

9
2oj.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES¹
FAC. DE QUIMICA

ESTUDIO FITOQUIMICO DE

Iostephane Madriensis (Cachana)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C O

P R E S E N T A

ARTURO EDUARDO CANO FLORES

MEXICO, D. F.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

I.-	INTRODUCCION	1
II.-	ANTECEDENTES	4
III.-	PARTE TEORICA	15
IV.-	ESPECTROS:	
	Espectro # 1. I.R. (CHCl ₃) ác.traquiloban-19-oico.	55
	Espectro # 2. RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 80 MHz) del ác. traquiloban-19-oico.	56
	Espectro # 3. I.R. (CHCl ₃) del 16 α-hidroxi- <i>ent</i> -kaurano.	57
	Espectro # 4 RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 80 MHz) del 16-α-hidroxi- <i>ent</i> -kaurano.	58
	Espectro # 5 I.R. (CHCl ₃) del ácido <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico, mezclado con el ácido <i>ent</i> -beyer-15-en-19-oico.	59
	Espectro # 6 RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 80 MHz) del ácido <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico, mezclado con el ácido <i>ent</i> -beyer-15-en-19-oico.	60
	Espectro # 7. I.R. CHCl ₃) del ácido 15 α-anqeloiloxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico.	61

Espectro # 8.	RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 80 MHz) del ácido 15 α-angeloiloxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico.	62
Espectro # 9.	I.R. (CHCl ₃) del ácido 15 α-hidrox <i>o</i> - <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico.	63
Espectro # 10.	RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 80 MHz) del ácido 15 α-hidrox <i>o</i> - <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico.	64
Espectro # 11.	I.R. (CHCl ₃) del ácido 15 α-hidrox <i>o</i> -traquiloban-19-oico.	65
Espectro # 12.	RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 80 MHz) del ácido 15 α-hidrox <i>o</i> -traquiloban-19-oico.	66
Espectro # 13.	I.R. (CHCl ₃) del 15 α-hidrox <i>o</i> -traquiloban-19-oato de metilo.	67
Espectro # 14.	RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 80 MHz) del 15 α-hidrox <i>o</i> -traquiloban-19-oato de metilo.	68
Espectro # 15.	RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 20 MHz) del 15 α-hidrox <i>o</i> -traquiloban-19-oato de metilo.	69
Espectro # 16.	I.R. (CHCl ₃) del ácido 15 α-acet <i>o</i> -traquiloban-19-oico.	70
Espectro # 17.	RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 80 MHz) del ácido 15 α-acet <i>o</i> -traquiloban-19-oico.	71
Espectro # 18.	I.R. (CHCl ₃) del 16 α-hidrox <i>o</i> - <i>ent</i> -kaur-19-ol.	72
Espectro # 19.	RMN- ¹ H (CHCl ₃ , 80 MHz) del 16 α-hidrox <i>o</i> - <i>ent</i> -kaur-19-ol.	73

Espectro # 20.	I.R. (CHCl ₃) del ácido 16 α-hidroxi- <i>ent</i> -kaur-11-en-19-oico.	74
Espectro # 21.	RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 80 MHz) del ácido 16 α-hidroxi- <i>ent</i> -kaur-11-en-19-oico.	75
Espectro # 22.	I.R. (CHCl ₃) del traquiloban-19-oato de metilo.	76
Espectro # 23.	RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 80 MHz) del traquiloban-19-oato de metilo.	77
V.- PARTE EXPERIMENTAL		78
VII.- RESUMEN Y CONCLUSIONES		91
- RECOMENDACIONES		99
VII.- BIBLIOGRAFIA		100

INTRODUCCION.

México es un país vasto y diverso en recursos vegetales, ya - que prácticamente todos los grandes tipos de vegetación existentes en el mundo se presentan en el país y su distribución a menudo es compleja en función de la amplia variedad de topografía, climas, suelos y usos de la tierra.¹

Sin embargo, el conocimiento y el estudio de la flora mexicana es aún muy deficiente y unilateral desde diversos aspectos, ya que el desarrollo del país requiere conocimientos sobre - sus recursos naturales, y especialmente los renovables para - su mejor aprovechamiento y preservación. El conocimiento de la vegetación y sobre todo de sus interrelaciones ecológicas con los diferentes factores del medio ambiente, constituye -- hoy en día la base indispensable para el adecuado aprovechamiento y la debida conservación de la flora mexicana.

El presente trabajo trata del estudio fitoquímico de una planta de uso medicinal, cuyo nombre popular es cachana, la cual es endémica de la Sierra Madre Occidental de Chihuahua.

El estudio de una planta medicinal requiere de metodología para examinar las interacciones y relaciones entre los componentes biológicos, químicos y culturales del medio ambiente.²

El uso medicinal popular de algunas plantas forman parte de - nuestra cultura y tradiciones. Sin embargo, la cachana, al -

igual que otras plantas utilizadas con fines curativos por los diversos grupos étnicos y sociales que habitan nuestro país, - carecen de estudios en las áreas de botánica, fitoquímica, farmacológica y de aplicación clínica. Por lo que es necesario - que en los países que poseen este tipo de vegetación, se integren y desarrollen grupos interdisciplinarios que contribuyan, por medio de la investigación, a la preservación y uso racional de tan valioso recurso natural.

Por otro lado, las plantas superiores han sido fuente de alimento tanto para el hombre como para los animales. Estas además, acumulan en cantidades considerables sustancias orgánicas llamadas metabolitos secundarios, algunos de los cuales pueden servir como fuentes de aceites industriales, resinas, colorantes, saborizantes, productos farmacéuticos, etc. y también desempeñan un papel ecológico de gran trascendencia. Por lo que en la actualidad los productos naturales adquieren una importancia singular.

Así, la investigación química en el área de productos naturales ha mostrado en los últimos años un gran desarrollo, gracias a los avances en las técnicas instrumentales de análisis, y al interés que se tiene sobre algunos metabolitos secundarios que representan un reto en el desarrollo de la síntesis orgánica, la cual genera conocimientos que contribuyen al avance -

de la química. Finalmente es la química de los productos naturales la que ha fomentado el desarrollo de otras áreas, debido a la variedad de compuestos proporcionados.

El presente trabajo tiene como objetivo la extracción, el aislamiento y la elucidación estructural de los metabolitos mayoritarios de la planta medicinal *Iostephane madrensis*, la cual es utilizada rutinariamente por los Tarahumaras en el tratamiento del reumatismo y de las úlceras digestivas. Esta planta, junto con la arnica, la yerba mora, y la siricua, son los ingredientes del té ulcero, el cual es muy popular en la Ciudad de Chihuahua para el tratamiento de las úlceras estomacales.³

ANTECEDENTES

Como en muchas otras áreas del saber, los conocimientos sobre la vegetación se inician indudablemente, con el comienzo de la humanidad misma.¹

En un enfoque histórico, desde luego cabe observar que el hombre primitivo estaba relacionado con la naturaleza en forma estrecha, y el éxito de sus actividades dependía de su habilidad para distinguir y reconocer diferentes tipos de nichos ecológicos que propiciaban albergue a las especies útiles, objecto de su búsqueda y persecución. La vida del hombre sedentario, que se basa en la agricultura, conoce mucho de la vegetación que le rodea, de su dinámica, de sus relaciones con el clima, con el suelo y de su valor en cuanto a su posible aprovechamiento agrícola y de otra índole. Tal sabiduría se acumula y se transmite verbalmente de generación en generación. A medida que el conocimiento avanza, el hombre trata de someter a la naturaleza a su propia voluntad para obtener un mayor beneficio.

En nuestro país, desde la época prehispánica abundan las referencias, en códices y otro tipo de documentos, donde se señalan los conocimientos que se tenían en aquellos tiempos, así como el nombre, uso y propiedades de un gran número de plantas, que eran utilizadas con fines curativos, las cuales fueron utilizadas "enteras" y sobre la base de un conocimiento -

empírico. De ahí que el conocimiento popular de las plantas medicinales está inmerso en la cultura del pueblo que lo posee, y que ésta se encuentra relacionada con la historia del mismo.

La transmisión de los conocimientos se lleva a cabo de generación en generación y está basado en su saber empírico.

De ahí que el objetivo general sea elevar el conocimiento popular a un nivel superior, confirmando ese conocimiento científicamente para llevarlo a una práctica más efectiva y sistemática.^{4,5}

Por lo tanto, es necesario que se orienten los esfuerzos de la investigación en todas las áreas (antropología, botánica, química, etnobotánica, farmacología, etc.) hacia un conocimiento científicamente más riguroso de las plantas que son utilizadas con fines curativos por los diferentes grupos étnicos y sociales de nuestro país.

Asimismo, el desarrollo tecnológico y científico de nuestro tiempo, requiere de conocimientos mucho más exactos de los recursos naturales disponibles dentro de los cuales se encuentra la flora.

Dentro de la rica y diversificada flora mexicana, se encuen-

tran las plantas medicinales, que forman parte de la herbolaria popular o indígena, que es rica en especies y conocimientos. En este grupo de plantas se encuentra *Iostephane madrensis* (S. Wats) Strother, cuyo nombre popular es "cachana", y la cual pertenece a la familia Asteraceae (Compositae).

La familia Compositae, la cual es la más vasta dentro de las fanerógamas, se encuentra más diversificada y mejor representada en el norte y centro de la República Mexicana. Esto se debe principalmente a factores ecológicos, pues el clima húmedo y caliente es el menos favorable para este grupo de plantas, que alcanzan su máxima representación en sitios secos y en lugares más frescos de las regiones montañosas. En México, la tribu Heliantheae forma el grupo dominante de la familia, prevaleciendo en zonas de clima templado y cálido.⁶ La familia de las Compuestas está constituida por hierbas, arbustos y árboles, con las hojas alternadas y opuestas, simples o divididas en forma diversa, sin estípulas. Las flores son hermafroditas, unisexuales o estériles, actinomorfas o cigomorfas, con cáliz ausente o sustituido por el papus o vilano que sirve para la diseminación de los frutos. Las flores se encuentran agrupadas en cabezuelas o capítulos. Estas poseen un involucre formado de brácteas, en receptáculo plano, cóncavo, convexo o globoso sobre el que se encuentran implantadas las flores, protegidas por brácteas, llamadas páleas. Las ca

bezuelas que tienen flores del mismo sexo se llaman homógamas, si son de sexo diferente se llaman heterógamas.⁷

Un estudio etnobotánico realizado con plantas originarias de la República Mexicana indica que éstas han sido agrupadas en base a su nombre común y características morfológicas, encontrándose que *Iostephane madrensis* forma parte de un complejo denominado "cachani" junto con otras tres especies de esta familia, (*Leatris punctata*, *Psaliun* sp. y *Roldana sessifolia*).³

Aunque la cachana es común en el Mercado de la Ciudad de Chihuahua, su distribución se encuentra limitada principalmente a poblaciones aisladas en las Colinas Orientales de la Sierra Madre de Chihuahua.²

Iostephane madrensis (cachana) cuyos sinónimos son *Helianthella madrensis* o *Pinocarpus madrensis*, presenta raíces gruesas y carnosas, sus tallos son escasamente pubescentes o glabros, casi desnudos de 60 cm de largo, sosteniendo de 3 a 5 flores penduladas. Las hojas en su mayoría son radicales, lineares y largamente pecioladas, agudas o acuminadas de 10.2 cm a 25.4 cm de longitud (también presenta hojas caulinales más cortas) enteras y glabras en el haz. Las flores se encuentran agrupadas en bezuelas pequeñas (5 a 6 líneas de flores), involucro finamente pubescentes formado por brácteas. Las brácteas de las flores poseen 9 líneas de longitud, son escamosas, delgadas y escario

sas, y el vilano tiene dos aristas delgadas y numerosas de sectadas. Los bosques de pinos sirven de nicho para la cachana.⁸

El té de la raíz de la cachana es tomado como remedio para las úlceras estomacales, los padecimientos del riñón, de la esterilidad y del "mal de espanto", mientras que como emplasto es utilizado para el tratamiento del reumatismo. La raíz seca de la cachana junto con el cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*), la árnica (*Heterotheca inuloides*), la yerba mora (*Solanum sp.*) y la siricua (*Plumbago scadens*) son los ingredientes del té denominado úlcerero, el cual es muy popular en la Ciudad de Chihuahua.³

En el presente estudio químico de *Icostephane madrensis*, se aislaron y caracterizaron nueve metabolitos secundarios, todos ellos diterpenos con esqueleto base del traquilobano, ent-beyreno y ent-kaureno. A continuación se reseñará brevemente la biosíntesis de estos tres tipos de esqueletos.

La biosíntesis de los terpenoides se encuentra bien documentada en la literatura, y en especial la del colesterol.⁹ A continuación se describirá la biosíntesis de los diterpenos policíclicos, la cual se ilustra en el esquema I.

La primera etapa de la biosíntesis de los diterpenos tetracíclicos, se inicia con la condensación de tres unidades de acetil-SCoA para formar el anión mevalonato (III). El proceso implica la formación inmediata de acetoacetil-SCoA (I) y subsecuente generación de β -hidroxi- β -metil-glutaril-SCoA (II). Este último se convierte en mevalonato mediante un paso dependiente de dos unidades de NADPH. Una molécula de NADPH funciona en la reducción del grupo carbonilo a un grupo hidroxilo, y la segunda unidad participa en la ruptura reductiva del enlace disulfuro para dar CoASH y mevalonato (III) - en su forma libre.

La segunda etapa se inicia con la activación del mevalonato por un trío de quininas dependientes de ATP para dar 3-fosfo-5-pirofosfato de mevalonilo (IV), el cual es muy inestable y, sufre una descarboxilación y una desfosforilación para generar pirofosfato de isopentenilo (V), que se isomeriza posteriormente, formando pirofosfato de γ,γ -dimetilalilo (VI). El pirofosfato de isopentenilo se condensa con una molécula de pirofosfato de γ,γ -dimetilalilo para obtener el pirofosfato de geranilo (VII), el cual a su vez se condensa con el pirofosfato de isopentenilo para producir el pirofosfato de geranil-geranilo (IX). Estas condensaciones no son directas, - sino que pasan a través del pirofosfato de geranilo (VII) y pirofosfato de farnesilo (VIII), ver esquema II.

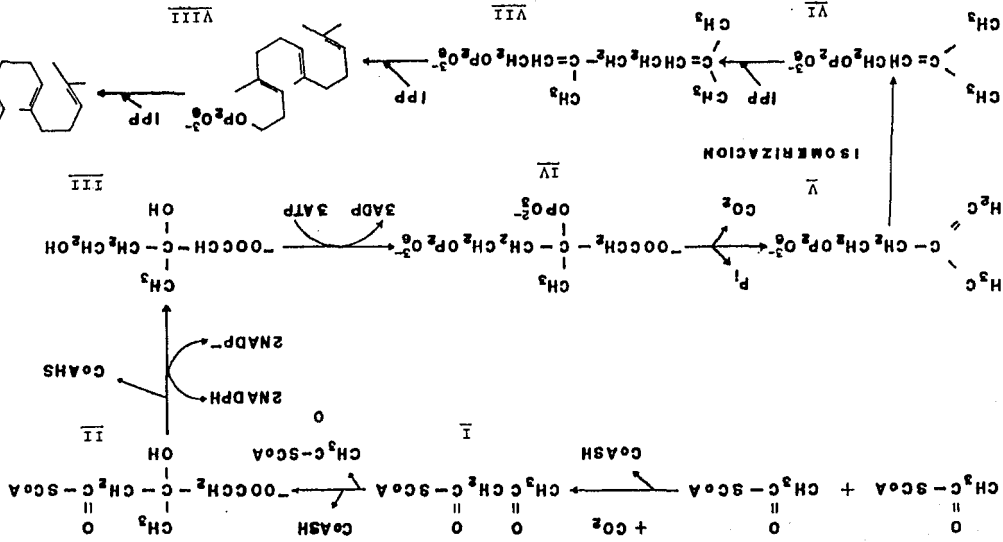
En términos generales se ha sugerido que la primera etapa de ciclización involucra el ataque electrofílico de un H^+ en el doble enlace terminal en C-14 del pirofosfato de geranil-geranilo (IX) (Esquema II), seguido de una serie de desplazamientos electrónicos de los dobles enlaces en C-6 y C-10 para formar dos anillos fusionados de seis miembros y, posteriormente la eliminación de un protón del grupo metilo del C-7, para generar un grupo metileno exocíclico y así formar un intermediario cíclico estable, conocido como pirofosfato de copalilo (X), el cual sirve como sustrato en varias ciclizaciones adicionales para formar diferentes tipos de diterpenos. El ataque nucleofílico a C-13 (nótese el cambio en el sistema de numeración) por el metileno exocíclico acoplado con la eliminación del grupo pirofosfato, produce, de acuerdo al arreglo espacial de la cadena de pirofosfato, dos carbocationes epiméricos (XI y XII), como se indica en el esquema II.

El ataque nucleofílico del doble enlace C-15 y C-16 al C-8 genera una ciclización adicional para formar un carbocatión en C-16 intermediario XIII.

