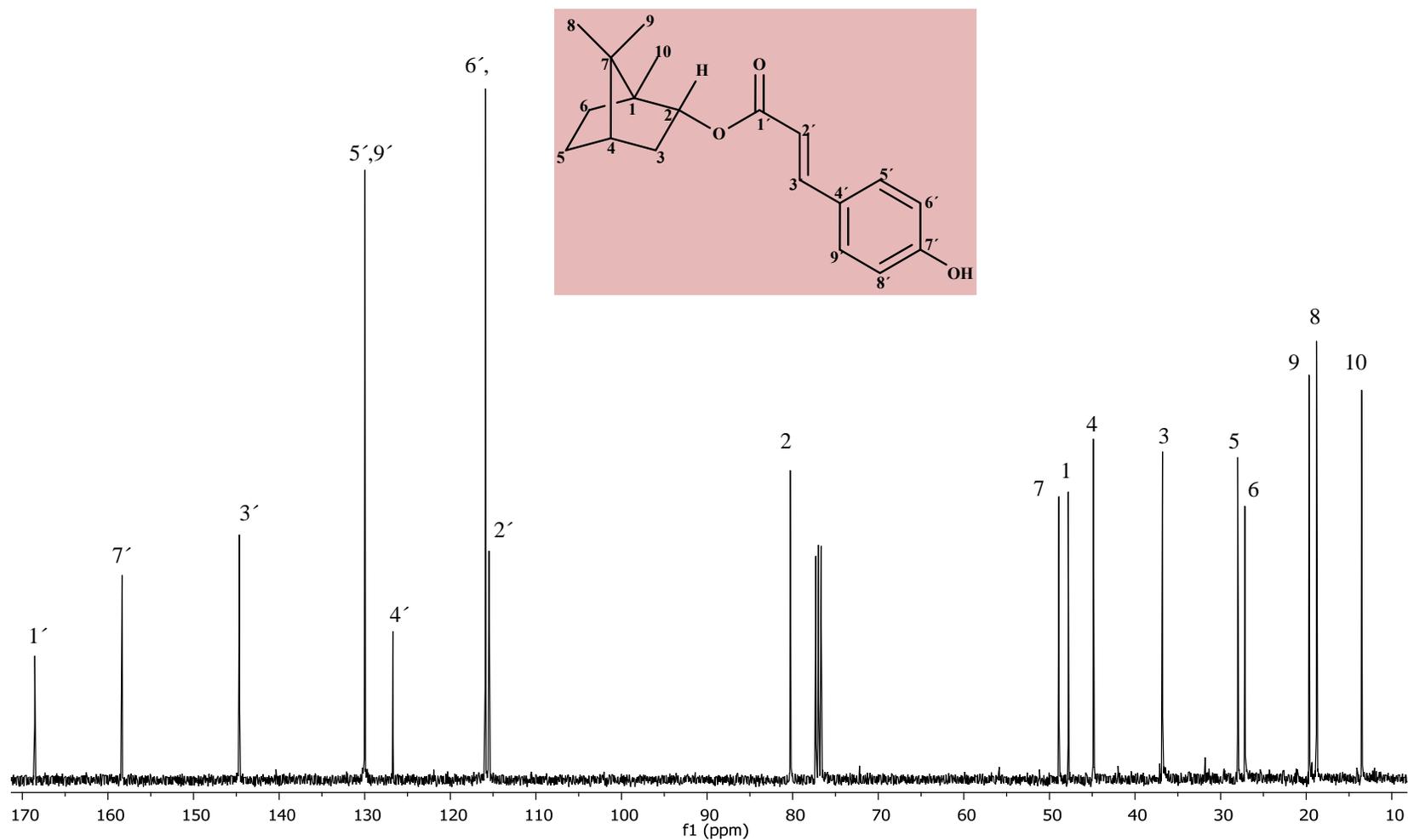


Figura 6.3.6 Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz en CDCl₃ del *p*-cumarato de bornilo (1).

CARBONO	EXPERIMENTAL δ en ppm	LITERATURA (Mongelli et al., 2003) δ en ppm
1	47.85	47.86
2	80.29	80.37
3	36.80	36.81
4	44.90	45.04
5	28.00	28.07
6	27.17	27.28
7	48.94	49.00
8	18.80	18.82
9	19.67	19.69
10	13.53	13.50
1'	168.55	168.53
2'	115.48	115.72
3'	144.64	144.64
4'	126.70	126.95
5'	129.98	129.99
6'	115.91	115.99
7'	158.35	158.35
8'	115.91	115.99
9'	129.98	129.99

Tabla 6.3.1 Comparación de los desplazamientos de RMN de ^{13}C del *p*-cumarato de bornilo (**1**) con la literatura (Mongelli et al., 2003).

