



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



Facultad de Químico Farmacobiología

**“Estudio Químico Preliminar del Extracto Hexánico de Hojas de *Perymenium
buphthalmoides*”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACOBIOLOGA**

PRESENTA

ANA LIZ MENDOZA VILLEGAS

ASESORES

DQ. Mario Armando Gómez Hurtado

QFB. Ana Karen Villagómez Guzmán

Morelia, Michoacán, Abril del 2016

DEDICATORIA

La presente investigación 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 dirección del DQ. Mario Armando Gómez Hurtado y la QFB. Ana Karen Villagómez Guzmán, con apoyo económico de la CIC-UMSNH.

AGRADECIMIENTOS

Índice

Abreviaturas, símbolos y acrónimos	i
Resumen	iii
Abstract.....	iv
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1. Familia Asteraceae.....	4
2.2. Género <i>Perymenium</i>	5
2.2.1. Clasificación botánica	5
2.2.2. Localización geográfica	5
2.2.3. Descripción botánica.....	8
2.3. Análisis químicos reportados de especies del género <i>Perymenium</i>	9
2.4. <i>Perymenium buphthalmoides</i> D.C.....	12
2.5. Descripción botánica de <i>Perymenium buphthalmoides</i>	13
3. Justificación	15
4. Objetivos	16
4.1. Objetivo general.....	16
4.2. Objetivos específicos	16
5. Metodología experimental	17
6. Resultados y discusión	18
6.1. Colecta e identificación de la especie vegetal	18
6.2. Tratamiento vegetal	18
6.3. Análisis químico del extracto hexánico de hoja.....	18
7. Conclusiones	36
8. Metodología experimental	37
8.1. Material vegetal	37
8.2. Obtención de extractos.....	37
8.3. Resonancia magnética nuclear (RMN), Espectrometría de Masa	37
8.4. Análisis químico	37
8.5. Cromatografía en capa fina impregnada con solución de AgNO ₃	37
9. Bibliografía	42

Abreviaturas, símbolos y acrónimos

ATP	Trifosfato de adenosina
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
MVA	Ácido Mevalónico
MEP	Metil Eritritol Fosfato
IPP	Difosfato de Isopentilo
DMAPP	Difosfato de Dimetilalilo
GPP	Difosfato de Geranilo
FPP	Difosfato de Farnesilo
GGPP	Difosfato de Geranilgeranilo
ppm	Partes por millón
AcOEt	Acetato de Etilo
cm	Centímetros
g	Gramos
COSY	CORrelated SpectroscopY
d	Señal doble
da	Señal doble ancha
Dd	Señal doble de dobles
dda	Señal doble de dobles ancha
dt	Señal doble de triples
HETCOR	HETeronuclear CORrelation
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m	Señal múltiple

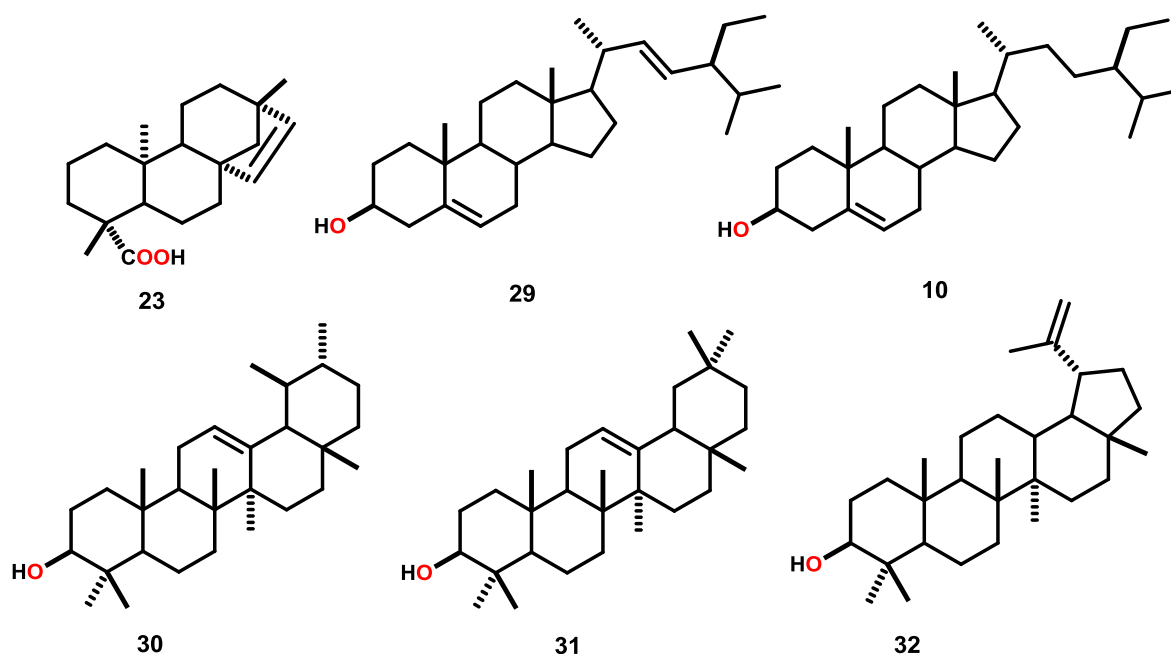
mg	Miligramos
mL	Mililitros
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN de ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN de ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$	Rotación específica
δ	Desplazamiento químico en ppm
ϕ	Diámetro

Resumen

El género *Perymenium* es un taxón que incluye mayormente especies endémicas de México, distribuidas desde el noroeste de México hasta Perú. Hasta el año 2011 se reconocieron 50 especies para este género concentrando en México su principal centro de diversidad con 44 especies, de las cuales, la mayoría aún no han sido analizadas química o biológicamente.

La especie *Perymenium buphthalmoides* cuenta con un estudio químico preliminar del extracto de raíz realizado por nuestro grupo de trabajo, en el cual se reporta la presencia de compuestos de interés biológico, por lo que resulta de interés realizar un estudio químico preliminar que contribuya con datos a la quimiotaxonomía de este género y de esta especie.

En la siguiente investigación se describe el aislamiento y caracterización del ácido beyerenoico (**23**), estigmasterol (**29**), β -sitosterol (**10**), α -amirina (**30**), β -amirina (**31**) y el lupeol (**32**) a partir del extracto hexánico de hojas de *Perymenium buphthalmoides*.



Los compuestos fueron caracterizados por sus datos físicos y por RMN de ^1H y ^{13}C así como en experimentos en 2D.

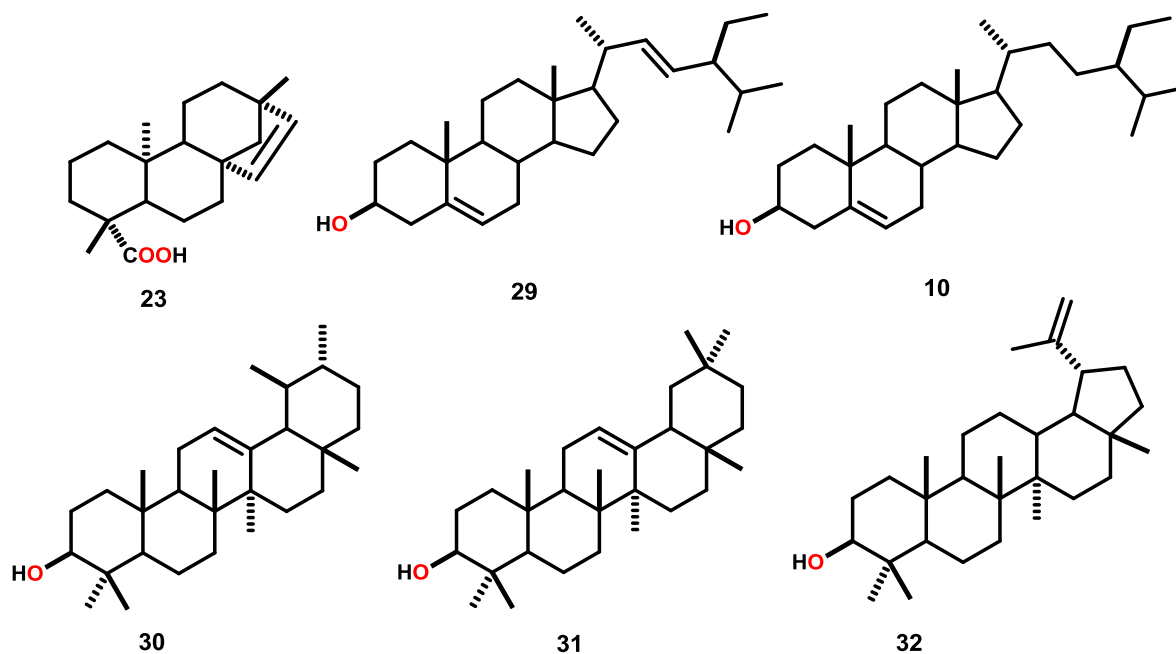
Palabras clave: *Perymenium buphthalmoides*, Heliantheae, terpeno, Asteraceae, ácido beyerenoico.

Abstract

The genus *Perymenium* is a taxon that includes mostly endemic species from Mexico, which are distributed from northwestern Mexico to Peru. Until 2011, 50 species were recognized for this genus, and its main center of diversity is Mexico with 44 species, most of them have not been chemical or biologically analyzed.

The roots of *Perymenium bupthalmoides* has a preliminary chemical study made by our working group, in which the presence of biologically active compounds was demonstrated. Due to this, is interesting to conduct a preliminary chemical study of leaves from *P. bupthalmoides* that contributes to chemotaxonomy data of this genus and species.

In this investigation the isolation, purification and characterization of beyerenoic acid (**23**), stigmasterol (**29**), β -sitosterol (**10**), α -amyrin (**30**), β -amyrin (**31**) and lupeol (**32**) from hexanic extract obtained of the leaves of *Perymenium bupthalmoides* are described.



The isolated compounds were characterized by 1D and 2D NMR.

Keywords: *Perymenium bupthalmoides*, Heliantheae, terpene, Asteraceae, beyerenoic acid.

1. Introducción

Todos los organismos vivos necesitan transformar e interconvertir un vasto número de compuestos orgánicos para poder vivir, crecer y reproducirse. Las especies vegetales son organismos altamente eficientes en la síntesis de compuestos orgánicos a partir de fuentes inorgánicas mediante la vía fotosintética, mientras que otros organismos tales como los animales y microorganismos obtienen los nutrientes a través de la dieta.

Las moléculas crucialmente importantes para la vida se dividen en hidratos de carbono, proteínas, grasas y ácidos nucleicos. A pesar de las muy variadas características de los organismos vivos, las vías para modificar y sintetizar estas moléculas parecen ser esencialmente las mismas en todos los organismos. Estos procesos demuestran la unidad fundamental de toda la materia viva, y se describen colectivamente como metabolismo primario y los compuestos que intervienen en él se denominan metabolitos primarios.

En contraste con estas rutas metabólicas primarias, también existe un área que se refiere a compuestos que tienen una distribución mucho más limitada en la naturaleza, los denominados metabolitos secundarios, que se encuentran en organismos más específicos.

Los bloques de construcción para estos metabolitos derivan del metabolismo primario y de sus procesos metabólicos fundamentales, los cuales darán origen a los compuestos intermediarios biosintéticos como acetil-CoA, ácido shikímico, ácido mevalónico y metil eritritol fosfato; con frecuencia se emplean otros bloques de construcción a base de aminoácidos para la síntesis de péptidos, proteínas y alcaloides. Los componentes de estos se indican brevemente en la Figura 1.1 (Dewick 2009).

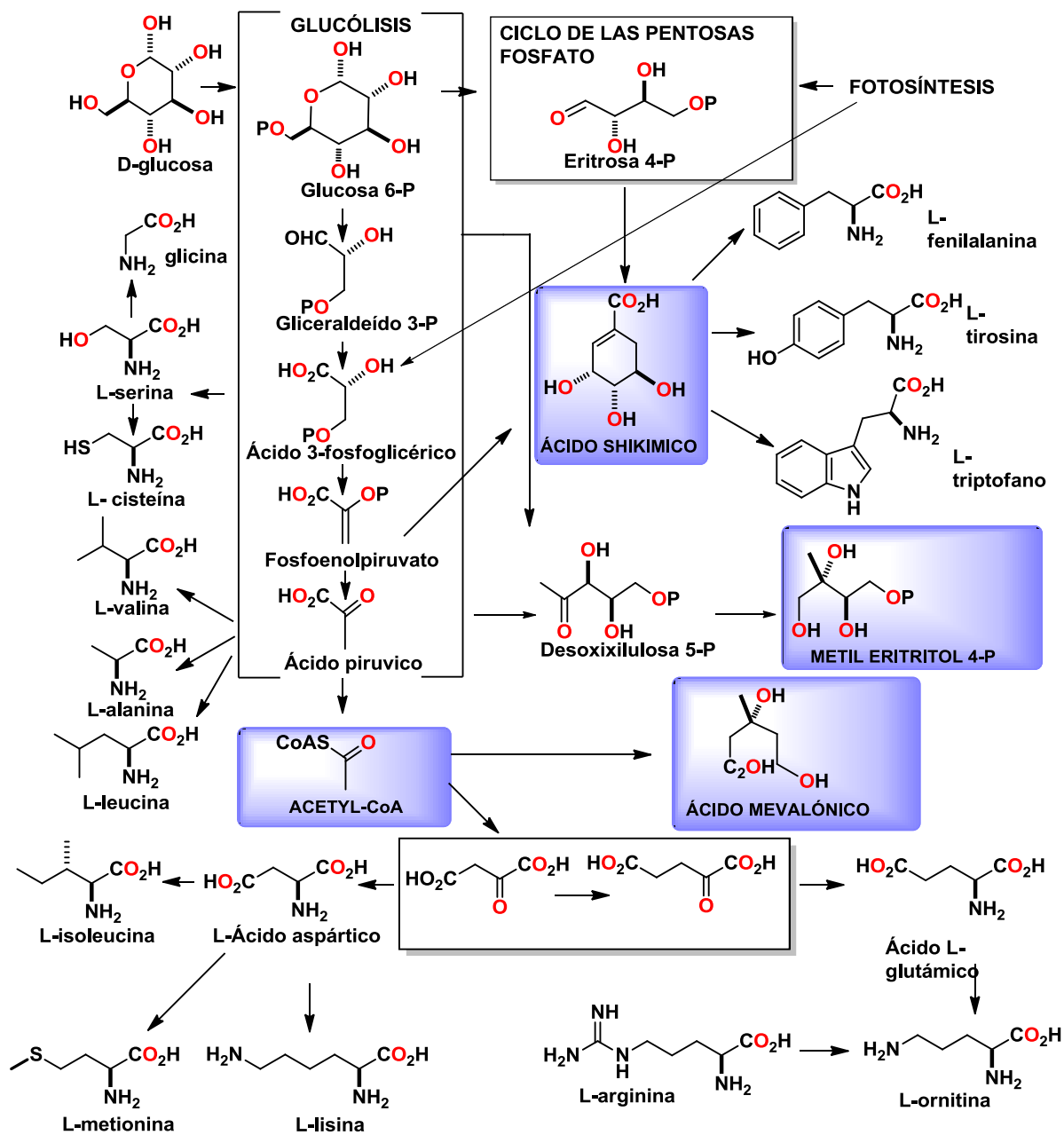


Figura. 1.1. Bloques de construcción para la síntesis de metabolitos secundarios (Dewick 2009).

De especial importancia es mencionar que los metabolitos secundarios no se encuentran en todos los grupos de plantas, se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada estando su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia o incluso a algunas especies (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

Para su estudio, los metabolitos secundarios se dividen en tres grandes grupos:

✚ Terpenos

✚ Fenoles

✚ Alcaloides

Las denominaciones genéricas de “sustancias terpenicas”, “terpenoides” o simplemente “terpenos” son aplicadas a una extensa gama de productos naturales que está formada por ciertos hidrocarburos y sus derivados oxigenados (González 1991), y se clasifican en base a las unidades de isopreno (C_5) que contiene su estructura, Tabla 1.1 (Marcano & Hasegawa, 2002).

Tabla 1.1. Clasificación de terpenos.

