



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

"DITERPENOS DEL GÉNERO *EUPATORIUM*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

MARIELA ROQUE FLORES

ASESOR DE TESIS:

D. C. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES

Morelia, Michoacán. Diciembre del 2008



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....	17
PARTE EXPERIMENTAL	38
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	45

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Química de Productos Naturales en el Instituto de Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría de la D.C Rosa Elva Norma del Río Torres.

Con apoyo económico por parte del proyecto PROMED Nuevo PT6, 2.32 Búsqueda de Nuevos Productos Naturales con Actividad Biológica en Especies de los Géneros *Eupatorium* y *Ageratina*.

A mi asesora de tesis D.C Rosa Elva Norma del Río Torres, palabras no me alcanzarían para agradecer su ayuda incondicional en todo momento, el tiempo que me dedico para la realización de esta tesis, haber compartido sus invaluable conocimientos, su amistad. Muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios por darme la vida y todas las cosas hermosas que tengo hasta este momento.

A mis Padres: Jovita Flores Sólis y Víctor Juan Roque Madrigal; por enseñarme que con el trabajo constante podemos alcanzar nuestros más grandes anhelos, por su amor, dedicación, por ser parte de este sueño. Gracias, los quiero mucho.

A mis hermanas Consuelo y Marisol: Por confiar en mí, por su gran ayuda para poder concluir mis estudios, por figurar como mi otra mamá cuando lo he necesitado, por el afecto y compañía. Gracias, las quiero mucho.

A mis hermanos Vanesa, Fátima, Víctor y Alondra: Por ser cómplices de mis sueños, por darme una palabra de aliento cuando siento que ya no puedo, por su linda compañía, por confiar en mí, por todos los lindos momentos que hemos compartido. Gracias, los quiero mucho.

A mi abuelito Juan Roque Flores: Por confiar en mí, por cuidarme, por ser mi cómplice en todas mis travesuras, por todo el cariño que me diste, aunque sé que ya no estas a mi lado físicamente pero eres mi Ángel que me cuida a donde quiera que voy. Te quiero y te extraño mucho.

A mi abuelita Consuelo Roque Madrigal: Por ser como mí mamá cuando era niña, por cuidarme, por todo el cariño que me has dado. Gracias, te quiero mucho.

A mi novio Gibrán: Por ser mi amigo, mí confidente, por ser parte de este sueño, por tu apoyo incondicional en todo momento, por ser parte importante en la toma de dediciones, por estar a mí lado y brindándome tu amor. Gracias catito lindo, Te amo.

A mi amigo Benjamín: Por ser un lindo acompañante durante toda mi carrera, por su gran ayuda en la elaboración de esta tesis, por todo. Gracias.

A mis amigos de la Facultad: Abel, Chio, Susy, Lucia, Ivonne, Damián, Martha, Carmina, Adriana, Rocio, Asael, Rosa, Mario: Por compartir tantos momentos lindos. Gracias, siempre los llevare en mi corazón.

A mis amigas del laboratorio: Fanny, Luz y Adriana. Gracias por su apoyo.

A mis amigos del laboratorio de Fisiología Celular: Ale, Tere, Rosy, Mony, Alberto, Cesar, Edgar, Clau. Por su ayuda Gracias.

A mis amigos Jean, Efraín, Adriana, Maricela: Por su apoyo incondicional, por tener siempre una palabra de aliento hacia mí. Los quiero mucho.

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

Al Dr. Pedro Joseph Nathan y Carlos M. Cerda García-Rojas. Del Departamento de Química del CINVESTAV por las facilidades otorgadas en la determinación de los espectros de IR y RMN.

A la Q.F.B Concepción Armenta Salinas, del IIQM-UMSNH por la determinación de RMN a 400 MHZ. Gracias

Al Q.F.B Gerardo Morán López, del IIQB-UMSNH, por sus enseñanzas en las técnicas de laboratorio. Gracias

INTRODUCCIÓN

La diversidad de la flora ha sido admirada desde el tiempo en el que el hombre empezaba a habitar Meso-América, luego la manipuló para usarla a su conveniencia: para alimentarse, curarse y ornamentarse, atribuyéndole propiedades divinas.¹

La República Mexicana cuenta con una inmensa diversidad de flora y fauna las cuales, coexisten de manera equilibrada y que el ser humano trata de estudiar, analizar y comprender para su bien y el del planeta. En el estado de Michoacán existe una variedad importante de flora que ha sido catalogada y utilizada por nuestros ancestros aun desconociendo los compuestos activos de ellas. A pesar de esta gran variedad de plantas que se utilizaban, otras especies se desconocían.

Los vegetales producen una diversidad de sustancias, producto del metabolismo secundario, algunas responsables de la coloración y aromas de flores y frutos, otras vinculadas con interacciones ecológicas, como es el caso de la atracción de polinizadores. Actualmente, se ha demostrado que principalmente la mayoría de ellos participan en el mecanismo de defensa de las plantas. Entre estos últimos, se consideran a las fitoalexinas, los alelopáticos, por mencionar algunos.² La razón de ser de estos metabolitos permite una gama de usos en la agricultura y en la medicina. Adicionalmente, las múltiples funciones que presentan en los vegetales permite la búsqueda de nuevos agroquímicos naturales, como insecticidas, herbicidas, reguladores de crecimiento, colorantes, aromas, condimentos, antibióticos, extractos alergénicos e inmunizantes biológicos, etc.

Un punto importante en el conocimiento de las moléculas implicadas en la actividad de las plantas es la determinación de su estructura y de su comportamiento. Ello permite comprender la naturaleza y las modalidades de los métodos de control, racionalizar los procesos extractivos, a veces prever la

actividad farmacológica, frecuentemente pronosticar la farmacocinética y la biodisponibilidad; es preliminar a la síntesis. Estudiar las estructuras moleculares es también comprender su origen.

El estudio de la parte química de las plantas ha dado respuestas de la procedencia de las actividades medicinales de las plantas; dichas actividades provienen de metabolitos que ellas producen y, aunque a la mayoría de estos no se les conocen su función metabólica dentro del organismo vegetal, es de gran interés para la química de los productos naturales determinar la estructura molecular de aquellos compuestos que pudiera tener alguna actividad terapéutica.

Como parte de un estudio Fitoquímico integral de la flora de las plantas de Michoacán, en el presente trabajo estudiaremos dos especies del género *Eupatorium*. Algunas plantas de este género son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional como: antimicrobiano, astringentes, desinfectantes, hepatoprotectores, anti-herpético, anti-reumático, analgésico, así como en el tratamiento de fiebre, dolor de cabeza, úlcera estomacal y diarrea³⁻⁴ por lo tanto este género promete ser una fuente de drogas biológicamente activas.

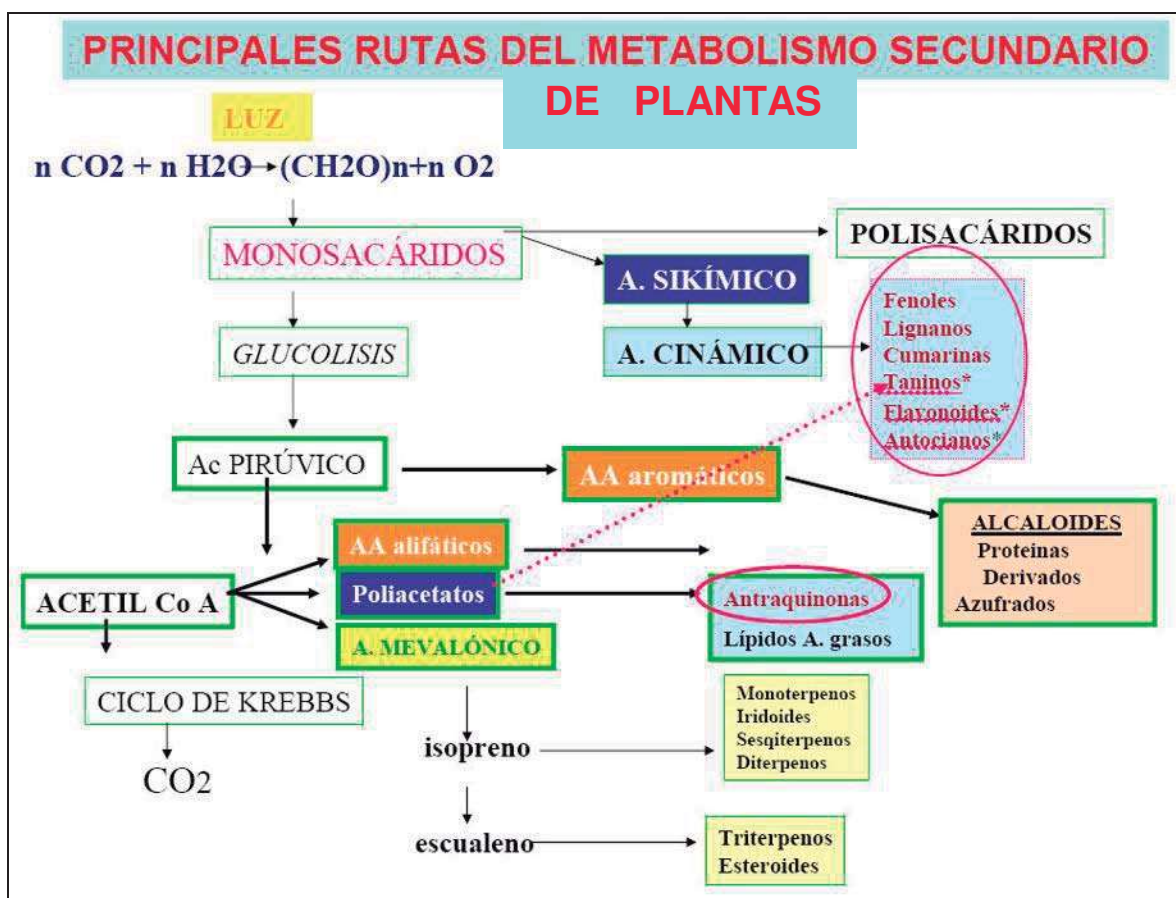
ANTECEDENTES

Las plantas producen una increíble diversidad de metabolitos secundarios, cuya elaboración puede estar influenciada por varios factores externos, tales como las condiciones ambientales predominantes; por ejemplo, la presencia de depredadores, infecciones producidas por parásitos, temperatura del agua, profundidad y niveles de nutrientes. También factores internos influyen en la presencia de un metabolito determinado, como el estado de desarrollo, reproducción, etc. Por lo que debido a estos parámetros cambiantes, el contenido químico a menudo varía, dependiendo de cuándo y dónde son recolectadas las plantas. Las sustancias denominadas “*metabolitos secundarios*” generalmente están distribuidas en un número limitado de grupos taxonómicos. Muchas de sus funciones aún son desconocidas.

Un metabolito secundario es considerado como un compuesto que no parece participar directamente en el crecimiento o desarrollo de un organismo, sin embargo aquellos que los producen presentan ventajas en cuanto a las condiciones de su entorno. Algunas de estas sustancias juegan un papel importante en la protección contra el ataque de patógenos y herbívoros; otros son atractivos de los animales para la polinización y la dispersión de los frutos y de las semillas. Sin embargo, todavía se conoce poco de las máximas potencialidades y beneficios que su utilización parece proporcionar a las plantas.⁵

PRODUCTOS DEL METABOLISMO SECUNDARIO.

Los terpenos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran dentro de los productos del metabolismo secundario de la plantas, son un grupo de compuestos lipídicos diversos y numerosos. A continuación se muestra de manera general en el Esquema 1 las principales rutas del metabolismo secundario de las plantas y sus derivados.⁵



Esquema 1: Rutas del metabolismo secundario de plantas.⁵ (Tomado de <http://www.um.es/bbmbi/Docencia/Antioxidantes/2007-11-13-AntioxidantesNaturales-DistribucionBiosintesis.pdf>).

Algunas de las características de los terpenos es que van de insolubles a parcialmente miscibles en agua, son biosintetizados a partir de acetil-CoA e intermediarios de la glicólisis, además de ser compuestos derivados de la unión de unidades de isopreno de 5-carbonos (C_5H_8). Estos terpenoides pueden tener presente otros elementos como el oxígeno.⁶

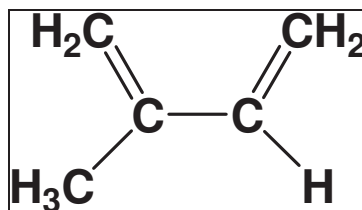
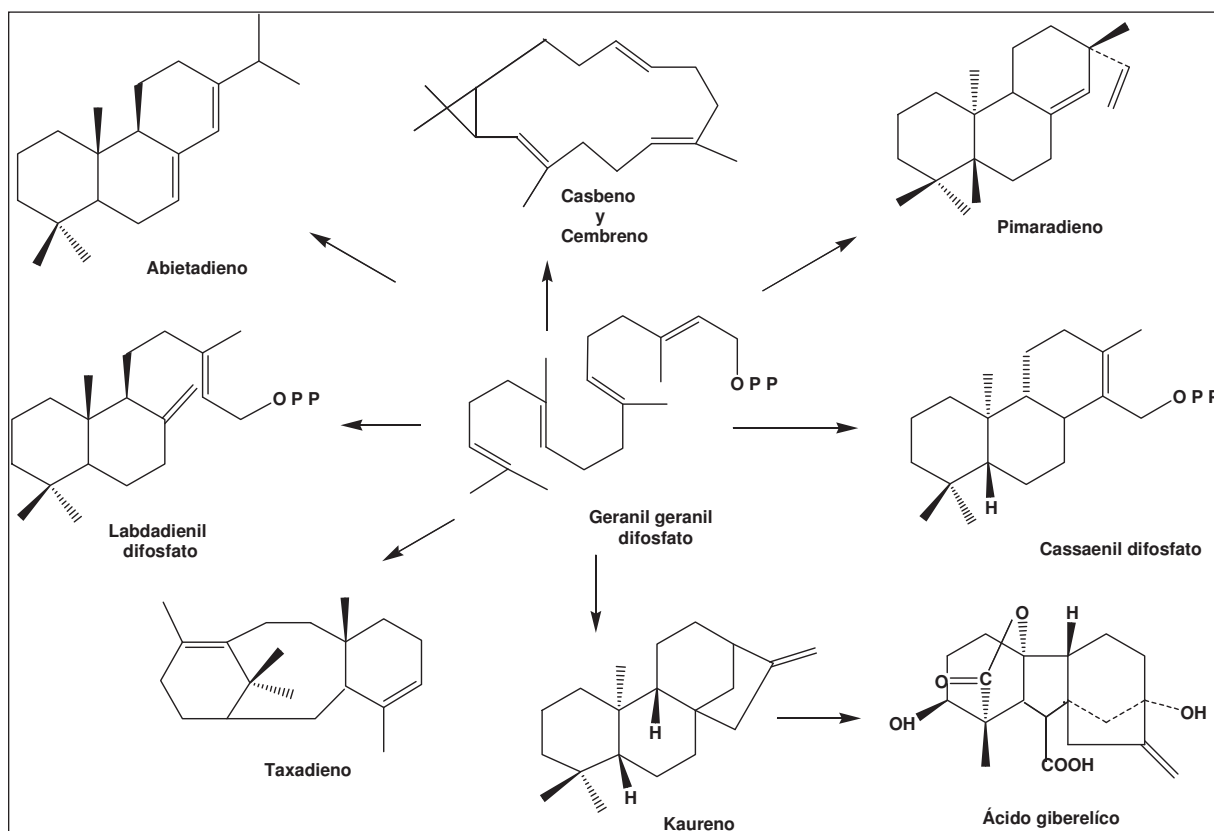


Fig. 1: Estructura del isopreno.

BIOSINTESIS DE TERPENOS

La biogénesis de los terpenos involucra la conversión de acetato a mevalonato y desde ahí vía isopentil pirofosfato a polienos acíclicos. Ciclización y rearrreglos de estos polienos acíclicos proporciona rutas razonables para la mayoría de los esqueletos carbonados encontrados en la naturaleza.