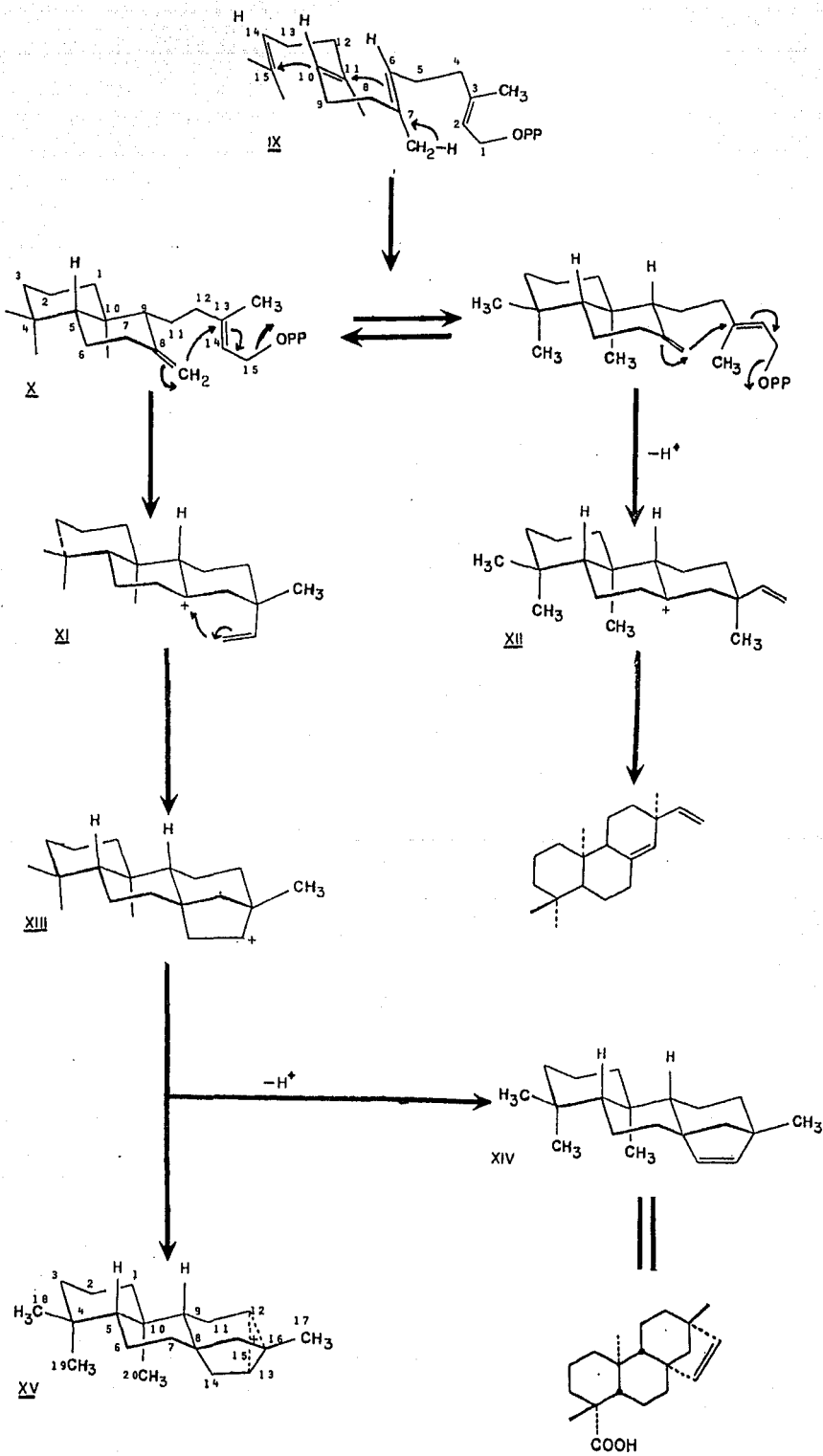
El intermediario XIII puede eliminar un protón del C-15 y formar un doble enlace C(15)-C(16), generándose así el esqueleto del *ent*-beyereno(s). Por otro lado, la ruptura parcial del enlace C(12)-C(13) y la formación parcial del enlace C(12)-C(16)

genera un carbocatión no clásico (XV), el cual es un intermedio importante en la formación del *ent*-kaureno, traquilobano y *ent*-atisano. El esqueleto del *ent*-kaureno se origina mediante la formación del enlace (12)-C(16) del intermedio (XV), para generar un carbocatión terciario (XVI) (nótese el cambio en el sistema de numeración), el cual se estabiliza por pérdida de un protón de C-17 para formar el metileno exocíclico (XVII). Alternativamente, a partir del intermedio (XV), se genera la formación del esqueleto del traquilobano (XVIII), mediante la pérdida del protón en C-12 y la formación del enlace C(12)-C(16), ver esquema III.^{10,11,12,13.}

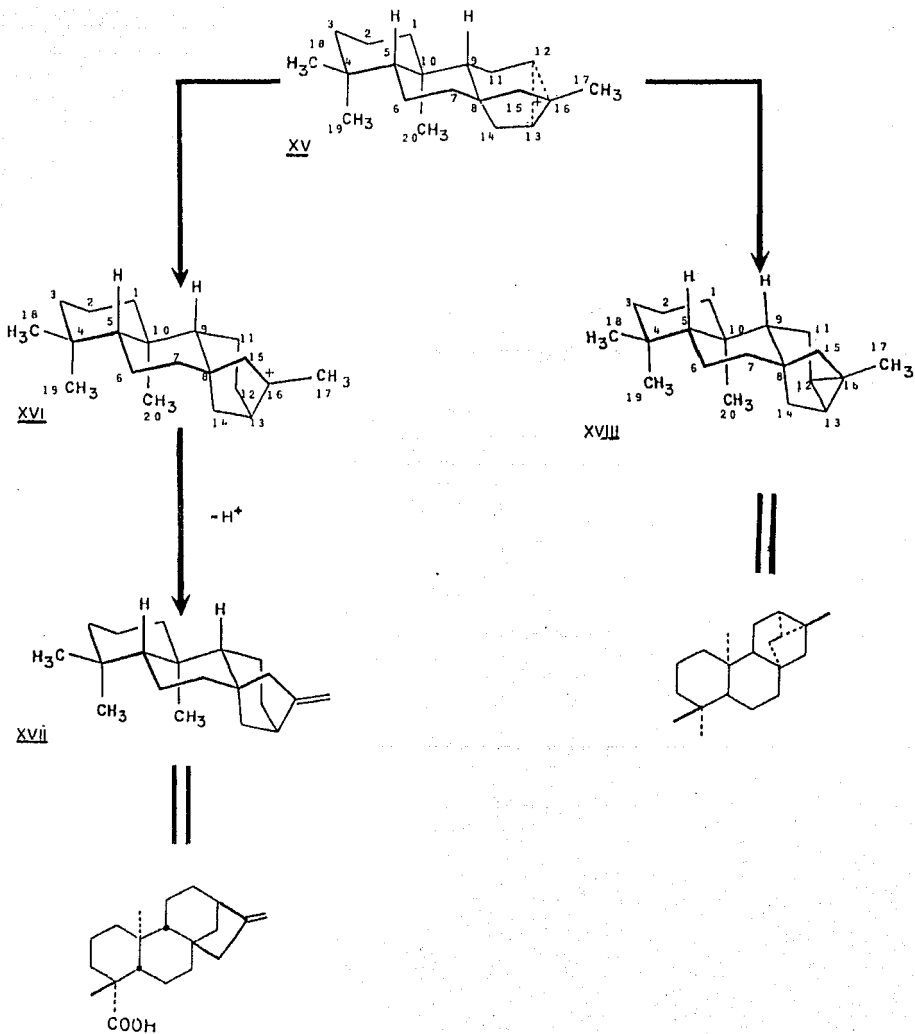
EQUEMA 1.



ESQUEMA II.



ESQUEMA III.



PARTE TEORICA

La raíz seca de *Iostephane madrensis* fue sometida a extracción por maceración con CHCl_3 , en las condiciones que se describen en la parte experimental, para después proceder a la separación y determinación de algunos de sus metabolitos secundarios.

De las fracciones 38-58, que se obtuvieron al eluir la columna con una mezcla de hexano-acetato de etilo (98:2), se aisló un compuesto cristalino de p.f. 160-162°C y $[\alpha] = -68.18$ (c 1.32; CHCl_3), que en el espectro de masas por impacto electrónico muestra el ión molecular a m/e 302. En el espectro de infrarojo (espectro # 1), se observan una banda para la (O-H) de 3200 a 2600 cm^{-1} , y dos bandas que corresponden a la $\nu(\text{C=O})$ en 1729 y 1692 cm^{-1} , lo cual indica que en la molécula está presente un grupo carboxilo (-COOH), el cual se comprobó químicamente al obtener el éster correspondiente por metilación con diazometano (CH_2N_2) en condiciones normales.

Los datos anteriores aunados con la discusión posterior, permitieron proponer una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$, y a la cual le corresponden seis grados de insaturación.

El espectro de RMN- ^1H (espectro # 2) de este compuesto muestra tres sinquletes a campo alto que integran para tres proto

nes cada uno, lo cual indica la presencia de tres metilos cuaternarios. Se observan también dos señales complejas a campo alto (δ 0.63 y δ 0.77) que por su desplazamiento químico corresponden a los protones que forman parte de un ciclopropano.¹⁴

Por lo anterior, se propuso como hipótesis estructural un diterpeno tetracíclico con esqueleto del tipo del traquilobano, ya que este incorpora en su arreglo molecular a un ciclopropano, (figura 1).

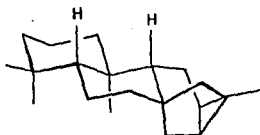


Figura 1.

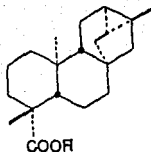
De esta manera se explican los seis grados de insaturación que posee esta molécula; una es debida a la presencia del grupo carboxilo, y cinco corresponden al esqueleto del traquilobano.

Las asignaciones para los tres singuletes, observados en el espectro de RMN-¹H que corresponden a los grupos metilos que están unidos a carbonos cuaternarios son: CH₃-17 (δ 1.11, s, 3H); CH₃-20 (δ 0.86, s, 3H). Tales asignaciones se argumentan al considerar el efecto de anisotropía causado por el grupo carboxilo en posición axial sobre el CH₃-20.¹⁹

El efecto de un grupo carboxilo axial sobre un grupo metilo unido al mismo átomo de carbono es de desprotección debido a que el grupo metilo se encuentra espacialmente muy cercano al grupo electroattractor. De ahí que la señal que se encuentra a campo más bajo haya sido asignada al CH₃-18 (δ 1.2). Mientras que al grupo CH₃-17 se le asigno la señal en δ 1.11 al considerar el efecto de desprotección que causa el anillo del ciclopropano.

Las asignaciones descritas son consistentes con las correspondientes a diterpenos con esqueleto de *ent*-kaurano, que se muestran en la tabla I y las cuales se describirán posteriormente.

De la discusión anterior, y en base a la comparación de las propiedades físicas y de las características espectroscópicas reportadas en la literatura para el traquilloban-19-oato de metilo (2), se pudo concluir que la sustancia aislada de *Isotephane madrensis* es el ácido traquilloban-19-oico (1).^{14, 15, 16}



- 1 R = H
2 R = CH₃

De las fracciones 86-90 que se obtuvieron al eluir la columna con una mezcla de hexano-acetato de etilo (94:6), se aisló un compuesto cristalino de p.f. 215-217°C, que en el espectro de masas por impacto electrónico presenta un ión molecular a m/e 290. El espectro de infrarojo (espectro # 3), muestra la presencia de un grupo hidroxilo, por la banda en 3411 cm⁻¹, que corresponde a la $\nu(\text{O-H})$. También se observa una señal doble a 1385 y 1369 cm⁻¹ que sugiere la presencia de un *gem*-dimetilo que corresponde a la $\nu(\text{C-H})$. Por otro lado, en el espectro de RMN-¹H (espectro # 4), se observan cuatro señales simples que integran para tres protones, los cuales corresponden a cuatro grupos metilos que están unidos a átomos de carbono --cuaternarios. Los datos descritos permitieron proponer una fórmula molecular C₂₀H₃₄O, a la cual le corresponden cuatro --grados de insaturación, y a plantear como hipótesis estructu-

ral a un diterpeno tetracíclico con esqueleto del tipo *ent-kaurano*, con un grupo hidroxilo como substituyente en el átomo -- de C-16 (figura 2).

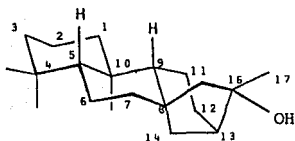
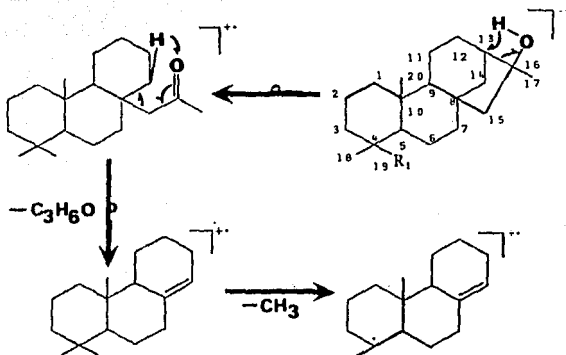


Figura 2.

Esta hipótesis fue confirmada al analizar el espectro de masas de este compuesto, el cual sugiere un patrón de fragmentación análogo al propuesto para el *ent-kauran-16-ol*, y el cual se muestra en el esquema III.¹⁷

Esta secuencia de fragmentación explica la presencia de una señal a m/e 232 (29.27%) que corresponde a la pérdida de 58 una a partir del ión molecular $[M^+ - C_3H_6O]$. La eliminación de (C_3H_6O) puede llevarse a cabo al romperse la unión entre el C(13)-C(16), con una migración del hidrógeno hidroxílico al C-13 para que posteriormente se lleva a cabo un rearrreglo de Mc. Lafferty. La pérdida del substituyente axial del C-4 a --

partir del ión $[M^+-58]$ genera un ión a 217 unidades de masa.¹⁷



Esquema III.- Patrón de fragmentación del *ent*-kauran-16-ol.

Las asignaciones de las diferentes señales que aparecen en su espectro de RMN-¹H (espectro # 4) se hicieron de la siguiente manera: la señal en (δ 0.86, s, 3H) se asignó al CH₃-18 en posición ecuatorial, mientras que la señal a (δ 0.81, s, 3H) se le adjudicó al CH₃-19 en posición axial, tomando en consideración que los grupos metilos en posición ecuatorial aparecen a campo más bajo que los grupos metilos en posición axial, debido a la desprotección que ejercen las ligaduras sigma C-C sobre los sustituyentes en posición ecuatorial.¹⁸

Por otro lado, al CH_3 -20 se le asignó la señal en (δ 1.04, s, 3H), tomando en consideración el efecto de desprotección debido a las interacciones 1,3-diaxiales con los grupos CH_3 -19 y CH_2 -14 (figura # 3), los desplazamientos químicos asignados a los tres grupos metilos presentes en esta molécula están de acuerdo con los desplazamientos químicos que se han reportado para derivados del kaureno y los cuales se muestran en la tabla I.

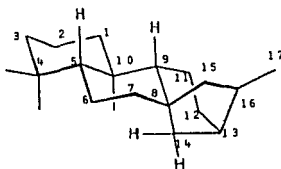
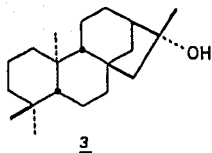


Figura 3.

Finalmente las señales en δ 1.37 (s, 3H) y δ 1.45 (s, 1H) -- fueron asignados a los grupos CH_3 -17 y OH en C-16 respectivamente.

De la discusión anterior, y comparando el patrón de fragmentación del espectro de masas, así como las propiedades físicas y constantes espectroscópicas reportadas en la literatura, se pudo concluir que el compuesto aislado de *Iostephane madrensis* es el 16 α -hidróxi-ent-kaureno (3).17,20,21



De las fracciones 91-103, que se obtuvieron al eluir la columna con una mezcla de hexano-acetato de etilo (92:8), se obtuvo una mezcla de dos compuestos. Ambos muestran en el espectro de masas por impacto electrónico un m/e molecular a m/e 302, figura 4.



Figura 4.

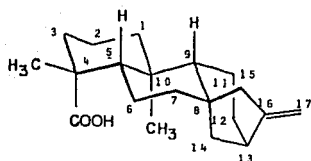
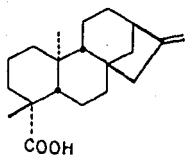
En el espectro de infrarojo (espectro # 5) se observan una banda ancha en la región de 3300 a 2500 cm^{-1} que corresponde a la $\nu(\text{O-H})$, dos bandas finas e intensas en 1730 a 1692 cm^{-1} que corresponden a la $\nu(\text{C=O})$ y una banda a 920 cm^{-1} debida a la $\nu(\text{O-H})$ fuera del plano, que sugiere la presencia de un grupo carboxilo. La presencia de una doble ligadura se manifiesta por las bandas que aparecen a 3066 cm^{-1} que corresponde a la $\nu(\text{C-H})$ olefínico, en 1655 cm^{-1} para la $\nu(\text{C=C})$ y en 878 cm^{-1} $\nu(\text{C-H})$ fuera del plano. La discusión anterior explica dos grados de insaturación, y se propone una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$, fórmula a la cual le corresponden seis grados de insaturación.

Debido a que el espectro de masas muestra homogeneidad en la zona del ión molecular, se concluye que la mezcla está constituida por sustancias isoméricas.

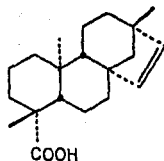
En el espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ (espectro # 6) se observan dos señales simples a campo alto, las cuales integran para tres protones cada una. Al CH_3 -18 se le asignó la señal en (δ 1.26, s, 3H). De la tabla I se puede observar que el desplazamiento químico para el grupo CH_3 -18 ecuatorial aumenta de 0.4-0.45ppm cuando se compara con el desplazamiento químico para el CH_3 -18 ecuatorial cuando el grupo CH_3 axial en C-4 es sustituido por

el grupo (-COOH). En los diferentes metabolitos secundarios de *Iostephane madrensis* que presentan este tipo de funcionalidad, estas observaciones se pueden fundamentar si se considera, en primer término, la cercanía especial de los grupos CH₃-18 ecuatorial y (-COOH) axial, y en segundo término el efecto electroatractor del grupo carboxilo. Al CH₃-20 le fue asignada la señal en $\delta 0.96$ (g, 3H), al considerar el efecto de anisotropía -- que ejerce el grupo carboxilo, el cual causa un efecto de protección sobre el metilo angular en C-10. Esto se debe al arreglo especial que presenta el sistema sp² (plano trigonal), el cual tiene libre rotación y tiende a estar equidistante del -- CH₃-20.²² Lo anterior está de acuerdo con los datos que se presentan en la tabla I y II.

También se ha observado un efecto de desprotección al CH₃20 por el grupo carboxilo en posición axial en C-4. Este efecto es -- originado por el arreglo especial en el isómero *trans-anti-cis* que tienen los anillos en el esqueleto del kaurano, que ocasionan que el grupo CH₃-20 sufra interacciones 1,3-diaxiales, en el cual la interacción corresponde a un desplazamiento a campo bajo en aproximadamente 0.12 ppm (ver tabla I), (figura 5).

Figura 5.4.

Las señales en δ 2.64 (s amplio, 1H, $W_k = 12$ Hz) y δ 4.73 (s amplio, 2H, $W_k = 11$ Hz) está de acuerdo con la presencia de un protón alílico terciario y de un metileno exocíclico, respectivamente. La comparación de estos datos con los reportados para el ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (4), y comparación directa con una muestra auténtica, confirmó la identidad de la sustancia.²⁰



5.

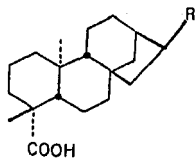
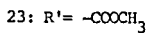
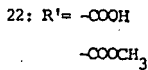
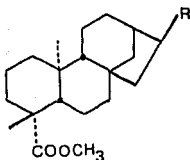
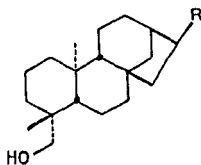
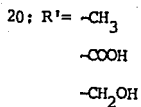
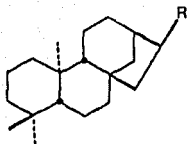
El otro componente de la mezcla mencionada, se encuentra en proporción minoritaria, y le corresponde la misma fórmula molecular ($C_{20}H_{30}O_2$). Fue identificado como el ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (5) ya que el espectro de RMN- 1H , muestra dos señales dobles que forman

parte de un sistema AB, que fueron asignadas a los protones vi-
níficos que están unidos a C-15 (δ 5.72, d, 1H, J= 6 Hz) y C-16 -
(δ 5.42, d, 1H, J= 6 Hz), además se observan tres señales simples
que se asignaron de la manera siguiente: para el CH₃-20 la señal
en δ 0.96, al CH₃-18 se le asignó la señal en δ 1.26, mientras --
que la señal en δ 0.69 fue asignada al CH₃-17. La confirmación -
de la estructura propuesta se hizo mediante la comparación de -
sus propiedades físicas y constantes espectroscópicas con las que -
se encuentran reportadas en la literatura, después de la purifica-
ción de esta sustancia por medio de cristalizaciones sucesivas -
y la comparación directa con una muestra auténtica. ²³

Tabla I: Desplazamientos químicos de los grupos metilo en derivados del kaurano*

Grupo en C-4 axial (R)	CH ₃ en C-4 CH ₃ -18	CH ₃ en C-10 CH ₃ -20	COMPUESTOS
-CH ₃	0.85-0.81	1.01-1.00	20: R' = CH ₃ -CH ₂ OH -COOH
-CH ₂ OH	0.96-0.95	0.99	21: R' = CH ₃ -COOCH ₃
-CO ₂ CH ₃	1.17	0.82-0.81	22: R' = COOH -COOCH ₃
-COOH	1.24-1.23	0.94-0.93	23: R' = COOCH ₃

*) Henrick, C. A. and Jefferies, P. R., The Chemistry of the Euphorbiaceae. *Aust. J. Chem.* 17, 915 (1964).



