



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

23
29

FACULTAD DE QUIMICA

LABORATORIO DE QUIMICA ORGANICA
FACULTAD DE QUIMICA

**DETERMINACION DE ACTIVIDAD BIOLOGICA
DE COMPUESTOS AISLADOS DE
*Brickellia glandulosa***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
BEATRIZ CASTAÑEDA MALVAEZ



MEXICO, D. F.

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 esta 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.

Jurado asignado:

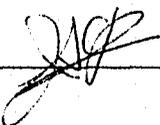
Presidente: Prof. Jaime Medina Oropeza
Vocal: Prof. Ana María Vázquez Álvarez
Secretario: Prof. José Serafín Calderón Pardo
1er. Suplente: Prof. Rafael Rion Arriola
2do. Suplente: Prof. Perla Carolina Castañeda López

Sitio donde se desarrolló el tema:

INSTITUTO DE QUIMICA, U.N.A.M.

Asesor del tema:

Dr. José Serafín Calderón Pardo



Sustentante:

Beatriz Castañeda Malvaez



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO
EN EL LABORATORIO L-7
DE LA UNIDAD DE PLANTAS MEDICINALES
DEL INSTITUTO DE QUIMICA
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO
BAJO LA DIRECCION DEL
DR. JOSE S. CALDERON PARDO
CON UNA AYUDA ECONOMICA
OTORGADA POR EL
SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES

DEDICATORIAS

A mis padres: Por el apoyo brindado.

A mis hermanos: Caro, Angel, Geli, Beto y Ana por su apoyo y confianza en mí, por los momentos agradables compartidos y para que sigan siempre adelante sin importar los obstáculos.

A Germán: Con todo cariño te dedico el presente trabajo porque con tu ayuda incondicional, tu confianza en mí y tu apoyo te has empeñado en animarme a seguir siempre adelante.

A todas las personas que de una u otra forma han contribuido en mi formación personal y profesional.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Calderón: Con profunda admiración y respeto por ser mi asesor de tesis, por su paciencia, por su apoyo y por compartir sus conocimientos para la culminación de una de mis metas más preciadas.

¡GRACIAS!

Al Ing. Jaime Medina: Por sus consejos, su estímulo constante a seguir adelante y su valiosa ayuda en la revisión de la presente tesis.

A los Drs. Leo Quijano, Tirso Ríos y Federico Gómez: Por su optimismo y sus valiosas aportaciones académicas para la realización del presente trabajo.

A mis asesores: Prof. Ana María Vázquez, Dr. Rafael Ríos y Prof. Perla Castañeda: Por sus enseñanzas, comentarios y sugerencias no sólo para ésta tesis sino a lo largo de mi carrera.

Al laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química a cargo del Maestro Javier Taboada y a las Biólogas Carmen y Tere: Por su ayuda en las pruebas de toxicidad frente a A. salina y en las pruebas de actividad antiinflamatoria.

Al laboratorio de microbiología experimental de la Facultad de Química y en especial a las Maestras Rosa Ma. Ramírez, Beatriz Luna y Lupita: Por su asesoría y valiosa ayuda para la realización de las pruebas de actividad antimicrobiana.

A mis compañeros del Laboratorio L-7 y 2-6 especialmente a Ruth y al Maestro Eugenio Flores: Por sus consejos durante el desarrollo del trabajo experimental.

Un especial agradecimiento al Ing. Claudio Arcos R. y su esposa la Sra. Marcela Martínez de DIPESA: Por su paciencia y su apoyo al permitirme finalizar dicho trabajo en forma paralela a mi desempeño laboral en su empresa.

INDICE

INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	2
PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS DITERPENOS	9
PARTE TEORICA	22
PARTE EXPERIMENTAL	30
CONCLUSIONES	53
LISTA DE ABREVIATURAS	54
ESPECTROS	55
BIBLIOGRAFIA	79

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La importancia del estudio de la flora mexicana radica en la poderosa contribución que ofrecen los recursos de la naturaleza a la terapéutica convencional (alopática) y la tradicional. Las plantas siempre han sido una fuente común de productos medicinales, tanto en la forma de preparaciones tradicionales, como de principios activos puros; y aunque es imposible ignorar los beneficios aportados por los medicamentos sintéticos, cada vez se subraya más el interés por los fármacos naturales.

Muchos compuestos de origen natural sirven de materia prima para la síntesis de fármacos semisintéticos, como ejemplo tenemos que la progesterona se obtiene a partir de la diosgenina, extraída de varias especies del género *Dioscorea*. También los fármacos naturales sirven como prototipos estructurales para la síntesis de drogas análogas con mayor actividad biológica, por ejemplo, los anestésicos como la benzocaína, lidocaína y procaína se sintetizaron considerando a la cocaína como modelo estructural.

En la actualidad con el gran desarrollo de la química de los productos naturales y gracias a las técnicas analíticas y preparativas como son la cromatografía y la espectrofotometría, se pueden aislar, purificar y determinar la estructura química de muchos compuestos de origen natural para su utilización en la terapéutica.

El presente trabajo muestra el estudio fitoquímico de la planta *Brickellia glandulosa* y el estudio de algunas propiedades biológicas de los compuestos aislados de dicha planta, contribuyendo así a uno más de los estudios en productos naturales realizados en el Instituto de Química de la U.N.A.M.

GENERALIDADES

GENERALIDADES

La gran amplitud altitudinal de México, su ubicación a ambos lados del Trópico de Cáncer, la influencia oceánica, la forma misma del territorio de la República y su complicada y variada topografía son factores determinantes y muy significativos que hacen que México sea uno de los países que poseen una amplia diversidad en su vegetación¹.

El género *Brickellia* pertenece a la tribu Eupatorieae de la subfamilia segunda Tubuliflorae, la cual a su vez pertenece a la familia Compositae (compuestas).

Las compuestas constituyen una de las familias más amplias y diversificadas, ya que cuenta con más de 950 géneros y cerca de 20,000 especies, además se encuentra ampliamente distribuida en toda la Tierra².

El género *Brickellia* se encuentra distribuido desde la frontera suroeste de Canadá hasta el sur de América, siendo México el país donde se encuentra la mayor cantidad de especies. Especialmente en el Valle de México (Pedregal de San Angel, Desierto de los Leones, Ajusco, Cerro del Teutli, Cerro del Pino, Santa Fé y proximidades de Ayotla) se pueden localizar las especies de *B. escoparia*, *B. pendula* y *B. veronicaefolia*.

Se tiene el conocimiento de que algunas especies del género *Brickellia* son usadas en forma empírica como plantas medicinales, *B. veronicaefolia* (pesto), por ejemplo, es usada contra la diarrea, dolor de estómago y empacho en algunas

localidades del estado de Hidalgo³ y de esta especie se han aislado diterpenos tipo labdano⁴. *B. lanata* (sanguinaria) se utiliza para "purificar la sangre" en localidades del estado de Jalisco³. Con estos antecedentes se decidió estudiar la especie *Brickellia glandulosa* (sin nombre vulgar ó regional reportado), recolectada en el estado de Oaxaca, de la cual muy poco se ha estudiado.

BIOSÍNTESIS DE DITERPENOS

Biosíntesis se refiere a la serie de reacciones metabólicas mediante las cuales los seres vivos forman sus moléculas orgánicas. Estas se clasifican en metabolismo primario y secundario.

En el metabolismo primario los seres vivos sintetizan y degradan sustancias orgánicas que les son indispensables para vivir. Estos procesos son similares en casi todos los organismos vivos. Los productos formados se denominan **metabolitos primarios** y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Como ejemplo tenemos: aminoácidos, carbohidratos, proteínas, lípidos, etc.

En el metabolismo secundario los seres vivos sintetizan compuestos orgánicos que aparentemente no les son indispensables para vivir. Estos se forman a partir de los compuestos primarios y pueden diferir en los diferentes organismos. Los productos del metabolismo secundario se denominan **metabolitos secundarios** y presentan una distribución taxonómica restringida (en ocasiones característico de un género o especie). Algunos ejemplos son: alcaloides, favonoides, terpenoides, etc.

Los metabolitos secundarios son generalmente los responsables de la actividad terapéutica de los vegetales; así como también de los olores característicos y colores de los mismos, además comunican a la planta sus virtudes culinarias, medicinales o venenosas.

Existen 3 rutas metabólicas a partir de las cuales se originan los metabolitos secundarios:

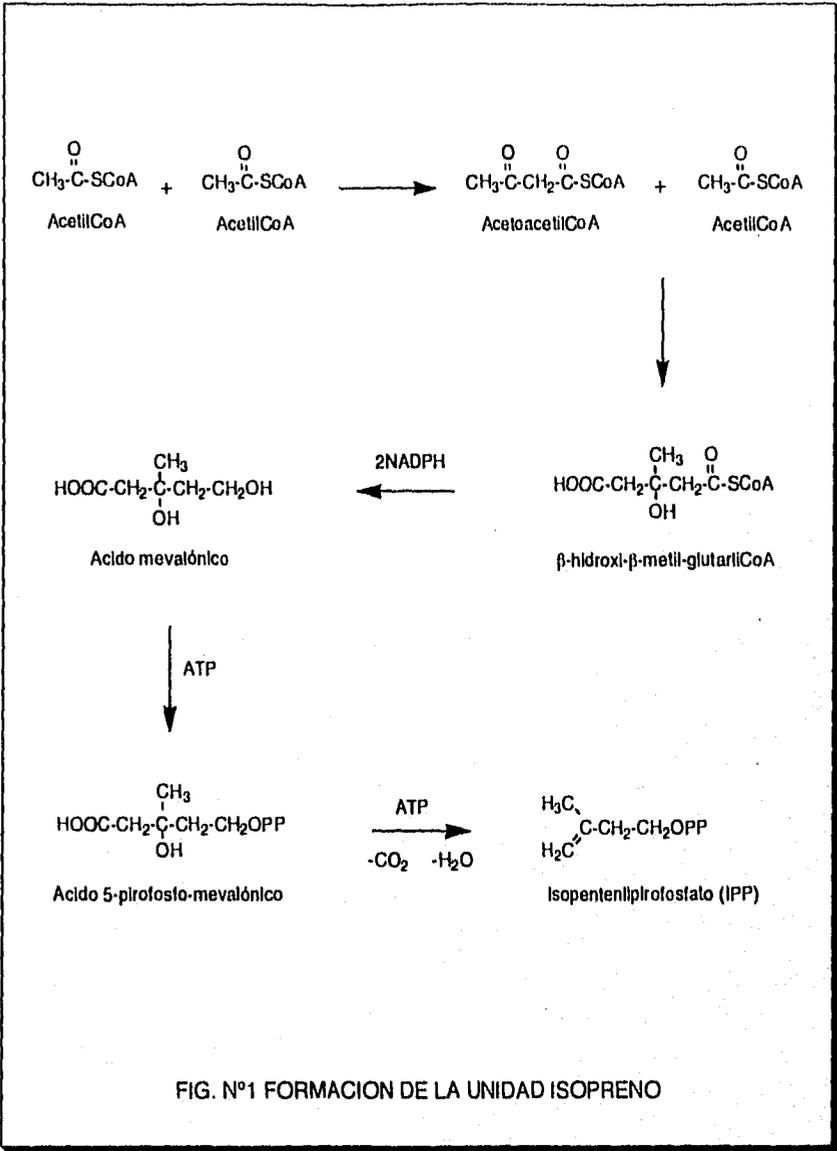
- 1) Acido siquímico
- 2) Acetato - malonato
- 3) Acetato - mevalonato

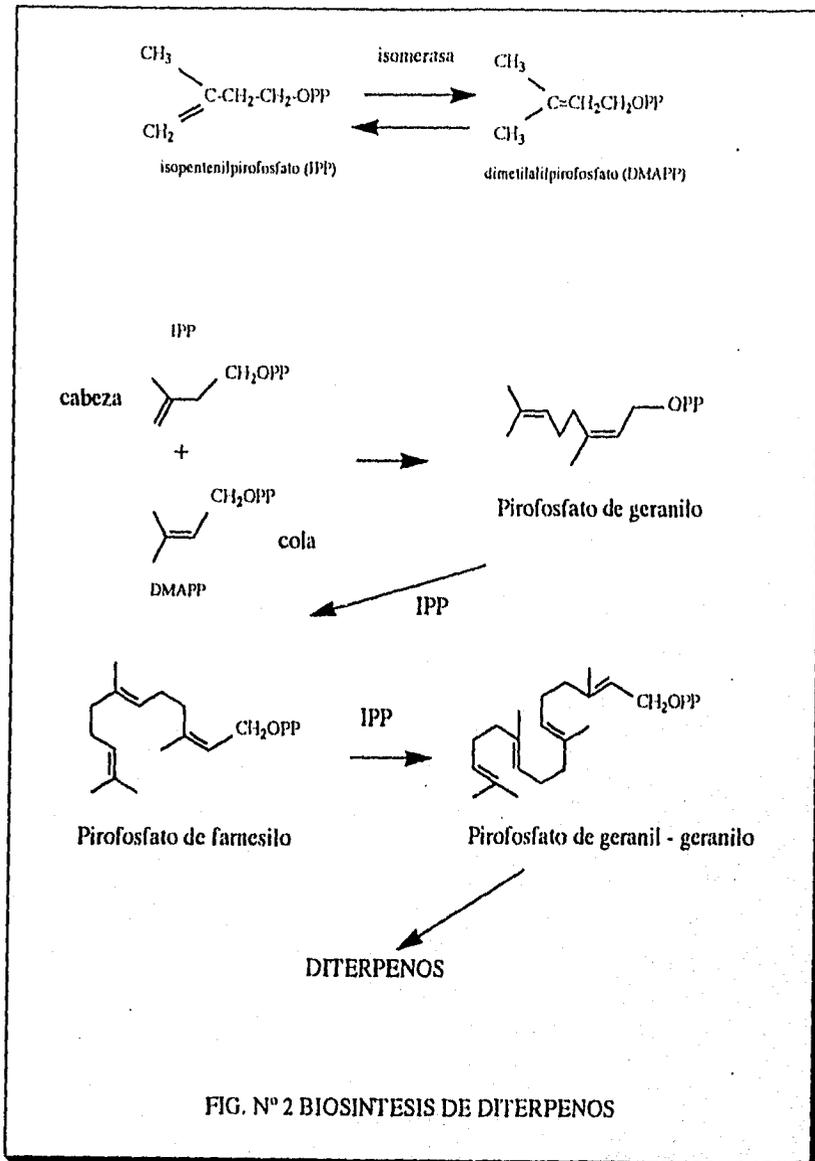
Los diterpenos se biosintetizan por la ruta del Acetato-mevalonato⁵. Están formados por unidades de 5 átomos de carbono llamado isopreno C_5H_8 (2-metil-1,3-butadieno), siguiendo la regla del isopreno que establece que todos los terpenos deben ser divisibles en unidades de isopreno. El isopreno no se ha encontrado como sustancia natural pero se sabe que proviene del ácido mevalónico (Fig. N° 1).

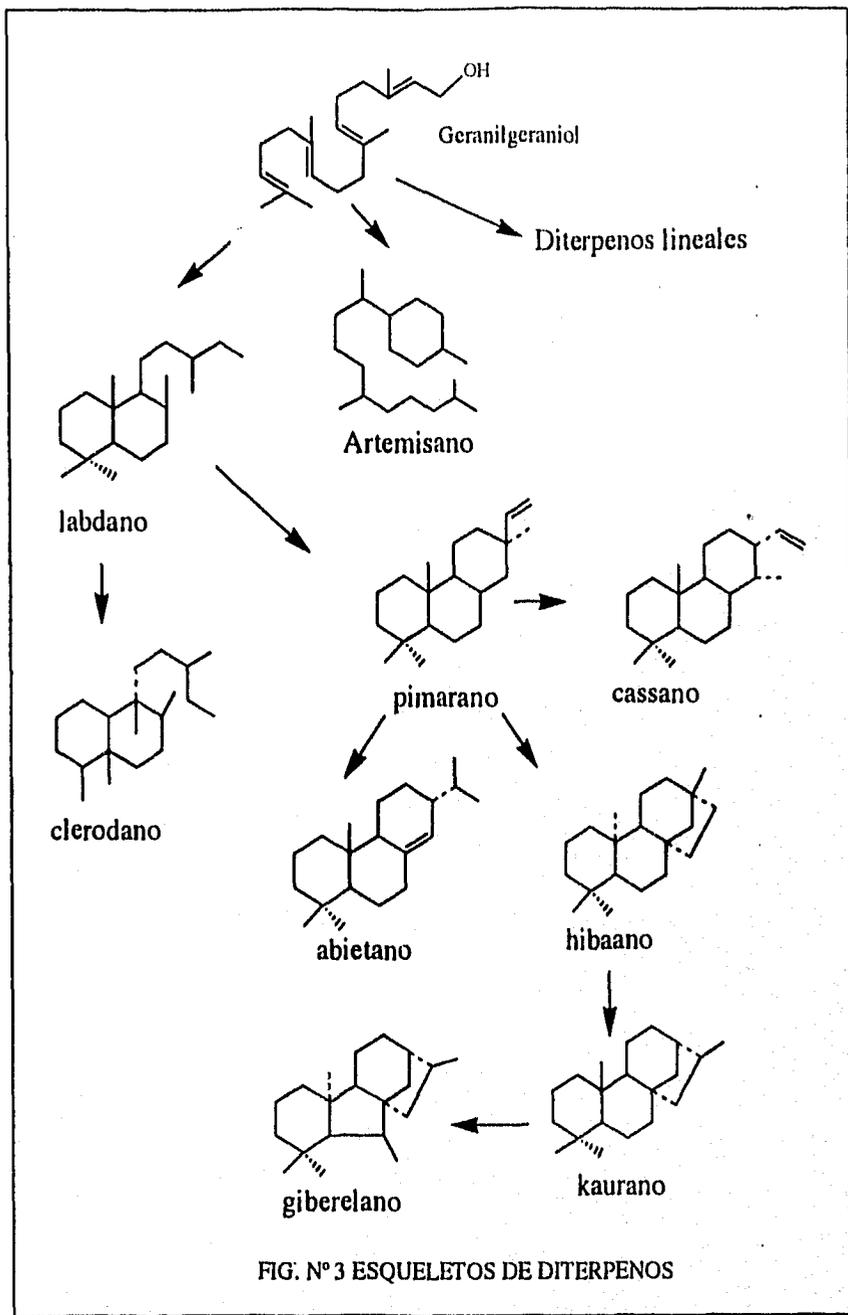
La síntesis se realiza por condensaciones cabeza-cola del isopentenilpirofosfato (IPP)⁶ con el dimetilalilpirofosfato (DMAPP) para dar pirofosfato de geranilo (GPP). El GPP se condensa también en forma cabeza-cola con otra unidad de IPP para formar el pirofosfato de farnesilo (FPP). Una vez formado el FPP éste se condensa con una unidad de IPP para dar el pirofosfato de geranil-geranilo que es el precursor general de los diterpenos (Fig. N° 2).

Los diterpenos son compuestos constituidos por veinte átomos de carbono y están formados por la unión de cuatro unidades de isopreno. Se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, hongos y particularmente en las resinas de los arbustos y árboles en donde actúan como inhibidores del crecimiento de bacterias, así como proporcionando adherencia a las fibras de las maderas.

Los diterpenos están clasificados de acuerdo al número de anillos y tipo de esqueleto estructural que contenga su molécula⁷. Los esqueletos más comunes en diterpenos se representan en la Fig. N° 3.