La biogénesis de los diterpenos se considera a partir del geranil-geranil difosfato, la ciclización vía hidratación, neutralización y rearrreglos produce los diferentes tipos de diterpenos que se muestran en el Esquema 2.⁶



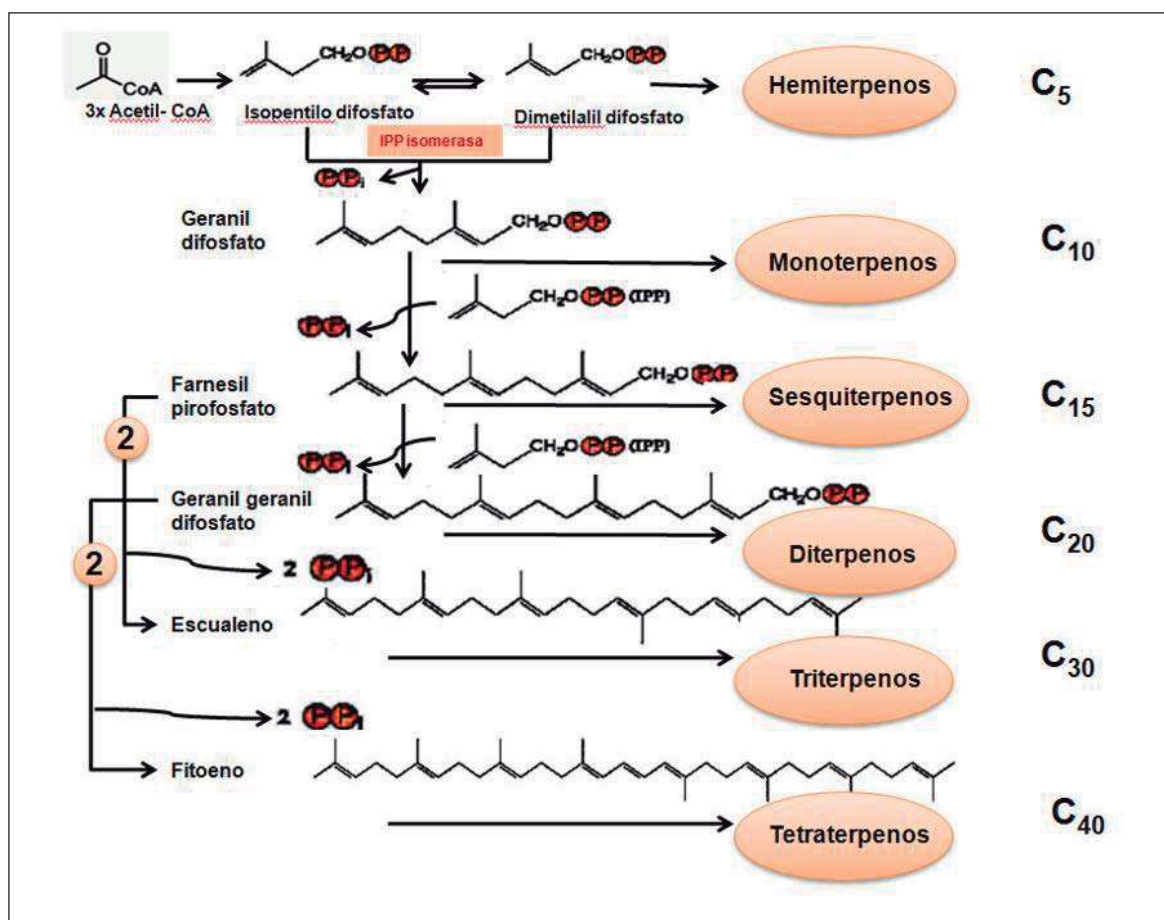
Esquema 2: Esqueletos básicos de diterpenos. (Modificado de <http://mail.fq.edu.uy/~planta/Cursos/teorico%20terpenos%202007,%20tema%2012.pdf>).

Las diferentes modificaciones enzimáticas de los esqueletos comprende la clasificación de los terpenos de acuerdo al número de unidades de isopreno con

los que cuenta la molécula. Algunas veces son compuestos muy modificados y es difícil identificar al isopreno.

CLASIFICACIÓN DE TERPENOS:⁶⁻⁷

- **Hemiterpenos:** Contienen 1 unidad isopreno (5-C)
- **Monoterpenos:** Contienen 2 unidades de isopreno (10-C)
- **Sesquiterpenos:** 3 unidades de isopreno (15-C)
- **Diterpenos:** 4 unidades de isopreno (20-C)
- **Triterpenos:** 6 unidades de isopreno (30-C)
- **Tetraterpenos:** 8 unidades de isopreno (40-C)
- **Politerpenos:** Más de 10 unidades de isopreno

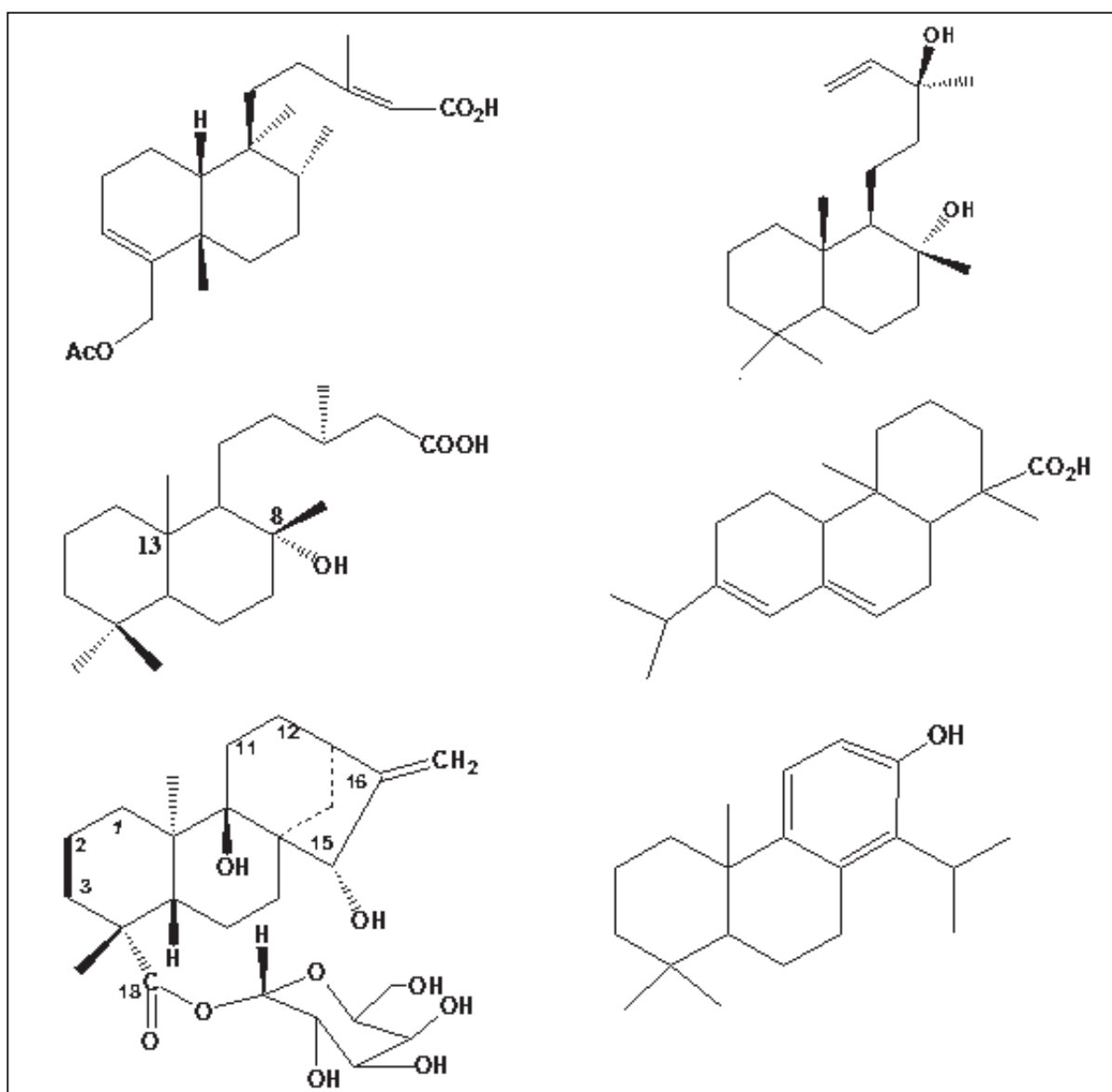


Esquema 3: Clasificación general de terpenos. (Modificado de

<http://www.ugr.es/~quiorred/pnatu/terpenoides.htm>).

Los diterpenos constituyen un grupo muy amplio de componentes de los vegetales cuya característica común es la de poseer una estructura básica con 20 carbonos y proceder biosintéticamente del ácido mevalónico aunque existan un gran número de estructuras distintas.⁸

Se subdividen atendiendo al tipo de esqueleto carbonado, entre otros, como bicíclicos (tipo labdano y clerodano); tricíclicos (tipo primario, abietano, cassano, totarona y podocarpano); tetracíclicos (tipo kaurano, beyerano, atisano, giberelano).⁹ En el Esquema 4 se muestran algunos ejemplos de diterpenos:



Esquema 4: Ejemplos de diterpenos.⁹**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DITERPENOS**

La actividad anti-bacterial de extractos naturales puede ser en muchas instancias atribuidas a la presencia de diterpenoides. En algunas investigaciones se han logrado aislar y caracterizar un número de diterpenoides que han tenido actividad contra una variedad de microorganismos.⁹

Las investigaciones en laboratorios dedicados a la acción biológica de estos diterpenoides han revelado algunas características comunes. Todos los compuestos demostraron ser activos contra bacterias Gram positivas pero inactivos contra bacterias Gram negativas.¹⁰⁻¹¹ Se ha comparado la actividad antimicrobiana de los diterpenoides aislados previamente con la de algunos de sus derivados y compuestos relacionados descritos en la literatura, en busca de las características estructurales comunes que pudieron ser responsables de su actividad. En un intento por validar la relación estructura-actividad de esta clase de compuestos.¹⁰

Aunque los mecanismos de la acción de estos compuestos se pudieron variar y haber aclarado para solamente algunos, se ha sugerido que algunos diterpenoides derivan su actividad de su capacidad de cruzar o de dañar las membranas de la célula bacteriana.¹²⁻¹³

Los diterpenos poseen interés actual como futuros fármacos potenciales, ya sean aislados directamente de la planta o derivados modificados. Uno de dichos compuestos es la forskolina (coleonol) la cual se ilustra en la Fig.2, diterpeno aislado de *Coleus forskohlii*. Han sido muy utilizadas, preparaciones de especies de *Coleus*, en la medicina tradicional hindú, especialmente en el tratamiento de dolencias cardíacas, cólico abdominal. Se ha demostrado que la forskolina posee actividad hipotensora, espasmolítica, cardiotónica e inhibidora de la agregación plaquetaria.¹⁴

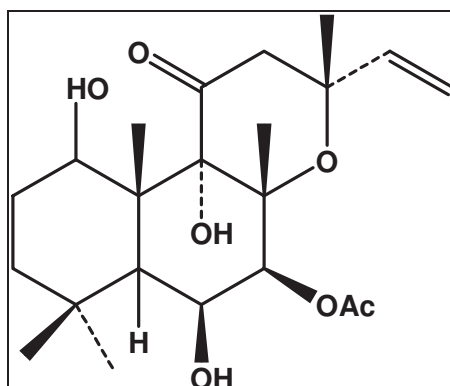


Fig. 2: Forskolina aislada de *Coleus forskohlii*.¹⁴

Diterpenos, aislados de varias plantas del género *Salvia*, han sido investigados por su actividad farmacológica: analgésica, anti-inflamatoria, hemostática, antioxidante, anti-microbiana¹⁵ y como remedio antitumoral. Algunos diterpenos han sido usados de manera eficiente contra el tratamiento de enfermedades coronarias, como la angina de pecho, infarto al miocardio y recientemente se ha encontrado que algunos compuestos de *Salvia* ssp (sobre todo *Salvia divinorum* Epling & Jativa) son capaces de influir en el sistema nervioso central induciendo efectos alucinógenos.¹⁶

Dentro de este grupo figuran importantes compuestos naturales de aplicación en terapéutica. Un ejemplo típico es el caso del Taxol® (Fig.3), también conocido como Paclitaxel®, compuesto obtenido a partir de las cortezas de tejo americano (*Taxus brevifolia* Nutt.) que ha mostrado una elevada eficacia en el tratamiento de algunos tipos de cánceres en la clínica. Este compuesto es un

diterpeno tricíclico con esqueleto básico del grupo de los taxanos y con una función amida por lo que en ocasiones se considera como un pseudoalcaloide.¹⁷

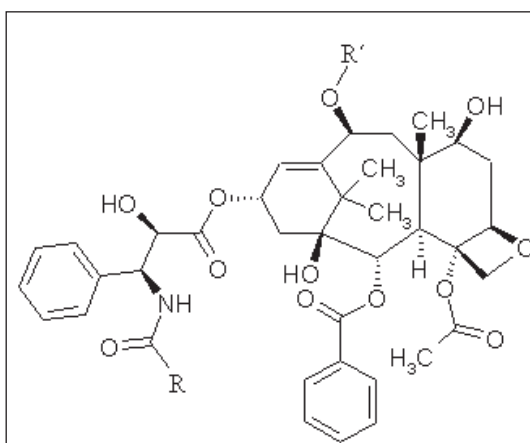


Fig 3: Estructura del Taxol.¹⁷

Existen en la literatura diterpenos de tipo labdano glicosídicos con actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer humano, como se muestra en la Fig. 4, el cual ha sido aislado del extracto metanólico de las partes aéreas de la planta *Aster spathulifolius*.¹⁸

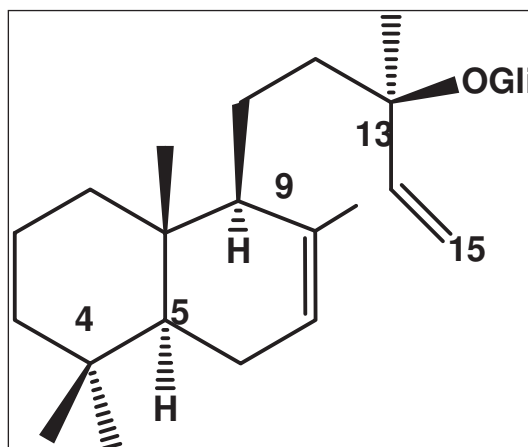


Fig 4: Diterpeno de tipo labdano.¹⁸

GENERALIDADES DEL GÉNERO *EUPATORIUM*

El género *Eupatorium* son hierbas generalmente perennes, arbustos o arbolitos bajos; hojas opuestas o en ocasiones alternas; capítulos homógamos, generalmente pequeños, dispuestos en inflorescencias corimbiformes o paniculiformes, rara vez solitarios; involucro cilíndrico, turbinado, campanulado o hemisférico, sus brácteas en número variable, dispuestas en dos o más series, imbricadas, de longitud similar y entonces a menudo con cálculo, otras veces desiguales y graduadas; receptáculo plano, convexo o cónico, desnudo; flores pocas o numerosas, todas hermafroditas, blancas, rosadas, moradas o azulosas; corola tubulosa, tubo corto, limbo brevemente pentalobulado o pentadentado, anteras con la base obtusa y el apéndice del conectivo reducido o bien desarrollado; ramas del estilo largas y sobresalientes, lineares o claviformes, a veces coloreadas, su ápice obtuso, sin pelos y cubierto de numerosas papilas cortas; aquenios prismáticos de ápice truncado, con cuatro a seis costillas bien definidas, glabros o pilosos, vilano de pocas o numerosas cerdas capilares persistentes y libres de la base .

