



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**Elucidación estructural de metabolitos secundarios
aislados de *Lasianthaea aurea***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

**Química Farmacobióloga:
ROSALBA CRUZ CORONA**

DIRECTORES:

**Doctora en Ciencias Químicas:
ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES**

**Doctor en Química:
MARIO ARMANDO GÓMEZ HURTADO**

Morelia, Michoacán

Marzo 2018

Dedicatoria

A mis padres

*Rosa María Corona Zúñiga y Salvador Cruz Núñez, por todo el cariño, sus
buenos consejos y apoyo incondicional.*

A mis hermanos

María Guadalupe, Salvador, Daniel y Alberto, mis fieles compañeros de vida.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de la Maestría y la obtención del grado.

A mis directores la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres, a quien admiro y estimo enormemente, agradezco toda la confianza y apoyo brindado durante todo este tiempo, su preocupación y entrega en la realización de esta investigación, así como, ser parte importante en mi formación académica y personal. Al D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado, a quien estimo y agradezco la confianza, el conocimiento, y las aportaciones realizadas para este proyecto.

A mi comité tutorial el D.C. Juan Diego Hernández Hernández, la D.C. Yliana López Castro y el D.C. Hugo Alejandro García Gutiérrez, por las aportaciones que enriquecieron e hicieron posible este trabajo.

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

A Juan Luis Cortés Muñoz agradezco su apoyo incondicional y su valiosa compañía. A mis amigos y compañeros Sinuhé y Odessa, por su bonita amistad. Al D.C. Armando por su apoyo y conocimiento dedicado para la realización de este trabajo. A mis compañeros de laboratorio Viridiana, Gabriela, Eva, Dalia, Araceli, Julio, Mónica, Teresa, Rosa, Irving, Yunuen, Martín, Celeste y Esau por todos esos buenos momentos compartidos.

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

Parte de los resultados de este trabajo de investigación se presentaron en los siguientes congresos y foros:

- En la 3^a semana del posgrado en Ciencias Químicas con la ponencia oral del trabajo titulado “Elucidación estructural de metabolitos secundarios aislados de *Lasianthaea aurea*”, el 27 de junio de 2016, en Morelia, Michoacán.
- En el marco de las actividades del 51° Congreso Mexicano de Química y 35° Congreso Nacional de Educación Química, con la ponencia oral del trabajo titulado “Kaurenos aislados de *Lasianthaea aurea*”, del 28 de septiembre a 1 de Octubre de 2016, en Pachuca de Soto, Hidalgo, México.
- En el II Congreso Internacional y IV Nacional de Químico Farmacobiología, con la ponencia oral del trabajo titulado “Estudio Químico de la Raíz de *Lasianthaea aurea*” del 28 de noviembre al 1 de diciembre del 2016, en Morelia, Michoacán, México.
- En la 13^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, con la ponencia en modalidad cartel del trabajo titulado “*Lasianthaea aurea* como fuente de kaurenos” celebrada del 17 al 20 de mayo de 2017 en Morelia, Michoacán, México.
- En el 1er Foro del posgrado en Ciencias Químicas del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, con la ponencia del trabajo titulado “Estudio químico de extractos hexánicos de *Lasianthaea aurea*”, celebrado del 31 de julio al 4 de agosto de 2017, en Morelia, Michoacán, México.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	viii
SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Terpenos	4
2.1.1 Monoterpenos	5
2.1.2 Sesquiterpenos	5
2.1.3 Diterpenos.....	6
2.1.4 Triterpenos.....	7
2.2 Familia Asteraceae	8
2.3 Género <i>Lasianthaea</i>	9
2.4 Estudios químicos reportados para el género <i>Lasianthaea</i>	10
2.4.1 <i>Lasianthaea fruticosa</i>	10
2.4.2 <i>Lasianthaea podocephala</i>	11
2.5 <i>Lasianthaea aurea</i>	12
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. OBJETIVOS	15
4.1 Objetivo General	15
4.2 Objetivos Específicos	15
5. ESQUEMA EXPERIMENTAL	16
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
6.1 Colecta de la especie y análisis de extractos	17
6.2 Estudio químico de raíz.....	20
6.3 Estudio químico de flor	49
6.4 Estudio químico de tallo.....	53
6.5 Estudio químico de hoja.....	54
7. CONCLUSIONES	59
8. PARTE EXPERIMENTAL	61
9. BIBLIOGRAFÍA	71

| ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Eventos en los cuales se induce la producción de metabolitos secundarios como respuesta de defensa, en las plantas.....	2
Figura 2. Terpenos de interés.....	4
Figura 3. Biosíntesis de terpenos.....	6
Figura 4. Serie enantiomérica (- <i>ent</i>) y serie normal de diterpenos en la ciclización del GGPP.....	7
Figura 5. Lasidiol angelato de <i>Lasianthaea fruticosa</i>	10
Figura 6. Kaurenos de <i>Lasianthaea fruticosa</i>	10
Figura 7. Compuestos de <i>Lasianthaea podocephala</i>	11
Figura 8. <i>Lasianthaea aurea</i>	12
Figura 9. Ácido periménico aislado de <i>Lasianthaea aurea</i>	13
Figura 10. Espectros comparativos de RMN de ¹ H a 400 MHz de los extractos hexánicos de raíz de <i>L. aurea</i> , colecta Santa María (color negro) y colecta carretera Tiripetío-Villa Madero (color azul).....	18
Figura 11. Espectros comparativos de RMN de ¹ H a 400 MHz de los extractos hexánicos (color rojo) y de CH ₂ Cl ₂ (en color azul) de raíz, flor, tallo y hoja de <i>L. aurea</i>	19
Figura 12. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz del α -pineno (15).....	21
Figura 13. Espectro de RMN de ¹³ C a 100 MHz del α -pineno (15).....	21
Figura 14. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz del curcumeno (8).....	24
Figura 15. Espectro de RMN de ¹³ C a 100 MHz del curcumeno (8).....	24
Figura 16. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz del ácido kaurenico (4).....	26
Figura 17. Espectro de RMN de ¹³ C a 100 MHz del ácido kaurenico (4).....	26
Figura 18. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz del <i>ent</i> -kaur-16-en-19-ato de metilo (16)....	29
Figura 19. Espectro de RMN de ¹³ C a 100 MHz del <i>ent</i> -kaur-16-en-19-ato de metilo (16)...	29
Figura 20. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz de 4 y ácido grandiflorénico (5).....	31
Figura 21. Espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz del podocefalol (12).....	33

Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz del podocefalol (12).....	33
Figura 23. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz del acetato de podocefalilo (13).....	35
Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz del acetato de podocefalilo (13).....	36
Figura 25. Experimento NOESY del acetato de podocefalilo (13).....	36
Figura 26. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del kaurenal (17).....	39
Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del kaurenal (17).....	39
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del ácido <i>ent-3α-angeloil-kaur-16-en-19-oico</i> (18) y ácido angeloilgrandiflórico (19).....	41
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del ácido <i>ent-3α-isobutiroiloxi-kaur-16-en-19-oico</i> (20).....	44
Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del ácido <i>ent-3α-isobutiroiloxi-kaur-16-en-19-oico</i> (20).....	44
Figura 31. Experimento NOESY del ácido <i>ent-3α-isobutiroiloxi-kaur-16-en-19-oico</i> (20).....	46
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz del ácido periménico (14).....	47
Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz del ácido periménico (14).....	48
Figura 34. Difracción de Rayos X del ácido periménico (14).....	48
Figura 35. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del extracto hexánico de flor de <i>L. aurea</i>	49
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del estigmasterol (21) y β -sitosterol (22).....	51
Figura 37. Espectro de masa del estigmasterol (21).....	52
Figura 38. Espectro de masa del β -sitosterol (22).....	52
Figura 39. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del extracto hexánico de tallo de <i>L. aurea</i>	54
Figura 40. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del extracto hexánico de hoja de <i>L. aurea</i>	55
Figura 41. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz de α -amirina (23), β -amirina (24) y lupeol (25).....	57

| ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Desplazamientos de RMN de ^{13}C del α -pineno (15).....	22
Tabla 2. Desplazamientos de RMN de ^{13}C del curcumeno (8).....	23
Tabla 3. Desplazamientos de RMN de ^{13}C del ácido kaurenico (4).....	27
Tabla 4. Desplazamientos de RMN de ^{13}C del <i>ent</i> -kaur-16-en-19-ato de metilo (16).....	30
Tabla 5. Desplazamientos de RMN de ^1H del ácido grandiflorénico (5).....	32
Tabla 6. Desplazamientos de RMN de ^1H del podocefalol (12).....	37
Tabla 7. Desplazamientos de RMN de ^1H del acetato de podocefalilo (13).....	38
Tabla 8. Desplazamientos de RMN ^1H del ácido <i>ent</i> -3 α -angeloil-kaur-16-en-19-oico (18) y ácido angeloilgrandiflórico (19).....	42
Tabla 9. Desplazamientos de RMN de ^1H y ^{13}C del ácido <i>ent</i> -3 α -isobutiroiloxi-kaur-16-en-19-oico (20).....	45
Tabla 10. Desplazamientos de RMN ^1H de estigmasterol (21) y β -sitosterol (22).....	53
Tabla 11. Desplazamientos de RMN de ^1H de α -amirina (23), β -amirina (24) y lupeol (25).....	58

| ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Obtención del derivado 16.....	28
Esquema 2. Obtención del derivado acetilado 13.....	34

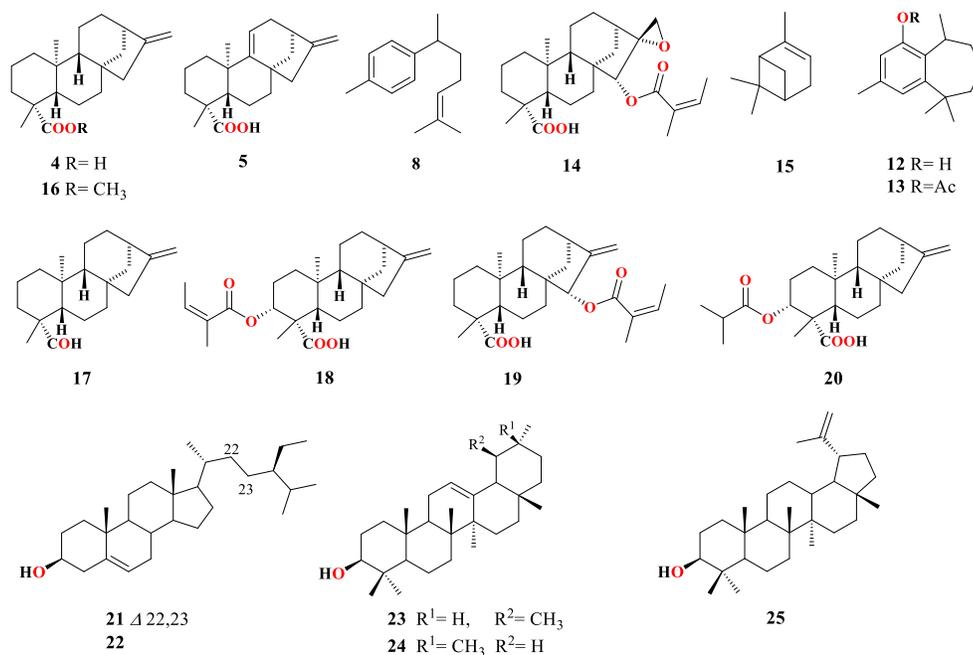
| SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

δ	Desplazamiento químico en partes por millón
°C	Grados Celsius
Ac	Acetato
Ac ₂ O	Anhídrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
Ang	Angelato
<i>c</i>	Concentración
CG	Cromatógrafo de gases
Cin	Cinamato
cm	Centímetros
d	Señal doble
da	Señal doble ancha
dd	Señal doble de dobles
dda	Señal doble de dobles ancha
DMAPP	Dimetilalil difosfato
dq	Señal doble de cuádruples
EM	Espectrómetro de masa
EMIE	Espectro de Masa por Impacto Electrónico
<i>ent</i>	Enantiómero
eV	Electron Volt
FDA	Food and Drug Administration
FPP	Farnesil difosfato
g	Gramos
GGPP	Geranilgeranil difosfato
h	Horas
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
IPP	Isopentenil difosfato

IR	Espectroscopia de Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
km	Kilómetro
m	Señal múltiple
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
mg	Miligramos
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ppm	Partes por millón
Py	Piridina
q	Señal cuádruple
qq	Señal cuádruple de cuádruples
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Señal simple
sa	Señal simple ancha
Sen	Seneciato
Sept	Señal séptuple
Sext	Señal Séxtuple
t.a.	Temperatura ambiente
ta	Señal triple ancha
TMS	Tetrametilsilano

| RESUMEN

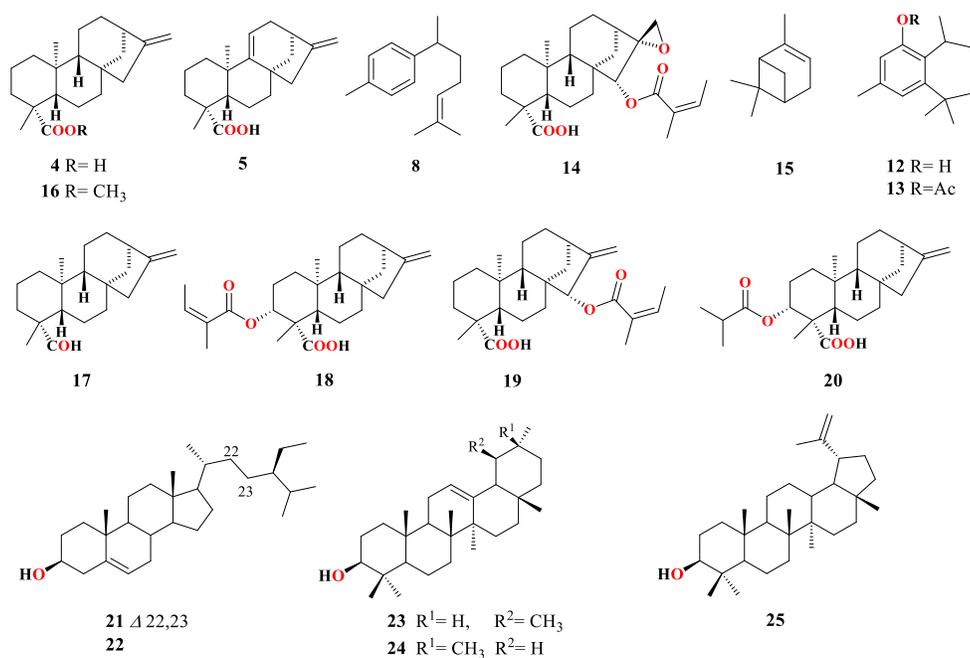
En el presente trabajo se analizaron los extractos hexánicos y de CH₂Cl₂ de raíz, flor, tallo y hoja de especímenes de *Lasianthaea aurea* colectadas en dos zonas diferentes del Estado de Michoacán, evidenciando la similitud de los componentes químicos, no obstante su procedencia. Del estudio de los extractos hexánicos de raíz se aislaron e identificaron al ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**4**), ácido grandiflorénico (**5**), curcumeno (**8**), podocefalol (**12**), ácido periménico (**14**), α -pineno (**15**), kaurenal (**17**), ácido *ent*-3 α -angeloil-kaur-16-en-19-oico (**18**), ácido angeloilgrandiflórico (**19**), y ácido *ent*-3 α -isobutiroiloxi-kaur-16-en-19-oico (**20**), un compuesto nuevo. La confirmación de los grupos funcionales presentes en **4** y **12** se logró mediante la preparación de los derivados *ent*-kaur-16-en-19-ato de metilo (**16**) y acetato de podocefalilo (**13**). A partir de los extractos de hexanos y CH₂Cl₂ de flor, tallo y hoja se identificaron al ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**4**), estigmasterol (**21**) y el β -sitosterol (**22**), de manera independiente. Adicionalmente, en los extractos hexánico y CH₂Cl₂ de hojas fueron identificados los triterpenos α -amirina (**23**), β -amirina (**24**) y lupeol (**25**). Todos los compuestos fueron caracterizados mediante sus datos físicos y espectroscópicos. Del compuesto **14** fue posible su caracterización mediante difracción de rayos X de monocristal.



Palabras clave: *Lasianthaea*, fitoquímica, RMN, terpenos.

| **ABSTRACT**

The chemical analyses of the hexanic and CH₂Cl₂ extracts from *Lasianthaea aurea* were achieved in this work. Specimens of this plant were collected in two different places from Michoacán State, evidencing the same chemical constitution, notwithstanding its origin. The chemical study of the hexanic extract from the roots afforded *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (**4**), grandiflorenic acid (**5**), curcumene (**8**), perimenic acid (**14**), podocefalol (**12**) kaurenal (**17**), *ent*-3 α -angeloyl-kaur-16-en-19-oic acid (**18**), angeloylgrandifloric acid (**19**), and the new compound *ent*-3 α -isobutyryloxy-kaur-16-en-19-oic acid (**20**). The chemical characterization of **4** and **12** was done by the preparation of their respective *ent*-kaur-16-en-19-ate methyl ester (**16**) and podocefalyl acetate (**13**). The *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (**4**), stigmasterol (**21**) and β -sitosterol (**22**) were obtained from the hexanic and CH₂Cl₂ extracts of flowers, stems and leaves. In addition, a mixture of α -amyrin (**23**), β -amyrin (**24**), and lupeol (**25**) was identified in the hexanic and CH₂Cl₂ extracts of the leaves. The compounds obtained herein were characterized by its physical and spectroscopic data. X ray diffraction studies of compound **14** were also possible.



Keywords: *Lasianthaea*, phytochemistry, NMR, terpenes.

1. | INTRODUCCIÓN

Desde el comienzo de la civilización, el hombre ha experimentado con plantas superiores en un intento de encontrar remedios contra diversas afecciones o enfermedades. A través del ensayo y error, la humanidad primitiva ha encontrado propiedades medicinales en las semillas, cortezas y raíces de ciertas plantas. Hasta principios del siglo XX, la principal fuente de medicamentos consistía en preparaciones farmacológicas obtenidas principalmente de plantas terrestres y vegetales.¹ Dada la riqueza química de las plantas, éstas fueron consideradas la fuente natural de numerosos medicamentos y por ello usadas en la medicina tradicional, popular o folklórica, sus cualidades fueron transmitidas a través de las culturas de los pueblos.²

La fitoquímica es la disciplina que tiene como principal objetivo el estudio de los constituyentes químicos de las plantas,³ los cuales se extraen del material que ha sido colectado, secado y molido con disolventes orgánicos de distinta polaridad, el subsecuente proceso de fraccionamiento y purificación de componentes con técnicas cromatográficas que incluyen columnas y placas, con gel de sílice como fase de separación.⁴

Con el desarrollo de la química de los productos naturales, surgió a su vez la posibilidad de caracterizar y clasificar a las plantas basándose en sus constituyentes químicos, estas características son controladas genéticamente, pero tienen la ventaja sobre las morfológicas, de que pueden ser descritas exactamente en términos de estructuras definidas y fórmulas químicas configuracionales. La elucidación de estructuras y configuraciones, abre el camino para entender su biosíntesis, la cual es de importancia sistemática fundamental. De esta manera, el método de la quimiotaxonomía es simple en principio y consiste en la investigación de la distribución en series de plantas relacionadas o supuestamente relacionadas, de los compuestos químicos o grupos de compuestos afines biosintéticamente.⁵

Las plantas poseen una gran cantidad de metabolitos primarios y secundarios que le permiten crecer, propagarse, defenderse y sobrevivir. Los metabolitos secundarios o productos naturales son compuestos de bajo peso molecular que tienen gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos.

Una síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas como el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), el ataque por microorganismos (virus, bacterias y hongos), la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y otros tipos de estrés abiótico (**Figura 1**).

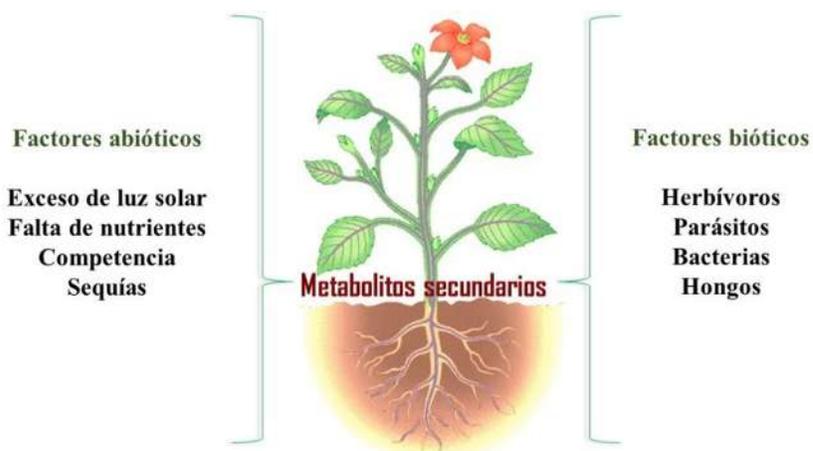


Figura 1. Eventos en los cuales se induce la producción de metabolitos secundarios como respuesta de defensa, en las plantas.

Existen dos grupos de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas, los fenoles y los terpenos, solo una tercera parte de especies conocidas contienen metabolitos basado en el nitrógeno, denominados alcaloides.⁶

El descubrimiento de fármacos ha estado asociado a dos disciplinas: la Química de Productos Naturales y la Síntesis Orgánica. Ninguna otra disciplina puede descubrir y desarrollar nuevas moléculas de pequeño peso molecular que puedan ser utilizadas como fármacos. Los productos naturales pueden ser útiles por sus posibilidades directas como agentes terapéuticos, como modelos para la preparación de sustancias bioactivas, como materia prima para la síntesis de sustancias de interés farmacológico y/o interés industrial. Sin lugar a dudas los productos naturales son estructuras biológicamente validadas a través de la co-evolución con el resto de los seres vivos.⁷

Para descubrir y desarrollar la entidad final de un medicamento la utilización de productos naturales se ha considerado de gran importancia. De un total de 1562 nuevos fármacos

aprobados por la FDA de 1981 al 2014, el 21% corresponde a derivados de un producto natural, el 4% a producto natural inalterado y el 21% a síntesis mimética de productos naturales.⁸

La diversidad con que cuenta México es una de las más variadas del mundo, reflejada en la presencia de prácticamente todos los tipos de vegetación. Esto se debe en gran medida a la ubicación entre dos zonas biogeográficas de América: la neártica y la neotropical, dando lugar a la existencia de toda gama de climas y suelos⁴. Diversos autores ubican a México entre los países con la mayor riqueza florística, y es quizá el país americano con el mayor nivel de endemismo.⁹

Por su número de especies, México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial, y entre los países continentales, ocupa el segundo por el número de especies endémicas (alrededor del 50%); registrándose 23,314 especies, distribuidas en 2,854 géneros de plantas vasculares nativas.¹⁰

Entre las especies endémicas de México se encuentra al género *Lasianthaea* que pertenece a la familia Asteraceae, este género cuenta con muy pocos reportes del estudio fitoquímico de sus especies. *Lasianthaea aurea* crece abundante en el Estado de Michoacán y se conoce como hierba del cangro o té de llano. De esta especie se cuenta con un solo estudio químico preliminar donde mencionan el aislamiento de dos diterpenos de tipo kaurano de la raíz, por lo que resultó interesante continuar con su exploración química.

En el presente trabajo se describen los metabolitos secundarios elucidados de los extractos hexánicos y de cloruro de metileno de raíz, flor, tallo y hoja de *Lasianthaea aurea* la cual fue colectada en dos zonas del estado de Michoacán.

2. | ANTECEDENTES

2.1 | Terpenos

Los terpenos son comercialmente interesantes debido a su uso como sabores y fragancias en alimentos y cosméticos como el mentol, nootkatona y esclareol o porque son importantes para la calidad de los productos agrícolas, como el sabor de las frutas y la fragancia de las flores (linalool). Además, los terpenos pueden tener propiedades medicinales tales como actividad anticanceroso (Taxol[®] y perilla alcohol), antipalúdica (artemisinina), antiulcerosa, antimicrobiana o diurética (Glicirricina) **Figura 2.**¹¹

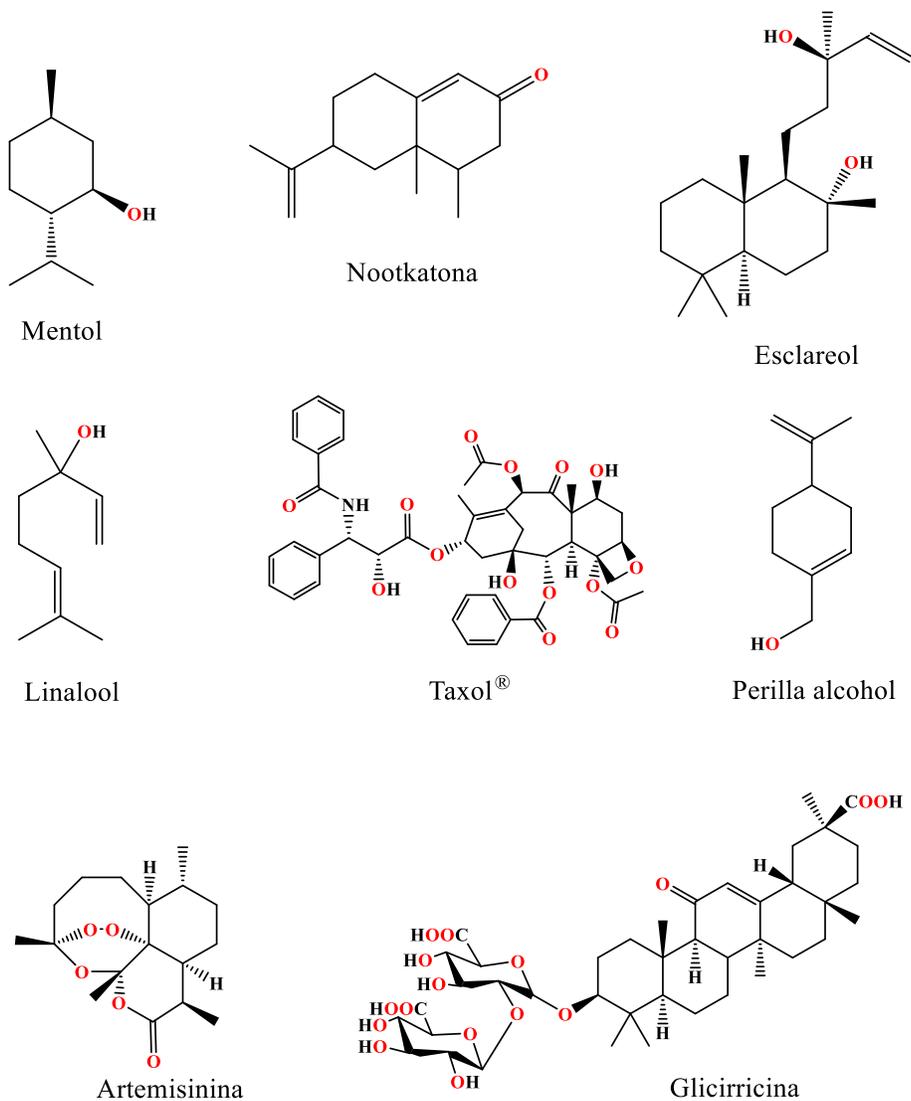


Figura 2. Terpenos de interés.

Los terpenos son el grupo más grande de productos naturales de plantas, que contienen una amplia variedad de tipos estructurales.¹²

Para su síntesis existen dos vías, una es la ruta del mevalonato que se lleva al cabo en el citoplasma y la otra se denomina como la ruta del metileritritol fosfato, la cual es independiente de la del mevalonato y que se realiza en los plástidos.⁶ Todos los terpenos se derivan del precursor universal isopentenil difosfato (IPP) que, después de la isomerización a dimetilalil difosfato (DMAPP) por IPP isomerasa, se elonga secuencialmente por preniltransferasas a geranyl difosfato (GPP, C₁₀), farnesil difosfato (FPP, C₁₅) y geranylgeranyl difosfato (GGPP, C₂₀)

Figura 3. Estos intermediarios acíclicos funcionan en los puntos de ramificación del metabolismo isoprenoide del cual los monoterpenos (de GPP), sesquiterpenos (de FPP) y diterpenos (de GGPP) divergen a través de la acción de las terpenoides sintasas.¹³ Estos mismos precursores se incorporan en muchos metabolitos primarios esenciales para la vida de las plantas, como los carotenoides, las ubiquinonas, los esteroides y la cadena lateral fitol de la clorofila.¹⁴

2.1.1 | Monoterpenos

Los monoterpenos conformados con dos unidades de isopreno (C₁₀), son más conocidos como componentes de las esencias volátiles de las flores y de los aceites esenciales de hierbas y especias, en los que representan hasta un 5% del peso seco de la planta. Los monoterpenos se aíslan por destilación o extracción y encuentran un uso industrial considerable en sabores y perfumes.