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1 Muestra vegetal

La especie vegetal *Eupatorium aff cardiophyllum* fue colectada a orilla de la carretera Tiripetío-Villa Madero en el km 21, en el estado de Michoacán, a 19° 23,965' latitud y 101° 17,911' longitud y una altitud de 2,124 metros sobre el nivel del mar, en Octubre del 2015. La identificación taxonómica se llevó a cabo por parte del D.C. Jerzy Rzedowski del Herbario del Instituto de Ecología A.C. en Pátzcuaro, Michoacán, México.

8.2 Obtención de extractos

La planta colectada se dejó secar a la sombra, posteriormente se separaron sus partes aéreas y se colocaron en maceración 700 g de tallos, previamente molidos, con 2.6 L de hexanos, durante tres días. Se realizó tres veces la extracción obteniéndose 3 g de extracto con aspecto de miel densa color amarilla.

8.3 Espectroscopia y métodos físicos (RMN, EMIE, IR y p.f.)

El análisis espectroscópico de resonancia magnética nuclear de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz, así como los diagramas de correlación bidimensional H/H (COSY) y H/C (HETCOR) se realizaron en un espectrómetro Varian Mercury Plus 400 al igual que el experimento DEPT. En las determinaciones se utilizó como disolvente al cloroformo deuterado (CDCl_3) y como referencia interna al tetrametilsilano (TMS). Los espectros obtenidos fueron procesados a través del programa MestReNova 8.

El espectro de IR se midió en un espectrofotómetro FT-IR 200 Perkin Elmer.

El espectro de masa de baja resolución por impacto electrónico se llevó a cabo en un Cromatógrafo de Gases marca Thermo Scientific, modelo Trace 1310 acoplado a un Espectrómetro de Masas marca Thermo Scientific, modelo ISQ LT.

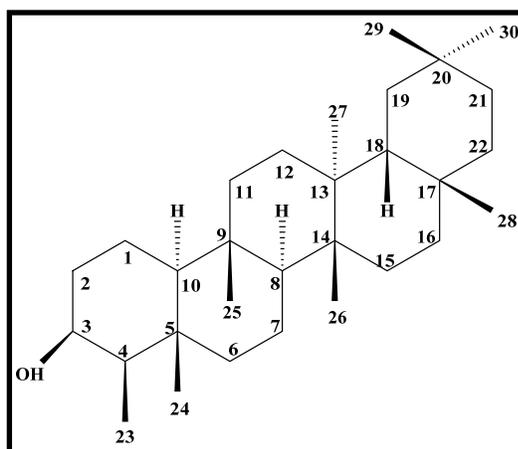
Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Scientific y no están corregidos.

8.4 Análisis químico

La purificación de los compuestos se realizó mediante cromatografía en columna, utilizando una columna de vidrio de 2 cm de diámetro y 30 cm de altura, empacada con 14 cm de gel de sílice marca Merck de 230-400 mallas como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de hexanos-AcOEt en polaridad ascendente, colectándose fracciones de 10 mL; el monitoreo de las fracciones se efectuó por cromatografía en placa fina.

3 β -Friedelinol (32)

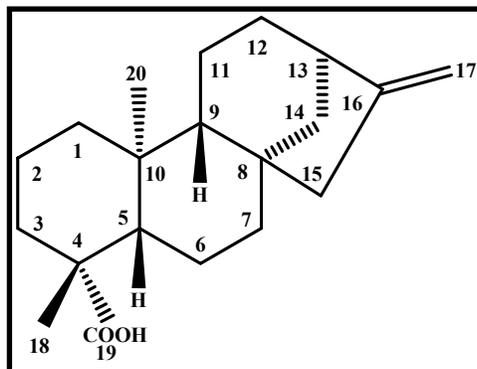
De las fracciones 14-16 obtenidas en la polaridad 9:1 hexanos-AcOEt se obtuvieron mieles cristalinas que fueron sometidas a cristalización con hexanos-CH₂Cl₂, obteniéndose el 3 β -friedelinol (32).