El género *Eupatorium* (familia Asteraceae, tribu Eupatorieae, subtribu Eupatoriinae es taxonómicamente compleja, por lo cual ha sufrido varias clasificaciones¹⁹. Representa el 10% de la familia Asteraceae y posee cerca de 2000 especies presentes en las regiones neotropicales²⁰ Debido a su complejidad morfológica, la clasificación de muchas de ellas era muy ambigua, hasta el estudio en que R.M. King y H. Robinson las agruparon en nuevas taxonomías.²¹ Generalmente éste género se encuentra en el centro de Europa, este de Asia, y toda América.²² De los estudios reportados se han encontrado una gran variedad y

diversidad de metabolitos secundarios. Como son: sesquiterpenlactonas tipo guaianólidas, germacranólidas, heliangólidas, eudesmanólidas, flavonoides, diterpenos, benzofuranos, alcaloides, crómeno, derivados del timol y longipinenos.²³

DITERPENOS DEL GÉNERO *Eupatorium*

Del género *Eupatorium* se han identificado diterpenos de tipo labdano que presentan actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, estos fueron obtenidos de extractos hexánicos de *E. glutinosum*²⁴. El ácido 3-O-β-D-glucósido 3,15-dihydroxy-ent-labd-7-en-17-oico (Fig. 6) y su aglicona han sido aislados de *E. glutinosum*. Las estructuras fueron determinadas por IR, RMN de una y dos dimensiones, la espectrometría de alta resolución de masas, transformaciones químicas, y la comparación de datos espectroscópicos con diterpenos estrechamente relacionados. Extractos totales mostraron actividad antimicrobiana y citotóxicas, mientras que los compuestos aislados mostrarán solo actividad antimicrobiana. Estos resultados apoyan el empleo vernáculo medicinal de la planta como un antimicrobiano.³

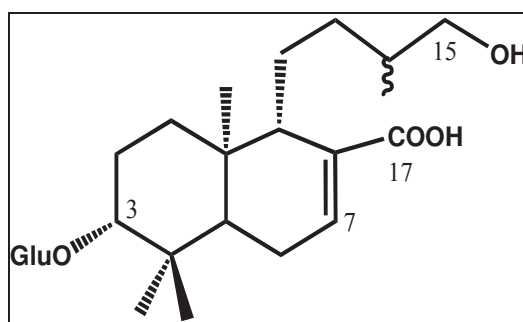


Fig 6: Ácido 3-O-β-D glucósido 3,15-dihydroxy-ent-labd-7-en-17-oico.³

El ácido 7-hidroxi-8 (17) labden-15-oico (ácido salvico Fig. 5) y su acetato, los cuales inhiben preferencialmente el crecimiento de bacterias Gram positivas, fueron aislados del extracto cloruro metilénico de tallos y hojas de *E. salvia*.²⁵

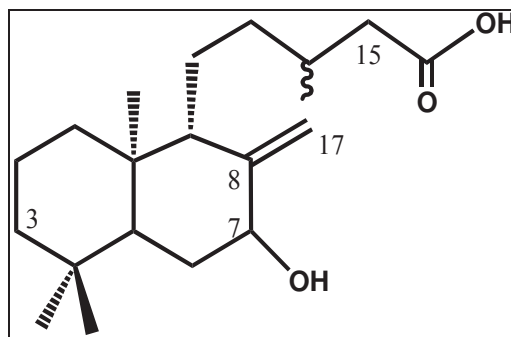


Fig 5: Ácido 7-hidroxi-8 (17) labden-15-oico.²⁵

Un nuevo diterpeno de tipo kaureno, caracterizado como ácido 15-decanoiloxi-kaur-16-en-19-óico (Fig.7) ha sido aislado del extracto hexánico de flor de *E. betonicaeforme*, así como después de llevar a cabo varias cromatografías en columnas con sílica gel lograrón aislar este metabolito secundario.²³

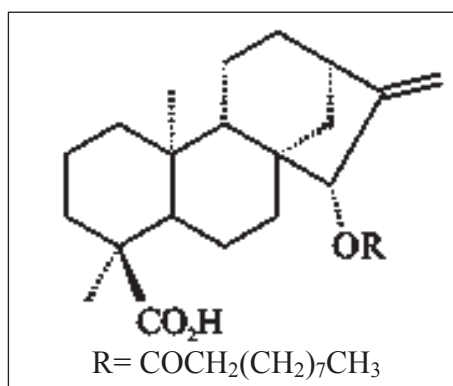


Fig 7: Ácido 15-decanoiloxi-kaur-16-en-19-óico.²³

Del extracto hexánico de la parte aérea de la planta *E. macrocephalum* Less. Se aisló el diterpeno identificado como 19-O-β-D-glucosido 9,15-dihidroxi-kaurano (Fig 8).²⁷

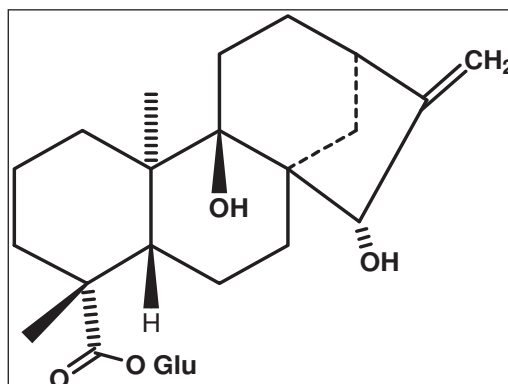


Fig 8: Diterpeno 19-O-β-D-glucosido 9,15-dihidroxi-kaurano.²⁷

Recientemente se llevó a cabo una revisión de todos los componentes aislados de las plantas del género *Eupatorium* y su actividad biológica.²⁸

Algunos autores han desarrollado patentes para el tratamiento de diferentes enfermedades, empleando plantas del género *Eupatorium*. (Tabla 1)

Tabla 1: Patentes del uso de plantas del género *Eupatorium*

PLANTA	ACTIVIDAD	REFERENCIA
<i>E. fortunei</i>	Antirreumática	29
<i>E. fortunei</i>	Anorexia infantil	30
<i>E. japonicum</i>	Cáncer de hígado	31
<i>E. adenophorum</i>	Repelente para mosquitos	32

Estudios acerca de la actividad antimicrobiana de los extractos de *E. lindleyanum* DC han reportado que puede ser un ingrediente funcional para la conservación de alimentos ya que puede actuar como un preservador natural, además presenta una actividad antimicrobiana efectiva contra bacterias Gram (+) y Gram (-).³³

Los extractos de *E. buniifolium* han mostrado actividad antioxidante, que podría coincidir con el uso en la medicina tradicional de Argentina. El efecto observado se debe tal vez a la presencia de compuesto fenólicos y flavonoides a los cuales se les ha caracterizado como compuestos eliminadores de radicales libres.³⁴

Del extracto clorofórmico de hojas de *E. birmanicum* se han aislado dos compuestos: β -sitosterol, β -sitosterol-D-glucósido y ácido-*o*-coumárico; así como del extracto metanólico de hojas se han aislado tres compuestos: cerebrósido, ceramida y rutinosido-3-O-quercetina. Las estructuras de los compuestos aislados fueron caracterizadas por diferentes métodos espectroscopicos.³⁵

Se ha reportado que el aceite esencial de *E. capillifolium* y *E. compositifolium* se puede utilizar como combustible para el motor de diesel y gasolina en forma refinada o sin refinar y puede ser un sustituto de ambos.³⁶

De aceite esencial de *E. fortunei* Turcz se han aislado compuestos de tipo terpenoide como son: *p*-cimeno, linalool, β -caryofileno, α -humuleno, α -curcumeno. Así como derivados del timol tienen actividad citotóxica.³⁷

Se ha aislado de *E. chinense* L., una flavona identificada como Eupalinin-A, la cual en estudios realizados *in-vitro* esta flavona induce autofagocitosis en células humanas con leucemia tipo HL60.³⁸

Un sesquiterpeno cadinano (Fig. 9), incluyendo su derivado dimérico y un análogo del peróxido cadinano, se ha aislado de las hojas de *E. adenophorum*. Su estructura incluyendo la configuración absoluta fue determinada en base a la interpretación de los datos espectroscópicos y cristalografía de rayos X.

Demostrando que presenta citotoxicidad in vitro contra variedades de células del cáncer HCT-8, Bel-7402, y A2780.³⁹

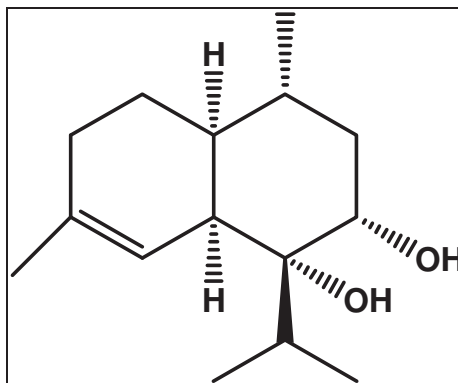


Fig. 9: Sesquiterpeno cadinano.³⁹

Recientemente de *E. glehnii* se ha aislado un sesquiterpeno identificado como Guaiaglehnin. Su estructura fue determinada en base a la interpretación de datos espectroscópicos así como de una comparación genética con una hiodorilatona.⁴⁰

Por lo mencionado anteriormente es importante contar con estrategias para la búsqueda de especies vegetales que sean utilizadas como fuente de productos naturales.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es realizar un estudio químico de las flores del género *Eupatorium*; *E. petiolare* y *E. cardiophyllum*

METODOLOGÍA Y RESULTADOS

Eupatorium cardiophyllum

Eupatorium cardiophyllum (Fig. 10) es un arbusto que mide de 1-2 m de altura, tallos duros de 6-8 mm de diámetro; presenta hojas opuestas ligeramente dentadas, acorazonadas, de 5-6 nervaduras; con pequeñas flores en cabezuelas de color blanco, cada cabezuela consta de 23-28 flores simples.¹⁹

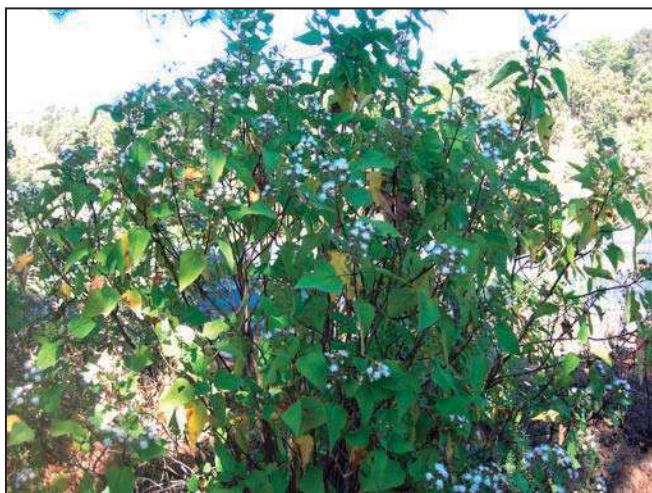


Fig. 10: *Eupatorium cardiophyllum*.

Un lote de 240 g de flor de *E. cardiophyllum* colectada el 22 de Febrero del 2006 en el kilómetro 51 de la carretera Morelia-Zacapu, previamente secada a la sombra, se sometió a maceración a temperatura ambiente con 3 litros de hexano, durante 8 días por tres veces.

Transcurrido éste tiempo se filtraron y concentraron a sequedad en el rotavapor. El residuo fue resuspendido en metanol, para eliminar las grasas.

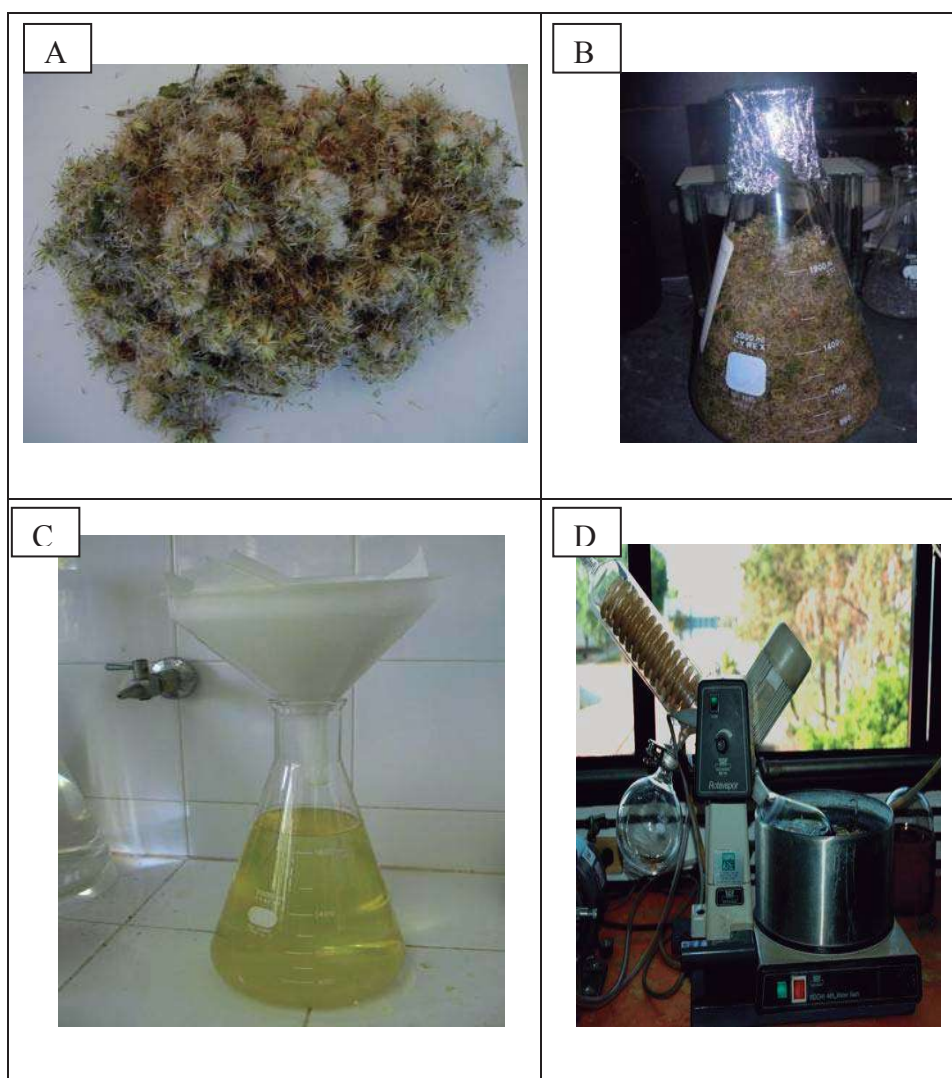


Fig.11: Obtención de extracto hexánico: A) Flor, B) Maceración con hexano, C) Filtrado, D) Concentración del extracto.

El extracto hexánico fue analizado por resonancia magnética nuclear de hidrógeno, para observar la naturaleza y abundancia de los componentes; detectándose una mezcla de compuestos tipo terpenoide ya que las principales señales se encuentran de 1 a 2 ppm.

1g del extracto desengrasado fue purificado por cromatografía en columna usando como fase móvil mezcla de Hexano-AcOEt en orden ascendente de polaridad, (Fig. 12) se colectaron fracciones de 10 ml, de las fracciones (27–40) eluídas con hexano-acetato de etilo 9:1 se obtuvo un aceite incoloro que al ser analizado por cromatografía de gases mostró el cromatograma de la Fig.13 donde se observa un compuesto mayoritario con un tiempo de retención 20.97 min.



Fig. 12: Cromatografía en columna

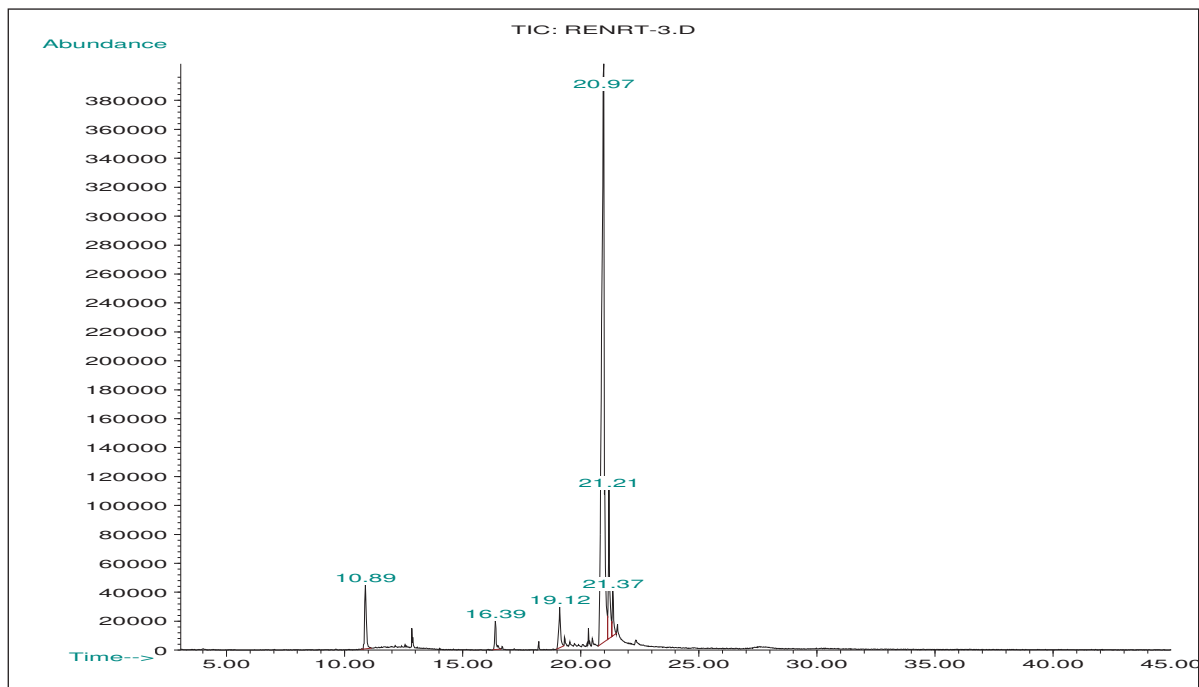


Fig. 13: Cromatograma de gases de las fracciones 27-40.