**PROPIEDADES BIOLÓGICAS
DE LOS DITERPENOS**

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DITERPENOS

Los diterpenos poseen actividades biológicas muy importantes, principalmente los provenientes de plantas de los géneros *Ericaceae*, *Euphorbiaceae*, *Laminaceae*, *Labiatae* y *Compositae* ⁸. A continuación se mencionan algunos diterpenos y la actividad biológica que poseen:

Actividad/Compuesto	Fuente natural	Familia	Referencia
ANTIFUNGICOS			
Casbeno (1)	<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae	8, 9
Acido pseudolárico (2)	<i>Psudolarix kaempferi</i>	Pinaceae	10
Sclareol (3)	<i>Nicotiana glutinosa</i>	Solanaceae	11
PISCICIDAS			
Eremona (4)	<i>Emerocarpus setigerus</i>	"	12
Acido hautriwaico (5)	"	"	"
INSECTICIDAS			
Ajugarin IV (6)	<i>Ajuga remota</i>	Laminaceae	13, 14
Isodonal (7)	<i>Isodon japonicus</i>	Labiatae	35
Enmeina (8)	"	"	"
MOLUSQUICIDAS			
Acido kaurenoico (9)	<i>Wedelia scaberria</i>	Compositae	15
ANTIBACTERIANOS			
Diterpenos 1-7 tipo labdano (10-16)	<i>Cistus incanus</i>	Cistaceae	34
Acido kaurenoico (9)	<i>Mikania monagasensis</i>	Compositae	16
Cembreno (17)	<i>Pinus albicaulis</i>	Pinaceae	17

Actividad/Compuesto	Fuente natural	Familia	Referencia
ANTIBIOTICOS			
LL-S491 β (18)	<i>Aspergillus chavalieri</i>	Fungae	18
LL-S491 γ (19)	"	"	"
Przewaquinona A (20)	<i>Salvia przewalskii</i>	Laminaceae	12
Sonderianol (21)	<i>Croton sonderianus</i>	Euphorbiaceae	13
Secokaurenlactona (22)	<i>Wedelia paludosa</i>	Compositae	37
ANTIMICROBIANOS			
Isodon diterpenos (7,8,23,24,25,26)	<i>Isodon japonicus</i>	Labiatae	35
7,18-dihidroxi-sanda- racopimaradieno (27)	<i>Iboza riparia</i>	Laminaceae	12
Diterpeno tipo ent-rosa- 5-15-dieno (28)	<i>Echinolea inflexa</i>	Graminae	33
ANTIVIRALES			
Bacchotricuneatina (29)	<i>Baccharis tricuneata</i>	Compositae	19
LLS-491 β y γ (18,19)	<i>Aspergillus chavalieri</i>	Fungae	18
OXITOCICOS			
Zoapatanol (30)	<i>Montanoa tomentosa</i>	Compositae	8,20,21
INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS			
Carboxiatractilosido (31)	<i>Xanthium strumarium</i>	Compositae	22
Momilactona A (32) y	<i>Oryza sativa</i> L.	Graminae	23
Momilactona B (33)	"	"	"
AGENTES ENDULZANTES			
Steviosido (34)	<i>Stevia</i> (18 spp.)	Compositae	24,25

Actividad/Compuesto	Fuente natural	Familia	Referencia
ANTITUMORALES			
Enmeina (8)	<i>Rabdosia trichocarpa</i>	Labiatae	36
Tricholabdales A,B,C,D,E (35,36,37,38)	"	"	"
Taxodiona (39)	<i>Taxodium distichum</i>	Taxodiaceae	26,27,32
Taxodona (40)	"	"	"
Oridonina (41)	<i>Isodon japonicus</i>	Labiatae	28
Lasiokaurina (42)	"	"	"
Triptolido (43)	<i>Trypterigium wilfordii</i>	Celasteraceae	29
Triptiolido (44)	"	"	"
Gnididina, Gniditrina y Gnidicina (45,46,47)	<i>Gnidia lamprantha</i>		30,41
Merezeina (48)	<i>Daphne mezereum</i>		"
12-tiglato-13-decanoato de forbol (49)	<i>Croton triglium</i>	Euphorbiaceae	"
Dibenzoato de ingeol (50)	<i>Euphorbia escula</i>	"	"
Podolido (51)	<i>Podocarpus spp.</i>		"
Nagilactona C (52)	"		"
Diterpenos 1 - 7 tipo labdano (10 - 16)	<i>Cistus incanus</i>	Cistaceae	34
Diterpenos de Isodon	<i>Isodon japonicus</i>	Labiatae	35
CARDIOACTIVOS			
Diterpenos C,D y E (53,54,55)	<i>Coleus forskohlii</i>	Labiatae	31,32
Grayanotoxina (56)	<i>Rhododendrum, Kalmia y Leucothoe spp.</i>		32,41
Licoctonina (57)	<i>Aconitum spp.</i>	Ranunculaceae	8,32
Antranollicoctonina (58)	"	"	"
Inuroileanol (59)	<i>Inula royleana</i>	Compositae	38
7- ceteroileanona (60)	"	"	"

Otros diterpenos que poseen actividad biológica muy importante son por ejemplo el Fitol (61), que es un diterpeno acídico constituyente de la clorofila, la vitamina A (62) y las cadenas laterales de la vitamina E (63) y de la vitamina K (64).

Las giberelinas son hormonas que poseen actividad como promotoras de la extensión celular en el crecimiento de las plantas³². El ácido giberélico (65) es comercialmente utilizado en el proceso de malta de la cerveza y en horticultura. Además de proporcionar cohesión a las fibras de la madera también las protege del ataque microbiano. El ácido podocárpico (66), el ferruginol (67) y el ácido abiético (68) poseen la misma acción antimicrobiana³².

También se han aislado diterpenos bicíclicos con sabor amargo como son la Clerodina (69), Columbina (70) y la Andrografolida (71) que además poseen actividad antialimenticia³².

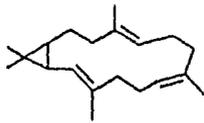
Los diterpenos aislados de especies de *Isodon* también presentan inhibición del desarrollo de larvas de los insectos africanos *Spodoptera exempa* y *S. littoralis*³⁵, además poseen un sabor amargo que en los humanos presenta actividad antialimenticia por al menos durante 2 horas.

Las Longikaurinas de *Rabdosia longituba* son compuestos antibacterianos¹⁰ y antitumorales³⁶.

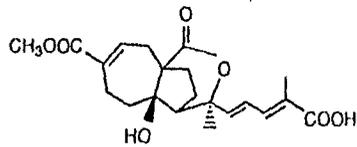
La Podolactona de algunas especies de la familia Coniferae también actúa como inhibidor del crecimiento de las plantas¹².

DITERPENOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

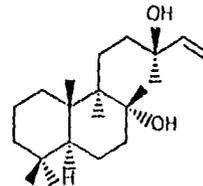
ANTIFUNGICOS:



Casbene (1)

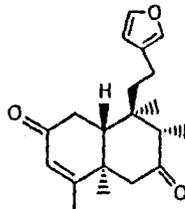


Acido pseudolárico (2)

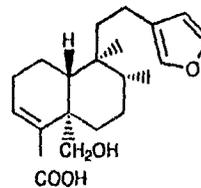


Sclareol (3)

PISCICIDAS:

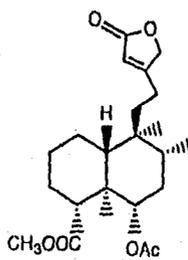


Eremona (4)

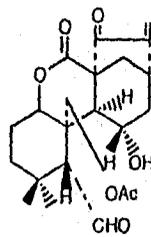


Acido hautriwalco (5)

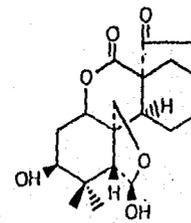
INSECTICIDAS:



Ajuarín IV (6)

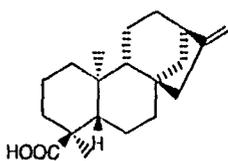


Isodonal (7)

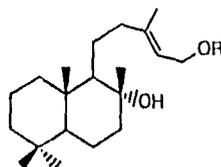


Enmelina (8)

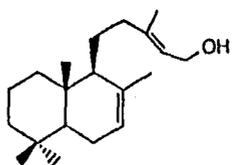
ANTIBACTERIANOS:



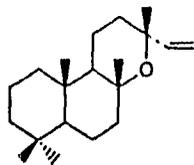
Acido kaurenico (9)



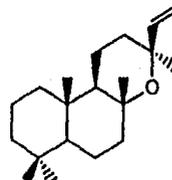
R=H Comp. 1 C. Incanus (10)
R=Ac Comp. 2 C. Incanus (11)



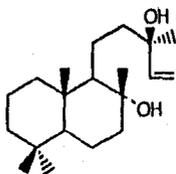
Comp. 3 C. Incanus (12)



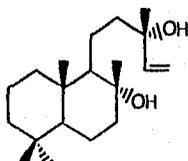
Comp. 4 C. Incanus (13)



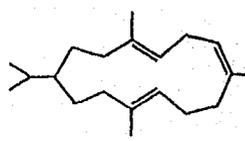
Comp. 5 C. Incanus (14)



Comp 6 C. Incanus (15)

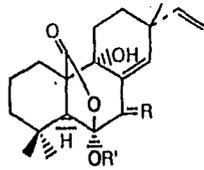


Comp. 7 C. Incanus (16)

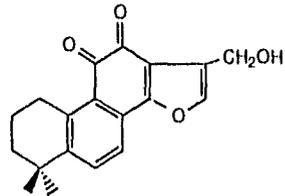


Cembreno (17)

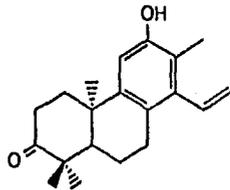
ANTIBIOTICOS:



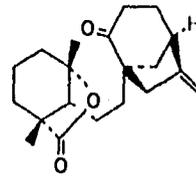
R= O; R' = H LLS-491β (18)
R= β-OH, α-H; R' = H LLS491γ (19)



Przewaquinona A (20)

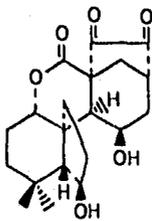


Sonderlanol (21)

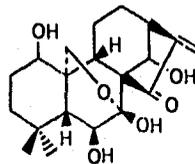


Secokaurenlactona (22)

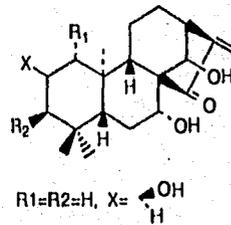
ANTIMICROBIANOS:



Comp. 2 Isodon (23)



Comp. 4 Isodon (24)

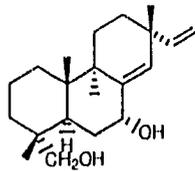


R1=R2=H, X= 

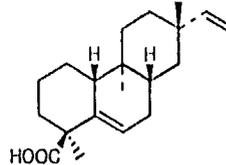
Comp. 5 Isodon (25)

R1=OH, R2=H, X=H₂

Comp. 6 Isodon (26)

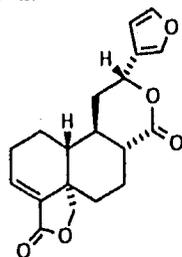


7-18-Dihidro-sandaraco pimaradieno (27)



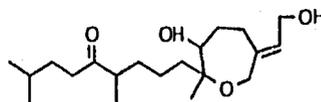
Comp. 1 E. Inflexa (28)

ANTIVIRAL:



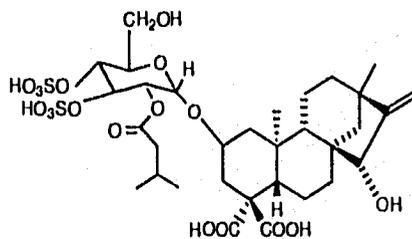
Baccholicunealina (29)

OXITOCICO:

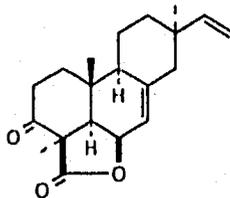


Zoapatanol (30)

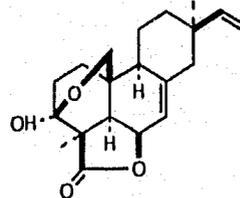
INHIBIDORES DEL
CRECIMIENTO DE PLANTAS:



Carboxiatractiloso (31)

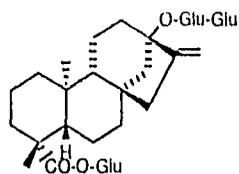


Momilactona A (32)



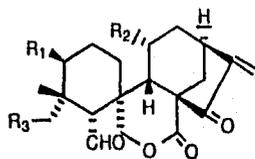
Momilactona B (33)

AGENTE ENDULZANTE:



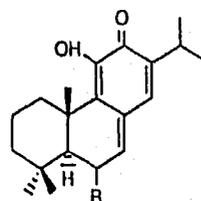
Steviosido (34)

ANTITUMORALES:

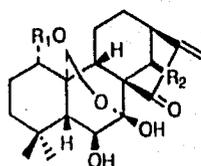


$R_1=R_3=H, R_2=OH$
Tricholabdal A (35)
 $R_1=H, R_2=OH, R_3=OAc$
Tricholabdal B (36)

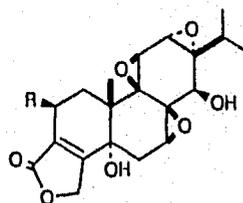
$R_1=OH, R_2=H, R_3=OAc$
Tricholabdal C (37)
 $R_1=R_2=OH, R_3=OAc$
Tricholabdal D (38)



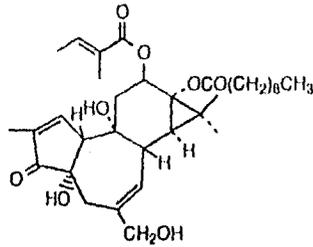
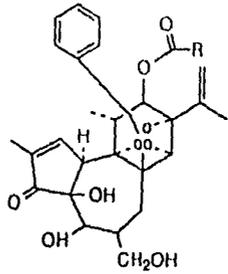
$R=O$ Taxodona (39)
 $R=OH$ Taxodona (40)



$R_1=H, R_2=OH$ Oridonina (41)
 $R_1=Ac, R_2=OH$ Laslokaurlina (42)

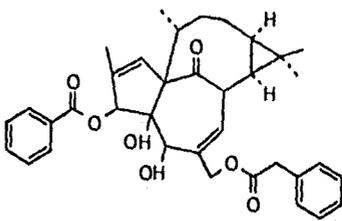


$R=H$ Triptolide (43)
 $R=OH$ Triptolidolide (44)

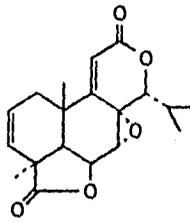


- R= $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$
 Gnididina (45)
 R= $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}=\text{CH})_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_3$
 Gnidirina (46)
 R= $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5$
 Gnidicina (47)
 R= $-(\text{CH}=\text{CH})_2-\text{C}_6\text{H}_5$
 Merezina (48)

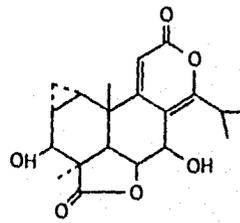
12-ligolato-13-decanoato de lorbol (49)



Dibenzoato de ingeol (50)

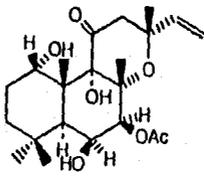


Podolito (51)

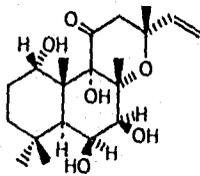


Nagliactona C (52)

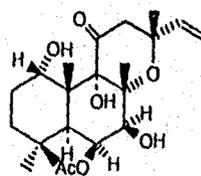
CARDIOACTIVOS:



Diterpeno C C. forskohlii (53)

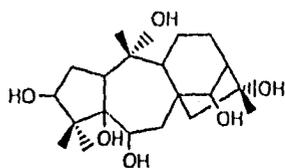


Diterpeno D C. forskohlii (54)

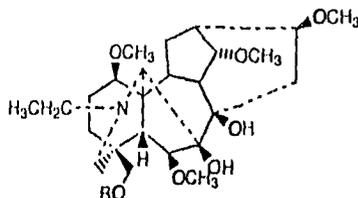


Diterpeno E C. forskohlii (55)

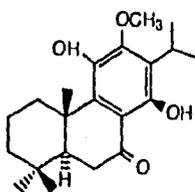
CARDIOACTIVOS:



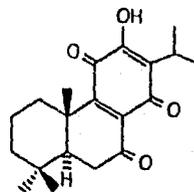
Grayanotoxina (56)



R = H Licoctonina (57)

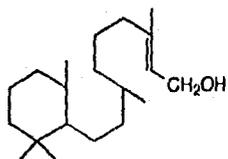


Inuroleanol (59)



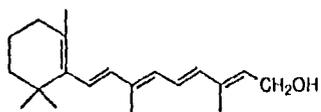
7-Cetorolleanona (60)

CONSTITUYENTE DE LA CLOROFILA:

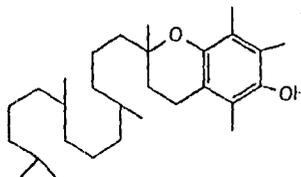


Fitol (61)

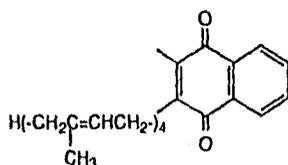
VITAMINAS:



Vitamina A (62)

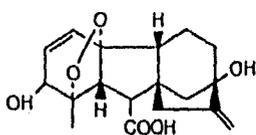


Vitamina E (63)

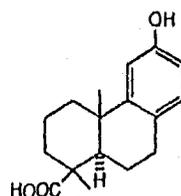


Vitamina K (64)

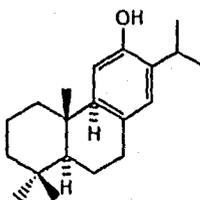
COHESIVOS Y
ANTIMICROBIANOS:



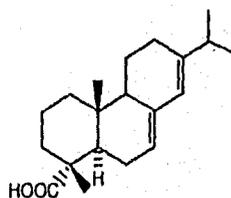
Acido giberólico (65)



Acido podocárpico (66)

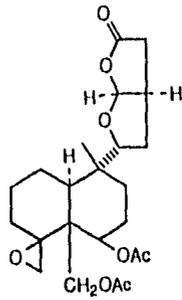


Ferruginol (67)

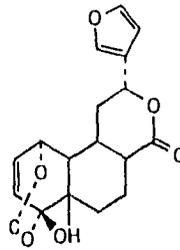


Acido abietico (68)

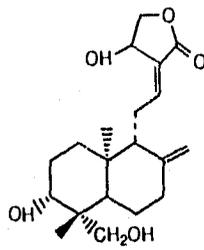
ANTIALIMENTARIOS:



Clerodina (69)



Columbina (70)



Andragratolida (71)

PARTE TEORICA

PARTE TEORICA

La planta *Brickellia glandulosa* fué recolectada en Tamazulapan, Estado de Oaxaca en Febrero de 1990.

El extracto de diclorometano de las flores de *B. glandulosa* se cromatografió en gel de sílice, utilizando como eluyente mezcla de hexano-acetato de etilo.

De las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 9:1 se obtuvo el compuesto 1 un ácido diterpénico como un aceite amarillo, cuyo peso molecular determinado por espectrofotometría de masas³⁹ fué de 406 y corresponde a la fórmula molecular $C_{25}H_{42}O_4$. El espectro de I.R.⁴⁰ muestra una banda ancha en $3500 - 2679\text{ cm}^{-1}$ y una banda afilada en 1717 cm^{-1} para el carbonilo del grupo ácido carboxílico. También se observa en 1732 cm^{-1} una banda afilada asignada al carbonilo de un éster y otra banda afilada en 1192 cm^{-1} de menor intensidad que corresponde al grupo éster. En 890 cm^{-1} se observa una banda para un metileno exocíclico.

El espectro de $^1\text{H NMR}$ muestra una señal doble en 1.10 ppm, $J=7\text{ Hz}$ que corresponde a un metilo unido al metino del éster. También se observa una señal doble de dobles en 4.06 ppm $J=10.8\text{ Hz}$, para un metileno unido al oxígeno del éster. Otra señal doble en 0.93 ppm $J=6.8\text{ Hz}$ para un metilo secundario y señales simples en 0.65 y 0.96 ppm para 2 metilos terciarios indican que se trata de un núcleo labdano. La presencia de un metileno exocíclico se confirma con las absorciones que se exhiben en 4.46 y 4.78 ppm.

En el espectro de ^{13}C NMR se observan los 25 átomos de carbono correspondientes que permiten asignar la estructura 1 para éste diterpeno ácido previamente aislado de esta misma especie⁴¹.

A éste compuesto 1 se le hicieron pruebas de actividad biológica, de las cuales presentó toxicidad frente a *Artemia salina* ($\text{LC}_{50}=3.2 \mu\text{g/ml}$) y ligera actividad de antibiosis frente a *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium smegmatis*.

El compuesto 1 se sometió a una reacción de hidrólisis alcalina de la cual se obtuvo el compuesto 1A como un alcohol ácido que comprueba la presencia del grupo éster del compuesto 1. Este compuesto se obtuvo en forma de cristales incoloros con un p. f.= $129 - 131^\circ\text{C}$ y su peso molecular de 322 determinado por espectrofotometría de masas permitió determinar su fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3$ (aislado anteriormente)⁴¹. El espectro de ^1H NMR además de mostrar señales similares a las del espectro anterior, muestra una señal AB en 3.35 y 3.74 ppm, $J=10.8$ Hz característica para un grupo metileno unido a un oxhidrilo en posición axial.

