



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**METABOLITOS SECUNDARIOS DE CORTEZA DE RAÍZ DE  
*PITTOCAULON PRAECOX***

**TESIS EXPERIMENTAL**

**PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**ERICK DANIEL GASTÉLUM ALCÁUTER**



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.

*Pittocaulon praecox*



SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES  
LABORATORIO 2-7**

**Director de Tesis: M. en C. Amlra Arcinlegas Arcinlegas**

**Asesor Técnico: Q.F.B. Ángel Tlapanco Ochoa**

El temor a Jehová es el principio de la sabiduría,  
Y el conocimiento del Santísimo es la inteligencia.

Porque por mí se aumentarán tus días,  
Y años de vida se te añadirán.

Si fueres sabio, para ti lo serás;  
Y si fueres escarnecedor, pagarás tú solo.

Proverbios 9: 10-12.

## DEDICATORIAS

A Ivette el amor de mi vida que siempre me alentó con sus ganas y empuje, a mis padres y hermanas que siempre me apoyaron y preocuparon tanto por mí, a mis familias y a mis amigos Roberto, Alma, Rosa, Alicia, Anay, Alma, Bere, Irais, Jazz, Laura, Tan, Tani, Lili, Isaac, Mauricio, Israel, Edgar, Ricardo, Fabi, Paulina, Moni, Edith, Leti, Marina, Lilia, Antinea, Paco, Chava, Adrián, Daniel, Abahel, Claudia, Chio, Eliú, Humberto, Jhon, Zuen y Yunuen.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis profesores:

Dr. Alfonso Romo de Vivar  
M. en C. Amira Arciniegas Arciniegas  
M. en C. Ana Lidia Pérez Castorena  
M. en C. Emma Maldonado Jiménez

Agradezco a mis sinodales:

M. en C. Ma. Patricia Shirley Demare Negrete  
M. en C. Amira Arciniegas Arciniegas  
Q.F.B. Ángel Tlapanco Ochoa  
Dr. Benlto Reyes Trejo  
M. en C. Francisco Oscar Guadarrama Morales

Agradecemos a: Héctor Ríos, Ángeles Peña, Elizabeth Huerta, Nieves Zavala, Beatriz Quiroz, Isabel Chávez, Rocío Patlño, Luis Velasco, Javier Pérez, Alfredo Toscano, Simón Hernández, Carmen Márquez, Eréndira Ríos por la determinación de los diferentes espectros y a Antonio Nieto por la elaboración de las pruebas de actividad anti-inflamatoria.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS	9
1. INTRODUCCIÓN	12
2. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA	15
2.1 Familia Asteraceae	15
2.2 Tribu Senecioneae	16
2.3 Género <i>Senecio</i>	16
2.4 Género <i>Pittocaulon</i>	16
2.4.1 Química del género <i>Pittocaulon</i>	17
2.4.1.1 Eremofilanos	17
2.4.1.1.1 Actividad biológica de los eremofilanos	18
2.4.1.1.2 Alcaloides pirrolizidínicos	19
2.4.1.2.1 Actividad biológica de los alcaloides pirrolizidínicos	19
2.5 <i>Pittocaulon praecox</i>	20
2.6 <i>Pittocaulon bombycophole</i>	22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	24
6. PARTE EXPERIMENTAL	25
6.1 Equipo utilizado	25
6.2 Análisis cromatográfico	25
6.3 Material vegetal	26
6.4 Preparación de extractos	26
6.4.1. Extracto metanólico	26
6.4.2. Extracto alcaloideo	26
6.5 Fraccionamiento del extracto alcaloideo	28
6.6 Fraccionamiento del extracto metanólico	29
6.7 Hidrólisis ácida de <b>XI</b> y <b>XII</b>	33
6.8 Actividad anti-inflamatoria	34



7. RESULTADOS	35
7.1 Extracto alcaloideo	35
7.2 Extracto metanólico	35
7.3 Resultados de las pruebas de actividad anti-inflamatoria	37
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	38
9. CONCLUSIONES	57
10. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES	58
11. BIBLIOGRAFÍA	59
12. ANEXOS	63

## ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
Ang	Angelolol
Aps	Alcaloides pirrolizidínicos
c	Señal cuádruple
c	Concentración
CCD	Cromatografía de Capa Delgada
CCF	Cromatografía en Columna Flash
CCV	Cromatografía en Columna al Vacío
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
COLOC	COrrrelation LOng-range Coupling
COSY	Homonuclear Correlation SpectroscopY
d	Señal doble
da	Señal doble ancha
dd	Señal doble de doble
dc	Señal doble de cuartetos
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
ddd	Señal doble de doble de doble
DMSO <sub>d</sub> <sub>6</sub>	Dimetil sulfoxido hexadeuterado
EMAR (FAB)	Espectrometría de Masas de Alta Resolución (Bombardeo con Átomos Rápidos)
EMIE	Espectrometría de Masas de Impacto Electrónico
eV	Electron Volts
HETCOR	HETeronuclear chemical shift CORrelation
Hz	Hertz
HMBC	Heteronuclear Múltiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
/ Bu	Isobutiril
IR	Infrarrojo

<i>i</i> Val	Isovaleril
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>m</i>	Señal múltiple
Me <sub>2</sub> COd <sub>6</sub>	Acetona deuterada
mg	Miligramos
MHz	Megahertz
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
[M+H] <sup>+</sup>	Masa molecular más hidrógeno
nm	Nanómetro
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OAc	Acetoxi
OAng	Angeloiloxi
O/Bu	Isobutiriloxi
OMe	Metoxi
ORTEP	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot
pf	Punto de fusión
pH	Potencial de Hidrógeno
ppm	Partes por millón
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H
<i>s</i>	Señal simple
<i>sa</i>	Señal ancha
Sen	Senecioll
<i>t</i>	Señal triple
Tig	Tiglolil
Met	Metacriloil
TMS	Tetrametilsilano
TPA	acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
UV	Ultravioleta
[α] <sub>D</sub>	Rotación óptica
δ	Desplazamiento químico (RMN)

$\epsilon$	Coeficiente de extinción
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu\text{l}$	Microlitros
$\nu$	Frecuencia

## 1. INTRODUCCIÓN

La vida del hombre está íntimamente unida a su medio ambiente, en particular a las plantas, las cuales le proporcionan alimento, vestido, materiales de construcción, esparcimiento visual y olfativo, regeneran el aire y según sus propiedades pueden afectar la salud o producir la muerte. Los pueblos primitivos han adquirido información sobre las propiedades medicinales de un gran número de plantas propias de su medio ambiente. Estos conocimientos, generalmente han sido acumulados por individuos, sacerdotes, hechiceros, curanderos, etc, quienes los han transmitido de generación en generación, a sus aprendices y descendientes (Domínguez, 1988).

Se estima que el 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional como primera opción para el cuidado de su salud, sin embargo, existe un gran riesgo en el uso inadecuado de la misma, por lo que se requiere de la información que proporciona la investigación sistemática de plantas (Miller, 1996). Tanto en animales como en vegetales, los metabolitos secundarios sirven o funcionan como parte del sistema de defensa contra herbívoros y depredadores, microbios o virus, así como también en los mecanismos de competencia entre las mismas plantas. Por lo tanto los metabolitos secundarios son de suma importancia para los fines para los que cada organismo los produce. Los conocimientos sobre las plantas medicinales de América, fueron transmitidos por los indígenas a misioneros y viajeros españoles, quienes los inmortalizaron en diversas obras (Domínguez, 1988). En los Manuscritos Indígenas y otros documentos, en que se da a conocer el cúmulo cultural Prehispánico de México, abundan referencias a las plantas, sus nombres, propiedades y usos. En la actualidad son los hombres de campo, quienes saben mucho acerca de la vegetación que los rodea, de su dinámica, de su relación con el clima y de su posible aprovechamiento. Sin embargo, el desarrollo tecnológico y científico de los tiempos modernos requiere de conocimientos mucho más exactos acerca de los recursos naturales disponibles y uno de estos recursos naturales es precisamente la cubierta vegetal. (Rzedowski, 1983).

En los países en vía de desarrollo existe una gran dificultad para hacer llegar la medicina moderna a todos los estratos de la población, por lo que la fitoterapia, arraigada en la cultura popular, constituye una de las formas más económicas para el tratamiento de diversas enfermedades. Coincidentemente, estos países poseen una importante riqueza florística y cultural (Lara y Márquez, 1996). México es un ejemplo de lo anterior, ya que posee una amplia biodiversidad y numerosos grupos culturales, características que explican el por qué cuenta con un amplio conocimiento en medicina tradicional. Aunado a lo anterior, el alto costo de los medicamentos, entre otras causas, ha ocasionado que la gente recurra con mayor frecuencia a la herbolaria. El conocimiento sobre plantas medicinales se ha utilizado en el mundo académico, ya que a través de estudios fitoquímicos se han obtenido metabolitos secundarios con diversas actividades terapéuticas. Estas sustancias han servido como prototipo para la síntesis de fármacos con mayor potencia y baja toxicidad (Lara y Márquez, 1996).

Dentro de la familia Asteraceae, el género *Senecio* agrupa especies que poseen múltiples propiedades farmacológicas. Los metabolitos secundarios frecuentemente encontrados en este género son sesquiterpenos principalmente de tipo eremofilano y alcaloides pirrolizidínicos. Los eremofilanos pueden poseer propiedades antialimentarias (Reina *et al.*, 2001), antiinflamatorias (Hwang *et al.*, 2002) o antifúngicas (Reina *et al.*, 2006), aunque también se les atribuyen propiedades tóxicas (Pomilio y Jares, 1997). En muchas regiones del mundo, la ingestión de especies de plantas del género *Senecio* es responsable de innumerables muertes de ganado y numerosas intoxicaciones en humanos (Robins, 1977). La toxicidad de estas plantas se atribuye en parte a la presencia de alcaloides pirrolizidínicos, algunos de los cuales pueden provocar enfermedades como cirrosis hepática y tumores primarios (Roeder, 1995).

Por su parte el género *Pittocaulon* agrupa 5 especies recientemente segregadas del género *Senecio* (Robinson y Bretell, 1973). Una de ellas, *Pittocaulon praecox* es usado en medicina popular para curar el reumatismo y sanar heridas (Agullar, 1994; Martínez, 1959). Los estudios previos de esta planta han reportado furanoeremofilanos y alcaloides pirrolizidínicos

como sus principales metabolitos secundarios (Ortega *et al.*, 1975, Bohlmann y Zdero, 1976, Marín-Loalza *et al.*, 2008a). Sin embargo, solamente se han estudiado los extractos hexánicos y no se ha explorado una posible actividad anti-inflamatoria. En el presente trabajo reportamos los resultados del estudio del extracto metanólico de la corteza de raíz de *Pittocaulon praecox* y la evaluación de la actividad anti-inflamatoria de los compuestos aislados.

## 2. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA

### 2.1 Familia Asteraceae

La familia Asteraceae, también llamada Compositae, es una de las más grandes de la división Magnoliofita o angiospermas (plantas con flores). Está formada por 13 tribus, alrededor de 1500 géneros y 30000 especies (Heywood *et al.*, 1977). La diversidad observada en esta familia puede atribuirse a su plasticidad genética que le permite adaptarse a diferentes condiciones ecológicas, a sus eficientes mecanismos de distribución y a su plasticidad química que se refleja en el éxito contra depredadores y competidores. México es uno de los principales centros de diversificación de la familia Asteraceae. La tabla 1 muestra la clasificación de la familia Asteraceae en México, representada con más de 380 géneros y 2861 especies siendo la familia más ampliamente distribuida (Villaseñor, 1993).

**Tabla 1.** Clasificación de la familia Asteraceae en México.

<b>Tribus</b>	<b>Géneros</b>	<b>Especie</b>	<b>Variedades o Subespecies</b>	<b>Total</b>
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
Hellantheae	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>



## 2.2 Tribu Senecioneae

La tribu Senecioneae, constituida por tres subtribus: Senecioninae, Tussilaginatae y Blennospermatinae, contiene cerca de 3000 especies y es la más grande de las tribus de la familia Asteraceae (Heywood *et al.*, 1977). Esta tribu cuenta en México y Centroamérica con 228 especies que pertenecen a 19 géneros, siendo el género *Senecio* el que agrupa mayor número de especies (Villaseñor, 1993).

## 2.3 Género *Senecio*

El género *Senecio*, distribuido en todo el mundo, incluye alrededor de 1500 especies en un amplio espectro de formas de vida. México y Centroamérica constituyen un importante centro de diversificación para este género. Tomando en cuenta nuevos estudios genéticos y taxonómicos el género *Senecio sensu lato (sl)*, en la región antes mencionada, fue reorganizado y muchas de sus especies fueron segregadas a géneros pertenecientes a las subtribus Senecioneae y Tussilaginatae. Uno de estos es el género *Pittocaulon* (Barkley *et al.*, 1996).

## 2.4 Género *Pittocaulon*

El género *Pittocaulon* (Asteraceae Senecioneae y Tussilaginatae) agrupa solo 5 especies: *P. bombycophole*, *P. filare*, *P. hintonii*, *P. praecox*, y *P. velatum*, todas segregadas del *Senecio sl.* (Robinson y Bretell, 1973). Las especies de este género también llamado tezcapatli (Aguilar, 1994; Martínez, 1959) se conocen popularmente como palo loco probablemente por que florecen al final de la estación seca. Son arbustos o árboles pequeños resinosos de tallos gruesos, hojas caducas e inflorescencias terminales corimbosas sostenidas por tallos cortos. Las hojas son alternas con nerviosidad prominente ligeramente palmeadas. Las inflorescencias de tipo capítulo en forma de cabezuelas producen flores de tipo hermafrodita y pistiladas. Los tallos de corteza espesa tienen un xilema grueso que contiene una medula estratificada que permite el almacenamiento de agua y engrosan estacionalmente (Olson, 2005). *Pittocaulon praecox* es la especie más abundante y más ampliamente distribuida del género, abarca toda la zona montañosa de Zacatecas a Oaxaca. Le sigue en abundancia *Pittocaulon velatum*, el cual crece en los estados de Guerrero, Jalisco, México, Nayarit, Oaxaca y Zacatecas. En tanto que *Pittocaulon filare* esta

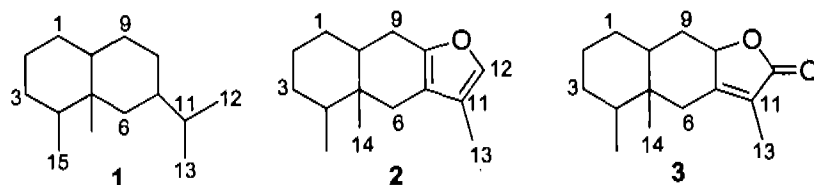
restringida al estado de Colima. Con respecto a *P. bombycophole* crece en los estados de Michoacán, Guerrero y Morelos y *P. hintonii* se encuentra en unas pocas localidades de los estados de Colima y Michoacán.

#### 2.4.1 Química del género *Pittocaulon*

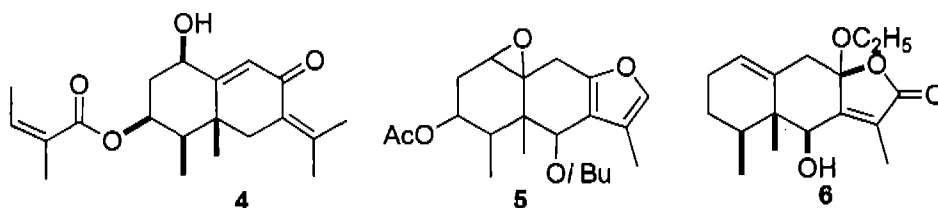
Los reportes de las únicas especies estudiadas de este género: *Pittocaulon praecox* (Ortega *et al.*, 1974; Bohlmann y Zdero, 1976; Marín-Loaiza *et al.*, 2008a) y *P. bombycophole* (Maldonado *et al.*, 2008), muestran que sus principales metabolitos secundarios son sesquiterpenos principalmente de tipo eremofilano y alcaloides pirrolizidínicos.

##### 2.4.1.1 Eremofilanos

Los sesquiterpenos con estructura de eremofilano (1) son característicos de la tribu Senecioneae, pueden tener diferentes grados de oxidación y a menudo se pueden encontrar como furanoeremofilanos (2) o eremofilanolidas (3) (Romo de Vivar *et al.*, 2007).

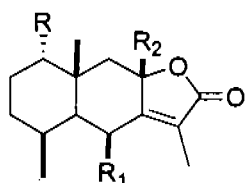


Las estructuras 1-3 están frecuentemente sustituidas con grupos hidroxilo, cetona o éter y los grupos hidroxilo pueden estar esterificados, siendo comunes los acetatos, angelatos, tiglatos, seneciatos e isobutiratos, como en el caso del eremofilano 4 aislado de *Robinsonecio gerberifolius* (Arciniegas *et al.*, 2003), del furanoeremofilano precoxalina A (5) obtenido de *Pittocaulon praecox* (Ortega *et al.*, 1974), y de la eremofilanolida 6 aislada de *Senecio toluccanus* (Pérez *et al.*, 1991).



### 2.4.1.1.1 Actividad biológica de los eremofilanos

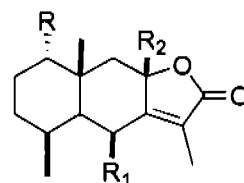
Se encuentran en la literatura varios estudios que describen diversas actividades biológicas de eremofilanos, la figura 1 muestra algunos ejemplos. Se ha descrito la actividad antialimentaria de las eremofilanólidas **7-9** (Reina *et al.*, 2001), la actividad antifúngica de **9** (Reina *et al.*, 2006), el efecto anti-inflamatorio del furanoeremofilano **10** (Hwang *et al.*, 2002), así como también se ha atribuido toxicidad a los eremofilanos (**11-14**) presentes en el extracto hexánico de *S. bonariensis* (Pomillo y Jares, 1997).



**7** R = OAc R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = OMe

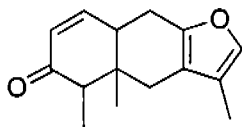
**8** R = OAng R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = OMe

Actividad antialimentaria



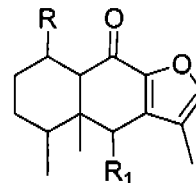
**9** R = Otig R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H

Actividad antialimentaria y antifúngica



**10**

Actividad antiinflamatoria



**11** R = H R<sub>1</sub> = O/Bu

**12** R = OAc R<sub>1</sub> = OAc

**13** R = OAc R<sub>1</sub> = OAng

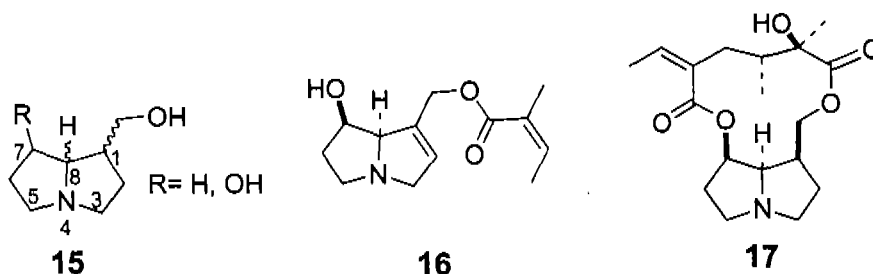
**14** R = H R<sub>1</sub> = OAng

Toxicidad

**Figura 1:** Algunos eremofilanos con actividad biológica.

### 2.4.1.2 Alcaloides Pirrolizidínicos

La presencia de alcaloides pirrolizidínicos (Aps) solo se ha detectado en dos tribus de la familia Asteraceae, la Eupatorieae y la Senecioneae. Los Aps están formados por una porción básica, la hidroximetil pirrolizidina (**15**). Los grupos hidroxilo pueden esterificarse con ácidos monocarboxílicos para formar alcaloides de cadena abierta como la 9-angelilretronecina (**16**), o con ácidos dicarboxílicos para formar macrociclos como la platifilina (**17**) (Romo de Vivar *et al.*, 2000).



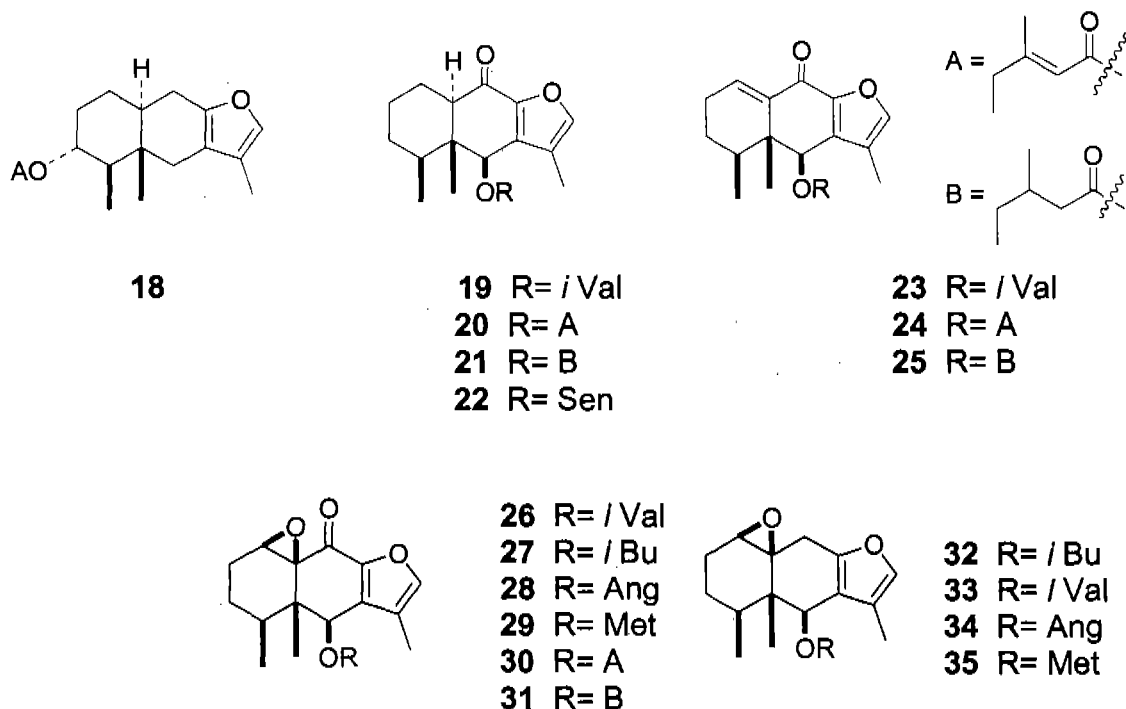
#### 2.4.1.2.1 Actividad biológica de los alcaloides pirrolizidínicos

Los Aps que tienen una insaturación en posición 1 son hepatotóxicos, mutagénicos y pueden causar hepatomegalia y desórdenes venooclusivos. El consumo de plantas que contienen este tipo de Aps ha sido detectado como un problema de salud ya que se han reportado muertes de ganado y de seres humanos ocasionada por la ingesta de dichas plantas (Roeder, 1995). Sin embargo, algunos Aps saturados poli-hidroxiados mimetizan la estructura de monosacáridos y por eso tienen un potencial terapéutico en muchas enfermedades como infecciones virales, cáncer y diabetes (Asano *et al.*, 2000).

Los APs también pueden ser acumulados en los cuerpos de insectos de diferentes ordenes como es el caso de la mariposa *Danaus gilippus* que los utiliza como precursores de sus feromonas. El análisis químico del cuerpo de las mariposas monarca (*Danaus plexippus*), las cuales pasan el invierno en México, muestra alto contenido de Aps que usan probablemente como defensa contra los depredadores (Romo de Vivar *et al.*, 2007).

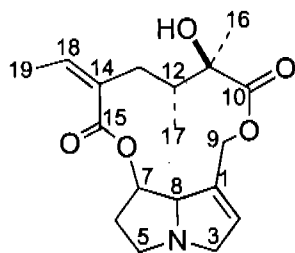
## 2.5 *Pittocaulon praecox*

*Pittocaulon praecox* es un arbusto de 1-4 metros de altura con tallos de hasta 12 cm. de ancho, hojas ovaladas pubescentes de 5-10 cm. de ancho y flores radiales de 4.5 a 15 mm. de largo dispuestas en discos que contienen de 12 a 20 flores. Se encuentra distribuido en los estados de Oaxaca, Puebla, Distrito Federal, Querétaro, Michoacán, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, San Luis Potosí y Zacatecas (Olson, 2005). En el primer estudio de *Pittocaulon praecox*, en 1975, se aisló el furanoeremofilano precoxillina A (5) y se detectó el Aps seneclonina (I) (Ortega et al., 1975). Al año siguiente, Bohlmann y Zdero aislaron del tallo el furanoeremofilano 18 y dos complejas mezclas de otros furanoeremofilanos: 19-21 y 23-25 y de las raíces obtuvieron 22 y las mezclas: 19-21, 23-25, 26-31 y 32-35 (Bohlmann y Zdero, 1976).

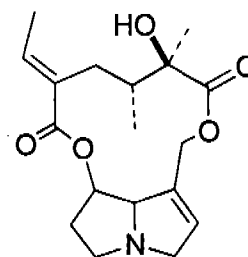


En 2007, Marin-Loalza, J.C. *et al.* mediante el análisis por Cromatografía de Gases – Espectroscopía de Masas de diferentes extractos de *P. praecox* identificaron los Aps: seneclonina (I), neosenkirkina (36), neoplatifillina (37) 9-angeloldihidroxiheliotridano (38), 7-angeloldihidroxiheliotridano (39), integerrimina (II), platifillina (17), senkirkina (40) en la planta. Estos alcaloides son secuestrados por la gama de insectos *Ceroplastes albolineatus*

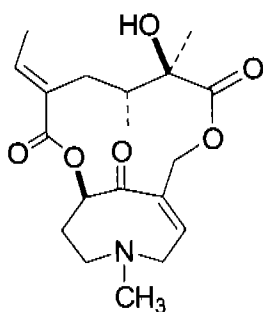
el cual infesta la planta. (Marin-Loaiza *et al.*, 2007). Los mismos autores publicaron en 2008 la actividad anti-inflamatoria y antibacteriana de los extractos de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *Plittocaulon praecox*, *P. bombycophole* y *P. hintonii*. (Marin-Loaiza *et al.*, 2008).



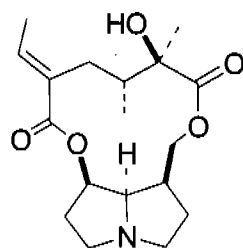
Senecionina I



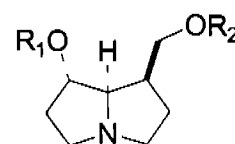
Integerrimina II



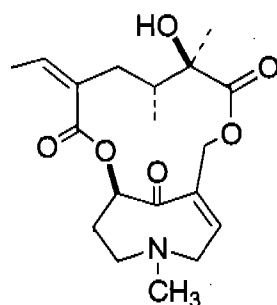
neosenkirquina (36)



neoplatifilina (37)



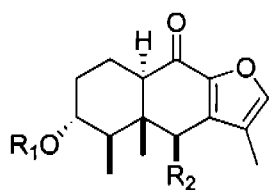
9-angeloldihidroxiheliotridano  
(38) R<sub>1</sub>= H R<sub>2</sub>=Ang  
7-angeloldihidroxiheliotridano  
(39) R<sub>1</sub>= Ang R<sub>2</sub>= H



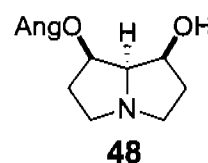
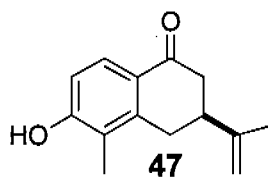
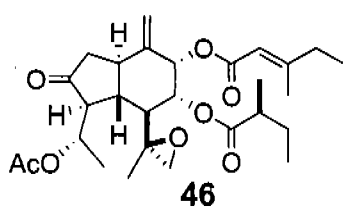
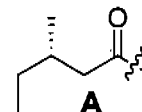
40

## 2.6 *Pittocaulon bombycophole*

Del estudio de *P. bombycophole* se aislaron siete sesquiterpenos (**41-47**) y el alcaloide pirrolizidínico (**48**) (Maldonado *et al.*, 2008).



- 41**  $R_1 = A, R_2 = OAc$
- 42**  $R_1 = A, R_2 = H$
- 43**  $R_1 = Ang, R_2 = OAc$
- 44**  $R_1 = Ang, R_2 = H$
- 45**  $R_1 = /Val, R_2 = H$



### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se encuentran descritos cinco estudios químicos de *Pittocaulon praecox*, en el primero se aisló el furanoeremofilano precoxillina A y se detectó el alcaloide pirrolizidínico seneclonina (Ortega et al., 1975), el segundo reportó mezclas complejas de furanoeremofilanos, sin descripción de las propiedades físicas de los compuestos y con pocos datos espectroscópicos sobre las mezclas (Bohlmann y Zdero, 1976). En los estudios tercero y cuarto, aparecidos recientemente, se hizo el análisis por HPLC de su contenido alcaloidal (Marin-Loaiza et al., 2007, Marin-Loaiza et al., 2008a). Y en el quinto se analizaron las propiedades antifúngicas y antibacterianas de sus extractos (Marin-Loaiza et al., 2008b).

*Pittocaulon praecox* es usado en medicina tradicional para curar el reumatismo y sanar heridas (Aguilar, 1994; Martínez, 1959) por lo que la planta puede ser una fuente de sustancias anti-inflamatorias. Dado que a los compuestos obtenidos de esta fuente no se les ha determinado esta actividad, y teniendo en cuenta que se han estudiado solamente los extractos hexánicos, resultó interesante realizar una nueva investigación de la planta. Adicionalmente, es importante señalar que la presencia de alcaloides pirrolizidínicos, constituye un factor de riesgo en la utilización de *P. praecox* como planta medicinal.



#### 4. HIPÓTESIS

Del extracto metanólico de la corteza del rizoma de *Pittocaulon praecox* se espera aislar sesquiterpenos de tipo eremofilano y alcaloides pirrolizidínicos.

Dado que *Pittocaulon praecox* es empleado en medicina popular para curar el reumatismo y sanar heridas, en este estudio se espera encontrar sustancias con actividad anti-inflamatoria.

#### 5. OBJETIVOS

##### Objetivos generales

- Contribuir con el estudio químico del género *Pittocaulon*, segregado del género *Senecio*.
- Determinar la actividad anti-inflamatoria de los compuestos aislados de *Pittocaulon praecox*.

##### Objetivos particulares

- Aislar, purificar, identificar y cuantificar los principales metabolitos secundarios del extracto metanólico de la corteza de rizoma de *Pittocaulon praecox*.
- Determinar si existen diferencias entre los metabolitos secundarios que se obtengan de *Pittocaulon praecox* con los de especies pertenecientes al género *Senecio*.
- Comparar los resultados obtenidos con los reportados en los estudios precedentes de *P. praecox*.
- Evaluar la actividad anti-inflamatoria de los metabolitos aislados.

## 6. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1 Equipo utilizado

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

La Rotación óptica fue realizada en el polarímetro Perkin-Elmer 343.

Los espectros de UV e IR fueron registrados en los equipos Shimadzu UV 160U y Broker Tensor 27, respectivamente.

Espectros de RMN 1D y 2D fueron obtenidos en espectrofotómetros Eclipse JEOL 300 MHz, Bruker Avance 300 MHz o Varian-Unity Inova 500 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno.

Datos de EM-IE fueron determinados a 70 eV en un espectrómetro de masas Bruker Daltonics Analysis 3.2. Los EMAR (FAB<sup>+</sup>) fueron realizados en un JEOL MS-SX1102A a 10 Kv usando iones de polietilenglicol (Fluka 200 y 300) como material de referencia.

El análisis de cristalografía de Rayos X fue realizado en el difractómetro Bruker Smart Apex CCD con grafito-monocromado Mo K $\alpha$  radiación ( $\lambda=0.71073$  Å). Las estructuras fueron resueltas por métodos directos utilizando el programa SHELXS. Los átomos diferentes a hidrógeno fueron refinados con parámetros de desplazamiento anisotrópico. Los átomos de hidrógeno fueron incluidos en las posiciones calculadas y no están refinados.

Para la cromatografía de gases se utilizó un equipo Agilent 6890 con una columna AT5 de 30 m x 0.25 mm con una película de 0.1  $\mu$ m de espesor. La temperatura inicial de 100°C aumentó en 10 minutos hasta la temperatura final de 200°C.

### 6.2 Análisis cromatográfico

La cromatografía en columna fue realizada con vacío (CCV) utilizando gel de Sílice G 60 (Merck, Darmstadt, Germany).

La cromatografía Flash (CCF), empacada con gel de Sílice 60 (230-400 Macherey-Nagel), fue realizada con inyección de aire por la parte superior de la columna para obtener una elusión aproximada de 3 ml por minuto.

La Cromatografía en capa delgada (CCD) fue realizada utilizando placas de gel de sílice GF<sub>254</sub> (Merck), para la cromatografía analítica se usaron placas de 0.25 mm de espesor y para la preparativa de 1.0 y 2.0 mm.

El monitoreo de las placas se llevó a cabo mediante exposición a luz UV (254 nm y 365 nm). Se utilizó solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico como revelador.

### **6.3 Material vegetal**

*Pittocaulon praecox*, originario del Pedregal de San Ángel México D.F. y cultivado en Ozumba, Estado de México, se recolectó en marzo del 2007. Un ejemplar fue depositado en el herbario del Instituto de Biología (MEXU 1236997), Universidad Nacional Autónoma de México.

