



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

“CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS  
PRESENTES EN DOS POBLACIONES DE *HETEROTHECA INULOIDES*.  
DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE PRODUCTOS NATURALES  
NOVEDOSOS”.

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:  
I.Q. GABRIELA SALAZAR CERVANTES

TUTOR  
Dr. E. GUILLERMO DELGADO LAMAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx. AGOSTO 2016



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.



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

“CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS  
SECUNDARIOS PRESENTES EN DOS POBLACIONES DE  
*HETEROTHECA INULOIDES*. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL  
DE PRODUCTOS NATURALES NOVEDOSOS”.

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**I.Q. GABRIELA SALAZAR CERVANTES**

TUTOR

**Dr. E. GUILLERMO DELGADO LAMAS.**



Ciudad de México. Agosto 2016.

## Jurado

Dr. Manuel Jiménez Estrada	Presidente
Dra. Rachel Mata Essayag	Vocal
Dra. María Isabel Aguilar Laurents	Vocal
M. en C. Emma Maldonado Jiménez	Vocal
Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava	Secretario

Este trabajo se realizó en el laboratorio 1-C, del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. E. Guillermo Delgado Lamas.

Los resultados derivados de este trabajo se presentaron en:

Celebración del 75 aniversario del Instituto de Química. Ciudad Universitaria, Cd Mx. 6 de Abril 2016. “Chemical variation of the secondary metabolites in two populations of *Heterotheca inuloides*”. Modalidad: cartel.

12<sup>a</sup>. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Xalapa, Veracruz. 20 de Mayo 2016. “Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios presentes en dos poblaciones de *Heterotheca inuloides*”. Modalidad: cartel.

**Sustentante**

**Tutor**

---

I.Q. Gabriela Salazar Cervantes

---

Dr. E. Guillermo Delgado Lamas

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (becario 335971). Al programa DGAPA-PAPIIT (proyecto IG 200514).

Al Dr. Guillermo Delgado, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por su paciencia, y por el invaluable apoyo en la realización de este trabajo.

Al personal técnico del Instituto de Química. A la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, a la Quím. María De los Ángeles Peña González, a las doctoras María Isabel Chávez Uribe y Beatriz Quiroz García, en los laboratorios de Resonancia Magnética Nuclear; a la Q.F.B. María del Rocío Patiño Maya del laboratorio de Espectroscopia y Polarimetría; a los doctores Javier Pérez Flores y María del Carmen García González del laboratorio de Espectrometría de masas, y finalmente, al M. en C. Antonio Nieto Camacho, del laboratorio de Pruebas Biológicas.

A los miembros del jurado, los doctores: Manuel Jiménez Estrada, Rachel Mata Essayag, María Isabel Aguilar Laurents, la M. en C. Emma Maldonado Jiménez y la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, por la cuidadosa atención y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, por sus valiosos comentarios y recomendaciones.

A todos mis compañeros del laboratorio 1C. Sin excepción, estén donde estén, no hay alguno al que no deba agradecerle algo: la cordial bienvenida, el ánimo en las horas difíciles, la comprometida colaboración y cooperación en el laboratorio, la solidaridad en las largas jornadas, los buenos ratos, las sonrisas amables y las risas alegres, el enriquecedor conocimiento y experiencia compartidos. Todos, con quienes tuve la fortuna de coincidir en este laboratorio, conocen bien alguna, o varias de estas situaciones. Una vez más: Gracias.

A mi esposo e hijos, por esperarme siempre con cariño y entusiasmo, por su actitud cotidiana, por no retroceder nunca. Sigamos adelante.



## Contenido

Índice de esquemas.....	v
Índice de figuras .....	v
Índice de tablas y diagramas e índice de espectros.....	vi
Lista de abreviaturas y acrónimos.....	viii
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Generalidades de <i>Heterotheca inuloides</i>.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Composición química.....</b>	<b>3</b>
<b>2.3. Actividad biológica de los constituyentes de <i>H. inuloides</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>2.3.1. Otras actividades reportadas con interés agronómico .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4. Variabilidad de los metabolitos presentes en <i>H. inuloides</i>.....</b>	<b>10</b>
<b>2.5. Metabolismo secundario.....</b>	<b>10</b>
<b>2.6. Función de terpenos en las plantas.....</b>	<b>12</b>
<b>3. Justificación.....</b>	<b>15</b>
<b>4. Objetivo general.....</b>	<b>15</b>
<b>4.1. Objetivos específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>5. Resultados y discusión.....</b>	<b>16</b>
<b>5.1. Identificación y elucidación estructural de los compuestos aislados.....</b>	<b>18</b>
<b>5.2. Resultados de actividad anti-inflamatoria de <b>11</b> y <b>13</b>.....</b>	<b>32</b>
<b>5.3. Relación cualitativa y cuantitativa de los compuestos en ambas poblaciones.....</b>	<b>34</b>
<b>5.4. Propuesta biogenética de los compuestos <b>11</b> y <b>13</b>.....</b>	<b>36</b>
<b>6. Parte experimental.....</b>	<b>38</b>
<b>6.1. Material vegetal.....</b>	<b>38</b>
<b>6.2. Material y equipo.....</b>	<b>38</b>

6.3. Aislamiento.....	38
6.4. Características físicas y datos espectroscópicos de los compuestos aislados.....	40
6.5. Peso de 3, 4, 5 y 7 en cada población.....	50
7. Resumen y conclusiones.....	51
8. Referencias.....	53
9. Espectros.....	57

### Índice de esquemas

	Página
Esquema 1. Monoterpenos en <i>H. inuloides</i> .....	4
Esquema 2. Sesquiterpenos en <i>H. Inuloides</i> .....	5
Esquema 3. Fitoesteroles y triterpenos en <i>H. inuloides</i> .....	5
Esquema 4. Algunos flavonoides encontrados en <i>H. inuloides</i> .....	6
Esquema 5. Metabolitos de <i>H. inuloides</i> evaluados biológicamente.....	8
Esquema 6. Biosíntesis de terpenos. ....	13
Esquema 7. Ruta biogenética de sesquiterpenos tipo cadinano.....	14
Esquema 8. Biosíntesis propuesta para los compuestos <b>11</b> y <b>13</b> .....	37

### Índice de figuras

Figura 1. Esqueleto base tipo cadinano.....	19
Figura 2. Correlaciones HMBC y NOESY de <b>1</b> .....	19
Figura 3. Estructura de 4-Metoxi-isocadaleno.....	20
Figura 4. Correlaciones de <b>11</b> observadas en HMBC y NOESY.....	27
Figura 5. (15- <i>nor</i> -1,9- <i>seco</i> )-6,9-dihidroxi-calamen-1-ona ( <b>11</b> ).....	28
Figura 6. Correlaciones de <b>13</b> observadas en espectroscopia 2D.....	31
Figura 7. Ácido-(1,9- <i>seco</i> )-1-dehidro-9-hidroxi-calamen-15-oico ( <b>13</b> ).....	31
Figura 8. Compuestos aislados de <i>Heterotheca inuloides</i> .....	52



## Índice de tablas y diagramas

Tabla 1. Actividad biológica de los extractos y aceite esencial de <i>H. inuloides</i> .....	7
Tabla 2. Actividad biológica de los metabolitos de <i>H. inuloides</i> .....	8
Tabla 3. Datos de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C del compuesto <b>11</b> .....	29
Tabla 4. Datos de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C del compuesto <b>13</b> .....	32
Tabla 5. Actividad anti-inflamatoria de <b>11</b> y <b>13</b> .....	33
Tabla 6. Actividad anti-inflamatoria de metabolitos de <i>Heterotheca inuloides</i> .....	33
Tabla 7. Coordenadas geográficas de las poblaciones <b>A</b> y <b>B</b> .....	34
Tabla 8. Compuestos aislados de las poblaciones <b>A</b> y <b>B</b> .....	34
Tabla 9. Fracciones reunidas. Población <b>A</b> . .....	39
Gráfico 1. Actividad anti-inflamatoria de metabolitos de <i>Heterotheca inuloides</i> . .....	33
Gráfico 2. Rendimiento de <b>3</b> , <b>4</b> , <b>5</b> y <b>7</b> con respecto al material vegetal seco.....	35

## Índice de espectros

	página
<b>Espectro 1.</b> RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) de cadaleno ( <b>1</b> ).....	58
<b>Espectro 2.</b> RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100MHz) de cadaleno ( <b>1</b> ).....	59
<b>Espectro 3.</b> HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) de cadaleno ( <b>1</b> ).....	60
<b>Espectro 4.</b> HMBC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) de cadaleno ( <b>1</b> ).....	61
<b>Espectro 5.</b> RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) de 4-metoxi-isocadaleno ( <b>2</b> ).....	62
<b>Espectro 6.</b> RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub> , 300MHz) de (4 <i>R</i> )-7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno ( <b>3</b> ).....	63
<b>Espectro 7.</b> IR (CHCl <sub>3</sub> ) de (4 <i>R</i> )-7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno ( <b>3</b> ).....	64
<b>Espectro 8.</b> RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) de 7-hidroxi-cadaleno ( <b>4</b> ).....	65
<b>Espectro 9.</b> RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) de 3β-friedelanol ( <b>5</b> ).....	66
<b>Espectro 10.</b> RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 101 MHz) de 3β-friedelanol ( <b>5</b> ).....	67
<b>Espectro 11.</b> DEPT 90 y 135 (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) de 3β-friedelanol ( <b>5</b> ).....	68
<b>Espectro 12.</b> HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) de 3β-friedelanol ( <b>5</b> ).....	69
<b>Espectro 13.</b> RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) de 1-hidroxi-1(4 <i>H</i> )-isocadalen-4-ona ( <b>6</b> ).....	70

<b>Espectro 14.</b> RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz) de 1-hidroxi-1(4H)-isocadalen-4-ona ( <b>6</b> ).....	71
<b>Espectro 15.</b> RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) de α-espinaesterol ( <b>7</b> ).....	72
<b>Espectro 16.</b> RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz) de 3,7-dihidroxi-3(4H)-isocadalen-4-ona ( <b>8</b> ).....	73
<b>Espectro 17.</b> RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de 7-hidroxi-14-cadalenal ( <b>9</b> ).....	74
<b>Espectro 18.</b> RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) de 7-hidroxi-14-cadalenal ( <b>9</b> ).....	75
<b>Espectro 19.</b> HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de 7-hidroxi-14-cadalenal ( <b>9</b> ).....	76
<b>Espectro 20.</b> HMBC (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de 7-hidroxi-14-cadalenal ( <b>9</b> ).....	77
<b>Espectro 21.</b> RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona ( <b>10</b> ).....	78
<b>Espectro 22.</b> RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) de <b>11</b> .....	79
<b>Espectro 23.</b> RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) de <b>11</b> .....	80
<b>Espectro 24.</b> HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) de <b>11</b> .....	81
<b>Espectro 25.</b> HMBC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) de <b>11</b> .....	82
<b>Espectro 26.</b> IR de (15- <i>nor</i> -1,9- <i>seco</i> )-6,9-dihidroxi-calamen-1-ona ( <b>11</b> ).....	83
<b>Espectro 27.</b> Espectro de masas de <b>11</b> .....	84
<b>Espectro 28.</b> RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz) de <b>12</b> .....	85
<b>Espectro 29.</b> RMN <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 75 MHz) de <b>12</b> .....	86
<b>Espectro 30.</b> Espectro de IR de <b>12</b> .....	87
<b>Espectro 31.</b> RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) de <b>13</b> .....	88
<b>Espectro 32.</b> RMN <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz) de <b>13</b> .....	89
<b>Espectro 33.</b> RMN HSQC (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) de <b>13</b> .....	90
<b>Espectro 34.</b> RMN HMBC (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) de <b>13</b> .....	91
<b>Espectro 35.</b> IR del ácido-(1,9- <i>seco</i> )-1-dehidro-9-hidroxi-calamen-15-oico ( <b>13</b> ).....	92
<b>Espectro 36.</b> Datos de masas de alta resolución de <b>13</b> .....	93
<b>Espectro 37.</b> Datos de masas de alta resolución de <b>11</b> .....	94

## Abreviaturas y acrónimos

AcOEt	Acetato de etilo
ASTM	Sociedad Americana para Pruebas de Materiales <i>(American Society for Testing Materials)</i>
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
COSY	Espectroscopia de correlación homonuclear ( <i>Correlated Spectroscopy</i> )
COX	Ciclooxigenasa
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
d	Señal doble
DART	Análisis Directo en Tiempo Real ( <i>Direct Analysis in Real Time</i> )
dd	Señal doble de dobles
ddd	Señal doble de doble de dobles
dc	Señal doble de cuádruples
dt	Señal doble de triples
δ	Desplazamiento químico (ppm)
DEPT	Aumento sin Distorsión por transferencia de Polarización ( <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> )
ε	Coefficiente de extinción molar
EM	Espectrometría de Masas
HMBC	Correlación Heteronuclear a Enlaces Múltiples <i>(Heteronuclear Multiple Bond Correlation)</i>
HSQC	Correlación Heteronuclear Cuántica Sencilla

*(Heteronuclear Single Quantum Correlation)*

Hz	Hertz
eV	Electrón-Volt
hept	Señal héptuple
IE	Impacto electrónico
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de Acoplamiento
$\lambda$	Longitud de onda
m	Señal múltiple
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NOESY	Espectroscopia de Efecto Nuclear OverHauser ( <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i> )
Pf	Punto de Fusión
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Señal singulete
UV	Ultravioleta
$[\alpha]_D^{25}$	Rotación específica a 25 °C, en la línea D del espectro de sodio (589.3 nm)

## 1. Introducción

La flora es uno de los recursos naturales con mayor diversidad de usos, y resulta destacada su utilidad con fines terapéuticos. Algunos de los primeros registros del uso de plantas con fines medicinales se hicieron en Mesopotamia, en el año 2600 antes de Cristo [1-3], desde entonces, el interés derivado de los beneficios obtenidos condujo al descubrimiento de las plantas como una fuente de sustancias con diversas propiedades. Actualmente, aproximadamente el 60% de los fármacos utilizados contra el cáncer y el 75% de los utilizados contra enfermedades infecciosas son Productos Naturales o derivados de estos [4].

Se estima que han aislado más de 200 000 sustancias [2,5], sin embargo, se considera que solo se han analizado alrededor del 6% de las más de 300 000 especies vegetales del planeta [1].

El estudio de los Productos Naturales requiere de varias áreas de investigación que incluyen la identificación y elucidación estructural, biosíntesis, actividad biológica, el desarrollo sintético de estos o de compuestos similares con aplicaciones no solo en la medicina, sino también en la industria, la agricultura y en la alimentación. Estas tareas deben ser abordadas de manera interdisciplinaria y la química resulta una ciencia central en estas investigaciones.

México se considera un país megadiverso, ya que alberga aproximadamente el 10% de la flora del planeta. De las 422 familias de plantas con flores que se conocen en el mundo se han registrado 246 en México y se calcula que el 54.2% de las especies vasculares son endémicas [6].

La familia de las asteráceas (compuestas) ocupa un lugar destacado en la medicina tradicional mexicana [7]. Una de sus especies es *Heterotheca inuloides* (conocida como árnica mexicana), la cual crece en varios estados de la república y es apreciada en la medicina tradicional, donde es utilizada desde hace muchos años para tratar diversos padecimientos, y cuyo uso entre la población ha aumentado en los años recientes [8-10].

Los primeros estudios dirigidos a conocer la composición química de *H. inuloides* se realizaron en México en 1886 [11], pero es hasta 1976 que se informan las estructuras de compuestos sesquiterpénicos como constituyentes químicos de las flores de árnica mexicana [12]. Análisis posteriores [13-16] reportaron otros compuestos y permitieron identificar a los sesquiterpenos de tipo cadinano como característicos del género *Heterotheca*.

El estudio de los extractos y compuestos aislados de *H. inuloides* ha demostrado que estos poseen diversas actividades biológicas, la mayoría de estas actividades correlacionan con el uso popular que se da a la planta [16-18], lo que ha permitido ampliar el conocimiento de esta especie vegetal.

En 2009 *H. inuloides* fue incluida en la sección *Extrafarmacopea* de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos al considerarse una especie importante, pero con escasa información. En la segunda edición de esta farmacopea, publicada en 2013, la flor de árnica mexicana dejó atrás la sección *Extrafarmacopea*. Su monografía se incluyó de manera oficial, y contiene los métodos de análisis para identificación y especificaciones de contenido, además de las descripciones microscópicas y macroscópicas [19].

Considerando la importancia que tiene la planta en la Medicina Tradicional Mexicana, la variedad estructural de sus constituyentes químicos (recientemente se ha informado el hallazgo de nuevos compuestos) [20], y las actividades biológicas reportadas para los extractos y ciertos constituyentes, resulta pertinente continuar el estudio de los metabolitos secundarios presentes en árnica mexicana. En este trabajo se realizó el estudio químico de dos poblaciones de *H. inuloides* de la misma área geográfica, que crecieron bajo las mismas condiciones climáticas.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Generalidades de *Heterotheca inuloides*

Cuatro especies del género *Heterotheca* (Asteraceae) crecen en México: *H. subaxillaris*, *H. grandiflora*, *H. leptoglosa* y *H. inuloides*, las dos últimas son especies endémicas del país [21]. *H. inuloides* crece principalmente en el centro de México y se extiende hacia los extremos abarcando los estados de Colima, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Tlaxcala, Veracruz y la Ciudad de México [22]. *H. inuloides* es una planta herbácea que puede alcanzar hasta 1 m de altura, con tallos y hojas pubescentes, inflorescencias amarillas en capítulos que agrupan cerca de 150 flores, las hojas son más largas que anchas y se ensanchan en la punta, de hábitat ruderal y arvense, también asociado a los bosques de *Quercus*, *Pinus* y *Juniperus* [23,24].

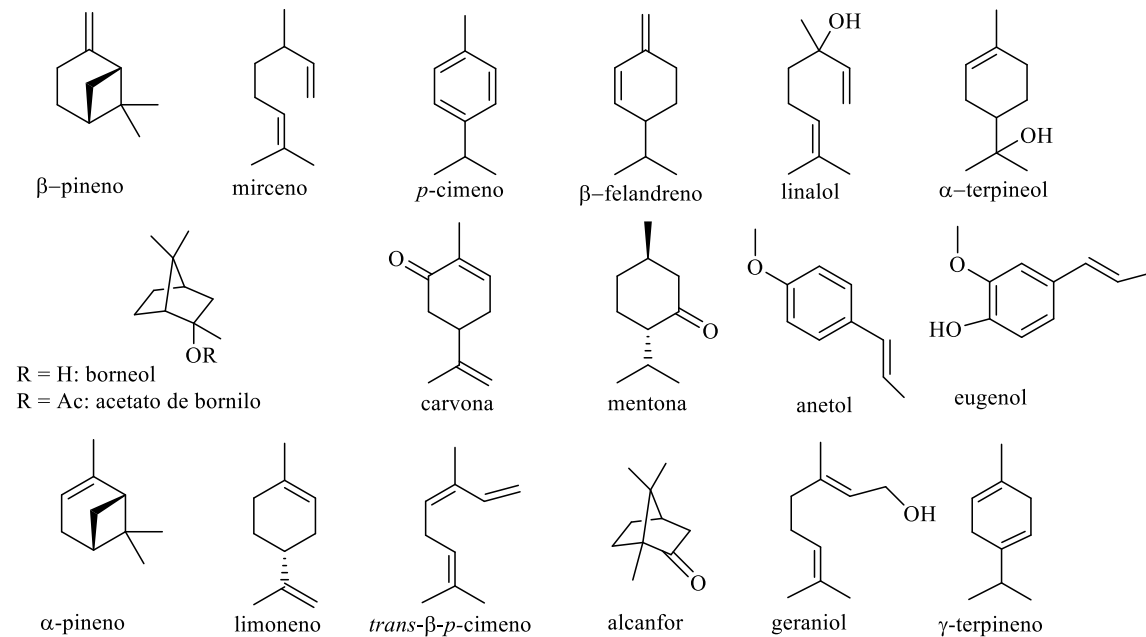
La medicina tradicional mexicana emplea principalmente las flores de *H. inuloides*, aunque también se señala el uso de toda la parte aérea de la planta. Generalmente es utilizada para tratar contusiones [8], como anti-inflamatorio, analgésico, cicatrizante, desinfectante; también se ocupa en el tratamiento de cáncer [25], y otros padecimientos. La infusión de la planta se consume como té o es utilizada de manera tópica como emplasto, en fomentos empapados de la cocción o maceración de la planta, como pomada [26,27] o aplicando directamente el material seco y pulverizado.

### 2.2. Composición química

Se han realizado diversos estudios químicos de *H. inuloides*, la mayoría enfocados a las flores, aunque también se han analizado otras partes de la planta. El análisis químico de las flores indica que contienen principalmente compuestos sesquiterpénicos entre los que se encuentran: cadaleno, (4*R*)-7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, 7-hidroxi-cadaleno, 4-metoxi-isocadaleno, cariolan-1,9- $\beta$ -diol, epóxido de cariofileno,  $\beta$ -cariofileno, 1-hidroxi-1(4*H*)-isocadalen-4-ona, ácido-1-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrocadalen-15-oico [13-16]. También se han aislado monoterpenos volátiles como:  $\beta$ -pineno, mirceno, *p*-cimeno,  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$ -*p*-dimetilestireno,  $\beta$ -bourbonano,  $\alpha$ -bergamoteno,  $\gamma$ -murolano,  $\alpha$ -curcumeno, entre otros. En cuanto a compuestos triterpénicos y fitoesteroles se han encontrado  $\alpha$ -espinasterol y mezclas de  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina, junto con lanosterol, campesterol,  $\beta$ -estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol [28]. Además, se han aislado

flavonoides, el flavonol quercetina se menciona como compuesto mayoritario. Sin embargo, el número de flavonoides y sus derivados glucosilados aislados o identificados en las flores es extenso [14, 29-30]. Adicionalmente, se ha reportado la presencia de otros compuestos como ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, fenol, ácido clorogénico, umbeliferona, aldehído bencílico, alcohol bencílico, ácido palmítico y algunas cumarinas. Actualmente, pueden contabilizarse más de 120 compuestos identificados en *H. inuloides*. A continuación se muestran algunas estructuras de los compuestos reportados como constituyentes mayoritarios o que han mostrado una actividad biológica destacada.

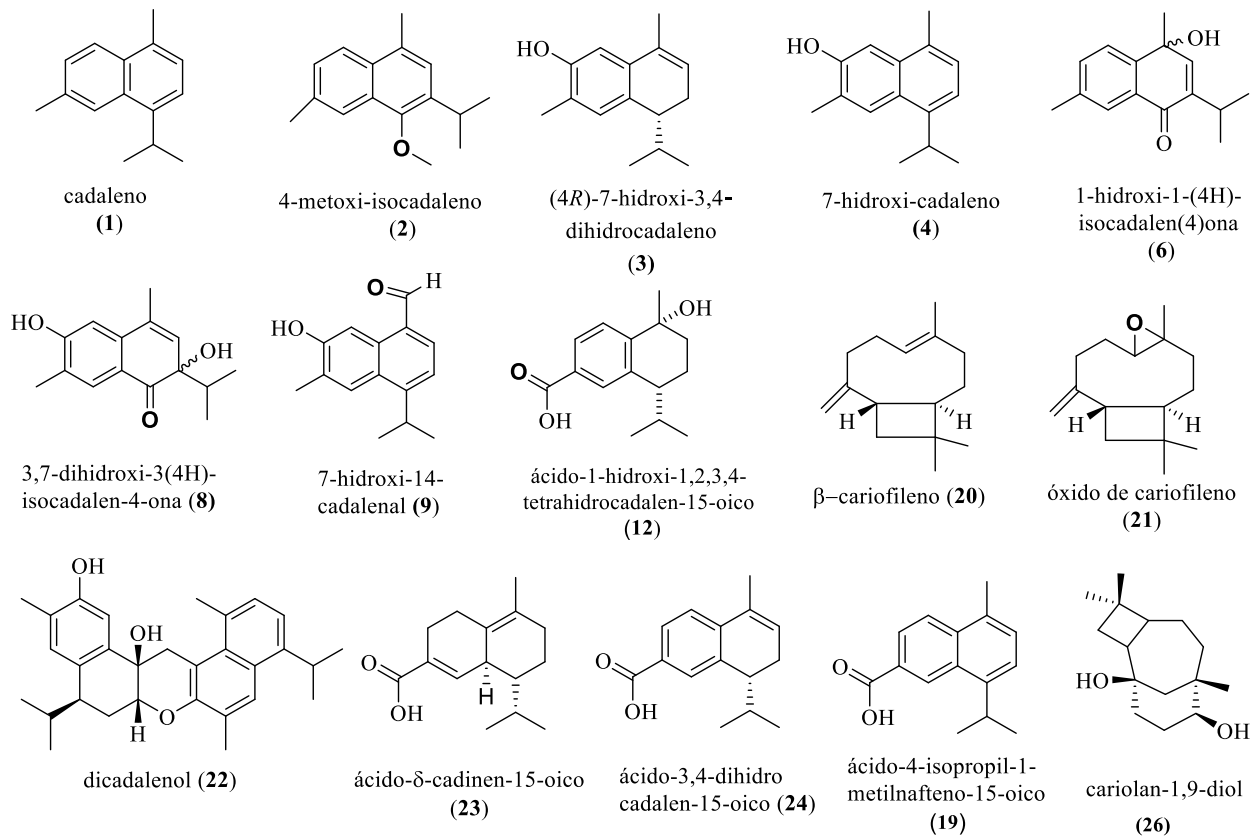
### Monoterpenos



Esquema 1. Monoterpenos en *Heterotheca inuloides*

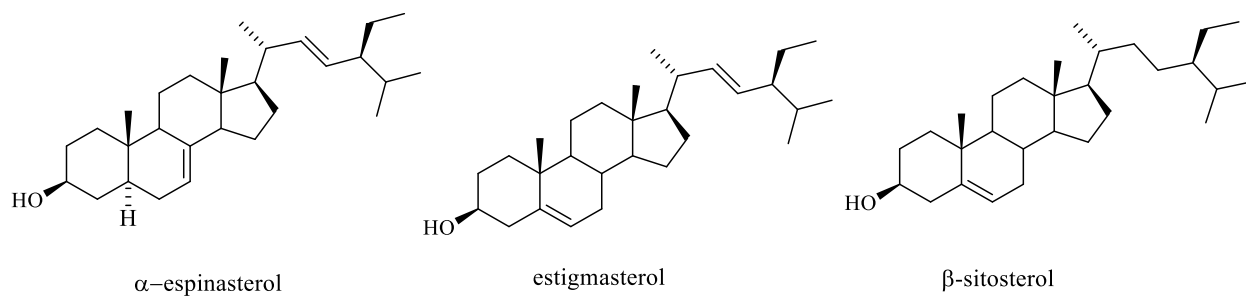


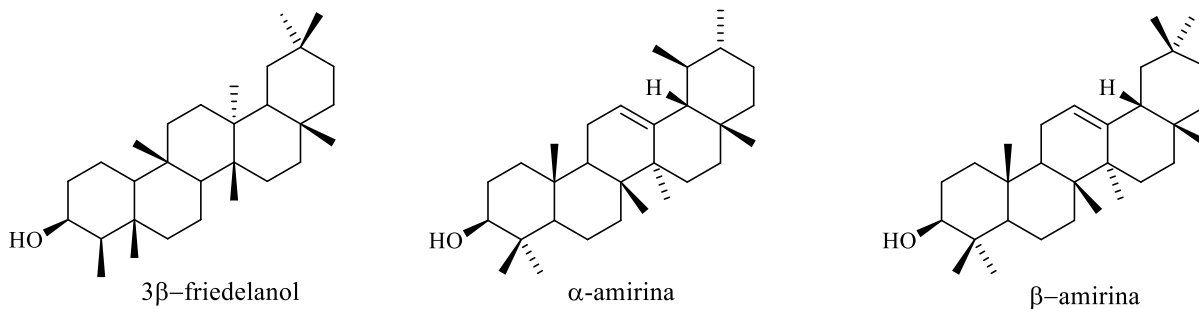
## Sesquiterpenos



Esquema 2. Sesquiterpenos en *H. Inuloides*

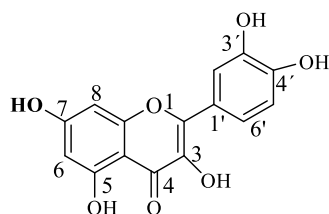
## Fitoesteros y triterpenos



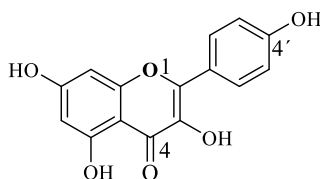


Esquema 3. Fitoesteroles y triterpenos en *H. inuloides* (continuación)

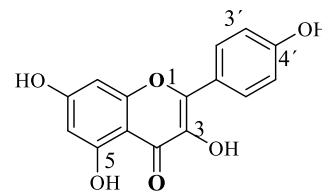
## Flavonoides



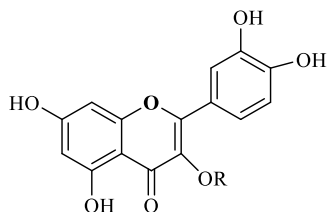
quercetina



kaempferol

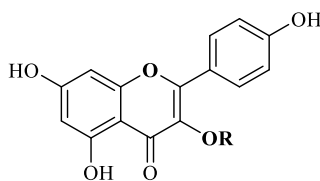


luteolina



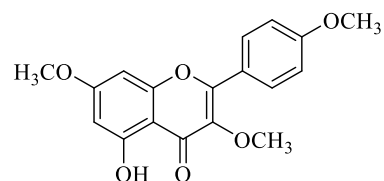
glucósidos de quercetina

R = 3β-galactósido,  
3β-rutinósido, 3β-glucorónido  
3α-L-arabinosa

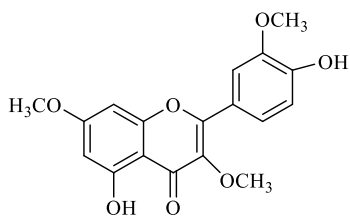


glucósidos de kaempferol

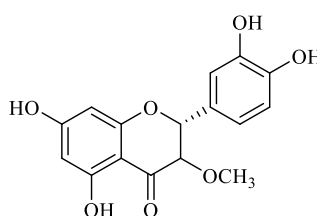
R = 3β-galactósido,  
3β-rutinósido, 3β-robinobiósido



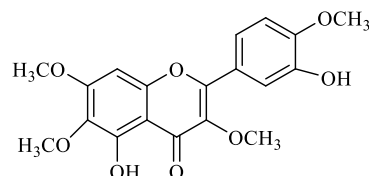
éter 3,7, 4'-trimetilico  
de kaempferol



éter 3,7,3'-trimetilico de quercetina



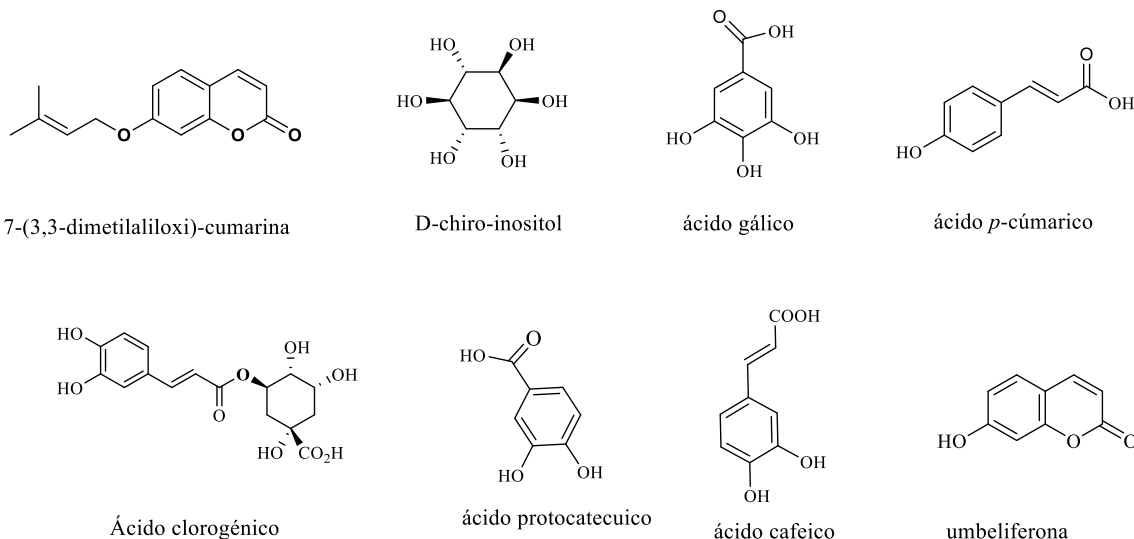
éter 3-metilico de eriodictiol



éter 3,6,7,4'-tetrametilico de quercetagina

Esquema 4. Algunos flavonoides encontrados en *H. inuloides*

## Otros compuestos encontrados en *H. inuloides*



### 2.3. Actividad biológica de los constituyentes de *H. inuloides*.

Se han realizado diversos estudios con los extractos de la planta, los cuales se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Actividad biológica de los extractos y aceite esencial de *H. inuloides*

año	referencia	parte de la planta	extracto	actividad
1998	[31]	F	butanol	analgésica
2000	[32]	F	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	anti-inflamatoria (inhibición de COX1 y COX2)
2009	[33]	PA	acuoso*	anti- <i>Helicobacter-pylori</i>
	[33]	PA	metanol	anti- <i>Helicobacter-pylori</i>
2010	[34]	PA	acetona	antioxidante
	[34]	PA	metanol	antioxidante
2011	[35]	PA	acetona	hepatoprotector
	[35]	PA	metanol	hepatoprotector
2013	[36]	PA	aceite esencial	Inhibición del desensamble del citoesqueleto articular

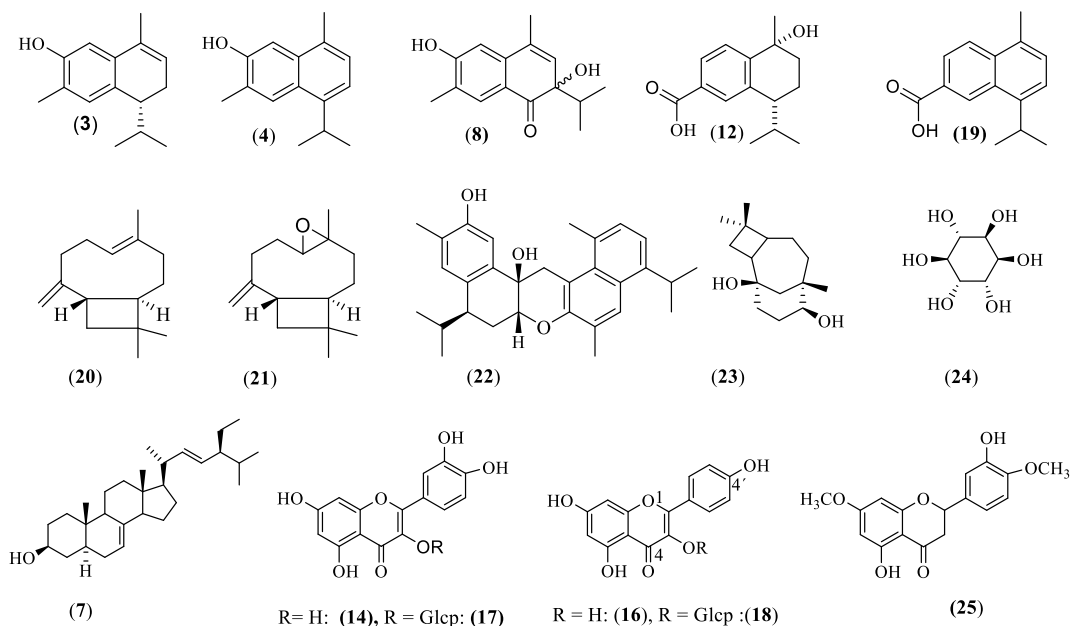
F = flores, PA = parte aérea. \* En este caso se reportó actividad moderada (ref. 33).

La actividad de los metabolitos aislados a partir de *H. inuloides* y de ciertos derivados semisintéticos ha sido evaluada empleando diversos modelos biológicos. La Tabla 2 resume la información de los Productos Naturales generada en este aspecto.

