



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

"Aislamiento y caracterización de sesquiterpenos y otros
metabolitos de *Pittocaulon filare*"

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. KARINA GONZÁLEZ FLORES

Tutor

DR. ALFONSO ROMO DE VIVAR

Instituto de Química

México D.F. marzo 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto. Número de registro:

387606

Jurado Asignado

Presidente	Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas
Vocal	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Vocal	Dra. Laura Patricia Álvarez Berber
Vocal	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Secretario	M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez

Sustentante

Q.F.B. Karina González Flores

Este proyecto se realizó en el laboratorio 2-7 del Departamento de Productos Naturales del instituto de Química, bajo la Tutoría del Dr. Alfonso Romo de Vivar.

Este trabajo fue presentado en el 30° CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA, 27-31 Octubre, Cancún, 2012 y el Congreso de alumnos del posgrado en Ciencias Químicas, QUIMIUNAM 2012

Agradecimientos

Al **Dr. Alfonso Romo de Vivar** y a la Maestra en Ciencias **Amira Arciniegas** por todos los conocimientos brindados, la paciencia, esfuerzo y dedicación que siempre mostraron.

A las Maestras **Ana Lidia Pérez Castorena** y **Emma Maldonado** por su apoyo y consejos acertados en todo momento.

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

Dedicatorias

A mis padres, a quienes debo lo que soy, a mis hermanos, por su tolerancia, apoyo y comprensión y de manera muy especial a Richard por su apoyo incondicional.

CONTENIDO

	Páginas
Abreviaturas	III
Lista de cuadros	V
Lista de figuras	VI
Gráfica	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Familia Asteraceae	3
2.1.1 Distribución y morfología de la familia Asteraceae	3
2.1.2 Química de la familia Asteraceae	4
2.2 Tribu Senecioneae	4
2.2.1 Química de la tribu Senecioneae	4
2.2.2 Alcaloides pirrolizidínicos	4
2.2.3 Eremofilanos	5
2.2.4 Flavonoides	6
2.3 Género <i>Pittocaulon</i>	7
2.3.1 <i>P. praecox</i>	8
2.3.2 <i>P. velatum</i>	10
2.3.3 <i>P. hintonii</i>	11
2.3.4 <i>P. bombycophole</i>	12
2.3.5 <i>P. filare</i>	13
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	15
6. PARTE EXPERIMENTAL	16

6.1 Equipo utilizado	16
6.2 Análisis cromatográfico	17
6.3 Material vegetal	17
6.4 Preparación de los extractos	18
6.5 Fraccionamiento y purificación	18
6.5.1 Extracto hexánico	18
6.5.2 Extracto metanólico	24
6.6 Metodología de la prueba de actividad anti-inflamatoria	29
6.7 Metodología de la prueba de medición de mieloperoxidasa	30
7. RESULTADOS	31
7.1 Metabolitos aislados	31
7.2 Resultados de las pruebas de actividad anti-inflamatoria	32
7.2.1 Rastreo primario de actividad anti-inflamatoria	32
7.3 Resultados de la determinación de la dosis inhibitoria ₅₀ de los compuestos II-V .	34
7.4 Resultados del ensayo de mieloperoxidasa en los tejidos tratados con los oplopanos.	35
7.4.1 Estudio comparativo del contenido de mieloperoxidasa de los tejidos tratados con los oplopanos II-V con la indometacina.	37
7.5 Coeficiente de correlación de Pearson entre la actividad anti-inflamatoria de los compuestos II-V y el contenido de mieloperoxidasa	39
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
8.1 Elucidación de las estructuras	40
8.2 Discusión de los resultados de las pruebas biológicas	68
9. CONCLUSIONES	71
10. BIBLIOGRAFÍA	76
11. APENDICE	79

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
Ang	Angeloil
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 ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy
d	Señal doble
da	Señal doble ancha
DC	Dicroísmo circular
dd	Señal doble de doble
dc	Señal doble de cuartetos
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dddd	Señal doble de doble de doble de doble
ddd	Señal doble de doble de doble
EMAR (FAB)	Espectrometría de Masas de Alta Resolución (Bombardeo con Átomos Rápidos)
EMIE	Espectrometría de Masas de Impacto Electrónico
Hz	Hertz
HMBC	Heteronuclear Múltiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy
HTAB	Hexadecyltrimethyl-ammonium bromide
IR	Infrarrojo
<i>i</i> Bu	Isobutiril
<i>N</i> al	Isovaleril
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m	Señal múltiple

mg	Miligramos
Met	Metacriloil
m/z	Relación masa/carga
[M+H] ⁺	Masa molecular más hidrógeno
nm	Nanómetro
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PBS	Buffer de fosfatos
pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de ¹³ C
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de ¹ H
s	Señal simple
sa	Señal ancha
Sen	Senecioil
t	Señal triple
TMS	Tetrametilsilano
TPA	acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
UV	Ultravioleta
[α] _D	Rotación óptica
δ	Desplazamiento químico (RMN)
ε	Coeficiente de extinción
λ	Longitud de onda
μL	Microlitros
ν	Frecuencia

Lista de Cuadros

	Páginas
Cuadro 1. Fracciones obtenidas del extracto hexánico, polaridad en la que se obtuvieron y número de la columna en que se purificaron.	18
Cuadro 2. Fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto metanólico, polaridad en la que se obtuvieron y número de la columna en que se purificaron.	24
Cuadro 3. Rastreo primario de actividad anti-inflamatoria utilizando el modelo de edema inducido con TPA.	32
Cuadro 4. DI_{50} de los oplopanos aislados (II-V).	34
Cuadro 5. Resultados del ensayo de mieloperoxidasa del compuesto II	35
Cuadro 6. Resultados del ensayo de mieloperoxidasa del compuesto III.	36
Cuadro 7. Resultados del ensayo de mieloperoxidasa del compuesto IV.	36
Cuadro 8. Resultados del ensayo de mieloperoxidasa del compuesto V.	36
Cuadro 9. Resultados del ensayo de mieloperoxidasa de la indometacina.	37
Cuadro 10. Resultados del contenido de mieloperoxidasa (%) de los tejidos tratados con los oplopanos.	37
Cuadro 11. Coeficiente de correlación de Pearson de los oplopanos	39
Cuadro 12. Datos de RMN- 1H y ^{13}C del compuesto I.	41
Cuadro 13. Datos de RMN- 1H y ^{13}C del compuesto II.	43
Cuadro 14. Datos de RMN- 1H y ^{13}C del compuesto III.	48
Cuadro 15. Datos de RMN- 1H y ^{13}C del compuesto IV.	50
Cuadro 16. Datos de RMN- 1H y ^{13}C del compuesto V.	53
Cuadro 17. Datos de RMN- 1H y ^{13}C del compuesto VI.	55
Cuadro 18. Datos de RMN- 1H y ^{13}C del compuesto VII.	57
Cuadro 19. Datos de RMN- 1H y ^{13}C delos compuesto VIII y IX.	60
Cuadro 20. Datos de RMN- 1H y ^{13}C del compuesto X.	61
Cuadro 21. Datos de RMN- 1H y ^{13}C del compuesto XI.	63
Cuadro 22. Datos de RMN- 1H y ^{13}C del compuesto XII.	66
Cuadro 23. Datos de RMN- 1H y ^{13}C del compuesto XIII y XIII Ac.	66

Lista de figuras

Figura 1. Metabolitos aislados de <i>Pittocaulon filare</i> y sus rendimientos	31
Figura 2. Principales interacciones HMBC del compuesto II .	45
Figura 3. Principales interacciones NOESY del compuesto II .	45
Figura 4. Estructura del compuesto II determinada por Difracción de Rayos x.	46
Figura 5. Principales interacciones NOESY del compuesto III .	48
Figura 6. Estructura del compuesto IV determinada por Difracción de Rayos x.	52
Figura 7. Principales interacciones HMBC del compuesto VII .	58
Figura 8. Principales interacciones NOESY del compuesto VIII .	59
Figura 9 Principales interacciones HMBC del compuesto XI .	64
Figura 10. Principales interacciones NOESY del compuesto XI .	64

Lista de gráficas

Grafica 1. Resultados del porcentaje de inhibición del edema.	33
Gráfica 2. DI_{50} de los oplopanos (II-V).	35
Gráfica 3. Resultados del contenido de mieloperoxidasa % de los tejidos tratados con los oplopanos y la indometacina.	38

1. INTRODUCCIÓN

Durante siglos se han utilizado las plantas como una fuente de remedios que combinados con misticismo, magia y religión eran utilizados con fines terapéuticos.¹ Esto sigue perdurando ya que en las últimas décadas, aproximadamente el 60 % de la población mundial recurre a las plantas para su medicación.²

Con los avances tecnológicos y científicos se han logrado aislar, purificar e identificar un sinnúmero de compuestos activos derivados de productos naturales como agentes antimaláricos, anticancerígenos y antibióticos tan importantes como el taxol, el captopril, la ciprofloxacina, la amoxicilina, por mencionar solo algunos.³ De hecho, de los fármacos anticancerígenos aprobados por la FDA (Agencia de drogas y alimentos de Estados Unidos) entre 1940-2010 el 48% son de un producto natural o derivado de un producto natural.⁴

Actualmente los productos naturales son una estrategia para el descubrimiento de nuevos fármacos, no sólo como producto natural, sino también como derivado del mismo, ya que proveen una gran variedad estructural ofreciendo mayores oportunidades de encontrar nuevas moléculas contra un amplio rango de blancos.³ Sin embargo, si bien hay una gran biodiversidad vegetal (estimada de 250,000 especies de plantas en el mundo) sólo el 10% de las especies han sido probadas en algún tipo de actividad biológica,⁵ por lo que hay muchas especies no estudiadas y metabolitos secundarios por descubrir.

En México, se han utilizado las plantas en la medicina tradicional desde tiempos precolombinos, los registros más antiguos sobre plantas medicinales que se tienen son el Código Florentino “Historia general de las cosas de la nueva España”, compilado por el monje franciscano Fray Bernardino de Sahagún que data del siglo XVI,⁶ y el “*Libellus de medicinalibus indorum herbis*” o Códice Badiano escrito en náhuatl por Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano en 1552.⁷

La familia Asteraceae ha sido utilizada desde tiempos ancestrales para el tratamiento de diferentes padecimientos y en México, en donde está ampliamente representada, tiene un nivel de utilización etnomédico importante. Entre las muchas especies de esta familia utilizadas con fines curativos, las que forman el género *Pittocaulon*, conocidas como palo

loco, se utilizan en medicina popular contra el reumatismo y para curar heridas.⁸ Por este motivo resultó interesante el estudio de *Pittocaulon filare*, como posible fuente de sustancias antiinflamatorias.

El presente trabajo tiene como objetivo contribuir a la química del género *Pittocaulon* mediante la separación, purificación e identificación de los principales metabolitos secundarios de tallo y raíz de *Pittocaulon filare* y la determinación de la actividad antiinflamatoria de sus extractos y metabolitos no alcaloideos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Familia Asteraceae

Dentro de las angiospermas o plantas con flores, la familia Compositae o Asteraceae, una de las más diversas y ampliamente distribuidas, ocupa un lugar preponderante en la flora mexicana,⁹ como resultado de sus eficientes mecanismos de dispersión, plasticidad genética y química que le han permitido adaptarse a diversas condiciones ecológicas y desarrollar mecanismos de defensa contra depredadores y competidores.¹⁰

En México, se reconocen 387 géneros y 2861 especies pertenecientes a la familia Asteraceae.⁹

2.1.1 Distribución y morfología de la familia Asteraceae

Los miembros de la familia Asteraceae son identificados por sus inflorescencias primarias constituídas por una cabezuela pseudántica. Sus frutos tienen forma de aquenio (frutos de paredes delgadas, llevando en la parte superior flores en forma de disco (vilano) o radialmente simétricas. Sus hojas están usualmente alternas u opuestas, pecioladas y algunas veces sésiles. Sus raíces son fibrosas y sus tallos usualmente erectos.¹¹

Esta familia se encuentra distribuida por todo el mundo, siendo el suroeste de los Estados Unidos y México la región más rica en miembros de la familia.¹²

En México, 27 de los 32 estados de la república presentan un rico componente de Asteraceae en sus floras (mayor al 10%), destacando Chiapas, Jalisco, México, Michoacán y Oaxaca con una riqueza excepcional constituida por más de 500 especies,¹⁰ siendo las zonas montañosas, las áridas y semiáridas las principales áreas de diversificación de la familia Asteraceae.¹³

2.1.2. Química de la familia Asteraceae

Resulta complicado describir metabolitos característicos de la familia Asteraceae, ya que se encuentra conformada por un gran número de especies. Sin embargo, de las especies estudiadas se han aislado ácidos grasos, lactonas sesquiterpénicas, triterpenos pentacíclicos, monoterpenos fenólicos, diterpenos, ésteres de ácido cafeico, flavonoides, compuestos acetilados, ciclitoles, cumarinas, alcaloides pirrolizidínicos, ácidos triterpénicos, amidas de ácidos grasos, polisacáridos y cromonas, entre otros.¹⁴

2.2 Tribu Senecioneae

La tribu Senecioneae es la más grande de las 13 tribus pertenecientes a la familia Asteraceae, se divide en tres subtribus: Senecionineae, Tussilagenineae y Blenospermatineae y contiene aproximadamente 3000 especies agrupadas en 120 géneros. En México y Centroamérica, está representada por 165 especies pertenecientes a 19 géneros incluyendo al gran género *Senecio*.

Las especies del género *Senecio sensu lato* (cerca de 1500 especies) fueron segregadas en diferentes géneros pertenecientes a las subtribus Senecionineae y Tussilagenineae, uno de estos es el género *Pittocaulon* (Asteraceae, Senecioneae, Tussilagininae), que es el objeto de este estudio.¹⁵

2.2.1 Química de la tribu Senecioneae

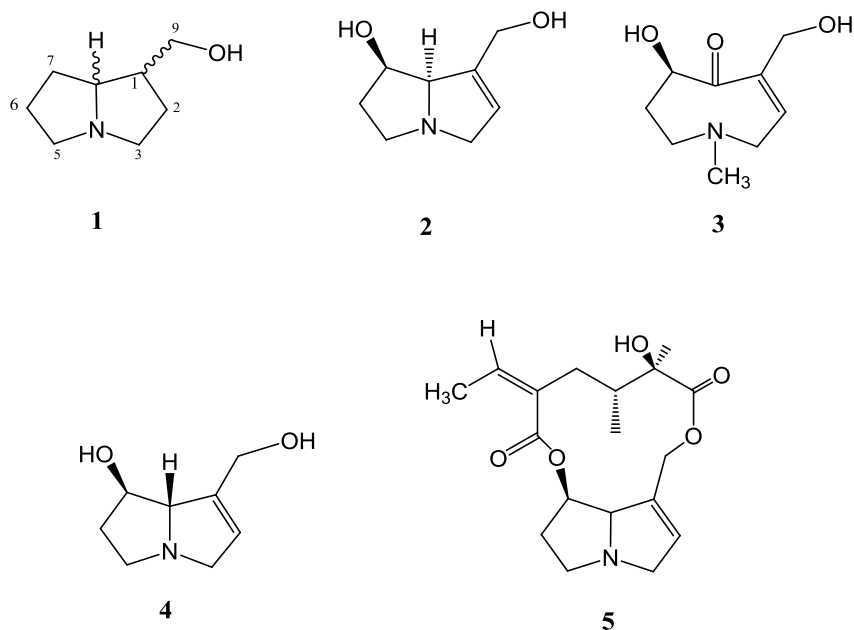
Hasta ahora se han estudiado cerca de 50 especies mexicanas pertenecientes a las subtribus Senecioninae y Tussilagininae. De estos estudios, se han aislado como principales metabolitos secundarios: alcaloides pirrolizidínicos, sesquiterpenos de tipo eremofilano y flavonoides.¹⁶

2.2.2 Alcaloides pirrolizidínicos

Los alcaloides pirrolizidínicos (Aps) contienen en su molécula uno de los cuatro isómeros de la 1-hidroximetil pirrolizidina (**1**), los cuales son llamados necinas. Ellos pueden tener

un doble enlace en el C-1, un grupo OH en C-7, y estar oxidados en las posiciones 2 y 6. Además, los grupos hidroxilos pueden ser esterificados por ácidos dicarboxílicos o monocarboxílicos.¹⁶

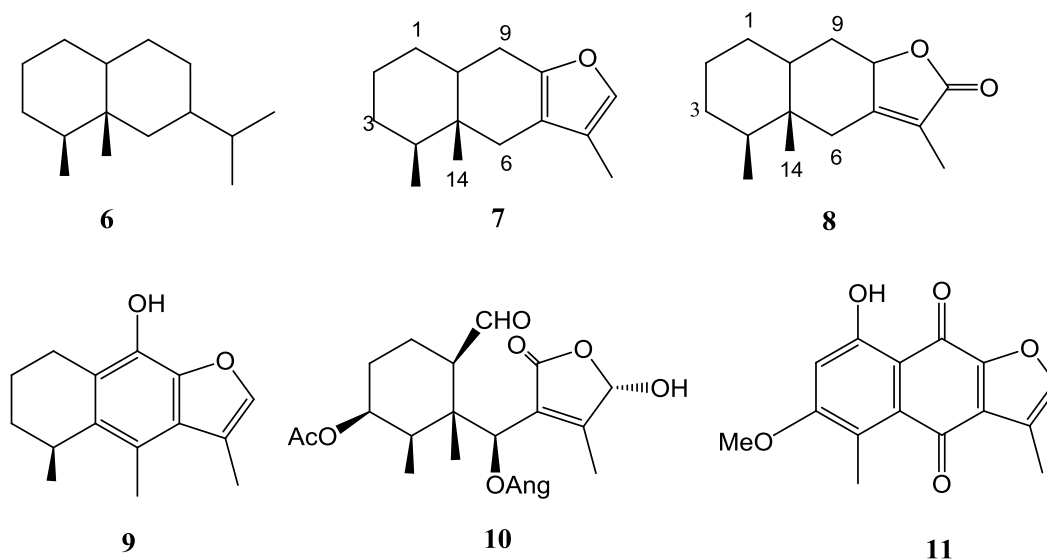
Los Aps que contienen en su esqueleto cualquiera de las bases retronecina (**2**), otonecina (**3**) o heliotridina (**4**); son altamente tóxicos, pueden tener efectos hepatotóxicos, mutagénicos, causar hepatomegalia y desórdenes venooclusivos y se han reportado muertes humanas y de ganado a causa de la ingesta de plantas que contienen este tipo de sustancias.¹⁶ La toxicidad se incrementa con la presencia de un éster cíclico como en la senecionina (**5**), lo cual es común en los alcaloides pirrolizidínicos de esta tribu.¹⁷ Los Aps polihidroxisaturados mimetizan la estructura de monosacáridos teniendo así un efecto potencial en algunas enfermedades tales como infecciones virales, cáncer y diabetes.¹⁸



2.2.3 Eremofilanos

Los eremofilanos son sesquiterpenos cuyo esqueleto base (**6**) contiene un sistema de decalina, sus posiciones 1, 3, 6 y 9 pueden estar sustituidas con grupos hidroxilos, la presencia de cetonas en ciertas posiciones y epóxidos es también frecuente.¹⁶

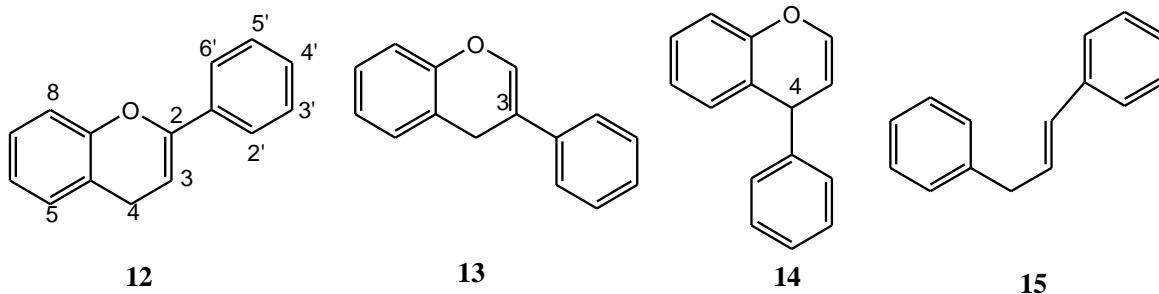
En diversos géneros de la tribu Senecioneae tales como *Senecio*, *Roldana*, *Packera*, *Pittocaulon*, es común encontrarlos oxidados formando furanoeremofilanos (**7**) o eremofilanolidas (**8**). Otros géneros como *Psacalium* y *Roldana* son ricos en furanoeremofilanos modificados de tipo *abeo*, conocidos como derivados del cacalol¹⁹ (**9**). De manera menos frecuente, se pueden encontrar en forma de *seco*-eremofilanos como el compuesto **10**²⁰ aislado del género *Roldana* y *nor*-eremofilanos como **11**²¹ obtenido de especies de *Senecio*.



2.2.4 Flavonoides

Los flavonoides son un gran grupo de polifenoles presentes como productos naturales que proveen el color a las plantas.²² Su estructura química está basada en un esqueleto de C₆-C₃-C₆ y difieren en la insaturación del anillo C, en la colocación del anillo aromático B en C-2 o en C-3 y en los patrones de hidroxilación.

Para su estudio, este grupo de compuestos se ha dividido en tres clases: los flavonoides 2-fenilbenzopiranos (**12**), los isoflavonoides 3-fenilbenzopiranos (**13**) y los neoflavonoides 4-fenilbenzopiranos (**14**), todos tienen como precursor común la chalcona (**15**) además de que están biogénica y estructuralmente relacionados.²³



2.3 Género *Pittocaulon*

El género *Pittocaulon* pertenece a la tribu Senecioneae, subtribu Tussilaginatae de la familia Asteraceae, fue segregado del género *Senecio*, y está formado por 5 especies: *P. praecox*, *P. filare*, *P. bombycophole*, *P. velatum* y *P. hintonii*.²⁴ Estas especies se utilizan en la medicina popular contra el reumatismo y para curar heridas, además se ha reportado actividad antifúngica y antibacteriana de los extractos de *P. praecox*, *P. bombycophole* y de *P. hintonii*.²⁵

Las 5 especies del género *Pittocaulon* son endémicas de México y sólo una de ellas, *P. velatum*, se encuentra también en Guatemala. Crecen en hábitats secos tropicales, a menudo rocosos y en desfiladeros comprendidos entre 300 y 3000 metros de altura.²⁶

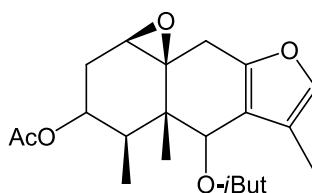
Las especies de este género son arbustos o árboles pequeños resinosos, de tallo grueso, hojas caducas e inflorescencias terminales corimbosas sostenidas por tallos cortos.²⁶ Estas plantas tienen gran capacidad de almacenamiento de agua en su tallo ya que poseen xilemas cilíndricos delgados que permiten amortiguar el daño provocado por las condiciones climáticas y florecer en épocas de sequía, razón por la cual es conocido popularmente como palo loco, tienen pequeños racimos de hojas en épocas de lluvia y se desojan el resto del año.

2.3.1 *Pittocaulon praecox*:

Es la especie más ampliamente distribuida del género y la más estudiada química y morfológicamente. Se puede observar sobre rocas pertenecientes al flujo de lava del valle de México y en lugares de Zacatecas, Oaxaca²⁶ y Aguascalientes.¹⁶

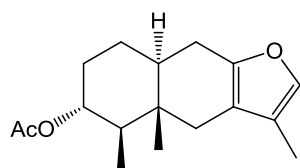


Existen varios estudios químicos de esta especie: en 1975 se aislaron de la raíz un sesquiterpeno identificado como precoxilina A (**16**) y el alcaloide senecionina (**5**).²⁷

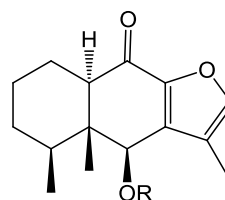


16

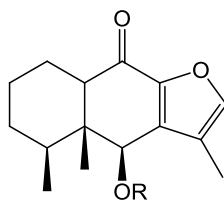
Posteriormente, en 1976 se aislaron un furanoeremofilano (**17**) y tres mezclas complejas de furanoeremofilanos (**18-21**, **22-24** y **25-30**).²⁸



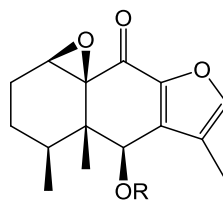
17



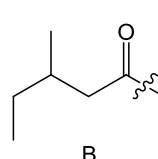
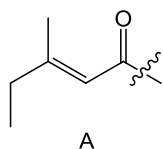
18 R = *i*Val
19 R = A
20 R = B
21 R = Sen



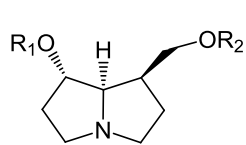
22 R = *i*Val
23 R = A
24 R = B



25 R = *i*Val
26 R = *i*But
27 R = Ang
28 R = Met
29 R = A
30 R = B

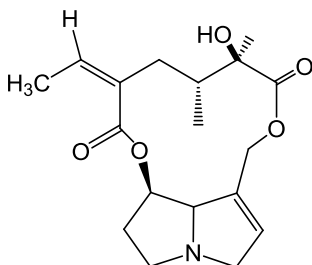


En el 2007, utilizando la técnica de análisis por CG-EM se identificaron en flores raíces tallos y hojas los alcaloides pirrolizidínicos 7-angeloldihidroxiheliotridano (**31**), 9-angeloldihidroxiheliotridano (**32**), senecionina (**33**), integerrimina (**34**), platifillina (**35**), neoplatifillina (**36**), senkirina (**37**) y neosenkirina (**38**).²⁹

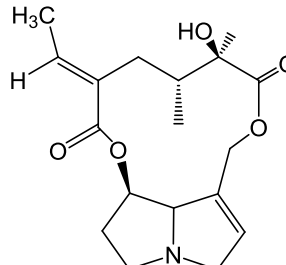


31 R₁ = H R₂ = Ang

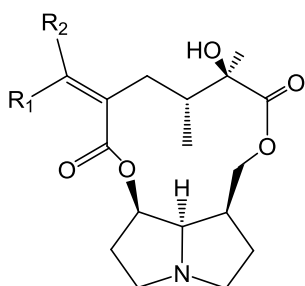
32 R₁ = Ang R₂ = H



33

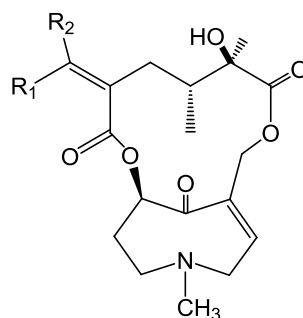


34



35 R₁ = CH₃ R₂ = H

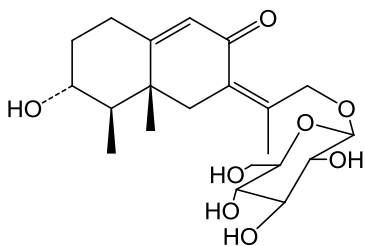
36 R₁ = H R₂ = CH₃



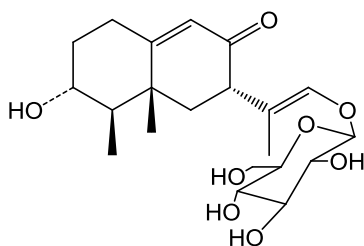
37 R₁ = CH₃ R₂ = H

38 R₁ = H R₂ = CH₃

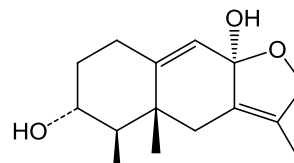
En el último estudio reportado en 2009 se aislaron: 2 glucósidos de eremofilano (**39-40**), 3 eremofilanólidas (**41-43**), 7 eremofilanos (**27, 44-49**) y 3 flavonoides (**50-52**).³⁰



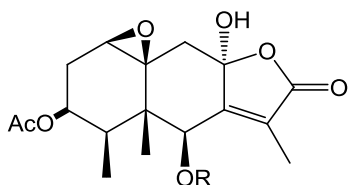
39



40

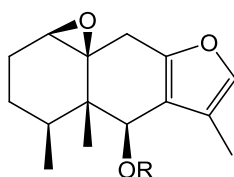


41



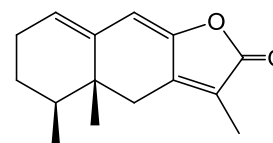
42 R = *i*Bu

43 R = Ang

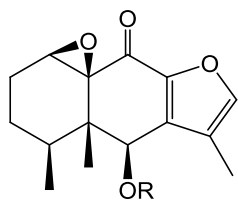


44 R = *i*Bu

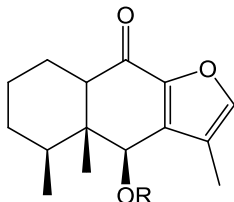
45 R = Ang



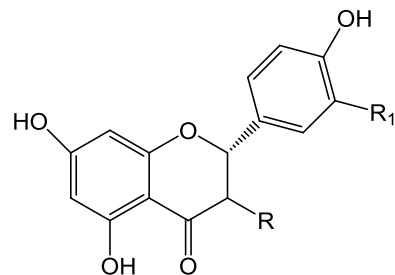
46



47 R = *i* Bu



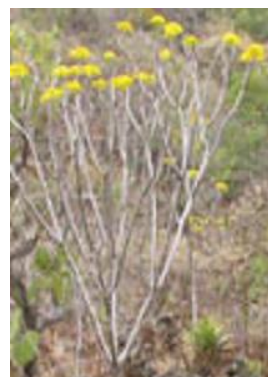
48 R = Ang
49 R = *i*Bu



50 R = R₁ = H
51 R = OH R₁ = H
52 R = R₁ = OH

2.3.2 *Pittocaulon velatum*:

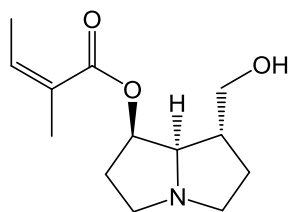
Es un arbusto de hasta 5 metros de alto con tallos de hasta 9 cm de diámetro, los cuales presentan en la parte alta pubescencias cafés cortas y densas e inflorescencias en el tallo central prominente que contiene de 6 a 7 flores.



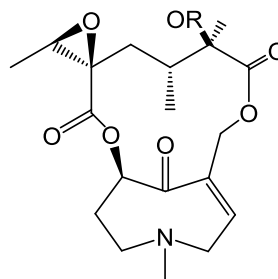
Después de *P. praecox*, *P. velatum* es la especie más distribuida. Agrupa las variedades *P. velatum* ssp y *tzinolensis* y se encuentra sobre rocas y desfiladeros

de los cañones en hábitats estacionalmente húmedos en los estados de Chiapas, sureste de Oaxaca y un limitado número de localidades en Guatemala.²⁶

En el 2007, se aislaron los APs: 7-angeliolheliotridina (**53**), integerrimina (**34**), senecionina (**33**), senkirquina (**37**) y acetilpetasitenina (**54**).²⁹



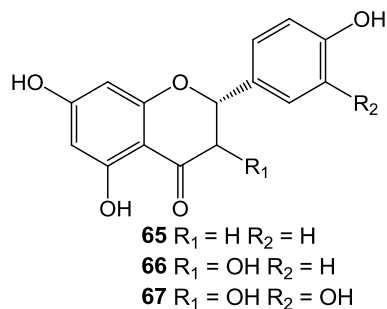
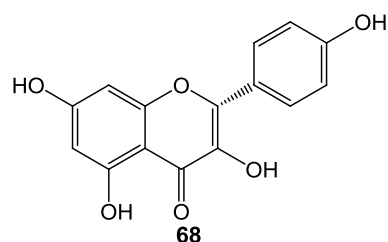
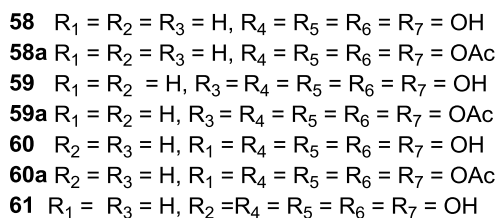
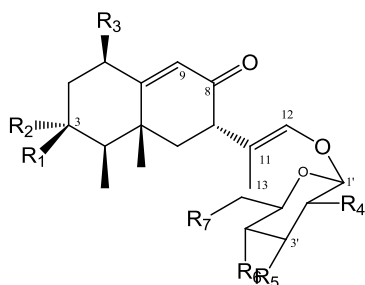
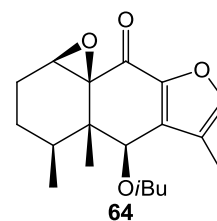
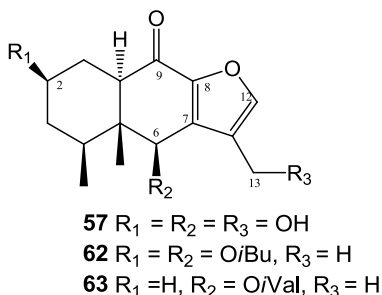
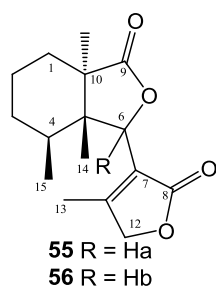
53



54 R = Acetil

En el segundo estudio descrito en el 2011, se aislaron dos seco-eremofilanólidas, velatumólida (**55**) y epi-velatumólida (**56**), el trihidroxifuranoeremofilano, velatumin (**57**),

tres glucósidos de eremofilano (**58-60**), cuatro furanoeremofilanos (**61-64**) y cuatro flavonoides (**50-63**).³¹

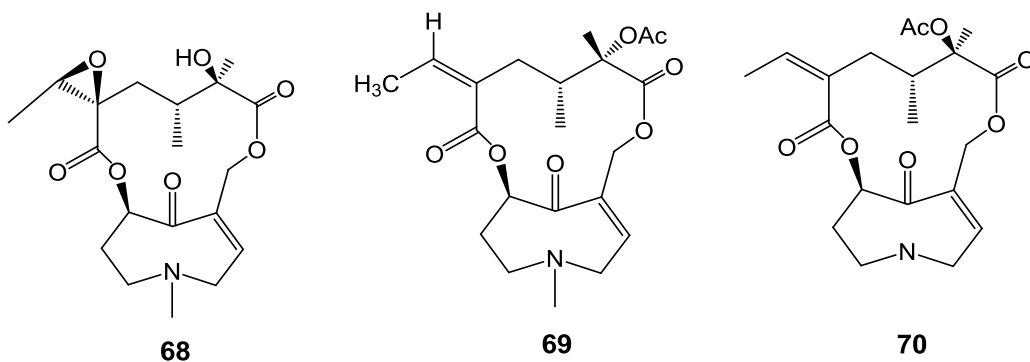


2.3.3 *Pittocaulon hintonii*:

Se encuentra en pocas localidades de Michoacán²⁶ y Colima, la especie está escasamente ramificada y crece en pequeños grupos esparcidos entre las rocas,¹⁶ llega a alcanzar hasta los 5 metros de altura.²⁶

De *P. hintonii* se han aislado los APs: 7-angeloilturneforcidina (**53**), 9-angeloilturneforcidina, senkirina (**37**), neosenkirina (**38**), petasitenina (**68**), ligularidina (**69**), acetilsenkirina (**70**), acetilpetasitenina (**54**),²⁹ y no existen estudios de su contenido no alcaloidal.



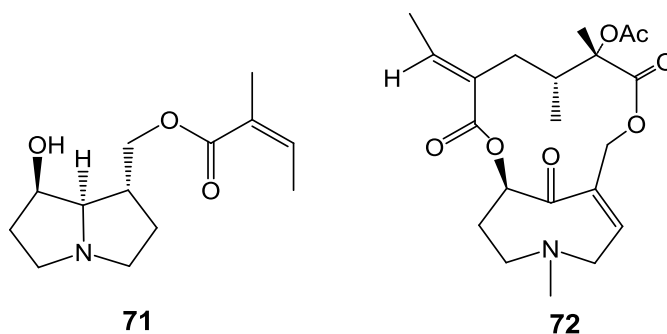


2.3.4 *Pittocaulon bombycophole*:

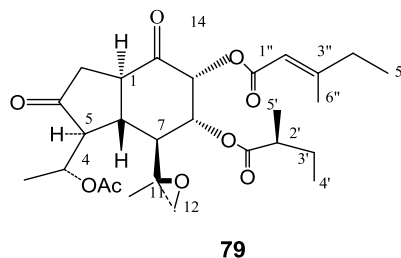
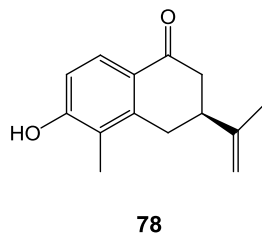
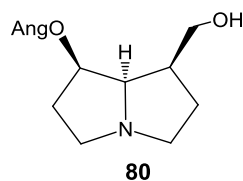
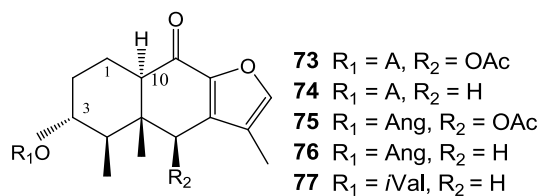
Crece en los estados de Michoacán, Guerrero, Morelos¹⁶ y una pequeña parte de México,²⁶ sus ramas y tallo son muy gruesos, y al igual que *P. filare* están cubiertas con pequeñas vellosidades blancas.¹⁶



Los Aps reportados en *P. bombycophole* son: 7-angeloilturneforcidina (**53**), 9-angeloilturneforcidina (**71**), senkirquina (**37**), petasitenina (**68**), acetilpetasitenina (**54**) y neoligularidina (**72**).²⁹



En el 2008, se aislaron 5 furanoeremofilanos (**73-77**), un *nor*-eremofilano (**78**), un oplopano (**79**) y un alcaloide pirrolizidínico y la 7-angeloilplatinecina (**80**).³²

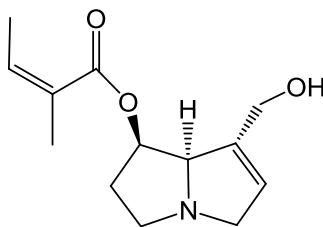


2.3.5 *Pittocaulon filare*:

Se localiza en zonas rocosas y secas de Colima y Jalisco,²⁶ es más pequeño que *P. praecox*, sus hojas están cubiertas por pequeños vellos (lanudas), tiene hermosas flores amarillas y sus semillas se mantienen por largo tiempo en la planta.¹⁶



De *P. filare* solamente existe una descripción en la literatura en donde se identificaron los Aps: 7-angeloilturneforcidina (**53**), 7-angeloilretronecina (**81**), senecionina (**33**), intergerrimina (**34**), senkirkina (**37**), acetilsenkirkina (**70**) y neoligularidina (**72**).²⁹



81

3. JUSTIFICACIÓN

El género *Pittocaulon* (Asteraceae, Senecioninae, Tussilagininae) es utilizado en la medicina popular contra el reumatismo y para curar heridas,⁸ además se ha reportado la actividad antifúngica y antibacteriana de extractos de *P. praecox*, *P. bombycophole*, *P. hintonii* y *P. velatum*.²⁵

Hasta el momento, además del contenido alcaloidal reportado en las cinco especies del género,²⁹ se han estudiado químicamente tres especies, *P. praecox*, *P. bombycophole* y *P. velatum* y de estas que se han aislado los siguientes metabolitos:

- *P. praecox*: furanoeremofilanos, glucósidos de eremofilanos, eremofilanólidas y flavonoides.^{27,28,30}
- *P. velatum*: seco-eremofilanólidas, glucósidos de eremofilano, eremofilanos y flavonoides.³¹
- *P. bombycophole* se han encontrado furanoeremofilanos y un oplopano.³²

Teniendo en cuenta que de *P. filare* solamente se encuentra descrito su contenido alcaloideo se consideró pertinente realizar un estudio químico de los extractos no alcaloideos a fin de contribuir al establecimiento de un patrón quimiotaxonómico del género y evaluar la posible actividad antiinflamatoria de sus metabolitos.

4. HIPÓTESIS

Considerando los productos naturales previamente aislados del género *Pittocaulon* se espera aislar de *P. filare* sesquiterpenos de tipo eremofilano, oplopanos y alcaloides pirrolizidínicos.

Teniendo en cuenta que las especies de *Pittocaulon* se utilizan en la medicina popular contra el reumatismo y para curar heridas se espera que los extractos y metabolitos secundarios de *Pittocaulon filare* presenten actividad antiinflamatoria.

5. OBJETIVOS

Generales

- Contribuir al estudio fitoquímico del género *Pittocaulon* mediante el estudio de la especie *Pittocaulon filare*.
- Contribuir al hallazgo de nuevas sustancias químicas con actividad antiinflamatoria para corroborar las propiedades farmacológicas descritas para el género.

Particulares

- Aislar y purificar los principales metabolitos secundarios de tallo y raíz de *P. filare* mediante métodos cromatográficos y químicos convencionales.
- Identificar los metabolitos aislados mediante técnicas espectroscópicas de IR, Masas, RMN-H y C¹³ mono y bidimensionales y por comparación con datos reportados en la literatura.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de los metabolitos aislados de *P. filare* usando el modelo de edema inducido por TPA.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Equipo utilizado

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johns serie N° 591 y no están corregidos y la rotación óptica fue realizada en el polarímetro Perkin-Elmer 343.

Los espectros de UV fueron registrados en un equipo Shimadzu UV 160U y los de IR con un Bruker Tensor 27, utilizando técnicas de suspensión, disolución y pastilla en KBr.

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C mono y bidimensionales, homo y heteronucleares fueron obtenidos en espectrofotómetros Eclipse JEOL 300 MHz, Bruker Avance 400 MHz o Varian-Unity Inova 500 MHz, los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm respecto al tetrametilsilano (TMS) como estándar interno y en todos los casos se utilizaron disolventes deuterados.

Los datos de EM-IE fueron determinados a 70 eV en un espectrómetro de masas JEOL JMS-AX505HA 70 eV. Los EMAR-ESI fueron realizados en un Bruker micrOTOF II con una resolución de masa de 16.500 FWHM, un intervalo de masa de 50-20,000 m/z y una velocidad de 40 Hz. Los espectros de EM-FAB⁺ y EMAR-FAB⁺ 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 Ka radiación ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). 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.

El dicroísmo circular fue obtenido de un espectropolarímetro Jasco J-720.

El análisis por cromatografía de gases fue realizado en un sistema Agilent 6890 GC con una columna AT5 30 m x 0.25 mm 0.1 µm de espesor a una temperatura inicial de 100 °C y una temperatura final de 200 °C.

6.2 Análisis cromatográfico

La cromatografía en columna fue realizada con vacío (CCV) utilizando gel de Sílice G 60 (90 % ≤ 45 µm, Merck, Darmstadt, Germany).

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

La Cromatografía en capa delgada (CCD) fue realizada utilizando placas de gel de sílice GF254 (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.

La Cromatografía en capa delgada de fase inversa fue realizada utilizando placas de sílice ALUGRAM RP-18W/UV 254 para la cromatografía analítica, con 0.15 mm de espesor, y para preparativa se utilizaron placas DC-Fertigplatten RP-18W/UV254 de 1.0 mm.

El monitoreo de las placas se llevó a cabo mediante exposición a luz UV a dos longitudes de onda (254 y 365 nm). Se utilizó solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N como revelador.

6.3 Material vegetal

Pittocaulon filare (McVaugh) H. Rob.& Brettell (Asteraceae) se recolectó en marzo de 2011 en el municipio de Colima, Colima, Km 17.5 de la carretera antigua (México 110) Colima-Tecomán, México. Un ejemplar fue depositado en el herbario del Instituto de Botánica (IBUG), Universidad de Guadalajara. Col. M. Harker y L. Hernández L. 4168. Del. Harker.

6.4 Preparación de los extractos

La planta (720 g de tallo y 250 g de raíz) se secó a temperatura ambiente y se trituró. Las moliendas se sometieron a un proceso de percolación con hexano y metanol por separado. Los extractos hexánicos de tallo y raíz, así como, los metanólicos de tallo y raíz se reunieron debido a que presentaron una composición muy similar en cromatografía en capa delgada obteniendo finalmente dos extractos: el extracto hexánico (37 g) y el extracto metanólico (140 g), los cuales se fraccionaron por métodos cromatográficos.