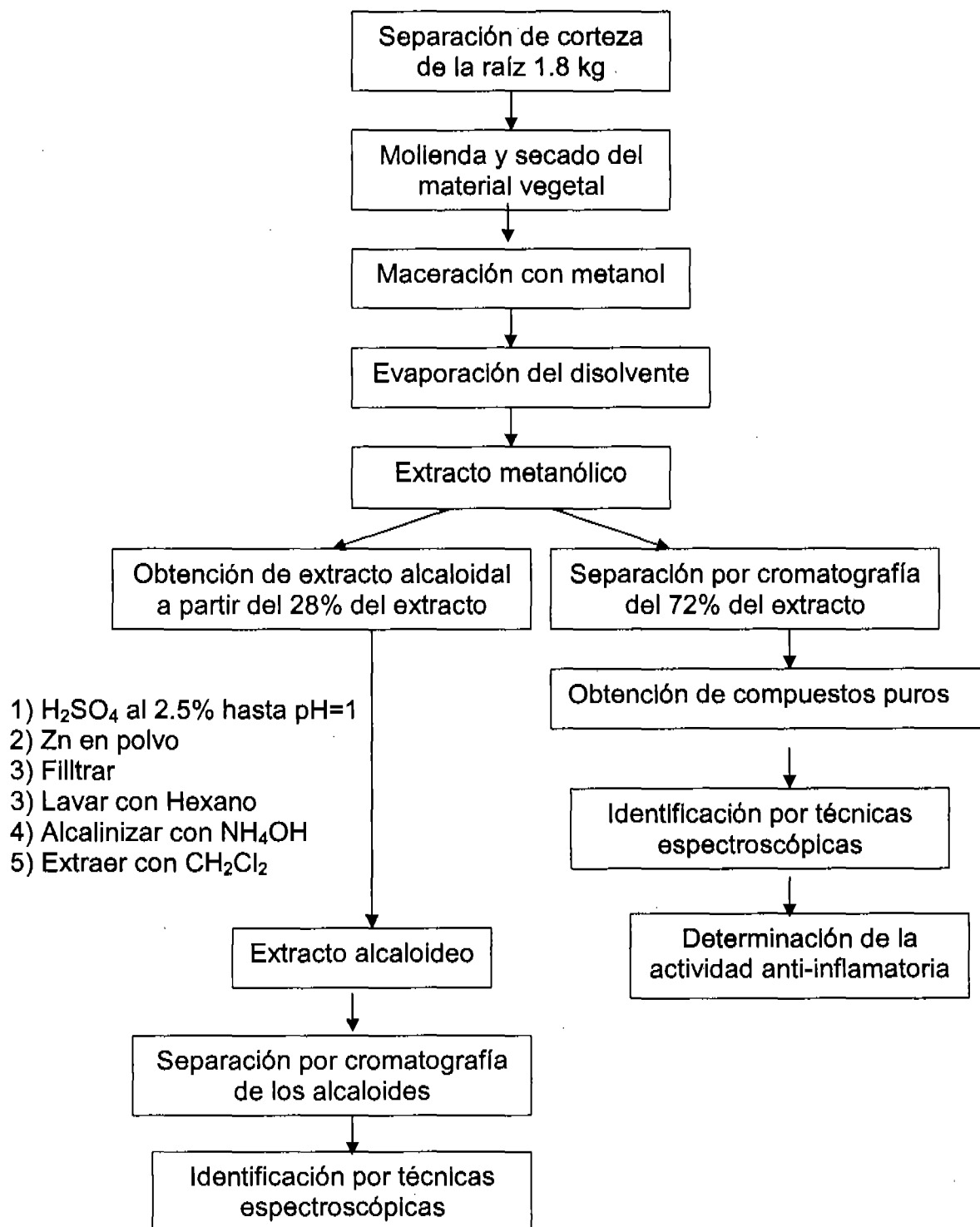
### **6.4 Preparación de extractos**

#### **6.4.1. Extracto metanólico**

La corteza de la raíz (1.8 Kg.) se separó y se secó a temperatura ambiente, se trituró y se extrajo por maceración con MeOH durante una noche. El disolvente se filtró y se evaporó en un evaporador rotatorio. Esta operación se repitió tres veces para obtener 250 g de extracto. El extracto metanólico (165 g) fue purificado por métodos cromatográficos (Esquema 1).

#### **6.4.2 Extracto alcaloideo**

Una porción del extracto metanólico (85 g) fue sometida a un tratamiento con Zn en medio ácido para reducir los N-oxidos de los alcaloides pirrolizidínicos (Pérez-Castorena *et al.*, 1998): se llevó a pH=1 con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2.5 %, se agregaron 4.2 g (5 %) de Zinc en polvo, se agitó durante la noche, se filtro y lavó con hexano. La fase acuosa que se llevó a pH=11 con NH<sub>4</sub>OH, y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio y el disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio para obtener el residuo alcaloideo (3.3 g) el cual fue purificado por métodos cromatográficos (Esquema 1).



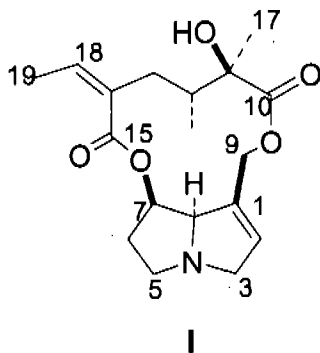
**Esquema 1:** Diagrama del flujo empleado para la obtención de los metabolitos aislados de *Pitticaulon praecox*

### 6.5 Fraccionamiento del extracto alcaloideo

El extracto alcaloideo (3.3 g) se adsorbió en celita y se purificó por cromatografía en columna al vacío (CCV) con gel de sílice (35 g) eluída con mezcla AcOEt-MeOH en gradiente de polaridad creciente (C-1), colectando 230 fracciones de 15 ml.

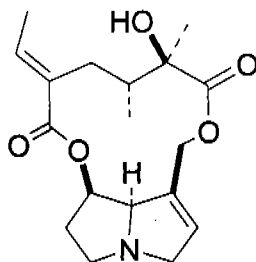
Las fracciones 11-30 (450 mg), obtenidas por elusión con AcOEt se sometieron a una nueva CCV eluída con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 95:5 para obtener 50 fracciones de 10 ml (C-2). Las fracciones 5-14 de C-2 (45 mg) se purificaron por CCV con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 95:5 para obtener un sólido ámbar que una vez recristalizado en metanol se identificó como senecionina (I, 5 mg).

Senecionina (I): p.f. 227-230°C (Logie *et al.*, 1994; Roeder, 1990).



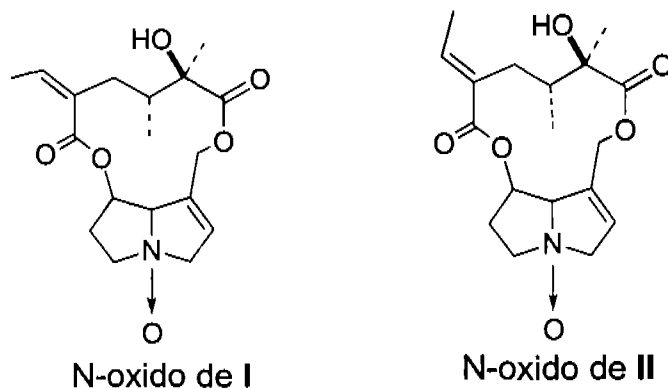
Las fracciones 15-46 de C-2 (50 mg) se purificaron por CCV eluída con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 95:5 para obtener integerrimina (II, 4.3 mg).

Integerrimina (II): p.f. 170-172°C (Logie *et al.*, 1994; Roeder, 1990).



## II

Las fracciones 196-206 de C-1 (250 mg) obtenidas por elusión con mezcla AcOEt-MeOH 7:3 fueron purificadas por dos CCV sucesivas eluidas con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 4:1 para obtener 11 mg de mezcla de N-óxido de seneclonina e Integerrimina (Logie *et al.*, 1994; Roeder, 1990).



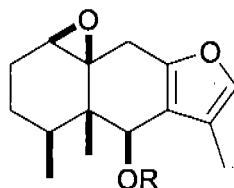
### 6.6 Fraccionamiento del extracto metanólico

El extracto metanólico remanente (165 g) fue fraccionado por CCV utilizando mezclas AcOEt-MeOH en gradiente de polaridad creciente para obtener la fracción A obtenida con AcOEt, la fracción B eluida con AcOEt-MeOH 19:1, 9:1 y 4:1 y la fracción C obtenida de las fracciones eluidas con AcOEt-MeOH 1:1 y MeOH.

La fracción A (55 g) fue purificada por CCV eluida con un sistema gradiente de hexano-AcOEt para obtener las fracciones D (eluida con hexano y hexano- AcOEt 19:1) y la E (eluida con hexano- AcOEt 9:1). La purificación de la fracción D (35 g) por CCV (eluida con hexano-AcOEt sistema de polaridad creciente) produjo las fracciones F (eluida con hexano- AcOEt 49:1) y G (eluida con hexano-AcOEt 19:1). De la fracción F, después de dos cromatografías sucesivas (hexano- AcOEt 49:1), se obtuvo una mezcla de los compuestos III y IV (1.2 g), la purificación de 200 mg de esta mezcla por CCD preparativa, eluida con hexano-AcOEt 99:1 produjo senemorin (III, 125 mg), y el compuesto IV (18 mg).

Senemorin (III):

Aceite incoloro;  $[\alpha]_D^{25} - 18.4^\circ$ , (c 0.14, CHCl<sub>3</sub>); IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\nu$  1709, 1645, 1155 cm<sup>-1</sup> (Novoty *et al.*, 1973).



**III** R = Ang

**IV** R = *i*Bu

6 $\beta$ -Isobutiriloxi-1,10 $\beta$ -epoxifuranoeremofilano (**IV**):

Aceite amarillo;  $[\alpha]_D^{25} - 34.6^\circ$ , (*c* 0.13, CHCl<sub>3</sub>); IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\nu$  1728, 1464, 1152, 964 cm<sup>-1</sup>;

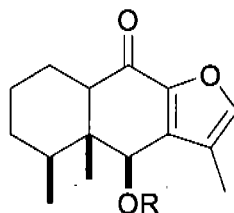
RMN <sup>1</sup>H: ver espectro 5.1, RMN <sup>13</sup>C: ver espectro 5.2 (Bohlmann y Zdero, 1976).

La fracción G (19.2 g), fue purificada por CCV eluída con Hexano-AcOEt 49:1, obteniendo los compuestos **V** (1.1 g), **VI** (0.7 g) y la mezcla (2:1) de los compuestos **V** y **VI** (10.8g).

6 $\beta$ -Angeloiloxifuranoeremofilan-9-ona (**V**):

Agujas incoloras (hexano-eter isopropilico); pf 103-105°C;  $[\alpha]_D^{25} - 92.5^\circ$ , (*c* 0.20,

CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>); IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\nu$  1708, 1644, 1155 cm<sup>-1</sup> (De Bernardi *et al.*, 1988).



**V** R = Ang

**VI** R = *i*Bu

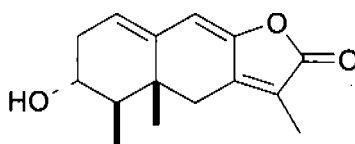
6 $\beta$ -Isobutiriloxifuranoeremofilan-9-ona (**VI**):

Aceite incoloro;  $[\alpha]_D^{25} - 38.2^\circ$ , (*c* 0.22, CHCl<sub>3</sub>); IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\nu$  1727, 1679, 1151 cm<sup>-1</sup> (Villarroel y Torres, 1991)

La purificación de la fracción E (9.5g) por columna flash (hexano-AcOEt 19:1) produjo **VII** (30 mg), **VIII** (75 mg), **IX** (60 mg), una mezcla (3:2) de los compuestos **VIII** y **IX** (5.8 g) y el compuesto **X** (17 mg, 0.0014%).

3 $\alpha$ -Hidroxi-1(10), 7(11), 8-eremofilatrien-12,8-olida (VII):

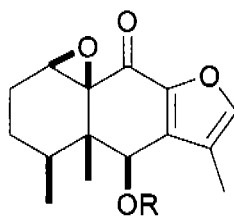
Agujas amarillas; pf 190-192°C (AcOEt-MeOH);  $[\alpha]_D^{25} - 94^\circ$ , (c 0.15, MeOH); IR (KBr):  $\nu$  3471, 1665  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$ : ver espectro 6.1; RMN  $^{13}\text{C}$ : ver espectro 6.2 (Shinel *et al.*, 2006).



VII

6 $\beta$ -Angeloiloxi-1,10 $\beta$ -epoxifuranoeremofilan-9-ona (VIII):

Aceite amarillo pálido;  $[\alpha]_D^{25} - 37.2^\circ$ , (c 0.14,  $\text{CHCl}_3$ ); IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu$  1707, 1689, 1155  $\text{cm}^{-1}$  (Wang *et al.*, 2002)



VIII R = Ang

IX R = *t*Bu

1,10 $\beta$ -Epoxy-6 $\beta$ -isobutiriloxifuranoeremofilan-9-ona (IX):

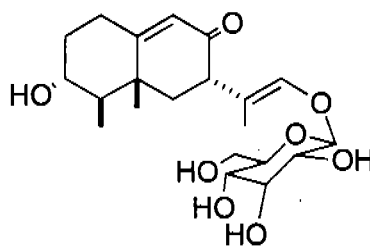
Aceite amarillo pálido;  $[\alpha]_D^{25} - 16.0^\circ$ , (c 0.20,  $\text{CHCl}_3$ ); IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu$  1728, 1690, 1154  $\text{cm}^{-1}$  (Wang *et al.*, 2002).

3 $\beta$ -Acetoxi-1,10 $\beta$ -epoxi-8 $\alpha$ -hidroxi-6 $\beta$ -isobutiriloxi-7(11) eremofilan-12,8-olida (X):

Prismas incoloros (AcOEt-MeOH); pf 258-260°C;  $[\alpha]_D^{25} - 46.0^\circ$ , (c 0.15, DMSO); IR (KBr):  $\nu$  3346, 1743, 1729, 1701  $\text{cm}^{-1}$ ; UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 214 nm (3.8); RMN  $^1\text{H}$  ver espectro 1.1; RMN  $^{13}\text{C}$  ver espectro 1.2. EMIE (espectro 1.7)  $m/z$  (%): 408 (10)  $[\text{M}]^+$ , 320 (30), 260 (30), 71 (100); EMAR-FAB $^+$   $m/z$ : 409.1865 (calculado 409.1862 para  $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{O}_8$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ). RX: ver anexo Tabla 9 pg. 111.



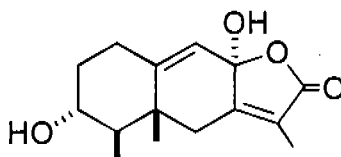
RMN  $^{13}\text{C}$  ver espectro 3.2; EMIE: (espectro 3.7)  $m/z$  (%): 250 (55), 233 (20), 125 (100); EMAR-FAB $^+$   $m/z$ : 413.2175 (calculado 413.2175 para  $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{O}_8$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).



**XII**

**3 $\alpha$ -8 $\alpha$ -Dihidroxi-7(11),9-eremofiladien-12,8-olida (XIII)**

Prismas incoloros (hexano-AcOEt); pf 175-177°C;  $[\alpha]_D^{25}$   $-31.2^\circ$ ,  $c$  0.25, MeOH; IR (KBr):  $\nu$  3351, 1755, 1651,  $\text{cm}^{-1}$ ; UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 226 nm (3.9); RMN  $^1\text{H}$ : ver espectro 4.1; RMN  $^{13}\text{C}$ : ver espectro 4.2; EMIE (espectro 4.7)  $m/z$  (%): 265 (3), 246 (35), 219 (100), 178 (50); EMAR-FAB $^+$   $m/z$ : 265.1440 (calculado 265.1440 para  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_4$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).



**XIII**

De la fracción J se obtuvieron por recristalización 5.5 g de **XI**. La purificación de las aguas madres (8.5 g) por una CCV eluída con AcOEt -MeOH 49:1 dio lugar a 2.8 g de **XI** y 1.2 g del compuesto **XII**.

La purificación de la fracción C (31 g) por CCV (AcOEt -MeOH sistema de gradientes) produjo el compuesto **XI** (150 mg) y sacarosa (5.5 g).

### 6.7 Hidrólisis ácida de los compuestos **XI** y **XII**

Los compuestos **XI** y **XII** fueron hidrolizados separadamente siguiendo la misma metodología. Cada compuesto (100 mg) se calentó a 70°C por media hora con HCl al 10%. La mezcla de reacción se enfrió y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase acuosa se evaporó con aire. Se obtuvo el derivado sililado agregando al residuo acuoso seco la mezcla Hexametildisilano-Clorotrimetilsilano-piridina (3:1:9). El análisis por cromatografía de gases de estos derivados permitió identificar glucosa como el azúcar presente en **XI** y **XII**.

### **6.8 Actividad anti-Inflamatoria**

La actividad anti-Inflamatoria se determinó utilizando el modelo de edema inducido en oreja de ratón con acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) (Rao *et al.*, 1993., Payá *et al.*, 1996).

Se emplearon ratones macho de la cepa CD1 (25-30g). Los animales se dividieron al azar en los siguientes grupos de cinco animales: control (recibieron TPA más el vehículo), prueba (recibieron TPA más la sustancia problema) y referencia (recibieron TPA más indometacina).

Los ratones se colocaron en cajas de acrílico transparente a temperatura constante de 24°C, con un fotoperíodo de 12/12 horas luz / oscuridad y con agua y alimento *ad libitum*. Bajo anestesia general con pentobarbital sódico (3.5 mg/kg, por vía intraperitoneal), en la oreja derecha se aplicaron 10 µl de una solución etanólica de TPA (0.25 mg/ml) a todos los animales. Diez minutos después, en la misma oreja se aplicaron las sustancias de prueba o el fármaco de referencia (a los animales de los grupos de prueba y referencia, respectivamente) disueltos en 20 µl del vehículo. La oreja izquierda (sirvió como control negativo) recibió solamente 10 µl de etanol y 20 µl del vehículo del compuesto. Cuatro horas después de la aplicación del TPA, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical para tomar de muestra de 7 mm de diámetro de ambas orejas. El incremento del peso de la muestra derecha con respecto a la izquierda representa el edema. La inhibición del edema se calcula con fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = [(C-E)/C] \cdot 100$$

en donde:

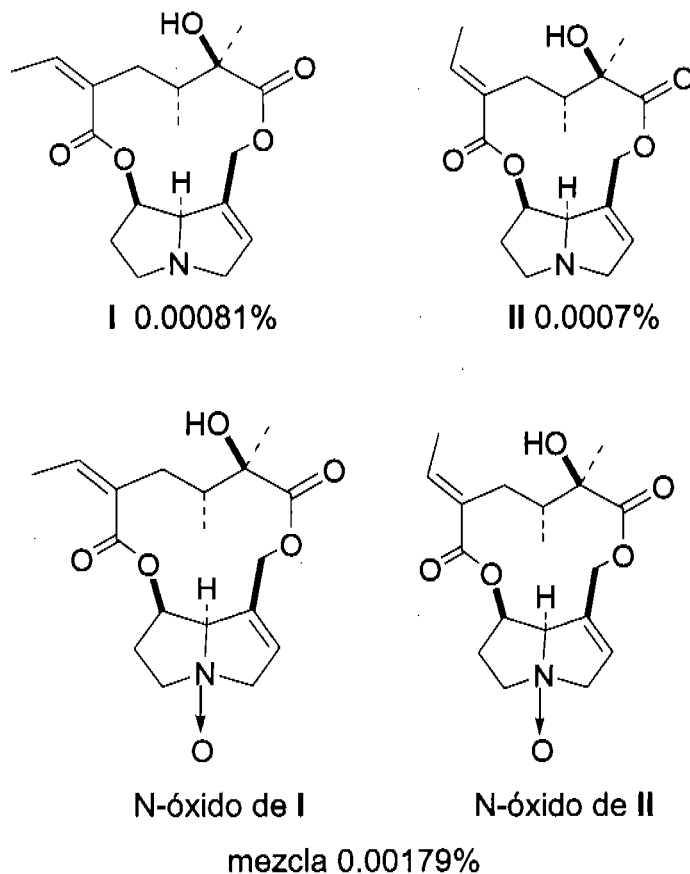
C= Edema del grupo control (tratado con TPA)

E= Edema del grupo de prueba (TPA más el compuesto) o de referencia (TPA más indometacina)

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Extracto alcaloideo

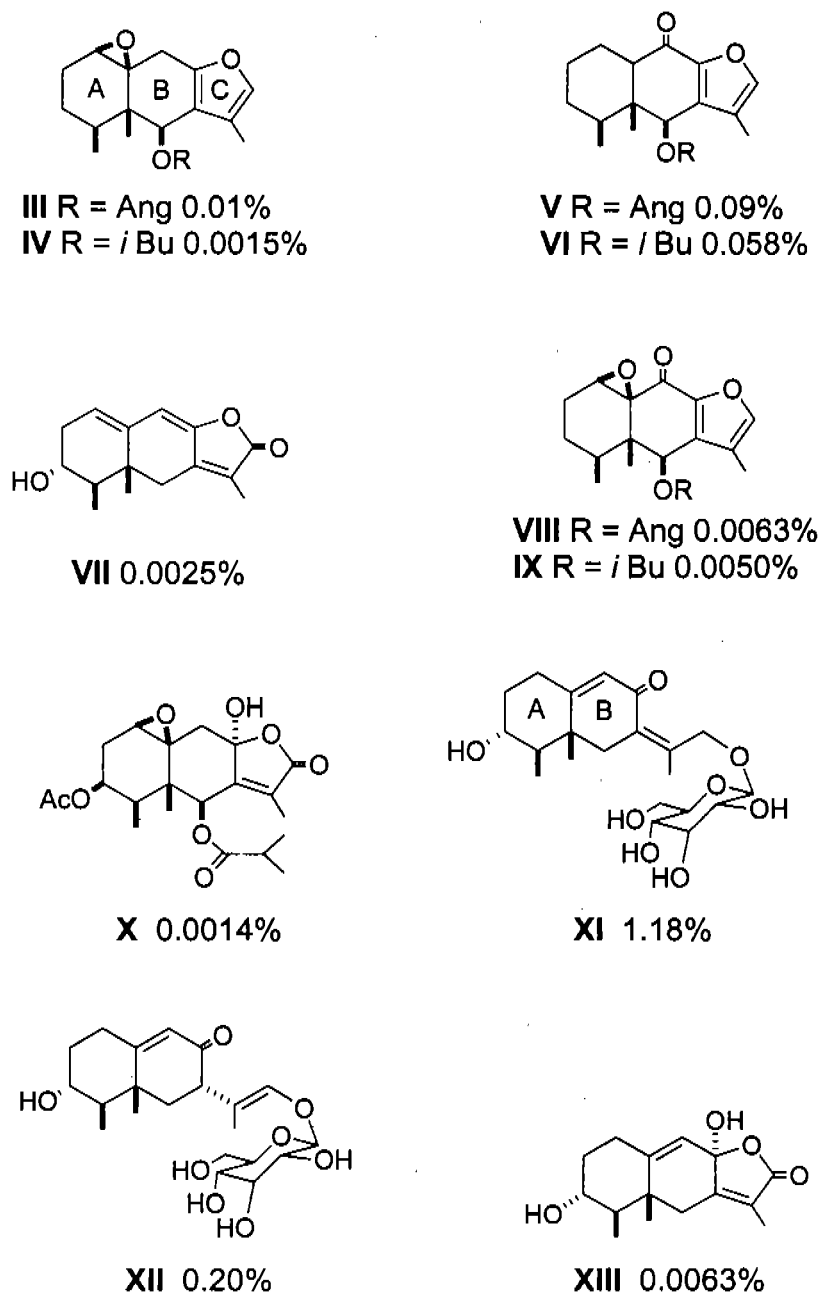
De la corteza de raíz de *P. praecox* se obtuvo (3.3g) 0.53% de extracto alcaloideo, de este extracto se separaron dos alcaloides pirrolizidínicos, la senecionina (I) y la integerrimina (II) y la mezcla de sus N-óxidos.



**Figura 2.** Metabolitos aislados del extracto alcaloideo de *Pittocaulon praecox*

### 7.2 Extracto metanólico

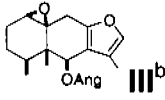
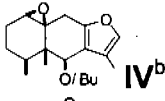
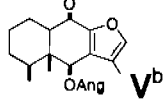
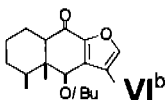
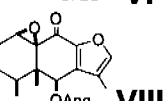
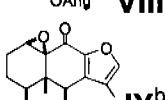
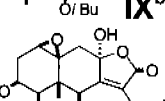
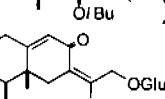
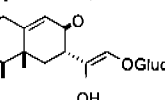
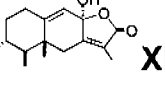
Del extracto metanólico de *P. praecox* se obtuvieron cuatro nuevos compuestos, dos glucósidos de eremofilano XI y XII y dos eremofilanólidas X y XIII (Figura 3). También se obtuvieron siete compuestos conocidos III-IX (Figura 3).



**Figura 3.** Metabolitos aislados del extracto metanólico de corteza de raíz de *P. praecox*

### 7.3 Resultados de las pruebas de actividad anti-inflamatoria

**Tabla 2:** Actividad anti-inflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA.

Sustancia	Dosis 1 µg/oreja	Edema (mg)	Inhibición %
Indometacina <sup>a</sup>	1.0	1.99 ± 0.68	83.73
 III <sup>b</sup>	1.0	9.97 ± 0.98*	30.98
 IV <sup>b</sup>	1.0	5.03 ± 1.23**	65.14
 V <sup>b</sup>	1.0	7.38 ± 1.16**	48.93
 VI <sup>b</sup>	1.0	9.58 ± 1.53**	33.69
 VIII <sup>b</sup>	1.0	8.55 ± 1.45**	40.79
 IX <sup>b</sup>	1.0	7.50 ± 2.28**	48.06
 X <sup>c</sup>	1.0	6.10 ± 0.21	15.86
 XI <sup>d</sup>	1.0	12.00 ± 1.41	14.69
 XII <sup>d</sup>	1.0	11.07 ± 1.03	21.33
 XIII <sup>e</sup>	1.0	9.10 ± 1.64	31.92
Extracto metanólico <sup>f</sup>	1 mg/oreja	6.96 ± 1.05*	39.93

Control: <sup>a</sup>etanol:acetona 1:1 (15.00 ± 0.47), <sup>b</sup>acetona:diclorometano 1:1 (14.44 ± 0.61), <sup>c</sup>DMSO 10% en mezcla de acetona:diclorometano 1:2 (7.25 ± 0.43), <sup>d</sup>metanol (14.07 ± 0.84), <sup>e</sup>DMSO 10% en acetona (13.37 ± 1.18), <sup>f</sup>metanol (16.58 ± 0.72). Los datos representan el promedio de cinco animales ± el error estándar de la media ( $\bar{x} \pm EEM$ ). Los resultados se analizaron mediante una prueba de *t* de Student y los valores de  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*\*) se considera como diferencia significativa con respecto al control.

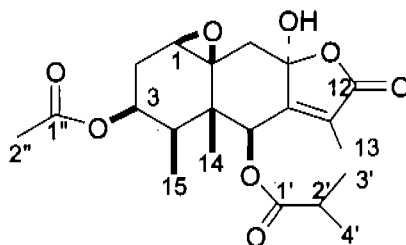
## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para obtener el extracto alcaloideo, una porción del extracto metanólico se sometió a un tratamiento ácido-base en presencia de Zn con el objetivo de reducir los N-óxidos presentes, dado que la extracción de los Aps se facilita si éstos se encuentran en forma de bases libres. La purificación de este extracto por métodos cromatográficos permitió aislar dos alcaloides, reportados con anterioridad en la planta, la senecionina (I) y la integerrimina (II) y una mezcla de sus N-óxidos. La identidad de los alcaloides obtenidos y la de sus N-óxidos fue determinada por la comparación de sus constantes físicas y datos espectroscópicos con los reportados en la literatura (Logie *et al.*, 1994; Roeder, 1990) y además fue confirmada por comparación con muestras auténticas. La presencia de N-óxidos, a pesar del tratamiento reductivo utilizado para transformarlos en bases libres, puede ser debida a una reducción incompleta de los N-óxidos o al hecho de que, siendo el diclorometano el disolvente que permitía una mejor separación cromatográfica, se utilizó en la purificación. Existen estudios que reportan que los alcaloides libres en contacto prolongado con disolventes clorados pueden transformarse en N-óxidos (Phillipson y Bisset, 1972).

Del extracto metanólico de *P. praecox* se obtuvieron cuatro nuevos compuestos, dos glucósidos de eremofilano **XI** y **XII** y dos eremofilanólidas **X** y **XIII** (Figura 3). Sus estructuras fueron elucidadas por medio de técnicas espectroscópicas: Masas, UV, IR y RMN de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ , mono y bidimensional, homo y heteronuclear. La estructura del compuesto **X** se confirmó por difracción de Rayos X. También se obtuvieron siete compuestos conocidos **III-IX** (Figura 3). La identidad de los compuestos **III**, **V**, **VI**, **VIII** y **IX** fue obtenida por comparación de sus datos espectroscópicos y constantes físicas con los reportados en la literatura. El compuesto **IV** ha sido reportado como parte de una mezcla (Bohlmann y Zdero, 1976) y el compuesto **VII** se encuentra solamente mencionado como intermediario de síntesis (Shinei *et al.*, 2006).

A continuación se presenta la discusión de la elucidación de la estructura de los nuevos metabolitos **X**, **XI**, **XII** y **XIII**, seguida de la de los compuestos conocidos **IV** y **VII**, cuyos datos espectroscópicos no se encuentran disponibles en la literatura. Finalmente se comentan los resultados de las pruebas de actividad biológica.

### 3 $\beta$ -Acetoxi-1,10 $\beta$ -epoxi-8 $\alpha$ -hidroxi-6 $\beta$ -isobutiriloxi-7(11)-eremofilin-12,8-olida (X)



El espectro UV para este compuesto presentó una absorbancia máxima a  $\lambda$  214 nm atribuible a grupos carbonilo.

El espectro IR (espectro 1.9), mostró bandas de absorción de grupos hidroxilo a  $3346\text{ cm}^{-1}$  y grupos carbonilo a  $1743$ ,  $1729$  y  $1701\text{ cm}^{-1}$ .

La fórmula molecular  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_8$  se dedujo del ión molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  a  $m/z$ : 409.1865 que presentó el espectro de Masas  $\text{FAB}^+$  de alta resolución.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 1.1, Tabla 3), presentó, en su zona de mayor frecuencia, dos señales atribuibles a protones geminales a grupos éster. Debido a la multiplicidad de estas señales se concluyó que la primera, en  $\delta$  5.88 (d,  $J = 1.5\text{ Hz}$ ), era la señal del protón en posición 6 puesto que presentó un acoplamiento homoalílico con el metilo 13 en  $\delta$  1.74 (d,  $J = 1.5\text{ Hz}$ ). La segunda señal, en  $\delta$  4.86 (ddd,  $J = 4.0, 7.0, 11.5\text{ Hz}$ ), fue asignada al protón en posición 3 ya que mostró acoplamiento con el metileno 2 y con el metino 4, estas correlaciones fueron confirmadas con el espectro COSY (espectro 1.5).

A menor frecuencia se observó la señal de un protón base de función epóxido, en  $\delta$  3.18 (d,  $J = 5.5\text{ Hz}$ ), esta señal presentó un acoplamiento, en el espectro COSY, con uno de los protones del metileno 2 en  $\delta$  2.26 (ddd,  $J = 14.0, 7.0, 5.5\text{ Hz}$ ). Finalmente se observaron las señales de 6 metilos, tres de ellas ( $\delta$  1.73, d,  $J = 1.5\text{ Hz}$ ; 1.08, s; 0.91, d,  $J = 7.5\text{ Hz}$ ) correspondientes a las señales de los metilos 13, 14 y 15, respectivamente, característicos de la estructura base de eremofilanólida. Las otras tres señales en  $\delta$  1.98 (s), 1.17 (d,  $J = 7.0$



Hz) y 1.14 (d,  $J = 7.0$  Hz) se asignaron a los metilos de las funciones éster presentes en la molécula.

**Tabla 3.** Datos de RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de (X).

Posición	RMN $^1\text{H}$ , $\text{DMSO}d_6$ , 500 MHz	RMN $^{13}\text{C}$ , $\text{DMSO}d_6$ , 125 MHz / DEPT
1	3.19 d (5.5)	59.4 CH
2 $\alpha$	2.26 ddd (14.0, 7.0, 5.5)	24.4 CH <sub>2</sub>
2 $\beta$	1.90 da (13.0)	-
3	4.86 ddd (11.5, 7.0, 4.0)	67.3 CH
4	1.85 m	33.3 CH
5	-	44.1 C
6	5.88 d (1.5)	71.2 CH
7	-	154.4 C
8	-	101.1 C
9 $\beta$	2.32 d (13.5)	41.8 CH <sub>2</sub>
9 $\alpha$	1.67 d (13.5)	-
10	-	60.7 C
11	-	123.3 C
12	-	170.6 C
13	1.74 d (1.5)	7.8 CH <sub>3</sub>
14	1.08 s	15.0 CH <sub>3</sub>
15	0.91 d (7.5)	9.1 CH <sub>3</sub>
1'	-	174.9 C
2'	2.70 hept (7.0)	33.1 CH
3'	1.17 d (7.0)	18.9 CH <sub>3</sub>
4'	1.14 d (7.0)	18.3 CH <sub>3</sub>
1''	-	169.5 C
2''	1.98 s	20.8 CH <sub>3</sub>
OH	7.78 s	-

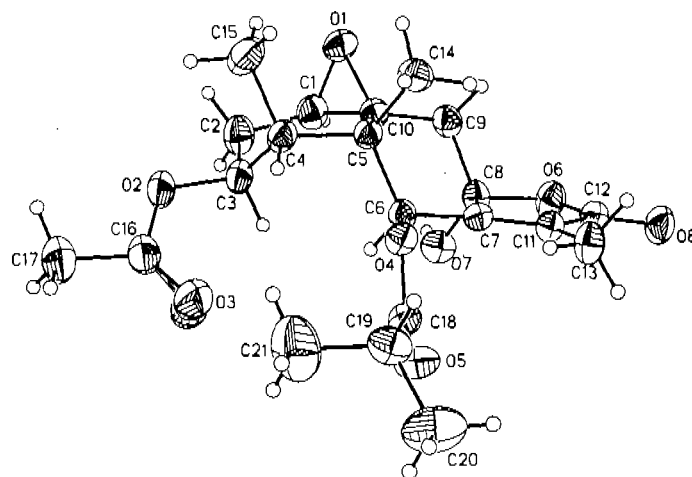
El espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro 1.2, tabla 4), mostró las señales de 21 átomos de carbono, se observaron tres carbonilos de éster en  $\delta$  174.9 (s) C-1', 170.6 (s) C-12 y 169.5 (s) C-1", dos carbonos vinílicos en  $\delta$  154.3 (s) y 123.3 (s), cinco carbonos base de oxígeno en  $\delta$  71.2 (d), 67.3 (d), 101.1 (s), 60.7 (s) y 59.4 (d). Y además, con ayuda del espectro DEPT (espectro 1.3) se notaron a campo más alto, un carbono cuaternario, 2 metinos, 2 metilenos y 6 metilos.

Con el espectro HMBC (espectro 1.6) fue posible determinar la posición de los ésteres en la molécula. El grupo isobutiriloxi se localizó en C-6 por el cruce de los picos observados de C-1' ( $\delta$  174.9 s) con H-6 ( $\delta$  5.88 d,  $J = 1.5$  Hz) y con H-2' ( $\delta$  2.70 hept  $J = 7.0$  Hz), mientras que H-3 ( $\delta$  4.86 ddd,  $J = 11.5, 7.0, 4.0$  Hz) correlacionó con el carbonilo del grupo acetoxi C-1" ( $\delta$  169.5 s) y este a su vez presentó interacción con los hidrógenos del metilo en posición 2" ( $\delta$  1.98 s), indicando para éste grupo la en posición 3.

El espectro de masas de impacto electrónico (espectro 1.8) mostró fragmentos a  $m/z$ : 320 y 260 correspondientes a la pérdida de los ácidos isobutírico y acético, respectivamente, confirmando su presencia en la molécula.

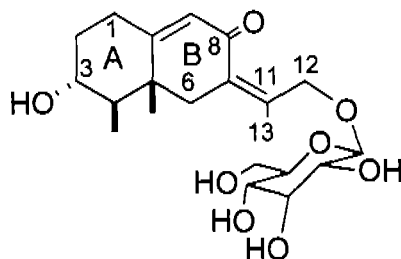
El experimento NOESY (espectro 1.6), sustentó el cruce de picos del OH con H-6, H-1 y H-9 $\alpha$ , de H-3 con H-6 y H-4 y entre H-9 $\beta$  y H-14, sugiriendo que el OH, H-1, H-3, H-4 y H-6 deberían ser orientados  $\alpha$ .