2.1.2 | Sesquiterpenos

Se derivan de tres unidades de isopreno (C₁₅), conteniendo 15 átomos de carbono, al igual que los monoterpenos, muchos sesquiterpenos se encuentran en los aceites esenciales. Numerosos sesquiterpenos actúan como fitoalexinas, compuestos antibióticos producidos por las plantas en respuesta al desafío microbiano.¹⁵⁻¹⁶

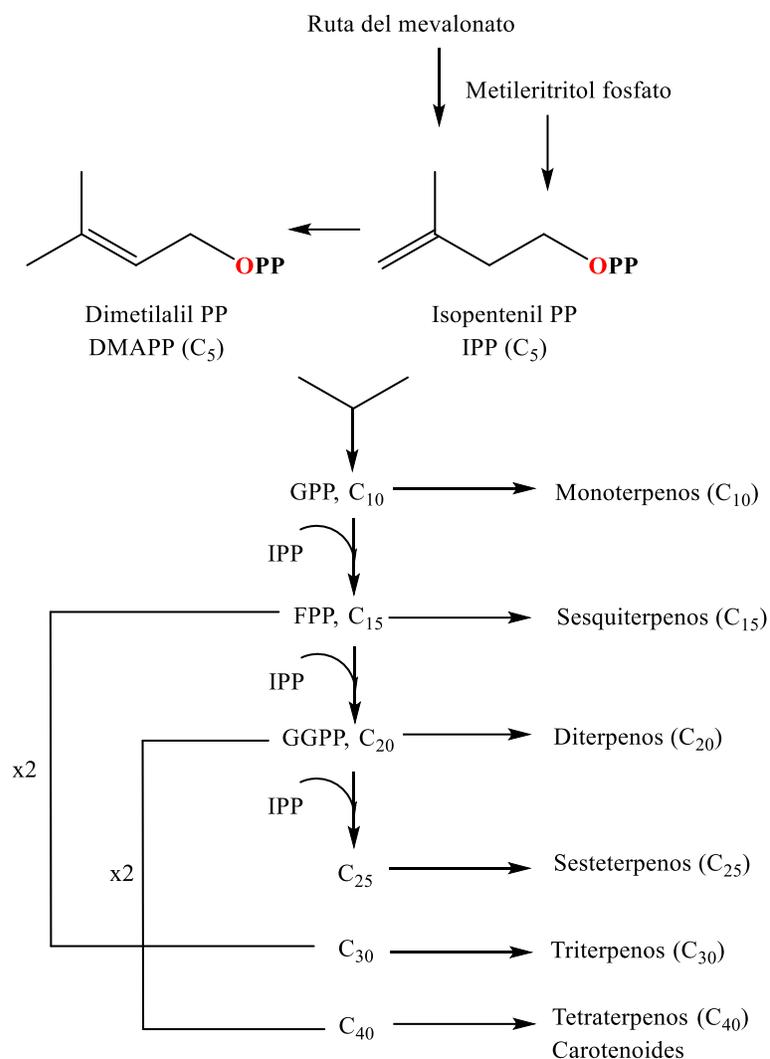


Figura 3. Biosíntesis de terpenos.

2.1.3 | Diterpenos

Los diterpenos constituyen un amplio conjunto de compuestos de C₂₀ biosintetizados a partir del geranylgeranyl difosfato (GGPP), que al ciclarse pueden dar lugar a dos series: la serie "normal" son las estructuras cuya fusión entre los anillos A y B ocurre de la misma manera que en los esteroides, mientras que las estructuras de la serie enantiomérica (denotadas como *ent-*) son las imágenes especulares correspondientes a la serie normal (**Figura 4**). Se encuentran principalmente en plantas y hongos, aunque también se han encontrado diterpenos en organismos marinos e insectos.¹⁷⁻¹⁸

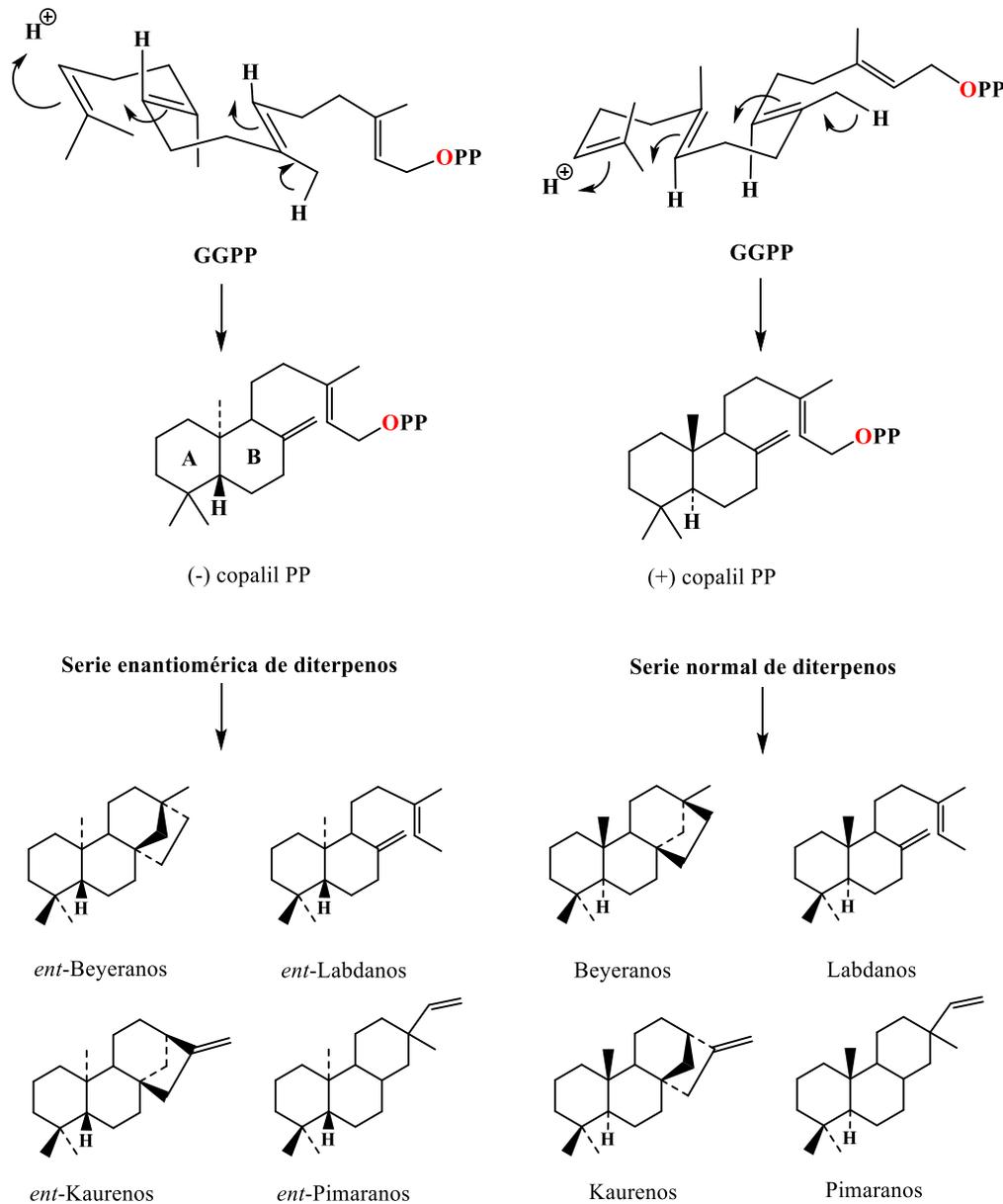


Figura 4. Serie enantiomérica (-*ent*) y serie normal de diterpenos en la ciclización del GGPP.

2.1.4 | Triterpenos

Los triterpenos contienen 30 átomos de carbono, se generan por la unión de dos cadenas C₁₅, cada una de las cuales se constituye por tres unidades de isopreno. Esta gran clase de moléculas incluye los brasinoesteroides, fitoesteroles (que componen la membrana), ciertas fitoalexinas, diversas toxinas y componentes de ceras superficiales, como el ácido oleanólico de las uvas.¹⁵

2.2 | Familia Asteraceae

El Neotrópico es la región biogeográfica con la mayor biodiversidad del planeta. En particular México es considerado un sitio de concentración de diversidad y de endemidad, comparado con muchas otras entidades políticas en el mundo.¹⁹

La familia fue fundada en 1792 con el nombre de Compositae por Giseke. En 1822 el código internacional de nomenclatura botánica permitió también el uso del nombre Asteraceae Dumortier.

La familia Asteraceae o Compositae, constituye el grupo vegetal más diverso de plantas vasculares sobre el planeta. Su distribución es prácticamente cosmopolita y es una de las familias más comunes en la mayor parte de los hábitats.²⁰ Asteraceae representa un grupo natural, con un número elevado de especies y amplia variación en cuanto a formas de vida, estructura floral, mecanismos de polinización y dispersión de semillas. Sus miembros son fácilmente reconocidos por sus inflorescencias.

La riqueza de la familia a nivel mundial se estima entre 1,500-1,700 géneros y entre 24,000-30,000 especies, con centros de diversificación importantes en la región del Mediterráneo en el Viejo Mundo, la región del Cabo en África, Australia, México y la Cordillera de los Andes en Sudamérica.²¹ En México existen alrededor de 385 géneros y 3,057 especies.²²

Su diversidad puede atribuirse entre otras cosas a sus excelentes mecanismos de dispersión y a su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ecológicas, muchas veces viéndose favorecidas por la perturbación, por lo que no es raro verlas dominando los medios arvenses, ruderales o en ocasiones compitiendo con los cultivos como malezas.²³ Dentro de esta familia se encuentra al pequeño género *Lasianthaea*.

2.3 | Género *Lasianthaea*

Durante muchos años este grupo se consideraba como parte integral de *Zexmenia*, conjunto polifilético actualmente subdividido en varios géneros. Son plantas herbáceas perennes, arbustivas o a veces arborescentes hasta de 7 metros de alto, sus hojas todas opuestas, algunas alternas, simples e indivisas, por lo común triplinervadas, flores liguladas fértiles, amarillas, anaranjadas o rojas; flores del disco hermafroditas, sus corolas pentámeras, tubulosas, amarillas a rojas, glabras, anteras apendiculadas en el ápice, auriculadas en la base, cafés a negruzcas, ramas del estilo filiformes.

Es un pequeño género que comprende 26 especies distribuidas en el continente Americano (desde el suroeste de Estados Unidos hasta Venezuela), y que hasta al año 2012 solo 15 se encuentran aceptadas.²⁴ En 2016 para este género se reportan 16 especies endémicas en México:²²

	<i>aurea</i>
	<i>beckerii</i>
	<i>ceanothifolia</i>
	<i>crocea</i>
	<i>fruticosa</i>
	<i>gentryi</i>
	<i>helianthoides</i>
	<i>macrocephala</i>
<i>Lasianthaea</i>	<i>machucana</i>
	<i>palmeri</i>
	<i>podocephala</i>
	<i>ritovegana</i>
	<i>rosei</i>
	<i>seemannii</i>
	<i>squarrosa</i>
	<i>zinnioides</i>

2.4 | Estudios químicos reportados para el género *Lasianthaea*

2.4.1 | *Lasianthaea fruticosa*

De esta especie reportaron al lasidiol angelato (**1**), un sesquiterpeno aislado del extracto de cloroformo de las hojas, la estructura que propusieron fue en base a la evidencia espectral (**Figura 5**).²⁵

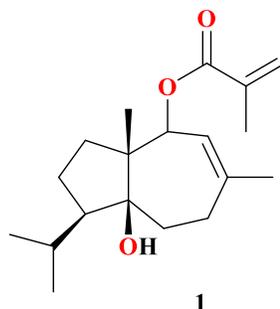


Figura 5. Lasidiol angelato de *Lasianthaea fruticosa*.

En un estudio posterior del extracto obtenido de una mezcla de metanol/éter etílico/éter de petróleo (1:2:1) de las partes aéreas de *Lasianthaea fruticosa* reportaron dos nuevos kaurenos denominados ácido *ent*-12 α -angeloiloxi-9,11-dehidro-kaur-16-en-19-oico (**2**) y ácido *ent*-12 α -senecioiloxi-9,11-dehidro-kaur-16-en-19-oico (**3**) **Figura 6**; cabe mencionar que los autores comentan que no detectaron la presencia del sesquiterpeno **1** previamente reportado.²⁶

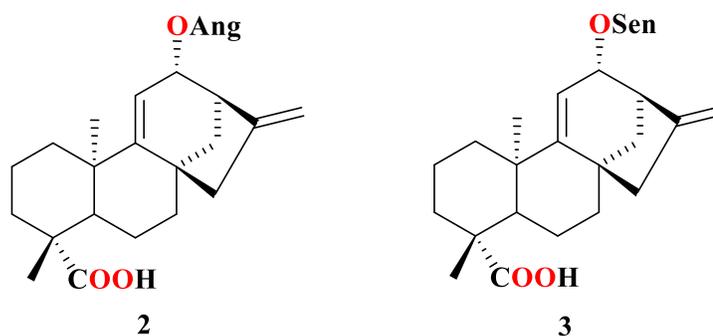


Figura 6. Kaurenos de *Lasianthaea fruticosa*.

2.4.2 | *Lasianthaea podocephala*

De las raíces de *L. podocephala* reportaron el aislamiento de **4-5**, un ácido epimérico **6**, los hidrocarburos **7-9**, además realizaron investigaciones espectroscópicas de RMN detalladas con la adición de $\text{Eu}(\text{fod})_3$ para determinar a **10** que llamaron hidroxicurcumeno y podocefalol (**12**) cuyos compuestos integraban una mezcla, donde **10** solo podría obtenerse puro después de su acetilación, **11**. El compuesto **10** fue primeramente aislado de esta especie,²⁷ y posteriormente realizaron un estudio para la determinación de la configuración absoluta, mediante su síntesis (**Figura 7**).²⁸

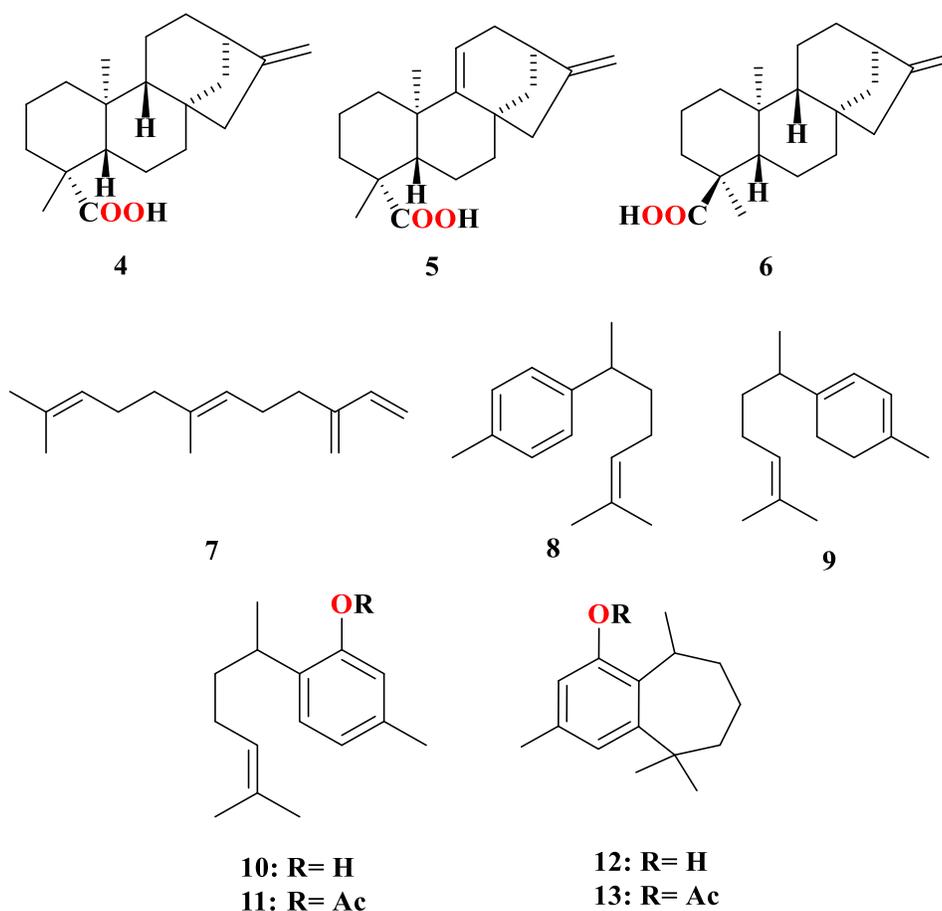


Figura 7. Compuestos de *Lasianthaea podocephala*.

2.5 | *Lasianthaea aurea*

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

Sinónimo: *Wedelia aurea*.



Figura 8. *Lasianthaea aurea*.

Lasianthaea aurea (**Figura 8**) fue identificada en el año 1979. Es una planta herbácea perenne, que crece hasta 60 cm de alto a partir de un conjunto de raíces tuberosas. Sus tallos a menudo varios, simples o ramificados, erectos o ascendentes. Hojas opuestas, de lámina lanceolada a elíptica, de 2 a 7.5 cm de largo, de 0.8 a 3 cm de ancho, margen toscamente denticulado y rasposa en ambas caras. Flores liguladas 6 a 11, sus láminas elípticas a oblongas de 8 a 17 mm de largo, amarillas; flores del disco 20 a 40, sus corolas tubulosas, de 6 a 8 mm de largo, amarillas, anteras cafés, de 2 a 2.5 mm de largo ramas del estilo con ápices subulados y pubérulos; aquenios de las flores liguladas triquetros, los de las flores del disco biconvexos, de 2.5 a 3.5 mm de largo, hispídulos a glabros, vilano de 2 a 3 aristas de 0.5 a 2.5 mm de largo, sin escamas.

Esta especie se ubica frecuentemente en pastizales secundarios y claros, en medio de bosques de encino en el norte de Michoacán, más escaso en Guanajuato y Querétaro, en alturas que van desde 1750 a 2650 msnm. Florece de julio a agosto principalmente, aunque se ha encontrado hasta el mes de octubre.

Es una especie endémica del centro de México: Michoacán, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Jalisco, Ciudad de México. Planta relativamente común y sin problemas de supervivencia.²⁹⁻³⁰

En el 2015 en un estudio químico preliminar realizado a los extractos hexánicos de raíz de *Lasianthaea aurea*, colectada en el km 3.5 de la carretera Tiripetío-Villa Madero en Michoacán, describieron el aislamiento del ácido kaurenoico (**4**) que se encontró como compuesto mayoritario y el ácido periménico (**14**) en menor proporción (**Figura 9**).³¹

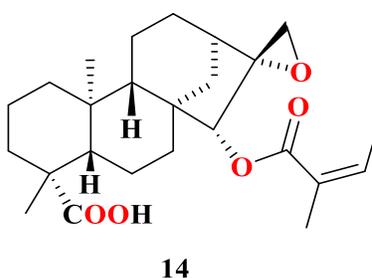


Figura 9. Ácido periménico aislado de *Lasianthaea aurea*.

Los pocos estudios que existen para este género reportan compuestos de tipo terpenoide los cuales han mostrado ser de gran importancia por su uso comercial y de *L. aurea* se tienen identificados dos compuestos de esta naturaleza, por lo que fue importante continuar con las investigaciones químicas.

3. | JUSTIFICACIÓN

Del metabolismo secundario que realizan las plantas, se pueden obtener una gran diversidad de compuestos en ellas, los cuales pueden ser aislados, caracterizados y posteriormente usarlos como nuevas rutas de investigación.

El género *Lasianthaea* ha sido poco estudiado desde el punto de vista químico y los reportes datan de hace más de diez años. De la especie *L. aurea* se encuentra un solo estudio químico preliminar de los extractos hexánicos de raíz en donde aislaron dos diterpenos del tipo kaurano. Es por esto que resulta interesante continuar con el estudio químico de esta especie para la elucidación estructural de los metabolitos secundarios que se encuentren presentes y contribuir a la quimiotaxonomía de este género.

4. | OBJETIVOS

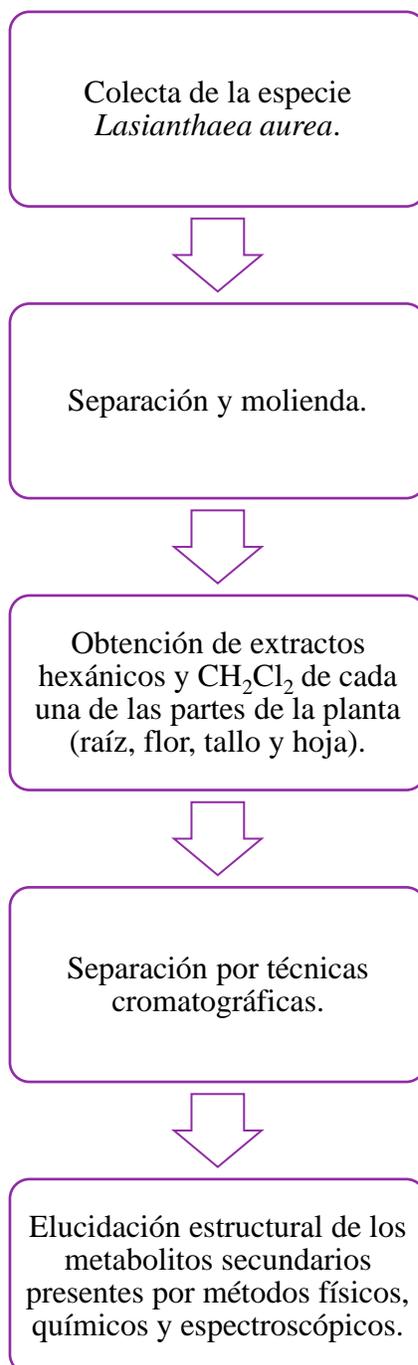
4.1 | Objetivo General

Realizar un estudio químico a la especie *Lasianthaea aurea*.

4.2 | Objetivos Específicos

- Obtener los extractos hexánicos y de CH_2Cl_2 de raíz, flor, tallo y hoja de *Lasianthaea aurea*.
- Aislar y caracterizar compuestos presentes, mediante métodos físicos, químicos y espectroscópicos.

5. | ESQUEMA EXPERIMENTAL



6. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 | Colecta de la especie y análisis de extractos

Las colectas de la especie *Lasianthaea aurea* se realizaron en el estado de Michoacán, en julio del 2014 en el km 3.5 de la carretera Tiripetío-Villa Madero y posteriormente en 2015 y 2016 en la Tenencia de Santa María en Morelia. La planta se dejó secar a la sombra y se separó en sus cuatro partes: raíz, flor, tallo y hoja, para la obtención de los extractos hexánicos y de CH_2Cl_2 de manera individual.

Para descartar variaciones en presencia o abundancia de compuestos debido al cambio de área de colección de la planta, se realizó una comparación de los espectros de RMN de ^1H (**Figura 10**) de los extractos hexánicos de raíz de la primera colecta (2014, en el km 3.5 de la carretera Tiripetío-Villa Madero) y de la realizada en el 2015 (en la Tenencia de Santa María en Morelia), observándose el mismo conjunto de señales para ambos espectros, donde se muestran las señales de δ 7.20 a 6.30 características de protones aromáticos o vinílicos, de δ 6.10 a 4.55 protones vinílicos, de δ 3.70 a 3.00 señales atribuidas a protones base de heteroátomo y de δ 2.50 a 0.55 las señales de protones alifáticos, lo cual nos indicó la presencia de terpenos de manera abundante. En base a lo anterior, las colectas de la especie *L. aurea* se hicieron en las dos zonas encontradas en Michoacán ya que se encontró la misma composición y abundancia de metabolitos secundarios.

Se obtuvieron los espectros de RMN de ^1H de los extractos hexánicos y de cloruro de metileno de cada una de las partes de la planta (**Figura 11**), los cuales al ser comparados se observó que en ambas polaridades de cada uno de los órganos se encuentra el mismo contenido de señales, con ligeras variaciones en abundancia de compuestos. Las partes aéreas (tallo, hoja y flor) de esta especie muestran gran similitud en la presencia de metabolitos secundarios.

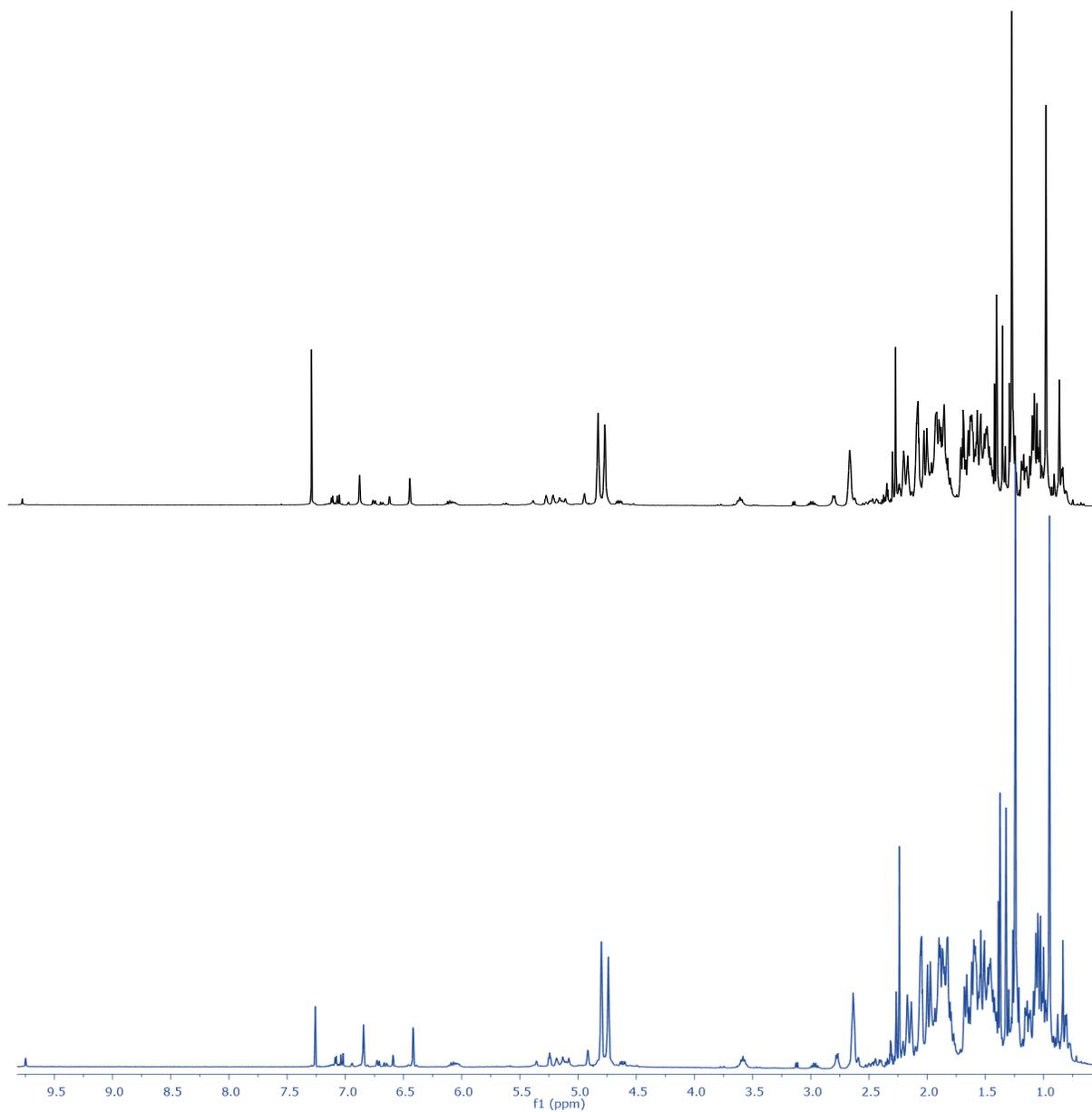
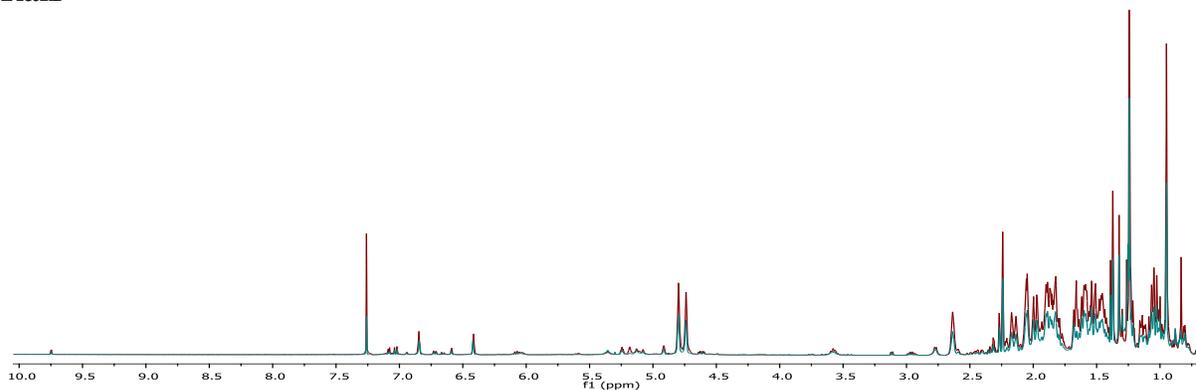
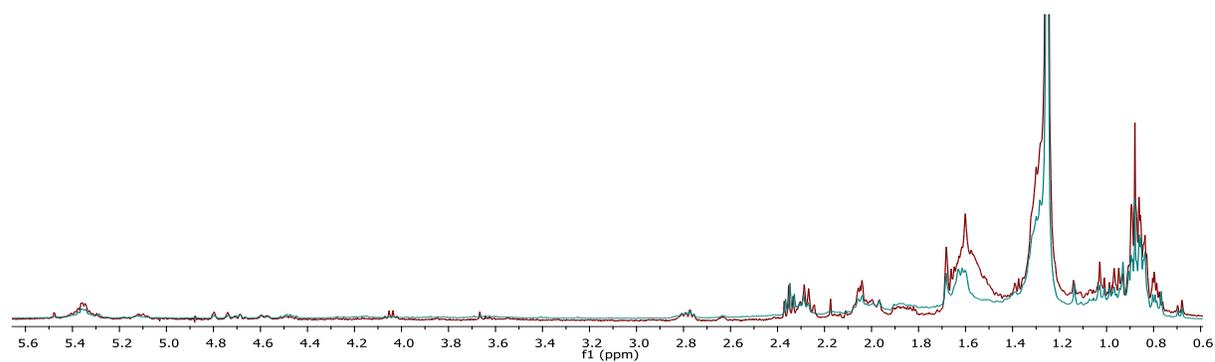


Figura 10. Espectros comparativos de RMN de ¹H a 400 MHz de los extractos hexánicos de raíz de *L. aurea*, colecta Santa María (color negro) y colecta carretera Tiripetío-Villa Madero (color azul).