Cristales en forma de agujas, p. f.: 282-284 °C. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3.74 (1H, m, H-3), 1.90 (1H, dt, $J = 10.0, 2.4$ Hz, H-2a), 1.73 (1H, dt, $J = 12.8, 3.2$ Hz, H-6a), 1.56 (1H, m, H-2b), 1.55 (1H, m, H-18), 1.47 (1H, m, H-6b), 1.44 (2H, m, H-1), 1.17 (3H, s, CH₃-28), 1.00 (3H, s, CH₃-27), 0.99 (3H, s, CH₃-30), 0.98 (3H, s, CH₃-26), 0.96 (3H, s, CH₃-24), 0.94 (3H, s, CH₃-29), 0.94 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH₃-23), 0.91 (2H, m, H-22), 0.85 (3H, s, CH₃-25).

Ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (26)

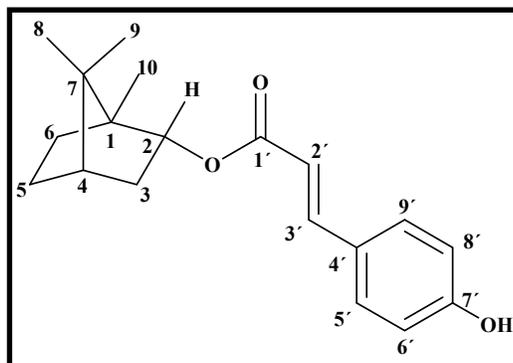
Por recromatografía del sedimento recuperado de la cristalización de las fracciones 14-16 se obtuvieron unas mieles cristalinas. El análisis espectroscópico permitió identificar al ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (26).



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-11a), 1.58 (1H, m, H-7a), 1.54 (1H, m, H-12a), 1.51 (1H, m, H-11b), 1.48 (1H, m, H-7b), 1.46 (1H, m, H-12b), 1.44 (1H, m, H-2b), 1.24 (3H, s, CH_3 -18), 1.13 (1H, dd, $J = 11.0, 4.6$ Hz, H-14b), 1.09 (1H, m, H-5), 1.06 (1H, dda, $J = 10.6, 4.3$ Hz, H-9), 1.02 (1H, m, H-3b), 0.95 (3H, s, CH_3 -20), 0.81 (1H, td, $J = 13.3, 4.0$ Hz, H-1b).

***p*-Cumarato de bornilo (1)**

En la polaridad 4:1 hexanos-AcOEt de las fracciones 22-37 se obtuvo un aceite denso amarillo que fue cristalizado con hexanos/acetona en proporción 1:1, obteniéndose 500 mg de *p*-cumarato de bornilo (1).



Sólido amorfo blanco, p f.: 150-152 °C. IR (CHCl₃) ν_{\max} 3259, 2878, 1671, 1628, 1604 cm⁻¹. EMIE 70 eV *m/z* (Int. Rel.) [M]⁺ 300.21. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.62 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-3'), 7.43 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5', H-9'), 7.14 (1H, sa, H-7'), 6.88 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-6', H-8'), 6.33 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-2'), 5.01 (1H, ddd, *J* = 9.9, 3.3, 2.1 Hz, H-2), 2.42 (1H, m, H-3a), 2.04 (1H, m, H-6a), 1.77 (1H, m, H-5b), 1.71 (1H, t, *J* = 4.4 Hz, H-4), 1.37 (1H, m, H-6b), 1.27 (1H, m, H-5a), 1.06 (1H, dd, *J* = 13.7, 3.3 Hz, H-3b), 0.92 (3H, s, CH₃-8), 0.89 (3H, s, CH₃-9), 0.88 (3H, s, CH₃-10).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 168.55 (C, C-1'), 158.35 (C, C-7'), 144.64 (CH, C-3'), 129.98 (CH, C-5', C-9'), 126.70 (C, C-4'), 115.91 (CH, C-6', C-8'), 115.48 (CH, C-2'), 80.29 (CH, C-2), 48.94 (C, C-7), 47.85 (C, C-1), 44.90 (CH, C-4), 36.80 (CH₂, C-3), 28.00 (CH₂, C-5), 27.17 (CH₂, C-6), 19.67 (CH₃, C-9), 18.80 (CH₃, C-8), 13.53 (CH₃, C-10).

