



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO QUÍMICO DE TRES ESPECIES ENDÉMICAS DE MÉXICO DE LA Subtribu  
*Tussilagininae (Asteraceae, Senecioneae)*. CONTRIBUCIÓN A LA BIOGÉNESIS  
DE EREMOFILANÓLIDAS

TESIS

PARA OBTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. JHON IRONZI MALDONADO RODRÍGUEZ.



TUTOR: DR. ALFONSO ROMO DE VIVAR ROMO 2009



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.

---

Este trabajo se realizó en el laboratorio 2-07 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo, con el apoyo económico de la CEP (antes DGEP).

---

***A mis padres***

***Gilma Rodríguez Ortega y José del Carmen Maldonado Sáenz***

***A mis hermanos***

***Luz Celly, Luz Cielo, Luz Amparo, Yined, Yesid, Franky y José.***

### AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial al **Dr. Alfonso Romo de Vivar** por la formación académica que me ha brindado durante mis estudios de maestría y doctorado y por ese don de sabiduría, enseñanza y calidez humana que nunca dejaron de asombrarme.

A la Coordinación de Estudios de Posgrado (CEP) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría y doctorado.

A las maestras Amira Arciniegas, Ana-Lidia Pérez y Emma Maldonado.

A la Dra. Luvia Enid Sánchez Torres de la ENCB del Instituto Politécnico Nacional y sus estudiantes Mary Carmen Godínez y Marco Antonio Omaña.

Al **H. jurado** integrado por los doctores: Luvia Enid Sánchez Torres, Rachel Mata Essayag, René Miranda Ruvalcaba, Ricardo Reyes Chilpa y Rogelio Pereda Miranda.

Al **H. comité tutelar** integrado por los doctores: Alfonso Romo de Vivar Romo, Rogelio Pereda Miranda y José Guillermo Penieres Carrillo.

A todo el personal técnico-académico del Instituto de Química y de manera especial al grupo de RMN (Angeles Peña, Beatriz Quiróz, Elizabeth Huerta, Héctor Ríos, Ma. Isabel Chávez y Nieves Zavala), al grupo de espectroscopia de masas (Luis Velazco y Javier Pérez) al grupo de Cristalografía de rayos-X (Alfredo Toscano), al grupo de cromatografía de líquidos y cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (Eréndira García y Carmen Márquez), al grupo de pruebas biológicas (Ma. Teresa Ramírez-Apan y Antonio Nieto) y al grupo de IR, RO y UV. (Rocío Patiño).

A todo el personal administrativo y de apoyo logístico del posgrado en ciencias químicas, del Instituto de Química y de control escolar (UNAM).

A todos mis compañeros y amigos de la UNAM y de México.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS -----	i
RESÚMEN-----	x
ABSTRACT-----	xii
INTRODUCCIÓN-----	1
ANTECEDENTES-----	4
Biogénesis de pseudoguayanos, eremofilanos y sus respectivas lactonas pseudoguayanólidas y eremofilanólidas -----	4
Familia <i>Asteraceae</i> -----	8
Química de la familia <i>Asteraceae</i> -----	9
Tribu <i>Senecioneae</i> -----	10
Química de especies mexicanas de la tribu <i>Senecioneae</i> -----	11
Morfología general de la tribu <i>Senecioneae</i> -----	11
Género <i>Pittocaulon</i> -----	12
<i>Pittocaulon bombycophole</i> -----	12
<i>Pittocaulon velatum</i> -----	13
Química del género <i>Pittocaulon</i> -----	14
Genero <i>Roldana</i> -----	16
Morfología general -----	16
Distribución del género -----	17

---

<i>Roldana reticulata</i> .....	17
Química del género <i>Roldana</i> .....	19
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVOS.....	26
PARTE EXPERIMENTAL.....	27
Métodos de separación .....	27
Determinación de las constantes físicas y espectroscopia .....	27
Bioensayos de actividad biológica .....	28
Cultivo celular para cernimiento primario y determinación de $CI_{50}$ ---	28
Cultivo celular para viabilidad celular, muerte y arresto celular .....	28
Cernimiento primario .....	29
Determinación de la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) .....	29
Evaluación de la actividad antiinflamatoria .....	29
Viabilidad celular.....	30
Determinación del tipo de muerte celular .....	31
Análisis de ciclo celular .....	31
Estudio de la biogénesis de eremofilanólidas .....	32
Obtención de eremofilanólidas <b>98</b> y <b>99</b> a partir del glucósido <b>8</b> .....	32
Obtención de las eremofilanólidas <b>98</b> y <b>99</b> a partir del glucósido <b>9</b> --	33
Obtención del aldehído <b>100</b> a partir del glucósido <b>8</b> .....	33

---

Obtención del compuesto <b>101a</b> a partir del glucósido <b>9</b> -----	<b>34</b>
Obtención de la lactona deuterada <b>102</b> a partir del glucósido <b>9</b> ----	<b>36</b>
<i>Pittocaulon bombycophole</i> (material vegetal) -----	<b>36</b>
<i>Pittocaulon velatum</i> (material vegetal) -----	<b>47</b>
<i>Roldana Reticulata</i> (material vegetal) -----	<b>51</b>
RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	<b>56</b>
Metabolitos secundarios de <i>P. Bombycophole</i> -----	<b>56</b>
Metabolitos secundarios de <i>P. Velatum</i> -----	<b>64</b>
Metabolitos secundarios de <i>R. Reticulata</i> -----	<b>68</b>
Estudio de la biogénesis de eremofilanólidas -----	<b>72</b>
Actividad citotóxica -----	<b>84</b>
Actividad antiinflamatoria -----	<b>87</b>
Viabilidad celular -----	<b>88</b>
Citofluorometría de flujo -----	<b>90</b>
Arresto de ciclo celular -----	<b>91</b>
CONCLUSIONES -----	<b>92</b>
PERSPECTIVAS -----	<b>94</b>
BIBLIOGRAFÍA-----	<b>95</b>
ESPECTROS -----	<b>105</b>
CROMATOGRAMAS -----	<b>136</b>
ANEXOS -----	<b>138</b>



### ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS:

<b>A.C</b>	Antes de Cristo
<b>A. <i>m</i>-Cl-pb</b>	Acido <i>meta</i> -cloroperbenzoico
<b>Ang</b>	Angelato
<b>Ac.</b>	Acetato
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>AcO</b>	Acetoxi
<b>CCP</b>	Cromatografía capa preparativa
<b>Cl<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria media
<b>c</b>	Concentración mg/ 100 ml
<b>c</b>	Señal cuartete
<b>cc</b>	Señal cuartete de cuartete
<b>cd</b>	señal cuartete doble
<b>C/u</b>	Cada uno (a)
<b>COSY</b>	“Correlated spectroscopy”
<b>COLOC</b>	“Coupling long-range correlation”
<b>(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub> CO</b>	Deuteroacetona
<b>CD</b>	Dicroísmo circular
<b>CLAE</b>	Cromatografía líquida de alta eficiencia

<b>DEPT</b>	“Distortionless enhancement by polarization transfer”
<b>dd</b>	Señal doble de doble
<b>ddc</b>	señal doble de doble cuartete
<b>dt</b>	Señal doble triplete
<b>ddd</b>	Señal doble de doble de doble
<b>d</b>	Señal doble
<b>dddd</b>	Señal doble de doble de doble de doble.
<b>Epoang.</b>	Epoxiangelato
<b>Et<sub>2</sub>O</b>	Éter etílico
<b>EM-IM</b>	Espectrometría de masas por impacto electrónico.
<b>EMAR-FAB</b>	Espectrometría de masas de alta resolución “fast atomic bombardment”
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>g</b>	Gramos
<b><i>hν</i></b>	Paquete de energía o cuanto
<b>hex</b>	Hexano
<b>HCT-15</b>	Línea celular de cáncer de pulmón

<b>HMBC</b>	“Heteronuclear multiple-bond correlation”
<b>HETCOR</b>	“Heteronuclear chemical - shift correlation”
<b>HSQC</b>	“Heteronuclear single-quantum correlation”
<b><i>i</i>-val</b>	isovalerato
<b><i>i</i>-Bu</b>	Isobutirato
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamiento
<b>KV</b>	Kilovoltios
<b>K-562</b>	Línea celular de leucemia mieloide crónica
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>Me</b>	Metilo
<b>MCF-7</b>	Línea celular de cáncer de mama
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>m/z</b>	Relación masa-carga
<b>mg</b>	Miligramos
<b>m</b>	Señal múltiple
<b>NOESY</b>	“Nuclear overhauser effect spectroscopy”
<b>nm</b>	Nanómetros

<b>[O]</b>	Oxidación
<b>PI</b>	Yoduro de propidio
<b>PC-3</b>	Línea celular de cáncer de próstata
<b>Pf</b>	Punto de fusión
<b>pH</b>	Medida de acidez en escala 1-14
<b>RMN-<sup>1</sup>H</b>	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
<b>RMN-<sup>13</sup>C</b>	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>Sen</b>	Senecioato
<b>s</b>	Señal sencilla
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>TLC</b>	Thin layer chromatography
<b>t</b>	Señal triple
<b>ta</b>	Triplete ancho
<b>T. a.</b>	Temperatura ambiente
<b>UV</b>	Ultra violeta
<b>U-251</b>	Línea celular de cáncer de sistema nervioso central
<b>µm</b>	Micrómetros

## Lista de esquemas, cuadros, figuras, gráficos y espectros

---

$\mu\text{M}$	Micromolar	
$V_{\text{max}}$		Frecuencia máxima
$[\alpha]_D$		Rotación específica
$\delta$		Desplazamiento químico
$\lambda_{\text{max}}$		Longitud de onda máxima
% in. rel.		Porcentaje de intensidad relativa

### Lista de Esquemas:

<b>Esquema 1:</b>	Biogénesis de eudesmano y pseudoguayanos.	<b>4</b>
<b>Esquema 2:</b>	Biogénesis de eremofilanos	<b>5</b>
<b>Esquema 3:</b>	Biogénesis de pseudoguayanólidas.	<b>5</b>
<b>Esquema 4a:</b>	Formación de eremofilanólidas por foto-oxidación.	<b>6</b>
<b>Esquema 4b:</b>	Formación de eremofilanólidas por tratamiento con perácidos.	<b>6</b>
<b>Esquema 5:</b>	Mecanismo de formación de eremofilanólidas.	<b>7</b>
<b>Esquema 6:</b>	Biogénesis propuesta para epoxieremofilanólidas.	<b>7</b>
<b>Esquema 7:</b>	Posibles precursores de radulifolinas A, B, y <i>epi</i> -radulifolina A.	<b>8</b>
<b>Esquema 8:</b>	Biogénesis de lactonas sesquiterpénicas.	<b>72</b>
<b>Esquema 9:</b>	Tratamiento de un furanoeremofilano y un 9-cetofuranoeremofilano con el ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico	<b>73</b>
<b>Esquema 10:</b>	Principales metabolitos aislados de <i>P. praecox</i> .	<b>74</b>

## Lista de esquemas, cuadros, figuras, gráficos y espectros

---

<b>Esquema 11:</b> Conversión de los glucósidos <b>8</b> y <b>9</b> aislados de <i>P. praecox</i> en eremofilanólidas.	<b>75</b>
<b>Esquema 12:</b> Mecanismo propuesto para la formación de las lactonas <b>98</b> y <b>99</b>	<b>77</b>
<b>Esquema 13:</b> Obtención del aldehído <b>100</b> a partir del glucósido <b>8</b>	<b>77</b>
<b>Esquema 14:</b> Tratamiento ácido a temperatura ambiente del glucósido <b>9</b>	<b>79</b>
<b>Esquema 15:</b> Obtención de la lactona deuterada <b>102</b> a partir del glucósido <b>9</b>	<b>80</b>
<b>Esquema 16:</b> Obtención de la lactona deuterada <b>102</b> a partir del glucósido <b>8</b>	<b>81</b>
<b>Esquema 17:</b> Mecanismo de formación de lactonas establecido por marcación isotópica con deuterio	<b>82</b>
<b>Esquema 18:</b> Mecanismo propuesto para la formación de las lactonas reportadas para el <i>Pittocaulon praecox</i>	<b>83</b>

### Lista de cuadros:

<b>Cuadro 1:</b> Número de géneros, especies y variedades o subespecies de Asteráceas presentes en México y su distribución	<b>9</b>
<b>Cuadro 2:</b> Porcentaje promedio de inhibición del crecimiento en varias líneas celulares de cáncer para los compuestos <b>72-74</b> y <b>76-77</b>	<b>85</b>
<b>Cuadro 3:</b> Promedio de los valores de concentración inhibitoria media en varias líneas celulares de cáncer para los compuestos <b>72-74</b> y <b>76</b>	<b>86</b>
<b>Cuadro 4:</b> Actividad antiinflamatoria del oplopano <b>74</b> comparada con la de la	

indometacina en el modelo de edema inducido con TPA	<b>87</b>
---	-----------

### **Lista de figuras**

<b>Figura 1:</b> Ejemplar de <i>Pittocaulon bombycophole</i>	<b>12</b>
<b>Figura 2:</b> Ejemplares de <i>P. velatum</i>	<b>13</b>
<b>Figura 3:</b> Ejemplar de <i>Roldana reticulata</i>	<b>17</b>
<b>Figura 4:</b> Distribución geográfica de las especies del género <i>Roldana</i> en México	<b>18</b>
<b>Figure 5:</b> Estructura de rayos X del compuesto 72	<b>58</b>
<b>Figure 6:</b> Estructura de rayos X del compuesto 74	<b>59</b>
<b>Figura 7:</b> Correlaciones selectas en el espectro NOESY de 101a	<b>79</b>

### **Lista de gráficos**

<b>Grafico 1:</b> Porcentaje de viabilidad de la línea K-562 después de 24 horas de cultivo en presencia y en ausencia del oplopano	<b>74</b>	<b>88</b>
<b>Grafico 2:</b> Número total de células K-562 después de 24 horas de cultivo en presencia y ausencia del oplopano	<b>74</b>	<b>89</b>
<b>Gráfico 3 (diagrama de puntos):</b> Evaluación del tipo de muerte celular inducida por el oplopano en cultivos celulares de K-562		<b>90</b>
<b>Gráfico 4:</b> Análisis del ciclo celular de la línea K-562 creciendo en presencia		

del oplopano <b>74</b> a concentraciones de 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{M}$	<b>91</b>
--	-----------

**Lista de espectros:**

<b>Espectro 1a:</b> RMN- $^1\text{H}$ del compuesto <b>98</b>	<b>105</b>
<b>Espectro 1b:</b> RMN- $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>98</b>	<b>106</b>
<b>Espectro 1c:</b> Experimento COSY del compuesto <b>98</b>	<b>107</b>
<b>Espectro 2:</b> RMN- $^1\text{H}$ del compuesto <b>99</b>	<b>108</b>
<b>Espectro 3a:</b> RMN- $^1\text{H}$ del compuesto <b>100</b>	<b>109</b>
<b>Espectro 3b:</b> RMN- $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>100</b>	<b>110</b>
<b>Espectro 4a:</b> RMN- $^1\text{H}$ del compuesto <b>101a</b>	<b>111</b>
<b>Espectro 4b:</b> RMN- $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>101a</b>	<b>112</b>
<b>Espectro 4c:</b> Experimento DEPT del compuesto <b>101a</b>	<b>113</b>
<b>Espectro 5a:</b> RMN- $^1\text{H}$ del compuesto <b>102</b>	<b>114</b>
<b>Espectro 5b:</b> RMN- $^1\text{H}$ del compuesto <b>102</b> (Intercambio con $\text{D}_2\text{O}$ )	<b>115</b>
<b>Espectro 5c:</b> COSY del compuesto <b>102</b>	<b>116</b>
<b>Espectro 6a:</b> RMN- $^1\text{H}$ del compuesto <b>78</b>	<b>117</b>
<b>Espectro 6b:</b> RMN- $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>78</b>	<b>118</b>
<b>Espectro 7a:</b> RMN- $^1\text{H}$ del compuesto <b>79</b>	<b>119</b>
<b>Espectro 7b:</b> RMN- $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>79</b>	<b>120</b>
<b>Espectro 8a:</b> RMN- $^1\text{H}$ del compuesto <b>71</b>	<b>121</b>



## Lista de esquemas, cuadros, figuras, gráficos y espectros

---

<b>Espectro 8b:</b> RMN- <sup>13</sup> C del compuesto <b>71</b>	<b>122</b>
<b>Espectro 9a:</b> RMN- <sup>1</sup> H del compuesto <b>74</b>	<b>123</b>
<b>Espectro 9b:</b> RMN- <sup>13</sup> C del compuesto <b>74</b>	<b>124</b>
<b>Espectro 10:</b> RMN- <sup>1</sup> H del compuesto <b>75</b>	<b>125</b>
<b>Espectro 11a:</b> RMN- <sup>1</sup> H del compuesto <b>72</b>	<b>126</b>
<b>Espectro 11b:</b> RMN- <sup>13</sup> C del compuesto <b>72</b>	<b>127</b>
<b>Espectro 12a:</b> RMN- <sup>1</sup> H del compuesto <b>76</b>	<b>128</b>
<b>Espectro 12b:</b> RMN- <sup>13</sup> C del compuesto <b>76</b>	<b>129</b>
<b>Espectro 13a:</b> RMN- <sup>1</sup> H del compuesto <b>77</b>	<b>130</b>
<b>Espectro 13b:</b> RMN- <sup>13</sup> C del compuesto <b>77</b>	<b>131</b>
<b>Espectro 14a:</b> RMN- <sup>1</sup> H del compuesto <b>73</b>	<b>132</b>
<b>Espectro 14b:</b> RMN- <sup>13</sup> C del compuesto <b>73</b>	<b>133</b>
<b>Espectro 15:</b> RMN- <sup>1</sup> H del compuesto <b>86a</b>	<b>134</b>
<b>Espectro 16:</b> RMN- <sup>1</sup> H del compuesto <b>86b</b>	<b>135</b>

### Lista de cromatogramas:

<b>Cromatograma 1:</b> Perfil cromatográfico del compuesto <b>87</b>	<b>136</b>
<b>Cromatograma 2:</b> CLAE-MASAS del compuesto <b>103</b>	<b>137</b>

---

**RESUMEN**

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio químico de tres especies de la subtribu *Tussilaginatae* endémicas de México: *Pittocaulon bombycophole*, *P. velatum* y *Roldana reticulata*.

Como resultado del estudio químico de *P. bombycophole*, se obtuvieron 14 compuestos, entre los cuales hay tres nuevos eremofilanos (**71-73**), un nuevo oplopano (**74**), y un nuevo eudesmano (**75**). De manera adicional, se obtuvieron los compuestos de estructura conocida **76-80**, el alcaloide 7-angeloilplatinecina (**81**) y, por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas fueron identificados los alcaloides 1-hidroxi-9-valerianoxiplatinecina (**82**), 7-valerianoxi, 1-hidroxi-pirrolizidina (**83**) y neopetasitenina (**84**).

Entre los componentes encontrados en *P. bombycophole*, un eudesmano, ocho 9-ceto-furanoeremofilanos y un norsesquiterpeno, se observa una cadena biogénica: eudesmano-eremofilano-nor-sesquiterpeno.

Como resultado del estudio químico de *P. velatum* se obtuvieron los eremofilanos **85-88** y los flavonoides **89-91**.

El estudio químico de *Roldana reticulata* permitió identificar los eremofilanos **92** y **93**, el glucósido de sitosterol, una mezcla de sitosterol-estigmasterol, y los compuestos senecrasano-5,8 diol (**94**), tirosol (**95**) el icarósido D<sub>2</sub> (**96**), y el flavonoide rutina (**97**).

Hasta el momento no se han encontrado en la naturaleza 9-ceto-eremofilanólidas y, en general, las lactonas han sido poco frecuentes en las especies estudiadas de *Pittocaulon*. Sin embargo, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio, se obtuvieron de *P. praecox* los glucósidos **8** y **9**, los cuales aquí se proponen como precursores biogénicos de eremofilanólidas. La propuesta se fundamentó a través de la conversión, mediante hidrólisis ácida, de cada uno de ellos en un par de lactonas, una de estructura nueva (**98**) y la otra de estructura conocida (**99**). En dicho proceso de

hidrólisis también fueron aislados los compuestos **100** y **101a** que representan nuevas estructuras. Para explicar la formación de las lactonas se propone un mecanismo con base en un estudio de marcación isotópica con deuterio.

Los compuestos **72-74** y **76-77** al ser evaluados en varias líneas celulares de cáncer mostraron un débil efecto citotóxico, no obstante, un bioensayo de actividad antiinflamatoria utilizando el modelo de edema inducido por TPA permitió establecer que el oplopano **74** presenta un efecto antiinflamatorio significativo. Debido a que un amplio espectro de agentes antiinflamatorios son efectivos en la inducción de apoptosis y dada la importancia que tiene la modulación de dicho fenómeno para el desarrollo de nuevas terapias, se llevaron a cabo experimentos adicionales por citofluorometría de flujo para evaluar si el oplopano **74** inducía muerte celular por apoptosis en la línea K-562. Los resultados indicaron que el compuesto **74** no induce muerte celular y tampoco causa un arresto de ciclo celular, sin embargo, de alguna forma afecta el crecimiento normal de células K-562 en cultivos *in vitro*.

**ABSTRACT:**

In the present work the chemical study of three species of the subtribe *Tussilagininae* endemics to Mexico: *Pittocaulon bombycophole*, *P. velatum* and *Roldana reticulata*, was performed.

As a result of the chemical study of *P. bombycophole*, 14 compounds were obtained: 3 new eremophylanes (**71-73**), a new oplopene (**74**), and a new eudesmane (**75**). Additionally, the known compounds **76-80** and the alkaloid 7-angeloilplatinecine (**81**) were obtained. The alkaloids 1-hydroxy-9-valerianoxyplatynecine (**82**), 7-valerianoxy, 1-hydroxypyrrolizidine (**83**) and neopetasitenine (**84**) were identified by gas chromatography-mass spectrometry.

Between the molecules found in *P. bombycophole*, an eudesmane, eight 9-cetofuranoeremophylanes and a norsesquiterpene, a biogenetic chain is observed: Eudesmane-eremophylane-norsesquiterpene.

As a result of the chemical study of *P. velatum*, the eremophylanes **85-88** and the flavonoids **89-91**, were obtained.

The chemical study of *Roldana reticulata* allowed the identification of eremophylanes **92** and **93**, the glucoside of sitosterol, a mixture of sitosterol-stigmasterol and compounds senecrasane-5, 8-diol (**94**), tyrosol (**95**), icaraside D<sub>2</sub> (**96**) and the flavonoid rutine (**97**).

It is important to note that compounds of the class of 9-ceto-8,12 eremophylanolides have not been found in nature, and lactones are not very common in the *Pittocaulon* species. However, in a study undertaken in our laboratory, the glucosides **8** and **9** of *P. praecox*, were isolated, which are here proposed as biogenetic precursors of eremophylanolides, this fact evidenced by their conversion, by means of acid hydrolysis, to the corresponding lactones, one of them a new structure (**98**) and the other a known structure (**99**); In the course of this process, compounds **100** and **101a**

were also isolated. In order to explain the formation of the lactones, a mechanism supported with an isotopic labelling study using deuterium was proposed.

In complement with the phytochemical study, the compounds **72-74** and **76-77** were evaluated in various cellular lines of cancer, demonstrating a weak cytotoxic effect. Nevertheless, an anti-inflammatory activity bioassay using the TPA-induced edema model, allowed to show that the oplopane **74** presents a significant anti-inflammatory effect. Because a wide spectrum of anti-inflammatory agents are effective in inducing apoptosis and the importance that the phenomenon of modulation of apoptosis represent for new therapies; additional experiments, were carried out by flow cytometry to assess whether the oplopene **74** induced cell death by apoptosis in the cell line K-562. The results indicate that compound **74** does not induce cellular death and neither does it arrested cellular cycle. However, in some way it affects the normal growth of K-562 cell population in *in vitro* culture.

### INTRODUCCIÓN

El interés en el estudio de plantas ha sido constante desde la más remota antigüedad, de lo cual dan fe los experimentos realizados con plantas que se encuentran descritos en tablillas de arcilla que datan de 4000 años y que fueron desenterrados en la ciudad sumeria de Nippur [1]. Del mismo modo, los usos de la *Rosa damascena* como droga cardiaca fueron descritos por el científico, filósofo y médico persa Ibn-senna (980-1037-D.C) conocido en occidente como Avicena [2].

En México, se perfeccionó la obtención de hule de *Castilla elastica* lo que se puede considerar como el primer aislamiento en el continente americano de un compuesto químico de origen natural. Esta sustancia fue usada en el México prehispánico con una variedad de fines y entre ellos el más notable fue para la confección de las bolas usadas para el juego de pelota tan difundido en México y Centroamérica, regiones estas en donde se practicaba ya hace más de mil años como consta en el disco de Chinkultic, Chiapas que está fechado en el año 591 [3].

Los colorantes de origen natural como el ácido carmínico con el que los antiguos mexicanos teñían textiles, murales y códices, fue aislado del insecto *Dactylopius coccus* que crece sobre el nopal [4]. Los carotenos del achiote (*Bixa orellana*) se usaban y se siguen usando en la actualidad para hacer más atractivos los alimentos por el color rojo anaranjado que les imparte [5]. Numerosas plantas fueron usadas con fines medicinales como consta en las obras de Francisco Hernández [6] y en documentos como *Libellus de medicinabilis indorum herbis*, escrito en náhuatl en 1512 por Martínez De La Cruz y traducido al latín por Juan Badiano [7].

Las importantes aportaciones de los antiguos mexicanos al conocimiento de plantas ha continuado hasta nuestros días, incluso, en 1840 y con las técnicas disponibles para ese entonces, el químico mexicano Vicente Ortigosa [8] determinó la estructura de la coniina, considerado el principal alcaloide de la cicuta con la que los griegos aplicaban la pena de muerte, y entre cuyos ejecutados se encuentra el filósofo Sócrates, condenado a beber una infusión de dicha planta en el año 399 AC.

El interés en las propiedades de las plantas que tenían los antiguos mexicanos, los colonizadores españoles y que tienen los mexicanos actuales, es debido a la gran diversidad de especies en el país, una de las más ricas del planeta, destacando por su abundancia las de la familia *Asteraceae*.

Esta familia que a nivel mundial cuenta con más de 20.000 especies entre las que se encuentran plantas comestibles como la lechuga, la alcachofa y el girasol, al igual que plantas ornamentales como los crisantemos y medicinales como árnica, manzanilla y zoapatle entre muchas otras, se encuentra dividida en 13 tribus [9] siendo la tribu *Senecioneae* la mayor, constituida por más de 3000 especies divididas en tres subtribus: *Blenospermatinae*, *Senecioninae* y *Tussilagininae* [10].

La diversificación de la tribu *Senecioneae* en México ha ocurrido como consecuencia de la gran actividad tectónica en la región y a cambios de clima en localidades cercanas [11] por lo cual existen 165 especies divididas en 19 géneros [12] entre los cuales destaca el género *Senecio* ampliamente distribuido a través del mundo y conocido por ser una fuente de alcaloides pirrolizidínicos y eremofilanos [13], una característica que hace a sus especies poco atractivas desde el punto de vista medicinal, dado el carácter tóxico que presentan este tipo de compuestos [14-16]. No obstante, existen varios reportes que atribuyen propiedades citotóxicas a los sesquiterpenos de tipo eremofilano en líneas celulares de cáncer [17-25], lo que nos induce a buscar y evaluar nuevas estructuras con dichas propiedades.

De manera adicional, en algunas plantas de este grupo coexisten sustancias que se pueden considerar como precursores de otras biogenéticamente más complejas, lo que ayuda a postular teorías de biogénesis.

Como aporte al conocimiento de la biogénesis de eremofilanólidas y teniendo en cuenta que los furanoeremofilanos son considerados como sus precursores [26], en el presente trabajo se discute el papel de dos glucósidos de eremofilano aislados de una especie de la subtribu *Tussilagininae* (*P. praecox*), como precursores de eremofilanólidas, y se estudia el mecanismo por medio del cual se efectúan sus transformaciones a lactonas en medio ácido. Del mismo modo se presenta la

composición química de tres plantas pertenecientes a la subtribu *Tussilagininae* que son endémicas de México: *Roldana reticulata*, *Pittocaulon bombycophole* y *P. velatum*; y se evalúa el efecto citotóxico en líneas celulares de cáncer de algunos de los metabolitos aislados de estas especies.

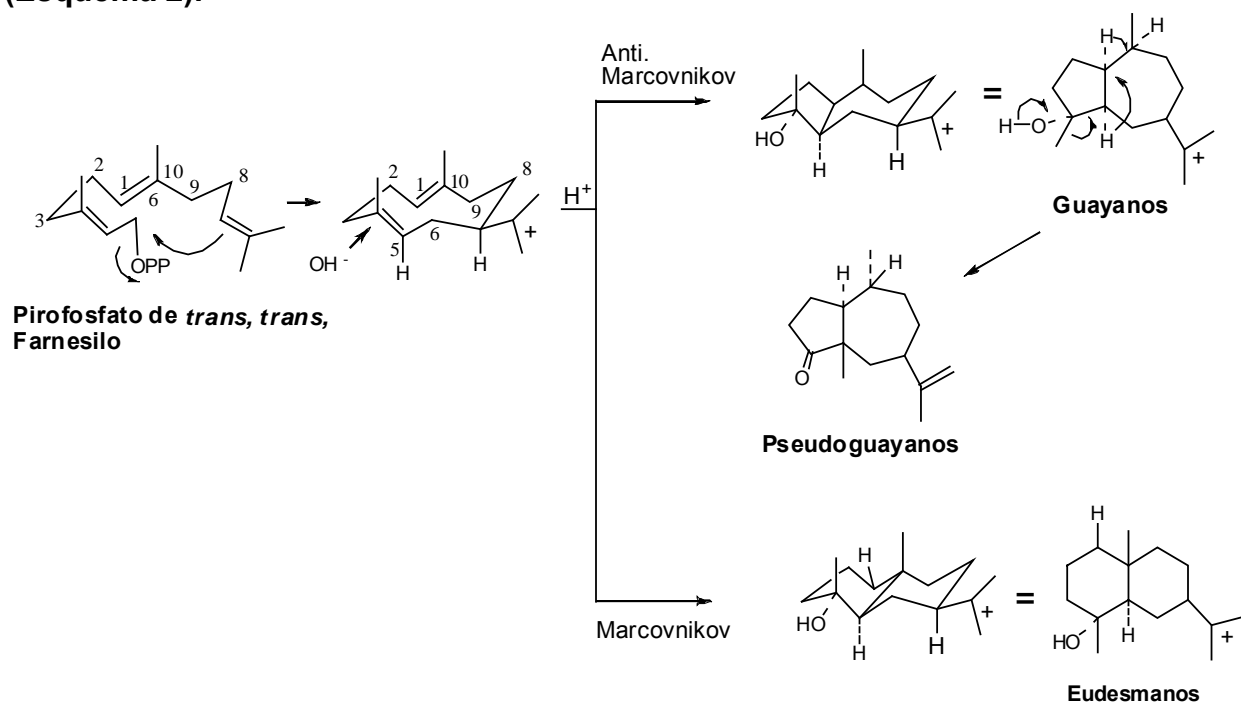


## ANTECEDENTES

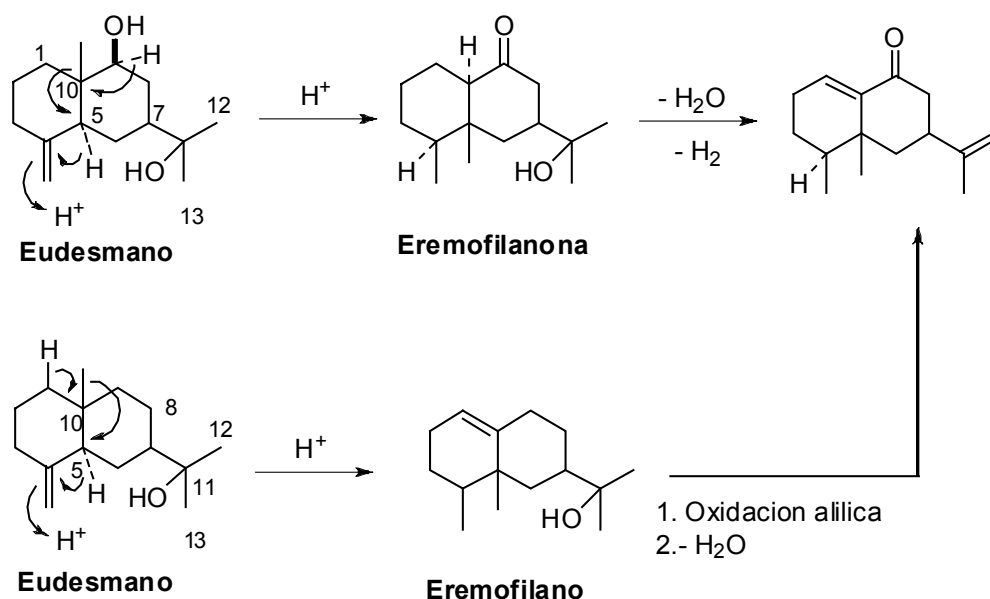
### Biogénesis de pseudoguayanos, eremofilanos y sus respectivas lactonas pseudoguayanólidas y eremofilanólidas:

Los pseudoguayanos y eremofilanos tienen como precursor al pirofosfato de farnesilo el cual se transforma en germacrano, siendo este último el que a través de una ciclización tipo Marcovnikov da origen a los eudesmanos, mientras que una ciclización tipo antimarcovnikov conlleva a la formación de los guayanos que a su vez pueden ser convertidos en pseudoguayanos [27] (**Esquema 1**).

Los eremofilanos, principales metabolitos secundarios de la subtribu *Tussilagininae*, son sesquiterpenos que contienen en su esqueleto básico un sistema de decalina y provienen de un precursor con esqueleto de eudesmano por medio de una migración Wagner Meerwein en la que un metilo migra de C-10 a C-5 [28] (**Esquema 2**).

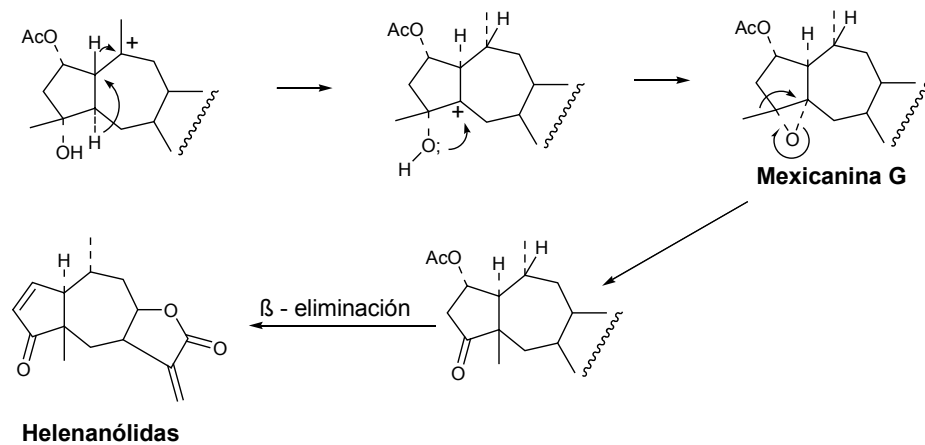


**Esquema 1: Biogénesis de eudesmanos y pseudoguayanos**



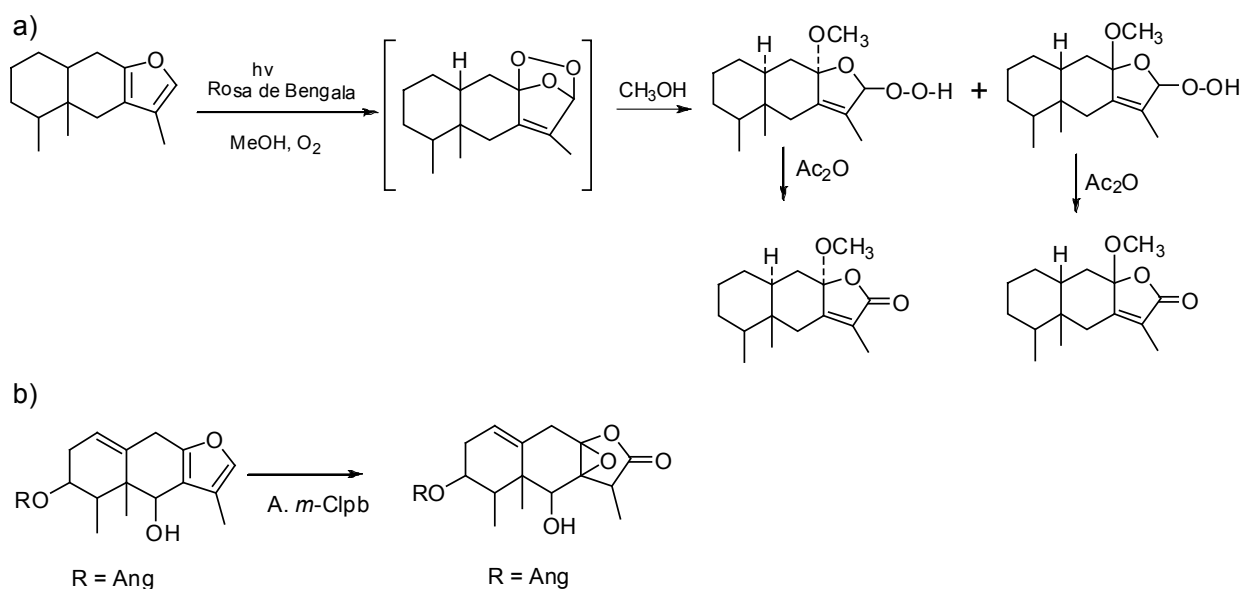
Esquema 2: Biogénesis de eremofilanos

Tanto pseudoguayanos como eremofilanos representan un paso biogénico avanzado y ambos pueden dar origen a lactonas de tipo pseudoguayanólida o eremofilanólida, respectivamente. En el caso de las pseudoguayanólidas se ha sugerido como su precursor a las guayanólidas siendo la mexicanina G un apoyo a esta teoría. Es la primera molécula de este tipo encontrada en *Helenium mexicanum* coexistiendo con pseudoguayanólidas [29] y su posible transformación se ejemplifica en el esquema 3.



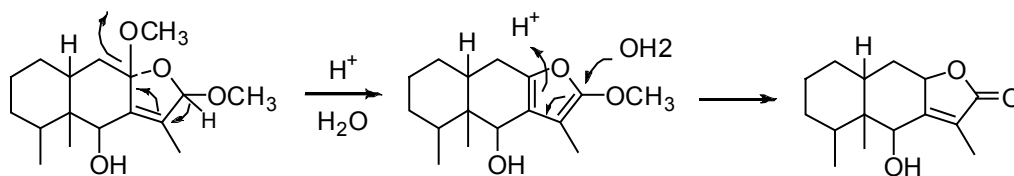
Esquema 3: Biogénesis de pseudoguayanólidas

En el caso de las eremofilanólidas, algunas se han obtenido químicamente por tratamiento de una eudesmanólida con ácido fórmico en acetona [30]; sin embargo, se ha sugerido que dichas moléculas derivan biogenéticamente de los furanoeremofilanos por auto-oxidación lo cual ha sido evidenciado a través de transformaciones químicas como foto-oxidación sensibilizada con rosa de bengala [31, 32-34] y el tratamiento con perácidos [35]. No obstante, hay que destacar que las eremofilanólidas con grupo ceto en el carbono 9 no han sido aisladas hasta ahora. En las foto-oxidaciones de furanos sensibilizadas por colorante en metanol, se ha demostrado que el mecanismo procede a través de un peróxido cíclico por la adición 1, 4 de oxígeno al anillo de furano seguida espontáneamente por adición de metanol dando lugar a dos derivados hidroperoxidos que por tratamiento con anhídrido acético se convierten en lactonas como se muestra en el esquema 4 [32, 36].



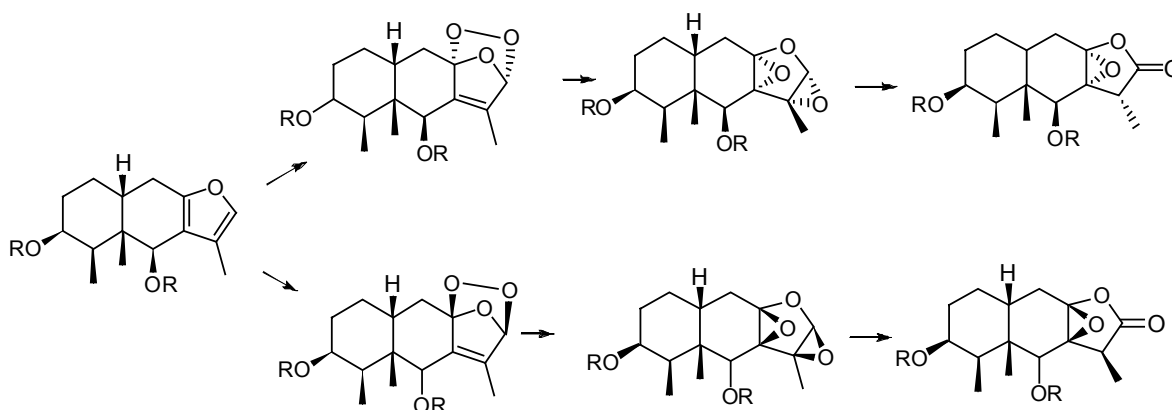
**Esquema 4: Formación de eremofilanólidas por vía del furano por foto-oxidación (a) y por tratamiento con perácidos (b).**

Por otra parte, debido a la presencia en *Petasites hybridus* [37] de dimetoxi-dihidrofuranoeremofilano, se ha sugerido que la presencia de peróxidos de metanol en los vegetales puede dar origen a las eremofilanólidas por oxidación de furanos; y esta conversión biogenética podría estar ocurriendo a través de un mecanismo como el mostrado en el esquema 5 [37, 38].



**Esquema 5: Mecanismo de formación de eremofilanólidas a partir de un dimetoxidihidrofuranoremofilano**

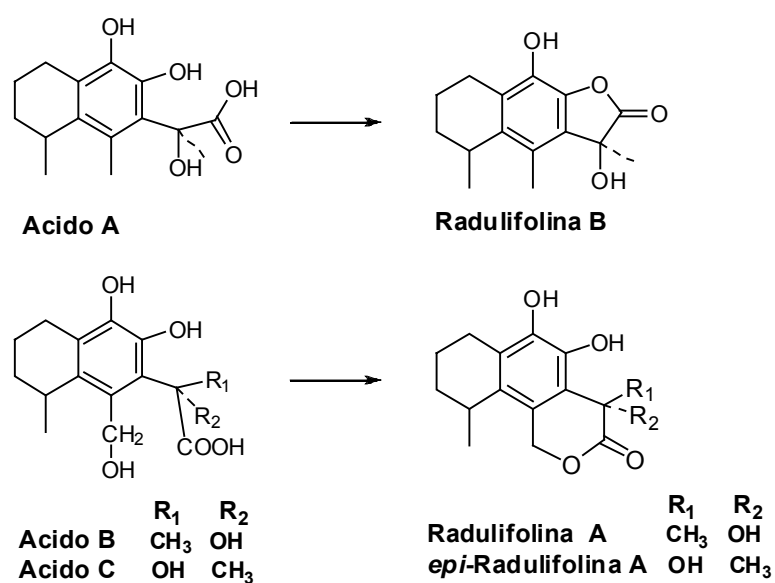
También se ha sugerido que en la naturaleza puede ocurrir un ozónido intermediario como en las reacciones de foto-oxidación, el cual sufre rearrreglos dando origen a diepóxidos y epoxilactonas como los compuestos aislados de *petasites japonicus* [39]. **(Esquema 6)**



**Esquema 6: Biogénesis propuesta para epoxieremofilanólidas**

La fácil conversión de furanoeremofilanos a lactonas favorece también la idea de que las eremofilanólidas no sean productos naturales sino más bien artefactos formados durante el proceso de aislamiento y purificación. No obstante, con frecuencia se encuentran series de metabolitos de complejidad biogénica ascendente cuyas transformaciones en el laboratorio constituyen una herramienta útil en el esclarecimiento de la biogénesis de eremofilanólidas. Es también notable que en plantas de la tribu *Senecioneae* se encuentran con mucha frecuencia 9-ceto furanoeremofilanos y nunca 9-cetoeremofilanólidas, lo que posiblemente se deba a que el grupo ceto desactive al furano; sin embargo, en *Psacalium radulifolium* se encontró la lactona radulifolina B [40] que contiene un grupo fenólico en C-9, pero esto nos lleva

a la consideración de que existe un mecanismo diferente para la formación de lactonas con esqueleto de eremofilano modificado que no requieren de la formación previa de un furano, y en este caso el paso previo sería la oxidación de C-12 a ácido tal como sucede en eudesmanólidas y guayanólidas. Esta idea se encuentra reforzada por la presencia en *Psacalium radulifolium* de las  $\delta$ -lactonas radulifolina A y *epi*-radulifolina A [40]. Tanto radulifolina B como las radulifolinas A podrían generarse por medio de ácidos precursores como los señalados en el esquema 7 (ácidos A-C), aunque hay que considerar que las radulifolinas son compuestos que representan un paso biogénético adelante de las eremofilanólidas.



Esquema 7: Posibles precursores de radulifolinas A, B y *epi*-radulifolina A

### Familia *Asteraceae*:

La familia *Compositae* o *Asteraceae* se divide en trece tribus y es una de las más diversas y ampliamente distribuidas de las angiospermas debido a su plasticidad genética, a su capacidad de distribución y a su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ecológicas [9]. También, se considera que su plasticidad química ha desempeñado un papel preponderante en su diversificación debido a la presencia de

metabolitos secundarios que han sido usados como mecanismos de defensa contra depredadores y/o competidores [41]. Varios autores estiman que la familia *Asteraceae* está constituida por 1300 géneros y entre 22000 y 30000 especies. En México, se reconocen 387 géneros y 2861 especies (**cuadro 1**) y eso aunado al hecho de que muchas son endémicas, hace de este país un lugar privilegiado por su riqueza en miembros de la familia; a pesar de que aproximadamente un 20 % de la flora mexicana aún no se conoce [9, 10].

**Cuadro 1: Número de géneros, especies y variedades o subespecies de asteráceas presentes en México y su distribución; tomado de [10]**

TRIBUS	GENEROS	ESPECIES	VARIEDADES O SUBESPECIES	TOTAL
Anthemideae	13	26	1	27
Astereae	38	338	42	380
Calenduleae	1	1	0	1
Cardueae	4	47	2	49
Eupatorieae	61	589	51	640
Heliantheae	171	1175	180	1355
Inuleae	15	70	3	73
Lactuceae	25	75	6	81
Liabeae	3	23	0	23
Mutisieae	8	90	11	101
Senecioneae	19	228	15	243
Tageteae	19	128	20	148
Vernonieae	10	71	11	82
<b>TOTAL</b>	<b>387</b>	<b>2861</b>	<b>342</b>	<b>3203</b>

**Química de la familia *Asteraceae*:**

Esta familia es muy distintiva en sus atributos químicos. Sin embargo, no hay un grupo particular de constituyentes restringido sólo a las compuestas y dado el gran número de especies que la conforman, aún no está disponible un cuadro completo de

su química. Varios metabolitos son característicos entre los cuales se destacan los sesquiterpenos, principalmente de tipo lactónico, que han sido encontrados en casi todas las tribus; Los ácidos grasos y derivados de poliacetileno han sido encontrados principalmente en material fresco, dado el carácter lábil que presentan; el poliisopreno o caucho aparece como el principal constituyente químico del látex en miembros individuales de las tribus *Cynareae*, *Vernonieae*, *Arctotideae* y *Mutiseae*. Adicionalmente, se encuentran también ésteres del ácido cafeíco, aceites esenciales, eremofilanos, alcaloides pirrolizidínicos, triterpenos, diterpenos, coumarinas, flavonoides y fructosanos tipo inulina entre otros [9, 42].

Cabe destacar que muchas de las sustancias elaboradas por la familia son tóxicas, razón por la cual no es común que las plantas de la familia *Compositae* se usen en la dieta humana o como forraje para animales, no obstante, debido a su gran variedad también podemos encontrar aunque en baja proporción plantas comestibles como la lechuga, el girasol y la alcachofa. Además, un gran número de ellas fueron usadas en el pasado y los son en la actualidad por sus propiedades curativas como es el caso de *Taraxacum officinale* conocida por ser diurética y de aquí su nombre pass-a-bed y pissenlit (en francés); la estornudadera, *Achillea ptarmica* que aparte de su olor inductor de estornudos, fue usada principalmente contra el dolor de muela [9], la árnica, la manzanilla, el ajeno y la santamaría, esta última usada para combatir la migraña.

### **Tribu *Senecioneae***

Esta tribu es considerada como un grupo monofilético. Para 1873, Bentham reconocía 4 subtribus que fueron: *Senecioninae*, *Liabinae*, *Tussilagininae* y *Othonninae*. Para 1977, se propuso dividir a la tribu *Senecioneae* en dos subtribus: *Senecioninae* y *Blennospermatinae* [9, 43]. La primera incluía las subtribus *Tussilagininae* y *Othonninae*; y la segunda incluía todos aquellos géneros con afinidades taxonómicas poco precisas. Actualmente, la tribu *Senecioneae* se divide en tres subtribus, *Senecioninae*, *Tussilagininae* y *Blenospermatininae*. Los géneros

*Pittocaulon* y *Roldana* que forman parte de este estudio se encuentran dentro de la subtribu *Tussilagininae* [44].

### Química de especies mexicanas de la tribu *Senecioneae*

Hasta el momento se han estudiado 44 especies mexicanas de la tribu *Senecioneae*, que hacen parte de las subtribus, *Senecioninae* y *Tussilagininae* [44]. A pesar de que por razones taxonómicas se han segregado del género *Senecio* especies que ahora forman parte de 11 nuevos géneros agrupados en la subtribu *Tussilagininae*, sus perfiles químicos mantienen una estrecha relación con dicho género por su contenido de eremofilanos y/o alcaloides pirrolizidínicos, muchos de los cuales y específicamente los alcaloides pirrolizidínicos con doble enlace en C-1, presentan carácter tóxico [14-16], siendo esto un motivo de precaución cuando se usan con fines medicinales, ya que es grande el número de plantas de la subtribu *Tussilagininae* usadas en medicina popular como es el caso de varias especies del género *Psacalium* agrupadas en el llamado complejo matarique [45].

### Morfología general de la tribu *Senecioneae*

La tribu *Senecioneae* está constituida por especies arbóreas, arbustivas, y herbáceas, con tallos lisos o variadamente pubescentes. Sus hojas pueden ser alternas y algunas veces opuestas o rosuladas, sésiles o pecioladas, aunque algunas veces peltadas.



## Género *Pittocaulon*

El género *Pittocaulon* (*Asteraceae*, *Senecioneae*, *Tussilagininae*) cuyo nombre proviene de sus tallos resinosos que los hacen distintivos; forman parte de un grupo monofilético entre los que se encuentran 5 géneros mexicanos estudiados: *Barkleyanthus*, *Psacalium*, *Robinsonecio*, *Roldana* y *Telanthophora*. El género *Pittocaulon* está constituido por 5 especies segregadas del género *Senecio* y confirmado recientemente por técnicas de filogenética molecular [46, 47] que corresponden a *P. bombycophole*, *P. filare*, *P. praecox*, *P. velatum* y *P. hintonni*, estas dos últimas con dos variedades, *P. velatum tzimolensis* y *P. hintonni cerrogranadensis* respectivamente. La mayoría de las especies son endémicas de México a excepción de *P. velatum* y *P. praecox* que son especies que crecen desde el norte de México (Zacatecas) hasta Centroamérica. Crecen en hábitats tropicales secos, a menudo rocosos y desfiladeros comprendidos entre los 300 a 3000 metros de elevación y sus especies son conocidas como palo loco en vista de que florecen muy al final de la estación seca, cuando todas las demás plantas están sufriendo de los efectos de la sequía [44].

### *Pittocaulon bombycophole*



Fig. 1: Ejemplar de *Pittocaulon bombycophole*

Esta especie está restringida a los estados de Michoacán y Guerrero y a una pequeña parte del Estado de México. A menudo crece sobre rocas como sucede con otras especies del género, pero tiene una mayor tendencia a crecer como elemento secundario en bosque tropical seco. Se caracteriza por ser una planta arbustiva de 1 a 3 m de altura y con tallo relativamente grueso y ramificado. Como en todas las especies que comprende el género, tienen pequeñas ramas con hojas durante la estación lluviosa las que pierden durante la sequía. Al igual que todas las especies de *Pittocaulon*, el tallo de *P. bombycophole* consiste de una corteza gruesa con un xilema relativamente grueso y en su interior una médula esponjosa que almacena cantidades variables de agua [48, 49] (fig. 1).

### *Pittocaulon velatum*



Fig. 2: Ejemplares de *P. velatum*

La especie *P. velatum* es la de mayor distribución después de *Pittocaulon praecox*; está ampliamente distribuida en la región central de México y se presenta en áreas rocosas y secas de Nayarit y Oaxaca. Es posible encontrarla también en los estados de Jalisco, Guerrero, México, Michoacán, Puebla y Zacatecas (fig. 2).

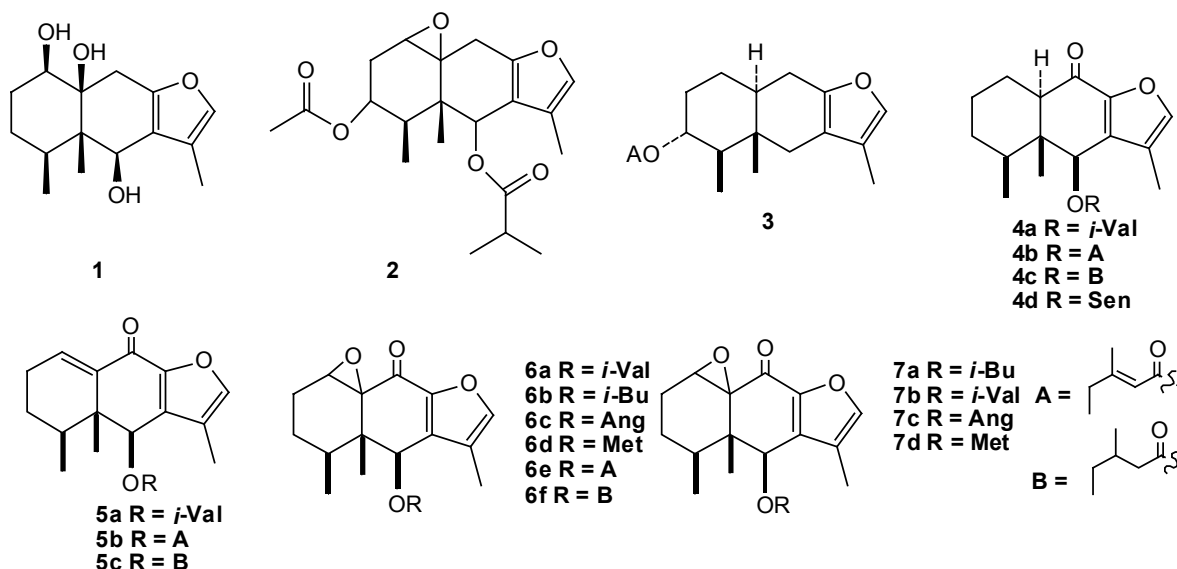
Esta especie que comprende también las variedades *P. velatum ssp* y *tzinolensis*, se encuentra sobre rocas y en los desfiladeros de los cañones en hábitats estacionalmente húmedos en diversos estados mexicanos y en un limitado número de localidades en Guatemala. Puede encontrarse como árboles hasta de 5 m de alto con

tallos hasta de 9 cm de diámetro los cuales presentan en la parte alta unas pubescencias café cortas y densas e inflorescencias con un tallo central más prominente conteniendo 6-7 flores de disco [46, 49].

### Química del género *pittocaulon*

Varios estudios químicos y morfológicos del género *Pittocaulon* se han enfocado básicamente a *Pittocaulon praecox*, por ser la especie más ampliamente distribuida, [49].