6.5 Fraccionamiento y purificación

6.5.1 Extracto hexánico.

Columna 1

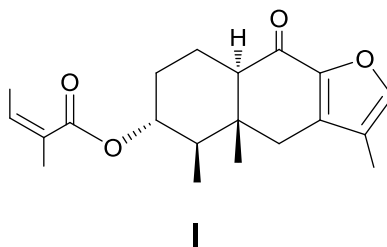
El extracto hexánico (37 g) se fraccionó por cromatografía en columna al vacío (CCV) (C1) eluida con mezclas de Hexano-Me₂CO en gradiente de polaridad creciente. De esta cromatografía se obtuvieron 44 fracciones, las cuales se reunieron por su similitud en cromatografía de capa delgada (CCD) para su posterior purificación (cuadro 1).

Cuadro 1. Fracciones obtenidas del extracto hexánico, polaridad en la que se obtuvieron y número de la columna en que se purificaron.

Fracciones	Disolvente	Columna
1-7	Hexano	C2
8-9	Hexano-Me ₂ CO 19:1	C3
10-14	Hexano-Me ₂ CO 19:1	C4
15-23	Hexano-Me ₂ CO 9:1	C5
24-44	Hexano-Me ₂ CO 4:1	C6

De la fracción 8 eluida con hexano-Me₂CO (19:1) se obtuvieron 1.25 g de cristales identificados como el 3 α -angeloiloxi-9-oxo-furanoeremofilano (**I**).

3 α -angeloiloxi-9-oxo-furanoeremofilano (I).³²⁻³⁴

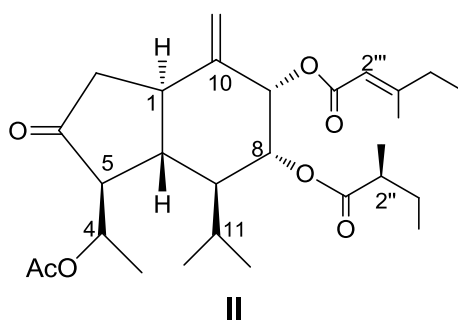


Cristales incoloros (hexano-Me₂CO); pf. 152-153 °C; IR (CHCl₃) ν_{max} 1697, 1673, 806 cm⁻¹; RMN ¹H (espectro 1.1, cuadro 12); RMN ¹³C (espectro 1.2, cuadro 12); EM-IE m/z (% intensidad relativa): 190 (25), 205 (42), 232 (100), 330 [M]⁺ (1).

Columna 2.

Las fracciones 1-7 (6.35 g) de C1 se purificaron por una CCV (C2), utilizando mezclas de disolvente hexano-AcOEt en gradiente de polaridad creciente. Se obtuvieron 82 fracciones. Las fracciones 47-53 (159 mg), eluidas con hexano, se purificaron mediante una columna flash (C2a) utilizando como disolvente de elución mezcla hexano-Me₂CO (9:1) para obtener 30 fracciones. De las fracciones 18-23 se obtuvieron 12 mg del compuesto II.

(1*R*,4*R*,5*S*,6*R*,7*S*,8*R*,9*S*,2''*S*,2'''*E*)-4-acetil-8-(2-metilbutanoiloxi)-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-10(14)-oplopen-3-ona (II).



Prismas incoloros (hexano-acetona); pf 115-117 °C; [α]_D²⁵ -14.28° (c 0.07, cloroformo); DC (c 0.285 x 10⁻³ MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm): -1.42 (302); IR (CHCl₃): ν_{max} 1745, 1727, 1715 cm⁻¹

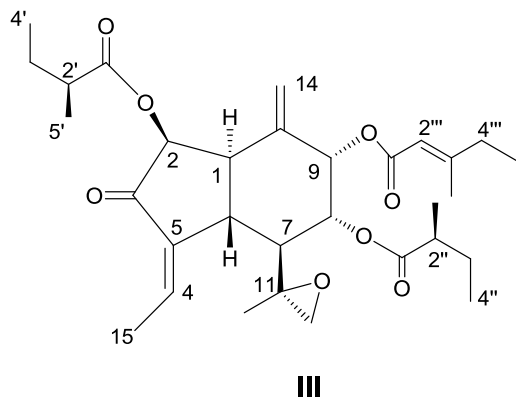
(espectro 2.7); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 219 nm (3.41); RMN ^1H (espectro 2.1, cuadro 13); RMN ^{13}C (espectro 2.2, cuadro 13); EM-IE m/z (% intensidad relativa): 57 (15), 97 (100) 491 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (1); EMARESI m/z 529.2564 $[\text{M} + \text{K}]^+$ (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{KO}_7$ 529.2562).

Columna 3

Las aguas madres de la fracción 8 y la fracción 9 de C1 se reunieron (15.04 g) y se purificaron mediante una CCV (C3) eluida con mezcla de hexano-AcOEt en gradiente de polaridad creciente obteniendo 43 fracciones. Las fracciones eluidas con hexano-AcOEt 19:1 (15-23) presentaron sólidos que se identificaron como el compuesto **I** (2.05 g) por su punto de fusión y CCD.

Las fracciones 24-35 (440 mg) obtenidas con el mismo gradiente de mezcla se purificaron mediante una columna flash (C3a) utilizando como fase móvil hexano-AcOEt (17:3). De las fracciones 15-21 se obtuvo un aceite amarillo identificado como el compuesto **III** (203 mg).

(1*H* α ,2*\beta*,6*H* β ,7*\beta*,8*\alpha,9*\alpha*,4*Z*,2''''*E*)11,12-epoxi-2,8-di-(2-metilbutanoiloxi)-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-4,5-10(14)-oplopedien-3-ona (III).*⁴²

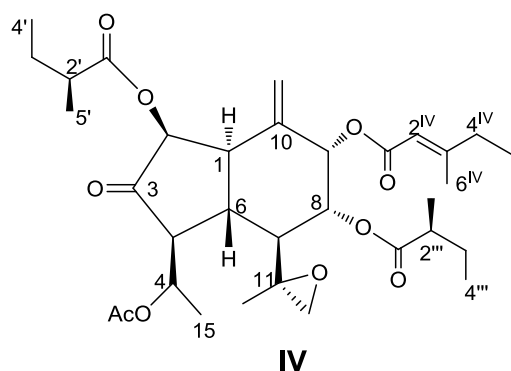


Aceite incoloro; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -115.0° (c 0.2, cloroformo); CD (c 0.308×10^{-3} MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm): -0.84 (351); IR (CHCl_3): $\nu_{\text{máx}}$ 1740, 1646 cm^{-1} ; RMN ^1H (espectro 3.1, cuadro 14); RMN ^{13}C (espectro 3.2, cuadro 14); EMARESI m/z 567.2925 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{NaO}_8$ 567.2928).

Columna 4

Las fracciones 10-14 (5 g) de C1 se purificaron por una cromatografía en columna al vacío (C4) utilizando como disolvente de elución mezclas de hexano-Me₂CO en gradiente de polaridad creciente para obtener 133 fracciones. De las fracciones 1-25 eluidas con hexano se aisló el compuesto **I** (203 mg). De las fracciones 26-29 eluidas con hexano-Me₂CO (99:1) se separó un sólido que fue recristalizado en hexano-Me₂CO para obtener el compuesto **IV** (335 mg).

(1R,2S,4R,5S,6R,7S,8R,9S,11S,2'S,2'''S,2^{IV}E) 11,12-epoxi-2,8-di-(2-metilbutanoiloxi)-4-acetil-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-10(14)-oplopen-3-ona. (IV).⁴²

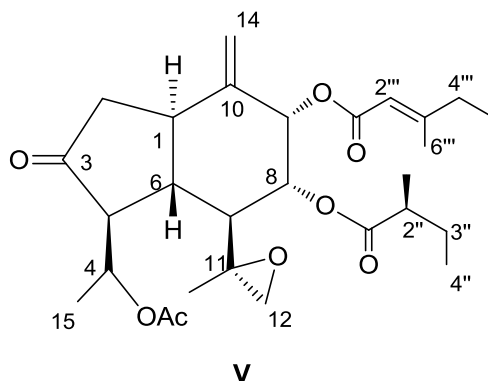


Prismas incoloros (hexano-acetona); pf 105-108 °C; $[\alpha]_D^{25} -69.5^\circ$ (c 0.21, cloroformo); DC (c 0.033 X 10⁻³ MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm): -16.08 (319); IR (CHCl₃): $\nu_{m\acute{a}x}$ 1762, 1728, 1647 cm⁻¹; RMN ¹H (espectro 4.1. cuadro 15); RMN ¹³C (espectro 4.2, cuadro 15); EMARESI m/z 627.3127 [M+Na]⁺ (calculado para C₃₃H₄₈ NaO₁₀ 627.3140).

Las fracciones 30-78 (1.6 g), obtenidas con la mezcla hexano-Me₂CO (19:1) fueron purificadas por columna flash (C4a) utilizando como fase móvil hexano-Me₂CO (9:1) para obtener:

- De las fracciones 10-13 el compuesto **III** (394 mg).
- De las fracciones 36-46 el compuesto **IV** (25 mg).
- De las fracciones 71-103 el compuesto **V** (569 mg).

(1R,4R,5S,6R,7S,8R,9S,11S,2''S,2'''E)-11,12-epoxi-8-(2''metilbutanoiloxi)-9-(3'''-metil-2'''-pentenoiloxi)-10(14)-oplopen-3-ona (V).³²



Prismas incoloros (hexano-acetona); pf 128-130 °C; IR (CHCl₃): $\nu_{\text{máx}}$ 1745, 1726, 1647 cm⁻¹; RMN ¹H (espectro 5.1. cuadro 16); RMN ¹³C (espectro 5.2, cuadro 16).

Las aguas madres de las fracciones 36-46 se reunieron con las fracciones 47-58 (458 mg) de C4a y fueron purificadas por columna flash (C4b) eluida con hexano-Me₂CO (9:1) para obtener 10 mg del compuesto **IV**.

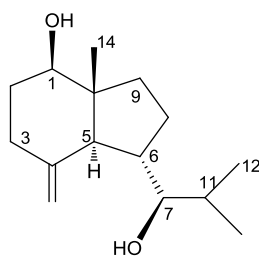
Columna 5

La purificación de las fracciones 15-23 de C1 (1.47 g) eluidas con hexano-Me₂CO (9:1) se realizó mediante una CCV (C5). Las primeras 40 fracciones se obtuvieron con hexano-AcOEt (19:1) y a partir de la fracción 41 se eluyó con mezcla hexano-AcOEt 9:1.

De las fracciones 5-14 se aislaron 132 mg del compuesto **V** y las fracciones 15-40 (214 mg) fueron purificadas mediante cromatografía en columna flash (C5a), utilizando como disolvente hexano-Me₂CO (4:1), para obtener 63 mg más del compuesto **V**.

Las fracciones 41-46 (487 mg) se purificaron mediante un CCF (C5b), utilizando como disolvente de elución hexano-AcOEt (4:1), para obtener de las fracciones 27-40, una mezcla (43 mg) que se purificó mediante cromatografía en placa preparativa eluida con hexano-Me₂CO (4:1) para aislar el compuesto **VI** (15 mg).

(7*R*)-opposit-4(15)-en-1β-ol (VI).³⁵



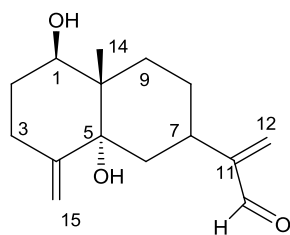
VI

Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25} +63.7^\circ$ (c 0.16, cloroformo); IR (CHCl₃): $\nu_{\text{máx}}$ 3587, 3450, 1464 cm⁻¹; RMN ¹H (espectro 6.1, cuadro 17); RMN ¹³C (espectro 6.2, cuadro 17).

Columna 6

Las fracciones 24-44 (2.4 g) de C1 se purificaron mediante una cromatografía en columna al vacío (C6) utilizando mezclas de hexano-AcOEt en polaridad creciente. Las fracciones obtenidas con hexano-AcOEt 19:1 (204 mg) fueron purificadas por columna flash (C6a) utilizando como disolvente hexano-AcOEt (4:1), las fracciones 12-18 (150 mg) se purificaron con una segunda columna flash (C6b) eluida con hexano-Me₂CO (7:3) para obtener 4 mg del compuesto **VII**.

1,5-dihidroxi-4(15)-11(12)-eudesmadien-13-al (VII).

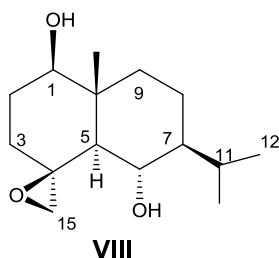


VII

Cristales incoloros (hexano-acetona); pf 132-135 °C; $[\alpha]_D^{25} +58.0^\circ$ (c 0.05, cloroformo); IR (CHCl₃): $\nu_{\text{máx}}$ 3495, 1677 cm⁻¹ (espectro 7.7); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 218 nm (3.867); RMN ¹H (espectro 7.1, cuadro 18); RMN ¹³C (espectro 7.2, cuadro 18); EMAR-FAB⁺ m/z: 251.3164 (calculado 251.1647 para C₁₅H₂₃O₃ [M+H]⁺).

Las fracciones (730 mg) eluidas con hexano-AcOEt (9:1) de C6 fueron purificadas por una CCF (C6c) utilizando como disolvente hexano-AcOEt (3:2). Las fracciones 13-16 de C6c (110 mg) se purificaron mediante cromatografía en placa preparativa fase inversa eluida con H₂O-MeOH (1:1) para obtener 24 mg de una mezcla que fue purificada por placa preparativa en hexano-Me₂CO (3:2) para obtener 6 mg del compuesto **VIII**.

4(15)-epoxi-1,6-eudesmanodiol (VIII).³⁶



Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25} -26.8^\circ$ (c 0.44, cloroformo); RMN ¹H (espectro 8.1, cuadro 19); RMN ¹³C (espectro 8.2, cuadro 19)

6.5.2 Extracto metanólico

Columna 7

El extracto metanólico (140 g) se fraccionó mediante una columna al vacío (C7) utilizando como fase móvil mezclas de disolventes AcOEt-MeOH en gradiente de polaridad creciente para obtener 112 fracciones (cuadro 2).

Cuadro 2. Fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto metanólico, polaridad en la que se obtuvieron y el número de la columna en que se purificaron.

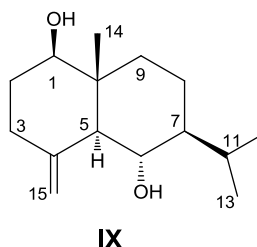
Fracciones	Disolvente	Columna
1-2	AcOEt	C8
3-8	AcOEt	
9-25	AcOEt	C9
26-38	AcOEt-MeOH 49:0	C10
39-51	AcOEt-MeOH 9:1	C11
52-112	AcOEt-MeOH 4:1	C12

Columna 8

Las fracciones 1-2 (1.16 g) se purificaron mediante una columna al vacío (C8) con mezclas de hexano-AcOEt en gradiente de polaridad creciente. De las fracciones obtenidas con hexano se obtuvieron 30 mg de mezcla de sitosterol-estigmasterol.

Las fracciones 35-53 (75 mg) eluidas con hexano-AcOEt (19:1) se purificaron mediante dos placas preparativas sucesivas con hexano-AcOEt (9:1) para obtener el compuesto **IX** (4 mg).

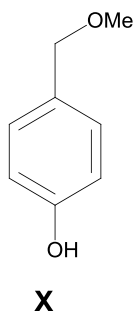
4(15)-eudesman-1 β ,6 α -diol (IX).³⁷



Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25} +18.5^\circ$ (c 0.59, cloroformo); RMN ^1H (espectro 9.1, cuadro 19); RMN ^{13}C (espectro 9.2, cuadro 19).

Las fracciones 80-107 (654 mg) eluidas con hexano-AcOEt (9:1) proporcionaron 8 mg del compuesto **X** mediante una purificación en columna flash (C8a) utilizando como disolvente mezcla de hexano- Me_2CO (3:1).

α -Metoxi-*p*-cresol (X)³⁸



Prismas incoloros (hexano- Me_2CO); pf 184-185 $^\circ\text{C}$, RMN ^1H (espectro 10.1, cuadro 20); RMN ^{13}C (espectro 10.2, cuadro 20).

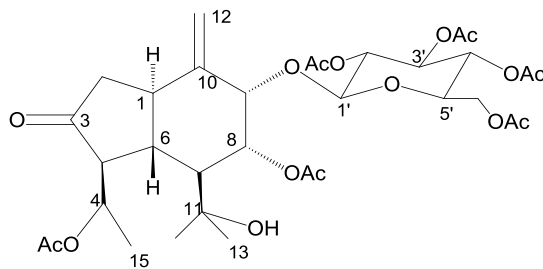
Columna 9

La purificación de las fracciones 9-25 de C7 (1.3 g) mediante una CCV (C9) utilizando como disolvente hexano-Me₂CO (4:1) dio lugar a 65 fracciones, de las cuales las primeras 7 (519 mg) se purificaron mediante una columna flash (C9a) utilizando como disolvente hexano-AcOEt (7:3). De C9a se obtuvo una mezcla (317 mg) que se purificó mediante una placa preparativa eluida con hexano-AcOEt (4:1) para obtener 7 mg del compuesto **IX**.

Las fracciones 31-35 de C9 se limpiaron mediante una cromatografía en columna al vacío (C9b) utilizando mezcla de CH₂Cl₂-MeOH en polaridad creciente obteniendo 70 fracciones, las fracciones 44-47 presentaron un sólido (185 mg) en cuyo espectro de ¹H RMN se observó una compleja mezcla de glicósidos, una parte de esta mezcla (112.7 mg) se acetiló para facilitar su purificación, y 60 mg fueron hidrolizados para identificar el azúcar presente en la misma.

La mezcla acetilada (82 mg) se purificó mediante una CCF con hexano-Me₂CO (7:3) obteniendo 50 fracciones, las fracciones 17-18 (12 mg) fueron nuevamente purificadas por CCF con AcOEt-hexano (3:2) para obtener 4 mg del compuesto **XI**.

9-O-β-D-(2'-O,3'-O,4'-O,6'-O-tetraacetil) glucopiranosido de (1R,4R,5S,6R,7R,8R,9S)-4-8-acetoxi-11-hidroxi-10(14)-oplopen-3-ona XI.



XI

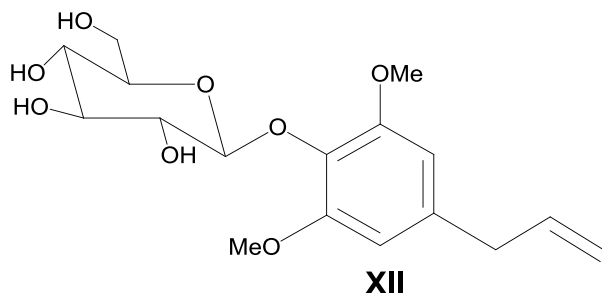
Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25} -32.38^\circ$ (c 0.21, cloroformo); DC (c 4.2 X 10⁻³MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm): -18.1 (302); IR (CHCl₃): $\nu_{\text{máx}}$ 3543, 1746 cm⁻¹ (espectro 11.7); RMN ¹H (espectro 11.1, cuadro

21); RMN ^{13}C (espectro 11.2, cuadro 21); EMAR-FAB⁺ m/z: 699.2853 (calculado 699.2864 para $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{O}_{16}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$)

Columna 10

Las fracciones 26-38 eluidas con AcOEt-MeOH (49:1) de C7 (504 mg) se purificaron mediante cromatografía en columna al vacío (C10). Se colectaron 67 fracciones con mezclas de AcOEt-MeOH. De la fracción 31, eluida AcOEt: MeOH (9:1), se obtuvo el compuesto **XII** (6 mg).

Glucósido de 4-alil-2,6-dimetoxifenol (XII).³⁹



Sólido blanco (hexano-AcOEt); pf 152-153 °C; RMN ^1H (espectro 12.1. cuadro 22); RMN ^{13}C (espectro 12.2, cuadro 22).

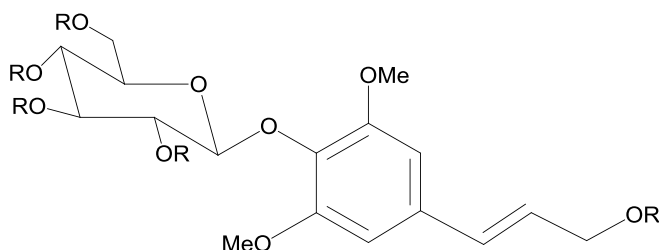
Columna 11

Las fracciones 39-51 (689 mg) de C7 se purificaron por medio de una columna flash (C11) utilizando como mezcla de elución AcOEt-MeOH (19:1) para obtener 77 fracciones.

De la purificación de las fracciones 17-23 (167 mg) por placa preparativa eluida con AcOEt-MeOH (49:1) se obtuvo una mezcla (43 mg) que se purificó con una columna flash (C11a) utilizando como disolvente CH_2Cl_2 -MeOH (19:1) para obtener 3 mg del compuesto **XII**.

Las fracciones 45-52 (38 mg) de C11 fueron purificadas con una placa preparativa fase inversa en H₂O-MeOH (1:1) seguida de una columna flash en AcOEt-MeOH (9:1) para obtener el compuesto **XIII** (8 mg).

Syringina (**XIII**).⁴⁰



XIII R= H
XIIIA R= Ac

XIII: Polvo amorfo blanco; RMN ¹H (espectro 13.1, cuadro 23); RMN ¹³C (espectro 13.2, cuadro 23).

XIIIA: Polvo amorfo blanco; RMN ¹H (espectro 14.1, cuadro 24); RMN ¹³C (espectro 14.2, cuadro 24).

Columna 12

Las fracciones 52-112 (11.7 g) de C7 se purificaron mediante una cromatografía en columna al vacío (C12) utilizando mezclas AcOEt-MeOH en gradiente de polaridad creciente. De las fracciones eluidas con AcOEt-MeOH (19:1) se separó un sólido (504 mg) el cuál fue acetilado para facilitar su purificación.

La mezcla acetilada (483 mg) se purificó mediante una cromatografía en columna flash (C12a) utilizando como disolvente CH₂Cl₂-Me₂CO (4:1), las fracciones 5-6 (212 mg) se purificaron por placa preparativa fase inversa en MeOH-H₂O (1:1) obteniendo 13 mg del compuesto **XIIIA**.

Acetilación de las mezclas de glicósidos

Para la acetilación se agregó a la sustancia (504 mg) 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de piridina. La mezcla se dejó reaccionar por doce horas. Una vez que se comprobó que la

reacción se había completado. Se adicionó agua, se extrajo con diclorometano (5 x 3 mL), se lavó con HCl al 5% (3 x 3 mL), con solución saturada de NaHCO₃ (3 x 3 mL), y con agua, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró en un rotavapor para obtener la mezcla acetilada que fue purificada por cromatografía.

Hidrólisis de la mezcla de glicósidos

La mezcla de glicósidos se calentó por media hora a 70°C con 5 mL de HCl 10%. La reacción se enfrió y extrajo con CHCl₃ (5 X 3 mL). La fase acuosa se evaporó con aire. Se obtuvo el derivado sililado agregando al residuo acuoso seco la mezcla de hexametildisilano-clorometilsilano-piridina (3:1:9). El análisis por cromatografía de gases de este derivado permitió identificar a la glucosa como el azúcar presente en la mezcla hidrolizada.

6.6 Metodología de las pruebas de actividad antiinflamatoria.

La actividad antiinflamatoria se determinó utilizando el modelo de edema inducido en oreja de ratón con acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA).⁴⁷ Se emplearon ratones macho (25-30 g), los cuales se dividieron en grupos de tres ratones: control (se administró TPA más el vehículo), prueba (recibieron TPA más el compuesto de prueba) y referencia (recibieron TPA más indometacina). Se colocaron en cajas de acrílico traslúcidas a temperatura constante de 22 ± 2 °C, con ciclos de luz oscuridad de 12 hr, los animales recibieron agua y alimento del laboratorio *ad libitum*.

Para anestésarlos se administró (vía intraperitoneal) 3.5 mg/kg de pentobarbital sódico. En la oreja derecha se aplicaron 10 µL de solución etanólica de TPA (2.5 µg/oreja) a todos los ratones, diez minutos después, en la misma oreja se aplicó una dosis de 1.0 µmol/oreja del compuesto de prueba o del fármaco de referencia (grupo de prueba y control, respectivamente) disueltos en 20 µL del vehículo. La oreja izquierda recibió 10 µL de etanol y 20 µL del vehículo del compuesto (control negativo). Cuatro horas después de la aplicación del TPA, los animales fueron sacrificados en cámaras de CO₂ para tomar una 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 la fórmula:

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

en donde C representa el edema del grupo control (tratado con TPA) y E corresponde al edema del grupo de prueba (TPA más el compuesto) o de referencia (TPA más indometacina).

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguida de una prueba de Dunnett de comparación múltiple para aislar los grupos con diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$). La DE_{50} se determina a partir de las ecuaciones de regresión no lineal con los datos significativos.

6.7 Metodología de la prueba de medición de mieloperoxidasa (MPO) por el método de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina).^{43,44,45}

Se agregó 1 mL de HTAB 0.5 % frío en un vial de 5 mL, se colocó la muestra de oreja en el vial y se homogenizó durante 30 s a velocidad máxima (25,000 rpm); el homogenizado se congeló en hielo seco.

Se congeló y descongeló por tres veces el homogenizado, en el último descongelamiento se sonizó por 20 segundos, después se centrifugó entre 5-10 min a 12,000 rpm a 4 °C, se tomó por cuadruplicado 1 μ L del sobrenadante y se colocaron en pozos. El blanco sólo llevó 10 μ L de HTAB 0.5 %, posteriormente se agregaron 180 μ L de PBS 80 mM, pH = 5.4 sin HTAB. Se calentó la placa a 37 °C, dicha temperatura se mantuvo durante el resto del ensayo, se agregó 20 μ L de H₂O₂ 0.017 % a cada pozo y se inició la reacción adicionando 20 μ L de TMB (18.4 mM) disuelto en DMF 50 % y se incubó por 5 min a 37 °C con agitación suave. Finalmente, se agregaron 20 μ L de H₂SO₄ 2 M y se midió la densidad óptica a 450 nm. Este procedimiento se realizó para cada oreja de los 25 ratones por cada compuesto de prueba.

7. RESULTADOS

7.1 Metabolitos aislados.

De los extractos hexánico y metanólico de *P. filare* se aislaron: un eremofilano (**I**), cuatro oplopanos (**II-V**), un opositano (**VI**), tres eudesmanos (**VII-IX**), un glucósido de oplopano (**XI**), dos fenilpropanoides (**XII y XIII**), α -metoxy-*p*-cresol (**X**) y la mezcla de sitosterol-estigmasterol. El oplopano (**II**), el eudesmano (**VII**) y el glucósido de oplopano (**XI**) no tienen descripciones previas en la literatura.

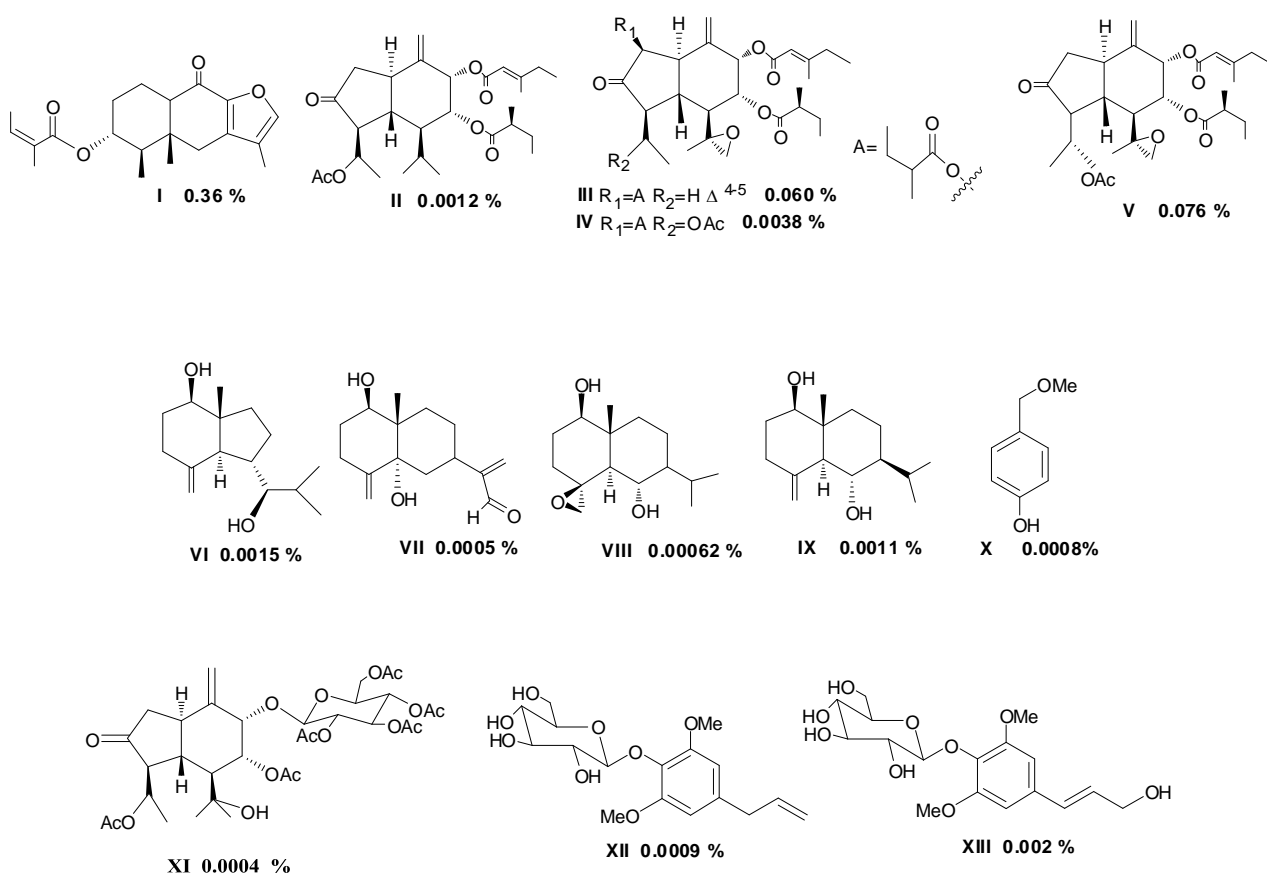


Figura 1. Metabolitos aislados de *Pittocaulon filare* y sus rendimientos

7.2 Resultados de las pruebas de actividad antiinflamatoria.

Los compuestos **I-V**, obtenidos en cantidad suficiente, fueron sometidos a un rastreo primario de actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido en oreja de ratón con TPA, estos resultados se muestran en el cuadro 3 y en la gráfica 1.

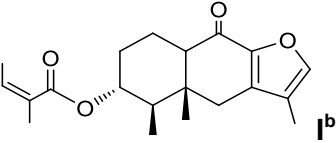
Se determinó la dosis inhibitoria cincuenta (DI_{50} , cuadro 4, gráfica 2) de los compuestos con actividad mayor a 60% (**II-V**).

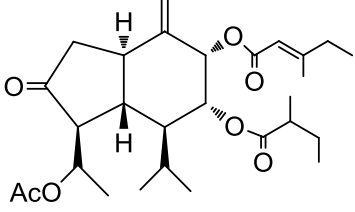
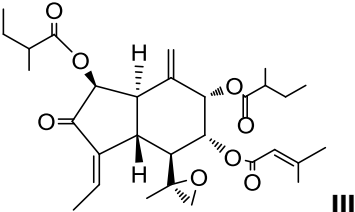
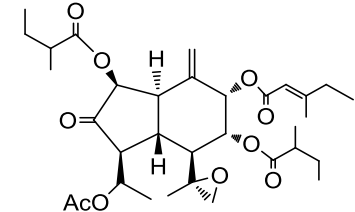
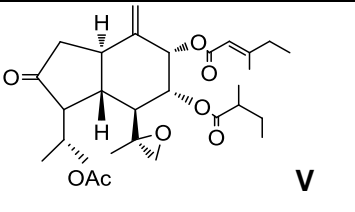
Para determinar el efecto de los compuestos probados en la migración de neutrófilos se realizó el ensayo de mieloperoxidasa^{43,44,45} (cuadros 5-9). Estos resultados se compararon mediante el cálculo del porcentaje de contenido de mieloperoxidasa obtenido para la prueba de cada oplopano, considerando como 100% la densidad óptica del TPA en cada prueba (cuadro 10).

Finalmente, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre la actividad antiinflamatoria y el contenido de mieloperoxidasa obtenido en los tejidos tratados con cada uno de los oplopanos (cuadro 11), con el fin de determinar si la inhibición en la migración de neutrófilos se encontraba asociada al efecto de disminución del edema en cada caso.

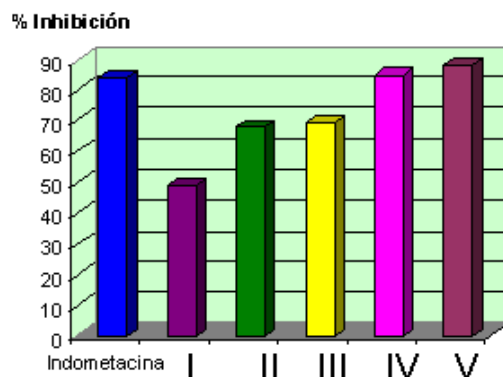
7.2.1 Rastreo primario de actividad anti-inflamatoria.

Cuadro 3. Rastreo primario de actividad anti-inflamatoria del extracto hexánico y los compuestos **I-V** utilizando el modelo de edema inducido con TPA.

Compuesto	Dosis ($\mu\text{mol/oreja}$)	Edema (mg)	Inhibición (%)
Indometacina ^a	1.0	1.99 \pm 0.68	83.73 **
	1.0	7.10 \pm 1.21	48.67 **

 <p style="text-align: right;">II</p>	1.0	4.47 ± 1.28	67.71 **
 <p style="text-align: right;">III</p>	1.0	4.23 ± 1.24	69.40 **
 <p style="text-align: right;">IV</p>	1.0	2.10 ± 0.37	84.82 **
 <p style="text-align: right;">V</p>	1.0	1.63 ± 0.06	88.19 **
Extracto hexánico ^c	1.0 (mg/oreja)	10.05 ± 0.71	33.88 *

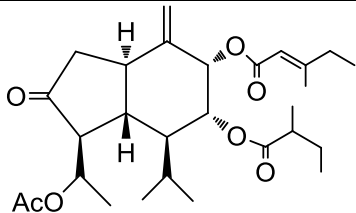
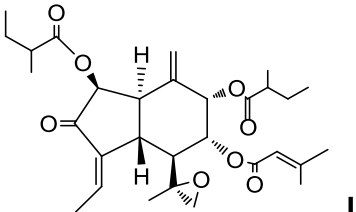
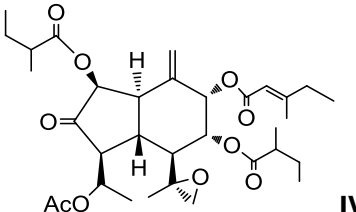
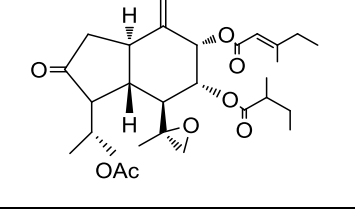
Control: ^a acetona (11.43 ± 1.30), ^b acetona: diclorometano (13.63 ± 0.32), ^c acetona: diclorometano (15.20 ± 0.65). Los datos representan el promedio de tres a cuatro animales ± el error estándar de la media ($\bar{x} \pm EEM$). Los resultados se analizaron mediante una prueba de *t* de Student y los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se considera como diferencia significativa con respecto al control.

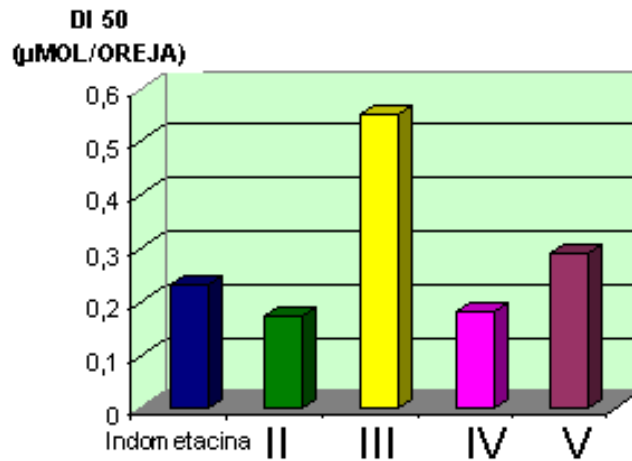


Grafica 1. Resultados del porcentaje de inhibición del edema.

7.3 Resultados de la determinación de la DI_{50} de los compuestos II-V.

Cuadro 4. DI_{50} de los oplopanos aislados (II-V).

Compuesto	Dosis ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)	Edema (mg)	Inhibición (%)	DI_{50}
Indometacina	0.031 0.1 0.31 1	12.78 ± 1.21 $10.74 \pm 1.13^*$ $5.62 \pm 0.89^{**}$ $2.88 \pm 0.78^{**}$	13.36 27.19 61.90 78.76	0.236 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ ($r = 0.98$)
 II	0.031 0.1 0.31 1	12.08 ± 0.75 $9.29 \pm 1.35^*$ $5.84 \pm 1.73^{**}$ $2.12 \pm 0.20^{**}$	21.15 39.43* 61.88** 86.16**	0.17 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ ($r = 0.99$)
 III	0.031 0.1 0.31 1	14.50 ± 0.68 $12.40 \pm 0.69^*$ $11.14 \pm 1.03^{**}$ $5.84 \pm 1.46^{**}$	11.37 24.21* 31.91** 64.30**	0.55 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ ($r = 0.79$)
 IV	0.031 0.1 0.31 1	14.22 ± 0.89 $9.02 \pm 1.61^*$ $5.74 \pm 1.54^{**}$ $1.38 \pm 0.43^{**}$	1.52 37.53* 60.25** 90.44**	0.18 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ ($r = 0.99$)
 V	0.031 0.1 0.31 1	13.22 ± 0.75 $11.04 \pm 1.40^*$ $7.50 \pm 1.20^{**}$ $2.92 \pm 0.40^{**}$	11.39 26.01* 49.73** 80.43**	0.29 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ ($r = 0.99$)



Gráfica 2. DI₅₀ de los oplopanos (II-V).

7.4 Resultados del ensayo de mieloperoxidasa en los tejidos tratados con los oplopanos.

Cuadro 5. Resultados del ensayo de mieloperoxidasa del compuesto II.

Muestra	Dosis (µmol/oreja)	MPO (DO/biopsia)	Contenido de MPO(%)	Inhibición de MPO (%)
Basal	-	0.024±0.005	5.76±1.45	-
TPA	-	0.376±0.011	100±2.73	-
II	0.031	0.234±0.041**	61.98±11.06**	38.01±11.06**
	0.1	0.170±0.028**	44.61±7.60**	55.38±7.60**
	0.31	0.146±0.038**	39.04±10.49**	60.95±10.49**
	1	0.048±0.013**	12.67±3.67**	87.32±3.67**

Cuadro 6. Resultados del ensayo de mieloperoxidasa del compuesto III.

Muestra	Dosis ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)	MPO (DO/biopsia)	Contenido de MPO(%)	Inhibición de MPO (%)
Basal	-	0.030 \pm 0.005	6.89 \pm 1.40	-
TPA	-	0.426 \pm 0.022	100.00 \pm 5.13	-
III	0.031	0.252 \pm 0.026**	58.84 \pm 6.27**	41.16 \pm 6.27**
	0.1	0.080 \pm 0.017**	18.72 \pm 4.17**	81.18 \pm 4.17*
	0.31	0.060 \pm 0.014**	14.44 \pm 3.27**	85.56 \pm 3.27**
	1	0.048 \pm 0.009**	11.07 \pm 3.13**	88.93 \pm 2.13**

Cuadro 7. Resultados del ensayo de mieloperoxidasa del compuesto IV.

Muestra	Dosis ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)	MPO (DO/biopsia)	Contenido de MPO(%)	Inhibición de MPO (%)
Basal	-	0.036 \pm 0.006	26.31 \pm 4.57	-
TPA	-	0.139 \pm 0.020	100.00 \pm 14.39	0.00 \pm 14.39
IV	0.031	0.179 \pm 0.019	128.46 \pm 14.01	-28.46 \pm 14.01
	0.1	0.051 \pm 0.014**	36.62 \pm 10.61**	63.37 \pm 10.61**
	0.31	0.034 \pm 0.005**	24.92 \pm 3.88**	75.07 \pm 3.88**
	1	0.026 \pm 0.002**	19.05 \pm 2.04**	80.94 \pm 2.04**

Cuadro 8. Resultados del ensayo de mieloperoxidasa del compuesto V.

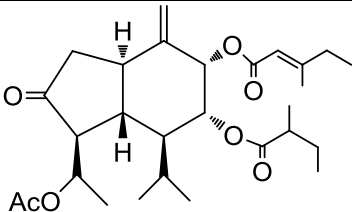
Muestra	Dosis ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)	MPO (DO/biopsia)	Contenido de MPO(%)	Inhibición de MPO (%)
Basal	-	0.053 \pm 0.006	18.15 \pm 2.15	-
TPA	-	0.292 \pm 0.023	100 \pm 7.97	-
V	0.031	0.224 \pm 0.029	76.92 \pm 10.02	23.08 \pm 10.02
	0.1	0.176 \pm 0.052*	60.32 \pm 17.94*	39.68 \pm 17.94*
	0.31	0.046 \pm 0.004**	15.75 \pm 1.43**	84.24 \pm 1.43**
	1	0.046 \pm 0.010**	16.05 \pm 3.60**	83.94 \pm 3.60**

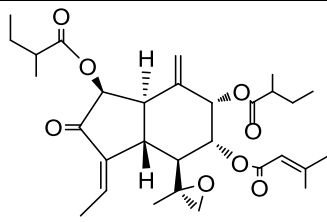
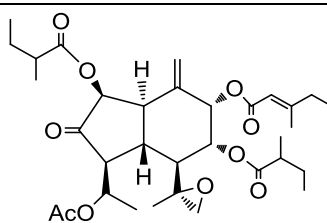
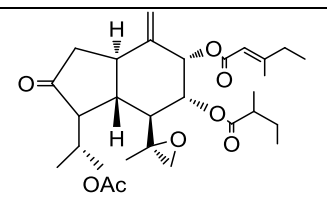
Cuadro 9. Resultados del ensayo de mieloperoxidasa de la indometacina.

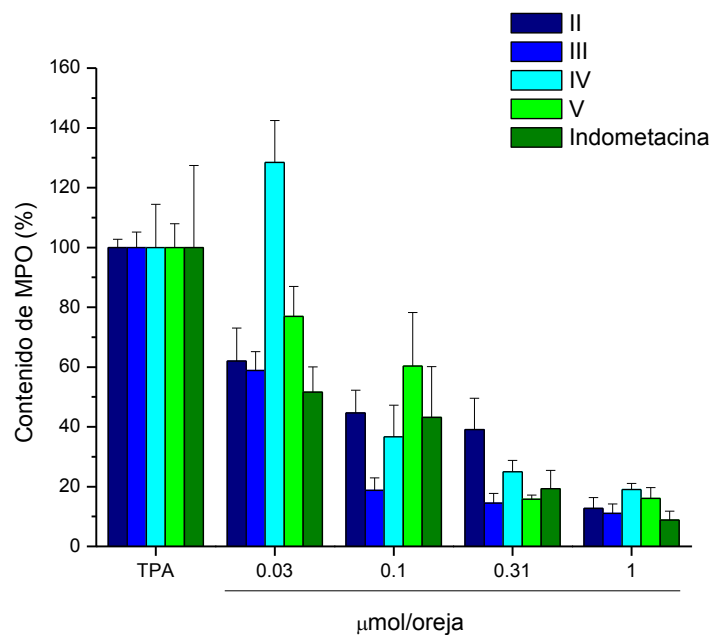
Muestra	Dosis (μmol/oreja)	MPO (DO/biopsia)	Contenido de MPO(%)	Inhibición de MPO (%)
Basal	-	0.013 ±0.006	-	-
Indometacina	C	0.202 ±0.029	100 ± 27.41	-
	0.031	0.104 ±0.052*	51.59 ± 8.48*	48.51
	0.1	0.087 ± 0.034 *	43.19 ±	56.93
	0.31	0.039 ± 0.012 **	16.92**	80.69
	1	0.018 ± 0.006 **	19.26 ± 6.2** 8.83 ± 2.98**	91.08

7.4.1 Estudio comparativo del contenido de mieloperoxidasa de tejidos tratados con los oplopanos II-V con los tratados con indometacina.

