



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Estudio Químico Preliminar de *Perymenium buphthalmoides*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

Q.F.B. Ana Karen Villagómez Guzmán

ASESORES

D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado

D.Q. Gabriela Rodríguez García

Morelia, Michoacán, agosto del 2016

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Bilógicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría del D. Q. Mario Armando Gómez Hurtado y la D. Q. Gabriela Rodríguez García, con la colaboración económica de la CIC- UMSN

ÍNDICE

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Biodiversidad vegetal y productos naturales	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Terpenos, clasificación y biosíntesis	3
2.1.2. Diterpenos	6
2.2. Familia Asteraceae	7
2.3. Género <i>Perymenium</i>	8
2.3.1. Clasificación botánica	8
2.3.2. Localización geográfica	9
2.3.3. Descripción botánica.....	11
2.3.4. Composición química	12
2.3.4.1. Kauranos.....	12
2.4. Análisis químicos reportados de especies del género <i>Perymenium</i>	15
2.5. <i>Perymenium buphthalmoides</i> D.C.....	19
2.5.1. Descripción botánica.....	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. OBJETIVOS.....	23
4.1. Objetivo general	23
4.2. Objetivos específicos	23
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
6.1. Colecta e identificación de la especie vegetal.....	26
6.2. Tratamiento vegetal	26
6.3. Análisis químico del extracto hexánico de la raíz	26
6.4. Análisis químico del extracto hexánico de hojas	62

6.5. Análisis químico del extracto hexánico de tallos	71
6.6. Análisis químico del extracto hexánico de flores.....	73
7. CONCLUSIONES	89
8. PARTE EXPERIMENTAL.....	92
8.1. Material vegetal.....	92
8.2. Obtención de extractos.....	92
8.3 RMN, EM, IR, Rotación óptica y p.f.....	92
8.4. Análisis químico	93
8.5. Cromatografía en columna impregnada con solución de AgNO ₃	93
8.6. Cromatografía en capa fina impregnada con solución de AgNO ₃	93
9. BIBIOGRAFÍA.....	101

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$[\alpha]_D^{25}$	Rotación específica
δ	Desplazamiento químico en ppm
cm	Centímetro
COSY	Correlated spectroscopy
d	Señal doble
da	Señal doble ancha
dd	Señal doble de dobles
dda	Señal doble de dobles ancha
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMAPP	Difosfato de dimetilalilo
dt	Señal doble de triples
dq	Señal doble de cuádruples
EMIE	Espectrometría de masa de impacto electrónico
FPP	Difosfato de farnesilo
g	Gramos
GFPP	Difosfato de geranilfarnesilo
GPP	Difosfato de geranilo
GGPP	Difosfato de geranilgeranilo
h	Horas
HETCOR	Heteronuclear correlation
Hz	Hertz

IPP	Difosfato de isopentilo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramo
km	Kilómetro
m	Señal múltiple
MEP	Metil eritritol fosfato
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MVA	Ácido mevalónico
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
ppm	Partes por millón
qd	Señal cuádruple de dobles
qq	Señal cuádruple de cuádruples
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN de ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN de ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
rpm	Revoluciones por minuto
s	Señal simple
sa	Señal simple ancha
ta	Señal triple ancha
td	Señal triple de dobles
TMS	Tetrametilsilano

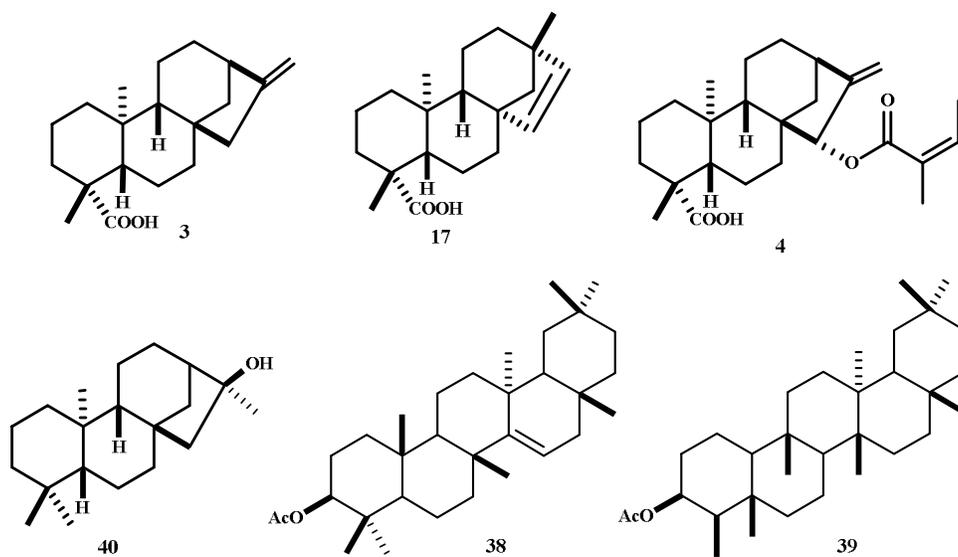
RESUMEN

Dentro de la variada flora que se encuentra en nuestro País, se localiza un gran número de especímenes de la familia Asteraceae, aproximadamente reúne 3,080 especies distribuidas en 373 géneros. *Perymenium* es un taxón clasificado dentro de la familia Asteraceae, endémico de México, que ha sido poco explorado químicamente.

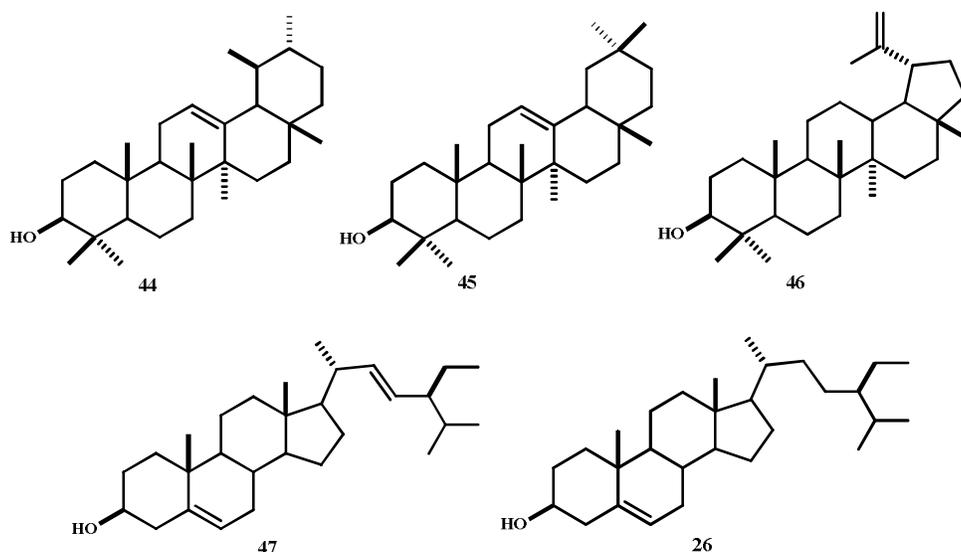
Perymenium bupthalmoides es una especie que cuenta con un análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de raíz en el que se detectó la presencia de diterpenos ampliamente conocidos por sus propiedades biológicas por lo que resulta importante continuar el estudio fitoquímico preliminar para profundizar en su composición química.

En esta investigación se describen los metabolitos secundarios mayoritarios del extracto hexánico de raíz y partes aéreas.

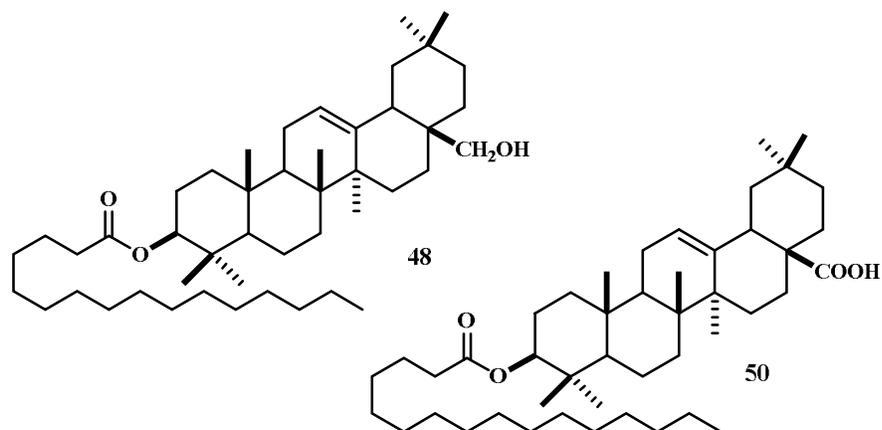
Durante el análisis fitoquímico del extracto hexánico de raíz se identificó al ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**3**); ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (**17**), ácido *ent*-kaur-15 α -angeloiloxi-16-en-19-oico (**4**), 16 β -hidroxikaurano (**40**), y los triterpenos acetato de taraxerol (**38**) y acetato de β -friedelinol (**39**).



La investigación química del extracto hexánico de hojas condujo al aislamiento del ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (**17**), la mezcla de los triterpenos α -amirina (**44**) y β -amirina (**45**), lupeol (**46**), así como la mezcla de fitoesteroles estigmasterol (**47**) y β -sitosterol (**26**).



Del análisis químico efectuado al extracto hexánico de tallo se identificaron al ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**3**), ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (**17**), ácido *ent*-kaur-15 α -angeloiloxi-16-en-19-oico (**4**) y la mezcla de fitosteroles **47** y **26**. Con el estudio del extracto hexánico de flores se identificaron los triterpenos palmitato de eritrodíol (**48**) y palmitato del ácido oleanólico (**50**).



Palabras clave: Asteracea, *Perymenium bupthalmoides*, Diterpenos, Triterpenos.

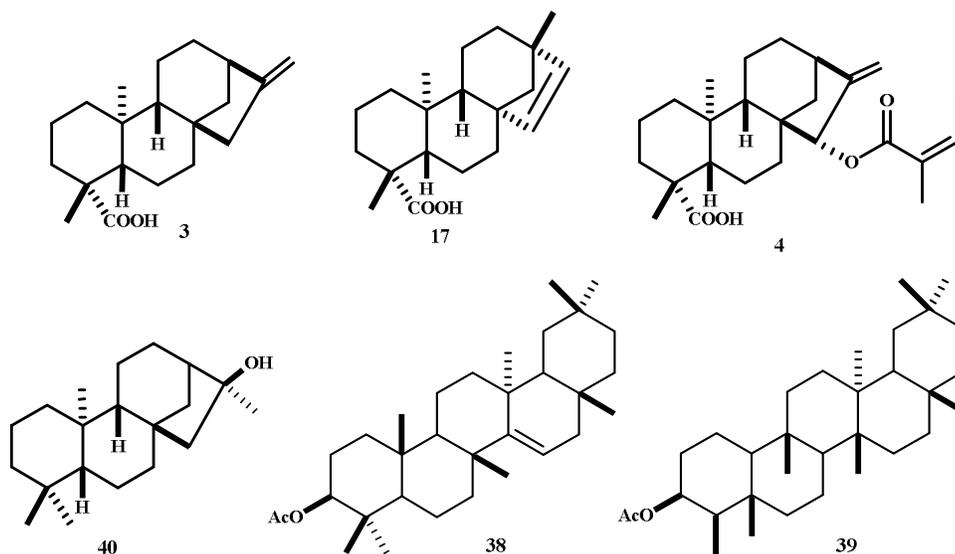
ABSTRACT

Within the varied flora from our country, a large number of specimens of the family Asteraceae is located, approximately 3,080 species distributed in 373 genera are found in this family, including *Perymenium*, endemic to Mexico, and it has been little explored from chemical or biological perspective.

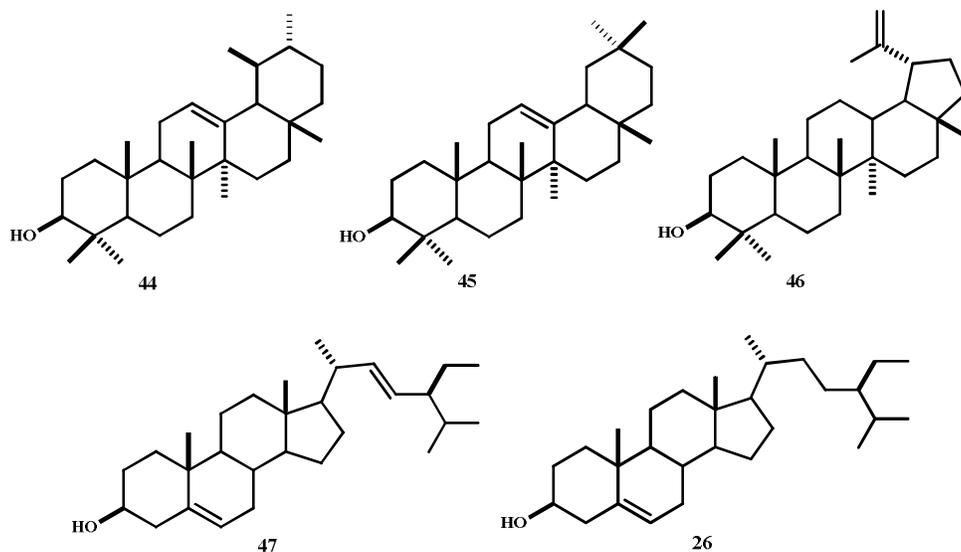
Perymenium bupthalmoides is a species that has a preliminary phytochemical study. In the hexanic extract from the roots the presence of diterpenes widely known for their biological properties were detected, due to this it is important to continue with the preliminary phytochemical study to increase the knowledge in the chemical composition of this plant.

In this research the main secondary metabolites of the hexanic extract from the roots and aerial parts from *P. bupthalmiodes* are described.

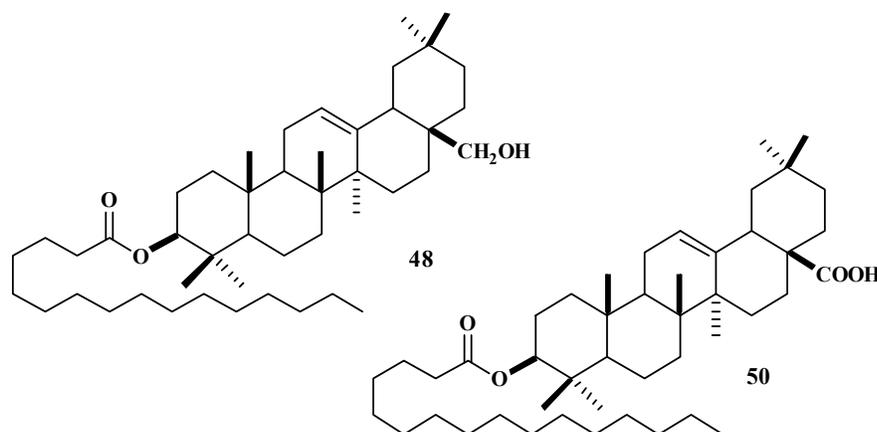
In the phytochemical analysis of the hexanic extract from the roots of *P. bupthalmoides* the *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (**3**), *ent*-beyer-15-en-19-oic acid (**17**), *ent*-kaur-15 α -angeloyloxy-16-en-19-oic acid (**4**), 16 β -hydroxykaurane (**40**), the triterpenes taraxerol acetate (**38**) and 3 β -friedelinol acetate (**39**) were obtained.



The chemical research of the hexanic extract from the leaves afforded the isolation of *ent*-beyer-15-en-19-oic acid (**17**), the mixture of the triterpenes α -amyrin (**44**) and β -amyrin (**45**), lupeol (**46**), as well as the mixture of the phytosterols stigmasterol (**47**) and the β -sitosterol (**26**).



The chemical study of the hexanic extract from the stems of *P. bupthalmoides* yielded the isolation of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (**3**); *ent*-beyer-15-en-19-oic acid (**17**), *ent*-kaur-15 α -angeloyloxy-16-en-19-oic acid (**4**), and the mixture of phytosterols **47** and **26**. With the chemical study of the hexanic extract of the flowers the triterpenes erythrodiol palmitate (**48**) and oleanolic acid palmitate (**50**) were obtained.



Key words: Asteraceae, *Perymenium bupthalmoides*, Diterpenes, Triterpenes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biodiversidad vegetal y productos naturales

La biodiversidad o diversidad biológica es la variedad de la vida. Este reciente concepto incluye varios niveles de la organización biológica, abarca la diversidad de especies de plantas, animales, hongos y microorganismos que viven en un espacio determinado a su variabilidad genética, a los ecosistemas de los cuales forman parte estas especies y a los paisajes o regiones en donde se ubican los ecosistemas (CONABIO).

Iberoamérica es conocido mundialmente por su biodiversidad, particularmente México es un país con una riqueza natural extraordinaria; es considerado un País “mega diverso”, ya que forma parte del selecto grupo de naciones poseedoras de la mayor cantidad y diversidad de animales y plantas, casi el 70% de la diversidad mundial de especies (Martínez *et al.*, 2014), ocupa el cuarto lugar en este rubro, superado tan solo por Brasil, Colombia e Indonesia (SEMARNAT, 2011), es el uno de los Países con la mayor biodiversidad vegetal con aproximadamente 23, 424 plantas vasculares (Llorente-Bousquets & Ocegueda, 2008).

La relación biología-botánica, con sus métodos de investigación y sistematización hacen posible junto con la química, crear la fitoquímica, disciplina que proporciona de manera integral el conocimiento de los distintos productos químicos naturales de las plantas (Domínguez, 1982). Su nombre proviene del vocablo griego Phyton= planta o vegetal, que literalmente significa: “Química de las plantas”.

Tradicionalmente, la fitoquímica se ha dedicado al estudio de los componentes químicos de las plantas mediante la extracción del material que ha sido recolectado, secado y molido de acuerdo a procedimientos establecidos. La extracción regularmente ha utilizado disolventes orgánicos como el hexano, éter etílico, cloruro de metileno, cloroformo, acetato de etilo y metanol, entre otros (Ocampo, 1994).

La finalidad de un estudio químico preliminar es determinar la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios (terpenos, polifenoles y/o alcaloides) en una especie vegetal, y dado que cada uno de estos grupos de compuestos está relacionado con actividades biológicas específicas, partiendo de los resultados obtenidos en el estudio fitoquímico orientar investigaciones posteriores para determinar posibles aplicaciones.

Las investigaciones químicas que implican el conocimiento de los productos sintetizados a partir del metabolismo secundario de las plantas, son muy importantes para numerosas disciplinas como la fisiología, la bioquímica, la farmacognosia, la biotecnología de las plantas, así como para la quimiotaxonomía.

La contribución de la quimiotaxonomía proporciona evidencia para la clasificación de las plantas dado que los constituyentes fitoquímicos son considerados como marcadores químicos, los cuales, permiten ubicar o reubicar distintos taxones críticos, en los casos donde estas relaciones son poco claras, los metabolitos secundarios son sin duda una prueba de considerable valor (Montiel, 1991). Sin embargo, el número de compuestos conocidos para cada planta es aún bastante limitado, y por otra parte, aún no se han estudiado todas las plantas.

Históricamente el descubrimiento de fármacos ha estado asociado a dos disciplinas: la Química de Productos Naturales y la Síntesis Orgánica (Gutiérrez & Estévez, 2009). Un estudio reciente de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos estima que se han caracterizado químicamente menos del 1% de todas las especies vivas por lo tanto la química de los productos naturales permanece hasta ahora como un área activa de investigación y se espera que se descubran innumerables sustancias con propiedades potencialmente útiles (McMurry, 2012), por otro lado, el hallazgo de nuevas sustancias a partir de las plantas con actividad terapéutica constituye una meta para la humanidad debido a contiene un enorme potencial de moléculas bioactivas por descubrir.

Perymenium es taxón endémico de México clasificado dentro de la familia Asteraceae el cual ha sido poco analizado químicamente, no obstante, las especies que poseen análisis fitoquímico describen la presencia de metabolitos secundarios de tipo terpeno, compuestos ampliamente conocidos por sus propiedades biológicas, así como por su uso dentro de la rama industrial.

Estos datos nos orientaron a continuar con el estudio de este género para profundizar en la composición química cuya finalidad es encontrar moléculas que puedan ser útiles química o biológicamente.

En este trabajo se describen los resultados obtenidos del estudio fitoquímico preliminar de la especie *Perymenium buphthalmoides*, la cual a la fecha cuenta con un reporte de análisis químico del extracto hexánico de raíz, sin embargo, no cuenta con estudio de sus partes aéreas y a la fecha no existe reporte de estudios biológicos para dicha especie.

2. ANTECEDENTES

2.1. Terpenos, clasificación y biosíntesis

El término "terpeno" se atribuye a Kekulé quien lo acuñó para describir hidrocarburos $C_{10}H_{18}$ que se obtienen del aceite de la trementina (en alemán, "Terpentin"). Este término, a lo largo de los años ha adquirido un significado genérico y se utiliza para designar a los metabolitos secundarios basados en unidades de isopreno (Rowe, 1989).

Los terpenos forman una familia grande y estructuralmente diversa de productos naturales siendo estos el mayor grupo de compuestos (Eckart, 2008), con al menos 40,000 estructuras lo que los hace la clase más impresionante de la evolución de químicos de las plantas. El éxito en la evolución de esta clase de compuestos se basa en parte en la simplicidad de la construcción de moléculas de diferente tamaño (Toll, 2015). Algunos son moléculas de cadena abierta y otros contienen anillos, algunos son hidrocarburos y otros contienen heteroátomos.

Independiente de sus diferencias estructurales evidentes todos los terpenoides están relacionados acorde a un formalismo llamado *regla del isopreno* establecida por Wallach y posteriormente ampliada por Ruzicka, según la cual el principio estructural de todas estas sustancias es la asociación o la unión cabeza con cola de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (Ballesteros *et al.*, 2013).

Se clasifican en base a las unidades de isopreno que contiene su estructura (Tabla 2.1.1). Así mismo dentro de cada clase, los miembros suelen agruparse de acuerdo con el número de anillos presentes en las moléculas (Sarker *et al.*, 2007).

Tabla 2.1.1. Clasificación de terpenos en base a las unidades de isopreno.

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

Para la biosíntesis de isoprenoides (terpenoides) los bloques de construcción, pueden ser sintetizados a partir de metabolitos primarios por dos rutas diferentes la ruta del ácido mevalónico (MVA) y la ruta del metil eritritol fosfato (MEP).

En la ruta del ácido mevalónico, tres moléculas de acetil Cola se condensan para formar el ácido mevalónico, este intermediario clave de 6 átomos de carbono es fosforilado, descarboxilado y deshidratado para formar el IPP.

Adicionalmente, se ha descubierto que el IPP también puede ser originado como intermediario de la glicólisis o el ciclo fotosintético de reducción del carbono (Taiz *et al.*, 2006). Sin embargo, se piensa que la ruta del mevalonato es probablemente la más ampliamente utilizada en la naturaleza.

El difosfato de isopentilo (IPP) y su isómero el difosfato de dimetilalilo (DMAPP) son los precursores activos de la biosíntesis de terpenos que se combinan para formar moléculas mayores. Una condensación de "cabeza a cola" de ambos isómeros conduce al precursor común de todos los monoterpenoides (C_{10}), difosfato de geranilo (GPP). La condensación de difosfato de geranilo y otro difosfato isopentetilo genera difosfato de farnesilo (FPP) C_{15} , el precursor de todos sesquiterpenoides. El difosfato de farnesilo a su vez puede condensarse "cabeza a cola" con el IPP para formar el difosfato de geranilgeranilo (GGPP) C_{20} . En contraste con todas estas condensaciones "cabeza a cola", la condensación de "cola a cola" de dos moléculas de difosfato de farnesilo es responsable de la formación de escualeno (C_{30}), el precursor común de todos los triterpenos. La reacción análoga de dos moléculas de difosfato de geranilgeranilo origina la molécula de fitoeno (C_{40}), precursor de los tetraterpenoides, Figura 2.1.1 (Eckart, 2008).

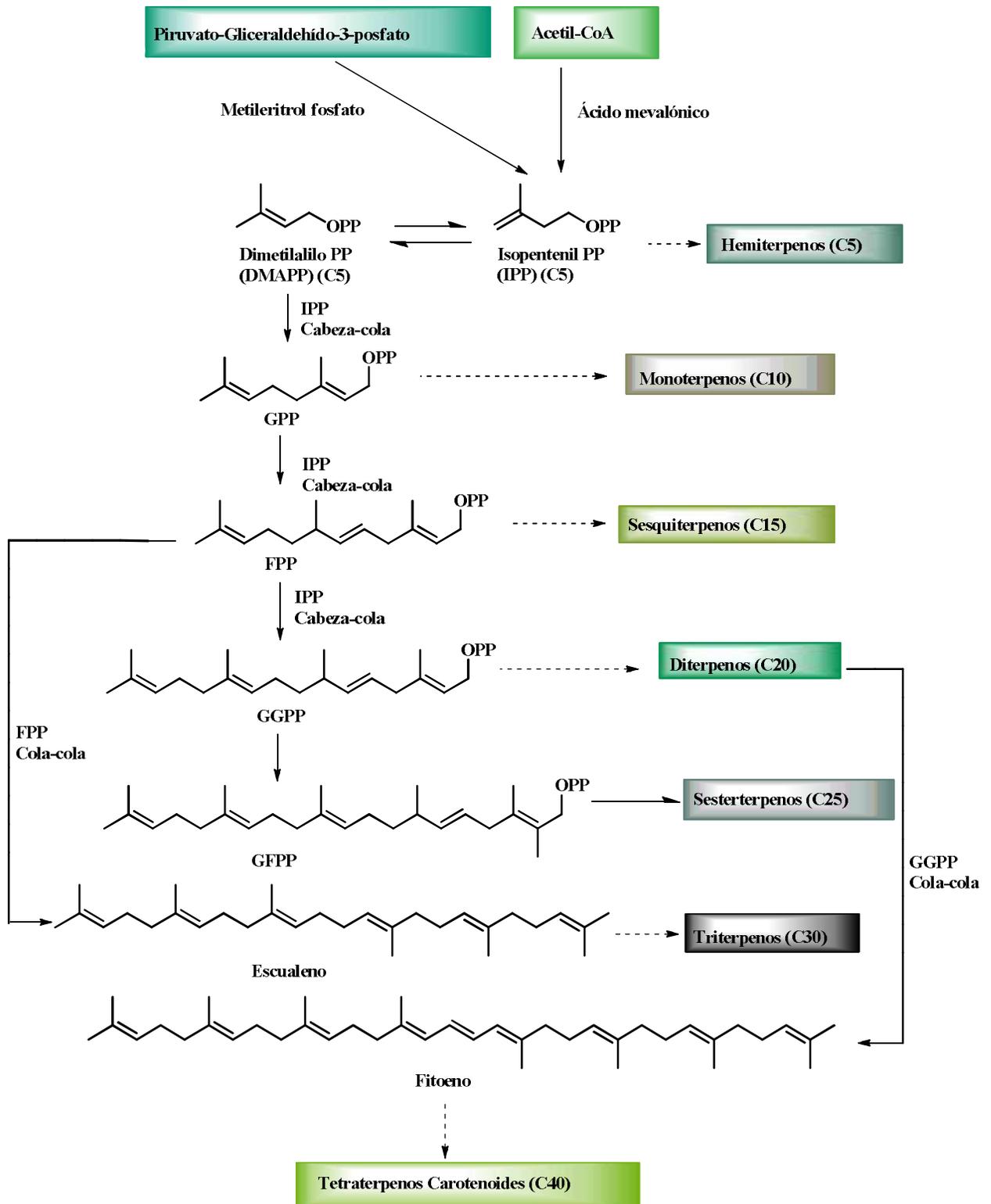


Figura 2.1.1. Biosíntesis de terpenos. Modificado de Dewick 2009

2.1.2. Diterpenos

Los diterpenos son metabolitos secundarios cuyo esqueleto fundamental está constituido por cuatro unidades isoprenicas en unión cabeza a cola (C_{20}). Constituyen aproximadamente la cuarta parte de todos los terpenoides vegetales, en la actualidad se estima que son más de 12,000 estructuras conocidas.

Los diterpenos surgen del difosfato *2E,6E,10E,14E*-geranilgeranilo (GGPP), que se forma por adición de una molécula más IPP a FPP de la misma manera como se describe para los terpenoides inferiores.

De acuerdo al número y a los patrones de ciclización que aparecen en su esqueleto se clasifican en: acíclicos (fitano), bicíclicos (labdanos, clerodanos), tricíclicos (pimaranos, abietanos, cassanos, rosanos, vouacapanos, podocarpanos), tetracíclicos (trachilobanos, kauranos, afidicolanos, estemodanos, estemaranos, beyeranos, atisanos, gibberellanos), diterpenos macrocíclicos (taxanos, cembranos, dafnanos, tiglianos, ingenanos) (García *et al.*, 2007).

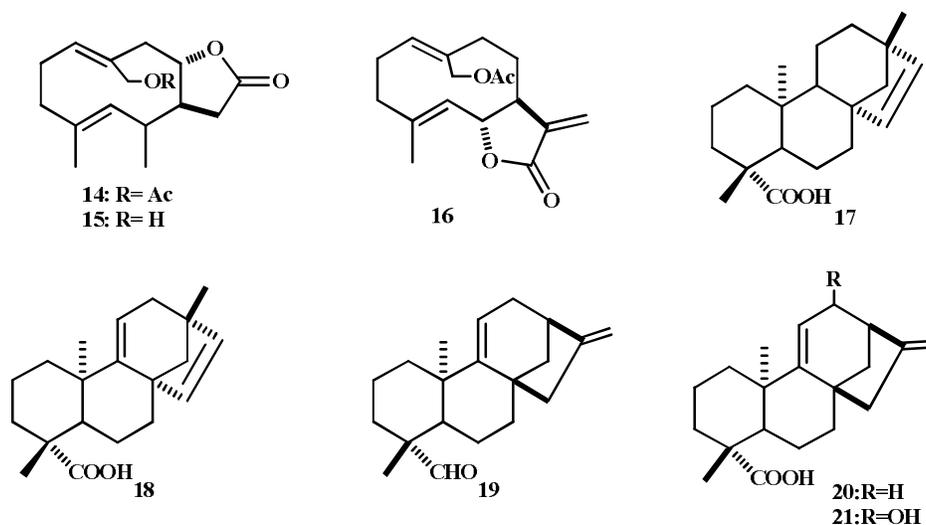


Figura 2.1.2.1. Esqueletos de diterpenos.

2.1.3. Triterpenos

Los triterpenos (seis unidades isoprénicas) C_{30} , se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza tanto en el reino vegetal como animal (Romo de Vivar, 2006).

Desde una perspectiva biológica, se asume que los esqueletos de oleanano, ursano y lupano son las más importantes dentro de los triterpenos, Figura 2.1.3.1. Dichas estructuras policíclicas pueden encontrarse, ya sea en su estado libre, como ésteres o en forma de glicósidos. Como consecuencia, presentan una gran diversidad estructural, hasta ahora, se conocen alrededor de 100 diferentes tipos de esqueletos en la naturaleza. Los efectos biológicos correspondientes a este tipo de compuestos son muy diversos y pueden ser resumidos como: anti-tumorales, anti-inflamatorios, anti-VIH, anti-microbianos, cardioprotectores, analgésicos, anti-micóticos, entre otros (Cano-Flores, 2013).

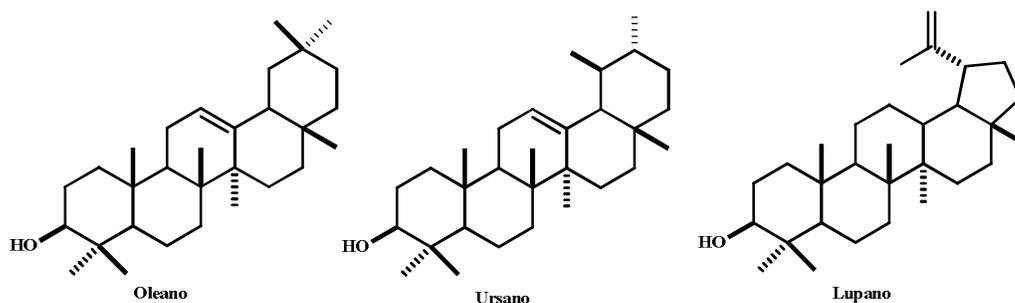


Figura 2.1.3.1. Esqueletos de oleanano, ursano y lupano

2.2. Familia Asteraceae

Las asteráceas, también conocidas como compuestas, constituyen la familia más grande de plantas con flor sobre la tierra (Villarreal *et al.*, 1996). Se calcula que está formada por aproximadamente 1,700 géneros y unas 24,000-30,000 especies distribuidas por todo el mundo, excepto en la Antártida, incluyen desde pequeñas hierbas de 1 cm hasta árboles de más de 30 m de altura, ampliamente caracterizadas por la morfología de su

inflorescencia racimosa en capitulo donde se disponen las flores de manera sésil (Katinas *et al.*, 2007).

México es uno de los principales centros de diversidad de la familia Asteraceae, una familia de angiospermas con distribución cosmopolita (Villaseñor, 1993). Las estimaciones actuales indican que en México incluye unos 373 géneros y 3,080 especies nativas, más 29 géneros introducidos (Redonda *et al.*, 2011); estimándose que esta familia representa entre el 12-15% de la flora vascular mexicana, siendo los Estados de Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Jalisco y Michoacán los que cuentan con el 46% del total de la población de especies de esta familia y aproximadamente el 72% de esta población es de especies endémicas (Villaseñor, 2003). Debido a su diversidad, la familia Asteraceae es dividida por tribus siendo la Heliantheae una de las más numerosas con cerca de 2,500 especies agrupadas en 189 géneros (Novora *et al.*, 2010). La distribución de Heliantheae se concentra en el continente americano y la mayoría de sus géneros se distribuyen en México y Estados Unidos de América, situándose en México su principal centro de diversidad e igualmente es la que cuenta con mayor número de especies en el País (Villaseñor *et al.*, 2011).

2.3. Género *Perymenium*

2.3.1. Clasificación botánica

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

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

2.3.2. Localización geográfica

El género *Perymenium* es clasificado dentro de la tribu Heliantheae; es un taxón que incluye mayormente especies endémicas de México, su distribución geográfica es exclusivamente americana, extendiéndose desde el noroeste de México hasta Perú (Figura 2.3.2.1) (Ciccío *et al.*, 2012). Al año 2011, se reconocieron 50 especies para este género, concentrando en nuestro País su principal centro de diversificación con 44 ejemplares (Figura 2.3.2.2) y (Tabla 2.3.2.1.).



Figura 2.3.2.1. Distribución del género *Perymenium* en el mundo.



Figura 2.3.2.2. Distribución del género *Perymenium* en México.

Tabla 2.3.2.1. Especies aceptadas dentro del género *Perymenium* (Pyramus, 1836, Robinson *et al.*, 1899, Rzedowski *et al.*, 2010, ^aRzedowski *et al.*, 2011, ^bRzedowski *et al.*, 2011).

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

Se trata de un taxón aparentemente monofilético, pero de taxonomía difícil y controvertida, pues no existe buen acuerdo en cuanto a la circunscripción de varias de sus especies y entidades infraespecíficas, y las claves existentes a menudo son escasas para el reconocimiento de sus ejemplares (Rzedowski *et al.*, 2010).

Sin embargo, es pertinente mencionar que el último trabajo de revisión del género *Perymenium* en México y Centroamérica fue realizado por J. J. Fay en 1978, en la cual reconoció la existencia de 31 especies, de las cuales 5 resultaron ser nuevas, y hasta el año 2011 se dieron a conocer 13 novedades adicionales y siguen apareciendo otras más de distribución geográfica muy limitada (^aRzedowski *et al.*, 2011).

2.3.3. Descripción botánica

Dentro del género *Perymenium* se concentran plantas herbáceas perennes o con más frecuencia arbustivas a veces arborescentes, algunas trepadoras; hojas opuestas, a menudo rasposas al tacto en el haz, por lo general trinervadas o triplinervadas; inflorescencias cimosas por lo común umbeliformes, corimbiformes o paniculiformes, en ocasiones las cabezuelas solitarias; estas heterógamas y radiadas; brácteas involucrables dispuestas en 2 a 4 series, graduadas o casi iguales, receptáculo plano y convexo, provisto de páleas conduplicadas que rodean a los aquenios de las flores del disco; flores liguladas 8-13, por lo común fértiles amarillas, flores del disco hermafroditas y fértiles, sus corolas pentámeras, tubulosas amarillas anteras auriculadas en la base y provistas de vistosos apéndices terminales de color pálido, ramas de estilo aplanadas, puntiagudas y puberulas hacia el ápice; aquenios de las flores periféricas triquetos, los del disco comprimidos, tetragonos o biconvexos, en algunas especies todos provistos de alas laterales, vilano de 8 a 30 aristas delgadas, frágiles y caedizas de largo muy desigual (Figura 2.3.3.1) (^bRzedowski *et al.*, 2011).



Perymenium grande



Perymenium berlandieri



Perymenium mendezii

Figura 2.3.3.1. Especies del género *Perymenium*.

2.3.4. Composición química

La química del género *Perymenium* está constituida principalmente por terpenoides de tipo monoterpenos (componentes de los aceites esenciales), lactonas sesquiterpénicas, así como cumarinas, flavonoides y triterpenos. Un grupo importante identificado lo constituyen los diterpenos con esqueleto de kaurano y beyerano.

2.3.4.1. Kauranos

Los kauranos consisten de una clase de diterpenos tetracíclicos con estereoquímica 5β , 10α , Figura 2.3.4.1.1 (Ballesteros *et al.*, 2013).

Su nombre proviene del popular “kauri” nombre con el que se designa coloquialmente a la especie vegetal de Nueva Zelanda *Agathis australis*. En 1928-1930 Hosking aisló de esta planta un diterpeno cristalino de fórmula molecular $C_{20}H_{32}$ al que denominó *ent*-kaureno.

Los derivados del *ent*-kaureno juegan un rol muy importante de protección de algunas plantas frente a bajas temperaturas, actúan como reguladores de la geminación y el crecimiento vegetal, así como en la defensa frente a depredadores (Peña, 2008). Actualmente, son compuestos de gran interés científico debido a las numerosas propiedades biológicas que se les ha reportado en la última década, es por ello que son considerados productos naturales relevantes.

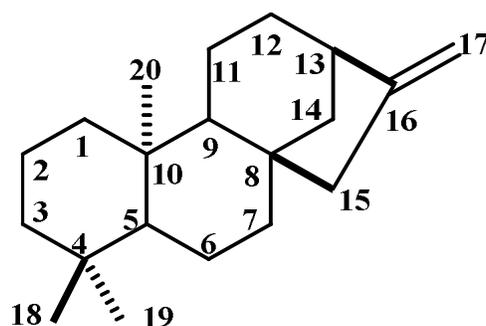


Figura 2.3.4.1.1. Estructura y numeración de *ent*-kaureno

2.3.4.2. Biosíntesis

La biosíntesis de kauranos y beyeranos inicia con la formación del carbocatión del GGPP por protonación del doble enlace a la cabeza de la cadena, que conduce a una secuencia de ciclizaciones, terminada por la pérdida de un protón de un grupo metilo, obteniéndose (-)-copalilo PP (Figura 2.3.4.2.1.).