Terpenos	Unidades de isopreno	Número de carbonos
Monoterpenos	2	C_{10}
Sesquiterpenos	3	C_{15}
Diterpenos	4	C_{20}
Sesterterpenos	5	C_{25}
Triterpenos	6	C_{30}
Tetraterpenos	8	C_{40}
Politerpenos	Más de 8	Más de C_{40}

Algunas actividades importantes de los terpenos dentro de las especies vegetales es como mensajeros, atrayentes, disuasivos, fitoalexinas, entre otros. La labor biológica de los terpenos ha destacado y se pueden utilizar en el tratamiento contra enfermedades como el cáncer, malaria, inflamación y en diversas infecciones ocasionadas por virus y bacterias. Algunos terpenoides importantes clínicamente son el paclitaxel (1) y la artemisinina los cuales son usados para combatir el cáncer y la malaria, respectivamente (2) Figura 1.2 (Ding *et al.*, 2012).

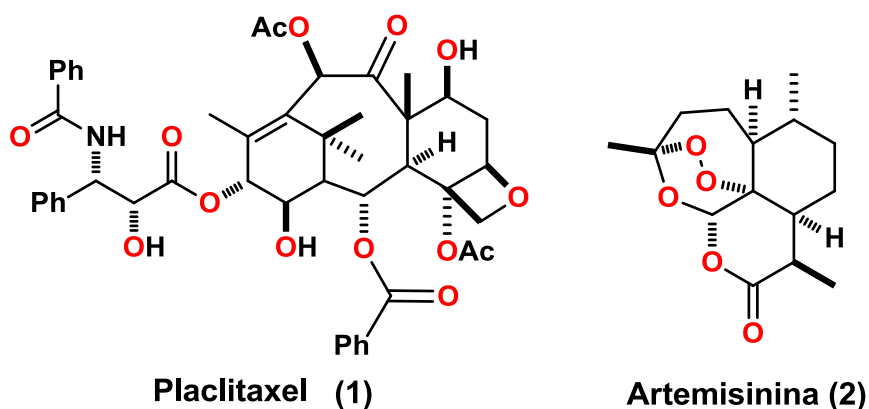


Figura 1.2. Terpenoides de interés biológico.

Debido a las aplicaciones potenciales de los metabolitos secundarios, se vuelve pertinente llevar a cabo estudios químicos en especies vegetales.

2. Antecedentes

2.1. Familia Asteraceae

La familia Asteraceae o Compositae, constituye el grupo vegetal más diverso de plantas vasculares sobre el planeta (Smith *et al.*, 2004); su distribución es prácticamente cosmopolita y es una de las familias más comunes en la mayor parte de los habitats (Rzedowski, 1972); representa un grupo natural con un número elevado de especies y amplia variación (Funk *et al.*, 2005). Sus miembros son fácilmente reconocidos por sus inflorescencias dispuestas en capítulos, flores gamopétalas y por lo general pentámeras, cáliz modificado en un vilano, estambres singenesios y el ovario inferior bicarpelar que deriva en una cipsela (Villaseñor, 1993; Bremer, 1994).

En el mundo se estiman entre 1,500 y 1,700 géneros y entre 24,000 y 30,000 especies de la familia Asteraceae. México es uno de los principales centros de diversidad (Katinas *et al.*, 2007; Funk *et al.*, 2009) donde se estiman unos 373 géneros y 3,080 especies nativas y más de 29 géneros introducidos (Redonda & Villaseñor, 2011); representando entre el 12-15% de la flora vascular Mexicana, donde los estados de Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Jalisco y Michoacán cuentan con el 46% del total de la población de especies de esta familia y el 72% de especies endémicas (Villaseñor, 2003).

La familia Asteraceae es dividida por tribus, donde la Heliantheae es una de las más numerosas con aproximadamente 2,500 especies, agrupadas en 189 géneros (Novora & Gutiérrez, 2010). La distribución de esta tribu se concentra en el continente americano y la mayoría de sus géneros se distribuyen en México, siendo este su principal centro de diversificación (Villaseñor & Hinojosa, 2011).

2.2. Género *Perymenium*

2.2.1. Clasificación botánica

El género *Perymenium* cuenta con las siguientes categorías taxonómicas:

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Perymenium</i>

2.2.2. Localización geográfica

El género *Perymenium* es un taxón que incluye mayormente especies endémicas de México, distribuidas desde el noroeste de México hasta Perú. Hasta el año 2011 se consideran 50 especies para este género concentrando en México su principal centro de diversidad con 44 especies, de las cuales la mayoría aún no han sido analizadas química o biológicamente Figura 2.2.2.1.

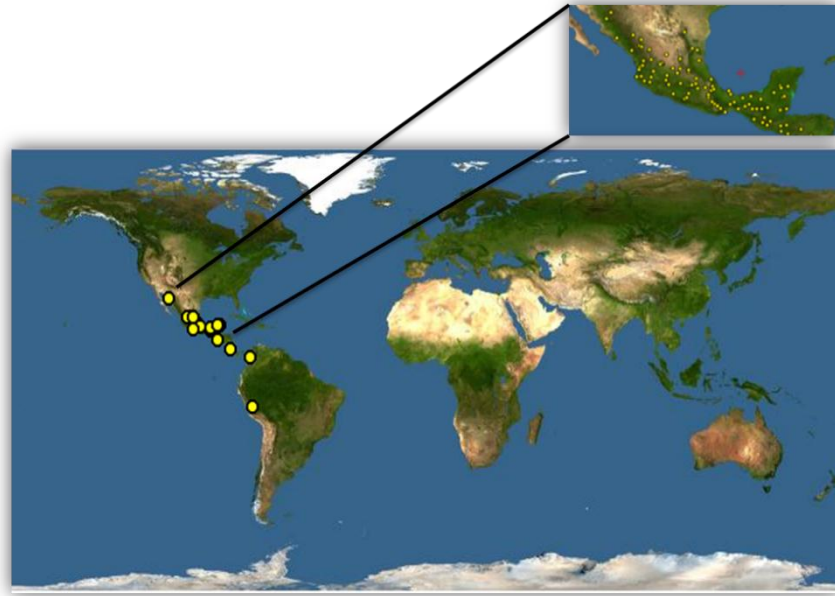


Figura 2.2.2.1. Distribución geográfica del género *Perymenium*.

Es fundamental indicar que el último trabajo de verificación del género *Perymenium* en México y Centroamérica fue elaborado por J. J. Fay en 1978, quien reconoció la presencia de 31 especies, de las cuales 5 resultaron ser nuevas, hasta el año 2011 se dieron a saber 13 novedades adicionales y siguen manifestándose otras de distribución geográfica muy restringida Tabla 2.2.2.1 (Rzedowski *et al.*, 2010, Rzedowski *et al.*, 2011, Robinson & Greenman, 1899, Pyramus, 1836).

Tabla 2.2.2.1. Especies aceptadas dentro del género *Perymenium*.

Espece	País	Espece	País	Espece	País
<i>P. arriagae</i>	México	<i>P. gymnomoides</i>	México	<i>P. rosei</i>	México
<i>P. asperifolium</i>	México	<i>P. hintonii</i>	México	<i>P. rude</i>	México
<i>P. barclayanum</i>	México	<i>P. ibarrarum</i>	México	<i>P. serratum</i>	Perú
<i>P. beckeri</i>	México	<i>P. jaliscense</i>	México	<i>P. sotoarenasii</i>	México
<i>P. berlandieri</i>	México	<i>P. klattianum</i>	México	<i>P. subsquarrosum</i>	México
<i>P. bupthalmoides</i>	México	<i>P. klattii</i>	Colombia	<i>P. tamaulipense</i>	México
<i>P. cervantesii</i>	México	<i>P. mendezii</i>	México	<i>P. tenellum</i>	México
<i>P. chalarolepis</i>	México	<i>P. microcephalum</i>	México	<i>P. verbesinoides</i>	México
<i>P. cornutum</i>	México	<i>P. microphyllum.</i>	México	<i>P. gymnomoides</i>	México
<i>P. croceum</i>	México	<i>P. moctezumae</i>	México	<i>P. hiesbrgeghtii</i>	México
<i>P. discolor</i>	México	<i>P. Nelsonii</i>	México	<i>P. matthewsii</i>	Perú
<i>P. ecuadoricum</i>	Ecuador	<i>P. ovalifolium</i>	México	<i>P. estrigillosum</i>	El salvador
<i>P. featherstonei</i>	Perú	<i>P. parvifolium</i>	México	<i>P. hintoniorum</i>	México
<i>P. ghiesbreghti</i>	México	<i>P. pellitum</i>	México	<i>P. paneroi</i>	México
<i>P. globosum</i>	México	<i>P. pringlei</i>	México	<i>P. basaseachicanum</i>	México
<i>P. gracile</i>	México	<i>P. reticulatum</i>	México	<i>P. oxycarphum</i>	México
<i>P. grande</i>	Guatemala	<i>P. rogmavaghii</i>	México		

2.2.3. Descripción botánica

Dentro del género *Perymenium* se concentran plantas herbáceas perennes o con más frecuencia arbustivas a veces arborescentes, algunas trepadoras; hojas opuestas, a menudo rasposas al tacto en el haz, por lo general trinervadas o triplinervadas; inflorescencias cimosas por lo común umbeliformes, corimbiformes o paniculiformes, en ocasiones las cabezuelas solitarias; estas heterógamas y radiadas; flores liguladas 8-13 por lo común fértiles (estériles en una especie), amarillas, sus corolas pentámeras, tubulosas amarillas anteras auriculadas en la base y provistas de vistosos apéndices terminales de color pálido, ramas de estilo aplanadas, puntiagudas y puberales hacia el ápice; aquenios de las flores periféricas triquetos, los del disco comprimidos, tetrágonos o biconvexos, en algunas especies todos provistos de alas laterales, vilano de 8 a 30 aristas delgadas, frágiles y caedizas de largo muy desigual, Figura 2.2.3.1 (Rzedowski *et al* 2011).



Perymenium grande



Perymenium featherstonei



Perymenium discolor

Figura 2.2.3.1. Especies del género *Perymenium*.

2.3. Análisis químicos reportados de especies del género *Perymenium*

La química del género *Perymenium* está constituida principalmente por terpenoides de tipo monoterpenos y sesquiterpenos (componentes de los aceites esenciales), cuyo análisis fue realizado por Ciccio y colaboradores evaluando a *Perymenium grande*, (Ciccio & Chaverri, 2012), en esta especie además se reporta la presencia de las lactonas sesquiterpénicas **3-5** (Murillo *et al.*, 2006). Adicionalmente, este tipo de compuestos se describen en el extracto clorofórmico de las partes aéreas de *Perymenium mendezii* var. *Verbesinioides* **6-7** (Maldonado *et al.*, 1983) así como en las partes aéreas *Perymenium berlandieri* **8-9** (Maldonado *et al.*, 1994) Figura. 2.3.1.

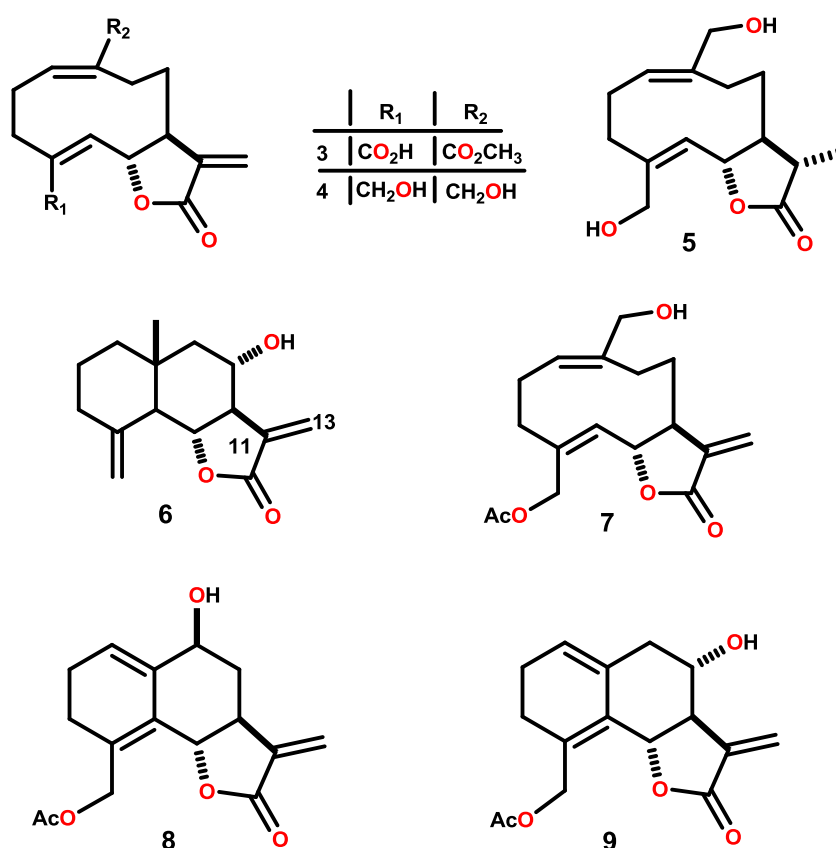


Figura 2.3.1. Lactonas sesquiterpénicas aisladas de especies de *Perymenium*.

Por otro lado, de *Perymenium hintonni* reportaron la presencia de cumarinas, flavonoides y triterpenos (**10-11**) así como dos nuevas lactonas diterpénicas isoméricas (**12-13**) Figura 2.3.2 (Maldonado *et al.*, 1997).

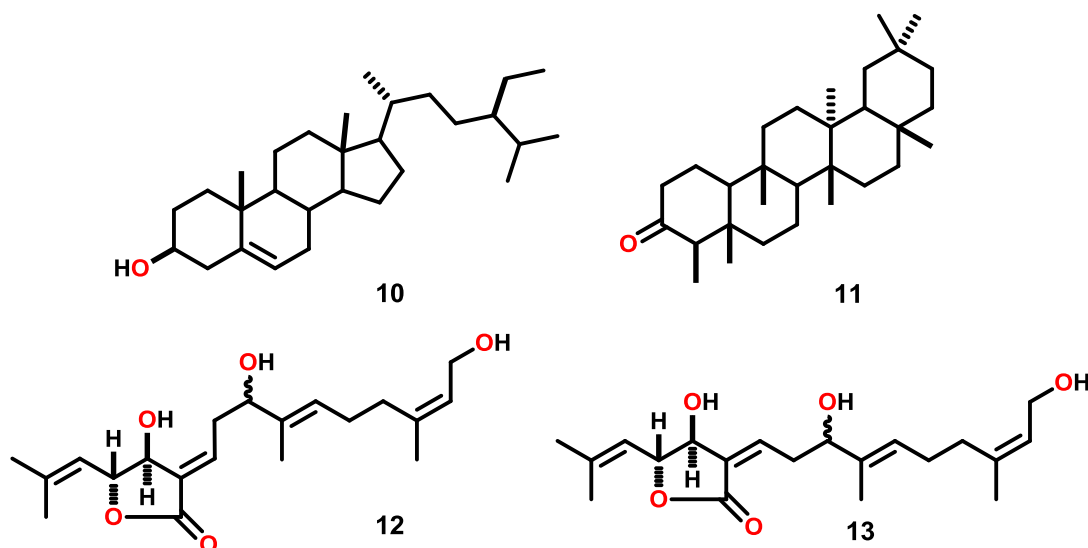


Figura. 2.3.2. Diterpenos y triterpenos aislados de *Perymenium hintonni*.

Un grupo importante identificado lo constituyen los diterpenos con esqueleto de kaurano encontrados en el análisis químico realizado a *Perymenium ecuadorium* **14-21** (Bohlman & Zdero, 1976). De la misma forma se encuentran presentes en el extracto de las partes aéreas de *Perymenium featherstonei* (**15-17** y **22**) Figura. 2.3.3 (Bohlmann *et al.*, 1984).