Cuadro 10. Resultados del contenido de mieloperoxidasa (%) de los tejidos tratados con los oplopanos y los tratados con indometacina.

Compuesto	Dosis (μmol/oreja)	Contenido de MPO(%)
Indometacina	0.031	51.59 ± 8.48*
	0.1	43.19 ± 16.92**
	0.31	19.26 ± 6.2**
	1	8.83 ± 2.98**
 II	0.031	61.98±11.06**
	0.1	44.61±7.60**
	0.31	39.04±10.49**
	1	12.67±3.67**

 <p style="text-align: right;">III</p>	0.031	58.84±6.27**
	0.1	18.72±4.17**
	0.31	14.44±3.27**
	1	11.07±3.13**
 <p style="text-align: right;">IV</p>	0.031	128.46±14.01
	0.1	36.62±10.61**
	0.31	24.92±3.88**
	1	19.05±2.04**
 <p style="text-align: right;">V</p>	0.031	76.92±10.02
	0.1	60.32±17.94*
	0.31	15.75±1.43**
	1	16.05±3.60**



Gráfica 3. Resultados del contenido de mieloperoxidasa % de tejidos tratados con los oplopanos y los tratados con indometacina.

7.5 Coeficiente de correlación de Pearson entre la actividad anti-inflamatoria de los compuestos II-V y el contenido de mieloperoxidasa.

Cuadro 11. Coeficiente de correlación de Pearson de la actividad anti-inflamatoria de los oplopanos y el contenido de mieloperoxidasa.

Compuesto	Coeficiente de correlación de Pearson	Valor de p (≤ 0.05)	Número de muestras
II	0.90	0.0001	25
III	0.69	0.00013	25
IV	0.71	0.0000064	25
V	0.84	0.0001	25
Indometacina	0.91	0.02	5

8. DISCUSION DE RESULTADOS

Las estructuras de los compuestos nuevos (**II**, **VII** y **XI**) fueron elucidadas por medio de técnicas espectroscópicas: Masas, UV, IR y RMN de ^{13}C y ^1H , mono y bidimensional, homo y heteronuclear.

En el caso de los compuestos **III** y **IV** se corrigió la estructura descrita en la literatura invirtiendo el orden de los sustituyentes en C-9 y C-8.

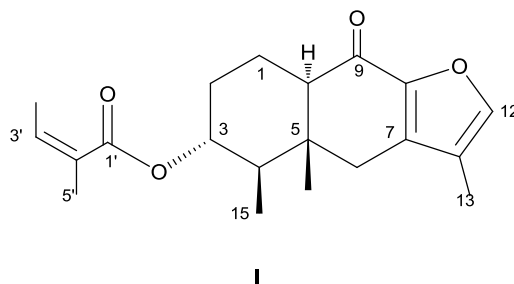
Se determinó la configuración absoluta de los compuestos **II**, y **IV** empleando los métodos de Dicroísmo Circular y difracción de rayos X.

La identidad de los compuestos conocidos: **I**, **III-VI**, **VIII-X** y **XII-XIII** fue determinada mediante la comparación de sus datos espectroscópicos (espectrometría IR y de RMN de ^1H y de ^{13}C) y constantes físicas con los descritos en la literatura, además en el caso del compuesto **V** y el sitosterol-estigmasterol los compuestos fueron comparados con muestras auténticas disponibles en el laboratorio.

A continuación se presenta la discusión de la elucidación de las estructuras de los compuestos obtenidos, seguida de la discusión de los resultados de las pruebas de actividad antiinflamatoria.

8.1 Elucidación de las estructuras.

3 α -Angeloiloxi-9-oxo furanoeremofilano (I).



De la fracción 8 del extracto hexánico se aisló un producto en forma de cristales incoloros solubles en cloroformo y con punto de fusión de 152-153 °C.

El espectro de IR mostró bandas a 1672 y 1697 cm^{-1} características de grupos carbonilos conjugados y a 1458 cm^{-1} la presencia de una banda característica de dobles enlaces.

La presencia de 20 átomos de carbono en el espectro de RMN ^{13}C (espectro 1.2, cuadro 12) junto con las señales protónicas de tres metilos a δ 1.90 (s), 0.99 (d, $J = 7.0$ Hz) y 0.88 (s) y del hidrógeno característico del furano (δ 7.37, d, $J = 1.0$ Hz) (espectro 1.1, cuadro 12) sugirió una estructura de sesquiterpeno de tipo furanoeremofilano sustituido con un éster de 5 átomos de carbono.

En el espectro de RMN de ^1H se observa un protón vinílico a δ 6.05 ppm que presenta interacciones, en el experimento COSY, con dos metilos a δ 1.98 y 1.90 ($\text{H}_3\text{-4}'$, $\text{H}_3\text{-5}'$), señales características de un grupo angelato. La posición de este grupo se elucidó por la interacción observada en el espectro HMBC entre H-3 (δ 4.83) y C-1' (δ 167.7).

En el espectro de RMN de ^{13}C se observa la presencia de un carbono de cetona conjugada a δ 185.9 el cual fue localizado en C-9 por sus interacciones con H-10 y H-1 en el experimento HMBC.

Con base en lo anterior, se dedujo que el compuesto **I** tiene una estructura de 9-oxo furanoeremofilano sustituido en C-3 con un grupo angelato, lo cual se corroboró con los datos observados en los experimentos DEPT, COSY, HMBC y HSQC. Las interacciones observadas en el espectro NOESY entre H-3 con H₃-15 y H₃-14 indicaron la orientación β de este hidrógeno ya que biogenéticamente los metilos 14 y 15 tienen una orientación β⁴¹ y, por lo tanto, la interacción entre H-4 y H-10 sugirió la orientación α de este último.

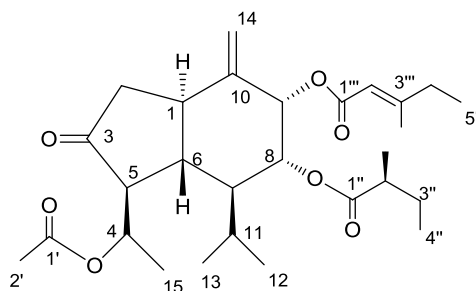
La estructura encontrada para el compuesto **I** corresponde a la reportada^{32,33,34} para el 3 α-angeloiloxi-9-oxo furanoeremofilano.

Cuadro 12. Datos de RMN-¹H y ¹³C de 3α-angeloiloxi-9-oxo furanoeremofilano (**I**).

Posición	RMN ¹ H, CDCl ₃ , 500 MHz	RMN ¹³ C, CDCl ₃ , 100 MHz	DEPT
1a	2.31 dtd (<i>J</i> = 14.5, 3.5, 3.5 Hz)	19.5	CH ₂
1b	1.56 dtd (<i>J</i> = 14.5, 12.0, 4.0 Hz)		
2 a	2.26 dtd (<i>J</i> = 12.0, 4.0, 4.0 Hz)	31.3	CH ₂
2 b	1.38 dtd (<i>J</i> = 12.0, 11.0, 4.0 Hz)		
3	4.83 td (<i>J</i> = 11.0, 5.0 Hz)	73.7	CH
4	1.82 dq (<i>J</i> = 11.0, 7.0 Hz)	47.4	CH
5	-	44.0	C
6a	2.76 d (<i>J</i> = 16.5 Hz)	35.5	CH ₂
6b	2.49 d (<i>J</i> = 16.5 Hz)		
7	-	136.3	C
8	-	146.8	C
9	-	185.9	C
10	2.44 dd (<i>J</i> = 12.0, 3.5 Hz)	55.0	CH
11	-	121.2	C
12	7.37 d (<i>J</i> = 1.0 Hz)	144.5	CH
13	2.00 d (<i>J</i> = 1.0 Hz)	7.6	CH ₃
14	0.88 s	13.1	CH ₃
15	0.99 d (<i>J</i> = 7.0 Hz)	10.6	CH ₃
1'	-	167.7	C

2'	-	128.3	C
3'	6.05 qq ($J = 7.5, 1.5$ Hz)	137.0	CH ₃
4'	1.98 dq ($J = 7.5, 1.5$ Hz)	15.6	CH
5'	1.90q ($J = 1.5$ Hz)	20.5	CH ₃

(1*R*,4*R*,5*S*,6*R*,7*S*,8*R*,9*S*,2''*S*,2'''*E*)-4-Acetil-8-(2-metilbutanoiloxi)-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-10(14)-oplopen-3-ona (II).



II

El compuesto **II** se aisló en forma de cristales incoloros solubles en cloroformo con un punto de fusión de 115-117 °C.

El espectro de UV presentó una absorbancia máxima a λ 219 nm correspondiente a un carbonilo conjugado. En el espectro de IR se observaron señales de cetona de anillo de 5 miembros (1745cm^{-1}), de ésteres ($1727, 1715\text{cm}^{-1}$) y dobles enlaces a 1667cm^{-1} (espectro 2.7).

La fórmula molecular de $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{O}_7$, con número de insaturación de 8 se dedujo por el ion molecular $[\text{M} + \text{K}]^+$ de m/z 529.2562 calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{KO}_7$ observado en el espectro de masas de alta resolución por electrospray.

En el espectro de RMN de ^{13}C (espectro 2.2, cuadro 13) se observaron las señales de 28 carbonos. Se distinguen 4 grupos carbonilos (uno de cetona a δ 213.8 y 3 carbonilos de éster a δ 175.5, 170.7 y 165.6) y cuatro a carbonos vinílicos (δ 162.7, 143.3, 114.1 y 111.6) los cuales contribuyen con 6 de las 8 insaturaciones de la molécula. Las otras dos insaturaciones deben provenir de una estructura, en la que hay un anillo de cinco

miembros en el que se encuentra el grupo cetona, lo cual sugiere un esqueleto de tipo oplopano.

En el espectro de RMN de ^1H (espectro 2.1, cuadro 13), se observaron dos señales pertenecientes a un metileno exocíclico (δ 5.20 y 4.88) que se encuentra localizado en C-10 por las interacciones observadas en el experimento HMBC (espectro 2.5, figura 2) entre H_2 -14 y los carbonos C-1 y C-9. Además, se observaron, las señales dobleteadas de tres metilos, dos pertenecen a los metilos del grupo isopropilo H_3 -12 y H_3 -13 (δ 1.14 y 0.89), puesto que interaccionan en el experimento HMBC con C-11 y C-7, y la tercera a H_3 -15 (δ 1.24) por el cruce de picos de estos protones con C-4 y C-5 observados en el mismo espectro (figura 3), confirmando de esta manera el esqueleto del oplopano.

En el espectro de RMN de ^1H se pueden observar las señales de tres protones geminales a grupos éster, la primera a δ 5.72 asignada a H-9 por las correlaciones alílicas observadas en el experimento COSY (espectro 2.4) con el metileno 14, las otras dos señales a δ 5.09 (m) y 5.06 (dd $J = 4.0, 3.0$ Hz) fueron asignadas a H-4 por las interacciones observadas en el espectro HMBC de C-4 con H-15 y a H-8 por el cruce de picos entre C-8 y H-9 en el mismo experimento.

Cuadro 13. Datos de RMN- ^1H y ^{13}C del compuesto (II).

Posición	RMN ^1H , CDCl_3 , 500 MHz	RMN ^{13}C , CDCl_3 , 100 MHz	DEPT
1	2.69 m	41.4	CH
2 a	2.46 ddd ($J=16.0, 6.0, 1.5$ Hz)	42.4	CH ₂
2 b	2.17 m		
3	-	213.7	C
4	5.09 qd ($J = 6.5, 3.0$ Hz)	69.8	CH
5	2.43 dd($J= 9.5, 3.0$ Hz)	57.4	CH
6	1.55 qa ($J = 11.0$ Hz)	44.9	CH
7	2.17 sobrelapada en H-6''	48.8	CH
8	5.06 m	72.8	CH
9	5.72 d ($J = 3.0$ Hz)	72.3	CH
10	-	143.3	C

11	2.25 m	27.9	CH
12	1.14 d ($J = 6.5$ Hz)	23.01	CH ₃
13	0.89 d ($J = 7.0$ Hz)	15.7	CH ₃
14a	5.20 d ($J = 1.5$ Hz)	111.6	CH ₂
14b	4.88 d ($J = 2.0$ Hz)		
15	1.24 d ($J = 6.5$ Hz)	15.9	CH ₃
1'	-	170.7	C
2'	2.10 s	21.1	CH ₃
1''	-	175.5	C
2''	2.32 sext ($J = 7.0$ Hz)	41.4	CH
3a''	1.7 dqd ($J = 14.0, 14.0, 7.5$ Hz)	26.2	CH ₂
3b''	1.43 dqd ($J = 14.0, 14.0, 7.5$ Hz)		
4''	0.90 t ($J = 7.5$ Hz)	11.7	CH ₃
5''	1.13 d ($J = 7.0$ Hz)	16.6	CH ₃
1'''	-	165.6	C
2'''	5.66 tq ($J = 1.5, 1.0$ Hz)	114.1	CH
3'''	-	162.7	C
4'''	2.18 m	33.8	CH ₂
5'''	1.08 t ($J = 7.5$ Hz)	11.9	CH ₃
6'''	2.15 sa	18.9	CH ₃

Con el espectro COSY (espectro 2.4) se pudo elucidar la secuencia de los carbonos, ya que se observaron las interacciones de H-1 con H-6, H-2a y H-2b, de H-5 con H-6 y H-4, de H-9 con H-14 y H-8, y finalmente las interacciones de H-7 con H-6 y H-8.

De las 28 señales de carbono observadas en el espectro de ¹³C, en el espectro DEPT se observó la presencia de ocho metilos, cuatro metilenos y diez metinos en concordancia con la estructura propuesta del compuesto II. La asignación de los carbonos se logró con la ayuda de los experimentos HSQC (espectro 2.3).

En el espectro HMBC (espectro 2.5) se pudo observar la correlación entre los hidrógenos H-2'' y H-3'' y entre H-8 y C-1'', determinando así que el éster 2-metil-butanoato está en

posición 8. De igual manera, se observaron las interacciones del H2''' con C-1''' y éste a su vez, con H-9, determinando que el éster 3-metil-pentenoato está en posición 9 y finalmente se observaron las interacciones de los hidrógenos del metilo 2' con C-1' y este a su vez con el protón H-4, determinando que el grupo acetato se encuentra en posición 4.

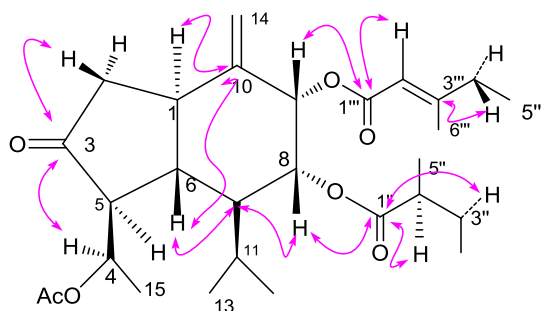


Figura 2. Principales interacciones HMBC del compuesto II.

En el experimento NOESY (figura 3) se pueden ver las interacciones entre los protones H-1, H-5 y H-7, que indican que estos protones están del mismo lado y del lado opuesto a H-6, H-8 y H-9, que también interactúan entre si lo que nos indica que la unión de ambos anillos es *trans* y que los ésteres se encuentran del mismo lado de la molécula, de igual manera se observó la interacción entre H-2''' y H₂-4''' indicando que el doble enlace es *E*.

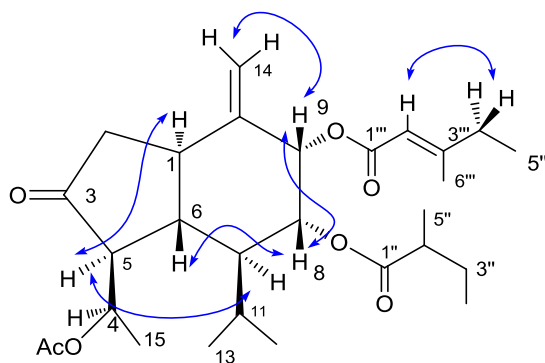


Figura 3. Principales interacciones NOESY del compuesto II.

La estructura y configuración relativa del compuesto II fueron confirmadas por análisis de rayos X (Figura 4).

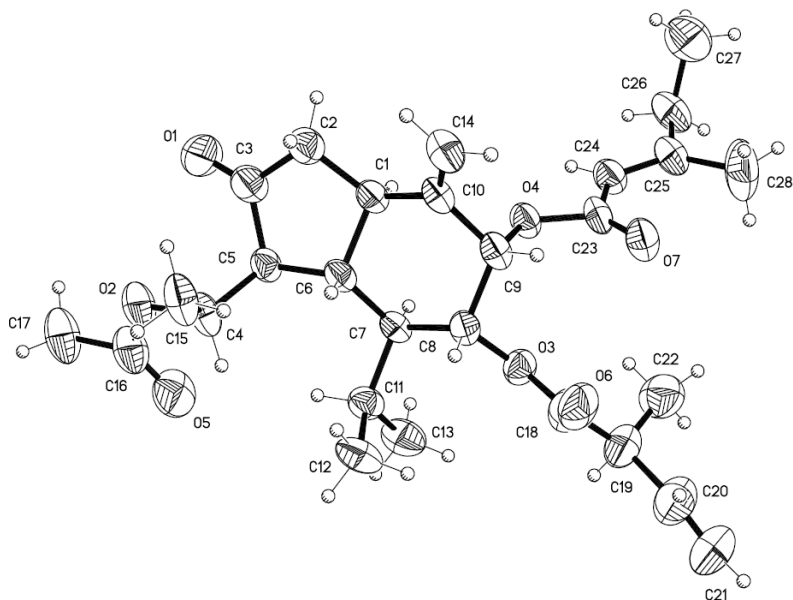
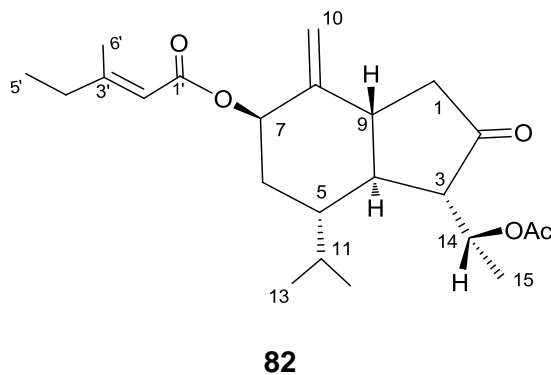
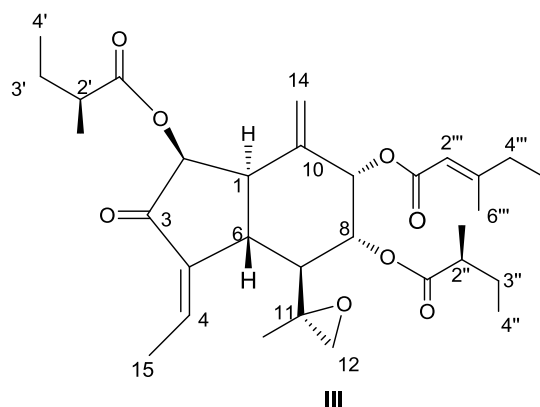


Figura 4. Estructura del compuesto **II** determinada por Difracción de Rayos x.

La configuración absoluta se estableció por el espectro de dicroísmo circular (DC) en el cual se observó un efecto Cotton negativo en la banda $n-\pi$ a de la cetona λ 303 nm ($\Delta\epsilon = -1.42$), igual que el reportado para la tussilagona⁵¹ **82** cuya configuración absoluta es conocida, por lo tanto la configuración absoluta del compuesto **II** se determinó como (1*R*,4*R*,5*S*,6*R*,7*S*,8*R*,9*S*,2''*S*,2'''*E*)-4-acetil-8-(2-metilbutanoiloxi)-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-10(14)-oplopen-3-ona.



(1*H*_α,2*β*,6*H*_β,7*β*,8*α*,9*α*,4*Z*,2''''*E*)11,12-epoxi-2,8-di-(2-metilbutanoiloxi)-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-4,5-10(14)-oplopedien-3-ona (III).⁴²



De las fracciones eluidas con hexano-Me₂CO (19:1) del extracto hexánico se aisló un aceite incoloro identificado como el compuesto **III**.

En el espectro de IR este compuesto presentó bandas a 1740 y 1646 cm⁻¹ pertenecientes a grupos carbonilo y dobles enlaces. Su fórmula molecular de C₃₁H₄₄O₈ fue determinada por el ion molecular [M + Na]⁺ de *m/z* 567.2928 observado en el espectro de masas exactas por electrospray.

El espectro de RMN de ¹H (espectro 3.1, cuadro 14) resultó ser muy parecido al del compuesto **II** lo que indicó que también se trata de un oplopano. Sin embargo, hay ciertas diferencias:

Se puede observar que la señal de H-2 integra para un hidrógeno y está desplazada a δ 5.54, es decir, es un metino geminal a un grupo éster.

En posición 4 encuentra un protón cuya señal se observa como cuartete dobleteado a δ 6.43 (*J* = 7.5, 2.0 Hz). Este protón interacciona en el experimento COSY con un metilo a δ 2.19 (*J* = 7.5 Hz) y a larga distancia con H-6, indicando la presencia de un doble enlace en C-4.

Las señales de H₂-12 (δ 2.82 y 2.65) y la ausencia de H-11 indican la presencia de un epóxido en C-11.

La identidad del grupo éster (2-metil-butanoato) en posición 2 se determinó por el espectro HMBC ya que se observó el cruce de picos entre los hidrógenos H-2' y H-3', y H-

2 con el C-1'. Este mismo experimento permitió determinar la presencia de los ésteres 3-metil-2-pentenoiloxy y 2-metilbutanoiloxy en C-9 y C-8, respectivamente, igual que en el compuesto II.

En el espectro NOESY (Figura 5) se observó la interacción entre H-4 y H₂-12 de lo que se dedujo que el doble enlace en C-4 tiene una estereoquímica Z. Así mismo, de la interacción entre H-2''' y H₂-4''' se concluyó que, como en II, la estereoquímica del éster 3-metil-2-pentenoiloxy es E. Además, los picos cruzados de H-1 con H-2 y H-7 y de H-8 con H-9 y H-6 permitieron determinar la configuración relativa del compuesto III como 1H α ,2 β ,6H β ,7 β ,8 α ,9 α ,4Z,2'''E.

La estructura III corrige la reportada por Bolhman⁴² y colaboradores para un compuesto con los mismos datos de RMN de ¹H y constantes físicas que el compuesto III pero con la posición de los ésteres en C-8 y C-9 intercambiada.

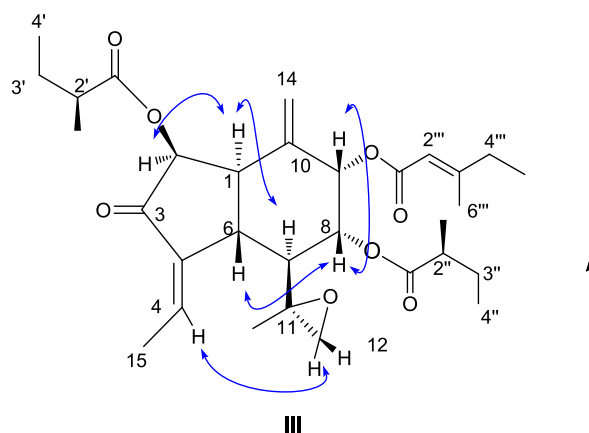


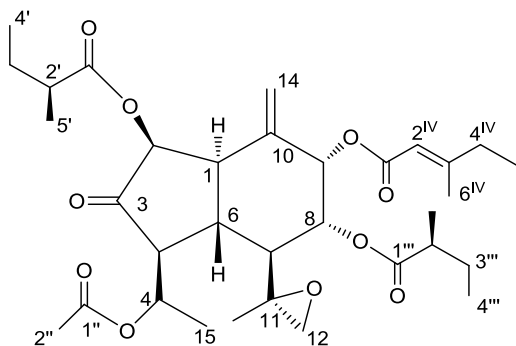
Figura 5. Principales interacciones NOESY de III

Cuadro 14. Datos de RMN-¹H y ¹³C del compuesto III.

Posición	RMN ¹ H, CDCl ₃ , 500 MHz	RMN ¹³ C, CDCl ₃ , 100 MHz	DEPT
1	2.78 da ($J=16.0$ Hz)	44.8	CH
2	5.54 d ($J= 4.5$ Hz)	71.6	CH
3	-	199.2	C
4	6.43 dq ($J= 7.5,2.0$ Hz)	139.4	CH

5	-	163.5	C
6	2.52 m	49.0	CH
7	2.15 m	47.3	CH
8	5.13 d ($J = 5.0$ Hz)	73.2	CH
9	5.62 da ($J = 1.5$ Hz)	71.6	CH
10	-	137.2	C
11	-	55.9	C
12a	2.82 d ($J = 4.0$ Hz)	51.2	CH ₂
12b	2.65 d ($J = 4.0$ Hz)		
13	1.52 s	22.4	CH ₃
14a	5.24 s	113.4	CH ₂
14b	4.94 sa		
15	2.19 d ($J = 7.5$ Hz)	15.2	CH ₃
1'	-	175.4	C
2'	1.44 m	26.4	CH
3'	2.37 hept ($J = 7.0$ Hz)	41.2	CH ₂
4'	1.15 d ($J = 7.0$ Hz)	16.5	CH ₃
5'	1.07 d ($J = 7.0$ Hz)	16.6	CH ₃
1''	-	165.5	C
2''	1.66 m	26.7	CH
3''	2.37 hept ($J = 7.0$ Hz)	40.9	CH ₂
4''	0.89 t ($J = 7.0$ Hz)	11.6	CH ₃
5''	1.15 d ($J = 7.0$ Hz)	16.5	CH ₃
1'''	-	175.7	C
2'''	5.65 q ($J = 1.5$ Hz)	113.7	CH
3'''	-	137.7	C
4'''	1.07 t ($J = 7.5$ Hz)	11.8	CH ₂
5'''	1.10 d ($J = 7.5$ Hz)	16.6	CH ₃
6'''	2.15 sext	18.9	CH ₃

(1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*R*,7*S*,8*R*,9*S*,11*S*,2'*S*,2''*S*,2^{IV}*E*) 11,12-epoxi-2,8di-(2-metilbutanoiloxi)-4-acetil-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-10(14)-oplopen-3-ona. (IV).⁴²



IV

El compuesto **IV** se aisló en forma de prismas incoloros de punto de fusión 105-108 °C, el espectro de IR mostró bandas a 1762, 1728 y 1647 cm⁻¹ que indican la presencia de grupos carbonilos.

En el espectro de masas de alta resolución por electrospray se observó el ion molecular (M+Na) de 627.3127 correspondiente a la fórmula molecular C₃₃H₄₈NaO₁₀.

El espectro de RMN de ¹H (espectro 4.1, cuadro 15) es similar al del compuesto **III**. La diferencia radica en la presencia de un grupo acetato en el C-4 ya que la señal de H-4 aparece a δ 5.19 y la de H-5 a δ 2.75 dd (*J* = 10.0, 3.2 Hz), en lugar del doble enlace 4-5 presente en **III**. Además, en el espectro de ¹³C (espectro 4.2, cuadro 15) se observan dos señales más que en el espectro del compuesto **III** a δ 165.2 y 15.6 pertenecientes al carbonilo y al metilo del grupo acetato.

Cuadro 15. Datos de RMN-¹H y ¹³C del compuesto **IV**.

Posición	RMN ¹ H, CDCl ₃ , 500 MHz	RMN ¹³ C, CDCl ₃ , 100 MHz	DEPT
1	2.64 da (<i>J</i> = 12.0 Hz)	45.3	CH
2	5.49 d (<i>J</i> = 5 Hz)	71.3	CH
3	-	206.4	C
4	5.19 m	68.5	CH
5	2.75 dd (<i>J</i> = 10.0, 3.2 Hz)	55.8	CH

6	2.10 m	41.1	CH
7	1.95 m	48.8	CH
8	5.19m	72.0	CH
9	5.74 d ($J = 3.6$ Hz)	72.6	CH
10	-	137.0	C
11	-	55.0	C
12a	2.84 d ($J = 3.6$ Hz)	52.7	CH ₂
12b	2.70 d ($J = 3.6$ Hz)		
13	2.10 s	16.7	CH ₃
14a	5.31 d ($J = 1.6$ Hz)	116.1	CH ₂
14b	4.90 d ($J = 2.0$ Hz)		
15	1.25 d ($J = 6.4$ Hz)	15.6	CH ₃
1'	-	174.7	C
2'	2.40 sext ($J = 6.8$ Hz)	41.1	CH
3a'	1.75 m	26.7	CH ₂
3b'	1.45 m		
4'	0.91 t ($J = 6.6$ Hz)	11.6	CH ₃
5'	1.17 d ($J = 6.2$ Hz)	16.2	CH ₃
1''	-	170.7	C
2''	2.10 s	21.3	CH ₃
1'''	-	176.0	C
2'''	2.40 sext ($J = 6.8$ Hz)	41.1	CH
3a'''	1.70 m	26.3	CH ₂
3b'''	1.45 m		
4'''	0.96 t ($J = 6.6$ Hz)	11.6	CH ₃
5'''	1.60 d ($J = 6.6$ Hz)	16.3	CH ₃
1^{IV}	-	165.2	C
2^{IV}	5.62 q ($J = 1.2$ Hz) m	113.7	CH
3^{IV}	-	163.3	C
4^{IV}	2.17 q ($J = 7.2$ Hz)	33.7	CH ₂
5^{IV}	1.08 t ($J = 7.2$ Hz)	11.8	CH ₃
6^{IV}	2.14 d ($J = 1.2$ Hz)	18.9	CH ₃

Por medio del espectro de HMBC se pudo determinar la posición del grupo acetato en C-4 por las interacciones de H-4 con C-1' (δ 174.7). En este mismo experimento se observaron las correlaciones de H-8 con el carbonilo C-1'' y de H-9 con el carbonilo C-1''' que indican la posición de los ésteres 2-metil-butanoato y el 3-metil-pentenoato.

La estructura y la configuración relativa de **IV** fueron corroboradas por difracción de rayos X (figura 6) y corrige la descrita en la literatura³⁶ con los ésteres en C-8 y C-9 intercambiados.

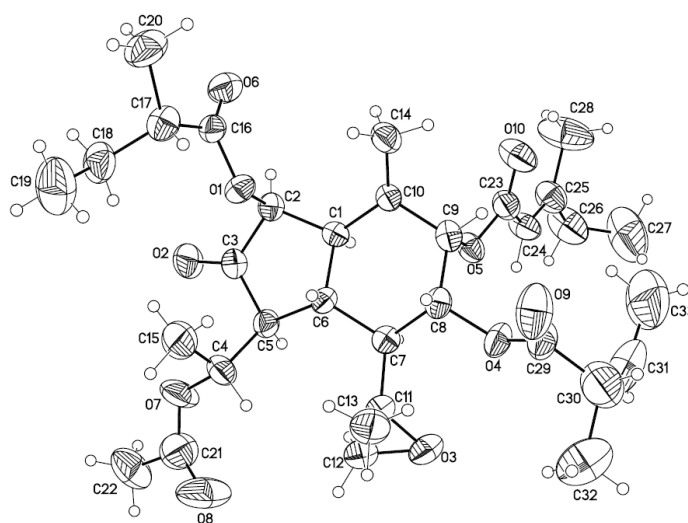
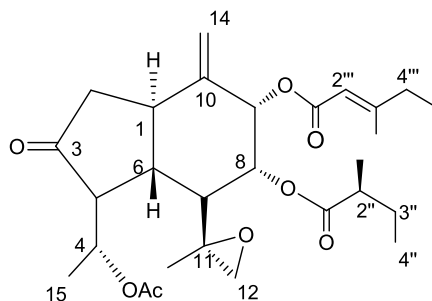


Figura 6. Estructura del compuesto **IV** determinada por rayos x.

En el experimento de dicroísmo circular se observó un efecto Cotton negativo en la banda $n-\pi$ de la cetona a λ 319 nm ($\Delta\epsilon$ -16.08). Aunque este efecto no puede estrictamente compararse con el de la tussilagona (**82**) puesto que hay un sustituyente adicional en C-2, teniendo en cuenta que los rayos x muestran que la configuración relativa de C-1, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8 y C-9 es la misma que la observada en el compuesto **II** y la tussilagona y que el signo del efecto Cotton se mantiene se puede concluir que la configuración absoluta del compuesto **IV** es: (1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*R*,7*S*,8*R*,9*S*,11*S*,2'*S*,2'''*S*,2^{IV}*E*)-11,12-epoxi-2,8-di-(2-metilbutanoiloxi)-4-acetoxi-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-10(14)-oplopen-3-ona.

(1*R*,4*R*,5*S*,6*R*,7*S*,8*R*,9*S*,11*S*,2''*S*,2'''*E*)-11,12-Epoxi-4-acetoxi-8-(2''metilbutanoiloxi)-9-(3'''-metil-2''-pentenoiloxi)-10(14)-oplopen-3-ona (V).³²



V

El compuesto **V** se aisló como prismas incoloros, con un punto de fusión de 128-130 °C, el espectro de IR mostró bandas características de carbonilos y dobles enlaces (1745, 1726, 1647 cm⁻¹).

El espectro de RMN de ¹H (espectro 5.1, cuadro 16) es muy similar al compuesto **II**, la única diferencia se observó en las señales de H₂-12 (δ 2.81 d *J* = 4.0 Hz y 2.69 d *J* = 4.0 Hz) que presentan un desplazamiento característico de grupo epóxido.

En el espectro de ¹³C (espectro 5.2) se observan las señales del C-11 y C-12 que aparecen a δ 54.9 y 52.8 respectivamente, con ayuda del experimento DEPT nos damos cuenta que se tratan de un carbono cuaternario y del metileno de un epóxido, conforme a la estructura del compuesto **V**.

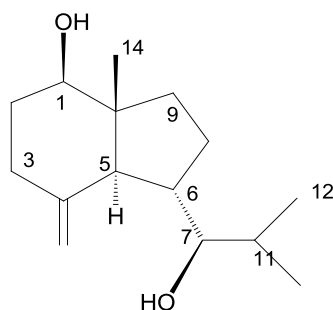
Cuadro 16. Datos de RMN-¹H y ¹³C del compuesto **V**.

Posición	RMN ¹ H, CDCl ₃ , 500 MHz	RMN ¹³ C, CDCl ₃ , 100 MHz	DEPT
1	2.5 ddd (<i>J</i> =17.0,7.0, 1.0 Hz)	40.9	CH
2a	2.42 dd (<i>J</i> =14.0,7.0 Hz)	41.8	CH ²
2b	2.18 m		
3	-	112.6	C
4	5.16 m	68.6	CH
5	2.64 da (<i>J</i> = 11.5 Hz)	56.4	CH
6	1.53 dd(<i>J</i> = 11.5, 11.5 Hz)	45.8	CH

7	2.01 m	48.8	CH
8	5.16 m	72.8	CH
9	5.80 d ($J = 3.5$ Hz)	72.2	CH
10	-	142.3	C
11	-	54.9	C
12a	2.81 d ($J = 4.0$ Hz)	52.8	CH ₂
12b	2.69 d ($J = 4.0$ Hz)		
13	1.25 s	15.9	CH ₃
14a	4.92 d ($J = 2.0$ Hz)	113.0	CH ₂
14b	5.29 d ($J = 1.5$ Hz)		
15	1.23 d ($J = 7.0$ Hz)	15.1	CH ₃
1'	-	170.9	C
2'	2.11 s	21.3	CH ₃
1''	-	176.1	C
2''	2.42 m	41.1	CH
3a''	1.76 ddq ($J = 14.5, 7.0, 7.0$ Hz)	26.3	CH ₂
3b''	1.48 ddq ($J = 14.5, 7.0, 7.0$ Hz)		
4''	0.91 t ($J = 7.0$ Hz)	11.6	CH ₃
5''	1.07 d ($J = 7.5$ Hz)	16.2	CH ₃
1'''	-	165.3	C
2'''	5.64q ($J = 1.0$ Hz)	113.9	CH
3'''	-	163.1	C
4'''	2.18 m	33.8	CH ₂
5'''	1.07 t ($J = 7.5$ Hz)	11.8	CH ₃
6'''	2.13 d ddq ($J = 1.5$ Hz)	18.9	CH ₃

La identidad de este compuesto se corroboró por comparación con una muestra auténtica del compuesto (1*R*,4*R*,5*S*,6*R*,7*S*,8*R*,9*S*,11*S*,2''*S*,2'''*E*)-11,12-epoxi-4-acetoxy-8-(2'-metilbutanoiloxi)-9-(3'-metil-2''-pentenoiloxi)-10(14)-oplopen-3-ona disponible en el laboratorio. La muestra de referencia fue obtenida de *Pittocaulon bombycophole*.³²

(7*R*)-Opposit-4(15)-en-1β-ol (VI).³⁵



VI

El compuesto **VI** se aisló como un aceite incoloro, en el espectro de IR se observaron bandas a 3587, 3450 y 1464 pertenecientes a grupo hidroxilo y doble ligadura.

En el espectro de RMN de ¹H (espectro 6.1, cuadro 17) se observaron las señales de dos metilos dobles a δ 0.99 y 0.91 (H₃-12, *J* = 7.0 Hz; H₃-13, *J* = 6.5 Hz), a δ 0.66 se observó la señal de un metilo singulete (H₃-14) y a δ 4.94, 4.80 las resonancias de un metileno exocíclico (H₂-15).

En el espectro HMBC se observaron las interacciones de un metino (δ 1.75, m) y dos metilos dobles (H₃-12 y H₃-15) con un carbono oxigenado asignado a la posición 7 indicando la presencia de un grupo isobutilo. En este mismo experimento, las interacciones de H-6 con C-5, C-7 y C8, de H₂-8 con C-9 y de H₂-9 con C-10 mostraron la presencia de un anillo de cinco miembros. Lo anterior y la presencia de 15 señales en el espectro de ¹³C sugirió una estructura con esqueleto de opositano.

Dentro de las señales de los 15 carbonos observadas en el espectro de ¹³C (espectro 6.2, cuadro 17) se distinguen las de dos carbonos oxigenados a δ 78.9 y 82.7, asignadas a C-1 y C-7, respectivamente; y las señales de dos carbonos vinílicos a δ 148.9 y 107.6 asignada a la posición C-4 y C-15 por las interacciones observadas en el experimento HMBC con H-3 y H-5, soportando la estructura **VI**

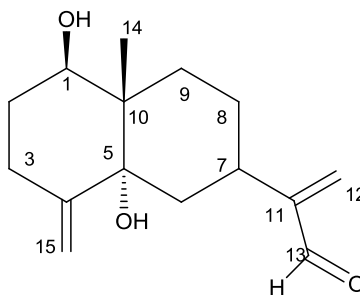
Cuadro 17. Datos de RMN-¹H y ¹³C del compuesto **VI**.

Posición	RMN ¹ H, CDCl ₃ , 500 MHz	RMN ¹³ C, CDCl ₃ , 100 MHz	DEPT
1	3.58 dd (<i>J</i> = 11.5, 5.0 Hz)	78.9	CH

2a	1.85m	31.8	CH ₂
2b	1.50 m		
3a	2.30 m	34.9	CH ₂
3b	2.10 m		
4	-	148.9	C
5	1.83 da (<i>J</i> = 10.0 Hz)	56.4	CH
6	2.32 m	39.4	CH
7	3.23 dd (<i>J</i> = 9.5, 3.0 Hz)	82.7	CH
8a	1.32 m	26.0	CH ₂
8b	1.90 m		
9a	1.75 m	37.3	CH ₂
9b	1.38 m		
10	-	49.5	C
11	1.75 m	31.3	CH
12	0.99 d (<i>J</i> = 7.0 Hz)	20.5	CH ₃
13	0.91 d (<i>J</i> = 6.5 Hz)	14.7	CH ₃
14	0.66 s	12.3	CH ₃
15a	4.94 q (<i>J</i> = 1.5 Hz)	107.6	CH ₂
15b	4.80 q (<i>J</i> = 1.5 Hz)		

La estructura encontrada para el compuesto **VI** corresponde a la reportada³⁵ para el (7*R*)-opposit-4(15)-en-1β-ol.

1,5 Dihidroxi-4(15),11(12)-eudesmadien-13-al (VII).



El compuesto **VII** se aisló en forma de cristales incoloros con punto de fusión de 132-135 °C, en el espectro de IR (espectro 7.7) mostró bandas a 3495, 1677 cm^{-1} características de grupos hidroxilo y carbonilo conjugado.

La fórmula molecular de $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$ se determinó por espectrometría de masas FAB de alta resolución.

El espectro de RMN de ^1H (espectro 7.1, cuadro 18) mostró la señal de un protón de aldehído a δ 9.55 asignado a H-13 por las interacciones observadas en el experimento HMBC con C-11. Siguiendo con el espectro se observaron dos metilenos vinílicos asignados a H_2 -12 (δ 6.31 y δ 6.03) por el cruce de picos con el H-7 observado en el experimento COSY (espectro 7.4), y a H_2 -15 (δ 4.85 y 4.68) por las interacciones observadas en el espectro HMBC con C-6 y C-5. Además se observó una señal de protón geminal al grupo hidroxilo a δ 4.12 asignada a H-1 (dd, $J = 14.5, 6$ Hz), ya que mostró cruce de picos con C-14 y C-2 en el experimento HMBC.

El espectro de ^{13}C (espectro 7.2, cuadro 18) mostró 15 señales de carbono: presentó el carbonilo del aldehído a δ 194.7 en posición 13, los cuatro carbonos vinílicos (δ 154.8, 150.1, 133.4 y 108.8) asignados a C-11, C-4, C-12 y C-15. También se observaron dos carbonos oxigenados (δ 72.8 y 75.8). Con ayuda del experimento DEPT se observó que uno de los dos era el metino en posición 1 y el segundo un carbono cuaternario al cual se le asignó la posición 5 por las interacciones observadas en el experimento HMBC (espectro 7.5, figura 7).

Cuadro 18. Datos de RMN- ^1H y ^{13}C del compuesto **VII**.

Posición	RMN ^1H , CDCl_3 , 400 MHz	RMN ^{13}C , CDCl_3 , 100 MHz	DEPT
1	4.12dd ($J = 11.6, 4.8$ Hz)	72.8	CH
2a	1.85m	30.5	CH ₂
2b	1.58 m		
3 α	2.72 tdt ($J = 13.6, 6.0, 1.6$ Hz)	29.7	CH ₂
3 β	2.17 ddd ($J = 14.0, 5.6, 2.0$ Hz)		
4	-	150.1	C
5	-	75.8	C

6α	1.58 m	35.9	CH ₂
6β	1.75 t ($J = 13.6$ Hz)		
7	3.15 ttd($J = 11.5, 4.0, 0.8$ Hz)	31.2	CH
8a	1.66m	25.4	CH ₂
8b	1.55 m		
9a	1.90 dda($J = 14.8, 4.0$ Hz)	29.7	CH ₂
9b	1.68m		
10	-	42.1	C
11	-	154.8	C
12a	6.32 d ($J = 0.8$ Hz)	133.4	CH ₂
12b	6.03 s		
13	9.55 s	194.7	CH
14	0.83 s	12.7	CH ₃
15a	4.85 t ($J = 2.0$ Hz)	108.8	CH ₂
15b	4.68 t ($J = 2.0$ Hz)		

En el espectro de HMBC (espectro 7.5, Figura 7) se observaron interacciones de C-1 con H-2a y la del hidrógeno del aldehído H-13 y H₂-12 con el carbonilo en posición 11.