De la esterificación del compuesto 1 con solución etérea de diazometano se obtuvo un líquido viscoso, siendo el compuesto 1B con lo cual se comprobó la presencia del grupo ácido y cuyas constantes espectroscópicas coinciden con su fórmula molecular $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}_4$. Su espectro de ^1H NMR presenta el mismo patrón de sustitución que el espectro del compuesto 1 excepto que la señal a campo bajo en 3.66 ppm indica que el grupo carboxilo se esterificó.

Este compuesto a su vez se sometió a una reducción con hidruro de litio y aluminio en éter anhidro, obteniendo así el compuesto 1C que es un diol en forma de cristales ligeramente amarillos con un p.f. = 110 - 112°C y cuyo peso molecular fue de 308 para la fórmula $C_{20}H_{36}O_2$. El espectro de 1H NMR muestra dos dobletes a 3.35 ppm, $J=11.7$ Hz y 3.72 ppm, $J=10.8$ Hz formando un sistema AB característico de un metileno unido a un grupo hidroxilo en C-4 en posición axial. También se observa un triplete en 3.7 ppm $J=6.9$ Hz correspondiente al grupo alcohol unido en H-15.

El espectro de ^{13}C NMR muestra señales para 20 átomos de carbono. Con estos datos se identificó a este compuesto como el imbricatadiol^{42,43}.

El compuesto 2 también un ácido diterpénico, se aisló a partir de las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 8:2 como un líquido viscoso amarillo y con un peso molecular de 320 que corresponde a la fórmula $C_{20}H_{32}O_3$. En el espectro de 1H NMR se observa una señal simple en 5.73 ppm correspondiente a un protón vinílico, además de una señal en 1.87 ppm para un metilo vinílico. Los desplazamientos químicos sugieren que la insaturación se encuentra en el enlace 7-8. También se observan señales simples para 3 metilos terciarios en 0.81, 1.09 y 1.12 ppm y una señal doble en 1.0 ppm $J=6.7$ Hz para un metilo secundario correspondientes a un núcleo labdano.

En el espectro de ^{13}C NMR se exhiben claramente las señales correspondientes a los 20 átomos de carbono de éste diterpeno.

Durante las pruebas de actividad biológica, el compuesto **2** presentó ligera toxicidad frente a *Artemia salina* ($LC_{50}=500 \mu\text{g/ml}$) y una actividad de antibiosis comparable con Ampicilina, frente a *S.taphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp* y *Shigella sp* (los resultados se muestran en la parte experimental de actividad biológica).

De su esterificación con diazometano se obtuvo el compuesto **2A**, también como un aceite amarillento y las constantes espectroscópicas para cada uno permitió identificar a éstos compuestos como el ácido 6-oxo-calfívico y su éster metílico respectivamente (previamente aislados^{44,45}).

De las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 7:3 se aisló el compuesto **3** en forma de cristales blancos, p.f. = 157-159°C, con un peso molecular de 378 para la fórmula $C_{20}H_{34}O_3$. En el espectro de I.R. se exhibe una banda ancha en 3431 - 2820 cm^{-1} para el grupo ácido y una banda afilada en 1708 cm^{-1} que corresponde al carbonilo del grupo ácido carboxílico. Se observa una banda afilada en 1733 cm^{-1} asignada al carbonilo del éster y otra banda afilada en 1249 cm^{-1} característica de los ésteres.

A diferencia del espectro de $^1\text{H NMR}$ para el compuesto **2**, éste muestra una señal en 4.40 ppm (dd), $J=7.3$ y $J=9.1$ Hz asignada a un protón de un éster, en este caso del acetato y se comprueba con la señal simple de 2.05 ppm correspondiente al grupo acetato. Con el análisis de las constantes de acoplamiento calculadas del espectro se deduce que el grupo acetato se encuentra en C-3 en posición axial.

En el espectro de ^{13}C NMR se observan las 20 señales de los átomos de carbono de este compuesto.

Probando la actividad biológica del compuesto 3 se determinó que posee ligera toxicidad para *Artemia salina* ($\text{LC}_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$), poca actividad de antibiosis con *S. aureus* y *M. smegmatis*, pero a diferencia de los demás compuestos, éste resultó tener actividad antiinflamatoria.

Por medio de la esterificación de este compuesto con diazometano disuelto en éter se obtuvo su éster metílico 3A con un p.f. = 155-157°C, de peso molecular 392 y fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_5$. El espectro de ^1H NMR es similar al del compuesto 3 excepto que éste presenta una señal simple en 3.65 ppm característica del éster metílico.

Una mezcla de los compuestos 4, 5 y 6 fué obtenida de las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 1:1. Esta mezcla se cromatografió sobre gel de sílice utilizando como eluyente mezcla de diclorometano-metanol.

El compuesto 4, una flavona, se aisló de las fracciones eluidas con diclorometano en forma de cristales amarillos con p.f. = 193-195°C.

El compuesto 5 se aisló también de las fracciones eluidas con diclorometano como cristales amarillos con un p.f. = 169-172°C, conocido como ayanina, siendo también una flavona.

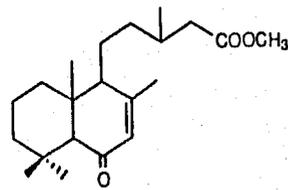
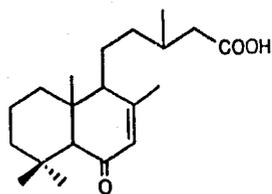
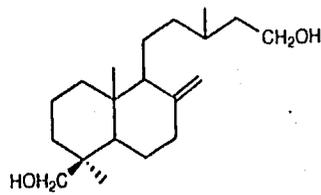
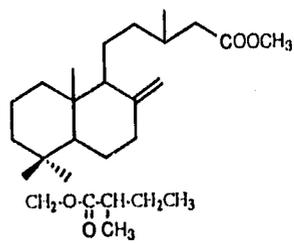
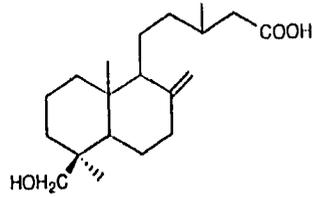
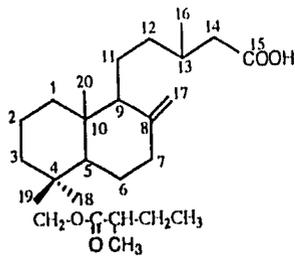
De las fracciones eluidas con diclorometano-metanol 9:1 se obtuvo el compuesto 6 en forma de líquido viscoso, con un peso molecular de 338 y cuya fórmula molecular es $C_{20}H_{34}O_4$. Su espectro de I.R. exhibe una banda ancha en 3462 cm^{-1} característica del grupo hidroxilo. La presencia del grupo ácido carboxílico se muestra por las absorciones I.R. exhibidas en $3072 - 2852\text{ cm}^{-1}$ y 1724 cm^{-1} .

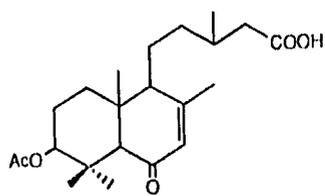
En el espectro de $^1\text{H NMR}$ se observan 3 señales simples en 0.68, 0.84 y 0.95 ppm asignadas a 3 metilos terciarios, dos señales para un metileno exocíclico en 4.65 y 5.08 ppm y una señal doble en 0.97 ppm, $J=6.7\text{ Hz}$ para un metilo secundario, esto indica que se trata de otro esqueleto tipo labdano que a diferencia de los anteriores presenta una señal triple de triples en 3.89 ppm, $J=11.22\text{ Hz}$ asignada al grupo alcohol unido a C-2.

El espectro de $^{13}\text{C NMR}$ confirma la estructura al mostrar las señales correspondientes a los 20 carbonos de este diterpeno también alado anteriormente⁴¹.

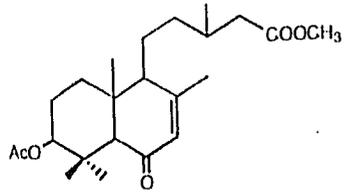
Se comprobó la presencia del grupo ácido cuando se formó el éster metílico con diazometano, compuesto 6A, puesto que en el espectro de $^1\text{H NMR}$ aparece una señal simple en 3.65 ppm para el grupo metoxilo.

ESTRUCTURAS DE COMPUESTOS AISLADOS

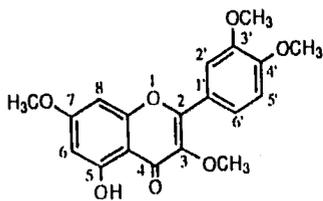




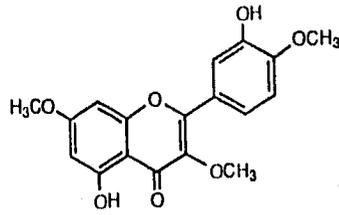
3



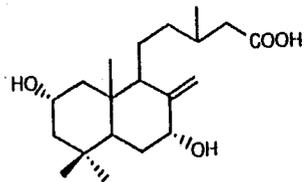
3A



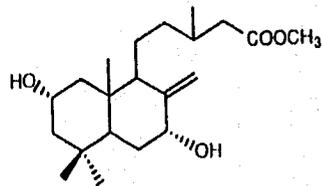
4



5



6



6A

PARTE EXPERIMENTAL

Material y equipo utilizado

Para la cromatografía en columna se utilizaron columnas de:

60 cm de largo X 7.0 cm de diámetro

40 cm " " X 4.5 cm " "

90 cm " " X 2.5 cm " "

20 cm " " X 2.0 cm " "

Las columnas se empacaron con gel de sílice tipo 60 de tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, el extracto y compuestos se preadsorbieron en gel de sílice de tamaño de partícula 0.2-0.5 mm

Para la cromatografía en capa delgada se utilizaron placas preparativas de vidrio con gel de sílice tipo 60 Merck con indicador fluorescente UV254 de 2.0, 1.0, y 0.25 mm de espesor. Para el seguimiento de las fracciones colectadas y de los productos de reacciones se utilizaron cromatofolios de aluminio con gel de sílice 60 con indicador fluorescente UV254 de 0.25 mm de espesor. Como reveladores se utilizaron solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N y lámpara de luz ultravioleta.

Los disolventes requeridos fueron destilados previamente.

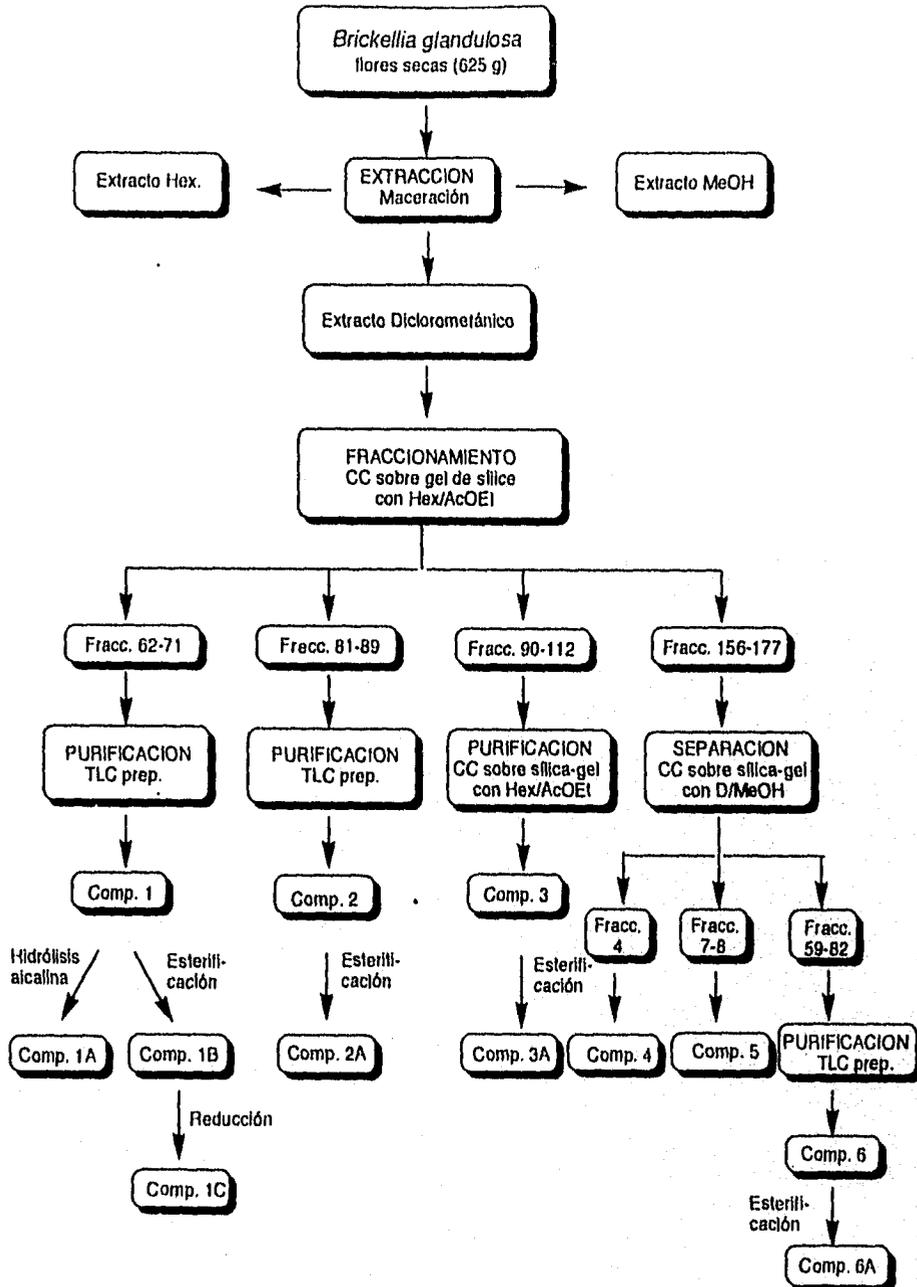
Para determinar los puntos de fusión se utilizó un aparato de Fisher - Johns y no están corregidos.

Los espectros de ^1H NMR y ^{13}C se determinaron en un espectrofotómetro Varian Gemini 200 (200 MHz) y en un Varian Unity 300 (300 MHz), utilizando disolventes deuterados, los desplazamientos químicos (δ) están expresados en ppm tomando como referencia al tetrametilsilicio (TMS) para los espectros de ^1H y cloroformo deuterado (CDCl_3) para los espectros de ^{13}C . La multiplicidad de las señales está indicada como s=simple, d=doble, t=triple, c=cuadruple, dd=doble de doble, m=múltiple y s.a.=señal ancha. Las constantes de acoplamiento se expresan en Hertz.

Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Mod. 283-B y en un Nicolet FTIR Mod. DIP-360.

Los espectros de masas se determinaron en un espectrofotómetro de masas Hewlett Packard Mod. 5985-B, a 70 eV, a una temperatura de 250°C.

ESQUEMA DE TRABAJO



PARTE EXPERIMENTAL

La planta *Brickellia glandulosa* en floración, fué recolectada en Tamazulapan, Oaxaca, en Febrero de 1990.

625g de las flores de ésta planta se extrajeron con 8 litros de diclorometano durante 24 horas, el disolvente se destiló al vacío quedando 14.3g de un residuo de color verde pasto.

Este extracto se cromatografió en una columna empacada con 176g de gel de sílice como soporte. Previamente el extracto se adsorbió en 45g de gel sílice de tamaño de partícula mayor. Se comenzó a eluir con hexano y después se continuó con mezclas de hexano-acetato de etilo, aumentando gradualmente la polaridad. Se aplicó vacío para la colección de las fracciones. Se obtuvieron 187 fracciones de 250 ml cada una. Estas fracciones se monitorearon por cromatografía en capa fina y se reunieron las que presentaban un R.f. similar.

Aislamiento del ácido labda-8(17)-en-18- α -metilbutiriloxi-15-olico (Compuesto 1)

De las fracciones 62-71 eluidas con mezcla de hexano-acetato de etilo 9:1 se obtuvieron 1.95 g de un aceite amarillo. Se tomaron 151.3 mg y se purificaron por cromatografía en placa preparativa de gel de sílice de 20 x 20 cm y 2 mm de espesor, utilizando como eluyente diclorometano-metanol 98:2. Se obtuvieron 57.5 mg de

compuesto puro, dicho compuesto 1 presentó las siguientes constantes espectroscópicas:

I.R. $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (CHCl_3): (Espectro N°1) 3500-2679 (COOH); 1732 (C=O del éster);
1717 (C=O del ácido); 1192 (COOR); 890 (metileno exocíclico).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3), 200 MHz, δ ppm: (Espectro N° 2) 0.65 (3H, s, H-20); 0.93 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-16); 0.96 (3H, s, H-18); 1.10 (3H, d, $J=7$ Hz, H-5'); 4.06 (2H, dd, $J=10.8$ Hz, $J=88.5$ Hz, H-19); 4.46 (1H, s, H-17); 4.78 (1H, s, H-17').

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3), 50 MHz, δ ppm: (Espectro N°3) 11.6 (c, C-5'); 15.2 (c, C-20); 16.6 (c, C-4'); 18.9 (t, C-2); 19.9 (c, C-16); 21.0 (t, C-11); 24.5 (t, C-6); 26.7 (t, C-3'); 27.6 (c, C-18); 30.9 (d, C-13); 35.8 (t, C-3); 36.3 (t, C-1); 37.4 (s, C-4); 38.5 (t, C-7); 38.9 (t, C-14); 39.6 (s, C-10); 41.3 (d, C-2); 41.4 (t, C-12); 56.3 (d, C-5); 57.1 (d, C-9); 66.5 (t, C-19); 106.7 (t, C-17); 147.9 (s, C-8); 176.9 (s, C-1'); 179.5 (s, C-15).

**Aislamiento del ácido 6-oxo catílico (ácido 6-oxolabda-7-en-15-olico
Compuesto 2)**

Se reunieron las fracciones 81-89 eluidas con hexano-acetato de etilo 8:2 y se pasaron a través de una columna de celita-carbón activado 1:1 eluyendo con metanol caliente para eliminar clorofilas, se obtuvieron 395.7 mg de un compuesto aceitoso. Se purificó por cromatografía en capa fina usando dos placas preparativas de 20 x 20

cm y 2 mm de espesor y como eluyente benceno-acetato de etilo 9:1, después de eluir 2 veces cada placa se obtuvieron 322.3 mg del compuesto .2. que presentó las siguientes características espectroscópicas:

I.R. ν máx cm^{-1} (CHCl_3): (Espectro N° 4) 3436-2850 (COOH); 1709 (C=O de la cetona); 1668 (C=O del ácido); 1633 (C=C).

^1H NMR (CDCl_3), 200 MHz, δ ppm: (Espectro N° 5) 0.80 (3H, s, H-20); 0.99 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-16); 1.1(3H, s, H-19); 1.12 (3H, s, H-18); 1.87 (3H, s, H-17); 2.01 (1H,s, H-5); 2.26 (1H, cc, $J=6.6$, H-14); 5.73 (1H,s,H-7).

^{13}C NMR (CDCl_3), 50 MHz, δ ppm: (Espectro N° 6) 14.7 (c, C-20); 18.2 (t, C-2); 19.6 (c, C-16); 21.5 (c, C-17); 22 (c, C-19); 24.5 (t, C-11); 30.7 (d, C-13); 32.3 (s, C-4); 33.4 (c, C-18); 38.7 (t, C-12); 39.1 (t, C-1); 39.2 (s, C-10); 41.5 (t, C-14); 43.1 (t, C-3); 56.5 (d, C-5); 63.6 (d, C-9); 128.5 (d, C-7); 158.7 (s, C-8); 178.6 (C-15); 200.4 (s, C-6).