El espectro de masas (Fig.14) del compuesto mayoritario mostró un ión molecular de 306 uma correspondiente a un $C_{20}H_{34}O_2$ y cuya comparación del patrón de fragmentación con el de la base de datos nos indicó que se trataba del ácido catívico, con una certeza del 99%.

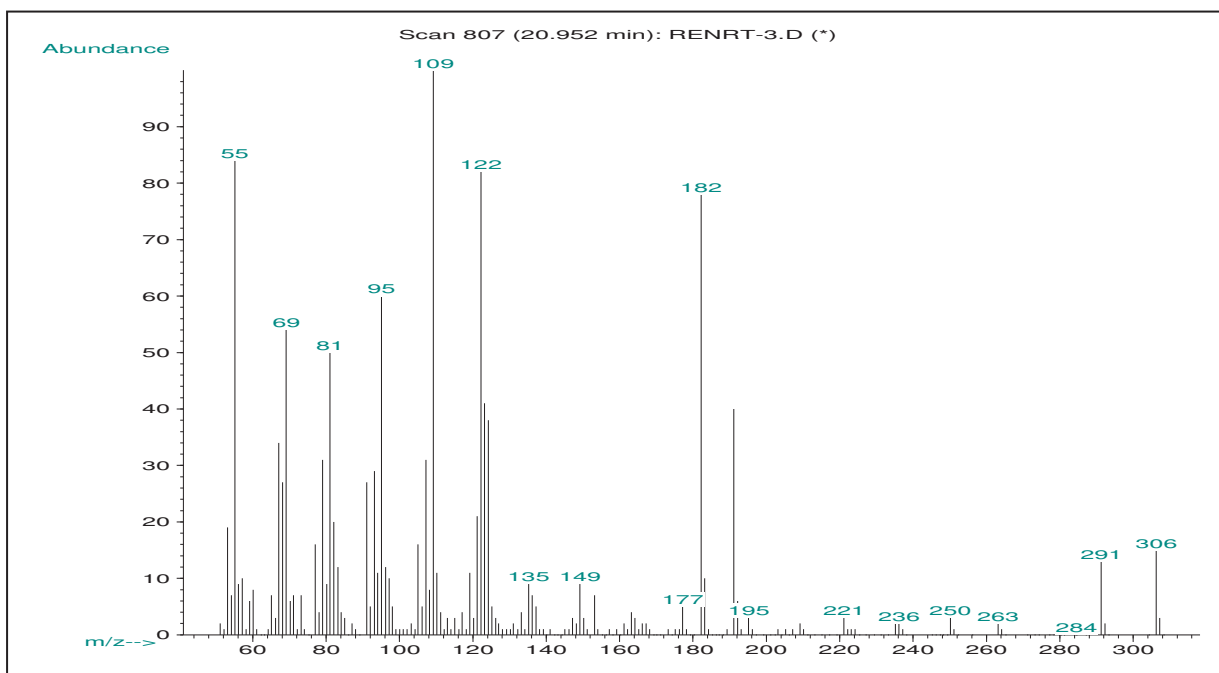


Fig.14: Espectro de masas del Ácido catívico.

Con el fin de comprobar la identificación del ácido catívico se procedió a realizar la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y Carbono-13.

El espectro de ^1H -RMN a 400 MHz (Fig.15) mostró una señal múltiple en 5.38 ppm correspondiente a un hidrógeno vinílico, en 2.39 se observó una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de $J=15.01$ y 5.86 Hz, en 2.15 se observó otra señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de $J=15.01$ y 8.42 Hz, señales correspondientes a los hidrógenos 14 y 14' los cuales al estar en una posición α a un grupo carbonilo presentan este desplazamiento. En 1.65 ppm se observó una señal simple ancha que integra para 3 hidrógenos que correspondió al metilo vinílico 17, en 0.99 ppm se observó una señal doble que integra para 3 hidrógenos que corresponde al metilo secundario 16, en 0.87, 0.85 y 0.75 ppm se observaron tres señales simples correspondientes a los metilos terciarios correspondientes a los H-18, 19 y 20 respectivamente.

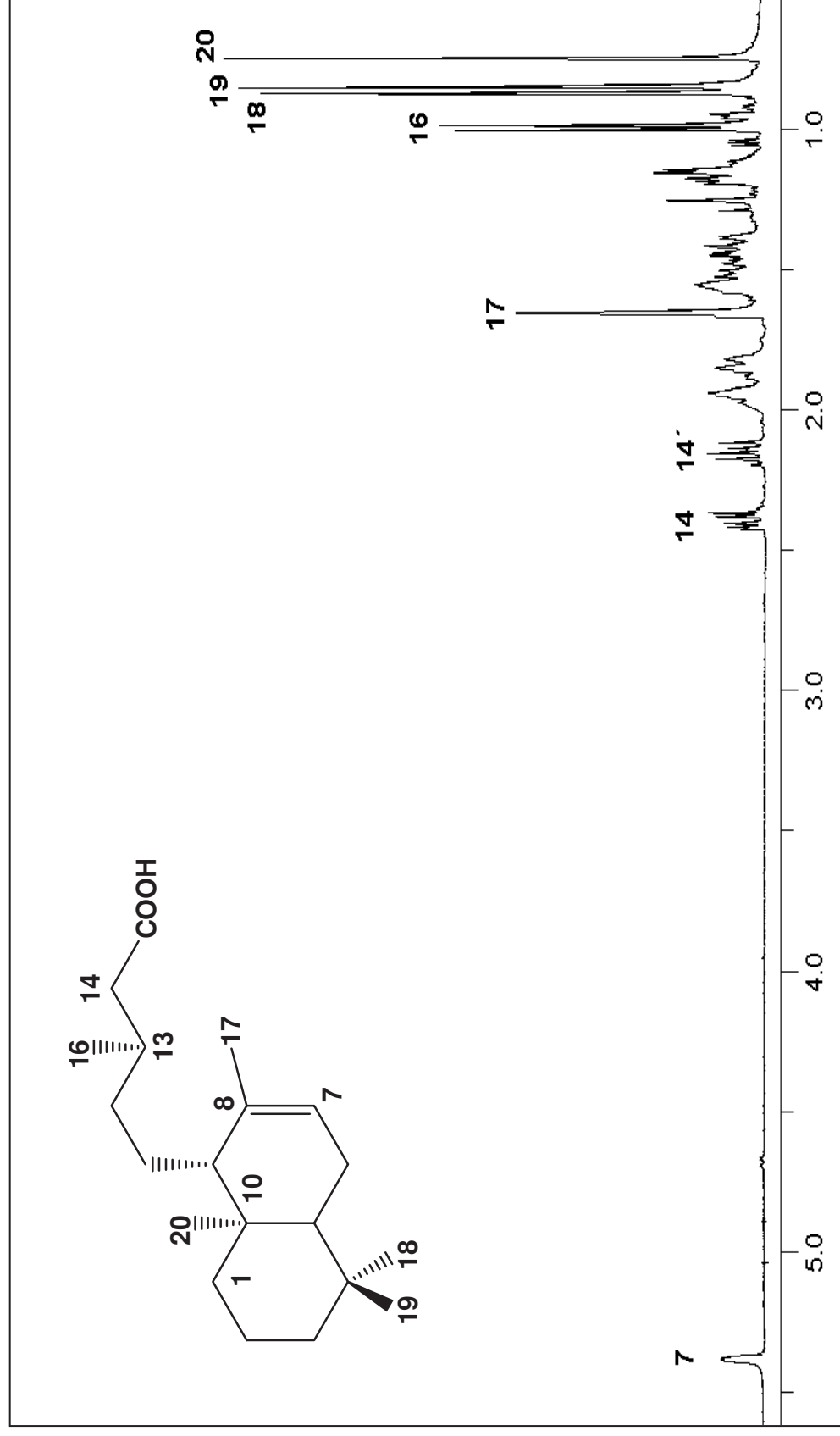


Fig.15: Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del Ácido catívico.

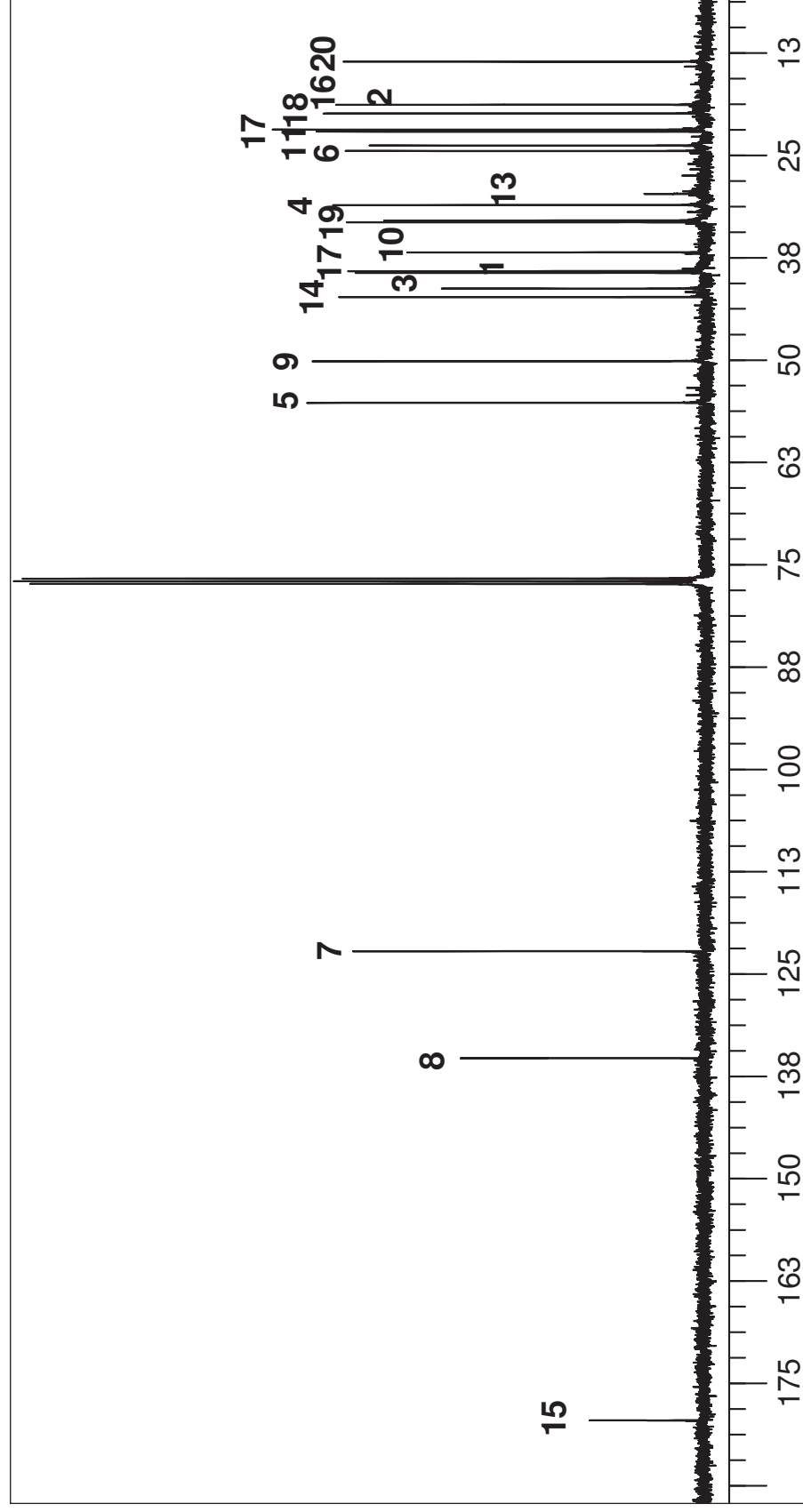


Fig.16: Espectro de RMN ^{13}C Ácido catívico.

El espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C (Fig.16) presentó 20 señales, lo que nos indicó que se trataba de un compuesto diterpénico, en 179.51 ppm se observó una señal correspondiente carbonilo del ácido carboxílico, en 135.26 y 122.20 ppm se observaron las señales correspondientes a un doble enlace en las posiciones 8 y 7. La asignación del resto de las señales se realizó mediante el experimento DEPT y HETCOR.

El experimento COSY (correlación homonuclear) figura 17 sirve para identificar hidrógenos vecinos por lo tanto algunas asignaciones fueron realizadas en base a este experimento.

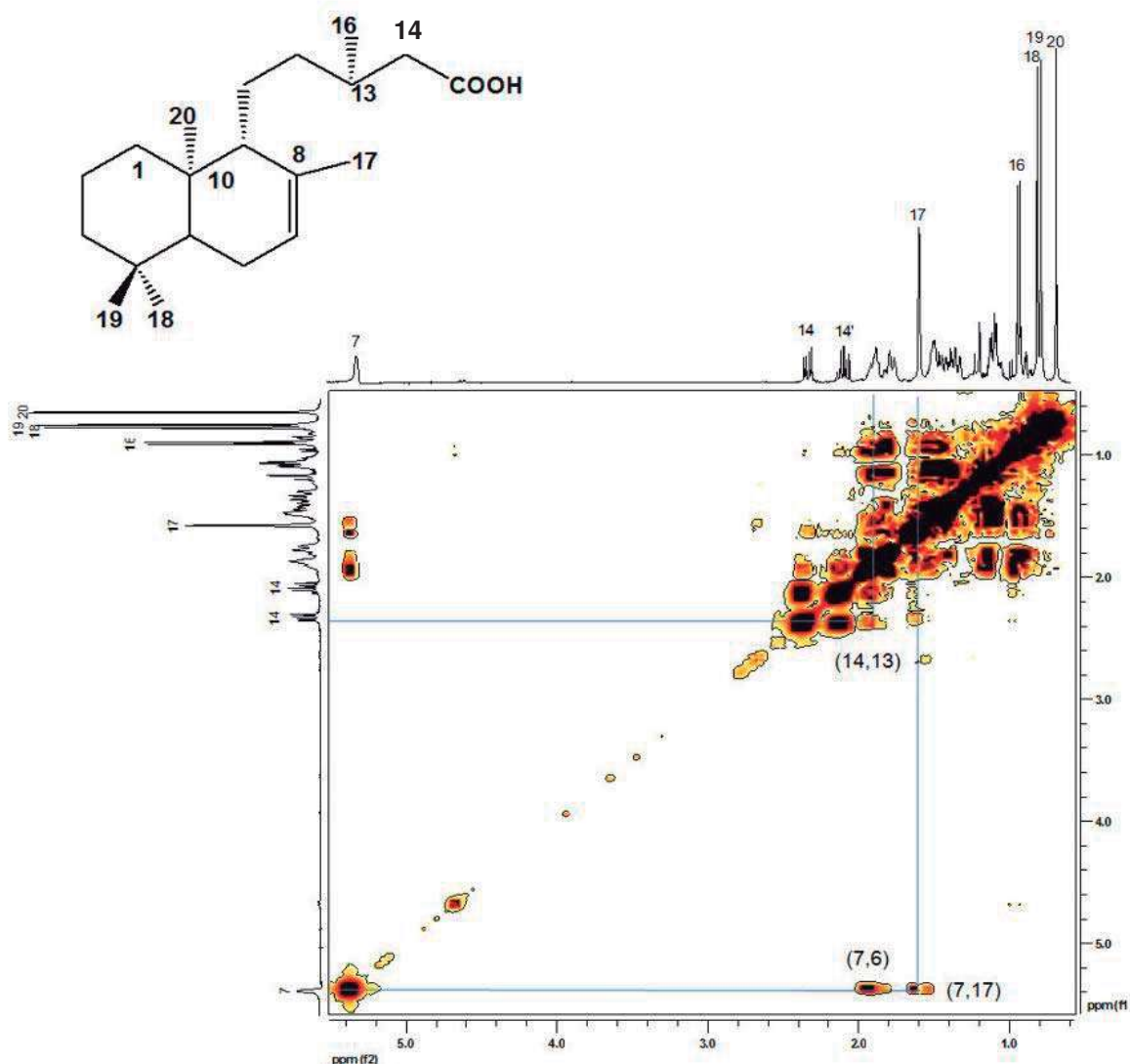


Fig.17: Experimento de correlación homonuclear (COSY) del Ácido catívico.