Figuras anexas a la tabla I, en donde se muestran diferentes compuestos derivados del Kaurano.

Tabla II: Desplazamientos químicos de los grupos metilo en derivados del kaurano**

Grupo en C-4 axial (R)	CH ₃ en C-4 CH ₃ -18	CH ₃ en C-10 CH ₃ -20	COMPUESTOS
-CH ₃	0.81	1.04	3: 16 α-hidroxi- <i>ent</i> -kaurano.
-COOH	1.21-1.26	0.95-0.96	4: ác. <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico. 5: ác. 15 α-angeloloixi- <i>ent</i> -kaur-en-19-oico. 6: ác. 15 α-hidroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico. 7: ác. 16 α-hidroxi- <i>ent</i> -kaur-11-en-19-oico.
-COOCH ₃	1.17	0.82-0.81	16: 15 α-hidroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oato de metilo.
-CH ₂ OH	1.36	1.01	14: 16 α-hidroxi- <i>ent</i> -kaur-19-ol.

** En los metabolitos secundarios de *Iostephane madrensis*.

De las fracciones 120-138, que se obtuvieron al eluir la columna con una mezcla de disolventes formada de hexano-acetato de etilo (85:15), se aisló un sólido cristalino de p.f. 185-187°C.

El espectro de masas por impacto electrónico muestra un ión molecular a m/e 400, al cual se le hizo corresponder una fórmula molecular $C_{25}H_{36}O_4$, y la que presenta ocho grados de insaturación, que junto con los datos obtenidos en base a su análisis espectrocópico y espectrométrico, sugieren que se trata de un diterpeno tetracíclico del tipo del *ent*-kaurano, esterificado con un residuo de cinco átomos de carbono.

En el espectro de infrarojo (espectro # 7) se observan bandas en $3200-2600\text{ cm}^{-1}$ ν (O-H), 1693 cm^{-1} ν (C=O) y 909 cm^{-1} ν (O-H) - que sugieren la presencia de un grupo carboxilo. La banda del grupo carbonilo de éster se superpone con la ν (C=O) del grupo carboxilo. Sin embargo la presencia del grupo éster se confirma con las bandas en 1239 cm^{-1} (vibración asimétrica) y 1169 cm^{-1} (vibración simétrica), que corresponden a la unión C-O-C. La presencia del doble enlace C=C se manifiesta por las absorciones en 3055 cm^{-1} ν (C-H) y 1648 cm^{-1} ν (C=C).

En el espectro de RMN- ^1H (espectro # 8), se observan dos señales simples que se asignaron al CH_3 -20 (δ 0.95, s, 3H) y CH_3 -18 (δ 1.22, s, 3H) de un *ent*-kaureno respectivamente, --

basándose en los argumentos descritos anteriormente y en los datos mostrados en la tabla I. Al protón alílico de la posición-13, se le asignó la señal en δ 2.75 (s amplio, 1H, $W_{\frac{1}{2}}=12$ Hz), mientras que la señal en δ 5.05 (s amplio, 1H, $W_{\frac{1}{2}}=4$ Hz) - fue asignada al protón alílico base de éster de la posición - C-15.

Asimismo el espectro de RMN-¹H confirma la presencia de un grupo metileno exocíclico, ya que se observan las señales correspondientes a este grupo funcional en δ 5.10 (s amplio, 1H, - - H-17a, $W_{\frac{1}{2}} = 5$ Hz) y δ 5.31 (s amplio, 1H, H-17b, $W_{\frac{1}{2}} = 4$ Hz).

El grupo éster fué identificado como un resto del ácido angélico (figura # 6), el cual se dedujo a partir de las señales características en RMN-¹H para este fragmento estructural, las cuales son las siguientes: al H-3' vinílico se le asignó la señal en δ 6.18 (cc, 1H, $J = 7$ y 1.2 Hz), al CH₃-4' δ 2.03 (dc, 3H, $J = 7$ y 1.4 Hz) y para el CH₃-5' la señal en δ 1.99 (s amplio, 3H, $W_{\frac{1}{2}} = 1.2$ Hz).

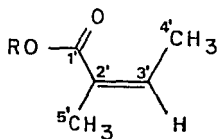
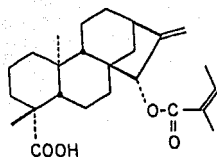


Figura 6

La presencia del residuo del ácido angélico se apoya, adicionalmente, en el patrón de fragmentación, que presenta un ión - en m/e 300 (22.5%), que corresponde a la pérdida de el fragmento $C_5H_8O_2$ al cual le corresponden 100 uma. La señal en m/e 83 (100%) corresponde al ión C_5H_7O , y finalmente la señal en m/e 55 (45%) corresponde a la pérdida de CO a partir del ión angelato.^{24,25,26.}

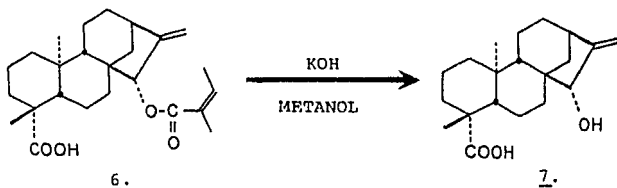
Para determinar la orientación y posición del grupo angeloiloxi en el esqueleto del *ent*-kaurano se sometió a hidrólisis una muestra del ácido 15 α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico con una solución alcohólica de KOH al 5%, obteniéndose como producto de reacción el ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico, - el cual es descrito como producto natural de *Iostephane madreensis* más adelante en el presente trabajo. La posición y orientación del grupo angeloiloxi fueron determinados en base a las propiedades físicas y constantes espectroscópicas del producto aislado y del producto de reacción.

En base a la discusión anterior, y comparando las constantes espectroscópicas y las propiedades físicas con las reportadas en la literatura se pudo concluir, que el compuesto aislado de *Iostephane madreensis* es el ácido 15 α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (6).^{20,27}



6.

De las fracciones 179-186, obtenidas al eluir la columna inicial con una mezcla de hexano-acetato de etilo (80:20), se aisló un producto sólido cristalino de p f. 229-231°C, el cual presentó propiedades físicas y constantes espectroscópicas idénticas al producto que se obtuvo al hidrolizar en medio básico una muestra del ácido 15 α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (Esquema IV.), por lo que se pudo concluir que el compuesto aislado de *Iostephane madrensis* es el ácido 15 α -hidroxí-*ent*-kaur-16-en-19-oico (7).



6.

7.

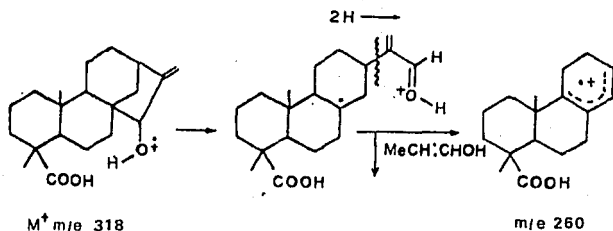
Esquema IV.- Hidrólisis básica del ácido 15 α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (6).

Esta sustancia posee una fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_3$, y un peso molecular de 318 uma, y le corresponden seis grados de insaturación. El espectro de infrarojo (espectro # 9) muestra la presencia de un grupo carboxilo por las bandas que aparecen en $3200-2500\text{ cm}^{-1}$ para la $\nu(O-H)$, en 1692 cm^{-1} $\nu(C=O)$ y 906 cm^{-1} para la flexión fuera del plano del grupo $O-H$. La presencia de un metileno exocíclico es evidenciada por las bandas que aparecen en 3064 cm^{-1} $\nu(C=C-H)$ y 906 cm^{-1} para la vibración fuera del plano del grupo $(C=C-H)$, y la cual aparece superpuesta con la banda de $\nu(O-H)$. Las absorciones del grupo hidroxilo aparecen en 1016 cm^{-1} $\nu(C-O)$ y 1258 cm^{-1} $\nu(C-H)$.

En el espectro de RMN- 1H (espectro # 10) se observan dos señales simples que fueron asignadas al CH_3 -20 (δ 0.95, s, 3H) y al CH_3 -18 (δ 1.21, s, 3H). Estas asignaciones son consistentes con los argumentos descritos previamente en la tabla I y II. Por otro lado, la señal en δ 2.70 (s amplio, $W_x = 12\text{ Hz}$) - fue asignada al protón unido al C-13, el cual se encuentra en posición alílica.

En base al patrón de fragmentación reportado en la literatura, se pudo corroborar la presencia de un grupo hidroxilo en C-15, debido a la eliminación del grupo (C_3H_6O) , la cual puede llevarse a cabo al romperse la unión entre los carbonos C(8)-C(15), y posteriormente se trasponen dos átomos de hidró

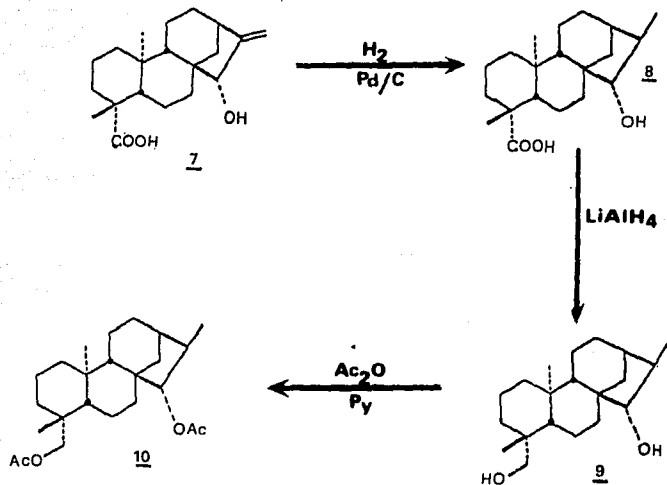
geno para generar un ión a m/e 260 (95.12%). Esta fragmentación se muestra en el esquema v.²⁰



Esquema V.- Patrón de fragmentación del ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (7).

La orientación α del hidroxilo en C-15 fue establecida por Piozzi y colaboradores como se describe a continuación²⁸ (Esquema VI). Primeramente efectuaron la reducción catalítica del ácido grandiflórico 7 (15 α -hidroxi-*ent*-kauran-19-oico), obteniéndose como producto el dihidroderivado 8 (15 α -hidroxi-*ent*-kaur-19-oico), el cual posteriormente fue reducido con LiAlH_4 para obtener el diol 9.

Este último fue acetilado y en el producto obtenido 10 de esta reacción fue posible deducir la posición entre el grupo metilo de C-17 y la función oxigenada en C-15, los cuales guar-



Esquema VI: Derivatización del ácido grandiflorenico (7) realizada por Piozzi para establecer la estereoquímica en C-15.²⁸

dan una relación *trans* debido a la constante de acoplamiento que hay entre el H-15 y H-16 y la cual tiene un valor de 4 - Hz. 28,29,30. (Ver nota anexa).

El metilo en C-17 tiene orientación β , ya que la hidrogenación catalítica del doble enlace en C(16)-C(17) procede por la cara α (cara alfa) de la olefina. El detalle gráfico de la estereoselección mencionada se muestra en la figura 7.

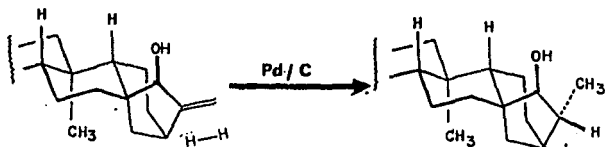


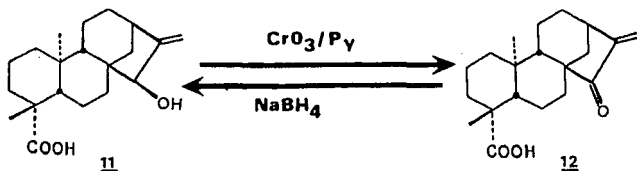
Figura 7: Curso estereoquímico de la reducción catalítica del metileno exocíclico de *ent*-kaurenos.

En base a lo anterior, y comparando las propiedades físicas - así como sus constantes espectroscópicas con las reportadas - en la literatura se pudo confirmar que se trataba del ácido -

15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (7),^{20,28,29}.

N O T A: La estereoquímica del epímero en C-15 del ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico, ha sido determinada por correlación química, como se describe a continuación: La oxidación del alcohol-alfílico secundario (11) produce la enona correspondiente (12), la cual al ser tratada con NaBH_4 , produce el producto original (11), esquema VII.

Tomando en consideración que la entrada del hidruro a C-15 es por el lado menos impedido de la molécula, por lo que se concluye que el hidroxilo -- tiene la orientación β .²⁹



Esquema VII: Oxidación y Reducción del ácido 15 β -hidroxi-*ent*-kaur-19-oico para la determinación de la orientación del grupo hidroxilo.

El detalle gráfico de la estereoselección mencionada se muestra en la figura 8.

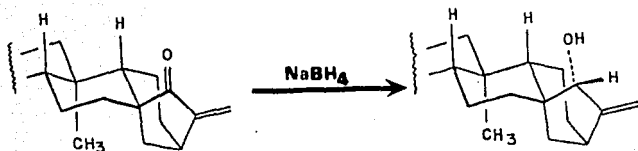


Figura 8: Curso estereoquímico de la reducción química del carbonilo en C-15 de *ent*-kaurenos.

De las fracciones 191-213, obtenidas al eluir la columna con una mezcla de hexano-acetato de etilo (75;25), se aisló un compuesto cristalino de p.f. 222-224°C, que en el espectro de masas por impacto electrónico muestra una señal correspondiente a su ión molecular en m/e 318. El espectro de infrarojo (espectro # 11), muestra la presencia de una banda ancha de 3300 a 2500 cm^{-1} que se asigna a la $\nu(\text{O-H})$, y dos bandas a 1730 y 1690 cm^{-1} que corresponden a la $\nu(\text{C=O})$, lo cual sugiere

re la presencia de un grupo carboxilo, que fue confirmada al tratar una muestra de este compuesto con diazometano en éter -- etílico, y obtener el derivado metilado correspondiente de este metabolito secundario.

La presencia del grupo hidroxilo fue determinada por la banda ancha a 1360 cm^{-1} , la cual corresponde a la vibración de flexión del grupo (OH). La presencia de este grupo fue confirmada al acetilar una muestra de este compuesto en condiciones normales, y obtener su correspondiente derivado acetilado.

El espectro de RMN- ^{13}C (espectro # 15) de su derivado metilado en desacoplamiento total muestra la presencia de 21 átomos de carbono. La naturaleza de un grupo funcional así como el grado de hidrogenación de estos átomos se deduce en base a su desplazamiento químico y por la multiplicidad mostrada en el espectro de desacoplamiento parcial. En base a esto se pudo establecer la presencia de un grupo carboxilo, cinco carbonos cuaternarios, cinco metinos, siete metilenos y cuatro metilos. Por lo que la molécula posee 21 átomos de Carbono, 31 átomos de Hidrógeno, 2 átomos de oxígeno del grupo carboxilo y el átomos de Oxígeno del grupo hidroxilo, el cual ya estaba comprobada su presencia al formar el derivado acetilado de dicho compuesto.³¹

De la información anterior, se propuso una fórmula molecular $C_{21}H_{32}O_3$, que sugiere que se trata de un diterpeno tetracíclico, que presenta como esqueleto base al del traquilobano, y al que se le asocian cinco grados de insaturación.

El espectro de RMN- 1H (espectro 14) de este compuesto muestra la presencia de tres señales simples, las cuales fueron -- asignadas de la siguiente manera: al CH_3 -20 se le asignó la señal en (δ 0.77, s, 3H) observándose un efecto de protección -- originado al sustituir el grupo -COOH por el grupo -COOCH $_3$ -- ($\Delta\delta$ = 0.13-0.12 ppm). En la tabla III se muestran los desplazamientos químicos observados para dos compuestos diferentes, -- que presentan un mismo tipo de esqueleto el del traquilobano, aislados de *Iostephane madrensis*. Por otro lado la señal (δ 1.15, s, 3H) fué asignada al CH_3 -18, observándose un efecto de protección.

Al comparar el desplazamiento químico de el CH_3 -17 en ambos -- compuestos se observa una $\Delta\delta$ = -0.10 ppm, la cual sugiere la presencia cercana de un átomo electronegativo que causa la des-- protección de el CH_3 -17. De ahí que la señal en δ 3.21 (s, 1H) haya sido asignada a un átomo de hidrógeno base de un grupo hidroxilo. Tal asignación fué apoyada al observar, en el espectro de RMN- 1H (espectro 17) del derivado acetilado de este -- compuesto, una señal simple que integra para 1H a δ 4.76. Mien

tras que la señal del CH_3 -17 aparece en δ 1.06 (s, 3H).

La posición y el arreglo espacial del grupo hidroxilo fueron confirmados en base a los datos proporcionados en el espectro de RMN- ^{13}C (tabla IV, espectro 15). En un esqueleto del tipo del traquilobano, el grupo CH_3 -17 tiene una orientación β -ecuatorial, mientras que el grupo hidroxilo en el C-15 puede tomar dos diferentes orientaciones β -axial (figura # 9) y α -ecuatorial (figura # 10).

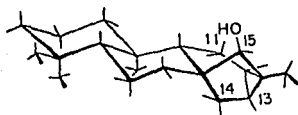


Figura 9.

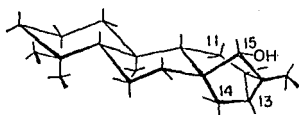


Figura 10.

El efecto de un grupo sustituyente separado por tres enlaces de un átomo de C depende de su orientación relativa; por ejemplo un átomo de C en su conformación eclipsada ó alternada sufre una protección mayor que su configurómero anti.³² Por lo -

Tabla III: Desplazamientos químicos de los grupos metilos en compuestos con esqueleto del tipo de traquilobano

COMPUESTO	CH ₃ -20	CH ₃ -18	CH ₃ -17	CH ₃ -21
13: ác. 15- α -hidroxi-traquilo ban-19-oico*.	0.90	1.19	1.21	----
14: 15- α -hidroxi-traquiloban- 19-oato de metilo*.	0.77	1.15	1.20	3.61
1: ác. traquiloban-19-oico*.	0.86	1.20	1.11	----
2: traquiloban-19-oato de - metilo*.	0.74	1.12	1.10	3.61
15: ác. 15- α -aceto-traquilo- ban-19-oico*.	0.88	1.18	1.06	----
16: ác. 7- α -hidroxi-traquilo- ban-19-oico**.	0.79	1.15	1.15	----

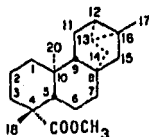
*. Compuestos aislados de *Iostephane madreensis*.

** . Compuesto aislado de *H. ciliaris*.³⁵

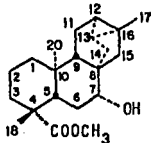
Tabla IV.

Desplazamientos químicos en ^{13}C para tres diferentes compuestos con esqueletos del traquilobano.

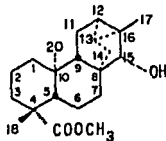
(CDCl_3 , TMS).



traquiloban-19-oato de metilo^{3,6}.



7 α -hidroxi-traquiloban-19-oato de metilo^{3,5}.



