

00570



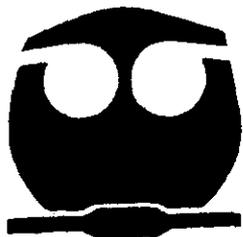
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

INSTITUTO DE QUIMICA

"ANALISIS QUIMICO DEL ARNICA MEXICANA
(HETEROTHECA INULOIDES)
BIODIRIGIDO A LA CARACTERIZACION DE SUBSTANCIAS
ANTI - INFLAMATORIAS"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA FARMACEUTICA)
P R E S E N T A :
QUIM. IND. MA. DEL SOCORRO OLIVARES ALVARO



MEXICO, D. F.

2000

277 732



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ (IQ)
VOCAL: DRA. MARÍA LUISA VILLARREAL (IMSS)
SECRETARIO: DR. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA (FQ)
PRIMER SUPLENTE: DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO (FQ)
SEGUNDO SUPLENTE: DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS (FQ)

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNAM**

SUSTENTANTE: QUÍM. IND. MARÍA DEL SOCORRO OLIVARES ALVARO

DIRECTOR DE TESIS: DR. GUILLERMO DELGADO LAMAS

EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, CON EL APOYO FINANCIERO DEL CONACYT (MEDIANTE EL OTORGAMIENTO DE LA BECA DE POSGRADO) Y DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA) DE LA PROPIA UNIVERSIDAD (PROYECTO IN221198), BAJO LA DIRECCIÓN ACADÉMICA DEL DR. GUILLERMO DELGADO LAMAS.

AGRADECIMIENTOS

Dado que una tesis no es el trabajo de una sola persona, tengo mucho que agradecer.

De manera muy especial quiero agradecer al Dr. Guillermo Delgado L. Por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su invaluable dirección para la realización del presente trabajo de investigación, por su liderazgo y excelencia académica, siempre con la intención de ayudar a sus alumnos. ¡Gracias Doctor!

A la M. en C. Teresa Ramírez-Apan quien colaboró en la parte farmacológica de este trabajo (Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM), y por su disponibilidad y su desinteresada ayuda, en los conocimientos impartidos, que me han sido útiles en la interpretación de los resultados.

Al Dr. Salvador Guzmán N. Por sus sugerencias, comentarios, por la oportunidad que me ha brindado, y por darme su apoyo para llevar a cabo la culminación de este trabajo.

A los Maestros Rocío Patiño, Luis Velazco, Javier Pérez Flores, María Isabel Chávez y Beatriz Quiroz (Instituto de Química de la UNAM), por su colaboración en la parte de recopilación de los datos espectroscópicos, espectrométricos y ópticos.

A los Drs. Edelmira Linares y Robert Bye (Jardín Botánico, Instituto de Biología de la UNAM), por el suministro del material vegetal, y por interesantes observaciones de campo referentes al árnica.

A todo el personal de la biblioteca (Instituto de Química de la UNAM).

A todos mis compañeros del laboratorio 1 de la UIPM: Lili, Yola, Vero, Ma. Luisa, Emmita, Bernice, Julia, Vane, Paty Erika, Elisa, Anibal, Marce, Ricardo y Raquel. Por la ayuda que me brindaron durante el tiempo que estuvimos juntos.

A mis compañeras de Maestría: Adriana, Marina, Rosa, Rosaura, Lupita e Isabel.

Al H. Jurado, por sus comentarios durante la revisión del presente trabajo y por el tiempo dedicado al mismo ¡Gracias!.

Presidente: Dr. Mariano Martínez Vázquez

Vocal: Dra. María Luisa Villarreal

Secretario: Dr. Rafael Castillo Bocanegra

Primer Suplente Dr. Andrés Navarrete Castro

Segundo Suplente Dra. María Isabel Aguilar Laurenta

DEDICATORIAS

A Dios

Dios te doy gracias por

este día. Sé que aún no he logrado todo lo que esperas de mí y si esa es la razón por la cual me bañas en el fresco rocío de otro amanecer. Me siento muy agradecida.

Estoy preparada, al fin, a hacer que te sientes orgulloso de mí.

Gracias por haberme permitido que este sueño se hiciera realidad, y porque a pesar de todos los momentos difíciles tú nunca me dejaste sola.

A mi esposo: Fernando.

Con mucho amor y agradecimiento , por estar conmigo en todo momento, y permitirme ser una mujer plena, me diste la motivación y la fuerza para culminar una meta más, este trabajo también es tuyo. ¡ Te amo!

Con amor incondicional dedico este trabajo al tesoro más grande que me ha dado Dios y que me da la motivación para escribir y la inspiración para vivir. Mis dos hijos:

Jesús Edgar

Y

Denisse Neftali

Por fortalecer día a día mi razón de ser, por permitirme ser su amiga, a ellos, poco es decirles que los amo y que es mucha mi necesidad de su alimento espiritual, y por soportar aquellos momentos que yo les he robado para estar juntos. ¡Los amo!

A la memoria de mi Padre y Hermano:

Felix Olivares Montes de Oca y Rafael Olivares Alvaro.

Porque aunque no estén presentes los llevo siempre en mi corazón.

A mi madre: Teresa Alvaro Benitez.

Quiénes me han brindado la herencia más grande, Amar a Dios y a confiar plenamente en él. ¡Gracias Papás!

A mis hermanitos.

Porque juntos aprendimos a vivir, crecimos como cómplices y amigos incondicionales.

Prospero, Felipe, Emma, Rafael, Lucha, Jesús, Chelo, Tere, Pedro, Rosy y Dely.

Doy gracias infinitas a Dios, por habernos hecho hermanos, los quiero mucho y para siempre.

A todos mis sobrinos especialmente a los más traviosos y hermosos:

Cesar, Isela, Jose, Isac, Emanuel, Chema, Jesús, Ailed, Yareni, Itsel, David, y Axel. Por esa felicidad que me han transmitido al estar con ustedes.

¡Los quiero mucho! Manojitos de amor.

A la familia González Alvaro.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo General	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1 Descripción Botánica y Distribución	4
3.2 Uso en Medicina Tradicional	5
3.3 Antecedentes Fitoquímicos y Farmacológicos	6
3.4 Actividad Anti-inflamatoria	25
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	28
4.1 Sesquiterpenos	28
4.2 Cumarinas	49
4.3 Flavonoides	50
4.4 Esteroles y Glicéridos	51
4.5 Resultados de la Actividad Biológica	52
5. PARTE EXPERIMENTAL	55
5.1 Material y Equipo	55
5.2 Procedimiento Experimental	56
5.3 Método para evaluar la actividad antiedematosa en el edema inducido por TPA	57
5.4 Obtención de 7-Hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (7)	59
5.5 Obtención de 7-Hidroxicalaleno (57)	62
5.6 Obtención de 7-[3,3-dimetilaliloxi]cumarina (130)	64
5.7 Obtención de Naftalinona (8)	66
5.8 Obtención de Ácido cadalen 15-oico (126)	67
5.9 Obtención de 2,6-dihidroxi-4,7-dimetil-3,4(H) naftalinona(127)	69
5.10 Obtención de 7-metil- α -hidroxicalamen-15-oico (66)	72
5.11 Obtención de Dicadalenol (129)	74
5.12 Obtención de Cariolan - 1 β ,9 β -diol (128)	76
5.13 Obtención de Quercetina (9)	79

	Página
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES	82
7. ESPECTROS	84
Espectro 1. IR (CHCl ₃ cm ⁻¹) 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (7)	84
Espectro 2. EM (70 eV) 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (7)	85
Espectro 3. RMN ¹ H 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (7)	86
Espectro 4. IR (CHCl ₃ cm ⁻¹) 7-hidroxicadaleno (57)	87
Espectro 5. EM (70 eV) 7-hidroxicadaleno (57)	88
Espectro 6. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) 7-hidroxicadaleno (57)	89
Espectro 7 IR (CHCl ₃ cm ⁻¹) 4-hidroxi, 2-isopropil-4,7-dimetil-1(4H) naftalinina (8)	90
Espectro 8. EM (70 eV) 4-hidroxi-2-isopropil-4,7-dimetil-1(4H) naftalinona (8)	91
Espectro 9. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) 4-hidroxi-2-isopropil-4,7-dimetil-1(4H) naftalinona (8)	92
Espectro 10. DC (MeOH) 4-hidroxi-2-isopropil-4,7-dimetil-1(4H) naftalinona (8)	93
Espectro 11. IR (KBr, cm ⁻¹) Ácido- 7-Metil-7- α -hidroxicalamen- 15-oico (66)	94
Espectro 12. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) Ácido-7-Metil-7- α -hidroxicalamen-15-oico (66)	95
Espectro 13. EM (70 eV) Ácido-7-Metil-7- α -hidroxicalamen-15-oico (66)	96
Espectro 14. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) Ácido- 7-Metil-7- α -hidroxicalamen-15-oico (66)	97
Espectro 15. IR (KBr, cm ⁻¹) Ácido cadalen-15-oico (126)	98
Espectro 16. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) Ácido cadalen-15-oico (126)	99
Espectro 17. EM (70 eV) Ácido cadalen-15-oico (126)	100
Espectro 18. RMN ¹ H (500 Mz, CDCl ₃) Ácido cadalen-15-oico (126)	101
Espectro 19. NOESY Ácido cadalen-15-oico (126)	102
Espectro 20. HMBC Ácido cadalen-15-oico (126)	103
Espectro 21. HMQC Ácido cadalen-15-oico (126)	104
Espectro 22. IR (KBr cm ⁻¹) 2,6-Dihidroxi-4,7-dimetil-3(4H)-naftalinona (127)	105
Espectro 23. EM (70 eV) 2,6-Dihidroxi-4,7-dimetil-3(4H)-naftalinona (127)	106
Espectro 24. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) 2,6-Dihidroxi-4,7-dimetil-	

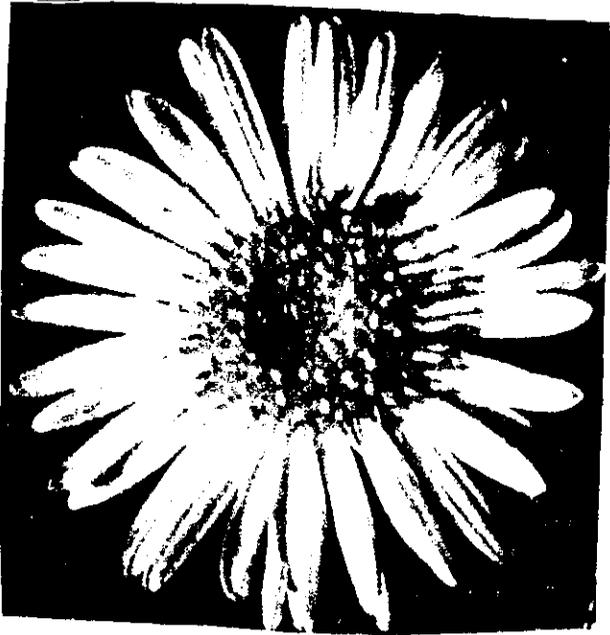
	Página
3(4H)-naftalinona (127)	107
Espectro 25. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) 2,6-Dihidroxi-4,7-dimetil-3(4H)-naftalinona (127)	108
Espectro 26. NOESY 2,6-Dihidroxi-4,7-dimetil-3(4H)-naftalinona (127)	109
Espectro 27. HMBC 2,6-Dihidroxi-4,7-dimetil-3(4H)-naftalinona (127)	110
Espectro 28. IR (CHCl ₃ , cm ⁻¹) Cariolan-1β,9β-diol (128)	111
Espectro 29 EM (70 eV) Cariolan-1β,9β-diol (128)	112
Espectro 30. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) Cariolan-1β,9β-diol (128)	113
Espectro 31. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) Cariolan-1β,9β-diol (128)	114
Espectro 32. EM (70 Ev) Dicadalenol (129)	115
Espectro 33. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) Dicadalenol (129)	116
Espectro 34. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) Dicadalenol (129)	117
Espectro 35. HMQC Dicadalenol (129)	118
Espectro 36. HMBC Dicadalenol (129)	119
Espectro 37. NOESY Dicadalenol (129)	120
Espectro 38. IR (CHCl ₃ , cm ⁻¹) 7-3',3'-dimetilaliloxi-cumarina (130)	121
Espectro 39. RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) 7-3',3'-dimetilaliloxi-cumarina (130)	122
Espectro 40. EM (70 Ev) 7-3',3'-dimetilaliloxi-cumarina (130)	123
Espectro 41. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) 7-3',3'-dimetilaliloxi-cumarina (130)	124
Espectro 42. IR (KBr, cm ⁻¹) Quercetina (9)	125
Espectro 43. RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) Quercetina (9)	126
Espectro 44. EM (70 Ev) Quercetina (9)	127
Espectro 45. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) Quercetina (9)	128
8. BIBLIOGRAFÍA	129

ABREVIATURAS

RMN ¹³ H	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
DEPT	Distortion enhanced polarization transfer
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
COSY	Correlated spectroscopy homonuclear
EM	Espectrometría de masas
IR	Espectrometría de infrarrojo
UV	Ultravioleta
$[\alpha]_D^{22}$	Rotación específica
DI	Dicroísmo circular
AcOEt	Acetato de etilo
MeOH	Metanol
cc	Cromatografía en columna
ccf	Cromatografía en capa fina
ccpr	Cromatografía en columna a presión reducida
ccp	Cromatografía en placa preparativa
Pf	Punto de fusión
PM	Peso molecular
ϵ	Coefficiente de extinción
μ L	Microlitros
s	Singulete
d	Doblete
dt	Doblete tripleteado
m	Multiplete
J	Constante de acoplamiento
t	Triplete

1. INTRODUCCIÓN

ÁRNICA MEXICANA (*HETEROTHECA INULOIDES*)



Introducción

Los metabolitos secundarios presentes en las plantas y los compuestos obtenidos por síntesis química constituyen las fuentes principales de sustancias de interés terapéutico [1]. La investigación en productos naturales ha proporcionado durante los últimos siglos, numerosos compuestos modelo que actualmente permanecen en el mercado [2], y su relevancia en el descubrimiento de fármacos ha sido notable en las últimas décadas. El taxol (aislado de *Taxus brevifolia*) [3], la artemisinina (de *Artemisia annua*) [4], los alcaloides vincristina y vinblastina (aislados de *Catharantus roseus*), entre otras sustancias, pueden mencionarse como ejemplos sobresalientes.

Se han reconocido numerosas alternativas en la búsqueda de sustancias activas a partir de plantas, algunas de las cuales se mencionarán a continuación [5]. La aproximación taxonómica se refiere al estudio de especies pertenecientes a grupos vegetales definidos, considerando que la similitud morfológica derive de una similitud biosintética; así, puede mencionarse que diferentes taxoides se encuentren en diferentes especies de *Taxus* [6]. La aproximación fitoquímica se refiere a la búsqueda específica de metabolitos secundarios definidos en varios grupos de especies [5]. Puede mencionarse la presencia de iridoïdes en numerosas familias de plantas, entre las que destacan las familias Loganiaceae, Rubiaceae y Gentianaceae, entre otras. La aproximación etnobotánica se guía en el conocimiento tradicional y retrospectivamente constituye una alternativa de éxito particular para la búsqueda de sustancias bioactivas. Finalmente, se ha identificado que el conocimiento de los mecanismos de defensa de las plantas puede proporcionar elementos importantes para la búsqueda de moléculas bioactivas [7].

En nuestro país, la química de productos naturales constituye una línea de investigación que se practica desde hace varias décadas. Sin embargo, dada la diversidad vegetal de México, derivada de numerosos factores geográficos y climáticos[8], es importante reconocer que sólo se ha estudiado, desde el punto de

vista químico, un porcentaje relativamente bajo de la vegetación. Por otro lado, y considerando a las especies vegetales empleadas en la medicina tradicional, es interesante mencionar que la diversidad de etnias proporciona un elemento adicional de diversificación, ya que puede suceder que la misma especie vegetal tenga diferente aprecio y uso en diferentes comunidades [9].

De acuerdo con datos recientes del Herbario Medicinal del IMSS, la flora medicinal de México asciende a más de 4000 especies [9,10], de aproximadamente 22000 plantas vasculares. De acuerdo a la encuesta de Lozoya [10], la mayoría de estas especies vegetales se emplean para la atención de padecimientos digestivos, respiratorios y de la piel, así como para malestares corporales, estados febriles y el dolor. Entre las especies vegetales de uso medicinal frecuente, se encuentra el árnica mexicana (*Heterotheca inuloides*), que se considera un recurso herbolario importante para el tratamiento de afecciones de la piel y traumatismos.

La investigación de los constituyentes químicos de las plantas y la evaluación de sus actividades biológicas, contribuirá a enriquecer el conocimiento sobre nuestros recursos naturales, favoreciendo así su uso racional y conservación.

2. OBJETIVOS

Objetivo General

Generar conocimiento referente a los recursos naturales de nuestro país, mediante la búsqueda, aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios bioactivos presentes en la flora empleada en la medicina tradicional, con el fin de ponderar su potencial terapéutico y coadyuvar a su conservación y aprovechamiento racional.

Objetivos Específicos

Recopilar la información etnomédica y química de la especie *Heterotheca inuloides* (árnica mexicana), la cual se emplea tradicionalmente para el tratamiento de padecimientos infecciosos e inflamatorios.

Realizar el aislamiento y caracterización de los principales metabolitos con actividad anti-inflamatoria de *Heterotheca inuloides*.

Establecer posibles correlaciones entre el uso popular del vegetal con la estructura molecular y propiedades biológicas de los metabolitos secundarios aislados.

Generar resultados que permitan ponderar el potencial de los metabolitos secundarios bioactivos como agentes anti-inflamatorios.

Integrar los conocimientos adquiridos con los informados en la literatura con el fin de proporcionar los antecedentes pertinentes para estudios adicionales subsecuentes.

3. ANTECEDENTES

A continuación se describirán brevemente algunas generalidades del árnica mexicana (*Heterotheca inuloides*), la cual pertenece a la familia Asteraceae, tribu Astereae

Descripción Botánica y Distribución

Nombre Científico: *Heterotheca inuloides*

Nombre Común: árnica mexicana, falsa árnica, tabaco de las montañas, acahual, ornilla, acahualli, y xochihuepal.

El árnica mexicana (*Heterotheca inuloides*) representa una de las especies vegetales endémicas de nuestro país más utilizadas en la medicina tradicional. Diversas encuestas y estadísticas preliminares la ubican entre las plantas mexicanas más frecuentemente empleadas con fines medicinales, en particular, para el tratamiento de procesos inflamatorios y para otros padecimientos relacionados. Precisamente el nombre de "árnica" proviene de la planta *Arnica montana*, la cual es europea y sus usos principales en el viejo continente son como agente anti-inflamatorio [11].

Indudablemente que el mestizaje cultural después de la conquista permitió, por un lado, el intercambio y cultivo de especies vegetales, y por otro, la substitución o equivalencia de las ya existentes.

En el caso del "árnica mexicana" (*Heterotheca inuloides*), es claro que su similitud en el aspecto físico (flores amarillas y compuestas), y en el modo de empleo con el árnica europea (*Arnica montana*), es el origen del nombre árnica mexicana en nuestro país. También recibe nombres en varias lenguas indígenas [11,12].

La distribución geográfica de *Heterotheca inuloides* es la siguiente: crece en

regiones templadas, en las orillas de los caminos, en terrenos pedregosos o en terrenos limpios. Actualmente se cultiva, y su distribución natural es en el valle de México, y en los lugares más altos de los estados de Nuevo León, San Luis Potosí, Hidalgo, Veracruz, Jalisco, Michoacán Colima, Tlaxcala y Puebla, principalmente [13].

La descripción botánica es la siguiente: es una planta herbácea perenne de 0.25 a 1.00 m de altura, el tallo es cilíndrico y piloso, está poco ramificado en la parte inferior y un poco más en la parte superior, las hojas a veces son más largas que anchas, y las flores están agrupadas en una cabezuela, todas colocadas en un disco, son de color amarillo débil y sabor amargo, son parecidas a las margaritas. Esta planta es anual y crece en la época de lluvia en los meses de julio y agosto [13].

Uso en Medicina Tradicional.

El árnica mexicana se emplea, de acuerdo con Maximino Martínez, "en forma de tintura alcohólica aplicada tópicamente sobre las contusiones; pero al parecer sin tener los mismos buenos efectos que con el "árnica de Europa" [11] (*Arnica montana*). Por otro lado, Linares [9] indica que "su uso actual más generalizado es para lavar heridas, para el tratamiento de contusiones y para la curación de ronchas de la piel", finalmente se informa que puede emplearse "para curar golpes internos".

Es conveniente mencionar que con el nombre de "árnica" se conocen otras especies vegetales también empleadas en la medicina tradicional. En la tabla 1 se enumeran algunas especies con este nombre vulgar.

El "árnica" y las especies conocidas con este nombre, son muy apreciadas en la

medicina tradicional, y se utilizan ampliamente en todo el país, sobre todo en las zonas rurales. Sus usos específicos han sido transmitidos de generación en generación hasta nuestros días.

Al comparar la información entre el árnica mexicana (*Heterotheca inuloides*) y las otras árnicas, puede observarse que la primera se usa principalmente para el tratamiento de la inflamación, mientras que, en términos generales, las otras "árnicas" se emplean para lavar heridas, ronchas y afecciones cutáneas, que puede correlacionar tanto con infecciones como con síntomas de inflamación. Todas las especies conocidas como árnica pertenecen a la familia de las compuestas, a excepción de *Galphimia glauca* ("árnica roja", familia *Malpighiaceae*). Es pertinente mencionar que como "árnica" se encuentran registradas en el diccionario de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas las siguientes especies: *Heterotheca leptoglossa*, *Neurolaena lobata*, *Trixis angustifolia*, *Trixis radialis*, *Verbesina greenmani*. Finalmente puede mencionarse que el árnica mexicana se usa en combinación con otras plantas entre las que destacan en combinación con el romero (*Rosmarinus officinalis* Labiatae), la santa maría (*Chrysanthemum parthenium*, Compositae), y el té de monte (*Satureja macrostema*, Labiatae) [14,15]. En la tabla 1 se indican algunas especies de árnica, así como su uso tradicional.

Antecedentes Fitoquímicos y Farmacológicos.

Un estudio comparativo de *Heterotheca inuloides* y *Arnica montana*, permitió observar que *Heterotheca inuloides*, no contiene las lactonas sesquiterpénicas típicas de la árnica europea; tampoco contiene alcaloides. La composición de flavonoides en diferentes especies de *Heterotheca* varía considerablemente de una especie a otra.

Tabla 1 Algunas especies vegetales conocidas con el nombre de "árnica".

Nombre vulgar	Nombre científico	Usos	Ref.
Árnica	<i>Mentzelia conzattii</i>	Afecciones cutáneas	[14]
Árnica	<i>Zexmenia pringeli</i>	Para lavar heridas	[14]
Árnica rosa	<i>Aster gymnocephalus</i>	Para granos, heridas e hinchazón	[14]
Árnica de diente	<i>Taraxacum officinale</i>	Para quitar granos	[16]
Árnica de peluche	<i>Heterotheca inuloides</i>	Para granos, ronchas y comezón	[16]
Árnica	<i>Tithonia diversifolia</i>	Reumatismo	[16]
Árnica	<i>Tanacetum parthenium</i>	Para curar granos, he- ridas y para la sarna	[16]
Árnica	<i>Trixis inula</i>	Reumatismo	[16]
Árnica morada	<i>Aster gymnocephalus</i>	Tratamiento de heridas	[16]
Árnica amarilla	<i>Grindelia oxylepsis</i>	Tratamiento de heridas	[16]
Árnica roja	<i>Galphimia glauca</i>	para curar heridas y granos	[16]

Investigaciones realizadas por Kubo y colaboradores (1994) [17] establecieron que los sesquiterpenos 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (**7**) y 7-hidroxicadaleno (**57**), presentan una potente actividad antibacteriana, contra bacterias *Gram* positivas. Además el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (**7**) muestra actividad bactericida contra

Staphylococcus aureus resistente a la penicilina. Este mismo grupo de investigadores encontró en 1996 que β -cariofileno (55), el óxido de cariofileno (56), 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (7) y 7-hidroxicadaleno (57) también inhiben la peroxidación microsomal de los lípidos, lo cual correlaciona con la actividad anti-inflamatoria [18].

Por otra parte, Kubo y colaboradores (1995) [19] aislaron el sesquiterpeno denominado inuloidina (58), que presentó actividad inhibidora del crecimiento de plantas de lechuga, y no presentó la actividad antibacteriana mostrada por el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno y el 7-dihidroxicadaleno.

Estudios químicos de estas especies han reportado algunas sustancias comunes, ya que durante varios años el *Arnica montana* y *Heterotheca inuloides* han sido tema de estudio de varios grupos de investigación, encontrándose como constituyentes principales, en ambas especies, los siguientes metabolitos.

Heterotheca inuloides

(Árnica mexicana)

Poliacetilenos

Sesquiterpenos bicíclicos

Flavonoides

Glicósidos de flavonoides

Esteroles

Arnica montana

(Árnica)

Lactonas sesquiterpénicas

Flavonoides

Alcaloides pirrolidínicos

Glicósido de flavonoides

A continuación se muestra una lista de las especies de *Heterotheca* y *Arnica* analizadas hasta ahora y las sustancias aisladas.

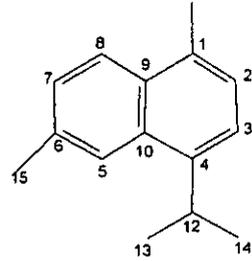
SUBSTANCIAS AISLADAS DE ESPECIES DE *HETEROTHECA*

ESPECIE: *Heterotheca inuloides* [20].

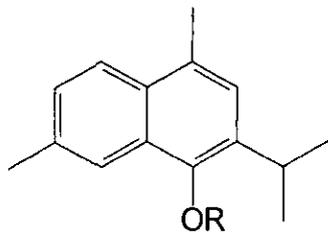
COMPUESTOS:



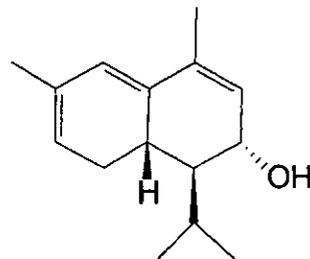
- (1) R = Ac
- (2) R = Ang



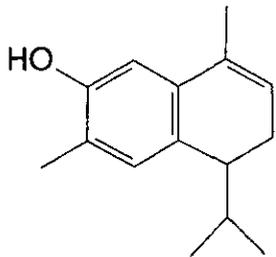
cadaleno (3)



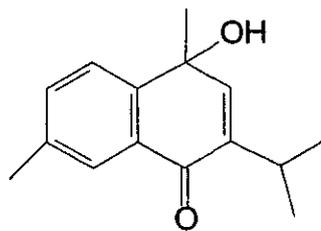
- R=CH₃ 4-Metoxiisocadaleno (4)
- R=H 4-Hidroxiisocadaleno (5)



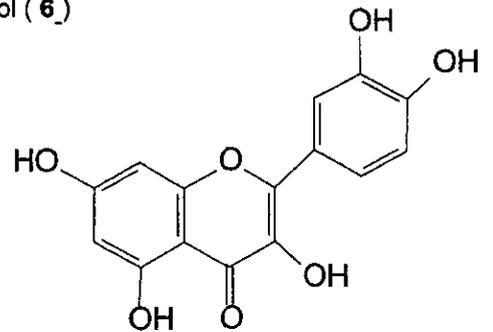
1-Isopropil-4,6-dimetil
1,2,8,8α-tetrahidro-2-
naftol (6)



7-hidroxi-3,4-dihidro
cadaleno (7)

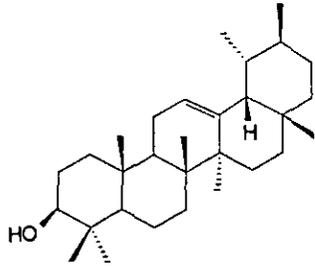


4-hidroxi-2-isopropil-4,7-di-
metil-1(4H)-naftalinona (8)

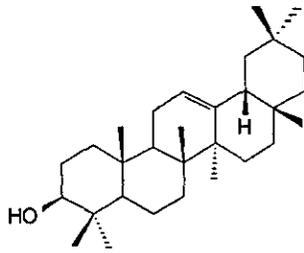


Quercetina (9)

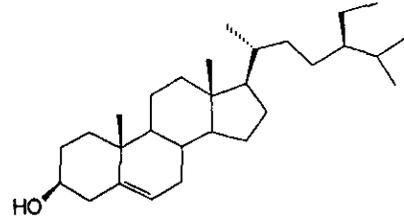
ESPECIE: *Heterotheca inuloides* [21]



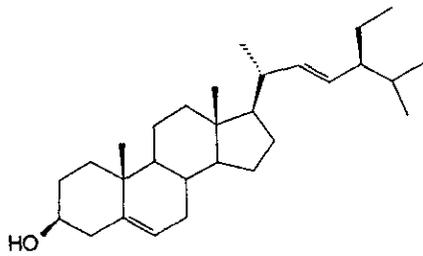
α -Amirina (10)



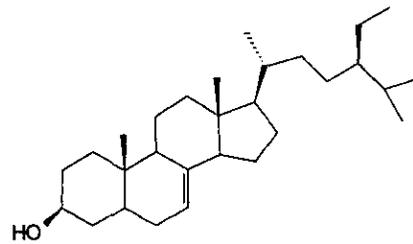
β -Amirina (11)



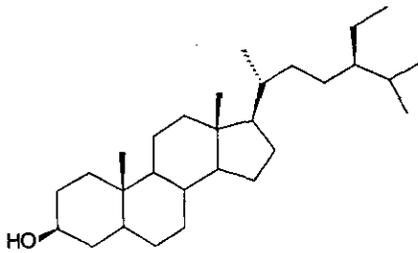
β -Sitosterol (12)



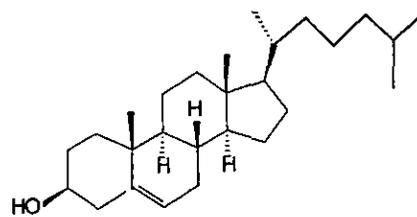
Estigmasterol (13)



Estigmastan-7-enol (14)



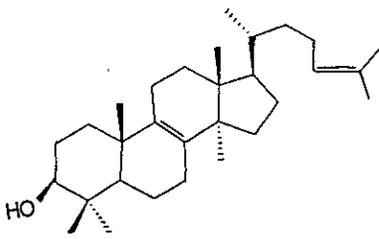
Estigmastanol (15)



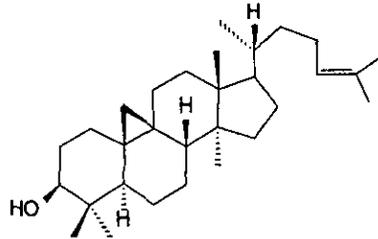
Colesterol (16)

ESPECIE: *Heterotheca inuloides* [21]

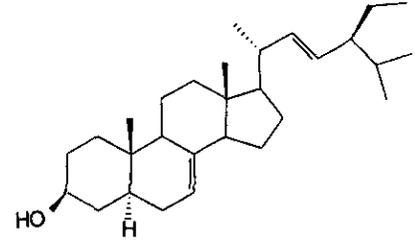
COMPUESTOS:



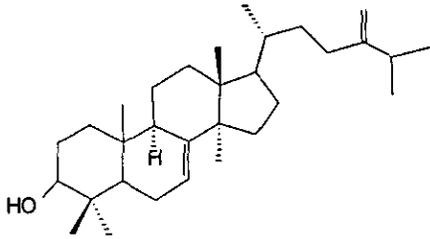
Lanosterol (17)



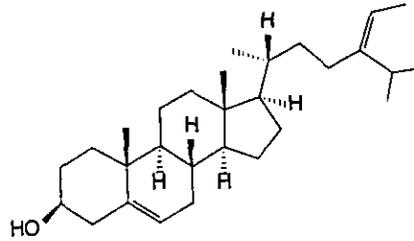
Cicloartenol (18)



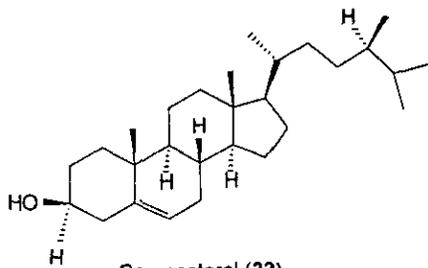
α -Espinasterol (19)



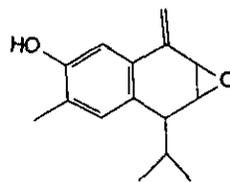
24-Metilfen-colest-7-enol (20)



Avenasterol-7-enol (21)



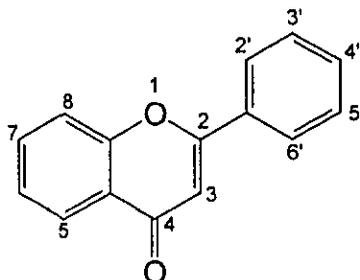
Campesterol (22)



2,3-epoxi-7-hidroxi
 β -calacoreno(23)

4-hidroxi-2-isopropil
-4,7-dimetil-1(4H)-naf-
talinona (8)

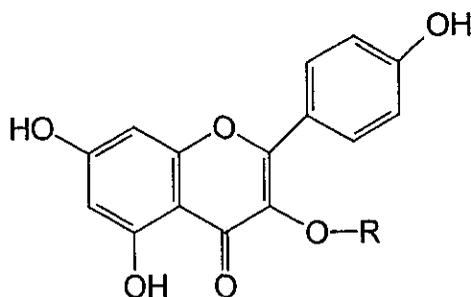
ESPECIE: *Heterotheca inuloides* [22]

COMPUESTOS:

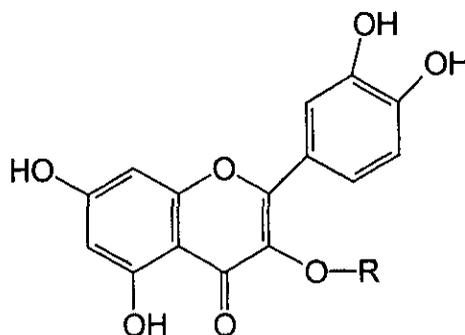
NOMBRE	S U B S T I T U Y E N T E S					
	3	5	6	7	3'	4'
Luteolina (24)		OH		OH	OH	OH
Kamferol (25)	OH	OH		OH		OH
Éter-3,7-dimetílico de kamferol (26)	CH ₃ O			CH ₃ O		
Éter-3,7,4'-trimetílico de kamferol (27)	CH ₃ O			CH ₃ O		CH ₃ O
6-Metoxi-éter-3,7-dimetílico de kamferol (28)	CH ₃ O		OCH ₃	CH ₃ O		
Quercetina (9)	OH	OH		OH	OH	OH
Éter-3,3'-dimetílico de quercetina (29)	CH ₃ O				CH ₃ O	
Éter-3,4'-dimetílico de quercetina (30)	CH ₃ O					CH ₃ O
Éter-3,7-dimetílico de quercetina (31)	CH ₃ O			CH ₃ O		
Éter-3,7,3'-trimetílico de quercetina (32)	CH ₃ O			CH ₃ O	CH ₃ O	
Éter-3,7,4'-trimetílico de quercetina (33)	CH ₃ O			CH ₃ O		CH ₃ O
Éter-3,7,3',4'-tetrametílico de quercetina (34)	CH ₃ O			CH ₃ O	CH ₃ O	CH ₃ O
Quercetagetina (35)		OH	OH	OH	OH	
Éter-3,6,7,4'-tetrametílico de quercetagetina (36)	CH ₃ O		CH ₃ O	CH ₃ O		CH ₃ O
Eriodictiol (37)		OH		OH	OH	OH
Éter-3'-metílico de eriodictiol (38)					CH ₃ O	
Éter-7,3'-dimetílico de eriodictiol (39)				CH ₃ O	CH ₃ O	

ESPECIE: *Heterotheca inuloides* [23, 24]

COMPUESTOS:



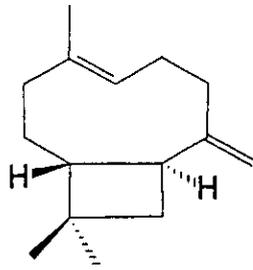
- | | | |
|------|---------------------------------|---------------------|
| (40) | 3-O-β-glucósido de kamferol | R = β-glucósido |
| (41) | 3-O-β-galactósido de kamferol | R = β-galactósido |
| (42) | 3-O-β-rutinósido de kamferol | R = β-rutinósido |
| (43) | 3-O-β-rubinobiósido de kamferol | R = β-rabinobiósido |



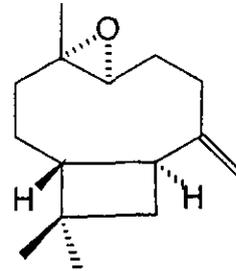
- | | | | | |
|------|-------------------------------------------------|-------------------|------|--------------------|
| (44) | 3-O-β-Glucósido de quercetina | R = β-glucósido | (50) | Ácido caféico |
| (45) | 3-O-β-Galactósido de quercetina | R = β-galactósido | (51) | Ácido protocaféico |
| (46) | 3-O-β-Glucurónido de quercetina | R = β-glucurónido | (52) | Ácido clorofénico |
| (47) | 3-O-β-Glucurónido éter 3"metílico de quercetina | R = β-glucurónido | (53) | Umbeliferona |
| (48) | 3-O-α-L-arabinósido de quercetina | R = α-arabinósido | | |
| (49) | 3-O-β-rutinósido de quercetina | R = β-rutinósido | | |

ESPECIE: *Heterotheca inuloides* [17 , 24]

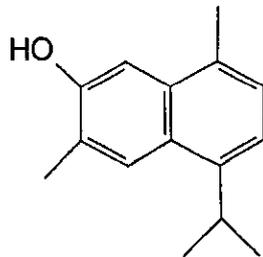
COMPUESTOS:



β -Cariofileno (54)



Epóxido de β -
cariofileno (55)



7-Hidroxicadalenol (56)

7-Hidroxi-3,4-dihidro-
cadaleno (7)

α -Espinasterol (19)

Heterotheca inuloides [18]

β -cariofileno (54)

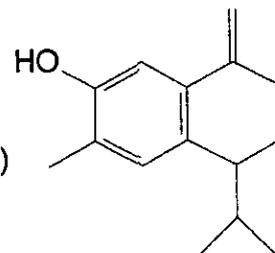
Epóxido de β -cariofileno (55)

7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (7)

7-hidroxicadalenol (56)

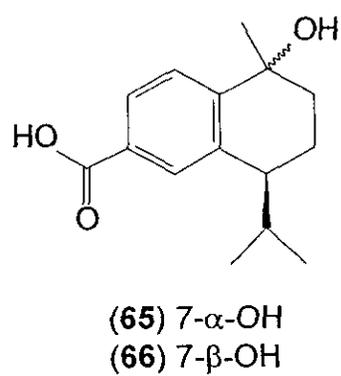
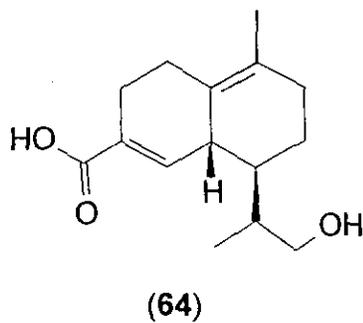
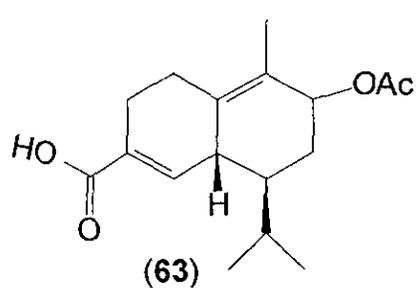
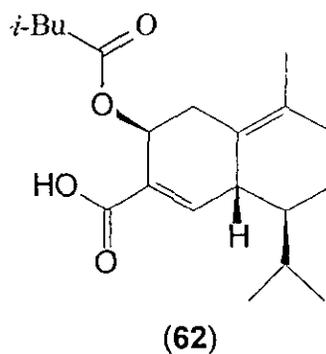
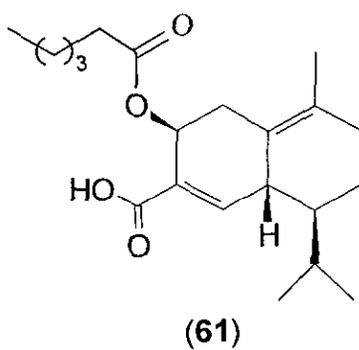
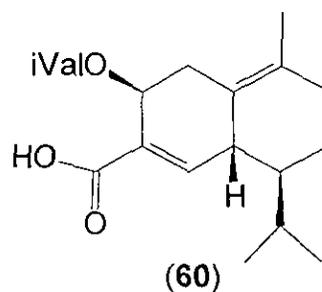
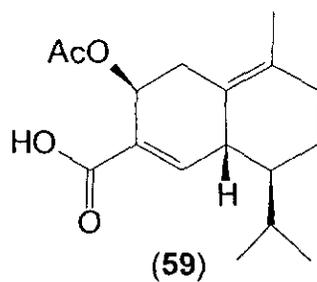
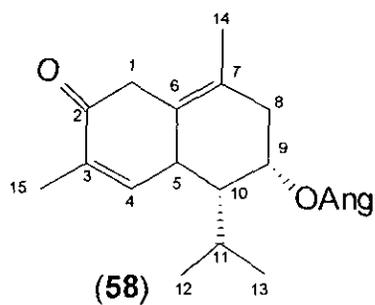
quercetina (9)

kamferol (25)



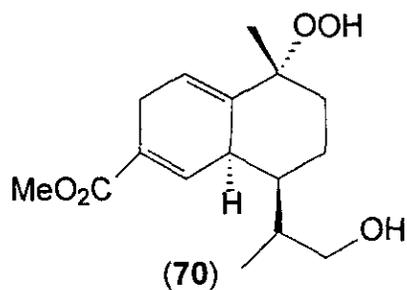
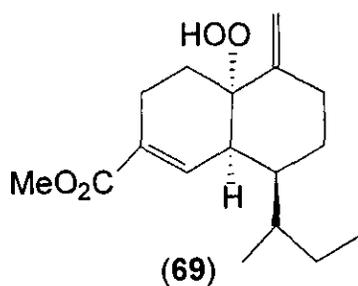
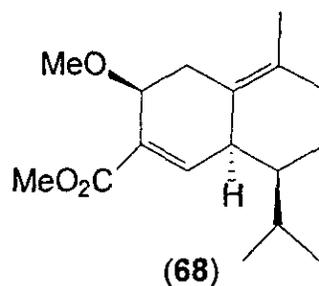
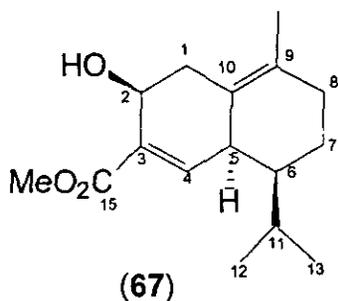
Inuloidina (57)

ESPECIE: *Heterotheca latifolia* [25]

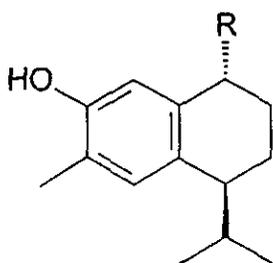
COMPUESTO

ESPECIE: *Heterotheca latifolia* [26]

COMPUESTOS:

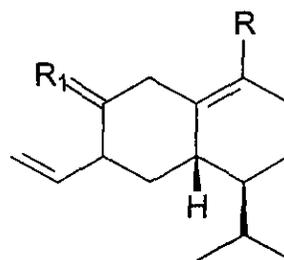


Heterotheca grandiflora [27]



(72) (73) (74)