9. BIBLIOGRAFÍA

- Albuquerque M. R. J., Pires A. M., Pessoa O. D., Silveira E. (2006). Terpenoids, flavonoids and other constituents of *Eupatorium betonicaeforme* (Asteraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 17:68-72.
- Albuquerque M. R. J., dos Santos H., de Souza E., da Silva R., de Menezes J. E. S., Pessoa O. D., Braz-Filho R., Costa S. M. (2010). Composición química volátil y no volátil de *Eupatorium ballotifolium* Kunth, Asteraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 20:615-620.
- Achika J., Arthur D., Gerald I., Adedayo A. (2014). A Review on the phytoconstituents and related medicinal properties of plants in the Asteraceae family. *Journal of Applied Chemistry*. 7:01-08.
- Ávalos A., Pérez-Urria E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología), Serie Fisiología Vegetal*. 2:119-145.
- Bedolla-Cázares F., Hernández-Marcelo P. E., Gómez-Hurtado M. A., Rodríguez-García G., del Río R. E., López-Castro Y., García-Merinos J. P., Torres-Valencia J. M., González-Campos J. B. (2017). Silver nanoparticles from AgNO₃-affinin complex synthesized by an ecofriendly route: chitosan-based electrospun composite production. *Clean Technologies and Environmental Policy*. 19:897-906.
- Box V. G. S., Chan W. R. (1975). Terpenoids from *Verbesina rupestris*. *Phytochemistry*. 14:583.
- Cartón P., Cruz L. (2007). Estrategia para la conservación y uso sustentable de la diversidad biológica de Michoacán. CONABIO, SUMA, SEDAGRO. 1ª edición. México.
- Coll M. V., Mercado M. I., Grau A., Catalán C. A. N. (2010). *Ent*-kaurane derivatives from the root cortex of yacon and other three *Smallanthus* species (Heliantheae, Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 38:1042-1048.
- Cortez-Gallardo V., Macedo-Ceja J., Hernández-Arroyo M., Arteaga-Aureoles G., Espinosa-Galván D., Rodríguez-Landa J. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomédica*. 15:123-136.

- Costa-Vasconcelos R. M., Carvalho-Leite F., Alves-Leite J., Rodrigues-Mascarenhas S., Rodrigues L. C., Piuvezam M. R. (2012). Synthesis, acute toxicity and anti-inflammatory effect of bornyl salicylate, a salicyc acid derivate. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 34:1028-1038.
- Cragg G. M., Grothaus P. G., Newman D. J. (2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical Reviews*. 109:2012-3043.
- Cruz-Corona R. (2015). Estudio químico preliminar de raíz de *Lasianthaea aurea*. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Del Vitto L. A., Petenatti E. M. (2009). Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. *Multequina*. 18:87-115.
- Dewick P. M. (2009). Medicinal natural products: A biosynthetic approach. 3rd edition. UK: *John Wiley & Sons*. 371.
- Discover Life. (2016). Designed by the polistes corporation proceedings of life. En www.discoverlife.org/. Consultado el 23 de Febrero del 2017.
- El-Seedi H. R., Ohara T., Sata N., Nishiyama S. (2002). Antimicrobial diterpenoids from *Eupatorium glutinosum* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 81:293-296.
- Funk V. A., Susanna A., Stuessy T. F., Bayer R. J. (2009). Systematics, evolution, and biogeography of Compositae. *Madroño*. 56:209-211.
- García P. A., de Oliveira A. B., Batista R. (2007). Ocurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. *Molecules*. 12:455-483.
- García-Sánchez C. A., Sánchez-González A., Villaseñor J. L. (2014). La familia Asteraceae en el parque nacional de los Mármoles, Hidalgo, México. *Acta Botánica Mexicana*. 106:97-116.
- García-Sánchez E., Ramírez-López C. B., del Río R. E., Martínez-Pacheco M. M. (2011). A revision of *Eupatorium* (Compositae: Eupatorieae) from Michoacán. *International Journal of Experimental Botany*. 80:139-146.
- García-Vega M. R. (2007). Constituyentes químicos y actividades biológicas de *Eupatorium macrocephalum* Less (Asteraceae) y *Annona dioica* st. HILL