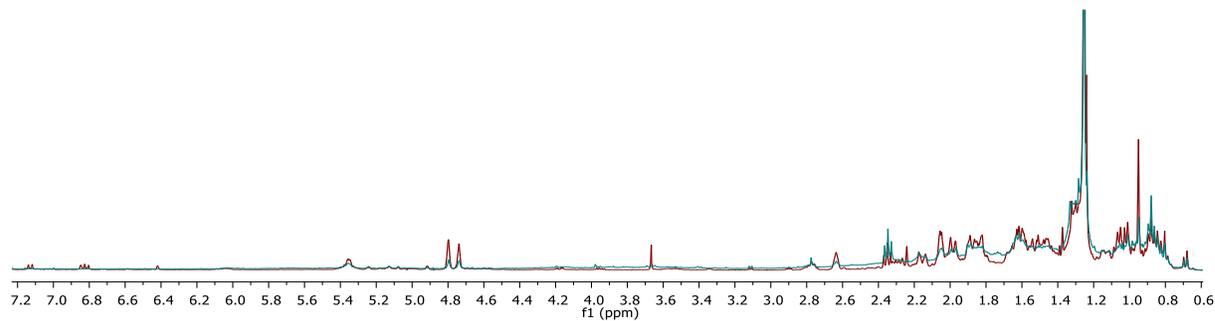
Raíz



Flor



Tallo



Hoja

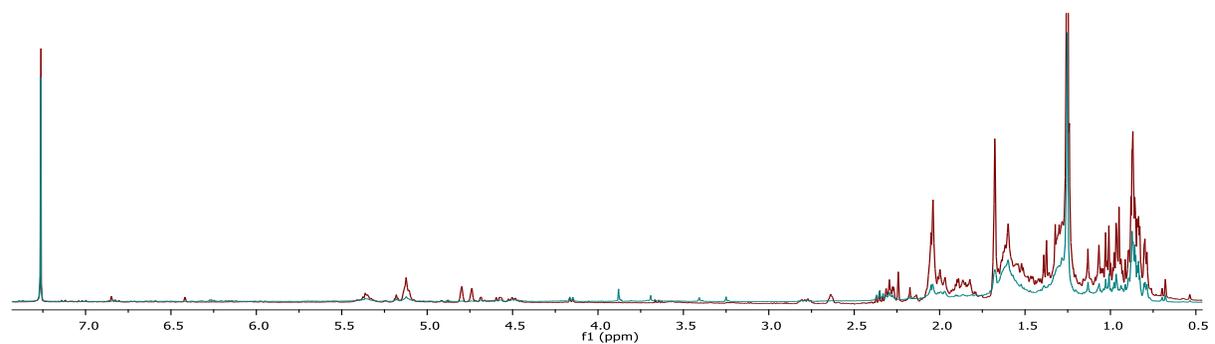


Figura 11. Espectros comparativos de RMN de ^1H a 400 MHz de los extractos hexánicos (color rojo) y de CH_2Cl_2 (en color azul) de raíz, flor, tallo y hoja de *L. aurea*.

6.2 | Estudio químico de raíz

Un lote de 995 g de raíz seca y triturada se maceró durante cinco días a temperatura ambiente utilizando como disolvente hexanos, se filtró y concentró en rotavapor para obtener el extracto, este procedimiento se realizó hasta agotar componentes, obteniendo un total de 123 g de una miel de color amarillo y textura viscosa, posteriormente se analizó por RMN de ^1H (**Figura 10**) para conocer de manera preliminar los componentes presentes.

Un total de 20 g de extracto hexánico de la raíz se sometió a columna cromatográfica con gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de hexanos-AcOEt en orden ascendente de polaridad como eluente, monitoreada por cromatografía en capa fina utilizando el mismo sistema de disolventes. En las fracciones 6-7 que fueron eluidas con hexanos se obtuvo un líquido viscoso incoloro y con aroma característico a pino. En su espectro de RMN de ^1H (**Figura 12**) se muestra una señal múltiple en δ 5.19 característica para un hidrógeno de doble enlace (H-3), en δ 1.65 aparece una señal que corresponde a los hidrógenos de un metilo vinílico (CH₃-10), en δ 1.26 y 0.84 dos señales simples que corresponden a los hidrógenos de los metilos geminales CH₃-8 y CH₃-9 respectivamente, el resto de las señales se ubican de δ 2.3 a 0.9.

En el espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 13**) se observa un total de diez señales, lo que sugirió la presencia de un monoterpeno, destacando entre ellas la de los carbonos vinílicos C-2 en δ 144.5 y CH-3 en δ 116.0, la señal del metilo vinílico (CH₃-10) en δ 23.0 y las señales de los metilos geminales CH₃-8 y CH₃-9 en δ 26.3 y 20.8 respectivamente, el resto de las señales de la estructura se localizan de δ 47.0 a 20.0. Los datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C (**Tabla 1**) y ^1H mostraron gran concordancia con la literatura, identificando al líquido viscoso transparente aislado como α -pineno (**15**).

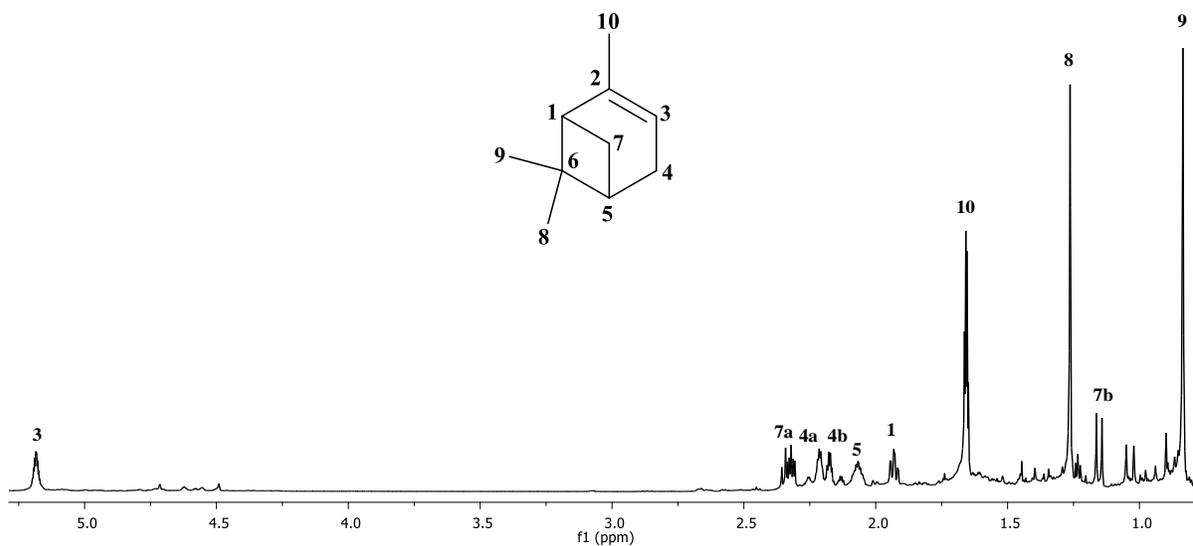


Figura 12. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del α-pineno (15).

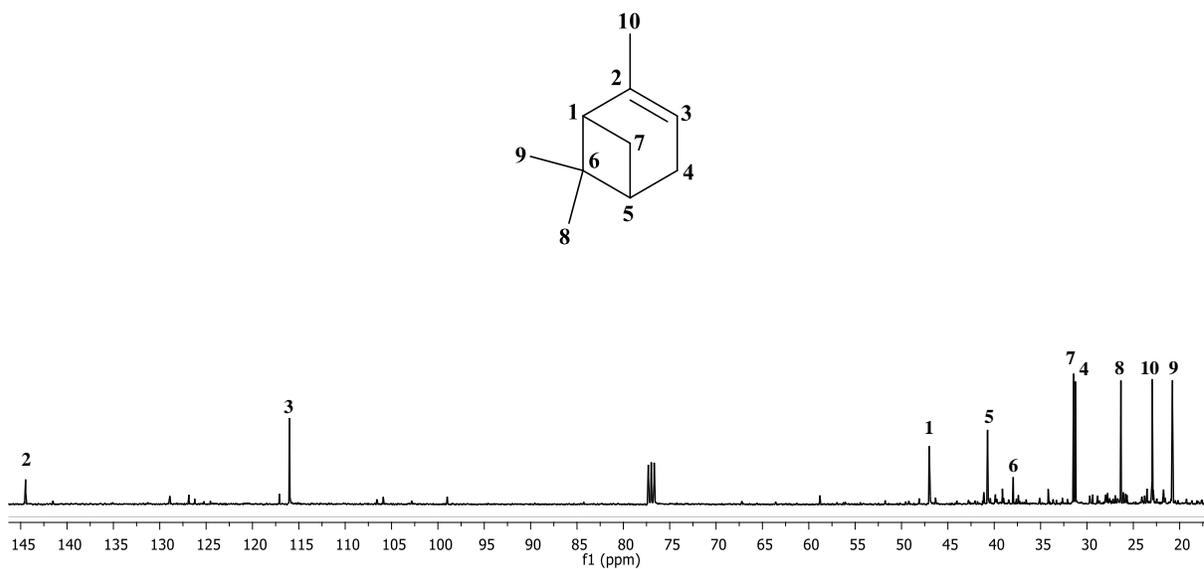


Figura 13. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz del α-pineno (15).

Tabla 1. Desplazamientos de RMN de ^{13}C del α -pineno (**15**).

CARBONO	δ EXPERIMENTAL	δ LITERATURA ³²
1	47.0	47.0
2	144.5	144.5
3	116.0	116.0
4	31.2	31.2
5	40.7	40.7
6	37.9	38.0
7	31.4	31.4
8	26.3	26.3
9	20.8	20.8
10	23.0	23.0

Posteriormente, después de varios procesos de recromatografía en columna y de una cromatografía en placa preparativa eluída con hexanos, se obtuvo un líquido viscoso incoloro, el cual se procedió a caracterizar por RMN de ^1H (**Figura 14**), en δ 7.08 se observa una señal múltiple característica de hidrógenos aromáticos que integra para cuatro (H-1, H-2, H-4 y H-5), una señal triple ancha que corresponde a un hidrógeno vinílico H-10 ($J=7.1$ Hz) se presenta en δ 5.09, en δ 2.65 una señal séxtuple asignada a H-7 ($J=7.0$ Hz), una señal simple se encuentra en δ 2.32 que integra para tres hidrógenos del CH_3 -15 aromático, en δ 1.87 y en 1.58 dos señales múltiples que integran cada una para dos hidrógenos asignadas a los metilenos CH_2 -9 y CH_2 -8 respectivamente, en δ 1.67 (CH_3 -12) y δ 1.52 (CH_3 -13) se encuentran dos señales simples que corresponden a los metilos geminales, y el metilo secundario (CH_3 -14) se observa como una señal doble en δ 1.21 ($J=7.0$ Hz).

En su espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 15**) se observan las señales del anillo aromático en δ 144.6 (C-6), 135.1 (C-3), las señales en δ 128.9 (CH-2, CH-4) y en δ 126.9 (CH-1, CH-5) se encuentran traslapadas, los carbonos vinílicos C-11 y CH-10 aparecen en δ 131.3 y 124.5 respectivamente, el metino CH-7 se observa en δ 39.0, los carbonos de los metilenos de la cadena alifática se ubican en δ 38.4 (CH_2 -8) y δ 26.1 (CH_2 -9), en δ 25.7 y 17.6 los metilos geminales CH_3 -12 y CH_3 -13, la señal en δ 22.4 es asignada para el metilo secundario CH_3 -14,

y la del metilo aromático CH₃-15 en δ 21.0. La asignación completa se realizó con el experimento HMBC. Los datos obtenidos de ¹³C (**Tabla 2**) coincidieron con los encontrados en la literatura para el sesquiterpeno aromático conocido como curcumeno (**8**).

Tabla 2. Desplazamientos de RMN de ¹³C del curcumeno (**8**).

CARBONO	δ EXPERIMENTAL	δ LITERATURA ³³
1	126.9	126.9
2	128.9	129.0
3	135.1	135.2
4	128.9	129.0
5	126.9	126.9
6	144.6	144.7
7	39.0	39.0
8	38.4	38.5
9	26.2	26.2
10	124.6	124.6
11	131.4	131.4
12	25.7	25.8
13	17.7	17.7
14	22.5	22.5
15	21.0	21.0

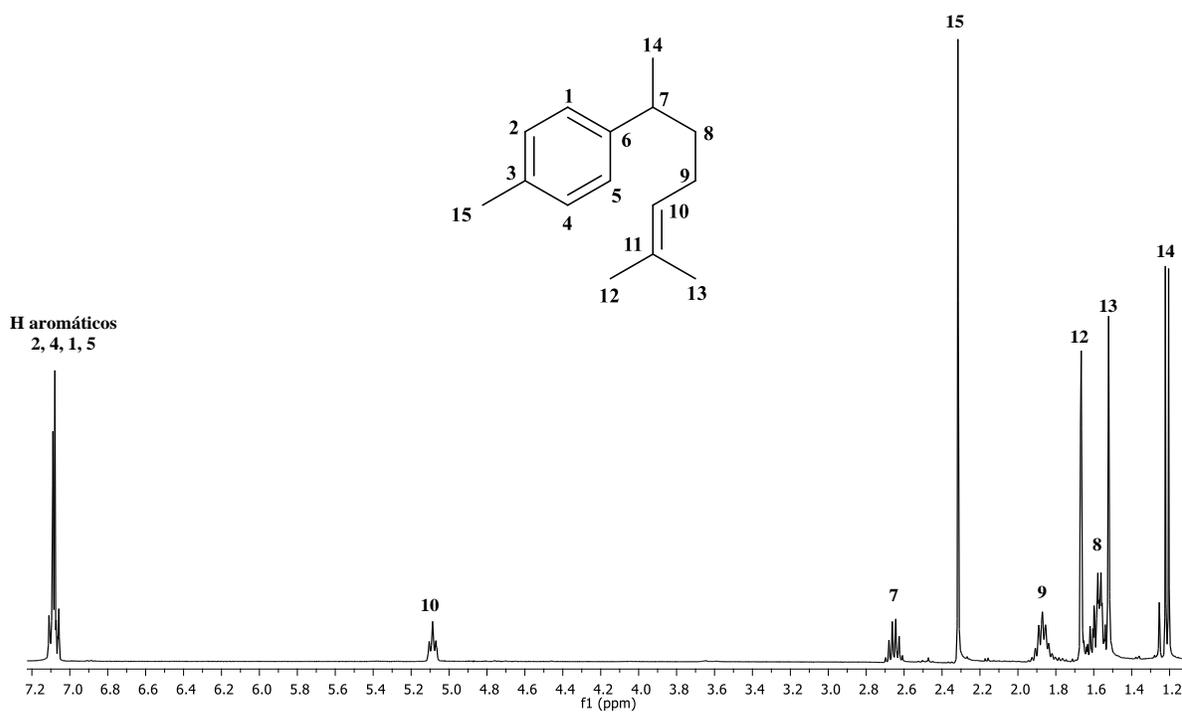


Figura 14. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del curcumeno (8).

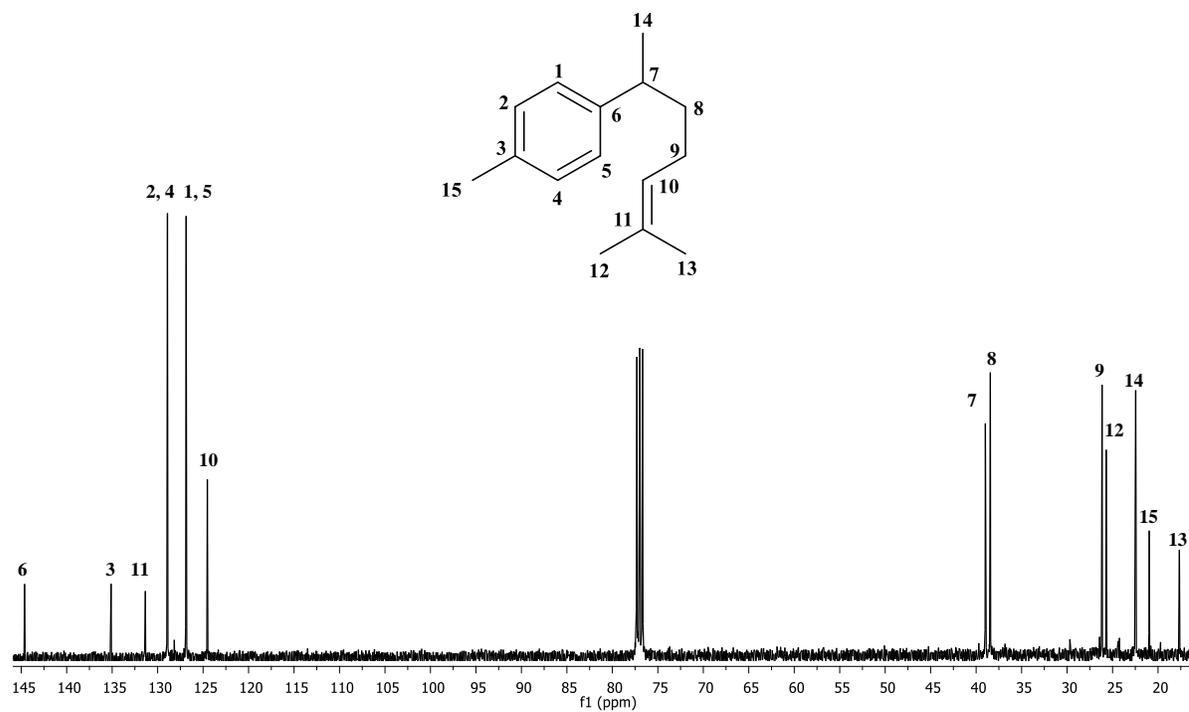


Figura 15. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz del curcumeno (8).

A partir de las fracciones 12-38 eluídas con 95:5 mezcla hexanos-AcOEt, se obtuvo un sólido blanco con miel amarilla, el cual se separó con lavados de hexanos en frío. Punto de fusión de 175-177 °C y rotación específica de $[\alpha]_{589} -104$ (c 1, CHCl_3) a 25 °C.

En su espectro de RMN de ^1H (**Figura 16**) se muestran dos señales simples características de hidrógenos de doble enlace exocíclico en δ 4.80 (H-17a) y δ 4.74 (H-17b), en δ 2.64 se aprecia una señal triple ancha correspondiente a un protón alílico (H-13) con $J = 4.0$ Hz, se localiza en δ 2.16 una señal doble ancha correspondiente al H-3a ($J = 14.6$ Hz), adicionalmente se observan señales simples de metilos terciarios CH_3 -18 y CH_3 -20 en δ 1.24 y δ 0.95 respectivamente, el resto de las señales del compuesto aparecen de δ 2.10 a 0.75.

En el espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 17**) aparecen 20 señales que son representativas de un diterpeno, destacando la del carbonilo del ácido en δ 184.8 (C-19), dos señales pertenecientes a carbonos sp^2 C-16 y C-17 en δ 155.8 y δ 103.0 respectivamente, se observan también en δ 57.0, 55.1 y 43.8 señales de los carbonos metinos C-5, C-9 y C-13 respectivamente, adicionalmente se muestran las señales de metilos en δ 28.9 (CH_3 -18) y en δ 15.6 (CH_3 -20), y de δ 50.0 a 15.0 se observa el resto de las señales de la estructura. Los desplazamientos de ^{13}C experimentales obtenidos (**Tabla 3**) y los datos físicos, fueron comparados con lo reportado, y se encontró buena correspondencia para el compuesto ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico conocido como ácido kaurenico (**4**).

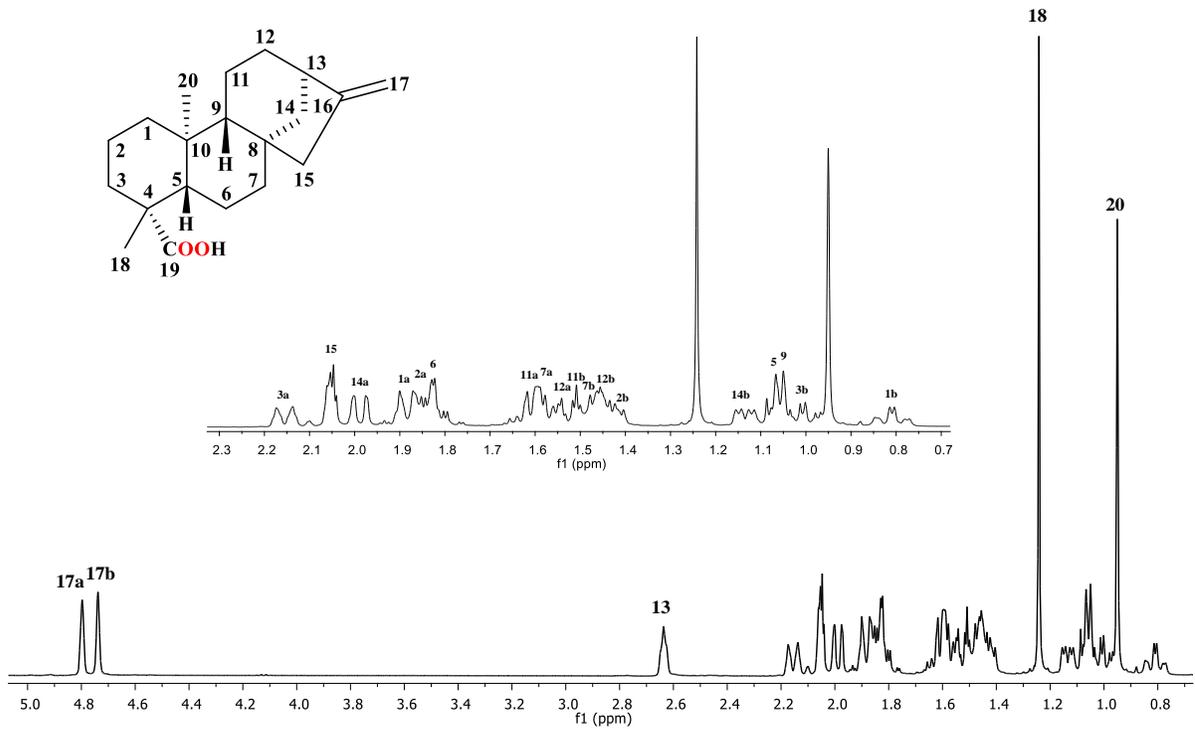


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del ácido kaurenoico (4).

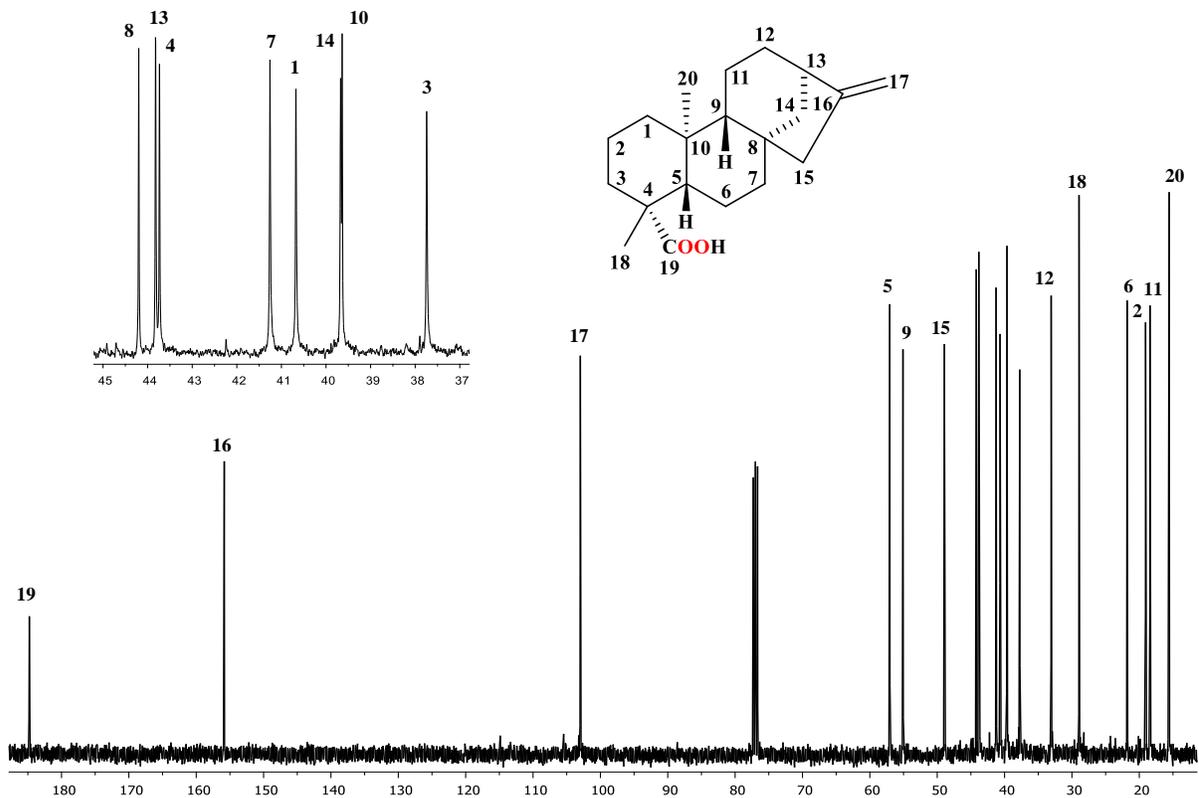


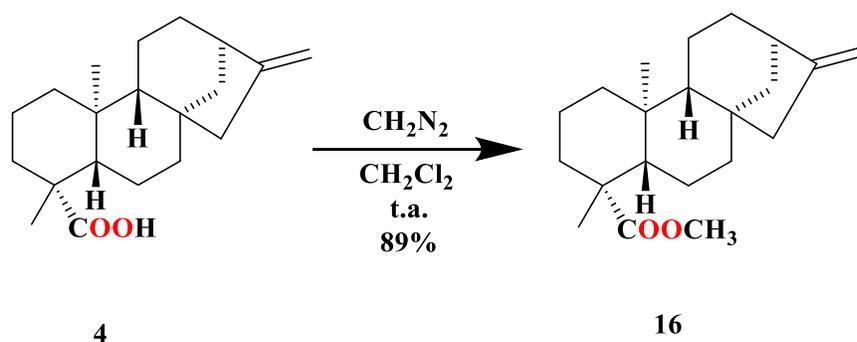
Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del ácido kaurenoico (4).

Tabla 3. Desplazamientos de RMN de ^{13}C del ácido kaurenico (**4**).

CARBONO	δ EXPERIMENTAL	δ LITERATURA ³⁴
1	40.7	40.8
2	19.1	19.2
3	37.7	37.8
4	43.7	43.9
5	57.0	57.2
6	21.8	21.9
7	41.3	41.4
8	44.2	44.3
9	55.1	55.3
10	39.6	39.8
11	18.4	18.5
12	33.1	33.2
13	43.8	43.9
14	39.7	39.8
15	48.9	48.9
16	155.8	155.9
17	103.0	103.1
18	28.9	29.0
19	184.8	185.1
20	15.6	15.6

Como parte del proceso de separación de los compuestos y elucidar sus grupos funcionales, se preparó el éster metílico del ácido kaurenico con diazometano (**Esquema 1**), el crudo se llevó a cromatografía en columna, la cual fue eluída con hexanos-AcOEt en orden ascendente de polaridad, obteniendo el compuesto *ent*-kaur-16-en-19-ato de metilo (**16**) en la fracción 13 (polaridad 98:2) como un sólido blanco.

En su espectro de RMN de ^1H (**Figura 18**), se muestran las dos señales simples características de hidrógenos de doble enlace exocíclico en δ 4.79 (H-17a) y δ 4.73 (H-17b), en δ 3.64 se aprecia la nueva señal de los hidrógenos que corresponde al metilo del éster CH_3 -21 lo cual confirma que la reacción se llevó a cabo, en δ 2.63 aparece la señal triple ancha del hidrógeno alílico H-13 ($J= 4.0$ Hz), las señales simples de los metilos terciarios CH_3 -18 y CH_3 -20 (en δ 1.17 y 0.83 respectivamente) en comparación con la materia prima (**Figura 16**) se observan desplazadas a frecuencias menores por el cambio de grupo funcional de ácido carboxílico a éster metílico y de δ 2.2 a 0.7 se muestran el resto de las señales de la estructura. En su espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 19**) aparece el desplazamiento del carbonilo C-19 a frecuencias menores de δ 184.8 a 178.1, así como la presencia de una señal adicional del metilo del éster CH_3 -21 en δ 51.1, y de δ 57.1 a 15.4 encontramos el resto de las señales de **16**; los datos de ^{13}C (**Tabla 4**) y experimentales, coincidieron con los reportados.



Esquema 1. Obtención del derivado **16**.