Tabla 2. Actividad biológica de los metabolitos de *H. inuloides*.

año	referencia	parte de la planta	actividad evaluada	bioensayo dirigido	extracto activo	compuestos detectados con actividad relevante
1993	[15]	F	antimicrobiana	si	hexano	<b>21, 3 y 4</b>
1994	[37]	F	inhibidor de tirosinasa	si	MeOH	<b>14</b>
1996	[17]	F	citotóxica			<b>4, 3, 21 y 20</b>
1996	[17]	F	antioxidante			<b>3 y 4</b>
1997	[38]	F	antioxidante			<b>3, 4, 14, 16, 17 y 18</b>
2000	[39]	F	inhibidor de tirosinasa			<b>14 y 16</b>
2000	[32]	F	anti-inflamatoria	si	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	<b>3</b>
2001	[16]	F	anti-inflamatoria	si	acetona	<b>22, 14, 23, 19, 8 y 3</b>
2010	[34]	F	antioxidante			<b>24, 7 y 14</b>
2010	[27]	F	analgésica	si	hexano	<b>5</b>
2014	[40]	F	antineuropático			<b>3</b>
2015	[41]	F	anti- <i>Giardia intestinalis</i>			<b>3 y 12</b>
2015	[42]	F	antioxidante			<b>3, 14 y 25</b>
2015	[42]	F	extensión de vida <i>C.elegans</i>			<b>14</b>
2015	[43]	F	citotoxicidad y toxicidad aguda			<b>3**</b>
2016	[44]	F	protectora e inhibidora de óxido nítrico sintetasa			<b>14</b>

F = flores, \*\* Clasificado como categoría 4 de acuerdo al sistema para el etiquetado y clasificación de sustancias químicas<sup>43</sup>.



### Esquema 5. Algunos de los Metabolitos de *H. inuloides* evaluados biológicamente.

Aunque la mayor parte de los estudios químicos se han realizado a las flores, es conveniente recordar que el uso tradicional incluye toda la parte aérea de la planta. Son

destacables los productos naturales **3**, **4** y **14** por su actividad biológica. Sin embargo, otros constituyentes también han resultado activos en ciertos ensayos biológicos. En un estudio publicado se evaluó el efecto anti-inflamatorio de los extractos acetónico y metanólico; se observó que el extracto acetónico mostró la mayor actividad (61.7% de inhibición), los compuestos aislados de este extracto en su mayoría fueron sesquiterpenos de tipo cadinano, y aunque todos ellos mostraron efecto anti-inflamatorio, solo uno de estos compuestos (**22**) mostró un porcentaje de inhibición mayor al 50%. A partir de estos resultados puede sugerirse que la bioactividad del extracto acetónico es atribuida al efecto aditivo de los productos presentes en dicho extracto [16].

Recientemente se reportó un estudio químico realizado en partes aéreas de *H. inuloides* sin flor, en el cual se registró la ausencia de los cadinanos **3** y **4**, la presencia de **2**, **6**, **8** y **12**, y el hallazgo de cuatro nuevos sesquiterpenos tipo cadinano los cuales mostraron actividad anti-inflamatoria moderada [20].

### 2.3.1. Otras actividades reportadas con interés agronómico.

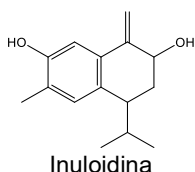
Además de las pruebas derivadas del uso terapéutico de la planta, se han realizado pruebas que muestran el posible uso de la planta o de algunos de sus metabolitos en el área agronómica.

#### Actividad contra algunos fitófagos

Se ha evaluado el efecto del polvo de la planta seca contra plagas de granos almacenados, observándose actividad relevante de esta planta, la cual causó una mortalidad del 87% en el gorgojo de maíz [45].

#### Efecto inhibidor de crecimiento de plantas,

A través de un fraccionamiento biodirigido se identificó a uno de los metabolitos de la planta, el sesquiterpeno llamado inuloidina, como un inhibidor de crecimiento de plantas [18].



#### 2.4. Variabilidad de los metabolitos presentes en *H. inuloides*

En contraste con el número de publicaciones relacionadas con el aislamiento, identificación y actividad biológica de los metabolitos de *H. inuloides*, puede afirmarse que la información disponible sobre la variabilidad metabólica en esta planta es escasa [46].

En el único estudio reportado acerca de la variabilidad de metabolitos en *H. inuloides* se analizó la parte aérea de poblaciones cultivadas para este propósito en el mismo espacio. El estudio concluye que ni la fertilización ni el número de cortes (podas) realizados tuvieron un efecto significativo sobre la producción de sesquiterpenos; sin embargo, se observó un efecto de la edad de la planta sobre el contenido de sesquiterpenos, encontrándose que antes de 15 meses de edad no existen diferencias significativas en el contenido de los compuestos analizados, solamente hasta los 15 meses se observó un aumento significativo de los sesquiterpenos.

En este aspecto, las investigaciones realizadas a otras especies muestran que los perfiles metabólicos observados entre poblaciones de una misma especie pueden diferir debido a diferentes factores involucrados en ese fenómeno. Se ha indicado que factores como el tipo de suelo, humedad, salinidad [47] influyen en el perfil observado, y en general, se ha mencionado que la variabilidad ecológica conduce a la variabilidad química [48].

#### 2.5. Metabolismo secundario

Durante la segunda mitad del siglo XIX se propone la diferenciación entre el metabolismo secundario y metabolismo primario, la cual hoy sabemos que es arbitraria. En 1873 el botánico alemán Julius Sachs define como “subproductos” del metabolismo a los compuestos que han sido formados durante el metabolismo, pero no se utilizaron para la formación de nuevas células y reconoce que no se sabe cuál es su importancia. En 1888 el naturalista alemán Ernst Stahl propone la idea de que los metabolitos secundarios cumplen funciones ecológicas y de defensa en las plantas, sin embargo, sus observaciones son poco consideradas. Es hasta la segunda mitad del siglo XX que se empieza a investigar el aspecto funcional de los metabolitos secundarios. Actualmente se reconoce a estas sustancias como estructuras químicas únicas con funciones ecológicas indispensables [49,50].

Aunque aún se utiliza el término metabolismo secundario (para diferenciarlo del metabolismo primario que cubre todos los procesos de crecimiento y desarrollo), actualmente puede ser llamado metabolismo especializado al considerar que cada organismo cumple un papel ecológico único dentro del medio y desde esta posición debe sintetizar un arreglo de sustancias que le ayude a interactuar con los factores bióticos y abióticos del ecosistema en que se encuentra, y que esta característica la provee el metabolismo secundario [50].

A través de los 400 millones de años que las especies vegetales tienen sobre la tierra [51] los metabolitos secundarios han asegurado su supervivencia, proporcionando una rica reserva de compuestos, cumpliendo funciones de defensa química [52], funciones de atracción para otros organismos que son útiles para la planta, incluso cubriendo funciones del metabolismo primario, como el ácido abscísico que cumple la función de una fitohormona, o los carotenoides que funcionan como fotoprotectores. Algunos otros desempeñan funciones múltiples en ambos niveles del metabolismo, donde puede mencionarse el papel de los lignanos como reforzadores de la pared celular y defensores químicos [49,51,53].

Se considera que un grupo de metabolitos predomina en un determinado taxón, unos pocos compuestos mayoritarios son acompañados de varios derivados y compuestos minoritarios. Para una determinada planta el patrón de metabolitos secundarios observado es complejo, ya que presenta diferencias de acuerdo al órgano, tejido o estado de desarrollo. Se ha propuesto que los órganos importantes para la reproducción presentan los metabolitos con mayor bioactividad [54].

Existe una amplia variedad estructural de metabolitos secundarios, en la que se encuentran: alcaloides, monoterpenos (incluyendo iridoides), diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, tetraterpenos, cumarinas, flavonoides, lignanos, poliacetilenos, policétidos, entre otros.

La clasificación de los metabolitos secundarios se ha homogeneizado en los últimos años y estos son clasificados según su ruta biosintética. Debido a que los principales metabolitos secundarios en *H. inuloides* son sesquiterpenos de tipo cadinano a continuación se describe su función y biogénesis.

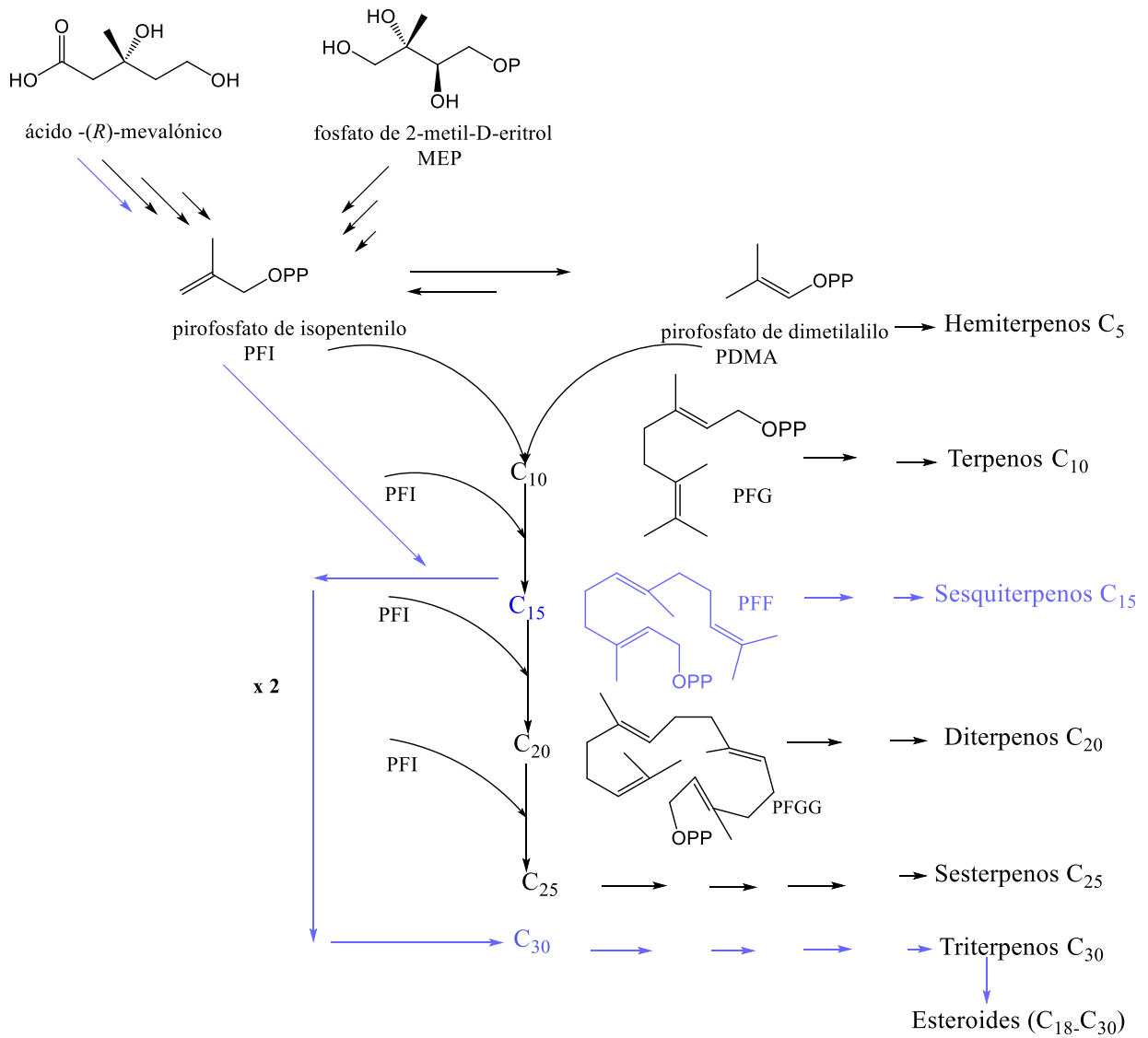
## 2.6. Función de terpenos en las plantas

Aunque se han realizado numerosas investigaciones sobre aplicaciones diversas a los Productos Naturales, aún no se conoce con certeza la función específica de cada Producto Natural o grupo de Productos Naturales en la naturaleza. Cada tipo de compuesto puede tener una función específica con un modo de acción molecular particular, de lo cual aún se tiene poco conocimiento [55]. Cambios estructurales menores pueden resultar en una actividad biológica completamente diferente. La función de pocas sustancias, como los fitoesteroides (componentes de la membrana celular), han sido reconocidas en varias especies vegetales.

Los terpenos constituyen el grupo más numeroso de Productos Naturales, se ha estimado que se conocen más de 50 000 estructuras de este tipo [56], pero pocos se han estudiado desde una perspectiva funcional. Los terpenos pueden ser tóxicos, repelentes o atrayentes de otros organismos. Por ejemplo, se ha observado que los sesquiterpenos de tipo drimano tienen actividad antibacteriana y antifúngica, y resultan tóxicos hacia insectos, nematodos, moluscos y peces, inhibiendo el consumo de las plantas que los contienen [55].



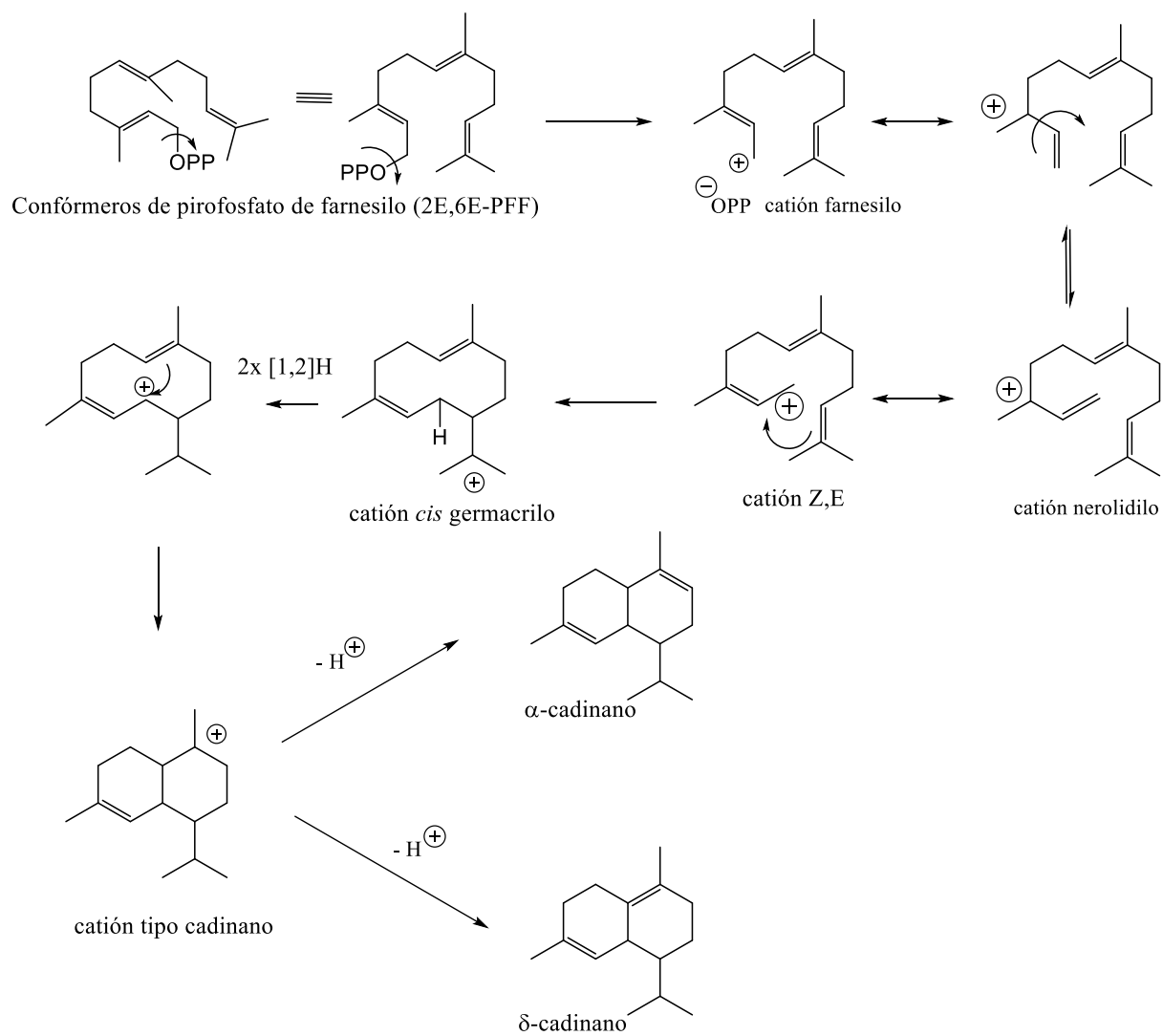
## Biosíntesis de terpenos



**Esquema 6. Biosíntesis de terpenos.**

La biosíntesis de sesquiterpenos se realiza en el citosol, siguiendo la ruta del ácido mevalónico o la del fosfato de 2-metil-D-eritrol

### Ruta biogénica de sesquiterpenos tipo cadinano



Esquema 7. Ruta biogénica de sesquiterpenos tipo cadinano

### **3. Justificación**

Considerando el aprecio con que cuenta *H. inuloides* en la medicina tradicional de diversos grupos étnicos en la parte central del país, la variedad estructural de los Productos Naturales que biosintetiza, las bioactividades que estos poseen, así como el hallazgo reciente de nuevos compuestos, se estimó pertinente profundizar en el contenido químico de esta especie, enfatizando la búsqueda de nuevas sustancias y obtención de información adicional a la que se tiene actualmente.

### **4. Objetivo general**

Aportar conocimientos científicos acerca de los constituyentes químicos presentes en *Heterotheca inuloides*, mediante el análisis químico de dos poblaciones de la especie.

#### **4.1. Objetivos específicos.**

- Aislar los metabolitos secundarios presentes en la parte aérea de dos poblaciones de árnica mexicana.
- Elucidar las estructuras moleculares de los compuestos aislados.
- Realizar la evaluación preliminar del efecto anti-inflamatorio de las posibles nuevas sustancias encontradas.
- Comprobar la presencia y cuantificar la abundancia relativa de compuestos que se han considerado característicos en la planta.
- Comparar los resultados obtenidos en ambas poblaciones.

## 5. Resultados y discusión

El material seco de las dos muestras de *Heterotheca inuloides* fue macerado en acetona. El residuo obtenido en ambos casos, una vez evaporado el disolvente, fue sometido a un fraccionamiento cromatográfico primario (la descripción detallada de estos procesos se incluye en la sección experimental). El perfil cromatográfico de las fracciones primarias, observado en CCF, permitió su agrupamiento en nuevas fracciones, de las cuales fue posible aislar y caracterizar los siguientes quince compuestos: cadaleno (**1**), 4-metoxi-isocadaleno (**2**), (4*R*)-7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (**3**), 7-hidroxi-cadaleno (**4**), 3 $\beta$ -friedelanol (**5**), 1-hidroxi-1(4*H*)-isocadalen-4-ona (**6**),  $\alpha$ -espinasterol (**7**), 3,7-dihidroxi-3(4*H*)-isocadalen-4-ona (**8**), 7-hidroxi-14-cadalenal (**9**), 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona (**10**), (15-*nor*-1,9-*seco*)-6,9-dihidroxi-calamen-1-ona (**11**), ácido-(1*R*,4*R*)-1-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrocadalen-15-oico (**12**), ácido-(1,9-*seco*)-1-dehidro-9-hidroxi-calamen-15-oico (**13**), quercetina (**14**) y  $\beta$ -D-glucopiranosido de espinasterilo (**15**).

Con la finalidad de comparar la abundancia de los metabolitos mayoritarios **3**, **4**, **5** y **7** presentes en ambas poblaciones, se procuró extraer la totalidad de estos compuestos para su cuantificación.

Todos los compuestos se aislaron mediante la aplicación sucesiva de diversos procedimientos cromatográficos, y en ciertos casos se realizaron cristalizaciones sucesivas. Los compuestos aislados y purificados se caracterizaron e identificaron por medios espectroscópicos y espectrométricos. Los compuestos ya conocidos se compararon directamente con muestras auténticas proporcionadas por el propio grupo de investigación del laboratorio donde se llevó a cabo este trabajo.

En el siguiente diagrama se resume el proceso general y se señalan los compuestos obtenidos a partir de la población **A**, colectada en Santiago Mamalhuazuca, Municipio de Ozumba, Estado de México.

Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos de *Heterotheca inuloides*, población A

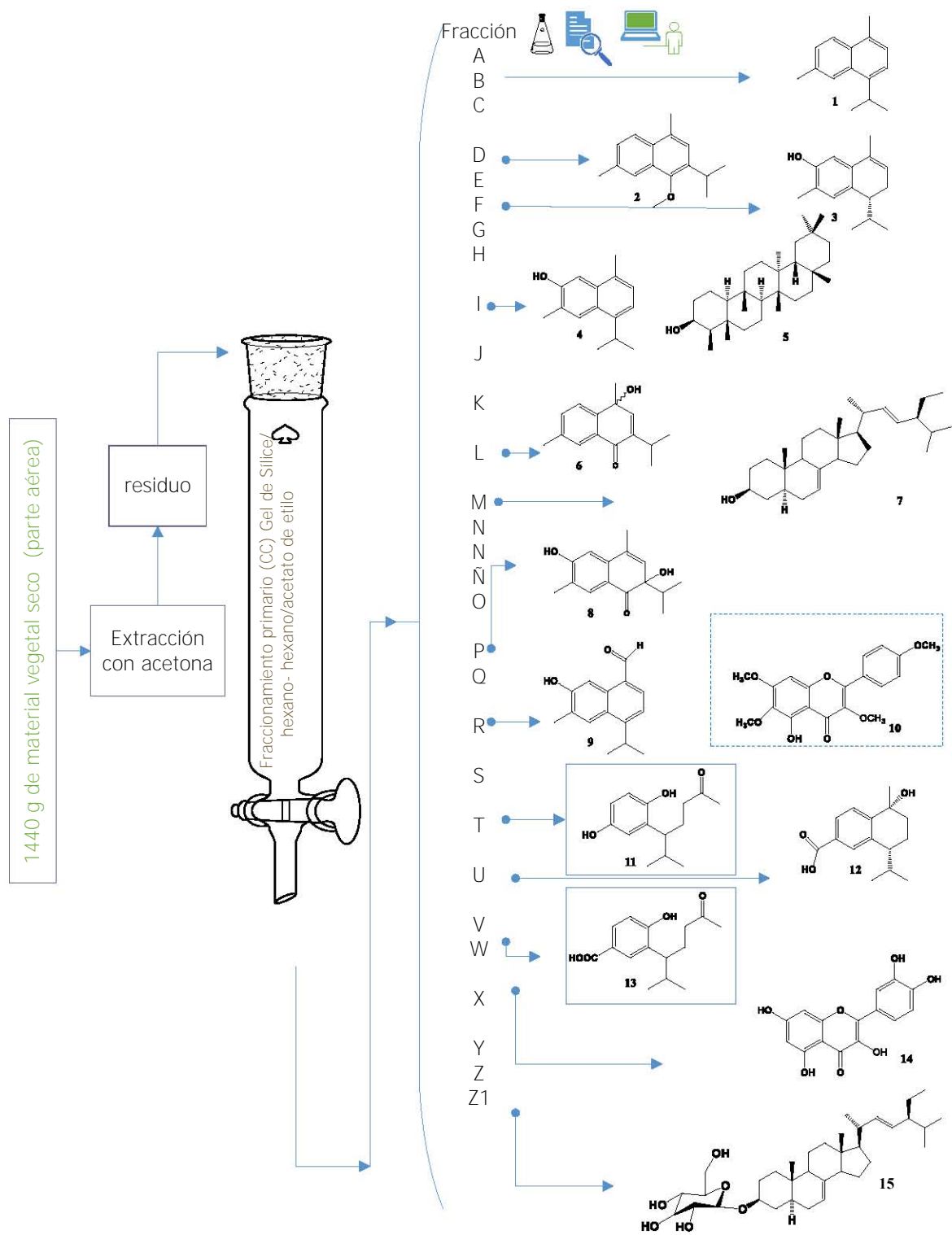


Diagrama del procedimiento general del estudio químico de *H. inuloides*

El estudio realizado a la población **B**, colectada en San José Tlacotitlán (Municipio de Ozumba, Edo. de México), permitió aislar los compuestos anteriores con excepción de los compuestos **9**, **10** y **13** que no fueron localizados en su extracto.

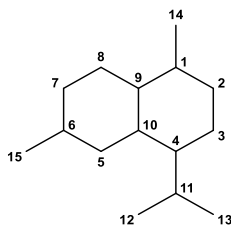
A continuación se describe la elucidación estructural de los compuestos obtenidos, los cuales se han numerado de acuerdo al gradiente creciente de polaridad en que fueron aislados, en relación con el fraccionamiento primario.

### 5.1. Identificación y elucidación estructural de los compuestos aislados

#### Cadaleño (**1**)

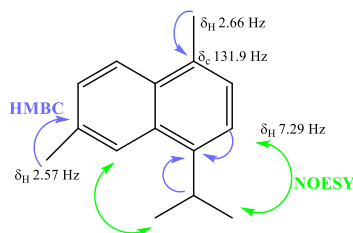
Se obtuvo como un aceite ligeramente amarillo, *R<sub>f</sub>* 0.625 (*n*-hexano). El espectro de RMN <sup>1</sup>H (espectro 1, CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de esta sustancia mostró señales para cinco hidrógenos bencenoides a campo bajo ( $\delta_{\text{H}}$  8.00 – 7.00). Se observan dos señales que integran para seis hidrógenos, asignables a dos metilos unidos directamente a un anillo aromático ( $\delta_{\text{H}}$  2.66 y 2.57), y un doblete a campo alto, que integra para seis hidrógenos, centrado en  $\delta_{\text{H}}$  1.39 ( $J = 6.8$ ), el cual, en conjunción con la señal heptuplete centrada en  $\delta_{\text{H}}$  3.72 ( $J = 6.8$ ), sugiere la presencia de un grupo isopropilo, también unido al anillo aromático. En total, la integración bajo la curva de este espectro permite contabilizar 18 hidrógenos en la molécula. Considerando al esqueleto de los cadalenos (presentes en *H. inuloides*), puede proponerse que se trata de este tipo de estructura, la cual se presenta como naftaleno trisustituido, ya que no se observan señales de hidrógenos metilénicos. Esta propuesta es consistente con las señales que se observan en el espectro de RMN <sup>13</sup>C (espectro 2, CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz), en el cual se muestran 14 señales, una de ellas con doble intensidad ( $\delta_{\text{C}}$  23.8) que presumiblemente es asignable a los 2 carbonos del isopropilo, por lo que se establece la presencia de 15 átomos de carbono, correspondientes a un sesquiterpeno, y que aunado a los 18 hidrógenos deducidos por RMN <sup>1</sup>H, se establece la fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>. Así, los 7 grados de insaturación confirman la presencia del naftaleno, y los sustituyentes corresponden a dos metilos y a un isopropilo.

Por lo anterior, y teniendo en cuenta al esqueleto de cadinano (ver la numeración en la figura 1), se establece la ubicación de los metilos en C-1 y C-6, y del isopropilo en C-4.



**Figura 1.** Esqueleto base tipo cadinano

El análisis del experimento HSQC (espectro 3) permite confirmar que la señal intensa de carbono ( $\delta_C$  23.8) correlaciona con las de los dos metilos del isopropilo centradas en  $\delta_H$  1.39. El experimento HMBC (espectro 4) muestra la correlación de la señal de  $\delta_H$  7.29 (1H, d,  $J = 7.4$ , H-3) con el carbono cuaternario en  $\delta_C$  142.2 (C-4), el cual correlaciona con H-11, confirmando las asignaciones mostradas en la figura 2. La señal en  $\delta_H$  7.23 (1H, d,  $J = 7.4$  Hz) se asigna a H-2, ya que correlaciona con el carbono cuaternario en  $\delta_C$  131.9 (correspondiente a C-1). Este último carbono correlaciona con los hidrógenos de metilo en  $\delta_H$  2.66, por lo que esta señal corresponde al metilo en C-1. El experimento NOESY muestra correlaciones de H-12, H-13 con H-3 y con H-5 ( $\delta_H$  7.90, sa, 1H). Las asignaciones descritas se confirman con las correlaciones adicionales esperables que se observan en experimentos bidimensionales (HSQC, COSY, HMBC y NOESY), y se confirma la estructura del cadinano representado en la figura 2.



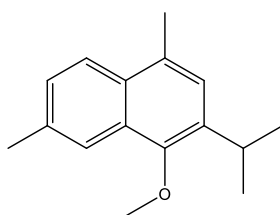
**Figura 2.** Correlaciones HMBC y NOESY de 1

Previamente se informó el aislamiento de este compuesto en *H. inuloides* [12], y los datos espectroscópicos de RMN  $^1H$  informados en la literatura coinciden con los obtenidos para el compuesto **1**, a excepción de las asignaciones para los metilos, que en la literatura se encuentran intercambiados [12,13] (véase la tabla de datos en la sección experimental, página 41).

#### 4-Metoxi-isocadaleno (**2**)

Se obtuvo en forma de cristales transparentes, Pf 70-71° C, *Rf* 0.7 (*n*-hexano-AcOEt, 95:5). El espectro de RMN <sup>1</sup>H (espectro 5, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) muestra en δ<sub>H</sub> 3.59 una señal séptuple propia del metino del isopropilo (H-11), lo cual está de acuerdo con la señal doble en δ 1.32, una señal doble intensa que integra para seis protones, correspondientes a los metilos. También se observan tres señales que integran para tres hidrógenos, centradas en δ<sub>H</sub> 2.56 (s) y δ<sub>H</sub> 2.65 (s) asignables a los metilos unidos al anillo aromático y la tercera, ubicada en δ<sub>H</sub> 3.92 (s), que corresponde, por su desplazamiento químico a un metilo unido a oxígeno. El espectro también exhibe la presencia de cuatro hidrógenos aromáticos, uno de estos aparece como una señal simple en δ<sub>H</sub> 7.16, dos de ellos muestran un sistema ABC en δ<sub>H</sub> 7.85 (1H, d, *J* = 8.6 Hz) y en δ 7.33 (1H, dd, *J* = 8.6, 1.9 Hz), lo que define un sistema *orto* de un anillo bencénico, y un acoplamiento en *meta* de este último hidrógeno con el cuarto hidrógeno aromático que presenta un desplazamiento de 7.90 ppm (1H, d, *J* = 1.9 Hz), por lo que a este último se le asigna la posición 5 de un esqueleto tipo cadinano y a los dos anteriores las posiciones H-8 y H-7 respectivamente.

La comparación de los datos espectroscópicos de **2** con los publicados anteriormente [12,13] permitieron concluir que esta sustancia es el 4-metoxi-isocadaleno.



**Figura 3.** Estructura de 4-metoxi-isocadaleno (**2**)

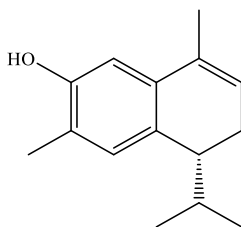
#### (4*R*)-7-Hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (**3**)

Se obtuvieron cristales blancos en forma de agujas, parcialmente solubles en hexano con Pf 104-106 °C y *Rf* 0.52 (*n*-Hex-AcOEt, 8:2). El espectro de IR (espectro 7, CHCl<sub>3</sub>) muestra una banda fina en 3603 cm<sup>-1</sup>, atribuida a un grupo OH, además señales características de metilos y



metilenos entre 3008 y 2834  $\text{cm}^{-1}$ , aparece una banda en 1630 y otra en 1457  $\text{cm}^{-1}$  las cuales son asignadas a dobles enlaces C=C.

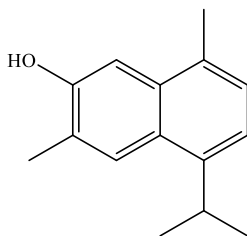
Los datos de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 6.  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 300 MHz) son los siguientes:  $\delta_{\text{H}}$  6.83 s (H-5), 6.73 s (H-8), 5.64 s (H-2), 2.39 – 2.25 m (H-3a, H3b), 2.24 – 2.2 m (H-4), 2.18 s (H-15), 1.93 s (H-14), 1.78 hept d (H-11  $J = 6.7, 8.0$  Hz), 0.86 d (H-12,  $J = 6.7$  Hz), 0.78 d (H-13, d,  $J = 6.7$  Hz) 7.8 s (H-O-) La coincidencia de los datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e IR con los reportados en la literatura [13] y la comparación cromatográfica con una muestra auténtica, aislada previamente en el laboratorio, permitieron confirmar su identidad como (4*R*)-7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (**3**).



4(*R*)-7-Hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (**3**)

#### 7-Hidroxi-cadaleno (**4**)

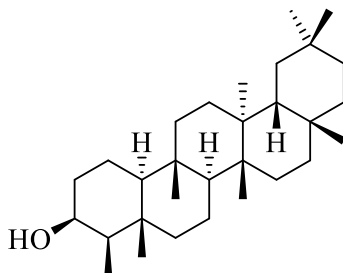
Se aislaron cristales incoloros, finos, Pf 116-117 °C  $R_f$  0.475 (*n*-Hex-AcOEt, 8:2). Las asignaciones de los datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  de **4** (Espectro 8,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) son las siguientes:  $\delta$  7.90 s (H-5), 7.26 s (H-8), 7.20 d (H-2,  $J = 7.5$  Hz), 7.14 d (H-3,  $J = 7.5$  Hz), 4.96 s (H-O-), 3.67 hept (H-11,  $J = 6.9$  Hz), 2.56 s (H-14), 2.47 s (H-15), 1.37 d (H-12, H-13,  $J = 6.9$  Hz). Estos datos coinciden con los reportados en estudios previos para el compuesto 7-hidroxi-cadaleno (**4**) [13]. La comparación directa con una muestra auténtica obtenida previamente en el laboratorio confirmó la identidad de esta sustancia.



7-Hidroxi-cadaleno (**4**)

### 3 $\beta$ -Friedelanol (**5**)

Se obtuvo como un sólido cristalino, parcialmente soluble en hexano y acetato de etilo, soluble en cloroformo, Pf 280-282 °C, *Rf* 0.47, (*n*-Hex-AcOEt, 8:2). El espectro de RMN <sup>13</sup>C de esta sustancia (espectro 10, CDCl<sub>3</sub>, 101 MHz) muestra las siguientes 30 señales:  $\delta_C$  11.8, 15.9, 16.5, 17.7, 18.4, 18.8, 20.3, 28.3, 30.2, 30.8, 31.9, 32.2, 32.5, 32.9, 35.2, 35.3, 35.5, 35.7, 36.2, 37.2, 37.9, 38.5, 39.4, 39.8, 41.8, 42.9, 49.3, 53.3, 61.5, 72.9. La modalidad DEPT (espectro 11) establece la presencia de cinco metinos, once metilenos, ocho metilos y seis carbonos cuaternarios. Las correlaciones observadas en el experimento HSQC (espectro 12), permiten asignar los desplazamientos de los carbonos e hidrógenos presentes y la comparación de estas asignaciones con los datos informados en la literatura [57] confirman su identidad como 3 $\beta$ -friedelanol (**5**), lo cual está de acuerdo con la comparación directa con una muestra auténtica obtenida en el laboratorio.



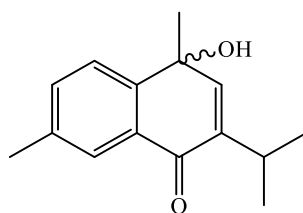
3 $\beta$ -Friedelanol (**5**)

### 1-Hidroxi-1(4H)-isocadalen(4)ona (**6**)

Se aisló un aceite amarillo. *Rf* 0.4 (*n*-Hex-AcOEt, 8:2). Los desplazamientos de las señales mostradas en RMN <sup>13</sup>C (espectro 14, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) son los siguientes:  $\delta_C$  21.2, 21.9, 26.5, 31.0, 68.2, 126.1, 127.1, 129.7, 133.9, 136.9, 138.1, 143.3, 144.3, 145.4, 184.4. De las 14 señales destaca por su intensidad la señal en  $\delta_C$  21.9, debida posiblemente a dos carbonos equivalentes, como ya se ha descrito en el presente trabajo para los metilos del isopropilo. También es notable la señal en  $\delta_C$  184.4, asignable a una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada cíclica. El espectro de RMN <sup>1</sup>H (espectro 13, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) confirma la presencia del fragmento isopropilo como una señal

séptuple en  $\delta_H$  3.11 que integra para un hidrógeno, y la señal doble de dobles que integra para seis unidades en  $\delta_H$  1.13, conformando el sistema  $A_6X$ . A campo bajo se observan cuatro señales que integran cada una para un hidrógeno dos de ellas presentan un acoplamiento *orto*:  $\delta_H$  7.65 d ( $J = 8$  Hz) y  $\delta_H$  7.42 dd ( $J = 8$  y 1.2 Hz), este último hidrógeno acoplado en *meta* como ya se ha descrito en esta tesis. Los dos hidrógenos restantes se observaron como señales singuletes en  $\delta_H$  7.91 y  $\delta_H$  6.70. En el espectro de RMN  $^{13}C$  se observa una señal en  $\delta_C$  68.2, por lo cual se asigna a un carbono unido a un hidroxilo.