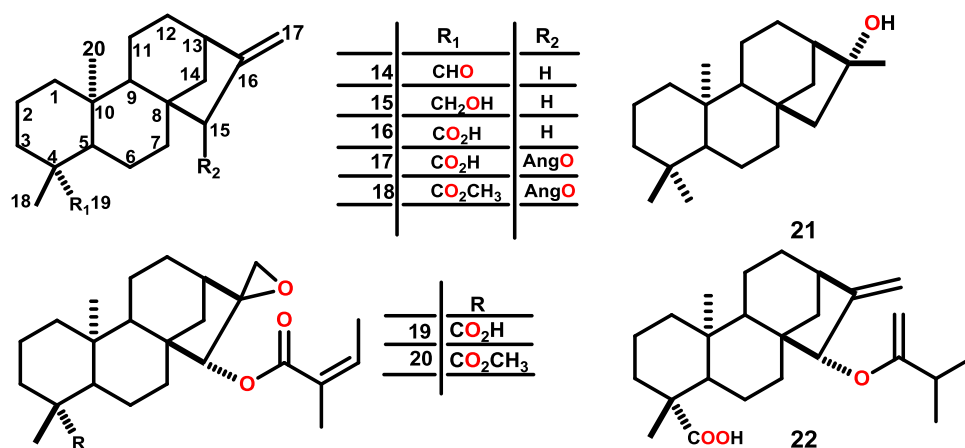


Figura 2.3.3. Diterpenos con esqueleto de kaureno de *Perymenium ecuadorium* y *Perymenium featherstonei*.

Finalmente, existe el reporte de compuestos con esqueleto de kaureno y beyerano en *Perymenium klattianum* (**23-27**) Figura 2.3.4 (Bohlmann *et al.*, 1985).

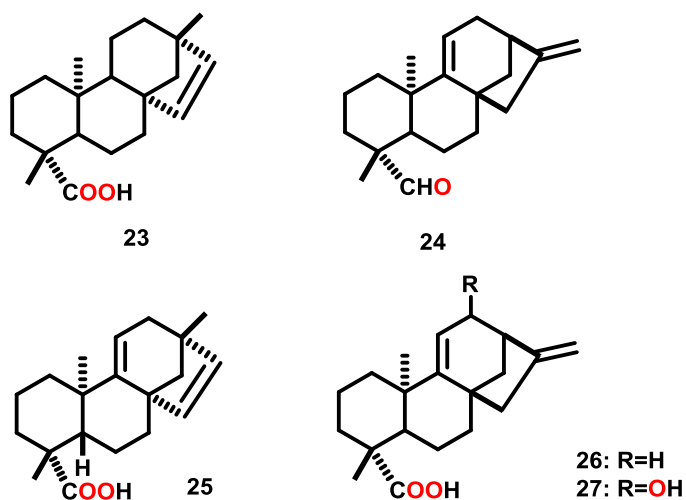


Figura. 2.3.4. Diterpenos de *Perymenium klattianum*.

El género *Perymenium* no cuenta con reporte de su uso en la medicina tradicional; sin embargo, estudios químicos realizados indican la presencia de compuestos con interés farmacológico como el ácido *ent*-kaurenoico (Zgoda *et al.*, 2002, Vieira *et al.*, 2002, Jeong *et al.*, 2013) y su análogo el ácido *ent*-beyerenoico (Zamilpa *et al.*, 2002), así como lactonas sesquiterpénicas a las cuales también se les ha asociado como agentes terapéuticos contra la inflamación y el cáncer (Arellano & Delgado, 2004, Siedle *et al.*, 2010) y triterpenos como agentes antimicrobianos y antiinflamatorios (Yínusa *et al.*, 2014; Fonnegra & Jiménez, 2007).

2.4. *Perymenium bupthalmoides* D.C.

Es una especie endémica de México que se localiza en el Estado de Michoacán y Estados aledaños (Figura 2.4.1) se desarrolla primordialmente en matorrales xerófilos, pastizales, bosques de encino y de coníferas, particularmente abundante en los claros de estos últimos. Florece de junio a septiembre, planta por lo general común y sin problemas de supervivencia.

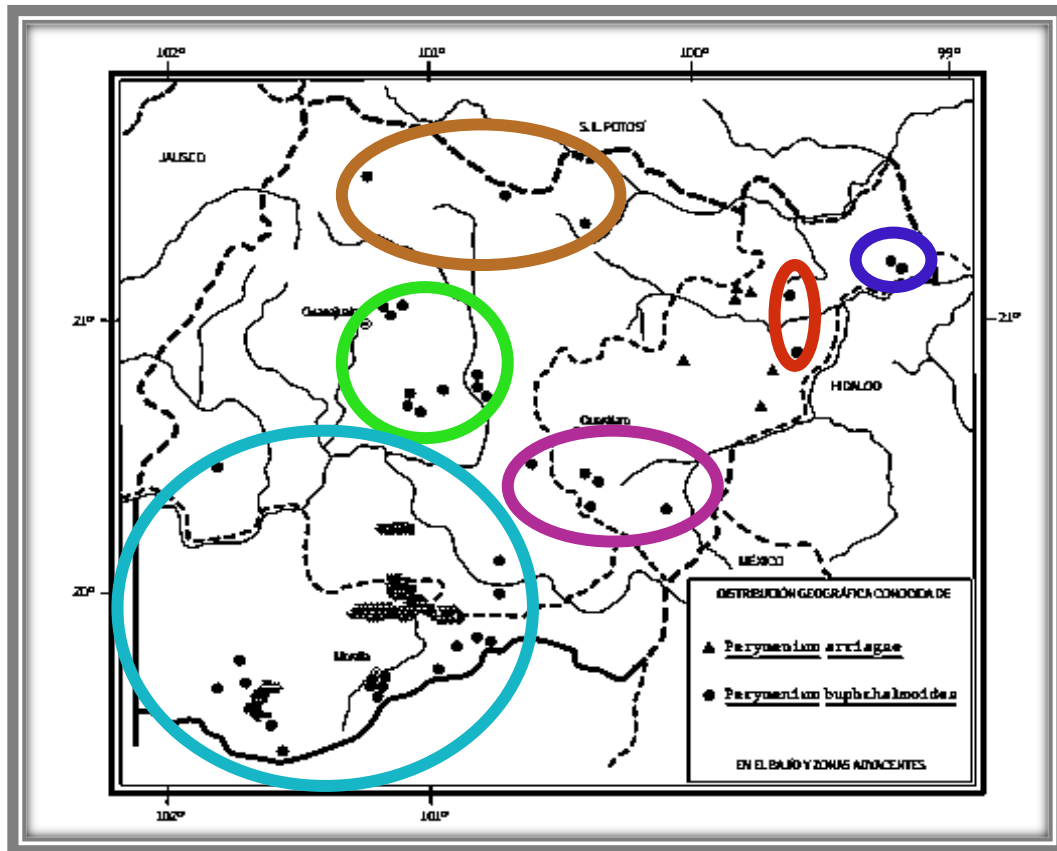


Figura 2.4.1. Localización de *Perymenium bupthalmoides*.

2.5. Descripción botánica de *Perymenium bupthamoides*

Planta herbácea anual, erecta ascendente o decumbente, hasta de 60 cm de largo, provista de raíz tuberosa a menudo muy engrosada y leñosa.

Tallos: con frecuencia varios partiendo de la base, simples o a veces ramificados, estriados por lo común esparcidamente estrigosos, otras veces parcial o totalmente hispídeos.

Hojas: todas opuestas, casi sésiles o con peciolo hasta de 6 mm de largo, lamina foliar ovada a elíptica, ampliamente lanceolada u oblanceolada, de 2 a 6 cm de largo y 1-3 cm de ancho, aguda a obtusa en el ápice, cuneada a subcordada en la base, margen serrado a subentero, triplinervada o trinervada de textura membranácea, verde oscura y estrigosa a hirsuta o pilosa en el haz, más pálida e hispidula en el envés; cabezuelas solitarias y terminales a veces agrupadas por pocas en conjuntos cimosos, pedúnculos hasta de 16 cm de largo; involucreo campanulado a hemisférico sus brácteas 8 a 15, dispuestas en 2 a 3 series, de tamaño subigual a veces las exteriores más largas que las interiores, lanceoladas a elípticas, de 4-7 mm de largo, agudas o romas en el ápice, estrigosas a hispídas a veces pilosas por fuera, receptáculo convexo, paleas oblongas a elípticas, de 4-6 cm de largo, agudas a acuminadas y a menudo ciliadas en el ápice; flores liguladas 8 a 13, sus laminas elípticas a oblanceoladas, de 0.8-2 cm de largo, amarillas, glabras o casi glabras.

Flores: del disco 25-50, sus corolas tubulosas, de 3.5-5.5 mm de largo, amarillas con los lóbulos papiloso-puberulos por dentro, anteras negruzcas a cafés, de 1.5 a 2.5 mm de largo, ramas del estilo aplanadas, agudas e hispidulas en el ápice.

Aquenios: obovados, de 2 a 3.5 mm de largo, los del radio triquetos, los del disco biconvexos o tetragonales, negruzcos, casi glabros a puberulos o estrigosos, en el cual se inserta el vilano, este de 1 a 2 aristas delgadas hasta 4.5 mm de longitud y varias adicionales de menos de 1 mm de largo, en ocasiones estas últimas o todas o casi todas ausentes (Figura 2.5.1) (Rzedowski *et al.*, 2011).



Figura 2.5.1. *Perymenium bupthamoides*.

En el año 2014, Villagómez realizó el estudio químico preliminar del extracto hexánico de raíz de *Perymenium bupthalmoides*, en el cual reportó la separación, purificación e identificación del ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**16**); así como el ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (**23**) los cuales corresponden a los componentes mayoritarios de dicho extracto y el 3 β -friedelinol (**28**), Figura 2.5.2.

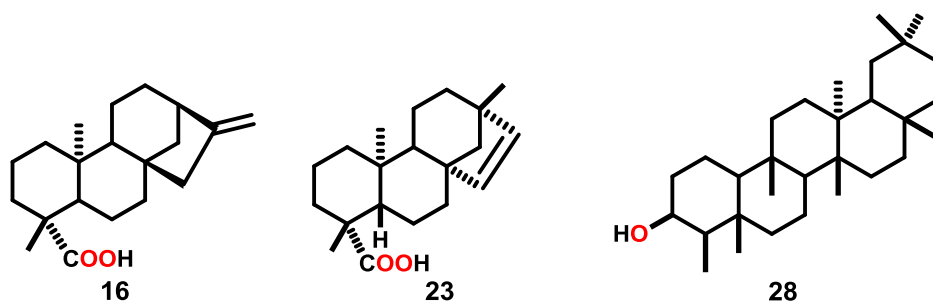


Figura 2.5.2. Terpenos aislados de *Perymenium bupthalmoides*.

3. Justificación

Perymenium buphthalmoides es una especie ubicada en México y su delimitación geográfica se centraliza principalmente en el Estado de Michoacán, la cual no cuenta con reporte de análisis químico de sus partes aéreas, por lo que esta promueve interés en la búsqueda de metabolitos secundarios.

Con este estudio se pretende continuar con el análisis fitoquímico de esta especie, ya que existe un estudio químico preliminar del extracto de raíz realizado por nuestro grupo de trabajo, en el cual se reporta la presencia de compuestos con interés biológico por lo que resulta de beneficio ahondar en el estudio químico de las especies de este género.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Llevar acabo el estudio químico preliminar del extracto hexánico de hojas de *Perymenium buphthalmoides*, mediante métodos cromatográficos para aislar e identificar los componentes mayoritarios.

4.2. Objetivos específicos

-  Obtener el extracto hexánico de hojas de la planta.
-  Separar y purificar mediante técnicas cromatografías los componentes mayoritarios presentes en dicho extracto.
-  Caracterizar las sustancias químicas mediante métodos físicos, químicos, espectroscópicos y espectrométricos.

5. Metodología experimental

Esquema 5.1. Metodología experimental para el desarrollo del proyecto.



6. Resultados y discusión

6.1. Colecta e identificación de la especie vegetal

Perymenium bupthalmoides se colectó en julio del 2011, junio del 2013 y 2014 en el km 3.5 de la carretera Tiripetio-Acuitzio a 19°30.916' latitud y 101° 20.634' longitud y una altitud de 2095 metros sobre el nivel del mar. La planta fue identificada por el Dr. Jerzy Rzedowski, conservando un ejemplar en el herbario del Instituto de Ecología de Pátzcuaro A.C.

6.2. Tratamiento vegetal

Para la obtención de los extractos inicialmente se separó la especie en sus distintas partes y posteriormente se dejó secar a la sombra.

6.3. Análisis químico del extracto hexánico de hoja

En el análisis inicial, un lote de 147 g hojas de la especie vegetal, se sacaron a la sombra y posteriormente se molieron, la extracción se llevó a cabo con mezcla de hexanos mediante reflujo durante 6 horas.

Del extracto hexánico de hojas mediante RMN de ^1H (Figura 6.3.1) se distinguieron señales en la región de los dobles enlaces entre 5.65-4.50 ppm así como señales en la región de los protones alifáticos destacando la señal simple en 1.25 ppm asignada a metilenos pertenecientes a cadenas de ácidos grasos.

El estudio químico preliminar del extracto hexánico de hojas de *P. bupthalmoides* se realizó empleando un lote de 7 g de extracto que fue sometido a separación por cromatografía en columna utilizando gel de sílice malla 230-400 y como eluyente mezclas de hexanos-AcOEt en polaridad ascendente. La cromatografía en columna fue monitoreada mediante de cromatografía analítica utilizando el mismo sistema de disolventes. Las fracciones eluidas se analizaron por RMN de ^1H .

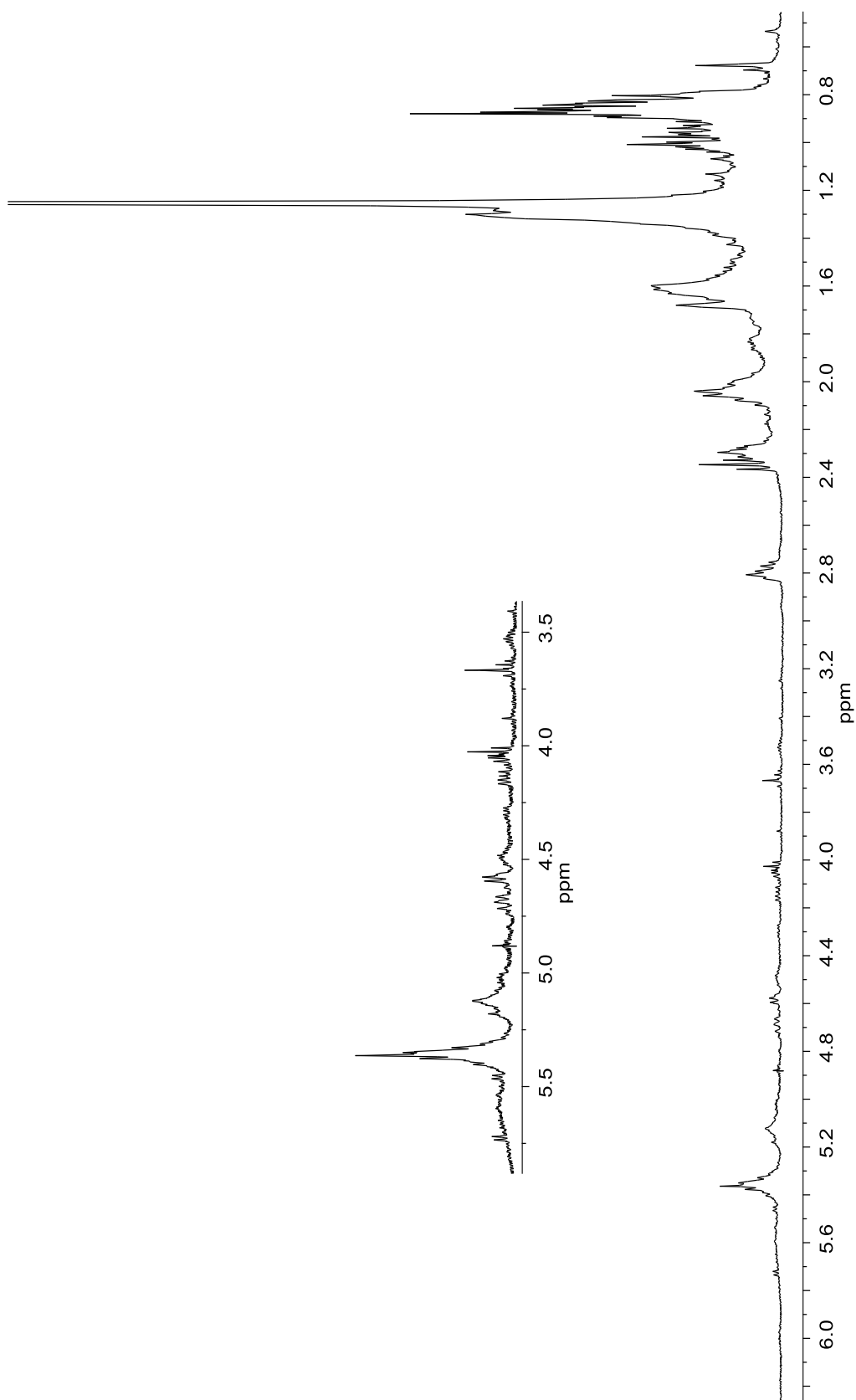


Figura 6.3.1. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto hexánico de hojas de *P. buphthalmoides*.