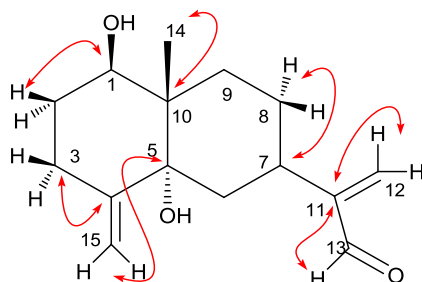


Figura 7. Principales interacciones HMBC del compuesto **VII**

Las principales interacciones observadas en el espectro NOESY (espectro 7.6, figura 8) fueron entre H-1 y H-3 α , de H-15a con H-3 β , y de H₃-14 con H-6 β ya que biogénicamente el metilo H₃-14 tiene una orientación β . Para que estas interacciones puedan observarse la unión de ambos ciclos de la molécula debe ser trans (utilizando los modelos Drielding) por lo que se colocó al grupo hidroxilo en posición 5 con orientación α .

La orientación de H-7 no fue determinada.

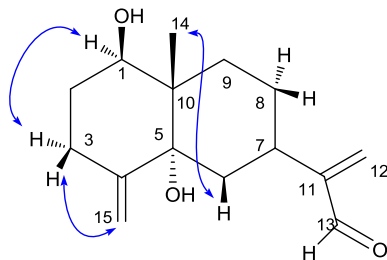
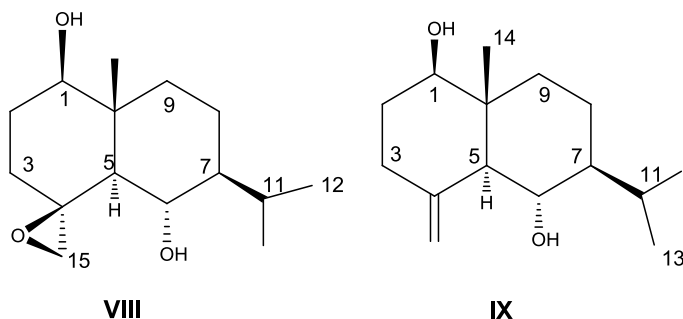


Figura 8. Principales interacciones NOESY del compuesto **VII**

4(15)-Epoxi-1,6 eudesmanodiol (VIII)³⁶ y 4(15)-Eudesmen-1 β ,6 α -diol(IX).³⁷



Ambos compuestos se aislaron como aceites incoloros. Los dos mostraron en el espectro de ^{13}C (espectro 8.2 y 9.2, cuadro 19) 15 señales de carbono. El compuesto **VIII** mostró dos señales δ 61.60 y 51.6 desplazamientos característico de carbonos unidos a epóxido, asignadas a C-4 y C-15 respectivamente. En el compuesto **IX** la señal de C-4 aparece desplazada a δ 146.2 y C-15 a δ 107.8 indicando la presencia de un metileno exocíclico.

El espectro de RMN- ^1H de **VIII** mostró (espectro 8.2, cuadro 19) las señales del metileno H_2 -15 a δ 3.22 y 2.78, con desplazamiento característico de epóxidos, y en el compuesto **IX** las señales de H_2 -15 se observaron a δ 5.02 y 4.74 indicando que se trata de un metileno exocíclico.

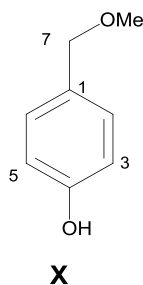
Ambos compuestos presentaron en el espectro de hidrógeno dos señales de protones geminales a grupo hidroxilo asignadas a H-6 y H-1 y los metilos dobles asignados a H_3 -12 y H_3 -13 característicos del grupo isopropilo.

Comparando sus datos espectroscópicos con los reportados en la literatura, se determinó que el compuesto **VIII** era el 4(15)-epoxi-1,6-eudesmandiol³⁶ y el compuesto **IX** el 4(15)-eud esmen-1 β ,6 α -diol,³⁷ ambos descritos en la literatura.

Cuadro 19. Datos de RMN-¹H y ¹³C de los compuestos VIII, IX.

Posición	RMN ¹ H, CDCl ₃ , 500 MHz		RMN ¹³ C, CDCl ₃ , 100 MHz		DEPT
	1	3.43 m	3.42 dd (<i>J</i> = 4.5, 11.0 Hz)	78.2	
2a	1.86m	1.86 m	29.4	31.9	CH ₂
2b	1.92 m	1.58 m			
3a	1.52 m	2.32 dd (<i>J</i> = 2.5, 13.5 Hz)	33.3	35.1	CH ₂
3b	1.96 m	2.06 dd (<i>J</i> = 2.5, 13.5 Hz)			
4	-	-	61.6	146.2	C
5	1.66 d (<i>J</i> = 10.0 Hz)	1.74 d (<i>J</i> = 11.5 Hz)	49.8	55.9	CH
6	3.44 m	3.71 t (<i>J</i> = 9.5 Hz)	67.6	67.0	CH
7	1.28 m	1.30 m	49.7	49.3	CH
8a	1.52 m	1.54 m	18.0	18.2	CH ₂
8b	1.88 m	1.25 m			
9	1.86 m	1.91 dt (<i>J</i> = 3.0, 11.5 Hz)	36.8	36.3	CH ₂
10	-	1.19 m	41.9		C
11	2.24 m	-	25.1	41.7	CH
12	0.92 d (<i>J</i> = 7.0 Hz)	2.24 dqq (<i>J</i> = 2.5, 7.0, 7.0 Hz)	15.9	26.0	CH ₃
13	0.82 d (<i>J</i> = 7.0 Hz)	0.87 d (<i>J</i> = 7.0 Hz)	21.0	16.2	CH ₃
14	0.87 s	0.95 d (<i>J</i> = 7.0 Hz)	12.2	21.1	CH ₃
15a	3.22 dd (<i>J</i> = 2.0, 2.0 Hz)	0.71 s	51.6	11.6	CH ₂
15b	2.78 dd (<i>J</i> = 1.0, 1.0 Hz)	5.02 d (<i>J</i> = 1.5 Hz)		107.8	
		4.74 d (<i>J</i> = 1.5 Hz)			

α -Metoxy-*p*-cresol (X).³⁸



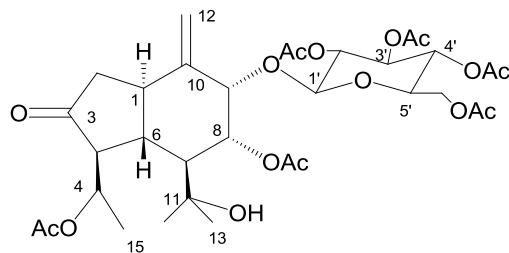
El compuesto **X** se aisló también del extracto metanólico de las fracciones eluidas con AcOEt. El espectro de RMN ¹H (espectro 10.1, cuadro 20) presentó las señales características de un sistema AA'BB' en anillo aromático disustituido en posición para. Siguiendo con el espectro se observa un singulete ancho que integra para un protón a δ 6.51 perteneciente a un alcohol, a δ 3.89 se observa un singulete que integra para dos hidrógenos perteneciente a un metileno y finalmente un singulete a δ 3.76, señal perteneciente a un metoxilo asignado a H₃-8.

El espectro de ¹³C (espectro 10.2, cuadro 20) presentó cinco señales, dos pertenecientes a carbonos aromáticos, una al metoxilo C-9 (δ 52.28) y otra al metileno C-7 (δ 40.53). El compuesto se encontró reportado en la literatura como α -metoxy-*p*-cresol.³⁸

Cuadro 20. Datos de RMN-¹H y ¹³C del compuesto **X**.

Posición	RMN ¹ H, CDCl ₃ , 400 MHz	RMN ¹³ C, CDCl ₃ , 100 MHz	DEPT
1	-	49.8	C
2	7.10 dd (<i>J</i> = 9.0, 9.0 Hz)	129.4	CH
3	7.26 s	119.0	CH
4	-	135.8	C
5	7.26 s	119.0	CH
6	7.10 dd(<i>J</i> = 9.0, 9.0 Hz)	129.4	CH
7	3.89 s	40.5	CH ₂
8	3.76 s	52.3	CH ₃

9-O-β-D-(2'-O,3'-O,4'-O,6'-O-Tetraacetil) glucopiranosido de(1R,4R,5S,6R,7R,8R, 9S)-4-8-acetoxy-11-hidroxi-10(14)-oplopan-3-ona XI.



XI

El compuesto XI se aisló en forma de aceite incoloro. En el espectro de IR (espectro 11.7) mostró bandas a 3543, 1746 cm^{-1} características de grupos hidroxilo y carbonilo, respectivamente.

La fórmula molecular de $\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{O}_{16}$, fue determinada por espectroscopía de masas de alta resolución FAB.

En el espectro de RMN de ^1H (espectro 11.1, cuadro 21), además de las señales del esqueleto del oplopano observadas en el compuesto II, se observaron las señales de un azúcar acetilado: el hidrógeno anomérico a δ 4.65 d ($J = 7.5$ Hz), las señales de los hidrógenos geminales a grupos acetatos entre δ 4.18 y 5.22 con los metilos correspondientes entre δ 2.07 y 2.00.

En el espectro de RMN de ^{13}C (espectro 11.2, cuadro 21) se observaron las señales de 33 átomos de carbono, 14 de las cuales corresponden al azúcar acetilado y las 19 restantes al esqueleto de oplopano sustituido con dos acetatos. Dentro de estas se distinguen 7 grupos carbonilo (uno de cetona a δ 214.9 y 6 carbonilos de acetato a δ 171.1, 170.5, 170.2, 169.6, 169.4 y 169.2) dos carbonos vinílicos (δ 144.4 y 111.1), el carbono anomérico (δ 99.5) y 9 señales más de carbonos oxigenados: 5 pertenecientes a la glucosa y 4 a carbonos del esqueleto de oplopano.

4

Cuadro 21. Datos de RMN-¹H y ¹³C del compuesto XI.

Posición	RMN ¹ H, CDCl ₃ , 500 MHz	RMN ¹³ C, CDCl ₃ , 100 MHz	DEPT
1	2.86 m	41.0	CH
2a	2.52 (<i>J</i> = 16.0, 6.0, 1.0 Hz)	42.5	CH ₂
2b	2.10 m		
3	-	214.9	C
4	5.63 qd (<i>J</i> = 6.5, 3.0 Hz)	70.4	CH
5	2.63 dd (<i>J</i> = 9.5, 3.0 Hz)	58.5	CH
6	1.66 dt (<i>J</i> = 12.0, 9.5 Hz)	41.6	CH
7	2.07 m	56.8	CH
8	5.10 m	71.9	CH
9	4.42 d (<i>J</i> = 1.5 Hz)	77.6	CH
10	-	144.4	C
11	-	71.9	C
12	1.18 s	24.4	CH ₃
13	1.44 s	32.4	CH ₃
14a	5.29 s	111.1	CH ₂
14b	4.93 s		
15	1.16 d (<i>J</i> = 7.0 Hz)	15.3	CH ₃
1'	4.65 d (<i>J</i> = 7.5 Hz)	99.5	C
2'	5.07 dd (<i>J</i> = 7.5, 10.0 Hz)	71.3	CH
3'	5.22 dd (<i>J</i> = 9.5, 9.5 Hz)	72.8	CH
4'	5.02 dd (<i>J</i> = 9.5, 8.0 Hz)	68.4	CH
5'	3.68 ddd (<i>J</i> = 9.5, 5.0, 3.0 Hz)	72.4	CH
6'a	4.18 (<i>J</i> = 12.5, 5.0 Hz)-	62.0	CH ₂
6'b	4.13 dd (<i>J</i> = 9.5, 3.0 Hz)		
COCH₃	2.07, 2.06, 2.05, 2.04, 2.03, 2.00	21.49, 21.14, 20.66, 20.57	
COCH₃		171.1, 170.5, 170.2, 169.6, 169.4, 169.2	

Se observó la presencia de solamente un carbono cuaternario oxigenado que fue asignado a la posición 11 por las interacciones observadas en el experimento HMBC (espectro 11.5, figura 9) entre los hidrógenos de los metilos H₃-12 y H₃-13 y C-11.

La asignación de los carbonos se logró con la ayuda de los experimentos HSQC (espectro 11.3).

Los protones geminales a grupos acetato H-4, H-8 se encontraron desplazados a δ 5.63, 5.10, respectivamente y fueron asignados por sus respectivas interacciones con C-3 y C-9 en el experimento HMBC. La interacción observada en este mismo experimento entre H-9 (δ 4.42) y el carbono anomérico del azúcar, permitió su localización en C-9.

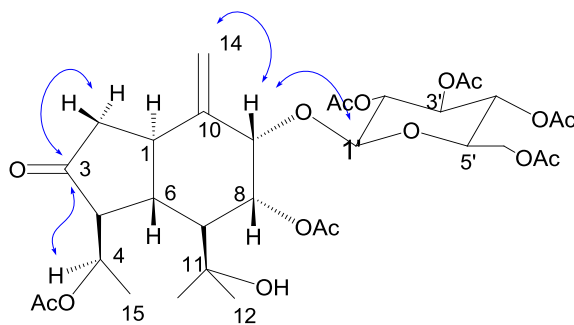


Figura 9. Principales interacciones HMBC del compuesto **XI**.

Para determinar la identidad del azúcar se realizó una hidrólisis de **XI** y por cromatografía de gases se determinó la identidad del azúcar por comparación de su derivado silylado con el patrón correspondiente como glucosa. El compuesto **XI** es por lo tanto un β -glucósido puesto que el protón anomérico es α axial ($J = 7.5$).

En el espectro NOESY (espectro 11.6, figura 10) se observaron las mismas interacciones que los compuestos **II-V**.

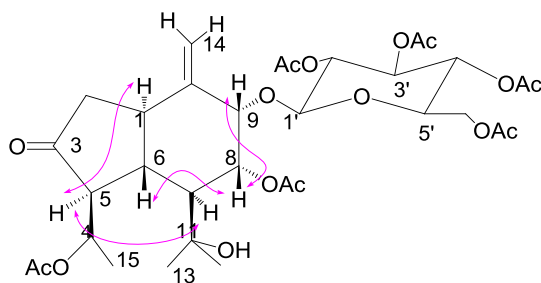
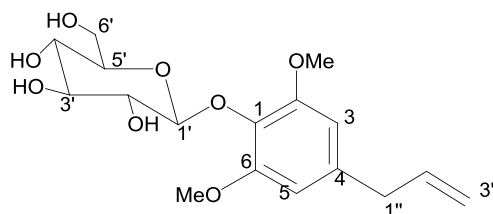


Figura 10. Principales interacciones NOESY del compuesto **XI**.

En el experimento de DC el compuesto **XI** mostró un efecto Cotton negativo en la banda $n-\pi$ a λ 302 nm ($\Delta\epsilon$ -18.1), comparable al de tussilagona (**82**), por lo tanto la configuración absoluta de **XI** es: 9-O- β -D-(2'-O,3'-O,4'-O,6'-O-tetraacetil) glucopiranosido de (1*R*,4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,8*R*,9*S*)-4,8-acetoxi-11-hidroxi-10(14)-oplopen-3-ona.

Glucósido de 4-alil-2,6-dimetoxifenol (**XII**).³⁹



XII

El compuesto **XII** se aisló como cristales incoloros con un punto de fusión de 152-153 °C.

El espectro de RMN de ^1H (espectro 12.1, t cuadro 22) mostró las características de un sistema aromático tetrasustituido simétrico puesto que presenta una señal simple a δ 6.52 que integra para dos hidrógenos que fueron asignados a H-3 y H-5 por el cruce de picos observado en el espectro COSY con el metileno en posición 1'' (δ 3.33, da, 7.0 Hz). Este metileno forma parte del grupo alilo unido a C-4 ya que, en el mismo experimento COSY, interactuó con el metino vinílico 2'' (δ 5.95, ddt, 17.0, 10.0, 6.5 Hz).

En el espectro de RMN de ^{13}C (espectro 12.2, cuadro 22), además de los carbonos atribuibles al sistema aromático y al grupo alilo, antes descritos, se observaron señales de carbonos oxigenados características de un azúcar: cinco metinos (δ 105.6, 78.3, 77.8, 75.7 y 71.4) y un metileno (δ 62.6). En el experimento de resonancia protónica el hidrógeno anomérico aparece a δ 4.80 (d, 7.5 Hz) sugirieron que el azúcar es β . La posición en C-1 del grupo azúcar se determinó por las interacciones observadas en el espectro de HMBC con C-2 y C-6.

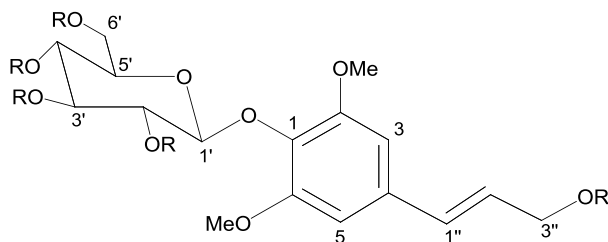
En el espectro de RMN de ^1H se observó también a δ 3.81 una señal simple que integra para seis hidrógenos y que se asignó a los grupos metoxilo en posiciones 2 y 6 del anillo aromático.

En el espectro de ^{13}C , se observaron 17 señales de carbono, las cuales fueron asignadas con ayuda de los experimento DEPT y HSQC y concuerdan con las estructura **XI** que resultó ser idéntica a la reportada en la literatura para el glucósido de 4-alil-2,6-dimetoxifenol.³⁹

Cuadro 22. Datos de RMN- ^1H y ^{13}C del compuesto **XII**.

Posición	RMN ^1H , MeOH, 500 MHz	RMN ^{13}C , MeOH, 100 MHz	DEPT
1	-	134.7	C
2	-	154.2	C
3	6.52 s	107.5	CH
4	-	138.4	C
5	6.52 s	107.5	CH
6	-	154.2	C
OMe	3.82 s	56.9	CH ₃
1'	4.80 d ($J = 7.5$ Hz)	105.6	CH
2'	3.39 dd($J = 7.5, 6.0$ Hz)	71.4	CH
3'	3.46 dd($J = 7.5, 6.0$ Hz)	75.7	CH
4'	3.41 dd($J = 7.5, 6.0$ Hz)	77.8	CH
5'	3.19 m	78.3	CH
6a'	3.78 dd($J = 12.0, 2.0$ Hz)	62.6	CH ₂
6b'	3.65 dd($J = 12.0, 3.0$ Hz)		
1''	3.33 da ($J = 7.0$ Hz)	41.4	CH ₂
2''	5.95 ddt($J = 17, 10, 6.5$ Hz)	138.6	CH
3''a	5.09 dtd($J = 17, 1.5, 1.5$ Hz)	116.2	CH ₂
3''b	5.04 ddt($J = 10, 2.0, 1.0$ Hz)		

Syringina (XIII)⁴⁰ y XIII A



XIII R=H
XIII A R=Ac

El compuesto **XIII** se aisló como un polvo amorfo, su espectro de RMN de ¹H (espectro 13.1, cuadro 23) es parecido al compuesto **XII**, a diferencia de que muestra dos señales de protones vinílicos desplazadas a campo bajo a δ 6.56 d ($J = 15.5$ Hz) y δ 6.21 dt ($J = 15.5, 7.0$ Hz) asignadas a H-1'' y H-2'', también se observa un hidrógeno geminal a grupo hidroxilo a δ 4.21 dd ($J = 5.5, 1.5$ Hz) asignado a H-3'' ya que presentó interacciones observadas en el espectro HMBC con C1'' y C-2'', en el caso del compuesto **XIII A** se observaron las señales de los hidrógenos geminales a grupo hidroxilo que se desplazaron a campo bajo como resultado de la acetilación y las señales de 4 metilos de acetato a δ 2.10, 2.04, 2.03 y 2.02.

El espectro de ¹³C (espectro 13.1, cuadro 23) también es parecido al compuesto **XII** a diferencia de los carbonos C-1'' y C-2'' que se encuentran desplazados a δ 135.9, 130.1 por ser carbonos vinílicos y C-3'' a δ 63.6 por ser oxigenados, en el espectro del compuesto **XIII A**, se observaron adicionalmente las señales de los carbonilos de los 5 ésteres y los metilos correspondientes.

Se compararon los datos espectroscópicos con los de la literatura y se encontró que el compuesto **XIII** estaba reportado como el Syringina⁴⁰.

Cuadro 23. Datos de RMN-¹H y ¹³C del compuesto **XIII** y **XIII Ac**.

Posición	RMN ¹ H, MeOH, 500 MHz	RMN ¹³ C, MeOH, 100 MHz	RMN ¹ H, CDCl ₃ , 300 MHz	RMN ¹³ C, CDCl ₃ , 100 MHz	DEPT
	Compuesto XIII		Compuesto XIII Ac		
1	-	135.9	-	169.3	C

2	-	154.3	-	153.1	C
3	6.78 s	105.5	6.60 s	140.0	CH
4	-	131.3	-	133.1	C
5	6.78 s	105.5	6.60 s	104.0	CH
6	-	154.4	-	143.8	C
OMe	3.82 s	57.0	3.82 s	56.3	CH ₃
1'	4.86 d (J = 7.5 Hz)	105.35	5.08 d (J = 7.0 Hz)	101.2	CH
2'	3.44 m	75.7	5.31 t (J = 7.0 Hz)	72.0	CH
3'	3.56 m	77.8	5.28 dd (J = 9.0, 7.0 Hz)	68.1	CH
4'	3.63 m	71.3	5.25 t (J = 9.0 Hz)	73.1	CH
5'	3.20 m	78.4	3.69 m	71.9	CH
6a'	3.46 m	62.6	4.24dd (J = 12.5, 5.0 Hz)	62.3	CH ₂
6b'	3.40 m		4.12dd (J = 12.5, 2.5 Hz)		
1''	6.54 d (J = 15.5 Hz)	135.9	6.56 d (J = 15.5 Hz)	133.9	CH
2''	6.32 dt (J = 16.0, 6.0 Hz)	130.1	6.21 dt (J = 15.5, 7.0 Hz)	122.3	CH
3''	4.21 dd (J = 5.5, 1.5 Hz)	63.6	4.72 dd (J = 6.5, 1.0 Hz)	64.8	CH ₂
<u>COCH₃</u>			2.10, 1.04, 2.03, 2.03, 2.03		
<u>COCH₃</u> ^a			20.98, 20.71, 20.67, 20.62		
<u>COCH₃</u> ^a			170.6, 170.5, 169.7, 169.5, 169.5		

^a datos de RMN de ¹³C de los acetatos del compuesto XIII Ac:

8.2 Discusión de los resultados de las pruebas biológicas

Actividad antiinflamatoria

El proceso inflamatorio desencadenado por el TPA no es completamente conocido pero se cree que se debe a la activación de la proteína cinasa c (PKc), la fosfolipasa A2 y la ciclooxigenasa, la formación del edema está asociado con el aumento de citosinas proinflamatorias y eicosanoides⁴⁷, que trae como efecto la migración de neutrófilos y otras células. Todos los agentes antiinflamatorios muestran actividad en este modelo, principalmente aquellos cuyo efecto inhibitorio se lleva a cabo en las enzimas ciclooxigenasas (Cox- 1 y Cox-2) y lipooxigenasas, así como los inhibidores de los leucotrienos, siendo las primeras mas efectivas en reducir la respuesta edematosa.⁴⁸

Con el fin de corroborar la actividad antiinflamatoria descrita para el género⁸ se sometieron los metabolitos más abundantes (**I-V**) a pruebas de actividad antiinflamatoria en edema inducido en oreja de ratón con TPA.

En el rastreo primario de actividad antiinflamatoria (cuadro 4, gráfica 1) se pudo observar que los oplopanos **IV** y **V** mostraron un mayor porcentaje de inhibición (84.82 y 88.19%, respectivamente) que el compuesto de referencia Indometacina (83.73%).

Se determinó la DI_{50} de los compuestos **II-V** utilizando el método isoblográfico descrito por Tallarida⁵², se graficó el porcentaje de inhibición de la inflamación vs el logaritmo de la dosis. Los oplopanos **II** y **IV** fueron los más activos con DI_{50} de 0.17 (-0.77)* y 0.18 (-0.74)*, respectivamente, menores que la indometacina 0.23 (-0.64)* (cuadro 5, gráfica 2).

*Valores logarítmicos

Se observó también que el compuesto **III**, que no tiene un grupo acetato en posición 4, fue el menos activo con una mayor DI_{50} (0.55 μ mol/oreja) indicando que este sustituyente juega un papel importante en la actividad antiinflamatoria de los compuestos estudiados.

La acumulación de neutrófilos es una medida característica de la inflamación cutánea, ya que migran al sitio de inflamación incrementando el edema para después liberar toxinas, sin embargo, la medición de neutrófilos en el sitio de inflamación está obstaculizada por el tejido. Así que se mide la mieloperoxidasa como marcador indirecto de estos ya que ésta enzima constituye el 5% de la masa total de los neutrófilos.⁴⁹

Se observó (tabla 10, gráfica 2) que el tejido tratado con el compuesto **II** a dosis de 0.1 y 1 μ mol/oreja muestra un contenido de mieloperoxidasa (44.61 y 12.67 %, respectivamente) similar al del tratado con indometacina (43.19 y 8.83 % respectivamente), lo que indica que la inhibición de migración de neutrófilos al sitio de inflamación es parte de su mecanismo antiinflamatorio. En el caso de los tejidos tratados con el compuesto **IV**, aunque se observó una inhibición de neutrófilos, esta fue menor que la observada en los tejidos tratados con indometacina, indicando que en este caso deben estar presentes otros mecanismos en el proceso anti-inflamatorio.

Para determinar la correlación de la inhibición del edema y la disminución de neutrófilos se utilizó el modelo estadístico de coeficiente de correlación de Pearson (tabla 11), que es un índice que mide el grado de covariación entre distintas variables relacionadas linealmente.⁵⁰ Se observó que los coeficientes de correlación de Pearson (ρ) tienen un valor menor a 0.05 indicando que en todos los oplopanos la inhibición de neutrófilos (mieloperoxidasa) está asociada con la disminución del edema.

9. CONCLUSIONES

- De *P. filare* se aislaron: un eremofilano (**I**), cuatro oplopanos (**II-V**), un opositano (**VI**) tres eudesmanos (**VII-IX**), dos fenilpropanoides (**XII** y **XIII**), α -metoxy-*p*-cresol (**X**), un glucósido de oplopano (**XI**) y mezcla sitosterol-esrtigmasterol.
- El oplopano **II**, el eudesmano **VII** y el glucósido de oplopano **XI** no tienen reportes previos en la literatura.
- Este es el primer reporte de un glucósido de oplopano.
- Se corrigieron las estructuras reportadas para los oplopanos **III** y **IV**.
- Es el primer reporte de opositanos (**VI**), eudesmanos (**VII-IX**) y fenilpropanoides aislados del género *Pittocaulon*.
- En el rastreo primario los oplopanos **II-V** presentaron entre 67 y 88% de inhibición de edema a una dosis de 1 (μ mol/oreja).
- Los compuestos **II** y **IV** fueron los más activos ya que presentaron una DI_{50} (0.17 y 0.18 respectivamente) menor que la indometacina (0.23).
- Comparando las estructuras de los oplopanos probados en el modelo de edema inducido por TPA, se puede concluir que el grupo acetato en posición 4 es importante para la actividad antiinflamatoria.
- En los resultados de contenido de mieloperoxidasa el compuesto **II** presentó una inhibición similar al de la indometacina **II** a dosis de 0.1 y 1 μ mol/oreja indicando que probablemente la inhibición de neutrófilos sea parte del mecanismo de su proceso antiinflamatorio.
- Por el contrario, el compuesto **IV** presentó menor inhibición de mieloperoxidasa, lo que indica que hay otros factores que influyen en su proceso antiinflamatorio.
- El coeficiente de correlación de Pearson mostró que en los cuatro oplopanos la inhibición de neutrófilos (mieloperoxidasa) está asociada con la disminución del edema.
- Considerando los objetivos planteados: *P. filare* con eremofilanos, oplopanos, y opositanos, es la especie del género *Pittocaulon* que muestra la mayor variedad de sesquiterpenos.
- Siendo los oplopanos los metabolitos má abundantes, es probable que la actividad antiinflamatoria atribuída al género se deba a la presencia de estos oplopanos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Dewick, M. P. Medicinal Natural Product (A Biosynthetic Approach), Editorial Wiley, New York, **2008**, 3^{ra} Edición, pag 1.
- 2.- Farnsworth, N.R; Ethnobotany and the Search for New Drugs, Wiley, **1994**, Editorial Ciba Foundation, pag 280.
- 3.- Harvey, A. L. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products, *Drug discovered today*, **2000**, 5, 294-300.
- 4.- Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 311-335.
- 5.- Vepoorte, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development, *Drug discovered today*, **1998**, 3, 232-238.
- 6.- Heinrich, M.; Robles, M.; West, J. Annu. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). *Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1998**, 38, 539-565.
- 7.- Martínez, M. Las plantas medicinales de México, **1959**, 4^a Ed., Editorial botas, México, 470-471.
- 8.- De la Cruz, M. Libellus de medicinalibus Indorum herbis, Editorial Fondo de Cultura económica, 2da Ed., **1991**, págs 258.
- 9.- Villaseñor, J. L. La familia *Asteraceae* en México, *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* **1993**, 117-124.
- 10.- Cabrera-Rodriguez, L.; Villaseñor, J. L. Revisión bibliográfica sobre el conocimiento de la familia *Compositae* en México, **1987**, Bitácora 12, 131-147.
- 11.- Heywood, V. H.; Harborne, J. B.; Turner, B. L. An overture to the *Compositae*, The Biology and Chemistry of the *Compositae* VI, *Academic Press*, New York, **1977**, 2-20.
- 12.- Villaseñor, J. L. The genera of *Asteraceae* endemic to Mexico and adjacent regions, **1990**, *Aliso*, 12, 685-692.

- 13.- Rzedowsk, J. Contribuciones a la fitogenética florística e histórica de México III. Algunas tendencias en la distribución geográfica y ecológica de las Compositae mexicanas, *Ciencia (México)*, **1972**, 21, 123-132.
- 14.- Heywood, V. H.; Harborne, J. B.; Turner, B. L. The chemistry of the Compositae. The Biology and Chemistry of the Compositae VI. *Academic Press*, **1977**, 283-335.
- 15.- Barkley, T. M.; Clark, B. L.; Funston A. M. The segregate genera of *Senecio sensu lato* and *Cacalia sensu lato* (Asteraceae: Senecioneae) in México and central América, *Royal Botanic Gardens*, **1996**, 1, 613-620.
- 16.- Romo de Vivar, A.; Pérez-Castorena, A. L.; Arciengas, A., Villaseñor, J. L. Secondary Metabolites from Mexican Species of the Tribe Senecioneae (Asteraceae), *J. Mex. Chem. Soc.* **2007**, 51, 160-172.
- 17.- Roeder, E. Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids, *Pharmazie* **1995**, 50, 83-95.
- 18.- Asano, N.; Nash, R. J.; Molineax, R. J.; Flete, W. J. Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application, *Tetrahedron Asymmetry*, **2000**, 11, 1645-1680.
- 19.- Kedrowski, B. L.; Hoppe, R. W. A concise Synthesis of (\pm)-Cacalol, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 5177-5179.
- 20.- Pérez-Castorena, A. L.; Arciniegas, A.; Hernández, M. L.; Toscano, R. A.; Contreras J. L.; Romo de Vivar, A. 8,9-Seco-eremophilanolides from *Roldana ehrenbergiana*, *J. Mex. Chem. Soc.* **2006**, 50, 157-159.
- 21.- Torres, P.; Chinchilla, R.; Asensi, M. C.; Grande, M. Furanoeremophilanes from *Senecio linifolius*, *Phytochemistry* **1989**, 28, 3093-3095.
- 22.- Harborne, J. B. The Handbook of Natural Flavonoids, John Wiley and sons, **1999**, 1, 7-13.
- 23.- Grotewoly, E. The science of Flavonoids, Editorial Springer. USA, **2006**.
- 24.- Robinson, H.; Brettell, R. Studies on the Senecioneae (Asteraceae). I. A new genus, *Pittocaulon*, *Phytologia* **1973**, 26, 454-453.

- 25.- Marín-Loaiza, J. C.; Ávila, J. G.; Canales, M.; Hernández, T.; Céspedes, C. L. Antifungal and antibacterial activities of endemic *Pittocaulon* ssp. from México, *Pharm. Biol.* **2008**, *46*, 66-71.
- 26.- Olson, M. Wood, bark, and pith anatomy in *Pittocaulon* (Senecio, Asteraceae): Water storage and systematics, *J. Torrey Bot. Soc.* **2005**, 173-186.
- 27.- Ortega, A.; Romero, M.; Díaz, E. Furanoeremofilanos del *Senecio preacox*, *Rev. Latinoamer. Quím.* **1975**, *6*, 136-142.
- 28.- Bohlmann F.; Zdero C., Neue Furanoeremophilane aus mexikanischen Senecio-Arten, *Chem. Ber.* **1976**, *109*, 819-825.
- 29.- Marín-Loaiza, J. C.; Ludger, E.; Beverle, T.; Theuring, C.; Céspedes, C. L.; Hartmann, T. Pirrolizidine alkaloids of the endemic Mexican genus *Pittocaulon* and assignment of the stereoisomeric 1,2-saturated necine bases, *Phytochemistry* **2008**, *69*, 147-167.
- 30.- Arciniegas, A.; Pérez-Castorena A. L.; Gastélum E.; Villaseñor, J. L.; Romo de Vivar, A. Eremofilane derivatives from *Pittocaulon praecox*, *Heterocycles* **2009**, *78*, 1253-1263.
- 31.- Arciniegas, A.; González, K.; Pérez-Castorena A. L.; Villaseñor, J. L.; Romo de Vivar, A. Seco-eremophiladiolides and eremophilane Glucosides from *Pittocaulon velatum*, *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1584-1589.
- 32.- Maldonado, J.; Arciniegas, A.; Pérez-Castorena, A.L.; Villaseñor, J. L.; Romo de Vivar, A. Furanoeremophilanes and other constituents of *Pittocaulon bombycophole*, *Heterocycles* **2008**, *75*, 3035-3042.
- 33.- Burgueño-Tapia, E.; Joseph-Nathan, P. Cacalolides from *Senecio barba-johannis*; *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 386-390.
- 34.- Bohlmann, F.; Castro, V.; Zdero, C.; King, M.; Robinson, H. New furanoeremophilane from *Senecio* Species. *Rev. Latinoamer. Quím.* **1984**, *14*, 101-103.
- 35.- Iijima, T.; Yaoita, Y.; Kikuchi, M. Five new sesquiterpenoids and a new diterpenoid from *Erigeron annuus* (L.) Perps., *Erigeron philadelphicus* L. and *Erigeron sumatrensis* Retz., *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 545-549.

- 36.- Li, X.; Yang, M.; Han, Y.; Gao, K. New sesquiterpenes from *Erigeron annuus*, *Planta Med.* **2005**, *71*, 268-272.
- 37.- Sun, Z.; Chen, B.; Zhang, S.; Hu, C.; Four new esudesmanes from *Caragana intermedia* and their biological activities; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1975-1979.
- 38.- Galetto, W.; Hoffman, P. Some benzyl ethers present in the extract of vanilla (*Vanilla planifolia*), *J. Agric. Food Chem.* **1978**, 195 - 197.
- 39.- Miyase, T.; Kuroyanagi, M.; Noro, T.; Ueno, A. Fukushima, S. Studies on sesquiterpenes from *Macroclinidium trilobum*, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *10*, 4445-4450.
- 40.- Yang, E.; Kim, S.; Ku, H.; Lee, D.; Lee, J.; Kim, Y.; Seong, Y.; Song, K. Syringin from Stem bark of *Fraxinus rhynchophylla* Protects A β ₍₂₅₋₃₅₎ induced Toxicity in neuronal cells, *Arch. Pharm. Res.* **2010**, *4*, 531-538.
- 41- Hendrickson, J. B. Stereochemical implications in sesquiterpene biogenesis, *Tetrahedron* **1959**, *7*, 82-89.
- 42.- Bohlmann, F.; Ahmed, M.; Jakupovic, J.; Jeffrey, C. Sesquiterpenes from *Kleinia* Species; *Phytochemistry* **1981**, *20*, 251-256.
- 43.- Bradley, P. P.; Priebat, D. A.; Christensen, R. D.; Rothstein, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker, *J. Invest. Dermatol.* **1982**, *78*, 206-209.
- 44.- Susuki, K.; Ota, H.; Sasagawa, S.; Sakatani, T.; Fujikura, T. Assay Method for Myeloperoxidase in Human Polymorphonuclear Leukocytes, *Anal. Biochem.* **1983**, *132*, 345-352.
- 45.- Recio, M. C.; Giner, R. M.; Uriburu, L.; Máñez, S.; Cerdá, M., De la Fuente, J. R.; Ríos, J. L. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation, *Life Sciences* **2000**, *66*, 2509-2518.
- 47.- Oviedo Chávez I. Obtención de agentes antiinflamatorios y citotóxicos a partir de modificaciones químicas a los ácidos Masticadeiónico y 3-Epimasticadienoico. Tesis Doctorado. Instituto de Química. UNAM. México D.F., **2006**.

48.- Franco, A.; Matis, E.; Calle, J.; Pinzón, R.; Ospina, F. Actividad anti-inflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana* L, *Biomédica*, **2007**, 27, 110-115.

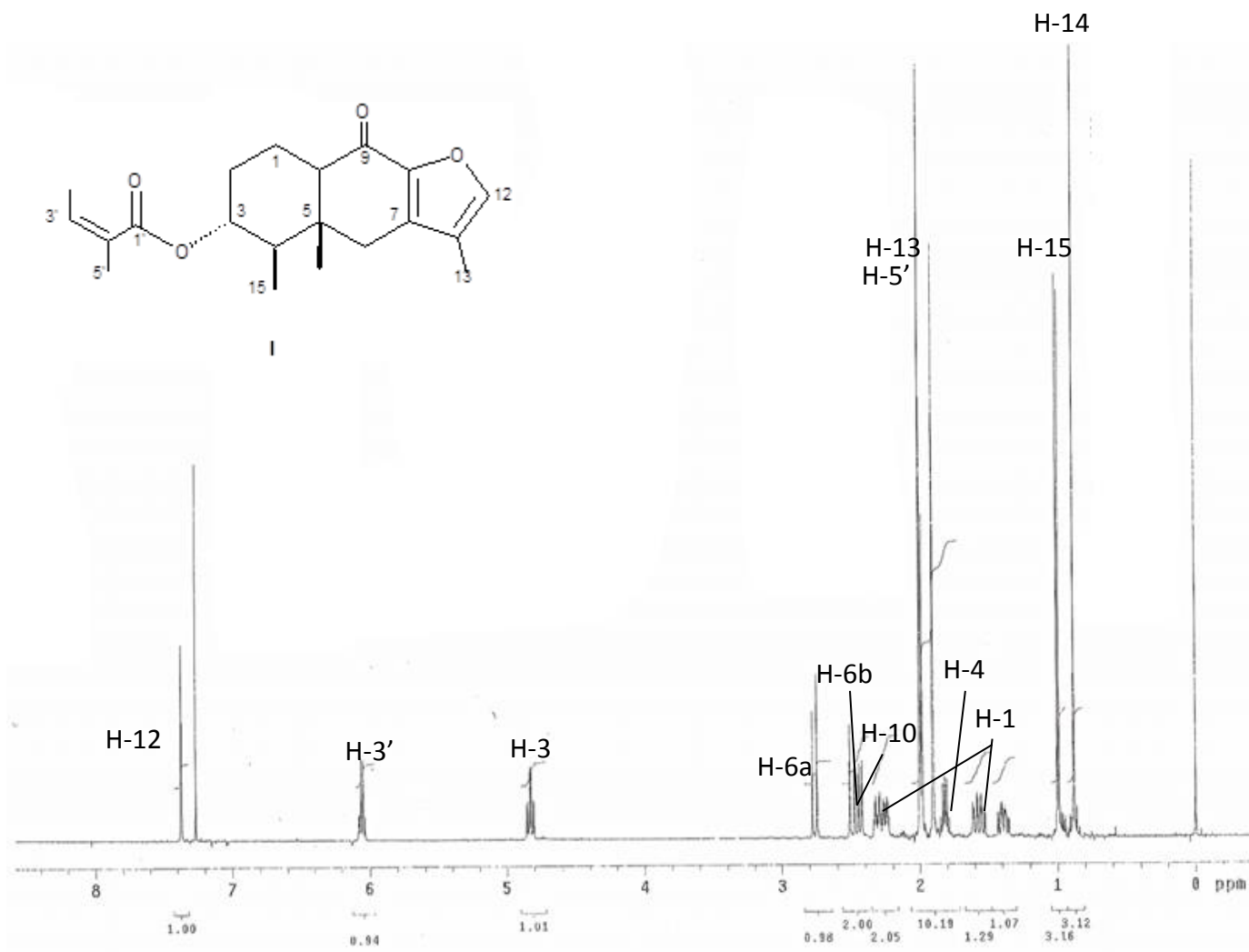
49.- Peter, P.; Bradley, M. D.; Dennis, A.; Priebat, M. D.; Robert, D.; Christensen, M. D.; Rothstein, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker, *J. Invest. Derm.* **1982**, 78, 206-209.

50.- Rodríguez, E.; Álvarez, S.; Bravo, E. Coeficientes de asociación, Editorial Plaza, 3^a Edición, **2006**, pag 38.

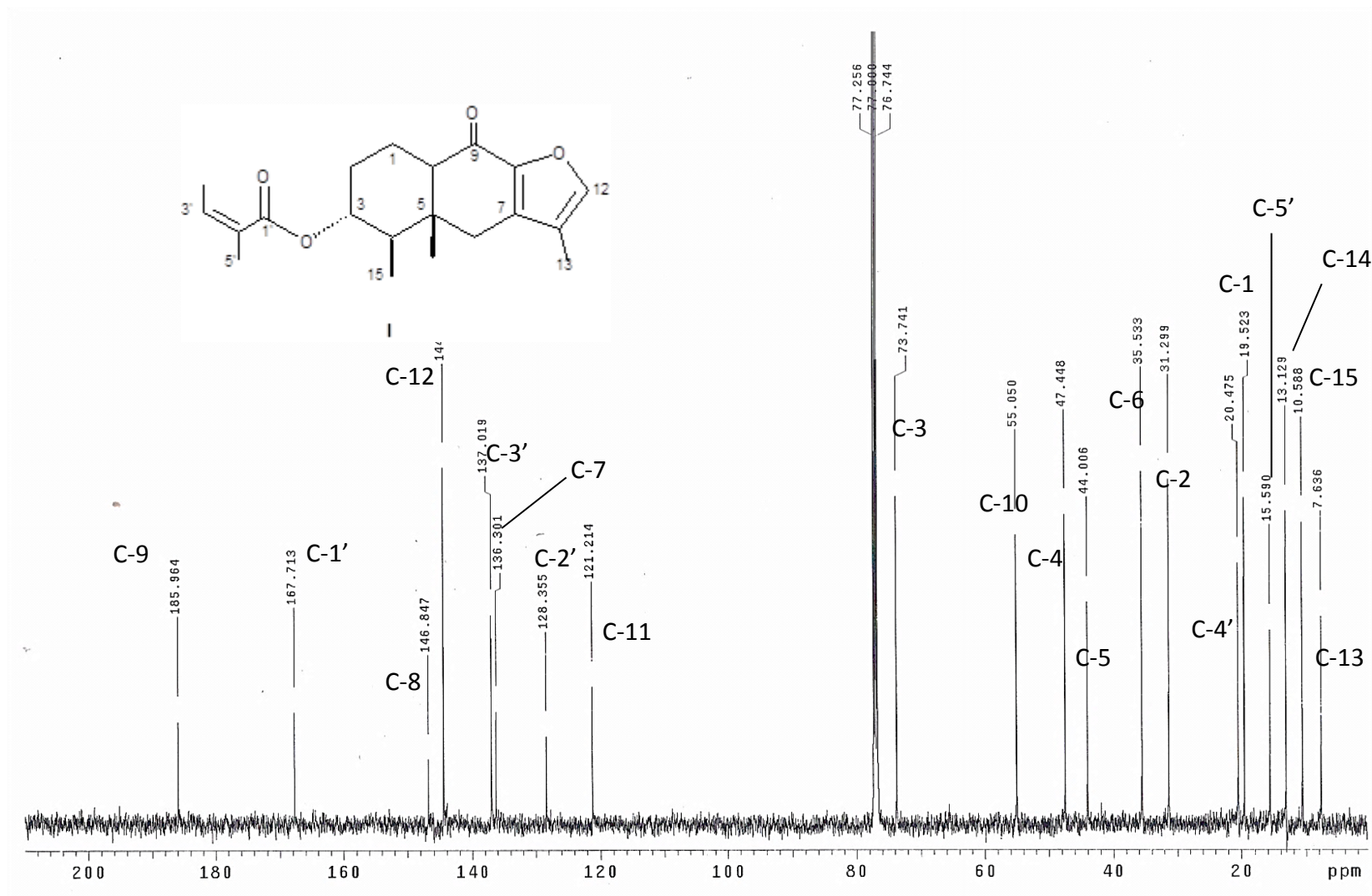
51.-Yaoita, Y.; Susuki, N.; Kikuch, M.; Structures of New sesquiterpenoids from Farfarae Flos, *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49, 645-649.