La estructura (X) fue confirmada por análisis de Rayos X (figura 4).



**Figura 4.** Proyección ORTEP de 3 $\beta$ -acetoxi-1,10 $\beta$ -epoxi-8 $\alpha$ -hidroxi-6 $\beta$ -isobutiriloxi-7(11)-eremofilen-12,8-olida (X) (numeración cristalográfica, datos cristalográficos: tabla 9, pg 111)

#### 12-O- $\beta$ -D-Glucopirranósido de 3 $\alpha$ -hidroxi-7(11),9-eremofiladlen-8-ona (XI)



El espectro UV presentó una absorbancia máxima a  $\lambda$  204 y 248 nm sugiriendo la presencia de grupos carbonilos conjugados.

En el espectro de IR (espectro 2.9), se observaron bandas desplazadas a 3359, 1653 y 1605  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a grupos hidroxilo, grupos carbonilo y dobles enlaces, respectivamente. Lo que es congruente con la adsorción observada en el espectro de UV.

La fórmula molecular  $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{O}_8$  se dedujo del ión molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  a  $m/z$  413.2175 que se obtuvo en el espectro de Masas de alta resolución  $\text{FAB}^+$ .

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectros 2.1 y 2.1.1, Tabla 4) se observó en la zona de campo bajo la señal de un protón vinílico en  $\delta$  5.75 (d,  $J = 2.1$  Hz) atribuido al protón del carbono 9 acoplada allicamente con la señal en  $\delta$  2.50 (dddd,  $J = 15.0, 15.0, 5.1, 2.1$  Hz) de uno de los protones del metileno en posición 1, interacción que se observa en el espectro COSY (espectro 2.5). El mismo experimento COSY permitió observar la interacción de los hidrógenos atribuidos al metileno 1 con los hidrógenos del metileno 2 ( $\delta$  2.129 m y 1.433 m) y de estos a su vez con el hidrógeno base de alcohol en posición 3 ( $\delta$  3.53 ddd,  $J = 11.4, 11.4, 4.2$  Hz), que interacciona con la señal del metileno H-4 ( $\delta$  1.39 m), geminal al metilo doblete 15 ( $\delta$  1.11 d,  $J = 6.6$  Hz), determinando así la secuencia del anillo A. Al metileno vinílico en  $\delta$  5.75 le fue asignada, por lo tanto, la posición 9.

Siguiendo con el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , se observaron las señales de un metileno en  $\delta$  4.87 (dd,  $J = 13.5, 1.5$  Hz) y 4.49 (dd,  $J = 13.5, 2.1$  Hz) asignadas a los protones H-12a y H-12b, las cuales presentan acoplamiento de largo alcance, en el experimento COSY, con el metilo en posición 13 (1.97 d,  $J = 1.2$  Hz) y con el metileno en posición 6 ( $\delta$  2.19 da,  $J = 13.5$  Hz).

Al continuar con el espectro aparece la señal del protón anomérico H-1' en  $\delta$  4.17 acoplado con H2' con una constante de acoplamiento diaxial (d,  $J = 7.6$  Hz) indicando que el azúcar sustituyente es una  $\beta$  hexosa. La hidrólisis ácida de **XI** permitió identificar éste azúcar como  $\beta$ -D- glucosa por cromatografía de gases del derivado sililado.

Finalmente, a campo alto en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se observaron las señales en  $\delta$  1.97 (d,  $J = 1.2$  Hz), 1.11 (d,  $J = 6.6$  Hz) y 1.05 (s) asignadas a los metilos 13, 15 y 14, respectivamente, soportando la estructura **XI**.

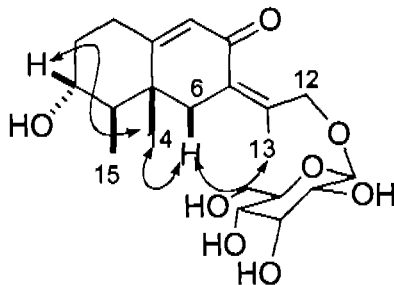
En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro 2.2, Tabla 4), se observaron 21 átomos de carbono, 15 de los cuales corresponden al eremofilano base y los 6 carbonos restantes, base de oxígeno, fueron asignados a la glucosa incluyendo el anomérico en  $\delta$  103.2 d.

Dentro de los carbonos atribuidos al eremofilano se distingue el carbonilo de cetona ( $\delta$  193.3 s), cuatro carbonos vinílicos ( $\delta$  171.2 s, 144.5 s, 132.2 s y 126.3 d), un metileno ( $\delta$  69.9 t) y un metino ( $\delta$  71.1 d) bases de alcohol atribuidos a C-12 y C-3, respectivamente, además de las señales de los metilenos, metilos y metinos que corroboraron la estructura **XI**.

La asignación de los hidrógenos y carbonos se hizo con ayuda de los experimentos DEPT (espectro 2.3), HETCOR (espectro 2.4) y COLOC (espectro 2.5).

En el espectro COLOC se observó la correlación de C-1' con H-12a y H-12b, lo cual nos permitió proponer que la glucosa estaba unida al carbono 12. Además se observaron las interacciones de C-10 con H-14 y H-6a, de C-7 con H-13, H-12b y H-9, de C-5 con H-15 y H-9, de C-1 con H-9 y C-6 con H-14, que confirmaron la estructura **XI**.

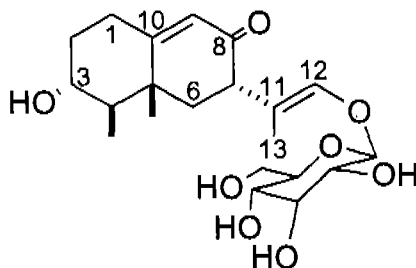
En el experimento NOESY (figura 5, espectro 2.7) se determinó la configuración Z de la doble ligadura 7(11) por el cruce de picos de CH<sub>3</sub>-13 con H-6 $\beta$ , además se observaron las interacciones H-6  $\beta$  con H-14 y H-13, y de H-3 con H-14 permitiendo proponer la orientación  $\alpha$  del grupo hidroxilo en C-3, ya que biogénicamente, el CH<sub>3</sub>-14 esta orientado  $\beta$  (Richards y Hendricsson, 1964). Además, la constante de acoplamiento de H-3 ( $J = 11.4, 11.4, 4.2$  Hz) sugirió una orientación axial  $\beta$ , para este hidrógeno conforme a lo observado en el experimento NOESY.



**Figura 5.** Experimento NOESY del compuesto **XI**

En el espectro de EMIE (espectro 2.8) se verificó la presencia de la glucosa al observarse el fragmento  $m/z$  250 correspondiente a  $[M-C_6H_{10}O_5]^+$ .

## 12-O-β-D-Glucopiranosído de 3α-hidroxi-9,11-eremofladien-8-ona (XII)



El espectro UV presentó una absorbancia máxima a  $\lambda$  237 nm atribuible a grupos carbonilo conjugado.

En el espectro de IR (espectro 3.9), se observaron bandas desplazadas a 3387, 1656, 1618  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a grupos hidroxilo, grupos carbonilo y dobles enlaces respectivamente.

El espectro de Masas FAB<sup>+</sup> de alta resolución presentó un ión molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de  $m/z$ : 413.2175 compatible con la fórmula molecular  $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{O}_8$ .

La espectroscopía de RMN  $^1\text{H}$  (espectros 3.1 y 3.1.1, Tabla 5) fue similar a la del compuesto **XI**. La diferencia entre los dos compuestos se observó en las señales en  $\delta$  6.30 (q,  $J = 1.5$  Hz), señal que integra para un solo hidrógeno, atribuida a H-12 y en  $\delta$  3.03 (dd,  $J = 14.0, 5.0$  Hz) asignada a H-7, ausente en el compuesto **XI**. Además, las señales de los protones H-6 fueron localizadas a campo más alto en  $\delta$  1.97 (dd,  $J = 13.5, 5.0$  Hz) y  $\delta$  1.90 (dd,  $J = 14.0, 13.5$  Hz) con respecto a las señales de H-6 en el compuesto **XI**, debido a que la doble ligadura se encuentra en C-11, en concordancia con estructura **XII**.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro 3.2, Tabla 5) se observaron las señales de 21 carbonos de los cuales, como en el compuesto **XI**, 15 correspondieron al eremofilano y 6 al azúcar. Este azúcar fue identificado como  $\beta$ -D-glucosa por la constante de acoplamiento de su carbono anomérico y por el análisis por cromatografía de gases de producto de hidrólisis de **XII**, como en el compuesto **XI**.

La asignación de los hidrógenos y carbonos se hizo en base a los experimentos DEPT (espectro 3.3), HSQC (espectro 3.4) y HMBC (espectro 3.6).

**Tabla 5.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de (XII).

Posición	RMN <sup>1</sup> H, CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz	RMN <sup>13</sup> C, CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz / DEPT
1β	2.53 dddd (14.5, 14.5, 5.0, 1.5)	31.9 CH <sub>2</sub>
1α	2.33 ddd (14.5, 4.0, 2.5)	-
2β	2.12 m	36.0 CH <sub>2</sub>
2α	1.40 m	-
3	3.56 ddd (11.0, 11.0, 4.5)	71.1 CH
4	1.29 m	51.3 CH
5	-	40.9 C
6β	1.97 dd (13.5, 5.0)	43.1 CH <sub>2</sub>
6α	1.90 dd (14.0, 13.5)	-
7	3.03 dd (14.0, 5.0)	47.5 CH
8	-	201.9 C
9	5.73 d (1.5)	124.6 CH
10	-	171.7 C
11	-	114.5 C
12	6.30 c (1.5)	142.5 CH
13	1.56 d (1.5)	10.6 CH <sub>3</sub>
14	1.20 s	17.3 CH <sub>3</sub>
15	1.05 d (6.5)	10.6 CH <sub>3</sub>
1'	4.49 d (7.5)	103.7 CH
2'	3.35 m	74.3 CH
3'	3.32 m <sup>a</sup>	71.1 <sup>a</sup> CH
4'	3.32 m <sup>a</sup>	78.1 <sup>a</sup> CH
5'	3.37 m	77.7 CH
6'a	3.84 dd (13.5, 1.5)	62.4 CH <sub>2</sub>
6'b	3.66 dd (13.5, 4.5)	-

<sup>a</sup> Señales cuyos valores son intercambiables

En el espectro COSY (espectro 3.5) se observaron las mismas interacciones descritas para el anillo A del compuesto XI. Además fueron evidentes las interacciones de H-7 ( $\delta$  3.03, dd,  $J = 14.0, 5.0$  Hz) con H-6 $\beta$  y H-6 $\alpha$  ( $\delta$  1.97, dd,  $J = 13.5, 5.0$  Hz y 1.90, d,  $J = 14.0, 13.5$  Hz) y de H-12 ( $\delta$  6.30, q,  $J = 1.5$  Hz) con H-13 ( $\delta$  1.56, d,  $J = 1.5$  Hz).

En el espectro NOESY (espectro 3.7) la correlación de H-7, H-12 y CH<sub>3</sub>-14 sugirió la configuración E de la doble ligadura en C-11 y la orientación  $\beta$  de H-7. El cruce de los picos entre H-3 y CH<sub>3</sub>-14, en concordancia con las constantes de acoplamiento de H-3 ( $\delta$  3.56 ddd (11.0, 11.0, 4.5)), permitió proponer la orientación  $\alpha$  de el grupo hidroxilo.

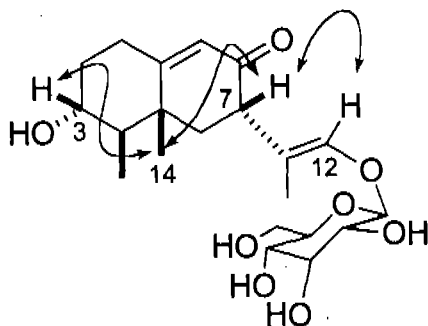
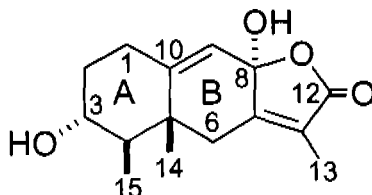


Figura 6. Experimento NOESY compuesto XII

### 3 $\alpha$ -8 $\alpha$ -Dihidroxi-7(11),9-eremofladien-12,8-olida (XIII)



El espectro UV presentó una absorbancia máxima a  $\lambda$  226 nm atribuible a grupos carbonilo.

La espectroscopia IR (espectro 4.9), mostró bandas en 3351, 1755 y 1651  $\text{cm}^{-1}$  indicando la presencia de grupos hidroxilo y  $\gamma$  lactona insaturada.



La fórmula molecular  $C_{15}H_{21}O_4$  se dedujo del ión molecular  $[M+H]^+$  de  $m/z$  265.1440 que se observó en el espectro de Masas FAB<sup>+</sup> de alta resolución.

En la espectroscopía de RMN  $^1H$  (espectros 4.1 y 4.1.1, Tabla 6), fue evidente la presencia de un protón vinílico en  $\delta$  5.66 (d  $J = 2.0$  Hz), y de un protón base de alcohol en  $\delta$  3.46 (ddd  $J = 10.5, 10.5, 4.5$  Hz). En la región de baja frecuencia del espectro tres señales de grupos metilos en  $\delta$  1.78 (d,  $J = 1.5$  Hz), 1.10 (d,  $J = 6.5$  Hz) y 0.92 (s), típicas de esqueleto de eremofilanolida soportaron, la estructura **XIII**.

En el espectro RMN  $^{13}C$  (espectro 4.2, Tabla 6), se observaron 15 átomos de carbono, entre los cuales un carbonilo de lactona ( $\delta$  171.9, s), cuatro carbonos vinílicos ( $\delta$  159.0, s, 150.3, s, 122.6, s y 120.3, d), dos carbonos base de oxígeno ( $\delta$  100.9, s y 71.1, d) y tres metilos ( $\delta$  19.1, c, 11.2, c, y 8.2, c) fueron evidentes.

La multiplicidad de los carbonos que mostró el espectro DEPT (espectro 4.3) para esta molécula fue 3 metilos, 3 metilenos y 3 metinos.

La estructura **XIII** fue confirmada por las interacciones observadas en los experimentos de RMN en dos dimensiones:

En el espectro COSY (espectro 4.5), se observaron las interacciones de H-9 con H-1a, de H-1a con H-2a y H-2b y de estos últimos con H-3 que a su vez interactuó con H-14 confirmando la secuencia del anillo A. además se observó la interacción de H-6 $\alpha$  con H-13.

De igual manera, en el espectro HMBC (espectro 4.6) se observaron las correlaciones de C-12 con H-13, de C-7 con H-13, H-6a, H-6b y H-9, de C-10 con H-14, H-6a y H-6b, de C-8 con H-6a y de C-5 con H-15, H-1b y H-9.

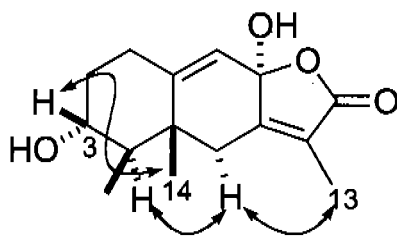
**Tabla 6.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de (XIII).

Posición	RMN <sup>1</sup> H, Me <sub>2</sub> COd <sub>6</sub> , 500 MHz	RMN <sup>13</sup> C, Me <sub>2</sub> COd <sub>6</sub> , 125 MHz / DEPT
1β	2.28 dddd (14.5, 14.5, 5.0, 2.0)	31.0 CH <sub>2</sub>
1α	2.13 ddd (14.5, 7.5, 4.5)	-
2β	2.03 m	36.9 CH <sub>2</sub>
2α	1.31 m	-
3	3.46 ddd (10.5, 10.5, 4.5)	71.1 CH
4	1.41 dc (10.5, 6.5)	51.6 CH
5	-	46.3 C
6β	2.88 d (12.5)	37.1 CH <sub>2</sub>
6α	2.38 da (12.5)	-
7	-	159.1 C
8	-	100.9 C
9	5.66 d (2.0)	120.3 CH
10	-	150.3 C
11	-	122.6 C
12	-	171.9 C
13	1.78 d (1.5)	8.2 CH <sub>3</sub>
14	0.92 s	19.1 CH <sub>3</sub>
15	1.10 d (6.5)	11.2 CH <sub>3</sub>

La estereoquímica de XIII se dedujo por las interacciones observadas en el espectro NOESY (espectro 4.7). La correlación de H-3 con H-2a, H-14 y H-15, aunado a los valores de las constantes de acoplamiento de H-3 (ddd,  $J = 10.5, 10.5, 4.5$  Hz), permitió proponer la orientación  $\alpha$  para el OH unido a C-3. y la orientación  $\beta$  para H-2a.

El grupo hidroxilo en C-8 se propuso orientado  $\alpha$  debido a la presencia del acoplamiento homoalílico entre H-6 $\alpha$  ( $\delta$  2,38, da  $J = 12.5$  Hz) y el metilo 13 ( $\delta$  1.78, d  $J = 1.5$  Hz). Para que este acoplamiento sea posible se requiere que el enlace de C-11 con el metilo 13 forme ángulos diedros de 90° con y H-6 $\alpha$  y con el hidróxido en C-8 y eso solo es posible si el OH en

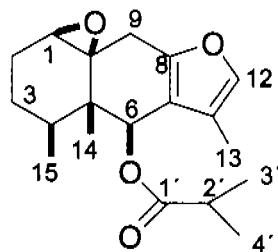
C-8 tiene orientación  $\alpha$  (Moriyama y Takahashi, 1976). La orientación  $\alpha$  de H-6b se dedujo por su interacción en el experimento NOESY con H-4 mientras que H-6a, orientado  $\beta$ , interaccionó con CH<sub>3</sub>-14 y CH<sub>3</sub>-15.



**Figura 7.** Experimento NOESY compuesto **XIII**

En el espectro de EMIE (espectro 4.8) se observó la presencia de los fragmentos en  $m/z$  247 [M-OH]<sup>+</sup> y 229 [247-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> correspondientes a la pérdida de un grupo hidroxilo y de agua, respectivamente, lo cual confirmó la presencia de grupos hidroxilo.

#### **6 $\beta$ -Isobutiriloxi-1,10 $\beta$ -epoxifuranoeremofilano (IV)**



La espectroscopia IR, mostró bandas en 1728, 1464, 1152, 850 cm<sup>-1</sup> de grupos carbonilo, furano y epóxido, respectivamente.

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (espectros 5.1 y 5.1.1, Tabla 7) se observó en la zona de alta frecuencia la señal de un protón vinílico en  $\delta$  7.07 (s) atribuido a H-12 y en  $\delta$  6.35 (q,  $J$  = 1.2 Hz) la señal atribuida a H-6 base de éster. A continuación se detectaron en  $\delta$  3.23 (dd,  $J$  = 16.8, 1.8 Hz) y  $\delta$  2.18 (d,  $J$  = 16.8 Hz) las señales asignadas a los protones unidos al carbono

9, en  $\delta$  3.09 (d,  $J = 5.1$  Hz) la señal de H-1 base de epóxido y en  $\delta$  1.85 (d,  $J = 1.2$  Hz), 1.26 (s) y 1.07 (d, 7.2 Hz) las señales de los 3 metilos característicos de un furanoeremofilano.

**Tabla 7.** Datos de RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de (IV).

Posición	RMN $^1\text{H}$ , $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz	RMN $^{13}\text{C}$ , $\text{CHCl}_3$ , 75 MHz / DEPT
1	3.09 d (5.1)	62.9 CH
2a	1.95-1.83 m	19.9 $\text{CH}_2$
2b	1.34 m	-
3a	2.05 m	23.6 $\text{CH}_2$
3b	1.95-1.83 m	-
4	1.52 m	34.4 CH
5	-	41.0 C
6	6.35 c (1.2)	69.3 CH
7	-	119.7 C
8	-	148.4 C
9a	3.23 dd (16.8, 1.8)	30.6 $\text{CH}_2$
9b	2.18 d (16.8)	-
10	-	63.3 C
11	-	116.9 C
12	7.07 s	138.9 CH
13	1.85 d (1.2)	8.6 $\text{CH}_3$
14	1.26 s	16.7 $\text{CH}_3$
15	1.07 d (7.2)	15.2 $\text{CH}_3$
1'	-	177.0 C
2'	2.65 hept (7.2)	32.1 CH
3'	1.24 d (7.2)	19.5 $\text{CH}_3^a$
4'	1.24 d (7.2)	18.7 $\text{CH}_3^a$

<sup>a</sup> Señales cuyos valores son intercambiables

La presencia de una señal heptuplete en 2.65 ( $J = 7.2$ ) acoplada con la señal que integró para dos metilos en 1.24 (d,  $J = 7.2$ ) indicó que el grupo que sustituye la molécula en posición 6 era un isobutiriloxi.

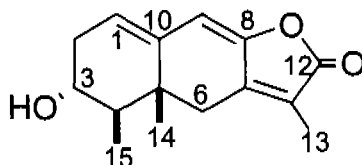
En el espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro 5.2, Tabla 7), la presencia de 19 átomos de carbono corroboró la estructura de un furanoeremofilano sustituido con un éster de 4 átomos de carbono. Se observaron la señal de grupo carbonilo del éster ( $\delta$  177.0 s), los cuatro carbonos vinílicos del grupo furano ( $\delta$  148.4, s, 138.9, d, 119.7, s y 116.9, s), los carbonos base de oxígeno del éster ( $\delta$  69.3, d) y del epóxido ( $\delta$  66.3, s, 62.9 s). Además, con ayuda del experimento DEPT (espectro 5.3) se identificaron las señales de 3 metilenos, 2 metinos alifáticos y las de los cinco metilos presentes en la molécula.

La similitud en la constante de acoplamiento del H-1 (d,  $J = 5.1$ ) con la observada para H-1 (d,  $J = 5.5$ ) en el compuesto **X** permitió proponer para el epóxido en posición 1-10 una orientación  $\beta$ .

La orientación  $\beta$  del grupo isobutiriloxi en posición 6 se dedujo de la constante de acoplamiento a larga distancia observada entre H-6 ( $\delta$  6.35, q,  $J = 1.2$  Hz) y  $\text{CH}_3$ -13 ( $\delta$  1.85, d,  $J = 1.2$  Hz), acoplamiento que ocurre cuando el C-H alílico forma un ángulo diedro de  $90^\circ$  con el plano del metilo vinílico 13 y esto solo es posible si H-6 es  $\alpha$  (Samek *et al*, 1969).

Este compuesto fue reportado por Bohlmann y sus colaboradores como parte de la mezcla de los compuestos **32-35**, aislados en un estudio anterior de *P. praecox* (Bohlmann y Zdero, 1976).

**3 $\alpha$ -Hidroxi-1(10), 7(11), 8-eremofilatrien-12,8-olida (VII)**



La espectroscopia IR, mostró bandas en 3471 de grupo hidroxilo y en 1665  $\text{cm}^{-1}$  de grupo carbonilo conjugado.

**Tabla 8.** Datos de RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de (VII).

Posición	RMN $^1\text{H}$ , $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz	RMN $^{13}\text{C}$ , $\text{CH}_3\text{OD}$ , 125 MHz / DEPT
1	5.67 dd (6.0, 2.5)	127.2 CH
2 $\beta$	2.62 ddd (19.0, 6.0, 6.0)	36.9 $\text{CH}_2$
2 $\alpha$	2.10 ddd (19.0 10.0, 2.5)	-
3	3.70 ddd (10.0, 10.0, 6.0)	69.2 CH
4	1.67 dc (10.0, 7.0)	47.3 CH
5	-	40.9 C
6 $\beta$	2.90 d (16.5)	35.8 $\text{CH}_2$
6 $\alpha$	2.22 dd (16.5, 1.5)	-
7	-	141.2 $\text{C}^a$
8	-	137.0 $\text{C}^a$
9	5.86 s	111.8 CH
10	-	142.1 C
11	-	126.4 C
12	-	175.2 C
13	1.83 d (1.5)	7.9 $\text{CH}_3$
14	0.97 s	20.8 $\text{CH}_3$
15	1.11 d (7.0)	10.7 $\text{CH}_3$

<sup>a</sup> Señales cuyos valores son intercambiables

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectros 6.1 y 6.1.1, Tabla 8) se observaron a campo bajo las señales de los hidrógenos vinílicos H-9 ( $\delta$  5.86 (s) y H-1 ( $\delta$  5.67, dd,  $J = 6.0, 2.5$  Hz), seguidas de la señal de H-3 ( $\delta$  3.70, ddd,  $J = 10.0, 10.0, 6.0$  Hz) geminal al grupo hidroxilo, de la señal AB del metileno 6 ( $\delta$  2.90 d,  $J = 16.5, 2.22$  dd,  $J = 16.5, 1.5$  Hz), de los tripletes del metileno 2 ( $\delta$  2.62 ddd,  $J = 19.0, 6.0, 6.0$ ; 2.10 ddd,  $J = 19.0, 10.0, 2.5$  Hz) para finalmente encontrar los 3 metilos típicos de la eremofilanolida ( $\delta$  1.83, d,  $J = 1.5$ ; 1.11, d,  $J = 7.0$ ; 0.97, s).

En el espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro 6.2, tabla 8), se observaron 15 átomos de carbono, entre los cuales un carbonilo en  $\delta$  175.2 (s) para C-12, seis carbonos vinílicos en  $\delta$  142.1 (s), 141.2 (s), 137.0 (s), 127.2 (d), 126.4 (d) y 111.8 (d), un carbono base de oxígeno en  $\delta$  69.2 (d), dos metilenos en ( $\delta$  36.9 t, 35.8 t,) y tres metilos ( $\delta$  20.8, c; 10.7, c; 7.9, c).

En el espectro DEPT (espectro 6.3), se notaron 3 metilos, 2 metilenos y 4 metinos, que soportan la estructura **VII** para este compuesto.

La orientación  $\alpha$  del OH en 3 se dedujo de las constantes de acoplamiento observadas para H-3 ( $\delta$  3.70 ddd (10.0, 10.0, 6.0) que implican una orientación axial  $\beta$  para este hidrogeno.

Este compuesto se encuentra mencionado como intermediario en la síntesis de derivados del tetrahidronaftofurano (Shinei *et al*, 2006) y no ha sido aislado con anterioridad como producto natural.

## Pruebas biológicas

En la tabla 2 se muestran los resultados del rastreo primario de actividad anti-Inflamatoria en el modelo de edema inducido en oreja de ratón con TPA.

Todos los compuestos presentaron una cierta actividad anti-inflamatoria, pero ninguno de ellos con grado relevante.

El compuesto con mayor porcentaje de inhibición del edema fue el furanoeremofilano **IV** con 65.14%, sin embargo esta actividad es baja si se compara con la del producto de referencia, la indometacina la cuál presentó 83.73% de inhibición.

Comparando la actividad del compuesto **IV** (65.14%) con la del compuesto **III** (30.98%) se observó que con el cambio del éster de Isobutirato a angelato esta disminuye. En los compuestos **IX** y **VIII** la tendencia se mantiene, ya que la actividad pasa de 48.06%, en el isobutirato, a 40.79% en el angelato. Sin embargo, en los compuestos **V** y **VI** la tendencia es inversa, la actividad aumento al pasar de isobutirato (33.69%) en el compuesto **VI** a angelato (48.93%) en el **V**, por lo tanto no es posible establecer que la naturaleza del éster tenga un efecto claro sobre la actividad.

Observando la tabla 2 se puede deducir que en general los compuestos con estructura de furanoeremofilano del **III** al **IX** presentaron inhibición del edema que varía ente 30.98 y 65.14%. Esta actividad fue mayor que la de los compuestos con estructura de eremofilanólida **X** y **XIII**, con valores de 15.86 y 31.92 %, y estos a su vez fueron más activos que los glucósidos de eremofilano **XI** y **XII** que solo inhibieron el edema en 14.69 y 21,33 % respectivamente.



## 9. CONCLUSIONES

1. Del estudio del extracto metanólico de corteza de raíz de *Pittocaulon praecox* se obtuvieron dos nuevos glucósidos de eremofilano (**XI, XII**), metabolitos poco comunes, y dos nuevas eremofilanolidas (**X, XIII**).
2. Este es el primer reporte tanto de glucósidos de eremofilano como de eremofilanolidas en el género *Pittocaulon*.
3. *Pittocaulon praecox* mostró un patrón Quimiotaxonómico semejante al presentado por de especies del género *Senecio* del que fue segregado.
4. Comparando los resultados obtenidos en este estudio con los reportados en los estudios anteriores de *Pittocaulon praecox*, se pueden hacer las siguientes observaciones:
  - Cuatro de los compuestos obtenidos (**III, IV, VIII y IX**) habían sido aislados anteriormente de esta planta (Bohlmann y Zdero, 1976).
  - Los alcaloides encontrados, senecionina e integerrimina ya habían sido reportados en la planta (Marin-Loaiza, 2008a).
  - Los otros 7 compuestos obtenidos (**V, VI, VII, X, XI, XII y XIII**) no habían sido reportados en los estudios anteriores de *Pittocaulon praecox* ni en otras especies de *Pittocaulon*.
  - Se aislaron 4 nuevos metabolitos **X, XI, XII y XIII**.
5. De los resultados de las pruebas de actividad anti-inflamatoria puede concluirse que en general las actividades detectadas fueron bajas con respecto al compuesto de referencia la indometacina. Se pudo observar que los compuestos con estructura de furanoeremofilano (**III – IX**) presentaron mayor actividad que los compuestos con estructura de eremofilanólida (**X y XIII**) y que estos a su vez fueron más activos que los glucósidos de eremofilano (**XI y XII**). Sin embargo es claro que ni el extracto metanólico, ni los compuestos aislados

presentaron actividad anti-inflamatoria relevante. Es posible que existan compuestos activos que no fueron aislados o que estos se encuentren en la parte área de la planta.

## **10 PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES**

Dado que de *Pittocaulon praecox* se obtuvieron glucósidos de eremofilano y eremofilanólidas, compuestos no reportados en género *Pittocaulon*, sería interesante el continuar con el estudio de otras especies del género para determinar si estos metabolitos pueden ser considerados como marcadores quimiotaxonómicos del género.

## 11 BIBLIOGRAFÍA

- Agullar A., **1994**, Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Ed. IMSS, p 56.
- Arciniégas, A., Pérez-Castorena, A. L., Reyes, S., Contreras, J. L., Romo de Vivar, A., **2003**, New oplopane and eremophilane derivatives from *Robinsonecio gerberifolius*, *J. Nat. Prod.* **66**, 226-229.
- Asano, N., Nash, R. J., Mollneax, R. J., Fleet, W. J., **2000**, Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application, *Tetrahedrom Asymmetry*. **11**, 1645-1680.
- Barkley, T. M., Clark, B. L., Funston, M., **1996**, The segregate genera of *Senecio sensu lato* and *Cacalia sensu lato* (Asteraceae, Seneclioneae) in Mexico and C. America, *Ed. Royal Botanic Gardens, Kew*, Vol. **1**, 613-620.
- Bohlmann, F.; Zdero, C., **1976**, Neue Furanoeremophilane aus Mexikanischen *Senecio* arten, *Chem. Ber.*, **109**, 819-825.
- De Bernardi, M., Vidari, G., Vita-Finzi, P., Abdo, S., Marinoni, G. Mellerio, G., **1988**, Metabolites of medicinal plants. II. Furanoeremophilanes from *Lasiocephalus ovatus*, *Gazz. Chim. Ital.*, **38**, 565.
- Domínguez, X. A., **1988**, Métodos de investigación fitoquímica. *Editorial Limusa*, México, 9-22.
- Heywood, V. H., Harborne, J. B., Turner, B. L., **1977**, An Overture to the Compositae. The Biology an Chemistry of Compositae, VI, *Academic Press, New York*, 2-20
- Hwang, B. Y., Lee, J-H., Koo, T. H., Kim, H. S., Hong, Y. S., Ro, J. S., Lee, K. S., Lee, J. J., **2002**, Furanoligularenone, an eremophilane from *Ligularia fischeri*, inhibits the LPS-induced production of nitric oxide and prostaglandin E2 in macrophage., *Planta Med.* **68**, 101-105.
- Lara, F., Marquez, C., **1996**, Plantas medicinales de México, composición, usos y actividad biológica. México: UNAM. *Dirección General de Publicaciones*, 5-8.
- Logie C. G., Grue M. R., Liddell J. R., **1994**, Proton NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry*, **37**, 43-109.