Aislamiento del ácido 3-acetoxi-labda-7-en-15-oico (Compuesto 3)

A las fracciones 90-112 eluidas con hexano- acetato de etilo 7:3 se les eliminaron las clorofilas pasándalas por una columna de celita-carbón activado 1:1 y eluyendo con metanol caliente. Se obtuvieron 3.7523g de cristales amarillos, siendo el compuesto más abundante, los cuales se purificaron por columna con 65g de gel de sílice fina y se eluyó con mezcla de hexano-acetato de etilo 9:1, aplicando vacío. Se obtuvieron 3.2138g del compuesto .3., de los cuales 115.2 mg se lavaron con éter

etélico quedando en forma de cristales blancos con un p.f. = 157 - 159°C, que exhibieron las siguientes constantes espectroscópicas:

I.R. ν máx cm^{-1} (CHCl_3): (Espectro N° 7) 3431-2820 (COOH); 1733 (C=O del éster); 1708 (C=O del ácido); 1249 (COOR).

^1HMR (CDCl_3), 200 MHz, δ ppm: (Espectro N° 8) 0.86 (3H, s, H-20); 1.0 (3H, d, J=6.6 Hz, H-16); 1.12 (3H, s, H-19); 1.19 (3H, s, H-18); 1.89 (3H, s, H-17); 2.05 (3H, s, OAc); 2.12 (1H, s, H-5); 4.4 (1H, dd, J=7.3 Hz, J=9.1 Hz, H-3); 5.75 (1H, s. a., H-7).

$^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3), 50 MHz, δ ppm: (Espectro N° 9) 14.8 (c, C-20); 15.9 (c, C-19); 19.7 (c, C-16); 21.2 (c, C-2'); 21.8 (c, C-17); 23.1 (t, C-2); 24.5 (t, C-11); 28.1 (c, C-18); 30.8 (d, C-13); 36.4 (t, C-1); 36.6 (s, C-4); 39.1 (t, C-12); 41.0 (t, C-14); 42.9 (s, C-10); 56.5 (d, C-5); 62.8 (d, C-9); 80.5 (d, C-3); 128.6 (d, C-7); 158.9 (s, C-8); 171.0 (s, C-1'); 178.5 (s, C-15); 198.6 (s, C-6).

Una mezcla de las fracciones 156-177 (2.6476g) eluidas con hexano-acetato de etilo 1:1 se cromatografió en una columna empacada con 30.04g de gel de sílice gruesa, la muestra se preadsorbió en 6g de la misma sílice utilizando como eluyente diclorometano al inicio y se fué aumentando gradualmente la polaridad eluyendo con mezcla de diclorometano-metanol. Se colectaron por gravedad 98 fracciones de 25 ml cada una, que se monitorearon con cromatofolios y se reunieron de acuerdo a su R.f.

Aislamiento de la 3,7,3',4'-tetrametoxi-5-hidroxi-flavona (Compuesto 4)

En la fracción 4 eluida con diclorometano se obtuvieron 19.2 mg de cristales amarillos puros con un p.f.= 193-195°C siendo el compuesto 4, una flavona que presentó los siguiente datos espectroscópicos:

EMIE 70 eV m/z (int. rel): (Espectro N° 10)

- 360 [M + 2]⁺ (3)
- 359 [M + 1]⁺ (22)
- 358 [M]⁺ (C₁₉H₁₈O₇) (100),
- 357 [M - H]⁺ (55)
- 343 [M - CH₃]⁺ (C₁₈H₁₅O₇) (44)
- 315 [M - CH₃ - CO]⁺ (C₁₇H₁₅O₆) (37)

¹HNMR (CDCl₃, DMSO), 200 MHz, δ ppm: (Espectro N° 11) 3.84 (3H, s, O-CH₃); 3.86 (3H, s, O-CH₃); 3.95 (6H, s, O-CH₃); 6.33 (1H, d, J=2.2 Hz, H-6); 6.42 (1H, d, J=2.2 Hz, H-8); 6.97 (1H, d, J=8.5, H-5'); 7.66 (1H, d, J=2.0 Hz, H₂'); 7.72 (1H, dd, J=2.0, J=8.5 Hz, H-6'); 12.62 (1H, s, C₅-OH).

Aislamiento de la 5,3'-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona (Compuesto 5)

En las fracciones 7 y 8 eluidas también con diclorometano, cristalizó el compuesto 5. (24.3 mg), un sólido amarillo de p.f.= 169-172°C, que presentó un R.f.

menor que el compuesto anterior, siendo entonces más polar y el cual se identificó como la flavona ayanina por presentar la siguiente espectroscopía:

¹HNMR (CDCl₃, DMSO), 200 MHz, δ ppm: (Espectro N° 12) 3.85 (6H, s, O-CH₃); 3.97 (3H, s, O-CH₃); 5.69 (1H, s, C₃-OH); 6.33 (1H, d, J=2.2 Hz, H-6), 6.42 (1H, d, J=2.2 Hz, H-8); 6.95 (1H, d, J=8.2 Hz, H-5'); 7.67 (1H, d, J= 1.8 Hz, H-2'); 7.7(1H, dd, J=2.2, J=8.9 Hz, H-6'); 12.6 (1H, s, C₅-OH);

Aislamiento del ácido 2-hidroxi-labda-7-en-15-olico (Compuesto 6)

Las fracciones 59-82 eluidas con diclorometano-metanol 9:1 se reunieron (133.2 mg) y se purificó en una placa preparativa de 20 x 20 cm de 2 mm de espesor, obteniéndose 97 mg de un compuesto líquido viscoso, ligeramente amarillo, dicho compuesto 6. mostró las siguientes constantes espectroscópicas.

I.R. ν máx cm⁻¹ (CHCl₃): (Espectro N° 13) 3462 (OH); 3072-2852 (COOH); 1724 (C=O del ácido); 1651 (C=C).

¹HNMR (CDCl₃), 200 MHz, δ ppm: (Espectro N° 14) 0.68 (3H, s, H-20); 0.84 (3H, s, H-19); 0.95 (3H, s, H-18); 0.97 (3H, d, J=6.7 Hz, H-16); 2.20 (1H, s. a., H-5); 3.89 (1H, tt, J=11.22 Hz, H-2); 4.04 (1H, s. a., H-7); 4.65 (1H, s. a., H-17); 5.08 (1H, s. a., H-17').

¹³CNMR (CDCl₃), 50 MHz, δ ppm: (Espectro N° 15) 14.4 (c, C-20); 19.9 (c, C-16); 20.5 (t, C-6); 22.4 (c, C-19); 29.7 (t, C-11); 30.4 (d, C-13); 33.3 (c, C-18); 34.6 (t, C-1); 34.7 (s, C-4); 41.1 (s, C-10); 41.8 (t, C-3); 47.1 (d, C-7); 47.8 (t, C-14); 50.4 (d, C-5); 51.0 (t, C-12); 65.8 (d, C-9); 73.9 (d, C-2); 110.6 (t, C-17); 148.7 (s, C-8); 177.5 (s, C-15).

EMIE 70 eV m/z (int. rel.): (Espectro N° 16)

338 [M]⁺ (C₂₀H₃₄O₄) (5)
320 [M - H₂O]⁺ (C₂₀H₃₂O₃) (41)
302 [M - 2H₂O]⁺ (C₂₀H₃₀O₂) (45)
287 [M - H₂O - CH₃]⁺ (C₁₉H₂₇O₂) (32)
261 (35), 137 (56), 121 (100), 95 (52),
81 (46), 69 (45), 55 (54), 41 (52).

**Obtención del ácido labda-8(17)-en-18-hidroxi-15-oico (Compuesto 1A)
por hidrólisis alcalina**

224.9 mg del compuesto 1 se disolvieron en 20 ml de metanol, se le adicionaron 5 ml de una solución acuosa metanólica de hidróxido de sodio 10%. Se dejó en reflujo durante 24 horas, siguiendo la reacción por cromatografía en capa fina. Una vez finalizada la reacción se diluyó con 100 ml de agua destilada, se aciduló ligeramente con HCl diluido y se extrajo 3 veces con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con agua y se secó con sulfato de sodio anhidro. El residuo obtenido después de la evaporación del disolvente se recristalizó con éter etílico obteniéndose

135.3 mg del compuesto 1A en forma de cristales incoloros de p.f.=129-131°C y con los siguientes datos espectroscópicos:

¹HNMR (CDCl₃), 200 MHz, δ ppm: (Espectro N° 17) 0.61 (3H, s, H-20); 0.93 (3H, d, J=5.7 Hz, H-16); 0.96 (3H, s, H-18); 3.55 (3H, dd, J=10.8 Hz, H-19); 4.45 (1H, s, H-17); 4.77 (1H, s, H-17').

¹³CNMR (CDCl₃), 50 MHz, δ ppm: (Espectro N° 18) 15.3 (c, C-20); 19.0 (t, C-2); 19.9 (c, C-16); 21.0 (t, C-11); 24.4 (t, C-6); 27.1 (c, C-19); 30.9 (d, C-13); 35.4 (t, C-3); 35.8 (t, C-1); 38.6 (t, C-7); 38.8 (t, C-14); 39 (s, C-4); 39.6 (s, C-10); 41.3 (t, C-12); 56.3 (d, C-5); 57.2 (d, C-9); 65 (t, C-18); 106.6 (t, C-17); 148.1 (s, C-8); 179 (s, C-15).

Obtención del éster metílico del ácido labda-8(17)-en-18- α -metilbutiriloxi-15-oico (Compuesto 1B) por esterificación con diazometano

Se colocaron 100 ml de éter etílico en un matraz erlenmeyer, se agregaron 1.45 ml de KOH 40% y 0.4835g de nitrosometilurea. La fase etérea (diazometano) se agregó a 1.036 g del compuesto 1 disuelto en éter. Se dejó reaccionar durante 3 horas monitoreando la reacción por cromatografía en capa fina con cromatofolios de aluminio. Una vez terminada la reacción se evaporó el éter y el residuo disuelto en acetato de etilo se lavó con 3 ml de solución saturada de cloruro de sodio; se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente, quedando 510.6 mg de un aceite, el cual se purificó por cromatografía en columna empacada con 20.31g de gel

de sílice 70/230 y eluyendo con mezcla de hexano-diclorometano aumentando gradualmente la polaridad. Se colectaron por gravedad fracciones de 25 ml. De las fracciones 33-48 eluidas con hexano-diclorometano 7:3 se obtuvieron 483.2 mg del compuesto 1B que presentó las siguientes características de espectroscopía:

¹H NMR (CDCl₃), 200 MHz, δ ppm: (Espectro N° 19) 0.68 (3H, s, H-20); 0.91 (3H, d, J=6.6 Hz, H-16); 0.97 (3H, s, H-18); 1.13 (3H, d, J=7 Hz, H-5'); 3.66 (3H, s, O-CH₃); 4.04 (2H, dd, J=10.9 Hz, H-19); 4.49 (1H, s, H-17); 4.81 (1H, s, H-17').

¹³C NMR (CDCl₃), 50 MHz, δ ppm: (Espectro N° 20) 11.6 (c, C-5'); 15.2 (c, C-20); 16.6 (c, C-4'); 18.9 (t, C-2); 19.6 (c, C-16); 20.9 (t, C-11); 24.5 (t, C-6); 26.8 (t, C-3'); 27.6 (c, C-18); 30.9 (d, C-13); 35.7 (t, C-12); 35.8 (t, C-3); 36.3 (t, C-1); 37.5 (s, C-4); 38.5 (t, C-7); 38.9 (t, C-14); 39.6 (s, C-10); 41.3 (d, C-2'); 51.3 (c, O-CH₃); 56.3 (d, C-5); 57.2 (d, C-9); 66.5 (t, C-19); 106.7 (t, C-17); 148.0 (s, C-8); 173.7 (s, C-15); 176.8 (s, C-1').

Obtención del (13s)-labda-8(17)-en-15,19-diol (Compuesto 1C) por reducción con hidruro doble de litio y aluminio

Se disolvieron 310.6 mg del diéster 1B en 30 ml de éter etílico anhidro en un matraz de dos bocas con una trampa de CaCl₂, se adicionaron 219.4 mg de hidruro doble de litio y aluminio, en pequeñas cantidades y con agitación continua. Se dejó

reaccionar durante 18 horas, siguiendo la reacción por cromatografía en capa fina. Una vez terminada la reacción se aciduló con HCl diluído a pH=6-6.5, se filtró y se extrajo con acetato de etilo 3 veces. La fase orgánica se lavó con agua y se secó con sulfato de sodio anhidro. Al evaporar el disolvente se obtuvieron 163.8 mg de cristales con p.f.=110-112°C siendo identificado como el compuesto 1C (imbricatadiol) por sus constantes espectroscópicas descritas a continuación:

$[\alpha]_D^{25} = +27.75^\circ$ (c, 1.0, CHCl₃)

¹HNMR (CDCl₃), 200 MHz, δ ppm: (Espectro N° 21) 0.62 (3H, s, H-20); 0.87 (3H, d, J=6.28 Hz, H-16); 0.94 (3H, s, H-18); 3.35 (1H, d, J=11.7 Hz, H-19); 3.72 (1H, d, J=10.8 Hz, H-19); 3.6 (2H, t, J=6.9 Hz, H-15); 4.46 (1H, s, H-17); 4.77 (1H, s, H-17).

¹³CNMR (CDCl₃), 50 MHz, δ ppm: (Espectro N° 22) 15.3 (c, C-20); 19.0 (t, C-2); 19.9 (c, C-16); 21.0 (t, C-11); 24.5 (t, C-6); 27.1 (c, C-19); 30.3 (d, C-13); 35.4 (t, C-3); 36.3 (t, C-1); 38.7 (t, C-7); 38.9 (t, C-14); 39.0 (s, C-4); 39.7 (s, C-10); 40.2 (t, C-12); 56.4 (d, C-5); 57.5 (s, C-9); 61.2 (t, C-15); 65.0 (t, C-18); 106.5 (t, C-17); 148.4 (s, C-8).

Obtención del éster metílico del ácido 6-oxo catívico (Compuesto 2A) por esterificación con diazometano

Se disolvieron 26.6 mg del compuesto 2 en 20 ml de éter etílico, se dejó reaccionar durante 3 horas con diazometano en solución etérea (preparado a partir

de 30 mg de nitrosometilurea). Una vez finalizada la reacción se evaporó el disolvente por destilación. Se purificó en placa preparativa de 10 x 20 cm y 0.25 mm de espesor, eluyéndose con mezcla de hexano-diclorometano 9:1. Se obtuvieron 15.1 mg del compuesto 2A, el cual exhibió las siguientes constantes espectroscópicas:

¹HNMR (CDCl₃), 200 MHz, δ ppm: 0.82 (3H, s, H-20); 0.98 (3H, d, J=6.6 Hz, H-16);
1.01 (3H, s, H-19); 1.12 (3H, s, H-18); 1.67 (3H, s, H-17); 2.05 (1H,
s, H-5); 3.65 (3H, s, O-CH₃); 5.64 (1H, s, H-7).

Obtención de éster metílico del ácido 3-acetoxi-labda-7-en-15-olco
(Compuesto 3A) por esterificación con diazometano

101.1 mg del compuesto 3 se disolvieron en 20 ml de éter etílico, se agregó diazometano (preparado a partir de 150 mg de nitrosometilurea). Se dejó reaccionar durante 3 horas. Cuando finalizó la reacción se evaporó el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purificó en una cromatoplaque preparativa de 20 x 20 cm y 1.0 mm de espesor y se eluyó con mezcla de diclorometano-metanol 98:2. Se obtuvieron 83.2 mg del compuesto 3A cuyos datos espectroscópicos son:

¹HNMR (CDCl₃), 200 MHz, δ ppm: (Espectro N° 23) 0.85 (3H, s, H-20); 0.96 (3H, d,
J=6.0 Hz, H-16); 1.12 (3H, s, H-19); 1.19 (3H, s, H-18); 1.9 (3H, s,
H-17); 2.04 (3H, s, OAc); 2.12 (3H, s, H-5); 3.65 (3H, s, O-CH₃);
4.41 (1H, t, J= 7.7 Hz, H-3); 5.75 (1H, s. a., H-7).

¹³CNMR (CDCl₃), 50 MHz, δ ppm: (Espectro N° 24) 14.9 (c, C-20); 16.0 (c, C-19); 19.9
(c, C-16); 21.2 (c, C-2'); 21.8 (c, C-17); 23.3 (t, C-2); 24.6 (t, C-11);

28.2 (c, C-18); 31.1 (d, C-13); 36.6 (t, C-1); 36.7 (s, C-4); 39.2 (t, C-12); 41.2 (t, C-14); 43.0 (s, C-10); 51.4 (c, O-CH₃); 56.7 (d, C-5); 63.0 (d, C-9); 80.6 (d, C-3); 128.8 (d, C-7); 158.7 (s, C-8); 170.9 (s, C-1'); 173.3 (s, C-15); 198.4 (s, C-6).

Obtención del éster metílico del ácido 2-hidroxi-labda-7-en-15-olico (Compuesto 6A) por esterificación con diazometano

Del compuesto 6 se tomaron 20.6 mg que se disolvieron en 20 ml de éter etílico, se adicionó diazometano en solución etérea que se había preparado a partir de 30 mg de nitrosometilurea. Se dejó reaccionar durante 3 horas y al finalizar se eliminó el disolvente por destilación. El compuesto obtenido se purificó por cromatografía en capa fina, utilizando una placa preparativa de 10 x 20 cm y 0.25 mm de espesor que se eluyó con mezcla de diclorometano-metanol 9:1. El compuesto purificado fue el 6A y se obtuvieron 18.6 mg.

¹HNMR (CDCl₃). 200 MHz, δ ppm: 0.71 (3H, s, H-20); 0.90 (3H, s, H-19); 0.92 (3H, s, H-18); 0.96 (3H, d, J=6.5 Hz, H-16); 1.63 (3H, s. a., H-17); 3.65 (3H, s, O-CH₃); 3.86 (1H, t, J=11.0 Hz, H-2); 5.1 (1H, s. a. H-7).

PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

ENSAYO DE TOXICIDAD FRENTE A *Artemia salina* LEACH

Se impregnan discos de papel filtro con el compuesto en concentraciones de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ en, los discos control sólo se impregnaron con disolvente. Se dejaron secar a temperatura ambiente. Se utiliza el crustáceo *Artemia salina* Leach^{46,47} en fase larvaria, con 48 horas de incubación en salmuera. La salmuera se preparó con Instant Ocean marca Acualic Systems que contiene todos los componentes del agua de oceano natural. Se colocan 10 crustáceos en un frasco vial, el cual contiene el disco con el compuesto a evaluar y 5 ml de salmuera. La prueba se hace por triplicado. Los viales se mantienen con iluminación artificial durante 24 horas y a temperatura ambiente, como alimento se agregó una gota de suspensión de levadura a cada vial. Transcurrido el tiempo, se cuenta el número de sobrevivientes para determinar el porcentaje de mortalidad ó la DL₅₀. Los resultados se muestran en la tabla N^o 1.

COMPUESTO	CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)	DL ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
1	100	3.2
2	100	500
3	100	>100
4	100	NEGATIVO
5	100	NEGATIVO

TABLA N^o 1

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

La propiedad antiinflamatoria se determinó por la técnica de Winter⁴⁸, usando 4 ratas (200 - 300 g de peso) por compuesto. Se trabajó un grupo control y un grupo tratado con el compuesto a evaluar.

Al grupo control se le administró solamente el vehículo (DMSO 1% + metilcelulosa 0.5%). La dosis de la muestra fué de 200 mg/kg.

Se indujo inflamación (edema) a ambos grupos por inyección subcutánea de 0.1 ml de carragenina en la pata de la rata. La carragenina se administra 60 min. después de haber administrado por vía oral tanto el vehículo como el compuesto en estudio. Se observó durante 5 horas y se comparó el edema de las ratas tratadas con los compuestos con respecto al grupo control.

La determinación del volumen del edema se realizó utilizando un pletismómetro, éste aparato está compuesto por una celda llena de agua en la cual se sumerge la pata inflamada del animal y se mide la diferencia en el nivel del agua causada por desplazamiento de volumen. Los resultados se exhiben en la tabla N° 2. En la tabla N° 3 y en la gráfica N° 1 se muestran los resultados del compuesto 3, el cual fué el único que presentó actividad antiinflamatoria.