R OH OAng OMeBu OiBu

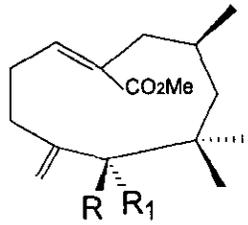
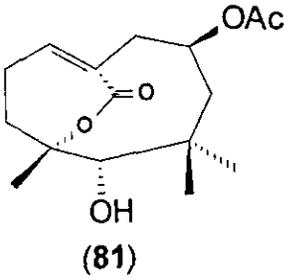
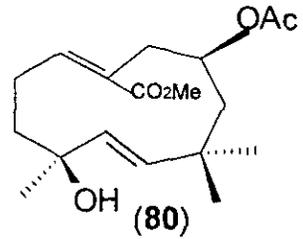
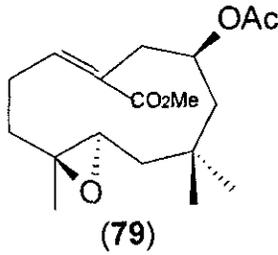
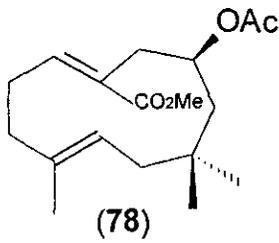


(76) (77)

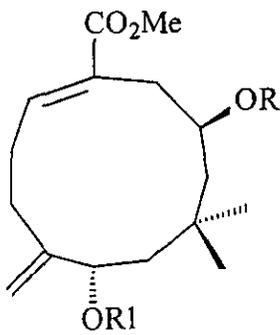
R Me CO₂H CO₂M
R₁ O H₂ H₂

ESPECIE *Heterotheca villosa* [28]

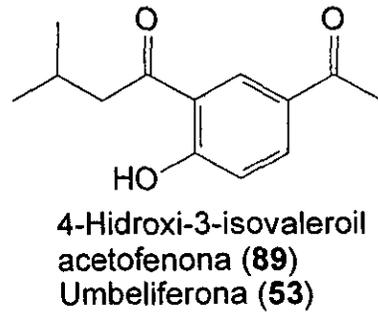
COMPUESTOS:



R	OH	H	H	H
R ₁	H	OH	OOH	OAc

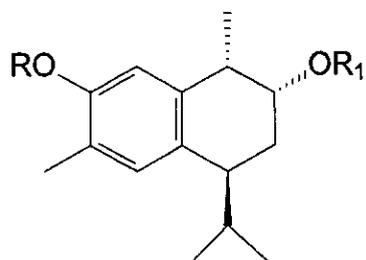
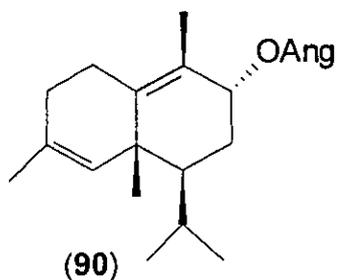


R	i-val	Tigl	Tigl
R ₁	H	H	OH

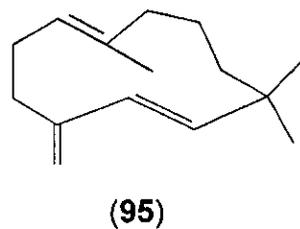
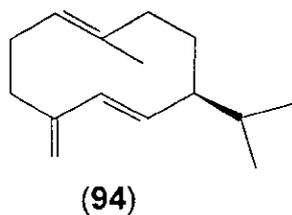


ESPECIE: *Heterotheca subaxillaris* [29]

COMPUESTOS:



	(91)	(92)	(93)
R	H	Me	H
R ₁	Ang	Ang	H



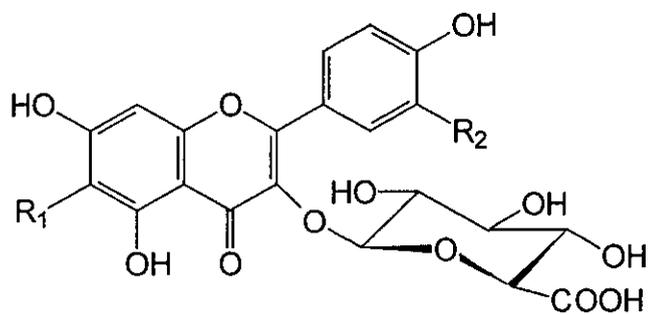
7-Hidroxicadalenos (42)

7-Hidroxi-3,4-dihidroca
dalenos (7)

4-Hidroxi-2-isopropil-4,7-
dimetil-1(4H)-naftalinona
(8)

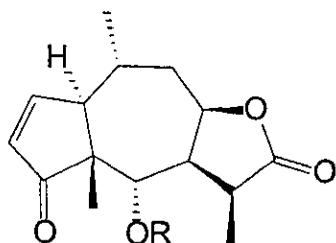
SUBSTANCIAS AISLADAS DE ARNICA MONTANA (ÁRNICA)

Glucurónidos de flavonoles de *Arnica montana* [30]



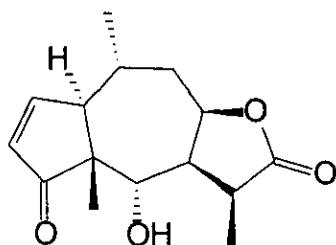
	R ₁	R ₂	
(96)	H	OH	3-O-β-D-Glucurónido de quercetina
(97)	H	H	3-O-β-D-Glucurónido de kamferol
(98)	H	OCH ₃	3-O-β-D-Glucurónido de isorhamnetina
(99)	OCH ₃	OH	3-O-β-D-Glucurónido de patuletina
(100)	OCH ₃	H	3-O-β-D-Glucurónido de 6-metoxikamferol

Arnicólidas de *Arnica montana* [31]

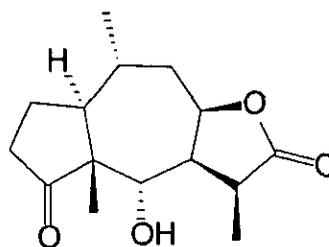


Arnicólidas

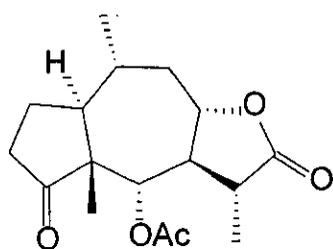
- (101) R = Ac
- (102) R = COCH₂ (CH₃)₂
- (103) R = COCH(CH₃)₂
- (104) R = COC(CH₃) -CH₂



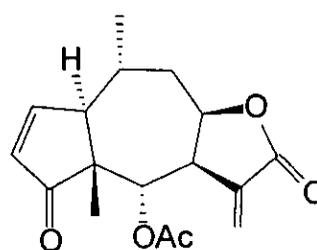
Dihydrohelenalina (105)



Tetrahydrohelenalina (106)

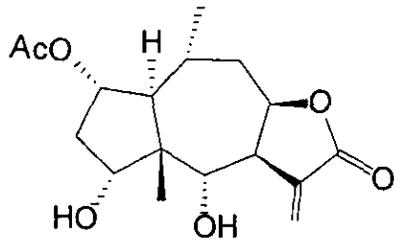


Acetiltetrahydrohelenalina (107)

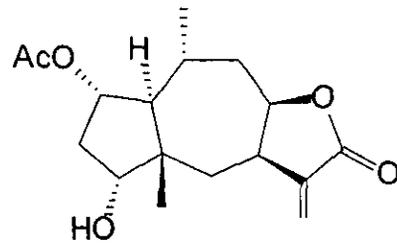


Acetilhelenalina (108)

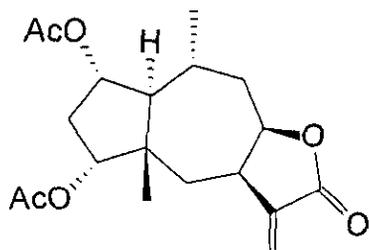
Arnica chamisonii [32]



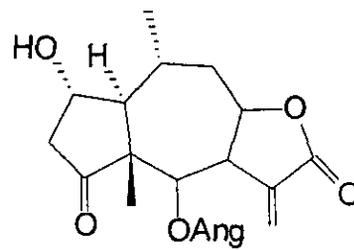
Chamisonólida (109)



6-Desoxichamisonólida (110)

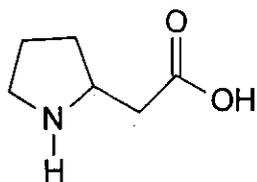


Diacetato 6-desoxichamisonólida (111)

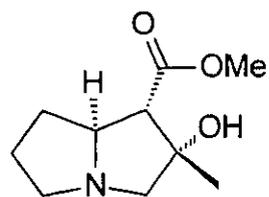


Arnifolina (112)

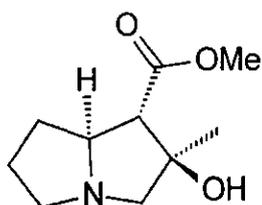
Arnica montana [33]



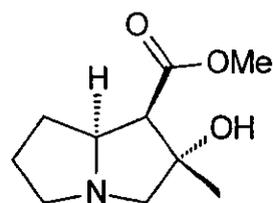
Ácido-2-pirrolidinacético (133)



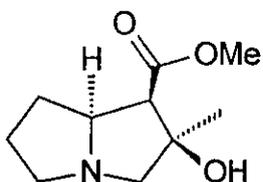
Tusilagina (114)



Isotusilagina (115)

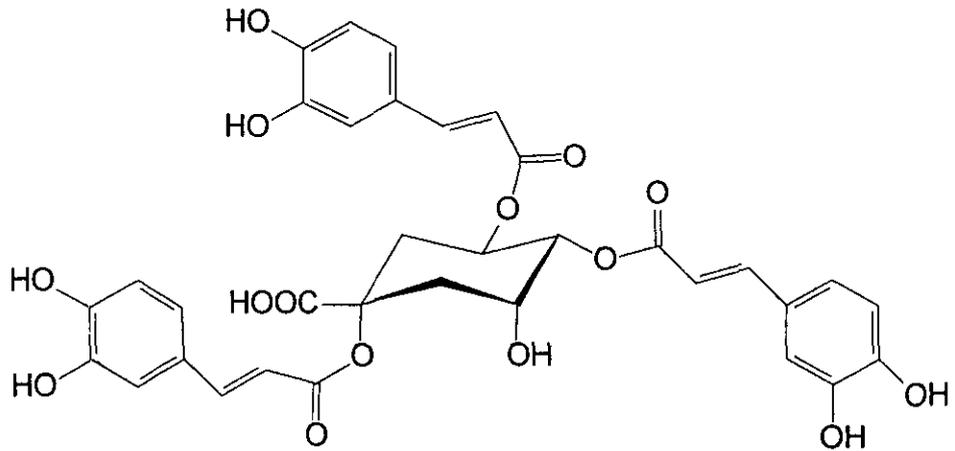


Neotusilagina (116)

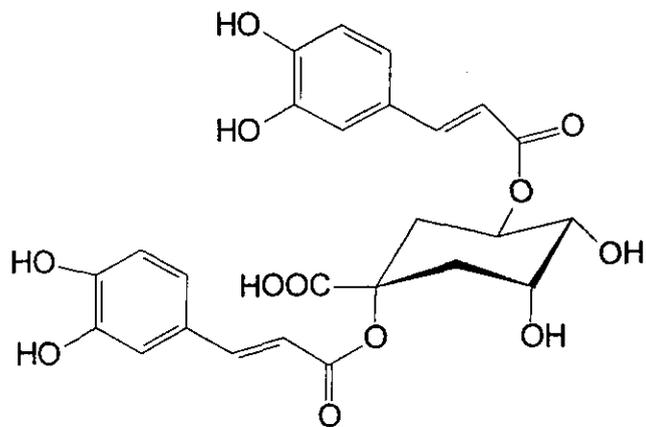


Neoisotusilagina (117)

***Arnica montana* [34]**

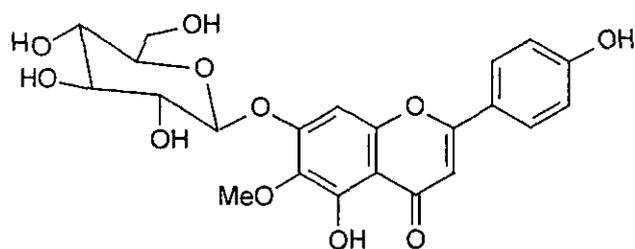


Ácido-1,4,5-O-cafeoilquínico (118)

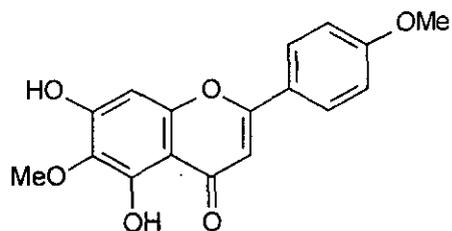


Ácido-1,4-di-O-cafeoilquínico (119)

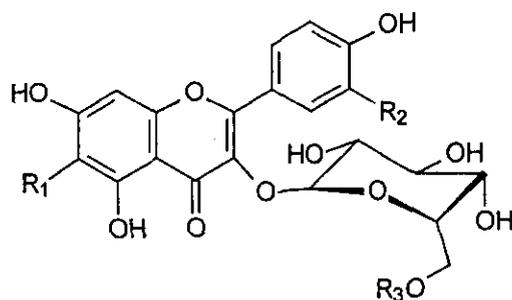
Arnica montana [35]



7-O-β-glucósido de hispidulina (120)



Pectolarigenina (121)



	R ₁	R ₂	R ₃
(122) 3-O-β-glucósido de isorhamnetina	H	OCH ₃	H
(123) 3-O-β-glc de 6-metoxikamferol	OCH ₃	H	H
(124) 3-O-β-glc de patuletina	OCH ₃	OH	H
(125) 3-O-β-D-glc de espinacetina	OCH ₃	OCH ₃	H

Actividad Anti-inflamatoria

Proceso Inflamatorio.

La inflamación se define como la respuesta fisiológica del organismo a lesiones ocasionadas por factores externos o internos. Es un proceso complejo en el que intervienen factores de tipo humoral, celular e inmunológico, todavía hoy en día conocidos de forma incompleta.

Se reconocen dos modelos de inflamación: aguda y crónica. La primera es una respuesta inmediata, de corta duración. Se caracteriza principalmente por la exudación de líquido y proteínas plasmáticas, y por la migración de leucocitos al lugar de la lesión. Así, la inflamación aguda es una reacción que depende más de la intensidad de la lesión que de la causa de la misma. Si la inflamación perdura varios días, se desarrolla la inflamación crónica, que se caracteriza por la aparición de linfocitos y macrófagos en el lugar de la lesión, así como por la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conjuntivo [36].

Cuando un tejido del organismo recibe un estímulo inflamatorio, se desencadena una serie de cambios progresivos, cuyos síntomas son rubor, calor e hinchazón. El rubor y el calor son debidos a un incremento del flujo sanguíneo en la zona, como resultado de la vasodilatación, la hinchazón es el resultado de alteraciones en la permeabilidad vascular. Inmediatamente después del estímulo inflamatorio, que va seguido de un breve periodo de vasoconstricción, se produce dilatación o hiperemia. Al mismo tiempo, se incrementa la permeabilidad vascular, produciéndose exudación. El exudado puede ser diferente en función de la cantidad de proteínas plasmáticas o de leucocitos neutrófilos (supurativos o pus) que contenga.

El fluido extravascular acumulado en el espacio intersticial, como consecuencia de la exudación plasmática, recibe el nombre de edema [37].

La inflamación está controlada por mediadores químicos, que poseen funciones específicas en la misma como son: histamina, 5-hidroxitriptamina, serotonina o cinina, prostaglandinas, leucotrienos, el factor de activación plaquetaria (PAF) citocinas, radicales libres, ácido hipocloroso, etc. [38].

Evaluación de Fármacos.

La evaluación de fármacos con actividad anti-inflamatoria se lleva a cabo por diferentes métodos, los más usados son la prueba de la carragenina en las patas traseras de ratas, y el edema inducido por el 13-acetato tetrahydroforbol (TPA) por ser más confiables y reproducibles, además de que se utiliza poco material.

Edema Inducido por Carragenina en Rata.

Este modelo es el más eceptado en la investigación y evaluación de fármacos anti-inflamatorios, ya que muestra una buena correlación con los resultados obtenidos en clínicas. Las carrageninas son polisacáridos extraídos de algunas algas rojas. La inyección subcutánea de carragenina produce una reacción inflamatoria aguda no específica como resultado de la acción secundaria de varios mediadores [39].

Este modelo de carragenina consiste en inyectar este agente inflamatorio en una de las patas traseras de la rata a la cual se va a tratar con el producto de prueba, el efecto anti-inflamatorio se observará en el volumen de la pata trasera comparada con la pata no tratada. Este modelo muestra dos fases:

1.- Fase inicial. Medida por la histamina y serotonina.

2.- Fase tardía: Medida por metabolitos del ácido araquidónico. Se ha determinado que los inhibidores de araquidonato ciclooxigenasa (COX) son más efectivos que los inhibidores del araquidonato lipooxigenasa (LO) en inhibir la inflamación

inducida por carragenina:

Modelo Experimental de TPA

Este modelo es utilizado para la valoración de la actividad anti-inflamatoria de fármacos aplicados por vía tópica y es utilizado por diversos grupos de investigación [38, 40]. La valoración de este ensayo consiste en tratar una oreja con este agente y tratada con el producto a ensayar y la actividad anti-inflamatoria se determina comparando el peso de la oreja tratada con la no tratada. Este ensayo involucra:

Dependencia de la liberación de ácido araquidónico y metabolitos.

Interacción con sitio receptor en la proteína quinasa C(PKC)

Un incremento en la enzima biosintética poliamina ODC (ornitina descarboxilasa).

Se ha determinado que inhibidores de PLA₂, CO y LO así como corticoides, son efectivos en la supresión del edema después de la aplicación tópica de TPA. Este método se describe en la parte experimental.

En los últimos años se han realizado diferentes estudios para evaluar la actividad anti-inflamatoria de los flavonoides. Sobre la base de estos estudios se ha sugerido que los flavonoides no solamente incrementan la permeabilidad capilar, sino que también inhiben numerosos estados en la inflamación. La actividad anti-inflamatoria de *Heterotheca inuloides* puede ser atribuida a la quercetina y sus glicósidos que han sido ampliamente estudiados por sus efectos sobre la inflamación. El flavonol ejerce efectos anti-inflamatorios en el edema inducido con aceite, la quercetina (9) inhibe la secreción de histamina. Los flavonoides ofrecen la ventaja de alto margen de seguridad y carencia de efectos secundarios tales como la ulceración, con respecto a drogas anti-inflamatorias [41,42,43] tipo aspirina.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

DISCUSION DE RESULTADOS

Del extracto acetónico de *Heterotheca inuloides* se obtuvieron varias fracciones mediante cromatografía en columna, empleando mezclas de hexano-acetato de etilo de polaridad creciente, como se informa en la parte experimental.

La elucidación estructural se describirá de acuerdo al grupo de productos naturales al cual pertenecen las sustancias aisladas, que son los siguientes: sesquiterpenos, flavonoides, cumarinas, esteroides y glicéridos.

Para la caracterización estructural de los constituyentes se realizó el análisis comparativo de sus constantes físicas y espectroscópicas, y la comparación directa con muestras auténticas.

Sesquiterpenos.

De la fracción E (eluato 41-66) se aisló por cromatografía un sólido blanco, pf 103-104°C. Esta sustancia mostró en IR (CHCl₃, espectro 1) absorciones características para grupos oxhidrilo, en 3375 cm⁻¹, bandas en 2959, 2869 cm⁻¹ correspondientes a metilos y metilenos, y absorciones en 1620, 1429 cm⁻¹, asignables a insaturaciones aromáticas.

En el espectro de masas (espectro 2) se observa el ion molecular (M⁺) a *m/z* 216, lo cual sugiere la fórmula molecular C₁₅H₂₀O.

En el espectro de RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, espectro 3) de este compuesto, se pueden observar señales aromáticas. Específicamente, en δ 6.85 se observa una señal simple que integra para un hidrógeno; éste fue asignado a un protón bencenoide. También se observa otra señal simple en δ 6.67, que integra para un

hidrógeno y que corresponde a una relación *para* entre ambos. Tomando en consideración ambas señales se propone la fórmula parcial A mostrada en la figura 1.

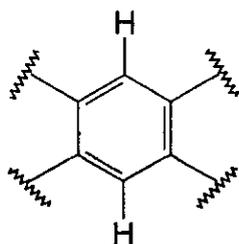


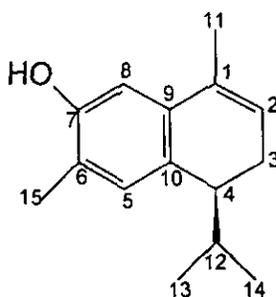
Figura 1. Fórmula parcial A

En δ 5.67 se observa una señal triple y ancha que integra para un hidrógeno, y fue asignada a un hidrógeno vinílico. En δ 4.53 se observa una señal simple que integra para un hidrógeno probablemente de un oxhidrilo; en δ 2.31- 2.34 se observa una señal múltiple que integra para tres hidrógenos, probablemente de un metileno y un metino; en δ 2.23 y 1.96 se observan dos señales simples que integra cada una para tres hidrógenos, correspondientes a dos metilos: uno aromático y otro vinílico, respectivamente. En δ 1.83 se observa una señal séxtuple que integra para un hidrógeno característico de un metino adyacente a dos metilos. Los cuales, se observan como dos señales dobles en δ 0.87 y 0.79, que integra cada una para tres hidrógenos y que corresponden a los metilos geminales.

La comparación entre los parámetros de resonancia magnética nuclear, infrarrojo, espectrometría de masas, punto de fusión, y rotación óptica, obtenidos para esta sustancia, y los informados en la literatura [20] para la 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (7) tabla 6, permitió establecer la identidad de ambas.

La tabla 6, ubicada en la parte experimental, muestra comparativamente los datos de RMN¹H informados en la literatura y los obtenidos en el presente trabajo.

La configuración en C-4 se propone como 4*S* únicamente por convención en la representación de los sesquiterpenos del cadinano, como los representa Bohlmann y colaboradores [20]. El discernimiento entre las estructuras enantioméricas permanece por realizarse.



7-Hidroxi-3,4-dihidrocadalenos (7)

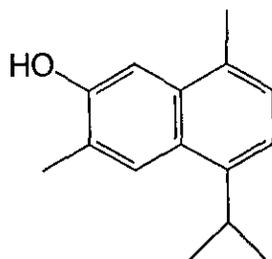
Mediante la aplicación de procedimientos cromatográficos se aisló, de la misma fracción E, un sólido cristalino con *pf* 115-116^o C. Esta sustancia mostró en IR (CHCl₃ espectro 4) absorciones características para grupos oxhidrilo en 3599 cm⁻¹, en 2927, 2866 cm⁻¹ muestra absorciones para grupos metilos, y en 1631, 1426 cm⁻¹ se observan bandas para grupos aromáticos.

En el espectro de masas (espectro 5) se observa el ion molecular (M^{*}) a *m/z* 214, lo cual sugiere la fórmula molecular C₁₅H₁₈O.

El análisis del espectro de RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz, espectro 6) para este compuesto indica notables similitudes al espectro 3 (correspondiente a 7). En δ 7.89 y 7.25 se observan dos señales simples que integran cada una para un hidrógeno, atribuidos a los hidrógenos de un anillo bencénico. Se observa un sistema AB en δ 7.15 (J=7 Hz), lo cual sugiere que hay un segundo anillo

bencénico con dos hidrógenos en posición *orto*, así mismo se observa una señal simple en δ 4.96 que integra para un hidrógeno, asignable a un hidrógeno hidroxílico. Se observa una señal heptuplete en δ 3.67 que integra para un hidrógeno, correspondiente a un metino unido a dos metilos geminales, observándose, complementariamente, una señal *d* en δ 1.37 que integra para seis hidrógenos de estos dos metilos. Finalmente se observan dos señales simples en δ 2.55 y δ 2.45 que integra cada una para tres hidrógenos, correspondientes a dos metilos aromáticos.

La comparación con los datos espectroscópicos de la literatura mostrados en la tabla 8 (ubicada en la parte experimental) permitió establecer que el compuesto aislado es 7-hidroxicalaleno (**57**), aislado previamente de *Heterotheca inuloides* [17].



7-Hidroxicalaleno (**57**)

La fracción G estuvo constituida por dos componentes mayoritarios, de acuerdo con su análisis por ccf, los cuales fueron separados por cromatoplaça preparativa. El primer constituyente que se obtuvo fue un aceite amarillo; esta substancia mostró en IR (CHCl_3 espectro 7) bandas de absorción correspondientes a grupos oxhidrilo en 3586 cm^{-1} , en 2965 cm^{-1} para grupos metilo y en 1662 cm^{-1} se observa una señal intensa característica de grupo carbonilo.

En el espectro de masas (espectro 8), se observa el ion molecular (M^+) a m/z de 230 lo cual sugiere la fórmula molecular $C_{15}H_{18}O_2$.

En el espectro de RMN^1H ($CDCl_3$, espectro 9), para este compuesto se puede observar que presenta señales en la zona de δ 7.89 - 7.37, lo cual indica la presencia de protones aromáticos, diferentes a los espectros anteriores. Específicamente, en δ 7.89 se observa una señal doble ($J=1.0$ Hz) que integra para un hidrógeno, asignada a un hidrógeno bencénico; en δ 7.65 se observa una señal doble ($J= 7$ Hz) que integra para un hidrógeno, lo cual indica que hay un sistema de hidrógenos *orto*, ya que en δ 7.40 se observa una señal *dd* ($J= 1$ y 7 Hz) correspondiente a un hidrógeno bencénico adicional.

La señal en 2.40 (s, 3H) corresponde a un metilo aromático que se ubica en la posición *orto* a los hidrógenos bencénicos, debido a la presencia de un anillo fusionado adicional, que se colocará en las posiciones remanentes. Esta discusión establece la fórmula parcial A mostrada en la figura 2, la cual incluye el trazo del sistema ABX.

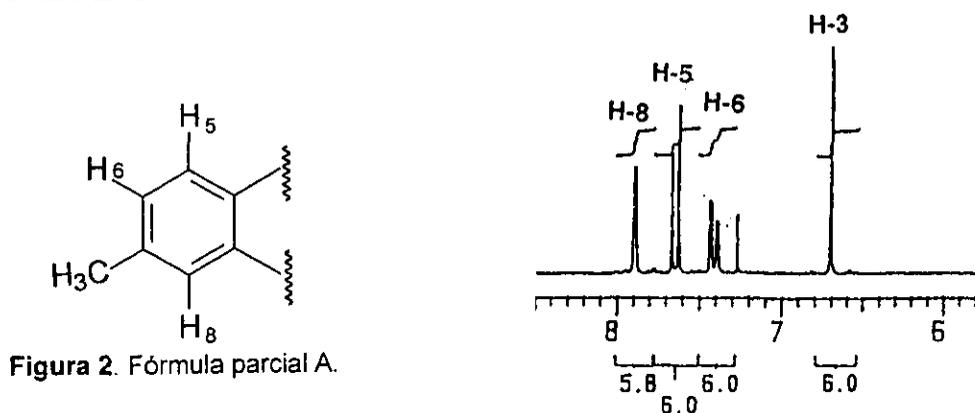


Figura 2. Fórmula parcial A.

Por otro lado, en δ 6.69 se observa una señal *d* ($J=1.6$ Hz), presumiblemente de un hidrógeno vinílico, el cual se encuentra acoplado a larga distancia con un hidrógeno que aparece en δ 3.08 (como heptuplete dobleteado).

La multiplicidad como heptuplete se explica si se ubica este metino como unido a dos metilos (δ 1.09 y δ 1.14, 3H c/u, d , $J=10$). El desplazamiento químico del protón vinílico (δ 6.69) establece su ubicación β a un grupo carbonilo (evidenciado por la absorción de 1662 cm^{-1} en IR), lo cual permite deducir la fórmula parcial B de la figura 3

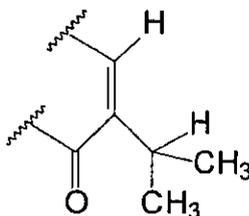
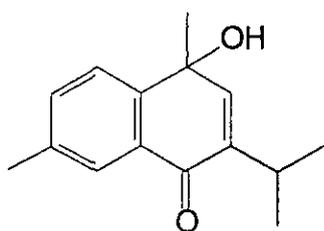
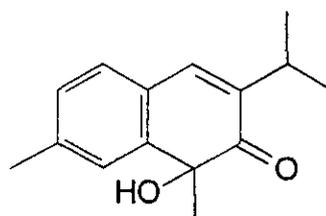


Figura 3. Fórmula parcial B

La señal adicional en δ 1.60 (s, 3H), se atribuye a un metilo sobre carbono cuaternario unido a oxígeno, que para satisfacer la fórmula molecular, el oxígeno pertenece a un hidroxilo terciario. La combinación de los fragmentos A y B con el residuo metil carbinólico permite la integración de las fórmulas C y D. Figura 4.



Fórmula C



Fórmula D

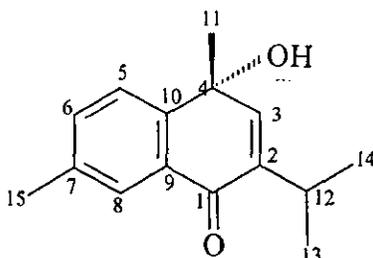
Figura 4. Fórmula C y D.

La absorción en IR del grupo carbonilo (1662 cm^{-1}) es más consistente con la fórmula C, en la cual el carbonilo está flanqueado por insaturaciones, mientras que

en la fórmula D sólo tiene una insaturación adyacente. Adicionalmente, la fórmula C pertenece al esqueleto de cadinano. Esta discusión permite establecer la fórmula C como la correspondiente al producto natural de *Heterotheca inuloides*.

Esta misma estructura se ha reportado en la literatura [20] como producto natural y se denomina 4-hidroxi-2-isopropil-4,7-dimetil-1(4H)-naftalinona. Los datos de RMN¹H de la literatura se muestran en la tabla 12 de la parte experimental.

Con respecto a la estereoquímica del alcohol terciario, esta se establece como α dado el efecto de Cotton positivo observado en la curva de dicroísmo circular (espectro 10).



4-Hidroxi-2-isopropil-4,7-dimetil-1(4H) naftalinona (8)

El segundo compuesto que se aisló de esta fracción se describirá más adelante, ya que se trata de una cumarina.

De la fracción L se aisló por procedimientos convencionales un sólido, cuyas características son las siguientes: en IR (KBr, espectro 11) se observa la presencia de las bandas correspondientes a grupos oxhidrilo en 3294 cm⁻¹; en 2957, 2523 cm⁻¹ se observan absorciones para metilos y metilenos, y en 1680 cm⁻¹ se observa una banda intensa de carbonilo.

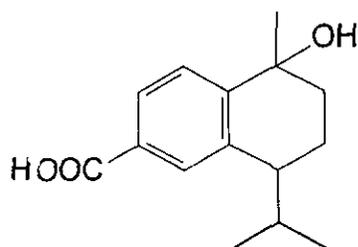
El espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz, espectro 12) muestra 15 señales, lo cual establece la naturaleza sesquiterpénica de esta sustancia. Entre estas señales destacan las seis correspondientes a carbonos bencénicos (140.07, 138.78, 129.22, 128.28, 126.48, 126.00), un carbonilo de ácido carboxílico (δ 168.10), un carbono cuaternario unido a oxígeno (δ 69.21), dos metinos alifáticos (δ 42.80 y 30.80), dos metilenos (δ 36.33 y 19.57), y tres metilos (δ 30.81, 20.93 y 17.55)

En el espectro de masas (espectro 13), se observa el ion molecular (M⁺) a *m/z* 248, lo cual indica la fórmula molecular C₁₅H₂₀O₃, y esta de acuerdo con un compuesto bencénico con un ácido carboxílico, fusionado a un ciclohexano; esta deducción es congruente con los seis grados de insaturación presentes en la estructura.

En el espectro de RMN¹H, (CDCl₃, 500 MHz, espectro 14) se observa un sistema ABX correspondiente a una sustitución 1,2,4 del anillo bencénico. La señal a más bajo campo (s 7.99, *d*, J=1 Hz) corresponde al protón desprotegido por el grupo carboxílico, mientras que los hidrógenos en disposición *orto* resuenan en δ 7.70 (*d*, J= 8.5 Hz) y δ 7.92 *dd*, (J= 8.5 y 2.0 Hz), lo cual permite deducir la fórmula parcial A de la fig 5. En esta figura se muestra el trazo del espectro y la fórmula parcial.



La presencia del ciclohexano fusionado al benceno, del carbinol terciario (δ 1.50, 3H, s) y del grupo isopropilo permiten extender la estructura al cadinano 1-metil- α -hidroxi-calamenano (66).



Ácido 7-metil-7- α -hidroxicalamen-15-oico (66)

En concordancia con los datos de RMN¹³C arriba descritos, ambos epímeros han sido informados en literatura (como ésteres metílicos) [25], como derivados de los ácidos naturales de *Heterotheca latifolia*.

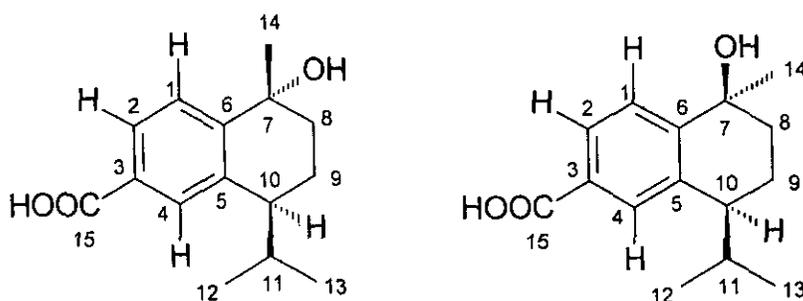


Figura 6.

La diferencia notable reside en el desplazamiento químico de H-10. Es claro que el isómero que tenga el desplazamiento químico a más bajo campo debe poseer una orientación *cis* con el hidroxilo en C-7. De esta deducción se concluye que la información publicada por Bohlmann no es correcta. En efecto, en la discusión de los resultados del artículo del autor alemán argumenta este efecto, pero las fórmulas publicadas se encuentran invertidas. Así, la substancia de *Heterotheca inuloides* posee la estructura con el hidroxilo en C-7 α y el isopropilo en orientación β *pseudo* ecuatorial, como se muestra en la figura 7. Estas asignaciones se confirman mediante las interacciones NOESY, las cuales se muestran en la figura

7.

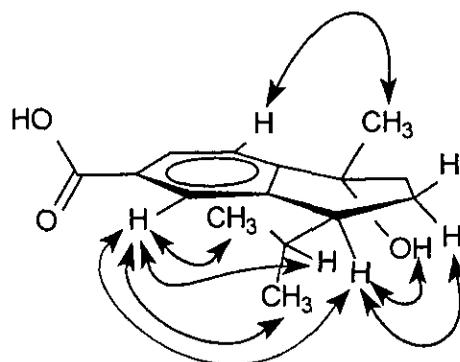


Figura 7. Interacciones observadas en el espectro NOESY (**66**)

De la fracción I se aisló por cromatografía un sólido cristalino con pf 168-170^o C. Esta sustancia mostró en IR (KBr, espectro 15) absorciones características para grupos hidroxilo en 3622 cm⁻¹, en 2972 cm⁻¹ para grupos metilo, y en 1692 cm⁻¹ se observa una señal intensa característica de un grupo carbonilo, presumiblemente de ácido.

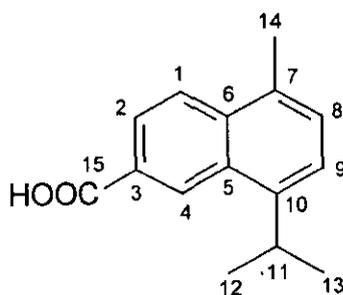
El espectro de RMN¹³C (125 MHz, espectro 16) para este compuesto presenta quince señales, las cuales confirman al grupo carbonilo de ácido (δ 150.21), a los fragmentos aromáticos y a los metilos.

En el espectro de masas (espectro 17) se observa el ion molecular (M⁺) a *m/z* 228 correspondiente a C₁₅H₁₆O₂, de un producto natural de naturaleza sequiterpénica.

El análisis de los desplazamientos químicos y multiplicidades de las señales del espectro de RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz, espectro 18) de esta sustancia permite deducir la presencia de un sistema ABC de un sistema bencenoide tetrasustituido similar al descrito para (**66**), y son las señales de δ 9.05 (*d*, J=1.8 Hz), δ 8.15 (*dd*, J=1.5, 8.5 Hz) y δ 8.09 (*d*, J=8.5 Hz). Un segundo sistema bencenoide puede

deducirse del espectro, donde se observa una señal *dd* ($J=8$) en δ 7.40, que integra para dos hidrógenos y que están en posición *orto* formando un sistema AB. Esto puede confirmarse en el espectro NOESY (espectro 19) donde se observa la interacción del H-8 con el metilo en C-7. Para este metilo se observa una señal simple en δ 2.70 que integra para tres hidrógenos. También se observa interacción de H-9 con dos metilos geminales de un isopropilo, observándose una señal *d* en δ 1.42 que integra para los seis hidrógenos de dichos metilos. Finalmente, en δ 3.85 se observa el heptuplete característico de un metino unido a los dos metilos geminales.

Los datos descritos permiten concluir que esta sustancia (**126**) es un producto natural presente en las partes aéreas de *Heterotheca inuloides*. El análisis de los datos de los espectros NOESY, HMBC y HMQC (espectros 19, 20, y 21) permiten realizar las asignaciones espectroscópicas inambiguas para los núcleos presentes. Esta sustancia no se encuentra descrita en la literatura.



Ácido cadalen-15-oico (**126**)

De esta misma fracción se aisló otro sólido cristalino con *pf* 198-200°C. Esta sustancia mostró en IR (KBr espectro 22) absorciones características para grupos oxhidrilo en 3618 cm^{-1} , una banda intensa característica de carbonilo de cetona en 1696 cm^{-1} , bandas en 1607 cm^{-1} de insaturaciones aromáticas y bandas en 2975,

2930 cm^{-1} de metilos y metilenos.

En el espectro de masas (espectro 23) se puede observar el ion molecular (M^+) a m/z 246, que sugiere la fórmula molecular $C_{15}H_{18}O_3$, la cual se confirma por los datos de RMN^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz, espectro 24)

En el espectro de RMN^1H (CDCl_3 , espectro 25) de este compuesto se puede observar que presenta señales en la zona de δ 6.71 - δ 7.72, lo que indica la presencia de un anillo bencénico. En particular, en δ 7.72 se observa una señal simple que integra para un hidrógeno del anillo aromático y que por estar a campo bajo los hidrógenos del mismo esqueleto, puede proponerse que este hidrógeno esté cercano a un grupo carbonilo. La presencia del carbonilo se corrobora en el espectro de RMN^{13}C (125 MHz, espectro 24) por una señal de cetona (δ 203.94). En δ 6.75 se observa otra señal simple que integra para un hidrógeno del anillo aromático, esta descripción permite proponer la fórmula parcial A mostrada en la figura 8.

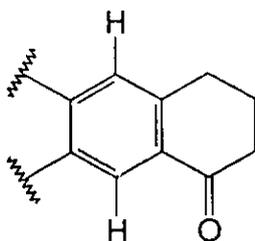
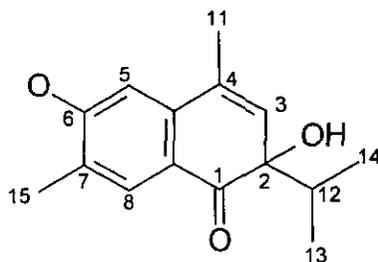


Figura 8. Fórmula parcial A

La ausencia de hidrógenos bencénicos adicionales sugiere que el anillo aromático este unido a un segundo anillo, como lo indica la fórmula molecular ($C_{15}H_{18}O_3$). En δ 6.04 se observa una señal doble ($J=1.5$) que integra para un hidrógeno, probablemente vinílico. En δ 5.39 y 3.25, se observan dos señales simples intercambiables que integra cada una para un hidrógeno, asignadas a un protón del fenol y a un grupo hidroxilo, respectivamente. En δ 2.27 y 2.09 se observan dos

señales simples que integra cada una para tres hidrógenos características de dos metilos, uno aromático y otro vinílico, respectivamente, que por el experimento NOESY (espectro 26) se observa la interacción del metilo vinílico al H-5 de un cadinano y con un hidroxilo en C-6. En δ 1.90 se observa la señal característica de un metino unido a dos metilos geminales; estos metilos se observan como dos señales dobles que integran para seis hidrógenos. Mediante el análisis de la modalidad HMBC del espectro de RMN¹H (espectro 27) se pueden corroborar las interacciones siguientes: H-8 interacciona con C(1) del carbonilo y con el metilo aromático; H-5 interacciona con C(6) y C(4); H-13, H-14 interaccionan con C(2) y C(12); H-15 interacciona con C(6) y C(7); H-11 interacciona con C(9) y C(3), confirmándose la estructura (127). Esta sustancia no se encuentra descrita en la literatura.



2,6-Dihidroxi-4,7-dimetil – 3 (4H)naftalinona (127)

La fracción M estuvo constituida, de acuerdo a su análisis por ccf, por dos componentes mayoritarios, que fueron separados por cromatoplaqa preparativa. El primer constituyente que se obtuvo fue un aceite amarillo; esta sustancia muestra en IR (CHCl₃ espectro 28) absorciones características para grupos oxhidrilo en 3619 cm⁻¹, bandas entre 2955, 2869 cm⁻¹ de metilos y metilenos, y no muestra absorciones para grupos aromáticos o carbonilo.

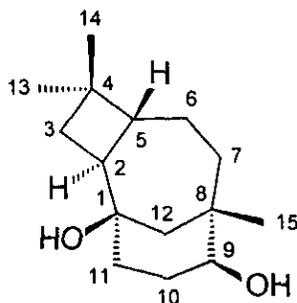
El ion molecular M⁺ m/z 238 observado en el espectro de masas (espectro 29)

está de acuerdo con $C_{15}H_{26}O_2$, estableciéndose tres grados de insaturación .

En el espectro de RMN¹³C (espectro 30) se observa la presencia de 15 señales a campo alto, deduciéndose que no hay grupos aromáticos. En δ 72.27 y 70.78 se observan átomos de carbono que llevan OH que por el experimento DEPT y APT mostraron ser, uno secundario y otro terciario. También se observan claramente seis señales de metilenos.

El espectro de RMN¹H (CDCl₃, espectro 31) de este compuesto no mostró señales en la zona de los hidrógenos bencénicos. En δ 3.44 muestra una señal triple que integra para un hidrógeno de un metino unido a un grupo hidroxilo; en δ 2.22 y 1.89 se observan dos señales *ddd* ($J=12, 10, J=9$ y 6), que integra cada una para un hidrógeno de dos metinos, que presumiblemente se encuentran vecinos. En δ 2.04 se observa una señal *dddd* (15, 12.5, 5.5 y 3) de un metileno, ya que el otro hidrógeno se manifiesta como un *ddt* ($J=15, 5, 3$) centrado en δ 1.77. En δ 1.64 se observa una señal *dt*, (12.5, 5) que junto a la señal en δ 1.51 (m), constituyen otro metileno. En δ 1.54 se observa una señal *t* ($J=10$), se encuentra acoplada geminalmente a la centrada en δ 1.49 ($J=10, 9$), que corresponde a otro metileno. En δ 1.53 y 1.39 se observan dos señales múltiples, que corresponden a un metileno adicional en δ 1.15 y 1.42 e integran para dos hidrógenos, ya que el otro hidrógeno se manifiesta como un *ddt* ($J=15, 5, 3$) centrado en δ 1.77. En 1.54 se observa una señal *t* ($J=10$), que integra para dos hidrógenos; en δ 1.53 y 1.39 se observan dos señales múltiples, que integra cada una para dos hidrógenos de dos metilenos; en 1.47 se observa una señal doble correspondiente a un metileno, y finalmente en 1.02, 1.06 y 0.93 se observan tres señales simples que integra cada una para tres hidrógenos correspondientes a tres metilos terciarios. Se deduce así que esta substancia es el cariolano 1 β ,9 β -diol (128), que es un metabolito que anteriormente fue aislado de *Sindora sumatrana* [44]. Los datos de RMN¹H

obtenidos para esta substancia y los informados en la literatura para este compuesto se resumen en la tabla 20.