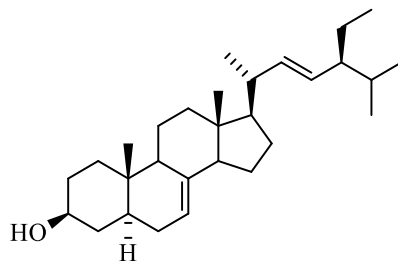
La comparación de los datos físicos y espectroscópicos obtenidos con los informados previamente [12,20], así como la comparación directa con una muestra auténtica permitieron identificar esta sustancia como 1-hidroxi-1(4H)-isocadalen(4)ona (6). Esta sustancia no mostró actividad óptica, por lo que se encuentra como mezcla racémica.



1-Hidroxi-1(4H)-isocadalen(4)ona (6)

#### $\alpha$ -Espinasterol (7)

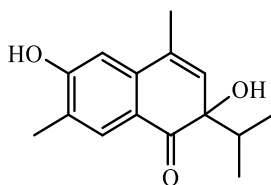
Se obtuvieron cristales incoloros en forma de agujas con Pf 169-170 °C,  $R_f$  0.37 (*n*-Hex-AcOEt, 8:2), la comparación directa con una muestra de  $\alpha$ -espinasterol y la comparación de los datos obtenidos del espectro de RMN  $^1H$  (espectro 15,  $CDCl_3$ , 300 MHz) con los datos reportados en la literatura [15, 58], confirmaron la identidad del compuesto.



$\alpha$ -Espinasterol (7)

3,7-Dihidroxi-3(4H)-isocadalen-4-ona (8)

Se purificó como un sólido cristalino, incoloro, Pf 199-200 °C, *Rf* 0.34 (*n*-Hex-AcOEt, 75:25). Su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 16,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) muestra señales características de un sesquiterpeno análogo a los anteriormente descritos. En particular, dos señales singuletes que integran para tres hidrógenos, cada una, en  $\delta_{\text{H}}$  2.14 y  $\delta_{\text{H}}$  2.22, dos señales dobles a campo alto:  $\delta_{\text{H}}$  0.76 (d, 3H,  $J = 7$  Hz) y  $\delta_{\text{H}}$  0.96 (d, 3H,  $J = 7$  Hz), una señal séptuple que integra para un hidrógeno centrada en  $\delta_{\text{H}}$  1.99 (1H), además de tres señales más a campo bajo. Al cotejar los datos con los reportados en la literatura [16], se identifica al compuesto como 3,7-dihidroxi-3(4H)-isocadalen-4-ona.(8)

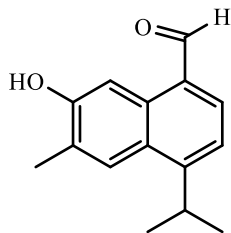


3,7-Dihidroxi-3(4H)-isocadalen-4-ona (8)

7-Hidroxi-14-cadalenal (9)

Se obtuvo como un sólido amorfo, amarillo claro con Pf 150-151 °C, *Rf* 0.5 (*n*-Hex-AcOEt, 8:2). Su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 17,  $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) permite observar una señal séptuple en  $\delta_{\text{H}}$  3.78 (1H,  $J = 7$  Hz) y una señal doble en  $\delta_{\text{H}}$  1.42 (6H,  $J = 7$  Hz). En  $\delta_{\text{H}}$  7.41 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz) se identifica un hidrógeno con acoplamiento *orto* con el hidrógeno en  $\delta_{\text{H}}$  7.85

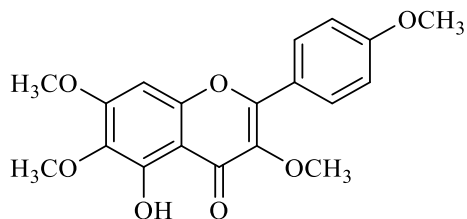
d (1H,  $J = 7.5$  Hz). Además, se observan tres señales a campo bajo,  $\delta_H$  7.97 (s, 1H),  $\delta_H$  8.93 (s, 1H) y  $\delta_H$  10.18 (s, 1H). Este último desplazamiento indica la presencia de un aldehído. El espectro de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 18,  $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) muestra quince señales, una de ellas en  $\delta_C$  194.5. Lo cual confirma la presencia del grupo aldehído. Al comparar los datos espectroscópicos del compuesto con los reportados en trabajos publicados, se observa coincidencia con los datos del sesquiterpeno 7-hidroxi-14-cadalenal [20], lo que confirma su identidad.



7-Hidroxi-14-cadalenal (**9**)

#### 5-Hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona (**10**)

Se obtuvo como polvo amarillo, Pf 159-160°C,  $R_f$  0.5 ( $n$ -Hex-AcOEt, 6:4), el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 21,  $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) exhibe cuatro señales singuletes, entre  $\delta_H$  3.87 y  $\delta_H$  3.96, cuyo desplazamiento permite sugerir que pertenecen a metilos unidos a oxígeno, lo que indica la presencia de un flavonoide metoxilado. En  $\delta_H$  6.50 se observa una señal singulete que integra para un hidrógeno. Se observa un sistema acoplado A'ABB' con las siguientes señales:  $\delta_H$  7.03 (dd, 2H,  $J = 9.1, 2.1$  Hz) y  $\delta_H$  8.08 (dd, 2H,  $J = 9.1, 2.1$  Hz) el cual podría atribuirse al anillo B de un flavonoide sustituido con un grupo metoxilo en 4'. El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  muestra 17 señales, de las cuales dos sobresalen por su intensidad ( $\delta_C$  114.0 y 130.1), posiblemente ocasionadas por dos carbonos isócronos, además de una señal en  $\delta_C$  178.9. Esta información sugiere la presencia de una flavona tetra-metoxilada, y la revisión bibliográfica [59,60] permite identificar al compuesto **10** como 5-hidroxi-3,6,7,4' tetrametoxiflavona. Este compuesto no se ha reportado anteriormente en *H. inuloides*



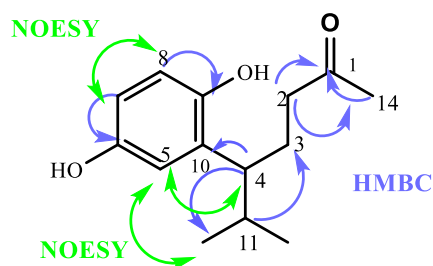
5-Hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona (**10**)

(15-*nor*-1,9-*seco*)-6,9-dihidroxi-calamen-1-ona (**11**)

El compuesto **11** se aisló como un aceite amarillo ópticamente activo  $[\alpha]_D^{25} + 11.11$  (*c* 0.12 MeOH). El análisis de masas (DART) indicó  $m/z = 237.14909$   $[M+H]^+$ , (237.14907 calculada para  $C_{14}H_{21}O_3$ ), por lo que se determinó la fórmula  $C_{14}H_{20}O_3$ , que señala un índice de insaturación de 5. Las señales observadas en RMN de  $^{13}C$  (espectro 23,  $CDCl_3$ , 400 MHz) se clasificaron a partir del experimento DEPT obteniendo siete señales de carbonos con hibridación  $sp^2$ , dos de ellos cuaternarios ( $\delta_C$  211.5 y 131.7), dos cuaternarios unidos a oxígeno ( $\delta_C$  149.8 y 148.2) y tres metinos ( $\delta_C$  117.00, 114.7 y 113.7). Con hibridación  $sp^3$  se observaron las señales de dos metinos ( $\delta_C$  44.3 y  $\delta_C$  33.2), dos metilenos ( $\delta_C$  26.9 y  $\delta_C$  41.8) y tres metilos ( $\delta_C$  30.2,  $\delta_C$  21.3 y  $\delta_C$  20.9). La señal en  $\delta_C$  211.5 indicó la presencia de una cetona.

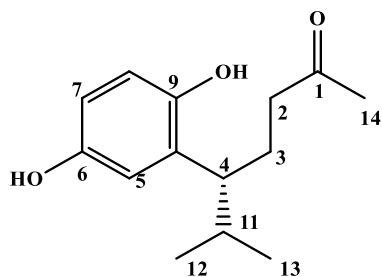
Las señales del espectro de RMN  $^1H$  (espectro 22,  $CDCl_3$ , 400 MHz) sugieren la estructura de un esqueleto tipo cadinano. Se observaron las señales atribuibles a tres hidrógenos bencenoides con acoplamientos *orto*, *meta* y *para*, en los siguientes desplazamientos:  $\delta_H$  6.68 (dd,  $J = 9.4, 0.7$  Hz, 1H), 6.56 (dd,  $J = 9.4, 3$  Hz, 1H), 6.56 (dd,  $J = 3, 0.7$  Hz, 1H). Se identificó la señal simple de un metilo en  $\delta_H$  2.05 (s, 3H) y el fragmento isopropilo partir de la señal de un metino centrada en  $\delta_H$  1.80 (hept d,  $J = 8.7, 6.7$  Hz, 1H) que se asignó como H-11 y mostró un acoplamiento con las señales en  $\delta_H$  1.00 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H), y 0.74 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H) las cuales se asignaron a las señales de los protones de metilos, H-12 y H-13 respectivamente. De acuerdo a los datos obtenidos en el experimento HSQC (espectro 24) la señal de hidrógeno del segundo metino se localizó en  $\delta_H$  2.60 (ddd,  $J = 12.1, 8.7, 3.9$  Hz, 1H), correlacionada con la señal de carbono  $sp^3$  desplazada a campo bajo  $\delta_C$  44.3, conforme a su desplazamiento y a las constantes de acoplamiento de la señal del hidrógeno, este metino se asigna a la posición 4. A partir de que se observa en el experimento HMBC (espectro 25) la correlación de la señal de un hidrógeno en

la región aromática,  $\delta_H$  ( $J = 3.0, 0.7, 1H$ ), con C-4 y con las señales  $\delta_C$  113.7 y 149.8 se asigna al hidrógeno la posición H-5, en tanto que los carbonos se asignan C-7 y C-6, lo cual es consistente con la constante de acoplamiento de H-7 ( $\delta_H$  6.56 (dd,  $J = 9.4, 3.0$  Hz, 1H)) y permite deducir que H-8 produce la señal en  $\delta_H$  6.68 (dd,  $J = 9.4, 0.7$  Hz, 1H). El análisis del espectro NOESY confirmó la asignación de H-5 al observarse correlaciones de éste con H-4, H-11, H-12 y H-13. Se localizaron las señales correspondientes a los hidrógenos de los metilenos en  $\delta_H$  2.3 – 2.2 (m, 2H), correlacionada con  $\delta_C$  41.8 y en  $\delta_H$  1.71 (m, 1H) y 2.09 (m, 1H) correspondientes con la señal en  $\delta_C$  26.9. Se observó la correlación en el espectro HMBC de la señal de H-4 con la señal en  $\delta_H$  1.71 (m, 1H), correspondiente al hidrógeno Hb del metileno con  $\delta_C$  26.9, estas señales se asignaron al metileno en la posición 3, lo que resultó consistente con las correlaciones de H-4 con H-3a y H-3b, observadas en el experimento COSY. Siguiendo las correlaciones mostradas en los experimentos HMBC, COSY y NOESY se confirmaron las asignaciones realizadas y se establecieron las conectividades de átomos restantes, C-3 se encontró adyacente al otro carbono de metileno en  $\delta_C$  41.8 (C-2), las señales de los hidrógenos H-2 correlacionaron con la señal del carbono  $\delta_C$  211.5, de igual forma se mostró correlación de las señales de los protones de metilo  $\delta_H$  2.05 (s, 3H) con el mismo carbono, por lo que se asignó la señal en  $\delta_C$  211.5 a (C-1) y la señal en  $\delta_H$  2.05 a H-14. Las señales de los carbonos cuaternarios en  $\delta_C$  149.8 y 148.2 se asignaron en el anillo bencenoide a las posiciones 6 y 9, respectivamente, sustituidos con un grupo OH, lo que resultó consistente con los desplazamientos de estas señales y de las señales de los protones asignados en el anillo aromático. La presencia de un anillo bencenoide y una cetona está de acuerdo con el índice de insaturación de 5. Las señales de los protones aromáticos, así como las de H-4 y H-3 correlacionan con el carbono en 131.7, por lo que se establece este como C-10, como se muestra en la figura 4.



**Figura 4.** Correlaciones de **11** observadas en HMBC y NOESY

El espectro de IR (espectro 26) permite observar una banda de absorción en  $3603\text{ cm}^{-1}$ , característica de fenoles libres, así como bandas de absorción en  $2962$ ,  $2931$  y  $2873\text{ cm}^{-1}$  debidas a estiramientos del enlace C-H; en  $1711\text{ cm}^{-1}$  se observa la banda intensa de carbonilo, lo que confirma la funcionalidad propuesta. La integración de la información previa permite confirmar la estructura propuesta (figuras 4 y 5), la cual corresponde a un compuesto que no se ha reportado previamente en la literatura y puede ser nombrado como se indica en la figura 5.



**Figura 5.** (15-*nor*-1,9-*seco*)-6,9-dihidroxi-calamen-1-ona (**11**)

Esta molécula tiene una fórmula molecular  $C_{14}H_{20}O_3$ , pocos *nor*-cadinanos han sido reportados, la mayor parte de estos se han encontrado en especies del mismo género (*Heterotheca grandiflora*) [61], pero todos ellos presentan los dos anillos.

Aunque no se determinó la configuración absoluta de este compuesto puede proponerse la configuración *4R* por analogía con los sesquiterpenos aislados de la misma especie.

El resumen de los datos espectroscópicos de RMN de **11** se presenta en la tabla **3**.



Tabla 3. Datos de RMN de **11** en CDCl<sub>3</sub>

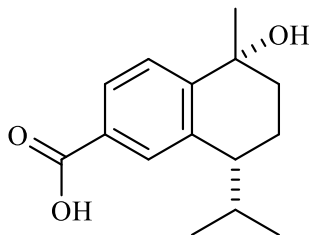
posición	δC, Tipo	δ <sub>H</sub> , multiplicidad, (J, Hz)	HMBC <sup>b</sup>
1	211.5, C		
2	41.8, CH <sub>2</sub>	2.24, m 2.24, m	3, 4, 1, 10
3	26.9, CH <sub>2</sub>	2.09, m 1.71, m	2, 10, 11, 4,
4	44.3, CH	2.60, ddd, (12.1, 8.7, 3.9)	11, 12, 13, 3, 2, 5, 10
5	114.7, CH	6.56, dd, (3, 0.7)	4, 7, 6, 10
6	149.8, C		
7	113.7, CH	6.56, dd, (9.4, 3.0)	5, 8, 10, 9, 6
8	117.00, CH	6.68, dd, (9.4, 0.7)	7, 10, 9, 6
9	148.2, C		
10	131.7, C		
11	33.2, CH	1.80, hept d, (8.7, 6.7)	12, 13, 3, 4, 10
12	21.3, CH <sub>3</sub>	1.00, d, (6.7)	11, 13, 4
13	20.9, CH <sub>3</sub>	0.74, d (6.7)	12, 11, 4
14	30.2, CH <sub>3</sub>	2.05, s	2, 1

Espectro de RMN <sup>1</sup>H medido a 400 MHz y espectro de RMN <sup>13</sup>C medido a 100 MHz  
<sup>b</sup>Correlaciones HMBC de protón a carbono

La posible ruta biosintética de **11** se presenta en la página 37.

#### Ácido-(1*R*,4*R*)-1-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrocadalen-15-oico (**12**)

Se aislaron cristales transparentes, Pf 201-202 °C, *R*<sub>f</sub> 0.54 (*n*-Hex-AcOEt, 4:6), el compuesto se identificó por comparación de los datos espectroscópicos de IR y RMN con los datos reportados en la literatura [16] (espectros 28-30).



#### Ácido-(1*R*, 4*R*)-1-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrocadalen-15-oico (**12**)

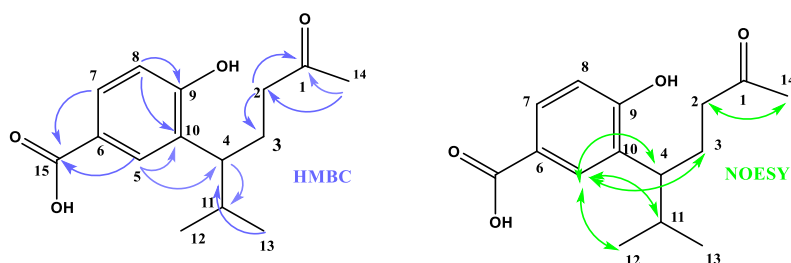
### Ácido-(1,9-*seco*)-1-dehidro-9-hidroxi-calamen-15-oico (**13**)

Se aisló un aceite amarillo,  $R_f = 0.28$  (*n*-Hex-AcOEt, 4:6), el cual mostró actividad óptica,  $[\alpha]_D^{25} +10$  (*c* 0.13, MeOH). Se dedujo una fórmula molécula  $C_{15}H_{20}O_4$ , con base en el análisis de masas, DART ( $m/z$  265.14400 ( $[M+H]^+$ ; 265.14398 calculado para  $C_{15}H_{21}O_4$ ) lo que indicó un grado de insaturación de 6. Su espectro de infrarrojo (Espectro 36) exhibe una banda de absorción en  $3589\text{ cm}^{-1}$ , atribuible a hidroxilos libres en soluciones diluidas, además, permite observar una banda de absorción ancha desde  $3400$  a  $2600\text{ cm}^{-1}$ , la cual se reconoce como la característica de los enlaces O-H de un ácido carboxílico. Se muestran dos bandas de absorción intensas en  $1712$  y  $1688\text{ cm}^{-1}$  propias de estiramientos C=O, por lo que se considera la presencia de dos grupos carbonilos.

El espectro de  $^1\text{H}$  (espectro 32, 500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) muestra gran similitud con el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **11**, se identifica el fragmento isopropilo a partir de la señal en  $\delta_{\text{H}} 1.95$  (hept d,  $J = 6.7, 8.2$  Hz) la cual se numera H-11, las señales acopladas con esta se asignan de la siguiente manera: H-13 en  $\delta_{\text{H}} 0.78$  y H-12 en  $\delta_{\text{H}} 1.02$ , estas dos señales son dobletes con la misma constante de acoplamiento ( $J = 6.7$  Hz), a partir de las correlaciones observadas en el experimento HMBC (espectro 35) se ubica a H-4 en  $\delta_{\text{H}} 2.81$  (ddd,  $J = 4.7, 8.2, 9.0$  Hz). El espectro muestra, además, la señal simple de tres protones de un metilo en  $\delta_{\text{H}} 2.05$ , asignada a la posición 14, un multiplete centrado en  $\delta_{\text{H}} 2.25$  (2H) y que de acuerdo al experimento HSQC correlaciona con la señal de un carbono de metileno,  $\delta_{\text{C}} 42.5$  ( $\text{CH}_2$ -2), dos multipletes centrados en  $\delta_{\text{H}} 2.16$  (1H) y  $1.84$  (1H), que correlacionan con la señal de un segundo carbono de metileno en  $\delta_{\text{C}} 27.2$  ( $\text{CH}_2$ -3), y las señales de tres protones en la región aromática.

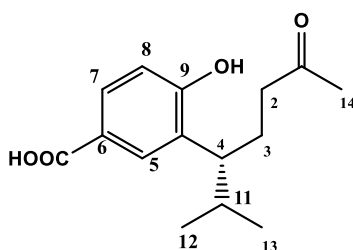
El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro 33,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) muestra 15 señales, de las cuales cinco corresponden a carbonos cuaternarios y se encuentran en:  $\delta_{\text{C}} 212.2, 170.7, 161.6, 131.4$  y  $123.0$ . Los dos primeros confirman la presencia de grupos carbonilos, atribuibles a una cetona alifática y a un ácido carboxílico como sustituyente de un anillo bencenoide, lo cual es consistente con el grado de insaturación de 6. Por la similitud de las señales observadas para el compuesto **11** en los espectros de RMN, se plantea el mismo tipo de esqueleto observado en el compuesto **11** para la sustancia **13**. La señal en  $\delta_{\text{C}} 212.2$  se asigna C-1. La señal en  $\delta_{\text{C}} 161.6$  puede atribuirse a un carbono aromático sustituido con un grupo OH (C-9), funcionalidad que se observó en el espectro IR. Las dos señales de carbonos cuaternarios restantes se atribuyen, una

al carbono aromático sustituido con el ácido carboxílico ( $\delta_C$  123.0) el cual se asigna C-6 y otra ocasionada por otro carbono del anillo bencenoide sustituido, como parte del sistema aromático de seis miembros trisustituido, lo que es consistente con las tres señales de protones que muestran un sistema de acoplamiento ABX:  $\delta_H$  7.78 (d,  $J = 2.00$  Hz), 7.76 (dd,  $J = 8.3, 2.0$  Hz) y 6.84 (d,  $J = 8.3$  Hz), las cuales se asignan a H-5, H-7 y H-8, respectivamente, estas asignaciones se confirman, además, con la correlación observada en el experimento HMBC de la señal de protón H-5 con la señal del carbonilo en  $\delta_C$  170.7, el cual se asigna C-15, se establece que señal en  $\delta_C$  161.6 corresponde a C-9, lo que es consistente con el desplazamiento químico observado y con las correlaciones reveladas en la inspección del espectro HMBC. Se deduce una estructura similar a la del compuesto **11**, diferenciada por la presencia de un ácido como sustituyente sobre el anillo. A continuación, se ilustran las correlaciones relevantes observadas en los espectros HMBC y NOESY



**Figura 6.** Correlaciones de **13** observadas en espectroscopia 2D

La información descrita confirma la estructura de **13**, la cual puede nombrarse como se indica en la figura 7.



**Figura 7.** Ácido-(1,9-seco)-1-dehidro-9-hidroxi-calamen-15-oico (**13**)

Los datos espectroscópicos de **13** se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 4. Datos de RMN de **13** en CD<sub>3</sub>OD

posición	δC, Tipo	δ <sub>H</sub> , multiplicidad, (J, Hz)	HMBC <sup>b</sup>
1	212.2, C		
2	42.5, CH <sub>2</sub>	2.25, m 2.25, m	3, 1, 14
3	27.2, CH <sub>2</sub>	2.16, m 1.84, m	2
4	45.8, CH	2.81, ddd, (4.7, 8.2, 9.0)	12, 13 4, 7, 9, 15,
5	131.70, CH	7.78, d, (2.00)	10
6	123.0, C		
7	130.3, CH	7.76, dd, (8.3, 2.00)	9, 15
8	115.6, CH	6.84, d, (8.3)	6, 9, 10
9	161.6, C		
10	131.4, C5		
11	33.7, CH	1.95, hept d, (6.7, 8.2)	
12	21.5, CH3	1.02, d, (6.7)	13, 11, 4
13	21.1, CH3	0.78, d, (6.7)	12, 11, 4
14	29.90, CH3	2.05, s	1, 2
15	170.7, C		

Espectro de RMN <sup>1</sup>H medido a 500 MHz y espectro de RMN <sup>13</sup>C medido a 125 MHz <sup>b</sup> Correlaciones de HMBC de protón a carbono

Este compuesto no se ha informado en la literatura, en la página 37 se propone su ruta biosintética.

Quercetina (**14**) y β-D-glucopiranosido de espinasterilo (**15**).

Estos compuestos fueron identificados por comparación directa con muestras auténticas obtenidas previamente en laboratorio.

## 5.2. Resultados de actividad anti-inflamatoria de **11** y **13**

Se evaluó la actividad anti-inflamatoria de estos compuestos utilizando el modelo de edema inducido con 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (ATF). Se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 5. Actividad anti-inflamatoria de 11 y 13

Muestra	Dosis ( $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ )	Edema (mg)	Inhibición (%)
Control	-	16.57 $\pm$ 0.58	-
11	1	12.87 $\pm$ 0.88*	22.33 $\pm$ 5.29
13	1	11.90 $\pm$ 0.70**	28.17 $\pm$ 4.22

Los datos representan el promedio de tres animales  $\pm$  el error estándar de la media ( $\bar{x} \pm EEM$ ). Los resultados se analizaron mediante una prueba de *Dunnnett*, los valores de  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*\*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

Con la finalidad de comparar la actividad anti-inflamatoria de las nuevas moléculas. Con la actividad anti-inflamatoria que han mostrado otros compuestos aislados de la misma especie vegetal, se presenta la siguiente tabla. En ella se han enlistado los resultados obtenidos en estudios previos realizados en el laboratorio de investigación en donde se desarrolló este trabajo. Se incluye el gráfico correspondiente. [16, 20].

Tabla 6. Actividad anti-inflamatoria de metabolitos de *H. inuloides*

1 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ (dosis)		% inhibición	$\pm$ EEM
compuesto			
1	24 <sup>a</sup>	12.09	0.48
2	12 <sup>b</sup>	12.20	7.5888
3	3 <sup>b</sup>	13.64	1.2528
4	2 <sup>a</sup>	15.32	1.95
5	6 <sup>b</sup>	19.19	4.692
6	4 <sup>b</sup>	19.82	5.0504
7	23 <sup>a</sup>	21.51	6.99
8	11	22.33	5.29
9	19 <sup>b</sup>	27.47	4.56
10	8 <sup>b</sup>	28.16	5.7072
11	13	28.17	4.22
12	26 <sup>b</sup>	31.75	6.426
13	14 <sup>b</sup>	39.89	9.7848
14	9 <sup>a</sup>	43.13	8.09
15	22 <sup>b</sup>	62.29	9.1464
16	indometacina <sup>b</sup>	43.15	0

<sup>a</sup>referencia [20]    <sup>b</sup>referencia [16]

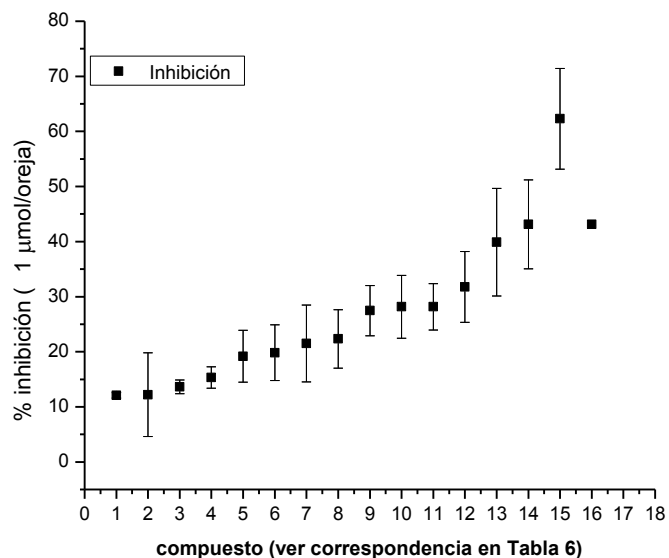


Gráfico 1. Actividad anti-inflamatoria de metabolitos de *Heterotheca inuloides*.

Como se observa, los compuestos evaluados poseen actividad anti-inflamatoria, similar a la que han mostrado otros metabolitos de esta especie. Sin embargo, la actividad de los nuevos compuestos puede considerarse como moderada, al inhibir menos del 50% la formación del edema.

### 5.3. Relaciones cualitativas y cuantitativas de los compuestos en ambas poblaciones

Con la finalidad de determinar si había alguna diferencia en el contenido metabólico de las poblaciones colectadas en dos localidades adyacentes, se realizó la comparación correspondiente en cuanto a variedad estructural y abundancia relativa.

Las dos localidades pertenecen al Municipio de Ozumba de Alzate, Estado de México. Ambas localidades comparten las siguientes características: clima templado subhúmedo con lluvias en verano (precipitación pluvial de 800-1100 mm), con un rango de temperatura de 12 a 20 °C, relieve de lomerío con rocas ígneas y con suelo andosol, de uso predominantemente agrícola [62]. Las coordenadas geográficas de las dos poblaciones se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Coordenadas geográficas de las poblaciones A y B [63]

Población	Latitud	longitud	altitud
Santiago Mamalhuazuca (A)	18°59'39''	-98°47'42''	2185 msnm
San José Tlacotitlán (B)	18°58'58''	-98°48'31''	2135 msnm

Los compuestos aislados a partir del análisis químico de las poblaciones A y B de *Heterotheca inuloides* se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 8. Compuestos aislados en las poblaciones A y B de *Heterotheca inuloides*

	Compuesto														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>población A</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>población B</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+

+ = se encuentra presente, - = no se encontró

La tabla muestra que existe similitud en el tipo de compuestos contenidos en ambas poblaciones. Sin embargo, se observa que la población **A** presenta una mayor variedad de compuestos, aislándose 15 compuestos, 12 de los cuales también están presentes en la población **B**, los compuestos sesquiterpénicos **9** y **13** y el flavonoide **10** no fueron encontrados en **B**.

De manera adicional, considerando que los compuestos **3**, **4**, **5** y **7** han resultado abundantes en el extracto acetónico, son estables y de manipulación reproducible, estos se seleccionaron para comparar su abundancia relativa en los extractos.

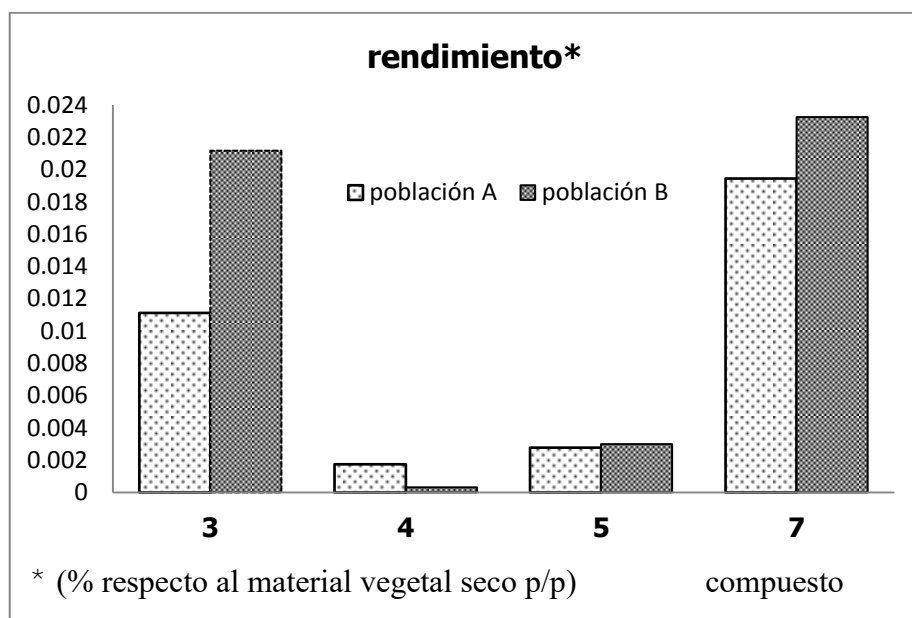


Gráfico 2. Rendimiento de los compuestos **3**, **4**, **5** y **7** con respecto al material vegetal seco

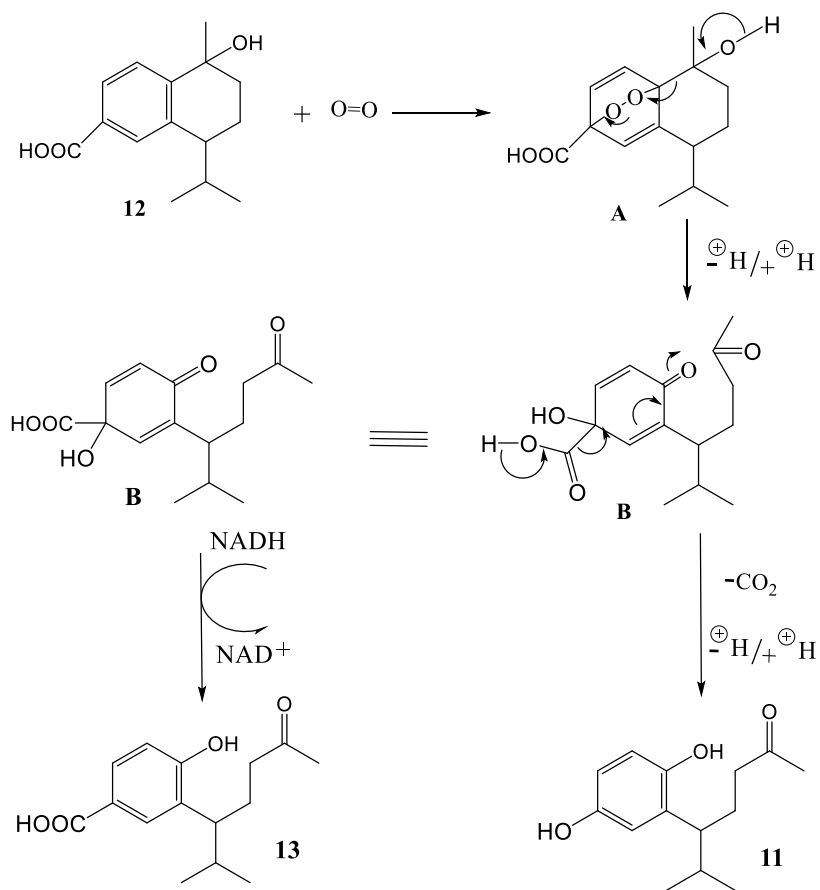
Como puede observarse en el gráfico 2, las variaciones en abundancia relativa son mayores en los productos **3** y **4**, que son sesquiterpenos tipo cadinano. El compuesto **3** presentó un rendimiento de 0.0111% en la población **A**, mientras que el rendimiento en la población **B** fue de 0.0211%, lo que representa un incremento cercano al 100% respecto al observado en **A**. En cuanto al contenido de **4**, la variación entre ambas poblaciones es aún mayor, pero en este caso la población **A** presenta mayor cantidad relativa, el rendimiento porcentual de **4** en la población **A** fue de 0.0017%, mientras que en **B** este fue del 0.0003 %. Para los compuestos **5** y **7** las variaciones porcentuales en el contenido entre ambas poblaciones fueron menos notables.

#### 5.4. Propuesta biogenética de los compuestos **11** y **13**

Las propuestas de formación de las sustancias naturales en los organismos vivos se denominan genéricamente como hipótesis biogenéticas, y se requieren experimentos específicos (marcaje isotópico, seguimientos de las secuencias de formación de las sustancias, atrapamiento y caracterización de intermediarios, entre otros), que proporcionen evidencias específicas de su formación. Finalmente, puede procederse (mediante el manejo de los complejos enzimáticos previamente aislados y caracterizados) a la biosíntesis (es decir, la síntesis mediada por enzimas) de las sustancias naturales, con lo cual se confirman las hipótesis biogenéticas, y puede afirmarse que a partir de relativamente pocos experimentos, se hacen numerosas inferencias referentes a la biosíntesis de los productos naturales.

Para el caso particular de los dos *seco*-cadinanos aislados y caracterizados en el presente trabajo (uno de ellos *nor-seco*-cadinano), a continuación se presenta una propuesta biogenética, a partir de la sustancia **12**, que es un producto natural presente en esta fuente y puede considerarse como precursor. Cabe señalar que en las rutas biogenéticas se consideran las reacciones redox como una parte importante, en las cuales interviene el cofactor NADH como agente reductor (al transformarse en  $\text{NAD}^+$ ). El esquema 8 muestra de manera resumida la formación de los compuestos **11** y **13**.





**Esquema 8. Biogénesis propuesta para los compuestos 11 y 13**

La reacción de Diels y Alder (térmica) entre **12** y  $O=O$  puede generar el peróxido de dialquilo **A** como intermediario, el cual, mediante una reacción de fragmentación e intercambio de hidrógeno, genera la ciclohexadienona **B**, que también puede considerarse como intermediario. Esta sustancia puede descarboxilarse y directamente formar la hidroquinona **11**. Por otro lado, la reducción (presumiblemente catalizada por NADH) del intermediario **B** puede generar al fenol **13**.

## 6. Parte experimental

### 6.1. Material Vegetal

El material vegetal fue colectado, durante el mes de octubre de 2012 en las localidades de Santiago Mamalhuazuca (clave de colecta: A-2 2753, Linares y Bye) y San José Tlacotitlán (clave de colecta: A-1 2754, Linares y Bye), ambas pertenecientes al Municipio de Ozumba en el Estado de México. Para fines de este trabajo, las localidades fueron identificadas como **A** y **B** respectivamente. El material fue identificado por los profesores Edelmira Linares y Robert Bye. Las muestras se encuentran depositadas en la Colección Etnobotánica del Jardín Botánico de la UNAM.

### 6.2. Material y equipo

En todas las columnas cromatográficas se utilizó como fase estacionaria gel de sílice de malla 230-400 (ASTM), y como fase móvil mezclas de disolventes de polaridad creciente, la mayoría de las veces, *n*-hexano y acetato de etilo.