COMPUESTO	DOSIS (vía oral) mg/kg	%ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA
1	200	0
2	200	0
3	200	74.32
Control	-----	0

TABLA N° 2

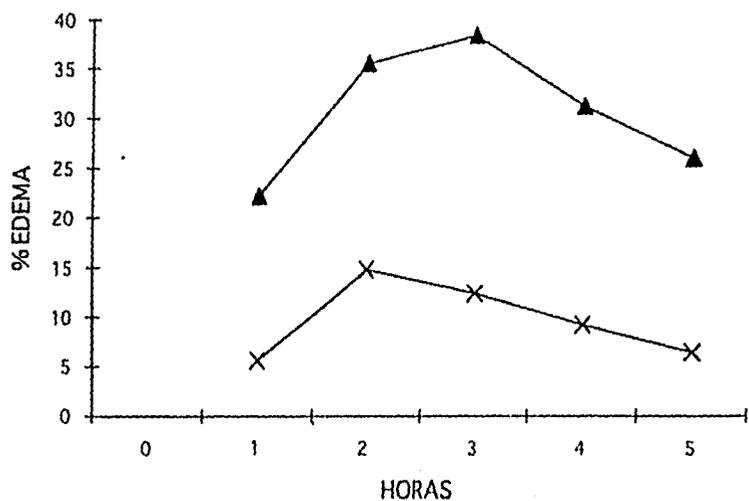
GRUPO CONTROL:

TIEMPO (hrs.)	1	2	3	4	5
VOLUMEN PROMEDIO DE EDEMA (ml)	22.2	35.7	38.5	31.2	26.0
DESVIACION ESTANDAR	0.25	0.8	0.7	0.6	0.9

GRUPO TRATADO CON EL COMPUESTO 3

VOLUMEN PROMEDIO DE EDEMA (ml)	5.7	14.8	12.5	9.25	6.5
DESVIACION ESTANDAR	0.22	0.49	0.48	0.42	0.27

TABLA N° 3



- Δ Grupo control
- X Grupo tratado con comp. 3

GRAFICA Nº 1
CURSO TEMPORAL DEL EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Se realizó el método de difusión en agar empleando discos de papel filtro impregnados con el compuesto a estudiar⁴⁹. Los discos de 7 mm de diámetro se impregnaron con el compuesto previamente disuelto en DMSO. Se dejaron secar, se colocaron en el medio de cultivo ya inoculado con el microorganismo y se incubó durante 24 horas a 37°C.

Se utilizó medio N° 1 para antibióticos (marca Bioxon) para *S. aureus* y *E. coli*; y agar Mycobacteria (Bioxon) para *M. smegmatis*. Se estudiaron 5 compuestos, los resultados se muestran en la tabla N° 4.

MICROORGANISMO	COMP. 1 (1 mg/disco)	COMP. 2	COMP. 3 (5 mg/disco)	COMP. 4 (1 mg/disco)	COMP 5 (1 mg/disco)
<i>S. aureus</i>	8 mm	15 mm (0.5mg/disco) 11 mm (0.1mg/disco)	11 mm	NEGATIVO	NEGATIVO
<i>E. coli</i>	NEGATIVO	NO SE PROBO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
<i>M. smegmatis</i>	8 mm	15 mm (500µg/disco) 13 mm (134µg/disco)	11 mm	NEGATIVO	NEGATIVO

TABLA N° 4 DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICION

Debido a que el compuesto 2 presentó una notable actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y *M. smegmatis*, se probó con otros microorganismos utilizando diferentes concentraciones del compuesto. En la tabla N° 5 se indican los microorganismos de prueba.

MICROORGA-NISMO	Medio de aclivación	Medio de siembra	Medio de conservación	Condiciones de incubación
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Caldo TSA	TSA	TSA	37°C, 24 hrs.
<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	Caldo nutritivo	Agar nutritivo	TSA	30°C, 24 hrs.
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Caldo nutritivo	Agar nutritivo	TSA	37°C, 24 hrs.
<i>E. coli</i> ATCC 10536	Caldo nutritivo	Agar nutritivo	TSA	37°C, 24 hrs.
<i>Salmonella sp.</i>	Caldo nutritivo	Agar nutritivo	TSA	37°C, 24 hrs.
<i>Shigella sp.</i>	Caldo nutritivo	Agar nutritivo	TSA	37°C, 24 hrs.

Según recomendación de ATCC (American Type Culture Collection)
TSA Agar Tripticase Soya.

TABLA N° 5

Se emplearon cajas de petri con dos capas de medio de cultivo, una capa base (medio N° 2 para antibióticos marca Difco) y otra que contenía el microorganismo de ensayo (medio N° 1 para antibióticos, marca Difco), sobre ésta se colocaron en forma equidistante discos de papel filtro de 19 mm de diámetro impregnados con 100 µl de diferentes concentraciones del diterpeno en estudio y discos impregnados con antibióticos de referencia, se incubó a 37°C durante 24 horas y se midieron los halos de inhibición comparando los halos obtenidos por la acción del compuesto 2 con los del antibiótico de referencia. El ensayo se realizó por triplicado. Los resultados promedio se muestran en la tabla N° 6.

Microorganismo	20 µg/disco	40 µg/disco	80 µg/disco	160 µg/disco	Diámetro Referencia	Referencia utilizada
<i>S. aureus</i>	23.69 mm	26.37 mm	28.03 mm	29.2 mm	28.0 mm	Ampicilina 1µg/disco
<i>Ps. aeruginosa</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	24.21 mm	Ampicilina 1µg/disco
<i>B. subtilis</i>	Negativo	Negativo	Negativo	21.0 mm	28.21 mm	Estrepto- micina 10µ/disco

TABLA N° 6 DIAMETROS DE HALOS DE INHIBICIÓN DESARROLLADOS POR EFECTO DEL COMPUESTO 2

Con la finalidad de determinar el efecto de antibiosis y el MIC del compuesto 2 frente a las enterobacterias *E. coli*, *Salmonella sp* y *Shigella sp* se realizó el método de dilución tomando como referencia el cloranfenicol. Se utilizó un inóculo de 5×10^5 células/ml. Se trabajaron las siguientes concentraciones: 50, 100, 150 y 200 µg/ml. Se realizó un blanco para cada concentración preparado de la misma manera que los demás tubos pero sin el inóculo y un tubo cero que contenía únicamente el inóculo. Después del período de incubación se observó visual e instrumentalmente la turbidez y se obtuvo como resultado que en todos los tubos había desarrollo microbiano con lo cual se deduce que el compuesto no posee actividad antibiótica frente a estas enterobacterias a dichas concentraciones.

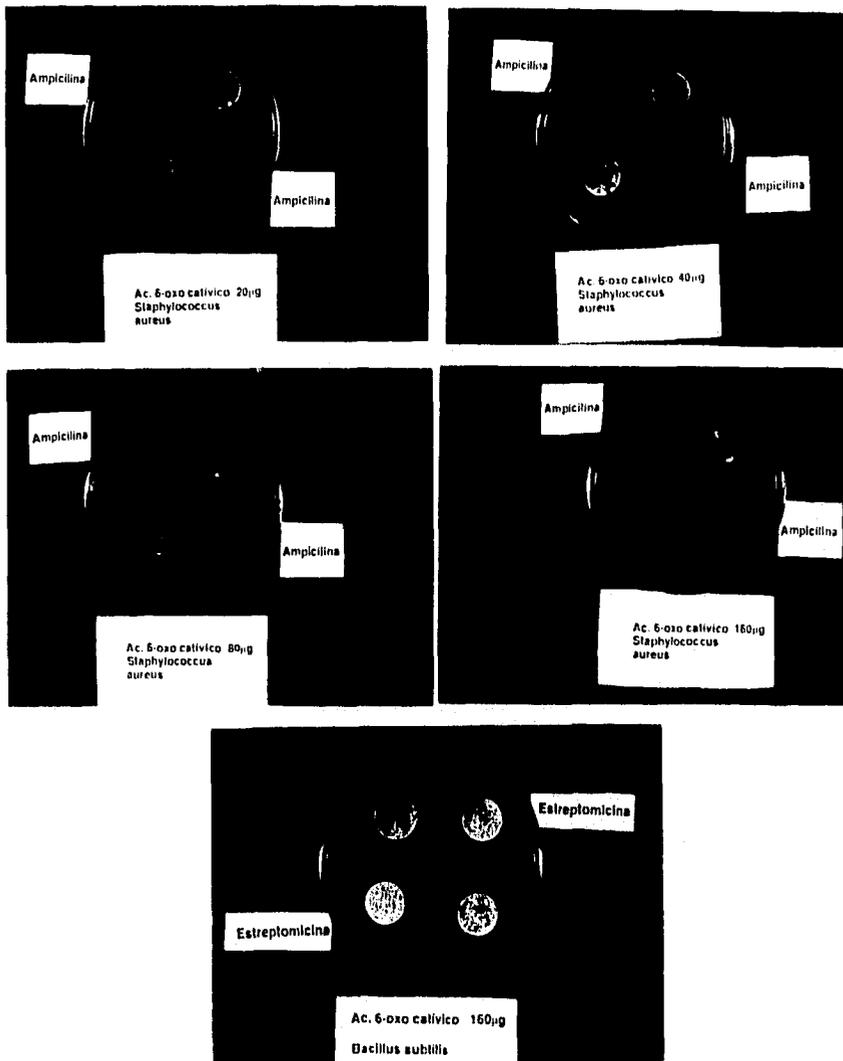


FIG. No. 4
 HALOS DE INHIBICION DESARROLLADOS POR EFECTO DEL
 ACIDO 6-OXO-CATIVICO (COMP. 2) EN LA PRUEBA DE DIFUSION EN AGAR

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1) En el presente trabajo se describió el estudio fitoquímico de la planta mexicana *Brickellia glandulosa* recolectada en el estado de Oaxaca.

2) Se aislaron e identificaron 4 diterpenos (compuestos 1, 2, 3 y 6) y 2 flavonas (compuestos 4 y 5). Por medio de reacciones químicas se obtuvieron los compuestos 1A, 1B, 1C, 2A, 3A y 6A.

3) De éstos compuestos ya aislados anteriormente se obtuvieron sus datos actualizados de ^1H NMR a 200 MHz. Además se hicieron las asignaciones de los Carbonos de éstos diterpenos por medio de los espectros de ^{13}C NMR, lo cual no se ha reportado en la literatura.

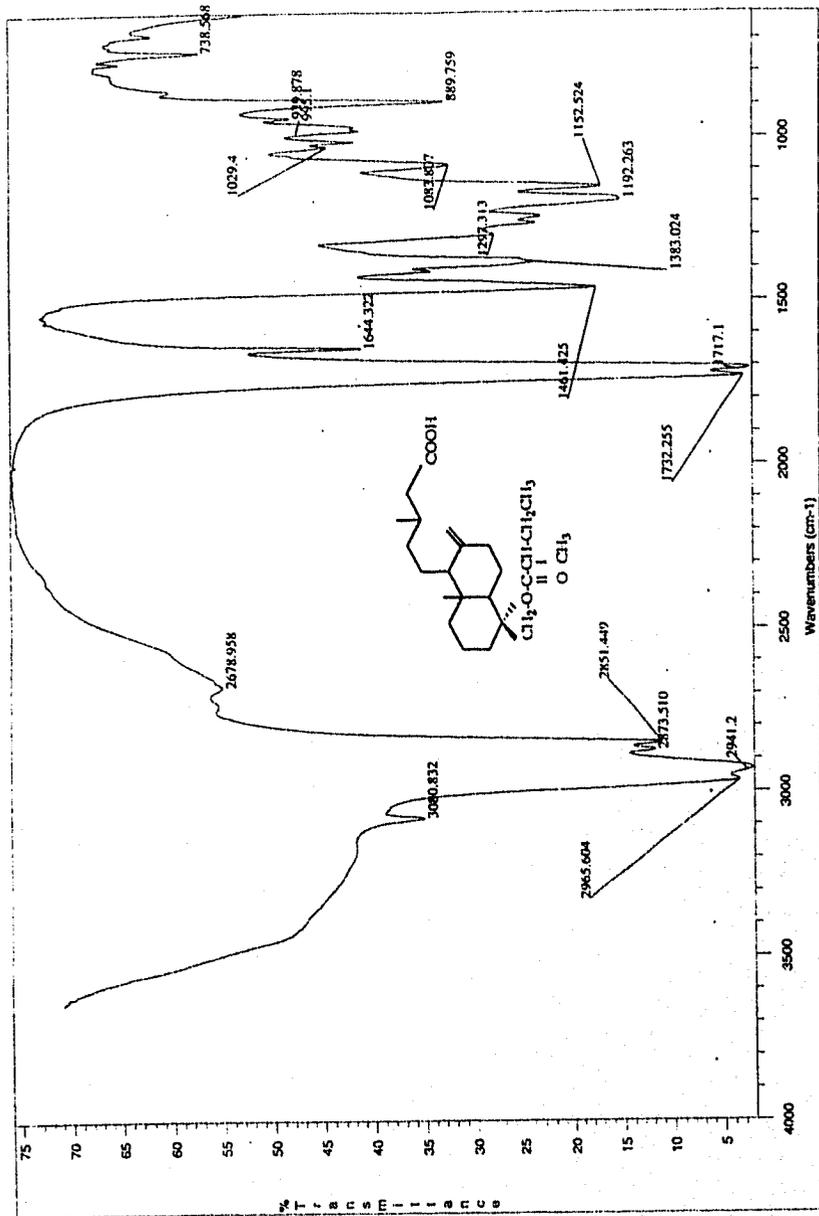
4) Con las pruebas de actividad biológica se determinó que el diterpeno 2 posee un efecto antibiótico muy potente, lo cual lo hace un buen candidato como posible fármaco contra algunas infecciones microbianas.

5) El diterpeno 3 presentó una actividad antibiótica moderada, pero demostró tener un efecto antiinflamatorio de un 75.32% que lo hace un buen candidato para estudiarse más a fondo como un fármaco antiinflamatorio.

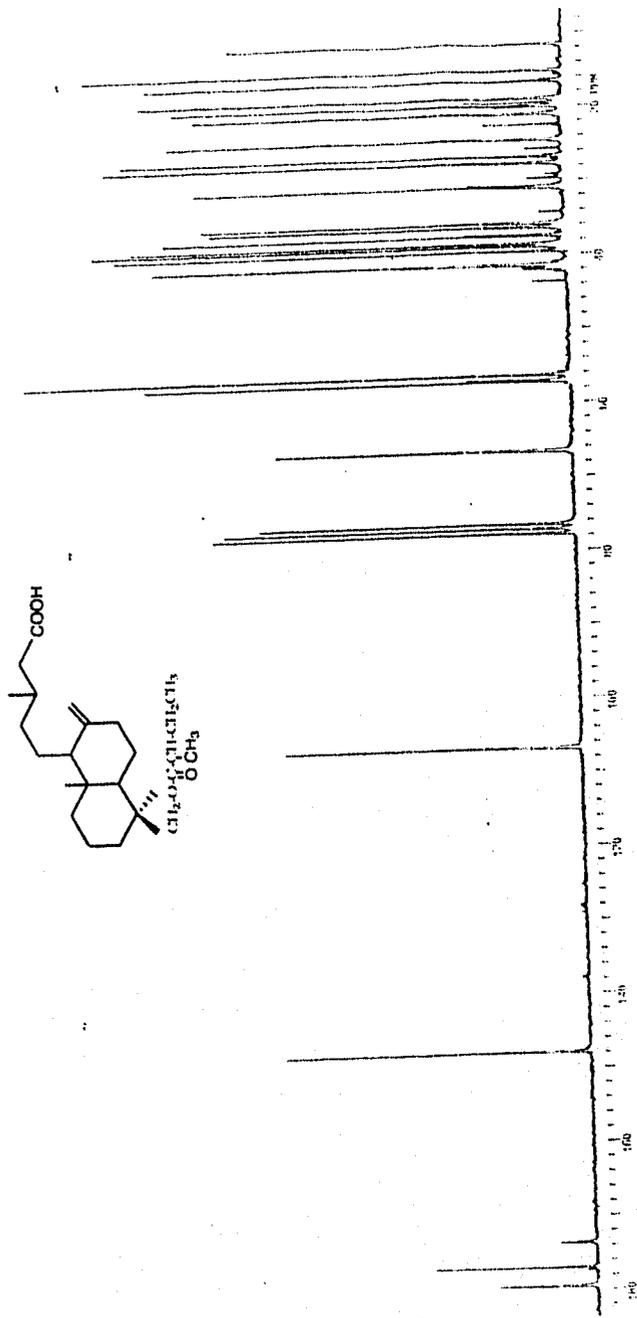
**LISTA DE ABREVIATURAS EMPLEADAS
EN EL PRESENTE TRABAJO**

Hex	Hexano
AcOEt	Acetato de etilo
D	Diclorometano
MeOH	Metanol
CC	Cromatografía en columna
TLC prep.	Cromatografía en capa fina preparativa
UV	Ultravioleta
p.f.	Punto de fusión
IR	Infrarrojo
$\nu_{\text{máx}}$	Frecuencia de onda máxima
$^1\text{H NMR}$	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
$^{13}\text{C NMR}$	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
J	Constante de acoplamiento
Hz	Hertz
δ	Desplazamiento químico
ppm	Partes por millón
CDCl_3	Cloroformo deuterado
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
EMIE	Espectrofotometría de Masas de Impacto Electrónico
eV	Electrón volt
m/z	Masa-carga
M^+	Ión molecular
\uparrow	
$[\alpha]_D$	Rotación óptica
LC ₅₀	Concentración Letal Media
DL ₅₀	Dosis Letal Media
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria

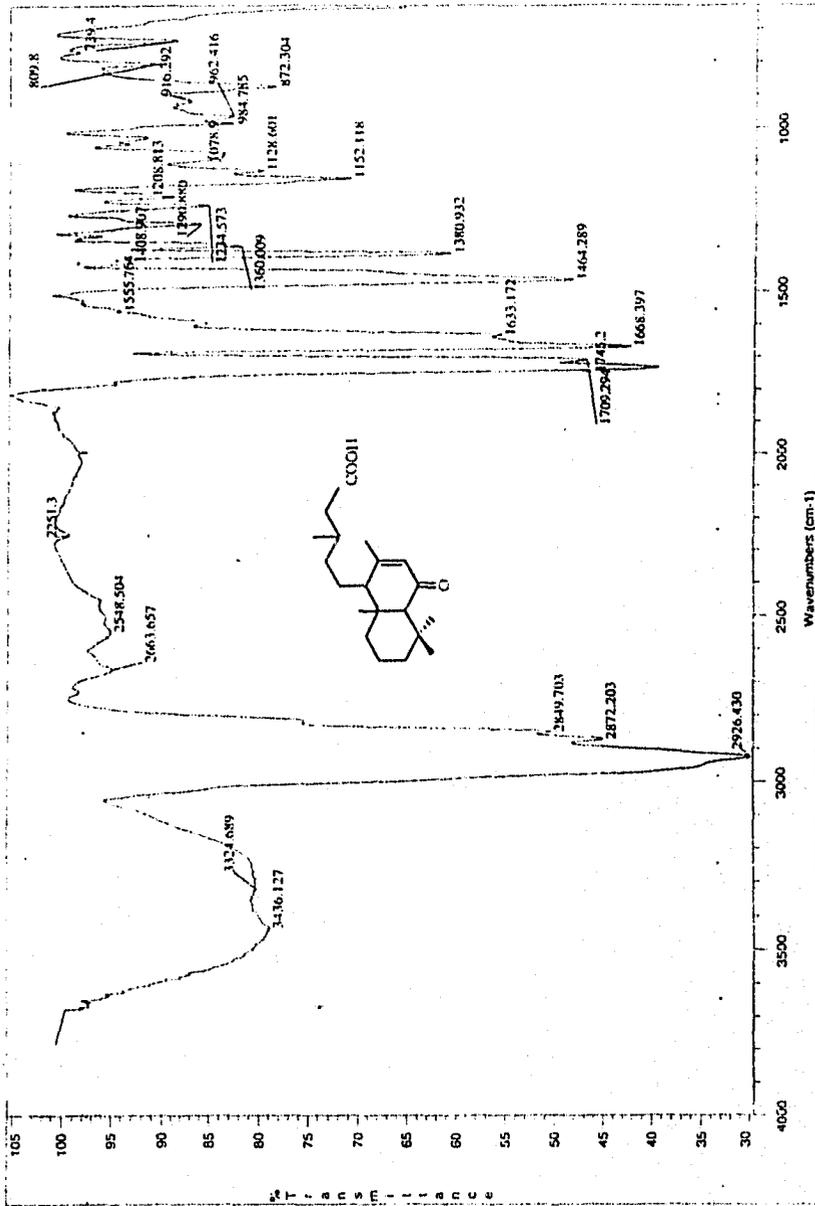
ESPECTROS



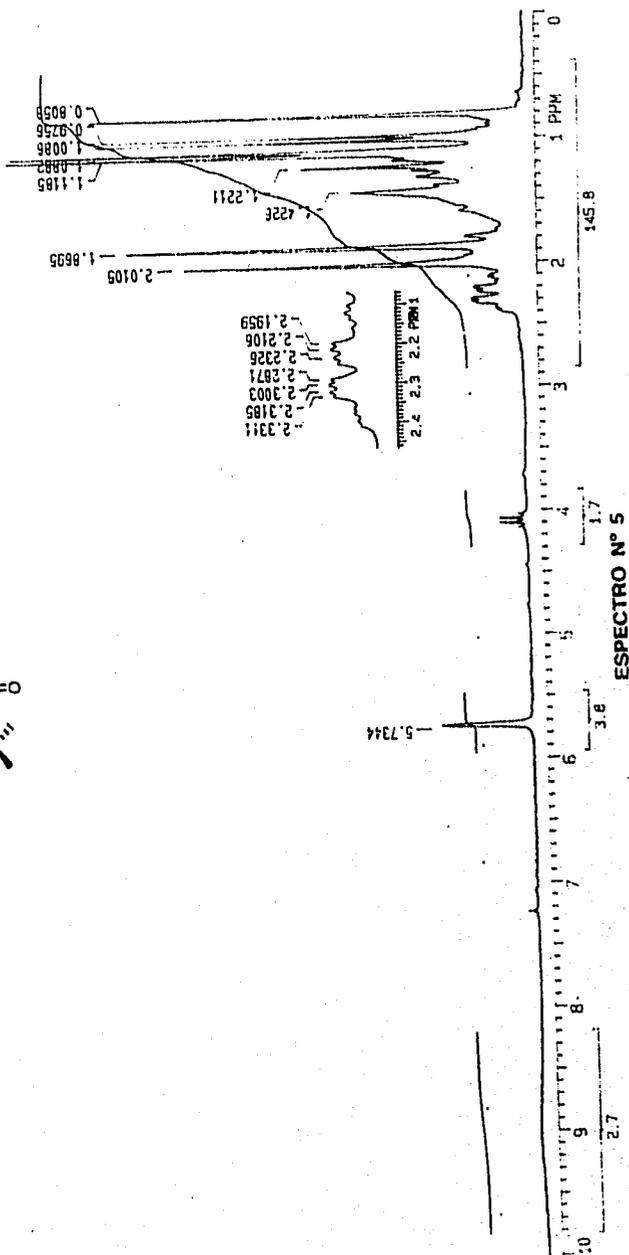
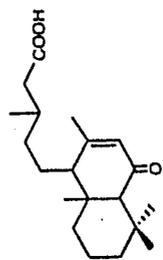
ESPECTRO N° 1