Cariolan-1 β ,9 β -diol (128)

El segundo compuesto que se aisló es un sólido cristalino con pf 258-260°C, y mostró en IR (CHCl₃), una banda de absorción en la región de los grupos oxhidrilo en 3621 cm⁻¹, y bandas entre 2973, 2928, 2895 cm⁻¹ para metilos y metilenos.

El espectro de masas (espectro 32) muestra el ion molecular (M⁺) a m/z 444. Considerando 30 señales que se observan en el espectro de RMN¹³C (espectro 33) puede proponerse una fórmula molecular C₃₀H₃₆O₃. La presencia de un grupo hidroxilo queda confirmada por la pérdida directa de 18 unidades de masa a partir del ion molecular (M⁺ -18 = 426 (32)). Esta fórmula molecular requiere de 13 grados de insaturación.

El espectro de RMN¹H (CDCl₃, espectro 34) de este compuesto muestra la presencia de hidrógenos aromáticos. Son observables tres señales simples que integra cada una para un hidrógeno, y que son las siguientes: en δ 7.76, 7.05 y 7.00. Estas señales pueden asignarse a dos anillos bencénicos, como se muestra en la estructura parcial A figura 9.

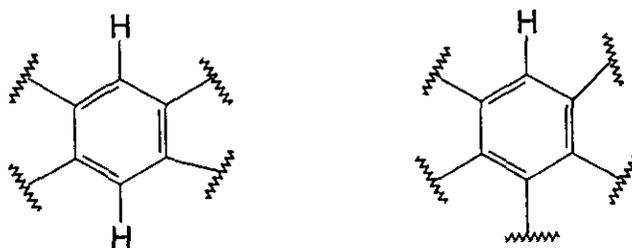


Figura 9. Estructura A.

Adicionalmente, se observa un sistema AB correspondiente a dos hidrógenos *orto* de un anillo bencénico (δ_H 7.12, δ_H 7.10, $J=7.5$) lo que establece la presencia de un tercer anillo aromático, como se muestra en la estructura parcial B de la figura 10

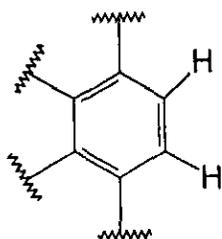


Figura 10. Fórmula parcial B

En el experimento HMQC (espectro 35) muestra la presencia de tres metilos sobre anillos aromáticos (δ_H 2.76, s, que correlaciona con δ_C 26.54; δ_H 2.38, s, que correlaciona con δ_C 17.69; y δ_H 2.20, s, que correlaciona con δ_C 15.67).

Puede identificarse en esta estructura a un fenol (δ_H 4.86, δ_C 152.45), un alcohol (presumiblemente terciario (δ_H 1.57, δ_C 68.75), a un metino unido a oxígeno (δ_H 4.57, δ_C 75.75), y a un metileno (δ_H 3.66, δ_C 39.92) de acuerdo al espectro HMQC (espectro 37). Los fragmentos deducidos pueden acomodarse considerando el esqueleto básico de los cadinanos análogos a los que anteriormente se han discutido, para las fórmulas parciales C y D que se muestran en la figura 11.

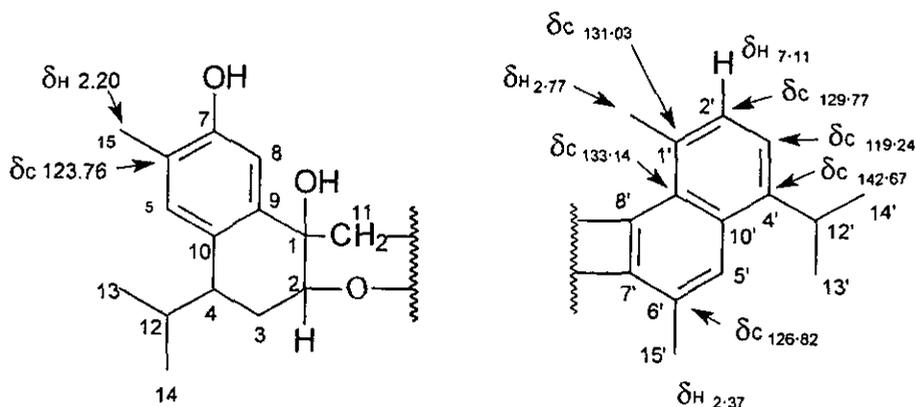


Figura 11. Fórmulas parciales C y D

Estas fórmulas parciales están de acuerdo con los fragmentos estructurales descritos y fueron confirmados por las correlaciones observadas en el espectro HMBC (espectro 36). Algunas correlaciones relevantes se muestran en la figura 12.

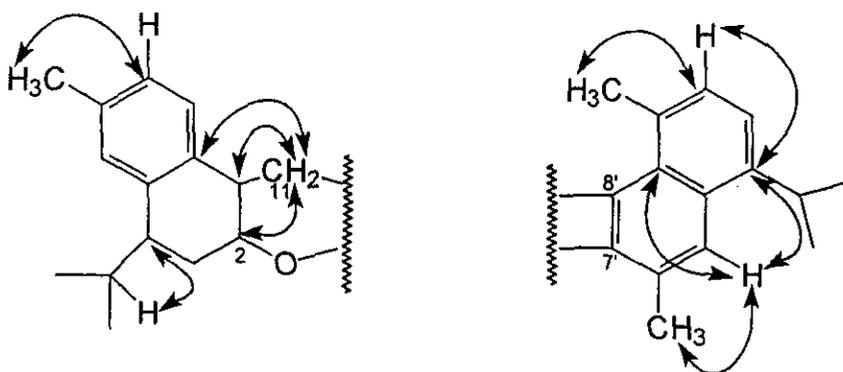
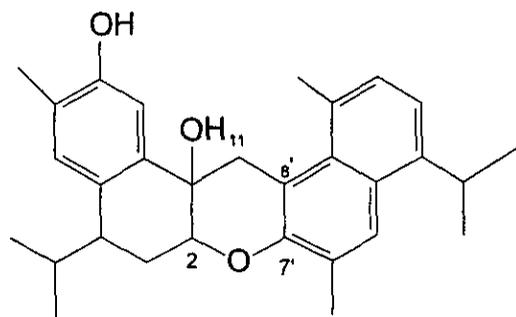


Figura 12. Correlaciones selectas observadas en el experimento HMBC.

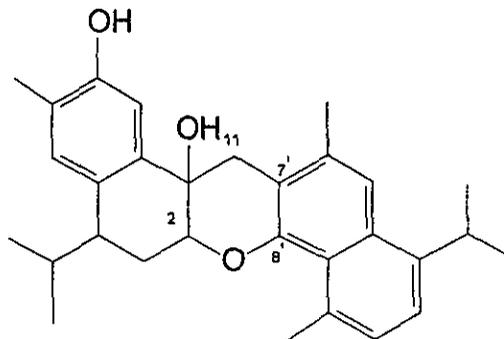
Los fragmentos estructurales mostrados suman 12 grados de insaturación, por lo que es necesaria la presencia de un anillo adicional que combine a los dos fragmentos estructurales. Considerando la numeración indicada en la figura 11 pueden existir las conectividades C(2)-O-C(7') y C(11)-C(8'), o bien, alternativamente C(2)-O-C(8') y C(11)-C(7'), para generar las fórmulas E y F,

respectivamente, las cuales representan *regio*-isómeros. Figura 13.



Fórmula E

Conectividad C(2)-O-C(7')
y C(11)-C(8')



Fórmula F

Conectividad C(2)-O-C(8')
y C(11)-C(7')

Figura 13. Fórmulas E y F

La discriminación entre las fórmulas E y F se llevó a cabo mediante el análisis de las correlaciones observadas en el espectro bidimensional HMBC. En particular, las interacciones mostradas en la figura 14, (H(11) → C(8'), H(11) → C(7'), H(11) → C(9') y H(2) → C(7'), dan evidencia de la conectividad C(2)-O-C(7') y C(11)-C(8'), lo cual indica que la fórmula E corresponde a la estructura del metabolito secundario de *Heterotheca inuloides*. Estas interacciones se muestran en la figura 14.

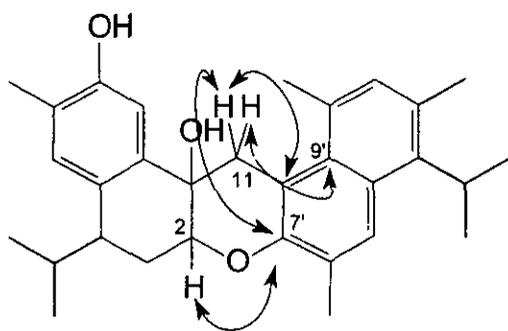


Figura 14. Interacciones mostradas en HMBC.

Esta conectividad C(2)-O-C(7') y C(11)-C(8') queda confirmada mediante el análisis del espectro NOESY. (espectro 37). Las correlaciones en esta modalidad espectroscópica bidimensional que corroboran las uniones se muestran en la figura 15.

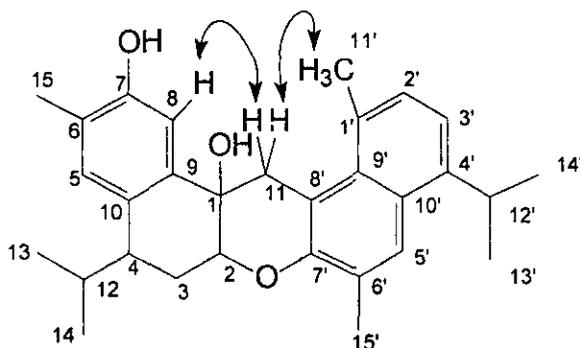


Figura 15. Correlaciones selectas observadas en el espectro NOESY.

En la estructura deducida existen tres centros estereogénicos que pueden generar $2^3 = 8$ estereoisómeros (4 pares de enantiómeros). Dado que el producto natural aislado es ópticamente activo ($[\alpha]_D^{22} = -15$), su estructura debe corresponder a uno de los ocho estereoisómeros.

Con el fin de simplificar la discusión de la estereoquímica de esta sustancia se consideran las fórmulas mostradas en la figura 15, en las cuales se mantiene al isopropilo con orientación β y se tiene la fusión de anillos *cis* o *trans*

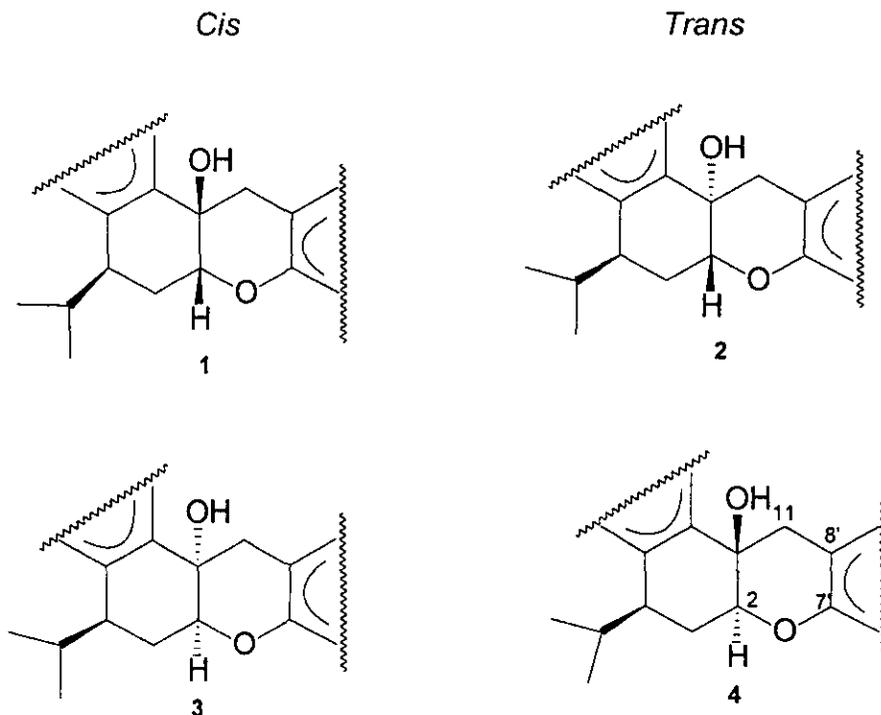


Figura 16. Posibilidades estereoisoméricas para el dímero del cadinano (se omiten los enantiómeros)

El isómero 4 de la figura 16 es el que se propone como la estructura correcta ya que cumple con los siguientes requisitos

- 1.- El H-2 debe tener una disposición "axial" ya que posee una constante *trans* diaxial ($J=11,4$) con otro hidrógeno.
- 2.- El isopropilo tenderá a la orientación ecuatorial (menos impedimento estérico)
- 3.- En el espectro de NOESY se observa la interacción de H-2 \rightarrow H-11 α .

La figura 17 muestra la proyección conformacional simplificada para el isómero 4 de la figura 16.

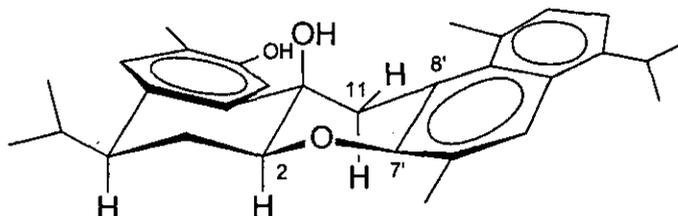


Figura17.

Cumarinas

De la fracción G, como ya se mencionó anteriormente, se aisló un compuesto cristalino con pf 64-65^o C

En el espectro de IR (CHCl₃, espectro 38) se observa una banda intensa en 1729 cm⁻¹ característica de grupos carbonilo y una banda en 1614cm⁻¹ para un grupo aromático.

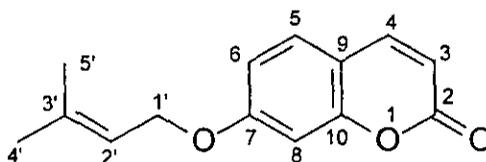
El espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 125 MHz, espectro 39) muestra señales para catorce carbonos, lo cual nos indica que no es un sesquiterpeno.

En el espectro de masas (espectro 40) se observa el ion molecular (M⁺) m/z 230 lo cual indica la fórmula molecular C₁₄H₁₄O₃, la cual esta de acuerdo con un sistema bencénico fusionado a una cadena alifática y a un éter cíclico, y esta deducción es congruente con ocho grados de insaturación.

En el espectro de RMN¹H (CDCl₃, espectro 41) de este compuesto se muestran las

siguientes señales: en δ 7.63 se observa una señal *d* ($J=9$) que integra para un hidrógeno, lo cual indica que hay una relación vecinal con un hidrógeno vinílico, que se observa como una señal doble en δ 6.24 ($J=9$), observándose un sistema AB, lo cual se confirma mediante las correlaciones que presentan los hidrógenos en el espectro COSY. En δ 7.35 se observa otra señal doble ($J=9.5$) que integra para un hidrógeno, lo cual indica que hay una relación *orto* con un hidrógeno vecino, que se localiza en δ 6.83 como una señal *dd* ($J=2$ y 9.5) que integra para un hidrógeno, lo cual indica que tiene ubicados dos hidrógenos, uno en posición *orto* y otro en *meta*, de un anillo bencénico, estableciéndose el núcleo de la cumarina. En δ 5.47 se observa una señal triple que integra para un hidrógeno, presumiblemente de un hidrógeno vinílico. En δ 4.57 se observa otra señal doble ($J=6.5$) que integra para dos hidrógenos de un oximetileno alílico, y finalmente se observa una señal doble que integra para seis hidrógenos, de dos metilos geminales.

Se deduce así que esta sustancia es la 7-(3,3 -dimetilaliloxi)cumarina, que es un metabolito que ya ha sido aislado anteriormente [45, 46]. La ubicación del oxiprenilo se confirma en C(7) por comparación de los datos publicados. Los datos de RMN¹H obtenidos para esta sustancia y los informados en la literatura se encuentran resumidos comparativamente en la tabla 11 de la parte experimental.



7-[3,3-dimetilaliloxi]cumarina (130)

Flavonoides.

De la fracción N se aisló por cromatografía y cristalización un sólido amarillo con $mp > 300^{\circ}C$.

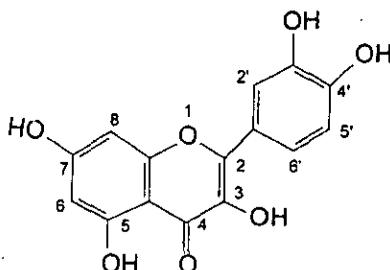
Esta sustancia mostró en IR (KBr, espectro 42) una banda de absorción en la región de los grupos oxhidrilo en 3334 cm^{-1} , bandas en 1658 cm^{-1} de grupos carbonilo, en 1612 , 1560 cm^{-1} de compuestos aromáticos.

El análisis de RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz, espectro 43) muestra 15 señales, pero diferentes a los sesquiterpenos antes mencionados, y se observa que existen dos anillos aromáticos.

En el espectro de masas (espectro 44) se observa el ion molecular (M⁺) a m/z 302, lo cual indica la fórmula molecular C₁₅H₁₀O₇, y está de acuerdo con 11 grados de insaturación.

En el espectro de RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, espectro 45), de este compuesto muestra un trazo característico para flavonoides; es decir, señales a campo bajo correspondientes a hidrógenos bencénicos, e hidrógenos fenólicos intercambiables. En efecto, se observa un sistema ABX y un sistema AB característico del núcleo quercetina, en δ 6.93 se observa una señal *d* (J=8.7), lo que indica que tiene un hidrógeno vecino en posición *orto*, en δ 7.59 se observa una señal *dd* (J=2), en δ 7.75 se observa una señal *d* (J=2) y a campos más bajos se observa el sistema AB, es decir en δ 6.38 se observa una señal *d* (J=2) y otra señal *d* (J=2) lo cual quiere decir que ambos hidrógenos están en posición *meta*. Se deduce así que esta sustancia es la 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona (quercetina **9**), que es un metabolito ampliamente distribuido en plantas superiores.

Los datos de RMN¹H (espectro 45) obtenidos para esta sustancia y los informados en la literatura para este compuesto se resumen en la tabla 23 de la parte experimental.



3,5,7,3',4'-Pentahidroxi flavona (quercetina 9)

Esteroles.

De la fracción G obtenida por elución con hexano-acetato de etilo, se obtuvieron por cromatografía y recristalización una mezcla de esteroles, β sitosterol (12) y estigmasterol (13)

Glicéridos

De la fracción K se aisló por cromatografía un aceite amarillo. Esta sustancia mostró en IR (CHCl_3) absorciones características para grupos oxhidrilo en 3622 cm^{-1} , y en $2927, 2854 \text{ cm}^{-1}$ para metilos y metilenos.

En el espectro de RMN¹H (CDCl_3) se observa la presencia de hidrógenos vinílicos (δ 5.34) y en δ 3.84 de hidrógenos alílicos, sugiriendo la estructura de glicéridos (ésteres del glicerol) para este grupo de sustancias, donde el número de átomos de carbono en las cadenas puede ser variable.

Resultados de la Actividad Biológica.

Evaluación biológica de las subfracciones del extracto de acetona tabla 2^a

Fracciones	% de Inhibición
A	Sin Actividad
B	Sin actividad
C	Sin actividad
D	Sin Actividad
E	Sin Actividad
F	sin actividad
G	Sin Actividad
H	Sin actividad
I	66.95 ± 12.79
J	28.67 ± 6.78
K	36.25 ± 17.91
L	62.26 ± 4.96
M	68.75 ± 5.43
N	78.13 ± 3.24

Tabla 2. Porcentaje de inhibición de las subfracciones. Conc. 0.5 mg/oreja.

^a Las fracciones marcadas en negritas fueron sometidas a análisis químico exhaustivo.

Actividad anti-inflamatoria preliminar de los 11 metabolitos aislados de *Heterotheca inuloides*.

COMPUESTO Conc. = 0.5mg/oreja	% DE INHIBICION
7-Hidroxi-3,4-dihidrocadalenol (7)	31.58 ± 2.91
7-Hidroxycadalenol (57)	46.31 ± 11.77
Naftalinona (8)	41.71 ± 10.21
7-[3,3-Dimetilaliloxi] cumarina (130)	14.17 ± 9.81
Ácido cadalen-15-oico (126)	60.24 ± 10.0
3,7-Dihidroxi-1,6-dimetil-3 (4H) naftalinona (127)	57.24 ± 11.58
Glicérido	17.43 ± 6.47
Calamenano (66)	24.60 ± 15.31
Cariolan 1,9 β diol (128)	66.71 ± 13.52
Dicadalenol (129)	70.39 ± 10.33
Quercetina (9)	66.05 ± 16.20

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de los compuestos puros aislados.

Como se observa en la tabla 3, los tres últimos compuestos presentaron la mayor actividad anti-inflamatoria por lo que se les realizó una curva dosis respuesta, cuyos resultados se muestran en la tabla 4. Observándose como compuesto más activo el dicadalenol (129), y el de menor actividad el cariolan-1β,9β diol (128)

Discusión de resultados

COMPUESTOS	DOSIS (mg/oreja)	% INHIBICION EDEMA	DE ₅₀ (mg/oreja)
(129)	0.01	17.08* ± 4.05	
	0.05	29.45** ± 6.10	0.11
	0.1	57.06** ± 4.73	(0.03,0.46)
	.5	70.15** ± 3.71	
(128)	0.05	20.74* ± 3.22	
	0.1	28.96** ± 4.87	0.34
	0.5	56.17** ± 3.01	(0.27,0.41)
	1.0	67.76** ± 6.57	
(9)	0.05	29.93** ± 7.38	
	0.1	41.86** ± 5.47	0.16
	0.5	67.42** ± 3.92	(0.12,0.21)
	1.0	83.60** ± 3.05	
Indometacina	0.05	26.35*	
	0.1	34.77**	0.18
	0.5	60.53**	(0.07,0.52)
	1.0	93.48**	

* p< 0.05 ** p< 0.01

Tabla 4. Actividad anti-inflamatoria de Dicadalenol (129), Cariolan1,9 β diol (128), y Quercetina (9).
En la prueba de TPA en la oreja de raton.

5. PARTE EXPERIMENTAL

Material y Equipo

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns, y no están corregidos. Los espectros de IR se obtuvieron en instrumentos Perkin-Elmer 238-B. Los espectros de RMN¹H se obtuvieron en un espectrómetro analítico Varian Gemini 200 y Varian XR-300, a 300 y 500 MHz, utilizando como disolvente CDCl₃ y tetrametilsilano (TMS), como referencia interna. Los espectros de RMN¹³C se obtuvieron en instrumentos Varian a 75 y 125 MHz. Para la elucidación estructural de algunas sustancias se recurrió a experimentos en RMN¹³C con desacoplamiento electrónico por transferencia de polarización (DEPT), (HMQC), (HMBC), (COSY), (NOESY), en RMN¹H

Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro Hewlett Packard 5985-B, utilizando la técnica de impacto electrónico de ionización de 70 eV.

Procedimiento Experimental

Heterotheca inuloides fue colectada e identificada por el Dr. Robert Bye (Instituto de Biología de la UNAM), y una muestra de la misma se encuentra depositada en el Herbario del Jardín Botánico de la Universidad Nacional Autónoma de México, con la clave, R. B. 19401.

Para el estudio de esta planta se utilizaron las flores y hojas, que es el material que se emplea en la medicina tradicional, las cuales se dejaron secar a temperatura ambiente.

El material vegetal seco (3.5 Kg) fué extraído con acetona (3 ocasiones, 1 día cada vez) y posteriormente con metanol (3 ocasiones, 1 día cada vez) a temperatura ambiente, obteniéndose 195 y 180 g de residuo, respectivamente. El

procedimiento general para la extracción de la planta se muestra en el diagrama 1.

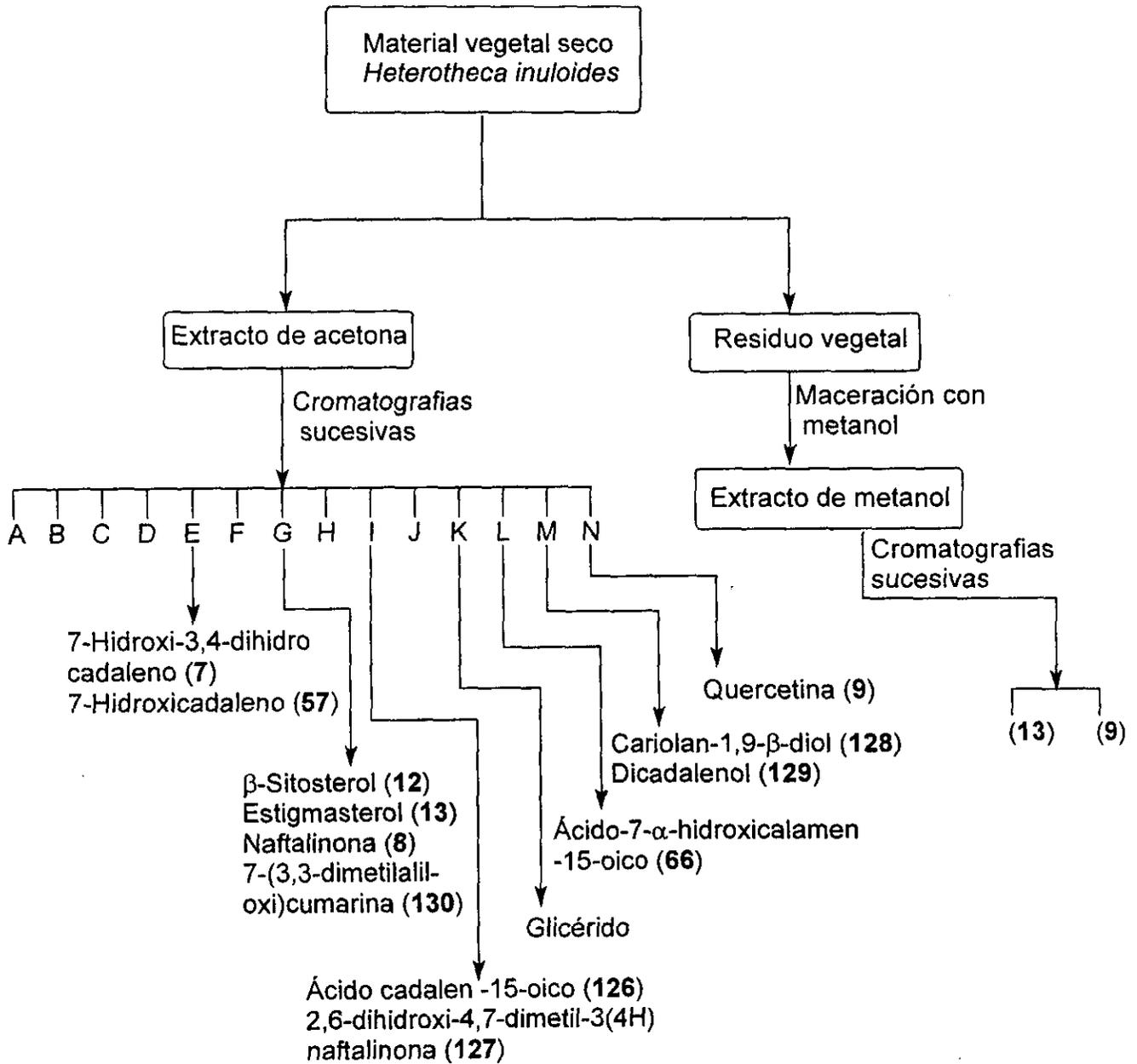


Diagrama 1 Obtención de los extractos y principales fracciones en la purificación de los constituyentes de *Heterotheca inuloides*.

La composición de los extractos obtenidos, así como la pureza de las sustancias aisladas, fueron analizados por cromatografía en capa fina (ccf). En esta técnica se utilizaron cromatofolios Alugram-Sil G/UV 254 Macherey-Nagel; y como reveladores, una solución de sulfato cérico amoniacal al 1% en ácido sulfúrico 2N, con posterior calentamiento de la placa a 70 °C, y una lámpara de UV Spectroline Modelo ex-20 con longitudes de onda a 254 y 365 nm.

A los dos extractos obtenidos, acetónico (195 g) y metanólico (180 g), se les realizó la prueba de actividad anti-inflamatoria en el edema inducido por TPA en la oreja de ratón, presentando la siguiente inhibición.

% de Inhibición Conc. 0.5 mg/oreja

Extracto de Acetona	61.72
Extracto de Metanol	4.49

Actividad anti-inflamatoria de extractos o compuestos de origen natural administrado tópicamente en el edema inducido con 13-acetato-12-miristato diester diforbol (TPA) en la oreja de ratón.

Método para evaluar la actividad antiedematosa en el edema inducido por TPA.

Este método se realizó tomando en cuenta el método de Tubaro y Gómez [38, 42]

En este estudio se emplearon ratones machos NIH cuyo peso osciló entre 25 a 30g. Se emplearon para las pruebas preliminares tres animales por compuesto en una conc. de 0.5 mg/oreja, y para la curva dosis respuesta grupos de cinco a ocho

animales por dosis a las conc. de 0.05, 0.1, 0.5, y 1.0 mg/oreja.

Los animales fueron anestesiados con imalgen y posteriormente se les aplicó una solución de 13-acetato-12-O-tetradecanoil forbol (TPA 2.5 µg) disueltos en 10µl de etanol, tanto en la parte interna como externa de la oreja derecha por medio de una microjeringa, y en la oreja izquierda sólo se le aplicó 10µl de etanol en ambas caras, tanto los compuestos de prueba como el fármaco prototipo (indometacina) se disolvieron en acetona, a las concentraciones antes mencionadas en un volumen de 20µl fueron aplicadas tópicamente 10 minutos después de la administración de TPA en la oreja derecha. Los grupos controles recibieron solamente acetona (20µl) y el grupo testigo recibió indometacina disuelta en las dosis especificadas anteriormente. La inflamación se desarrolla por espacio de cuatro horas, y al finalizar dicho periodo, los animales se sacrifican por dislocación cervical, y se tomó de la porción central de cada oreja una muestra de tejido con ayuda de un sacabocados de (9 mm de diámetro), posteriormente fueron pesados, la diferencia en peso de esta porción central fue tomada como medida de la respuesta anti-edematosa, el % de inhibición se calcula por la siguiente ecuación

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{Edema A} - \text{Edema B}) \times 100}{\text{Edema A}}$$

Edema (mg) = peso de la oreja tratada con TPA – Peso de la oreja sin TPA.

Edema A = Edema del grupo control

Edema B = Edema del grupo tratado con los compuestos.

Estos resultados muestran que el extracto de acetona fue el más activo, por lo cual se procedió a realizar una fraccionación por cromatografía en columna a presión reducida (ccpr). Para ello, fue necesario adsorber el extracto en gel de sílice Merck 60 GF 254 en una relación extracto 1:5. El desarrollo de la

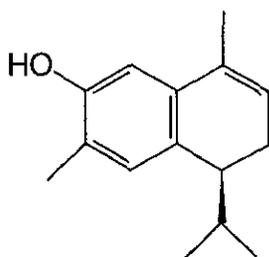
cromatografía se llevó a cabo utilizando inicialmente hexano como eluyente e incrementando la polaridad gradualmente con una mezcla de hexano-acetato de etilo. El número de fracciones resultantes de la columna cromatográfica anterior, el peso de las mismas y las sustancias aisladas a partir de estos, se presentan en la tabla 5

Eluato (500 ml).	Fracción	Peso (g).	Eluyente (Hex/AcOEt)	Compuesto Identificado
1 - 13	A	5.6	Hexano	
14 - 20	B	2.3	99:1	
21 - 31	C	3.2	98:2	
32 - 40	D	17.3	97:3	
41 - 66	E	7.8	95:5	7-Hidroxi-3,4 dihidrocadaleno (7)
67 - 87	F	14.9	93:7	
88 - 115	G	9.4	91:9	β -Sitosterol (12), Estigmasterol (13)
116 - 130	H	6.3	88:12	
131 - 145	I	7.8	85:15	
146 - 157	J	5.8	80:20	
158 -169	K	10:10	75:30	
170 - 193	L	6.8	70:30	
194 - 211	M	5.5	60:40	
212 - 227	N	11.2	50:50	

Tabla 5 Fracciones obtenidas de la columna cromatográfica de extracto hexánico del árnica mexicana.

Los datos espectroscópicos de la 7-hidroxi, 3-4-dihidrocadaleno son los siguientes:

Parte Experimental



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

Rf 0.33 (hex-AcOEt 9:1)

PM 216

Pf 103-4°C

UV (MeOH) λ max. (ϵ) 304.0 (71.), 265.5(11.394), 221.5(362.34).

$[\alpha]_D^{22} = -24$ (c 2, MeOH)

IR (espectro 1, CHCl₃, cm⁻¹); 3599, 2927, 2866, 1631, 1446, 1464

RMN¹H (espectro 3, 300 MHz, CDCl₃, δ , J (Hz); 6.85 (1H, s, H-5), 6.67 (1H, s, H-8), 5.67 (1H, t, H-2), 4.53 (1H, s, OH), 2.31-2.34 (3H, m, H-3 y H-4), 2.23 (3H, s, C-15), 1.96 (3H, s, C-11), 1.83 (1H, hep, H-12), 0.87 (3H, d, C-13), 0.79 (3H, d, C-14).

EMIE (espectro 2, *m/z* int.rel.) 115 (6), 128 (8), 145 (12), 158 (34), 173 (100), 216 (24)

La comparación de los datos de RMN¹H obtenidos para (**7**) con los informados en la literatura [20] para 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (**7**), las cuales se muestran en

la tabla 6 y permitió establecer la identidad de ambas sustancias.

Asignación	Datos reportados de literatura	Datos Observados
H-2	m, 5.71	t, 5.67
H-3	m, 2.38	m, 2.31-2.34
H-4		
H-5	s, 6.89	s, 6.85
H-8	s, 6.62	s, 6.67
H-11	d, 1.99	s, 1.97
H-12	q, 1.88	hep, 1.83
H-13	d, 0.82	d, 0.87
H-14	d, 0.80	d, 0.79
H-15	d, 2.28	s, 2.23

Tabla 6. Datos de RMN¹H obtenidos de 7 y los reportados[20]

A las subfracciones se les realizó nuevamente la evaluación de actividad antiinflamatoria a la conc. de 0.5 mg/oreja en el edema inducido por TPA en la oreja de ratón, mediante el procedimiento descrito anteriormente. Los resultados se presentan en la tabla 2. En discusión de resultados.

La fracción E (41-66, 7.8 g) fue sometida a fraccionamiento por cromatografía en columna de 5 cm de diámetro empacada con 40 g de sílica gel 60 GF-254 (5:1 sílica muestra). La elución de esta columna se realizó a presión reducida y se utilizó hexano 100% hasta la fracción 8, posteriormente se utilizaron mezclas de hexano:AcOEt (98:2) hasta la fracción 23 y 96:4 hasta la fracción 30.

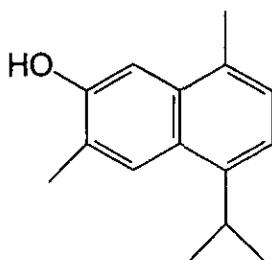
Con los eluatos 14-25 (3.2 g) se preparó una nueva columna cromatográfica, de 3 cm de diámetro, 20 g de sílica gel 60 GF-254, 5:1 sílica muestra, a presión reducida, y los datos para esta columna se muestran a continuación en la tabla 7

Parte Experimental

Eluato	Fraccion	Peso (g)	Eluyente (Hex-AcOEt)	Compuesto Identificado
1 - 5	E ₁	1.50	98:2	
6 - 10	E ₂	0.85	94:6	
11 - 15	E ₃	1.70	90:10	7-Hidroxicaleno (57)
16 - 23	E ₄	2.0	85:15	

Tabla 7. Fracciones obtenidas de los eluatos 14-24

De la fracción E₃ se aisló un compuesto sólido cristalino, el cual se purificó mediante recristalizaciones sucesivas empleando acetona a temperatura ambiente, obteniéndose 35 mg de 7-hidroxicaleno. Sus características físicas y espectroscópicas son las siguientes.



7-Hidroxicaleno (57)

Rf 0.35 (hex-AcOEt 9:1)

PM 214

Pf 115-6° C

IR (espectro 4, CHCl₃ cm⁻¹), 3622, 2972, 1692.

RMN¹H (espectro 6, 500 MHz, CDCl₃), δ, J (Hz); 7.89 (1H, s, H-5), 7.25 (1H, s, H-8), 7.15 (2H, dd, J=7, H-2 y H-3), 4.96 (1H, s, OH), 3.67 (1H, hep, H-12), 2.55 (3H, s, H-11), 2.46(3H, s, H-15), 1.37 (6H, d, H-13 y H-14).

EMIE (espectro 5 m/z (int.rel)) 214 (75), 199 (11), 173 (14), 154 (100), 136 (88), 12

(15), 107 (21), 89 (18), 77 (19).

Los datos obtenidos para esta substancia y los comparados con la literatura [17] permitieron establecer la identidad de esta substancia, tabla 8

Asignación H	Datos informados 300 MHz, CDCl ₃ :	Datos observados 500 MHz CDCl ₃
H-2,H-3	7.15	7.15,dd(J=7)
H-5	7.85,s	7.89,s
H-8	7.23,s	7.25,s
H-11	2.54,s	2.55,s
H-12	3.66,m	3.67,hep
H-13,H-14	1.36,d	1.37,d
H-15	2.45,d	2.46,s

Tabla 8 Comparación de los datos obtenidos para 57 con los informados en la literatura [17].

La fracción G (88-115 9.4 g) fue sometida a fraccionamiento en una columna cromatográfica empacada con 90 g de sílica gel 60 GF-254 en relación 10:1 de sílica muestra a presión reducida, iniciando la elución con hexano 100% y posteriormente se utilizaron mezclas de hexano-AcOEt, obteniéndose los siguientes resultados tabla 9.

Eluato	Fracción	Peso (g).	Eluyente (Hex/AcOEt)	Compuesto Identificado
1 - 6	G ₁	1.8	hexano 100%	
7 - 10	G ₂	0.8	98:2	
11 - 16	G ₃	1.0	96:4	
17- 18	G ₄	1.5	9:1	Estigmasterol (13) β-Sitosterol (12)
19 - 27	G ₅	0.55	85:15	
28 - 40	G ₆	0.45	4:1	
41 - 46	G ₇	1.2	75:25	

Tabla 9 Fracciones obtenidas del eluato G

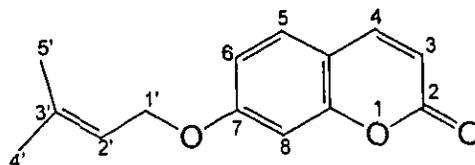
De la fracción G₄ cristalizó un sólido en forma de agujas que por sus constantes físicas y espectroscópicas y comparación con una muestra auténtica resultó ser una mezcla de b-Sitosterol (**12**) y Estigmasterol (**13**).

Con las fracciones G₆ y G₇ (1.65 g) se preparó una columna cromatográfica, 5 cm de diámetro, 16 g de sílica gel 60GF-254, 10:1 sílica muestra, a presión reducida. Los datos obtenidos para esta columna se muestra en la tabla 10.

Eluato	Fracción	peso (mg)	Eluyente (Hex/AcOEt)	Compuesto Identificado
1 - 7	G 1'	150	98:2	
8 - 15	G 2'	700	9:1	
16 - 24	G 3'	350	87:13	Naftalinona (8) Coumarina (124)
25 - 32	G 4'	200	80:20	

Tabla10. Fracciones obtenidas de G₆ y G₇

Debido a que la separación no fue eficiente, la fracción G-3' (350 mg) fué aplicada sobre una cromatoplaqa preparativa (1.5 mm, 20 x 20 cm) eluida una vez con una mezcla de hexano-acetato de etilo, 8:2. De esta placa se extrajeron 45 mg de un sólido cristalino que se identificó como la cumarina (**130**) (7-3',3'-dimetilaliloxi-cumarina), y un aceite de color amarillo que se caracterizó como naftalinona (**8**) Las características físicas y espectroscópicas de estos compuestos son las siguientes.



7-[3,3-dimetilaliloxi]cumarina (**130**)

R_f = 0.55 (hex-AcOEt 85:15).

UV λ_{\max} MeOH: 324nm (ϵ 13639), 205.5 (ϵ 31510)

IR (espectro 38, CDCl_3 cm^{-1}) 1729, 1614, 1279

RMN¹H (espectro 41, 300 MHz, CDCl_3), δ , J (Hz); 7.63 (1H, d, J=9, H-4), 7.35 (1H, d, J=8.5, H-5), 6.85 (1H, d, J=2.5, H-8), 6.83 (1H, dd, J=2, 7.5, H-6), 6.24 (1H, d, J=9.5, H-3), 5.47 (1H, t, H-2'), 4.57 (2H, d, J=6.5, H-1'), 1.79 (6H, d, H-4' y H-5').

RMN¹³C (espectro 39, 125 MHz, CDCl_3 , δ): 161.29 (C-2), 113.00 (C-3), 143.43 (C-4), 128.68 (C-5), 113.25 (C-6), 162.21 (C-7), 101.62 (C-8), 155.94 (C-9), 112.46 (C-10), 65.46 (C1'), 118.70 (C-2'), 139.24 (C-3'), 25.77 (C-4'), 18.25 (C-5').

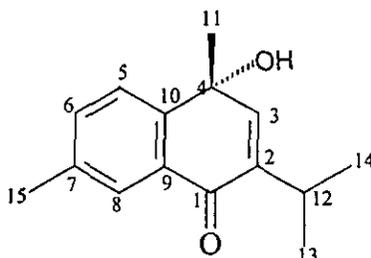
EMIE (espectro 40, m/z (int.rel.) 230 (6), 162 (100), 134 (36), 69 (44), 41 (34),

Los datos obtenidos para esta substancia y los reportados en la literatura [39,40] permitieron establecer la identidad de esta substancia, tabla 11

Asignación H	Datos informados 300 MHz, CDCl_3	Datos observados 500 MHz, CDCl_3
H-3	6.20, d J=9Hz	6.24, d J=9.5Hz
H-4	7.60, d J=9Hz	7.63, d J=9Hz
H-5	7.34, d J=9Hz	7.35, d J=8.5Hz
H-6-	6.84, m	6.83, dd, J=2, 7.5
H-8	6.84, m	6.85, d, J=2.5
H-2'	5.48, m	5.47, t
H-1'	4.55, d	4.57, d, J=6.5
H-3'	1.75, d	1.79, d

Tabla 11 Comparación de los datos de RMN¹H observados en el presente trabajo con los informados en la literatura para **130** [45, 46].

Parte Experimental



4-Hidroxi-2-isopropil-4,7-dimetil-1(4H) naftalinona (**8**)

Rf 0.62 (hex-AcOEt, 85:15)

PM 230

UV (MeOH) λ max (ϵ): 275.4 (275.23), 236.0 (422.43), 210.2 (663.93)

$[\alpha]_D^{22} = 5$ (c 3, MeOH)

IR (espectro 7, CHCl_3 , cm^{-1}): 3586, 2965, 2930, 1662, 1611, 1263

RMN¹H (espectro 9, 300 MHz, CDCl_3), δ , J (Hz); 7.89 (1H, d, J= 1.0 H-8), 7.65 (1H, d, J=8, H-5), 7.40 (dd, J=2 y 7, H-6) 6.69 (1H, d, J=1.6, H-3), 3.08 (1H, hepd, H-12), 2.40 (3H, s, H-15), 1.59 (3H, s, H-11), 1.07 (6H, dd, H-13, H-14).