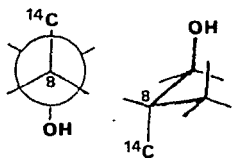
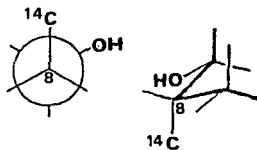
15 α -hidroxi-traquiloban-19-oato de metilo.

C	2	16	14	$\Delta\delta^*$	$\Delta\delta^{**}$
1	39.5-t	39.7-t	39.79-t	- 0.2	- 0.29
2	18.8-t	19.4-t	19.15-t	- 0.6	- 0.35
3	38.1-t	38.5-t	38.15-t	- 0.4	- 0.05
4	43.7-d	43.6-d	43.82-d	0.1	- 0.12
5	57.0-d	54.0-d	56.73-d	3.0	0.27
6	21.8-t	24.9-t	20.99-t	- 3.1	0.81
7	39.3-t	74.2-d	33.94-t	-34.9	5.36
8	40.8-d	47.4-d	44.96-d	- 6.6	- 4.16
9	52.7-d	52.2-d	52.12-d	0.5	0.58
10	38.6-d	39.3-d	38.58-d	- 0.7	0.02
11	19.7-t	22.3-t	18.87-t	- 2.6	0.83
12	20.5-d	24.0-d	25.12-d	- 3.5	- 4.62
13	24-2-d	21.0-d	23.59-d	3.2	0.61
14	33.1-t	32.2-t	29.72-t	0.9	3.38
15	50.4-t	45.4-t	86.76-d	5.0	-36.36
16	22.4-d	20.1-d	27.87-d	2.3	- 5.47
17	20.5-c	20.9-c	16.02-c	- 0.4	4.48
18	28.7-c	29.2-c	28.69-c	- 0.5	0.01
19	177.8-d	179.9-d	177.82-d	- 2.1	0.02
20	12.3-c	13.1-c	12.74-c	- 0.8	- 0.44
21	----	----	51.06-c	----	-----

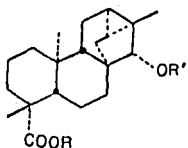
$\Delta\delta^* = (\delta \text{ del compuesto } 2 - \delta \text{ del compuesto } 16)$

$\Delta\delta^{**} = (\delta \text{ del compuesto } 2 - \delta \text{ del compuesto } 14)$

que los átomos de carbono al grupo hidroxilo, cuando se encuentra éste en una orientación β -axial, deben de sufrir un desplazamiento a campo alto, debido al efecto de compresión estérica ocasionada por el grupo hidroxilo. Sin embargo en la tabla IV, se muestra un $\Delta\delta$ mayor para los átomos en C-7, C-14 y C-17, lo cual indica que existe un mayor efecto de compresión estérica entre estos átomos de carbono y el grupo hidroxilo. En la figura # 11 se muestra la disposición del grupo hidroxilo con respecto a estos átomos de carbono, encontrándose que únicamente el C-14 puede confirmar la orientación espacial del grupo hidroxilo, ya que puede tener dos orientaciones para generar dos configurómeros diferentes. El configurómero anti en donde el grupo (O-H) es β -axial y en el cual el efecto γ -gauche sería nulo (figura # 11a), y el configurómero syn en el cual el grupo hidroxilo es α -ecuatorial en el C-15, y en donde se ejerce un efecto γ -gauche que protege al C-14 (figura # 11b).^{33,34}

Figura 11a.Figura 11b.

La discusión anterior confirma la estructura y estereoquímica de este metabolito secundario aislado de *Iostephane madrensis*, y que fué identificado como el ácido 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oico (13). 38,39,40.



R	R'
13=H	H
14=CH ₃	H
15=H	OAC

De las fracciones 203-208, obtenidas al eluir la columna con una mezcla de hexano-acetato de etilo (75:25), y que fueron tratadas con diazometano en éter etílico, se aislaron 22.6 mg de un compuesto cristalino de p.f. 201-202°. En el espectro de masas por impacto electrónico muestra una señal correspondiente al ión $[M^+ - H_2O]$ en 288 uma, mientras que por ionización química se observa una señal $[M^+ - H_2O + 1]$ en 289 uma, lo cual indica que el compuesto tiene un peso molecular de 306. En el espectro de infrarojo (espectro # 18) se observa la presencia del grupo hidroxilo por la banda que aparece a 3628 cm^{-1}

y que corresponde a la $\nu(\text{OH})$. Las bandas en 1063 y 114 cm^{-1} indican la $\nu(\text{C-O})$, y las bandas correspondientes a la $\nu(\text{C-CH})$ saturado en 2929, 2869 cm^{-1} y 1446, 1374 cm^{-1} las cuales corresponden a la vibración asimétrica y simétrica respectivamente.

Los datos anteriores, aunados con la discusión posterior permitieron proponer una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$, a la que le corresponden cuatro grados de insaturación que pueden atribuirse al esqueleto base de la molécula, ya que no muestra en sus espectros ningún grupo funcional al cual se le pueda asociar algún grado de insaturación, lo que permitió que se planteara como hipótesis estructural al esqueleto del *ent*-kaurano.

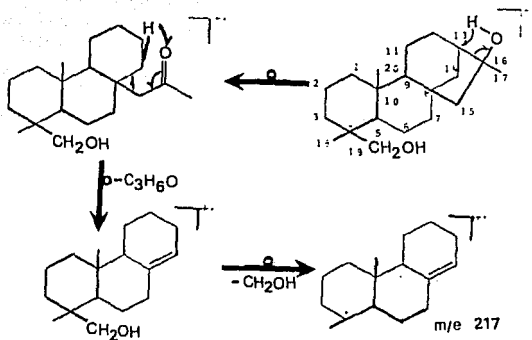
En el espectro del RMN^{-1}H (espectro # 19) de este compuesto se observa un sistema que por su desplazamiento químico (δ 3.55) - corresponde a dos protones no equivalentes (diasterotópicos) - que se encuentran cercanos a un grupo hidroxilo y que se asignó al grupo metileno axial del átomo de C-4.⁴¹

Lo anterior puede confirmarse en base al espectro de masas,¹⁷ ya que se observa un pico a m/e 275 (46.35%) que corresponde a la pérdida del sustituyente axial en C-4 y el cual general el fragmento $[\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{OH}]$.

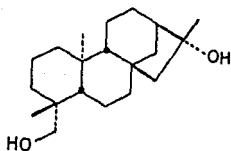
La adición de $\text{Eu}(\text{fod})_3 \cdot \text{d}_{30}$ a una muestra disuelta en CDCl_3 mos

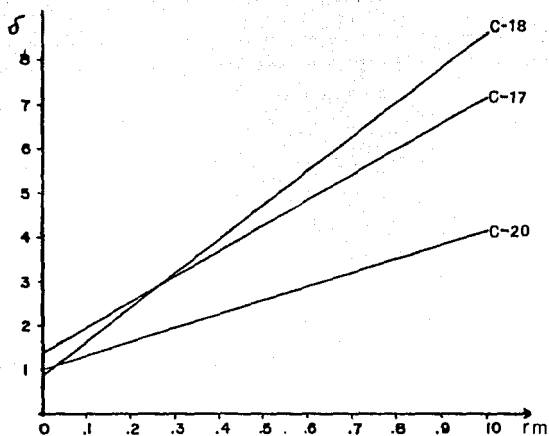
tró el desplazamiento a campo bajo en la frecuencia de resonancia de los protones cercanos a los grupos hidroxilo (ver esquema IX), lo que permitió la asignación de las señales simples que se observan en el espectro de RMN-¹H y que corresponden a los tres grupos metilo que se encuentran presentes en la molécula, así al CH₃-20 se le asignó la señal en (δ 1.01, s - 3H), observándose que no hay variación en el desplazamiento químico de este grupo cuando se reemplaza un grupo metilo axial por el grupo -CH₂OH. Mientras que el grupo metilo ecuatorial unido al C-4 se le adjudicó la señal un δ 0.96, observándose un efecto de protección (Δδ = 0.1 ppm) ejercido sobre este metilo, y el cual es generado por el grupo -CH₂OH, lo cual está de acuerdo con los desplazamientos químicos enlistados en la tabla I.¹⁹

La señal en δ 1.36 fue asignada al CH₃-17, debido a la cercanía al grupo hidroxilo, lo cual fue demostrado al agregar el reactivo de desplazamiento y comprobándose con la pérdida de 58 -- una a partir del ión molecular [M⁺-C₃H₆O]. La eliminación de (C₃H₆O) se ilustra en el esquema VIII.¹⁷ Asimismo la pérdida del substituyente axial en C-4 a partir de [M⁺-58] genera un ión a 217 (26.83%). Comprobándose así que el grupo CH₃-17 se encuentra en posición geminal al grupo hidroxilo.

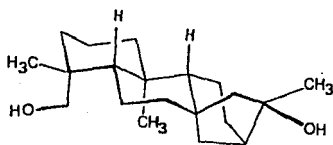


Esquema VIII: Patrón de fragmentación del 16 α -hidroxi-*ent*-kaur-19-ol.





Esquema IX: Variación en el desplazamiento químico para los diferentes — grupos metilos presentes en el 16 α -hidroxil-ent-kaur-19-ol, en CDCl_3 con incrementos en la concentración de $\text{Eu}(\text{fod})_3 \cdot \text{d}_{30}$.



De la discusión anterior, se pudo concluir que el compuesto - aislado de *Iostephane madrensis* es el 16 α -hidroxi-ent-kaur-19-ol (17).

La comparación de los datos físicos y espectroscópicos de esta molécula con las reportadas en la literatura, confirmaron esta conclusión.^{44,45.}

De las fracciones 245-264 obtenidas al eluir la columna con una mezcla de hexano-acetato de etilo (70:30), se aisló un -- compuesto sólido que presenta un pf. 234-236°C, y el cual muestra en el espectro de masas por ionización química una señal-- correspondiente al ión M+1 en m/e 319. En el espectro de infrarrojo (espectro # 20) muestra la presencia de un grupo carboxilo debido a las bandas que corresponden a ν (O-H) en 3250-2500 cm^{-1} y ν (C=O) en 1699 cm^{-1} y ν (O-H) en 890 cm^{-1} . La presencia de la doble ligadura es manifiesta por la ν (C-H)olefínico) en 3024 cm^{-1} y las bandas en 3452 cm^{-1} ν (O-H) y en 1238 cm^{-1} -- (O-H) que sugiere la presencia de un grupo hidroxilo. De esta forma se explican dos grados de insaturación, de los seis que corresponden a un compuesto de fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$.

El espectro RMN-¹H (espectro # 21) presenta señales similares a los de los ácidos ent-kaurenóicos, ya que se observan tres -- señales simples que corresponden a tres grupos metilos, los -- cuales están unidos a átomos de carbono cuaternarios, y fueron

asignados tomando en cuenta los argumentos descritos anteriormente y los datos mostrados en la tabla I. Por lo tanto, la señal en δ 0.84 (s, 3H) fue asignado al grupo metilo del C-10, mientras que al grupo metilo unido al C-4 se le asignó la señal en δ 1.23 (s, 3H).

La señal en δ 1.31 (s, 3H) corresponde al CH_3 -17, ya que su desplazamiento químico sugiere la cercanía de un átomo electronegativo como el oxígeno, y el cual se encuentra en el mismo carbono al cual está unido el grupo metilo.

Por otro lado, se observa en la zona de protones vinílicos, cuatro señales que forman parte de un sistema AB, en el cual cada parte del sistema interactúa con un protón adicional, indicando la presencia de una fórmula parcial representada en la figura 12.

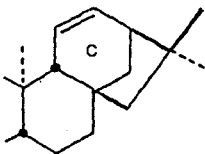
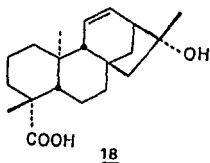


Figura 12.

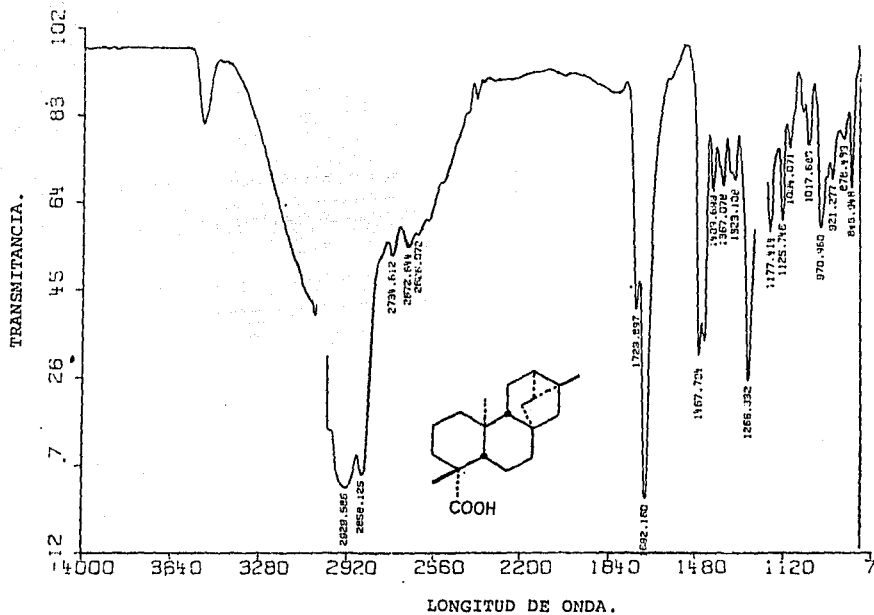
El anillo C de un esqueleto del tipo del *ent*-kaurano, es el único sitio donde es posible ubicar el fragmento estructural recién descrito. Por lo tanto la señal en $\delta 5.89$ (dd, $J = 10$ y 4 Hz, 1H) fué asignada al H-12, mientras que el H-11 se le -- asignó la señal en $\delta 5.50$ (dd, $J = 10$ y 4 Hz, 1H).

En base a la discusión teórica anterior, y por medio de la -- comparación de sus propiedades espectroscópicas y espectromé-- tricas con las ya reportadas en la literatura, se pudo con-- cluir que el compuesto aislado de *Iostephane madrensis* era -- el ácido 16 α -hidroxi-*ent*-kaur-11-en-19-oico (18).

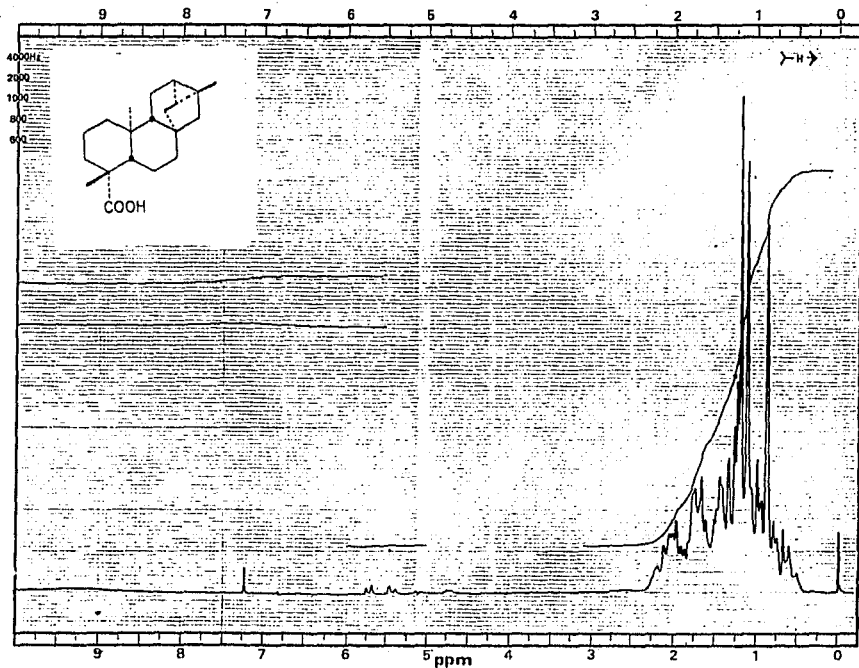


ESPECTROS.

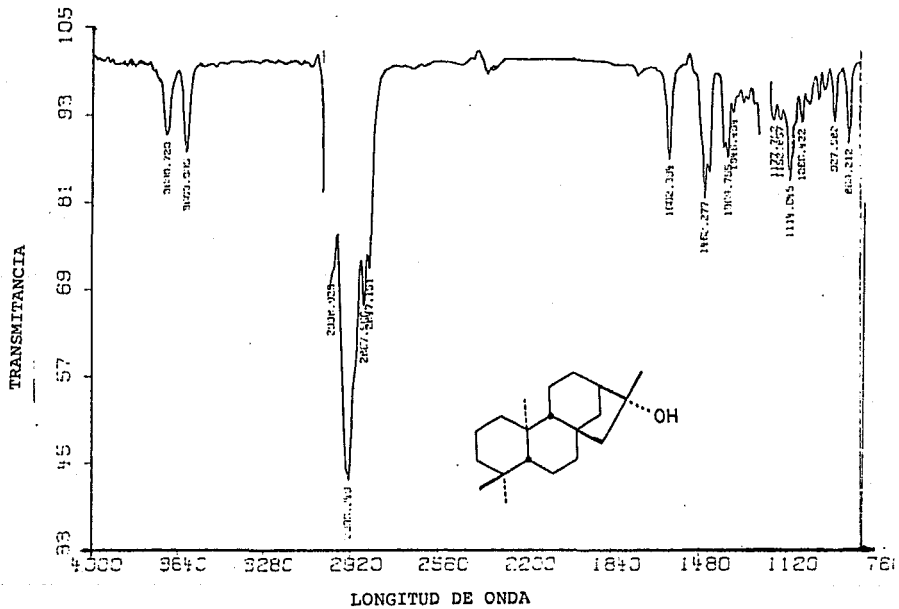
ESPECTRO 1; I, R, (CHCl₃) del ácido traquiloban-19-oico,



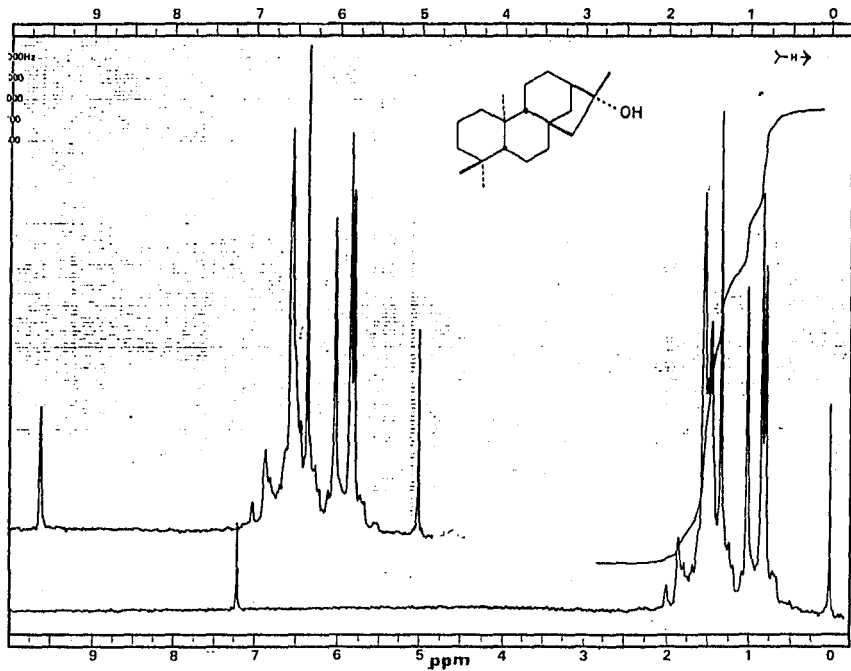
ESPECTRO 2: RMN-¹H (CDCl₃, 80 MHz) del ácido traquiloban-19-oico.