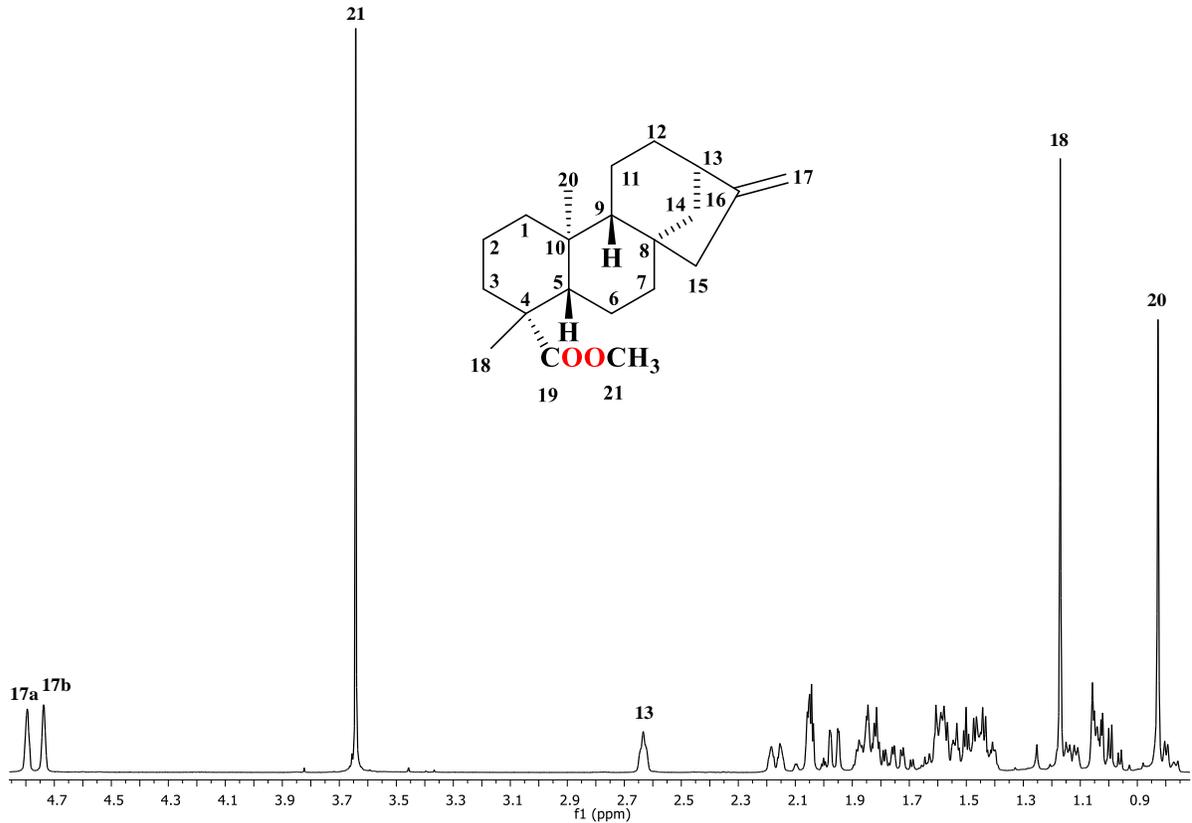


Figura 18. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del *ent*-kaur-16-en-19-ato de metilo (16).

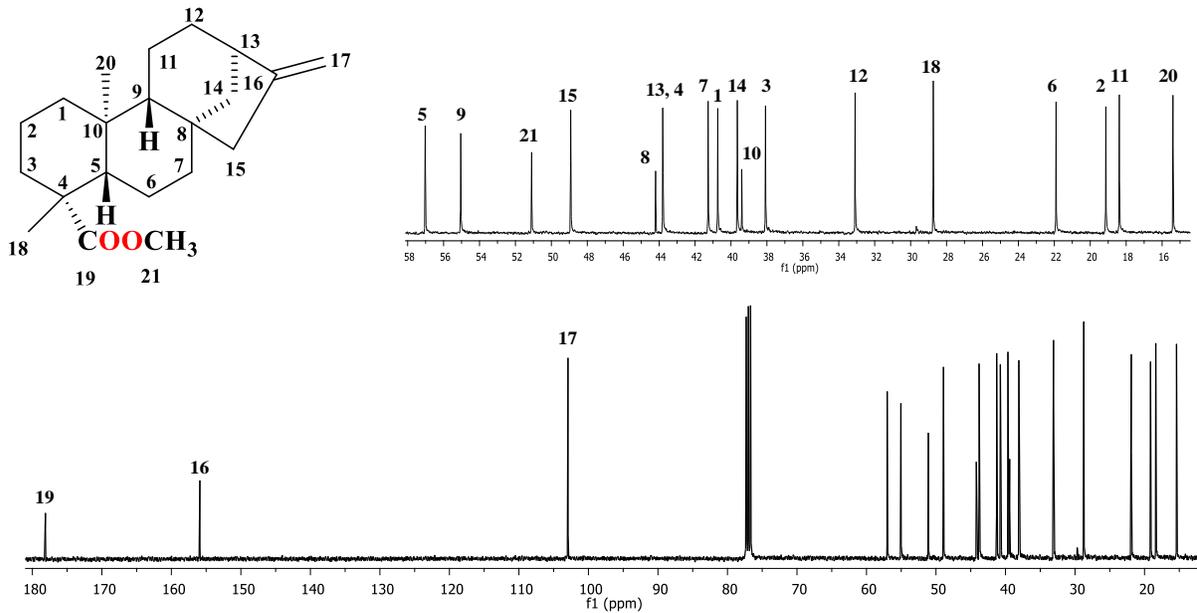


Figura 19. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz del *ent*-kaur-16-en-19-ato de metilo (16).

Tabla 4. Desplazamientos de RMN de ^{13}C del *ent*-kaur-16-en-19-ato de metilo (**16**).

CARBONO	δ EXPERIMENTAL	δ LITERATURA ³⁵
1	40.7	40.8
2	19.1	19.2
3	38.1	38.2
4	43.8	43.9
5	57.0	57.1
6	21.9	21.9
7	41.3	41.3
8	44.2	44.2
9	55.0	55.1
10	39.4	39.4
11	18.4	18.4
12	33.1	33.1
13	43.8	43.8
14	39.7	39.7
15	48.9	48.9
16	155.9	155.9
17	103.0	102.9
18	28.7	28.9
19	178.1	178.1
20	15.4	15.4
21	51.1	51.1

Un sólido blanco amorfo se obtuvo en la fracción 19 después de una recromatografía en columna eluída con mezcla hexanos-AcOEt en proporción 99:1. En su espectro de RMN de ^1H (**Figura 20**) se observa la presencia de dos conjuntos de señales características de esqueletos de tipo kaureno en proporción 1:1, en donde uno de los compuestos presenta las señales pertenecientes al compuesto ya identificado como ácido kaurenoico (**4**): en δ 4.80 (H-17a) y 4.74 (H-17b) las dos señales simples del enlace exocíclico, en δ 2.64 la señal del protón alílico

H-13, y los metilos CH₃-18 y CH₃-20 en δ 1.24 y 0.95 respectivamente; el segundo compuesto es identificado como ácido grandiflorénico (**5**) y presenta una señal vinílica triple ancha en δ 5.24 (H-11) que integra para un hidrógeno ($J= 3.3$ Hz), se observan dos señales simples en δ 4.91 para el H-17a y en δ 4.80 para el H-17b del metileno vinílico, en δ 2.77 una señal triple ancha que pertenece al hidrógeno alílico H-13 ($J= 5.2$ Hz), los metilos de la estructura se localizaron en δ 1.24 (CH₃-18) y 1.02 (CH₃-20), el desplazamiento de las señales de los protones H-12a (δ 1.62) y H-12b (δ 1.46) del ácido kaurenoico (**4**) cambia para el compuesto **5** a frecuencias mayores ubicándose H-12a en δ 2.43 y H-12b en δ 1.99 esto debido a la insaturación presente entre los carbonos 9 y 11 del compuesto, el resto de las señales de las estructuras se ubican de δ 2.60 a 0.81. Los datos obtenidos para **5** (Tabla 5) y **4** coincidieron con los encontrados en la literatura para estos compuestos^{34,36}. No resultó posible la separación de estos compuestos por métodos convencionales.

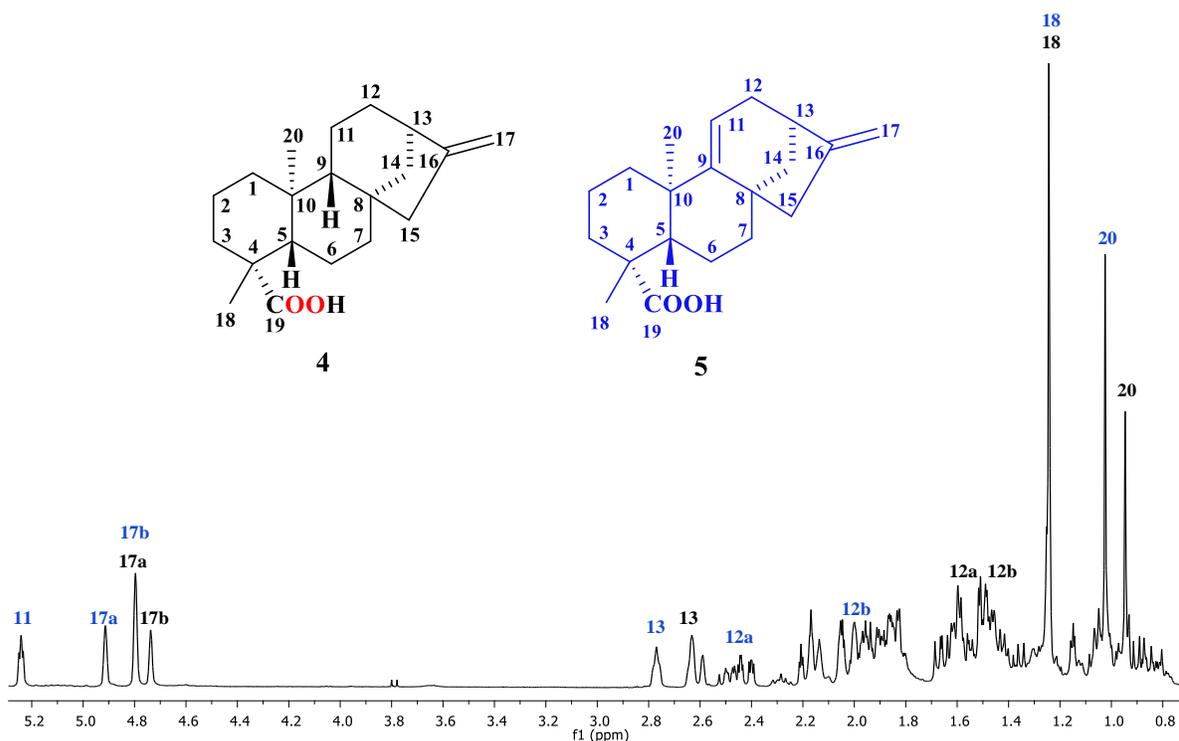


Figura 20. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz de **4** y ácido grandiflorénico (**5**).

Tabla 5. Desplazamientos de RMN de ^1H del ácido grandiflorénico (**5**).

δ ^1H	EXPERIMENTAL	LITERATURA ³⁶
H-11	5.24 (1H, ta, $J= 3.3$ Hz)	5.24
H-12	2.43 (1H, m, H-12a)	2.43
	1.99 (1H, m, H-12b)	1.99
H-13	2.77 (1H, ta, $J= 5.2$ Hz)	2.77
H-17	4.91 (1H, s, H-17a)	4.91
	4.80 (1H, s, H-17b)	4.80
H-18	1.24 (3H, s)	1.24
H-20	1.02 (3H, s)	1.02

Continuando con la separación de los compuestos, se logró obtener después de una recromatografía en columna, cristales de color ligeramente amarillo en las fracciones 26-30 (polaridad 95:5 hexanos-AcOEt) con punto de fusión de 47-49 °C. En su espectro de RMN de ^1H (**Figura 21**) en la región de protones aromáticos se observan dos señales múltiples en δ 6.85 y δ 6.41 que son asignadas a H-4 y H-2 respectivamente, en δ 4.64 se muestra una señal simple ancha característica de un hidroxilo, una señal múltiple en δ 3.58 es asignada al hidrógeno H-7 base de metilo secundario, a frecuencias menores se observa una señal simple en δ 2.24 para los hidrógenos de un metilo aromático (CH₃-15), en δ 1.38 se muestra una señal doble que corresponde a los hidrógenos del metilo CH₃-14 ($J= 7.4$ Hz) y la de los metilos geminales CH₃-13 y CH₃-12 se encuentran en δ 1.37 y 1.32. Su espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 22**) muestra un total de 15 señales, lo cual indica la presencia de un sesquiterpeno, en donde destacan las señales observadas en δ 153.5 correspondiente al carbono base de alcohol C-1, los metinos aromáticos CH-4 en δ 122.3 y CH-2 en δ 113.3, en δ 35.6 y 30.2 se encuentran los metilos geminales CH₃-12 y CH₃-13 respectivamente, la señal del metilo secundario CH₃-14 en δ 19.1, principalmente. Al observar en el espectro de RMN de ^1H la señal característica de grupos hidroxilos se decidió preparar su derivado acetilado (**Esquema 2**), para determinar el número de OH en el sesquiterpeno, así como, corroborar la estructura.

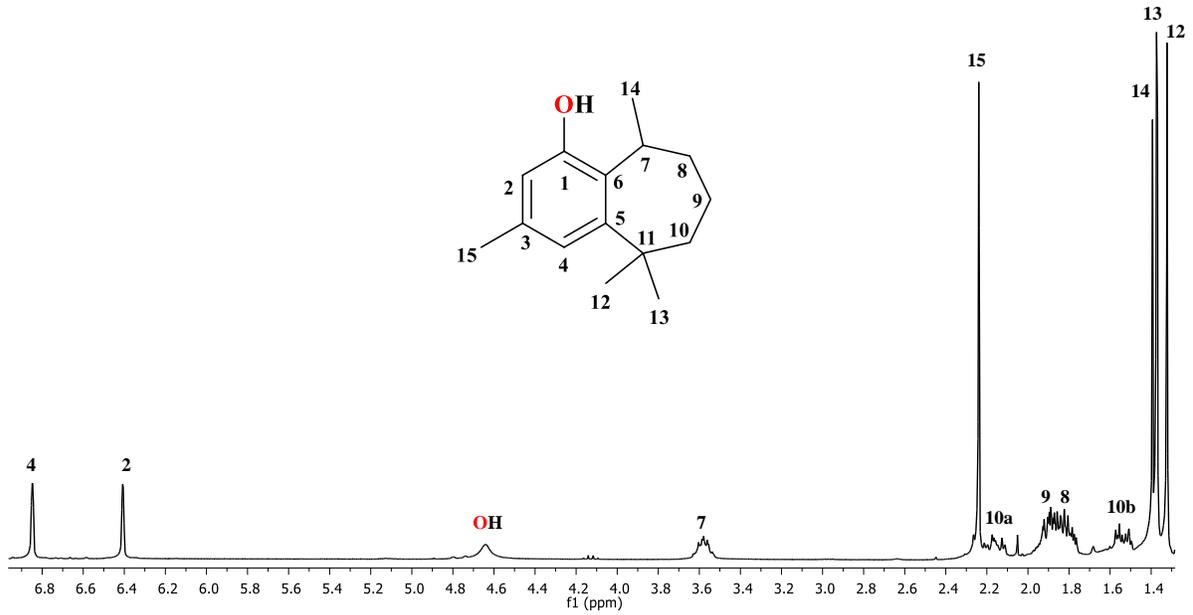


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz del podocetalol (12).

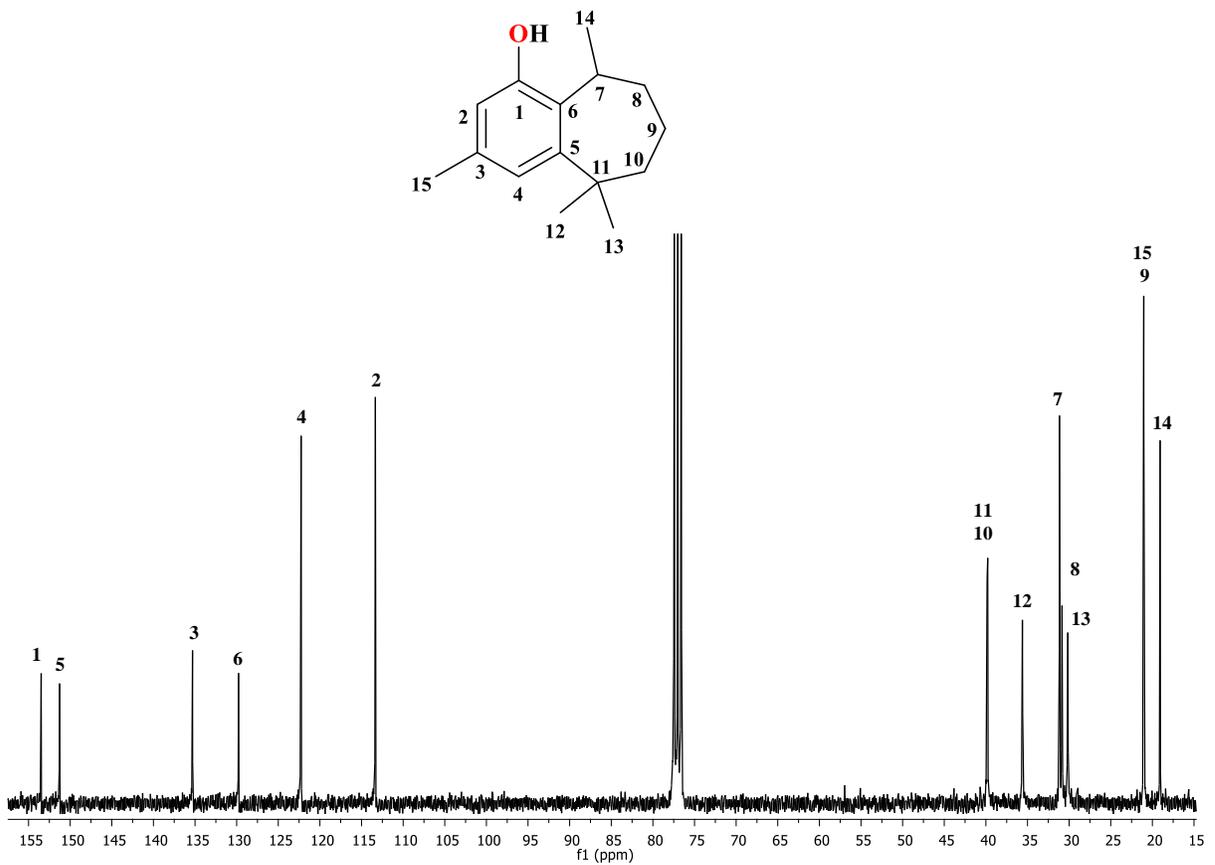
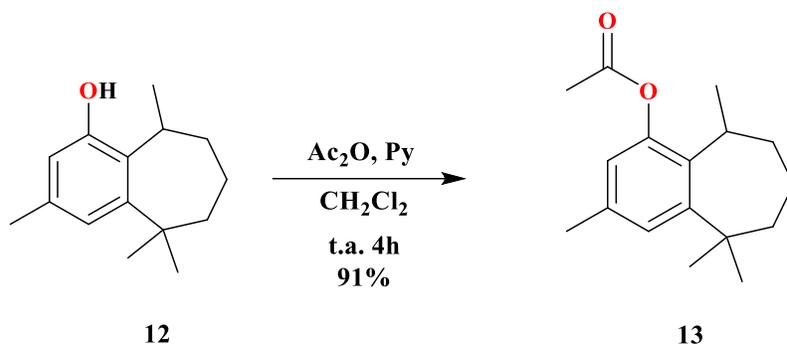


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz del podocetalol (12).



Esquema 2. Obtención del derivado acetilado **13**.

En el espectro de RMN de ^1H (**Figura 23**) del sesquiterpeno acetilado **13** (acetato de podocefalilo) punto de fusión 48-50 °C, se puede apreciar la ausencia de la señal del hidroxilo que se ubicaba en δ 4.64, así como un ligero desplazamiento a frecuencias mayores de los hidrógenos aromáticos H-4 y H-2 a δ 7.14 y 6.65, el H-7 se observa en δ 3.33 como una señal múltiple, se observa una sola señal de hidrógenos de metilo de acetato CH₃-2' en δ 2.31, la señal simple encontrada en δ 2.29 corresponde a los hidrógenos del CH₃-15 aromático, los metilos geminales CH₃-13 y CH₃-12 se presentan en δ 1.38 y 1.34, la señal doble ($J= 7.4$ Hz) del metilo CH₃-14 se muestra en δ 1.33, y de δ 2.12 a 1.50 se observa el resto de las señales de la estructura. Su espectro RMN de ^{13}C (**Figura 24**) mostró un total de 17 señales las cuales indican la presencia de un solo grupo acetato adicionado a la molécula, observando al carbonilo (C-1') en δ 170.0 y el CH₃-2' en 21.2 como nuevas señales, el resto se mostraron con ligeros cambios de desplazamiento.

La asignación de los carbonos protonados se estableció con el espectro HSQC, mientras que la de los carbonos cuaternarios fue sustentada con las correlaciones observadas en el experimento HMBC. La asignación posicional de los grupos funcionales en la molécula se estableció con ayuda del experimento NOESY donde destacó la correlación de los protones del acetato con H-7. Un estudio conformacional de **13**, empleando el programa Spartan`04, mediante mecánica molecular, y la optimización de las energías mediante teoría de funcionales de la densidad (DFT), con una base de cálculo B3LYP, y nivel de teoría 631G** apoyó la correlación observada en NOESY para los protones del metilo del acetato con el H-7, ya que la distancia determinada en el mínimo global, así como, en el 75% de la población fue de 3.22 Å (**Figura 25**), cabe destacar que dicho cálculo se llevó a cabo con los epímeros 7α y 7β y ambos

cálculos arrojaron el mismo resultado. Los datos obtenidos de RMN de ^1H (Tabla 6 y 7) del compuesto natural (**12**) y el derivado acetilado **13** coinciden con los encontrados en la literatura.

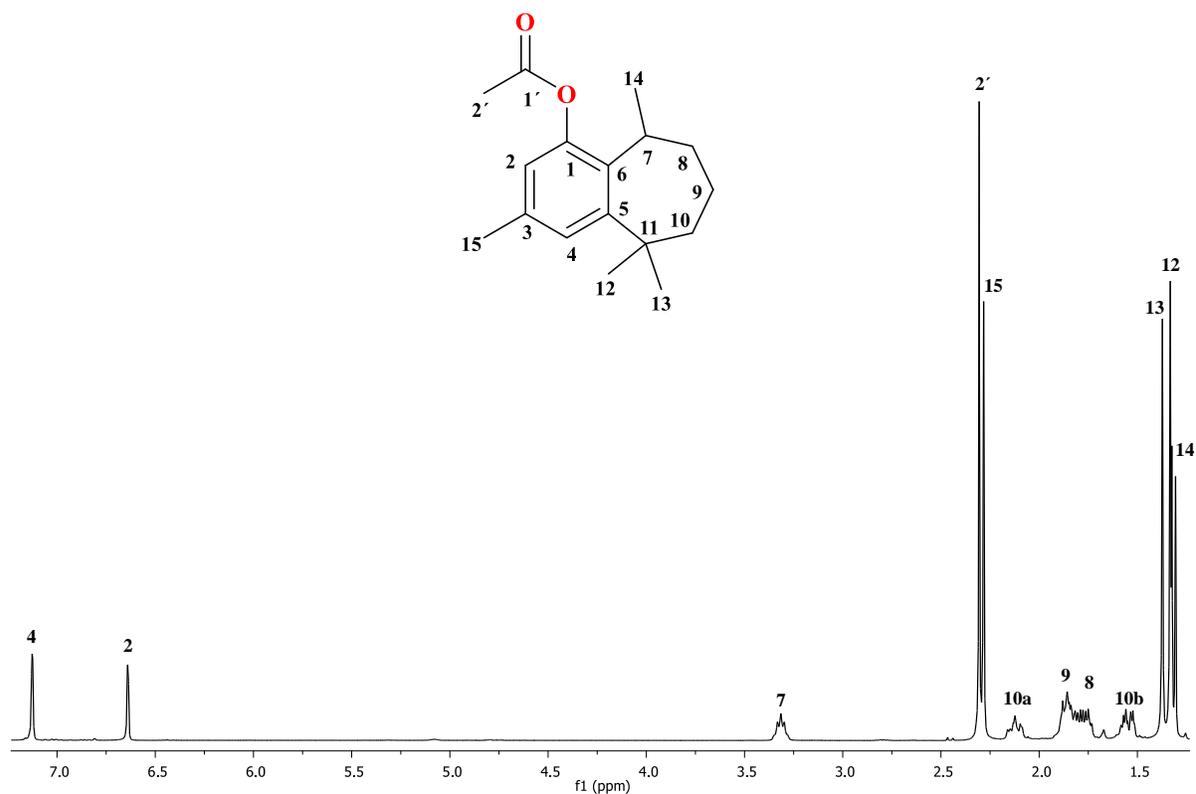


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz del acetato de podocetalilo (**13**).

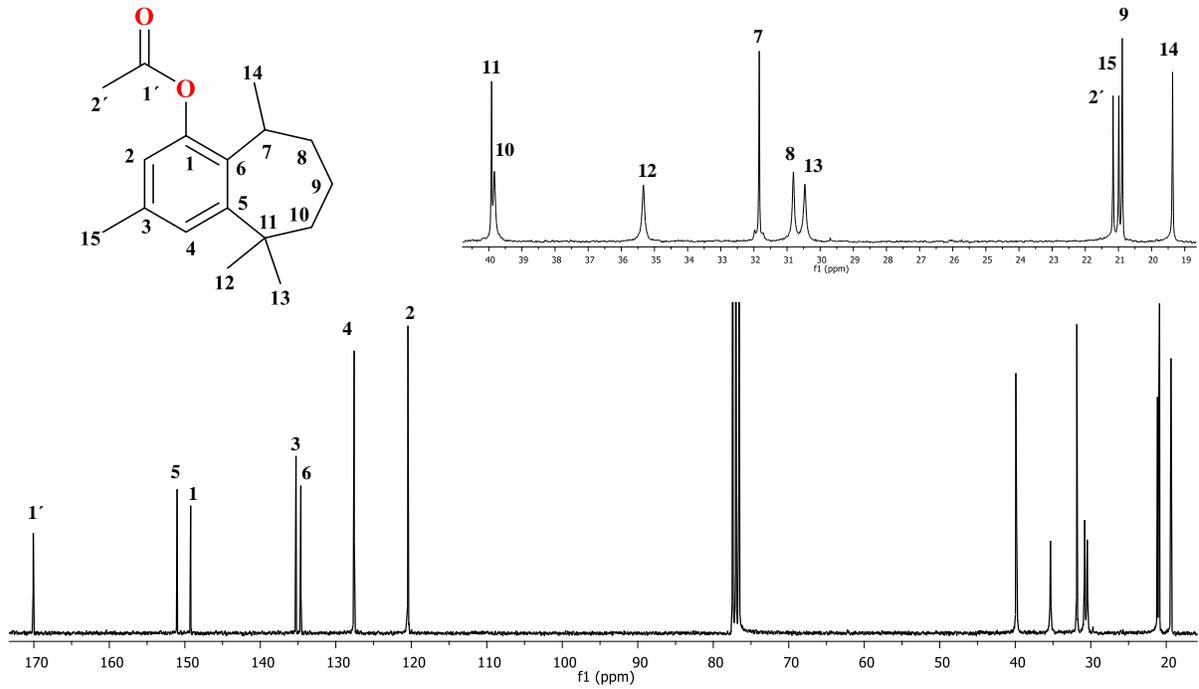


Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz del acetato de podocetalilo (**13**).

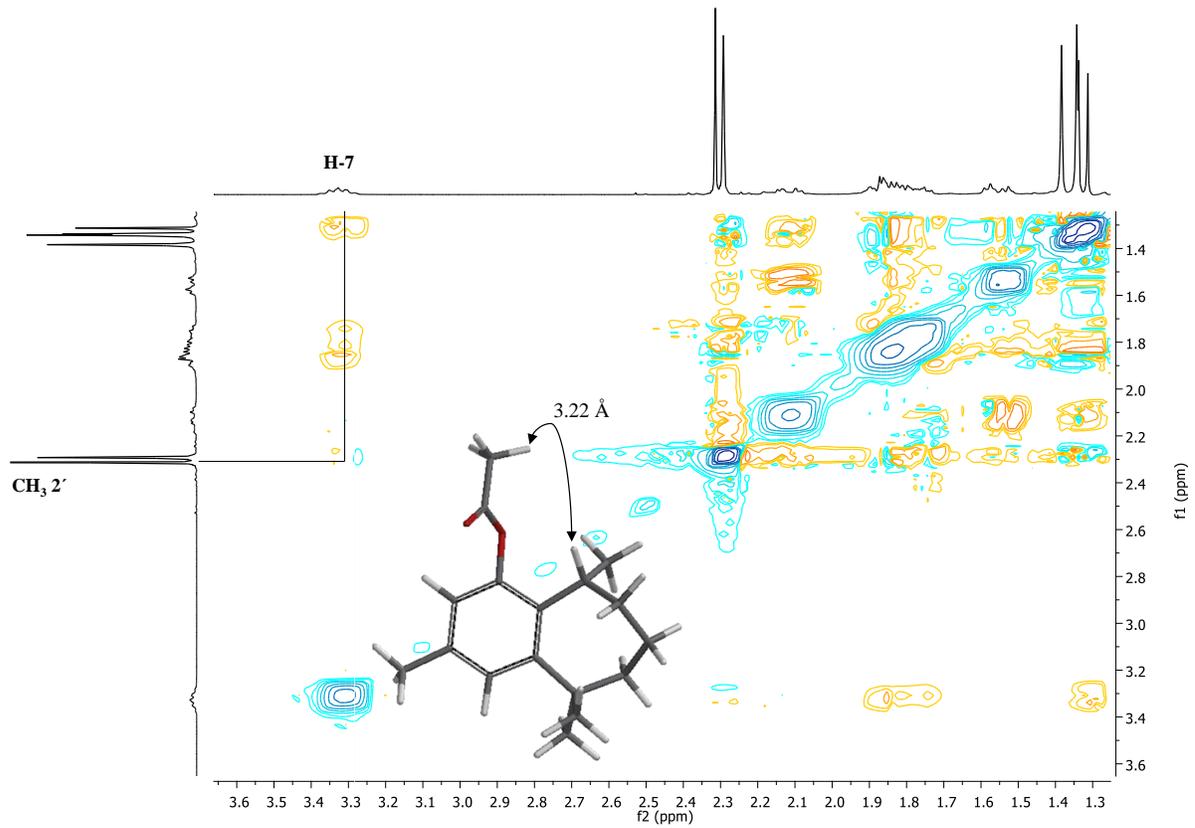


Figura 25. Experimento NOESY del acetato de podocetalilo (**13**).