En el proceso de purificación se utilizaron cromatoplasmas Merck de sílice 60 F<sub>254</sub>, preparativas, soportadas sobre una placa de vidrio y analíticas, soportadas en aluminio. Estas fueron reveladas con lámpara de UV ( $\lambda$  de 254 y 365 nm) y solución de sulfato cérico amoniacal al 1% en ácido sulfúrico, con posterior calentamiento.

Los puntos de fusión no fueron corregidos y se tomaron en un aparato de *Fisher Johns* con velocidad ajustada. Los espectros de RMN fueron obtenidos utilizando varios equipos que incluyen *Varian, Unity Inova 500 MHz, Bruker Avance III 400 MHz, Bruker, Avance 300 MHz, Bruker Fourier 300 MHz, Varian, Unity 300 MHz, y Jeol, Eclipse 300 MHz*. Los espectros de infrarrojo de obtuvieron en un espectrofotómetro *Bruker Tensor 27 (IR-FT)*, los espectros de UV fueron adquiridos en un espectrofotómetro *Shimadzu U160*. La rotación óptica se obtuvo con un polarímetro *Perkin Elmer 243*. Los análisis espectrométricos se realizaron en un espectrómetro de masas *Jeol, The AccuTOF JMS-T100LC* en análisis directo de tiempo real.

### 6.3. Aislamiento

Para ambas poblaciones se empleó la metodología que a continuación se describe.

El material vegetal seco fue extraído sucesivamente con acetona tres veces, una cada 24 h,

a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente a presión reducida y una vez que se eliminó el disolvente se registró su peso. El extracto se adsorbió en sílice (230-400) en una relación 1:1, hasta la obtención de una mezcla homogénea, la cual fue colocada sobre una columna de 10 cm de diámetro, empacada con gel de sílice. Se utilizó *n*-hexano como fase móvil inicial y esta fue modificada agregando acetato de etilo de manera gradual. Las fracciones colectadas fueron reunidas de acuerdo a la similitud de su perfil cromatográfico, para posterior fraccionamiento.

El material vegetal seco de **A** registró un peso de 1440 g y se obtuvieron 27 g de extracto acetónico, y a partir de 7700 g de **B** se obtuvieron 180 g de extracto. La relación de las fracciones reunidas en la población **A** se presenta enseguida.

Tabla 9. Fracciones reunidas. Población A

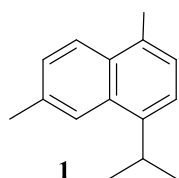
Eluatos (400 mL) c/u	Fracción		Fase móvil (Hexano:AcOEt)	compuesto aislado
		Peso [mg]		
1--7	A	920	100	
8 -- 16	B	24	98- 02	<b>1</b>
17 - 26	C	36	98- 02	
27-44	D	1180	98- 02	<b>2</b>
45-46	E	50	95-05	
47-52	F	75	95-05	ácidos grasos
53-54	G	75	95-05	
55-63	H	310	95-05	<b>3</b>
64-73	I	120	95-05	<b>4 y 5</b>
74-75	J	80	90-10	
76-84	K	1050	90-10	ácidos grasos
85-92	L	970	90-10	<b>6</b>
93-101	M	610	90-10	<b>7</b>
102-106	N	300	90-10	
107-108	Ñ	57	90-10	
109-115	O	430	85-15	ácidos grasos
116-123	P	492	85-15	<b>8</b>
124-142	Q	700	85-15	
143-149	R	420	80-20	<b>9 y 10</b>
150-159	S	300	80-20	
160-172	T	900	80-20	<b>11</b>
173-189	U	190	75-25	<b>12</b>
190-211	V	980	70-30	
222-226	W	312	60-40	<b>13 y 14</b>
227-237	X	240	60-40	<b>14</b>
238--258	Y	730	50-50	

259-287	Z	840	50-50	
288-328	Z1	1280	00-100	<b>15</b>
329-340	Lavado	1480	(100% acetona)	

Se realizó el estudio químico de igual manera con **B**; sin embargo no se encontraron los compuestos **9**, **10** y **13**.

#### 6.4. Características físicas y datos espectroscópicos de los compuestos aislados

##### Cadalenos (**1**)



La fracción B, se sometió a cromatografía en capa fina (CCFP) utilizando *n*-hexano como fase móvil, luego de extraer de la sílice con *n*-hexano- AcOEt el compuesto, y de la posterior evaporación de los disolventes, se obtuvo un aceite amarillo (17 mg) identificado como cadaleno.

*R<sub>f</sub>* 0.625 (*n*-hexano).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.92, H-8 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H); 7.90, H-5 (sa, 1H); 7.34, H-7 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H); 7.29, H-3 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H); 7.23, H-2 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H); 3.72, H-11 (hept, *J* = 6.8 Hz, 1H); 2.66, H-1 (s, 3H); 2.57, H-6 (s, 1H); 1.39, H-12, H-13 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H).

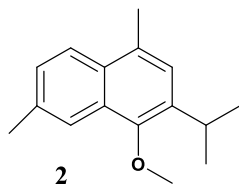
RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 19.6 (C-14), 22.2 (C-15), 23.8 (C-12, C-13), 28.4 (C-11), 121.5 (C-3), 123.1 (C-5), 124.9 (C-8), 125.7 (C-2), 127.3 (C-7), 131.2 (C-10), 131.6 (C-9), 131.9 (C-1), 134.9 (C-6), 142.2 (C-4).

Desplazamientos encontrados para el compuesto (**1**) y los reportados previamente [12,13].

	400 MHz	270 MHz	400 MHz
	CDCl <sub>3</sub> ( <b>1</b> )	CDCl <sub>3</sub> (ref. 12)	CDCl <sub>3</sub> (ref. 13)
posición	δ <sub>H</sub> (ppm)	δ <sub>H</sub> (ppm)	δ <sub>H</sub> (ppm)
1			
2	7.23, da	7.25, da	7.20, da
3	7.29, d	7.27, d	7.26, d
5	7.90, sa	7.91, sa	7.90, sa
7	7.36, dd	7.34, dd	7.33, dd
8	7.92, d	7.91, d	7.90, d
11	3.72, hept	3.71, qq	3.71, m
12	1.39, d	1.38, d	1.37, d
13	1.39, d	1.38, d	1.37, d
14	2.66, s	2.55, s	2.54, s
15	2.57, s	2.64, s	2.63, s

(sa: señal singulete ancha, da: señal doble ancha)

#### 4-Metoxi-isocadalenos (**2**)

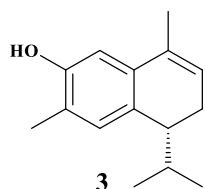


Se pesaron 30 mg de la fracción D y se sometieron a CCFP utilizando como fase móvil *n*-hexano-acetato de etilo (9:1). Después del procedimiento usual se obtuvieron 8 mg del compuesto 4-metoxi-isocadalenos.

Cristales incoloros, Pf 70-71 °C (literatura: 71-72 °C)<sup>13</sup>, *R<sub>f</sub>* 0.7 (*n*-hexano-AcOEt, 95:5). Los datos de RMN <sup>1</sup>H obtenidos para **2** fueron se muestran a continuación, estos fueron comparados con los reportados en la literatura [13] y resultaron consistentes.

RMN <sup>1</sup>H (301 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> 7.90 (H-5 d, 1H), 7.85 (H-8 d, 1H), 7.33 (H-7 dd, 1H), 7.16 (H-2 s, 1H), 3.92 (s), 3.59 (H-11 hept, 1H), 2.65 (H-14 s, 3H), 2.56 (H-15, s 3H), 1.32 (H-12,H-13 d, 6H).

### 7-Hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (**3**)

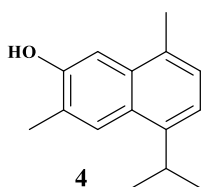


De la fracción H se separaron cristales blancos que precipitaron espontáneamente, estos fueron recrystalizados utilizando una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo. Adicionalmente, se obtuvieron 5 mg de **3**, de la fracción I, mediante CCFP con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (9:1), como fase móvil.

Cristales blancos en forma de agujas, Pf 104-106 °C (literatura: 102-103 °C) [13], *R<sub>f</sub>* 0.52 (*n*-Hex-AcoEt, 8:2).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>,) δ<sub>H</sub> 6.83 (H-5 s, 1H), 6.73 (H-8 s, 1H), 5.64 (H-2 m 1H), 2.4 – 2.25 (H-3a, H3b m, 2H), 2.24 – 2.2 (H-4 m 1H), 2.18 (H-15 s, 3H), 1.93 (H-14 s, 3H), 1.78 (H-11 hept d, *J* = 6.7, 8.0 Hz 1H), 0.86 (H-13 d, 3H), 0.78 (H-12, d, 3H). Estos datos son consistentes con los reportados previamente [13].

### 7-Hidroxi-cadaleno (**4**)

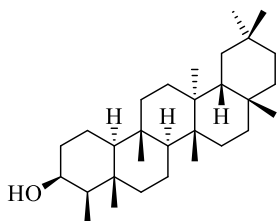


De la fracción I precipitó una mezcla de cristales y polvo blanco. La mezcla se separó utilizando *n*-hexano frio (4 °C) como disolvente del polvo blanco, los cristales (**5**) resultaron muy poco solubles en *n*-hexano. Las aguas madres se dejaron cristalizar obteniendo cristales amarillentos finos que fueron recrystalizados de *n*-hexano-acetato de etilo para obtener cristales transparentes de **4**. El resto de la fracción se sometió a CCFP con *n*-hexano-acetato de etilo (9:1) como fase móvil, para obtener la mayor cantidad de **3**, **4** y **5**

Datos de compuesto **4**. Pf 116-117 °C (literatura: 116-117) [16] *Rf* 0.475 (*n*-Hex-AcOEt, 8:2)

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 7.90 (H-5 s 1H), 7.26 (H-8 s, 1H), 7.20 (H-2 d, 1H), 7.14 (H-3, d, 1H), 4.96 (H-O- s 1H), 3.67 (H-11 hept, 1H), 2.56 (H-14 s, 3H), 2.47 (H-15 s, 3H), 1.37 (H-12, H-13 d, 6H). Estos datos corresponden a los informados previamente [13].

3β-Friedelanol (**5**)

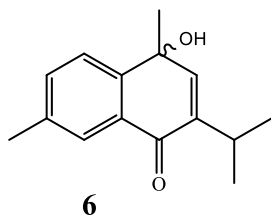


Se obtuvieron cristales que precipitaron espontáneamente en la fracción I, los cuales se recrystalizaron de cloroformo-hexano.

Sólido cristalino insoluble en hexano y acetato de etilo, soluble en cloroformo, Pf 280-282 °C (literatura: 280-283 °C) [57] *Rf* 0.47, (*n*-Hex-AcOEt, 8:2).

RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 11.8 (C-23), 15.9 (C-24), 16.5 (C-1), 17.7 (C-7), 18.4 (C-25), 18.8 (C-27), 20.3 (C-26), 28.3 (C-20), 30.2 (C-17), 30.8 (C-12), 31.9 (C-30), 32.2 (C-28), 32.5 (C-15), 32.9 (C-21), 35.2 (C-29), 35.3 (C-11), 35.5 (C-2), 35.7 (C-19), 36.2 (C-16), 37.2 (C-5), 37.9 (C-9), 38.5 (C-13), 39.4 (C-22), 39.8 (C-14), 41.8 (C-6), 42.9 (C-18), 49.3 (C-4), 53.3 (C-8), 61.5 (C-10), 72.9 (C-3). Los datos de RMN corresponden con los reportados anteriormente [57].

1-Hidroxi-1(4H)-isocadalen-4-ona (**6**)



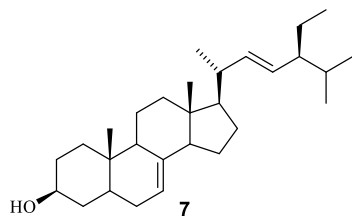
30 mg de la fracción L se sometieron a CCFP utilizando como fase móvil una mezcla de diclorometano-acetato de etilo (99:1), la sustancia se extrajo de la sílice con una mezcla de hexano-AceOEt. Se obtuvieron 4.5 mg de **6**.

Aceite amarillo. *R<sub>f</sub>* 0.4 (*n*-Hex-AcOEt, 8:2). Los datos espectroscópicos de RMN se cotejaron con los ya reportados y se encontraron coincidentes [12,20].

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> 7.91 (H-5 s, 1H), 7.65 (H-8 d, 1H), 7.42 (H-7 dd, 1H), 6.70 (H-2 s, 1H), 3.11 (H-11 hept 1H), 2.41 (H-15 s, 1H), 1.61 (H-14 s, 1H), 1.13 (H-12,H-13 dd, 6H).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 21.2 (C-15), 21.9 (C-12, C-13), 26.5 (C-11), 31.0 (C-14), 68.2 (C-1), 126.1 (C-8), 127.1 (C-5), 129.7 (C-10), 133.8 (C-7), 138.1 (C-6), 143.3 (C-3), 144.3 (C-9), 145.4 (C-2), 184.4 (C-4).

α-Espinasterol (**7**)



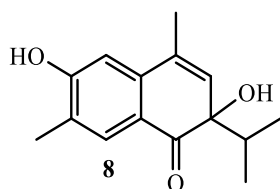
De la fracción M se obtuvo un sólido blanco que fue recrystalizado de hexano-acetato de etilo. Se obtuvo una cantidad adicional de la fracción N.

Cristales incoloros. Pf 169-170 °C (literatura: 172-174 °C) [15], *R<sub>f</sub>* 0.37 (*n*-Hex-AcOEt, 8:2). Se comparó directamente, por CCF con una muestra auténtica.



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.19-5.12 m (señales superpuestas 2H, H-7 y H-22 [ $J = 15.1$  y 8 Hz]), 5.02 dd (1H, H-23  $J = 15.1$  y 8 Hz), 3.59 m (1H, H-3), 1.03 d (3H, H-21  $J = 6.7$  Hz), 0.85 d (3H, H-26  $J = 6.7$  Hz), 0.82 d (3H, H-27  $J = 7$  Hz), 0.8 s (3H, H-19), 0.55 s (3H, H-18). Estos datos se compararon con los reportados en estudios previos [15, 58].

### 3,7-Dihidroxi-3(4H)-isocadalen-4-ona (**8**)

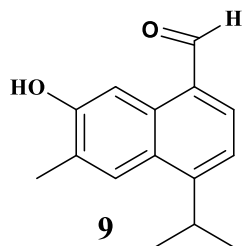


La fracción P (490 mg) fue sometida a cromatografía en columna (CC). Como fase estacionaria se utilizó gel de sílice en una relación 1:100. La fase móvil consistió en *n*-hexano al inicio y fue modificada gradualmente añadiendo acetato de etilo. Se obtuvieron 160 fracciones de 50 mL, estas fueron agrupadas de acuerdo a su perfil cromatográfico en 20 nuevas fracciones (1-20). La fracción 12 (25 mg) fue sometida a CCFP con *n*-hexano-acetato de etilo (8:2) como fase móvil. Se utilizó una mezcla de acetona- metanol para extraer la sustancia del gel de sílice, y después de la evaporación de esta se obtuvieron 2.1 mg de **8**.

Cristales incoloros. Pf 199-200 °C (literatura: 198-200 °C) [16],  $R_f$  0.34 (*n*-Hex-AcoEt, 75:25).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.70 (H-5 s, 1H), 6.79 (H-8 s, 1H), 5.96 (H-2 s, 1H), 2.22 (H-15 s, 3H), 2.14 (H-14 s, 3H), 2.10 – 1.96 (H-11, hept, 1H), 0.96 (H-12 d,  $J = 7$  Hz 3H), 0.76 (H-13 d,  $J = 7$  Hz 3H). Estos datos fueron consistentes con los ya reportados [16].

### 7-Hidroxi-14-cadalenal (**9**)



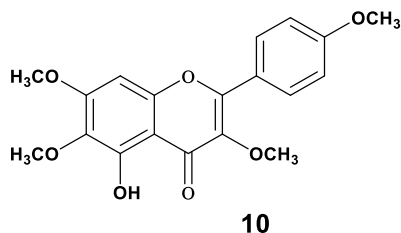
La fracción R y S se unieron (720 mg), este residuo se sometió a CC con gel de sílice (1:100) utilizando hexano-acetato de etilo como fase móvil, se obtuvieron 148 fracciones de 75 mL, que se agruparon en 5 nuevas fracciones (1-5). La fracción 1 (R-1) registró un peso de 22 mg, esta fue sometida a CCFP utilizando el sistema hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (60:35:05) y se obtuvieron 2.5 mg de **9**, utilizando una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo.

Polvo amarillento. Pf 150-151 °C (literatura: 153-155 °C) [20], *R<sub>f</sub>* 0.5 (*n*-Hex-AcOEt, 8:2)

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> 10.18 (H-14 s, 1H), 8.93 (H-8 s, 1H), 7.97 (H-5 s, 1H), 7.85 (H-2 d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.41 (H-3 d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.78 (H-11 hept, *J* = 7 Hz, 1H), 2.48 (H-15 d, *J* = 1.0 Hz, 3H), 1.42 (H-12, H-13 d, *J* = 7 Hz, 6H).

RMN <sup>13</sup>C (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 17.1 (C-15), 23.5 (C-12 y C-13), 29.4 (C-11), 107.9 (C-8), 118.9 (C-3), 125.5 (C-5), 127.2 (C-1), 127.5 (C-10), 128.0 (C-6), 131.5 (C-9), 138.7 (C-2), 153.2 (C-4), 156.1 (C-7), 194.5 (C-14). Los datos se compararon con los reportados anteriormente [20].

### 5-Hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona (**10**)



A partir de la cromatografía del residuo R (descripción anterior), se obtuvo la fracción 3 (R-3), la cual pesó 67 mg y se sometió a CC utilizando *n*-hexano-acetato de etilo como fase

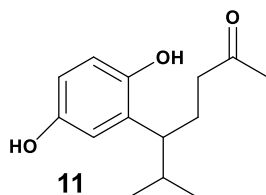
móvil y gel de sílice como fase estacionaria, se obtuvieron 110 fracciones de 75 mL, las cuales se agruparon en 10 subgrupos (1-10). La fracción 3 (15 mg) se sometió a CCFP utilizando como fase móvil  $\text{CHCl}_3$ -acetona (92:8). Se utilizó una mezcla de AcOEt y *n*-hexano para extraer de la sílice 2.8 mg de **10**

Polvo amarillo. Pf 159-160 °C (literatura: 159-160 °C) [60], *Rf* 0.5 (*n*-Hex-AcOEt, 6:4). La sustancia fue identificada a partir de la comparación de los datos obtenidos de RMN con los informados en la literatura [59,60], los datos de **10** se presentan enseguida.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  8.08 (H-2, H-6 dd,  $J = 9.1, 2.1$  Hz, 2H), 7.03 (H-3', h-5' dd,  $J = 9.1, 2.1$  Hz, 2H), 6.50 (H-8 s, 1H), 3.96 (H-13 s, 3H), 3.93 (H-14 s, 3H), 3.90 (H-12 s, 3H), 3.87 (H-15 s, 3H).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  55.4 (C-14), 56.3 (C-13), 60.1 (C-12), 60.8 (C-11), 90.3 (C-8), 108.7 (C-10), 114.1 (C-3' y C-5'), 122.8 (C-1), 130.1 (C-2' y C-6'), 132.3 (C-6), 138.7 (C-3), 152.3 (C-5), 152.8 (C-9), 156 (C-7), 161.7 (C-4'), 178.9 (C-4).

(15-*nor*-1,9-*seco*)-6,9-dihidroxi-calamen-1-ona (**11**)



La fracción T (930 mg) se sometió a CC utilizando gel de sílice como fase estacionaria, se reunieron 54 fracciones de 75 mL cada una. Inicialmente, se utilizó *n*-hexano como fase móvil, (fracciones 1-30), posteriormente, para las fracciones 31-54 se cambió la fase móvil, la cual consistió en una mezcla de *n*-hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -acetona (5:4:1). De acuerdo al perfil cromatográfico se reunieron las fracciones 24-29 (230 mg) y se sometieron a una segunda CC utilizando una fase móvil isocrática de *n*-hexano-acetato de etilo (95:5). Se obtuvieron 30 fracciones que se reagruparon en cinco grupos (1-5), la fracción 2 (120 mg) se purificó utilizando una cromatoplaqueta preparativa y una mezcla de *n*-hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (6:3:1), como fase móvil. Mediante este procedimiento se obtuvieron 37 mg de **11**. Después del análisis de esta

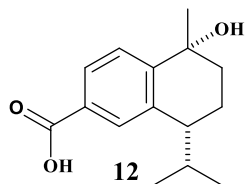
sustancia por RMN se realizó CCF a la muestra analizada y se observó que la sustancia no es estable.

Aceite amarillo. *Rf* 0.4 (*n*-Hex-AcOEt, 1:1),  $[\alpha]_D^{25} +11.11$  (*c* 0.12, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 295 (3.38), 204 (3.97), 269 (2.95) nm; IR  $\nu_{\max}$ . (CHCl<sub>3</sub>) 3603, 3397, 2962, 2931, 2873, 1711, 1658, 1601, 1499 cm<sup>-1</sup> EM (DART) *m/z* 237.14909 [M+H] (calculado para C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>O<sub>3</sub>, 237.14907)

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  6.68 (H-8 dd, 1H), 6.56 (H-7 dd, 1H), 6.56 (H-5 dd, 1H), 2.60 (H-4 ddd, 1H), 2.3 – 2.2 (H-2 m, 2H), 2.09 (H-3 m, 1H), 2.05 (H-14 s, 3H), 1.80 (H-11, 1H), 1.71 (H-3, m, 1H), 1.0 (H-13 d, 3H), 0.74 (H-12 d, 3H).

RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  20.9 (C-12), 21.3 (C-13), 26.9 (C-14), 30.2 (C-3), 33.2 (C-11), 41.8 (C-2), 44.3 (C-4), 113.7 (C-7), 114.7 (C-5), 117.00 (C-8), 131.7(C-10), 148.2 (C-9), 149.8 (C-6), 211.5 (C-1).

Ácido-(1*R*,4*R*)-1-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrocalalen-15-oico (**12**)

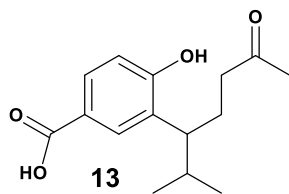


Se obtuvieron cristales amarillos de la fracción U, estos se recrystalizaron de acetona-hexano hasta obtener cristales transparentes (90 mg).

Pf 201-202°C (literatura: 203-205 °C) [16], *Rf* 0.54 (*n*-Hex-AcOEt, 4:6)

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_C$  7.87 (H-5, s, 1H), 7.79 (H-7, dd, 1H), 7.64 (H-8 d, 1H), 2.60 (H-4, ddd, 1H), 2.25 (H-11, hept d, 1H), 2.1 – 2.0 (H-3a m, 1H), 2.0 – 1.8 (H-3b m, 1H), 1.9 – 1.7 (H-2a, H-2b m, 2H), 1.45 (H-14 s, 3H), 1.02 (H-13 d, 3H), 0.80 (H-12 d, 3H). Estos datos se cotejaron con los informados en la literatura [16].

Ácido-(1,9-*seco*)-1-dehidro-9-hidroxi-calamen-15-oico (**13**)



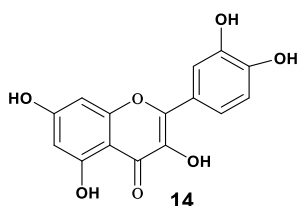
La fracción W (312 mg) se sometió a CC con gel de sílice y mezcla de *n*-hexano- acetato de etilo de polaridad gradual. Se utilizó una relación de 1:200 (muestra: gel de sílice), se obtuvieron 60 fracciones de 20 mL que se reagruparon en 5 nuevas fracciones (1-5), la fracción 3 (51.4 mg). Se sometió a CCFP con mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (88:12) como fase móvil, se obtuvieron 4.7 mg de **13**. La fracción 4 (32.5 mg) se disolvió en acetona y se observó un sólido amarillo insoluble en el disolvente, el cual se separó.

Aceite amarillo, *Rf* 0.28 (*n*-Hex-AcOEt, 4:6);  $[\alpha]_D^{25} +10$  (*c* 0.13, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 257 (3.64), 207 (4.63), 232 (3.34) nm; IR  $\nu_{\max}$ . (CHCl<sub>3</sub>) 3589, 3526, 2962, 2929, 2872, 2666, 1712, 1688, 1605, 1500, 1440, 1411 cm<sup>-1</sup>. EM (DART) *m/z* 265.14400 [M+H] (calculado para C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>O<sub>4</sub>, 265.14398).

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_H$  7.78 (H-5 d, 1H), 7.76 (H-7 dd, 1H), 6.84 (H-8 d, 1H), 2.81 (H-4, ddd, 1H), 2.3 – 2.2 (H-2 m, 2H), 2.16 (H-3a, m, 1H), 2.05 (H-14, s, 3H), 1.95 (H-11, hept d, 1H), 1.84 (H-3b, m, 1H), 1.02 (H-12, d, 3H), 0.78 (H-13, d, 3H).

RMN <sup>13</sup>C (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_C$  21.1 (C-13), 21.5 (C-12), 27.2 (C-3), 29.9 (C-14), 33.7 (C-11), 45.8 (C-4), 42.5 (C-2), 115.6 (C-8), 123.0 (C-6), 130.3 (C-7), 131.4 (C-10), 131.7 (C-5), 161.6 (C-9), 170.7 (C-15), 212.2 (C-1).

#### Quercetina (**14**)



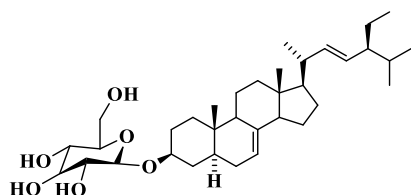
Al agregar acetona a la fracción X (240 mg) se observó al fondo del matraz un polvo insoluble. Este se separó y se comparó por CCF con el sólido obtenido en el subfraccionamiento

de W. Se reconoció el mismo compuesto, el cual se identificó como quercetina (36 mg), al compararlo con una muestra auténtica obtenida en el laboratorio.

Polvo amarillo Rf 0.25 (*n*-Hex-AcoEt, 4:6), punto de fusión superior a 290 °C (literatura: 309-311 °C) [64].

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.77 (H-2' d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.67 (H-6' dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 6.92 (H-5' d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.42 (H-8 d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.22 (H-6 d, *J* = 1.7 Hz, 1H).

#### Glucopiranosido de espinaestero (15)



El compuesto se separó como un sólido amorfo de la fracción Z1, insoluble en acetona y metanol, se comparó con una muestra auténtica de glucopiranosido de espinaestero, se obtuvieron 78 mg.

Sólido blanco. Pf > 270 °C (literatura: 278-280 °C) [58], Rf 0.25 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH, 9:1)

#### 6.5. Peso (mg) de los compuestos 3, 4, 5 y 7 en cada población

Población	Peso de los compuestos [mg]			
	3	4	5	7
A	160	25	40	250
B	1630	25	230	1730

## 7. Resumen y conclusiones

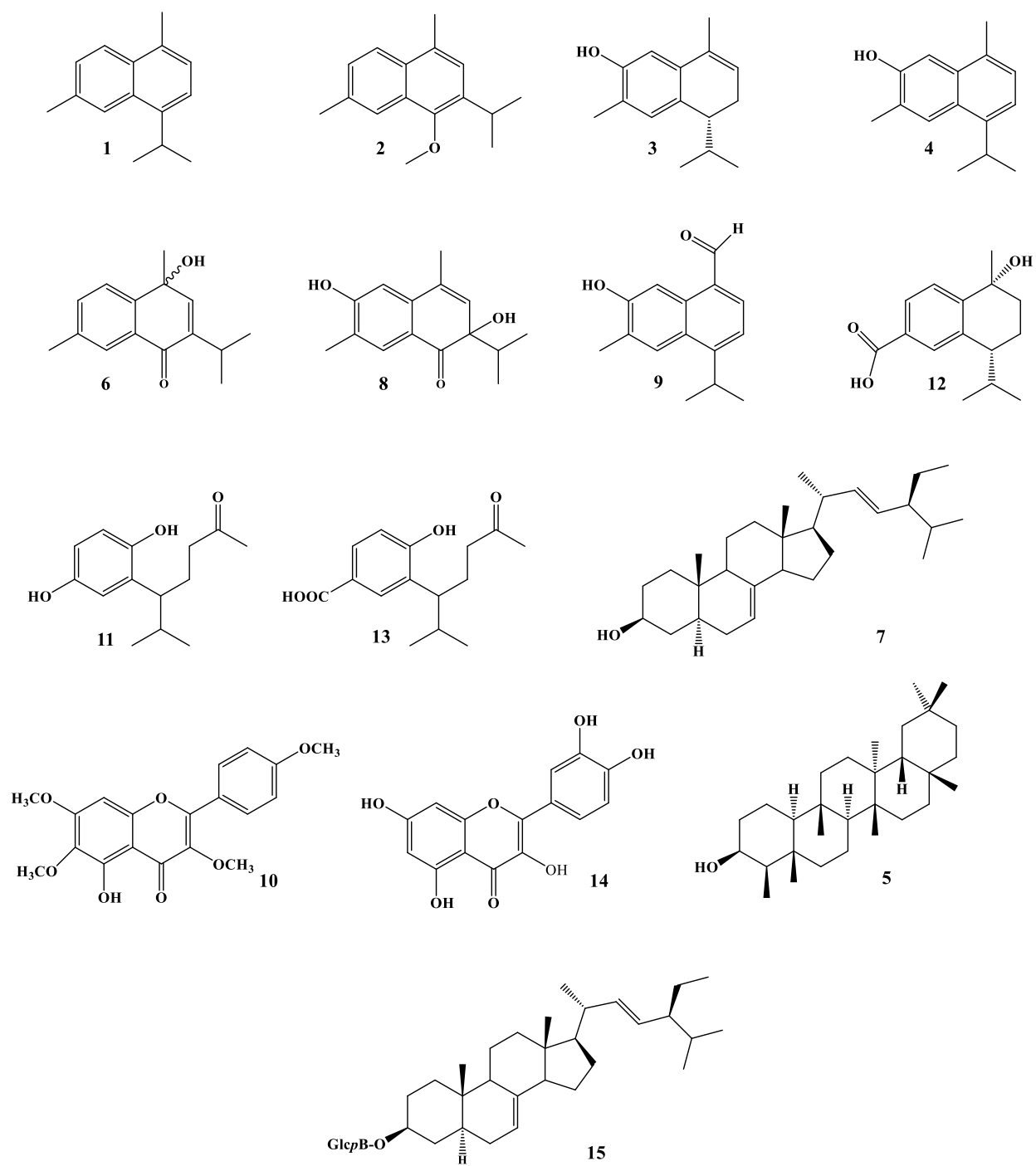
El estudio químico de dos poblaciones de *H. inuloides* permitió la obtención de 15 metabolitos diferentes. Se aislaron dos flavonoides (**10** y **14**), uno de los cuales no había sido reportado previamente en la especie (**10**), un triterpeno (**5**), un fitoesterol (**7**), su glucósido (**15**) y diez sesquiterpenoides (**1-4**, **6**, **8**, **9** y **11-13**). De estos últimos dos resultaron ser compuestos novedosos (**11** y **13**), evidenciando la variedad estructural de los metabolitos presentes en esta especie vegetal.

Los nuevos compuestos presentaron actividad anti-inflamatoria moderada, reafirmando la presencia de compuestos anti-inflamatorios en *H. inuloides*.

Los compuestos novedosos son un *seco*-cadinano y un *nor-seco*-cadinano, este tipo de compuestos no se había reportado en esta especie. Se propone una ruta de biogénesis para **11** y **13** a partir de **12**.

Se observaron mínimas variaciones estructurales y de abundancia relativa de los sesquiterpenos entre las dos poblaciones. Cabe mencionar que ambas crecieron bajo condiciones climáticas y factores geográficos similares y fueron colectadas en la misma temporada.

Se alcanzaron los objetivos propuestos, ya que se generó conocimiento científico referente al contenido metabólico de las dos poblaciones de la especie estudiada y de la actividad biológica de las sustancias novedosas obtenidas.



