



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

**“AISLAMIENTO, DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR,
BIOEVALUACIÓN Y ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA
MOLECULAR Y LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS
NATURALES PRESENTES EN *HETEROTHECA INULOLIDES* (Cass)”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. en I. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ CHÁVEZ

TUTOR:
DR. EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. HELGI HELEN JUNG COOK- FACULTAD DE QUÍMICA
DR. RICARDO REYES CHILPA- INSTITUTO DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F. DICIEMBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr Alejandro Manuel García Carrancá
Instituto de Investigaciones Biomédicas/ INCan

SECRETARIA: Dra Helgi Helen Jung Cook
Facultad de Química/ INNN

VOCAL: Dra. Martha Lydia Macias Rubalcava
Instituto de Química

VOCAL: Dr. José Pedraza Chaverri
Facultad de Química

VOCAL: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Facultad de Química

Esta tesis se realizó en el Instituto de Química de la
Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría del
Dr. Guillermo Delgado Lamas

Sustentante

Tutor

M. en I. José Luis Rodríguez Chávez

Dr. Guillermo Delgado Lamas

El presente trabajo se llevo a cabo en el Laboratorio 1-C del Área de Productos Naturales del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los ensayos con *Giardia intestinalis* y *Caenorhabditis elegans* se realizaron en el Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de Salud, y los resultados derivados de la investigación se presentaron en en:

30° Congreso Latinoamericano de Química. Cancún, Quintana Roo, México. “Evaluación biológica de los constituyentes de *Heterotheca inuloides* y algunos derivados”. Octubre de 2012.

9ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Pachuca, Hidalgo, México. “Evaluación in vitro de constituyentes naturales y derivados semisintéticos de *Heterotheca inuloides* frente a *Caenorhabditis elegans*”. Mayo de 2013.

XIV Reunión Internacional de Ciencias Médicas. León, Guanajuato, México. “Evaluación in vitro de constituyentes naturales y derivados semisintéticos de *Heterotheca inuloides* frente a *Giardia intestinalis*”. Abril de 2014.

XV Reunión Internacional de Ciencias Médicas. León, Guanajuato, México. “Evaluación toxicológica de constituyentes naturales y derivados semisintéticos de *Heterotheca inuloides* (Árnica mexicana)”. Abril de 2015.

3er Simposio Iberoamericano en Farmacia Social Dra. Marina Altagracia Martínez. México DF. “Evaluación toxicológica de *Heterotheca inuloides* (Árnica mexicana)”. Junio de 2015.

5° Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía. Zapopan, Jalisco, México. “Evaluation of the protective ability of *Heterotheca inuloides* metabolites toward oxidative damage to *C. elegans* using spectroscopic techniques”. Octubre de 2015.

AGRADECIMIENTOS

- Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM.
 - AL **CONACYT**, por la beca otorgada para la realización de los estudios de doctorado.
 - A la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo económico otorgado a través del programa DGAPA-PAPIIT No.IG200514.
 - Al Dr. Guillermo Delgado Lamas, por su invaluable asesoría académica y gran apoyo.
 - A la Dra. Helgi Helen Jung Cook, por su eterna asesoría, amistad y apoyo.
 - Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa, miembro de mi comité tutorial por su valioso aporte durante el desarrollo de la presente investigación.
 - Al M. en C. Antonio Nieto C. y a la M. en C. Teresa Ramirez A., por su ayuda para realizar los ensayos biológicos.
 - A la Dra. Elvia Coballase, Dr. Daniel Ortega, M. en C. Yadira Rufino, Dra. Martha Ponce y Dr. Rafael Coria del Instituto Nacional de Pediatría, por su asesoría técnica.
 - Al personal técnico del Instituto de Química de la UNAM.
 - Al personal técnico de la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular.
 - Al personal de la Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas en el INP, por las facilidades brindadas.
 - Al personal técnico de los laboratorios de Neuroquímica, Bacteriología y Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría.
 - A la comunidad “México-Colombia-Ecuatoriana” del Laboratorio 1-C del IQ, por su gran amistad.
-

Dedicatoria

Con todo mi cariño a mi madre Juliana Chávez.

A Hilda, Carmen, Lourdes y Matías Alejandro Rodríguez Cháves gracias por ser parte de mi existencia y por apoyarme en cada momento de mi vida.

A Jessica Pineda, Ileana Reyes, Hugo Rico, Eunice Ríos, Victor Barrera, Verónica Egas, J. Antonio Rivera, Fabiola López, Julio Mena por su gran amistad y solidaridad.

A todos los integrantes del grupo de Biofarmacia 112-113 (BH).

A los estudiantes de Ayotzinapa

	Pág.
Lista de tablas	v
Lista de figuras	vi
Lista de siglas y acrónimos	viii
Resumen	1
Abstrac	2
1. Antecedentes	3
1.1 Constituyentes químicos de <i>Heterotheca inuloides</i>	5
1.1.1 Compuestos de tipo sesquiterpeno	5
1.1.2 Compuestos de tipo flavonoide	7
1.1.3 Compuestos de tipo triterpeno y fitoesterol	10
1.1.4 Compuestos volátiles	11
1.1.5 Actividad biológica de <i>Heterotheca inuloides</i>	13
1.1.6 Actividad antimicrobiana y antifúngica	13
1.1.7 Actividad antiinflamatoria	14
1.1.8 Actividad antioxidante y protectora	15
1.1.9 Actividad citotóxica	15
1.1.10 Actividad quelante	16
1.1.11 Protección de granos almacenados	16
1.1.12 Actividad fitotóxica	16
2. Justificación	17
3. Hipótesis	17
4. Objetivos	18
4.3 Objetivo general	18
4.4 Objetivos particulares	18
5. Discusión de Resultados	20
5.1 Aislamiento	20
5.2 Obtención de derivados	20
5.3 Ensayo de citotoxicidad	23
5.4 Estimación de la capacidad antiinflamatoria	25
5.5 Estimación de la Capacidad antioxidante y atrapadora de ERO	26

5.5.1	Inhibición de la peroxidación lipídica y reducción del radical DFPH	26
5.5.2	Capacidad atrapadora del radical Superóxido	28
5.5.3	Capacidad atrapadora de peróxido	29
5.5.4	Actividad atrapadora de hidroxilo	29
5.5.5	Actividad atrapadora de oxígeno singulete	29
5.5.6	Capacidad de depuración de HOCl	30
5.6	Ensayos en cultivos de <i>C. elegans</i>	32
5.6.1	Incremento en la sobrevivencia	33
5.6.2	Resistencia al estrés	35
	5.6.2.1 Ensayos con juglona y paraquat	35
	5.6.2.2 Efecto protector frente a CuSO ₄	36
5.7	Actividad anti <i>Helicobacter pylori</i>	41
5.8	Actividad anti <i>Giardia intestinalis</i>	42
5.9	Ensayo de toxicidad	45
	5.9.1 Ensayo con <i>Artemia salina</i>	45
	5.9.2 Viabilidad Celular en Macrófagos	47
	5.9.3 Toxicidad aguda en ratón	47
5.10	Ensayos para determinar la configuración absoluta	50
	5.10.1 Obtención de derivados de Mosher	50
	5.10.2 Análisis mediante dicroísmo circular	51
5.11	Publicaciones	53
	5.11.1 In vitro activity of “Mexican Arnica” <i>Heterotheca inuloides</i> Cass natural products and some derivatives against <i>Giardia intestinalis</i> .	53
	5.11.2 Antioxidant Capacity of “Mexican Arnica” <i>Heterotheca inuloides</i> Cass natural products and some derivatives: Their anti-Inflammatory evaluation and effect on <i>C. elegans</i> life span	63
	5.11.3 Toxicological evaluation of the natural products and some semisynthetic derivatives of <i>Heterotheca inuloides</i> Cass (Asteraceae)	75

5.11.4	<i>Heterotheca inuloides</i> (Mexican arnica) metabolites protects <i>Caenorhabditis elegans</i> from oxidative damage and inhibits the nitric oxide production	86
5.11.5	Mexican Arnica (<i>Heterotheca inuloides</i> Cass Asteraceae: Astereae): Ethnomedical uses, chemical constituents and biological properties	87
6.	Desarrollo experimental	88
6.1	Materiales y equipos	88
6.1.1	Material biológico	89
6.2	Sección experimental	90
6.2.1	Aislamiento	90
6.2.2	Obtención de derivados	90
	6.2.2.1 Esterificación	90
	6.2.2.2 Hidrogenación	91
	6.2.2.3 Oxidación con ácido <i>mCPB</i>	91
	6.2.2.4 Características físicas y químicas de los productos naturales y derivados semisintéticos	91
6.2.3	Ensayo de citotoxicidad	98
6.2.4	Estimación de la capacidad antiinflamatoria	98
6.2.5	Estimación de la capacidad antioxidante y atrapadora de ERO	99
	6.2.5.1 Inhibición de la peroxidación lipídica	99
	6.2.5.2 Reducción del radical DFPH	100
	6.2.5.3 Capacidad atrapadora del radical superóxido	101
	6.2.5.4 Capacidad atrapadora de peróxido	101
	6.2.5.5 Actividad atrapadora de hidroxilo	102
	6.2.5.6 Actividad atrapadora de oxígeno singulete	103
	6.2.5.7 Capacidad de depuración de HOCl	104
6.2.6	Ensayos en cultivos de <i>C. elegans</i>	104
	6.2.6.1 Incremento en la sobrevivencia	105
	6.2.6.2 Ensayo con juglona	105
	6.2.6.3 Ensayo con paraquat	106
	6.2.6.4 Ensayo con sulfato de cobre	106
	6.2.6.5 Estudio de interacción con cobre (UV/visible)	106
6.2.7	Actividad anti <i>Helicobacter pylori</i>	106

6.2.8	Actividad anti <i>Giardia intestinalis</i>	107
6.2.8.1	Microscopía electrónica de Transmission (TEM)	108
6.2.9	Ensayos de toxicidad	109
6.2.9.1	Ensayo con <i>Artemia salina</i>	109
6.2.9.2	Viabilidad celular en macrofagos	109
6.2.9.3	Toxicidad aguda en ratón	110
6.2.10	Ensayos para determinar la configuración absoluta	111
6.2.10.1	Obtención de derivados de Mosher	111
6.2.10.2	Determinación de la configuración absoluta mediante dicroísmo circular	111
6.2.11	Análisis estadístico	112
7.	Conclusiones	113
8.	Referencias	115
9.	Anexos	126

Lista de tablas

TABLA		Pág.
1.	Especies pertenecientes al complejo de plantas medicinales conocidas como árnica en México	3
2.	Evaluación preeliminar de la capacidad de los metabolitos para inhibir la proliferación celular a una concentración de 50 μ M	25
3.	Concentración inhibitoria media de la proliferación celular (CI ₅₀)	26
4.	Actividad antiinflamatoria de los metabolitos de <i>H.inuloides</i>	27
5.	Capacidad para inhibir la peroxidación lipídica y reducir el radical DFPH•	29
6.	Capacidad atrapadora de ERO de los productos naturales de <i>H. inuloides</i> y derivados semisintéticos	33
7.	Efecto del vehículo en la sobrevida de <i>C. elegans</i>	34
8.	Efecto de los componentes naturales y derivados semisintéticos de <i>H. inuloides</i> en la sobrevida de <i>C. elegans</i>	36
9.	Efecto de los componentes naturales y derivados semisintéticos de <i>H. Inuloides</i> en la vida media de <i>C. elegans</i> en presencia de juglona y paraquat	38
10.	Efecto de los metabolitos de <i>H. inuloides</i> en la sobrevivencia de <i>C. elegans</i> expuesto a CuSO ₄	40
11.	Actividad anti- <i>H. pylori</i> de los metabolitos de <i>H. inuloides</i>	44
12.	Efecto anti-giardiasis de los componentes naturales y semisintéticos de <i>H. inuloides</i>	45
13.	Toxicidad de los sesquiterpenos aislados de <i>H. inuloides</i>	48
14.	Efecto de los metabolitos de <i>H. inuloides</i> en la viabilidad de la línea celular de macrófagos RAW264.7	49
15.	Datos de RMN ¹ H (400 MHz) y ¹³ C (100 MHz) en CDCl ₃ de 138 y 139	53
16.	Datos de RMN de ¹ H, ¹³ C para 130 , 131 , 132 y 133 (400,125 MHz, CDCl ₃ , δ)	96

Lista de figuras

FIGURA		Pág.
1.	Compuestos de tipo cadinano aislados a partir de <i>H. inuloides</i>	6
2.	Compuestos de tipo flavonoide aislados a partir de <i>H. inuloides</i>	8
3.	Glucósidos de flavonoide aislados a partir de <i>H. inuloides</i>	9
4.	Compuestos fenólicos y otros aislados de <i>H. inuloides</i>	10
5.	Triterpenos y fitosteroles aislados de <i>H. inuloides</i>	11
6.	Constituyentes volátiles y otros compuestos aislados de <i>H. inuloides</i>	12-13
7.	Productos naturales aislados de <i>H. inuloides</i>	20
8.	Reacciones de derivatización	21
9.	Desplazamientos químicos para los protones del compuesto 137	23
10.	Capacidad atrapadora de ERO de los metabolitos y derivados semisintéticos de <i>H. inuloides</i> .	31
11.	Curvas de sobrevida de <i>C. elegans</i> en presencia de los metabolitos de <i>H. inuloides</i>	34
12.	Espectros UV-Vis del compuesto 23(a) y Cu- 23 (b).	39
13.	Semejaza de un fragmento estructural entre los compuestos 7 (3,7-dihidroxi-3(4H)-isocadalen-4-ona) y 23 (quercetina)	40
14.	Espectro UV/visible del compuesto 7 (a) y complejo 7-Cu (b)	40
15.	Espectro UV/visible del compuesto 1 (a) y complejo 1-Cu (b)	41
16.	Efecto de la la concentración de los metabolitos de <i>H. inuloides</i> y el fármaco de referencia (MTZ) en el crecimiento de los trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	44
17.	Microscopía electrónica de transmisión de trofozoítos de <i>Giardia intestinalis</i>	45
18.	Curvas concentración-sobrevida de los compuestos 1 , 2 , 17 , 135 y 136 en larvas de <i>Artemia salina</i> .	46
19.	Efecto de la administración de dos dosis del 7- hidrox-3,4-dihidrocadalen-3-ol (1) en el peso corporal de ratones	48
20.	Estudio histopatológico de hígado y riñón de ratones, administrados por via oral con solución de electrolitos (I) y con 300 y 2000 mg/kg de 7-hidrox-3,4-dihidrocadalen-3-ol (1) (II y III) obtenidas en el día 15 del tratamiento	49

Lista de figuras

FIGURA		Pág.
21.	Reacción del 7-hidroxi, 3,4-dihidrocadalenol con los cloruros <i>R</i> y <i>S</i> - del ácido α -metoxi- α -trifluorometilfenil acético (AMTFA)	51
22.	Representación esquemática del compuesto 13 (ácido 7-metil- α -hidroxicalamen-15-oico) en los espacios tridimensionales definidos por la regla del benzoato	52
23.	Espectro de dicroísmo circular para el compuesto 13 (ácido 7-metil- α -hidroxicalamen-15-oico)	52
24.	Reacción entre el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo y compuestos oxidables	100
25.	Detección de superóxido mediante azul de nitrotetrazolio (NBT)[100
26.	Oxidación del ión Fe^{2+} en presencia de naranja de xilenol	101
27.	Formación de malondialdehído a partir de desoxirribosa en presencia de fierro	102
28.	Determinación de $^1\text{O}_2$ empleando histidina como aceptor	103

Lista de siglas y acrónimos

ABTS ⁺⁺	2,2-azinobis- (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMTFA	Ácido α -metoxi- α -trifluorometilfenil acético
ASTM	American Society for Testing Materials
ATF	13-acetato-12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol
ATA	Ácido tricloroacético
ATB	Ácido 2-tiobarbiturico
BHT	2[3]-tertbutil-4-hidroxitolueno
BHTA	Bromuro de hexadeciltrimetil ammonio
CCF	Cromatografía en capa fina
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración mínima inhibitoria
COX	Ciclooxigenasa o prostaglandina-endoperóxido sintasa
DMNA	N,N-dimetil-4-nitrosoanilina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMTU	Dimetil tiourea
DFPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etildiaminotetraacético)
EIMS	Electron ionization mass spectral
ERO	Especie reactiva de oxígeno
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
FRAP	Ferric reducing/antioxidant power (poder antioxidante reductor del hierro)
GSH	Glutación
HOCL	Ácido hipocloroso
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HPLC	High-performance liquid chromatography
HTB	Hidroxitoluen butilado
IR	Infrarojo
mCPBA	Ácido meta-cloro-perbenzoico
MIC	Concentración inhibitoria mínima

MTZ	Metronidazol
NDGA	Nordihydroguaiaretic acid (ácido nordihidroguayarético)
NAD(P)H	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada
NBT	Nitrotetrazolium Blue chloride (nitroazul de tetrazolio)
OCDE	Organisation for Economic Cooperation and Development (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos)
ONOO-	Peroxinitrito
O ₂ ⁻	Superóxido
¹ O ₂	Oxígeno singulete
OH [•]	Radical hidroxilo
PAF	Factor activador de las plaquetas
PTM	Tetrametoxi propano
RMN	Resonancia magnética nuclear
SAF	Solución amortiguadora de fosfatos
SRATB	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
UV/Vis	Ultravioleta-visible

Resumen

La especie *Heterotheca inuloides* Cass. (Asteraceae), conocida popularmente como árnica mexicana, es una de las plantas nativas de México más utilizadas en la medicina tradicional. Las preparaciones de esta planta se utilizan tradicionalmente para tratar problemas dermatológicos, golpes, úlceras, diarrea, erisipela, fiebre y procesos inflamatorios. Los principales productos naturales de *H. inuloides* son sesquiterpenos, flavonoides y fitoesteroles. Se han aislado ciertos metabolitos de *H. inuloides* con propiedad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana y antinociceptiva.

A partir de las flores de *H. inuloides* se aislaron los compuestos: 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (**1**), 7-hidroxicadaleno (**2**), 3,7-dihidroxi-3(4*H*)-isocadalen-4-ona (**7**), ácido 1*R*,4*R*-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrocadalen-15-oico (**13**), quercetina (**23**), caryolan-1,9β-diol (**17**), éter 3,7,3''-trimetilico de quercetina (**27**), éter 3,7,3'',4''-tetrametilico de quercetina (**29**), 7-(3,3-dimetil aliloxi) cumarina (**62**), espinasterol (**80**) y D-*chiro*-inositol (**127**), éter 7,3''-dimetilico de eriodictol (**129**). La actividad de los productos naturales y la de los compuestos semisintéticos 7-acetoxi-3,4-dihidrocadaleno (**130**), 7-benzoxi-3,4-dihidrocadaleno (**131**), 7-acetoxicadaleno (**132**), 7-benzoxicadaleno (**133**), pentaacetyl-quercetina (**134**), 7-hidroxicadalenano (**135**), mansonona C (**136**) y 6-isopropil-4,9-dimetilbenzo[*c*]oxepina-1,3-diona (**137**), preparados en el presente estudio, se evaluó en diferentes modelos biológicos. Algunos compuestos de tipo cadinano presentaron actividad en los ensayos de citotoxicidad, inflamación, inhibición de la peroxidación lipídica, anti-*Giardia intestinalis* y anti-*Helicobacter pylori*, mientras que los compuestos de tipo flavonoide fueron activos en los ensayos de atrapamiento de especies reactivas de oxígeno (ERO), peroxidación lipídica, y sobrevida de *Caenorhabditis elegans* bajo condiciones normales y en condiciones de estrés.

Este trabajo generó nuevo conocimiento científico sobre los metabolitos secundarios de *H. inuloides* y algunos derivados semisintéticos, particularmente mediante la evaluación de diferentes propiedades biológicas.

Abstract

Heterotheca inuloides Cass. (Asteraceae), popularly known as *árnica mexicana* (name derived from the European species *Arnica montana*), is one of the Mexican native species more widely used in traditional medicine. Preparations of this plant are traditionally used for the treatment of pain and inflammatory processes, and also for dermatological problems, blows, ulcers, diarrhea, erysipelas, fevers, gastritis and renal problems. The main natural products from *H. inuloides* are sesquiterpenes, flavonoids and phytosterols. Several secondary metabolites from *this species* display antioxidant antiinflammatory and antinociceptive properties.

Chemical analysis of the flowers of *H. inuloides* allowed the isolation of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (**1**), 7-hydroxycadalene (**2**), 3,7-dihydroxy-3(4*H*)-isocadalen-4-one (**7**), 1*R*,4*R*-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydrocadalen-15-oic acid (**13**), quercetin (**23**), caryolan-1,9 β -diol (**17**), quercetin-3,7,3''-trimethyl ether (**27**), quercetin-3,7,3'',4''-tetramethyl ether (**29**) 7-(3,3-dimethyl allyloxy) coumarin (**62**), α -spinasterol (**80**), D-*chiro*-inositol (**127**), eriodictyol-7,3''-dimethyl ether (**129**). The activity of these compounds as well as that of 7-acetoxy-3,4-dihydrocadalene (**130**), 7-benzoyloxy-3,4-dihydrocadalene (**131**), 7-acetoxycadalene (**132**), 7-benzoxycadalene (**133**), quercetin pentaacetate (**134**), 7-hydroxicalamenene (**135**), mansonone C (**136**) and (**137**) synthesized in this study, was evaluated in different biological models. Several cadinane-type compounds displayed activity in the cytotoxicity, antiinflammation, lipidic peroxidation, anti-*Giardia intestinalis*, and anti-*Helicobacter pylori* assays. Flavonoid compounds were active in trapping reactive oxygen species (ROS), inhibition of the lipidic peroxidation, and life extension of *Caenorhabditis elegans* under normal- and stress conditions.

This work generated new scientific knowledge on the secondary metabolites from *H. inuloides*, and some semisynthetic compounds, particularly evaluating different biological properties.

1. Antecedentes

En México varias especies de plantas pertenecientes a diferentes géneros comparten el nombre popular de “árnica”, nombre derivado de *Arnica montana*, especie europea utilizada en la medicina tradicional en Europa [1] Algunos de los miembros de este complejo de plantas medicinales tienen características morfológicas y usos que son similares a los de *Arnica montana*. Este complejo incluye especies de los géneros *Mentzelia*, *Tithonia*, *Trixis*, *Verbesina*, *Helenium*, *Carlowrightia*, *Aster*, *Tanacetum*, *Zexmenia*, *Bahia*, *Grindelia*, *Galphimia*, *Machaeranthera*, *Desmodium*, *Oenothera*, *Taraxacum*, y *Heterotheca*. Estas especies difieren en sus características botánicas, pero comparten varias aplicaciones en la medicina tradicional [2-6] (Tabla 1).

Tabla 1. Especies pertenecientes al complejo de plantas medicinales conocidas como árnica en México [2-5].

Familia	Genero	Especie
Acanthaceae	<i>Carlowrightia</i>	<i>Carlowrightia cordifolia</i> Gray.
Asteraceae	<i>Aster</i>	<i>Aster gymnocephalus</i> (DC) Gray.
	<i>Bahia</i>	<i>Bahia absinthifolia</i> Benth.
	<i>Heterotheca</i>	<i>Heterotheca inuloides</i> Cass.
		<i>Heterotheca subaxilaris</i> Lam.
	<i>Helenium</i>	<i>Helenium mexicanum</i> Kunth.
	<i>Grindelia</i>	<i>Grindelia inuloides</i> Willd.
		<i>Grindelia squarrosa</i> Dunal.
	<i>Machaeranthera</i>	<i>Machaeranthera breviligulata</i> Turner y Horne.
	<i>Tanacetum</i>	<i>Tanacetum diversifolia</i> Sch. Bip.
	<i>Taraxacum</i>	<i>Taraxacum officinale</i> Weber
	<i>Tithonia</i>	<i>Tithonia diversifolia</i> (Helms.) A. Gray.
	<i>Trixis</i>	<i>Trixis inula</i> Crantz.
	<i>Verbesina</i>	<i>Verbesina greenmani</i> Urb.
	<i>Zexmenia</i>	<i>Zexmenia pringeli</i> Greenm.
Fabaceae	<i>Desmodium</i>	<i>Desmodium</i> sp.
Loasaceae	<i>Mentzelia</i>	<i>Mentzelia conzatti</i> Greenm.
Malpigiaceae	<i>Galphimia</i>	<i>Galphimia glauca</i> Cav.
Onagraceae	<i>Oenothera</i>	<i>Oenothera rosea</i> L'Hér. ex Aiton.

El género *Heterotheca* [7] incluye plantas anuales, bienales y perennes, inicialmente incluidas en siete especies nativas de América [8]. Posteriormente el género fue dividido en tres secciones, *Heterotheca sect. Phyllothea* Nutt., *Heterotheca sect. Ammodia* Nutt. y

Heterotheca sect. *Heterotheca*, describiéndose aproximadamente treinta especies [9]. Este género se caracteriza por tener aquenios dimórficos (heterocarpia), característica que comparte con otros géneros de *Asteraceae*, tales como *Senecio*, *Crepis*, *Erigeron* y *Leontodon*; y con otras familias, incluyendo *Caryophyllaceae*, *Apiaceae* y *Poaceae* [10].

En México crecen cuatro especies de *Heterotheca* sect. *Heterotheca*: *H. grandiflora* Nutt, *H. subaxilaris* Britt. Rusby, *H. inuloides* Cass. (Tres variedades), y *H. leptoglosa* DC. Las especies *H. inuloides* y *H. leptoglosa* son endémicas de México [11]. Las especies *H. inuloides* y *H. subaxilaris* son conocidas comúnmente como árnica, sin embargo, es más frecuente el uso de la primera en la medicina tradicional mexicana [12,13]. *H. inuloides* también recibe otros nombres locales, que incluyen acahual, akawtomitl, acahualli, xochihuepal, cuauteteco, árnica falsa, hornilla, tabaco de las Montañas, re-rem, riemn, y árnica del País [2,3]. La infusión de las flores secas se ha empleado para el tratamiento de contusiones, tromboflebitis postoperatoria, reumatismo, cólicos y otras condiciones dolorosas asociadas a procesos inflamatorios, problemas dermatológicos, venas varicosas, úlceras diarrea, erisipela, fiebre, gastritis, problemas renales y dolor muscular [4,12-20]. Para su administración interna, las flores se hierven en agua y se toma como un té. Para la administración externa la planta se aplica a la piel intacta como una crema o ungüento [19]. Se ha reportado además el uso de esta especie en forma de té a partir de las flores, para el tratamiento del cáncer [22] y la diabetes [23,24].

En 2001, la especie *H. inuloides* fue incluida en la sección Extrafarmacopea de la Farmacopea Herbolaria Mexicana, debido a los pocos estudios controlados (químicos o clínicos), que validen su uso terapéutico [25]. La Farmacopea Herbolaria Mexicana describe a *H. inuloides* como una planta herbácea de hasta 1 m de altura, con tallos erectos con pubescencia, hojas simples, alternadas, pilosas, con márgenes aserrados, flores en cabezuelas sobre pedúnculos de hasta 8 cm de largo, dimórficas simpétalas de color amarillo con aquenios dimórficos, e indica que la planta tiene un olor ligero y sabor amargo. La especie *H. inuloides* es una planta diploide ($2n = 9$) [26], que crece de mayo a diciembre en las regiones frías y templadas (2000-3000 m) y en algunos casos asociada a otros cultivos en los estados de Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Hidalgo,

Jalisco, México, Morelos, Nuevo León, Michoacán, Nayarit, Puebla, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala, Veracruz, y Zacatecas [11,27-32].

1.1. Constituyentes químicos de *Heterotheca inuloides*

Mediante el empleo de diversas técnicas entre las que se incluyen la cromatografía en columna abierta, cromatografía en capa fina, cromatografía de gases, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, cromatografía líquida de alta resolución, resonancia magnética de ^1H y ^{13}C , espectroscopia de infrarrojo, espectrometría de masas y espectroscopia UV/Vis, se han aislado, purificado e identificado diversos productos naturales presentes en *H. inuloides* [33-35]. Adicionalmente se ha empleado el ultrasonido para mejorar el proceso de extracción [35]. Los productos naturales aislados a partir de las raíces, partes aéreas y flores de *H. inuloides* se pueden incluir básicamente en compuestos de tipo sesquiterpeno, compuestos fenólicos y fitoesteroles.

1.1.1. Compuestos de tipo sesquiterpeno

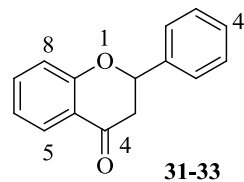
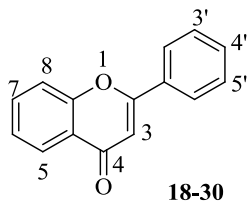
El género *Heterotheca* se caracteriza por contener sesquiterpenos de tipo cadinano, que se han asociado con diversas actividades biológicas [36-38]. De la especie *H. inuloides* se han aislado compuestos como 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol (1), cadalenol (2), 4-metoxiisocadalenol (3), 4-hidroxiisocadalenol (4), 7-hidroxicadalenol (5), 1-isopropil-4,6-dimetil-1,2,8 α ,8 β -tetrahidro-2-naftol (6), 1 α -hidroxi-1(4H)-isocadalen-4-ona (7), 2,3-epoxi-7-hidroxi- β -calacoreno (8), inuloidina (9), ácido cadalen-15-oico (10), 3,7-dihidroxi-3(4H)-isocadalen-4-ona (11), dicadalenol (12), ácido 1*R*,4*R*-1-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrocadalen-15-oico (13), 1-isopropil-4,6-dimetil-1,2,8 α ,8 β -tetrahidro-naftalen-2-ona (14), β -cariofileno (15) epóxido de β -cariofileno (16) y caryolan-1,9 β -diol (17) (Figura 1) [39-44].

posee una configuración opuesta al aislado de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) y de kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) pertenecientes a la familia Malvaceae [45].

1.1.2. Compuestos de tipo flavonoide

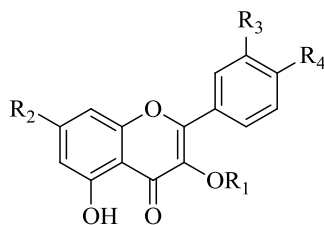
Los siguientes flavonoides han sido aislados a partir de las flores secas de *H. inuloides*: luteolina (**18**), kaempferol (**19**), éter 3,7-dimetílico de kaempferol (**20**), éter 3,7,4''-trimetílico de kaempferol (**21**), éter 3,7-dimetílico de 6-metoxikaempferol (**22**), quercetina (**23**), éter 3,3''-dimetílico de quercetina (**24**), éter 3,4''-dimetílico de quercetina (**25**), éter 3,7-dimetílico de quercetina (**26**), éter 3,7,3''-trimetílico de quercetina (**27**), éter 3,7,4''-trimetílico de quercetina (**28**), éter 3,7,3'',4''-tetrametílico de quercetina (**29**), éter 3,6,7,4''-tetrametílico de quercetina (**30**), éter 3'-metílico de eriodictol (**31**), éter 7,3''-dimetílico de eriodictol (**32**), catequina (**33**) [46,47] (Figura 2). Adicionalmente, se han aislado los siguientes glucósidos de flavonoide: 3- β -D-glucopiranosido de kaempferol (**34**), 3- β -galactopiranosido de kaempferol (**35**), 3- β -rutinosido de kaempferol (**36**), 3- β -robinobinosido de kaempferol (**37**), 3- β -glucopiranosido de quercetina (**38**), 3- β -galactopiranosido de quercetina (**39**), 3- β -glucuronido de quercetina (**40**), éter 6''-metilílico 3- β -glucuronido- (**41**), 3- α -L-arabinósido (**42**), y 3- β -rutinosido (**43**), 3-*O*-glucuronido-7-*O*-galactopiranosido de quercetina (**44**), 3-*O*-glucuronido-7-*O*-glucopiranosido de quercetina (**45**), 3-*O*-ramnosil galactopiranosido de quercetina (**46**), y 3-*O*-cafeoilglucopiranosido de quercetina (**47**) [48,49] (Figura 3).

Otros compuestos fenólicos aislados a partir de *H. inuloides* incluyen guayacol (**48**), ácido elágico (**49**), fenol (**50**) y ácido *p*-cumárico (**51**) [35], ácido 1-cafeoilquínico (**52**), ácido 3-cafeoilquínico (**53**), ácido 4-cafeoilquínico (**54**), ácido 3,4-dicafeoilquínico (**55**), ácido 1,5-dicafeoilquínico (**56**), ácido 3,5-dicafeoilquínico (**57**), ácido 4,5-dicafeoilquínico (**58**), ácido cafeico (**59**) [49], ácido protocatecuico (**60**), umbeliferona (**61**) [48], 7-(3,3-dimetil aliloxi) cumarina (**62**) [43], así como vainillina (**63**), siringaldehído (**64**), coniferaldehído (**65**), sinapaldehído (**66**), acetovanillona (**67**), acetosiringona (**68**), pirogalol (**69**), pirocatecol (**70**), ácido gálico (**71**), ácido vanílico (**72**), y ácido siringico (**73**) [35] (Figura 4).



	3	5	6	7	3''	4''
18	H	OH	H	OH	OH	OH
19	OH	OH	H	OH	H	OH
20	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	H	OH
21	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃
22	OCH ₃	OH	CH ₃ O	OCH ₃	H	OH
23	OH	OH	H	OH	OH	OH
24	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OH	OH
25	OCH ₃	OH	H	OH	OH	OCH ₃
26	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OH	OH
27	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	OH
28	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
29	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
30	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃
31	OH	OH	H	OH	OH	OH
32	H	OH	H	OH	OCH ₃	OH
33	H	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	OH

Figura 2. Compuestos de tipo flavonoide aislados a partir de *H. inuloides*



	R₁	R₂	R₃	R₄
34	β- D-glucopiranosido	OH		OH
35	β-rutinósido	OH		OH
36	β-galactopiranosido	OH		OH
37	β-rabinobiósido	OH		OH
38	β-D-glucopiranosido	OH	OH	OH
39	β- D-galactopiranosido	OH	OH	OH
40	β- D-glucurósido	OH	OH	OH
41	β-D-glucurónido-6''''- metilester	OH	OH	OH
42	α-L-arabinósido	OH	OH	OH
43	β-rutinósido	OH	OH	OH
44	β- D-glucurónido	galactosido	OH	OH
45	β- D-glucurónido	glucosido	OH	OH
46	ramnosilgalactopiranosido	OH	OH	OH
47	cafeoilglucopiranosido	OH	OH	OH

Figura 3. Glucósidos de flavonoide aislados a partir de *H. inuloides*

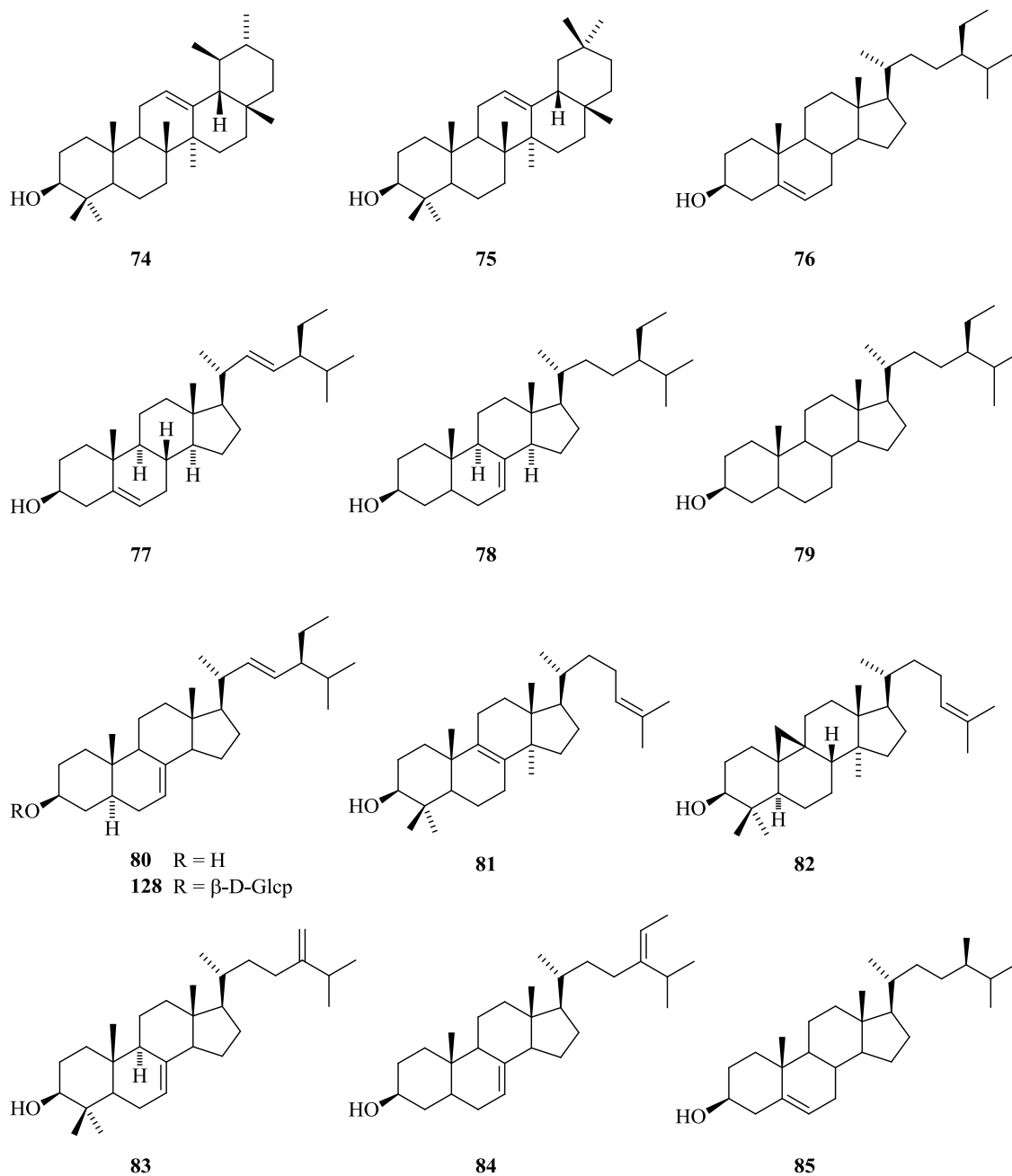


Figura 5. Triterpenos y fitoesteros aislados de *H. inuloides*

1.1.4. Compuestos volátiles

Los siguientes mono-y sesquiterpenos se han caracterizado a partir de las hojas de *H. inuloides*: α -pineno (86), sabineno (87), β -pineno (88), mirceno (89), 1,4-cineol (90), α -terpineno (91), *p*-cimeno (92), *cis*- β -ocimeno (93), β -fellandreno (94), limoneno (95), *trans*- β -ocimeno (96), γ -terpineno (97), terpinoleno (98), linalool (99), *cis*-sabineno (100),

alcanfor (**101**), mentona (**102**), borneol (**103**), α -terpineol (**104**), carvona (**105**), geraniol (**106**), anetol (**107**), acetato de bornilo (**108**), eugenol (**109**), acetato de geraniol (**110**), α -cubebeno (**111**), β -elemeno (**112**), β -bourboneno (**113**), α -cariofileno (**114**), α -cadinano (**115**), α -bergamoteno (**116**), humuleno (sin: α -cariofileno **114**), germacreno-D (**117**), α -curcumeno (**118**), γ -muuroleno (**119**), δ -cadineno (**120**), *trans*-nerolidol (**121**) [33] y cedreno (**122**) [50]. Además, a partir de las flores secas de *H. inuloides* también se caracterizaron los ácidos grasos eicosatetraenoico (**123**, ácido araquidónico), *cis*-9-hexadecenoico (**124**, palmitoleico), hexacosanoico (**125**) y *cis*-9-octadecenoico (**126**) [35], *D*-chiro-inositol (**127**) y 3-O- β -D-glucopiranosido de espinasterilo (**128**) (Figura 6).

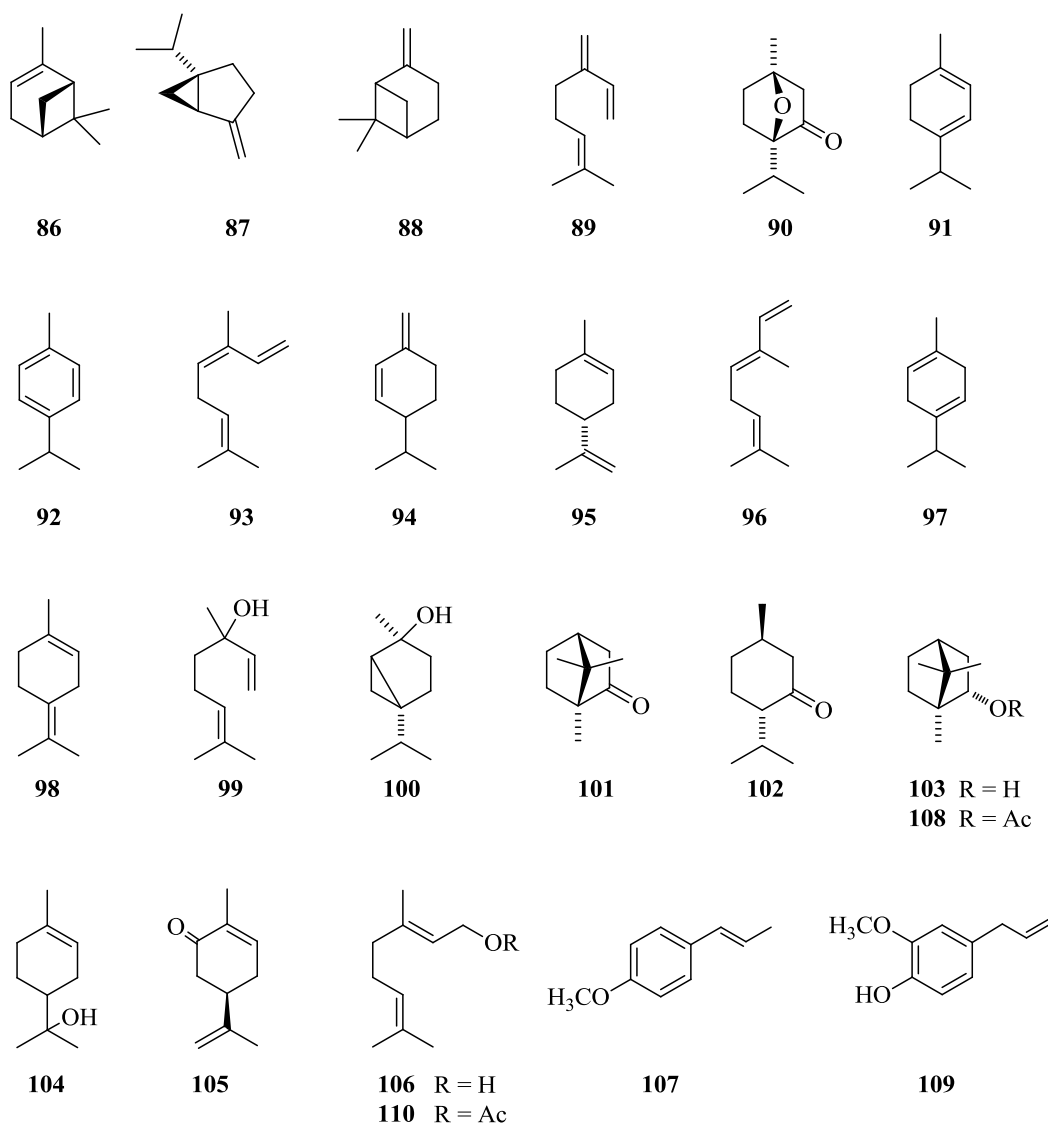


Figura 6. Constituyentes volátiles y otros compuestos aislados de *H. inuloides*

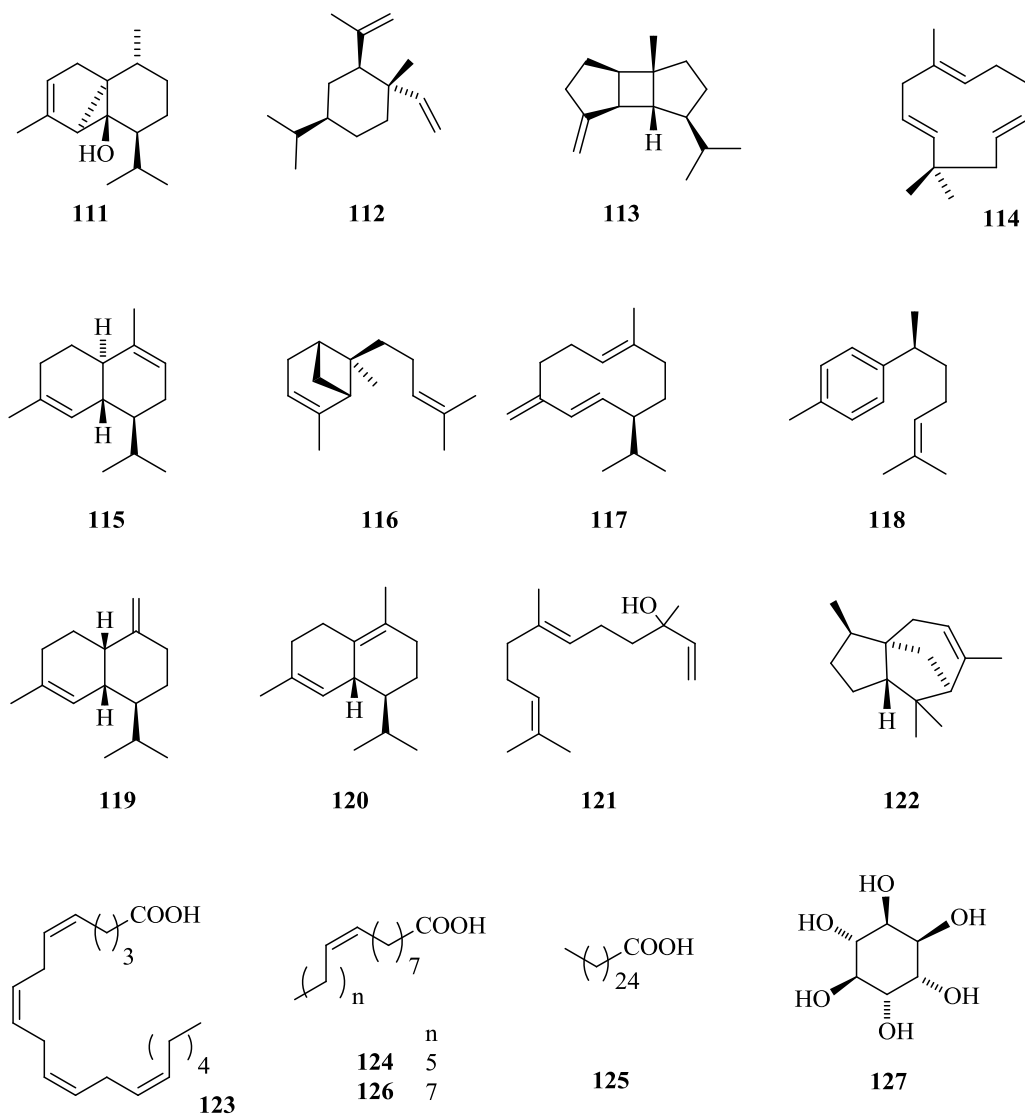


Figura 6. Constituyentes volátiles y otros compuestos aislados de *H. inuloides* (Cont.)

1.2. Actividad biológica de *Heterotheca inuloides*

1.2.1 Actividad antimicrobiana y antifúngica

Se ha descrito que los sesquiterpenos **1** (7-hidroxicadalenos) y **5** (7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenos) poseen actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y además, que el compuesto **5** posee actividad frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina [51]. En otro estudio se observó que los extractos metanólico y acuoso de *H. inuloides* poseen actividad anti-*Helicobacter pylori* [52]. Además el extracto etanólico presentó actividad contra *Streptococcus mutans* [53].

En lo referente a la actividad antifúngica se ha descrito que el extracto de diclorometano de las flores secas de *H. inuloides* posee actividad contra cepas de *Microsporum gypseum* y *Trichophyton mentagrophytes*, mientras que el extracto metanólico es activo contra *T. mentagrophytes* [54].

1.2.2 Actividad antiinflamatoria

Dentro de la Medicina Tradicional Mexicana las preparaciones de *H. inuloides* se emplean como agentes antiinflamatorios y analgésicos, estas propiedades han sido investigadas empleando los modelos de edema en oreja de ratón inducido por aceite de croton, edema plantar en pata de rata inducido por carragenina, ensayos in vitro con las enzimas COX-1 y COX-2, prueba de la formalina, y exocitosis inducida por PAF fMLP de neutrófilos humanos [43,50,55,56].

Se ha demostrado actividad antiinflamatoria de los extractos de diclorometano, acetónico y metanólico en el ensayo de edema inducido por aceite de croton [43,55]. Por otro lado, el extracto acuoso de las flores inhibió en un 29% la inflamación en el modelo de edema plantar inducida por carragenina, mientras que, las fracciones de éter etílico, butanol y acuosa obtenidas del extracto acuoso presentaron un efecto inhibitor del 19.9%, 58.0% y 30% en el mismo modelo [56]. Adicional a lo anterior la administración intraperitoneal de 50-100 mg/kg de la fracción de butanol inhibió la inflamación inducida por dextran (38.9-68.1%) y ácido araquidónico (0-33.9%) y las constricciones abdominales (73.8-78.2%) seguidas a la inyección de ácido acético [56]. Los productos naturales 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol (**1**), dicadalenol (**12**), cariolan-1,9 β -diol (**17**) y quercetina (**23**) aislados a partir del extracto acetónico mostraron efectos anti-inflamatorios en el mismo modelo experimental [43]. El compuesto **1** inhibe la biosíntesis de prostaglandinas catalizada por COX-1 y COX-2, sin que se observara efecto sobre el edema inducido por carragenina [55]. Se ha descrito además que infusiones comerciales de *H. inuloides* inhiben la actividad *in vitro* de la enzima COX-2 [57].

En el ensayo de la formalina se observó un efecto antinociceptivo del extracto hexánico. El fraccionamiento del extracto hexánico demostró la presencia de los

compuestos **1**, **2**, **16**, **114**. Sólo el compuesto **1** presentó efecto antinociceptivo significativo en la prueba de la formalina (100 mg/pata). Dicho compuesto fue igual de eficaz y potente como el diclofenaco en la segunda fase de la prueba de la formalina, pero más eficaz y potente en la primera. Se observó que receptores serotoninérgicos, pero no opioides, participan en el efecto antinociceptivo de este compuesto [50].

1.2.3 Actividad antioxidante y protectora

En diversos estudios se ha evaluado la capacidad antioxidantes de ciertos metabolitos de *H. inuloides*. Los compuestos **1** y **2** inhiben la peroxidación lipídica [58]. Además, el compuesto **1** inhibe la peroxidación lipídica mitocondrial inducida por Fe (III) y protege las células rojas contra la hemólisis oxidativa [59]. Al evaluar la capacidad de atrapamiento de ERO de los extractos acetónico y metanólico de *H. inuloides* se observó que estos extractos son eficaces para atrapar las especies: $ABTS^{++}$, $DFPH^{\bullet}$, $ONOO^{-}$, $O_2^{\bullet-}$, 1O_2 , $HOCl$, H_2O_2 y OH^{\bullet} [60]. De la misma manera las infusiones comerciales de *H. inuloides* han presentado actividad antioxidante en los ensayos de ABTS y FRAP equivalente a: $1.47 \pm 0.010 \mu\text{mol eq. Tx/mL}$ y $1.32 \pm 0.006 \mu\text{moleq FeSO}_4/\text{mL}$, respectivamente [57].

El pretratamiento con los extractos acetónico y metanólico de *H. inuloides* protege al hígado contra el daño oxidativo inducido por CCl_4 , evitando la oxidación de las enzimas de desintoxicación glutatión S-transferasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa, superóxido dismutasa [61]. Además, el pretratamiento con extractos de *H. inuloides* atenuó el aumento en el contenido de bilirrubina total, creatinina, y creatina cinasa, la actividad sérica de la fosfatasa alcalina, e impidió la disminución de γ -globulina y albúmina, indicando que protegen contra la peroxidación lipídica, manteniendo la actividad antioxidante [62].

1.2.4 Actividad citotóxica

Los extractos de éter de petróleo, etanol y diclorometano de *H. inuloides* presentan acción citotóxica contra células de leucemia murina P388 [63], mientras que los compuestos **1**, **2**, **15** y **16** aislados a partir de flores secas exhiben actividad citotóxica

contra el carcinoma de mama (células BT-20), carcinoma epitelioide de cuello uterino (células HeLa), melanoma de piel humano (células B-16) y melanoma de piel de ratón [58].

1.2.5 Actividad quelante

En un estudio realizado se observó que la quercetina (**23**), aislada de *H. inuloides* posee una fuerte capacidad para inhibir la oxidación de la L-3,4-dihidroxifenilalanina por tirosinasa fúngica, mientras que la quercetina glicosilada (**38**) no presenta actividad inhibidora [52]. Posteriormente se confirmó la capacidad que poseen los compuestos **18** y **23** para quelatar el cobre. El mecanismo de quelación parece ser específico de flavonoles, siempre y cuando el grupo 3-hidroxilo se encuentre libre [64]. Para infusiones comerciales de *H. inuloides* se ha descrito una actividad quelante de Fe^{2+} equivalente a $72.21 \pm 1.19 \mu\text{g}$ eq. EDTA/mL [57].

1.2.6 Protección de granos almacenados

La especie *H. inuloides* ha sido evaluada como opción en la lucha contra *Sitophilus zeamais* y *Zabrotes subfasciatus*. El polvo de hojas y flores de *H. inuloides* produjo una mortalidad del 87,7% en *S. zeamais* en granos de maíz tratados 15 días después de la infestación [65]. Por otro lado, la actividad de *H. inuloides* contra el gorgojo del frijol (*Z. subfasciatus* Boheman) fue escasa, observándose una mortalidad inferior al 40% en los ensayos [66].

1.2.7 Actividad fitotóxica

El sesquiterpeno inuloidina (**9**), aislado de las flores de *H. inuloides*, inhibe crecimiento de plántulas de lechuga, con actividad inhibidora de 500 $\mu\text{g/mL}$ [42]. Efectos similares se han observado en experimentos con compuestos aislados del lixiviado de diclorometano obtenido de los tejidos aéreos de *H. subaxillaris*. Los componentes fitotóxicos de este lixiviado fueron compuestos de tipo calameneno, siendo el ácido 2-metoxi-calamenano-14-carboxílico el compuesto con mayor actividad inhibitoria del crecimiento vegetal contra *Agrostis stolonifera*, *Lactuca sativa* y *Lemna sp.* [67].

2. Justificación

Considerando el amplio uso popular de *H. inuloides*, es pertinente una investigación adicional que defina la configuración absoluta de los productos naturales, pondere la actividad antioxidante, inhibidora de la proliferación celular, antiinflamatoria, antimicrobiana, antiparasitaria y toxicológica de los metabolitos secundarios, y que permita determinar la relación entre la estructura molecular y la bioactividad.

3. Hipótesis

Considerando las variaciones estructurales de los productos naturales aislados de *H. inuloides*, así como, sus diversas actividades biológicas, podrán aislarse y caracterizarse metabolitos secundarios adicionales, preparar derivados semisintéticos, y evaluar su actividad biológica con el fin de generar conocimiento científico adicional de este recurso.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Contribuir al conocimiento químico y biológico de los productos naturales bioactivos presentes en *H. inuloides* y sus derivados.