La estereoquímica en este producto está controlada por la conformación del sustrato en la superficie de la enzima, no obstante, un plegado alternativo puede dar lugar a (+)-copalil PP el producto con configuraciones opuestas en los centros estereogénicos.

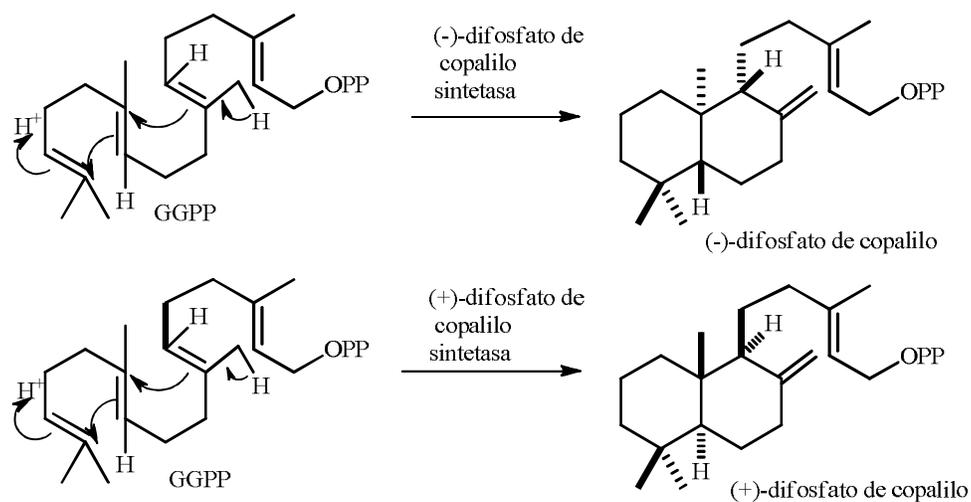


Figura 2.3.4.2.1. Biosíntesis del (-)-difosfato de copalilo y (+)-difosfato de copalilo.

A partir de (-)-difosfato de copalilo, se inicia una secuencia de ciclizaciones y un reordenamiento, todo catalizado por una única enzima, la kaureno sintasa, que conduce al *ent*-kaureno. Esto implica la pérdida del difosfato que permite la formación del carbocatión alílico, el cual da origen una serie de ciclizaciones para generar al tercer anillo y más tarde al cuarto anillo. Posteriormente sigue una migración Wagner-Meerwein. La fuerza impulsora es la transformación de un carbocatión secundario en un terciario. La pérdida de un protón del grupo metilo genera el doble enlace exocíclico del *ent*-kaureno (Figura 2.3.4.2.2).

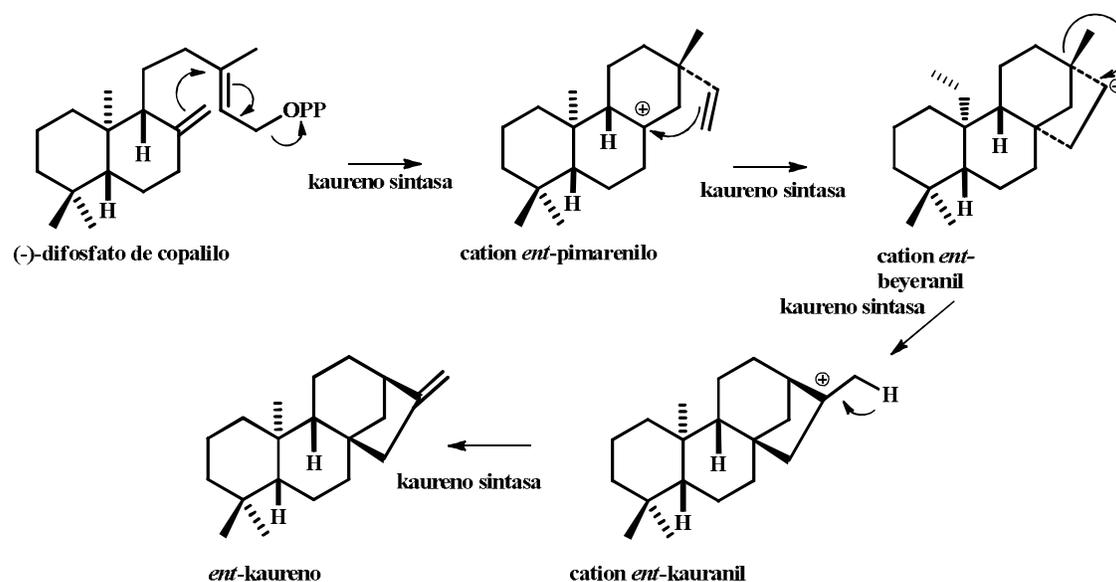


Figura 2.3.4.2.2. Biosíntesis de *ent*-kaurenos y *ent*-beyeranos

Cabe resaltar que el prefijo *ent*, empleado en la nomenclatura tanto de los kaurenos como de los beyeranos, indica que estos esqueletos guardan una relación enantiomérica con el precursor de la “serie normal” (+)-difosfato de copalilo; y se sabe que la estereoquímica de este precursor resulta ser la más encontrada en la naturaleza, los *ent*-kaurenos y *ent*-beyeranos son considerados enantiómeros de la “serie normal”, Figura 2.3.4.2.3 (Dewick, 2009).

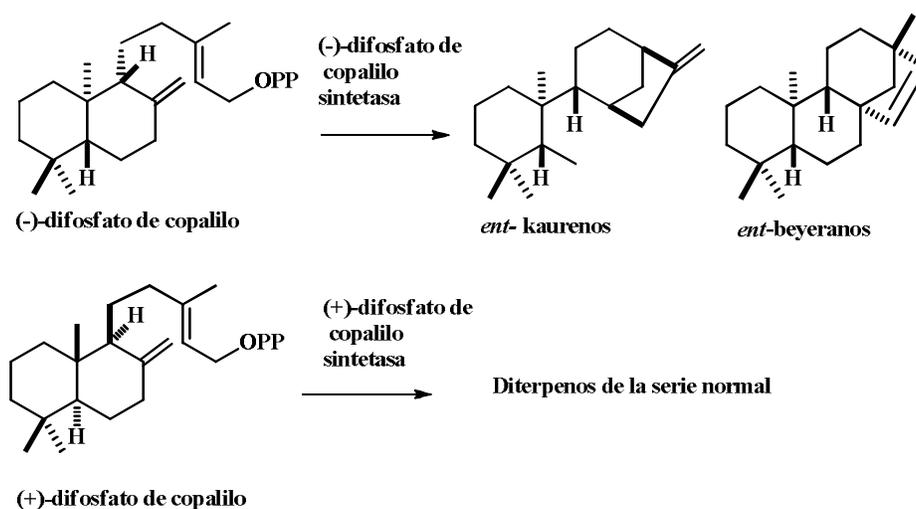


Figura 2.3.4.2.3. Estereoquímica de los *ent*-kaurenos y *ent*-beyeranos

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

Los estudios fitoquímicos del género *Perymenium* iniciaron en 1976 con el estudio de *Perymenium ecuadoricum*. En este trabajo Bohlmann y colaboradores, describen diterpenos con esqueleto de kaureno con distintos grados de oxidación en el C-19: aldehído **1**, alcohol **2**, ácido **3** y **4** y éster **5**, adicionalmente reportaron la presencia de un grupo angelato en el C-15 del ácido kaurenoico (**4**) y de su respectivo éster metílico (**5**), así como kauranos con función éster y epóxido en el carbono C-15 y C-16, respectivamente **6** y **7** y el 16 α -hidroxikauranol (**8**) Figura 2.4.1.

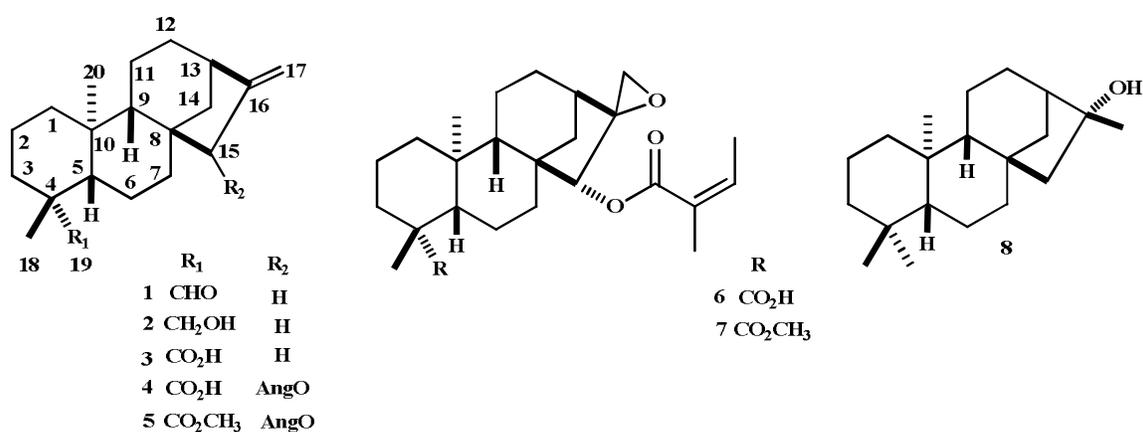


Figura 2.4.1. Diterpenos con esqueleto de kaurano.

Del extracto de cloroformo de las partes aéreas de *Perymenium mendezii* reportaron dos nuevas γ -lactonas sesquiterpénicas (**9** y **10**) con un doble enlace C-11/C-13 exocíclico, Figura 2.4.2 (Maldonado *et al.*, 1983).

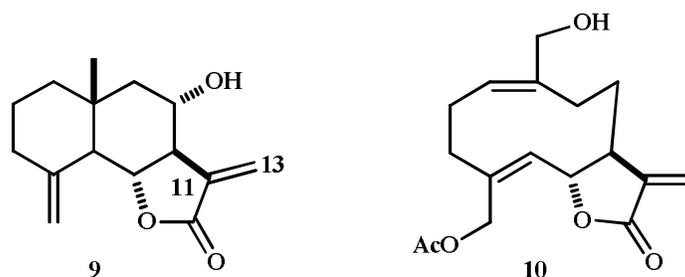


Figura 2.4.2. Lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Perymenium mendezii*.

El *ent*-kauranol (2), el ácido *ent*-kaurenoico (3) y sus derivados 15 α -angeloiloxi 4 y 15 α -isobutiriloxi 11 fueron reportados de *Perymenium featherstonei*, así como la 4 α -dihidroencelina (12) y el germacreno D (13) Figura 2.4.3 (Bohlmann *et al.*, 1983).

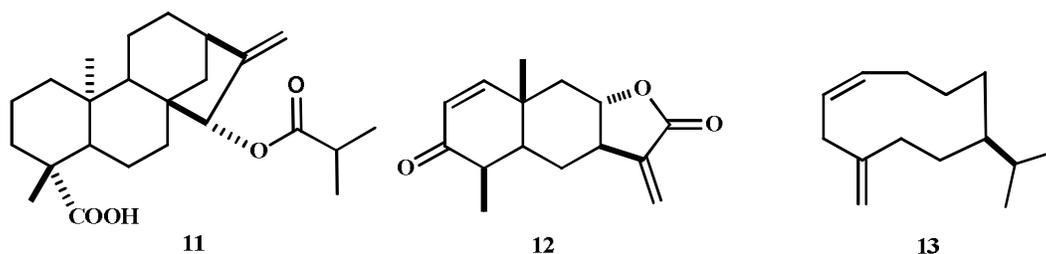


Figura 2.4.3. Kaurenos y sesquiterpenos aislados de *Perymenium featherstonei*.

De *Perymenium klattianum* aislaron el *ent*-kaurenal (1), ácido *ent*-kaurenoico (3) tres lactonas sesquiterpénicas (14-16), el ácido *ent*-beyerenoico (17) así como cuatro derivados (18-21) Figura 2.4.4 (Bohlmann *et al.*, 1984).

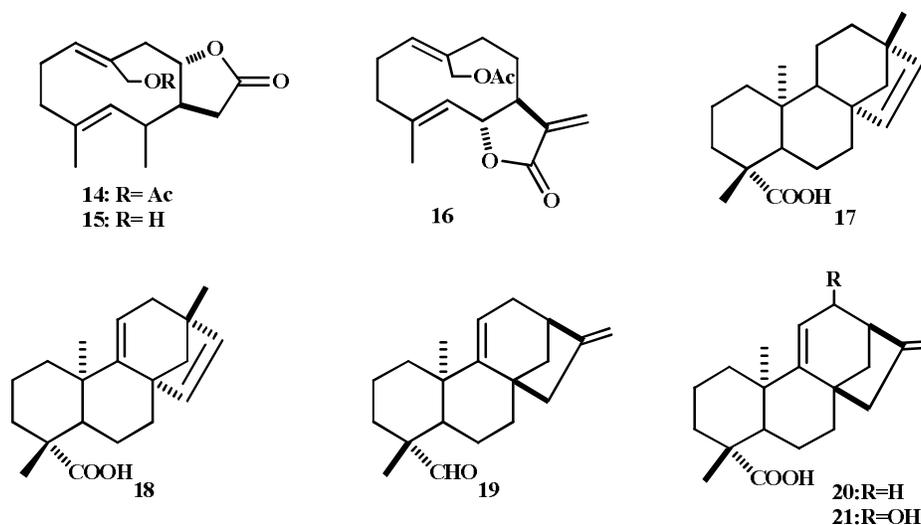


Figura 2.4.4. Diterpenos y germacranólidas aislados de *Perymenium klattianum*.

De la investigación química de las partes aéreas de *Perymenium discolor*, aislaron una nueva melanpólida (22) con presencia de un grupo carboxilo en C-10, así como el ácido *ent*-kaurenoico (3), el ácido *ent*-16 α -hidroxikauran-19-oico (23), el *ent*-16 α -

hidroxikauran-19-al (**24**), Figura 2.4.5. Mientras que de *Perymenium mendezii* solo reportaron la germacranólida **14** (Maldonado *et al.*, 1986).

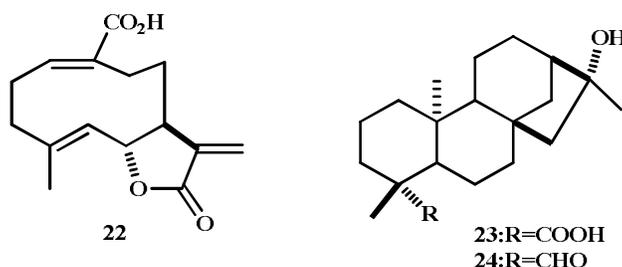


Figura 2.4.5. Terpenoides aislados de *Perymenium discolor*.

Dos nuevas lactonas acetiladas (**25** y **26**) fueron reportadas de *Perymenium berlandieri*, Figura 2.4.6 (Maldonado *et al.*, 1994).

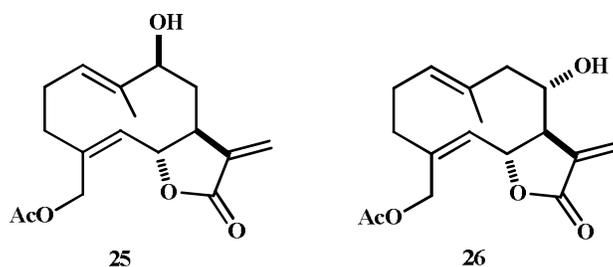


Figura 2.4.6. Lactonas aisladas de *Perymenium berlandieri*.

De *Perymenium hintonii* fueron aisladas dos nuevas lactonas diterpénicas isoméricas denominadas tuxpanólida (**27**) e isotuxpanólida (**28**), Figura 2.4.7 (Maldonado *et al.*, 1997).

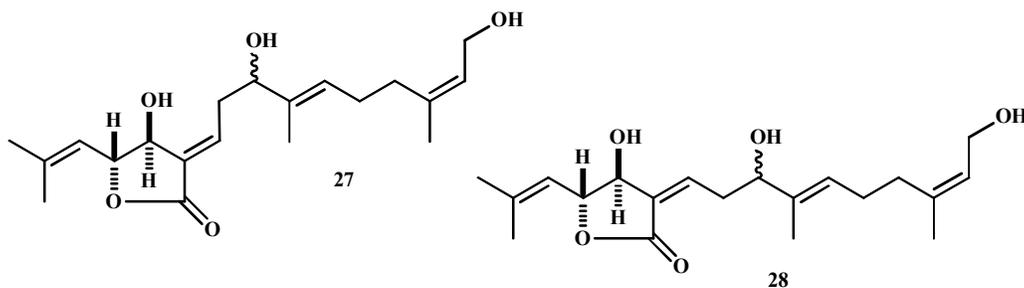


Figura 2.4.7. Diterpenos acíclicos aislados de *Perymenium hintonii*.

Del extracto de *t*-butilmetiléter y metanol de *Perymenium grande* reportaron ocho lactonas sesquiterpénicas, tres de ellas de estructura novedosa (**29-31**) las cinco restantes conocidas (**32-36**) Figura 2.3.8 (Murillo *et al.*, 2006).

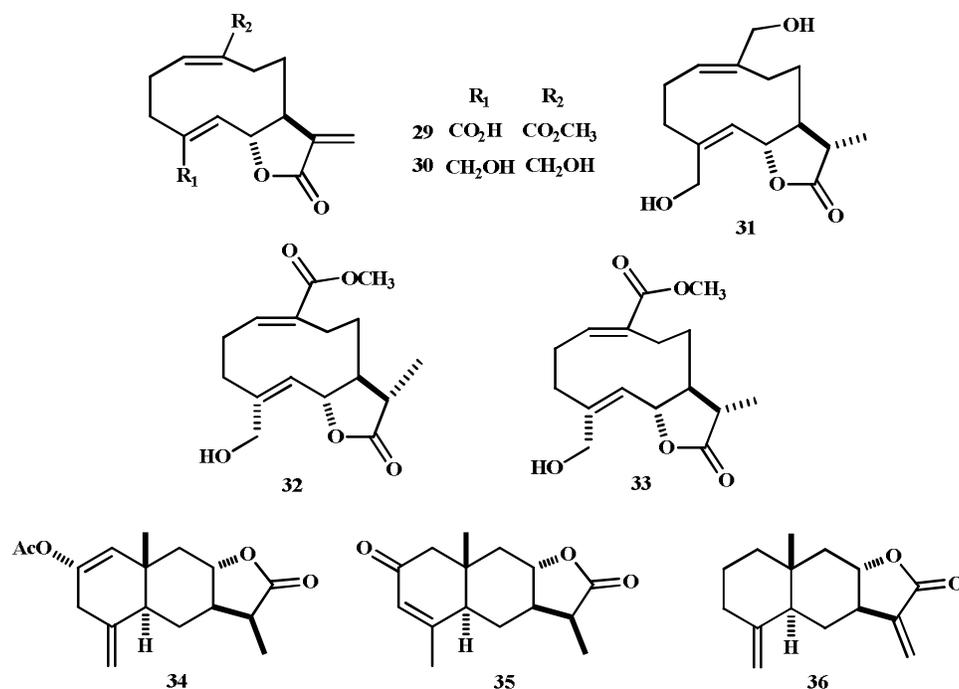


Figura 2.4.8. Lactonas aisladas de *Perymenium grande*.

Adicionalmente, Ciccío y colaboradores en el 2012 reportaron el primer análisis de la composición química de los aceites esenciales para este género evaluando a *Perymenium grande*, describieron ciento dos y ciento siete compuestos para hojas y tallos, respectivamente, e identificaron principalmente monoterpenos y sesquiterpenos (Ciccío *et al.*, 2012). A la fecha no existe reporte del uso de las especies del género *Perymenium* en la medicina tradicional; sin embargo, estudios químicos realizados con algunas de sus especies reportaron la presencia de compuestos con interés farmacológico como el ácido *ent*-kaurenoico (Zgoda *et al.*, 2002, Vieira *et al.*, 2002, Jeong *et al.*, 2013) y su análogo el ácido *ent*-beyerenoico (Zamilpa *et al.*, 2002), así como lactonas sesquiterpénicas, a las cuales también se les ha asociado como agentes terapéuticos contra la inflamación y el cáncer (Siedle *et al.*, 2004, Arellano *et al.*, 2010).

2.5. *Perymenium bupthalmoides* D.C.

Augustin Pyramus de Candolle (1778-1841) en 1836 describió por primera vez a *Perymenium bupthalmoides*, en su obra *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*.

Es una especie endémica de México que se distribuye en el Estado Michoacán y Estados aledaños (Figura 2.5.1), crece principalmente en matorrales xerófilos, pastizales, bosques de encino y de coníferas, particularmente abundante en los claros de estos últimos. Florece de junio a septiembre, planta por lo general común y sin problemas de supervivencia.

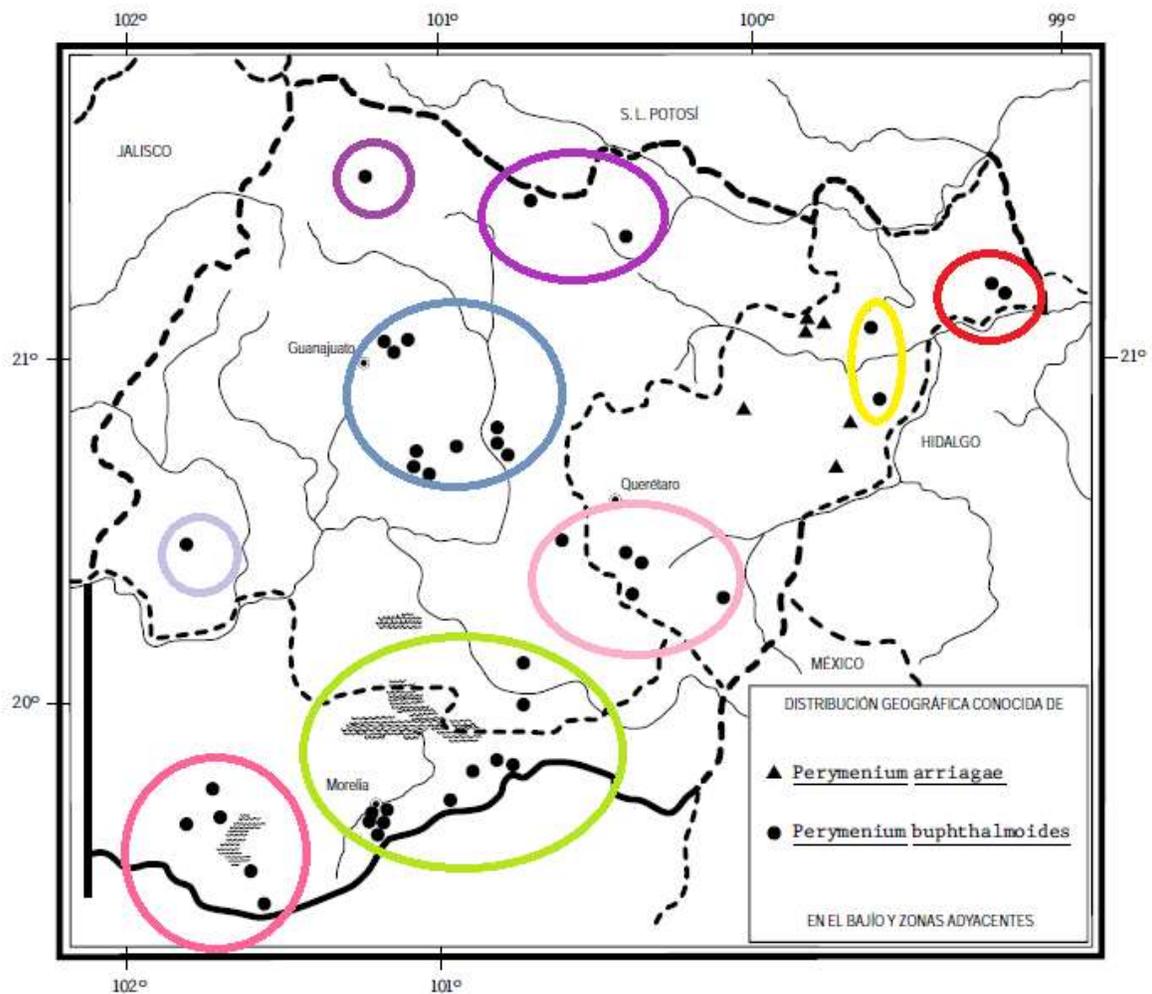


Figura 2.5.1. Localización geográfica de *Perymenium bupthalmoides*.

2.5.1. Descripción botánica

Planta herbácea perenne, erecta, ascendente o decumbente, hasta de 60 cm de largo.

Raíz: tuberosa a menudo muy engrosada y leñosa.

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

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

Flores: liguladas 8 a 13, sus láminas elípticas ablanceoladas, de 0.8 a 2 cm de largo, amarillas, glabras o casi glabras; flores del disco 25 a 50, sus corolas tubulosas, de 3.5 a 5.5 mm de largo, amarillas con los lóbulos papiloso-pubérulos por dentro, anteras negruzcas o cafés, de 1.5 a 2.5 mm de largo, ramas de estilo aplanadas, agudas e hispídulas en el ápice.

Aquenos: obovados, de 2 a 3.5 mm de largo, los del radio triquetos, los del disco biconvexos o tetraangulares, negruzcos, casi glabros o pubérulos o estrigosos, sobre todo en el extremo distal, todos adelgazándose en el ápice hacia el cuello, en el cual se inserta el vilano, éste de 1 a 2 aristas delgadas hasta de 4.5 mm de longitud y varias adicionales de menos de 1 mm de largo, en ocasiones estas últimas o todas o casi todas ausentes, Figura 2.5.1.1^(b)Rzedowski *et al.*, 2011).



Figura 2.5.1.1. *Perymenium bupthalmoides*.

Durante el estudio químico preliminar del extracto hexánico de raíz de *Perymenium bupthalmoides*, se describió la separación, purificación e identificación del ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**3**); así como el ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (**17**) y el triterpeno 3β -friedelinol (**37**). Es importante mencionar que el extracto representa una fuente abundante de **3** y **17**, Figura 2.5.1.2 (Villagómez, 2014)

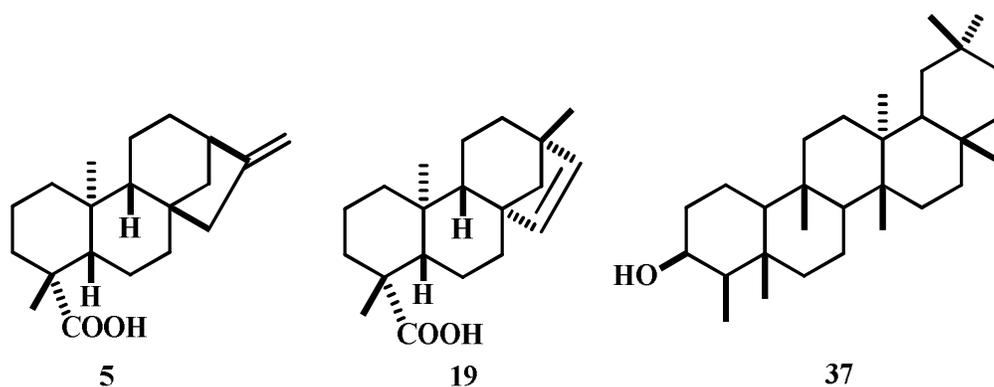


Figura 2.5.1.2. Terpenos aislados de *Perymenium bupthalmoides*.

3. JUSTIFICACIÓN

Las especies del género *Perymenium* han sido poco analizadas químicamente; sin embargo, los resultados arrojados de las especies que poseen análisis químico revelaron la presencia de compuestos conocidos por sus propiedades biológicas,

Perymenium bupthalmoides es una especie endémica de México y su localización geográfica se concentra principalmente en el Estado de Michoacán. En un estudio previo del extracto hexánico de raíz realizado dentro del grupo de trabajo se identificaron diterpenos ampliamente conocidos por sus propiedades biológicas por lo que resulta de interés continuar con el estudio químico de *Perymenium bupthalmoides* para ahondar en el conocimiento de las especies de este género así como aislar y caracterizar los principales grupos de metabolitos secundarios y contribuir así a la quimiotaxonomía de este género.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Llevar a cabo el estudio químico preliminar de los extractos hexánicos de *Perymenium bupthalmoides*.

4.2. Objetivos específicos

- Obtener los extractos de hexanos de raíz, tallo, hojas y flores de la planta.
- Continuar con el estudio del extracto hexánico de raíz.
- Separar y purificar mediante técnicas cromatográficas los componentes mayoritarios presentes en los extractos obtenidos.
- Caracterizar las sustancias químicas mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.

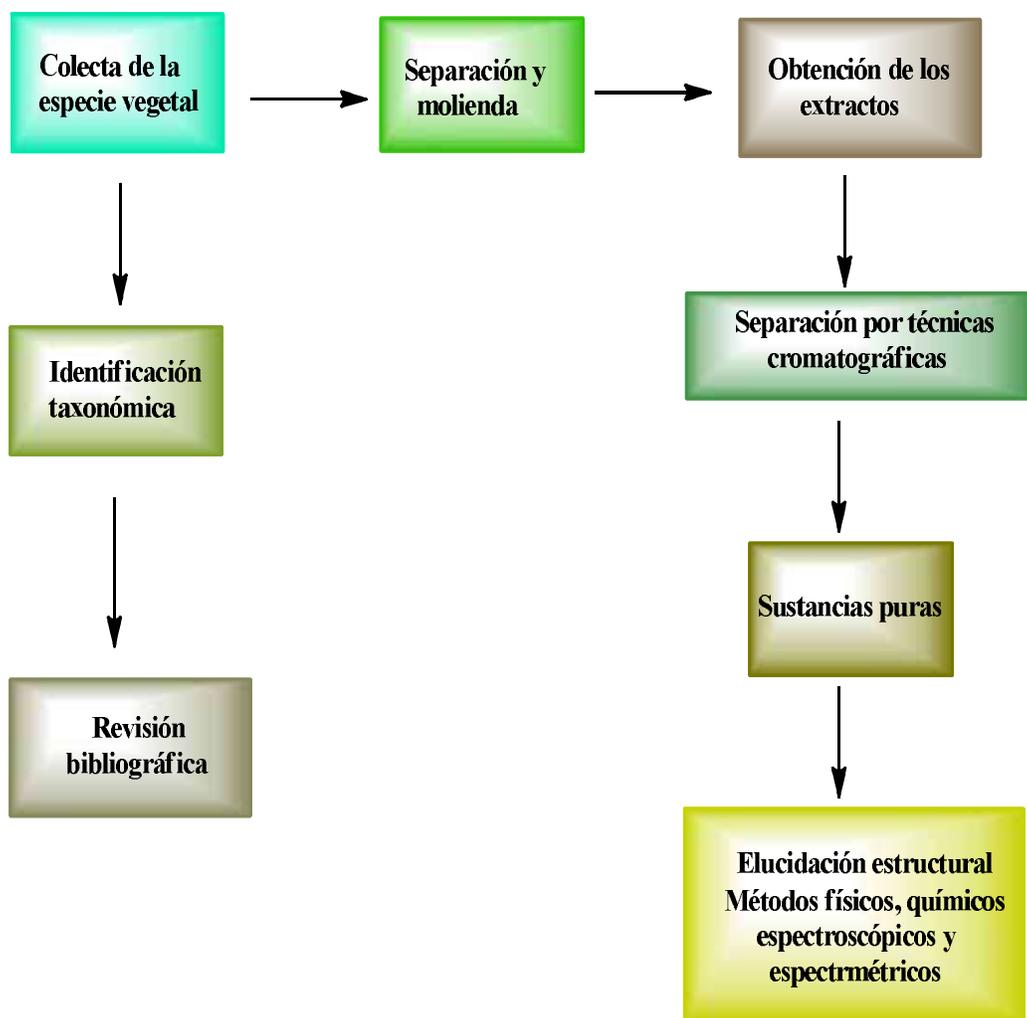
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para el estudio de los compuestos contenidos en la raíz y partes aéreas de *Perymenium bupthalmoides* se realizó lo siguiente:

- Colecta de la especie vegetal.
- Separación de la planta en sus distintas partes (raíz, tallo, hojas y flores).
- Obtención de los extractos mediante reflujo durante 6 h con hexanos.
- Aislamiento y purificación mediante técnicas cromatográficas que involucran cromatografía en columna y cromatografía en capa fina.
- Elucidación estructural mediante punto de fusión, rotación específica, resonancia magnética nuclear de 1D y 2D, infrarrojo, ultravioleta, espectrometría de masa.

La metodología experimental se resume en el Esquema 5.1.

Esquema 5.1. Metodología experimental para el desarrollo del proyecto.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Colecta e identificación de la especie vegetal

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

6.2. Tratamiento vegetal

Para la obtención de los extractos, inicialmente se dejó secar a la sombra y posteriormente se separó en sus distintas partes; raíz, hojas, tallos y flores las cuales fueron molidas individualmente.

6.3. Análisis químico del extracto hexánico de la raíz

La raíz seca y molida (1.040 kg) se extrajo mediante reflujo con 2.5 L de hexanos durante 6 h, este proceso se realizó tres veces, obteniéndose como resultado 17.6 g de una miel de color amarillo.

Para la separación se colocó el extracto en columna cromatográfica de 5 cm de diámetro por 15 cm de altura utilizando gel de sílice malla 230-400 como fase estacionaria y mezclas de hexanos-CH₂Cl₂ en orden ascendente de polaridad como eluente.

El análisis químico preliminar del extracto hexánico de raíz inició con la obtención del espectro de RMN de ¹H del extracto, para determinar la naturaleza y abundancia de los componentes, en el cual se observaron señales en la región de los protones vinílicos de δ 6.00 a 4.50, así como señales en la región de los protones alifáticos lo que sugirió una mezcla de compuestos de tipo terpenoide, por lo que se inició con la separación en columna cromatográfica empleando gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de hexanos-CH₂Cl₂ como fase móvil.

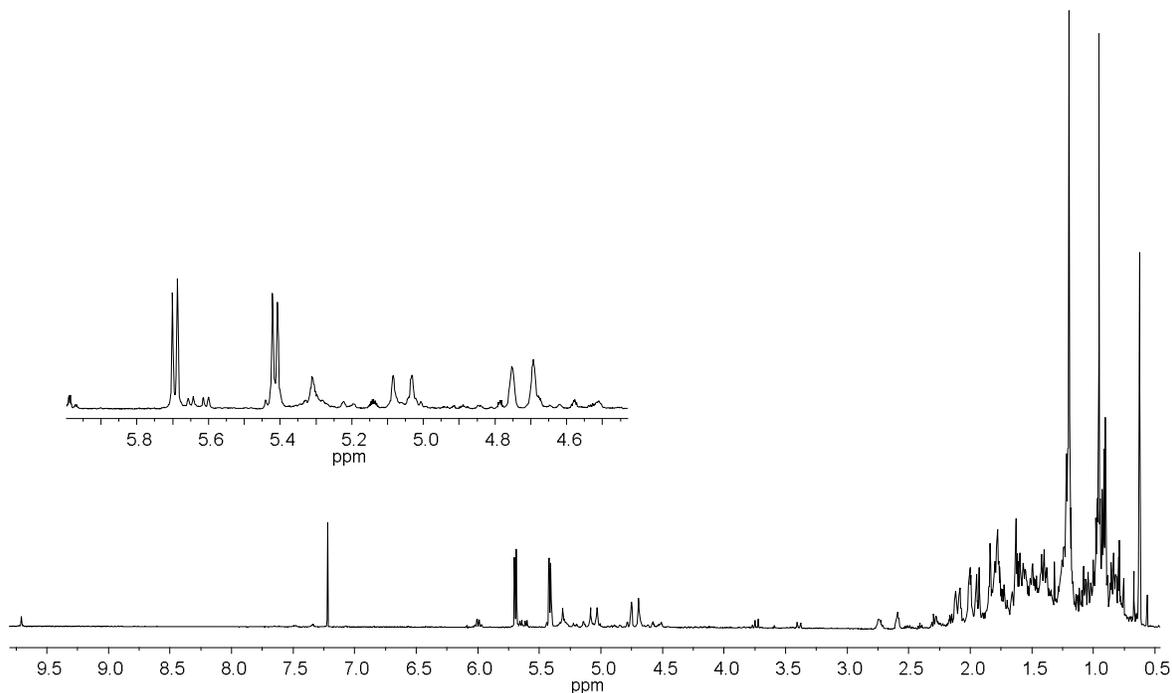


Figura 6.3.1. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del extracto hexánico de raíz de *Perymenium bupthalmoides*.

De las fracciones 4-9 de la cromatografía del extracto hexánico de raíz se obtuvieron cristales transparentes los cuales se recrystalizaron empleando CH₂Cl₂ y hexanos a evaporación lenta, como resultado se obtuvieron 8 g de cristales incoloros los cuales fueron analizados por RMN de ¹H identificando la mezcla de isómeros **3** y **17**. Para la separación un lote de 1.5 g de cristales se sometió a columna cromatográfica utilizando como soporte gel de sílice impregnado con solución de AgNO₃ (15% p/p) y como fase móvil CH₂Cl₂-AcOEt (3:1).

Bajo estas condiciones se obtuvieron 850 mg del ácido beyerenoico (**17**) como un sólido cristalino de forma prisma con un punto de fusión 160-161 °C. En el espectro de RMN de ¹H (Figura 6.3.2) se observaron los protones del enlace doble en δ 5.74 y δ 5.46 pertenecientes a los H-15 (1H, d, *J*= 5.6 Hz) y H-16 (1H, d, *J*= 5.6 Hz); en δ 1.24, δ 1.00, δ 0.67 se localizaron las señales simples para los metilos CH₃-18, CH₃-17 y CH₃-20.

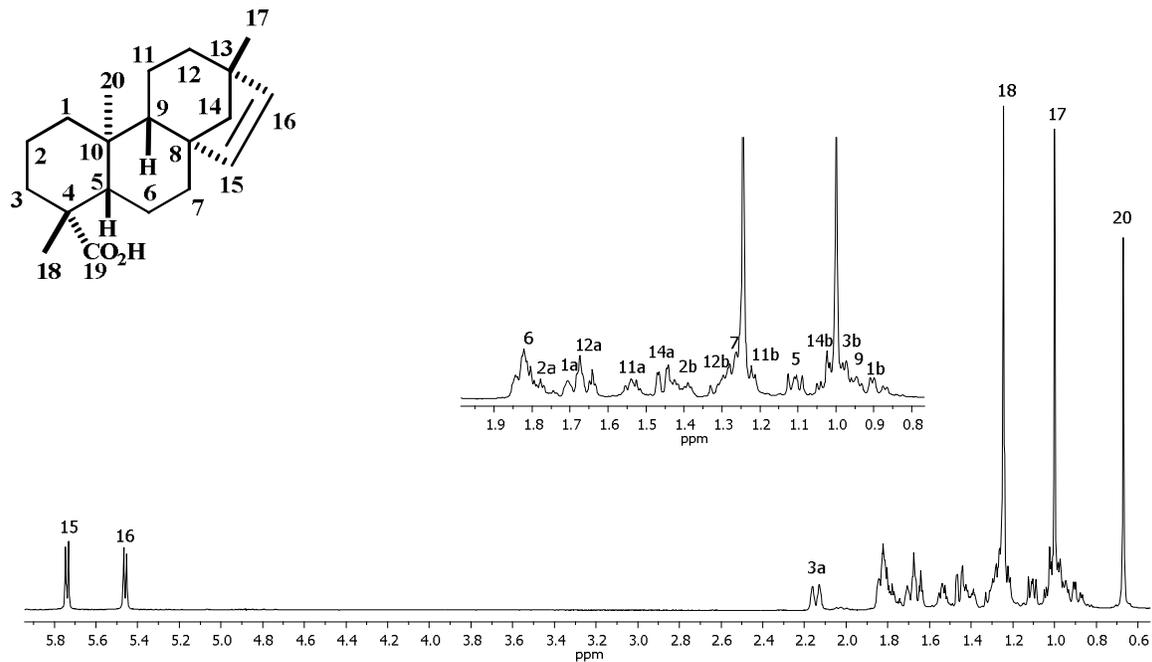


Figura 6.3.2. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (17).