52.- Tallarida RJ. Murray RB. "Manual of pharmacologic calculations with computer programs". Second edition, Springer-Verlag, New York, **1987**; 77: 284.

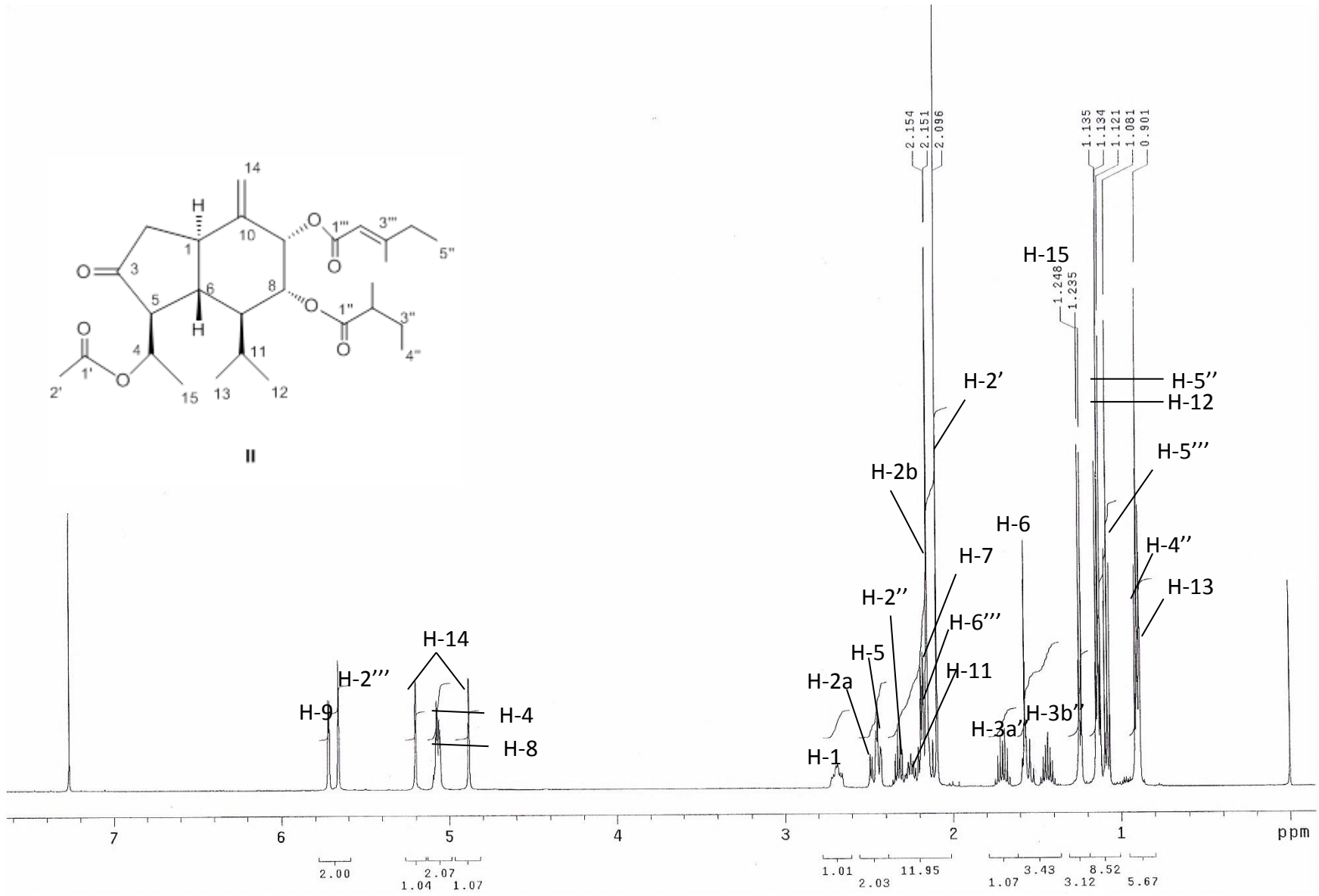
APENDICE



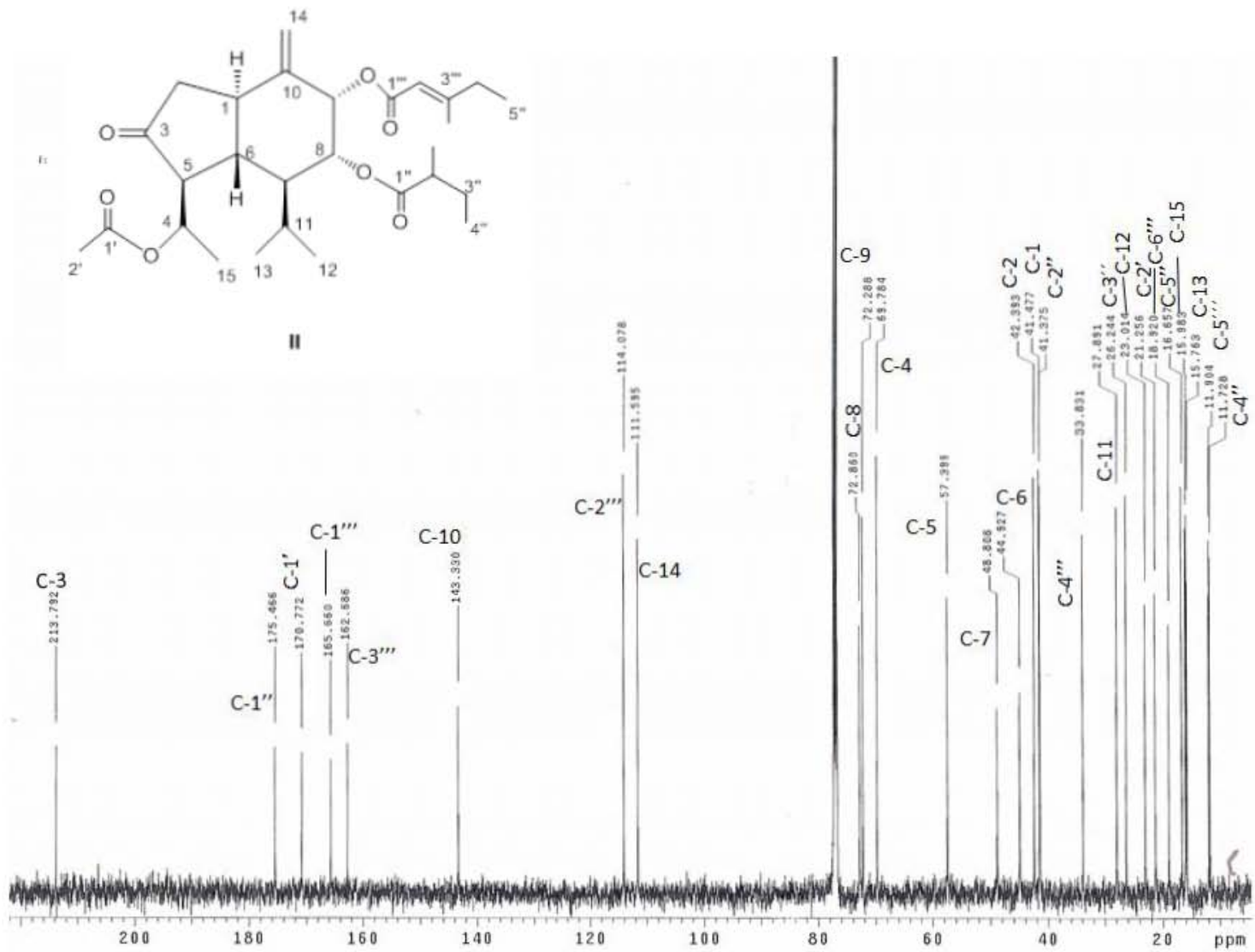
Espectro 1.1: RMN ¹H (CDCl₃, MHz 500) de 3 α -Angeloiloxi-9-oxo furanoeremofilano (I).



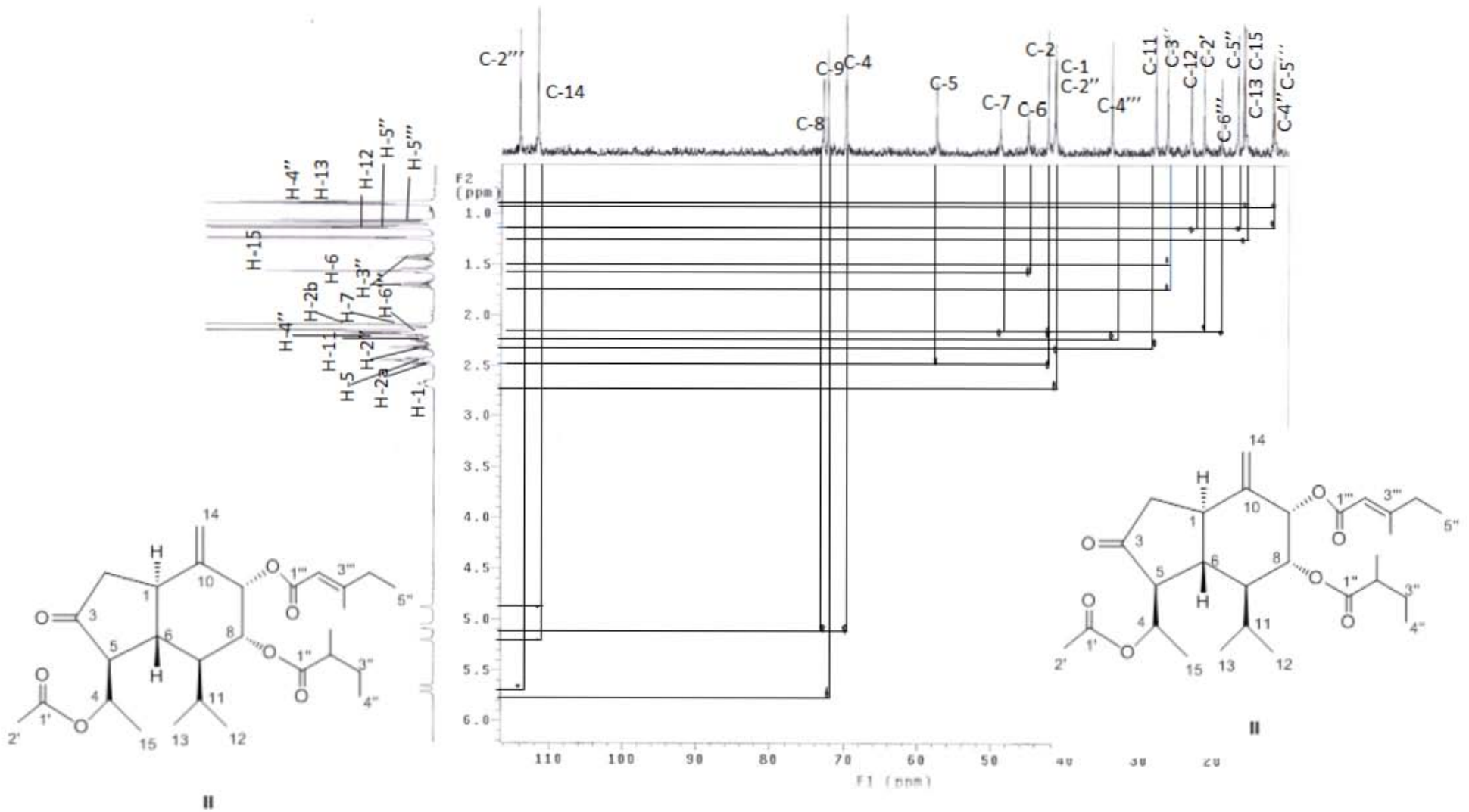
Espectro 1.2: RMN ^{13}C (CDCl₃, MHz 100) de 3 α Angeloiloxi-9-oxo furanoeremofilano (I).



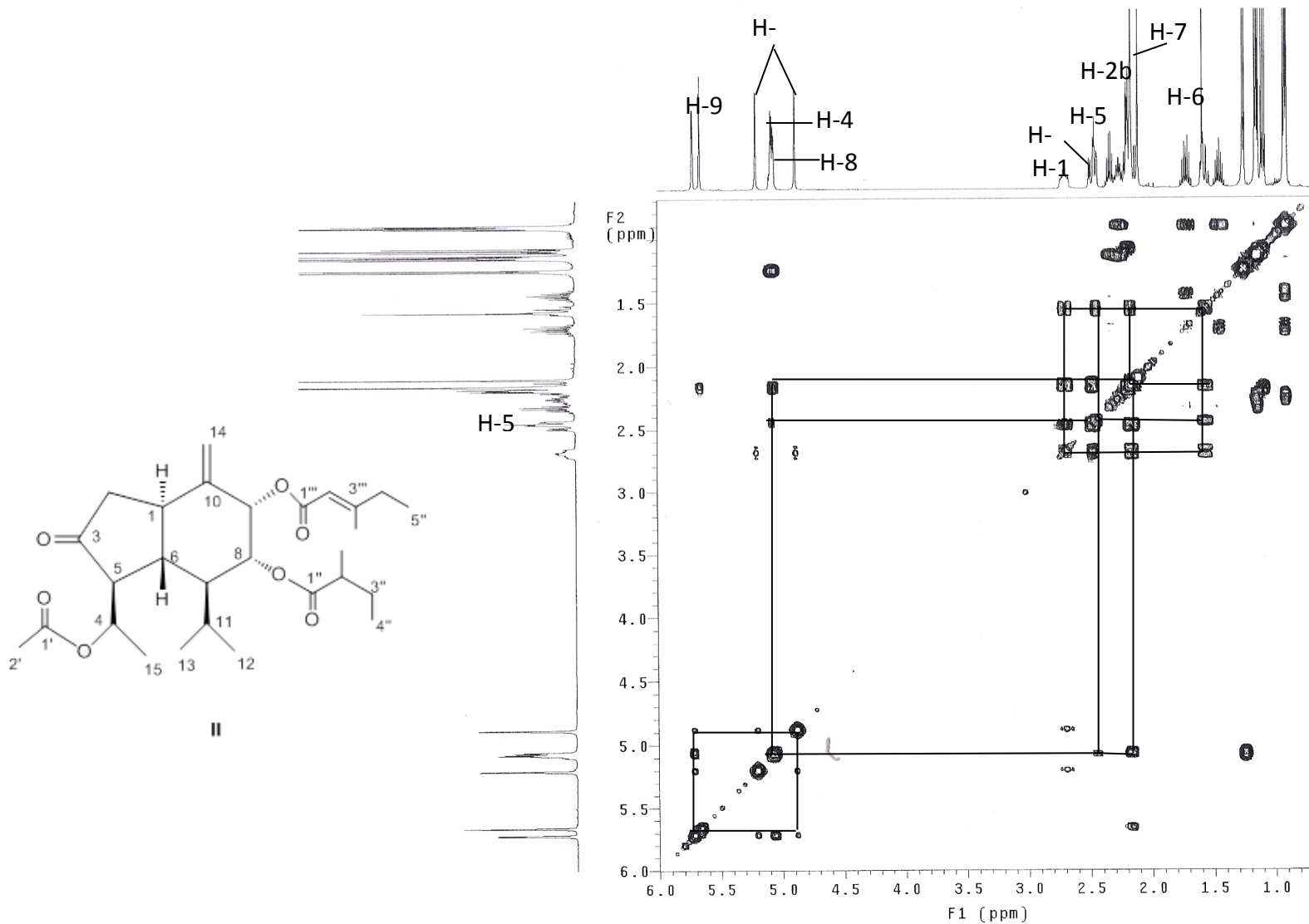
Espectro 2.1: RMN ^1H (CDCl₃, MHz 500) (1R,4R,5S,6R,7R,8R,9S,2''S,2'''E)-4-Acetoxy-8-(2-metilbutanoiloxi)-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-10(14)-opopen-3-ona (II).



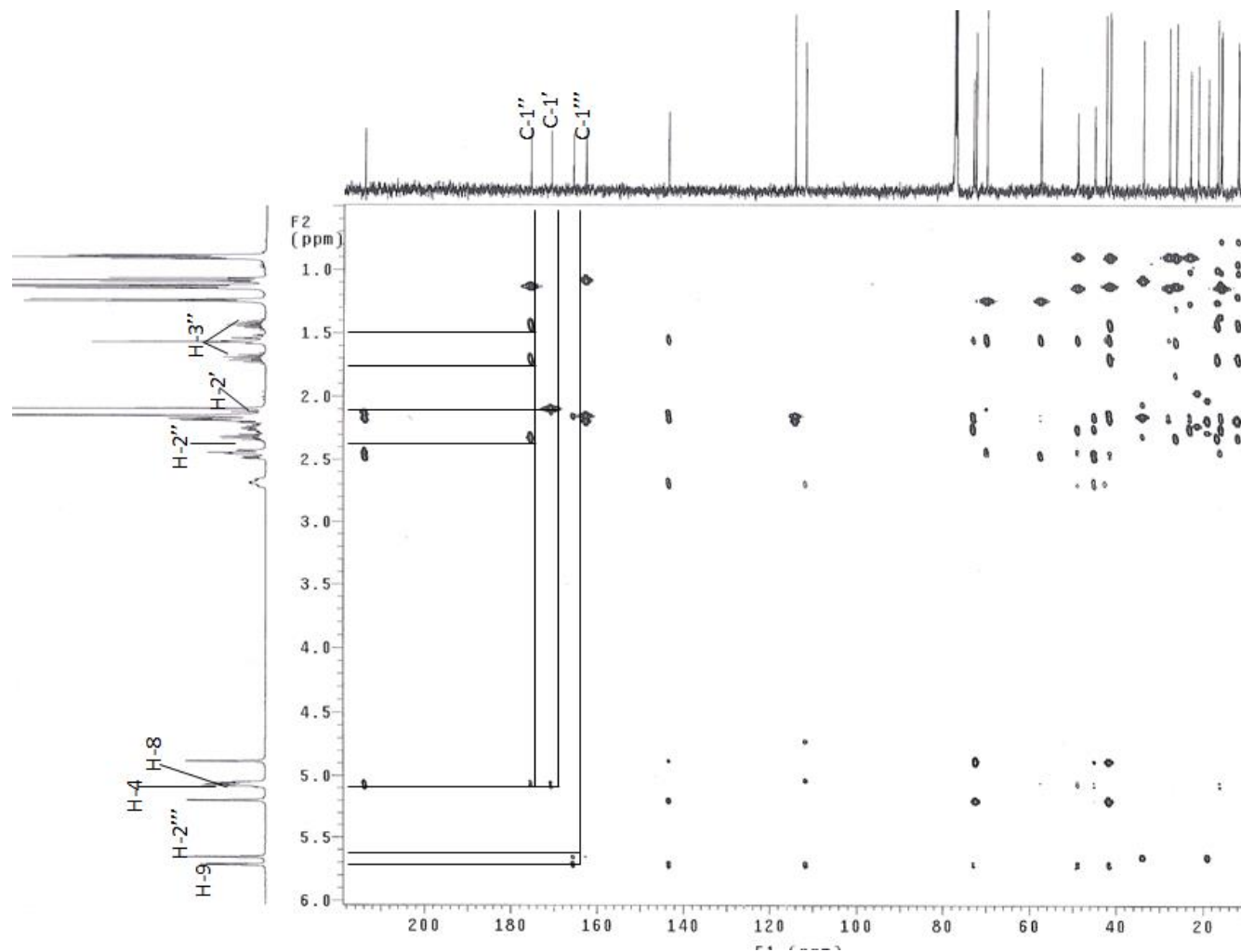
Espectro 2.2: RMN ^{13}C (CDCl_3 , MHz 100) (1R,4R,5S,6R,7R,8R,9S,2''S,2'''E)-4-Acetoxy-8-(2-metilbutanoiloxi)-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-10(14)-opopen-3-ona (II).



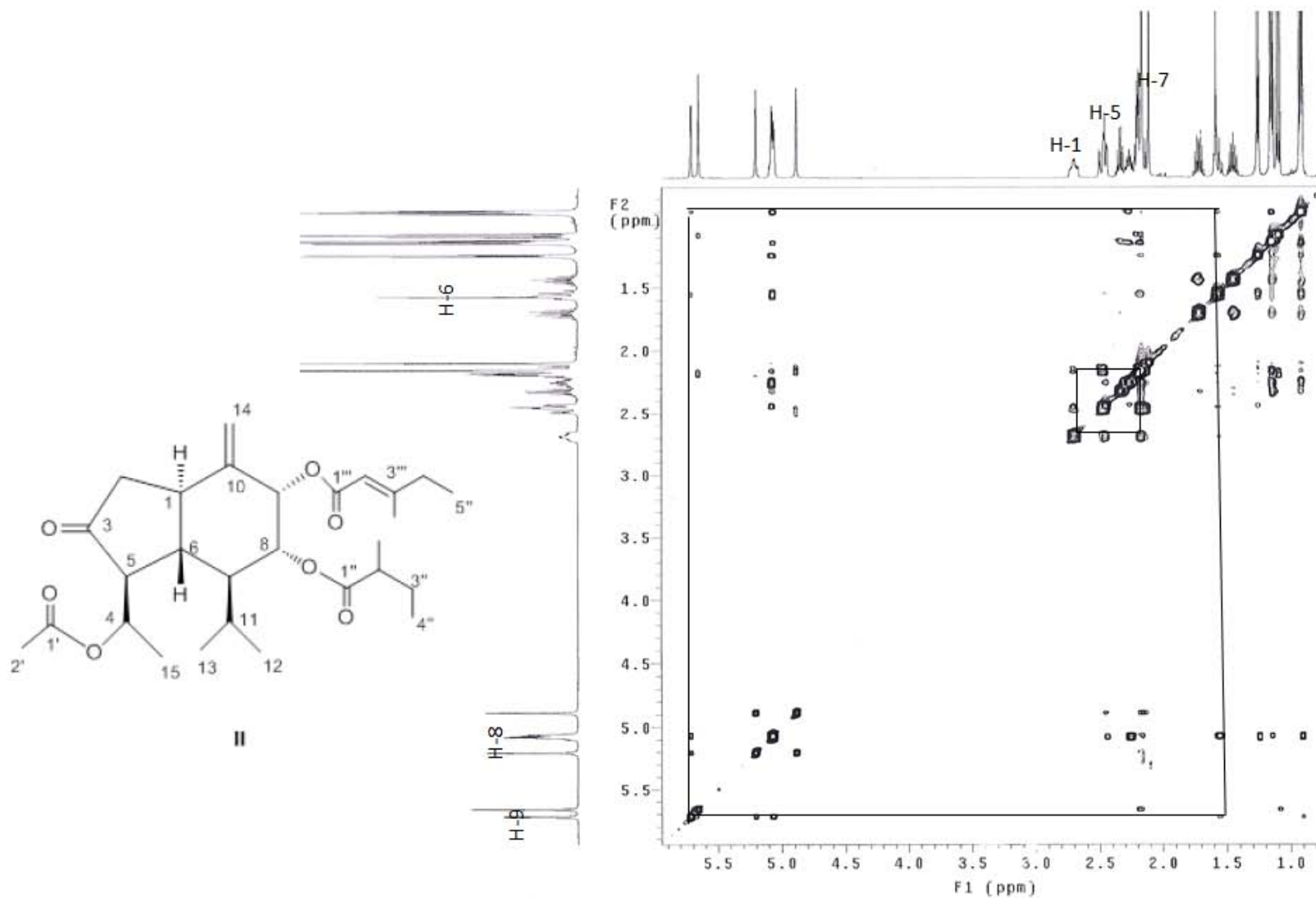
Espectro 2.3: HSQC (CDCl₃, MHz 500) (1R,4R,5S,6R,7R,8R,9S,2''S,2'''E)-4-Acetoxy-8-(2-metilbutanoiloxi)-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-10(14)-oplopen-3-ona (II).



Espectro 2.4: COSY (CDCl_3 , MHz 500) (1R,4R,5S,6R,7R,8R,9S,2''S,2''E)-4-Acetoxy-8-(2-metilbutanoiloxi)-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-10(14)-opopen-3-ona (II).

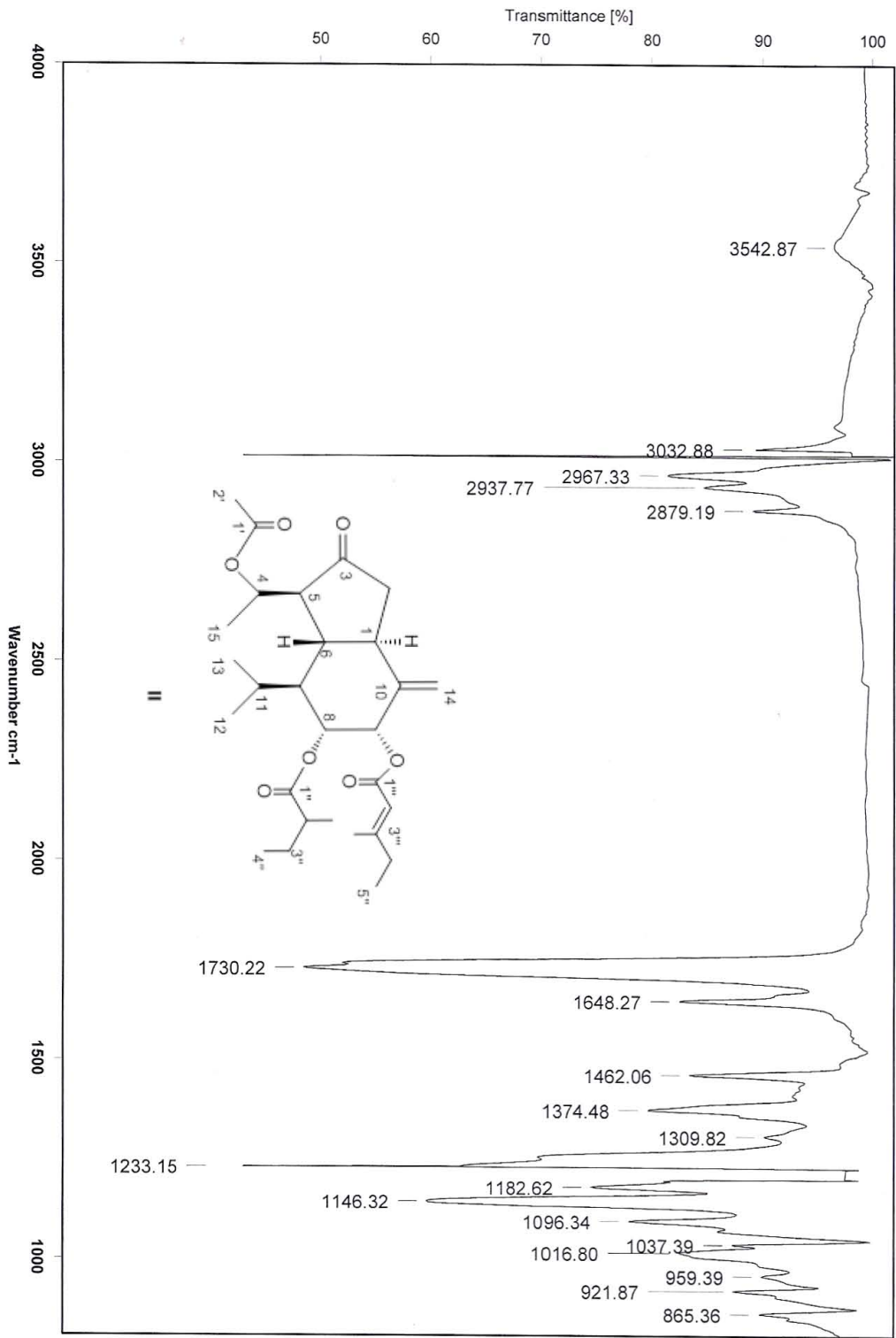


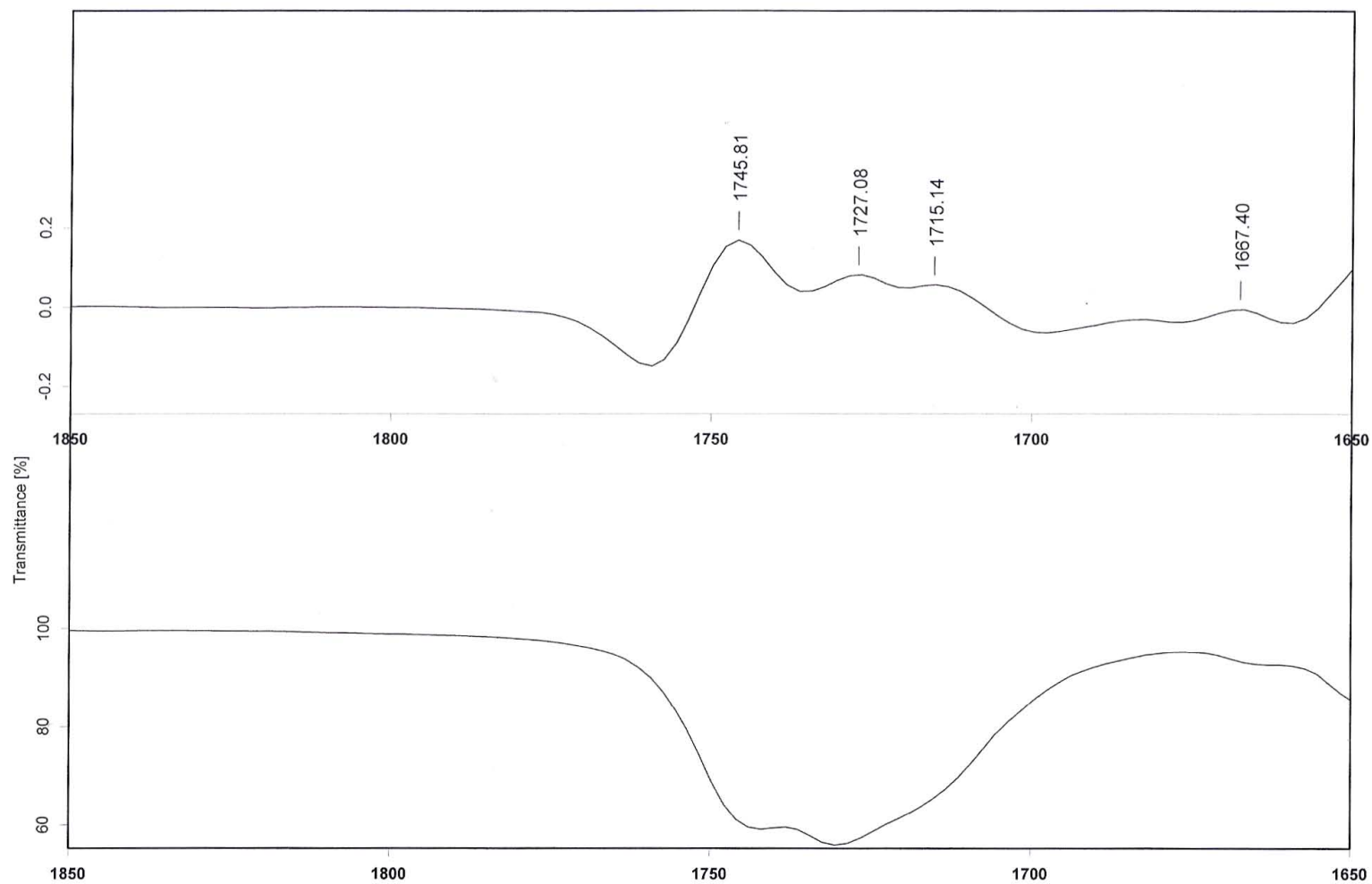
Espectro 2.5: HMBC (CDCl₃, MHz 500) (1R,4R,5S,6R,7R,8R,9S,2''S,2'''E)-4-Acetoxy-8-(2-metilbutanoiloxi)-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-10(14)-opopen-3-ona (**II**).



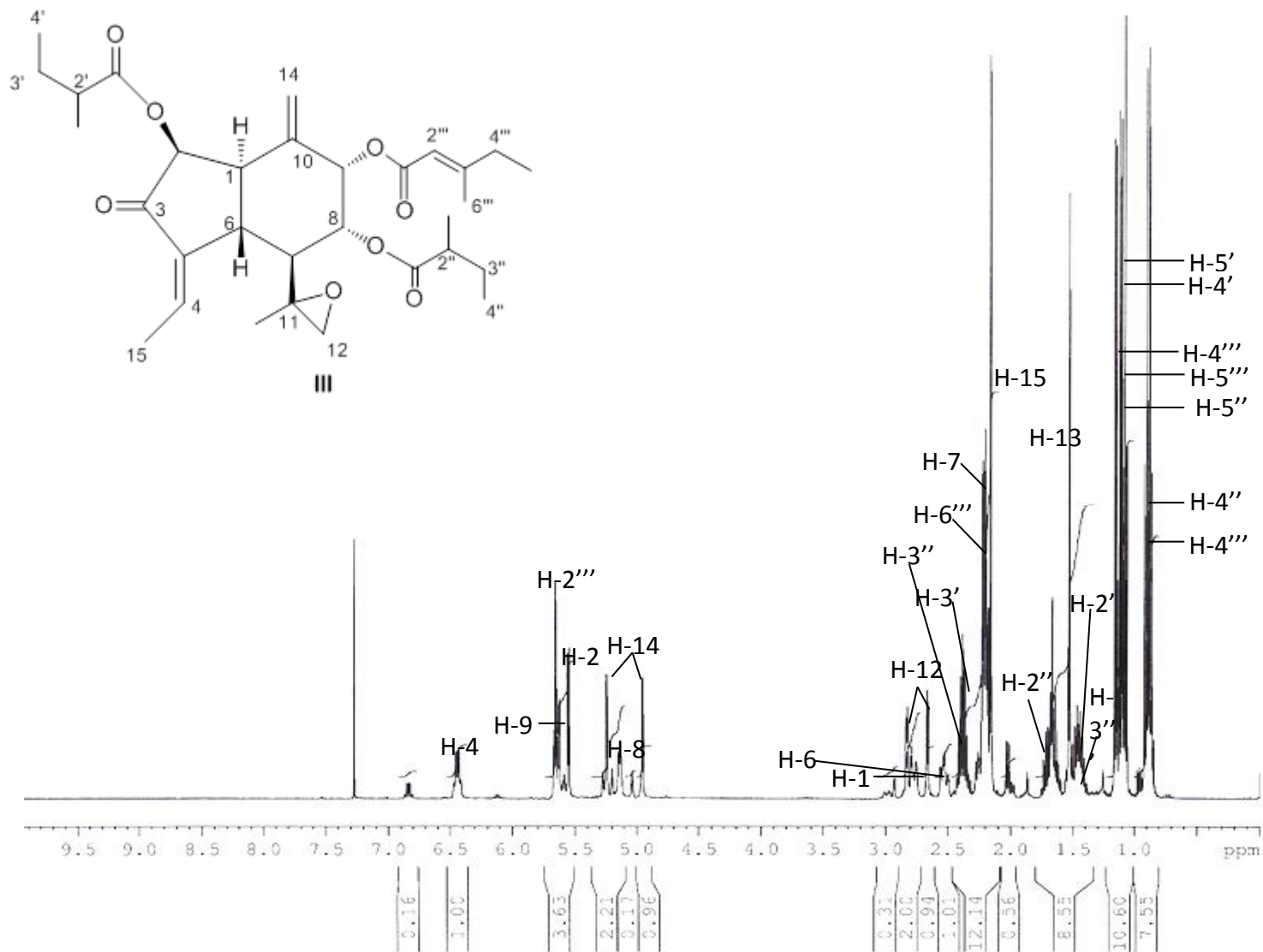
Espectro 2.6: NOESY (CDCl₃, MHz 500) (1R,4R,5S,6R,7R,8R,9S,2''S,2'''E)-4-Acetoxy-8-(2-metilbutanoiloxi)-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-10(14)-oplopen-3-ona (II).

Espectro 2.7: IR (CHCl₃) (1R,4R,5S,6R,7R,8R,9S,2''S,2'''E)-4-Acetoxy-8-(2-metilbutaniloxi)-9-(3-metil-2-penteniloxi)-10(14)-oplopen-3-ona (II).

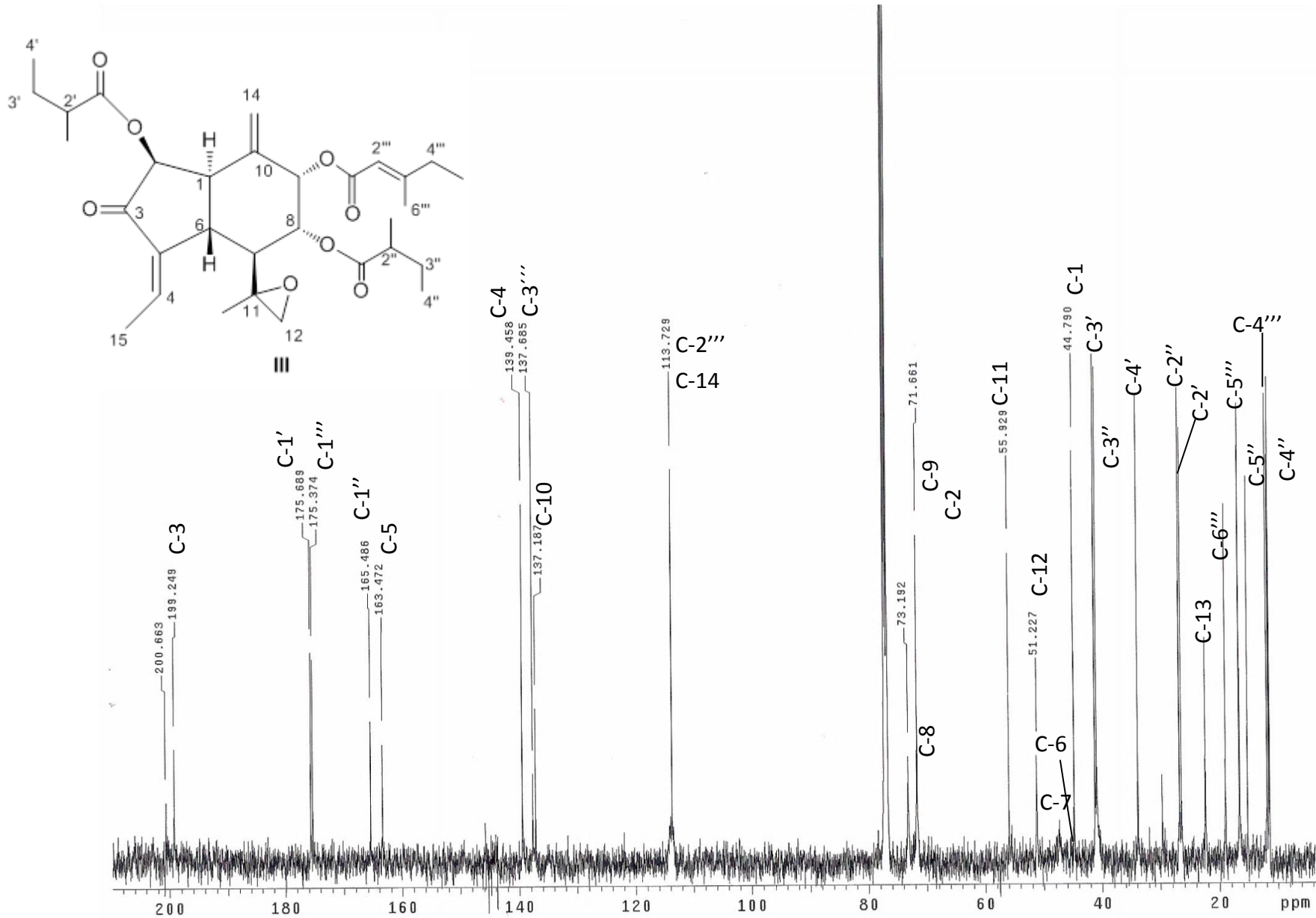




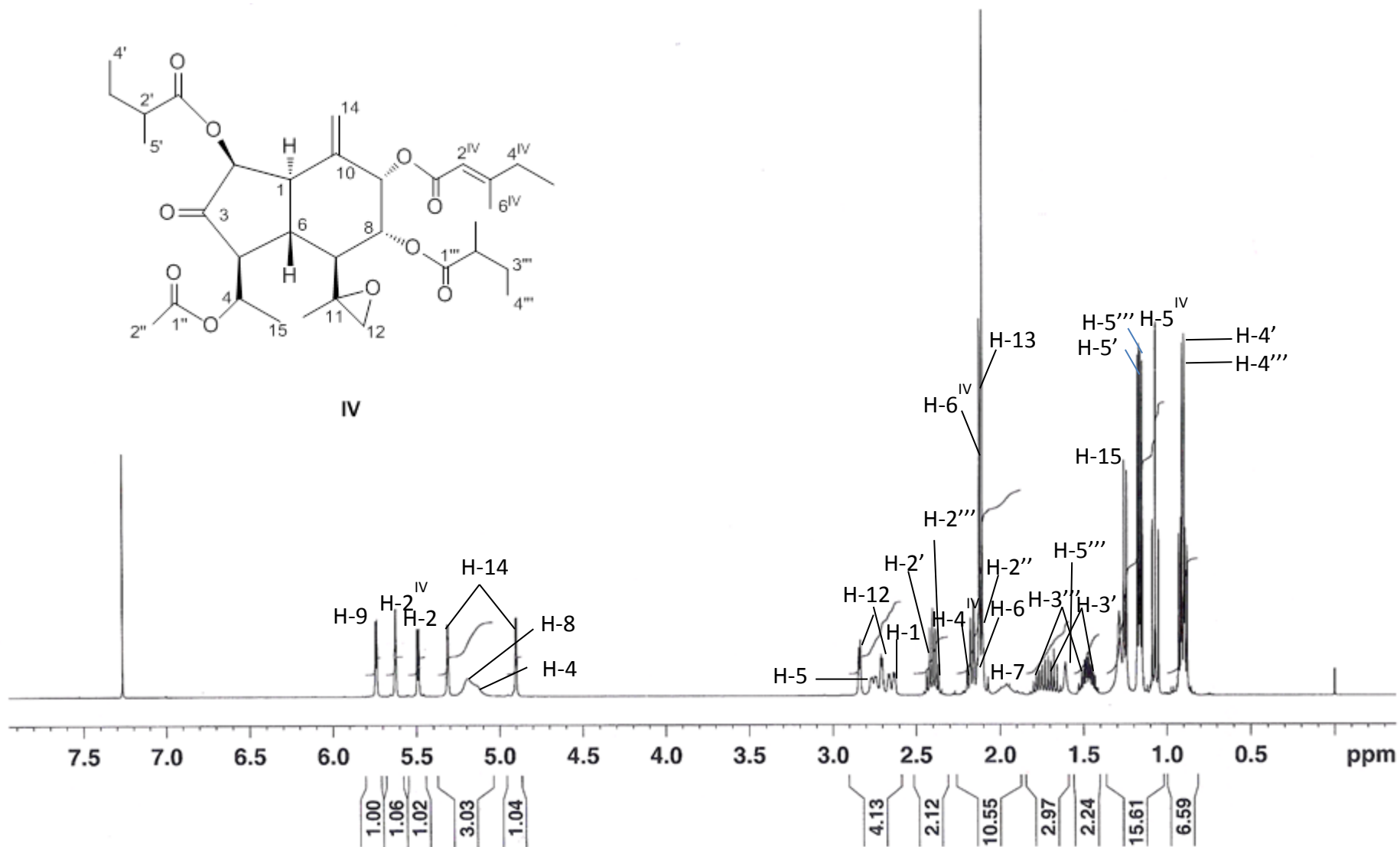
Espectro 2.8: IR (CHCl_3) (1R,4R,5S,6R,7R,8R,9S,2''S,2'''E)-4-Acetoxy-8-(2-metilbutanoiloxi)-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-10(14)-oplopen-3-ona (II).