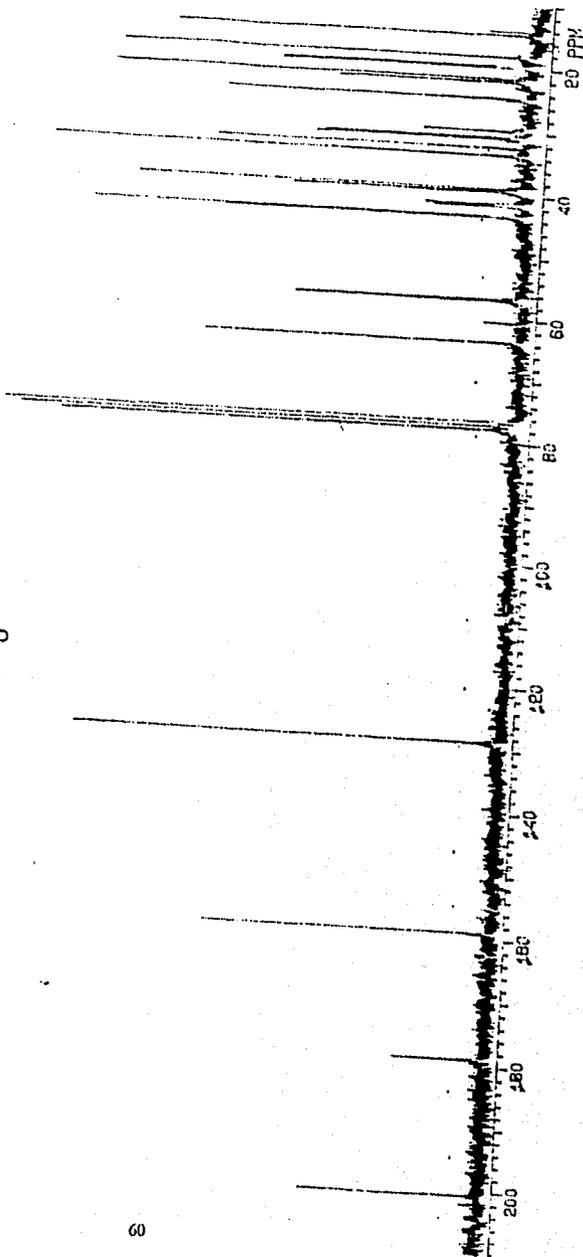
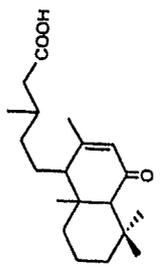


ESPECTRO N° 3

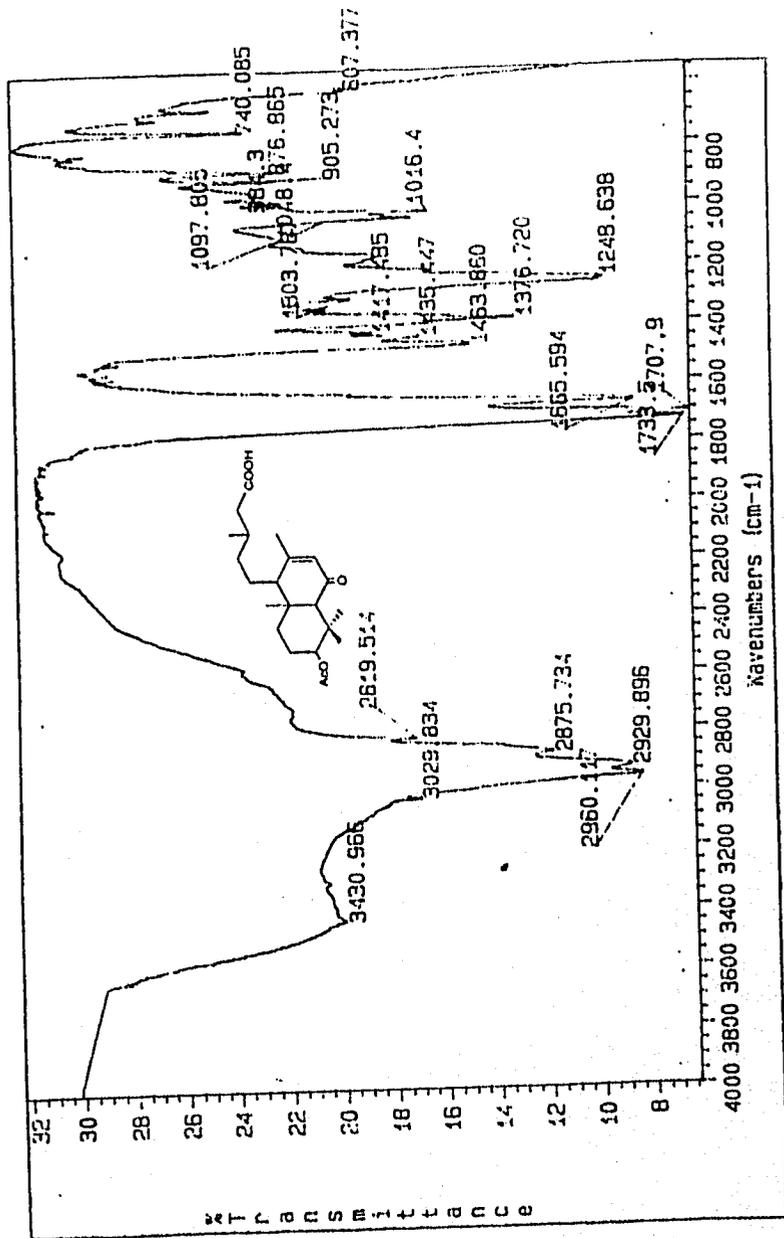


ESPECTRO N° 4

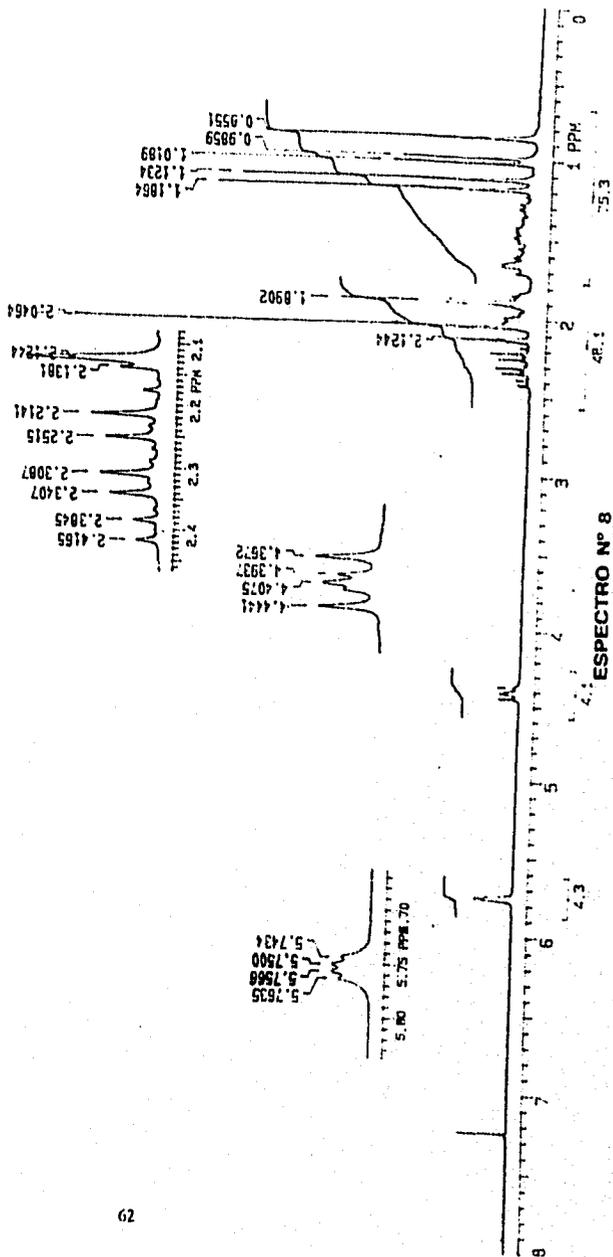
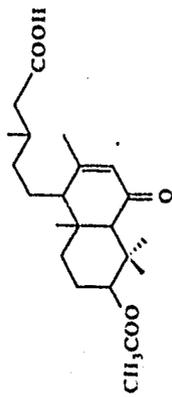


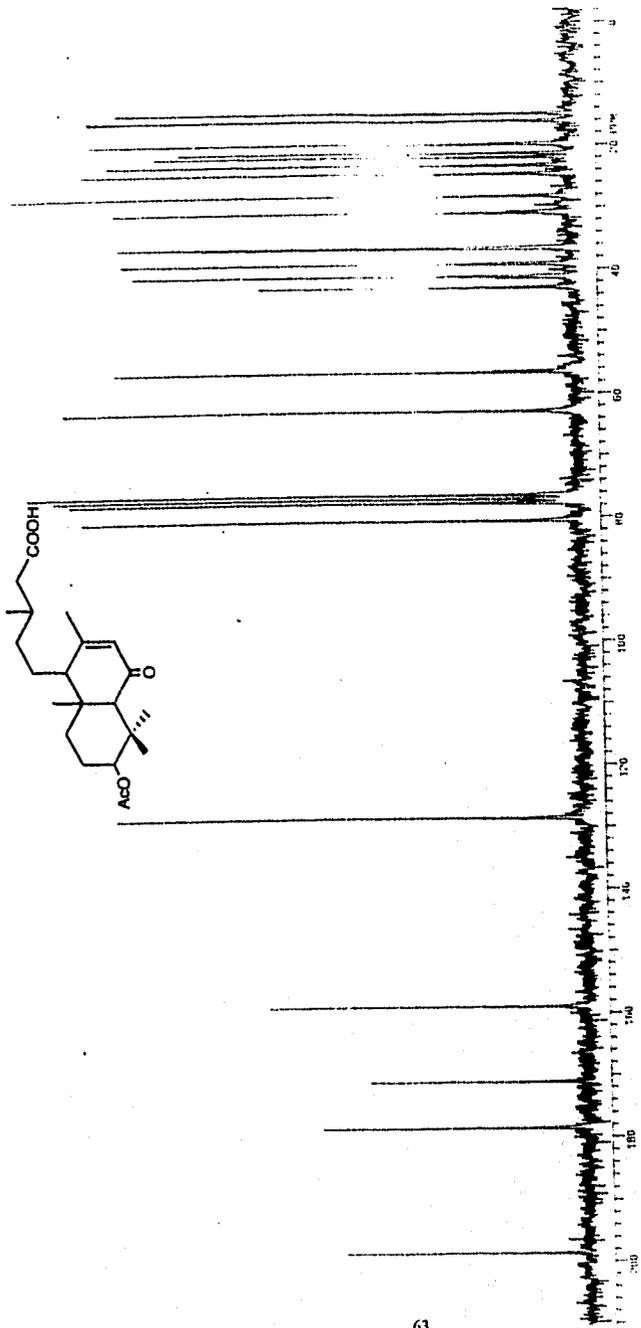


ESPECTRO Nº 6



ESPECTRO N° 7





ESPECTRO N° 9

[Mass Spectrum]

Date : 28-Nov-55 11:25

Data : EG-4

Sample : M

Notes : Dr-Jose-Calderton-AX505

Inlet : Direct

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 1.15 min Scan# : (231.26)

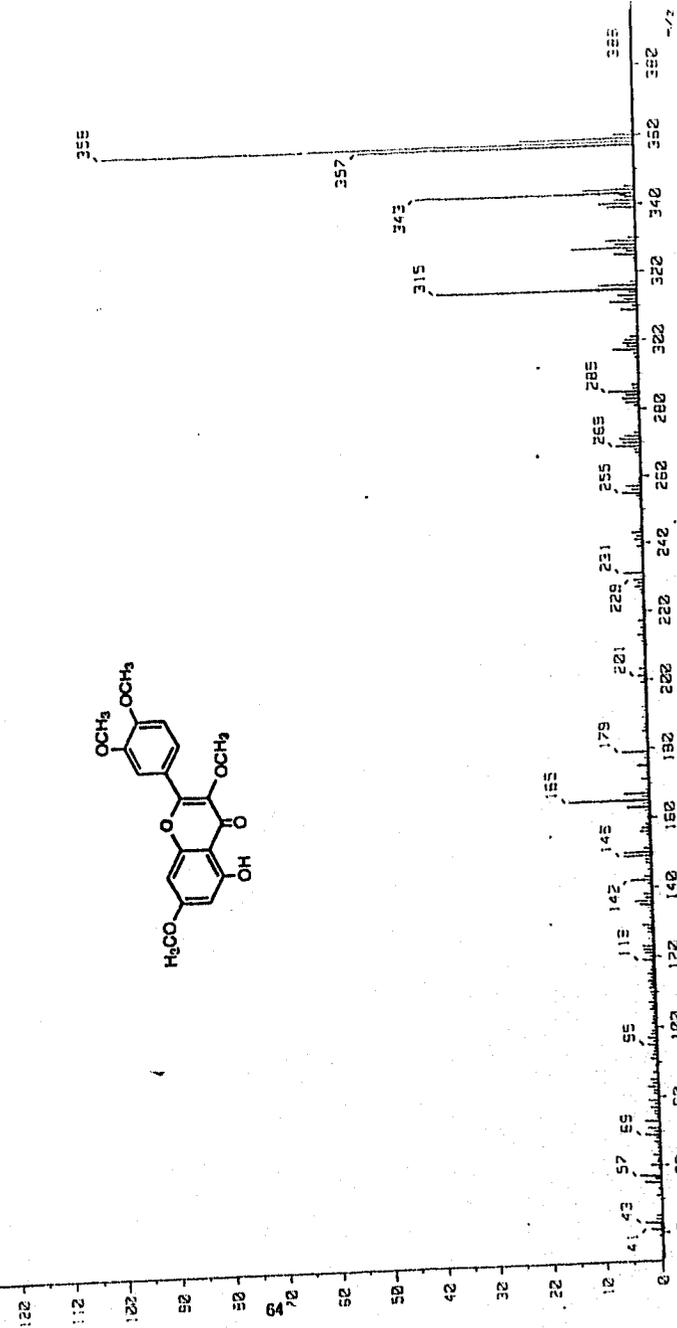
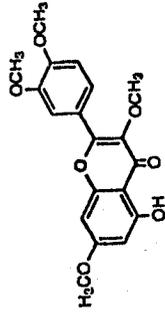
ES : m/z 358.0020 Int. : 1293.33

Cut Level : 0.00 %

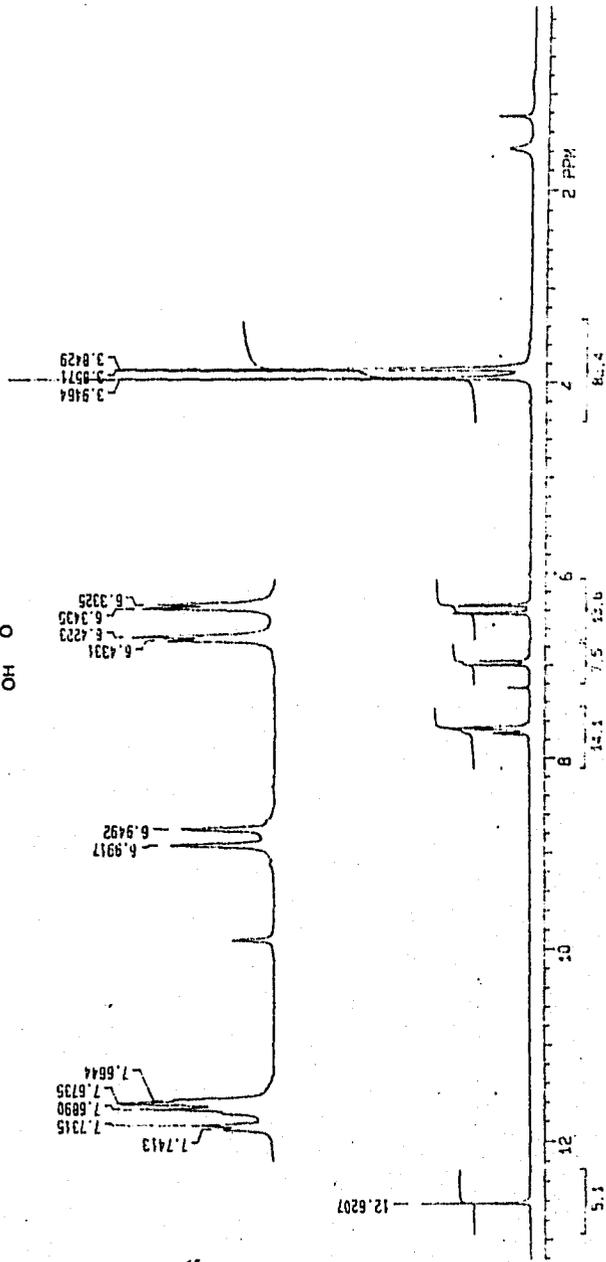
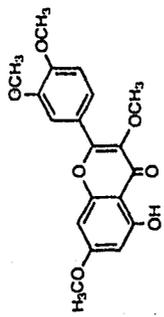
Output m/z range : 33.0000 to 355.2210