4.2. Objetivos particulares

Determinar la actividad antioxidante, de los productos naturales de *H. inuloides* y derivados semisintéticos mediante en los ensayos de reducción del radical DFPH, inhibición de la peroxidación lipídica, capacidad atrapadora de especies reactivas de oxígeno y capacidad protectora en cultivos de *Caenorhabditis elegans* sometidos a condiciones estresantes generadas por agentes inductores de especies reactivas.

Determinar la actividad citotóxica de los productos naturales de *H. inuloides* y derivados semisintéticos en las líneas celulares U251 (astrocitoma), PC-3 (próstata), K562 (leucemia), HCT-15 (colon), MCF-7 (mama), SKLU-1 (pulmón) empleando el ensayo de sulforrodamina B.

Determinar la actividad antiinflamatoria de los productos naturales de *H. inuloides* y derivados semisintéticos mediante los modelos de inflamación en oreja de ratón inducido por TPA e inhibición de la producción de óxido nítrico en línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7, estimulados con lipopolisacáridos.

Determinar la actividad antimicrobiana de los productos naturales de *H. inuloides* en cepas bacterianas de interés clínico.

Determinar la actividad antiparasitaria de los productos naturales de *H. inuloides* y derivados semisintéticos frente a *Giardia intestinalis*.

Determinar la actividad toxicológica de los productos naturales de *H. inuloides* y derivados semisintéticos mediante en el modelo de *Artemia salina* y en el ensayo de

toxicidad aguda en ratón.

Explorar la posible correlación entre la estructura molecular y la actividad biológica de los productos naturales bioactivos de *H. inuloides* y sus derivados.

5. Discusión de resultados

5.1. Aislamiento

Mediante la aplicación de procedimientos convencionales, a partir del extracto acetónico de las flores secas de *H. inuloides*, se aislaron y caracterizaron los siguientes compuestos: 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (**1**), 7-hidroxicadaleno (**2**), 3,7-dihidroxi-3(4*H*)-isocadalen-4-ona (**7**), ácido 1*R*,4*R*-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrocadalen-15-oico (**13**), quercetina (**23**), caryolan-1,9β-diol (**17**), éter 3,7,3''-trimetílico de quercetina (**27**), éter 3,7,3'',4''-tetrametílico de quercetina- (**29**) 7-(3,3-dimetil aliloxi) cumarina (**62**), espinasterol (**80**) y *D*-chiro-inositol (**127**), 3-O-β-D-glucopiranosido de espinasterilo (**128**), éter 7,3''-dimetílico de eriodictol (**129**) (Figura 7).

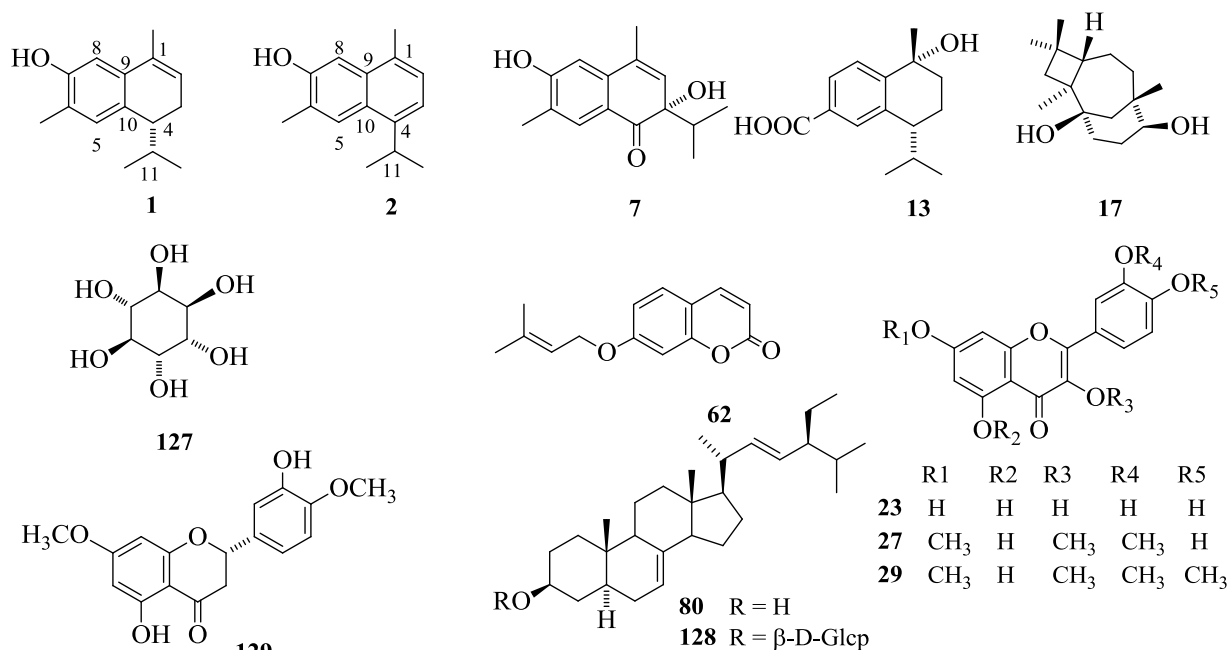


Figura 7. Productos naturales aislados de *H. inuloides*

5.2. Obtención de derivados

Con la finalidad de evaluar el efecto de la estructura molecular sobre la actividad biológica, se prepararon, mediante métodos químicos convencionales, los derivados. 7-acetoxi-3,4-dihidrocadaleno (**130**), 7-benzoxi-3,4-dihidrocadaleno (**131**), 7-acetoxicadaleno (**132**), 7-benzoxicadaleno (**133**), pentaacetil-quercetina (**134**) y 7-hidroxicalamenano (**135**)

(Figura 8). Los compuestos **130-133** son productos nuevos no descritos previamente en la literatura.

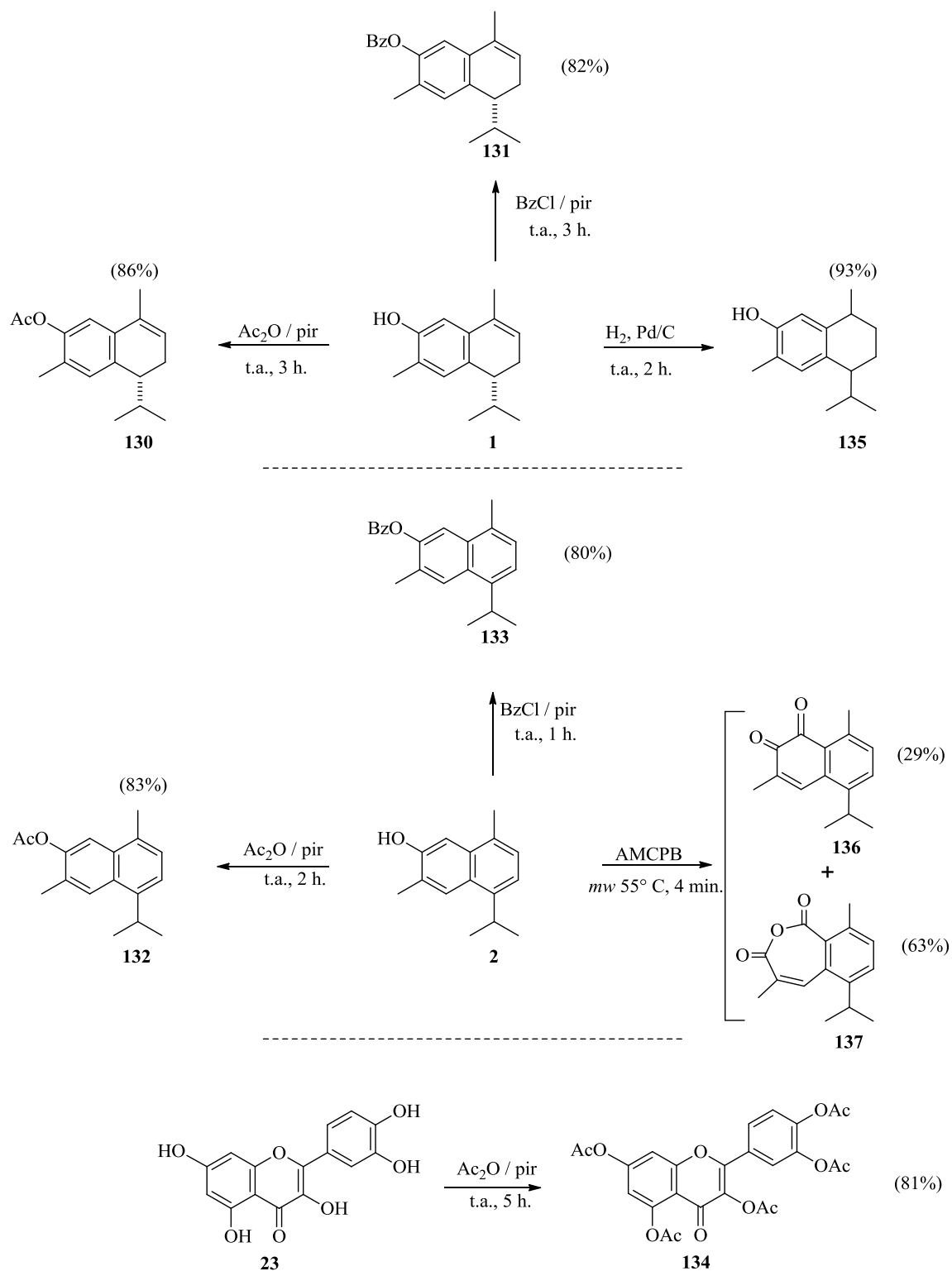


Figura 8. Reacciones de derivatización

A partir de la reacción del compuesto **2** con *m*CPBA aplicando irradiación de microondas, se obtuvieron los compuestos **136** y **137**. Los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C del **136**, su punto de fusión y la comparación con los datos descritos en la literatura permitieron identificar al compuesto como 3,8-dimetil-5-(1-metiletil)-1,2-naftoquinona (mansonona C). Este compuesto se ha preparado a partir de **2** (7-hidroxicadalenol) por oxidación con sal de Fremy [68], oxidando **2** sobre gel de sílice [69] y por ciclación de la *p*-benzoquinona hidroxiperezone [70]. Utilizando estos métodos el rendimiento reportado es bajo y se requiere un tiempo prolongado para su obtención. Mediante la aplicación de microondas el tiempo requerido se redujo a solo 4 minutos.

Los datos espectroscópicos de RMN de ^1H del compuesto **137** (Figura 9) revelan dos señales dobles correspondientes a protones aromáticos en posición orto a δ 7.28 y δ 7.38 ppm que integran cada una para un protón, una señal a δ 7.23 para un protón, cuyo desplazamiento químico indica que se encuentra cercano a un grupo carbonilo. Se observa una señal heptuplete en δ 3.18 que integra para un protón, correspondiente a un metino unido a dos metilos geminales, observándose complementariamente una señal doble a δ 1.25 que integra para los seis protones de estos dos metilos. Finalmente se observan dos señales simples en δ 2.26 y δ 2.40 que integran cada una para tres protones, correspondientes a dos metilos. De acuerdo con lo anterior, se propone que el compuesto obtenido a partir de la reacción con *m*CPBA conserva similitud estructural con el compuesto **2**, se conservan las señales del isopropilo que presenta el compuesto **2**, de igual manera se observan las señales de los metilos del compuesto **2**. En el espectro de RMN de ^1H desaparecen las señales correspondientes al protón aromático en posición 8 y la señal correspondiente al OH en posición 7. El espectro de RMN de ^{13}C presenta señales para 15 carbonos, lo que indica que no se incremento ni disminuyo el número de carbonos contenidos en el compuesto **2**. El espectro de ^{13}C muestra presenta dos señales correspondientes a carbonos de carbonilo de éster en la región de 160 a 165 ppm. El espectro de IR del compuesto revela dos bandas estrechas a 1740.5 y 1782.4 cm^{-1} asociadas a carbonilos de anhídrido. El análisis por espectrometría de masas indica que se tiene un compuesto con $[\text{M}]^+$ de 245.117 y fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$. La estructura propuesta

para **137** implica la expansión del anillo de **2** con la correspondiente formación del anhídrido. El compuesto fue identificado como 6-isopropil-4,9-dimetilbenzo[*c*]oxepina-1,3-diona y representa un nuevo compuesto químico no reportado en la literatura.

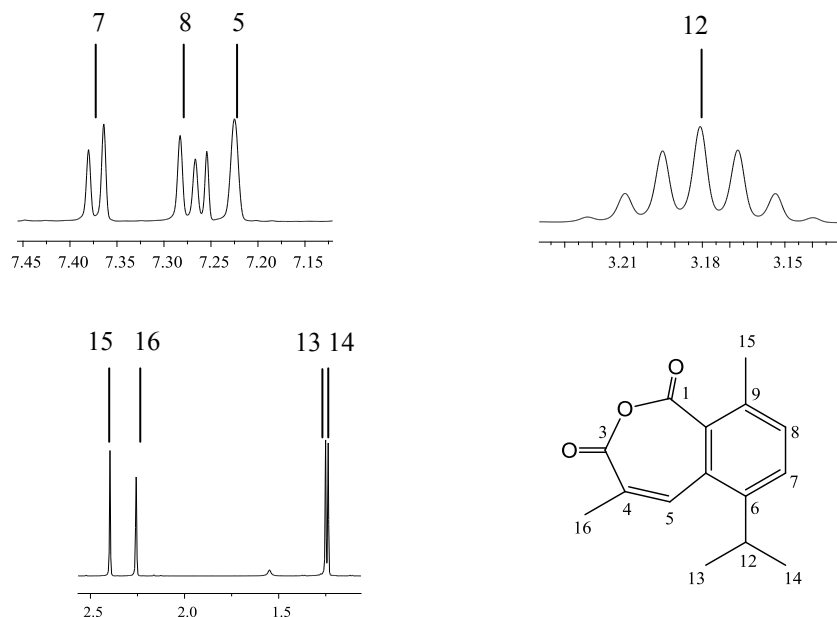


Figura 9. Desplazamientos químicos para los protones del compuesto **137**

5.3. Ensayo de citotoxicidad

La investigación en productos naturales ha dado como resultado el descubrimiento de diversos agentes anticancerígenos que incluyen la vincristina, vinblastina, etopósido, paclitaxel, camptotecina y doxorrubicina, entre otros [71,72,73]. La capacidad de los productos naturales para inhibir la proliferación celular es importante en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos debido al incremento en la incidencia de este padecimiento, no solo en México, sino a nivel mundial [74,75].

A una concentración de 50 μ M diversos compuestos presentaron capacidad para inhibir la proliferación celular (Tabla 2). A esta concentración, los compuestos **1** y **2** y sus correspondientes derivados acetilados **130** y **132** produjeron el mayor porcentaje de inhibición de la proliferación de las líneas celulares tumorales. La sustitución del hidrógeno en posición 7 en los compuestos **1** y **2** por un grupo benzoilo redujo la actividad de lo

derivados **131** y **133**. Dicho efecto podría atribuirse a un impedimento estérico derivado del aumento en el volumen de los derivados.

Los valores de CI_{50} de los compuestos que presentaron un acapacidad de inhibición mayor o igual al 50% en el ensayo preliminar se presentan en la tabla 3. De los compuestos de tipo cadinano, el compuesto **136** presentó la mayor actividad frente a las líneas celulares K562 y HCT-15 con valores de CI_{50} de 1.45 ± 0.14 y $22.44 \pm 2.6 \mu M$, respectivamente. Se observa además, que la actividad de los derivados acetilados **130** y **132** se conserva frente a la línea tumoral K562, sin embargo disminuye frente a las líneas HCT-15 y MCF-7 al compararse con sus precursores **1** y **2**. Los resultados obtenidos son congruentes con estudios previamente publicados que indican que los sesquiterpenos **1** y **2** y compuestos de estructura similar exhiben actividad citotóxica contra diversas líneas celulares tumorales [58], y que la modificación del OH en la posición 7 modifica la actividad biológica [76].

Tabla 2. Evaluación preeliminar de la capacidad de los metabolitos para inhibir la proliferación celular a una concentración de 50 μM

COMPUESTO	Línea celular (% de inhibición)					
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
1	100	100	60.18	100	100	100
2	100	100	100	100	100	98
7	47.43	75.66	69.8	85.52	61.3	35.5
13	48.27	41.08	s/a	17.49	10.30	28.54
17	13.69	57.95	27.28	45.28	15.92	23.72
23	81.79	94.22	42.5	80.99	73.53	90.77
62	29.39	58.31	40.77	68.29	33.19	33.77
80	s/a	s/a	21.8	s/a	s/a	s/a
127	s/a	15.59	3.93	7.96	3.73	4.0
129	71.6	55.75	96.36	56.68	54.4	69.29
130	100	100	65.48	100	100	100
131	25.8	22.5	s/a	49.5	60.7	37.0
132	100	100	100	100	100	89.6
133	41.5	21.2	44.3	72.0	51.2	63.0
134	100	100	55.42	--	100	100
135	4.6	29.2	0.3	83.75	25.9	12.7
136	53.7	76.1	77	61.53	56.9	77.7

sa: sin actividad. U251 (astrocitoma), PC-3 (próstata), K562 (leucemia), HCT-15 (colon), MCF-7 (mama), SKLU-1 (pulmón).

En lo referente a los compuestos de tipo flavonoide, los compuestos naturales **23** y **27** y el compuesto semisintético **133** fueron activos frente a las diferentes líneas celulares. En relación a esto algunos trabajos reportan que los flavonoides son capaces de inhibir la proliferación celular *in vitro* [77-79]; e *in vivo* [80-82], mientras que otros señalan moderada citotoxicidad en ensayos con líneas celulares y células tumorales animales [83]. De acuerdo a los protocolos internacionales aprobados para evaluar la actividad se puede decir que los compuestos evaluados tienen una actividad moderada.

Tabla 3. Concentración inhibitoria media de la proliferación celular (CI₅₀)

Compuesto	CI ₅₀ ± ESM (µM)		
	K562	HCT-15	MCF-7
1	49.35±23.6	59.37± 4.5	61.37± 4.3
2	26.41±2.0	18.89±1.2	30.± 0.87
7	---	55.34±2.8	51.76±2.2
23	---	--	70.3±4.6
129	57.67±0.6	62.53±3.6	51.48±3.5
130	46.43±3.4	71.56±2.4	79.65±2.1
132	27.54±0.9	55.93±3.5	63.62±5.8
134	35.31±2.9	28.57±2.1	22.57±2.4
136	1.45±0.14	22.44±2.6	--
Camptotecina	0.59 ± 0.02 ^a	0.13 ± 0.05 ^a	0.16 ± 0.01 ^a

^aValores expresados en el rango nanomolar (nM).

5.4. Estimación de la capacidad antiinflamatoria

Previamente se ha encontrado que los extractos acuoso, de acetona, diclorometano y metanol, y los metabolitos 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol (**1**), 7-hidroxicadalenol (**2**), dicadalenol (**12**), ácido cadalen-15-oico (**13**), caryolan-1,9β-diol (**17**) y quercetina (**23**) aislados a partir de *H. inuloides* poseen actividad antiinflamatoria [43,50,55-57]. La evaluación de los constituyentes adicionales no descritos previamente arrojó los resultados presentados en la tabla 4. Como se puede observar a excepción de los compuestos **2** y **132**, el resto de los componentes adicionales de *H. inuloides* no evaluados previamente no presentaron una actividad antiinflamatoria relevante.

Se observa que los compuestos **130** y **132** resultado de la acetilación en posición 7 de los compuestos **1** y **2**, con la correspondiente modificación del OH presentaron capacidad proinflamatoria en el ensayo. Sin embargo, la actividad antiinflamatoria se conserva en los derivados benzoilados **131** y **133**. Los flavonoides **27** y **129** fueron moderadamente activos en el ensayo; ambos compuestos presentan diferentes grados de modificación de los grupos hidroxilo, los cuales han sido sustituidos por metilos, dicha sustitución conduce a una pérdida de la capacidad antiinflamatoria en comparación con los flavonoides altamente hidroxilados [84].

Tabla 4. Actividad antiinflamatoria de los metabolitos de *H.inuloides*^a

Compuesto	Edema (mg ± EEM)	% Inhibición
Control negativo	12.07	--
1	10.50 ± 0.99	5.41
2	1.85 ± 0.52	83.33**
13	5.27 ± 0.70	65.73**
27	7.30 ± 1.15	38.86**
80	9.80 ± 0.36	7.98
129	7.57 ± 0.45	36.63**
130	11.87 ± 0.66	
131	11.07 ± 1.15	
132	13.60 ± 0.70	-13.90
133	3.73 ± 1.62	66.44**
134	9.07 ± 0.70	19.46
135	13.17 ± 0.51	13.57
Control (indometacina 0.31 μmol/oreja)		61.90**

^aLos datos representan el promedio de tres animales ± el error estándar de la media ($\bar{x} \pm \text{EEM}$). Los resultados se analizaron mediante una prueba de t de Student, los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferentes significativamente con respecto al control negativo.

5.5. Estimación de la capacidad antioxidante y atrapadora de ERO

Se evaluó la capacidad de los productos naturales, aislados a partir de *H. inuloides*, sus derivados semisintéticos, y compuestos de referencia, para inhibir la peroxidación lipídica, reducir el radical DFPH y atrapar a las especies reactivas $\text{O}_2^{\bullet -}$, HOCl, H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, y OH^{\bullet} .

5.5.1 Inhibición de la peroxidación lipídica y reducción del radical DFPH

La capacidad para inhibir la peroxidación de lípidos es importante debido a su relación con el daño oxidativo a las membranas y procesos de toxicidad que conducen a la muerte celular. Los resultados obtenidos al evaluar la capacidad de los compuestos para inhibir la peroxidación lipídica revelan que el compuesto **135** (7-hidroxicalamenano) presentó la mayor actividad seguido del compuesto **130** (7-acetoxi-3,4-dihidrocadaleno). La esterificación de **1** y **2** para obtener los correspondientes derivados benzoilados eliminó la capacidad inhibitoria de los compuestos (Tabla 5). Entre los metabolitos de tipo flavonoide, el de mayor actividad fue el derivado pentaacetilado de la quercetina (**134**), seguido de la quercetina (**23**). Se observa que la sustitución de los grupos hidroxilo por metoxilos disminuye su capacidad para inhibir la peroxidación. Estos resultados confirman informes previos que indican que los compuestos de fenolicos poseen capacidad antioxidante al actuar como atrapadores de ERO [85,87] e inhibidores la peroxidación de lípidos [88].

En lo referente a reducción del radical DFPH puede observarse que, con excepción de los compuestos **2** (7-hidroxicadaleno), **27** (trimetilquercetina) y **129** (éter dimetilico de eriodictol), el resto de los compuestos no presentó actividad relevante para reducir al radical (Tabla 5). Los resultados obtenidos de la evaluación de la inhibición de la peroxidación lipídica y el ensayo de DFPH[•] revelan que ciertos compuestos poseen capacidad para inhibir la peroxidación de lípidos (TBARS), sin embargo, son inactivos en el ensayo de DFPH[•]. Lo anterior se puede explicar el porque el DFPH[•] en solución metanólica es un radical estable con un máximo de absorbancia a 520 nm para su forma oxidada [89,90]. Además la curva de respuesta de tiempo para alcanzar el estado de equilibrio no es lineal a diferentes proporciones de antioxidante/DFPH[•] [88,91], la sustracción de un átomo de hidrógeno a partir de un antioxidante por el DFPH[•] es un proceso que ocurre lentamente en solventes como metanol y etanol [92], el DFPH[•] es un radical que no guarda similitud con los radicales peroxilo involucrados en la peroxidación lipídica, por lo que muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con los radicales peroxilo reaccionan lentamente o son inertes a DFPH[•] [93]. Por otra parte, el ácido tiobarbitúrico (ATB) reacciona no sólo con el malondialdehído formado como resultado de

la peroxidación lipídica, sino también con glucosa, desoxirribosa, ácido ascórbico, y algunos aminoácidos [94-96].

Tabla 5. Capacidad para inhibir la peroxidación lipídica y reducir el radical DFPH^{*}

<i>Compuesto</i>	CI ₅₀ μM	
	Peroxidación lipídica	Reducción de DFPH
1	4.72±0.11	> 100
2	3.09±0.19	30.66±8.14
7	sa*	sa*
13	sa*	sa*
17	sa*	sa*
23	4.30±0.27	13.11±1.2
27	6.16±0.06	> 100μM
29	sa*	sa*
129	14.46±0.61	6.97±0.14
62	17.35±1.40	sa
80	sa*	sa
127	sa*	sa
130	1.82±0.12	sa
131	> 100	sa
132	> 100	sa
133	> 100	sa
134	3.67 ± 0.43	sa
135	0.58±0.008	sa
136	**	sa
137	--	--
α-tocoferol	6.78 ± 2.16	31.74±1.

*sa: sin actividad relevante.

** El compuesto 136 mostró actividad proinductora de la peroxidación.

5.5.2 Capacidad atrapadora del radical superóxido

En el ensayo efectuado los compuestos **129** y **27** presentaron capacidad para atrapar el O₂^{•-} con valores de CI₅₀ de 12.2±0.22 y 20±0.27 μM, respectivamente. Ambos valores son inferiores al obtenido para el compuesto de referencia (NDGA) cuya CI₅₀ fue de 11.6±0.13. La capacidad atrapadora de superóxido disminuye en el siguiente orden: **129**> **27**> **29**> **7**> **2**> **13**> **130**> **132** (Tabla 6, Figura 10). La capacidad para atrapar O₂^{•-} es importante ya que es altamente reactiva, no se difunde fácilmente a través de la célula y daña principalmente al ADN mitocondrial al producirse en la membrana mitocondrial interna [97]. Los resultados obtenidos están acorde con información publicada que indica

que los sesquiterpenos de *H. inuloides* presentan capacidad para reducir el radical DFPH[•] pero no presentan actividad relevante contra el O₂^{•-}; mientras que los compuestos de tipo flavonoide muestran capacidad para eliminar ambos tipos de radicales [98].

5.5.3 Capacidad atrapadora de peróxido

De los resultados obtenidos se observa que la habilidad de los compuestos para atrapar el peróxido de hidrógeno disminuyó en el siguiente orden: **129 > 27 > 29 > 2 > 130 > 7 > 132 > 13**. El compuesto **32** presentó la mejor capacidad atrapadora con una CI₅₀ de 154±6.3 μM, sin embargo, ninguno de los compuestos fue más activo que el piruvato empleado como sustancia de referencia y cuya CI₅₀ fue de 32.2± 1.7 μM (Tabla 6, Figura 10). La capacidad atrapadora de H₂O₂ es importante ya que esta especie es una de las principales ERO y se ha demostrado que participa en el daño celular a través de la oxidación directa de los lípidos, proteínas y ADN al generar radicales hidroxilo, producto de la reacción de Fenton [99], o al actuar como una molécula de señalización para activar las vías de apoptosis celular [100].

5.5.4 Actividad atrapadora de hidroxilo

El radical hidroxilo deriva del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y puede tener efectos devastadores debido a que reacciona con macromoléculas tales como lípidos de membrana, proteínas y carbohidratos. En el ADN, puede inducir roturas de la cadena, así como cambios químicos en la desoxirribosa y en las bases de purina y pirimidina [101,102]. La capacidad para atrapar el radical hidroxilo fue la siguiente: **2 > 129 > 27 > 29 > 132 > 130 > 7 > 13**. El valor de la CI₅₀ para la DTU empleada como sustancia de referencia fue 131± 3.6 μM y fue menor a la de los compuestos evaluados (Tabla 6, Figura 11).

5.5.5 Actividad atrapadora de oxígeno singulete

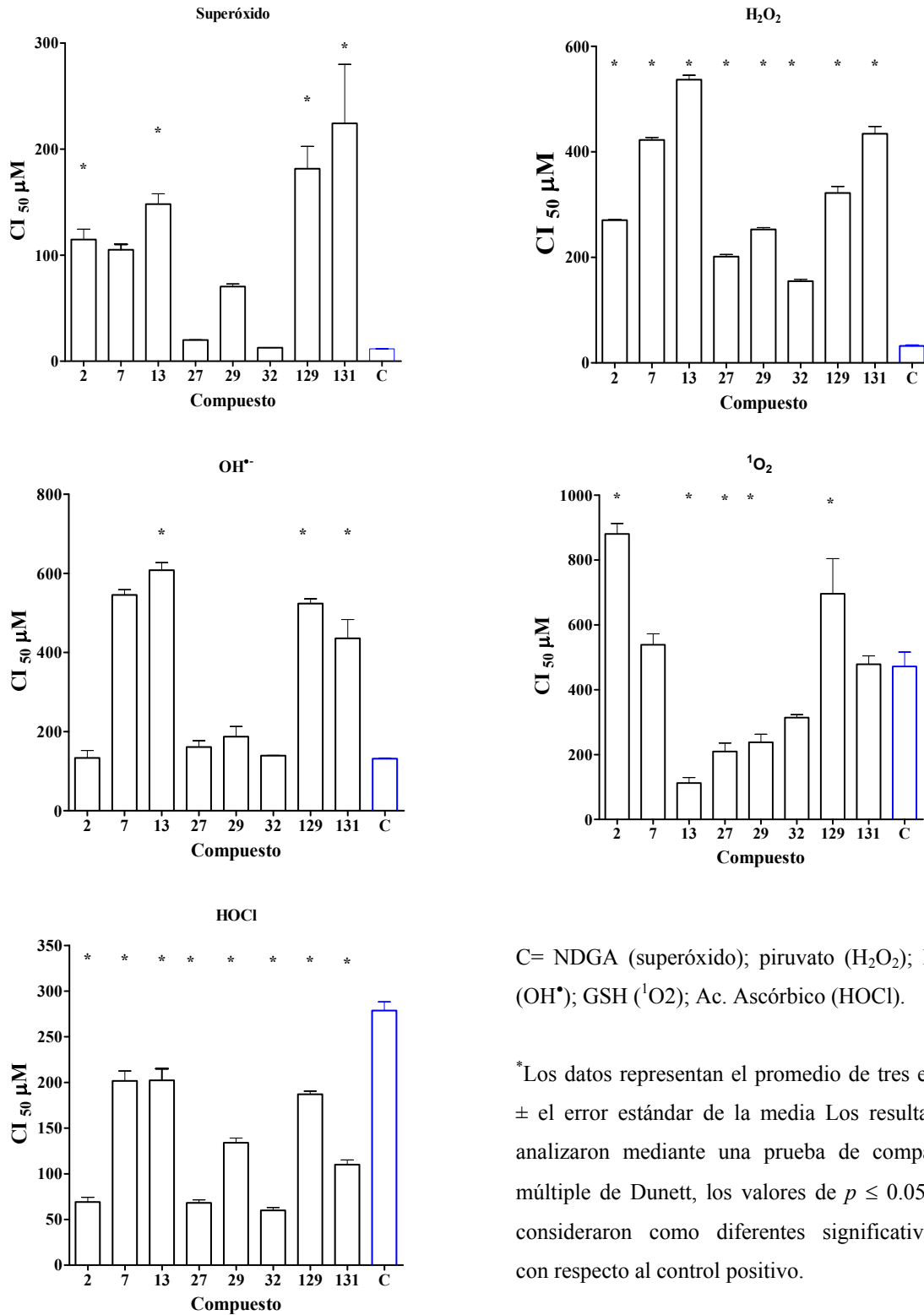
Los resultados obtenidos muestran una actividad concentración-dependiente de los compuestos como atrapadores de ¹O₂ (Tabla 6, Figura 10). La capacidad de los compuestos para atrapar al ¹O₂ disminuyó en el siguiente orden **13 > 27 > 29 > 129 > 132 > 7 > 130 > 2**. El ácido calamenónico presentó comparativamente mejor actividad que el GHS. Los valores de CI₅₀ de ácido calamenónico (**13**) y GHS fueron 112.4±29.3 μM y 471±77 μM (Tabla 6).

El $^1\text{O}_2$ tiene un carácter de no radical y electrofílico; por lo tanto puede inducir reacciones de oxidación con compuestos orgánicos en sus residuos ricos en electrones sin la participación de radicales libres. La alta reactividad de $^1\text{O}_2$ con macromoléculas biológicas hace que tenga un potencial dañino cuando se produce dentro de la célula, especialmente por su capacidad para dañar los componentes de la guanina y los ácidos nucleicos, con efectos tóxicos y mutagénicos [103].

5.5.6 Capacidad de depuración de HOCl

Los resultados de la evaluación de la capacidad de atrapamiento de HOCl revelan que el ácido ascórbico empleado como sustancia de referencia presentó un valor de CI_{50} de $3.511 \pm 0.58 \mu\text{g/mL}$. De los compuestos evaluados el éter 7,4'-dimetilico de eriodictiol (**129**) seguido por trimetilquercetina (**27**) y 7-hidroxicadaleno (**5**) mostraron poseer la capacidad de atrapamiento de HOCl más alta (Tabla 6, Figura 10). Los compuestos **7** y **13** presentaron la menor capacidad de atrapamiento. La capacidad de los compuestos para atrapar HOCl es importante, ya que aun cuando su producción en los neutrófilos por el sistema mieloperoxidasa- H_2O_2 - Cl^- desempeña un papel central en la capacidad de estas células para matar una amplia gama de patógenos, la generación de este agente oxidante implica un riesgo para el organismo, debido a que contribuye a la lesión de los tejidos asociado a inflamación [104].

Se ha descrito que los compuestos de tipo polifenol son eficientes donadores de hidrógenos, y que su potencial antioxidante es dependiente de la cantidad y posición de grupos hidroxilos y de la presencia de grupos donadores de electrones en su estructura [105], debido a la capacidad que poseen los anillos aromáticos de deslocalización del sistema de electrones π ; a mayor capacidad para la deslocalización electrónica más eficacia antioxidante del polifenol [106-108]. En los flavonoides la capacidad de atrapamiento de radicales libres de los compuestos de tipo flavonoide es altamente dependiente de la presencia del grupo 3-OH. El bloqueo en la posición C-3 resulta en una pérdida de actividad antioxidante [108-109].



C= NDGA (superóxido); piruvato (H₂O₂); DMTU (OH[•]); GSH (¹O₂); Ac. Ascórbico (HOCl).

Los datos representan el promedio de tres ensayos ± el error estándar de la media. Los resultados se analizaron mediante una prueba de comparación múltiple de Dunnett, los valores de $p \leq 0.05$ () se consideraron como diferentes significativamente con respecto al control positivo.

Figura 10: Capacidad atrapadora de ERO de los metabolitos y derivados semisintéticos de *H. inuloides*.

Tabla 6. Capacidad atrapadora de ERO de los productos naturales de *H. inuloides* y derivados semisintéticos

Comp.	O ₂ ^{•-}	H ₂ O ₂	CI ₅₀ μM*		
			OH [•]	¹ O ₂	HOCl
2	114.6±13.9*	270±2.7	133.4±32.6	880.4±55.4	69.1±8.8
7	105±7.2	422±8	545.4± 23.0	538.9±58.6	202.3±21.9
13	148±13*	536±14	607.9± 33.5.	112.4±29.3	203.5±23.9
27	20±0.27	201±6.7	161.2± 27.2	209.7±44.5	68.1±5.77
29	70.4±3.3	252± 6.5	187.1± 44.6	237.8±43.1	133.9±9.0
129	12.2±0.22	154±6.3	139.5± 1.1	314.4±15.8	60.0±5.2
130	181.5±29.8*	322 ± 21	523.8±20.4	697 ± 187	106.1±4.4
132	244.1±78*	434.5± 23.3	435.78±82	478.6±44.7	110.0±15.8
Control	NDGA	Piruvato	DMTU	GSH	Ac. ascórbico
	11.6±0.13	32.2± 1.7	131.5±3.6	471 ±77	278.6± 16.7

*Los datos representan el promedio de tres ensayos ± la desviación estándar de la media ($\bar{x} \pm DE$)

5.6. Ensayos en cultivos de *Caernohabditis elegans*

En 1963 Brenner introdujo a *C. elegans* como organismo modelo de investigación en biología [110], con características de bajo costo, y un ciclo de vida corto que permite realizar ensayos con rapidez y facilidad [111]. *C. elegans* ha sido empleado en estudios *in vivo* para evaluar compuestos de origen vegetal farmacológicamente activos [112].

Muchos de los trabajos que se han llevado a cabo para estudiar los efectos de polifenoles en cultivos de *C. elegans* se han realizado en medio sólido, sin embargo, debido a la poca disponibilidad de algunos de los compuestos se eligió usar medio líquido para su cultivo, aun cuando se han reportado algunos inconvenientes en ensayos de longevidad y reproducción, ya que los gusanos en medio líquido dejan de poner huevos al exterior y los mantienen dentro de tal forma que eclosionan en el interior [113]. En los ensayos con *C. elegans* generalmente se emplea DMSO como vehículo, sin embargo, la baja solubilidad de los compuestos en el medio acuoso requirió de pruebas de solubilidad con diferentes mezclas de disolventes. Se observó que la sobrevivencia del nemátodo no se afectaba cuando se emplearon mezclas de DMSO/etanol (50/50% v/v) y DMSO/acetona (40/60% v/v) como

vehículo, por lo cual la mezcla DMSO/etanol (50/50% v/v) se utilizó como vehículo para disolver los compuestos ensayados con *C. elegans*.

Tabla 7. Efecto del vehículo en la sobrevida de *C. elegans*

Glicerol	% de disolvente			Sobrevida*
	DMSO	Etanol	Acetona	
10	90	-	-	**
20	80	-	-	**
30	70	-	-	65
40	60	-	-	35
50	50	-	-	30
20	30	50	-	75
-	40	60	-	94
-	50	-	50	96

* Sobrevida con respecto al control a los 28 días

** Algunos compuestos se precipitan en el medio de cultivo

5.6.1 Incremento en la sobrevida

La Figura 11 muestra las curvas de subrevida de los gusanos tratados con los metabolitos de *H. inuloides* comparadas con los gusanos control (sin tratamiento). Se puede observar que la tasa de gusanos muertos fue más alta en presencia de ciertos compuestos que en los controles. Sin embargo, la exposición de *C. elegans* a 100 mM de compuestos de tipo flavonoide incrementó la sobrevida en comparación con el control (Tabla 8). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 0.001$). Los compuestos de tipo cadinano no presentaron capacidad para incrementar sobrevida de *C. elegans* y 2 de ellos fueron tóxicos para el gusano.

Los resultados obtenidos son acordes con otros estudios llevados a cabo en los cuales se ha informado que ciertos compuestos de tipo flavonoide aumentan la longevidad de *C. elegans*, lo protegen contra el estrés oxidativo y provocan un aumento en la translocación del factor de transcripción DAF-16 [114-116]. En el ensayo de sobrevida se observó que el compuesto **23** (quercetina) presentó la mayor capacidad para incrementar la sobrevida del nematodo, observándose una disminución del efecto en sus derivados naturales (**27** y **29**) y semisintético (**134**). Estos resultados son congruentes con lo informado en la literatura, que indica que la metilación y la glucuronidación disminuyen la

actividad antioxidante *in vitro* de los flavonoides [117,119], aun cuando también se ha informado que ciertos derivados glucosilados y metilados del compuesto **23** aumentan la resistencia al estrés térmico y producen un incremento en la vida media de *C. elegans* [120,121].

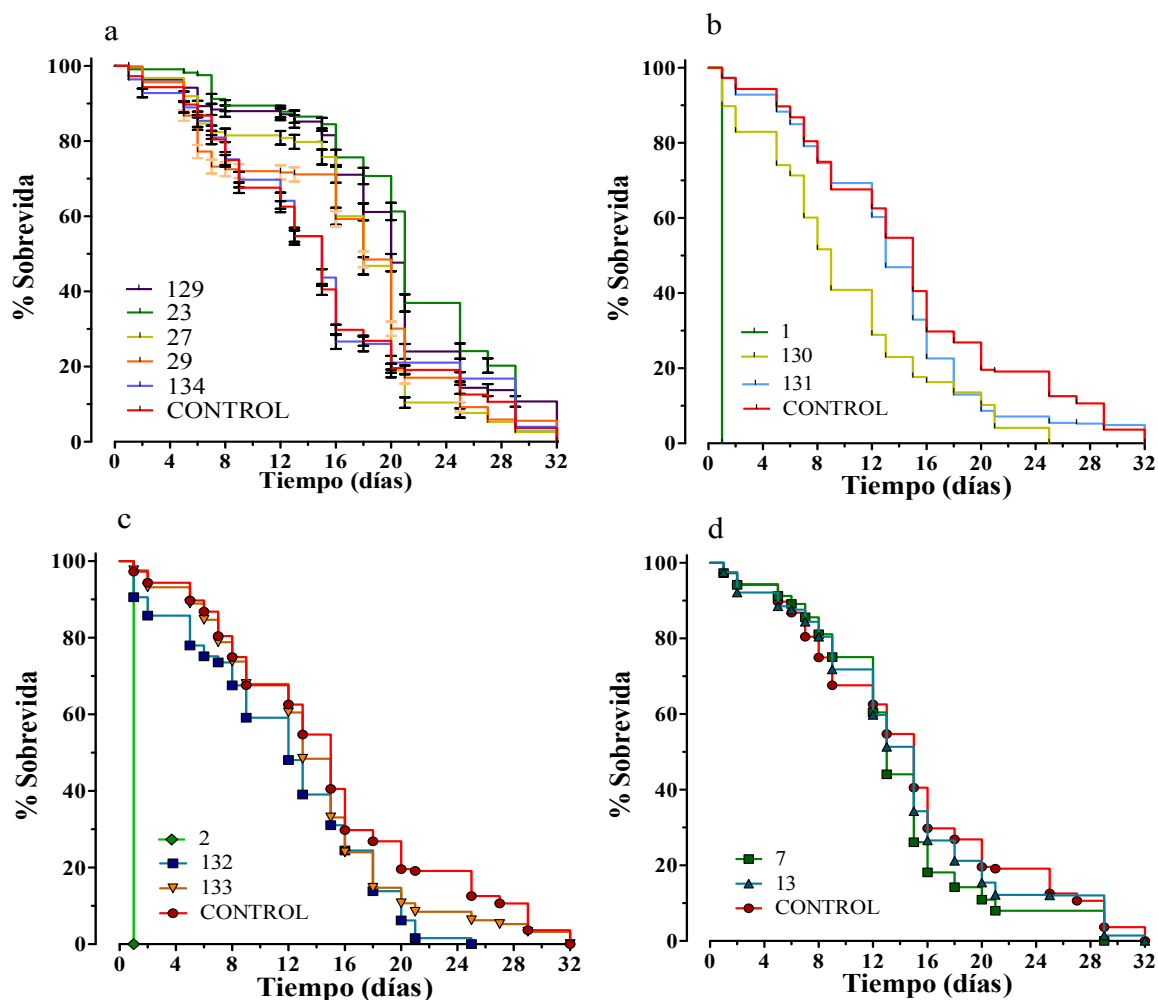


Figura 11. Curvas de supervivencia de *C. elegans* en presencia de los metabolitos de *H. inuloides*. Las etiquetas denotan el compuesto ensayado. Curva a) Flavonoides; curva curvas b), c) y d) compuestos naturales y semisintéticos de tipo cadinano.

Tabla 8. Efecto de los componentes naturales y derivados semisintéticos de *H.inuloides* en la sobrevida de *C. elegans*

Tratamiento	Sobrevida, 20° C (media)	IC 95%	(n)	P vs. control	
				(log-rank)	(Gehan-Breslow-Wilcoxon)
1	1	0.171-1.962	449	< 0.0001	< 0.0001
2	1	0.169-1.964	479	< 0.0001	< 0.0001*
7	13.661	13.13-14.20	513	<0.0001*	0.0036*
13	14.391	13.78-15.00	557	0.1175	0.2972
23	19.20	18.41-19.82	444	<0.0001*	< 0.0001*
27	16.991	16.38-17.59	470	<0.0001*	< 0.0001*
29	16.583	15.92-17.23	575	<0.0001*	0.0049*
129	17.74	17.04-18.44	466	<0.0001*	< 0.0001*
130	11.012	10.41-11.60	434	0.0080*	< 0.0001
132	13.424	12.84-14.00	531	0.0001*	0.0020*
131	11.659	11.10-12.21	499	0.0150*	0.1796**
133	13.520	12.91-14.12	496	0.0001*	0.0050*
134	15.216	14.47-15.95	499	0.1751	0.5905
Control negativo	14.943	14.47-15.41	1098		

5.6.2 Resistencia al estrés

5.6.2.1 Ensayos con juglona y paraquat

Las quinonas como la juglona (5-hidroxi-1,4-naftalendiona) son citotóxicas por su capacidad para formar generar radicales libres y formar aductos consecuencia del ciclo redox con sus conjugados semiquinonas e hidroquinonas [122]. Por su parte, el PQ (1,1-dimetil-4,4-cloruro de bipyridilio,) es ingrediente de los herbicidas de bipyridilo, que genera radicales libres durante los procesos de desintoxicación y por lo tanto aumenta los niveles de ERO *in vivo* [123], al inducir la formación de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 a partir de O_2 [124]. La exposición prolongada al paraquat se ha asociado como un factor de riesgo potencial para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas [125]. Se ha descrito que el estrés oxidativo impuesto por el paraquat reduce la vida útil en *C. elegans* [126, 127].

El tratamiento con los metabolitos de *H. inuloides* aumentó en algunos casos la resistencia de *C. elegans* al estrés impuesto por la juglona o el paraquat respecto al control. En el ensayo con juglona el compuesto **23** (quercetina) incrementó la vida media de *C.*

elegans de 1.915 ± 0.018 horas a 2.074 ± 0.041 horas ($p < 0.0001$). El tratamiento con los compuestos **7**, **27** y **129** también mejoró la resistencia al estrés, sin que se observaran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre dichos tratamientos. En el ensayo con paraquat solo los compuestos **23** y **129** aumentaron la resistencia del gusano al estrés. En general, los compuestos de tipo cadinano no produjeron un efecto positivo sobre *C. elegans*, observándose, además, que compuestos como el **130** y **135** tuvieron un efecto negativo respecto al control (Tabla 9). Los resultados son congruentes con datos publicados que indican que compuestos polifenólicos protegen contra el daño, disminuyen la generación del radical superóxido y reducen la mortalidad inducida por la exposición crónica a paraquat [128-130].

5.6.2.2 Efecto protector frente a CuSO_4

Los iones de ciertos metales de transición (V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo y Cd) son esenciales en los procesos biológicos normales, su deficiencia conlleva a la incapacidad del organismo para efectuar ciertos procesos importantes [131-133]; sin embargo, la exposición a un exceso puede resultar en toxicidad [134]. Iones metálicos como el Cu^+ o Fe^{2+} interactúan con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para formar radicales hidroxilo (OH^{\bullet}), que conduce a condiciones patológicas que incluyen daño oxidativo a las membranas y biomoléculas [135].

En la Tabla 10 se muestran los resultados de la actividad protectora de los metabolitos de *H. inuloides* en los cultivos de *C. elegans* en presencia de Cu^{2+} . Puede apreciarse que solamente el extracto acetónico y los compuestos **1**, **7** y **23** presentaron capacidad protectora, con más del 50% de gusanos al final del ensayo. El resto de los compuestos presentó un efecto protector inferior al 20% (Figura 13). Previamente se ha descrito que infusiones de *H. inuloides* poseen actividad quelante de Fe^{2+} [57], dicha actividad se puede asociar al contenido de compuestos fenólicos y de tipo flavonoide que posee el extracto [60]. Estos compuestos poseen grupos catecol y galato que pueden conjugar metales de transición, impidiendo la formación de radicales libres inducida por el metales [136,137], lo anterior puede explicar la actividad del extracto acetónico, el cual permitió una supervivencia del 94.38%.

Tabla 9. Efecto de los componentes naturales y derivados semisintéticos de *H. Inuloides* en la vida media de *C. elegans* en presencia de juglona y paraquat

Compuesto	Juglona 250 mM				PQ (85 mM)			
	Media±EE (Hr)	N	Log-rank χ^2	P^a	Media±EE (Hr)	N	Log-rank χ^2	P^a
7	2.058±0.053	242	4.004	0.0454*	54.428±0.811	243	3.251	0.0714
13	1.898±0.051	310	0.04955	0.8239	53.933±0.819	304	0.5294	0.4669
23	2.074±0.041	335	51.67	< 0.0001**	58.836±0.831	237	4.540	0.0331*
27	2.066±0.047	280	3.858	0.0495*	54.695±0.923	275	2.830	0.0925
29	1.905±0.043	322	0.04543	0.8312	51.510±0.913	279	1.004	0.3163
129	2.045±0.047	301	4.373	0.0365*	57.508±0.912	268	4.132	0.0421*
130	1.248±.037	214	110.6	< 0.0001**	44.369±0.754	293	93.91	< 0.0001**
131	1.859±0.046	311	0.00102	0.9745	56.249±1.063	257	0.2486	0.6181
132	1.481±0.034	329	95.75	< 0.0001	47.025±0.801	315	42.96	< 0.0001**
133	1.791±0.051	289	0.9045	0.3416	51.874±0.885	349	0.01164	0.9141
134	1.951±0.048	307	0.8426	0.3586	53.722±0.924	288	0.03737	0.8467
135	0.688±0.018	255	415.6	< 0.0001**	33.818±0.512	286	256.6	< 0.0001**
Control	1.915±0.042	248	---	---	53.238±0.918	336	---	---

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

^a Determinado mediante la prueba de log-rank. EE, error estándar; N, número de gusanos.

El compuesto **23** (quercetina) presentó la mayor actividad protectora con una supervivencia del $88.18 \pm 7.36\%$. La capacidad para quelatar el cobre que poseen compuestos de tipo flavonoide cuyo mecanismo de quelación está asociado a que el grupo 3-hidroxilo se encuentre libre [64].

Tabla 10. Efecto de los metabolitos de *H. inuloides* en la sobrevivencia de *C. elegans* expuesto a CuSO_4

Tratamiento	% Sobrevida a 24 horas		
	Media	EE	
1	69.167**	5.64	
2	0	--	
7	82.93**	8.87	
13	21.10	5.95	
23	88.18**	7.36	
27	6.78	4.38	
29	0	---	
129	8.44	3.68	
130	0	0	
131	15.56	5.47	
132	6.25	6.25	
133	0	---	
134	16.66	11.91	
135	2.38	2.38	
Ext. acetónico	94.38**	5.22	
Controles	Naringenina	72.97**	18.75
	Hid. de catequina	91.44**	3.80
	Catequina	64.14**	4.60
	Epicatequina	85.38**	5.87
	Control negativo	6.250	1.22

Los datos representan el promedio de tres ensayos ** $P < 0.05$ con respecto al control negativo

El efecto protector del compuesto **23** fue equivalente al de los otros flavonoides ensayados como controles positivos. La formación del complejo flavonoide-metal se evidenció mediante el espectro de UV/vis, cuyo patrón espectral es acorde con lo informado en la literatura [138]. En la Figura 12a (línea continua) se observan las dos bandas principales de absorción en la región UV/vis que presenta el compuesto **23**, una a 371 nm (banda II) que representa la absorción de los anillos B y C (sistema cinamoilo) y otra a 255 nm (banda I) asociada a la absorción del anillo A (sistema benzoilo), estas bandas están asociadas con las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ dentro del anillo aromático [139], las cuales se modifican por cambios de pH, presencia de metales o presencia de sustituyentes.

El espectro de absorción del compuesto **23** asociado al Cu^{2+} revela un efecto batocrómico como se observa en la Figura 12b (línea punteada).

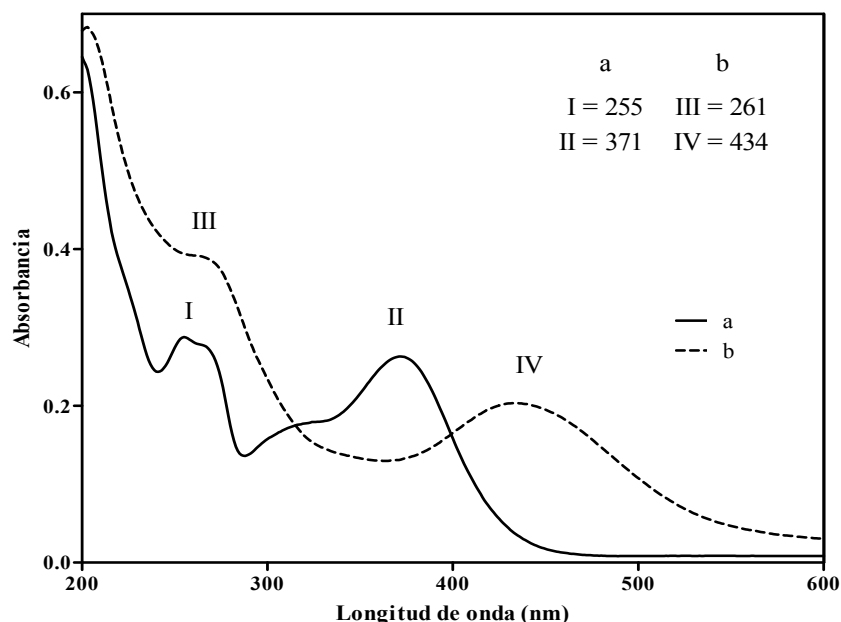


Figura 12. Espectros UV-Vis del compuesto **23**(a) y Cu-**23** (b).

De los compuestos de tipo cadinano, el compuesto 3,7-dihidroxi-3(4H) isocadalen-4-ona (**7**) presentó una alta capacidad para proteger los cultivos de *C. elegans*, permitiendo una sobrevivencia del 82.93%. Este compuesto de tipo cadinano, tiene un hidroxilo y un grupo oxo similar a los grupos 3-hidroxilo y 4-oxo presentes en el anillo C de los flavonoides (Figura 13), propuesto como uno de los sitios de unión de los flavonoides con los metales [140,141]. Sin embargo, la presencia del grupo isopropilo representa un impedimento estérico para la formación de un complejo con el cobre, lo que implica que el efecto protector de este compuesto sea a través de mecanismos diferentes a la quelatación.

Los datos espectrales del compuesto **7** revelan una banda primaria de absorción a 249 nm atribuible a la aromaticidad del benceno y otra banda secundaria a 283 nm, asociada a las transiciones $\eta-\pi^*$ de la cetona. Para el espectro del compuesto **7** en presencia de cobre (línea punteada) se observa un desplazamiento batocrómico y un efecto hipsocrómico (Figura 14).