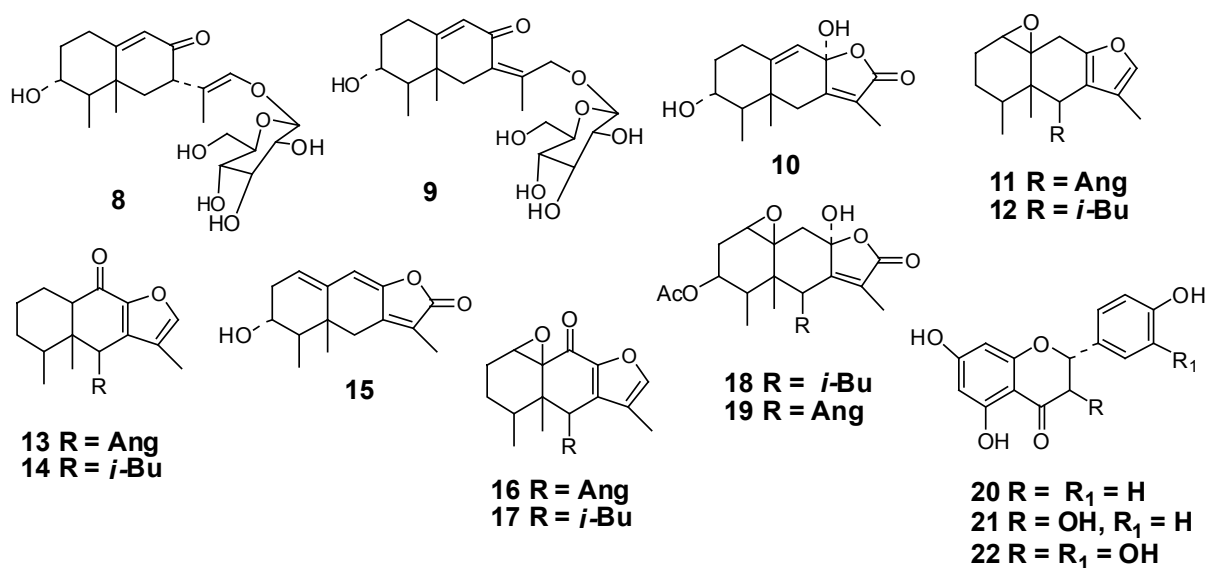
Como resultado del estudio químico de *P. praecox*, se han aislado a partir de extractos de raíz, el furanoeremofilano (1) al igual que la precoxilina A (2) obtenida a partir del estudio químico de flores [50].



Del mismo modo, otro reporte habla del aislamiento del furanoeremofilano **3** a partir de tallo y dos mezclas complejas que si bien no fueron purificadas si lograron ser identificadas como los furanoeremofilanos **4a – 4c** y **5a -5c**. En este mismo estudio, a partir de raíces se aisló el furanoeremofilano **4d** y una serie de mezclas de

eremofilanos identificados como **4a-c**, **5a-c**, **6a-f** y **7a-d** [51, 44]. Estos estudios muestran a los 9-ceto furanoeremofilanos como los principales constituyentes químicos de *P. praecox* con ausencia de eremofilanólidas.

Un estudio reciente, permitió identificar por cromatografía de gases-masas, los alcaloides pirrolizidínicos presentes en las 5 especies del género *Pittocaulon* [52], sin embargo, el estudio químico más reciente sobre dicho género lo constituye nuevamente *P. praecox* [53], pero en este caso, la especie provenía de un hábitat diferente al común, ya que siendo originario de ciudad universitaria, donde normalmente crece sobre roca, esta especie fue cultivada en suelo profundo en el municipio de Ozumba, del estado de México. En dicho estudio, se aislaron los compuestos **8-22** de los cuales, los glucósidos **8** y **9** se discuten en esta tesis como precursores de eremofilanólidas. Además, debido a la ausencia de estudios químicos sobre los metabolitos de tipo no alcaloideo de las especies *P. bombycophole* y *P. velatum*, aquí abordamos su estudio junto con el análisis de *Roldana reticulata*.



Principales metabolitos aislados de *P. praecox*

### Género *Roldana* [63]

En 1901, J. M., Greenman, hizo una monografía de las especies del género *Senecio* de América del Norte y de América Central, dividiendo al género en 22 secciones, entre las que se encontraban las secciones *Fruticossi* y *Palmatinervii*; esta última que para ese entonces no estaba completa, hasta que Gibson finalmente la completó en el año de 1968. Posteriormente, en el año de 1974, Robinson y Brettell reconocieron la sección *Palmatinervii* como un género distinto bajo el nombre de *Roldana*, e incluyeron en este nuevo género parte de la sección *Fruticossi*, todo el género *Pericalia* y la especie *Senecio heteroidea*. Por último, para el año de 1996, Barkley, Clark, y Funston perfilan al género *Roldana* como un género segregado de *Senecio* y lo ubican dentro de la subtribu *Tussilagininae* con 48 especies en total. Es de notar que el suelo mexicano es rico en especies del género *Roldana*, en donde se localizan sus dos centros de diversificación, uno en el eje volcánico y sierra madre del sur y el otro a lo largo de la sierra madre de Chiapas y cordillera centroamericana [54].

### Morfología general

Dentro del género *Roldana*, se pueden encontrar especies herbáceas ramificadas y perennes de 1 m o menos de alto. También las hay herbáceas erectas, de un sólo tallo o grupo de tallos débilmente leñosos hacia la base, que pueden crecer hasta 4 m de altura. También, se pueden encontrar arbustos o especies casi arbóreas con tallos ramificados, solitarios o agrupados. Por otro lado, la corteza de las especies arbóreas es lisa con algunas fisuras, y la de las especies arbustivas y herbáceas es roja o verde crema, con una textura que va desde lisa hasta vellosa. Se caracterizan por poseer un caudex típicamente vellosa y propagado de rizomas. Con excepción de *R. acutangula* y *R. hatwegii*, la forma es típicamente redonda. En términos de

citotaxonomía, se sabe que el género *Roldana* presenta un número elevado de cromosomas ( $X= 30$ ) [9].

### Distribución del género

Las especies de *Roldana* se distribuyen desde el extremo sur de Arizona y Nuevo México en los E.E.UU., hasta la cordillera de Talamanca en Panamá. Se encuentran en bosques de pino encino entre los 2000 y 4000 m de altitud aunque también han sido encontradas especies a alturas tan bajas como los 900 m. En México existen 8 regiones fisiogeográficas de distribución: Sierra Madre Occidental, Sierra M. Oriental, Sierra M. del Sur, Sierras de Chiapas y Guatemala, Meseta del Centro, Eje Neovolcánico, Llanura Costera del Sur del Golfo y Cordillera Centroamericana, [43]. (Figura 4)

### *Roldana reticulata*



Fig. 3: ejemplar de *Roldana reticulata*



FUENTE: Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, Dirección General de Geografía  
 Cartas Fisiográficas escala 1:1 000 000, México

**Sierra Madre Occidental:**

- R. barba-johannis*
- R. cordovensis*
- R. gentryi*\*
- R. gonzalezae*
- R. guadalajarensis*
- R. hartwegii*
- R. heracleifolia*
- R. mezquitlanensis*\*
- R. sessifolia*
- R. subpeltata*\*
- R. suffulta*

**Sierra Madre Oriental**

- R. albonervia*
- R. angulifolia*
- R. aschenborniana*
- R. barba-johannis*
- R. grimesii*
- R. hartwegii*
- R. heracleifolia*
- R. hirsuticaulis*
- R. lobata*
- R. albonervia*
- R. neogibsonii*\*
- R. petasitis*
- R. plataniifolia*
- R. reticulata***
- R. sessilifolia*
- R. sundbergii*\*
- R. metepeca*\*
- R. lineolata*
- Llanura Costera del sur del Golfo**
- R. schaffneri*

**Sierra Madre del Sur**

- R. angulifolia*
- R. anisophylla*\*
- R. lobata*
- R. barba-johannis*
- R. cordovensis*
- R. heteroidea*\*
- R. jurgensenii*
- R. langlassei*\*
- R. robinsoniana*
- R. aschenborniana*
- R. petasitis*
- R. pinetorum*\*
- R. reticulata*
- R. suffulta*
- R. schaffneri*
- R. tlacotepeca*\*
- R. subcymosa*
- R. lineolata*
- R. lanicaulis*
- R. mexicana*

**Sierra de Chiapas y**

- Guatemala**
- R. acutangula*
  - R. barba-johannis*
  - R. greenmanii*
  - R. heterogama*
  - R. jurgensenii*
  - R. petasitis*
  - R. schaffneri*
  - R. subcymosa*

**Eje Neovolcánico**

- R. albonervia*
- R. aliena*
- R. angulifolia*
- R. aschenborniana*
- R. cordovensis*
- R. chrismarii*
- R. chrismarii*
- R. robinsoniana*
- R. suffulta*
- R. galicana*
- R. glinophylla*
- R. gonzalezae*
- R. grimesii*
- R. hartwegii*
- R. heracleifolia*
- R. heracleifolia*
- R. schaffnerii*
- R. sessilifolia*
- R. lanicaulis*
- R. lineolata*
- R. lobata*
- R. mexicana*
- R. petasitis*

**Mesa del Centro**

- R. angulifolia*
- R. cordovensis*
- R. heracleifolia*
- R. hirsuticaulis*
- R. lineolata*
- R. pentafolia*\*
- R. acutangula*
- R. heterogama*
- R. jurgensenii*
- R. lanicaulis*
- R. petasitis*
- R. schaffneri*

**Cordillera C.A**

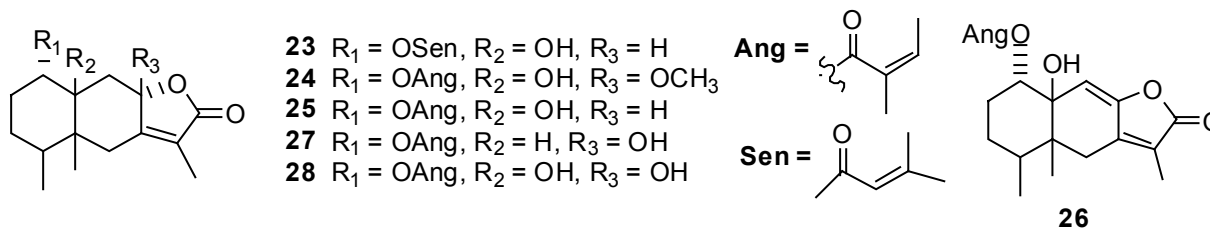
Figura 4: Distribución geográfica de las especies del género *Roldana* en México. Los asteriscos señalan especies endémicas [43].

La *Roldana reticulata* es una yerba perenne de un sólo tallo de 0.5 a 1 m de alto muy ramificada en la parte alta y se levanta a partir de un caudex leñoso. Su tallo es esencialmente glabro redondo, estriado y de un color que va desde crema a rojo. Se le considera como otro miembro del complejo pericalia. La característica más sobresaliente de *Roldana reticulata* son sus hojas que comienzan en la mitad del tallo, las primeras son caducas, van de ovadas a deltoides y están unidas al tallo por un peciolo relativamente corto (0.5-1.5 cm), tanto que cuando las hojas se comprimen con el tallo, este es encerrado dejándolo fuera de visión. Adicionalmente, la *Roldana reticulata* es una de las pocas especies en su género con una cima corimbiforme [43]. Está distribuida a través de todo México central y puede ser encontrada en los estados de Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro, y en el Distrito Federal, a elevaciones entre 2800 y 3600 m en bosques de pino roble. Sus flores son amarillas o anaranjadas, con un capítulo de 8-15 cm de largo y 5-10 mm de ancho en la base (Fig. 3), [43].

### Química del género *Roldana*

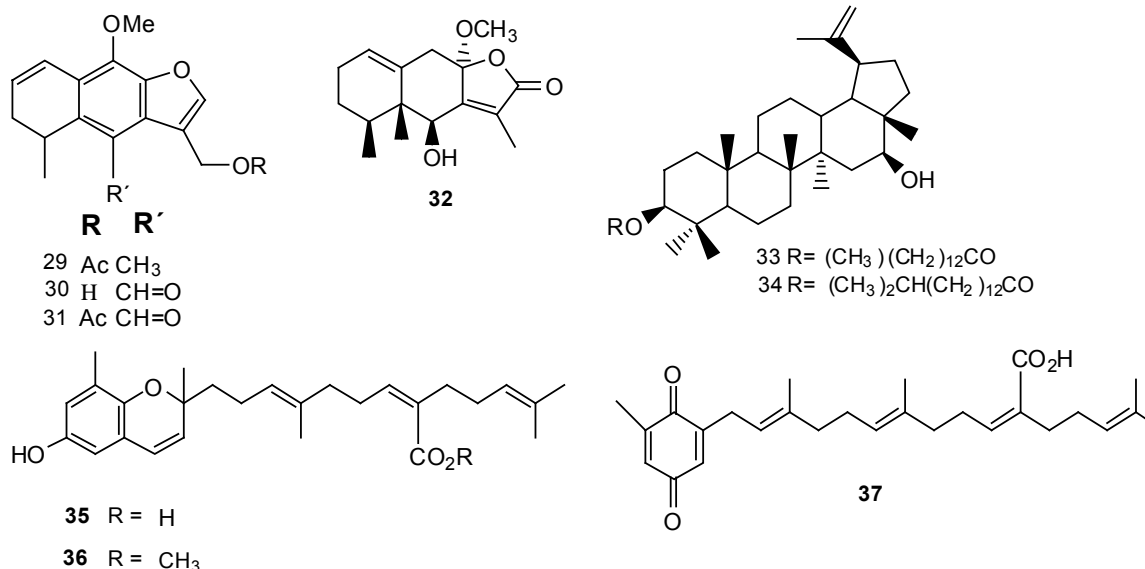
Con respecto a la química del género *Roldana*, se han estudiado ocho especies: *R. lobata*, *R. barba-johannis*, *R. aschenborniana*, *R. sessilifolia*, *R. heterogama*, *R. mexicana*, *R. ehrenbergiana* y *Roldana lineolata*. Todas ellas han mostrado presencia de sesquiterpenos del tipo eremofilano.

De raíz de *R. lobata* fueron aisladas las eremofilanólidas **23-28**, y los flavonoides hyperina y rutina; estos últimos obtenidos a partir del extracto metanólico de hoja [55].

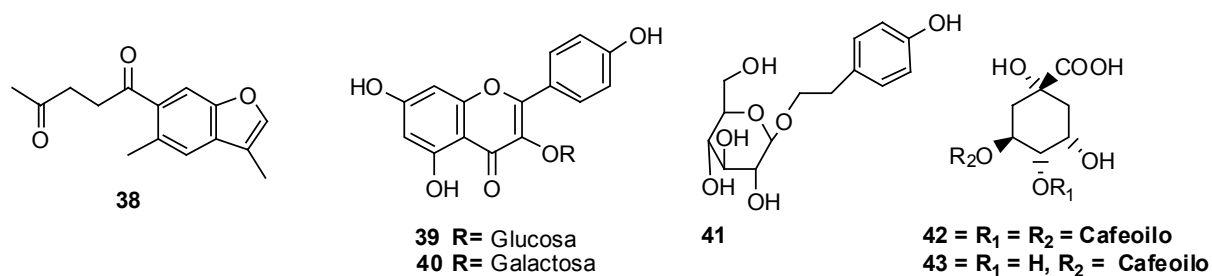




De la raíz de *R. barba-johannis*, se han descrito compuestos del tipo eremofilano (29-31) [56]. De la parte aérea se han aislado la lactona 32, los triterpenos 33 y 34 y sustancias antioxidantes estructuralmente relacionadas a la vitamina E, como los compuestos 35, 36, y la plastoquinona 37 [57], las cuales presentan actividad inhibitoria del crecimiento de insectos [58].

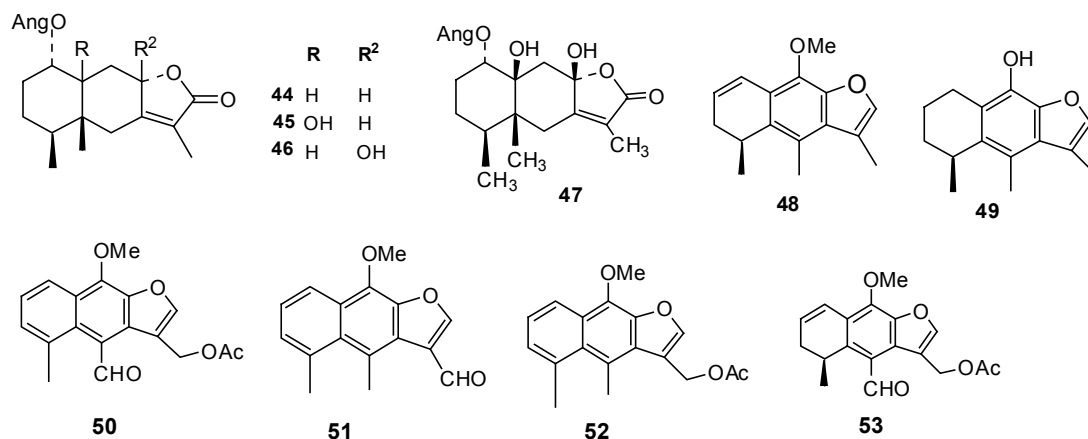


Del mismo modo, de la parte aérea de *Roldana aschenborniana*, se aislaron el seco-furanoeremofilano 38, los flavonoides astragalina (39) y trifolina (40); y los compuestos fenólicos salidrósido (41), ácido 3,4-dicafeoilquínico (42) y ácido clorogénico (43) [59].

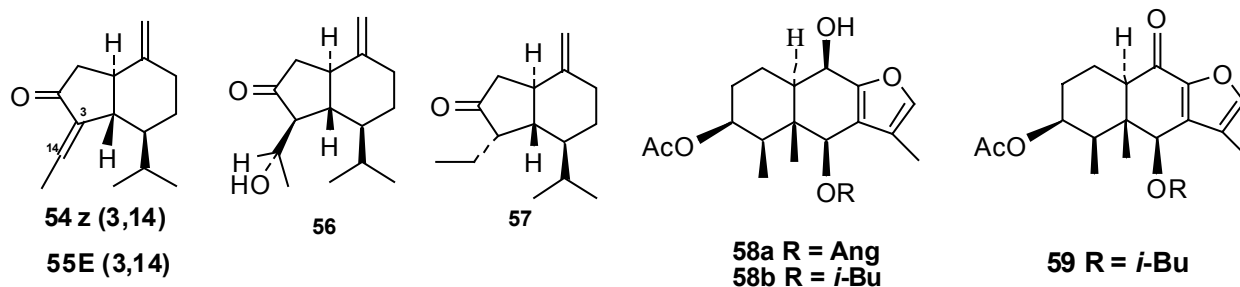


Moléculas del tipo eremofilano también se encontraron en extractos de raíz de *R. sessilifolia* y *R. heterogama*. Estos compuestos presentan en su estructura un grupo angeloxi (44-47), y algunos son derivados del cacalol, (48-53) [60-62].

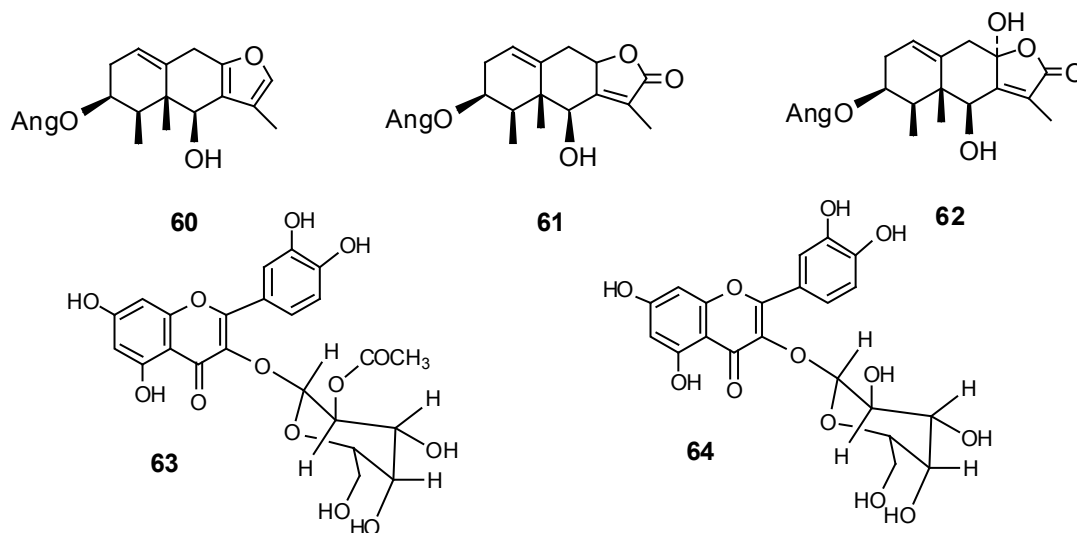
La *Roldana sessilifolia* es un miembro del complejo de plantas medicinales conocido como “cachana”, “cachane” o “cachani”, de cuyas raíces mezcladas con otras plantas se prepara un té que es usado en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la esterilidad femenina.



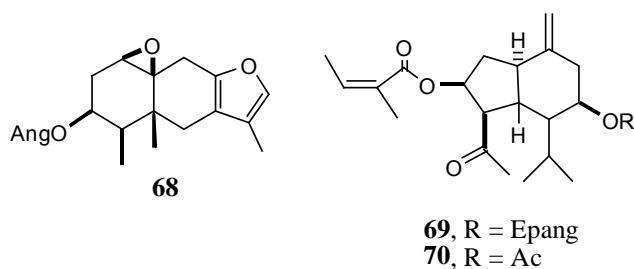
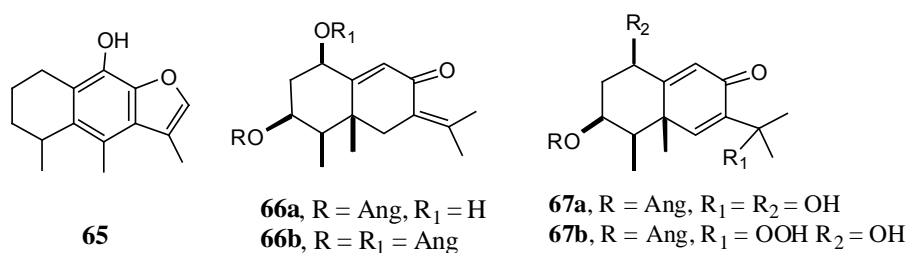
Dicho complejo, conocido también como “raíz de peyote”, es usado como una tintura que se aplica sobre el cuerpo para aliviar dolores reumáticos [60]; sin embargo, no hay estudios encaminados a establecer alguna relación de los compuestos de tipo eremofilanos presentes en sus raíces con dichas propiedades. Los reportes sobre *Roldana mexicana* indican la presencia en esta especie, de algunos derivados de oplopano ya antes encontrados en otras especies de la tribu *Senecioneae*. En este caso, los compuestos **54-56** se encontraron en raíz y parte aérea, y el compuesto **57**, solamente en la parte aérea [63, 64]. De *R. ehrenbergiana*, se han reportado entre otros metabolitos, los compuestos de tipo eremofilano **58** y **59** aislados de la raíz de la planta [65, 66].



De *Roldana lineolata* y a partir de la raíz fueron aislados el fueranoeremofilano **60** y las lactonas **61**, y **62** al igual que el glucósido de sitosterol. De la parte aérea se obtuvieron los flavonoides **63** y **64**, ésteres del calenduladiol y una mezcla de sitosterol-estigmasterol [67].



Otras especies mexicanas de la tribu *Senecioneae* pertenecientes a la subtribu *Tussilaginatae* de los grupos *Psacalium*, *Robinsonecio* y *Barkleyanthus*, tuvieron una composición química parecida, aunque en *Psacalium* hubo predominio de compuestos derivados del cacalol (**65**) [44].



El género *Robinsonecio* está constituido por las especies: *R. gerberifolius* y *R. porphyresthes* y hasta ahora sólo la primera se ha estudiado, encontrándose que es una especie donde predominan los derivados 8-cetoeremofilanos (**66a-b** y **67a-b**). De esta especie también se describieron un eremofilano (**68**) y dos derivados de oplopano (**69-70**) [21]. El género *Barkleyanthus* está constituido solamente por *B. salicifolius* y aquí se encontraron principalmente furanoeremofilanos, entre ellos un 9-ceto y un 6-ceto furanoeremofilano, este último poco común. Se encontró también, el alcaloide 7-angelilhebolidina [44].

## JUSTIFICACIÓN

La tribu *Senecioneae*, que a su vez se divide en las subtribus *Blenospermatinae*, *Senecioninae* y *Tussilagininae* [10], agrupa 3000 especies de las cuales existen en México 228 divididas en 19 géneros. Como parte de los estudios sistemáticos que se han venido realizando en el Instituto de Química de la UNAM sobre la química de la tribu *Senecioneae*, se han estudiado 44 especies muchas de ellas segregadas según sus características morfológicas del gran género *Senecio* y agrupadas dentro de las subtribus *Tussilagininae* y *Senecioninae*.

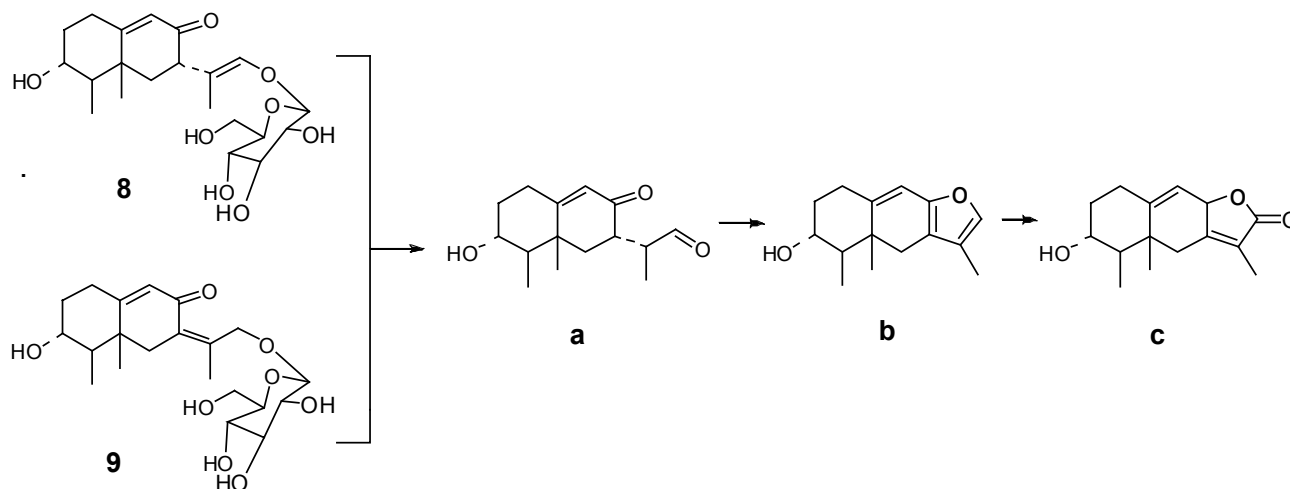
Considerando que los alcaloides pirrolizidínicos y los eremofilanos son los metabolitos secundarios más representativos del género *Senecio*, y que por razones taxonómicas muchas especies de este género han sido segregadas, entre ellas las tres que se analizaron en la presente tesis y que pertenecen a la tribu *Senecioneae* (géneros *Roldana* y *Pittocaulon*), el estudio químico de estas tres especies se sumará a los ya realizados en especies mexicanas de la tribu *Senecioneae* y representa una contribución al conocimiento de la química de dicha tribu permitiendo además explorar si existe correlación entre la segregación de especies basada en sus características morfológicas y su contenido de metabolitos secundarios. De manera adicional, la fácil conversión de furanoeremofilanos en lactonas por foto-oxidación o tratamiento con perácidos, y la frecuente aparición de metabolitos de complejidad biogénica ascendente, hacen atractivos los estudios que ayuden a aclarar los mecanismos biogénicos de diversos sesquiterpenos.

Considerando las propiedades citotóxicas de algunos eremofilanos [17-25]; su búsqueda y posterior evaluación en líneas celulares de cáncer es importante como contribución al descubrimiento de nuevas entidades químicas que pudieran representar un papel importante como antineoplásicos.

## HIPÓTESIS

Debido a la diversidad estructural de los metabolitos secundarios de la subtribu *Tussilagininae*, y la frecuente presencia en la subtribu de eremofilanos, moléculas de las que también se han descrito propiedades citotóxicas en líneas celulares derivadas de carcinomas humanos; el estudio químico de tres de sus especies permitirá obtener no solamente nuevas estructuras, sino también eremofilanos con dichas propiedades.

Con base en el estudio químico reciente de *P. praecox* donde fueron aislados por primera vez los glucósidos de eremofilano **8** y **9** junto con varias lactonas, se deduce que los primeros forman parte en la biogénesis de eremofilanólidas puesto que sus agliconas representan compuestos 1,4 dicarbonílicos (a) los cuales son precursores en la síntesis de furnoeremofilanos (b) y por ende de eremofilanólidas (c).



## OBJETIVOS

### Objetivos generales:

- Contribuir al estudio químico de la subtribu *Tussilagininae* mediante el estudio químico de tres de sus especies.
- Contribuir a la búsqueda de nuevas entidades químicas con actividad biológica en líneas celulares derivadas de carcinomas humanos.
- Contribuir al conocimiento de la biogénesis de lactonas sesquiterpénicas.

### Objetivos específicos:

- Aislar y purificar los principales metabolitos secundarios de *Roldana reticulata*, *Pittocaulon bombycophole* y *P. velatum*.
- Evaluar la actividad citotóxica de algunos metabolitos en las líneas celulares derivadas de carcinomas humanos U-251, PC-3, K-562, HCT-15, MCF-7 y SKLU-1.
- Mimetizar mediante reacciones químicas la conversión de los glucósidos **8** y **9** aislados de *P. praecox* en eremofilanólidas, y estudiar los mecanismos químicos involucrados mediante marcación con deuterio.

### PARTE EXPERIMENTAL

**Métodos de separación:** Los metabolitos secundarios y productos de reacción descritos en este trabajo fueron aislados mediante el uso de cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (kieselgel 60 G, 90 % < 45  $\mu\text{m}$ ); cromatografía en columna flash gel 60 (230-400 Macherey-Nagel); cromatografía en placa preparativa (CCP) en cromatoplacas ALUMGRAM SIL 100 G/UV<sub>254</sub> y 200 G/UV<sub>254</sub> de 20 x 20 cm; cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) llevada a cabo en un equipo Waters Delta Prep. 4000 apparatus, detector de absorbancia Waters 486,  $\lambda = 254$  y 290 nm, columna de fase reversa Luna 5  $\mu$  C<sub>18</sub> (2), 100 Å, 50 x 21.2 mm. Durante el proceso de fraccionamiento se realizó un monitoreo continuo por cromatografía en capa fina de sílice gel 60G UV<sub>254</sub> 20 x 20 cm y 0,25 mm de espesor, con observación directa por exposición a luz UV con dos longitudes de onda (254 nm y 365 nm) y posterior revelado por aspersion con una solución de sulfato cérico.

**Determinación de las constantes físicas y espectroscopia:** Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher- Johns serie No. 591 y las rotaciones ópticas en un polarímetro Jasco DIP-360. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN)- <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se obtuvieron en equipos Varian-unity y Bruker-Avance, a frecuencias de 200, 300 y 500 MHz para <sup>1</sup>H y 75.4 MHz para <sup>13</sup>C; en todos los casos los disolventes fueron deuterados y se usó el tetrametilsilano como referencia interna (TMS). Los espectros de IR se obtuvieron en equipos Perkin-Elmer 337 y Bruker Tensor 37 y los espectros de UV, en un equipo Shimadzu 160 U. Los espectros de masas por las técnicas de impacto electrónico y bombardeo con átomos rápidos (FAB) se obtuvieron en espectrómetros JEOL JMS-AX5505HA 70 eV y JEOL MS-SX1102A 10 KV, respectivamente. El análisis de difracción de rayos X se llevó a cabo en un difractómetro Bruker Smart apex CCD con grafito monocromado Mo K $\alpha$  radiation. Para el análisis de las muestras por citometría de flujo, se utilizó el citómetro Becton



Dickinson, San José, California y el software CellQuestPRO. Se analizaron en todos los casos 20.000 eventos.

### **Bioensayos de actividad biológica:**

**Cultivo celular para cernimiento primario y determinación de  $CI_{50}$ :** Las células se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO BRL, Life Technologies, Invitrogen California) suplementado con suero fetal bovino descomplementado al 10% (GIBCO BRL, Life Technologies, Invitrogen California) y antibiótico/antimicótico al 1% (10.000 u/ml penicilina, 10.000  $\mu$ g/ml estreptomina y 25  $\mu$ g/ml de anfotericina B; GIBCO Invitrogen Corporation NY), en atmósfera húmeda a 37 °C y  $CO_2$  al 5 %. En una placa de 96 pozos se colocaron 100  $\mu$ L de cada línea celular cuyas densidades celulares fueron las siguientes: 5 x 10<sup>4</sup> células/ml de K-562 y MCF-7, 7.5 x 10<sup>4</sup> células/ml de U-251, PC-3 y SKLU-1; y 10 x 10<sup>4</sup> células/ml de HCT-15.

**Cultivo celular para evaluar viabilidad celular, muerte celular y arresto de ciclo celular:** Se llevó a cabo en placas para cultivo de 24 pozos, 2.5 x10<sup>5</sup> células K-562/ml de medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO BRL, Life Technologies, Invitrogen California) suplementado con suero fetal bovino descomplementado al 10% (GIBCO BRL, Life Technologies, Invitrogen California) y antibiótico/antimicótico al 1% (10.000 U/ml penicilina, 10.000  $\mu$ g/ml de estreptomina y 25  $\mu$ g/ml de anfotericina B; GIBCO Invitrogen Corporation NY) en atmósfera húmeda a 37 °C y  $CO_2$  al 5 %. Las células se cultivaron sólo en RPMI (control), en RPMI con 0.1 % de DMSO (Testigo) o en RPMI conteniendo diferentes concentraciones del compuesto a evaluar (25, 50, 75 y 100  $\mu$ M). El compuesto evaluado (oplopano **74**) se disolvió en DMSO.

**Cernimiento primario:** Para el cernimiento primario fueron evaluadas las propiedades citotóxicas de los compuestos ensayados a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  en las líneas K-562, MCF-7, U-251, PC-3, HCT-15 y SKLU-1; utilizando el bioensayo de sulforrodamina B, un colorante de unión a proteínas que da una medida indirecta de la replicación celular [85]. Las soluciones de proteínas coloreadas fueron leídas en un lector de microplacas Elx 808, BIO-TEK Instruments, Inc a 515 nm.

**Determinación de la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ):** Se eligieron aquellos compuestos con base en el valor de inhibición de crecimiento celular más alto en el cernimiento primario y a la disponibilidad de muestra para llevar a cabo la determinación de la  $CI_{50}$  usando el mismo método colorimétrico de la sulforrodamina. Para cada molécula se graficó una curva dosis-respuesta y la  $CI_{50}$  se determinó mediante ecuaciones de regresión lineal de acuerdo al protocolo de la sulforrodamina B [68].

**Evaluación de la actividad antiinflamatoria:** Se llevó a cabo usando el modelo de edema inducido con acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) de acuerdo a la siguiente metodología: Se emplearon ratones macho de la cepa CD1 (25-30 g). Los animales ( $n = 4$ ) se colocaron en cajas de acrílico transparente a temperatura constante de  $22 \pm 2$  °C, con un fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad y con agua y alimento *ad libitum*. Bajo anestesia general con pentobarbital sódico (31.5 mg / kg intraperitoneal), en la oreja derecha se aplicaron tópicamente 10  $\mu\text{L}$  de una solución etanólica de TPA (0.25 mg/ml). Diez minutos después, en la misma oreja, se aplicaron 0.1, 0.31, 0.42, 0.56 y 1  $\mu\text{moles}$  del compuesto disuelto en 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla acetona: diclorometano. La oreja izquierda (control) recibió solamente 10  $\mu\text{L}$  de etanol y 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla de disolventes. Cuatro horas después de la aplicación del TPA, los animales se sacrificaron con  $\text{CO}_2$  y se tomó una muestra de 7 mm de diámetro de ambas orejas. Las muestras se pesaron y el incremento del peso de la muestra derecha con respecto a la izquierda representó el edema. La inhibición del edema se calculó con la siguiente

fórmula: % de inhibición =  $[(C - E) / C] \cdot 100$  en donde C representa el edema del grupo control (tratado con TPA) y E corresponde al edema de grupo experimental (TPA más el compuesto). Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguida de una prueba de Dunnett de comparación múltiple para aislar los grupos con diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ). Se usó indometacina como estándar de referencia disuelta en etanol (0.1, 0.31 y 1  $\mu\text{mol}$ ). La dosis inhibitoria media se calculó mediante una regresión lineal de los puntos significativos, graficando el logaritmo de la dosis contra % de inhibición del edema.

**Viabilidad celular:** Este experimento se hizo con base en los resultados obtenidos de actividad antiinflamatoria para el compuesto **74**, la disponibilidad de muestra y el acceso a las instalaciones de los laboratorios de ciencias biológicas del Instituto Politécnico Nacional, donde ya se tiene establecida una línea de investigación con células K-562.

Para determinar la viabilidad de células K-562 creciendo en presencia del oplopano **74**, se utilizó el método de exclusión con azul tripano, que consiste en teñir las células con este colorante el cual penetra solamente las membranas de aquellas células que se encuentren muertas, permitiendo así distinguir entre células vivas y muertas por observación al microscopio. Los ensayos se realizaron en placas para ELISA de fondo plano (Costar 3696, Cambridge MA), con  $5 \times 10^4$  células/pozo resuspendidas en 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado. El compuesto se ensayó por triplicado a las concentraciones de 25 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$ , 75 $\mu\text{M}$  y 100 $\mu\text{M}$ , durante 24 horas. Concluido el tiempo de incubación las células K-562 fueron diluidas 1:10 en una solución de azul tripano al 0.5 % en PBS 1X. Inmediatamente después, se colocó la muestra en la cámara de Neubauer que es un dispositivo utilizado para realizar el conteo de células en un medio líquido y por observación al microscopio óptico, realizándose a la par la determinación de la viabilidad celular.

**Determinación del tipo de muerte celular:** La determinación del tipo de muerte celular se llevó a cabo mediante citometría de flujo usando la técnica de anexina V-yoduro de propidio (PI) [69]. Se tomaron las células contenidas en cada pozo de un cultivo celular y se lavaron las células con buffer fosfato de sodio 1X (PBS 1X) dos veces consecutivas. Después de centrifugar y quitar el sobrenadante, se agregaron 100  $\mu$ l de buffer de unión y 3  $\mu$ l de Anexina V–isotiocianato de fluoresceína (FITC). Se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y después de este tiempo, se resuspendieron en 400  $\mu$ l de buffer de unión y se agregaron 3  $\mu$ l de PI. Las muestras se adquirieron y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA) utilizando el programa CellQuestPRO. En el diagrama de puntos de tamaño vs granularidad se delimitó la región y se adquirieron 10,000 eventos en dicha región por muestra. Los resultados se muestran en diagramas de puntos (Anexina V/ PI).

**Análisis del ciclo celular:** Se empleó la técnica de pico sub-G0 que además de evaluar la fragmentación celular por citometría de flujo, también permite evaluar la fase del ciclo celular en la que se encuentra cada célula y de este modo permite establecer si una molécula dada es capaz de inducir un arresto en alguna fase del ciclo celular, es decir, si tiene un efecto citostático.

Las células K-562 fueron cultivadas durante 24 horas en presencia y ausencia del oplopano **74** a las concentraciones de 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M y 100  $\mu$ M como esta descrito previamente. Posteriormente las células se fijaron con etanol al 70 % y se mantuvieron a una temperatura de -20 °C por 24 h; al cabo de ese tiempo, se lavaron, se resuspendieron en PBS 1X y se les adicionó 250  $\mu$ L de buffer de citratos-fosfatos (PC). Luego de incubarlas 3.5 min, se centrifugaron y posteriormente se decantaron para adicionar 400  $\mu$ l de solución de PI y RNAsa y ser analizadas en un citómetro de flujo (Becton Dickson), con el programa Cell Quest PRO, adquiriéndose 10,000 eventos.

## Estudio de la biogénesis de eremofilanólidas

**Obtención de las eremofilanólidas 98 y 99 a partir del glucósido 8:** 100 mg del compuesto **8** se trataron con 5 ml de HCl al 10 % y la reacción se llevó a cabo durante 30 minutos a 70 °C. Al cabo de ese tiempo, dicha reacción se detuvo por enfriamiento a 0 °C y adición de agua. Se extrajo con CHCl<sub>3</sub> seis veces consecutivas y la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad. Posteriormente, sucesivas cromatografías en columna flash mediante elución con AcOEt-hex 7:3 permitieron obtener 5.1 mg de la lactona **98** de estructura nueva como un sólido cristalino de pf. 140-142 °C (hexano-AcOEt) y 4.8 mg de la lactona **99** de estructura conocida de pf. 158-159 °C [31].

### 3 $\alpha$ -hidroxi-8H $\alpha$ , 10H $\alpha$ -eremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (**98**)

Sólido cristalino, (hexano-AcOEt); pf. 140-142 °C

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>, -157° (MeOH, c, 0.14)

UV, 220.4 nm (log  $\epsilon$  = 2.4)

IR, (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 3473.40, 1743.12, 1684.66

EM-IE, *m/z* (% int. rel.): 250 (15) M<sup>++</sup> 232 (20) [M – 18]<sup>+</sup>, 217 (33), [M – 18 – 15]<sup>+</sup>, 121 (100), 112 (60).

EMAR-FAB [M + 1]<sup>+</sup>, *m/z*: 251.1651 (observado), estimado para C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>O<sub>3</sub>, 251.1647

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  4.65 (1H, ddd, *J* = 11.0, 7.0, 1.5 Hz, H-8), 3.43 (1H, ddd, *J* = 10.5, 10.5, 5.0 Hz, H-3), 2.78 (1H, d, *J* = 13.5 Hz, H-6a), 2.16 (1H, ddd, *J* = 10.0, 7.0, 3.0 Hz, H-9a), 2.07 (1H, m, H-2a), 1.87 (1H, d, *J* = 13.5 Hz, H-6b), 1.80 (3H, t, *J* = 1.5 Hz, H-13), 1.5 (1H, m, H-1a), 1.52 (1H, m, H-10), 1.37 (1H, m, H-2b), 1.35 (1H, m, H-1b), 1.30 (1H, m, H-4), 1.25 (1H, ddd, *J* = 11.0, 11.0, 10.0 Hz, H-9b), 1.08 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-15), 0.60 (3H, s, H-14) [**Espectro 1a**].

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125. MHz)**  $\delta$  175.64(C, C-12), 160.2 (C, C-11), 122.8 (C, C-7), 80.0 (CH, C-8), 71.6 (CH, C-3), 50.14 (CH, C-4), 42.15 (CH, C-10), 40.5 (C, C-5), 38.7 (CH<sub>2</sub>, C-6), 35.95 (CH<sub>2</sub>, C-9), 35.63 (CH<sub>2</sub>, C-2), 26.88 (CH<sub>2</sub>, C-1), 11.6 (CH<sub>3</sub>, C-14), 10.6 (CH<sub>3</sub>, C-15), 8.10 (CH<sub>3</sub>, C-13) **[Espectro 1b]**.

**3 $\alpha$ -hidroxi-8H $\beta$ , 10H $\beta$ -eremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (99)**

**Cristales incoloros**, pf. 158-159 °C

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)**  $\delta$  4.65 (1H, ta,  $J$  = 5.0 Hz, H-8), 3.46 (1H, ddd,  $J$  = 10.5, 10.5, 5.0 Hz, H-3), 2.92 (1H, d,  $J$  = 14.1 Hz, H-6a), 2.13 (1H, m, H-9a), 1.88 (1H, d,  $J$  = 14.1 Hz, H-6b), 1.81 (3H, t,  $J$  = 1.5, H-13), 1.48 (1H, m, H-10), 1.32 (1H, m H-9b), 1.05 (3H, s, H-14), 1.0 (3H, d,  $J$  = 6.6 Hz, H-15) **[Espectro 2]**

**Obtención de las eremofilanólidas 98 y 99 a partir del glucósido 9:** El tratamiento de 100 mg del compuesto **9** en las mismas condiciones descritas para el glucósido **8** (pag.33) permitió obtener 6.4 mg de la lactona **98** y 5.2 mg de la lactona **99**.

**Obtención de las eremofilanólidas 98 y 99 a partir del glucósido 8 (un minuto de reacción):** 100 mg del glucósido **8** se disolvieron en 5 ml de HCl al 10 % y se dejaron reaccionar durante un minuto a reflujo. La reacción se detuvo enfriando a 0 °C y extrayendo inmediatamente con cloroformo seis veces consecutivas. Mediante sucesivas cromatografías en columna flash se obtuvieron 1.6 mg de la lactona **98** y 0.3 mg de la lactona **99**.

**Obtención del aldehído 100 a partir del glucósido 8:** 100 mg del glucósido **8** se trataron con 5 ml de HCl al 10 % y se hicieron reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente. Posterior a ese tiempo, se extrajo con cloroformo cinco veces

consecutivas y la fase orgánica se evaporó y se separó por cromatografía en placa delgada, obteniéndose 13.6 mg del aldehído **100**.

**3 $\alpha$ -hidroxi-eremofil-9-en-8-ona-7-(2-propanal) (100)**

**Aceite**,  $[\alpha]_D^{25}$ , + 69.0 (CHCl<sub>3</sub>, c, 0.21)

**UV**, 237.5 nm (log  $\epsilon$  = 2.98)

**IR (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>**: 3508, 1721, 1667.

**EM-IE, m/z (% int. rel.)**: 250(4), M<sup>+</sup>, 222 (65), [M – 28]<sup>+</sup>, 175 (40), 121 (40).

**EMAR-FAB [M + 1]<sup>+</sup>, m/z**: 251.1645 (observado), estimado para C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>O<sub>3</sub>, 251.1647

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**  $\delta$  9.76 (1H, s, H = 12), 5.78 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-9), 3.62(1H, ddd, *J* = 10.8, 10.8, 4.5 Hz, H-3), 3.01 (1H, ddd, *J* = 13.5, 3.6, 4.5 Hz, H-7), 2.61 (1H, cd, *J* = 7.2, 3.6 Hz, H-11), 2.32-252, (2H, m, H-1a, 1b), 2.18, (1H, m, H-2a), 1.98 (1H, dd, *J* = 13.5, 4.5 Hz, H-6a), 1.70 (3H, ta, *J* = 13.5 Hz, H-6b), 1.46 (1H, m, H-2b), 1.36 (1H, c, *J* = 6.9 Hz, H-4), 1.26 (3H, s, H-14), 1.18 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, H-13), 1.08 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, H- 15) **[Espectro 3a]**.

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.4 MHz)**  $\delta$  204.0 (C, C-12), 197.9 (C, C-8), 168.5 (C, C-10), 124.0 (CH, C-9), 70.9 (CH, C-3), 50.2 (CH, C-4), 45.4 (CH, C-7), 44.1 (CH<sub>2</sub>, C-6), 40.0 (C, C-5), 39.2 (CH, C-11), 35.0 (CH<sub>2</sub>, C-2), 31.0, (CH<sub>2</sub>, C-1), 17.3 (CH<sub>3</sub>, C-14), 10.4 (CH<sub>3</sub>, C-13), 9.6 (CH<sub>3</sub>, C-15) **[Espectro 3b]**.

**Obtención del compuesto 101a a partir del glucósido 9**: 100.3 mg del glucósido **9** se disolvieron en 5 ml de HCl al 10 % y se dejó reaccionar durante catorce horas a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla de reacción se extrajo con cloroformo y la fase acuosa se neutralizó con NaOH al 10 % secándose enseguida con aire. Una vez secada la fase acuosa se pesó obteniéndose 139 mg de los cuales a través de una separación por cromatografía en placa delgada dos veces consecutivas

se obtuvieron 1,4 mg de un compuesto que pudo ser identificado como el derivado **101a** más otros dos compuestos **101b** (6 mg) y **101c** (6mg) cuyas estructuras aún se desconocen.

**Compuesto 101a:**

**Aceite,  $[\alpha]_D^{25}$ , + 45.4** (MeOH, c, 0.11)

**UV**, 238.0 nm (log  $\epsilon$  = 3.98)

**IR (película)  $\text{cm}^{-1}$** : 3381, 1658.

**EM-IE,  $m/z$  (% int. rel.)**: 412 (2),  $[M]^+$ , 250(35),  $[M - 162]^+$ .

**RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)**  $\delta$  5.64 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz, H-9), 4.63 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, H-12a), 4.23 (1H, d,  $J = 8.0$ , H-1'), 3.86 (1H, dd,  $J = 12.0, 2.0$  Hz, H-6'a), 3.70 (1H, dd,  $J = 12.0, 5.0$  Hz, H-6'b), 3.56 (1H, m, H-3), 3.54 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, H-12b), 3.24-3.44 (4H, m, H-2'-5'), 2.66 (1H, dd,  $J = 13.5, 4.0$  Hz, H-6a), 2.56 (1H, dd,  $J = 13.5, 4.0$  Hz, H-7), 2.48 (1H, dddd,  $J = 14.5, 14.5, 5.0, 1.5$  Hz, H-1a), 2.31 (1H, ddd,  $J = 14.5, 4.5, 2.5$  Hz, H-1b), 2.14 (1H, m, H-2a), 1.54 (1H, t,  $J = 13.5$  Hz, H-6b), 1.38 (1H, m, H-2b), 1.30 (3H, s, H-13), 1.26 (1H, c,  $J = 6.5$  Hz, H-4), 1.16 (3H, s, H-14), 1.09, (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-15) **[Espectro 4a]**.

**RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125.71 MHz)**  $\delta$  200.7 (C, C-8), 171.3 (C, C-10), 125.2 (CH, C-9), 100.4 (CH, C-1'), 79.9 (CH, C-3), 75.8 ( $\text{CH}_2$ , C-12), 75.3 (CH, C-5'), 74.7 (C, C-11), 74.2 (CH, C-4'), 72.1 (CH, C-3'), 71.2 (CH, C-2'), 62.6 ( $\text{CH}_2$ , C-6'), 51.9 (CH, C-4), 51.2 (CH, C-7), 41.2 (C, C-5), 37.4, ( $\text{CH}_2$ , C-6), 36.3 ( $\text{CH}_2$ , C-2), 31.8 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 16.9, ( $\text{CH}_3$ , C-14), 15.0 ( $\text{CH}_3$ , C-13), 10.9 ( $\text{CH}_3$ , C-15) **[Espectro 4b]**.



**Obtención de la lactona deuterada 102 a partir del glucósido 9:** 200 mg del glucósido **9** se disolvieron en 10 ml de DCI al 10 % en D<sub>2</sub>O y se hizo reaccionar por treinta minutos a 70 °C. Una vez terminada la reacción se procedió a extraer 6 veces consecutivas con cloroformo y la fase orgánica se purificó por sucesivas cromatografías en columna flash dando lugar a 1.6 mg de la lactona deuterada **102**.

**Lactona 102 (C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>D<sub>6</sub>O<sub>3</sub>):**

**Aceite amarillo,**

**EM-IE *m/z*, (% int. rel.):** 256 (14.6), M<sup>+</sup>, 257(7.5), M<sup>+</sup>, 236 (3%), [M – D<sub>2</sub>O]<sup>++</sup>.

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)** δ 3.45 (1H, ddd, *J* = 11.0, 11.0, 4.5 Hz, H-3), 2.78 (1H, d, *J* = 13.5 Hz, H-6a), 2.05 (1H, dd, *J* = 12.5, 4.5 Hz, H-2a), 1.86 (1H, d, *J* = 13.5 Hz, H-6b), 1.80 (3H, s, H-13), 1.35 (1H, ta, *J* = 12.5 Hz, H-2b), 1.30 (1H, c, *J* = 6.5 Hz, H-4), 1.08 (1H, d, *J* = 6.5 Hz, H-15), 0.59 (1H, s, H-14) [**Espectro 5a**].

***Pittocaulon bombycophole* (material vegetal)**

*Pittocaulon bombycophole* se recolectó en la localidad de Taxco, en el estado de Guerrero. Fue identificado como *Pittocaulon bombycophole* por el Dr. José Luis Villaseñor Ríos y se depositó una muestra vegetal en el herbario del Instituto de Biología de la UNAM, (MEXU 1205019). Se separaron las cortezas de tallo (441 g) y de raíz las que se secaron a temperatura ambiente y se molieron por separado y enseguida cada una se sometió a un proceso de extracción con disolventes.

### Fraccionamiento de los extractos:

**Fraccionamiento del extracto hexánico de corteza de raíz:** El extracto hexánico de corteza de raíz (14.09 g) se redisolvió en una pequeña cantidad de hexano y se adsorbió en celita. Posteriormente se evaporó el solvente y el extracto ya adsorbido en celita se dispuso en una columna de vidrio empacada con 200 g de gel de sílice. Enseguida se inició la elución con un gradiente de polaridad creciente hexano-acetona. En total se obtuvieron 98 fracciones de las cuales las fracciones 15-22, eluidas con hexano-acetona (9:1) se reunieron y sometieron a una nueva cromatografía en columna abierta usando un sistema de elución en gradiente hexano-acetona para obtener esta vez dos fracciones A y B, las que se trabajaron por separado. De la fracción A (4.7 g) se obtuvieron por cristalización 9 mg de una mezcla de sitosterol-estigmasterol. Una cromatografía en columna abierta permitió obtener 143 mg de un aceite cuyo espectro de RMN-<sup>1</sup>H indicaba la presencia de dos ésteres. En vista de que no hubo manera de separarlos, se llevó a cabo una hidrólisis básica de 100 mg de dicha mezcla cuyos productos de reacción se separaron por cromatografía en placa delgada y mediante elución hexano-AcOEt (7:3). Dicho procedimiento permitió obtener 18 mg de cristales incoloros de pf. 230-231 °C que corresponden al furanoeremofilano de estructura conocida **78** [70] y 10.3 mg de otros cristales de pf. 174-176 °C que corresponden al furanoeremofilano también de estructura conocida **79** [70]. De fracciones posteriores a la 15/22 y luego de sucesivas cromatografías se obtuvo 1 g adicional de la mezcla de ambos compuestos.

### **3 $\alpha$ -hidroxi-10H $\alpha$ -furanoeremofilan-9-ona (78):**

#### **Cristales incoloros, pf. 230-231 °C (éter-hexano)**

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 300 MHz)**  $\delta$  7.53 (1H, d,  $J$  = 1.2 Hz, H-12), 3.34 (1H, ddd,  $J$  = 10.2, 10.2, 4.8 Hz, H-3), 2.83 (1H, d,  $J$  = 16.5 Hz, H-6a), 2.50 (1H, d,  $J$  = 16.8 Hz, H-6b), 2.42 (1H, dd,  $J$  = 11.7, 3.6 Hz, H-10 $\alpha$ ), 2.11 (1H, m, H-2a), 2.03 (1H, m, H-1a), 1.99 (3H, d,  $J$  = 1.2 Hz, H-13), 1.50 (1H, m, H-4), 1.34 (1H, m, H-1b), 1.26 (1H, m, H-2b), 1.06 (3H, d,  $J$  = 6.9 Hz, H-15), 0.74 (3H, s, H-14) [**Espectro 6a**].

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.4 MHz)**  $\delta$  186.7 (C, C-9), 147.6 (C, C-8), 145.15 (CH, C-12), 137.4 (C, C-7), 122.3 (C, C-11), 71.05 (CH, C-3), 55.8 (CH, C-10), 50.9 (CH, C-4), 44.3 (C, C-5), 36.01 (CH<sub>2</sub>, C-6), 35.84 (CH<sub>2</sub>, C-2), 20.5 (CH<sub>2</sub>, C-1), 13.2 (CH<sub>3</sub>, C-14), 10.8 (CH<sub>3</sub>, C-15), 7.6 (CH<sub>3</sub>, C-13) [**Espectro 6b**].