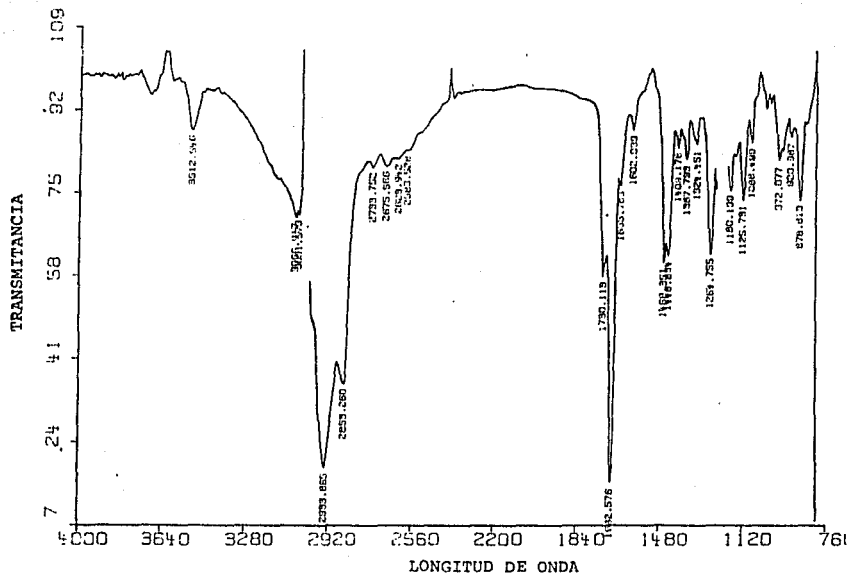
ESPECTRO 3: I. R. (CHCl₃) del 16 α -hidroxi-ent-kaurano.



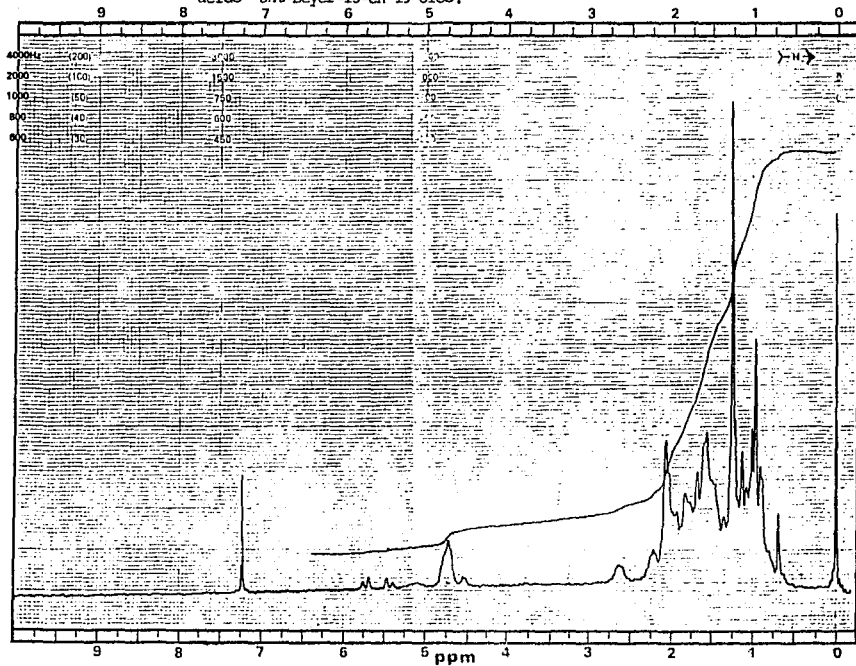
ESPECTRO 4: RMN-¹H (CDCl₃, 80 MHz) del 16 α-hidroxi-*ent*-kaurano.



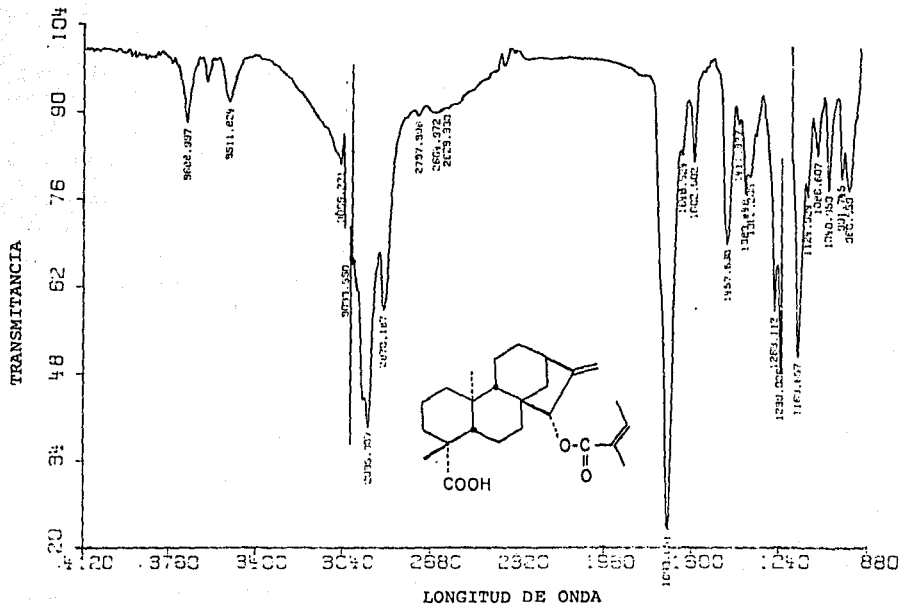
ESPECTRO 5: I. R. (CHCl₃) del ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico mezclado con el ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico.



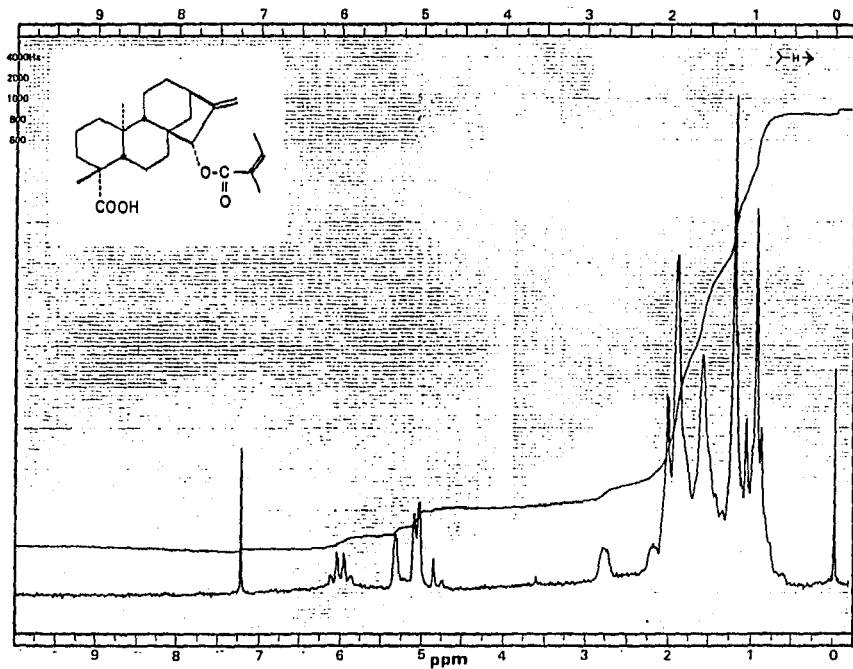
ESPECTRO 6: RMN-¹H (CDCl₃, 80 MHz) del ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico mezclado con el ácido *ant*-beyer-15-en-19-oico.



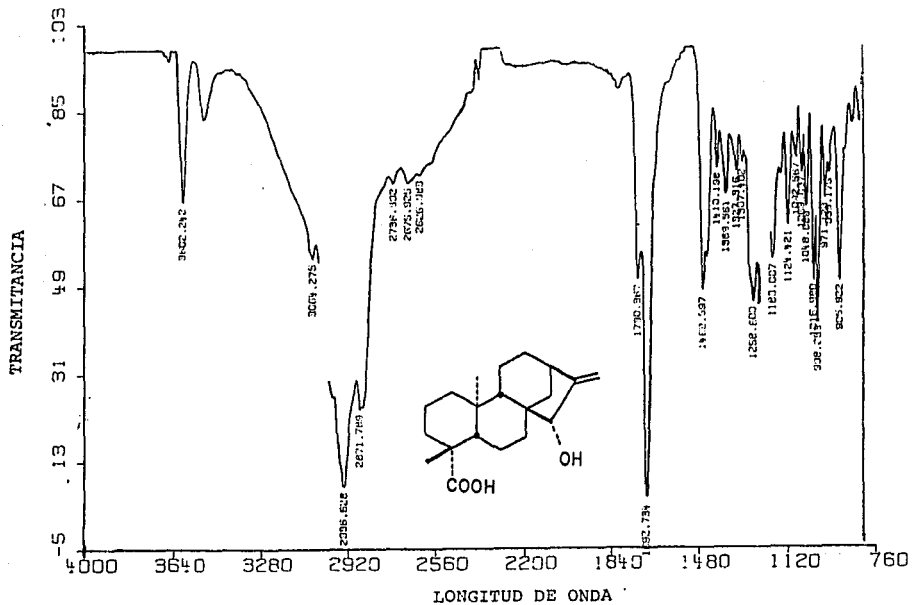
ESPECTRO 7: I. R. (CHCl₃) del ácido 15 α-angeloiloxi-ent-kaur-16-en-19-oico.



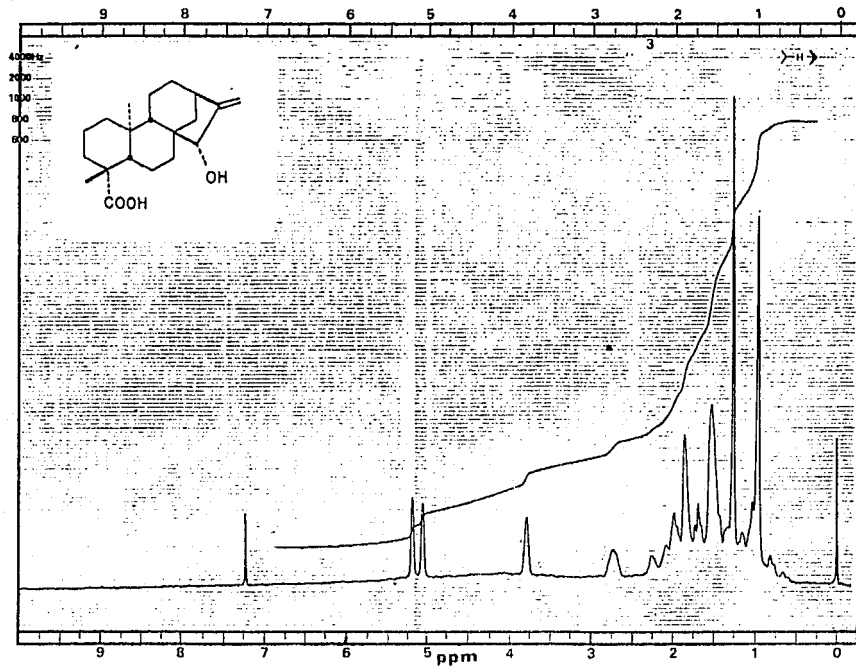
ESPECTRO 8: RMN-¹H (CDCl₃, 80 MHz) del ácido 15 α-angeloiloxi-ent-kaur-16-en-19-oico.



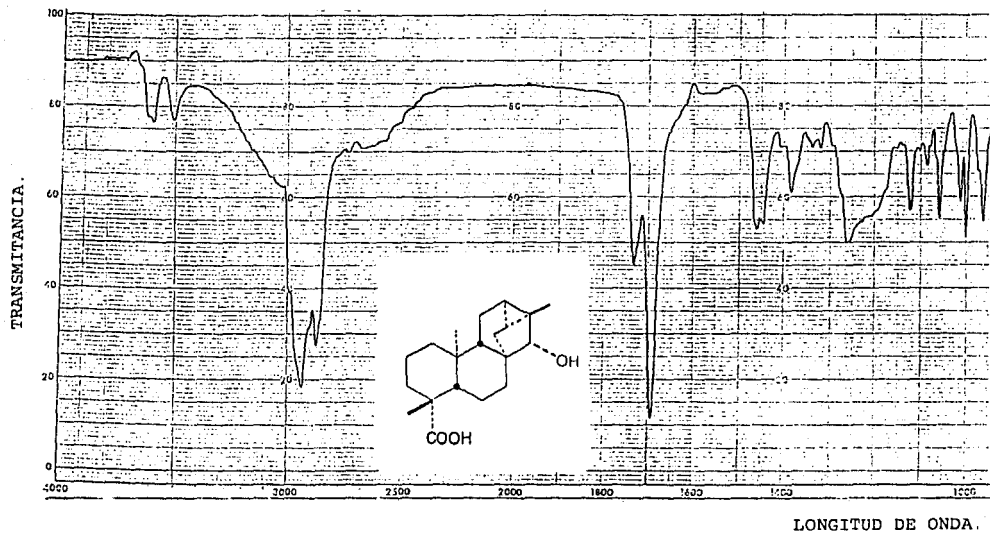
ESPECTRO 9: I. R. (CHCl₃) del ácido 15 α-hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico.



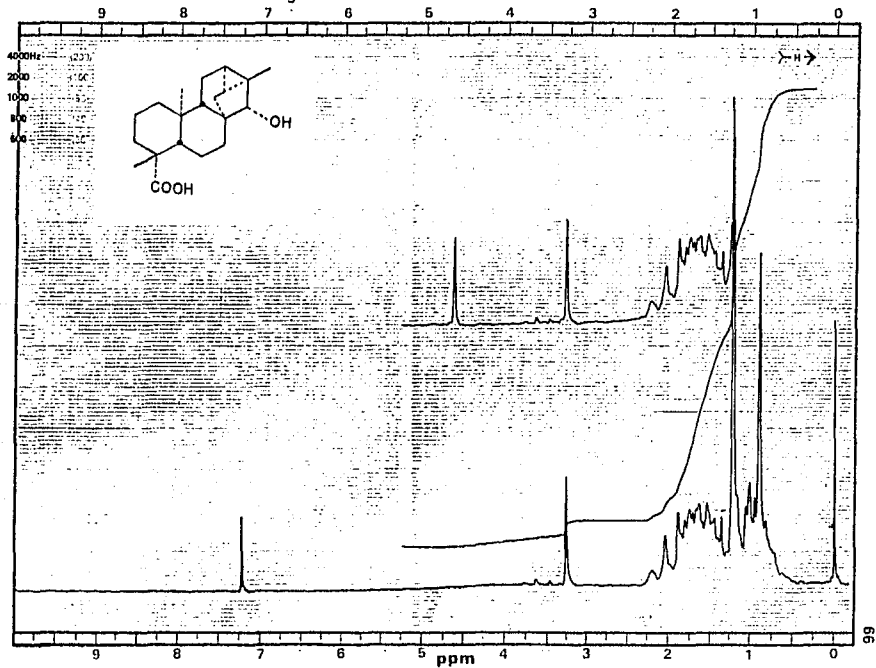
ESPECTRO 10: RMN-¹H (CDCl₃, .80 MHz) del ácido 15 α-hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico.



ESPECTRO 11: I. R. (CHCl₃) del ácido 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oico.

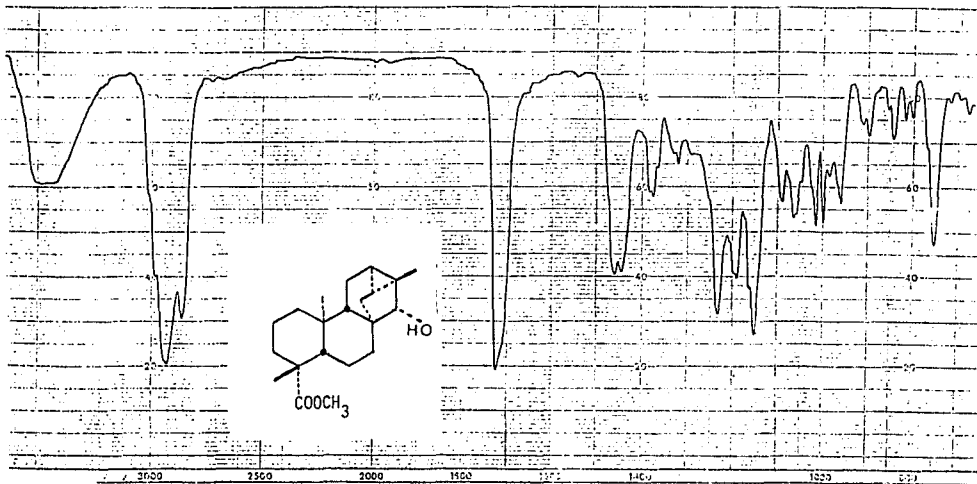


ESPECTRO 12: RMN-¹H (CDCl₃, 80 MHz) del ácido 15 α-hidroxi-traquiloban-19-oico.



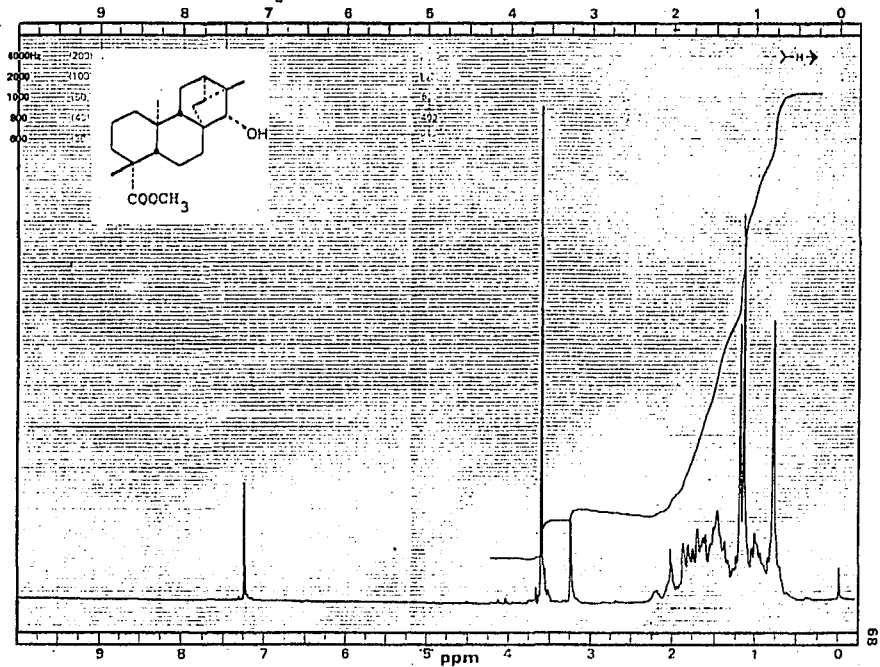
ESPECTRO 13: I. R. (CHCl₃) del 15 α-hidroxi-traquiloban-19-oato de metilo.

TRANSMITANCIA.