**Figura 8.** Compuestos aislados de *Heterotheca inuloides*



## 8. Referencias

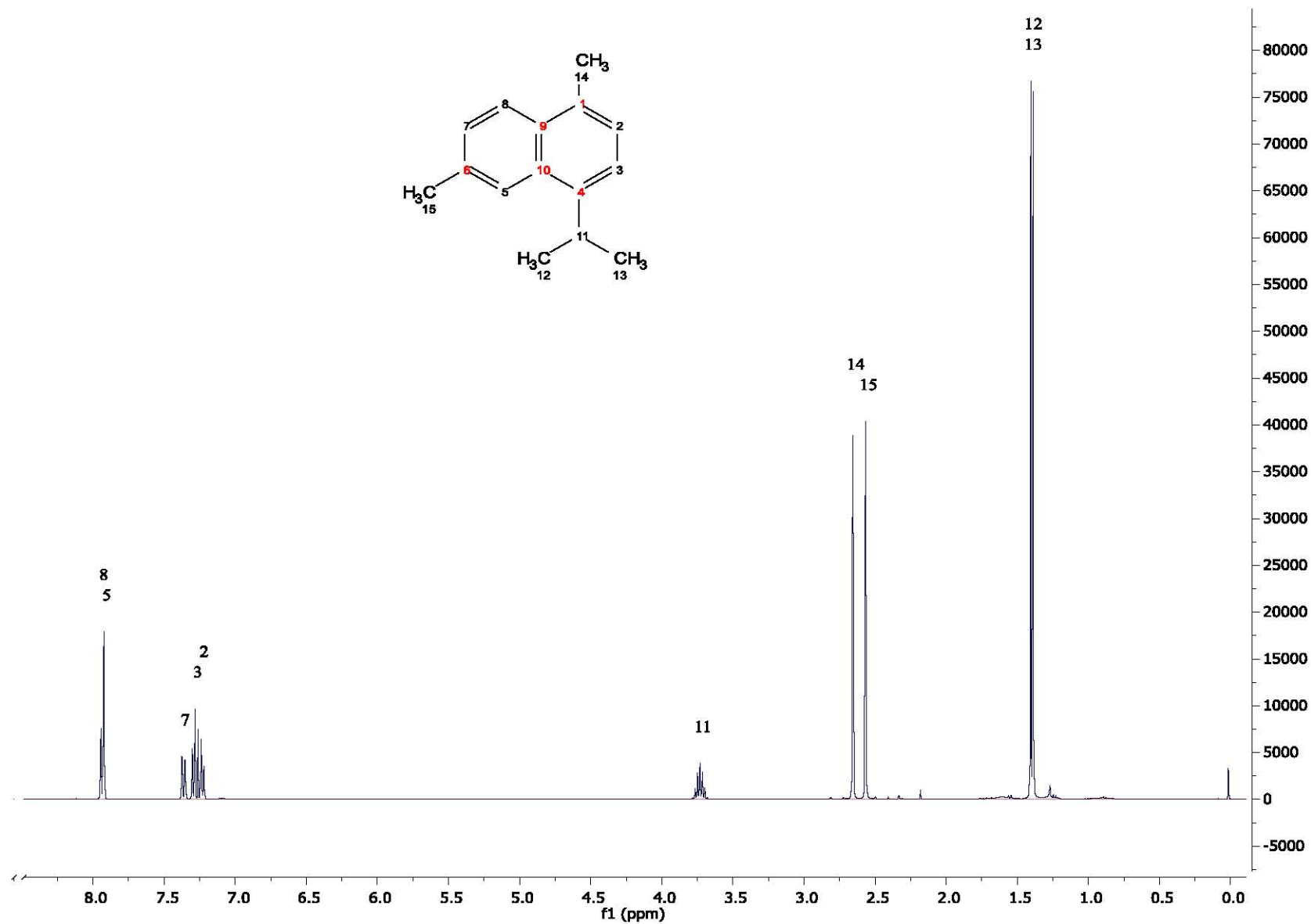
- (1) Cragg, G. M.; Newman, D. J. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2013**, *1830* (6), 3670–3695.
- (2) Brahmachari, G. *Bioactive Natural Products*; Brahmachari, G., Ed.; World Scientific: Singapore, 2012.
- (3) Delgado, G., Romo de Vivar, A. *Temas Selectos de Química de Productos Naturales*. Instituto de Química, UNAM: México, D.F. 2015.
- (4) McChesney, J. D.; Venkataraman, S. K.; Henri, J. T. *Phytochemistry* **2007**, *68* (14), 2015–2022.
- (5) Osbourn, A. E. ., Lanzotti, V. *Plant-derived Natural Products*. Springer: New York, USA, 2009.
- (6) Villaseñor, J. L.; Magaña, P. *Ciencias* **2002**, *abril-junio*, 24.26.
- (7) Heinrich, M.; Robles, M.; West, J. E.; Ortiz de Montellano, B. R.; Rodriguez, E. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1998**, *38*, 539–565.
- (8) Martínez, M. *Las plantas medicinales de México*, 4a ed.; Editorial Botas: Mexico, 1959.
- (9) Monroy-Ortiz, C.; García-Moya, E.; Romero-Manzanares, A.; Sánchez-Quintanar, C.; Luna-Cavazos, M.; Uscanga-Mortera, E.; Flores-Guido, J. S.; Gonzalez-Romero, V. *Ethno-Med* **2013**, *7*, 13–26.
- (10) Linares, E. (Instituto de B.; Bye, R. (Instituto de B. *Caminos y mercados de México*, 1. ed.; Long, J., Attolini Lecón, A., Eds.; Serie Historia general / Instituto de Investigaciones Históricas; Universidad Nacional Autónoma de México : Instituto Nacional de Antropología e Historia: México, D.F, 2010.
- (11) Reyes, B. A. Estudio comparativo sobre las flores del árnica del país y extranjera, Escuela Nacional de Medicina de México, 1886. [Biblioteca Histórica Dr. Nicolás Leon, Facultad de Medicina, UNAM]
- (12) Bohlmann, F.; Zdero, C. *Chem. Ber.* **1976**, *109*, 2021–2025.
- (13) Willuhn, V. G.; Schneider, R.; Matthiesen, U. *Dtsch. Apotheker Zeitung* **1985**, *125* (39), 1941–1944.
- (14) Jerga, C.; Merfort, I.; Willuhn, G. *Planta Med.* **1990**, *56*, 413–415.
- (15) Kubo, I.; Muroi, H.; Kubo, a; Chaudhuri, S. K.; Sanchez, Y.; Ogura, T. *Planta Med.* **1994**, *60* (3), 218–221.
- (16) Delgado, G.; Olivares, M. de S.; Chávez, M. I.; Ramírez-Apan, T.; Linares, E.; Bye, R.; Espinosa-García, F. J. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64* (7), 861–864.
- (17) Kubo, I.; Chaudhuri, S. K.; Kubo, Y.; Sanchez, Y.; Ogura, T.; Saito, T.; Ishikawa, H.;

- Haraguchi, H. *Planta Med.* **1996**, 62 (5), 427–430.
- (18) Kubo, I.; Ishiguro, K.; Chaudhuri, S. K.; Kubo, Y.; Sanchez, Y.; Ogura, T. *Phytochemistry* **1995**, 38 (2), 553–554.
- (19) Secretaría de Salud. *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*, 2a ed. Comision Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos México, D.F. 2013.
- (20) Egas, V.; Toscano, R. A.; Linares, E.; Bye, R.; Espinosa-García, F. J.; Delgado, G. *J. Nat. Prod.* **2015**, 78 (11), 2634–2641.
- (21) Nesom, G. L. *Phytologia* **1990**, 4, 282–294.
- (22) Lara, F.; Márquez, C. *Plantas Medicinales en México. Composición, usos y actividad biológica. Tomo II*; UNAM, Ed.; Talleres Grafico de Cultura: México, D.F, 1996; pp 15–17.
- (23) ::: BIBLIOTECA :::  
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Heterotheca inuloides&id=7120> (consultado el 14 de abril, 2016).
- (24) Argueta, V. A.; Cano, A. L.; Rodarte, M. L. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*; Instituto Nacional Indigenista: México, 1994.
- (25) Alonso-Castro, A. J.; Villarreal, M. L.; Salazar-Olivo, L. a.; Gomez-Sanchez, M.; Dominguez, F.; Garcia-Carranca, A. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, 133 (3), 945–972.
- (26) González-Stuart, A. E. *Not. Sci. Biol.* **2010**, 2 (4), 07.
- (27) Rocha-González, H. I.; Blaisdell-López, E.; Granados-Soto, V.; Navarrete, A. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, 649 (1-3), 154–160.
- (28) Willuhn, G.; Schneider, R. *Arch. der Pharm.* **1987**, 320, 393–396.
- (29) Jerga, C.; Willuhn, G.; Willuhn, G. *Planta Med.* **1990**, 56, 122–123.
- (30) Mijangos, O. F.; Ruiz-Jiménez, J.; Lagunez-Rivera, L.; de Castro, M. D. L. *Phytochem. Anal.* **2011**, 22 (6), 484–491.
- (31) Gené, R. M.; Segura, L.; Adzet, T.; Marin, E.; Iglesias, J. *J. Ethnopharmacol.* **1998**, 60 (2), 157–162.
- (32) Segura, L.; Freixa, B.; Ringbom, T.; Vila, R.; Perera, P.; Adzet, T.; Bohlin, L.; Cañigüeral, S. *Planta Med.* **2000**, 66 (6), 553–555.
- (33) Castillo-Juárez, I.; González, V.; Jaime-Aguilar, H.; Martínez, G.; Linares, E.; Bye, R.; Romero, I. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, 122 (2), 402–405.
- (34) Coballase-Urrutia, E.; Pedraza-Chaverri, J.; Camacho-Carranza, R.; Cárdenas-Rodríguez, N.; Huerta-Gertrudis, B.; Medina-Campos, O. N.; Mendoza-Cruz, M.; Delgado-Lamas,

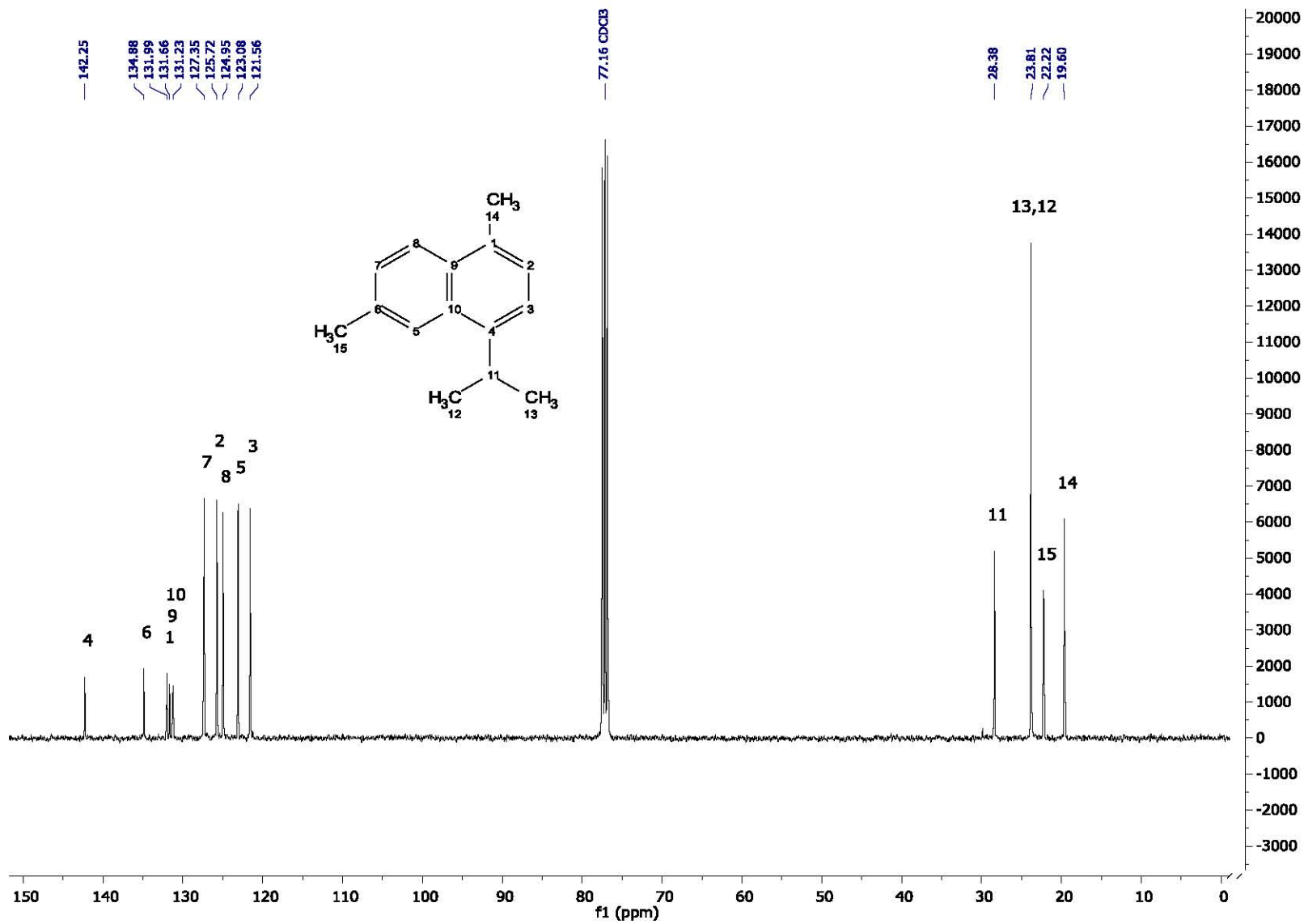
- G.; Espinosa-Aguirre, J. J. *Toxicology* **2010**, 276 (1), 41–48.
- (35) Coballase-Urrutia, E.; Pedraza-Chaverri, J.; Cárdenas-Rodríguez, N.; Huerta-Gertrudis, B.; García-Cruz, M. E.; Ramírez-Morales, A.; Sánchez-González, D. J.; Martínez-Martínez, M. C.; Camacho-Carranza, R.; Espinosa-Aguirre, J. J. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2011**, 63 (4), 363–370.
- (36) Flores-San Martín, D.; Perea-Flores, M. D. J.; Morales-López, J.; Centeno-Alvarez, M. M.; Pérez-Ishiwara, G.; Pérez-Hernández, N.; Pérez-Hernández, E. *Nat. Prod. Res.* **2013**, No. November, 37–41.
- (37) Kubo, I.; Kinst-Hori, I.; Ishiguro, K.; Chaudhuri, S. K.; Sanchez, Y.; Ogura, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 1443–1446.
- (38) Haraguchi, H.; Ishikawa, H.; Sanchez, Y.; Ogura, T.; Kubo, Y.; Kubo, I. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5 (5), 865–871.
- (39) Kubo, I.; Kinst-Hori, I.; Chaudhuri, S. K.; Kubo, Y.; Sánchez, Y.; Ogura, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8 (7), 1749–1755.
- (40) Rocha-González, H. I.; Ramírez-Aguilar, M.; Granados-Soto, V.; Reyes-García, J. G.; Torres-López, J. E.; Huerta-Cruz, J. C.; Navarrete, A. *BMC Complement. Altern. Med.* **2014**, 14, 129.
- (41) Rodríguez-Chávez, J. L.; Rufino-González, Y.; Ponce-Macotela, M.; Delgado, G. *Parasitology* **2015**, 142, 576–584.
- (42) Rodríguez-Chávez, J. L.; Coballase-Urrutia, E.; Nieto-Camacho, A.; Delgado-Lamas, G. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, 2015, 1–11.
- (43) Rodríguez-Chávez, J. L.; Coballase-Urrutia, E.; Sicilia-Argumedo, G.; Ramírez-Apan, T.; Delgado, G. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, 175, 256–265.
- (44) Rodríguez-Chávez, J. L.; Gómez-Vidales, V.; Coballase-Urrutia, E.; Ortega-Cuéllar, D.; Delgado-Lamas, G. *RSC Adv.* **2016**, 6 (15), 12032–12041.
- (45) Juárez-Flores, B. I.; Jasso-Pineda, Y.; Aguirre-Rivera, J. R.; Jasso-Pineda, I. *Polibotánica* **2010**, No. 30, 123–135.
- (46) Maldonado-Lopez, Y.; Linares-Mazari, E.; Bye, R.; Espinosa-Garcia, F. J.; Delgado, G. *Econ. Bot.* **2008**, 62 (2), 161–170.
- (47) Taarit, M. B. .; Msaada, M. .; Hosni, K. .; Marzouk, B. *Acta Physiol Plant* **2011**, 33, 153–162.
- (48) Jordán, M. J.; Martínez, R. M.; Cases, M. A.; Sotomayor, J. A. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51 (18), 5420–5427.
- (49) Hartmann, T. *Phytochemistry* **2007**, 68 (22-24), 2831–2846.
- (50) Chen, F.; Tholl, D.; Bohlmann, J.; Pichersky, E. *Plant J.* **2011**, 66 (1), 212–229.

- (51) Wink, M. *Medicines* **2015**, 2 (3), 251–286.
- (52) Espinosa-García, F. J.; Delgado, G. *Rev. Latinoamer. Quím.* **1998**, 26 (1), 13–29.
- (53) Roberts, S. C. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3 (7), 387–395.
- (54) Wink, M. *Phytochemistry* **2003**, 64 (1), 3–19.
- (55) Gershenzon, J.; Dudareva, N. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3 (7), 408–414.
- (56) Kumari, S.; Priya, P.; Misra, G.; Yadav, G. *Structural and biochemical perspectives in plant isoprenoid biosynthesis*; 2013; Vol. 12.
- (57) Van Minh, C.; Van Kiem, P.; Thanh Houg, H.; Tien Dat, N.; Hoai Nam, N.; Joon Lee, J.; Ho Kim, Y. *J. Chem.* **2005**, 43 (2), 235–239.
- (58) Zhang, L.-J.; Yang, X.-D.; Xu, L.-Z.; Zou, Z.-M.; Yang, S.-L. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2005**, 7 (4), 649–653.
- (59) Southwick, L.; Mabry, T. J.; Averett, J.; Powell, A. M. *Phytochem. reports* **1972**, 11 (1972), 2351.
- (60) Çitoğlu, G. S.; Sever, B.; Antus, S.; Baitz-Gács, E.; Altanlar, N. *Pharm. Biol.* **2005**, 42 (8), 659–663.
- (61) Bordoloi, M.; Shukla, V. S.; Nath, S. C.; Sharma, R. P. *Phytochemistry* **1989**, 28 (8), 2007–2037.
- (62) Inegi. *Compendio de información geográfica municipal 2010 Ozumba México*; 2010.
- (63) Ozumba, H. A. de. *Dirección General de Protección Civil*. Gobierno del Estado de México: Toluca Estado de México 2001.
- (64) Dutta, N. K.; Mazumdar, K.; Mishra, U. S.; Dastidar, S. G.; Park, J.-H. *Pharm. Chem. J.* **2007**, 41 (5), 269–271.

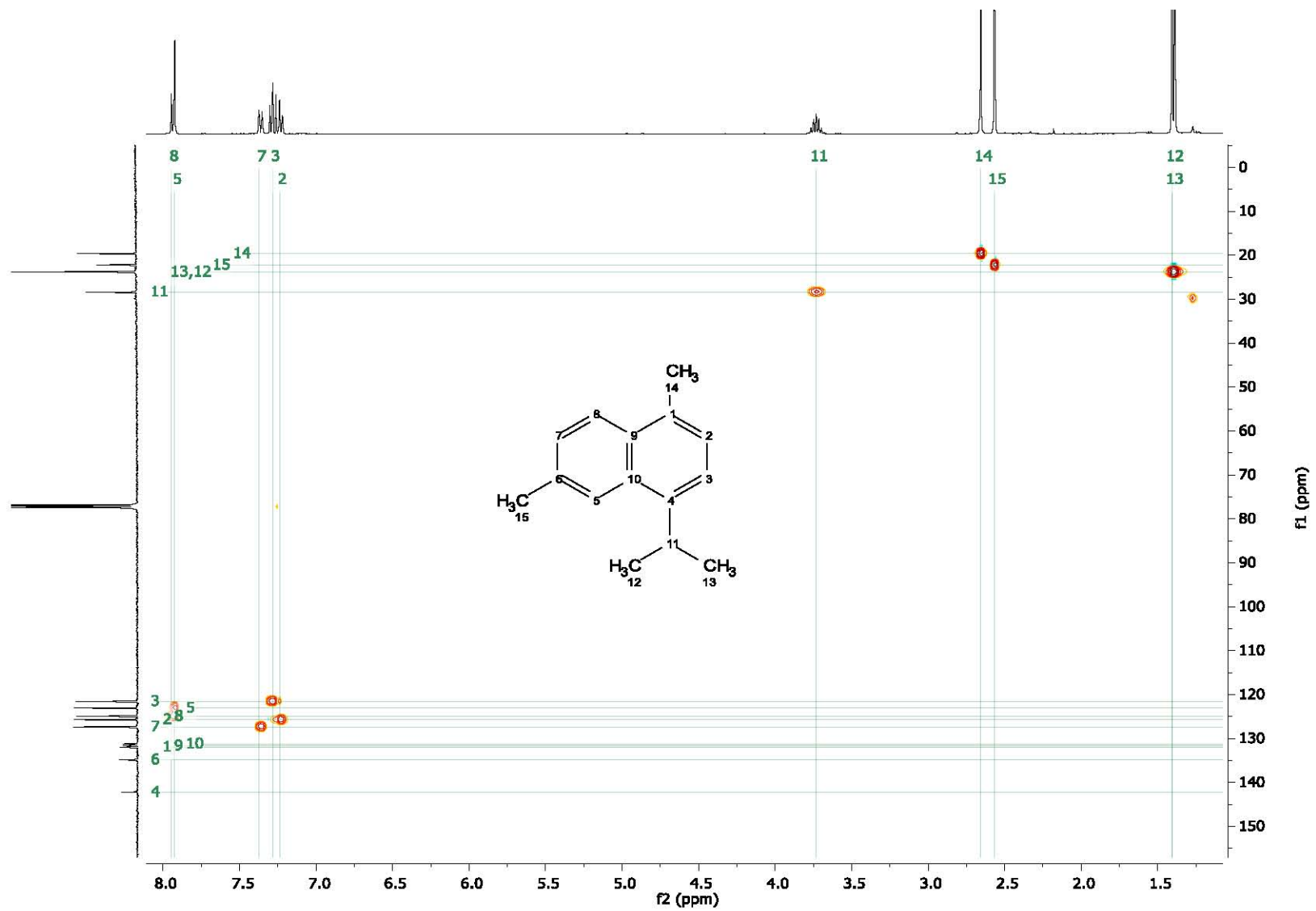
## 9. Espectros



**Espectro 1. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de cadaleno (1)**

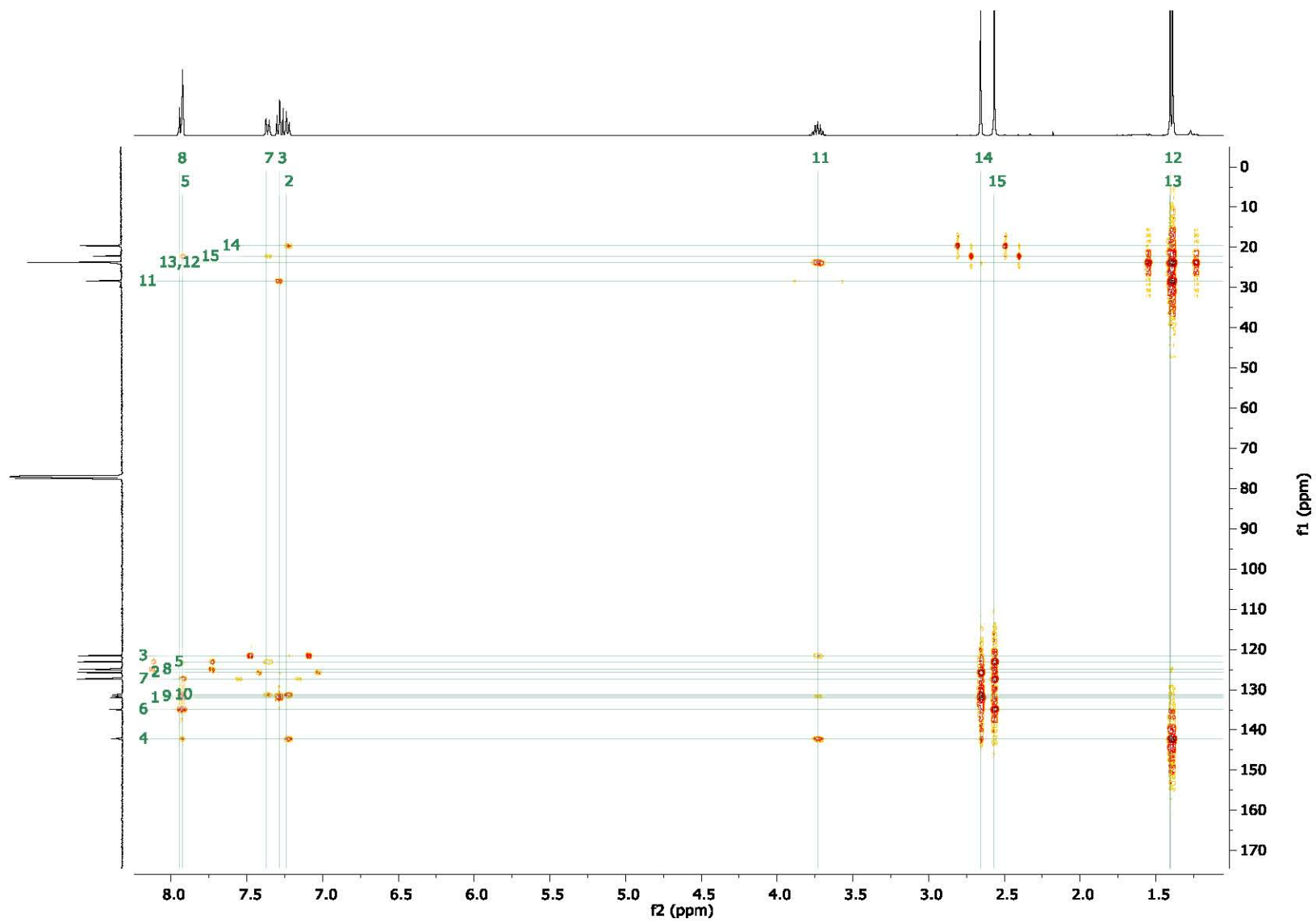


**Espectro 2.** RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) de cadaleno (1)

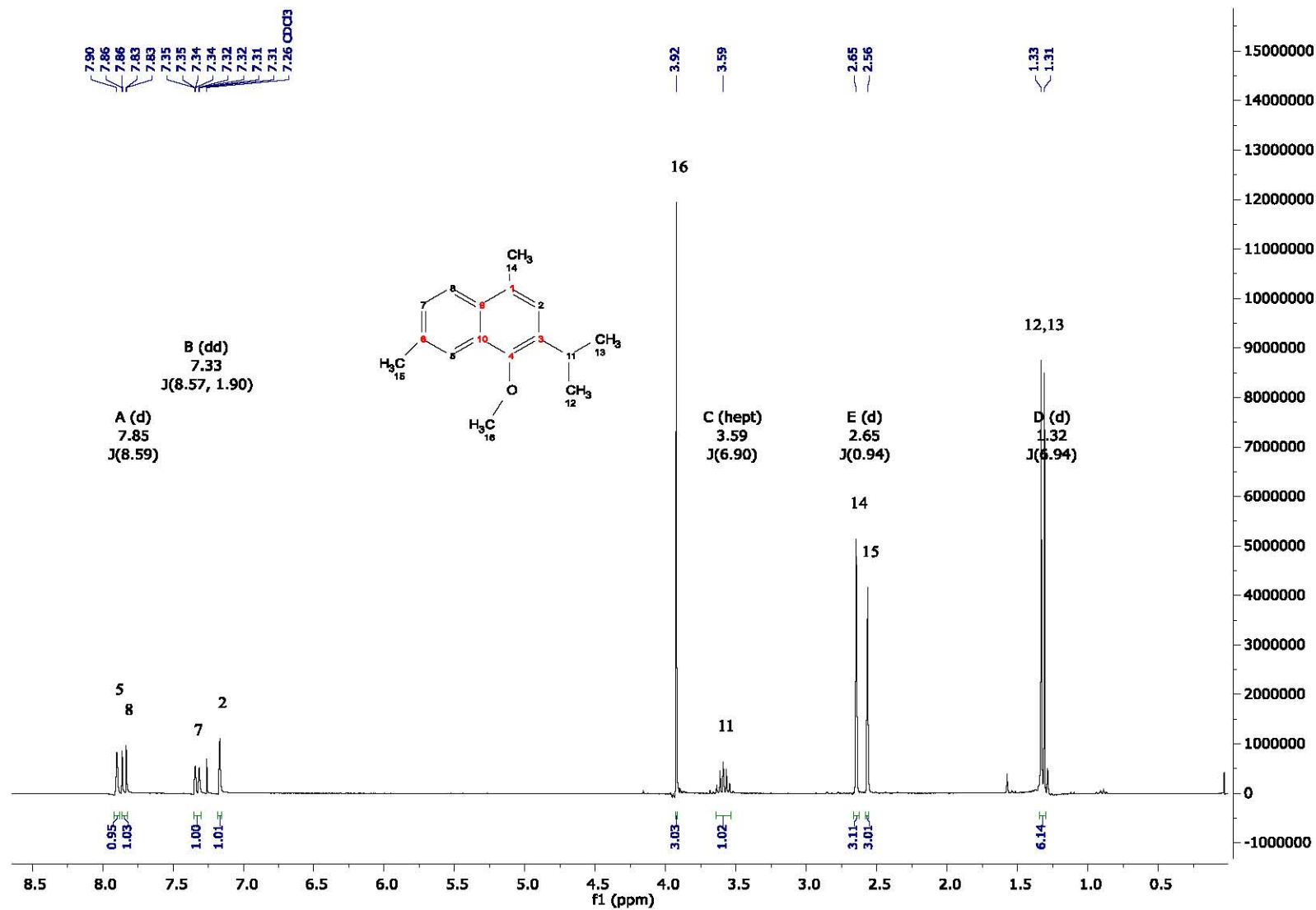


**Espectro 3.** HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de cadaleno (**1**)

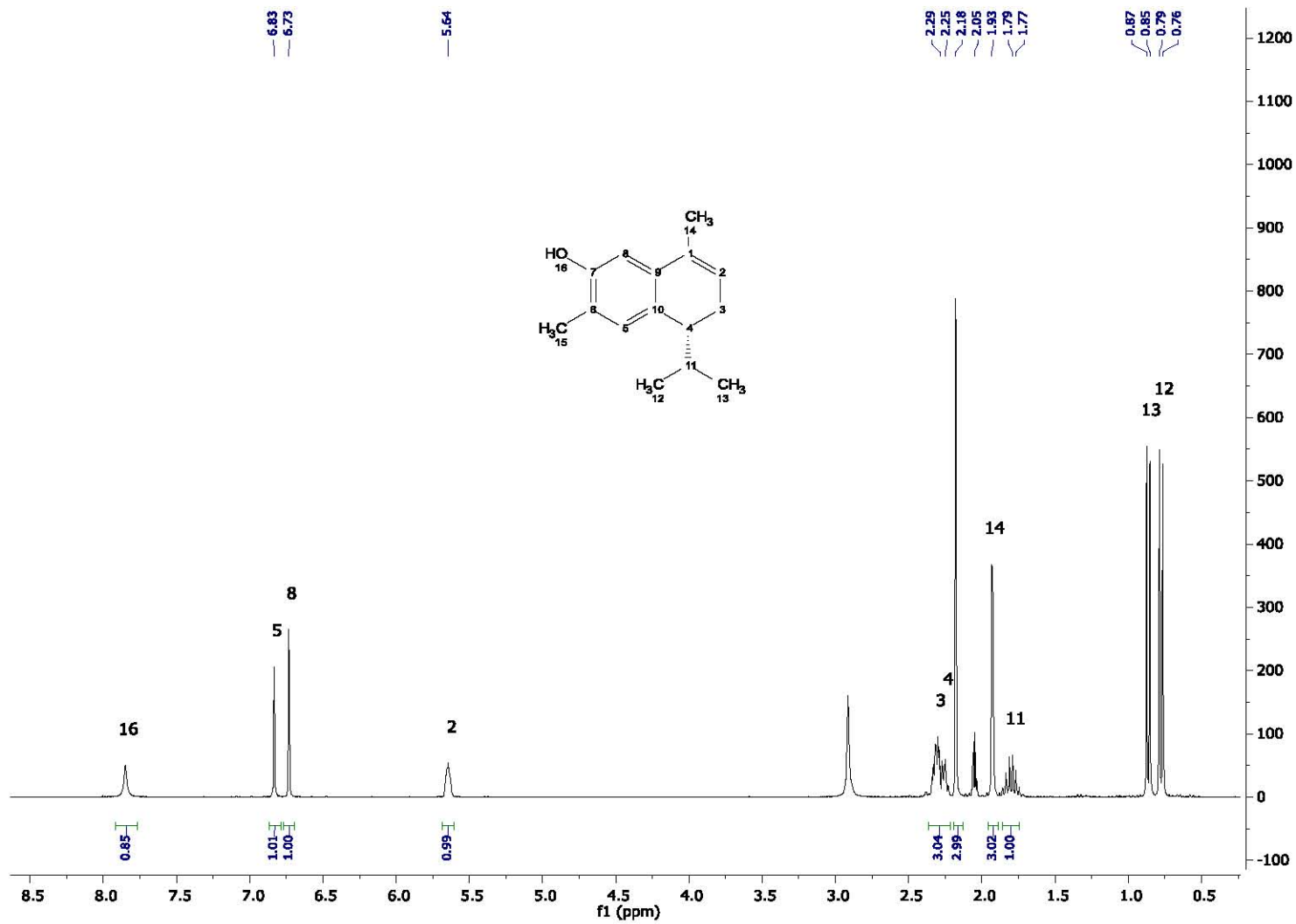




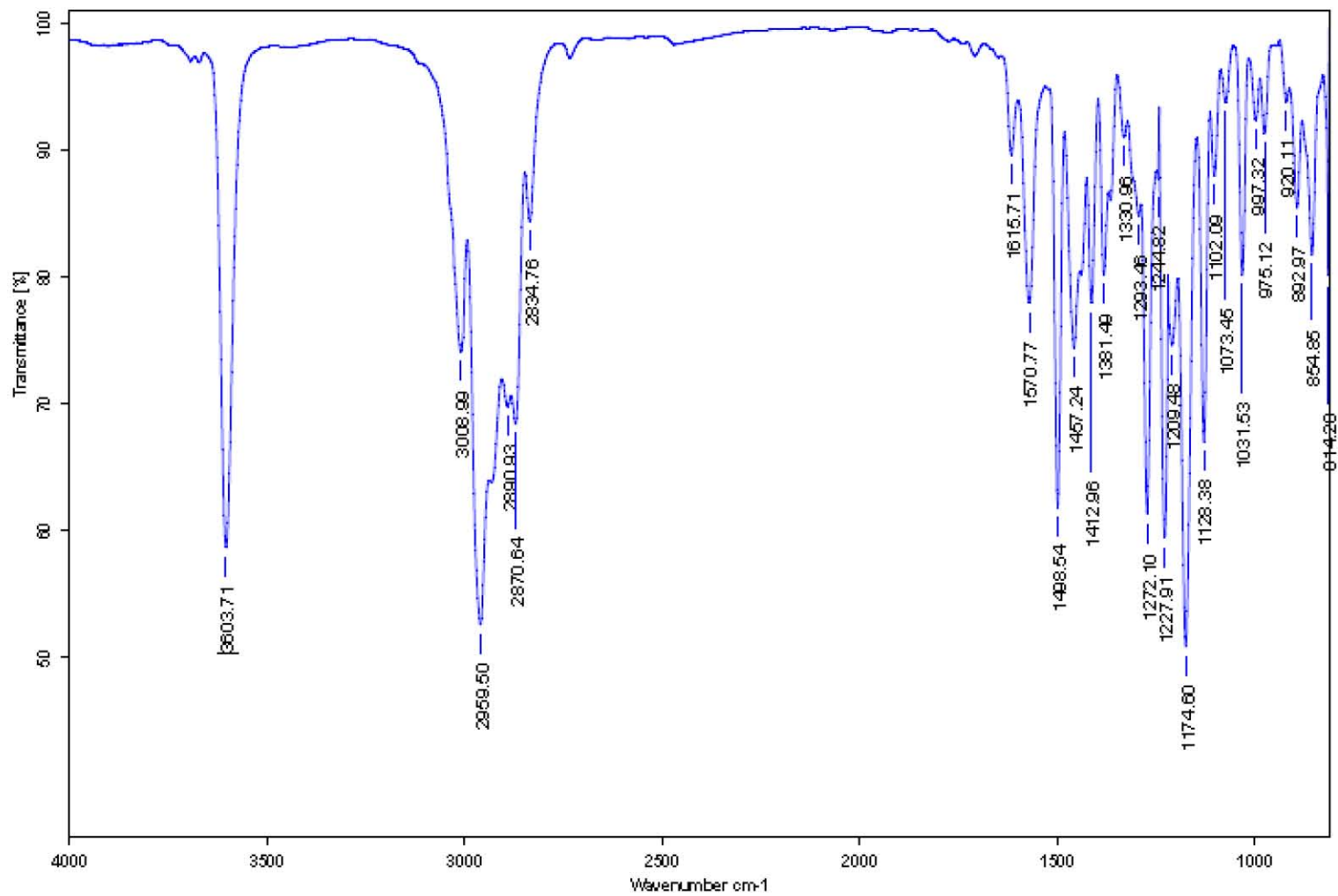
**Espectro 4.** HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de cadaleno (**1**)



**Espectro 5.** RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de 4-metoxi-isocadalenol (2)



Espectro 6. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>, 300MHz) de (4*R*)-7-hidroxi-3,4.dihidrocadaleño (3)