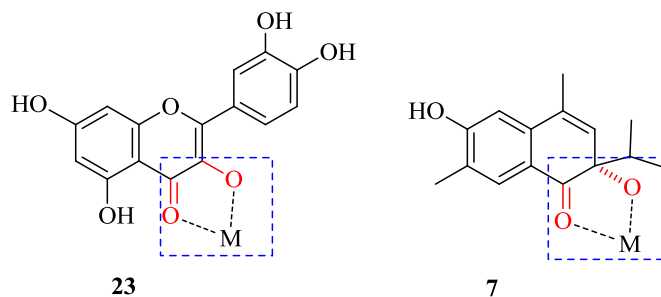


Figura 13. Semejaza de un fragmento estructural entre los compuestos **7** (3,7-dihidroxi-3(4H)-isocadalen-4-ona) y **23** (quercetina)

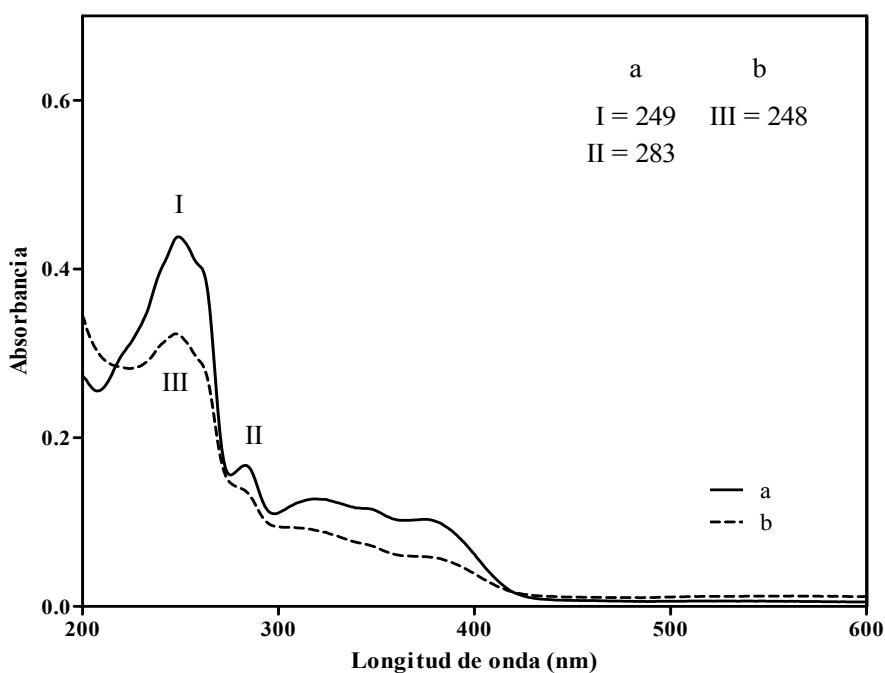


Figura 14 Espectro UV/visible del compuesto **7** (a) y complejo **7-Cu** (b)

Otro compuesto que presentó actividad protectora fue el compuesto **1** (7-hidroxi-3,4-dihidrocadalen). Se ha informado que este compuesto inhibe la peroxidación lipídica mitocondrial inducida por Fe (III) [59]. Para el compuesto **1** los datos espectrales revelan tres bandas atribuibles a la aromaticidad del benceno con un desplazamiento batocrómico por efecto de la conjugación con otro anillo que posee dobles enlaces. La primera banda de absorción a 217 nm, otra banda secundaria a 265.0 nm y una tercera banda a 302 nm. Para

el espectro obtenido del compuesto **1** en presencia de cobre (línea punteada) se observa un efecto hipsocrómico en los tres picos de absorción (Figura 17).

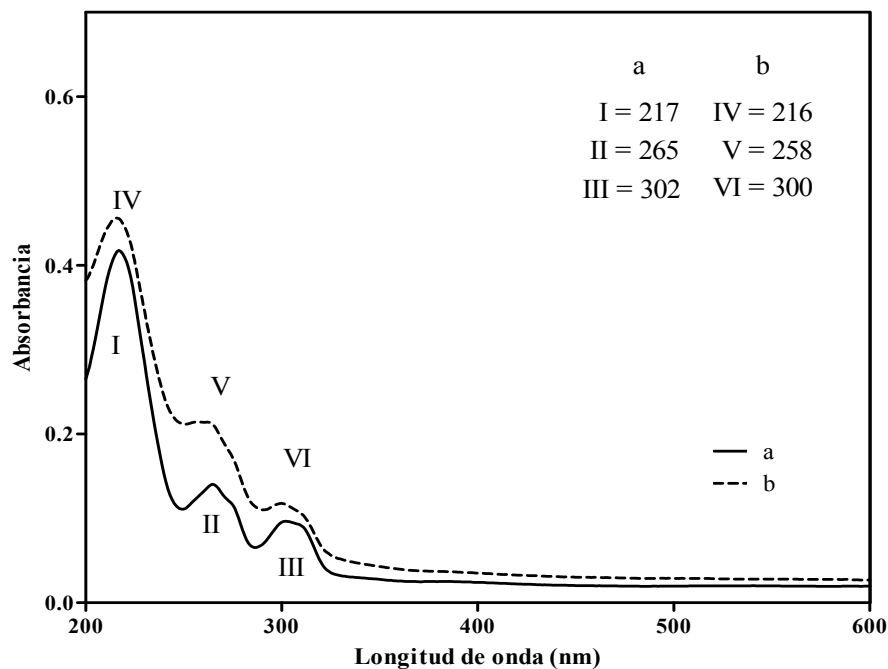


Figura 15. Espectro UV/visible del compuesto **1** (a) y **1-Cu** (b)

5.7. Actividad anti *Helicobacter pylori*

La determinación de la actividad de los compuestos contra *H. pylori* se realizó empleando el método de cultivo líquido. Los de tipo cadinano presentaron actividad considerable contra la bacteria, en algunos casos la CMI fue menor a la del metronidazol, fármaco empleado habitualmente en la terapéutica. Como se observa en la Tabla 11, destaca la actividad del compuesto **133** (7-benzoxicadaleño), compuesto producto de la derivatización del compuesto **2** (CMI = 1.95 $\mu\text{g/mL}$). El efecto del compuesto **133** sobre *H. pylori* presenta una concentración mínima bactericida menor a la de los fármacos metronidazol y amoxicilina. Puede observarse además el efecto de la modificación de la estructura molecular en la actividad biológica de los compuestos **1** y **2** y sus correspondientes derivados **130-133**; el incremento en la aromaticidad disminuye la actividad de **1** con respecto a **2**, de igual forma la modificación del hidroxilo en posición 7 produce un cambio en la actividad, la formación del correspondiente producto acetilado reduce la actividad de los dos derivados **130** y **132**, mientras que la formación de los

benzoatos incrementa la actividad en los compuestos **131** y **133** comparados con sus precursores **1** y **2**. El compuesto **133** mostró la mejor actividad con una CI_{50} de 1.95 $\mu\text{g/mL}$. Previamente se ha descrito que *H. inuloides* se encuentra entre las plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales [51], sin embargo, es la primera vez que se reporta la evaluación de la actividad anti-*Helicobacter* de sus metabolitos.

Tabla 11. Actividad anti-*H. pylori* de los metabolitos de *H. inuloides*

Compuesto	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
1	7.8
2	3.9
7	62.5
13	>125
23	62.5
27	>125
129	15.6
80	>125
130	15.6
131	7.8
132	7.8
133	1.95
134	125
Controles	
Metronidazol	300
Amoxicilina	0.005
Claritromicina	0.5

5.8. Actividad anti *Giardia intestinalis*

La giardiasis, incluida desde 2004 en la iniciativa de las enfermedades desatendidas de la OMS [142], es un problema de salud pública, especialmente en los países en desarrollo [143]. En México, en 2012 se detectaron un total de 10,650 nuevos casos de esta enfermedad [144]. El MTZ es el fármaco de primera elección en el tratamiento de la giardiasis [145,146], sin embargo, está asociado a diversos efectos secundarios [147]. Los resultados de la evaluación de la actividad anti-giardia de los metabolitos de *H. inuloides* y derivados semisintéticos muestran que solo los compuestos de tipo cadinano tuvieron actividad sobre los trofozoítos de *G. intestinalis*. Aún cuando diversos estudios han informado que algunos flavonoides inhiben el crecimiento de trofozoítos de *E. histolytica* y

G. lamblia [148,149] y que algunos otros muestran actividad antiprotozoaria moderada [150].

Tabla 12. Efecto anti-giardiasico de los componentes naturales y semisintéticos de *H. Inuloides*^a

Compuesto	µg/mL	
	CI ₅₀ ± EEM ^b	CI ₉₀ ± EEM
7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (1)	15.3±1.98	23.69±2.29
7-hidroxicalaleno (2),	22.96±2.31	32.51±3.25
7-acetoxi-3, 4-dihidrocadaleno (130)	28.81±2.82	50.34±9.7
7-benzoxi-3, 4-dihidrocadaleno (131)	64.42±18.24	>100
7-acetoxicalaleno (132)	35.5±5.10	72.84±10.26
7-hidroxicalamenano (135)	13.5±0.83	24.21±5.35
Metronidazol ^c	0.281±0.06	3.05±0.758

^a Los resultados se expresan como la media (n = 6)

^b Error estándar de la media

^c Control positivo

Las curvas de inhibición del crecimiento ajustadas mediante regresión no lineal muestran un comportamiento descrito por la ecuación de Boltzman en el caso de los compuestos **1**, **2**, **130** y **135**; de tipo Slogistic para el compuesto **131** y asintótica en el caso del compuesto **132** (Figura 16). Los compuestos 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (**1**) y 7-hidroxicalamenano (**135**), fueron capaces de reducir significativamente la supervivencia de los trofozoítos de *G. intestinalis in vitro* (Tabla 12). La modificación en la estructura molecular modificó la respuesta biológica. La aromaticidad del anillo B disminuye la actividad del compuesto **2** y sus derivados con respecto al compuesto **1**. La modificación del residuo hidroxilo en la posición 7 por esterificación de los compuestos **1** y **2** resultó en una disminución de la actividad anti-giardia. El producto de hidrogenación **135** presentó mayor actividad, sin embargo, no fue estadísticamente diferente al compuesto **1**. Otros compuestos requirieron concentraciones equivalentes a dos o cuatro veces la concentración de los compuestos **1** y **135** para producir valores de mortalidad similares. Después de 24 h de exposición *in vitro* los trofozoítos no tratados presentaron la morfología característica de giardia (Figura 17a). La exposición de los trofozoítos al compuesto **1** generó un aumento

Discusión de resultados

celular, presencia de vacuolas en el citoplasma, acumulación de material denso en los bordes del núcleo, fragmentación del disco adhesivo e interrupción de membrana lateral (Figura 17b), estas alteraciones condujeron a un daño irreversible en la estructura celular.

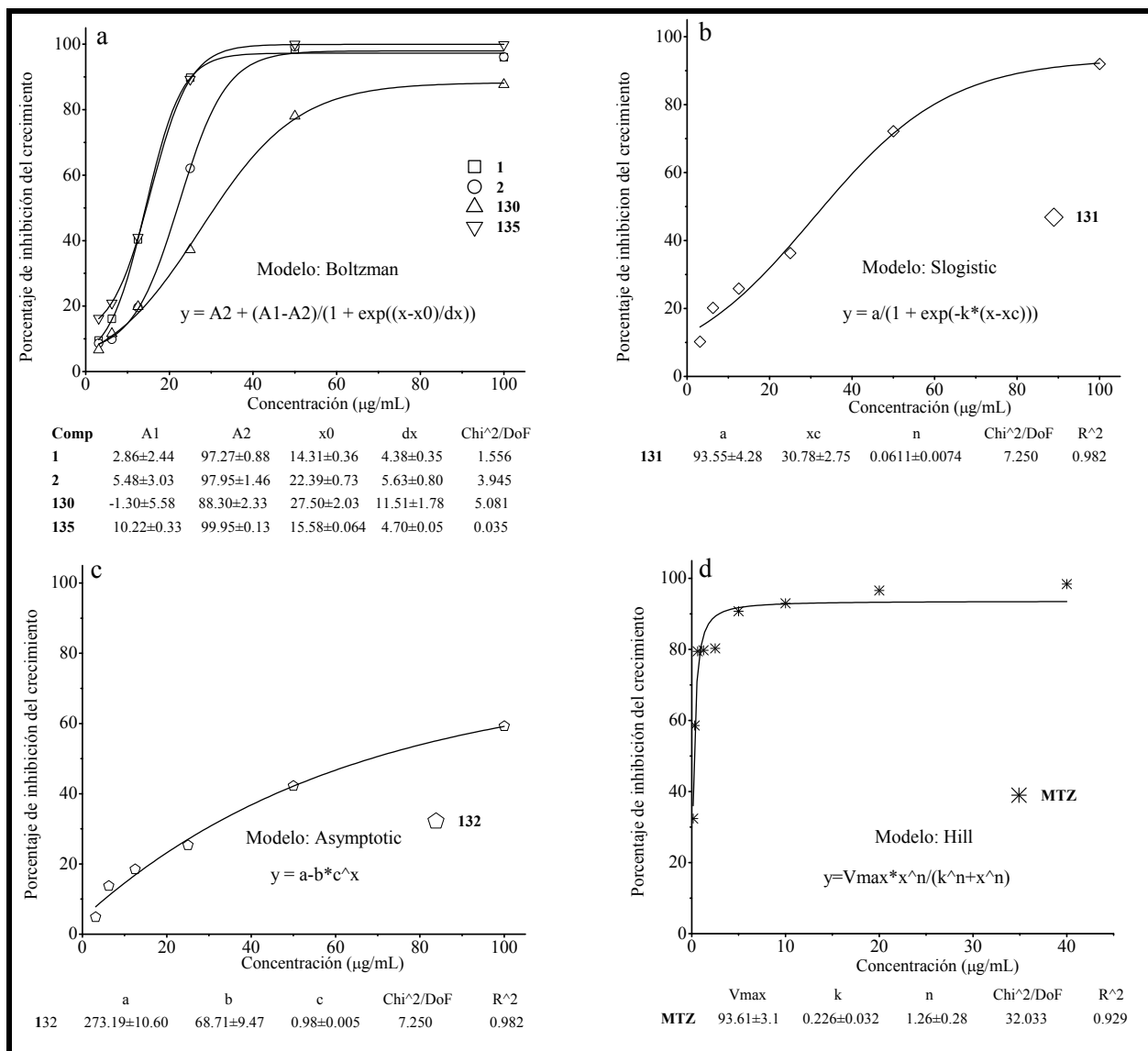


Figura 16. Efecto de la la concentración de los metabolitos de *H. inuloides* y el fármaco de referencia (MTZ) en el crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis*. Las ecuaciones describen las curvas con mejor ajuste obtenidos por regresión no lineal.

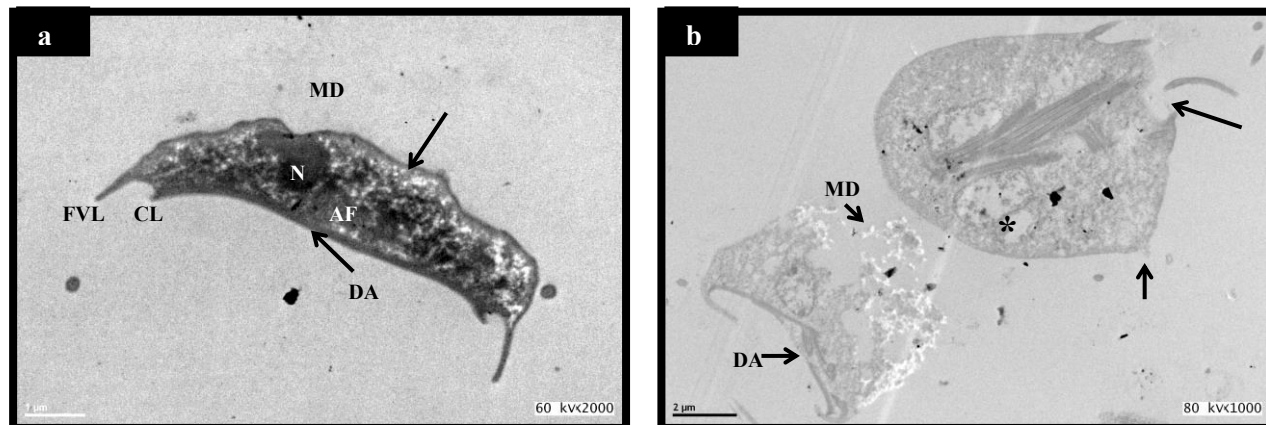


Figura 17. Microscopía electrónica de transmisión de trofozoítos de *Giardia intestinalis*. (a) grupo control. Se observa la integridad del disco adhesivo (DA), membrana dorsal (MD), núcleo (N) y axonemas flagelares (AF). Flanco ventrolateral (FVL), cresta lateral (CL), (b) trofozoítos expuestos a 50 µg/mL del compuesto 1.

Estos resultados revelan por primera vez la eficacia de los compuestos **1** (7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleño) y **135** (7-hidroxicalamenano) para inhibir el crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis*. Sin embargo, el mecanismo de acción implicado en la lisis y la muerte de las células de *Giardia* no se conoce aún, lo anterior pone en evidencia la necesidad de desarrollar estudios complementarios que permitan entender el mecanismo de acción de los compuestos.

5.9. Ensayo de toxicidad

5.9.1 Ensayo con *Artemia salina*

A partir de 1982 se introdujo el uso de larvas de *Artemia spp* en sustitución de los animales superiores para evaluar extractos de plantas, en la búsqueda de compuestos con actividad antitumoral y citotóxica [151]. Los resultados de las pruebas con *Artemia salina* se resumen en la Tabla 14. Puede observarse que los compuestos **1**, **2**, **17**, **135** y **136** exhibieron efectos tóxicos para las larvas de *Artemia salina* mostrando un comportamiento dependiente de la concentración (Figura 18). El resto de los compuestos evaluados no presentó efecto tóxico significativo.

Tabla 13. Toxicidad de los sesquiterpenos aislados de *H. inuloides*

Compuesto	% de larvas muertas			CI ₅₀ (μM)
	Dosis (μM)			
	1	10	100	
1	0	0	100	45.47±1.74
2	0	0	100	53.92±1.04
7	0	0	0	>100
13	0	0	0	>100
17	0	0	100	54.13±1.07
130	0	0	100	>100
131	0	0	0	>100
132	0	0	100	>100
133	0	0	0	>100
135	0	0	98	70.16±1.08
136	0	0	100	39.4±1.07
Control (K ₂ Cr ₂ O ₇)				385.6±1.07

Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes ± error estándar de la media ($\bar{x} \pm ES$). Los resultados de CI₅₀ fueron sujetos a un análisis de varianza seguido de una prueba de Dunnett. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) fueron considerados estadísticamente diferentes con respecto al control (K₂Cr₂O₇).

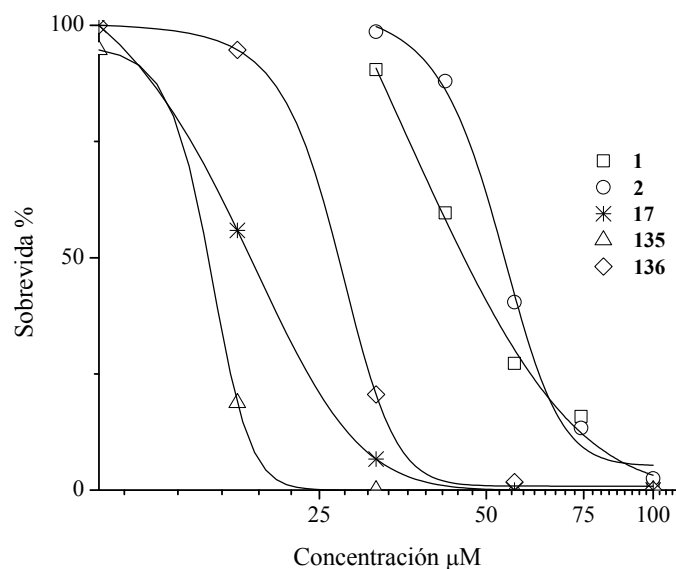


Figura 18: Curvas concentración-sobrevida de los compuestos **1**, **2**, **17**, **135** y **136** en larvas de *Artemia salina*.

5.9.2 Viabilidad celular en macrófagos

Los compuestos **1** y **2** y el derivado acetilado **132** produjeron una disminución en la viabilidad de los macrófagos a 25 µg/mL (Tabla 14). En el resto de los compuestos el porcentaje de células vivas cuantificadas empleando el método de MTT fue mayor al 75%. La modificación de la estructura molecular de los compuestos **1** y **2** modificó su efecto tóxico. La acetilación no modificó el efecto tóxico de **2**, sin embargo la esterificación de **1** y **2** con cloruro de benzoilo para formar los correspondientes derivados **131** y **133** disminuyó su efecto tóxico en los macrófagos.

Tabla 14. Efecto de los metabolitos de *H. inuloides* en la viabilidad de la línea celular de macrófagos RAW264.7

Compuesto (25 µg/mL)	% Viabilidad
1	4.0±0.5*
2	3.6±0.1*
7	92.5±7.5
5	100
23	100
27	89.7±10.3
28	79.6±0.1*
129	100
130	5.2±0.09*
131	100
132	3.7±0.06*
133	100
Ácido Oléico ^a	91.92±1.4

^a Control negativo. * $p < 0.05$ con respecto al control negativo.

5.9.3 Toxicidad aguda en ratón

Debido a la escasez del compuesto **2**, solamente se evaluó el potencial tóxico del compuesto **1** mediante el ensayo de toxicidad aguda oral en ratones cepa CD1 según el método descrito en la Guía N° 423 de la OCDE [152]. En el ensayo se administraron por vía oral dosis de 300 y 2,000 mg/kg de peso. La administración oral del 300 mg/kg no produjo signos de toxicidad, ni se observó muerte de los animales. Sin embargo, la

administración de 2,000 mg/kg del compuesto **1** dio lugar a una disminución de la actividad motora, disminución de los reflejos y respiración entrecortada, 1 h después apareció postración. Estos síntomas desaparecieron 4 h después. Al analizar la variación del peso corporal, durante el período de tratamiento, se observó un incremento similar entre el grupo tratado con 300 mg/kg y el grupo control, mientras que el grupo tratado con 2,000 mg/kg presentó una disminución en el peso corporal durante el período de prueba respecto al control (Figura 19). Al final del período de prueba la administración de 2,000 mg/kg produjo la muerte de 3 ratones. De acuerdo con estos resultados el compuesto **1** aislado a partir de las flores secas de *H. inuloides* se enmarca en la categoría 4 (300-2,000 mg/kg) del Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos y tendría una DL_{50} cercana a los 500 mg/kg de peso corporal [153].

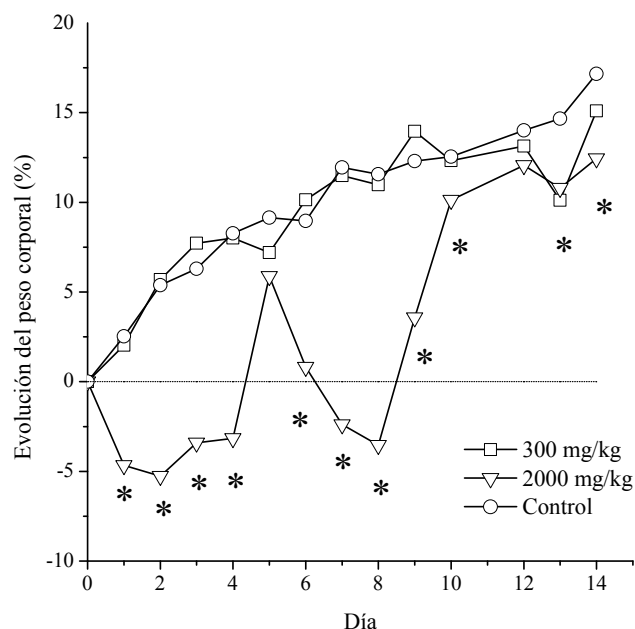


Figura 19: Efecto de la administración de dos dosis del 7- hidroxí-3,4-dihidrocadalenó (**1**) en el peso corporal de ratones

Las secciones de hígado de los animales del grupo control (grupo I) mostraron una histo-arquitectura típica con un arreglo normal de las células en los lóbulos del hígado con una vena central y cordones radiales hepáticos y sinusoides intactos (HE, ampliación 40X).

La microscopía reveló un citoplasma integro (Figura 20). En los grupo II y III (300 y 2000 mg/kg de peso corporal respectivamente) la microscopía óptica reveló distorsión en la arquitectura, la presencia de un infiltrado inflamatorio, compuesto de células mononucleares (células Kupffer), y vacuolización de los hepatocitos. No se observaron cambios morfológicos en los riñones de grupo de control, se observaron numerosos glomérulos, túbulos renales y tejido intersticial revelando una estructura histológica normal. El tratamiento con 300 mg/kg y 2000 mg/kg de peso causó una leve alteración en su estructura morfológica, además, se observó distensión de la cápsula de Bowman, siendo más evidente a una dosis de 2,000 mg/kg de peso corporal (Figura 20).

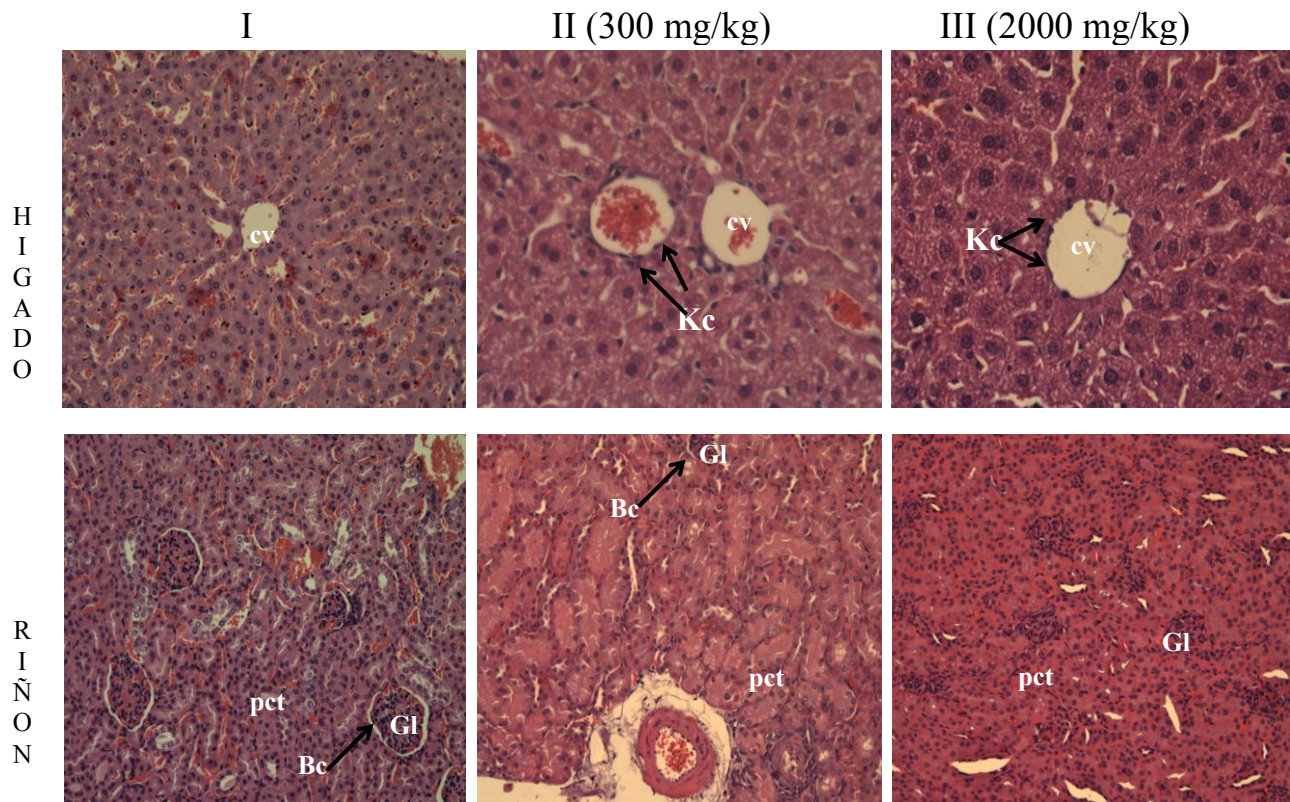


Figura 20. Cortes (5µm) de hígado y riñón de ratones administrados por vía oral con solución de electrolitos (I) y con 300 y 2000 mg/kg del compuesto **1** (II y III) obtenidas en el día 15 del tratamiento. Abreviatura: cv (vena central), Kc (células de Kupffer), Bc (cápsula de Bowman), Gl (glomérulo), pct (túbulo contorneado proximal), Secciones (5 mm) de hígado y riñón de ratones teñidas con HE (40X).

5.10. Ensayos para determinar la configuración absoluta

5.10.1 Obtención de derivados de Mosher

A partir de la reacción entre el compuesto **1** y con los cloruros *R* y *S*- del AMTFA [154] se obtuvieron los correspondientes ésteres de Mosher **138** y **139** (Figura 21). La comparación de los desplazamientos químicos de los ésteres *R*- y *S*- no reveló diferencias significativas (tabla 15). Lo anterior puede atribuirse a las libres rotaciones que pueden existir a lo largo de los enlaces σ del éster, lo cual no permite la diferenciación espectroscópica a temperatura ambiente. Debido a lo anterior se decidió realizar los espectros de RMN a baja temperatura (-40 °C, en CDCl₃), sin embargo, no fue posible observar diferencias que permitieran concluir acerca de la configuración del compuesto **1**.

Tabla 15. Datos de RMN ¹H (400 MHz) y ¹³C (100 MHz) en CDCl₃ de **138** y **139**

Posición	138		139	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	-	130.80	-	-
2	5.716 m	124.34	5.715 m	124.33
3	2.355 m	25.48	2.354 m	25.48
4	2.348 m	43.79	2.500 m	43.79
5	-	137.45	-	-
6	6.949 sa	131.38	6.947 sa	131.35
7	-	127.01	-	-
8	-	147.14	-	-
9	6.850 s	115.26	6.844 s	115.25
10	-	134.82	-	-
11	1.857 dq (J=7.0)	30.17	1.857 dq (J=7.0)	30.17
12	0.880 d (J=7.0)	20.24	0.879 d (J=7.0)	20.24
13	0.790 (J=7.0)	21.38	0.792 (J=7.0)	21.39
14	1.966 sq (J=2.0)	18.85	1.963 sq (J=2.0)	18.87
15	2.081 s	16.04	2.082 s	16.08
1'	-	165.06	-	-
2'	-	84.71	-	-
3'	-	123.33	-	-
4'	-	131.92	-	-
5', 9'	7.700 dd (J=6.0, 1.5)	127.47	7.701 m	127.46
6', 8'	7.465 dd (J=6.0, 6.0)	128.55	7.465 m	128.55
7'	7.465 m	128.82	7.465 m	128.82
10'	3.704 s	55.71	3.706 s	55.71

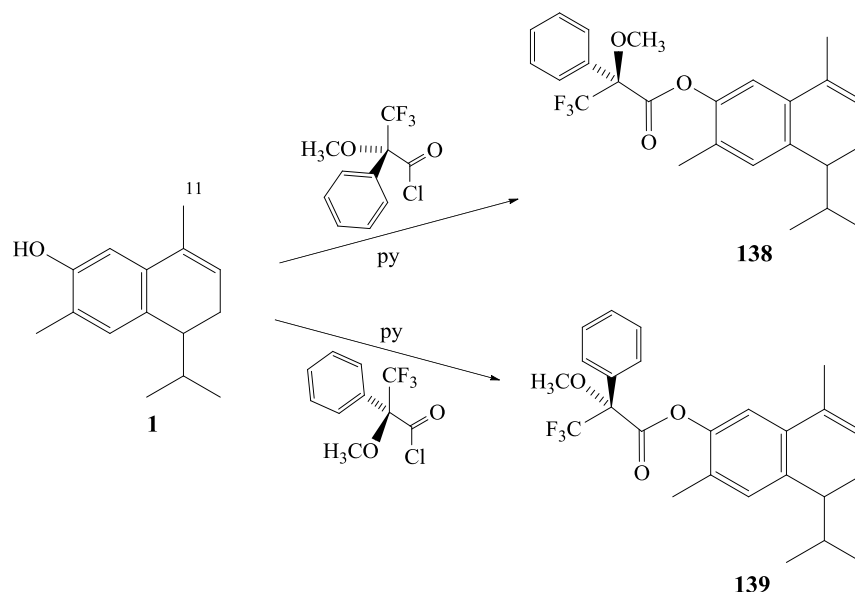


Figura 21. Reacción del 7-hidroxi, 3,4-dihidrocadaleño con los cloruros *R* y *S* del ácido α -metoxi- α -trifluorometilfenil acético (AMTFA) [154]

5.10.2 Análisis mediante dicroísmo circular

Para determinar la configuración absoluta de los compuestos **7** y **13** mediante el análisis de la curva de dicroísmo circular, se determinó primeramente su actividad óptica. El ácido 7-metil- α -hidroxi-calamen-15-oico (**13**) presentó actividad óptica, mientras que 2,6-dihidroxi-4,7-dimetil-3(4H)-naftalinona (**7**) no presentó actividad óptica, lo que implica que este último compuesto se encuentra como mezcla racémica, por lo que no procede la determinación de la configuración absoluta. Se aplicó la regla del benzoato [155] para diucidar la configuración absoluta del ácido 7-metil- α -hidroxi-calamen-15-oico (**13**). El arreglo espacial de la molécula utilizando este modelo (Figura 22) coincide con el espectro de dicroísmo circular en la cual se observa un efecto Cotton negativo corresponde a una configuración *R*. El aporte al signo está dado por el isopropilo (Figura 23).

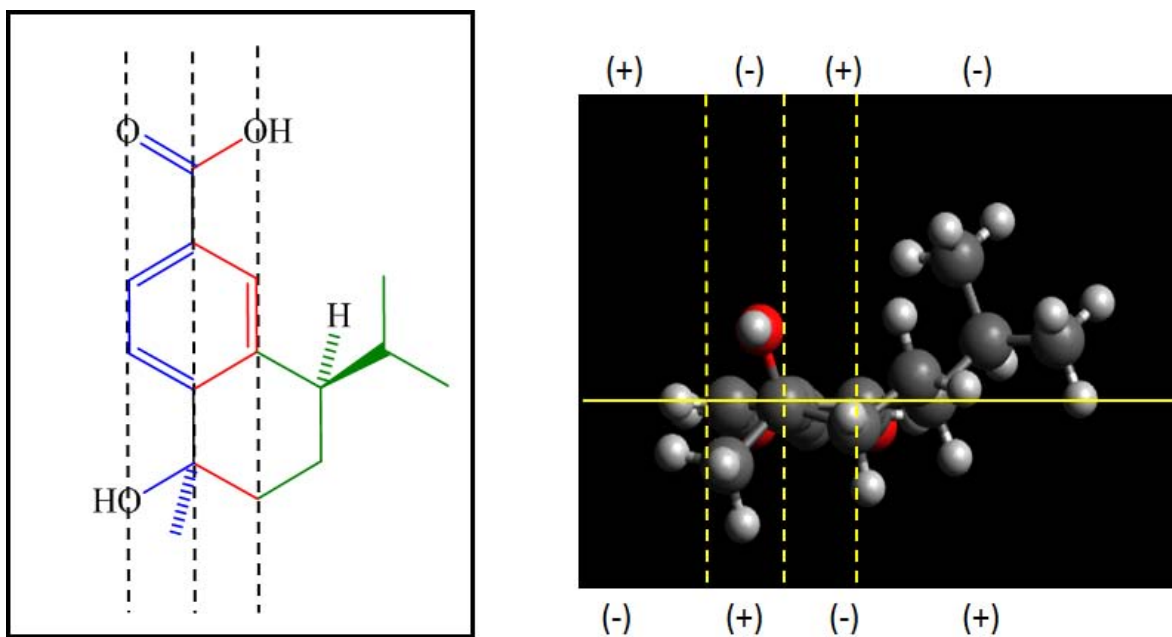


Figura 22. Representación esquemática del compuesto **13** (ácido 7-metil- α -hidroxicalamen-15-oico) en los espacios tridimensionales definidos por la regla del benzoato [155]

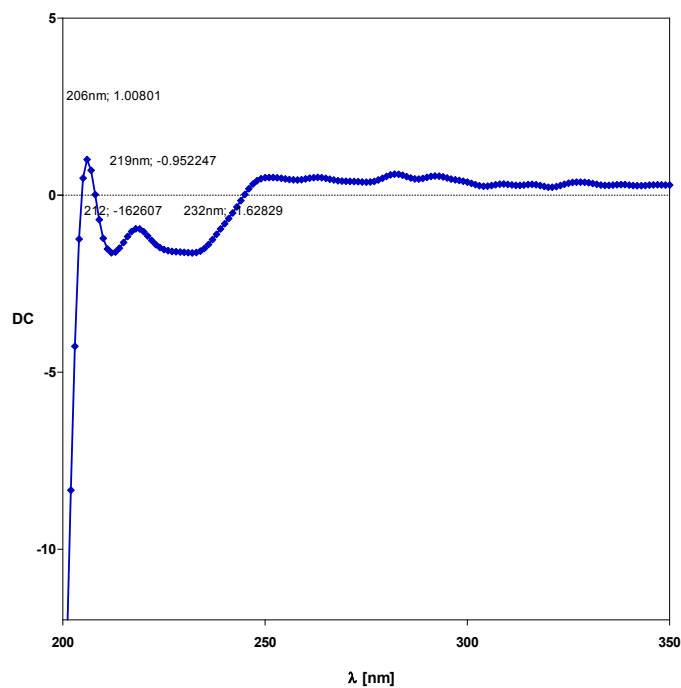


Figura 23. Espectro de dicroísmo circular para el compuesto **13** (ácido 7-metil- α -hidroxicalamen-15-oico)

5.11. Publicaciones

Artículo 1

In vitro activity of “Mexican Arnica” *Heterotheca inuloides* Cass natural products and some derivatives against *Giardia intestinalis*.

Autores: José Luis Rodríguez-Chávez, Yadira Rufino-González, Martha Ponce-Macotela, Guillermo Delgado.

Publicado en: *Parasitology*. 2015, 142(4): 576-84.

El trabajo hace referencia a la actividad anti $giardia$ de metabolitos y derivados semisintéticos de *Heterotheca inuloides* Cass (árnica). Los resultados dan apoyo científico al uso tradicional de esta planta para el tratamiento de trastornos gastrointestinales.

In vitro activity of 'Mexican Arnica' *Heterotheca inuloides* Cass natural products and some derivatives against *Giardia intestinalis*

JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ-CHÁVEZ¹, YADIRA RUFINO-GONZÁLEZ²,
MARTHA PONCE-MACOTELA² and GUILLERMO DELGADO^{1*}

¹Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D. F., México

²Laboratorio de Parasitología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700-C, 04530 México, D. F., México

(Received 16 June 2014; revised 5 September 2014; accepted 7 September 2014; first published online 3 November 2014)

SUMMARY

Giardiasis is a gastrointestinal disease that affects humans and other animals caused by parasitic protists of the genus *Giardia*. *Giardia intestinalis* (Syn. *Giardia lamblia*; *Giardia duodenalis*) infections can cause acute or chronic diarrhoea, dehydration, abdominal discomfort and weight loss. Metronidazole is the most widely used drug for treating giardiasis. Although effective, metronidazole has undesirable secondary effects. Plants used in traditional medicine as anti-diarrhoeals or antiparasitics may represent alternative sources for new compounds to treat giardiasis. *Heterotheca inuloides* Cass. (Asteraceae/Compositae) plant is widely used in Mexican traditional medicine. The following secondary metabolites were isolated from *H. inuloides* flowers: 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (**1**), 7-hydroxycadalene (**2**), 3,7-dihydroxy-3(4H)-isocadalen-4-one (**3**), 1*R*,4*R*-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydrocadalen-15-oic acid (**4**), quercetin (**5**), quercetin-3,7,3'-trimethyl ether (**6**), quercetin-3,7,3',4'-tetramethyl ether (**7**) and eriodictyol-7,4'-dimethyl ether (**8**). The activity of these compounds against *Giardia intestinalis* trophozoites was assessed *in vitro* as was the activity of the semisynthetic compounds 7-acetoxy-3,4-dihydrocadalene (**9**), 7-benzoxo-3,4-dihydrocadalene (**10**), 7-acetoxycadalene (**11**), 7-benzoxycadalene (**12**), quercetin pentaacetate (**13**) and 7-hydroxycalamenene (**14**). Among these, 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (**1**) and 7-hydroxycalamenene (**14**) were the most active, whereas the remaining compounds showed moderate or no activity. The *G. intestinalis* trophozoites exposed to compound **1** showed marked changes in cellular architecture along with ultrastructural disorganization. The aim of this study was to evaluate the giardicidal activity of selected *H. inuloides* metabolites and some semisynthetic derivatives using an *in vitro* experimental model of giardiasis.

Key words: *Heterotheca inuloides*, anti-giardial activity, cadinanes, flavonoids.

INTRODUCTION

Giardiasis is an illness caused by the flagellate protozoan *Giardia intestinalis*. This parasite is the most frequent enteric parasite both humans and domestic and wild animals (Feng and Xiao, 2011) and the infectious organism most associated with waterborne outbreaks of diarrhoea at day care centres, and with illnesses in international travellers (Okhuysen, 2001). *Giardia intestinalis* can cause both acute and chronic diarrhoea (Newman *et al.* 2001). *Giardia* species are endemic in most areas with poor sanitation and giardiasis is a public health problem, especially in developing countries (Kappus *et al.* 1994; Hollm-Delgado *et al.* 2008). In 2004 giardiasis was included in the WHO neglected diseases initiative (WHO, 2004; Savioli *et al.* 2006). The mode of transmission of this parasite is in the cyst form via contaminated food and water (Dawson, 2005; Daly *et al.* 2010), and ingestion of as few as 10 *Giardia* cysts may be enough

to cause infection (Yoder *et al.* 2012). Giardiasis can be asymptomatic or symptomatic (Prado *et al.* 2005; Nikolić *et al.* 2011). Patients with symptomatic giardiasis have acute or chronic diarrhoea, anorexia, abdominal pain, intestinal malabsorption and weight loss. There may be other non intestinal manifestations as well, such as eye pain, arthralgia, allergic reactions and urticaria (Müller and von Allmen, 2005; Buret, 2007; Mörch *et al.* 2009). In Mexico a total of 10 650 new cases of giardiasis were reported in 2012 (Secretaría de Salud, 2013). Metronidazole (MTZ) is the drug most commonly used to treat giardiasis (Busatti *et al.* 2009; Solaymani-Mohammadi *et al.* 2010). Although effective, MTZ has undesirable side effects such as nausea, stomachache, anorexia and a metallic taste in the mouth (Misra *et al.* 1995). There are additional reports of adverse effects on the nervous system, including encephalopathy, peripheral neuropathy, headache, confusion, vertigo, depression, optic neuritis and blindness (Bradley *et al.* 1977; Heaney *et al.* 2003; McGrath *et al.* 2007). MTZ is mutagenic in laboratory animals (Bendesky *et al.* 2002), treatment failure occurs in up to 20% of

* Corresponding author. Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D. F., México. E-mail: delgado@unam.mx

cases, in laboratory studies *Giardia* can readily acquire laboratory-induced resistance to MTZ and cross-resistance to other 5-nitroimidazole drugs (Upcroft and Upcroft, 2001; Lopez-Velez *et al.* 2010; Tejman-Yarden *et al.* 2011). More recently, the FDA approved a new thiazolideantiparasitic agent, nitazoxanide, for the treatment of diarrhoea caused by *Cryptosporidium* species and *Giardia intestinalis*. Nitazoxanide has eradication rates of over 70% for *G. intestinalis* in clinical studies (Romero *et al.* 1997; Abaza *et al.* 1998; Escobedo *et al.* 2008). There are alternative therapies for the treatment of giardiasis, but in many cases these are less effective than 5-nitroimidazoles (Gardner and Hill, 2001). Medicinal plants could be a source of new antiprotozoal drugs. Several plants used in Mexican traditional medicine, such as *Lippia* spp., *Justicia spicigera*, *Geranium mexicanum*, *Dorstenia contrajerva*, *Senna villosa*, *Ruta chalepensis*, *Psidium guajava*, *Punica granatum*, *Mangifera indica*, *Plantago major*, *Castela tortuosa* and *Haematoxylum campechianum*, show activity against *Giardia* (Ponce-Macotela *et al.* 1994, 2001, 2006; Calzada *et al.* 2005, 2006). *Heterotheca inuloides* (common name: Mexican arnica) is a plant that belongs to the *Asteraceae* family and is widely distributed in Mexico (Calderón and Rzedowski, 2005; Martínez *et al.* 2006; Semple, 2008). An infusion of dried flowers has been used to treat contusions (Lozoya *et al.* 1987; Hersch-Martínez, 1997), colic, muscular pain, skin inflammation and wounds (Andrade-Cetto, 2009). For internal administration, the flowers are boiled in water and consumed as tea. For external administration, the plant is applied to unbroken skin as a cream or ointment (González-Stuart, 2010). Several types of compounds have been isolated from this plant, including cadinane-type sesquiterpenes, phenolic compounds and phyosterols. Extracts and some metabolites have demonstrated antimicrobial, antifungal (Kubo *et al.* 1994; Castillo-Juárez *et al.* 2008; Rosas-Piñón *et al.* 2012), anti-inflammatory (Segura *et al.* 2000; Delgado *et al.* 2001) and cytotoxic activity (Villarreal *et al.* 1992; Kubo *et al.* 1996). The aim of this study was to evaluate the giardicidal activity of selected *H. inuloides* metabolites and some semisynthetic derivatives using an *in vitro* experimental model of giardiasis. We also used electron microscopy to investigate their effects on the morphology and ultrastructural organization of *G. intestinalis*.

MATERIALS AND METHODS

Giardia isolate (WB)

The reference strain WB (American Type Culture Collection 30957) was provided by Dr G. Ortega (Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Mexico). This strain was originally isolated from 27-year-old white American patient with chronic

diarrhoea infected in Afghanistan (Smith *et al.* 1982). First genome of *Giardia WB* was published in 2007 (Morrison *et al.* 2007) and recently, chromosome-wide maps were established by optical mapping (Perry *et al.* 2011). Trophozoites were grown in axenic culture at 37 °C in TYIS-33 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and bovine bile (Keister, 1983). Log phase (48–72 h) cultures were harvested by cooling the culture vials at 4 °C for 15 min and centrifuging them (5 min at 3500 rpm). The trophozoites were counted in a haemocytometer (Neubauer cell-counter chamber) and used in experiments.

Plant material

Dried flowers of *H. inuloides* Cass was provided by Mixim Laboratories (Mexico). Plant material was collected in 2010, in the town of Mesas Altas de San Juan Xoconusco, municipality of Donato Guerra (State of Mexico). The plant material was authenticated by MS Abigail Aguilar-Contreras and a voucher was deposited in the Medicinal Plant Herbarium of the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, Mexico City), where the voucher specimen is conserved under reference code number IMSSM-16064.

Extraction and fractionation of constituents

Dried and powdered plant material (10 kg) was extracted with acetone at room temperature (3 times/24 h), to afford, after evaporation of the solvent, 450 g of residue. The residue was purified by vacuum liquid chromatography (VLC) (Coll and Bowden, 1986; Delgado *et al.* 2001) using hexane and mixtures of hexanes–EtOAc. The fractions (1 L each) were monitored by thin layer chromatography (TLC) and pooled into 9 (A–I) fractions according their similarity. Fraction A (86 g, eluted with hexanes–EtOAc, 9:5:0:5) was rechromatographed by VLC, and some fractions were further chromatographed on Si gel to afford 2.682 g of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (**1**) mp 100–103 °C [lit. 103.5 °C] (Bohlmann and Zdero, 1976); Rf 0.5 (n-hexanes–EtOAc, 8:2)], and 520 mg of 7-hydroxycadalene (**2**) mp 117–118 °C [lit. 118–119 °C], (Gallagher and Sutherland, 1965); Rf 0.43 (hexanes–EtOAc, 8:2). Fraction D (9 g) was purified by successive VLC on silica gel (hexanes–EtOAc gradient) to afford 3,7-Dihydroxy-3(4H)-isocadalen-4-one (**3**) (205 mg) mp 200–202 °C [lit. 198–200 °C] (Delgado *et al.* 2001); Rf 0.32 (n-hexanes–EtOAc, 7:3) and 24.5 mg of eriodictyol-7,4'-dimethyl ether (**8**), mp 168–170 °C; Rf 0.45 (n-hexanes–EtOAc, 6:4). The melting point of this compound agrees with data from literature [165–168 °C] (Vasconcelos *et al.* 1998). Fraction E was chromatographed using VLC with mixtures of hexanes–EtOAc to afford 15 mg of

Table 1. ^1H (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) spectral data for compounds **9**, **10**, **11** and **12** (CDCl_3 , δ)

Position	9		10		11		12	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	–	136.6	–	136.7	–	129.9	–	131.6
2	5.69	123.8	5.72	123.9	7.24	125.7	7.31	126.3
3	2.35	25.28	2.39	25.5	7.26	121.2	7.28	121.2
4	2.35	43.60	2.39	43.8	–	29.70	–	142.1
5	6.94	130.82	7.01	133.4	7.99	126.3	7.79	128.7
6	–	127.2	–	129.6	–	132.4	–	129.9
7	–	147.56	–	147.9	–	147.5	–	147.7
8	6.82	115.9	6.99	116.2	7.63	116.3	8.06	116.5
9	–	134.7	–	131.0	–	131.5	–	133.5
10	–	127.0	–	127.3	–	128.5	–	125.7
11	1.97	18.8	2.00	18.9	2.61	19.3	2.64	19.3
12	1.87	30.2	1.92	30.2	3.69	28.4	3.74	28.4
13	0.88	20.1	0.92	21.2	1.39	23.6	1.44	23.6
14	0.81	21.31	0.85	20.2	1.38	23.6	1.42	23.6
15	2.14	15.85	2.22	16.0	2.39	17.0	2.46	17.2
1'	–	169.3	–	165	–	169.6	–	165.2
2'	2.32	20.8	–	131.2	2.40	20.9	–	129.6
3'	–	–	8.24	130.1	–	–	8.32	130.2
4'	–	–	7.54	128.5	–	–	7.58	128.6
5'	–	–	7.66	134.7	–	–	7.70	132.5
6'	–	–	7.54	128.5	–	–	7.58	128.6
7'	–	–	8.24	130.1	–	–	8.31	130.2

quercetin-3,7,3',4'-tetramethyl ether (**7**) mp 150–152 °C [lit. 148–150 °C] (de la Torre *et al.* 2004); Rf 0.29 (n-hexanes–EtOAc, 6:4). Fraction F (17.5 g, eluted with n-hexanes–EtOAc, 8:2) was chromatographed using VLC with mixtures of hexanes–EtOAc to afford 48.5 mg of (1*R*,4*R*)-1-hydroxy-4H-1,2,3,4-tetrahydrocadalen-15-oic acid (**4**), mp 198–200 °C [lit. 203–205 °C] (Delgado *et al.* 2001); Rf 0.29 (n-hexanes–EtOAc, 6:4), and 17 mg of quercetin-3,7,3'-trimethyl ether (**6**), mp 170–172 °C [lit. 168–170 °C] (Ali *et al.* 2008); Rf 0.30 (n-hexanes–EtOAc, 6:4). Fraction G (127.5 mg, eluted with hexanes–EtOAc, 6.5:3.5) was rechromatographed using VLC with mixtures of hexanes–EtOAc to afford 3.110 g of quercetin (**5**), mp greater than 300 °C [lit. 309–311 °C] (Dutta *et al.* 2007); Rf 0.68 (Isopropyl alcohol–water, 3:2). The identification of the isolated compounds was determined by comparison of the spectroscopic and spectrometric data with those published previously and confirmed by direct comparison with authentic samples from our laboratory (Delgado *et al.* 2001).

Esterification

Compounds 7-acetoxy-3,4-dihydrocadalene (**9**), 7-acetoxycadalene (**11**) and quercetin pentaacetate (**13**) (Picq *et al.* 1982) were obtained by treating the natural products **1**, **2** and **5**, respectively, with acetic anhydride and pyridine at room temperature. Compounds 7-benzoxy-3,4-dihydrocadalene (**10**)

and 7-benzoxy-3,4-dihydrocadalene (**12**) were obtained by treating **1** and **2** with benzoyl chloride and pyridine. Product formation was monitored by TLC using n-hexane–EtOAc (8.5:1.5) as elution solvent system. The reactions were stopped by adding ice. After 1 h of stirring the reaction mixture was extracted 3 times with EtOAc. The combined organic phases were treated first with 10% HCl, then with a saturated solution of NaHCO_3 , and finally with saturated NaCl. The organic layer was dried with anhydrous sodium sulphate and concentrated under vacuum. The resulting residue was chromatographed on a silica gel column using a n-hexane–EtOAc gradient elution system to afford derivatives **9**, **10**, **11**, **12** and **13** in 86, 82, 83, 80 and 81% yield, respectively. **9**–**12** are novel compounds that have not been reported previously in the literature.

7-acetoxy-3,4-dihydrocadalene (**9**): oily substance; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -44.4 (*c* 0.1, MeOH); IR (KBr) ν max 3552, 2962, 2931, 2862, 1720, 1600, 1580, 1491, 1463, 1381, 1290, 1233, 1222, 1216, 1128, 1074, 1037, 956, 918 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR see Table 1, EIMS m/z 258 $[\text{M}]^+$ (9), 215 (10), 214 (5), 199 (5), 186 (4), 174 (16), 173 (100), 172 (9), 158 (14), 155 (5), 128 (5), 115 (3). HRFABMS m/z 258.1621 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_2$, 258.1620). 7-benzoxy-3,4-dihydrocadalene (**10**): oily substance; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -28 (*c* 0.1, MeOH); IR (KBr) ν max 3030, 2960, 2928, 2871, 1732, 1602, 1567, 1495, 1452, 1382, 1261, 1175, 1130, 1084, 1066, 1026, 900 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR see Table 1, EIMS m/z 320 $[\text{M}]^+$ (5), 277 (7), 175 (3), 106 (6), 77 (13). HRFABMS m/z 320.1770 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_2$, 320.1776). 7-acetoxycadalene

(**11**): colourless needles (EtOAc/hexane), mp 68–70 °C; IR (KBr) ν max 3073, 3037, 3021, 2966, 2929, 2869, 1750, 1464, 1441, 1236, 1149, 1126, 1041, 1017, 914 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR see in Table 1, EIMS m/z 256 $[\text{M}]^+$ (20), 215 (15), 214 (55), 184 (13), 169 (6), 155 (7), 153 (6), 128 (5). HRFABMS m/z 256·1466 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_2$, 258·1463). 7-benzoxycadalene (**12**): colourless needles (EtOAc/hexane), mp 138–140 °C; IR (KBr) ν max 2962, 2924, 2862, 1734, 1599, 1508, 1447, 1381, 1317, 1266, 1241, 1149, 1062, 1024, 714 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR see Table 1, EIMS m/z 318 $[\text{M}]^+$ (35), 303 (3), 170 (9), 128 (3), 155 (9), 141 (100), 128 (3), 77 (25). HRFABMS m/z 318·1628 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_2$, 318·1620).

Hydrogenation

Compound **1**, which is (4*R*)-7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (36 mg, 0·163 mmol), was dissolved in 6 mL of ethyl acetate in a 50 mL flask. The flask was sealed with a septum and the air was replaced with argon. The catalyst (10% Pd/C, 4 mg) was added, and the flask was placed in the hydrogenation equipment. The system was purged with H_2 to replace the argon. The mixture was stirred at 25 °C for 2 h and the reaction progress was monitored by TLC using n-hexane–EtOAc (8·5:1·5). The reaction mixture was purified using a silica gel chromatography column, using a n-hexane–EtOAc gradient to afford compound **14** in 93% yield, whose enantiomer was previously reported (Pereira *et al.* 2011).

Bioassays

The *in vitro* assays were performed as follows. All compounds were dissolved in DMSO. Serial dilutions (100, 50, 25, 12·5, 6·25 and 3·125 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared in TYIS-33 medium in 96-well plates, and 1×10^5 *G. intestinalis* trophozoites were added for a final volume of 300 μL (0·4% v/v DMSO) of final volume. Wells without compounds (0·4% DMSO alone) served as negative controls. In addition, the susceptibility of trophozoites to MTZ (40, 20, 10, 5, 2·5 and 1·25, 0·6125, 0·312, 0·156 $\mu\text{g mL}^{-1}$) also was quantified. Trophozoites were incubated for 24 h at 37 °C. After the incubation period, the culture medium was removed by inverting the plate and shaking it gently and the trophozoites were fixed with methanol and stained with 0·1% methylene blue for 10 min. The plate was washed and incubated for 20 min with HCl 0·1M, the dye removed and the absorbance was determined at 655 nm (Houkong *et al.* 2011). Growth inhibition was calculated as a percentage by comparison with negative controls (Rufino-González *et al.* 2012). Each experiment was performed six times.