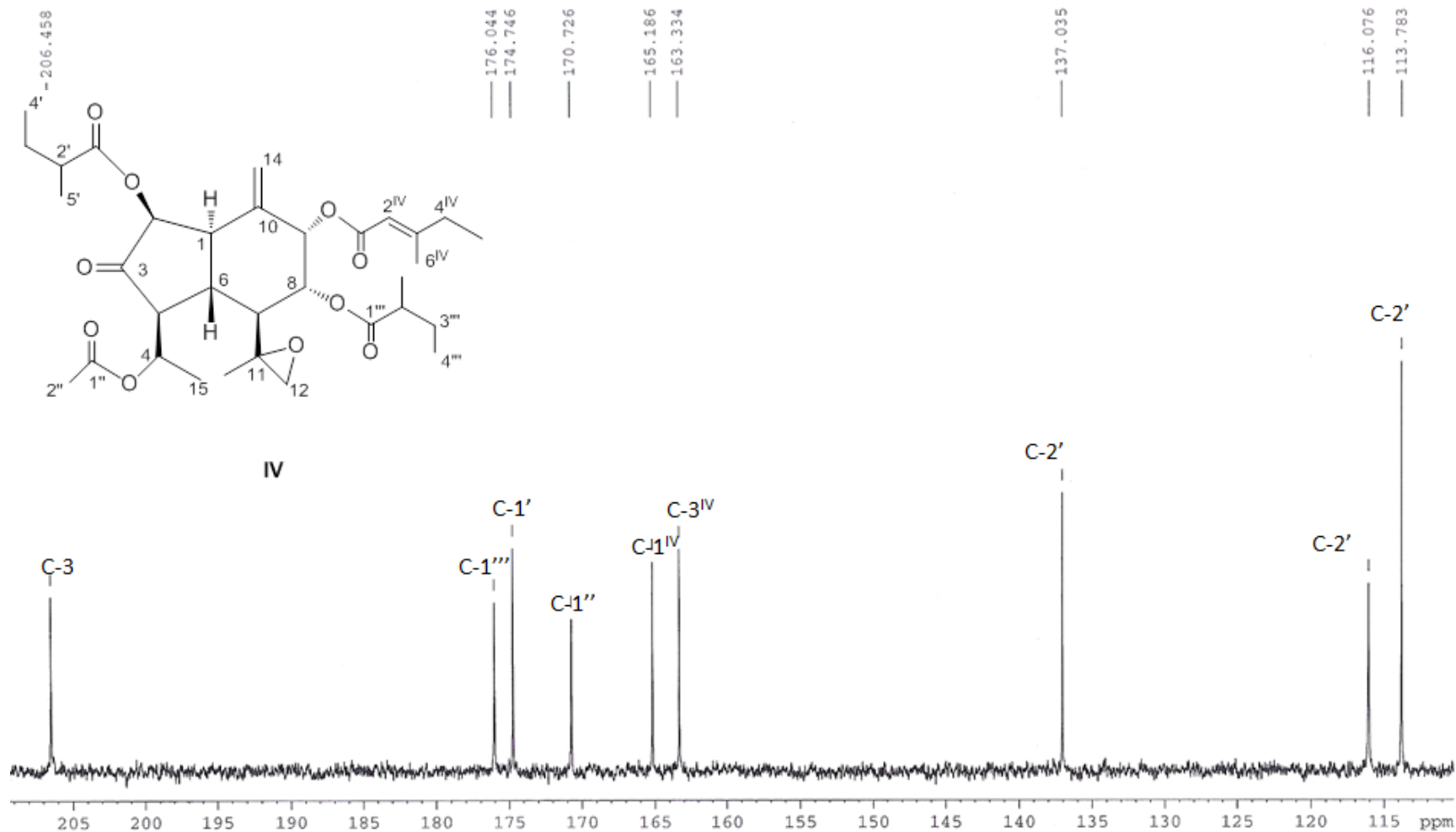
Espectro 3.1: RMN ¹H (CDCl₃, MHz 500) (1*R*,2*S*,6*R*,7*R*,8*R*,9*S*,11*R*,4*Z*,2'*S*,2''*S*,2'''*E*)-11,12-Epoxi-2,8-di-(2-metilbutanoiloxi)-9-(3metil-2-pentenoiloxi)-4,5-10(14)-oplopedien-3-ona. (III).



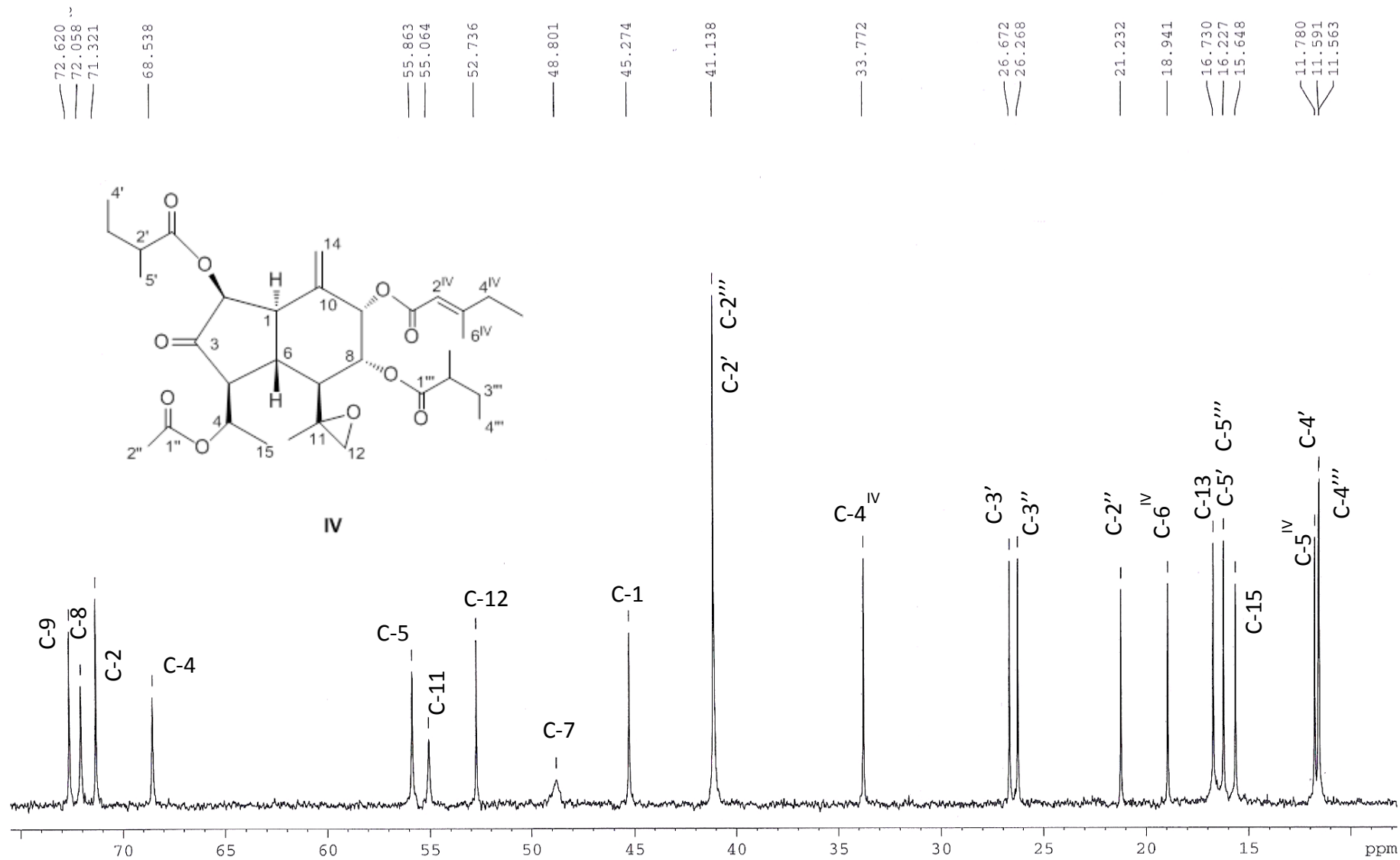
Espectro 3.2: RMN ¹H (CDCl₃, MHz 100) (1*R*,2*S*,6*R*,7*R*,8*R*,9*S*,11*R*,4*Z*,2'*S*,2''*S*,2'''*E*)-11,12-Epoxi-2,8-di-(2-metilbutanoiloxi)-9-(3metil-2-pentenoiloxi)-4,5-10(14)-oplopedien-3-ona. (III).



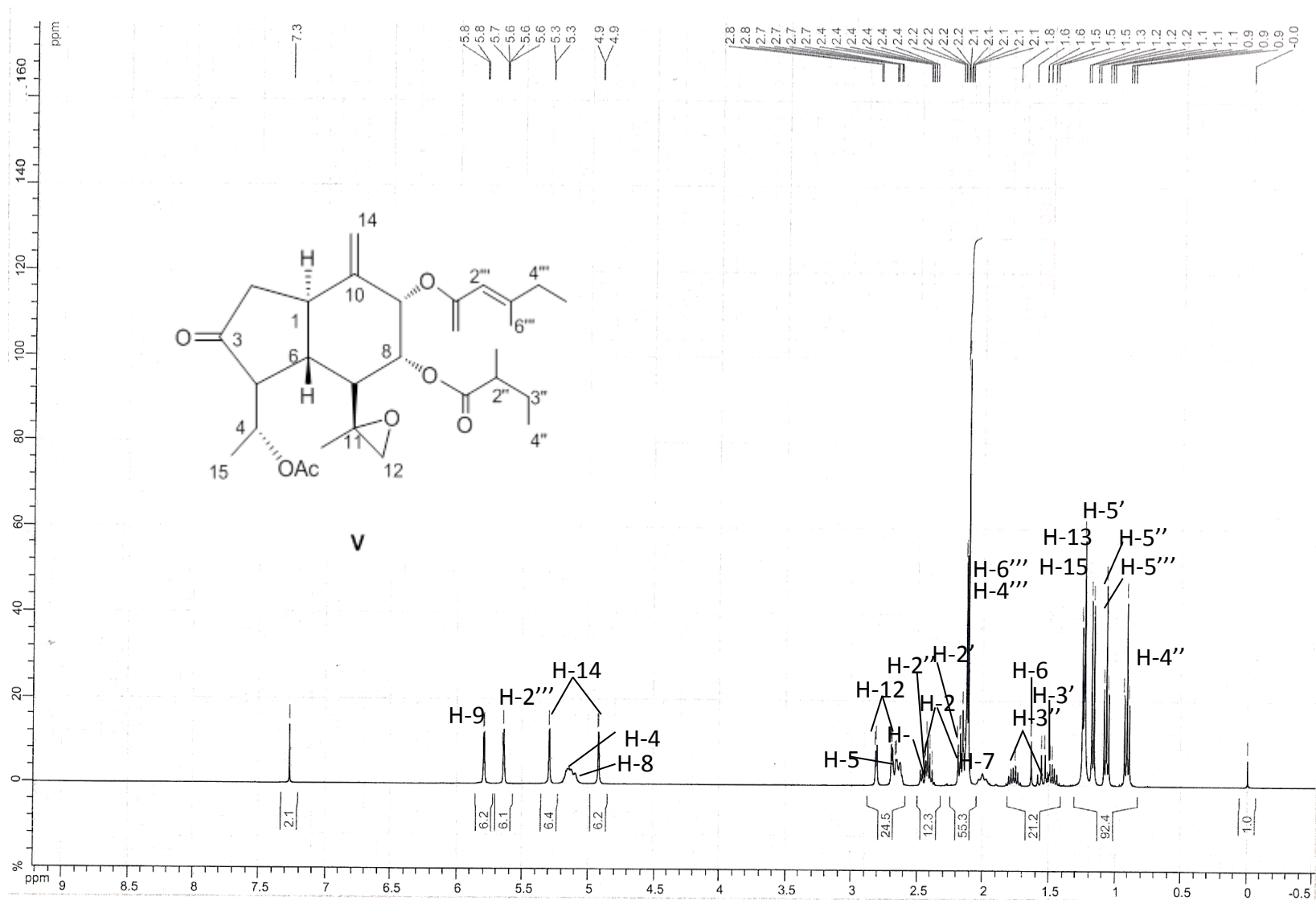
Espectro 4.1 : RMN ¹H (CDCl₃, MHz 500) (1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,8*R*,9*S*,2'*S*,2''*S*,2'^{IV}*E*)-11,12-Epoxi-2,8-di-(2-metilbutanoiloxi)-4-acetoxy-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-10(14)-oplopen-3-ona. (**IV**).



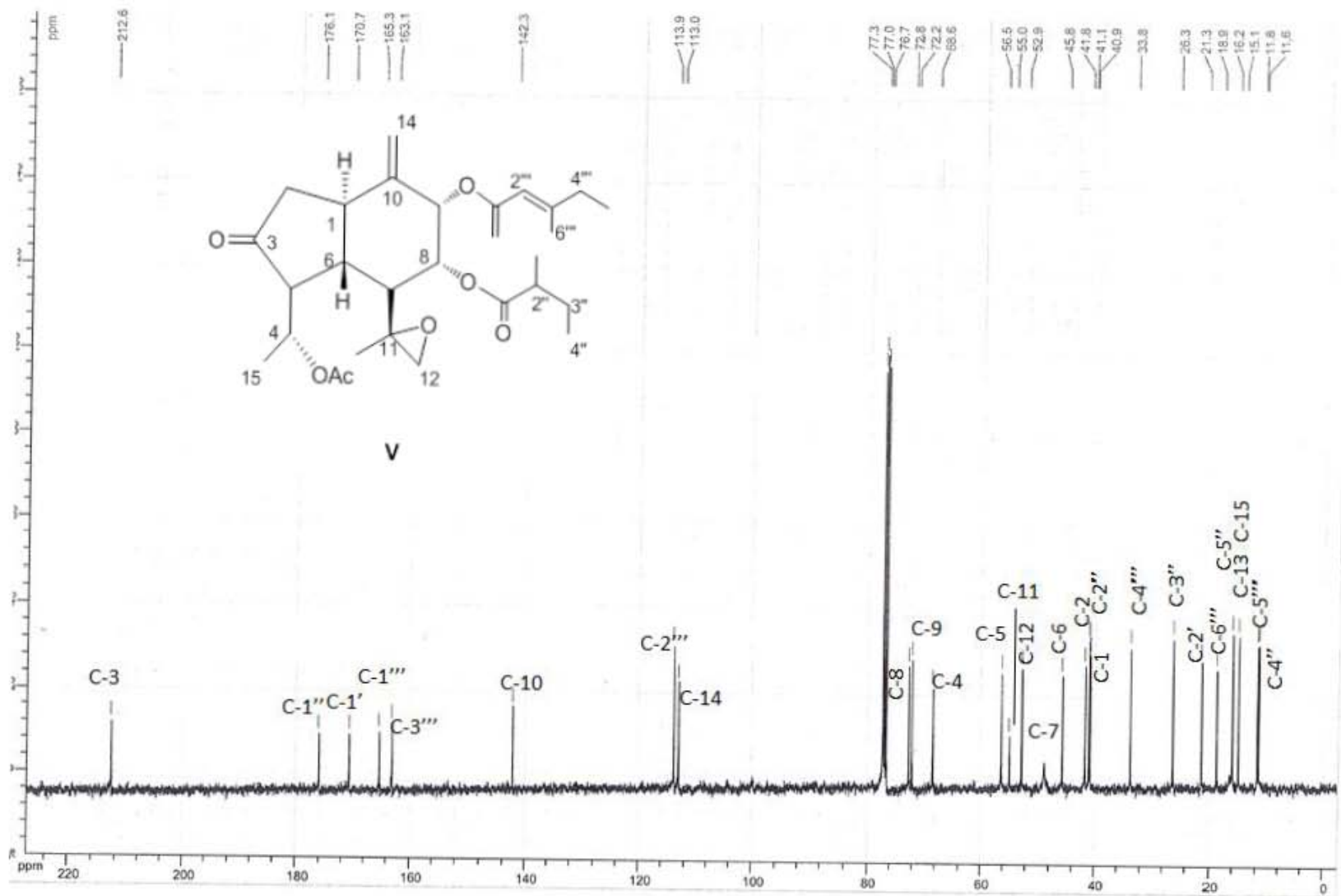
Espectro 4.2 : RMN ^{13}C (CDCl_3 , MHz 100) (1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,8*R*,9*S*,2'*S*,2''*S*,2'*V**E*)-11,12-Epoxi-2,8-di-(2-metilbutanoiloxi)-4-acetoxy-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-10(14)-oplopen-3-ona. (IV).



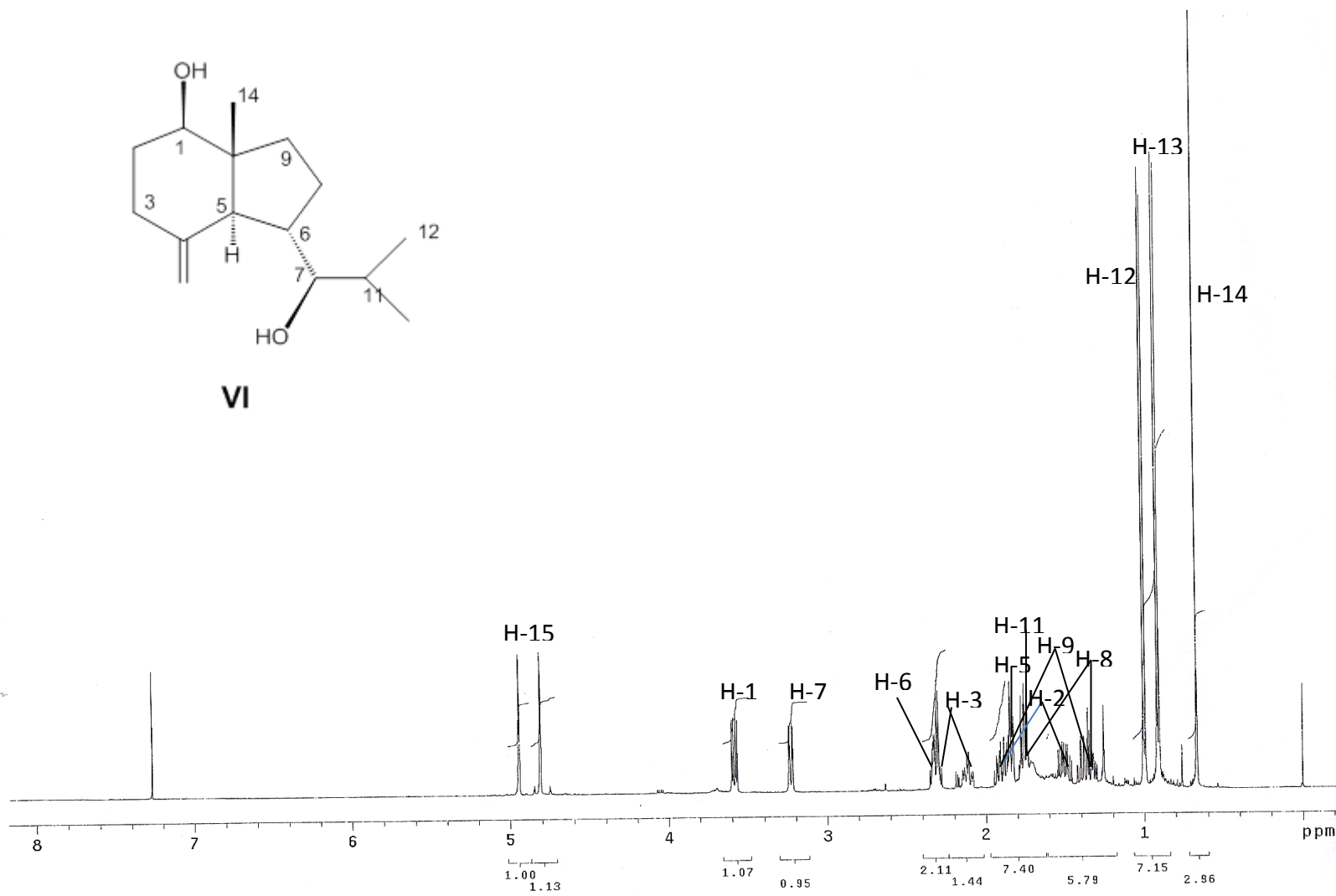
Espectro 4.2 : RMN ^{13}C (CDCl_3 , MHz 100) (1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,8*R*,9*S*,2'*S*,2'''*S*,2'*V**E*)-11,12-Epoxi-2,8-di-(2-metilbutanoiloxi)-4-acetoxy-9-(3-metil-2-pentenoiloxi)-10(14)-oplopen-3-ona. (**IV**).



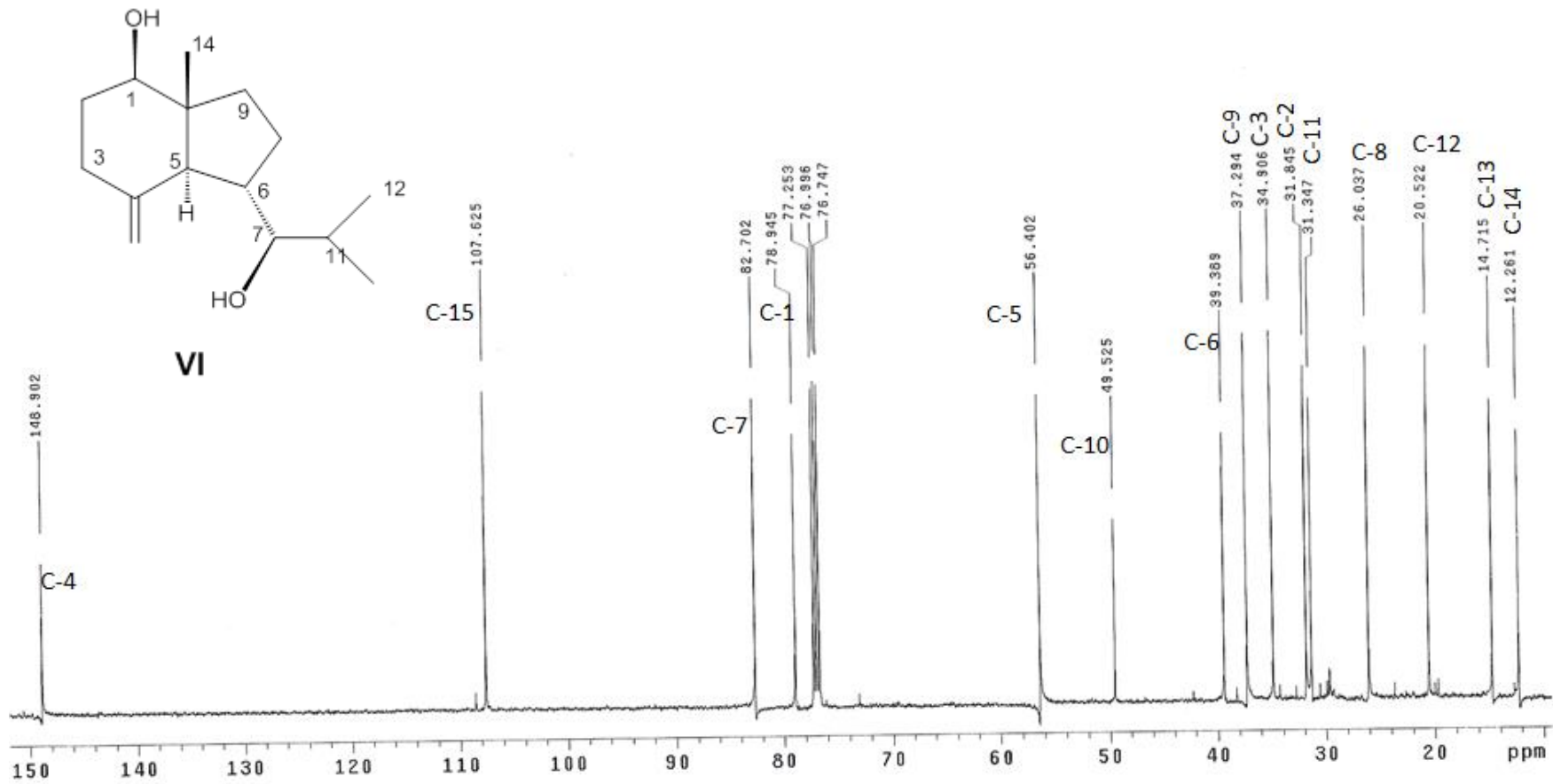
Espectro 5.1 : RMN ¹H (CDCl₃, MHz 500) (IR.4R,5S,6R,7S,8R,9S,11S,2'',2''' E)-11,12-Epoxi-4-acetoxi-8-(2''metilbutanoiloxi)-9-(3''-metil-2''-pentenoiloxi)-10(14)-oplopen-3-ona (**V**).



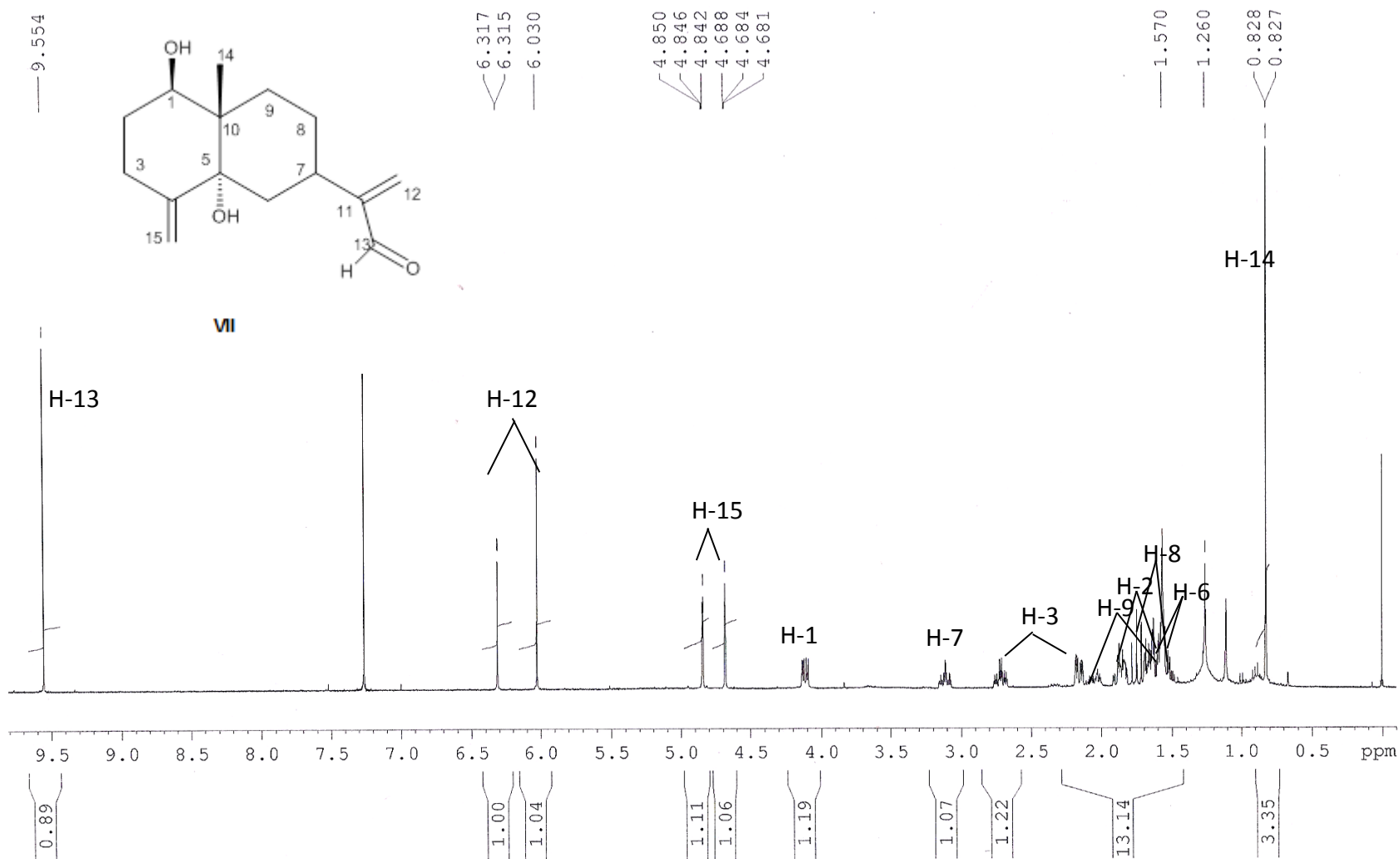
Espectro 5.2 : RMN ¹³C (CDCl₃, MHz 100) (1*R*,4*R*,5*S*,6*R*,7*S*,8*R*,9*S*,11*S*,2'',2''' *E*)-11,12-Epoxi-4-acetoxy-8-(2'-metilbutanoiloxi)-9-(3''-metil-2''-pentenoiloxi)-10(14)-oplopen-3-ona (**V**).



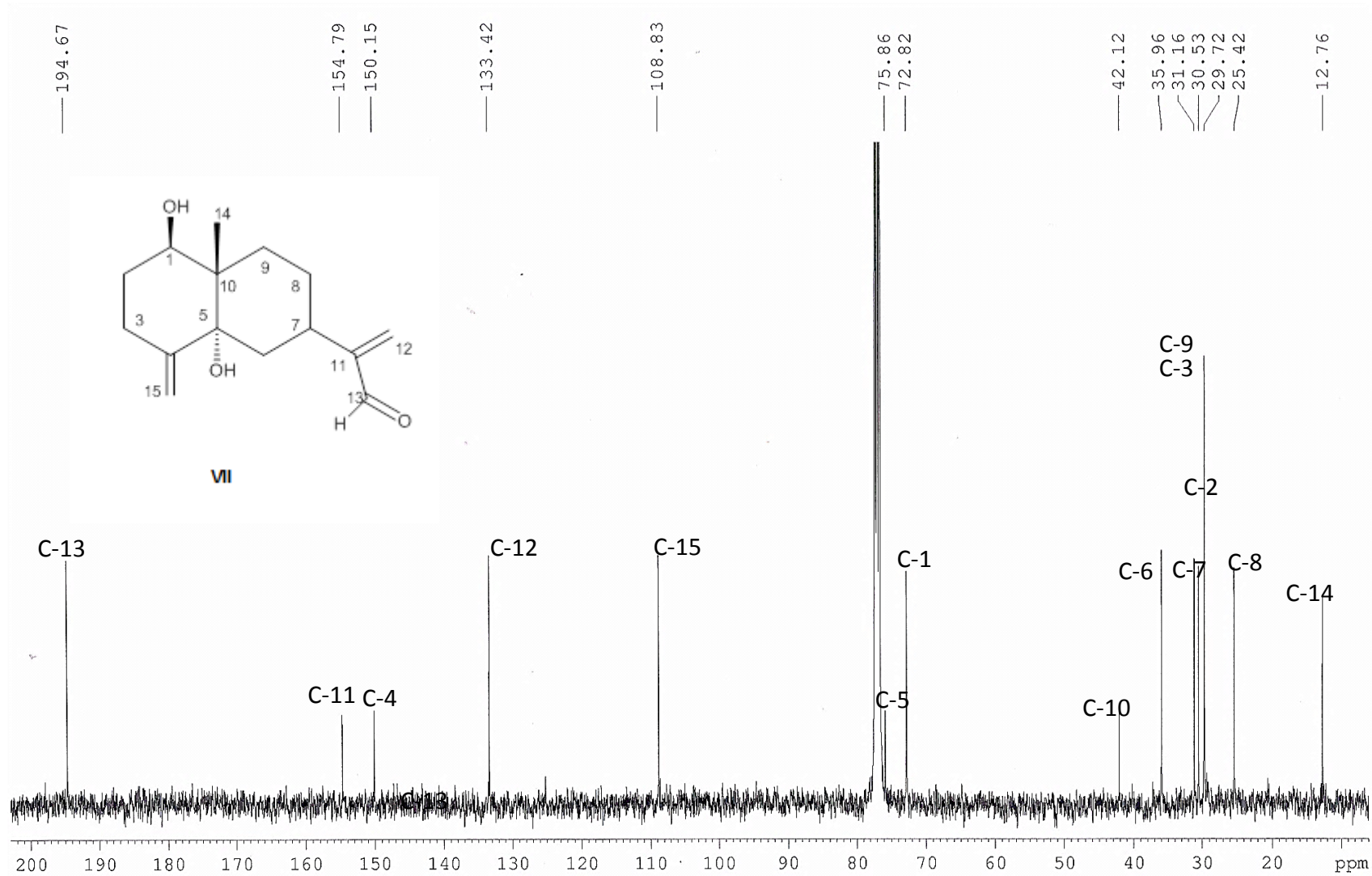
Espectro 6.1 : RMN ¹H (CDCl₃, MHz 100) (7R)-Opposit-4(15)-en-1β-ol (VI).



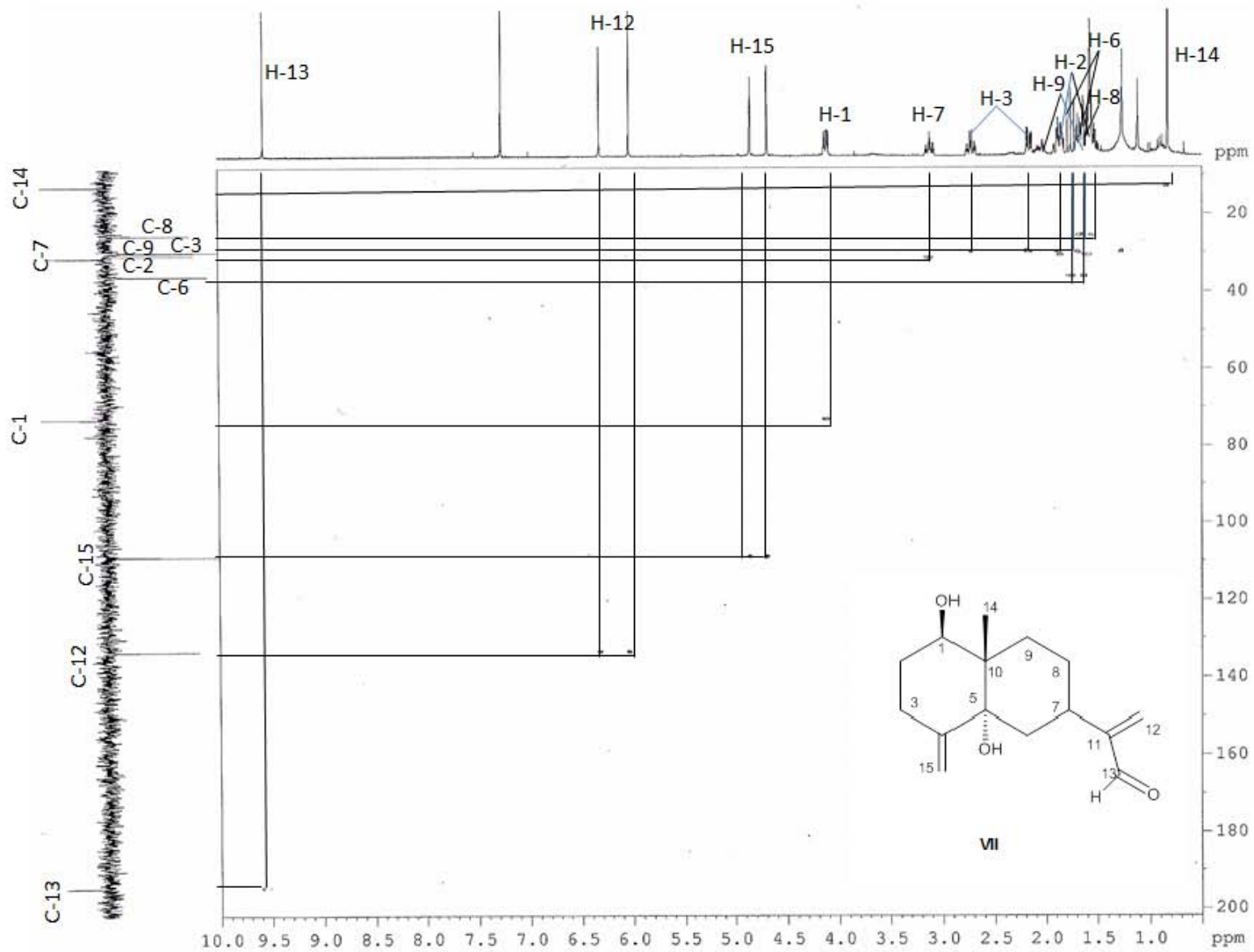
Espectro 6.2 : RMN ^{13}C (CDCl_3 , MHz 125) (*7R*)-Opposit-4(15)-en-1 β -ol (**VI**).



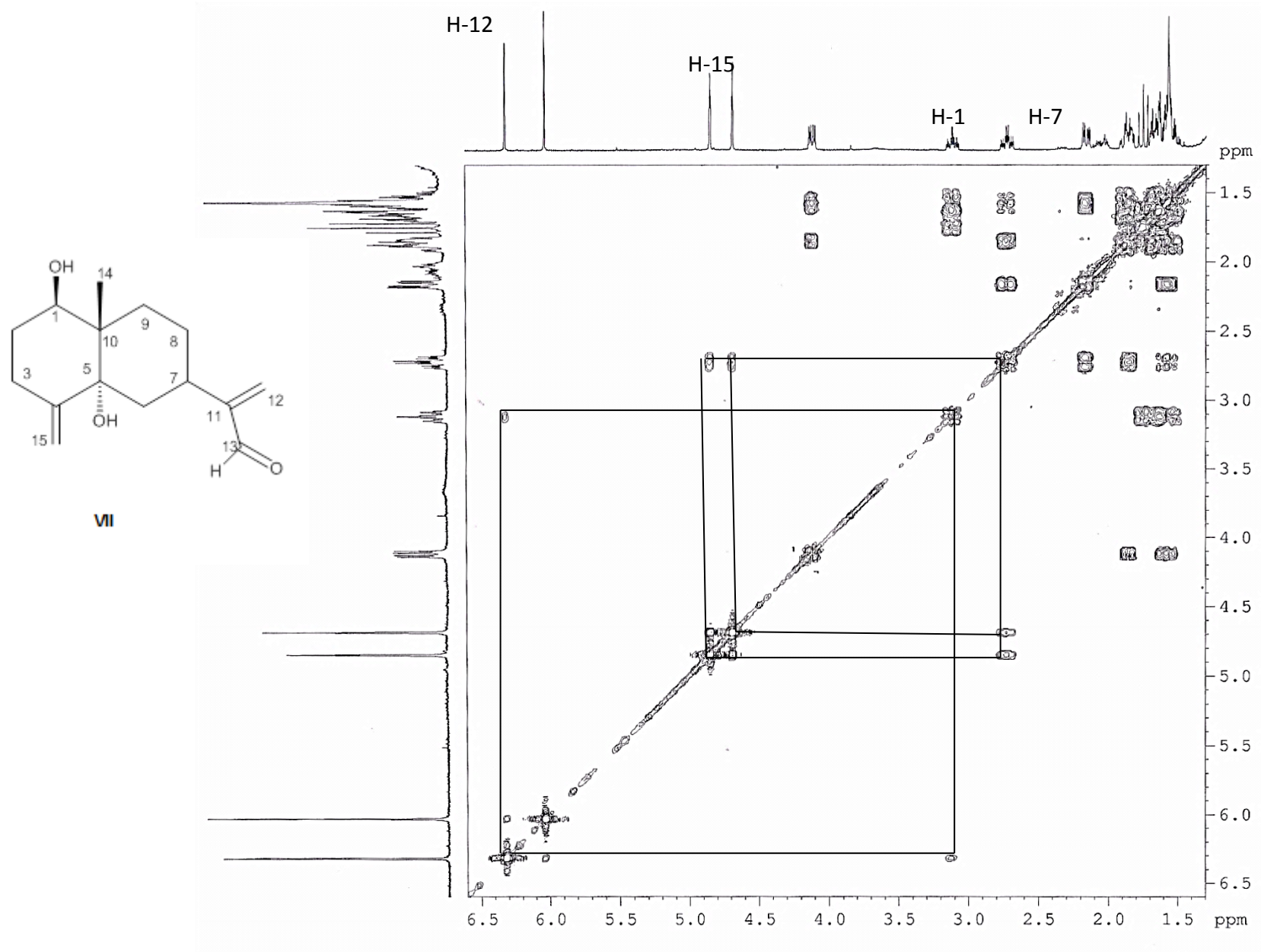
Espectro 7.1 : RMN ¹H (CDCl₃, MHz 400) 1,5 Dihidroxi-4(15),11(12)-eudesmien-13-al (VII).



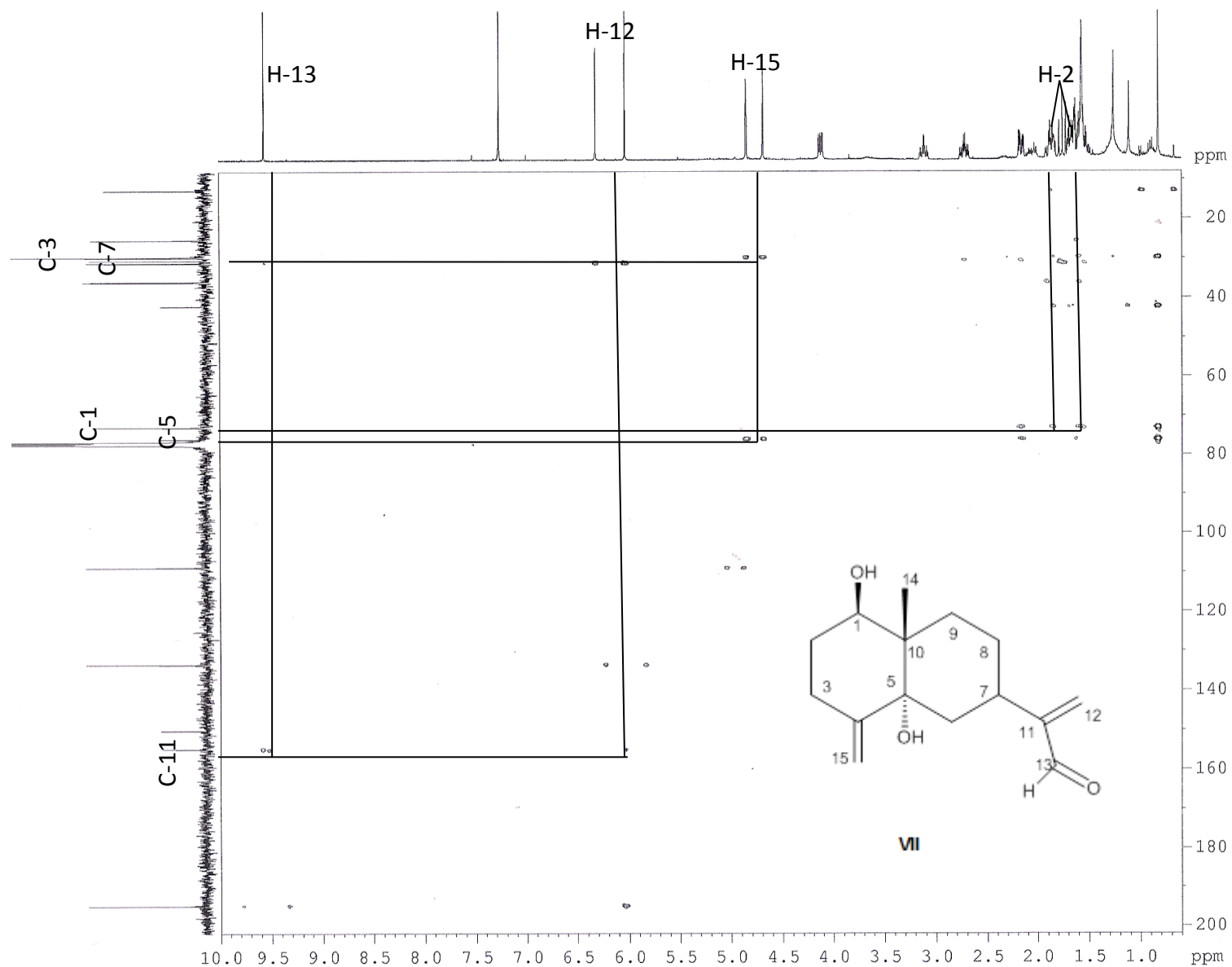
Espectro 7.2 : RMN ^{13}C (CDCl₃, MHz 100) 1,5 Dihidroxi-4(15),11(12)-eudesmien-13-al (VII).