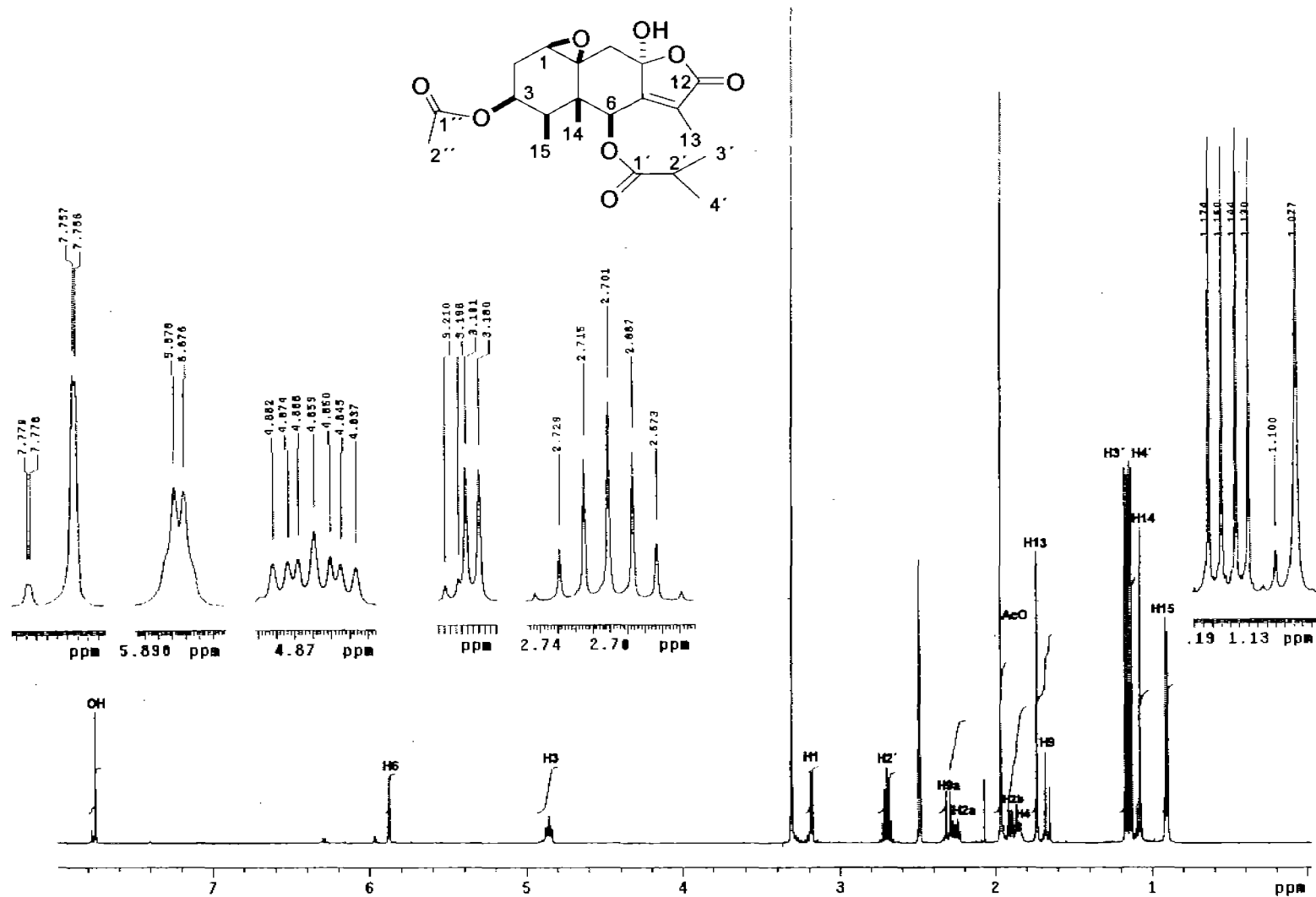
- Maldonado R, J. I., Arciniegas, A.; Pérez-Castorena, A. L.; Villaseñor, J. L.; Romo de Vivar, A., **2008**, Furanoeremophilanes and other constituents of *Pittocaulon Bombycophole*, *Heterocycles.*, *75*, 3035-3042.
- Marín-Loaiza, J. C., Céspedes, C. L., Beverle, T., Theuring, C., Hartmann, T., **2007**, *Ceroplastes albolineatus*, the first scale insect shown to sequester pyrrolizidine alkaloids from its host-plant *Pittocaulon praecox*, *Chemoecology*, *17*, 109-115.
- Marín-Loaiza, J. C., Ludger, E., Beverle, T., Theuring, C., Céspedes, C. L., Hartmann, T., **2008a**, Pyrrolizidine alkaloids of the endemic mexican genus *Pittocaulon* and assignment of stereoisomeric 1,2-saturated necine bases. *Phytochemistry*, *69*, 154-167.
- Marín-Loaiza, J. C., Ávila, J.G., Canales, M., Hernandez, T., Céspedes C. L., **2008b**, Antifungal and antibacterial activities of endemic *Pittocaulon* ssp. from Mexico. *Pharmaceutical Biology*, *46*, 66-71.
- Martínez M., **1959**, Las plantas medicinales de México, 4ª Ed. 470-471.
- Miller, J., **1996**, Collecting Methodologies for plant samples for pharmaceutical research, sampling the green world, Editado por Tod. F. Stuessy and Sohmer, S.H. New York, 74-87.
- Moriyama, Y. and Takahashi, T., **1976**, New sesquiterpene lactones of eremophilane-type from *Ligularia fauriei* (Fr.) koidz., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, *49*, 3196-3199.
- Novoty, L., Krojidló, M., Samek, Z., Kohoutová, J. and Sorm, F., **1973**, The structure of nemosenins A, B, C, D, and senemorin, new furoeremophilane derivatives from *Senecio nemorensis*, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, *38*, 739-755.
- Ortega, A.; Romo, M.; Díaz, E., **1975**, Furanoeremofilanos del *Senecio praecox*. Precocilina A. *Rev. Latinoamer. Quim.*, *6*, 136-142.
- Olson, M. E., **2005**, Wood, bark, and pith anatomy en *Pittocaulon* (*Senecio*, *Asteraceae*): Water storage and systematics, *Journal of Torrey Botanical Society.*, *132*(2), 173-186.
- Payá, M., Ferrándiz, M. L., Erradi, F, Terencio, M. C., Kljjoa, A., Pinto, M., Alcaraz, M.J., **1996**, Inhibition of inflammatory responses by a series of novel dolabrane derivatives. *European Journal of Pharmacology*. *312*, 97-105.
- Perez-Castorena, A. L., Arciniegas, A., Ramírez A. M. T., Villaseñor, J. L., Romo de Vivar, A., **2002**, Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activities of the

plastoquinone derivatives isolated from *Roldana barba-johannis*. *Planta Medica.*, **68**, 645-647.

- Perez, A. L., Vidales, P., Cardenas, J., Romo de Vivar, A., **1991**, Eremophilanolides from *Senecio toluccanus* var. *modestus*., *Phytochemistry*, **30**, 905-908.
- Perez-Castorena, A. L.; Arciniegas, A.; Pérez Alonso R.; Villaseñor, J. L.; Romo de Vivar, A., **1998**, Callosine, a 3-Alkyl-Substituted Pyrrolizidine Alkaloid from *Senecio Callosus*, *J. Nat. Prod.*, **61**, 1288-1291.
- Phillipson J. D. and Bisset N. G., **1972**, Quaternisation and oxidation of strychnine and brucine during plant extraction, *Phytochemistry*, **11**, 2547-2553.
- Pomillo, A. B. and Jares E. A., **1997**, Toxic furanoeremophilanes from *Senecio bonariensis*, *Internacional Journal of Pharmacognosy*, **35**, 207-211.
- Rao, T. S., Currie, J. L., Shaffer, A. F., and Isakson, P., **1993**, Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphobol acetate (TPA)- induced dermal inflammation. *Inflammation*. **10**, 723-741.
- Rzedowski Jerzy, **1983**, *Vegetación de México*, Ed. Limusa, 2<sup>a</sup> reimpresión, México D.F. 9-14
- Reina, M., González-Coloma, A., Gutiérrez, C., Cabrera, R., Rodríguez, M. L., Fajardo, V., Villarroel, L., **2001**, Defensive Chemistry of *Senecio miser*, *J. Nat. Prod.* **64**, 6-11.
- Reina, M., González-Coloma, A., Domínguez-Díaz, D., Cabrera, R., Rodríguez, M. L., Giménez Maríño, C., Rodríguez, M. L., Villarroel, L., **2006**, Bioactive eremophilanolides from *Senecio Poepigii*, *Nat. Prod. Research* **20**, 13-19.
- Richards, J. and Hendricsson, J., **1964**, Biosynthesis of terpenes sterolds and acetogenins., W. A. Benjamín Inc., New York, 225-237.
- Robins, J. D., **1977**, *Senecio* chemical review en the biology and chemistry of the *compositae*, *Editorial Academic Press, New York*, Vol II., **30**, 831-847.
- Robinson, H. and Bretell, R. D., **1973**, Studies in the Senecioneae (Asteraceae) I. A new genus, *Pittocaulon*, *Phytologia.*, **26**, 451-453.
- Roeder, E., **1990**, Carbon-13 NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids, *Phytochem.* **29**,11-29
- Roeder, E., **1995**, Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids, *Pharmazie*, **50**, 83-98.

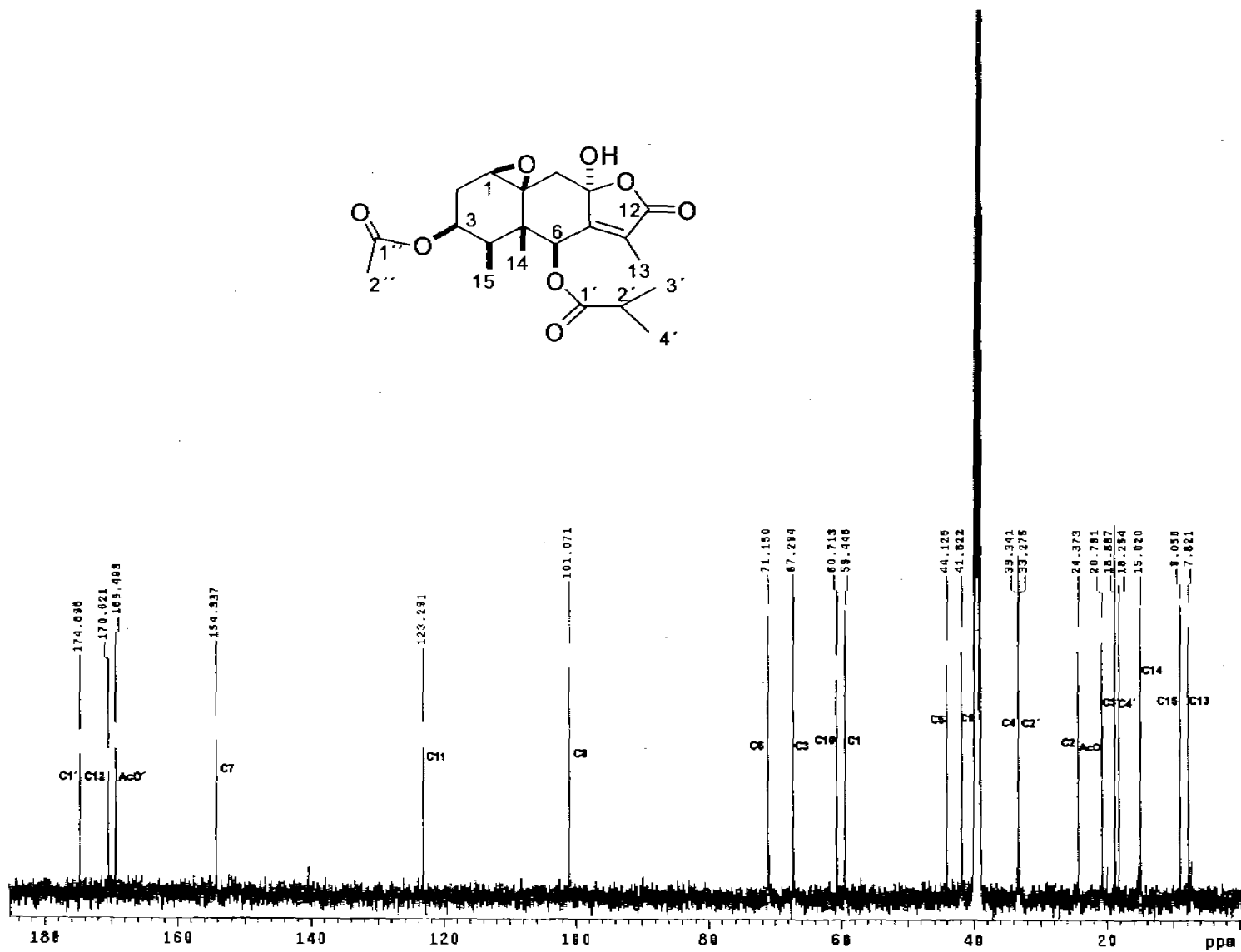
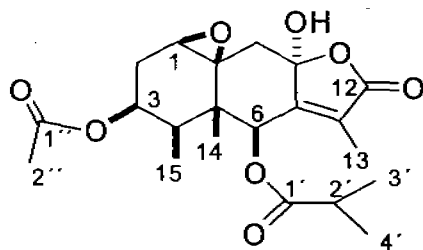
- Romo de Vivar, A., Perez-Castorena, A. L., Arciniegas, A., Villaseñor, J. L., **2007**, Secondary metabolites from mexican species of the tribe Senecioneae, *J. Mex. Chem. Soc.*, *51*, 160-172.
- Romo de Vivar, A., Perez-Castorena, A. L., Arciniegas, A., Villaseñor, J. L., **2000**, Pirrolizidine alkaloids from *Senecio* species belonging to Section Mulgedifolii, *Recent Res. Devel. Phytochem.*, *4*, 61-74.
- Samek, Z., Harmetha, J., Novotny, L. and Sorm, F., **1969**, On terpenes. CCII. Absolute configuration of adenostylone, neoadenostylone and isoadenostylone from *Adenostyles alliariae* (Gouan) Kern, and of decompostin from *Cacalia decomposita* A. Gray, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* *34*, 2792-2807.
- Shinei, R., Kurihara, K., Tanabe, K., Tabata, Y., Kurata, Y., Hoshiko, S., Okonogi, T., **2006**, Nonsteroidal progesterone receptor ligands (I): Synthesis and SAR of new tetrahydronaphthofuranone derivatives., *Bioorg. Med. Chem.*, *14*, 4850.
- Villarroel, L. and Torres, R., **1991**, 9-oxo-10 $\alpha$ H-Furanoeremophilanes from *Senecio chilensis* and *Senecio patagonicus*, *J. Nat. Prod.*, *54*, 588.
- Villaseñor, J. L., **1993**, La familia Asteraceae en México, *Rev. Soc Mex. Hist. Nat.*, XLIV, 117-124.
- Wang, Y., Yuan, C., Han, Y. and Jia, Z., **2003**, Sesquiterpenos from roots of *Lingularia veichiana*, *Pharmazie*, *58*, 349-352.

**12 ANEXOS**

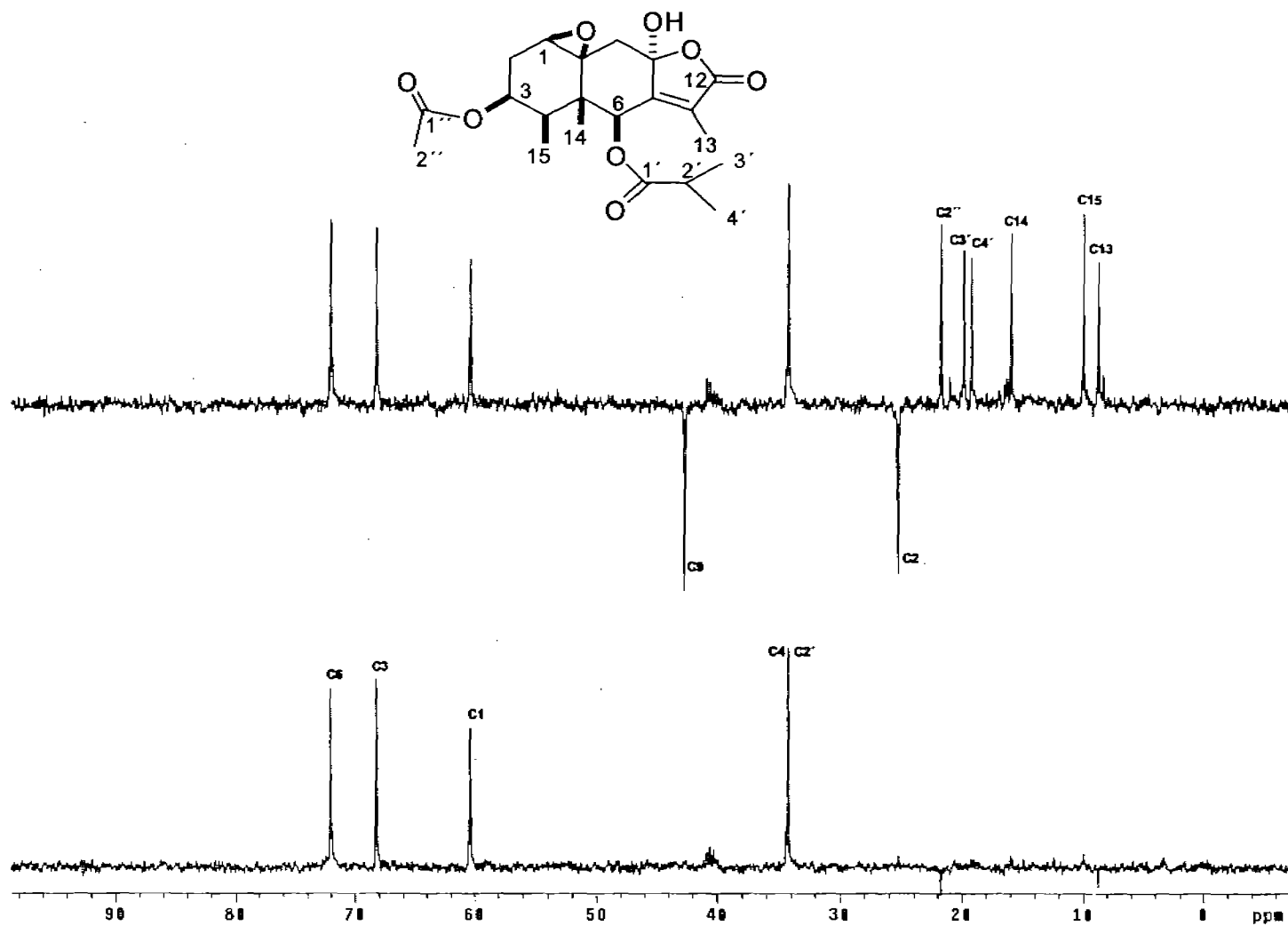


Espectro 1.1: RMN <sup>1</sup>H (DMSO<sub>d</sub><sub>6</sub>, 500 MHz) de 3β-acetoxi-1,10β-epoxi-8α-hidroxi-6β-isobutiriloxi-7(11) eremofilen-12,8-olida (X)

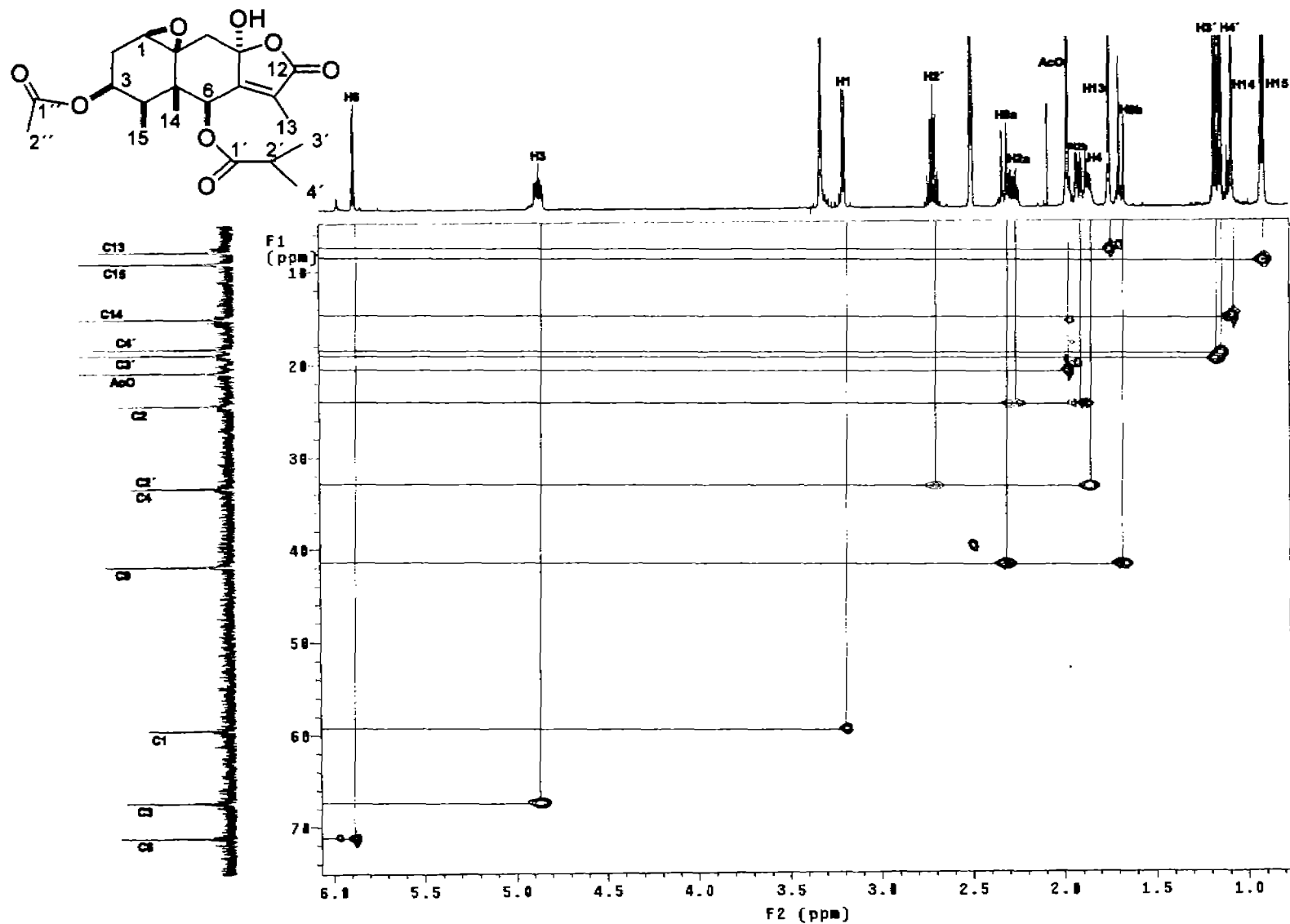




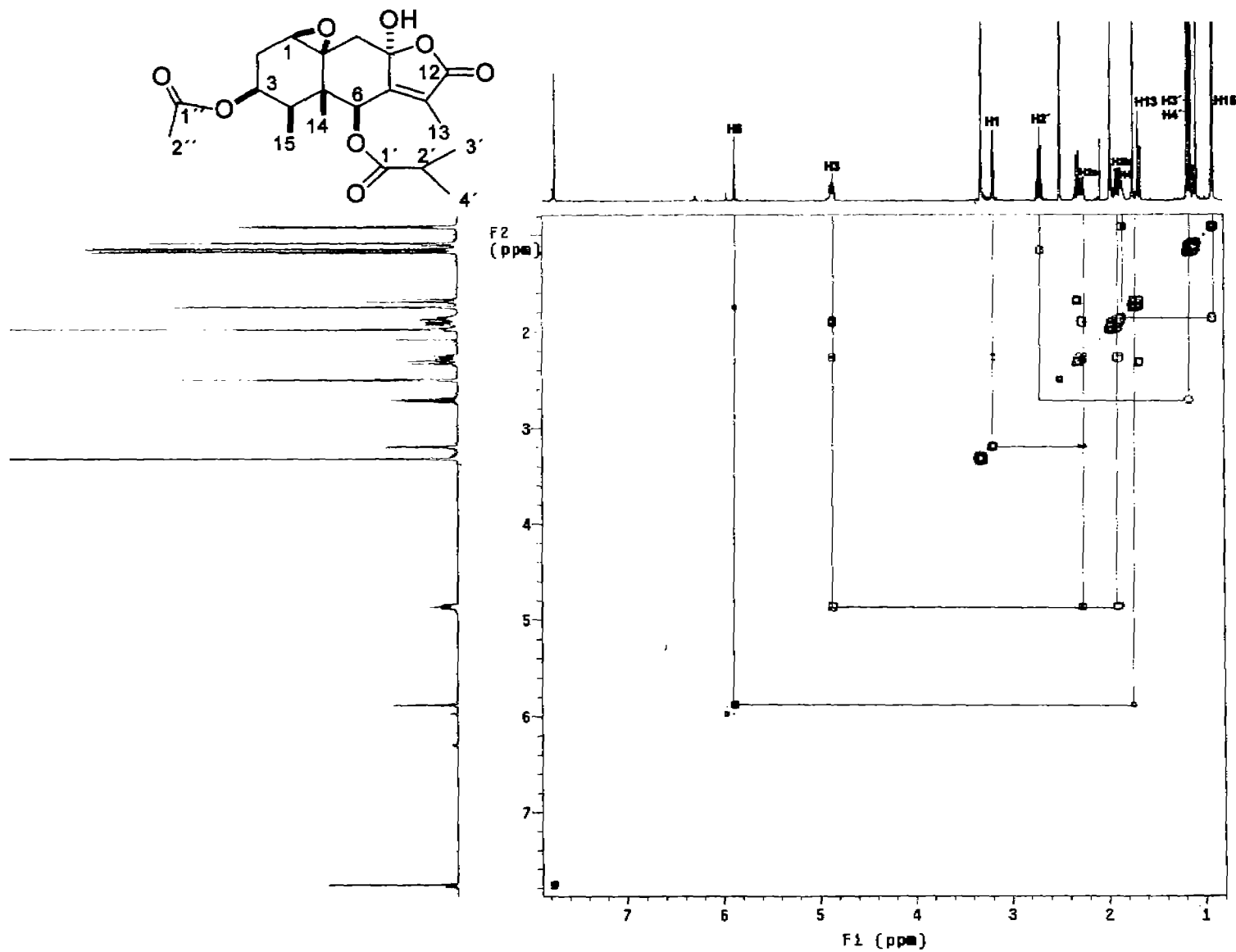
Espectro 1.2 RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 125 MHz) de 3 $\beta$ -acetoxi-1,10 $\beta$ -epoxi-8 $\alpha$ -hidroxi-6 $\beta$ -isobutiriloxi-7(11) eremofilen-12,8-olida (X)



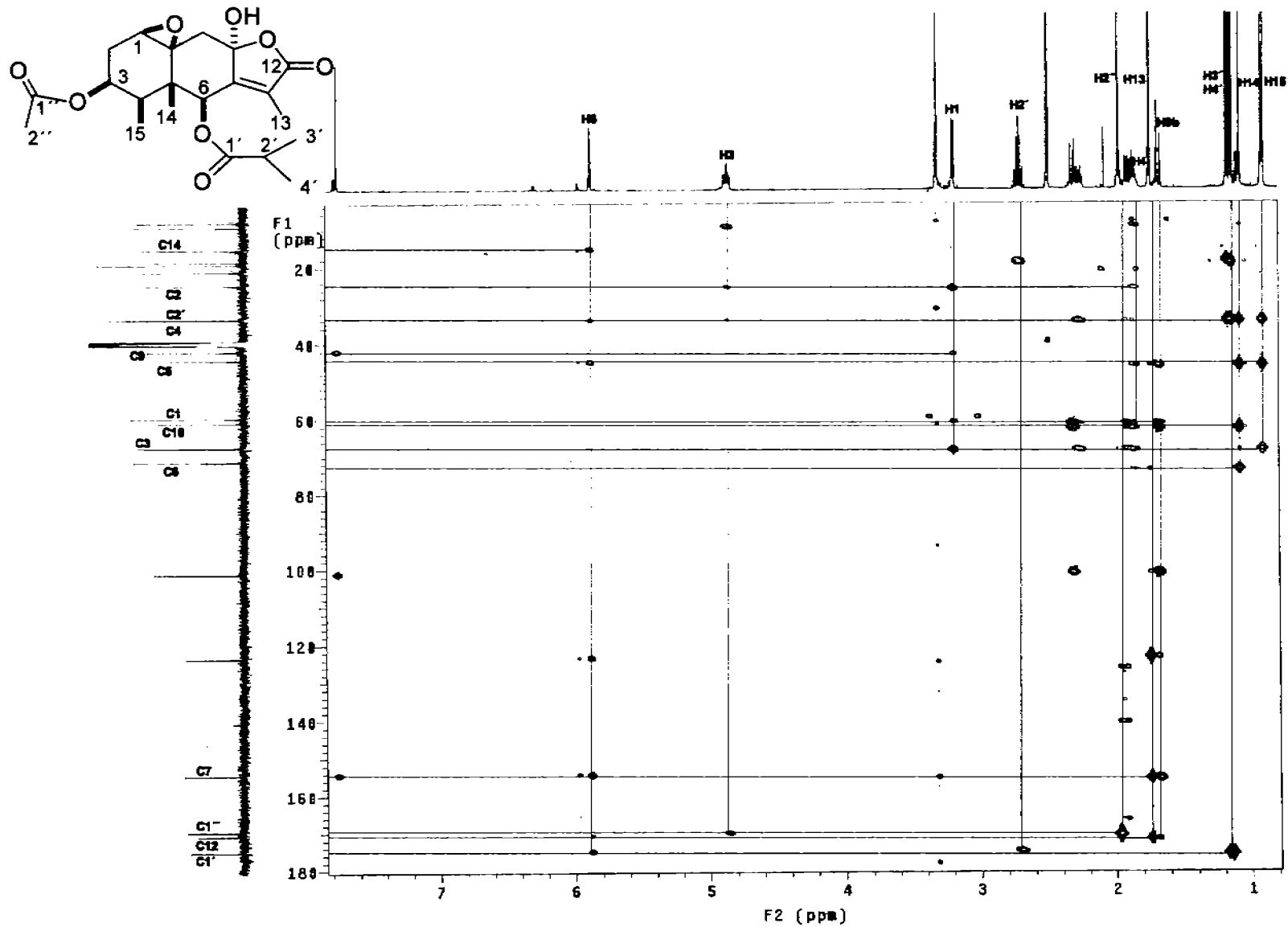
Espectro 1.3 DEPT (DMSO<sub>d</sub><sub>6</sub>, 125 MHz) de 3β-acetoxi-1,10β-epoxi-8α-hidroxi-6β-isobutiriloxi-7(11)-eremofilen-12,8-olida  
(X)



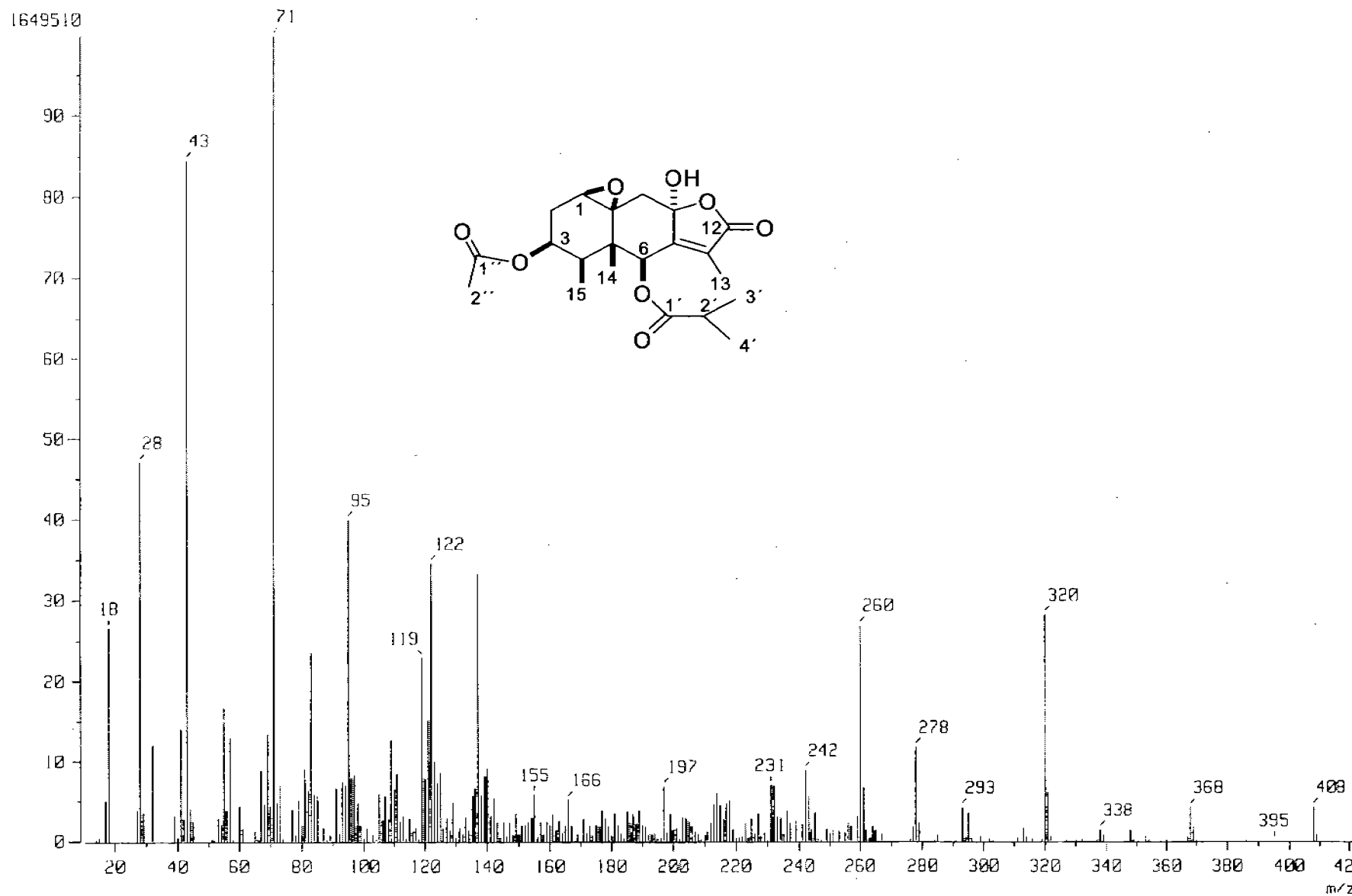
Espectro 1.4: Experimento HSQC (DMSO<sub>d</sub><sub>6</sub>, 500 MHz) de 3β-acetoxi-1,10β-epoxi-8α-hidroxi-6β-isobutiriloxi-7(11) eremofilen-12,8-olida (X)



Espectro 1.5: Experimento COSY (DMSO<sub>d</sub><sub>6</sub>, 500 MHz) de 3β-acetoxy-1,10β-epoxi-8α-hidroxi-6β-isobutiriloxy-7(11) eremofilen-12,8-olida (X)