- (Annonaceae): Una contribución al estudio de plantas medicinales en Paraguay. Tesis de doctorado. Universidad Federal Rural de Río de Janeiro.
- Hernández V. M., Martínez M., Joseph-Nathan P. (1986). Presence of bornyl-*p*-coumarate in the roots of *Eupatorium deltoideum*. *Journal of Natural Products*. 49:1173–1174.
- Hodgson G. L., Mac Sweeney D. F., Money T. (1973). Synthesis of (±)-campherenone, (±)-epicampherenone, (±)- β -santalene, (±)-*epi*- β -santalene, (±)- α -santalene, (±)-ylangocamphor, (±)-copacamphor, and (±)-sativene. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*. 1:2113.
- Liu P.-Y., Liu D., Li W.-H., Zhao T., Sauriol F., Gu Y.-C., Shi Q.-W., Zhang M.-L. (2015). Chemical constituents of plants from the genus *Eupatorium* (1904-2014). *Chemistry & Biodiversity*. 12:1481-1515.
- Maldonado E., Ramírez M. T., Pérez-Castorena A. L. (1998). Anti-Inflammatory activity of phenyl propanoids from *Coreopsis mutica* var. *mutica*. *Planta Medica*. 64:660-661.
- McMurry J. (2012). Química Orgánica. 8ª edición. *Cengage Learning*. 299.
- Molina-Torres J., Salgado-Garciglia R., Ramírez-Chávez E., del Río R. E. (1995). Presence of the bornyl ester of deca-2*E*-6*Z*-8*E*-trienoic acid in *Heliopsis longipes* roots. *Journal of Natural Products*. 58:1590-1591.
- Mongelli E., Martiáñez J., Anaya J., Grande C., Torres P., Pomilio A. B. (2003). *Bolax gummifera*: Toxicity against *Artemia* sp. of bornyl and *iso*-bornil esters. *Molecular Medicinal Chemistry*. 1:26-29.
- Montagnac A., Provost J. P., Litaudon M., Pais M. (1997). Antimitotic and cytotoxic constituents of *Myodocarpus gracilis*. *Planta Medica*. 63:365-366.
- Moreno A. B., Delle Monache G., Delle Monache F., Marini-Bettolo G. B. (1979). Flavones and kauranoid diterpenes from *Eupatorium tinifolium*. *Farmaco-Ed. Sci*. 35:457-464.
- Newman D. J., Cragg G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. 79:629-661.
- Ocampo-Sánchez R. (1994). Domesticación de plantas medicinales en Centroamérica. *Turrialba*. 108.

- Palá J. (2002). Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género “*Eryngium*” L., en la Península Ibérica. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. En biblioteca.ucm.es.tesis/bio/ucm-t26240.pdf.
- Pérez-Alonso N., Jiménez E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*. 4:195-211.
- Petersen F., Amstutz R. (2008). Natural compounds as drugs. *Birkhäuser*. 1:371.
- 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.
- Ragasa C. Y., Caro J. L., Shen C.-C. (2015). Chemical constituents of *Artocarpus ovatus* Blanco. *Der Pharma Chemica*. 7:178-182.
- Ringuelet J., Viña S. (2013). Productos naturales vegetales. 1ª edición. La Plata: Universidad Nacional de la Plata. 91-104.
- Romo A. (2006). Química de la flora mexicana. 1ª Edición. UNAM. México. 40-41.
- Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski y colaboradores. (2005). Flora fanerogámica del valle de México. 2a. edición, 1a reimp. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán). 1406.
- Sarker S. D., Nahar L. (2007). Chemistry for pharmacy students: General, organic and natural product chemistry. England: *John Wiley & Sons, Ltd*. 371.
- Sepúlveda-Jiménez G., Porta-Ducoin H., Rocha-Sosa M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21:355-383.
- Setzer W. N., Setzer M. C., Bates R. B., Nakkiew P., Jackes B. R., Chen L., McFerrin M. B., Meehan E. J. (1999). Antibacterial hydroxycinnamic esters from *Piper caninum* from Paluma, North Queensland, Australia. The crystal and molecular structure of (+)-bornyl coumarate. *Planta Medica*. 65:747-749.
- Shilpa K., Varun K., Lakshmi BS. (2010). An alternate method of natural drug production: eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *Journal of Plant Sciences*. 5:222-247.
- Somolinos J. (1990). El código de la Cruz Badiano. *Salud Pública de México*. 32:603-617.

- Vibrans H. (2011). Malezas de México, *Eupatorium pycnocephallum* Less. En <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/eupatorium-pycnocephallum/ficha.htm>. Consultado el 30 de Enero del 2017.
- Villagómez-Guzmán A. K. (2016). Estudio químico preliminar de *Perymenium bupthalmoides*. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Villaseñor J. L., Ortiz E., Harker M. (2016). Asteráceas (Asteraceae). En: La biodiversidad en Colima, estudio de Estado. CONABIO. México. 1ª edición. 199-208.
- Zhang, M.-L., Wu M., Zhang J.-J., Irwin D., Gu Y.-C. & Shi Q.-W. (2008). Chemical constituents of plants from the genus *Eupatorium*. *Chemistry and Biodiversity*. 5:40-55.
- Zhao X., Zheng G.-W., Niu X.-M., Li W.-Q., Wang F.-S., Li S.-H. (2009). Terpenes from *Eupatorium adenophorum* and their alleopathic effects on *Arabidopsis* seeds germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57:747-749.