Tabla 6.3.1. Comparación de los desplazamientos de RMN de ^1H del ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (**17**) con la literatura (Grande *et al.*, 1990).

Hidrógeno	Experimental (δ en ppm)	Reportado (δ en ppm)
1	1.66 (2H, dt, $J = 13.8, 3.1$ Hz)	-
2	0.98 (2H, m)	-
3	2.15 (2H, da, $J = 13.6$ Hz)	-
4	-	-
5	1.11 (1H, m)	-
6a	1.82 (1H, m)	-
6b	1.69 (1H, da, $J = 12.6$ Hz)	-
7	1.33 (2H, m)	-
8	-	-
9	0.89 (1H, dda, $J = 12.6, 4.4$ Hz)	-
10	-	-
11	1.54 (2H, m)	-
12	1.26 (2H, m)	-
13	-	-
14a	1.46 (1H, dd, $J = 10.0, 1.9$ Hz)	-
14b	1.01 (1H, da, $J = 10.0$ Hz)	-
15	5.74 (1H, d, $J = 5.6$ Hz)	5.47 (1H, d, $J = 5.7$ Hz)
16	5.46 (1H, d, $J = 5.6$ Hz)	5.76 (1H, d, $J = 5.7$ Hz)
17	1.00 (3H, s)	1.01 (3H, s, H-17)
18	1.24 (3H, s)	1.26 (3H, s, H-18)
19	-	-
20	0.67 (3H, s)	0.69 (3H, s, H-20)

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.3.3) se encontró en δ 184.1 (C-19) una señal característica de carbonilo de ácido; adicionalmente, se observaron dos señales pertenecientes a carbonos de enlaces dobles en δ 136.5 (C-16) y δ 134.8 (C-15); las señales correspondientes al esqueleto tetracíclico se ubicaron entre δ 61.0 a δ 13.8. La comparación de sus datos de RMN de ^1H (Figura 6.3.2.y Tabla 6.3.1) y ^{13}C (Figura 6.3.3 y Tabla 6.3.2) coincidieron con los reportados en la literatura.

La naturaleza de cada uno de los carbonos de la molécula se definió con el experimento DEPT, donde se observaron tres carbonos de grupo metilo en δ 29.1 (C-18), δ 24.9 (C-17) y en δ 13.8 (C-20); asimismo, se observaron ocho carbonos metilénicos, los cuales se ubicaron en δ 61.0 (C-14), δ 39.5 (C-1), δ 37.9 (C-3), δ 37.9 (C-12), δ 33.1 (C-7), 21.5 (C-6), δ 20.4 (C-11) δ 19.2 (C-2); se apreciaron en δ 57.0 (C-5) y δ 52.2 (C-9) los carbonos metínicos; por consiguiente, los carbonos cuaternarios se asignaron en δ 49.1 (C-8), δ 43.7 (C-4), δ 43.6 (C-13), y 37.6 δ (C-10).

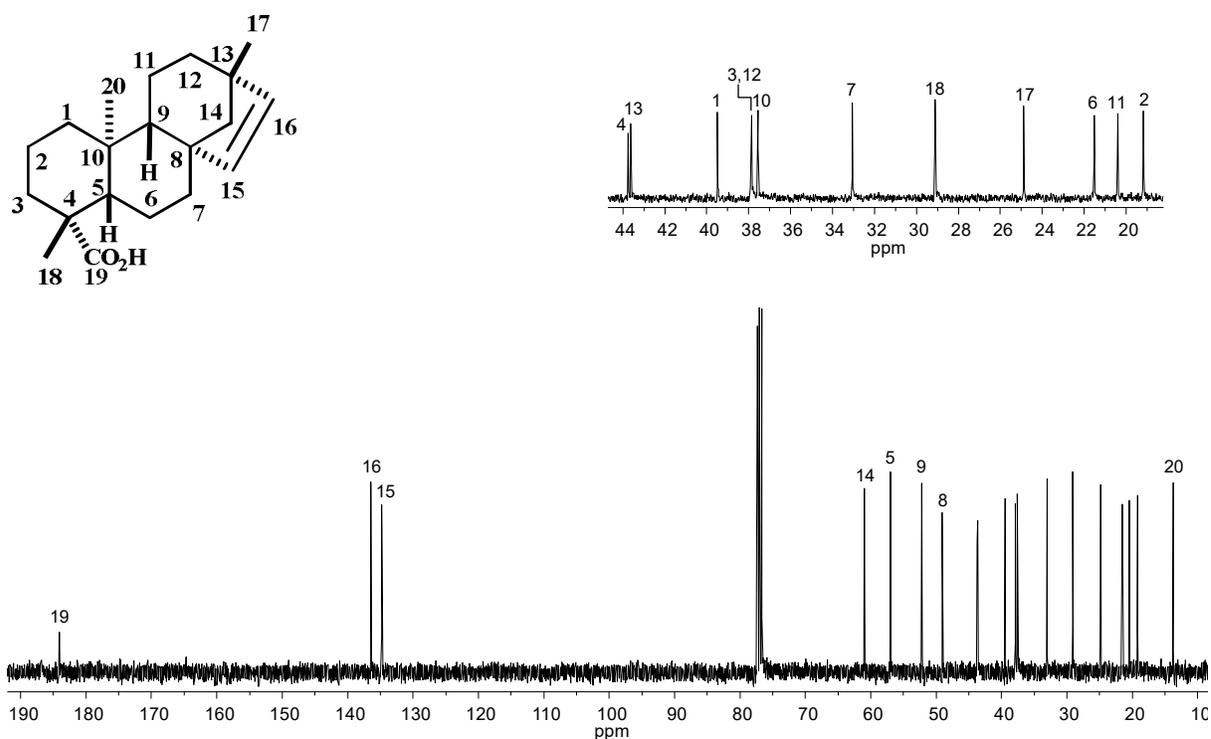


Figura 6.3.3. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (17).

Tabla 6.3.2. Comparación de los desplazamientos de RMN de ^{13}C del ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (**17**) con la literatura (Grande *et al.*, 1990).

Carbono	Experimental (δ en ppm)	Reportado (δ en ppm)
1	39.5	39.6
2	19.2	19.3
3	37.9	38.0
4	43.7	43.9
5	56.9	57.2
6	21.5	21.6
7	37.5	37.7
8	49.1	49.2
9	52.2	52.4
10	37.5	37.7
11	20.4	20.5
12	33.0	33.2
13	43.6	43.7
14	61.0	61.1
15	134.8	134.8
16	136.5	136.5
17	24.9	24.9
18	29.1	29.1
19	183.2	184.3
20	13.8	13.8

La comparación de sus datos de RMN de ^1H (Figura 6.3.2.y Tabla 6.3.1) y ^{13}C (Figura 6.3.3 y Tabla 6.3.2) concordaron a los reportados.

Continuando con la cromatografía en columna impregnada con solución de nitrato de plata, se obtuvieron 214 mg del ácido kaurenoico (**3**) como cristales transparentes de forma prisma con un p.f. 146-148 °C.

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 6.3.4) se observaron los protones del enlace doble en δ 4.80 y δ 4.74 pertenecientes a los H-17a y H-17b; en δ 2.64 se observó la señal triple ancha referente al protón alílico H-13 (1H, ta, $J= 4.0$ Hz); en δ 1.24, δ 0.95 se localizaron las señales simples para los metilos H-18 y H-20.

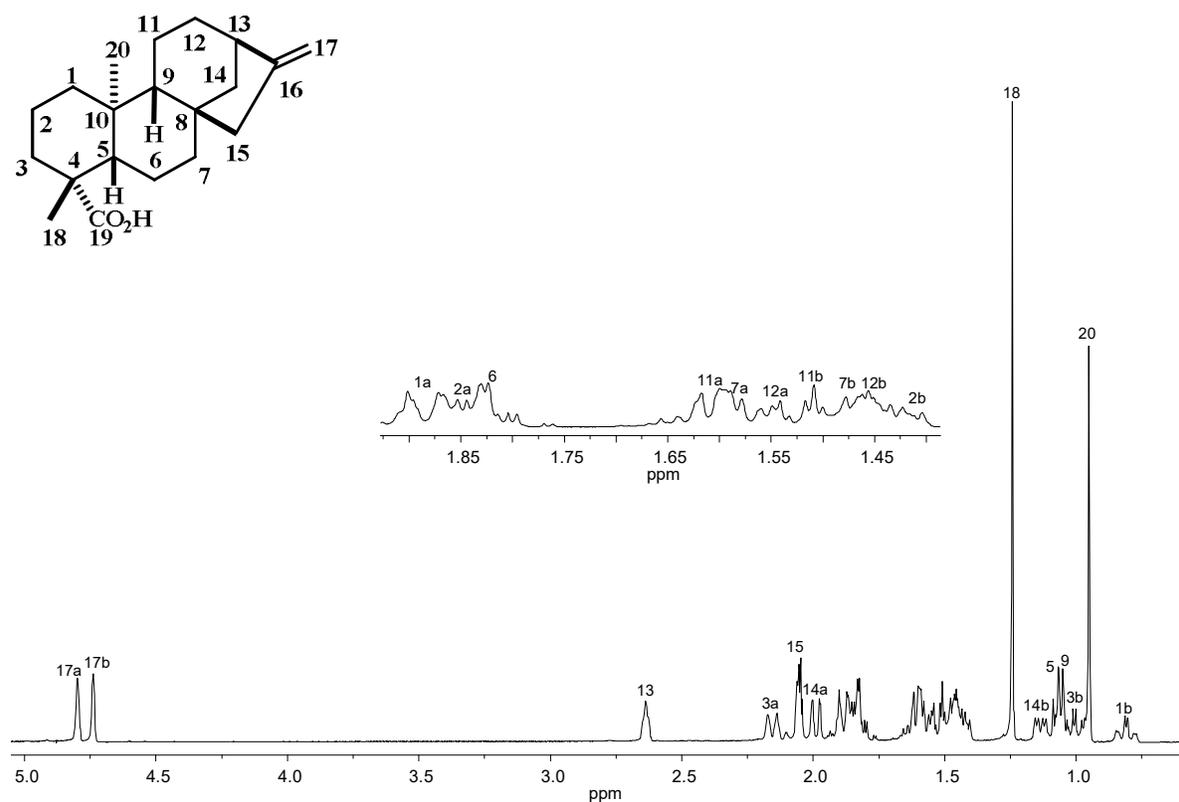


Figura 6.3.4. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**3**).

Tabla 6.3.3. Comparación de los desplazamientos de RMN de ^1H del ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**3**) comparados con la literatura (Ohno *et al.*, 1979; Jeong *et al.*, 2013).

Hidrogeno	Experimental (δ en ppm)	Reportado (δ en ppm)
1a	1.88 (1H, da, $J= 13.2$ Hz)	0.83 (2H, dd, $J= 13.2, 4.2$ Hz, H-1)
1b	0.81 (1H, td, $J= 13.2, 4.0$ Hz)	
2a	1.85 (1H, m)	-
2b	1.42 (1H, m)	
3a	2.15 (1H, da, $J= 14.8$ Hz)	-
3b	1.01 (1H, m)	
4	-	-
5	1.06 (1H, m)	1.08 (1H, m, H-5)
6	1.82 (1H, m)	2.09 (2 H, d, $J= 3.0$ Hz, H-6)
7a	1.58 (1H, m)	1.5 (4H, m, H-7 y H-12)
7b	1.47 (1H, m)	-
8	-	-
9	1.04 (1H, m)	-
10	-	-
11a	1.60 (1H, m)	1.62 (2H, m, H-11)
11b	1.51 (1H, m)	
12a	1.54 (1H, m)	1.5 (4H, m, H-7 y H-12)
12b	1.46 (1H, m)	-
13	2.64 (1H, ta, $J= 4.0$ Hz)	2.61 (1H, sa, H-13)
14b	1.99 (1H, d, $J= 12.0$ Hz)	-
14b	1.12 (1H, $J=$ dda, 12.0, 4.0 Hz)	
15	2.05 (1H, m)	-
16	-	-
17a	4.80 (1H, s)	4.77 (sa, H-17 _b)
17b	4.74 (1H, s)	4.72 (1H, sa, H-17 _a)
18	1.24 (3H, s)	1.21 (3H, s, H-18)
19	-	-
20	0.95 (3H, s)	0.92 (3H, s, H-20)

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.3.5) se encontró en δ 183.6 (C-19) una señal característica de carbonilo de ácido; adicionalmente, se observaron dos señales pertenecientes a carbonos de enlaces dobles en δ 155.9 (C-16) y δ 103.0 (C-17); las señales correspondientes al esqueleto tetracíclico se ubicaron entre δ 57.0 a δ 15.6.

La comparación de sus datos de RMN de ^1H (Figura 6.3.4.y Tabla 6.3.3) y ^{13}C (Figura 6.3.5 y Tabla 6.3.4) concordaron a los reportados.

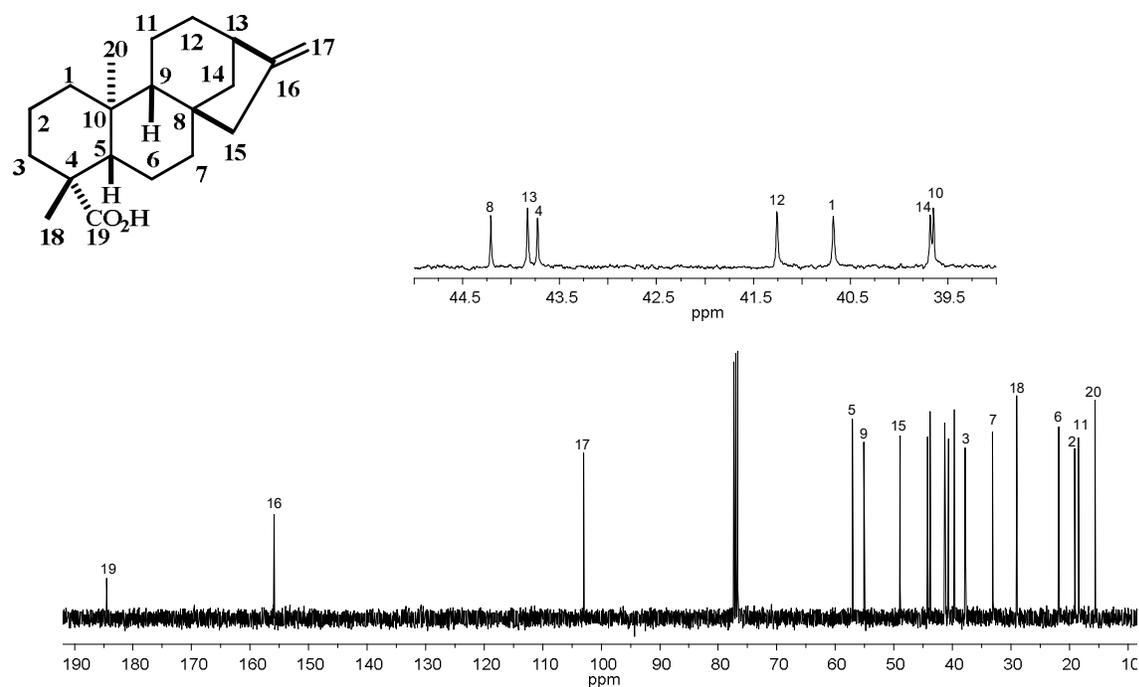


Figura 6.3.5. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (3).

Tabla 6.3.4. Comparación de los desplazamientos de RMN de ^{13}C del ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**3**) con la literatura (Ohno *et al.*, 1979; Jeong *et al.*, 2013).

Carbono	Experimental (δ en ppm)	Reportado (δ en ppm)
1	40.7	40.8
2	19.1	19.2
3	37.8	37.8
4	43.7	43.9
5	57.0	57.2
6	21.8	21.9
7	41.2	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	49.1
16	155.9	155.9
17	103.0	103.1
18	29.0	29.0
19	184.6	185.1
20	15.6	15.6

Asimismo, de las fracciones 4-9 tras varios procesos cromatográficos se obtuvo una mezcla de compuestos los cuales fueron purificados a través de cromatografía preparativa impregnada con solución de AgNO_3 al 20% con un sistema de elución hexanos- CH_2Cl_2 (4:1). De este procedimiento se obtuvo el compuesto **38**.

En su espectro de masa mostró un ion molecular de 468 m/z correspondiente a la fórmula molecular ($\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$) y en su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.3.6) se observó una señal doble de dobles en δ 5.53 correspondiente al protón del enlace doble H-15 (1H, dd, $J= 8.4, 3.2$ Hz); en δ 4.48 se aprecia una señal múltiple asignada al H-3 base de acetato; en δ 2.04 se ubicó la señal simple asignada al metilo del acetato $\text{CH}_3\text{-2}'$; se observaron las señales de grupos metilo en δ 1.09 ($\text{CH}_3\text{-26}$), δ 0.95 ($\text{CH}_3\text{-29- CH}_3\text{-23}$), δ 0.91 ($\text{CH}_3\text{-25}$), δ 0.90 ($\text{CH}_3\text{-30}$), 0.88 ($\text{CH}_3\text{-27}$), 0.86 ($\text{CH}_3\text{-28}$), 0.82 ($\text{CH}_3\text{-24}$).

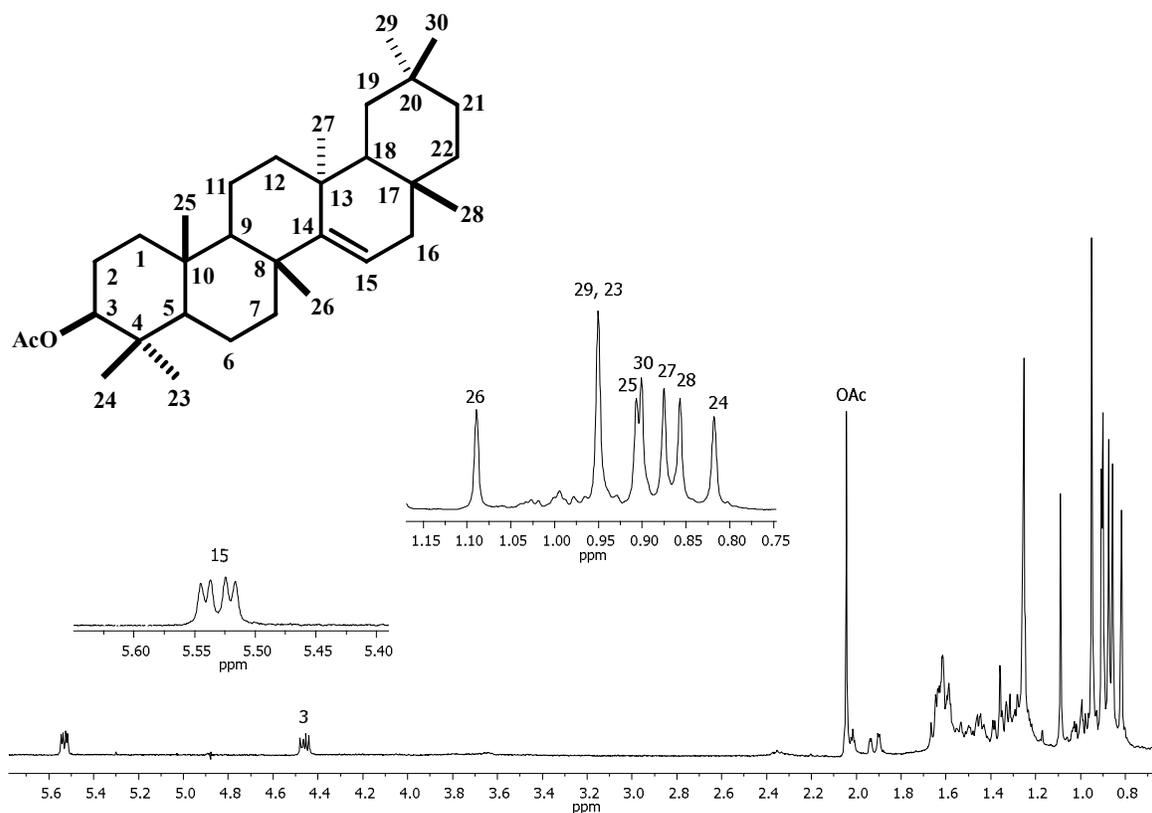


Figura 6.3.6. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del de acetato de taraxerol (**38**).

los desplazamientos de RMN de ^{13}C (Tabla 6.3.5), fueron comparados con los descritos, entrándose coincidencia para el acetato de taraxerol (**38**) sin embargo, la asignación de C-2 no corresponde al analizar los espectros DEPT y HETCOR, por lo que estos datos deben ser revisados. **Tabla 6.3.5.** Comparación de los desplazamientos de RMN de ^{13}C del acetato de taraxerol (**38**) con la literatura (Thuy *et al.*, 2008).

Carbono	Experimental (δ en ppm) Acetato taraxerol	Reportado (δ en ppm) Acetato taraxerol
1	37.7	37.73
2	23.4	28.86
3	81.0	80.98
4	39.0	39.01
5	55.6	55.63
6	18.6	18.76
7	35.1	35.15
8	37.9	37.92
9	48.7	48.76
10	37.7	37.72
11	17.5	17.59
12	35.8	35.83
13	37.4	37.41
14	158.0	157.84
15	116.9	116.84
16	36.6	36.7
17	37.5	37.58
18	49.2	49.2
19	41.2	41.23
20	28.8	28.86
21	33.7	33.72
22	33.1	33.17
23	28.0	28.04
24	15.5	15.59
25	16.6	16.67
26	29.9	29.99
27	25.9	25.99
28	29.8	29.89
29	33.3	33.41
30	21.3	21.42
1'	171.0	170.81
2'	21.3	21.36

Adicionalmente, mediante cromatografía preparativa impregnada con solución de AgNO_3 se obtuvo un sólido blanco el cual en su espectro de masa mostró un ion molecular de 470 m/z correspondiente a la fórmula molecular ($\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_2$). En su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.3.7) se observó una señal cuádruple en δ 4.89 (1H, q, $J= 4.0$ Hz) correspondiente al protón base de acetato H-3; en δ 2.04 se apreció la señal simple asignada al metilo del acetato $\text{CH}_3\text{-2}'$, se observaron las señales de grupos metilo en δ 1.17 ($\text{CH}_3\text{-28}$), δ 1.00 ($\text{CH}_3\text{-30}$), δ 0.99 ($\text{CH}_3\text{-26-CH}_3\text{-27}$), δ 0.94 ($\text{CH}_3\text{-29}$), δ 0.93 ($\text{CH}_3\text{-24}$), 0.86 ($\text{CH}_3\text{-25}$) y δ 0.81 (3H, d, $J= 7.2$ Hz, $\text{CH}_3\text{-23}$).

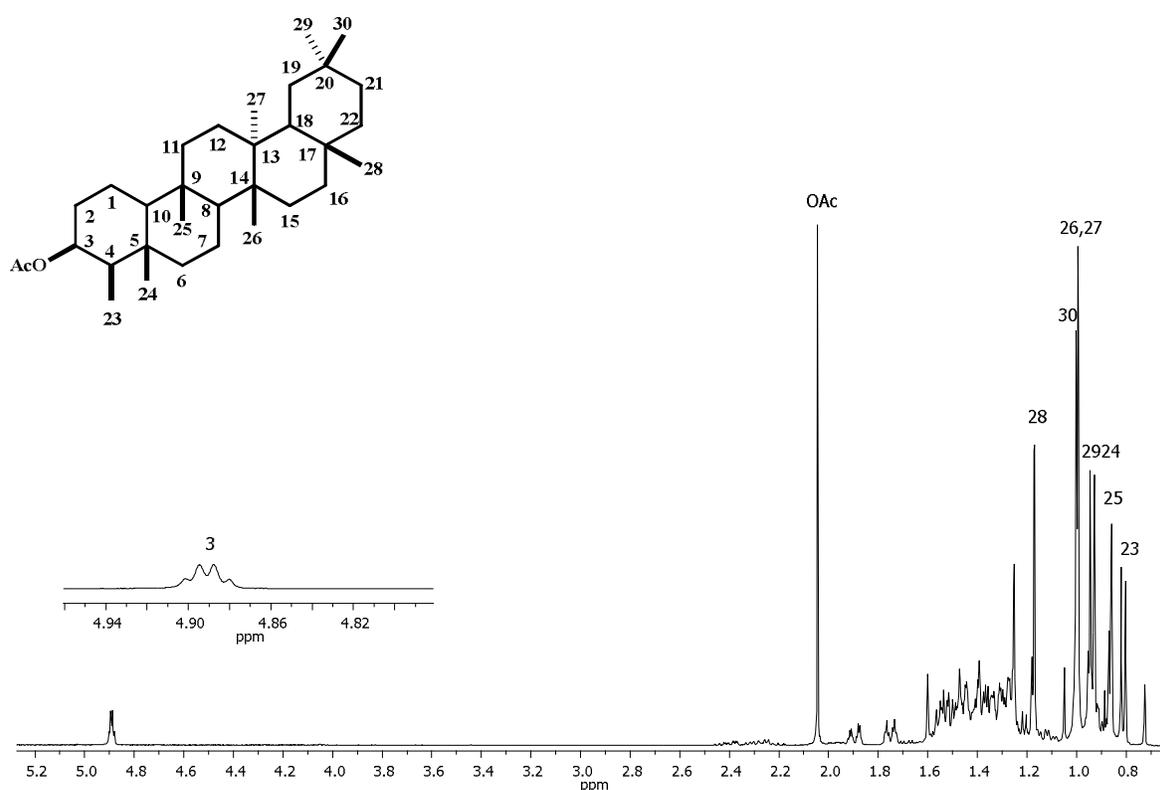


Figura 6.3.7. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del acetato de 3β -friedelinol (39).

Estos datos fueron comparados con los descritos, coincidiendo para el triterpeno denominado acetato de 3β -friedelinol (39), Tabla 6.3.6.

Tabla 6.3.6. Comparación de los desplazamientos de RMN de ^{13}C del acetato de 3 β -friedelinol (**39**) con la literatura (Patra *et al.*, 1981).

Carbono	Experimental (δ en ppm)	Reportado (δ en ppm)
1	16.3	16.3
2	32.1	32.1
3	74.6	74.5
4	48.1	48.0
5	37.9	37.8
6	41.7	41.6
7	17.7	17.6
8	53.2	53.1
9	37.1	37.0
10	60.9	60.9
11	36.1	36.3
12	30.6	30.5
13	38.4	38.3
14	39.7	39.6
15	32.3	32.3
16	35.5	36.0
17	29.7	29.9
18	42.8	42.8
19	35.3	35.5
20	28.2	28.1
21	32.8	32.8
22	39.3	39.2
23	11.3	11.2
24	15.8	15.7
25	18.2	18.1
26	18.5	18.5
27	20.1	20.0
28	32.2	32.0
29	35.0	34.9
30	31.9	31.7
1'	170.9	170.7
2'	21.4	21.1

Las fracciones 10-11 de la cromatografía del extracto hexánico de la raíz se recromatografiaron empleando mezclas de hexanos-acetona en orden ascendente de polaridad. En la polaridad 9:1 se obtuvo una mezcla de compuestos, la cual fue separada mediante lavados con hexanos obteniéndose un sólido de color blanco el cual fue recristalizado utilizando hexanos-AcOEt, obteniéndose 300 mg de un compuesto cristalino de forma rómbica con punto de fusión 180-182 °C.

El espectro RMN de ^1H (Figura 6.3.8) mostró las señales características de un grupo angeloiloxi, en δ 6.04 la señal cuádruple de cuádruples (1H, qq, $J= 7.2, 1.2$ Hz) asignada al protón vinílico H-3', en δ 1.98 se localizó la señal doble de cuádruples perteneciente al H-4' (1H, dq, $J= 7.2, 1.6$ Hz) y en δ 1.88 la señal cuádruple (q, 3H, $J= 2.8$ Hz) asignada al metilo 5'. Adicionalmente, en δ 5.35 se observó la señal simple perteneciente al protón base de éster H-15; en δ 5.13 (H-17a) y δ 5.07 (H-17b) se apreciaron dos señales simples características de hidrógenos vinílicos; en δ 2.79 se observó la señal triple ancha referente al H-13 (1H, ta, $J= 4.0$ Hz); por otra parte, en δ 2.15 se ubicó la señal doble ancha correspondiente al H-14a con $J= 13.6$ Hz; la señal doble de dobles correspondiente a H-14b se localizó en δ 1.13 (1H, dd, $J= 11.0, 4.6$ Hz); finalmente, en δ 1.22 y en δ 0.96 se ubicaron la señales simples de grupos metilo pertenecientes a los CH₃-18 y CH₃-20 respectivamente, lo que sugirió la presencia de un esqueleto tipo kaureno.

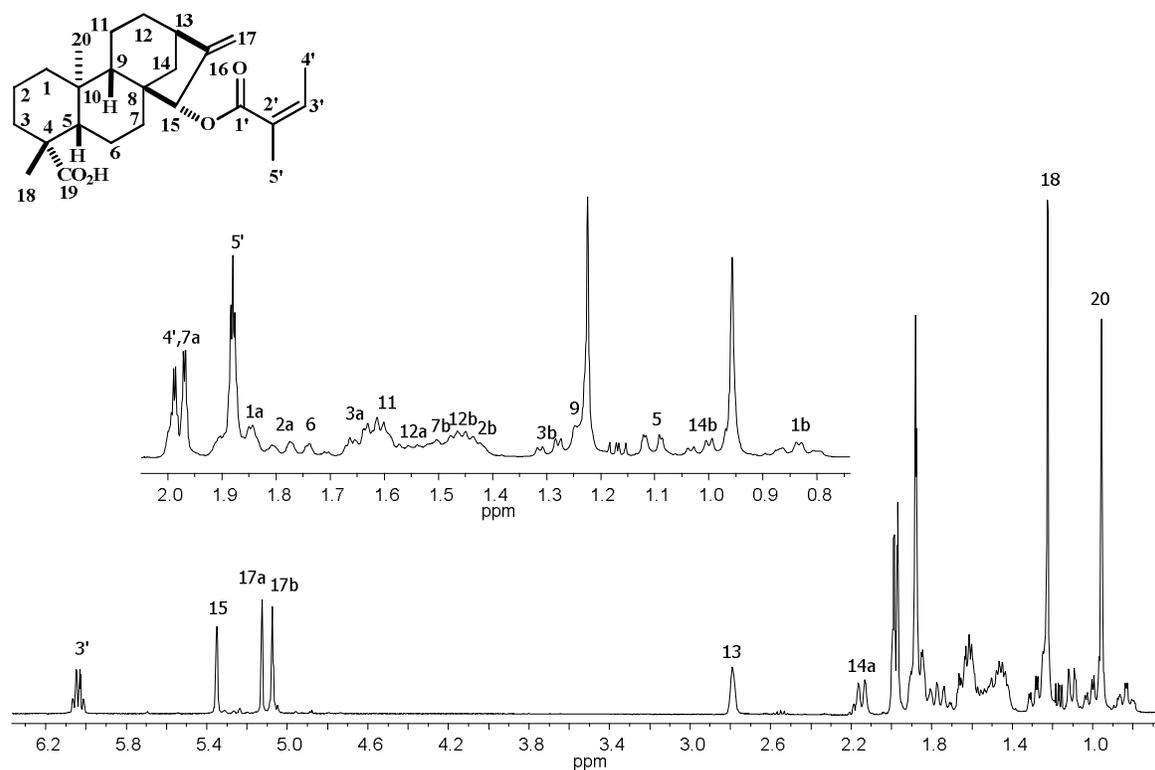


Figura 6.3.8. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del ácido *ent*-kaur-15 α -angeloiloxi-16-en-19-oico (4).

Tabla 6.3.7. Comparación de los desplazamientos de RMN de ^1H del ácido *ent*-kaur-15 α -angeloiloxi-16-en-19-oico (**4**) con la literatura (Ohno *et al.*, 1979).

Hidrógeno	Experimental (δ en ppm)	Reportado (δ en ppm)
1a	1.87 (1H, m)	
1b	0.83 (1H, td, $J= 13.4, 4.0$ Hz)	
2a	1.84 (1H, m)	-
2b	1.43 (1H, m)	
3a	1.65 (1H, m)	-
3b	1.28 (1H, td, $J= 13.2, 4.0$ Hz)	
4	-	-
5	1.10 (1H, dda, $J= 12.0, 2.0$ Hz)	
6	1.77 (2H, ta, $J= 14.0$ Hz)	
7a	1.96 (1H, m)	
7b	1.45 (1H, m)	
8	-	-
9	1.24 (1H, m)	-
10	-	-
11	1.63 (1H, m)	
12a	1.53 (1H, m)	
12b	1.46 (1H, m)	
13	2.79 (1H, ta, $J= 4.0$ Hz)	2.80 (1H, m)
14a	2.15 (1H, da, $J= 13.6$ Hz)	-
14b	1.13 (1H, dd, $J = 11.0, 4.6$ Hz)	
15	5.35 (1H, s)	5.40(1H, m)
16	-	-
17a	5.13 (1H, s)	5.18 (1H, s)
17b	5.07 (1H, s)	5.10 (1H, s)
18	1.22 (3H, s)	1.23 (1H, s)
19	-	-
20	0.96 (3H, s)	0.97 (3H, s)
1'	-	-
2'	-	-
3'	6.04 (1H, qq, $J= 7.2, 1.2$ Hz)	6.07 (qq, 1H, $J= 8.0, 1.0$ Hz)
4'	1.98 (1H, dq, $J= 7.2, 1.6$ Hz)	1.98 (dq, 1H, $J= 8.0, 1.0$ Hz)
5'	1.88 (q, 3H, $J= 2.8$ Hz)	1.88 (q, 3H, $J= 1.0$ Hz)

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.3.9) se observaron 25 señales, de las cuales se identificó en δ 184.4 la señal típica de carbonilo de ácido (C-19) y en δ 168.0 la señal característica de carbonilo de éster (C-1'); en δ 155.5 (C-16) y δ 110.0 (C-17) se encontraron señales pertenecientes a carbonos de sp^2 asignadas al doble enlace exocíclico; por otro lado, se observaron δ 137.4 (C-3') y δ 128.2 (C-2') los carbonos sp^2 correspondientes al grupo angeloilo, los metinos se apreciaron en δ 82.5 (C-15), δ 56.5 (C-5), δ 52.9 (C-9) y δ 42.5 (C-13); finalmente, los carbonos de grupos metilo se observaron en δ 28.8 (C-18), δ 20.7 (C-5'), δ 15.8 (C-4') y δ 15.7 (C-20).

Adicionalmente se observaron señales en δ 39.8 (C-1), δ 37.6 (C-14), δ 37.4 (C-7), δ 35.0 (C-3), δ 32.6 (C-12), δ 20.8 (C-6), δ 19.0 (C-2) y en δ 18.4 (C-11); así mismo, se apreciaron las señales de los carbonos cuaternarios en δ 47.5 (C-8), δ 43.7 (C-4) y δ 40.5 (C-10).

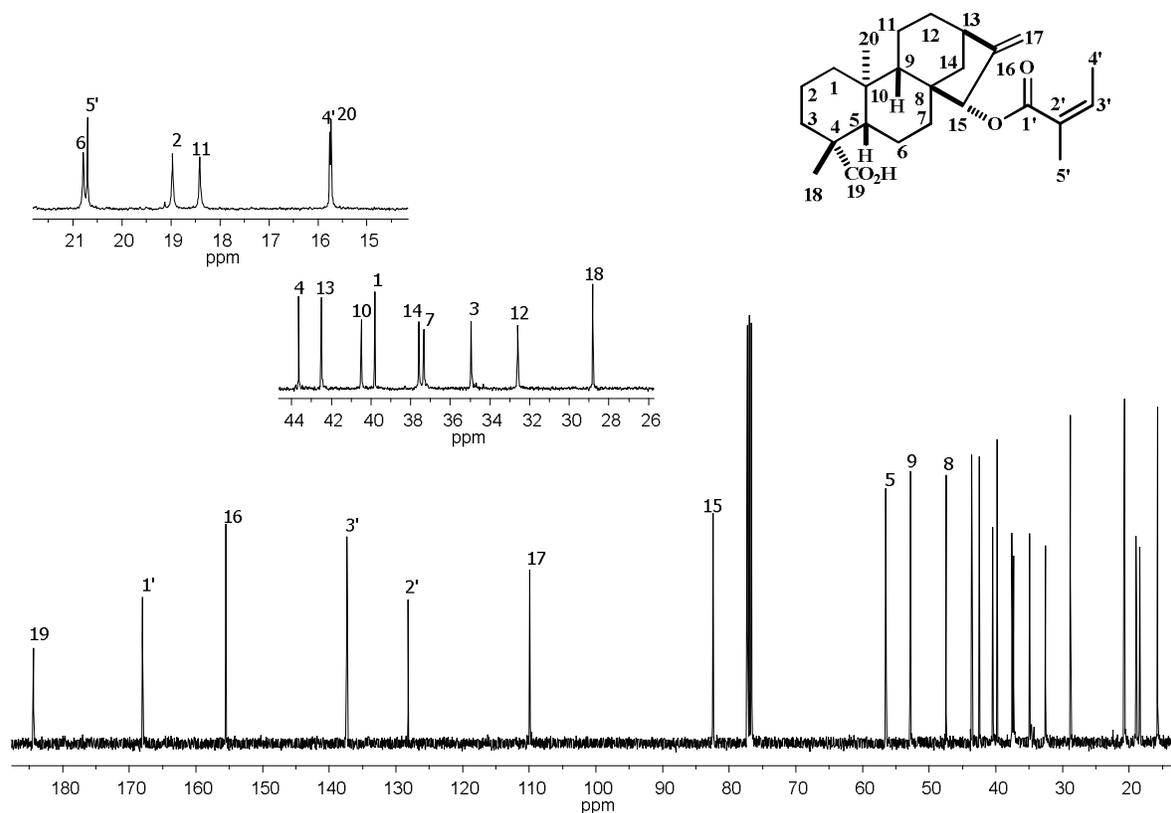


Figura 6.3.9. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del ácido *ent*-kaur-15 α -angeloil-16-en-19-oico (4).

Tabla 6.3.8. Comparación de los desplazamientos de RMN de ^{13}C del ácido *ent*-kaur 15 α -angeloiloxi-16-en-19-oico (**4**) con la literatura (Kakuta *et al.*, 1992, Ohno *et al.*, 1979).