Tabla 6. Desplazamientos de RMN de ^1H del podocetalol (**12**).

δ ^1H	EXPERIMENTAL	LITERATURA ²⁷
H-2	6.41 (1H, m)	6.42 (s)
H-4	6.85 (1H, m)	6.85 (s)
H-7	3.58 (1H, m)	3.59 (m)
H-8	1.86 (2H, m)	
H-9	1.87 (2H, m)	1.50–2.50 (m)
H-10	2.17 (1H, m, H-10a) 1.53 (1H, m, H-10b)	
H-12	1.32 (3H, s)	1.33 (s)
H-13	1.37 (3H, s)	1.38 (s)
H-14	1.38 (3H, d, $J=7.4$ Hz)	1.40 (d)
H-15	2.24 (3H, s)	2.25 (s)
OH	4.64 (1H, sa)	4.61 (s)

Tabla 7. Desplazamientos de RMN de ^1H del acetato de podocetalilo (**13**).

δ ^1H	EXPERIMENTAL	LITERATURA ²⁷
H-2	6.65 (1H, m)	6.65 (s)
H-4	7.14 (1H, m)	7.15 (s)
H-7	3.33 (1H, m)	3.32 (m)
H-8	1.81 (2H, m)	
H-9	1.82 (2H, m)	1.50–1.90 (m)
H-10	2.12 (1H, m, H-10a) 1.55 (1H, m, H-10b)	
H-12	1.34 (3H, s)	1.34 (s)
H-13	1.38 (3H, s)	1.38 (s)
H-14	1.33 (3H, d, $J=7.4\text{Hz}$)	1.33 (d)
H-15	2.29 (3H, s)	2.29 (s)
H-2'	2.31 (3H, s)	2.33 (s)

Después de sucesivas recromatografías, en la polaridad hexanos-AcOEt (99:1) se obtuvieron cristales incoloros con un punto de fusión de 114-116 °C. En su espectro de RMN de ^1H (**Figura 26**) se encuentran las señales características de **4** (**Figura 16**), con la diferencia de una señal doble ancha adicional en δ 9.72 ($J=1.3\text{ Hz}$) característica de un hidrógeno de aldehído. En su espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 27**) se aprecia un conjunto de 20 señales que al comparar con el espectro del compuesto **4** (**Figura 17**) se observa un corrimiento a frecuencias mayores de la señal del carbonilo C-19 de δ 184.8 a 205.9 que corresponde al carbonilo de aldehído en este compuesto y del carbono cuaternario C-4 que soporta al aldehído de δ 43.7 a 48.5, así como, desplazamientos a frecuencias menores de las señales del CH_3 -18 (de δ 28.9 a 24.3) y del metileno CH_2 -3 (de δ 37.7 a 34.2) principalmente, el resto de las señales no muestran diferencias significativas en sus desplazamientos, este compuesto fue identificado como *ent*-kaur-16-en-19-al o kaurenal (**17**) mediante los datos obtenidos y los reportados.³⁷

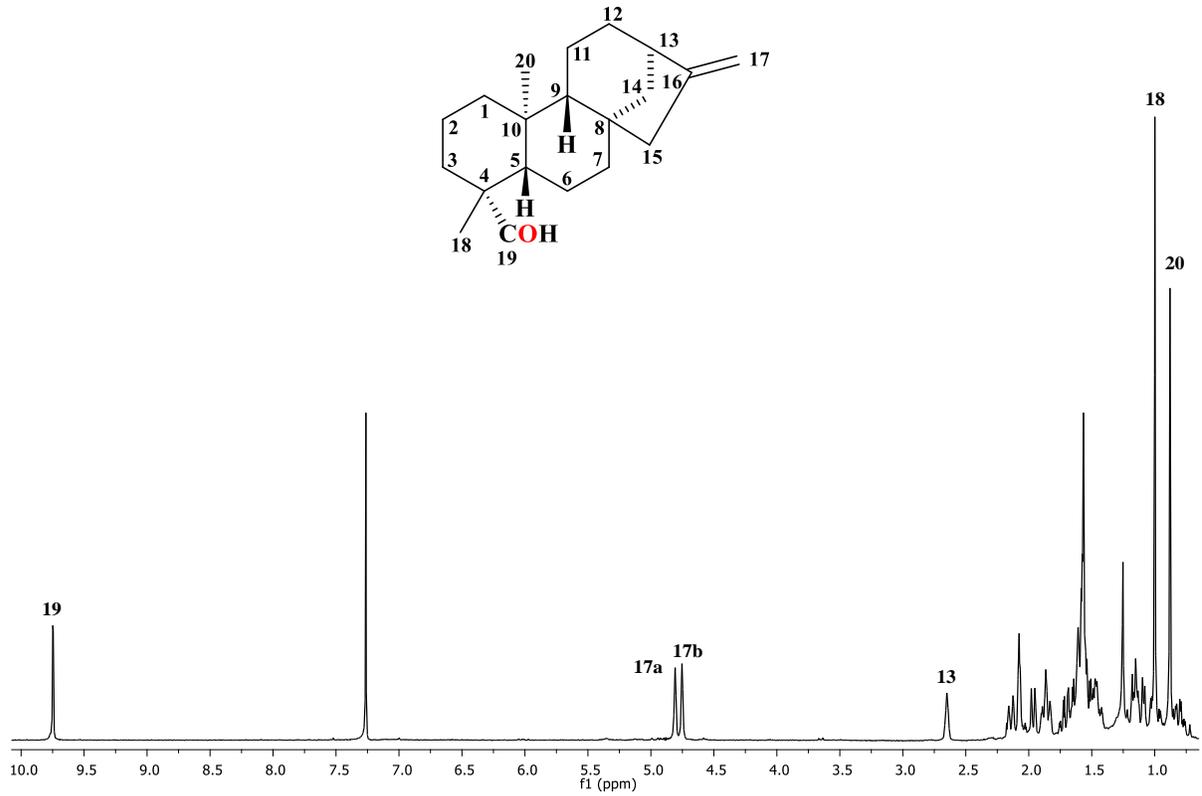


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del kaurenal (17).

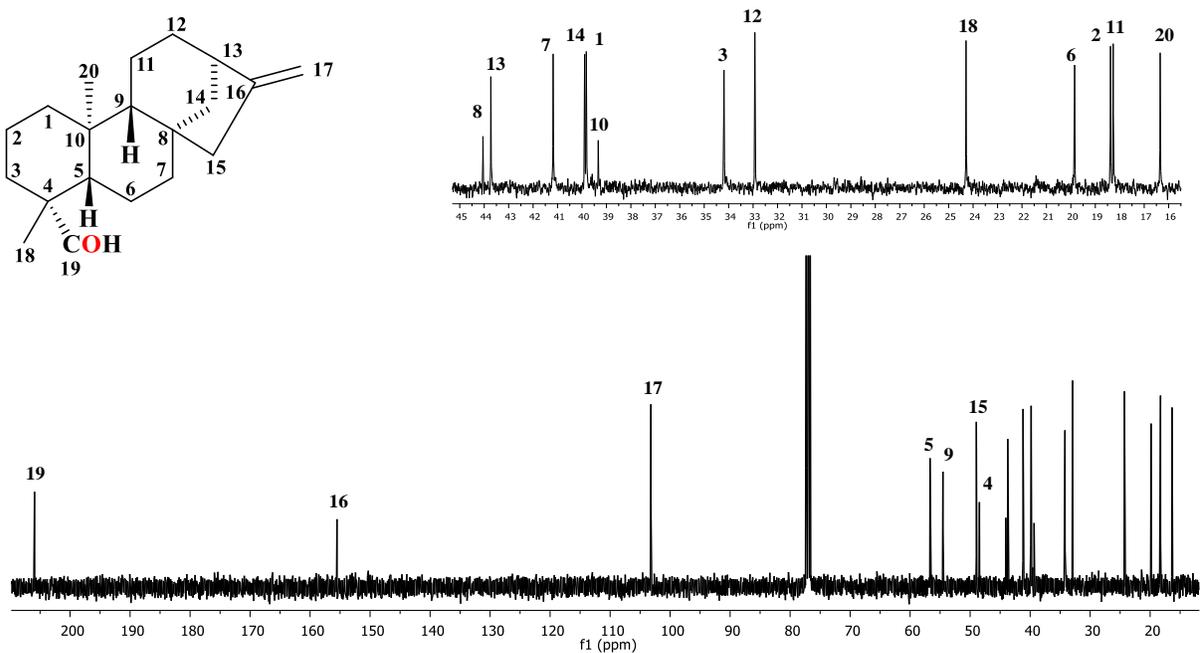


Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del kaurenal (17).

En las fracciones 110-121 eluidas con mezclas hexanos-AcOEt en proporción 85:15 se observó la formación de un sólido blanco el cual fue separado con lavados de hexanos. En su espectro de RMN de ^1H (**Figura 28**) se observaron dos grupos de señales en proporción 1:4, ambos compuestos presentan señales características de angelatos esterificados: en δ 6.08 una señal múltiple correspondiente a un protón de doble enlace H-3', en δ 1.99 y 1.89 las señales de los metilos vinílicos H-4' y H-5' respectivamente. El compuesto observado en mayor proporción presenta dos señales simples en δ 4.81 (H-17a) y 4.75 (H-17b) de protones de metileno de un doble enlace, una señal doble de dobles en δ 4.62 ($J=12.4, 4.8$ Hz) correspondiente al H-3 base del éster del grupo angelato, en δ 2.64 se encuentra una señal simple ancha del hidrógeno alílico (H-13), una señal múltiple se muestra en δ 2.38 que es asignada para uno de los hidrógenos del CH_2 -2, en δ 2.07 se ubica una señal simple ancha que corresponde al metileno alílico CH_2 -15 y las señales simples de los metilos terciarios de la estructura se ubican en δ 1.30 (CH_3 -18) y 1.04 (CH_3 -20). Este compuesto correspondió al ácido *ent*-3 α -angeloil-kaur-16-en-19-oico (**18**).

El compuesto presente en menor proporción muestra en δ 5.36 una señal simple asignada al hidrógeno H-15, que es la base del éster del grupo angelato en esta estructura, en δ 5.13 (H-17a) y 5.08 (H-17b) las señales características del doble enlace exocíclico, el hidrógeno alílico (H-13) se presenta como una señal simple ancha en δ 2.79, las señales de los hidrógenos de los metilos de la estructura se ubican como señales simples en δ 1.23 para el CH_3 -18 y δ 0.96 para el CH_3 -20. Este compuesto fue identificado como ácido *ent*-15 α -angeloil-kaur-16-en-19-oico o conocido como ácido angeloilgrandiflorico (**19**). Dada las estructuras propuestas, se realizó la comparación de la información experimental obtenida con la literatura para cada uno de ellos (**Tabla 8**), encontrando pocos reportes de sus datos espectroscópicos, los cuales resultaron cercanos para esta mezcla de isómeros, la cual no fue posible separar por métodos convencionales.

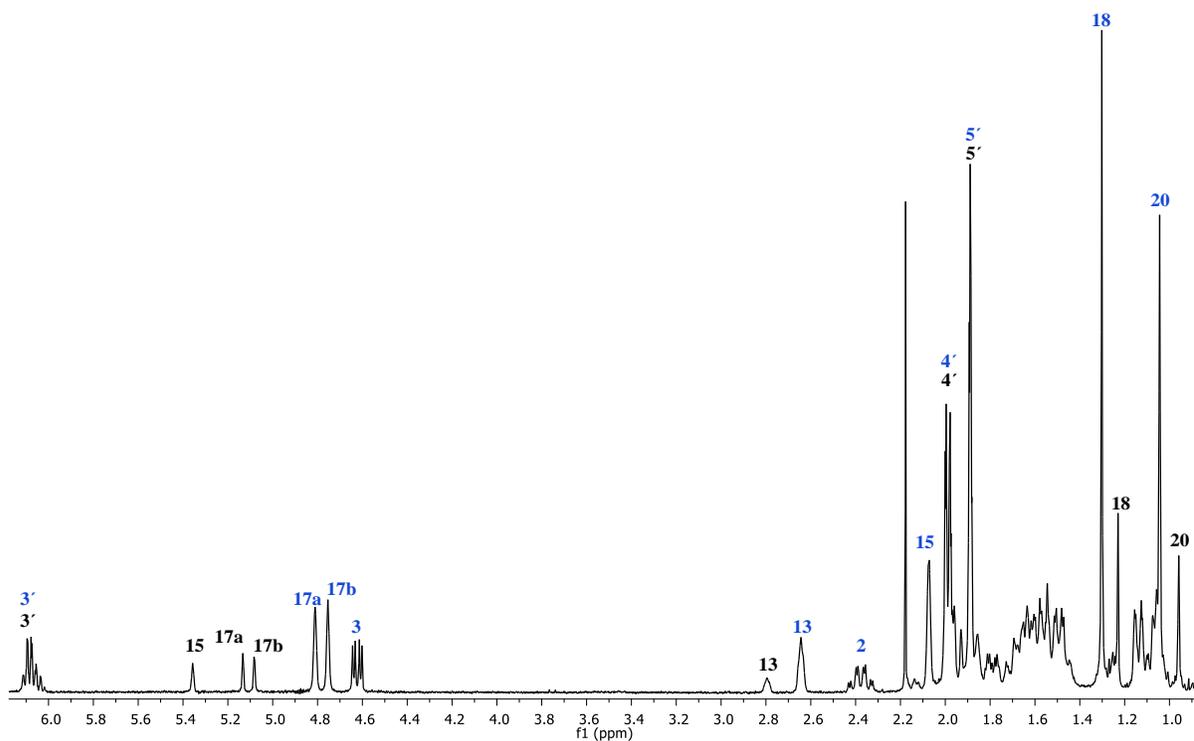
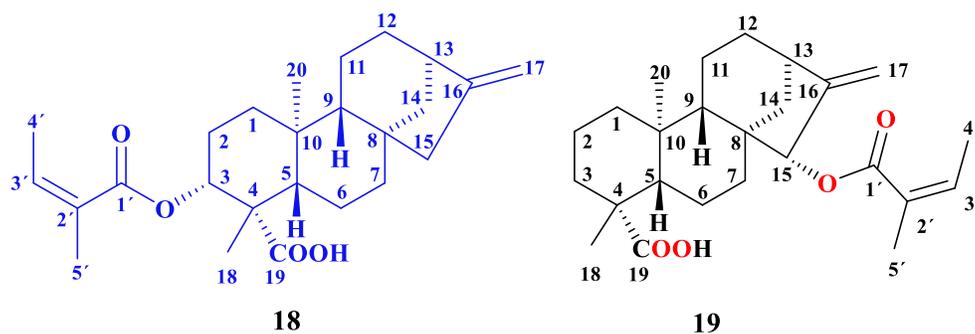


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del ácido *ent*-3 α -angeloil-kaur-16-en-19-oico (18) y ácido angeloilgrandiflorico (19).

Tabla 8. Desplazamientos de RMN ^1H del ácido *ent-3 α -angeloil-kaur-16-en-19-oico* (**18**) y ácido angeloilgrandiflorico (**19**).

$\delta^1\text{H}$	EXPERIMENTAL 18	LITERATURA ³⁸ 18	EXPERIMENTAL 19	LITERATURA ³⁹ 19
H-2	2.38 (1H, m)	-	-	-
H-3	4.62 (1H, dd, $J=$ 12.4, 4.8 Hz)	4.52 (1H, dd)	-	-
H-13	2.64 (1H, sa)	2.63 (1H, sa)	2.79 (1H, sa)	2.80 (1H, m)
H-15	2.07 (2H, sa)	2.07 (2H, sa)	5.36 (1H, s)	5.40 (1H, m)
H-17	4.81 (1H, s, H-17a)	4.70 (1H, sa, 17a)	5.13 (1H, s, 17a)	5.18 (1H, sa, 17a)
	4.75 (1H, s, H-17b)	4.76 (1H, sa, 17b)	5.08 (1H, s, 17b)	5.10 (1H, sa, 17b)
H-18	1.30 (3H, s)	1.21 (3H, s)	1.23 (3H, s)	1.23 (3H, s)
H-20	1.04 (3H, s)	0.92 (3H, s)	0.96 (3H, s)	0.97 (3H, s)
H-3'	6.08 (1H, m)	6.00 (1H, qq)	6.08 (1H, m)	6.07 (1H, qq, $J=$ 8, 1.0 Hz)
H-4'	1.99 (3H, m)	1.96 (1H, dq)	1.99 (3H, m)	1.98 (1H, dq, $J=$ 8, 1.0 Hz)
H-5'	1.89 (3H, m)	1.85 (1H, dq)	1.89 (3H, m)	1.88 (3H, q, $J=$ 1.0 Hz)

Después de una serie de recromatografías en la fracción 107 eluída con la polaridad hexanos-acetona 85:15, se obtuvieron cristales blancos con un punto de fusión de 217-219 °C y una rotación de $[\alpha]_{589} -63.7$ (c 0.87, CHCl_3 a 25 °C).

En su espectro de RMN de ^1H (**Figura 29**) se observan dos señales simples de hidrógenos vinílicos en δ 4.81 (H-17a) y δ 4.75 (H-17b) característicos de un doble enlace exocíclico, una señal doble de dobles en δ 4.53 que corresponde al H-3 base de éster ($J=$ 4.7, 12.2 Hz), en δ 2.64 se encuentra una señal simple ancha que corresponde a un protón alílico H-13; en δ 2.58 una señal séptuple que corresponde al H-2' ($J=$ 7.0 Hz) que indica la presencia de un grupo esterificado de tipo isobutirato, se encuentra una señal múltiple en δ 2.35 asignada para un hidrógeno del metileno CH_2 -2 (H-2a), en δ 2.07 se encuentra una señal simple ancha que integra para dos hidrógenos del metileno alílico CH_2 -15, se asignan las señales dobles a los

hidrógenos de metilos pertenecientes al grupo isobutirato CH₃-3' y CH₃-4' en δ 1.18 ($J= 3.2$ Hz) y δ 1.17 ($J= 3.2$ Hz) respectivamente, y las señales simples de CH₃-18 en δ 1.27 y CH₃-20 en δ 1.04, las señales de los protones alifáticos del resto del esqueleto se presentaron de δ 2.42 hasta 0.88.

En el espectro de RMN de ¹³C (**Figura 30**) se encontró un conjunto de 24 señales lo cual nos habla de la presencia de un diterpeno funcionalizado y con lo observado en su espectro de RMN de ¹H se encuentra esterificado con un grupo isobutirato, y destacan las siguientes señales: en δ 179.7 la señal del carbonilo de ácido C-19, poco menos desplazada en δ 176.8 la del carbonilo del éster asignada como C-1', las señales que corresponden a los carbonos del doble enlace excocíclico se encuentran en δ 155.4 para C-16 y δ 103.3 para CH₂-17, el carbono base del éster C-3 se encuentra en δ 78.5, las señales que pertenecen a los metilos del isobutirato C-3' y C-4' se encuentran en δ 19.1 y 18.9 respectivamente, así como los metilos C-18 en δ 23.8 y C-20 en δ 15.4, el resto de las señales asignadas para la molécula se encuentran entre δ 44 a 18.

La estereoquímica del grupo isobutirato fue definida con el experimento NOESY (**Figura 31**) en el cual se observa la correlación que guardan los hidrógenos del CH₃-18 que se encuentra con estereoquímica definida en posición β con el H-3, con lo cual definimos al H-3 en posición β , y por resultado el grupo isobutirato tiene una estereoquímica α . Adicionalmente se muestran las correlaciones de los hidrógenos del CH₂-17, el H-17a con el hidrógeno alílico H-13, y el H-17b con los protones del metileno alílico CH₂-15.

Realizando una búsqueda en la literatura no se encontró ningún reporte para este compuesto, por lo cual resulta ser una estructura novedosa. La asignación completa del ácido *ent-3 α -isobutiroiloxi-kaur-16-en-19-oico* (**20**) fue realizada por su RMN de ¹H, ¹³C, (**Tabla 9**) experimentos en 2D y análisis por HMBC.

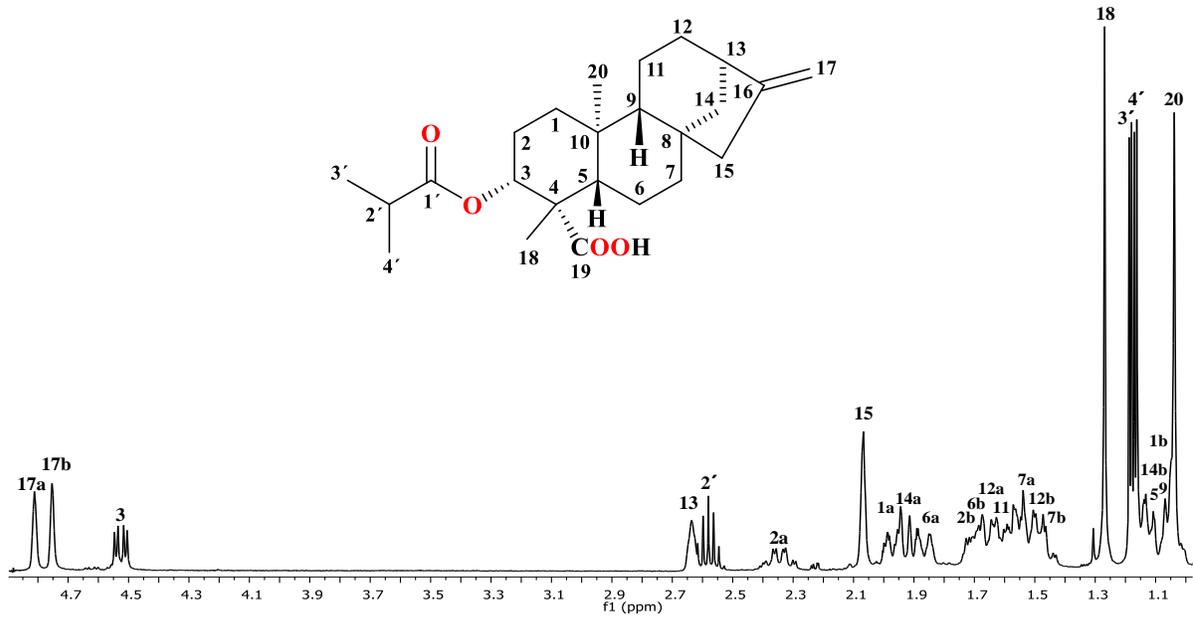


Figura 29. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del ácido *ent*-3 α -isobutiroiloxi-kaur-16-en-19-oico (20).

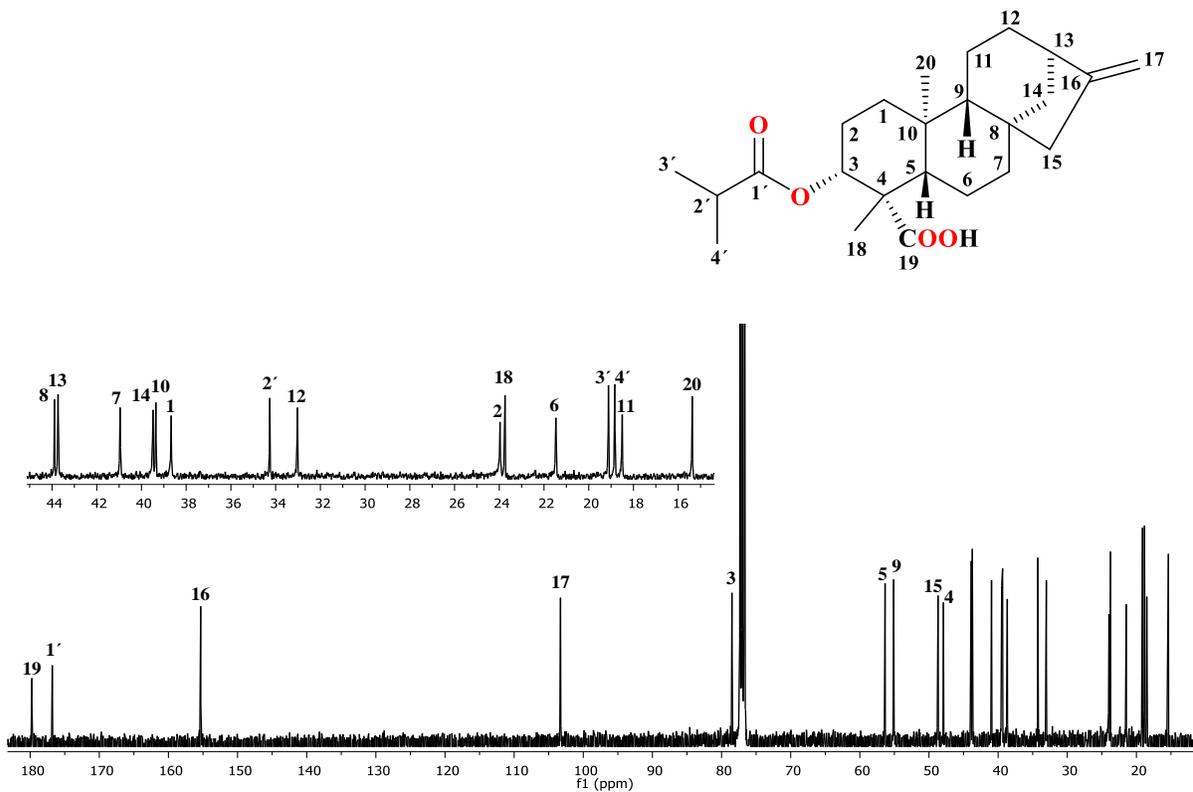


Figura 30. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz del ácido *ent*-3 α -isobutiroiloxi-kaur-16-en-19-oico (20).

Tabla 9. Desplazamientos de RMN de ^1H y ^{13}C del ácido *ent*-3 α -isobutiroiloxi-kaur-16-en-19-oico (**20**).