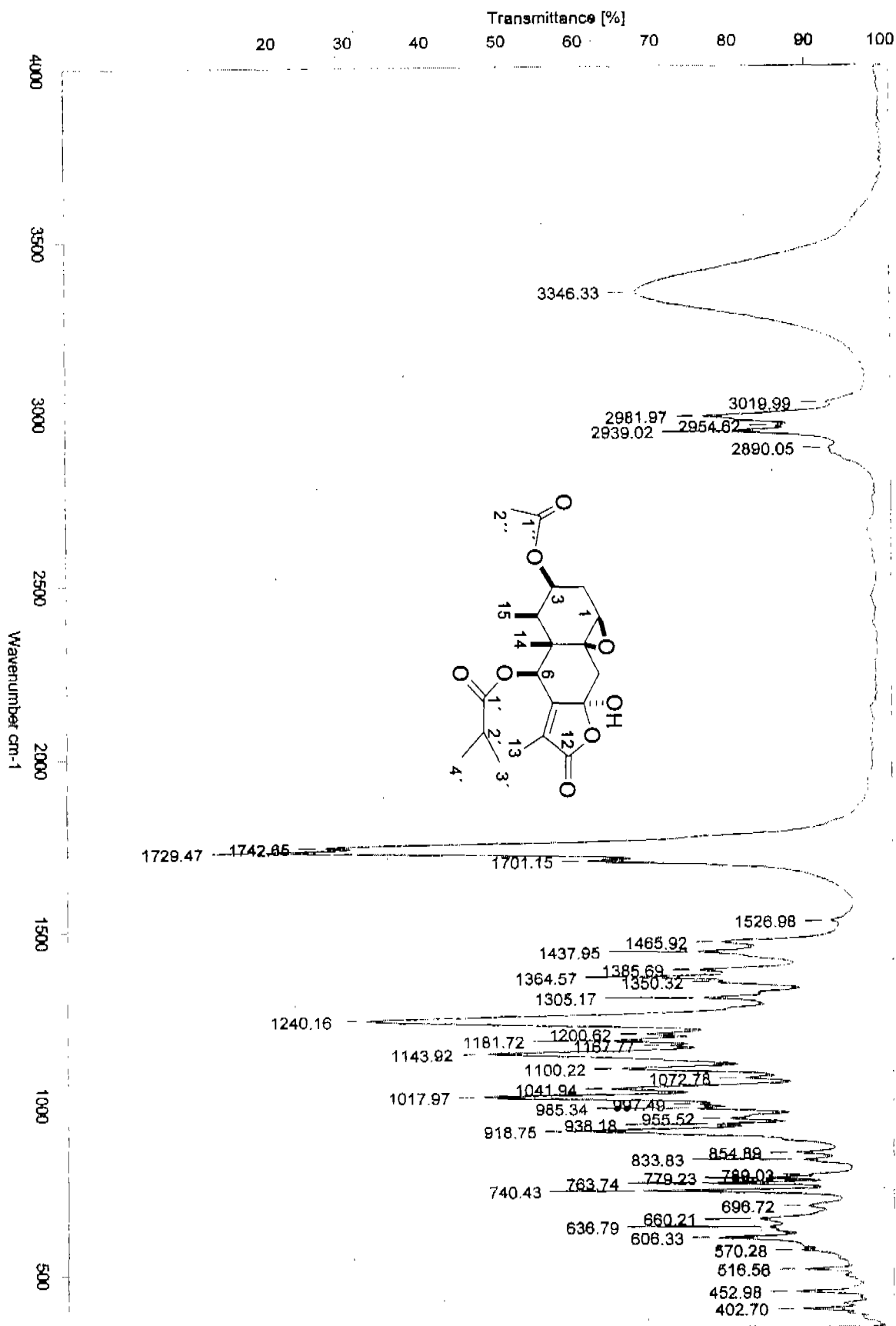


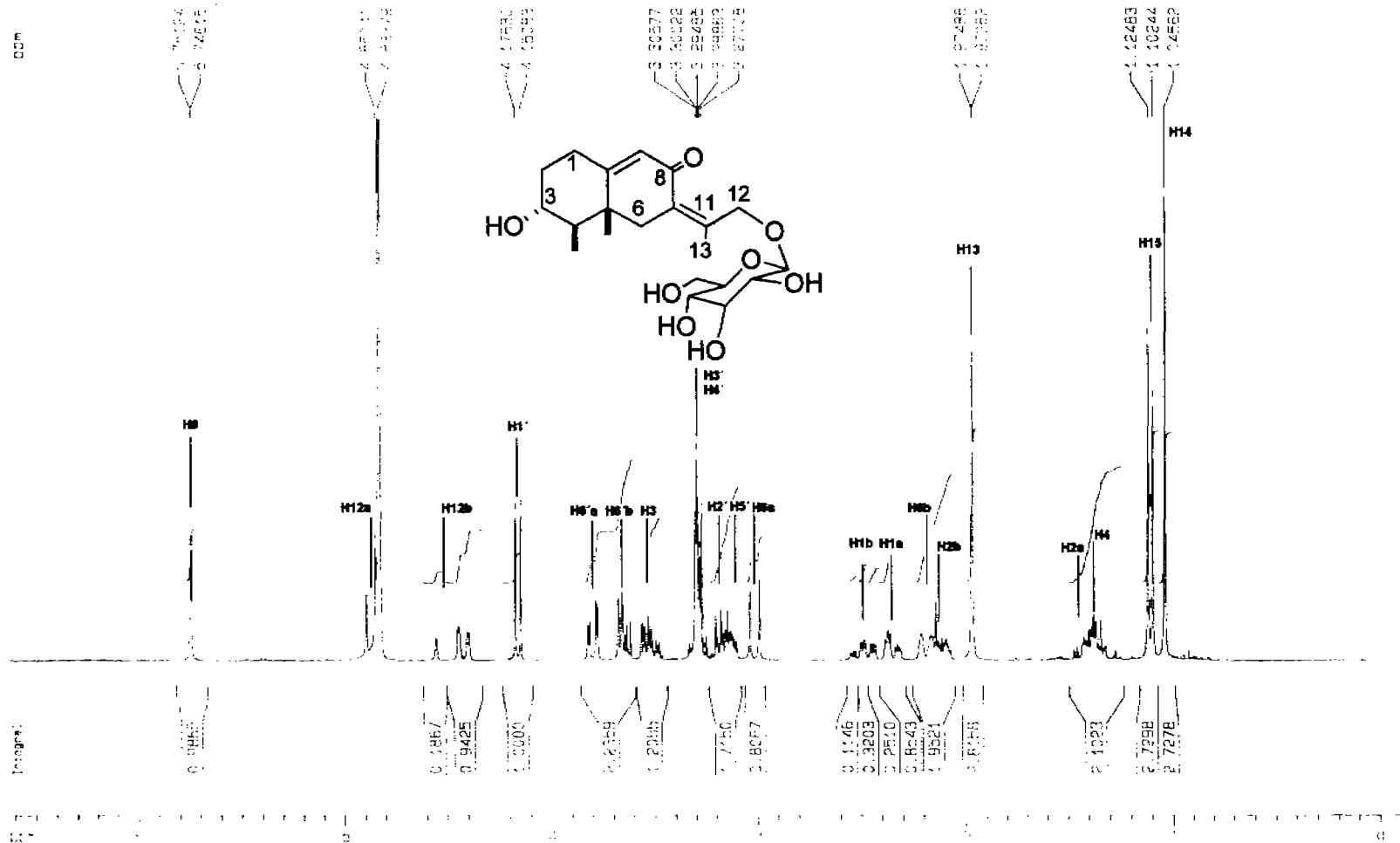
Espectro 1.6: Experimento HMBC (DMSO<sub>d</sub><sub>6</sub>, 500 MHz) de 3β-acetoxi-1,10β-epoxi-8α-hidroxi-6β-isobutiriloxi-7(11) eremofilen-12,8-olida (X)



Espectro 1.8: MASAS IE de 3 $\beta$ -acetoxi-1,10 $\beta$ -epoxi-6 $\beta$ -8 $\alpha$ -hidroxi-isobutiriloxi-7(11) eremofilen-12,8-olida (X)

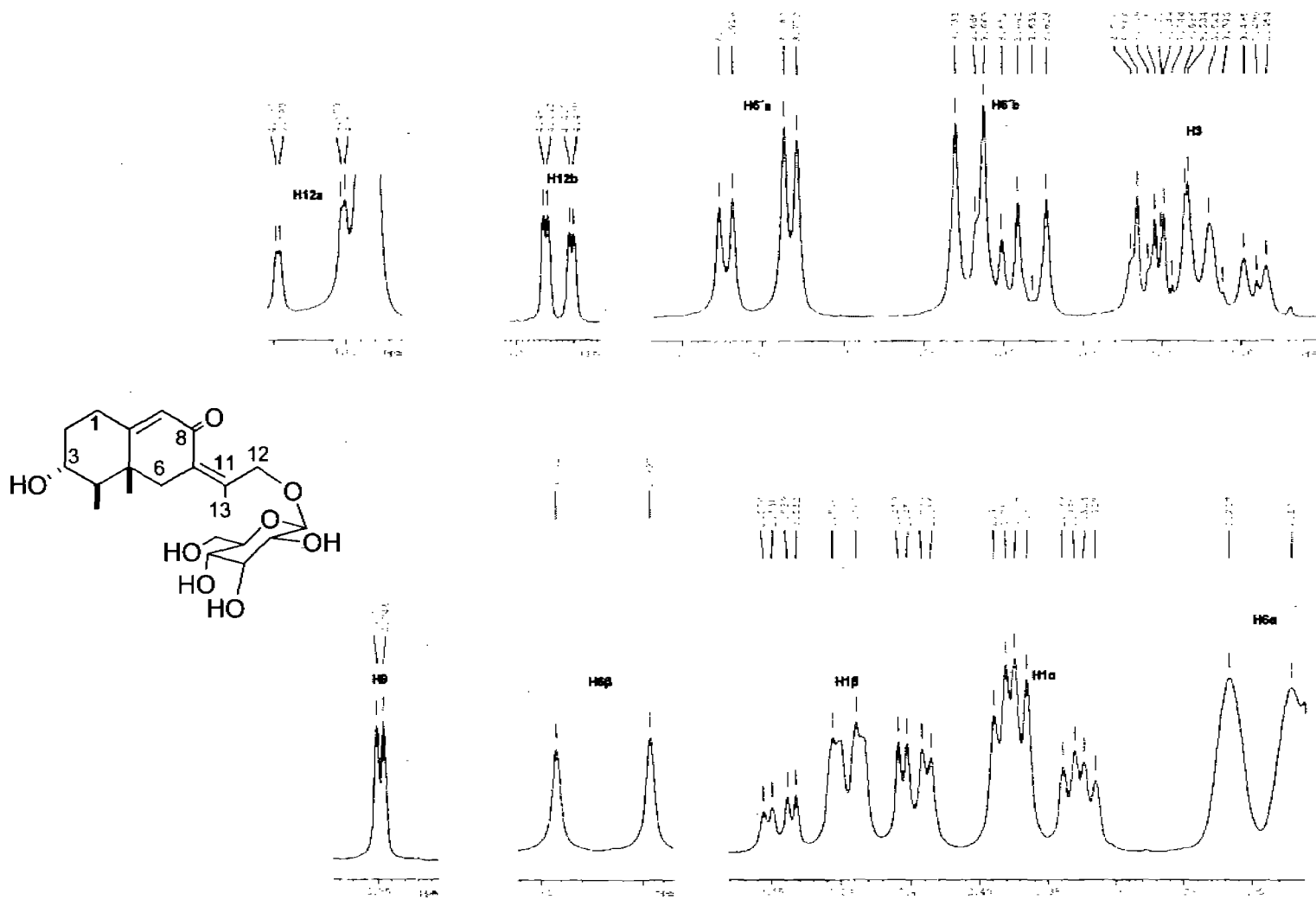
Espectro 1.9: IR de 3 $\beta$ -acetoxi-1,10 $\beta$ -epoxi-8 $\alpha$ -hidroxi-6 $\beta$ -isobutiriloxi-7(11) eremofilén-12,8-olida (X)



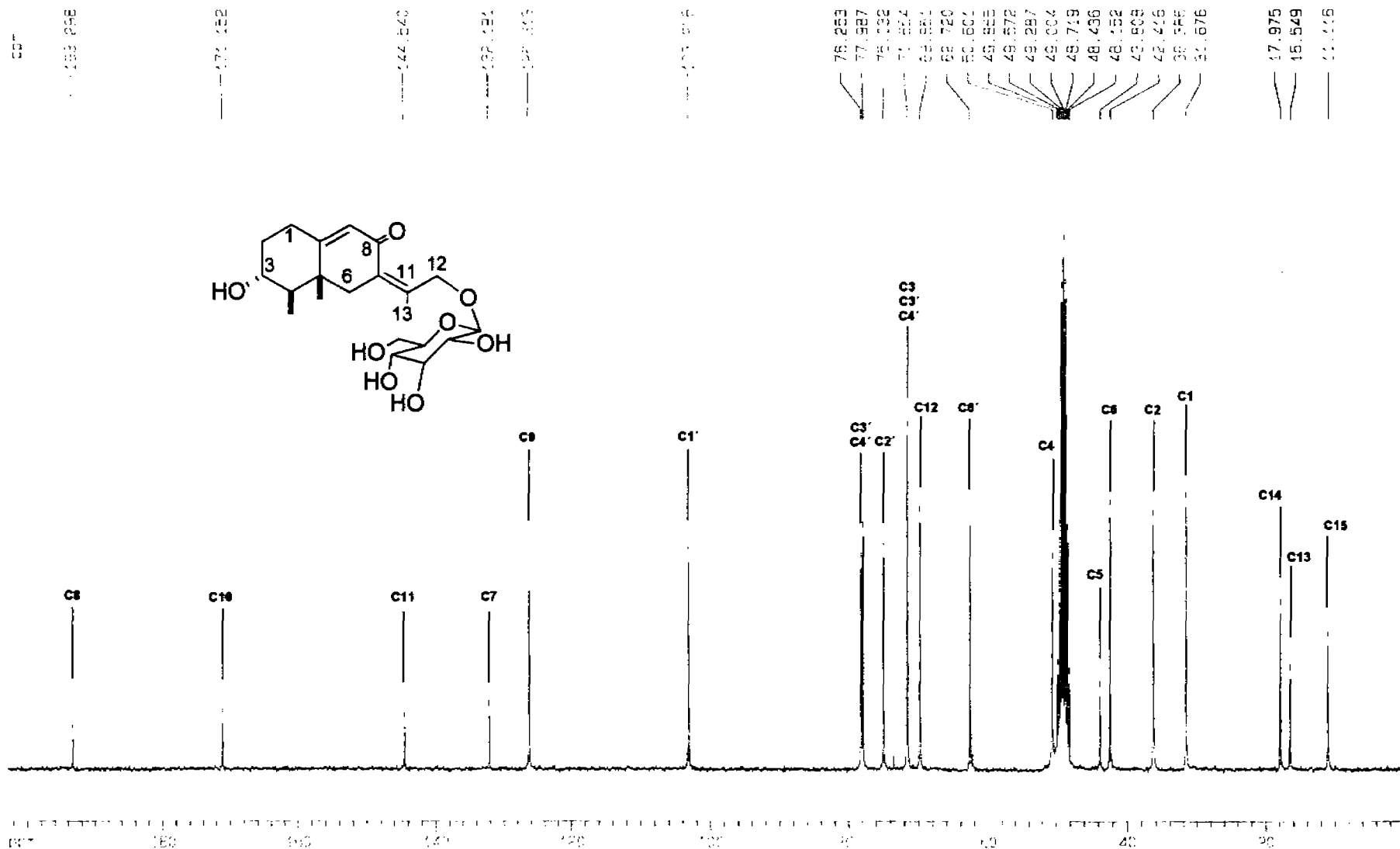


Espectro 2.1: RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) de 12-O-β-D-glucopiranosido de 3α-hidroxi-7(11),9-eremofiladien-8-ona (XI)

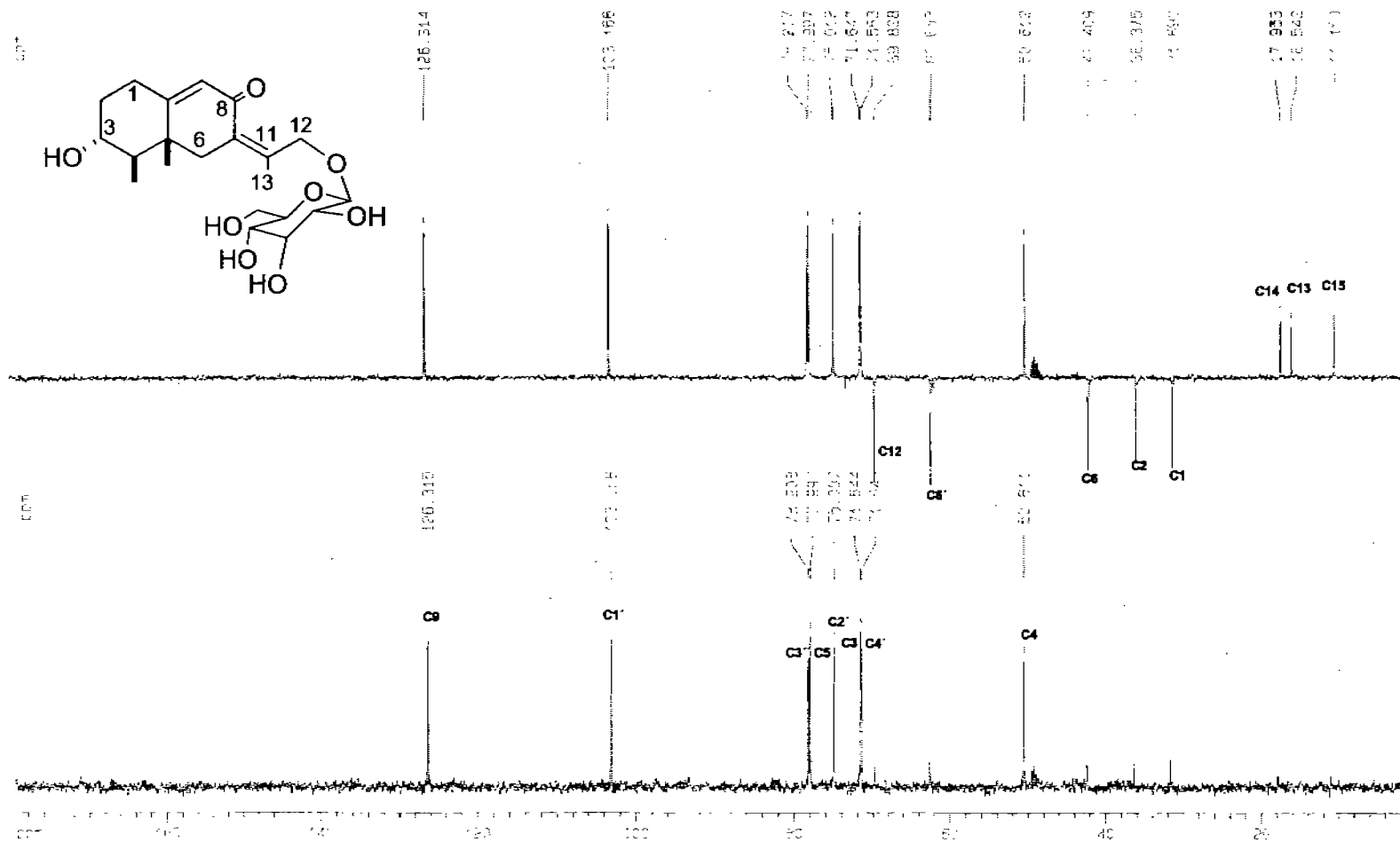




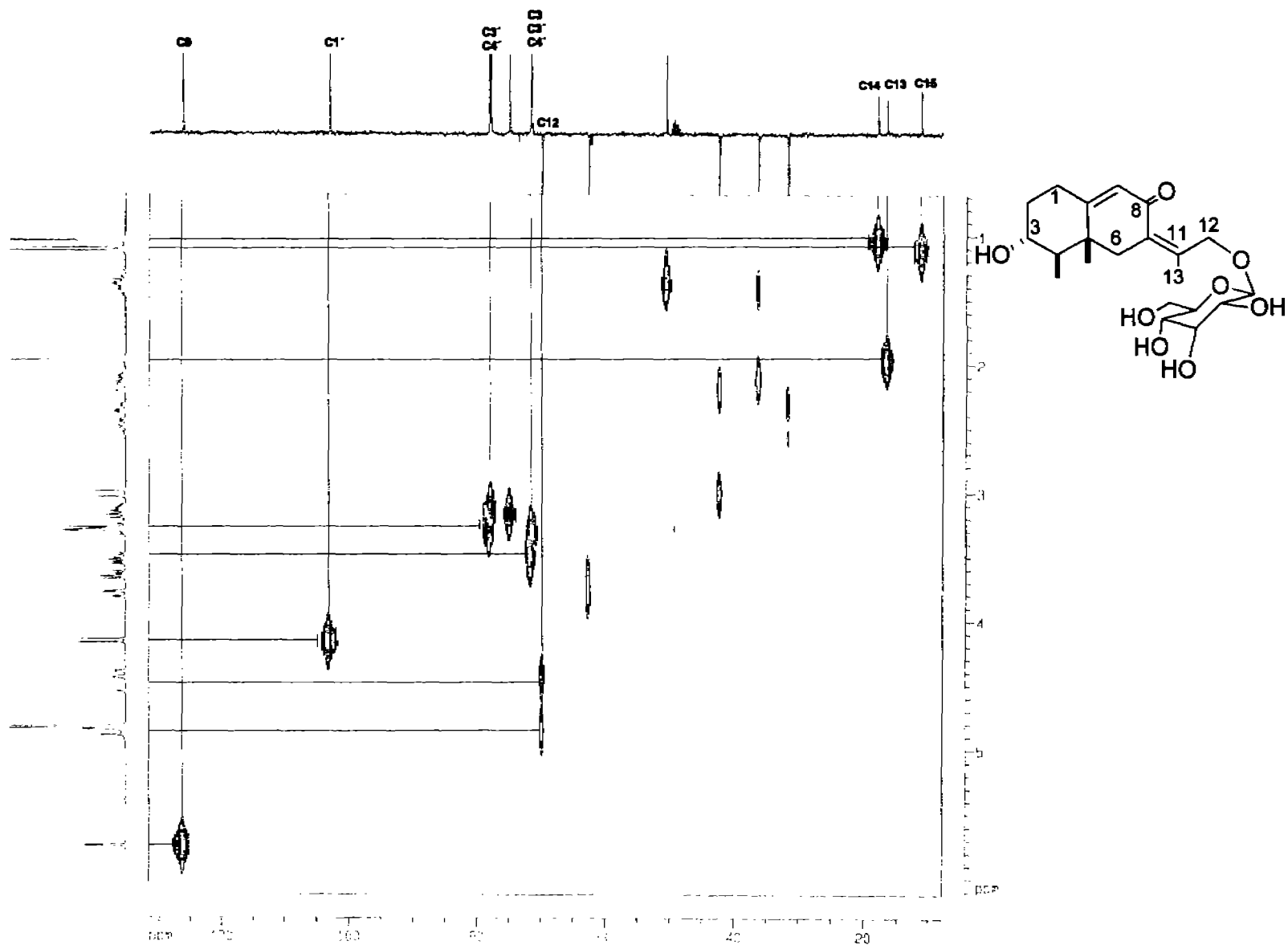
Espectro 2.1.1: RMN <sup>1</sup>H (ampliación) (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) de 12-O-β-D-glucopiranosido de 3α-hidroxi-7(11),9-eremofiladien-8-ona (XI)



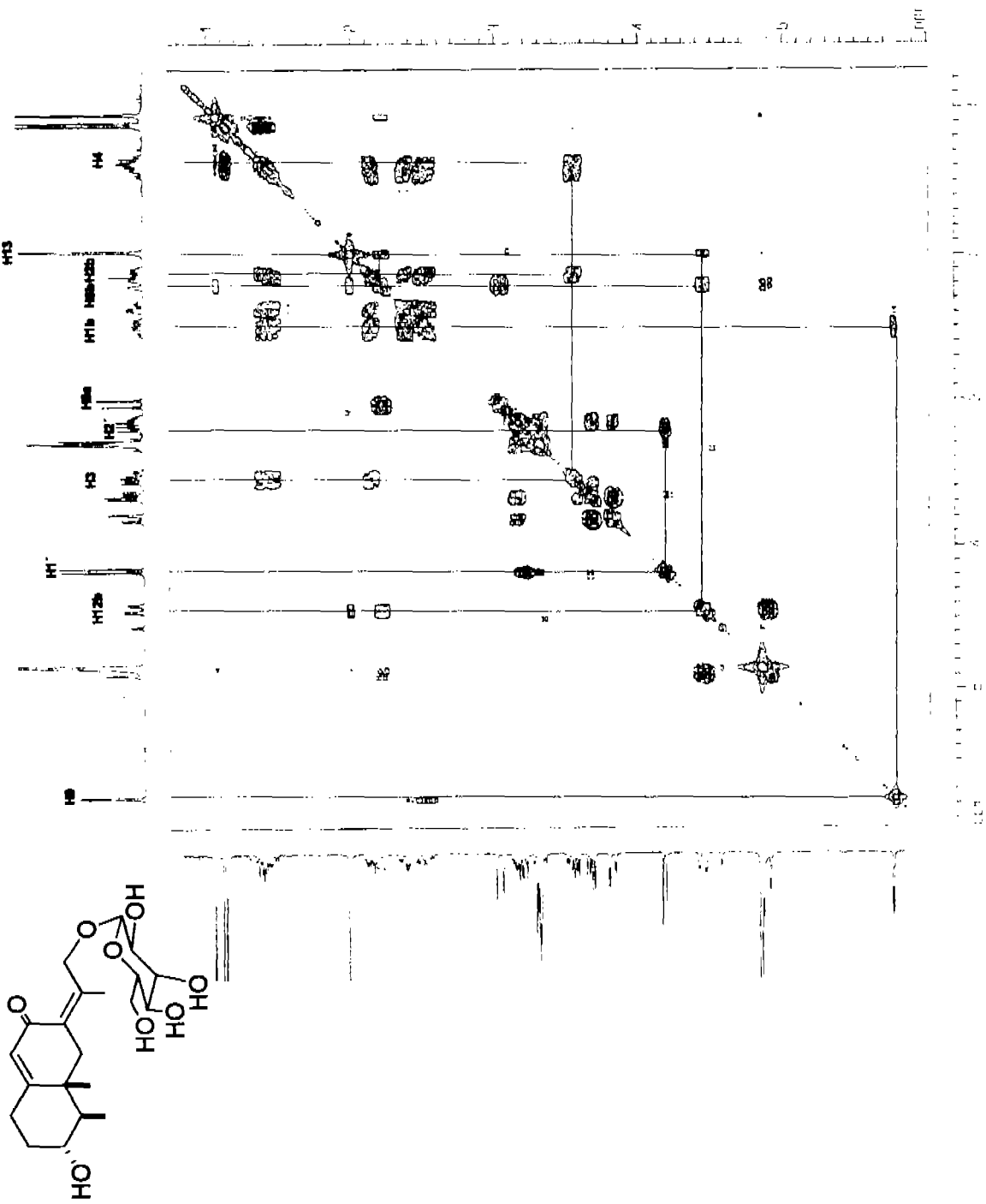
Espectro 2.2: RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 75.4 MHz) de 12-O-β-D-glucopiranosido de 3α-hidroxi-7(11),9-eremofiladien-8-ona (XI)



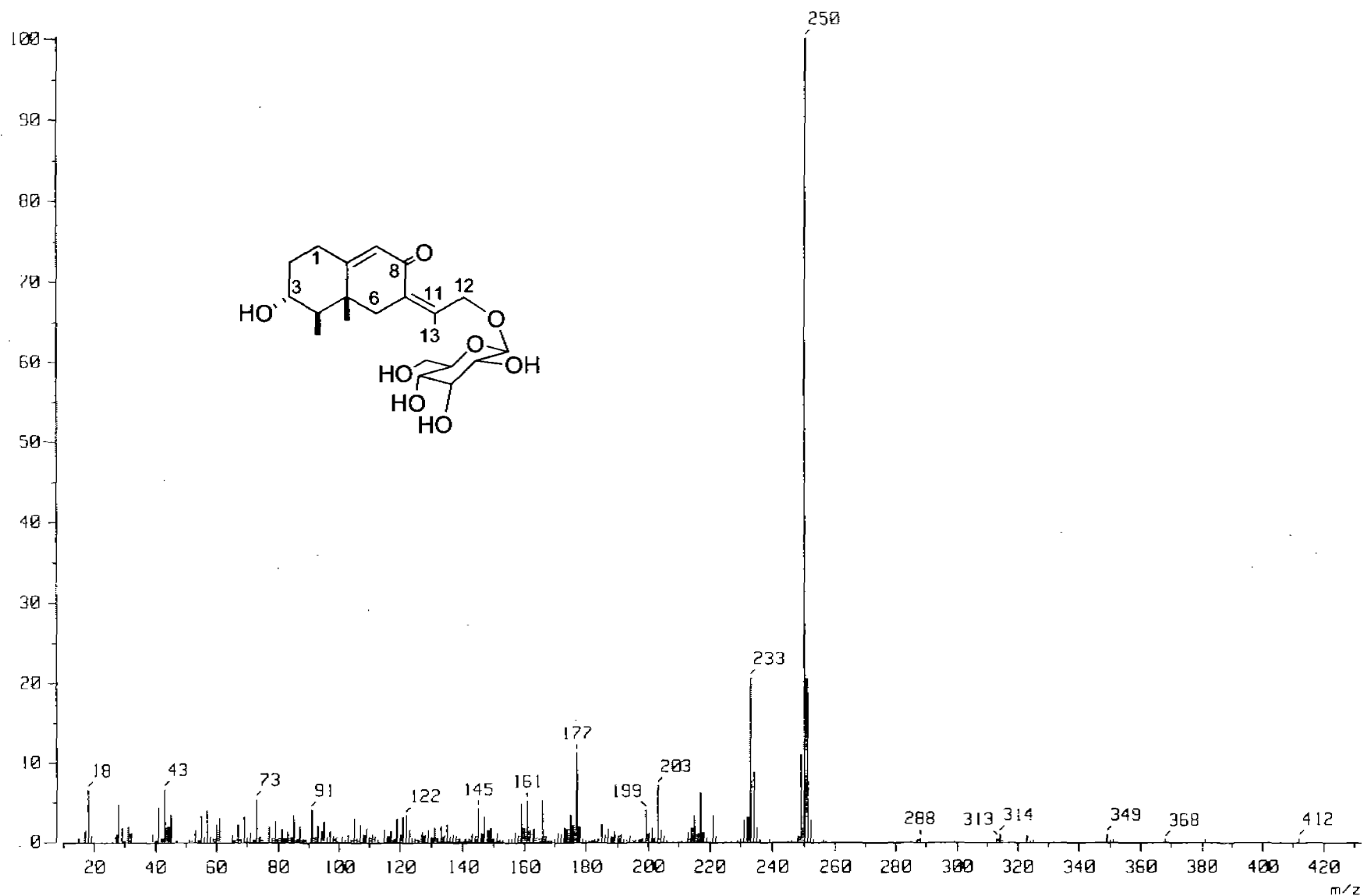
Espectro 2.3: DEPT (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) de 12-O-β-D-glucopiranósido de 3-α-hidroxi-7(11),9-eremofiladien-8-ona (XI)



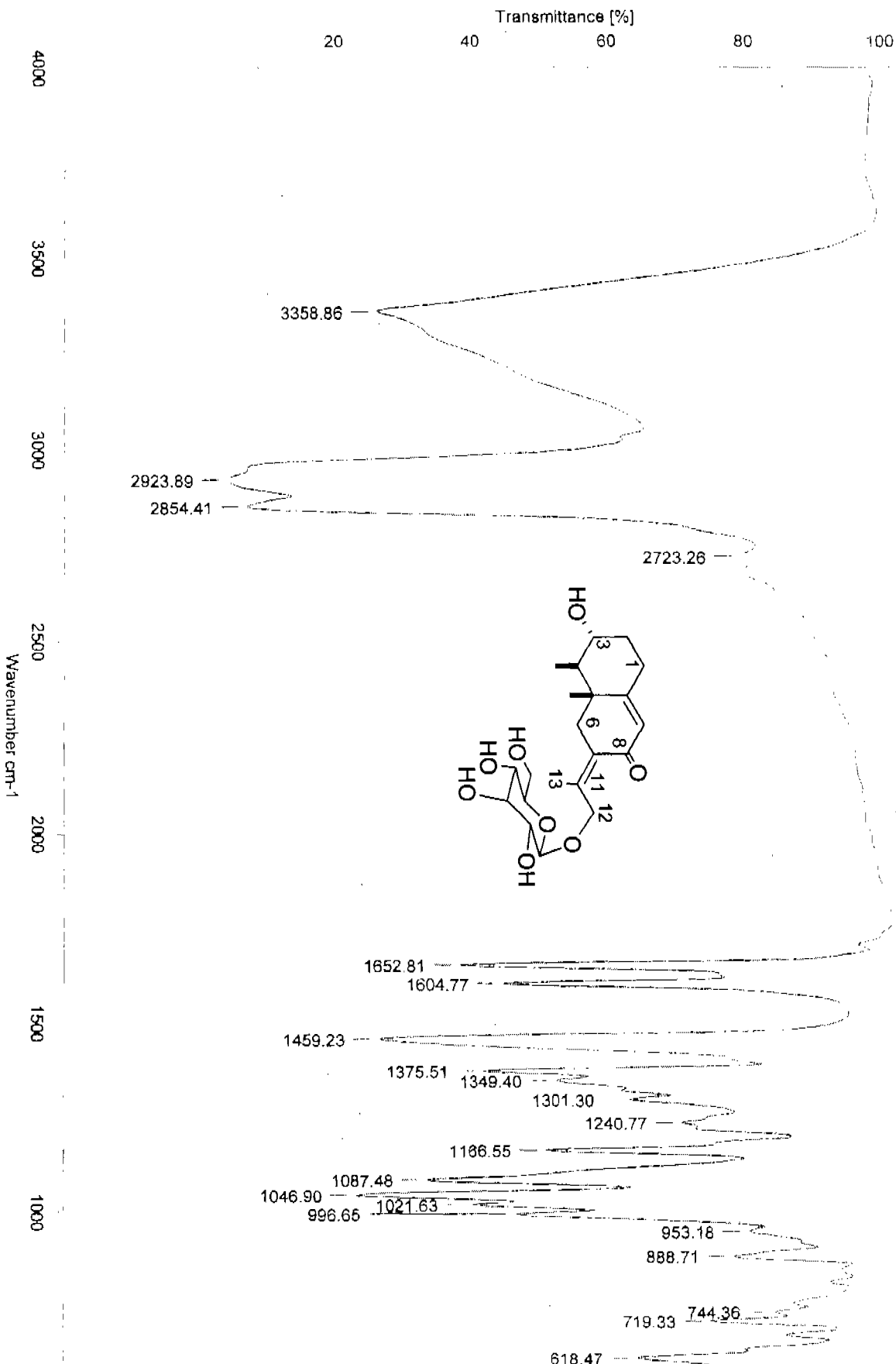
**Espectro 2.4:** Experimento HETCOR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) de 12-O- $\beta$ -D-glucopiranosido de 3 $\alpha$ -hidroxi-7(11),9-eremofiladien-8-ona (XI)

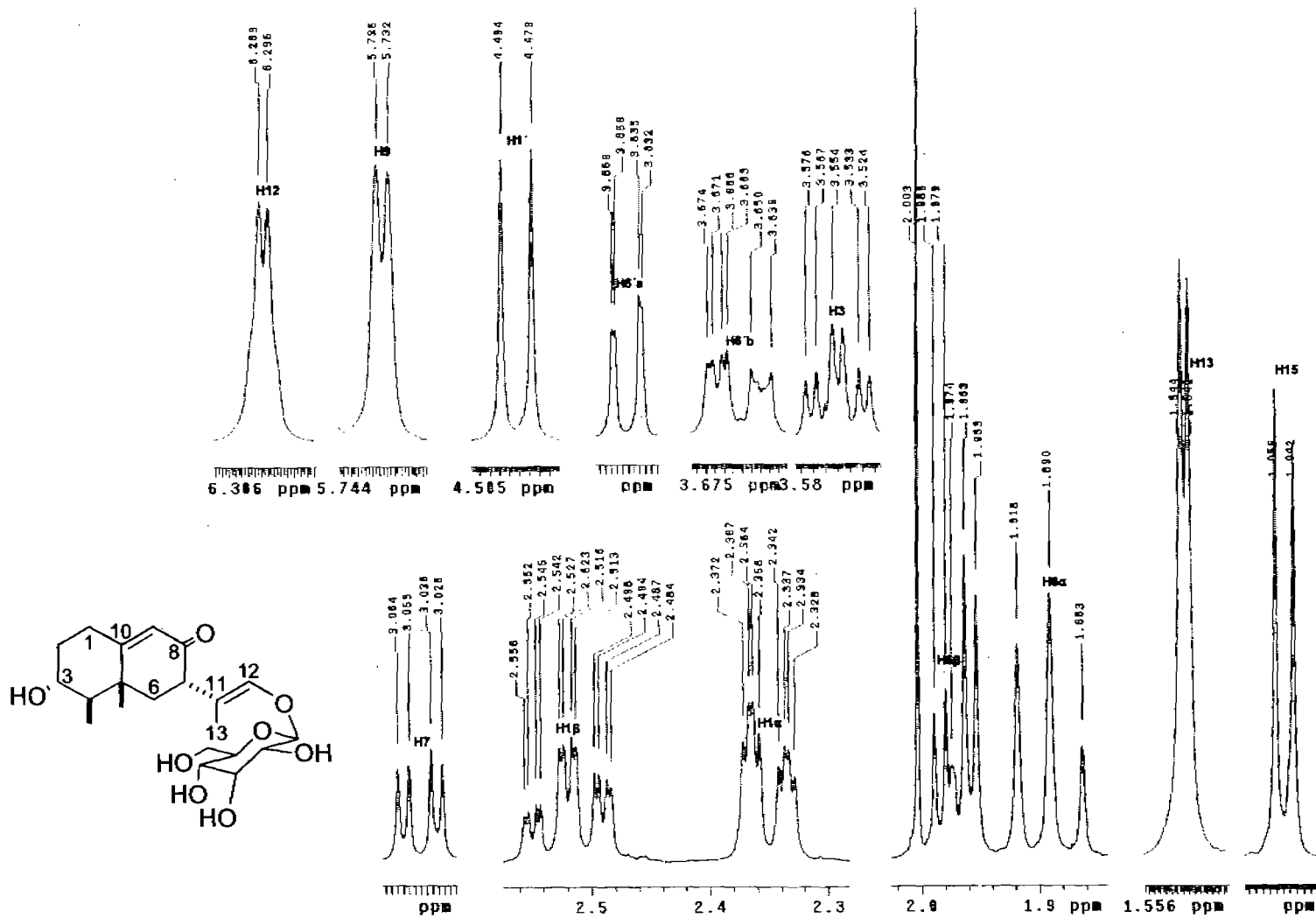


Espectro 2.5: Experimento COSY de 12-O- $\beta$ -D-glucopiranosido de 3 $\alpha$ -hidroxi-7(11),9-eremofiladien-8-ona (XI)