Carbono	Experimental (δ en ppm)	Reportado (δ en ppm)
1	39.8	40.6
2	19.0	19.0
3	35.0	35.1
4	43.7	43.8
5	56.5	56.6
6	20.8	20.8
7	37.4	37.5
8	47.5	47.6
9	52.9	53.0
10	40.5	39.9
11	18.4	20.7
12	32.6	32.7
13	42.5	42.6
14	37.6	37.7
15	82.5	82.6
16	155.5	155.5
17	109.9	110.0
18	28.8	28.9
19	184.4	184.9
20	15.7	15.8
1'	168.0	168.2
2'	128.2	128.4
3'	137.4	137.5
4'	15.8	15.8
5'	20.7	18.5

En el experimento COSY (Figura 6.3.10) se observó la correlación de la señal en δ 2.79 perteneciente al H-13, con la señal localizada en δ 1.46 correspondiente al H-12b; por otro lado se apreció la correlación de la señal en δ 2.15 asignada al H-14a con la señal doble de dobles δ en 1.13 perteneciente al H-14b; así mismo, se apreció la correlación para el H-1a con la señal ubicada en δ 0.83 del H-1b; también se distinguió la correlación de la señal encontrada en δ 1.96 correspondiente a H-7a, con la señal en δ 1.45 asignada al H-7b, finalmente se observó la correlación de la señal en δ 1.65 con la señal en δ 1.28 correspondientes al H-3a y H-3b, respectivamente.

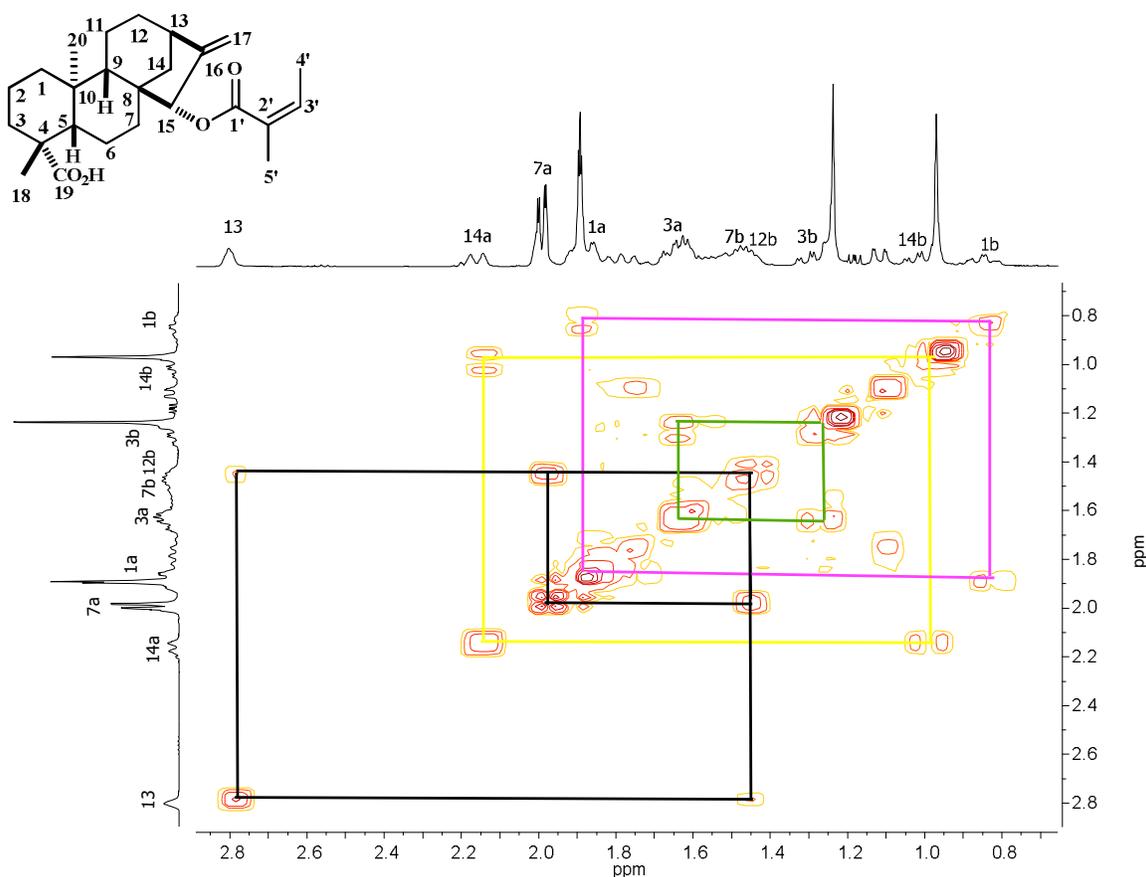


Figura 6.3.10. Espectro COSY del ácido *ent*-kaur-15 α -angeloiloxi-16-en-19-oico (4).

El experimento HETCOR (Figura 6.3.11) se observó la correlación de la señal en δ 137.4 con la señal cuádruple de cuádruples ubicada en δ 6.04 asignada al protón vinílico H-3' característica del grupo angeloilo, se observó la correlación del carbono sp^2 C-17 con los hidrógenos vinílicos en δ 5.13 y δ 5.07; el C-15 ubicado en δ 82.5 presentó correlación con la señal simple en δ 5.35 (H-15); la señal perteneciente al C-5 correlacionó con la señal en δ 1.10 (H-5); el C-9 correlacionó con la señal múltiple en δ 1.24; el C-13 mostró correlación con la señal en δ 2.79 (H-13); la señal en δ 39.8 referente al C-1 correlacionó con la señal múltiple ubicada en δ 1.87 y con la señal triple de dobles localizada en δ 0.83.

Los datos de RMN de ^1H (Tabla 6.3.7) y ^{13}C (Tabla 6.3.8) al compararlos con los descrito en la bibliografía coincidieron con el ácido *ent*-kaur-15 α -angeloiloxi-16-en-19-oico (4) sin embargo, la asignación de C-11 y C-5' resultaron invertidas al analizar los espectros DEPT y HETCOR, por lo que estos datos deben ser revisados.

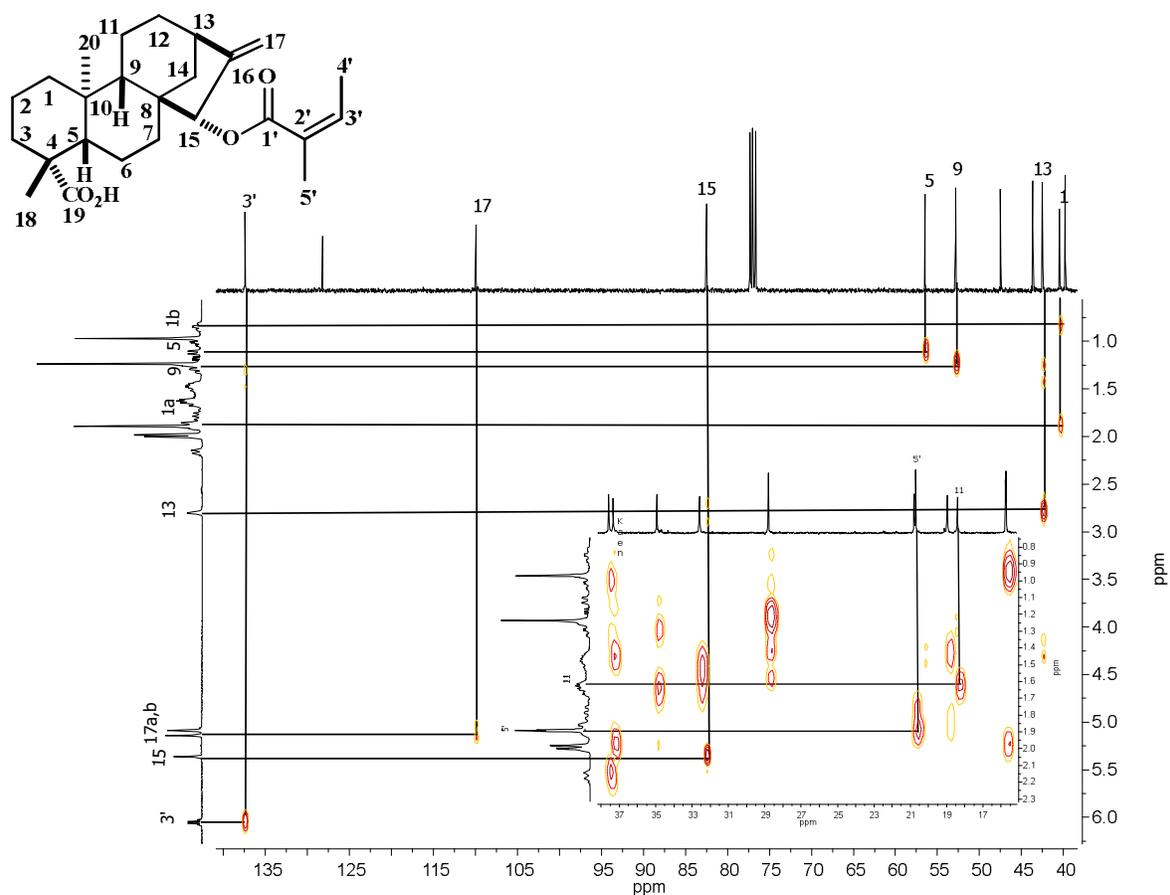


Figura 6.3.11. Espectro HETCOR del ácido *ent*-kaur-15 α -angeloiloxi-16-en-19-oico (4).

De la recromatografía de las fracciones 10-11 a polaridad hexanos-acetona (17:3) se obtuvo una mezcla de compuestos la cual fue purificada mediante lavados con hexanos obteniéndose 35 mg de cristales blancos. El espectro de masa mostró el ion $[M]^+$ de 291, el cual sugirió la fórmula molecular $C_{20}H_{34}O$.

El espectro RMN de 1H (Figura 6.3.12) mostró señales solamente en la región de los protones alifáticos; en δ 1.93 se ubicó la señal correspondiente al H-1a (1H, da, $J= 11.6$ Hz); en δ 1.83 (1H, da, $J= 4.0$ Hz) se observó la señal perteneciente al protón cabeza de puente H-13; en δ 1.77 (1H, dd, $J= 13.2, 3.2$ Hz) se ubicó la señal perteneciente al H-7a; en δ 1.55 y 1.30 se ubicaron las señales múltiple y doble de dobles correspondientes a los protones metilénicos H-14a y H-14b respectivamente; a campo alto, en δ 1.11 se encontró la señal triple de dobles (2H, td, $J= 14.0, 4.8$ Hz) asignada al metileno H-3; adicionalmente, se observó la señal doble ancha con una constante de acoplamiento ($J= 8.0$ Hz) asignada al H-5, el H-9 se apreció como una señal doble de dobles en δ 0.77 (1H, dd, $J= 12.0, 1.6$ Hz); finalmente, las señales simples en δ 1.36 (H-17), δ 0.84 (H-18), δ 0.80 (H-19), y en δ 1.02 (H-20) indicaron la presencia de cuatro grupos metilo.

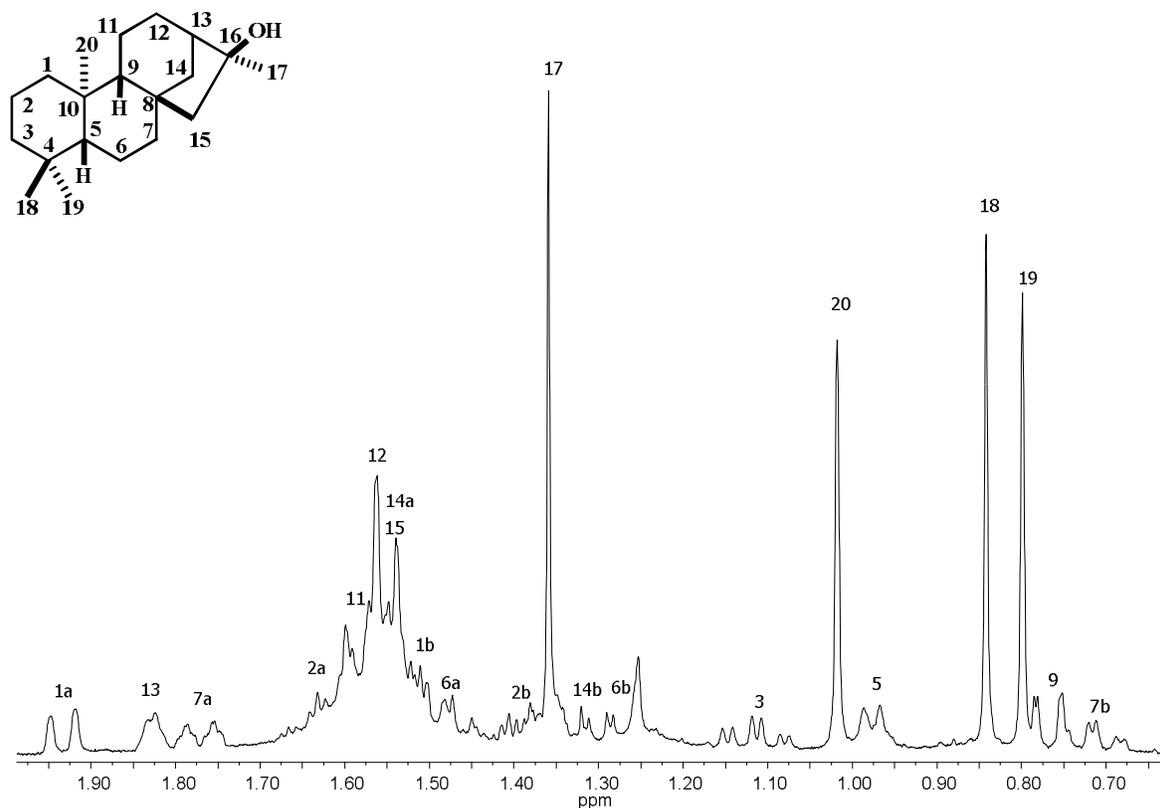


Figura 6.3.12. Espectro de RMN de 1H a 400 MHz en $CDCl_3$ del 16β -hidroxikaurano (**40**).

Tabla 6.3.9. Comparación de los desplazamientos de RMN de ^1H del 16β -hidroxikaurano (**40**) con la literatura (Pyrek, 1984).

Hidrógeno	Experimental (δ en ppm)	Reportado (δ en ppm)
1a	1.93 (1H, da, $J= 11.6$ Hz)	-
1b	1.53 (1H, m)	-
2a	1.62 (1H, m)	-
2b	1.39 (1H, m)	-
3	1.11 (2H, td, $J= 14.0, 4.8$ Hz)	-
4	-	-
5	0.97 (1H, dda, $J= 8.0$ Hz)	-
6a	1.51(2H, m)	-
6b	1.26 (2H, m)	-
7a	1.77 (1H, dda, $J =13.2, 3.2$ Hz)	-
7b	0.72 (1H, tda, $J = 13.2, 4$ Hz)	-
8	-	-
9	0.77 (1H, dda, $J = 12, 1.6$ Hz)	-
10	-	-
11	1.57 (2H, m)	-
12	1.56 (2H, m)	-
13	1.83 (1H, da, $J= 4.0$ Hz)	-
14a	1.55 (1H, m)	-
14b	1.30 (1H, dd, $J= 11.6. 3.2$ Hz)	-
15	1.54 (2H, m)	-
16	-	-
17	1.36 (3H, s)	1.36 (3H, s)
18	0.84 (3H, s)	0.85 (3H, s)
19	0.80 (3H, s)	0.81 (3H, s)-
20	1.02 (3H, s)	1.03 (3H, s)

En su espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.3.13) se observaron las señales características de un esqueleto diterpénico, de las cuales se identificó en δ 79.4 una señal típica de carbono base de alcohol correspondiente al (C-16). Con ayuda del experimento DEPT se asignaron los metinos en δ 56.9 (C-5), δ 56.2 (C-9) y δ 49.0 (C-13); los metilenos en δ 58.0 (C-15), δ 42.0 (C-14-3), δ 40.3 (C-7), δ 39.3 (C-1), δ 26.9 (C-12), δ 20.4 (C-6), δ 18.6 (C-2) y en δ 17.9 (C-11); así mismo, se apreciaron las señales de los carbonos cuaternarios en δ 45.3 (C-8), δ 37.7 (C-10) y δ 33.2 (C-4); los carbonos de grupos metilo se observaron en δ 33.6 (C-18), δ 24.5 (C-17), δ 21.5 (C-19) y δ 17.8 (C-20).

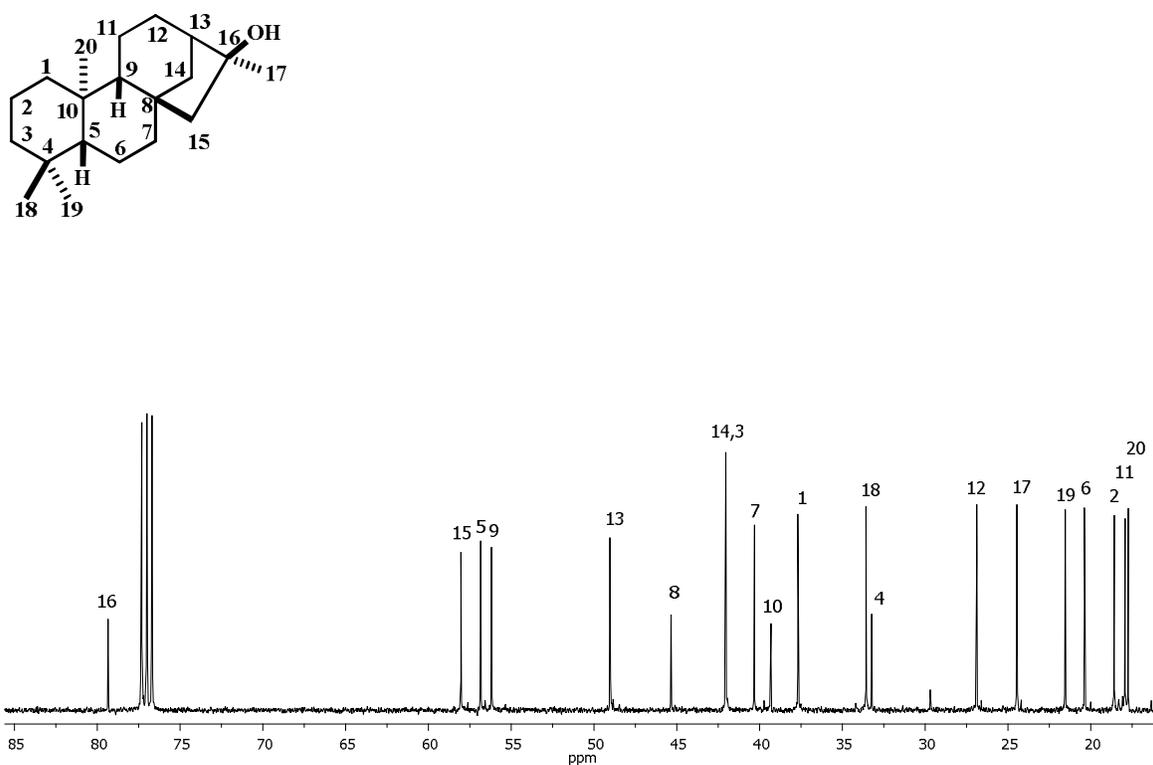


Figura 6.3.13. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del 16 β -hidroxikaurano (40).

Tabla 6.3.10. Comparación de los desplazamientos de RMN de ^{13}C del 16 β -hidroxikaurano (40) con la literatura (Pirek, 1984).

Carbono	Experimental (δ en ppm)	Reportado (δ en ppm)
1	37.7	37.88
2	18.6	18.76
3	42.1	42.27
4	33.2	33.50
5	56.8	56.47
6	20.4	20.61
7	40.3	40.61
8	45.3	45.50
9	56.2	57.15
10	39.6	39.60
11	17.9	18.13
12	26.9	27.05
13	49.0	49.30
14	42.0	42.27
15	58.0	58.47
16	79.4	79.35
17	24.5	24.52
18	33.6	33.69
19	21.5	21.69
20	17.6	17.88

En el experimento COSY (Figura 6.3.14) se observó la correlación de la señal en δ 1.93 perteneciente al H-1a con la señal múltiple en δ 1.53 la cual se asignó al H-1b; también se distinguió la correlación de la señal para el H-13 con la señal ubicada en δ 1.56, concerniente al H-12; así mismo, se apreció la correlación de la señal encontrada en δ 1.77 correspondiente a H-7a con la señal en δ 0.72 asignada para el H-7b; por otro lado, se ubicaron las correlaciones correspondientes al H-2a y H-2b con la señal triple de dobles ubicada en δ 1.11 correspondiente al H-3; el H-11 presentó correlación con el H-9 situado en δ 0.77.

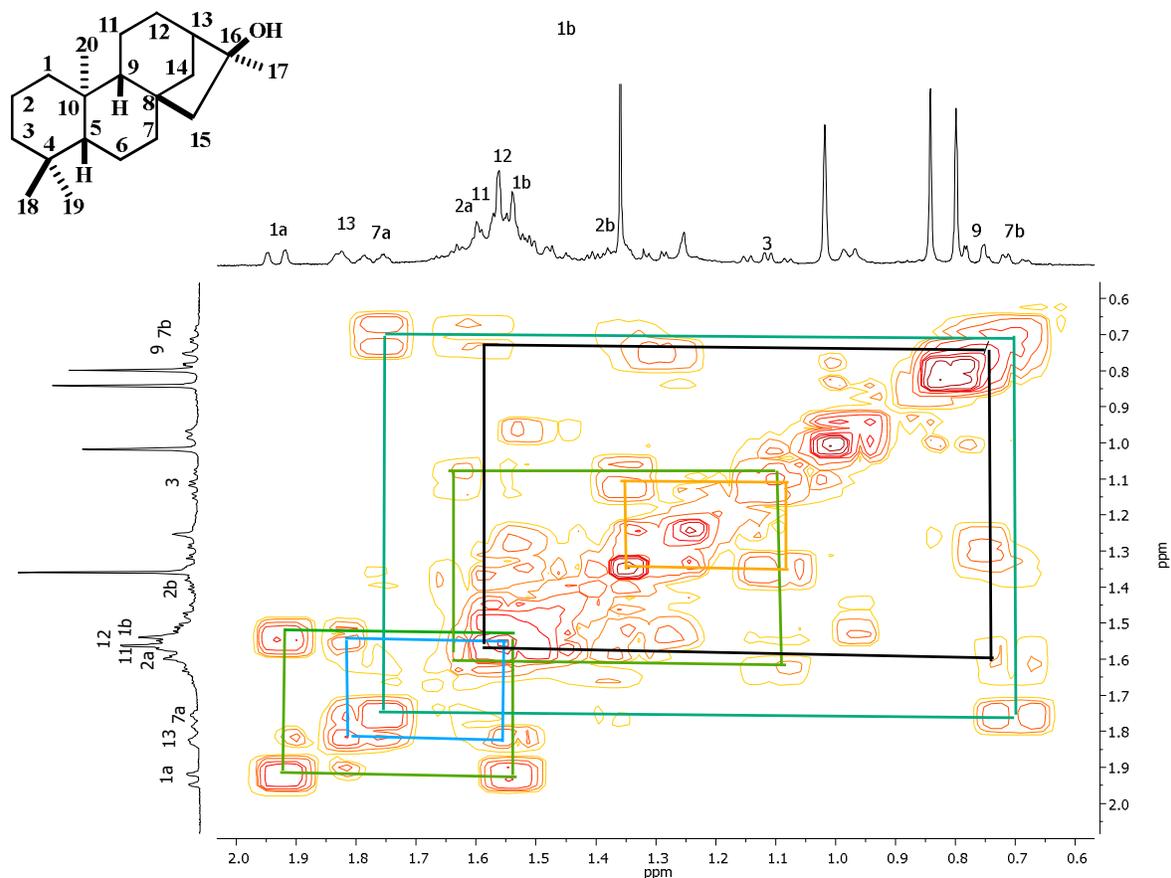


Figura 6.3.14. Experimento COSY del 16 β -hidroxikaurano (**40**).

El espectro HETCOR (Figura 6.3.15) mostró la correlación del C15 con los protones en δ 1.54; la señal del C-5 en δ 56.9 correlacionó con la señal doble ancha ubicada en δ 0.97 asignada al H-5; la señal en δ 56.2 correlacionó con la señal localizada en δ 0.77 asignada al H-9; adicionalmente, se observó la correlación del C-13 ubicada en δ 49.0 con la señal doble ancha localizada en δ 1.83 (H-13); el C-14 correlacionó con las señales múltiple y doble de dobles ubicadas en δ 1.55 y δ 1.30 asignadas a los protones H-14a y H-14b, respectivamente; el C-6 correlacionó con la señal ubicada en δ 1.51 perteneciente al H-6a y con la señal en δ 1.26 asignada al protón H-6b; los C-18, C-17 C-19 y C-20 correlacionaron con los hidrógenos metílicos en δ 0.84, 1.36, 0.80 y 1.02, respectivamente.

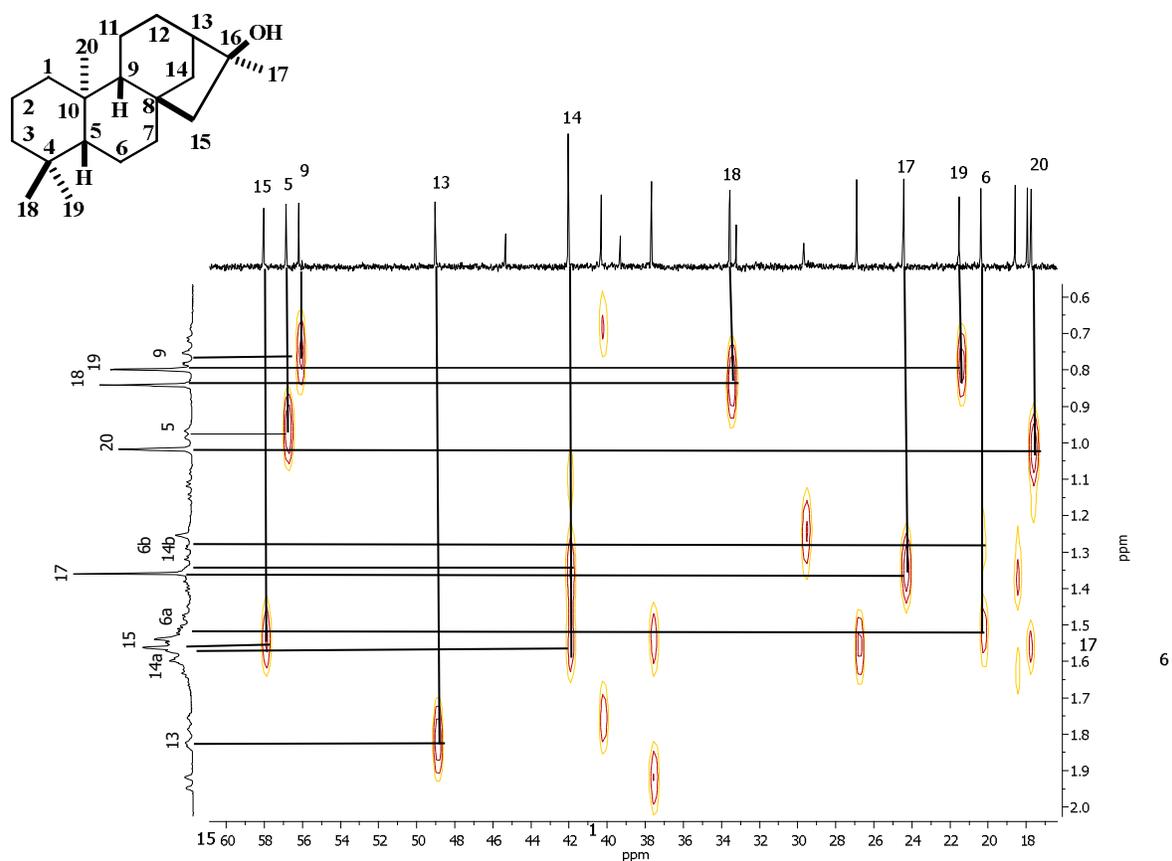
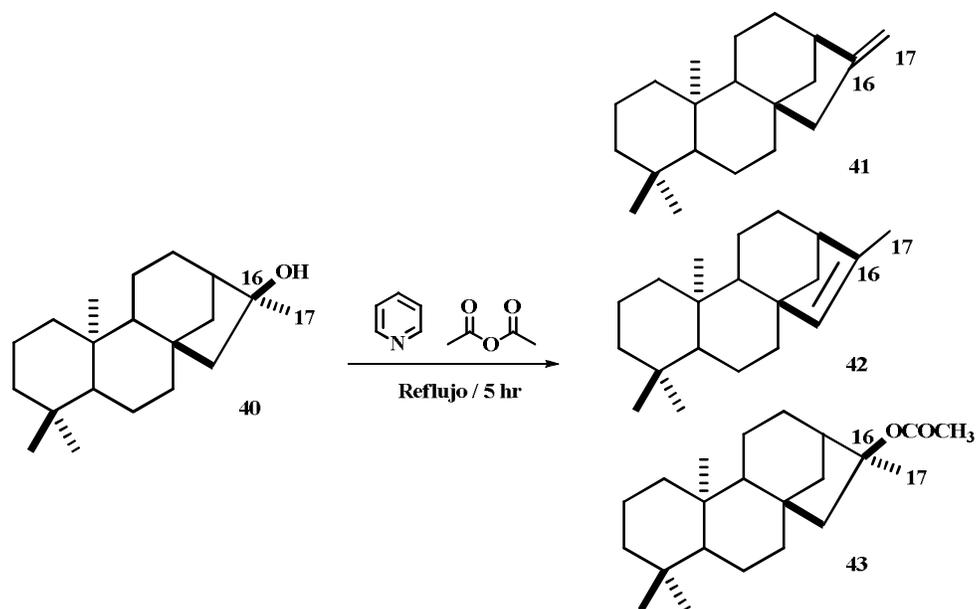


Figura 6.3.15. Espectro HETCOR del 16 β -hidroxikaurano (**40**).

El espectro de masa, la rotación específica ($[\alpha]_D^{25} = -34$), así como los datos de RMN de ^1H y ^{13}C fueron comparados con la literatura (Tablas 6.3.9 y 6.3.10) mostrando que se trataba del 16 β -hidroxikaurano (**40**) (Pyrek, 1984).

Para confirmar la naturaleza del grupo hidroxilo en el diterpeno **40** así como la asignación de sus señales por RMN de ^1H y de ^{13}C se realizó la reacción de acetilación empleando anhídrido acético y piridina. El crudo de reacción fue purificado mediante cromatografía en columna utilizando gel de sílice como fase estacionaria y como eluyente una mezcla de polaridad 19:1 hexanos-AcOEt, obteniendo tres productos de reacción Esquema de 6.3.1.



Esquema de 6.3.1. Acetilación del 16β-hidroxi-kaurano (40).

En la fracción 1-4 se obtuvo una sustancia cristalina la cual fue analizada por RMN de ¹H observándose que corresponde a la mezcla de alquenos **41** y **42** los cuales al ser isómeros estructurales presentan un *R_F* idéntico por lo que la separación se realizó en cromatografía preparativa impregnada con solución de AgNO₃ al 20% y como fase móvil una mezcla de 2:3 hexanos-AcOEt.

De este proceso se obtuvo a **41** como un sólido blanco. En su espectro de RMN de ¹H (Figura 6.3.16) se aprecian dos señales simples en δ 4.83 y δ 4.77 asignadas a los protones H-17a y H-17b, respectivamente; adicionalmente, a campo alto se observan tres señales simples correspondientes a grupos metilo en δ 1.06 (CH₃-20), δ 0.89 (CH₃-18), δ 0.85 (CH₃-19). El espectro de RMN de ¹³C (Figura 6.3.17) mostró 20 señales características de un esqueleto diterpénico, en el destacaron las señales en δ 156.2 (C-16) y δ 135.9 (C-17) correspondientes al doble enlace exocíclico, las señales restantes del diterpeno se ubicaron en la región alifática de δ 56.5 a δ 17.0. Estos datos se compararon con lo descrito en la literatura y se encontró que corresponden al diterpeno *ent*-kaureno (**41**) Tabla 6.3.1 (Pacheco *et al.*, 2009).

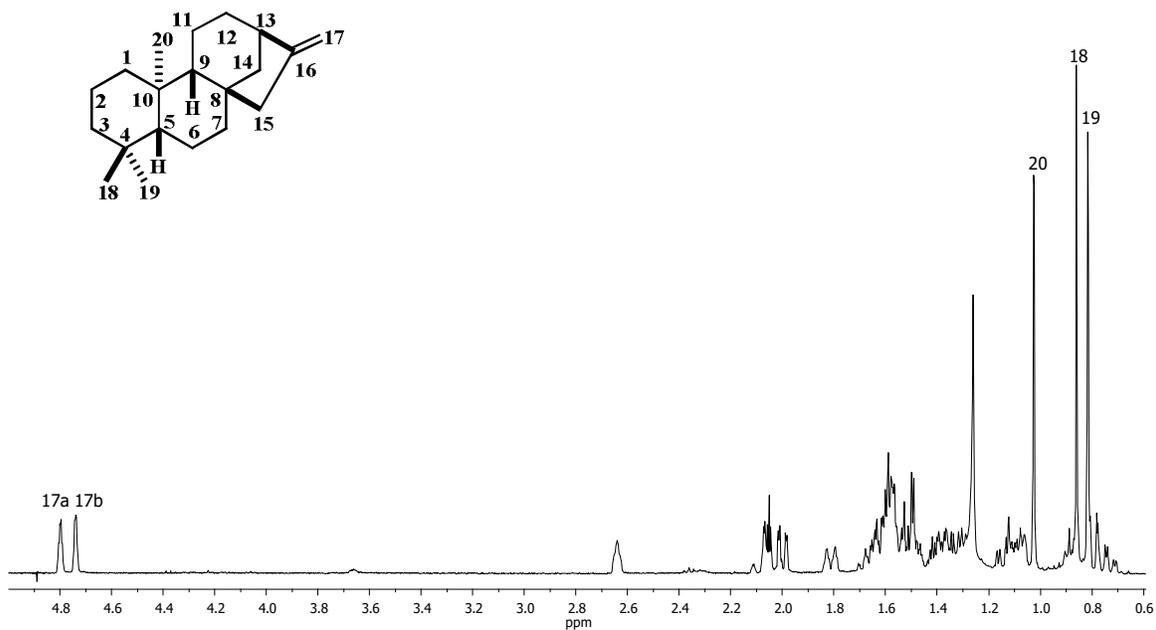


Figura 6.3.16. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del *ent*-kaureno (41).

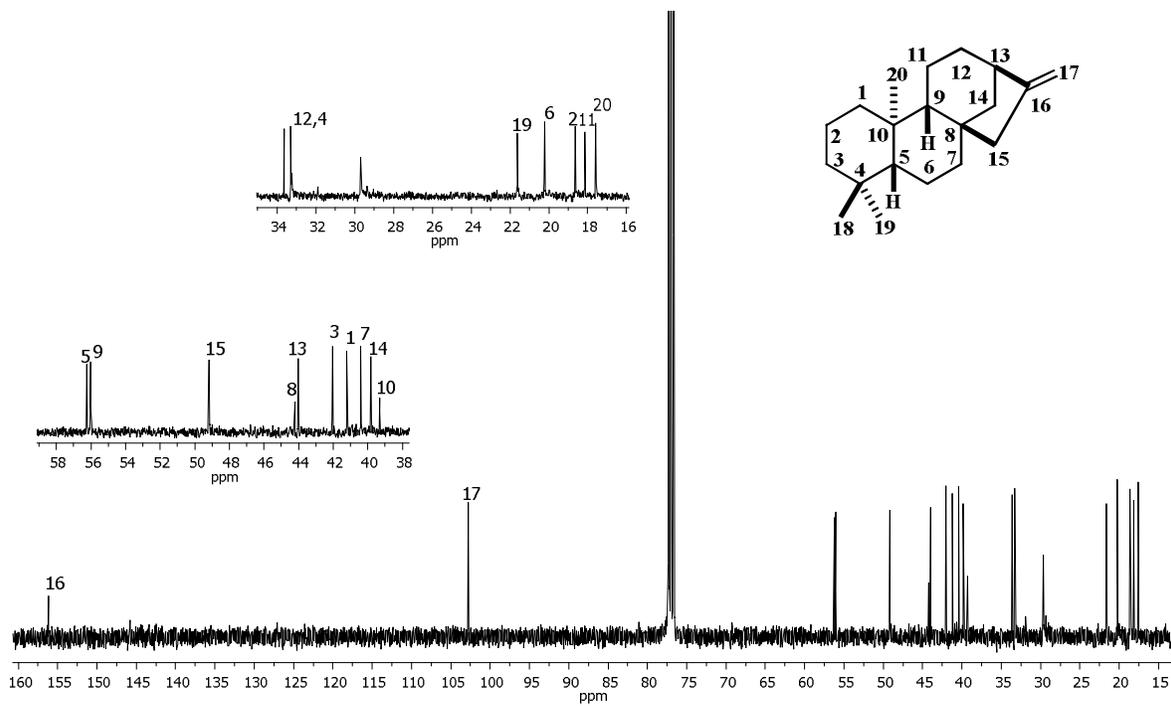


Figura 6.3.17. Espectro de RMN ¹³C a 100 MHz en CDCl₃ del *ent*-kaureno (41).

Tabla 6.3.11. Comparación de los desplazamientos de RMN de ^{13}C del *ent*-kaureno (**41**) con la literatura (Pacheco *et al.*, 2009).

Carbono	Experimental (δ en ppm)	Reportado (δ en ppm)
1	41.2	41.3
2	18.7	18.7
3	42.1	42.0
4	33.3	33.3
5	56.2	56.1
6	20.2	20.6
7	40.4	40.4
8	44.2	44.2
9	56.0	56.1
10	39.3	39.3
11	18.1	18.1
12	33.3	33.3
13	44.0	44.2
14	39.8	39.9
15	49.1	49.2
16	156.2	156.0
17	102.8	102.8
18	33.7	33.7
19	21.6	21.7
20	17.6	17.6

El compuesto **42** se obtuvo como un sólido blanco el cual presenta en su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.3.18) una señal simple en δ 5.06 correspondiente al protón del doble enlace endocíclico H-15; adicionalmente, en la región de los protones alifáticos se aprecian cuatro señales simples pertenecientes a los protones de los grupos metilos en δ 1.70 (CH_3 -17), δ 1.03 (CH_3 -20), δ 0.85 (CH_3 -18) y δ 0.80 (CH_3 -19). En su espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.3.19) se distinguen dos señales pertenecientes a carbonos sp^2 en δ 142.5 y δ 135.9 asignados al C-16 y C-15 pertenecientes al doble enlace endocíclico; el resto de las señales del esqueleto tetracíclico se aprecian entre δ 56.0 a δ 15.0. Con base a estos datos y por la comparación con otros compuestos de la misma naturaleza se estableció este compuesto como *ent*-isokaureno (**42**).