	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	38.7	1.97 (1H, m, H-1a), 1.04 (1H, m, H-1b)
2	24.0	2.35 (1H, m, 2a), 1.71 (1H, m, 2b)
3	78.5	4.53 (1H, dd, $J= 12.2, 4.7$ Hz)
4	47.9	-
5	56.4	1.12 (1H, m)
6	21.5	1.86 (1H, m, 6a), 1.64 (1H, m, 6b)
7	41.0	1.53 (1H, m, 7a), 1.47 (1H, m, 7b)
8	43.9	-
9	55.1	1.06 (1H, m)
10	39.4	-
11	18.5	1.58 (2H, m)
12	33.0	1.61 (1H, m, 12a), 1.50 (1H, m, 12b)
13	43.8	2.64 (1H, sa)
14	39.5	1.93 (1H, m, 14a), 1.14 (1H, m, 14b)
15	48.7	2.07 (2H, sa)
16	155.4	-
17	103.3	4.81 (1H, s, 17a), 4.75 (1H, s, 17b)
18	23.8	1.27 (3H, s)
19	179.7	-
20	15.4	1.04 (3H, s)
1'	176.8	-
2'	34.3	2.58 (1H, sept, $J= 7.0$ Hz)
3'	19.1	1.18 (3H, d, $J= 3.2$ Hz)
4'	18.9	1.17 (3H, d, $J= 3.2$ Hz)

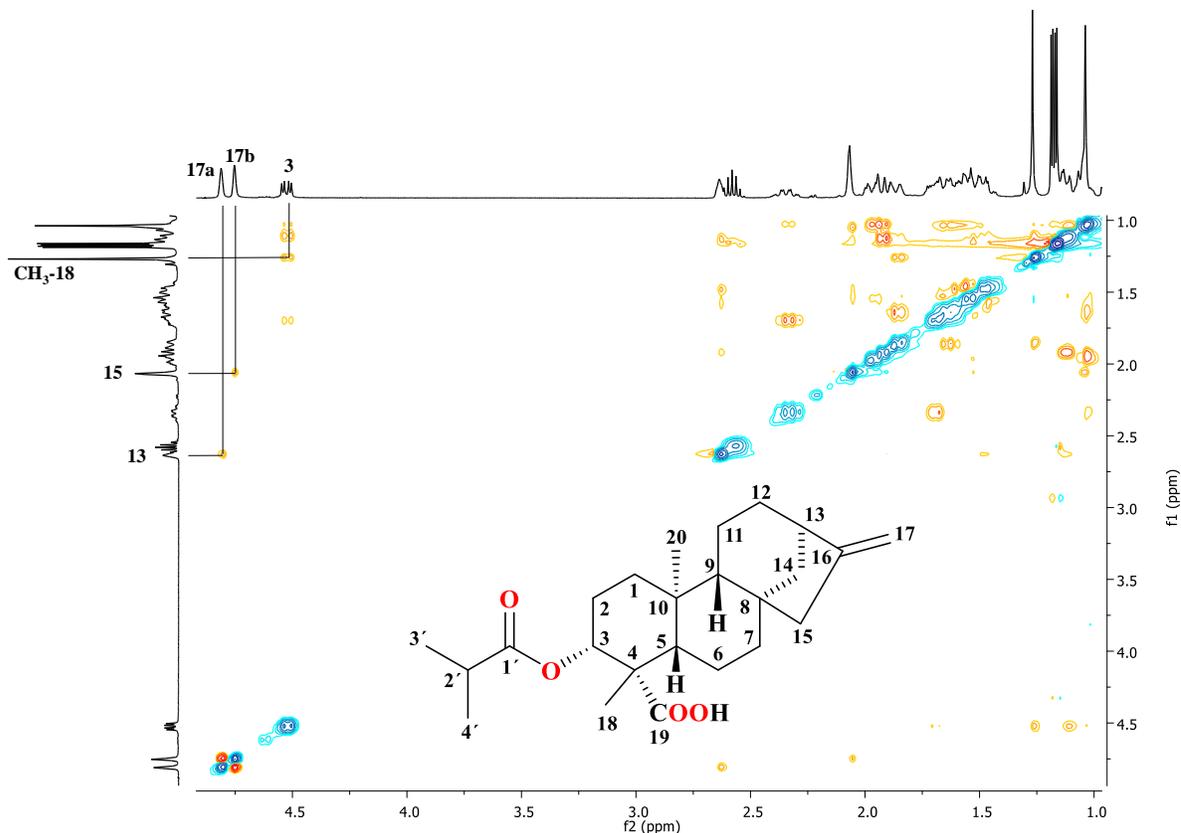


Figura 31. Experimento NOESY del ácido *ent*-3 α -isobutiroiloxi-kaur-16-en-19-oico (**20**).

Posteriormente, en las fracciones 54-64 eluidas con la polaridad hexanos-AcOEt en proporción 4:1, se obtuvieron cristales incoloros en forma de agujas con punto de fusión de 235-237 °C y rotación específica de $[\alpha]_{589} -47$ (c 1, CHCl₃ a 25 °C).

En su espectro de RMN de ¹H (**Figura 32**) se encuentra una señal múltiple en δ 6.03 correspondiente a un protón vinílico H-3', en δ 4.79 una señal simple ancha base de éster asignada al H-15, en δ 3.11 y 2.76 dos señales dobles características de protones base de epóxido H-17a y H-17b con una $J = 5.3$ Hz para cada una, en δ 2.18 una señal doble ancha con $J = 12.9$ Hz correspondiente al H-3a, se observa en δ 2.00 y δ 1.90 las señales de los metilos vinílicos 4' y 5' respectivamente, de δ 2.30 a δ 0.80 se muestra el resto de las señales. La presencia de la señal cuádruple del hidrógeno de doble enlace (H-3') y las señales simples de metilos vinílicos, indicaron la existencia de un grupo angelato.

En el espectro de RMN de ¹³C (**Figura 33**) se observan un total de 25 señales lo que sugirió la presencia de un diterpeno funcionalizado con un grupo angelato, donde destacan en δ 184.1 señal del carbonilo de ácido (C-19), en δ 167.9 (C-1') la de un carbonilo de éster, en δ

137.4 (C-3') y δ 128.0 (C-2') se observan las señales de carbonos vinílicos del angelato, en δ 81.9 la señal de un carbono base de éster (C-15), en δ 66.4 y 49.7 las señales de los carbonos cuaternario y metileno C-16 y C-17 respectivamente, del anillo de epóxido. El resto de las señales aparecen entre δ 50.0 y 15.0. En el experimento DEPT se observó que las señales en δ 28.89 y 28.86 correspondían a un metileno (C-12) y a un metilo (CH₃-18) respectivamente. Los datos experimentales obtenidos, coincidieron con el primer estudio realizado en 2015³¹ para el ácido *ent*-15 α -angeloiloxi-16 α ,17-epoxi-kauran-19-oico conocido comúnmente como ácido periménico (**14**). Se obtuvieron cristales adecuados de **14** para el análisis por difracción de rayos X (**Figura 34**), lo cual permitió confirmar la estructura y su estereoquímica, en donde se observa que el grupo angelato y el ácido carboxílico se encuentran orientados en posición α , al igual que el CH₃-20.

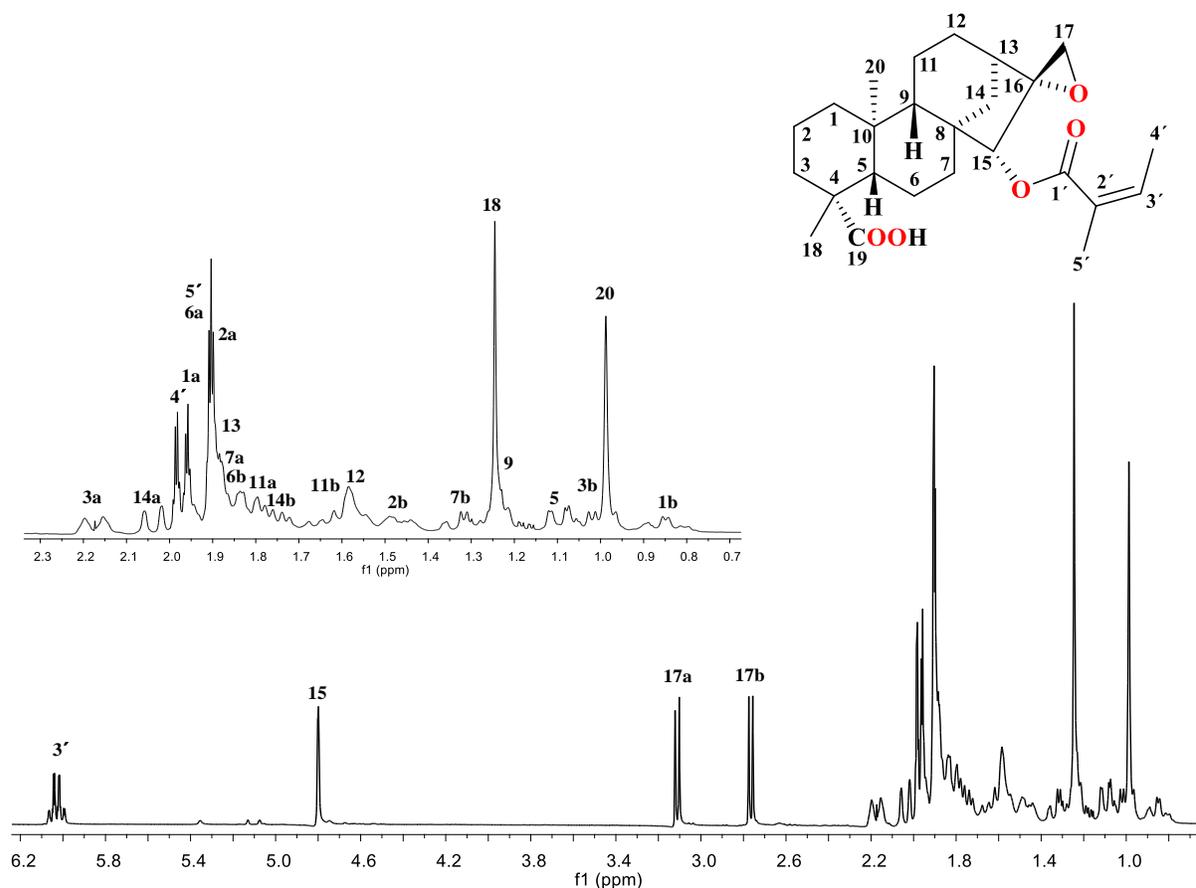


Figura 32. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz del ácido periménico (**14**).

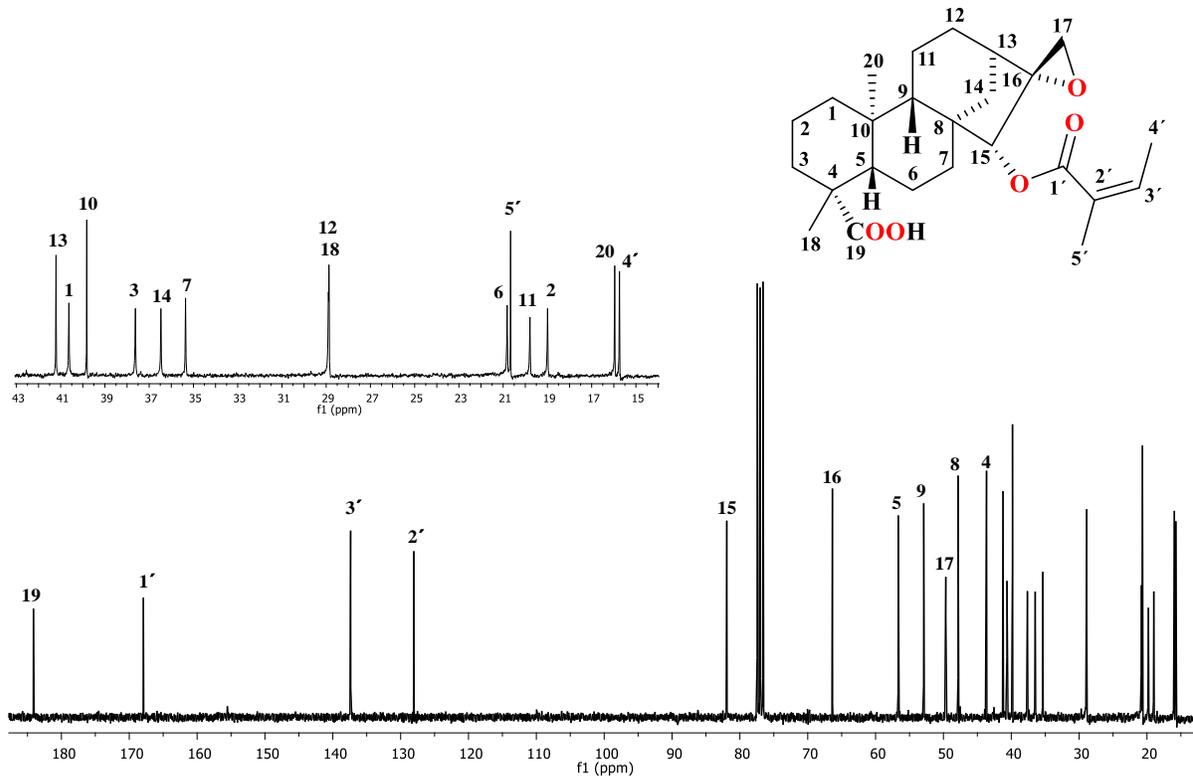


Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz del ácido perimérico (14).

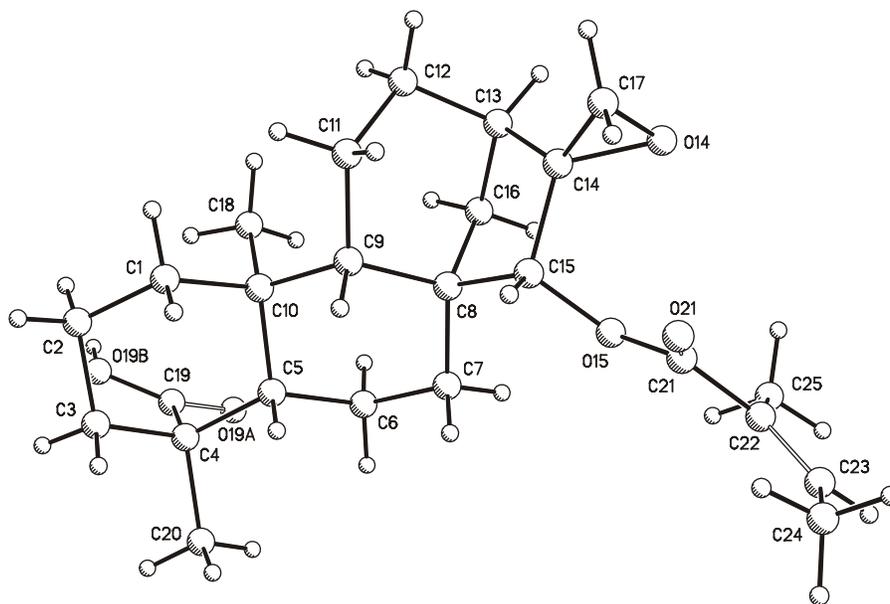


Figura 34. Difracción de Rayos X del ácido perimérico (14).

6.3 | Estudio químico de flor

Un lote de 190 g de flor seca se maceraron durante cinco días a temperatura ambiente utilizando como disolvente hexanos, se filtró y concentró en rotavapor para obtener el extracto crudo y se realizó este procedimiento en tres ocasiones para obtener un total de 1.8 g que se mostró de color amarillo oscuro, se analizó por RMN de ^1H para observar de manera preliminar la mezcla de compuestos presentes (**Figura 35**). Se muestran señales de protones vinílicos de δ 5.50 a 4.10 y en la región alifática de δ 1.70 a 0.65 lo cual indica la presencia de cadenas hidrocarbonadas características de ácidos grasos como componentes mayoritarios. Las grasas presentes en el extracto se precipitaron con metanol para después filtrar y obtener un total de 0.61 g.

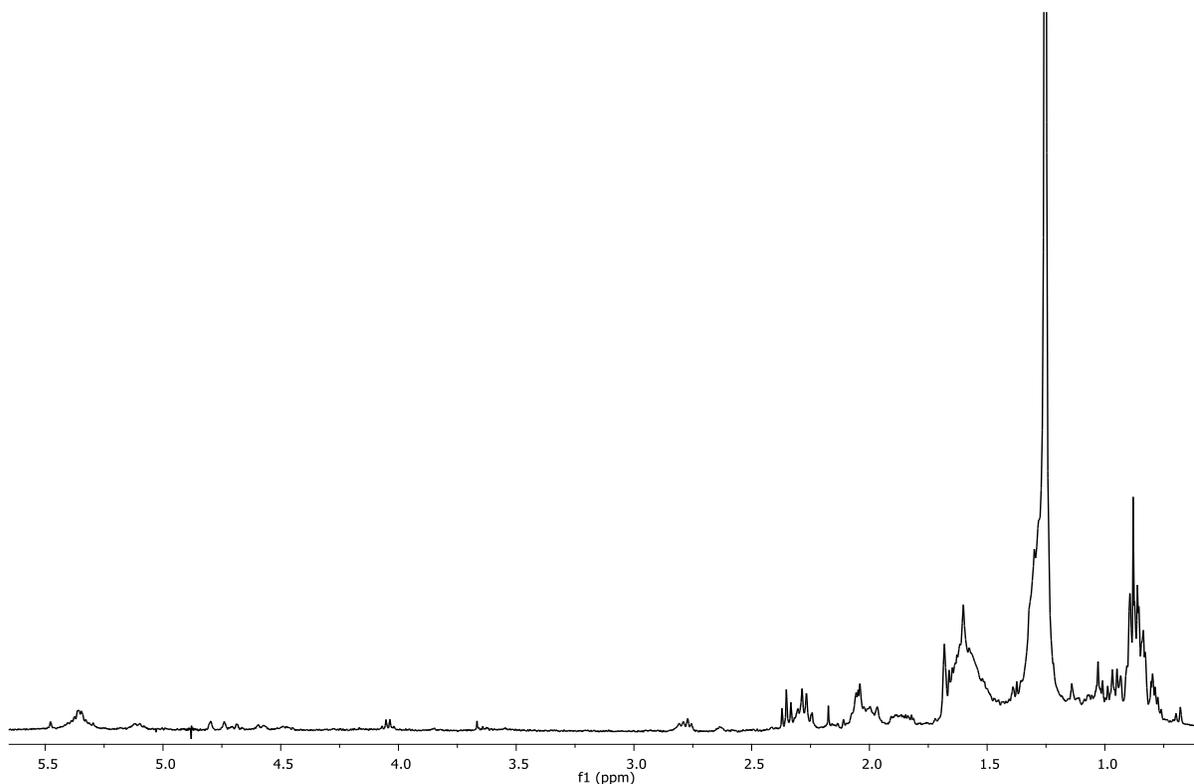


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del extracto hexánico de flor de *L. aurea*.

El extracto desengrasado se sometió a columna cromatográfica de 2 cm de diámetro, empacada con gel de sílice (12 cm de altura), eluída con mezclas de hexanos-AcOEt en orden ascendente de polaridad, las fracciones 47-51 obtenidas y que fueron eluídas con hexanos-AcOEt 9:1 se recromatografiaron obteniendo en la fracción 10 un sólido color blanco.

En su espectro de RMN de ^1H (**Figura 36**) se observa en δ 5.35 una señal doble ancha con una $J= 5.1$ Hz asignada a dos hidrógenos vinílicos H-6, una señal múltiple que integra para dos hidrógenos H-3 en δ 3.53 base de hidroxilos, estas señales son características de una mezcla de dos compuestos conocidos como estigmasterol (**21**) y β -sitosterol (**22**) en proporción 1:1. Para el estigmasterol aparece en δ 5.15 dos señales dobles de dobles con una $J= 15.1, 8.6$ Hz para el hidrógeno vinílico H-22 y en δ 5.01 con $J= 15.1, 8.7$ Hz para el hidrógeno vinílico H-23, las señales de protones de metilos se ubican en: δ 1.02 (CH₃-21), 1.01 (CH₃-19), 0.85 (CH₃-26), 0.80 (CH₃-27) y 0.70 (CH₃-18). Para el β -sitosterol las señales de metilos se muestran en δ 0.68 (CH₃-18), 1.01 (CH₃-19), 0.92 (CH₃-21), 0.82 (CH₃-26) y 0.84 (CH₃-27). El resto de las señales alifáticas para ambos compuestos se presentan de δ 2.35 a 1.05. Los datos fueron comparados con los datos de la literatura (**Tabla 10**) y mostraron una alta concordancia con los datos obtenidos para **21** y **22**.

Adicionalmente se obtuvieron sus espectros de masa (por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa) observando el ion molecular de 412 m/z (**Figura 37**) correspondiente al estigmasterol (**21**) y 414 m/z (**Figura 38**) para el β -sitosterol (**22**). Posteriormente se realizaron sucesivas recromatografías y fue posible aislar e identificar al ácido kaurenico (**4**).

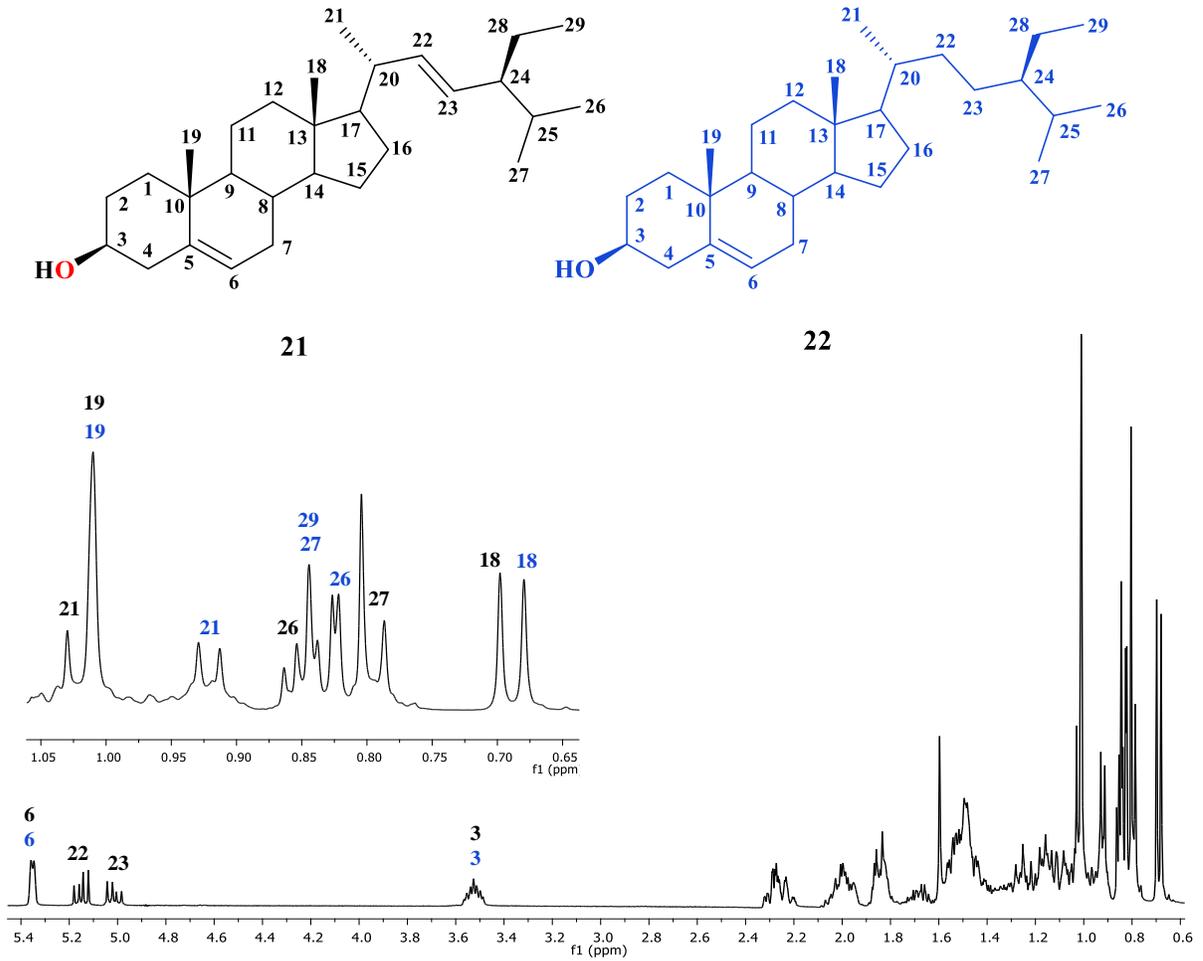


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del estigmasterol (21) y β -sitosterol (22).

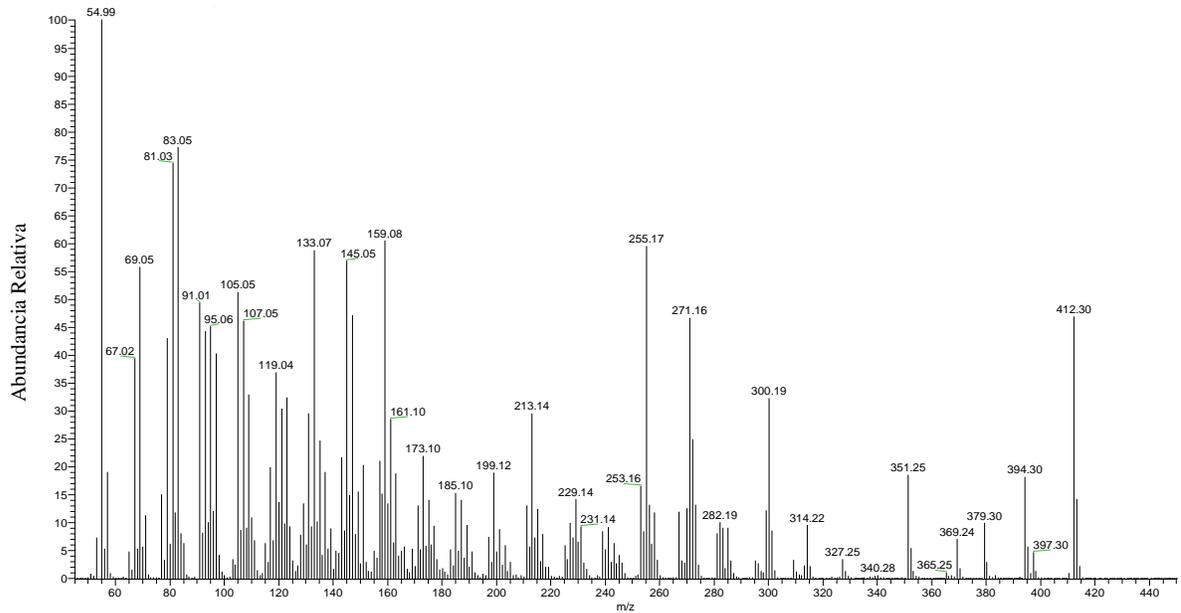


Figura 37. Espectro de masa del estigmasterol (21).

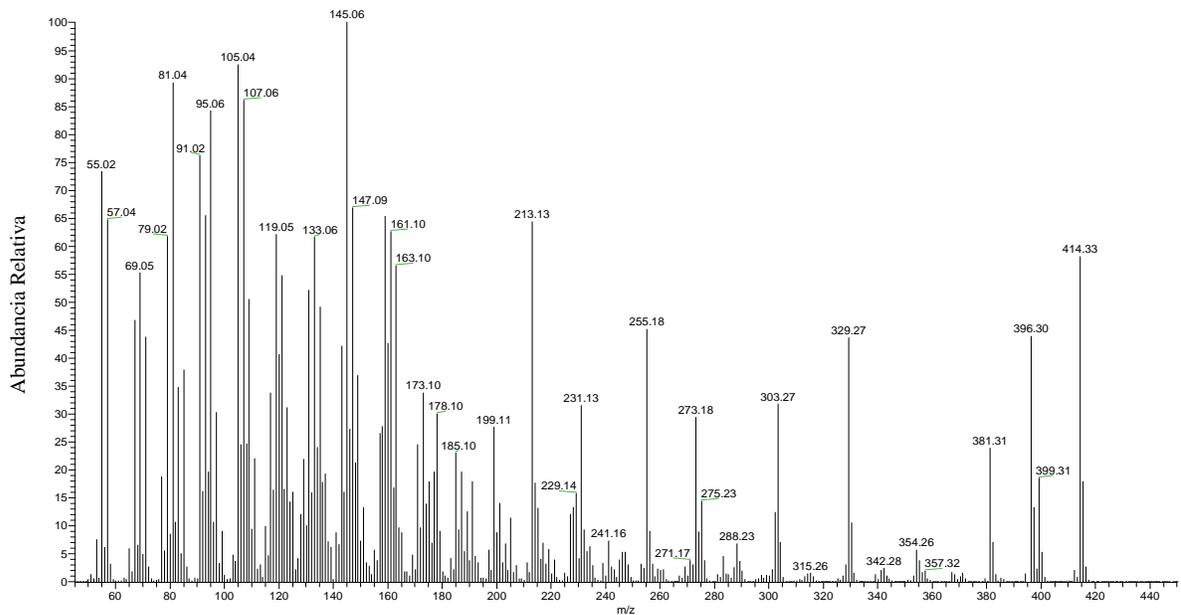


Figura 38. Espectro de masa del β -sitosterol (22).

Tabla 10. Desplazamientos de RMN ^1H de estigmasterol (**21**) y β -sitosterol (**22**).

δ ^1H	EXPERIMENTAL Estigmasterol	LITERATURA ⁴⁰ Estigmasterol	EXPERIMENTAL β -sitosterol	LITERATURA ⁴¹ β -sitosterol
H-3	3.53 (1H, m)	3.51 (1H, m)	3.53 (1H, m)	3.54 (1H, m)
H-6	5.35 (1H, da, $J= 5.1$ Hz)	5.34 (1H, m, $J=5.3$ Hz)	5.35 (1H, d, $J= 5.1$ Hz)	5.38 (1H, m)
H-18	0.70 (3H, s)	0.70 (3H, s)	0.68 (3H, s)	0.68 (3H, s)
H-19	1.01 (3H, s)	1.01 (3H, s)	1.01 (3H, s)	1.00 (3H, s)
H-21	1.02 (3H, d, $J= 7.9$ Hz)	1.03 (d)	0.92 (3H, d, $J= 6.5$ Hz)	0.92 (3H, d, 6.4)
H-22	5.15 (1H, dd, $J=$ 15.1, 8.6 Hz)	5.17 (1H, dd, $J=15.2$ Hz)	-	-
H-23	5.01 (1H, dd, $J=$ 15.1, 8.7 Hz)	5.04 (1H, $J= 8.6$ Hz)	-	-
H-26	0.85 (3H, d)	0.85 (3H, d)	0.82 (3H, d)	0.82 (3H, d)
H-27	0.80 (3H, d)	0.80 (3H, d)	0.84 (3H, d)	0.84 (3H, d)
H-29	-	0.81 (3H, t)	-	0.84 (3H, t, 7.6)

6.4 | Estudio químico de tallo

Un lote de 130 g de tallos secos se maceraron a temperatura ambiente por aproximadamente cinco días utilizando como disolvente hexanos, se filtró y concentró en rotavapor, realizando el mismo proceso en tres ocasiones, para obtener el extracto (0.73 g) y analizar por RMN de ^1H , en el cual se observa de δ 7.20 a 6.35 señales características de protones aromáticos, de δ 5.40 a 4.50 señales vinílicas, entre ellas una señal doble en δ 4.78 que es distintiva de diterpenos de tipo kaureno, y de δ 2.45 a 0.70 señales de protones alifáticos (**Figura 39**).