La señal en 5.38 ppm asignada para H-7 correlaciona con las señales en 1.92 y 1.63 ppm correspondientes a los protones H-6 y H-17. La señal en 2.39 ppm correspondiente al H-14' correlaciona con las señales en 2.39 y 1.95 ppm correspondientes a H-14 y H-13.

El espectro de RMN de ^{13}C fue asignado en base al experimento HETCOR (Fig.18): Así por ejemplo podemos ver que la señal en 0.74 ppm asignada a H-20 correlaciona con la señal en escala de carbono 13.14 ppm, por lo tanto esta señal corresponde a C-20. De la misma manera la señal en 5 ppm correspondiente a H-7 correlaciona con la señal en 121.78 ppm en escala de carbono por lo tanto esta señal se le asigna al C-7.

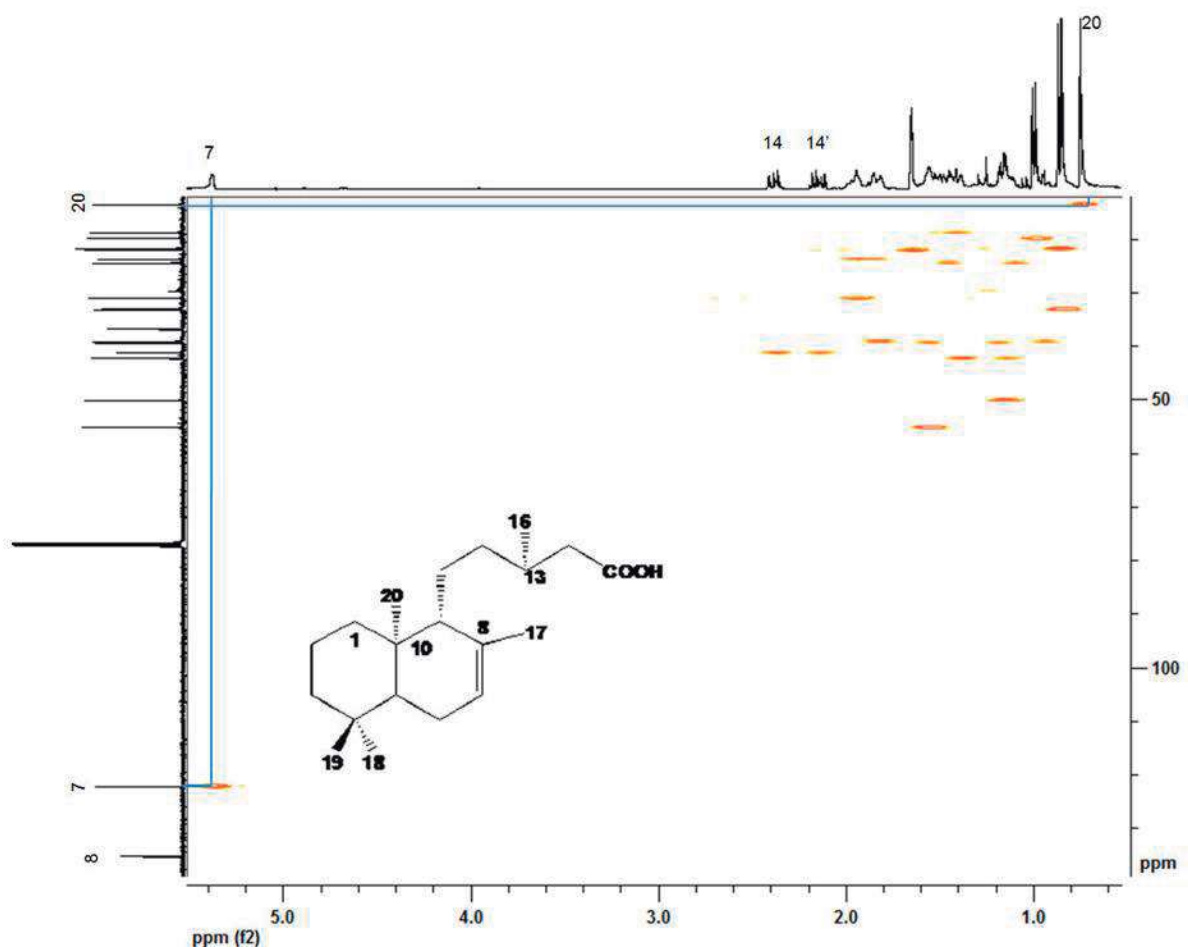


Fig.18: Experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) del Ácido catívico.

El ácido catívico fue aislado por primera vez de *Prioria capuifera*, Griseb en 1938⁴¹. Posteriormente se aisló de *Eperua falcata*, reportándose una actividad anti-fúngica por estos autores.⁴² También se ha logrado aislar de *Copaifera cearensis*.⁴³ Así como el bálsamo de *Copaifera langsdorfii* L. y la *Copaifera multijuga* Hayne utilizado para restauración de obras de arte.⁴⁴ Siendo esta la primera vez que se aisla del género *Eupatorium*.

De las fracciones (102-165) eluidas con hexano-acetato de etilo 75:25 se obtuvo un aceite incoloro que por análisis por cromatografía de gases nos indicó que se trataba de un compuesto mayoritario con un tiempo de retención de 22.43 min.

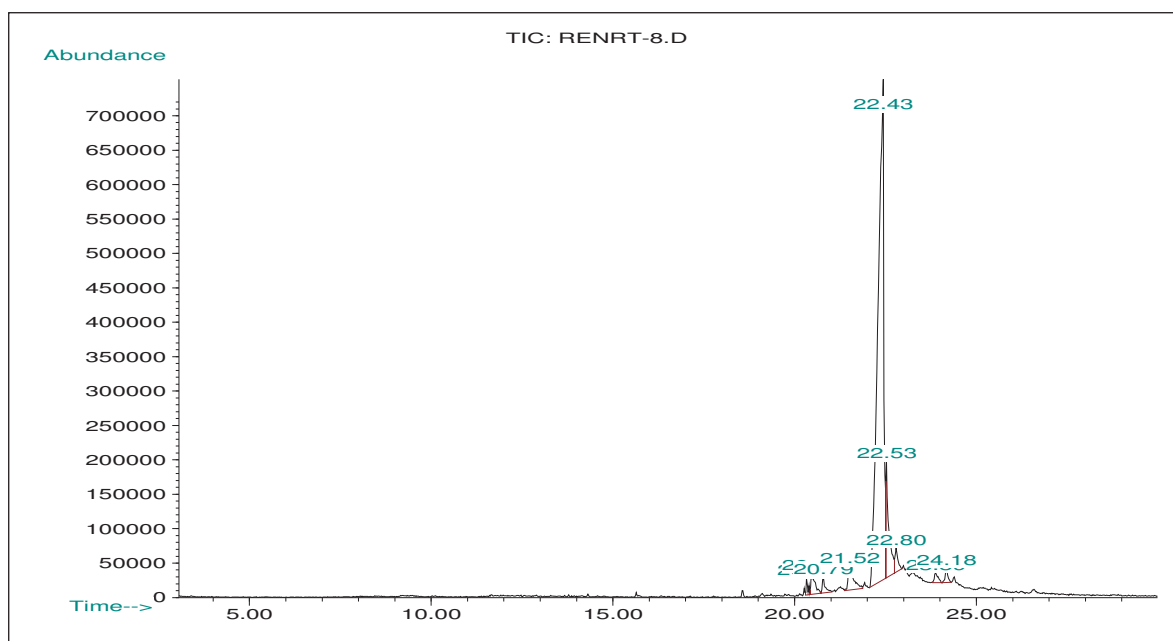


Fig.19: Cromatograma de gases de las fracciones 102-165.

El espectro de masas (Fig.20) del segundo compuesto mayoritario mostró un ión molecular de 324 uma correspondiente al $C_{20}H_{36}O_3$ y cuyo patrón de fragmentación al ser comparado con la base de datos nos indicó que se trataba

del ácido labdanólico; como se puede apreciar el ión molecular difiere en 18 unidades con respecto al ácido catívico lo que nos sugirió que se trataba de un compuesto de estructura muy parecida encontrándose se además una gran similitud en el espectro de masas.

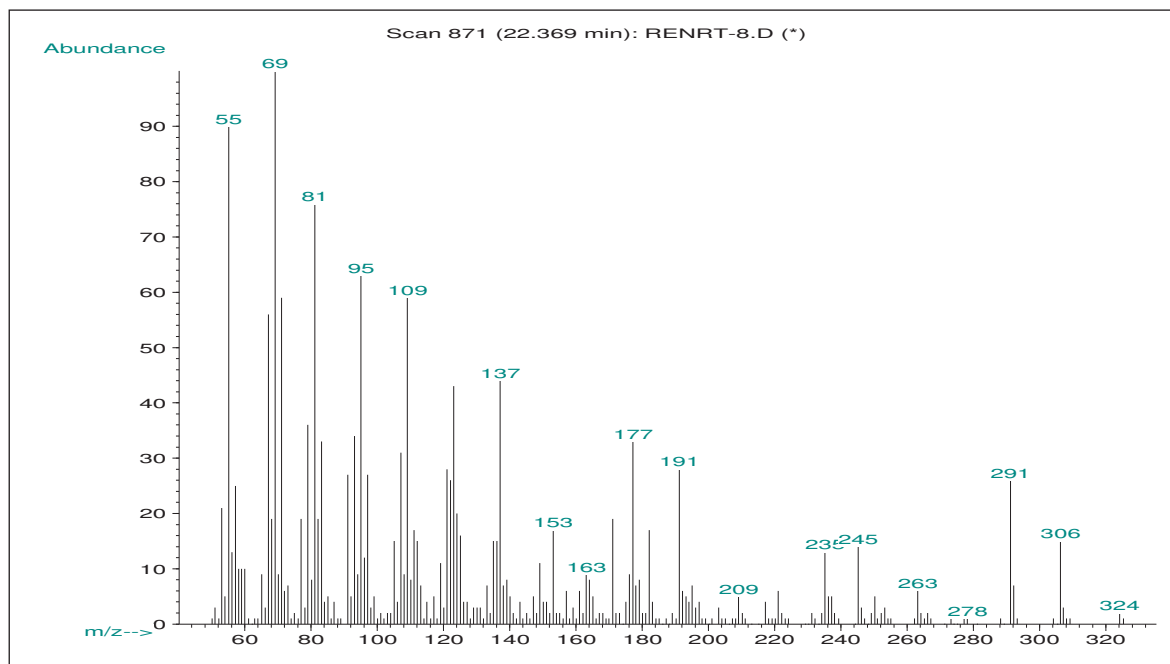


Fig. 20: Espectro de masas del Ácido Labdanólico.

El espectro de ^1H -RMN a 400 MHz (Fig.21) mostró un patrón de señales similares a las observadas en el ácido catívico, en 2.40 ppm una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de $J = 14.64$ y 6.60 Hz, en 2.14 ppm se observó una señal doble de dobles con constante de acoplamiento de $J = 14.64$ y 7.87 Hz señales correspondientes a los H 14 y 14', cabe menciona que no se observaron señales de protones vinílicos, por lo tanto la señal simple en 1.15 ppm correspondiente al metilo 17 se ve modificado en su desplazamiento químico. En 0.98 ppm se observó una señal doble que integra para tres hidrógenos correspondiente al metilo secundario 16, en 0.86 ppm se observó una señal simple correspondiente al metilo terciario 18, en 0.78 ppm se observa una señal simple que integra para 6 hidrógenos correspondientes a los metilos 19 y 20 que se encuentran sobrepuestos.

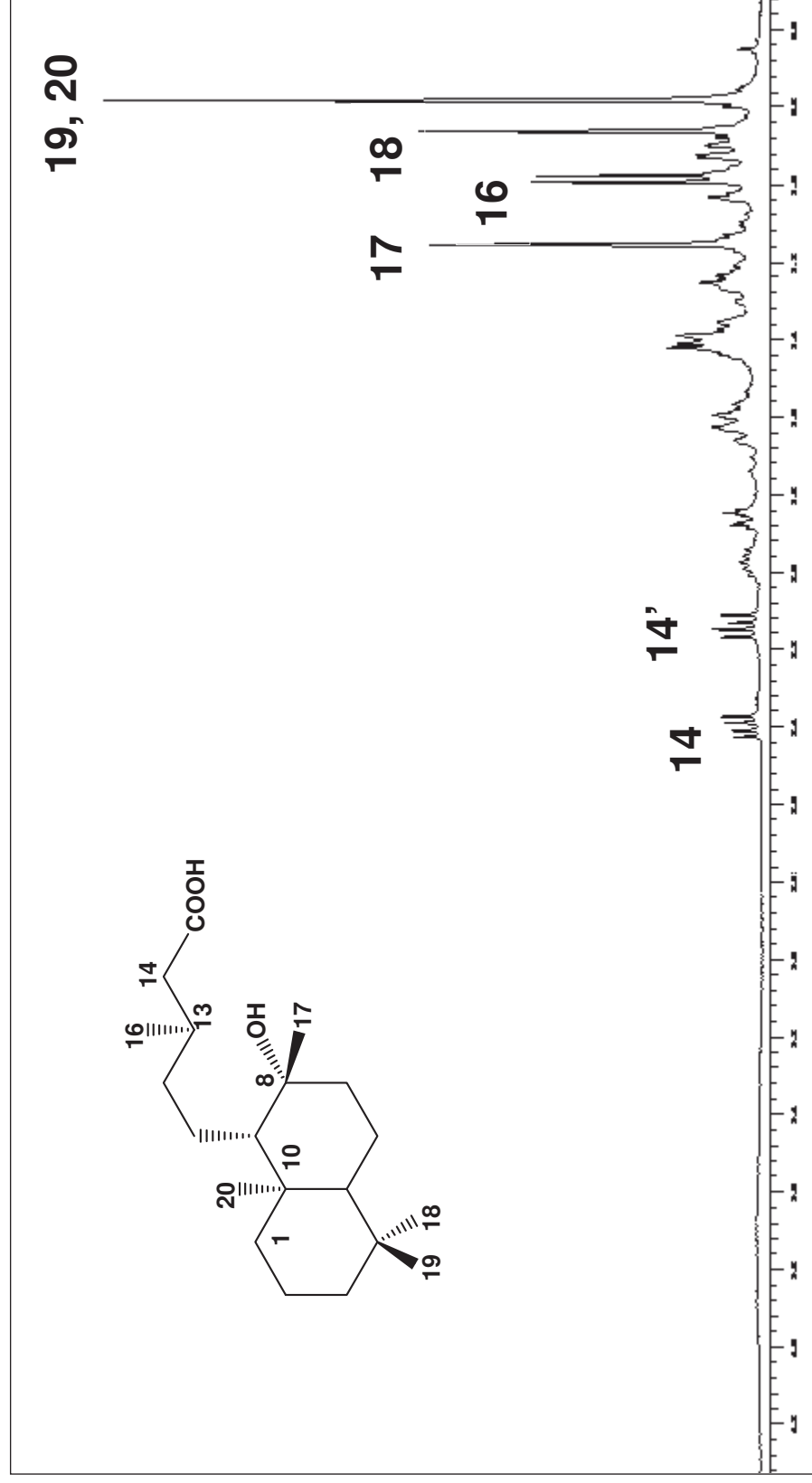


Fig.21: Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del Ácido labdanólico.