Transmission electron microscopy

Giardia trophozoites treated with compound **1** (7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene at 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and negative control trophozoites (no compounds) were fixed in 3% glutaraldehyde buffered with phosphate buffer saline (0·1 M, pH 7·2), post-fixed in osmium tetroxide (1%) and dehydrated in an ethanol series. The samples placed in propylene oxide and embedded in EPON resin, were incubated at 60 °C for 48 h. Thin sections (60–90 nm) were cut with an ultramicrotome (Reichert-JungLeica, GmbH, Heidelberg, Germany), mounted on Formvar-coated copper grids and counter stained with uranyl nitrate and lead citrate. For each sample, structural changes were examined in 50 fields using a Jeol 1200EXII transmission electron microscope (Jeol Ltd, Tokyo, Japan).

Statistics

Percentage of dead trophozoites were plotted against concentration. The curves obtained were analyzed by Origin 8 software (OriginLab Co., Northampton, Massachusetts). The 50% (IC_{50}) and 90% (IC_{90}) were determined by graphic extrapolation of the concentration–response curves using a nonlinear regression analysis. Standard error of the mean were calculated from data of six experiments.

RESULTS

Compounds **1–8** were isolated from *H. inuloides* flowers. The identities of the natural compounds were confirmed by comparing their spectroscopic data with those published in the literature and by direct comparison with authentic samples previously isolated in our laboratory (Delgado *et al.* 2001). Four novel compounds were synthesized by conventional esterification procedures: 7-acetoxy-3,4-dihydrocadalene (**9**), 7-benzoxy-3,4-dihydrocadalene (**10**), 7-acetoxycadalene (**11**) and 7-benzoxycadalene (**12**). The known compounds quercetin pentaacetate (**13**) and 7-hydroxycalamenene (**14**) (Fig. 1) were obtained from **5** and **1**, respectively, by conventional chemical methods. Their structures were determined by ^1H and ^{13}C NMR, HRMS, IR and UV spectroscopic analyses. The ^1H and ^{13}C NMR data for **9–12** were consistent with the expected changes due to esterification and are shown in Table 1. In particular, the ^1H NMR signals of the new acetyl groups (in **9** and **11**) were evident by the appearance of the signals at 2·32 and 2·40 ppm, respectively, corresponding to the methyl protons, and at 20·8 and 20·9 ppm for methyl carbons in ^{13}C NMR experiments. For compounds **10** and **12** the signals of the carbonyl group appeared at 165·0 and 165·2 ppm, respectively, in the ^{13}C experiments, and the appearance of the

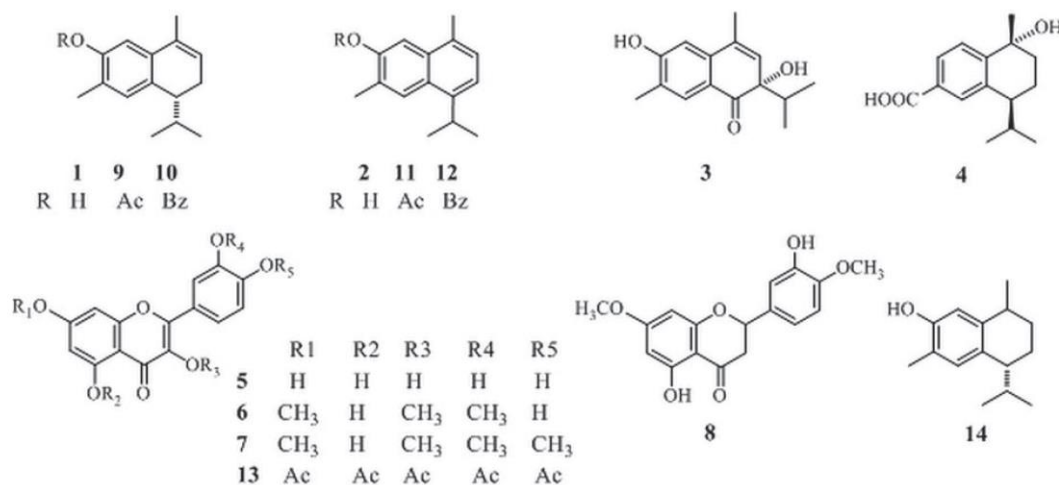


Fig. 1. Natural products isolated from *H. inuloides* and semisynthetic derivatives that were assayed for activity against *Giardia intestinalis*.

Table 2. Antigiardial activity of *H. inuloides* metabolites and derivatives^a

Compound	$\mu\text{g mL}^{-1}$	
	IC ₅₀ ± SEM ^b	IC ₉₀ ± SEM ^b
7-hydroxy-3,4-dihydrocandalene (1)	15.3 ± 1.98	23.69 ± 2.29
7-hydroxycandalene (2)	22.96 ± 2.31	32.51 ± 3.25
7-acetoxy-3,4-dihydrocandalene (9)	28.81 ± 2.82	50.34 ± 9.7
7-benzoxy-3,4-dihydrocandalene (10)	64.42 ± 18.24	> 100
7-acetoxycandalene (11)	35.5 ± 5.1	72.84 ± 10.26
7-hydroxycalamenene (14)	13.5 ± 0.83	24.21 ± 5.35
Metronidazole ^c	0.281 ± 0.064	3.05 ± 0.758

^a Results are expressed as mean (*n*=6).

^b Standard error of the mean.

^c Positive control.

corresponding aromatic signals were in agreement with the structures.

A colorimetric assay was used to evaluate the *in vitro* anti-giardial activity of compounds isolated from *H. inuloides* flowers as well as the activity of synthesized compounds. Cadinane-type compounds, but not flavonoid-type compounds, showed activity against *Giardia* trophozoites. Compounds 7-hydroxy-3,4-dihydrocandalene (**1**) and 7-hydroxycalamenene (**14**) displayed the best anti-giardial activity at IC₅₀ and IC₉₀ (Table 2). Compounds 7-hydroxycandalene (**2**), 7-acetoxy-3,4-dihydrocandalene (**9**), 7-acetoxycandalene (**11**), and 7-benzoxycandalene (**12**) only achieved similar activity levels at concentrations two to four times the of compounds **1** and **14**. Compounds 3,7-dihydroxy-3(4H)-isocandalen-4-one (**3**), and (1*R*,4*R*)-1-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydrocandalen-15-oic acid (**4**) showed no significant anti-giardial activity (Table 2).

Nonlinear regression of concentration–response curves showing different behaviours were described by four equations (Fig. 2). Concentration–response curves for compounds **1**, **2**, **9** and **14** showed a sigmoid pattern described by the Boltzmann equation (Fig. 2a), and particularly, **1** and **14** produced around 90% death in trophozoites at 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Compounds **10** and **11** showed Slogistic and asymptotic curves, respectively (Fig. 2b and c). The concentration–response curve obtained by the inhibitory effect of MTZ upon *Giardia* trophozoites displayed a rapid increase in mortality of trophozoites at low concentrations (Fig. 2d). The behaviour of MTZ was consistent with previous reports in the literature (Busatti and Gomes, 2007).

After 24 h in the *in vitro* activity assay, untreated trophozoites showed morphology that was normal for *Giardia*, as shown in Fig. 3a; undamaged cytoplasmic membranes, adhesive discs, a nucleus and flagellar axonemes. Compounds **1** (7-hydroxy-3,4-dihydrocandalene) and **14** (7-hydroxycalamenene) had anti-*Giardia* activity *in vitro*; consistent with this there were alterations in the cell membrane that caused irreversible damage to the cellular structure. Trophozoites exposed to 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (230 μM) of 7-hydroxy-3,4-dihydrocandalene (**1**) showed increased volume, vacuoles in the cytoplasm, dense material accumulated around the edges of the nuclei, adhesive disc fragmentation and lateral membrane disruption (Fig. 3b).

DISCUSSION

Giardiasis is currently treated mostly with nitroimidazoles, primarily MTZ and other drugs such as albendazole, nitazoxanide, paromomycin and nitrofurans (Gardner and Hill, 2001; Müller and von Allmen, 2005). However, many of these drugs have

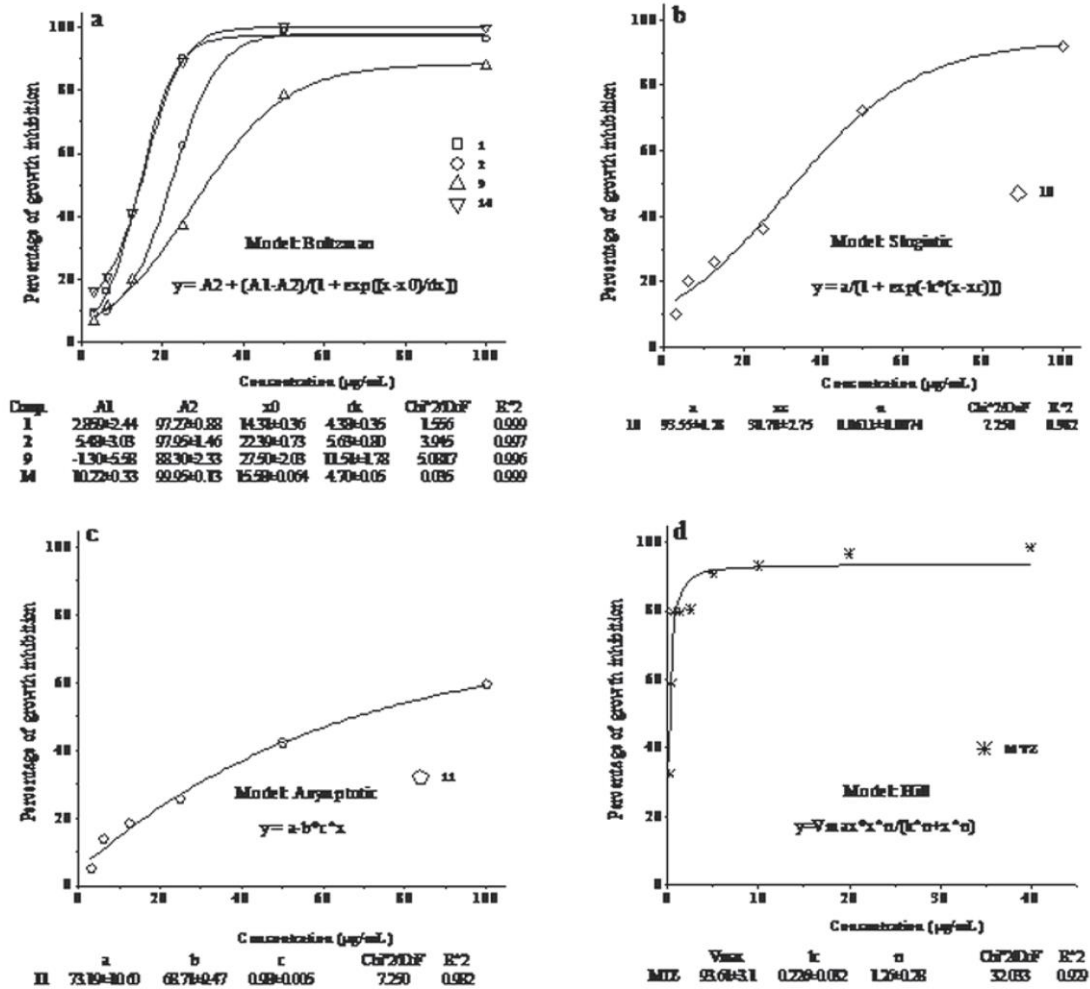


Fig. 2. Effect of *H. imuloides* metabolites and drug reference (MTZ) concentration upon the growth of trophozoites of *G. intestinalis*. The equations describe the best fit curves obtained by nonlinear regression.

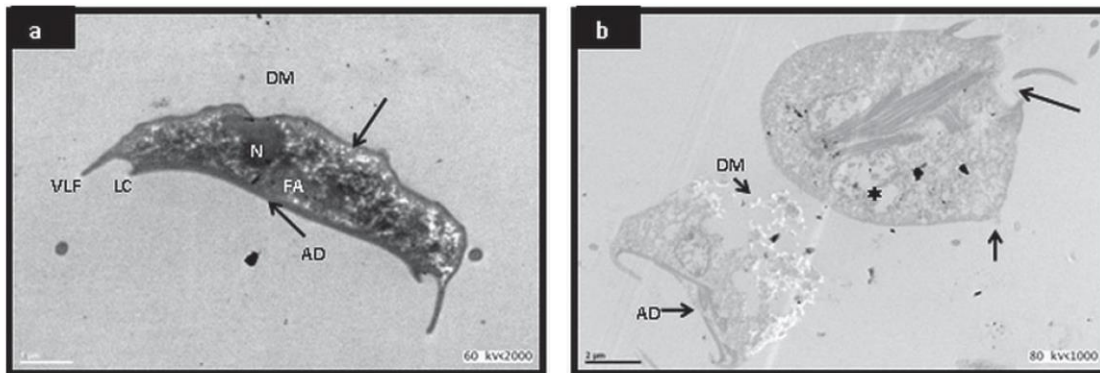


Fig. 3. Transmission electron microscopy of *G. intestinalis* trophozoite in (a) the negative control group (no treatment). A coronal view of a trophozoite shows the integrity of the adhesive disc (AD), dorsal membrane (DM), nucleus (N) and flagellar axonemes (FA). The ventrolateral edge (VLE) and lateral crest (LC) are shown for the ventral disc; (b) exposed to 50 µg mL⁻¹ of compound 1. The trophozoite showed structural changes, an increase in volume, dorsal membrane destruction (DM) and adhesive disc fragmentation (AD). The ventral region of the trophozoite has a large vacuole near the nucleus (*). Rupture of the cytoplasmic membrane (short arrow) and loss of cytoplasmic material in the caudal region.

side effects and non-negligible failure rates (Gardner and Hill, 2001; Müller and von Allmen, 2005). The failure rates reflect the need for more alternatives for treating giardiasis. Several experimental studies have investigated the effects of medicinal plants used to treat the gastrointestinal disorders against *Giardia* trophozoites. These studies have evaluated more than 100 natural products from diverse plant species. Such products fall into the following main chemical groups: flavonoids, triterpenes, alkaloids and sesquiterpenes. Other compounds have been tested, but to a lesser extent (Amaral *et al.* 2006). Several Mexican plants have been evaluated as remedies for *Giardia* (Calzada *et al.* 1998, 2006; Arrieta *et al.* 2001; Peraza-Sánchez *et al.* 2005; Barbosa *et al.* 2007).

Several methods can be used to evaluate the bio-activity of isolated compounds including: cell morphology assays, trophozoite adhesion, radiolabeling and direct counting. These are laborious and time consuming, and also depend on the observer's experience. We evaluated the giardicidal activity of *H. imuloides* metabolites and some derivatives in an experimental *in vitro* assay involving a methylene blue-based colorimetric method. This method is convenient and reliable and has been used previously to assess the anti-giardial activity of drugs (Busatti *et al.* 2009; Hounkong *et al.* 2011). The results showed that cadinane-type compounds had activity against *Giardia*. In particular, compounds 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (**1**) and 7-hydroxycalamene (**14**) significantly reduced the survival of the *G. intestinalis* trophozoites *in vitro*. Although several compounds isolated from *H. imuloides* have anti-inflammatory activity (Delgado *et al.* 2001) and it has been found that the 7-hydroxycalamene shows activity against *Leishmania chagasi* promastigotes with a minimum inhibitory concentration of $15.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Rodríguez *et al.* 2013), this is the first report that **1** and **14** can act as anti-giardial agents.

Modification of the molecular structure of the compounds changed their *in vitro* activity. Specifically the aromaticity of ring B decreased the activity of compound **2** and its derivatives with respect to compound **1**. Esterification of the hydroxyl residue at position 7 in compounds **1** and **2** decreased their anti-giardial activity. Hydrogenation product **14** showed anti-giardial activity as strong as that of compound **1**. Acetylated derivatives showed slightly better activity than benzoylated ones, possibly due to steric hindrance in the latter.

Previous studies reported that some flavonoids inhibit the growth of trophozoites of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* (Calzada *et al.* 1998). Another study observed that kaempferol had a strong activity; to a lesser extent, so did quercetin flavonoids isolated from *Cuphea pinetorum*, plant used by the Tzotzil and Tzeltal communities in Mexico as anti-diarrhoeals and to treat dysentery, and they show activity against *Giardia* (Calzada 2005).

The antiprotozoal activity of flavonol glycosides isolated from *Helianthemum glomeratum* showed that tiliroside was the most potent anti-amoebic and anti-giardial compound (Calzada and Alanís, 2007). However, the antiprotozoal activity of flavonoids was moderate in an evaluation of flavonoids isolated from *Mimosa tenuiflora* (Bautista *et al.* 2011). In the present study the tested flavonoids did not show significant anti-giardial activity.

This is the first study to evaluate the activity of the natural products and derivatives of *H. imuloides* against *Giardia* trophozoites. The transmission electron microscopy results revealed that trophozoites of *G. intestinalis* treated with *H. imuloides* metabolites showed marked changes in cellular architecture accompanied by ultrastructural disorganization (Fig. 3b). *Giardia intestinalis* is a protozoan with a two-stage life cycle, i.e. the trophozoite and cyst stages, the trophozoite is the cause of giardiasis in patients and asymptomatic carriers. This protozoan divides asexually; making it important in the *in vitro* assays that the population is completely killed, eliminating the possibility that the organism population will rebound after a short time.

The present study evaluated the anti-giardial activity of *H. imuloides* flower constituents and of some semisynthetic derivatives. It demonstrated the *in vitro* anti-giardial efficacies of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene and 7-hydroxycalamene. However, the mechanism of action involved in the lysis and death of *Giardia* cells is not yet known, therefore, complementary studies are needed to clarify the mechanism of action of the compounds.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Chem. J. Ebrard (Laboratorios Mixim) for providing the plant material and Dr G. Ortega (Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional) for providing the *Giardia intestinalis* isolate (WB). We also thank M. I. Chávez, B. Quiroz, R. Patiño, R. Gaviño, L. Velasco, J. Pérez, A. Peña, E. Huerta, Instituto de Química, UNAM for technical assistance.

FINANCIAL SUPPORT

J.L.R.-Ch. thanks CONACyT (México) and Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (UNAM) for scholarship for doctoral studies. We acknowledge UNAM-DGAPA-PAPIIT (Project IG200514) and CONACyT (Project 102158) for support.

REFERENCES

- Abaza, H., El-Zayadi, A., Kabil, S.M. and Rizk, H. (1998). Nitazoxanide in the treatment of patients with intestinal protozoan and helminthic infections: a report on 546 patients in Egypt. *Current Therapeutic Research* **59**, 116–121.
- Ali, H.A., Chowdhury, A.K., Rahman, A.K., Borkowski, T., Nahar, L. and Sarker, S.D. (2008). Pachypodol, a flavonol from the leaves of *Calycopteris floribunda*, inhibits the growth of CaCo 2 colon cancer cell line *in vitro*. *Phytotherapy Research* **22**, 1684–1687.

In vitro activity of *Heterotheca inuloides*

- Amaral, F. M. M., Ribeiro, M. N. S., Barbosa-Filho, J. M., Reis, A. S., Nascimento, F. R. F. and Macedo, R. O. (2006). Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **16**, 696–720.
- Andrade-Cetto, A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal of Ethnopharmacology* **122**, 163–171.
- Arrieta, J., Reyes, B., Calzada, F., Cedillo-Rivera, R. and Navarrete, A. (2001). Amoebicidal and giardicidal compounds from the leaves of *Zanthoxylum liebmannianum*. *Fitoterapia* **72**, 295–297.
- Barbosa, E., Calzada, F. and Campos, R. (2007). In vivo anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology* **109**, 552–554.
- Bautista, E., Calzada, F., Ortega, A. and Yépez-Mulia, L. (2011). Antiprotozoal activity of flavonoids isolated from *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae). *Journal of the Mexican Chemical Society* **55**, 251–253.
- Bendesky, A., Menéndez, D. and Ostrosky-Wegman, P. (2002). Is metronidazole carcinogenic? *Mutation Research* **511**, 133–144.
- Bohlmann, F. and Zdero, C. (1976). Natürlich vorkommende Terpen-Derivate, 63. Über die Inhaltsstoffe von *Heterotheca inuloides* Cass. *Chemische Berichte* **109**, 2021–2025.
- Bradley, W. G., Karlsson, I. J. and Rassol, C. G. (1977). Metronidazole neuropathy. *British Medical Journal* **3**, 610–611.
- Buret, A. G. (2007). Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut* **56**, 316–317.
- Busatti, H. G. N. O. and Gomes, M. A. (2007). A simple colourimetric method to determine anti-giardial activity of drugs. *Parasitology Research* **101**, 819–821.
- Busatti, H. G. N. O., Santos, J. F. G. and Gomes, M. A. (2009). The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: where are we? *Biologics: Targets and Therapy* **3**, 273–287.
- Calderón, R. G. and Rzedowski, J. (2005). *Flora Fanerogámica del Valle de México*. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Calzada, F. (2005). Additional antiprotozoal constituents from *Cuphea pinetorum*, a plant used in Mayan traditional medicine to treat diarrhoea. *Phytotherapy Research* **19**, 725–727.
- Calzada, F. and Alanís, A. D. (2007). Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *Phytotherapy Research* **21**, 78–80.
- Calzada, F., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Contreras, A. and Mata, R. (1998). Screening of Mexican medicinal plants for antiprotozoal activity. *Pharmaceutical Biology* **36**, 305–309.
- Calzada, F., Cervantes-Martínez, J. A. and Yépez-Mulia, L. (2005). In vitro antiprotozoal activity from the roots of *Geranium mexicanum* and its constituents on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Journal of Ethnopharmacology* **98**, 191–193.
- Calzada, F., Yépez-Mulia, L. and Aguilar, A. (2006). In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* **108**, 367–370.
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R. and Romero, I. (2008). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* **122**, 402–405.
- Coll, J. C. and Bowden, B. F. (1986). The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *Journal of Natural Products* **49**, 934–936.
- Daly, E. R., Roy, S. J., Blaney, D. D., Manning, J. S., Hill, V. R., Xiao, L. and Stull, J. W. (2010). Outbreak of giardiasis associated with a community drinking-water source. *Epidemiology and Infection* **138**, 491–500.
- Dawson, D. (2005). Foodborne protozoan parasites. *International Journal of Food Microbiology* **103**, 207–227.
- de la Torre, M. D. L., Rodrigues, A. G. P., Tomé, A. C., Silva, A. M. S. and Cavaleiro, J. A. S. (2004). [60] Fullerene-flavonoid dyads. *Tetrahedron* **60**, 3581–3592.
- Delgado, G., Olivares, M. S., Chávez, M. I., Ramírez-Apan, T., Linares, E., Bye, R. and Espinosa-García, F. J. (2001). Antiinflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*. *Journal of Natural Products* **64**, 861–864.
- Dutta, N. K., Mazumdar, K., Mishra, U. S., Dastidar, S. G. and Park, J. H. (2007). Isolation and identification of a flavone (quercetin) from *Butea frondosa* bark. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **41**, 269–271.
- Escobedo, A. A., Alvarez, G., González, M. E., Almirall, P., Cañete, R., Cimerman, S., Ruiz, A. and Pérez, R. (2008). The treatment of giardiasis in children: single-dose tinidazole compared with 3 days of nitazoxanide. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **102**, 199–207.
- Feng, Y. and Xiao, L. (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* **24**, 110–140.
- Gallagher, M. J. and Sutherland, M. D. (1965). 2-Hydroxy- and 7-Hydroxy-cadalene. *Australian Journal of Chemistry* **18**, 1111–1113.
- Gardner, T. B. and Hill, D. R. (2001). Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* **14**, 114–128.
- González-Stuart, A. E. (2010). Use of medicinal plants in Monterrey, Mexico. *Notulae Scientia Biologicae* **2**, 7–11.
- Heaney, C. J., Campeau, N. G. and Lindell, E. P. (2003). MR imaging and diffusion-weighted imaging changes in metronidazole (Flagyl)-induced cerebellar toxicity. *American Journal of Neuroradiology* **24**, 1615–1617.
- Hersch-Martínez, P. (1997). Medicinal plants and regional traders in Mexico: physiographic differences and conservational challenge. *Economic Botany* **51**, 107–120.
- Hollm-Delgado, M. G., Gilman, R. H., Bern, C., Cabrera, L., Sterling, C. R., Black, R. E. and Checkley, W. (2008). Lack of an adverse effect of *Giardia intestinalis* infection on the health of Peruvian children. *American Journal of Epidemiology* **168**, 647–655.
- Houkong, K., Sawangjaroen, N. and Phongpaichit, S. (2011). A colorimetric method for the evaluation of anti-giardial drugs in vitro. *Experimental Parasitology* **127**, 600–603.
- Kappus, K. D., Lundgren, R. G., Juranek, D. D., Roberts, J. M. and Spencer, H. C. (1994). Intestinal parasitism in the United States: update on a continuing problem. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **50**, 705–713.
- Keister, D. B. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Advance Access* **77**, 487–488.
- Kubo, I., Muroi, H., Kubo, A., Chaudhuri, S. K., Sánchez, Y. and Ogura, T. (1994). Antimicrobial agents from *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica* **60**, 218–221.
- Kubo, I., Chaudhuri, S. K., Kubo, Y., Sanchez, Y., Ogura, T., Saito, T., Ishikawa, H. and Haraguchi, H. (1996). Cytotoxic and antioxidant sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica* **62**, 427–430.
- Lopez-Velez, R., Batlle, C., Jiménez, C., Navarro, M., Norman, F. and Perez-Molina, J. (2010). Short course combination therapy for giardiasis after nitroimidazole failure. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **83**, 171–173.
- Lozoya, X., Aguilar, A. and Camacho, R. (1987). Encuesta sobre el uso actual de plantas en la Medicina Tradicional Mexicana. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* **25**, 283–291.
- Martínez, M. D., Alvarado, F. R., Mendoza, C. M. and Basurto, P. F. (2006). Plantas medicinales de cuatro mercados del estado de Puebla, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **79**, 79–87.
- McGrath, N. M., Kent-Smith, B. and Franco, D. M. (2007). Reversible optic neuropathy due to metronidazole. *Clinical and Experimental Ophthalmology* **35**, 585–586.
- Misra, P. K., Kumar, A., Agarwal, V. and Jagota, S. C. (1995). A comparative clinical trial of albendazole versus metronidazole in giardiasis. *Indian Pediatrics* **32**, 291–294.
- Mørch, K., Hanevik, K., Rortveit, G., Wensaas, K. A., Eide, G. E., Hausken, T. and Langeland, N. (2009). Severity of *Giardia* infection associated with post-infectious fatigue and abdominal symptoms two years after. *BMC Infectious Diseases* **9**, 206.
- Morrison, H. G., McArthur, A. G., Gillin, F. D., Aley, S. B., Adam, R. D., Olsen, G. J., Best, A. A., Cande, W. Z., Chen, F., Cipriano, M. J., Davids, B. J., Dawson, S. C., Elmendorf, H. G., Hehl, A. B., Holder, M. E., Huse, S. M., Kim, U. U., Lasek-Nesselquist, E., Manning, G., Nigam, A., Nixon, J. E., Palm, D., Passamaneck, N. E., Prabhu, A., Reich, C. I., Reiner, D. S., Samuelson, J., Svard, S. G. and Sogin, M. L. (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* **317**, 1921–1926.
- Müller, N. and von Allmen, N. (2005). Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *International Journal for Parasitology* **35**, 1339–1347.
- Nikolić, A., Klun, I., Bobić, B., Ivović, V., Vujančić, M., Živković, T. and Djurković-Djaković, O. (2011). Human giardiasis in Serbia: asymptomatic vs symptomatic infection. *Parasite* **18**, 197–201.
- Newman, R. D., Moore, S. R., Lima, A. A., Nataro, J. P., Guerrant, R. L. and Sears, C. L. (2001). A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. *Tropical Medicine and International Health* **6**, 624–634.
- Okhuysen, P. C. (2001). Traveler's diarrhea due to intestinal protozoa. *Clinical Infectious Diseases* **33**, 110–114.

- Peraza-Sánchez, S. R., Poot-Kantún, S., Torres-Tapia, L. W., May-Pat, F., Simá-Polanco, P. and Cedillo-Rivera, R. (2005). Screening of native plants from yucatan for anti-*giardia lamblia* activity. *Pharmaceutical Biology* **43**, 594–598.
- Pereira, A. Q., Chaves, F. C. M., Pinto, F. C., Leitão, S. G. and Bizzo, H. R. (2011). Isolation and identification of cis-7-hydroxycalamene from the essential oil of *Croton cajucara* Benth. *Journal of Essential Oil Research* **23**, 20–23.
- Perry, D. A., Morrison, H. G. and Adam, R. D. (2011). Optical map of the genotype A1 WB C6 *Giardia lamblia* genome isolate. *Molecular and Biochemical Parasitology* **180**, 112–114.
- Picq, M., Prigent, A. F., Némoz, G., André, A. C. and Pacheco, H. (1982). Pentasubstituted quercetin analogues as selective inhibitors of particulate 3',5'-cyclic-AMP phosphodiesterase from rat brain. *Journal of Medicinal Chemistry* **25**, 1192–1198.
- Ponce-Macotela, M., Navarro, I., Martínez, M. N. and Álvarez, R. (1994). Efecto anti-giardiasis *in vitro* de 14 extractos de plantas. *Revista de Investigación Clínica* **46**, 343–347.
- Ponce-Macotela, M., Rufino-González, Y., de la Mora-de la Mora, J. I., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R. and Martínez-Gordillo, M. N. (2001). Mortality and morphological changes in *Giardia duodenalis* induced by exposure to ethanolic extracts of *Justicia spicigera*. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* **44**, 151–152.
- Ponce-Macotela, M., Rufino-González, Y., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R. and Martínez-Gordillo, M. N. (2006). Oregano (*Lippia spp.*) kills *Giardia intestinalis* trophozoites *in vitro*: anti-giardiasis activity and ultrastructural damage. *Parasitology Research* **98**, 557–560.
- Prado, M. S., Cairncross, S., Strina, A., Barreto, M. L., Oliveira-Assis, A. M. and Rego, S. (2005). Asymptomatic giardiasis and growth in young children; a longitudinal study in Salvador, Brazil. *Parasitology* **131**, 51–56.
- Rodríguez, I. A., Azevedo, M. M. B., Chaves, F. C. M., Bizzo, H. R., Corte-Real, S., Alviano, D. S., Alviano, C. S., Rosa, M. S. S. and Vermelho, A. B. (2013). In vitro cytotoxic effects of the essential oil from *Croton cajucara* (red sacaca) and its major constituent 7-hydroxycalamene against *Leishmania chagasi*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **13**, 249.
- Romero, C. R., Guerrero, L. R., Muñoz, G. M. R. and Geyne, C. A. (1997). Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **91**, 701–703.
- Rosas-Piñón, Y., Mejía, A., Díaz-Ruiz, G., Aguilar, M. I., Sánchez-Nieto, S. and Rivero-Cruz, J. F. (2012). Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *Journal of Ethnopharmacology* **141**, 860–865.
- Rufino-González, Y., Ponce-Macotela, M., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R., Jiménez-Estrada, M., Sánchez-Contreras, A. and Martínez-Gordillo, M. N. (2012). In vitro activity of the F-6 fraction of oregano against *Giardia intestinalis*. *Parasitology* **139**, 434–440.
- Savioli, L., Smith, H. and Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in Parasitology* **22**, 203–208.
- Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. Vigilancia Epidemiológica Semana 32, 2013. *Boletín Epidemiológico* 2013. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2013/semanas/sem32/pdf/cua4.3.pdf>.
- Segura, L., Freixa, B., Ringbom, T., Vila, R., Perera, P., Adzet, T., Bohlin, L. and Cañigual, S. (2000). Anti-inflammatory activity of dichloromethane extract of *Heterotheca inuloides* *in vivo* and *in vitro*. *Planta Medica* **66**, 553–555.
- Semple, J. C. (2008). Cytotaxonomy and cytogeography of the goldenaster genus *Heterotheca* (Asteraceae: Astereae). *Botany* **86**, 886–900.
- Smith, P. D., Gillin, F. D., Spira, W. M. and Nash, T. E. (1982). Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production, and host immune response. *Gastroenterology* **83**, 797–803.
- Solaymani-Mohammadi, S., Genkinger, J. M., Loffredo, C. A. and Singer, S. M. (2010). A meta-analysis of the effectiveness of albendazole compared with metronidazole as treatments for infections with *Giardia duodenalis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **4**, e682.
- Tejman-Yarden, N., Millman, M., Lauwaet, T., Davids, B. J., Gillin, F. D., Dunn, L., Upcroft, J. A., Miyamoto, Y. and Eckmann, L. (2011). Impaired parasite attachment as fitness cost of metronidazole resistance in *Giardia lamblia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**, 4643–4651.
- Upcroft, J. A. and Upcroft, P. (2001). Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 1810–1814.
- Vasconcelos, J. M. J., Silva, A. M. S. and Cavaleiro, J. A. S. (1998). Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* subsp. *maritima*. *Phytochemistry* **49**, 1421–1424.
- Villareal, M. L., Alonso, D. and Melesio, G. (1992). Cytotoxic activity of some Mexican plants used in traditional medicine. *Fitoterapia* **41**, 518–522.
- World Health Organization (2004). *Intensified Control of Neglected Diseases*. WHO Report of an International Workshop Berlin, 10–12 December 2003. http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_CDS_CPE_CEE_2004.45.pdf
- Yoder, J. S., Gargano, J. W., Wallace, R. M. and Beach, M. J. (2012). Giardiasis Surveillance-United States, 2009–2010. *MMWR Surveillance Summaries* **61**, 13–23. <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/ss/ss6105.pdf>.

Artículo 2

Antioxidant Capacity of „Mexican Arnica“ *Heterotheca inuloides* Cass Natural Products and Some Derivatives: Their Anti-Inflammatory Evaluation and Effect on *C. elegans* Life Span.

Autores: José Luis Rodríguez-Chávez, Elvia Coballase-Urrutia, Antonio Nieto-Camacho, Guillermo Delgado-Lamas.

Publicado en: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2015, Article ID 843237, 11 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/843237>

El trabajo hace referencia a la capacidad de los metabolitos y derivados semisintéticos de *Heterotheca inuloides* Cass para actuar como agentes antioxidantes, la actividad antiinflamatoria de los constituyentes no reportados y su efecto en la sobrevivencia. Incluye una discusión sobre el efecto de la modificación estructural en la actividad biológica de los metabolitos.

Research Article

Antioxidant Capacity of “Mexican Arnica” *Heterotheca inuloides* Cass Natural Products and Some Derivatives: Their Anti-Inflammatory Evaluation and Effect on *C. elegans* Life Span

José Luis Rodríguez-Chávez,¹ Elvia Coballase-Urrutia,²
Antonio Nieto-Camacho,¹ and Guillermo Delgado-Lamas¹

¹Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510 México, DF, Mexico

²Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700-C, 04530 México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Elvia Coballase-Urrutia; elcoballase@yahoo.com.mx and Guillermo Delgado-Lamas; delgado@unam.mx

Received 28 November 2014; Revised 16 January 2015; Accepted 26 January 2015

Academic Editor: Vladimir Jakovljevic

Copyright © 2015 José Luis Rodríguez-Chávez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

It has been suggested that the accumulation of biomolecular damage caused by reactive oxygen species (ROS) contributes to aging. The antioxidant activity is related to the ability of certain compounds to protect against the potentially harmful effect of processes or reactions involving ROS. This ability is associated with the termination of free radical propagation in biological systems. From *Heterotheca inuloides* various compounds which have shown to possess antioxidant capacity and scavenging ROS. The aim of this study was to determine the antioxidant capacity of additional natural components isolated from *H. inuloides* and some semisynthetic derivatives, their anti-inflammatory activity and the effect on *Caenorhabditis elegans* nematode life span. Compounds showed ability to inhibit various biological processes such as lipid peroxidation, scavenge nonbiological important oxidants such as ¹O₂, OH[•], H₂O₂, and HOCl and scavenge non biological stable free radicals (DPPH). Some cadinane type compounds showed possess antioxidant, ROS scavenging capacity, anti-inflammatory activity, and effect on the *C. elegans* life span. Flavonoid type compounds increased the life of the nematode and quercetin was identified as the compound with the greatest activity. The modification of chemical structure led to a change in the antioxidant capacity, the anti-inflammatory activity, and the survival of the worm.

1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) exist as products of normal cellular physiology and play vital roles in the stimulation of signaling pathways in plant and animal cells [1]. Aerobic organisms produce ROS during the reduction of molecular oxygen by mitochondria [2]. ROS include free radicals such as superoxide anion (O₂⁻), hydroxyl radical (OH[•]), and nonradical molecules like hydrogen peroxide (H₂O₂), singlet oxygen (¹O₂), and other species such as nitric oxide (NO), hypochlorous acid (HOCl), and peroxyxynitrite (ONOO⁻). When the level of ROS exceeds away cellular factors responsible for protecting cellular biomolecules against damage generated by oxidizing species is said to be in a state of

“oxidative stress.” Under these conditions ROS can damage biomolecules like nucleic acids, proteins, lipids, carbohydrates, and enzymes. This condition has been implicated in the pathogenesis of a number of multiple pathologies such as senescence [3], ischemia/reperfusion injury [4], neurodegenerative diseases [5], infectious processes [6], rheumatoid arthritis [7], arterial diseases [8], obesity, diabetes, chronic kidney disease [9], and other ailments.

Heterotheca inuloides is commonly known as “Mexican arnica” and it is known by other names in different regions of Mexico [10, 11]. In Mexican traditional medicine the infusions of this plant are mainly used for treatment of contusions and bruises [12]. Phytochemical studies of this plant, allowed isolating different classes of compounds, mainly cadinane

type sesquiterpenes [13], flavonoids [14], and phytosterols [15]. Previous studies have reported that methanolic extract and certain natural products isolated from *H. inuloides* dried flowers have antioxidant activity and ability to inhibit lipid peroxidation, scavenging ROS and act as hepatoprotective agents [16–18]. However, the antioxidant activity of natural products isolated from the acetone extract has not been reported. In the present study, we evaluated the antioxidant and ROS scavenging capacity of *H. inuloides* metabolites isolated from the acetonic extract and prepared semisynthetic derivatives and also evaluated their anti-inflammatory effects and effect on the *C. elegans* life span. Here we report the results considering the structure-activity relationships.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents. All reagents used were of analytical grade. Sodium pyruvate, dimethyl thiourea (DMTU), nordihydroguaiaretic acid (NDGA), ascorbic acid, histidine, xylenol orange (FOX), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), dimethylsulfoxide (DMSO), N,N-dimethyl-4-nitrosoaniline (DMNA), catalase, xanthine, xanthine oxidase, nitroblue tetrazolium (NBT), dL-penicillamine 2-thiobarbituric acid (TBA), α -tocopherol, Folin and Ciocalteu's phenol reagent, 3,5-di-tert-4-butylhydroxytoluene (BHT), and 5-fluoro-2'-deoxyuridine were purchased from Sigma-Aldrich (Toluca, Mexico, or Sigma, St. Louis, MO). Absolute ethanol, hydrogen peroxide (H_2O_2), sulfuric acid (H_2SO_4), methanol, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA), NaCl, KH_2PO_4 , $NaHPO_4 \cdot 7H_2O$, NaOH, and H_2SO_4 were purchased from Merck-Mexico. Sodium hypochlorite (NaOCl) was purchased from Hycl (Mexico City, Mexico).

2.2. Strains of *C. elegans*. Experimental *C. elegans* strain was wild type N2 (Bristol). The strain was obtained from the Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA) and was maintained on nematode growth medium (NGM) at 20°C as described previously by Brenner [19]. Age-synchronized worms were generated in all experiments through the sodium hypochlorite method. Worms were allowed to hatch in Petri dishes in liquid S-medium with concentrated *Escherichia coli* OP50 as food [20].

2.3. Plant Material. Flowers of *H. inuloides* (provided by MIXIM Laboratories, Naucalpan, Mexico) were collected in 2010, in the town of Mesas Altas de San Juan Xoconusco, municipality of Donato Guerra (State of Mexico), and authenticated by MS Abigail Aguilar-Contreras. A voucher of plant material was deposited under code IMSSM-16064 in the Medicinal Plant Herbarium of the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, Mexico City).

2.4. Heterotheca inuloides Metabolites and Derivatives. Compounds 1–12 were isolated from the acetone extract of dried flowers of *H. inuloides* in a previous study. Semisynthetic compounds 7-acetoxy-3,4-dihydrocadalene (13), 7-benzoyloxy-3,4-dihydrocadalene (14), 7-acetoxycadalene (15), 7-benzoxycadalene (16), quercetin pentaacetate (17), and

7-hydroxy calamenene (18) were obtained by conventional chemical procedures as was previously described [21] (Figure 1). Due to the paucity of material compounds 10 and 11 were not included in all the bioassays.

2.5. Antioxidant Effects and ROS Scavenging of *H. inuloides* Metabolites

2.5.1. Estimation of Lipid Peroxidation. Lipid peroxidation was measured by TBARS assay using rat brain homogenates [22], with some modifications. Adult male Wistar rats (200–250 g) were provided by the Instituto de Fisiología Celular, UNAM, and their use was approved by the Animal Care and Use Committee [23]. The animals sacrifice was carried out avoiding unnecessary pain with CO_2 , cerebral tissue (whole brain) was rapidly dissected and homogenized. The homogenate was centrifuged for 10 min at 3400 rpm to yield a pellet that was discarded; protein content in the supernatant was measured using the Folin and Ciocalteu's phenol reagent [24] and adjusted to 2.66 mg protein/mL with PBS. The supernatant (375 μ L) was incubated at 37°C for 30 min in presence of test sample (25 μ L) dissolved in DMSO or ethanol and 50 μ L of EDTA solution (20 μ M). Lipid peroxidation was started adding 50 μ L of a freshly prepared 100 μ M $FeSO_4$ solution (final concentration 10 μ M) and incubated at 37°C for 60 min TBARS were determined as described by Ohkawa et al. [25] with some modifications. Concentration of TBARS was calculated by interpolation in a standard curve of tetrametoxipropane (TMP) [26]. Final results were expressed as mmoles of TBARS per mg of protein. The inhibition ratio (%) was calculated using the following formula:

$$\text{Inhibition ratio (\%)} = \frac{(C - E)}{C} \times 100\%, \quad (1)$$

where C was the absorbance of control and E was the absorbance of the test sample.

2.5.2. DPPH^{*} Scavenging Capacity. DPPH assay was assessed in 96-well microtiter plates according to the method of Blois [27] with minor changes. Briefly, 0.05 mL of test compounds in DMSO at different concentrations was added to an ethanolic solution of 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH^{*}) (133.33 μ M, 0.150 mL). The control sample contained distilled water. Reaction mixtures were incubated at 37°C for 30 min in the dark. After incubation the absorbance was measured at 515 nm in a microplate reader ELx808 (BioTek Instruments, Inc., Vermont, USA). The % inhibition of each compound was determined by comparison with a DPPH ethanol blank solution [28]. The scavenging capacity is given as percent (%) DPPH scavenged, calculated as [(optical density of control – optical density of compound)/(optical density of control) \times 100]; α -tocopherol was used as standard.

2.5.3. Superoxide Radical-Scavenging Activity. The superoxide radicals (O_2^-) were generated through the system xanthine oxidase [29]. O_2^- in the assay system and xanthine oxidase activity were measured as NBT reduction using a DU-640 series Beckman spectrophotometer. 800 μ L of

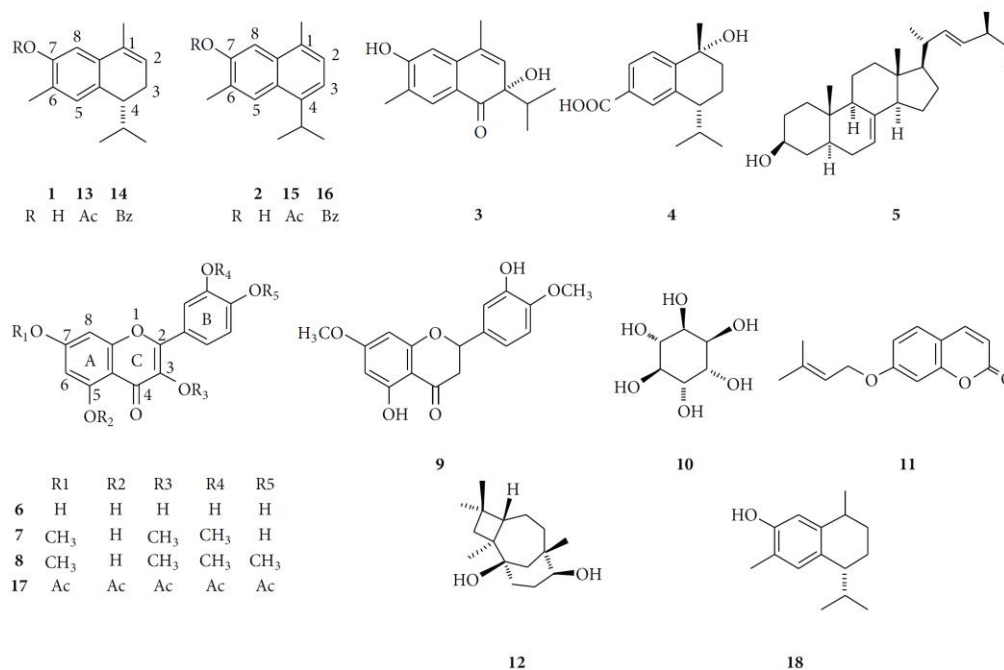


FIGURE 1: Natural products isolated from *H. inuloides* flowers and derivatives.

the following reaction mixtures: 90 μM xanthine, 16 mM Na_2CO_3 , 22.8 μM NBT, and 18 mM phosphate buffer (pH 7.0) was mixed with 100 μL of different concentrations of *H. inuloides* metabolites. The reaction was started by the addition of 100 μL of xanthine oxidase (168 U/L). Optical density was registered both at 295 (for uric acid production) and at 560 nm (for O_2^- in the assay system). The absorbance was determined using a Beckman DU640 Spectrophotometer (Beckman Coulter, Inc. California, USA).

2.5.4. Peroxide Scavenging Activity. Determination of scavenging capacity was made by ferrous ion oxidation-xylenol orange (FOX) assay [30]. Concentration of H_2O_2 was calculated from a standard curve prepared with increasing H_2O_2 concentrations. A solution of 75 μM H_2O_2 was mixed (1:1 v/v) with water (0% scavenging tube) or with different concentrations of *H. inuloides* metabolites and incubated for 30 min at room temperature. After this, H_2O_2 was measured by the following method. Briefly, 9 volumes of 4.4 mM BHT in HPLC-grade methanol were mixed with 1 volume of 1 mM xylenol orange and 2.56 mM ammonium ferrous sulphate in 0.25 M H_2SO_4 to give the working FOX reagent. 45 μL of the metabolite solutions and 45 μL of 75 μM H_2O_2 were dispensed in 1.5 mL Eppendorf tubes and mixed with 10 μL of HPLC-grade methanol immediately followed by the addition of 0.9 mL of FOX reagent, mixed on a vortex mixer for 5 s and then incubated at room temperature for 10 min. The tubes were centrifuged for 15,000 g for 10 min and absorbance at 560 nm was read against a methanol

blank using a Beckman DU640 Spectrophotometer (Beckman Coulter, Inc. California, USA). The concentration of H_2O_2 was calculated from a standard curve prepared with increasing H_2O_2 concentrations. Sodium pyruvate was used as standard for H_2O_2 scavenging activity.

2.5.5. Hydroxyl Radical-Scavenging Activity. The malondialdehyde formed from the decay of deoxyribose was evaluated in reaction with thiobarbituric acid and measured at 532 nm [31]. The reaction mixture containing deoxyribose (0.056 mM), H_2O_2 (1 mM), potassium phosphate buffer (10 mM, pH 7.4), FeCl_3 (0.2 mM), EDTA (0.2 mM), ascorbic acid (0.2 mM), and 100 μL of different concentrations of *H. inuloides* was incubated in a water bath at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for 1 h. The extent of the deoxyribose degradation by the OH^\bullet formed was measured by the thiobarbituric acid test at 532 nm using a Beckman DU640 Spectrophotometer (Beckman Coulter, Inc. California, USA). The ability of *H. inuloides* metabolites to scavenge OH^\bullet was compared with that of DMTU (0, 1, 2, 10, 20, and 31 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The final results were expressed as inhibition percent in relation to a control test (without the sample).

2.5.6. Singlet Oxygen ($^1\text{O}_2$) Scavenging Activity. The ability of the compounds to scavenging $^1\text{O}_2$ was detected spectrophotometrically at 440 nm using the bleaching of N,N-dimethyl p-nitrosoaniline (DMNA) as a specific detector [32]. The assay mixture contained 45 mM Na-phosphate buffer (pH

7.1), 10 mM histidine, 10 mM NaOCl, 10 mM H₂O₂, 50 μM DMNA, and 0.1 mL of different concentration of compounds. The total volume of reaction (2.0 mL) was incubated at 30°C for 40 min. The extent of ¹O₂ production was determined by measuring the decrease in the absorbance of DMNA at 440 nm using a Beckman DU640 Spectrophotometer (Beckman Coulter, Inc. California, USA). The relative scavenging efficiency (% inhibition production of ¹O₂) of *H. inuloides* metabolites was estimated from the difference in absorbance of DMNA with and without the addition of compounds being tested or reference compound. Glutathione (0, 0.92, 1.53, 2.15, 2.45, and 3.07 mg/mL) was used as standard for ¹O₂ scavenging.

2.5.7. HOCl Scavenging Assay. The HOCl scavenging activity was evaluated by measuring the decrease in absorbance of catalase at 404 nm and was carried out as described by Aruoma and Halliwell [33] with minor changes. Briefly, 150 μL of 49.8 μM bovine liver catalase solution (16.6 μM, final concentration) was mixed with 150 μL of 18 mM HOCl (6 mM, final concentration) and 150 μL of *H. inuloides* metabolite solutions in increasing concentrations or the reference compound ascorbic acid (0, 22, 44, 88 and 176 μg/mL). Spectra (370–450 nm) of catalase alone, catalase plus HOCl, or catalase plus HOCl and *H. inuloides* metabolites or the reference compound were registered and the optical densities (OD) at 404 nm were determined using a Beckman DU640 Spectrophotometer (Beckman Coulter, Inc., California, USA). The value of the OD of catalase alone minus the OD of catalase plus HOCl was considered as 100% of degradation of catalase (or 0% of scavenging activity), and the difference of the catalase alone minus the OD of the catalase plus HOCl in presence of either *H. inuloides* metabolites or reference compound was compared against this value. The ability of TPM to scavenge HOCl was compared with that of ascorbic acid.

2.6. Evaluation of Anti-Inflammatory Effect. The biological model employed was ear edema in mice induced by 13-ethyl-12-O-tetradecanoylphorbol (TPA), as described by Rao et al. [34] with slight modifications. CD1 male mice were used. Mice were administered with sodium pentobarbital (31.5 mg/kg, ip) and TPA solution (2.5 μg/ear) dissolved in ethanol (10 μL). This was done topically on the right ear, in both faces of the ear. The left ear received only ethanol, 10 min after the test substances (1 μmol/ear) or indomethacin (0.31 μmol/ear) as drug reference. The tested substances and indomethacin were dissolved in 20 μL of acetone and administered on both sides of the ears (10 μL/side). The control only received the vehicle (20 μL of acetone). Four hours later the mice were killed with CO₂. A 7 mm diameter plug was removed from each ear. The swelling was assessed as the difference in weight between right and left ear plugs. The anti-inflammatory activity was expressed as inhibition of edema (IE) in percent relative to the edema formed in control animals according with the following formula: IE (%) = 100 - [B × 100/A], where A = edema induced by TPA alone, and B = edema induced by TPA plus sample.

2.7. Lifespan Assay. Lifespan assays were assessed in liquid medium at 20°C in 96-well plates (Corning, NY) and were carried out according to the established protocols [35]. Briefly, the nematodes were age-synchronized and distributed in wells as L1 larvae (10–20 animals per well) together with *Escherichia coli* OP50. To prevent self-fertilization, 5-fluoro-2'-deoxyuridine was added 36 h after seeding (0.12 mM final). Media were supplemented with different doses of compounds (100 or 200 μM). DMSO/ethanol (50/50% v/v) was included as a solvent control. The worms were monitored daily to observe the number of live worms in each treatment, the fraction of animals alive was scored on the basis of body movement. Observations and worm counts were performed using a microscope Eclipse TS 100 (Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan).

2.8. Statistical Analysis. For lipid peroxidation and DPPH scavenging data were represented as mean ± standard error of mean (SEM). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's test for comparisons against control. Values of $P \leq 0.05$ (*) and $P \leq 0.01$ (**) were considered statistically significant. The inhibitory concentration 50 (IC₅₀) was estimated by means of a linear regression equation. For scavenging capacity data were expressed as mean ± SEM. The data were compared against the blank tube without *H. inuloides* metabolites or the reference compounds, using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett's Multiple Comparison test (GraphPad Prism 4.0 Software, San Diego, CA, USA). $P < 0.05$ was considered statistically significant. The scavenging capacity was expressed as the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) value, which denotes the concentration of *H. inuloides* metabolites or the reference compounds required to give a 50% reduction in oxidating effect relative to the blank tube. The data of the lifespan assays were processed using the GraphPad Prism 4.0 Software, (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Survival was plotted by the Kaplan-Meier method and the curves compared for significance using the log-rank test.

3. Results

3.1. Antioxidant Effects and ROS Scavenging. Our results showed that only compounds **2**, **6**, and **9** displayed the ability to reduce DPPH radical with a IC₅₀ of 30.66 ± 8.14 μM, 13.11 ± 1.2 μM, and 6.97 ± 0.14 μM. Compounds **1** and **7** showed slight activity with IC₅₀ higher than 100 μM. The other compounds tested showed a rate of antioxidant capacity less than 25% during the preliminary screening and therefore were not considered active (Table 1).

In peroxidation assay some compounds showed ability to inhibit this process. The inhibitory capacity of these compounds decreased in the following order: **18** > **13** > **2** > **17** > **6** > **1** > **7** > **9** > **11**. Compound **18** had an IC₅₀ of 0.58 ± 0.008 μM and showed to possess greater ability to inhibit lipid peroxidation than α-tocopherol used as reference substance whose IC₅₀ was 6.78 ± 2.16 μM. The derivatives **14**, **15**, and **16** showed little ability to inhibit lipid peroxidation with IC₅₀ higher than 100 μM.

TABLE 1: Capacity to inhibit lipid peroxidation and to reduce the DPPH radical.

Compound	IC ₅₀ μM	
	Lipid peroxidation	Reduction of DPPH
1	4.72 ± 0.11	>100
2	3.09 ± 0.19	30.66 ± 8.14
3	nd*	nd
4	nd	nd
6	4.30 ± 0.27	13.11 ± 1.2
7	6.16 ± 0.06	>100
8	nd	nd
9	14.46 ± 0.61	6.97 ± 0.14
11	17.35 ± 1.40	nd
12	nd	—
13	1.82 ± 0.12	nd
14	>100	nd
15	>100	nd
16	>100	nd
17	3.67 ± 0.43	—
18	0.58 ± 0.008	nd
α-Tocopherol	6.78 ± 2.16	31.74 ± 1

*Not determined: at the concentrations tested the activity of compounds was low.