C:\Infrarrojo\AIR-LEP-IQUI-006\_16\DrGDelgado\243.0

Dr.G.Delgado

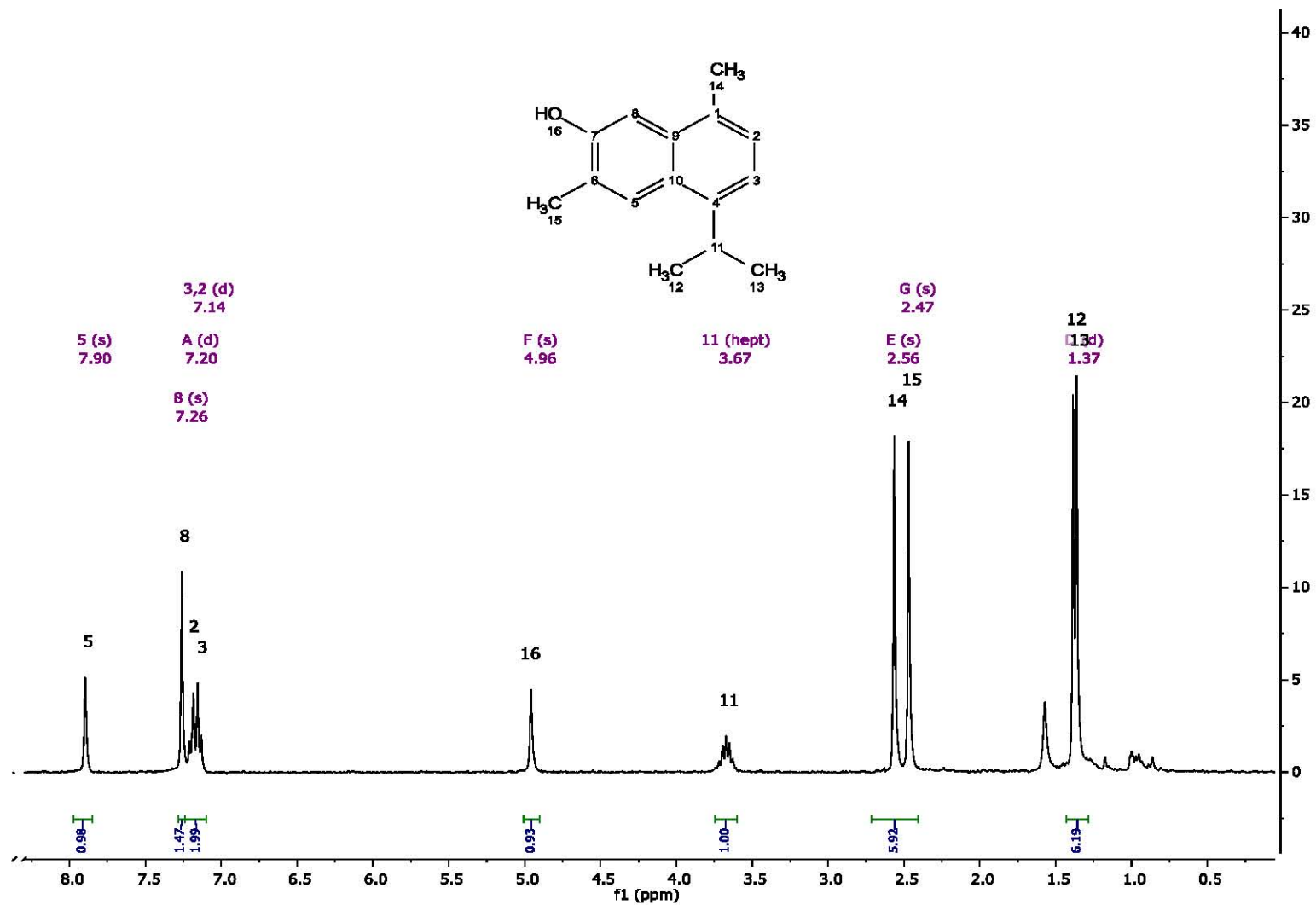
7OH-D

Sol/CHCl<sub>3</sub>

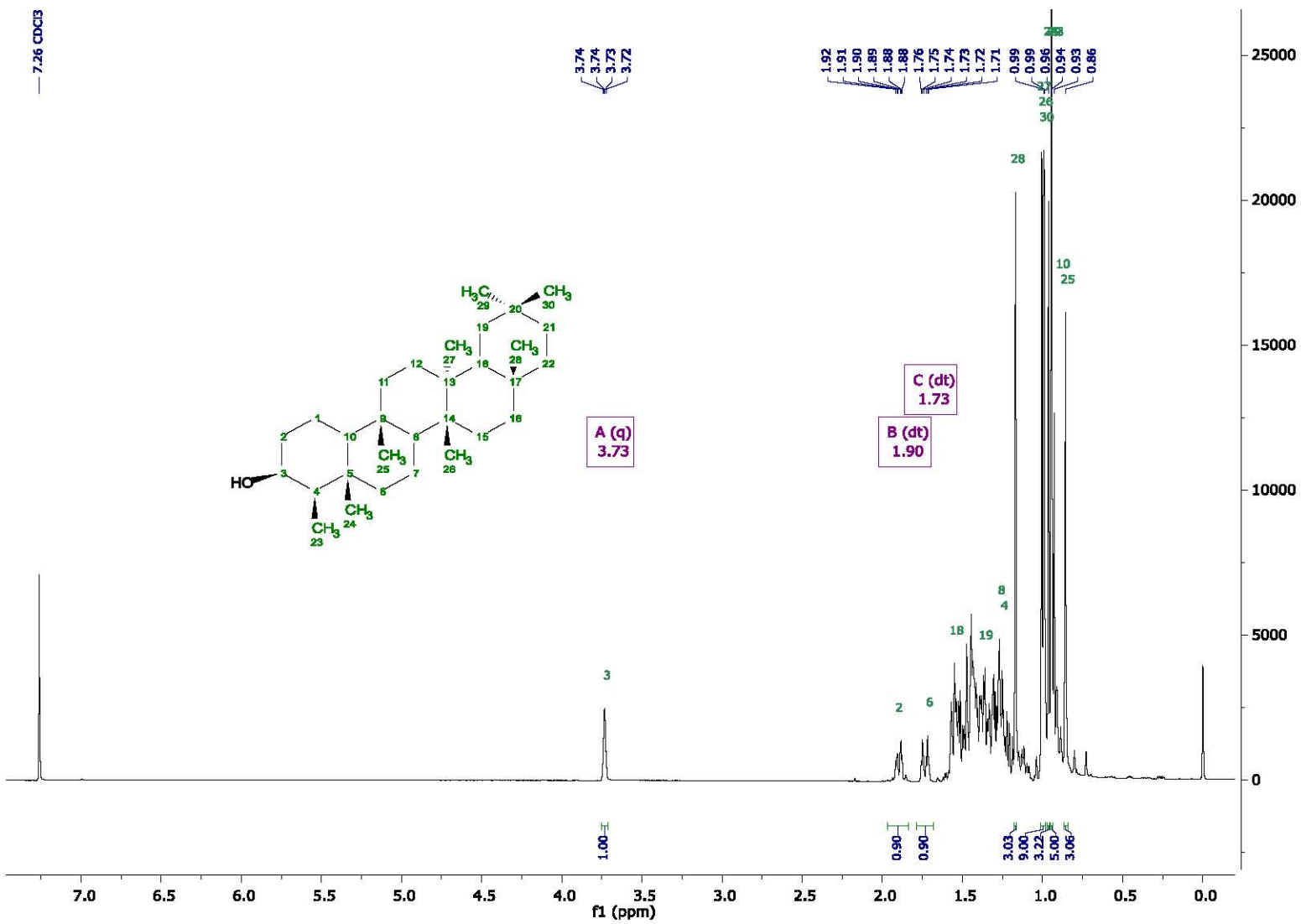
RPM

10/02/2016

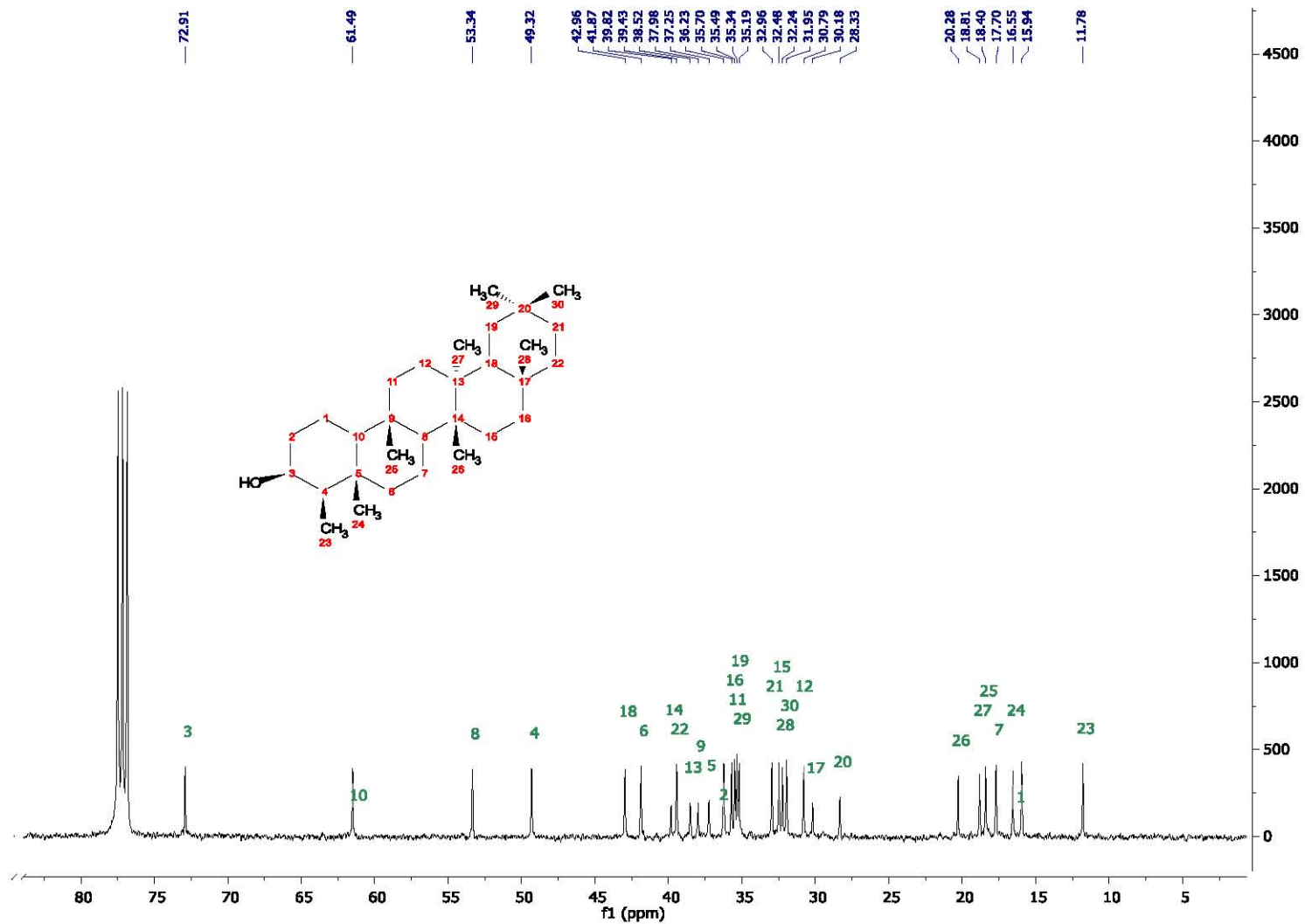
Espectro 7. IR (CHCl<sub>3</sub>) de (4R)-7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol (3)



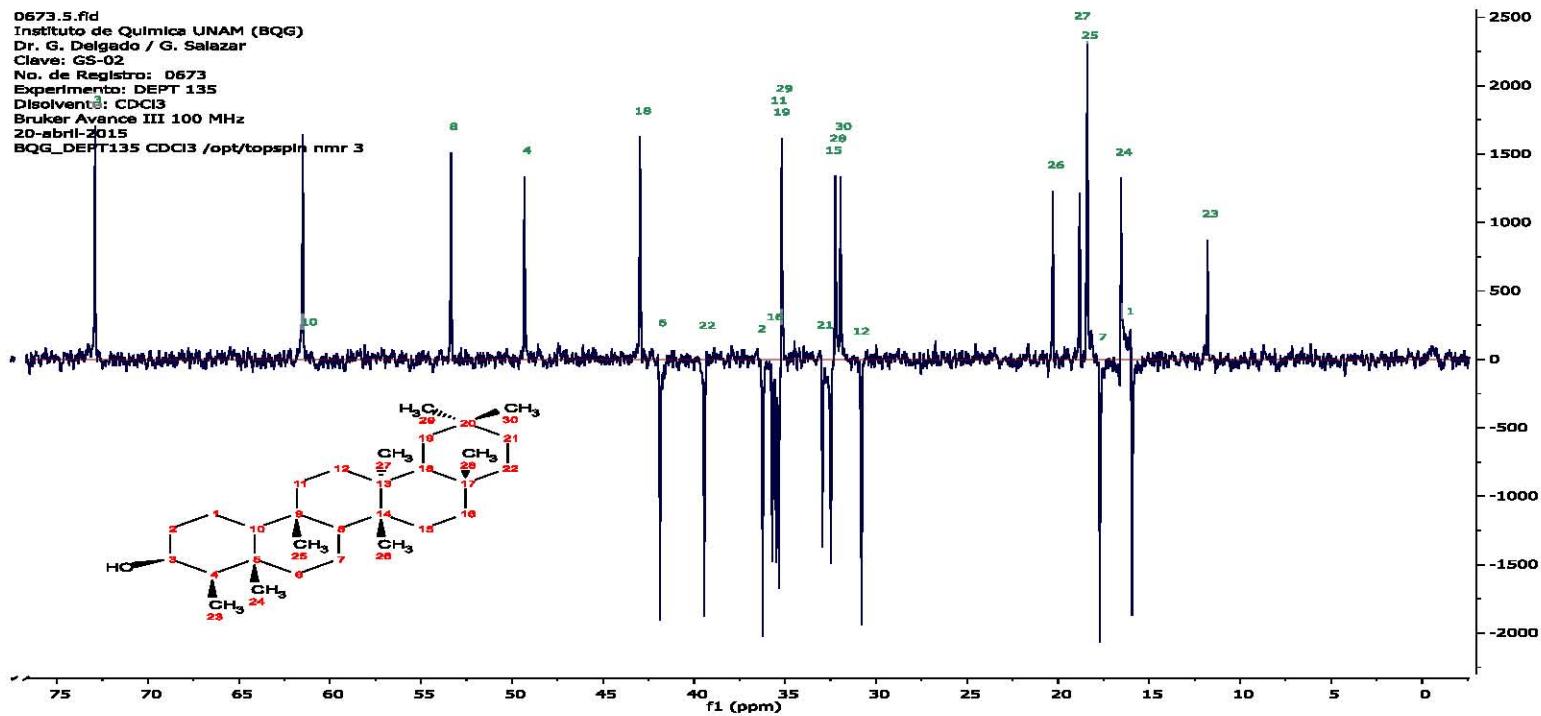
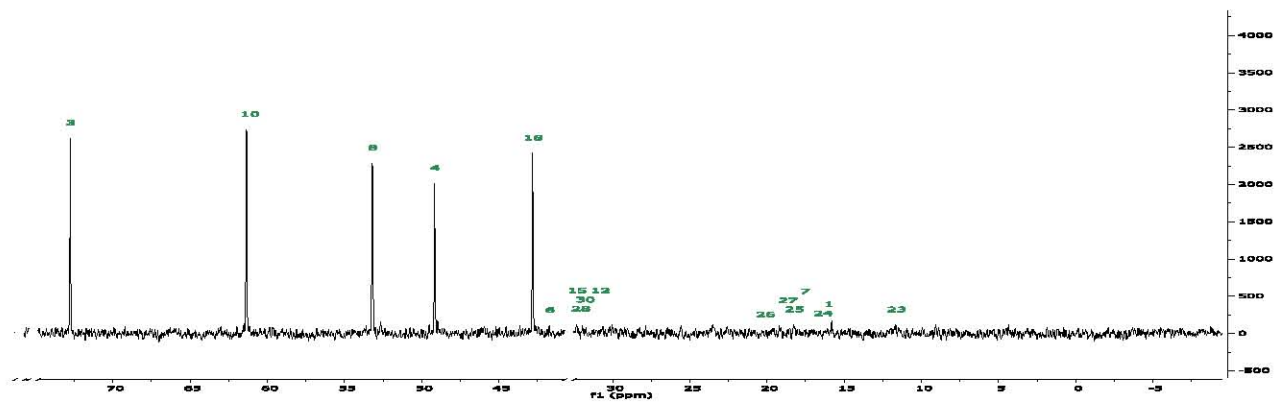
Espectro 8. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de 7-hidroxicadalenol (4)



Espectro 9. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de 3β-friedelanol (5)

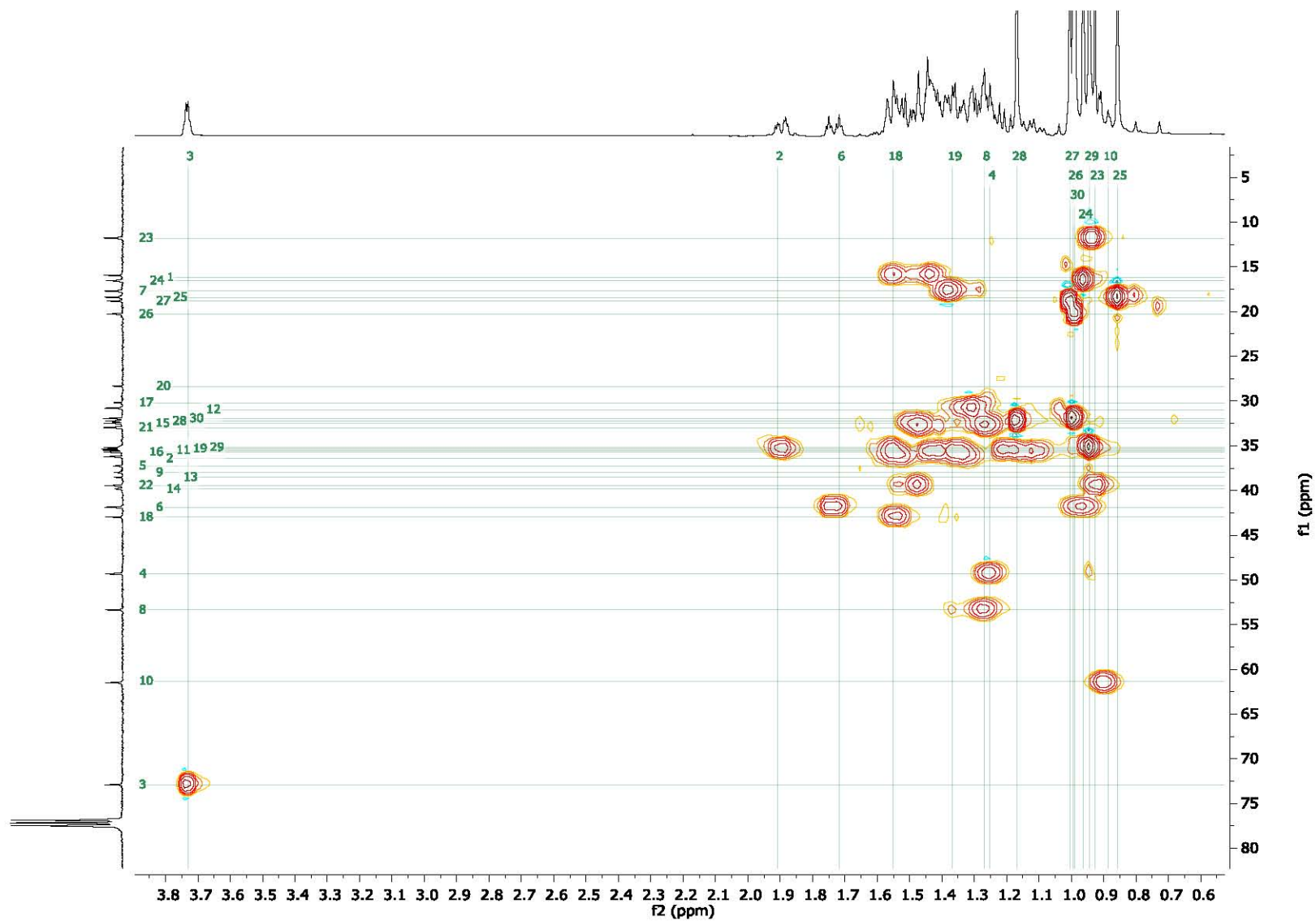


Espectro 10. RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 101 MHz) de 3β-friedelanol (5)

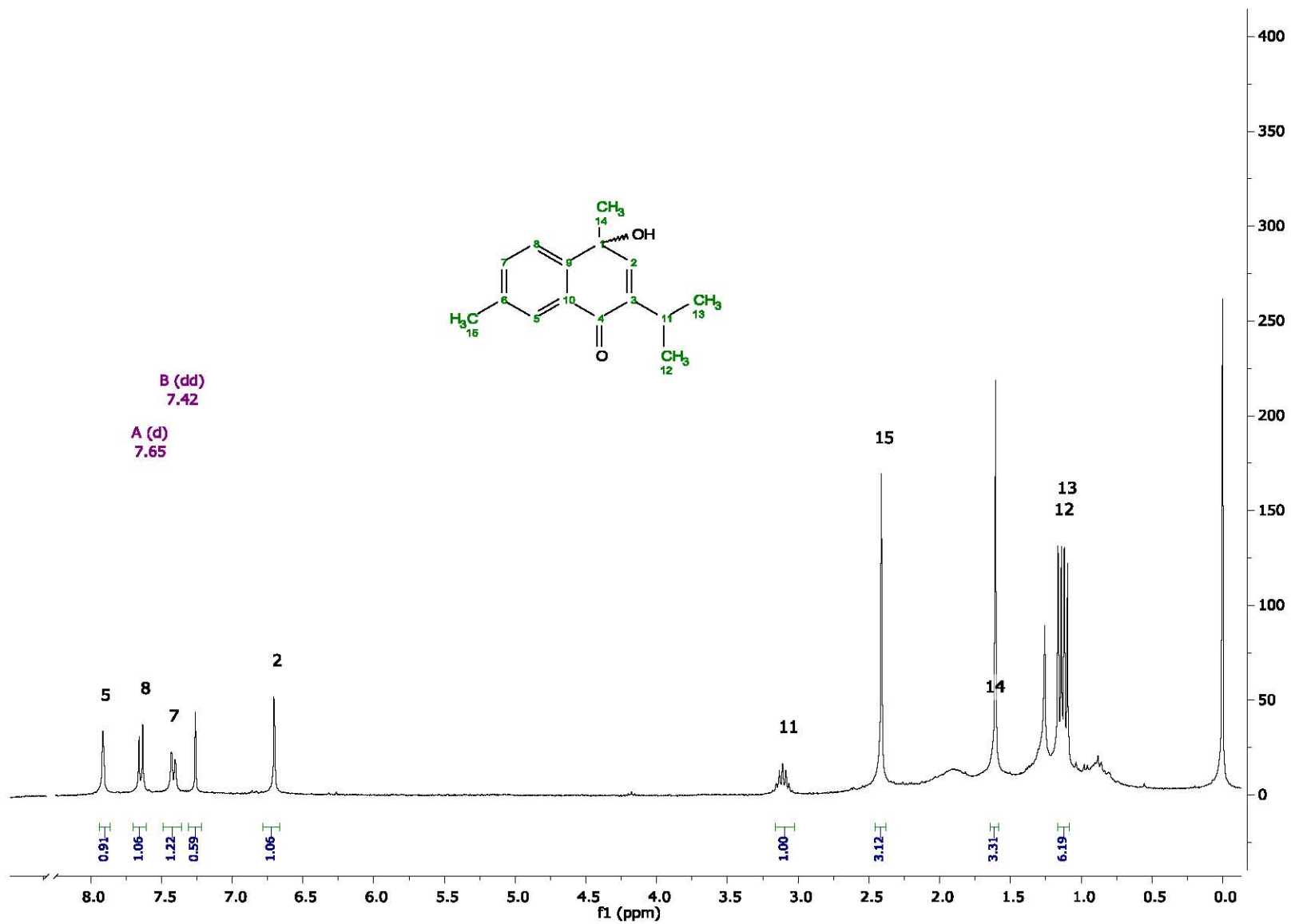


**Espectro 11.** DEPT 90 y 135 (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) de 3β-friedelanol (5)

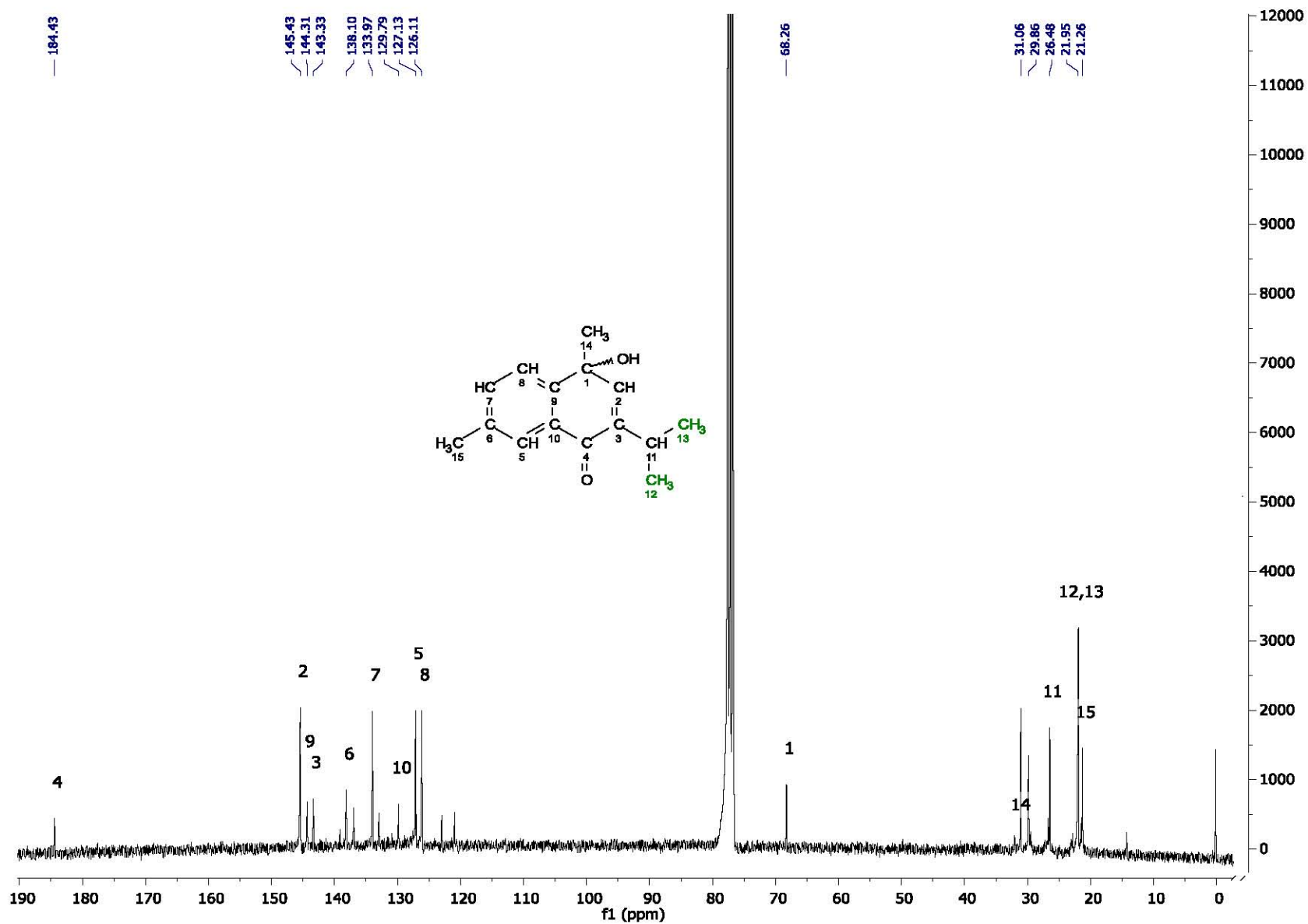




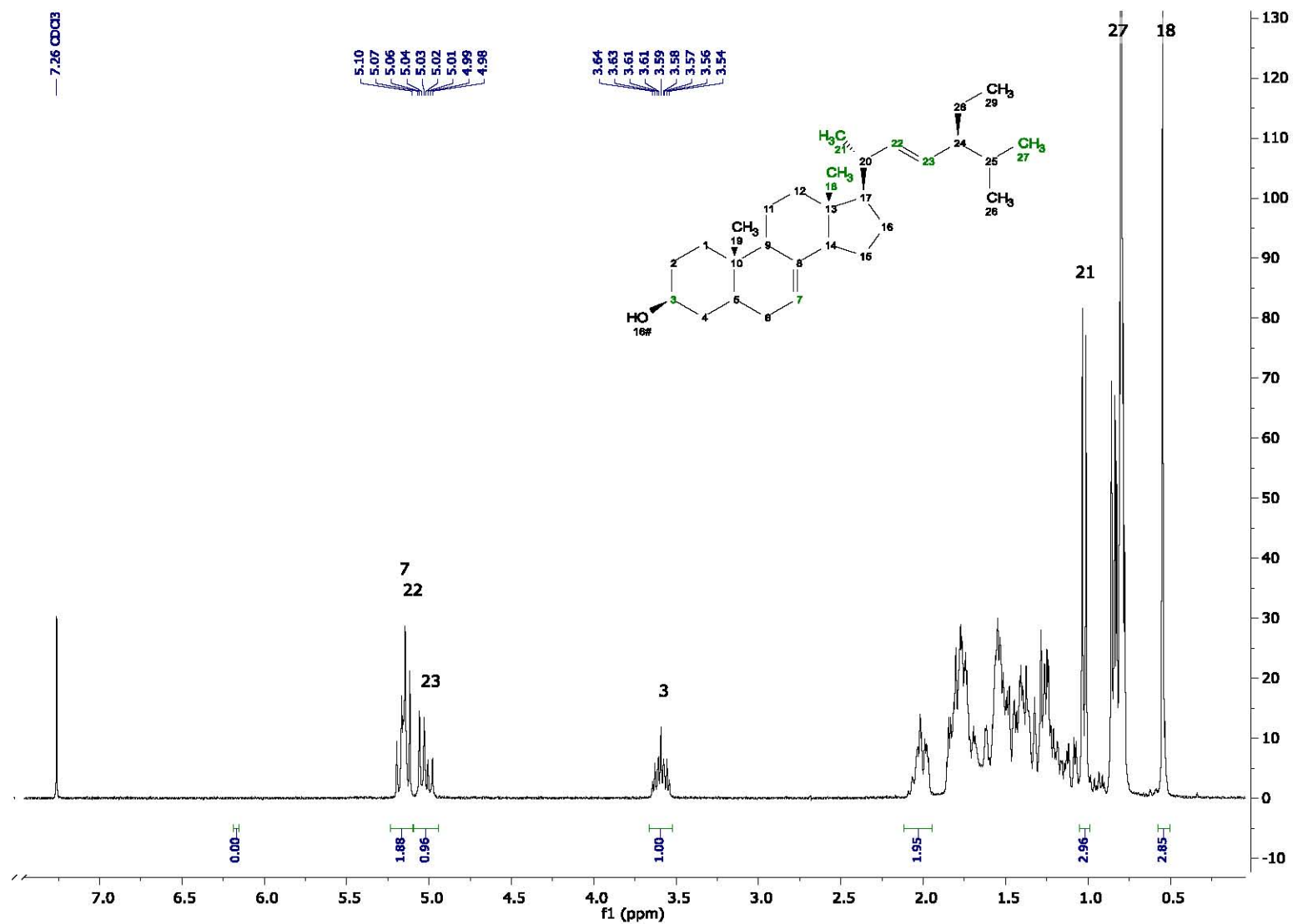
**Espectro 12.** HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de 3β-friedelanol (5)



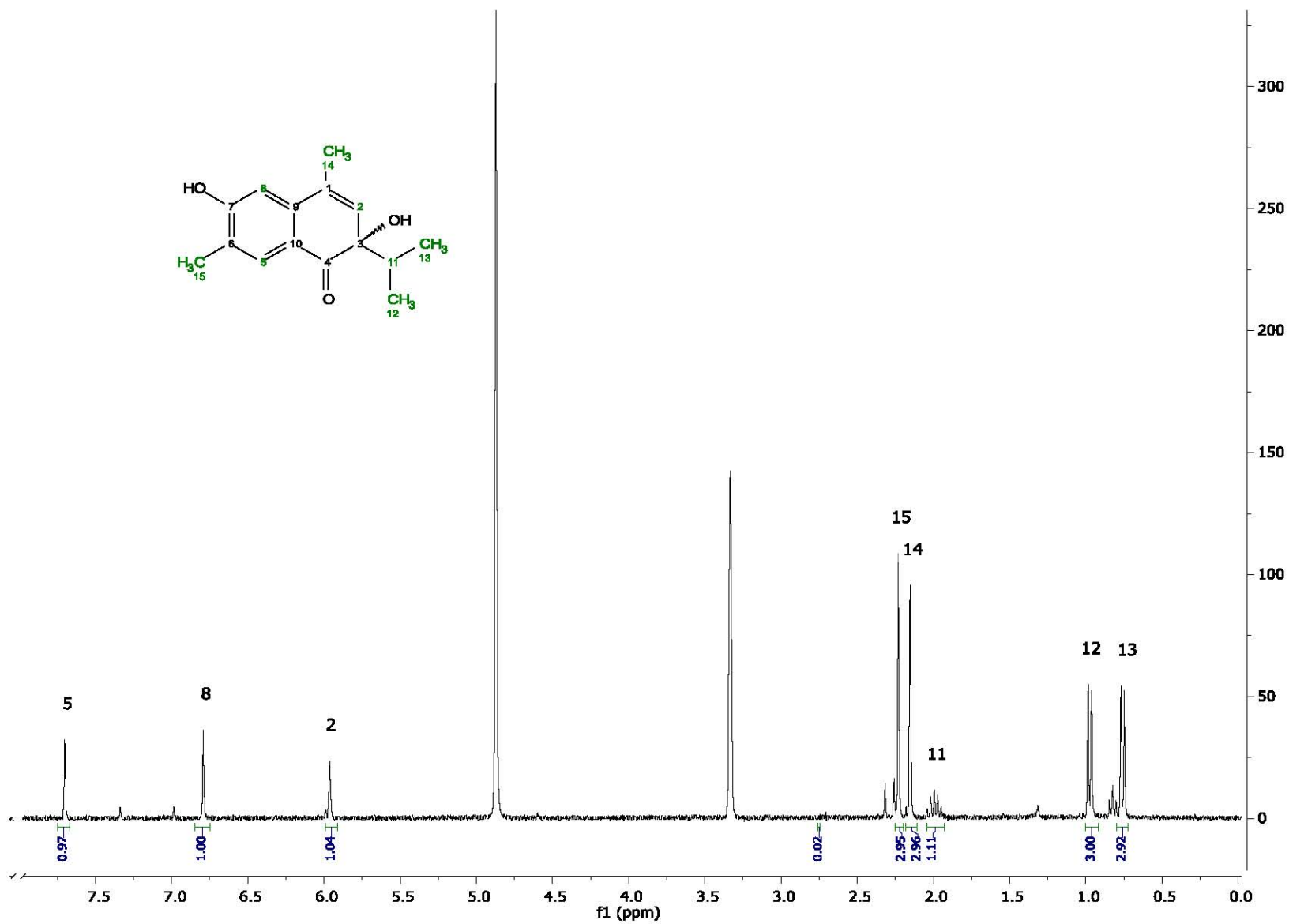
**Espectro 13.** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de 1-hidroxi-1(4H)-isocadalen-4-ona (6)



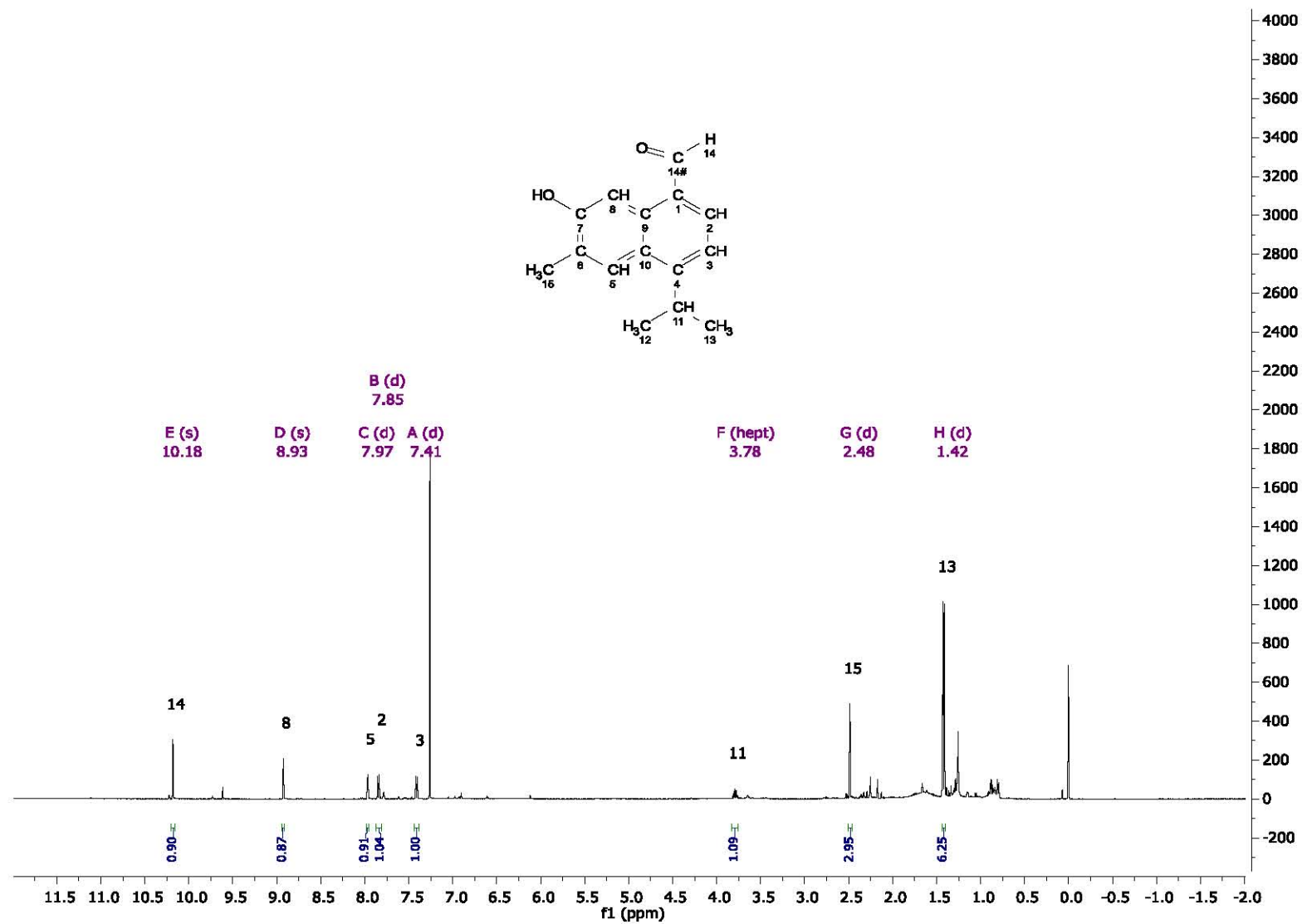
Espectro 14. RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) de 1-hidroxi-1(4H)-isocadalen-4-ona (6)