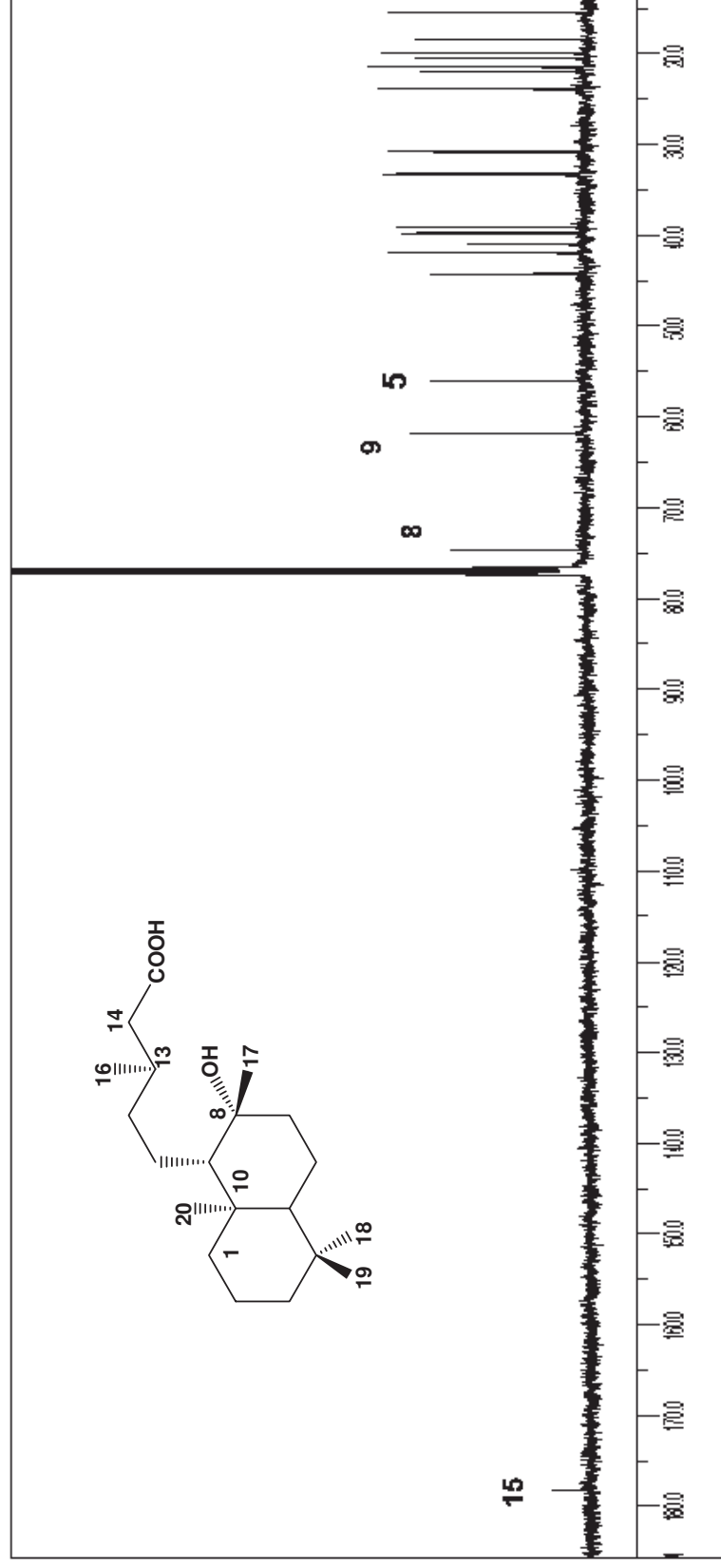


Fig.22: Espectro de RMN de ^{13}C del Ácido labdanónico.

El espectro de resonancia magnética nuclear ^{13}C (Fig.22) presentó 20 señales, lo que nos indicó que se trataba de un compuesto diterpénico, en 177.76 ppm se observó la señal correspondiente a la señal del ácido carboxílico, en 74.70 ppm se observó la señal de una carbono cuaternario base de oxígeno en el carbono 8.

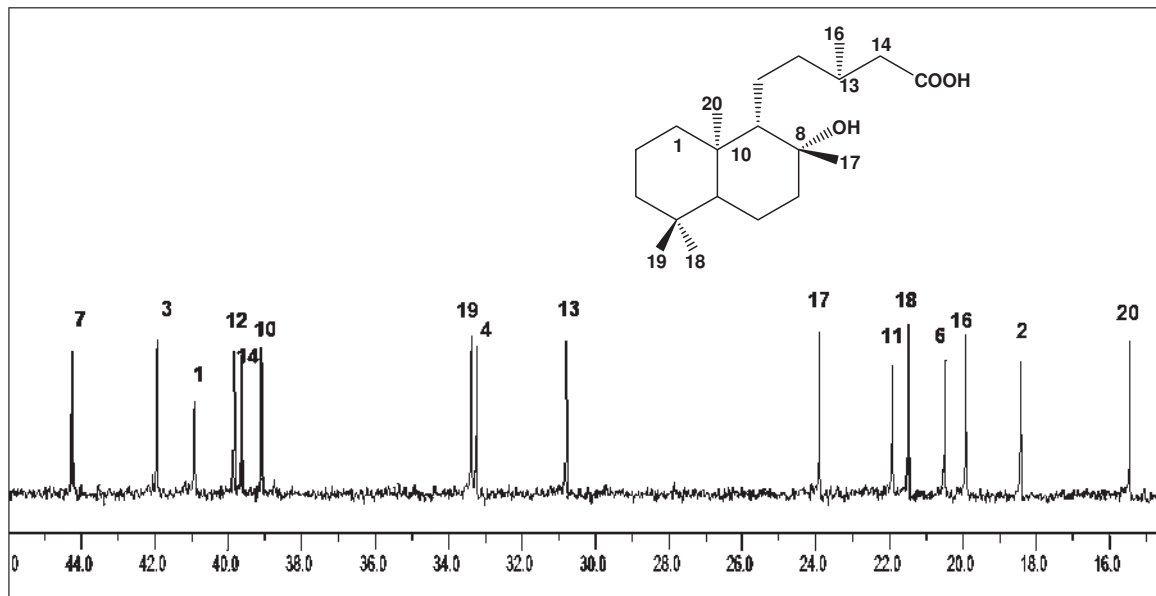


Fig.23: Expansión del espectro de ^{13}C de la zona alifática del Ácido labdanólico.

La asignación de señales de esta zona alifática se analizó primeramente mediante un experimento DEPT, el cual nos indicó la existencia de 5 CH_3 , 8 CH_2 , 3 CH y 4 C . El experimento de correlación heteronuclear fue de gran utilidad para lograr la asignación total del espectro de ^{13}C .

Las asignaciones fueron realizadas en base al experimento COSY (Fig.24) como se puede observar la señal en 2.40 ppm correspondiente al protón H-14 correlaciona con la señal en 1.97 ppm correspondiente al protón H-13. Así mismo

la señal en 1.97 ppm del H-13 correlaciona con la señal 0.96 ppm correspondiente al protón H-16.

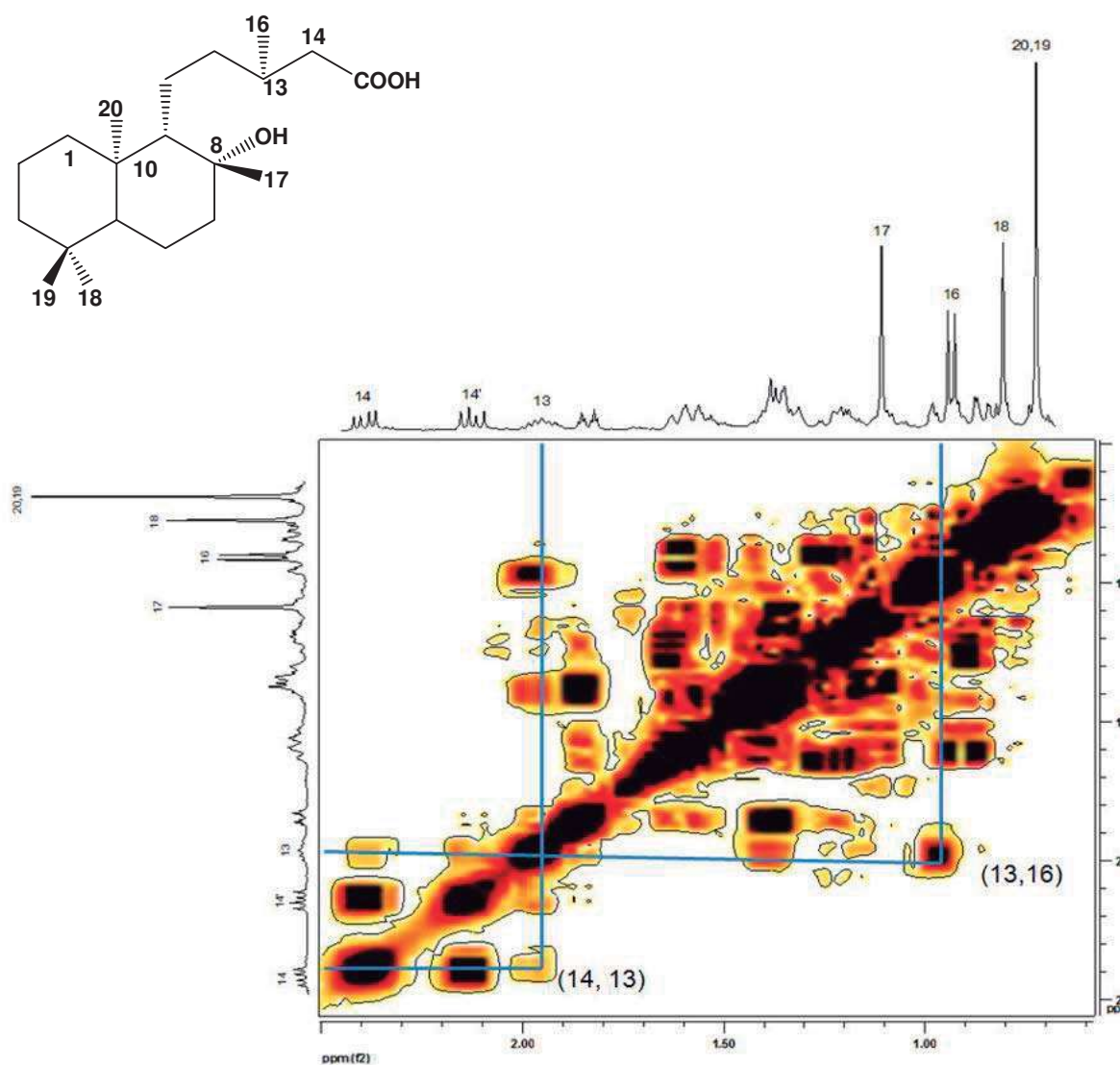


Fig.24: Experimento de correlación homonuclear (COSY) del Ácido labdanólico

El espectro de RMN de ^{13}C fue asignado en base al experimento HETCOR (Fig.25). Así podemos ver que la señal en 0.76 ppm correspondiente a la señal sobrepuesta de los H-19 y 20 correlacionan con las señales 21.1 ppm y 15.16 ppm en la escala de carbono corresponden al C-19 y 20 respectivamente. Así mismo la señal en 1.97 ppm correspondiente al H-13 correlaciona con la señal 30.55 ppm del escala de carbono a la cual se le asigna el C-13.

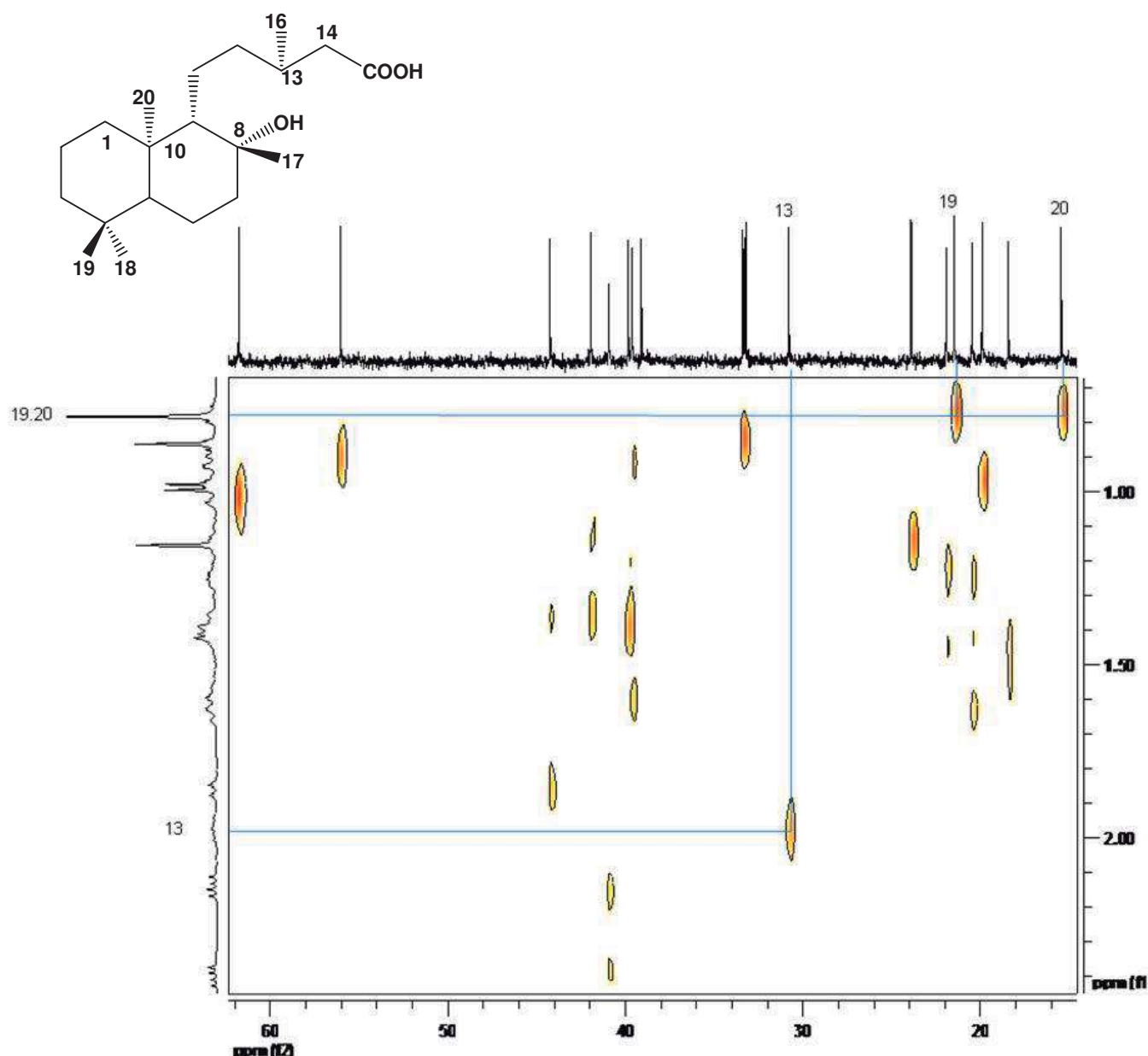


Fig.25: Experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) del Ácido labdanólico.

El ácido labdanólico ha sido aislado de las siguientes especies: *Copaifera cearensis*; ⁴³ *Espeletiopsis muisca*⁴⁵; *Cistus paliniae*; ⁴⁶ y de *Cistus symphytifolius*.⁴⁷ Esta es la primera vez que se aísla del género *Eupatorium*.

El ácido labdanólico es ampliamente utilizado para la obtención de Ambrox® mismo que es utilizado como una fuente de fijadores en la perfumería así como en la restauración de obras de arte⁴⁸ y en la terapéutica como promotor en la síntesis celular de colágeno base,⁴⁹ la obtención de este derivado el género *Eupatorium* promete ser una buena fuente.

Eupatorium petiolare

Ageratina petiolaris o *Eupatorium petiolare* (Fig.26) es un arbusto de 2 m de altura; con tallos leñosos; hojas opuestas con borde crenado-dentado, lanceoladas, 3-5 nervaduras; flores de 35-40 corola de 4-5 mm de largo, blancas, glabras, cerdas blanco-rosadas.¹⁹



Fig. 26: *Ageratina petiolaris*.

Un lote de 115 g de flor de *Ageratina petiolaris* o *Eupatorium petiolare*, colectada en el kilómetro 51 de la carretera Morelia-Zacápu colectada el 22 de abril del 2007 previamente secada a la sombra, se sometieron a maceración a temperatura ambiente con 3 litros de hexano, durante 8 días por tres veces. Transcurrido éste tiempo se filtraron y concentraron a sequedad en el rotavapor. El residuo fue resuspendido en metanol, para eliminar las grasas.