The *H. inuloides* natural products, derivatives as well as the reference compounds, displayed O₂⁻, HOCl, H₂O₂, ¹O₂, and OH[•] scavenging activity in a concentration-dependent way. The IC₅₀ values were calculated from the dose-response curve (Table 2, Figure 2).

The hypochlorous acid scavenging capability decreases in the following order **9 > 7 > 2 > 13 > 15 > 8 > 3 > 4**. Compound **9** showed to possess the higher scavenging ability against HOCl. Compounds **13** and **15**, acetylated derivatives of compounds **1** and **2**, displayed a reduction in radical scavenging ability, with an increase in the IC₅₀ value. The standard ascorbic acid showed an IC₅₀ value of 278.6 ± 16.7 μM.

In the case of hydroxyl radical, the capacity to scavenging decreased in the following order: **2 > 9 > 7 > 8 > 15 > 13 > 3 > 4**. The IC₅₀ value for the dimethylthiourea used as reference substance was 131.5 ± 3.6 μM and was lower than those of the compounds tested.

H. inuloides metabolites were capable of scavenging hydrogen peroxide in an amount-dependent manner. Results showed that the scavenging activity values decreased in the order of **9 > 7 > 8 > 2 > 13 > 3 > 15 > 4**. Compound **9** showed the best scavenging ability with an IC₅₀ of 154 ± 6.3 μM; however, none of the compounds showed higher activity than the pyruvate used as reference substance whose IC₅₀ was 32.2 ± 1.7 μM.

The superoxide scavenger capacity decreased in the following order: **9 > 7 > 8 > 3 > 2 > 4 > 13 > 15**. Compound **9** showed to possess the best ability to trap superoxide radical with IC₅₀ value of 12.2 ± 0.22 μM; however, it is not statistically different from NDGA reference compound whose IC₅₀ was 11.6 ± 0.13 μM.

With respect to the singlet oxygen scavenger capacity the ability of the compounds to trap the singlet oxygen decreased in the following order **4 > 7 > 8 > 9 > 15 > 3 > 13 > 2**. The calameoic acid (**4**) showed comparatively better activity than the GHS. The IC₅₀ values (Table 2) of calameoic acid and GHS were 112.4 ± 29.3 μM y 471 ± 77 μM.

3.2. Evaluation of Anti-Inflammatory Effect. The results show that only the compounds **2**, **4** and **16** displayed a significant anti-inflammatory activity, but this was less than that of indomethacin used as reference drug. The rest of the compounds showed a percentage of inhibition lower than 50%. (Table 3).

3.3. Life Span Assay. Exposure of *C. elegans* to compounds gave the following results: at 100 μM flavonoids type compounds extended half-life compared to the control (Table 4). Significant differences were observed for treatments compared with the vehicle-treated control (*P* < 0.001). The survival curve exhibited significant difference among worms fed with flavonoid compounds. There was not an increase in lifespan of the worm in the presence of cadinane compounds and some of them decreased survival as shown in Figure 3.

4. Discussion

H. inuloides metabolites showed to possess the ability to inhibit lipid peroxidation and scavenging free radicals and ROS. In lipid peroxidation assay we observed that the replacement of H at the hydroxyl in position 7 of sesquiterpenes **1** and **2** led to a decrease in the activity. It is further noted that the increase in the unsaturation of cadinanes led to a decrease in their activity, which is observed for compound **18** whose activity is greater than **1** that is greater than **2**. In the case of flavonoid type compounds, **6** (quercetin) had the best ability to inhibit lipid peroxidation; natural methoxy derivatives **7** and **8** showed lower activity. These results are consistent with those reported that indicate that methoxy substituent perturbs the planarity due to steric hindrance imparted by the methyl group [36]. It is reported that the antioxidant activity of flavonoids is proportional to the number of hydroxyl groups present in the molecule [37]. Compound **6** (quercetin) having a 3,5,7,3',4'-pentahydroxy group showed DPPH radical scavenging activity. Compounds **1** and **2** showed a statistically similar activity to **6** and higher than that of α-tocopherol. We noted that several tested compounds had the ability to inhibit lipid peroxidation; however, few of them reduced the DPPH radical. The above observations may be explained because the DPPH radical has a long life, and no resemblance to the highly reactive peroxy radicals involved in lipid peroxidation, and some antioxidants that react quickly with peroxy radicals react slowly or are inert to DPPH [38].

Hypochlorous acid radicals have the ability to inactivate the antioxidant enzyme catalase through degrade its heme group [33]. Catalase inactivation is inhibited in the presence of some *H. inuloides* compounds. The results showed that compounds are more efficient scavenger than the standard ascorbic acid. Among the flavonoid type compounds, **9**

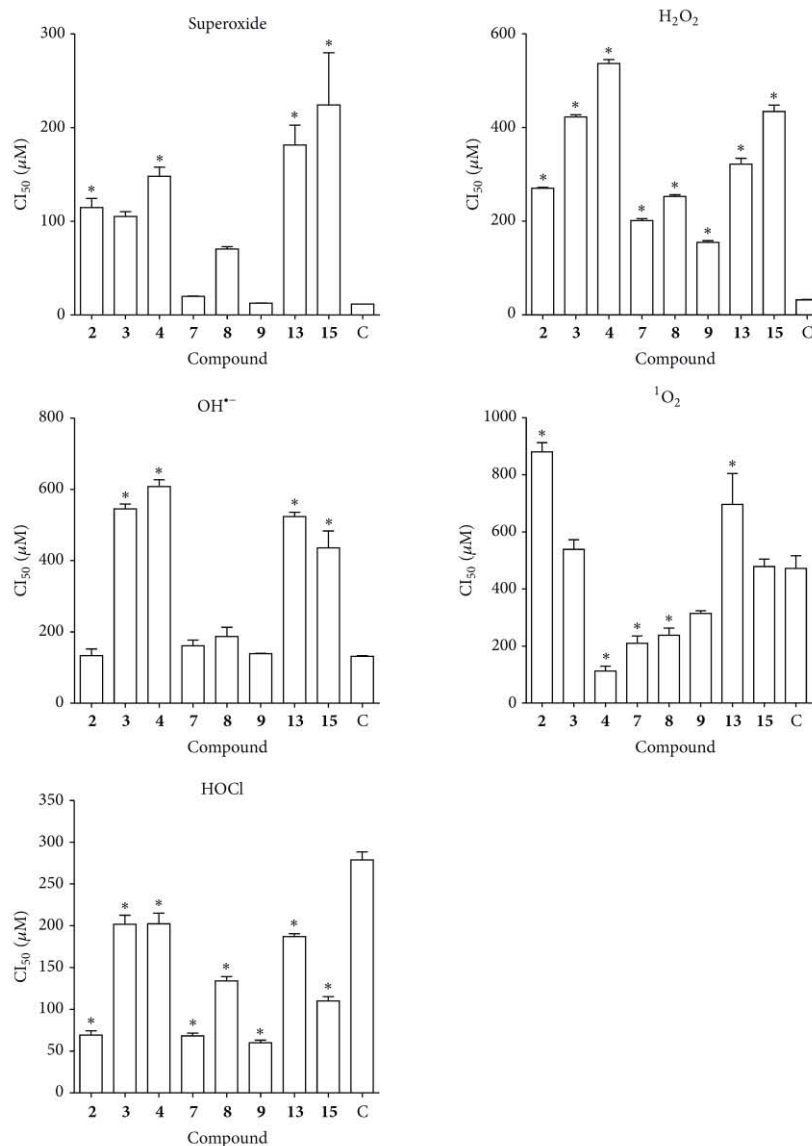


FIGURE 2: ROS scavenging capacity of *H. inuloides* metabolites and semisynthetic derivatives. C=NDGA (superoxide); pyruvate (H₂O₂); DMTU (OH[•]); GSH (¹O₂); ascorbic Ac. acid (HOCl). The results were analyzed by ANOVA. The Dunnett's Multiple Comparison test was used to compare outcomes between experimental and control group. *P < 0.05.

showed the highest ability to scavenge hypochlorous acid while 7 and 8 showed lower activity. In the last two compounds the hydroxyl at position 3, present in the quercetin molecule has been replaced by a methoxy group. It has been reported that the hydroxyl at position 3 of the C ring of quercetin plays an important role in the antioxidant activity including scavenging hypochlorite [39].

Hydroxyl free radicals cause damage to oxidative cells through damage DNA, lipids, and proteins [31]. The flavonoids scavenge hydroxyl (OH[•]) radicals. Hydroxyl radical (OH[•]) generated by the Fenton reaction system was evaluated by TBARS assay. We observed that compound 9 was more active than 7, which in turn was more active than 8, with only one hydroxyl group. The results obtained are consistent with

TABLE 2: Scavenging capacity of *H. inuloides* metabolites on hypochlorous acid, hydroxyl radical, peroxide, superoxide anion, and singlet oxygen (IC₅₀).

Compound	Scavenging capacity IC ₅₀ μM				
	HOCl	OH [•]	H ₂ O ₂	O ₂ ⁻	¹ O ₂
2	69.1 ± 8.8*	133.4 ± 32.6	270 ± 2.7*	114.6 ± 13.9*	880.4 ± 55.4*
3	202.3 ± 21.9*	545.4 ± 23.0*	422 ± 8.0*	105 ± 7.2*	538.9 ± 58.6
4	203.5 ± 23.9*	607.9 ± 33.5*	536 ± 14*	148 ± 13.0*	112.4 ± 29.3*
7	68.1 ± 5.77*	161.2 ± 27.2	201 ± 6.7*	20 ± 0.27*	209.7 ± 44.5*
8	133.9 ± 9.0*	187.1 ± 44.6	252 ± 6.5*	70.4 ± 3.3*	237.8 ± 43.1*
9	60.0 ± 5.2*	139.5 ± 1.1	154 ± 6.3*	12.2 ± 0.22	314.4 ± 15.8
13	106.1 ± 4.4*	523.8 ± 20.4*	322 ± 21.0*	181.5 ± 29.8*	697 ± 187.0*
15	110.0 ± 15.8*	435.78 ± 82.0*	434.5 ± 23.3*	244.1 ± 78.0*	478.6 ± 44.7*
Reference compound	Ascorbic acid	DMTU	Pyruvate	NDGA	GSH
	278.6 ± 16.7	131.5 ± 3.6	32.2 ± 1.7	11.6 ± 0.13	471 ± 77

Data represent the mean ± SE of the three independent assays. The results were analyzed by ANOVA. The Dunnett's multiple comparison test was used to compare outcomes between experimental and control group. *P < 0.05 versus reference compound.

TABLE 3: Anti-inflammatory activities of additional *H. inuloides* metabolites.

Compound (1 μmol/ear)	Edema (mg, average SE)	% Inhibition
Negative control	12.07	—
1	10.50 ± 0.99	5.41
2	1.85 ± 0.52	83.33**
4	5.27 ± 0.70	65.73**
5	9.80 ± 0.36	7.98
7	7.30 ± 1.15	38.86**
9	7.57 ± 0.45	36.63**
13	11.87 ± 0.66	-11.42
14	11.07 ± 1.15	11.06
15	13.60 ± 0.70	-13.90
16	3.73 ± 1.62	66.44**
17	9.07 ± 0.70	19.46
18	13.17 ± 0.51	13.57
Indomethacin (0.31 μmol)		61.90**

The data represent the mean of three animals ± the standard error of the mean. All the compounds were tested at 1 μmol/ear doses. The results were analyzed by ANOVA. Student's *t*-test was used to compare outcomes between experimental and control groups. *P < 0.05 versus reference drug.

reports indicating that the scavenging activity of flavonoids increases with the number of free hydroxyl groups, and it is independent of the presence of double bond between C-2 and C-3 of ring C [40].

In biological systems H₂O₂ produces hydroxyl ions and hydroxyl radicals by reacting with Fe²⁺ and Cu²⁺ ions and they have been related to the initiation of many toxic effects [41]. It is therefore biologically advantageous for cells to control the accumulation of H₂O₂. *H. inuloides* metabolites showed ability to trap peroxide; however, they were no better than pyruvate.

The superoxide radical is a highly reactive species and not readily diffuses through the cell. Because the main production site of O₂⁻ is the inner mitochondrial membrane,

TABLE 4: Summary of *Caenorhabditis elegans* life span.

Treatment	Adult life span, 20°C		(n)	P versus control (Log-rank)
	Mean	CI 95%		
1	1	0.171-1.962	449	<0.0001
2	1	0.169-1.964	479	<0.0001
3	13.661	13.13-14.209	513	<0.0001
4	14.391	13.776-15.006	557	0.1175
6	19.2	18.41-19.82	444	<0.0001
7	16.991	16.387-17.596	470	<0.0001
8	16.583	15.926-17.239	575	<0.0001
9	17.74	17.04-18.44	466	<0.0001
13	11.012	10.414-11.609	434	0.0080
14	13.424	12.845-14.003	531	0.0001
15	11.659	11.103-12.215	499	0.0150
16	13.520	12.917-14.123	496	0.0001
17	15.216	14.478-15.955	499	0.1751
Control	14.943	14.471-15.414	1098	

it has been proposed that mitochondrial DNA (mtDNA) is the main target of damage [42]. We noted that compounds **9** and **7** have the capacity to scavenging superoxide. It has been reported that the superoxide scavenging capacity of flavonoids is dependent on the number of hydroxyl groups in the B ring, on the presence of a free hydroxyl group at C3, on the presence of a saturated C2-C3 bond, and the absence of a C4 carbonyl group [43]. Also it has been reported that the number of conjugated double bonds and the presence of conjugated keto groups increase the quenching rate, while the presence of a hydroxyl, epoxy, and methoxy group has lesser effects [44]. Cadinane type compound **4** and flavonoid **9** showed the best ability to scavenge the singlet oxygen ¹O₂; other flavonoid type compounds showed lesser activity. The ¹O₂ scavenger activity of flavonoids is associated with the presence of a catechol moiety on ring B and with the presence of a hydroxyl group activating the double bond on C ring [45]. The cadinane type sesquiterpenes showed capacity to trap

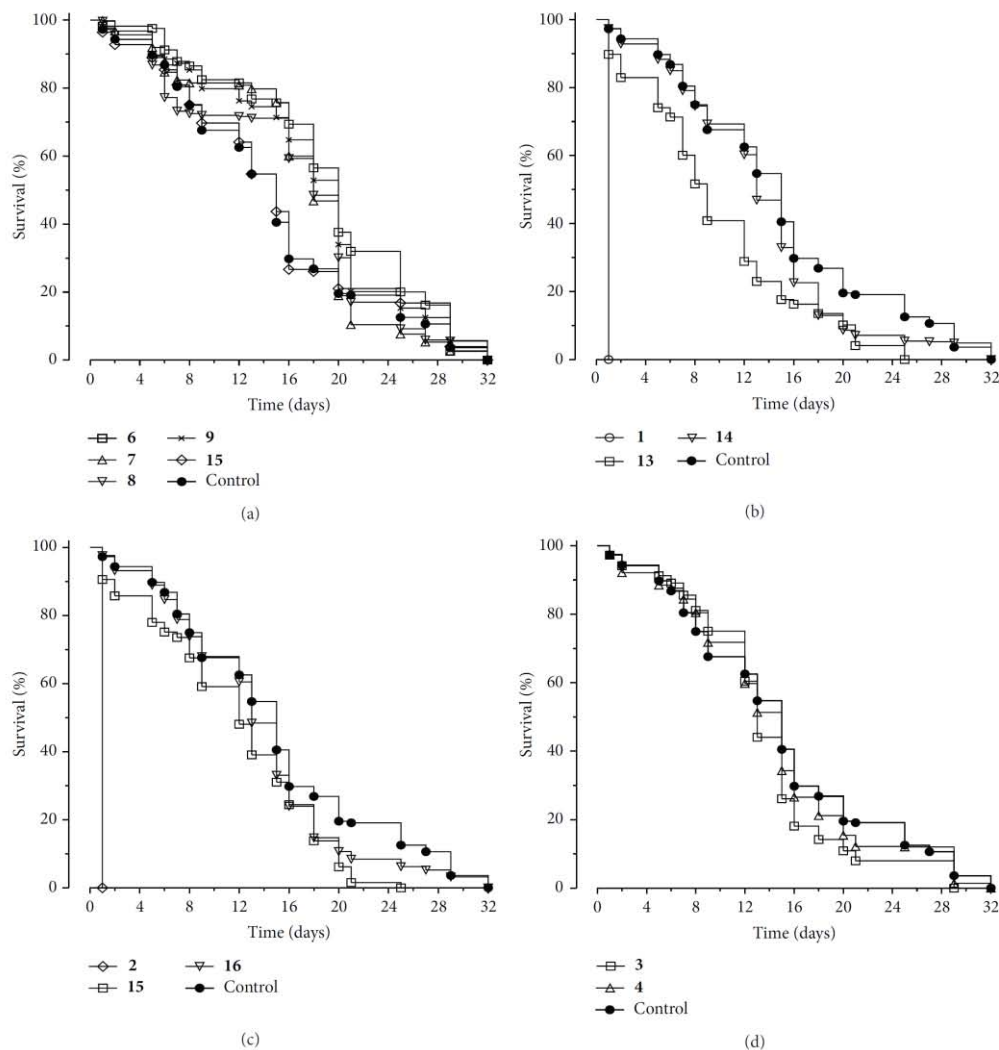


FIGURE 3: Lifespan survival curves in the presence *H. inuloides* metabolites. Labels denote the compound used (100 μ M). Curve (a) flavonoids, curves (b), (c), and (d) natural and semisynthetic cadinane type compounds.

singlet oxygen greater than glutathione. In another study the ability of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene to trap this species has been reported [46].

Preparations from *H. inuloides* are used as anti-inflammatory and analgesic agents in Mexican traditional medicine, and these properties have been investigated in several studies [13, 47, 48]. The results of anti-inflammatory assay activity showed that acetylation of compounds **1** and **2** to the corresponding derivatives **13** and **15**, respectively, generated a change in biological response, since these derivatives exhibited proinflammatory activity. However, the benzoyl derivatives **14** and **16** (obtained from **1** and **2**)

resulted in opposite effects. Compound **14** increased the anti-inflammatory activity with respect to **1**, while compound **16** displayed less activity in comparison with **2**. It has previously been reported that quercetin (**6**) showed anti-inflammatory capacity in the mice ear edema test [13]; in this study it was observed that naturally methylated derivative **7** and semisynthetic acetylated derivative **17** displayed little activity in this assay (see Table 3).

We evaluated the effect of some natural products isolated from *H. inuloides* and derivatives in extension of life of *C. elegans* nematode (Figure 3). Treatment of *C. elegans* with some *H. inuloides* metabolites prolonged the lifespan of the

worm and the best effects were obtained with flavonoid type compounds. The results are consistent with other studies conducted wherein it has been reported that certain compounds of flavonoid type increase lifespan of *C. elegans*, which protect against oxidative stress and cause an increase in the translocation of the transcription factor DAF-16 [49]. In another study it was observed that blueberry polyphenols increased lifespan and slowed aging related decline in *C. elegans*, but these benefits did not just reflect antioxidant activity [50]. Similarly, results of Wilson et al. [51] showed that the prolongevity effect of myricetin is dependent on DAF-16 and not on direct antioxidative effects of the flavonoid. Büchter et al. [52] observed that quercetin significantly increased reproductive capacity of *C. elegans* and enlarged the body size, whereas no modification of these characteristics was induced by their methylated derivatives, isorhamnetin, and tamarixetin. Certain cadinane type compounds isolated from *H. inuloides* have shown to possess antioxidant activity, but its antioxidant capacity was not reflected in an increase in the life span of *C. elegans*. Although several compounds isolated from *H. inuloides* have antiangiogenic activity [21] and it has been found that structurally similar compounds showed activity against *Leishmania chagasi* promastigotes [53].

5. Conclusions

In the present paper, we have shown that *H. inuloides* metabolites in vitro scavenged to O_2^- , HOCl, H_2O_2 , OH^\cdot , and 1O_2 in a concentration-dependent way. The IC_{50} in some cases were comparable to the reference compound. These observations suggest that metabolites of *H. inuloides* have the ability to capture free radicals. The results of the anti-inflammatory assay of the natural products and some derivatives showed both anti- and proinflammatory effects, depending on the functionalization of the OH^- groups. We have found that antioxidant capacities are not predictive of *C. elegans* lifespan benefits. Even where a life span extension and antioxidant effect were observed, it appears that other factors are also likely to be involved in modulating lifespan.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgments

José Luis Rodríguez-Chávez thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) for providing a graduate scholarship. The authors thank B. Quiroz, R. Patiño, M. I. Chávez, A. Peña, E. Huerta, R. Gaviño, L. Velasco, J. Pérez, Instituto de Química, UNAM, and D. Ortega Cuellar, Instituto Nacional de Pediatría, for technical assistance. The authors also acknowledge UNAM-DGAPA-PAPIIT (Project IG200514) for support. This paper is dedicated to Dr. Bernardino Huerta-Gertrudis (*In memoriam*), Instituto Nacional de Pediatría, México.

References

- [1] T. Jabs, "Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals," *Biochemical Pharmacology*, vol. 57, no. 3, pp. 231–245, 1999.
- [2] P. Venditti, L. Di Stefano, and S. Di Meo, "Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species," *Mitochondrion*, vol. 13, no. 2, pp. 71–82, 2013.
- [3] J. Dasgupta, S. Kar, R. Liu et al., "Reactive oxygen species control senescence-associated matrix metalloproteinase-1 through c-Jun-N-terminal kinase," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 225, no. 1, pp. 52–62, 2010.
- [4] T. Koyama, M. Tawa, N. Yamagishi et al., "Role of superoxide production in post-ischemic cardiac dysfunction and norepinephrine overflow in rat hearts," *European Journal of Pharmacology*, vol. 711, no. 1–3, pp. 36–41, 2013.
- [5] H. Xie, S. Hou, J. Jiang, M. Sekutowicz, J. Kelly, and B. J. Bacskaï, "Rapid cell death is preceded by amyloid plaque-mediated oxidative stress," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 19, pp. 7904–7909, 2013.
- [6] M. Pohanka, "Role of oxidative stress in infectious diseases. A review," *Folia Microbiologica*, vol. 58, no. 6, pp. 503–513, 2013.
- [7] S. Kundu, P. Ghosh, S. Datta, A. Ghosh, S. Chattopadhyay, and M. Chatterjee, "Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with Rheumatoid Arthritis," *Free Radical Research*, vol. 46, no. 12, pp. 1482–1489, 2012.
- [8] C. Marin, E. M. Yubero-Serrano, J. López-Miranda, and F. Pérez-Jiménez, "Endothelial aging associated with oxidative stress can be modulated by a healthy Mediterranean diet," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 5, pp. 8869–8889, 2013.
- [9] S. R. Khan, "Is oxidative stress, a link between nephrolithiasis and obesity, hypertension, diabetes, chronic kidney disease, metabolic syndrome?" *Urological Research*, vol. 40, no. 2, pp. 95–112, 2012.
- [10] J. L. Díaz, *Índice y Sinonimia de las Plantas Medicinales de México*, Monografías Científicas I, IMEPLAM, México City, Mexico, 1976.
- [11] A. Argueta, L. Cano, and M. E. Rodarte, *Atlas de las plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana*, vol. 1–3, Instituto Nacional Indigenista, Mexico City, Mexico, 1994.
- [12] X. Lozoya, A. Aguilar, and R. Camacho, "Encuesta sobre el uso actual de plantas en la Medicina Tradicional Mexicana," *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, vol. 25, pp. 283–291, 1987.
- [13] G. Delgado, M. Del Socorro Olivares, M. I. Chávez et al., "Antiinflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*," *Journal of Natural Products*, vol. 64, no. 7, pp. 861–864, 2001.
- [14] C. Jerga, I. Merfort, and G. Willuhn, "Flavonoidglyka aus den Blüten von *Heterotheca inuloides*," *Planta Medica*, vol. 56, no. 1, pp. 122–123, 1990.
- [15] G. Willuhn and R. Schneider, "Sesquiterpene, Triterpene und Sterine aus Blüten von *Heterotheca inuloides* ('Mexikanische Arnikablüten')," *Archiv der Pharmazie*, vol. 320, no. 5, pp. 393–396, 1987.
- [16] I. Kubo, S. K. Chaudhuri, Y. Kubo et al., "Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*," *Planta Medica*, vol. 62, no. 5, pp. 427–430, 1996.
- [17] H. Haraguchi, T. Saito, H. Ishikawa, Y. Sanchez, T. Ogura, and I. Kubo, "Inhibition of lipid peroxidation by sesquiterpenoid in

- Heterotheca inuloides*," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 48, no. 4, pp. 441–443, 1996.
- [18] E. Coballase-Urrutia, J. Pedraza-Chaverri, N. Cárdenas-Rodríguez et al., "Hepatoprotective effect of acetonetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats," *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 63, no. 4, pp. 363–370, 2011.
- [19] S. Brenner, "The genetics of *Caenorhabditis elegans*," *Genetics*, vol. 77, no. 1, pp. 71–94, 1974.
- [20] J. A. Lewis and J. T. Fleming, "Basic culture methods," in *Methods in Cell Biology*, H. F. Epstein and D. C. Shakes, Eds., vol. 48, pp. 3–29, Academic Press, San Diego, Calif, USA, 1995.
- [21] J. L. Rodríguez-Chávez, Y. Rufino-González, M. Ponce-Macotela, and G. Delgado, "In vitro activity of 'Mexican Arnica' *Heterotheca inuloides* Cass natural products and some derivatives against *Giardia intestinalis*," *Parasitology*, 2014.
- [22] T. B. Ng, F. Liu, and Z. T. Wang, "Antioxidative activity of natural products from plants," *Life Sciences*, vol. 66, no. 8, pp. 709–723, 2000.
- [23] Secretaría de Agricultura, "Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio".
- [24] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, 1951.
- [25] H. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yagi, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction," *Analytical Biochemistry*, vol. 95, no. 2, pp. 351–358, 1979.
- [26] H. Esterbauer and K. H. Cheeseman, "Determination of aldehydic lipid peroxidation products," *Methods in Enzymology*, vol. 186, pp. 407–421, 1990.
- [27] M. S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical," *Nature*, vol. 181, no. 4617, pp. 1199–1200, 1958.
- [28] N. Cotellet, J.-L. Bernier, J.-P. Catteau, J. Pommery, J.-C. Wallet, and E. M. Gaydou, "Antioxidant properties of hydroxyflavones," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 20, no. 1, pp. 35–43, 1996.
- [29] I. Fridovich, "Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 245, no. 16, pp. 4053–4057, 1970.
- [30] S. P. Wolff, "Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides," *Methods in Enzymology*, vol. 233, pp. 182–189, 1994.
- [31] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, and O. I. Aruoma, "The deoxyribose method: a simple 'test-tube' assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals," *Analytical Biochemistry*, vol. 165, no. 1, pp. 215–219, 1987.
- [32] N. Chakraborty and B. C. Tripathy, "Involvement of singlet oxygen in 5-aminolevulinic acid-induced photodynamic damage of cucumber (*Cucumis sativus* L.) chloroplasts," *Plant Physiology*, vol. 98, no. 1, pp. 7–11, 1992.
- [33] O. I. Aruoma and B. Halliwell, "Action of hypochlorous acid on the antioxidant protective enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase," *Biochemical Journal*, vol. 248, no. 3, pp. 973–976, 1987.
- [34] Y. K. Rao, S.-H. Fang, and Y.-M. Tzeng, "Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 100, no. 3, pp. 249–253, 2005.
- [35] G. M. Solis and M. Petrascheck, "Measuring *Caenorhabditis elegans* life span in 96 well microtiter plates," *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 49, Article ID e2496, 2011.
- [36] A. J. Dugas Jr., J. Castañeda-Acosta, G. C. Bonin, K. L. Price, N. H. Fischer, and G. W. Winston, "Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships," *Journal of Natural Products*, vol. 63, no. 3, pp. 327–331, 2000.
- [37] G. Cao, E. Sofic, and R. L. Prior, "Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 22, no. 5, pp. 749–760, 1997.
- [38] R. Amorati, S. Menichetti, C. Vigliani, and M. C. Foti, "Proton-electron transfer pathways in the reactions of peroxyl and dpph[•] radicals with hydrogen-bonded phenols," *Chemical Communications*, vol. 48, no. 97, pp. 11904–11906, 2012.
- [39] Y. Hirose, M. Kakita, T. Washizu, and S. Matsugo, "Structural determination of oxidation products of flavonoids in alcoholic aqueous solution with reactive oxygen species," *Journal of Photochemistry*, vol. 9, no. 2, pp. 424–426, 2002.
- [40] S. R. Husain, J. Cillard, and P. Cillard, "Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids," *Phytochemistry*, vol. 26, no. 9, pp. 2489–2491, 1987.
- [41] A. J. Nappi and E. Vass, "Hydroxyl radical production by ascorbate and hydrogen peroxide," *Neurotoxicity Research*, vol. 2, no. 4, pp. 343–355, 2000.
- [42] I. G. Kirkinetzos and C. T. Moraes, "Reactive oxygen species and mitochondrial diseases," *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 12, no. 6, pp. 449–457, 2001.
- [43] J. P. Hu, M. Calomme, A. Lasure et al., "Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity," *Biological Trace Element Research*, vol. 47, no. 1–3, pp. 327–331, 1995.
- [44] P. Di Mascio, M. E. Murphy, and H. Sies, "Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 53, no. 1, supplement, pp. 194S–200S, 1991.
- [45] C. Tournaire, S. Croux, M.-T. Maurette et al., "Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen (¹O₂) quenching," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 19, no. 3, pp. 205–215, 1993.
- [46] E. Coballase-Urrutia, J. Pedraza-Chaverri, R. Camacho-Carranza et al., "Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites," *Toxicology*, vol. 276, no. 1, pp. 41–48, 2010.
- [47] L. Segura, B. Freixa, T. Ringbom et al., "Anti-inflammatory activity of dichloromethane extract of *Heterotheca inuloides* in vivo and in vitro," *Planta Medica*, vol. 66, no. 6, pp. 553–555, 2000.
- [48] H. I. Rocha-González, E. Blaisdell-López, V. Granados-Soto, and A. Navarrete, "Antinociceptive effect of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin isolated from *Heterotheca inuloides*: role of peripheral 5-HT₁ serotonergic receptors," *European Journal of Pharmacology*, vol. 649, no. 1–3, pp. 154–160, 2010.
- [49] A. Kampkötter, C. G. Nkwonkam, R. F. Zurawski et al., "Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*," *Toxicology*, vol. 234, no. 1–2, pp. 113–123, 2007.
- [50] N. Saul, K. Pietsch, R. Menzel, S. R. Stürzenbaum, and C. E. W. Steinberg, "Catechin induced longevity in *C. elegans*: from key regulator genes to disposable soma," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 130, no. 8, pp. 477–486, 2009.
- [51] M. A. Wilson, B. Shukitt-Hale, W. Kalt, D. K. Ingram, J. A. Joseph, and C. A. Wolkow, "Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*," *Aging Cell*, vol. 5, no. 1, pp. 59–68, 2006.

- [52] C. Büchter, D. Ackermann, S. Havermann et al., "Myricetin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by DAF-16," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 6, pp. 11895–11914, 2013.
- [53] I. A. Rodrigues, M. M. B. Azevedo, F. C. M. Chaves et al., "In vitro cytotoxic effects of the essential oil from *Croton cajucara* (red sacaca) and its major constituent 7-hydroxycalamenene against *Leishmania chagasi*," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 13, article 249, 2013.

Artículo 3

Toxicological evaluation of the natural products and some semisynthetic derivatives of
Heterotheca inuloides Cass (Asteraceae)

José Luis Rodríguez-Chávez, Elvia Coballase-Urrutia, Gloria Sicilia-Argumedo, Teresa Ramírez-Apan, Guillermo Delgado

Publicado en: *Journal of Ethnopharmacology*. 2015, 175: 256-275.

El trabajo incluye la evaluación toxicológica de los metabolitos y ciertos derivados semisintéticos de *H. inuloides*, empleando diversos modelos biológicos. El documento aporta conocimiento sobre la toxicidad de los metabolitos de una planta ampliamente empleada en la medicina tradicional Mexicana.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep



Toxicological evaluation of the natural products and some semisynthetic derivatives of *Heterotheca inuloides* Cass (Asteraceae)



José Luis Rodríguez-Chávez^a, Elvia Coballase-Urrutia^b, Gloria Sicilia-Argumedo^c, Teresa Ramírez-Apan^a, Guillermo Delgado^{a,*}

^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México D.F., Mexico

^b Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700C Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán, 04530 México D.F., Mexico

^c Departamento de Patología, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700C Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán, 04530 México D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2015
Received in revised form 6 August 2015
Accepted 30 August 2015
Available online 5 September 2015

Keywords:

Heterotheca inuloides
Mexican arnica
Cytotoxicity
Cadinanes
RAW264.7 macrophages
Acute toxicity

Chemical compounds studied in this article:

7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (PubChem CID: 163563874)
7-hydroxycadalene (PubChem CID: 608115)
quercetin (PubChem CID: 5280343)
quercetin-3,7,3'-trimethyl ether (PubChem CID: 12303)
quercetin-3,7,3',4'-tetramethyl ether (PubChem CID: 5352005)
eriodictyol-7,4-dimethyl ether (PubChem CID: 320054)
 α -spinasterol (PubChem CID: 5281331)
7-(3,3-dimethylallyloxy)-coumarin (PubChem CID: 320362)
quercetin pentaacetate (PubChem CID: 14005)
3,8-dimethyl-5-(1-methylethyl)-1,2-naphthoquinone (PubChem CID: 21742)

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Heterotheca inuloides* Cass (Asteraceae), popularly known as *arnica mexicana*, is widely used in Mexican traditional medicine to treat bruises, dermatological problems, rheumatic pains, and other disorders as cancer. The major constituents in *H. inuloides* are cadinane type sesquiterpenes, flavonoids and phytosterols. Compounds with a cadinane skeleton have been proved to possess cytotoxic activity against human-tumor cell lines and brine shrimp, and display toxic effects in different animal species. Although this plant has been widely used, there is little available information on the safety and toxicity especially of pure compounds.

Aim of this study: Evaluate the potential toxicity of the natural products isolated from *H. inuloides* and some semisynthetic derivatives.

Materials and methods: The toxic aspects of the following natural products isolated from dried flowers of *H. inuloides*: 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (**1**), 7-hydroxycadalene (**2**), 3,7-dihydroxy-3(4H)-isocadalene-4-one (**3**), (1R,4R)-1-hydroxy-4H-1,2,3,4-tetrahydrocadalene-15-oic acid (**4**), D-chiro-inositol (**5**), quercetin (**6**), quercetin-3,7,3'-trimethyl ether (**7**), quercetin-3,7,3',4'-tetramethyl ether (**8**), eriodictyol-7,4-dimethyl ether (**9**), α -spinasterol (**10**), caryolan-1,9 β -diol (**11**) and 7-(3,3-dimethylallyloxy)-coumarin (**12**) as well as the toxic aspects of the semisynthetic compounds 7-acetoxy-3,4-dihydrocadalene (**13**), 7-benzyloxy-3,4-dihydrocadalene (**14**), 7-acetoxycadalene (**15**), 7-benzoxycadalene (**16**), quercetin pentaacetate (**17**), 7-hydroxycalamenene (**18**), 3,8-dimethyl-5-(1-methylethyl)-1,2-naphthoquinone (**19**), and 4-isopropyl-1,6-dimethylbenzo[c]oxepine-7,9-dione (**20**). Toxic activities of compounds were determined by sulforhodamine B (SRB) assay, *Artemia salina* assay, RAW264.7 macrophage cells. Additionally, the acute toxicity in mouse of compound **1**, the major natural sesquiterpene isolated from the acetone extract, was evaluated.

Results: The best cytotoxicity activity was observed for mansonone C (**19**) on K562 cell line with IC₅₀ 1.45 ± 0.14 μ M, for 7-hydroxycadalene (**2**) on HCT-15 cell line with IC₅₀ 18.89 ± 1.2 μ M, and for quercetin pentaacetate (**17**) on MCF-7 cell line with IC₅₀ 22.57 ± 2.4 μ M. Sesquiterpenes mansonone C (**19**) and 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (**1**) caused the strongest deleterious effects against *A. salina* with IC₅₀ 39.4 ± 1.07, and 45.47 ± 1.74 μ M, respectively. The number of viable RAW 264.7 cells was reduced with sesquiterpenes **1** and **2** by more than 90%. In addition, the acute study of **1** revealed no lethal effects at 300 mg/kg body weight, however, a reduction in the body weight of mice, morphological changes in the tissues of the liver and kidney and toxic signs were observed at very high doses (2000 mg/kg).

Conclusion: The results provided evidence for the cytotoxicity of Mexican arnica (*H. inuloides*) metabolites and may be correlated with one of the popular uses of this plant, in traditional Mexican medicine, as

Abbreviations: mCPBA, *Meta*-chloroperoxybenzoic acid; TCA, trichloroacetic acid; DMSO, dimethyl sulfoxide; Tris, tris(hydroxymethyl) aminomethane; SRB, sulforhodamine B; K₂Cr₂O₇, potassium dichromate; Tween[®] 80, polyoxyethylenesorbitan monooleate; Na₂HPO₄, sodium dihydrogen phosphate; Na₂HPO₄, sodium hydrogen phosphate; H₃PO₄, orthophosphoric acid; MTT, (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; CHCl₃, chloroform; Na₂SO₃, sodium sulfite; NaHCO₃, sodium bicarbonate; NaCl, sodium chloride; NMR, nuclear magnetic resonance; ATCC, American Type Culture Collection; HEPA, High Efficiency Particle Arrestance; UV, ultraviolet; IR, infrared; TLC, thin-layer chromatography; EIMS, electron ionization mass spectroscopy; HRFABMS, high resolution fast-atom bombardment mass spectrometry; v/v, volume/volume; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; OCDE, Organization for Economic Cooperation and Development; H-E, hematoxylin and eosin; COSY, correlation spectroscopy; NOESY, nuclear Overhauser effect spectroscopy; HSQC, heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy; HMBC, heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy; DEPT, distortionless enhancement by polarization transfer; LD50, median lethal dose; GHS, Globally Harmonized Classification System.

* Correspondence to: Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico. Fax: +52 55 5616 2217.

E-mail address: delgado@unam.mx (G. Delgado).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.055>
0378-8741/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

anticancer remedy. Among the active compounds contained in the acetone extract, the cytotoxic activity is mainly ascribable to cadinene type sesquiterpenes. In addition, evidence of acute toxicity suggests that 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (**1**) may lead to toxicity at very high doses.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Plants synthesize an array of metabolites that are released in response to damage or abiotic stress factors, and in the presence of pathogens or herbivores (Feng et al., 2007; Zhao et al., 2005). Some of these metabolites are harmful to mammals (Durmic and Blache, 2012; Iason, 2005). Mexican traditional medicine employs approximately 4000 plants (both native and introduced), with 85% of traded species coming from wild collections, some of which have never had their medicinal potential studied in detail (Juárez-Rosete et al., 2013). Certain plants used in traditional medicine in Mexico contain compounds that can cause adverse effects or affect the pharmacokinetics of various drugs (Cruz et al., 2012; Rodríguez-Fragoso et al., 2008). For this reason, the toxicities of several plants have been evaluated to determine their efficacy and safety (Aoki et al., 2005; Déciga-Campos et al., 2007).

Heterotheca inuloides Cass (Asteraceae), popularly known as *árnica mexicana*, is a plant native to Mexico (Nesom, 1990), widely used in Mexican traditional medicine and by the Mexican-American community to treat bruises, dermatological problems, rheumatic pains, and other disorders as cancer and diabetes (Alonso-Castro et al., 2011; Comisión Nacional Forestal, 2010; González-Stuart et al., 2006; Johnson et al., 2006; Zurita-Esquivel and Zolla, 1986). Mainly the dried flower heads (inflorescences) are used in the form of infusion, although the leaves and stems are sometimes used (Aguilar et al., 1994; Comisión Nacional Forestal, 2010; Winkelman, 1986). This plant species grows in highlands and in the cooler and temperate regions of Mexico (Nesom, 1990) and contains an array of bioactive compounds like cadinane type sesquiterpenes, phytosterols, and flavonoids (Bohlmann and Zdero, 1976; Delgado et al., 2001; Willuhn and Schneider, 1987). It has been reported that the extracts and some natural products from *H. inuloides* display a variety of biological activities such as anti-inflammatory, antibacterial, reactive oxygen species scavengers, and antiparasitic activity (Coballase-Urrutia et al., 2010; Delgado et al., 2001; Rodríguez-Chávez et al., 2015). *H. inuloides* was included in the extra-pharmacopoeia section of the Mexican Herbal Pharmacopoeia published by the Ministry of Health of Mexico due to a lack of sufficient scientific research (chemical or clinical) to support its therapeutic use (Secretaría de Salud, 2001). The herbal concoction containing *H. inuloides* combined with other plants has been associated with bleeding risks to perioperative patients (Wong et al., 2012) and recently, it has been reported that acetone and methanol extracts of *Heterotheca inuloides* display mutagenic activity (Ruiz-Pérez et al., 2014), however, the safety aspects of the pure components isolated and characterized from organic extracts of *H. inuloides*, including acute and subacute toxicity, have not been sufficiently evaluated.

The objective of this study was to investigate the toxicological aspects of the metabolites of *H. inuloides* using various human tumor cell lines, *Artemia salina*, and RAW 264.7 murine cell line; and the acute oral toxicity of the major natural constituent of the extract in mice. Based on the observed bioactivities, the effect of the modification of some chemical structures on biological activity was also discussed. The findings from this study contribute to a better understanding of the bioactivity of the natural products of *H. inuloides*, which is one of the plant species most widely used for traditional medicinal purposes in central Mexico.

2. Material and methods

2.1. General

All chemicals were analytical-reagent grade. mCPBA, TCA, DMSO, Tris, SRB, ethanol, K₂Cr₂O₇, Tween[®] 80, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, H₃PO₄, MTT, hematoxylin solution, CHCl₃, Na₂SO₃, NaHCO₃, NaCl, RPMI 1640 medium, and formaldehyde were purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA).

Amphotericin B was purchased from Gibco, Invitrogen Corporation (California, USA). Sodium pyruvate (ATCC30-2002) and heat-inactivated fetal bovine serum were purchased from ATCC (VA USA). Melting points were measured in a Fisher Scientific apparatus with a 300 °C thermometer (Cole-Parmer Instrument Company, IL USA). ¹H NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) spectra were obtained with Varian Unity INOVA equipment (Varian Co. CA USA) using TMS as internal standard. IR spectra were recorded on a Bruker Tensor 750 FT-IR (Bruker Co., MA USA) spectrophotometer with KBr pellets. UV spectra were obtained using a Shimadzu-UV160 spectrophotometer (Shimadzu Corporation, Kioto, Japan). Resolution mass spectra were obtained on a JEOL AccuTOF JMS-T100LC mass spectrometer (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Thin layer chromatography was performed using TLC Silica gel 60 F254, aluminum sheets 20 × 20 cm (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Compounds **5**, **7**, **8**, **9**, **11**, **12** and **20** were not tested in all assays due to a shortage of material.

2.2. Plant material

Flowers of *H. inuloides* (Common name: *árnica mexicana*, *acahual*, *akawtomitl*, *acahualli*, *xochihuepal*, *cuauteteco*, *falsa árnica*, *hornilla*, *tabaco de las montañas*, *re-emn*, *riemn*, and *árnica del país*; common English name: *false goldenaster*, *telegraph plant*) were provided by MIXIM Laboratories, Naucalpan, Mexico, and collected in 2010, in the town of Mesas Altas de San Juan Xoconusco, municipality of Donato Guerra (State of Mexico). The flowers were authenticated by Prof. Abigail Aguilar-Contreras. A voucher of plant material was deposited under code IMSSM-16064 in the Medicinal Plant Herbarium of the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, Mexico City). The accepted plant name was verified in www.theplantlist.org (accessed in May 2015).

2.3. Cell lines

Central leukemia (K562), colon (HCT-15) and breast (MCF-7) human tumor cell lines were supplied by the National Cancer Institute (NCI, Maryland, USA). The RAW264.7 murine macrophages (ATCC, TIB-71) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

2.4. Experimental animal 1

A. salina (Linnaeus) cysts (Eclósión Azul[®], Mexico) were obtained from a local store. The cysts were hatched in Petri dishes containing artificial seawater made by dissolving the commercial marine salt Instant Ocean[®] (Aquarium Systems, Inc. Blacksburg, VA) in deionized water (3.7% w/v with final pH 8) and incubated at 25 ± 1 °C for 48 h. Newly hatched brine shrimps were separated

from their shells and the remaining cysts transferred to freshly-prepared seawater with a Pasteur pipette, and readily used for bioassays.

2.5. Experimental animal 2

Female CD-1 mice weighing 20–25 g were obtained from the Production of Laboratory Animals Unit (UPEAL) from Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City. Prior to their acquisition, mice were kept in pathogen-free conditions in an HEPA filtered macro environment, at 21 ± 2 °C temperature, with 45–55% relative humidity, 12:12 light/dark cycles, and noise < 85 db. Mice were fed *ad libitum* with nutritious formula LabDiet-5001® (Purina, St. Louis, MO) and were supplied with ozonated water low in salts. They were housed in acrylic boxes (18.4 cm width \times 29.2 cm length \times 12.7 cm height) with the floor covered by a 5 cm bed of fine sawdust sterilized under UV light irradiation (Crigamex, Mexico).

2.6. Compounds from *H. inuloides*

The compounds 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (**1**), 7-hydroxycadalene (**2**), 3,7-dihydroxy-3(4H)-isocadalen-4-one (**3**), (1R,4R)-1-hydroxy-4H-1,2,3,4-tetrahydrocadalen-15-oic acid (**4**), D-*chiro*-inositol (**5**), quercetin (**6**), quercetin-3,7,3'-trimethyl ether (**7**), quercetin-3,7,3',4'-tetramethyl ether (**8**), eriodictyol-7,4'-dimethyl ether (**9**), α -spinasterol (**10**), caryolan-1,9 β -diol (**11**), and 7-(3,3-dimethyl allyloxy)-coumarin (**12**) were isolated from the acetone extract of dried flowers of *H. inuloides* in a previous study. The semisynthetic compounds 7-acetoxy-3,4-dihydrocadalene (**13**), 7-benzyloxy-3,4-dihydrocadalene (**14**), 7-acetoxycadalene (**15**), 7-benzoxycadalene (**16**), quercetin pentaacetate (**17**) and 7-hydroxycalamenane (**18**) were obtained by conventional chemical procedures as previously described (Rodríguez-Chávez et al., 2015).

2.7. Synthesis

3,8-Dimethyl-5-(1-methylethyl)-1,2-naphthoquinone (**19**), and 4-isopropyl-1,6-dimethylbenzo[*c*] oxepine-7,9-dione (**20**) were obtained by treating the natural product **2** with *m*CPBA. The reaction was carried out employing the microwave reactor Mono-wave 300 (Anton Paar GmbH, Graz, Austria). In a G10 reaction vial equipped with a stir bar, **2** (83 mg) was mixed with CHCl_3 (6 mL) solution of *m*CPBA (320 mg). The vial was sealed and the reaction mixture was exposed to microwave irradiation. The reaction mixture was stirred at a fixed rate of 200 rpm at 55 °C for 4 min. The reactor temperature was simultaneously monitored by an external infrared sensor and by an internal fiber-optic temperature probe (ruby thermometer) inserted directly in the reaction mixture. After cooling, reaction mixture was washed with 5% Na_2SO_3 , 5% NaHCO_3 , and saturated NaCl, and dried with anhydrous sodium sulfate. The solvent was evaporated and the residue was purified by column chromatography on silica gel using a Hexane-EtOAc gradient to provide derivatives **19** (Krishnamoorthy and Thomson, 1971) and **20** in 29% and 63% yields, respectively. Compound **20** is a novel compound that has not reported previously in the literature. The reaction was monitored by thin-layer chromatography (TLC) and the TLC plates were visualized with UV light (254 and 360 nm) and ceric ammonium sulfate solution. Column chromatography was carried out on a column packed with silica-gel 60 N spherical neutral size 230–400 mesh.

Mansonone C (**19**). Red-orange solid, mp 133–135 °C [lit: 134–135 °C] (Krishnamoorthy and Thomson, 1971); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 7.18 (1H, br, H-2), 7.42 (1H, br, H-3), 7.65 (1H, s, H-5), 2.62 (3H, s, H-9) 3.38 (1H, m, H-10), 1.29 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-11),

1.28 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-12), and 2.07 (3H, s, H-13). 6-isopropyl-4,9-dimethylbenzo[*c*]oxepine-1,3-dione (**20**): oily substance; IR (KBr) ν_{max} 2965, 2929, 2873, 1782, 1740, 1568, 1451, 1414, 1383, 1257, 1232, 1212, 1181, 1154, 1090, 1055, 1003, 806, 742 cm^{-1} . UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 242.2 (4.129), 216.4 (4.30). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz): δ_{H} 7.38 (1H, d, H-7) and δ 7.28 (1H, d, H-8), δ 7.24 (1H, s, H-5), δ 3.19 (1H, m, H-13), δ 2.40 (3H, s, H-15), δ 2.26 (3H, d, H-16), δ 1.25 (3H, s, H-13), and δ 1.25 (3H, s, H-14). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ_{C} 161.72 (C-1), 163.02 (C-3), 144.70 (C-6), 134.62 (C-9), 132.89 (C-11), 132.39 (C-5), 131.07 (C-4), 130.77 (C-7), 128.57 (C-8), 128.57 (C-10), 29.35 (C-12), 23.62 (C-13), 23.62 (C-14), 21.98 (C-15), 19.77 (C-16). EIMS m/z 245 [M] $^+$ (35). HRFABMS m/z 245.1011 [M] $^+$ (calc for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3 + \text{H}$, 245.1178).

2.8. Cytotoxicity by sulforhodamine B (SRB) assay

The cytotoxic activities of compounds were determined using the protein-binding dye SRB in a microculture method (Skehan et al., 1990). This assay is highly sensitive, its staining is not cell-line dependent, is independent of cell metabolic activity, and the end-point measurement is not time-critical, in addition, it has been adopted for routine use in the National Cancer Institute for *in vitro* antitumor evaluation (Keepers et al., 1991; Vichai and Kirtikara, 2006). Preliminary screening was carried out at 50 μM and the IC_{50} values were determined for those compounds that inhibited cell growth at least 50%. Cells were cultured in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% (v/v) inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin sulfate, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ glutamine, and 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B. Cells were maintained in a humidified atmosphere (95% humidity) with 5% CO_2 at 37 °C for 24 h prior to the addition of experimental compounds. The viability of the cells used in the experiments exceeded 95%, as determined with a trypan blue assay. The cells were removed from the tissue culture flasks by treatment with trypsin and diluted with fresh media. Cell suspensions (100 μL), containing 5000 or 7500 cells per well, were pipetted into 96-well plates (Corning, NY), and incubated at 37 °C for 24 h in a 5% CO_2 atmosphere to reach exponential growth. After 24 h, a 100 μL aliquot of the test compounds or positive control was added (all test substances were dissolved in DMSO at a maximum concentration of 0.5%, at which DMSO was completely innocuous) to each well. The cultures were exposed to the compounds for 48 h. After the incubation period, cells were fixed *in situ* by adding of 50 mL of cold 50% aqueous TCA and incubated at 4 °C for 1 h. The supernatant was discarded, and the plates were washed with tap H_2O , and air-dried. The TCA-fixed cells were stained by the addition of 0.4% SRB. Free SRB solution was then removed by washing with 1% aqueous acetic acid. The plates were then air-dried, and the bound dye was solubilized by the addition of 10 mM unbuffered Tris base (100 μL). The plates were placed on a shaker for 5 min, and the absorption was determined at 515 nm using an Ultra microplate reader (ELx808, Bio-Tek Instruments, Inc. Vermont, USA). The concentration–response curve was plotted for each compound. Results were expressed as the concentration giving 50% inhibition (IC_{50}), and were estimated from linear regression equations. The IC_{50} values (mean \pm standard error) for compounds and the positive control are reported in Table 1.

2.9. Viability of RAW264.7 macrophages by MTT assay

Mitochondrial function was used to establish how RAW 264.7 cell macrophages were affected after exposure to *H. inuloides* metabolites. This cell line offers advantageous characteristics, such as its ease of culturing, its adherence capability and its moderate growth which simplify the experimental procedures (Wiese and Seydel, 1996), and commonly utilized as an *in vitro* biological

Table 1
Activity of *H. inuloides* metabolites against cancer cell lines and *A. salina* (IC₅₀ in μM).

Compound	Cell lines			Artemia
	K562	HCT-15	MCF-7	salina
1	49.35 ± 3.6	59.37 ± 4.5	61.37 ± 4.3	45.47 ± 1.74
2	26.41 ± 2.0	18.89 ± 1.2	30. ± 0.87	53.92 ± 1.04
3		55.34 ± 2.8	51.76 ± 2.2	> 100
4	Nd	Nd	Nd	> 100
5	Nd	Nd	Nd	> 100
6			70.3 ± 4.6	> 100
7	–	–	–	> 100
8	–	–	–	> 100
9	57.67 ± 0.6	62.53 ± 3.6	51.48 ± 3.5	> 100
10	Nd	Nd	Nd	> 100
11	Nd	Nd	Nd	54.13 ± 1.07
12	Nd	Nd	Nd	> 100
13	46.43 ± 3.4	71.56 ± 2.4	79.65 ± 2.1	> 100
14	Nd	Nd	Nd	> 100
15	27.54 ± 0.9	55.93 ± 3.5	63.62 ± 5.8	> 100
16	Nd	Nd	Nd	–
17	35.31 ± 2.9	28.57 ± 2.1	22.57 ± 2.4	> 100
18	Nd	Nd	Nd	70.16 ± 1.08
19	1.45 ± 0.14	22.44 ± 2.6	–	39.4 ± 1.07
20	–	–	–	> 100
Controls ^a	0.59 ± 0.02 ^b	0.13 ± 0.05 ^b	0.16 ± 0.01 ^b	385.6 ± 1.07

Results represent the mean ± SD of three independent experiments. Nd—Not determined: at the concentrations tested the activity of compounds was low.

^a Camptothecin (CPT) for cytotoxicity in tumor cell lines and potassium dichromate (K₂Cr₂O₇) for *A. salina*.

^b CPT values are nanomolar range (nM).

model to determine effects of toxicants on cells. The cell respiration was determined by the mitochondrial-dependent reduction of MTT to formazan (Mosmann, 1983). The total amount of formazan is directly proportional to the number of viable cells (Keepers et al., 1991). The RAW264.7 cells were cultured in Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) with 4 mM L-glutamine, 4.5 g/L glucose, and 1 mM sodium pyruvate (ATCC30-2002) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (ATTC30-2020) and viability was determined by trypan blue exclusion. Cells were maintained at 37 °C, 5% CO₂ and used for experiments between passage 5 and 18. Reagents for cell culture were purchased from ATCC. 100 μL/well of 2x10⁶ cells/ml were seed in 96 well microtitre plates and incubated for 2 h. Cells were treated with or without 50 μL of each test compounds dissolved in DMSO and serially diluted at a decreasing concentration of 100–3.1 μM. The final concentration of DMSO in the cell culture supernatant was ≤ 0.1% (v/v). Controls also received the same amount of DMSO. Cells were then incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 24 h. After 24 h of exposure, the supernatant from each well was removed and briefly, 10 μL of MTT was added to the remaining cell in 96 well microtitre plates, and incubated for 4 h at 37 °C. Incorporated dye was dissolved in DMSO (100 μL) and their absorbance was measured on a microplates reader at 570 nm using an ELISA plate reader (Syner/HT: Biotek Instruments). Results were expressed as the percentage of MTT incorporated into treated cells compared with control cells.