**3 $\alpha$ -hidroxi-10H $\beta$ -furanoeremofilan-9-ona (79):**

**Cristales incoloros, pf. 174-176 °C (Et<sub>2</sub>O-hexano)**

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**  $\delta$  7.38 (1H, c,  $J$  = 1.2 Hz, H-12), 3.55 (1H, ddd,  $J$  = 10.5, 10.5, 4.8 Hz, H-3), 3.00 (1H, d,  $J$  = 17.4 Hz, H-6a), 2.52 (1H, m, H-1a), 2.43 (1H, d,  $J$  = 17.4 Hz, H-6b), 2.38 (1H, dd,  $J$  = 11.4, 3.9 Hz, H-10 $\beta$ ), 2.0 (3H, d,  $J$  = 1.2 Hz, H-13), 1.90 (1H, m, H-2a), 1.67 (1H, m, H-1b), 1.52 (1H, cd,  $J$  = 6.9, 2.7 Hz, H-4), 1.34 (1H, m, H-2b), 1.15 (3H, s, H-14), 0.97 (3H, d,  $J$  = 6.9 Hz, H-15) [**Espectro 7a**].

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.4 MHz)**  $\delta$  186.4 (C, C-9), 144.8 (CH, C-12), 136.7 (C, C-8), 120.9 (C, C-7), 111.9 (C, C-11), 72.3 (CH, C-3), 53.9 (CH, C-10), 42.9 (C, C-5), 40.5 (C, C-4), 32.0 (CH<sub>2</sub>, C-2), 31.8 (CH<sub>2</sub>, C-6), 23.2 (CH<sub>3</sub>, C-14), 19.4 (CH<sub>2</sub>, C-1), 11.6 (CH<sub>3</sub>, C-15), 7.6 (CH<sub>3</sub>, C-13) [**Espectro 7b**].

La cromatografía en columna abierta de la fracción B (1.24 g), mediante elución con un sistema de polaridad creciente hexano-acetona, seguida por una cromatografía en capa fina (TLC) eluida con hexano-AcOEt (9:1) permitió obtener 110 mg de una mezcla de la cual se aislaron por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) y mediante elución CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (60:40), 4 mg de un aceite que se identificó como el furanoeremofilano de estructura nueva **71**:

**6 $\beta$ -Acetiloxi-3 $\alpha$ -(3-metil)-pentanoiloxifuranoeremofilan-10H $\alpha$ -9-ona (71):**

**Aceite amarillo pálido,  $[\alpha]_D^{20}$  - 98 (MeOH, c 0.12).**

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 278 (4.26) nm.

IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{max}$  1731, 1688, 792 cm<sup>-1</sup>.

EM-IE  $m/z$  (% int. rel.) = 404 (2), M<sup>+</sup>, 344 (18), [M - 60]<sup>+</sup>, 288 (20), 246 (100), 228 (50).

EMAR-FAB [M + 1]<sup>+</sup>  $m/z$  405.2271 (observado), estimado para C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>O<sub>6</sub>, 405.2277.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  7.36 (1H, c,  $J$  = 1.0 Hz, H-12), 6.39 (1H, s, H-6), 4.61 (1H, ddd,  $J$  = 11.0, 11.0, 5.0 Hz, H-3), 2.44 (1H, dd,  $J$  = 12.5, 3.5, Hz, H-10), 2.29 (1H, ddd,  $J$  = 14.0, 14.0, 6.5 Hz, H-2'a), 2.27 (1H, m, H-1a), 2.19 (3H, s, OAc), 2.16 (1H, m, H-2a), 2.10 (1H, ddd,  $J$  = 14.0, 14.0, 6.5 Hz, H-2'b), 1.94 (1H, m, H-4), 1.92 (3H, d,  $J$  = 1.0 Hz, H-13), 1.88 (1H, m, H-3'), 1.60 (1H, m, H-1b), 1.36 (1H, m, H-4'a), 1.31 (1H, m, H-2b), 1.26 (1H, m, H-4'b), 0.99 (3H, s, H-14), 0.93 (3H, d,  $J$  = 6.5 Hz, H-6'), 0.91 (3H, d,  $J$  = 6.7 Hz, H-15), 0.90 (3H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H-5') [Espectro 8a].

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.4 MHz)  $\delta$  185.2 (C, C-9), 172.9 (C, C-1'), 170.8 (C, OAc), 146.5 (C, C-7), 145.4 (CH, C-12), 134.7 (C, C-8), 120.8 (C, C-11), 75.3 (CH, C-6), 73.7 (CH, C-3), 54.3 (CH, C-10), 50.0 (C, C-5), 45.9 (CH, C-4), 41.8 (CH<sub>2</sub>, C-2'), 32.0 (CH, C-3'), 30.6, (CH<sub>2</sub>, C-2), 29.4 (CH<sub>2</sub>, C-4'), 21.5 (CH<sub>3</sub>, OAc), 19.2 (CH<sub>3</sub>, C-6'), 18.9 (CH<sub>2</sub>, C-1), 12.0 (CH<sub>3</sub>, C-15), 11.2 (CH<sub>3</sub>, C-5'), 9.0 (CH<sub>3</sub>, C-14), 8.5 (CH<sub>3</sub>, C-13) [Espectro 8b].

De las fracciones 27-31 eluidas con hexano- acetona 9:1 se obtuvieron 94 mg de unos cristales impuros que posteriormente se separaron por medio de una cromatografía en placa delgada mediante elución con hexano-acetona (8:2), permitiendo obtener 78 mg de cristales en forma de aguja de pf. 130-133 °C (Et<sub>2</sub>O-hexano), identificado como el oplopano de estructura nueva **74** y 11 mg de cristales incoloros de pf.177-179 °C (Et<sub>2</sub>O-hexano), identificado como la ligujapona **80** [71]. Las fracciones 32-39 eluidas con hexano-acetona (9:1), se cromatografiaron en una nueva columna utilizando un gradiente de polaridad creciente hexano-acetona y las fracciones 8-10 eluidas con hexano-acetona (9:1) permitieron obtener por cristalización (Et<sub>2</sub>O-hexano) otros 106 mg del compuesto **74**.

**8-(2-metil)-butanoiloxi-9-(3-metil)-pent-2-enoiloxi-10(14)-oplopen-3-ona (74):**

**Agujas**, pf 130-133 °C, (Et<sub>2</sub>O-hexano),  $[\alpha]_D^{20} + 15.4$  (CHCl<sub>3</sub>, c 2.3,).

**UV (MeOH)**  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 220 (4.32) nm.

**IR (KBr)**  $\nu_{max}$  1740, 1717, 1651 cm<sup>-1</sup>.

**EM-IE  $m/z$  (% int. rel.)** = 504 (2), M<sup>+</sup>, 403 (5), 246 (5), 228 (8), 97 (100), 57 (24).

**EMAR-FAB [M + 1]<sup>+</sup>  $m/z$** : 505.2795 (observado), estimado para C<sub>28</sub>H<sub>41</sub>O<sub>8</sub>, 505.2801.

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**  $\delta$  5.80 (1H, d,  $J = 3.3$  Hz, H-9), 5.64 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-2"), 5.29 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz, H-14a), 5.16 (1H, m, H-4), 5.15 (1H, m, H-8), 4.92 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz, H-14b), 2.81 (1H, d,  $J = 3.9$  Hz, H-12a), 2.69 (1H, d,  $J = 3.9$  Hz, H-12b), 2.64 (1H, brd,  $J = 11.5$  Hz, H-5), 2.5 (1H, ddd,  $J = 17.0, 7.0, 1.0$  Hz, H-1), 2.42 (1H, dd,  $J = 14.0, 7.0$  Hz, H-2a), 2.42 (1H, m, H-2'), 2.18 (1H, m, H-2b), 2.18 (2H, m, H-4"), 2.13 (3H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-6"), 2.11 (3H, s, OAc), 2.01 (1H, m, H-7), 1.76 (1H, ddc,  $J = 14.3, 7.0, 7.0$  Hz, H-3'a), 1.53 (1H, brdd,  $J = 11.5, 11.5$  Hz, H-6), 1.48 (1H, ddc,  $J = 14.3, 7.0, 7.0$  Hz, H-3'b), 1.25 (3H, s, H-13), 1.23 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-15), 1.17 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-5'), 1.07 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-5"), 0.91 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-4') [**Espectro 9a**].

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.4 MHz)**:  $\delta$  212.6 (C, C- 3), 176.1 (C, C-1'), 170.7 (C, OAc), 165.3 (C, C- 1"), 163.1 (C, C-3"), 142.3 (C, C-10), 113.9 (CH, C-2"), 113.0 (CH<sub>2</sub>, C-14), 72.8 (CH, C-8), 72.2 (CH, C-9), 68.6 (CH, C-4), 56.4 (CH, C-5), 54.9 (C, C-11), 52.8 (CH<sub>2</sub>, C-12), 48.8 (CH, C-7), 45.8 (CH, C-6), 41.8 (CH<sub>2</sub>, C-2), 41.1 (CH, C-2'), 40.9 (CH<sub>2</sub>, C-1), 33.8 (CH<sub>2</sub>, C-4"), 26.3 (CH<sub>2</sub>, C-3'), 21.3 (CH<sub>3</sub>, OAc), 18.9 (CH<sub>3</sub>, C-6"), 16.2 (CH<sub>3</sub>, C-5'), 15.9 (CH<sub>3</sub>, C-13), 15.1 (CH<sub>3</sub>, C-15), 11.8 (CH<sub>3</sub>, C- 5"), 11.6 (CH<sub>3</sub>, C- 4') [**Espectro 9b**].

**Ligujapona (80):**

**Cristales incoloros**, pf. 177-179 (éter-hexano),

**IR (Nujol)**  $\nu_{max}$  3082, 1647, 901 cm<sup>-1</sup>.

EM-IE  $m/z$  (% int. rel.) = 216 (12),  $M^+$ , 174 (100), 159 (46).

RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.88 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-1), 6.78 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2), 4.86 (2H, m, H-12), 3.10 (1H, dd,  $J = 3.0, 13.0$  Hz, H-6a), 2.77 (1H, m, H-7), 2.53 (1H, dd,  $J = 3.0, 13.0$  Hz, H-6b), 2.21 (3H, s, H-14), 1.83 (3H, dd,  $J = 0.9, 1.5$  Hz, H-13).

RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 75.4 MHz):  $\delta$  197.9 (C, C-9), 158.5 (C, C-3), 146.9 (C, C-11), 144.4 (C, C-5), 126.9 (CH, C-1), 126.0 (C, C-10), 121.5 (C, C-4), 113.8 (CH, C-2), 110.8 ( $CH_2$ , C-12), 43.1 ( $CH_2$ , C-8), 41.7 (CH, C-7), 32.3 ( $CH_2$ , C-6), 20.6 ( $CH_3$ , C-13), 11.1 ( $CH_3$ , C-14).

**Fraccionamiento del extracto metanólico de corteza de raíz:** El extracto metanólico de la corteza de raíz (30.32 g), se redisolvió en una pequeña cantidad de metanol, aunque una fracción que parecía una resina fue insoluble (14.3 g). Esta fracción se disolvió en agua, se liofilizó y posteriormente se le hizo una prueba de Drangendorf para alcaloides la cual fue positiva. A dicha fracción se le denominó fracción alcaloidea del extracto metanólico. El extracto restante (11 grs) se adsorbió en celita y una vez evaporado el disolvente se sometió a un proceso de separación por cromatografía en columna abierta, empacada con gel de sílice y mediante elusión con un sistema de polaridad creciente hexano-acetona. Se obtuvieron en total 90 fracciones de 300 ml c/u y a partir de las fracciones reunidas 28-31 y eluidas con hexano-acetona (9:1) se obtuvieron 40 mg del compuesto **80**. El análisis cromatográfico de fracciones posteriores permitieron la obtención de otros 60 mg del mismo compuesto, luego de cristalizar.

A partir de la fracción 10 eluida con hexano-acetona 4:1 y a través de sucesivas cromatografías en columna y placa delgada se obtuvieron 3 mg del compuesto eudesma-4, 11-dien-1 $\beta$ -ol de estructura nueva **75**. De la fracción 11 eluida con hexano-acetona (4:1) se obtuvieron por cristalización 1.3 mg de una mezcla de sitosterol-estigmasterol la cual se identificó por comparación con el espectro de una mezcla original obtenida previamente en el laboratorio.

**Eudesma-4, 11-dien-1 $\beta$ -ol (75):**

**Aceite**

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)**  $\delta$  4.72 (2H, cd,  $J = 4.5, 1.5$  Hz, H-12), 3.48 (1H, dd,  $J = 10.0, 6.5$  Hz, H-1), 2.53 (1H, ddd,  $J = 10.5, 2.0, 2.0$  Hz, H-6a), 2.16 (1H, m, H-3a), 2.03 (1H, dt,  $J = 13.0, 3.5$  Hz, H-9a), 1.97 (1H, m, H-3b), 1.83 (1H, da,  $J = 10.5$  Hz, H-6b), 1.83 (1H, m, H-7), 1.76 (3H, d,  $J = 1.5$  Hz, H-13), 1.70 (1H, m, H-2a), 1.70 (1H, m, H-8a), 1.59 (3H, s, H-15), 1.52 (1H, m, H-2b), 1.53 (1H, m, H-8b), 1.20 (1H, ddd,  $J = 13.5, 4.0, 4.0$  Hz, H-9b), 1.03 (3H, d,  $J = 0.5$  Hz, H-14) **[Espectro 10]**.

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.4 MHz):**  $\delta$  149 (C, C-11), 134 (C, C-5), 122 (C, C-4), 108.3 (CH<sub>2</sub>, C-12), 78.4 (CH, C-1), 46.1 (CH, C-7), 39.8 (C, C-10), 38.8 (CH<sub>2</sub>, C-9), 31.9 (CH<sub>2</sub>, C-3), 30.9 (CH<sub>2</sub>, C-6), 27.2 (CH<sub>2</sub>, C-8), 27.1 (CH<sub>2</sub>, C-2), 20.8 (CH<sub>3</sub>, C-13), 19.0 (CH<sub>3</sub>, C-15), 17.3 (CH<sub>3</sub>, C-14).

**Residuo alcaloideo del extracto metanólico de raíz:** Este residuo (14.3 g), se disolvió en 165 ml de agua destilada y posteriormente se acidificó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2.5 % hasta pH = 2, se redujo con 1.47 g de Zn dejando en agitación durante la noche. Posteriormente, se extrajo con CHCl<sub>3</sub> y seguidamente la fase acuosa se basificó hasta pH = 10 con NH<sub>4</sub>OH. Luego de extraer esta solución varias veces consecutivas con CHCl<sub>3</sub> se obtuvieron 300 mg de un aceite amarillo consistente en una mezcla de alcaloides. Sucesivas cromatografías en columna abierta y placa delgada permitieron obtener cuatro mezclas muy inestables. Como consecuencia de esto, a una pequeña muestra de la mezcla original se le realizó un análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas mediante el cual se pudieron identificar los alcaloides 1-hidroxi-9-valerianoilplatinecina (**82**), 1-hidroxi-7-valerianoilpirrolizidina (**83**) y neopetasitenina (**84**) por comparación de sus patrones de fragmentación con los reportados en la literatura [48].

**Fraccionamiento del extracto hexánico de corteza de tallo:** El extracto hexánico de tallo (33.3 g), se purificó por cromatografía en columna abierta y empacada con gel de sílice y eluida con un sistema de polaridad creciente hexano-acetona. Las fracciones 30-34 eluidas con hexano-acetona (9:1) se reunieron (11.8 g) y 1 g de estas se sometieron a una cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) mediante elución isocrática con MeOH-H<sub>2</sub>O (8:2) para producir 130 mg del nuevo furanoeremofilano **72**, además de 47 mg y 12.4 mg de los compuestos de estructura conocida **76** [72,73] y **77** [74] respectivamente.

**3 $\alpha$ -(3-metil)-pentanoiloxifuranoeremofil-10H $\alpha$ -9-ona (72):**

**Cristales incoloros;** pf 87-90 °C,  $[\alpha]_D^{20}$  - 32 (CHCl<sub>3</sub>, c 0.25).

**UV (MeOH)**  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 280 (4.02) nm;

**IR (CHCl<sub>3</sub>)**  $\nu_{max}$  1728, 1679, 806 cm<sup>-1</sup>.

**EM-IE  $m/z$  (% int. rel.)** = 346 (20), M<sup>+</sup>, 247 (3), 230 (82), 215 (70), 175 (41), 162 (100).

**EMAR-FAB  $m/z$  [M + 1]<sup>+</sup>**, 347.2221 (Observado), estimado para C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>O<sub>4</sub>, 347.2222.

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**  $\delta$  7.36 (1H, c  $J$  = 1.2 Hz, H-12), 4.74 (1H, ddd,  $J$  = 10.8, 10.8, 4.5 Hz, H-3), 2.72 (1H, d,  $J$  = 16.2 Hz, H-6a), 2.50 (1H, d,  $J$  = 16.2 Hz, H-6b), 2.41 (d, 1H, dd,  $J$  = 12.0, 3.6 Hz, H-10), 2.30 (1H, dd,  $J$  = 14.4, 6.0 Hz, H-2'a), 2.24 (1H, m, H-1a), 2.20 (1H, m, H-2a), 2.12 (1H, dd,  $J$  = 14.4, 8.1 Hz, H-2'b), 1.99 (3H, d,  $J$  = 1.2 Hz, H-13), 1.90 (1H, oct,  $J$  = 6.6 Hz, H-3'), 1.76 (1H, dc,  $J$  = 10.8, 6.6 Hz H-4), 1.55 (1H, m, H-1b), 1.39 (1H, m, H-4'a), 1.32 (1H, m, H-2b), 1.27 (1H, m, H-4'b), 0.97 (3H, d,  $J$  = 6.6 Hz, H-15), 0.95 (3H, d,  $J$  = 6.6 Hz, H-6'), 0.91 (3H, t,  $J$  = 7.5, Hz, H-5'), 0.86 (3H, s, H-14) [**Espectro 11a**].

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.4 MHz)**  $\delta$  186.1 (C, C-9), 172.9 (C, C-1'), 146.6 (C, C-7), 144.6 (CH, C-12), 136.5 (C, C-8), 121.2 (C, C-11), 73.7 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-10), 47.1 (CH, C-4), 43.9 (C, C-5), 41.8 (CH<sub>2</sub>, C-2'), 35.4 (CH<sub>2</sub>, C-6), 32.0 (CH, C-3'), 31.1 (CH<sub>2</sub>, C-2),



29.4 (CH<sub>2</sub>, C-4'), 19.3 (CH<sub>2</sub>, C-1), 19.2 (CH<sub>3</sub>, C-6'), 13.1 (CH<sub>3</sub>, C-14), 11.2 (CH<sub>3</sub>, C-5'), 10.5 (CH<sub>3</sub>, C-15), 7.7 (CH<sub>3</sub>, C-13) [**Espectro 11b**].

**3 $\alpha$ -Angeloiloxi-10H $\alpha$ -9-oxo-furanoeremofilano (76):**

**Solido blanco**, pf. 156-158 °C (hexano-AcOEt)

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**  $\delta$  7.37 (1H, d,  $J$  = 1.2 Hz, H-12), 6.06 (1H, cc,  $J$  = 7.5, 1.5 Hz, H-3'), 4.84 (1H, ddd,  $J$  = 11.1, 11.1, 4.8 Hz, H-3), 2.79 (1H, d,  $J$  = 16.5 Hz, H-6a), 2.52 (1H, d,  $J$  = 16.5 Hz, H-6b), 2.45 (1H, dd,  $J$  = 12.3, 3.6 Hz, H-10 $\alpha$ ), 2.30 (1H, m, H-1a), 2.24 (1H, m, H-2a), 2.00 (3H, d,  $J$  = 1.2 Hz, H-13), 1.98 (3H, dd,  $J$  = 3.0, 1.5 Hz, H-4'), 1.90 (3H, dd,  $J$  = 3.0, 1.5 Hz, H-5'), 1.82 (1H, cd,  $J$  = 10.8, 6.6 Hz, H-4), 1.59 (1H, m, H-1b), 1.40 (1H, m, H-2b), 1.00 (3H, d,  $J$  = 6.9 Hz, H-15), 0.88 (3H, s, H-14) [**Espectro 12a**].

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.4 MHz)**  $\delta$  186.17 (C, C-9), 167.71 (C, C-1'), 146.65 (C, C-8), 144.54 (CH, C-12), 137.41 (CH, C-3'), 136.48 (C, C-7), 128.13 (C, C-2'), 121.23 (C, C-11), 73.62 (CH, C-3), 54.84 (CH, C-10), 47.27 (CH, C-4), 43.96 (C, C-5), 35.39 (CH<sub>2</sub>, C-6), 31.18 (CH<sub>2</sub>, C-2), 20.58 (CH<sub>3</sub>, C-5'), 19.41 (CH<sub>2</sub>, C-1), 15.68 (CH<sub>3</sub>, C-4'), 13.12 (CH<sub>3</sub>, C-14), 10.62 (CH<sub>3</sub>, C-15), 7.74 (CH<sub>3</sub>, C-13) [**Espectro 12b**].

**3 $\alpha$ -Isovaleroiloxi-10H $\alpha$ -furanoeremofilano (77):**

**Cristales blancos**, pf. 109-111 °C (Et<sub>2</sub>O-hexano)

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)**  $\delta$  7.37 (1H, c,  $J$  = 1.0 Hz, H-12), 4.74 (1H, dd,  $J$  = 11.0, 4.5 Hz, H-3), 2.75 (1H, d,  $J$  = 16.5 Hz, H-6a), 2.48 (1H, d,  $J$  = 16.5 Hz, H-6b), 2.41 (1H, dd,  $J$  = 12.0, 3.5 Hz, H-10 $\alpha$ ), 2.29 (1H, ddd,  $J$  = 14.5, 7.0, 3.5 Hz, H-1a), 2.20 (2H, dd,  $J$  = 13.5, 6.5 Hz, H-2'), 2.18 (2H, m, H-2a), 2.13 (1H, m, H-3'), 2.0 (3H, d,  $J$  = 1.0 Hz, H-13), 1.75 (1H, cd,  $J$  = 13.5, 6.5 Hz, H-4), 1.54 (1H, m, H-1b), 1.34 (1H, m, H-2b), 0.98 (3H, d,  $J$  = 6.5 Hz, H-15), 0.96 (3H, d,  $J$  = 7.0 Hz, H-4'), 0.97 (3H, d,  $J$  = 7.0 Hz, H-5'), 0.86 (3H, s, H-14) [**Espectro 13a**].

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125.7 MHz)** δ 186.2 (C, C-9), 172.8 (C, C-1'), 146.6 (C, C-8), 144.6 (CH, C-12), 136.5 (C, C-11), 121.2 (C, C-7), 73.7 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-10), 47.1 (CH, C-4), 43.9 (C, C-5), 43.8 (CH<sub>2</sub>, C-2'), 35.4 (CH<sub>2</sub>, C-6), 31.1 (CH<sub>2</sub>, C-2), 25.8 (CH, C-3'), 22.5 (CH<sub>3</sub>, C-4'), 22.4 (CH<sub>3</sub>, C-5'), 19.4 (CH<sub>2</sub>, C-6), 13.1 (CH<sub>3</sub>, C-14), 10.5 (CH<sub>3</sub>, C-15), 7.8 (CH<sub>3</sub>, C-13) [**Espectro 13b**].

Las fracciones 38-44 eluidas con hexano-acetona (9:1) se sometieron a una cromatografía en columna abierta con un sistema en gradiente hexano-acetona para obtener 62 fracciones. A partir de las cuales, las fracciones 13-39 eluidas con hexano, se recromatografiaron sucesivamente en columna abierta y placa fina permitiendo obtener 17 mg del compuesto de estructura nueva **73**.

**6β-Acetoxi-3α-angeloiloxi-10αH-furanoeremofilan-9-ona (73):**

**Cristales incoloros;** pf, 156-158 °C,  $[\alpha]_D^{20} - 117$  (CHCl<sub>3</sub>, c 0.25).

**UV (MeOH)**  $\lambda_{max}$  (log ε) 278 (4.32) nm.

**IR (CHCl<sub>3</sub>)**  $\nu_{max}$  1746, 1683, 851, cm<sup>-1</sup>.

**EM-IE *m/z* (% int. rel.)** = 388 (3), M<sup>+</sup>, 328 (20), 288 (20), 246 (75), 83 (100), 55 (45).

**EMAR-FAB [M + 1]<sup>+</sup>,** *m/z* 389.1975 (observado), estimado para C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>O<sub>6</sub>, 389.1964.

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz),** δ 7.37 (1H, c, *J* = 1.2 Hz, H-12), 6.40 (1H, s, H-6), 6.06 (1H, cc, *J* = 7.2, 1.5 Hz, H-3'), 4.71 (1H, ddd, *J* = 10.8, 10.8, 4.5 Hz, H-3), 2.47 (1H, dd, *J* = 12.0, 3.5, Hz, H-10), 2.31 (1H, dddd, *J* = 12.5, 12.0, 7.0, 3.5 Hz, H-1a), 2.23 (1H, dddd, *J* = 12.5, 8.0, 4.0, 3.5 Hz, H-2a), 2.19 (3H, s, OAc), 2.02 (1H, m, H-4), 1.98 (3H, dc, *J* = 7.2, 1.5 Hz, H-4'), 1.92 (3H, d, *J* = 1 Hz, H-13), 1.88 (3H, quint, *J* = 1.5 Hz, H-5'), 1.62 (1H, m, H-1b), 1.36 (1H, m, H-2b), 1.02 (3H, s, H-14), 0.94 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-15) [**Espectro 14a**].

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.4 MHz),**  $\delta$  185.2 (C, C-9), 170.8 (C, OAc), 167.6 (C, C-1'), 146.5 (C, C-8), 145.4 (CH, C-12), 137.8 (CH, C-3'), 134.7 (C, C-7), 127.9 (C, C-2'), 120.9 (C, C-11), 75.3 (CH, C-6), 73.6 (CH, C-3), 54.4 (CH, C-10), 50.1 (C, C-5), 46.1 (CH, C-4), 30.8 (CH<sub>2</sub> C-2), 21.5 (CH<sub>3</sub>, OAc), 20.5 (CH<sub>3</sub>, C-4'), 19.0 (CH<sub>2</sub>, C-1), 15.7 (CH<sub>3</sub>, C-5'), 12.1 (CH<sub>3</sub>, C-15), 8.9 (CH<sub>3</sub>, C-14), 8.5 (CH<sub>3</sub>, C-13) [**Espectro 14b**].

**Fraccionamiento del extracto metanólico de tallo:** El extracto metanólico de tallo (43.5 g) se sometió a una cromatografía en columna abierta con gel de sílice y eluida con un gradiente de polaridad creciente AcOEt-MeOH obteniéndose un total 99 fracciones. A partir de las fracciones 46-58 eluidas con AcOEt-MeOH (7:3), se obtuvieron por cristalización 18 mg del cloruro de 7-angeloylplatinecina el cual se trató con NaOH 0.05 N para obtener 10 mg de la base libre **81** [75].

### **7-Angeloilplatinecina (81)**

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**  $\delta$  6.20 (1H, cc,  $J = 7.5, 1.5$  Hz, H-3'), 5.34 (1H, ddd,  $J = 5.5, 4.0, 1.5$  Hz, H-7), 3.73 (1H, dd,  $J = 10.5, 5.5$  Hz, H-9a), 3.69 (1H, dd,  $J = 6.0, 4.0$  Hz, H-8), 3.56 (1H, dd,  $J = 10.5, 7.5$  Hz, H-9b), 3.31 (2H, m, H-3), 2.75 (1H, m, H-5a), 2.62 (1H, m, H-5b), 2.25 (1H, m, 6a), 2.18 (1H, m, H-1), 2.14 (1H, m, H-6b), 2.02 (3H, dc,  $J = 7.5, 1.5$  Hz, H-4'), 2.00 (1H, m, H-2a), 1.90 (3H, c,  $J = 3.0$  Hz, H-5'), 1.87 (1H, m, H-2b).

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.4 MHz)**  $\delta$  167.3 (C, C-1'), 139.8 (CH, C-3'), 127.2 (C, C-2'), 74.4 (CH, C-8), 72.0 (CH, C-7), 65.4 (CH<sub>2</sub>, C-9), 55.3 (CH<sub>2</sub>, C-3), 52.3 (CH<sub>2</sub>, C-5), 40.4 (CH, C-1), 35.2 (CH<sub>2</sub>, C-6), 31.6 (CH<sub>2</sub>, C-2), 20.6 (CH<sub>3</sub>, C-5'), 15.9 (CH<sub>3</sub>, C-4').

### ***Pittocaulon velatum* (material vegetal)**

*P. velatum* se recolectó en la localidad de Taxco, en el estado de Guerrero. Fue identificado por el Dr. José Luis Villaseñor Ríos. Una muestra vegetal se depositó en el herbario del Instituto de Biología de la UNAM, (MEXU 1205023). Posterior a un proceso de secado a temperatura ambiente, el material vegetal constituido por corteza de raíz (390 g) y de tallo, (701.56 g) se sometió a un proceso de molienda y extracción con disolventes (hexano, acetona y metanol). Posteriormente, los extractos hexánico y acetónico de tallo fueron fraccionados por cromatografía en columna.

#### **Fraccionamiento de los extractos:**

**Fraccionamiento del extracto hexánico de corteza de tallo:** El extracto hexánico de corteza de tallo (117.55 g) se sometió a un fraccionamiento por cromatografía en columna empacada con gel de sílice para obtener 80 fracciones las cuales se denominaron fracciones madre. La fracción madre 3 (690 mg) eluida con hexano, se sometió a un segundo fraccionamiento en columna; la elución se realizó con hexano-acetona permitiendo obtener 77 fracciones de las cuales las fracciones reunidas 46-59 y eluidas mediante hexano-acetona (9:1), permitieron obtener 16 mg de un aceite identificado como el compuesto de estructura conocida **85** [76].

#### **6 $\beta$ -Isobutiroiloxi-9-oxo-10H $\alpha$ -furaneremofilano (85):**

##### **Aceite**

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**  $\delta$  7.33 (1H, d,  $J$  = 1.2 Hz, H-12), 6.35 (1H, s, H-6), 2.65 (1H, ept  $J$  = 6.9 Hz, H-2'), 2.39 (1H, dd,  $J$  = 11.7, 3.3 Hz, H-10), 1.88 (3H, d,  $J$  = 1.2 Hz, H-13), 1.27, (3H, d,  $J$  = 6.9 Hz, H-3'), 1.26 (3H, d,  $J$  = 6.9 Hz, H-4'), 0.94 (3H, S, H-14), 0.87 (3H, d,  $J$  = 6.9 Hz, H-15).

**Saponificación de las fracciones 15-19:** Las fracciones madre 15-19 se reunieron y 1.08 gr de dicha mezcla se hidrolizaron con KOH en 70 ml de metanol durante 2 ½ horas a 65 °C. Los productos de reacción se purificaron por cromatografía en columna y placa delgada, y permitieron obtener 24 mg del compuesto **86a** de estructura conocida [51, 76] y el compuesto **86b**, también de estructura conocida [76, 77].

**6 $\alpha$ -Metoxi-10H $\alpha$ -9-oxo-furanoeremofilano (86a):**

**Cristales blancos**, pf. 111-112 °C

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**  $\delta$  7.39 (1H, c,  $J$  = 1.2 Hz, H-12), 4.08 (1H, s, H-6), 3.40 (3H, s, H-1'), 2.84 (1H, dd,  $J$  = 11.6, 3.6 Hz, H-10), 2.14 (3H, d,  $J$  = 1.1 Hz, H-13), 0.89 (3H, d,  $J$  = 6.8 Hz, H-15), 0.65 (3H, s, H-14) [**Espectro 15**].

**6 $\beta$ -Hidroxi-10H $\beta$ -9-oxo-furanoeremofilano (86b):**

**Cristales blancos**, pf. 161-163 °C

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**  $\delta$  7.40 (1H, c,  $J$  = 1.2 Hz, H-12), 4.97 (1H, s, H-6), 2.66 (1H, ta,  $J$  = 4.8 Hz, H-10), 2.13 (3H, d,  $J$  = 1.2 Hz, H-13), 1.13 (3H, s, H-14), 0.86 (3H, d,  $J$  = 6.9 Hz, H-15) [**Espectro 16**].

Las fracciones restantes 4-5 y 15-19 se reunieron con las fracciones 20-37 y juntas (101.3 g) se sometieron a un proceso de separación por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), a partir del cual fue posible aislar 3 mg de un aceite que se identificó como el compuesto de estructura conocida **87** [51, 78] y que corresponde al pico más intenso del perfil cromatográfico, cuyo espectro de RMN-<sup>13</sup>C aún no ha sido reportado (**Ver cromatograma 1**).

### **6 $\beta$ -Isovaleroiloxi-10H $\alpha$ -9-oxo-furanoeremofilano (87)**

#### **Aceite**

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)**  $\delta$  7.33 (1H, d,  $J$  = 1.0 Hz, H-12), 6.35 (1H, s, H-6), 2.38 (1H, dd,  $J$  = 12.5, 3.5 Hz, H-10), 2.31 (2H, t,  $J$  = 7.0 Hz, H-2'), 2.20 (1H, m, H-3'), 1.90 (3H, d,  $J$  = 1.0 Hz, H-13), 1.03 (3H, d,  $J$  = 6.5 Hz, H-4'), 1.02 (3H, d,  $J$  = 7.0 Hz, H-5'), 0.91 (3H, s, H-14), 0.89 (3H, d,  $J$  = 6.5 Hz, H-15).

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125.7 MHz):**  $\delta$ , 186.7 (C, C-9), 172.8 (C, C-1'), 144.9 (C, C-7), 134.7 (C, C-8), 120.7 (C, C-11), 75.4, (CH, C-6), 55.2 (CH, C-10), 49.8 (C, C-5), 43.6 (CH<sub>2</sub>, C-2'), 42.2 (CH, C-4), 32.3 (CH<sub>2</sub>, C-1), 24.9 (CH<sub>2</sub>, C-2), 24.6 (CH, C-3'), 22.7 (CH<sub>3</sub>, C-4'), 22.7 (CH<sub>3</sub>, C-5'), 20.8 (CH<sub>2</sub>, C-3), 17.9 (CH<sub>3</sub>, C-15), 8.8 (CH<sub>3</sub>, C-13), 7.7 (CH<sub>3</sub>, C-14).

**Fraccionamiento del extracto acetónico de corteza de tallo:** Este extracto (15.8 g), se sometió a un fraccionamiento en columna abierta empacada con gel de sílice mediante elución con un gradiente de polaridad creciente hexano-acetona. Se obtuvieron en total 94 fracciones. Las fracciones 18-24 (1.7 g) eluidas con hexano-acetona (9:1) se sometieron a un nuevo fraccionamiento en columna mediante elución con hexano-AcOEt, obteniéndose en total 57 fracciones. A partir de las fracciones 16-21 eluidas con hexano-AcOEt (95:5) se obtuvieron 19 mg de una mezcla sitosterol-estigmaterol. De este mismo fraccionamiento, las fracciones combinadas 27-28 (300 mg) eluidas con hexano-AcOEt (9:1) fueron recromatografiadas en columna abierta utilizando el mismo sistema de disolventes. Dicho fraccionamiento permitió obtener 56 mg de una mezcla la cual se purificó a través de una cromatografía en placa fina para obtener 10 mg de un aceite incoloro identificado como el compuesto de estructura conocida **88** [51].

### **1,10 $\beta$ -Epoxi-6 $\beta$ -isobutiroiloxifuranoeremofilano (88):**

#### **Aceite incoloro**

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** δ 7.46 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-12), 6.64 (1H, s, H-6), 3.35 (1H, da, *J* = 4.8 Hz, H-1), 2.73 (1H, ept, *J* = 6.9 Hz, H-2'), 1.95 (3H, d, *J* = 1.2 Hz, H-13), 1.29 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, H-3'), 1.27 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, H-4'), 1.22 (3H, s, H-14), 1.04 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, H-15).

Las fracciones 76-83 (9 g) eluidas con hexano- acetona (1:1), se sometieron a un refraccionamiento por cromatografía en columna para obtener en total 60 fracciones de las cuales se reunieron las fracciones 22-31 y 32-60. La recromatografía de las fracciones 22-31 (1.22 g) utilizando un sistema de elución CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt, permitió obtener 52 fracciones. A partir de las fracciones 25-49 eluidas mediante CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>- EtOAc (7:3), se aislaron 383 mg de un sólido amarillo de punto de fusión 255-256 °C identificado como naringenina **89** [53].

### Naringenina **89**

**Sólido amarillo, pf. 255-256 °C**

**RMN-<sup>1</sup>H [(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 300 MHz]** δ 7.38 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-3', 5'), 6.89 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-2', 6'), 5.95 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 5.94 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 5.44 (1H, dd, *J* = 12.9, 3.0 Hz, H-2), 3.17 (1H, dd, *J* = 17.1, 12.9 Hz, H-3a), 2.72 (1H, dd, *J* = 17.1, 3.0 Hz, H-3b).

De las fracciones 32-60 (4.50 g) se separaron por filtración 18 mg de un sólido de pf. 285-287 °C identificado como el flavonoide canferol **90** [79]. El filtrado se concentró (4.32 g) y se sometió a sucesivas cromatografías en columna permitiendo obtener 0.822 g de una mezcla. Una porción de dicha mezcla (200 mg) se sometió a una cromatografía en capa fina para obtener 28 mg de un sólido de color amarillo de pf 238-240 °C identificado como el flavonoide aromadendrina **91** [53].

**Canferol 90**

**Solido amarillo, pf. 285-287 °C**

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)**  $\delta$  8.04 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-3', 5'), 6.88 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-2', 6'), 6.36 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 6.16 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8).

**Aromadendrina 91**

**Solido amarillo, pf. 238-240 °C**

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)**  $\delta$  7.34 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3', 5'), 6.82 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-2', 6'), 5.85 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 5.81 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 4.93 (1H, d,  $J = 11.4$  Hz, H-2), 4.48 (1H, d,  $J = 11.4$  Hz, H-3).

***Roldana reticulata* (material vegetal):**

*Roldana reticulata* (D.C) H. Rob. & Brettell se recolectó el 13 de diciembre del 2006 en la localidad del Ajusco en un bosque de abetos. Fue identificada como *Roldana reticulata* por el Dr. José Luis Villaseñor Ríos y se depositó una muestra del vegetal en el herbario del Instituto de Biología de la UNAM, (MEXU 1156423). Posterior a un proceso de secado a temperatura ambiente, el material vegetal constituido por raíz se sometió a un proceso de molienda y extracción con disolventes orgánicos, en el cual, a 383.18 g de raíz seca y molida, se le hicieron extracciones sucesivas por maceración con hexano, acetona y metanol obteniéndose 13.37 g, 6.21 g, y 25.18 g de extracto, respectivamente.



### Fraccionamiento de los extractos:

**Fraccionamiento del extracto hexánico de raíz:** El extracto hexánico de raíz (12.37 g) se redisolvió en una pequeña cantidad de hexano y se mezcló con celita. Una vez evaporado el disolvente, el extracto adsorbido sobre la celita se colocó en una columna de vidrio empacada con 185 g de gel de sílice y posteriormente dicha columna se eluyó con un gradiente de polaridad creciente hexano-acetona.

Se obtuvieron 143 fracciones de 250 ml c/u, denominadas fracciones de la columna madre. Las fracciones 24-30 eluidas con hexano-acetona (95:5) se reunieron (0,411 g) y cromatografiaron nuevamente. De esta nueva cromatografía se obtuvieron 84 fracciones de 25 ml c/u, de las cuales, las fracciones 27-39 (100 mg) eluidas con hexano-acetona (99:1) se reunieron y sometieron a una cromatografía en placa delgada mediante elución con hexano-acetona (98:2) tres veces consecutivas. Este procedimiento permitió obtener 28 mg de un aceite incoloro constituido por una mezcla de compuestos, de la cual fue posible identificar al compuesto **92** como un furanoeremofilano de estructura conocida [78].

### **6 $\beta$ -Angeloiloxi-9-oxo-10H $\alpha$ -furanoeremofilano (92):**

#### **Aceite incoloro**

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)**  $\delta$  7.34 (1H, sa, H-12), 6.44 (1H, s, H-6), 6.28 (1H, cc,  $J = 7.2, 1.6$  Hz, H-3'), 2.42 (1H, dd,  $J = 11.8, 3.4$  Hz, H-10), 2.10 (3H, dd,  $J = 7.2, 1.4$  Hz, H-4'), 1.96 (3H, t,  $J = 1.4$  Hz, H-5'), 1.85 (3H, d,  $J = 0.8$  Hz, H-13), 0.96 (3H, s, H-14), 0.87 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-15).

Las fracciones de la columna madre 31-50 (0,812 g) eluidas con hexano-acetona (95:5) se reunieron y se sometieron a una posterior cromatografía en la cual se obtuvieron 32 fracciones. De estas 32 fracciones se reunieron las fracciones 1-24 (0,442 g) eluidas con hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8:2) y hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) para una posterior

cromatografía. De dicha cromatografía se obtuvieron 63 fracciones de las cuales se reunieron las fracciones 15-25, 26-34, y 35-52, eluidas con benceno-acetona (95:5). Cada una de estas fracciones reunidas se sometió a una cromatografía en placa delgada. La cromatografía en placa delgada de la fracción 15-25 (176 mg) al ser eluida con benceno-acetona 95:5 permitió obtener 86.7 mg de una mezcla aceitosa a la cual se le hizo nuevamente una cromatografía en placa delgada para obtener 24.5 mg de una goma incolora identificada como el furanoeremofilano de estructura conocida **93** [80].

### **6 $\beta$ -[2-Metil-2-vinilacetoxi]-furanoeremofilan-9-ona (93)**

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)**  $\delta$  7.34 (1H, c,  $J$  = 1.5 Hz, H-12), 6.35 (1H, s, H-6), 5.95 (1H, ddd,  $J$  = 17.0, 10.5, 8.0 Hz, H-3'), 5.19 (1H, ddd,  $J$  = 17.0, 2.5, 1.5 Hz, H-5'a), 5.16 (1H, ddd,  $J$  = 10.5, 2.5, 1.5 Hz, H-5'b), 3.3 (1H, dddc,  $J$  = 8.0, 7.5, 1.5, 1.5 Hz, H-2'), 2.40 (1H, dd,  $J$  = 11.7, 3.6, Hz, H-10), 1.89, (3H, d,  $J$  = 1.0 Hz, H-13), 1.36 (3H, d,  $J$  = 7.5 Hz, H-4'), 0.94 (3H, s, H-14), 0.84 (3H, d,  $J$  = 6.5 Hz, H-15).

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125.7 MHz):**  $\delta$ , 186.7 (C, C-9), 173.9 (C, C-1'), 146.8 (C, C-7), 144.9 (CH, C-12), 136.2 (CH, C-3'), 134.4 (C, C-8), 120.8 (C, C-11), 116.8 (CH<sub>2</sub>, C-5'), 75.9 (CH, C-6), 55.16 (CH, C-10), 49.9 (C, C-5), 44.4 (CH, C-2'), 42.5 (CH, C-4), 32.16 (CH<sub>2</sub>, C-3), 24.97 (CH<sub>2</sub>, C-2), 20.73 (CH<sub>2</sub>, C-1), 18.4 (CH<sub>3</sub>, C-15), 16.3 (CH<sub>3</sub>, C-4'), 8.9 (CH<sub>3</sub>, C-13), 7.7 (CH<sub>3</sub>, C-14).

La placa preparativa de la fracción 26-34 (83 mg) eluida con hexano-acetona (95:5) tres veces consecutivas, permitió obtener nuevamente 32 mg del compuesto **92**. Del mismo modo, la placa preparativa de la fracción 35-52 (26 mg) eluida con benceno-acetona (95:5) tres veces consecutivas, proporcionó 8 mg de una mezcla de  $\beta$ -sitosterol-estigmasterol.

Las fracciones de la columna madre 88-100 (2.41 g) se reunieron y se cromatografiaron nuevamente obteniéndose 45 fracciones de 40 ml c/u. De dicho

fraccionamiento, se reunieron las fracciones 16-36 (0,410 g) eluidas con hexano-acetona (9:1) y se sometieron a un posterior fraccionamiento en columna, obteniéndose esta vez 50 fracciones de 10 ml c/u; de las cuales, las fracciones 36-40, eluidas con benceno-acetona (95:5) permitieron obtener 3 mg de cristales incoloros de pf. 93-96 °C, que fueron identificados como el senecrasano-5,8 diol (**Compuesto 94**), por comparación con una muestra original [81].

**Fraccionamiento del extracto acetónico de hoja:** El extracto acetónico de hoja (5.21 g) se mezcló en una pequeña cantidad de acetona y se adsorbió en celita. Una vez evaporado el disolvente, dicho extracto se colocó en una columna empacada con 78 g de gel de sílice y posteriormente se sometió a un proceso cromatográfico mediante elución con un gradiente de polaridad creciente hexano-acetona.

En total se obtuvieron 140 fracciones de 250 mL c/u y las fracciones 94-99 (6 g) eluidas con hexano-acetona (6:4), se sometieron a una nueva cromatografía en columna de la cual se obtuvieron 6.2 mg de glucósido de sitosterol y una mezcla (0.45 g) que luego de sucesivas cromatografías en columna y finalmente una cromatografía en placa delgada eluida con benceno acetona (9:1) por cinco veces consecutivas, permitió obtener 5.1 mg del compuesto **95** identificado como tirosol [82].

De la fracción 123 eluida con hexano-acetona (1:1), se aislaron luego de filtrar 40 mg de un polvo amorfo que se identificó como icarósido D<sub>2</sub> **96** [83].

**Fraccionamiento del extracto metanólico de hoja:** El extracto metanólico (53 g) se redisolvió en una pequeña cantidad de metanol y posteriormente se filtró para separar 4,4 g de un sólido que se identificó como KCl. Posteriormente el extracto se adsorbió sobre celita y luego de evaporar el disolvente se sometió a una cromatografía en columna abierta empacada con 530 g de gel de sílice y eluida con un gradiente de polaridad creciente AcOEt-MeOH.

En total se obtuvieron 85 fracciones de 500 ml cada una y de las fracciones 9-11 eluidas con AcOEt, se obtuvieron por filtración 160 mg del compuesto **77**. De las fracciones reunidas 72-81 precipitó un sólido amarillo verdoso (0.762 g) identificado como cloruro de potasio (KCl). Las fracciones 27-61 eluidas con AcOEt-MeOH (95:5, 9:1 y 1:1) se reunieron para formar 11.46 g de muestra de la cual se tomaron 2,7 g y se sometieron a una cromatografía en columna abierta empacada con sephadex mediante elución con H<sub>2</sub>O-MeOH (1:1). En este proceso se obtuvieron 58 fracciones de 50 ml c/u. De las fracciones 24-39 cristalizaron, 58 mg de un compuesto de pf 210-212 °C identificado como rutina **97** [84].

### Rutina 97

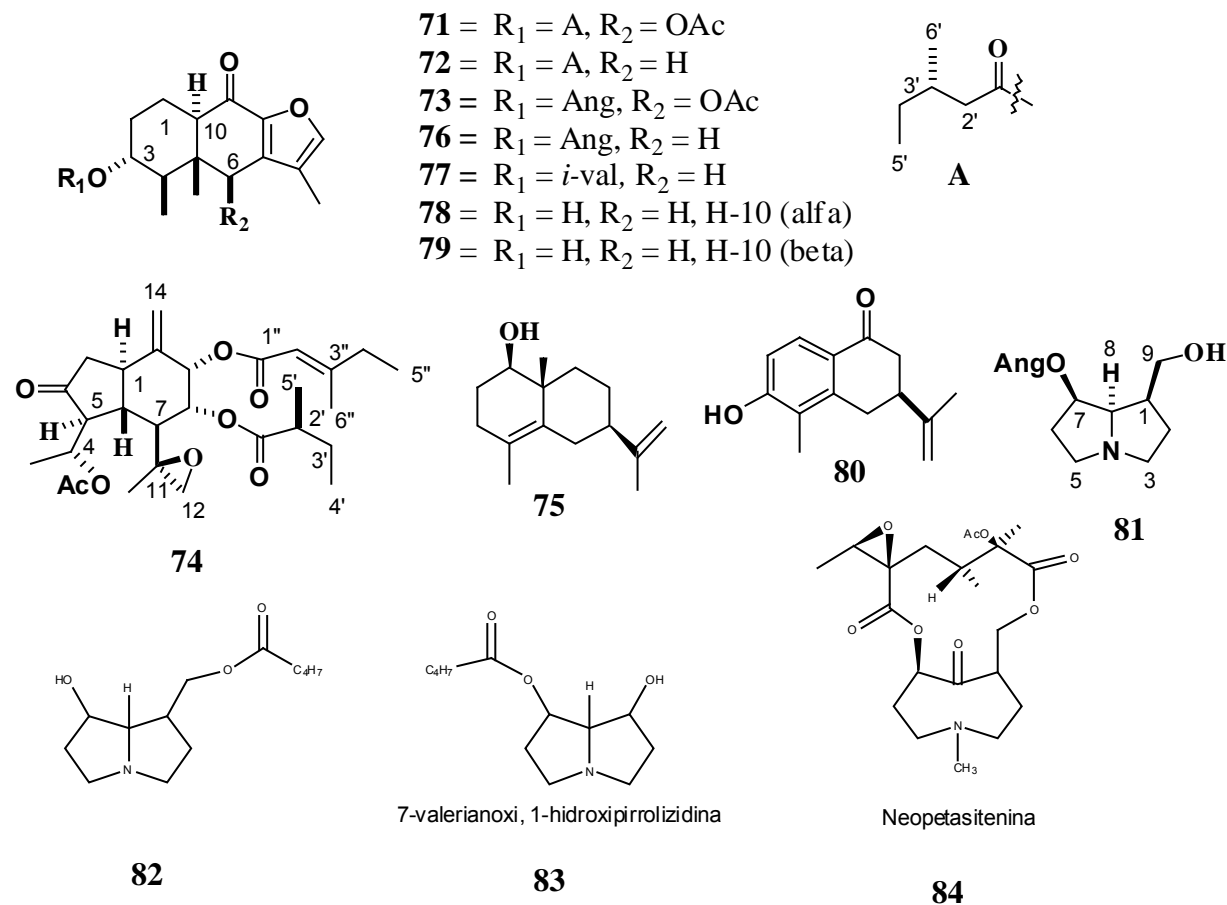
#### Cristales amarillos de Pf. 210-212 °C

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)** δ 7.66 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2'), 7.62 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-6), 5.10 (1H, d, *J* = 7.2, Hz, H-1''), 4.51 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-1'''), 3.22-3.81 (10H, H-2'', 2''', 3'', 3''', 4'', 4''', 5'', 5''', 6''), 1.11 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, H-6''').

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125.7 MHz):** δ, 179.4 (C, C-4), 166.0 (C, C-7), 162.9 (C, C-5), 159.3 (C, C-9), 158.5 (C, C-2), 149.8 (C, C-4'), 145.8 (CH, C-3'), 135.6 (C, C-3), 123.6 (C, C-1'), 123.1 (CH, C-6'), 117.7 (C, C-5'), 116.0 (CH, C-2'), 105.6 (C, C-10), 104.7 (CH, C-1''), 102.4 (CH, C-1'''), 78.1 (CH, C-5''), 77.2 (CH, C-3''), 75.7 (CH, C-2''), 73.9 (CH, C-4''), 72.2 (CH, C-3'''), 72.1 (CH, C-2'''), 71.4 (CH, C-4'''), 69.7 (CH, C-5'''), 68.6 (CH<sub>2</sub>, C-6''), 17.9 (CH<sub>3</sub>, C-6''').

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Metabolitos secundarios de *Pittocaulon Bombycophole*:



Los metabolitos secundarios que predominan en *P. bombycophole* son los 3 $\alpha$ -hidroxi-9-cetofuranoeremofilanos esterificados con diferentes ácidos, lo que los hace diferentes de los 9-cetofuranoeremofilanos de *P. praecox* que raramente presentan sustituyentes en C-3 [51].

De la raíz y el tallo de *Pittocaulon bombycophole* se aislaron cuatro moléculas que corresponden a estructuras no reportadas anteriormente. Una de ellas, la 6 $\beta$ -acetil-3 $\alpha$ -(3-metil)-pentanoiloxi-furanoeremofilan-10H $\alpha$ -9-ona (**71**) se aisló como un aceite amarillo pálido,  $[\alpha]_D^{25} + 98.3$ , con una fórmula molecular  $C_{23}H_{32}O_6$ , determinada por EM-FAB. Su espectro en el IR presentó bandas de absorción a 1731 y 1688  $cm^{-1}$ , indicativas de grupos carbonilo y una banda a 792  $cm^{-1}$  debido a un grupo furano. El

espectro de UV ( $\lambda_{\text{max}}$  278 nm,  $\log \epsilon$  4.26), indicó la presencia de un 9-ceto y no de un 6 ceto, ya que este último absorbería en el UV a una longitud de onda ( $\lambda$ ) más corta, ( $\pm$  250 nm). Los espectros de RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  mostraron señales para 9-oxofuranoeremofilanos: El cuarteto a  $\delta$  7.36 (c,  $J = 1.0$  Hz) debido a H-12, tres señales a  $\delta$  1.92 (d,  $J = 1.0$  Hz), 0.99 (s), y 0.91 (d,  $J = 6.7$  Hz) asignado a H-13, H-14 y H-15, respectivamente y la señal del C-9 a  $\delta$  185.2. La presencia de un grupo acetoxi en el carbono 6 se dedujo por un singulete a  $\delta$  2.19 y la correlación observada en el experimento HMBC entre C-1' ( $\delta$  172.4) y H-2' además de las correlaciones del carbono 3' ( $\delta$  32.0) con los hidrógenos H-2', H-4', H-5' y H-6'. Su espectro de masas mostró un fragmento de  $m/z$  288  $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2]^+$ , el cual corresponde con la pérdida del ácido metilpentanoico. La estereoquímica señalada para esta molécula se dedujo de las interacciones de la señal de H-3 con la de los metilos 14 y 15, que están orientados  $\beta$ , además de las interacciones de H-10 con H-4 y H-6 y las de H-6 con H-4, en el espectro NOESY.

El extracto de corteza de tallo, después de cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice seguida por CLAE, permitió el aislamiento del nuevo furanoeremofilano **72**, además de las moléculas conocidas **76** y **77**.

La molécula 3 $\alpha$ -(3-metil)-pentanoiloxifuranoeremofilan-10H $\alpha$ -9-ona (**72**) se obtuvo como cristales incoloros, de punto de fusión 87-90 °C,  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ , - 32. La fórmula molecular  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_4$  es indicativa de 7 grados de insaturación. Su espectro de IR mostró bandas para grupos carbonilo (1728 y 1679  $\text{cm}^{-1}$ ) y de un grupo furano (806  $\text{cm}^{-1}$ ). Su espectro UV presentó una banda de absorción a 280 nm característica de 9-oxofuranoeremofilanos [85]. Los espectros de RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  fueron similares a aquellos señalados para el compuesto **71**, excepto por la ausencia de la señal del grupo acetilo y la presencia de un sistema AB a  $\delta$  2.72 y 2.5 en el espectro de RMN- $^1\text{H}$  el cual corresponde a los hidrógenos unidos a C-6. La orientación  $\alpha$  del grupo 3-metilpentanoiloxi se dedujo a partir de las interacciones NOE de H-3 con los hidrógenos H-14 y H-15. La estereoquímica relativa se estableció por análisis cristalográfico de rayos X (figura 5).