El extracto hexánico fue analizado por resonancia magnética nuclear de hidrógeno, para observar la naturaleza y abundancia de los componentes; detectándose una mezcla de compuestos tipo terpenoide. 1g del extracto desengrasado fue purificado por cromatografía en columna, se colectaron fracciones de 10 ml, las fracciones (27-40) eluídas con hexano-acetato de etilo 9:1 correspondieron al ácido 2 α -isovaleroxieperúico. El espectro de ^1H -RMN a 400 MHz (Fig. 27) mostró una señal múltiple en 5.20 ppm correspondiente al H-2, se observó en 4.86 y 4.50 ppm dos señales simples anchas correspondientes a los hidrógenos H-17 y H-17' del metileno exocíclico; se observó en 0.87 ppm una señal simple que integra para 3 hidrógenos correspondientes al metilo 20. En 0.91 ppm se observó una señal doble con una constante de acoplamiento de $J = 6$ Hz que corresponde al metilo 16, en 0.95 ppm se observó una señal simple correspondiente al metilo 19, en 1.00 ppm se observó una señal simple correspondiente al metilo 18, en 0.94 ppm se observa una señal doble con una constante de acoplamiento de $J = 6$ Hz que integra para 6 hidrógenos correspondiente a un isopropil.

La identificación del compuesto se logró comparación de los datos reportados en la literatura.⁵⁰

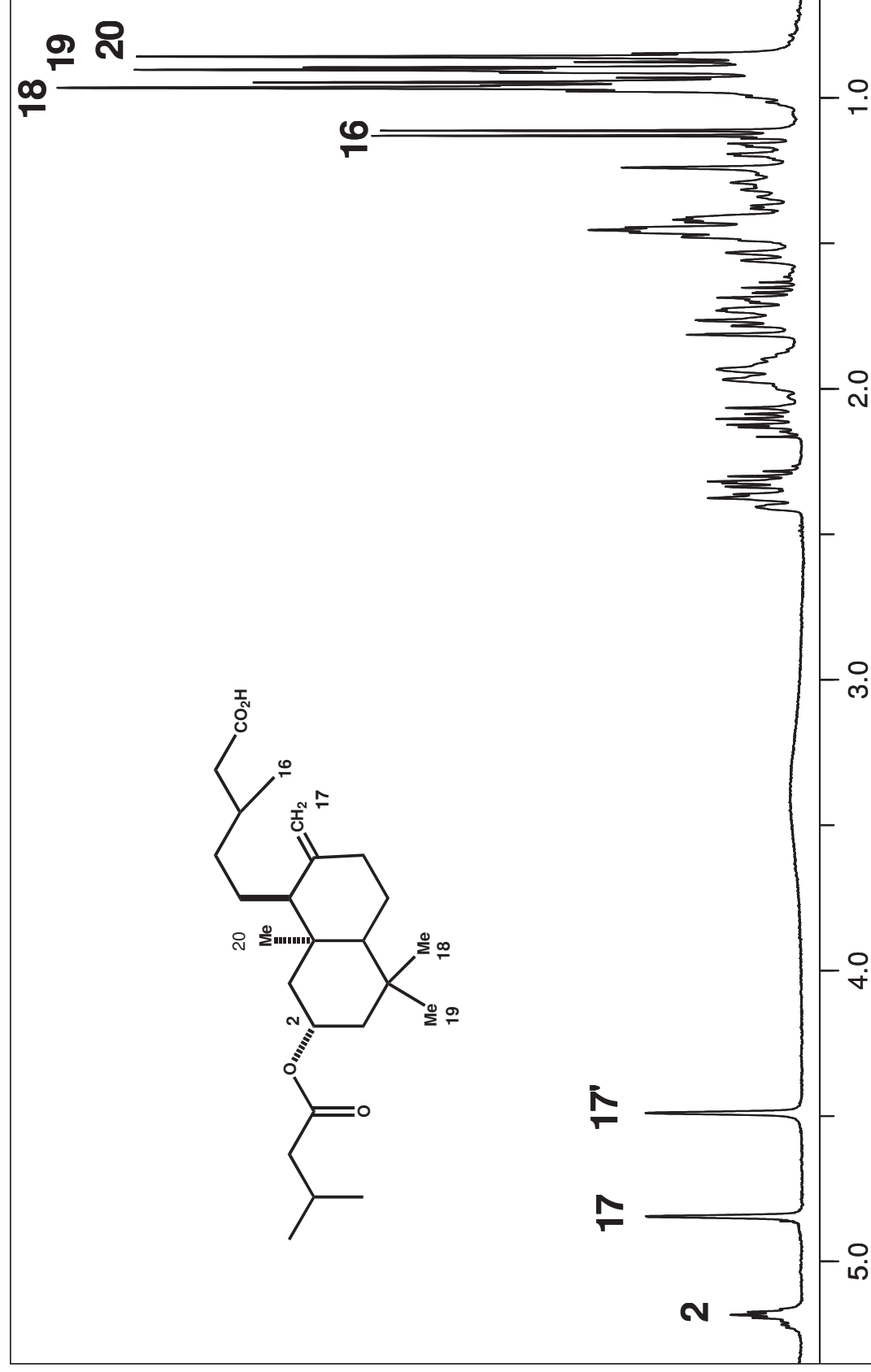


Fig. 27: Espectro de RMN ¹H del Ácido 2α-isovaleroxiperúico.

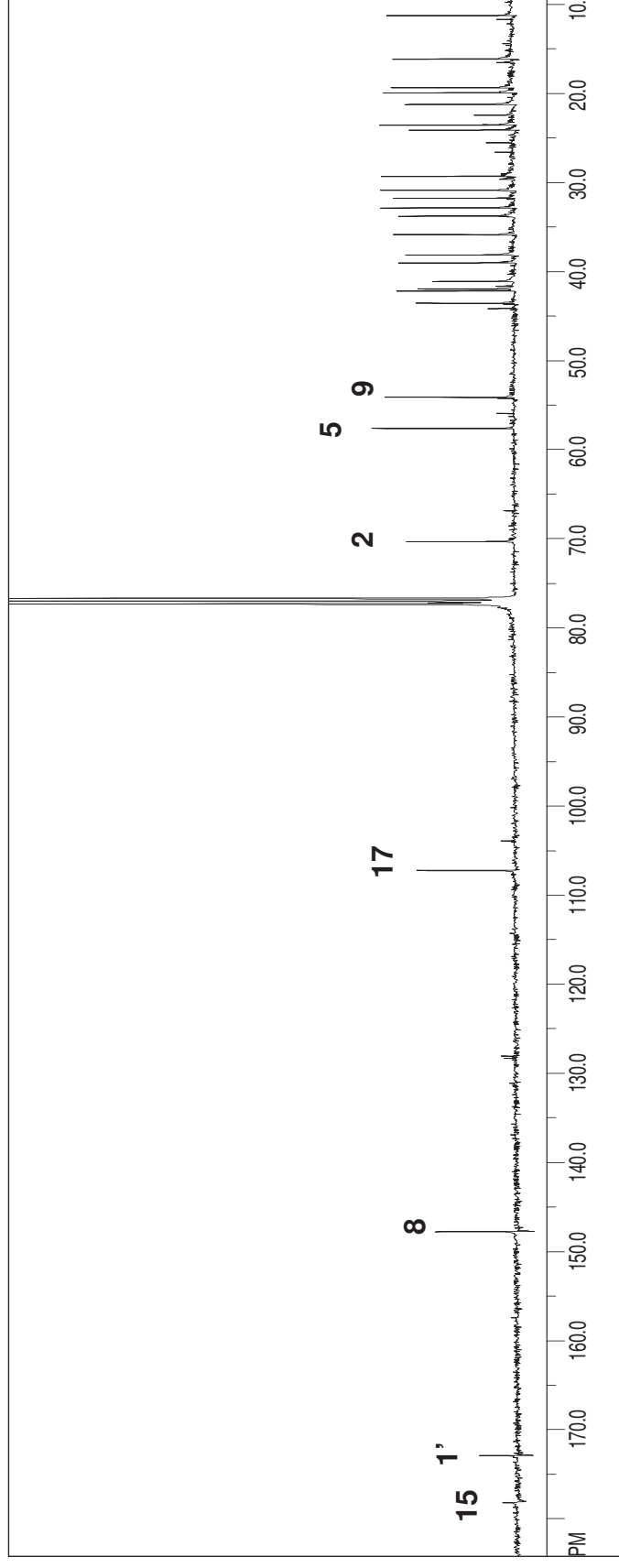
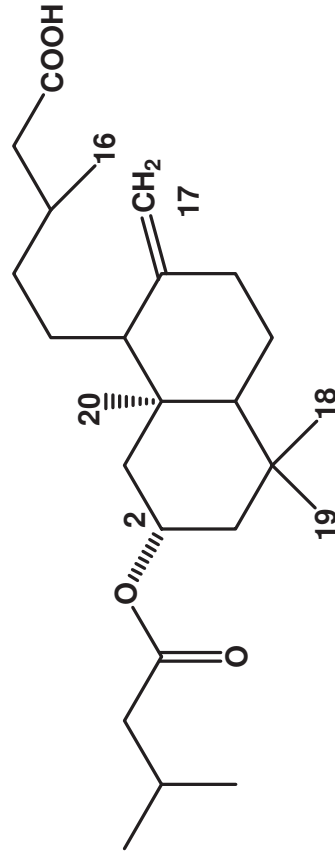


Fig.28: Espectro de RMN de ¹³C del Ácido 2α-isovaleroxiperúico.

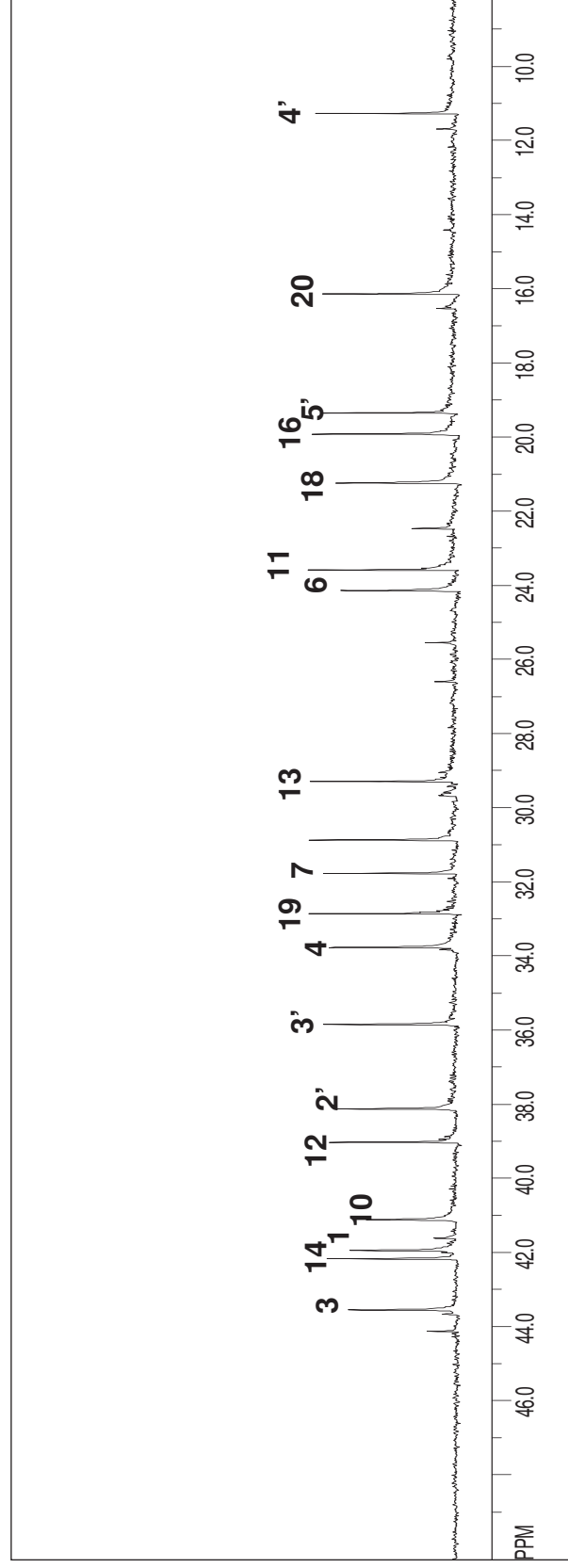
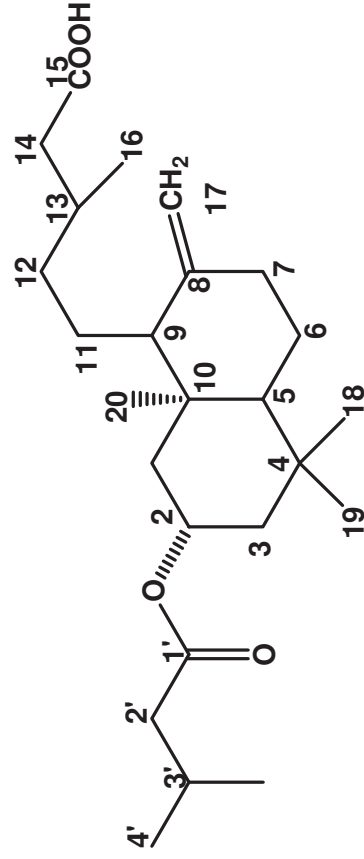


Fig. 29: Expansión del espectro de RMN de ¹³C del Ácido 2α-isovaleroxiperoácido.

PARTE EXPERIMENTAL

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz, así como los diagramas bi-dimensional de correlación $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ (HETCOR), $^1\text{H}/^1\text{H}$ (COSY) se determinaron en un aparato Varian Mercury Plus-400. En todas las determinaciones se utilizó como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3) y como referencia se utilizó tetrametisilano (TMS).

Los espectros de Masas se llevaron a cabo en un Cromatógrafo de Gases HP 5890 series II Plus, acoplado a un espectrómetro de Masas HP 5989-B.

Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer 16F PC FT-IR utilizando como disolvente cloroformo.

Para las separaciones cromatográficas se utilizó sílica gel 60-230 mallas, utilizando como fase móvil diferentes diluciones hexano-acetato de etilo a distintas proporciones.

Aislamiento del Ácido catívico y Ácido labdanólico

Un lote de 240 g de flor de *E. cardiophyllum* colectada el 22 de Febrero del 2006 en el kilómetro 51 de la carretera Morelia-Zacapu, previamente secada a la sombra, se sometieron a maceración a temperatura ambiente con 3 litros hexano, durante 8 días por tres veces. Transcurrido éste tiempo se filtraron y concentraron a sequedad en el rotavapor. El residuo fue resuspendido en metanol, para eliminar las grasas, filtrándose y evaporándose a sequedad quedando 12g de extracto puro poco denso de color ámbar.

Del extracto hexánico de flor se tomó 1 gramo para someterlo a una separación cromatográfica en columna utilizándose 30g sílica gel 60-230 mallas, una columna de vidrio de 3 cm de diámetro, como fase móvil para el empacamiento se utilizó hexano.

Una vez aplicado el gramo del extracto se inició la elusión en orden creciente de polaridad, utilizándose como disolventes hexano, acetato de etilo y mezcla de estos en distintas proporciones. Se colectaron fracciones de 10ml cada una.



Fig. 30: Cromatografía en columna

De las fracciones eluidas con Hexano-AcOEt 90:10 se obtuvo un sólido ligeramente amarillo. Del análisis espectroscópico se pudo identificar que correspondía al ácido catívico.

Ácido catívico. Sólido ligeramente amarillo. $[\alpha]_D^{25} = +9.7$ ($c = 0.11$, EtOH). IR $\nu_{\text{máx}} = 3014$ (OH), 1706 (C=O), 1208 (C-O). EMIE m/z 306 $[M^+]$ (18), 291 (16), 191 (44), 182 (80), 122 (84), 109 (100), 95 (62), 81 (50), 69 (55), 55 (84). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5.38 (1H, s.a, H-7), 2.39 (1H, d.d, $J = 15.01$ Hz, $J = 5.86$ Hz, H-14), 2.15 (1H, d.d, $J = 15.01$ Hz, $J = 8.42$ Hz, H-14'), 1.65 (3H, s.a, H-17), 0.99 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-16), 0.87 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, s, H-19), 0.75 (3H, s, H-20). ^{13}C -RMN (100 MHz CDCl_3) δ 179.51 (C, C-15), 135 (C, C-8), 122.20 (CH, C-7), 55.20 (CH, C-5), 50.13 (CH, C-9), 42.29 (CH_2 , C-14), 41.26 (CH_2 , C-3), 39.33 (CH_2 , C-17), 39.12 (CH_2 , C-1), 36.83 (C, C-10), 33.15 (CH_3 , C-19), 32.94 (C, C-4), 31.05 (CH,

C-13), 24.45 (CH₂, C-6), 23.79 (CH₂, C-11), 22.08 (CH₃, C-17), 21.84 (CH₃, C-18), 19.87 (CH₃, C-16), 18.79 (CH₂, C-2), 13.53 (CH₃, C-20).