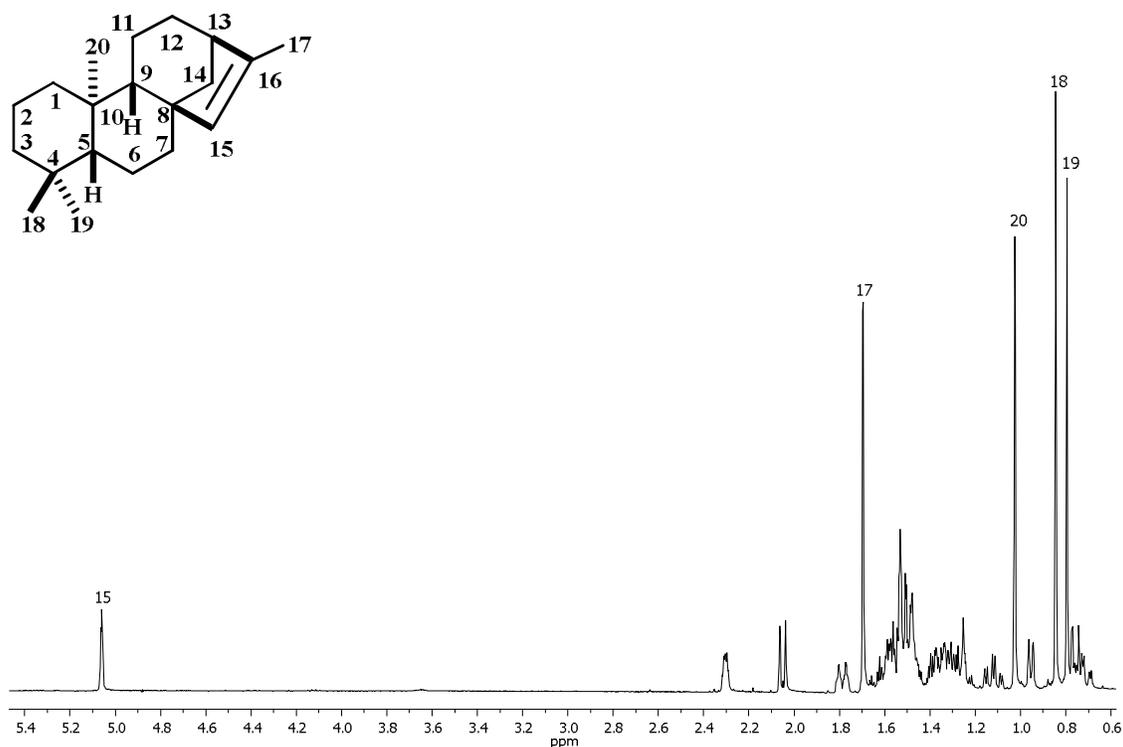


Figura 6.3.18. Espectro de RMN ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del *ent*-isokaureno (42).

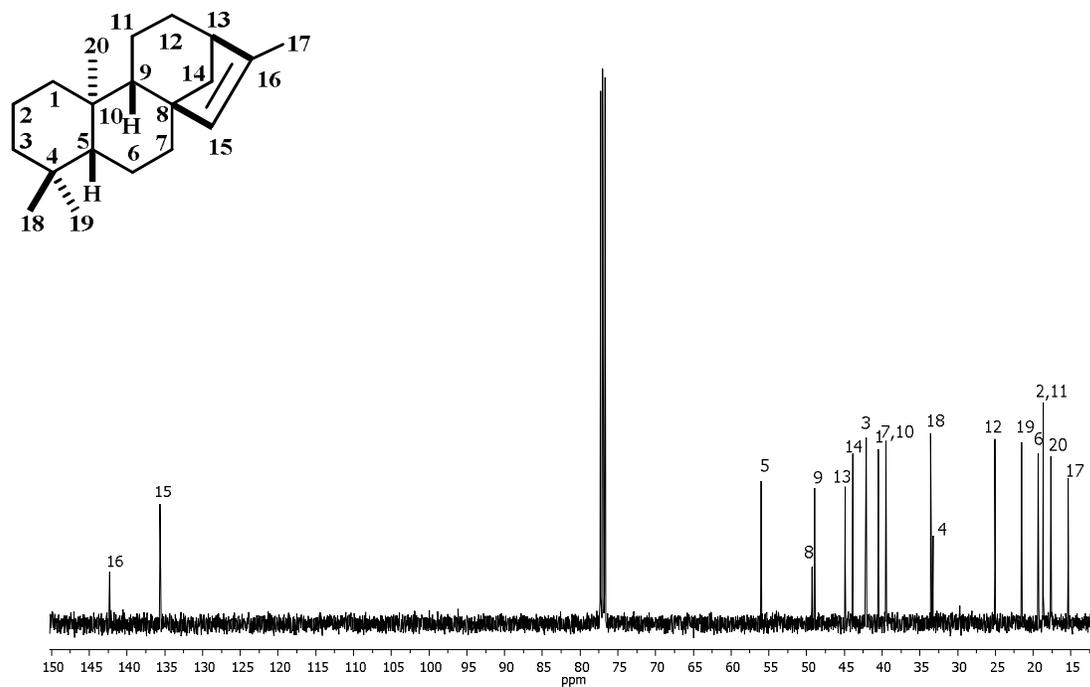


Figura 6.3.19. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del *ent*-isokaureno (42).

Tabla 6.3.12. Asignación propuesta del espectro de RMN de ^{13}C para el *ent*-isokaureno (42).

Carbono	Experimental (δ en ppm)
1	40.5
2	18.7
3	42.1
4	33.3
5	56.0
6	19.3
7	39.5
8	49.2
9	49.0
10	39.5
11	18.7
12	25.1
13	44.9
14	43.9
15	135.6
16	142.4
17	15.4
18	33.6
19	21.6
20	17.6

En la fracción 22-24 se obtuvo el compuesto **43** como un sólido cristalino. En su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.3.22), además de las señales observadas para el compuesto **40** se observa la aparición de la señal simple en δ 1.94 correspondiente al metilo del grupo acetato.

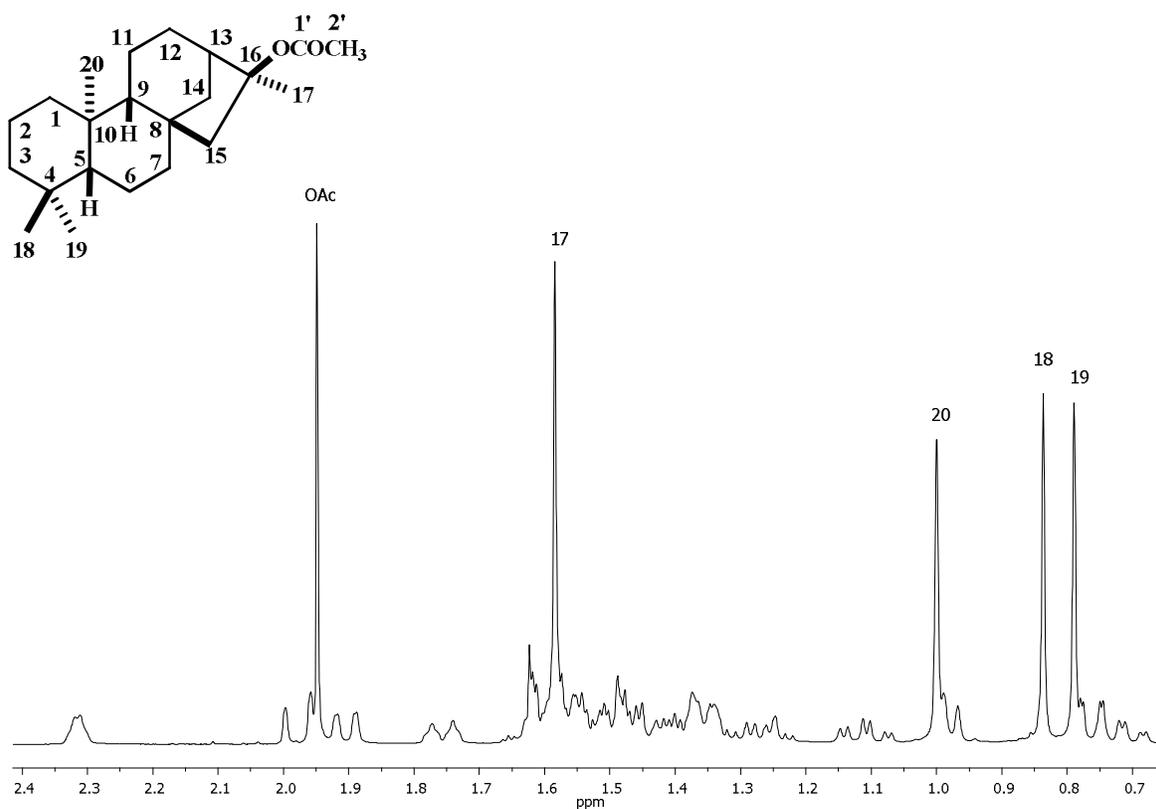


Figura 6.3.22. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del 16 β -acetoxikaurano (**43**).

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.3.23) se observa la aparición de la señal en δ 170.9 perteneciente al carbonilo del éster C-1'; el C-16 por otro lado sufrió un desplazamiento de δ 79.3 a δ 90.8 debido a que ahora pertenece a una base de éster; en δ 19.8 se adiciona la señal para el C-2' asignada al grupo metilo del acetato.

Con ayuda del experimento DEPT se ubicaron los metinos en δ 56.5 (C-9), δ 56.1 (C-5) y δ 45.5 (C-13); los metilenos en δ 55.6 (C-15), δ 42.0 (C-3), δ 41.9 (C-7), δ 40.1 (C-1), δ 37.5 (C-14), δ 26.2 (C-12), δ 20.4 (C-6), δ 18.6 (C-11) y en δ 18.0 (C-11); finalmente los carbonos de grupos metilo se observaron en δ 33.7 (C-18), δ 22.8 (C-2'), δ 21.5 (C-19), δ 19.8 (C-17) y δ 17.7 (C-20). Por consiguiente, los carbonos cuaternarios se aprecian en δ 90.8 (C-16), δ 44.7 (C-8), δ 39.3 (C-10), δ 33.2 (C-4) Tabla 6.3.3.

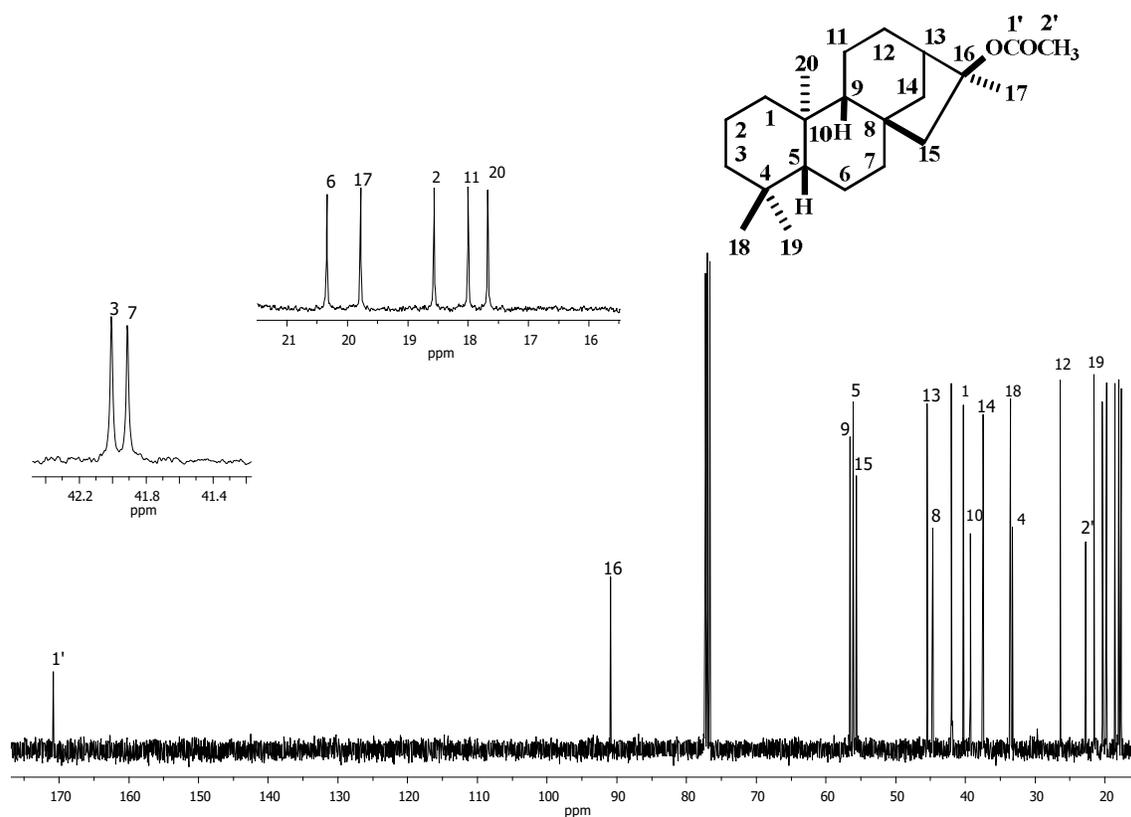


Figura 6.3.23. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz en CDCl₃ del 16β-acetoxikaurano (43).

Tabla 6.3.13. Comparación de los desplazamientos de RMN de ^{13}C del 16 β -acetoxikaurano (**43**) con la literatura (Patra *et al.*, 1980).

Carbono	Experimental (δ en ppm)	Reportado (δ en ppm)
1	40.3	40.2
2	18.6	18.5
3	42.0	42.0
4	33.2	33.1
5	56.1	56.0
6	20.3	20.3
7	42.0	41.9
8	44.7	44.6
9	56.5	56.5
10	39.3	39.2
11	18.0	17.9
12	26.4	29.6
13	45.5	45.4
14	37.5	37.4
15	55.6	55.6
16	90.9	90.7
17	19.8	19.7
18	33.6	33.6
19	21.5	21.4
20	17.7	17.9
1'	170.8	170.5
2'	22.8	20.3

En el experimento NOESY se apreció la correlación entre la señal del CH₃-17 ubicada en δ 1.59 con la señal doble ancha en δ 2.31 correspondiente al H-13 y con la señal simple en δ 1.00 correspondiente al CH₃-20 esta señal a su vez correlaciona con el CH₃-19 situada en δ 0.79. De esta manera podemos proponer la estereoquímica beta para el grupo acetilo en el compuesto **43**, Figura 6.6.24.

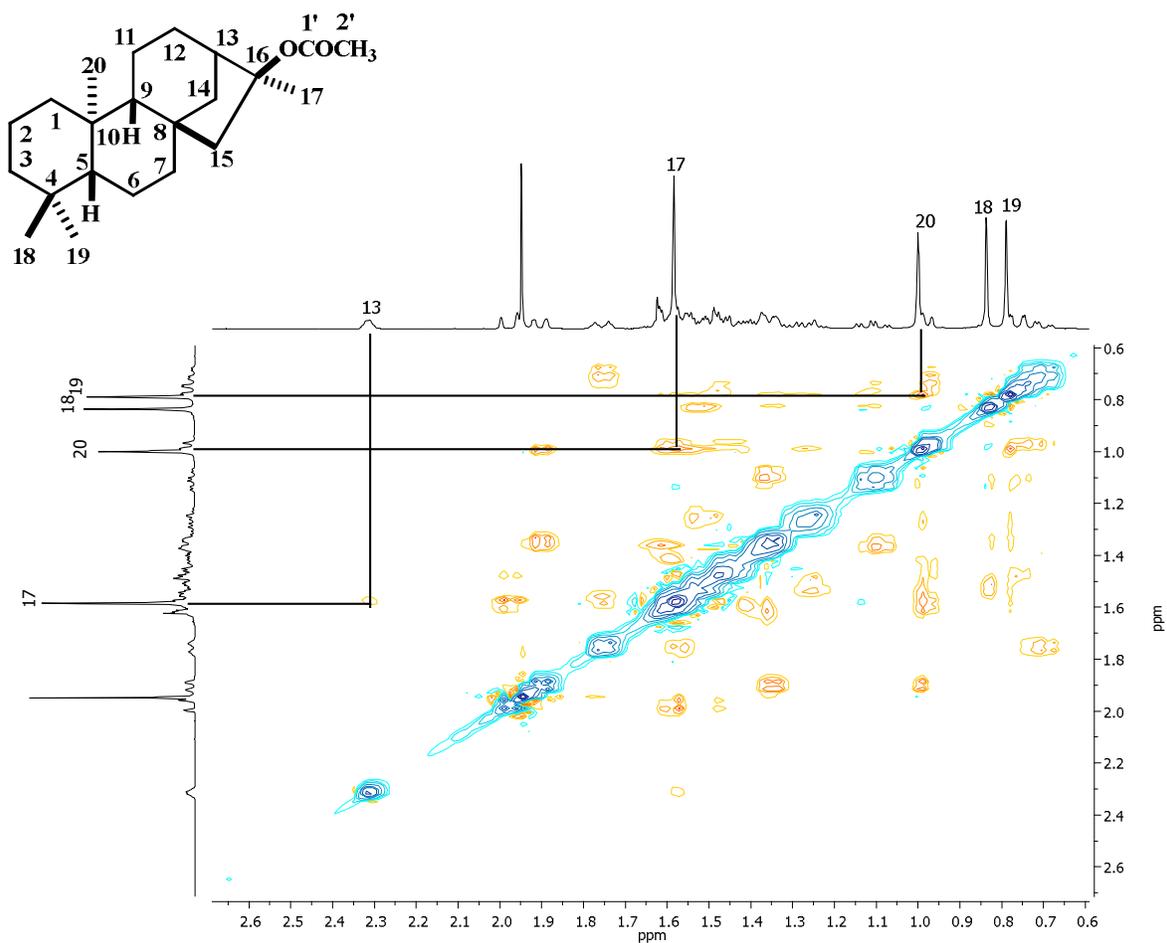


Figura 6.3.24. Experimento NOESY del 16 β -acetoxikaurano (**43**).

El experimento HETCOR (Figura 6.3.23) se observa la correlación de la señal en δ 56.5 con la señal doble ubicada en δ 0.98 asignada al protón H-9; el C-5 ubicado en δ 56.1 presenta correlación con la señal doble de dobles en δ 0.76 (H-5); la señal concerniente al C-13 correlaciona con la señal doble en δ 2.32 (H-13); la señal en δ 40.3 referente al C-1 correlaciona con la señal doble ancha ubicada en δ 1.76 (H-1a) y con la señal doble de dobles localizada en δ 0.70 (1H-1b); adicionalmente, se observa la correlación de la señal localizada en δ 37.5 con la señales pertenecientes a los protones H-14a situada en δ 1.90 y H-14b ubicada en δ 1.36; los C-18, C-2', C-19, C-17 y C-20 correlacionan con las señales de los protones metílicos en δ 1.95, δ 1.59, δ 1.00, δ 0.84 y δ 0.79, respectivamente. Estos datos fueron comparados con lo reportado para el epímero 16 α -acetoxikaurano (Patra *et al.*, 1980) donde se aprecian diferencias en los desplazamientos de C-12 y C-2', lo que sugiere la posición β del grupo acetoxi. Cabe destacar que no existe reporte de datos para el compuesto **43** por lo que resulta un derivado novedoso.

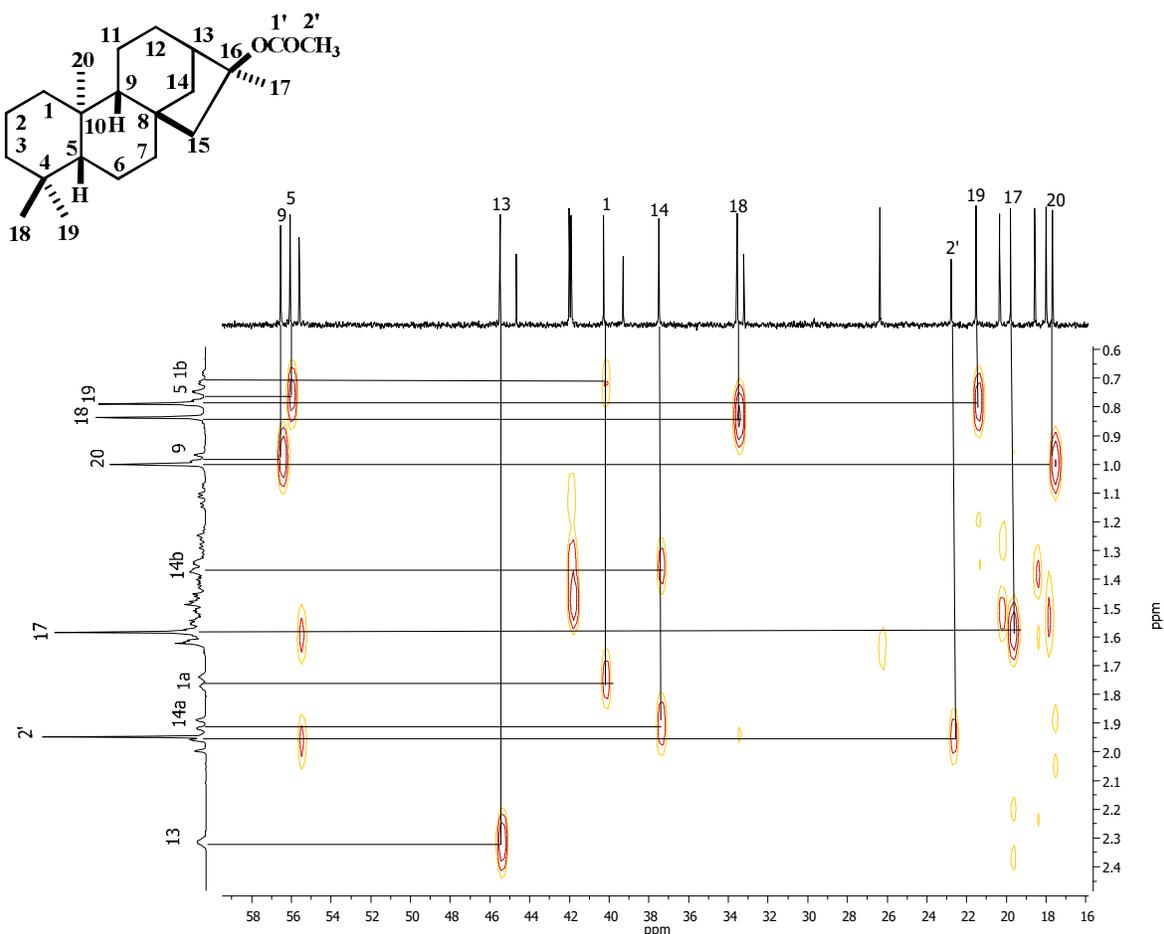


Figura 6.3.25. Experimento HETCOR del 16 β -acetoxikaurano (**43**).

6.4. Análisis químico del extracto hexánico de hojas

Tres lotes de hojas de la especie vegetal, se secaron a la sombra y posteriormente se molieron, la extracción se llevó a cabo con mezcla de hexanos mediante maceración y reflujo de acuerdo a la tabla 6.4.1.

Tabla 6.4.1. Extractos obtenidos de los tallos de *Perymenium bupthalmoides*.

Lote	Peso de las hojas en (g)	Método de extracción	Tiempo (h)	Peso del de extracto en (g)
2011	147	Maceración	72	1.5
2013	165	Reflujo	6	2.8
2014	200	Reflujo	6	2.8

En el análisis inicial se obtuvo el espectro de RMN de ^1H del extracto hexánico de hoja (Figura 6.4.1) en el cual se distinguen señales en el región de los protones vinílicos de δ 5.65 a δ 4.50 a sí como señales en la región de los protones alifáticos destacando la señal simple en δ 1.25 asignada a metilenos pertenecientes a cadenas de ácidos grasos.

Los extractos presentaron los mismos componentes por lo cual fueron unidos obteniendo 7.1 g de muestra. La separación se realizó en cromatografía en columna de 4 cm de diámetro por 15 cm de altura utilizando gel de sílice malla 230-400 y como eluente mezclas de hexanos-AcOEt en polaridad ascendente.

La cromatografía en columna fue monitoreada mediante cromatografía analítica utilizando el mismo sistema de disolventes. Las fracciones eluidas también se analizaron por RMN de ^1H .

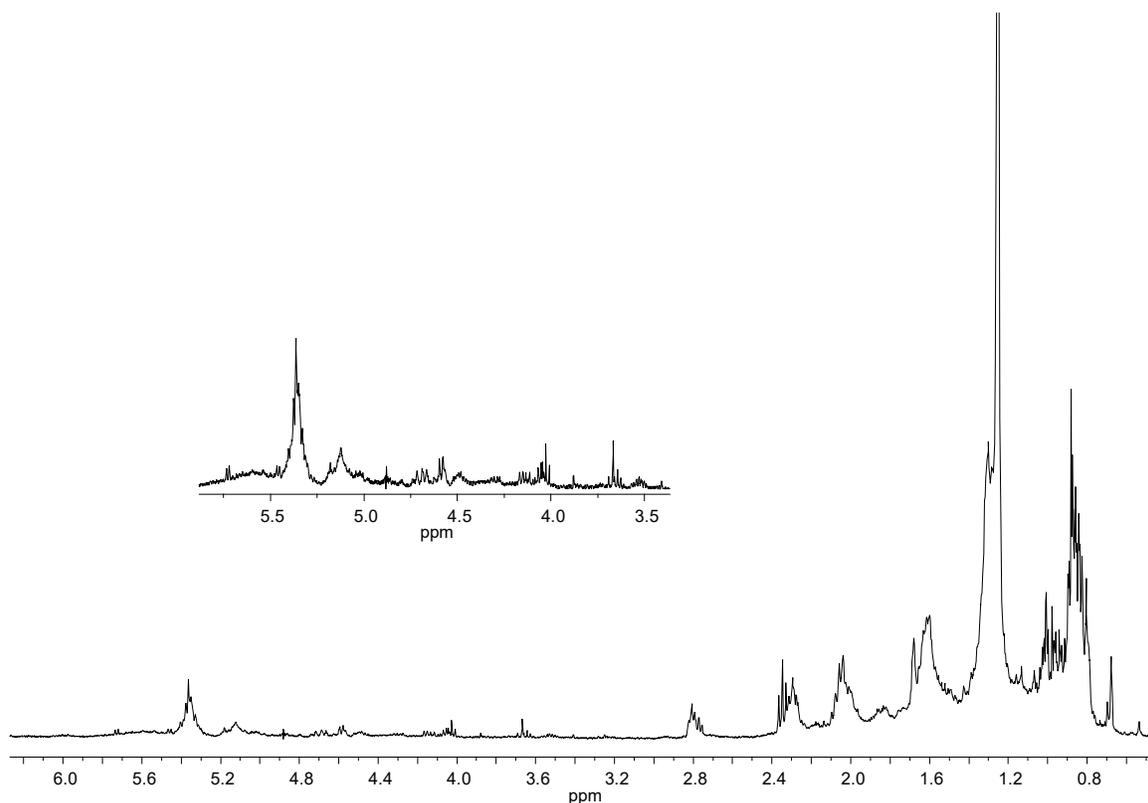


Figura 6.4.1. Espectro de RMN ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto hexánico de hojas de *Perymenium bupthalmoides*

La separación cromatográfica de la fracción 7 (obtenida a polaridad 1:1 hexanos-AcOEt) se realizó empleando gel de sílice y un sistema de elución hexanos-AcOEt 17:3, las fracciones 15-19 se recromatografiaron con mezclas de hexanos-AcOEt en orden creciente de polaridad como eluyente. En la fracción 7 (19:1 hexanos-AcOEt) se obtuvo un polvo blanco el cual se purificó por cromatografía preparativa impregnada con solución de AgNO_3 al 20%. Este proceso permitió la separación de un sólido blanco.

En su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.4.2) se observaron dos juegos de señales en proporción 2:1, destacando dos señales triples en δ 5.19 y δ 5.14 con una constante de acoplamiento de 4.0 Hz pertenecientes a los protones vinílicos H-12 y H-12'; así mismo en δ 3.24 se ubicó una señal doble de dobles asignada al protón base de oxhidrilo H-3; de igual manera en la región de los protones alifáticos se apreciaron señales de alta intensidad correspondientes a las señales de los protones del grupo metilo en δ 1.15 (H-27), δ 1.08 (H-27'), δ 1.08 (H-27), δ 1.02 (H-29'), δ 1.01 (H-28-28'), δ 0.98 (H-24), δ 0.97 (H-26'), δ 0.95 (H-29), δ 0.92 (H-23'), δ 0.88 (H-26-30), δ 0.84 (H-23), 0.81 (H-24-25-25'-30').

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.4.3.), se observaron las señales correspondientes a un compuesto de naturaleza triterpénica, destacando las señales en δ 145.2 y δ 121.7 correspondientes a los carbonos sp^2 C-13 y C-12, respectivamente; así mismo se aprecian las señales de los carbonos sp^2 presentes en δ 139.6 asignada al C-13' y δ 124.4 (C-12'), por otra parte el carbono base de hidroxilo se sitúa en δ 79.0 las señales asignadas al esqueleto pentacíclico se ubican en δ 59.1 a δ 15.5 (Tabla 6.4.2).

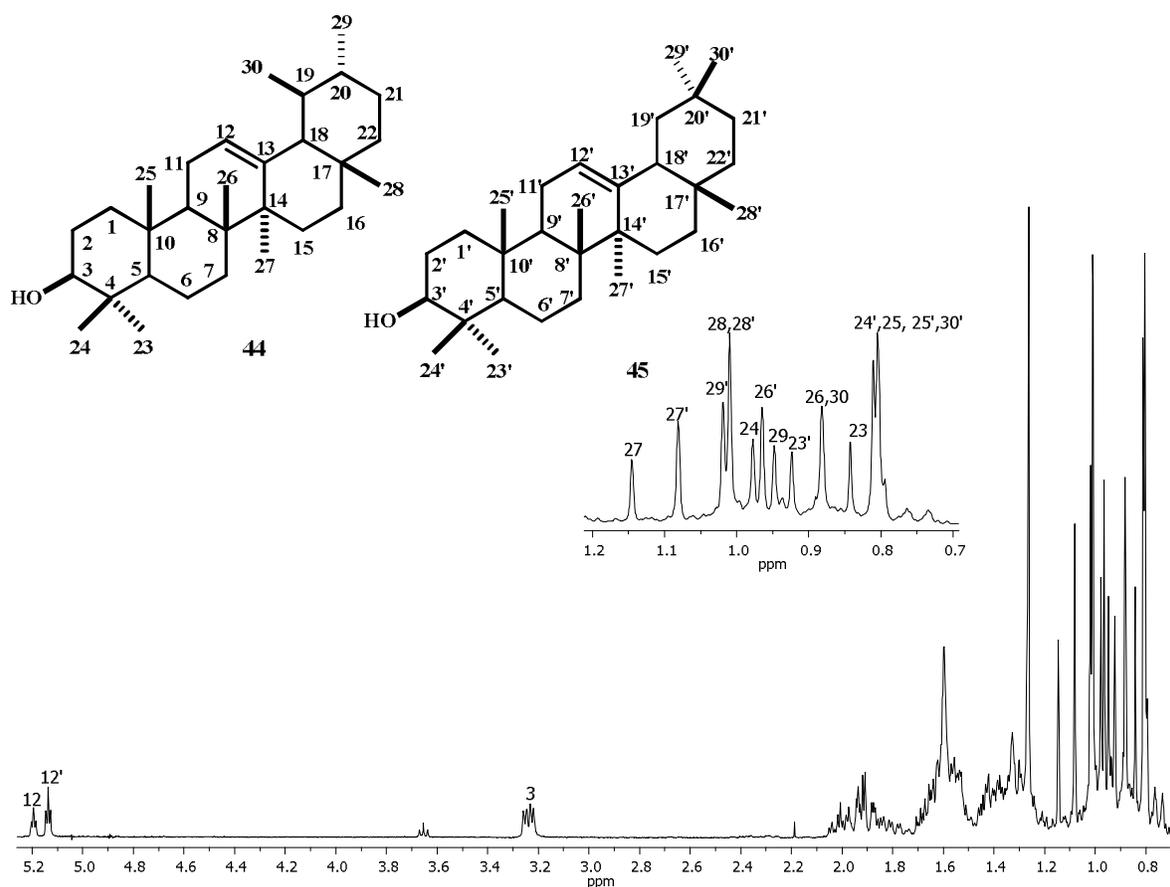


Figura 6.4.2. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del α -amirina (**44**) y β -amirina (**45**).

Como parte de la caracterización de la mezcla triterpénica se analizó por cromatografía de gases acoplado a EM lo que permitió confirmar la presencia de dos componentes mostrando un ion molecular de 426 m/z para cada uno de los compuestos, Figura 6.4.3 y Figura 6.4.4. Estos datos fueron comparados con lo descrito y se concluyó que se trataba de una mezcla constituida por el triterpeno de tipo ursalano la α -amirina (**45**) y de tipo oleanano la β -amirina (**46**) Tabla 6.4.2 (Mahato *et al.*, 1994, Oliveira *et al.*, 2011, Suarez *et al.*, 2009).

Tabla 6.4.2. Comparación de desplazamientos de RMN de ^{13}C de la α -amirina (**44**) y de β -amirina (**45**) (Mahato *et al.*, 1994).

Carbono	Experimental (δ en ppm) α-amirina	Reportado (δ en ppm) α-amirina	Experimental (δ en ppm) β-amirina	Reportado (δ en ppm) β-amirina
1	38.6	38.7	38.6	38.7
2	27.3	27.2	27.4	27.3
3	79.0	78.3	79.1	79.0
4	38.8	38.8	38.8	38.8
5	55.2	55.2	55.2	55.3
6	18.4	18.3	18.4	18.5
7	33.0	32.9	32.7	32.8
8	40.0	40.0	38.8	38.8
9	47.7	47.7	47.7	47.7
10	36.9	36.9	37.2	37.6
11	23.3	23.3	23.5	23.6
12	124.4	124.3	121.7	121.6
13	139.6	139.3	145.2	145.1
14	42.1	42.0	41.8	41.8
15	28.8	28.7	26.2	26.2
16	26.6	26.6	27.0	27.0
17	33.8	33.7	32.5	32.5
18	59.1	58.9	42.3	47.4
19	39.7	39.6	46.9	46.9
20	39.6	39.6	31.1	31.1
21	31.3	31.2	34.8	34.8
22	41.5	41.5	37.2	37.2
23	28.1	28.1	28.1	28.2
24	15.6	15.6	15.5	15.5
25	15.7	15.6	15.6	15.6
26	16.8	16.8	16.9	16.9
27	23.4	23.3	26.0	26.0
28	28.1	28.1	28.4	28.4
29	17.5	17.4	33.3	33.3
30	21.4	21.3	23.7	23.7

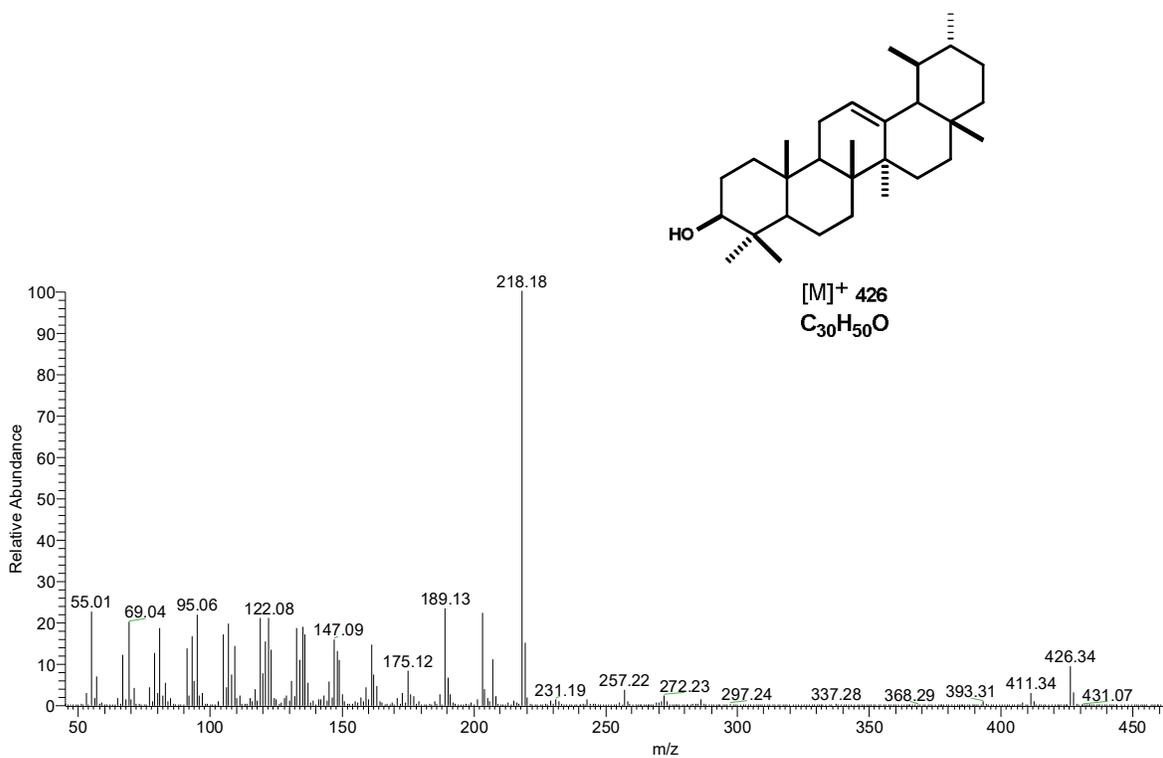


Figura 6.4.3. Espectro de masa de la α -amirina (44).

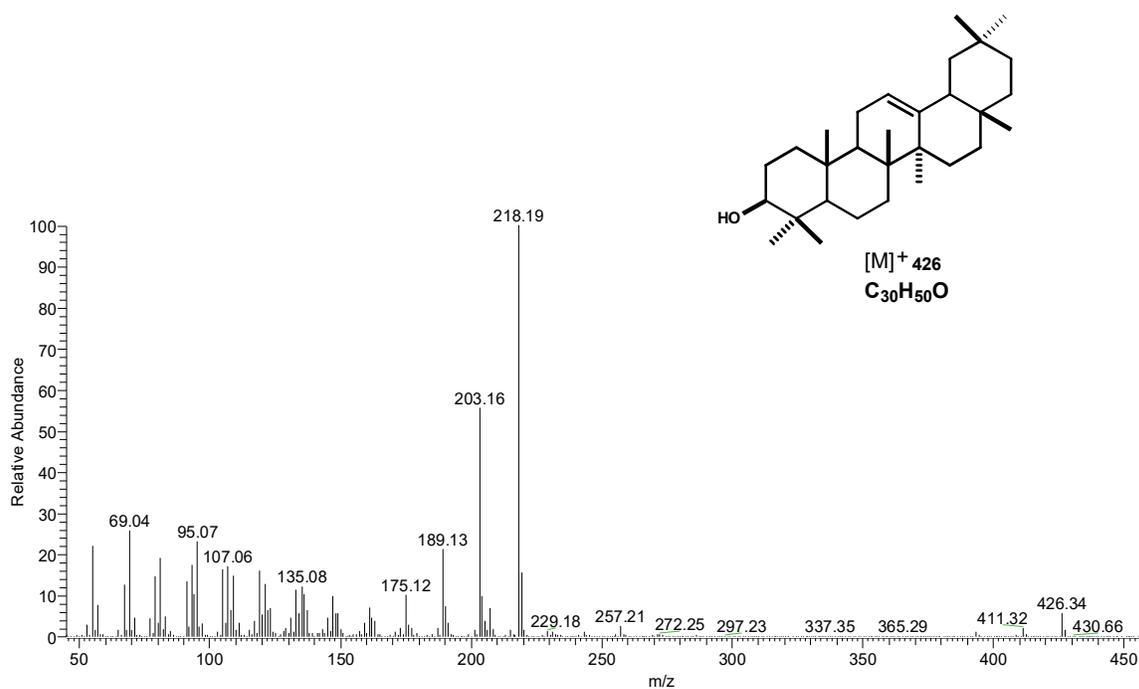


Figura 6.4.4. Espectro de masa de la β amirina (45).