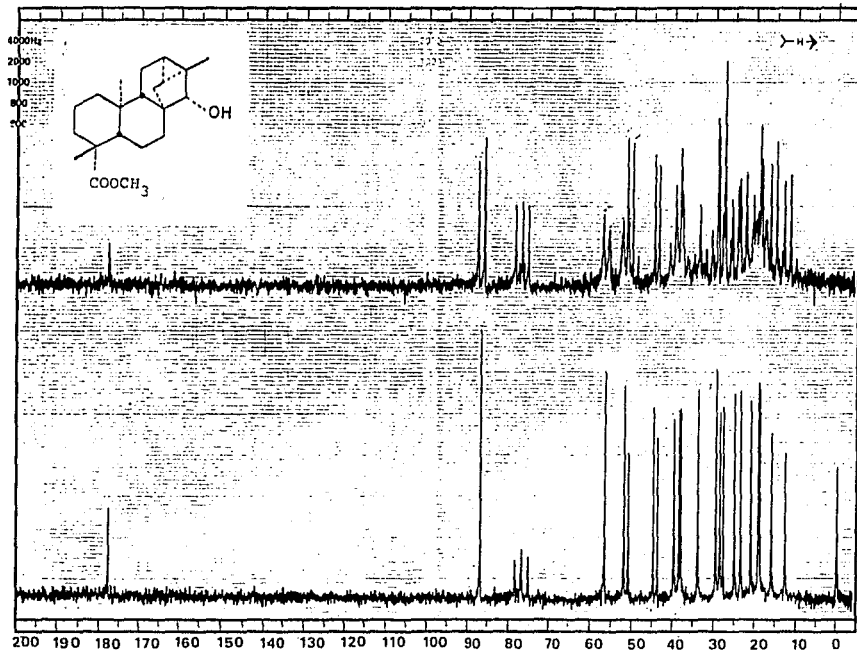


LONGITUD DE ONDA.

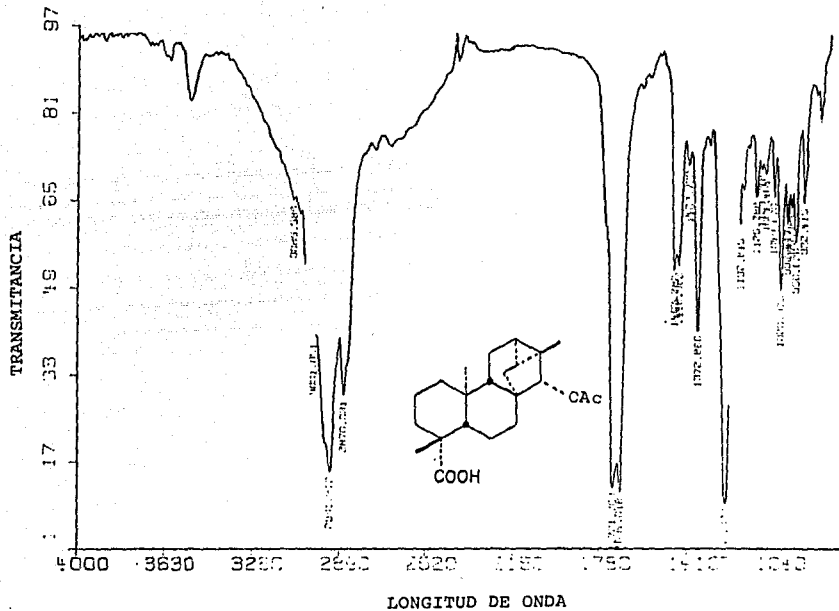
ESPECTRO 14: RMN- H (CDCl_3 , 80 MHz) del 15 α -hidroxi-traquilloban-19-oato de metilo.



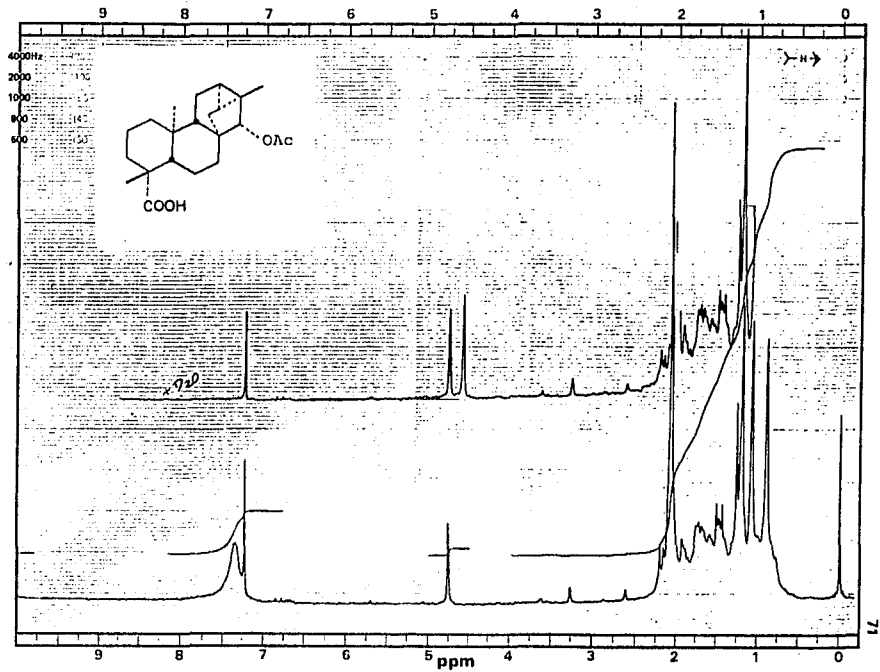
ESPECTRO 15: RMN-¹³C (CDCl₃, 20 MHz) del 15 α-hidroxi-traquiloban-19-oato de metilo.



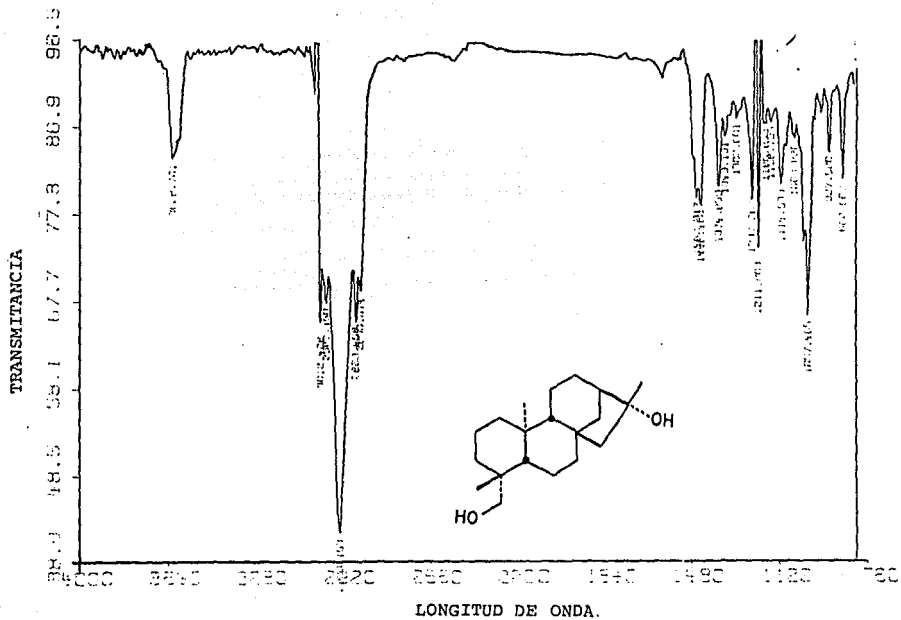
ESPECTRO 16: I. R. (CHCl₃) del ácido 15 α-aceto-traquilobar-19-oico.



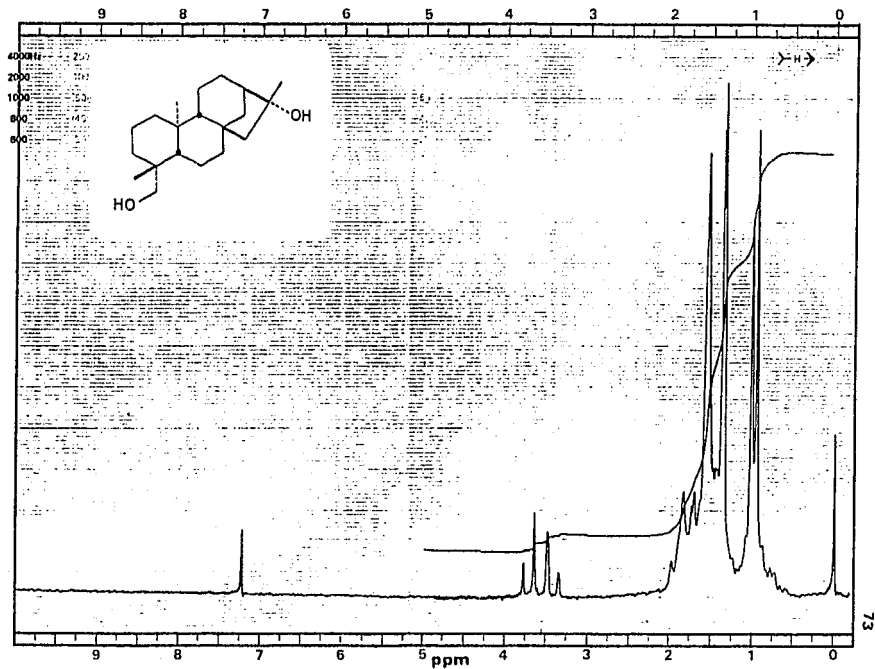
ESPECTRO 17: RMN-¹H (CDCl₃, 80 MHz) del ácido 15 α-aceto-traquiloban-19-oico.



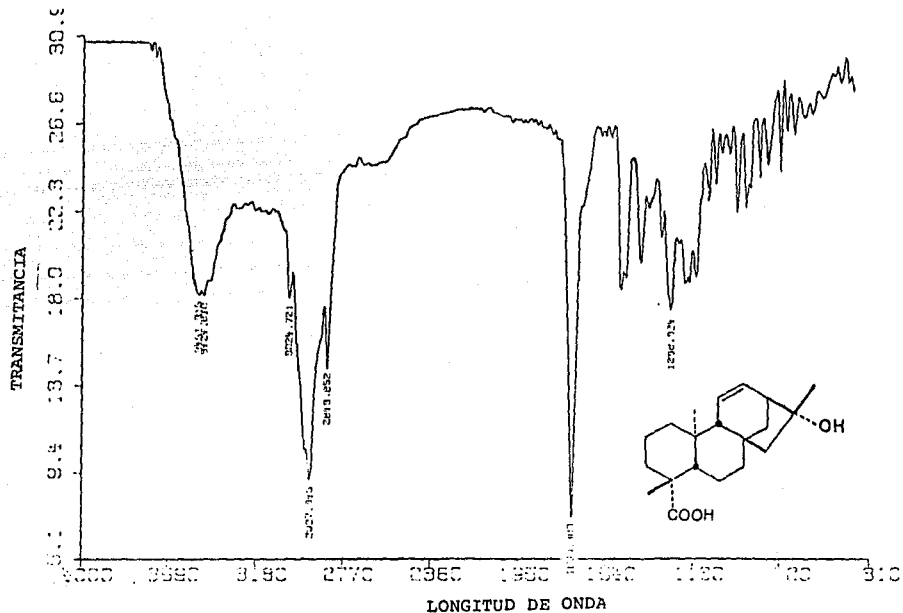
ESPECTRO 18; I. R. (CHCl₃) del 16 α -hidroxi-*ent*-kaur-19-ol.



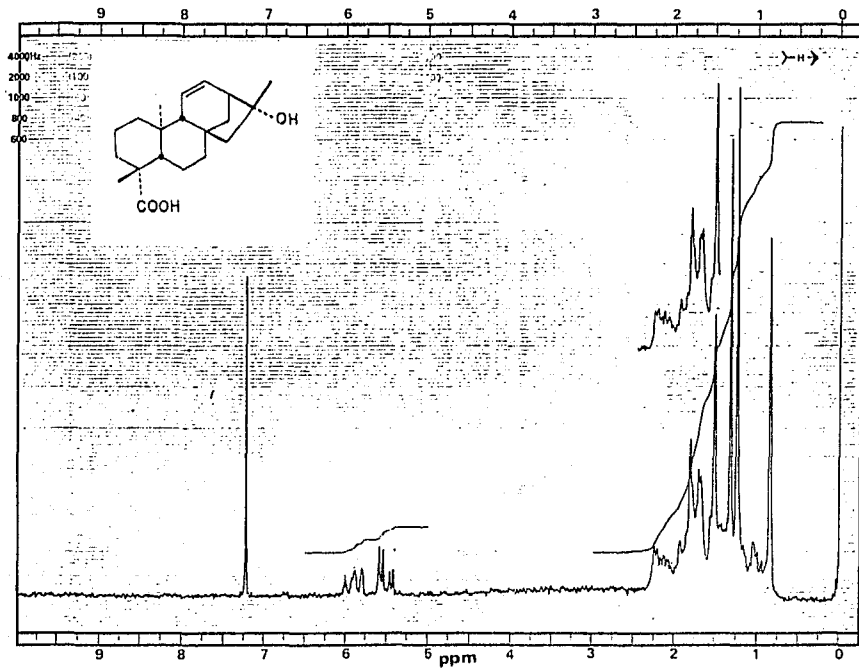
ESPECTRO 19: RMN-¹H (CDCl₃, 80 MHz) del 16 α-hidroxi-ent-kaur-19-ol.



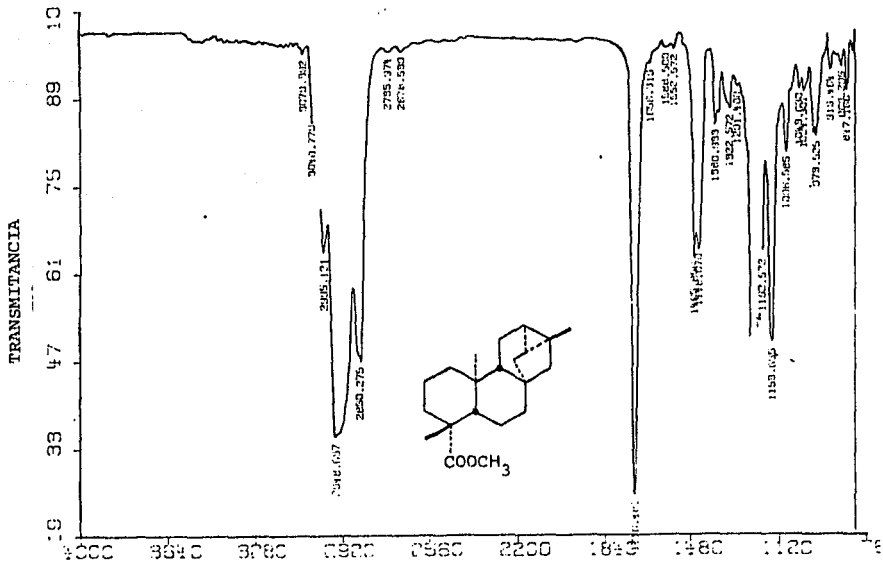
ESPECTRO 20: I. R. (CHCl_3) del ácido 16 α -hidroxi-*ent*-kaur-11-en-19-oico.



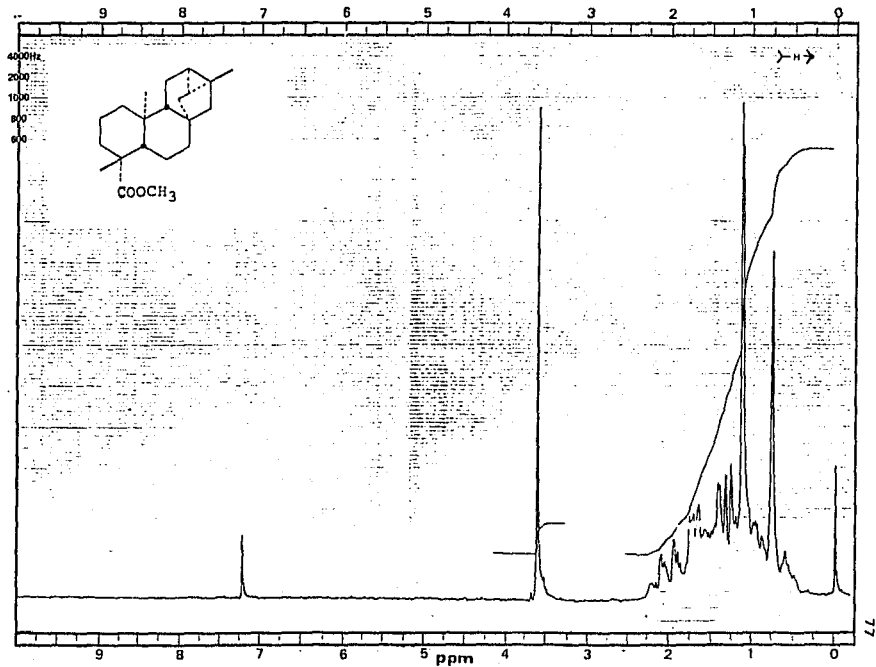
ESPECTRO 21: RMN-¹H (CDCl₃, 80 MHz) del ácido 16 α-hidroxi-ent-kaur-11-en-19-oico.



ESPECTRO 22: I. R. (CHCl₃) del traquiloban-19-oato de metilo.



ESPECTRO 23; RMN-¹H (CDCl₃, 80 MHz) del traquiloban-19-oato de metilo.



PARTE EXPERIMENTAL

La planta *Iostephane madrensis* (S. Watson) Strother, cuyo nombre común es cachana, fué obtenida en el Mercado de la Reforma en el Municipio de Chihuahua, Chihuahua, el 4 de octubre de 1985. La cachana es originaria de San Buena Ventura, Chihuahua. El material vegetal fue obtenido e identificado por los Profesores Robert Bye y Edelmira Linares colección 14 147, del Instituto de Biología de la U.N.A.M., y a quien expresamos nuestro agradecimiento por su colaboración.

7.5367 Kg de la raíz de la cachana seca se sometieron a extracción por maceración con CHCl_3 a temperatura ambiente, dicha operación fue repetida dos veces y por concentración del disolvente se obtuvo el extracto clorofórmico.

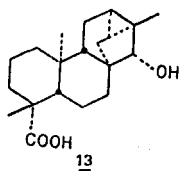
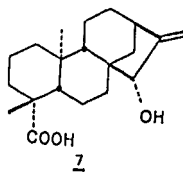
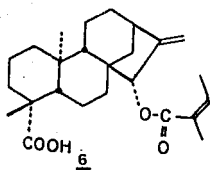
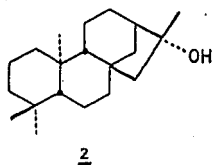
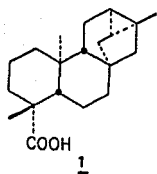
Con el objeto de conocer los tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto clorofórmico obtenido y así proceder a una óptima manipulación experimental de éste, se realizó un análisis cromatográfico preliminar de una parte alícuota del extracto, el cual se describe a continuación. El resto del extracto se mantuvo a baja temperatura y protegido de la luz.

17 g de extracto clorofórmico se adsorbieron en 22.94 g de sílice, y se aplicaron a una columna de cromatografía empacada con 425 g de sílice suspendida en hexano y utilizando co-

mo eluyente mezclas de hexano-acetato de etilo, en los que se incrementaba progresivamente la polaridad. La elución de la columna se concluyó con acetato de etilo. Este análisis permitió el aislamiento de los diterpenos siguientes: ácido traquilobanoico (1), el 16 α -hidroxi-*ent*-kaureno (2), el ácido 15 α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (6), el ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (7), y el 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico (13), ver figura 13, los cuales cristalizaron espontáneamente en mezcla, y mediante cristalizaciones sucesivas se logró su purificación.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Figura 13.