172187.2

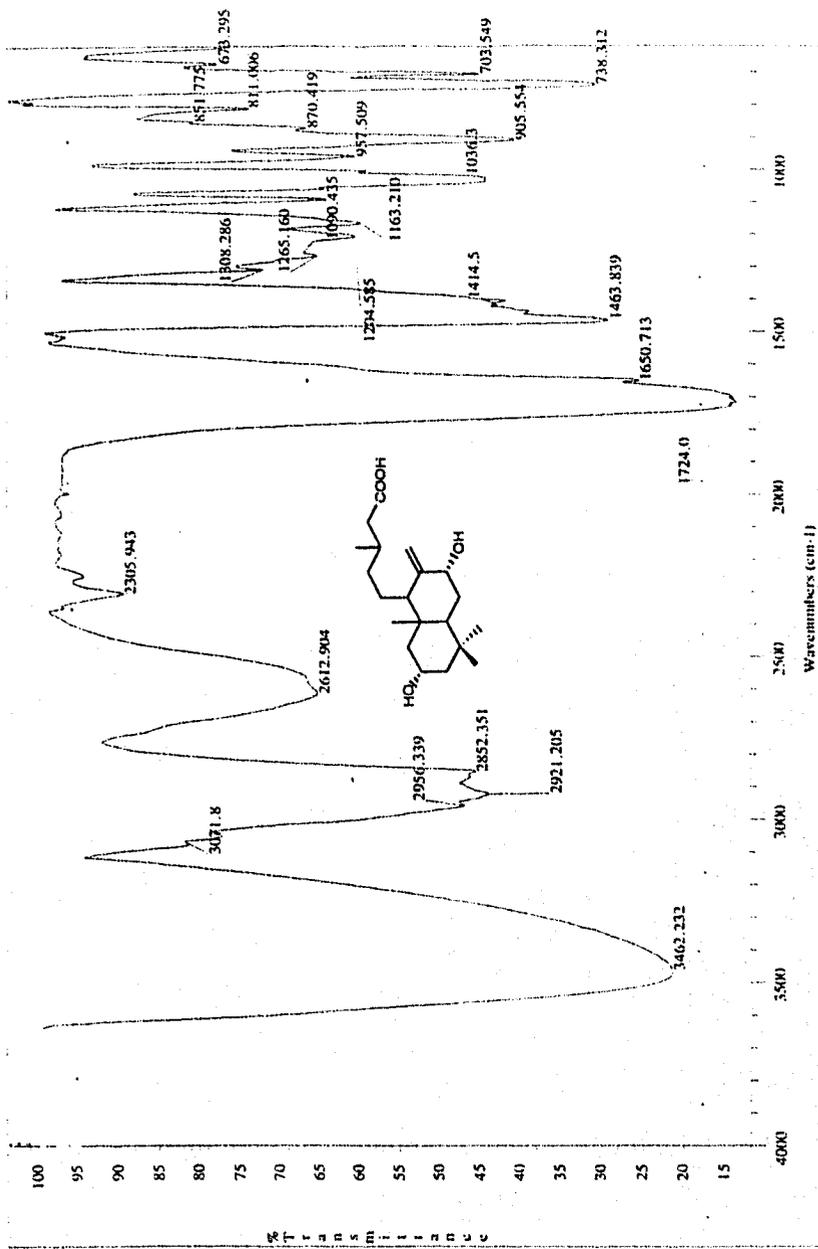
Ion Mode : EI+
Temp : 40.4 deg.C

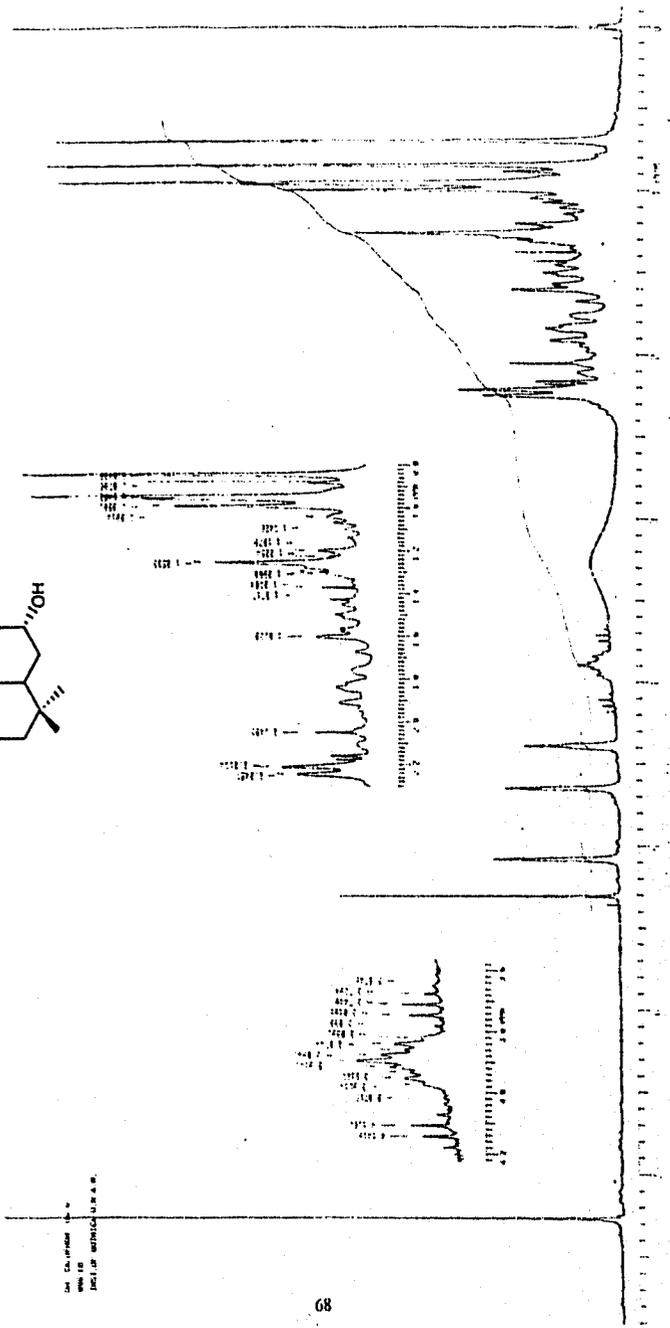
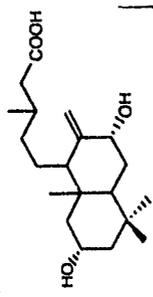


ESPECTRO N° 10



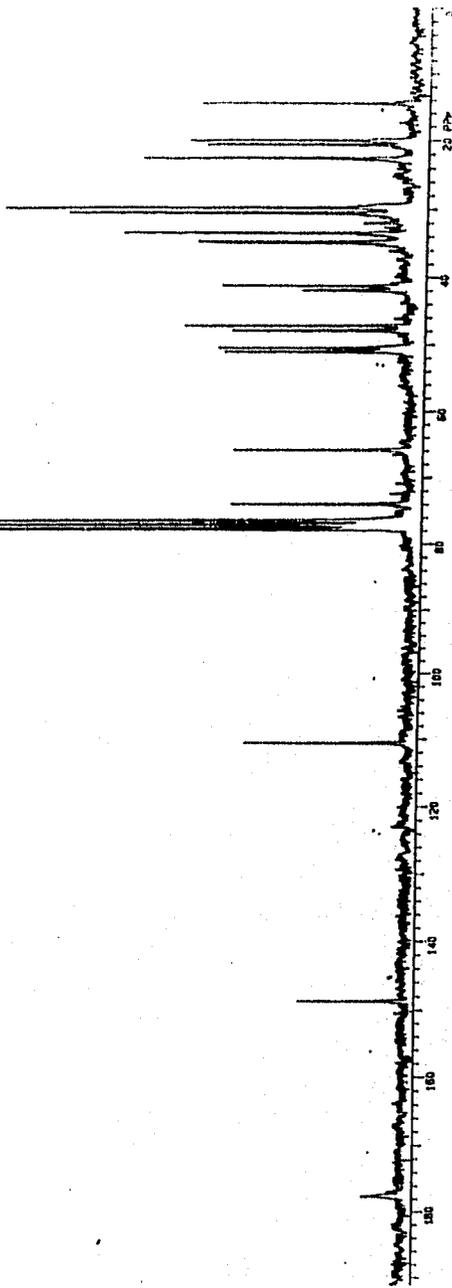
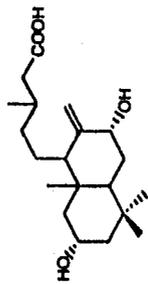
ESPECTRO N° 11



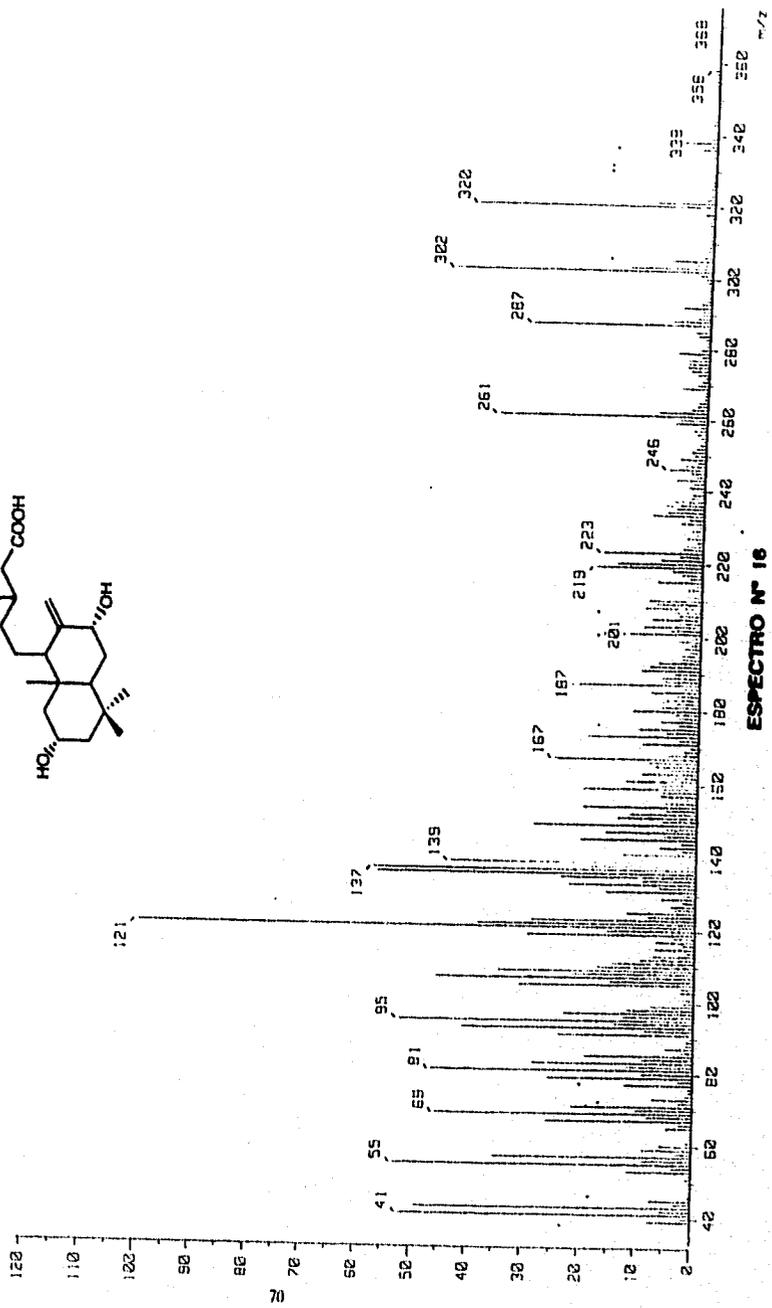
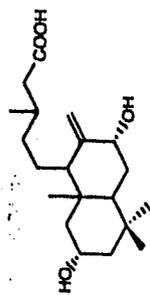


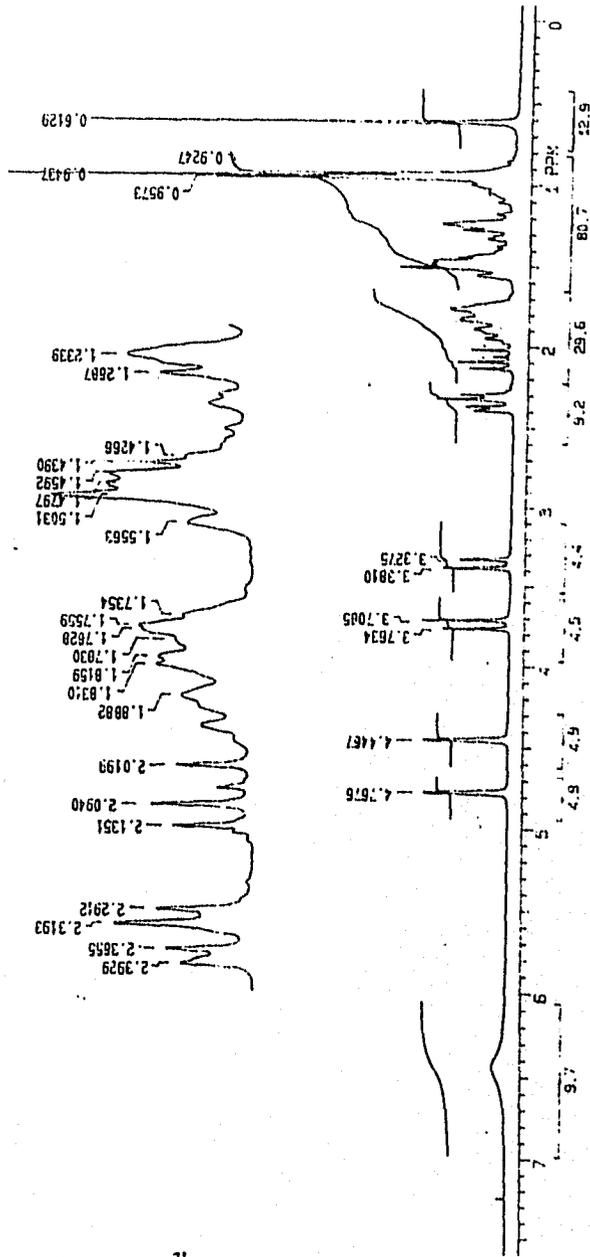
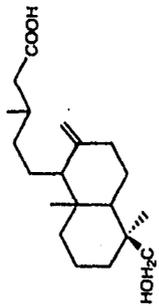
DR. CALIFORNIA
 1960
 1001 OF 1001

ESPECTRO N° 14

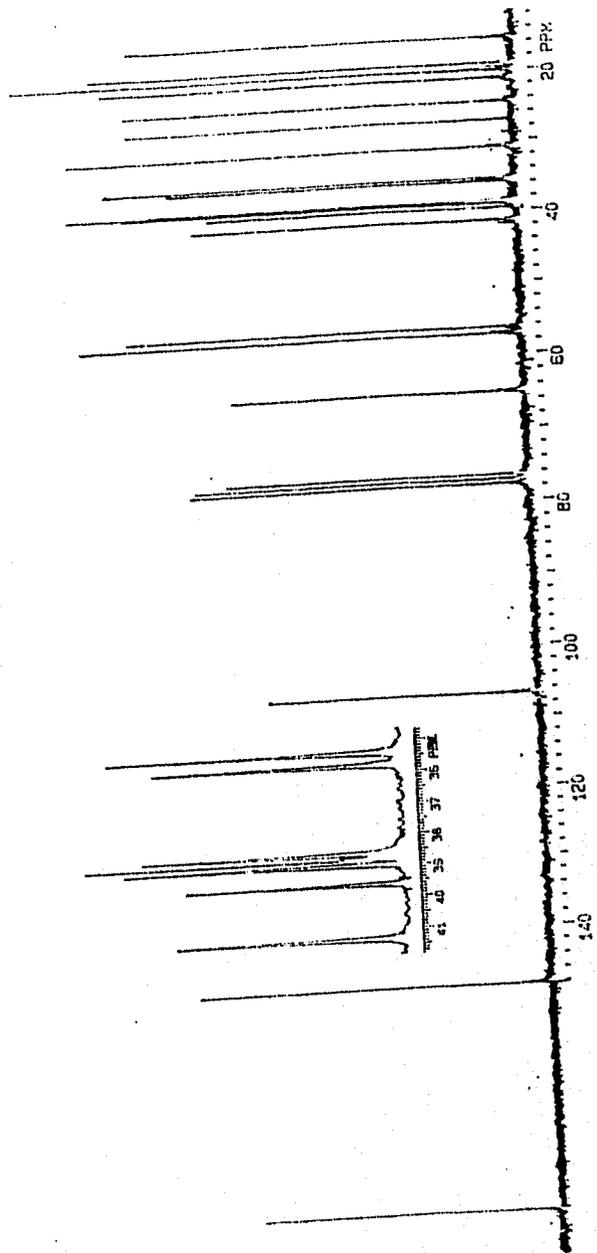
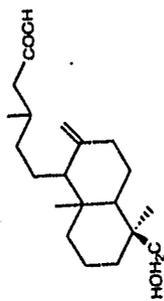


ESPECTRO N° 15

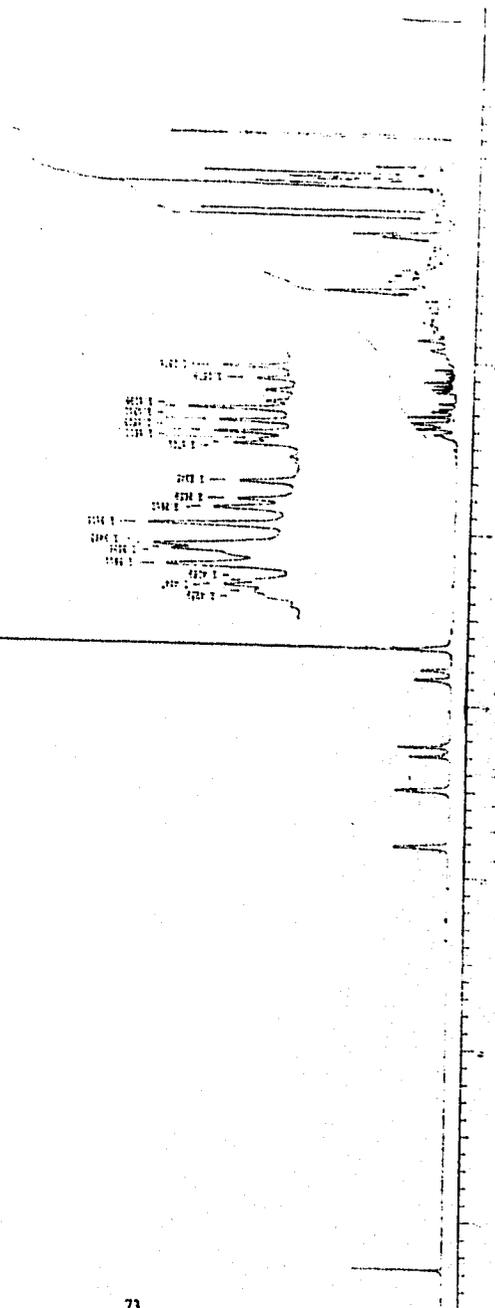
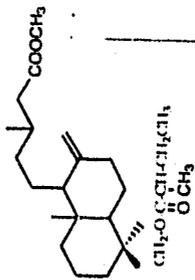