De la cromatografía preparativa impregnada con solución de AgNO_3 al 20% adicionalmente se obtuvo el compuesto **46**.

En su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.4.5) se apreciaron la señales correspondientes al doble enlace terminal δ 4.69 la señal doble con una constante de acoplamiento de 2.2 Hz en correspondiente al protón olefinico H-29a de la misma forma se observa en δ 4.56 la señal doble de dobles asignada al H-29b; adicional a esto se ubicó al protón base de hidroxilo en δ 3.20 perteneciente al H-3 y en δ 2.37 la señal múltiple asignada la H-19; por otro lado se observaron siete señales simples pertenecientes a los grupos metilo en δ 1.67 (CH_3 -30), δ 1.02 (CH_3 -28), δ 0.96 (CH_3 -27), δ 0.93 (CH_3 -26), δ 0.82 (CH_3 -25), δ 0.78 (CH_3 -24), δ 0.75 (CH_3 -23). Con estos datos y por igualdad a lo descrito se determinó que se trataba del triterpeno conocido como lupeol (**46**) (Gómez, 2011).

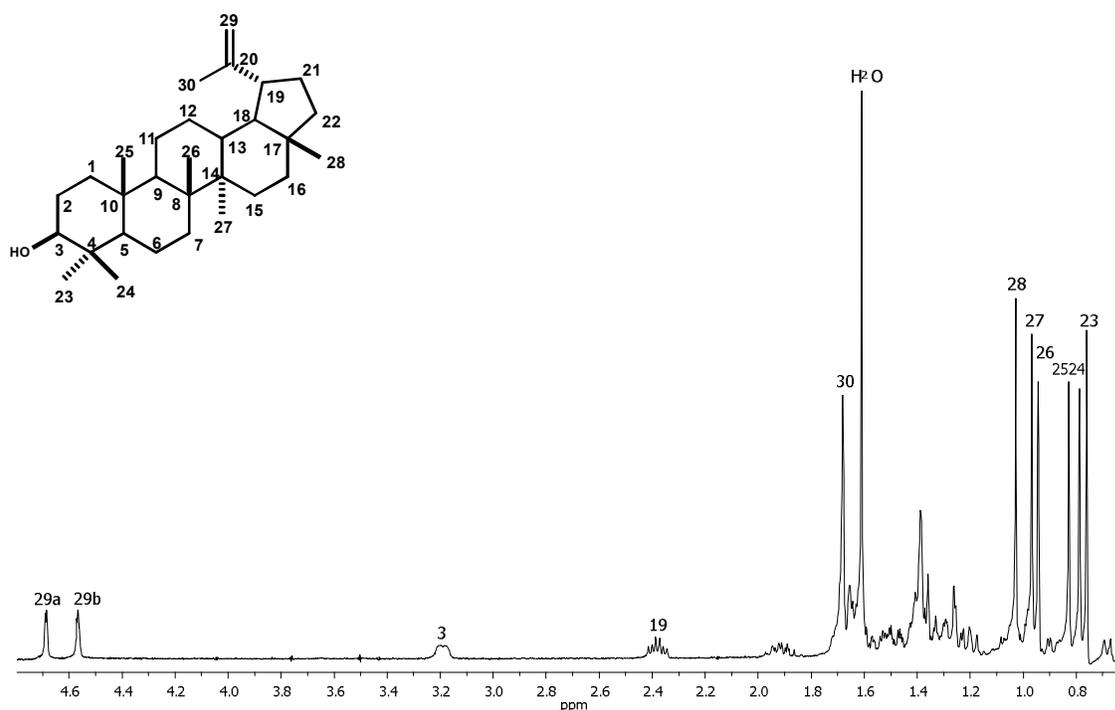


Figura 6.4.5. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del lupeol (**46**).

Las fracciones 22-27 obtenidas de la cromatografía de la fracción 7 del extracto total se obtuvo una sustancia cristalina la cual tras sucesivos lavados con hexanos fue purificada.

Dicha sustancia de aspecto cristalino presentó en el análisis de RMN de ^1H (Figura 6.4.6) en δ 5.34 una señal doble $J = 5.2$ Hz asignada al protón H-6 y H-6'; en δ 5.14 y δ 5.01 se apreció la señal doble de dobles con $J = 15.2$ y 8.4 Hz, asignada a los protones vinílicos H-22 y H-23, respectivamente; adicionalmente se distinguió la señal múltiple en δ 3.53, correspondiente al protón base del oxhidrilo H-3 y H-3'. La presencia de señales de alta intensidad a campo alto indicó la presencia de grupos metilo en δ 1.01 (CH_3 -21'); δ 1.00 (CH_3 -19- CH_3 -19'), δ 0.91 (CH_3 -21'), δ 0.85 (CH_3 -27') δ 0.84 (CH_3 -29- CH_3 -29'), δ 0.82 (CH_3 -27), δ 0.79 (CH_3 -27'), δ 0.69 (CH_3 -18), δ 0.68 (CH_3 -18').

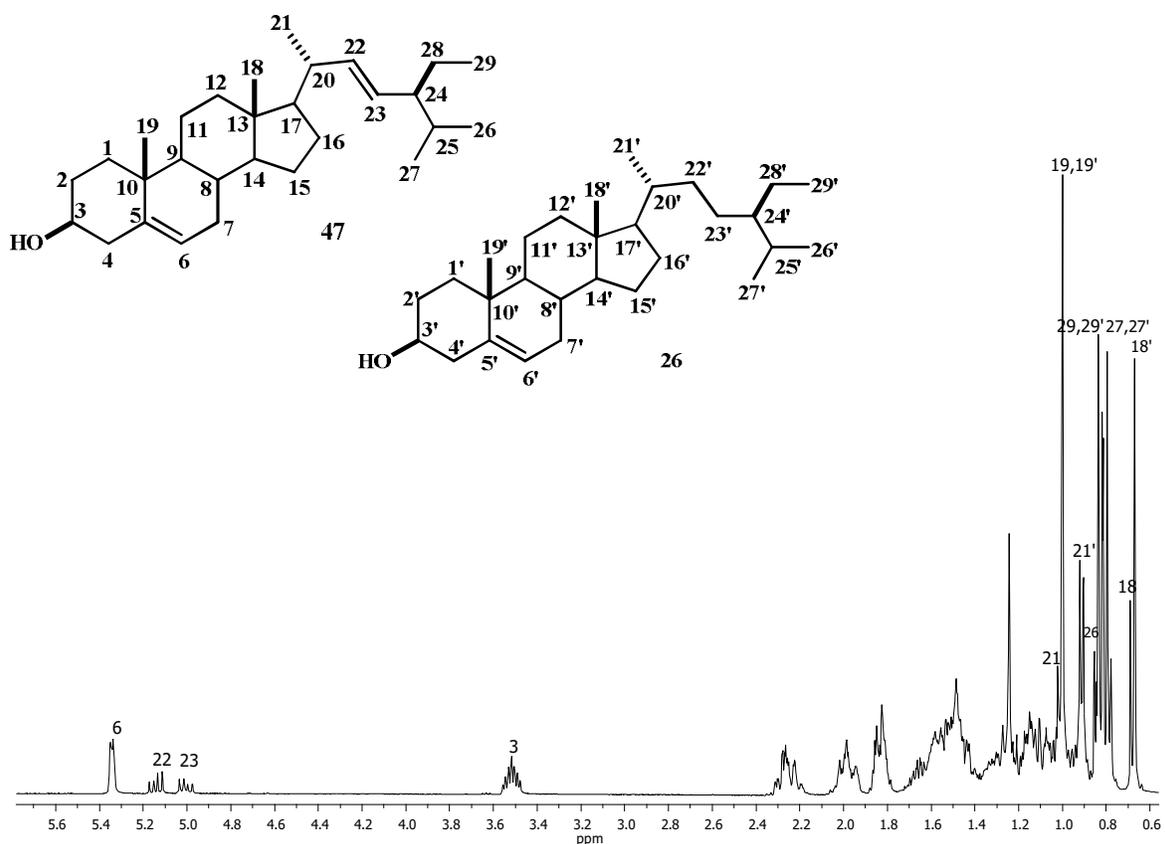


Figura 6.4.6. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del estigmasterol (47) y β -sitosterol (26).

Tabla 6.4.4. Comparación de desplazamientos de RMN de ^{13}C de estigmasterol (**47**) y β -sitosterol (**26**). (Isah *et al.*, 2012, Nes *et al.*, 1992).

Carbono	Experimental (δ en ppm) estigmasterol	Reportado (δ en ppm) estigmasterol	Experimental (δ en ppm) β -sitosterol	Reportado (δ en ppm) β -sitosterol
1	37.2	37.3	37.2	37.2
2	31.7	31.6	31.7	31.6
3	71.8	71.8	71.8	71.8
4	42.3	42.3	42.3	42.5
5	140.7	140.8	140.7	140.8
6	121.7	121.7	121.7	121.7
7	31.9	31.9	31.9	31.8
8	31.9	31.9	31.9	31.9
9	51.1	51.2	50.1	50.1
10	36.5	39.5	36.5	36.5
11	21.2	21.1	21.2	21.1
12	39.7	39.7	39.7	39.7
13	42.3	42.3	42.3	42.3
14	56.9	56.8	56.7	56.7
15	24.2	24.4	24.2	24.3
16	28.9	28.4	28.2	28.2
17	56.0	56.1	55.9	56.0
18	11.9	12.1	11.9	11.9
19	19.4	21.2	19.4	19.4
20	40.5	40.5	36.2	36.1
21	21.1	21.2	18.8	18.8
22	138.4	138.3	33.9	33.9
23	129.3	129.3	26.0	26.0
24	50.1	50.2	45.8	45.8
25	31.9	31.9	31.56	29.1
26	21.2	21.2	21.09	19.8
27	19.0	19.0	19.0	19.1
28	25.4	25.4	23.1	23.0
29	12.3	12.1	12.0	12.0

El análisis de cromatografía de gases acoplado a EM muestra el ion molecular de 412 m/z para el compuesto **47** (Figura 6.4.7) y el ion molecular de 414 m/z para el compuesto **26** (Figura 6.4.8). De acuerdo a la literatura estos datos corresponden a la mezcla de fitoesteros de estigmasterol (**26**) y β -sitosterol (**47**), la diferencia entre estos

dos compuestos radica en la presencia del doble C22=C23 en estigmasterol (**47**) y C22-C23 enlace sencillo en el β -sitosterol (**26**) lo cual puede ser apreciado en el análisis de EM.

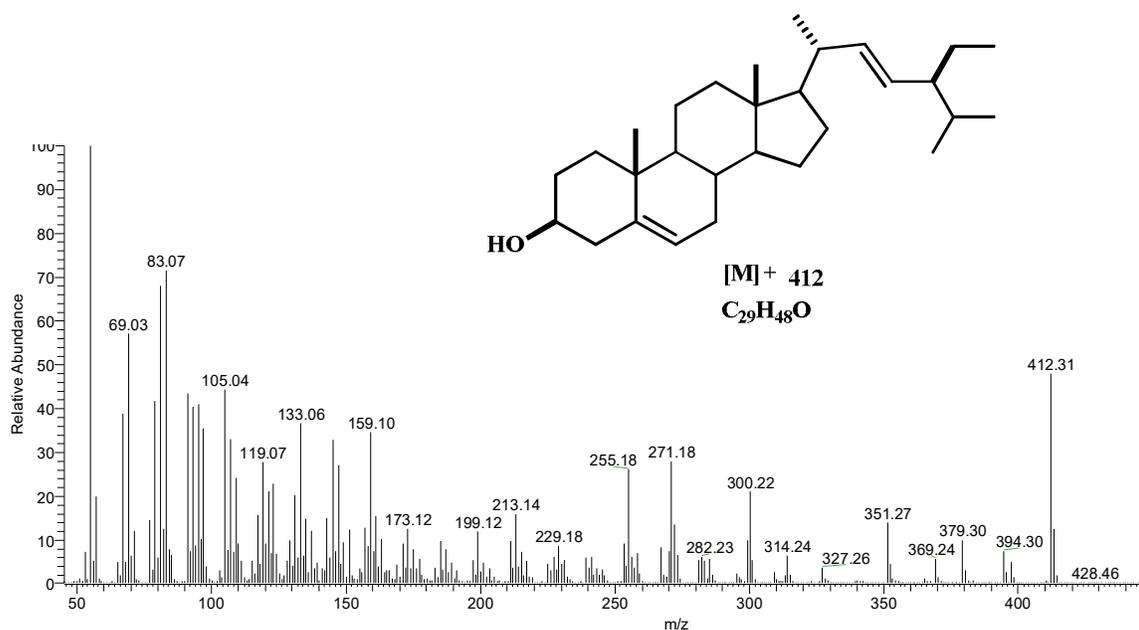


Figura 6.4.7. Espectro de masa del estigmasterol (**47**).

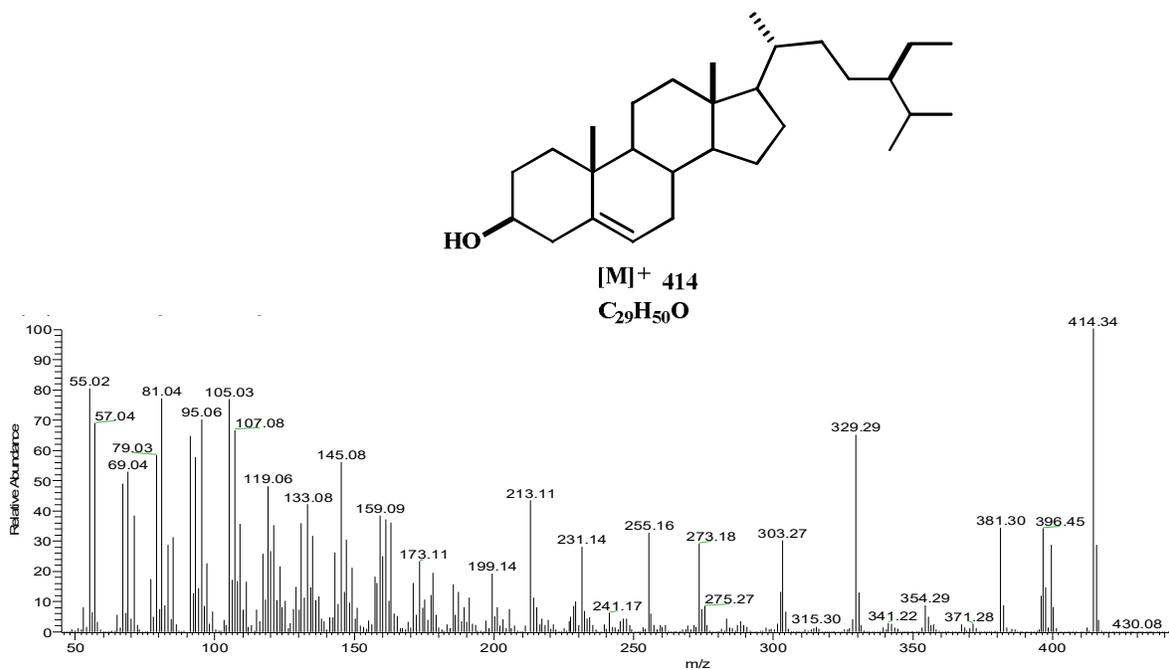


Figura 6.4.8. Espectro de masa del β -sitosterol (**26**).

6.5. Análisis químico del extracto hexánico de tallos

Los tallos de tres lotes de *Perymenium bupthalmoides*, se secaron a la sombra, se molieron y posteriormente se extrajeron empleando mezcla de hexanos de acuerdo a los datos de la tabla 6.5.1.

Tabla 6.5.1. Extractos obtenidos de los tallos de *Perymenium bupthalmoides*

Lote	Peso del tallo en (g)	Método de extracción	Tiempo (h)	Peso del de extracto en (g)
2011	115	Maceración	72	0.70
2013	95	Reflujo	6	0.74
2014	105	Reflujo	6	0.86

Para realizar el análisis preliminar se obtuvo el espectro de RMN de ^1H del extracto hexánico de tallo (Figura 6.5.1) en el cual se pueden observar señales en el región de los protones de enlaces dobles de δ 5.65 a δ 4.50 a sí como señales en la región de los protones alifáticos destacando la señal simple en 1.20 ppm lo que indicó la presencia de ácidos grasos como componente mayoritario. Sin embargo, en la región de los protones vinílicos se observan señales correspondientes a esqueleto de beyerano.

Tras observar la presencia de los mismos componentes se unieron los extractos, obteniendo 2.4 g del mismo el cual fue separado mediante columna cromatográfica de 3 cm de diámetro por 15 cm de altura utilizando gel de sílice malla 230-400 como fase estacionaria y mezclas de hexanos-AcOEt en orden ascendente de polaridad como eluente obteniéndose 11 fracciones. La cromatografía en columna fue monitoreada por medio de cromatografía en capa fina utilizando el mismo sistema de disolventes. Las fracciones eluidas también se analizaron por RMN de ^1H y recromatografiadas por separado.

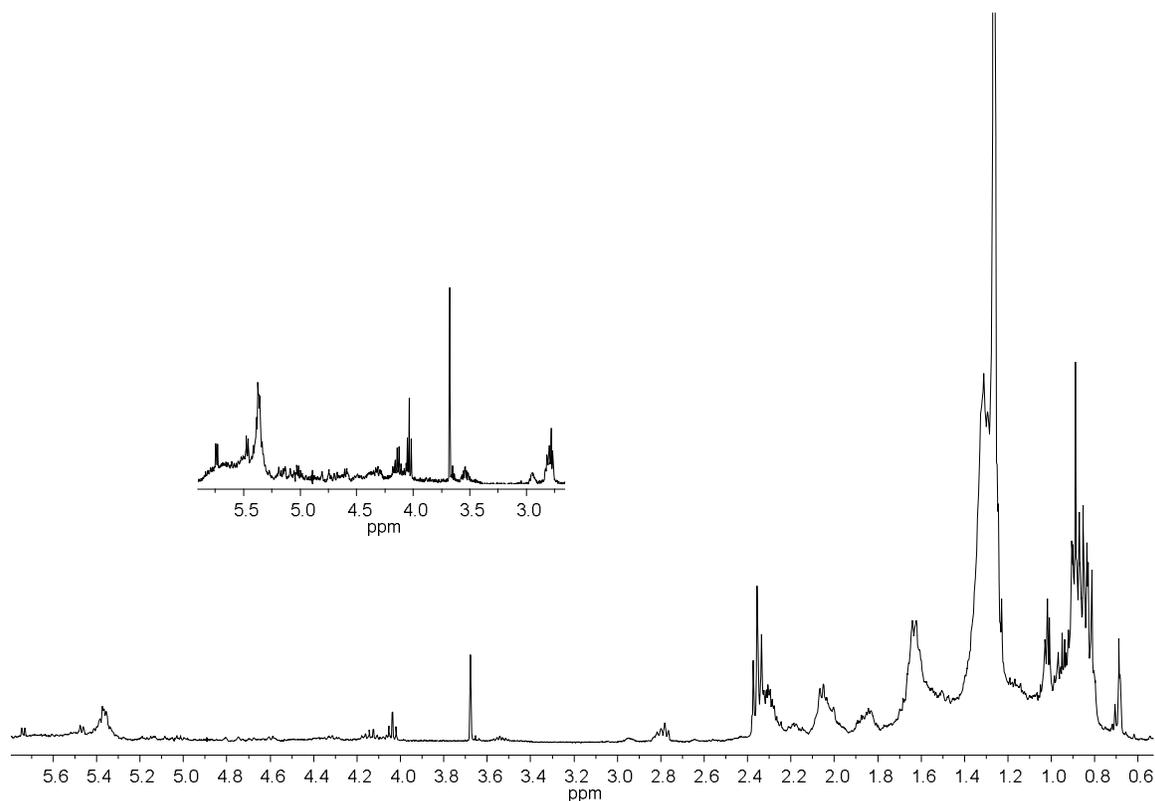


Figura 6.5.1. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto hexánico de tallos de *Perymenium bupthalmoides*.

En las fracciones 1-5 del extracto total condujeron a la obtención de ácidos grasos y alcanos, mientras que la fracción 7 fue recromatografiada en placa preparativa impregnada con solución de AgNO_3 al 20% con un sistema de elución CH_2Cl_2 -AcOEt (9:1).

De este procedimiento se identificó al ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**3**), el ácido *ent*-kaur-15 α -angeloxi-16-en-19-oico (**4**) y el ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (**17**) ya descritos en el extracto de raíz.

Por otra parte, la fracción 8 fue separada mediante cromatografía en capa fina como fase estacionaria y como fase móvil CH_2Cl_2 . En este caso se logró obtener la mezcla de fitoesteros del estigmasterol (**47**) y β -sitosterol (**26**) que también se encontraron presentes en el extracto hexánico de hojas.

6.6. Análisis químico del extracto hexánico de flores

Flores de tres lotes de la especie vegetal, una vez secadas y molidas se extrajeron con hexanos por los siguientes métodos tabla 6.6.1

Tabla 6.6.1. Extractos obtenidos de flores de *Perymenium bupthalmoides*.

Lote	Peso de las hojas en (g)	Método de extracción	Tiempo (h)	Peso del extracto en (g)
2011	90	Maceración	72	4.78
2013	25	Reflujo	6	0.87
2014	15	Reflujo	6	0.62

Los extractos obtenidos fueron analizados preliminarmente a través de RMN de ^1H , mostrando principalmente señales pertenecientes a ácidos grasos, también se apreciaron algunas señales en la región de los protones vinílicos entre δ 6.55 a δ 4.50 (Figura 6.6.1).

Los extractos presentaron los mismos compuestos por lo que se mezclaron obteniendo 6.27 g de muestra.

El extracto fue sometido a fraccionamiento en columna cromatográfica de 4 cm de diámetro por 15 cm de altura utilizando gel de sílice malla 230-400 y como eluente utilizando mezclas de hexanos-AcOEt en orden creciente de polaridad obteniéndose 10 fracciones las cuales fueron analizadas por RMN de ^1H y recromatografiadas individualmente.

La cromatografía en columna fue monitoreada mediante de cromatografía analítica utilizando el mismo sistema de disolventes. Las fracciones eluidas también se analizaron por RMN de ^1H .

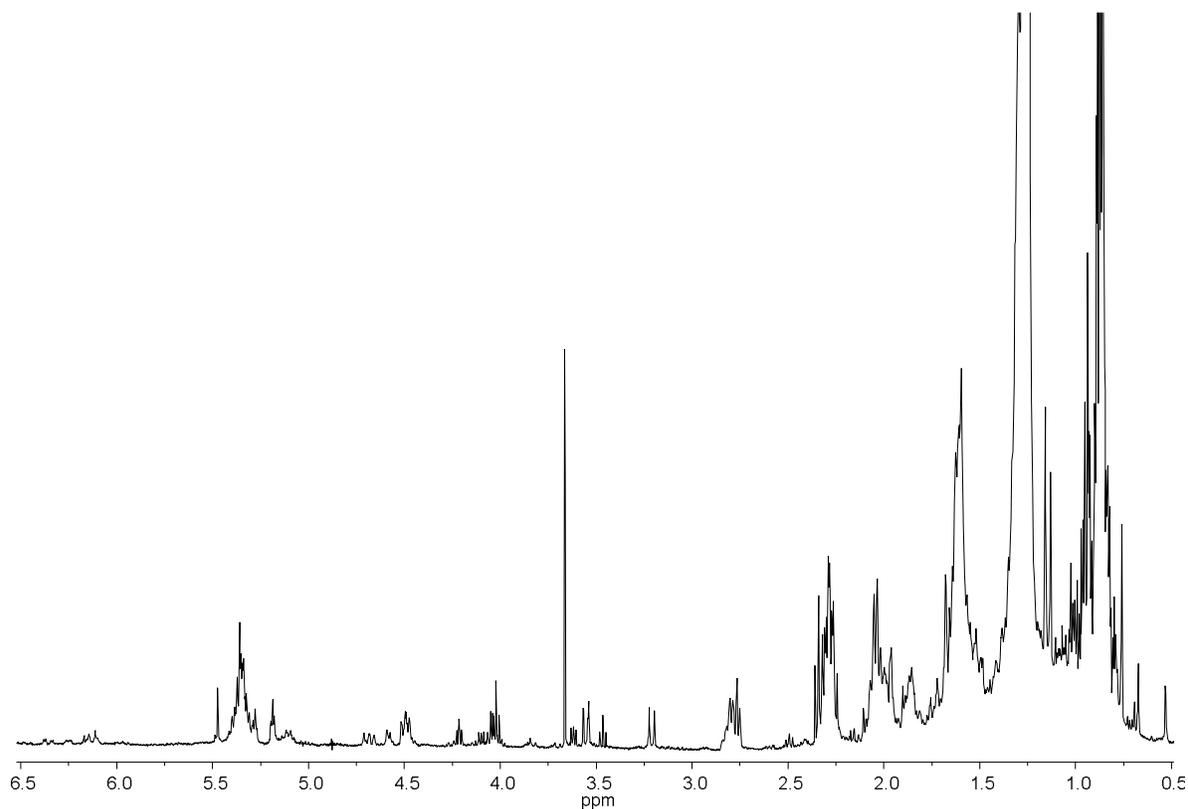


Figura 6.6.1. Espectro de RMN ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto hexánico de flores de *Perymenium bupthalmoides*.

Las fracciones 1-4 condujeron a la obtención de ácidos grasos saturados. Por otra parte, la fracción 5 se separó en columna cromatográfica de 2 cm de diámetro utilizando gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de hexanos-AcOEt en orden creciente de polaridad.

En las fracciones 26-35 (hexanos-AcOEt 19:1) se observó un compuesto cristalino el cual fue purificado mediante lavados con hexanos seguido de cristalización a evaporación lenta, estos procedimientos condujeron a la obtención de cristales blancos.

En su espectro RMN de ^1H (Figura 6.6.2) se observó una señal triple δ 5.16 con $J=3.6$ Hz perteneciente al protón vinílico H-12; en δ 4.47 se identificó la señal múltiple asignada al protón base de éster H-3 y en δ 3.52 y δ 3.19 se apreciaron dos señales dobles con $J=11.2$ Hz para los protones base de alcohol H-28a y H-28b; adicionalmente, se identificó una señal triple en δ 2.27 con $J=7.4$ Hz correspondiente al H-2'; en δ 1.23 se ubica una señal ancha característica de un ácido graso saturado; finalmente en δ 1.14, δ 0.93, δ 0.92, δ 0.86 aparecieron las señales simples establecidas para los metilos CH_3 -27, CH_3 -23, CH_3 -26, CH_3 -24 respectivamente, y entre δ 0.85-0.82 se ubican las señales simples traslapadas pertenecientes protones metílicos a CH_3 -30, CH_3 -29 y CH_3 -25.

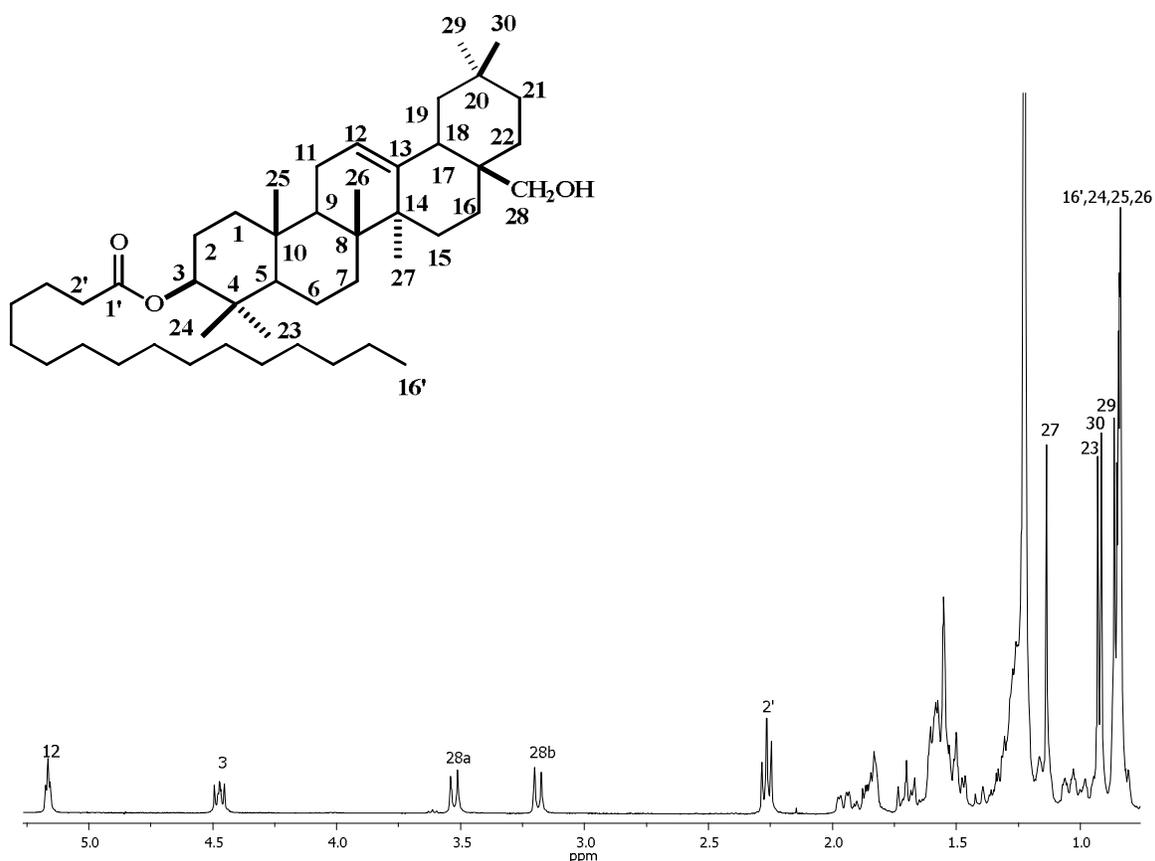


Figura 6.6.2. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del palmitato de eritrodíol (48).

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.6.3) se identificó en δ 173.8 la señal típica de carbonilo de éster (C-1'), en δ 144.4 y δ 122.4 se encontraron dos señales pertenecientes a carbonos de sp^2 asignadas a los C-13 y C-12, respectivamente; el C-3 base de éster se apreció en δ 80.5 y el C-28 base de alcohol en δ 69.8 el resto de las señales del esqueleto pentacíclico se ubicaron en δ 55.0 a δ 14.0 (Tabla 6.6.2).

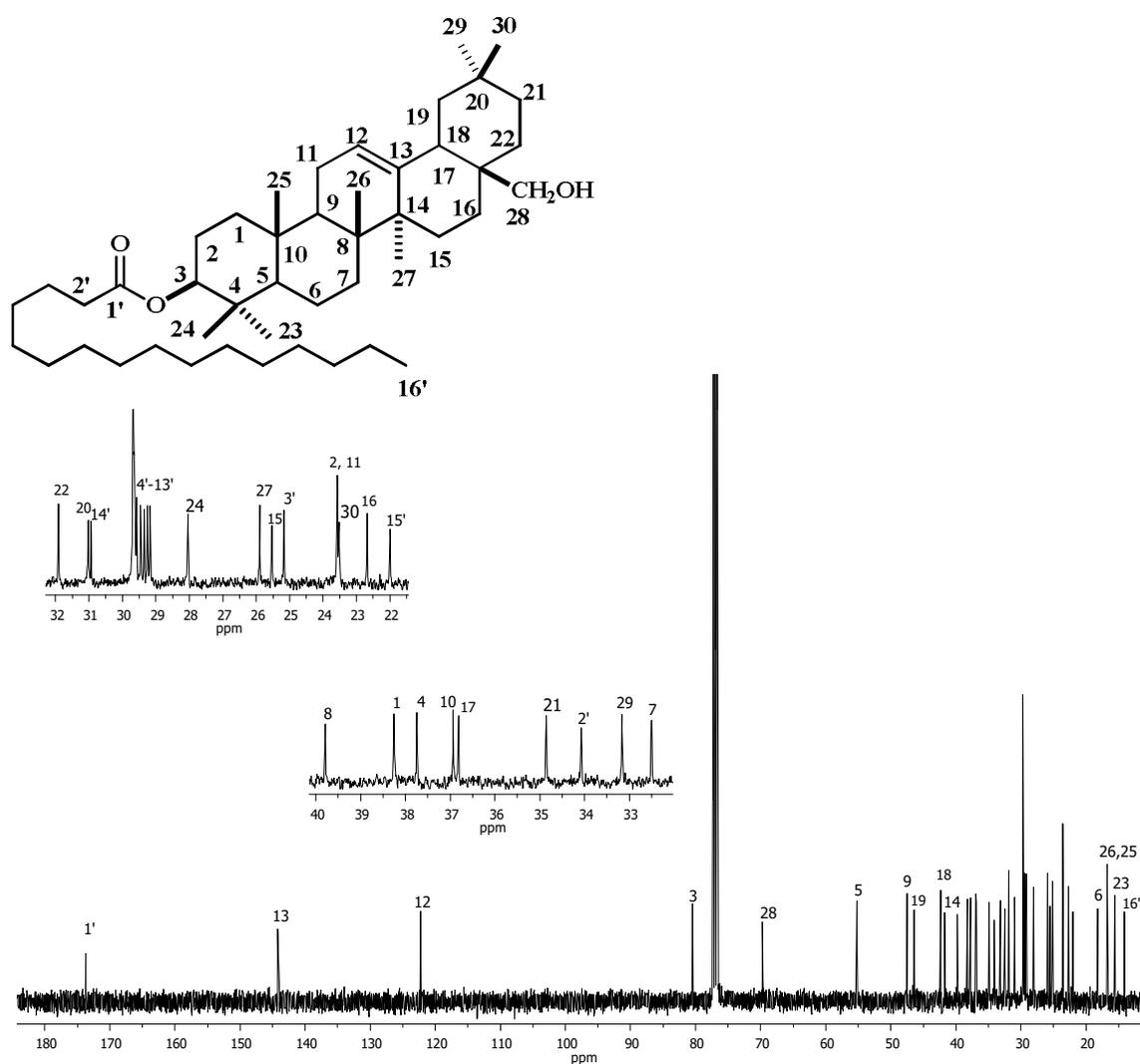


Figura 6.6.3. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del palmitato de eritrodíol (48).

Tabla 6.6.2. Comparación de los desplazamientos de RMN de ^{13}C del palmitato de eritrodiol (**48**) con la literatura (Faizi *et al.*, 2004).

Carbono	Experimental (δ en ppm)	Reportado (δ en ppm)
1	38.3	38.26
2	23.6	23.52
3	80.5	80.51
4	37.6	37.73
5	55.2	55.24
6	18.4	18.23
7	32.5	32.47
8	39.8	39.79
9	47.5	47.58
10	36.9	36.93
11	23.6	23.58
12	122.3	122.23
13	144.2	144.31
14	41.7	41.71
15	25.3	25.54
16	22.7	22.62
17	36.8	36.81
18	42.3	42.35
19	46.2	46.44
20	31.0	31.05
21	34.7	34.74
22	31.9	31.91
23	28.0	28.10
24	15.5	15.73
25	15.5	15.55
26	16.7	16.72
27	25.9	25.99
28	69.7	69.60
29	33.2	33.18
30	23.5	23.27
1'	173.8	173.5
2'	34.9	34.83
3'	25.2	25.15
4'-13'	29.7-29.2	29.67-29.02
14'	31.9	31.89
15'	22.9	22.77
16'	14.1	14.10

El espectro de masa mostró un ion de 662 m/z correspondiente al ion molecular $[C_{46}H_{80}O_3-H_2O]^+$ Figura 6.6.4. Estos datos fueron comparados con lo reportado (Awasthi *et al.*, 1967, Barreiros *et al.*, 2002, Faizi *et al.*, 2004) coincidiendo para el compuesto denominado palmitato de eritrodinol (**48**) (Tabla 6.6.2).

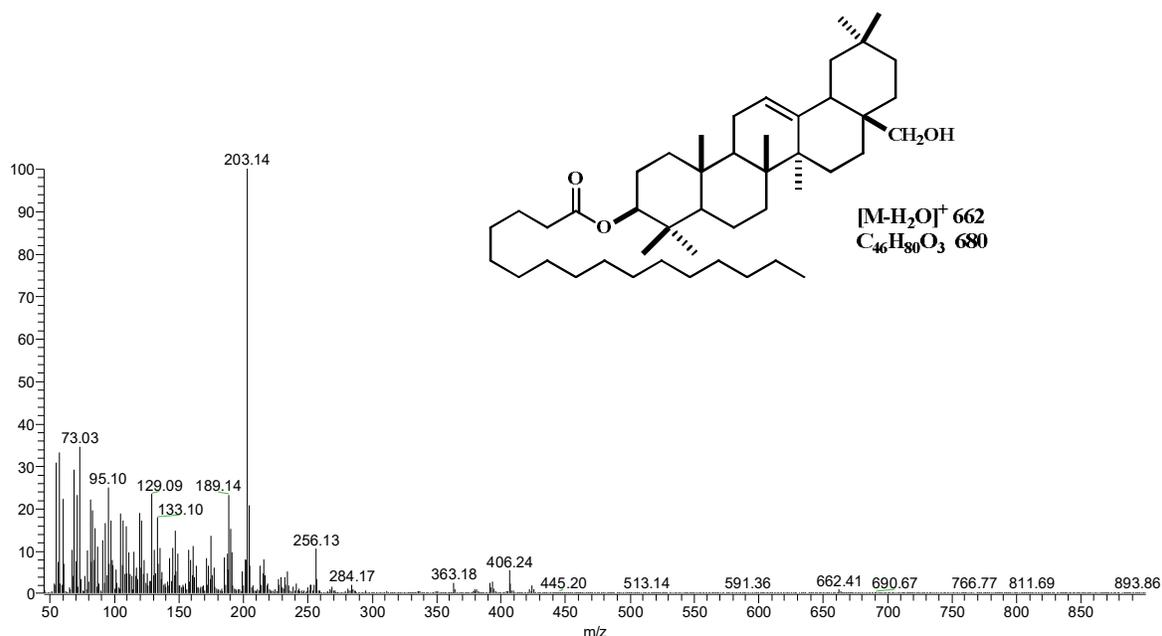
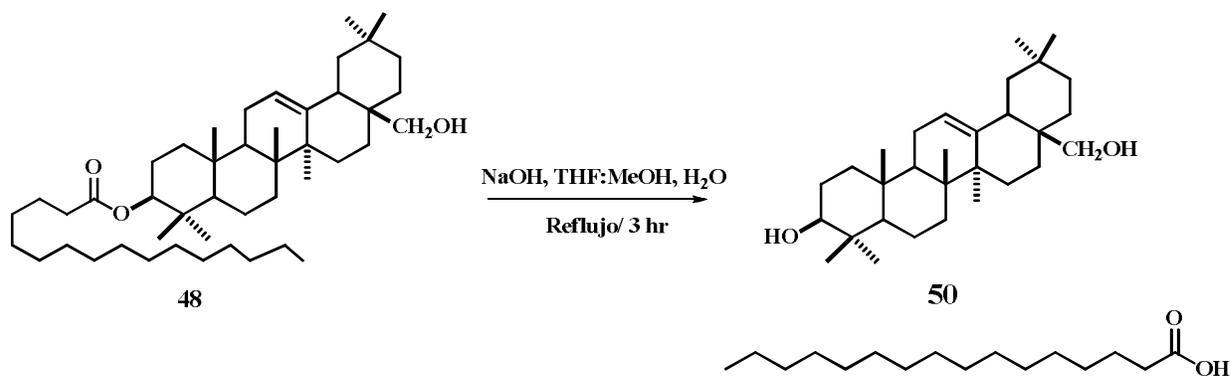


Figura 6.6.4. Espectro de masa del palmitato de eritrodinol (**48**).