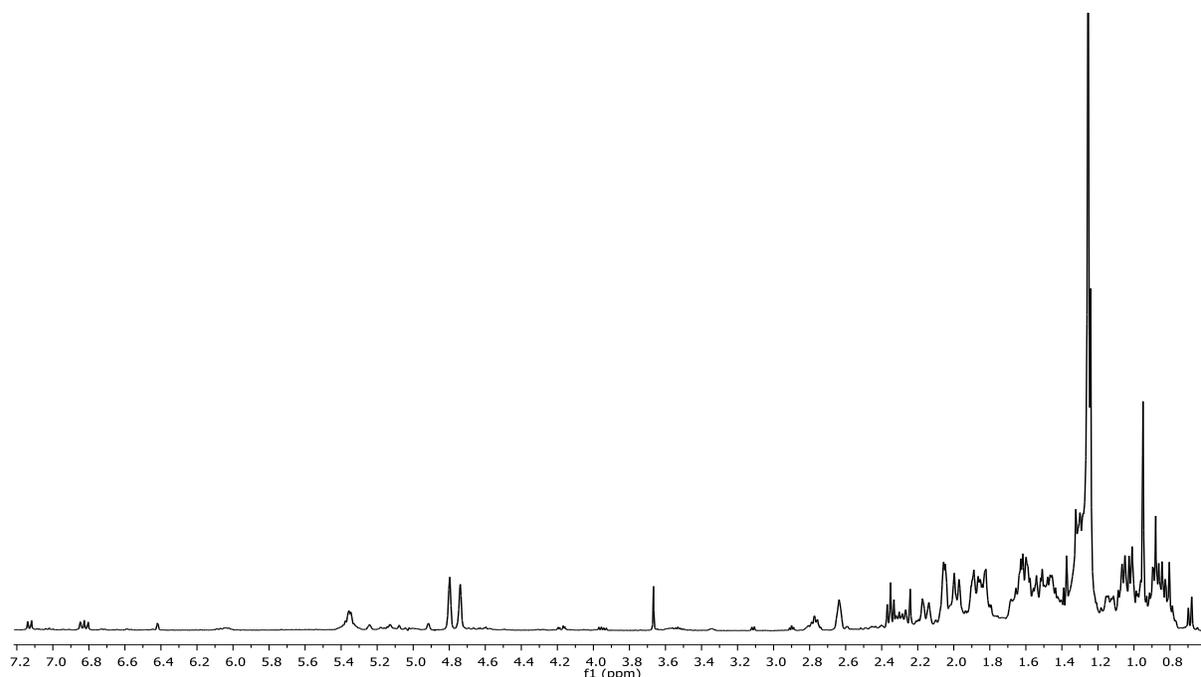


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del extracto hexánico de tallo de *L. aurea*.

El extracto se llevó a precipitación de sus grasas con metanol y se obtuvo 0.39 g, el cual se sometió a columna cromatográfica empacada con gel de sílice y eluída mezclas de hexanos-AcOEt. Tras varios procesos cromatográficos fue posible separar un sólido color blanco insoluble en hexanos, el cual se analizó por RMN de ^1H , observando en su espectro las señales que coincidieron con la mezcla de triterpenos conocidos como estigmasterol (**21**) y β -sitosterol (**22**) que fueron aislados de las flores de esta especie (**Figura 36**). También se aisló e identificó al ácido kaurenoico (**4**), que fue encontrado igualmente en raíz y flor.

6.5 | Estudio químico de hoja

Los extractos hexánicos de las tres colectas realizadas (2014, 2015 y 2016) se procesaron obteniendo un total de 7.5 g de color verde oscuro, el cual se analizó por RMN de ^1H (**Figura 40**) destacando principalmente de δ 5.55 a 4.00 las señales que indica la presencia de dobles enlaces y que en conjunto con las señales alifáticas de δ 2.40 a 0.65 revelan que se encuentran metabolitos de tipo terpenoides.

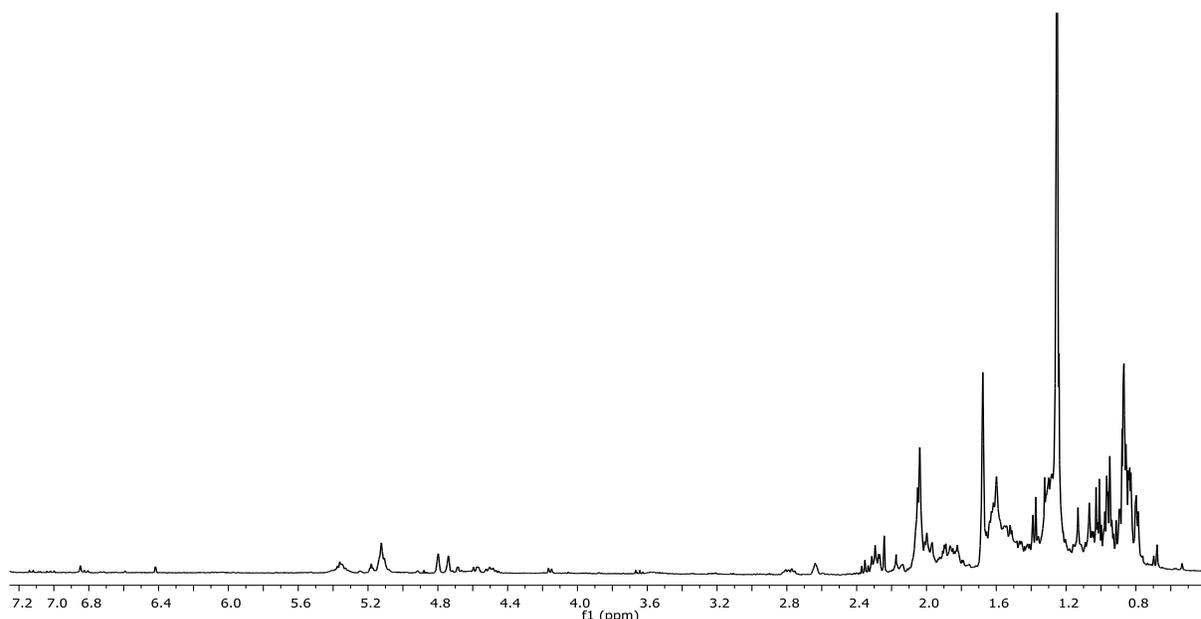


Figura 40. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del extracto hexánico de hoja de *L. aurea*.

La purificación se llevó a cabo en una columna cromatográfica con 7.5 g del extracto hexánico, y en las fracciones eluidas con la polaridad 4:1 hexanos-AcOEt se obtuvo un sólido blanco acompañado de mieles de color naranja los cuales se separaron con lavados de hexanos, y al analizar por RMN de ^1H , se identificó como la mezcla estigmasterol (**21**) y β -sitosterol (**22**) encontrada antes en flor y tallo (**Figura 36**). Posteriormente se realizó una recromatografía en columna de las fracciones 63-67 obtenidas en la polaridad 85:15 (hexanos-AcOEt), la cual fue eluida con CH_2Cl_2 como única polaridad obteniendo en las fracciones 10-13 un precipitado de color blanco, el cual se separó y se caracterizó por RMN de ^1H (**Figura 41**) en el cual se mostraron tres diferentes juegos de señales en proporción 46:42:12, las señales triples encontradas en δ 5.13 ($J= 5.4, 3.6$ Hz) y en 5.18 ($J= 3.5, 7$ Hz) son asignadas a los hidrógenos vinílicos (H-12) para los compuestos de tipo triterpeno conocidos como α y β amirinas respectivamente, para el compuesto mayoritario de tipo ursano **23** (α -amirina) se muestra la señal del H-3 base de hidroxilo en δ 3.21, los metilos se ubican en δ 1.01 (CH_3 -27), 1.00 (CH_3 -23 y 26), 0.95 (CH_3 -25), 0.80 (CH_3 -28) y en 0.79 (CH_3 -24). Para el compuesto de tipo oleanano la β -amirina (**24**) se observa la señal del hidrógeno base de heteroátomo (H-3) se encuentra en δ 3.24, en la parte alifática del espectro se ubican a los metilos en δ 1.13 (CH_3 -27), 1.07 (CH_3 -23), 1.00 (CH_3 -26), 0.94 (CH_3 -25), 0.87 (CH_3 -29 y 30), 0.83 (CH_3 -28) y en 0.79 (CH_3 -24). Para el compuesto minoritario se presentan dos señales múltiples en δ 4.69 y 4.57 que son asignadas

para los hidrógenos de doble enlace H-29a y H-29b, en 3.18 la señal del H-3 base de hidroxilo, una señal múltiple en δ 2.36 que es asignada para el hidrógeno alílico H-19, las señales simples que integran para tres hidrógenos se encuentran en δ 1.68 (CH₃-30), 1.03 (CH₃-26), 0.97 (CH₃-23), 0.91 (CH₃-27), 0.80 (CH₃-28), 0.83 (CH₃-25) y 0.76 (CH₃-24), el cual se identifica como a un triterpeno de tipo lupano, lupeol (**25**). Los datos obtenidos coincidieron con los reportes encontrados (**Tabla 11**). Después de varias recromatografías se obtuvo al ácido kaurenico (**4**), el cual se mantuvo presente en todas las partes de la planta.

Adicionalmente se realizó una columna cromatográfica, empacada con gel de sílice, de extractos de CH₂Cl₂ de las partes aéreas (flor, hoja tallo) de las tres colectas realizadas, (reuniendo un total de 11.5 g) la cual fue eluída con mezclas hexanos-AcOEt en orden ascendente de polaridad, de la cual se identificó principalmente a los compuestos: estigmasterol (**21**), β -sitosterol (**22**) y ácido kaurenico (**4**).

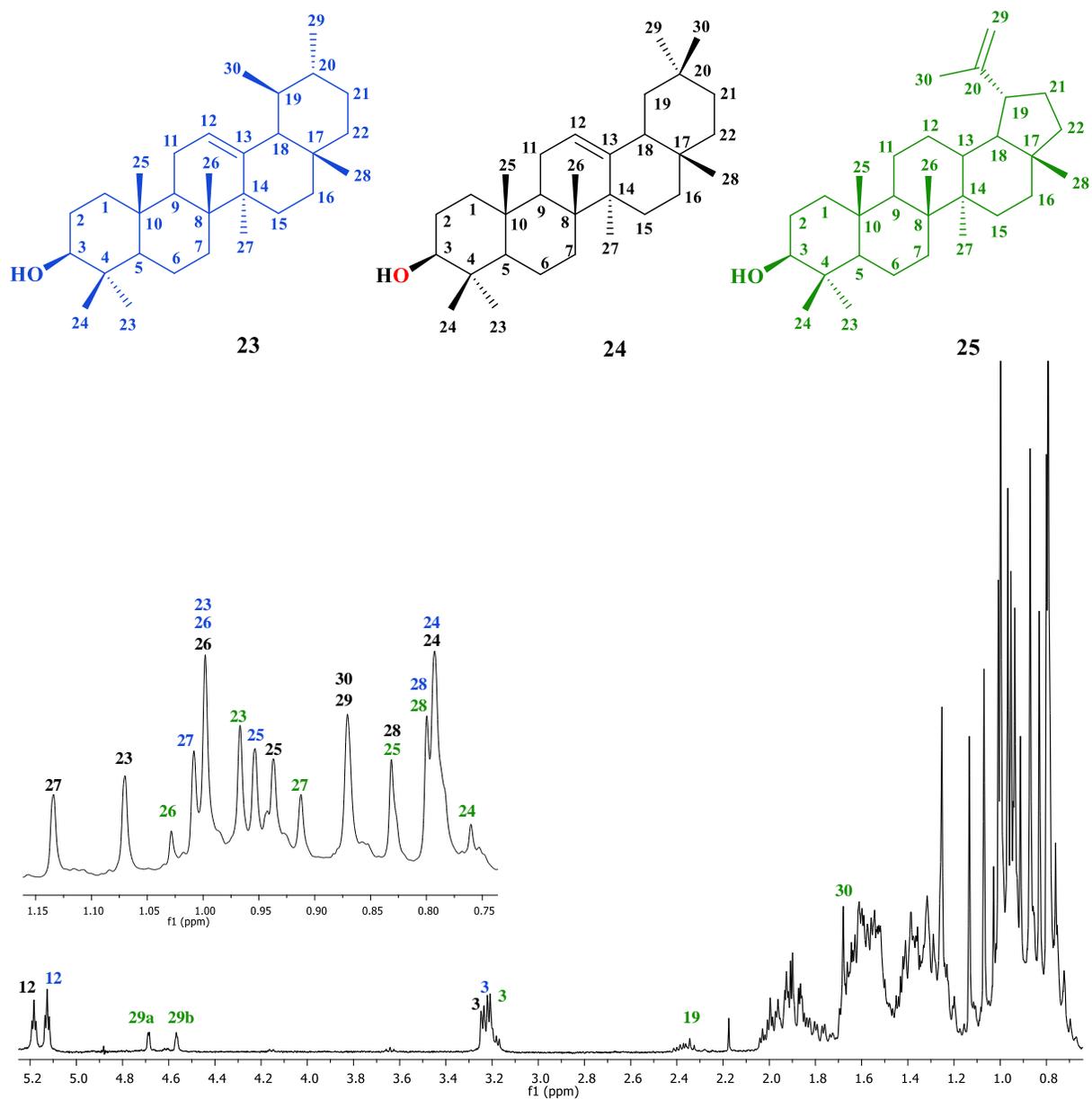


Figura 41. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz de α-amirina (23), β-amirina (24) y lupeol (25).

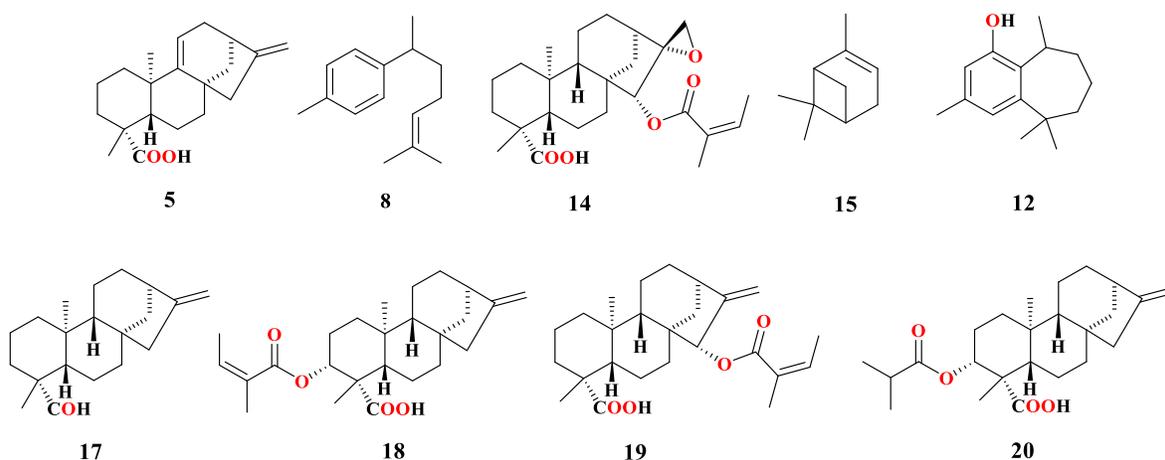
Tabla 11. Desplazamientos de RMN de ^1H de α -amirina (**23**), β -amirina (**24**) y lupeol (**25**).

δ ^1H	EXPERIMENTAL	LITERATURA ⁴²	EXPERIMENTAL	LITERATURA ⁴³	EXPERIMENTAL	LITERATURA ⁴⁴
	α -amirina	α -amirina	β -amirina	β -amirina	Lupeol	Lupeol
H-3	3.21 (1H, m)	3.22 (1H, dd, $J=5.0, 11.0$ Hz)	3.24 (1H, m)	3.22 (1H, dd, $J=$ 5.5, 7.4Hz)	3.18 (1H, m)	3.18 (1H, dd)
H-12	5.13 (1H, t, $J=5.4,$ 3.6 Hz)	5.13 (1H, t, $J=3.5$ Hz)	5.18 (1H, t, $J= 3.5,$ 7 Hz)	5.18 (1H, dd, $J=$ 3.5 Hz)	-	-
H-19	-	-	-	-	2.36 (1H, m)	2.29 (1H, m)
H-23	1.00 (3H, s)	1.00 (3H, s)	1.07 (3H, s)	1.00 (3H)	0.97 (3H, s)	0.97 (3H, s)
H-24	0.79 (3H, s)	0.79 (3H, s)	0.79 (3H, s)	0.79 (3H)	0.76 (3H, s)	0.76 (3H, s)
H-25	0.95 (3H, s)	0.95 (3H, s)	0.94 (3H, s)	0.94 (3H)	0.83 (3H, s)	0.83 (3H, s)
H-26	1.00 (3H, s)	1.01 (3H, s)	1.00 (3H, s)	0.97 (3H)	1.03 (3H, s)	1.03 (3H, s)
H-27	1.01 (3H, s)	1.07 (3H, s)	1.13 (3H, s)	1.13 (3H)	0.91 (3H, s)	0.94 (3H, s)
H-28	0.80 (3H, s)	0.80 (3H, s)	0.83 (3H, s)	0.83 (3H)	0.80 (3H, s)	0.79 (3H, s)
H-29	-	0.79 (3H, d $J=$ 5.5 Hz)	0.87 (3H, s)	0.87 (3H)	4.69 (1H, m, 29a) 4.57 (1H, m, 29b)	4.69 (1H, m, H- 29a) 4.57 (1H, m, H-29b)
H-30	-	0.92 (3H, d, $J=$ 5.5 Hz)	0.87 (3H, s)	0.87 (3H)	1.68 (3H, s)	1.68 (3H, s)

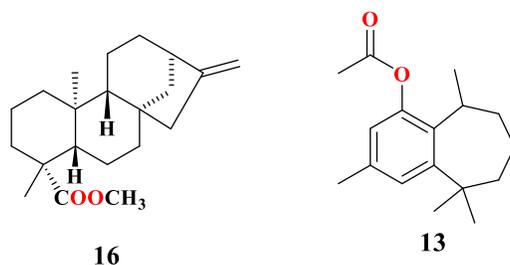
7. | CONCLUSIONES

El análisis de los espectros de RMN de ^1H obtenidos de los extractos de la especie *Lasianthaea aurea* de las dos zonas diferentes de colecta encontradas en el estado de Michoacán (km 3.5 de la carretera Tiripetío-Villa Madero y Tenencia de Santa María en Morelia), mostraron el mismo conjunto de señales, por lo que la presencia y abundancia de metabolitos secundarios no se vio afectada al cambiar el área de colección, lo cual permitió continuar con su exploración química. Los extractos de hexanos y CH_2Cl_2 de las partes aéreas (flor, tallo y hoja) conservan gran similitud en presencia de compuestos por su análisis de RMN de ^1H , la raíz a su vez posee el mismo conjunto de compuestos en su extracto hexánicos y de CH_2Cl_2 , por lo cual la separación de *L. aurea* será en partes aéreas y raíz, descartando los extractos hexánicos, para obtener de manera directa los de CH_2Cl_2 .

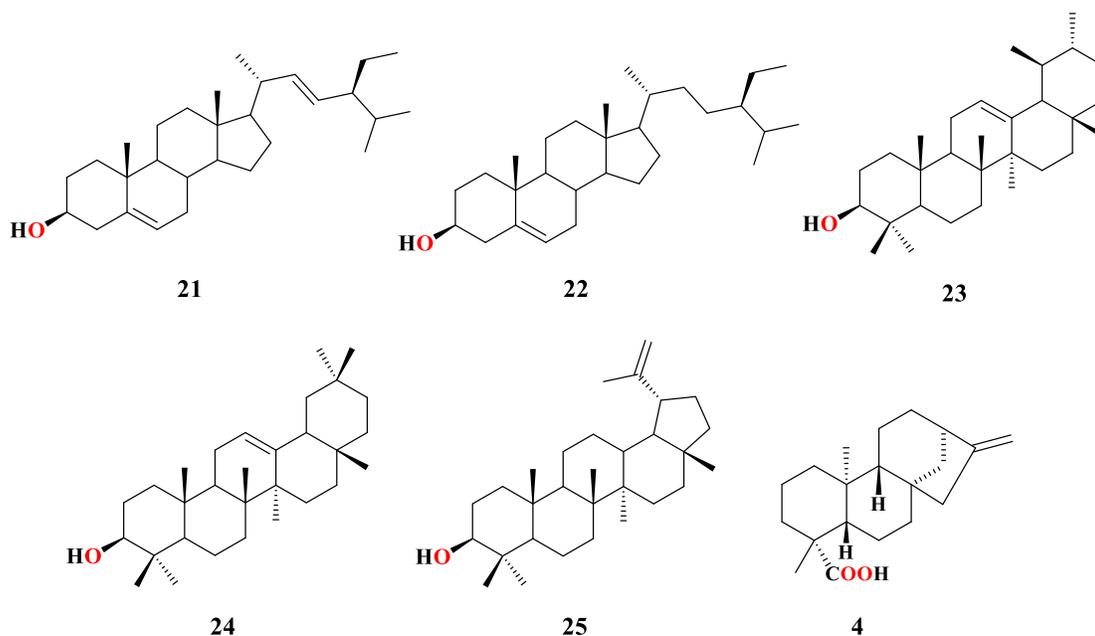
Del estudio químico de los extractos hexánicos de raíz se logró la separación e identificación de ácido grandiflorénico (**5**), curcumeno (**8**), ácido periménico (**14**) del cual se obtuvieron cristales adecuados para la difracción de rayos X, α -pineno (**15**), podocefalol (**12**), kaurenal (**17**), ácido *ent*-3 α -angeloil-kaur-16-en-19-oico (**18**) y ácido angeloilgrandiflórico (**19**), así como una estructura novedosa el ácido *ent*-3 α -isobutiroiloxi-kaur-16-en-19-oico (**20**).



Se prepararon los derivados *ent*-kaur-16-en-19-ato de metilo (**16**) y acetato de podocefalilo (**13**).



De los extractos de flor, tallo y hoja se identificaron a dos fitoesteroles, el estigmasterol (**21**) y el β -sitosterol (**22**). Del estudio de los extractos hexánicos y de CH_2Cl_2 de las hojas se logró identificar a los triterpenos α -amirina (**23**), β -amirina (**24**) y lupeol (**25**). De todos los órganos de la planta se identificó al ácido kaurenico (**4**).



Los compuestos **4**, **5**, **8** y **12** han sido aislados de *Lasianthaea podocephala*²⁷ y **4**, **5**, **17** y **18** de *Lasianthaea fruticosa*,^{26, 45} siendo las estructuras **14**, **15** y **19-25** novedosas en el género *Lasianthaea*. Los resultados obtenidos de este estudio enriquecen de manera importante los datos quimiotaxonómicos de este género.

8. | PARTE EXPERIMENTAL

| Materia vegetal

Las colectas de la especie vegetal *Lasianthaea aurea* se realizaron el 29 de Julio del 2014 en el km 3.5 de la carretera Tiripetío-Villa Madero y en la tenencia Santa María el 17 de Julio del 2015 y el 19 de agosto del 2016, en Morelia Michoacán. La planta colectada, se dejó secar extendida a la sombra, para su posterior separación en sus diferentes órganos, raíz, flor, tallo y hoja.

| Obtención de extractos

Raíz, flor, tallo y hoja, se maceraron con hexanos y posteriormente con CH₂Cl₂ a temperatura ambiente por cinco días, se filtró y evaporó el disolvente en rotavapor, para obtener los extractos correspondientes, este proceso se realizó por triplicado con el mismo disolvente, obteniendo un total de:

(g)	COLECTA 2014		COLECTA 2015			COLECTA 2016		
	Extractos hexánicos (g)	Extractos CH ₂ Cl ₂ (g)	(g)	Extractos hexánicos (g)	Extractos CH ₂ Cl ₂ (g)	(g)	Extractos hexánicos (g)	Extractos CH ₂ Cl ₂ (g)
Flor (190)	1.7929	1.8116	Flor (105)	1.1492	0.9764	Flor (125)	0.8701	0.8258
Hoja (310)	3.5311	3.3943	Hoja (625)	1.7307	1.4836	Hoja (145)	2.2526	1.2294
Tallo (150)	0.4243	0.5109	Tallo (130)	0.728	0.4736	Tallo (235)	0.9375	0.7102
Raíz (405)	41.1293	4.0142	Raíz (995)	91.3641	6.557	Raíz (1220)	73.2244	6.5809

| Análisis

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ¹H a 400 MHz y ¹³C a 100 MHz se midieron en un equipo Varian Mercury Plus 400, los espectros de RMN de ¹H a 300 MHz, ¹³C a 75 MHz y experimentos en 2D en equipo de Varian Mercury Plus 300, en todos los casos se utilizó como disolvente cloroformo deuterado (CDCl₃) y como referencia interna tetrametilsilano (TMS). Los espectros fueron procesados empleando el programa MestReNova.

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

Las rotaciones específicas fueron determinadas en soluciones clorofórmicas en un polarímetro marca Perkin-Elmer 341.

Los espectros de masa fueron determinados en un Cromatografo de Gases (CG) marca Thermo Scientific, modelo trace 1310 acoplado a un Espectrómetro de Masa (EM) marca Thermo Scientific, modelo ISQ LT.

Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro BUCK 500, utilizando soluciones clorofórmicas. Los datos se expresan en números de onda (ν) cm^{-1} , para los máximos principales de absorción.

El análisis de difracción de rayos X se llevó a cabo en un difractómetro Bruker-Nonius CAD4 con radiación de $\text{Cu K}\alpha$.

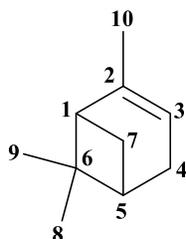
Los cálculos computacionales que se realizaron para el compuesto **13** se llevaron a cabo en una computadora personal (laptop) con 8 GB de memoria RAM y procesador Intel (R) Core(TM) i7 a 2.20GHz, empleando el programa Spartan`04. Se modelaron los epímeros 7α y 7β de **13**, de los cuales se obtuvieron 39 y 40 conformeros respectivamente en el cálculo de distribución conformacional a nivel de mecánica molecular (MMFF). La energía de todos los conformeros fue optimizada con B3LYP/631G**. La distribución poblacional se determinó a partir de la ecuación de Boltzmann:

$$e^{-\Delta E(KBT)} = 1$$

| Estudio químico

La separación de los compuestos se realizó mediante columna cromatográfica de vidrio con diámetro de 4, 3, 2 y 1 cm, utilizando gel de sílice de malla 230-400 marca Merck, con una altura de 12 cm como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de hexanos-AcOEt, hexanos-acetona en orden de polaridad creciente y CH_2Cl_2 como única polaridad, colectando fracciones de 3, 5 y 10 mL. Las cromatografías de columna fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina. Placa preparativa sílica gel 60 F₂₅₄ 0.5mm de la marca Merck de 10 cm de alto y 20 cm de ancho usando como fase móvil mezclas de disolventes mencionados.

α -pineno (15)

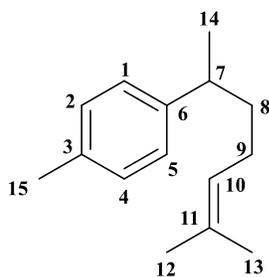


Líquido viscoso incoloro y con aroma característico a pino.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5.19 (1H, m, H-3), 2.33 (1H, m, H-7a), 2.21 (1H, m, H-4a), 2.17 (1H, m, H-4b), 2.00 (1H, m, H-5), 1.92 (1H, m, H-1), 1.65 (3H, t, H-10), 1.26 (3H, s, H-8), 1.15 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-7b) 0.84 (3H, s, H-9).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 144.5 (CH, C-2), 116.0 (CH, C-3), 47.0 (CH, C-1), 40.7 (CH, C-5), 37.9 (C, C-6), 31.4 (CH_2 , C-7), 31.2 (CH_2 , C-4), 26.3 (CH_3 , C-8), 23.0 (CH_3 , C-10), 20.8 (CH_3 , C-9).

Curcumeno (8)

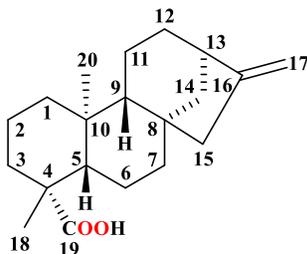


Líquido viscoso incoloro.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.08 (4H, m, H-1, H-2, H-4, H-5), 5.09 (1H, ta, $J = 7.1$ Hz, H-10), 2.65 (1H, sext, $J = 7.0$ Hz, H-7), 2.32 (3H, s, H-15), 1.87 (2H, m, H-9), 1.67 (3H, s, H-12), 1.58 (2H, m, H-8), 1.52 (3H, s, H-13), 1.21 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-14).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 144.6 (C, C-6), 135.1 (C, C-3), 131.3 (C, C-11), 128.9 (CH, C-2 y C-4), 126.9 (CH, C-1 y C-5), 124.5 (CH, C-10), 39.0 (CH, C-7), 38.4 (CH_2 - C-8), 26.1 (CH_2 , C-9), 25.7 (CH_3 , C-12), 22.4 (CH_3 , C-14), 21.0 (CH_3 -C-15), 17.6 (CH_3 , C-13).

Ácido kaurenoico o ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (4)



Cristales blancos.

Punto de fusión: 175-177 °C.

$[\alpha]_{589} -104$, $[\alpha]_{578} -108$, $[\alpha]_{546} -123$, $[\alpha]_{436} -207$, $[\alpha]_{365} -322$ (c 1, CHCl_3) a 25 °C.