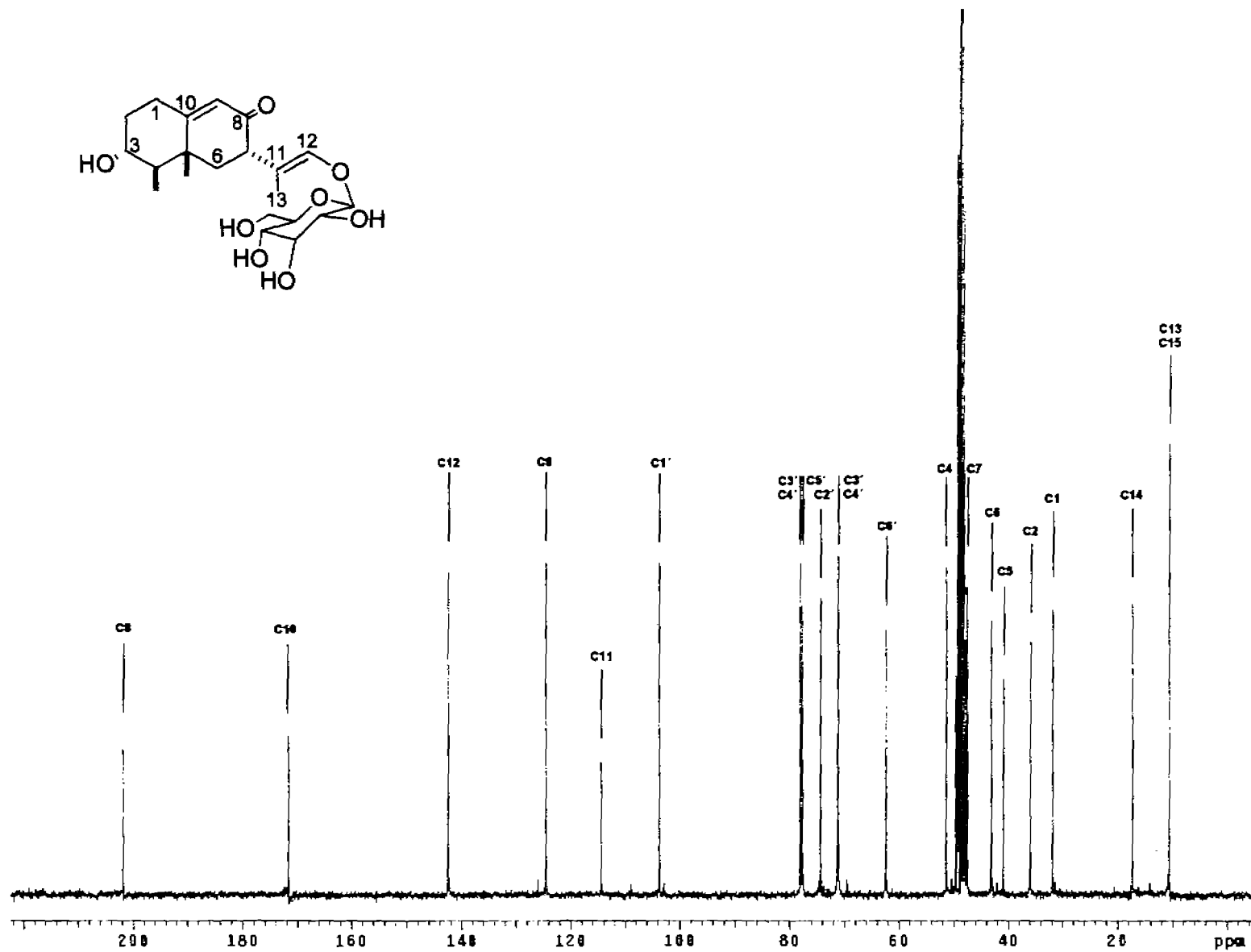
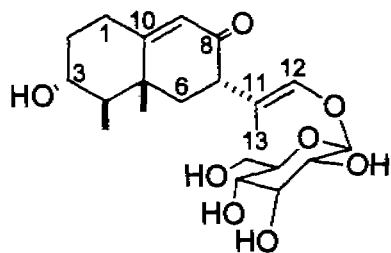
Espectro 2.9: IR de 12-O-β-D-glucopiranosido de 3α-hidroxi-7(11),9-eremofiladien-8-ona (XI)



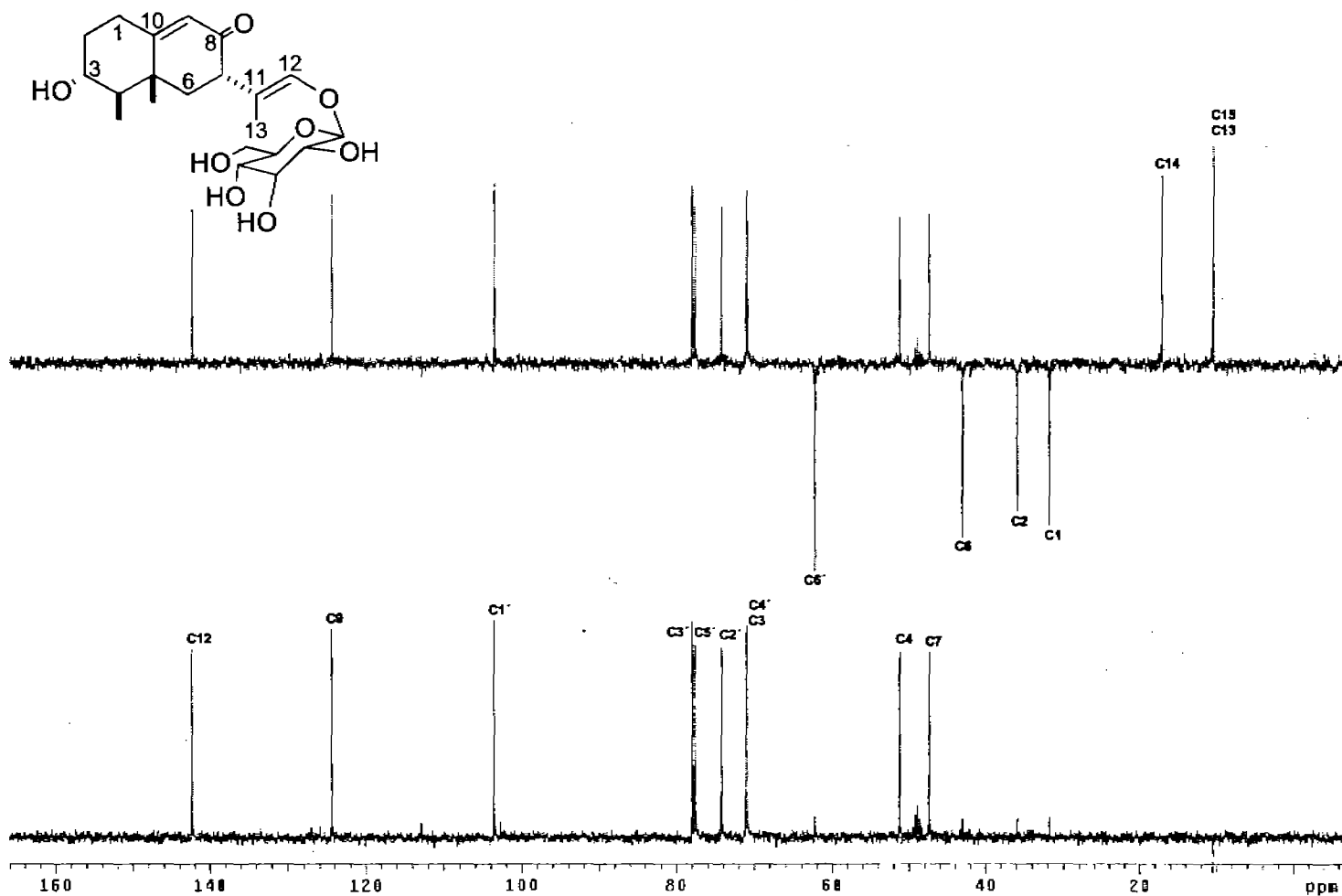


Espectro 3.1.1: RMN  $^1\text{H}$  (ampliación) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de 12-O-β-D-glucopiranosido de 3-α-hidroxi-9,11-eremofiladien-8-ona (XII)

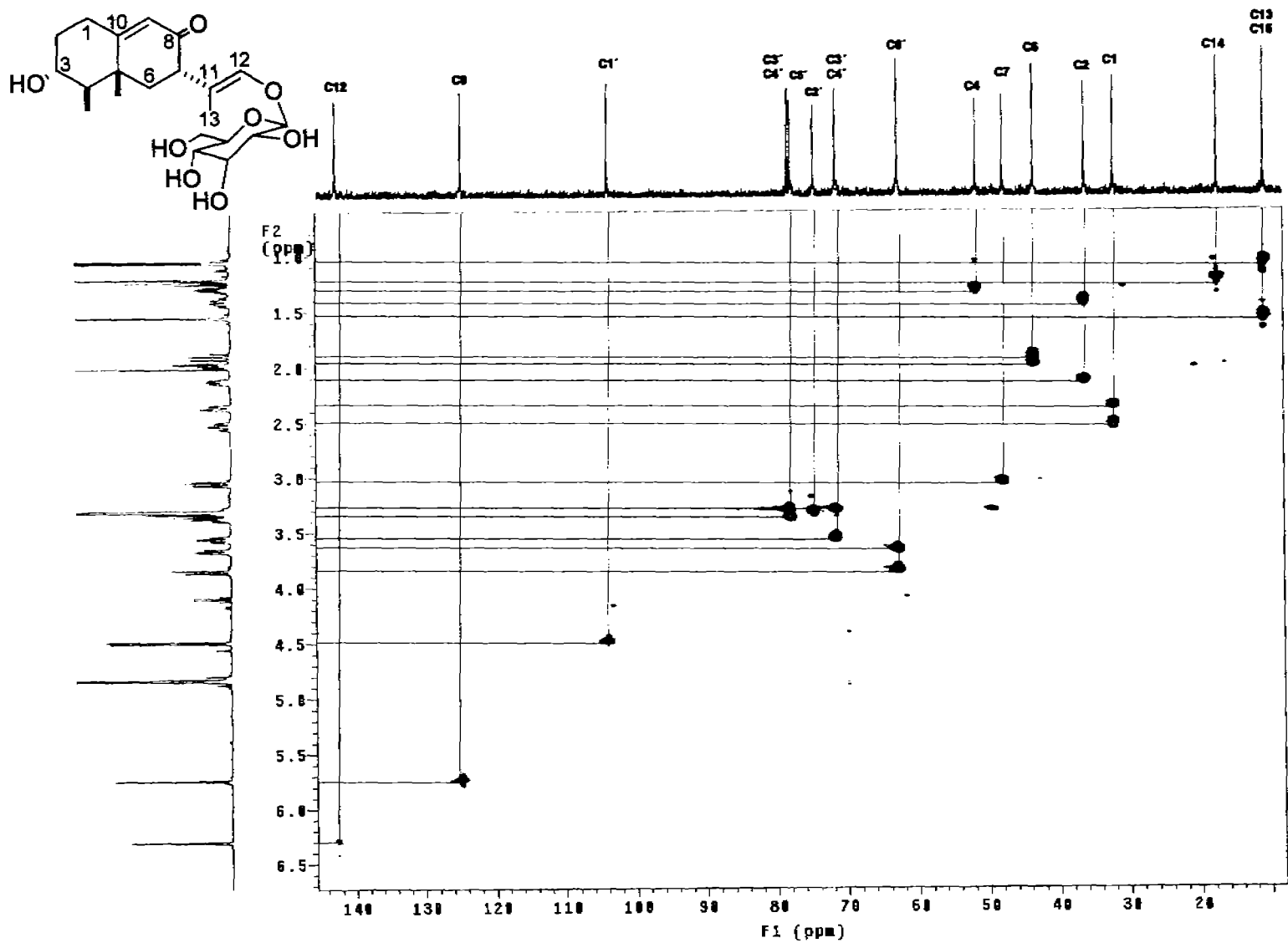




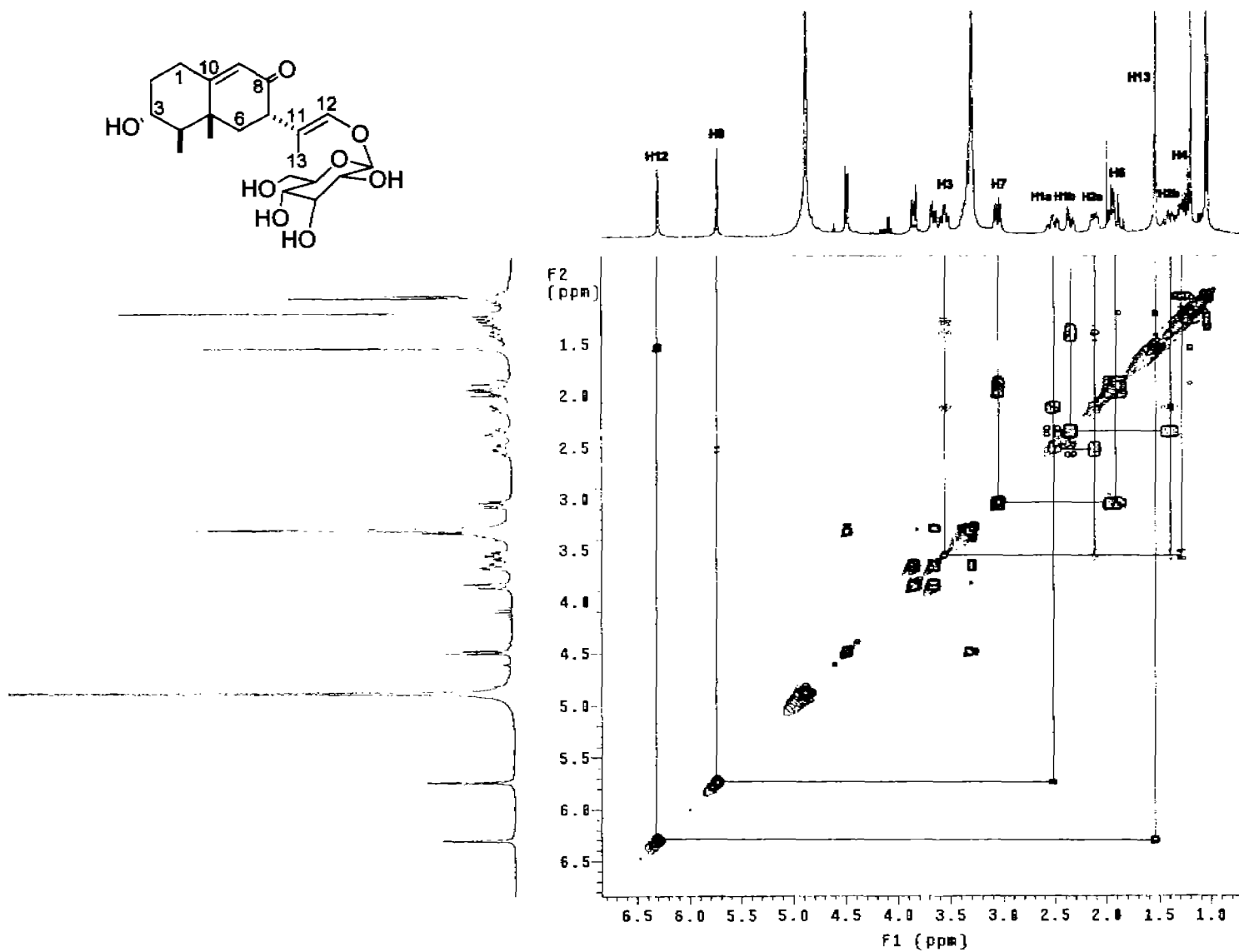
Espectro 3.2: RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de 12-O- $\beta$ -D-glucopiranosido de 3 $\alpha$ -hidroxi-9,11-eremofiladien-8-ona (XII)



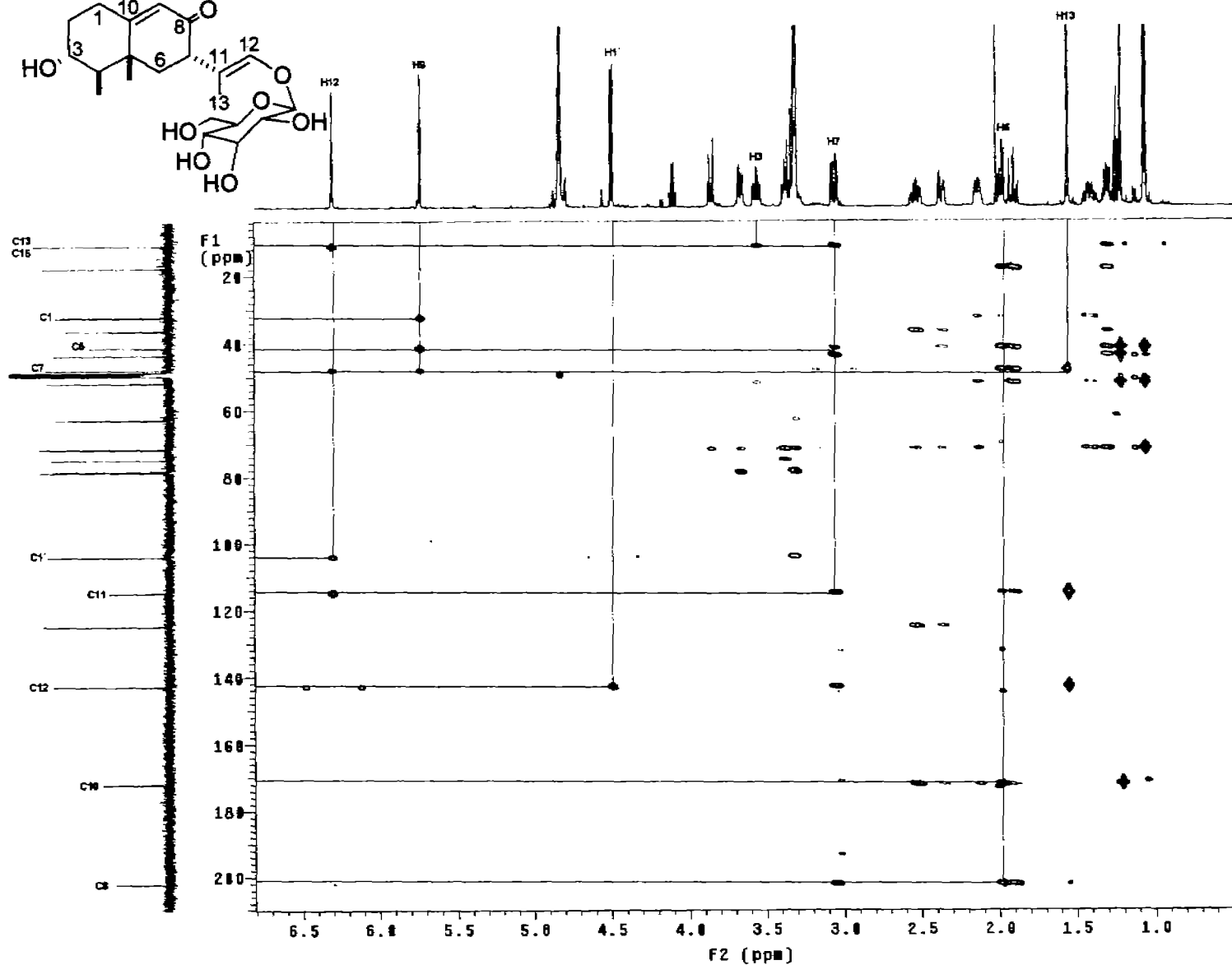
Espectro 3.3: DEPT (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) de 12-O-β-D-glucopiranosido de 3α-hidroxi-9,11-eremofiladien-8-ona (XII)



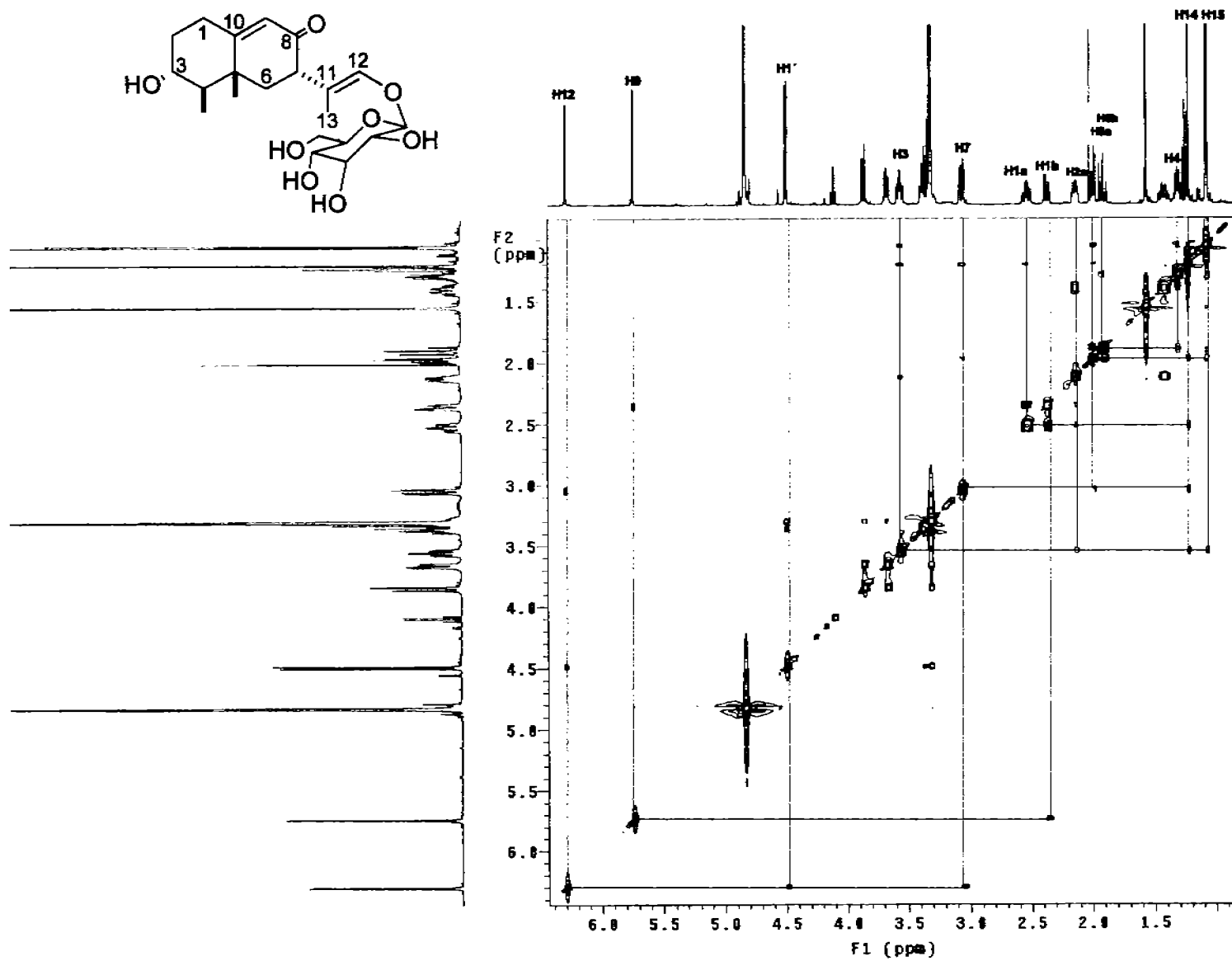
Espectro 3.4: Experimento HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) de 12-O-β-D-glucopiranosido de 3α-hidroxi-9,11-eremofiladien-8-ona (XII)



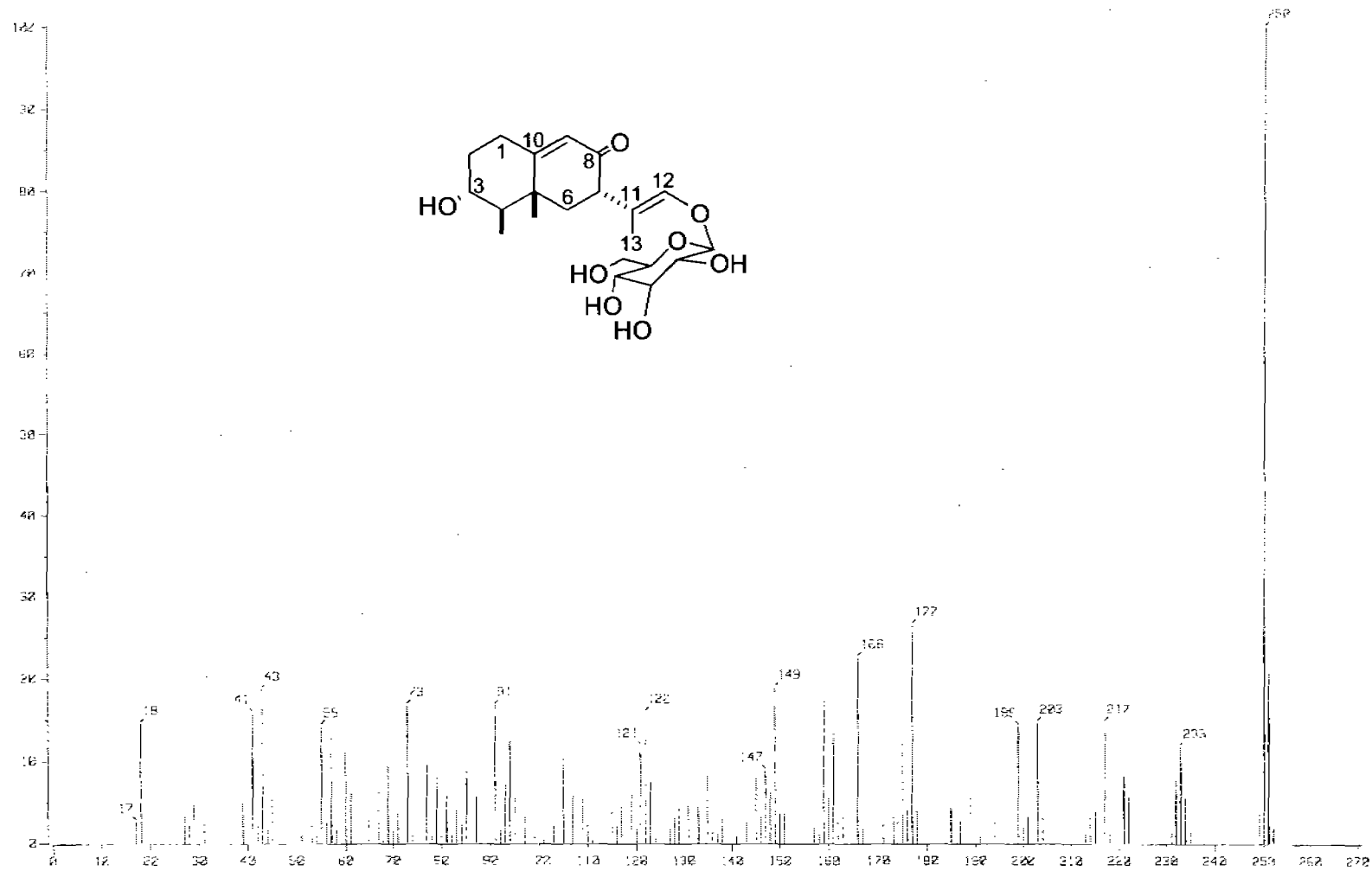
Espectro 3.5: Experimento COSY (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) de 12-O-β-D-glucopiranosido de 3-α-hidroxi-9,11-eremofiladien-8-ona (XII)



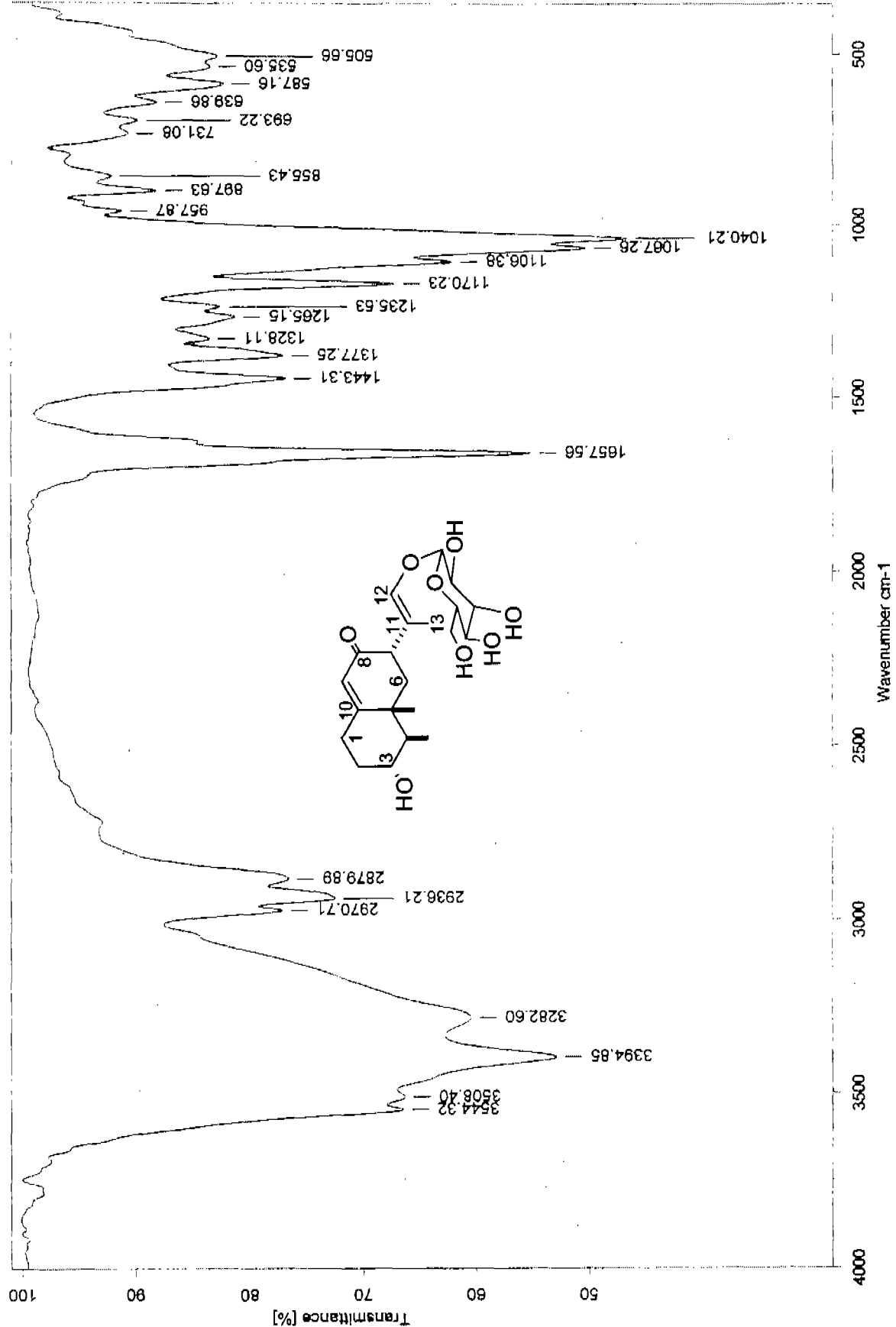
Espectro 3.6: Experimento HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) de 12-O-β-D-glucopiranosido de 3α-hidroxi-9,11-eremofiladien-8-ona (XII)



Espectro 3.7: Experimento NOESY (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) de 12-O-β-D-glucopiranosido de 3α-hidroxi-9,11-eremofiladien-8-ona (XII)