2.10. Artemia salina assay

Brine shrimp lethality assay was carried out to investigate the general toxicity of the metabolites of *H. inuloides*. Assays were performed in a 96-well microtitration plate (Corning, NY), as described elsewhere (Solis et al., 1993) with 10–20 brine shrimp larvae in 100 μL of seawater per well. The samples (in triplicate) to

be assayed were dissolved in ethanol-DMSO (50/50 v/v) and diluted serially in seawater to give assay concentrations adjusted of 1, 10, or 100 μM. Standard potassium dichromate solutions (1, 10, and 100 μM) were used as positive controls. Due to the low solubility of the compounds, the maximum concentration tested in the brine shrimp toxicity assay was 100 μM. Seawater and deionized water blank controls were also tested. After 24 h, survivors were counted using a Nikon Diaphot 300 inverted microscope (Nikon Co. Tokyo, Japan) and the mortality rate (%M) of each dose was calculated and compared with the control. The mortality rate was calculated as the number of dead nauplii divided by the initial number of nauplii (10) and multiplied by 100.

2.11. Acute oral toxicity in mice

The number of animals used was kept to a minimum. The experimental protocol was approved by the Institutional Ethical Animal Committee of the Instituto de Química-UNAM (Protocol number IQUNAM/CICUAL/01/GDL/15). In addition, the handling and euthanasia of animals were conducted out in strict accordance with the technical specifications for the production, care and use of laboratory animals, included in the Mexican Official Standard NOM-062-Z00-1999 (Secretaría de Agricultura, 2001), and Guiding Principles of the Use of Animals in Toxicology, adopted by the Society of Toxicology (USA) in July 1989 (amended in December 2008). The acute oral toxicity of compound 1 was evaluated according to the procedures outlined by the OECD (Organization for Economic Cooperation and Development, 2001). Mice were fasted 3–4 h prior to dosing but were administration water. The mice were randomized into 3 groups with six mice each (n=6). Group I (control) animals were administered only electrolyte solution. Group II animals were administered orally with 300 mg/kg body weight of compound 1. Group III animals received 2000 mg/kg body weight of the same compound 1. The test compound was suspended in an electrolyte solution containing glucose, 20 g; KCl, 1.5 g; NaCl, 3.5 g; Na₂H(C₃H₅O(COO)₂)₂·2H₂O, 2.9 g/L (Apotex Mexico), and 2% Tween-80[®] and was administered in a single dose by gavage using a suitable intubation cannula. After the fasting period, the animals were weighed and administered with the substance. After dosing, the fasting was continued for 1 h and mice were observed continuously for physiological and behavioral changes during the first 4 h and periodically during the first 24 h. They were then kept under observation for up to 14 days. During this period the animals were observed daily for mortality, behavioral profile (stereotypes, irritability, sedation), neurological profile (seizures, motor incoordination), and autonomic profile (salivation, piloerection, abdominal contortion, diarrhea), and weighed daily. On day 14, the animals were euthanized.

2.12. Justification for dose selection

The acute toxicity study of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (1) was evaluated in mice according to the OECD guideline 423. The guideline states on paragraph 19 that “when there is no information on a substance to be tested, for animal welfare reasons it is recommended to use the starting dose of 300 mg/kg body weight”. Since there is insufficient information on the toxicity of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (1), the starting dose of 300 mg/kg body weight for a period of 14 days was selected. Due to limited availability of the substance for further experimentation, the sub-acute assay could not be assessed in the present study.

2.13. Histopathological analysis

After sacrificing the mice, parts of the liver and kidney tissues were collected for the histological studies. The organs were

observed macroscopically for the presence or absence of alterations and their appearance was compared between the treated and control groups. The organs were washed in buffer solution and fixed immediately with 10% buffer/formaldehyde (v/v) for 24 h, dehydrated with a graded series of ethyl alcohol, and embedded in paraffin. The paraffin-embedded tissues were cut into 4–5 μm sections with a microtome (Leica Biosystems, Nussloch Germany) and mounted in glass, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for examination under a microscope. Histological slides were examined under a light Olympus BX51 microscope (Olympus Co. Tokyo, Japan) equipped with a digital camera, Micro-FireCX9000 (mbf Bioscience, Vermont, USA), using the digital image analysis system Picture Frame (TM) Applications 2.3 070207-05A (IEEE-1394PCI Card).

2.14. Statistical analysis

Experimental values are expressed as the mean \pm the standard deviation. Data were analyzed using the one-way analysis of variance (ANOVA) and Student's-*t* test. Statistical significance was set at $p \leq 0.05$. All calculations were performed using Origin 8 (OriginLab Co. Massachusetts, USA) software. The 50% lethal concentrations (LC_{50}) were obtained from the data according to the Reed–Muench method (Reed and Muench, 1938). For IC_{50} values, data were subjected to ANOVA followed by Dunnett's test. Values of $p \leq 0.05$ (*) and $p \leq 0.01$ (**) were considered significantly different from the control ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). The individual weight of animals was recorded before the administration of the compound on the 1st day of the study and 14th day of the experiment before sacrificing the animals. Changes in the weight were compared with that of the control animals. The experimental results were expressed as the mean \pm SEM. Dunnett's test was performed for the sample treated and control groups.

3. Results

3.1. Identification of compounds

Two compounds were obtained and isolated from the reaction of compound **2** with mCPBA using microwaves as the heating source. Compound **19** was purified as an orange solid and its IR spectrum showed the absorption of two carbonyl groups at 1665 and 1670 cm^{-1} . The ^1H and ^{13}C spectral data showed signals comparable with those for **2**, except for the replacement of an aromatic proton at δ_{H} 7.25 and phenol group at C7 in **2**, and displaying carbonyl carbon at δ_{C} 182.0 and 182.8, suggesting a cadinane type *o*-naphthoquinone. The ^1H and ^{13}C spectroscopic data, melting point and comparisons with data reported in the literature allowed the identification of the compound as 5-isopropyl-3,8-dimethylnaphthalene-1,2-dione (mansonone C, **19**). Compound **20**, obtained as an oily substance, had a molecular ion peak ($\text{M}^+ + \text{H}$) at m/z 245, indicating the molecular formula $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$. The structural elucidation of this compound was achieved on the basis of ^1H and ^{13}C NMR spectra, 2D COSY, NOESY, HSQC and HMBC experiments as well as HR-ESI-MS data (molecular ion peak at m/z 245.1100 $[\text{M} + \text{H}]^+$). The ^1H NMR spectrum displayed signals corresponding to two *ortho*-coupled aromatic protons at δ_{H} 7.28 (1H, d, $J=8.1$, H-8) and δ_{H} 7.38 (1H, d, $J=8.1$, H-7). There was one singlet signal of aromatic protons at δ_{H} 7.24 (1H, q, $J=8.1$, H-5), with the chemical shift indicating that it was next to a carbonyl group. The presence of two methyl groups at δ_{H} 2.40 (3H, s, H-15) and δ_{H} 2.26 (3H, d, $J=1.6$, H-16) and one isopropyl moiety at δ_{H} 3.19 (1H, m, H-12), δ_{H} 1.26 (6H, d, $J=6.8$ Hz, H-13 and H-14) supported the structure. The ^{13}C NMR spectrum displayed signals for 15 carbons, which were assigned by the DEPT spectrum as four methyls, four

methines and two carbonyl carbons. The remaining five signals appearing in the broad-band spectrum were attributed to the quaternary carbon atoms. IR absorption bands at 1741 and 1782 cm^{-1} revealed the presence of an anhydride and this functional group was further confirmed by the ^{13}C NMR spectrum, with signals at δ_{C} 161.71 (C-3) and δ_{C} 163.02 (C-1). The elucidated structure of this compound (**20**) is depicted in Fig. 1.

3.2. Cytotoxicity in cell lines

To evaluate the cytotoxicity of the compounds from *H. inuloides*, K652 (leukemia), HCT-15 (colon), and MFC7 (breast cancer) human cancer cell lines were treated with varying concentrations of these compounds and the sulforhodamine B assay was performed. Seven of the samples tested were active in at least two cell lines with IC_{50} values ranging from 1.45 ± 0.14 to 79.65 ± 2.1 μM . The acquired cytotoxicity data revealed that compound **19** (mansonone C) was the most active compound against the tested K652 cell line, followed by compound **2** and their acetylated derivative **15**, which were moderately active. Compounds **1**, **13**, and **9** also showed activity, although less. For the HCT-15 cell line, the most active compound was **2** (7-hydroxycadalene), followed by **19** and **17**. Finally, for the MCF cell line the most active compound was **17** (quercetin pentaacetate), followed by **2**. Other compounds showed IC_{50} values greater than 50 μM and some had no activity (see Table 1).

3.3. Artemia salina assay

The effect of the metabolites of *H. inuloides* and semisynthetic analogous on the lethality of brine shrimp was also determined. The LC_{50} values of the brine shrimp for these compounds and the positive control are shown in Table 1. The exposure of *A. salina* to some of the compounds produced toxic effects. Mansonone C (**19**) displayed the highest activity, followed by compounds **1**, **2**, **11**, and **18**. The LC_{50} value obtained according to the Reed–Muench method for **19** was 39.4 ± 1.07 μM . The remaining compounds were not toxic to *A. salina*, and the LC_{50} values of these compounds were presumably higher than 100 μM . The reference standard, potassium dichromate, had an LC_{50} value of 385.65 ± 1.07 μM . There was no mortality in the negative control group.

3.4. Viability of RAW264.7 macrophages

The viability of RAW264.7 macrophages in the presence of metabolites (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of *H. inuloides* was measured by the MTT assay. The results showed compounds **1** and **2** and their acetylated derivatives **13** and **15** produced a significant decrease in the viability of macrophages at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Table 2). Compounds 3,7-dihydroxy-3(4H)-isocadalen-4-one (**3**), (1*R*,4*R*)-1-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydrocadalen-15-oic acid (**4**), quercetin (**6**), quercetin-3,7,3'-trimethyl ether (**7**), quercetin-3,7,3',4'-tetramethyl ether (**8**), erioctoyl-7,4'-dimethyl ether (**9**), 7-benzyoxy-3,4-dihydrocadalene (**14**), and 7-benzoxycadalene (**16**) showed no significant macrophage toxicity (Table 2), and the percentage of living cells examined by MTT assay was greater than 80% in most cases.

3.5. Acute oral toxicity

After 14 days of administration of **1** (7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene), at a dose up to 300 mg/kg body weight, there were no toxic symptoms or mortality observed in mice. No seizures or motor incoordination occurred and other signs of toxicity, such as dyspnea, lethargy, and grunting, were not detected in mice during the first 4 h or at 24 h after administration. There were no significant differences in behavior, skin, respiratory or postural

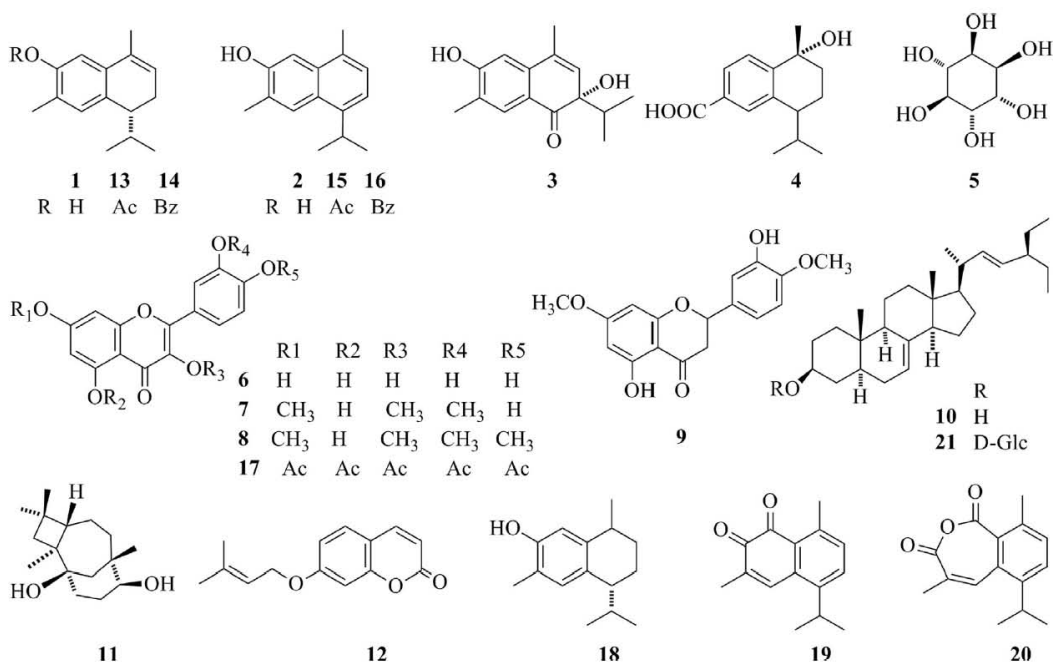


Fig. 1. The natural products and derivatives of *H. inuloides* assayed.

Table 2
Effect of *H. inuloides* metabolites on the RAW264.7 cells viability.

Compound (25 µg/mL)	% Viability
1	4.0 ± 0.5**
2	3.6 ± 0.1**
3	92.5 ± 7.5
5	100
6	100
7	89.7 ± 10.3
8	79.6 ± 0.1
9	100
13	5.2 ± 0.09**
14	100
15	3.7 ± 0.06**
16	100
Oleic acid ^a	91.92 ± 1.4

^a Negative control.

** *p* < 0.05 with respect to the control.

abnormalities between the treated and control groups. A significant difference was observed between treated animals and controls when compound **1** was administered at a dose of 2000 mg/kg. Mice treated showed piloerection, breathing difficulties and some toxicity signs, such as dyspnea, lethargy and grunting during the first 4 h. Short term sluggishness was observed in some mice after oral gavage in the first hour. The animals were observed for 14 days after administration of compound **1**, and no deaths occurred. The corporal weight of the animals was recorded. Weight gain was noticed in the group treated with 300 mg/kg of compound **1**, but the gain was not significantly different compared with the control group (Fig. 2). Compound **1** caused an abnormal increment in body weight and death in some mice of the group treated with 2000 mg/kg, during the 14-day observation period. The macroscopic examination of the organs of

animals treated with the compound **1** showed no change in color compared with organs from the controls.

3.6. Histopathological analysis

The liver sections of the control group (Group I) animals showed a typical histo-architecture with a normal arrangements of cells in the liver lobules with a central vein, radiating hepatic cords, and sinusoids intact (H&E magnification 40X). Light microscopy demonstrated a well-preserved and homogeneous cytoplasm of hepatocytes (Fig. 3). In groups II and III (treated with 300 and 2000 mg/kg body weight of compound **1**, respectively), light microscopy showed distortion in the architecture, the presence of a chronic inflammatory infiltrate composed of mononuclear cells (Kupffer cells), and vacuolization of hepatocytes. No morphopathological change was found in the control group, kidneys, which showed numerous glomeruli, renal tubules and interstitial tissues with normal histological structures. Treatment with compound **1** (300 mg/kg and 2000 mg/kg body weight) led to moderate damage. The proximal convoluted tubules presented slight alterations in the morphological structure and distension of Bowman's capsule, these changes were more evident with the dose of 2000 mg/kg body weight dose (Fig. 3).

4. Discussion

Through oxidation of the sesquiterpene **2** with *m*CPLBA using the microwave method, we obtained compound **19** (mansonone C) and the novel compound **20**. Compound **19** is found naturally in the heartwood of plants of the genera *Ulmus* and *Mansonia*, and has been synthesized from sesquiterpene **2** by oxidation with Fremy's salt (Alexander and Krishna-Rao, 1971; Krishnamoorthy and Thomson, 1971) and by oxidation in silica (Strunz et al., 1989).

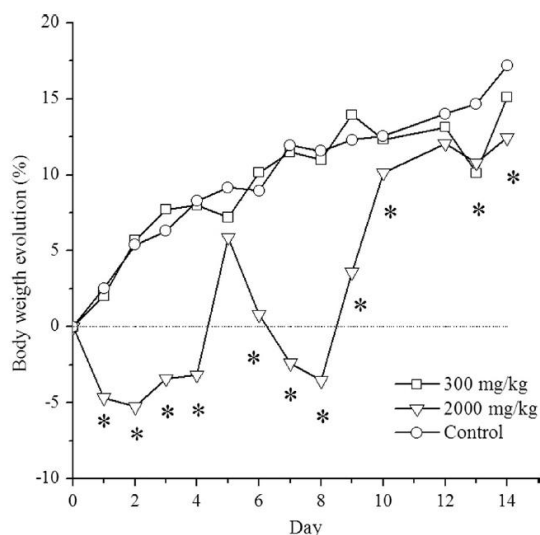


Fig. 2. Changes in body weight of mice exposed to compound **1** (7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene) at 300 and 2000 mg/kg body weight. Each point represents the mean of six mice. * $p < 0.05$ with respect to the control.

It was also obtained by cyclization of the *p*-benzoquinone hydroxyperezone (García et al., 1997). Using these conventional methods, the reported yield is low and the preparation is lengthy. The synthesis in the microwave required irradiation at 55 °C required only 4 min.

In Mexico, *H. inuloides* is used in traditional medicine as a remedy for of bruises, inflammatory processes and other ailments as cancer (Alonso-Castro et al., 2011; Zurita-Esquivel and Zolla, 1986). Previous reports mentioning that petrol, ethanol, and dichloromethane extracts of *H. inuloides* displayed cytotoxic action against murine leukemia (P388 cells) (Villarreal et al., 1992). Additionally, sesquiterpenoids **1** (7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene), **2** (7-hydroxycadalene), β -caryophyllene and β -caryophyllene epoxide isolated from dried flowers exhibited cytotoxic activity

against breast carcinoma (BT-20 cells), epitheloid cervix carcinoma (HeLa cells), melanoma skin cells from human (B-16 cells), and melanoma skin cells from mouse (Kubo et al., 1996). This study compares the cytotoxic activity of components isolated from acetone extract in order to increase the knowledge on the pharmacological potential of *H. inuloides*. The sulforhodamine B assay showed that cadinene type sesquiterpenes are considered to be the main active constituents. Replacement of hydrogen at position 7 in the sesquiterpenes **1** (7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene) and **2** (7-hydroxycadalene) by an acetyl group reduced the activity (of their acetylated derivatives **13** and **15**, respectively) against the HCT-15 and MCF-7 cell lines. Substitution of the hydroxyl group at position 7 resulted in a complete loss of activity in the benzoyl-substituted analogs (compounds **14** and **16**). This effect could be attributed to steric hindrance arising from the increase in the volume of the derivatives. Previous reports indicated that changes on OH at C-7 in structurally similar compounds modifies the biological activity (Lee et al., 2007). Conversely, the acetylated derivative (**17**) of compound **6** (quercetin) showed greater activity against the cell lines tested. It has been reported that ester-based derivatives enhanced the bioavailability of quercetin (Biasutto et al., 2007). This effect could be attributed to the increased solubility of the acetyl derivative compared with the natural compound.

Compounds **1** and **2** were significantly toxic to *A. salina* larvae. It was observed that replacement of the phenolic hydrogen in the sesquiterpenes **1** and **2** by acetyl groups in the compounds **13** and **15** did not modify the toxic effect; however, substitution with benzoyl groups in compounds **14** and **16** reduced the toxic effect. The other compounds tested did not show toxic effect on the brine shrimp. It is noted that compounds **1** and **2** were toxic to brine shrimp and were also active against tumor cell lines. These results are consistent with previously published data indicating that positive results in brine shrimp assays are associated with pharmacological potential, including anti-tumor activity (Meyer et al., 1982). Also, compounds with a cadinane skeleton, such as 10 α -hydroxyamorphane-4-en-3-one, 4 α -methylcadinane-1 α ,2 α ,10 α -triol, 10 α -hydroxyamorphane-4-en-3-one, α -cadinol, and parviflorene, have shown significant cytotoxic activity against human-tumor cell lines and were toxic to brine shrimp (He et al., 1997; Takahashi et al., 2003).

When tested with the murine peritoneal macrophage cell line

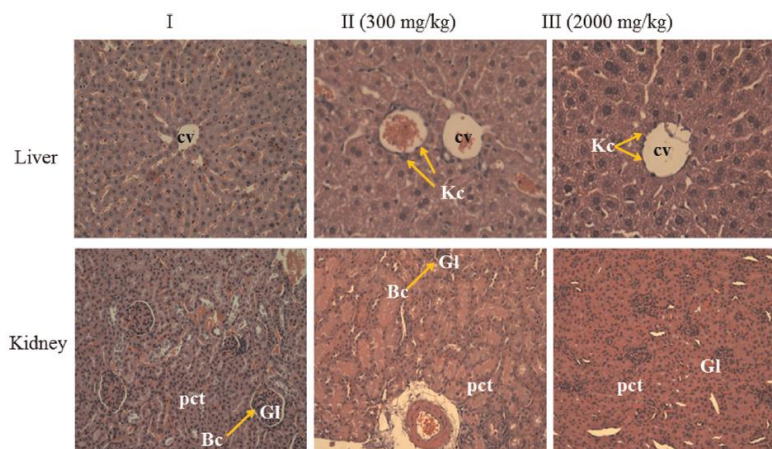


Fig. 3. Representative Hematoxylin & Eosin (H&E) staining liver and kidney sections (5 μ M) from mice treated with electrolyte solution (control I) or 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (**1**) (II and III) obtained on day 15 of treatment. Figure abbreviations: cv (central vein), Kc (Kupffer cells), Bc (Bowman's capsule), Gl (glomerulus), pct (proximal convoluted tubule). (H&E magnification 40X).

RAW264.7, the sesquiterpenes **1** and **2** showed toxicity. Modification of the molecular structures of **1** and **2** changed their toxicity. The viability values of the acetylated derivatives showed no statistically significant differences from their natural precursors. However, benzoylated derivatives showed a significant decrease in toxicity in macrophages. In the present study, the tested flavonoids did not show significant macrophage toxicity.

Acute toxicity tests represent the first stage in the evaluation of the toxic effects of new substances for therapeutic purposes and provide a preliminary identification of the species, target organ and dose specific toxic effects. Occasionally, the tests may confirm the short-term and long-term safety of such products before they are brought to market (Denny and Stewart, 2013; Parasuraman, 2011). In this study the process of the OECD was selected, because it offers the advantage that adequate information is obtained using only a few animals. Due to the shortage of compounds, only the acute toxicity of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (**1**) was evaluated. This cadinane sesquiterpene compound was the major constituent in the extract from *H. inuloides* flowers (Delgado et al., 2001). Information in the literature indicated that compounds with a cadinane skeleton display toxic effects in different animal species; for example, 9-oxo-10,11-dehydroageraphorone, a cadinene sesquiterpene isolated from *Eupatorium adenophorum* (Bhardwaj et al., 2001), and zederone, isolated from *Curcuma elata* (Pimkaew et al., 2013), are hepatotoxic. The first compound also causes cholestasis in rodents, and high concentrations of gossypol produces acute signs of poisoning (Gadelha et al., 2014).

CD-1 albino mice treated with 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (**1**) at 300 mg/kg doses did not show lethal effects, and there were no statistically significant changes in body weight, behavioral profiles, and appetite suppression. Thus, there were no deleterious effects. This could indicate that at this dose, this compound (**1**) did not produce a marked disturbance in metabolism. The highest dose (2000 mg/kg body weight) was associated with loss of weight in the first 7 days, with subsequent recovery; as a result, the weight was similar to the control group in the last 2 days (Fig. 3). Changes in weight have been accepted as a sensitive indicator of chemically induced changes in the body and may reflect the degree of toxicity after exposure to a toxic substance (Michael et al., 2007). According to the chemical labeling and classification of acute systemic toxicity recommended by GHS (UN. United Nations, 2011), compound **1** (7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene) was assigned class 4 status ($LD_{50}=500$ mg/kg). Histopathological analysis of mice in the control group revealed there was a characteristic histoarchitecture of a normal liver; while mice exposed to compound **1**, displayed distortion of the hepatic histo-architecture, the presence of a chronic inflammatory infiltrate, and microvesicular lipidosis in the cytoplasm of hepatocytes. These pathological signs have been associated with liver toxicity and failure caused by exogenous compounds (Roberts et al., 2007; Sanyal, 2002), suggesting that compound **1** has a mild to moderate toxic effect, with changes more visible with 2000 mg/kg dose. However, the presence of larger nuclei in cells suggests that they may undergo a regeneration process. Proximal convoluted tubules and the Bowman's capsule processes are involved in the excretion of endogenous and exogenous compounds, including metabolites and drugs. However, exposure to certain substances produced alterations in the histostructure (Abdelhalim and Jarrar, 2011; Hanika et al., 1986). The histopathological study showed after exposure of mice to compound **1**, there were alterations in the morphological structure of the proximal convoluted tubules and Bowman's capsule, which could be associated with a toxic effect on the kidney tissue that increases with dose (Fig. 3).

In published studies, the values of the amount of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (**1**) isolated from this Mexican plant ranged from 0.0009 to 1.67769 mg/g dry weight (Delgado et al., 2001;

Kubo et al., 1994; Maldonado-López et al., 2008; Rodríguez-Chávez et al., 2015). The extractability of the compounds depends on the parameters, including the temperature, time and the solvent type and polarity (Tan et al., 2014). The infusions of *H. inuloides* used in folk medicine are made with about 3 g of flowers per liter of boiled water (Comisión Nacional Forestal, 2010), while commercial tea infusions (200 mL) prepared with only one tea bag containing 1 g of plant (Muñoz-Velázquez et al., 2012), and the recommended doses is 3 cups a day during 15 days. Considering that tea infusions are dilute solutions of soluble constituents, and certain compounds of biological relevance may be not extracted, its ingestion may not cause any adverse effects because of the minimal amount ingested. However, further studies are necessary to evaluate sub-acute and chronic toxicity to better understand the risks and benefits of using *H. inuloides* in medicine.

5. Conclusions

The toxicity of different metabolites isolated from the acetone extract of *H. inuloides* and some semisynthetic derivatives was assessed. It was demonstrated the *in vitro* activity efficacies of some flavonoid and cadinene type compounds against different cancer cell lines. Among the compounds of *H. inuloides* the best cytotoxicity was observed for mansonone C (**19**) on K562 cell line with IC_{50} 1.45 ± 0.14 μ M, for 7-hydroxycadalene (**2**) on HCT-15 cell line with IC_{50} 18.89 ± 1.2 μ M, and for quercetin pentaacetate (**17**) on MCF-7 cell line with IC_{50} 22.57 ± 2.4 μ M. The strongest deleterious effects against *A. salina* were observed for sesquiterpenes mansonone C (**19**) and 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (**1**) with IC_{50} 39.4 ± 1.07 , and 45.47 ± 1.74 μ M, respectively. Hydroxycadalene (**2**) also showed a strong toxic effect on *A. salina* ($IC_{50}=53.92 \pm 1.04$ μ M). The number of viable RAW 264.7 cells was reduced with sesquiterpenes **1** and **2** by more than 90% compared to untreated controls. In the same biological assays the flavonoid type compounds did not exert toxic effect. In addition, the substituents play an important role in the activity of 7-modified **1** and **2** derivatives. Single dose acute toxicity of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene (**1**), the main *H. inuloides* cadinene sesquiterpene component, was examined to identify potent toxicity. At a dose of 2000 mg/kg, compound **1** significantly caused changes in body weight of mice, histomorphological changes in the liver and kidney, and lethal effects in mice. However, the mechanism of action involved in the toxicity is not yet known, therefore, complementary studies are needed to clarify the mechanism of action of the compounds. According to the GHS guidelines for the chemical labeling and classification, compound **1** (7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene) was assigned class 4 status ($LD_{50}=500$ mg/kg). This study is the first to show that *H. inuloides*, which is claimed to be a treatment for inflammatory process and other ailments, is a medicinal plant that contains compounds that may cause side effects, particularly at very high doses, suggesting that should be used with caution.

Conflicts of interest

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and publication of this article.

Ethical approval

All applicable institutional and/or national guidelines for the care and use of animals were followed.

Funding

Part of this work was supported by Universidad Nacional Autónoma de México-DGAPA-PAPIIT [grant IG200514].

Acknowledgements

J.L.R.-Ch. thanks Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) and Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) for financial support for doctoral studies. We thank Chemist Jorge Ebrard (Laboratorios Mixim, Mexico City) for providing the plant material and Prof. Abigail Aguilar-Contreras (Instituto Mexicano del Seguro Social) for the identification of the species. We also thank Antonio Nieto, Ángeles Peña, María Isabel Chávez, Beatriz Quiroz, Héctor Ríos, Rocío Patiño, Javier Pérez, and Luis Velasco from Instituto de Química, UNAM, for technical assistance.

References

Abdelhalim, M.A., Jarrar, B.M., 2011. Renal tissue alterations were size-dependent with smaller ones induced more effects and related with time exposure of gold nanoparticles. *Lipids Health Dis.* 21 (10), 163.

Aguilar, A., Camacho, J.R., Chino, S., Jáquez, P., López, M.E., 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información etnobotánica. IMSS, México.

Alexander, J., Krishna-Rao, G.S., 1971. Studies in terpenoids-XIX. Conversion of 7-hydroxy-calamenene and cadalene to mansonone C. *J. Indian Inst. Sci.* 53, 206–208.

Alonso-Castro, A.J., Villarreal, M.L., Salazar-Olivo, L.A., Gómez-Sánchez, M., Domínguez, F., García-Carranza, A., 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J. Ethnopharmacol.* 133 (3), 945–972.

Aoki, M.K., Encarnación-Dimayuga, R., Cortés, A.A.R., 2005. Evaluación toxicológica de productos naturales usando microtécnicas. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 36 (1), 11–17.

Bhardwaj, R., Singh, A., Sharma, O.P., Dawra, R.K., Kurade, N.P., Mahato, S.B., 2001. Hepatotoxicity and cholestasis in rats induced by the sesquiterpene, 9-oxo-10,11-dehydrogeraphorone, isolated from *Eupatorium adenophorum*. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15 (5), 279–286.

Biasutto, L., Marotta, E., De Marchi, U., Zoratti, M., Paradisi, C., 2007. Ester-based precursors to increase the bioavailability of quercetin. *J. Med. Chem.* 50 (2), 241–253.

Bohlmann, F., Zdero, C., 1976. Natürlich vorkommende Terpen-Derivate. 63. Über die Inhaltsstoffe von *Heterotheca inuloides* Cass. *Chem. Ber.* 109, pp. 2021–2025.

Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Camacho-Carranza, R., Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta-Gertrudis, B., Medina-Campos, O.N., Mendoza-Cruz, M., Delgado-Lamas, G., Espinosa-Aguirre, J.J., 2010. Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. *Toxicology* 276 (1), 41–48.

Comisión Nacional Forestal., 2010. *Árnica del País*. In *Plantas medicinales de la Farmacia Viviente del Cefofo: usos terapéuticos tradicionales y dosificación*. 1st ed. 12–14. México, pp. 12–13.

Cruz, S., de la, Rodríguez, E., Dávalos, H.N., Astudillo-Vázquez, A., 2012. Acute toxicity and decreased peristalsis in mice caused by *Taxodium mucronatum* and *Acacia farnesiana* extracts. *Rev. Latinoamer. Quim.* 40 (1), 19–25.

Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Angeles-López, G.E., Navarrete, A., Mata, R., 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 110 (2), 334–342.

Delgado, G., Olivares, M.S., Chávez, M.I., Ramírez-Apan, T., Linares, E., Bye, R., Espinosa-García, F.J., 2001. Antiinflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*. *J. Nat. Prod.* 64 (7), 861–864.

Denny, K.H., Stewart, C.W., 2013. Acute, sub-acute, sub-chronic and chronic general toxicity testing for preclinical drug development, 1st ed. In: Faqi, Ali S. (Ed.), *A comprehensive guide to toxicology in preclinical drug development* 87–105. Elsevier/Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 87–105, Chapter 5.

Durmic, Z., Blache, D., 2012. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176, 150–162.

Feng, Z., Liu, R., De Angelis, D.L., 2007. Plant–herbivore interactions mediated by plant toxicity. *Theor. Popul. Biol.* 73, 449–459.

Gadelha, I.C.N., Fonseca, N.B.S., Oloris, S.C.S., Melo, M.M., Soto-Blanco, B., 2014. Gossypol toxicity from cotton seed products. *Sci. World J.* 2014, 231635.

García, E., Mendoza, V., Guzman, J.A., 1997. Formation of mansonones from naturally occurring para-benzoquinones. *Nat. Prod. Lett.* 11 (1), 67–72.

González-Stuart, A., Rivera, J.O., Rodríguez, J.C., Hughes, H., 2006. Providers of

herbal products in the largest US-Mexico border community. *Tex. Med.* 102 (1), 56–60.

Hanika, C., Carlton, W.W., Hinsman, E.J., Tuite, J., 1986. Citrinin mycotoxicosis in the rabbit: ultrastructural alterations. *Vet. Pathol.* 23, 245–253.

He, K., Zeng, L., Shi, G., Zhao, G.X., Kozlowski, J.F., McLaughlin, J.L., 1997. Bioactive compounds from *Taiwania cryptomerioides*. *J. Nat. Prod.* 60 (1), 38–40.

Iason, G., 2005. The role of plant secondary metabolites in mammalian herbivory: ecological perspectives. *Proc. Nutr. Soc.* 64 (1), 123–131.

Juárez-Rosete, C.R., Aguilar-Castillo, J.A., Juárez-Rosete, M.E., Bugarín-Montoya, R., Juárez-López, P., Cruz, C.E., 2013. Hierbas aromáticas y medicinales en México: Tradición e Innovación. *Bio Ciencias* 2 (3), 119–129.

Johnson, L., Strich, H., Taylor, A., Timmermann, B., Malone, D., Teufel-Shone, N., Drummond, R., Woosley, R., Pereira, E., Martinez, A., 2006. Use of herbal remedies by diabetic Hispanic women in the southwest United States. *Phytother. Res.* 20 (4), 250–255.

Keepers, Y.P., Pizao, P.E., Peters, G.J., van Ark-Otte, J., Winograd, B., Pinedo, H.M., 1991. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer* 27 (7), 897–900.

Krishnamoorthy, V., Thomson, R.H., 1971. Mansonone C in elm wood. *Phytochemistry* 10, 1669–1670.

Kubo, I., Muroi, H., Kubo, A., Chaudhuri, S.K., Sanchez, Y., Ogura, T., 1994. Antimicrobial agents from *Heterotheca inuloides*. *Planta Med.* 60 (3), 218–221.

Kubo, I., Chaudhuri, S.K., Kubo, Y., Sanchez, Y., Ogura, T., Saito, T., Ishikawa, H., Haraguchi, H., 1996. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Med.* 62 (5), 427–430.

Lee, H.Y., Kwon, J.T., Koh, M., Cho, M.H., Park, S.B., 2007. Enhanced efficacy of 7-hydroxy-3-methoxycadalene via glycosylation in in vivo xenograft study. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (22), 6335–6339.

Maldonado-López, Y., Linares-Mazari, E., Bye, R., Delgado, G., Espinoza-García, F.J., 2008. Mexican arnica anti-inflammatory action: plant age is correlated with the concentration of anti-inflammatory sesquiterpenes in the medicinal plant *Heterotheca inuloides* Cass. (Asteraceae). *Econ. Bot.* 62 (2), 161–170.

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L., 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45 (5), 31–34.

Michael, B., Yano, B.L., Sellers, R.S., Perry, R., Morton, D., Roome, N., Johnson, J.K., Schafer, K., Pitsch, S., 2007. Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices. *Toxicol. Pathol.* 35 (5), 742–750.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 (1–2), 55–63.

Muñoz-Velázquez, E.E., Rivas-Díaz, K., Loarca-Piña, M.G., Mendoza-Díaz, S., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M., 2012. Comparison of phenolic content, antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of commercial herbal infusions. *Rev. Mex. Cienc. Agríc* 3, 481–495.

Nesom, G.L., 1990. Taxonomy of *Heterotheca* Sect. *Heterotheca* (Asteraceae: Asteraceae) in Mexico, with comments on the taxa of the United States. *Phytologia* 69 (4), 282–294.

Organization for Economic Cooperation and Development., 2001. OECD Guideline for testing of Chemicals. Guideline 423: acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method.

Parasuraman, S., 2011. Toxicological screening. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 2 (2), 74–79.

Pimkaew, P., Suksen, K., Somkid, K., Chokchaisiri, R., Jariyawat, S., Chuncharunee, A., Suksamran, A., Piyachaturawat, P., 2013. Zederone, a sesquiterpene from *Curcuma elata* Roxb. is hepatotoxic in mice. *Int. J. Toxicol.* 32 (6), 454–462.

Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27 (3), 493–497.

Roberts, R.A., Ganey, P.E., Ju, C., Kamendulis, L.M., Rusyn, I., Klaunig, J.E., 2007. Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Sci.* 96 (1), 2–15.

Rodríguez-Chávez, J.L., Rufino-González, Y., Ponce-Macotela, M., Delgado, G., 2015. In vitro activity of ‘Mexican Arnica’ *Heterotheca inuloides* Cass natural products and some derivatives against *Giardia intestinalis*. *Parasitology* 142 (4), 576–584.

Rodríguez-Fragoso, L., Reyes-Esparza, J., Burchiel, S.W., Herrera-Ruiz, D., Torres, E., 2008. Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 227 (1), 125–135.

Ruiz-Pérez, N.J., Arriaga-Alba, M., Sánchez-Navarrete, J., Camacho-Carranza, R., Hernández-Ojeda, S., Espinosa-Aguirre, J.J., 2014. Mutagenic and antimutagenic effects of *Heterotheca inuloides*. *Sci. Rep.* 4, 6743.

Sanyal, A.J., 2002. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 123 (5), 1705–1725.

Secretaría de Agricultura., 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Secretaría de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 1st ed., México, D.F., 2001.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R., 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82 (13), 1107–1112.

Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P., Phillips, J.D., 1993. A micro-well cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Med.* 59 (3), 250–252.

Strunz, G.M., Yu, C.M., Saloni, A., 1989. Formation of the ortho-quinone

- mansonone C from 7-hydroxycadalene on silica gel. *Phytochemistry* 28 (10), 2861–2863.
- Takahashi, M., Koyano, T., Kowithyakorn, T., Hayashi, M., Komiyama, K., Ishibashi, M., 2003. Parviflorene A, a novel cytotoxic unsymmetrical sesquiterpene–dimer constituent from *Curcuma parviflora*. *Tetrahedron Lett.* 44 (11), 2327–2329.
- Tan, S.P., Stathopoulos, C., Parks, S., Roach, P., 2014. An optimised aqueous extract of phenolic compounds from bitter melon with high antioxidant capacity. *Antioxidants* 3 (4), 814–829.
- UN, United Nations, 2011. System Globally Harmonized System of Classification and Labeling Chemicals (GHS). United Nations. New York and Geneva. (http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/English/ST-SG-AC10-30-Rev4e.pdf). Accessed on may 2015.
- Vichai, V., Kirtikara, K., 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* 1 (3), 1112–1116.
- Villarreal, M.I., Alonso, D., Melesio, G., 1992. Cytotoxic activity of some Mexican plants used in traditional medicine. *Fitoterapia* 63 (6), 518–522.
- Willuhn, G., Schneider, R., 1987. Sesquiterpene, triterpene und sterine aus blüten von *Heterotheca inuloides* (“Mexikanische Arnikablüten”). *Arch. Pharm. (Weinheim)* 320 (5), 393–396.
- Winkelman, M.J., 1986. Frequently used medicinal plants in Baja California Norte. *J. Ethnopharmacol.* 18 (2), 109–131.
- Wiese, M., Seydel, U., 1996. Drug effects on intracellular mycobacteria determined by mass spectrometry analysis of the Na⁺ - to- K⁺ ratios of individual bacterial organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (9), 2047–2053.
- Wong, W.W., Gabriel, A., Maxwell, G.P., Gupta, S.C., 2012. Bleeding risks of herbal, homeopathic, and dietary supplements: a hidden nightmare for plastic surgeons? *Aesthet. Surg. J.* 32 (3), 332–346.
- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 23 (4), 283–333.
- Zurita-Esquivel, M., Zolla, C., 1986. Enfermedades dermatológicas en la medicina tradicional de México. *Bol. Oficina. Sanit. Panam.* 101 (4), 339–347.

Artículo 4

Heterotheca inuloides (Mexican arnica) metabolites protects *Caenorhabditis elegans* from oxidative damage and inhibits the nitric oxide production

José Luis Rodríguez-Chávez, Virginia Gómez-Vidales, Elvia Coballase-Urrutia, Daniel Ortega-Cuellar, Guillermo Delgado

Sometido a: *RSC Advances*

El trabajo incluye los resultados de la evaluación de los metabolitos aislados del extracto acetónico de *H. inuloides* para proteger a *Caenorhabditis elegans* contra el daño generado por iones Cu^{2+} empleando técnicas espectroscópicas. Adicionalmente se evaluó su capacidad para inhibir la síntesis de óxido nítrico en macrófagos estimulados con LPS.

Artículo 5

Mexican Arnica (*Heterotheca inuloides* Cass Asteraceae: Astereae): Ethnomedical uses, chemical constituents and biological properties

José Luis Rodríguez-Chávez, Verónica Egas Ortuño, Guillermo Delgado

El trabajo es un estudio bibliográfico en el que se recopila, analiza, sintetiza y discute la información publicada sobre *Heterotheca inuloides*, sus usos etnomédicos, los compuestos químicos aislados a partir de esta planta y las actividades biológicas de los extractos y metabolitos secundarios de esta especie. El trabajo examina la información bibliográfica publicada e incluye un análisis crítico del estado de los conocimientos reportados en la literatura. Se describen las actividades antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, antinociceptiva y protectora de algunos metabolitos secundarios de *H. inuloides* también se describe su potencial beneficio terapéutico, ecológico y agronómico.

6. Desarrollo experimental

6.1. Materiales y equipos

Las placas comatográficas se revelaron empleando una lámpara *UV Spectroline ENF-240C* (λ de 254 y 365 nm). Para determinar los puntos de fusión se empleó un equipo *Fisher Johns* y no fueron corregidos. Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro *FT-IR Bruker Tensor 750* en solución de CHCl_3 y pastilla de KBr. Los espectros de UV se obtuvieron en un espectrofotómetro *Shimadzu-UV160*. La determinación de la rotación (RO) óptica se efectuó en un polarímetro *Perkin-Elmer 341*. Los espectros de dicroísmo circular (DC) se obtuvieron en un dicrógrafo *Jasco J-720*. Los espectros de masas por impacto electrónico se obtuvieron en un espectrómetro *Jeol JMS-AX505HA* con un potencial de ionización de 70 eV y una corriente de ionización de 100 μa . y para ionización por bombardeo rápido de átomos (FAB^+) se empleó un equipo *Jeol JMX-SX102A*.

Todos los reactivos empleados fueron grado analítico, el piruvato de sodio, la DMTU, el ácido NDGA, el ácido ascórbico, la histidina, el naranja de xilenol, el ATA, el ABTS, el DFPH, el DMSO, la DMNA, la catalasa, la xantina, la xantina oxidasa, el NBT, la dL-penicillamina, el ATB, el ATF, el α -tocoferol, el HTB, el BTH, el TMB, el BHTA, el PTM, los cloruros *R*- y *S*- del AMTFA, el ácido mCPBA, ácido tricloro acético, el medio RPMI-1640, el clorhidrato de aminoguanidina, reactivo de Griess, MTT y el lipopolisacárido de *E. coli*, serotipo 055: B5 fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo. EUA.). La dihidrorodamina 123 se obtuvo de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EUA.). El etanol, el H_2O_2 , el H_2SO_4 , el metanol, sal sódica del ácido etilenediaminotetraacético (EDTA), el NaCl, el KH_2PO_4 , el $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y el NaOH, fueron obtenidos de Merck-México. El hipoclorito de sodio (NaOCl) se compró a Hycel (México).

Para la separación y purificación de los productos naturales presentes en el extracto acetónico de *H. inuloides*, así como de los derivados semisintéticos, se empleó como fase estacionaria sílica gel (SiO_2) malla 230-400 ASTM y como fase móvil los siguientes disolventes *n*-hexano, acetato de etilo, acetona, diclorometano y benceno en diferentes

proporciones. El fraccionamiento, pureza de los constituyentes y avance de las reacciones se realizó empleando placas para cromatografía analítica soportadas en aluminio, mientras que la cromatografía en capa preparativa se realizó empleando placas de vidrio 20 x 20 cm (Merck 60 F₂₅₄, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Para el revelado de las placas de CCF se emplearon soluciones de sulfato cérico amoniacal ((NH₄)₂Ce(SO₄)₄) al 1% en H₂SO₄ y ácido fosfomolibdico. Se observaron los procedimientos estándares de seguridad y prácticas seguras en el laboratorio.

6.1.1 Material biológico

Las flores secas de *Heterotheca inuloides* fueron donadas por Laboratorios Mixim (México). El material vegetal se recolectó en 2010, en la localidad de Mesas Altas de San Juan Xoconusco, municipio de Donato Guerra (Estado de México) y autenticadas por M. en C. Abigail Aguilar Contreras. Una muestra del material vegetal se depositó bajo el código IMSSM-16064 en el Herbario de Plantas Medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, Ciudad de México).

La cepa de *C. elegans* Bristol N2 (de tipo silvestre) se obtuvo del Caenorhabditis Genetics Center (CGC) (Universidad de Minnesota, E.U.) y se mantuvo en medio NGM a 20° C [110]. La obtención de gusanos sincronizados se generó en todos los experimentos a través del método de hipoclorito de sodio. La eclosión de los gusanos se efectuó en cajas Petri con medio líquido y *Escherichia coli* cepa OP50 como fuente de alimento [156]. La cepa de referencia WB (ATCC 30957) de *Giardia intestinalis* fue proporcionada por la Dra. Guadalupe Ortega (CINVESTAV), esta cepa se aisló originalmente en los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos de un paciente con sintomatología gastrointestinal crónica y cuyo padecimiento se diagnosticó como giardiasis [157]. Los quistes de *Artemia salina* (Eclosión Azul®) se obtuvieron en una tienda local y se eclosionaron en placas de Petri con agua de mar artificial Instant Ocean® (Aquarium Systems, Inc. Blacksburg, VA).

6.2. Sección experimental

6.2.1 Aislamiento

Las flores secas de *H. inuloides* (10 Kg) se maceraron en acetona (3 ocasiones, 24 horas cada vez) a temperatura ambiente en recipientes de vidrio. El líquido obtenido de la maceración se concentró a presión reducida, obteniéndose 480 g de residuo. El extracto se disolvió en acetona y se adsorbió en sílica gel, el cual se colocó en una columna de vidrio empacada con sílica gel Merck 60 F254. La columna se eluyó con *n*-hexano y mezclas de polaridad creciente de *n*-hexano/acetato de etilo. Las fracciones colectadas (1 L) se analizaron mediante CCF. Se obtuvieron 250 fracciones que se reunieron en 8 fracciones principales (F1-F8) de acuerdo a su similitud. La identificación de las sustancias puras obtenidas del fraccionamiento se determinó mediante la comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas (RMN ^1H y ^{13}C ; UV, IR, masas) con las informadas en la literatura y por comparación con muestras aisladas previamente en el laboratorio. Adicionalmente, se efectuaron experimentos bidimensionales de RMN ^1H y ^{13}C (COSY, NOESY, NBC, HSQC, DEPT) para la elucidación estructural compuestos.

6.2.2 Obtención de derivados

6.2.5.1 Esterificación

Se llevaron a cabo las reacciones de esterificación con anhídrido acético /piridina y cloruro de benzoilo/piridina con los compuestos: **1** (7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno) y **2** (7-hidroxicadaleno). Además se efectuó la acetilación del compuesto **23** (quercetina) con los mismos reactivos a temperatura ambiente. La formación de productos se siguió por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando una mezcla de *n*-hexano-EtOAc (8.5:1.5) como fase móvil hasta el consumo de la materia prima. La reacción se detuvo mediante la adición de hielo y se dejó agitar por 1 h. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (3 veces). Las fases orgánicas fueron reunidas y se trataron secuencialmente con HCl al 10%, con una solución saturada de NaHCO_3 , y finalmente con solución saturada de NaCl. El residuo orgánico se secó mediante la adición de sulfato de sodio anhidro, se filtró y el filtrado se concentró a vacío. El residuo resultante se sometió a cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de *n*-hexano-EtOAc para dar los derivados **130-133** con rendimientos de 86%, 82%, 56% y 81%, respectivamente.

6.2.5.1 Hidrogenación

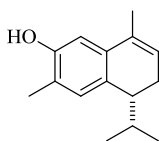
El compuesto **1** (36 mg, 0,163 mmoles) se disolvió en 6 mL de acetato de etilo en un matraz de 50 mL. El matraz se selló con un septum y el aire se sustituyó con argón. Se añadió el catalizador de 10% de Pd/C (4 mg), colocando el matraz en el equipo de hidrogenación. El sistema se purgó con H₂ para reemplazar el argón. La mezcla se agitó a 25°C durante 2 h. El desarrollo de la reacción se controló por CCF usando *n*-hexano-EtOAc (8.5:1.5). La mezcla de reacción se purificó usando una columna cromatográfica de gel de sílice, utilizando un gradiente *n*-hexano-EtOAc para dar el compuesto **135** en 93%.

6.2.5.1 Oxidación con ácido *m*CPB

La reacción del compuesto **2** con el ácido *m*CPB se llevó a cabo en tubos de vidrio G-10 de 10 mL, en el equipo de microondas *Monowave Anton Paar*. A una solución de *m*CPBA (320 mg) en CHCl₃ (6 mL) se añadieron 82mg de sustrato (**2**). La mezcla de reacción se agitó a 200 rpm a una temperatura de 55 ° C durante 4 minutos. La mezcla se enfrió y los productos de oxidación se lavaron con solución de NaHCO₃ al 5%, y solución saturada de NaCl, secándose con sulfato de sodio anhidro. El residuo resultante se sometió a cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de hexano-EtOAc para obtener los compuestos **136** y **137**.

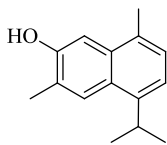
6.2.5.1 Características físicas y químicas de los productos naturales y derivados semisintéticos

1 (7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno) [35]



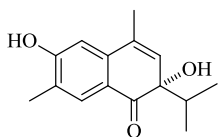
Sólido blanco. **RMN** ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ, J (Hz): 6.85 (s, H-5), 6.67 (s, H-8), 5.67 (t, H-2), 4.53(s, OH), 2.31-2.34 (m, H-3 y H-4), 2.23 (3H, s, C-15), 1.96 (3H, s, C-11), 1.83 (hept, H-12), 0.87 (3H, d, C-13), 0.79 (3H, d, C-14).

2 (7-hidroxicadalenos) [158]



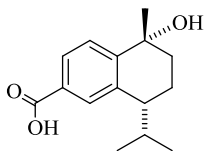
Sólido blanco. **RMN ¹H** (CDCl₃, 400 MHz): δ, J (Hz): 7.89 (1H,s, H-5), 7.25 (1H,s, H-8), 7.15 (2H, dd, J = 7, H-2 y H-3), 4.93(1H, s, OH), 3.67 (1H, hept, H-12), 2.56 (3H, s, C-11), 2.46 (3H, s, H-15), 1.38 (3H, d, C-13), 1.35 (3H, d, C-14).

11 (2,6-dihidroxi-4,7-dimetil-3-(4H) nafatalinona) [43]



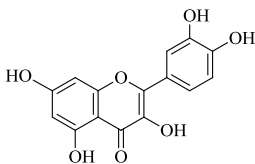
Sólido blanco. **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz): δ, J (Hz): 7.72 (s, H-8), 6.70 (1H, s, H-5), 6.04 (1H, d, H-3), 5.23(1H, s, OH), 3.29 (1H, s, OH), 2.27 (3H, s, C-15), 2.10 (3H, s, C-11), 1.89 (1H, hept, H-12), 0.87 (3H, d, H-13), 0.83 (3H, d, H-14).

13 (Ácido 7-metil-α-hidroxi-calamen-15-oico) [43]



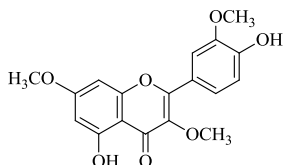
Sólido blanco. **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz): δ, J (Hz): 7.94 (1H, s, H-5), 7.89 (1H, dd, H-7), 7.67(1H, d, H-8), 2.59 (1H, ddd, H-4), 2.35 (1H, m, H-11), 1.7-2.0 (4H, m, H-2, H-3), 1.53 (3H, d, H-14), 1.05 (3H, d, H-12), 0.79 (3H, d, H-13).

23 (Quercetina) [159]



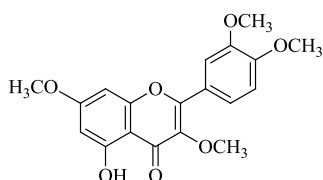
Sólido amarillo. **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz): δ, J (Hz): 12.1 (1H,s), 10.2 (1H, s), 9.0(1H, s), 8.8 (1H, s), 8.5 (1H, s), 7.75 (4H, d, H-8, H-2), 7.59 (1H, dd, H-6), 6.38 (1H, d, H-8), 6.21 (1H, d, H-6).

27 (Éter 3,7,3'-trimetílico de quercetina) [160]



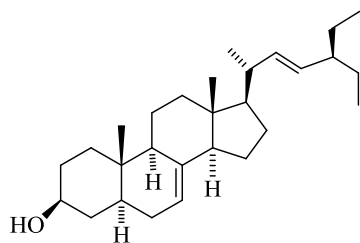
Sólido Amarillo. **RMN ¹H** ((CD₃)₂CO, 400 MHz): δ, J (Hz): 12.79 (1H,s,OH-5), 7.83(1H,d,2''), 7.75(1H,dd,H-6''), 7.05 (1H,d,H-5''), 6.71(1H,s, H-8), 6.36 (1H,s,H-6), 3.99 (3H,s, OCH₃-3''), 3.96 (3H,s, OCH₃-7), 3.94 (3H,s OCH₃-3).

29 (Éter 3,7,3'',4''-tetrametílico de quercetina) [161]



Sólido amarillo. **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz): δ, J (Hz): 12.64 (1H,s,OH-5), 7.73(1H,d,6''), 7.69(1H,d,H-5''), 6.99 (1H,d,H-2''), 6.45(1H,s, H-8), 6.36 (1H,s, H-6), 3.97 (3H,s, OCH₃-3), 3.97 (3H,s, OCH₃-3''), 3.88 (3H,s OCH₃-4''), 3.86 (3H,s OCH₃-7).

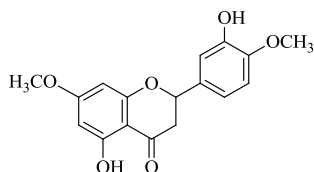
48 (Espinasterol) [162]



Sólido blanco. **RMN ¹³C** (CDCl₃, 75 MHz): 31.57 (C-1), 31.86 (C-2), 71.43 (C-3), 38.38 (C-4), 40.63 (C-5), 30.06 (C-6), 117.82 (C-7), 139.92 (C-8), 49.82 (C-9), 34.59 (C-10), 21.92 (C-11), 39.83 (C-12), 43.66 (C-13), 55.49 (C-14), 23.38 (C-15), 38.87 (C-

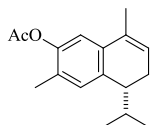
16), 56.27 (C-17), 12.42 (C-18), 13.41 (C-19), 41.19 (C-20), 21.74 (C-21), 138.52 (C-22), 129.8 (C-23), 51.61 (C-24), 32.24 (C-25), 21.45 (C-26), 19.36 (C-27), 25.76 (C-28), 12.61 (C-29).