EMIE (espectro 8 m/z (int. rel) 230 (25), 215 (100), 197 (23), 187 (88), 173 (20)

Los datos de RMN¹H obtenidos para este compuesto y los comparados con los de la literatura se muestran en la tabla 12.

Asignación	Datos informados 300 MHz, CDCl ₃	Datos observados 300 MHz, CDCl ₃
H-3	d, 6.53	d, 6.69
H-5	d 8.14	d, 7.65
H-6	dd, 7.04	dd, 7.40
H-8	d, 7.52	d, 7.89
H-11	s, 1.41	s, 1.59
H-12	qd, 3.25	hepd, 3.08
H-13, H-14	dd, 1.11	dd, 1.07
H-15	s, 2.19	s.2.40

Tabla 12. Comparación de los datos de RMN¹H obtenidos y reportados para **8** [20]

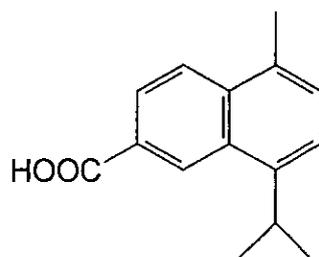
La fracción I (131-145, 7.8 g) fue sometida a fraccionamiento por cromatografía en columna de 3 cm de diámetro empacada con 13 g de sílica gel 60 GF-254 (5:1 sílica- muestra). La elución de esta columna se realizó a presión reducida y se utilizó hexano-AcOEt, iniciando la elución con 95:5 hex-AcOEt, obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 13.

Eluato	Fracción	Peso (g)	Eluyente (Hex-AcOEt)	Compuesto Identificado
1 - 7	I ₁	1.234	95:5	
8 - 9	I ₂	2.458	9:1	ácido cadalen-15-oico (126)
10 - 13	I ₃	1.321	9:1	
14 - 16	I ₄	0.528	8:2	
17 -23	I ₅	0.328	8:2	
24 - 30	I ₆	0.245	7:3	2,6-dihidroxi,4,7-dimetil-3-(4H)calamenano(127)
31 - 34	I ₇	1.385	7:3	

Tabla 13. Fracciones obtenidas de I.

La fracción I₂ presentó cristales blancos, las cuales se recrystalizaron de acetona a temperatura ambiente, obteniéndose 8.5 mg de ácido cadalen-15-oico (**126**). Las

características físicas y espectroscópicas de este sólido son las siguientes.



Ácido cadalen-15-oico (126)

Rf 0.44 (hex-AcOEt, 4:2)

PM 228

pf: 168-170^o C

UV (MeOH) λ max (ϵ): 335 (165.3), 285.5 (501.6), 241.5 (3283.2), 213(2017.8)

$[\alpha]_D^{22} = 5$ (c 2, MeOH)

IR (espectro 15, CHCl₃, cm⁻¹); 3618, 1696, 1607.

RMN¹H (espectro18, 500 MHz, CDCl₃), δ , J (Hz); 9.05 (1H, d, J=1.8, H-4), 8.15 (1H, d, J=1.5, 8.5, H-2), 8.09 (1H, d, J= 8.5, H-1), 7.4 (2H, dd, J=8, H-8 y H-9), 3.86 (1H, hep, H11), 2.70 (3H, s, H-14), 1.42 (6H, d, H-12, H-13).

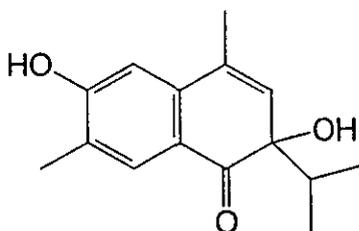
RMN¹³C (espectro 16, 125 MHz, CDCl₃) 125.42 (C-1), 124.69 (C-2), 144.78 (C-3), 128.01 (C-4), 132.16 (C-5), 130.67(C-6), 125.72 (C-7), 129.34 (C-8), 122.45 (C-9), 135.72(C-10), 28.45 (C-11), 23.78 (C-12,13), 172.03 (C-15).

EMIE (espectro 17, m/z , (int.rel.) 228 (72), 213 (100), 169 (12), 153 (17), 154 (26).

La fracción I₆ (.245 mg) se fraccionó nuevamente por cromatografía a presión reducida en una columna de 2 cm de diámetro, empacada con 1.5 g de sílica gel 60 GF-254 (5:1 sílica muestra) y con una mezcla de Hex-AcOEt 75:25 como eluyente, las fracciones resultantes de esta separación fueron:

I_{6A} (eluatos 1-3, 102 mg), I_{6B} (eluatos 5-9, 60.0 mg), I_{6C} (eluatos 10-14, 65 mg),.

La fracción I_{6C} (65 mg) se aplicó sobre placa preparativa (2.0 mm, 20x20 cm) eluyéndose una vez con hexano-acetona 7:3 separándose una banda color verde oscuro. De esta placa se extrajeron 15 mg de 2,6-dihidroxi-4,7-dimetil-3-(4H) naftalinona (**127**) como un sólido en forma de polvo de color blanco. Las características físicas y espectroscópicas son las siguientes.



2,6-dihidroxi-4,7-dimetil-3-(4H)
naftalinona (**127**)

Rf 0.56 (hex-AcOEt, 7:3)

PM 246

Pf: 198-200° C

UV (MeOH) λ max (ϵ): 308.5(711.76), 256(2925.76), 204.5(1525.2).

IR (espectro 22, CHCl₃, cm⁻¹) 3618, 1696, 1607, 2975, 2930.

RMN¹H (espectro 25, 300 MHz, CDCl₃), δ , J (Hz); 7.72 (1H, s, H-8), 6.75 (1H, s, H-5), 6.04 (1H, d, J=1.5, H-3), 5.39 (1H, s, OH), 3.25 (1H, s, OH), 2.27 (3H, s, H-15), 2.09 (3H, s, H-11), 1.90(1H, het, H 12), 0.87 (3H, d, H-13), 0.84 (3H, d, H-14).

RMN¹³C (espectro 24, 125 MHz, CDCl₃) 129.03 (C-4), 79.39 (C-2), 131.96 (C-3), 129.03 (C-4), 110.74 (C-5), 159.88 (C-6), 123.57 (C-7), 130.04 (C-8), 139.71 (C-9), 126.76 (C-10), 19.11 (C-11), 39.73 (C-12), 17.10 (C-14), 16.81 (C-13), 15.30 (C-15).

EMIE (espectro 23, *m/z* (int.rel.); 246 (26), 204 (98), 175 (100), 176 (90), 161 (19), 71 (16), 43 (52), 41 (18).

La fracción K (158-169, 4.1 g) fue sometida a fraccionamiento en una columna cromatográfica empacada con 20 g de sílica gel 60GF-254 (5:1 sílica muestra) a presión reducida. El desarrollo de la cromatografía se llevó a cabo utilizando mezclas de hex-AcOEt como eluyente, e iniciando la elución de la columna con 9:1 hex-AcOEt, incrementando la polaridad gradualmente con dicha mezcla. El desarrollo de dicha cromatografía se muestra en la siguiente tabla.

Eluato	Fracción	Peso (g)	Eluyente (Hex/AcOEt)	Compuesto Identificado
1-2	K ₁	0.523	90:10	
3-4	K ₂	0.612	85:15	
5	K ₃	0.754	80:20	
6-9	K ₄	0.542	75:25	Glicérido
10-14	K ₅	0.862	70:30	

Tabla 14. Fracciones obtenidas de K

De la fracción K₄ se aisló un compuesto sólido cristalino, purificándose mediante recristalización sucesiva, empleando acetona a temperatura ambiente,

obteniéndose 35 mg de un compuesto que por sus características físicas y espectroscópicas corresponden a un glicérido

Rf 0.24 (hex-AcOEt, 7:2)

Pf:118-120° C

IR (CHCl₃,cm⁻¹): 3622, 2927, 2854.

RMN¹H (300 MHz,CDCl₃), δ 5.34 (hidrógenos vinílicos), δ 2.01(hidrógenos alílicos) y δ 3.84 (hidrógenos doblemente alílicos).

La fracción L (170-193, 6.8 g) fue sometida a fraccionamiento en una columna empacada con 35 g de sílica gel 60 GF-254 (5:1 sílica muestra) a presión reducida. En este caso, se utilizaron mezclas de hex/AcOEt 9:3, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 15.

Eluato	Fracción	Peso (g)	Eluyente (hex-AcOEt)
		2.3	97.3
4 - 7	L ₁	1.75	95.5
8 - 12	L ₂		
13 - 15	L ₃	1.92	90.10

Tabla15. Fracciones obtenidas de L

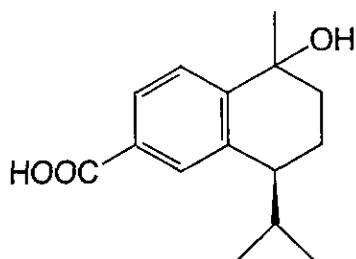
Con los eluatos 8-12, que integraron la fracción L₁ se preparó una nueva columna cromatográfica, de 2 cm de diámetro, 10 g de sílica gel 60 GF-254 (5:1 sílica muestra), que se desarrolló a presión reducida. Los datos de esta columna se muestran en la tabla 16.

Parte Experimental

Eluato	Fracción	Peso (g)	Eluyente (Hex/AcOEt)	Compuesto Identificad
1 - 15	L ₁	0.342	95:5	
16 - 17	L ₂	0.298	90:10	Calamenano (66)
18 - 22	L ₃	.0424	85:15	

Tabla 16. Fracciones obtenidas de L₁.

De la fracción L₂ se aisló un compuesto sólido cristalino, el cual se purificó mediante cristalización sucesiva de acetona a temperatura ambiente, obteniéndose 10.5 mg de ácido 7-metil- α -hidroxi-calamen-15-oico (66). Sus características físicas y espectroscópicas son las siguientes.



Ácido 7-Metil- α -hidroxicalamen-15-oico (66)

Rf 0.36 (hex-AcOEt, 7:3)

PM 248

Pf: 203-205^o C

UV (MeOH) λ max (ϵ) 277.5 (44.40), 237 (263.22), 206.5 (722).

$[\alpha]_D^{22} = 21$ (c 2 MeOH)

IR: (espectro 11, CHCl_3 , cm^{-1}); 3294, 2957, 2872, 1680, 1433, 1273.

RMN¹H (espectro 14, 500 MHz, CDCl_3) δ , J (Hz) 7.99 (1H, s, H-4), 7.92 (1H, dd, J= 2, 8.5 Hz, H-2), 7.70 (1H, d, J=8.5, H-1), 2.69 (1H, q, H-10), 2.34 (1H, oct, H-11), 1.7-2.0 (4H, m, H-8, H-9), 1.5 (3H, s, H-14), 1.05 (3H, d, H-12), 0.79 (3H, d, H-13).

RMN¹³C (espectro 12, 125 MHz CDCl_3): 126.00 (C-1), 126.48 (C-2), 148.07 (C-3), 129.22(C-4), 138.78 (C-5), 128.29 (C-6), 69.21 (C-7), 36.33 (C-8), 19.57 (C-9), 42.81 (C-10), 31.01 (C-11), 20.93 (C-12), 17.57 (C-13), 30.81 (C-14), 168.10 (C-15).

EMIE (espectro 13, m/z (int.rel) 248 (3), 233 (54), 187 (73), 143 (100), 128 (28), 115 (14).

Los datos de RMN¹H obtenidos para esta substancia y los informados en la literatura se resumen comparativamente en la tabla 17.

Asignación	Datos informados, 300 MHz, CDCl_3	Datos observados 500 MHz, CDCl_3 .
H-1	7.70, d	7.70, d, J= 8.2
H-2	7.82, dd	7.92, dd, J= 2, 8.5
H-4	7.93, s	7.99, s
H-8, H-9	1.5-1.9, m	1.7-2.0, m
H-10	2.08, m	2.69, c
H-11	2.45, dqq	2.34, oct.
H-12	1.07, d	1.05, d
H-13	0.70, d	0.79, d
H-14	1.53, s	1.50, s

Tabla 17 Comparación de los datos de RMN¹H obtenidos y reportados para 66 [25]

De la fracción M (194-211, 5.5 g) se sometió a un fraccionamiento por cromatografía en columna de 5 cm de diámetro y empacada con 27.5 g de sílica gel 60GF 254 (5:1 sílica muestra) la elución de esta columna se realizó a presión reducida y se utilizaron mezclas de hex-AcOEt, empezándose a eluir con hex-

AcOEt 97:3 y los datos para ésta fueron los siguientes, tabla 18.

Eluato	Fracción	Peso (g).	Eluyente (Hex-AcOEt)
1 - 16	M ₁	0.885	97:3
17	M ₂	0.231	95:5
18 - 23	M ₃	0.802	92:8
24 - 26	M ₄	0.955	90:1
27 - 34	M ₅	0.432	85:15
35 - 42	M ₆	0.824	80:20
43 - 48	M ₇	0.101	78:22

Tabla 18. Fracciones obtenidas de M

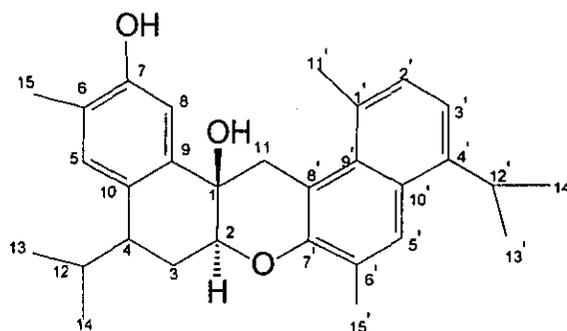
Con los eluatos 27-34 (0.432 g M₅) se preparó una nueva columna cromatográfica de 2 cm de diámetro y empacada con 4.3 g de sílica gel 60GF -254 (10:1, sílica muestra) a presión reducida, empezándose a eluir con hex-AcOEt 95:5. Los datos obtenidos para esta columna fueron los siguientes tabla 19.

Eluato	Fracción	Peso (g).	Eluyente (Hex-AcOEt)	Compuesto Identificado
1 - 20	M ₁	0.68	95:5	
21 - 26	M ₂	0.75	90:1	
27 - 34	M ₃	0.101	85:15	Cariolan 1,9 β-diol (128)
35 - 46	M ₄	0.125	80:20	Dicadalenol (129)

Tabla 19 Fracciones obtenidas de M₅.

La fracción M₄ fue aplicada sobre placa preparativa (20x20, 0.2 cm) eluida una vez con una mezcla de hex-AcOEt (75:25). De esta placa se extrajeron 15 mg de un sólido cristalino que se denominó dicadalenol.

Parte Experimental



Dicalalenol (129)

Rf= 0.35 (hex-AcOEt, 4:1).

PM 444

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3621, 2973, 2928, 2875, 1437.

UV (MeOH) λ_{\max} (ϵ): 337.5 (444), 323 (3848); 288.5 (2072), 243 (112628), 204.5 (110704).

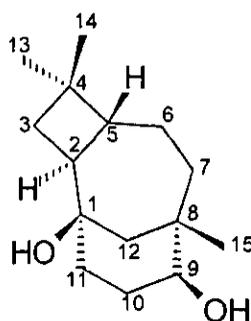
RMN¹H (espectro 34, 500 MHz, CDCl₃), δ , J(Hz); 7.77 (1H, s, H-5'), 7.12 (2H, dd, J=7.5 y 8.0, H-2' y 3'), 7.05 (1H, s, H-8), 7.00 (1H, s, H-5), 4.85 (1H, s, OH), 4.57 (2H, dd, J=11,4, H-2), 3.68 (2H, d, J=12, H-11), 3.62 (1H, sept, J=7, H-12'), 2.74 (1H, m, H-12), 2.77 (3H, s, H-11'), 2.37 (3H, s, H-15'), 2.94 (1H, ddd, J=12,8,4, H-4), 2.20 (2H, ddd, J= 14,4,4, H-3), 2.20 (3H, s, H-15), 1.57 (1H, s, OH), 1.34 (6H, d, H-13', H-14'), 1.09 (3H, d, H-13), 0.85 (3H, d, H-14).

RMN¹³C (espectro 33, 125 MHz, CDCl₃); 68.75 (C-1), 75.75 (C-2), 25.95 (C-3), 40.69 (C-4), 130.98 (C-5), 123.75 (C-6), 152.46 (C-7), 111.21 (C-8), 139.40 (C-9), 130.15 (C-10), 39.92 (C-11), 33.51 (C-12), 21.50 (C-13), 18.03 (C-14), 15.67 (C-15), 131.03 (C-1'), 129.77 (C-2'), 119.23 (C-3'), 142.67 (C-4'), 124.06 (C-5'), 126.83

(C-6'), 149.19 (C-7'), 112.10 (C-8'), 133.14 (C-9'), 127.99 (C-10'), 26.54 (C-11'), 28.51 (C-12'), 23.64 (C-13' y 14'), 17.68 (C-15').

EMIE (espectro 32), *m/z* (int.rel); 444(48), 426(29), 383(12), 218(29), 175(100), 83(4), 69(6), 43(9).

Las características físicas y espectroscópicas del aceite amarillo corresponden a 128 y son las siguientes:



Cariolan 1,9- β -diol (**128**)

R_f 0.43 (hex-AcOEt, 4:1)

PM 238

IR (espectro 28, CHCl₃, cm⁻¹), 3619, 3454, 2955, 2932, 2869

RMN¹H (espectro 31, 500, MHz, CDCl₃), δ (ppm), J (Hz): 2.22 (1H, ddd, 12, 10, 8.5, H-2), 1.54 (2H, t, 10, H-3), 1.89 (1H, ddd, 12, 9, 6, H-5), 1.39 (2H, m, H-6), 1.53 (2H, m, H-7), 3.44 (1H, t, H-9), 2.04 (2H, ddd, 15, 12, 5, H-10), 1.64 (2H, td, 12, 5.5, H-11), 1.47 (2H, d, H-12), 1.00 (3H, s, H-13), 1.02 (3H, s, H-14), 0.93 (3H, s, H-15).

RMN¹³C (espectro 30, 125 MHz, CDCl₃): 70.852 (C-1), 38.157 (C-2), 34.036 (C-3), 35.051 (C-4), 43.940 (C-5), 20.441 (C-6), 34.451 (C-7), 39.326 (C-8), 72.236 (C-9),

28.161 (C-10), 33.421 (C-11), 42.463 (C-12), 20.780 (C-13), 30.499 (C-14), 26.624 (C-15).

EMIE espectro 29, *m/z* (int.rel): 238 (8), 220 (37), 179 (66), 127 (98), 123 (100), 43 (69), 95 (62).

Los datos de RMN¹H obtenidos para esta substancia y los informados en la literatura para el cariolan 1 β ,9 β -diol (**128**) se muestran comparativamente en la tabla 20

Asignación H	Datos informados 400MHz, CDCl ₃	Datos Observados 500 MHz, CDCl ₃
2-H	2.22,ddd,J=12,10,8.5	2.22,ddd,12,10,8.5
3-H	1.49,dd,10,9	1.54,t,10
5-H	1.89,ddd,12,9,6	1.89,ddd,12,9,6
6-H	1.39,m	1.39,m
7-H	1.55-1.42,m	1.53,m
9-H	3.44, t, 3	3.44,t
10-H	1.77,ddt,15,5,3	2.04,ddd,15,12,5,3
11-H	1.51,m	1.64,td, 12.5,5
12-H	1.42,d	1.47,d
13-H	1.00,s	1.00,s
14-H	1.025,s	1.025,s
15-H	0.93, s	0.93, s

Tabla 20 datos obtenidos y reportados del cariolan-1,9- β -diol [47]

La fracción N (212-227 10.2 g) fue sometida a un fraccionamiento por cromatografía en columna de 5 cm de diámetro y empacada con 51 g de sílica gel 60 GF-254. La elución de esta columna se realizó a presión reducida y se utilizaron mezclas de hex-AcOEt, empezándose a eluir con hex-AcOEt 97:3 e incremento gradual de la polaridad.

El número de las fracciones resultantes de la columna cromatográfica anterior se

presenta en la tabla 21.

Eluato	Fracción	Peso (g.)	Eluyente (Hex-AcOEt)
1 - 8	N ₁	0.998	97:3
9 - 11	N ₂	2.74	95:5
12 - 19	N ₃	2.99	90:10
20 - 29	N ₄	1.855	85:15
30 - 39	N ₅	1.202	80:20

Tabla 21. Fracciones obtenidas de N.

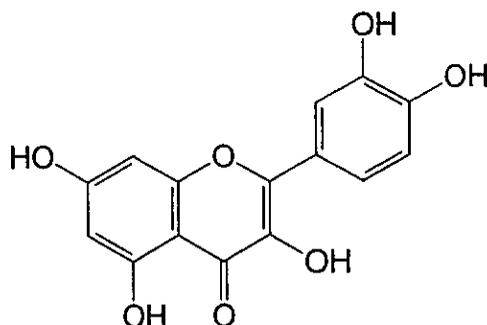
Los eluatos 20-29 reunidos (fracción N₄, 1.85 g) se sometieron nuevamente a un fraccionamiento por cromatografía en una columna de 1.5 cm de diámetro y empacada con 18.5 g de sílica gel 60 GF-254 (10:1 sílica muestra). La elución de esta columna se realizó a presión reducida y se utilizaron mezclas de hex-AcOEt, empezando la elución con hex-AcOEt (95:5) e incrementando la polaridad gradualmente.

El número de fracciones resultantes de la columna cromatográfica anterior se presenta en la tabla 2.

Eluato	Fracción	Peso (g.)	Eluyente (Hex-AcOEt)	Compuesto Identificado
1 - 9	N ₁	0.224	95:5	
10 - 18	N ₂	0.345	90:10	
19 - 26	N ₃	0.128	85 - 15	Quercetina (9)
27 - 36	N ₄	0.422	80:20	
37 - 42	N ₅	0.325	75:25	

Tabla 22. Fracciones obtenidas de N₄

De los eluatos 19-26 (fracción N₃ se aisló un compuesto sólido de color amarillo, el cual se purificó mediante recristalizaciones sucesivas de acetona, a temperatura ambiente, obteniéndose 45 mg de quercetina (9).



Quercetina (9)

Rf 0.40 (hex-AcOEt 73:35)

PM 302

Pf 304-306° C

IR (espectro 42, CHCl₃, cm⁻¹); 3334, 1658, 1612, 1514.

EMIE (espectro 44), *m/z* (int.rel): 302(100), 273(8), 153(7), 137(8), 128(6) 97(3), 69(6),.

RMN¹H (espectro 45 300 MHz, CDCl₃), δ , J(Hz); 12.1 (1H, s), 10.2 (1H,s), 9.0 (1H,s), 8.8 (1H,s), 8.5 (1H, s), 7.75 (1H, d, J=2, H-2'), 7.59 (1H, dd, J=2, H-6'), 6.9 (1H, d, J=8.5, H-5'), 6.38 (1H, d, J= 2.0, H-8), 6.21 (1H, d, J= 2, H-6),

RMN¹³C (espectro 43, 300 MHz, CDCl₃); 175.32 (C-4), 163:58 (C-7), 160. 56 (C-

5), 156.09 (C-9), 147.02 (C-2), 146.05 (C-3'), 144.48 (C-4'), 135.45 (C-10), 122.30 (C-1'), 119.90 (C-6'), 115.10 (C-5'), 114.73 (C-2'), 102.87 (C-3), 98.04 (C-6), 93.15 (C-8).

La tabla 23 muestra comparativamente los datos obtenidos de la quercetina aislada de *Heterotheca inuloides* con los informados en la literatura

Asignación H	Datos informados 300 MHz, CDCl ₃	Datos observados 500 MHz, CDCl ₃
H - 6	6.17, d, J=2	6.21, d, J=2
H - 8	6.37, d, J=2	6.38, d, J=2
H - 5'	6.87, d, J=8.5	6.9, d, J=8.7
H - 6'	7.61, dd, J=2	7.59, dd, J=2
H - 2'	7.72, d, J=2	7.75, d, J=2

Tabla 23. Datos obtenidos y reportados de la quercetina. (9) [47]

Al extracto de metanol de *Heterotheca inuloides* se le realizó una fraccionación por cromatografía en columna a presión reducida (ccpr). Para ello, fue necesario adsorber el extracto en gel de sílice en una relación 1:1 y se aplicó en una columna empacada con sílica gel GF-254 en una relación 1:5. El desarrollo de la cromatografía se llevó a cabo utilizando inicialmente hexano como eluyente e incrementando la polaridad gradualmente con una mezcla de hexano-AcOEt. El número de las fracciones resultantes de la columna cromatográfica anterior se presenta a continuación, tabla 24

Parte Experimental

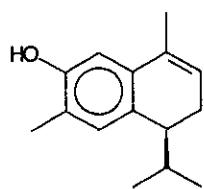
Eluato	Fraccion	peso (g)	Eluyente (Hex-AcOEt)	Compuesto Identificado
3 - 5	A'	6.5	hexano	
6 - 8	B'	3.5	98:2	Estigmasterol (13)
9 - 12	C'	4.1	95:5	
13 - 20	D'	16.0	93:7	
21 - 28	E'	8.5	90:10	
29 - 40	F'	15.8	85:15	
41 - 55	G'	10.3	80:20	Quercetina (9)
56 - 64	H'	9.6	75:25	
65 - 81	I'	6.4	70:30	

Tabla 24. Fracciones obtenidas del extracto de MeOH.

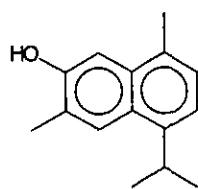
8. RESUMEN Y CONCLUSIONES

El análisis químico y la evaluación biológica preliminar de *Heterotheca inuloides* permitió la generación de conocimientos referentes tanto a los constituyentes de esta especie como de su actividad biológica. En esta investigación se aislaron y caracterizaron por métodos químicos y espectroscópicos tres nuevos metabolitos secundarios: dos sesquiterpenos del grupo del cadinano, ácido cadalen-15-oico (**126**), y 2,6-dihidroxi-4,7-dimetil-3-(4H)-naftalinona (**127**), y un dímero de sesquiterpeno también de tipo cadinano, al cual se le denominó trivialmente dicadalenol (**129**). Además se aislaron cinco sesquiterpenos ya descritos en la literatura: 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol (**7**), 7-hidroxicadalenol (**57**), naftalinona (**8**), ácido 7- α -hidroxicalamen-15-oico (**66**), cariolan-1 β ,9 β -diol (**128**), quercetina (**9**), la cumarina (**130**), estigmasterol (**13**) y β -sitosterol (**12**), y un glicérido. Estos resultados manifiestan la notable variación que existe en los constituyentes de este vegetal, ya que de las trece sustancias, tres representaron metabolitos secundarios novedosos. En el estudio preliminar de actividad anti-inflamatoria, se observó que el extracto de metanol no presentó dicha actividad; sin embargo, el compuesto puro aislado de este extracto, que fue la quercetina, sí mostró actividad. Por otro lado, el extracto de acetona mostró actividad, y de aquí se aislaron la mayor parte de los metabolitos, incluyendo al dímero dicadalenol (**129**). Es importante señalar que a cada metabolito se le realizó el ensayo biológico, observándose que la mayoría de ellos mostraron actividad. Los metabolitos con mayor actividad anti-inflamatoria fueron la quercetina (**9**), cariolan-1 β ,9 β -diol (**128**) y el dicadalenol (**129**). La evaluación de la dependencia con respecto a la dosis indicó que el compuesto con mayor actividad fue el dicadalenol (**129**), seguido de la quercetina (**9**), y por último el cariolan-1 β , 9 β -diol. Conociendo que *Heterotheca inuloides* tiene sesquiterpenos activos, resultaría conveniente conocer la actividad de estos compuestos en otro tipo de ensayo, como el de la carragenina en la pata de ratón, así como re-evaluar otros sesquiterpenos presentes en esta especie para poder establecer la relación entre la estructura molecular y la actividad biológica.

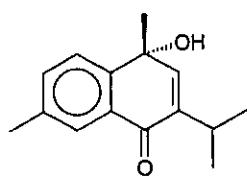
Metabolitos Aislados de *Heterotheca inuloides*



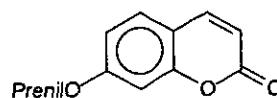
7



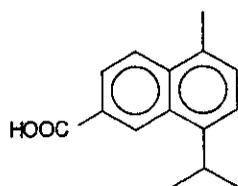
57



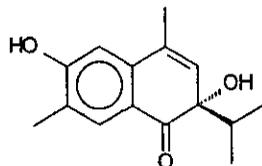
8



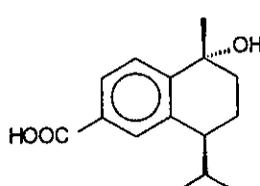
130



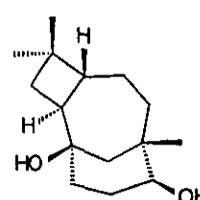
126



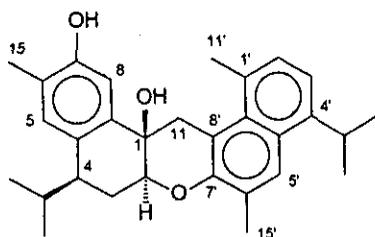
127



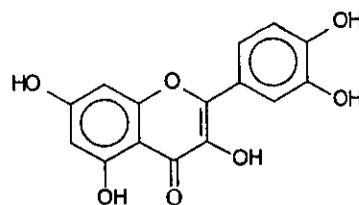
66



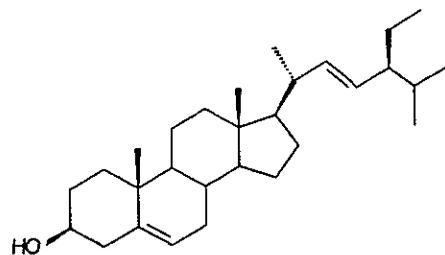
128



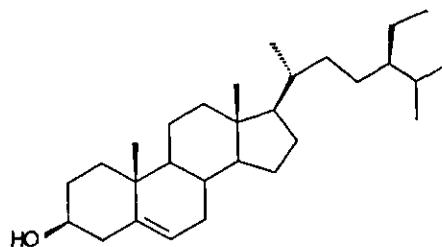
129



9



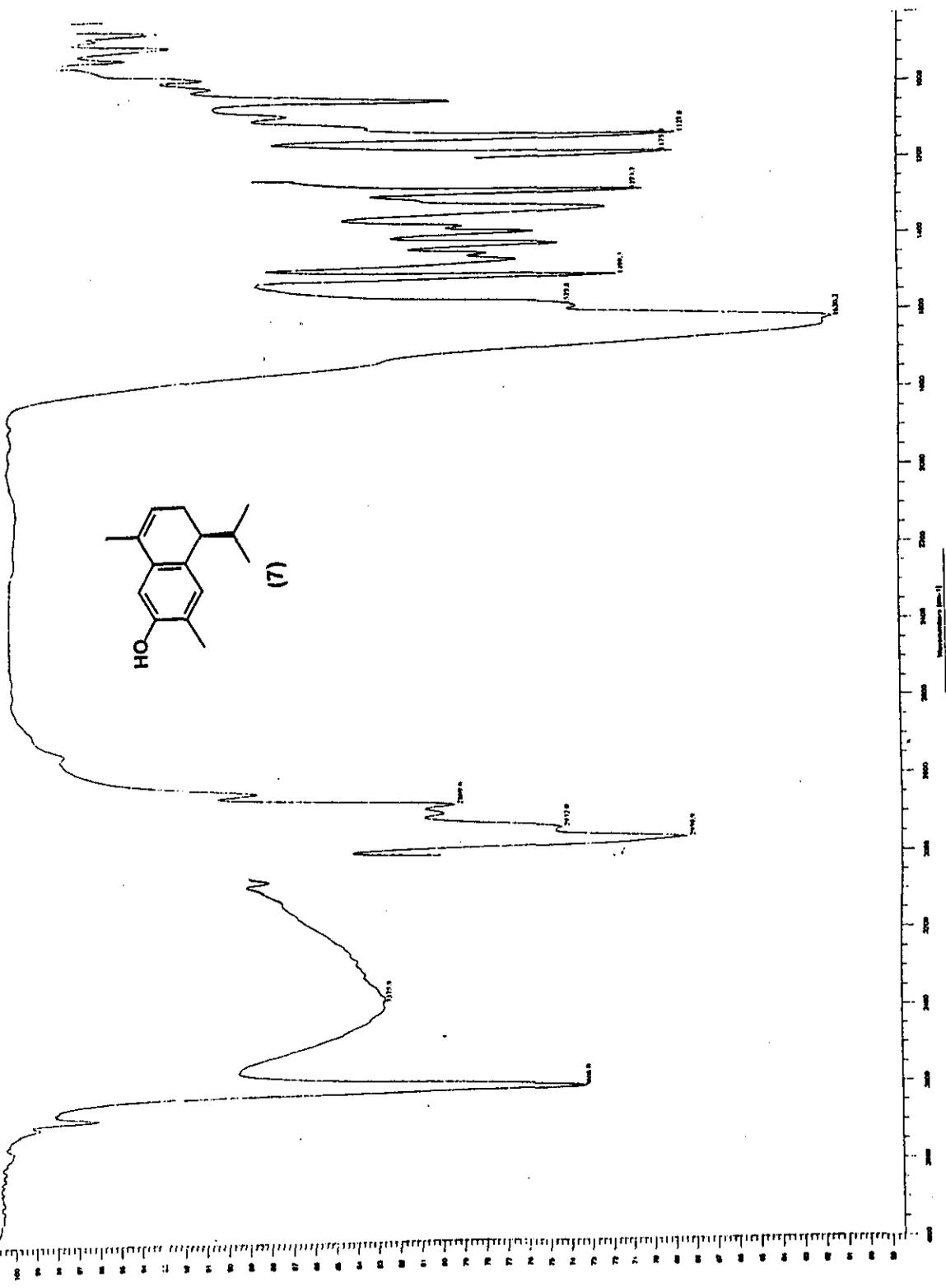
13



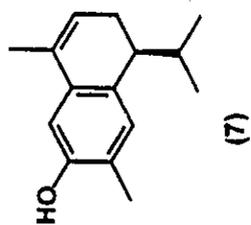
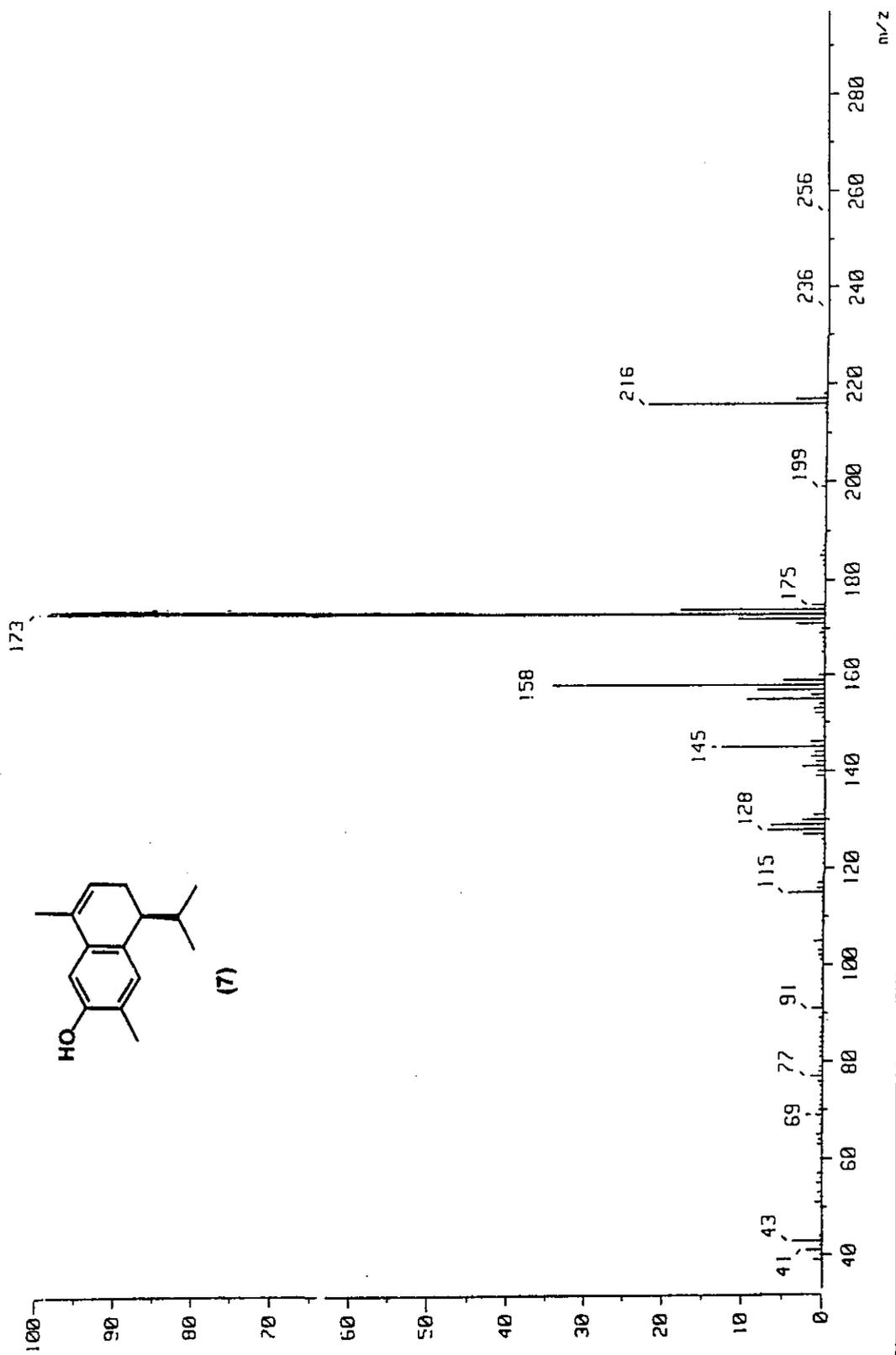
12

7. ESPECTROS

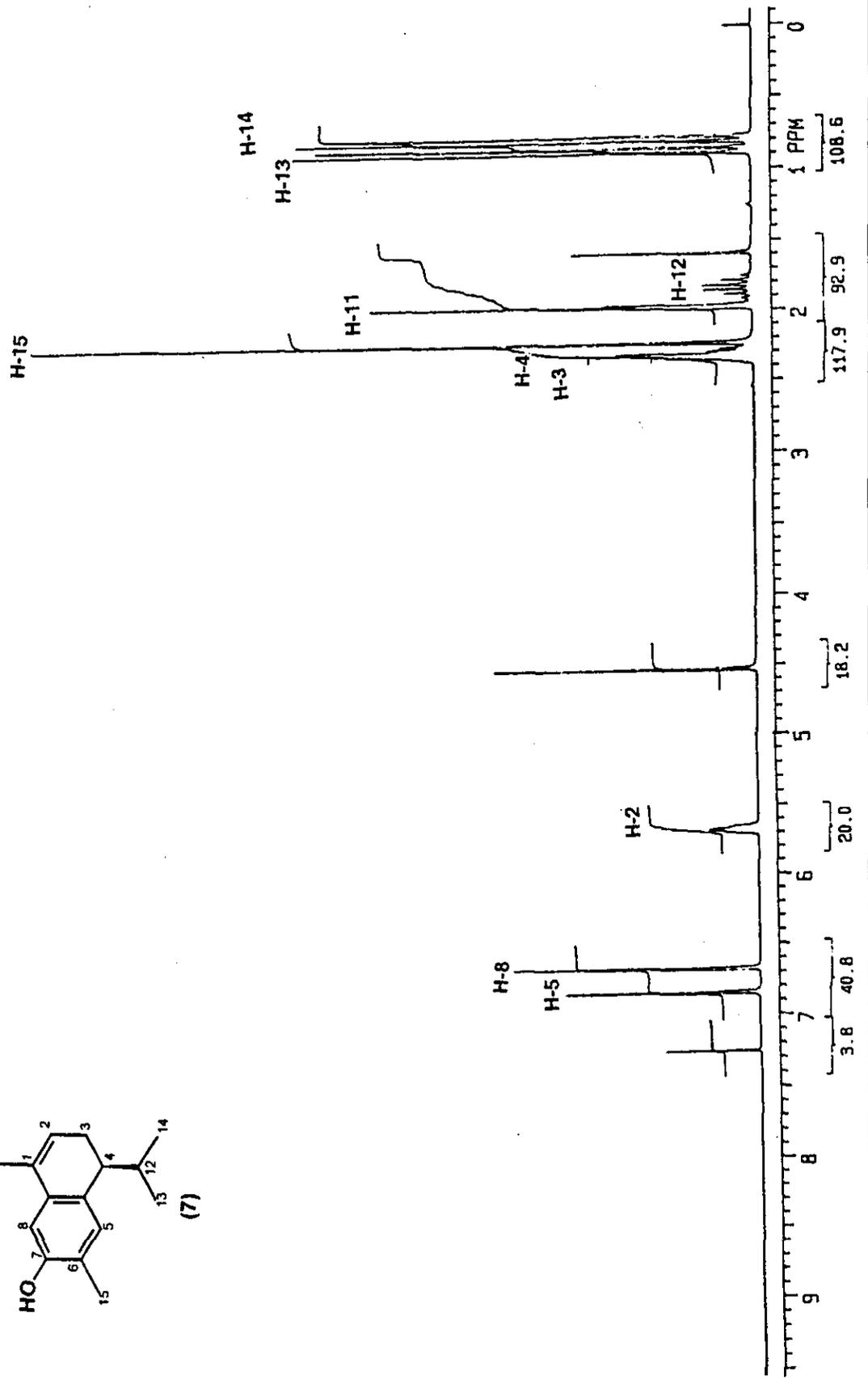
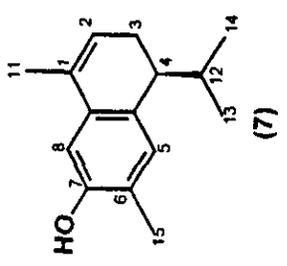
Espectro 1. IR (CHCl₃, cm⁻¹) 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (7)