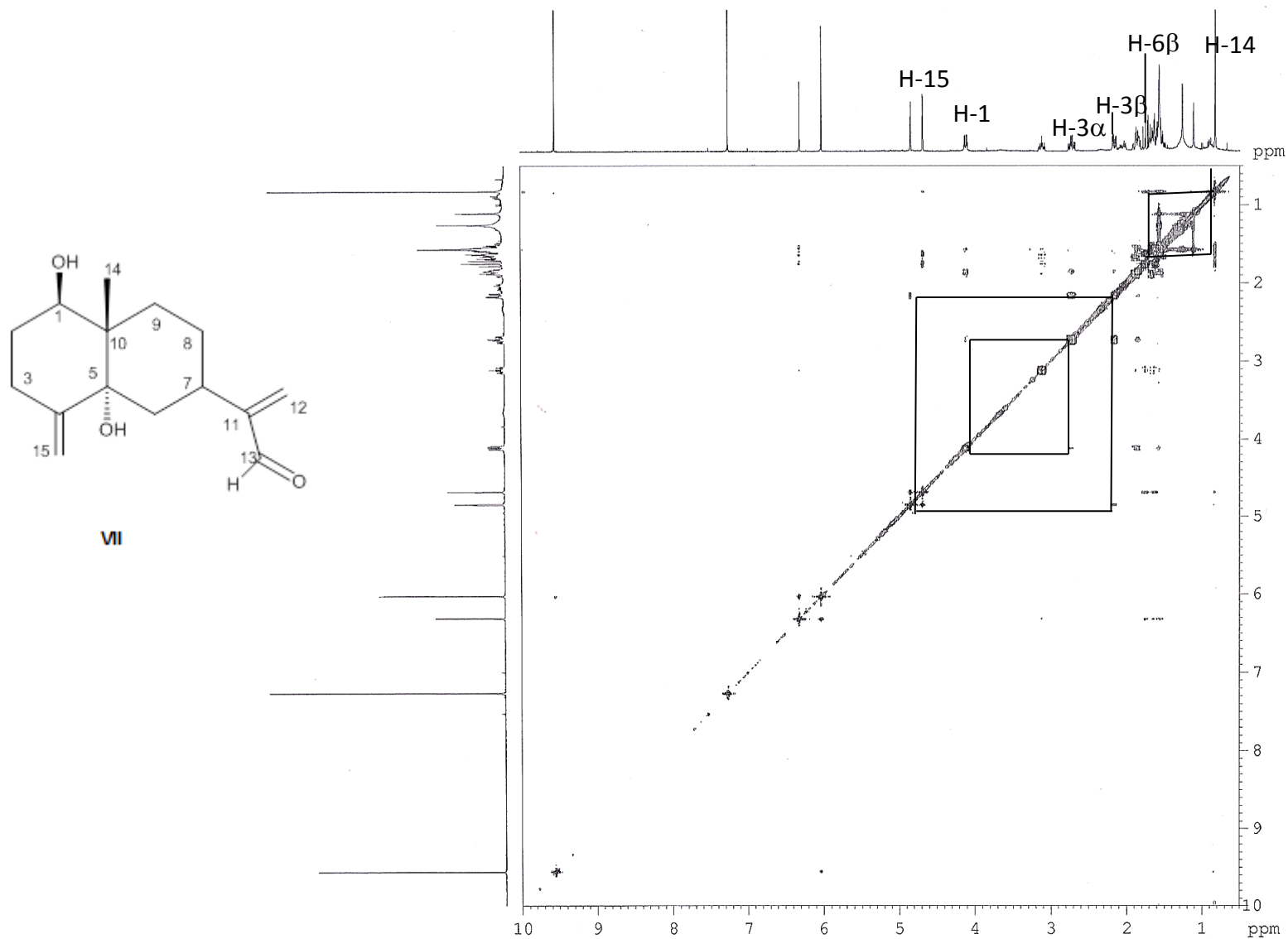
Espectro 7.3 : HSQC (CDCl₃, MHz 400) 1,5 Dihidroxi-4(15),11(12)-eudesmadien-13-al (**VII**).



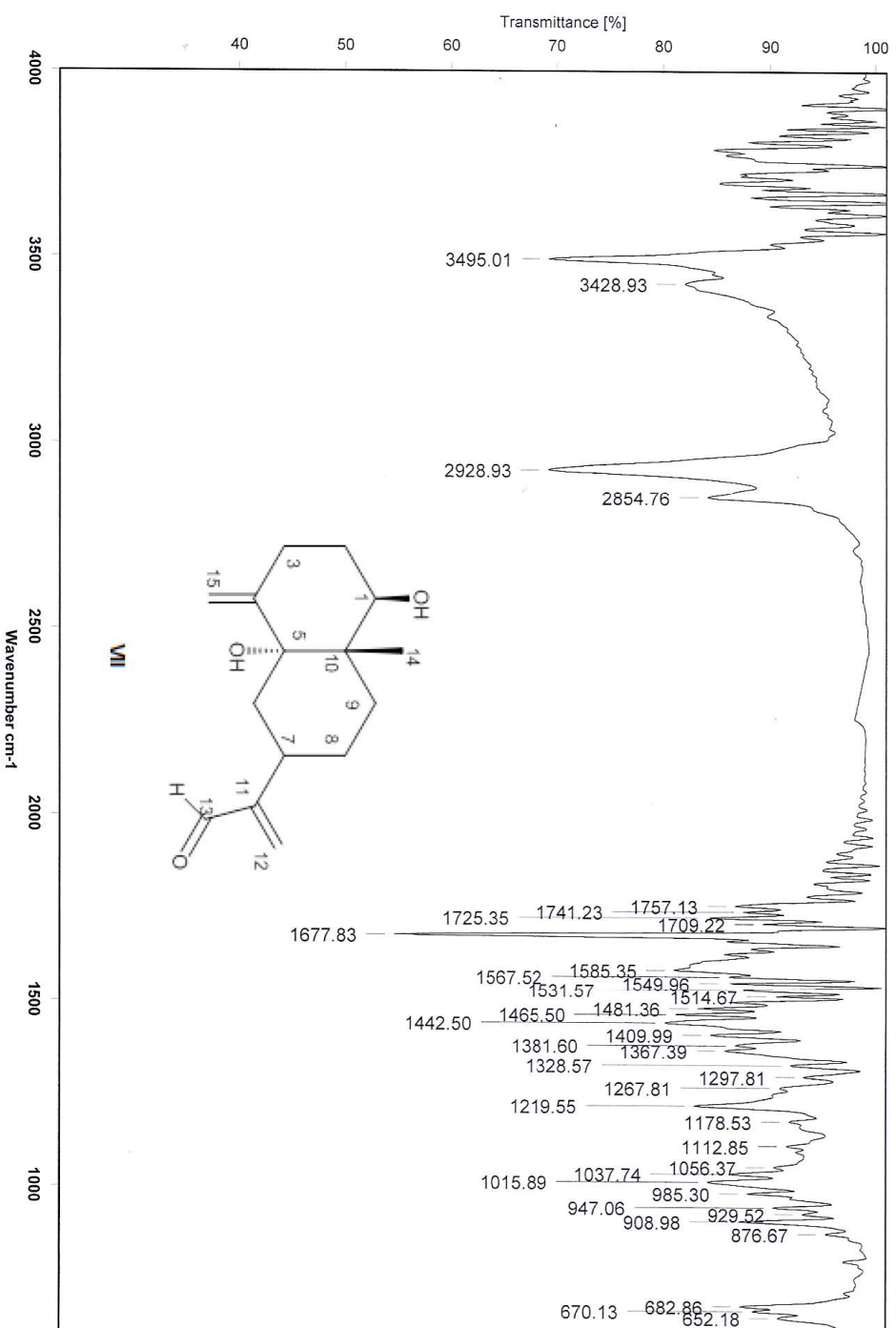
Espectro 7.4 : COSY (CDCl_3 , MHz 400) 1,5 Dihidroxi-4(15),11(12)-eudesmadien-13-al (**VII**).



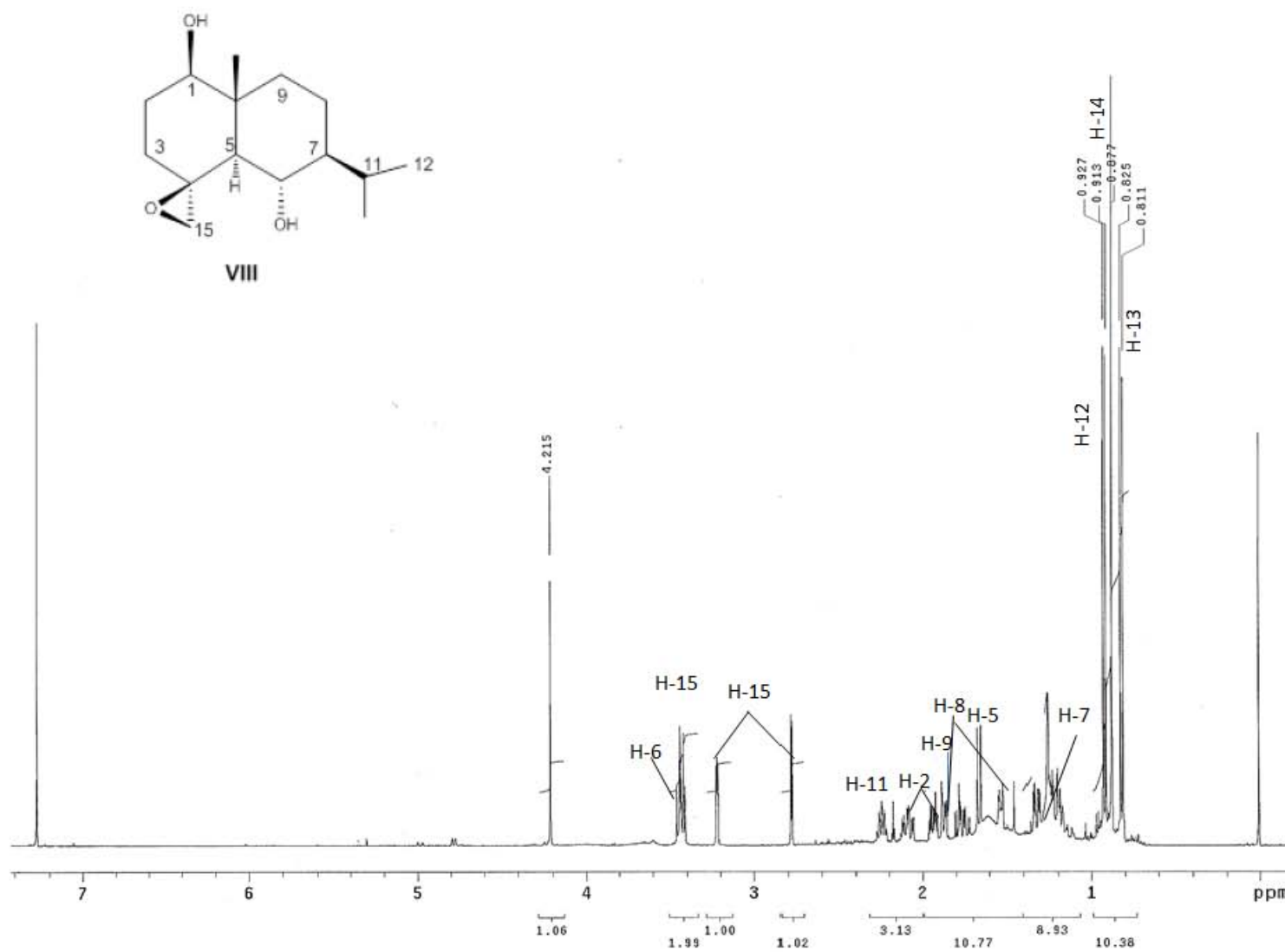
Espectro 7.5 : HMBC (CDCl_3 , MHz 400) 1,5 Dihidroxi-4(15),11(12)-eudesmadien-13-al (**VII**).



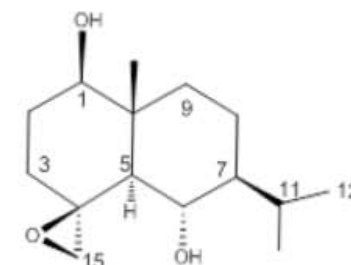
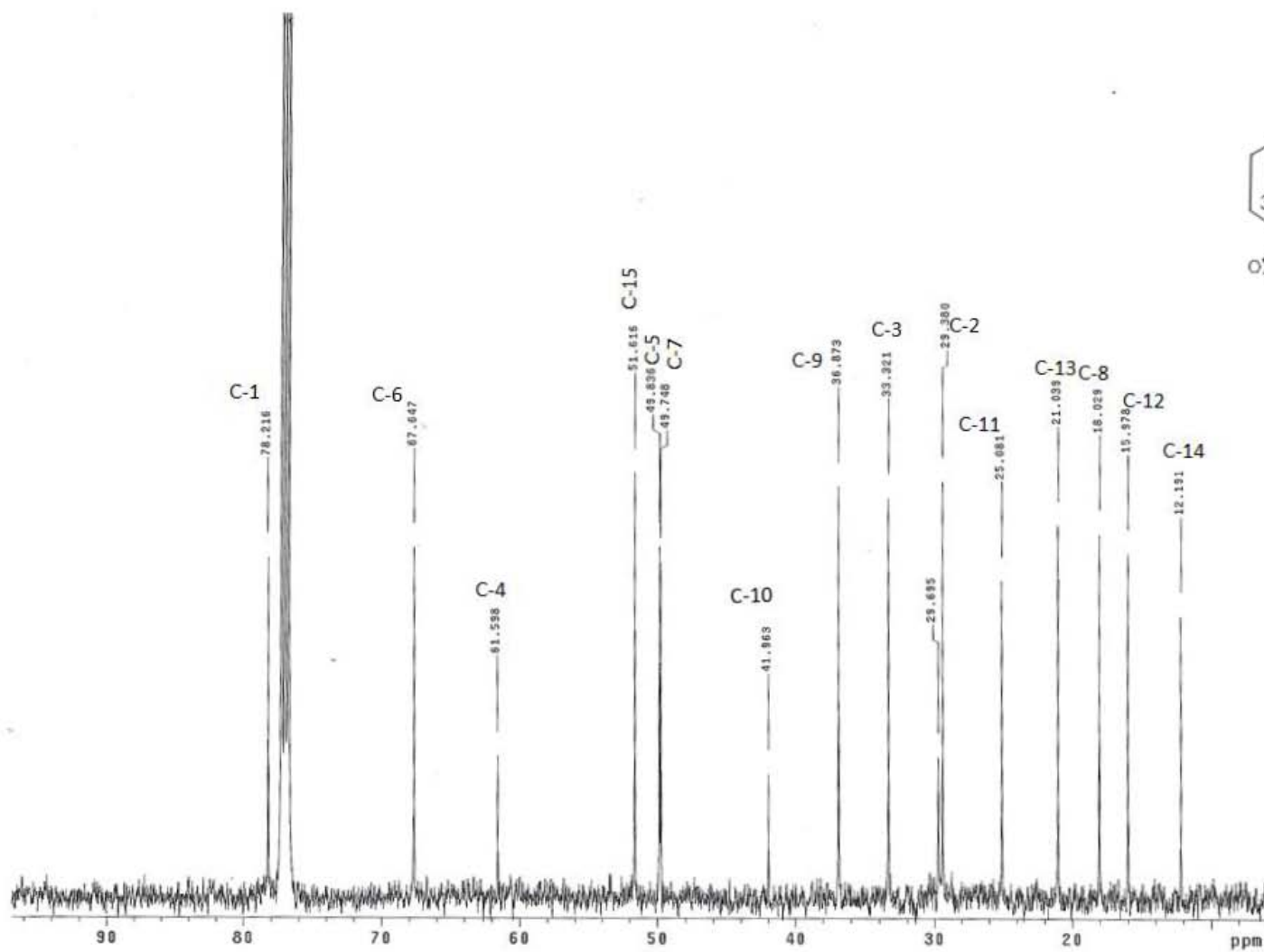
Espectro 7.6 : NOESY (CDCl_3 , MHz 400) 1,5 Dihidroxi-4(15),11(12)-eudesmadien-13-al (VII).



Espectro 7.7 : IR (CHCl₃)₁,5 Dihidroxi-4(15),11(12)-eudesmadien-13-al (VII).

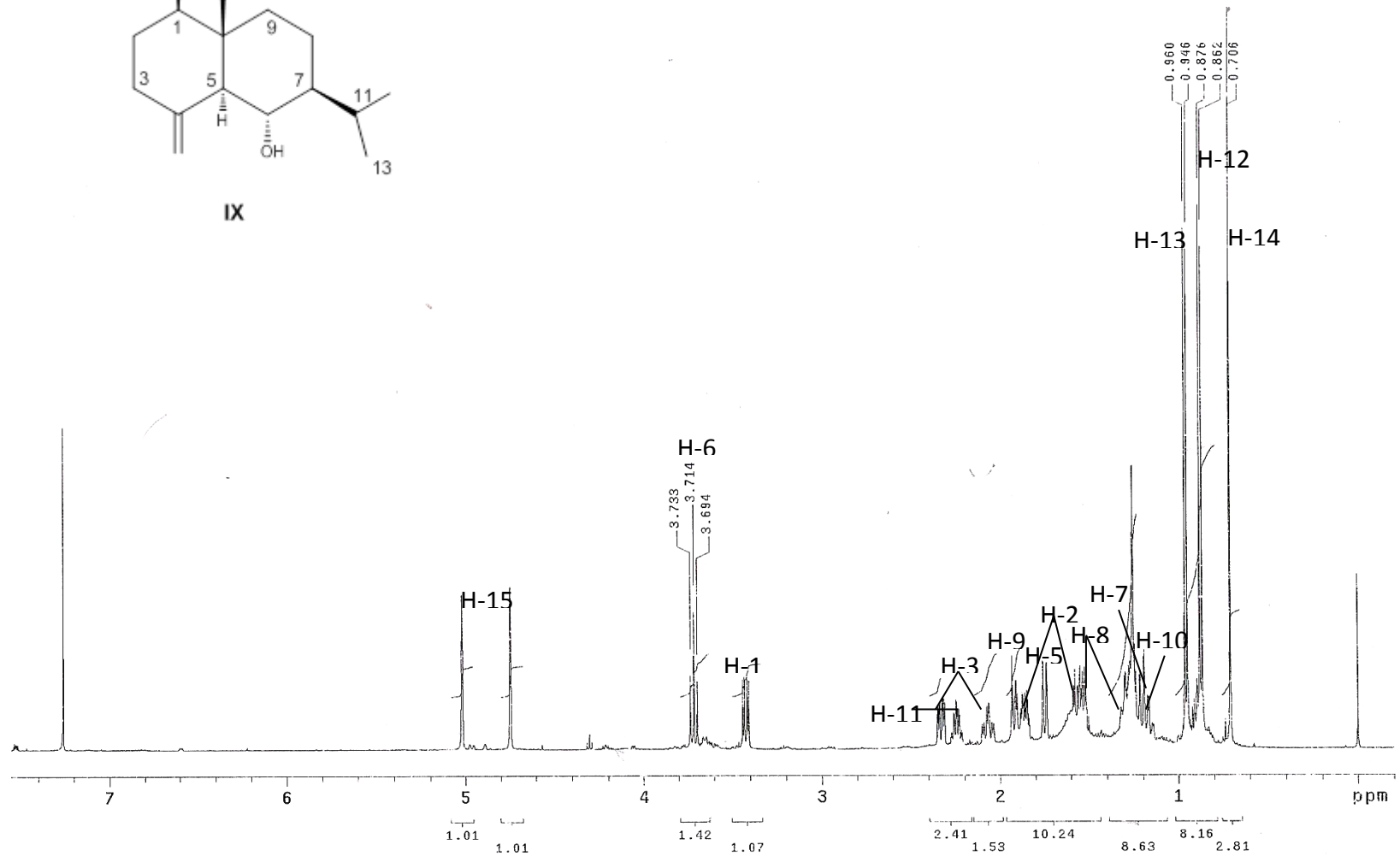
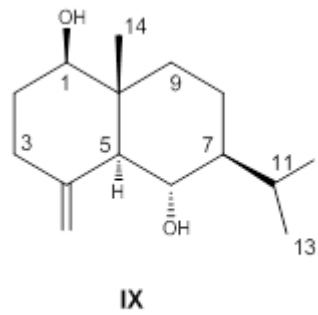


Espectro 8.1 : RMN ^1H (CDCl_3 , MHz 500) 4(15)-Epoxi-1,6 eudesmanodiol (**VIII**)

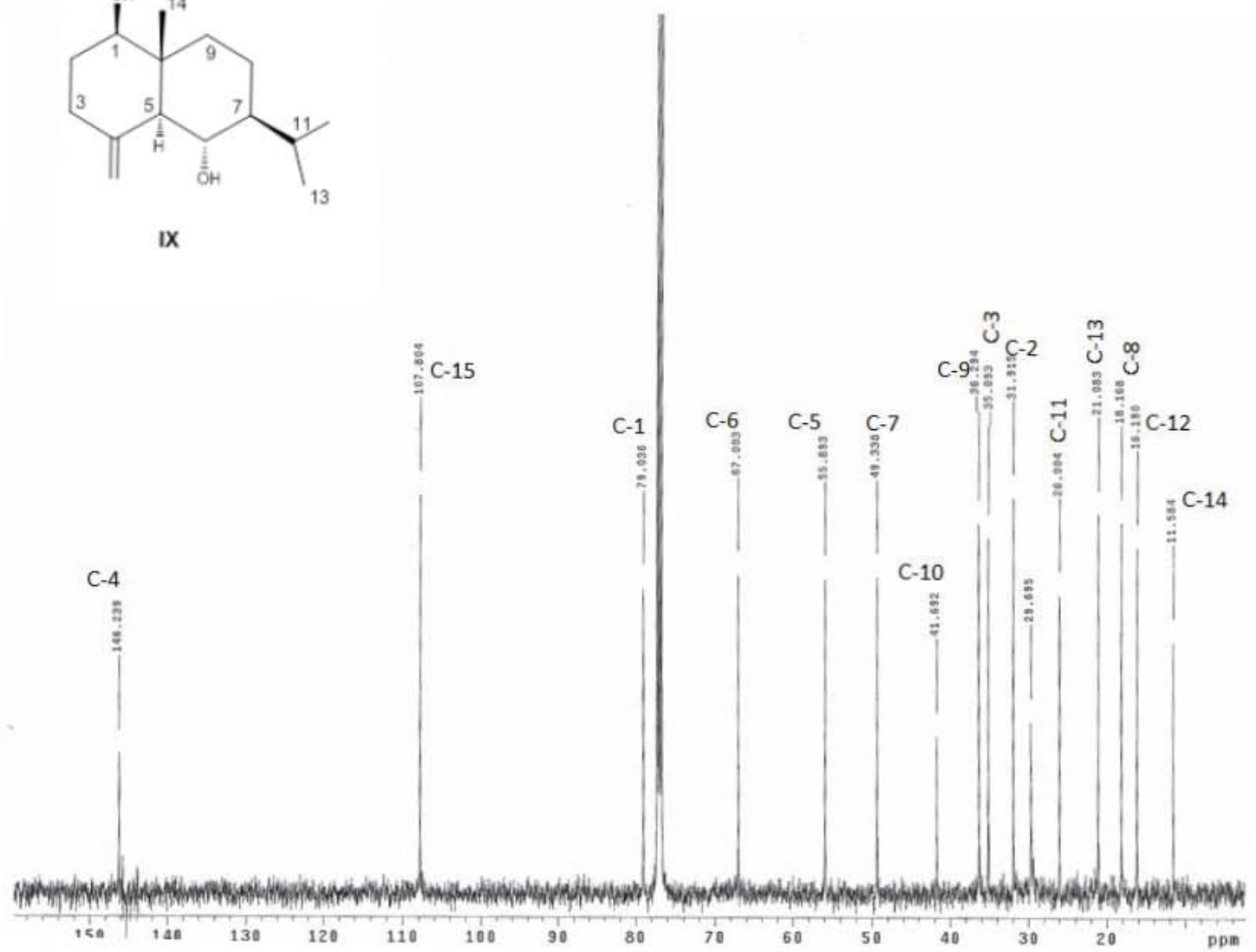
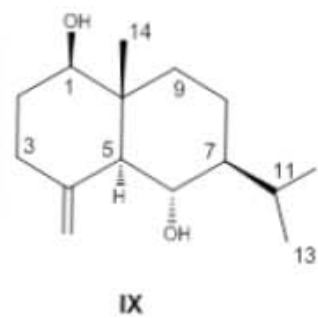


VIII

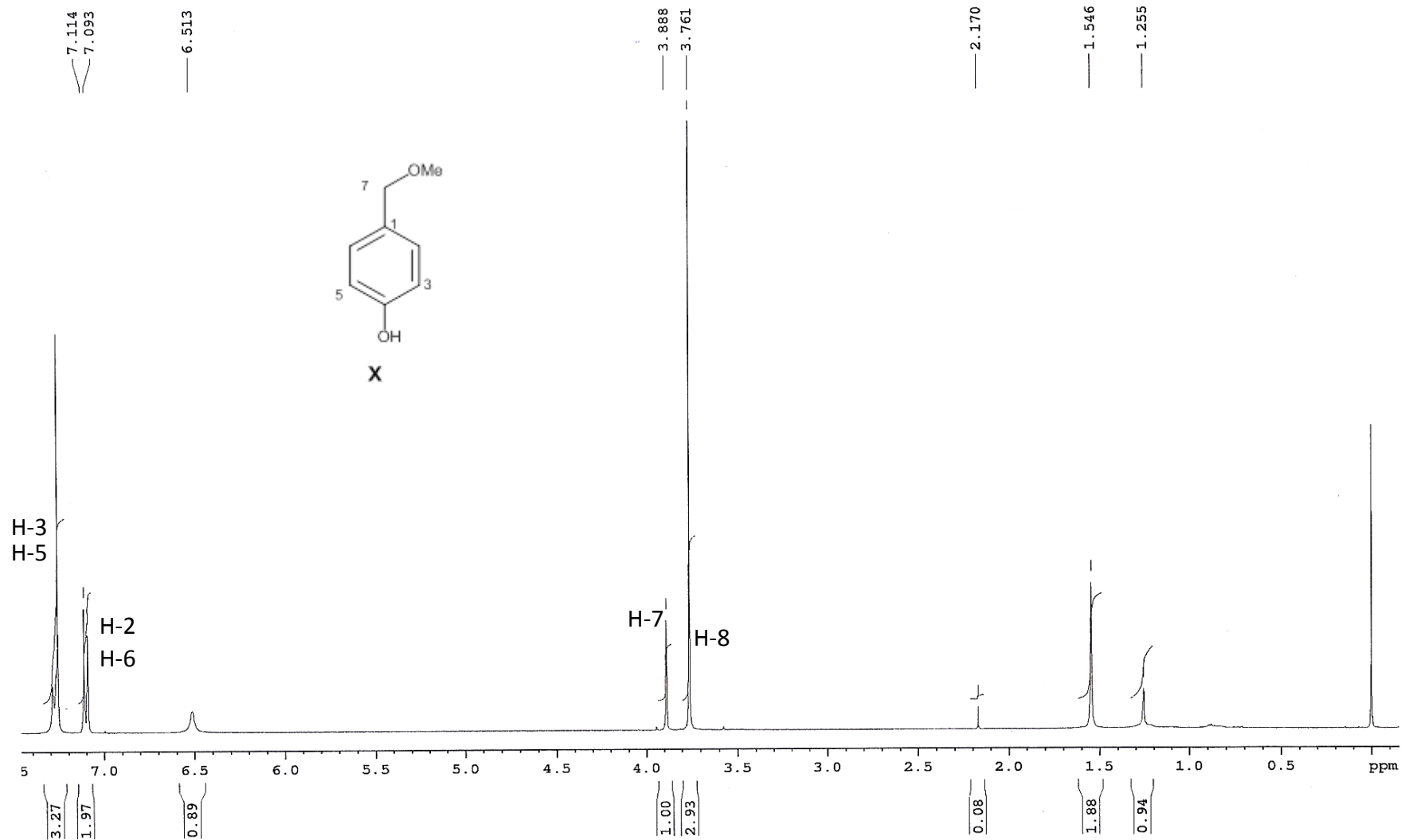
Espectro 8.2 : RMN ^{13}C (CDCl_3 , MHz 100) 4(15)-Epoxi-1,6 eudesmanodiol (VIII)



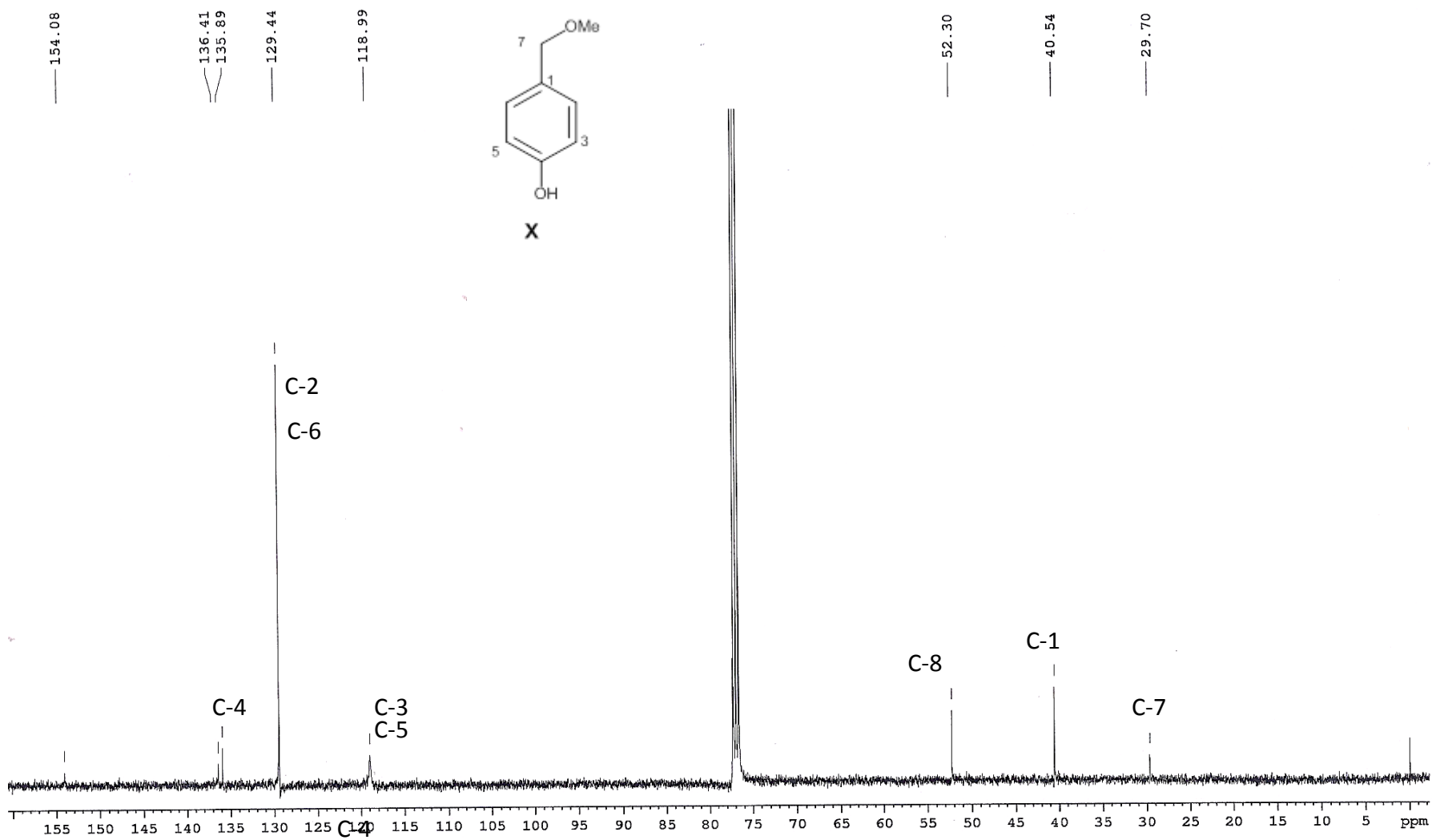
Espectro 9.1 : RMN ^1H (CDCl_3 , MHz 500) 4(15)-Eudesmen-1 β ,6 α -diol (**IX**).



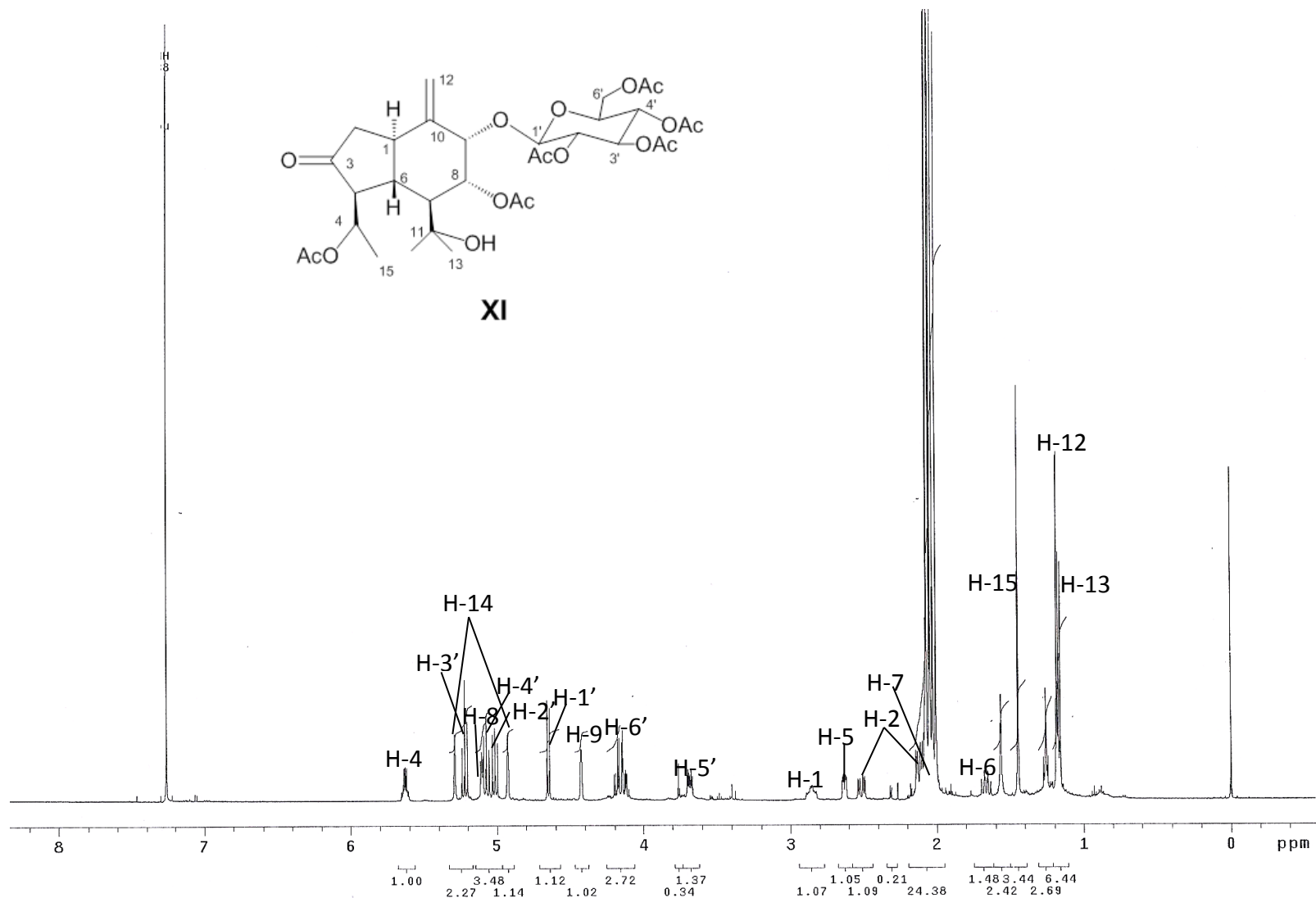
Espectro 9.2 : RMN ^{13}C (CDCl_3 , MHz 100) 4(15)-Eudesmen-1 β ,6 α -diol (**IX**).



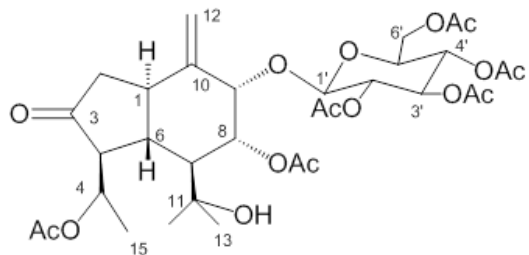
Espectro 10.1 : RMN ^1H (CDCl_3 , MHz 400) α -Methoxy-*p*-cresol (**X**).



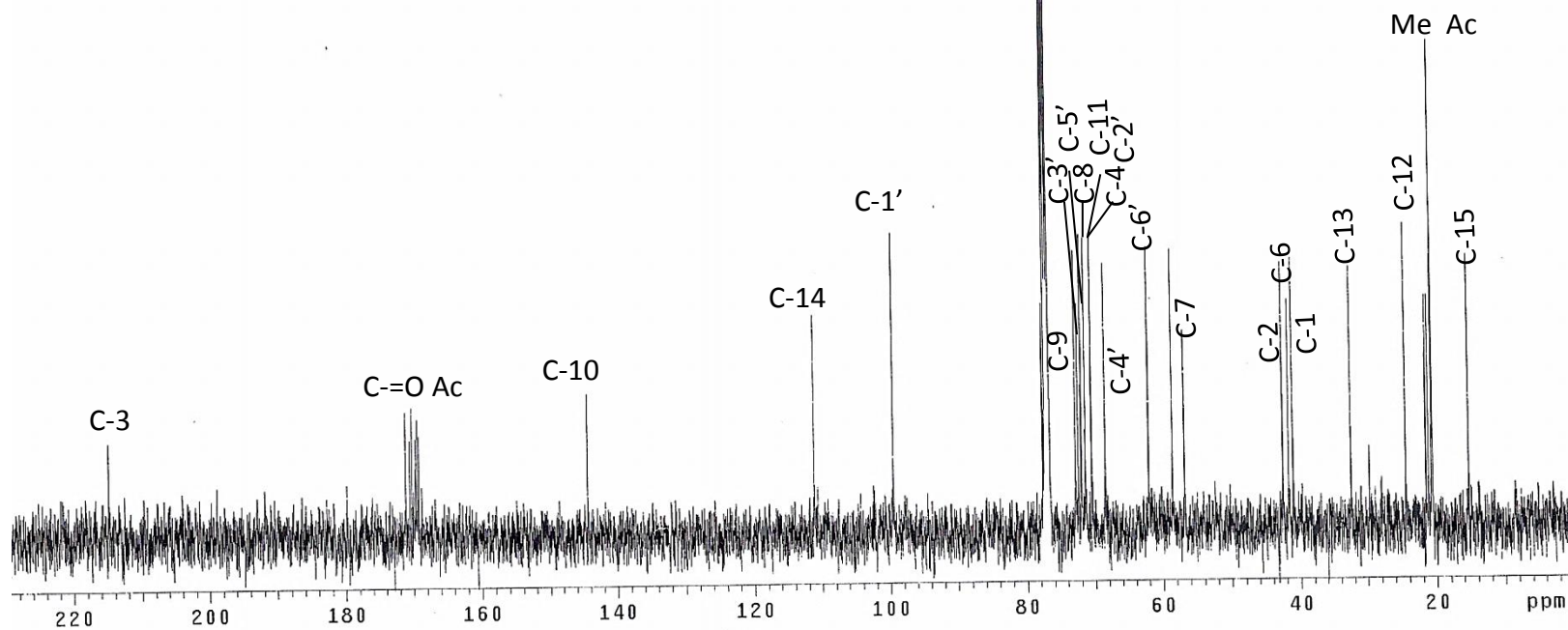
Espectro 10.2 : RMN ^{13}C (CDCl₃, MHz 100) α -Metoxy-*p*-cresol (X).



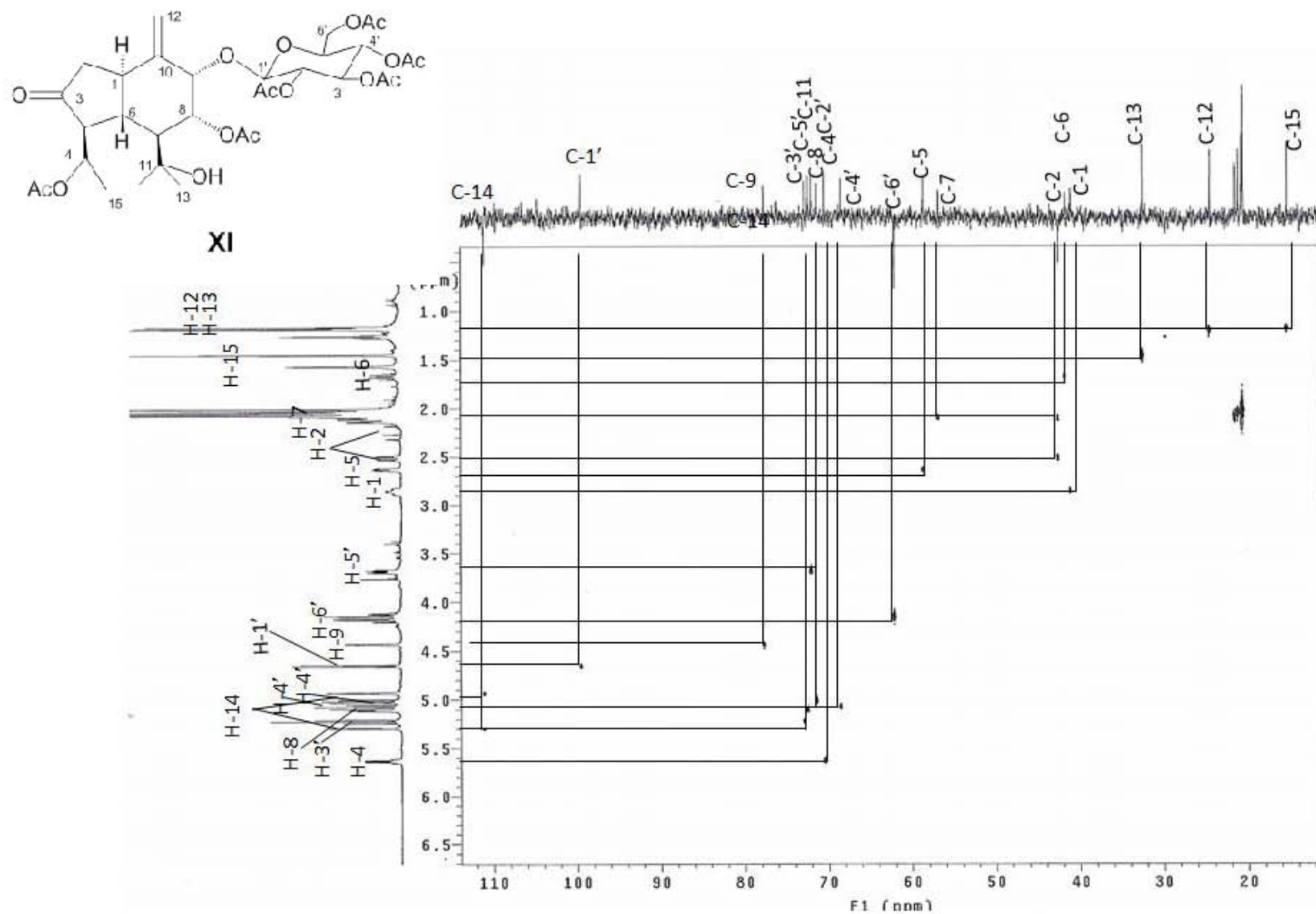
Espectro 11.1 : RMN ^1H (CD_3OD , MHz 500) 9-O- β -D-(2'-O,3'-O,4'-O,6'-O-Tetraacetil) glucopiranósido de(1R,4R,5S,6R,7R,8R,9S)- 4-8-acetoxi-11-hidroxi-10(14)-oplopen-3-ona **XI**.