De las fracciones(102-165) eluidas con Hexano-AcOEt 75:25 se obtuvo aceite ligeramente amarillo. Del análisis espectroscópico se pudo identificar que correspondía al ácido labdanolico.

Aceite ligeramente amarillo. $[\alpha]_D^{25} = +22$ EMIE m/z 324 [M⁺] (2), 306 (16), 291 (24), 191 (29), 177 (35), 153 (17), 137 (44), ²⁴123 (44), 109 (60), 81 (77), 69 (100), 55 (90). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 2.40 (1H, d.d, $J=14.64$ Hz, $J= 6.60$ Hz, H-14), 2.14 (1H, d.d, $J =14.64$ Hz, $J=7.87$ Hz, H-14'), 1.15 (3H, s, H-17), 0.98 (3H, d, $J= 6.5$ Hz, H-16), 0.86 (3H, s, H-18), 0.78 (6H, s, H-19-20). ¹³C-RMN (100 MHz CDCl₃) δ 177.76 (C, C-15), 74.70 (C, C-8), 61.74 (CH, C-9), 56.04 (CH, C-5), 44.22 (CH₂, C-7), 41.92 (CH₂, C-3), 40.84 (CH₂, C-1), 39.77 (CH₂, C-12), 39.63 (CH₂, C-14), 39.10 (C, C-10), 33.37 (CH₃, C-19), 33.22 (C, C-4), 30.75 (CH, C-13), 23.89 (CH₃, C-17), 21.85 (CH₂, C-11), 21.47 (CH₃, C-18), 20.47 (CH₂, C-6), 19.89 (CH₃, C-16), 18.42 (CH₂, C-2), 15.45 (CH₃, C-20).

Aislamiento del Ácido 2 α -isovaleroxieperúico

Un lote de 115 g de flor de *Ageratina petiolaris*, colectada en el kilómetro 51 de la carretera Morelia-Zacápu colectada el 22 de abril del 2007 previamente secada a la sombra, se sometieron a maceración a temperatura ambiente con 3 litros de hexano, durante 8 días por tres veces. Transcurrido éste tiempo se filtraron y concentraron a sequedad en el rotavapor. El residuo fue resuspendido en metanol, para eliminar las grasas filtrándose y evaporándose a sequedad quedando 9g de extracto puro.

Del extracto hexánico de flor se tomó 1 gramo para someterlo a una separación cromatográfica en columna utilizándose 30g sílica gel 60-230 mallas,

una columna de vidrio de 3 cm de diámetro, como fase móvil para el empacamiento se utilizó hexano.

Ácido 2 α -isovaleroxieperúico. Aceite incoloro. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5.20 (1H, m, H-2), 4.86 (3H, s.a, H-17), 4.50 (3H, s.a, H-17'), 0.87 (3H, s, H-20), 0.91 (3H, d, J= 6 Hz, H-16), 0.95 (3H, s, H-19), 1.00 (3H, s, H-18), 0.94 (6H, d, J= 6 Hz H-isopropil). RMN ^{13}C , 178.14(C, C-15), 172.90 (C, C-1'), 147.17(C, C-8), 107.24(CH_2 , C-17), 70.32(CH, C-2), 57.63(CH, C-5), 54.12(CH, C-9), 43.56(CH_2 , C-3), 42.18(CH_2 , C-14), 41.96(CH_2 , C-1), 41.13(C, C-10), 39.03(CH_2 , C-12), 38.13(CH, C-2'), 35.86(CH, C-3'), 33.78 (C, C-4), 32.86 (CH_3 , C-19), 31.78(CH_2 , C-7), 30.88 (CH_2 , C-13), 24.16(CH_2 , C-6), 23.60(CH_2 , C-11), 21.25 (CH_3 , C-18), 19.93(CH_3 , C-16), 19.34(CH_3 , C-5'), 16.15(CH_3 , C-20), 11.28 (CH_3 , C-4').

Mezcla (ml)		Volumen (ml)
Hexano	Acetato de etilo	
100	0	100
95	5	200
90	10	200
85	15	200
80	20	200
75	25	200
70	30	100
65	35	100
60	40	100
55	45	100
50	50	50
40	60	50
30	70	50
20	80	50
10	90	50
0	100	50

Tabla 1.- Mezclas de disolventes utilizados en la cromatografía en columna de *E. cardiophyllum*.

CONCLUSIONES

Del extracto hexánico de flor de *Eupatorium cardiophyllum* se aislaron dos diterpenos los cuales mediante procedimientos cromatográficos se lograron separar y purificar los cuales correspondieron al ácido catívico y ácido labdanólico. Se caracterizaron en base a sus datos físicos y espectroscópicos por comparación con los datos reportados en la literatura.

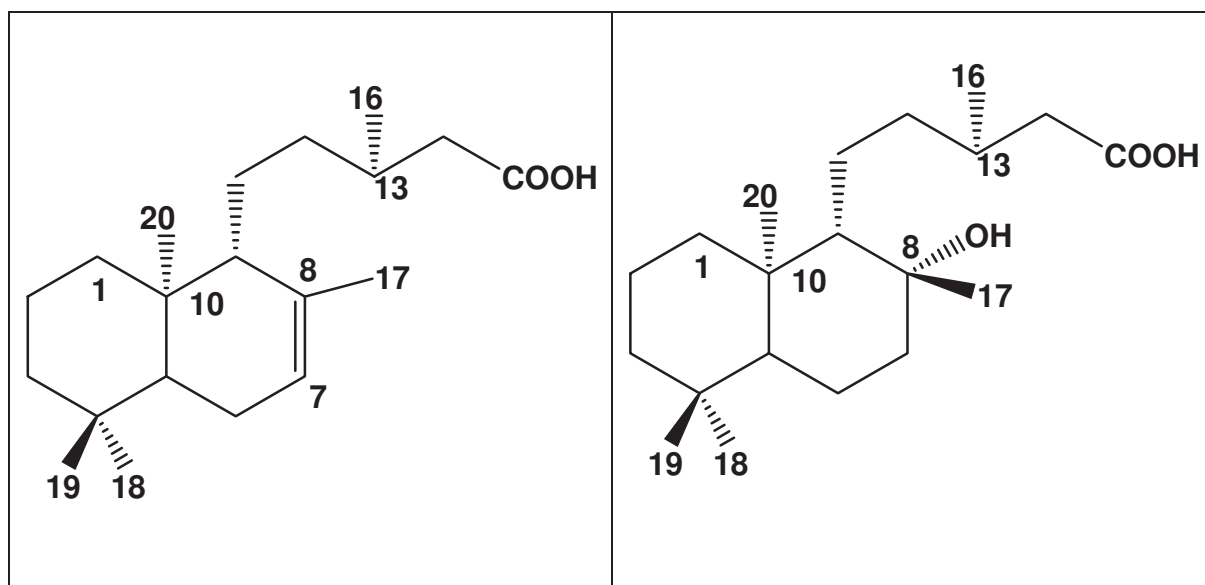


Fig. 31: Ácido catívico

Ácido labdanólico

Este es el primer estudio químico que se reporta de *E. cardiophyllum*. Siendo la primera vez que estos compuestos se aíslan de género *Eupatorium*, ya que anteriormente se habían aislados de otros géneros como son *Eperua*, y *Copaifera*, *Prioria*.

Del extracto hexánico de flor de *Euparotium petiolare* (*Ageratina petiolaris*) se aisló un compuesto de tipo diterpeno que mediante procedimientos cromatográficos se logró separa y purificar, el cual correspondió al ácido 2 α -isovarexieperuico. Se caracterizó en base a sus datos espectroscópicos por comparación con los reportados en la literatura.

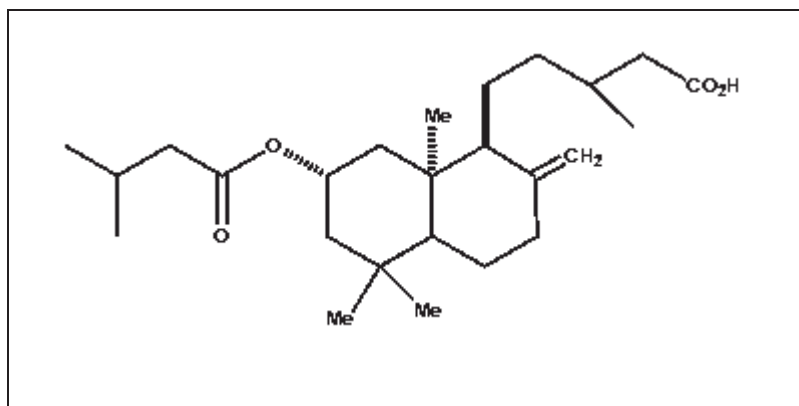


Fig. 32: Ácido 2 α -isovaleroxieperúico

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Treviño C.; Estudios sobre Etnobotánica y Antropología Médica. Instituto Mexicano para el estudio de las Plantas Medicinales (1997).
- 2.- García M.; Pérez L.; *Revista de Chapingo*. **9** 5-10 (2003).
- 3.-El-Seedi, h. R; Ohara, T; Sata, N; Nishiyama, S. *J. Ethnopharmacol.* **81**, 293-296, (2002).
- 4.- Wiedenfeld, H.; Guerrero, R.; y Roeder, E. *Planta Med.* **61**, 380-381 (1995).
- 5.- EN LÍNEA [<http://www.um.es/bbmbi/Docencia/Antioxidantes/2007-11-13-AntioxidantesNaturales-DistribucionBiosintesis.pdf>] 200908.
- 6.- EN LÍNEA [<http://mail.fq.edu.uy/~planta/Cursos/teorico%20terpenos%202007,%20tema%2012.pdf>] 200908.
- 7.- EN LÍNEA [<http://www.ugr.es/~quiorred/pnatu/terpenoides.htm>]200908.
- 8.- EN LÍNEA [<http://www.maca-peruana.com/analisis.htm>] 2109080
- 9.- Urzúa A., Rezende M., Mascayano y Vásquez. *Molecules*, **13**, 882-891 (2008).
- 10.- Tojo E.; Rial M. E.; Urzúa A.; Mendoza L.; *Phytochemistry*. **52**, 1531-1533, (1999).
- 11.- Mendoza L.; Tapia L.; Wilkens M.; Urzúa A. *Bol. Soc. Chil. Quím.* **47**, 91-98, (2002).
- 12.- Aranda F.J.; Villalalín J.; *Biochim. Biophys.* **1327**, 281-289, (1997).

- 13.- Matsingou C.; Hatzuantonio S.; Geirgopoulos A.; Dimas K.; Terzis A.; Demetzos C.; *Chem. Phys Lipids*. 138, 1-11, (2005).
- 14.-Ammon, H. P., y Miüller, A. B., *Planta Med.*, **6**, 473-477, (1985).
- 15.- Bucheler R, Gleiter CH, Schwoerer P, Gaether I. *Pharmacopsyehiatry*; **38**, 1-5 (2005).
- 16.- Ulubelen A, oksuz S, Topeu G, Goren AC, Voelter W. *J Nat. Prod.* **64**, 549-551 (2001).
17. - Wani M.C.; Taylor H.L.; Wall M.E.; *J.Am. Chem. Soc.* **93**, 2325-27, (1971).
- 18.- Lee S. O.; Choi S. Z; Choi S.U.; Lee K. C.; Chin Y. W.; Kim J.; Kim Y. C.; Lee K. R.; *J. Nat. Prod.* **68**, 1471-1474 (2005).
- 19.- Rzedowski G. y Rzedowski J.; Flora Fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A. C. CONABIO (2005).
- 20.- Torrenegra R., Guzmán A. y Rodríguez O., *Scientia et Technica*, **33**, 271-273 (2007).
- 21.- King R. y Robinson H, *Phytología*, **20**, 196-209 (1970).
- 22.- King, R. M; Robinson, H, ; *The Heneran of the Eupatoriae (Asteraceae) Monographs in Sistemic Botany, Missouri Botanical garden; US*; **22**, 65 (1987).
- 23.- Albuquerque M. R. J. R.; Pires A. M. L.; Pessoa O. D. L.; Silveira E. R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **17**, 68-72 (2006).
- 24.- El-Seedi HR, Sata N, Torssell KB and Nishiyama S. *J. Nat. Prod.* (2002) **65**: 728-9

- 25.- Katinas, L.; Gutiérrez, D.G.; Grossi, M. A.; *Bol. Soc. Argent. Bot.* **42** (1-2): 113-129 (2007).
- 26.- El-Seedi HR, Sata N, Torssell KB and Nishiyama S. *Journal of Ethnopharmacology.* **81**, 293-296, (2002).
- 27.- Vega M.R.; De Carvalho M. G.; Viera I. J.; Filho R. Braz.; *J. Nat. Med.* **62**, 122-123, (2008).
- 28.- Zhang M.L.; Wu M.; Zhang J. J.; Irwin D.; Gu, Y. C.; Shi Q. W.; *Chemistry & Biodiversity.* **5**(1), 40-55, (2008).
29. - Xu W.; Patente CN 101209337. (2008).
- 30.- Ye M; Ye Z.; Ye Z.; Patente CN 101199811. (2008).
- 31.- Yin K.; Patente CN 101129682. (2008).
32. Yu L.; Patente CN 101142926. (2008).
- 33.- Ji L. L.; Luo, Y. M.; Yam. G. L.; *Food Control.* **19**, 995-1001. (2008).
34. - Gorzalczany, S; Mushietti, L; Kartin, L; Ferraro, G; *Pharmacologyonline.* **1**, 139-147, (2008).
35. - Devi L.; Reena; Singh, Th Shyamkeshor; Laitonjam W. S.; *Indian Journal of Chemistry.* **46B** (11), 1868-1872, (2007).
36. - Belter R. K.; *Y-Not Chemical CO, Zachary, La, USA.* (2008).
- 37.- Hai-Xia, J.; Ya L.; Jing P. Y Kun G. *Helvetica. Chimica acta*, **89**, 558-566, (2006).
- 38.- Itoh T.; Ito Y.; Ohguchi K.; Ohyama M.; Linuma M., Otsuki Y.; Nozawa Y.; Akao Y. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* **16**(2), 721-731, (2008).

- 39.- He L.; Hou J.; Gan M.; Shi J.; Chantrapromma S.; Fun H.K., Williams L. D.; Sung H.; *J. Nat Prod.* **71**(8), 1485-1488, (2008).
- 40.- Tori M.; Morishita N.; Hirota N.; y col.; *Chemical & Pharmaceutica Bulletin* . **56**(5), 677-681, (2008).
41. - Kalman N. V.; *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 1423 (1938).
42. - Amusant N.; Moretti C.; Richard B.; Prost E.; Nuzillard J. M.; Thevenon M. F.; *Holz als Roh-und Werkstoff* . **65**(1), 23-28, (2007).
- 43.- Pinto A.; Braga W.; Rezende C.; Garrid F.; y col.; *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 1201, (1957).
44. - Van der Werf I. D.; Van den Berg K. J.; Schmitt S.; Boon J. J.; *Studies in Conservation*. **45**, 1-18, (2000).
45. Imamura, P. M.; Marsaioli, A. J.; Barata, L. E. S.; Rúveda, E. A. *Phytochemistry*. **1977**, 16, (1842)
- 46.- De Pascual T. J.; Urones J.G; Núñez L.; Basabe, P.; *Phytochemistry*. **22**(12), 20805-8 (1983).
- 47.- Calabuig M.T.; Cortes M.; Francisco, C. G; Hernández, R.; Suarez, E.; *Phytochemistry*. **20**(9), 2255-8, (1981).
- 48.- Castro J.; Salido S.; Altarejos J.; Nogueras M.; Sanchez A.; *Tetrahedron*. **58**, 54941-5949, (2002).
49. - Yamamoto T.; Yamamoto, K.; *Fr. Demande*. 30 (2004).
- 50.- Calderon J.S.; Quijano L.; Garduno M.; Gómez F.; Ríos T.; 2 α -iso-Valeroxyeperuic acid, a diterpene from *Eupatorium petiolare*. *Phytochemistry*. **22** (11), 2617-19 (1983).