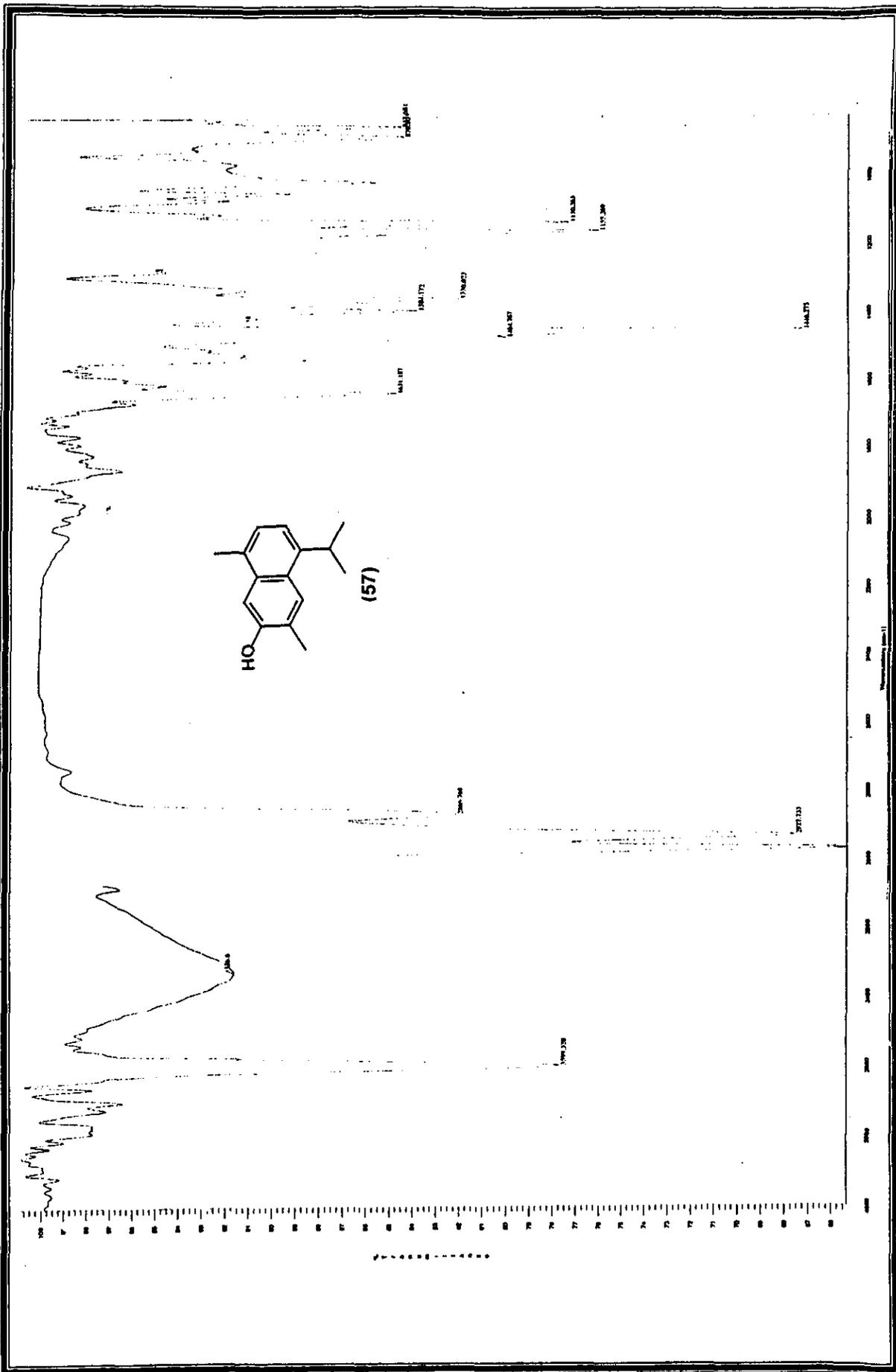
Espectro 2. EM (70 eV) 7-hidroxi-3,4-dihidrocajaleno (7)



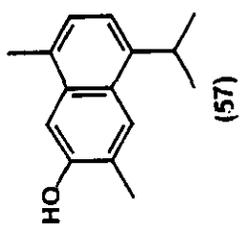
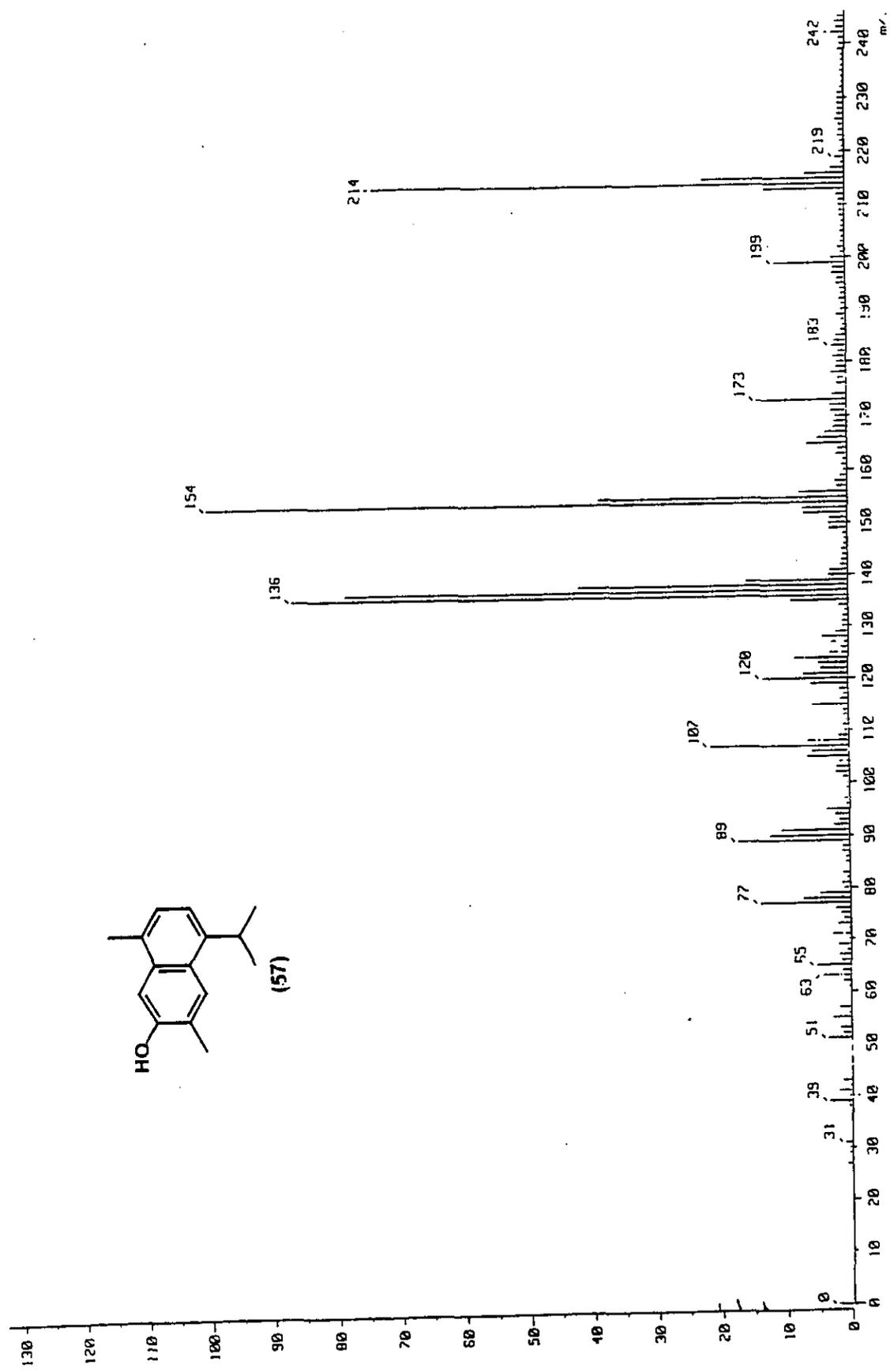
Espectro 3. RMN¹H 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenos (7)



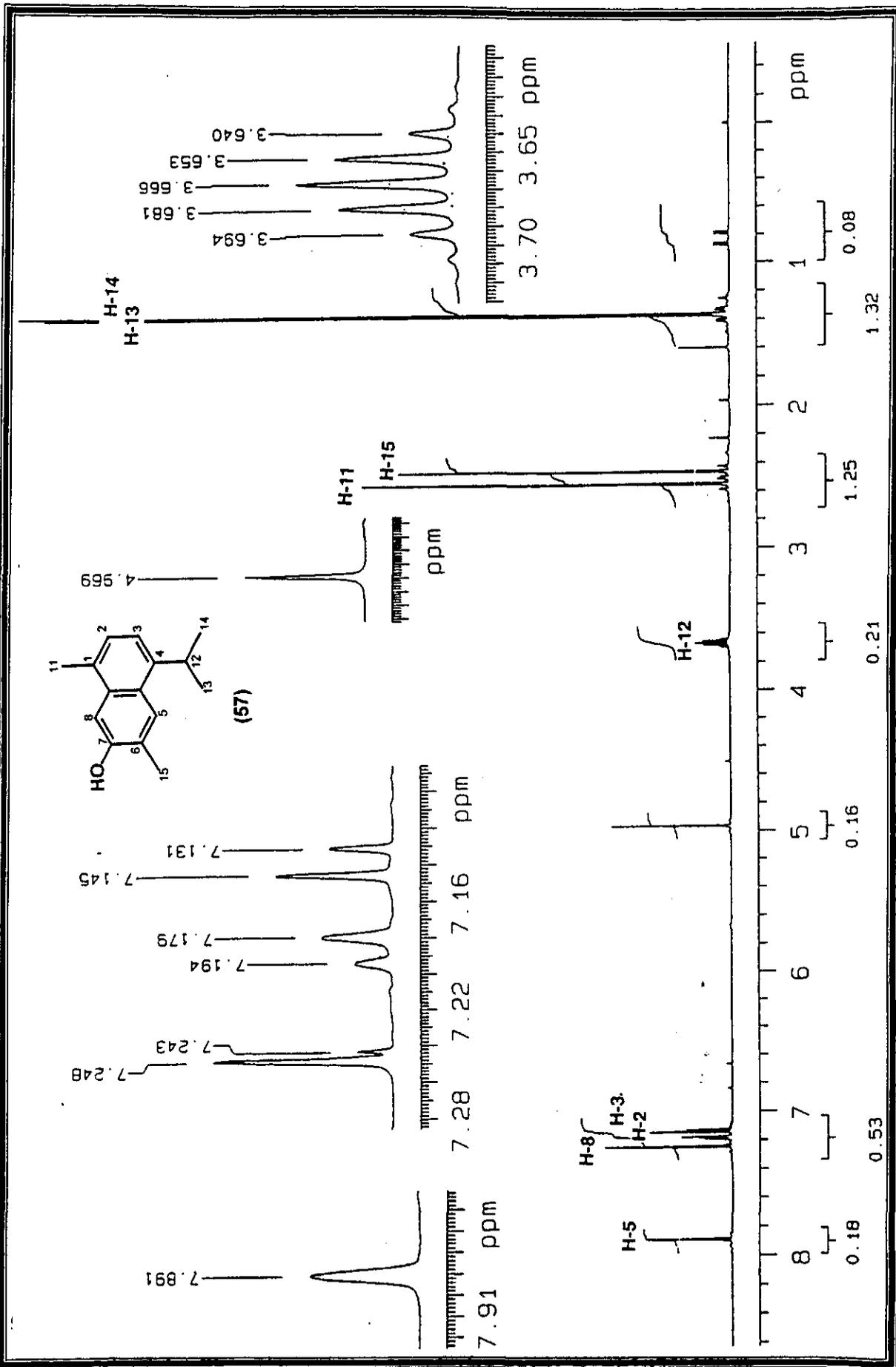
Espectro 4. IR (CHCl₃, cm⁻¹) 7-hidroxicadalenos (57)



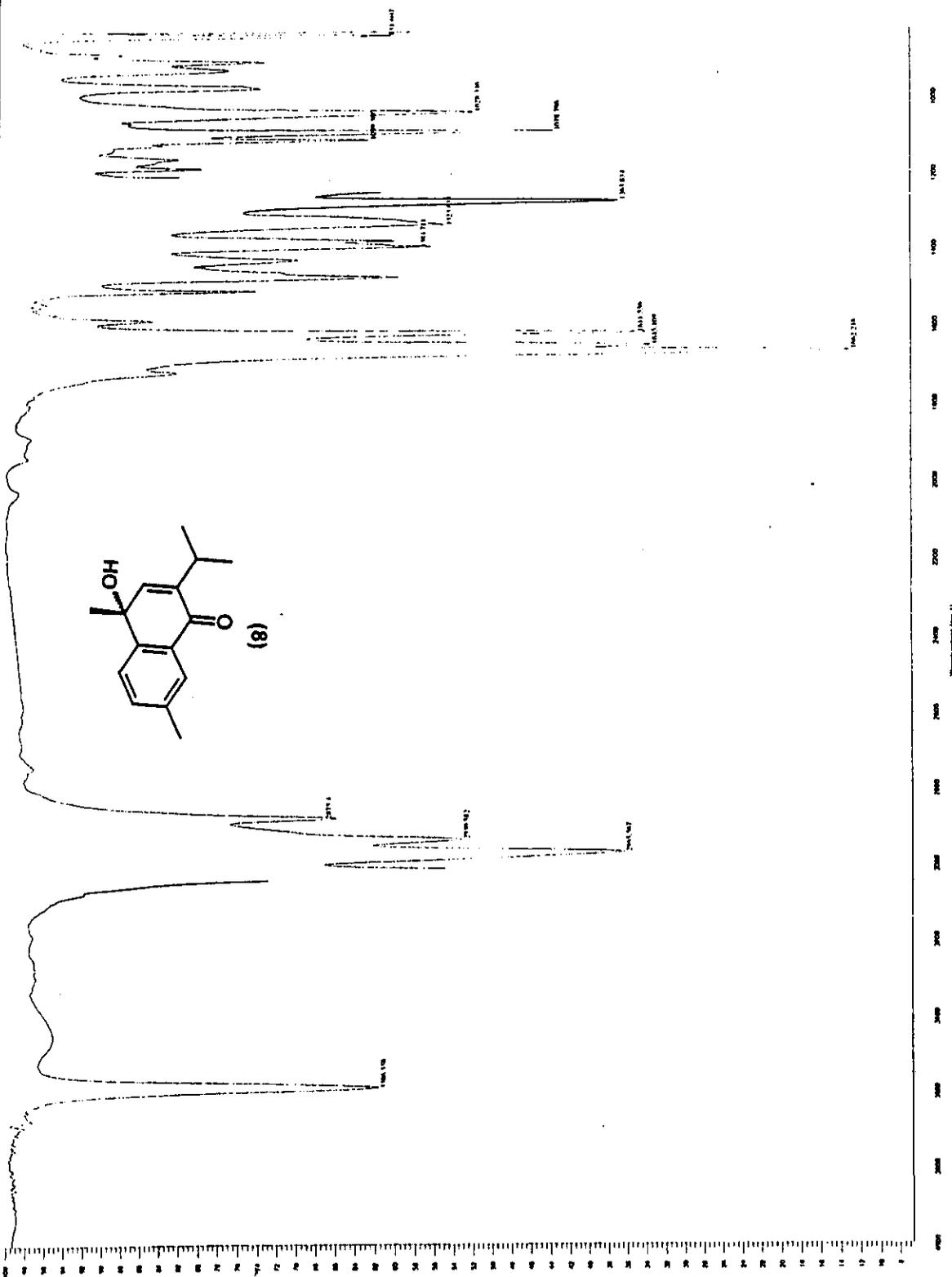
Espectro 5. EM (70eV) 7-hidroxicadaleneno (57)



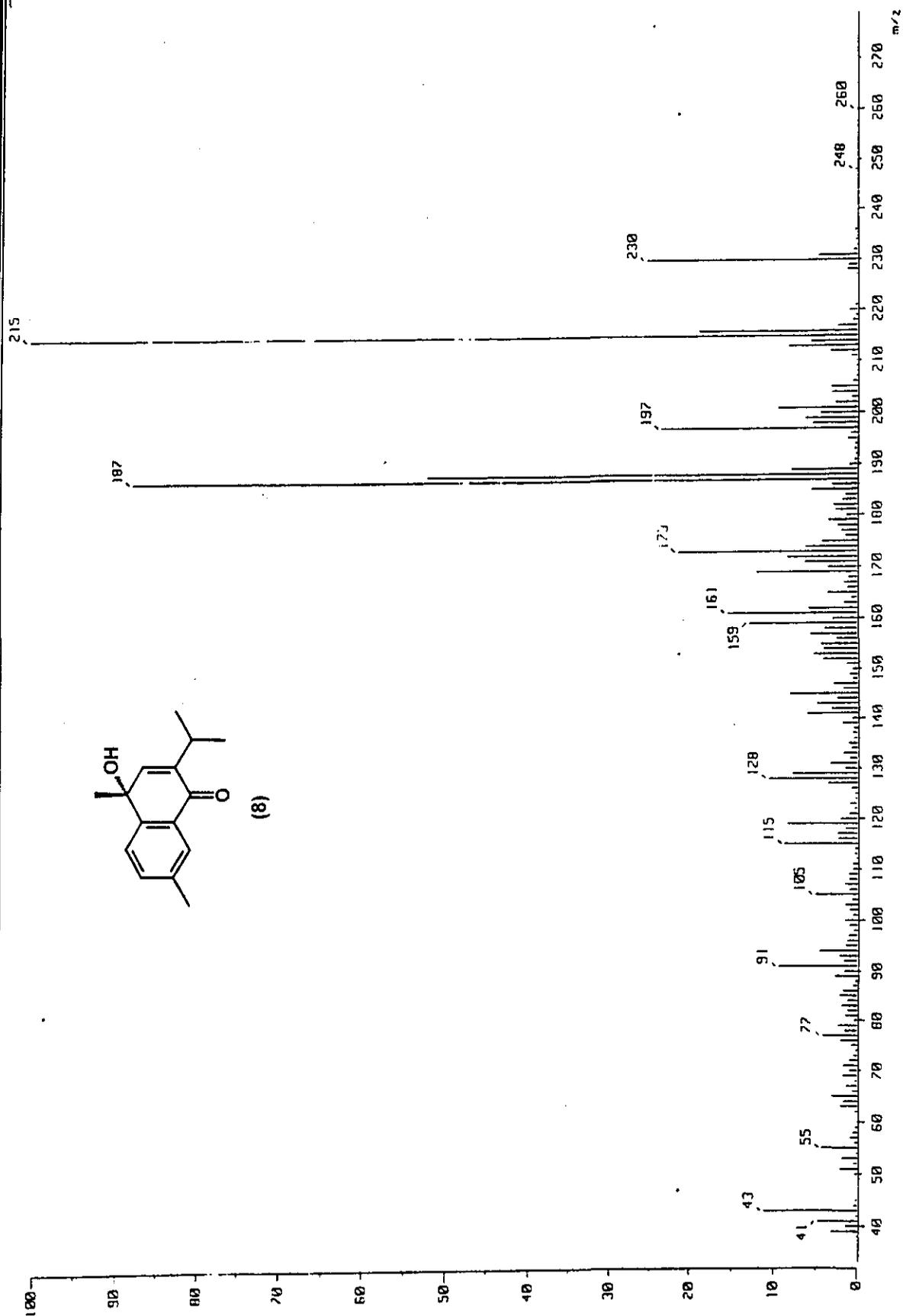
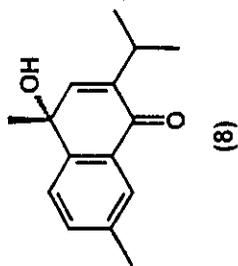
Espectro 6. RMN¹H (500 MHz, CDCl₃) 7-hidroxicadalenos (57)



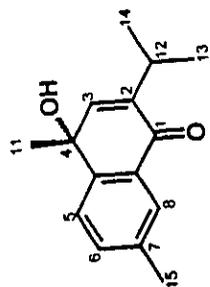
Espectro 7 IR (CHCl₃ cm⁻¹) 4-hidroxi, 2-isopropil-4,7-dimetil-1(4H) naftalinona (8)



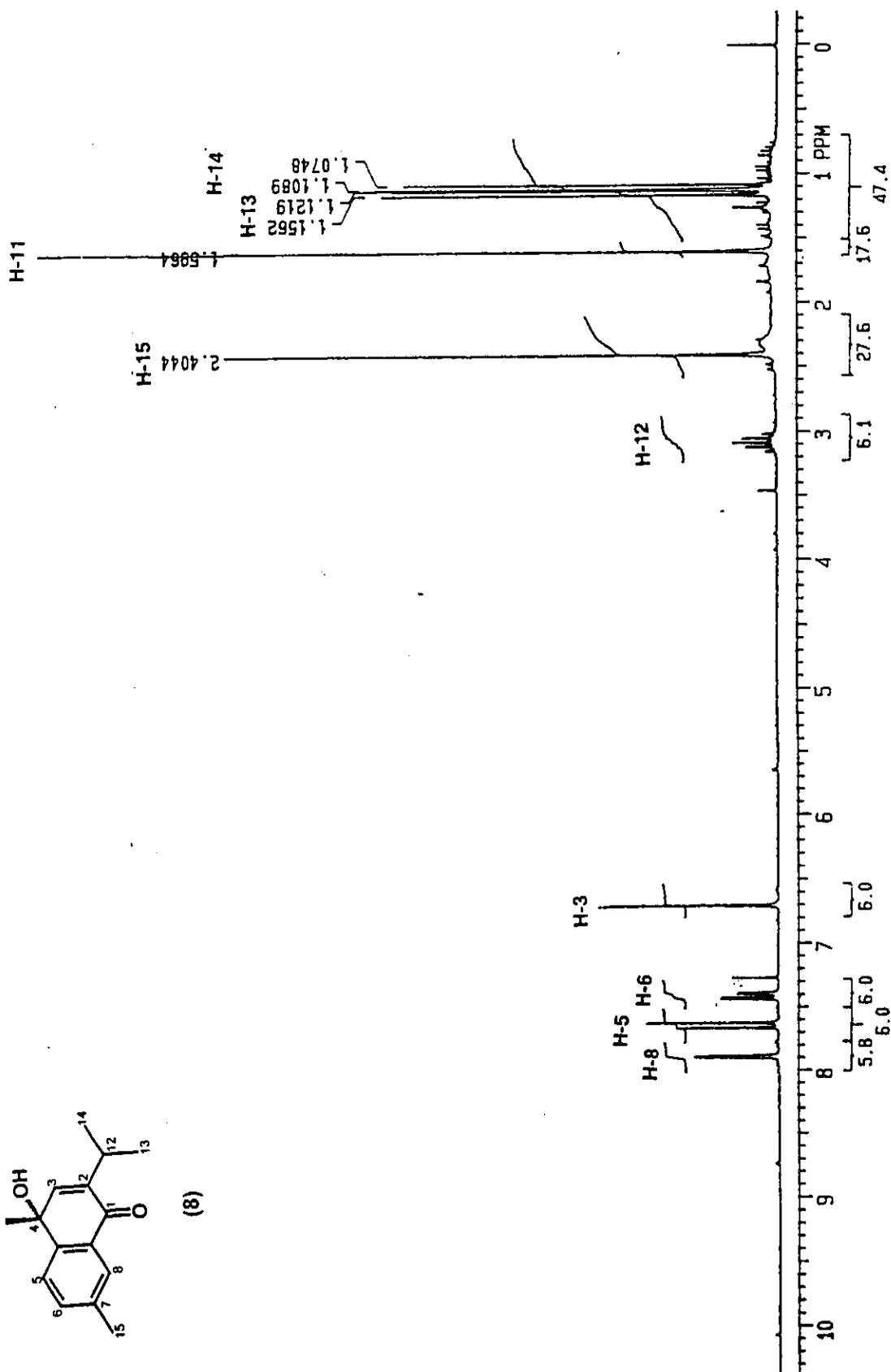
Espectro 8. EM (70 eV) 4-hidroxi-2-isopropil-4,7-dimetil-1(4H) naftalinona (8)



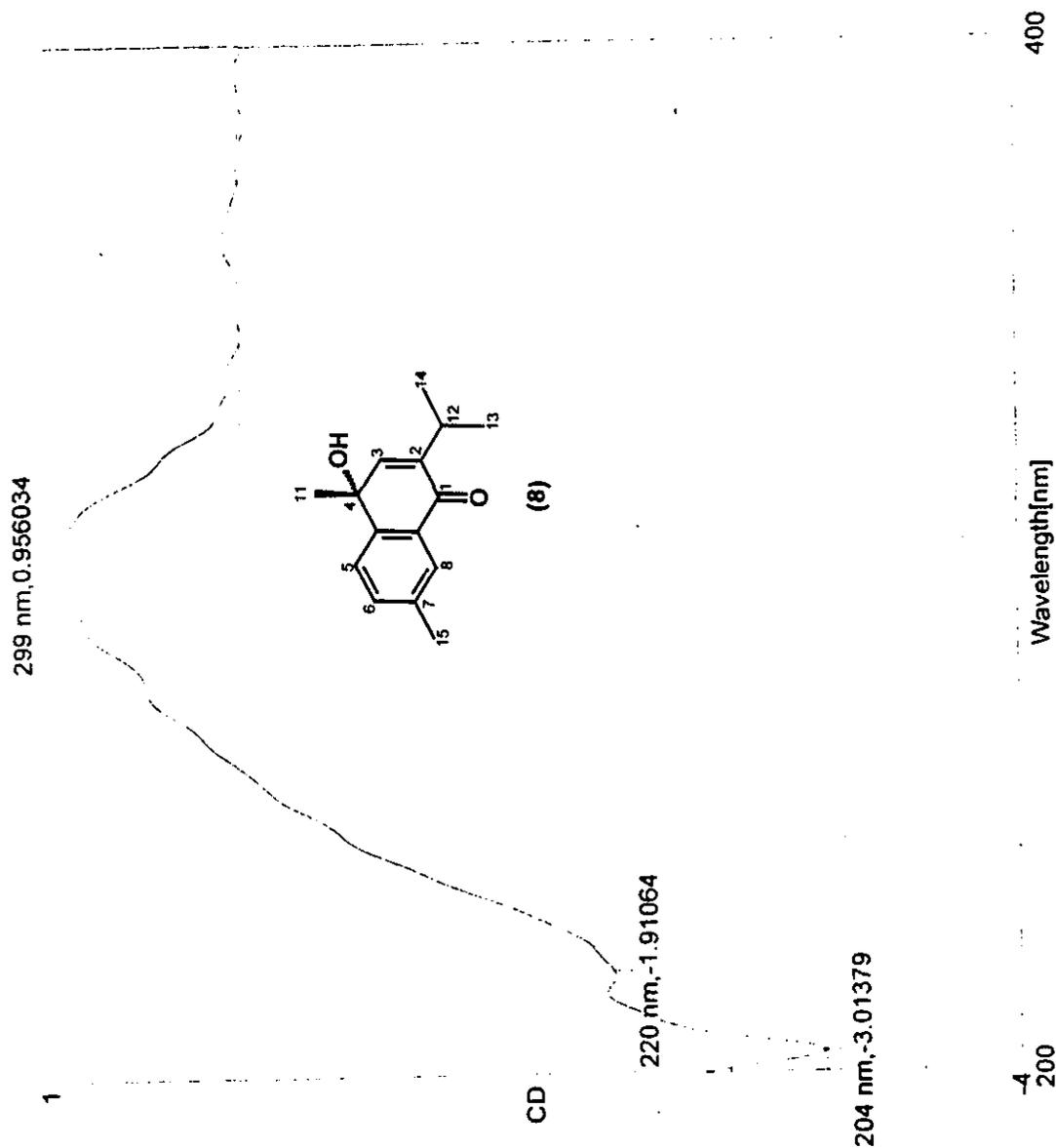
Espectro 9. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) 4-hidroxi-2-isopropil-4,7-dimetil-1(4H) naftalinona (8)



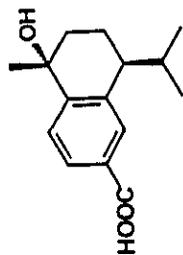
(8)



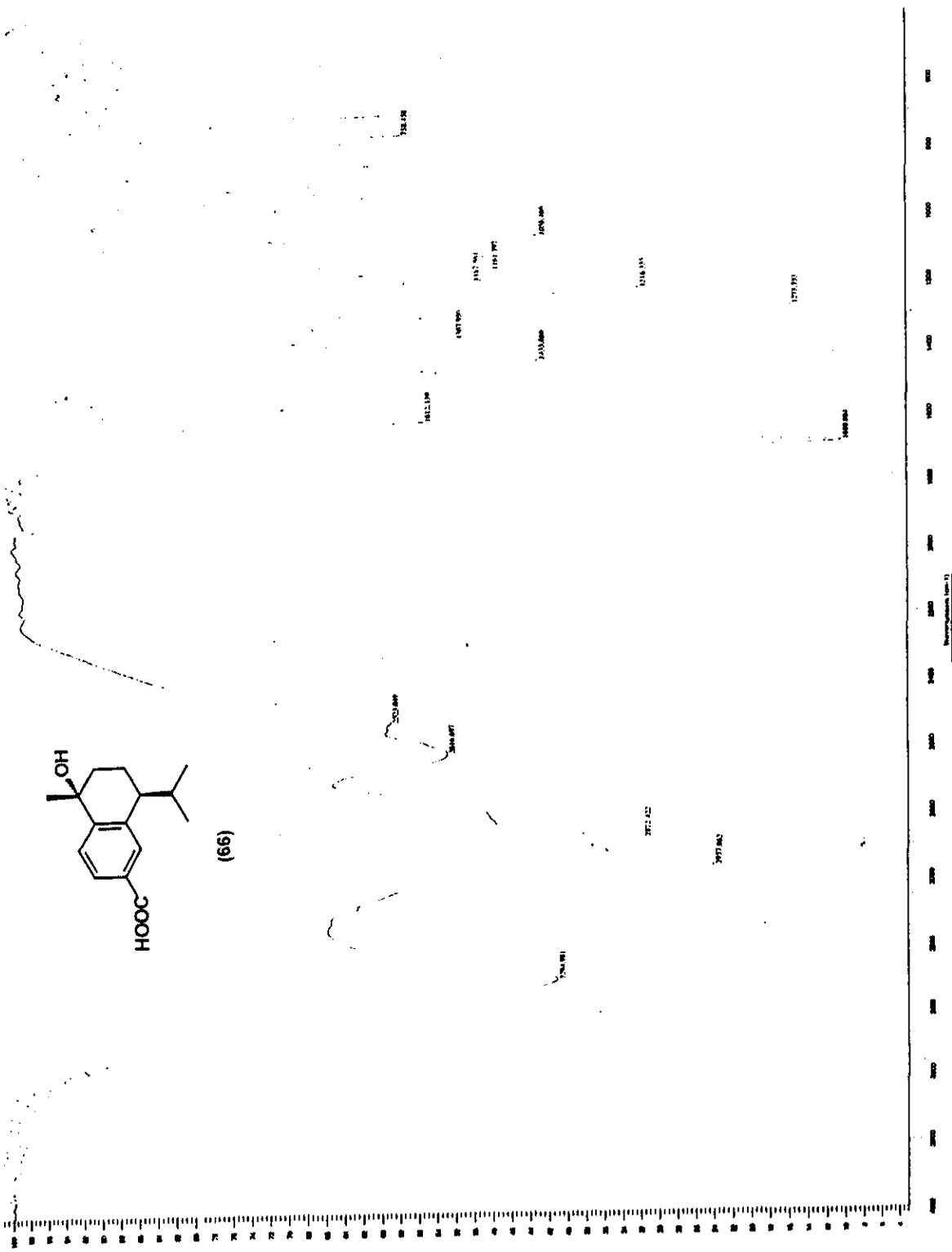
Espectro 10. DC (MeOH) 4-hidroxi-2-isopropil-4,7-dimetil-1(4H) naftalinona (8)



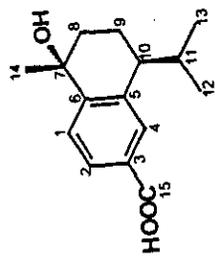
Espectro 11. IR (KBr, cm⁻¹) Ácido 7-Metil-7- α -hidroxicalamen-15-oico (66)



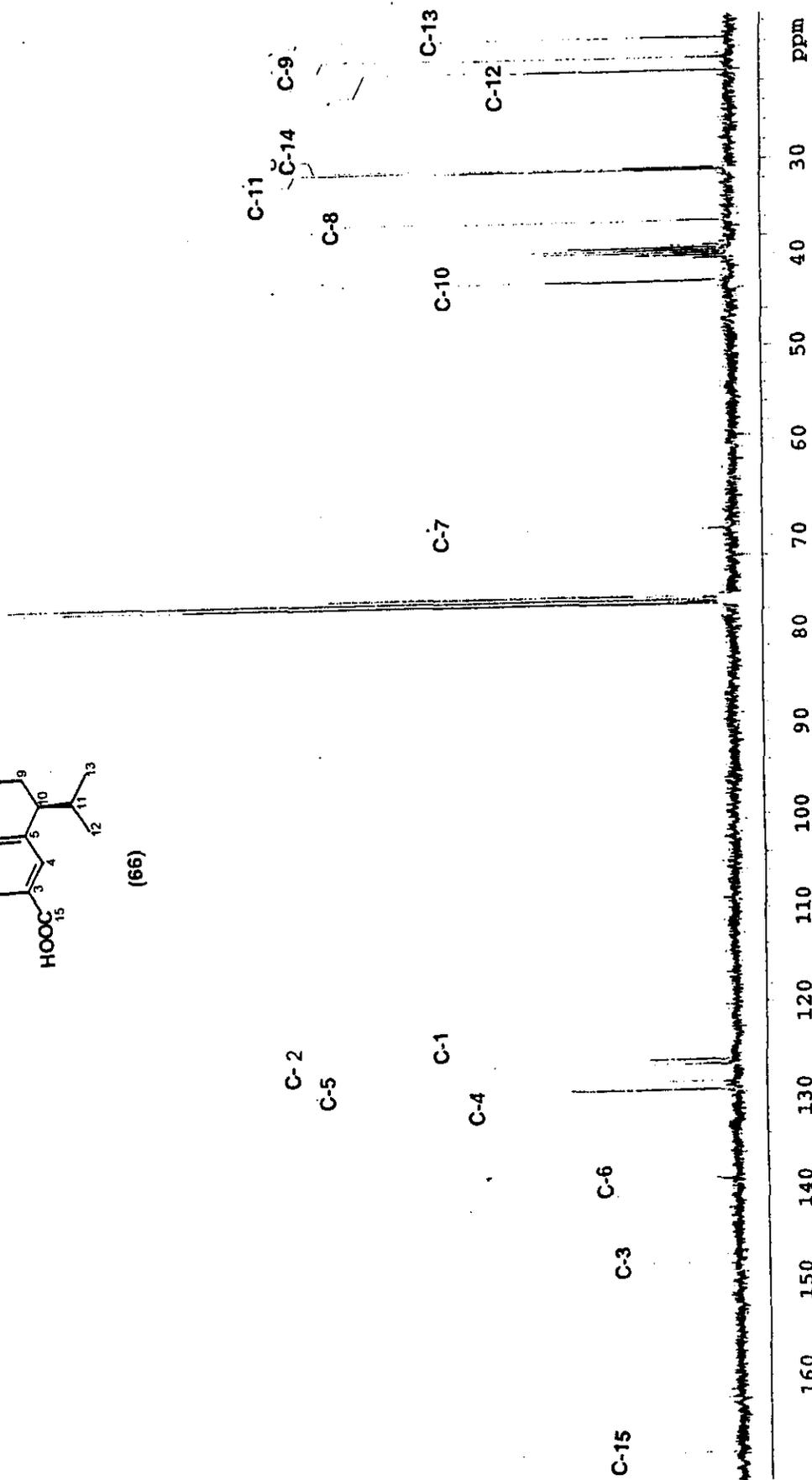
(66)



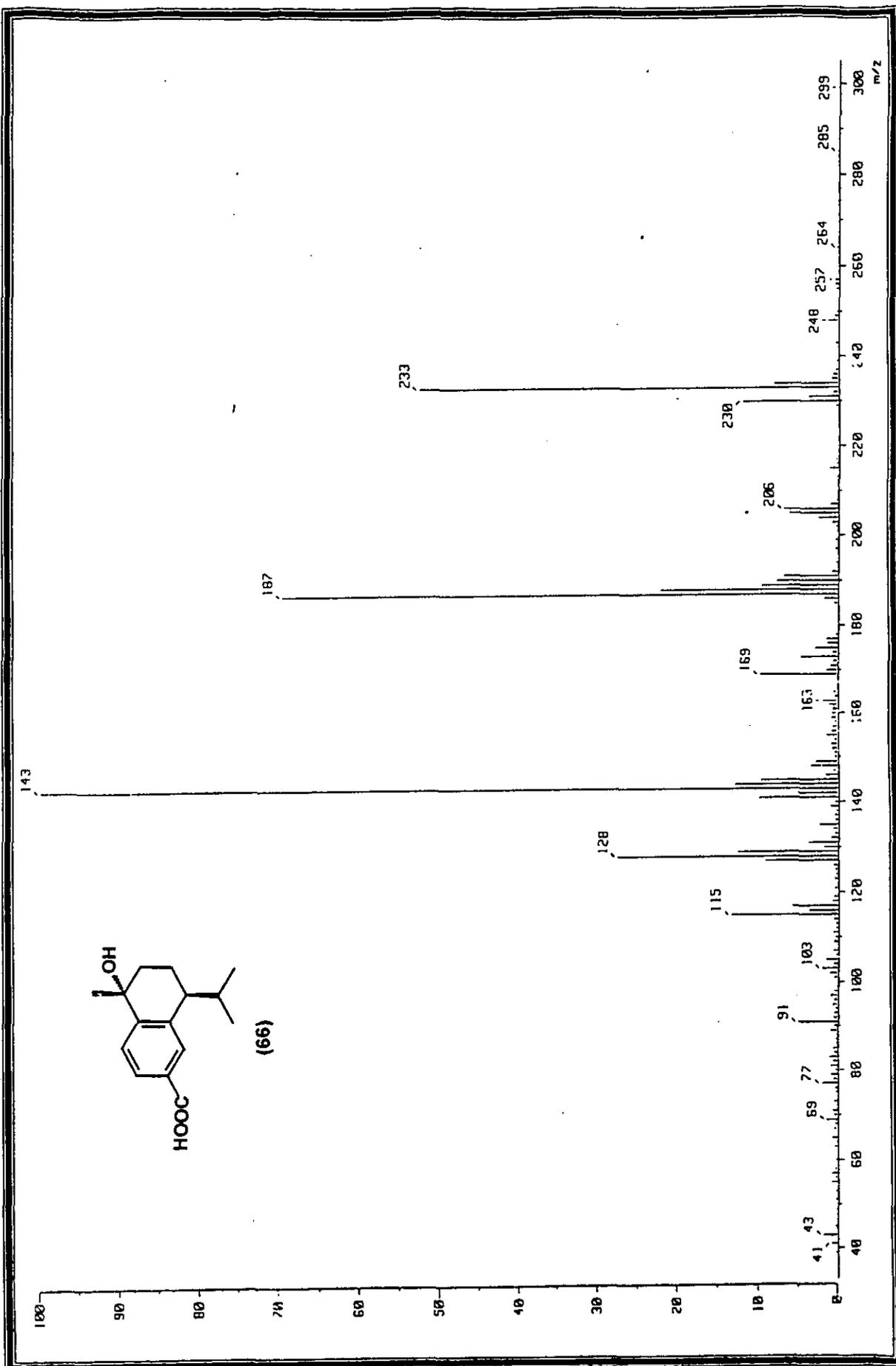
Espectro 12. RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) Ácido 7-Metil-7- α -hidroxicalamen-15-oico (66)



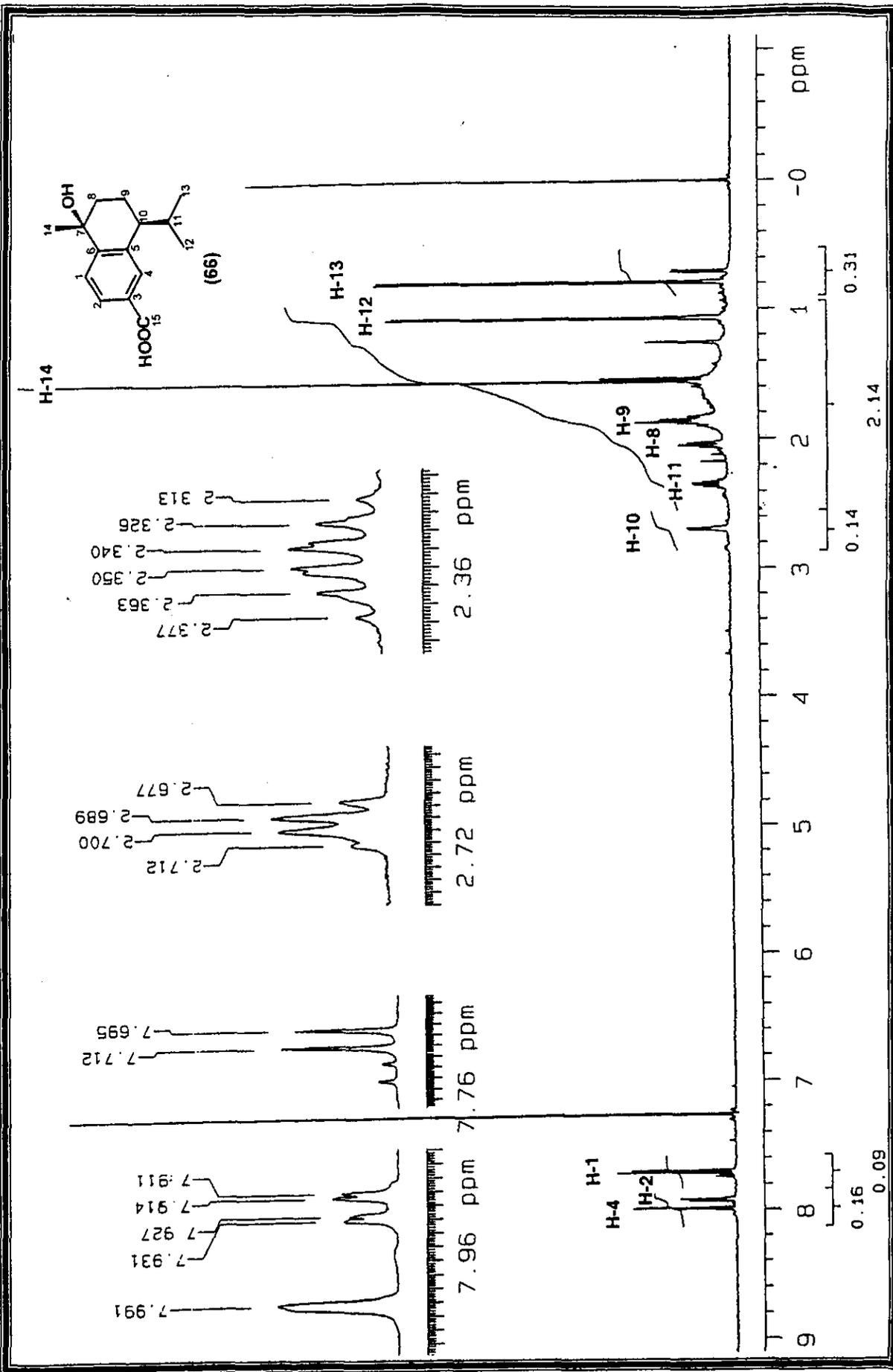
(66)



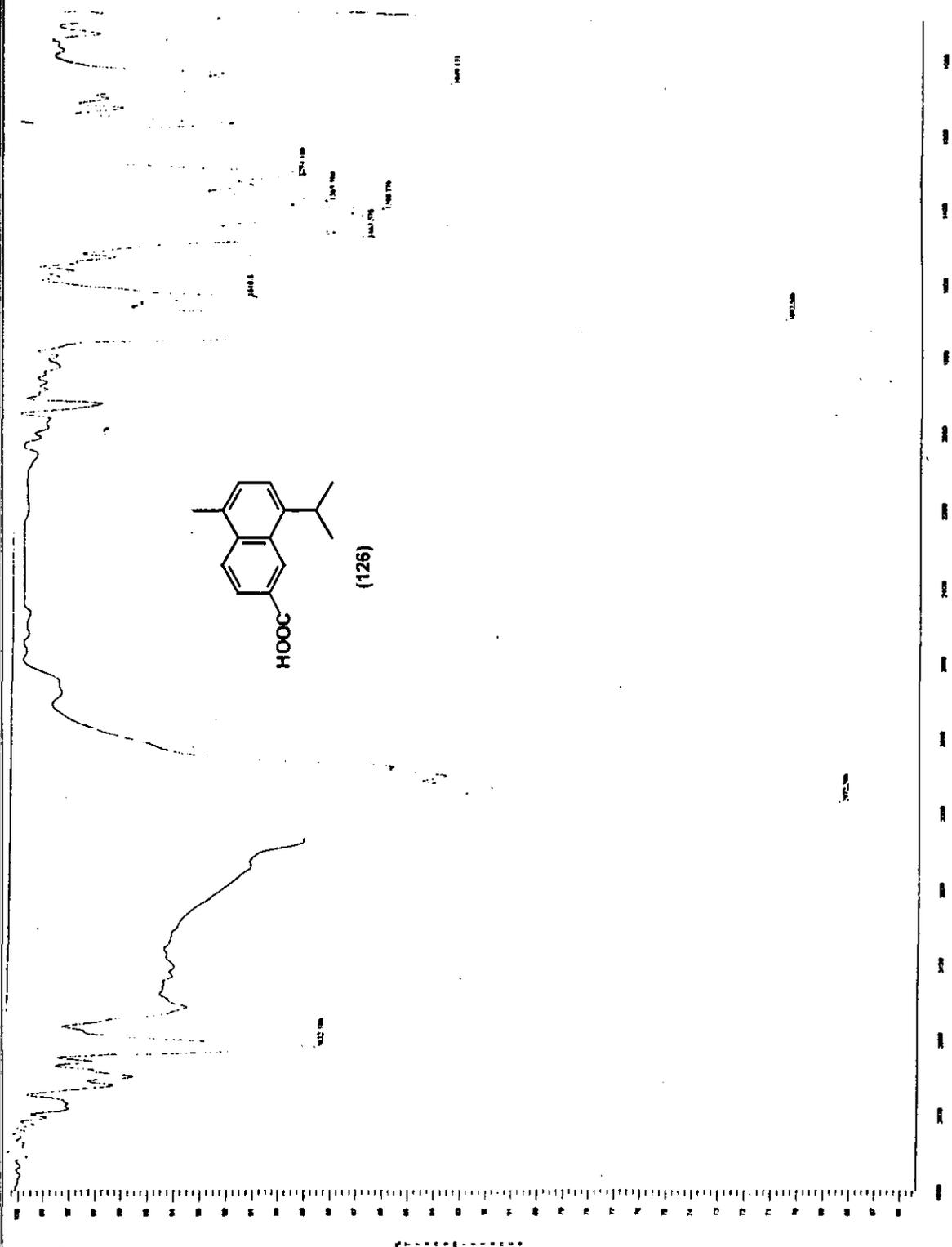
Espectro 13. EM (70 eV7) Ácido 7-Metil-7- α -hidroxicalamen-15-oico (66)