Como parte de la caracterización química del éster triterpénico se realizó la reacción de hidrólisis básica en la cual se colocaron 50 mg del triterpeno **48**, 53 mg de NaOH, 5 mL la mezcla THF:MeOH (1:1) y 2 mL de agua durante tres horas a reflujo (Esquema 6.6.1). Posteriormente se evaporó el THF, se acidificó a pH 6 y finalmente se extrajo con CH_2Cl_2 , se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en rotavapor.

La separación de la mezcla se realizó en columna cromatográfica de 0.8 de diámetro, empleando como fase estacionaria gel de sílice y un sistema de elución hexanos:AcOEt (9:1).



Esquema de 6.6.1. Hidrólisis del palmitato del oleanol (**48**).

Las fracciones 16-25 contenían un polvo blanco el cual en su espectro de RMN de ^1H se observó el desplazamiento de la señal ubicada en δ 4.47 correspondiente al protón base de éster (H-3) a δ 3.20 correspondiente al protón base de alcohol H-3, el resto de las señales permanecen con desplazamientos semejantes a los del triterpeno **48**.

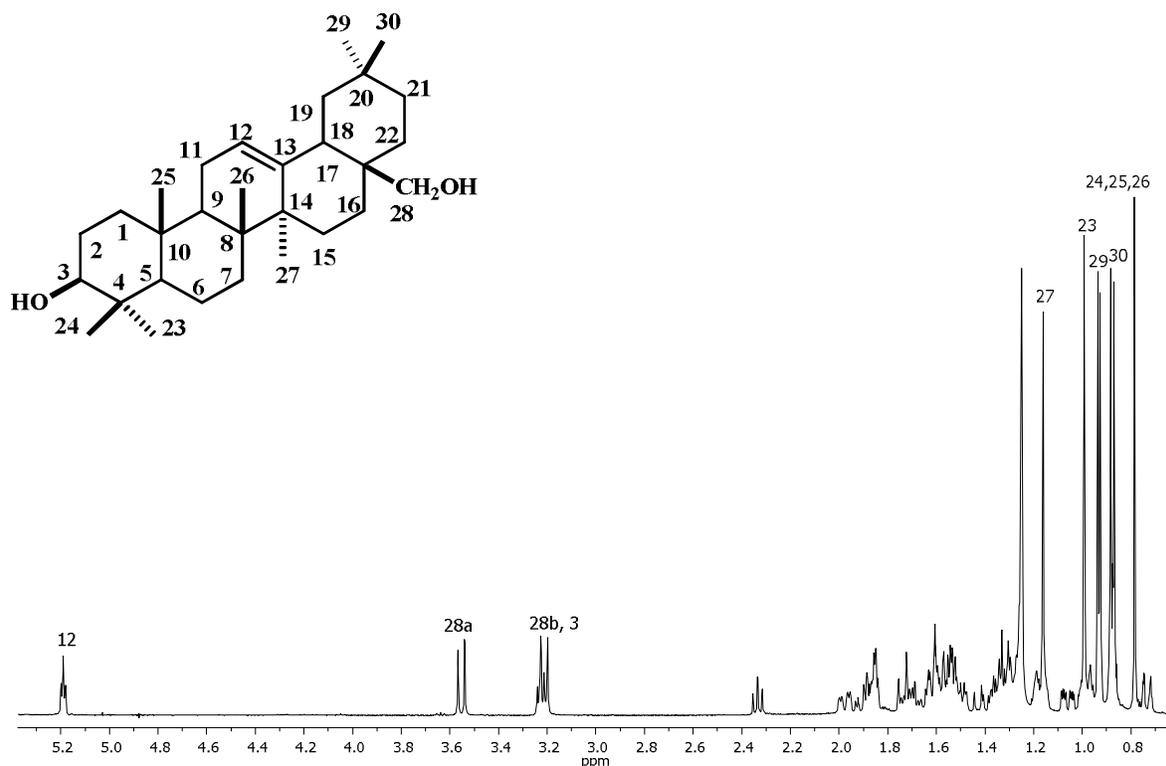


Figura 6.6.5. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del eritrodíol (**49**).

En el espectro de RMN de ^{13}C de la misma forma se apreció el desplazamiento de la señal del C-3 base de éster de δ 80.5 a δ 79.0 que pertenece al C-3 base de alcohol, el resto de las señales permanecen con desplazamientos semejantes (tabla 6.6.3). Estos datos fueron comparados con lo reportado encontrando coincidencia con el triterpeno eritrodiool (**49**).

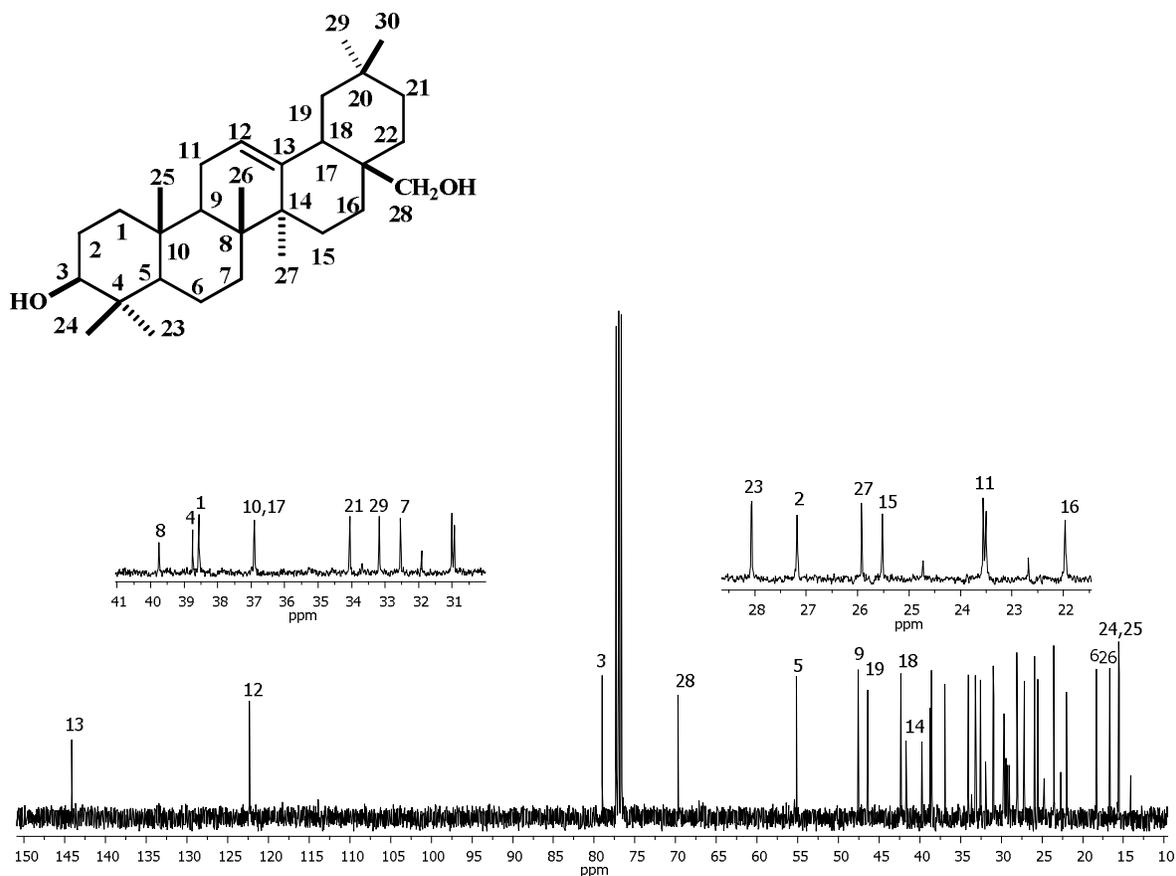


Figura 6.6.6. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del eritrodiool (**49**).

Tabla 6.6.3. Comparación de los desplazamientos de RMN de ^{13}C del eritrodiol (**49**) con la literatura (Mahato *et al.*, 1994).

Carbono	Experimental (δ en ppm)	Reportado (δ en ppm)
1	38.6	38.6
2	27.2	27.2
3	79.0	79.0
4	38.8	38.8
5	55.1	55.2
6	18.3	18.4
7	32.5	32.6
8	39.8	39.8
9	47.5	47.6
10	36.9	36.9
11	23.6	23.6
12	122.3	122.3
13	144.2	144.2
14	41.7	41.7
15	25.5	25.6
16	22.0	22.0
17	36.9	36.9
18	42.3	42.3
19	46.4	46.5
20	31.0	31.0
21	34.1	34.1
22	31.1	31.0
23	28.1	28.1
24	15.6	15.5
25	15.5	15.5
26	16.7	16.7
27	25.9	25.9
28	69.7	69.7
29	33.2	33.2
30	23.5	23.6

Las fracciones 41-60 hexanos-AcOEt (9:1) contenían una sustancia cristalina la cual fue purificada mediante lavados con acetona seguido de cristalización a evaporación lenta, estos procedimientos condujeron a la obtención de cristales transparentes.

En su espectro RMN de ^1H (Figura 6.6.7) se observó una señal triple δ 5.25 con $J=3.2$ Hz perteneciente al protón vinílico H-12; en δ 4.47 se identificó la señal múltiple asignada al protón base de éster H-3; en δ 2.79 se apreció una señal doble de dobles con $J=13.6$ y 3.6 Hz asignada al protón alílico H-18; adicionalmente se identificó una señal triple en δ 2.26 (2H, t, $J=7.2$ Hz) correspondiente al H-2'; en δ 1.23 se ubicó una señal ancha característica de un ácido graso saturado; finalmente, se apreciaron 7 señales simples δ 1.10, δ 0.91, δ 0.90, δ 0.85, δ 0.83, δ 0.82 y δ 0.72 establecidas para los metilos H-27, H-24, H-30, H-29, H-23, H-25 y H-26 respectivamente.

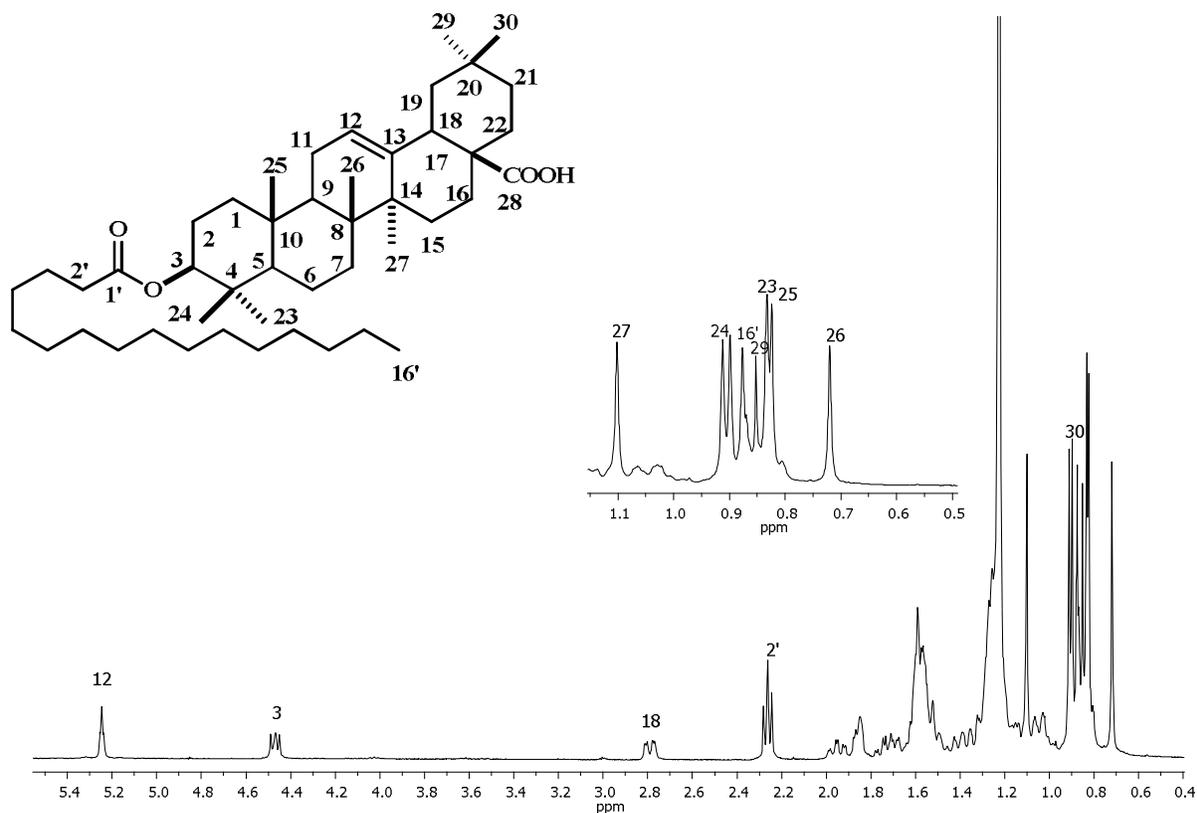


Figura 6.4.7. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 palmitato del ácido oleanólico (50).

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.6.8) se observaron señales para un esqueleto triterpénico dentro de las cuales se apreciaron dos señales para carbonos carbonílicos de en δ 183.9 correspondiente al carbonilo de ácido C-28 así como señal típica de carbonilo de éster en δ 173.7 para el C-1'; en δ 143.7 y δ 122.7 se encuentran las señales pertenecientes a los carbonos vinílicos C-13 y C-12, respectivamente; el C-3 base de éster se aprecia δ 80.6 y el resto de las señales de la estructura triterpénica se ubicaron en δ 60.0 a δ 14.0 (Tabla 6.6.3).

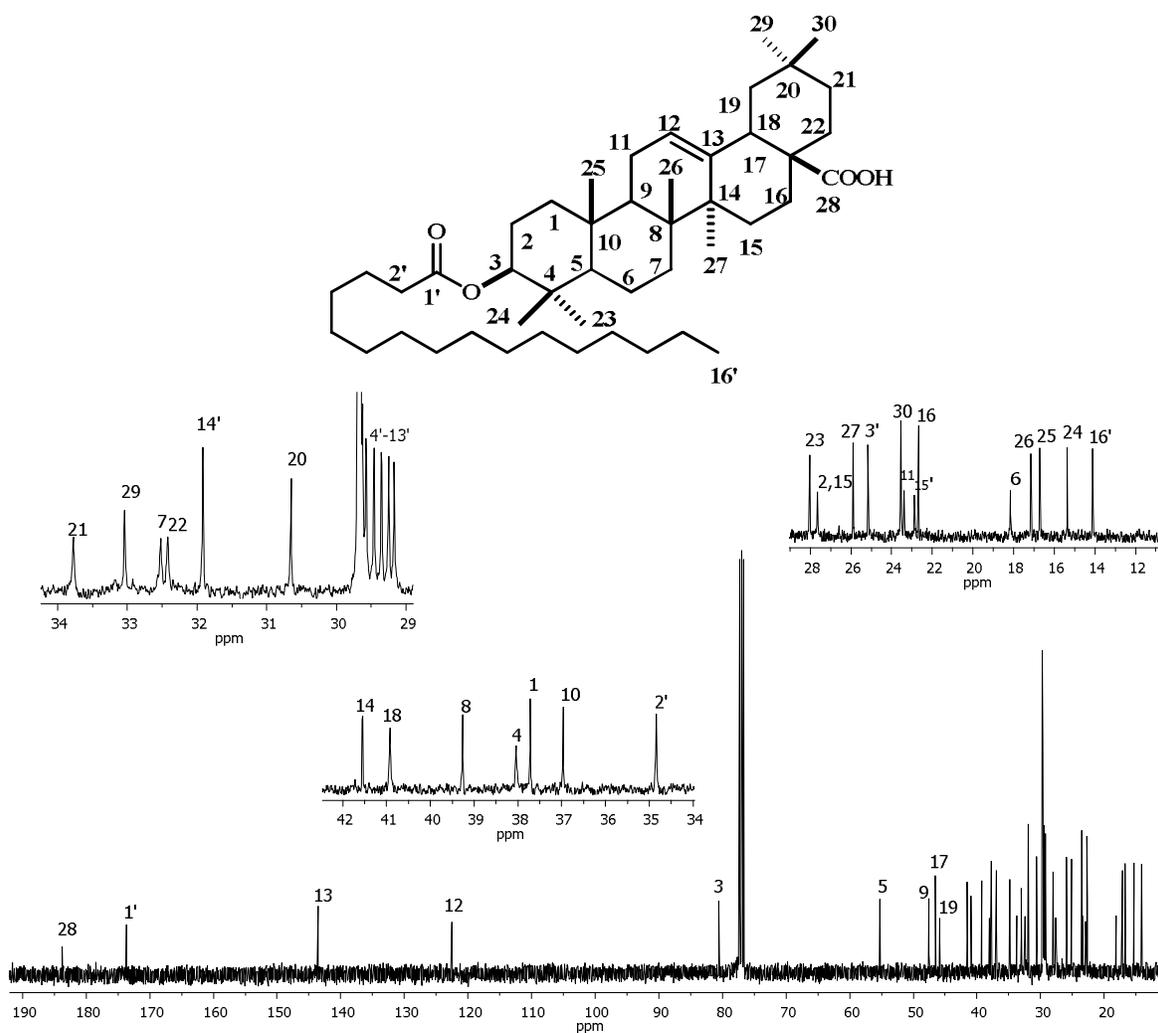


Figura 6.6.8. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del palmitato del ácido oleanólico (50).

Tabla 6.6.3. Comparación de los desplazamientos de RMN de ^{13}C del palmitato del ácido oleanólico (**50**) con la literatura (Faizi *et al.*, 2004, Mahato *et al.*, 1994).

Carbono	Experimental (δ en ppm)	Reportado (δ en ppm)
1	37.7	38.5
2	27.7	27.4
3	80.6	78.7
4	38.1	38.7
5	55.3	55.2
6	18.2	18.3
7	32.5	32.6
8	39.3	39.3
9	47.5	47.6
10	37.0	37.0
11	23.4	23.1
12	122.6	122.1
13	143.6	143.4
14	41.6	41.6
15	25.7	27.7
16	22.7	23.4
17	46.5	46.6
18	40.9	41.3
19	45.8	45.8
20	30.6	30.6
21	33.8	33.8
22	32.4	32.3
23	28.0	28.1
24	15.4	15.6
25	16.7	15.3
26	17.1	16.8
27	25.9	26.0
28	183.7	181.0
29	33.0	33.1
30	23.3	23.6
1'	173.7	173.65
2'	34.8	34.83
3'	25.2	25.15
4'-13'	29.7-29.2	29.67-29.02
14'	31.9	31.89
15'	22.9	22.77
16'	14.1	14.10

El espectro de masa mostró un ion de 692 m/z correspondiente al ion molecular $[C_{46}H_{78}O_4-2]^+$ Figura 6.6.9. Estos datos fueron comparados con la literatura (Faizi *et al.*, 2004, Mallavadhani *et al.*, 2003, Seebacher *et al.*, 2003) y se encontró que son semejantes al triterpeno palmitato del ácido oleanólico (**50**); sin embargo, se apreciaron distintos desplazamientos químicos para el C-25 y C-1 (Tabla 6.6.3).

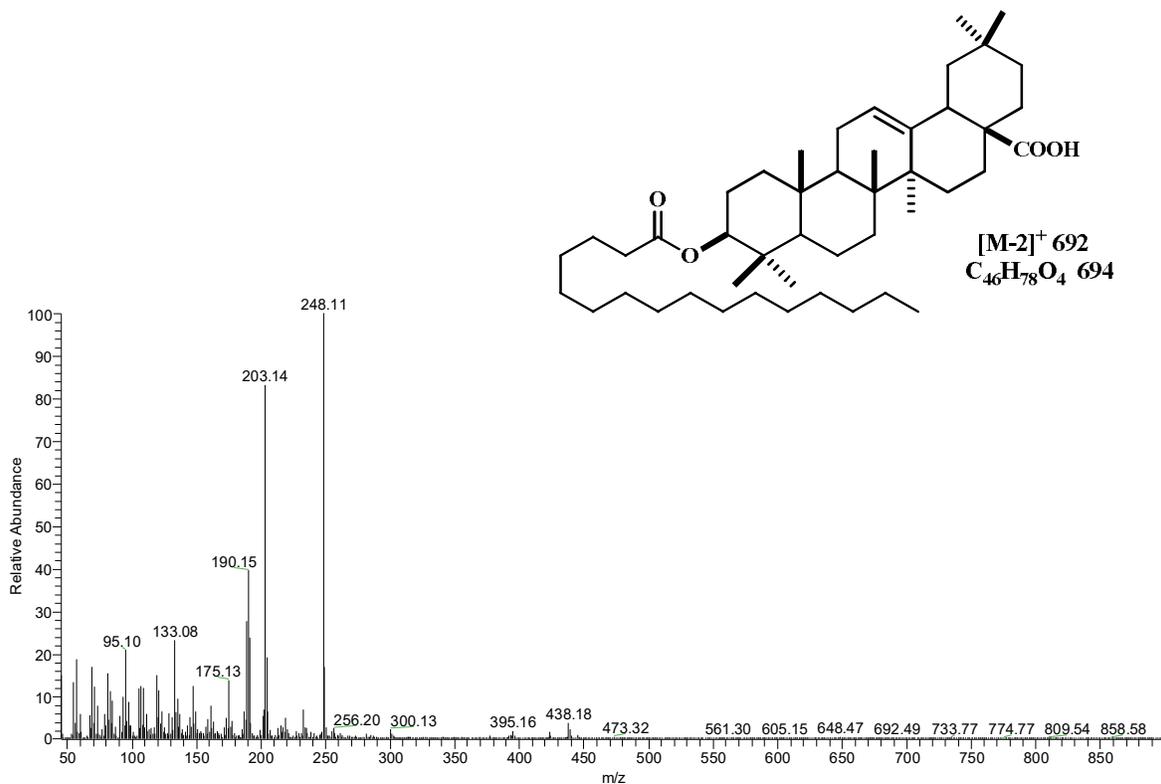
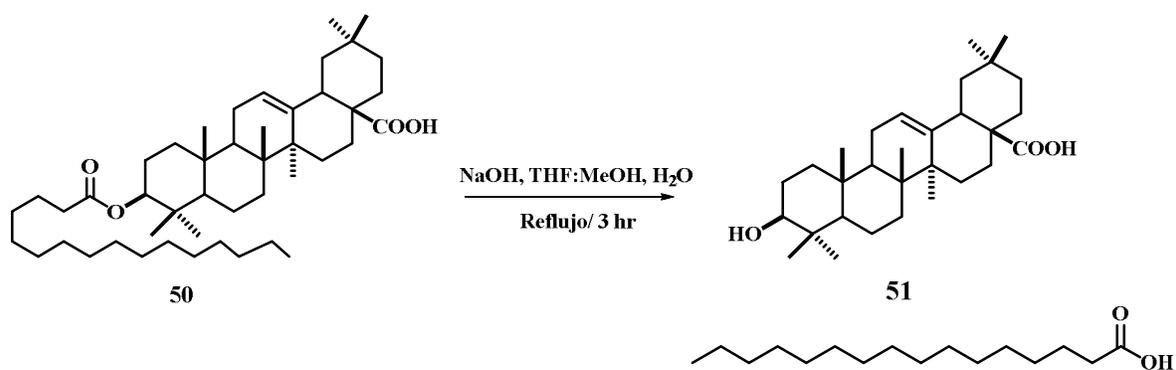


Figura 6.6.9. Espectro de masa del palmitato del ácido oleanólico (**50**).

La caracterización química del éster triterpénico se realizó llevando a cabo la reacción de hidrólisis básica en la cual se colocaron 30 mg del triterpeno **50**, 39 mg de NaOH, 5 mL la mezcla THF:MeOH (1:1) y 2 mL de agua durante tres horas a reflujo (Esquema 6.6.2). Posteriormente se evaporó el THF, se acidificó a pH 6 y finalmente se extrajo con CH_2Cl_2 , se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en rotavapor.



Esquema de 6.6.2. Hidrólisis del palmitato del ácido oleanólico (50).

Las fracciones 35-50 contenían un polvo blanco el cual en su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.6.10) se observó el desplazamiento de la señal ubicada en δ 4.47 correspondiente al protón base de éster (H-3) a δ 3.22 correspondiente al protón base de alcohol H-3, el resto de las señales permanecen con desplazamientos semejantes a los del triterpeno 50.

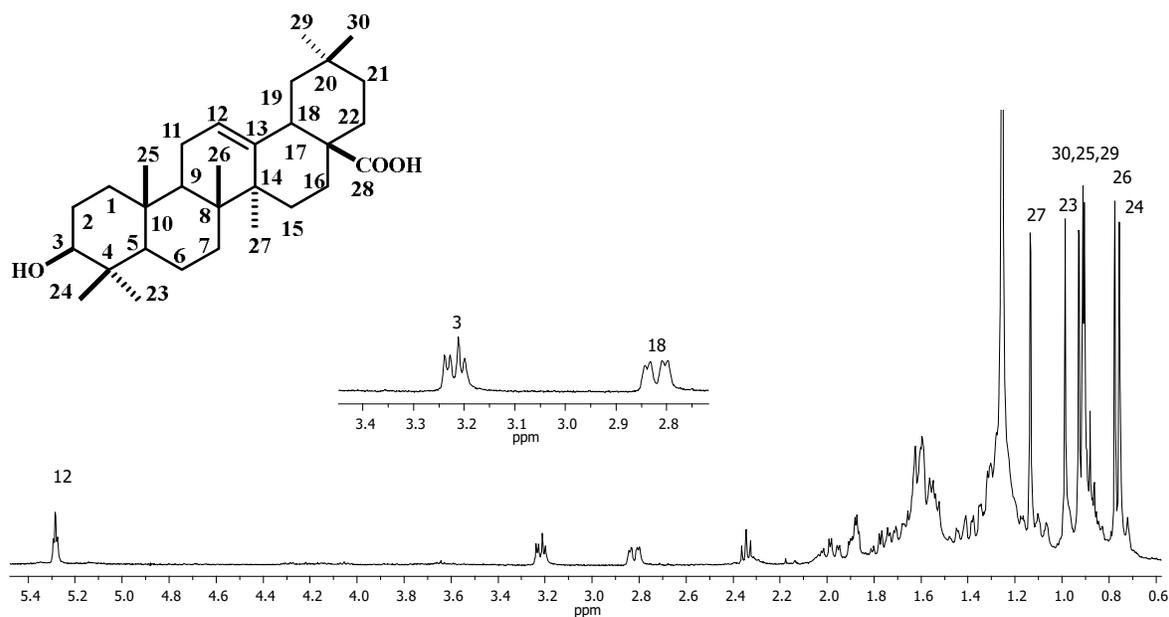


Figura 6.6.10. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del ácido oleanólico (51).

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.6.11) se apreció el desplazamiento del C-3 base de éster de δ 80.6 a δ 79.0 que a hora es perteneciente al C-3 base de alcohol, el resto de las señales permanecen con desplazamientos semejantes (Tabla 6.6.5). Estos datos fueron comparados con lo reportado encontrando coincidencia con el triterpeno ácido oleanólico (**51**).

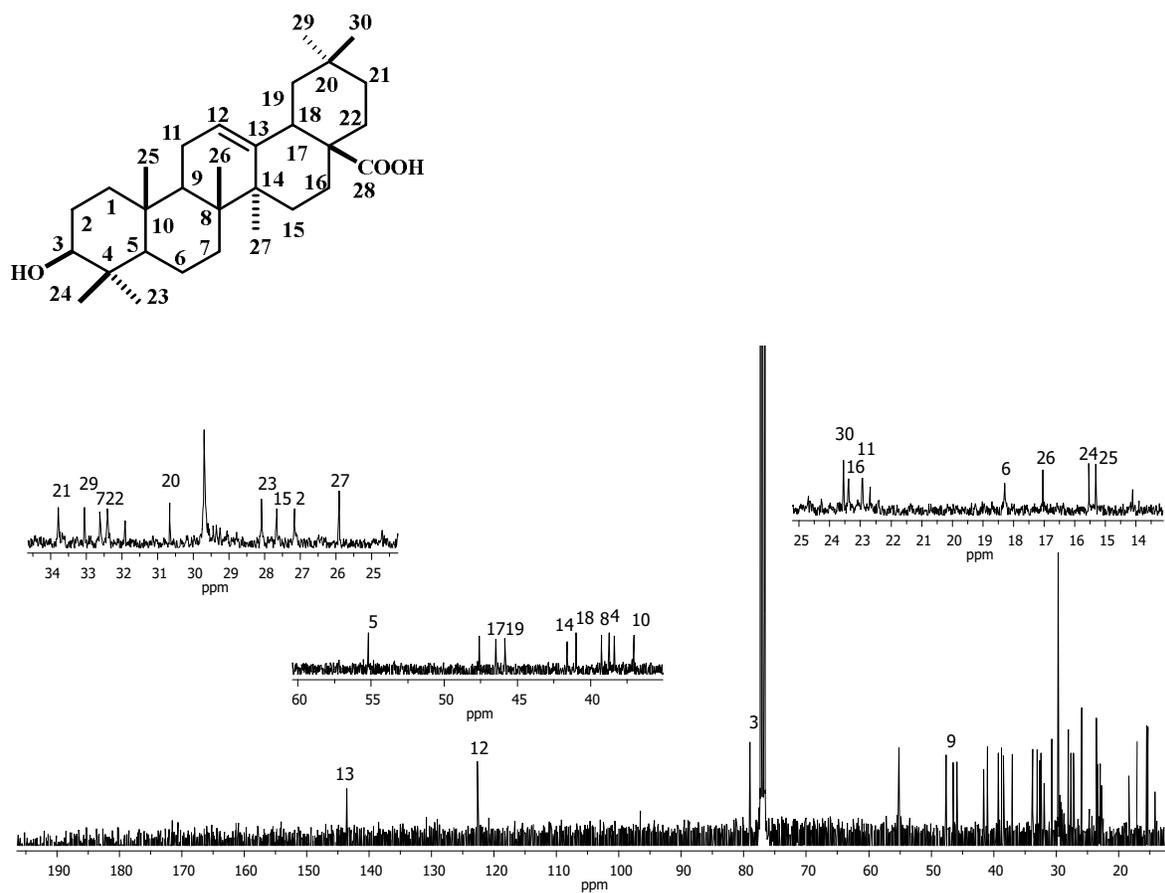


Figura 6.6.11. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del ácido oleanólico (**51**).

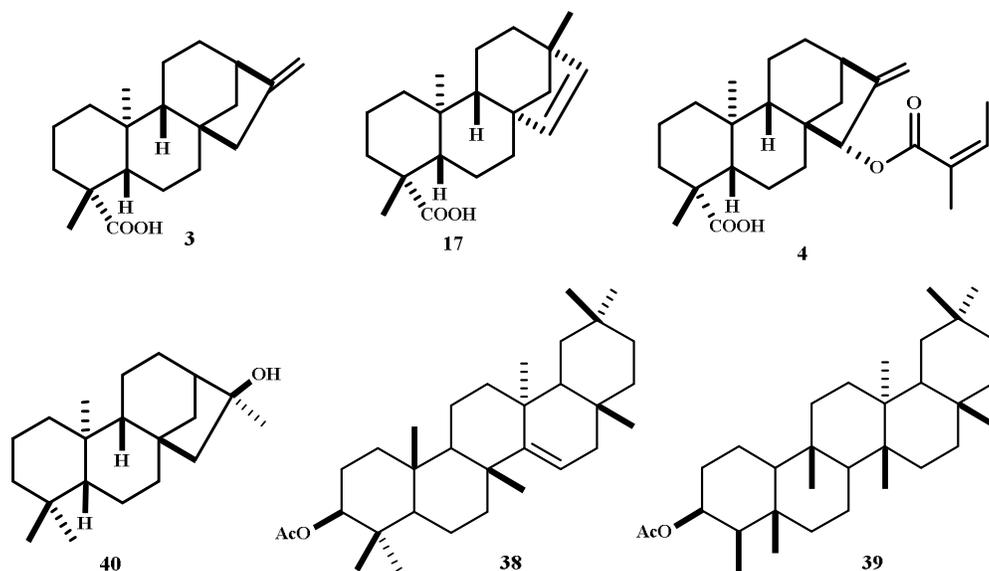
Tabla 6.6.5. Comparación de los desplazamientos de RMN de ^{13}C del ácido oleanólico (51) con la literatura (Mahato *et al.*, 1994).

Carbono	Experimental (δ en ppm)	Reportado (δ en ppm)
1	38.4	38.5
2	27.2	27.4
3	79.0	78.7
4	38.7	38.7
5	55.2	55.2
6	18.3	18.3
7	32.6	32.6
8	39.3	39.3
9	47.6	47.6
10	37.1	37.0
11	22.9	23.1
12	122.6	122.1
13	143.6	143.4
14	41.6	41.6
15	27.7	27.7
16	23.4	23.4
17	46.6	46.6
18	41.0	41.3
19	45.9	45.8
20	30.6	30.7
21	33.8	33.8
22	31.1	31.0
23	28.1	28.1
24	15.5	15.6
25	15.3	15.3
26	17.0	16.8
27	25.9	26.0
28		181
29	33.1	33.1
30	23.6	23.6

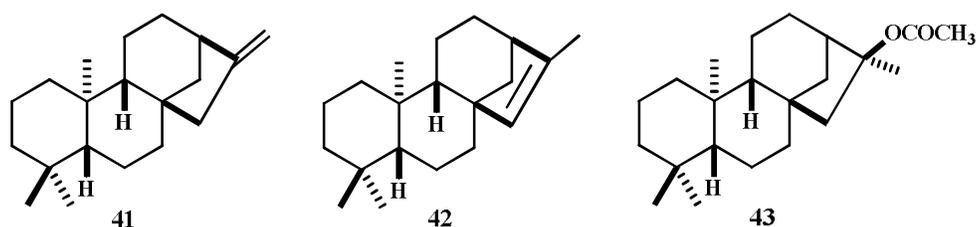
7. CONCLUSIONES

En este trabajo, se identificaron los metabolitos secundarios mayoritarios del extracto hexánico de raíz y partes aéreas.

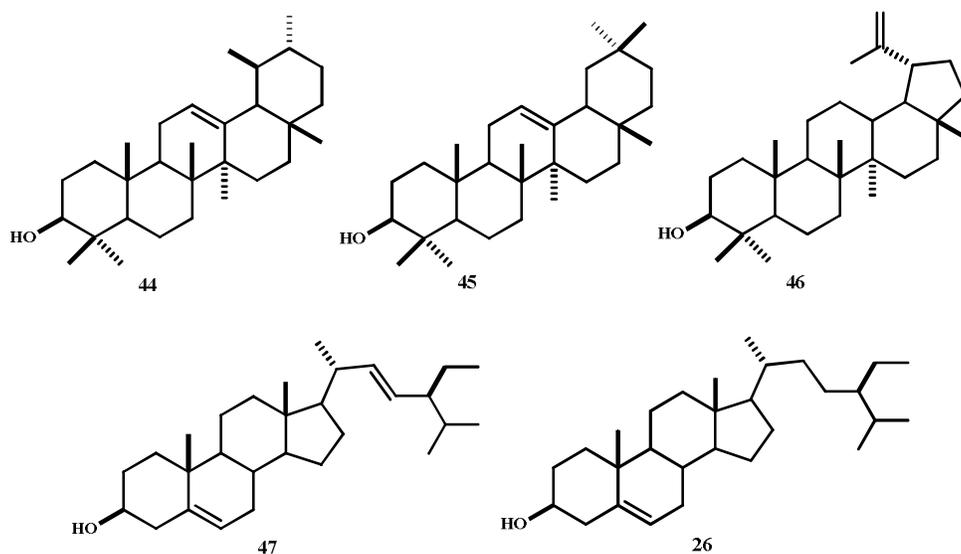
Del estudio químico del extracto hexánico de raíz se logró la separación, purificación e identificación del ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**3**), ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (**17**), ácido *ent*-kaur-15 α -angeloiloxi-16-en-19-oico (**4**) y 16 β -hidroxikaurano (**40**). Adicionalmente, se obtuvieron los triterpenos acetato de taraxerol (**38**) y acetato de β -friedelinol (**39**).



La reacción de acetilación de **40** produjo los derivados **41** y **42** como productos de deshidratación, así como el derivado acetilado **43**.

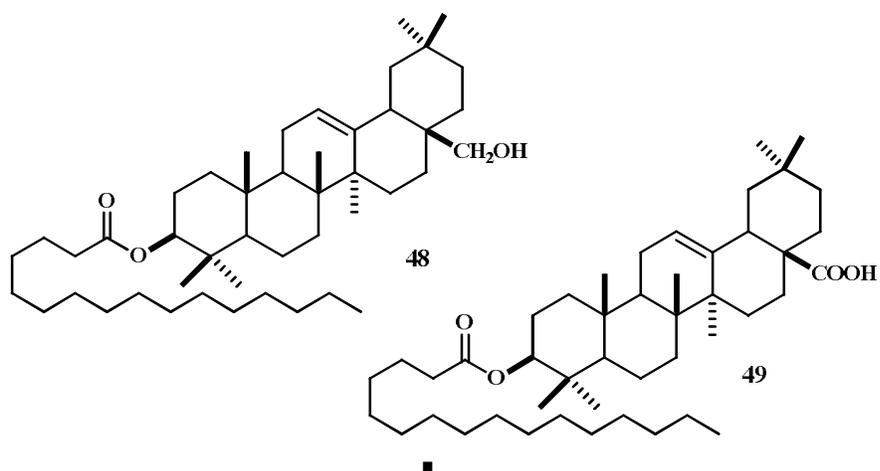


La investigación química del extracto hexánico de hojas condujo al aislamiento del ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (17), la mezcla de los triterpenos α -amirina (44) y β -amirina (45), lupeol (46), así como la mezcla de fitoesteroles estigmasterol (47) y β -sitosterol (26).