129 (éter 7,4'-dimetílico de Eriodictiol) [163]



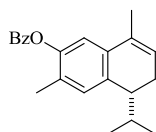
Sólido blanco. **RMN** ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ , J (Hz): 12.03 (1H,s,5-OH); 6.98 (1H,dd,H-6''); 6.96 (1H,dd,H-5''); 6.94 (1H,d,H-2''); 6.07 (1H,d,H-8); 6.05 (1H,d,H-6); 5.72 (1H,s,OH-4''); 5.34 (1H, dd, H-2); 3.94 (3H, s, OCH3-3''); 3.81 (3H, s, OCH3-7); 3.10 (1H, dd, H-3), 2.78(1H, dd, H-3).

130 (7-acetoxi-3,4-dihidrocadaleno)



Sustancia aceitosa. R_f : 0.58 (*n*-hexano/ EtOAc 4:6). $[\alpha]_D^{25}$ -5.45 (c 0.1, MeOH); **IR** (KBr) ν_{max} 3552, 2962, 2931, 2862, 1720, 1600, 1580, 1491, 1463, 1381, 1290, 1233, 1222, 1216, 1128, 1074, 1037, 956, 918 cm^{-1} . Desplazamientos de RMN de ^1H y ^{13}C ver la Tabla 16. **EIMS** m/z 258 $[\text{M}]^+$ (9), 215 (10), 214 (5), 199 (5), 186 (4), 174 (16), 173 (100), 172 (9), 158 (14), 155 (5), 128 (5), 115 (3). HRFABMS m/z 258.1620 $[\text{M}]^+$ (calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_2$, 258.1620).

131 (7-benzoxi-3,4-dihidrocadaleno)



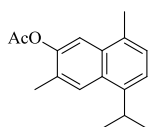
Sustancia aceitosa. $[\alpha]_D^{25}$ -28 (c 0.1, MeOH). **IR** (KBr) ν_{max} 3030, 2960, 2928, 2871, 1732, 1602, 1567, 1495, 1452, 1382, 1261, 1175, 1130, 1084, 1066, 1026, 900 cm^{-1} . Desplazamientos de RMN de ^1H y ^{13}C ver en la tabla 16, **EIMS** m/z 320 $[\text{M}]^+$ (5), 277 (7),

175 (3), 106 (6), 77 (13). HRFABMS m/z 320.1770 $[M]^+$ (calculado para $C_{22}H_{24}O_2$, 320.1776).

Tabla 16. Datos de RMN de 1H , ^{13}C para **130**, **131**, **132** y **133** (400,125 MHz, $CDCl_3$, δ)

Posición	130		131		132		133	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	--	136.6	--	136.7	--	129.9	--	131.6
2	5.69	123.8	5.72	123.8	7.24	125.7	7.31	126.3
3	2.35	25.8	2.39	25.5	7.26	121.2	7.28	121.2
4	2.35	43.8	2.39	43.8	--	142.1	--	142.1
5	6.94	131.9	7.01	133.4	7.99	126.3	7.79	128.7
6	--	127.2	--	129.6	--	132.4	--	129.9
7	--	147.7	--	147.8	-	147.5	--	147.7
8	6.82	115.9	6.99	116.2	7.63	116.3	8.06	116.5
9	--	134.7	--	131.0	-	131.5	--	133.5
10	--	127.0	--	127.3	--	128.5	--	125.7
11	1.97	18.9	2.00	18.9	2.61	19.3	2.64	19.3
12	1.87	30.2	1.92	30.2	3.69	28.4	3.74	28.4
13	0.88	20.1	0.92	21.2	1.39	23.6	1.44	23.6
14	0.81	21.4	0.85	20.2	1.38	23.6	1.42	23.6
15	2.14	15.9	2.22	16.0	2.39	17.0	2.46	17.2
1''	--	169.3	--	165	--	169.6	--	165.2
2''	2.32	20.8	--	131.2	2.40	20.9	--	129.6
3''			8.24	130.1			8.32	130.2
4''			7.54	128.5			7.58	128.6
5''			7.66	134.7			7.70	132.5
6''			7.54	128.5			7.58	128.6
7''			8.24	130.1			8.31	130.2

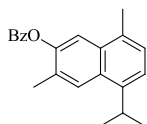
132 (7-acetoxicadaleneno)



Agujas incoloras (*n*-hexano- EtOAc). **pf** 68-70 °C. **IR** (KBr) ν_{max} 3073, 3037, 3021, 2966, 2929, 2869, 1750, 1464, 1441, 1236, 1149, 1126, 1041, 1017, 914 cm^{-1} . Desplazamientos

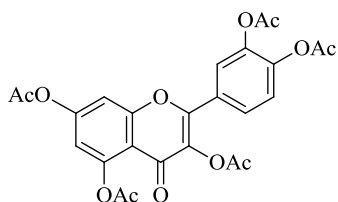
de RMN de ^1H y ^{13}C ver en la tabla 16. **EIMS** m/z 256 $[\text{M}]^+$ (20), 215 (15), 214 (55), 184 (13), 169 (6), 155 (7), 153 (6), 128 (5). **HRFABMS** m/z 256.1466 $[\text{M}]^+$ (calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_2$, 258.1463).

133 (7-benzoxicadaleneno)



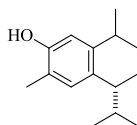
Agujas incoloras (*n*-hexano EtOAc). **pf** 138-140 °C. **IR** (KBr)v max 2962, 2924, 2862, 1734, 1599, 1508, 1447, 1381, 1317, 1266, 1241, 1149, 1062, 1024, 714 cm^{-1} . Desplazamientos de RMN de ^1H y ^{13}C ver en la tabla 16. **EIMS** m/z 318 $[\text{M}]^+$ (35), 303 (3), 170 (9), 128 (3), 155 (9), 141 (100), 128 (3), 77 (25). **HRFABMS** m/z 318.1628 $[\text{M}]^+$ (calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_2$, 318.1620).

134 (Pentaacetil-quercetina) [164]



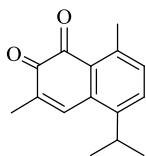
Sólido blanco. **RMN** ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ , J (Hz): 12.04 1H, s, 5-OH); 6.98 (1H, dd, H-6''); 6.96 (1H, dd, H-5''); 6.93 (1H,d,H-2''); 6.08 (1H,d,H-8); 6.07 (1H, d, H-6); 5.73 (1H, s, OH-4''); 5.35 (1H, dd, H-2); 3.95 (3H, s, OCH_3 -3''); 3.82 (3H, s, OCH_3 -7); 3.10 (1H, dd, H-3), 82 (1H, dd, H-3).

135 (7-hidroxicalamenano) [165]



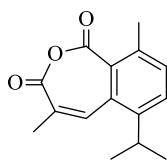
Sustancia aceitosa. **RMN ¹H** (400 MHz CDCl₃): δ, J (Hz): 6.94(1H, s, H-5), 6.57(1H, s, H-8), 4.46(1H, s, OH-7), 2.76(1H, m, H-1), 2.52(1H, dd, H-4), 2.20(3H, s, CH₃-15), 2.17(1H, m, H-12), 1.78(1H, m, H-2b), 1.73(1H, m, H-3a), 1.68(1H, m, H-3b), 1.59(1H, m, H-2a), 1.23(3H, d, CH₃-11), 1.01(3H, d, CH₃-12), 0.76(3H, m, d, CH₃-11).

136 (Mansonona C) [166]



Cristales rojo-naranja, pf: 133-135°C [lit: 134-135°C] [192]; (*n*-hexano-EtOAc). **RMN ¹H** (500 MHz): δH 7.65 (1H, s, H-4), 7.42 (1H, br, H-6), 7.18 (1H, br, H-7), 3.38 (1H, m, H-11), 2.62 (3H, s, H-14), 2.07 (3H, s, H-16), 1.29 (3H, d, H-12), and 1.28 (3H, d, H-13). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 125 MHz): 182.00 (C-1), 182.33 (C-2), 145.29 (C-5), 142.99 (C-8), 137.93 (C-3), 135.01 (C-4), 134.11 (C-10), 132.45 (C-6), 131.91, (C-7), 129.33 (C-9), 28.29 (C-11), 23.73 (C-12), 23.73, (C-12), 22.82 (C-14), 15.96 (C-15).

137 (6-isopropil-4,9-dimetilbenzo[*c*]oxepina-1,3-diona)



Sustancia aceitosa transparente. **IR** (KBr) ν_{\max} 2965, 2929, 2873, 1782, 1740, 1568, 1451, 1414, 1383, 1257, 1232, 1212, 1181, 1154, 1090, 1055, 1003, 7806, 742 cm⁻¹. **UV** (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 242.2 (4.129), 216.4 (4.30). **NMR ¹H** (500 MHz): δ 7.378 (1H, d, H-7) and δ 7.281 (1H, d, H-8), δ 7.235(1H, s, H-5), δ 3.187 (1H, m, H-12), δ 2.40 (3H, s, H-15), δ 2.263(3H, d, H-16), δ 1.25 (3H, s, H-13), δ 1.25 (3H, s, H-14). **NMR ¹³C** (CDCl₃, 125 MHz): 161.72 (C-1), 163.02 (C-3), 144.70(C-6), 134.62(C-9), 132.89(C-11), 132.39(C-5), 131.07(C-4), 130.77(C-7), 128.57(C-8), 128.57(C-10), 29.35 (C-12), 23.62 (C-13), 23.62 (C-14), 21.98(C-15), 19.77(C-16). **EIMS** m/z 245 [M]⁺ (35). **HRFABMS** m/z 245.09 [M]⁺ (calc for C₁₅H₁₆O₃, 245).

6.2.3 Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad de los compuestos se evaluó empleando el ensayo de sulforrodamina B [167]. Se emplearon las líneas celulares tumorales MCF-7 (mama), HCT-15 (colon), U-251 (SNC), K-562 (leucemia), y PC-3 (próstata), proporcionadas por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos. Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 enriquecido con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2µM, 100 UI/mL de penicilina G, sulfato de estreptomicina 100µg/mL y anfotericina B 0.25 µg/mL. Los cultivos se mantuvieron a 37° C y 5% de CO₂. Las suspensiones celulares se sembraron en placas de 96 pozos. Después de 24 h de incubación se adicionaron 100 µL de cada uno de los compuestos y el control positivo. A las 48 horas, las células adheridas se fijaron mediante la adición de 50 µL de ATA al 50% (m/v), incubándose a 4°C por 60 min. Posteriormente, el sobrenadante se desechó y los pozos lavados con agua destilada (triplicado) y secados al aire. Las células fijadas se tiñeron con sulforrodamina B al 0.4% por 30 min. El colorante se extrajo con 10 µM de una base sin solución amortiguadora. La densidad óptica de las soluciones se determinó en un equipo Elx 808 (Bio-Tek Instruments, Inc.) a 515 nm de longitud de onda. Los resultados se expresan como % de inhibición de proliferación y concentración inhibitoria media (IC₅₀).

6.2.4 Evaluación de la capacidad antiinflamatoria

Se emplearon ratones machos CD1 (25 – 30 g) de 3 semanas de nacidos, adquiridos en la Unidad de Producción y Experimentación de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco (UPEAL). Los animales se manejaron de acuerdo a lo establecido en la norma NOM-062-ZOO-1999 [168]. Se empleó el modelo de edema auricular inducido por ATF [169]. Los animales se dividieron al azar en grupos de cinco por tratamiento. Los animales se anesteciaron con una solución de pentobarbital sódico (31.5 mg/kg, i.p.) y una solución de ATF (2.5 µg/ oreja), disueltos en DMS (10 µL). Esto se realizó por vía tópica en la oreja derecha, en ambas caras de la oreja. La oreja izquierda recibió únicamente etanol (10 µL). Después de 10 min del tratamiento con ATF se administraron los compuestos a ensayar (1 mg/oreja) e indometacina (0.31 µg/oreja) como fármaco de referencia, disueltos en 20 µL de acetona, administrados en ambas caras de las orejas (10 µL/oreja). El control únicamente recibió el vehículo (20 µL de acetona). Cuatro horas después, los animales se sacrificaron

con bióxido de carbono (CO₂), y con un sacabocados (7 mm de diámetro) se horadaron ambas orejas. El tamaño del edema se calculó a partir de la diferencia de peso entre los cortes de las orejas tratada y no tratada. La actividad anti-inflamatoria se expresó como la inhibición del edema (IE) en % respecto al edema formado en los animales del grupo control de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%IE = \frac{100 - [b * 100]}{A}$$

Donde: *A* = Edema inducido únicamente por ATF; *b* = edema inducido por ATF y el compuesto.

6.2.5 Estimación de la capacidad antioxidante y atrapadora de ERO

6.2.5.1 Inhibición de la peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se midió empleando el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATBA) en homogeneizados de cerebro de rata [170]. Las ratas macho adultas (200-250 g) de la raza Wistar fueron proporcionadas por el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los animales se sacrificaron bajo anestesia con éter, el tejido fue disectado rápidamente y homogenizado y acorde con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana [168]. Se empleó solución amortiguadora de fosfatos (0.2 g de KCl, 0.2 g de KH₂PO₄, 8 g de NaCl, y 2.16 g de NaHPO₄·7H₂O por litro, pH 7.4) para obtener un homogenizado en proporción 1/10 (m/v). El homogeneizado se centrifugó durante 10 min a 3,400 rpm. Se midió el contenido de proteína en el sobrenadante empleando el reactivo de Folin y Ciocalteu [171] y se ajustó a 2.66 mg de proteína/mL con SAF. El sobrenadante (375 µL) se incubó a 37°C durante 30 min en presencia de la muestra a evaluar (25 µL) disuelta en DMSO o etanol. La peroxidación lipídica se inició con la adición de 50 µL de una solución 100 µM de FeSO₄ recién preparado (concentración final 10 µM) incubándose a 37°C durante 60 min. Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB) se determinaron por la adición de 5 mL de ácido tiobarbitúrico (ATB) (1 % de ATB en 0.05 N de NaOH y ácido tricloroacético al 30% en proporción 1:1) [172]. La última solución se enfrió en hielo durante 10 min, a continuación se centrifugó a 3,000 g (10,000 rpm en un rotor con radio de 10.5 cm.) durante 5 min y finalmente se calentó a 95° C en un baño de agua hirviendo durante 30 min. Después de enfriar en hielo, la absorbancia del

sobrenadante fue medida a 532 nm. Como controles positivos se emplearon el hidroxitolueno butilado y la quercetina. La concentración de SRATB se calculó por interpolación en una curva estándar de tetrametoxipropano (TMP) [173]. Los resultados finales fueron se expresaron en μmol de SRATB por mg de proteína. La inhibición (%) se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\%I = \frac{C - E}{C * 100\%}$$

C: absorbancia de control y E: absorbancia de la muestra de ensayo.

Los datos se expresaron como el error medio \pm desviación estándar de la media (SEM). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones contra el control. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como estadísticamente significativo. La concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) se estimó mediante análisis de regresión lineal.

6.2.5.2 Reducción del radical DFPH

El bioensayo se llevó a cabo de acuerdo con la metodología propuesta por Blois (Figura 24) [174]. Se añadieron 0,05 ml de compuestos a diferentes concentraciones a una solución etanólica de DFPH^{*} (100 mM, 2.95 mL). Al control sólo agua destilada. Después de la incubación durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad se registró la absorbancia a 517 nm. La capacidad reductora se calculó como el porcentaje (%) de DFPH^{*} depurado, calculado como [(DO de control- DO del compuesto)/(DO del control) x 100]. La quercetina y el α -tocoferol se utilizaron como estándares.

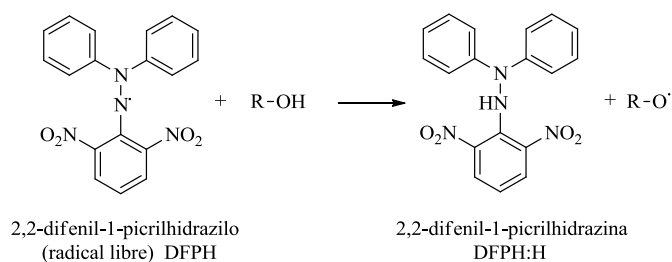


Figura 24. Reacción entre el radical DFPH y compuestos oxidables [174]

6.2.5.3 Capacidad atrapadora del radical superóxido

Los radicales superóxido reaccionan con cloruro de 4-nitro azul tetrazolio (NBT) para generar un compuesto coloreado con absorbancia a 560 nm [175]. Los radicales superóxido (O_2^-) se generaron a través del sistema xantina oxidasa [176,177] (Figura 27). Para este propósito, 800 μ L de mezcla de reacción (xantina 90 μ M, 16 mM de Na_2CO_3 , 22.8 μ M NBT, y solución amortiguadora de fosfatos 18 mM, pH 7) se mezclaron con 100 μ L de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7,0 (referencia 0%) o con 100 μ L de diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos. La reacción se inició mediante la adición de 100 μ L de xantina oxidasa (168 U/L). La conversión de xantina a urato se siguió a 295 nm, mientras que la reducción del NBT a 560 nm (producción de formazán), empleando un espectrofotómetro Beckman serie DU -64.

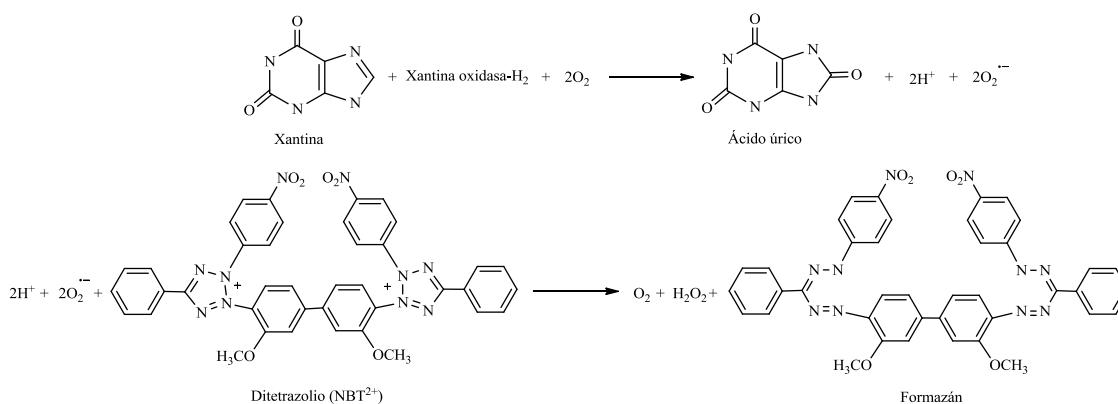


Figura 25. Detección de superóxido mediante azul de nitrotetrazolio (NBT) [175-177]

6.2.5.4 Capacidad atrapadora de peróxido

La determinación de la capacidad atrapadora de peróxido se realizó empleando el ensayo de oxidación del naranja de xilenol por ión férrico (FOX) [178] (Figura 28). Se mezclaron 75 μ M de H_2O_2 con agua en proporción 1:1(v/v) (tubo control 0%) o con diferentes concentraciones de los compuestos ensayados, y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo, el H_2O_2 residual se midió por el siguiente método: 9 volúmenes de BHT 4.4 mM en metanol grado HPLC se mezclaron con 1 volumen naranja de xilenol 1 mM y 2.56 mM de sulfato ferroso de amoniacal en 0.25 M de H_2SO_4 para preparar el reactivo FOX. Se mezclaron 55 μ L de las soluciones de los

compuestos y 45 μL de H_2O_2 75 mM en tubos Eppendorf de 1.5 mL con 10 μL de metanol de grado HPLC, seguido inmediatamente por la adición de 0.9 mL de reactivo FOX, los tubos se agitaron en un vórtex durante 5 s y luego se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se centrifugaron a 15,000 g (en un rotor con diámetro de 10.5 cm.) durante 10 min y se leyó la absorbancia a 560 nm frente a un blanco de metanol. La concentración de H_2O_2 se calculó a partir de una curva estándar preparada con soluciones de H_2O_2 de concentración creciente. El piruvato se utilizó como control para el atrapamiento de H_2O_2 .

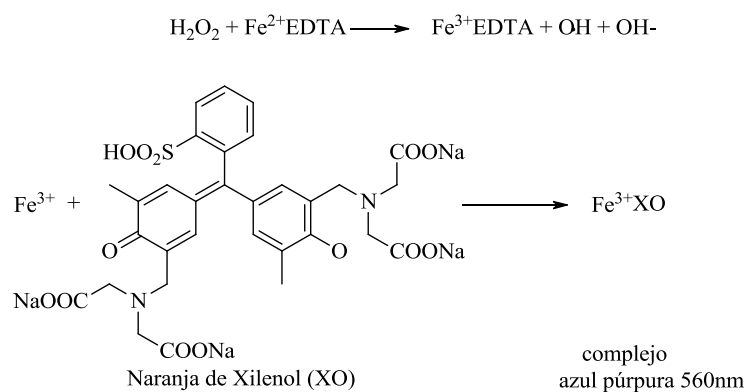


Figura 26. Oxidación del ión Fe^{2+} en presencia de naranja de xilenol [178]

6.2.5.5 Actividad atrapadora de hidroxilo

La desoxirribosa (2-desoxi-D-ribosa) decae cuando se expone a radicales hidroxilo generados por la reacción de Fenton [179] (Figura 29). La degradación de la desoxirribosa por radicales hidroxilo (OH^\bullet) se evaluó a través de un sistema conteniendo: desoxirribosa (0.056 mM), H_2O_2 (1 mM), solución amortiguadora de K_2HPO_4 -KOH (10 mM, pH 7.4), FeCl_3 (0.2 mM), EDTA (0.2 mM) y ascorbato (0.2 mm) y los compuestos (concentración variable). Las mezclas de reacción se realizaron inmediatamente antes de emplearlas, incubándose a 37 ± 0.5 °C durante una hora. El malondialdehído formado a partir de la degradación de la desoxirribosa se cuantificó espectrofotométricamente a 532 nm a partir de su reacción con ácido tiobarbitúrico [180]. Los resultados finales fueron expresados como porcentaje de inhibición en relación con el control (sin muestra).

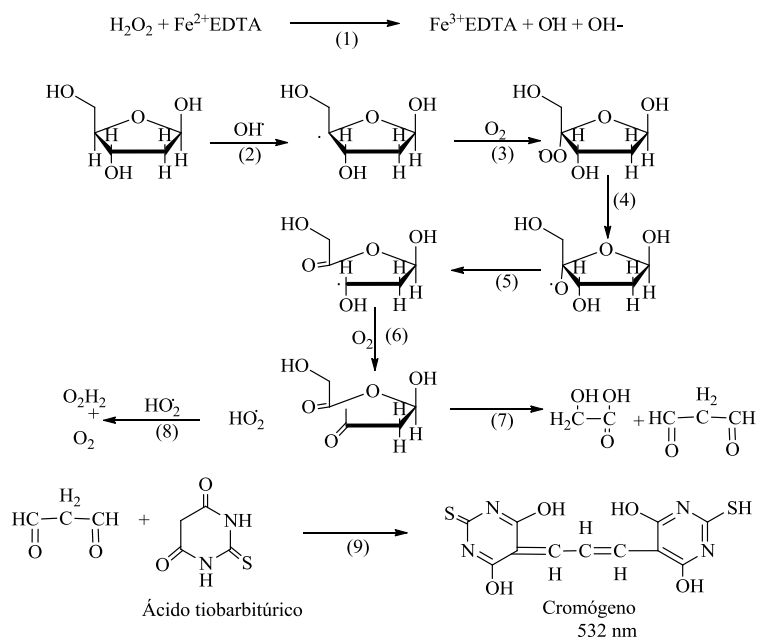


Figura 27. Formación de malondialdehído a partir de desoxirribosa en presencia de fierro [179,180]

6.2.5.6 Actividad atrapadora de oxígeno singulete

La capacidad atrapadora de la especie $^1\text{O}_2$ se determinó empleando un método espectrofotométrico con histidina como aceptor específico de $^1\text{O}_2$ [181] (Figura 28). El oxígeno singulete se obtuvo a partir de la reacción entre el hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrógeno [182]. La mezcla de ensayo contenía solución amortiguadora de fosfato 45 mM (pH 7.1), histidina 10 mM, NaOCl 10 mM, H_2O_2 10 mM, RNO 50 μM , y 0.1 mL de los compuestos en concentraciones crecientes. El volumen total de reacción (2 mL) se incubó a 30 °C durante 40 min. La producción de $^1\text{O}_2$ se detectó espectrofotométricamente monitoreando el blanqueo de DMNA a 440 nm. La inhibición en la producción de $^1\text{O}_2$ por los compuestos se estimó a partir de la diferencia en la absorbancia de DMNA con y sin la adición de las muestras o el compuesto de referencia. El glutatión se utilizó como compuesto de referencia [182].

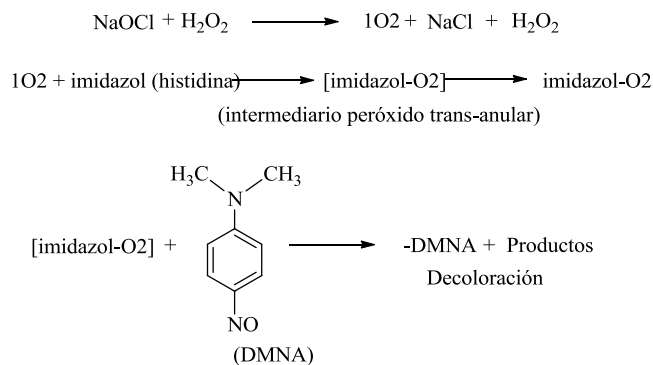


Figura 28. Determinación de $^1\text{O}_2$ empleando histidina como aceptor [181,182]

6.2.5.7 Capacidad de depuración de HOCl

El HOCl tiene la capacidad de inactivar la catalasa (oxidoreductasa de peróxido de hidrógeno) [183], causando cambios notables en el espectro de la proteína por la degradación del grupo hemo. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por Aruoma y Halliwell [184] con pequeños ajustes. El (HOCl) se preparó previo al experimento mediante el ajuste del pH de la solución de NaOCl a 6.2; la concentración de HOCl se determinó midiendo la absorbancia a 235 nm y con el coeficiente de extinción molar. La capacidad de atrapamiento se evaluó por la disminución de la absorbancia de la catalasa a 404 nm. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 mL, una solución de catalasa de hígado bovina 49.8 μM (16.6 μM , concentración final) y 18 mM de HOCl (6 mM, concentración final) y concentraciones crecientes de los compuestos ensayados. Se obtuvieron los espectros en un intervalo de 370 a 450 nm para la catalasa sola, catalasa más HOCl, y catalasa-HOCl más compuestos, y las absorbancias a 404 nm. El valor de la absorbancia a 404 nm para la catalasa sola menos la absorbancia de la catalasa más HOCl se consideró el como 100% de capacidad de atrapamiento (o 0% de degradación de la catalasa). La diferencia del valor de la absorbancia de la catalasa sola menos la absorbancia de la catalasa más HOCl en presencia de los compuestos se comparó con este valor.

6.2.6 Ensayos en cultivos de *Caenorhabditis elegans*

Los ensayos de sobrevivencia se evaluaron en medio líquido a 20°C empleando placas de 96 pozos [185]. Los nematodos se sincronizaron y se distribuyeron en los pozos como

larvas L1 (10-20 animales por pozo) con *Escherichia coli* OP50 como fuente de alimento. La sincronización de *C. elegans* se realizó con el objetivo de que todos los individuos empleados en los ensayos se encontraran en el mismo estado larvario. El proceso de sincronización se llevó a cabo empleando una solución de hipoclorito sódico. Para evitar la autofecundación, se añadió 5-fluoro-2'-desoxiuridina 36 horas después de la siembra (0.12 mM final).

Los pozos se suplementaron con los compuestos (100 μ mol). Como control se incluyeron pozos a los que se añadió solamente el vehículo DMSO/etanol (50/50% v/v). Posterior a la exposición de los gusanos a los tratamientos se realizaron observaciones continuas para determinar el número de animales vivos y muertos. Los gusanos eran considerados muertos si no respondían al toque suave o a la estimulación luminosa. En todos los casos, las observaciones y los recuentos se realizaron empleando un microscopio Nikon Eclipse TS 100.

6.2.6.1 Incremento en la sobrevida

En cada pozo se colocaron las larvas L1 (15-20 animales por pozo) sincronizados y *Escherichia coli* OP50 como fuente de alimento. Los medios se suplementaron con los compuestos (100 μ M) disueltos en una mezcla de DMSO/etanol (50/50 % v/v). De forma paralela se incluyeron pozos sin compuesto en los cuales solamente se adicionó el vehículo. La fracción de animales vivos y muertos se obtuvo diariamente, a partir del día 1, hasta el día 32. Durante el período de estudio las placas fueron suplementadas de manera continua con medio de cultivo y alimento. Estos ensayos se llevaron a cabo empleando aproximadamente 200 gusanos por tratamiento. A partir de los datos de las observaciones diarias, se construyeron las curvas de tiempo-sobrevida y se calculó la vida media de los nematodos expuestos a los diferentes compuestos.

6.2.6.2 Ensayo con juglona

La juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona), es un pro-oxidante que puede ser reducido con NAD(P)H por diaforasas, convirtiendo el oxígeno en anión superóxido y como consecuencia aumentando el estrés oxidativo intracelular [186]. Los ensayos de estrés

inducido por juglona se realizaron a 20°C. Los gusanos se trataron con 250 µM del agente prooxidante [186,187]; la juglona se aplicó disuelta en etanol/Tween 80 (92/ 8%) (v/v). La supervivencia de los gusanos se evaluó cada hora después de someter los nemátodos a estrés. Se consideró como gusanos vivos y que sobrevivieron al estrés oxidativo, a aquellos que reaccionaron con movimiento al observarlos al microscopio, los que no respondían a ningún estímulo externo eran considerados muertos.

6.2.6.3 Ensayo con paraquat

El ensayo de estrés oxidante inducido por paraquat se efectuó en placas de 96 pozos. Los compuestos de *H. inuloides* se añadieron a una concentración de 100 µM. El paraquat se disolvió en agua y se añadió a una concentración final de 85 mM a las placas con o sin metabolitos [188].

6.2.6.4 Ensayo con sulfato de cobre

El ensayo se realizó en placas de 96 pozos con medio líquido. El CuSO₄·5H₂O se disolvió en agua destilada estéril; la concentración final de CuSO₄·5H₂O fue de 1 mM. La fracción de animales vivos se obtuvo al observar los animales bajo el microscopio 24 horas después del tratamiento con sulfato de cobre [189].

6.2.6.5 Estudio de interacción con cobre (UV/visible)

Se prepararon soluciones de cada compuesto con una concentración 1 mM) en metanol. A partir de estas soluciones se prepararon soluciones 25 µM en solución amortiguadora de fosfatos (10 mM, pH 7.4). Se registró la absorbancias de las soluciones en el rango de 200 a 600 nm, en un espectrofotómetro UV 160 SHIMADZU, en celda de cuarzo de 10 mm de espesor. Se registro la absorbancia de los compuestos en presencia de CuSO₄ 50 µM [190].

6.2.7 Actividad anti *Helicobacter pylori*

Se empleó la cepa ATCC 43504 de *H. pylori*, la cual se cultivó en agar base Casman (BBL) en placas suplementadas con 5% de sangre de oveja defibrinada, vancomicina (10 mg/L), trimetoprim (5 mg/L), anfotericina B (2 mg/L), y polimixina B (2,5 mg/L) a 37°C

en condiciones microaerofílicas (10% CO₂ y 5% de O₂). La MIC de los metabolitos de *H. inuloides* y los antibióticos de referencia (amoxicilina, claritromicina y metronidazol) se determinó empleando el método de dilución en caldo de acuerdo con las recomendaciones del CLSI [191], en caldo de Mueller-Hinton (β- 0.2 % ciclodextrina, vancomicina 10 mg/L, trimetoprim 5 mg/L, anfotericina B 2 mg/, polimixina B 2.5 mg/L), con agitación suave (150 rpm) a 37 °C, bajo condiciones microaerofílicas. Los compuestos se disolvieron en DMSO y se prepararon diluciones seriadas para obtener concentraciones finales en el medio de cultivo de 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.81 y 3.6 µg/mL. Las pruebas se realizaron en placas de 24 pozos con capacidad de 3 mL, a cada pozo se agregó 1.5 mL de cultivo de *H. pylori* en la fase de crecimiento exponencial (aprox. 10⁸ UFC/ml), más 10 µL de la muestra disuelta de cada una de las diluciones, cada ensayo se realizó por triplicado. Como control negativo se utilizaron 10 µL de DMSO, como control positivo se emplearon los antibióticos de referencia. Se tomó una alícuota de 750 µL para determinar la absorbancia inicial, posteriormente las placas se colocaron en incubación durante 24 h. Transcurrido este tiempo se midió la lectura final, la ΔA₆₆₀ se utilizó para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento con respecto al control que se cultivó sólo con DMSO. La MIC definida como la concentración mas baja de tratamiento probado que inhibe el crecimiento bacteriano 100 % se obtuvo aplicando los siguientes cálculos:

$$\Delta A = A_f - A_i$$

ΔA es la diferencia de absorbancias de cada cultivo, A_i = absorbancia inicial, A_f = absorbancia final del cultivo. El porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\%I = 100 - \left[\frac{\Delta A_e * 100}{\Delta A_c} \right]$$

6.2.8 Actividad anti *Giardia intestinalis*

Los trofozoítos de *G. intestinalis* se crecieron en cultivo axénicos a 37 ° C en 8 mL de medio TYIS-33 suplementado con 10% de suero bovino fetal y antibióticos (anfotericina 0,005 mg/ml, gentamicina y ceftazidina 0.01 mg/ml) [192]. Los cultivos en

fase Log (cada 48-72 h) se recolectaron por enfriamiento (4°C durante 15 min) y centrifugación de los frascos de cultivo a 3500 rpm (24377.99 g) durante 5 minutos. Posteriormente, los trofozoítos fueron contados en un hemocitómetro. Estos trofozoítos se utilizaron para los bioensayos. Los ensayos *in vitro* se realizaron de la siguiente manera. Todos los compuestos se disolvieron en DMSO (0.4 %). Se prepararon diluciones seriadas a diferentes concentraciones (100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 µg/mL) con medio TYI-S-33 en placas de 96 pozos. En cada pozo se inocularon 1×10^5 trofozoítos de *G. intestinalis* cepa WB en un volumen final de 300 µL. Los trofozoítos de *G. intestinalis* se incubaron a 37° C. Pozos con DMSO al 0.4 % y DMSO al 0.4 % más metronidazol (20 µg/mL) sirvieron como controles. Los trofozoítos se incubaron durante 24 h a 37°C. Después de período de incubación el medio de cultivo se removió de la placa, los trofozoítos se fijaron con metanol y se tiñeron con 0.1% de azul de metileno durante 10 min. La placa se lavó y se incubó durante 20 min con HCl 0.1 M, el colorante se extrajo y la se midió la absorbancia a 655 nm [193]. Cada concentración se realizó por sextuplicado. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó por comparación con los controles cultivados sin compuestos.

6.2.8.1 Microscopía electrónica de Transmission (MET)

Para identificar las modificaciones ultraestructurales, trofozoítos de *Giardia* de los grupos experimentales y de control fueron fijados en una solución de glutaraldehído al 3% con solución amortiguadora de fosfato (0.1 M, pH 7.2). Posteriormente, se lavaron con solución amortiguadora de fosfato tres veces. Fijadas con tetróxido de osmio (1%), lavadas con solución amortiguadora de fosfato y sometidas a una deshidratación gradual con etanol. Las muestras se sometieron a dos períodos de incubación dentro de óxido de propileno y se embebieron durante 24 h en óxido de propileno y resina EPON. Las muestras se mantuvieron por 2 h bajo agitación en resina EPON. Posteriormente, se incubaron a 60°C durante 48 h. Las muestras se cortaron en secciones delgadas (60-90 nm) con un ultramicrotomo (Reichert-Jung Leica, Heidelberg, Alemania) y dichas secciones se montaron sobre rejillas de cobre y teñidas con nitrato de uranilo y citrato de plomo. Se registraron los cambios estructurales a 50 campos para cada muestra utilizando un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1200EXII (Jeol Ltd., Tokio, Japón).

6.2.9 Ensayos de toxicidad

6.2.9.1 Ensayo con *Artemia salina*

Las larvas *Artemia salina* (nauplios) se han utilizado para probar la toxicidad de diversas sustancias y para evaluar extractos de plantas con el fin de aislar compuestos biológicamente activos [151]. Los quistes se obtuvieron de una tienda local y se eclosionaron en placas de Petri con agua de mar artificial (3.7 % p/v sales marinas disuelto en agua desionizada a pH 8) y se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 h. Posteriormente las larvas recién nacidas fueron separados de sus cáscaras y los quistes restantes transfiriéndose a agua de mar recién preparada. Los ensayos de toxicidad se realizaron en una placa de 96 pozos (Corning, NY, EE.UU.). Los compuestos se disolvieron en una mezcla DMSO/etanol 50/50% v/v, a partir de estas soluciones se prepararon diluciones con agua de mar para obtener concentraciones equivalentes a 1, 10 y 1000 μM . El dicromato $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, empleado como control positivo, se preparó en concentraciones de 1, 10 y 100 μM . Se utilizaron pozos a los que solamente se agregó el vehículo como controles negativos. El porcentaje de mortalidad de las larvas (%) se determinó 24 h después de la exposición [151]. El porcentaje de mortalidad se calculó de acuerdo con el método de Reed-Muench [194], considerándose como muertas las larvas con ausencia de movimiento hacia delante. La CL_{50} se determinó empleando análisis probit.

6.2.9.2 Viabilidad celular en macrofagos

Para el ensayo 100 μL /pozo de un cultivo de 2×10^6 células/ml se embraron en placas de 96 pozos y se incubaron durante 2 h. Las células se trataron durante 24 h a 37°C , con o sin 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lipopolisacárido. Se añadieron 50 μL de cada compuestos ensayado en diferentes concentraciones (3.1 a 100 μM) a cada pozo. Se empleó clorhidrato de aminoguanidina como compuesto de referencia. La concentración de nitrito en el medio se midió como un indicador de la producción de NO de acuerdo con la reacción de Griess [195]. Cien microlitros de cada sobrenadante se mezclaron con el mismo volumen de reactivo de Griess (sulfanilamida al 1% en ácido fosfórico al 5% y N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro al 0.1% en agua), la absorbancia de la mezcla se determinó a 550 nm en un lector de microplacas (Syner/HT: Biotek Instruments). La concentración de nitrito se determinó por interpolación de las curvas de calibración construidas con

concentraciones conocidas de NaNO_2 . Cada experimento se realizó por triplicado. La respiración celular como un indicador de la viabilidad celular, se determinó mediante la reducción mitocondrial-dependiente del 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-tetrazolio bromuro de difenil (MTT) a formazán [196]. Lentamente, 10 μL de MTT se añadieron a las células remanentes en las placas de 96 pozos y se incubaron durante 4 h a 37° C. El colorante incorporado se disolvió en DMSO (100 μL). La absorbancia se midió en un lector de microplacas a 570 nm. Los resultados se expresaron como el porcentaje de MTT incorporado en las células tratadas en comparación con las células de control.

6.2.9.3 Toxicidad aguda en ratón

Se emplearon ratones hembra con peso entre 20 y 25 g adquiridos a la Unidad de Producción y Experimentación Animal de Laboratorio (UPEAL) Universidad Autónoma Metropolitana. El manejo de los animales se realizó conforme a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-Z00-1999 [168] y a Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology adoptado por la Sociedad Americana de Toxicología. Los animales se dividieron en grupos: tratados con el compuesto como grupo de prueba y administrados con solución salina como grupo control. En ambos casos el número de animales fue de seis (n=6). La toxicidad oral aguda del compuesto **1** se evaluó en ratones de acuerdo con los procedimientos establecidos por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) [152]. Los animales se colocaron en jaulas y se mantuvieron en ayunas durante 3 h previas a la administración, pero con suministro de agua. El compuesto ensayado se suspendió en el vehículo (solución de electrolitos que contenía glucosa 20 g, KCl 1.5 g, NaCl 35 g, $\text{Na}_2\text{H}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g por litro y 2% de Tween). Después del período de ayuno los animales se pesaron y se les administró la sustancia. Se administró en una sola dosis por vía oral empleando una cánula de intubación adecuada. Después de la dosificación el ayuno se continuó durante 1 h. Al grupo control se administró la misma cantidad de vehículo. La cantidad de compuesto administrado por vía oral a los animales del grupo de prueba fue equivalente a una dosis de 300 o 2,000 mg/kg de peso corporal. Los animales se observaron individualmente después de la administración por lo menos una vez durante los primeros 60 min y después periódicamente durante las primeras 24 h, con especial atención durante las primeras 4 horas y todos los días a partir de entonces para un

total de 14 días. Durante este período se observaron dos veces al día a los animales, registrándose la mortalidad, perfil de comportamiento (irritabilidad, sedación), el perfil neurológico (convulsiones, descoordinación motora) y el perfil autónomo (salivación, piloerección, contorsión abdominal, diarrea), durante este período también se evaluó el cambio en el peso corporal. En el día decimoquinto, los animales se sacrificaron y los órganos vitales (hígado, riñón, cerebro y pulmones) se sometieron a observación macroscópica.

6.2.10 Ensayos para determinar la configuración absoluta

6.2.10.1 Obtención de derivados de Mosher

Se empleó el método de Mosher [154], por el cual se hizo reaccionar el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol (**6**) con los cloruros *R* y *S*- del ácido α -metoxi- α -trifluorometilfenilacético (AMTFA). La formación de productos se siguió por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando una mezcla de *n*-hexano-EtOAc (8.5:1.5) como fase móvil hasta el consumo de la materia prima. La reacción se detuvo mediante la adición de hielo y se dejó agitar por 1 h. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (3 veces). Las fases orgánicas fueron reunidas y se trataron secuencialmente con HCl al 10%, con una solución saturada de NaHCO₃, y finalmente con solución saturada de NaCl. El residuo orgánico se secó mediante la adición de sulfato de sodio anhidro, se filtró y el filtrado se concentró a vacío.

6.2.10.2 Determinación de la configuración absoluta mediante dicroísmo circular

Para determinar la configuración absoluta de los compuestos **7** y **13** mediante el análisis de la curva de dicroísmo circular, se determinó primeramente su actividad óptica. El compuesto **13** presentó actividad óptica, mientras que el compuesto **7** no presentó actividad óptica, lo que implica que este último compuesto se encuentra como mezcla racémica, por lo que no es posible aplicar la técnica de dicroísmo circular en esta muestra. Se aplicó la regla del benzoato [155] para elucidar la configuración absoluta del ácido 7-metil- α -hidroxi-calamen-15-oico (**13**).

6.2.11 Análisis estadístico

Los datos sobrevida se analizaron utilizando el programa SPSS Statistics 20 IBM, (Chicago, IL, EU). Las gráficas se realizaron empleando el programa GraphPad Prism 4.0, (San Diego, CA, EU). La sobrevida de *C. elegans* se analizó por el método de Kaplan-Meier y la comparación de las curvas mediante la prueba de log-rank. El porcentaje de trofozoítos muertos se graficó *versus* la concentración. Las curvas obtenidas se analizaron empleando el programa Origin 8 (OriginLab Co., Northampton, Massachusetts). Los valores de mortandad de *G. intestinalis* al 50% (IC₅₀) y 90% (CI₉₀) se determinaron por extrapolación en las curvas concentración-respuesta ajustadas mediante regresión no lineal. El error estándar de la media se calculó a partir de los datos de seis experimentos.

7. Conclusiones

A partir del extracto acetónico de *Heterotheca inuloides* se aislaron 5 compuestos de sesquiterpeno, 4 flavonoides, 2 esteroides, 1 cumarina y un inositol, que se evaluaron en diferentes modelos biológicos.

Al evaluar la actividad de los compuestos se observó que estos compuestos presentaron actividad selectiva en los diferentes modelos.

Los compuestos de tipo cadinano fueron activos como antimicrobianos y antiparasitarios, mientras que los compuestos de tipo flavonoide presentaron mejor actividad como antioxidantes, atrapadores de ERO e incrementar la sobrevivencia de *C. elegans* en condiciones normales y bajo condiciones de estrés inducido.

Los compuestos **1** y **134** presentaron buena actividad para inhibir el crecimiento de los trofozoítos de *Giardia intestinalis*, representando a su vez la primera ocasión que se describe la evaluación de la actividad de los metabolitos de *H. inuloides* contra *G. intestinalis*.

Se observó que la actividad biológica de los compuestos es consecuencia de su estructura molecular. La disminución en la aromaticidad incrementó la capacidad de los cadinanos para inhibir la peroxidación. Por otro lado, la sustitución de los grupos hidroxilo por grupos benzoilo disminuyó la actividad de los cadinanos frente a *G. intestinalis*. En lo referente a la actividad antiinflamatoria, la acetilación el 7 en los compuestos 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleño y 7-hidroxicadaleño provocó un efecto proinflamatorio. La capacidad de los flavonoides para incrementar la sobrevivencia de *C. elegans* disminuye a medida que se incrementa el grado de sustitución de los grupos hidroxilo. a como en los flavonoides en los ensayos de citotoxicidad.

La evaluación de la toxicidad de los sesquiterpenos de tipo cadinano aislados del extracto acetónico de las flores secas de *H. Inuloides*, permitió clasificar al compuesto **1** (7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleño) en la categoría 4 del Sistema Globalmente Armonizado de

Conclusiones

Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos, estos resultados son los primeros en los que se describe la toxicidad de un metabolito de *H.inuloides*.

8. Referencias

1. Obón, C.; Rivera, D.; Verde, A.; Fajardo, J.; Valdés, A.; Alcaraz, F.; Carvalho, A.M. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *144*, 44–56.
2. Díaz, J.L. Índice y sinonimia de las plantas medicinales de México. Monografías Científicas I. IMEPLAM, A.C: México, DF, 1976.
3. Argueta, A.; Cano, L.; Rodarte, M.E. Atlas de las plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista: Vols. 1-3. México, 1994.
4. Martínez, M. Catálogo alfabético de nombres vulgares y científicos de plantas que existen en México. Ediciones Botas: México, **1937**.
5. Aguilar, A.; Camacho, J.R.; Chino, S.; Jáquez, P.; López, M.E. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información etnobotánica. IMSS: México, 1994.
6. Moreno-Salazar, S.F.; Robles-Zepeda, R.E.; Johnson, D.E. *Fitoterapia* **2008**, *79*, 132–141.
7. de Cassini, A.H.G. *Bull. Sci. Soc. Philom. Paris.* **1817**, 137.
8. Wagenknecht, B. L. *Rhodora* **1960**, *13*, 64-69.
9. Semple, J. C. *Brittonia* **1987**, *39*, 379-386.
10. Zohary, M. *Evolution* **1950**, *4*, 103–109.
11. Nesom, G. L. *Phytologia* **1990**, *69*, 282-294.
12. Lozoya, X.; Aguilar, A.; Camacho, J. R. *Rev. Méd. IMSS.* **1987**; *25*, 283-286.
13. Monroy-Ortiz, C.; García-Moya, E.; Romero-Manzanares, A.; Sánchez-Quintanar, C.; Luna-Cavazos, M.; Uscanga-Mortera, E.; Flores-Guido, J.S.; González-Romero, V. *Ethno. Med.* **2013**, *7*(1), 13-26.
14. Hersch-Martínez, P. *Econ. Bot.* **1997**, *51*, 107-120.
15. Zurita-Esquivel, M.; Zolla, C. *Bol. of Sanit. Panam.* **1986**, *101*, 339-345.
16. Heinrich, M.; Ankli, A.; Frei, B.; Weimann, C.; Sticher, O. *Soc. Sci. Med.* **1998**, *47*, 1859-1871.
17. Ugent, D. *Econ. Bot.* **2000**, *54*, 427-438.
18. Comisión Nacional Forestal. Plantas medicinales de la Farmacia Viviente del Cefofor: usos terapéuticos tradicionales y dosificación. México, D. F., 2010;12-14.
19. González-Stuart, A. E. *Not. Sci. Biol.* **2010**, *2*, 07-11.

20. Winkelman, M. J. *Ethnopharmacol.* **1986**, *18*, 109-131.
21. Andrade-Cetto, A. J. *Ethnopharmacol.* **2009**, *122*, 163–171.
22. Alonso-Castro, A. J.; Villarreal, M. L.; Salazar-Olivo, L. A.; Gómez-Sánchez, M.; Domínguez, F.; García-Carranca, A. J. *Ethnopharmacol.* **2011**, *133*, 945–972.
23. Andrade-Cetto, A.; Heinrich, M. J. *Ethnopharmacol.* **2005**, *99*, 325–348.
24. Johnson, L.; Strich, H.; Taylor, A.; Timmermann, B.; Malone, D.; Teufel-Shone, N.; Drummond, R.; Woosley, R.; Pereira, E.; Martinez, A. **2006**, *Phytother. Res.* *20*, 250–255.
25. Secretaría de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, México, D.F., 2001.
26. Keil, D. J.; Luckowan, M. A.; Pinkava, D. J. *Amer. J. Bot.* **1988**, *75*, 652-668.
27. Villaseñor, J. L.; Espinosa, G. F. J. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica: México, D.F., 1998.
28. Calderón R. G.; Rzedowski, J. Flora Fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: Pátzcuaro, Michoacán, México, 2001.
29. Martínez-Moreno, D.; Alvarado, F. R.; Mendoza, C. M.; Basurto, P. F. *Bol. Soc. Bot. Méx.* **2006**, *79*, 79-87.
30. Semple, J. C. *Can. J. Botany* **2008**, *86*, 886–900.
31. Ortiz-Bermúdez, E.; Villaseñor, J. L.; Téllez, O. *Acta Bot. Mex.* **1998**, *44*, 25-57.
32. Altieri, M. A.; Trujillo, J. *Hum. Ecol.* **1987**, *15*: 189-220.
33. Sagrero-Nieves, L.; Bartley, J. P. *Flavour Frag. J.* **1996**, *11*, 49-51.
34. Durón, R. R.; Almaguer, L. C.; Garza-Juárez, A. J.; Salazar, C. M. A.; Waksman-De-Torres. *Acta Chromatogr.* **2009**, *21*, 203–215.
35. Mijangos, R. O. F.; Ruiz-Jiménez. J; Lagunez-Rivera. L.; Luque, C. M.D. *Phytochem. Analysis* **2011**, *22*, 484–491.
36. Bohlmann, F.; Zdero, C.; Robinson, H.; King, R. M. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 1675-1680.
37. Bohlmann, F.; Zdero, C. *Phytochemistry*, **1979**, *18*, 1118-1187.

-
38. Bordoloi, M.; Shukla, V.S.; Nath, S.C.; Sharma, R.P. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2007-2037.
 39. Willuhn, G.; Schneider, R.; Matthiesen, U. *Dtsch. Apoth. Ztg.* **1985**, *125*, 1941 -1944.
 40. Bohlmann, F.; Zdero, C. *Chem. Ber.* **1976**, *109*, 2021-2025.
 41. Willuhn, G.; Schneider, R. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1987**, *320*, 393-396.
 42. Kubo, I.; Ishiguro, K.; Chaudhuri, S. K.; Kubo, Y.; Sánchez, Y.; Ogura, T. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 553-554.
 43. Delgado, G.; Olivares, M. S. Chávez, M. I.; Ramírez-Apan, T.; Linares, E.; Bye, R.; Espinosa-García, F.J. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 861-864.
 44. Maldonado López, Y.; Linares Mazari, E.; Bye, R.; Delgado, G.; Espinosa-García, F. *J. Econ. Bot.* **2008**, *62*, 161-170.
 45. Stipanovic, R. D.; Puckhaber, L. S.; Reibenspies, J. H.; Williams, H.J. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1304-1308.
 46. Jerga, C.; Merfort, I.; Willuhn, G. *Pharm. Weekblad* **1987**, *9*, 287.
 47. Jerga, C.; Merfort, I.; Willuhn, G. *Planta Med.* **1990**, *56*, 413-415.
 48. Jerga, C.; Merfort, I.; Willuhn, G. *Planta Med.* **1990**, *56*, 122-123.
 49. Lin, L. Z.; Harnly, J.M. *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 749-52.
 50. Rocha-González, H. I.; Blaisdell-López, E.; Granados-Soto, V.; Navarrete, A. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *649*, 154-160.
 51. Kubo, I.; Muroi, H.; Kubo, A.; Chaudhuri, S.K.; Sánchez, Y.; Ogura, T. *Planta Med.* **1994**, *60*, 218-221.
 52. Castillo-Juárez, I.; González, V.; Jaime-Aguilar, J.; Martínez, G.; Linares, E.; Bye, R.; Romero, I. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *122*, 402-405.
 53. Rosas-Piñón, Y.; Mejía, A.; Díaz-Ruiz, G.; Aguilar, M. I.; Sánchez-Nieto, S.; Rivero-Cruz, J. F. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *141*, 860-865.
 54. Freixa, B.; Vila, R.; Vargas, L.; Lozano, N.; Adzet, T.; Cañigüeral, S. *Phytother. Res.* **1998**, *12*, 427-430.
 55. Segura, L.; Freixa, B.; Ringbom, T.; Vila, R.; Perera, P.; Adzet, T.; Bohlin, L.; Cañigüeral, S. *Planta Med.* **2000**, *66*, 553-555.
 56. Gené, R.M.; Segura, L.; Adzet, T.; Marin E.; Iglesias, J. **1998**, *60*, 157-162
-

57. Muñoz-Velázquez, E. E.; Rivas-Díaz, K.; Loarca-Piña, M. G.; Mendoza-Díaz, S.; Reynoso-Camacho, R.; Ramos-Gómez, M. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* **2012**, *3*, 481-495.
58. Kubo, I.; Chaudhuri, S. K.; Kubo, Y.; Sánchez, Y.; Ogura, T.; Saito, T.; Ishikawa, H.; Haraguchi, H. *Planta Med.* **1996**, *62*, 427-430.
59. Haraguchi, H.; Saito, T.; Ishikawa, H.; Sánchez, Y.; Ogura, T.; Kubo, I. *J. Phar. Pharmacol.* **1996**, *48*, 441-443.
60. Coballase-Urrutia, E.; Pedraza-Chaverri, J.; Camacho-Carranza, R.; Cárdenas-Rodríguez, N.; Huerta-Gertrudis, B.; Medina-Campos, O. N.; Mendoza-Cruz, M.; Delgado-Lamas, G.; Espinosa-Aguirre, J. J. *Toxicology* **2010**, *276*, 41-48.
61. Coballase-Urrutia, E.; Pedraza-Chaverri, J.; Cárdenas-Rodríguez, N.; Huerta-Gertrudis, B.; García-Cruz, M. E.; Ramírez-Morales, A.; Sánchez-González, D. J., Martínez-Martínez, C. M., Camacho-Carranza, R.; Espinosa-Aguirre, J. J. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2011**, *63*, 363-370.
62. Coballase-Urrutia, E.; Pedraza-Chaverri, J.; Cárdenas-Rodríguez, N.; Huerta-Gertrudis, B.; García-Cruz, M.E.; Montesinos-Correa, H.; Sánchez-González, D. J.; Camacho-Carranza, R.; Espinosa-Aguirre, J. J. *Evid. Based Compl. Alt.* **2013**, 2013, Article ID 659165, 1-13.
63. Villareal, M. I.; Alonso, D.; Melesio, G. *Fitoterapia* **1992**, *41*, 518-522.
64. Kubo, I.; Kinst-Hori, I.; Chaudhuri, S. K.; Kubo, Y.; Sánchez, Y.; Ogura, O. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1749-1755.
65. Juárez-Flores, B. I.; Jasso-Pineda, Y.; Aguirre-Rivera, J. R.; Jasso-Pineda, I. *Polibotánica* **2010**, *30*, 123-135.
66. Rendón-Huerta, J.A.; Juárez-Flores, B.I.; Aguirre-Rivera, J.R.; Álvarez, F.G. *Afr. J. Agric. Res.* **2013** *8*, 971-977.
67. Morimoto, M.; Cantrell, C. L.; Libous-Bailey, L.; Duke, S. O. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 69-74.
68. Alexander, J.; Krishna-Rao, G.S. *J. Indian Inst. Sci.* **1971**, *53*, 206-208.
69. Strunz, G.M.; Yu, C.-M.; Salonius, A. *Phytochemistry* 1989, *28*(10): 2861-2863.
70. Garcia, E.; Mendoza, V.; Guzman, J.A. *Nat. Prod. Lett.* **1997**, *11* (1), 67-72.
71. Parkinson, D.R.; Arbuck, S.G.; Moore, T.; Pluda, J.M.; Christian, M.C. *Stem Cells* **1994**, *12*, 30-43.