Sin embargo, la cromatografía analítica de las fracciones obtenidas mostró la presencia de constituyentes minoritarios - los cuales no pudieron ser aislados en esta ocasión, pero -- que posiblemente sean también diterpenos policíclicos estructuralmente similares a los ya obtenidos, los cuales son relativamente estables de acuerdo a la homogeneidad y similitud de las manchas desarrolladas en la cromatografía analítica.- Con el objetivo de caracterizar y aislar los constituyentes minoritarios se procedió al estudio de una muestra mayor de extracto clorofórmico, cuya descripción se hace a continuación.

Del resto del residuo clorofórmico, se pesaron 113.50 g de éste, el cual fué adsorbido en 115 g de sílica, los cuales se aplicaron en una columna de cromatografía utilizando como fase estacionaria 1692.40 g de sílica gel para su fraccionamiento.

Inicialmente se utilizó como fase móvil hexano, para continuar eluyendo con una mezcla de hexano-acetato de etilo con un aumento gradual en la polaridad de ésta, y finalmente se eluyó con acetato de etilo, recolectando 383 fracciones de 500 ml cada una. El fraccionamiento del residuo clorofórmico se siguió a través de cromatografía analítica.

De las fracciones 38-58, que se recolectaron al eluir la columna con una mezcla de hexano-acetato de etilo (98:2), se aisló un compuesto insoluble en etanol, el cual fue recristalizado en una mezcla cloroformo-etanol y finalmente lavado con éter isopropílico, obteniéndose 1260.5 mg (1.110%) de un compuesto de p.f. 160-162°C y al cual se le determinó su estructura en base al análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, los cuales indicaron que se trataba del ácido traquiloban-19-oico, que presenta una fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_2$ y un peso molecular de 320.^{14,15,16.}

$$[\alpha]_D^{25} = -68.18 \quad (c=1.32; CHCl_3)$$

$$[\alpha]_D^{25} = -69.35 \quad (c=1.86; CH_3OH)$$

I. R. $\nu_{\max}^{CHCl_3}$ cm^{-1} (espectro # 1): 2929, 2858, 1729, 1692, 1467, 1409, 1367, 1266, 1177, 1127, 970 y 845.

RMN-¹H (80 MHz; $CDCl_3$), (espectro # 2); CH_3 -17 (δ 1.11, s, 3H), CH_3 -20 (δ 0.86, s, 3H), CH_3 -19 (δ 1.20, s, 3H), H-12 y H-13 (δ 0.63 y 0.77, señal compleja, 1 H)

E.M. (I.E.) m/e: 302 (M^+ , 100%), 246 (85.37%), 231 (34.15%), 119 (41.46%), 105 (56.09%), 93 (65.85%), 91 (85.37%), 79 (51.22%) y 41 (41.46%).

A partir de las fracciones 86-90, que fueron obtenidas al eluir la columna con una mezcla de hexano-acetato de etilo (92:8), se aisló un diterpeno tetracíclico, con esqueleto del tipo del *ent*-kaurano el cual fue cristalizado en una mezcla de cloroformo-etanol, y posteriormente lavado con etanol, obteniéndose 381.6 mg (0.336%) de un compuesto cristalino de p.f. 215-217°C [lit.²⁰, p.f. 215-216°C], el cual fue identificado como el 16 α -hidroxi-*ent*-kaurano (3), al cual le corresponde una fórmula molecular $C_{20}H_{34}O$ y un peso molecular de 290. Este compuesto ya había sido previamente aislado de *Gnaphalium artem*, *Heiractinia mollis* y *Viguiera dentata*.^{51,52.}

I. R. $\nu_{\text{max.}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} (espectro # 3): 3600, 2930, 1463, 1385, - 1369, 1113, 925 y 826.

RMN-¹H (80 MHz, CDCl_3), (espectro # 4): CH_3 -19 (δ 0.81, s, 3H), CH_3 -18 (δ 0.86, s, 3H), CH_3 -20 (δ 1.04, s, 3H) y CH_3 -17 (δ 1.37, s, 3H).

E. M. (I.E.) m/e: 290 (M^+ , 7.32%); 275 ($M^+ - \text{CH}_3$, 9.72%); 272 - ($M^+ - \text{H}_2\text{O}$, 41.4%); 257 ($M^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3$, 20%); 232 ($M^+ - \text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, - 29.27%), 229 (7.32%); 217 ($M^+ - \text{C}_3\text{H}_6\text{O} - \text{CH}_3$, 12.20%), 123 - (39.02%); 105 (36.59%); 69 (63.41%); 55 (65.85%); 43 (100%) y 41 (63.17%).

De las fracciones 91-103, que se obtuvieron al eluir la columna con una mezcla de hexano-acetato de etilo (92:8), se aislaron 109.7 mg (0.097%) de una mezcla de ácidos diterpénicos tetracíclicos, formada por el ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico y por el ácido *ent*-beyer-15-en-19 oico, la cual fue purificada por medio de cristalizaciones sucesivas, utilizando como disolventes una mezcla de cloroformo-etanol.

La determinación de su estructura se hizo en base a los datos obtenidos a partir de su análisis espectroscópicos y espectrométricos, los cuales fueron confirmados al comparar sus propiedades físicas y sus constantes espectroscópicas y espectrométricas reportadas en la literatura.^{20,23.}

I. R. $\sqrt{\frac{\text{CHCl}_3}{\text{max.}}}$ cm⁻¹ (espectro # 5): 3300-2500, 1730, 1692, 1468, 1264, 1125, 972 y 878.

RMN-¹H (80 MHz; CDCl₃), (espectro # 6): CH₃-20 (δ 0.96, s, 3H); CH₃-18 (δ 1.26, s, 3H); H-13 (δ 2.64, s, amplio, W_{1/2} = 12 Hz, 1H) y H-17 (δ 4.73, s, amplio, W_{1/2} = 11 Hz, 2H).

E.M. (I.E.) m/e: 302 (M⁺, 65.86%); 287 (M⁺-CH₃, 56.10%); 259 (M⁺-C₃H₇, 24.39%) 257 (M⁺-COOH, 19.51%) 243 (M⁺-CH₃-CO₂, 24.39%); 241 (M⁺-CH₃-HCO₂H, 34.15%); 287 (M⁺-CH₃-C₅H₈O₂, 17.07%); 213 (M⁺-C₃H₇-HCO₂H, 19.51%); 119 (46.34%); 105 (65.85%) 93 (56.10%) y 91 (100%).

RMN- H del ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico: CH₃-20 (δ 0.69, s, 3H); CH₃-17 (δ 1.00, s, 3H); CH₃-18 (δ 1.22, s, 3H), H-15 (δ 5.72, d, J_{AB} = 6 Hz, 1H) y H-16 (δ 5.42, d, J_{AB} = 6 Hz, 1H).

De las fracciones 120-138, que se obtuvieron al eluir la columna con una mezcla de hexano-acetato de etilo (90:10), se aisló un compuesto que se recristalizó de etanol, obteniéndose se 482.6 mg (0.425% a partir del extracto) de un sólido cristalino de p.f. 185-187°C [lit.20, p.f. 193-195°C; lit.27, p.f. 187-188°C], y al cual se le determinó su estructura en base a los datos obtenidos de su análisis espectroscópico y espectrométrico con las ya reportadas en la literatura, en lo cual se pudo concluir que el compuesto aislado era el ácido 15 α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico.^{20,27}

I. R. $\nu_{\text{max.}}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹ (espectro # 7): 3033, 2935, 2870, 1693, 1457, 1239, 1163, 1124, 1040, 960.

RMN-¹H (80 MHz, CDCl₃), (espectro # 8): CH₃-20 (δ 0.95, s, 3H); CH₃-18 (δ 1.22, s, 3H); H-13 (δ 2.75, s, amplio W_h = 11 Hz, 1H); H-15 (δ 5.05, s, amplio, W_h = 4 Hz, 1H), H-17 (δ 5.10, s, amplio, W_h = 4 Hz, 1H_a); H-17 (δ 5.31, s, amplio W_h = 5.5 Hz, 1H_b); H-3' (δ 6.18, cc, J = 7 y 1.2 Hz, 1H), CH₃-4' (δ 2.03, dc, J = 7 y 1.4 Hz, 3H) y CH₃-5' (δ 1.99, dc, J = 1.3 y 1.0 Hz, 3H).

E. M. (I.E.) m/e: 400 (M^+ , 10%); 318 ($M^+-C_5H_6O$, 2.5%) 300 - ($M^+-RCOOH$, 2.5%); 285 ($M^+-RCOOH-CH_3$, 22.5%); 272 ($M^+-C_5H_6O- -HCOOH$, 10%); 260 ($M^+-C_5H_6O-C_3H_6O$, 2.5%); 255 ($M^+-RCOOH-HCOOH$, 5%); 239 ($M^+-RCOOH-CH_3-HCOOC$, 10%), 83 (ión angeloilico, 100%) y 55 (ión angeloilico-CO, 45%).

De las fracciones 179-186, obtenidas al eluir la columna con una mezcla de hexano-acetato de etilo (80:20), se aislaron - 699.4 mg (0.616% con respecto al extracto) de un sólido cristalino de p.f. 229-231°C [lit. 20 227-228°C, lit. 28 226-228°C] el cual cristalizó espontáneamente, y que fue identificado como un diterpeno tetracíclico derivado del *ent*-kaurano y mediante la comparación de sus propiedades físicas y constantes espectroscópicas, con las reportadas en la literatura se pudo concluir que se trataba del ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico.^{20,28,29.}

I. R. $\nu_{\max}^{CHCl_3}$ cm^{-1} (espectro # 9): 3602, 3064, 2936, 1692, - 1468, 1258, 1183, 998 y 905.

RMN-¹H (80 MHz, $CDCl_3$), (espectro # 10); CH_3 -20 (δ 0.95, s, 3H); H-17_a (δ 5.04, s, amplio, $W_{\frac{1}{2}}$ =4 Hz, 1H); H-17_b (δ 5.17, s, amplio $W_{\frac{1}{2}}$ =4 Hz, 1H); H-15 (δ 3.77, s, amplio, $W_{\frac{1}{2}}$ =4 Hz); - H-13 (δ 2.70, s, amplio, $W_{\frac{1}{2}}$ =12 Hz).

E.M. (I.E.) m/e: 318 (M^+ , 26.83%); 303 (M^+-CH_3 , 17.07%); 300

(M^+-H_2O , 41.46%); 285 ($M^+-H_2O-CH_3$, 60.98%); 272 ($M^+-HCOOH$, - 14.63%); 260 ($M^+-C_3H_6O$, 95.12%); 257 ($M^+-HCOOH-CH_3$, 24.39%); 245 ($M^+-C_3H_6O-CH_3$, 31.77%); 91 (90.24%); 84 (90.24%); 79 - - (100%) y 55 (85.37%).

RMN- 1H (80 MHz, $Py-D_5$): CH_3-20 (δ 1.12, s, 3H); CH_3-19 - - (δ 1.26, 3, 3H); H-17_a (δ 5.01, s, amplio, $W_{\frac{1}{2}}$ = 5 Hz, 1H); H-17_b (δ 5.35, s, amplio, $W_{\frac{1}{2}}$ = 5 Hz, 1H); H-15 (δ 4.01, s, amplio, $W_{\frac{1}{2}}$ = 5 Hz, 1H); H-13 (δ 2.75, s, amplio, $W_{\frac{1}{2}}$ = 9 Hz, 1H).

De las fracciones 191-213, obtenidas al eluir la columna con una mezcla de hexano-acetato de etilo (75:25), se aisló un diterpeno tetracíclico, con esqueleto del tipo del traquilobano el cual fue recristalizado de una mezcla cloroformo-hexano, y posteriormente lavado con éter isopropílico, obteniéndose 1.2187 g (1.074%) de un compuesto cristalino de - p.f. 222-224°C, el cual fue identificado como el ácido - - 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oico , al cual le corresponde una fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_3$ y un peso molecular de 318.

I. R. ν_{CHCl_3} cm^{-1} (espectro # 11): 3600, 3510, 2930, 2850, max. 1730, 1693, 1460, 1445, 1260, 1120, 1000 y 960.

RMN- 1H (80 MHz, $CDCl_3$), (espectro # 12): CH_3-20 (δ 0.90, s,

3H); CH_3 -18 (δ 1.23, s, 3H); CH_3 -17 (δ 1.24, s, 3H) y H-15, (δ 3.26, s, 1H).

E.M. (I.E.) m/e: 318 (M^+ , 100%); 300 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$, 31.71%) 285 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3$, 26.83%); 261 (41.46%); 151 (63.41%); 145 - -- (46.34%); 123 (56.09%); 107 (60.98%); 105 (73.17%); 97 - -- (81.71%) 95 (56.10%); 93 (64.63%); 91 (98.78%); 79 (90.24%) y 41 (68.3%).

En las fracciones 203-208, obtenidas al eluir la columna con una mezcla de hexano-acetato de etilo (75:25), que fueron tratadas con diazometano en éter etílico, cristalizó espontáneamente un sólido, el cual fue recristalizado en una mezcla de hexano-cloroformo, obteniéndose 22.6 mg de un compuesto de pf. 201-202°C, y al cual se le determinó su estructura en base a los datos obtenidos de su análisis espectroscópico y espectrométrico, dicha información sugirió que se trataba de un diterpeno tetracíclico con esqueleto del tipo del *ent*-kaurano y al que le corresponde una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$.

La adición de $\text{Eu}(\text{fod})_3 \cdot \text{d}_3\text{O}$ en cantidades crecientes (tabla V) a una muestra de 8 mg de este compuesto disuelto en CDCl_3 , -- permitió asignar las tres señales simples correspondientes a los tres grupos metilos presentes en este compuesto, el cual fue identificado como el 16 α -hidroxi-*ent*-kaur-19-ol.

I.R. $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} (espectro # 18): 3628, 3012, 2869, 2820, - 1462, 1374, 1211, 1007 y 927.

RMN- ^1H (80 MHz, CDCl_3), (espectro # 19): CH_3 -20 (δ 1.01, s, -3H); CH_3 -18 (δ 0.96, s, 3H); CH_3 -17 (δ 1.36, s, 3H) y CH_2OH -19 (δ 3.55, dd, 2H).

E. M. (I.E.) m/e: 288 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$, 21.95%); 275 (46.34%); 258 -- (46.34%); 257 (100%); 217 (26.89%); 147 (26.89); 135 (31.71%); 123 (78.05); 109 (63.41%); 105 (60.98%); 95 (63.41%); 91 (70.73%); 81 (63.41%); 79 (58.54%); 55 (53.66) y 43 (95.12%).

Tabla V: Desplazamientos químicos de los grupos metilo en el 16 α -hidroxil-*ent*-kaur-19-ol, al adicionar cantidades molares crecientes de $\text{Eu}(\text{fod})_3 \cdot \text{d}_{30}$.

R. mol.	0.066	0.130	0.210	0.387	0.544	0.699	0.820
CH_3 -17	δ 3.02	δ 3.56	δ 4.30	δ 5.28	δ 6.65	δ 7.30	δ 8.60
CH_3 -18	δ 2.68	δ 3.12	δ 3.89	δ 5.34	δ 6.15	δ 6.71	δ 7.10
CH_3 -20	δ 1.85	δ 2.10	δ 2.45	δ 3.01	δ 3.49	δ 3.85	δ 4.10

De las fracciones 245-264, que fueron obtenidas al eluir la columna con una mezcla de hexano-acetato de etilo (70:30), se aislaron 66.8 mg de un sólido (0.0589% con respecto al extracto) de p f. 234-236°C [lit.³⁷, 244-246°C], el cual se cristalizó espontáneamente. Para determinar su estructura se propuso un esqueleto del tipo del *ent*-kaureno, tomando en cuenta los datos obtenidos de su análisis espectroscópicos y espectrométricos, los cuales al compararlos con las propiedades físicas y constantes espectroscópicas reportadas en la literatura, se pudo concluir que se trataba del ácido 16 α -hidroxi-*ent*-kaur-11-en-19-oico, el cual tiene una fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_3$ y a la que le corresponde un peso molecular de 318.

I. R. $\nu_{\text{max.}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} (espectro # 20): 3451, 3424, 3024, 2927, 1699, 1467, 1378, 1238, 1173, 1152, 932 y 890.

RMN- ^1H (80 MHz, CDCl_3), (espectro # 21): CH_3 -20 (δ 0.84, s, -3H); CH_3 -18 (δ 1.23, s, 3H); CH_3 -17 (δ 1.31, s, 3H); y dos señales que corresponde a los protones 11 y 12 (δ 5.50, dd, -- $J = 10$ y 4 Hz, 1H); (δ 5.89, dd, $J = 10$ y 7.5 Hz, 1H).

E.M. (I.Q.) m/e: 319 (73.17%); 303 (12.20%); 302 (10.5%); 301 (100%); 273 (12.20%); 260 (20.73%); 259 (17.07%); 255 (17.07%) 215 (9.76%) y 213 (9.76%).

Obtención del traquiloban-19-oato de metilo (2).

32.5 mg del ácido traquiloban-19-oico (1), fueron metilado CH_2N_2 en éter etílico, obteniéndose un sólido cristalino -- blanco, el cual fue recrystalizado en una mezcla de éter y metanol, de donde se aislaron 29.93 mg de un sólido cristalino que presentó un p f. 96-98°C. Y al cual se le comprobó su estructura por métodos convencionales, y en la comparación de sus propiedades físicas y constantes espectroscópicas con las reportadas en la literatura, ver figura 14.

$$[\alpha]_D^{25} = -55.19 \text{ (} c=1.54; \text{ CHCl}_3\text{)}.$$

$$[\alpha]_D^{25} = -56.52 \text{ (} c=1.38; \text{ CH}_3\text{OH)}$$

I. R. $\nu_{\text{max.}}^{\text{CHCl}_3} \text{ cm}^{-1}$ (espectro # 22): 2995, 2948, 2850, 1716, 1465, 1448, 1192, 1153, 1096 y 973.

RMN- H (80 MHz, CDCl_3), (espectro # 23): CH_3 -20 (δ 0.74, s, 3H); CH_3 -17 (δ 1.10, s, 3H); CH_3 -18 (δ 1.12, s, 3H) y CH_3 -21 (δ 3.61, s, 3H).

E.M. (I.E.) m/e: 316 (M^+ , 70.73%); 301 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 14.81%) 260 (28.40%); 257 (29.63%); 119 (37.04%); 107 (43.21%); 106 (40.74%); 105 (54.34%); 93 (64.20%); 91 (100%); 91 (100%); 81 (39.51%); 79 (58.02%); 77 (43.21%); 67 (32.10%) y 42 (74.07%).



Figura 14.

Obtención del ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (7).

120.8 mg del ácido 15 α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico - (6) en 25 ml de una solución de KOH al 5% en metanol, se pusieron a reaccionar a reflujo durante 26 horas, para que se llevara a cabo la reacción de hidrólisis de este compuesto. El curso de dicha reacción fué seguido en ccf. La reacción fué suspendida al adicionar HCl al 5% hasta neutralidad. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (5 veces) y la fase orgánica posteriormente fue secada con sulfato de sodio anhidro. La eliminación del disolvente permitió la obtención de 97.5 mg de un sólido cristalino de p f. 230-231°C (Me CO/i-Pr₂ 0), ver figura 15.