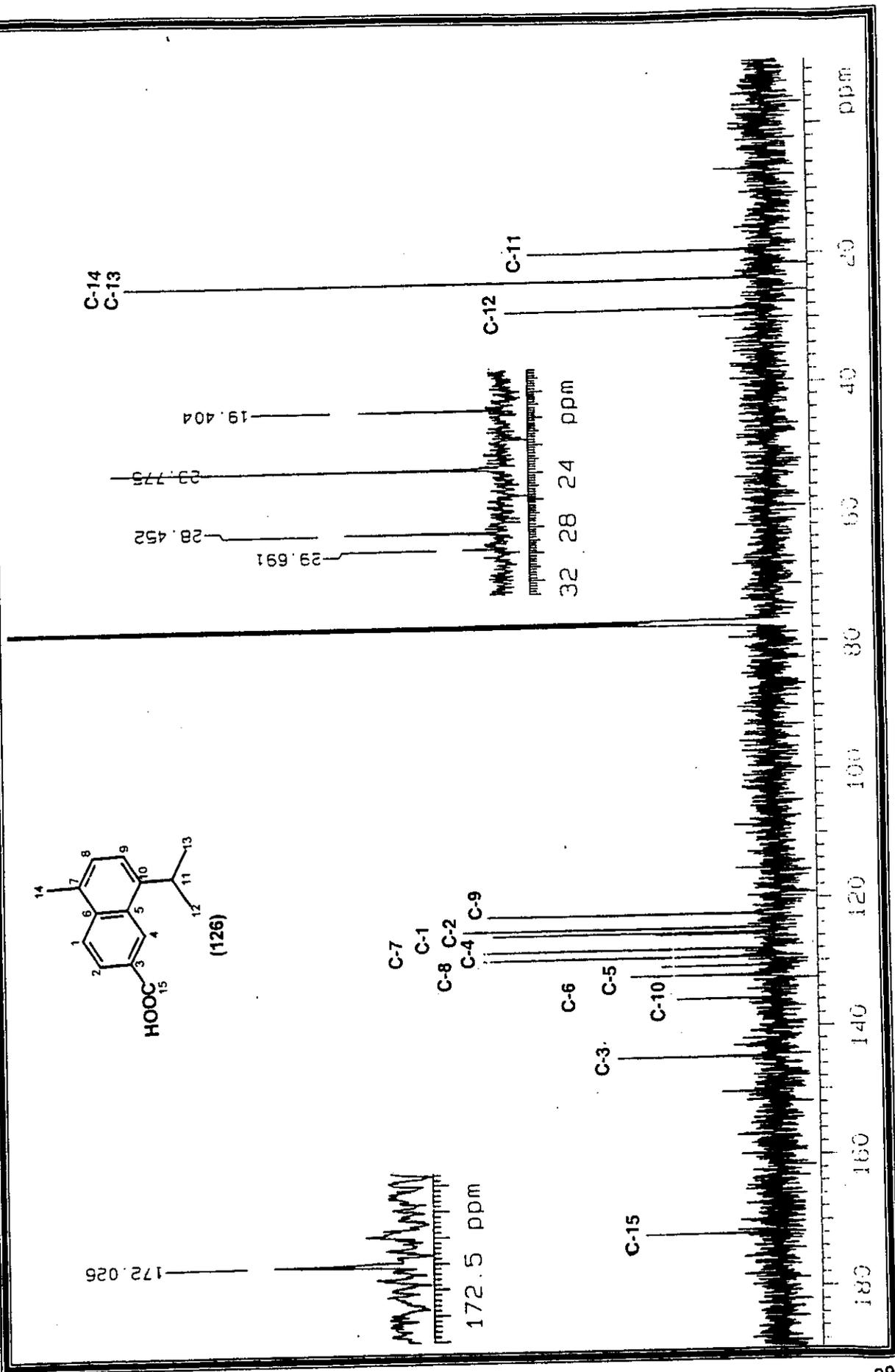
Espectro 14. RMN¹H (500 MHz, CDCl₃) Ácido 7-Metil-7- α -hidroxicalamen-15-oico (66)



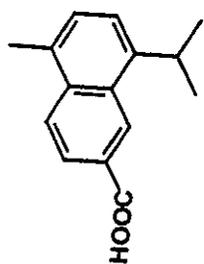
Espectro 15. IR (KBr, cm^{-1}) Ácido cadalen-15-oico (126)



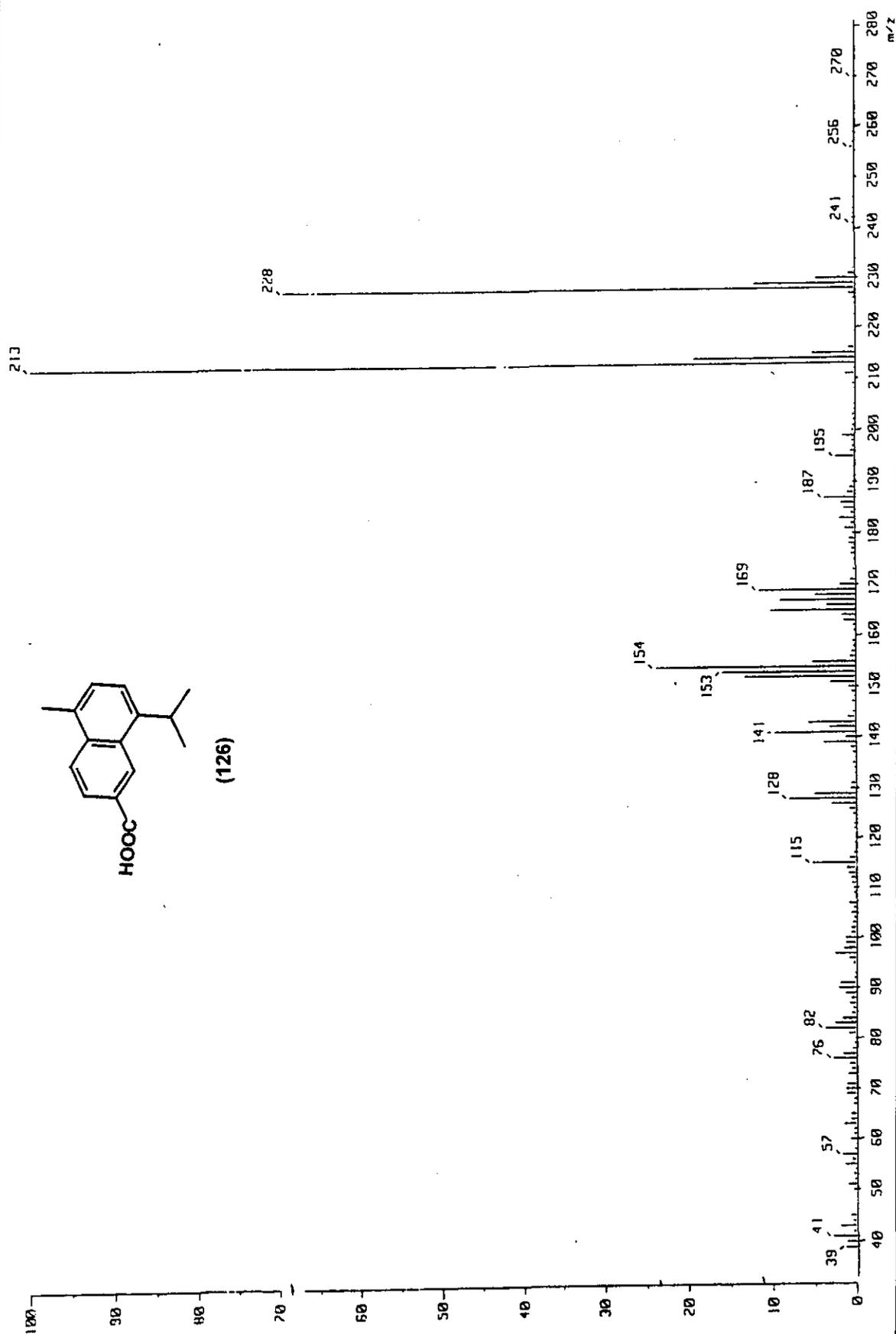
Espectro 16. RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃) Ácido cadalen-15-oico (126)



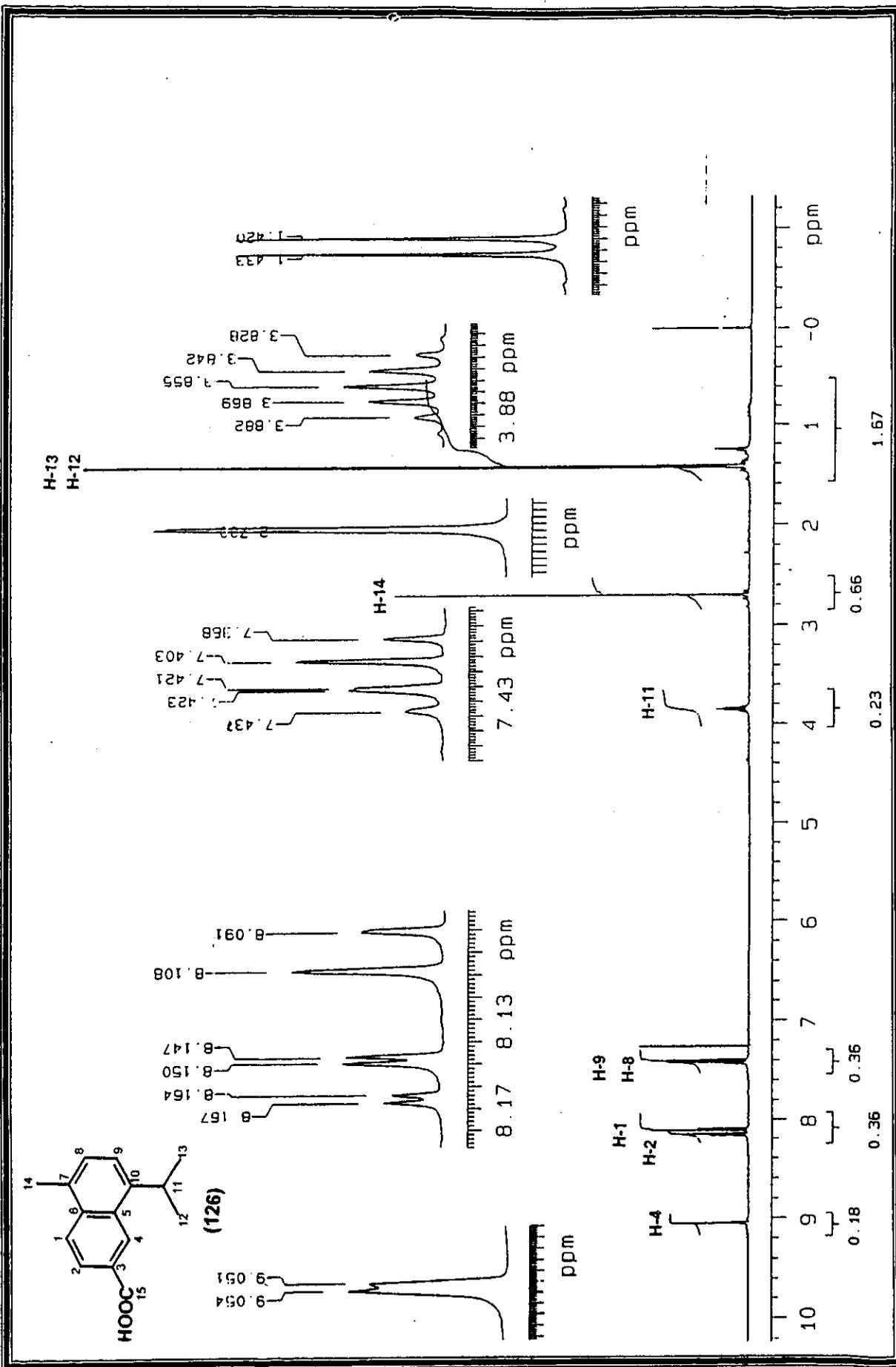
Espectro 17. EM (70 eV) Ácido cadalen-15-oico (126)



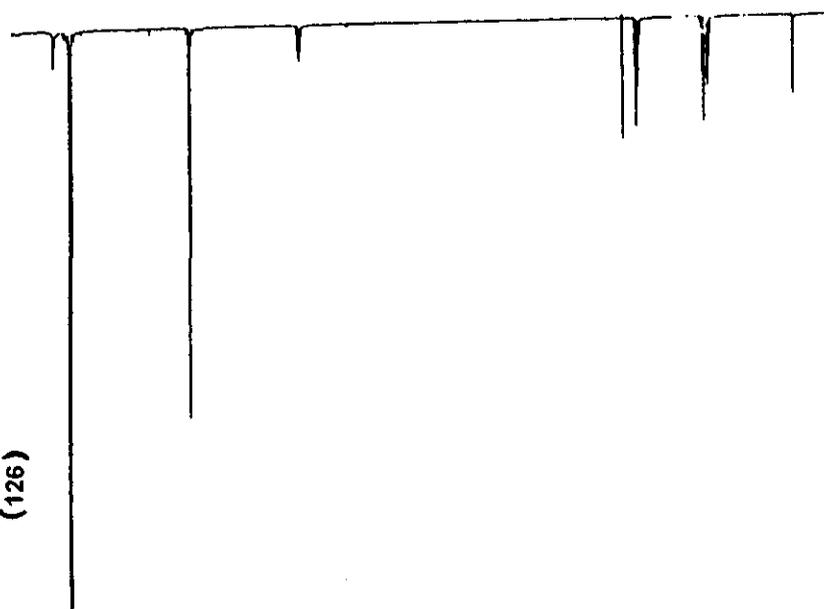
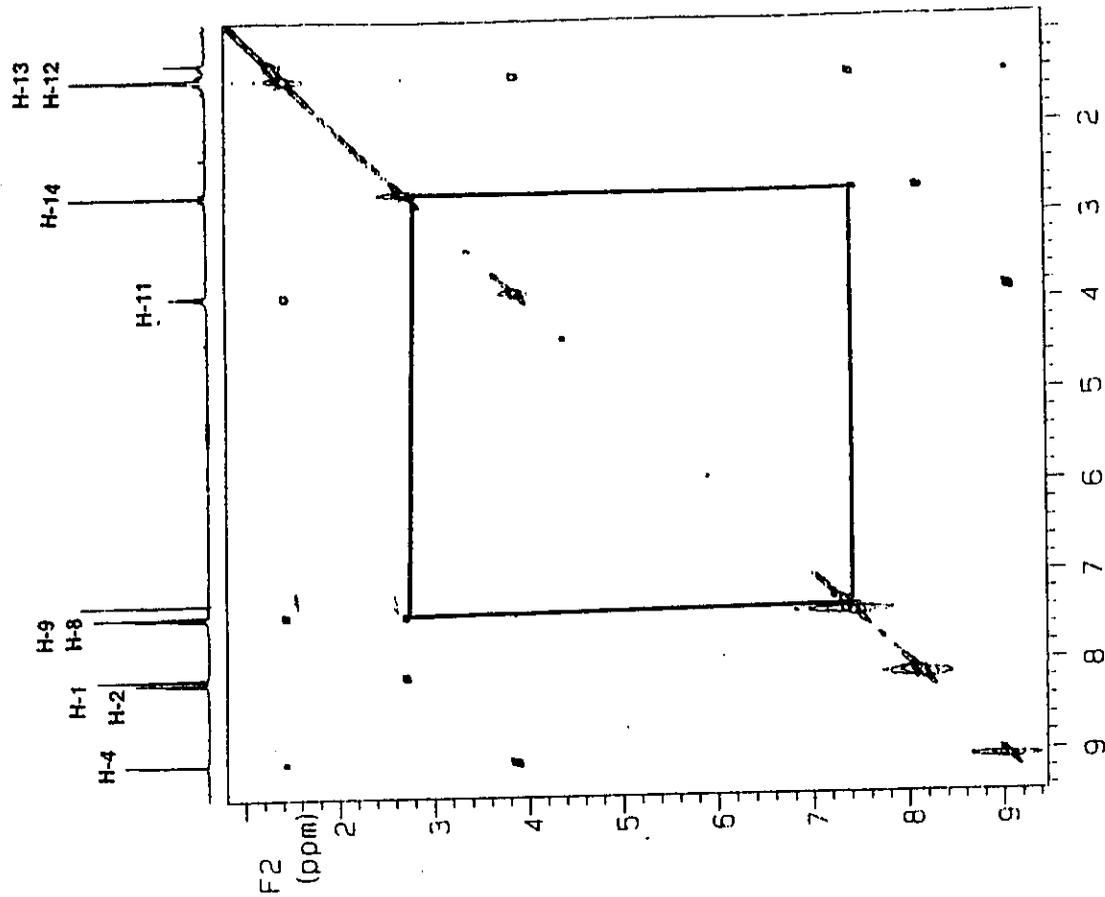
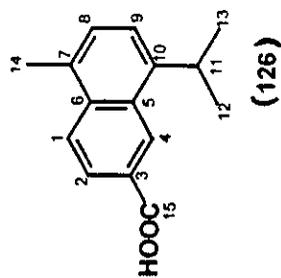
(126)



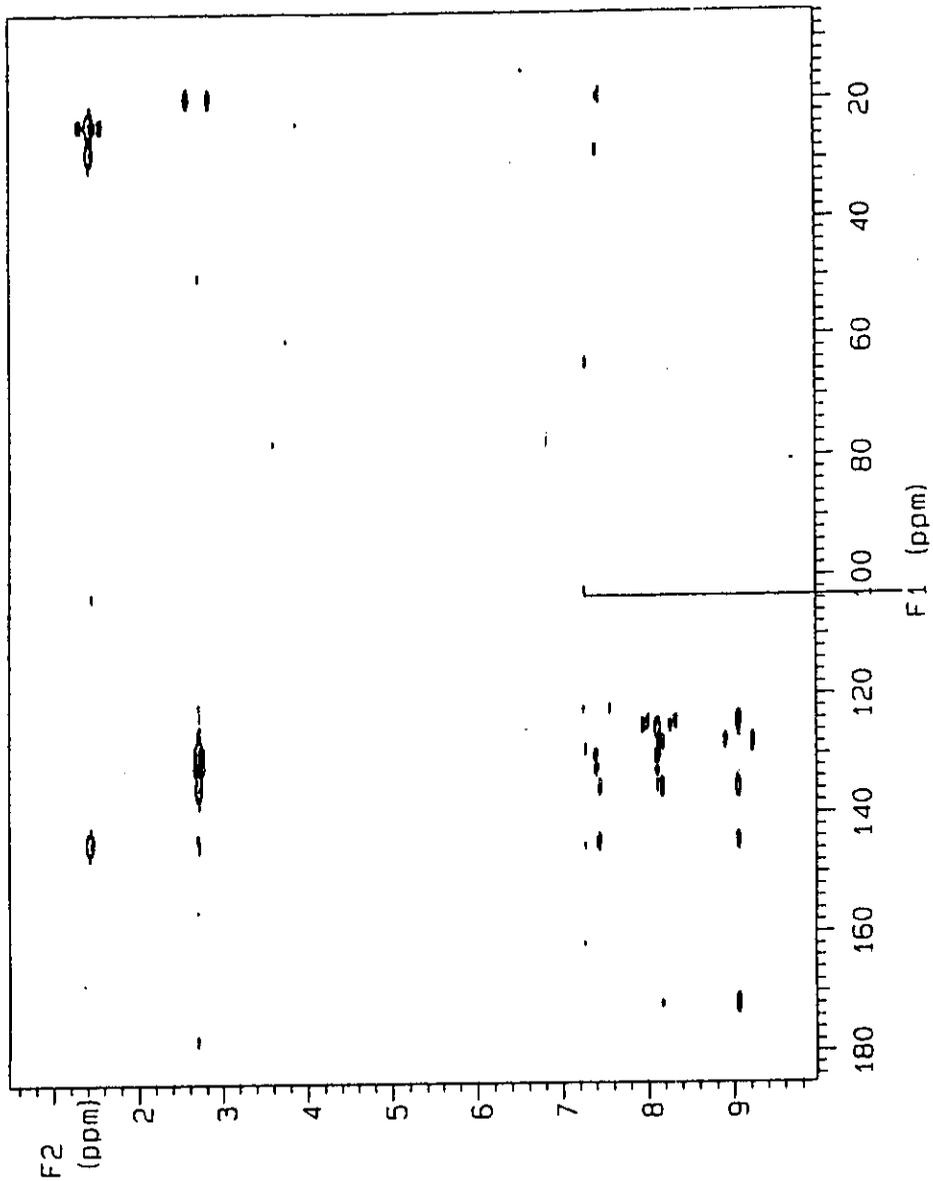
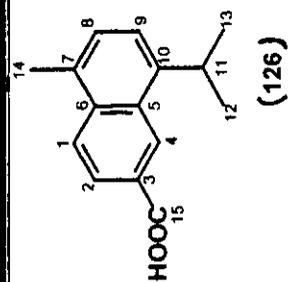
Espectro 18. RMN¹H (500 Mz, CDCl₃) Acido cadalen-15-oico (126)



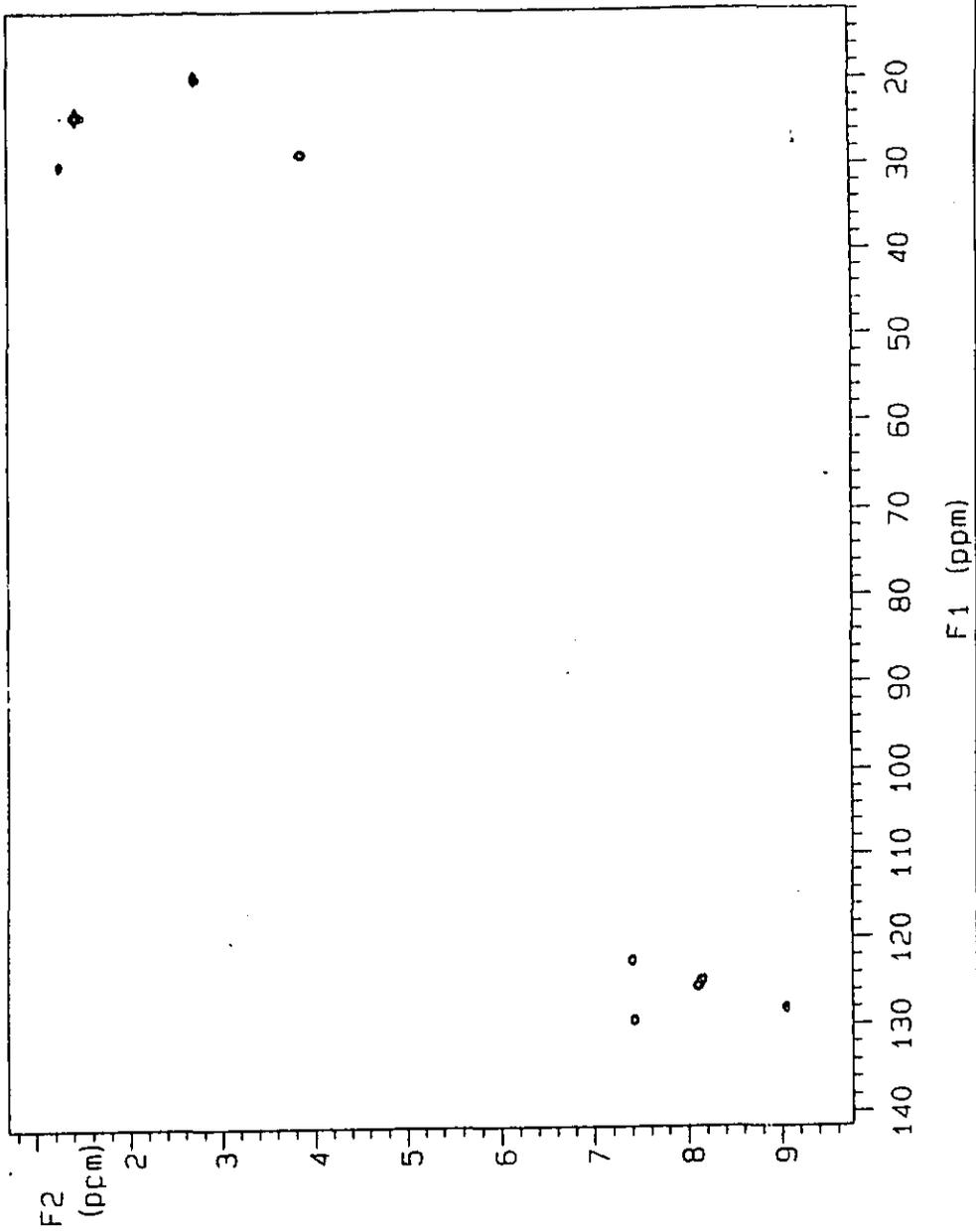
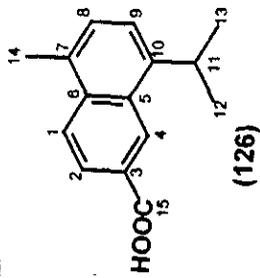
Espectro 19. NOESY Acido cadalen-15-oico (126)



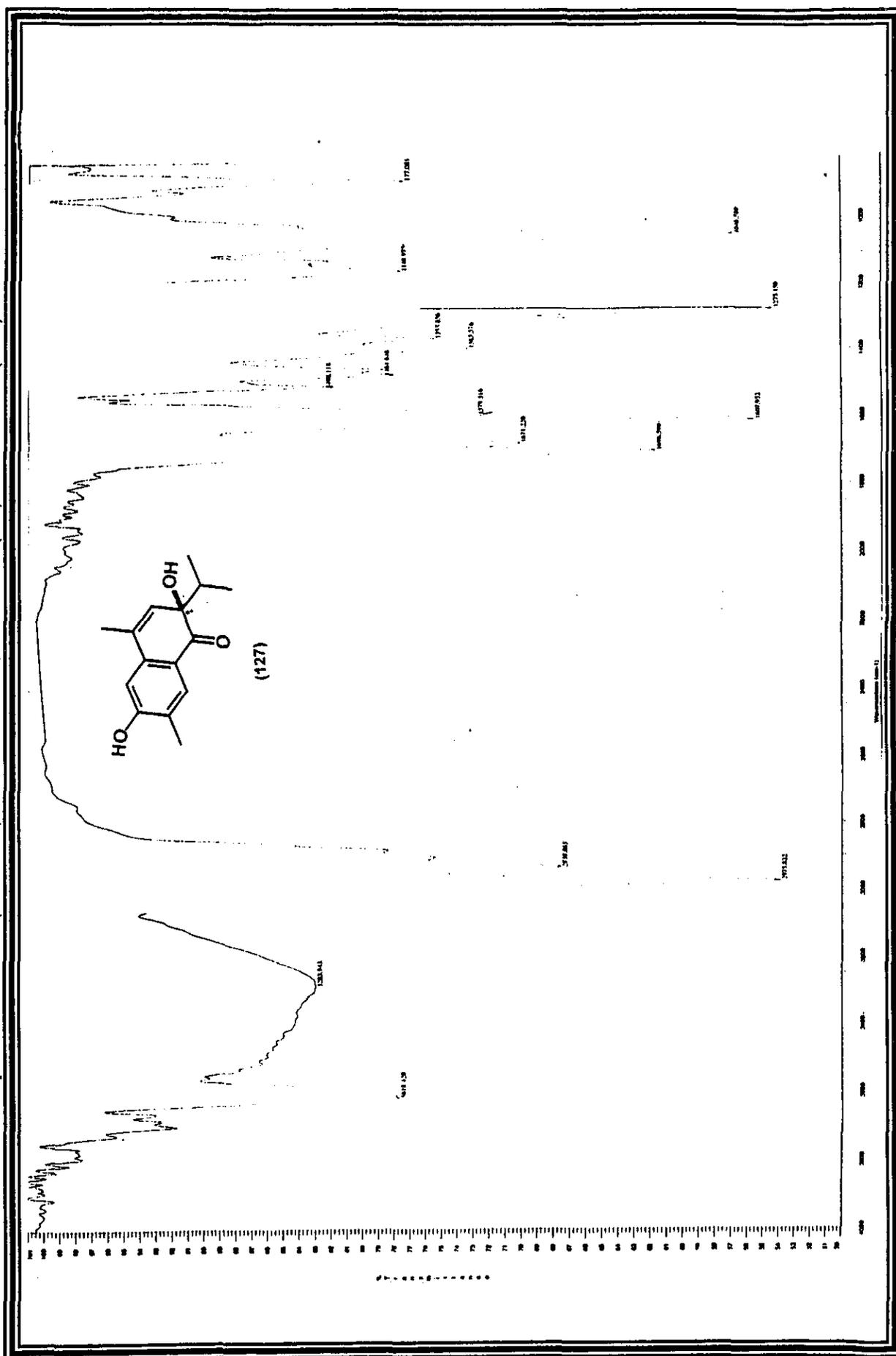
Espectro 20. HMBC Acido cadalen-15-oico (126)



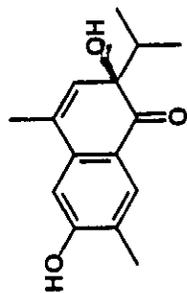
Espectro 21. HMQC Acido cadalen-15-oico (126)



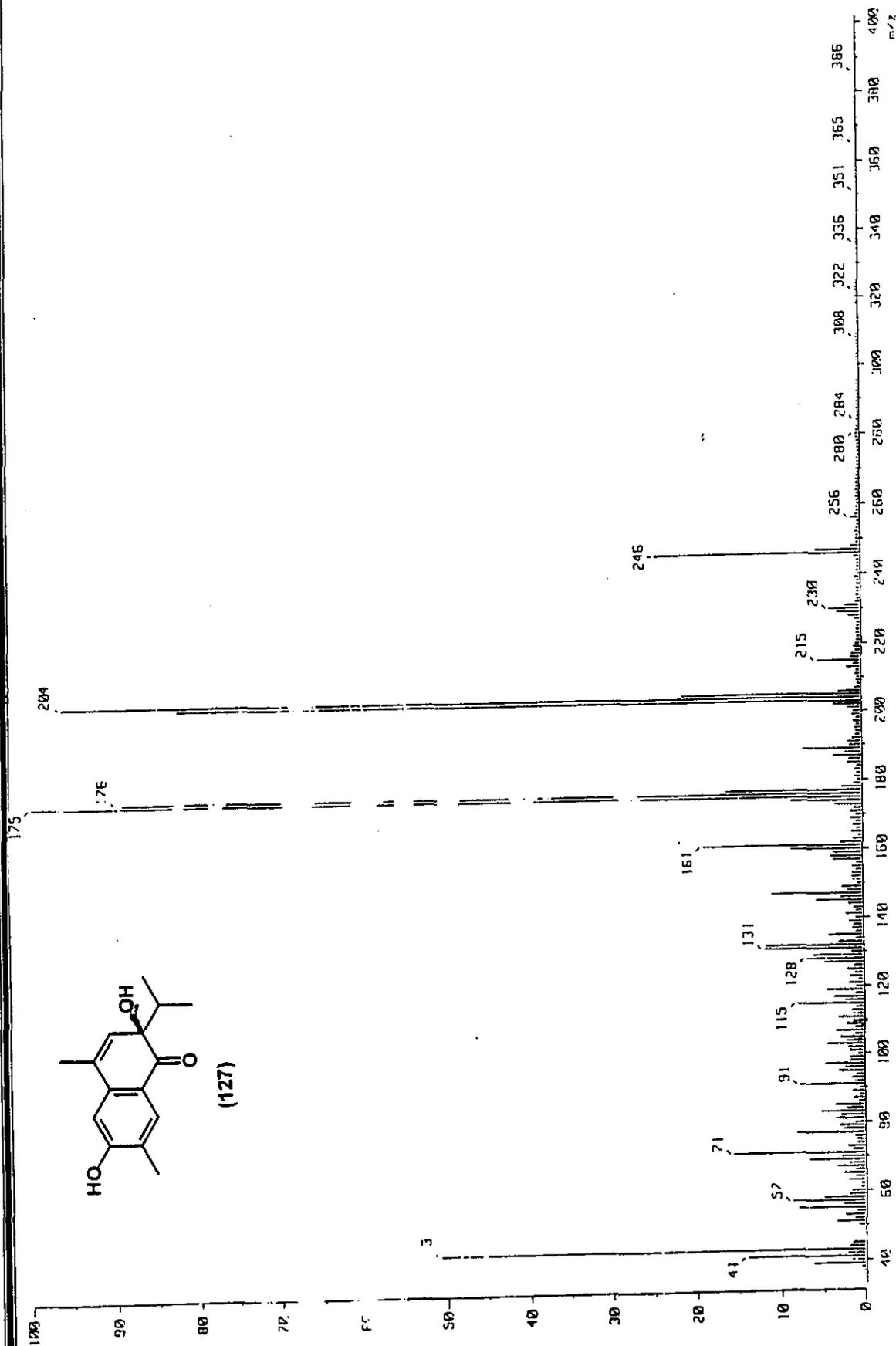
Espectro 22. IR (KBr cm^{-1}) 2,6-Dihidroxi-4,7-dimetil-3(4H)-naftalinona (127)



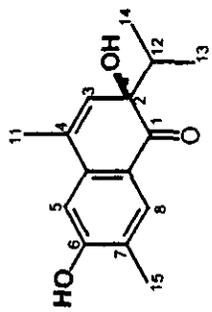
Espectro 23. EM (70 eV) 2,6-Dihidroxi-4,7-dimetil-3(4H)-naftalinona (127)



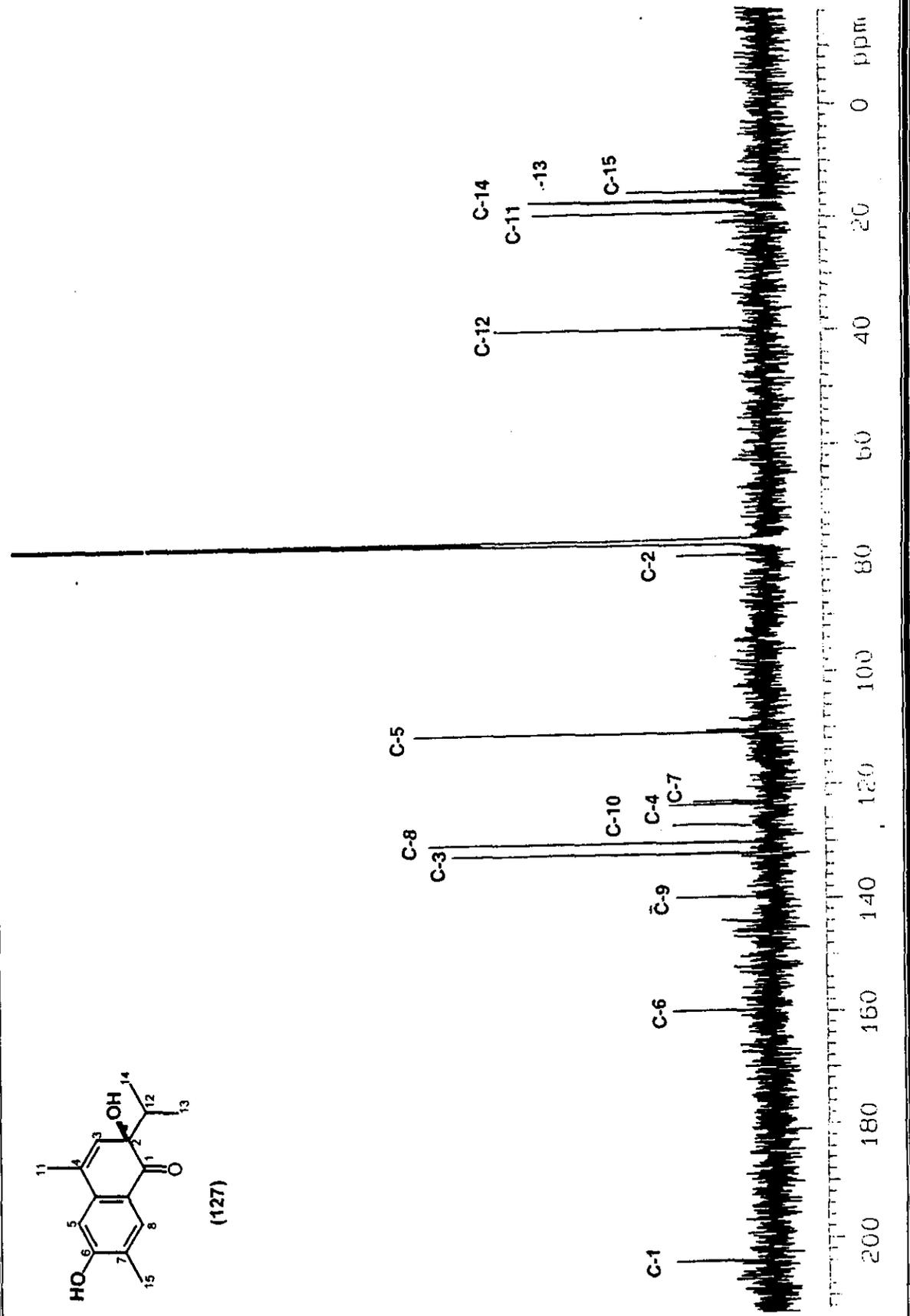
(127)



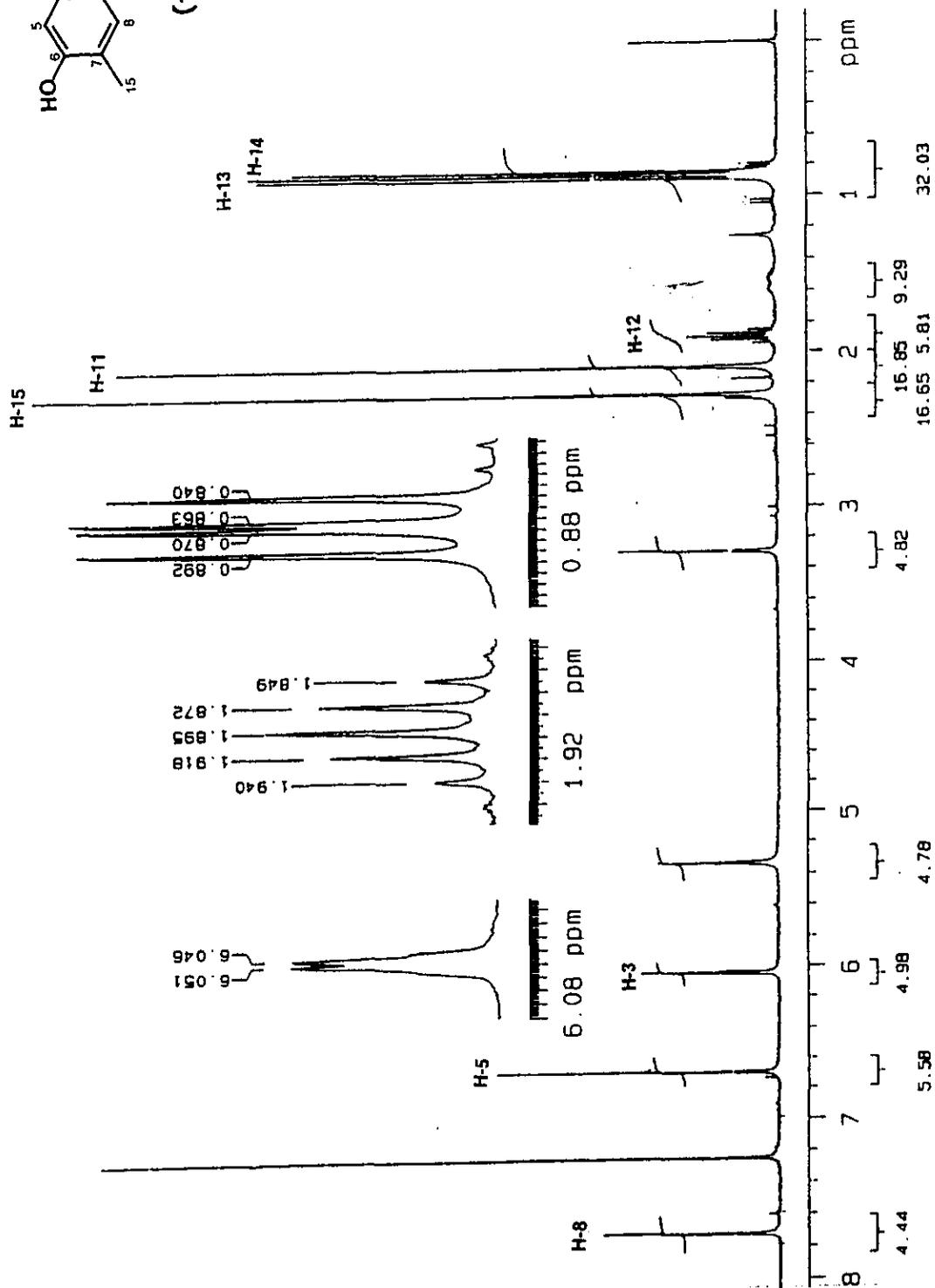
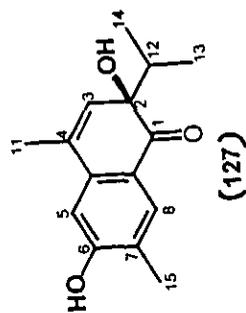
Espectro 24. RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃) 2,6-Dihidroxi-4,7-dimetil-3(4H)-naftalinona (127)



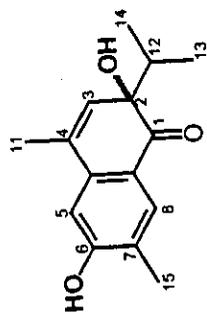
(127)



