



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE TALLO DE
PITTOCAULON VELATUM

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

KARINA GONZÁLEZ FLORES



MÉXICO, D.F.

2010



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: M en C Rosa Luz Cornejo Rojas.

VOCAL: M en C. Ana Adela Sánchez Mendoza

SECRETARIO: M en C. Amira Arciniegas Arciniegas

1er. SUPLENTE: M en C. Silvia Citlali Gama González

2° SUPLENTE: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México,
Departamento de Productos Naturales, Laboratorio 2-7.

Asesor del tema

Amira Arciniegas Arciniegas

Sustentante

Karina González Flores



Pittocaulon velatum





AGRADECIMIENTOS

Al Sistema Nacional de Investigadores por el apoyo económico otorgado por el nombramiento como ayudante de investigador nivel III.



Agradecimientos

A la **Facultad de química** y a la **Universidad** por la formación profesional que me brindó.

Al Dr. **Alfonso Romo de Vivar** y a mi tutora la M. en C. **Amira Arciniegas** por el tiempo, apoyo, dedicación, esfuerzo y paciencia que siempre mostraron durante la realización de mi trabajo de culminación de estudios profesionales.

A las maestras **Rosa Luz Cornejo Rojas** y **Ana Adela Sánchez Mendoza** por el tiempo invertido en la revisión y corrección de este trabajo.

A las maestras **Ana Lidia** y **Emma** por su apoyo y consejos profesionales y al maestro y amigo **Elihu**, por sus valiosos consejos tanto profesionales como de vida que siempre me dio.

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



Dedicatorias

A mis **padres** a quienes respeto y admiro, por el cariño, la educación, por sus valiosos consejos, la comprensión la confianza y el apoyo incondicional que siempre me han brindado, por darme todas las herramientas para alcanzar mis metas

A mis hermanos **Manuel** y **Daniel** por aguantarme en mis momentos de estrés y ayudarme en cuanto han podido y a **Santy** por las lecciones de superación que día a día me brinda.

A mis amigas de tantos años **Lucero** y **Ocelli** , por su amistad, su cariño, su apoyo, por confiar y creer en mi.

A mis amigos, **Cecy**, **Ivan**, **Adriana**, **Mitchel**, **Lalo** y **Xanat** que estuvieron conmigo desde el inicio de esta maravillosa etapa de mi vida, por haber compartido momentos de alegría, tristeza, felicidad, estrés, desvelos, sueños, por su apoyo y palabras de aliento en todo momento.

A **Richard**, **Bety**, **Fany**, **Norma**, **Ime**, **Sam**, e **Itzia** por ser parte importante en mi vida, y participes de mis noches de desvelo, ratos de triunfo y días de chacoteo, por estar siempre que los he necesitado y por todos los momentos maravillosos que hemos vivido juntos.



CONTENIDO

	Páginas
Abreviaturas	VII
Lista de figuras	IX
Lista de tablas.	IX
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ANTECEDENTES.	
2.1 Taxonomía del género <i>Pittocaulon</i> .	3
2.2 Descripción y distribución del género <i>Pittocaulon</i> .	4
2.3 Química del Género.	5
2.3.1 Alcaloides pirrolizidínicos.	5
2.3.2 Eremofilanos.	6
2.3.3 Flavonoides.	8
2.4. Metabolitos aislados de <i>P. preacox</i> .	11
2.5. Metabolitos aislados de <i>P. Bombycophole</i> .	13
2.6. Alcaloides pirrolizidínicos aislados de <i>P. filare</i> , <i>P. hintonii</i> y <i>P. velatum</i> .	14
2.7. Técnicas espectroscópicas	15
3. PLANTEAMIENTOS DEL PROBLEMA.	17
4. HIPÓTESIS.	18



5. OBJETIVOS GENERALES.	18
6. OBJETIVOS PARTICULARES.	18
7. PARTE EXPERIMENTAL.	19
7.1 Equipo utilizado.	19
7.2 Análisis cromatográfico.	20
7.3 Material vegetal.	20
7.4 Preparación del extracto.	20
7.5 Fraccionamiento y purificación.	21
7.6 Metodología de las pruebas anti-inflamatorias.	28
8. RESULTADOS.	29
8.1 Metabolitos aislados.	29
8.2 Pruebas anti-inflamatorias.	30
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	31
10. CONCLUSIONES.	43
11. BIBLIOGRAFÍA.	44
12. ANEXOS	48



ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
Ang	Angeloil
Aps	Alcaloides pirrolizidínicos
c	Señal cuádruple
c	Concentración
CCD	Cromatografía de Capa Delgada
CCF	Cromatografía en Columna Flash
CCV	Cromatografía en Columna al Vacío
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy
d	Señal doble
da	Señal doble ancha
dd	Señal doble de doble
dc	Señal doble de cuartetos
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dddd	Señal doble de doble de doble de doble
ddd	Señal doble de doble de doble
EMAR (FAB)	Espectrometría de Masas de Alta Resolución (Bombardeo con Átomos Rápidos)
EMIE	Espectrometría de Masas de Impacto Electrónico
Hz	Hertz
HMBC	Heteronuclear Múltiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy
IR	Infrarrojo
iBu	Isobutiril
iVal	Isovaleril



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



Lista de figuras.

	Páginas
Figura 1. Metabolitos aislados de <i>Pittocaulon velatum</i> y sus rendimientos.	29
Figura 2. Principales interacciones HMBC de velatumólida.	34
Figura 3. Principales interacciones NOESY de velatumólida.	35
Figura 4. Estructura de velatumólida obtenida por rayos X.	35
Figura 5. Principales interacciones HMBC de <i>epi</i> -velatumólida.	38
Figura 6. Principales interacciones NOESY de <i>epi</i> -velatumólida.	38
Figura 7. Principales interacciones HMBC de velatumina.	41
Figura 8. Principales interacciones NOESY de velatumina.	41

Lista de tablas.

Tabla 1. Fracciones obtenidas de la columna 1, la polaridad en la que se obtuvieron y número de columna en que se purificaron.	21
Tabla 2. Resultados de las pruebas anti-inflamatorias.	30
Tabla 3. Datos de RMN ^1H , ^{13}C y DEPT de velatumólida.	33
Tabla 4. Datos de RMN ^1H , ^{13}C y DEPT de <i>epi</i> -velatumólida.	37
Tabla 5. Datos de RMN ^1H , ^{13}C y DEPT de velatumina.	40



1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido utilizadas por el hombre desde los tiempos mas antiguos con diferentes fines, entre ellos, como recurso terapéutico. Hace 3000 años a. C. se escribió el libro mas antiguo de plantas medicinales en China.¹

En México el registro escrito mas antiguo sobre plantas medicinales, mal llamado “Códice badiano”, es el “Libellus” que fue escrito en náhuatl en 1552 por el médico indio mexicano Martín de la Cruz, en el colegio Santa Cruz de Tlatelolco, y traducido al latín por otro indígena Xochimilca, Juan Badiano. En el siglo XVI, Fray Bernardino de Sahagún, escribió su obra “Historia General de las cosas de la Nueva España” considerado como la fuente de información más fidedigna sobre la herbolaria medicinal indígena del siglo XVI.²

En el siglo XX, quizá la obra mas importante sobre plantas medicinales mexicanas es la del maestro Maximino Martínez, “Las Plantas Medicinales de México”, publicada en 1934, catálogo con la clasificación botánica, descripción, localización y usos comunes de 300 plantas medicinales.³

En los últimos años se han publicado numerosos trabajos sobre plantas medicinales de México en revistas nacionales e internacionales, sin embargo aún quedan sin estudiar numerosas especies de plantas que se utilizan en medicina popular con el objetivo de identificar sus metabolitos secundarios, moléculas que pueden ser los principios activos responsables de sus efectos curativos.

Actualmente, se ha descubierto un alto porcentaje de fármacos de origen vegetal, como resultado del estudio científico de plantas conocidas por su uso en la medicina popular. De ello puede inferirse que dichos estudios son un método apropiado para el descubrimiento de fármacos y que existe una gran probabilidad de que dichas plantas contengan compuestos biologicamente activos.