De la cromatografía del extracto hexánico de hojas, en la polaridad hexanos-AcOEt (1:1) se obtuvo una mezcla de compuestos la cual se recromatografió con mezclas de hexanos-AcOEt a polaridad 17:3, y en las fracciones 15-19 se obtuvo un polvo cristalino incoloro, cuya rotación específica fue de $[\alpha]_D^{25} = +4.5$, en su espectro de IR se apreció en 1730 cm^{-1} una banda intensa perteneciente a un grupo carbonilo de ácido y en el espectro de masa (Figura 6.3.2) se mostró un ion molecular $[M]^+$ 302 m/z , correspondiente a un compuesto con fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_2$. En el espectro de RMN de 1H (Figura 6.3.3) se observaron los protones del doble enlace en 5.74 y 5.46 ppm pertenecientes a los H-15 (1H, d, $J = 5.6\text{ Hz}$) y H-16 (1H, d, $J = 5.6\text{ Hz}$); en 2.15 ppm (2H, da, $J = 13.6\text{ Hz}$) se ubicó la señal correspondiente al H-3; posteriormente, en 1.24 ppm se localizó la señal simple para el H-18, en 1.00 ppm el H-17 y en 0.67 ppm el H-20, todas ellas pertenecientes a grupos metilo. En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.3.4) se encontró en 183.2 ppm (C-19) una señal característica de carbonilo de ácido; adicionalmente, se observaron dos señales pertenecientes a carbonos de dobles enlaces en 136.5 ppm (C-16) y 134.8 ppm (C-15); las diecisiete señales restantes se ubicaron entre 61.0 a 13.8 ppm.

La naturaleza de cada uno de los carbonos de la molécula se definió con el experimento DEPT, donde se observaron tres carbonos de grupo metilo en 29.1 ppm (C-18), 24.9 ppm (C-17) y en 13.8 ppm (C-20); asimismo, se observaron ocho carbonos metilénicos, los cuales se ubicaron en 61.0 ppm (C-14), 39.5 ppm (C-1), 37.9 ppm (C-3), 37.5 ppm (C-7), 33.0 ppm (C-12), 21.5 ppm (C-6), 20.4 ppm (C-11) y en 19.2 ppm (C-2); se apreciaron en 56.9 ppm (C-5) y 52.2 ppm (C-9) los carbonos metínicos; por consiguiente, los carbonos cuaternarios se asignaron en 49.1 ppm (C-8), 43.7 ppm (C-4), 43.6 ppm (C-13), y 37.5 ppm (C-10), los datos espectroscópicos obtenidos experimentalmente coincidieron para el compuesto denominado ácido beyerenoico (**23**).

Se reportó que en estudios al compuesto (**23**) presentó un efecto antiespasmódico y antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* (Zamilpa et al., 2002)

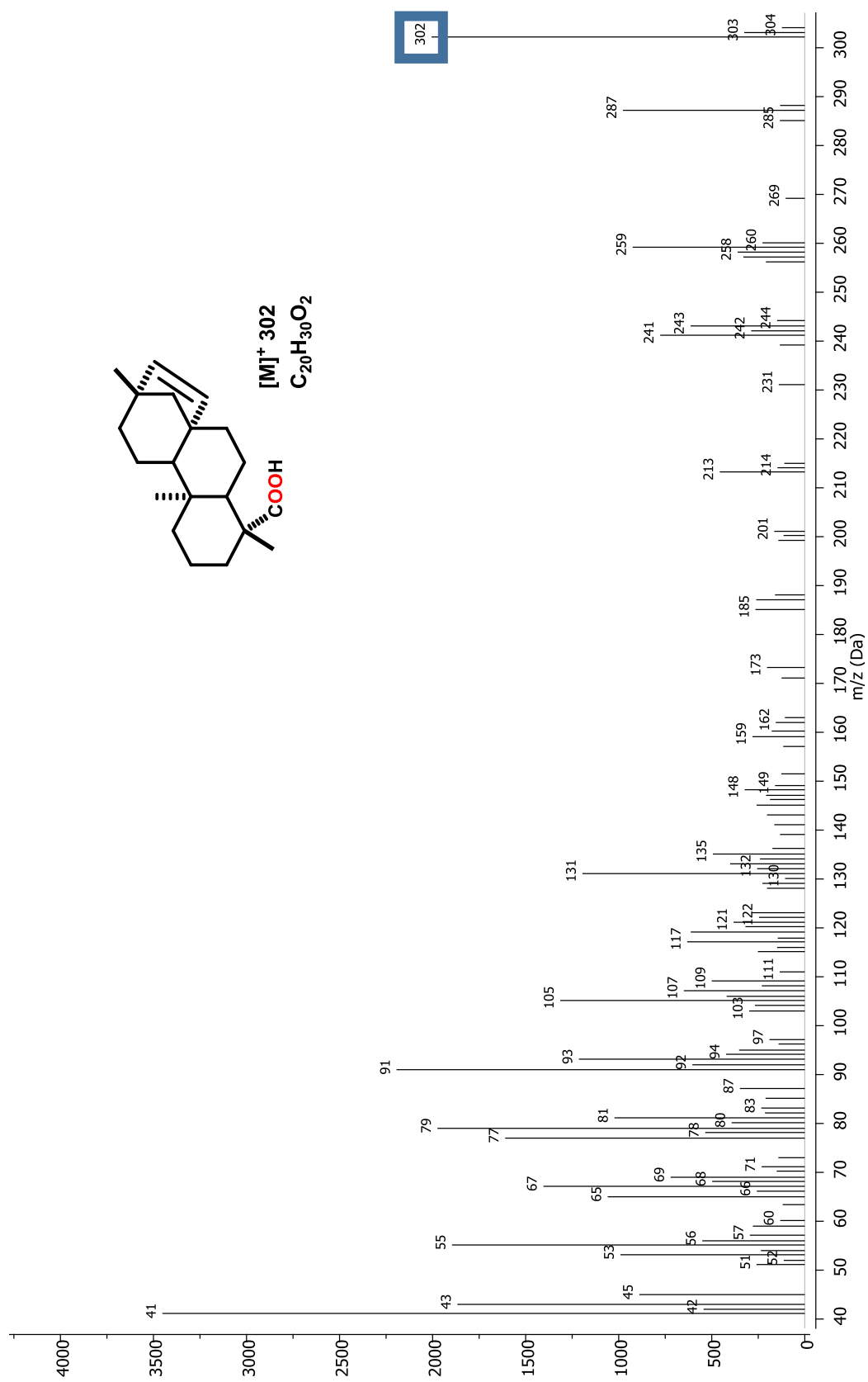


Figura 6.3.2. Espectro de masa del ácido ent-beyer-15-en-19-oico (23).

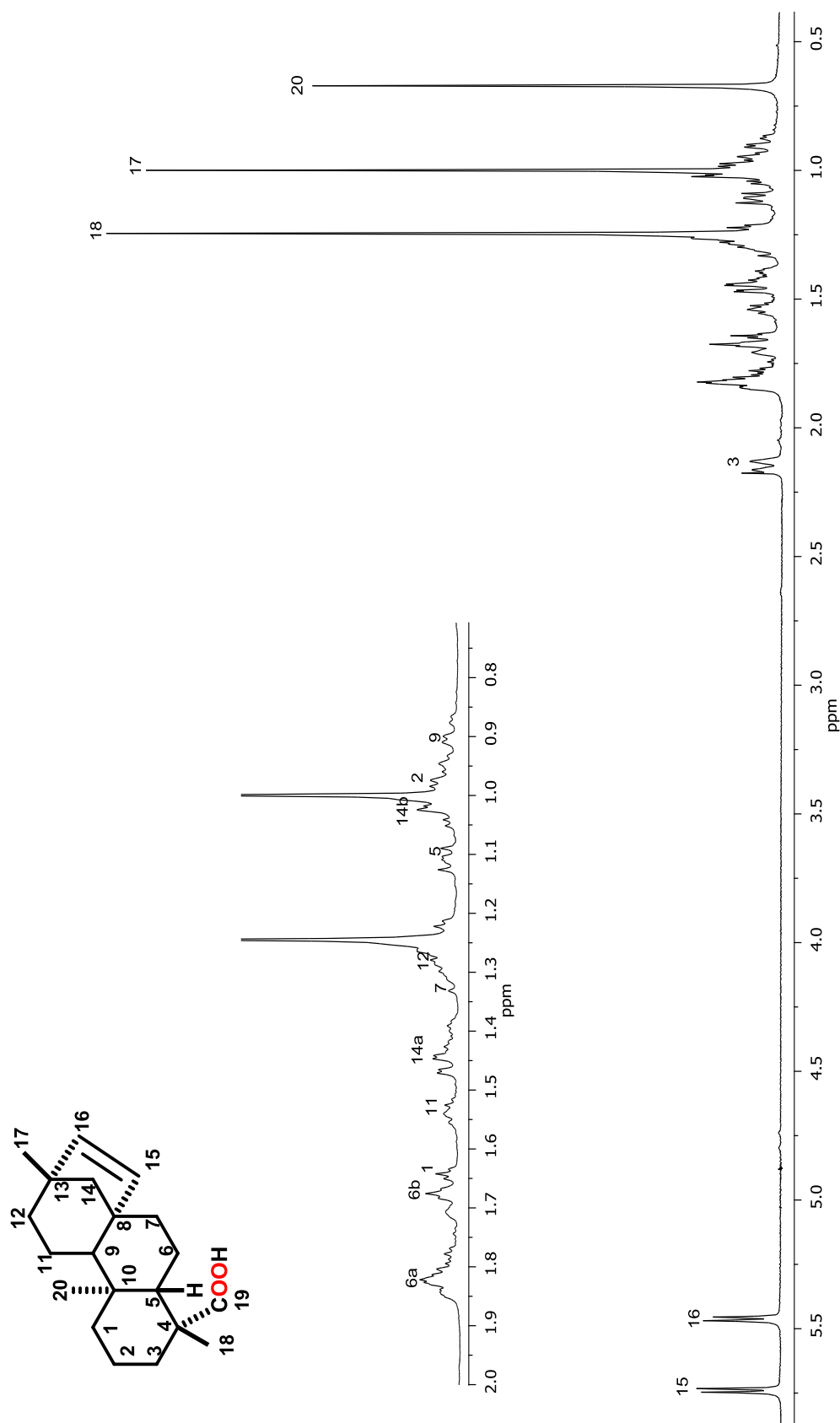


Figura 6.3.3. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (23).

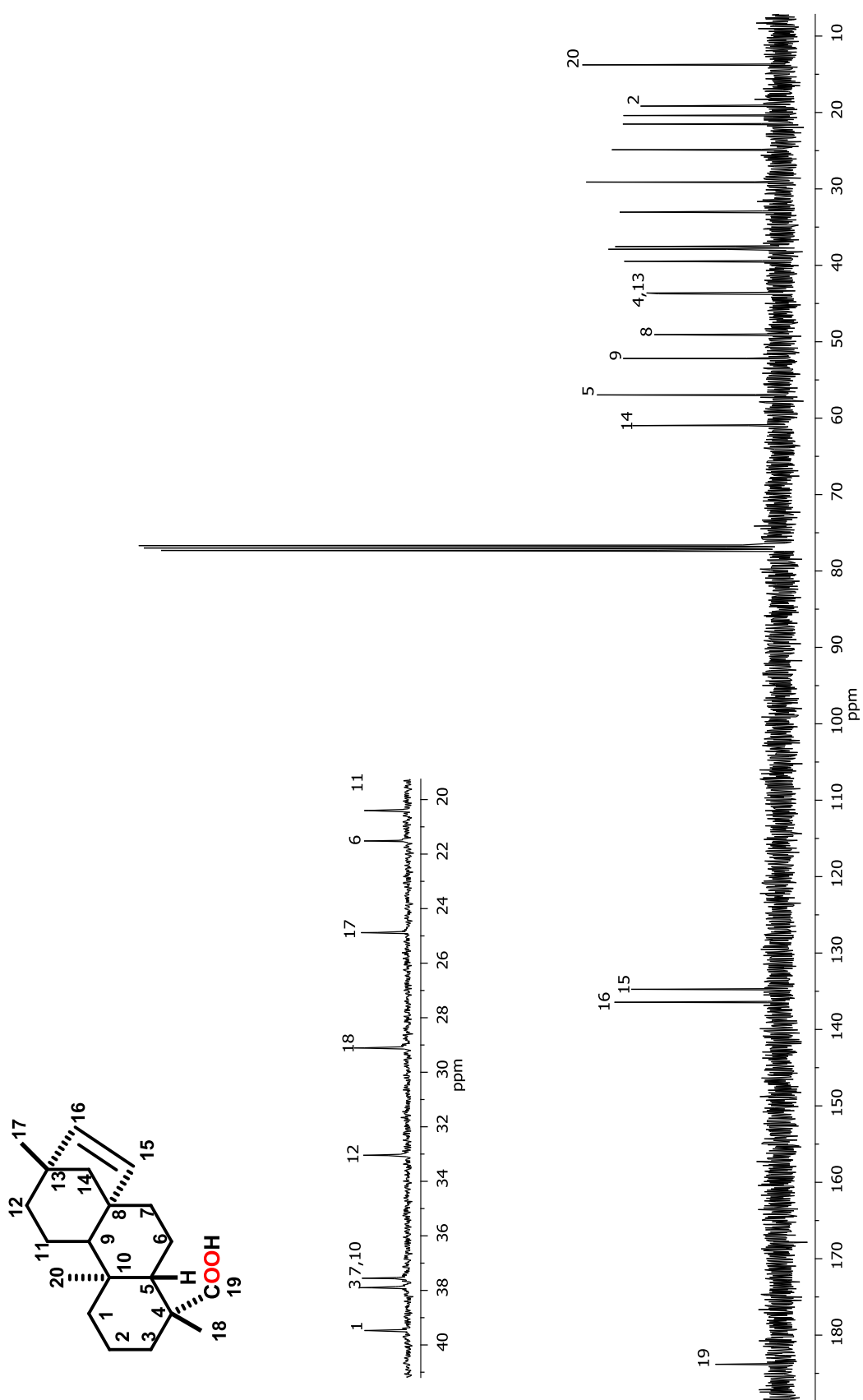


Figura 6.3.4. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (23).

La asignación inequívoca de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C fue posible a través del análisis de espectros de RMN de 2D, así como por comparación con datos de la literatura revelando que se trataba de ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (**23**) (Grande *et al.*, 1990).

Se ha reportado que **23** muestra actividad antiespasmódica y antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* (Zamilpa *et al.*, 2002).

Continuando con la cromatografía en columna, en las fracciones 22-27 de la recromatografía de la fracción 7 obtenida en la polaridad hexanos-AcOEt (1:1) se obtuvieron cristales incoloros los cuales fueron lavados en frío con hexanos para su purificación. El análisis por cromatografía de gases y el espectro de masa permitió la presencia de dos componentes (Figura 6.3.5) mostrando un ion molecular de 412 m/z , el cual sugirió la fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ correspondiente al fitoesterol denominado estigmasterol (**29**), observándose también el ion molecular de 414 m/z , el cual sugirió la presencia del fitosterol denominado β -sitosterol con fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ (**10**).