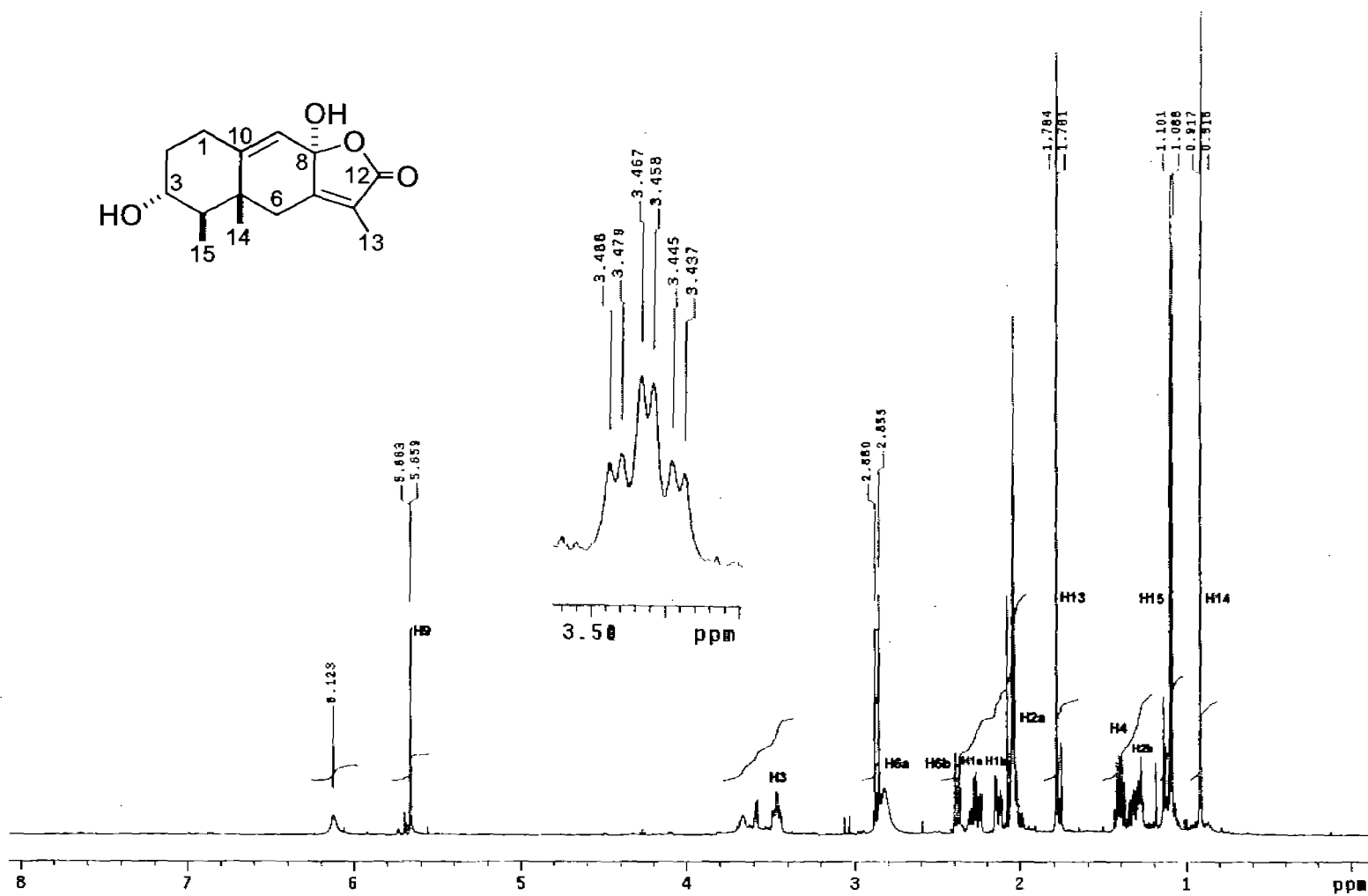


**Espectro 3.8: MASAS IE de 12-O-β-D-glucopiranósido de 3α-hidroxi-9,11-eremofiladien-8-ona (XII)**

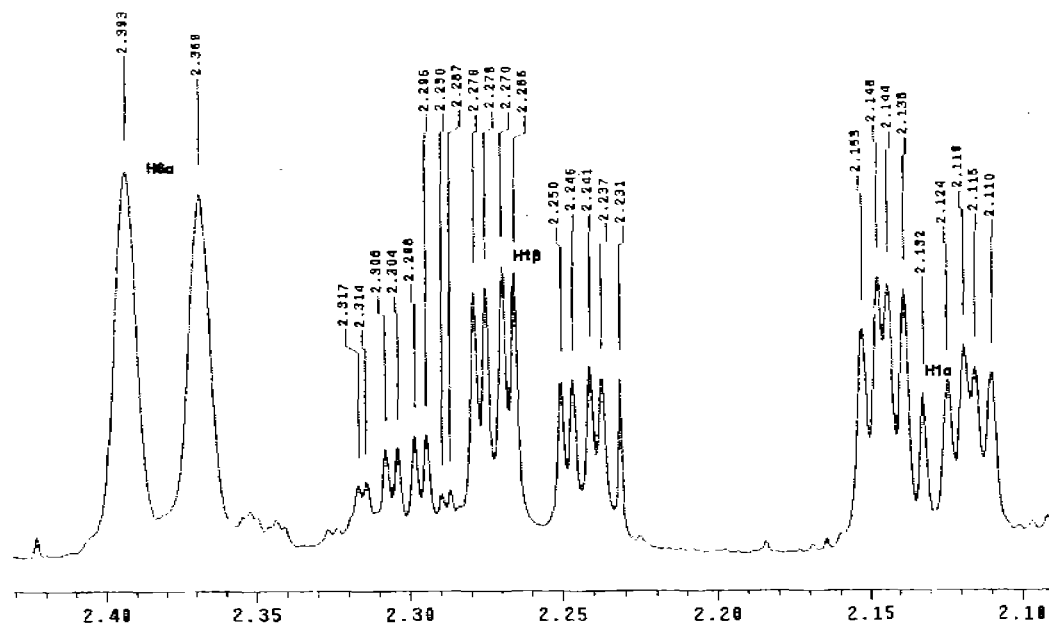
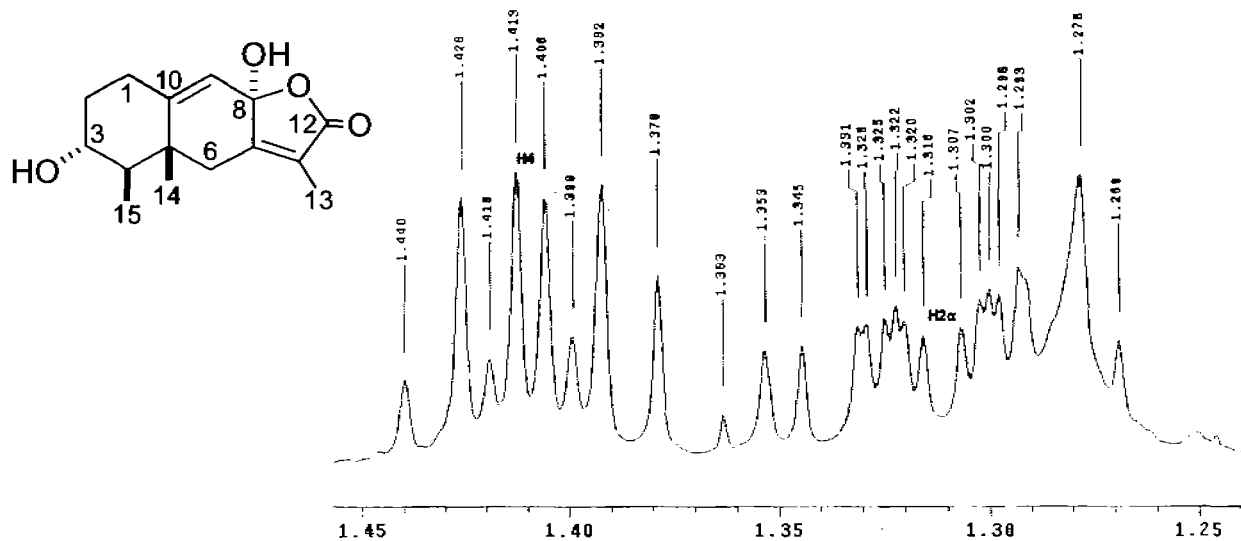


Espectro 3.9: IR de 12-O-β-D-glucopiranosido de 3α-hidroxi-9,11-eremofiladien-8-ona (XII)

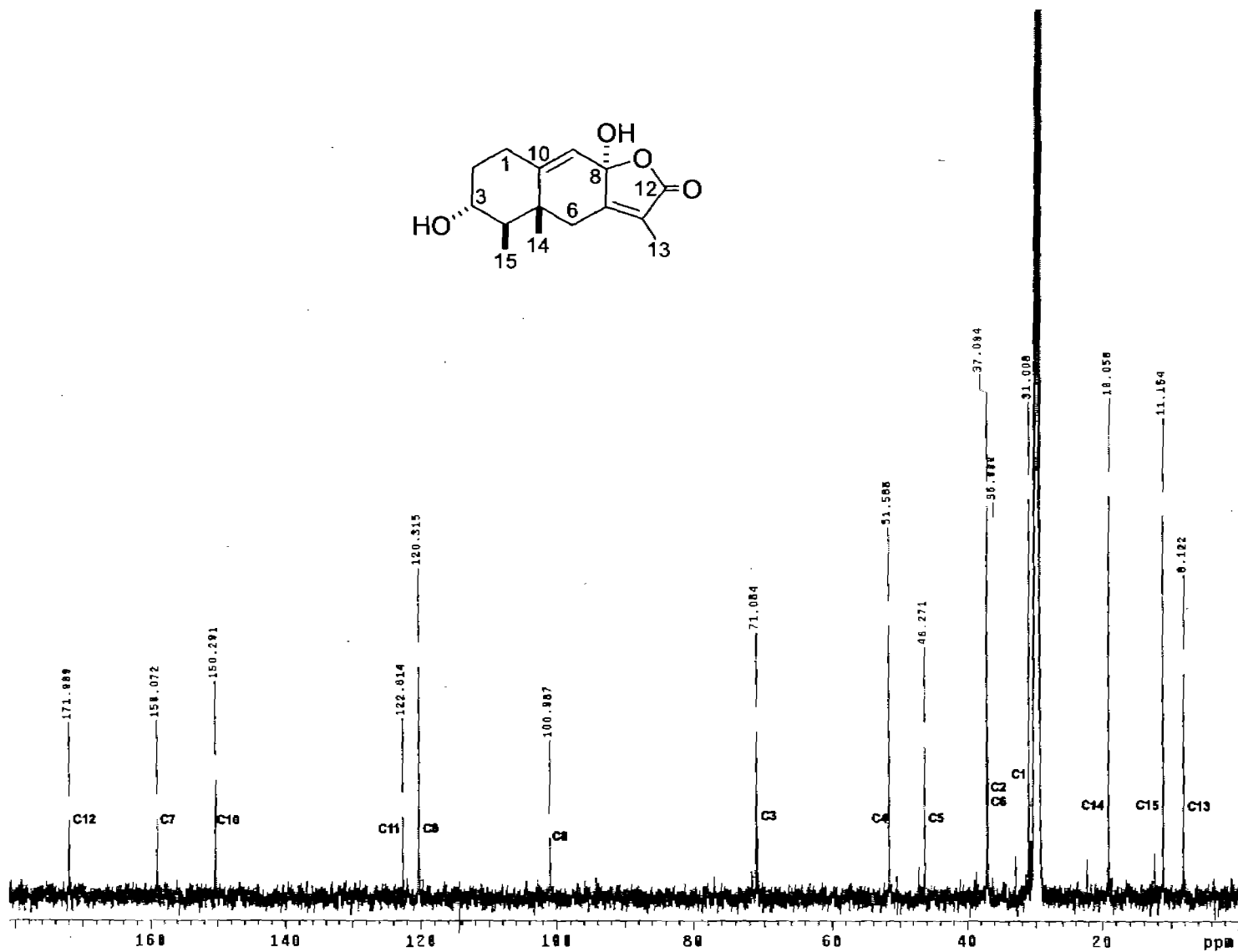
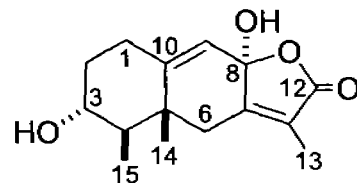




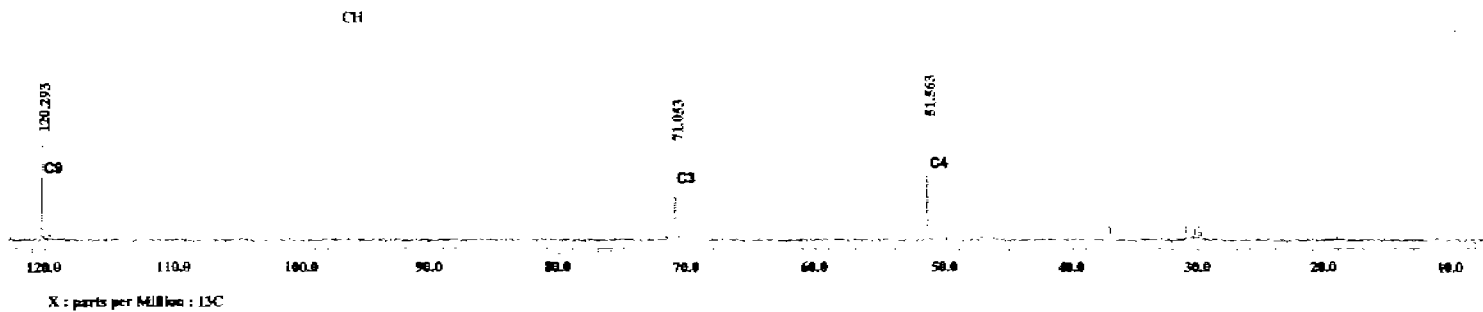
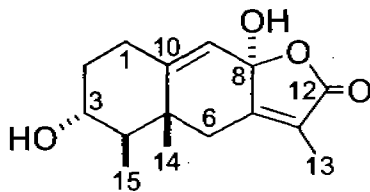
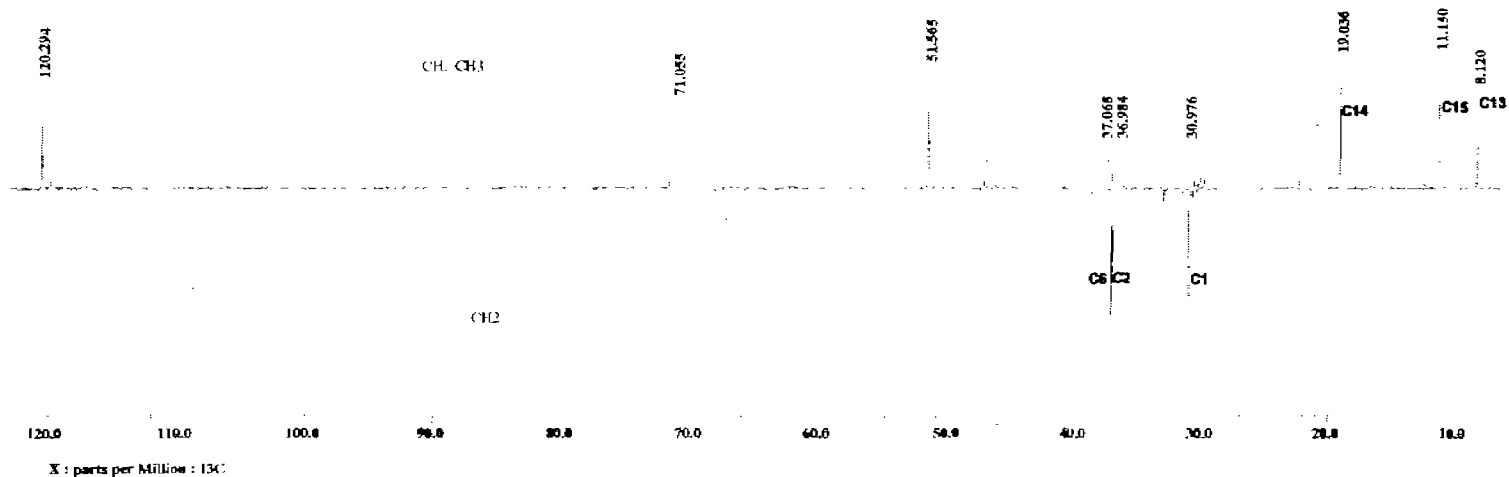
Espectro 4.1 RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$ , 500 MHz) de 3 $\alpha$ -8 $\alpha$ -dihidroxi-7(11),9-eremofiladien-12,8-olida (XIII)



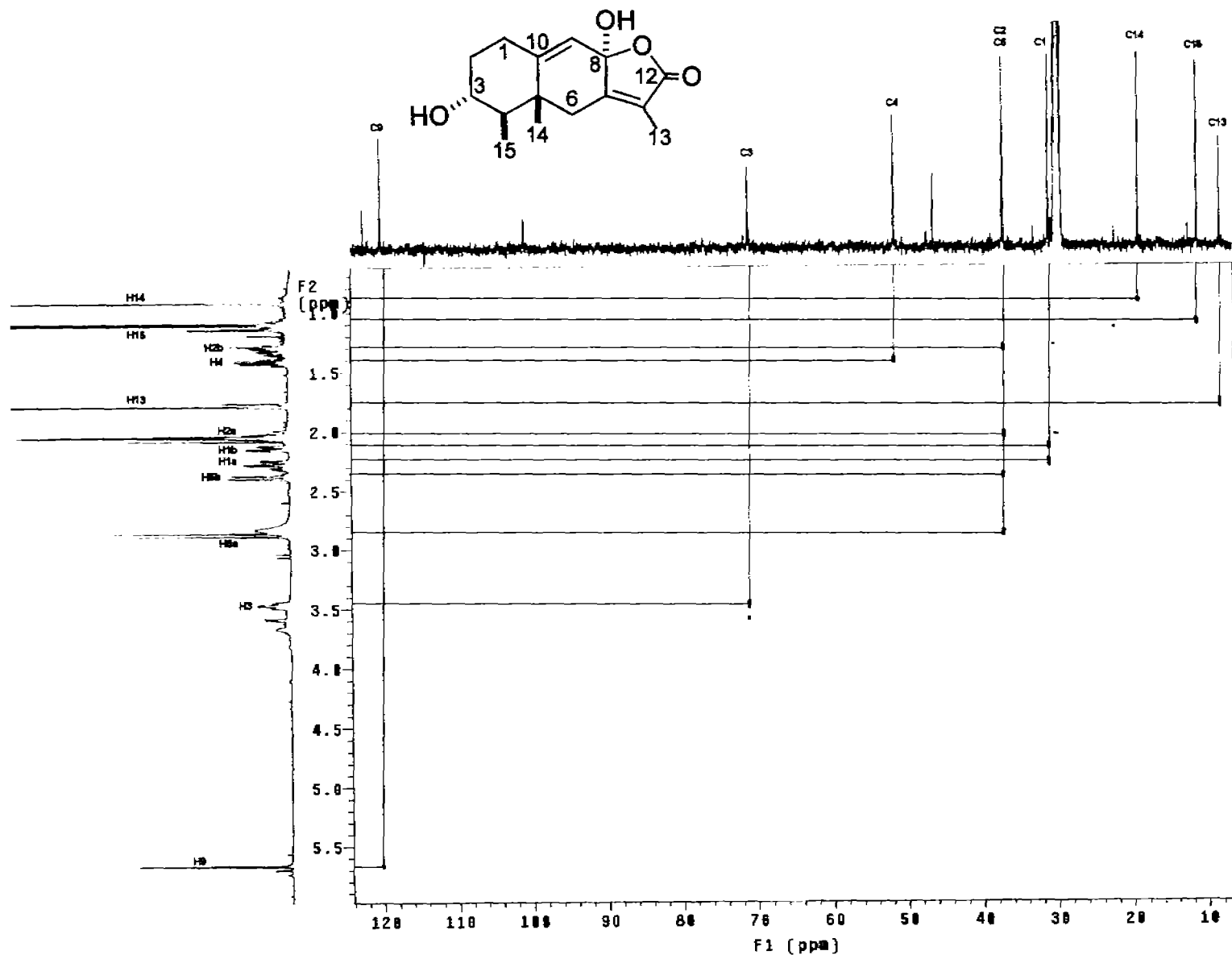
Espectro 4.1.1 RMN  $^1\text{H}$  (ampliación) ( $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$ , 500 MHz) de 3 $\alpha$ -8 $\alpha$ -dihidroxi-7(11),9-eremofiladien-12,8-olida (XIII)



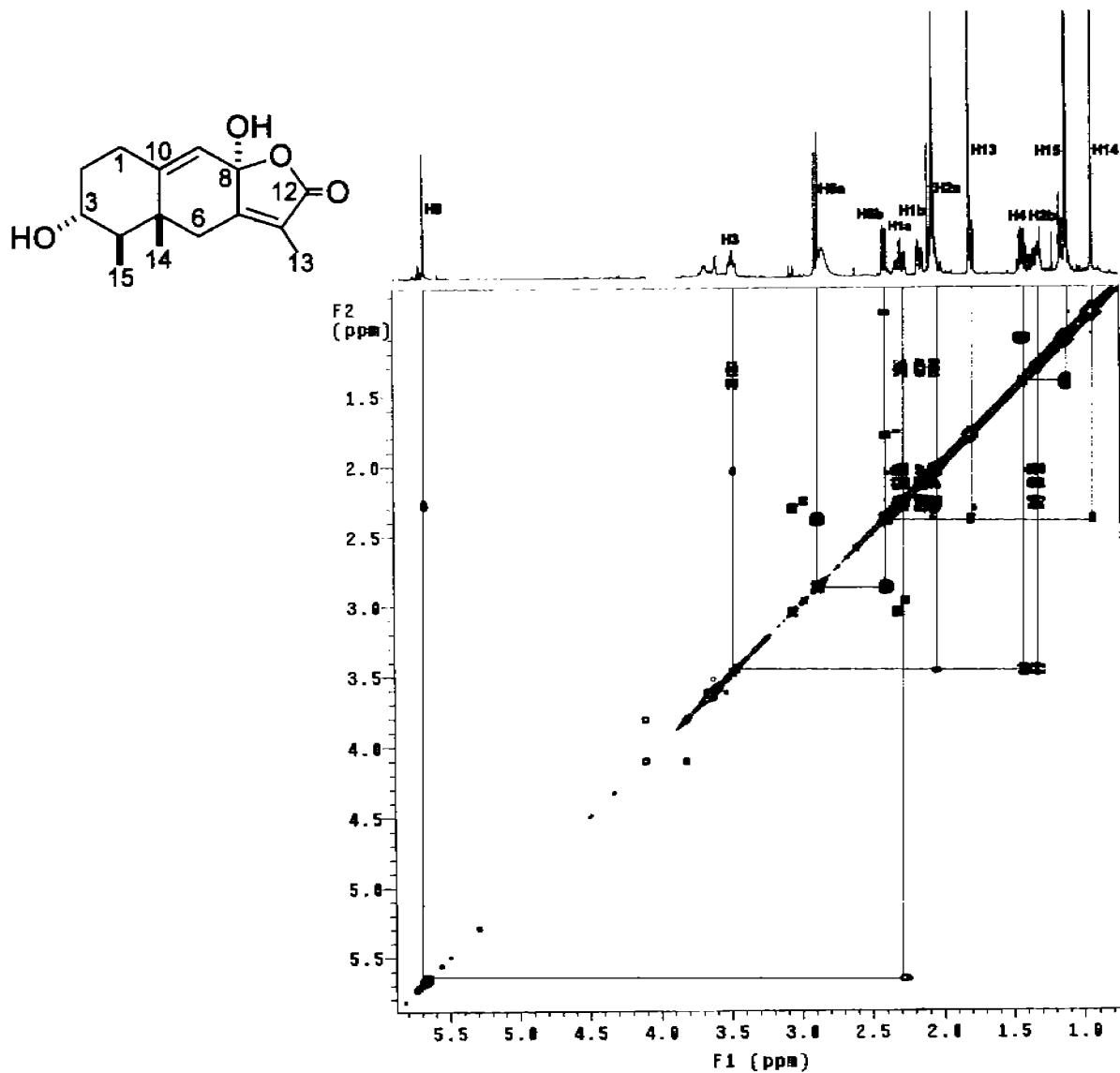
Espectro 4.2: RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{Me}_2\text{CO-d}_6$ , 125 MHz) de 3 $\alpha$ -8 $\alpha$ -dihidroxi-7(11),9-eremofiladien-12,8-olida (XIII)



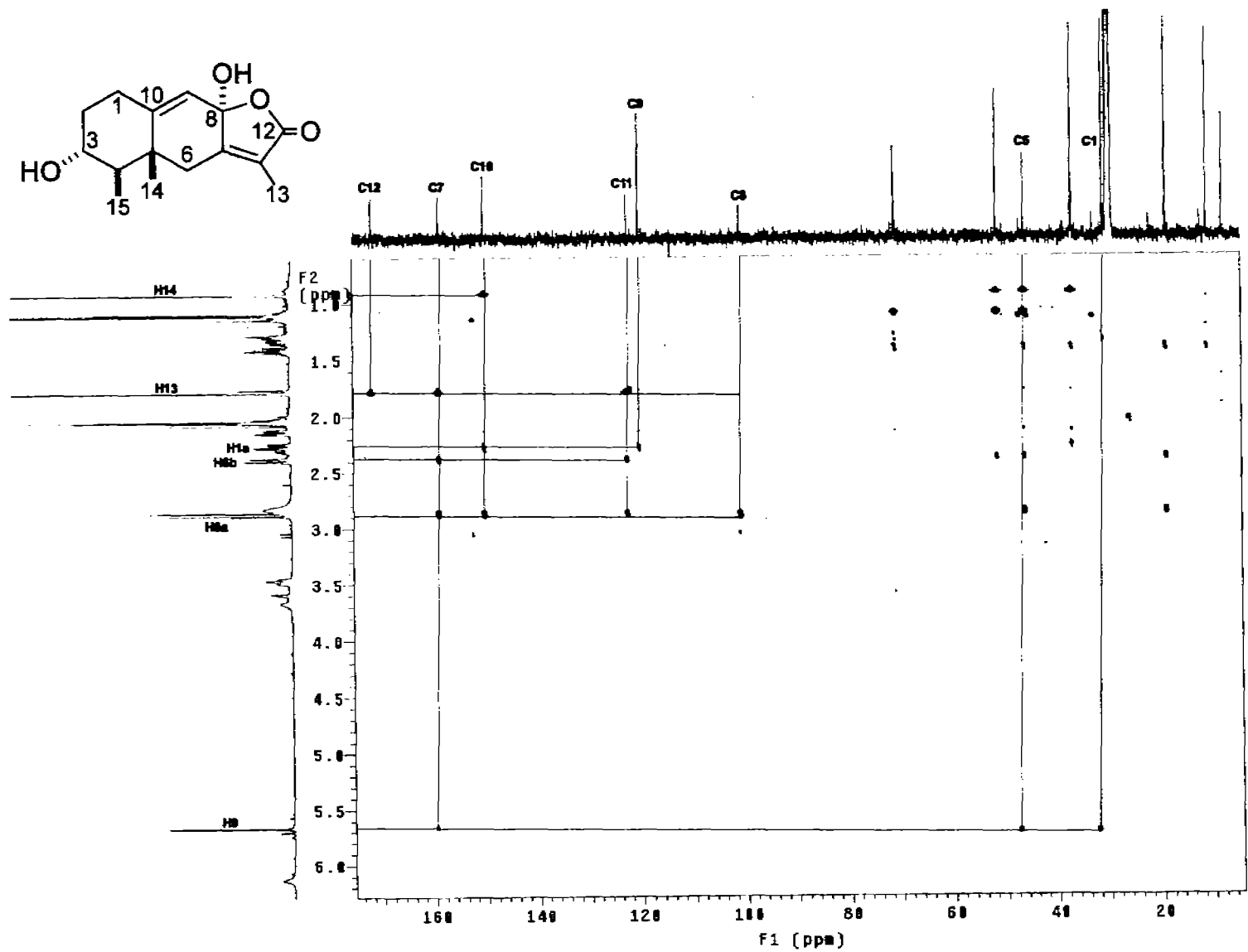
Espectro 4.3 DEPT ( $\text{Me}_2\text{CO}d_6$ , 500 MHz) de  $3\alpha$ - $8\alpha$ -dihidroxi-7(11),9-eremofiladien-12,8-olida (XIII)



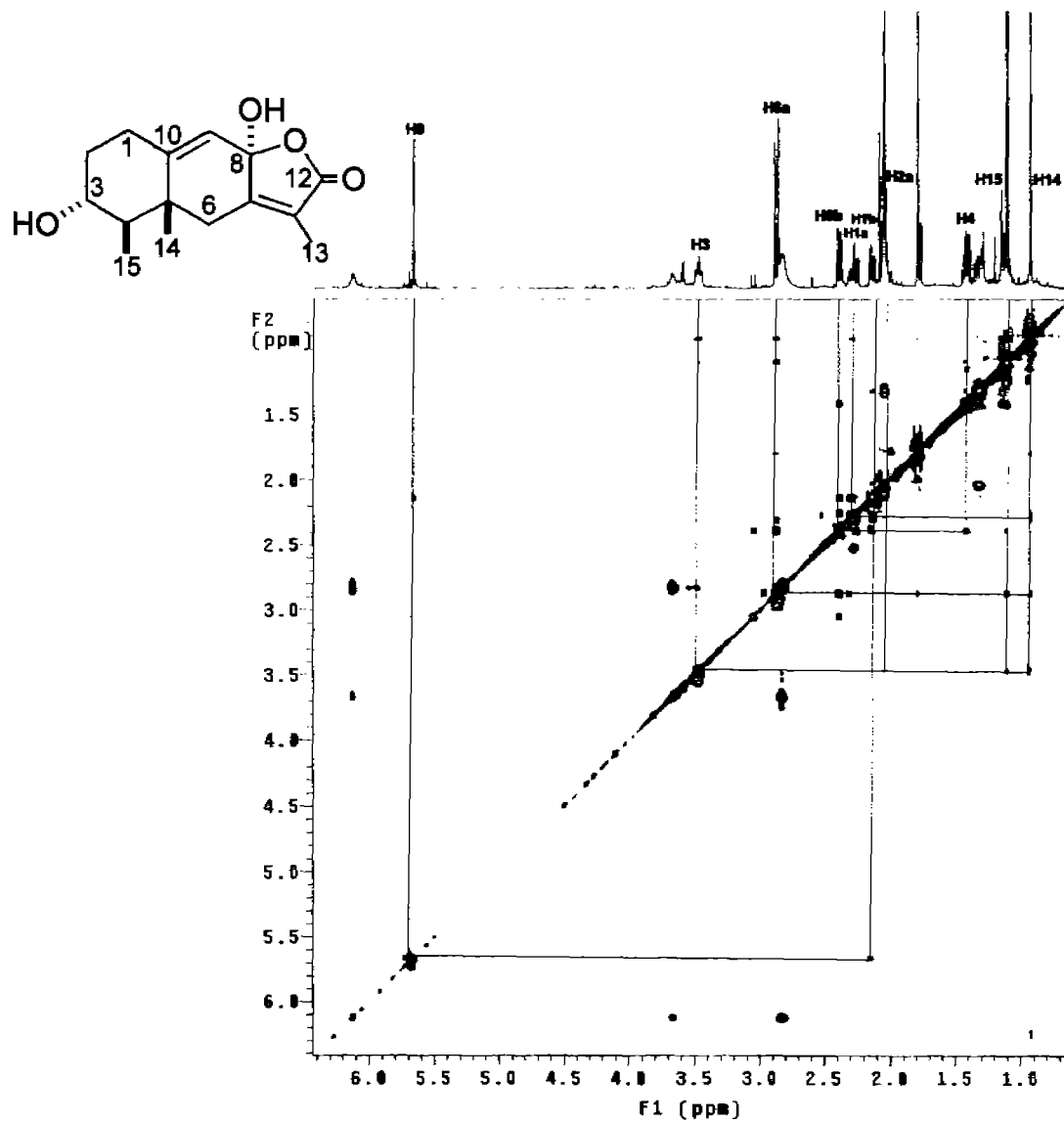
Espectro 4.4: Experimento HSQC (Me<sub>2</sub>CO-d<sub>6</sub>, 500 MHz) de 3 $\alpha$ -8 $\alpha$ -dihidroxi-7(11),9-eremofiladien-12,8-olida (XIII)



Espectro 4.5: Experimento COSY (Me<sub>2</sub>CO-d<sub>6</sub>, 500 MHz) de 3 $\alpha$ -8 $\alpha$ -dihidroxi-7(11),9-eremofiladien-12,8-olida (XIII)

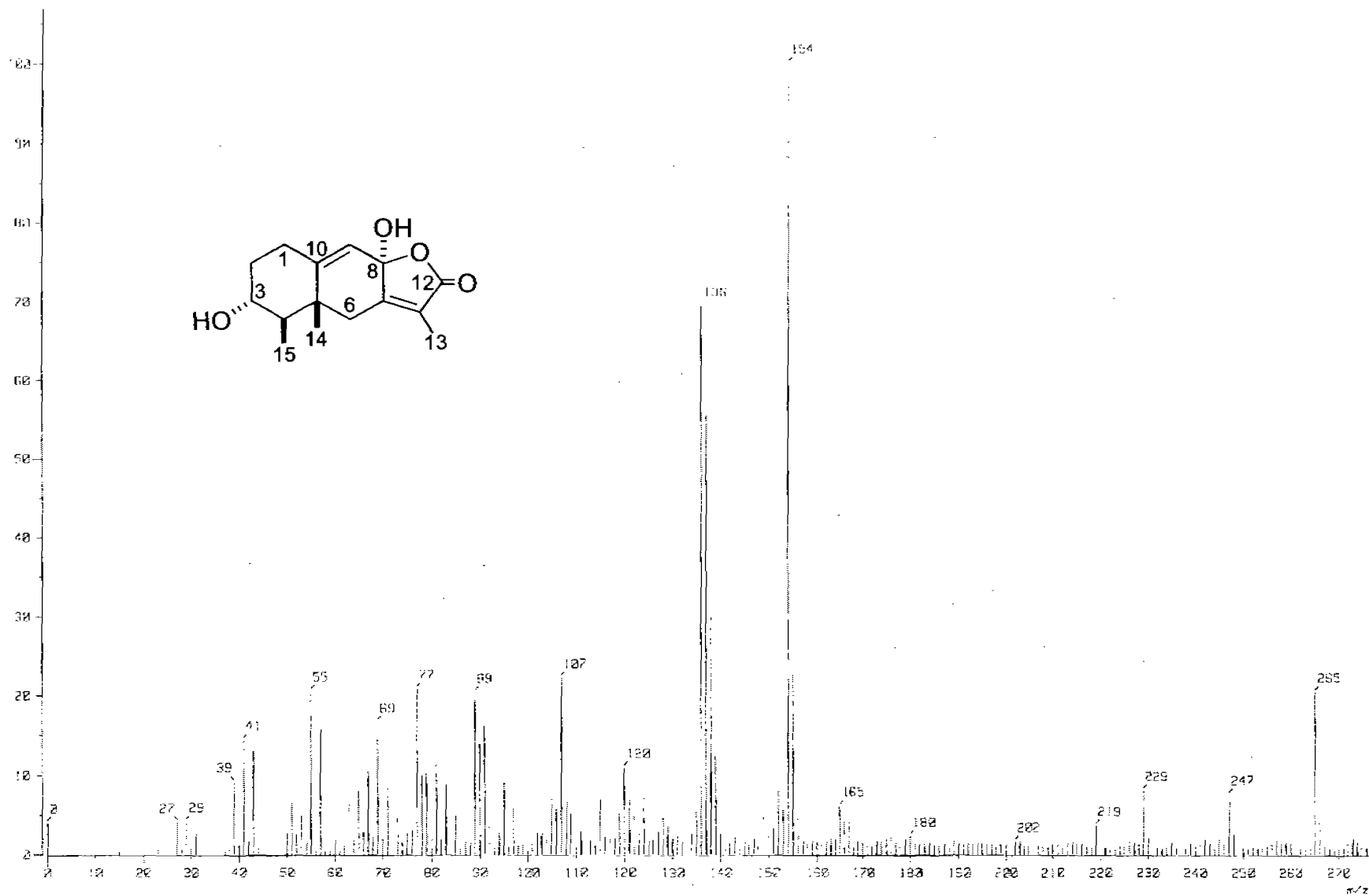


Espectro 4.6: Experimento HMBC (Me<sub>2</sub>CO-d<sub>6</sub>, 500 MHz) de 3 $\alpha$ -8 $\alpha$ -dihidroxi-7(11),9-eremofiladien-12,8-olida (XIII)