El género *Pittocaulum*, conocido como palo loco, se utiliza en medicina popular contra el reumatismo y para curar heridas,³ además se ha reportado la actividad antifúngica y antibacteriana de extractos de *P. praecox*, *P. bombycophole*, *P. hintonii* y *P. velatum*.⁴

Dado que de *Pittocaulon velatum* solamente se encuentra descrito en la literatura su contenido alcaloideo resulta interesante el estudio de sus metabolitos no alcaloideos como posible fuente de sustancias anti-inflamatorias, ya que esta planta es utilizada contra el reumatismo.

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



2. ANTECEDENTES

2.1 Taxonomía del género *Pittocaulon*.

La familia Asteraceae es una de las familias de angiospermas (plantas con flores) mas ampliamente distribuida, esta diversidad puede atribuirse a diversos factores tales como su plasticidad genética (le permite adaptarse a diversas condiciones ecológicas), su plasticidad química (le ayuda a protegerse contra depredadores) y sus eficientes mecanismos de dispersión.

Actualmente se estima que esta familia está compuesta por mas de 1100 géneros y unas 20000 especies. En la flora de nuestro país, ésta familia ocupa un lugar preponderante teniendo 387 géneros y 3202 especies.

La familia Asteraceae, cuyas especies están presentes en la mayoría de los estados de la república mexicana, encuentra tanto en las zonas montañosas como en las áridas y semiáridas importantes áreas de diversificación. Se destacan los estados de Chiapas, Jalisco, México, Michoacán y Oaxaca, con una riqueza excepcional constituida por mas de 500 especies.⁵

La tribu Senecioneae, dividida en las subtribus Senecionineae, Tussilaginineae y Blenospermatineae, es la mas grande de las 13 tribus pertenecientes a la familia Asteraceae pues contiene aproximadamente 3000 especies agrupadas en 120 géneros. En México y Centroamérica esta tribu está representada por 165 especies pertenecientes a 19 géneros incluyendo al gran género *Senecio*.

El género *Senecio sensu lato* llegó a representar un problema taxonómico, pues incluía cerca de 1500 especies con un amplio espectro de formas de vida. Teniendo en cuenta estudios genéticos y taxonómicos fue reorganizado y muchas de sus especies fueron segregadas en diferentes géneros pertenecientes a las



subtribus Senecioninae y Tussilagininae.⁶ Uno de estos es el género *Pittocaulon* (Asteraceae, Senecioneae, Tussilagininae) que está formado por 5 especies: *P. praecox*, *P. filare*, *P. bombycophole*, *P. velatum* y *P. hintonii*.⁷

2.2 Descripción y distribución del género *Pittocaulon*

Las especies del género *Pittocaulon*, tienen gran capacidad de almacenar agua en su corteza y médula en delgados xilemas cilíndricos lo que les permite amortiguar el daño ocasionado por las condiciones climáticas y florecer en épocas de sequía. Por esta razón son conocidas como palo loco. Son arbustos o árboles pequeños resinosos, de tallo grueso, hojas caducas e inflorescencias terminales corimbosas sostenidas por tallos cortos.^{7,8}

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

P. velatum es un arbusto de hasta 5 metros de alto con tallos de hasta 9 cm de diámetro, los cuales presentan en la parte alta pubescencias café cortas y densas e inflorescencias en el tallo central prominente que contiene de 6 a 7 flores de disco. Esta especie que comprende también la variedad de *P. velatum ssp y tzinolensis* se encuentra sobre rocas y desfiladeros de los cañones en habitats estacionalmente húmedos en los estados de Jalisco, Guerrero, México, Michoacán, Puebla, Zacatecas y en un limitado número de localidades en Guatemala, siendo así la especie más distribuida después de *P. praecox*.⁸