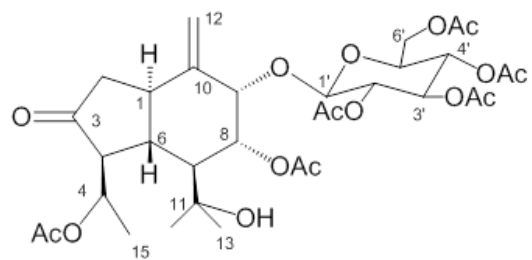
XI



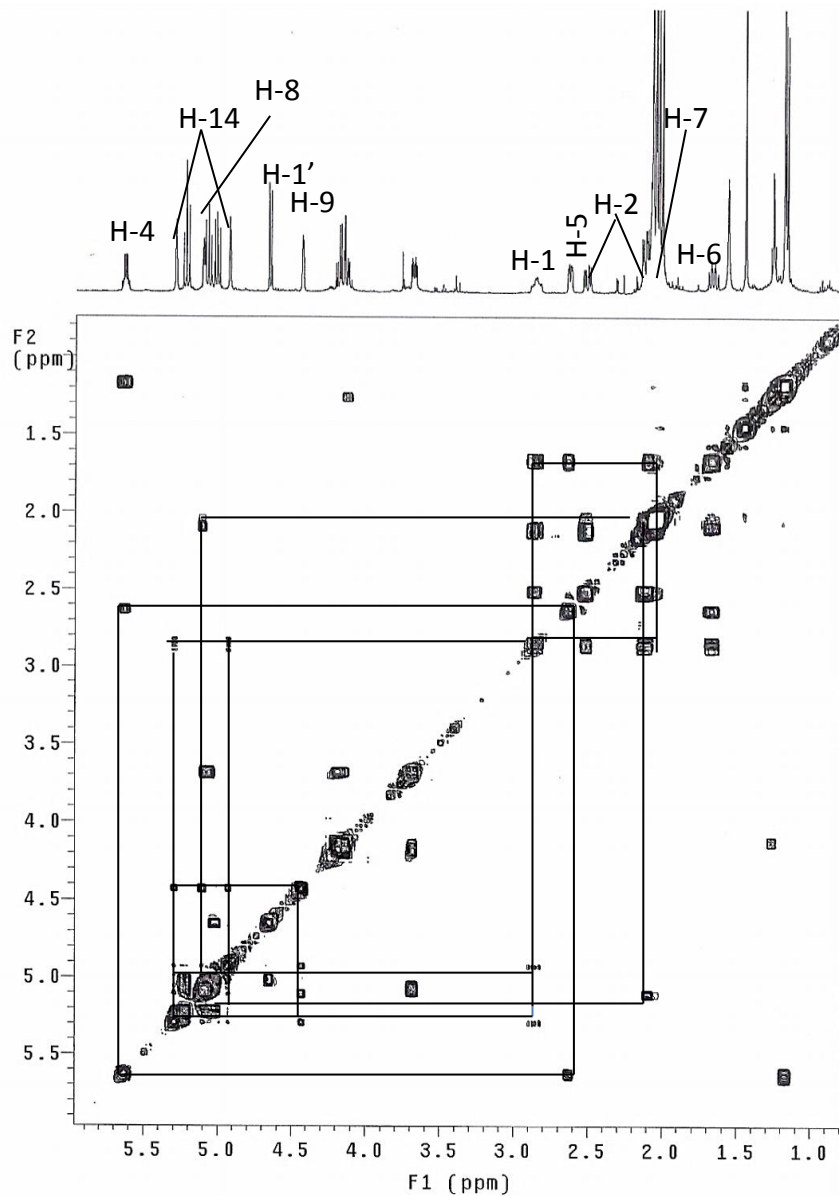
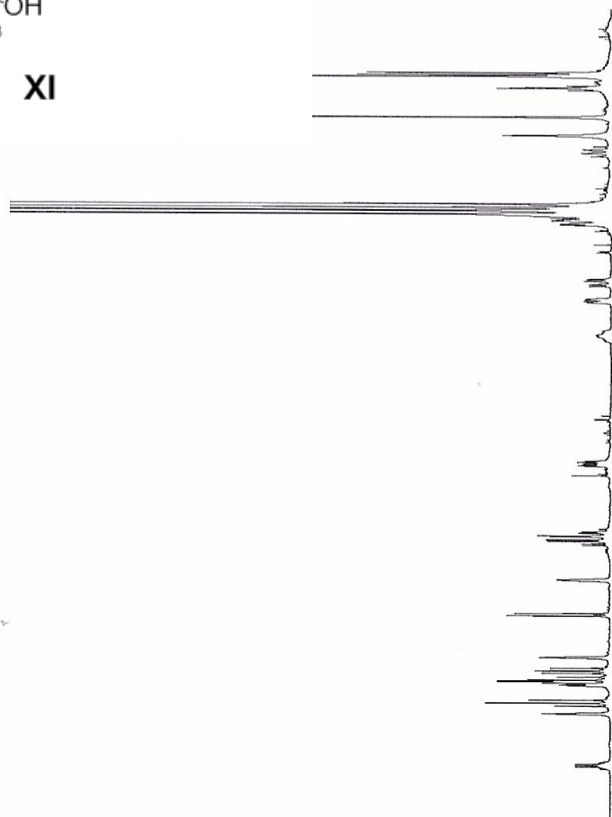
Espectro 11.2 : RMN ^{13}C (CD_3OD , MHz 100) 9-O- β -D-(2'-O,3'-O,4'-O,6'-O-Tetraacetil) glucopiranosido de(1*R*,4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,8*R*,9*S*)- 4-8-acetoxy-11-hidroxi-10(14)-oplopen-3-ona **XI**.



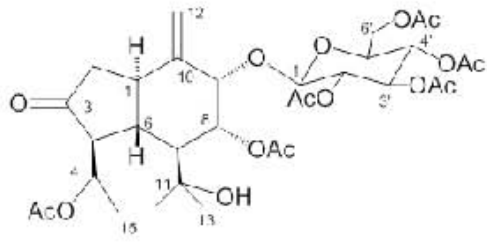
Espectro 11.3 : HSQC (CD₃OD, MHz 500) 9-O-β-D-(2'-O,3'-O,4'-O,6'-O-Tetraacetil) glucopiranosido de (1R,4R,5S,6R,7R,8R,9S) 4-8-acetoxi-11-hidroxi-10(14)-oplopen-3-ona **XI**.



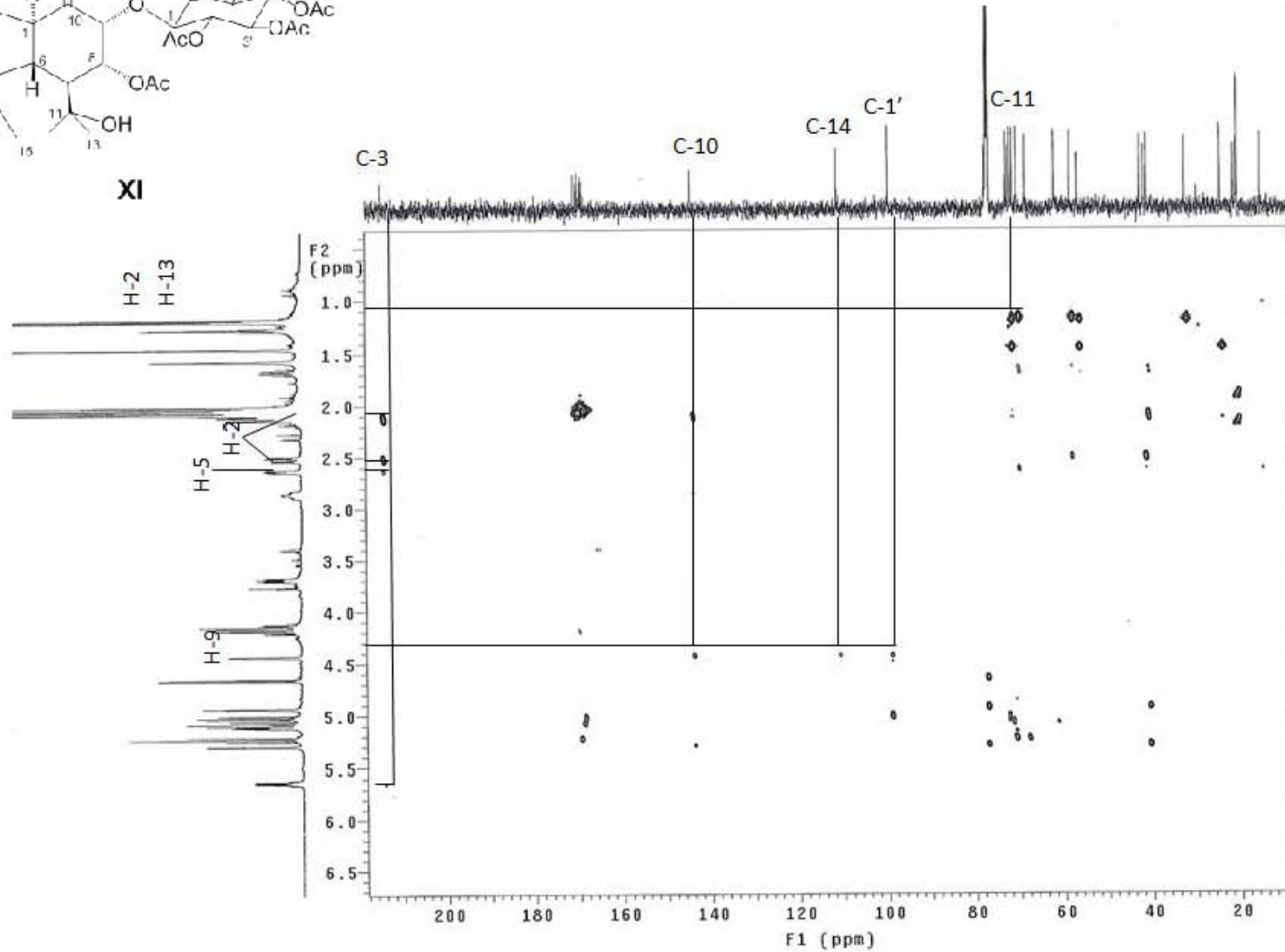
XI



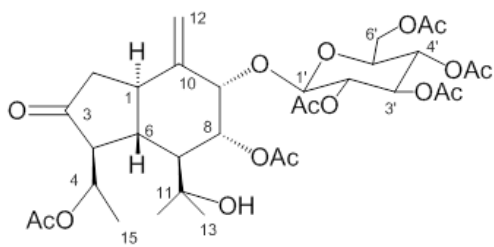
Espectro 11.4 : COSY (CD_3OD , MHz 500) 9-O- β -D-(2'-O,3'-O,4'-O,6'-O-Tetraacetil) glucopiranósido de (1R,4R,5S,6R,7R,8R,9S)- 4-8-acetoxy-11-hidroxi-10(14)-oplopen-3-ona **XI**.



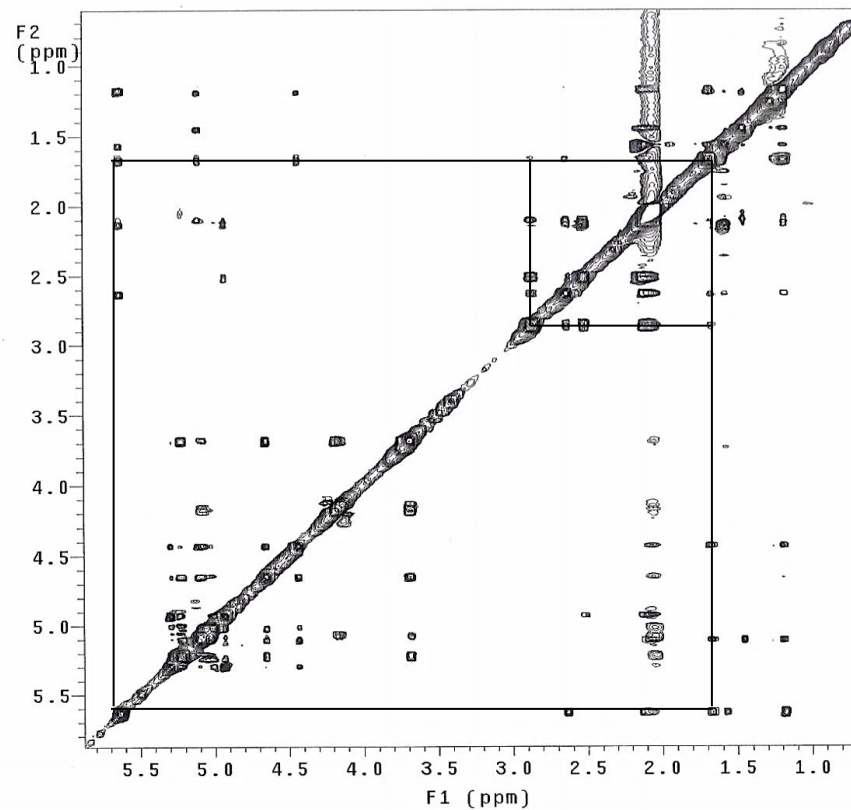
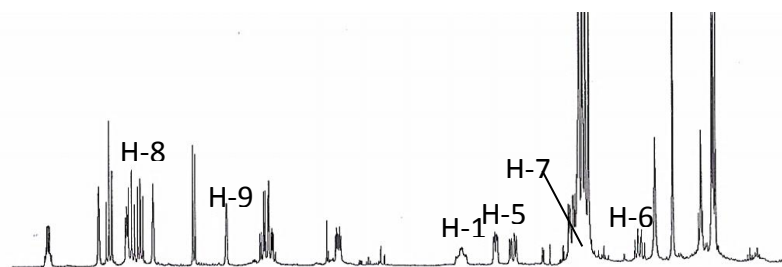
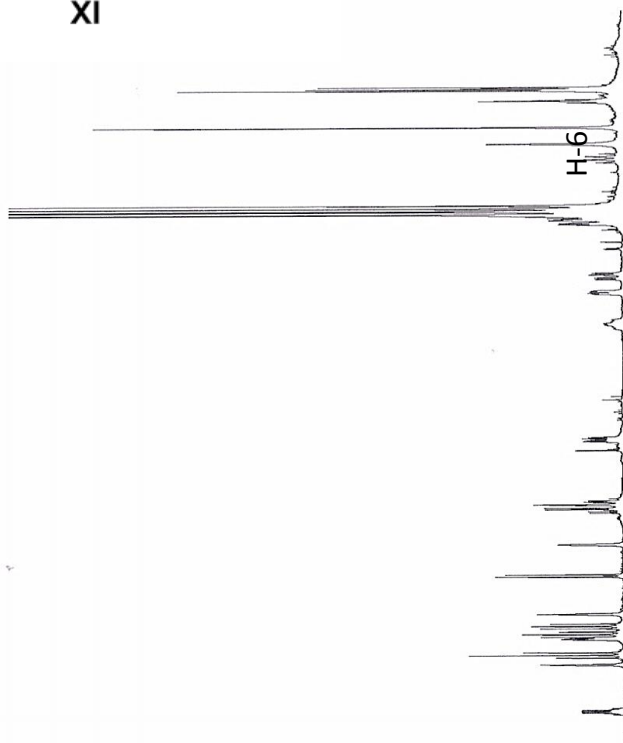
XI



Espectro 11.5 : HMBC (CD₃OD, MHz 500) 9-O-β-D-(2'-O,3'-O,4'-O,6'-O-Tetraacetil) glucopiranosido de (1R,4R,5S,6R,7R,8R,9S)- 4-8-acetoxi-11-hidroxi-10(14)-oplopen-3-ona **XI**.

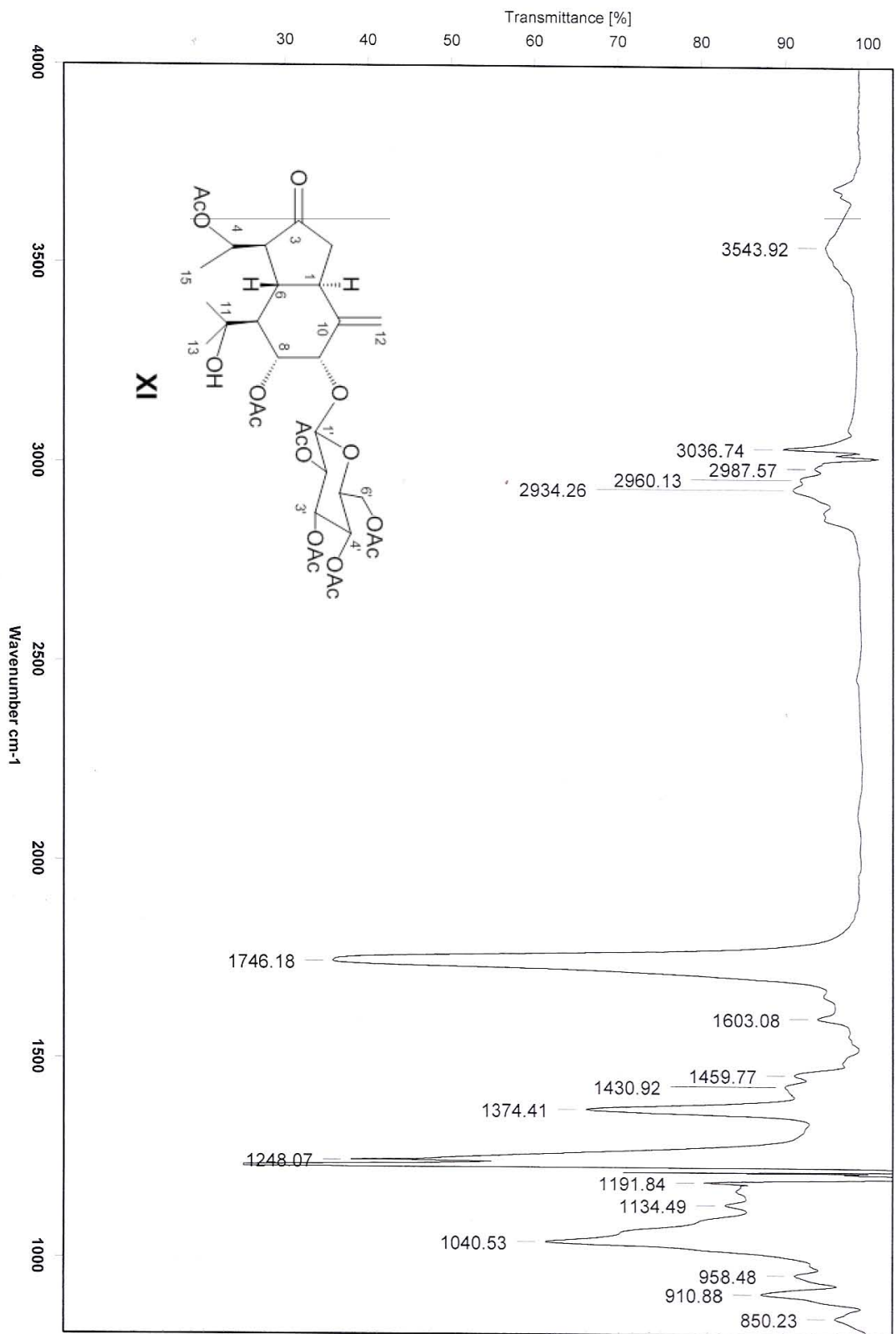


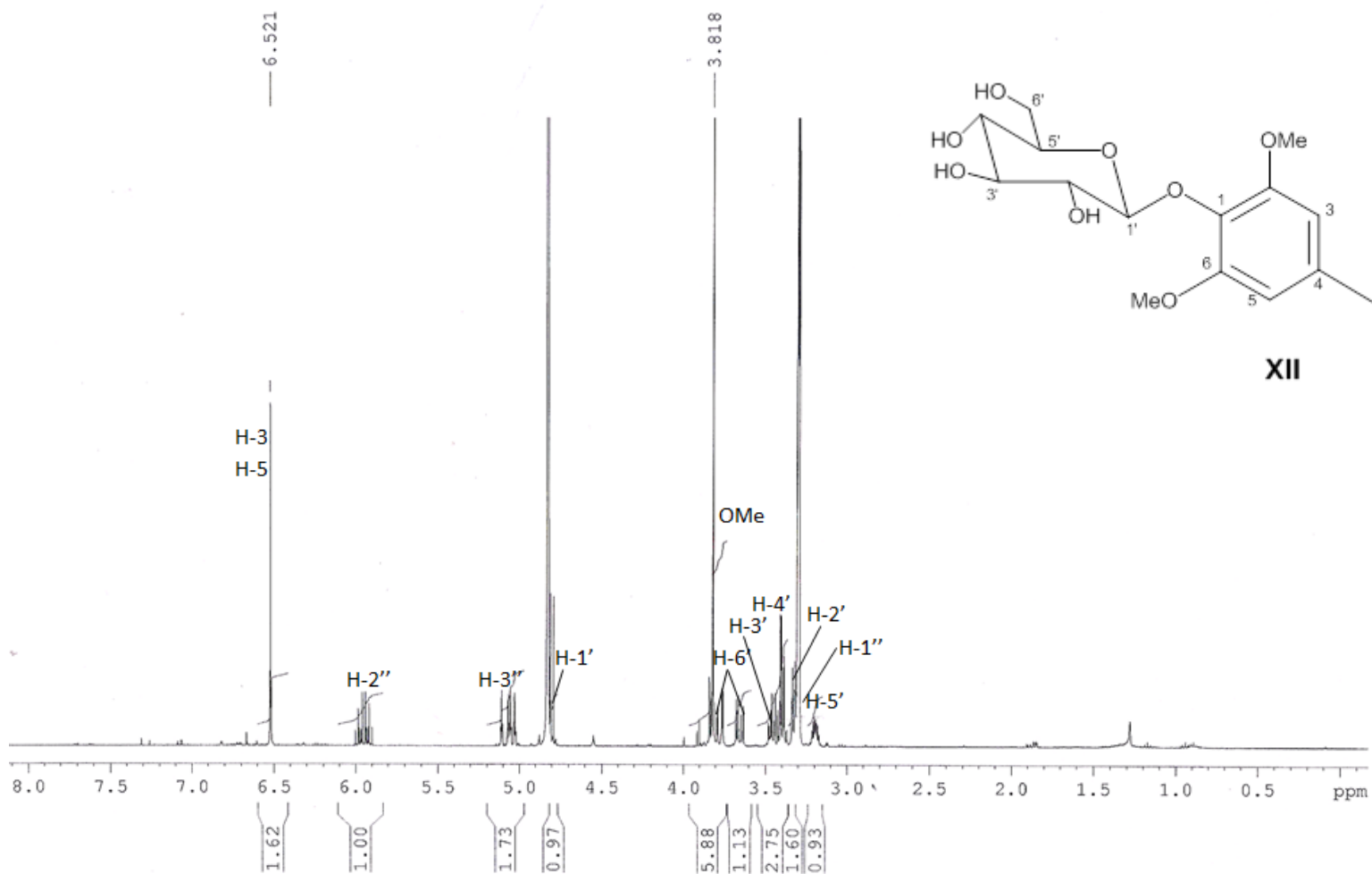
XI



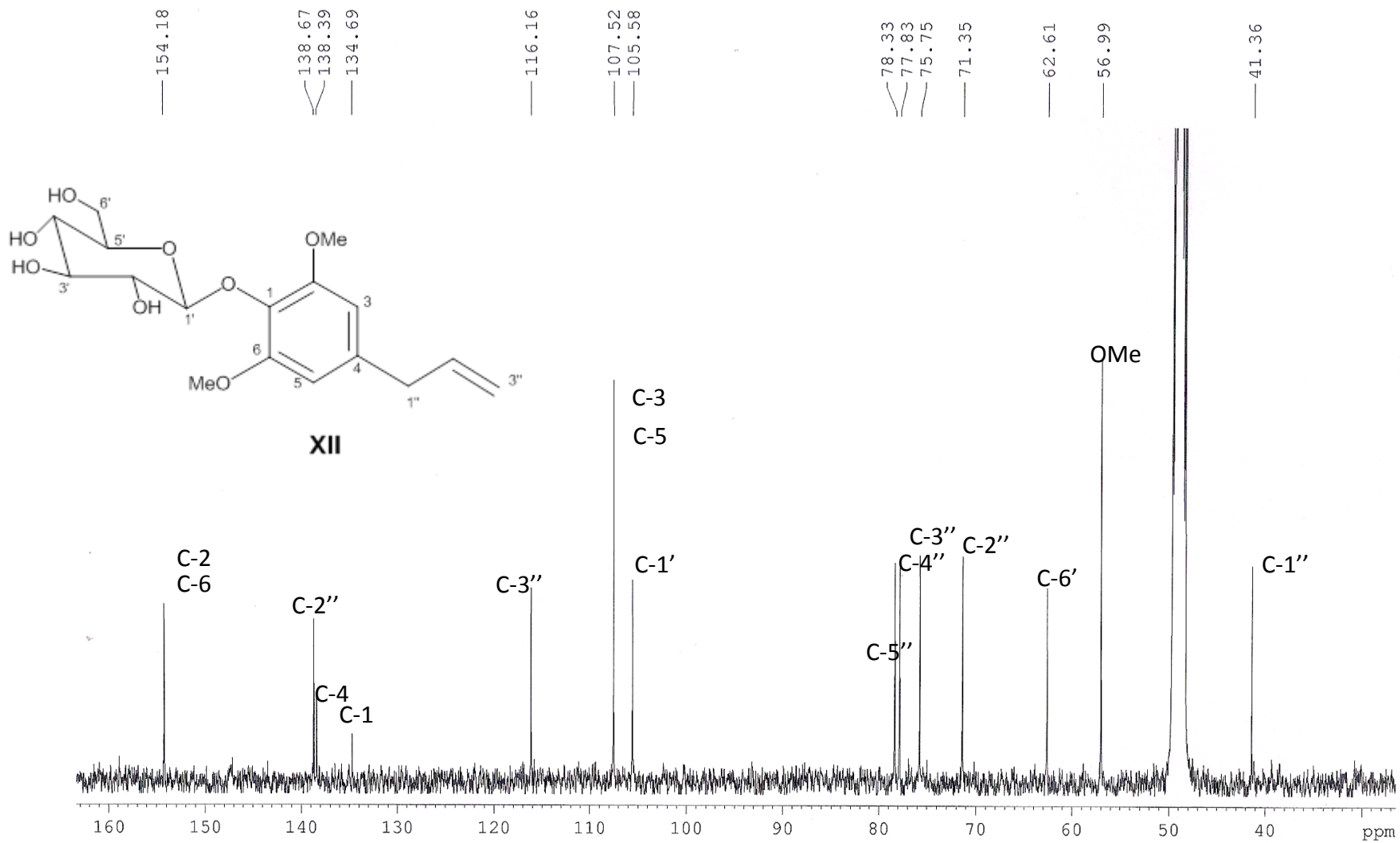
Espectro 11.6 :NOESY (CD₃OD. MHz 500) 9-O-β-D-(2'-O,3'-O,4'-O,6'-O-Tetraacetil) glucopiranosido de (1R,4R,5S,6R,7R,8R,9S)- 4-8-acetoxi-11-hidroxi-10(14)-oplopen-3-ona **XI**.

Espectro 11.7 :IR (CH₃OH) 9-O-β-D-(2'-O,3'-O,4'-O,6'-O-Tetraacetil) glucopiranosido de (1R,4R,5S,6R,7R,8R,9S)-4-8-acetoxi-11-hidroxi-10(14)-oploppen-3-ona XI.

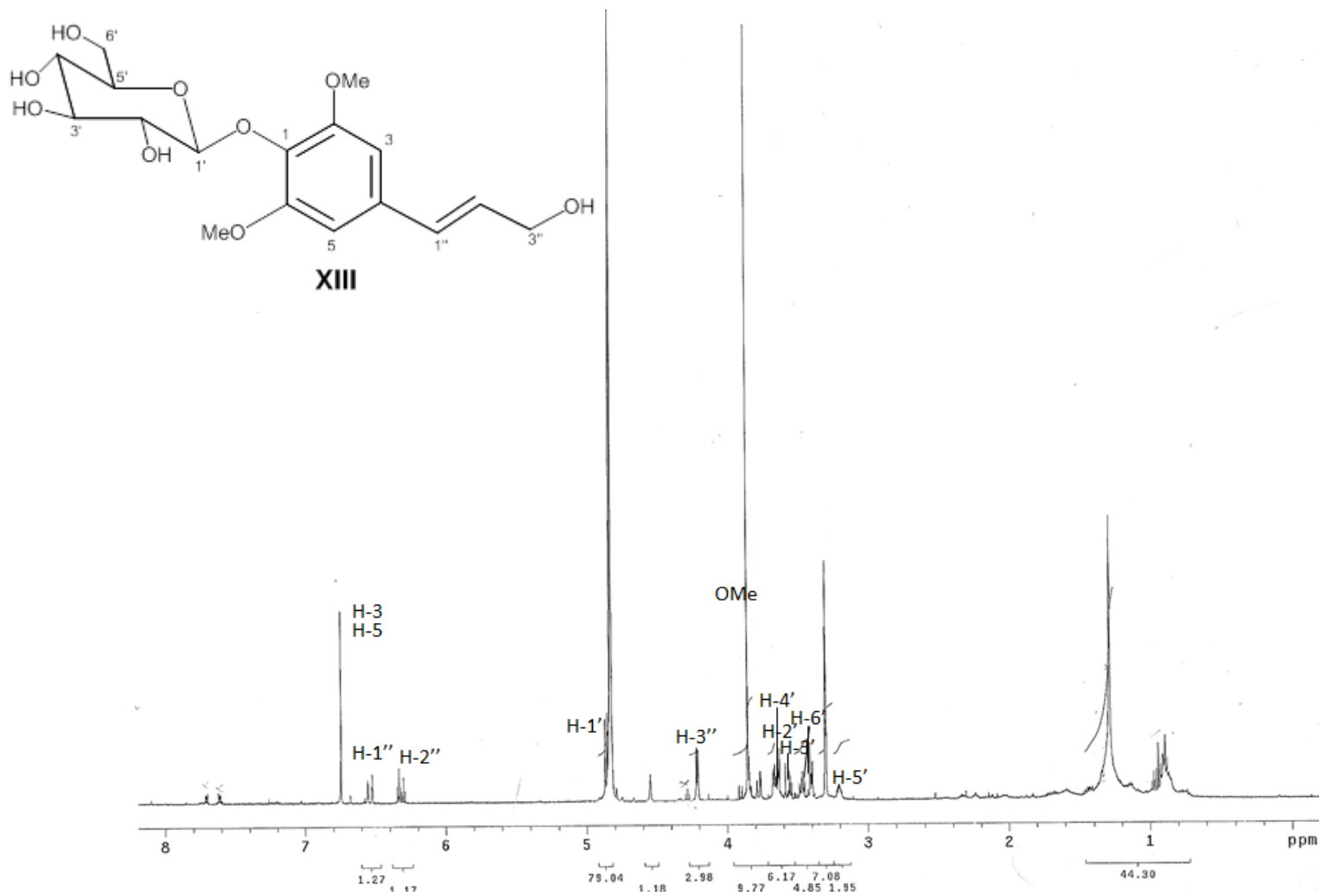




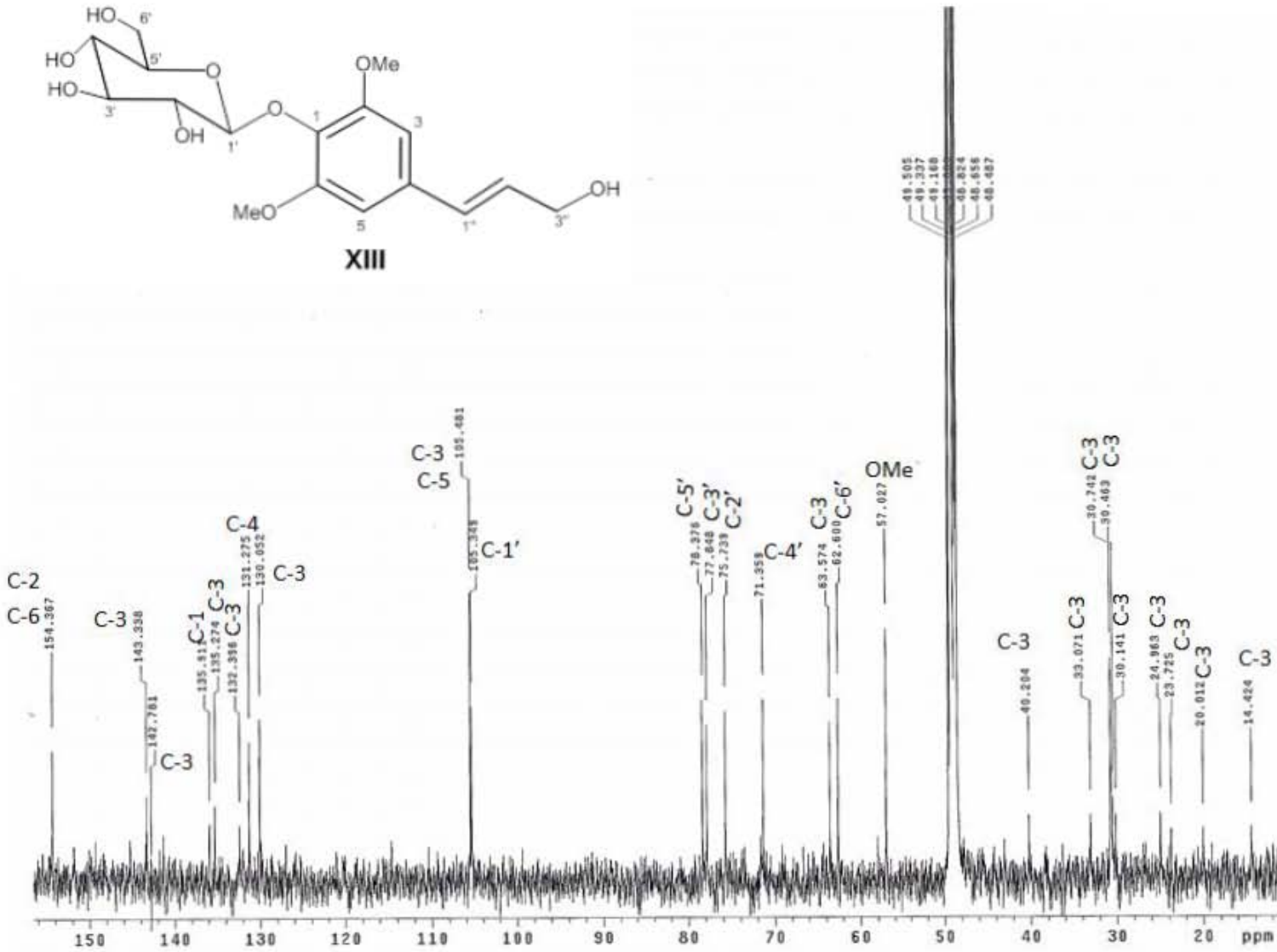
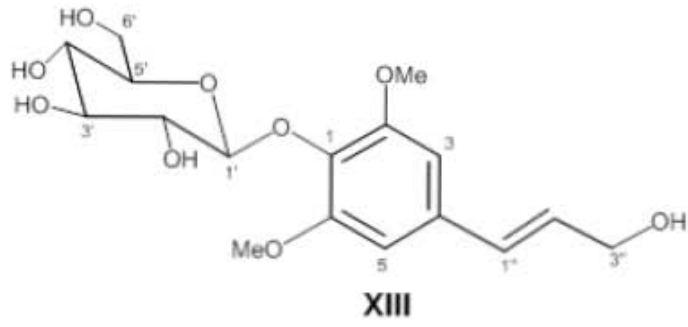
Espectro 12.1 : RMN ¹H (CD₃OD, MHz 500) Glucósido de 4-Alil-2,6-dimetoxifenol (XII).



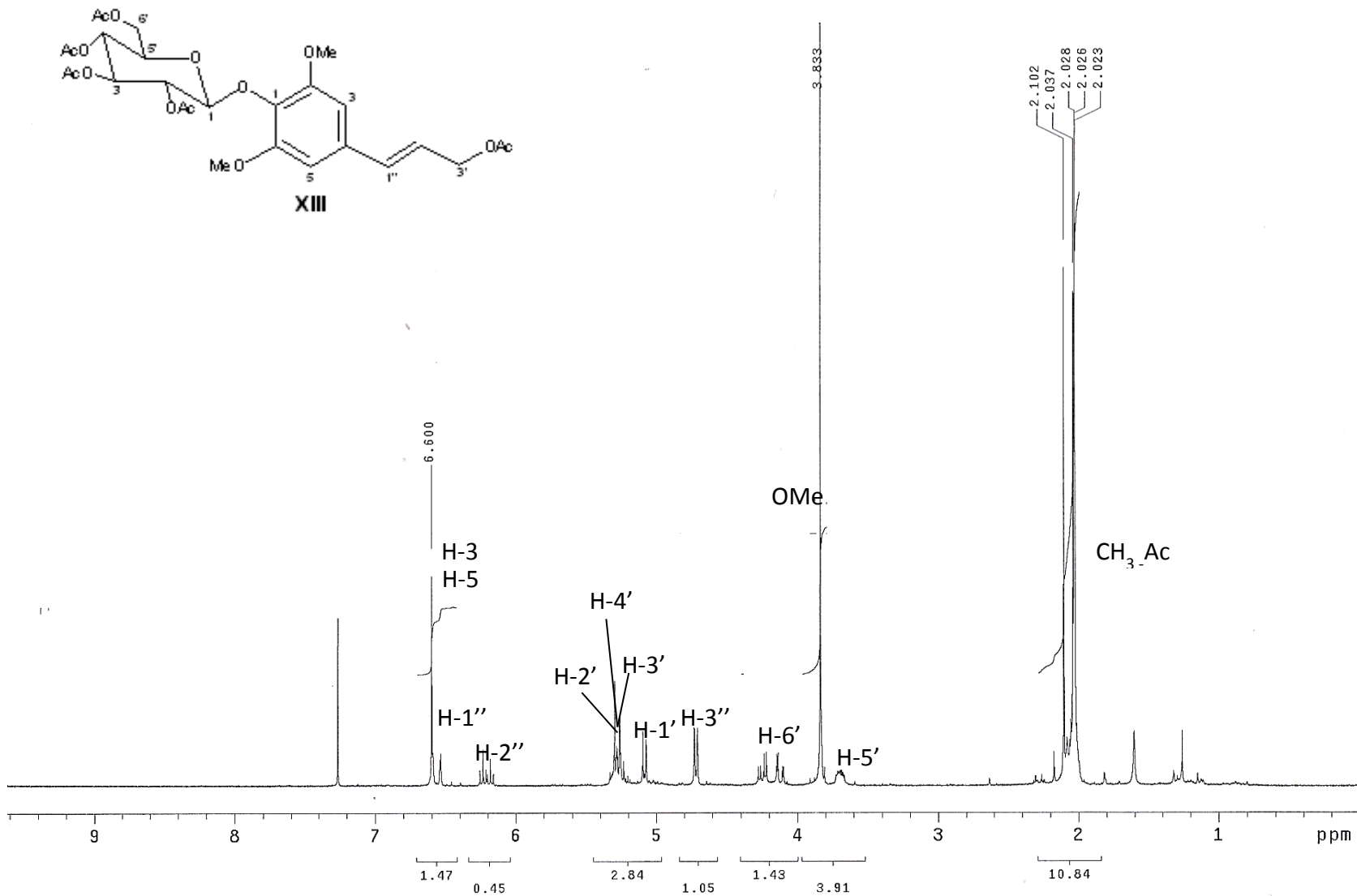
Espectro 12.2 : RMN ¹³C (CD₃OD, MHz 100) Glucósido de 4-Alil-2,6-dimetoxifenol (XII).



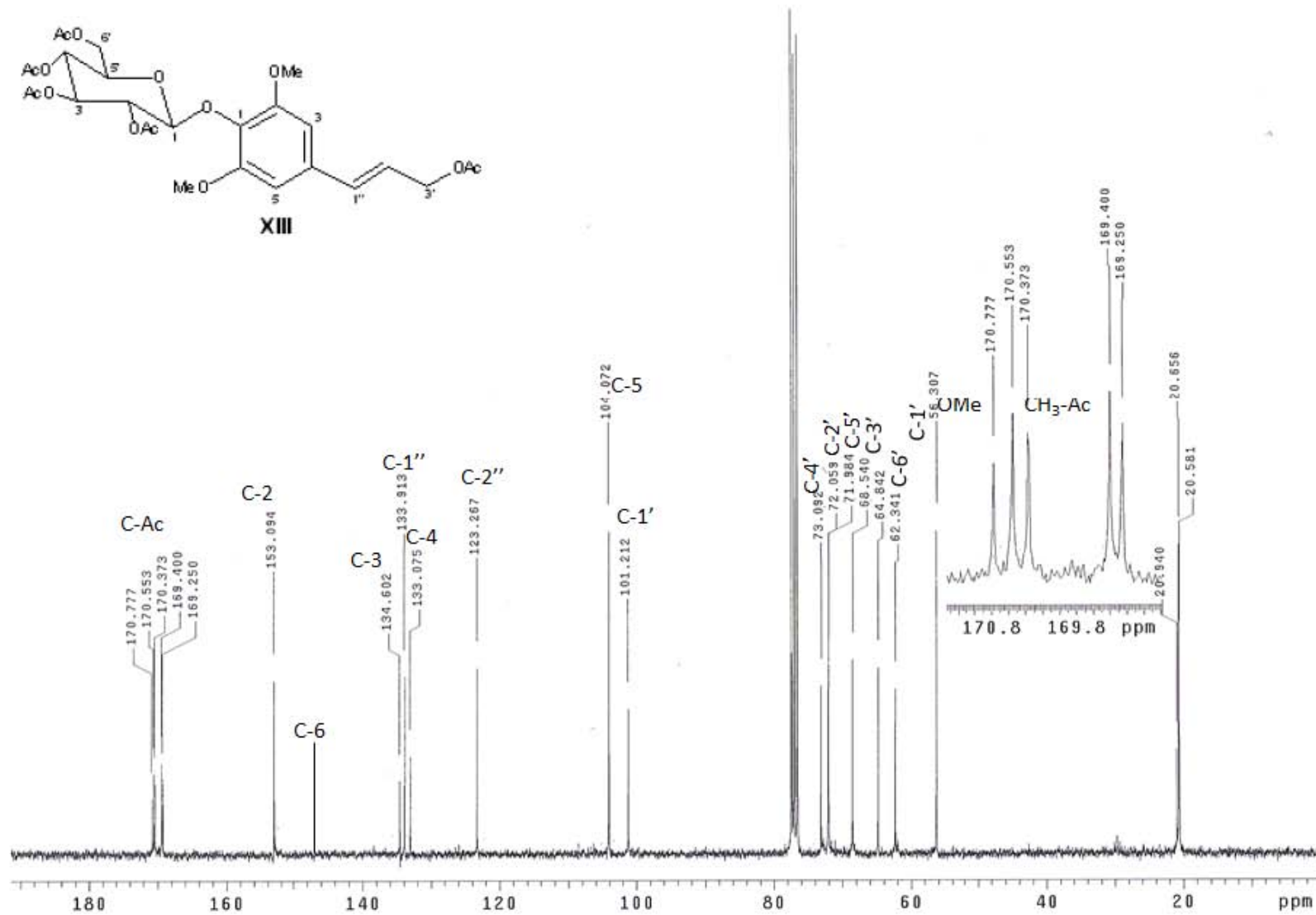
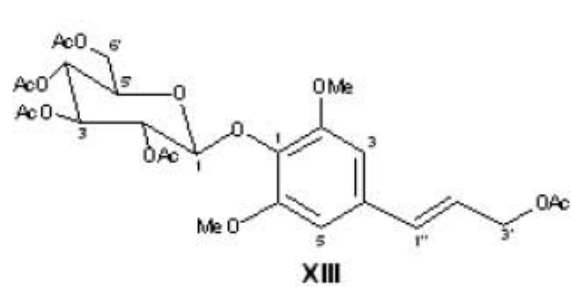
Espectro 13.1 : RMN ^1H ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, MHz 500) Syringin (XIII).



Espectro 13.2 : RMN ¹³ C (C₅H₅N, MHz 100) Syringin (XIII).



Espectro 14.1 : RMN ¹H (CHCl₃, MHz 300) XIII A



Espectro 14.2 : RMN ¹³C (CHCl₃, MHz 100) **XIII**A