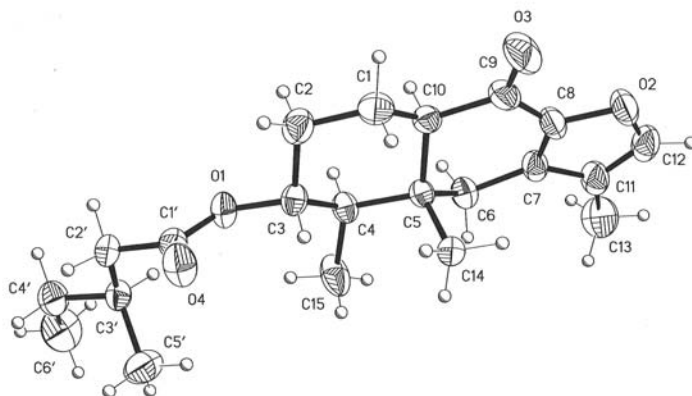


Figure 5. Estructura de rayos X del compuesto **72**

De las fracciones que siguieron a aquellas que contenían **72**, **76** y **77**, se pudo aislar otra molécula, la 6 $\beta$ -acetil-3 $\alpha$ -angeloiloxifuranoeremofilan-10H $\alpha$ -9-ona (**73**), como cristales incoloros de punto de fusión 156-158 °C,  $[\alpha]_D^{25}$  - 117.2 que presentó una fórmula molecular de C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>O<sub>6</sub>. Su absorción en el UV es característica de un 9-cetofuranoeremofilano y sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C fueron similares a los del compuesto **71** excepto por la presencia de un grupo angeloiloxilo ( $\delta$  6.06, 1.98, 1.92) en lugar de un grupo 3-metilpentanoiloxilo. La posición de los grupos ésteres fue inferido a partir del experimento HMBC en el cual el carbonilo del grupo angeloiloxilo ( $\delta$  167.6) mostró correlación con H-3 ( $\delta$  4.71) y el carbonilo del grupo acetoxilo ( $\delta$  170.8) mostró correlación con H-6 ( $\delta$  6.40). Considerando las interacciones observadas en el experimento NOESY de H-10 con H-4 y H-6 y aquellas observadas de H-3 con los grupos metilos 14 y 15 que por biogénesis se encuentran orientados  $\beta$ , la estereoquímica de este compuesto resultó ser la misma que presentaron los compuestos **71** y **72**.

Siguiendo con el análisis de las fracciones eluidas con hexano-acetona (9:1), se aisló el nuevo oplopano 4-acetoxi, 8-(2-metil)-butanoiloxi-9-(3-metil)-pent-2-enoiloxi-10(14)-oplopan-3-ona (**74**), como un sólido cristalino blanco de punto de fusión 130 - 133°C. Su fórmula molecular C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>O<sub>8</sub> fue determinada por EMAR. El espectro de IR mostró bandas de grupos carbonilos saturados y  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturados (1740 y 1717 cm<sup>-1</sup>)

respectivamente). Su espectro de RMN-<sup>1</sup>H mostró las señales de los átomos de hidrógeno de un doble enlace exocíclico ( $\delta$  4.92 y 5.29) y tres señales a  $\delta$  5.8, 5.16 y 5.15 que se asignaron a los hidrógenos unidos a C-9, C-4, y C-8, respectivamente, los cuales soportan grupos ésteres. Esos ésteres se identificaron como 3-metil-2-pentanoato, acetato y 2-metilbutanoato por sus señales características observadas en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. La posición del grupo acetoxi en el C-4 ( $\delta$  68.6), se dedujo por la observación en el espectro de HMBC de una correlación a cuatro enlaces entre este carbono y el grupo acetilo ( $\delta$  2.11). La posición del grupo éster 3-metil-2-pentanoato en el C-9 se confirmó por la correlación observada en el experimento de HMBC entre H-9 ( $\delta$  5.8) y la señal para carbonilo a  $\delta$  165.3 (C-1"). De este modo, por sustracción, dado que se tenían tres bases de oxígeno, el grupo éster 2-metilbutanoiloxilo se posicionó en el C-8 ( $\delta$  72.8). La función epoxi se localizó entre C-11 ( $\delta$  54.9) y C-12 ( $\delta$  52.8) a través de los experimentos HMBC y COSY.

La estructura y configuración relativa del oplopano **74** finalmente se estableció con base en un análisis de difracción de rayos X. De manera adicional, la configuración absoluta se estableció por dicroísmo circular (CD) en el cual se observó un efecto Cotton a 303 nm ( $\Delta\epsilon = -5.34$ ) similar al reportado para la molécula 14-(*R*)-hidroxi-7 $\beta$ -isovaleroiloxioplop-8(10)-en-2-ona, cuya estructura es muy parecida y está descrita en la literatura [86]. Con base en esta evidencia, la estereoquímica se pudo establecer como 1*R*, 4*R*, 5*S*, 6*R*, 7*S*, 8*R*, 9*S*, 11*S*, 2'*S*, 2''*E* F (Fig. 6).

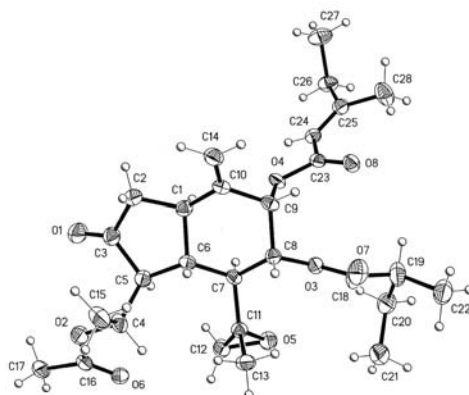


Figure 6. Estructura de rayos X del compuesto **74**



Del extracto metanólico de la corteza de raíz, se aisló directamente una goma resinosa que dio prueba positiva para alcaloides (Dragendorf). A partir de dicha goma, se aisló el alcaloide 7-angelilplatinecina **81** y fueron identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, los alcaloides pirrolizidínicos **82-84**. Una vez eliminada la fracción alcaloidea quedó un residuo (11 g), de donde se pudo aislar el compuesto **75** como un aceite y su espectro RMN-<sup>13</sup>C es consistente con un sesquiterpeno con un grupo metileno terminal ( $\delta$  108.3). Su espectro RMN-<sup>1</sup>H mostró señales para un grupo isopropenil: el exometileno H-12 ( $\delta_{\text{H}}$  4.72) y el metilo, C-13, ( $\delta$  1.76). También mostró dos señales a  $\delta$  1.03 y 1.59 las cuales fueron asignadas a los metilos 14 y 15 respectivamente. La posición del metilo 14 se basó en las correlaciones HMBC del carbono 14 con el metino base del grupo hidroxilo H-1 y uno de los protones H-8. La señal del metino base de oxígeno a  $\delta$  3.48 se asignó a H-1 con base en la interacción HMBC entre C-1 y los protones H-14, H-9, y H-2a. El grupo isopropenilo se ubicó en C-7 por la correlación HMBC observada entre C-7 y los protones H-12 y H-13. Debido a la sobreposición de las señales H-2 y H-8, el grupo hidroxilo también podría ser localizado en C-9 para ser consistente con la molécula de estructura conocida (+)-selina-4, 11-dien-9 $\alpha$ -ol [87], sin embargo, las señales para los C-2, C-7 y C-8 en la molécula **75** ( $\delta$  27.09, 46.1 y 27.2) no son consistentes con los del selina dieno ( $\delta$  18.7, 43.2 y 35.6) por lo cual se asume que la posición del hidroxilo efectivamente está en C-1, y esto es apoyado por la existencia del efecto NOE del hidrógeno base del grupo OH con uno de los hidrógenos H-3. El espectro NOESY proporcionó evidencia de la estereoquímica mostrada para esta molécula. Debido a la poca disponibilidad de muestra, no fue posible obtener otros parámetros espectroscópicos a pesar de que se trata de una estructura inédita en la literatura.

El compuesto **76** se aisló del extracto hexánico de corteza de tallo como un sólido blanco de pf. 156-158 °C y sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, similares a las de la molécula **73**, sin embargo, no se observó la presencia del grupo acetoxi unido al C-6 y en cambio aparecieron dos señales dobles ( $\delta$  2.79 y 2.52) formando un sistema AB ( $J$  = 16.5 Hz) que fueron asignados los dos hidrógenos de C-6. La estereoquímica de este compuesto se dedujo del experimento NOESY a partir de interacciones de H-10 con H-

4 y de H-3 con los metilos H-14 y 15. Estos datos corresponden con los reportados en la literatura para el compuesto 3 $\alpha$ -angeloiloxi-10 $\alpha$ H-9-oxofuranoeremofilano [72,73].

A partir del mismo extracto de la corteza de tallo y por medio de una separación por CLAE, se obtuvieron unos cristales blancos de pf. 109-111 °C identificados como el compuesto **77**. Las señales para esta molécula en sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C fueron idénticas a las mostradas por el compuesto **76**, excepto por la presencia de un grupo isovaleroiloxilo en lugar del grupo angeloiloxilo. Dicho grupo se dedujo por las señales para los metilos 3' y 4' a  $\delta$  0.98 y 0.96 como dos dobletes ( $J = 7.0$  Hz), la señal del metileno 2' a  $\delta$  2.20 (dd,  $J = 13.5, 6.5$  Hz) y la señal del metino 3' a  $\delta$  2.13. De manera adicional, se observaron correlaciones HMBC del carbono 1' con el metileno 2' y el metino 3' además de las correlaciones entre el carbono 3' con los metilos 4' y 5' todas ellas del grupo isovaleroiloxilo. La posición del grupo éster se dedujo a través de la interacción HMBC entre C-1' y el protón metino H-3. De acuerdo a las interacciones NOE, esta molécula presentó la misma estereoquímica de la molécula **76** y su estructura ya ha sido reportada en la literatura [74].

De las fracciones menos polares del extracto hexánico de corteza de raíz se aisló una mezcla de ésteres de furanoeremofilano que no se pudo resolver, por lo que se sometieron a hidrólisis básica 100 mg de dicha mezcla dando origen a los compuestos **78** y **79**. El compuesto **78** es un sólido cristalino de pf. 230-231 °C, cuyos espectros de UV, RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C mostraron igual que en casos anteriores, las señales típicas para un 9-oxofuranoeremofilano además de un protón base de oxígeno ( $\delta$  3.34) el cual fue asignado a H-3. El espectro de la mezcla original mostraba por lo menos dos furanoeremofilanos, uno de ellos, esterificado con un residuo de ácido angélico identificado por la señal característica a  $\delta$  6.08, (H-3') y el otro esterificado con el ácido 3'-metil-valérico cuya señal de H-3 apareció a  $\delta$  4.73 y su señal de carbonilo en RMN-<sup>13</sup>C apareció en un desplazamiento químico típico para este éster (173.0) junto con la del angelato ( $\delta$  167.7). Las señales para los carbonos 3 $\alpha$  base de los ésteres aparecieron a 73.6 para angelato y 73.7 para el 3-metilvalerato. La unión del grupo hidroxilo en el producto de hidrólisis (**78**) se asignó a C-3 por medio de un experimento HSQC en el que la única señal para un metino base de oxígeno en RMN-<sup>13</sup>C a  $\delta$  71.05

correlaciona con la señal para el protón a  $\delta$  3.34 y este a su vez, tiene correlación COSY con el protón metino H-4 y los protones metilenos H-2. La fusión AB *trans* del compuesto **78** fue asignada con base en el desplazamiento para la señal del metilo 14 el cual apareció a campo más alto que la del metilo 15 igual que ocurre para otras moléculas con la misma fusión de anillos y ausencia de sustituyente en C-6 como es el caso de las moléculas **76**, y **77**. Una confirmación de lo anterior y más detalles se lograron a partir de las interacciones NOE entre los hidrógenos H-10 y H-4 ambos orientados alfa y las interacciones del hidrógeno H-3 con los metilos 14 y 15 que biogenéticamente se encuentran orientados  $\beta$ . Estas características corresponden con la reportadas en la literatura por Nagano, et. al. [70].

El compuesto **79** se obtuvo como cristales incoloros de pf. 174-176 °C. Sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C fueron similares a los del compuesto **78** aunque mostrando las señales de los metilos 14 y 15 invertidas lo que indicaba una orientación diferente. Adicionalmente, en su experimento NOESY se observaron interacciones entre H-10 y H-14 en lugar de la interacción entre H-10 y H-4. A partir de este experimento, se comprobó la fusión *cis* del sistema decalina, contraria a la fusión en el otro producto de hidrólisis (*trans*). También, este compuesto (**79**), ha sido reportado en la literatura como un producto obtenido por tratamiento básico [70]. El hallazgo de los compuestos **78** y **79** provenientes de la hidrólisis de la mezcla de los ésteres **72** y **76**, no sólo implicó saponificación sino que también originó la epimerización de H-10 por ser  $\alpha$  a un carbonilo.

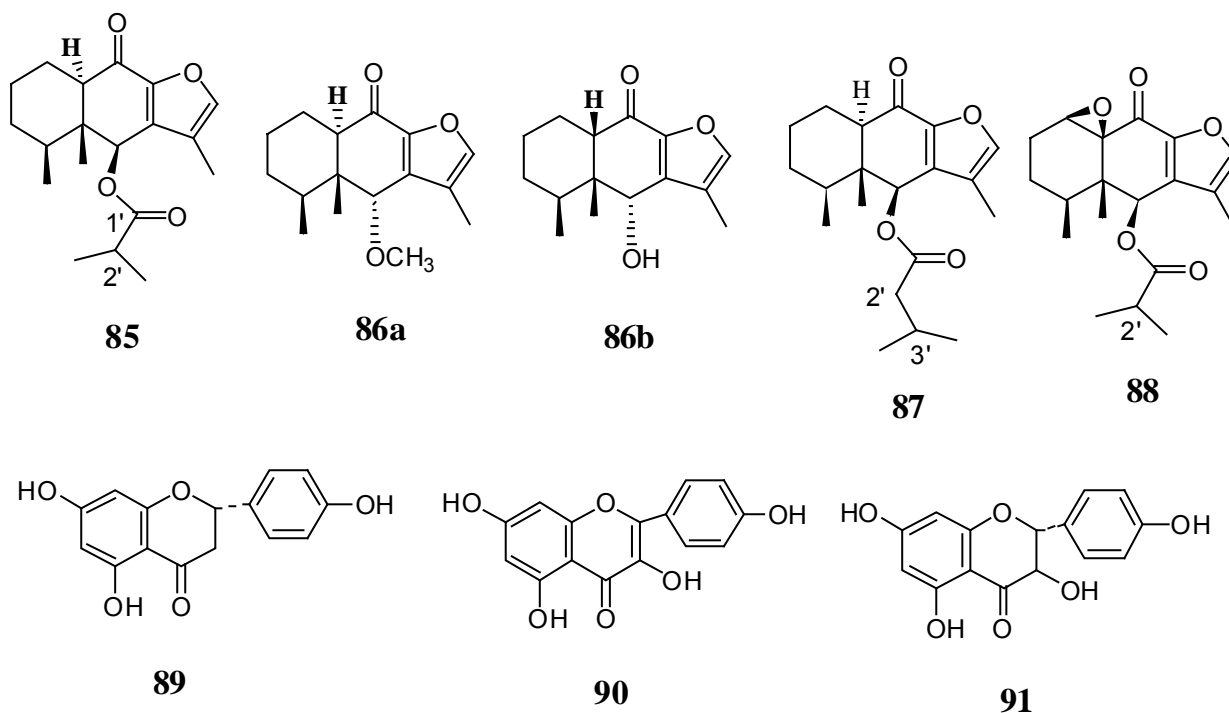
El compuesto **80** se aisló de la corteza de raíz como cristales incoloros de pf. 177-179 °C, su espectro IR exhibió banda para grupo fenólico a 3082 cm<sup>-1</sup>, para grupo isopropenilo a 1594.62 cm<sup>-1</sup> y 901 cm<sup>-1</sup> y para grupo carbonilo a 1647 cm<sup>-1</sup>. A partir del espectro de RMN-<sup>13</sup>C y el experimento DEPT, se dedujo su naturaleza norsesquiterpénica con grupo carbonilo ( $\delta$  197.9) y presencia de un metileno terminal ( $\delta$  110.8). Este mismo experimento también indicó la presencia de otros dos metilenos, tres metinos, y dos metilos. Su espectro de RMN-<sup>1</sup>H mostró dos señales dobles en la región de aromáticos a  $\delta$  7.88 y 6.78 con acoplamiento *orto* ( $J = 8.7$  Hz), asignados a los protones H-1 y H-2. Una señal para metileno terminal a  $\delta$  4.86, (H-12), una señal dd

para metilo a  $\delta$  1.83, que dada su multiplicidad y una interacción COSY con el exometileno, fue asignado al metilo H-13, una señal singulete a  $\delta$  2.21 fue asignada al metilo 14. Las características espectroscópicas de este compuesto correspondieron con el reportado en la literatura para la ligujapona [71].

### Identificación de los alcaloides de corteza de raíz:

La estructura del alcaloide **81** se determinó con base en las señales RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  que corresponden a los datos publicados para 7-angelilplatinecina [75]. El éster se identificó como el angelato, lo cual fue evidente por sus señales típicas en RMN- $^1\text{H}$ : una señal cc,  $J = 7.5$  y  $1.5$  Hz, que corresponde a H-3' y las señales para los metilos 4' y 5' a  $\delta$  2.02, (dc,  $J = 7.5, 1.5$  Hz) y  $\delta$  1.90 (c,  $J = 3.0$  Hz), respectivamente. Las interacciones COSY entre H-1 y los protones metilenos H-9 permitieron ubicar la posición del hidroxilo en C-9. El éster angélico se ubicó en C-7 debido a la interacción COSY entre H-8 ( $\delta$  3.69) y el único metino base de oxígeno que es H-7 ( $\delta$  5.34).

La mezcla de los alcaloides **82-84**, se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y sus estructuras fueron determinadas por comparación de sus patrones de fragmentación con los publicados [48].

Metabolitos secundarios de *Pittocaulon velatum*:

La composición química de *P. velatum* mostró al igual que en la de las otras especies de este género, un predominio de 9-cetofuranoeremofilanos. Es importante resaltar que los 9-cetofuranoeremofilanos de *P. velatum* carecen de sustituyentes en C-3, a diferencia de los 9-cetofuranoeremofilanos de *P. bombycophole* y *P. praecox* que si los tienen. Esta puede ser una característica de la especie; sin embargo, sería necesario completar el estudio químico del género *Pittocaulon* para tratar de establecer si esta particularidad también se presenta en otras especies del género y así poder establecer relaciones quimiotaxonómicas.

El compuesto **85** fue aislado de la corteza del tallo como un aceite y su espectro RMN-<sup>1</sup>H mostró señales que corresponden con las de un furanoeremofilano: Un doblete ancho a  $\delta$  7.33 (H-12), un doblete a  $\delta$  0.87 (H-15), un singulete a  $\delta$  0.94 (H-14) y una señal doble a  $\delta$  1.88 (H-13). Una señal dd a  $\delta$  2.39 fue asignada al protón H-10 y la magnitud de la constante de acoplamiento ( $J = 11.7$  Hz) de este protón con uno de los hidrógenos H-1 indicó su orientación  $\alpha$  en vista de que sólo así es posible una conformación axial-axial entre los dos hidrógenos. El grupo isopropilo se dedujo a partir de una señal heptuplete ( $J = 6.9$  Hz) asignada para el hidrógeno H-2' y las señales a  $\delta$

1.26 (d,  $J = 6.9$  Hz) para los metilos 3' y 4'. La estructura de este compuesto corresponde con la reportada en la literatura para dihidroadenostilona (**85**) [76].

Los compuestos **86a** y **86b** provienen de la hidrólisis básica de una mezcla de ésteres de eremofilano que se obtuvieron del extracto hexánico de la raíz y no pudieron ser resueltos. El compuesto **86a** fue aislado como cristales de pf. 111-112 °C cuyas señales de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C corresponden a un 9-oxofuranoeremofilano, con un grupo metoxilo en C-6 como lo indican las señales a  $\delta$  3.40 (OCH<sub>3</sub> y 4.08, s, (H-6). La estereoquímica de H-6 se determinó con base en la interacción NOE de este protón con los metilos H-14 y H-15. La señal a  $\delta$  2.84 fue asignada a H-10 y su acoplamiento con uno de los hidrógenos vecinos H-1 con una  $J = 11.6$  Hz indicó su orientación  $\alpha$ . Además no se observaron interacciones NOESY entre H-10 y H-6, ni de H-10 con H-14 que biogenéticamente se encuentra orientado  $\beta$ . Su espectro RMN-<sup>13</sup>C mostró una señal a  $\delta$  186.5 muy similar a las del carbono 9-ceto de los sesquiterpenos aislados de *P. bombycophole*. Este compuesto corresponde con el reportado por Bohlmann, et al. [51].

El otro producto de hidrólisis (**86b**), fue aislado como cristales de pf. 161-163 °C y sus espectros de RMN fueron similares a los del compuesto **86a** excepto por la ausencia de la señal para metoxilo y el desplazamiento a campo bajo de H-6 ( $\delta$  4.97). La diferencia entre **86b** y **86a** en la fusión de anillos se desprende de la diferencia de desplazamientos químicos de las señales de los metilos 14 y 15 en RMN-<sup>1</sup>H, y esto se confirmó por medio de experimentos NOESY en donde se observó la interacción de H-10 con los metilos H-14 y H-15 indicando una orientación  $\beta$  de H-10. Los datos corresponden con los reportados en la literatura para el 6 $\alpha$ -hidroxi-10H $\beta$ -9-oxo-furanoeremofilano, obtenido también mediante tratamiento básico [76, 77]. La orientación  $\beta$  de H-10 desconocida para 9-ceto furanoeremofilanos de origen natural se debe a la epimerización en medio básico; epimerización que también ocurrió en C-6 cuya estereoquímica es normalmente  $\beta$ . El análisis por HPLC de la mezcla antes de hidrolizar, permitió obtener el furanoeremofilano **87** como el compuesto más abundante (Ver cromatograma 1).

El compuesto **87** se obtuvo como un aceite incoloro y sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C mostraron además de las señales para 9-oxofuranoeremofilanos, aquellas para un grupo isopentanoilo:  $\delta$  2.31 (H-2'),  $\delta$  2.20 (H-3'),  $\delta$  1.03 (H-4'),  $\delta$  1.02 (H-5'). La posición del éster se dedujo a partir de la correlación HMBC entre el carbonilo C-1' y el hidrógeno H-6. También, se observaron correlaciones de dicho carbonilo con los protones H-2' además de interacciones entre C-2' con H-3', H-4', y H-5'. En el experimento NOESY se observaron interacciones entre H-6 con H-4 y H-10 lo cual permitió asignar la orientación  $\alpha$  de H-6 considerando que por biogénesis tanto H-4 como H-10, se encuentran orientados  $\alpha$ . Los datos de este compuesto corresponden con los reportados en la literatura para el compuesto 6 $\beta$ -isovaleroiloxi-10H $\alpha$ -9-oxofuranoeremofilano [51, 78]. También de la corteza de tallo de *P. velatum*, pero esta vez del extracto acetónico, se aisló el compuesto **88** como un aceite incoloro. Sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C fueron similares a los del compuesto **85** excepto por la ausencia de la señal para H-10, y la aparición de una señal a  $\delta$  3.3 (H-1), representativa de un epóxido 1,10  $\beta$ . Se observaron las señales para el grupo isobutilo como son: Un heptuplete a  $\delta$  2.73 ( $J = 6.9$  Hz) para H-2', y dos dobletes a  $\delta$  1.30 y 1.28 (c/u con  $J = 6.9$  Hz), para los metilos 3', 4' respectivamente. Los datos de este compuesto corresponden con los reportados para el compuesto 1,10 $\beta$ -epoxi-6 $\beta$ -isobutiroiloxi-furanoeremofilano [51].

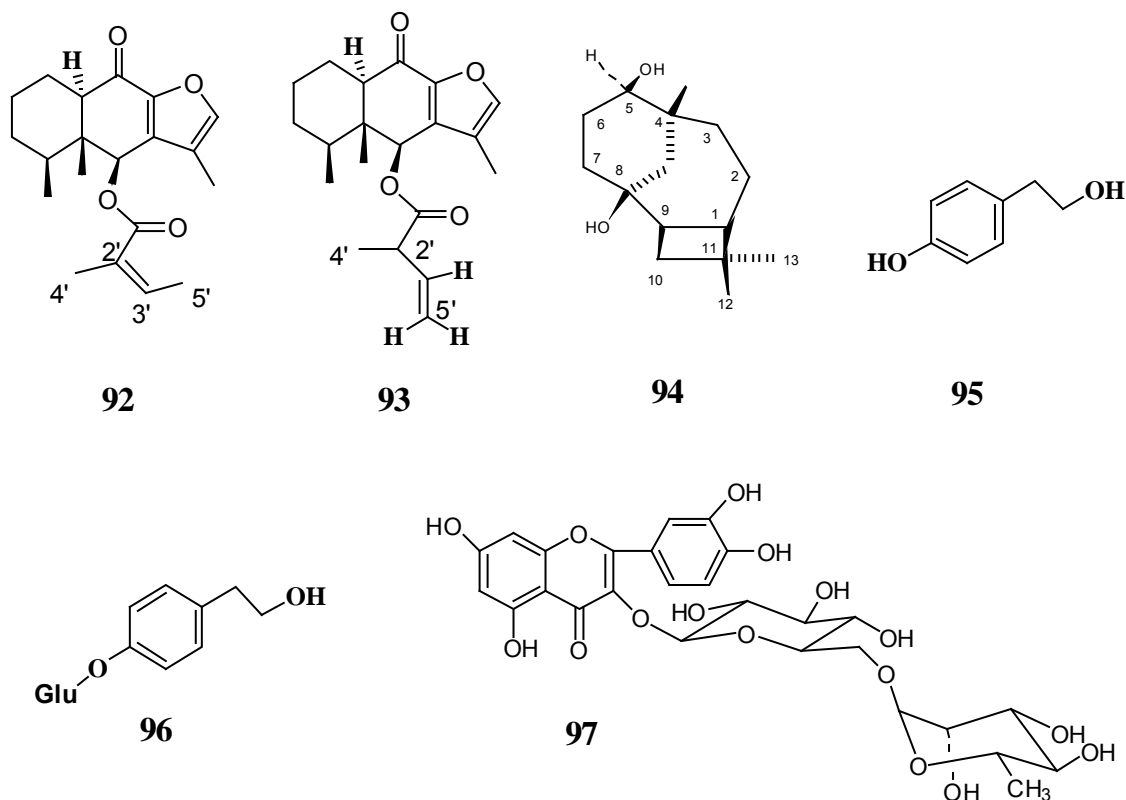
Del mismo extracto acetónico de tallo, pero a partir de las fracciones más polares, fueron aislados los flavonoides **89-91**. El compuesto **89** se obtuvo como un sólido amarillo de pf. 255-256 °C. Su espectro RMN-<sup>1</sup>H mostró una señal simple a campo bajo,  $\delta$  12.2, indicativa del grupo hidroxilo en C-5 de una molécula de flavonoide, que se encuentra quelatado con el carbonilo C-4. También se observaron dos señales dobles acopladas entre sí ( $J = 8.7$  Hz) para dos protones fenólicos (6-8 ppm). Una de ellas a  $\delta$  7.38 ( $J = 8.7$  Hz) y la otra a  $\delta$  6.89 ( $J = 8.7$  Hz). Estas señales se asignaron a los hidrógenos 3',5' y 2',6', en el anillo B respectivamente. Dos señales dobles con un pequeño acoplamiento entre ambas ( $J = 2.1$  Hz), se asignaron a los protones H-6 ( $\delta$  5.95) y H-8 ( $\delta$  5.94), respectivamente. Se sabe que para el caso de flavonas, flavonoles y flavanonas, H-6 aparece desplazado a campo alto con respecto a H-8. Una señal a  $\delta$  5.44 fue asignada al hidrógeno H-2, debido que aparece como un

dd ( $J = 12.9, 3.0$  Hz) por su acoplamiento con los hidrógenos metilenos del C-3, y a su vez, los hidrógenos unidos a este carbono, H-3a y H-3b aparecen cada uno como un dd a  $\delta$  3.17 ( $J = 17.1, 12.9$  Hz) y  $\delta$  2.72 ( $J = 17.1, 3.0$  Hz), respectivamente, y esto como consecuencia del acoplamiento con H-2. Los datos espectroscópicos de este compuesto corresponden con los reportados para el flavonoide naringenina [53].

El compuesto **90** fue aislado como un sólido amarillo de pf. 285-287 °C. Su espectro RMN-<sup>1</sup>H mostró 4 señales dobles en la región de aromáticos (6-8 ppm): Dos señales c/u integrando para dos hidrógenos y acopladas entre sí ( $J = 9$  Hz) a  $\delta$  8.06 y 6.88, fueron asignadas a los hidrógenos 3',5' y 2',6' del anillo B *para*-hidroxilado de un flavonoide. Las otras dos señales dobles, con acoplamiento *meta*, ( $J = 2.1$  Hz), e integrando cada una para 1 hidrógeno, fueron asignadas a los protones H-6 y H-8 del anillo A de un flavonoide. Los datos de este compuesto corresponden con los reportados para el flavonoide canferol [79].

El compuesto **91** fue obtenido como un sólido amarillo de pf. 238-240 °C y su espectro RMN-<sup>1</sup>H mostró un perfil similar al espectro del compuesto **90**, excepto por dos señales dobles adicionales y acopladas entre sí a  $\delta$  4.93 (d,  $J = 11.4$  Hz), y  $\delta$  4.48 (d,  $J = 11.4$  Hz), los cuales fueron asignadas para H-2 y H-3, respectivamente. Los datos de este compuesto corresponden a los reportados para el flavonoide aromadendrina [53].



Metabolitos secundarios de *Roldana reticulata*

El estudio químico de *Roldana reticulata* no mostró cambios significativos con respecto al patrón de metabolitos secundarios aislados de otras especies del género, salvo la presencia de 9-cetofuranoeremofilanos que si bien, ya se había encontrado uno en *ehrenbergiana*, su presencia ha sido poco frecuente en el género.

El compuesto **92** fue obtenido del extracto hexánico de raíz como un aceite y su espectro RMN-<sup>1</sup>H mostró las señales características de un furanoeremofilano: dos señales sencillas a  $\delta$  7.34 (H-12) y  $\delta$  0.96 (H-14), y dos señales dobles a  $\delta$  0.87 (H-15), y  $\delta$  1.85 (H-13). También se identificó un éster angélico por la señal características de H-3' a  $\delta$  6.28. La posición de dicho éster se asignó a C-6, debido a que H-6 apareció como un singulete desplazado a campo bajo ( $\delta$  6.44). La señal dd a  $\delta$  2.42, se asignó a H-10 que por la magnitud de una de sus constantes ( $J = 11.8$  Hz), se encuentra orientado  $\alpha$ , ya que este acoplamiento resulta de una interacción axial-axial con uno de los hidrógenos H-1 que sólo es posible verlo si H-10 se encuentra orientado  $\alpha$ . Las

señales de RMN-<sup>13</sup>C a  $\delta$  186.9 y  $\delta$  167.3, fueron asignados a los carbonilos C-9 y del éster respectivamente. Este compuesto corresponde al 6 $\beta$ -angeloiloxi-9-oxo-10H-furanoeremofilano descrito en la literatura [78].

A partir de fracciones ligeramente más polares del extracto hexánico de la raíz se aisló el compuesto **93** como una goma incolora cuyo espectro de RMN-<sup>1</sup>H mostró señales características de un furanoeremofilano:  $\delta$  7.34 (c,  $J$  = 1.5 Hz, H-12),  $\delta$  0.84 (d,  $J$  = 6.5 Hz, H-15),  $\delta$  0.94 (s, H-14), y  $\delta$  1.89 (d,  $J$  = 1.0 Hz, H-13). El singulete a  $\delta$  6.35 que de acuerdo al experimento DEPT corresponde a un metino base de oxígeno, fue asignado al hidrógeno H-6 con base a su desplazamiento a campo bajo el cual es consistente con un grupo éster en C-6. Una correlación HMBC del carbono C-1' del grupo éster con H-6 permitió confirmar la unión del grupo éster en C-6. Las señales a  $\delta$  5.19 y  $\delta$  5.16 fueron asignadas a los hidrógenos del metileno terminal en el grupo éster, H-5'a y H-5'b respectivamente, de acuerdo a los experimentos DEPT y HSQC. Ambos hidrógenos muestran acoplamiento COSY entre ambos y con cada uno de los hidrógenos H-3' y H-2'. De manera adicional se observa una correlación HMBC entre C-2' y el metino H-3'. Del mismo modo, los hidrógenos de metileno terminal fueron fácilmente distinguibles puesto que uno de ellos muestra un acoplamiento *trans* con H-3' ( $J$  = 17.0 Hz), mientras que el otro tiene un acoplamiento *cis*, ( $J$  = 10.5 Hz). La señal a  $\delta$  5.95 (ddd,  $J$  = 17.0, 10.5, 8.0 Hz) se asignó al metino H-3' con base a los experimentos DEPT y HSQC, además de su acoplamiento COSY con los hidrógenos del metileno terminal. Además, el hidrógeno H-3' muestra un acoplamiento adicional ( $J$  = 8 Hz) con uno de los protones del metileno H-2'. Este hidrógeno (H-2') corresponde a la señal que aparece a  $\delta$  3.3 (dddc,  $J$  = 8.0, 7.5, 1.5, 1.5 Hz) con base en los experimentos DEPT, HSQC y sus acoplamientos COSY con los protones H-3' ( $J$  = 8.0 Hz), 5'a ( $J$  = 1.5 Hz), y H-5'b ( $J$  = 1.5 Hz), además de un acoplamiento con el metilo H-4' que aparece a  $\delta$  1.36 (d,  $J$  = 7.5 Hz). De manera adicional, también se observaron las correlaciones HMBC de C-2' con los protones del metilo H-4' y los protones metilenos H-5'a y H-5'b. La señal a  $\delta$  2.40 (dd,  $J$  = 11.7, 3.6 Hz) se asignó al hidrógeno H-10, el cual muestra acoplamiento COSY con los hidrógenos H-1. La magnitud de una de sus constantes de acoplamiento ( $J$  = 11.7 Hz) indicó que este hidrógeno se encontraba orientado  $\alpha$ , y esto fue soportado por medio de las correlaciones NOE de H-10 con H-4

que por biogénesis sabemos que se encuentra orientado  $\alpha$ . En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se observaron dos señales para carbonilo a  $\delta$  173.9 y 186.7. La primera se asignó al C-1' del grupo éster por sus correlaciones HMBC con los hidrógenos H-2', H-4', H-5' y H-6 como se dijo anteriormente. La segunda fue asignada al C-9 aunque sólo se observó la correlación HMBC con H-10. Este compuesto corresponde al 6 $\beta$ -[2-metil-2-vinilacetoxi]-furanoeremofil-9-ona reportado en la literatura [80].

Los compuestos **94**, **95** y **96** fueron aislados de la parte aérea de la planta mediante sucesivas cromatografías del extracto acetónico de hoja. El compuesto **94** fue obtenido como unos cristales incoloros de pf 93-96 °C e identificado por comparación con una muestra auténtica como el cariofilano senecrasidiol [81]

El compuesto **95** fue aislado como cristales de pf. 93-95 °C, reaccionó positivamente frente a FeCl<sub>3</sub> y su espectro RMN-<sup>1</sup>H mostró dos señales dobles que integraban cada uno para dos hidrógenos en la región de aromáticos (6-8 ppm), formando un sistema AA'BB' a  $\delta$  7.1 y 6.78 ( $J = 8.4$  Hz). Estas señales fueron asignadas a los protones aromáticos H-2, H-6 y H-3, H-5, respectivamente. También, se observaron dos señales triples propias de un sistema A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> a  $\delta$  3.83 y 2.81 acopladas entre sí ( $J = 6.6$  Hz) que se asignaron a los protones metilenos 7 y 8, respectivamente. Los datos de este compuesto corresponden con los reportados para el tirosol [82].

El compuesto **96** C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub> se aisló como un polvo amorfo, no reaccionó frente a FeCl<sub>3</sub> y su espectro de masas (IE) mostró su ión molecular de  $m/z$  300. En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H se observó un perfil casi similar al tirosol: dos señales dobles a  $\delta$  7.14 y 7.01, respectivamente, integrando para 2 hidrógenos cada una y acopladas entre sí ( $J = 8.8$  Hz), las cuales fueron asignadas para H-2, H-6 y H-3, H-5, respectivamente; dos tripletes a  $\delta$  3.69 y 2.75 acopladas entre sí ( $J = 7$  Hz) propio de un sistema A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> fueron asignados a los hidrógenos H-7 y H-8, respectivamente. El espectro RMN-<sup>13</sup>C mostró un total de 14 carbonos, es decir, seis señales más que para el compuesto **95**, y una de ellas a  $\delta$  102.53, indicaba la presencia de un carbono anomérico, lo cual hizo suponer la presencia de un azúcar en este compuesto. Además, el experimento DEPT mostró las señales para cuatro metinos y dos metilenos base de oxígeno indicando la posible presencia de glucosa, considerando que uno de los metilenos base de oxígeno

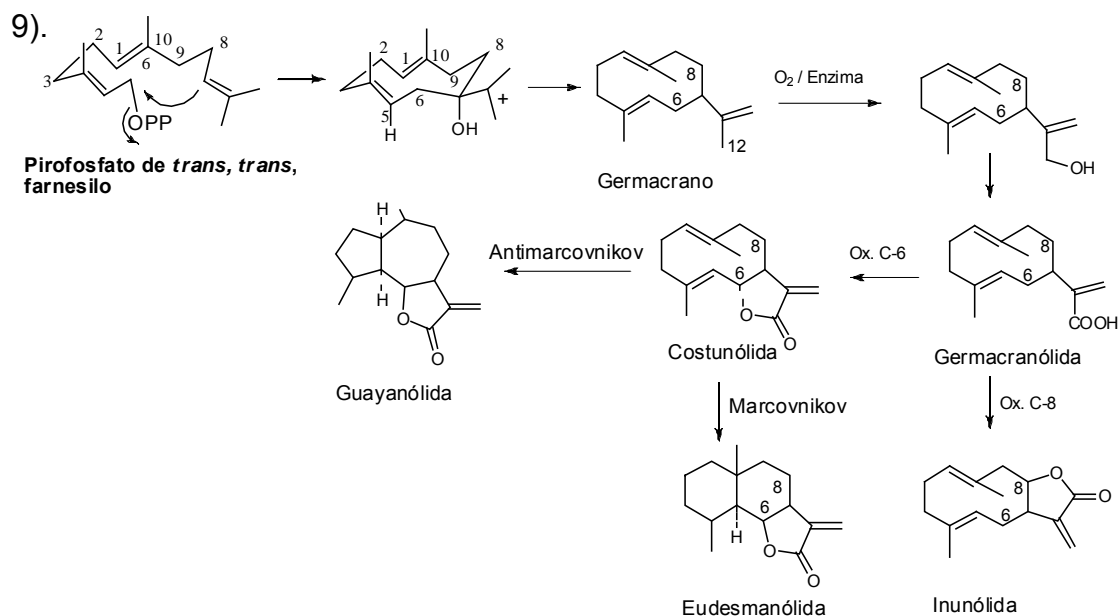
correspondían al metileno H-1 del tirosol. De manera adicional, en el espectro de masas (IE) se observó un fragmento de  $m/z$  121 que corresponde con la pérdida del fragmento glucosilo,  $[M - \text{glucosilo}]^+$ . La reacción negativa frente a  $\text{FeCl}_3$  permitió inferir que dicho azúcar se encontraba en C-6. Todos estos datos fueron consistentes con los reportados en la literatura para el compuesto icarósido  $\text{D}_2$  [83].

Siguiendo con el análisis de *Reticulata*, en el extracto metanólico de hoja hubo una presencia significativa de sales de cloruro de potasio que fueron identificadas a través de una prueba con nitrato de plata. También se expusieron a la flama de un mechero y esto permitió observar la emisión característica del potasio. Los fraccionamientos cromatográficos de este extracto, permitieron obtener además de sacarosa, unos cristales amarillos de pf. 210-212 °C, cuyos espectros de RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  corresponden con los reportados para la rutina **97** [84].

Estudio de la biogénesis de eremofilanólidas

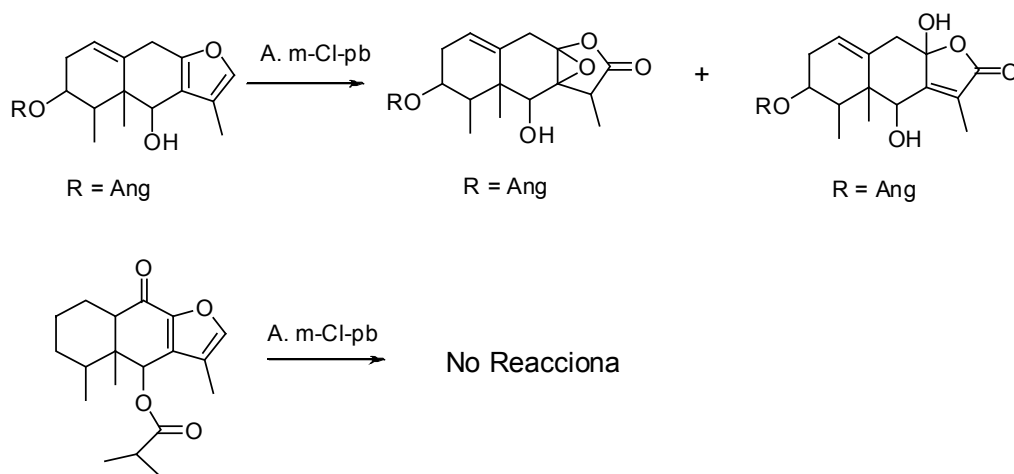
Es conocido que la biosíntesis de lactonas sesquiterpénicas comienza con la ciclación del pirofosfato de farnesilo para originar al germacrano el cual sufre la oxidación en C-12 y posteriormente se puede oxidar en C-6 o C-8 dando origen a las respectivas germacranólida, costunólida e inunólida. Estos compuestos pueden sufrir transposiciones de tipo marcovnikov o antimarcovnikov para dar eudesmanólidas o guayanólidas, respectivamente (esquema 8).

En el caso de las eremofilanólidas, existen numerosas evidencias para considerar a furanoeremofilanos como sus precursores [32-35]. Sin embargo, a pesar de que en las plantas de la tribu *senecioneae* abundan los furanoeremofilanos con grupo ceto en C-9, nunca han sido encontradas 9-ceto eremofilanólidas, y esto probablemente se deba a que el grupo ceto conjugado desactiva el anillo de furano evitando su oxidación a lactona. Una evidencia a la aseveración anterior se logró cuando se llevó a cabo la oxidación de un furanoeremofilano con ácido *m*-cloroperbenzoico lo cual dio origen a dos lactonas, mientras que en el caso de un furanoeremofilano con grupo ceto en el carbono 9, la reacción no tuvo lugar (Esquema



Esquema 8: Biogénesis de lactonas sesquiterpénicas

## Resultados y discusión: Estudio de la biogénesis de eremofilanólidas



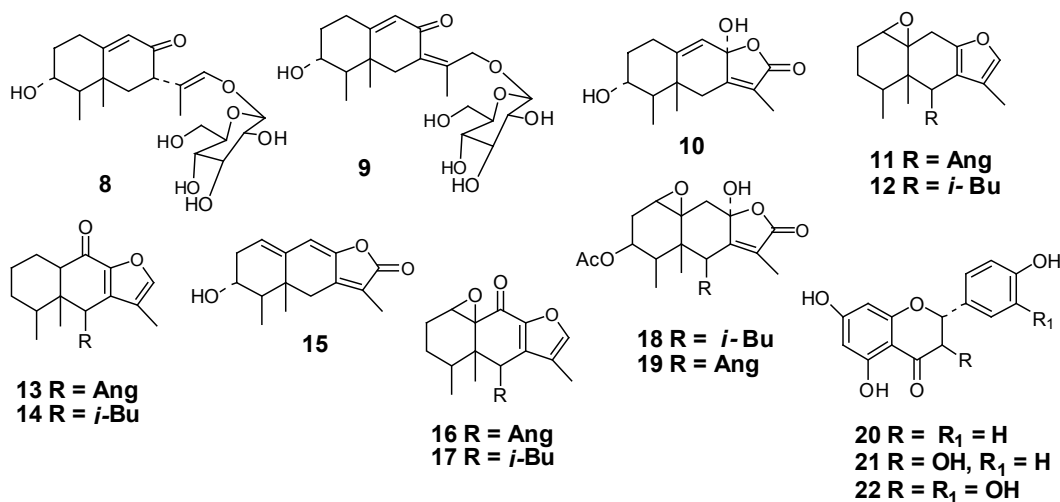
**Esquema 9: Tratamiento de un furanoeremofilano y un 9-cetofuranoeremofilano con el ácido *m*-cloroperbenzoico.**

A pesar de la ausencia de 9-oxoeremofilanólidas, existen moléculas estructuralmente relacionadas como es el caso de la radulifolina B aislada de *Psacalium radulifolium* [40,88] la cual contiene un grupo fenólico en C-9; sin embargo, estos compuestos representan un paso biogenético posterior a la formación de moléculas de tipo eremofilano y eso nos lleva a pensar de que existe un mecanismo diferente para la formación de lactonas con esqueleto de eremofilano modificado que no requieren de la formación previa de un furano. En este sentido, quizás un paso previo podría ser la oxidación de C-12 al ácido, tal como sucede en eudesmanólidas y guayanólidas. Esta idea parece estar apoyada por la presencia en *P. radulifolium* de las  $\delta$ -lactonas radulifolina A y *epi*-radulifolina A, además de la radulifolina B [40, 88], ya que estas moléculas podrían generarse por medio de precursores ácidos como los señalados en el esquema 7 (pag. 8).

Es importante destacar que las eremofilanólidas generalmente tienen un doble enlace endocíclico 7(11) a diferencia de eudesmanólidas y guayanólidas que por lo general tienen un doble enlace exocíclico (esquema 8), y tanto las  $\gamma$ -lactonas como las  $\delta$ -lactonas con esqueleto de eremofilano modificado no tienen doble enlace conjugado, lo cual evidencia su formación por medio de diferentes mecanismos, (esquema 7).

Eremofilanólidas y glucósidos de eremofilano en el género *Pittocaulon*:

Al estudiar un ejemplar de *Pittocaulon praecox* procedente de CU y cultivado en el municipio de Ozumba en el estado de México, se aislaron las eremofilanólidas **10**, **15**, **18** y **19** [53]; siendo esta la primera vez que se obtienen lactonas sesquiterpénicas en el género. Adicionalmente y más importante aún, fue el hallazgo de los glucósidos **8** y **9** que son compuestos novedosos no sólo en el género sino también en toda la tribu *Senecioneae* (Esquema 10).



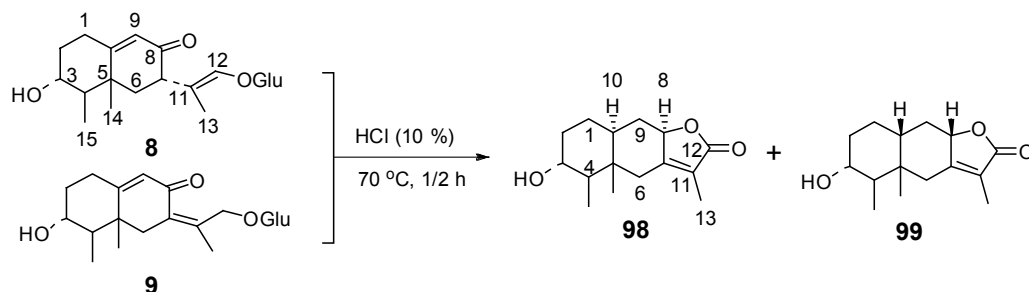
Esquema 10: Principales metabolitos aislados de *P. praecox* [53]

Los glucósidos **8** y **9** como precursores de lactonas:

La hidrólisis ácida de los glucósidos **8** y **9** teóricamente conduce a compuestos 1,4 dicarbonílicos que son precursores de furanos los que a su vez lo son de lactonas. Esto nos lleva a pensar que estos glucósidos sean precursores de eremofilanólidas, y con el propósito de comprobar lo antes dicho, se efectuó la hidrólisis ácida de **8** y **9** la que efectivamente produjo las eremofilanólidas **98** y **99** mostrando la existencia de otra

## Resultados y discusión: Estudio de la biogénesis de eremofilanólidas

ruta en la biogénesis de este tipo de lactonas que no pasa necesariamente por un furano intermediario (Esquema 11).



Esquema 11: Conversión de los glucósidos **8** y **9** aislados de *P. praecox* [53] en eremofilanólidas

La estructura de la nueva lactona **98**, uno de los productos de esta reacción, se pudo deducir a partir de las siguientes observaciones: Su espectro RMN-<sup>1</sup>H no mostró la señal a campo bajo para el protón vinílico H-9 ( $\delta$  5.7) al igual que ninguna señal para glucosa que sí mostraban sus precursores, es decir, los glucósidos **8** y **9** [53]. Tampoco, se observó en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C, la señal para el carbonilo (C-8) que mostraban los glucósidos **8** y **9** a  $\delta$  193 y  $\delta$  201.9, respectivamente [53]; en cambio se observó una señal para carbonilo de lactona a  $\delta$  175.64. En este orden de ideas, los datos hasta aquí mostrados indicaban que los glucósidos **8** y **9** habían perdido no sólo la glucosa, sino también la doble ligadura 9(10) y se había transformado en lactona.

La estructura de la lactona **98** también se dedujo de acuerdo a las siguientes observaciones: una longitud de onda de máxima absorción en el UV a 220.4 nm y una banda en el IR a 1743 cm<sup>-1</sup>, típicas de una  $\gamma$ -lactona  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturada con doble ligadura endocíclica. Su espectro de IR también mostró una banda a 3473 cm<sup>-1</sup> para grupo hidroxilo, que debe estar en C-3, como en los glucósidos **8** y **9** de donde se partió [53]. Su fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>O<sub>3</sub>, fue determinada por espectrometría de masas de alta resolución (FAB).

En consecuencia la composición elemental de la molécula C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>, corresponde a cinco grados de insaturación que en la estructura propuesta son el carbonilo de la lactona, un doble enlace y tres anillos. La estereoquímica de los hidrógenos H-3 y H-10 se dedujo a partir de los experimentos NOESY. La



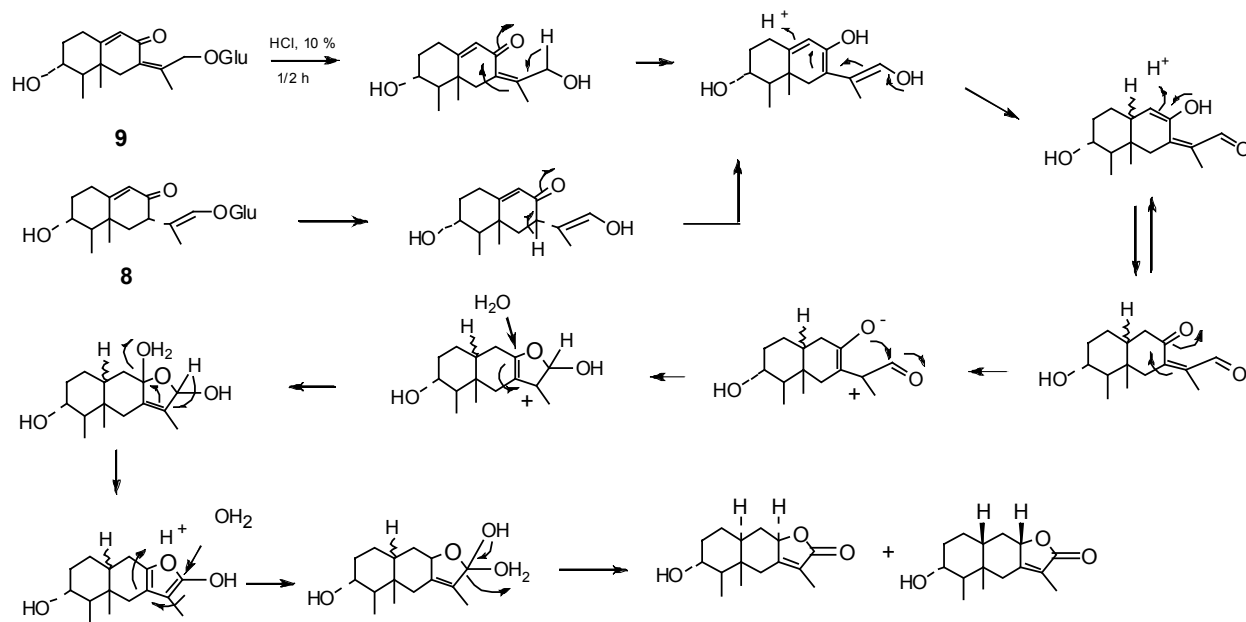
estereoquímica  $\beta$  de H-3 también se dedujo a partir de dos acoplamientos axial-axial de este hidrógeno con uno de los hidrógenos H-2 ( $J = 10.5$  Hz) y con H-4 ( $J = 10.5$  Hz), respectivamente, y esto sólo es posible si H-3 se encuentra orientado  $\beta$  de acuerdo con los modelos Dreiding, considerando además que H-4 biogénicamente se encuentra orientado  $\alpha$ . De manera adicional, sabíamos que sus precursores de reacción, los glucósidos **8** y **9**, presentaban a H-3 orientado  $\beta$  el cual conserva su estereoquímica durante la reacción. El hidrógeno H-10 mostró una interacción NOE con H-4 además de una interacción con H-8 y esto permitió establecer la estereoquímica  $\alpha$  para ambos hidrógenos sabiendo que H-4 se encuentra orientado  $\alpha$ . Todas las señales de RMN- $^{13}\text{C}$  fueron asignadas con base en los experimentos HMBC y HSQC.

El otro producto de reacción, la lactona **99**, corresponde con el reportado en la literatura [31] y sus señales en RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  son semejantes a las de la lactona **98**, salvo las de los protones H-10 y H-8 que difieren por tener una orientación  $\beta$  lo cual se puede observar, comparando los desplazamientos químicos de los metilos H-14 y H-15 que están invertidos con respecto a la lactona **98**.

Se sabe que cuando la fusión de anillos A/B se encuentra *cis* y el grupo unido a C-8 se encuentra orientado  $\beta$ , el desplazamiento químico del metilo H-14 se encuentra localizado a campo más bajo que la señal del metilo H-15 [31, 32, 33], y esto corresponde precisamente con lo observado para la lactona **99**. La desaparición de la doble ligadura 9(10) en las lactonas **98** y **99** se puede explicar mediante un mecanismo como el señalado en el esquema 12.

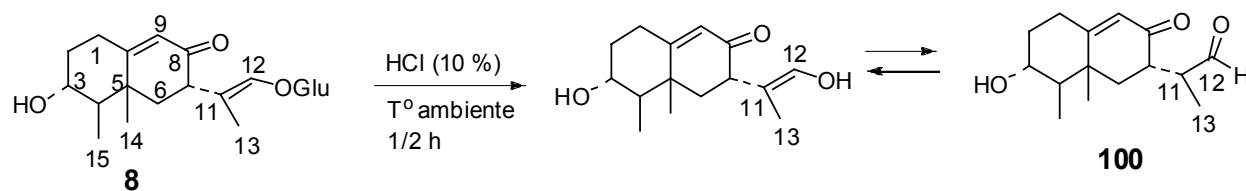
Posteriormente, se hicieron varias reacciones de hidrólisis con HCl a reflujo en tiempos variables y fue posible constatar que con sólo un minuto de reflujo ambos compuestos producen dichas lactonas además de que las mejores condiciones de reacción se dieron a 70 °C durante 30 minutos.

## Resultados y discusión: Estudio de la biogénesis de eremofilanólidas



Esquema 12: Mecanismo propuesto para la formación de las lactonas **98** y **99**

Dada la rapidez con la que suceden dichas reacciones, se buscaron condiciones que permitieran obtener las respectivas agliconas y se encontró que la hidrólisis del compuesto **8** a temperatura ambiente durante 30 minutos conduce al aldehído de estructura nueva **100** (Esquema 13).