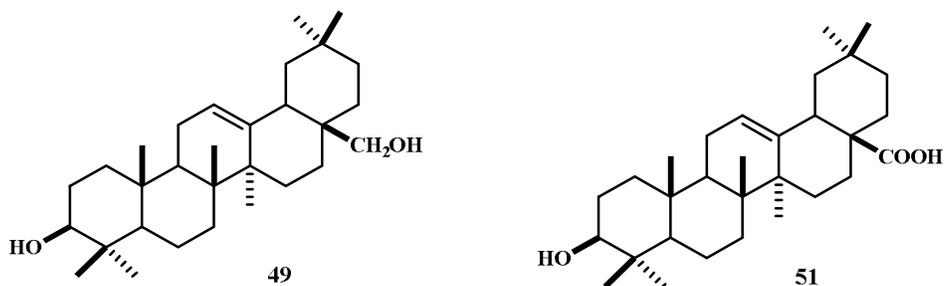


Del análisis químico efectuado al extracto hexánico de tallo se identificó al ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (3); así como al ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (17), ácido *ent*-kaur-15 α -angeliloxi-16-en-19-oico (4), y la mezcla de fitoesteroles 47 y 26.

Con el estudio del extracto hexánico de flores se identificaron los triterpenos palmitato de eritrodiool (48) y palmitato del ácido oleanólico (50).



- La hidrólisis básica de los ésteres **48** y **50** originó los derivados eritrodilol (**49**) y el ácido oleanólico (**51**).



Es importante mencionar que los compuestos **38-40**, **44-48** y **50** no han sido reportados dentro de los estudios realizados a las especies de este género.

Los compuestos fueron caracterizados por RMN de 1D y 2D, IR y EM. Estos datos fueron comparados con los descritos.

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. Material vegetal

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

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

8.2. Obtención de extractos

-La raíz seca y molida (1 Kg) se extrajo mediante reflujo con 750 mL de hexanos durante 6 h, este proceso se realizó tres veces, posteriormente se llevó a evaporación del disolvente en rotavapor obteniéndose el respectivo de extracto.

La obtención de los extractos de las partes aéreas se realizó de acuerdo a las tablas 6.4.1, 6.5.1 y 6.6.1.

8.3 RMN, EM, IR, Rotación óptica y p.f.

-Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y de ^{13}C se midieron en un equipo Varian Mercury Plus 400, a 400 MHz y 100 MHz, respectivamente, usando deuterio cloroformo (CDCl_3) como disolvente y como referencia interna tetrametilsilano (TMS).

-Los espectros de masa fueron obtenidos en un equipo Hewlett-Packard 5890 series II plus a 70 eV.

-Los espectros de IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro FT-IR 200 Perkin Elmer.

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

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

8.4. Análisis químico

-La separación de los compuestos se realizó en columna cromatográficas de vidrio ($h_{\text{columna}} = 15 \text{ cm}$, $\varnothing_{\text{columna}} = 0.5\text{-}3\text{cm}$) empleando gel de sílice (SiO_2) malla 230-400 como fase estacionaria, y mezclas de hexano-AcOEt en orden ascendente de polaridad como eluente. La cromatografía fue monitoreada por medio de cromatografía en capa fina.

-La separación por cromatografía preparativa se realizó en cromatofolios de 10x20 cm 0.5 μm de espesor.

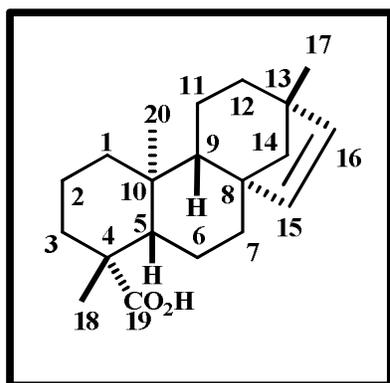
8.5. Cromatografía en columna impregnada con solución de AgNO_3

-En esta cromatografía se empleó como soporte gel de sílice impregnada con AgNO_3 (15% p/p) y como fase móvil CH_2Cl_2 -AcOEt (3:1).

8.6. Cromatografía en capa fina impregnada con solución de AgNO_3

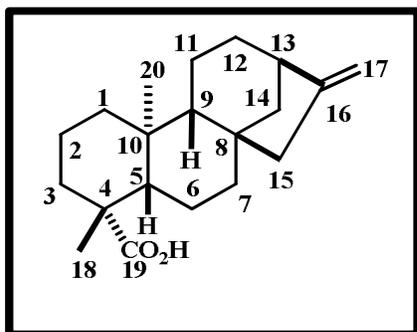
-Esta cromatografía se realizó en cromatofolios con soporte de cristal de sílica gel 60, impregnados con solución de nitrato de plata al 20% (850 mg AgNO_3 en 6 mL de acetonitrilo).

Ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (17)

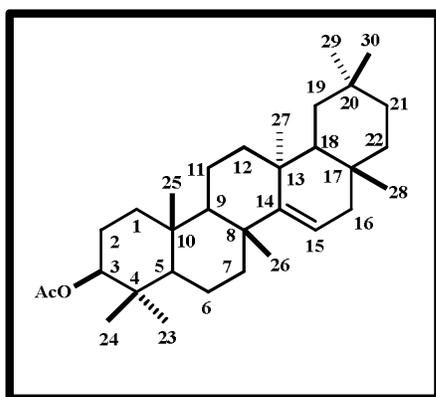


Las fracciones 4-9 de la cromatografía del extracto hexánico de raíz se obtuvo una sustancia sólida la cual se recrystalizó empleando CH_2Cl_2 y hexanos a evaporación lenta, como resultado se obtuvieron 8 g de cristales incoloros pertenecientes a la mezcla de isómeros. Un lote de 1.5 g de cristales se sometió a columna cromatográfica utilizando como soporte gel de sílice impregnada con AgNO_3 (15% p/p) y como fase móvil CH_2Cl_2 -AcOEt (3:1). De este proceso se obtuvieron 850 mg de ácido beyerenoico (17) y 241 mg del ácido kauranoico (3).

Cristales transparentes, p.f. 160-161 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = +4.5$ (c 0.31, CHCl_3), IR (CHCl_3) ν_{max} : 3513, 2946, 2925, 2850, 1730, 1693, 1468, 1454, 1367, 1273, 1255, 1117, 976 cm^{-1} ; EMIE, 302 m/z ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) ver tabla 6.3.1; RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ver tabla 6.3.2.

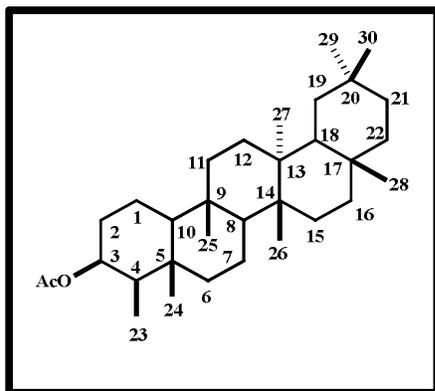
Ácido *ent*-kaur-15-en-19-oico (3)

Cristales transparentes, p.f. 146-148 °C; $[\alpha]_D^{25} = -83$ (c 0.58, CHCl_3), IR (CHCl_3) ν_{max} : 3508, 2934, 2853, 1729, 1693, 1658, 1472, 1461, 1450, 1412, 1369, 1326, 1266, 1180, 1125, 1022, 956, 880 cm^{-1} ; EMIE, 302 m/z ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) ver tabla 6.3.3; RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ver tabla 6.3.4.

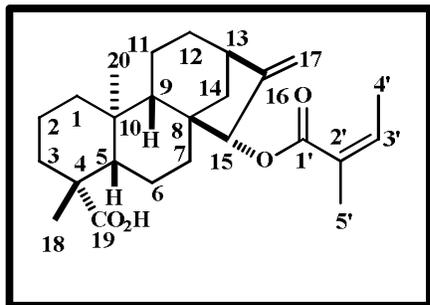
Acetato de taraxerol (38)

Las fracciones 4-9 del extracto hexánico de raíz tras varios procesos cromatográficos se obtuvo un sólido de color blanco el cual fue purificado en empleando cromatografía en capa fina impregnada con AgNO_3 20% y como eluente mezcla de hexanos- CH_2Cl_2 (4:1) eluir dos veces. De este procedimiento se identificó al acetato de taraxerol (**38**) y acetato de β -friedelinol (**39**).

Sólido de color blanco; EMIE, 468 m/z ($\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ 5.52 (1H, dd, $J = 8.4$, 3.2 Hz, H-15); δ 4.48 (1H, m, H-3); δ 2.04 (3H, s, CH_3 -2'), δ 1.09 (CH_3 -26), δ 0.95 (CH_3 -29- CH_3 -23), δ 0.91 (CH_3 -25), δ 0.90 (CH_3 -30), 0.88 (CH_3 -27), 0.86 (CH_3 -28), 0.82 (CH_3 -24); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ver tabla 6.3.4.

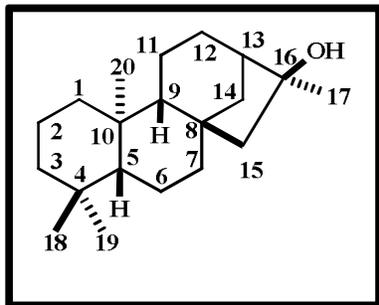
Acetato de β -friedelinol (39)

Sólido de color blanco; EMIE, 470 m/z ($\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_2$); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ 4.89 (1H, q, $J = 4$ Hz, H-3); δ 2.04 (CH_3 -2'); δ 1.17 (CH_3 -28), δ 1.00 (CH_3 -30), δ 0.99 (CH_3 -26- CH_3 -27), δ 0.94 (CH_3 -29), δ 0.93 (CH_3 -24), 0.86 (CH_3 -25), δ 0.81 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, CH_3 -23); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ver tabla 6.3.4.

Ácido *ent*-kaur-15 α -angeloiloxi-16-en-19-oico (4)

Las fracciones 10-11 de la cromatografía del extracto hexánico de la raíz se recromatografiaron empleando mezcla de hexanos-acetona en orden ascendente de polaridad. En la polaridad 9:1 se obtuvo una mezcla de compuestos, la cual fue separada mediante lavados con hexanos obteniéndose un sólido de color blanco el cual fue recristalizado utilizando hexanos-AcOEt, obteniéndose 300 mg de un compuesto cristalino.

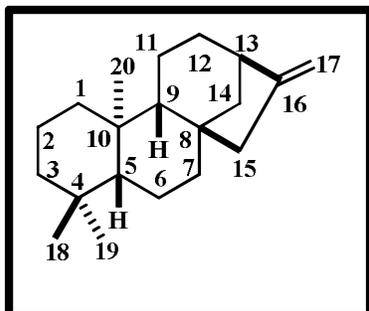
Cristales transparentes, p.f. 180-182 °C; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) ver tabla 6.3.7; RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ver tabla 6.3.8.

16 β -hidroxikaurano (40)

De la recromatografía de las fracciones 10-11 a polaridad hexanos-acetona (17:3) se obtuvo una mezcla de compuestos la cual fue purificada mediante lavados con hexanos obteniéndose 35 mg de cristales blancos.

Sólido de color blanco, p.f. °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -34$ (CHCl_3); EMIE, 291 m/z ($\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}$); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)

ver tabla 6.3.9; RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ver tabla 6.3.10.

***ent*-kaureno (41)**

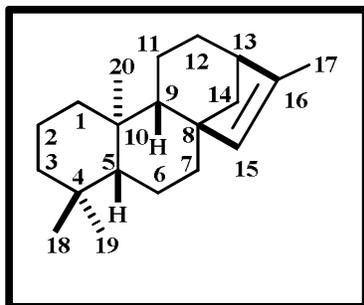
En un matraz balón de 25 mL se colocaron 50 mg del 16 β -kauranol (**40**), 2 mL piridina, 2 mL de $(\text{CH}_3\text{CO})_2$. La mezcla se colocó en agitación a 800 rpm y reflujo durante 5 h, posteriormente, la mezcla de reacción se extrajo con AcOEt, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró en rotavapor. Estos productos de reacción fueron separados mediante cromatografía en columna de 0.5 de diámetro utilizando gel de sílice como fase estacionaria y como eluyente una mezcla

de polaridad 19:1 hexanos-AcOEt. En la fracción 1-4 se obtuvo una sustancia cristalina que corresponde a la mezcla de alquenos **41** y **42**. La separación se realizó en cromatografía

preparativa impregnada con solución de AgNO_3 20% y como fase móvil una mezcla de hexanos-AcOEt (2:3).

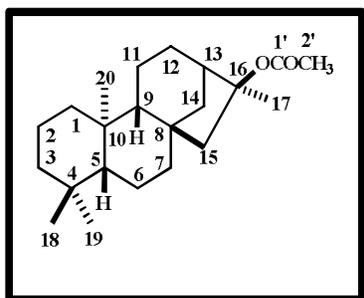
Sólido de color blanco; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3); δ 4.83 (1H, s, H-17a); δ 4.77 (1H, s, H-17b), δ 1.06 (3H, s, H-20), δ 0.89 (3H, s, H-18), δ 0.85 (3H, s, H-19); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ver tabla 6.3.11.

ent-isokaureno (42)



Sólido de color blanco, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ 5.06 (1H, s, H-15), δ 1.70 (3H, s, H-17), δ 1.03 (3H, s, H-20), δ 0.85 (3H, s, H-18) δ 0.80 (3H, s, H-19); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ver tabla 6.3.12.

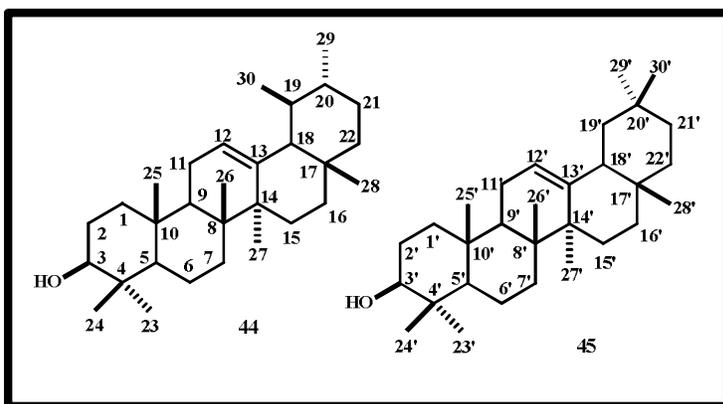
16 β -acetoxikaurano (43)



En la fracción 22-24 se obtuvo el compuesto **43**.

Sólido de color blanco; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ 1.95 (3H, s, H-1'), δ 1.58 (3H, s, H-17), δ 1.00 (3H, s, H-20), δ 0.85 (3H, s, H-18) δ 0.80 (3H, s, H-19); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ver tabla 6.3.13.

α -amirina (44) β -amirina (45)

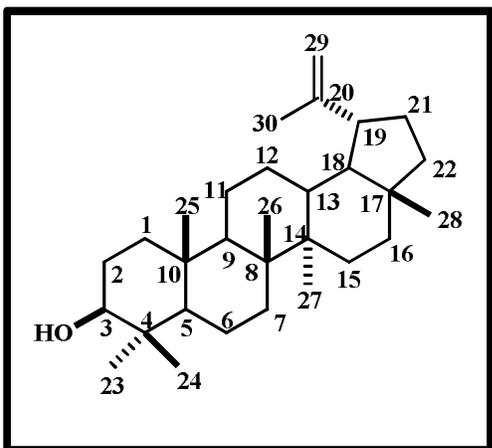


La separación cromatográfica de la fracción 7 (1:1) hexanos-AcOEt) del extracto hexánico de hojas se realizó utilizando gel de sílice y un sistema de elución hexanos-AcOEt 17:3, las fracciones 15-19 se recromatografiaron con mezclas de hexanos-AcOEt en orden

creciente de polaridad como eluente, en la fracción 7 hexanos-AcOEt (19:1) se obtuvo un polvo blanco el cual se purificó por cromatografía preparativa impregnada con solución de AgNO_3 al 20%. Este proceso permitió la separación de α -amirina (**44**) β -amirina (**45**) y el lupeol (**46**).

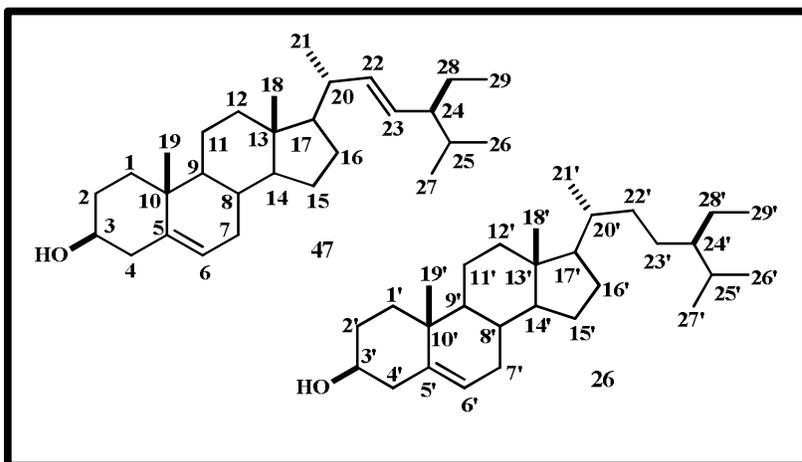
Sólido de color blanco; EMIE, 426 m/z ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$) para cada una de las moléculas; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ 5.19 (1H, t, $J = 4.0$ Hz, H-12'), 5.14 (1H, t, $J = 4.0$ Hz, H-12), 3.24 (2H, m, H-3 y H-3'); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ver tabla 6.4.2.

Lupeol (**46**)



Sólido de color blanco; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ 4.68 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-29), 4.56 (1H, dd, $J = 2.2, 1.1$ Hz, H-29'), 3.20 (1H, m, H-3), 2.37 (1H, m, H-19), 1.67 (3H, s, H-30), 1.02 (3H, s, H-28), 0.96 (3H, s, H-27), 0.93 (3H, s, H-26), 0.82 (3H, s, H-25), 0.78 (3H, s, H-24), 0.75 (3H, s, H-23).

Estigmasterol (**47**) y β -sitosterol (**26**)



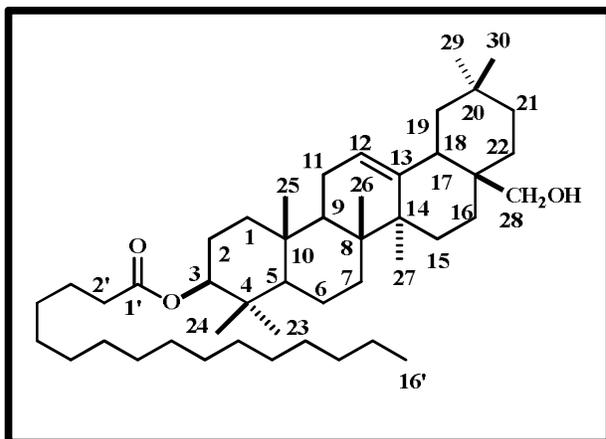
Las fracciones 22-27 obtenidas de la cromatografía de la fracción 7 del extracto total se obtuvo un sólido cristalino el cual fue lavado con hexanos.

De este proceso se obtuvieron los

fitosteroles estigmasterol (**47**) y β -sitosterol (**26**).

Sólido de color blanco; EMIE, 412 m/z ($C_{29}H_{48}O$) para el estigmasterol (**47**) y un ion de 414 m/z ($C_{29}H_{50}O$) para el β -sitosterol (**26**); RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$), δ 5.34 (2H, d, $J=5.2$ Hz, H-6, H-6'), 5.15 (1H, dd, $J=15.2, 8.4$ Hz, H-22), 5.02 (1H, dd, $J=15.2, 8.4$ Hz, H-23), 3.53 (2H, m, H-3 y H-3'); RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) ver tabla 6.4.3.

Palmitato de eritrodíol (**48**)

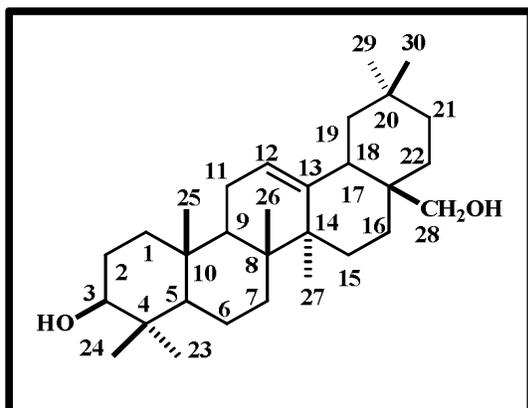


La fracción 5 del extracto hexánico de flor se separó en columna cromatográfica de 2 cm de diámetro utilizando gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de hexanos-AcOEt en orden creciente de polaridad. En las fracciones 26-35 (hexanos-AcOEt 19:1) se observó un compuesto cristalino el cual fue purificado mediante lavados con hexanos

seguido de cristalización a evaporación lenta, estos procedimientos condujeron a la obtención del palmitato de eritrodíol (**48**).

Sólido de color blanco; EMIE, 662 m/z ($C_{46}H_{80}O_3$); RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$), δ 5.1 (1H, t, $J=3.6$ Hz, H-12); δ 4.47 (1H, m, H-3); δ 3.40 (2H, d, $J=11.2$ Hz H-28a-H-28b); δ 1.14 (CH_3 -27), δ 0.93 (CH_3 -23), δ 0.92 (CH_3 -26), δ 0.86 (CH_3 -24) δ 0.85 (CH_3 -27), δ 0.82 (CH_3 -30, CH_3 -29, CH_3 -25); RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) ver tabla 6.6.2.

Eritrodíol (**49**)

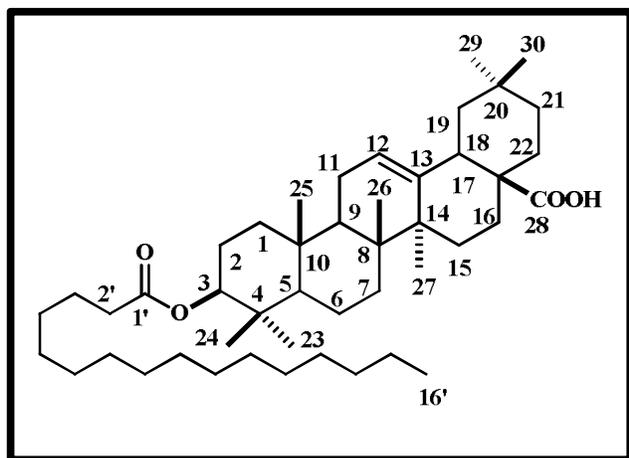


Se colocaron 50 mg de **48**, 53 mg de NaOH, 5 mL de la mezcla THF:MeOH (1:1) y 2 mL de agua en un matraz balón de 50 mL a reflujo durante 3 h. Posteriormente se evaporó el THF, seguido se vertió en un embudo de separación se acidificó con solución de HCl al 10 % hasta pH 6, se extrajo con CH_2Cl_2 , se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en rotavapor. La

separación se realizó en columna cromatográfica de 0.8 de diámetro, empleando como fase estacionaria gel de sílice y un sistema de elución hexanos:AcOEt (9:1) las fracciones 16-25 contenían al eritrodíol (**49**).

Sólido de color blanco; RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ver tabla 3.6.3.

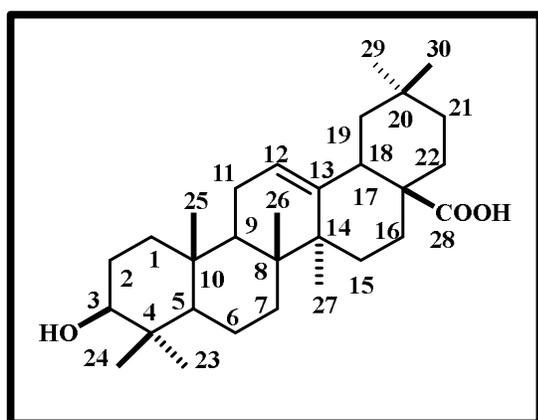
Palmitato del ácido oleanólico (**50**)



Las fracciones 41-60 de la fracción 5 del extracto hexánico de flor (hexanos-AcOEt 9:1) contenían una sustancia cristalina la cual fue purificada mediante lavados con acetona seguido de cristalización a evaporación lenta, estos procedimientos condujeron a la separación del palmitato del ácido oleanólico (**50**).

Sólido de color blanco; EMIE, 692 m/z ($\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{O}_4$); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ 5.25 (1H, t, $J= 3.2$ Hz, H-12); δ 4.47 (1H, m, H-3); δ 2.79 (1H, dd, $J= 13.6, 3.6$ Hz, H-18); δ 2.26 (2H, t, $J= 7.2$ Hz), δ 1.10 (CH_3 -27), δ 0.91 (CH_3 -24), δ 0.90 (CH_3 -30), δ 0.85 (CH_3 -29), δ 0.83 (CH_3 -23), δ 0.82 (CH_3 -25) δ 0.72 (CH_3 -26); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ver tabla 6.6.4.

Ácido oleanólico (**51**)



Se colocaron 30 mg de **50**, 39 mg de NaOH, 5 mL de la mezcla THF:MeOH (1:1) y 2 mL de agua en un matraz balón de 30 mL a reflujo durante 3 h. Posteriormente se evaporó el THF, enseguida se vertió en un embudo de separación se acidificó con solución de HCl al 10 % hasta pH 6, se extrajo con AcOEt, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en rotavapor. La separación se realizó en columna cromatográfica de 0.8 de diámetro, empleando como fase estacionaria gel

de sílice y un sistema de elución hexanos:AcOEt (9:1) las fracciones 35-50 contenían al ácido oleanólico (**51**).

Sólido de color blanco; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ 5.25 (1H, t, $J= 3.2$ Hz, H-12); δ 3.22 (1H, m, H-3); δ 2.79 (1H, dd, $J= 13.6, 3.6$ Hz, H-18); δ 2.26 (2H, t, $J= 7.2$ Hz), δ 1.10 (CH_3 -27), δ 0.91 (CH_3 -24), δ 0.90 (CH_3 -30), δ 0.85 (CH_3 -29), δ 0.83 (CH_3 -23), δ 0.82 (CH_3 -25) δ 0.72 (CH_3 -26); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ver tabla 6.6.5.

9. BIBIOGRAFÍA

- Awasthi Y., Mitra C., *Madhuca Butyracea*. Constituents of the Fruit-Pulp and the Bark, *Phytochemistry*, **1968**, 637-640.
- Ai-Xia C., Yong-Gen L., Ying-Bo M., Shan L., Ling-Jian W., Xiao-Ya C., Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions, *Journal of Integrative Plant Biology*, **2007**, 179-186.
- Arellano M., Delgado R., Hypargyrin A, a Hemiacetalic Germacrolide from *Viguiera hypargyrea* (Asteraceae). Biogenetic Implications and Biological Evaluation, *Journal of the Mexican Chemical Society*, **2010**, 117-121.
- Ballesteros G., Claramunt V., Sanz C., Teso V., Química Orgánica Avanzada, *UNED*, 1ra ed. 2013, 969-972.
- Barreiros M., David M., Pereira P., Guedes M., David J., Fatty acid Esters of Triperpenes from *Erythroxylum passerinun*, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2002**, 669-373.
- Briggs L., Cambie R., Rutledge P., Stanto D., Diterpenes. Part IX.1 Brorno-derivatives in the (+)-Phyllocladene and (-) - Isokaurene Series, *Journal Chemical Society, Perkin Trans 1*, 1965, 6212-6221.
- Rowe J., Natural Products of Woody Plants I, *Springer Series in Wood Science*, **1989**, 691-692.
- Bohlmann F., Zdero C., Eine neue diterpensaure aus *Perymenium ecuadoricum*, *Phytochemistry*, 1977, 786-787.
- Bohlmann F., Jakupovic J., Schuster A., Germacranolides from *Perymenium klattianum* and *Perymeniopsis ovalifolia*, *Phytochemistry*, **1984**, 495-499.
- Bohlmann F., Zdero C., King R., Robinson H., 4 α , 15-dihydroencelin and related sesquiterpene acids from *Perymenium featherstonei*, *Phytochemistry*, **1983**, 1185-1187.
- Cano-Flores A., Biotransformación de triterpenos con diferentes microorganismos Biotransformation of triterpene with diferent microorganisms, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, **2013**, 7-16

Ciccio J. F., Chaverri C., Chemical Composition of the Leaf and Branch Oils of *Perymenium grande* Hemsl. Var. *nelsonii* (Robins. & Greenm.) Fay (Asteraceae-Heliantheae) from Costa Rica, *Records of Natural Products*, **2012**, 371-375.

CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad).

Dewik M. P., Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach, 3ra ed., *Wiley*, **2009**, 223-230.

Domínguez X., Métodos de Investigación fitoquímica, *Limusa*, **1989**, 211-228.

Eckart E., Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites, *Springer-Verlag*, **2008**, 343.

Faizi S., Naz A., Palmitolate (=9Z) Hexadeca- 9-enoate) Esters of Oleanane Triterpenoids from the Golden Flowers of *Tagetes erecta*: Isolation and Autoxidation Products, *Helvetica Chimica Acta*, **2004**, 46-56.

García P., Braga de Oliveira A., Batista R. Occurrence, Biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides, *Molecules*, **2007**, 455-483.

García P. A., Occurrence, Biological Activities and Synthesis of Kaurane, *Molecules*, **2007**, 455-483.

Gómez H., Estudio químico y biológico de *Chromolaena pulchella*, Tesis para obtener el Título de Doctor en Química, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Hidalgo, **2011**.

Grande M., Mancheño B., Sánchez M. J., Elasclepial and other tetracyclic diterpenoids from *Elaeoselinum asclepium*, *Phytochemistry*, **1990**, 1977-1982.

Gutiérrez A., Estévez A., Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el s. XXI, *Real Academia de Ciencias Exactas Físicas Naturales*, **2009**, 409-419.

Isah Y., G Ndukwe I., O Amupitan J., 2., Isolation of Stigmasterol from Aerial Plant Part of *Spillanthes acmella* Murr, *World Journal of Life Sciences and Medical Research*, **2012**.

- Jeong S., Kim B., Keum K., Lee K., Kang S., Park B., Lee Y., You Y., Kaurenoic acid from *Aralia continentalis* Inhibits Biofilm Formation of *Streptococcus mutans*, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2013**, 1-9.
- Kamboj A., Saluja K. A., Isolation of Stigmasterol and β -sitosterol from Petroleum Ether Extract of Aerial Parts of *Ageratum Conyzoides* (Asteraceae), *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2011**, 0975-1491.
- Katinas L., Gutiérrez D. G., Grossi M. A., Crisci J. V., Panorama de la familia Asteraceae (= Compositae) en la República Argentina, *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, **2007**, 113-129.
- Llorente-Bousquets, J., Ocegueda.S., Estado del conocimiento de la biota, en Capital natural de México, *Conocimiento actual de la biodiversidad, CONABIO, México*, **2008**, 283-322.
- Luhata L. P., Munkombwe N. M., Isolation and Characterisation of Stigmasterol and β -Sitosterol from *Odontonema strictum* (Acanthaceae), *Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences*, **2015**, 88-95.
- Kakuta H., Seki T., Hashidoko Y., Mizutani J., *Ent*-kaurenic acid and its related compounds from glandular trichoma exudate and leaf extracts of *polymnia sonchifolia*, **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, **1992**, 1562-1564.
- McMurry J., Química Orgánica, *Cengage Learning*, 8ª edición, 2012, 299.
- Mahato S. B., Kundu A., ^{13}C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids a compilation and some salient features, *Phymchemistry*, **1994**, 1517-1575.
- Maldonado E., Vaughan J., Ortega A., A melampolide and an eudesmanolide from *Perymenium mendezii*, *Phytochemistry*, **1983**, 813-815.
- Maldonado E., Mayorga L., Ortega A., Perydiscolic acid, a germacranolide from *Perymenium* species, *Phytochemistry*, **1986**, 205-207.
- Maldonado E., Mancera C., Fiallega G., Ortega A., Germacranolides from *Perymenium berlandieri*, *Phytochemistry*, **1994**, 1265-1267.

- Maldonado E., Bello M., Villaseñor J. L., Ortega A., Acyclic diterpenes from *Perymenium hintonii*, *Phytochemistry*, **1998**, 1115-1118.
- Mallavadhani U. V. Mahapatra A., Raja S. S., Manjula C., Antifeedant Activity of Some Pentacyclic Triterpene Acids and Their Fatty Acid Ester Analogues, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 1952-1955.
- Marcano D., Hasegawa M., Fitoquímica Orgánica, *Torino*, 2da ed., **2002**, 317.
- Martínez-Meyer E., Sosa-Escalante E., Álvarez F., El estudio de la biodiversidad en México: ¿una ruta con dirección?, *Revista Mexicana de Biodiversidad*, **2014**, 1-9.
- Marzocca A., Nociones básicas de taxonomía vegetal, *IICA*, 1 ed., **1985**, 7-8.
- Montiel M., Introducción a la flora de Costa Rica, *Universidad de Costa Rica*, 1991, 139.
- Murillo R., Castro V., Araya J., Poveda L., Nuevas lactonas sesquiterpénicas de *Perymenium grande*, *Ciencia y Tecnología*, **2006**, 217-226.
- Nakanishi K., Goto T., Itô S., *Natural Products Chemistry*, **1974**, 250-251.
- Nes W., Norton R., Benson M., Carbon-13 NMR studies on sitosterol biosynthesized from [¹³C] mevalonates, *Phytochemistry*, **1992**, 805-811.
- Novara L., Gutiérrez D., Flora del valle de Lerma, Asteraceae bercht. & j. presl. v. Heliantheae Cass, **2010**, 1-2.
- Ocampo R., Domesticación de plantas medicinales en Centroamérica, **1994**, 108.
- Ohno N., Mabry T., Zabel V., Watson W., Tetrachyrin, a new rearranged kaurenoid lactone, and diterpene acids from *Tetrachyron orizabaensis* and *Helianthus debilis*, *Phytochemistry*, **1979**, 1687-1689.
- Oliveira D., Hamerski L., Pinto A., Separação semipreparativa de α e β -amirina por cromatografía líquida de alta eficiencia, *Química Nova*, **2011**, 704-706.
- Pacheco A., Machado de Oliveira P., Piló-Veloso D., Carvalho Alcântara F., ¹³C-NMR Data of Diterpenes Isolated from *Aristolochia* Species, *Molecules*, **2009**, 1245-1262.

- Patra A., Mitra A., Carbon ¹³ NMR Spectra of Kauranoid Diterpenes, *Organic Magnetic Resonance*, **1980**, 58-60.
- Patra A., Mukhopadhyay A., Mitra A., Carbon-13 Resonance Assignments of some Friedelanes and Taraxasteranes, *Organic Magnetic Resonance*, **1981**, 166-168.
- Prakash C. V., Prakash I., Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*, *International Current Pharmaceutical Journal*, 2012, 239-242.
- Peña A. Contribución al estudio de los ácidos kaurenicos aislados de *Coespeletia moritziana*, Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, departamento de Química, Mérida Venezuela 2008.
- Pyramo C. A., *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis Pars Quinta*, **1836**.
- Pyrek J., Neutral Diterpenoids of *Helianthus annuus*, *Journal of Natural Products*, **1984**, 822-827.
- Raviña E., Medicamentos: Un Viaje a Lo Largo de la Evolución Del Descubrimiento de Fármacos, Universidad de Santiago Compostela, **2008**.
- Rzedowski J., Calderón de Rzedowski G., Dos Especies Nuevas de *Perymenium* (Compositae-Heliantheae) de la Porción Árida del Estado de Querétaro, *Acta Botánica Mexicana* **90**, **2010**, 119-127.
- ^aRzedowski J., Calderón de Rzedowski G., Dos especies nuevas de *Perymenium* (Compositae-Heliantheae) del centro de México, *Acta Botánica Mexicana* **97**, 2011, 57-63.
- ^bRzedowski J., Calderón de Rzedowski G., Carrillo R. P., Flora del bajío y regiones adyacentes, Instituto de Ecología, A.C. Centro regional del Bajío, Pátzcuaro Michoacán, 2011, 107-114.
- Redonda M. R., Villaseñor J. L., Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlan, Bercht. & J. Presl, **2011**, 1-64.
- Robinson B. L., Greenman J. M., Revision of the Genera *Montanoa*, *Perymenium*, and *Zaluzania*, *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University*, **1899**, 507-534.
- Romo de Vivar A., Química de la Flora Mexicana, *Investigaciones en el Instituto de Química de la UNAM*, Primera edición, **2006**, 89.

- Rowe J., Natural Products of Woody Plants, *Springer Series in Wood Science*, 1989, 691-807.
- Sarker S., Nahar L., Chemistry for Pharmacy Students: General, Organic and Natural Product Chemistry, *Wiley*, **2007**, 331.
- Seebacher W., Simic N., Weis R., Saf R., Kunert O., Spectral Assignments and Reference Data, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2003**, 636-638.
- SEMARNAT, Serie ¿Y el medio ambiente? Biodiversidad Conocer para conservar, SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES, Dirección General de Estadística e Información Ambiental, **2011**, <http://www.semarnat.gob.mx>.
- Siedle B., García P., Murillo R., Schulte M., Castro V.; Rüngeler P., Klaas V., Da Costa F., Kisiel W., Merfort I., Quantitative Structure-Activity Relationship of Sesquiterpene Lactones as Inhibitors of the Transcription Factor NF-KB, *Journal Medical Chemistry*, 2004, 6042-6054.
- Soodabeh S., Azadeh M., Ahmad R. G., Mohammad A., The Story of Beta-sitosterol- A Review, *European Journal of Medicinal Plants*, **2014**, 590-609.
- Suárez A. I., Rivas D., Compagnone R., Castillo A., Blanco Z., Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Croton matourensi*, *Revista Facultad de Farmacia*, **2009**.
- Taiz L., Zeiger E., Fisiología vegetal, *Universitat Jaume I.*, 2006, 537.
- Tholl D., Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants, *Springer International Publishing Switzerland*, **2015**.
- Thuy T., Sung T, Frank S., Wessjohann L., Triterpenes from the roots of *Codonopsis pilosula*, *Journal of Chemistry*, **2008**, 515-520.
- Vieira H., Takahashia J. A., Oliveirab A. B., Chiaric E., Boaventura M. A., Novel Derivatives of Kaurenoic Acid: Preparation and Evaluation of their Trypanocidal Activity, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2002**, 151-157.
- Villagómez A., Estudio Químico Preliminar de *Perymenium bupthalmoides*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, **2014**, Morelia Michoacán, México.

Villarreal J., Reyna V., Villaseñor J. L., Corología de las Asteráceas de Coahuila, México, *Acta Botánica Mexicana*, **1996**, 29-42.

Villaseñor J., La familia Asteraceae en México, **1993**.

Villaseñor J., Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México, *Interciencia*, **2003**, 1-9.

Villaseñor J., Hinojosa E., El género *Sclerocarpus* (Asteraceae, Heliantheae) en México, 2011, 51-62.

Zamilpa A., Tortoriello J., Navarro V., Delgado G., Álvarez L., Antispasmodic and antimicrobial diterpenic acids from *Viguiera hypargyrea* roots, *Planta Medica*, **2002**, 281-283.

Zgoda P., Freyer A., Killmer L., Porter J., Antimicrobial diterpenes from the stem bark of *Mitrephora celebica*, *Fitoterapia*, **2002**, 434-438.