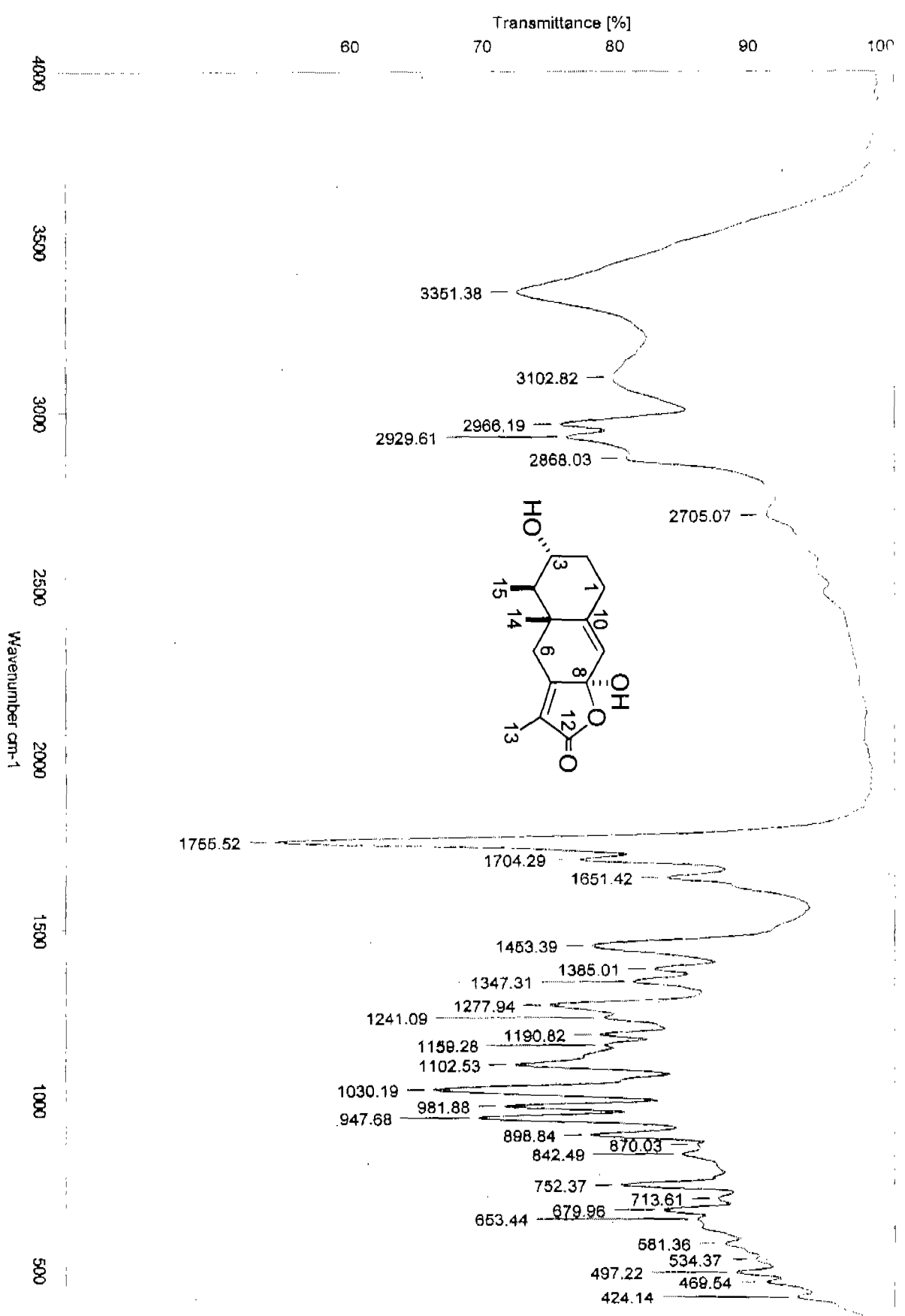
Espectro 4.7: Experimento NOESY RMN ( $\text{Me}_2\text{CO}d_6$ , 500 MHz) de  $3\alpha$ - $8\alpha$ -dihidroxi-7(11),9-eremofiladien-12,8-olida (XIII)

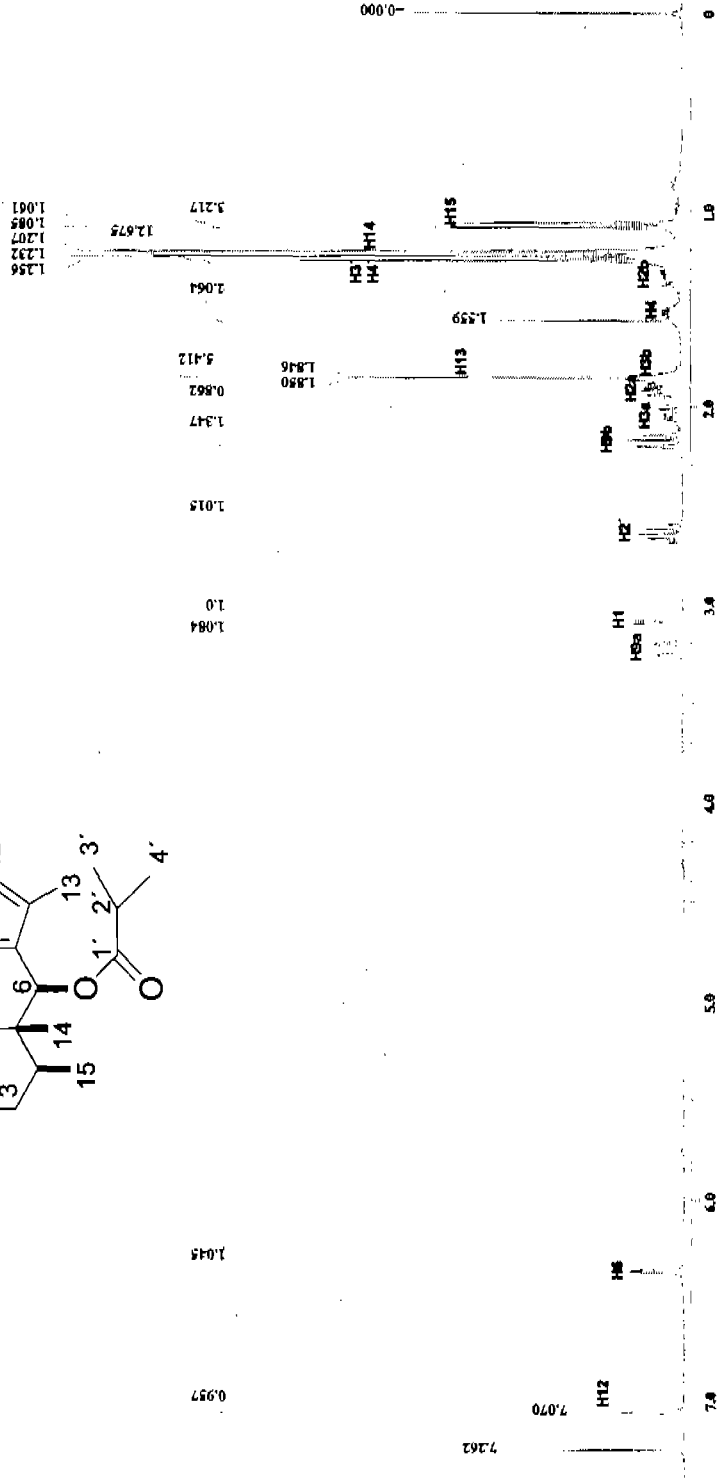
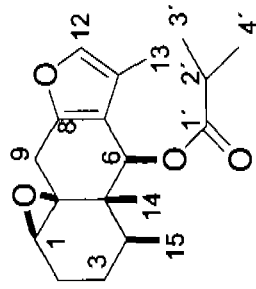




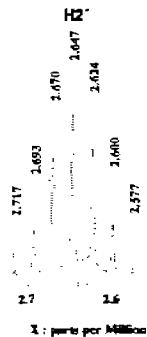
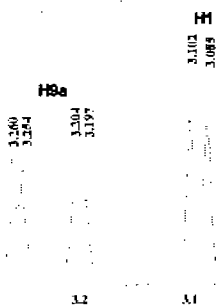
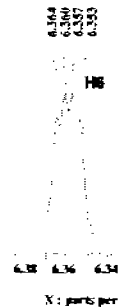
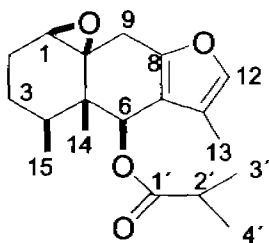
Espectro 4.8: MASAS IE de 3 $\alpha$ -8 $\alpha$ -dihidroxi-7(11),9-eremofiladien-12,8-olida (XIII)

Espectro 4.9: IR de 3 $\alpha$ -8 $\alpha$ -dihidroxi-7(11),9-eremofiladien-12,8-olida (XIII)

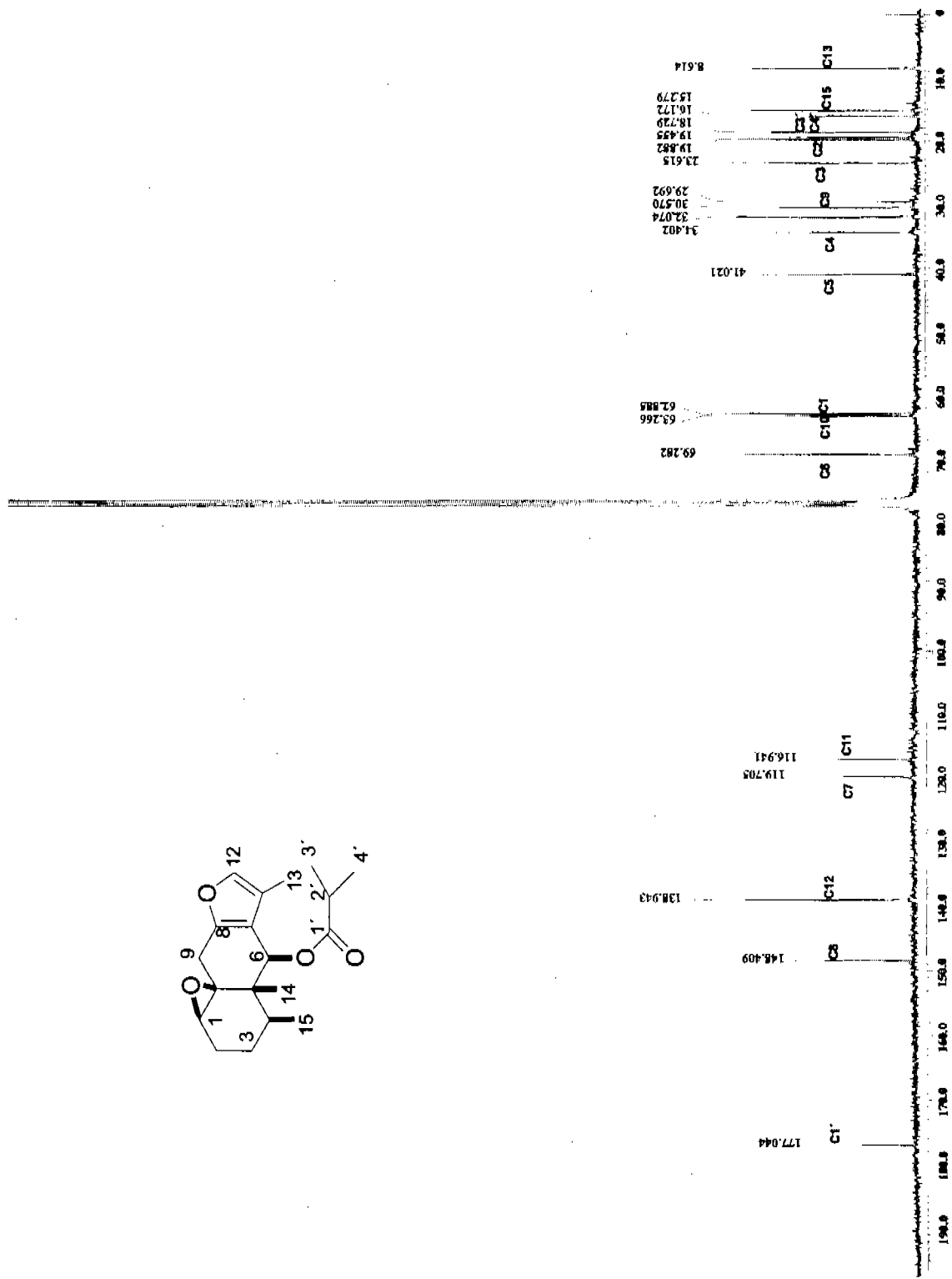
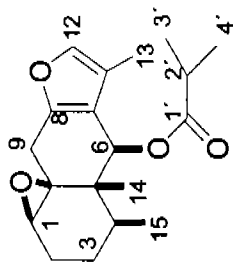




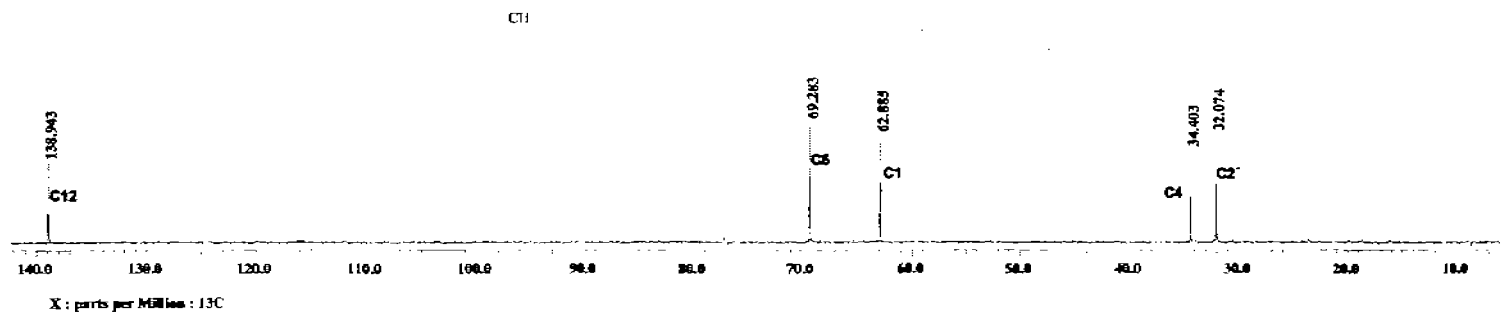
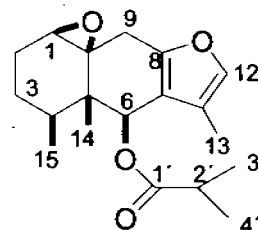
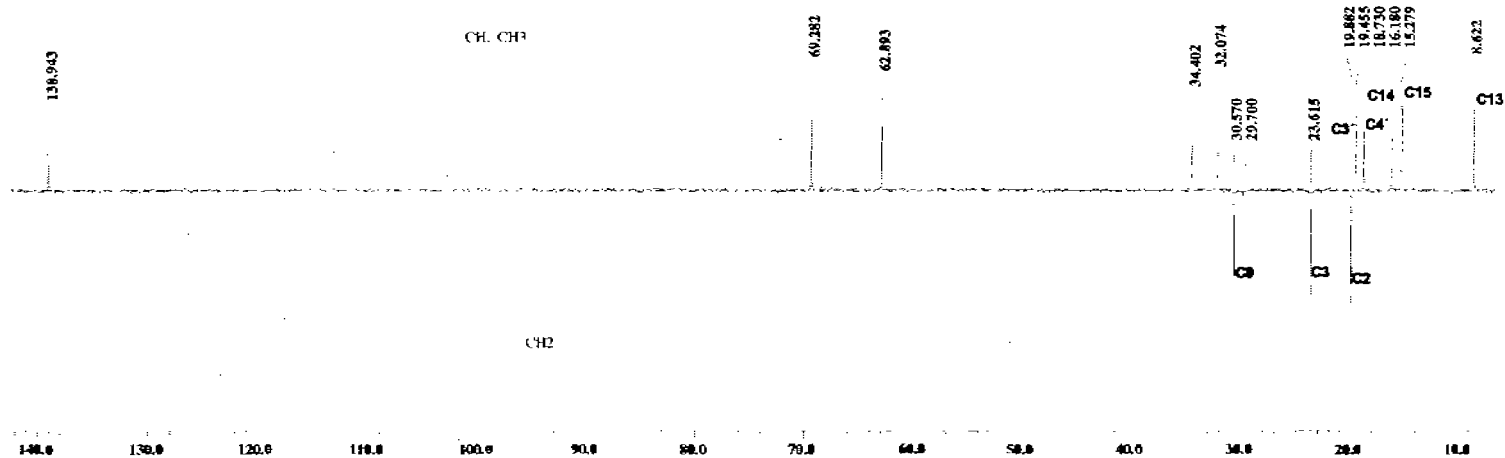
Espectro 5.1: RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de 6 $\beta$ -isobutiriloxi-1,10 $\beta$ -epoxifuranocremofilano (IV)



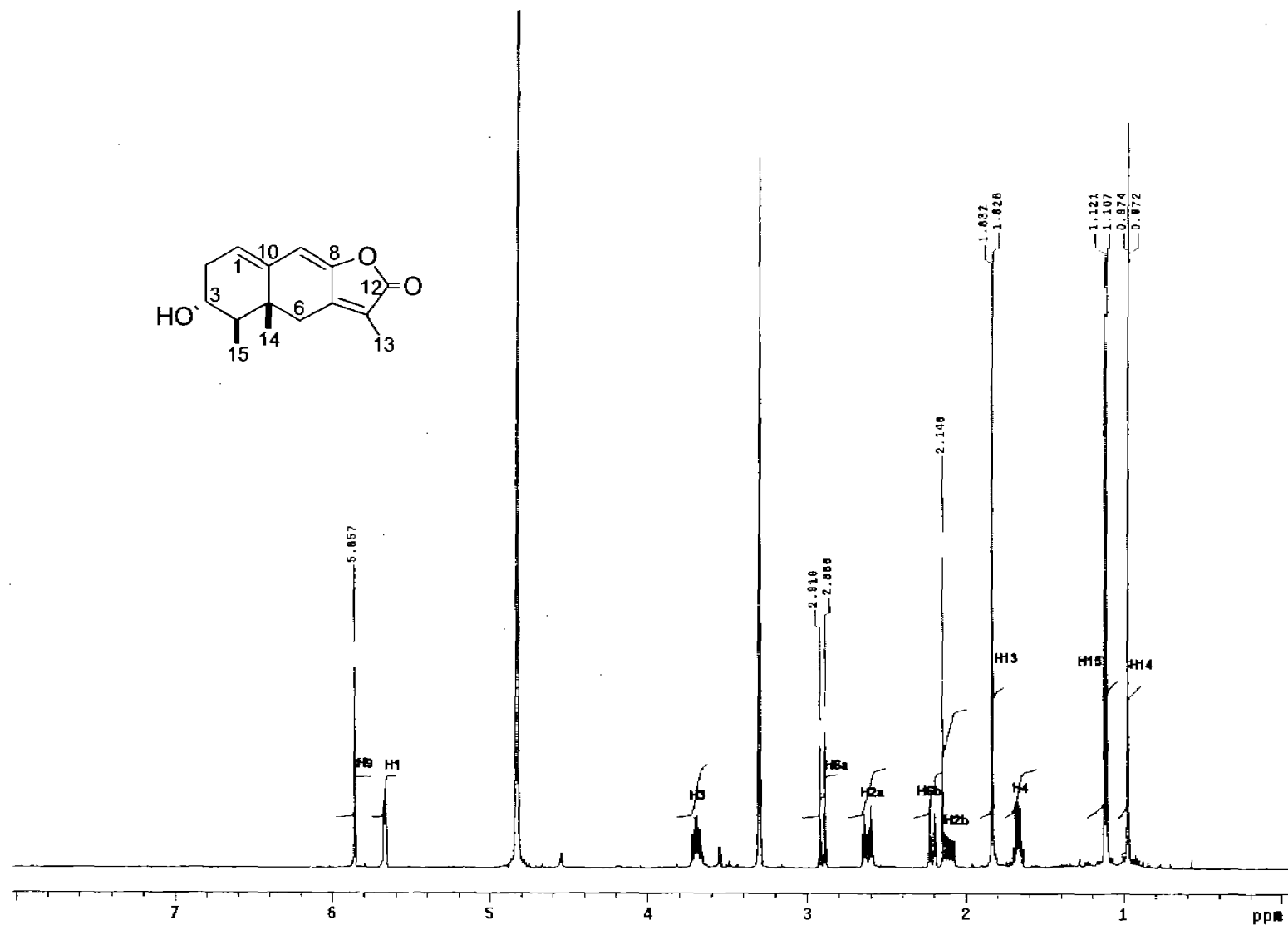
Espectro 5.1.1: RMN  $^1\text{H}$  (ampliación) ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de 6 $\beta$ -isobutiriloxi-1,10 $\beta$ -epoxifuranoeremofilano (IV)



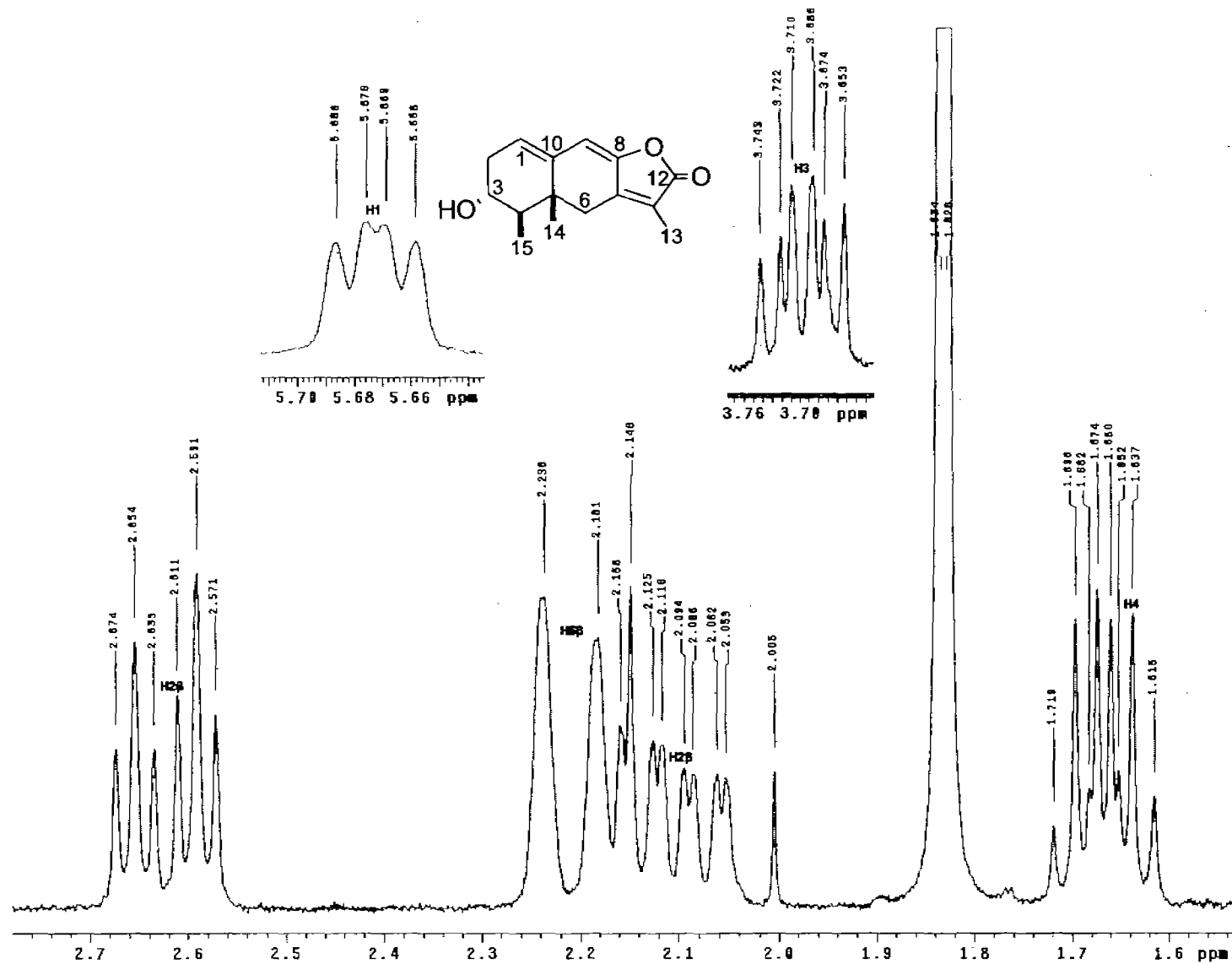
Espectro 5.2: RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CHCl}_3$ , 75 MHz) de 6 $\beta$ -isobutylinloxi-1,10 $\beta$ -epoxyfuranoeremofilano (IV)



Espectro 5.3: DEPT (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de 6β-isobutiriloxi-1,10β-epoxifuranoeremofilano (IV)

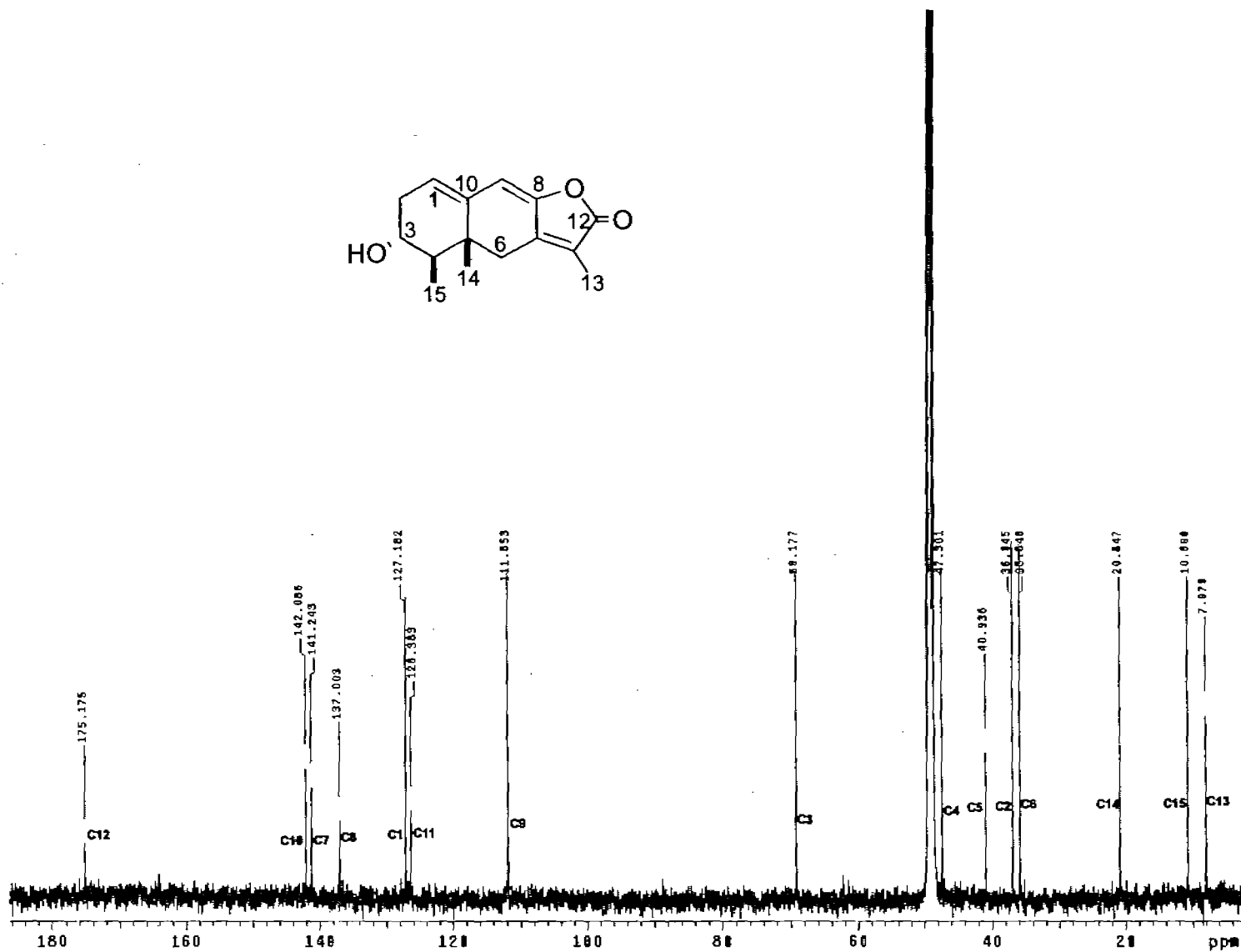
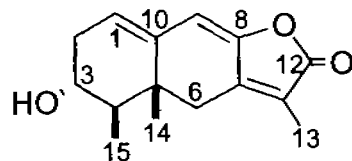


Espectro 6.1: RMN  $^1\text{H}$  (CD $_3$ OD 500 MHz) de 3 $\alpha$ -hidroxi-1(10),7(11),8-eremofilatrien-12,8-olida (VII)

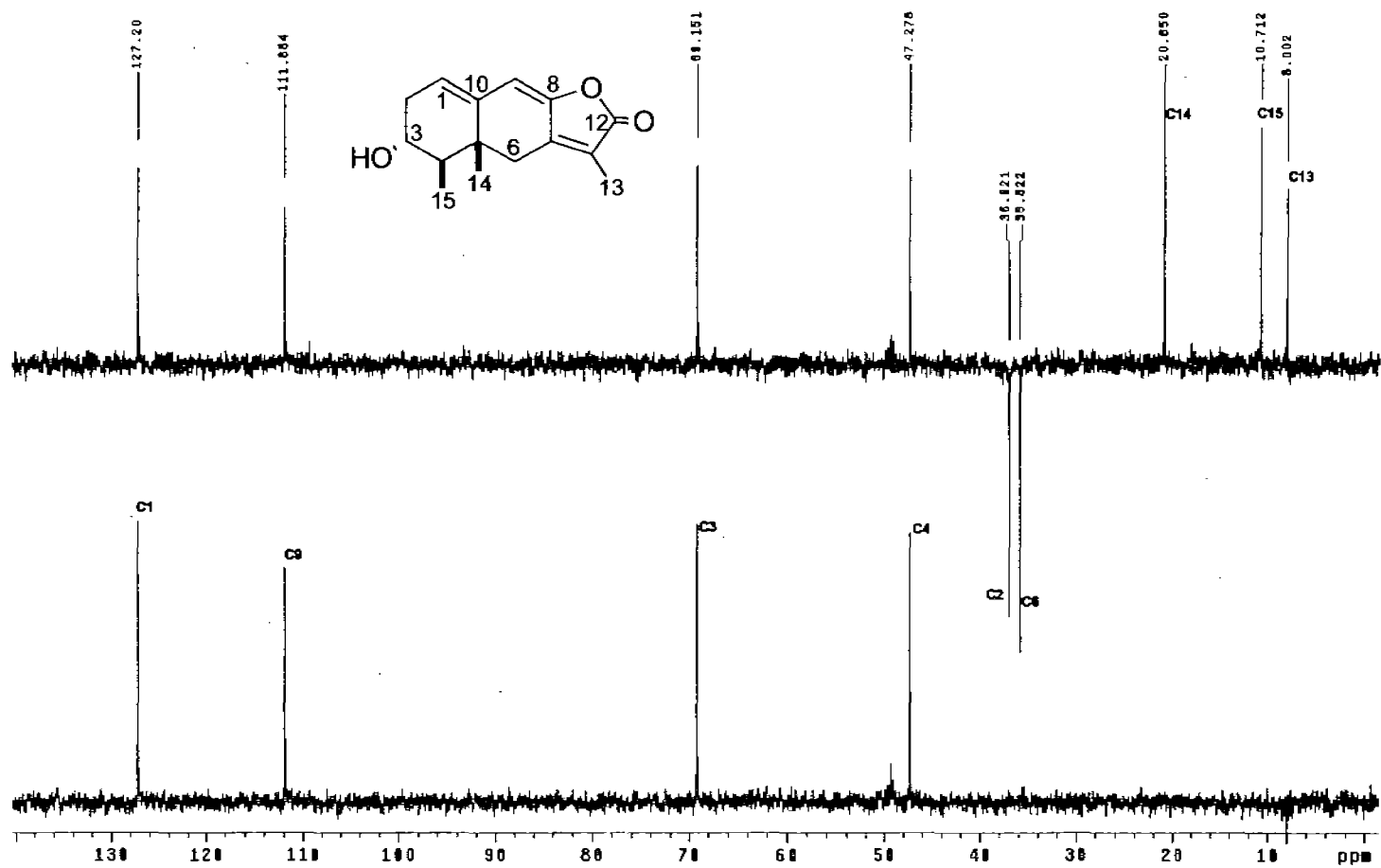


Espectro 6.1.1: RMN  $^1\text{H}$  (ampliación) ( $\text{CD}_3\text{OD}$  500 MHz) de 3 $\alpha$ -hidroxi-1(10),7(11),8-eremofilatrien-12,8-olida (VII)





Espectro 6.2:  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CH}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de 3 $\alpha$ -hidroxi-1(10),7(11),8-eremofilatrien-12,8-olida (VII)



Espectro 6.3: DEPT (CD<sub>3</sub>OD 500 MHz) de 3 $\alpha$ -hidroxi-1(10),7(11),8-eremofilatrien-12,8-olida (VII)

**Tabla 9.** Datos de rayos X de (X).

Fórmula empírica	$C_{21}H_{28}O_8$
Peso fórmula	$M_r = 408.43$
Temperatura	298(2) K
Longitud de onda	$Mok\alpha$ 0.71073 Å
Sistema cristalino	ortorrómbico
Grupo espacial	$P 2_1 2_1 2_1$
Dimensiones de celda	$a = 8.4002$ (6) Å, $\alpha = 90^\circ$ $b = 11.0620$ (8) Å, $\beta = 90^\circ$ $c = 22.1000$ (16) Å $\gamma = 90^\circ$
Volumen de la celda	$V = 2053.6$ (3) Å <sup>3</sup>
Numero de moléculas por unidad asimétrica	$Z = 4$
Densidad	$D_c = 1.321$ Mg/m <sup>3</sup>
Coefficiente de absorción	0.101 mm <sup>-1</sup>
Numero de electrones en la celda	$F(000) = 872$
Tamaño del cristal / forma / color	0.34 x 0.16 x 0.08 mm / prisma / incoloro
Barrido de recolección en el ángulo teta	1.84 – 25.37°
Limites de recolección	-10 ≤ h ≤ 10, -13 ≤ k ≤ 13, -26 ≤ l ≤ 26
Reflexiones recolectadas totales	22413
Reflexiones necesarias o únicas	3770 [R(int) = 0.0453]
Porcentaje de recolección de datos = 25.37°	99.9 %
Método de refinamiento	Matriz total de mínimos cuadrados sobre el factor de estructura
Datos totales / restricciones / parámetros refinados	3770 / 8 / 274
Bondad de los factores de estructura	0.953
Certidumbre de los datos finales [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R1 = 0.035$ , $wR^2 = 0.0783$
Certidumbre de los datos finales	$R1 = 0.0465$ , $wR^2 = 0.0815$
Parámetro de configuración absoluta de la estructura	0.1(9)
Máximo y mínimo de densidad electrónica al final del refinamiento	0.208 y -0.123 e. Å <sup>-3</sup>