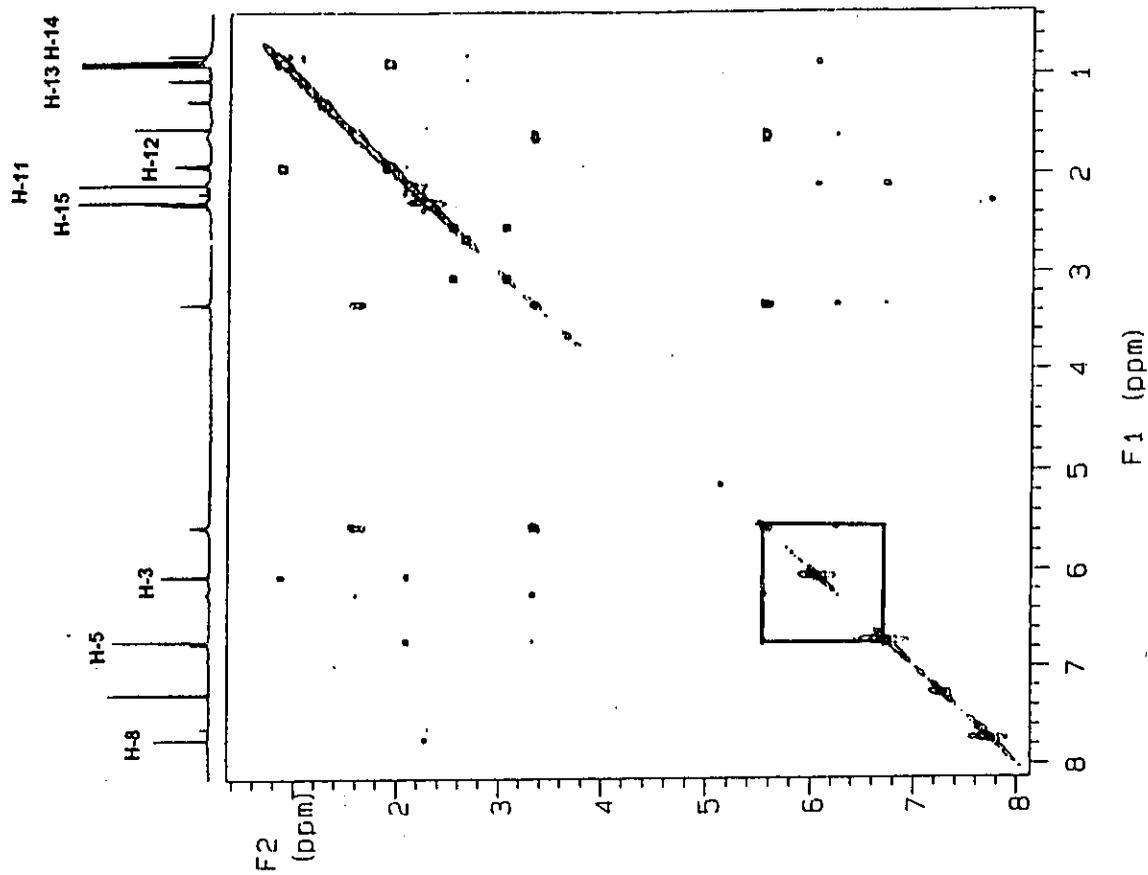
Espectro 25. RMN¹H (500 MHz, CDCl₃) 2,6-Dihidroxi-4,7-dimetil-3(4H)-naftalinona (127)



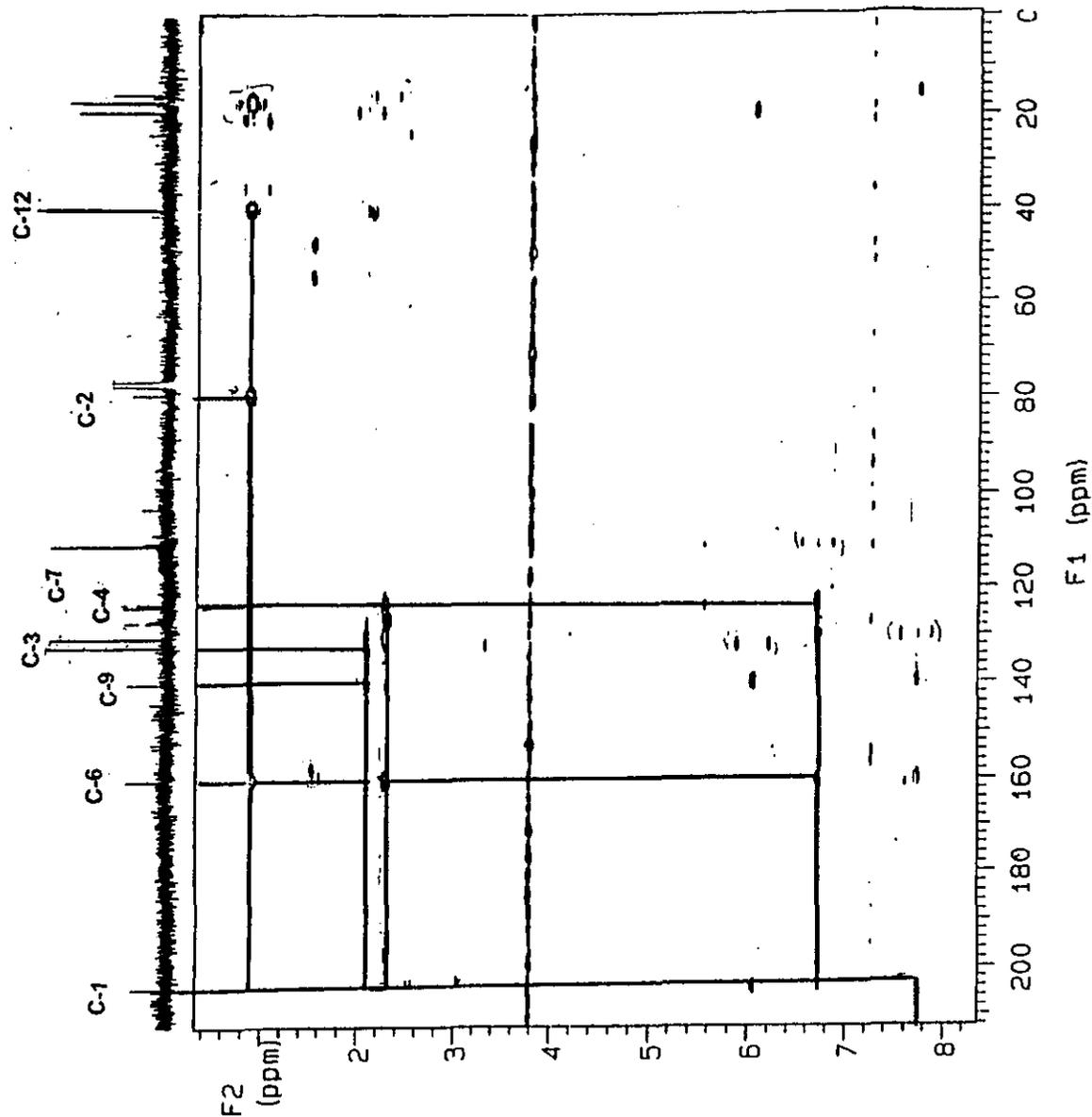
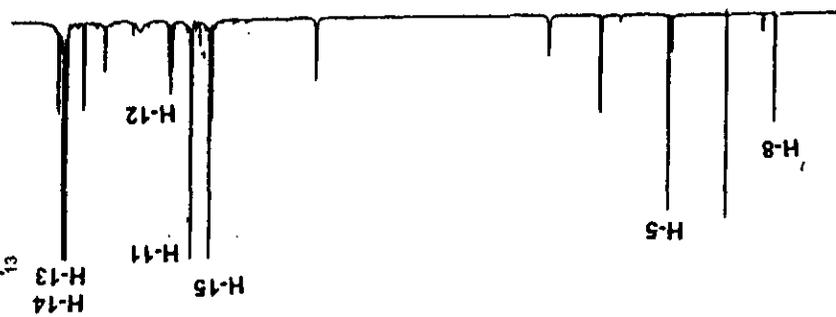
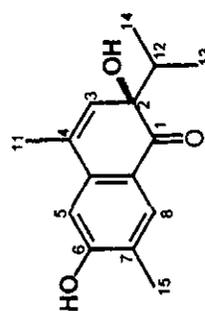
Espectro 26. NOESY 2,6-Dihidroxi-4,7-dimetil-3(4H)-naftalinona (127)



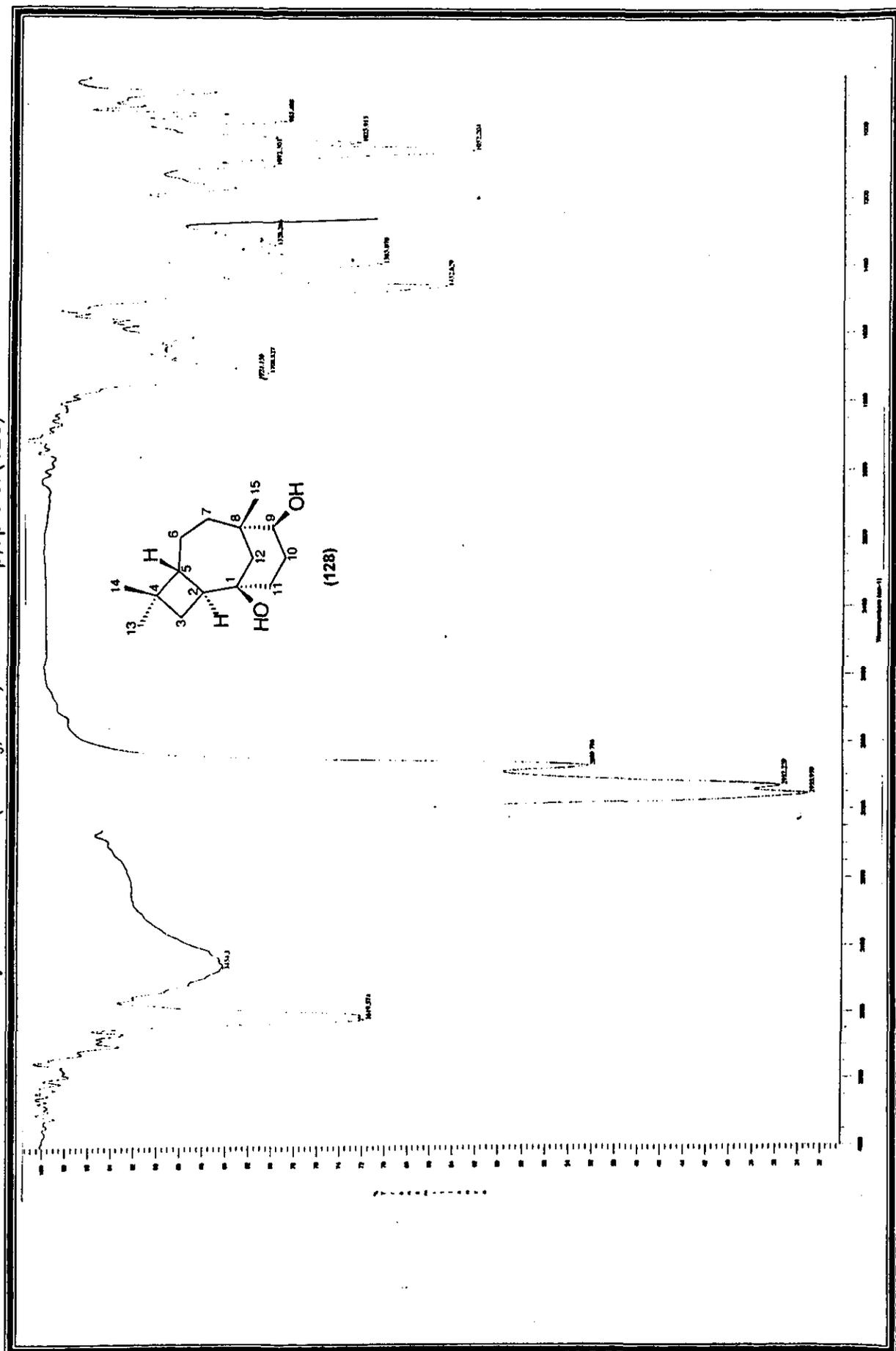
(127)



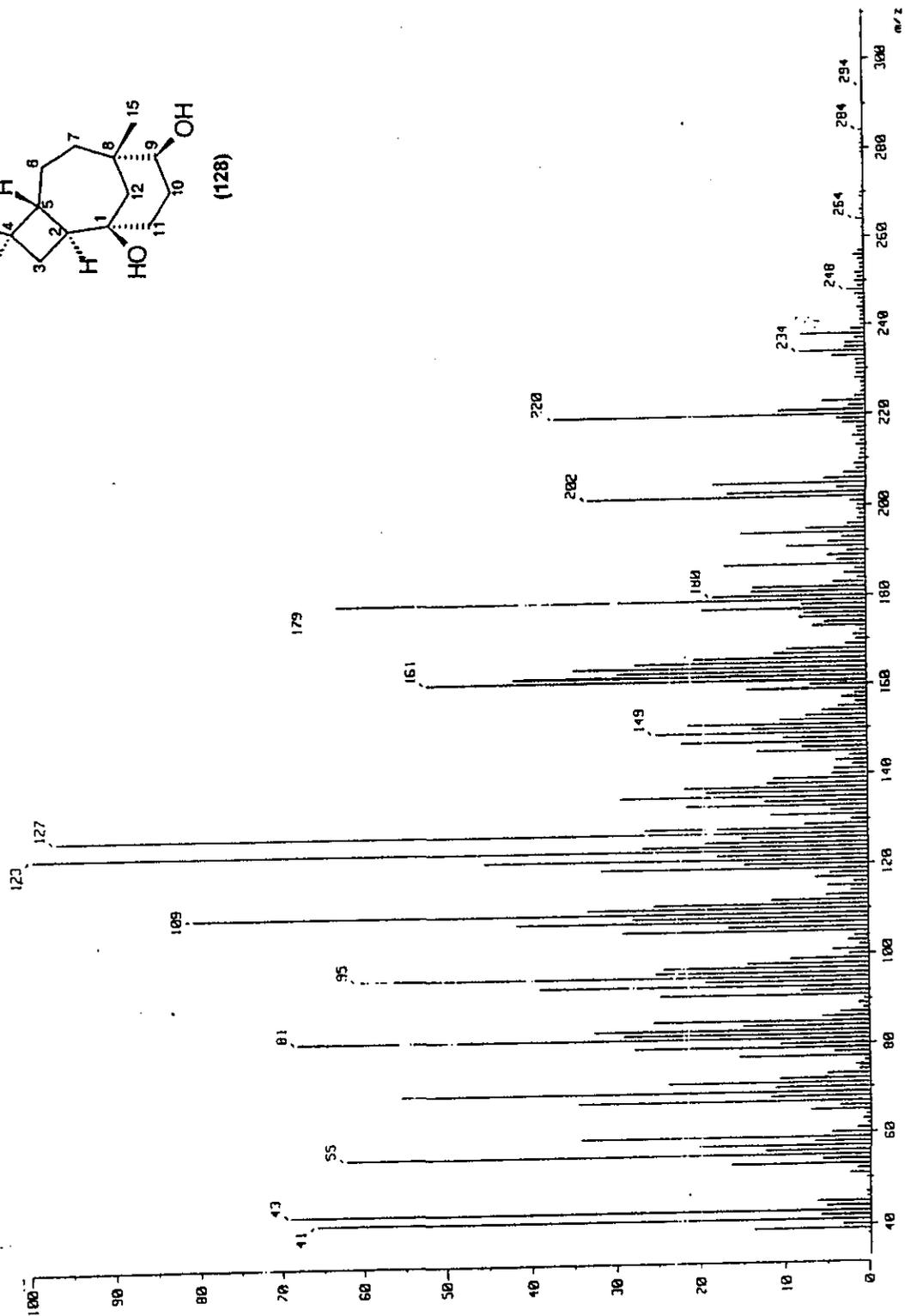
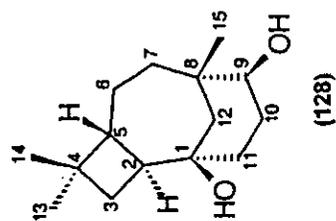
Espectro 27. HMBC 2,6-Dihidroxi-4,7-dimetil-3(4H)-naftalinona (127)



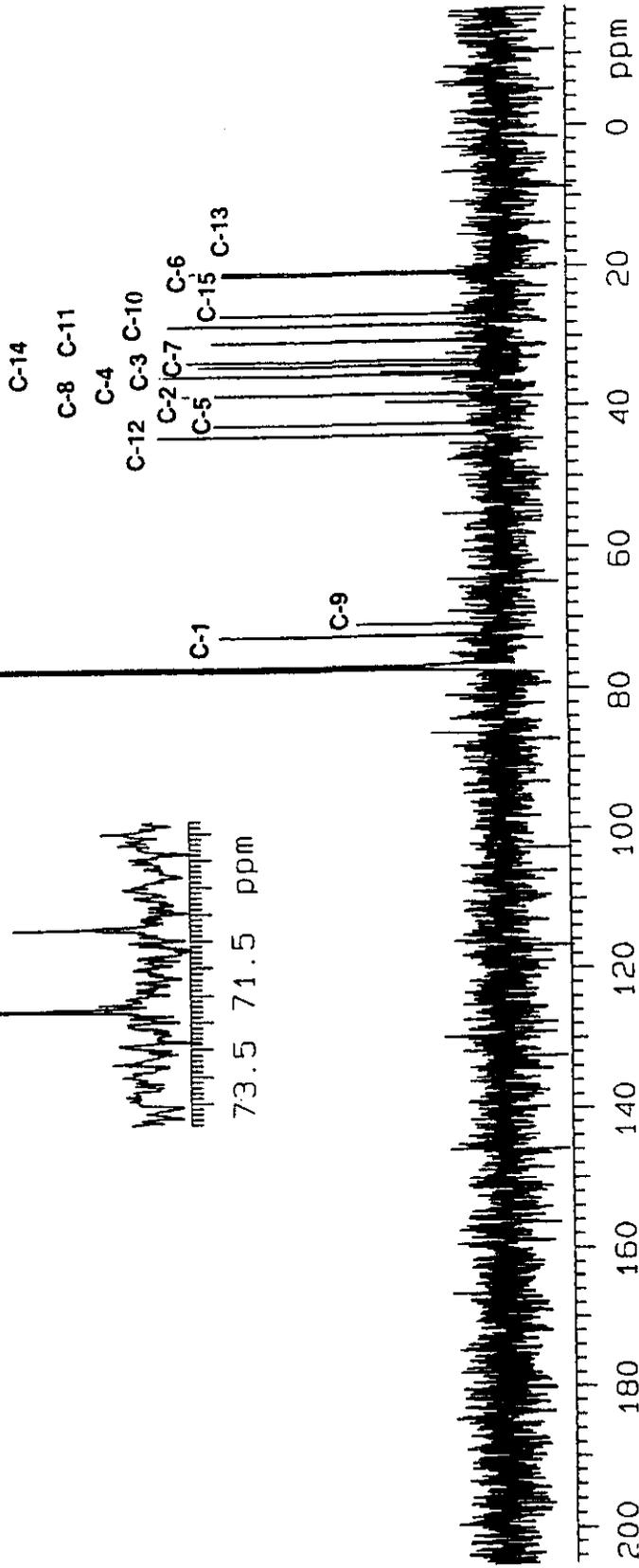
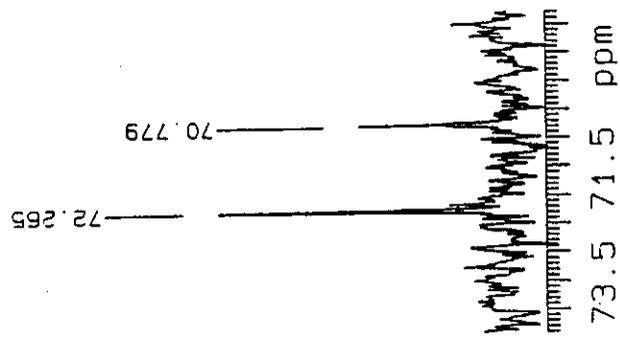
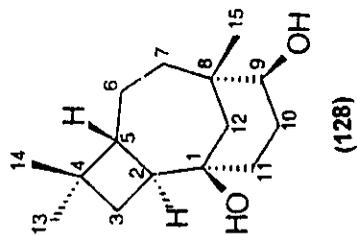
Espectro 28. IR (CHCl₃, cm⁻¹) Cariolan-1 β ,9 β -diol (128)



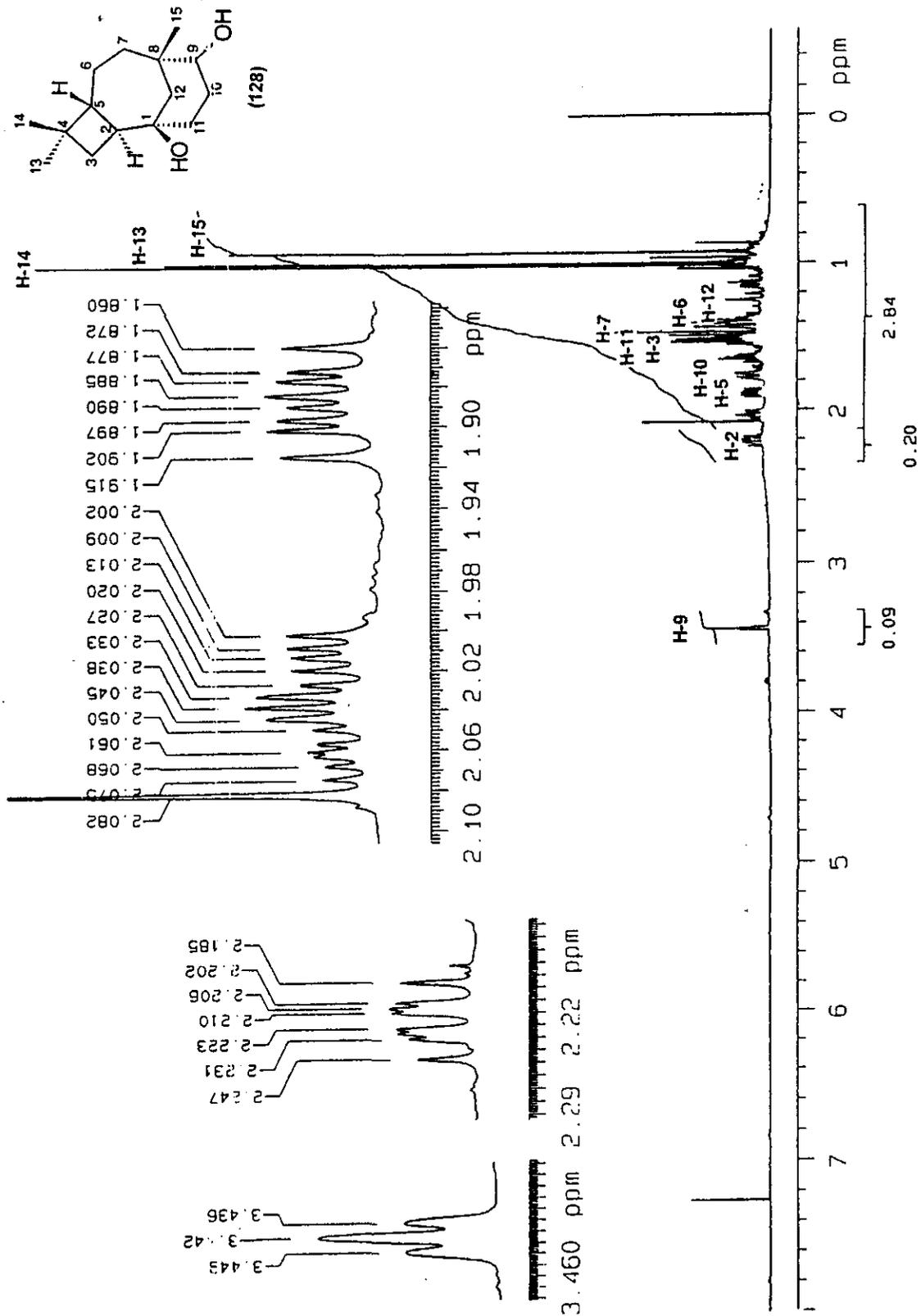
Espectro 29. EM (70 eV) Cariolan-1 β ,9 β -diol (128)



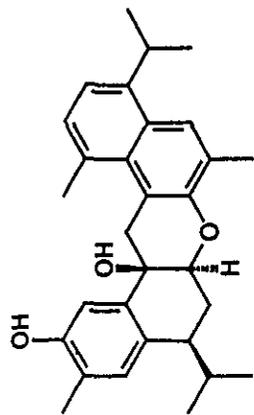
Espectro 30. RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃) Cariolan-1 β ,9 β -diol (128)



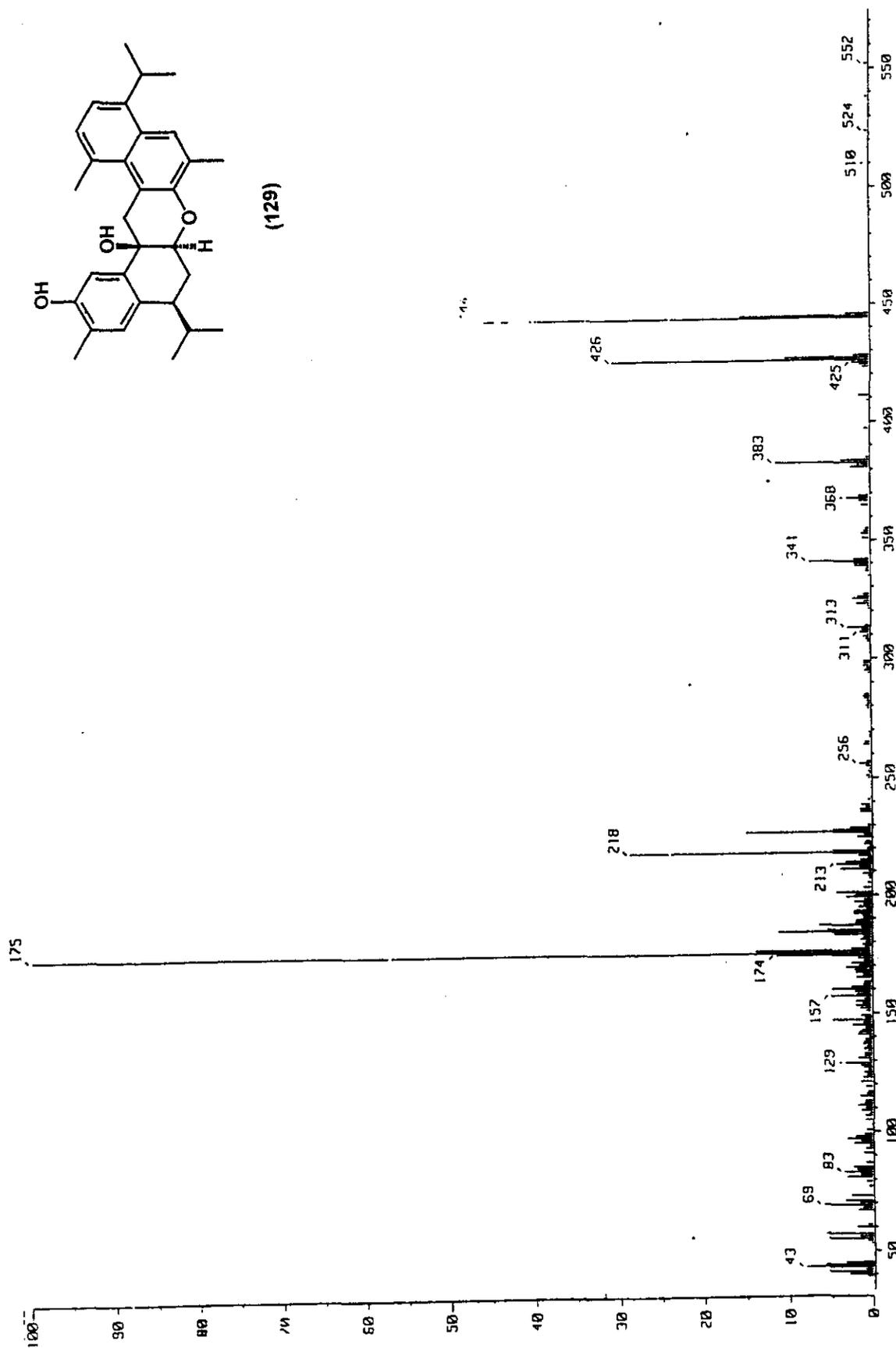
Espectro 31. RMN¹H (500 MHz, CDCl₃) Cariolan-1 β ,9 β -diol (128)



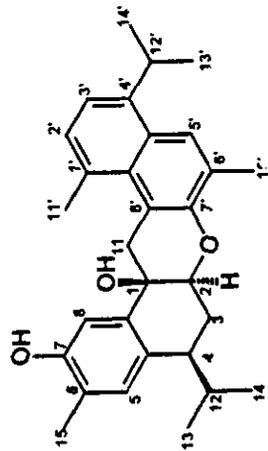
Espectro 32. EM (70 Ev) Dicadalenol (129)



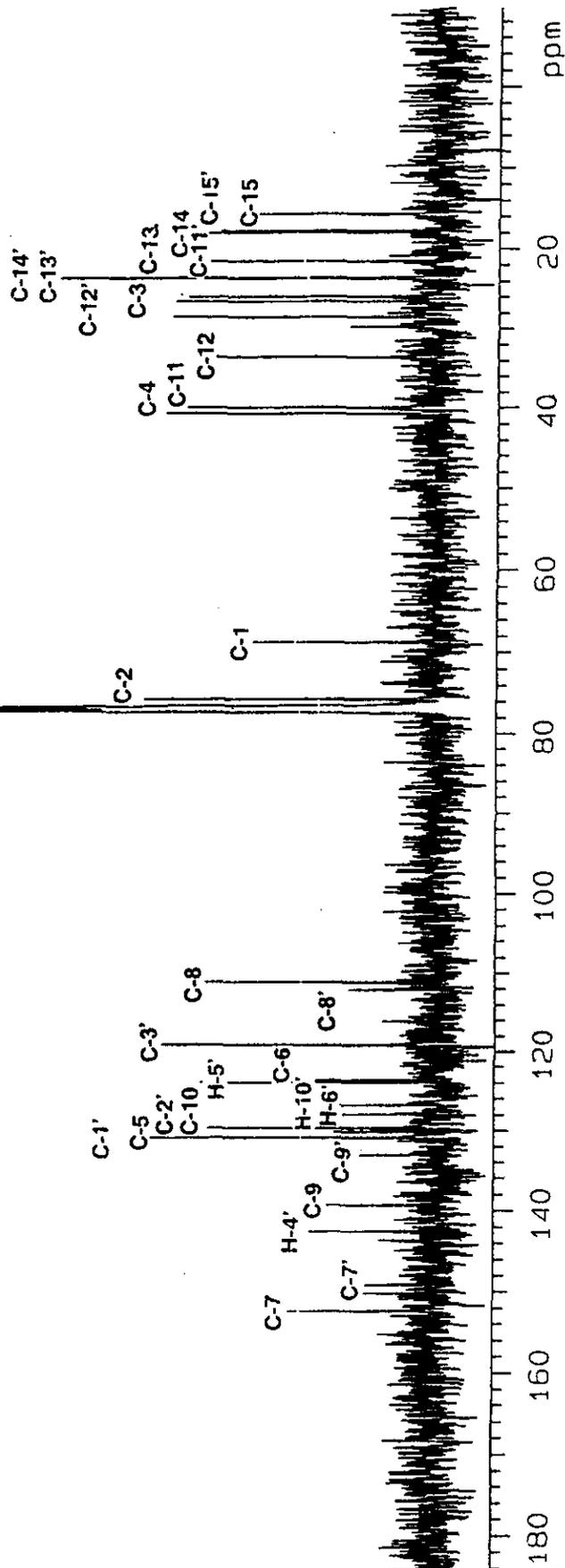
(129)



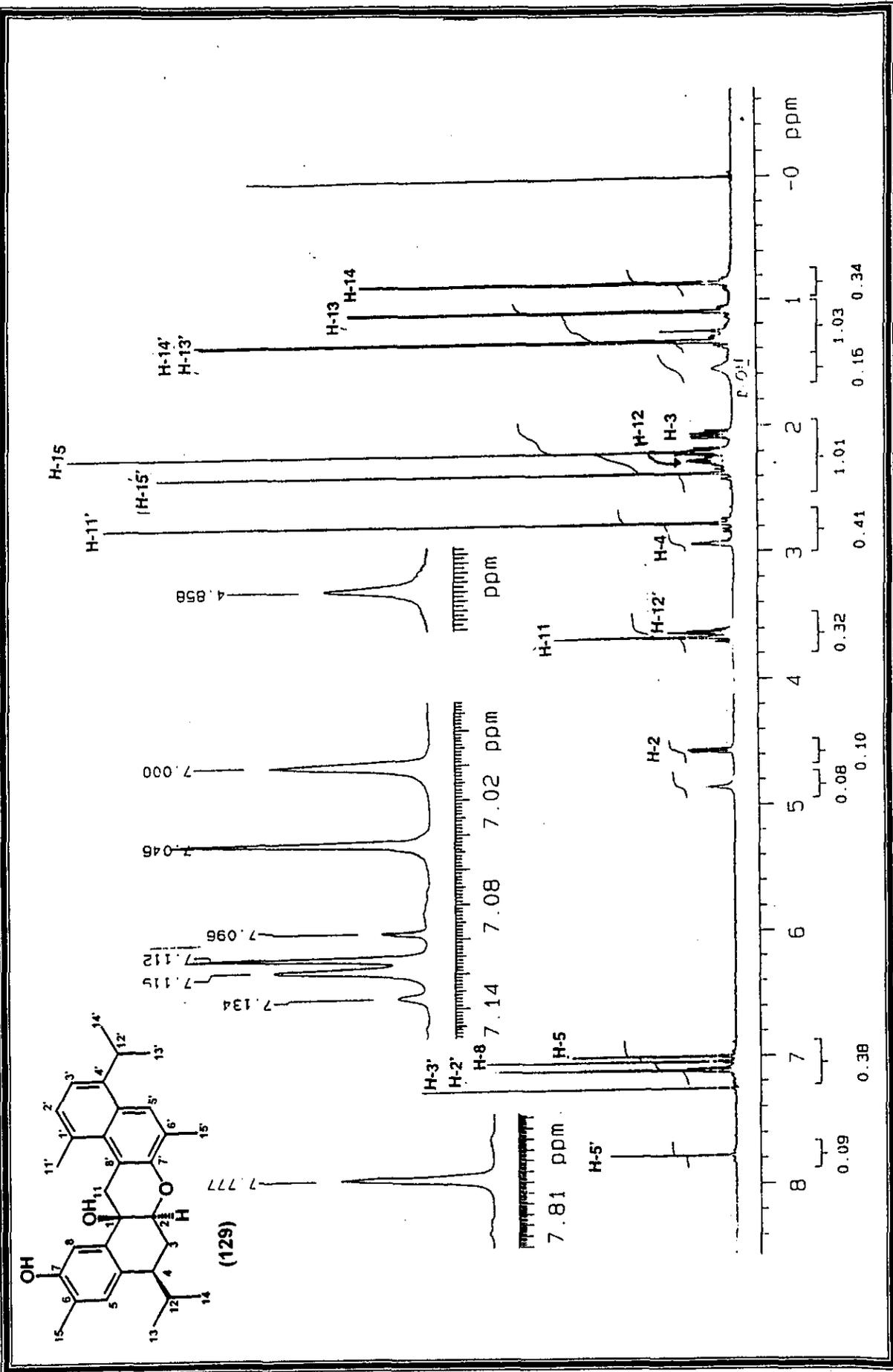
Espectro 33. RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃) Dicadalenol (129)



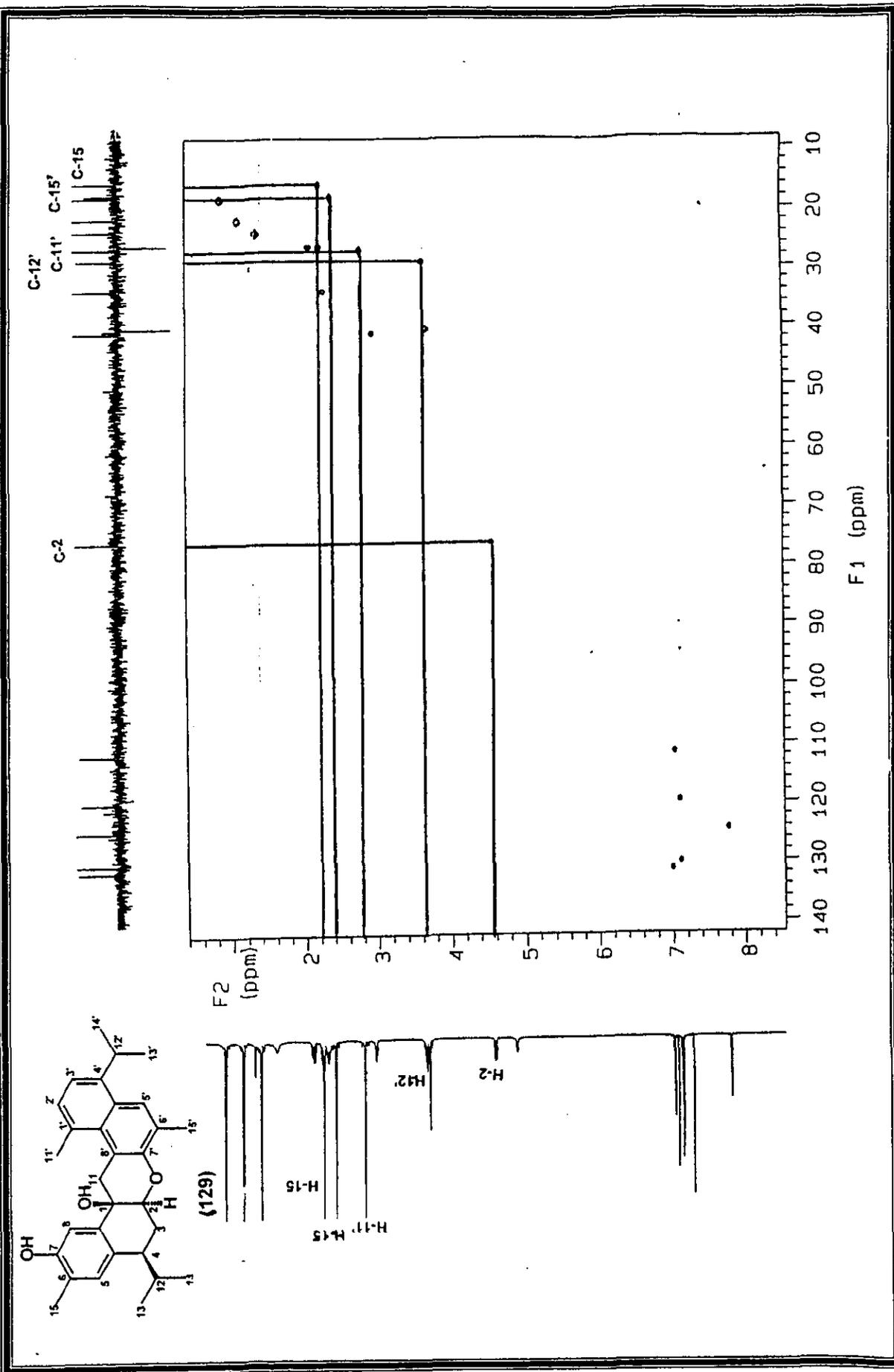
(129)



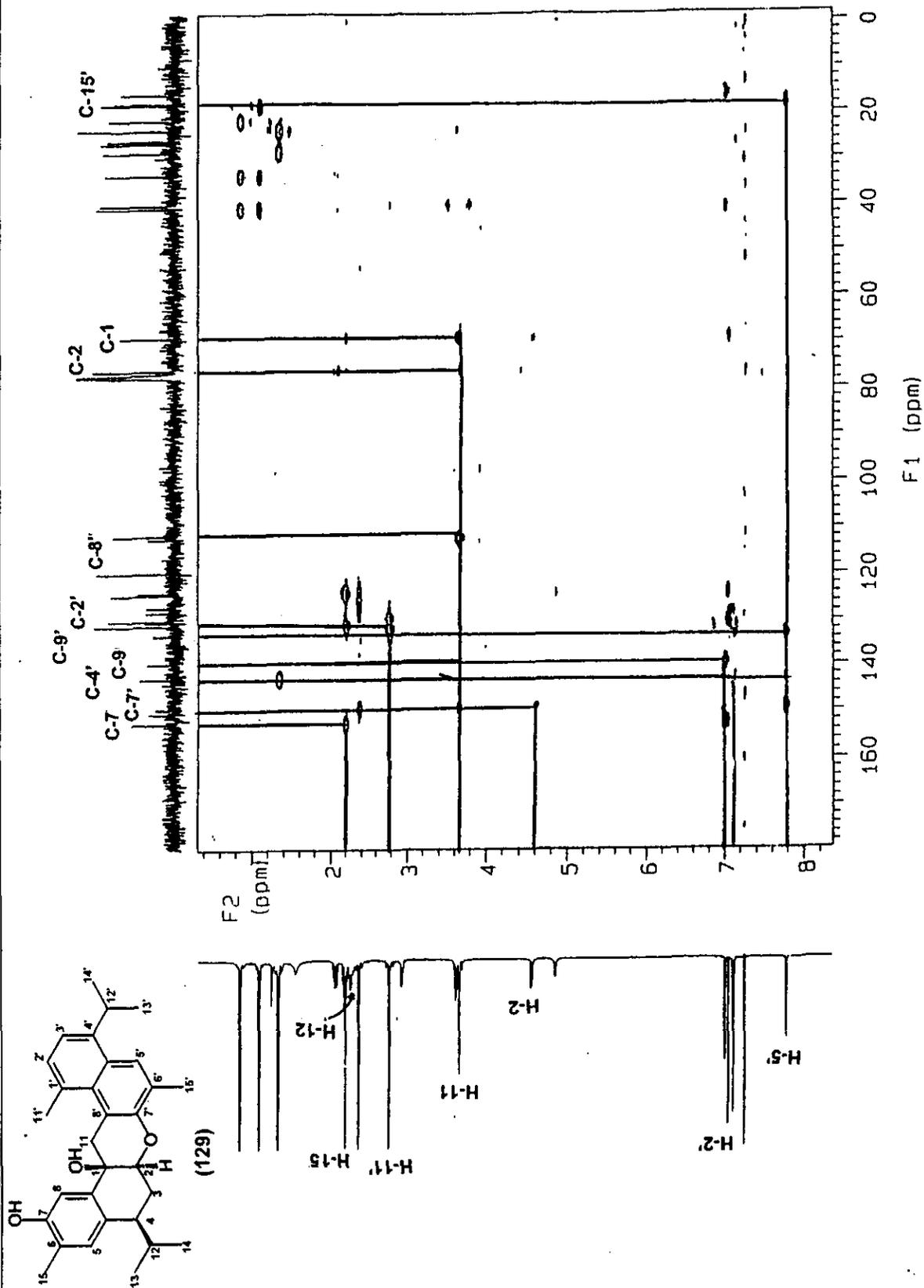
Espectro 34. RMN¹H (500 MHz, CDCl₃) Dicadalenol (129)