Esta mezcla no fue posible separarla, sin embargo, pudieron ser asignados sus espectros de RMN de 1D. En el espectro de RMN de ^1H (Figura 6.3.7) se observaron tres señales pertenecientes a protones de dobles enlaces; en 5.34 ppm se ubicó una señal doble $J= 5.2$ Hz asignada para el protón H-6 y H-6'; en 5.14 y 5.01 ppm se observó la señal doble de dobles con $J= 15.2$ y 8.4 Hz, asignadas a los protones vinílicos H-22 y H-23 de **29**; se apreció una señal múltiple en 3.53 ppm, perteneciente al protón base del hidroxilo (H-3 y H-3'); entre 1.05 ppm y 0.68 ppm se ubicaron las señales pertenecientes a los grupos metilo de ambas moléculas. En el espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), se observaron cuatro señales pertenecientes a carbonos de doble enlace en 140.7, 138.5, 129.3 y 121.7 ppm pertenecientes a los C-5/C-5', C-22, C-23 y C-6/C-6', respectivamente; en 71.9 ppm se observó la señal del carbono base de oxígeno C-3-C-3' y el resto de las señales corresponden a un sistema alifático observadas entre 57.0 y 10.0 ppm, los datos espectroscópicos obtenidos experimentalmente, fueron iguales a los de la literatura (Rowshanol *et al.*, 2007).

Se ha reportado que la mezcla de los compuestos **10** y **29** presentó actividad antimicrobiana (Yínusa *et al.*, 2014), Analgésico y Antidiarreico (Sáez *et al.*, 1998) e Hipoglucemiante (Luize & Cechinel-Filho, 2002).

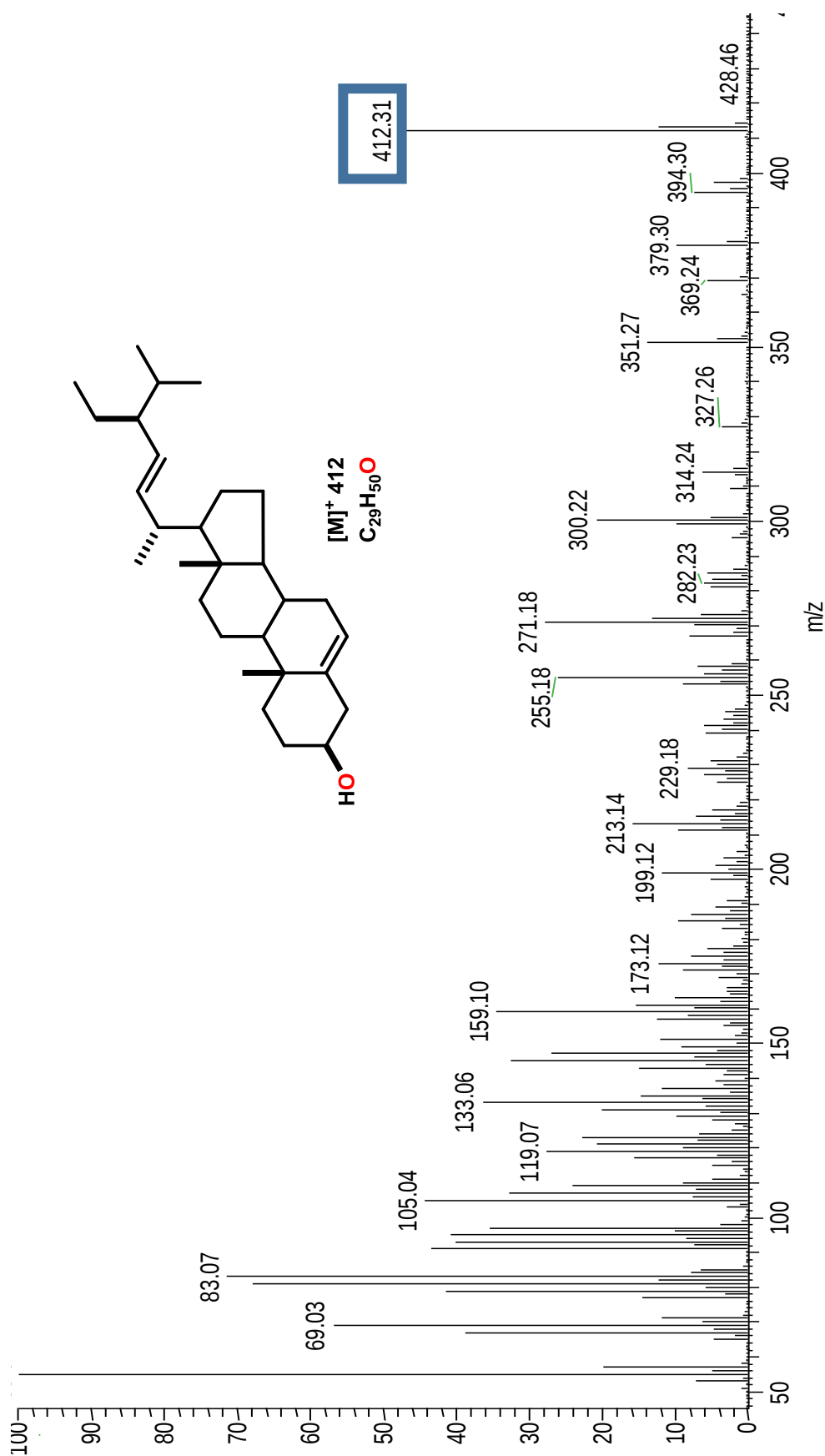


Figura 6.3.5. Espectro de masa del estigmasterol (29).

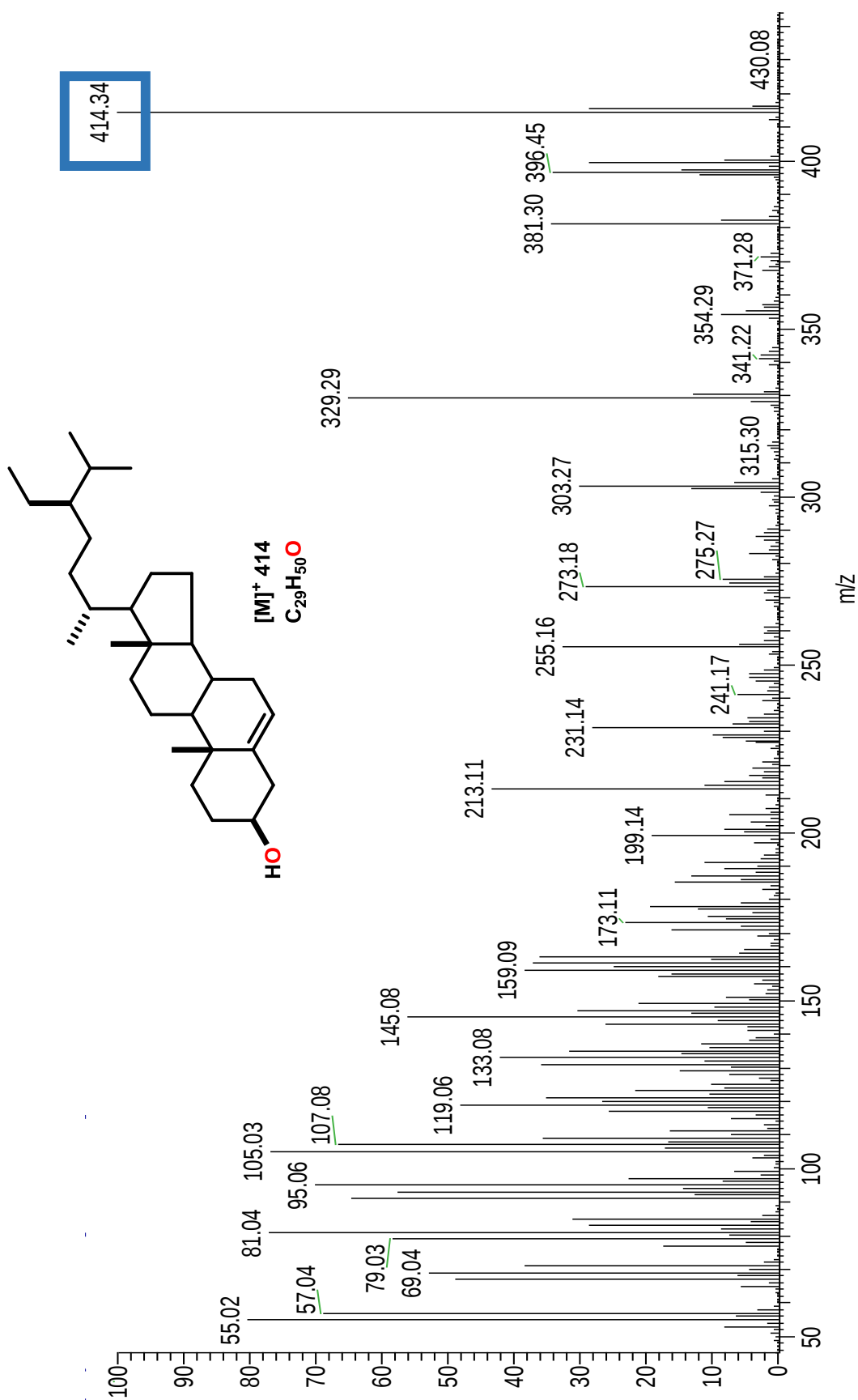


Figura 6.3.6. Espectro de masa del β -sitosterol (10).

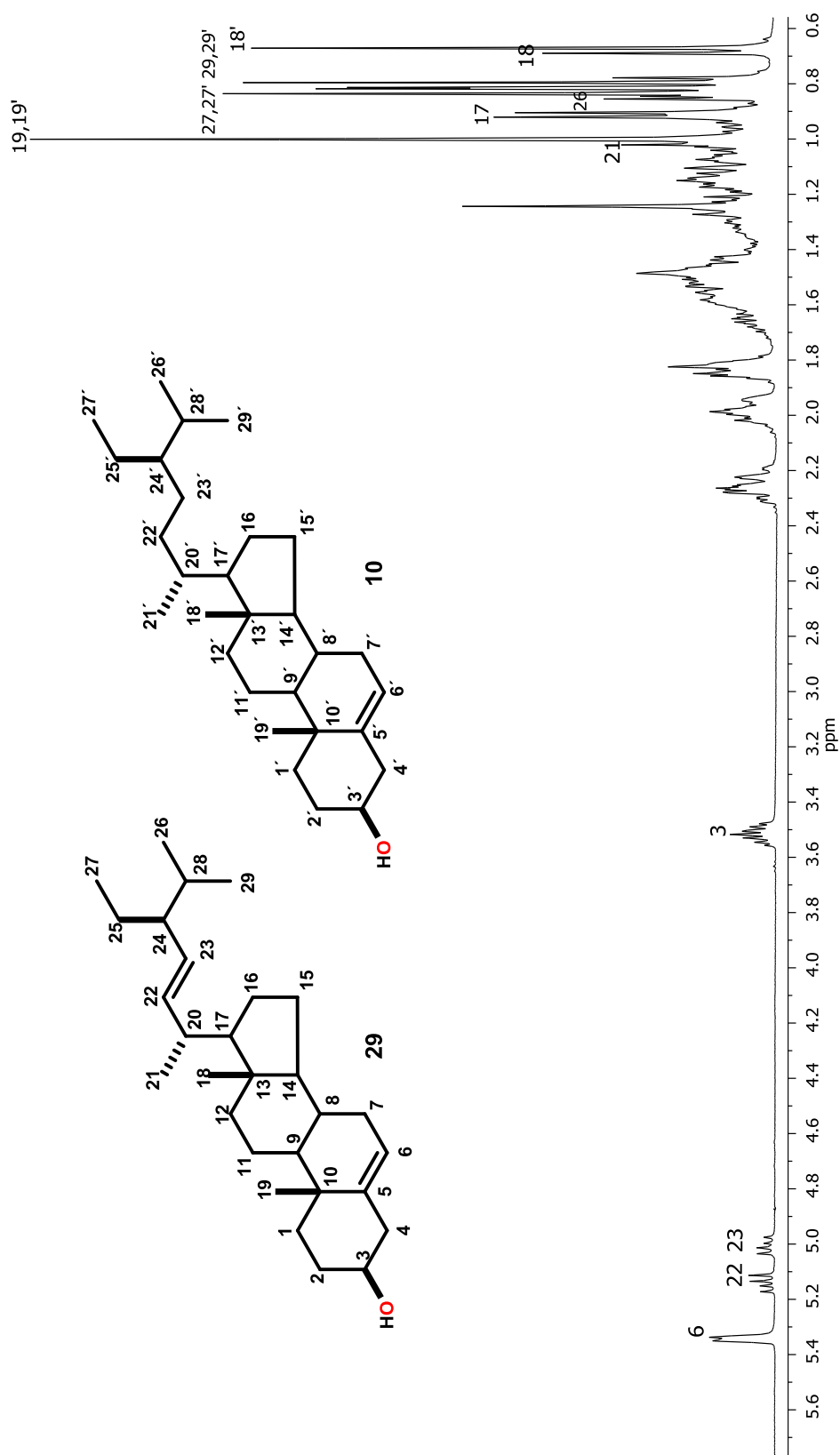


Figura 6.3.7. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del estigmasterol (29) y β -sitosterol (10).

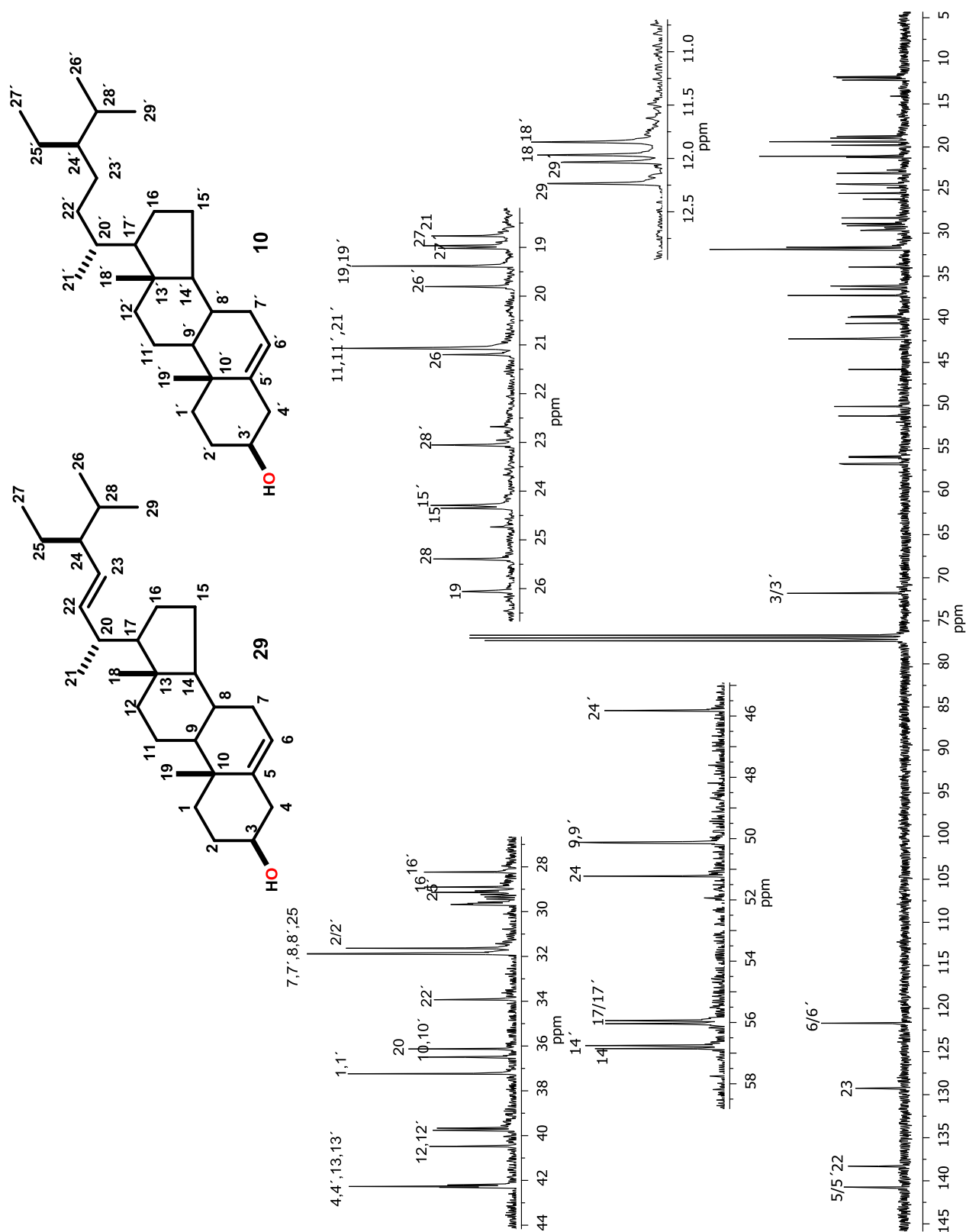


Figura 6.3.8. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del estigmasterol (29) y β -sitosterol (10).