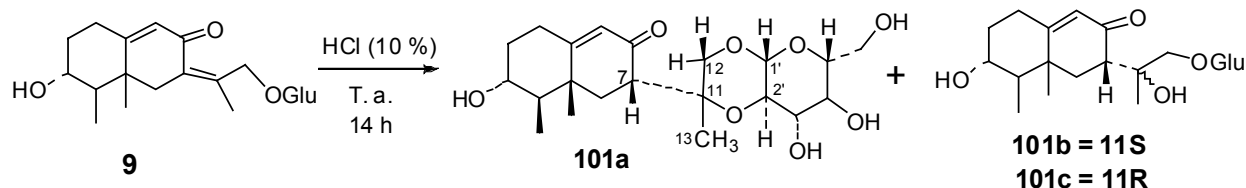
Esquema 13: Obtención del aldehído **100** a partir del glucósido **8**

La formación de este aldehído se pudo determinar por la presencia en su espectro de RMN-<sup>1</sup>H de una señal simple a  $\delta$  9.76 característica para un protón de aldehído y una señal para carbonilo en RMN-<sup>13</sup>C a  $\delta$  204 que fue asignada al C-12. Este mismo espectro mostró otra señal para carbonilo a  $\delta$  197.9 que corresponde al C-8 y que también fue reportada para el glucósido **8** [53]. La desaparición de la doble ligadura 11(12) en el compuesto **100** se pudo deducir de su espectro RMN-<sup>1</sup>H, por el

corrimiento a campo alto de la señal para el metilo 13 a  $\delta$  1.18 con respecto a la misma señal reportada para metilo **13** en el glucósido **8** ( $\delta$ 1.97) [53]. Esto también fue confirmado por la presencia de una señal qd a  $\delta$  2.61 que mostró acoplamientos con el metilo 13 y con H-7 ( $J = 7.2, 3.6$  Hz) la cual fue asignada a H-11. La señal de H-7 para este compuesto a  $\delta$  3.01, corresponde al mismo desplazamiento de H-7 reportado para el glucósido **8** ( $\delta$  3.03), y su estereoquímica se determinó con base en lo siguiente: el hidrógeno H-6b que aparece como un triplete a  $\delta$  1.70 mostró una interacción NOESY con el hidrógeno H-4 el cual sabemos que por biogénesis se encuentra orientado  $\alpha$  y por lo tanto, H-6b deberá también estar orientado  $\alpha$ . Adicionalmente, el mismo hidrógeno H-6b muestra un acoplamiento con H-7 de magnitud  $J = 13.5$  Hz que es más próximo a un acoplamiento axial-axial lo cual sólo es posible si H-7 se encuentra orientado  $\beta$  de acuerdo con el modelo Dreiding. Una interacción NOE entre H-7 y H-11 era indicativa de que H-11 también se encontraba orientado  $\beta$ . Sin embargo, se debe tener cuidado debido a que todo el sustituyente en C-7 presenta libre rotación por lo que no se puede asegurar su estereoquímica por este método. Todas las demás señales en RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  corresponden con la estructura **100** que además fueron similares a las reportadas para el glucósido **8** [53]. Su espectro UV ( $\lambda_{\text{max}}$  237.5 nm) y dos bandas en el IR a  $1667\text{ cm}^{-1}$  y  $1721\text{ cm}^{-1}$  indicaron la presencia de dos carbonilos, uno de ellos  $\alpha, \beta$  insaturados. Por espectrometría de masas de alta resolución (FAB), se obtuvo una masa estimada de  $m/z$  251.1647  $[\text{M} + 1]^+$  que corresponde a una fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}_3$ , que es consistente a la fórmula para la estructura propuesta  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$ . El cálculo del grado de insaturaciones condujo al equivalente de cinco insaturaciones que corresponden a los dos carbonilos, los dos anillos y el doble enlace 9(10).

El tratamiento ácido del glucósido **9** a temperatura ambiente no condujo a su aglicona y en lugar de eso se obtuvieron los compuestos **101a-c** (Esquema 14).

## Resultados y discusión: Estudio de la biogénesis de eremofilanólidas



Esquema 14: Tratamiento ácido a temperatura ambiente del glucósido **9**

El compuesto **101a** ( $R_f = 0.75$ ), resultó menos polar que el glucósido **9** ( $R_f = 0.45$ ) cuyos valores fueron calculados a partir de una cromatografía en placa fina de gel de sílice mediante tres eluciones consecutivas con AcOEt-MeOH 9:1. Dicho compuesto se produjo por la adición del grupo hidroxilo del C-2 de la glucosa a la doble ligadura conjugada 7(11) (Espectros 4a-c). La evidencia de la estructura para este compuesto se dedujo con base en lo siguiente: Aparece la señal para H-7 a  $\delta$  2.56 lo que indicó la saturación de la doble ligadura 7(11). También se observó el corrimiento a campo alto de la señal para el metilo 13 ( $\delta$  1.3) con respecto la señal para el mismo metilo en el glucósido **9** ( $\delta$  1.97). Por espectrometría de masas el ión molecular apareció a una  $m/z$  de 412, igual al reportado para el glucósido **9** [53], lo cual es congruente con una fórmula molecular  $C_{21}H_{32}O_8$ . El espectro de RMN- $^{13}C$  mostró 21 señales de las cuales 3 son metilos, 5 metilenos, 9 metinos y 4 carbonos cuaternarios. Todas estas observaciones concuerdan con una adición intramolecular, que de acuerdo con el experimento NOESY y los modelos Dreiding, se pudo establecer como la adición del hidroxilo de C-2' a la doble ligadura conjugada 7(11) para dar el compuesto **101a**. En la figura 7 se muestran las principales interacciones NOE que permitieron establecer la estructura propuesta para esta molécula, destacando la interacción de H-2' con H-13:

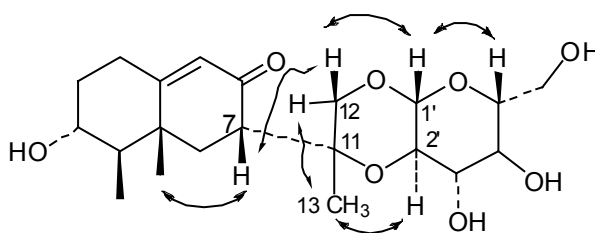
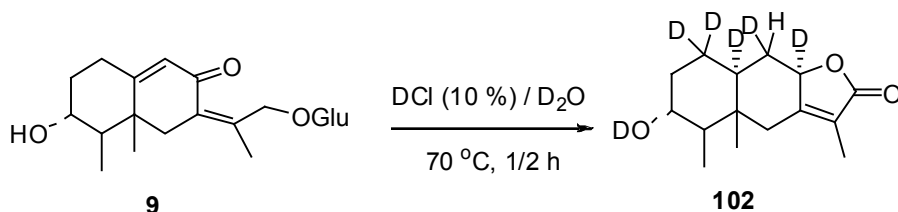


Figura 7: Correlaciones selectas en el espectro NOESY de **101a**

## Resultados y discusión: Estudio de la biogénesis de eremofilanólidas

Los compuestos **101b** ( $R_f = 0.38$ ) y **101c** ( $R_f = 0.34$ ), más polares que el glucósido **9**, se encuentran todavía en proceso de elucidación estructural. Sin embargo, de acuerdo a los datos preliminares todo parece indicar que corresponden a la adición de una molécula de agua a la doble ligadura 7(11) en donde una de ellas, (**101b**), podría estar formando un puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo unido a C-11 el cual entró por la cara  $\beta$  del carbono 11 y no así la estructura **101c** en donde el grupo hidroxilo se adicionó por el lado opuesto.

Con la idea de comprobar el mecanismo propuesto para la formación de las lactonas **98** y **99**, se llevó a cabo la reacción de hidrólisis del glucósido **9** en condiciones deuterantes empleando en este caso DCI al 10 % en  $D_2O$  en lugar de HCl y durante 30 minutos. Este proceso permitió obtener la lactona **102**, en la cual el deuterio se había incorporado en las posiciones 1, 8, 9 y 10. Dichas incorporaciones fueron deducidas por comparación de los respectivos espectros de RMN- $^1H$  y COSY de la lactona sin deuterar (Espectro 1a y 1c) y la deuterada (Espectro 5a, 5b y 5c), ya que esta última mostró total ausencia de los protones en dichas posiciones (Esquema 15).

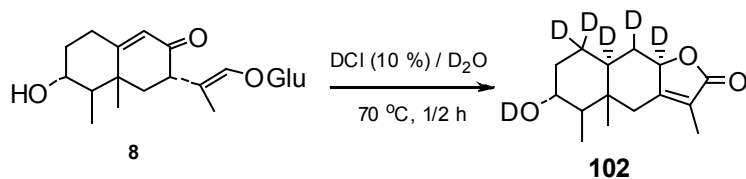


**Esquema 15: Obtención de la lactona deuterada 102 a partir del glucósido 9**

La incorporación de dos deuterios en C-1 se dedujo por el patrón de multiplicidad de los hidrógenos vecinos H-2, que consiste en un dd ( $J = 12.5, 5.0$  Hz), al estar acoplados sólo con H-3. La incorporación de los deuterios en C-8 y C-10 se dedujo por la desaparición de las señales para sus protones a  $\delta$  4.65 y 1.52 respectivamente, tomando como referencia la lactona sin deuterar. La incorporación de un deuterio en lugar de dos en C-9 se dedujo por la desaparición de la señal a  $\delta$  2.16 (ddd, H-9a) y debido a que la masa de la molécula en la que se han incorporado 6 deuterios (esquema 15) es consistente con el ión molecular de  $m/z$  256 (14.6%)  $M^+$ ,

observado por espectrometría de masas de impacto electrónico. Aquí es importante resaltar que en el mismo espectro de masas fue posible observar un segundo fragmento de  $m/z$  257 (7.5%) el cual corresponde a un segundo ión molecular. Esto sugiere de inmediato que, aunque en más baja proporción, existe otra molécula en la cual se han incorporado 7 deuterios, lo cual es consistente con la incorporación de dos deuterios en C-9. La incorporación de uno o dos deuterios en C-9 es completamente probable si tenemos en cuenta que este paso sucede a través de un equilibrio como el señalado en el esquema 12.

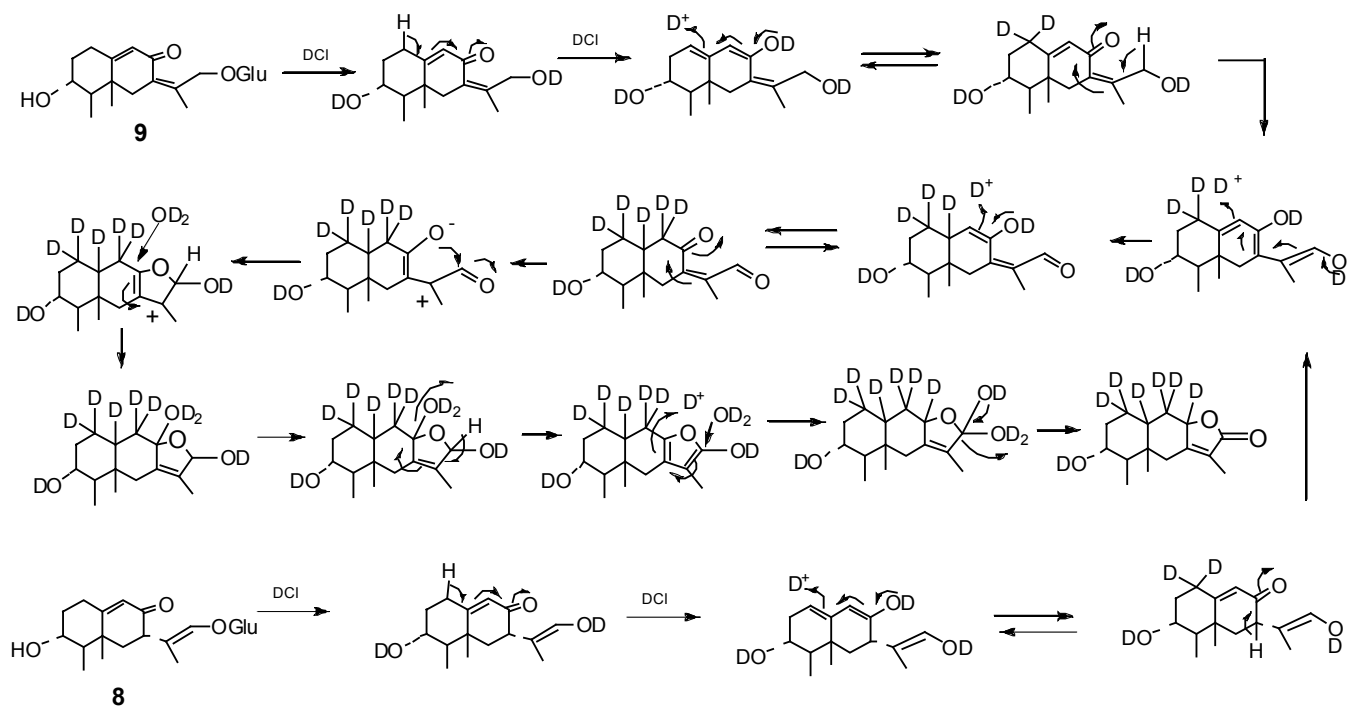
El tratamiento del glucósido **8** en las mismas condiciones permitió obtener una mezcla de la lactona deuterada y un aldehído. Sin embargo, un análisis de CLAR acoplado a EM permitió evidenciar un compuesto de  $m/z$  257  $[M + 1]^+$  (cromatograma 2). Dicha masa es consistente con la estructura de la lactona **102** a la que se incorporaron 6 deuterios y esto permite concluir que tanto el glucósido **8** como el glucósido **9** conducen al mismo patrón de marcación isotópica a través de una hidrólisis con DCI al 10 % en  $D_2O$  (Esquema 16) y por tanto siguen el mismo mecanismo.



**Esquema 16: Obtención de la lactona deuterada 102 a partir del glucósido 8**

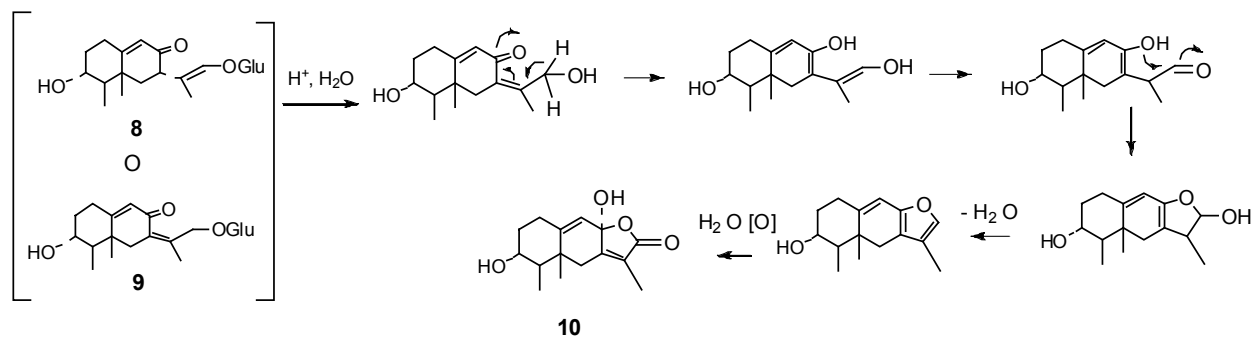
Con base estos resultados, se pudo establecer el mecanismo por el cual los glucósidos **8** y **9** se convierten en sus respectivas lactonas el cual se esquematiza a continuación, haciendo referencia a aquellos equilibrios donde existe la posibilidad de que se incorporen uno o dos deuterios como es el caso para C-9 (Esquema 17):

## Resultados y discusión: Estudio de la biogénesis de eremofilanólidas

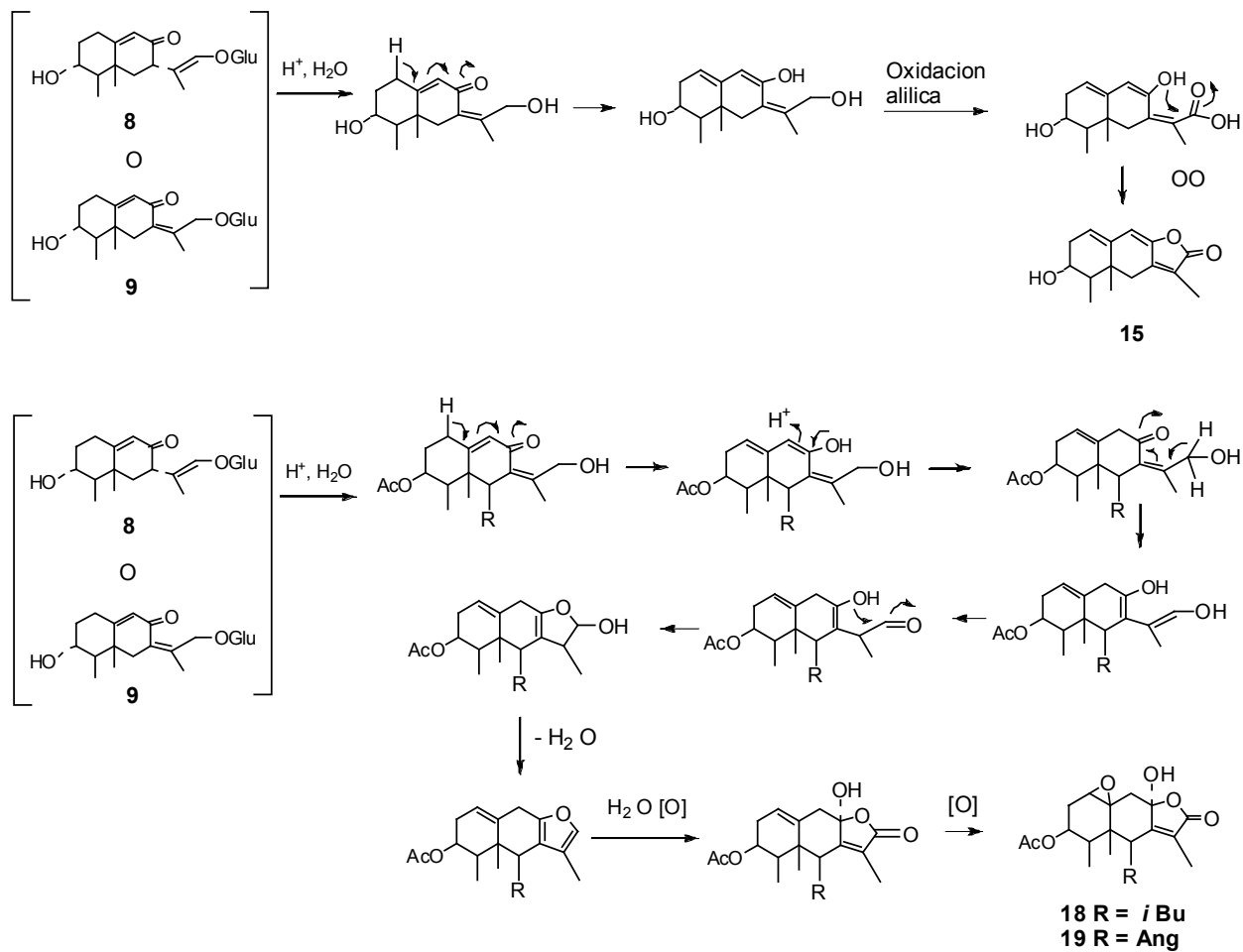


**Esquema 17: Mecanismo de formación de lactonas establecido por marcación isotópica con deuterio**

Con base en lo anterior, también se podría pensar que la biogénesis de las lactonas **10**, **15**, **18** y **19** reportadas para *Pittocaulon praecox* [53], podría estar ocurriendo a partir de los glucósidos **8** y **9** como se muestra a continuación:



## Resultados y discusión: Estudio de la biogénesis de eremofilanólidas



**Esquema 18:** Mecanismo propuesto para la formación de las lactonas reportadas para el *Pittocaulon praecox*.



### Actividad citotóxica

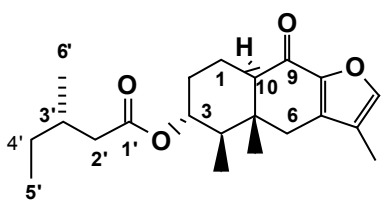
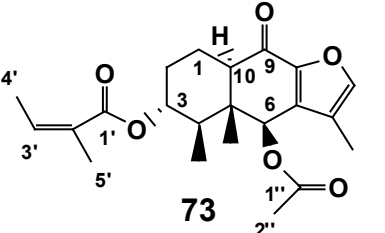
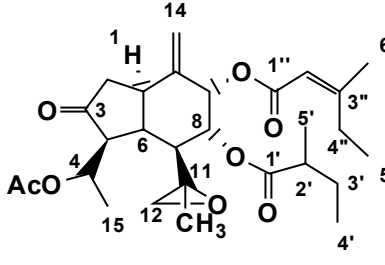
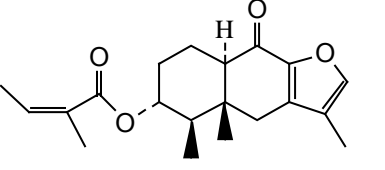
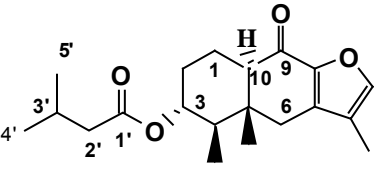
De los compuestos evaluados en un cernimiento primario de citotoxicidad (**cuadro 2**), los furanoeremofilanos **73** y **76** mostraron el mayor efecto inhibitorio de crecimiento celular en las líneas HCT-15, MCF-7 y SKLU-1. Por otra parte, los furanoeremofilanos **72** y **77** mostraron un valor de inhibición relativamente alto en las líneas K-562 y MCF-7, mientras que el oplopano **74** presentó su mayor efecto inhibitorio en las líneas U-251, PC-3 y K-562.

Los valores de  $CI_{50}$  para estos compuestos en sus respectivas líneas celulares donde fueron más activos en el cernimiento primario, no mostraron efectos citotóxicos significativos (**cuadro 3**). El valor más bajo se observó para el compuesto **72** en la línea K-562 ( $6.85 \pm 1.6 \mu\text{M}$ ), seguido del compuesto **73**, el cual mostró un valor de  $9.67 \pm 0.61 \mu\text{M}$ , en la línea HCT-15.

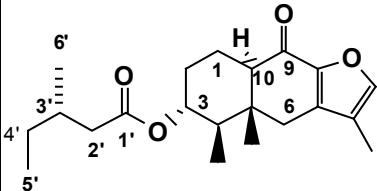
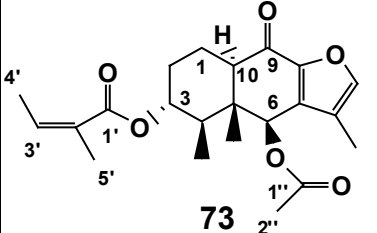
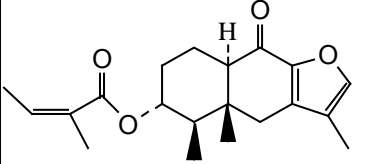
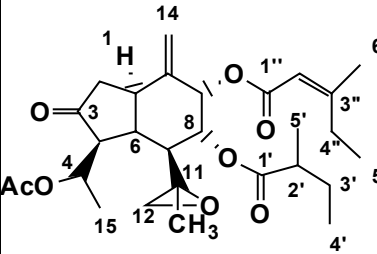
Si bien es cierto que este trabajo no estaba dirigido a un estudio de estructura-actividad, sino más bien a la búsqueda de moléculas de eremofilano que pudieran presentar un efecto citotóxico relevante, es importante señalar las diferencias en los valores de  $CI_{50}$  para los compuestos **73** y **76** en la línea HCT-15. La diferencia estructural del compuesto **73** con respecto al compuesto **76** la constituye un residuo acetilo en C-6 y su actividad, ( $CI_{50}$ ,  $9.67 \pm 0.61 \mu\text{M}$ ), se ve incrementada en casi tres veces el valor de  $CI_{50}$  del compuesto **76**, ( $CI_{50}$ ,  $28.04 \pm 2.1$ ). Esto denota que el residuo acetilo representa un papel importante en la actividad citotóxica de los  $3\alpha$ -angeloiloxi-10H $\alpha$ -9-oxo-furanoeremofilanos por lo menos en la línea HCT-15.

## Resultados y discusión: Actividad citotóxica

**Cuadro 2:** Porcentaje promedio de inhibición del crecimiento en varias líneas celulares de cáncer para los compuestos **72-74** y **76-77** a 50  $\mu\text{M}$ , en un experimento llevado a cabo por triplicado, (S.A.= Sin Actividad).

MOLECULA	U-251	PC-3	K-562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
 <p style="text-align: center;"><b>72</b></p>	49.28	49.71	75.37	S. A.	22.7	15.88
 <p style="text-align: center;"><b>73</b></p>	32.9	46.3	57.7	90.2	79.99	100.0
 <p style="text-align: center;"><b>74</b></p>	77.19	79.8	83.3	6.0	S. A.	S. A.
 <p style="text-align: center;"><b>76</b></p>	11.5	35.0	54.3	93.0	93.5	75.09
 <p style="text-align: center;"><b>77</b></p>	9.7	22.8	44.8	41.3	81.9	57.5

**Cuadro 3:** Promedio de los valores de concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ,  $\mu M$ ) en varias líneas celulares de cáncer para los compuestos **72-74** y **76**, en un experimento llevado a cabo por triplicado. Se usó como control positivo la doxorubicina: PC-3 ( $0.32 \pm 0.02$ ), U-251 ( $0.09 \pm 0.02$ ), K-562 ( $0.28 \pm 0.01$ ), HCT-15 ( $0.23 \pm 0.01$ ), MCF-7 ( $0.4 \pm 0.01$ ).

MOLECULA	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	U-251	PC-3	K-562
 <p><b>72</b></p>			<p><b>26.2</b> <math>\pm 2.0</math></p>			<p><b>6.85</b> <math>\pm 1.6</math></p>
 <p><b>73</b></p>	<p><b>9.67</b> <math>\pm 0.61</math></p>	<p><b>12.13</b> <math>\pm 1.2</math></p>	<p><b>25.66</b> <math>\pm 1.8</math></p>			
 <p><b>76</b></p>	<p><b>28.04</b> <math>\pm 2.1</math></p>	<p><b>50.92</b> <math>\pm 4.6</math></p>	<p><b>15.75</b> <math>\pm 07</math></p>			
 <p><b>74</b></p>				<p><b>25.87</b> <math>\pm 2.3</math></p>	<p><b>40.79</b> <math>\pm 2.5</math></p>	<p><b>31.39</b> <math>\pm 2.0</math></p>

## Resultados y discusión: Actividad antiinflamatoria

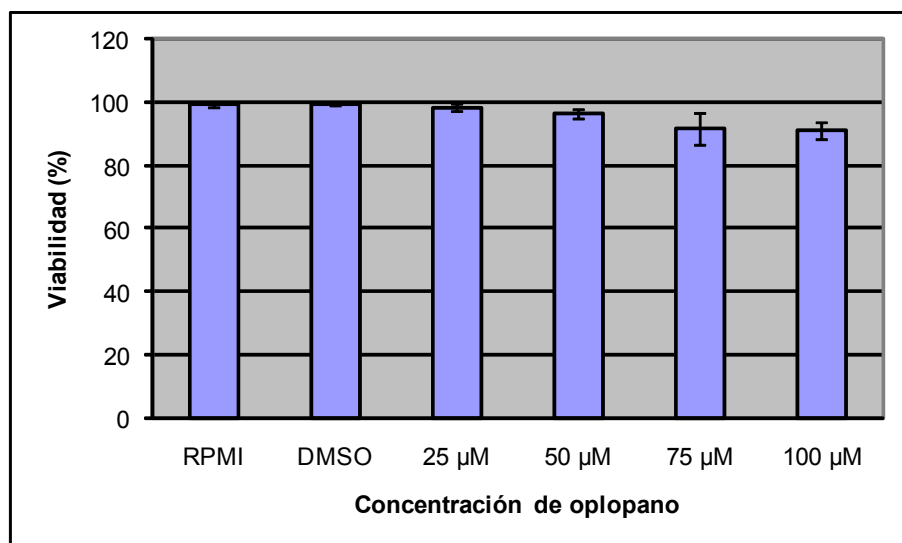
Un bioensayo para evaluar actividad antiinflamatoria utilizando el modelo de edema inducido con TPA, y usando como control positivo la indometacina, permitió establecer que el oplopano **74** presenta un efecto antiinflamatorio relativamente significativo con un valor de  $DI_{50}$  de 0.71  $\mu\text{mol}/\text{oreja}$  (**cuadro 4**).

**Cuadro 4: Actividad antiinflamatoria del oplopano 74 comparada con la indometacina en el modelo de edema inducido con TPA.** (Los datos representan el promedio de cuatro animales  $\pm$  el error estándar de la media. Los resultados se analizaron mediante ANOVA seguida de una prueba de Dunnett, los valores de  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*\*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control negativo que consiste en animales sin tratamiento).

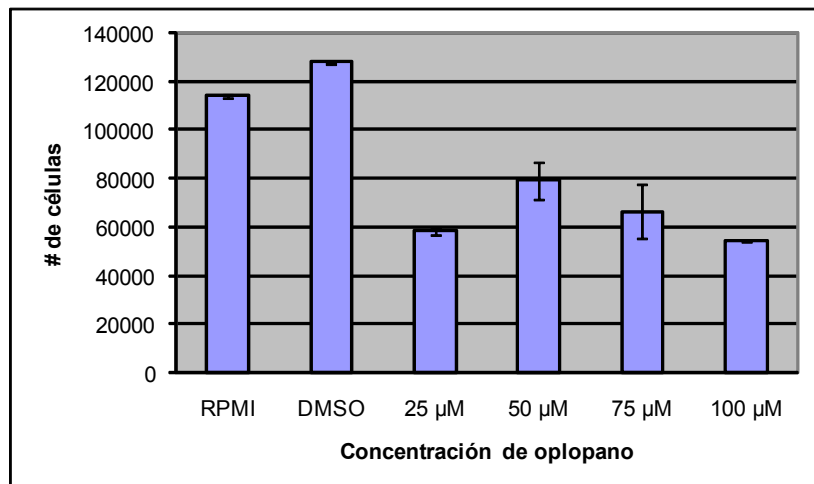
Muestra	Dosis $\mu\text{mol}/\text{oreja}$	Edema (mg)	Inhibición (%)	$DI_{50}$
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /acetone 1:1 <b>Oplopano</b>	-	16.08 $\pm$ 0.57	-	<b>0.71 <math>\mu\text{mol} / \text{oreja}</math> r = 0.98</b>
	0.1	15.59 $\pm$ 1.04	3.01	
	0.31	13.83 $\pm$ 0.76	13.99	
	0.42	11.75 $\pm$ 0.29*	26.91**	
	0.56	8.98 $\pm$ 1.81**	44.17**	
	1.0	6.13 $\pm$ 1.44**	61.89**	
Etanol <b>Indometacina</b>	-	15.00 $\pm$ 0.47	-	<b>0.27 <math>\mu\text{mol} / \text{oreja}</math> r = 0.99</b>
	0.1	11.83 $\pm$ 0.70*	21.11*	
	0.31	6.82 $\pm$ 1.27**	54.53**	
	1.0	1.99 $\pm$ 0.68**	83.73**	

El proceso inflamatorio desencadenado por la aplicación tópica del TPA se debe a la activación de la proteína cinasa c (PKC), la cual inicia la respuesta inflamatoria. Todos los agentes antiinflamatorios muestran actividad en este modelo, en especial aquellos cuyo efecto inhibitorio se lleva a cabo en las enzimas cicloxigenasas (Cox-1 y Cox-2) y también lipoxigenasas, aunque las primeras son más efectivas en reducir la respuesta edematosa [89] y ambas están involucradas en la biosíntesis de moléculas lipídicas mediadoras de la inflamación como lo son las prostaglandinas, los leucotrienos y las lipoxinas [90]. De este modo, es posible pensar entonces que el oplopano **74** estuviera ejerciendo su efecto antiinflamatorio por la vía de las cicloxigenasas.

Se ha reportado que un gran número de agentes antiinflamatorios inhiben la proliferación y/o inducen apoptosis en diferentes clases de células a través del ciclo celular y factores proapoptóticos [91-96]. Incluso, varios agentes conocidos entre ellos la aspirina y la indometacina inhiben la proliferación y arrestan el ciclo celular en la fase Go/G1 de células de adenocarcinoma de colon [97]. También se ha reportado que la indometacina induce apoptosis e inhibe la proliferación en células de leucemia mieloide crónica [98]. Considerando el interés que hay sobre la modulación del fenómeno de apoptosis para el tratamiento de algunas patologías como el cáncer o las enfermedades autoinmunes resulta importante la búsqueda de moléculas inductoras de apoptosis, por lo que se llevaron a cabo experimentos adicionales para establecer si el oplopano **74** inducía muerte celular por apoptosis en la línea K-562. Como primera medida se hizo un ensayo de viabilidad celular cuyos resultados no indicaron inducción de muerte a las cuatro concentraciones evaluadas del oplopano (**gráfico 1**); sin embargo, se observó un efecto inhibitorio sobre la proliferación de células, lo cual se hizo evidente al comparar el número de células K-562 que se cultivaron bajo el efecto del oplopano con respecto al número total de células, aunque no se observó un efecto dosis-respuesta (**gráfico 2**).

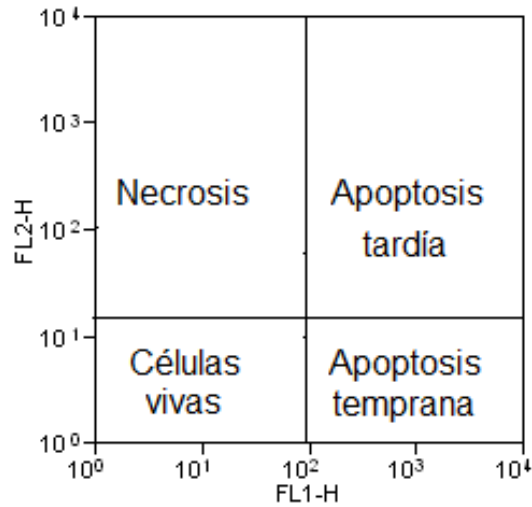


**Gráfico 1:** Porcentaje de viabilidad de la línea K-562 después de 24 horas de cultivo en presencia o ausencia del oplopano **74**. Las barras representan la media  $\pm$  la D.S de tres experimentos independientes entre sí.

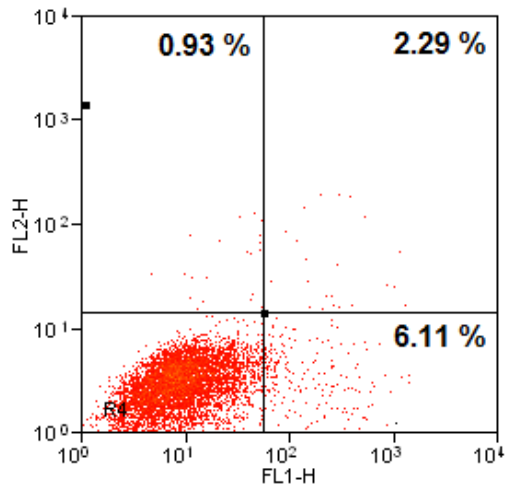


**Grafico 2:** Número total de células K-562 después de 24 horas de cultivo en presencia y ausencia del oplopano **74**. Las barras representan la media  $\pm$  la D.S de tres experimentos independientes entre sí.

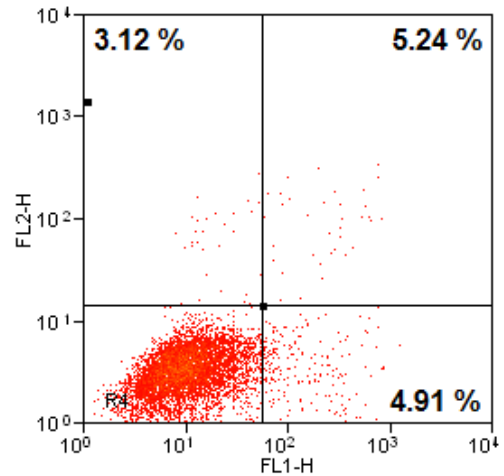
Considerando que la técnica de exclusión de azul tripano pone de manifiesto la ruptura de la membrana celular y que durante las fases tempranas de la apoptosis, la membrana permanece íntegra, se decidió evaluar si el oplopano **74** pudiera estar induciendo la translocación de la fosfatidilserina, evento considerado como temprano en el proceso apoptótico. Para ello, las células cultivadas en ausencia o presencia del compuesto a diferentes concentraciones se tiñeron con anexina-V acoplada a FITC y con PI. La anexina es una molécula que tiene gran afinidad por la fosfatidilserina y se usa acoplada al fluorocromo FITC junto con yoduro de propidio (PI) como colorante supravital. Esta técnica permite distinguir varios tipos de muerte celular: Células apoptóticas tempranas las cuales fijan la anexina V y excluyen al PI; células apoptóticas tardías, que capturan tanto la anexina V como al PI, y células necróticas (anexina V<sup>-</sup>, PI<sup>+</sup>). Las células vivas son negativas para ambos marcadores [69]. Los resultados obtenidos se muestran en diagramas de puntos e indican el tipo de muerte de acuerdo a la región donde se distribuyen las células K-562. Las imágenes corroboraron la ausencia de inducción de muerte bajo efecto del oplopano en cultivos de 24 horas y a la concentración más alta (100 µM) que fue evaluada en viabilidad celular (**ver diagrama de puntos C**).



(A)



(B)

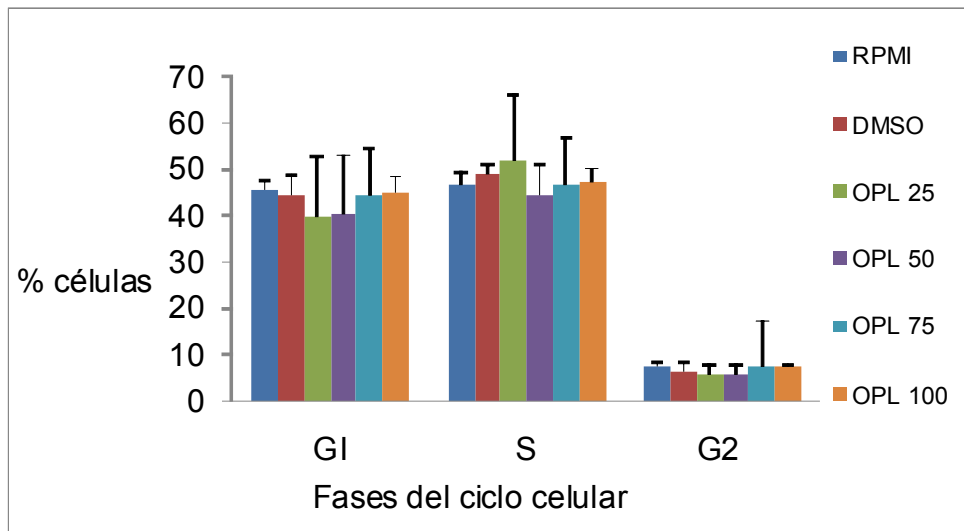


(C)

**Gráfico 3 (diagramas de puntos):** Evaluación del tipo de muerte celular inducida por el oplopano en cultivos celulares de K-562. **(A)** Interpretación gráfica de los resultados, **(B)** células control creciendo en ausencia de oplopano, **(C)** células K-562 creciendo bajo efecto del oplopano a 100  $\mu$ M por 24 horas.

**Arresto de ciclo celular:**

Los resultados obtenidos por citofluorimetría de flujo correspondieron a los obtenidos en el ensayo de viabilidad donde no se observó inducción de muerte celular (gráfico 1); sin embargo, la disminución en el número total de células observadas en el experimento de viabilidad en ausencia de muerte celular (gráfico 2), nos condujo a pensar en la posibilidad de que el oplopano **74** podría estar ejerciendo arresto de ciclo celular. El ciclo celular es un proceso de múltiples fases (Go, G1, G2, S y M) en las cuales se controla la proliferación involucrando varios reguladores [93, 94, 97, 99]. Se sabe por ejemplo que el antiinflamatorio celecoxib causa arresto del ciclo celular asociado a un incremento en la expresión de CDKIs en células de cáncer de colon [100]. En este orden de ideas, se llevó a cabo un análisis de ciclo celular usando citofluorimetría de flujo, la cual permite cuantificar el contenido de ADN celular como una medida indirecta de las distintas fases. Los resultados de este experimento no mostraron arresto de ciclo celular en ninguna de las tres fases evaluadas (G1, S y M) puesto que no hubo diferencias significativas con respecto a los controles RPMI (medio) y DMSO (vehículo) (**gráfico 4**).



**Gráfico 4:** Análisis del ciclo celular de la línea K-562 creciendo en presencia del oplopano **74** a concentraciones de 25, 50, 75 y 100  $\mu$ M.



### CONCLUSIONES

- Dentro de las suposiciones planteadas en la hipótesis se comprobó la presencia de cinco nuevas estructuras: tres furanoeremofilanos, un oplopano y un eudesmano. También, se comprobó que los glucósidos de eremofilanos **8** y **9** aislados de *P. praecox* podrían formar parte en la biogénesis de eremofilanólidas puesto que este proceso se mimetizó químicamente.
- Se propuso un mecanismo de conversión de los glucósidos **8** y **9** en eremofilanólidas apoyado por marcación isotópica con deuterio.
- Ninguno de los eremofilanos evaluados en líneas celulares derivadas de carcinomas humanos mostró efectos citotóxicos significativos.
- En el estudio químico de *P. bombycophole*, se encontró una cadena biogenética formada en orden de complejidad ascendente por los compuestos: Eudesmano (**75**) – furanoeremofilano (**21-79**) – nor-sesquiterpeno (**80**).
- Se encontró que los glucósidos 8-cetoeremofilanos **8** y **9** son importantes intermediarios en la biogénesis de eremofilanólidas.
- El estudio químico de las tres especies de la subtribu *Tussilaginatae* consideradas en esta tesis (dos *Pittocaulon* y una *Roldana*) mostraron a los 9-oxofuranoeremofilanos como sus principales metabolitos secundarios.
- Se encontró que los 9-oxofuranoeremofilanos de *P. bombycophole* tienen ésteres con orientación  $\alpha$  en la posición 3, mientras que ninguno de los encontrados en *P. velatum*, y muy pocos en *P. praecox* tienen sustituyentes en dicha posición, lo que se puede considerar como un carácter quimiotaxonómico, aunque una conclusión definitiva se tendrá cuando se hayan estudiado químicamente todas las especies de este género.

- La ausencia de eremofilanólidas en las especies tratadas se puede considerar como una consecuencia de la desactivación del anillo de furano por la presencia de un grupo ceto en C-9.
- La riqueza de furanoeremofilanos en especies de los géneros *Pittocaulon*, y *Roldana* podría ser una característica válida desde el punto de vista quimiotaxonómico que apoya su segregación del género *Senecio*.
- Mediante el modelo de edema inducido con TPA, se encontró que el oplopano **74** presenta un efecto anti-inflamatorio relativamente significativo.
- Se encontró que el oplopano **74** ejerce un efecto inhibitorio sobre la proliferación de células K-562 en cultivos *in vitro* que no está relacionado con la inducción de muerte celular ni con el arresto del ciclo celular en una fase particular del mismo.

**PERSPECTIVAS:**

- Continuar con el estudio químico del género *Pittocaulon*, con el fin de establecer la presencia o ausencia de glucósidos de 8-ceto-eremofilanos y eremofilanólidas en otras especies dada su poca ocurrencia en las especies estudiadas hasta ahora.
- Explorar la presencia de glucósidos de eremofilano en otras especies ricas en eremofilanólidas.
- Establecer si los 9-oxofuranoeremofilanos con sustitución de un éster orientado  $\alpha$  en C-3 están restringidos solamente a la especie *Pittocaulon bombycophole*.
- Terminar el estudio químico del género *Pittocaulon* para poder establecer su perfil quimiotaxonómico.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria del oplopano **74** empleando otros modelos que permitan corroborar los efectos mostrados en el modelo de edema inducido por TPA.
- Evaluar si el compuesto **72** induce muerte celular, dado que presentó el valor más bajo de  $CI_{50}$  en la línea K-562.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Marie, J.P., Unesco Courier, **1979**, 33, 8-16.
2. Mohammed, H., S. Unesco Courier, **1979**, 33, 4-5
3. Disco depositado en el museo de antropología e historia, México, D.F.
4. Piña-Lujan, I. en El nopal. Instituto de investigaciones forestales, **1981**, 34, 34-61.
5. Martínez, M. Las plantas medicinales de México. Ediciones Botas, **1959**, pp.24
6. Francisco Hernández. Obras completas, Historia natural de Nueva España, Universidad Nacional Autónoma de México **1959**.
7. De la cruz, M. Libellus de medicinalibus indorum herbis. Manuscrito azteca de 1552. Traducción latina de Juan Badiano. Fondo de cultura económica, IMSS, México **1991**.
8. Ortigosa, V., Ann. **1842**, 42, 313.
9. Heywood, V. H., Harborne, J. B., Turner, B. L. The biology and chemistry of the *Compositae*. Academic Press, London, **1977**.
10. Villaseñor, J.L., La familia *Asteraceae* en México. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. **1993**, Vol. Esp. (XLIV), 117-124.
11. Barkley, T. M. P. L., Syst. Evol. [suppl.4] **1990**, 113-119
12. Barkley, T.M., Clark, B.L., Funston, A.M. Proceedings, of the international *Compositae* conference. Kew Gardens **1994**, Hind D.M. Royal Botanical Gardens Kew 1996, vol. 188, 613-620
13. Reina, M., Gonzales-Coloma, A., Gutiérrez, C., Cabrera, R., Rodríguez, M. L., Fajardo, V., Villarroel, L. Defensive chemistry of *Senecio miser*. J. Nat. Prod. **2001**, 64, 6-11.

14. Chen, C., Chen, F.C., and Wei, R.D. Acute toxicity of PR toxin, a micotoxin from *Penicillium roqueforti*. *Toxicon*, **1982**, 20 (2), 433-441.
15. Jennings, P.W., Hurley, J. C., Reeder, S.K., Holian, A., Lee, P., Cauhglan, C.N., and Larsen, R.D. Isolation and structure determination of one second toxic constituent from *Tetradymia glabrata*. *J. Org. Chem.* **1976**, 41(26), 4078-4081
16. Roeder, E. Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids. *Pharmazie*, **2000**, 55(10), 711-725.
17. McDonald, L.A., Barbieri, L.R., Bernan, V.S., Janso, J., Lassota, P., and Carter, G. T.07H239-A. A new cytotoxic eremophilane sesquiterpene from the marine-derived *Xylariaceous* fungus LL-07H239. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67(9), 1565-1567.
18. Chun-Ming, W., Zhong-Jian, J., Rong-Liang, Z. The effect of 17 sesquiterpenes on cell viability and telomerase activity in the human ovarian cancer cell line HO-8910. *Planta Médica*, **2007**, 73, 180-184
19. Isaka, M., Srisanoh, U., Veeranondha, S., Choowong, W. Cytotoxic eremophilane sesquiterpenoids from the saprobic fungus *Berkleasmium nigroapicale* BBC 8220. *Tetrahedron* 2009, 65, 8808-8815.
20. Zhan-Xin, Z., Chan-Jun, L., Ping-Lin, L., Zhong-Jian, J. New weakly cytotoxic eremophilane sesquiterpenes from the roots of *Ligularia Virgaurea*. *Planta Médica*, **2007**, 73, 585-590.
21. Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A., Reyes, S., Contreras, J. L., and Romo de Vivar, A. New oplopane and eremophilane derivatives from *Robinsonecio gerberifolius*. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 225-229.
22. Dong-Qing, F., Shi-Gang, L., Chun-Mei, L., Gang, W., and Kung, G. Eremophilane type sesquiterpene derivatives from the roots of *Ligularia lapathifolia*. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70 (2), 241-245.
23. Qiu-Hong, W., Chun-Mei, L., Yan-Jun, C., and Kung, G. Terpenoids from roots of *Ligularia muliensis*. *Helv. Chim. Acta*, **2006**, 89, 915-921.

24. Wang, Q., Mu, Q., Shibano, M., Susan, L., Morris-Natschke, S.L., Kuo-Hsiung, L., and Dao-Feng, C. Eremophilane sesquiterpenes from *Ligularia macrophylla*. *J. Nat. prod.* **2007**, 70(8), 1259-1262.
25. Jurek, J.W., and Sheuer, P. J. Sesquiterpenoids and norsesquiterpenoids from the soft coral *Lemnalia Africana*. *J. Nat. Prod.* **1993**, 56 (4), 508-513.
26. Fisher, N. H., Oliver, E. J. Fisher, H. D. The Biogenesis and chemistry of sesquiterpene lactones. Wien Springer-Verlag, New York, **1979**, p. 257
27. Herz, W. Pseudoguaianolides in *compositae*. *Novel*, **1973**, 25, 153-170
28. Hendrickson, J. B., Stereochemical implications in sesquiterpene biogenesis. *Tetrahedron*, **1959**, 7, 82-89.
29. Romo de Vivar, A., Delgado, G., Huerta, E. Structure and stereochemistry of Mexicanin G, an intermediate in the biogenesis of Helenanolides. *Phytochemistry*, 1985, 24, 2977-2979.
30. Kitagawa, I., Shibuya, H., Yamazoe, Y., Takeno, H., and Yosioka, I. Conversion of dihidroalantolactone to tetrahidroligularenolide a biogenetic-type transformation of eudesmanolide to eremophilanolide. *Tetrahedron Lett.* **1974**, 1, 111-114.
31. Naya, K., et. al. The photosensitized oxigenation of furanoeremophilanes III. The transformations to the skeletally isomeric lactones from furanofukinol. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1991**, 64, 1071-1080
32. Naya, K., Kanazawa, R., and Michikazu, S. The photosensitized oxygenation of furanoeremophilanes I. The isomeric hydroperoxides from petasalbin and their transformations to lactones. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1975**, 48 (11), 3220-3225.
33. Naya, K., Nogi, N., Mariyama, Y., Takashina, H., and Imagawa, T. The photosensitized oxygenation of furanoeremophilanes II. The preparation and stereochemistry of the isomeric hydroperoxides and the corresponding lactones from furanofukinin and furanoeremophilane. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1977**, 50 (11), 3002-3006

34. Naya, K., Matsuura, T., Makiyama, M., and Tsumura, M. The conversion of furanoeremophilanes to epieremophilenolides. *Heterocycles*, **1978**, 10, 177-184.
35. Maldonado-Rodríguez, J.I., Estudio fitoquímico de *Roldana lineolata*, Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, **2006**.
36. Foote, C. S., Wuesthoff, M. T., Wexler, S., Burstain, I. G., and Denny, R. Photosensitized oxygenation of alkyl-substituted furans. *Tetrahedron*, **1967**, 23, 2583-2599.
37. Novotny, L., Samek, Z., and Sorm, F. Isolation and structure of dimethoxydihidrofuroeremophilane. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1966**, 31, 371-374.
38. Sorm, F. Advances in terpene chemistry. *Pure Appl. Chem.* **1970**, 21, 263-283.
39. Tori, Motoo, Kawahara, M., and Sono, M. Novel epoxyeremophilanolides, eremopetasitenins A1, A2, B1, and B2, from *Petasites japonicas*. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38(11), 1965-1968.
40. Garduño-Ramírez, Ma. L., Trejo, A., Navarro, V., Bye, R., Linares, E., and Delgado, G. New modified eremophilanes from the roots of *Psacalium radulifolium*. *J. Nat. Prod.*, 2001, 64, 432-435
41. Rodríguez-Cabrera, L., Villaseñor, J.L. Revisión bibliográfica sobre el conocimiento de la familia *Compositae* en México. *Biotica*, **1987**, 12(2), 131-147.
42. Hind, D.J.N., Jeffrey, C., *Advances in Compositae systematics*, **1993**, pp. 3-21. Royal Botanic Gardens, Kew.
43. Funston, A.M., A revision of the genus *Roldana* (*Asteraceae*: *Senecioneae*). Tesis de doctorado, Universidad del estado de Kansas, USA, **1999**.
44. Romo de Vivar, A., Pérez-Castorena, A., Arciniegas, A., Villaseñor, J.L. Secondary metabolites from Mexican species of the tribe *Senecioneae* (*Asteraceae*). *J. Mex. Chem. Soc.* **2007**, 51(3), 160-172.

45. Linares, E., Bye, R. A. A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *J. Ethnopharmacol*, **1987**, 19, 153-183.
46. Robinson, H., and Brettell, R.D. Studies in the *Senecioneae* (*Asteraceae*). I. A new genus *Pittocaulon*. *Phytologia*, **1973**, 26(6), 451-453.
47. Bain, J. F., and Golden, J. L. A phylogeny of *Packera* (*Senecioneae*; *Asteraceae*) based on internal transcribed spacer region sequence data and broad sampling of outgroups. *Mol. Phylogenet. and Evol.*, **2000**, 16(3), 331-338.
48. Marín-Loaiza, J. C. Estudio de la relación química entre *Ceroplastes albolineatus* (Coccidae) y su planta hospedera *Pittocaulon praecox*. (*Asteraceae*). Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, México, **2007**.
49. Olson, E. M. Wood, bark, and pith anatomy in *Pittocaulon* (*Senecio*, *Asteraceae*): Water storage and systematics. *J. Of The Torrey Botanical Society*, **2005**, 132, 2, 173-186.
50. Ortega, A., Romero, M., Díaz, E. Furanoeremofilanos del *Senecio praecox*. Precoxilina A. *Rev. Latinoamer. Quim.* **1975**, 6, 136-142.
51. Bohlmann, F., und Zdero, Ch. Neue furanoeremophilane aus mexikanischen *Senecio-Arten*. *Chem. Ber*, **1976**, 109, 819-825.
52. Marin-Loaiza, J.C., Ernst, L., Beuerle, T., Theuring, C., Céspedes, C.L., Hartmann, T. Pyrrolizidine alkaloids of the endemic Mexican genus *Pittocaulon* and assignment of stereoisomeric 1, 2-saturated necine bases. *Phytochemistry*, **2008**, 69, 154-167.
53. Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A. L., Gastélum, E., Villaseñor, J. L., Romo de Vivar, A. Eremophilanes derivatives from *Pittocaulon praecox*. *Heterocycles*, **2009**, 78 (5), 1253-1263.
54. Villaseñor, J. L. Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Bol. Soc. Bot. Méx.*, **2004**, 75, 105-135.