I. R. $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹ (espectro # 9): 3602, 3064, 2936, 1692, - 1468, 1258, 1183, 998 y 905.

RMN- ^1H (80 MHz, CDCl_3), (espectro # 10): CH_3 -20 (δ 0.95, s, -3H); CH_3 -19 (δ 1.21, s, 3H); H-15 (δ 3.77, s, amplio, $W_x = 4$ Hz, 1H); H-17_a (δ 5.04, s, amplio, $W_x = 4$ Hz, 1H); H-13 (δ 2.70, s, amplio, $W_x = 12$ Hz, 1H) y H-17_b (δ 5.17, s, amplio, $W_x = 4$ Hz, 1H).

E. M. (I.E.) m/e: 318 (M^+ , 26.38%); 303 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$, 41.46%); 285 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3$, 60.98%); 272 ($\text{M}^+ - \text{HCOOH}$, 14.63%) y 260 ($\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, 95.12%); 257 ($\text{M}^+ - \text{HCOOH} - \text{CH}_3$, 24.39%); 245 ($\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_6\text{O} - \text{CH}_3$, 31.71%); 91 (90.24%); 84 (90.24%); 79 (100%) y 55 (85.37%).

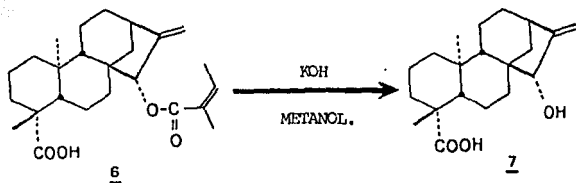


Figura 15.

Obtención del 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oato de metilo (14).

147.6 mg del ácido 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oico (13), fueron tratados con diazometano en éter etílico en condiciones normales. El curso de la reacción fue seguido por ccf. Terminada la reacción y procediendo de la manera usual, se obtuvieron 120.9 mg del 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oato de metilo (14), el cual presentó un aspecto similar al de un aceite, ver figura 16.

I. R. ν $\frac{\text{CHCl}_3}{\text{max.}}$ cm^{-1} (espectro # 13): 3600-3400, 2915, 2860, 1725, 1460, 1445, 1232, 1150, 1015, 1000 y 800.

RMN-¹H (80 MHz, CDCl_3), (espectro # 14): CH_3 -20 (δ 0.77, s, 3H); CH_3 -18 (δ 1.15, s, 3H); CH_3 -17 (δ 1.20, s, 3H); H-15 (δ 3.25, s, 1H) y CH_3 -21 (δ 3.61, s, 3H).

E. M. (I.E.) m/e : 317 (M - CH_3 , 4.48%); 314 (7.32%); 275 (9.76%); 239 (6.10%); 236 (6.10%); 215 (7.32%); 182 (14.6%); 159 (8.54%); 147 (2.72%); 145 (19.98%); 135 (13.41%); 121 (28.63%); 107 (36.59%); 105 (43.90%); 91 (78.05%); 81 (51.22%); 79 (73.17%); 43 (92.68%) y 41 (100%).

RMN-¹³C (20MHz, CDCl_3), (espectro # 15): C-1 (δ 39.79, t); C-2 (δ 19.15, t); C-3 (δ 38.15, t); C-4 (δ 43.82, s); C-5 (δ 56.73, d); C-6 (δ 20.99, t); C-7 (δ 33.94, t); C-8 (δ 44.96, d); C-9 (δ 52.12, d); C-10 (δ 38.58, s); C-11 (δ 18.87, t); C-12 (δ 25.12, d); C-13 (δ 23.59, d); C-14 (δ 29.72, t); C-15 (δ 86.76, d); C-16 (δ 27.87, s); C-17 (δ 16.02, s); C-18 (δ 28.69, c); C-19 (δ 177.82, s); C-20 (δ 12.74, c) y C-21 (δ 51.06, c).

Obtención del ácido 15 α -acetoxi-traquiloban-19-oico (15).

52.7 mg del ácido 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oico, se hicieron reaccionar con 0.75 ml de anhídrido acético y 0.5 ml de piridina durante 55 minutos, siguiendo el curso de la reacción - por medio de ccf.

Concluida la transformación, se adicionó hielo a la mezcla - de reacción, para posteriormente llevar a cabo la extracción del producto, lo cual se logró por medio de extracciones su - cesivas con acetato de etilo. La fase orgánica total obteni - da se lavó con una solución al 10% de HCl para eliminar la - piridina en forma de clorhidrato, el exceso de ácido en el - medio fue eliminado al tratarlo con una solución sobresatura - da de bicarbonato de sodio, y cualquier exceso de reactivo - presente en el medio se eliminó al lavarlo con agua, para -- posteriormente secar la fase orgánica obtenida con sulfato - de sodio anhidro, obteniéndose 47.8 mg de (15), el cual pre - sentó un aspecto similar al de un aceite, ver figura 17.

I. R. $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹ (espectro # 16): 3000, 2931, 2870, 1721, - 1694, 1467, 1448, 1372, 1256 y 1020.

RMN-¹H (80MHz, CDCl₃), (espectro # 17): CH₃-20 (δ 0.88, s, - 3H); CH₃-17 (δ 1.06, s, 3H); CH₃-18 (δ 1.18, s, 3H); AcO (δ - 2.06, s, 3H) y H-15 (δ 4.76, s, 1H).

E. M. (I.E.) m/e: 361 (M^+); 360 (3%); 318 (3%); 313 (1.3%) 105 (23.17%); 91 (29.27%); 79 (24.39%); 60 (17.07%); 57 (18.29%); 55 (26.83%); 45 (28.05%) y 43 (100%).

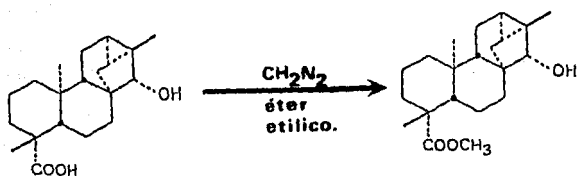


Figura 16.

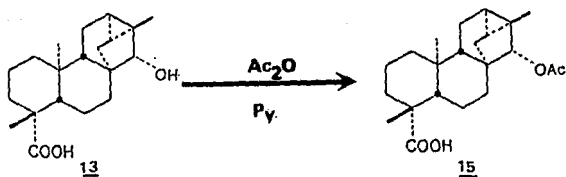


Figura 17.

RESUMEN
Y
CONCLUSIONES.

Se realizó el estudio fitoquímico de la raíz de *Iostephane madrensis*, cuyo uso forma parte de la herbolaria indígena de -- nuestro país, ya que el té de la misma es tomado como remedio para el tratamiento de la úlcera gástrica, los padecimientos del riñón y de la esterilidad, y como emplasto para el tratamiento del reumatismo, por algunos grupos étnicos y sociales de nuestro país, especialmente por los tarahumaras.

Del presente estudio se aislaron e identificaron nueve metabolitos secundarios, todos ellos diterpenos tetracíclicos, los cuales presentan como esqueleto base, el del traquilobano, -- *ent*-kaurano y *ent*-beyereno. La separación y purificación de estas sustancias se llevó a cabo utilizando técnicas de cromatografía en columna y placa preparativa, así como la de recristalizaciones sucesivas respectivamente.

Asimismo, la determinación y comprobación de la estructura de estas sustancias, se basó en los datos obtenidos de los análisis espectroscópicos y espectrométricos que les fueron realizados, así como la similitud de sus propiedades físicas y constantes espectroscópicas con las reportadas en la literatura y la comparación con muestras auténticas.

Lo anterior permite concluir que los metabolitos secundarios -- aislados de *Iostephane madrensis* eran: el ácido traquiloban-

19-oico(1), el 16 α -hidroxi-*ent*-kaurano(3), ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico(4), ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico(5), el ácido - - 15 α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico(6), el ácido 15 α -hi--droxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico(7), ácido-traquiloban-19-oico(13), 16 α -hidroxi-*ent*-kaur-19-ol(17) y el ácido 16 α -hidroxi-*ent*--kaur-11-en-19-oico(18).

Se considera que el objetivo primordial del presente estudio - ha sido alcanzado, y se puede tomar como el inicio de un estudio interdisciplinario que contribuye a evaluar y enriquecer - el conocimiento de las plantas mexicanas utilizadas en la medicina tradicional y de esta manera colaborar a su mejor aprovechamiento.

RECOMENDACIONES.

- Considero que los objetivos en la fitoquímica de las plantas medicinales deben orientarse a aislar e identificar - aquellas sustancias responsables de una acción farmacológica en un té o extracto de la planta. Por lo que es necesario un estudio farmacológico preliminar, el cual pueda servir como marco de referencia en la búsqueda de sustancias puras que reproduzcan el efecto inicial observado.
- La investigación que se haga debe ser necesariamente interdisciplinaria ya que las plantas medicinales componen un conjunto, al mismo tiempo natural y cultural, para cuyo conocimiento debe basarse en la botánica, farmacología y química, así como también en la historia, etnobotánica, etnología, etc.
- La utilización de las plantas medicinales en una colectividad, sociedad, etc., constituye parte de su cultura médica, este conocimiento tradicional y empírico se debe comprender como un proceso histórico continuo de interacción hombre-naturaleza.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Rzedowski, J.; Vegetación de México, Ed. Limusa, pp. 2-20. México, 1978.
- 2.- Bye, R. A., Medicinal Plants of the Sierra Madre: Comparative study of Tarahumara and Mexican Market Plants. *Economic Botany* 40, 103 (1986).
- 3.- Linares, E. and Bye, R.; A study of four plant complexes of México and adjacent United States. *J. of Ethnopharm* 19, 153 (1987).
- 4.- Capasso, F., Balestrieri, B. y Mascolo, N., Actualidad de las plantas medicinales. *Medicina Tradicional* 3, - 53 (1980).
- 5.- Lozoya, X., A manera de Introducción; *Medicina Tradicional* 2, 3 (1978).
- 6.- Rzedowski, J.; Contribuciones a la fitografía florística e Histórica de México III. Algunas tendencias en la distribución geográfica y ecológica de las Compositae Mexicanas. *Ciencia* 26, 123 (1972).
- 7.- Sánchez, S. O., La Flora del Valle de México; Ed. Herero; 6a. Ed.; pp. 390-391. México (1972).
- 8.- Watson, S., Contributions to American Botany. *Proc. Amer. Academ. Arts.* 23, 278 (1888).
- 9.- Hanson, J.R., The Biosynthesis of C₅-C₂₀ Terpenoid Compounds. *Natural Products Reports* 1, 443 (1984).

- 10.- Upper, Ch. D. and West, Ch. A., Biosynthesis of Gibberellins. Enzymic Cyclization of Geranylgeranyl-pyrophosphate to kaurene. *J. of Biol. Chem.* 242, 3285 (1967).
- 11.- Shechter, I. and West, Ch. A., Biosynthesis of cyclic diterpenes from trans-geranylgeranyl-pyrophosphate. *J. of Biol. Chem.* 244, 3200 (1969).
- 12.- Goodwin, T.W. and Mercer, E.I., Introduction to plant biochemistry. Pergamon Press, 2a. Ed., Great Britain pp. 420-433 y 586-590 (1983).
- 13.- Robinson, D.R. and West, Ch. A., Biosynthesis of Cyclic Diterpenes in extracts from seedlings of *Recinus communis* L. II. Conversion of geranylgeranyl-pyrophosphate into Diterpene hydrocarbons and partial purification of the cyclization enzymes. *Biochemistry* 9, 80 (1970)
- 14.- Hugel, G., Lods, L., Mellor, J. M., Theobald, D.N. et Purisson, G., Diterpenes de trachylobium, *Bull. Soc. -- Chim. Fr.* 2888 (1965).
- 15.- Bory, S. et Fetizon, M., Determination de la configuration d' esters di ou triterpeniques par spectroscopie infrarouge. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 570 (1964).
- 16.- Pyrek, S. St., New Pentacyclic diterpene. trachyloban-19-oic acid from sunflower. *Tetrahedron* 26, 5029 (1970).
- 17.- Kalinovsky, A. I., Serebryakov, E.P., et. al. Mass Spectroscopy of kaurene derivatives. *Organic Mass Spectrometry* 3, 1393 (1970).

- 18.- Nathan, J. y Díaz, E.; Introducción a la RMN- H, Ed. -
Limusa, pp. 170-171. México (1970).
- 19.- Henrick, C.A. and Jefferies, P. R., The chemistry of -
the Euphorbiaceae (The diterpene of *Ricinocarpus stylo-*
sus). *Aust, J. Chem.* 17, 915 (1964).
- 20.- Esahak, A.P., Ghosh, D.P. and Pakrashi, S.C., Studies -
on Indian Medicinal Plants. Part XXIX. Diterpenoid --
and other Constituents of *Enhydra fluctuans* Lour. *J. -*
Indian Chem. Soc. 51, 409 (1978).
- 21.- Hugel, G., Lods, L., Mellor, J.M., Theobald, D.W. et --
Ourrison, G., Diterpenes de trachylobium: Introduc- -
tion generale. Isolement du Kauranol et de huit diter-
penes nouveaux. *Bull, Soc. Chim. Fr.* 2882. (1965).
- 22.- Chien, J.C. C. W., Nuclear Magnetic Resonance Spectra -
of Resin Acids. *J. Am. Chem. Soc.* 82, 4762 (1960).
- 23.- Bohlmann, F. und Ngo, Le Van, Uber neue diterpene aus -
Dimorphotheca pluvialis Moench. *Chem. Ber.* 109, 1446
(1976).
- 24.- Nair, M.D. and Adams, R., The Structure of Redellic and
the Stereochemistry of necic acids. *J. Am. Chem. Soc.*
83, 922 (1961).
- 25.- Bohlmann, F. and Zdero, Ch., Uber ein neues Diterpen -
aus *Melampodium perfoliatum* (Carv) A. Gray, *Chem. Ber.-*
109, 1670 (1976)
- 26.- Grande, M., Segura, M., Mancheño, B., New Kaurene Diter

penoids from the roots of *Elaeolinum tenuifolium*. *J. Nat. Prod.* 49, 259 (1986).

- 27.- Delgado, G., Alvarez, L. and Romo de Vivar, A. Terpenoids and a flavon-3-ol from *Viguiera quinquerádiata*. *Phytochemistry* 23, 675 (1984).
- 28.- Piozzi, F. Sprio, V., Passannanti, J, e Mondelli, R., - - Struttura dell' acido grandiflorilico. *Gazz. Chim. Ital.* 98, 907 (1968).
- 29.- Cannon, J.R., Chow, P.W., Jefferies, P.R. and Meehan, G. V., Isolation of (-)-kaur-16-en-19-oic acid and 15 - hidroxi-(-)-kaur-16-en-19-oic acid from *Phebalium rude*. *J. Aust. Chem.* 19, 981 (1966).
- 30.- Dauben, W., Fonken, G. And Noyce, D., The Stereochemistry of hydride reductions. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 2579 (1956).
- 31.- Levy, G. y Nelson, G., Resonancia Magnética Nuclear de - Carbono-13. pp. 124-134. Bellatierra, Madrid (1972).
- 32.- Grover, S. H. and. Stothers, J.B. C-13 Nuclear Magnetic Resonance Studies. Examination of the Long-range shield-- din effects of the hydroxyl group in alicyclic systems. - *Can J. Chem.* 52, 870 (1974).
- 33.- Eliel, E., Bayley, W., et. al, C-13 Magnetic Resonance. - Upfield Shifts causes by Nitrogen, Oxygen and Fluorine -- atoms located at the γ -position and anti-periplanar to - the nucleus observed. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 322 (1975).

- 34.- Wehrli, F. W. and Wirthlin, T., Interpretation of C-13 NMR Spectra. Heyden. Great Britain 22 (1978).
- 35.- Bjeldanes, L. and Geissmann, T., Constituents of *Helianthus ciliaris*. *Phytochemistry* 11, 327 (1972).
- 36.- Arnone, A., Mondelli, R. and Pyrek, J. St. ^{13}C -NMR --- Spectroscopy of Natural Substance. Studies of trachylobane diterpenes, Complete carbon assignment. *Org. Mag. Res.* 12, 429 (1979).
- 37.- Ohno, N. and Mabry, T. J., Sesquiterpene lactones and diterpene carboxylic acids in *Helianthus niveus* subspecies *Canescens*. *Phytochemistry* 19, 409 (1980).
- 38.- Bohlmann, F., Zdero, Ch., Schmeda-Hirschmann, G., Jakupovic, J., Castro, V., King, R. M. und Robinson, H., - Helinagolide trachyloban und villanoban, derivatives aus *Viguiera* arten. *Liebigs. Ann. Chem.* 495 (1984).
- 39.- Fergurson, G., Mc Crindle, R., Murphy, S. T. and Parvaez, M., Further Diterpenoid Constituents of *Helianthus annuus*. L., crystal and molecular structure of methyl *ent*-15 α -hydroxy-trachyloban-19-oate. *J. Chem. Research* 200 (1982).
- 40.- Faulknor, D. F., Lebby, V. and Waterman, P. G., Further Diterpenes from otem bark of *Xylopiya aethiopica*. *Planta Médica* 354 (1985).

- 41.- Gaudemer, A., Polonsky, J., Wenkert, E., Determination de la conformation des groupements $-CH_2OH$ et $-CH_2OAc$ de quelques composés terpéniques par la résonance magnétique nucléaire. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 407 (1964).
- 42.- Rabenstein, D. L., Applications of Paramagnetic shift reagents in proton Magnetic Resonance Spectroscopy. --- *Anal. Chem.* 43, 1599 (1971).
- 43.- Dimarco, P. V., Else, T. L., Burton, R. and Wenkert, E., Paramagnetic induced shifts in the proton magnetic resonance spectra of alcohol resins of tris(dipivaloylmetanato) de europio III. *J. Am. Chem. Soc.* 92, 5735 (1970).
- 44.- Franklin, N. C. and Feltkamp, H., Conformational analysis of cyclohexane derivatives by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Edit.* 4, 774- (1979).
- 45.- Torsell, K. B., Natural Products Chemistry. Ed. John Wiley & Sons Ltd. Great Britain, 189 (1983).
- 46.- Bohinski, R., *Bioquímica*, Ed. Fondo Educativo Interamericano, pp. 498. México (1978).
- 47.- Devon, T. K. and Scott, A. I., Handbook of Naturally Occurring Compounds. Vol. II: Terpenes. Ed. Academic Press. N. York (1972).
- 48.- Heywood, V. H. and Harbone, J. B., Eds. *The Biology* --

and Chemistry of the Compositae. Academic Press. Great Britain. pp. 622 (1977).

- 49.- Hanson, J. R., The Biosynthesis of the Diterpenes. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 29, 396 (1971).
- 50.- Delgado, G. Instituto de Química. Comunicación Personal.
- 51.- Romo de Vivar, A., *Productos Naturales de la Flora Mexicana*. Ed. Limusa, México (1985).
- 52.- Nakanishi, L. *Infrared Absorption Spectroscopy*. Ed. Holden Day. Japón (1962).
- 53.- Bohlmann, F. und Ziesche, J., Nuev Diterpene aus *Gnaphalium*-arten. *Phytochemistry* 19, 71 (1980).
- 54.- Bohlmann, F., Knoll, Karl-Heins, et. al. Nene Eudesmanolide aus *S. Terractinia mollis*. *Phytochemistry* 19 971- (1980).
- 55.- Gao, F., Miski, M., Gage, D. and Mabry, T., Terpenoid - Constituents of *V. dentata*. *J. Nat. Prod.* 48, 316 --- (1985).