La recromatografía de la fracción 7 obtenida en la polaridad hexanos-AcOEt (1:1) se realizó utilizando gel de sílice y un sistema de elución hexanos-AcOEt (17:3), las fracciones 15-19 se recromatografiaron con mezclas de hexanos-AcOEt en orden creciente de polaridad como eluente, en la fracción 7 (19:1) se obtuvo un polvo blanco el cual se purificó por cromatografía analítica impregnada con solución de AgNO_3 al 20%. Este proceso permitió la separación de un sólido blanco. El análisis de cromatografía de gases y espectro de masa permitió confirmar la presencia de dos componentes mostrando un ion molecular de 426 m/z para cada uno de los compuestos sugiriendo la fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ (Figura 6.3.9 y Figura 6.3.10).

En su espectro de RMN de ^1H destacaron en 5.14 y 5.19 ppm dos señales triples ($J= 4.0$ Hz), pertenecientes a los protones vinílicos H-12 y H-12'; en 3.24 ppm se ubicó la señal perteneciente a los protones base de alcohol H-3/H-3', a campo alto se apreciaron señales de alta intensidad que correspondieron a las señales de los protones de grupos metilos entre 1.15 y 0.81 ppm para ambos compuestos. En el espectro de RMN de ^{13}C se observaron las señales para los carbonos de doble enlace en 145.2 ppm (C-13), 121.7 ppm (C-12), 139.6 ppm (C-13') y 124.4 ppm (C-12'); por otra parte, el carbono base de hidroxilo se situó en 79.0 ppm y las señales asignadas al esqueleto pentacíclico se ubicaron entre 59.1 y 15.8 ppm. Estos datos fueron iguales a los de la literatura (Mahato, 2009 y 1994).

Se ha reportado que la mezcla de los compuestos **30** y **31** presentó actividad antiinflamatoria (Fonnegra & Jimenez, 2007), antinociceptiva (Santos *et al.*, 2011), antibacterial e inhibidores de la proteasa (Oliveira *et al.*, 2004).

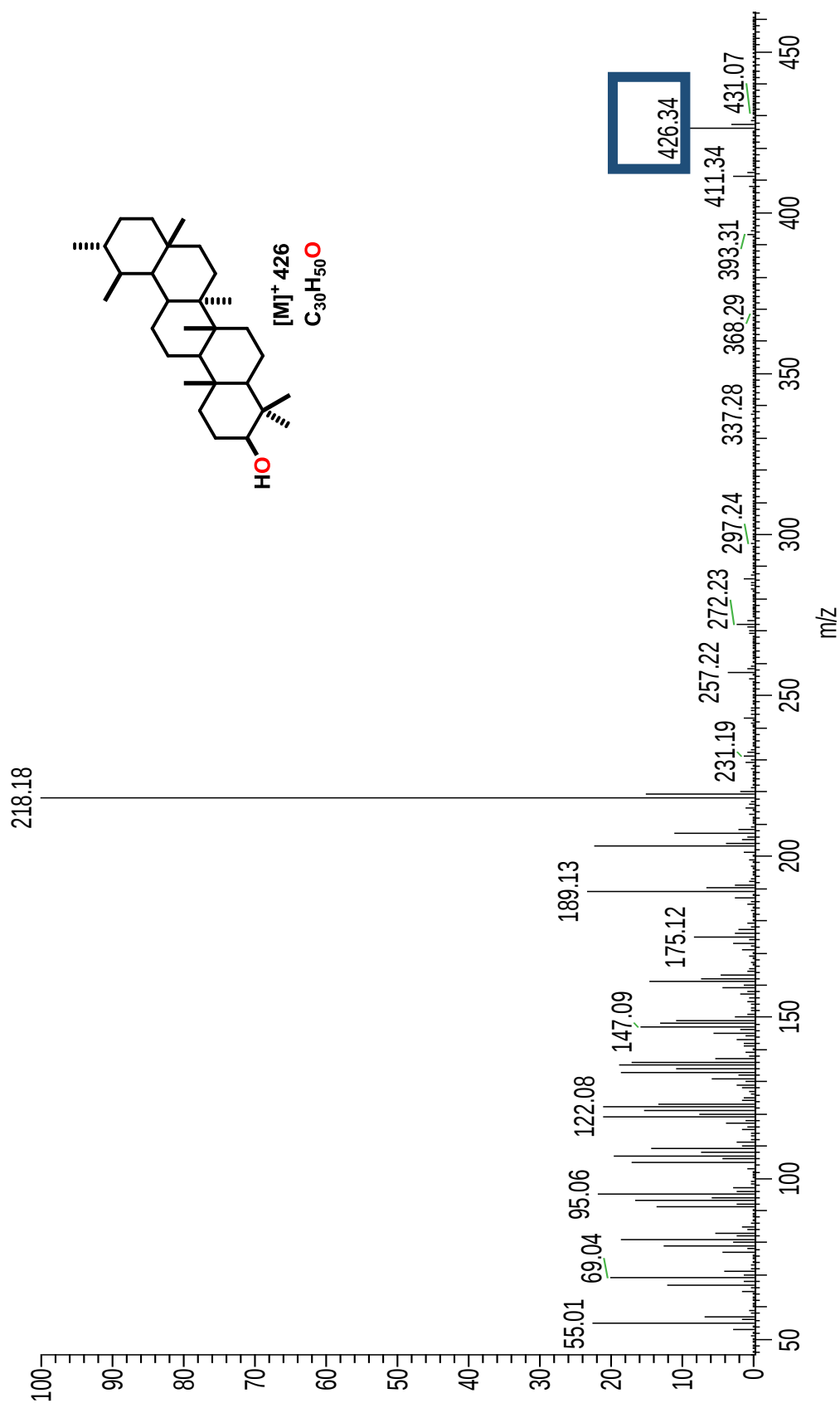


Figura 6.3.9. Espectro de masa de la α -amirina (30).

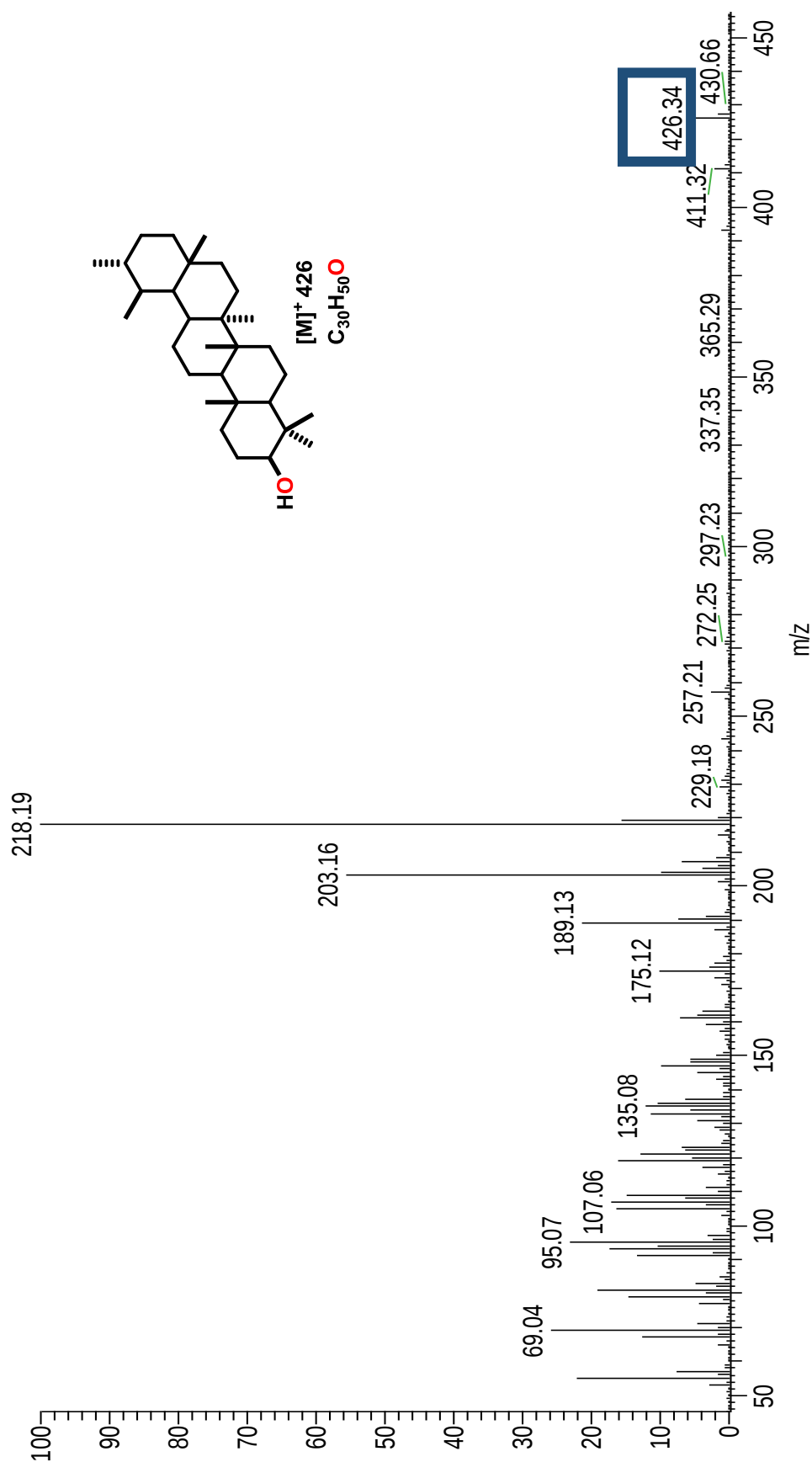


Figura 6.3.10. Espectro de masa de la β amirina (31).

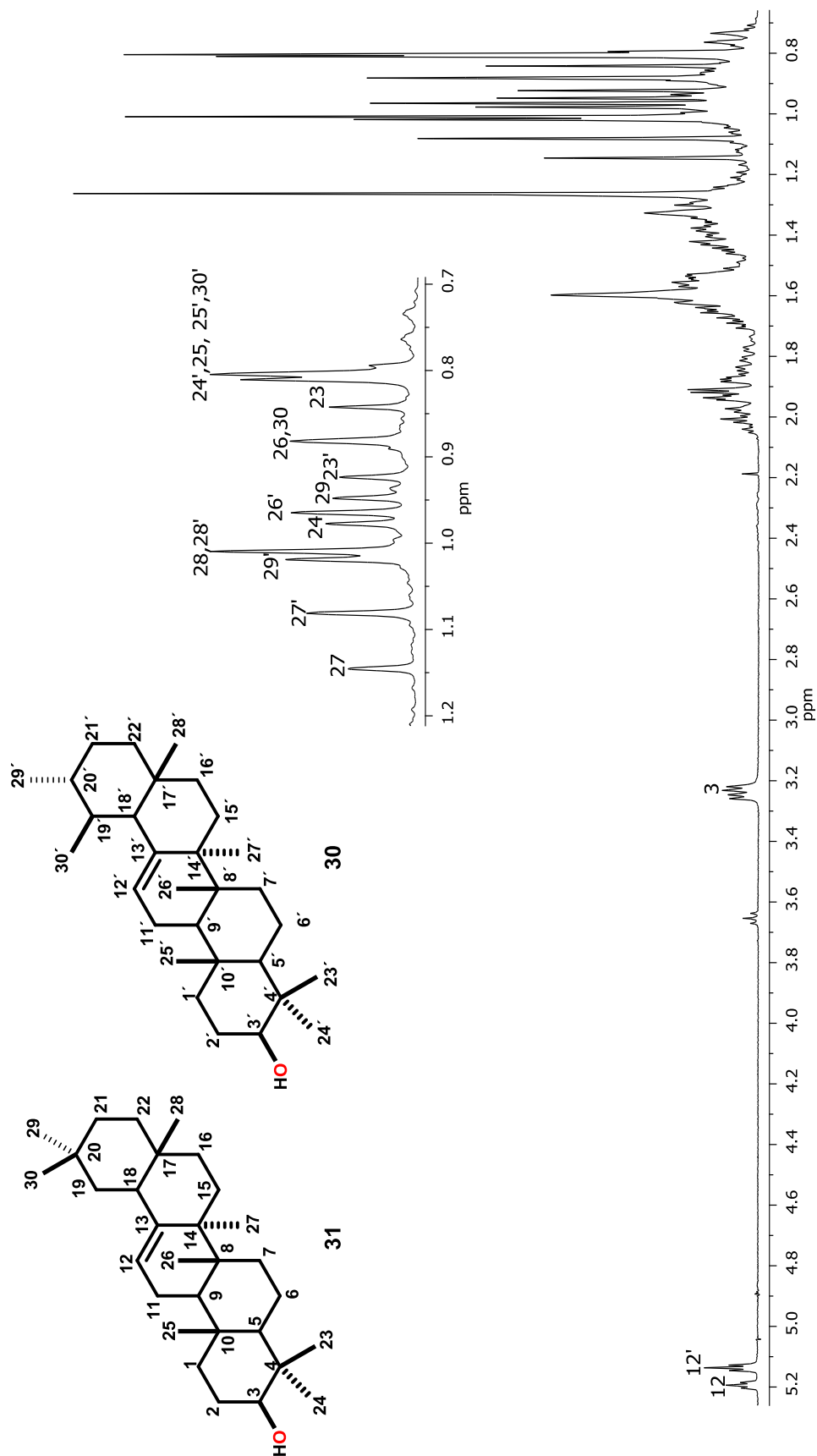


Figura 6.3.11. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del α -amirina (30) y β -amirina (31).

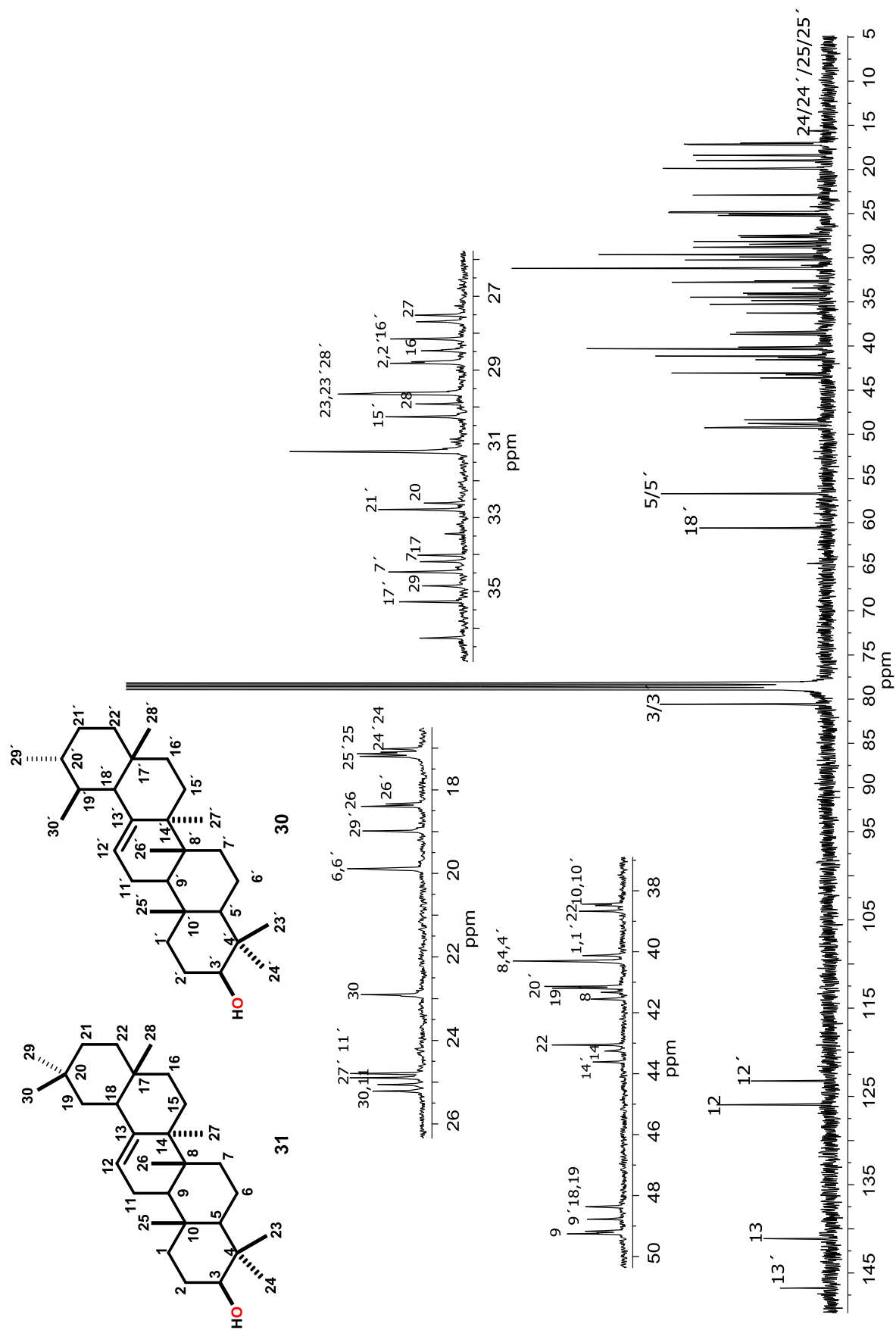


Figura 6.3.12. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de α -amirina (30) y β -amirina (31).