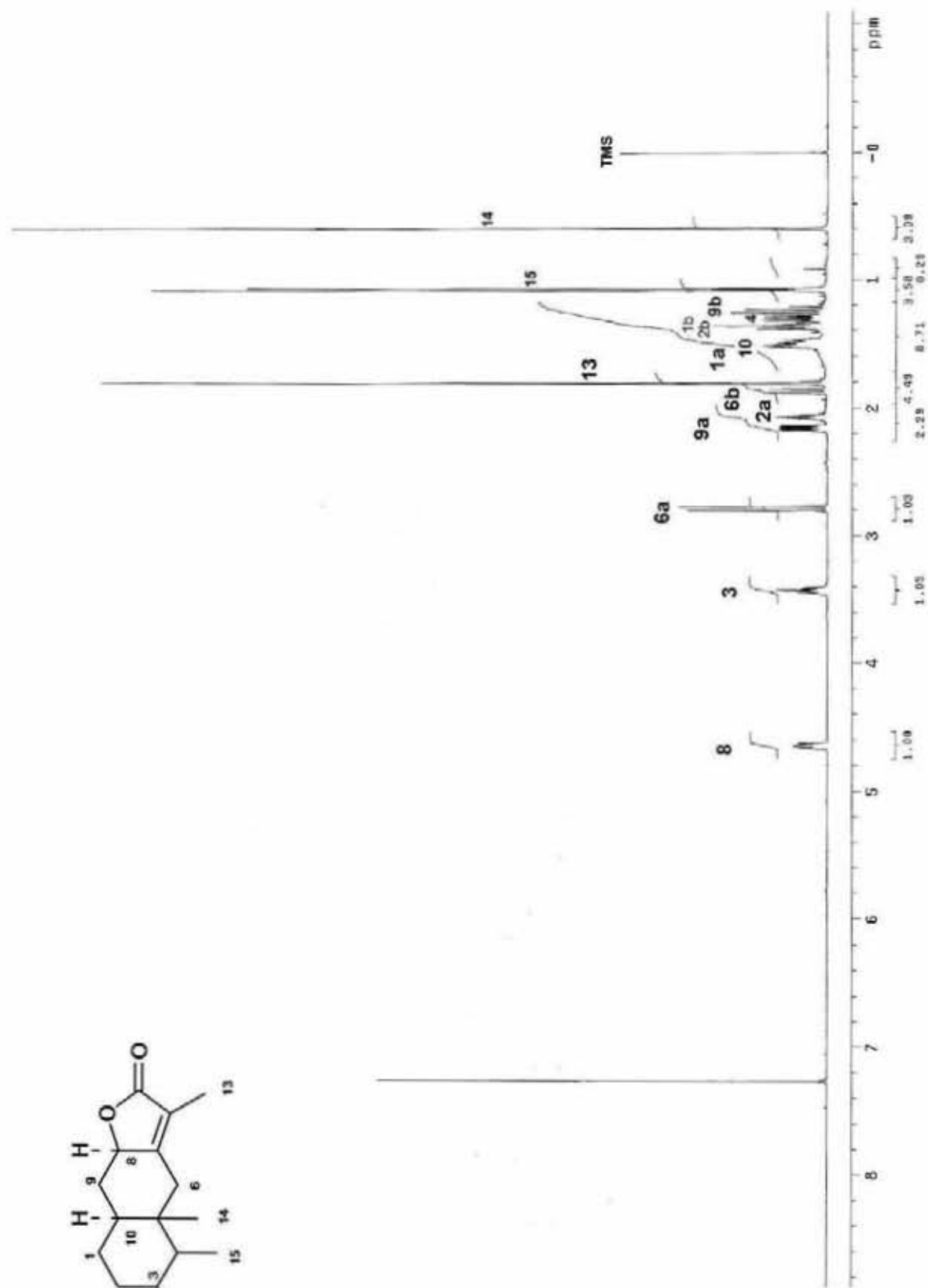
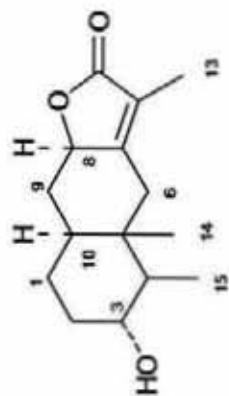
55. Maldonado J., Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A., Arciniegas, M., Villaseñor, J. L., and Romo de Vivar, A. Eremophilanolides from *Roldana lobata*. *Z. Naturforsch. B: Chem. Sci.*, **2008**, 63, 331-334.
56. Burgueño-Tapia, E., Joseph-Nathan, P. Cacalolides from *Senecio barba-johannis*. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, 41, 386-390.
57. Pérez-Castorena, A. L., Arciniegas, A., Ramírez, M. T., Villaseñor, J. L., Romo de Vivar, A. Evaluation and anti-inflammatory and antioxidant activities of the plastoquinone derivatives isolated from *Roldana barba-johannis*. *Planta Médica*, **2003**, 68, 645-647.
58. Céspedes, L. C., Tórrez, P., Marín, C. J., Arciniegas, A., Romo de Vivar, A., Pérez-Castorena, A. L., Aranda, E. Insect growth inhibition by tocotrienols and hydroquinones from *Roldana barba-johannis*. *Phytochemistry*, **2004**, 65 (13), 1963-1975.
59. Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A. L., Villaseñor, J. L., Romo de Vivar, A., Chemical constituents of *Roldana aschenborniana*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, 32, 615-618.
60. Delgado, G., García, P.  $1\alpha$ -Angeloyloxy- $8\beta$ ,  $10\beta$ -dyhydroxyeremophil-7(11)-en- $8\alpha$ , 12-olide from *Roldana sessilifolia*. *Planta Medica*, **1993**, 59, 389.
61. Delgado, G., García, P., Bye, R., Linares, E., Eremophilanolides from *Roldana sessilifolia*. *Phytochemistry*, **1991**, 30 (5), 1716-1719.
62. Bohlmann, F., Zdero, C. New cacalol derivatives from *Roldana heterogama*. *Phytochemistry*, **1978**, 17, 565-566.
63. Joseph-Nathan, P., Villagómez, R., Rojas-Gardida, M., Román, U. L., Hernández, D. J. Minor oplopanes from *Senecio mexicanus*. *Phytochemistry*, 1989, 28 (9), 2397-2401.
64. Joseph-Nathan, P., Villagómez, R., Román, U. L., Hernández, D. J. Oplopanes from leaves of *Senecio Mexicanus*. *Phytochemistry*, **1990**, 29 (3), 977-979.

65. Pérez-Castorena, Ana-L., Arciniegas, A., Hernández, Ma. L., Toscano, R. A., Contreras, J. L., Romo de Vivar, A. 8, 9 Seco-eremophilanolides from *Roldana ehrenbergiana*. J. Mex. Chem. Soc. **2006**, 50 (4), 157-159.
66. Pérez-Castorena, A. L., Arciniegas, A., Hernández, Ma. L., De la Rosa, I., Contreras, L. J., Romo de Vivar, A. Furanoeremophilanes from *Roldana ehrenbergiana*. Z. Naturforsch. B: Chem. Sci., **2005**, 60, 1088-1092.
67. Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A. L., Maldonado, J., Ávila, J., Villaseñor, J. L., Romo de Vivar, A. Chemical constituents of *Roldana lineolata*. Fitoterapia, **2008**, 79, 47-52.
68. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paul, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. J. Natl. Cancer Inst. **1991**, 83 (11), 757-766.
69. Sánchez-Tórrez, L. E., Diosdado, V. F. Apoptosis: El fenómeno y su determinación. Tec. Pecu. Mex. **2003**, 41(1), 49-62.
70. Nagano, H., Tanahashi, Y., Moriyama, Y. and Takahashi, T. New furanoeremophilane derivatives from *Farfarium japonicum* Kitamura. Bull. Chem. Soc. Jpn., **1973**, 46, 2840-2845
71. Naya, K., Okayama, T., Fujiwara, M., Nakata, M., Ohtsuka, T., and Kurio, S. Sesquiterpenes from the Rhizomes of *Ligularia dentata* Hara. Bull. Chem. Soc. Jpn. **1990**, 63, 2239-2245.
72. Bargeño-Tapia, E., Hernández-Carlos, B., Joseph-Nathan, P. DFT Solution, and crystal conformation of eremophilanolides. J. Mol. Struct. **2006**, 825, 115-123.
73. Bohlmann, F., Castro, V., Zdero, C., King, M., R., and Robinson, H. New furanoeremophilanes from *Senecio* Species. Rev. Latinoamer. Quim. **1984**, 14 (3), 101-103

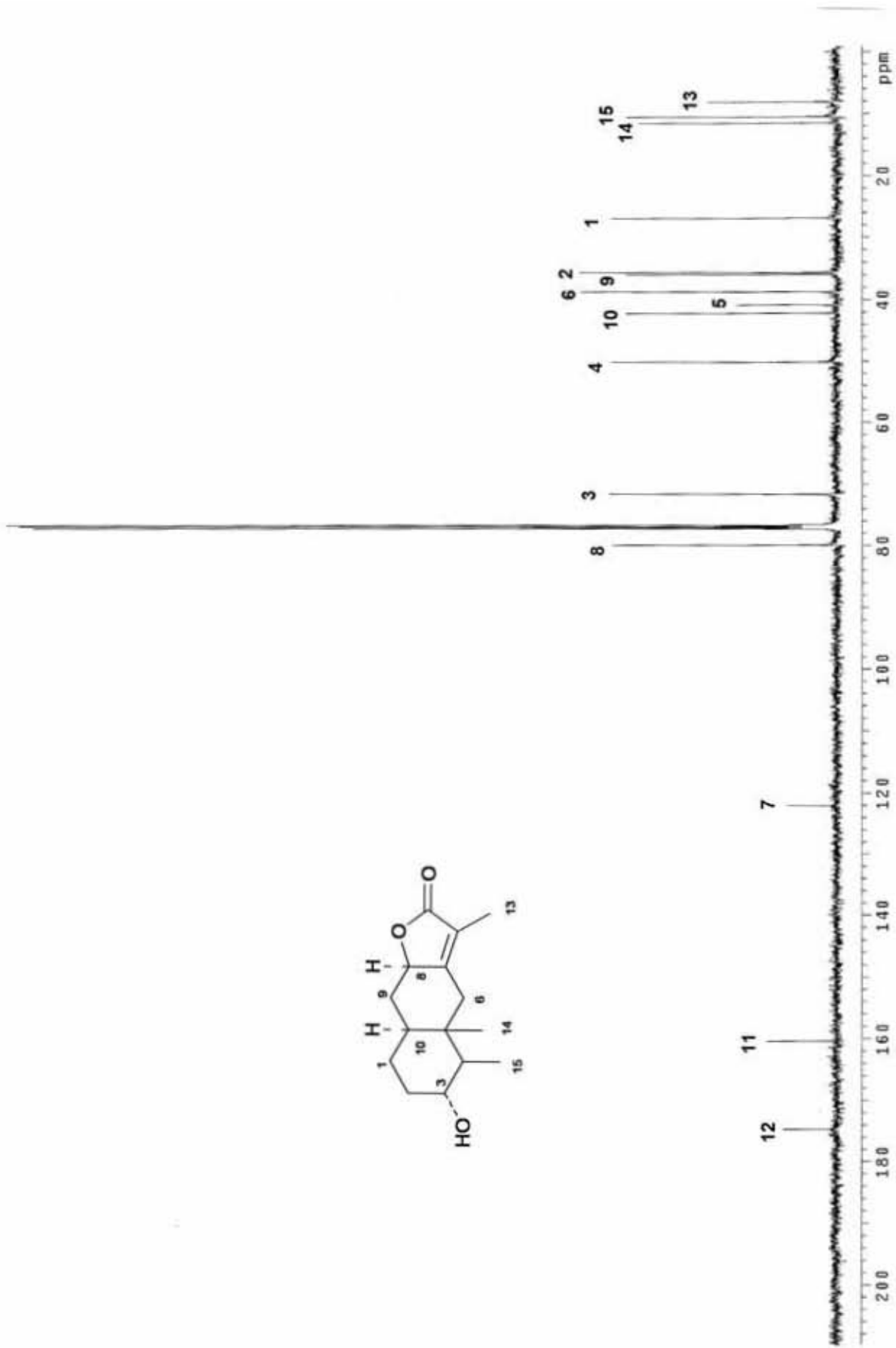
74. Bohlmann, F., Zdero, C., und Rao, N. Neue furanosesquiterpene aus *Euryops-Arten*. Chem. Ber. **1972**, 105, 3523-3531.
75. Grue, R., M., and Liddell, J. R. Pirrolizidine alkaloids from *Senecio Chrysocoma*. Phytochemistry, **1993**, 33 (6), 1517-1519.
76. Samek, Z., Harmatha, J., Novotný, L., and Sorm, F. Absolute configuration of adenostylone, neoadenostylone and isoadenostylone from *Adenostyles alliariae* (Gouan) Kern, and of decompostin from *Cacalia decomposita* A. Gray. Collect. Czech. Chem. Commun. **1969**, 34, 2792-2808.
77. Bohlmann, F., Hans-Jurgen, F., Christian-Herbert, F. Synthese von Furanoeremophilanen. Liebigs Ann. Chem. **1976**, 1487-1513.
78. Bohlmann, F., und Zdero, Ch. über neue Sesquiterpene der Gattung *Senecio*. Chem. Ber. **1974**, 107, 2912-2922.
79. Wagner, H., Mohan, V. C., und Sonnenbichler, J. <sup>13</sup>C-NMR-Spektren Natürlich vorkommender Flavonoide. Tetrahedron Lett. **1976**, 21, 1799-1802.
80. Mericli, A. H., Mericli, F., Jakupovic, J., Bolmann, F., Dominguez, X. A., and Vega, S. H. Eremophilane derivatives and other constituents from Mexican *Senecio* species. Phytochemistry, **1989**, 28 (4), 1149-1153.
81. Bohlmann, F., and Ziesche, J. Sesquiterpenes from three *Senecio* species. Phytochemistry, **1981**, 20, 469 -472.
82. Chistophoridou, S., Dais, P. Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Anal. Chim. Acta. **2009**, 633, 283-292
83. Miyase, T., Ueno, A., Takizawa, N., Kobayashi, H., and Oguchi, H. Flavonone and lignan glycosides from *Epimedium diphyllum*. Phytochemistry, **1989**, 28 (12), 3483-3485

84. Jae-Taek H., Myun-Ho, B., Ock-Kiung, C., Dae-Ok, K., Chang-Yong, L., Nam-In, B. Flavonol glycosides from the aerial parts of *Aceriphyllum rossii* and their antioxidant activities. Arch. Pharmacol. Res., **2004**, 27 (4), 390-395.
85. Eagle, G. A., Rivett, D. E. A., Williams, D. H., and Wilson, R. G. The structure of euryopsol, a furanoeremophilane from *Euryops* species. Tetrahedron, **1969**, 25, 5227-5233.
86. Yaoita, Y., Suzuki, N., Kikuchi, M. Structures of new sesquiterpenoids from *Farfarae Flos*. Chem. Pharm. Bull. **2001**, 49 (5), 645-648.
87. Martins, A. A., Paul, C., Konig, W. A., Muhle, H. Volatile components from European liverworts *Marsupella emarginata*, *M. aquatica* and *M. alpina*. Phytochemistry, **2002**, 61, 79-91.
88. Romo de Vivar, A. Química de la flora Mexicana. Investigaciones en el Instituto de Química de la UNAM. S y G Editores SA de CV, **2006**, 224p.
89. Franco, A. L., Matis, E. G., Calle, J., Pinzón, R., Ospina, F. L. Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana* L. Biomédica, **2007**, 27, 110-115.
90. Sigal, L. H., Ron, Y. Immunology and inflammation: Basic mechanism and clinical consequences, Edit. McGraw-Hill, U.S.A., **1994**, pp. 272-283, 288.
91. Corroyer, S., Schittny, J. C., Djonov, V., Burri, P. H., Clement, A. Impairment of rat postnatal lung alveolar development by glucocorticoids: Involvement of the p21<sup>CIP1</sup> and p27<sup>KIP1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitors. Pediatr. Res, **2002**, 51 (2), 169-176.
92. Fernandez, D., Guida, E., Koutsoubos, V., Harris, T., Vadiveloo, P., Wilson, J. W., Stewart, A. G. Glucocorticoids inhibit proliferation, cyclin D1 expression, and retinoblastoma protein phosphorylation, but not activity of the extracellular-regulated kinases in human cultured airway smooth muscle. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. **1999**, 21, 77-88.

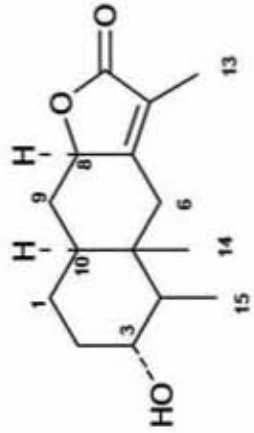
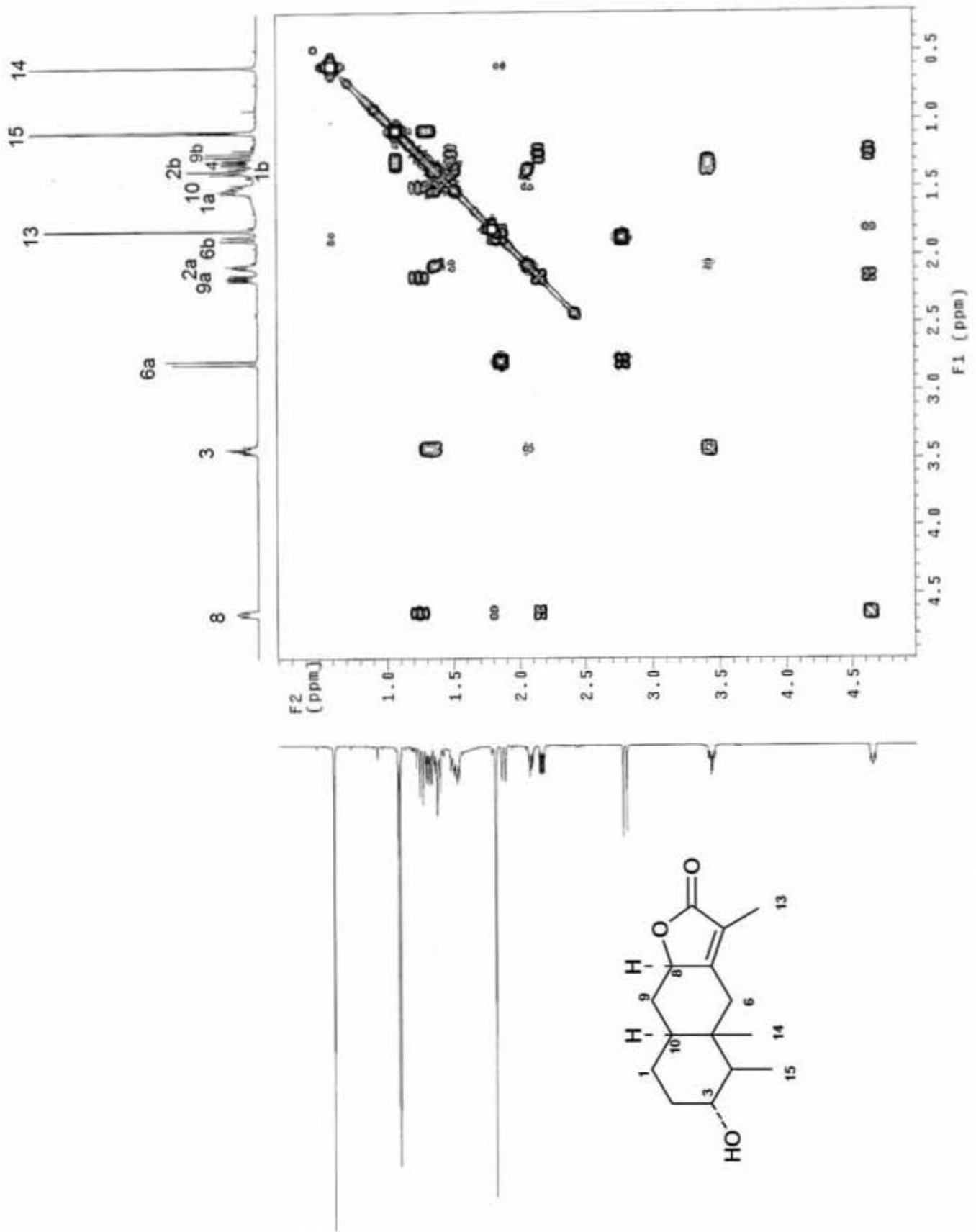
93. Yael, G., Imad, I. N., Annastassios, P., Li-Lan, T., Brian, D. D., Basil, R., and Steven, J. S. The anti-proliferative effect of sulindac and sulindac sulfide on HT-29 colon cancer cell: alterations in tumor suppressor and cell cycle-regulatory proteins. *Oncogene*, **1996**, 12, 893-901.
94. Piazza, G. A., Rahm, A. K., Finn, T. S., Fryer, B. H., Li, H., Stoumen, A. L., Pamukcu, R., Ahnen, D. J. Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest and p53 induction. *Cancer Res*, **1997**, 57, 2452-2459.
95. Weinstein, R. S., Jilka, R. L. Parfitt, A. M., Manolagas, S. C. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J. Clin. Invest.* **1998**, 102 (2), 274-282.
96. Weinstein, R. S., Manolagas, S. C. Apoptosis and osteoporosis. *Am. J. Med.* **2000**, 108, 153-164.
97. Shiff, S. J., Koutsos, M. I., Qiao, L., Rigas, B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: Effects on cell cycle and apoptosis. *Exp. Cell Res.* **1996**, 222, 179-188.
98. Zhang, g., Tu, C., Zhou, G., Zheng, W. Indomethacin induces apoptosis and inhibits proliferation in chronic myeloid leukemia cells. *Leuk. Res.* **2000**, 24, 385-392.
99. Niculescu III, A. B., Chen, X., Smeets, M, Hengst, L., Prives, C., Reed, S. I. Effects of p21<sup>(Cip1/Waf1)</sup> at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinate in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, 18, 629-643.
100. Grosch, S., Tegeder, I., Niederberger, E., Brautigam, L., Geisslinger, G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J.*, **2001**, 15, 2742-2744.



ESPECTRO 1a: RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 98

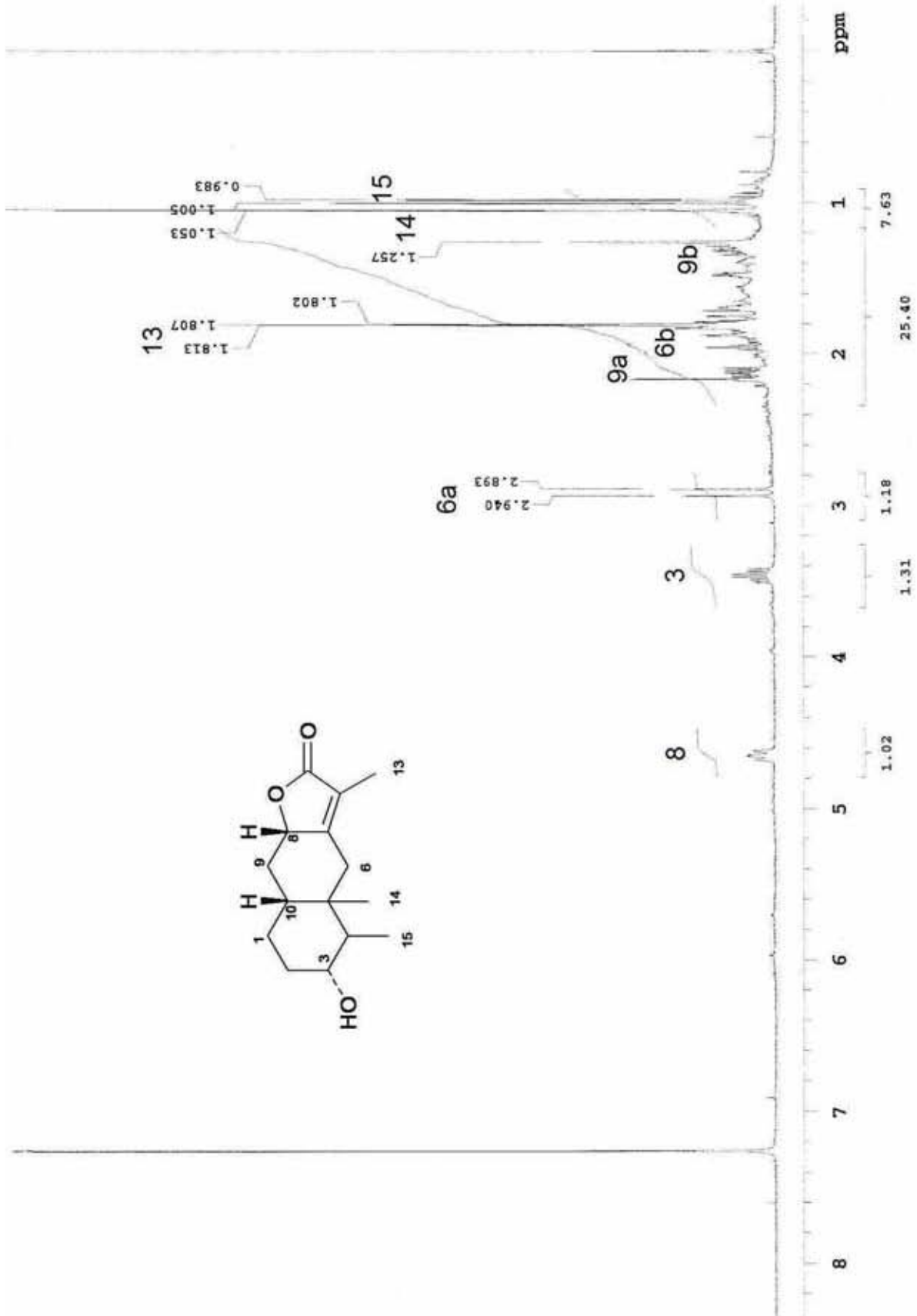


ESPECTRO 1b: RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 98

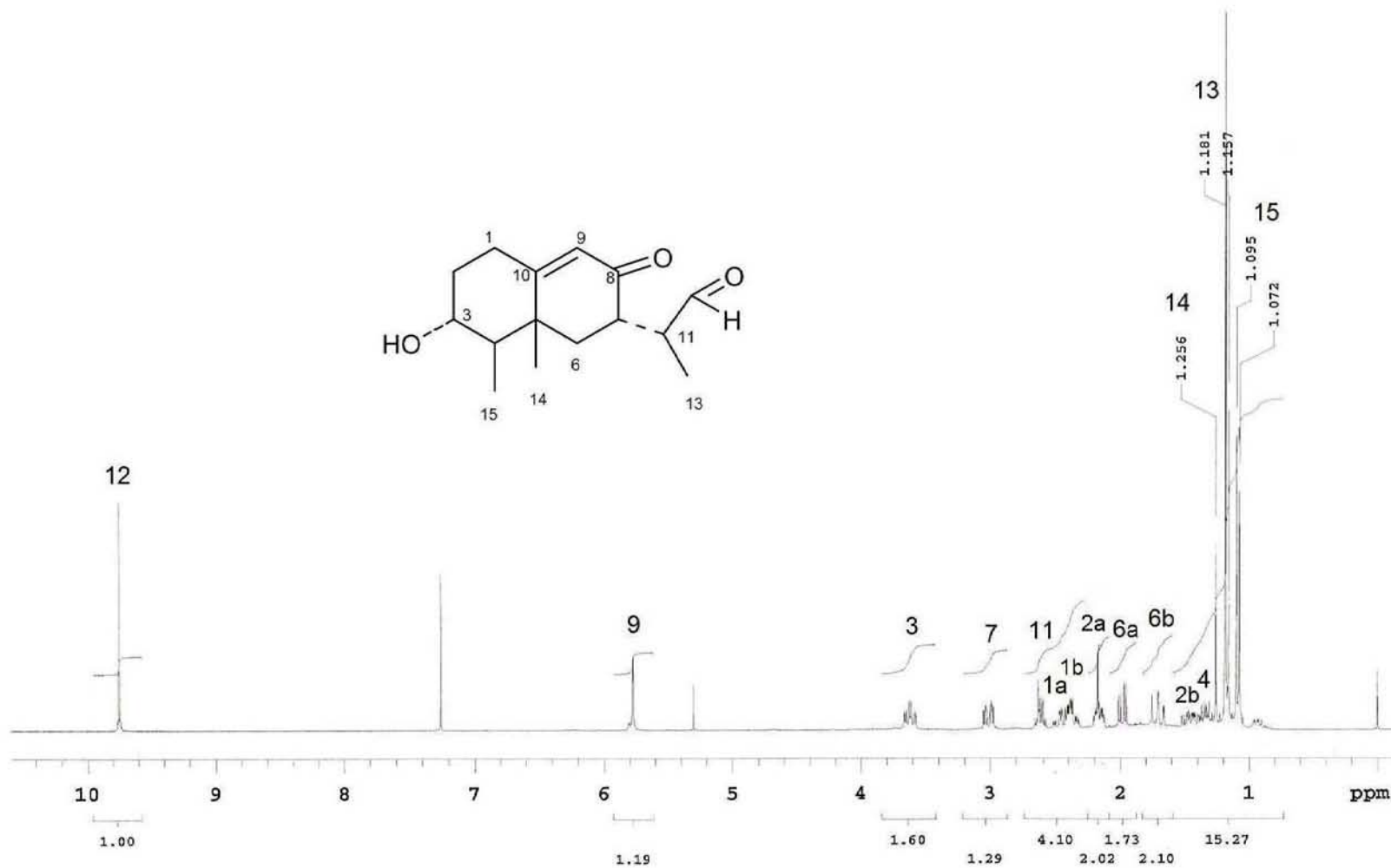


**ESPECTRO 1c: Experimento COSY del compuesto 98**

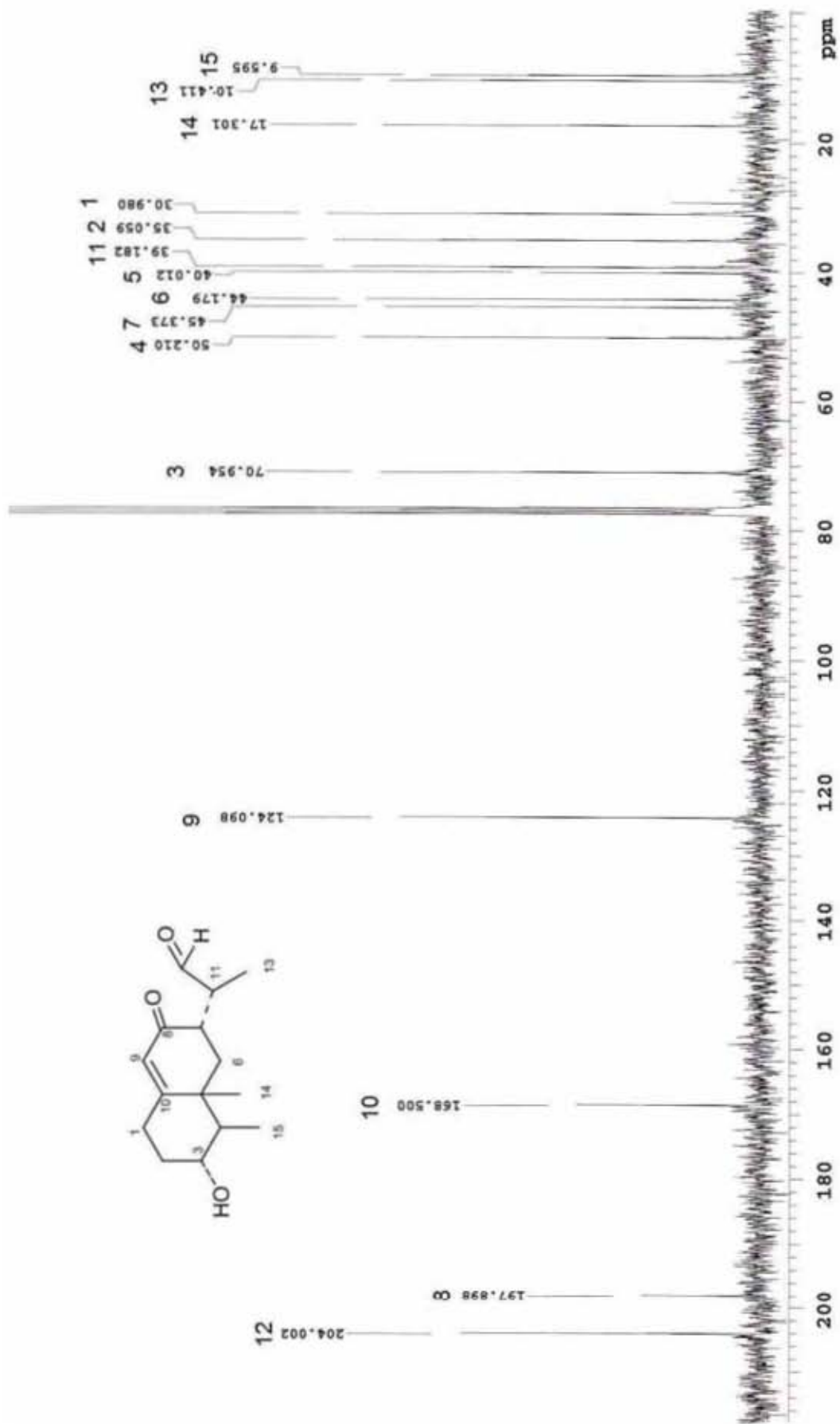




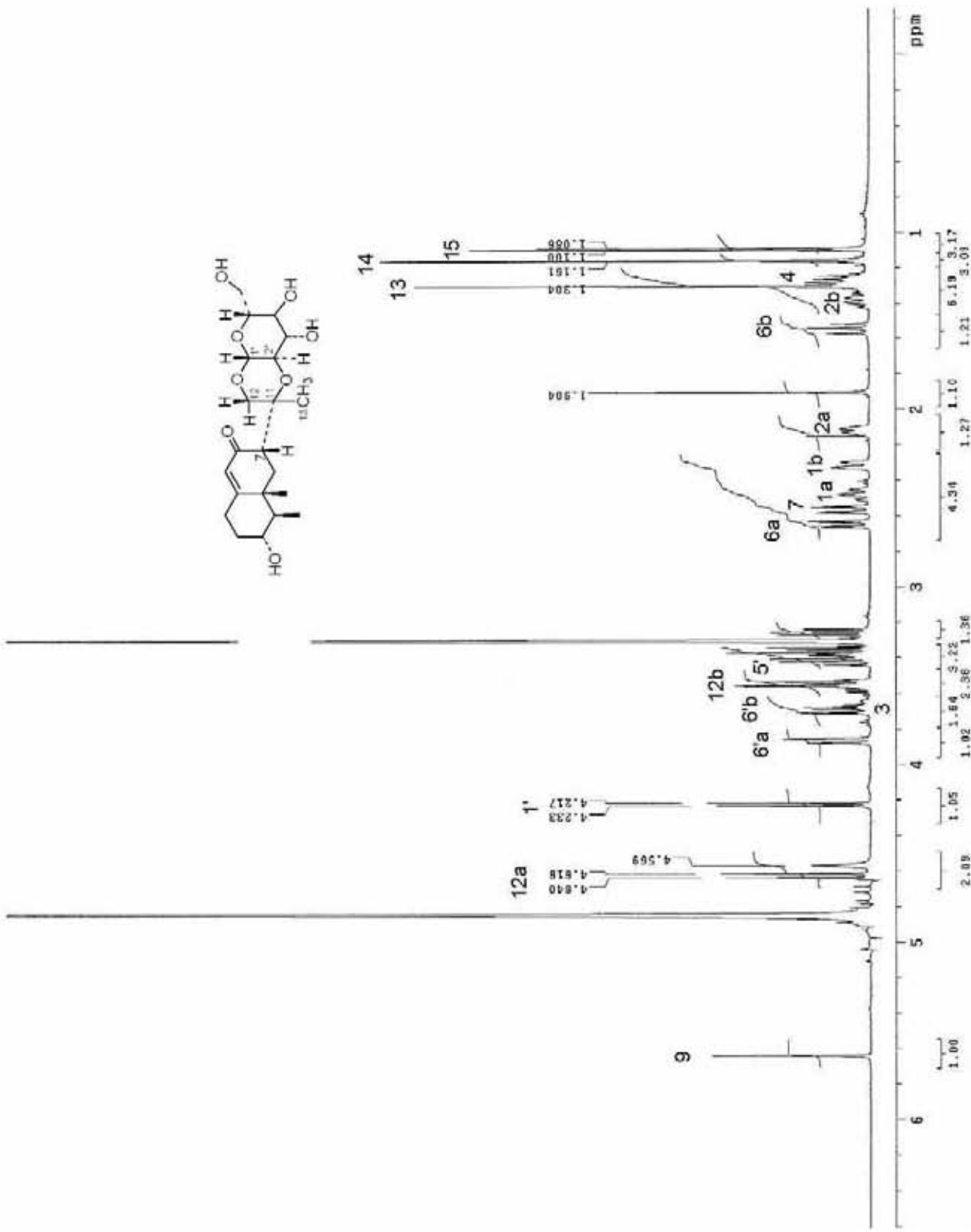
ESPECTRO 2: RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 99



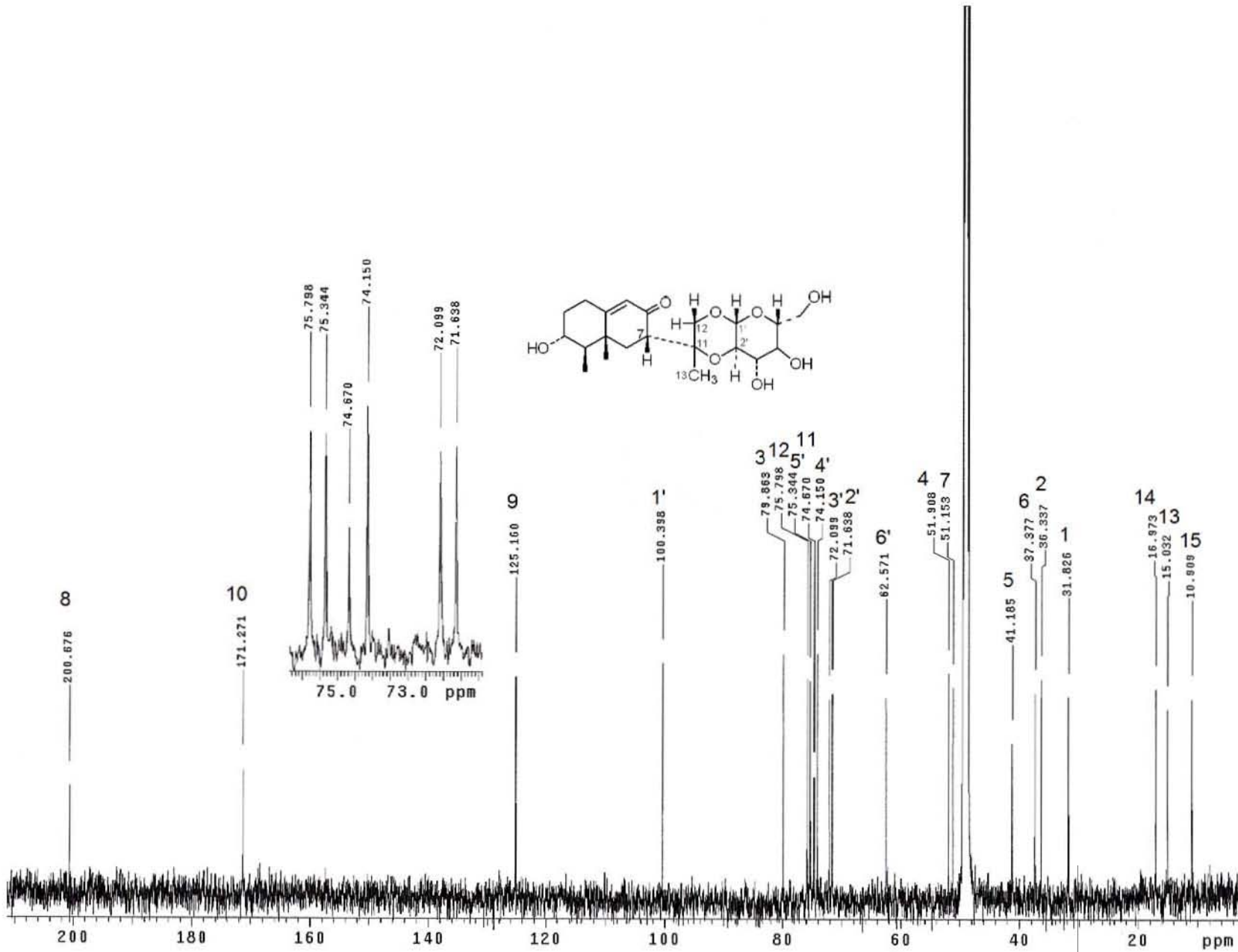
ESPECTRO 3a: RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 100



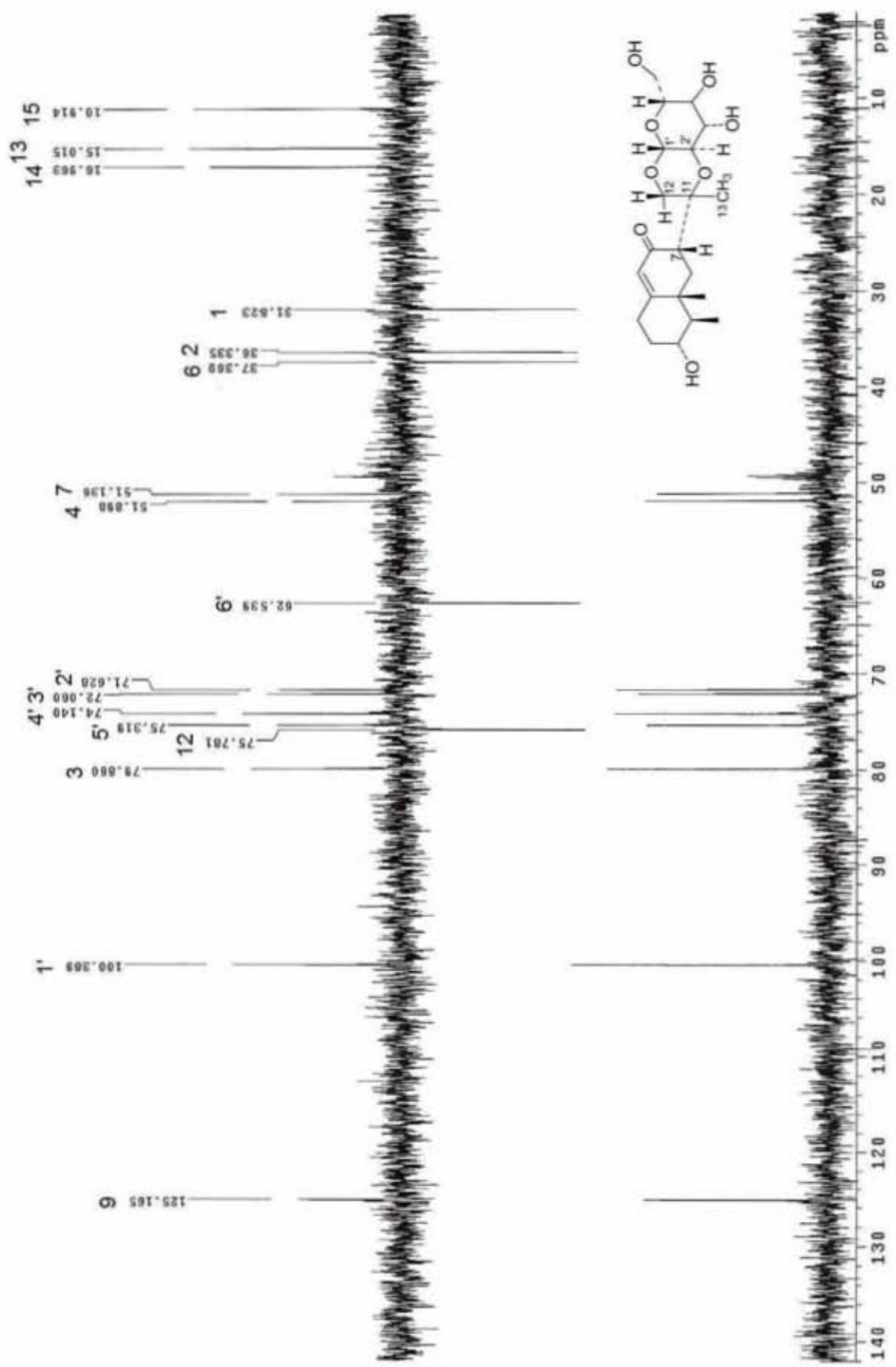
ESPECTRO 3b: RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 100



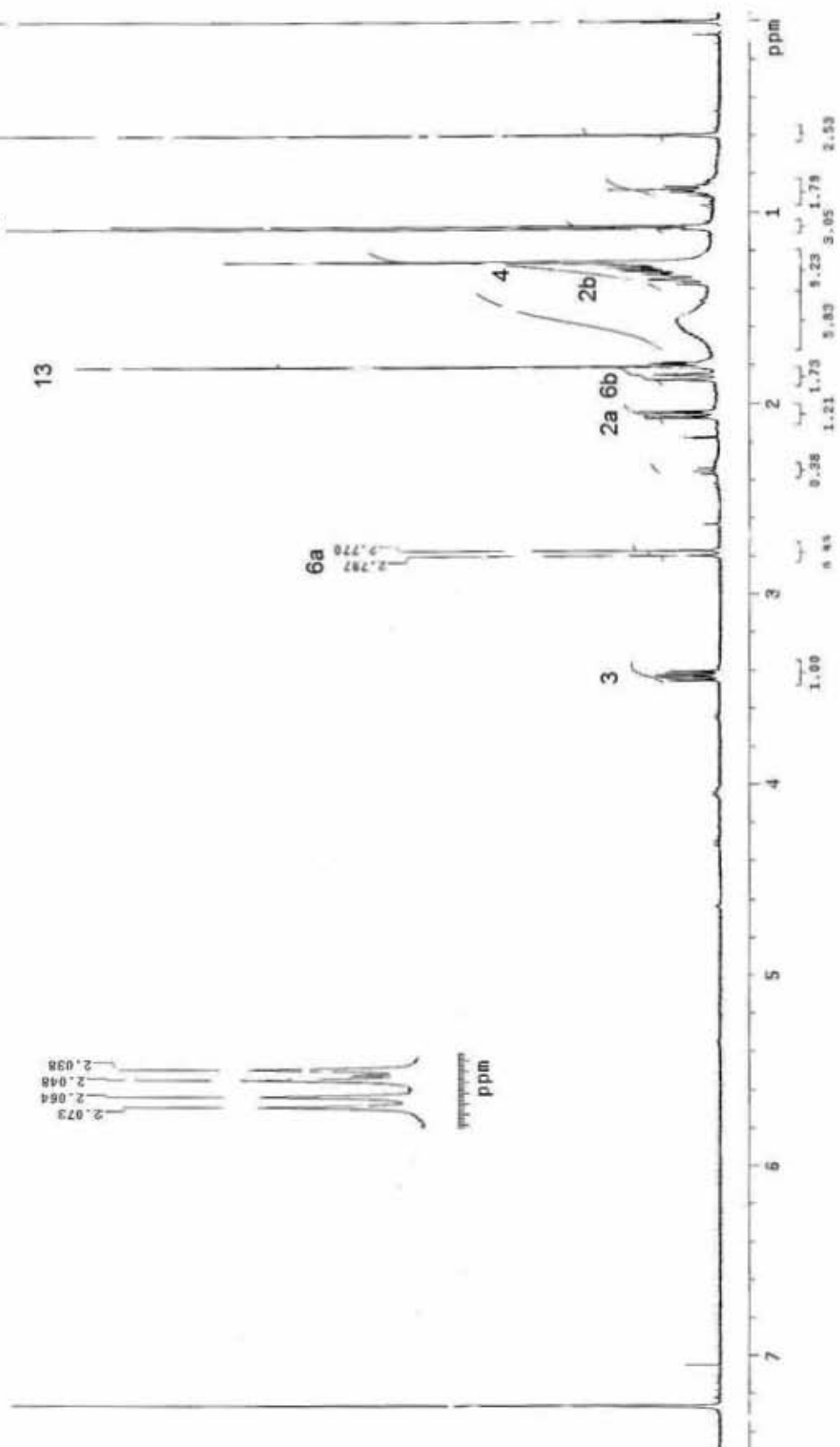
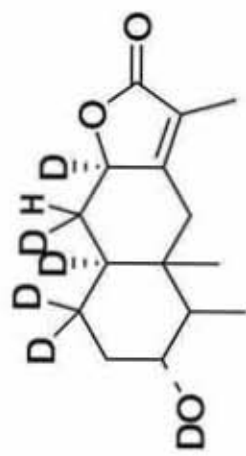
**ESPECTRO 4a: RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 101a**



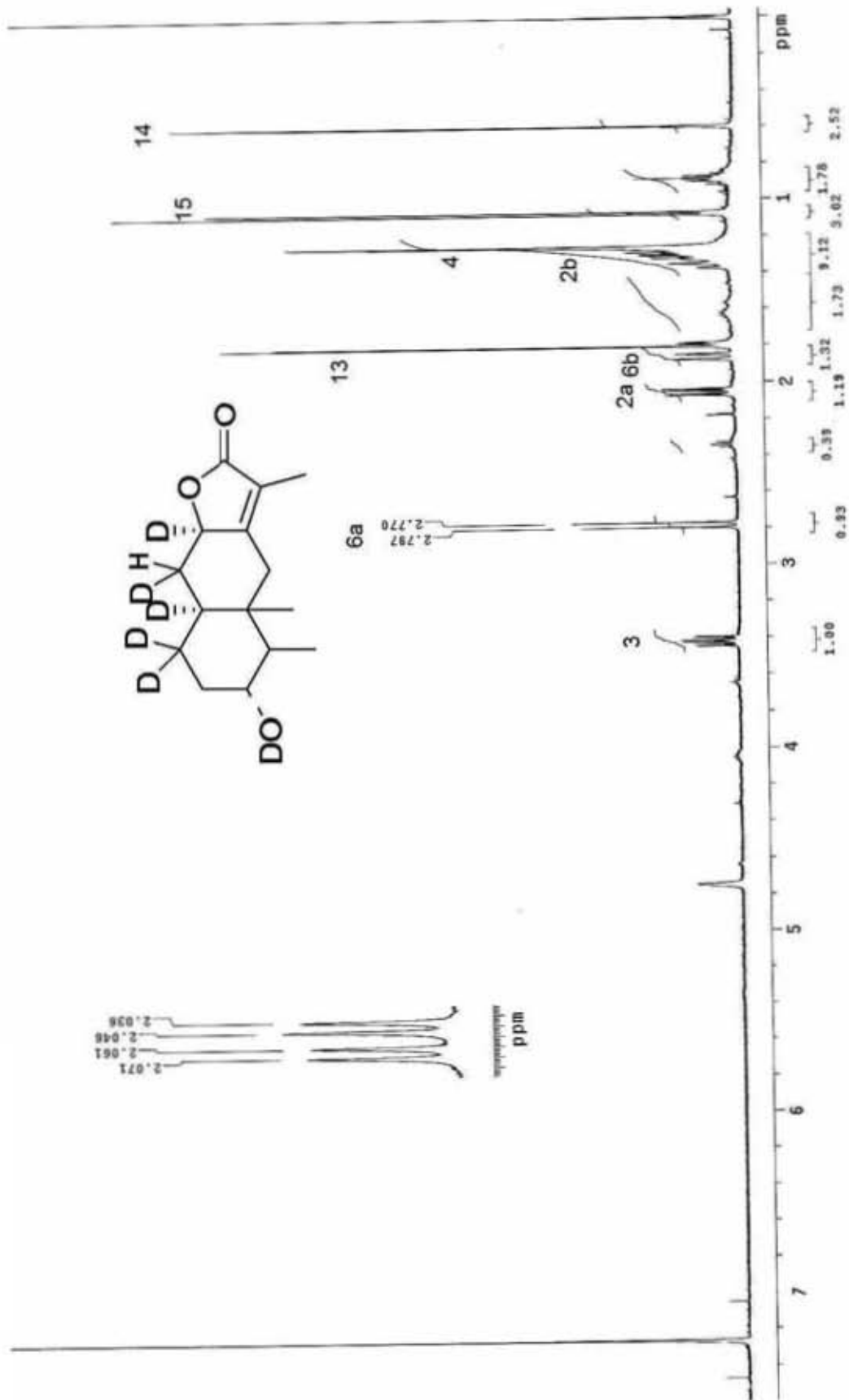
ESPECTRO 4b: RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 101a



ESPECTRO 4c: Experimento DEPT del compuesto 101a

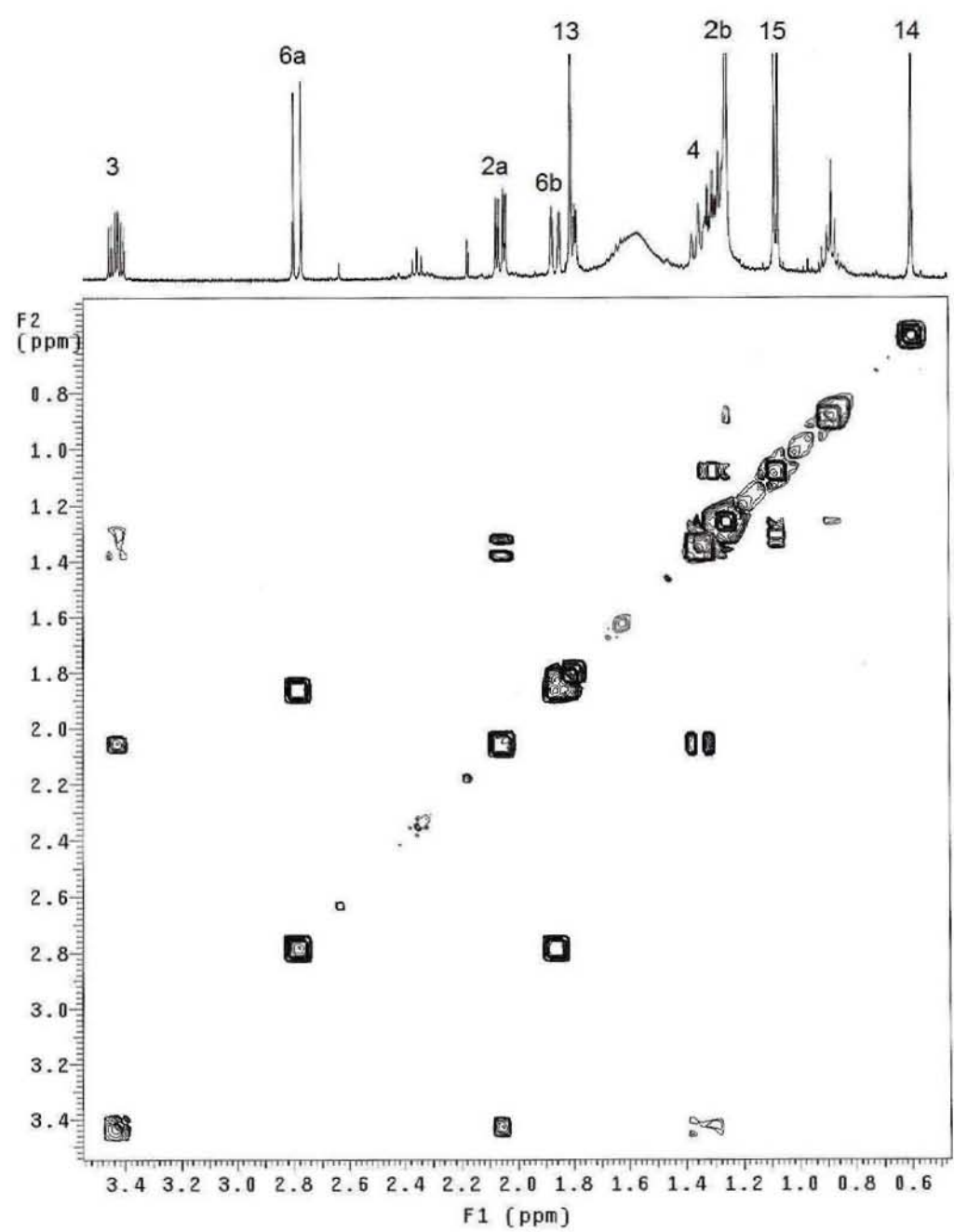
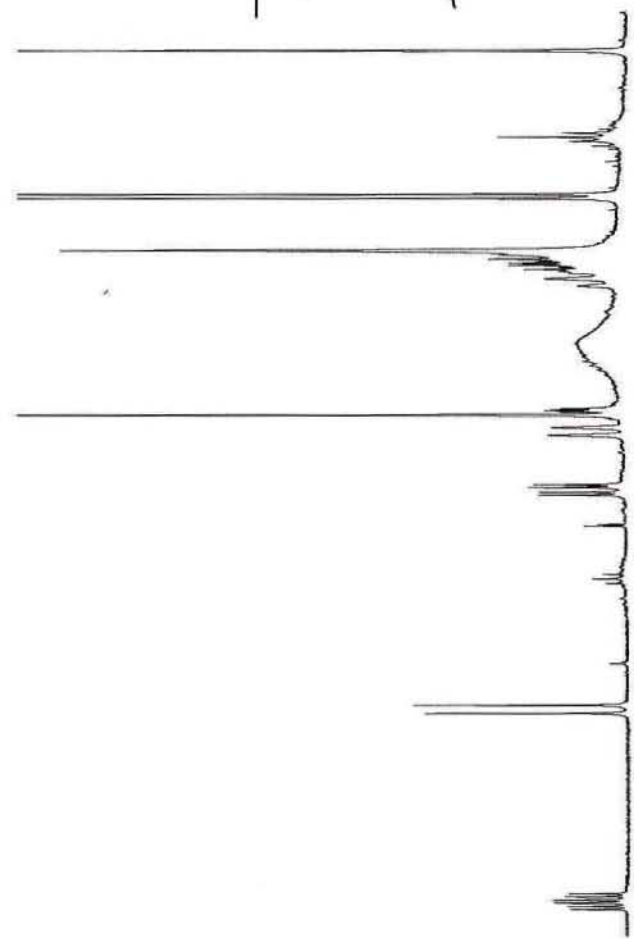
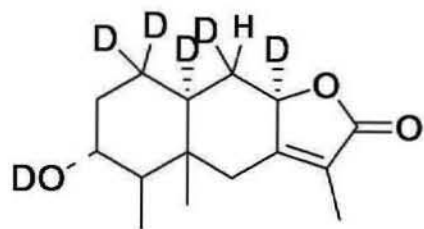