2.3 Química del Género

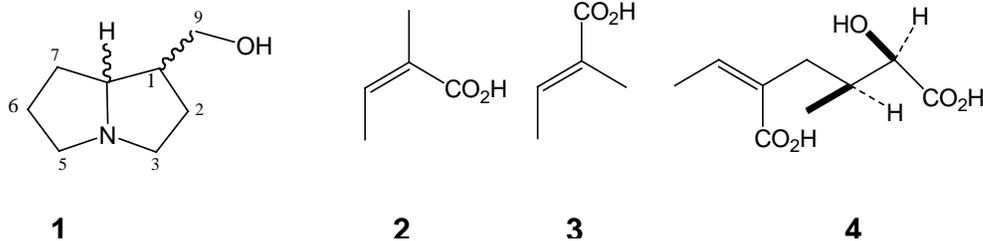
La química del género *Pittocaulon* es muy similar a la del género *Senecio* del cual fue segregado. En las 5 especies del género se ha descrito la presencia de



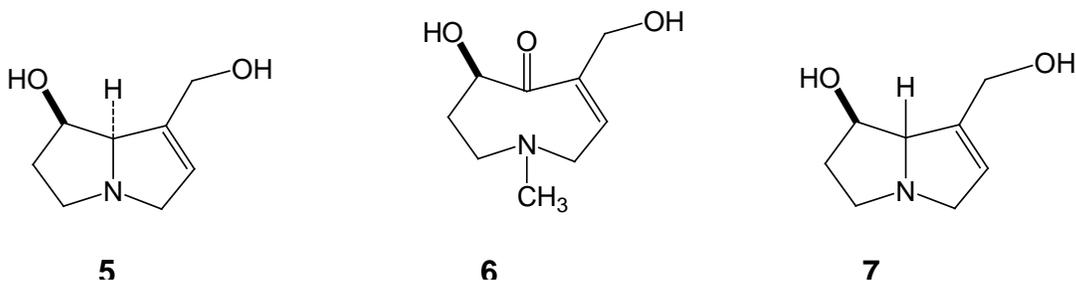
alcaloides pirrolizidínicos (Aps).⁹ De *P. praecox*^{10,11} y *P. bombycophole*¹² se han aislado sesquiterpenos principalmente de tipo eremofilano y en *P. praecox* se ha reportado la presencia de flavonoides.

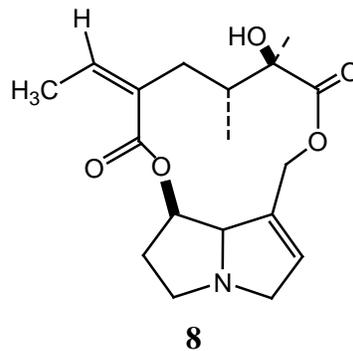
2.3.1 Alcaloides pirrolizidínicos

Los alcaloides pirrolizidínicos (Aps) contienen en su molécula, uno de los cuatro isómeros del 1-hidroximetilpirrolizidina (**1**), los cuales son llamados necinas. Ellos pueden tener un doble enlace en el C-1, un grupo OH en C-7, y estar oxidados en las posiciones 2 y 6. Los grupos hidroxilos pueden ser esterificados por ácidos monocarboxílicos tales como el ácido angélico (**2**) o el tíglico (**3**), o por ácidos dicarboxílicos como el ácido seneciónico (**4**).



Los alcaloides pirrolizínicos que contienen en su esqueleto la base retronecina (**5**), otonecina (**6**) o heliotridina (**7**), son altamente tóxicos. La toxicidad se incrementa con la presencia de un éster cíclico como en la senecionina (**8**), lo cual es común en los alcaloides pirrolizidínicos de la tribu Senecioneae.¹³





Los Aps pueden tener efectos hepatotóxicos, mutagénicos, causar hepatomegalia y desórdenes venooclusivos y se han reportado muertes humanas y de ganado a causa de la ingesta de plantas que contienen este tipo de sustancias, sin embargo, si bien son muy tóxicos para los humanos, para algunos animales es una gran ventaja, ya que los utilizan como protección contra depredadores.¹⁴

Los alcaloides pirrolizidínicos poli-hidroxisaturados mimetizan la estructura de monosacáridos teniendo así un efecto potencial en algunas enfermedades tales como infecciones virales, cáncer y diabetes.¹⁵