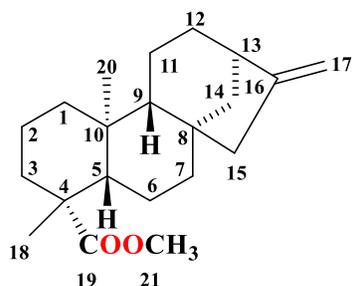
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4.80 (1H, s, H-17a), 4.74 (1H, s, H-17b), 2.64 (1H, ta, $J = 4.0$ Hz, H-13), 2.16 (1H, da, $J = 14.6$ Hz, H-3a), 2.05 (2H, m, H-15), 1.99 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-14a), 1.90 (1H, m, H-1a), 1.86 (1H, m, H-2a), 1.82 (2H, m, H-6),

1.61 (1H, m, H-11a), 1.58 (1H, m, H-7a), 1.55 (1H, m, H-12a), 1.50 (1H, m, H-11b), 1.48 (1H, m, H-7b), 1.46 (1H, m, H-12b), 1.24 (3H, s, H-18), 1.13 (1H, dd, $J = 11.0, 4.6$ Hz, H-14b), 1.08 (2H, m, H-5), 1.60 (1H, dda, $J = 10.6, 4.3$ Hz, H-9), 1.01 (1H, m, H-3b), 0.95 (3H, s, H-20), 0.81 (1H, td, $J = 13.3, 4.0$ Hz, H-1b).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 184.8 (C, C-19), 155.8 (C, C-16), 103.0 (CH_2 , C-17), 57.0 (CH, C-5), 55.1 (CH, C-9), 48.9 (CH_2 , C-15), 44.2 (C, C-8), 43.8 (CH, C-13), 43.7 (C, C-4), 41.3 (CH_2 , C-7), 40.7 (CH_2 , C-1), 39.7 (CH_2 , C-14), 39.6 (C, C-10), 37.7 (CH_2 , C-3), 33.1 (CH_2 , C-12), 28.9 (CH_3 , C-18), 21.8 (CH_2 , C-6), 19.1 (CH_2 , C-2), 18.4 (CH_2 , C-11), 15.6 (CH_3 , C-20).

***ent*-kaur-16-en-19-ato de metilo (16)**

Un lote de 100 mg de **4** se pusieron a reaccionar con diazometano, el cual se preparó con una

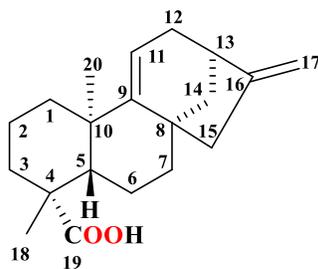


solución de *N*-metil-*N*-nitrosoamida en solución concentrada de NaOH como fase acuosa y CH_2Cl_2 como fase orgánica a temperatura ambiente, la purificación se llevó a cabo en columna cromatográfica eluída con mezcla hexanos-acetato de etilo (98:2), obteniendo como producto a **16** con un rendimiento del 89% como un sólido color blanco.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4.79 (1H, s, H-17a), 4.73 (1H, s, H-17b), 3.64 (3H, s, H-21), 2.63 (1H, ta, $J = 4.0$ Hz, H-13), 1.17 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-20).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 178.1 (C, C-19) 155.9 (C, C-16), 103.0 (CH_2 , C-17), 57.0 (CH, C-5), 55.0 (CH, C-9), 51.1 (CH_3 , C-21), 48.9 (CH_2 , C-15), 44.2 (C, C-8), 43.8 (CH, C-13), 43.8 (C, C-4), 41.3 (CH_2 , C-7), 40.7 (CH_2 , C-1), 39.7 (CH_2 , C-14), 39.4 (C, C-10), 38.1 (CH_2 , C-3), 33.1 (CH_2 , C-12), 28.7 (CH_3 , C-18), 21.9 (CH_2 -C-6), 19.1 (CH_2 , C-2), 18.4 (CH_2 , C-11), 15.3 (CH_3 , C-20).

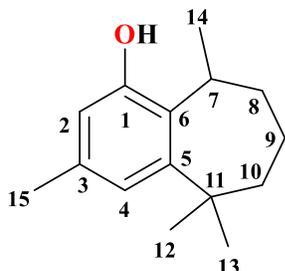
Ácido Grandiflorénico (5)



Sólido color blanco.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5.24 (1H, ta, $J=3.3$ Hz, H-11), 4.91 (1H, s, H-17a), 4.80 (1H, s, H-17b), 2.77 (1H, ta, $J=5.2$ Hz, H-13), 2.43 (1H, m, H-12a), 1.99 (1H, m, H-12b), 1.24 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-20).

Podocefalol (12)



Cristales color ligeramente amarillo.

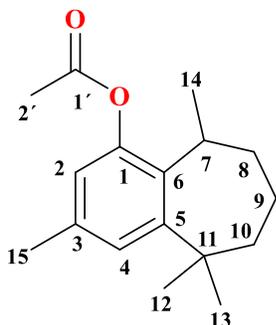
Punto de fusión: 47-49 °C.

IR (CHCl_3) ν_{max} 3590, 2925, 2856, 1708, 1612, 1569, 1465, 1281, 1167 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 6.85 (1H, m, H-4), 6.41 (1H, m, H-2), 4.64 (1H, sa, OH), 3.58 (1H, m, H-7), 2.24 (3H, s, H-15), 2.17 (1H, m, H-10a), 1.87 (2H, m, H-9), 1.86 (2H, m, H-8), 1.53 (1H, m, H-10b), 1.38 (3H, d, $J=7.4$ Hz, H-14), 1.37 (3H, s, H-13), 1.32 (3H, s, H-12).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 153.5 (C, C-1), 151.3 (C, C-5), 135.3 (C, C-3), 129.8 (C, C-6), 122.3 (CH, C-4), 113.3 (CH, C-2), 39.9 (C, C-11), 39.8 (CH_2 , C-10), 35.6 (CH_3 , C-12), 31.2 (CH, C-7), 30.9 (CH_2 , C-8), 30.2 (CH_3 , C-13), 21.0 (CH_3 , C-15), 21.0 (CH_2 , C-9), 19.1 (CH_3 , C-14).

Acetato de podocefalilo (13)



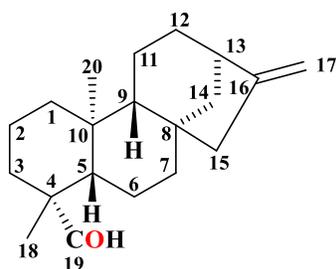
Una disolución de 50 mg de podocefalol (**12**) en 1 mL de CH_2Cl_2 , se pusieron a reaccionar con 0.5 mL de piridina y 0.5 mL de anhídrido acético durante 4 h a temperatura ambiente. Se obtuvo como único producto a **13**, con un rendimiento del 91% como cristales incoloros.

Punto de fusión: 48-50 °C.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.14 (1H, m, H-4), 6.65 (1H, m, H-2), 3.33 (1H, m, H-7), 2.31 (3H, s, H-2'), 2.29 (3H, s, H-15), 2.12 (1H, m, H-10a), 1.82 (2H, m, H-9), 1.81 (2H, m, H-8), 1.55 (1H, m, H-10b), 1.38 (3H, s, H-13), 1.34 (3H, s, H-12), 1.33 (3H, d, $J=7.4$ Hz, H-14).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 170.0 (C, C-1'), 151.0 (C, C-5), 149.2 (C, C-1), 135.3 (C, C-3), 134.6 (C, C-6), 127.6 (CH, C-4), 120.4 (CH, C-2), 39.9 (C, C-11), 39.8 (CH_2 , C-10), 35.3 (CH_3 , C-12), 31.8 (CH, C-7), 30.8 (CH_2 , C-8), 30.4 (CH_3 , C-13), 21.2 (CH_3 , C-2'), 21.0 (CH_3 , C-15), 20.9 (CH_2 , C-9), 19.4 (CH_3 , C-14).

Kaurenal o *ent*-kaur-16-en-19-al (17)



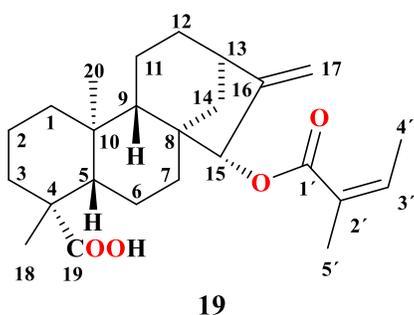
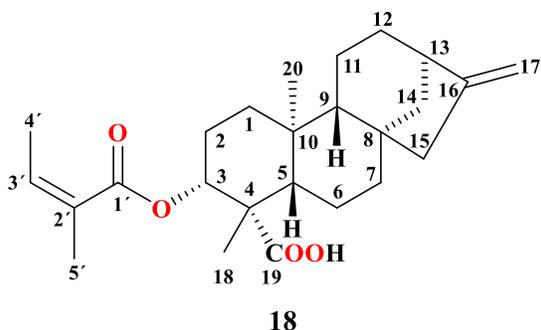
Cristales incoloros.

Punto de fusión: 114-116 °C.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 9.72 (1H, d, $J=1.3$ Hz, H-19), 4.80 (1H, s, H-17a), 4.75 (1H, s, H-17b), 2.65 (1H, ta, $J=4.0$ Hz, H-13), 1.0 (3H, s, H-18), 0.88 (3H, s, H-20).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 205.9 (C, C-19), 155.5 (C, C-16), 103.2 (CH_2 , C-17), 56.7 (CH, C-5), 54.5 (CH, C-9), 49.0 (CH_2 , C-15), 48.5 (C, C-4), 44.0 (C, C-8), 43.7 (CH, C-13), 41.1 (CH_2 , C-7), 39.9 (CH_2 , C-14), 39.8 (CH_2 , C-1), 39.3 (C, C-10), 34.2 (CH_2 , C-3), 32.9 (CH_2 , C-12), 24.3 (CH_3 , C-18), 19.9 (CH_2 , C-6), 18.4 (CH_2 , C-2), 18.3 (CH_2 , C-11), 16.4 (CH_3 , C-20).

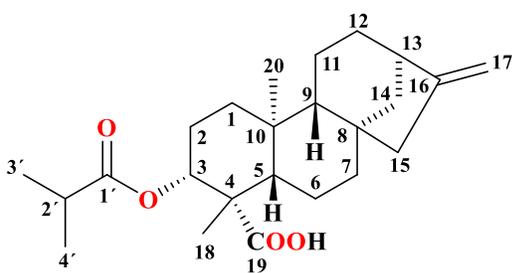
Ácido *ent*-3 α -angeloil- kaur-16-en-19-oico (18) y ácido angeloigrandiflórico o ácido *ent*-15 α -angeloil- kaur-16-en-19-oico (19)



Sólido color blanco.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) ácido *ent*-3 α -angeloil- kaur-16-en-19-oico (**18**): δ 6.08 (1H, m, H-3'), 4.81 (1H, s, H-17a), 4.75 (1H, s, H-17b), 4.62 (1H, dd, $J= 12.4, 4.8$ Hz, H-3), 2.64 (1H, sa, H-13), 2.38 (1H, m, H-2), 2.07 (2H, sa, H-15), 1.99 (3H, m, 4'), 1.89 (3H, m, H-5'), 1.30 (3H, s, H-18), 1.04 (3H, s, H-20). Ácido *ent*-15 α -angeloil-kaur-16-en-19-oico (**19**): δ 6.08 (1H, m, H-3'), 5.36 (1H, s, H-15), 5.13 (1H, s, H-17a), 5.08 (1H, s, H-17b), 2.79 (1H, sa, H-13), 1.99 (3H, m, H-4'), 1.89 (3H, m, H-5'), 1.23 (3H, s, H-18), 0.96 (3H, s, H-20).

Ácido *ent*-3 α -isobutiroiloxi-kaur-16-en-19-oico (20)



Sólido color blanco.

Punto de fusión: 217-219 °C.

$[\alpha]_{589} -63.7$, $[\alpha]_{578} -66.5$, $[\alpha]_{546} -75.4$, $[\alpha]_{436} -126.3$, $[\alpha]_{365} -195.2$ (c 0.87, CHCl_3) a 25 °C.

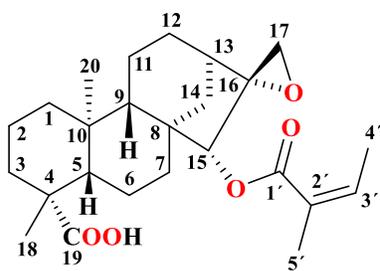
IR (CHCl_3) ν_{max} 2966, 2924, 2851, 1720, 1704, 1655 cm^{-1} .

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4.81 (1H, s, H-17a), 4.75 (1H, s, H-17b), 4.53 (1H, dd, $J= 12.2, 4.7$ Hz, H-3), 2.64 (1H, sa, H-13), 2.58 (1H, sept, $J= 7.0$ Hz, H-2'), 2.35 (1H, m, H-2a), 2.07 (2H, sa, H-15), 1.97 (1H, m, H-1a), 1.93 (1H, m, H-14a), 1.86 (1H, m, H-6a), 1.71 (1H, m, H-2b), 1.64 (1H, m, H-6b), 1.61 (1H, m, H-12a), 1.58 (2H, m, H-11), 1.53 (1H, m, H-7a), 1.50 (1H, m, H-12b), 1.47 (1H, m, H-7b), 1.27 (3H, s, H-18), 1.18 (3H, d, $J= 3.2$ Hz, H-3'), 1.17

(3H, d, $J = 3.2$ Hz, H-4'), 1.14 (1H, m, H-14b), 1.12 (1H, m, H-5), 1.06 (1H, m, H-9), 1.04 (1H, m, H-1b), 1.04 (3H, s, H-20).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 179.7 (C, C-19), 176.8 (C, C-1'), 155.4 (C, C-16), 103.3 (CH_2 , C-17), 78.5 (CH, C-3), 56.4 (CH, C-5), 55.1 (CH, C-9), 48.7 (CH_2 , C-15), 47.9 (C, C-4), 43.9 (C, C-8), 43.8 (CH, C-13), 41.0 (CH_2 , C-7), 39.5 (CH_2 , C-14), 39.4 (C, C-10), 38.7 (CH_2 , C-1), 34.3 (CH, C-2'), 33.0 (CH_2 , C-12), 24.0 (CH_2 , C-2), 23.8 (CH_3 , C-18), 21.5 (CH_2 , C-6), 19.1 (CH_3 , C-3'), 18.9 (CH_3 , C-4'), 18.5 (CH_2 , C-11), 15.4 (CH_3 , C-20).

Ácido periménico ó ácido *ent*-15 α -angeloiloxi-16 α ,17-epoxi- kauran-19-oico (14)



Cristales incoloros.

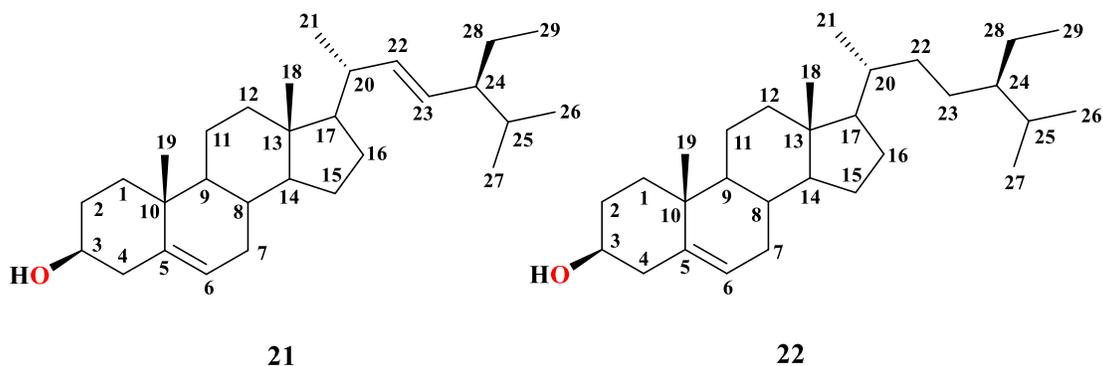
Punto de fusión: 235-237 °C.

$[\alpha]_{589} -47$, $[\alpha]_{578} -48$, $[\alpha]_{546} -55$ (c 1, CHCl_3) a 25 °C.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 6.03 (1H, m, H-3'), 4.79 (1H, sa, H-15), 3.11 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-17a), 2.76 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-17b), 2.18 (1H, da, $J = 12.9$ Hz, H-3a), 2.04 (1H, m, H-14a), 1.97 (3H, dd, $J = 7.3$, 1.5 Hz, H-4'), 1.92 (1H, m, H-1a), 1.91 (2H, m, H-6a), 1.91 (3H, m, H-5'), 1.89 (1H, m, H-2a), 1.88 (1H, m, H-13), 1.86 (1H, m, H-7a), 1.84 (1H, m, H-6b), 1.81 (1H, m, H-11a), 1.75 (1H, m, H-14b), 1.61 (1H, m, H-11b), 1.57 (2H, m, H-12), 1.47 (1H, m, H-2b), 1.31 (1H, m, H-7b), 1.25 (3H, m, H-18), 1.23 (1H, m, H-9), 1.11 (1H, m, H-5), 0.99 (3H, m, H-20), 0.85 (1H, m, H-1b).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 184.1 (C, C-19), 167.9 (C, C-1'), 137.4 (CH, C-3'), 128.0 (C, C-2'), 81.9 (CH, C-15), 66.4 (C, C-16), 56.7 (CH, C-5), 52.9 (CH, C-9), 49.7 (CH_2 , C-17), 47.8 (C, C-8), 43.6 (C, C-4), 41.2 (CH, C-13), 40.6 (CH_2 , C-1), 39.8 (C, C-10), 37.6 (CH_2 , C-3), 36.5 (CH_2 , C-14), 35.4 (CH_2 , C-7), 28.9 (CH_2 , C-12), 28.9 (CH_3 , C-18), 20.8 (CH_2 , C-6), 20.7 (CH_3 , C-5'), 19.8 (CH_2 , C-11), 19.0 (CH_2 , C-2), 15.9 (CH_3 , C-20), 15.7 (CH_3 , C-4').

Estigmasterol (21) y β -sitosterol (22)

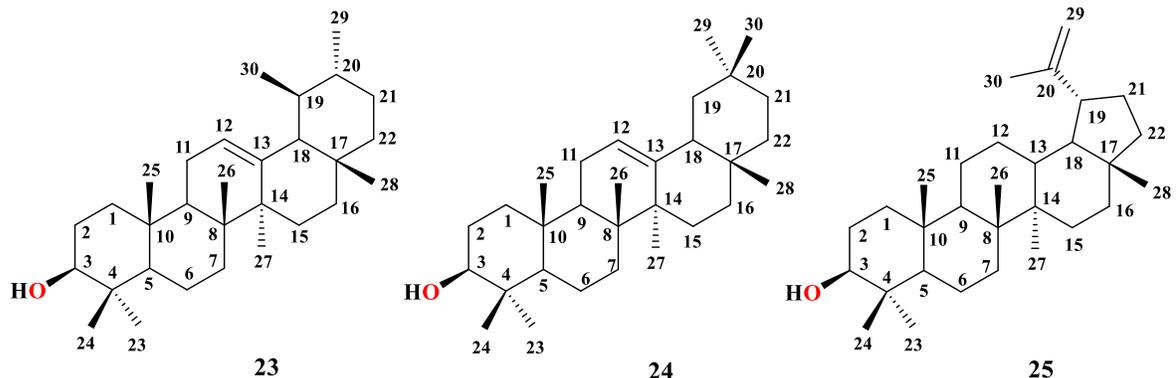


Sólido color blanco.

Estigmasterol: **EMIE** 70 eV m/z (Int. Rel.) 412(47) $[M]^+$, 271(47), 255(60), 159(60), 147(47), 145(57), 133(59), 119(37), 107(46), 105(51), 97(40), 95(45), 93(44), 91(49), 83(77), 81(74), 79(43), 69(56), 67(39), 55(100).

β -sitosterol: **EMIE** 70 eV m/z (Int. Rel.) 414(58) $[M]^+$, 213(64), 163(56), 161(63), 159(65), 147(67), 145(100), 133(62), 121(55), 119(62), 107(86), 105(92), 95(84), 93(65), 91(76), 81(89), 79(62), 69(55), 57(65), 55(73).

RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$). Estigmasterol (21): δ 5.35 (1H, da, $J= 5.1$ Hz H-6), 5.15 (1H, dd, $J= 15.1$ Hz y $J= 8.6$ Hz, H-22), 5.01 (1H, dd, $J= 15.1$ Hz, 8.7 Hz, H-23), 3.53 (1H, m, H-3), 1.02 (3H, d, $J= 7.9$ Hz, H-21), 1.01 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, d, H-26), 0.80 (3H, d, H-27), 0.70 (3H, s, H-18). β -sitosterol (22): δ 5.35 (1H, da, $J= 5.1$ Hz H-6), 3.53 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, $J= 6.5$ Hz, H-21), 0.84 (3H, d, H-27), 0.82 (3H, d, H-26), 0.68 (3H, s, H-18).

α -amirina (23), β -amirina (24) y lupeol (25)

Sólido color blanco.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3). α -amirina (**23**): δ 5.13 (1H, t, $J=5.4, 3.6$ Hz, H-12), 3.21 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, H-27), 1.00 (3H, s, H-26), 1.00 (3H, s, H-23), 0.95 (3H, s, H-25), 0.80 (3H, s, H-28), 0.79 (3H, s, H-24). β -amirina (**24**): δ 5.18 (1H, t, $J=3.5, 7$ Hz, H-12), 3.24 (1H, m, H-3), 1.13 (3H, s, H-27), 1.07 (3H, s, H-23), 1.00 (3H, s, H-26), 0.94 (3H, s, H-25), 0.87 (3H, s, H-29), 0.87 (3H, s, H-30), 0.83 (3H, s, H-28), 0.79 (3H, s, H-24). Lupeol (**25**): 4.69 (1H, m, H-29a), 4.57 (1H, m, H-29b), 3.18 (1H, m, H-3), 2.36 (1H, m, H-19), 1.68 (3H, s, H-30), 1.03 (3H, s, H-26), 0.97 (3H, s, H-23), 0.91 (3H, s, H-27), 0.83 (3H, s, H-25), 0.80 (3H, s, H-28), 0.76 (3H, s, H-24).

9. | BIBLIOGRAFÍA

1. Madari H, Jacobs RS, (2004) An analysis of citotoxic botanical formulations used in the traditional medicine of ancient Persia as Abortifacients, *Journal of Natural Products*, 67: 1204-1210.
2. Sampietro AR, Isla MI, Quiroga EN, Vattuone MA, (1997) Importancia del estudio fitoquímico en la formación del profesional farmacéutico, *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 16: 245-249.
3. Ringulet J, Viña S, (2013) Productos naturales vegetales, *Universidad Nacional de la Plata*, 1ª Ed: 8-10.
4. Ocampo RA, (1994) Domesticación de plantas medicinales en Centroamérica, *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza*.
5. Calderón GE, (1969) Químico-taxonomía vegetal, *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 1: 137-149.
6. Sepúlveda JG, Porta DH, Rocha SM, (2003) La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas, *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21: 355-363.
7. Gutiérrez RA, Estévez BA, (2009) Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el s. XXI, *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 103: 409-419.
8. Newman DJ, Cragg GM, (2016) Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014, *Journal of Natural Products*, 79: 629-661.
9. Villaseñor JL, (2003) Diversidad y distribución de las *Magnoliophyta* de México, *Interciencia*, 28: 160-167.
10. Villaseñor JL, (2016) Checklist of the native vascular plants of Mexico, *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87: 559-902.
11. Aharoni A, Jongsma MA, Bouwmeester, (2005) Volatile science? Metabolic engineering of terpenoides in plants, *TRENDS in Plant Science*, 10: 594-602.
12. Degenhardt J, Köllner TG, Gershenzon J, (2009) Monoterpene and sesquiterpene synthases the origin of terpene skeletal diversity in plants, *Phytochemistry*, 70: 1621-1637.

13. Davis EM, Croteau, (2000) Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes, *Topics in Current Chemistry*, 209: 53-95.
14. Paiva NL, (2000) An introduction to the biosynthesis of chemicals used in plant-microbe communication, *Journal of Plant Growth Regulation*, 19:131-143.
15. Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG, (2000) Natural products (secondary metabolites), *Biochemistry y Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists*. Capítulo 24.
16. Harbone JB, (1998) *Phytochemical Methods, A guide to modern techniques of plant analysis*, Third ed, Chapman & Hall.
17. García PA, de Oliveira AB, Batista R, (2007) Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides, *Molecules*, 12: 455-483.
18. Dewick PM, (2009) "Medicinal natural products: A biosynthetic approach", 3er Edición. Ed. Wiley, United Kingdom.
19. Villaseñor JL, Ortiz E, (2012) La familia Asteraceae en la flora del bajío y de regiones adyacentes, *Acta Botanica Mexicana*, 100: 259-291.
20. Katinas L, Gutiérrez DG, Grossi MA, Crisci JV, (2007) Panorama de la familia Asteracea (= compositae) en la República Argentina, *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 42: 113-129.
21. García CA, Sánchez A, Villaseñor JL, (2014) La familia Asteraceae en el parque Nacional los Mármoles, Hidalgo, México, *Acta Botanica Mexicana*, 106: 97-116.
22. Villaseñor JL, (2016) Checklist of the native vascular plants of Mexico, *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87: 559-902.
23. Tapia MJL, (2010) La familia Asteraceae, *Herbario CICY, Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. (CICY)*, 2: 82-84.
24. Becker KM, (1979) A monograph of the genus *Lasianthaea*, Bronx, New York Botanical Garden.
25. Wiemer DF, Ales DC, (1981) Lasidiol angelate: Ant repellent sesquiterpenoid from *Lasiantheae fruticosa*, *Journal of Organic Chemistry*, 46: 5449-5450.
26. Ahmed M, Jakupovic J, Castro V, (1991) Kaurene derivatives from *Lasianthea fruticosa*, revision of stereochemistry of related compounds, *Phytochemistry*, 30: 1712-1714.

27. Bohlmann F, Lonitz M, (1978) Neue sadaracopimaradien-derivate, sesquiterpene und sesquiterpenlactone aus *Zexmenia*-Arten, *Chemische Berichte*, 111: 843-852.
28. Ghisalberti E, Jefferies P, Stuart A, (1979) The absolute configuration of a sesquiterpene enone from *Stevia purpurea* and a phenol from *Lasianthaea podocephala*, *Australian Journal of Chemistry*, 32: 1627-30.
29. The Plant List, (2013) *The Plant List A working list of all plant species*, revisado de: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-28426>
30. Rzedowski J, Calderón de Rzedowski G, Carrillo-Reyes P, (2011) Flora del Bajío y de regiones adyacentes, *INECOL*, 172: 1-100.
31. Cruz-Corona R, (2015) Estudio químico preliminar de raíz de *Lasianthaea aurea*, tesis presentada en la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
32. Sueg-Geun L, (2002) α -Pinene and myrtenol: complete ^1H NMR assignment, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 40: 311-312.
33. Simonsen HT, Adsersen A, Bremner P, Heinrich M, Smitt UW, Jaroszewski JW, (2004) Antifungal constituents of *Melicope borbonica*, *Phytotherapy Research*, 18: 542-545.
34. Qiang Y, Du D-L, Chen Y-J, Gao K, (2011) *ent*-Kaurane diterpenes and further constituents from *Wedelia trilobata*, *Helvetica Chimica Acta*, 94: 817-823.
35. Vieira SH, Takahashi AJ, de Oliveira BA, Chiari E, Boaventura DAM, (2002) Novel derivatives of kaurenoic acid: Preparation and evaluation of their trypanocidal activity, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 13: 151-157.
36. Enriquez GR, Barajas J, Ortiz B, Lough JA, Reynolds FW, Yu, M, Leon I, Gnecco D, (1997) Comparison of crystal and solution structures and ^1H and ^{13}C chemical shifts for grandiflorenic acid, kaurenoico acid, and monoginoic acid, *Canadian Journal of Chemistry*, 75: 342-347.
37. Hayman RA, Weavers TR, (1990) Terpenes of foliage oils from *Halocarpus*, *Phytochemistry*, 29: 3157-3162.
38. Bohlmann F, Van LN, (1977) Neuen kaurensaure-derivate aus *Wedelia*-Arten, *Phytochemistry*, 16: 579-581.

39. Ohno N, Marbry TJ, Zabel V, Watson WH, (1979) Tetrachyrin, a new rearranged kaurenoid lactone, and diterpene acids from *Tetrachyron orizabaensis* and *Helianthus debilis*, *Phytochemistry*, 18:1687-1689.
40. Forgo P, Kövér EK, (2004) Gradient enhanced selective experiments in the ¹H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative, *Steroids*, 69: 43-50.
41. Nguyen AT, Malonne H, Duez P, Vanhaelen-Fastre, Vanhaelen M, Fontaine J, (2004) Cytotoxic constituents from *Plumbago zeylanica*, *Fitoterapia*, 75: 500-504.
42. Morita M, Shibuya M, Kushiro T, Masuda K, Ebizuka Y, (2000) Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*), *European Journal of Biochemistry*, 267: 3453-3460.
43. Takasaki M, Konoshima T, Tokuda H, Masuda K, Arai Y, Shiojima K, Ageta H, (1999) Anti-carcinogenic activity of Taraxacum plant. II, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 22: 606-610.
44. Na M, Kim YB, Osada H, Ahn SJ, (2009) Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by lupeol and lupenone isolated from *Sorbus commixta*, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24: 1056-1059.
45. Khan MA, Gray AI, Waterman PG, (1989) Kaur-16-ene diterpenes from the stem of *Lasianthea fruticosa*, *Revista Latinoamericana de Química*, 20: 75-6.