ESPECTRO 5a: RMN- <sup>1</sup>H del compuesto 102

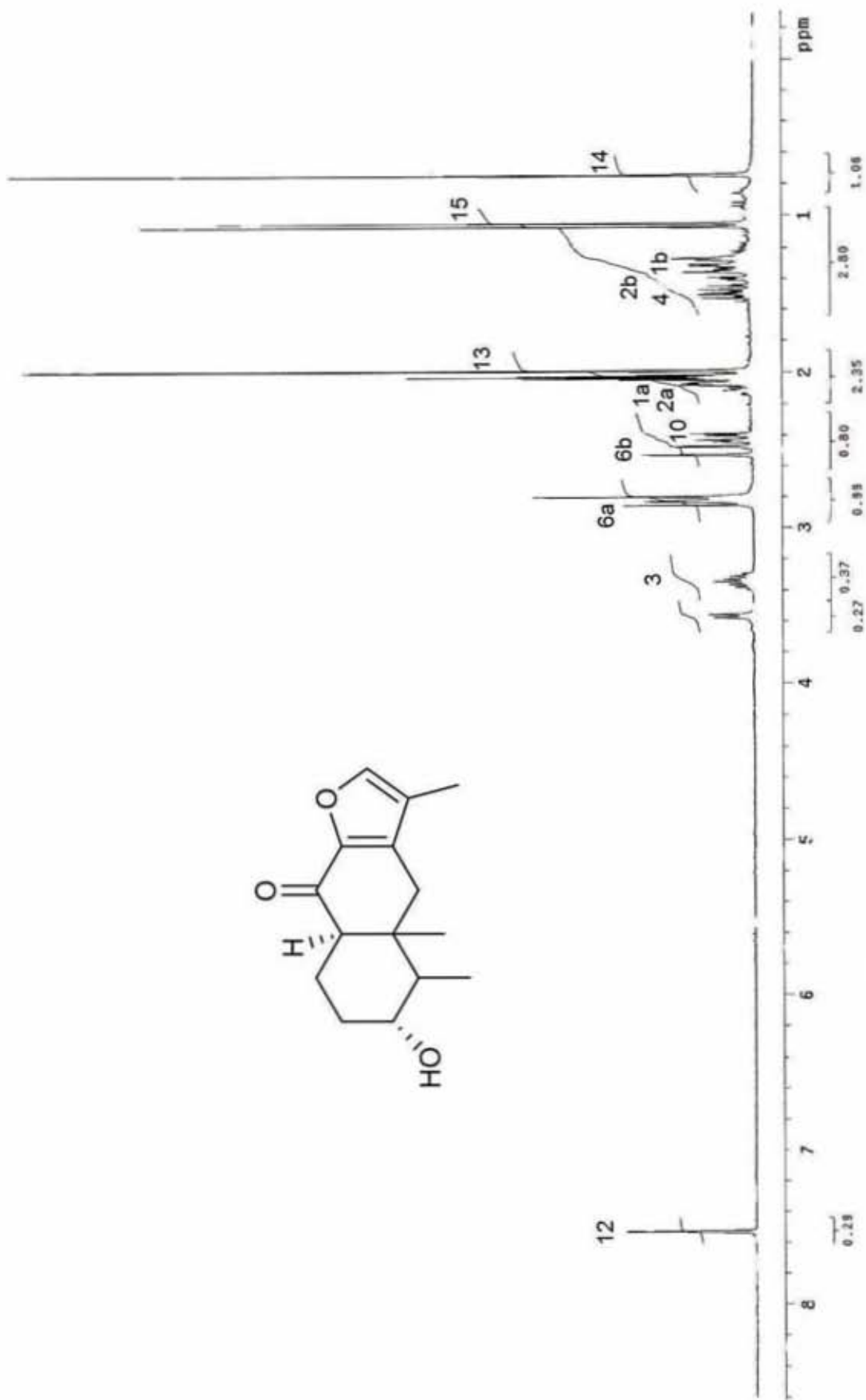
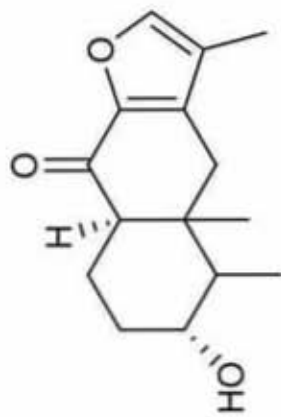


ESPECTRO 5b: RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 102 (Intercambio con D<sub>2</sub>O)

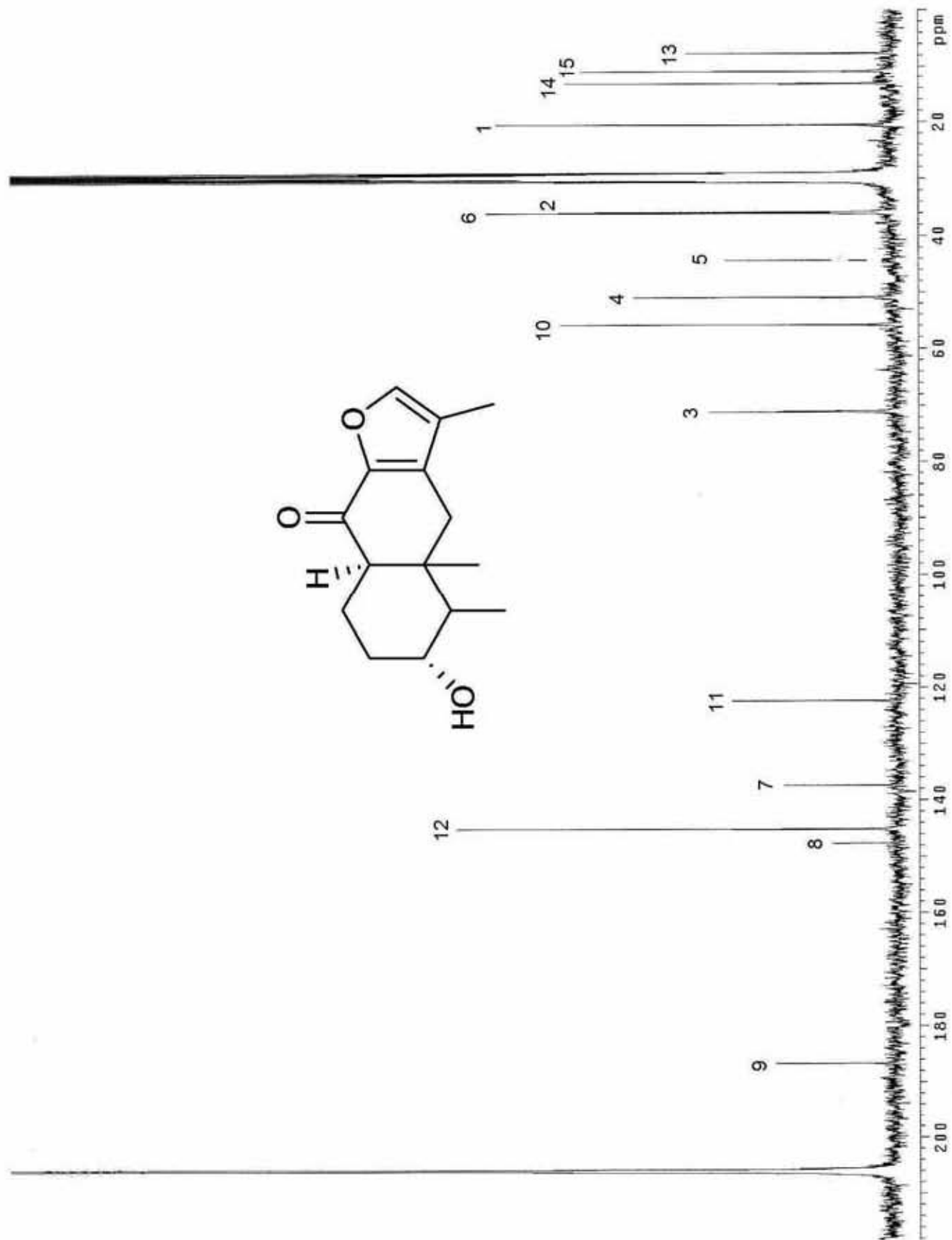




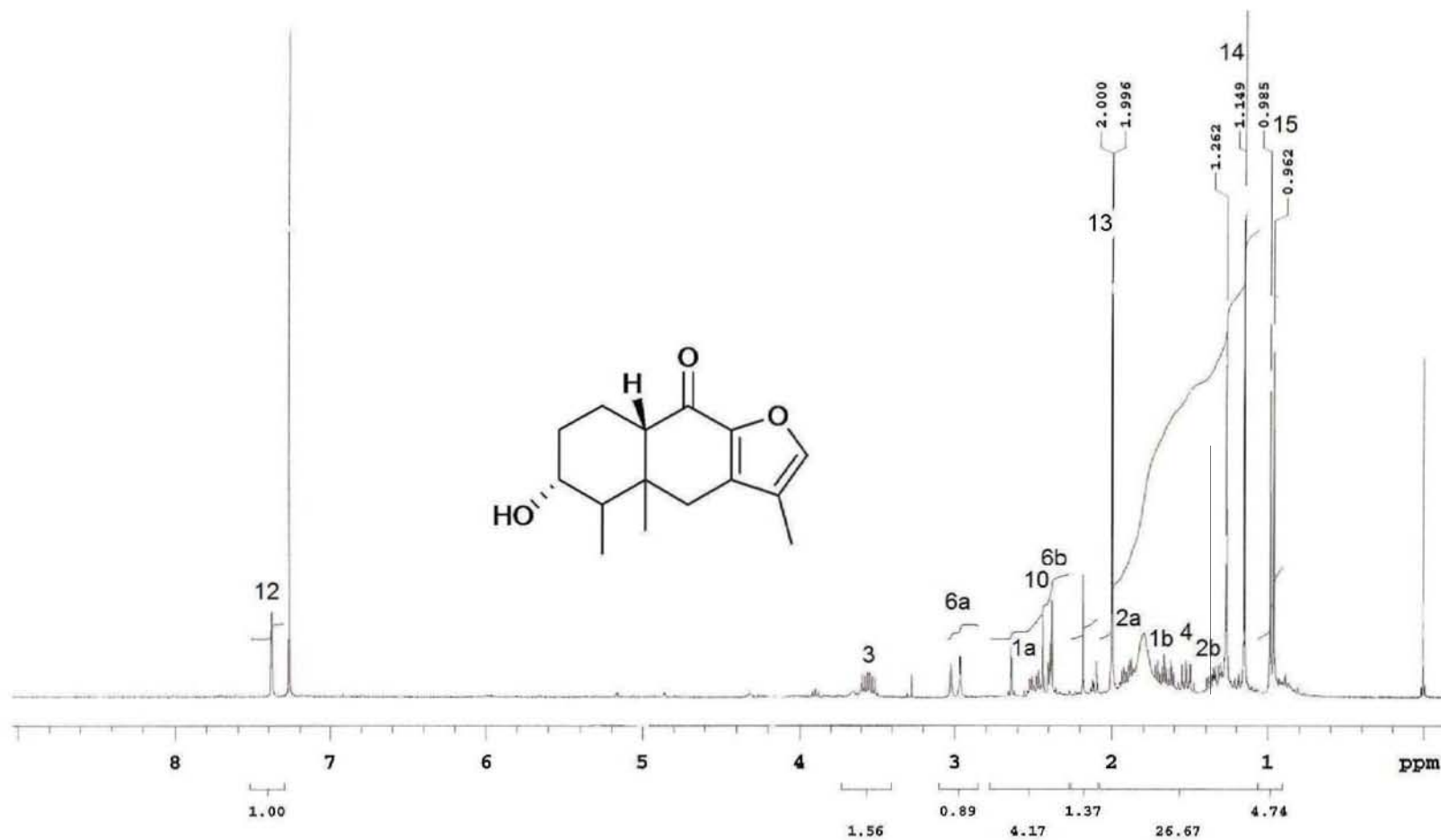
ESPECTRO 5c : COSY del compuesto 102



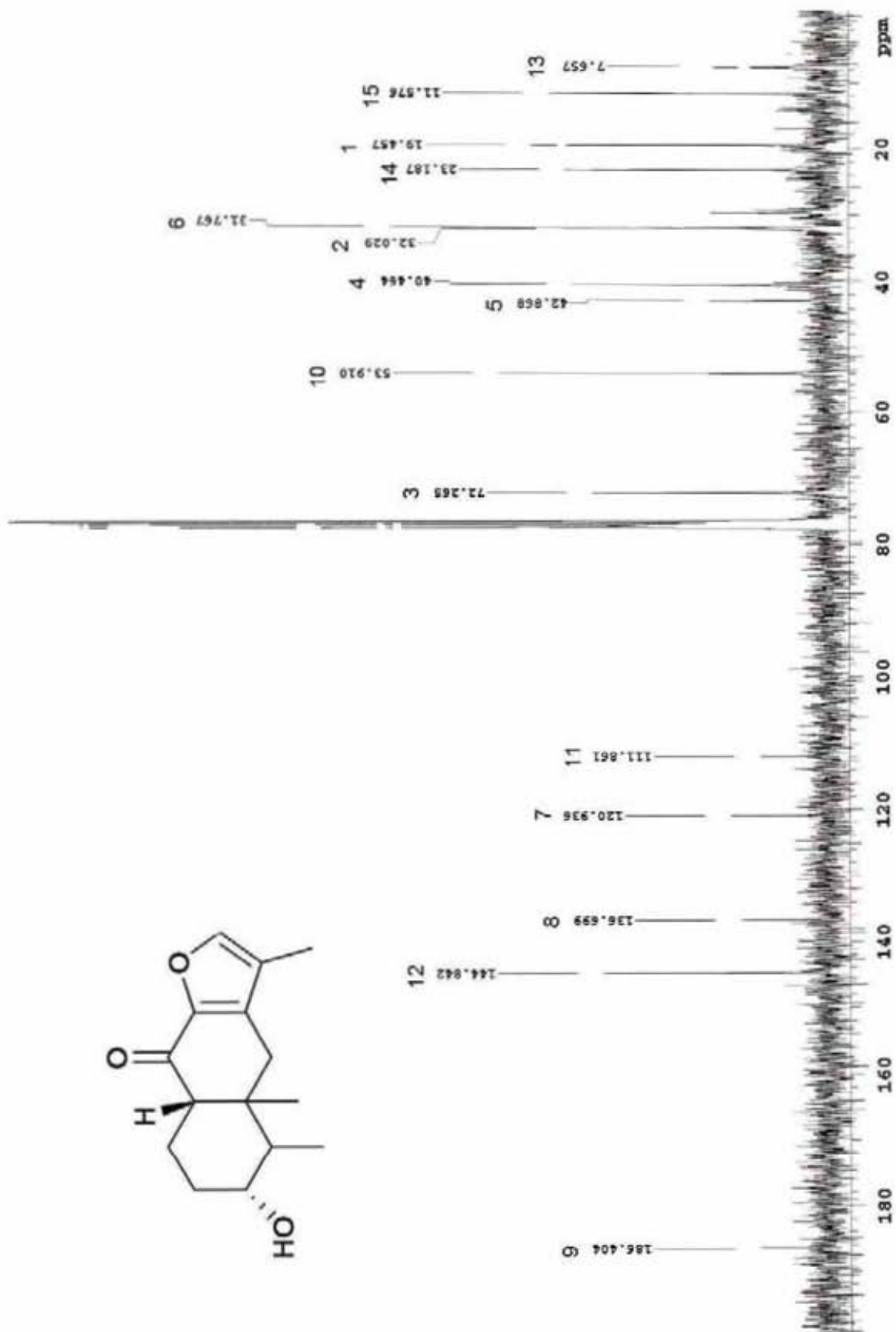
**ESPECTRO 6a: RMN- $^1\text{H}$  del compuesto 78**



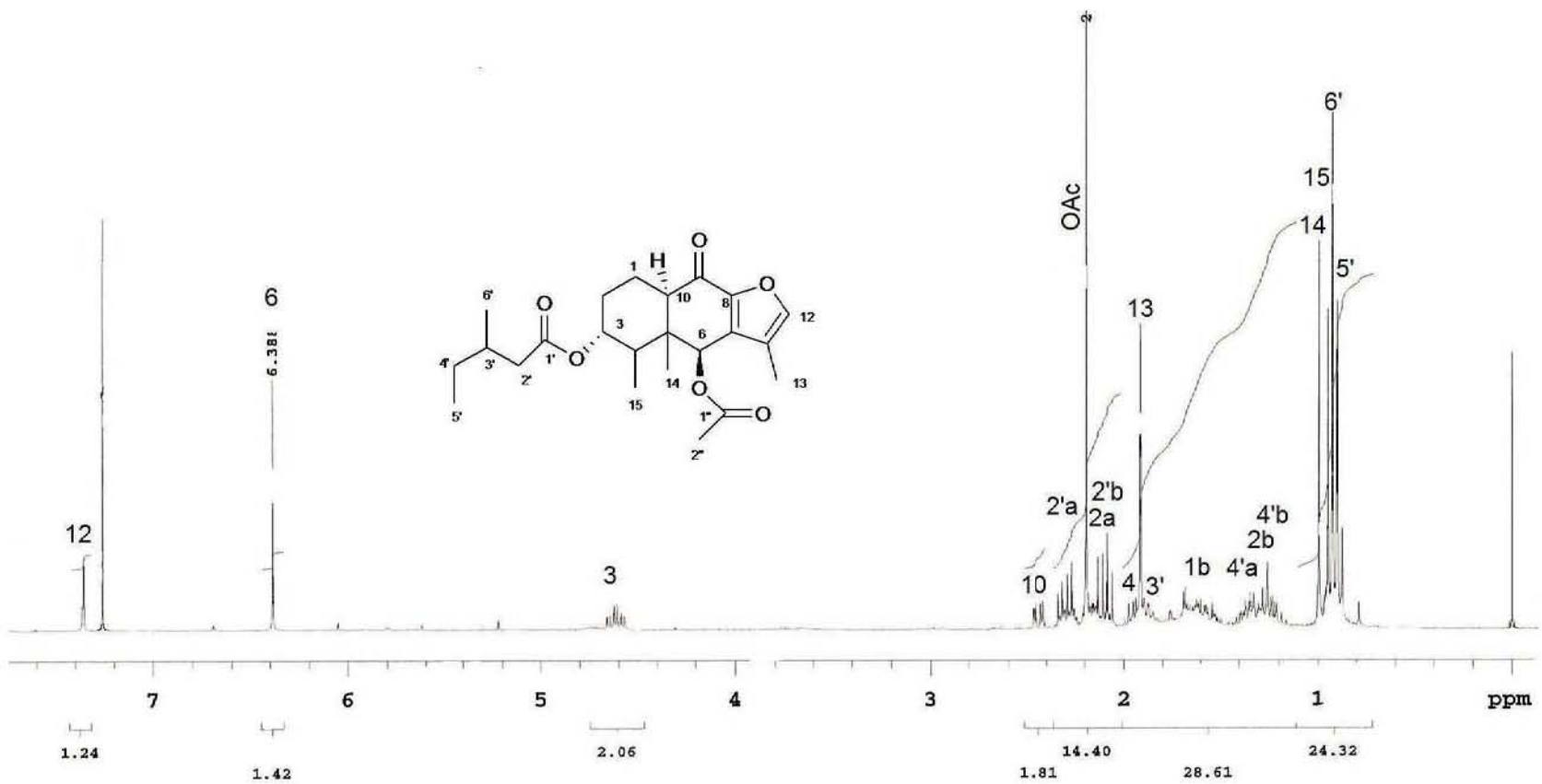
**ESPECTRO 6b: RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 78**



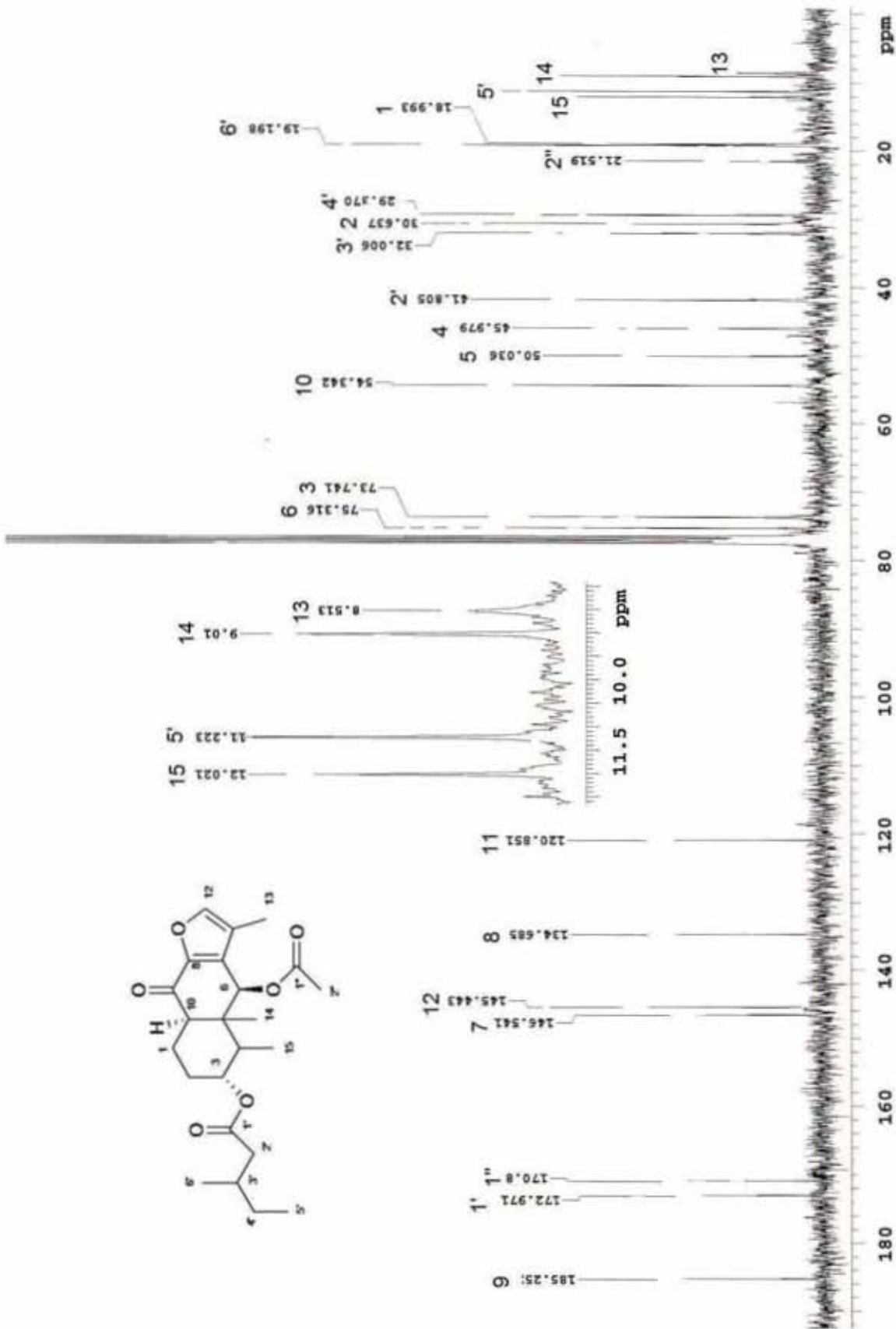
ESPECTRO 7a: RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 79



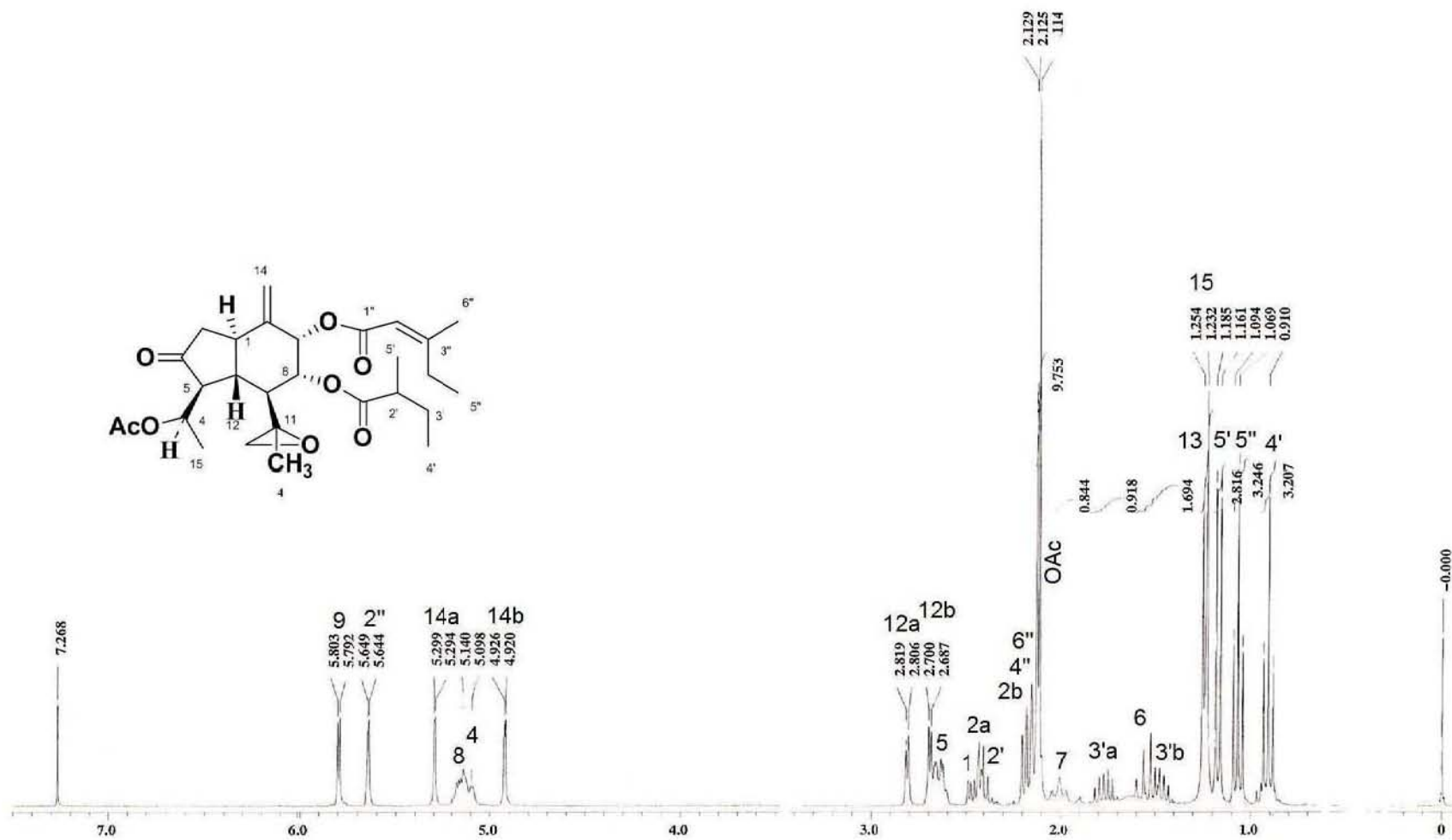
ESPECTRO 7b: RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto 79



ESPECTRO 8a: RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 71

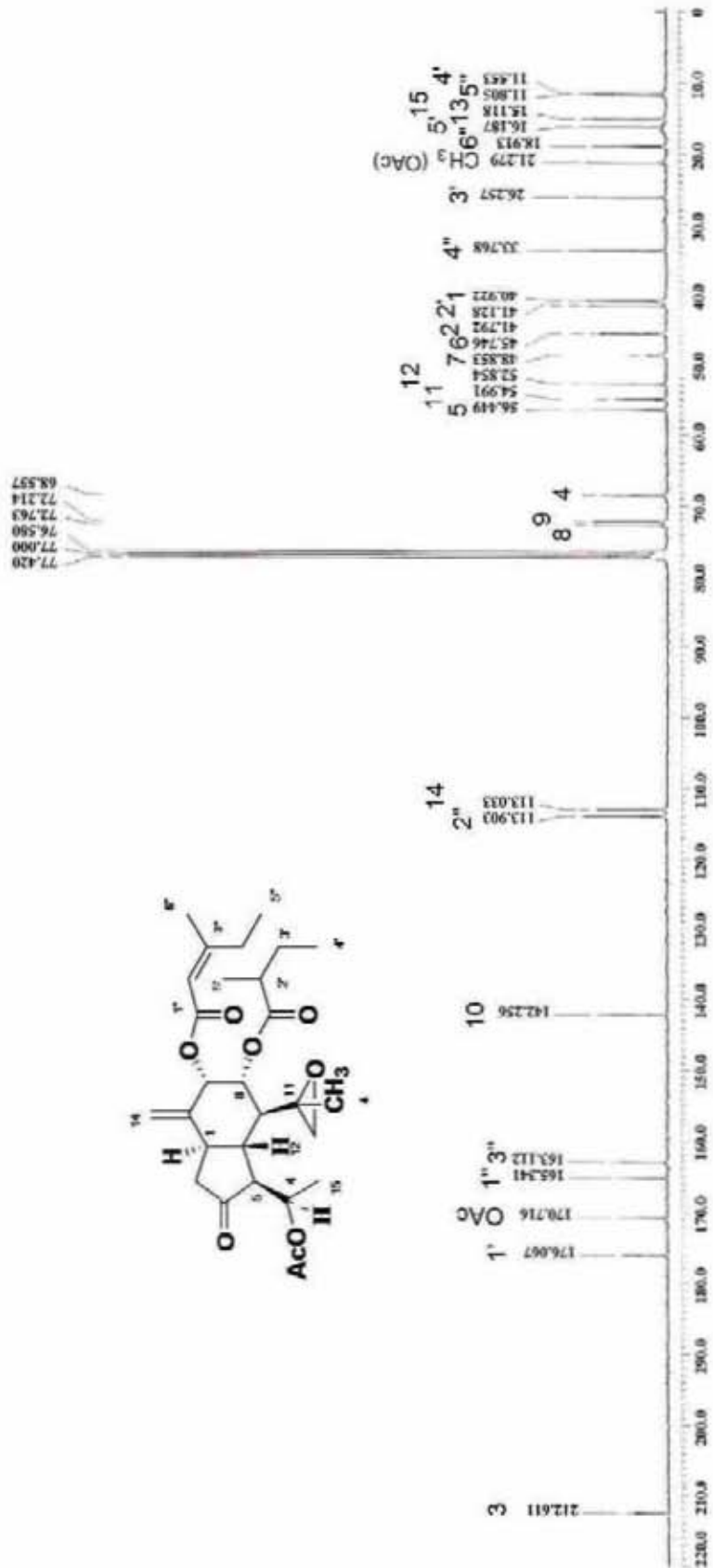


ESPECTRO 8b: RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto 71



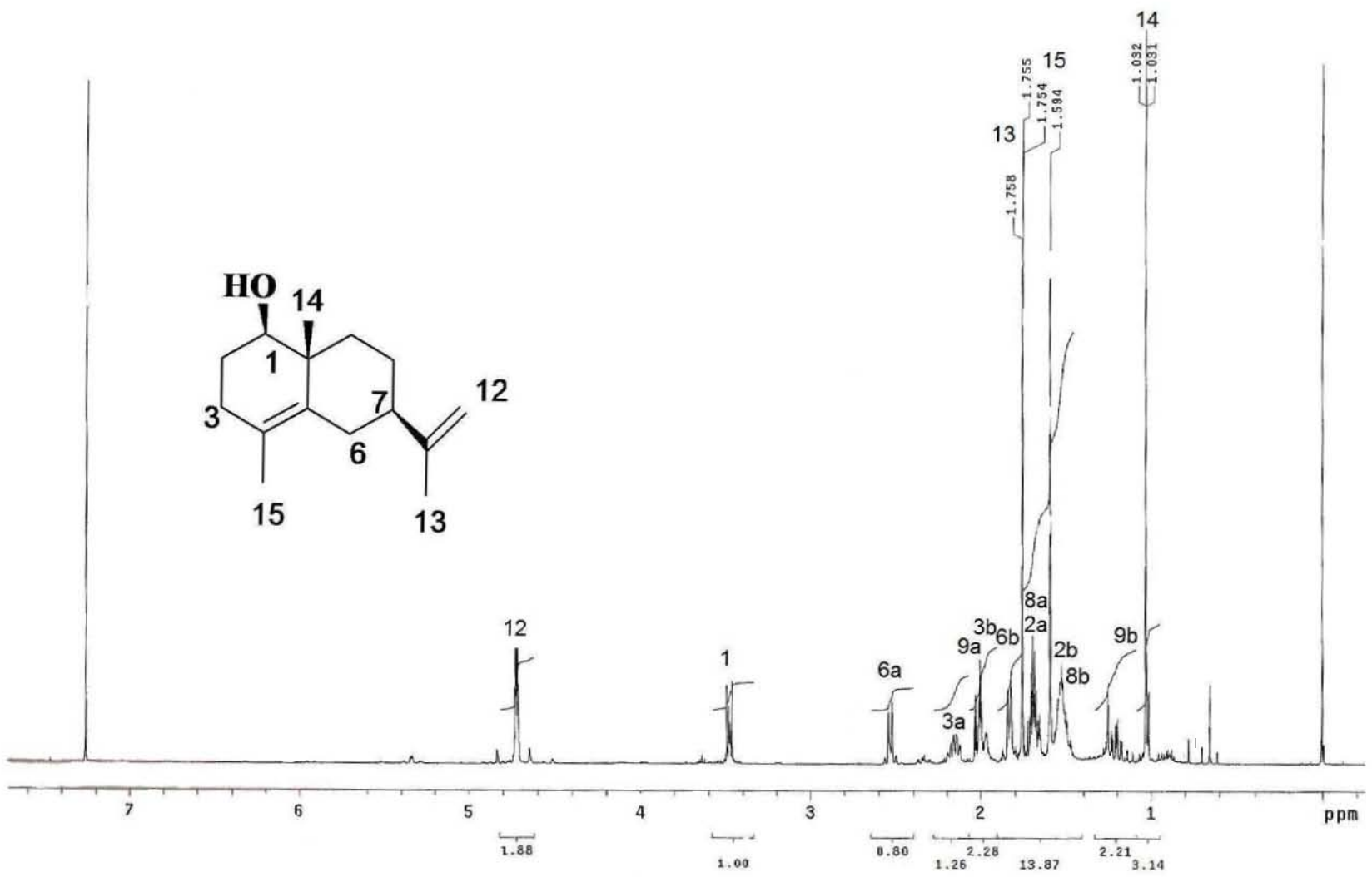
ESPECTRO 9a: RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 74



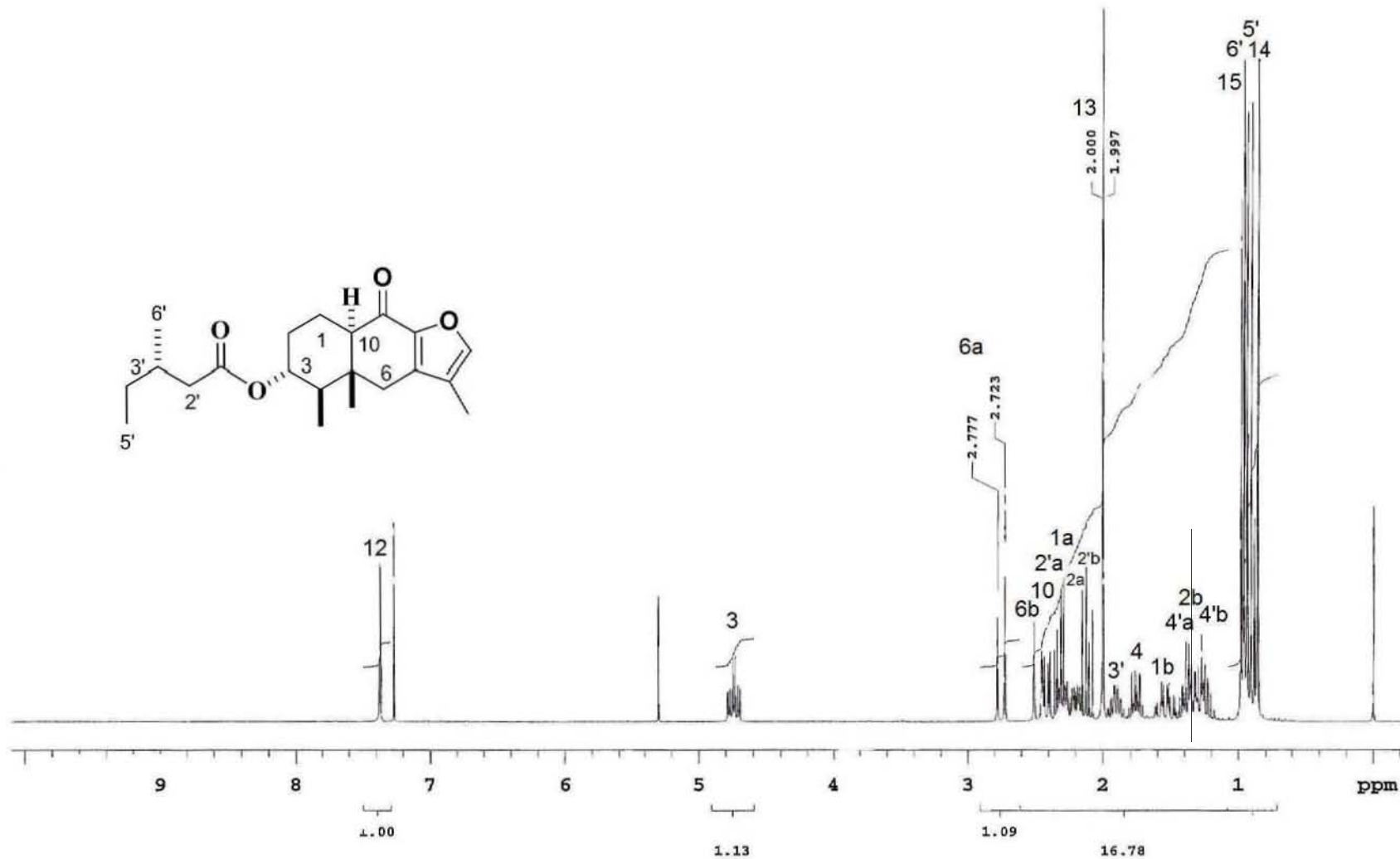


ESPECTRO 9b: RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 74

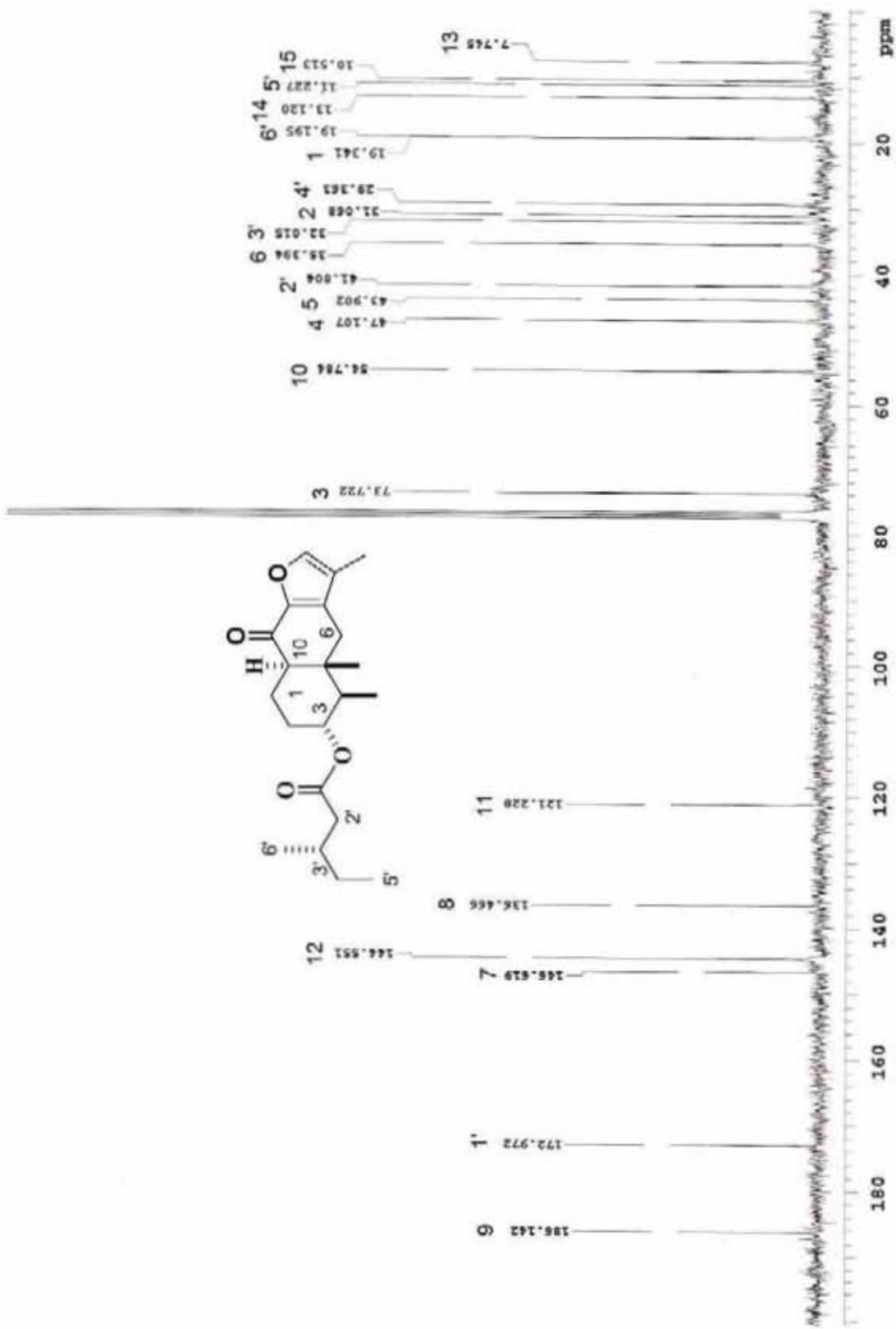
X: pps por MEBIOS 1 ELC



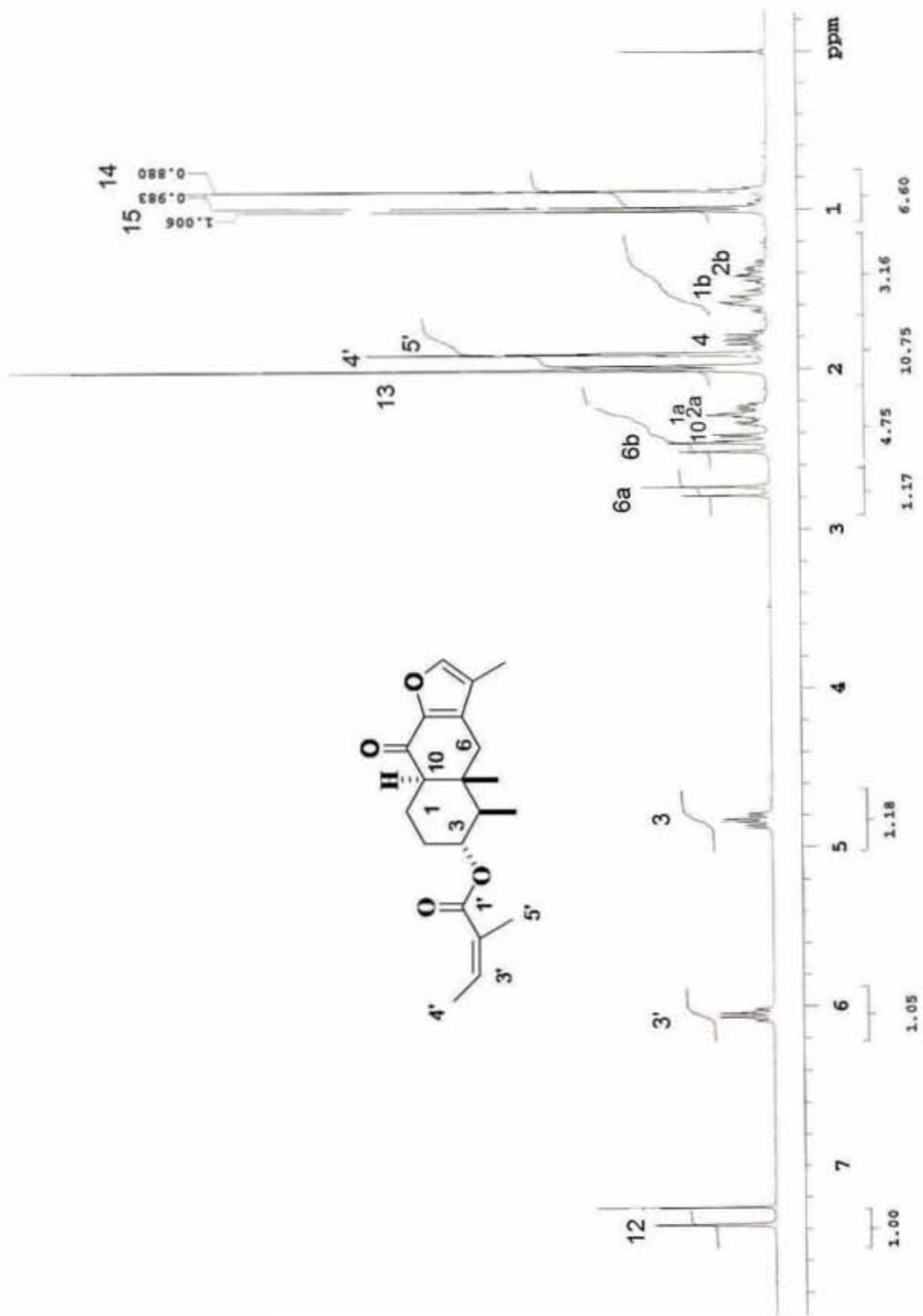
ESPECTRO 10: RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 75



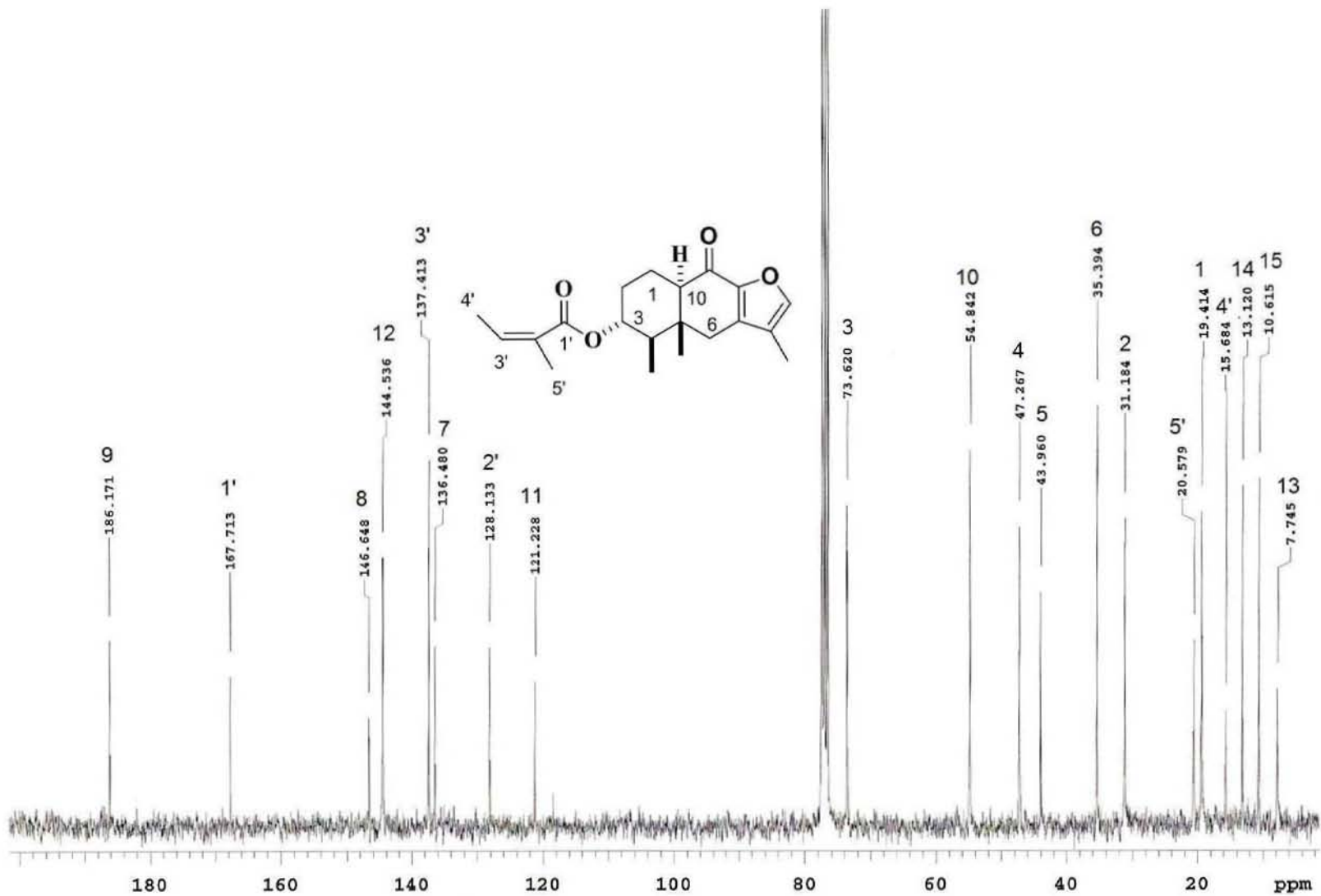
ESPECTRO 11a: RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 72



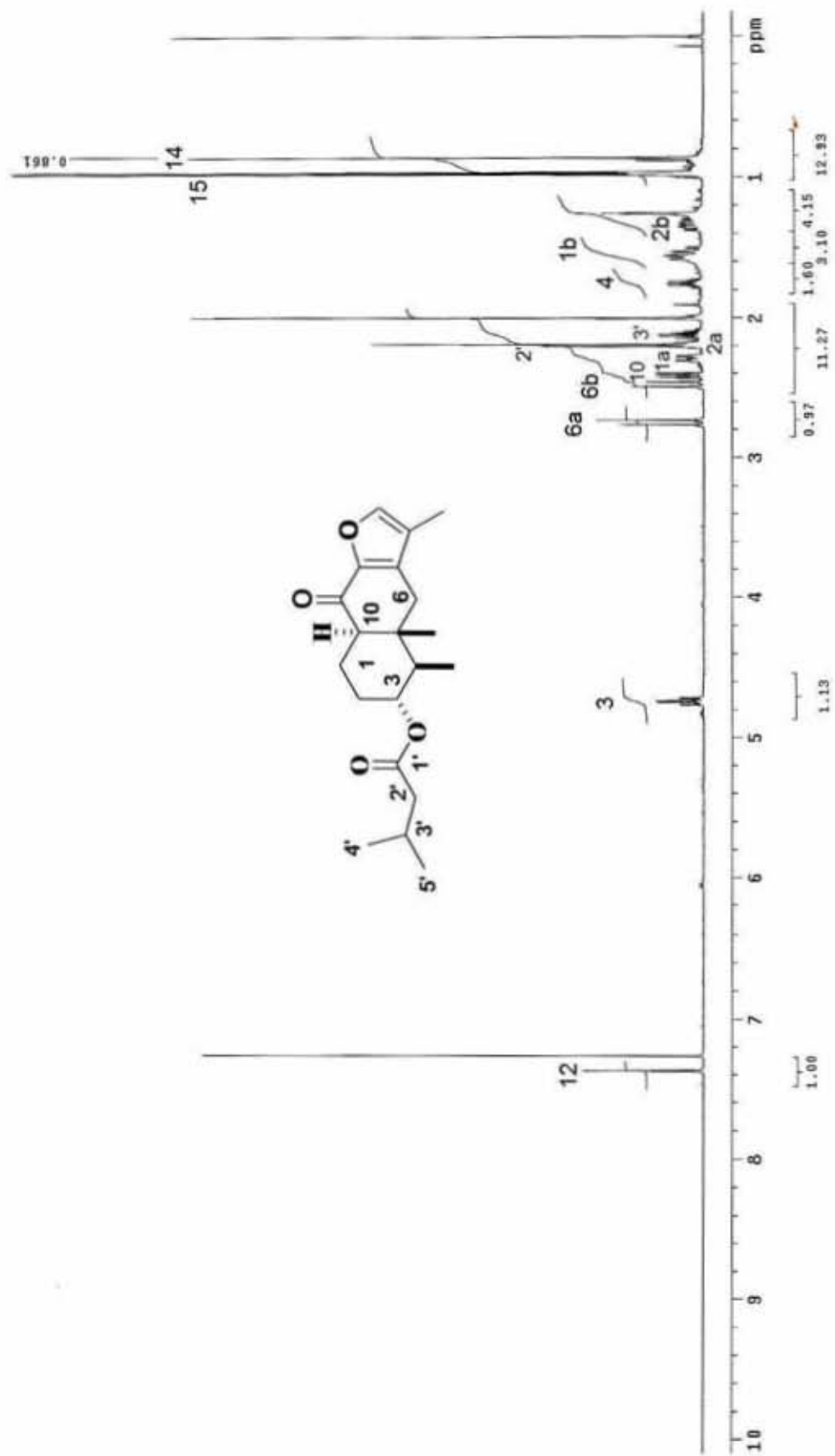
ESPECTRO 11b: RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 72



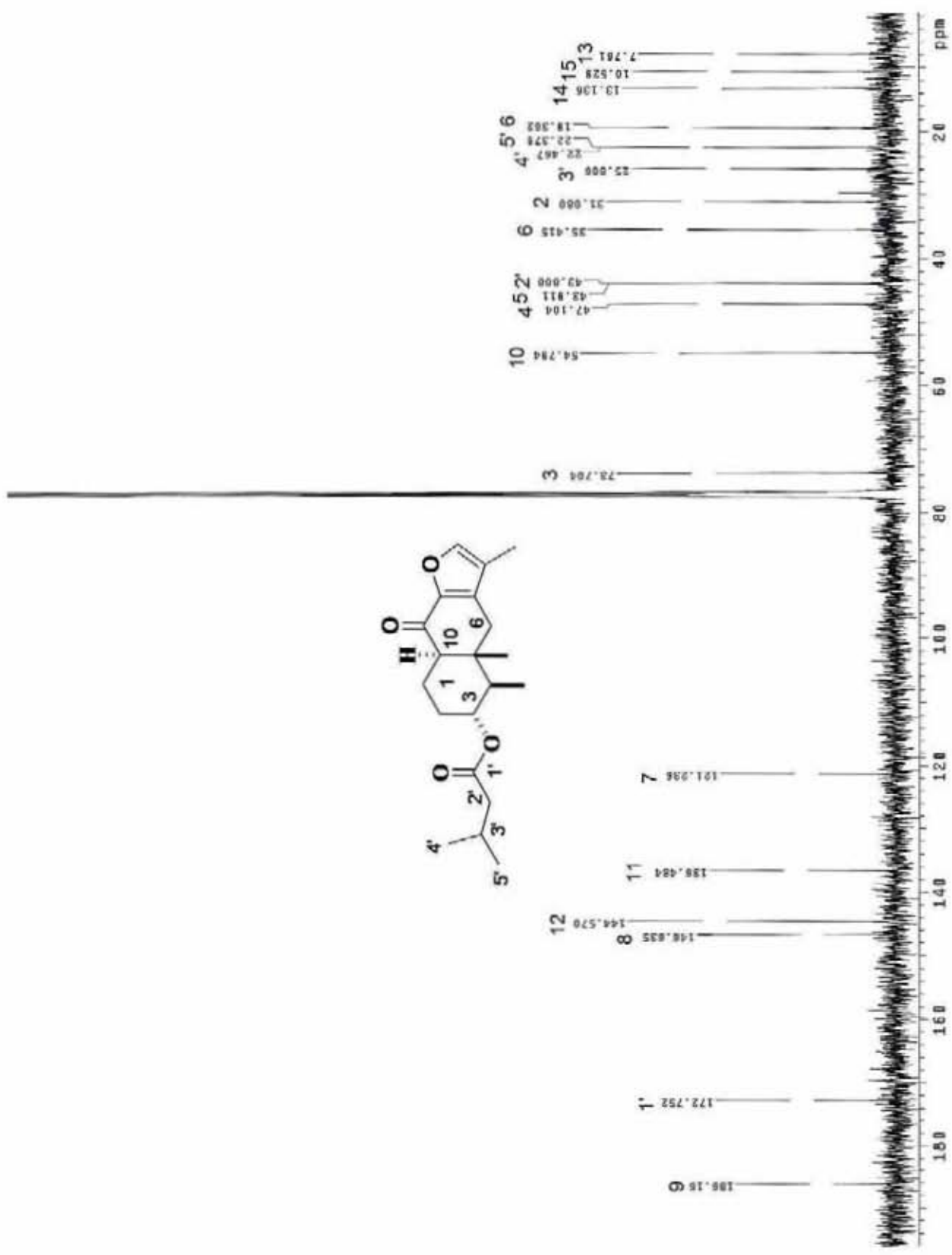
**ESPECTRO 12a: RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 76**