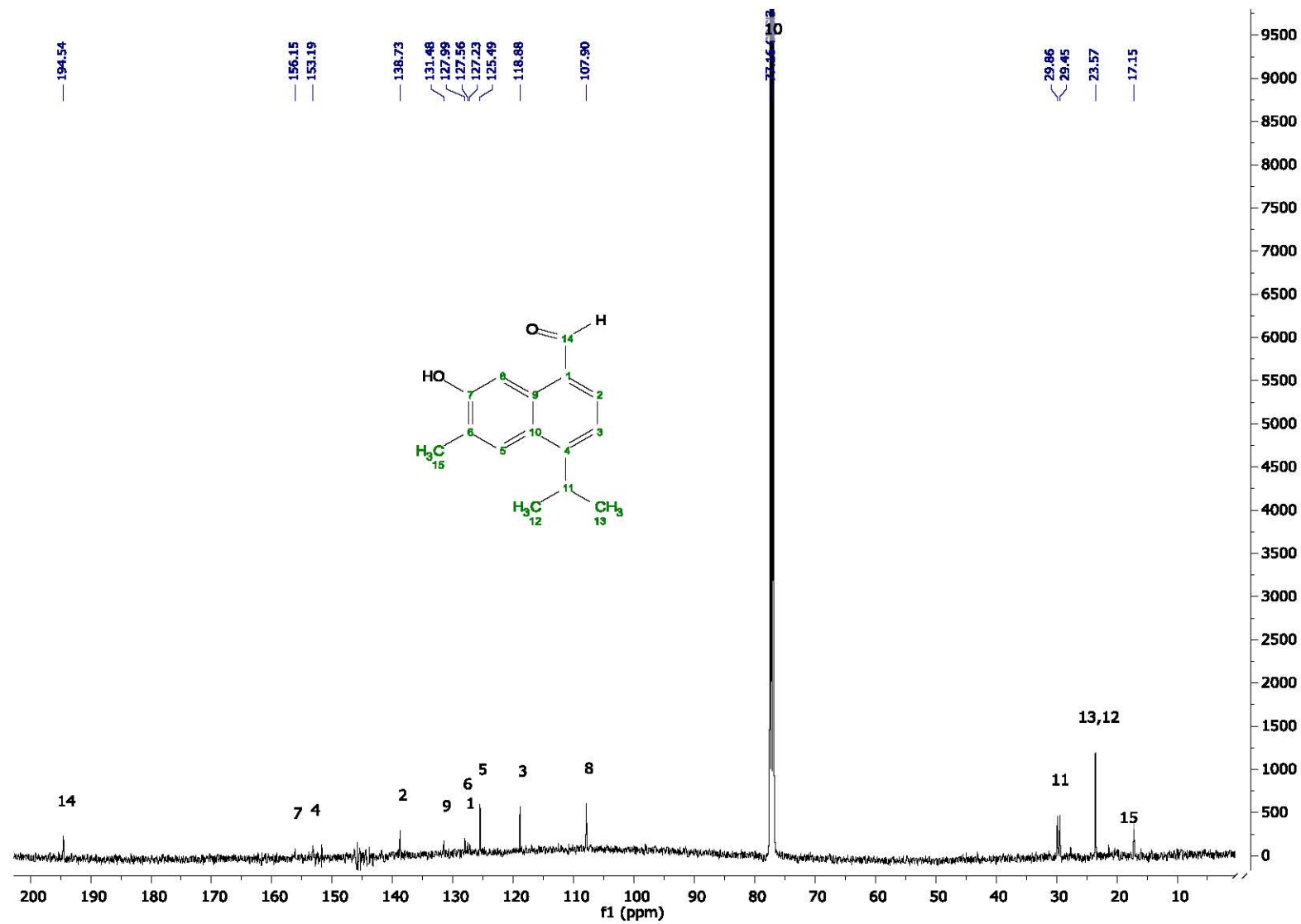
Espectro 15. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de  $\alpha$ -spinasterol (7)



Espectro 16. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) de 3,7-dihidroxi-3(4H)-isocadalen-4-ona (8)

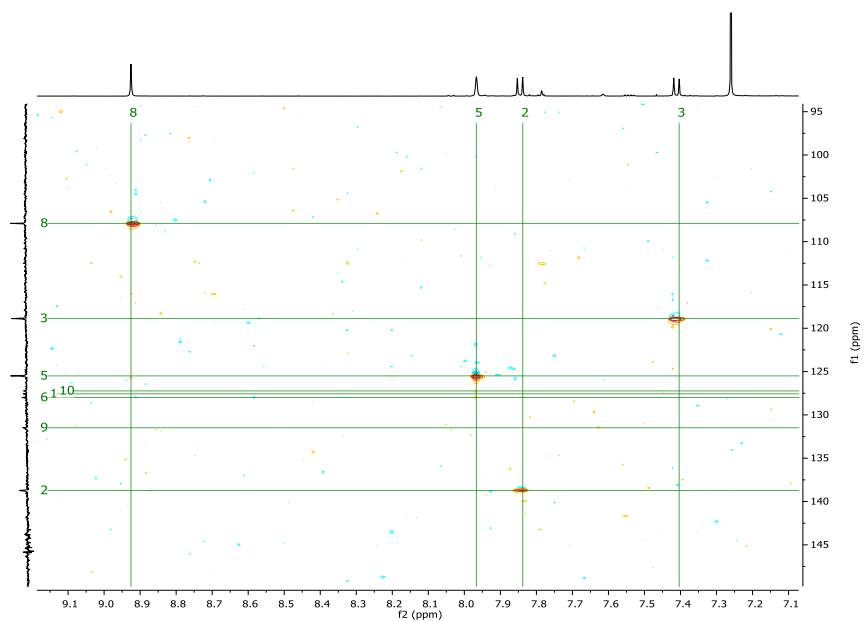
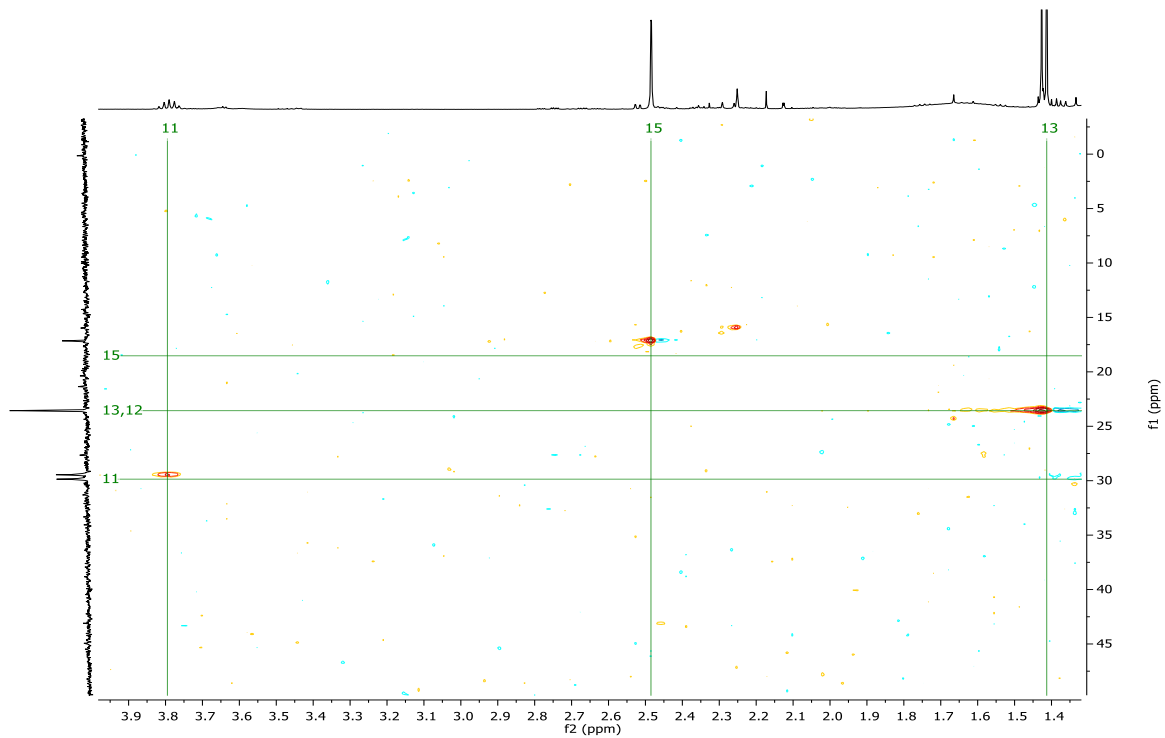


**Espectro 17.** RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de 7-hidroxi-14-cadalenal (9)

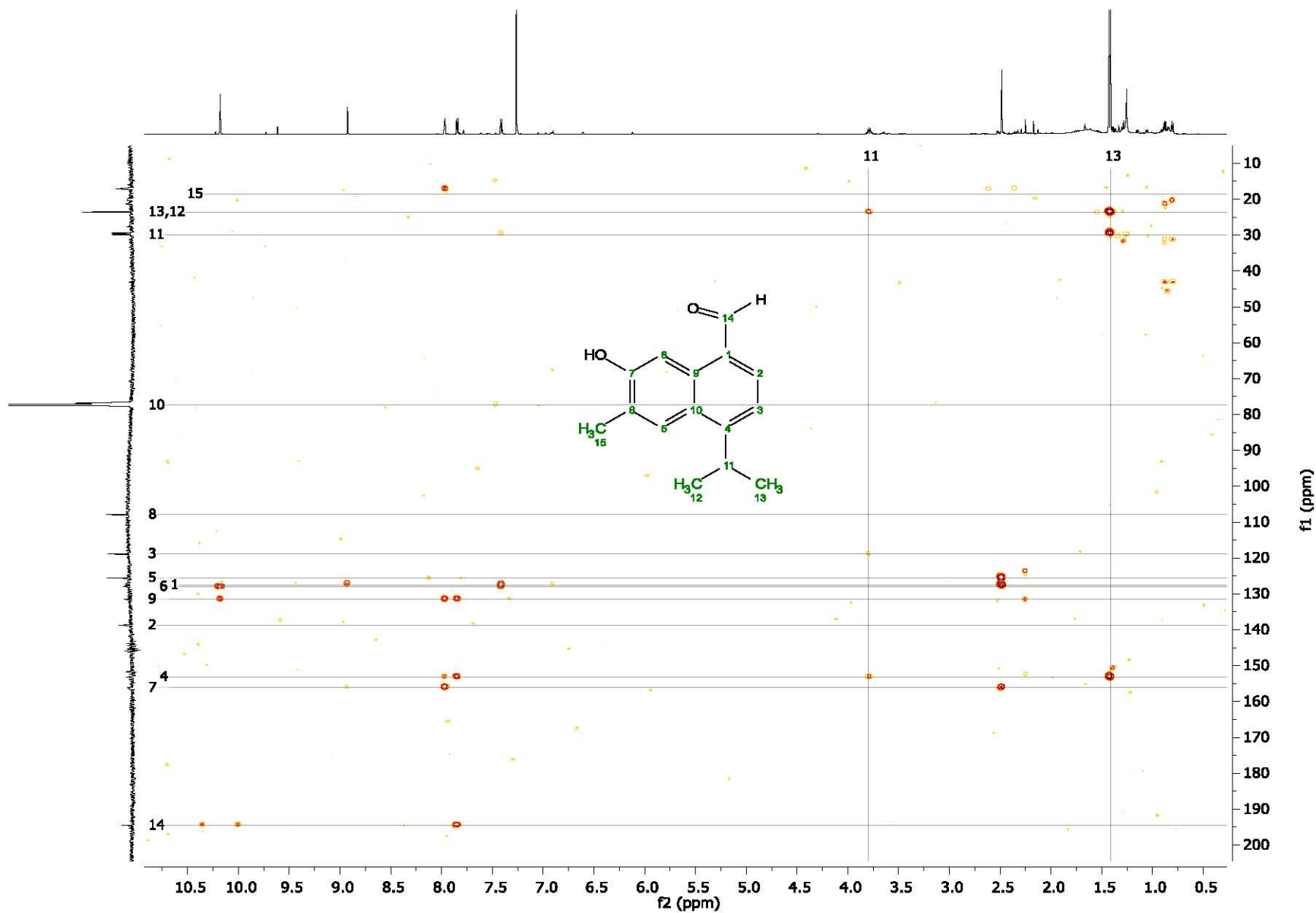


Espectro 18. RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de 7-hidroxi-14-cadalenal (9)

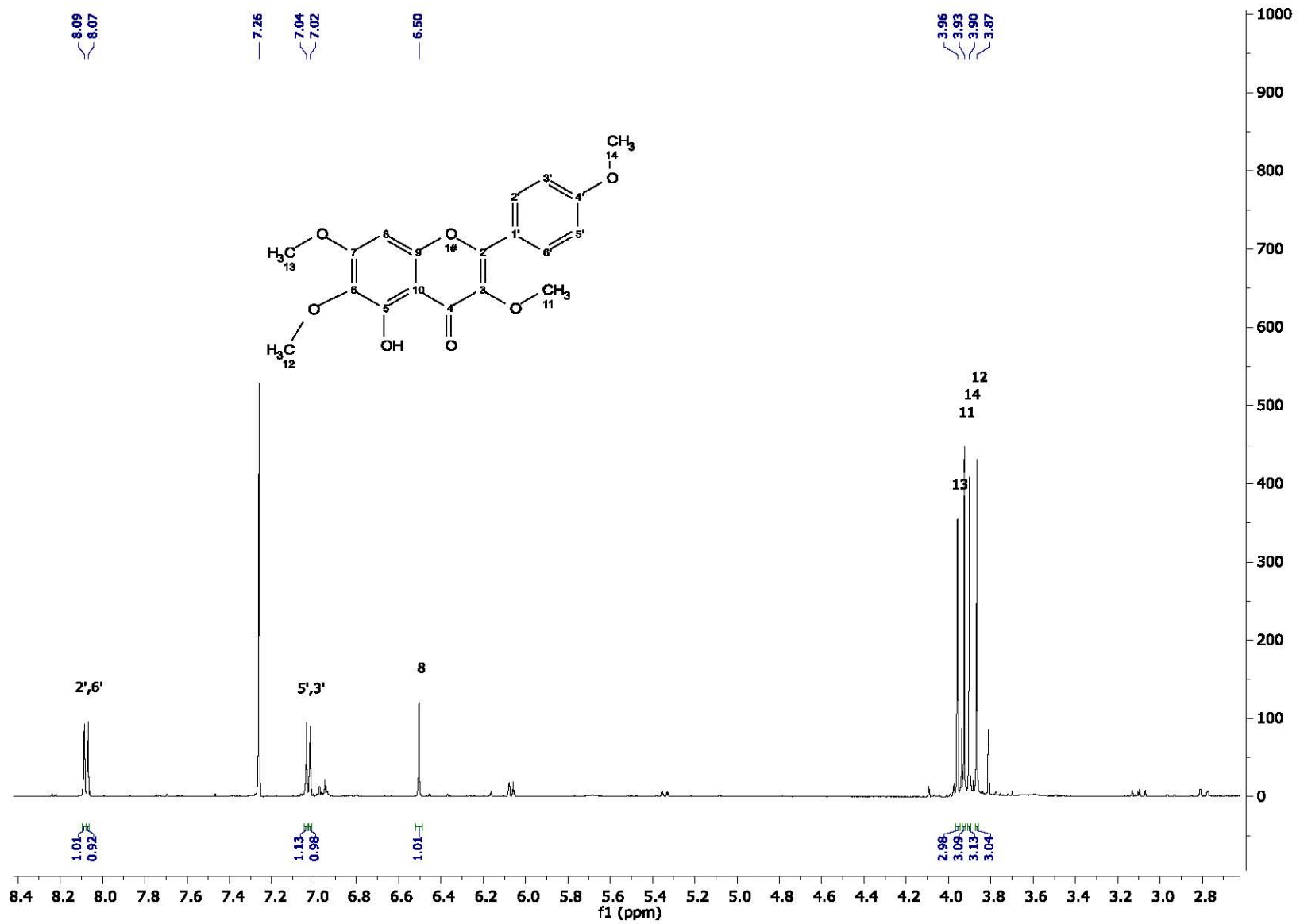
**Espectro 19.** Correlaciones observadas en el experimento HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de 7-hidroxi-14-cadalenal



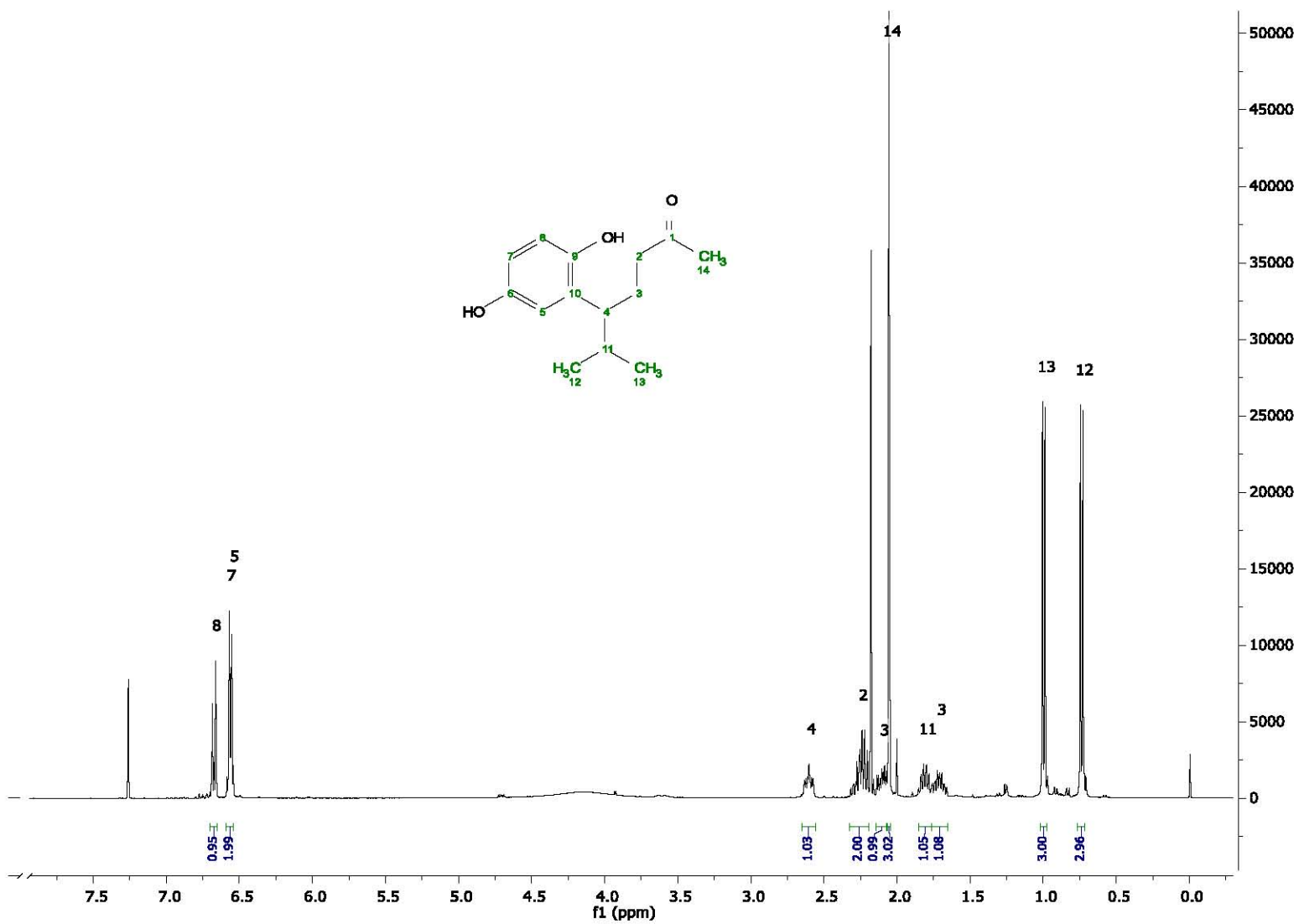




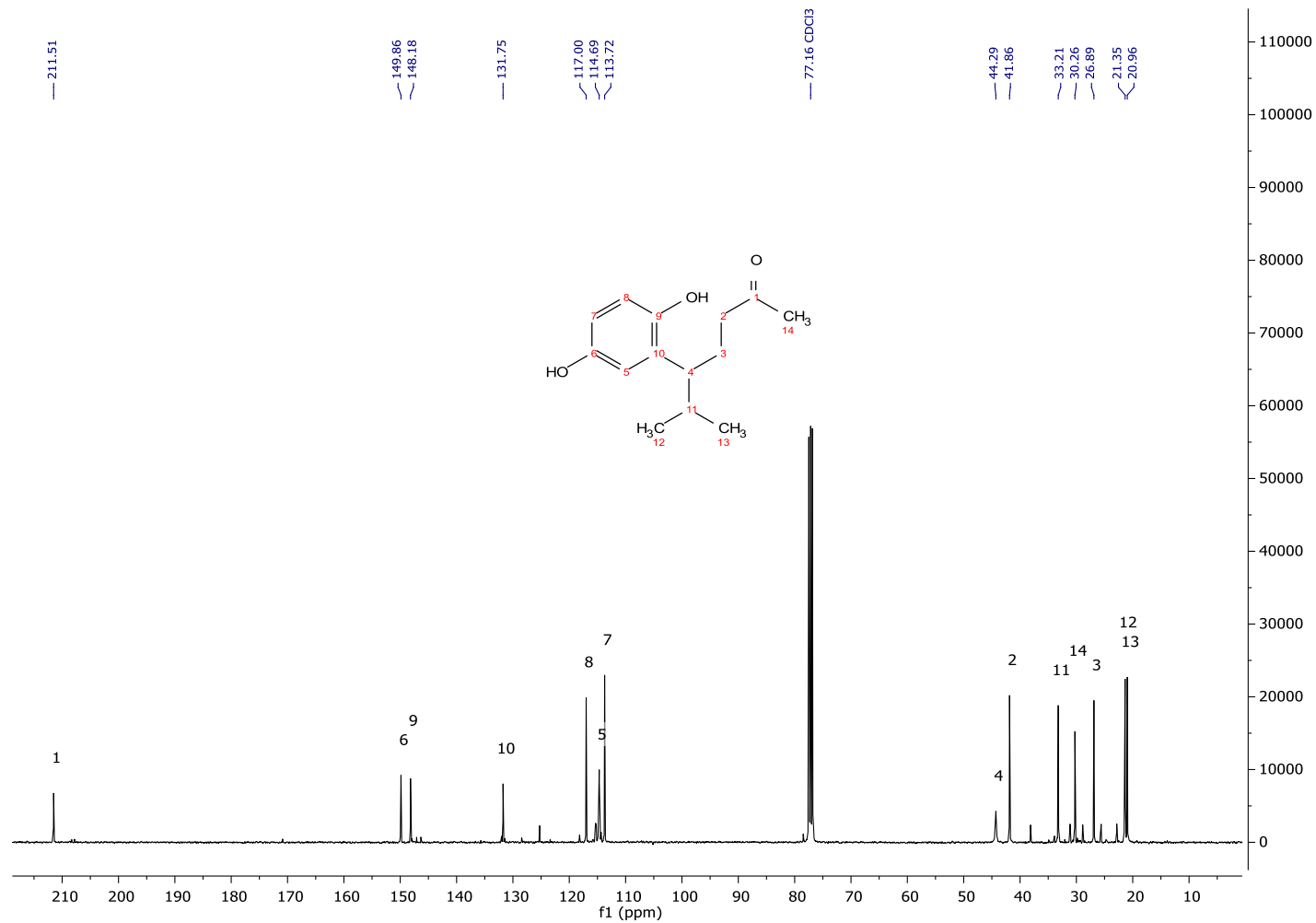
**Espectro 20.** HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de 7-hidroxi-14-cadalenal (9)



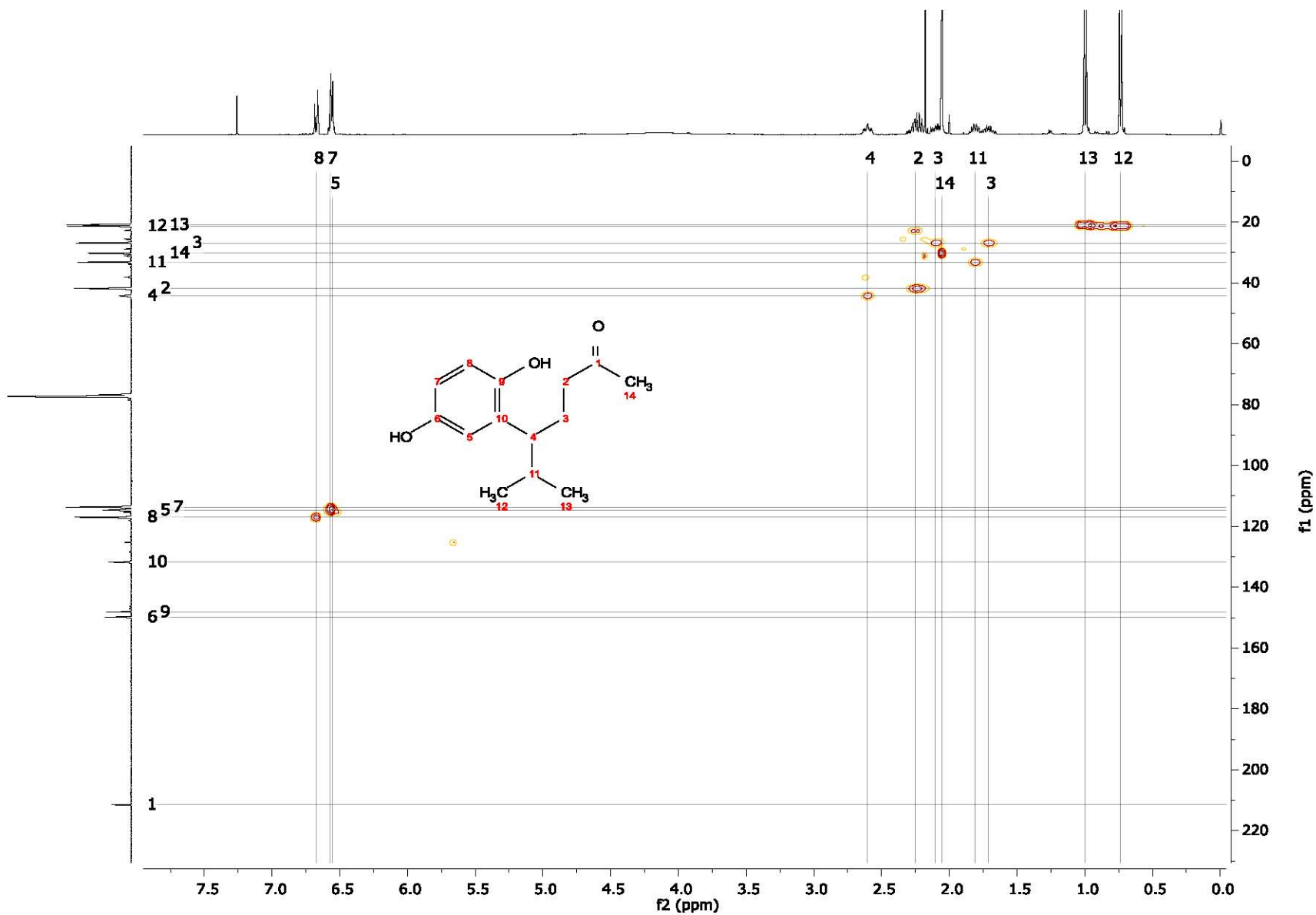
Espectro 21. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de 5-hidroxi-3,6,7,4' tetrametoxiflavona (10)



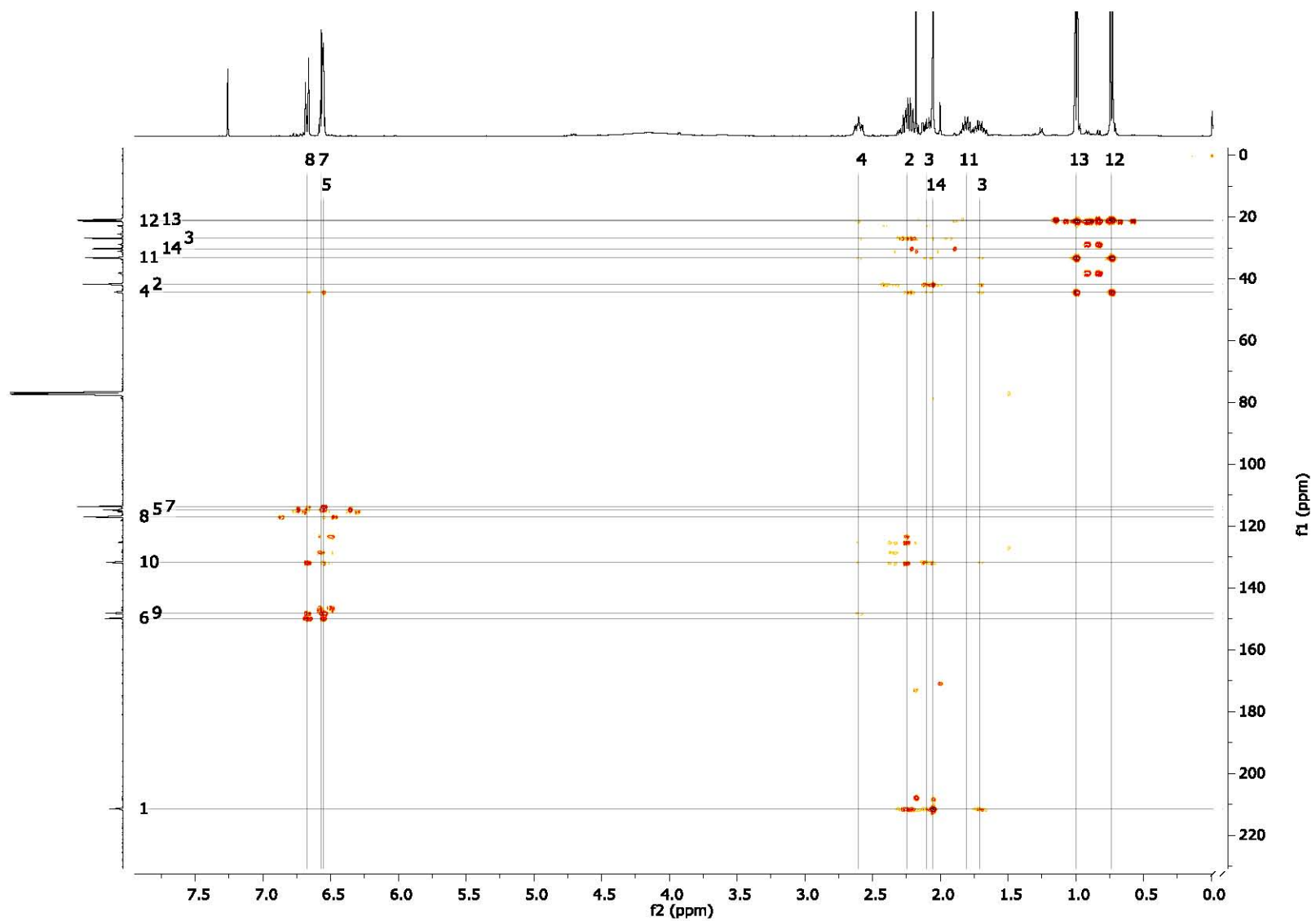
Espectro 22. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de (15-nor-1,9-seco)-6,9-dihidroxi-calamen-1-ona (**11**)



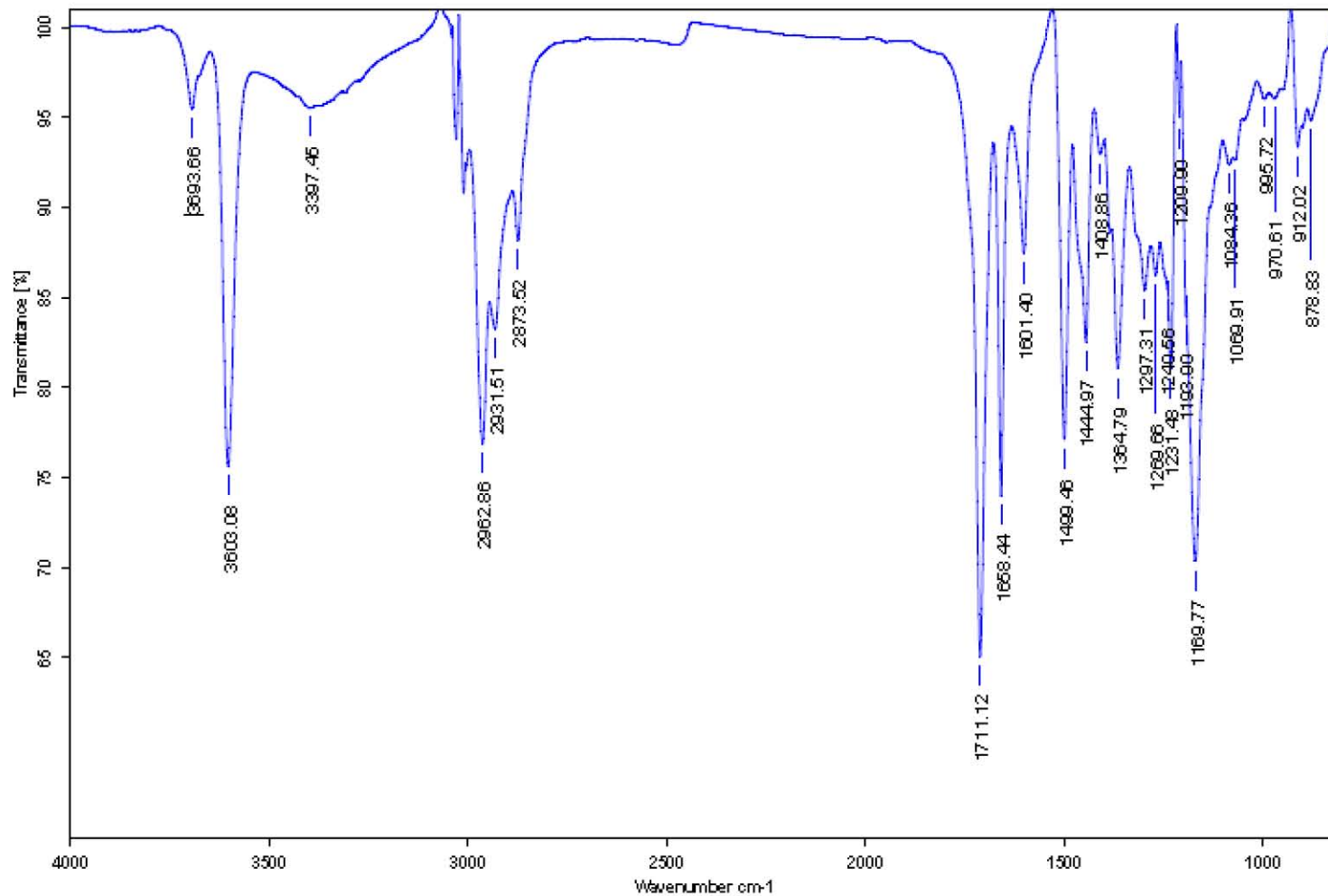
**Espectro 23.** RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) de (15-nor-1,9-seco)-6,9-dihidroxi-calamen-1-ona (**11**)



Espectro 24. HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de (15-nor-1,9-seco)-6,9-dihidroxi-calamen-1-ona (11)



Espectro 25. HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de (15-*nor*-1,9-*seco*)-6,9-dihidroxi-calamen-1-ona (11)



C:\Infrarrojo\AIR-LEP-IQUI-005\_15\2606.0

Dr.G.Delgado

16025b

Sol/CHCl3

RPM

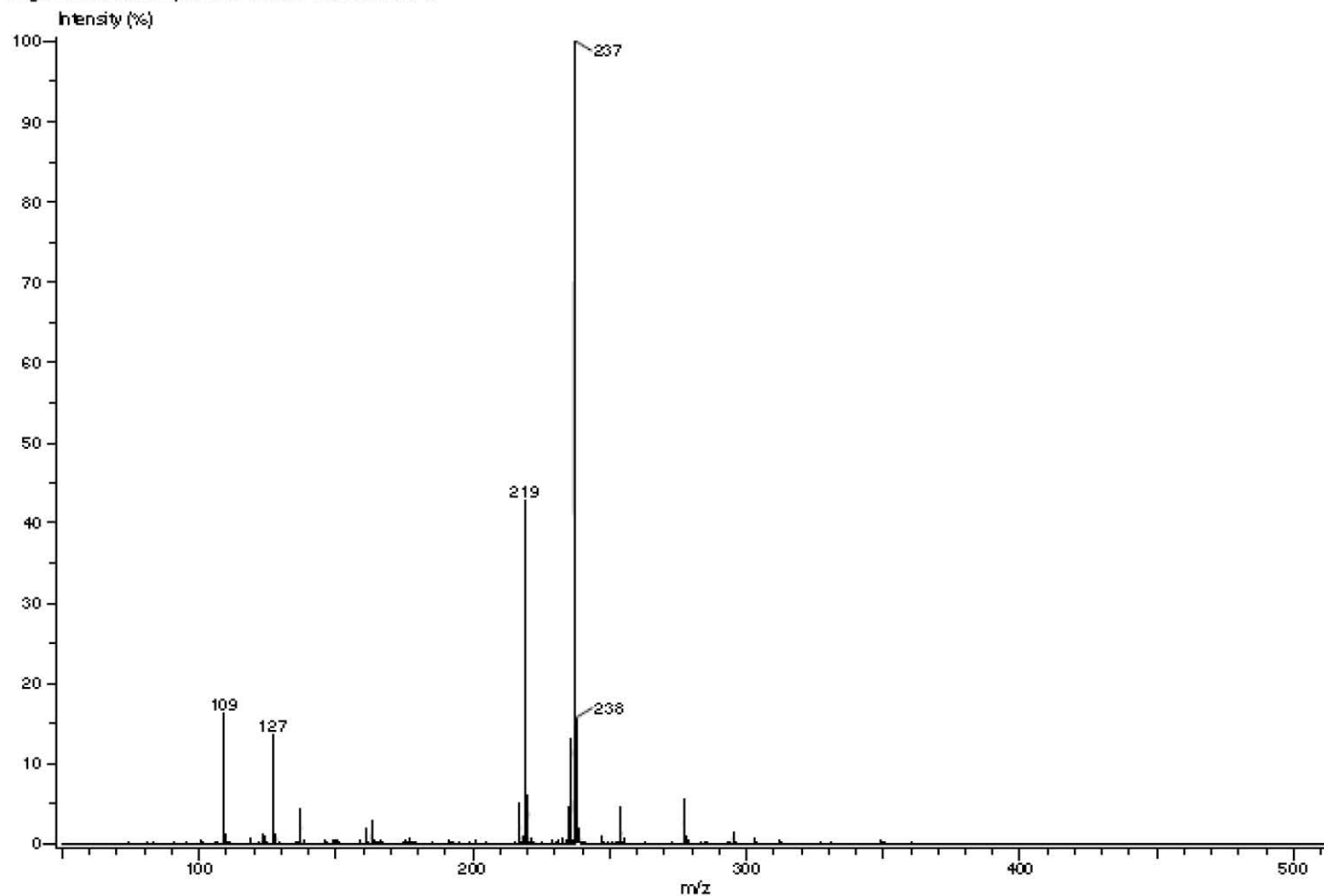
30/11/2015

**Espectro 26.** IR de (15-*nor*-1,9-*seco*)-6,9-dihidroxi-calamen-1-ona (**11**)

Experiment Date/Time: 11/26/2015 12:15:10 PM  
Creation Parameters: Average(MS[1] Time:1..1)  
Dr Delgado Guillermo/ Operador: Carmen Garcia-Javier ...