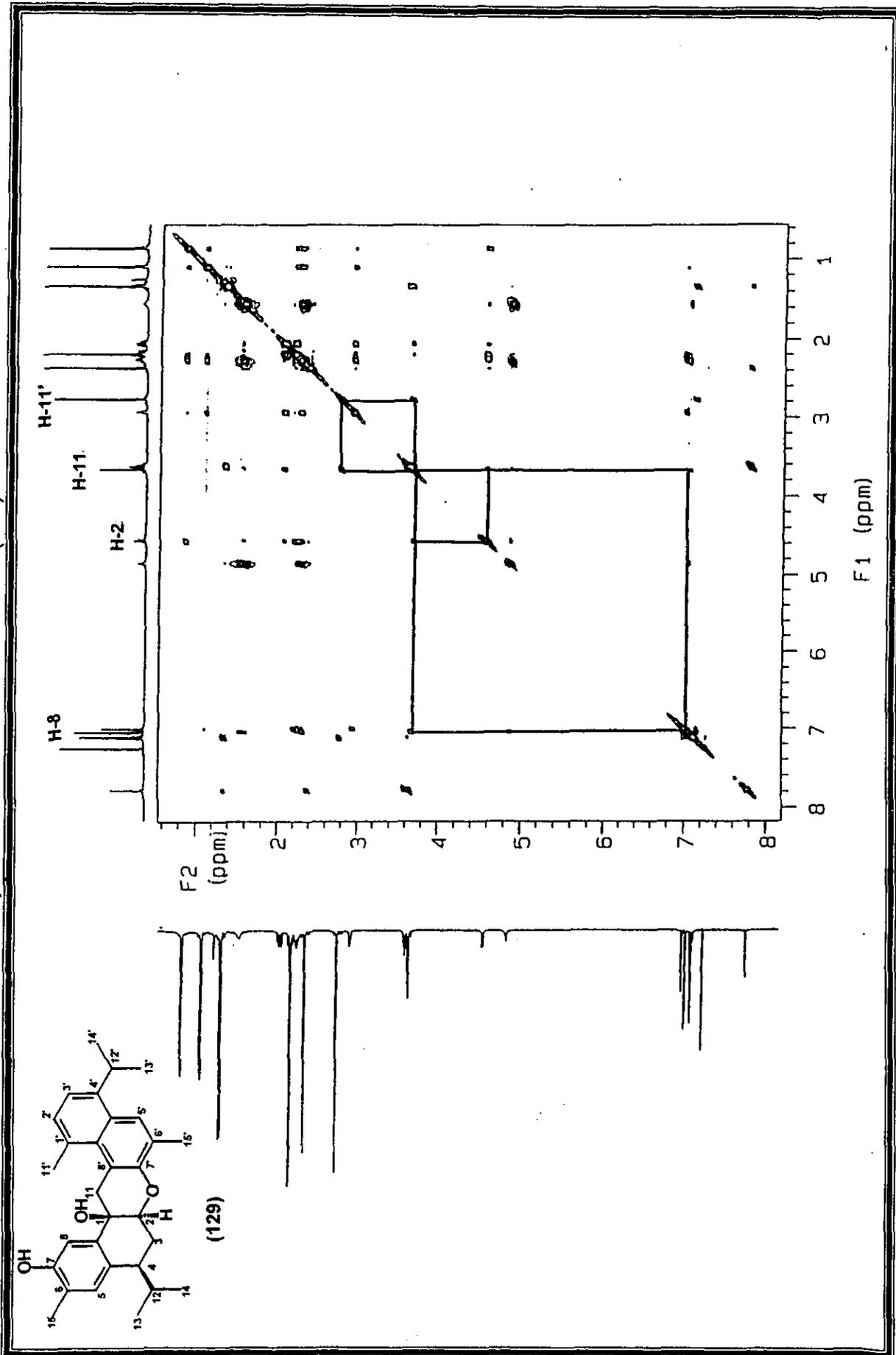
Espectro 35. HMQC Dicadalenol (129)



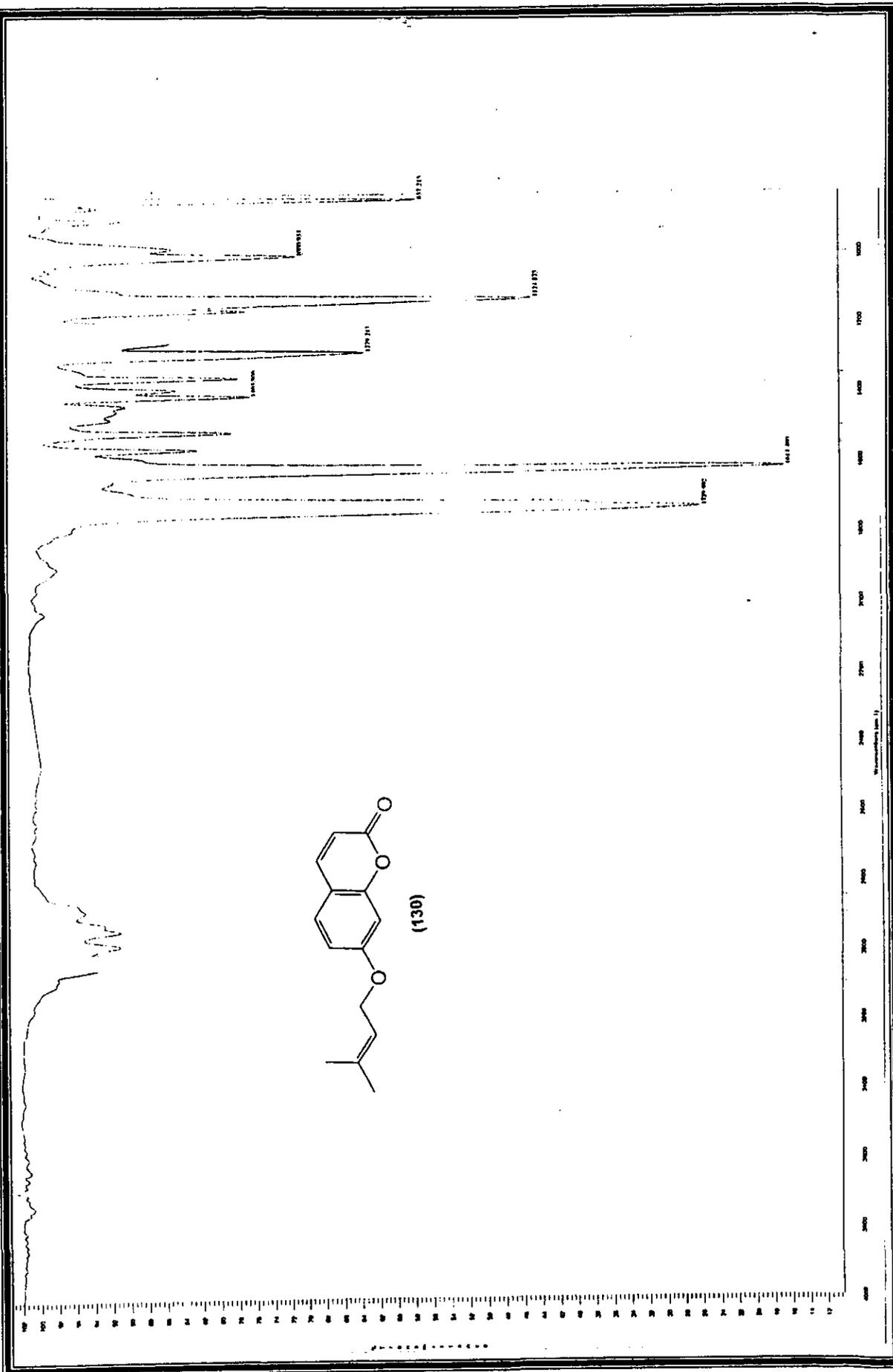
Espectro 36. HMBC Dicadalenol (129)



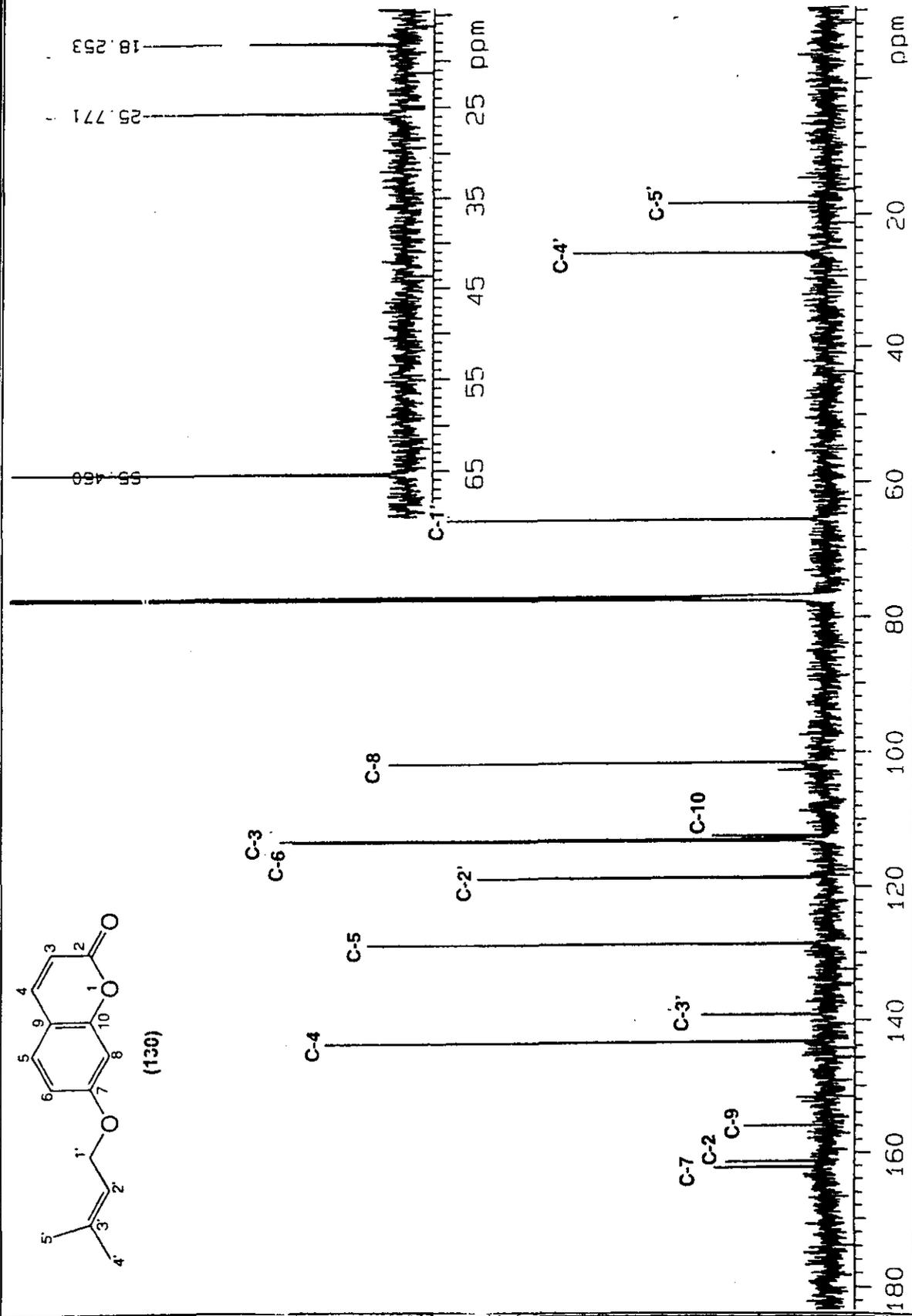
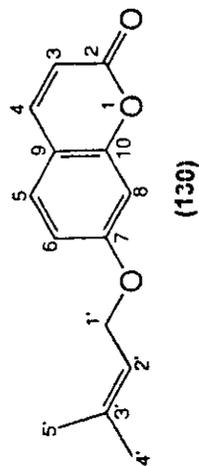
Espectro 37. NOESY Dicadalenol (129)



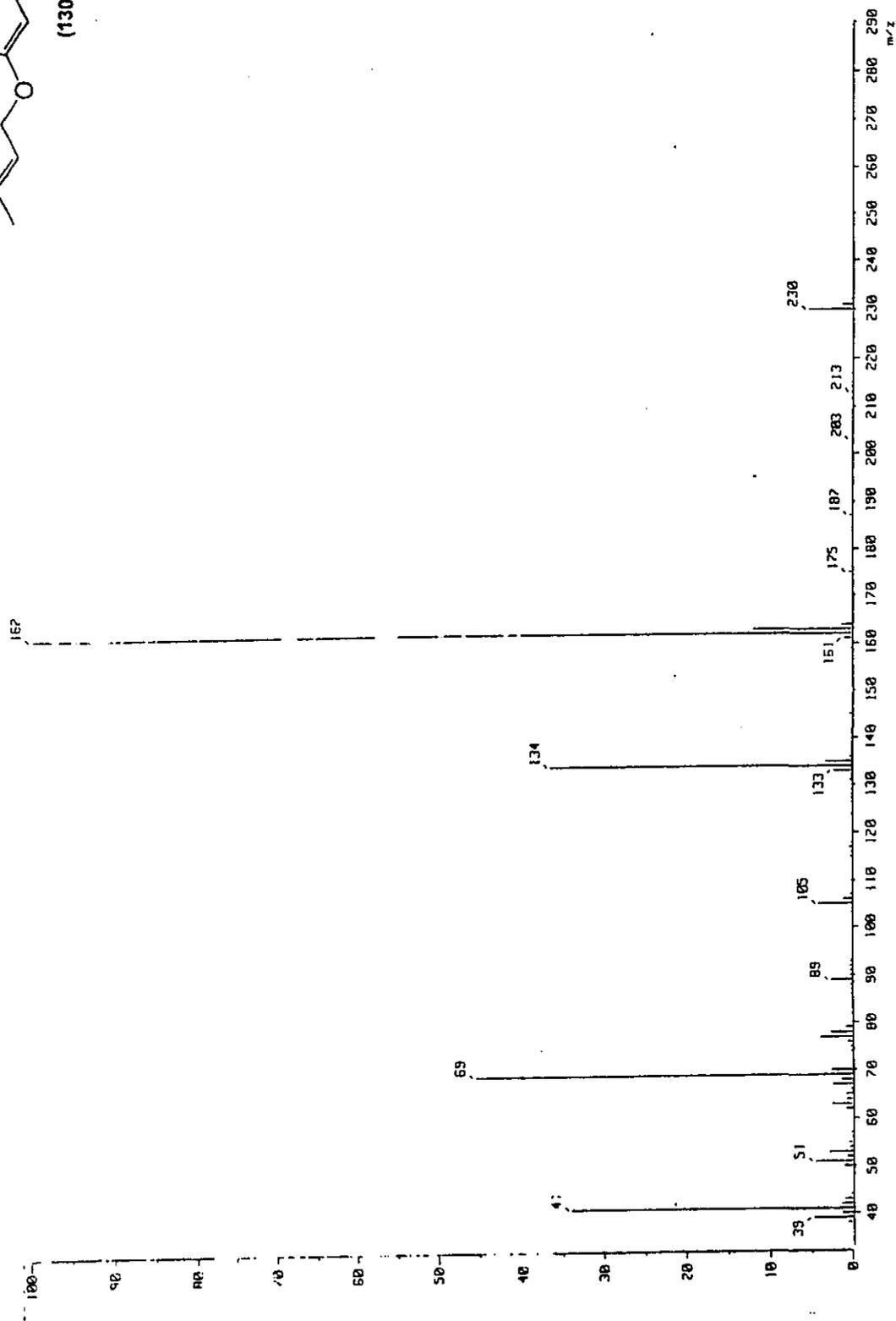
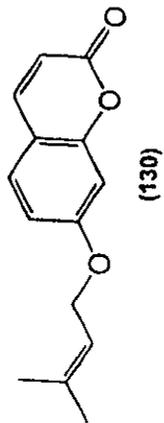
Espectro 38. IR (CHCl₃, cm⁻¹) 7-3',3'-dimetilaliloxi-cumarina (130)



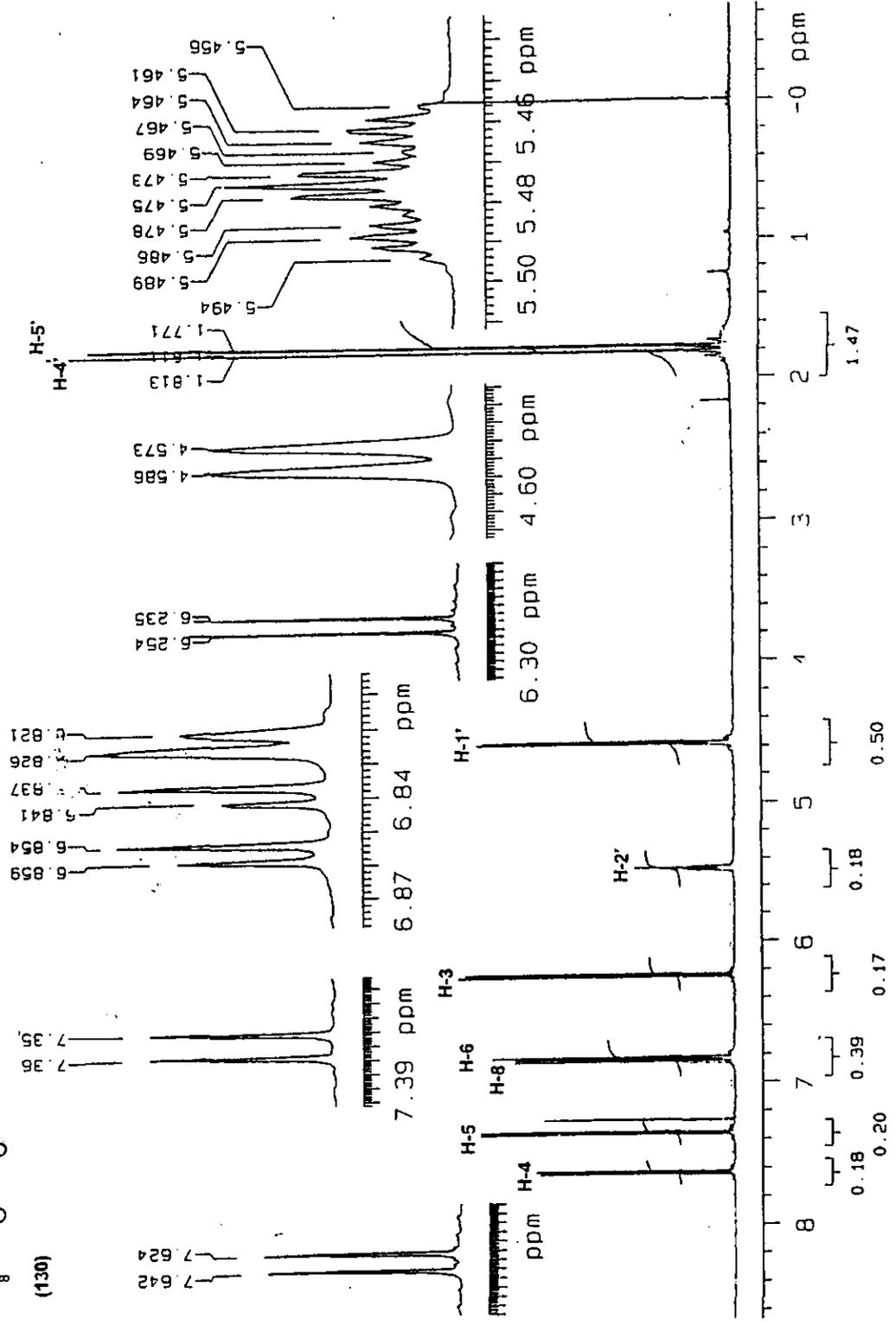
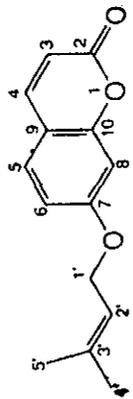
Espectro 39. RMN¹³C (500 MHz, CDCl₃) 7-3',3'-dimetilaliloxi-cumarina (130)



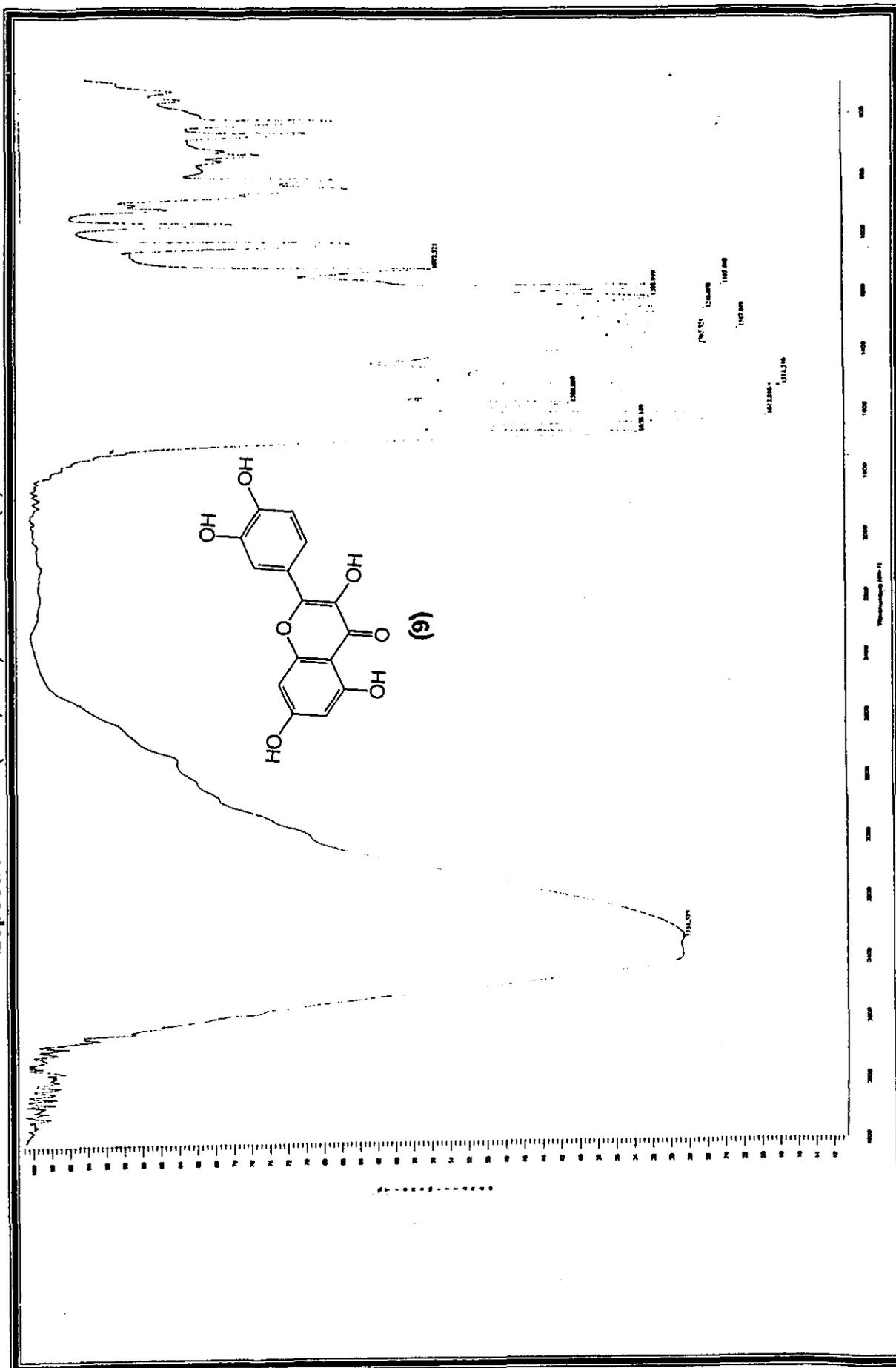
Espectro 40. EM (70 Ev) 7-3',3'-dimetilaliloxi-cumarina (130)



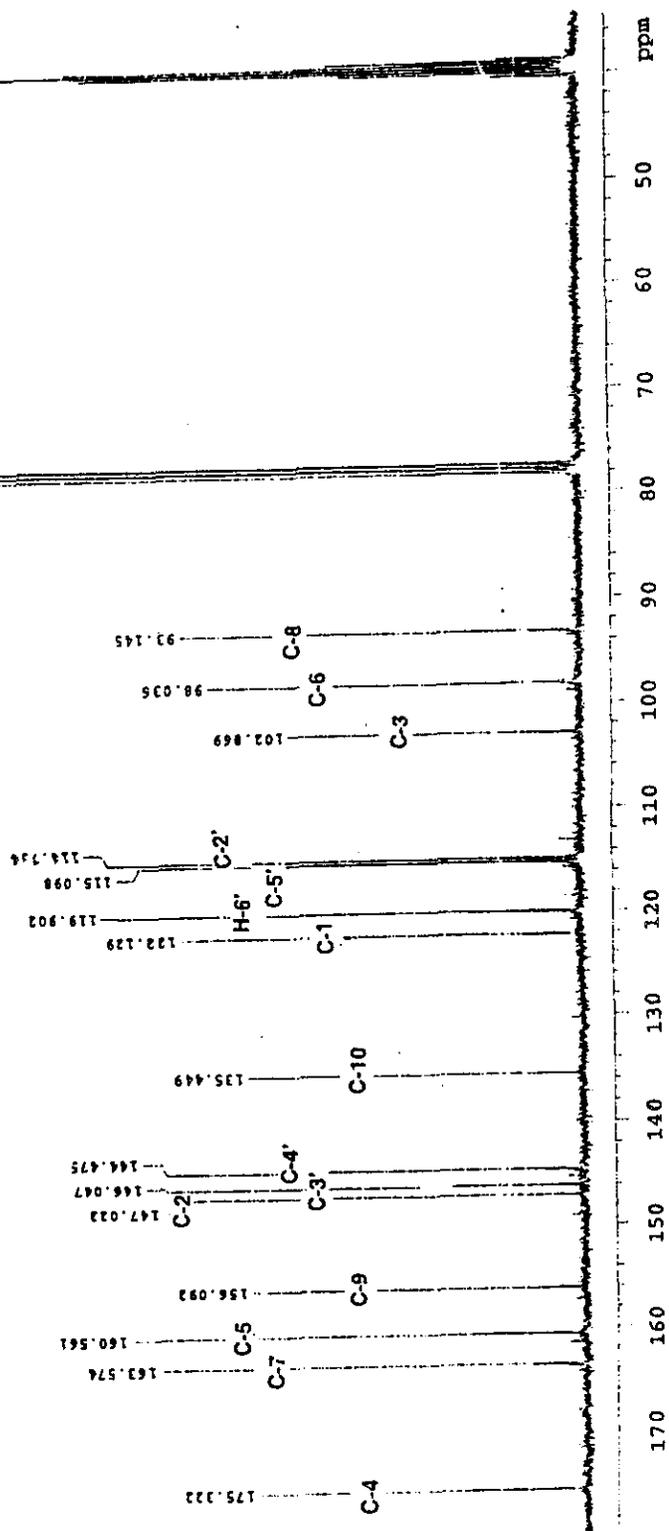
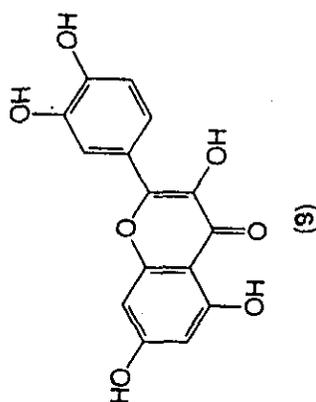
Espectro 41. RMN¹H (500 MHz, CDCl₃) 7-3',3'-dimetilaliloxi-cumarina (130)



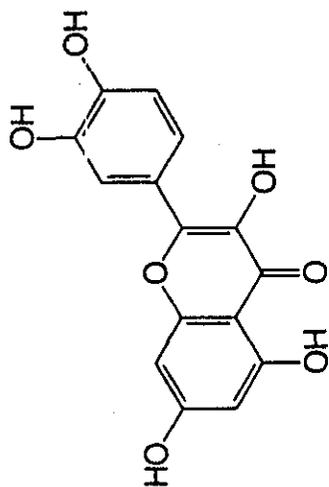
Espectro 42. IR (KBr, cm⁻¹) Quercetina (9)



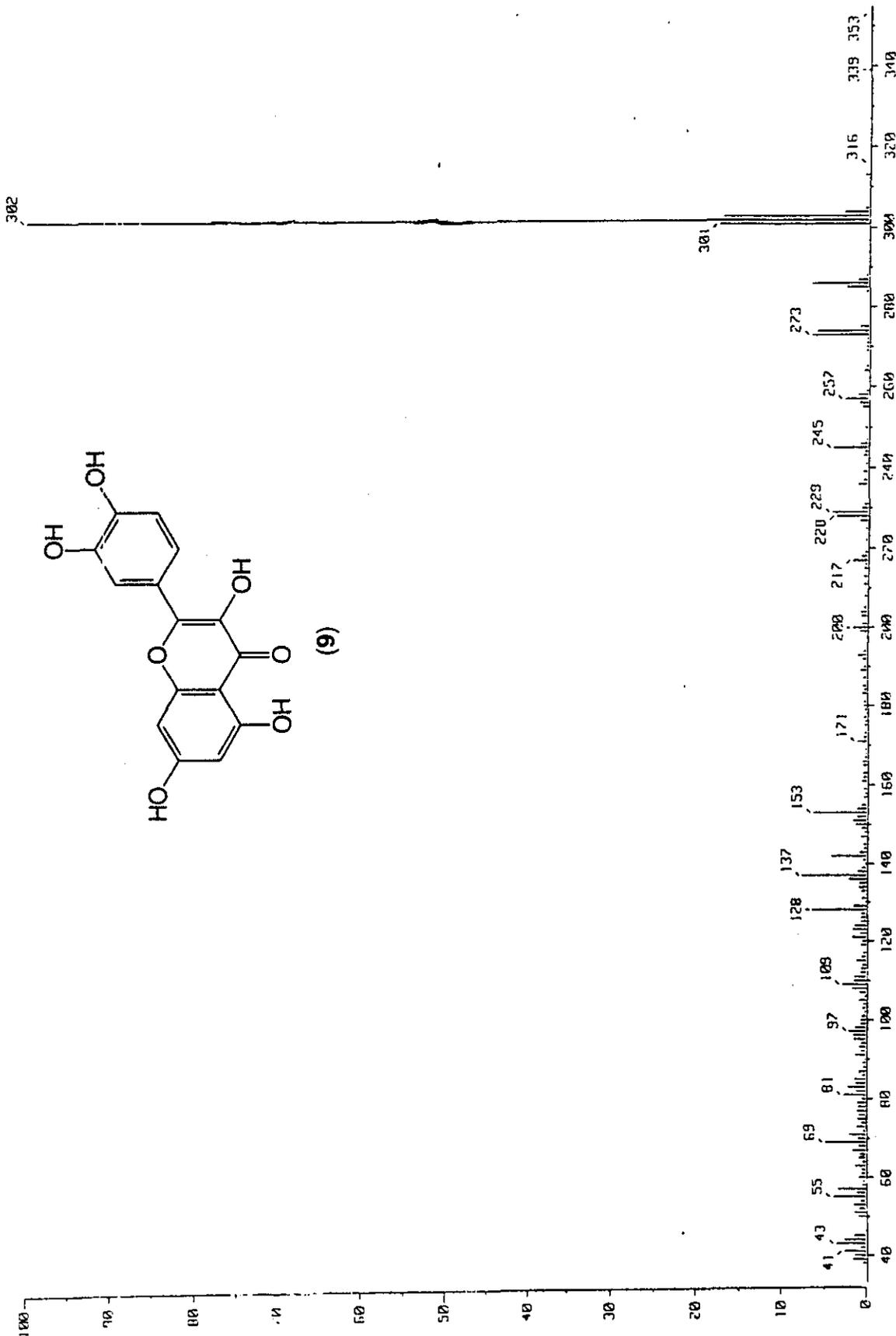
Espectro 43. RMN¹³C (500 MHz, CDCl₃) Quercetina (9)



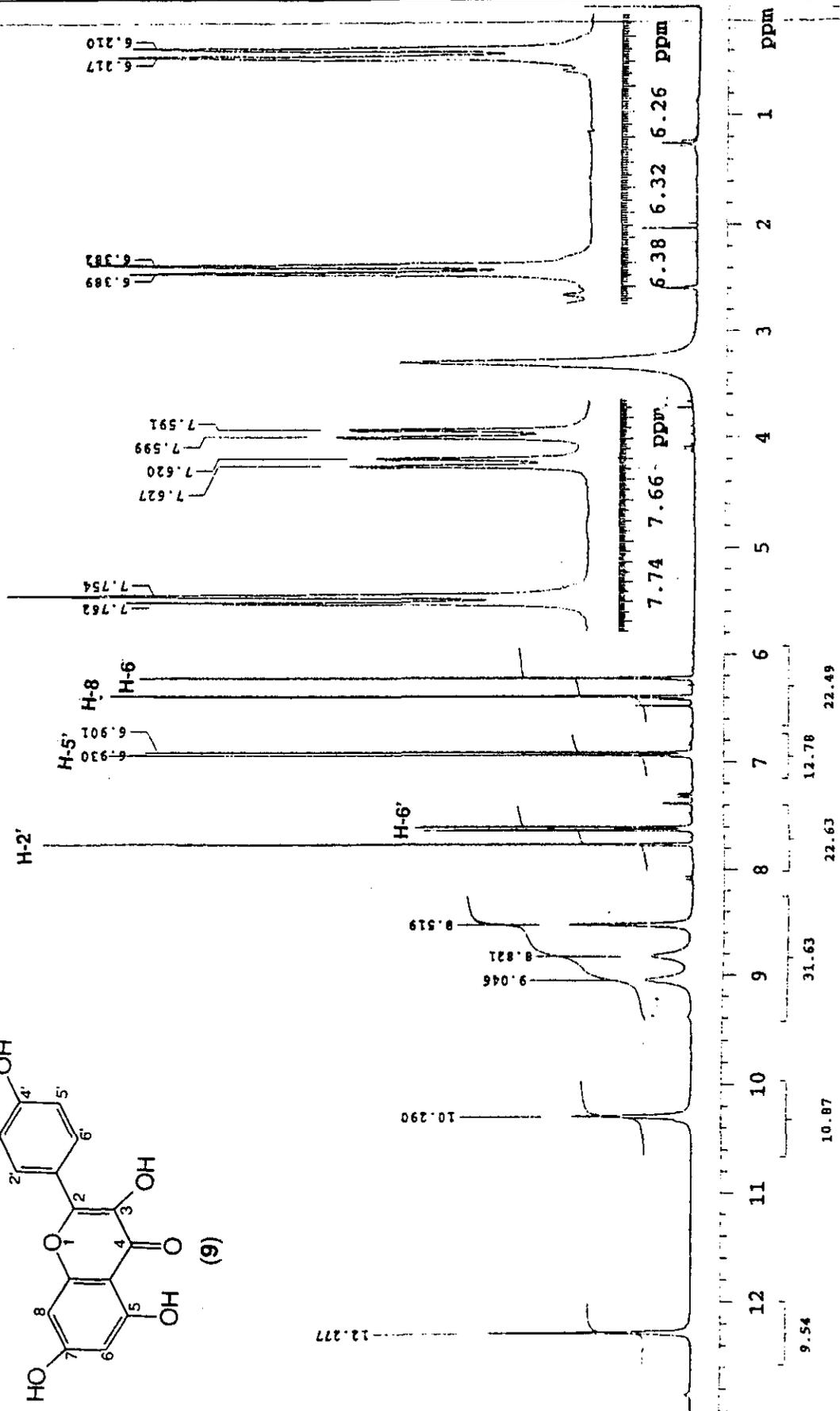
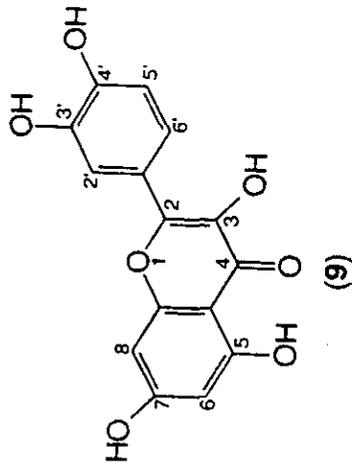
Espectro 44. EM (70 Ev) Quercetina (9)



(9)



Espectro 45. RMN¹H (500 MHz, CDCl₃) Quercetina (9)



8. BIBLIOGRAFÍA

1. Henkel, T.; Brunne, R.M.; Muller, H.; Reichel, F. Statical Investigation into the Structural Complementarity of Natural Products and Synthetic Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 643-647.
2. Malone, M. H. New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutic Activity (Wagner, H.; Wolff, P., Eds.) *Springer Verlag* **1977**.
3. Wall, M. E.; Wani, M. C. Taxol. From Discovery to Clinic. Economic and Medicinal Plant Research. Vol. 6. Wagner, H. and Farnsworth, N. F., Eds. *Academic Press* **1994**.
4. Trigg, P. I. Artemisinin as an Antimalarial Drug. Economic and Medicinal Plant Research. Vol. 3, Wagner, H. and Farnsworth, N. F., Eds. *Academic Press* **1991**.
5. Cordell, G. A.; Kinghorn, A. D.; Pezzuto, J. M. Separation, Structure Elucidation, and Biossay of Cytotoxic Natural Products. In: Bioactive Natural Products. Colegate, S. M.; Molyneux, R. J., Eds. *CRC Press* **1993**, 195.
6. (a) Appendino, G. Taxol (Paclitaxel). Historical and Ecological Aspects. *Fitoterapia* **1993**, *64*, 1-38
(b) Baloglu, E.; Kingston, D. G. I. The Taxane Diterpenoids. *J.Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1448-1472.
7. Espinosa-García, F.; Delgado, G. Relationship Between Ecology of Plant Defense and the Prospection of Secondary Metabolites with Potential Medicinal or Agricultural Application. *Rev. Latinoamer. Quím.* **1998**, *26*, 13-29.
8. Rzedowski, J. La Vegetación de México. *Limusa* **1980**.

9. Bye, R.; Linares, E.; Estrada, E. Biological Diversity of Medicinal Plants in Mexico. *Phytochemistry of Medicinal Plants* (Arnason, J. T., Mata, R., Romeo, J. T., Eds.) *Rec. Adv. Phytochem.* **1994**, *29*, 65-82.
10. Lozoya, X.; Aguilar, A.; Camacho, J. R. Encuesta sobre el Uso Actual de Plantas en la Medicina Tradicional Mexicana. *Rev. Med. IMSS* **1987**, *25*, 283-291.
11. Martínez, M. *Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas*. Fondo de Cultura Económica. México. **1979**.
12. Linares, E.; Flores, B.; Bye, R. *Selección de Plantas Medicinales de México*. Ed. Limusa. **1990**.
13. Domínguez, X. A. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Ed. Limusa, México **1973**.
14. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Instituto Nacional Indigenista.
15. Lara, F.; Márquez, C. *Plantas Medicinales de México*. Edición de la UNAM **1997**.
16. *Flora Medicinal Indígena de México*. Instituto Nacional Indigenista.
17. Kubo, I.; Muroi, H.; Kubo, A.; Chaudhuri, S.K.; Sánchez, Y.; Ogura, T. Antimicrobial Agents from *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica* **1994**, *60*, 218-221.

18. Kubo, I.; Chaudhuri, S.K.; Kubo, A.; Sánchez, Y.; Ogura, T., Saito, T.; Ishikawa, H.; Haraguchi, H. Cytotoxic and Antioxidative Sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica*. **1996**, *62*, 427-430.
19. Kubo, I.; Ishiguro, K.; Chaudhuri, S.K.; Kubo, A.; Sánchez, Y.; Ougura, T. A Plant Growth Inhibitory Sesquiterpenoid from *Heterotheca inuloides*. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 553-554.
20. Bohlmann, F.; Zdero, Ch. Über die Inhaltsstoffe von *Heterotheca inuloides* Cass. *Chem. Ber.* **1976**, *109*, 2021-2025.
21. Willuhn, G.; Schneider, R. Sesquiterpene, Triterpene und Sterine aus Blüten von *Heterotheca inuloides* ("Mexikanische Arnikabluten"). *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1987**, *320*, 393-396.
22. Jerga, Ch.; Merfort, I.; Willuhn, G. Flavonoidglyka aus den Blüten von *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica* **1990**, *56* 122.
23. Merfort, I.; Willuhn, G.; Jerga, Ch. Arnikabluten DAB 9- Reinheitsprüfung. *Deutsche Apotheker Zeitung* **1990**, *18*, 980-985 .
24. Jerga, Ch.; Merfort, I.; Willuhn, G. Flavonoidglykoside und Andere Hydrophile Inhaltsstoffe aus den Blüten von *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica*, **1990**, *56*, 413-414.
25. Bohlmann, F.; Rajindek, K.G.; King, R.M.; Robinson, H. New Cadinene Derivatives from *Heterotheca latifolia*. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 2982-2984.

26. Bohlmann, F.; Wolfrum, Ch.; Jakupovic, J.; King, R. M.; Robinson, H. Further Cadinene Derivatives from *Heterotheca latifolia*. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1101-1103.
27. El-Dahmy, S.; Sarg, T.; Farraga, N.M.; Ateya, A.M.; Jakupovic, J.; Bohlmann, F.; King, R.M. Further Cadinene Derivatives from *Heterotheca grandiflora*. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1474-1475.
28. Jakupovic, J.; Boeker, F.; Bohlmann, F.; King, R.M.; Robinson, H. Humulene Derivatives from *Heterotheca villosa*. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 445-448.
29. Bohlmann, F.; Zdero, Ch. Neue Cadinan Derivate aus *Heterotheca subaxillaris*. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 1185-1187.
30. Merfort, I.; Wendisch, D. Flavonolglucuronide aus den Blüten von *Arnica montana*. *Planta medica*, **1988**, 247-250.
31. Poplawski, J.; Holub, M.; Samek, S.; Herout, V. Arnicolides - Sesquiterpenic Lactones from the leaves of *Arnica montana*. *Chem. Commun.* **1971**, *36*, 2189-2199.
32. Willuhn, G.; Leven, W. Zur Qualitativen und Quantitativen Analyse der Sesquiterpen Lactone von Arnikablüten DAB9., *Pharm. Ztg. Wiss.* **1991**, 136-133.
33. Passreiter, C. M. Co-occurrence of 2-Pyrrolidineacetic Acid with the Pyrrolizidines Tussilaginic Acid and Isotussilaginic Acid and Their 1-Epipimers in *Arnica* Species and *Tussilago farfara*. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 4135-4137.

34. Merfort, I. Caffeoylquinin Acid from Flowers of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2111-2113.
35. Merfort, I.; Wendisch, D. Flavonoidglycoside aus *Arnica montana* und *Arnica chamissoni*. *Planta Medica*, **1987**, 434-437.
36. Trowbridge, H.O.; Emling, R. C. Inflammation. A Review of the Process. Ed. Quintessence Books. **1989**. London.
37. Zanin, M. T.; Ferreira, S. H. Relationship Between Edema and Plasm Exudation in Rat Paw Carragenin Inflammation. *Agents Actions*, **1978**, *8*, 606-609.
38. Tubaro, A.; Dri, P.; Delbello, G.; Zilli, C.; Della, L. R. The Croton Oil Ear Test Revisited. *Agents Actions*. 1985, *17*, 347-349.
39. Otterness, I. G.; Wiseman, E.H.; Gans, D.J. A Comparison of the Carrageenan Edema Test and Ultraviolet Light- Induced Erythema Test as Predictors of the Clinical Dose in Rheumatoid Arthritis. *Agents Actions* **1979**, *9*, 177-183.
40. Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica . 9ª. Mc. Graw- Hill. Interamericana, **1996**, 643-652.
41. Della, L. A.; Tubaro, A.; Dri, P.; Negro, P.D. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1986**, *213*, 481.
42. Merlos, M.; Gómez, L. A.; Vericat, M. L.; García-Rafanel J.; Form, J. *Br. J. Pharmacol.* **1991**, *104*, 990-994.
43. Pathak, D.; Pathak, K.; Singla, A. K. Flavonoids as Medicinal Agents. Recent

Advances Fitoterapia **1991**, *12*, 371-389.

44. Hegmann, H.; Tezuka, Y.; Kikuri, T.; Supriyatna, S. Constituents of *Sindora sumatrana* Miq, I, Isolation and NMR spectral Analysis of Sesquiterpens from the Dried Pods. *Chem Pharm. Bull*, **1994**, *42*, 138
45. Chiang, M. T.; Bittner, M.; Silva, M.; Mondaca, A.; Zemelman, R.; Sammes, P. G. A Prenylated Coumarin with Antimicrobial Activity from *Haplopappus multifolius*. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 2753.
46. Lassak, E. V.; Southwel, I. A. The Coumarins from the Resin of *Euodia vitiflora*. *Aust. J. Chem.* **1972**, *125*, 2491-2496.
47. Arrieta, A. Estudio Fitoquímico Biodirigido de *Senna* sp. Tesis de Maestría, UNAM.