ESPECTRO 12b: RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 76

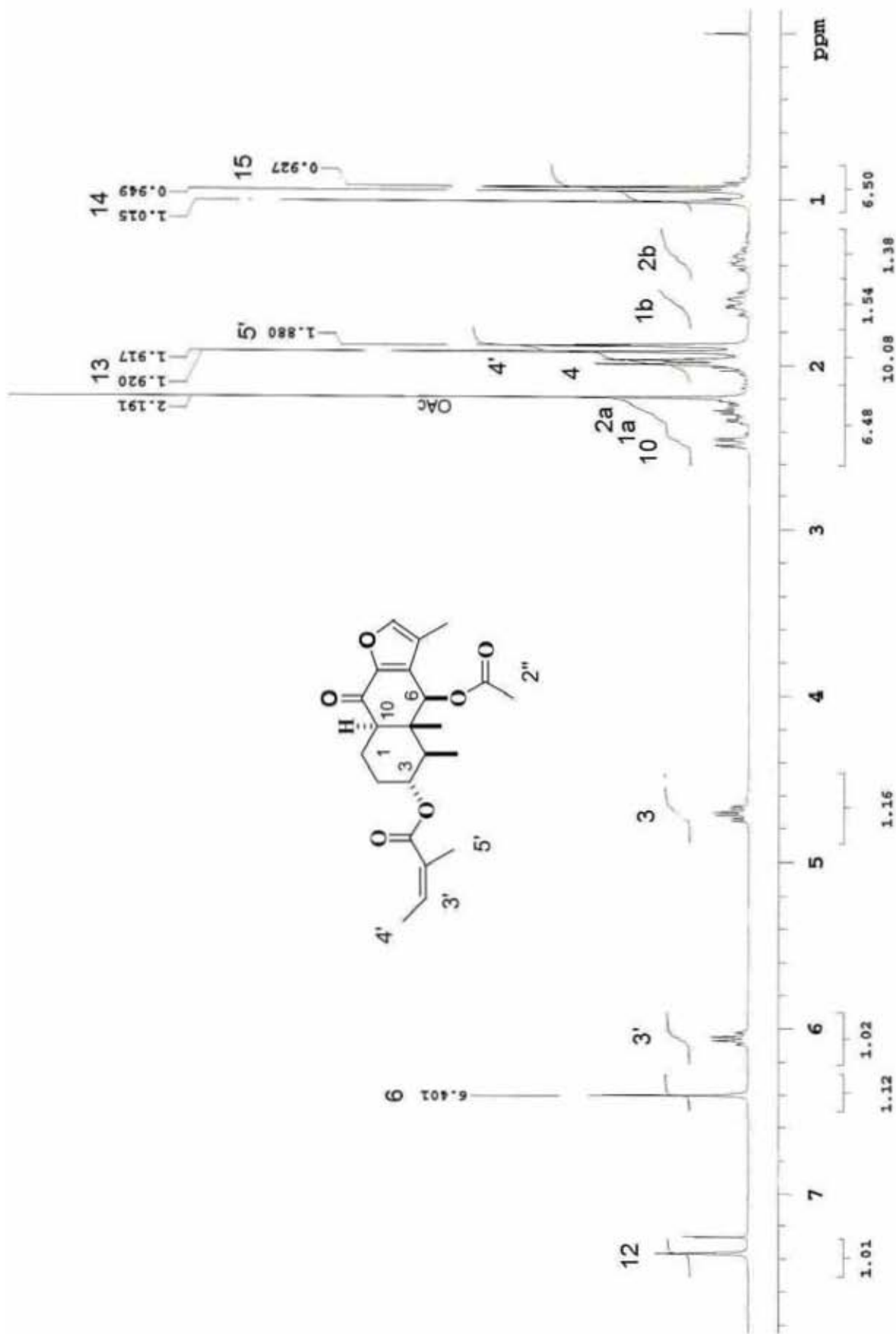


**ESPECTRO 13a: RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 77**

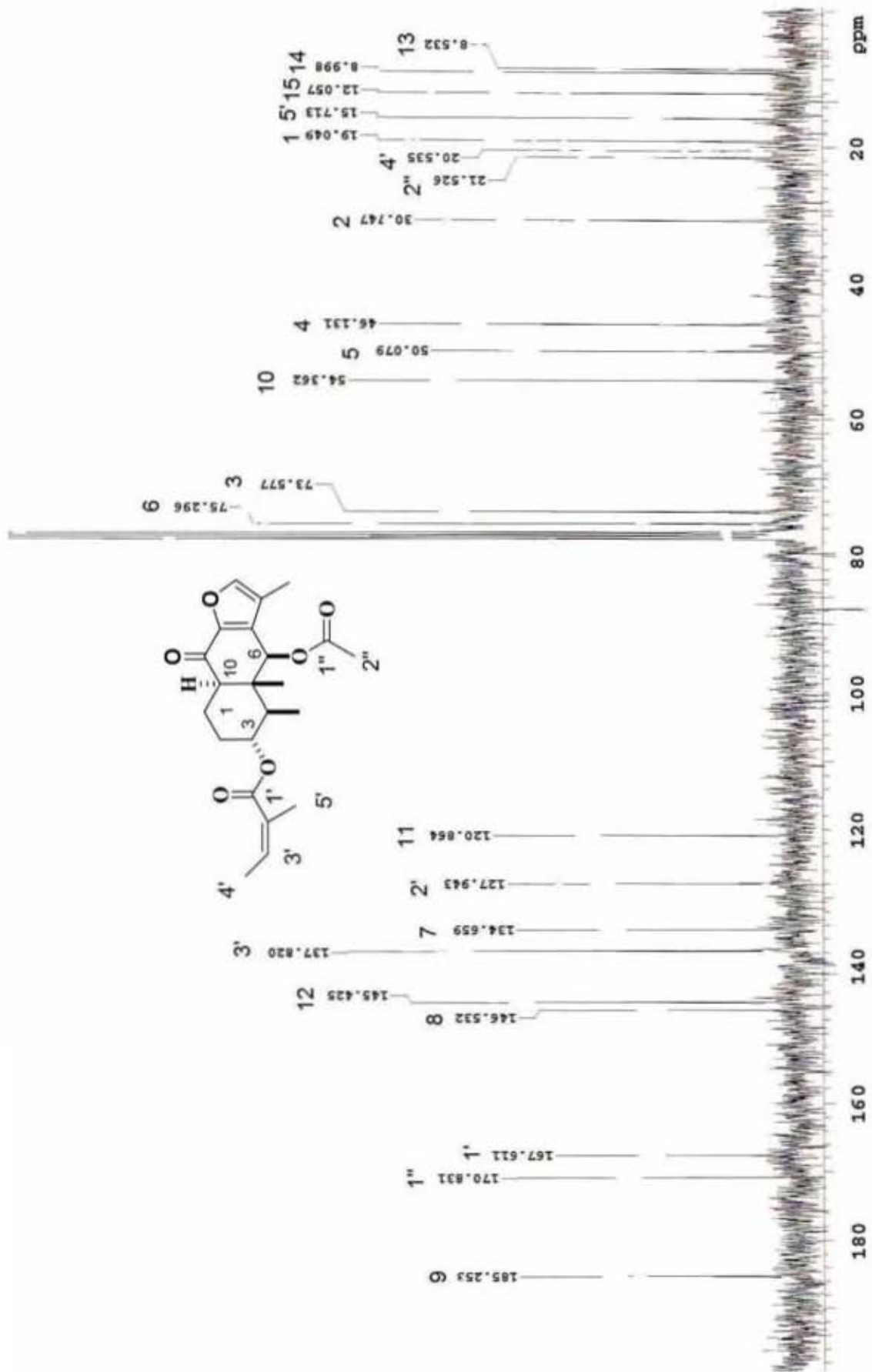


ESPECTRO 13b: RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 77

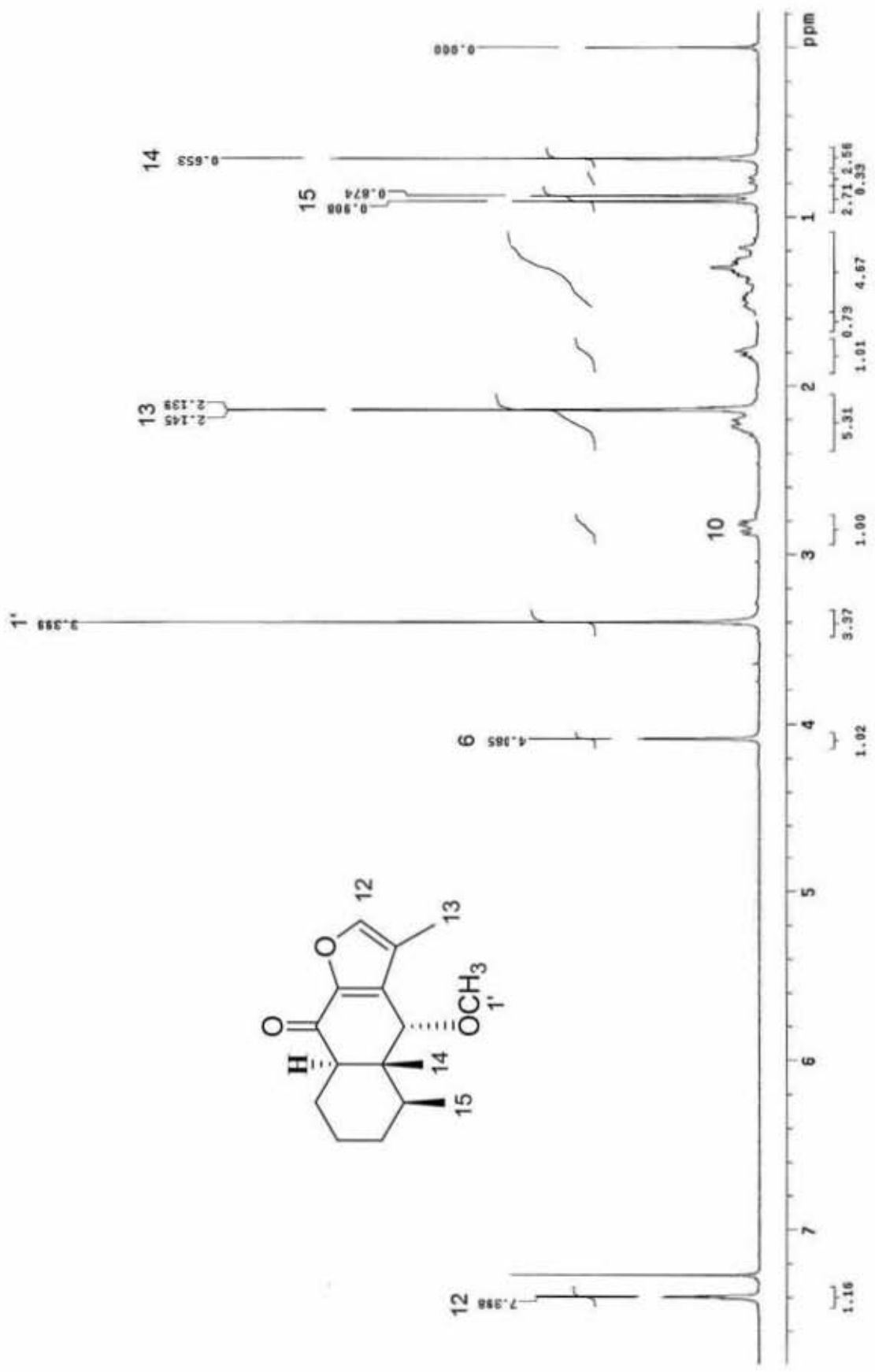




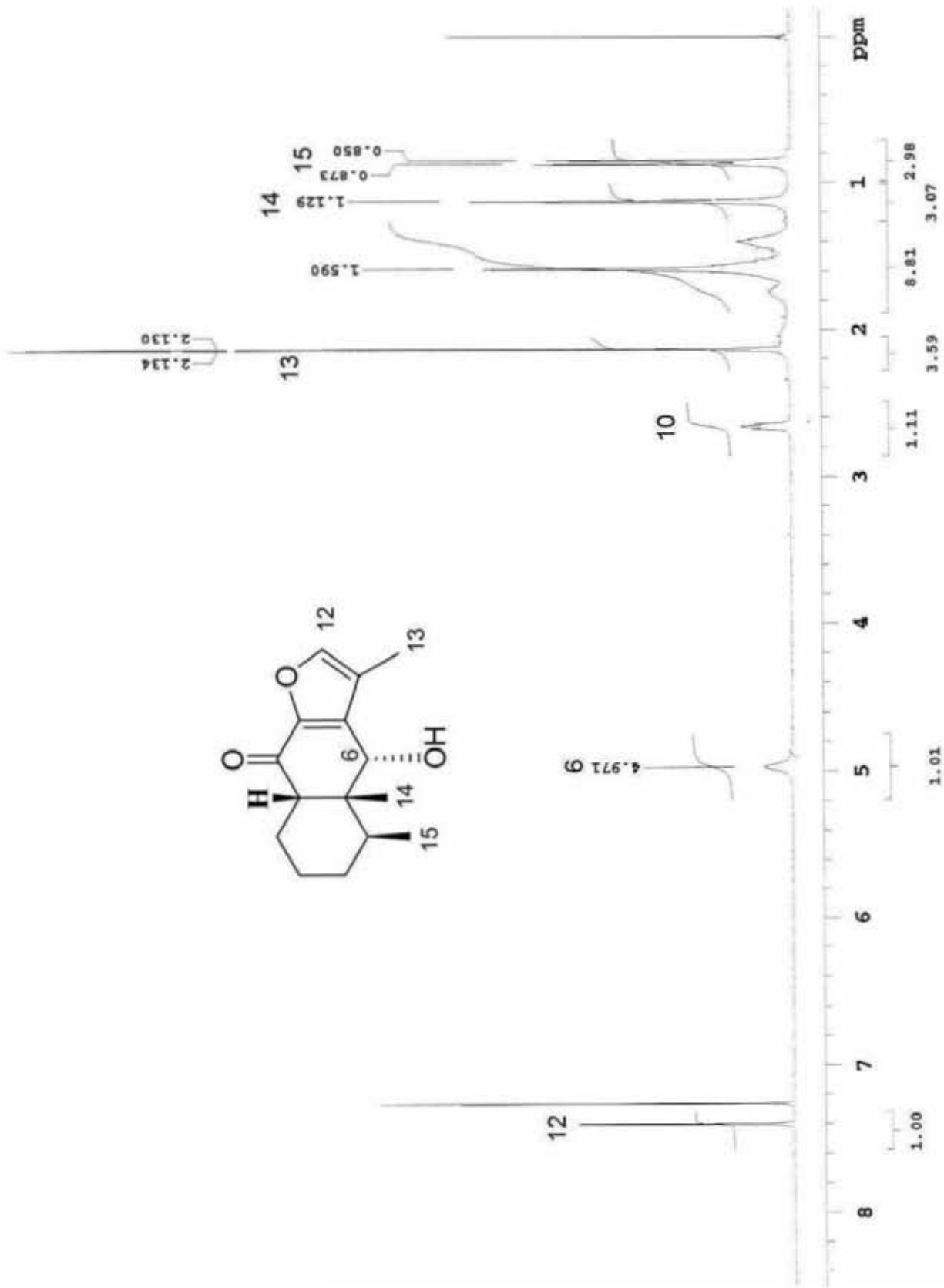
**ESPECTRO 14a: RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 73**



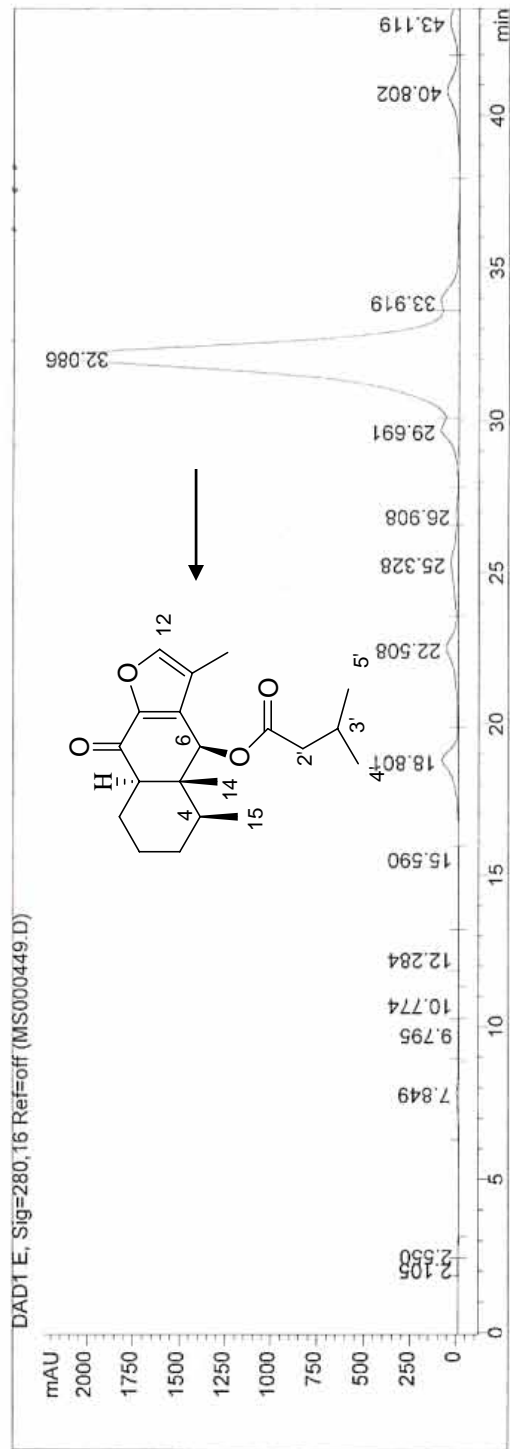
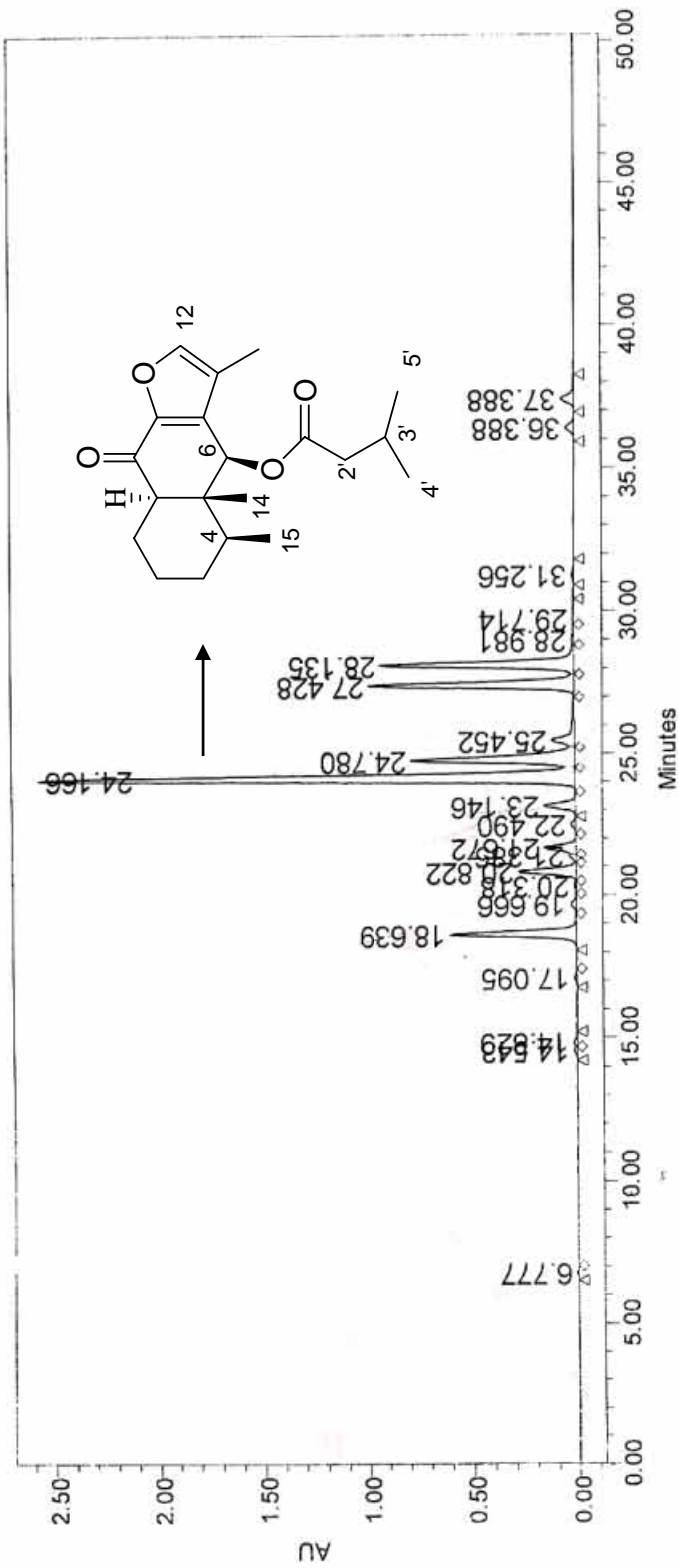
ESPECTRO 14b: RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 73



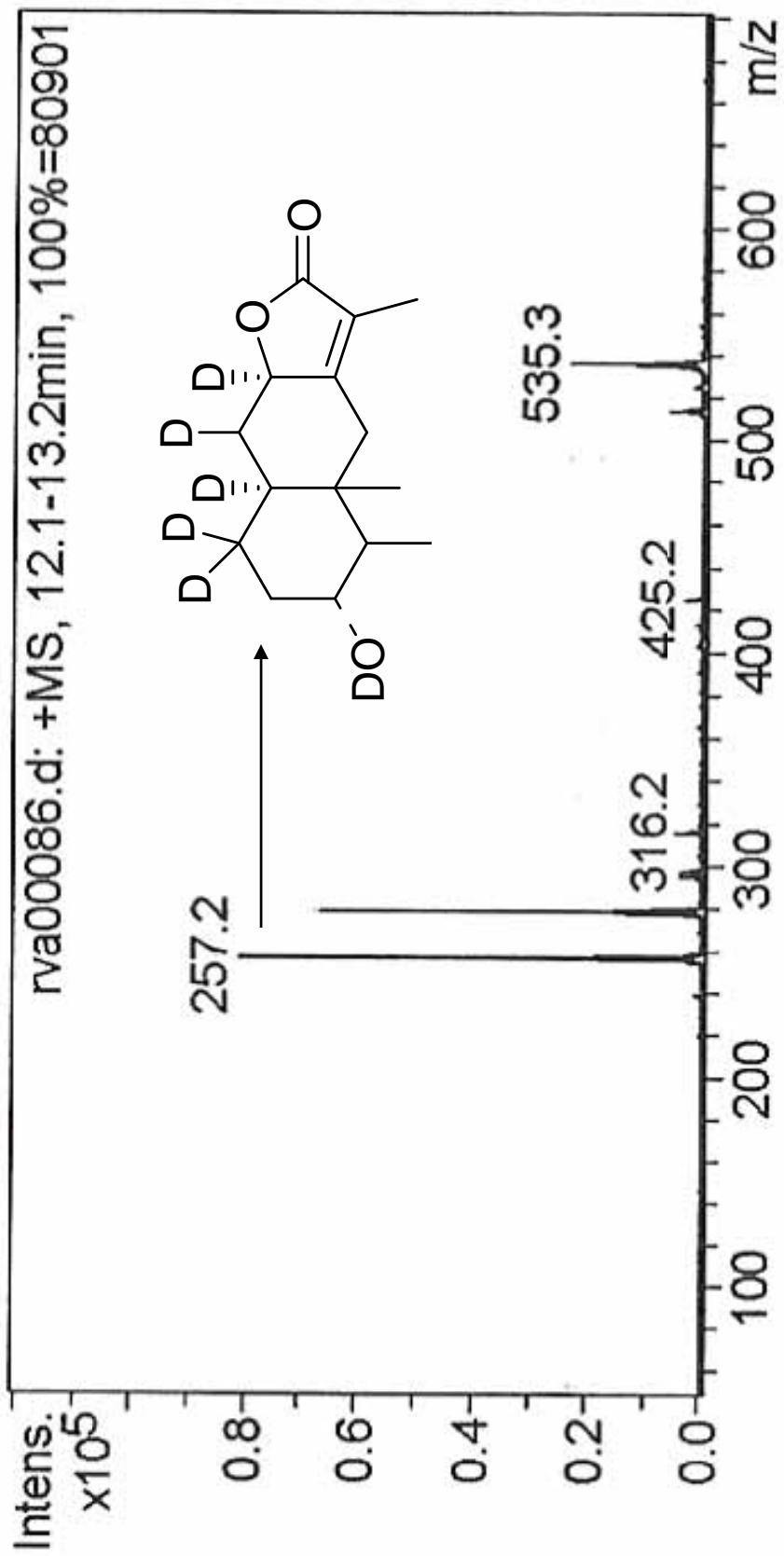
ESPECTRO 15: RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 86a



**ESPECTRO 16: RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 86b**



**Cromatograma 1: Perfil cromatográfico del compuesto 87**



Cromatograma 2: CLAE-MASAS del compuesto 103

## **ANEXOS**

HETEROCYCLES, Vol. 75, No. 12, 2008, pp. 3035 - 3042. © The Japan Institute of Heterocyclic Chemistry  
Received, 5th July, 2008, Accepted, 12th August, 2008, Published online, 18th August, 2008. COM-08-11479

## FURANOEREMOPHILANES AND OTHER CONSTITUENTS OF *PITTOCAULON BOMBYCOPHOLE*

Jhon Ironzi Maldonado R.,<sup>a</sup> Amira Arciniegas,<sup>a</sup> Ana-L. Pérez-Castorena,<sup>a</sup>  
José Luis Villaseñor,<sup>b</sup> and Alfonso Romo de Vivar<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, D.F. México E-mail: aromovi@servidor.unam.mx; <sup>b</sup>Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, D.F. México

**Abstract** – Three new eremophilanes (**1-3**) and a new oplopane (**4**) were isolated from *Pittocaulon bombycophole*. Additionally, three known sesquiterpenes (**5-7**) and the alkaloid 7-angeloylplatynecine (**8**) were isolated. The structures of the new compounds were elucidated by spectroscopic methods.

### INTRODUCTION

The genus *Pittocaulon* (Asteraceae, Senecioneae, Tussilagininae) consists of five species segregated from the genus *Senecio*.<sup>1,2</sup> Four species are endemic to Mexico and one is native of Southern Mexico and Guatemala. All the *Pittocaulon* species grow in dry tropical habitats often on rocky or steep cliffs.<sup>3</sup> Several chemical studies of *Pittocaulon praecox* have shown that it synthesizes furanocremophilanes as the main secondary metabolites.<sup>4-6</sup> Recently, the pyrrolizidine alkaloids present in the five species of the genus *Pittocaulon* were reported.<sup>7</sup> Considering that there are no studies about non alkaloidal metabolites of *P. bombycophole*, we undertook the chemical study of its roots and stems which afforded four new compounds, three furanoeremophilanes (**1-3**) and one oplopane (**4**), as well as four known compounds (**5-8**).<sup>8-13</sup>

### RESULTS AND DISCUSSION

Compound **1** was isolated as a pale yellow oil,  $[\alpha]_D^{25} + 98.3$ , with the molecular formula  $C_{23}H_{32}O_6$ , determined by HRFABMS. Its IR spectrum exhibited absorption bands at 1731 and 1688  $cm^{-1}$ , indicative of carbonyl groups, and a band at 792  $cm^{-1}$ , due to furan group. The  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR spectra showed



typical signals for a 9-oxofuranoeremophilane: The quartet at  $\delta$  7.36 (q,  $J = 1.0$  Hz) due to H-12, three signals at  $\delta$  1.92 (d,  $J = 1.0$  Hz), 0.99 (s), and 0.91 (d,  $J = 6.7$  Hz) assigned to H-13, H-14 and H-15, respectively, and the C-9 signal at  $\delta$  185.2. The presence of an acetoxy group at C-6 was deduced by the singlet signal at  $\delta$  2.19 and the correlation observed in the HMBC experiment between H-6 ( $\delta$  6.39) and the ester carbonyl ( $\delta$  170.8). The chemical shift of H-3 ( $\delta$  4.61) indicated its geminal position to an ester group. This ester was identified as 3-methylpentanoyloxy by the correlations observed in the HMBC experiment between C-1' ( $\delta$  172.4) and H-2' and those of C-3' ( $\delta$  32.0) with H-2', H-4', H-5' and H-6'. Its MS showed a fragment at  $m/z$  288  $[M - C_6H_{12}O_2]^+$  which corresponded to the loss of the methylpentanoic acid. The NOE effects of H-3 with H-14 and H-15, of H-10 with H-4 and H-6, and of H-6 with H-4, suggested the relative stereochemistry depicted in **1** (Figure 1).

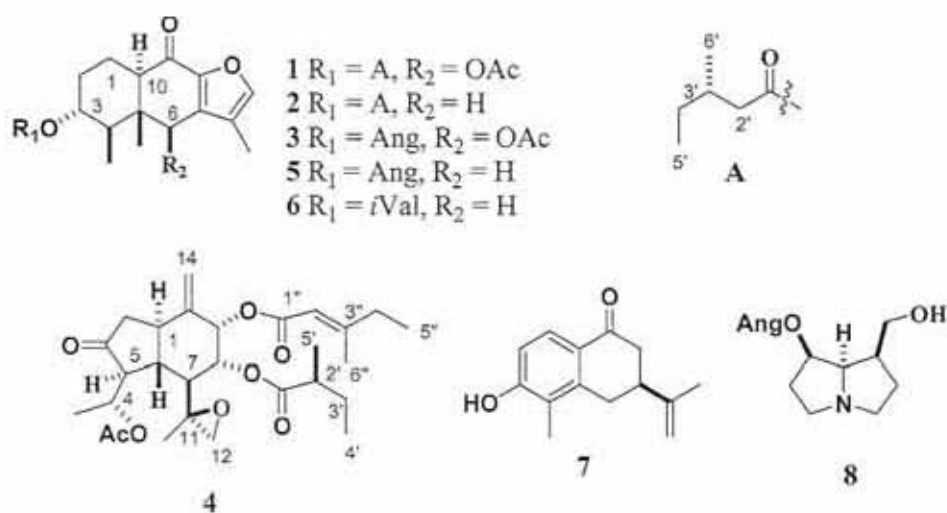


Figure 1

Compound **2** was obtained as colourless crystals, mp 87-90 °C,  $[\alpha]_D^{25} - 32$ . The molecular formula  $C_{21}H_{30}O_4$  is indicative of seven degrees of unsaturation. Its IR spectrum exhibited bands of carbonyl groups ( $1728$  and  $1679$   $cm^{-1}$ ) and of a furan group ( $806$   $cm^{-1}$ ). Its UV spectrum presented an absorption band at 280 nm characteristic of 9-oxofuranoeremophilanes.<sup>14</sup> The  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR spectra were similar to those of **1**, except for the absence of the acetyl signals and the presence of an AB system at  $\delta$  2.72 and 2.5 in the  $^1H$  NMR spectrum, which was assigned to the hydrogens of the C-6 methylene. The  $\alpha$  orientation of the 3-methylpentanoyloxy group was deduced by the NOE interactions of H-3 with H-14 and H-15. The relative stereochemistry was confirmed by an X-Ray crystallographic analysis (Figure 2).

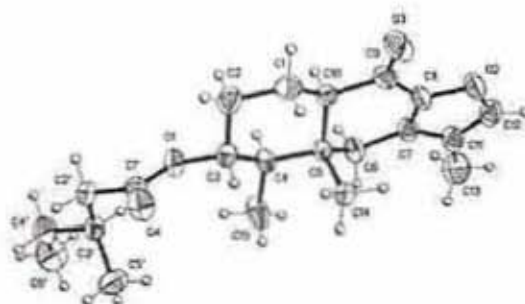


Figure 2. ORTEP projection of **2** (crystallographic numbering)

Compound **3** was isolated as colourless crystals, mp 156-158 °C,  $[\alpha]_D^{25} - 117.2$ , and exhibited a molecular formula of  $C_{22}H_{28}O_6$ . The  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR spectra were similar to those of **1** except for the presence of an angeloyloxy group ( $\delta$  6.06, 1.98, 1.92) instead of a 3-methylpentanoyloxy group. The position of the ester groups was inferred from the HMBC experiment in which the carbonyl of the angeloyloxy group ( $\delta$  167.6) showed correlation with H-3 ( $\delta$  4.71) and the carbonyl of the acetoxy ( $\delta$  170.8) correlated with H-6 ( $\delta$  6.40). Considering the interactions observed in the NOESY experiment of H-10 with H-4 and H-6 and those of H-3 with the  $\beta$  orientated methyl groups 14 and 15, compound **3** should have the same stereochemistry as that of **1** and **2**.

Compound **4** was obtained as a white crystalline solid, mp 130-133 °C. Its molecular formula  $C_{28}H_{40}O_8$  was determined by HRMS. The IR spectrum showed bands of saturated and  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyl groups (1740 and 1717  $cm^{-1}$  respectively). Its  $^1H$  NMR spectrum showed the signals of the hydrogen atoms of an exocyclic double bond ( $\delta$  4.92 and 5.29) and three signals at  $\delta$  5.80, 5.16 and 5.15 which were assigned to hydrogens attached to C-9, C-4 and C-8, respectively, which supported ester functions. These esters were identified as 3-methyl-2-pentenoate, acetate, and 2-methylbutanoate by their characteristic signals observed in the  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR spectra. The position of the acetoxy group at C-4 ( $\delta$  68.6) was achieved by the four-bond correlation observed in the HMBC spectrum between this carbon and the acetyl group ( $\delta$  2.11). The position of the 3-methyl-2-pentenoate at C-9 was confirmed by the cross peak observed in the HMBC experiment between H-9 ( $\delta$  5.8) and the carbonyl signal at  $\delta$  165.3 (C-1"). Therefore, the 2-methylbutanoyloxy group was attached at C-8 ( $\delta$  72.8). An epoxy function was localized between C-11 ( $\delta$  54.9) and C-12 ( $\delta$  52.8) by means of COSY and HMBC experiments. This structure and its relative configuration were established by X-Ray diffraction analysis. The absolute configuration was established by circular dichroism (CD) which showed a negative cotton effect at 303 nm ( $\Delta\epsilon = -5.34$ ) similar to that of the oplopene 14(*R*)-hydroxy-7 $\beta$ -isovaleroyloxyoplop-8(10)-en-2-one

isolated from *Tussilago farfara* L.<sup>15</sup> Based on this evidence, the stereochemistry was determined as 1*R*, 4*R*, 5*S*, 6*R*, 7*S*, 8*R*, 9*S*, 11*S*, 2'*S*, 2''*E* (Figure 3).

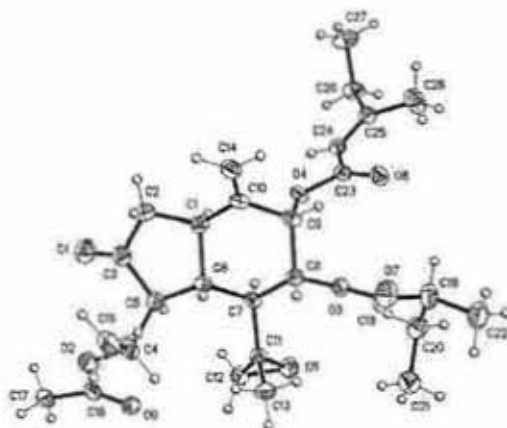


Figure 3. ORTEP projection of 4 (crystallographic numbering)

Structures of the known compounds 3*α*-angeloyloxy-9-oxofuranoeremophilane (5),<sup>8,9</sup> euryopsonol isovalerate (6),<sup>10</sup> ligujapone (7),<sup>11</sup> and 7-angelylplatynecine (8)<sup>12,13</sup> were determined by comparison of their physical constants and spectroscopic features with those reported in literature. The <sup>13</sup>C NMR of compound 6 is reported here for the first time.

## EXPERIMENTAL

**General experimental procedures.** Melting points were recorded on a Fisher-Jones apparatus. Optical rotations were determined on a JASCO DIP-360 digital polarimeter. IR spectra were recorded on a Nicolet Magna-IR 750 spectrometer. NMR spectra were obtained on an Eclipse JEOL 300 MHz, Bruker Avance 300 MHz or a Varian Unity Inova 500 MHz spectrometer with tetramethylsilane (TMS) as internal standard. EIMS data (70 eV) were determined on a Bruker Daltonics Analysis 3.2 mass spectrometer. FABMS were obtained on a JEOL JMS-SX102A Mass spectrometer and samples were desorbed from a nitro benzyl alcohol matrix using 6 KV xenon atoms. HRFABMS were performed at 10,000 resolution using electric field scans and polyethylene glycol ions (Fluka 200 and 300) as reference material. Column chromatography was carried out under vacuum on Kieselgel G (Merk, Darmstadt, Germany). TLC was performed on Si gel 60 and preparative TLC on Si gel GF<sub>254</sub> (MERCK) layer thickness 2.0 mm. HPLC separations were carried on Waters Delta Prep. 4000 apparatus, tunable Absorbance Detector Waters 486,  $\lambda = 254$  nm, RP-column Luna 5  $\mu$  C18 (2), 100 Å, 50 x 21.2 mm. X-Ray crystallographic analyses were realized on a Bruker Smart Apex CCD diffractometer with graphite-

monochromated Mo K $\alpha$  radiation ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ). The structures were solved by direct methods using the program SHELXS. Non-hydrogen atoms were refined with anisotropic displacement parameters. Hydrogen atoms were included at calculated positions and were not refined.

**Plant material.** *Pittocaulon bombycophole* (Bullock) H. Rob. & Brettell was collected in Taxco, Guerrero, Mexico, in April 2007. A voucher specimen (MEXU 1205019) was deposited at the herbarium of the Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

**Extraction and isolation.** Dried and ground root bark (441 g) and stem bark (801 g) were extracted exhaustively with hexane and MeOH and the four extracts were concentrated under reduced pressure. The root bark hexane extract (14.09 g) was submitted to column chromatography eluted with hexane-acetone gradient mixture system to obtain 98 fractions. Fractions 15-22 eluted with hexane-acetone (9:1) were submitted to column chromatography using a hexane-acetone gradient mixture system to afford fractions A and B. Fraction A afforded 9 mg of sitosterol-stigmasterol mixture. Purification of B by column chromatography eluted with hexane-acetone gradient system followed of preparative TLC eluted with hexane-EtOAc 9:1 afforded a mixture (110 mg) which was purified by HPLC (H<sub>2</sub>O-MeCN) to give 4 mg of **1**. Fractions 27-31 eluted with hexane-acetone 9:1 afforded by crystallization (Et<sub>2</sub>O-hexane) a mixture (94 mg), which was submitted to preparative TLC (hexane-acetone 8:2) to yield 11 mg of **7**<sup>11</sup> and 78 mg of compound **4**. Fractions 32-39 eluted with hexane-acetone 9:1 by column chromatography using hexane-acetone gradient system give by crystallization (Et<sub>2</sub>O-hexane) 106 mg of **4**. The stem bark hexane extract (33.3 g) was purified by column chromatography with an hexane-acetone gradient mixture system. A portion (1 g) of fractions 30-34 (11.8 g) eluted with hexane-acetone 9:1 was purified by HPLC (MeOH-H<sub>2</sub>O 8:2) to afford 47 mg of **5**,<sup>8,9</sup> 12.4 mg of **6**<sup>10</sup> and 130 mg of **2**. Fractions 38-44, eluted with hexane-acetone 9:1, were submitted to column chromatography with an hexane-acetone gradient system to yield 62 fractions from which, the fractions 13-39 eluted with hexane were submitted to column chromatography followed by a preparative TLC both eluted with benzene to afford by crystallization (Et<sub>2</sub>O-hexane) 17 mg of **3**. The stem bark methanolic extract (43.5 g) was submitted to column chromatography eluted with EtOAc-MeOH gradient system to obtain 99 fractions. Fractions 46-58 eluted with EtOAc-MeOH 7:3 afforded 18 mg of 7-angeloylplatynecine hydrochloride which on treatment with 0.05 N NaOH gave 10 mg of the free base **8**.<sup>12,13</sup>

**6 $\beta$ -Acetoxy-3 $\alpha$ -(3'-methylpentanoyloxy)-10 $\alpha$ H-furanoeremophil-9-one (1):** Pale yellow oil,  $[\alpha]_D^{20} - 98$  (MeOH,  $c$  0.12) UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 278 (4.26) nm; IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{max}$  1731, 1688, 792 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  7.36 (1H, q,  $J = 1.0$  Hz, H-12), 6.39 (1H, s, H-6), 4.61 (1H, ddd,  $J = 11.0, 11.0, 5.0$  Hz, H-3), 2.44 (1H, dd,  $J = 12.5, 3.5$ , Hz, H-10), 2.29 (1H, ddd,  $J = 14.0, 14.0, 6.5$  Hz, H-2'a), 2.27 (1H, m, H-1a), 2.19 (3H, s, OAc), 2.16 (1H, m, H-2a), 2.10 (1H, ddd,  $J = 14.0, 14.0, 6.5$  Hz, H-2'b),

1.94 (1H, m, H-4), 1.92 (3H, d,  $J = 1.0$  Hz, H-13), 1.88 (1H, m, H-3'), 1.60 (1H, m, H-1b), 1.36 (1H, m, H-4'a), 1.31 (1H, m, H-2b), 1.26 (1H, m, H-4'b), 0.99 (3H, s, H-14), 0.93 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-6'), 0.91 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz, H-15), 0.90 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-5');  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75.4 MHz)  $\delta$  185.2 (C, C-9), 172.9 (C, C-1'), 170.8 (C, OAc), 146.5 (C, C-7), 145.4 (CH, C-12), 134.7 (C, C-8), 120.8 (C, C-11), 75.3 (CH, C-6), 73.7 (CH, C-3), 54.3 (CH, C-10), 50.0 (C, C-5), 45.9 (CH, C-4), 41.8 ( $\text{CH}_2$ , C-2'), 32.0 (CH, C-3'), 30.6 ( $\text{CH}_2$ , C-2), 29.4 ( $\text{CH}_2$ , C-4'), 21.5 ( $\text{CH}_3$ , OAc), 19.2 ( $\text{CH}_3$ , C-6'), 18.9 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 12.0 ( $\text{CH}_3$ , C-15), 11.2 ( $\text{CH}_3$ , C-5'), 9.0 ( $\text{CH}_3$ , C-14), 8.5 ( $\text{CH}_3$ , C-13). EI-MS  $m/z$  404 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup> (5), 344 (18), 246 (100), 288 (20), 228 (50); HRFABMS  $m/z$  405.2271 (calcd. for  $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{O}_6$ , [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup> 405.2277).

**3 $\alpha$ -(3'-Methylpentanoyloxy)-10 $\alpha$ -H-furanoeremophil-9-one (2):** Colorless crystals; mp 87-90 °C,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 32$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c$  0.25) UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 280 (4.02) nm; IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  1728, 1679, 806  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.36 (1H, q,  $J = 1.2$  Hz, H-12), 4.74 (1H, ddd,  $J = 10.8, 10.8, 4.5$  Hz, H-3), 2.72 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz, H-6a), 2.50 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz, H-6b), 2.41 (d, 1H, dd,  $J = 12.0, 3.6$  Hz, H-10), 2.30 (1H, dd,  $J = 14.4, 6.0$  Hz, H-2'a), 2.24 (1H, m, H-1a), 2.20 (1H, m, H-2a), 2.12 (1H, dd,  $J = 14.4, 8.1$  Hz, H-2'b), 1.99 (3H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-13), 1.90 (1H, oct,  $J = 6.6$  Hz, H-3'), 1.76 (1H, dq,  $J = 10.8, 6.6$  Hz, H-4), 1.55 (1H, m, H-1b), 1.39 (1H, m, H-4'a), 1.32 (1H, m, H-2b), 1.27 (1H, m, H-4'b), 0.97 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-15), 0.95 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-6'), 0.91 (3H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-5'), 0.86 (3H, s, H-14);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75.4 MHz)  $\delta$  186.1 (C, C-9), 172.9 (C, C-1'), 146.6 (C, C-7), 144.6 (CH, C-12), 136.5 (C, C-8), 121.2 (C, C-11), 73.7 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-10), 47.1 (CH, C-4), 43.9 (C, C-5), 41.8 ( $\text{CH}_2$ , C-2'), 35.4 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 32.0 (CH, C-3'), 31.1 ( $\text{CH}_2$ , C-2), 29.4 ( $\text{CH}_2$ , C-4'), 19.3 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 19.2 ( $\text{CH}_3$ , C-6'), 13.1 ( $\text{CH}_3$ , C-14), 11.2 ( $\text{CH}_3$ , C-5'), 10.5 ( $\text{CH}_3$ , C-15), 7.7 ( $\text{CH}_3$ , C-13); EI-MS  $m/z$  346 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup> (20), 247 (3), 230 (82), 215 (70), 175 (41), 162 (100); HRFABMS  $m/z$  347.2221 (calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_4$ , [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup> 347.2222).

**6 $\beta$ -Acetoxy-3 $\alpha$ -angeloyloxy-10 $\alpha$ -H-furanoeremophil-9-one (3):** colourless crystals; mp 156-158 °C,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 117$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c$  0.25) UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 278 (4.32) nm; IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  1746, 1683, 851  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  7.37 (1H, q,  $J = 1.2$  Hz, H-12), 6.40 (1H, s, H-6), 6.06 (1H, qq,  $J = 7.2, 1.5$  Hz, H-3'), 4.71 (1H, ddd,  $J = 10.8, 10.8, 4.5$  Hz, H-3), 2.47 (1H, dd,  $J = 12.0, 3.5$  Hz, H-10), 2.31 (1H, dddd,  $J = 12.5, 12.0, 7.0, 3.5$  Hz, H-1a), 2.23 (1H, dddd,  $J = 12.5, 8.0, 4.0, 3.5$  Hz, H-2a), 2.19 (3H, s, OAc), 2.02 (1H, m, H-4), 1.98 (3H, dq,  $J = 7.2, 1.5$  Hz, H-4'), 1.92 (3H, d,  $J = 1$  Hz, H-13), 1.88 (3H, quint,  $J = 1.5$  Hz, H-5'), 1.62 (1H, m, H-1b), 1.36 (1H, m, H-2b), 1.02 (3H, s, H-14), 0.94 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-15);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75.4 MHz)  $\delta$  185.2 (C, C-9), 170.8 (C, OAc), 167.6 (C, C-1'), 146.5 (C, C-8), 145.4 (CH, C-12), 137.8 (CH, C-3'), 134.7 (C, C-7), 127.9 (C, C-2'), 120.9 (C, C-11), 75.3 (CH, C-6), 73.6 (CH, C-3), 54.4 (CH, C-10), 50.1 (C, C-5), 46.1 (CH, C-4), 30.8 ( $\text{CH}_2$ , C-2), 21.5 ( $\text{CH}_3$ , OAc), 20.5 ( $\text{CH}_3$ , C-4'), 19.0 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 15.7 ( $\text{CH}_3$ , C-5'), 12.1 ( $\text{CH}_3$ , C-15), 8.9 ( $\text{CH}_3$ , C-14), 8.5 ( $\text{CH}_3$ , C-13); EI-

MS  $m/z$  388 [M]<sup>+</sup> (3), 328 (20), 288 (20), 246 (75), 228 (63), 138 (38), 83 (100), 55 (45); HRFABMS  $m/z$  389.1975 (calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>O<sub>6</sub>, [M+H]<sup>+</sup> 389.1964).

**(1R, 4R, 5S, 6R, 7S, 8R, 9S, 11S, 2'S, 2''E)-11,12-Epoxy-8-(2'-methylbutanoyloxy)-9-(3''-methyl-2''-pentenoyloxy)-10(14)-oplopen-3-one (4):** white crystals mp 130-133 °C,  $[\alpha]_D^{20} + 15.4$  (CHCl<sub>3</sub>, *c* 0.23); UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 220 (4.32) nm; IR (KBr)  $\nu_{max}$  1740, 1717, 1651 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  5.80 (1H, d, *J* = 3.3 Hz, H-9), 5.64 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-2''), 5.29 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-14a), 5.16 (1H, m, H-4), 5.15 (1H, m, H-8), 4.92 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-14b), 2.81 (1H, d, *J* = 3.9 Hz, H-12a), 2.69 (1H, d, *J* = 3.9 Hz, H-12b), 2.64 (1H, brd, *J* = 11.5 Hz, H-5), 2.5 (1H, ddd, *J* = 17.0, 7.0, 1.0 Hz, H-1), 2.42 (1H, dd, *J* = 14.0, 7.0 Hz, H-2a), 2.42 (1H, m, H-2''), 2.18 (1H, m, H-2b), 2.18 (2H, m, H-4''), 2.13 (3H, d, *J* = 1.2 Hz, H-6''), 2.11 (3H, s, OAc), 2.01 (1H, m, H-7), 1.76 (1H, ddq, *J* = 14.3, 7.0, 7.0 Hz, H-3'a), 1.53 (1H, brdd, *J* = 11.5, 11.5 Hz, H-6), 1.48 (1H, ddq, *J* = 14.3, 7.0, 7.0 Hz, H-3'b), 1.25 (3H, s, H-13), 1.23 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-15), 1.17 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, H-5'), 1.07 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-5''), 0.91 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-4''); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75.4 MHz):  $\delta$  212.6 (C, C-3), 176.1 (C, C-1'), 170.7 (C, OAc), 165.3 (C, C-1''), 163.1 (C, C-3''), 142.3 (C, C-10), 113.9 (CH, C-2''), 113.0 (CH<sub>2</sub>, C-14), 72.8 (CH, C-8), 72.2 (CH, C-9), 68.6 (CH, C-4), 56.4 (CH, C-5), 54.9 (C, C-11), 52.8 (CH<sub>2</sub>, C-12), 48.8 (CH, C-7), 45.8 (CH, C-6), 41.8 (CH<sub>2</sub>, C-2), 41.1 (CH, C-2'), 40.9 (CH<sub>2</sub>, C-1), 33.8 (CH<sub>2</sub>, C-4''), 26.3 (CH<sub>2</sub>, C-3''), 21.3 (CH<sub>3</sub>, OAc), 18.9 (CH<sub>3</sub>, C-6''), 16.2 (CH<sub>3</sub>, C-5'), 15.9 (CH<sub>3</sub>, C-13), 15.1 (CH<sub>3</sub>, C-15), 11.8 (CH<sub>3</sub>, C-5''), 11.6 (CH<sub>3</sub>, C-4''); EIMS  $m/z$  504 [M]<sup>+</sup> (2), 403 (5), 246 (5), 228 (8), 97 (100), 57 (24); HRFABMS  $m/z$  : 505.2795 (calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>41</sub>O<sub>8</sub>, [M+H]<sup>+</sup> 505.2801).

**Euryopsonol isovalerate (6):** white crystal mp 109-111 °C; <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125.7 MHz)  $\delta$  186.2 (C, C-9), 172.8 (C, C-1'), 146.6 (C, C-8), 144.6 (CH, C-12), 136.5 (C, C-11), 121.2 (C, C-7), 73.7 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-10), 47.1 (CH, C-4), 43.9 (C, C-5), 43.8 (CH<sub>3</sub>, C-2'), 35.4 (CH<sub>2</sub>, C-6), 31.1 (CH<sub>2</sub>, C-2), 25.8 (CH, C-3'), 22.5 (CH<sub>3</sub>, C-4'), 22.4 (CH<sub>3</sub>, C-5'), 19.4 (CH<sub>2</sub>, C-6), 13.1 (CH<sub>3</sub>, C-14), 10.5 (CH<sub>3</sub>, C-15), 7.8 (CH<sub>3</sub>, C-13).

**Crystal data of 2:** C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>, *M<sub>r</sub>* 346.45, monoclinic, space group *P2*<sub>1</sub>, *a* = 7.801 (1) Å,  $\alpha$  = 90.00°, *b* = 12.905 (2) Å,  $\beta$  = 91.899 (2)°, *c* = 9.907 (1) Å;  $\gamma$  = 90°, *V* = 996.7(2) Å<sup>3</sup>, *Z* = 2, *D<sub>c</sub>* = 1.154 Mg/m<sup>3</sup>, *F*(000) = 376; crystal dimensions 0.466 x 0.178 x 0.108 mm. Reflections collected 9793, independent reflections 2391. Number of parameters refined 226; final *R* indices (observed data) *R* = 4.62 %, *wR*<sup>2</sup> = 9.3 %; *R* indices (all data) *R* = 7.12 %, *wR*<sup>2</sup> 10.1 %.

**Crystal data of 4:** C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>O<sub>8</sub>, *M<sub>r</sub>* 504.60, orthorhombic, space group *P2*<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, *a* = 6.578 (2) Å,  $\alpha$  = 90.00°, *b* = 14.847 (5) Å,  $\beta$  = 90°, *c* = 28.496 (10) Å;  $\gamma$  = 90°, *V* = 2783.3(17) Å<sup>3</sup>, *Z* = 4, *D<sub>c</sub>* = 1.204 Mg/m<sup>3</sup>, *F*(000) = 1088; crystal dimensions 0.56 x 0.07 x 0.05 mm. Reflections collected 26404, independent reflections 2962. Number of parameters refined 399; final *R* indices (observed data) *R* = 5.13 %, *wR*<sup>2</sup> =

11.32 %;  $R$  indices (all data)  $R = 9.15\%$ ,  $wR^2 = 12.96\%$ . Crystallographic data for **2** (CCDC-697746) and **4** (CCDC-697747) are available free of charge via the Internet at <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html> (or from the CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, U.K.; fax: +441223336033; deposit@ccdc.cam.ac.uk).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Carmen Márquez, Eréndira Ríos, Rubén A. Toscano, Ma. Rocío Patiño, Teresa Ramírez-Apan, Héctor Ríos, Angeles Peña, Elizabeth Huerta, Nieves Zavala, Beatriz Quiróz, Luis Velasco, Javier Pérez, and Gabriela Salcedo for technical assistance.

#### REFERENCES

1. H. Robinson and R. D. Brettell, *Phytologia*, 1973, **27**, 451.
2. J. F. Bain and J. L. Golden, *Mol. Phylogen. Evol.*, 2000, **16**, 331.
3. E. O. Mark, *J. Torrey Bot. Soc.*, 2005, **132**, AGRICOLA<sup>®</sup>, 173.
4. A. Ortega, M. Romero, and E. Diaz, *Rev. Latinoamer. Quim.*, 1975, **6**, 136.
5. M. Jiménez-Estrada, R. Reyes-Chilpa, E. Cerqueda, and I. Saad, *Rev. Soc. Quim. Méx.*, 1999, **43**, 106.
6. F. Bohlmann and C. Zdero, *Chem. Ber.*, 1976, **109**, 819.
7. J. C. Marin-Loaiza, L. Ernst, T. Beuerle, C. Theuring, L. C. Céspedes, and T. Hartmann, *Phytochemistry*, 2008, **69**, 154.
8. E. Burgueño-Tapia, B. Hernandez-Carlos, and P. Joseph-Nathan, *J. Mol. Struct.*, 2006, **825**, 115.
9. F. Bohlmann, V. Castro, C. Zdero, R. M. King, and H. Robinson, *Rev. Latinoamer. Quim.*, 1984, **14**, 101.
10. F. Bohlmann, C. Zdero, and N. Rao, *Chem. Ber.*, 1972, 3523.
11. K. Naya, T. Okayama, M. Fujiwara, M. Nakata, T. Ohtsuka, and S. Kurio, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1990, **63**, 2239.
12. R. M. Roby and F. R. Stermitz, *J. Nat. Prod.*, 1984, **47**, 846.
13. E. M. Stelijes, R. B. Kelley, R. J. Molyneux, and J. N. Seiber, *J. Nat. Prod.*, 1991, **54**, 759.
14. G. A. Eagle, D. E. A Rivett, D. H. Williams, and G. Wilson, *Tetrahedron*, 1969, **25**, 5227.
15. Y. Yaoita, N. Suzuki, and M. Kikuchi, *Chem. Pharm. Bull.*, 2001, **49**, 645.