-
72. Gordaliza, M. *Clin. Transl. Oncol.* **2007**, *9*, 767-76.
 73. Amin, A.R.; Kucuk, O.; Khuri, F.R.; Shin, D.M. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 2712–2725.
 74. Malvezzi, M.; Bosetti, C.; Chatenoud, L.; Rodríguez, T.; Levi, F.; Negri, E. La Vecchia, C. *Annals of Oncology.* **2004**, *15*, 1712-1718.
 75. Sosa-Durán, E.E.; García-Rodríguez, F.M. *Rev. Mex. Anest.* **2013**, *36*, supl. 1, 130-132.
 76. Lee, H.Y.; Kwon, J.T., Koh, M.; Cho, M.H.; Park, S.B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6335-6339.
 77. Pouget, C.; Lauthier, F.; Simon, A.; Fagnere, C.; Basly, J.P.; Delage, C.; Chulia, A.J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 3095-3097.
 78. Teillet, F.; Boumendjel, A.; Boutonnat, J.; Ronot, X. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 715-745.
 79. Romagnolo, D.F.; Selmin, O.I.; *J. Nutr. Gerontol. Geriatr.* **2012**; *3*, 206-238.
 80. Kanadaswami, C.; Lee, L.T.; Lee, P.P.; Hwang, J.J.; Ke, F.C.; Huang, Y.T.; Lee, M.T. *In Vivo.* **2005**, *19*, 895-909.
 81. Sun, M.; Han, J.; Duan, J.; Cui, Y.; Wang, T.; Zhang, W.; Liu, W.; Hong, J.; Yao, M.; Xiong, S.; Yan, X. *Phytother. Res.* **2007**, *21*, 269-277.
 82. Batra, P.; Sharma, A.K. *Biotech.* **2013**, *3*:439–459.
 83. Sánchez, I.; Calderón, J.; Ruiz, B.; Tellez, J.; Calzada, L.; Taboada, J. *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 290-293.
 84. Cottiglia, F.; Casu, L.; Bonsignore, L.; Casu, M.; Floris, C.; Sosa, S.; Altinier, G.; Della Loggia, R. *Z. Naturforsch. C.* **2005**, *60*, 63-66.
 85. Husain, S.R.; Cillard, J.; Cillard, P. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2489–2491.
 86. Wang, W.; Goodman, M.T. *Nutr. Res.* **1999**, *19*, 191-202.
 87. Lotito, S.B.; Frei, B. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *36*, 201-211.
 88. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. *Lebensm.-Wiss. u.-Technology* **1995**, *28*, 25-30.
 89. Molyneux P. *J. Sci. Technol.* **2004**; *26*, 211–219.
 90. Kedare, S.B.; Singh, R.P. *Songklanakarin J. Food Sci. Technol.* **2011**, *48*, 412-22.
-

91. Sanchez-Moreno, C.; Larrauri, J.A.; Saura-Calixto, F. *J. Sci. Food. Agri.* **1998**, *79*, 270–276.
92. Litwinienko, G.; Ingold, K.U. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3433-3438.
93. Amorati, R.; Menichetti, S.; Viglianisi, C.; Foti, M.C. *Chem. Commun.* **2012**; *48*, 11904-11906.
94. Fernandez, J.; Perez-Alvarez, J.A.; Fernandez-Lopez, J.A. *Food Chem.* **1997**, *59*, 345-353.
95. Spickett, C.M.; Wiswedel, I.; Siems, W.; Zarkovic, K; Zarkovic, N. *Free Rad. Res.* **2010**, *44*, 1172–1202.
96. Díaz, P.; Linares, M.B.; Egea, M.; Auqui, S.M.; Garrido, M.D. *Meat Sci.* **2014**, *98*, 569–573
97. Kirkinezos, I.G.; Moraes, C.T. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2001**, *12*, 449-57.
98. Haraguchi, H.; Ishikawa, H.; Sánchez, Y.; Ogura, T.; Kubo, Y.; Kubo, I. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 865-871.
99. Winterbourn, C.C. *Toxicol. Lett.* **1995**, *82-83*, 969-974.
100. Cerella, C.; Coppola, S.; Maresca, V.; De Incola, M.; Radogna, F.; Ghibelli, L. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1171*, 559-563.
101. Cadet, J.; Delatour, T.; Douki, T.; Gasparutto, D.; Pouget, J,P.; Ravanat, J.L.; Sauvaigo, S. *Mutat. Res.* **1999**, *8*, 424(1-2):9-21.
102. Guptasarma, P.; Balasubramanian, D.; Matsugo, S.; Saito, I. *Biochemistry.* **1992**, *5*; 4296-303.
103. Agnez-Lima, L.F.; Melo, J.T.; Silva, A.E.; Oliveira, A.H.; Timoteo, A.R.; Lima-Bessa, K.M.; Martinez, G.R.; Medeiros, M.H.; Di Mascio, P.; Galhardo, R.S.; Menck, C.F. *Mutat. Res.* **2012**, *751*, 15–28.
104. Pullar, J.M.; Vissers, M.C.; Winterbourn, C.C. *IUBMB Life* **2000**, *50*, 259-266.
105. Pereira, D.M.; Valentão, P.; Pereira, J.A.; Andrade, P.B. *Molecules*, **2009**, *14*, 2202-2211.
106. Swaran, J.S.F. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2009**, *2*, 191–20.
107. Kuhnle, J.A.; Windle, J.J.; Waiss, A.C. *J. Chem. Soc.* **1969**, 613-616

-
108. van Acker, S.; de Groot, M. J.; Van den Berg, D. J.; Tromp, M.N.J.L.; Donne'-OP den Kelder, G.; Wim, J.F.; van Der Vijgh, W.J.F.; Bast, A. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 1305-1312.
 109. Soobrattee, M.A.; Neergheen, V.S.; Luximon-Ramma, A.; Aruoma, O.I.; Bahorun, T. *Mutat. Res.* **2005**, *579*, 200-213.
 110. Brenner, S. *Genetics* **1974**; *77*, 71-94.
 111. Leung, M.C.; Williams, P.L.; Benedetto, A.; Au, C.; Helmcke, K.J., Aschner, M.; Meyer, J.N. *Toxicol. Sci.* **2008**, *106*, 5-28.
 112. Katiki, L.M.; Ferreira, J.F.; Zajac, A.M.; Masler, C.; Lindsay, D.S.; Chagas, A.C.; Amarante, A.F. *Vet. Parasitol.* **2011**, *182*, 264-268.
 113. Bany, I.A.; Dong MQ, Koelle MR. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 8060-8069.
 114. Pietsch, K.; Saul, N.; Menzel, R.; Stürzenbaum, S.R., Steinberg, C.E. *Biogerontology* **2009**, *10*, 565-578.
 115. Saul, N.; Pietsch, K.; Menzel, R.; Stürzenbaum, S.R., Steinberg, C.E. *Mech. Ageing Dev.* **2009**, *130*, 477-486.
 116. Kampkötter, A.; Timpel, C.; Zurawski, R.F.; Ruhl, S.; Chovolou, Y.; Proksch, P.; Wätjen, W. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *149*, 314-323.
 117. Kampkötter, A.; Nkwonkam, C.; Zurawski, R.F.; Timpel, C.; Chovolou, Y.; Wätjen, W.; Kahl, R. *Arch. Toxicol.* **2007**, *81*, 8498-58.
 118. Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. *J Nutr Biochem.* **2002**, *13*, 572-584.
 119. Moalin, M., Strijdonck, G.P.; Beckers, M.; Hagemen, G., Borm, P.; Bast, A., Haenen, G.R. *Molecules* **2011**, *21*, 9636-9650.
 120. Xue, Y.L.; Ahiko, T.; Miyakawa, T.; Amino, H.; Hu, F.; Furihata, K., Kita, K.; Shirasawa, T.; Sawano, Y.; Tanokura, M. **2011**, *J. Agric. Food Chem.* *8*, 5927-5934.
 121. Surco-Laos, F.; Cabello, J.; Gómez-Orte, E.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C.; Dueñas, M. *Food Funct*, **2011**, *2*, 445-456.
 122. Sabry, M.A. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2010**, *3*, 238-253.
 123. Arking, R.; Buck, S.; Berrios, A., Dwyer, S.; Baker, G.T. *Dev. Genet.* **1991**; *12*, 362-70.
 124. Castello, P.R.; Drechsel, D.A.; Patel, M. *J. Biol. Chem.* **2007**, *11*, 14186-14193.
-

125. Dinis-Oliveira, R.J.; Remião, F.; Carmo, H.; Duarte, J.A.; Navarro, A.S.; Bastos, M.L.; Carvalho, F. *Neurotoxicology* **2006**, *27*, 1110-1122.
126. Van Raamsdonk, J.M.; Hekimi, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *10*, 5785-90.
127. Ruan, Q.L.; Ju, J.J.; Li, Y.H.; Liu, R.; Pu, Y.P., Yin, L.H.; Wang, D.Y. *J. Toxicol. Environ. Health A*. **2009**; *72*, 746-51.
128. Park, H.K.; Kim, S.J.; Kwon, Y., Park, J.H., Kim, Y.C. *Life Sci*. **2010**, *87*, 181–186.
129. Jimenez-Del-Rio, M.; Guzman-Martinez, C.; Velez-Pardo, C. *Neurochem. Res.* **2010**, *35*, 227–238.
130. Peng, C.; Chan, H.Y.; Huang, Y., Yu, H., Chen, Z.Y. *J. Agric. Food Chem.* **2011**. *59*, 2097-2106.
131. Uriu-Adams, J.Y.; Keen, C.L. *Mol. Aspects Med.* **2005**, *26*, 268–298.
132. Simonsen, L.O.; Harbak, H.; Bennekou, P. *Sci. Total Environ.* **2012**, *15*, 210-215.
133. Kurita, H.; Ohsako, S., Hashimoto, S., Yoshinaga, J.; Tohyama, C. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 256–266.
134. Moriwaki, H.; Osborne, M.R.; Phillips, D.H. *Toxicol. in Vitro* **2008**, *22*, 36–44.
135. Georgopoulos, P.G.; Roy, A.; Yonone-Lioy, M.J.; Opiekun, R.E.; Lioy, P.J. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **2001**, *4*, 341–394.
136. Yoshino M, Murakami K. *Anal. Biochem.* **1998**, *1*, 40-44.
137. Perron, N.R.; Brumaghim, J.L. *Cell Biochem. Biophys.* **2009**, *53*, 75-100.
138. Bukhari, S.B.; Memon, S., Mahroof-Tahir, M.; Bhanger, M.I. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2009**, *71*, 1901-1906.
139. Brown, J.E.; Khodr, H.; Hider, R.C.; Rice-Evans, C.A. *Biochem. J.* **1998**, *330*, 1173-1178
140. Procházková, D.; Boušová, I.; Wilhelmová, N. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 513–523.
141. Rice-Evans, C.A, Miller, N.J., Paganga, G. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**; *20(7)*:933-956.
142. WHO. Intensified Control of Neglected Diseases. Report of an International Workshop Berlin, 10-12 December 2003. Geneva, 2004.
143. Feng, Y.; Xiao, L. *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, *24*, 110-140.

-
144. SSA. **2013**. Dirección General de Epidemiología. Boletín Epidemiológico. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2013/semanas/sem32/pdf/cua4.3.pdf>
 145. Busatti, H.G.N.O.; Santos, J.F.G.; Gomes, M.A. *Biologics* **2009**, *3*, 273–87.
 146. Solaymani-Mohammadi, S.; Genkinger, J.M.; Loffredo, C.A.; Singer, S.M. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*, e682.
 147. Misra, P.K.; Kumar, A.; Agarwal, V.; Jagota, S.C. *Indian Pediatr.* **1995**, *32*, 291-294.
 148. Calzada, F.; Meckes, M.; Cedillo-Rivera, R.; Tapia-Contreras, A.; Mata, R. *Phar. Biol.* **1998**, *36*, 305–309.
 149. Calzada, F.; Cervantes-Martínez, J.A.; Yépez-Mulia, L. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *98*, 191–193.
 150. Bautista, E.; Calzada, F.; Ortega, A.; Yépez-Mulia, L. *J. Mex. Chem. Soc.* **2011**, *55*, 251-253.
 151. Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; McLaughlin, J.L. *Planta Medica* **1982**, *45*, 31-34.
 152. OECD. OECD Guideline for testing of Chemicals, Guideline 423: acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method 2001.
 153. ONU. Sistema Globalmente Armonizado (SGA) de clasificación y etiquetado de productos químicos. Nueva York y Ginebra, 2011.
 154. Dale, J.A., Dull, D.L.; Mosher, H.S. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 2543–2549.
 155. Harada, N.; Ohashi, M.; Nakanishi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 7349.
 156. Lewis, J.A.; Fleming, J.T. Basic culture methods. In: *Methods in cell biology*, Vol. 48, H.F. Epstein and D.C. Shakes, eds. Academic Press: San Diego, 1995, 3-29.
 157. Smith, P.D.; Gillin, F.D.; Spira, W.M.; Nash, T.E. *Gastroenterology* **1982**, *83*, 797-803.
 158. Gallagher, M.J. and Sutherland, M.D. *Aus. J. Chem.* **1965**, *18*, 1111-1113.
 159. Dutta, N.K., Mazumdar, K., Mishra, U.S., Dastidar, S.G. and Park J.H. *Pharm. Chem. J.* **2007**, *41*, 269-271.
 160. Ali, H.A., Chowdhury, A.K., Rahman, A.K., Borkowski, T., Nahar, L. and Sarker, S.D. *Phytother. Res.* **2008**, *22*, 1684-1687.
-

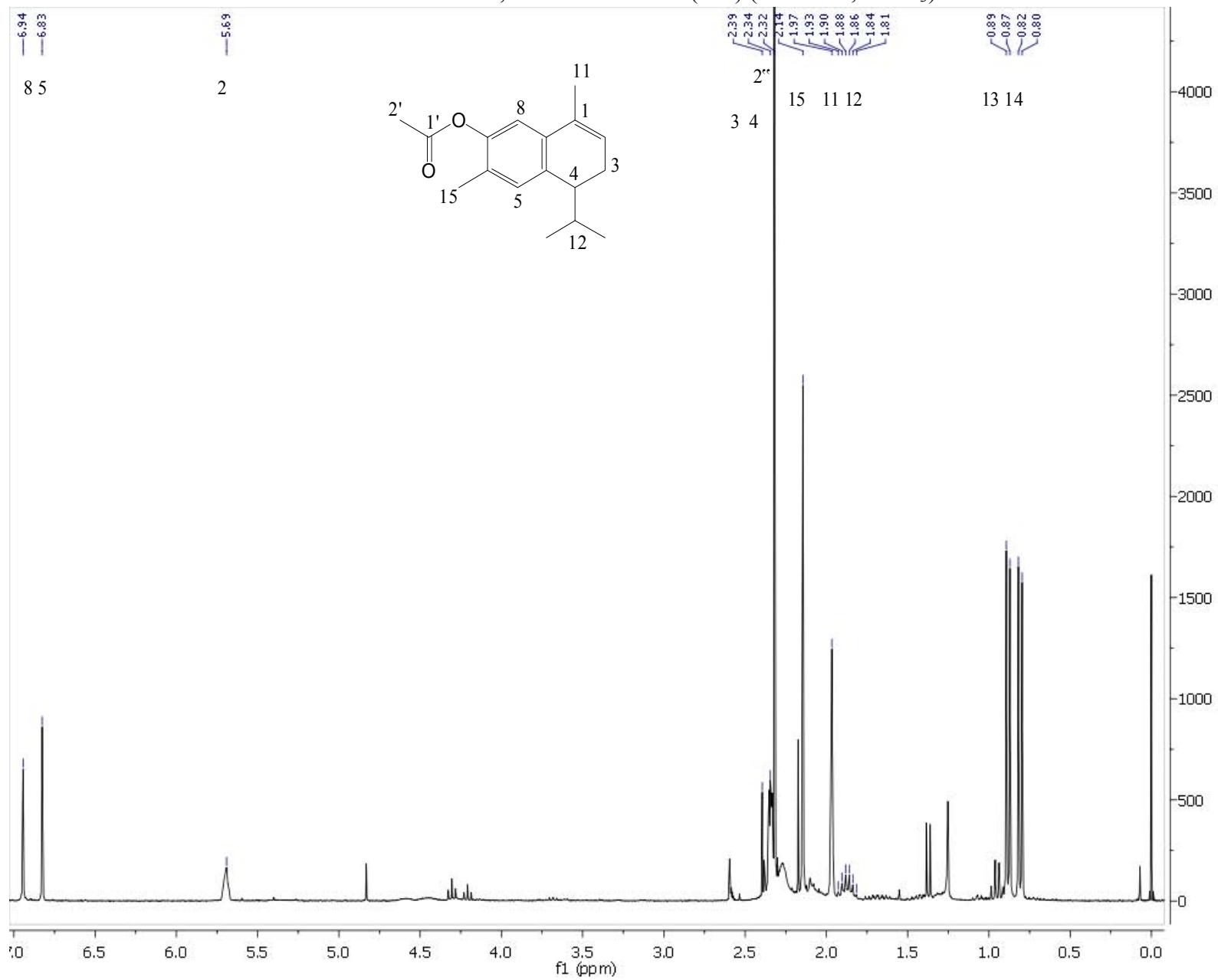
161. de la Torre, M.D.L.; Rodrigues, A.G.P.; Tomé, A.C., Silva; A.M.S. and Cavaleiro, J.A.S. *Tetrahedron*. **2004**, *60*, 3581–3592.
162. Villaseñor, I.M.; Lemon, P.; Palileo, A.; Bremner, J.B. *Mutation Research*. 1996, *360*, 89–93.
163. Vasconcelos, J.M.J.; Silva, A.M.S. and Cavaleiro, J.A.S. *Phytochemistry*. **1998**, *49*, 1421–1424.
164. Picq, M., Prigent, A.F., Némoz, G., André, A.C. and Pacheco, H. *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 1192-1198.
165. Burden, R.S. and KEMP. M.S. *Phytochemistry*. **1983**, *22*, 1039-1040.
166. Krishnamoorthy, V. and Thomson, R. H. *Phytochemistry*. **1971**, *10*, 1669-1670.
167. Vichai, V.; Kirtikara, K. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112-1116.
168. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
169. Young, J.M.; Wagner, B.M.; Spires, D.A. *J. Invest. Dermatol.* **1983**, *80*, 48-52.
170. Rossato, J. I.; Ketzer, L.A.; Centuriao, F.B.; Silva, S. J.; Lüdtke, D.S.; Zeni, G.; Braga, A.L.; Rubin, M.A.; Rocha, B.T. *Neurochem. Res.* **2002**, 297-303.
171. Lowry, O.H.; Rosebroug, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265-275.
172. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. *Anal. Biochem.* **1979**, *95*, 351-358.
173. Esterbauer, H.; Cheeseman, K.H. *Methods Enzymol.* **1990**; *186*, 407-421.
174. Blois, M.S. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200
175. Bielski, B.H.J.; Shlue, G.G.; Bajuk, S. *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 830-833.
176. Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1970**, *16*, 4053-5407.
177. Floriano-Sánchez, E.; Villanueva, C.; Medina-Campos, O.N.; Rocha, D.; Sánchez-González, D.J.; Cárdenas-Rodríguez, N.; Pedraza-Chaverri, J. *Free Radic. Res.* **2006**, *40*, 523-533.
178. Wolff, S.P. *Methods in Enzymology* **1994**, *233*, 182-189.
179. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.; Aruoma, O.I. *Anal. Biochem.* **1987**, *165*, 215-19.
180. Cheesman, K.H.; Beavis, A.; Esterbauer, H. *Biochem. J.* **1988**, *252*, 649-653.
181. Kraljic, I.; Mohsni, S.El. *Photochem. Photobiol.* **1978**, *28*, 577–81

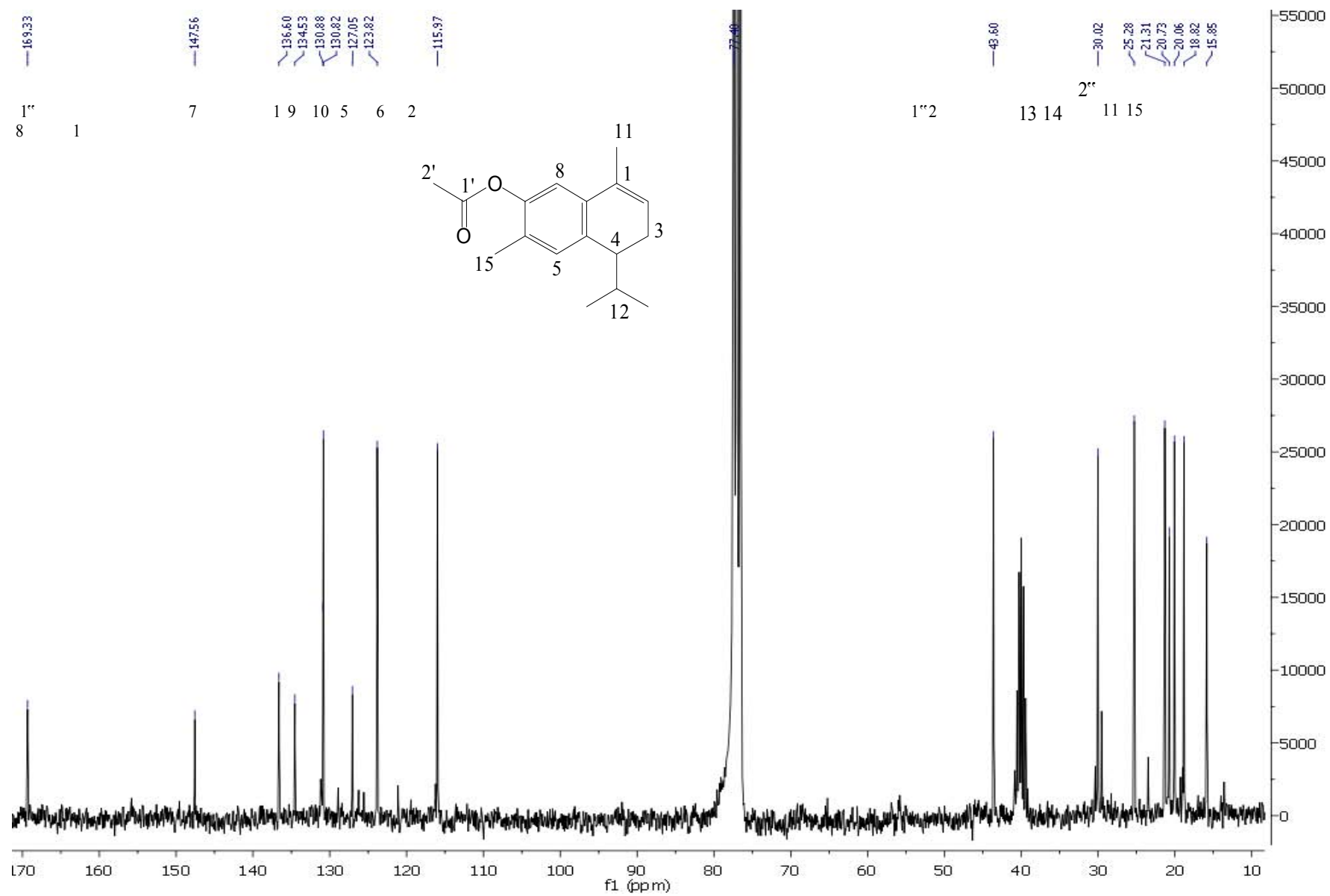
-
182. Pedraza-Chaverri, J.; Barrera, D.; Maldonado, P.D.; Chirino, Y.I.; Macías-Ruvalcaba, N.A.; Medina-Campos, O.N.; Castro, L.; Salcedo, L.I.; Hernández-Pando, R. *BMC Clinical Pharmacology*. **2004**, *4*, 1-13.
183. Mashino, T.; Fridovich, I. *Biochim.Biophys. Acta* **1988**, *956*, 63-69.
184. Aruoma, O.I.; Halliwell, B. *Biochem. J.* **1987**, *248*, 973-976.
185. Solis, G.M.; Petrascheck, M. *JoVE*. **2011**, *49*, 1-6.
<http://www.jove.com/details.php?id=2496>.
186. de Castro, E.; de Castro S.H.; Johnson, T.E. *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *37*, 139-145.
187. Hartwig, K.; Heidler, T.; Moch, J. *Genes Nutr.* **2009**, *4*, 59-67.
188. Lithgow, G.J.; White, T.M.; Melov, S.; Johnson, T.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7540-7544.
189. Harada, H.; Kurauchi, M.; Hayashi, R.; Eki, T. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2007**, *66*, 378-83.
190. Brown, J.E.; Khodr, H.; Hider, R.C.; Rice-Evans, C.A. *Biochem. J.* **1998**, *330*, 1173-1178.
191. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standars for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational suplement (M100-S17). National Committe for clinical laboratory standars: Wayne. Pa., 2007.
192. Keister, D.B. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1983**, *77*, 487-488.
193. Hounkong, K.; Sawangjaroen, N.; Phongpaichit, S. *Exp. Parasitol.* **2011**, *127*, 600-603.
194. Reed, L.J.; Muench, H. *Am. J. Hyg.* **1938**, *27* (3), 493-497.
195. Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. *Ana. Biochem.* **1982**, *126*, 131-138.
196. Mosmann, T. *J Immunol Methods.* **1983**, *16*, 55-63.

Anexos

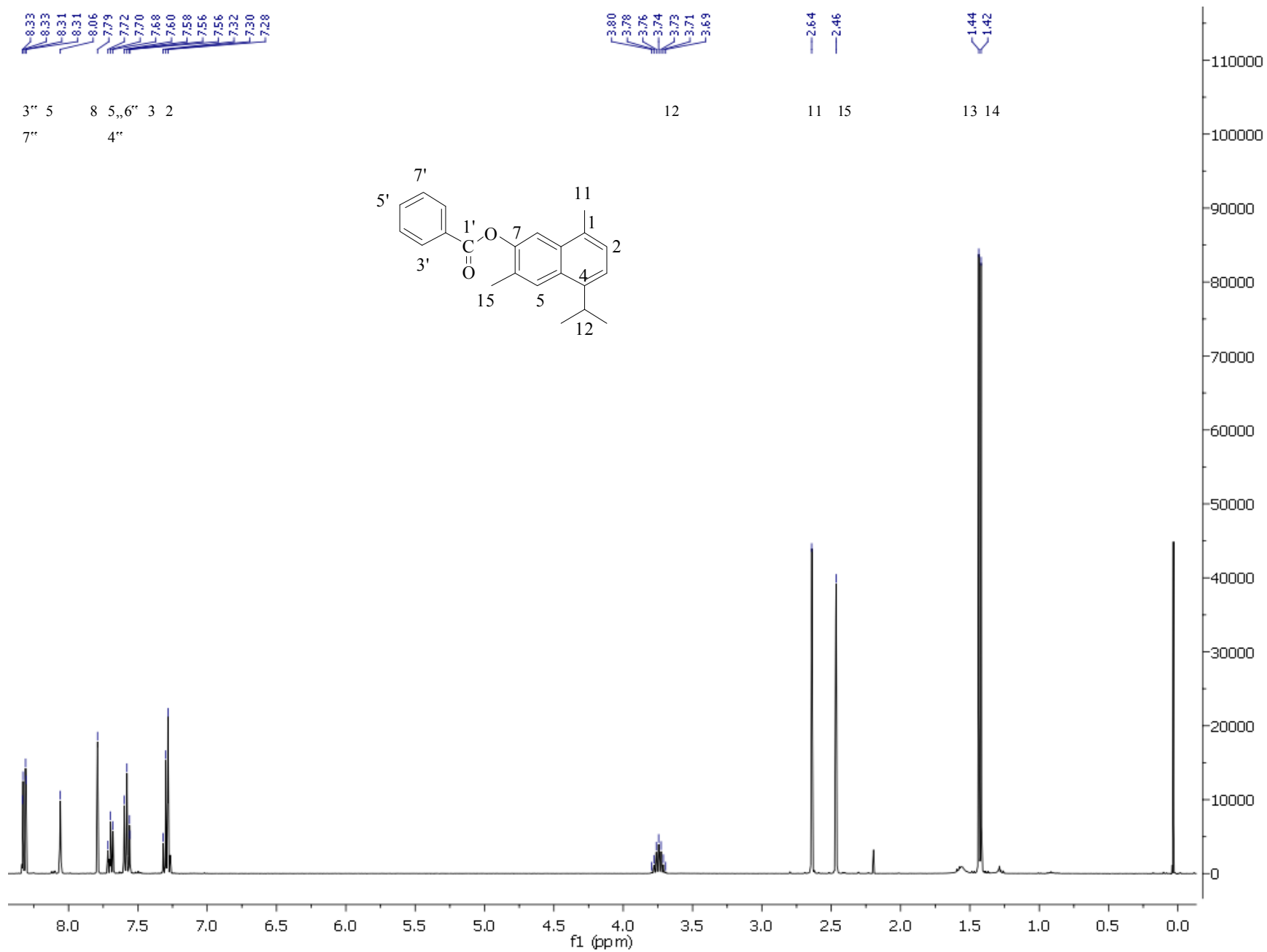
Espectro de RMN de ^1H de 7-acetoxi-3,4-dihidrocadaleno (130) (400 MHz, CDCl_3)	A1
Espectro de RMN de ^{13}C de 7-acetoxi-3,4-dihidrocadaleno (130) (100 MHz, CDCl_3)	A2
Espectro de RMN de ^1H de 7-benzoxi-3,4-dihidrocadaleno (131) (400 MHz, CDCl_3)	A3
Espectro de RMN de ^{13}C de 7-benzoxi-3,4-dihidrocadaleno (131) (100 MHz, CDCl_3)	A4
Espectro de RMN de ^1H de 7-acetoxicadaleno (132) (500 MHz, CDCl_3)	A5
Espectro de RMN de ^{13}C de 7-acetoxicadaleno (132) (125 MHz, CDCl_3)	A6
Espectro de RMN ^1H de 7-benzoxicadaleno (133) (500 MHz, CDCl_3)	A7
Espectro de RMN ^{13}C de 7-benzoxicadaleno (133) (125 MHz, CDCl_3)	A8
Espectro de RMN ^1H de 7-hidroxicalamenano (135)	A10
Espectro de RMN ^1H de 4-isopropil-1,6-dimetilbenzo[<i>c</i>]oxepina-7,9-diona (137)	A12

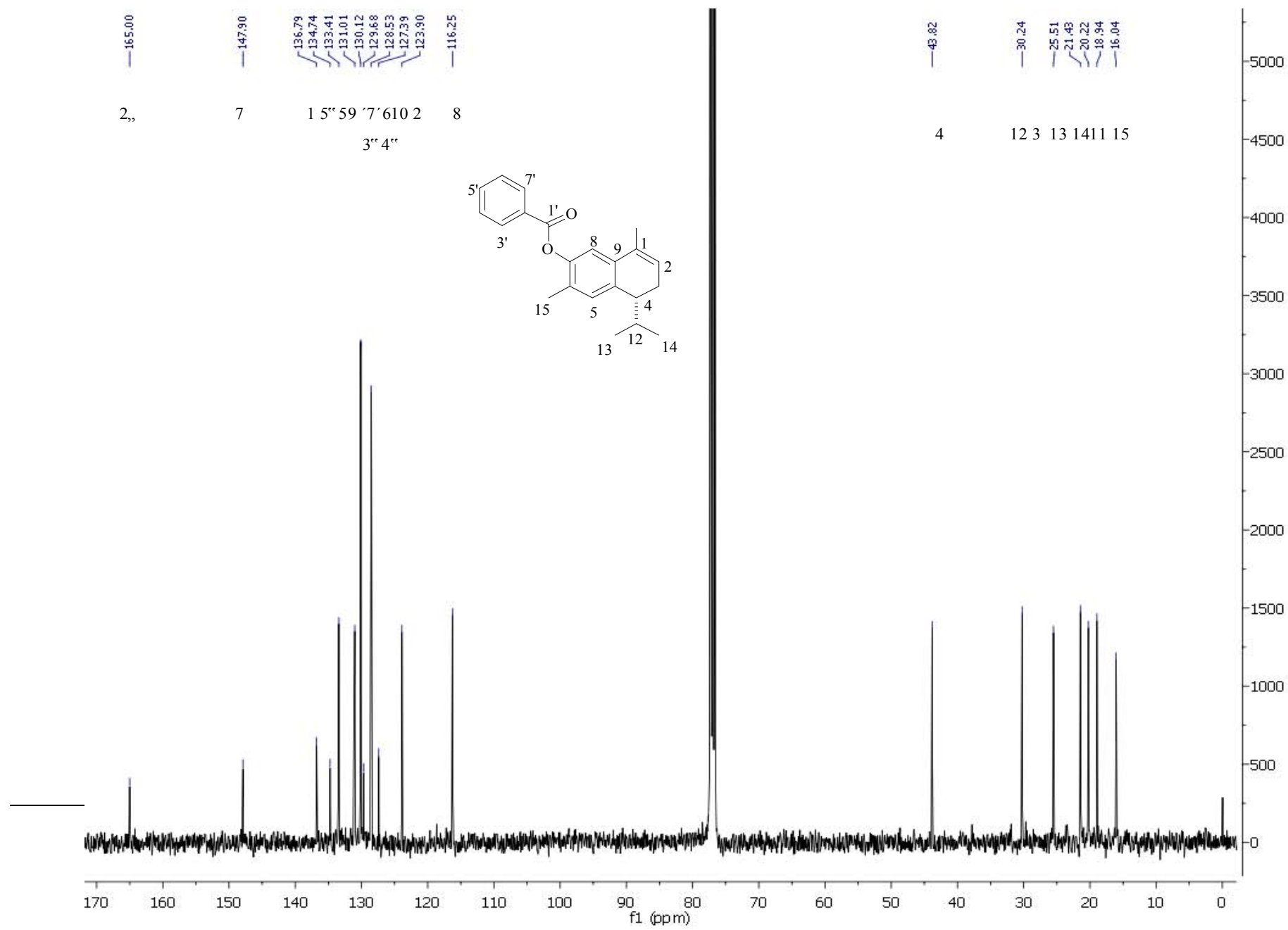
A1. RMN ^1H de 7-acetoxi-3,4-dihidrocadaleño (**130**) (400 MHz, CDCl_3)



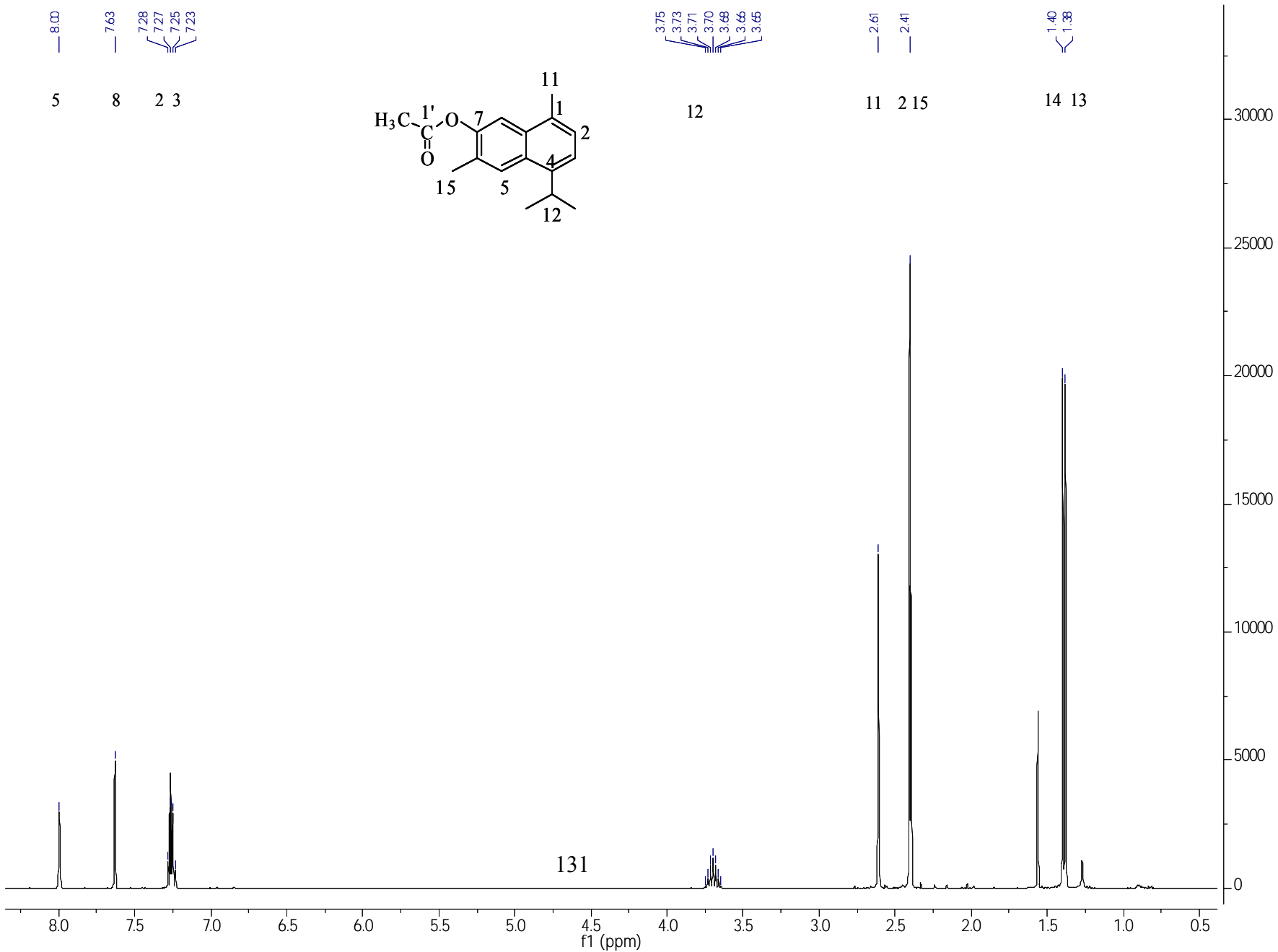
A2. RMN ^{13}C de 7-acetoxi-3,4-dihidrocadaleño (**130**) (100 MHz, CDCl_3)

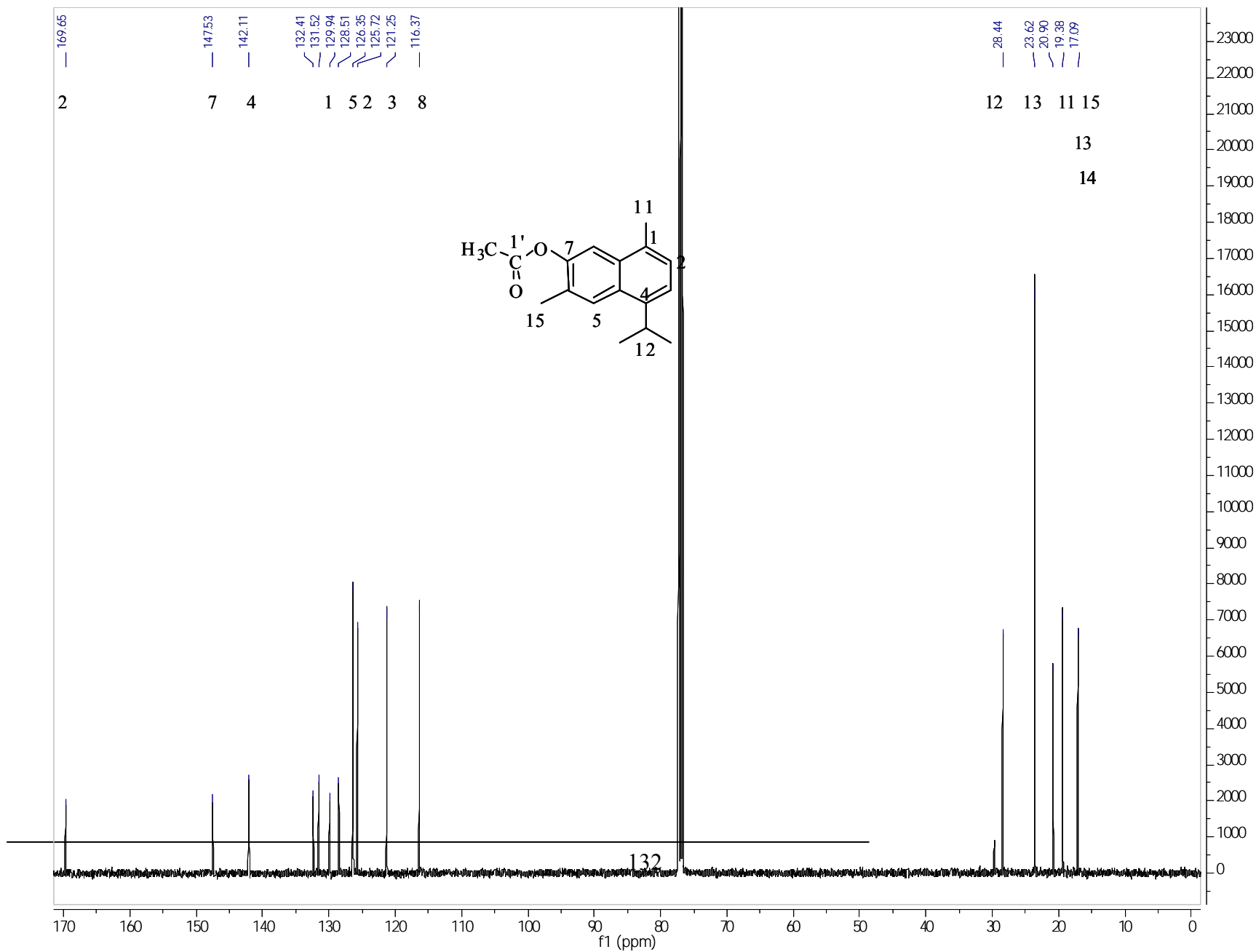
A3. RMN ^1H de 7-benzoxi-3,4-dihidrocadaleño (**131**) (400 MHz, CDCl_3)



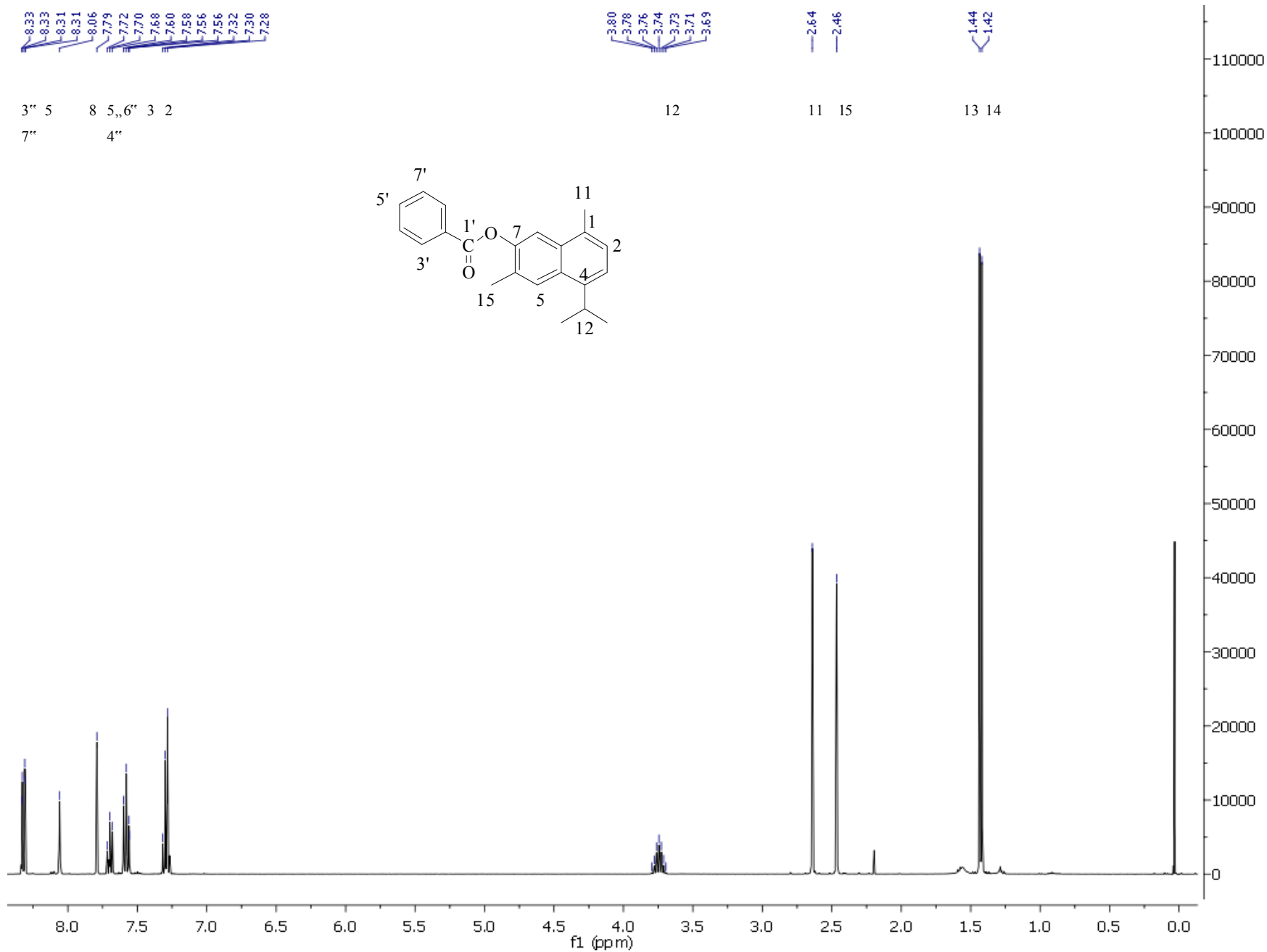
A4. RMN ^{13}C de 7-benzoxi-3,4-dihidrocadaleño (**131**) (100 MHz, CDCl_3)

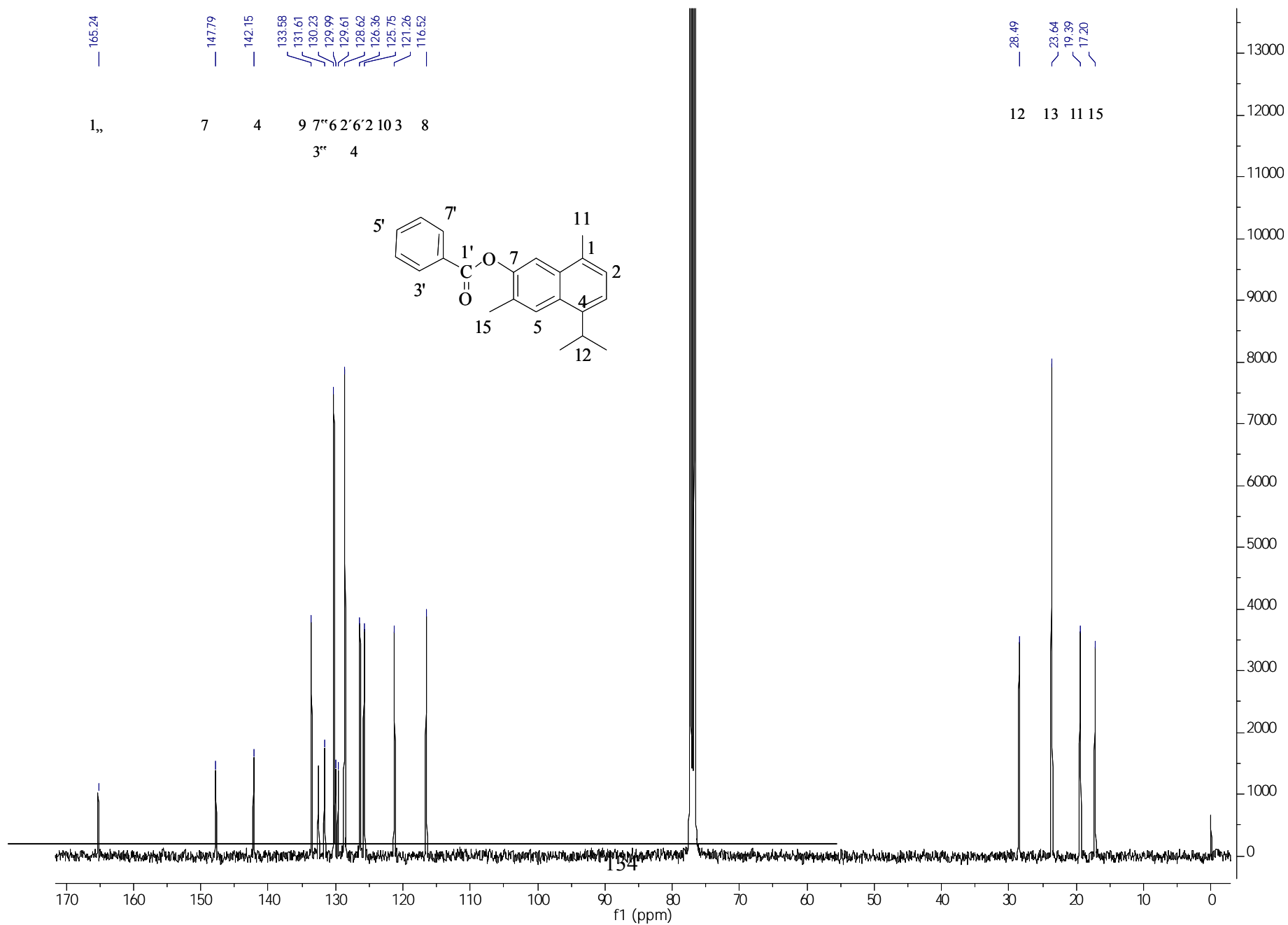
A5. RMN ^1H de 7-acetoxicadalenos (**132**) (500 MHz, CDCl_3)



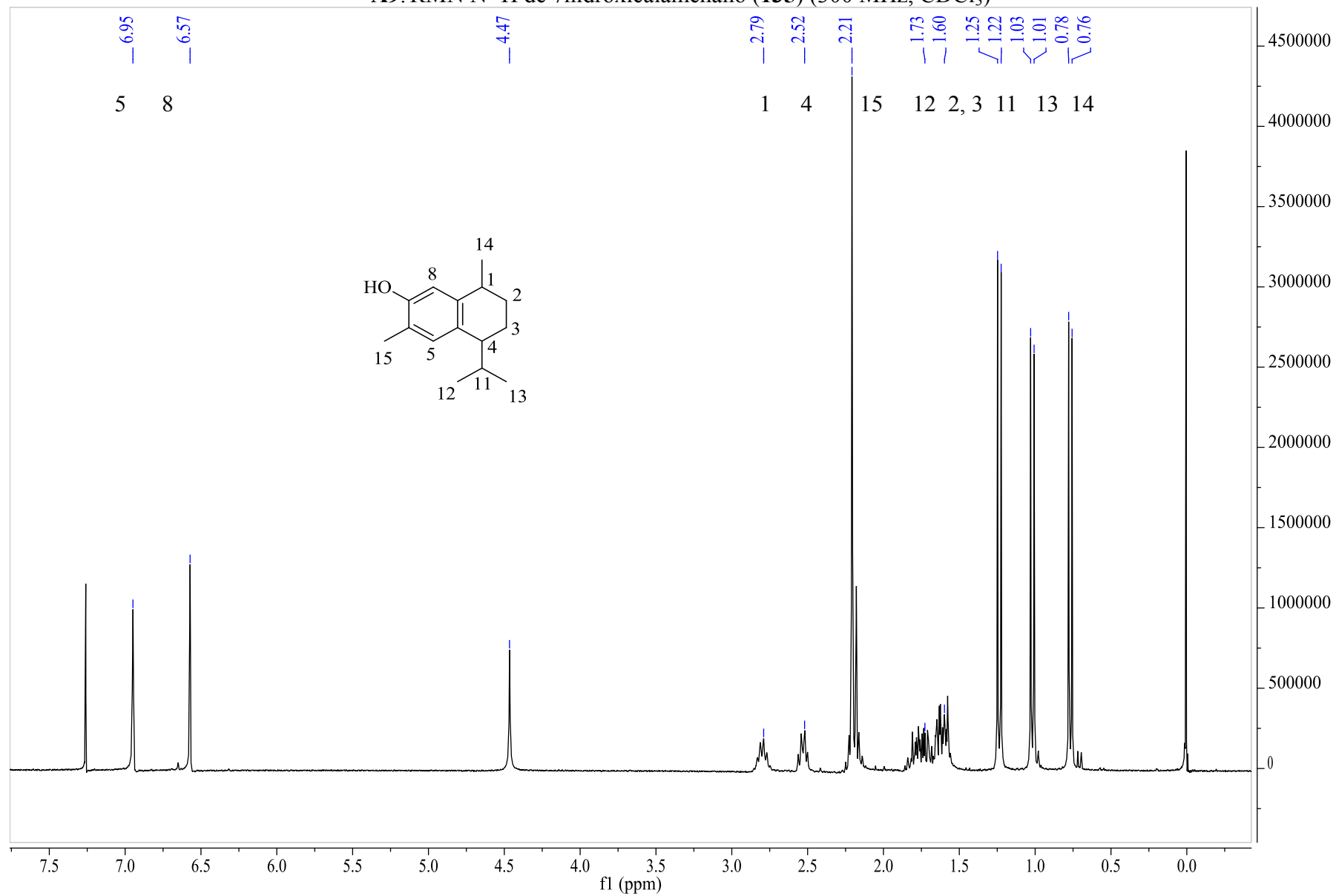
A6. RMN ^{13}C 7-acetoxicadaleneno (**132**) (125 MHz, CDCl_3)

A7. RMN ^1H de 7-benzoxicadaleño (**133**) (500 MHz, CDCl_3)



A8. RMN ^{13}C de 7-benzoxicadaleño (**133**) (125 MHz, CDCl_3)

A9. RMN N ¹H de 7hidroxicalamenano (**135**) (300 MHz, CDCl₃)



A10. RMN N ^1H de 4-isopropil-1,6-dimetilbenzo[*c*]oxepina-7,9-diona (**137**) (500 MHz, CDCl_3)