De la cromatografía preparativa impregnada con solución de AgNO_3 al 20% adicionalmente se obtuvo el compuesto **32**. En su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.3.15) se observaron las señales correspondientes al doble enlace en 4.69 ppm con una constante de acoplamiento de 2.2 Hz correspondiente al protón olefínico H-29a; de la misma forma, se observó en 4.56 ppm la señal doble asignada al H-29b; adicional a esto, se ubicó al protón base de hidroxilo en 3.20 ppm perteneciente al H-3, y en 2.37 ppm apareció la señal múltiple asignada la H-19; por otro lado, se observaron siete señales simples pertenecientes a los grupos metilo en 1.67 ppm (H-30), 1.02 ppm (H-28), 0.96 ppm (H-27), 0.93 ppm (H-26), 0.82 ppm (H-25), 0.78 ppm (H-24), 0.75 ppm (H-23). Con estos datos y por igualdad a lo descrito se determinó que se trataba del triterpeno conocido como lupeol (Ruíz, 2015; Gómez, 2011).

Se ha reportado que el lupeol (**32**) presentó actividad antibacterial (Osuna *et al.*, 2005) así como capacidad Inhibidora de la proteasa (Negri *et al.*, 2004).

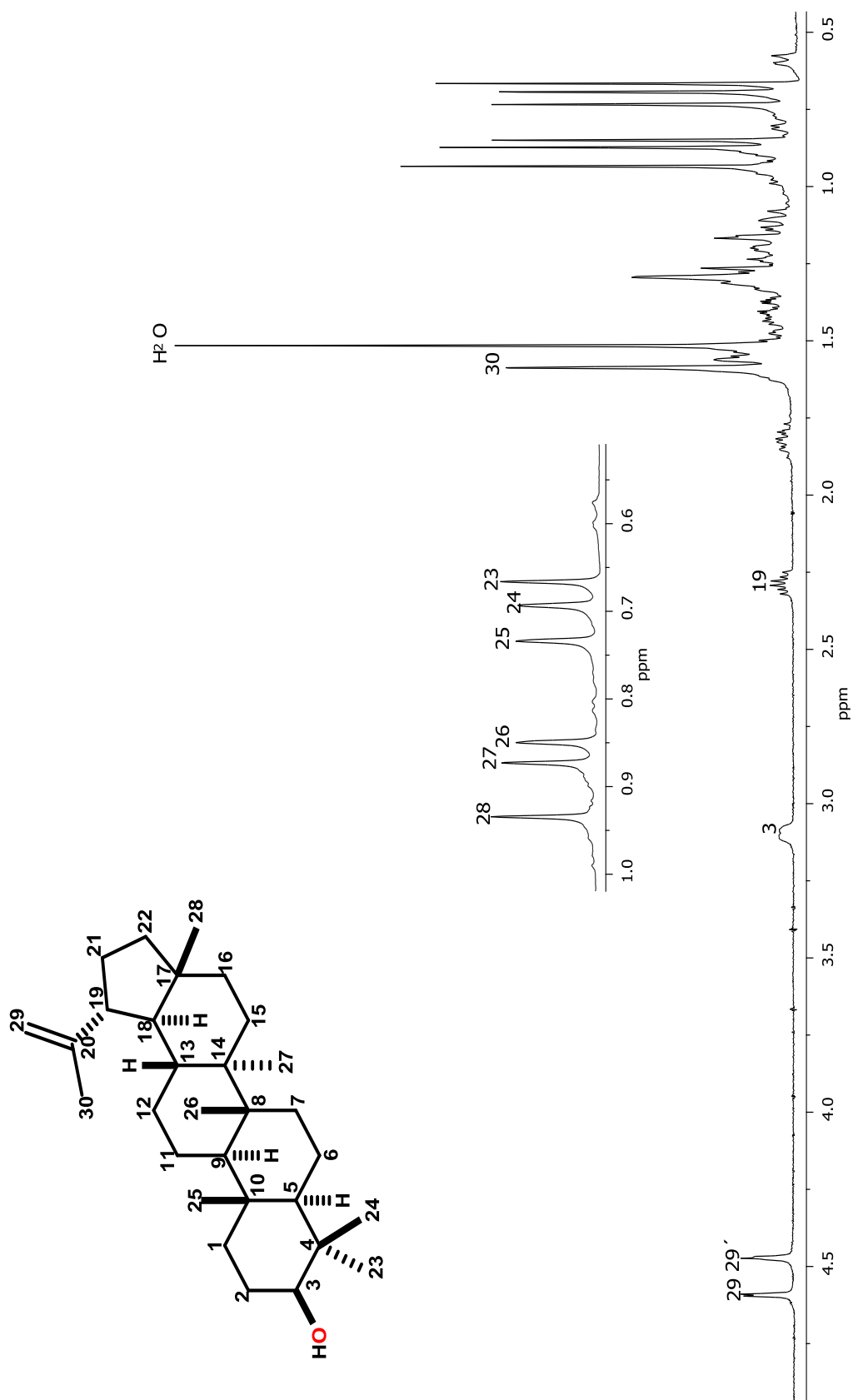
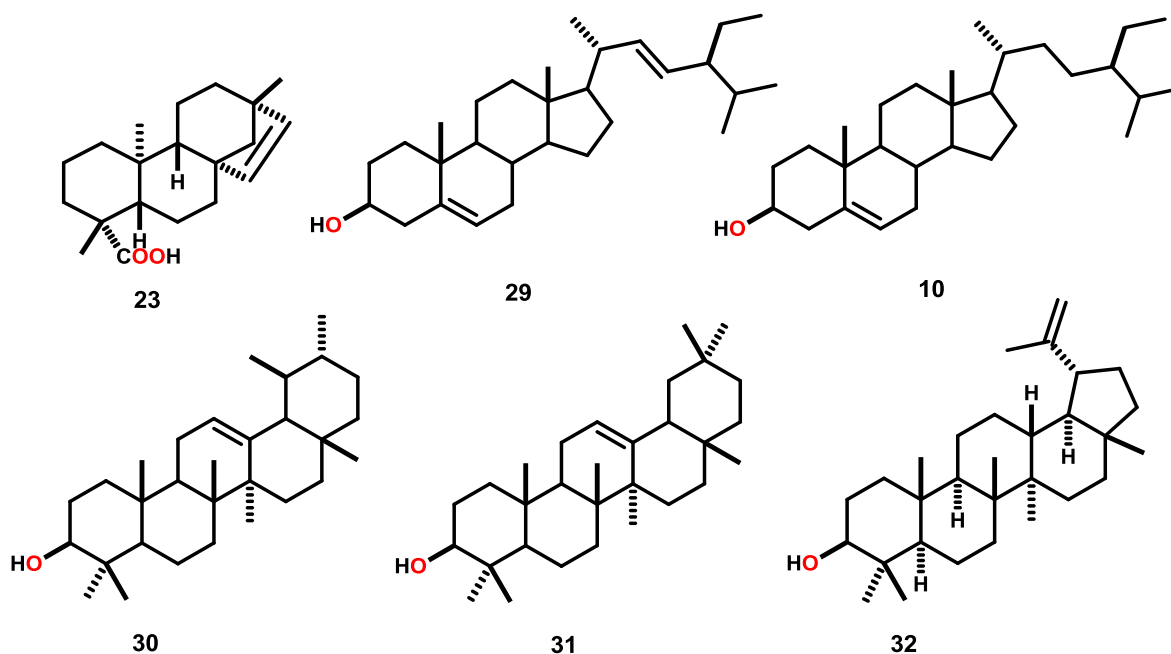


Figura 6.3.15. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del lupeol (32).

7. Conclusiones

El estudio químico preliminar del extracto hexánico de hojas de *Perymenium bupthalmoides* condujo al aislamiento e identificación del ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (**23**), el cual ya había sido descrito en el extracto hexánico de raíz, el estigmasterol (**10**) y β -sitosterol (**29**); así como los triterpenos α -amirina (**30**) y β -amirina (**31**) y el lupeol (**32**).



Los compuestos fueron caracterizados por RMN de ^1H y ^{13}C , así como con experimentos de 2D.

Es importante mencionar que los compuestos **29-32** no han sido reportados dentro de los estudios químicos realizados a las especies de este género.

8. Metodología experimental

8.1. Material vegetal

La especie vegetal de *Perymenium buphthalmides*, se colectó el 24 de julio del 2011 en el km 3.5 de la carretera Tiripitio-Acuitzio a 19° 30.916' latitud y 101° 20.634' longitud y una altitud de 2095 metros sobre el nivel del mar. La planta fue identificada por el Dr. J. Rzedowski, conservando un ejemplar en el herbario del instituto de Ecología de Pátzcuaro A.C.

Las especies destinadas para el análisis químico se secaron a la sombra a temperatura ambiente y posteriormente se separaron en sus distintas partes.

8.2. Obtención de extractos

Las hojas (512 g) de la especie vegetal, se sacaron a la sombra y posteriormente se molieron, la extracción se llevó a cabo con mezcla de hexanos mediante reflujo obteniendo 7 g de extracto crudo. El estudio químico preliminar del extracto hexánico de hojas de *P. buphthalmoides* se realizó en cromatografía en columna utilizando gel de sílice malla 230-400 y como eluyente mezclas de hexanos-AcOEt en polaridad ascendente.

8.3. Resonancia magnética nuclear (RMN), Espectrometría de Masa

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C se midieron en un equipo Varian Mercury Plus 400, a 400 MHz y 100 MHz, respectivamente, usando deuterocloroformo (CDCl_3) como disolvente y como referencia interna tetrametilsilano (TMS). Los espectros de masa fueron obtenidos en un equipo Hewlett-Packard 5890 series II plus a 70 eV.

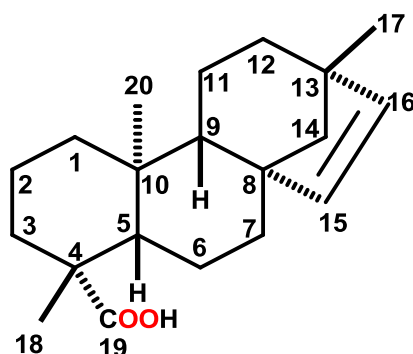
La rotación óptica se determinó en un polarímetro Perkin-Elmer 341 utilizando como disolvente CHCl_3 .

8.4. Análisis químico

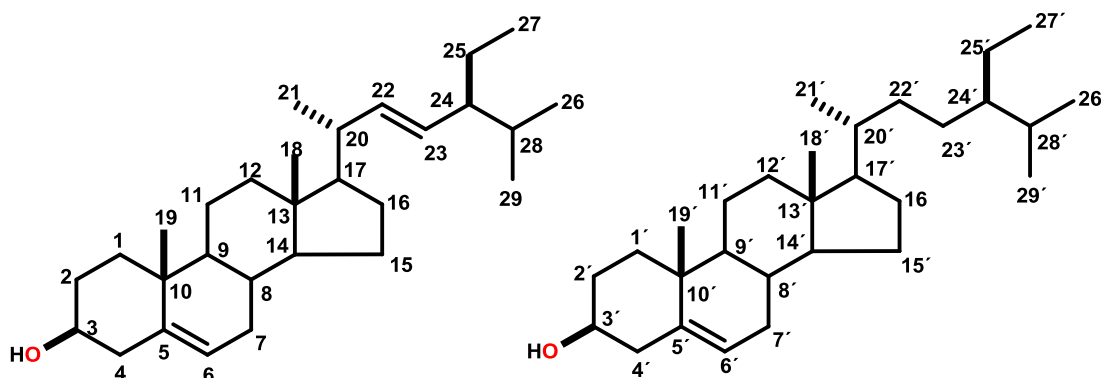
La separación de los compuestos se realizó en columna cromatográfica ($h_{\text{columna}} = 15 \text{ cm}$, $\phi_{\text{columna}} = 3 \text{ cm}$) empleando gel de sílice (SiO_2) malla 230-400 de como fase estacionaria, y mezclas de hexanos-AcOEt en orden ascendente de polaridad como eluyente. La cromatografía fue monitoreada por medio de cromatografía en capa fina.

8.5. Cromatografía en capa fina impregnada con solución de AgNO_3

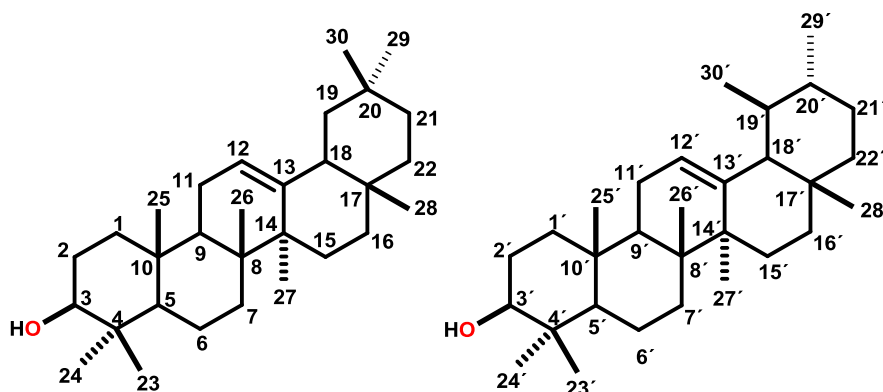
Esta cromatografía se realizó en cromatofolios base de aluminio de gel de sílice 60, impregnados con solución de nitrato de plata (850 mg AgNO_3 en 6 mL de acetonitrilo) con polaridad CH_2Cl_2 -AcOEt (17:3).

Ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (23)

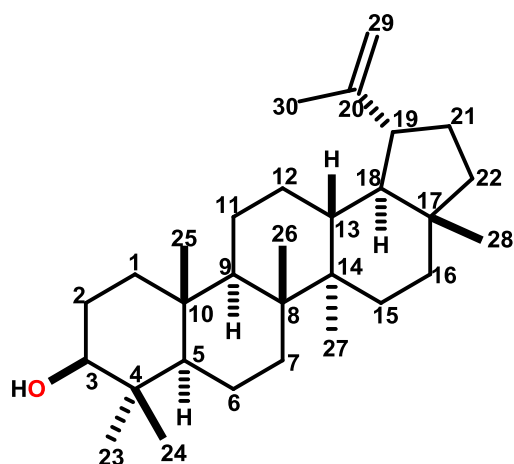
Sólido de color blanco, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +4.5$ (c 0.31, CHCl₃), IR (CHCl₃) ν_{max} : 3513, 2946, 2925, 2850, 1730, 1693, 1468, 1454, 1367, 1273, 1255, 1117, 976 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ 5.74 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-15), 5.46 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-16), 2.15 (2H, da, $J = 13.6$ Hz, H-3), 1.82 (1H, m, H-6), 1.69 (1H, da, $J = 12.6$ Hz, H-6'), 1.66 (2H, dt, $J = 13.8, 3.1$ Hz, H-1), 1.54 (2H, m, H-11), 1.46 (1H, dd, $J = 10.0, 1.9$ Hz, H-14), 1.26 (2H, m, H-12), 1.24 (3H, s, H-18), 1.11 (1H, m, H-5), 1.33 (2H, m, H-7), 1.01 (1H, da, $J = 10.0$ Hz, H-14'), 1.00 (3H, s, H-17), 0.98 (2H, m, H-2), 0.89 (1H, dda, $J = 12.6, 4.4$ Hz, H-9), 0.67 (3H, s, H-20), RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 183.2 (C, C-19), 136.5 (CH, C-16), 134.8 (CH, C-15), 61.0 (CH₂, C-14), 56.9 (CH, C-5), 52.2 (CH, C-9), 49.1 (C, C-8), 43.7 (C, C-4), 43.6 (C, C-13), 39.5 (CH₂, C-1), 37.9 (CH₂, C-3), 37.5 (C, C-10), 37.5 (CH₂, C-7), 33.0 (CH₂, C-12), 29.1 (CH₃, C-18), 24.9 (CH₃, C-17), 21.5 (CH₂, C-6), 20.4 (CH₂, C-11), 19.2 (CH₂, C-2), 13.8 (CH₃, C-20); EMIE, 302 m/z (C₂₀H₃₀O₂).

estigmasterol (29) y β -sitosterol (10).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5.34 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H-6 y H-6'), 5.15 (dd, $J = 15.2, 8.4$ Hz, 1H, H-22), 5.02 (dd, $J = 15.2, 8.4$ Hz, 1H, H-23), 3.53 (m, 1H, H-3 y H-3'), 1.03 (d, $J = 8, 3$ Hz, H-29 y H-29'), 1.01 (s, 3H, H-19 y H-19'), 0.93 (d, $J = 6.4$ Hz, H-21 y H-21'), 0.91 (d, $J = 7.2$, H-26 y H-26'), 0.81 (t, $J = 6.8$, H-27 y H-27'), 0.68 (s, 3H, H-18 y H-18'), RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 140.8 (C, C-5 y C-5'), 138.3 (CH_2 , C-22), 129.3 (CH_2 , C-23), 121.7 (CH, C-6 y C-6'), 71.8 (CH, C-3 y C-3'), 56.8 (CH, C-14), 56.7 (CH, C-14'), 56.1 (CH, C-17), 56.0 (CH, C-17'), 51.2 (CH, C-9), 51.1 (CH, C-9'), 42.5 (CH_2 , C-4'), 42.3 (CH_2 , C-4), 42.3 (C, C-13 y C-13'), 40.5 (CH, C-20), 40.5 (CH, C-24), 39.7 (CH_2 , C-12 y C-12'), 39.5 (C, C-10), 37.2 (CH_2 , C-1 y C-1'), 36.5 (C, C-10'), 36.1 (CH, C-20'), 36.1 (CH, C-24'), 33.9 (CH_2 , C-22'), 31.9 (CH_2 , C-7), 31.9 (CH_3 , C-25), 31.9 (CH, C-8 y C-8'), 31.8 (CH_2 , C-7'), 31.6 (CH_2 , C-2 y C-2'), 29.1 (CH_3 , C-25'), 28.4 (CH_2 , C-16), 28.2 (CH_2 , C-16'), 26.0 (CH_2 , 23'), 25.4 (CH, C-28), 25.4 (CH, C-28'), 24.4 (CH_2 , C-15), 24.3 (C, C-15'), 23.0 (CH, C-28'), 23.0 (CH, C-28'), 21.2 (CH_3 , C-19), 21.2 (CH_3 , C-21), 21.2 (CH_3 , C-26), 21.1 (CH_2 , C-11 y C-11'), 19.8 (CH_3 , C-26'), 19.4 (CH, C-19'), 19.1 (CH_3 , C-27'), 19.0 (CH_3 , C-27), 18.8 (CH_3 , C-21'), 12.1 (CH_3 , C-29), 12.1 (CH_3 , C-29'). EMIE, 412 m/z ($\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$) y EMIE, 414 m/z ($\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$).

α -amirina (30) y β -amirina (31)

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ 5.19 (t, $J= 3.6$ Hz, 1H, H-12'), 5.14 (t, $J= 4$ Hz, 1H, H-12), 3.24 (m, 1H, H-3 y H-3'), 1.27 (s, 3H, H-24 y H 27'), 1.15 (s, 3H, H-27), 1.01 (s, 3H, H-25 y H-25'), 0.98 (d, $J= 7.0$, 3H, H-30), 0.96 (s, 3H, H-26'), 0.88 (s, 6H, H-29'), 0.84 (s, 3H, H-28'), 0.80 (d, $J= 7.0$, 3H, H-29). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 145.3 (C, C-13'), 139.7 (C, C-13), 124.4 (CH, C-12), 121.7 (CH, C-12'), 80.6 (CH, C-3 y C-3'), 59.1 (CH, C-18), 55.3 (CH, C-5 y C-5'), 47.7 (CH, C-9 y C-9'), 46.9 (CH, C-19'), 42.2 (C, C-14), 41.8 (C, C-14'), 41.6 (CH_2 , C-22), 40.1 (C, C-8), 39.7 (CH, C-19, C-20), 38.8 (C, C-4, C-8'), 37.8 (CH_2 , C-19 y C-1'), 36.9 (C, C-10 y C-10'), 34.8 (CH_2 , C-21'), 33.8 (C, C-17), 33.4 (CH_3 , C-29'), 32.6 (CH_2 , C-7' y C-17'), 32.5 (CH_2 , C-7), 31.3 (CH_2 , C-21), 31.2 (CH, C-20'), 28.8 (CH_2 , C-15), 28.5 (CH_3 , C-28'), 28.1 (CH_3 , C-28), 27.0 (CH_2 , C-2 y C-2'), 26.7 (CH_2 , C-16), 26.2 (CH_2 , C-15'), 26.0 (CH_3 , C-27'), 23.8 (CH_3 , C-30), 23.6 (CH_2 , C-11'), 23.4 (CH_2 , C-119), 23.3 (CH_3 , C-27), 22.8 (CH_3 , C-23 y C-23'), 21.5 (CH_3 , C-30'), 18.3 (CH_2 , C-6 y C-6'), 17.6 (CH_3 , C-29), 16.9 (CH_3 , C-26 y 26'), 15.8 (CH_3 , C-25), 15.6 (CH_3 , C-24 y C-24', C-25'). EMIE, 426 m/z ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$).

Lupeol (32)

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ 4.69 (da, $J= 2.4$ Hz, 1H, H-29), 4.58 (dd, $J=2.4$, 1.6 Hz, 1H, H-29'), 4.47 (dt, $J= 12.4$, 6.0 Hz, 1H, H-3), 2.20 (m, 1H, H-19), 1.65 (sa, 3H, H-30), 0.93 (s, 3H, H-28), 0.88 (s, 3H, H-27), 0.84 (s, 6H, H-24, H-25), 0.79 (s, 3H, H-23).

9. Bibliografía

- Arango A. G., Alcaloides y Compuestos Nitrogenados, Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica. 12-14 (2002).
- Arellano M. R., Delgado R. G., Hypargiryn A, a Hemiacetalic Germacrolide from *Viguiera hypargyrea* (Asteraceae). Biogenetic Implication and Biological Evaluation, Journal of the Mexican Chemical Society. 969-972 (2010).
- Ávalos G. A., Pérez-Urria C. E., Metabolitos Secundarios de Plantas, Reduca (Biología), Serie Fisiológica Vegetal. 119-145 (2009).
- Bohlmann F., Zdero C., King R. M., Robinson H., 4 α -dihydroencelin and related sesquiterpene acids from *Perymenium featherstonei*, Phytochemistry. 1185-1187 (1983).
- Bohlmann F., Jakupovic J., Schuster A., Germacranolides from *Perymenium klattianum* and *Perymenium ovalifolia*, Phytochemistry. 1185-1187 (1983).
- Bohlmann F., Zdero C., Eine neue diterpensaure aus *Perymenium ecuadoricum*, Phytochemistry. 786-787 (1976).
- Bremer K., Asteraceae. Cladistics and Classification. Timber Press. 752. (1994).
- Ciccio J. F., Chaverri C., Chemical Composition of the leaf and Branch oils of *Perymenium grande* Helsl. var. *nelsonni* (Robins. & Grenm.) Fay (Asteraceae Heliantheae) from Costa Rica, Records of Natural Product. 371-375 (2012).
- Dewick M. P., Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd Edición. 15-19 (2008).
- Eckart E., Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites, Springer-Verlang. 343 (2008).
- Fonnegra G. R., Jiménez R. S., Plantas medicinales aprovadas en colombia, Univercidad de Antioquia. 72 (2007).
- Funk V. A., Stuessy T. F., Robinson E. H., Classification of Compositae. En *Systematics, evolution, and biogeography of Compositae. International Association for Plant Taxonomy (IAPT).*, Botany & Mycology, 171-189 (2009).
- Funk V. A., Randall J. B., Keeley S. C., Chan R., Watson L., Gemeinhonzer B., Schilling E., Panero J. L., Baldwin B. G., Garcia-jacas N., Sussana A., Jansen R. K., Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. Biological Skripts. 343-373 (2005).

- Gómez H. M. «Estudio químico y biológico de *Chromolaena pulchella*, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería.» (2011).
- Gonzalez A. F., «Nomenclatura de Química Orgánica.» 122 (1991).
- Grande M., Mancheño B., Sanchez M.J., «Elasclepial and other tetracyclic diterpenoids from *Elaeoselinum asclepium*, Phytochemistry.» 1977-1982 (1990).
- Jeong S., Kim B., Keum K., Lee K., Kang S., Park B., Lee Y., You Y., «Kaurenoic acid from *Aralia continentalis* Inhibits Biofilm Formation of *Streptococcus mutans*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.» 1-9 (2013).
- Katinas L., Gutiérrez D. G., Grossi M. A., Crisci J. V., «Panorama de la Familia Asteraceae (=Compositae) en la República Argentina, Boletín de la sociedad Argentina de Botánica.» 113-129 (2007).
- Loyola V. V., Sanches I. P., Canto C. B., Gutierrez P. L., Galaz A. R., Moreno V. O., «Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica, Unidad de biología molecular y bioquímica de plantas.» 67 (2004).
- Luize de S. K., Cechinel-Filho V., «Plantas de género Bauhinia: composicao química e potencia farmacológico. Química Nova.» 449 (2002).
- Mahato S. B., Kundu A., «¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient feature, Phytochemistry.» 1517-1575 (1994).
- Maldonado E., Mayorga L., Ortega A., «Perydiscolic acid, a germacranolide from *Perymenium* Species, Phytochemistry.» 205-207 (1986).
- Maldonado E., Bello M., Villaseñor J. L., Ortega A., «Acyclic diterpenes from *Perymenium hintonii*, Phytochemistry.» 1115-1118 (1997).
- Maldonado E., Mancera C., Fiallega G., Ortega A., «Germacranolides from *Perymenium berlandieri*, Phytochemistry.» 1265-1267 (1994).
- Maldonado E., Vaughan J., Ortega A., «A melampolide and an eudesmanolide from *Perymenium mendezii*, Phytochemistry.» 813-815 (1986).
- Marcano D., Hasegawa M. «Fitoquímica Orgánica Universidad central de Venezuela Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.» 239 (2002).
- Marquina S., Parra J. L., Gonzáles M., Zamilpa A., Escalante J., Trejo-Hernández M. R., Álvarez L., «Hydroxylation of the diterpenes *ent*-kaur-16-en-19-oic and *ent*-beyer-15-en-19-oic acids by the fungus *Aspergillus niger*, Phytochemistry.» 2017-2022 (2009).
- Murillo R., Castro V., Araya J., Poveda L., «Nuevas lactonas sesquiterpénicas de *Perymenium Grande*, Ciencia y Tecnología.» 217-226 (2006).

- Negri G., Oliveira A. F. M., Salatino M. L. F., Salatino A., Chemistry of the stem bark of *Amburana cearensis* (allemao) (A. C. SM) Instituto de biociencias. 1-4 (2004).
- Novora L., Gutierrez D. G., Flora del valle Lerma, asteraceae bercht. & j. presl. v. Heliantheae Cass. Aportes botánicos de Salta-ser. Flora. 1-2 (2010).
- Osuna T. L., Tapia P. M. E., Aguilar C. A., Plantas medicinales de la medicina mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Estudio etnobotánica, fitoquímico y farmacológico. 103-104 (2005).
- Quiñones M., Miguel M., Aleixandre A., Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludable sobre el sistema cardiovascular. Nutrición hospitalaria. 77-80 (2012).
- Redonda M. R., Villaseñor J. L., Flora del valle de Tehuacan-Cuicatlan, Bercht. & J. Presl. 1-64 (2011).
- Robinson B. L., Greenman J. M., Revision of the Genera Montanoa, *Perymenium*, and Zaluzania, Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University. 507-534 (1899).
- Rowshanol M. H., Farjana N., Matiar R., Haque M. E., Rezaul M. k., Isolation Of Stigmasterol and -Sitosterol from Metanolic Extrac of Root Bark of *Calotropis gigantea* (Linn). Department of Chemistry. 4175 (2007).
- Ruiz J. J. G. Estudio químico y actividad antioxidante de *Verbesina parviflora*, Instituto de Investigaciones químico biológicas. 2015.
- Rzedowski J., Calderón de R. G., Carrillo R. P., Floradel bajo y regiones adyacentes, Instituto de Ecología, A.C. Centro regional del Bajío, Patzcuaro Michoacán. 107-114 (2011).
- Rzedowski J., Calderón de R. G., Dos Especies Nuevas de *Perymenium* (Compositae-Heliantheae) del centro de México, Acta Botánica Mexicana (97). 57-63 (2011).
- Rzedowski J., Contribuciones a la fitogeografía florística e histórica de México III. Algunas tendencias en la distribución geográfica y ecológica de las Compositae mexicanas. 123-132 (1972).
- Sáez J., Granados H., Escobar G., Cardona W., Atehortua L., Callejas R., Cortés D., Gonzales C., Piperlongumina y Estigmasterol, compuestos de raíces y tallos de *piperauritum*. Revista colombiana de química. 77 (1998).
- Santos N., Noldin F. E. V., Cechinel-filho V., Anti-inflammatory-antinociceptive, and antipyretic effects of methanol extrac of *Cariniana rubra* stem bark in animal models. Anais da academia brasileira de ciencias. 86 (2011).

- Sepúlveda J. G., Porta D. H., Rocha S. M., La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas, *Revista Mexicana de Fitopatología*. 355-363 (2003).
- Siedle B.; Garcia P. A.; Murillo R.; Schulte M. J.; Castro V.; Rüngeler P.; Klass Vh. A.; Da Costa F.; Kisiel W.; Merfort I. J., Quantitative Structure-Activity Relationship of Sesquiterpene Lactone as Inhibitors of the Transcription Factor NF-KB, *Journal Medical Chemistry*. 6042-6054 (2004).
- Smith N., Mori S.A., Henderson A., Stevenson D., Helad S. V., «Flowering plants of the Neotropics. Princeton University Press.» 694 (2004).
- Taiz L., Zeiger E., «Fisiología vegetal, Universitat Jaume I.» 537 (2006).
- Vieira H. S., Takahashia J. A., Oliveira A. B., Chiaric E., Boaventura M. A., Novel Derivatives of kaurenoic Acid: Preparation and Evaluation of their Trypanocidal Activity, *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 151-157 (2002).
- Villagómez G. A. K., Estudio Químico Preliminar de *Perymenium buphthalmoides*, Facultad de Química Farmacobiología. 2014.
- Villaseñor J. L .; Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México Interciencia. 1-9 (2003).
- Villaseñor J. L., Hinojosa E. O., El género *Sclerocarpus* (Asteraceae, Heliantheae) en México. 51-62 (2011).
- Villaseñor J. L., «La familia Asteraceae en México.» 290-291. (1993).
- Yinusa I., George I. N., Usman S. O. A., Ayo R. G., Bioctivity of Stigmasterol isolated from the aerial part of *Spillanthes acmella* (murr) on selectec microorganism. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 475-479 (2014).
- Zamilpa A., Tortoriello J., Navarro V., Delgado G., Álvarez L., Antispasmodic and antimicrobial diterpenic acids from *Viguiera hypargyrea* roots, *Planta Médica*. 281-283 (2002).
- Zgoda-Pol, J Freyer A, J Killmer L, y Porter JR. Antimicrobial diterpenes from the stem bark of *Mitrephora celebica*, *Fitoterapia*. 434 (2002).