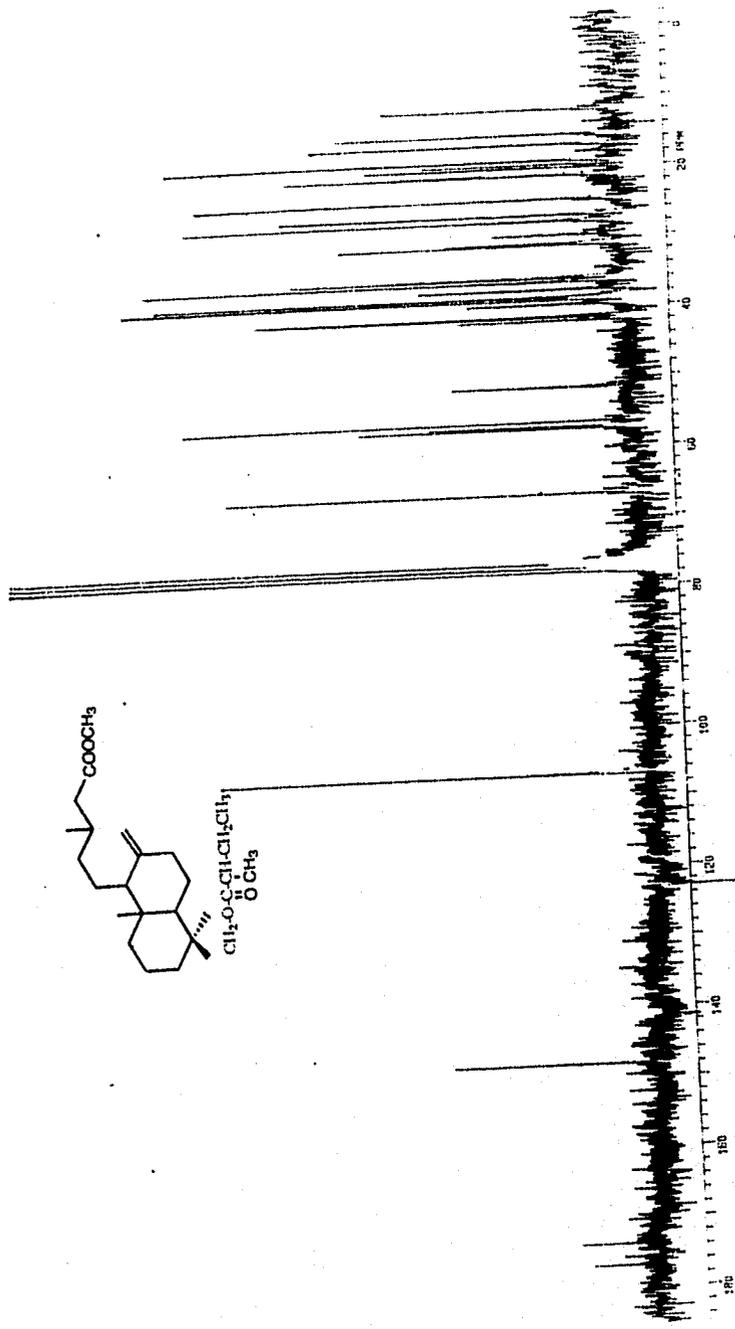
ESPECTRO N° 17



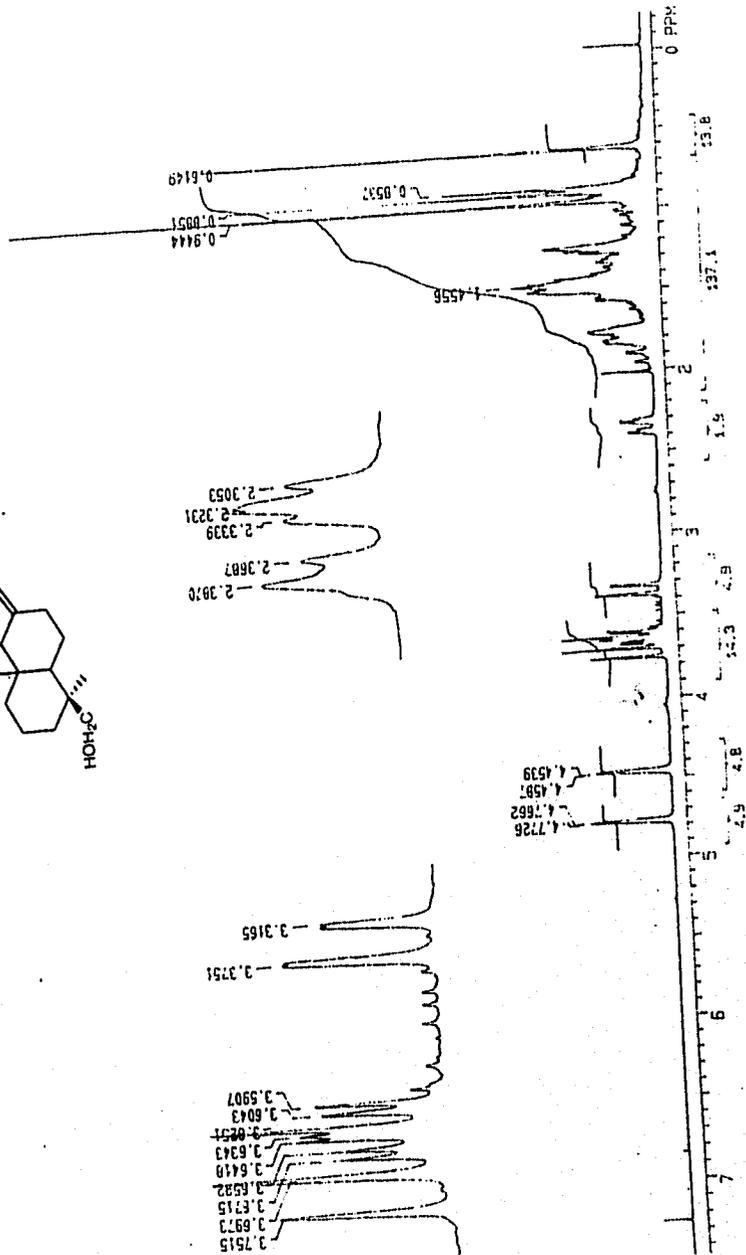
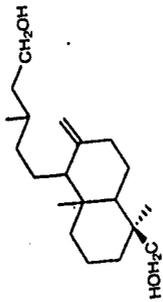
ESPECTRO N° 18



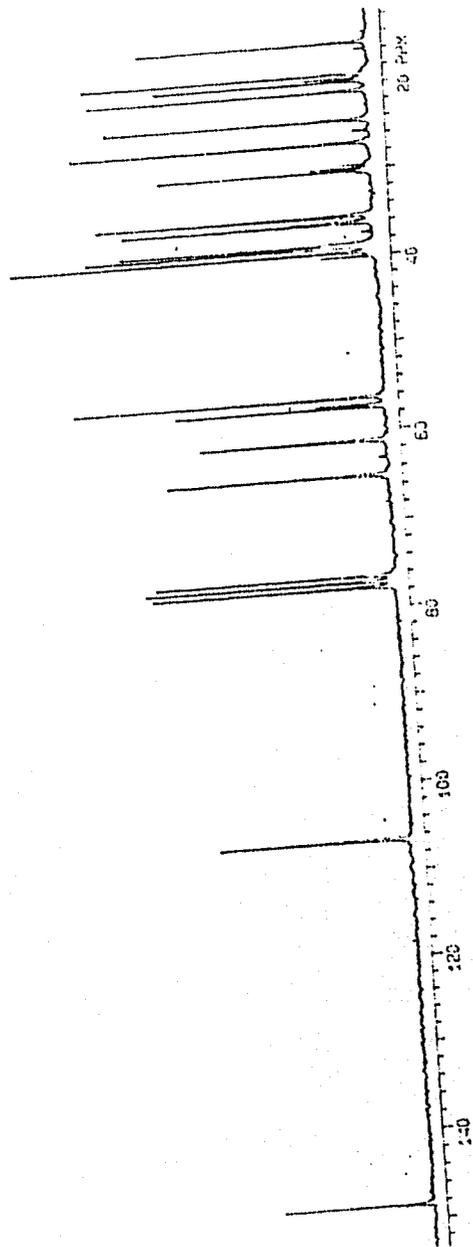
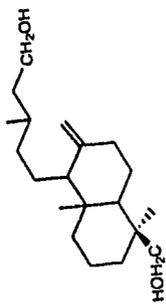
ESPECTRO Nº 19



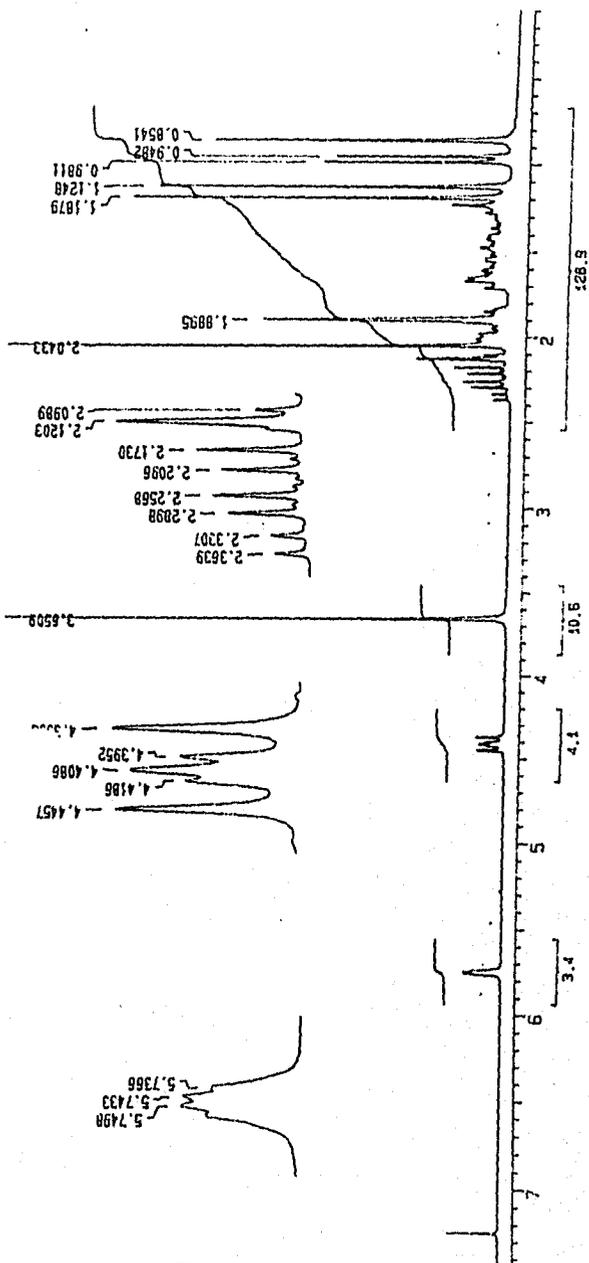
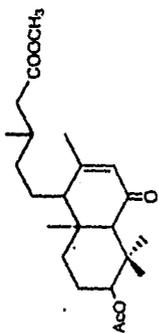
ESPECTRO N° 20



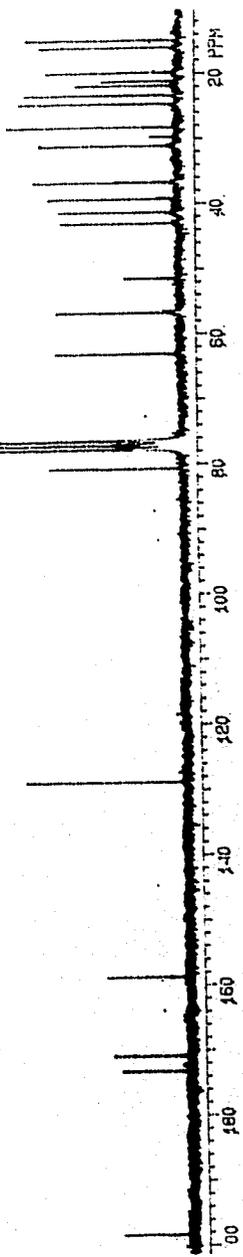
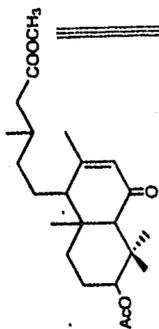
ESPECTRO Nº 21



ESPECTRO N° 22



ESPECTRO N° 23



ESPECTRO N° 24

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Rzedowski, J.
La vegetación de México.
Ed. Limusa, México (1983).
- 2.- Sánchez Sánchez Oscar
La flora del Valle de México
Ed. Herrero, México (1980).
- 3.- Aguilar, Abigail; Camacho, Juan Raúl; Chino, Soledad; Jáquez, Patricia; López, María Edith. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social.
México (1994).
- 4.- Calderón J. S., Quijano L., Cristiá M., Gómez F. y Rios T.
Labdane diterpenes from *Brickellia veronicaefolia*
Phytochemistry 22, 1783 - 1785 (1983).
- 5.- T. W. Goodwin
Introduction to plant biochemistry
Pergamon press, U.S.A. (1972).
- 6.- Domínguez Xorge A.
Métodos de investigación fitoquímica
Ed. Limusa, México (1985).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 7.- CRC Handbook of Terpenoids
Diterpenoids.
Volume II. Bicyclic diterpenoids
Sukh Dev and Renuka Misra
CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida (1985)
- 8.- Seaman F., Bohlmann F., Zdero C, and Mabry T. J.
Diterpenes of flowering plants
Springer-Verlag New York Inc. (1990).
- 9.- Sitton D., and West Ch. A.
Casbene: an antifungal diterpene produced in cell-free extracts of *Ricinus communis* seedlings.
Phytochemistry. 14, 1921-1925 (1975).
- 10.- Hanson J. R. Diterpenoids. Natural Products Reports I. 533 (1984).
- 11.- Bailey J. A., G. G. Vincent and R. S. Burdon.
Diterpenes from *Nicotiana gluriosa* and their effect on fungal growth.
J. of General Microbiology 85, 57 (1974).
- 12.- Hanson J. R. Diterpenoids. Natural Products Reports I. 171 (1984).
- 13.- Hanson J. R. Diterpenoids. Natural Products Reports I. 339 (1984).

- 14.- Elliger C A., D. F. Zinkel, B. G. Chan, and A. C. Waiss, Jr.
Diterpene acids as larval growth inhibitors. *Experientia* 32, 1364 (1976).
- 15.- Tomassini T. C. B. and M. E. O. Matos.
On the natural occurrence of 15 α -tiglinoyloxy-kaur-16-en-19-oic acid.
Phytochemistry 18, 663 (1979).
- 16.- Mathur S.B., P. Garcia Tello, C. M. Fermin, and V. Mora-Arellano.
Terpenoids of *Mikania monagasensis* and their biological activities.
Rev. Latinoamer. Quím. 6, 201 (1975).
- 17.- William G. D., William E. T., and Resnick P. R.
Cembrene, a 14-membered ring diterpene hydrocarbon.
J. Am. Chem. Soc. 84, 2015 (1962).
- 18.- Ellestead G., Knstmann M. P., Mirando P., and Morton G. O.
Structures of fungal diterpene antibiotics LLS-491 β and γ .
J. Am. Chem. Soc. 94, 6206 (1972).
- 19.- Wagner H. R., Seitz V. M., and Lotter.
New furanoid ent-clerodanes from *Baccharis tricuneata*.
J. Org. Chem. 43, 3339 (1978).

- 20.- Marcelle G. B., N. Bunyaphatsara, G. A. Cordell, H. H. S. Fong, K. C. Nicolaou, and R. E. Zipkin.
Studies on Zoapalle I. The extraction of zoapalle (*Montanoa tomentosa*) and the identification of 21-normontanol as the initial decomposition product of zoapatanol. J. Nat. Prod. 48, 739 (1985).
- 21.- Oshima Y., S. M. Wong, C. Konno, G. A. Cordell, D. P. Waller, D. D. Soejarto and H. H. S. Fong.
Studies on Zoapalle II. Leucantholide, a novel sesquiterpene lactone from *Montanoa leucantha*. J. Nat. Prod. 49, 313 (1986).
- 22.- Cutler H. G.
Carboxyatractyloside: A compound from *Xanthium strumarium* y *Atractylis gummifera* with plant growth inhibiting properties. The probable "Inhibitor A". J. Nat. Prod. 46, 609 (1983).
- 23.- Kato T., Kabuto Ch., Sasaki N., Tsunagawa M., Aizawa H., Fujita K., Kato Y., and Kitahara Y.
Momilactones, growth inhibitors from rice, *Oryza sativa* L.
Tetrahedron letters. 39, 3861-3864 (1973).
- 24.- Soejarto D. D., A. D. Kinghorn, and N. R. Farnsworth.
Potential sweetening agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of *Stevia* leaf herbarium samples for sweetness.
J. Nat. Prod. 45, 590 (1982).

- 25.- Sholicin M., Yamasaki K., Miyama R., Yahara S., and Tanaka O.
Labdane-type diterpenes from *Stevia rebaudiana*.
Phytochemistry. 19, 326 - 327 (1980).
- 26.- Morris Kupchan S., Karim A., and Marcks Carol.
Taxodione and Taxodone, two novel diterpenoid quinone methide tumor
inhibitors. J. Am. Chem Soc. 90, 5923 (1968).
- 27.- Morris Kupchan S., Karim A., and Marcks C.
Tumor inhibitors XLVIII. Taxodione and Taxodone, two novel diterpenoid
quinone methide tumor inhibitors from *Taxodium distichum*.
J. Org. Chem. 34, 3912 (1969).
- 28.- Fujita E., Nagao Y., Node M., Kaneko K., Nakazawa S., and Kuroda H.
Antitumor activity of the isodon diterpenoids: Structural requirements for the
activity. Experientia. 32, 203 (1976).
- 29.- Morris Kupchan S., Court W. A., Daley r. G., Gilmore C. J., and Bryan R. F.
Triptolide and Triptolide, novel antileukemic diterpenoid triepoxides from
Trypterigium wilfordii. J. Am. Chem. Soc. 90, 7194 (1972).
- 30.- Wagner H. and Wolf P.
New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or
therapeutical activity.
Ed. Springer-Verlag, New York. (1973).

- 31.- Bhat S. V., Bajwa B. S., Donauer H., and de Souza N. J.
Structures and stereochemistry of new labdane diterpenoids from *Coleus
lorskohlii* briq.
Tetrahedron Letters. 19, 1669 - 1672 (1977).
- 32.- Newman, A. A.
Chemistry of terpenes and terpenoids
Academic press, London (1972).
- 33.- Nicoletti M., Serafini M. and de Albuquerque J. F. C.
A new diterpene from *Echinolea inflexa*.
Rev. Latinoamer. Quim. 19/1, 13-14 (1988).
- 34.- Chinou I., Demetzos C., Harvala C., Roussakis C., and Verbist J. F.
Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts
of *Cistus incanus*.
Planta Med. 60, 34-36 (1994).
- 35.- Kubo I., Taniguchi M., and Kubota T.
The biological activities of the isodon diterpenoids.
Rev. Latinoamer. Quim. 9, 157-162 (1978).
- 36.- Kaoru Fuji and Manabu Node.
Antitumor diterpenoids in *Rabdosia trichocarpa*.
Rev. Latinoamer. Quim. 14-2, 55-58 (1983).

- 37.- Roque Nidia F., Gianella Tania L., Giesbrecht Astréa M., and Barbosa Rita de
cassia S. B. C.
Kaurene diterpenes from *Wedelia paludosa*.
Rev. Latinoamer. Quim. 1813, 110-111 (1987).
- 38.- Bhat S. V., Kalyanaraman P. S., Kohl H., and de Souza N. J.
Inuroleanol and 7-ketoroyleanone, two novel diterpenoids of *Inula royleana*.
Tetrahedron. 31, 1001 (1975).
- 39.- Silverstein, Robert M.
Spectrometric Identification of organic compounds.
4th. ed.
Ed. Wiley & sons, Inc. U.S.A. (1981).
- 40.- Bellamy L. J.
The infrared spectra of complex molecules.
3rd. ed.
Ed. Willey & sons, Inc. U.S.A. (1975).
- 41.- Moran Pineda Florencia Marina
Determinación de las estructuras químicas de nuevos diterpenos aislados del
género *Brickellia*.
Tesis (Licenciatura).
U. V. 1984.

- 42.- G. WeiBmann, K. Bruns und H. Fr. Grutzmacher.
Terpene aus dem harz von *Araucaria imbricata*, Pavon (*A. araucana*).
Tetrahedron Letters. 51, 4623-4626 (1965).
- 43.- K. Bruns.
Über die C₁₃-konfiguration der diterpene aus *Araucaria imbricata*, Pavon
(*Araucariaceae*). Tetrahedron. 24, 3417-3423 (1968).
- 44.- Calderón J. S., Quijano L., Gómez F., Morán M., and Rios T.
Labdane diterpenes from *Brickellia glomerata*.
Phytochemistry. 26, 2639 - 2641 (1987).
- 45.- A Halsall T. G., and Moyle M.
The chemistry of gum labdanum. Part IV The structure of a new diterpene acid.
J. Chem. Soc. 1324 (1960).
- 46.- Meyer B. N., Ferrigni N. R., Putnam J. E., Jacobsen L. B., Nichols D. E., and
McLaughlin J. L.
Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents.
Planta Medica. 45, 31-34 (1982).
- 47.- Wah, S. T.
Toxicity Testing Using the brine Shrimp: *Artemia salina*
Bioactive Natural Products. Detection, isolation and structural determination.
CRC Press, U.S.A. (1993).

- 48.- Winter C. A.; Risley E. A.; Nuss G.W.
Proc. Soc. Exp. Biol. 111, 544-547 (1962).
- 49.- Vanden Berghe D. A. and Vietinck A. J.
Screening Methods for Antibacterial and Antiviral Agents from Higher Plants.
Methods in Plant Biochemistry. Vol 6, 47-69
Academic Press Limited, 1991.
- 50.- Linton A. H.
Theory of Antibiotic Inhibition Zone Formation Disc.
Sensitive Methods and MIC Determinations:
Antibiotics; Assessment of Antimicrobial Activity and Resistance.
Academic Press, N. Y. (1988)