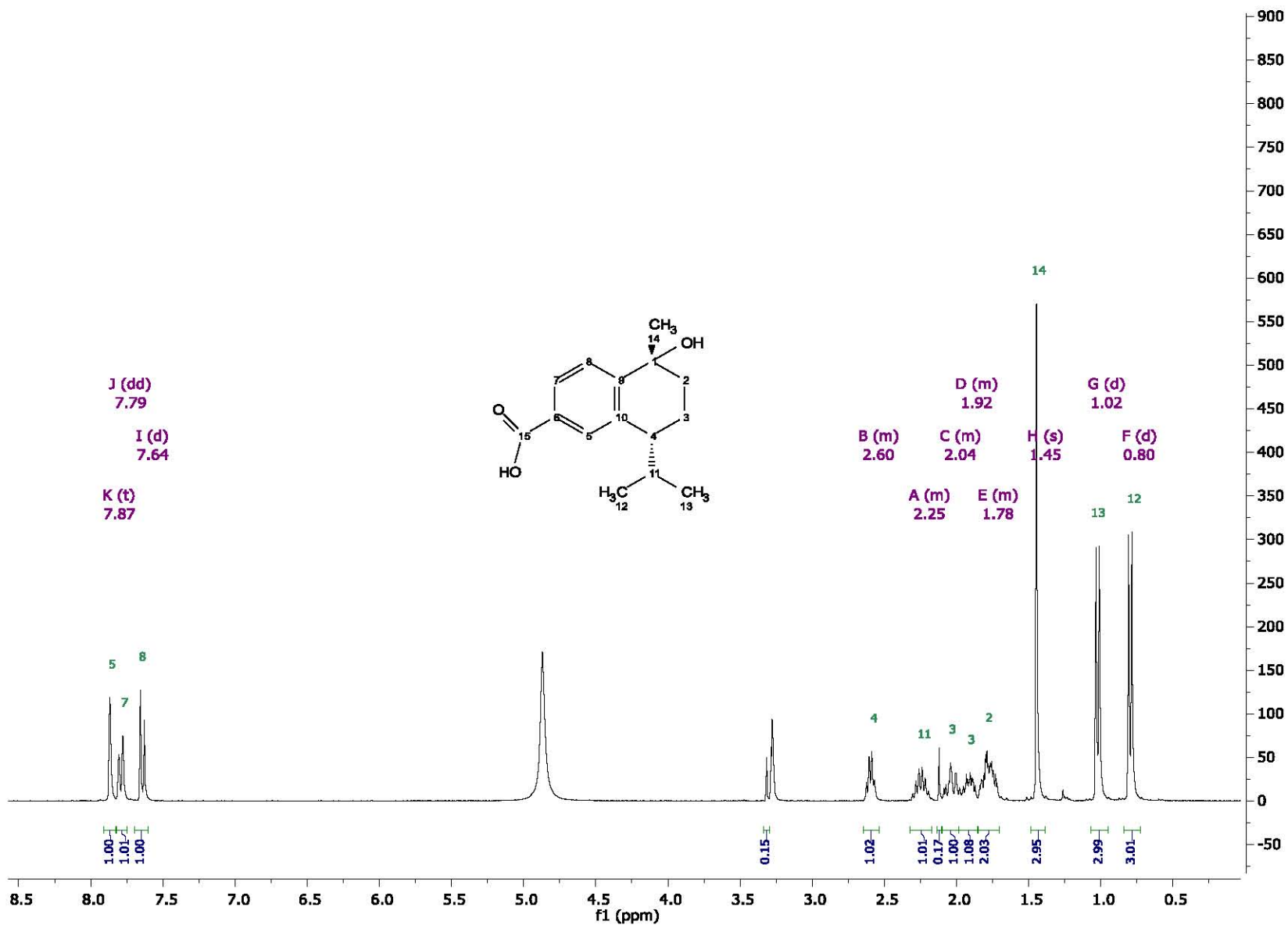
Acq. Data Name: 3687 16025b  
MS Tune Method Name:

Instrument Configuration: JMS-T100LC

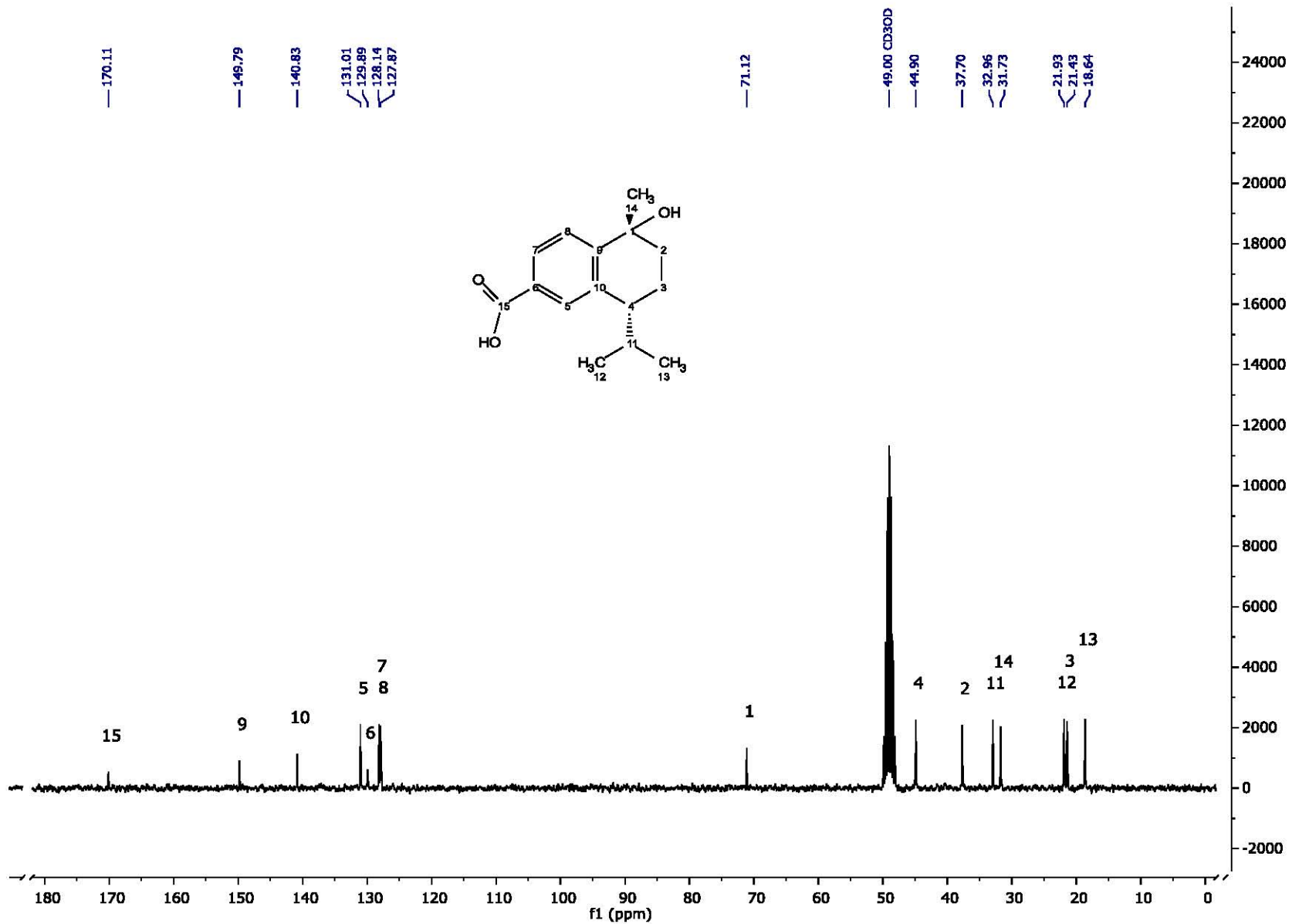


**Espectro 27.** Espectro de masas (DART) de (15-*nor*-1,9-*seco*)-6,9-dihidroxi-calamen-1-ona (**11**)

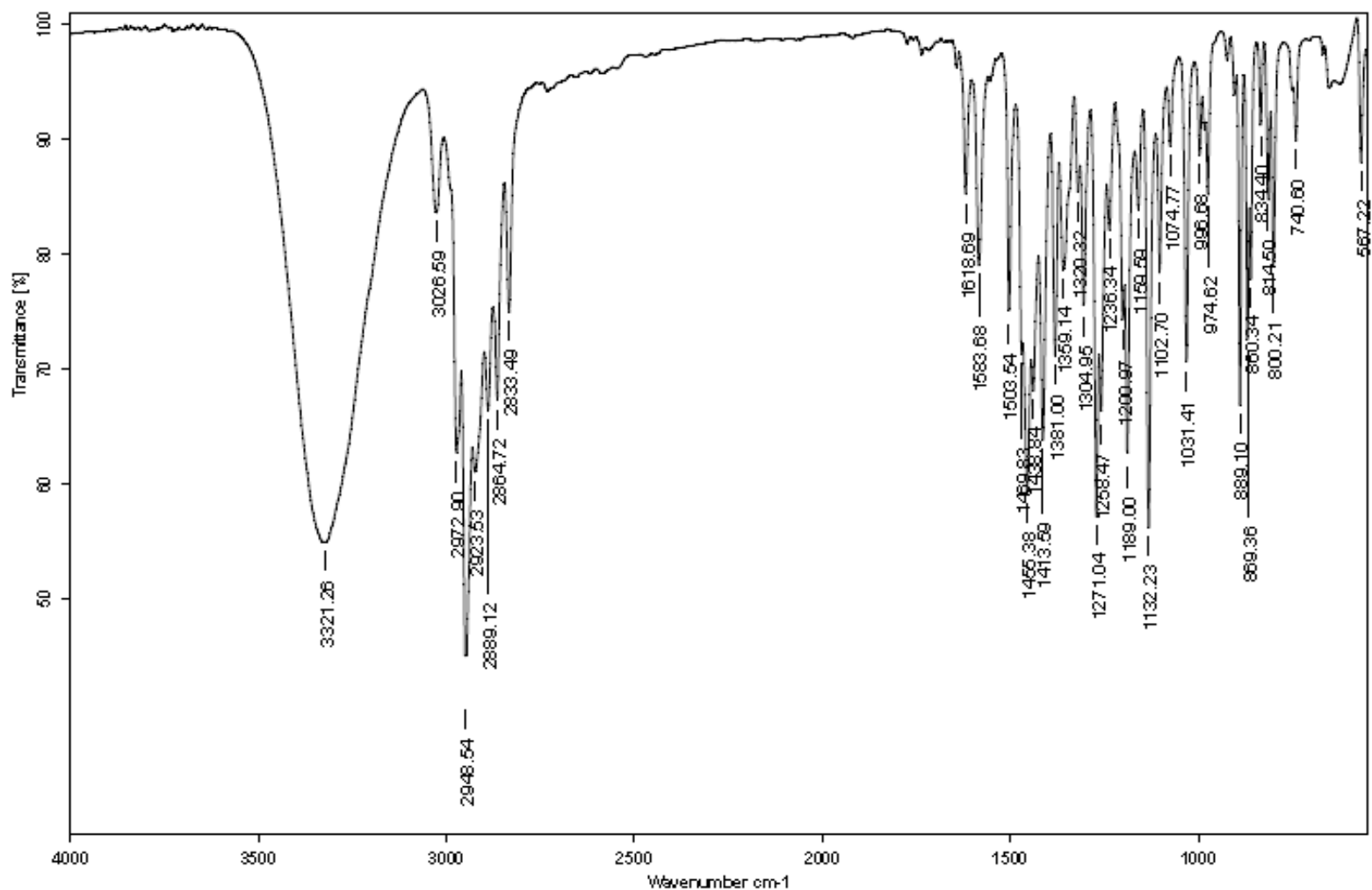




Espectro 28. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{CD}$ , 300 MHz) del ácido-(1R, 4R)-1-Hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrocalden-15-oico (12)



Espectro 29. RMN  $^{13}\text{C}$  (CD<sub>3</sub>CD, 75 MHz) de 12



C:\Infrarrojo\AIR-LEP-IQUI-006\_16\DrGDelgado\244.1

Dr.G.Delgado

G-171

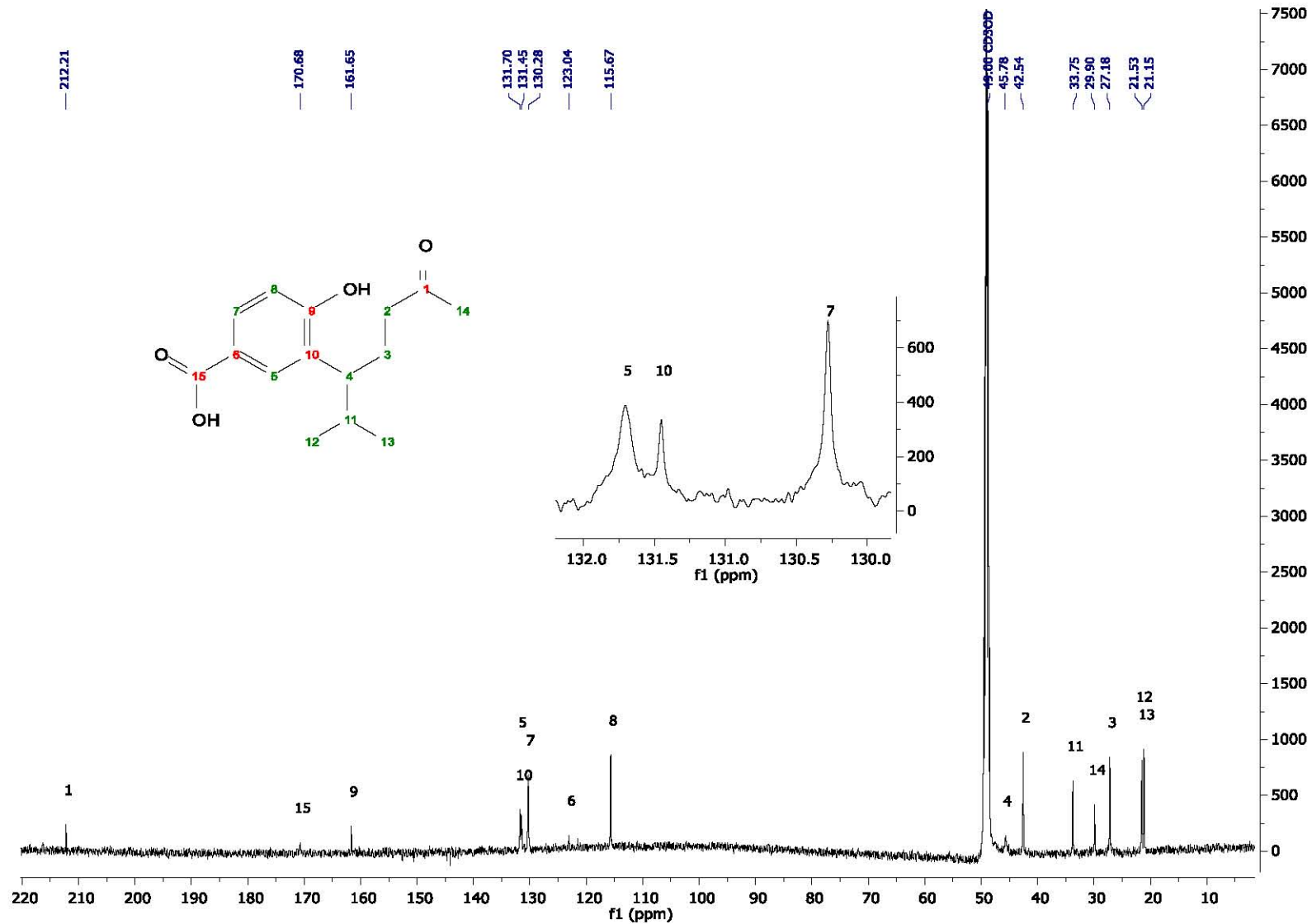
Película

RPM

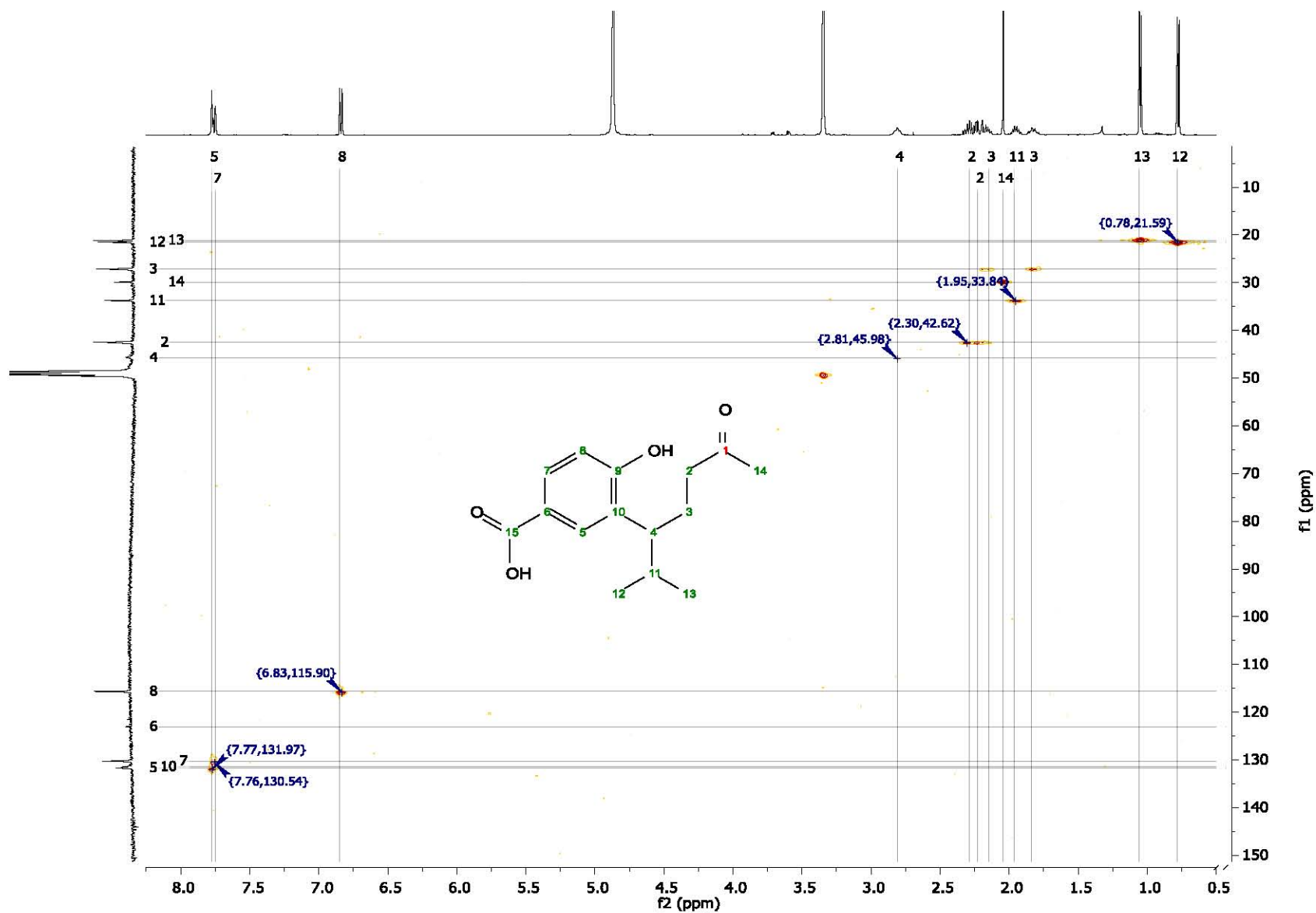
11/02/2016

Espectro 30. Espectro de IR de 12

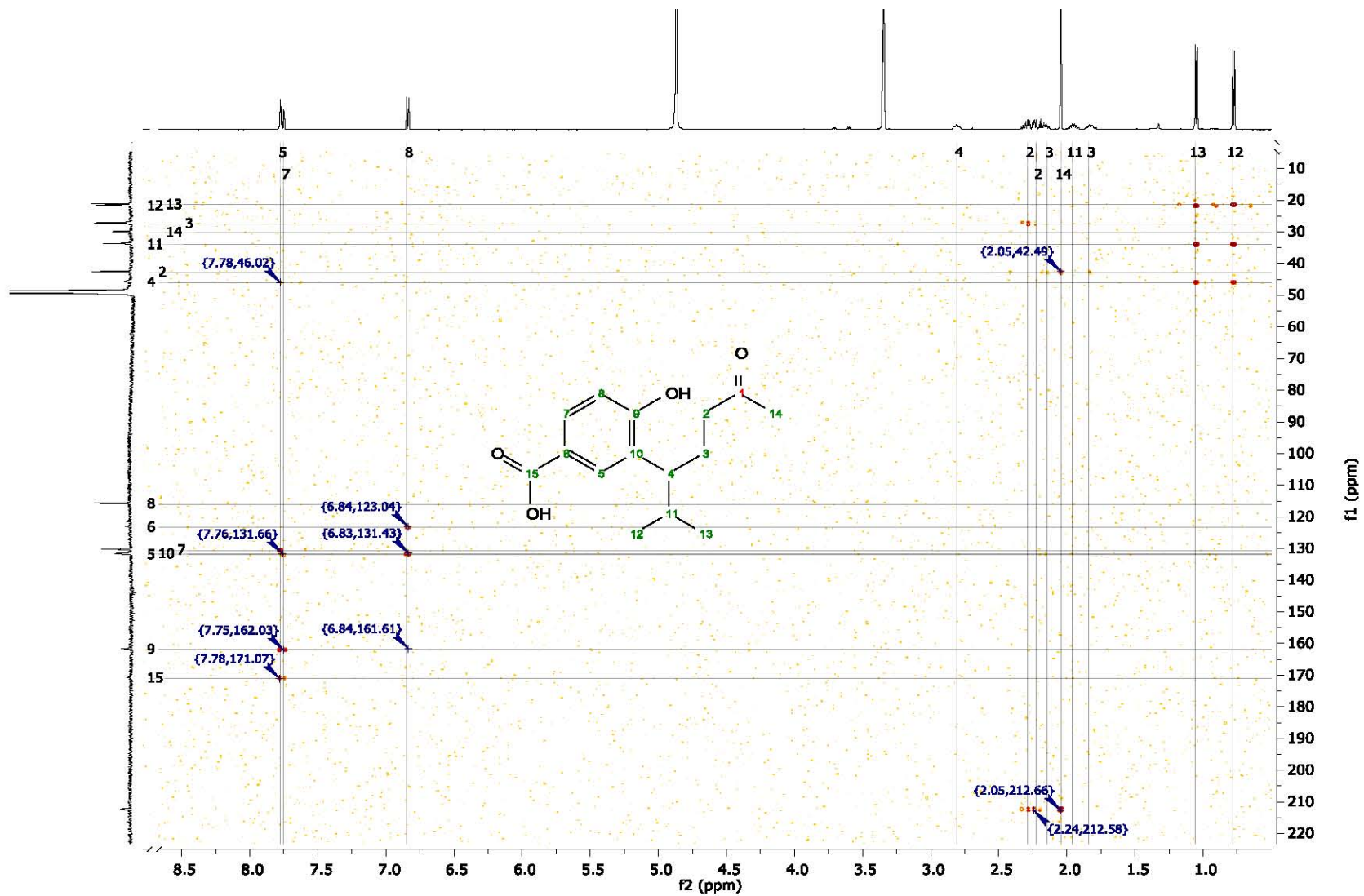




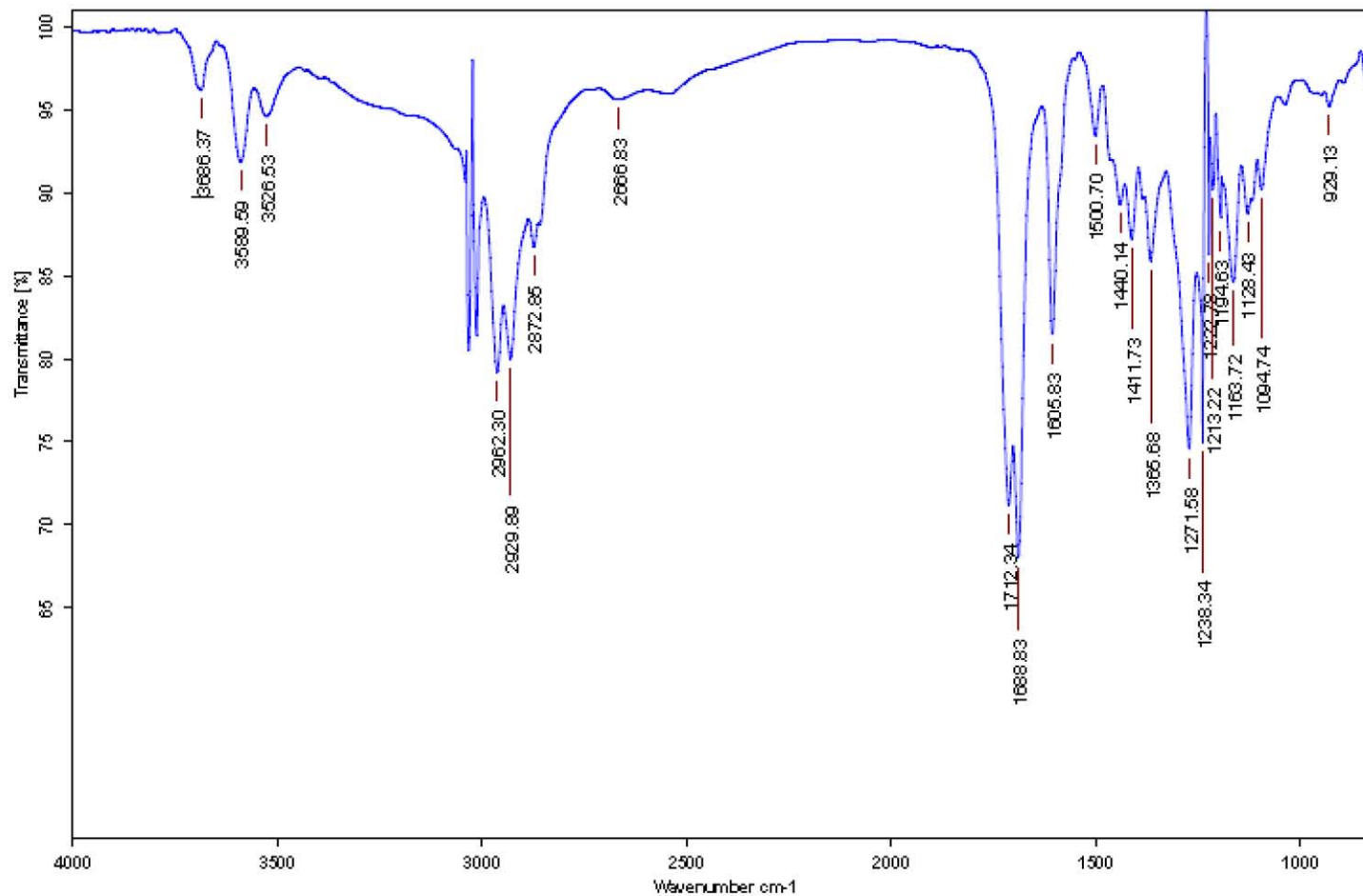
**Espectro 32.** RMN<sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) del ácido-(1,9-*seco*)-1-dehidro-9-hidroxi-calamen-15-oico (13)



Espectro 33. RMN HSQC (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) del ácido-(1,9-*seco*)-1-dehidro-9-hidroxi-calamen-15-oico (13)



Espectro 34. RMN HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) del ácido-(1,9-*seco*)-1-dehidro-9-hidroxi-calamen-15-oico (13)



C:\Infrarrojo\AIR-LEP-IQUI-005\_15\2646.0    Dr.G.Delgado    22-9-3    Sol/CHCl3    RPM    30/11/2015

Espectro 35. IR del Ácido-(1,9-*seco*)-1-dehidro-9-hidroxi-calamenoico 13



Data:3517 222-9-3

Sample Name:Dr Delgado Guillermo/ Operador: Carmen Garcia-Javier Perez

Description:

Ionization Mode:ESI+

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[5.0%]];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 0..0)

Acquired:11/19/2015 1:29:14 PM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:Cal\_Peg\_600

Created:12/4/2015 4:27:12 PM

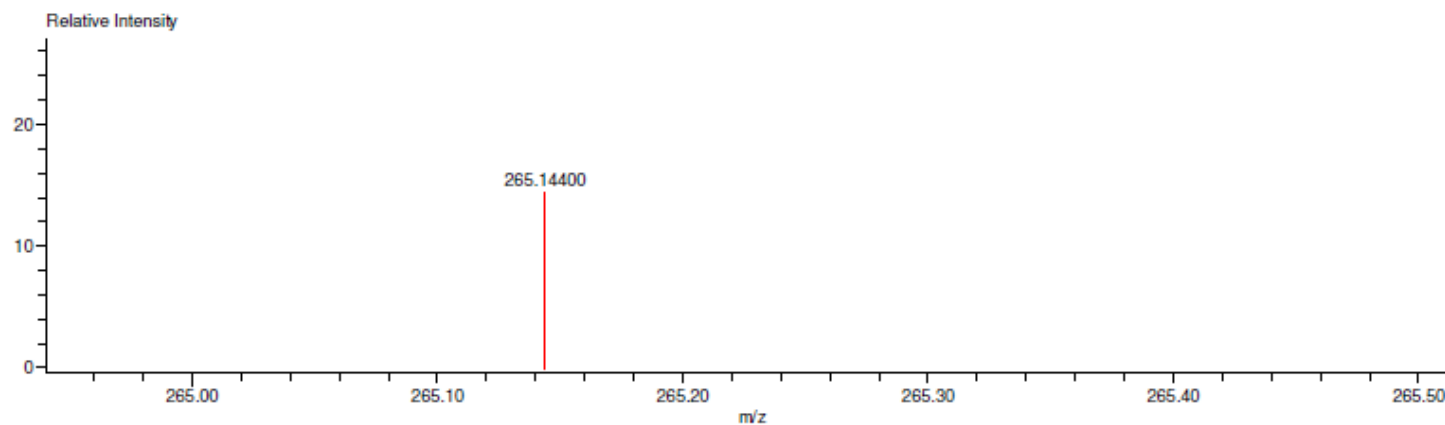
Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:3.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0 .. 20.0 (Fraction:Both)

Element:<sup>12</sup>C:0 .. 100, <sup>1</sup>H:0 .. 200, <sup>16</sup>O:0 .. 5



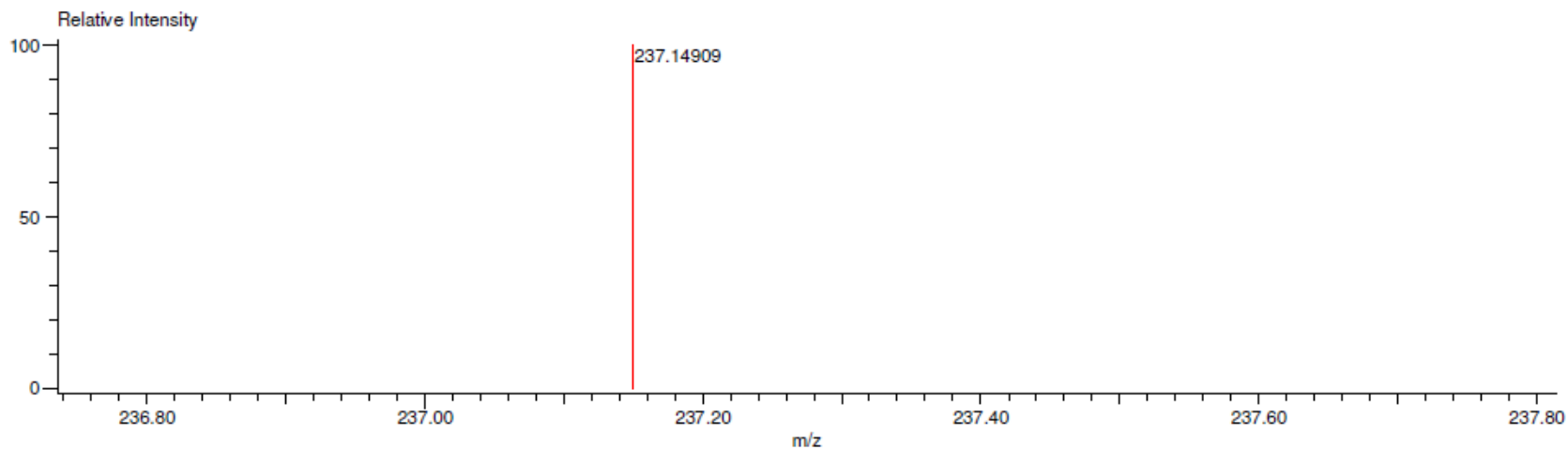
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
265.14400	5892.00	265.14398	0.01	0.06	<sup>12</sup> C <sub>15</sub> <sup>1</sup> H <sub>21</sub> <sup>16</sup> O <sub>4</sub>	5.5

### **Espectro 36. Datos de masas de alta resolución de 13**

Data:3687 16025b  
 Sample Name:Dr Delgado Guillermo/ Operador: Carmen Garcia-Javier Perez  
 Description:  
 Ionization Mode:ESI+  
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[5.0%]];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 1..1)

Acquired:11/26/2015 12:15:10 PM  
 Operator:AccuTOF  
 Mass Calibration data:Cal\_Peg\_600  
 Created:12/4/2015 4:32:00 PM  
 Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:3.00(mmu) Unsaturation Number:0.0 .. 20.0 (Fraction:Both)  
 Element:<sup>12</sup>C:0 .. 100, <sup>1</sup>H:0 .. 200, <sup>16</sup>O:0 .. 5



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
237.14909	215763.22	237.14907	0.02	0.08	<sup>12</sup> C <sub>14</sub> <sup>1</sup> H <sub>21</sub> <sup>16</sup> O <sub>3</sub>	4.5

**Espectro 37.** Datos de masas de alta resolución de **11**