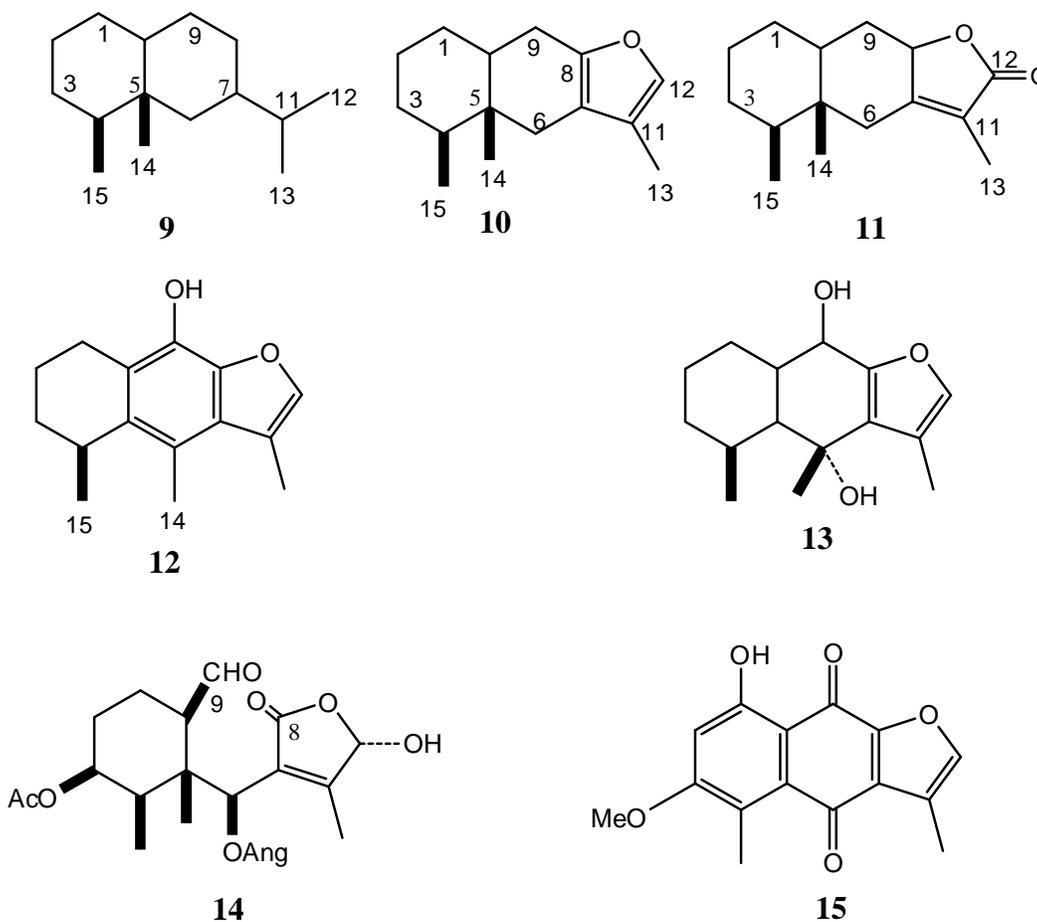
2.3.2 Eremofilanos

Los eremofilanos son sesquiterpenos, moléculas de quince átomos de carbono formadas por tres unidades de isopreno, cuyo esqueleto base (**9**) contiene un sistema de decalina.

En diversos géneros de la tribu Senecioneae tales como *Senecio*, *Roldana*, *Packera* o *Pittocaulon*, es común encontrarlos oxidados formando furanoeremofilanos (**10**) o eremofilanólidas (**11**). También se pueden encontrar compuestos en los que las estructuras base **9-11** han sido modificadas. Géneros como *Psacalium* y *Roldana* son ricos en furanoeremofilanos de tipo *abeo* (migración de un enlace con respecto al esqueleto base) conocidos como derivados del cacalol¹⁶ (**12**) en los que el metilo 14 migra al carbono 6, por ejemplo



la cacalona¹⁷ (**13**). De manera menos frecuente se pueden encontrar en forma de seco (rompimiento de un enlace en el esqueleto base) como el compuesto **14**, aislado del género *Roldana*,¹⁸ el cual presenta ruptura de enlace 8-9; o en forma de *nor* (pérdida de átomos de esqueleto base) como el compuesto **15**, que tiene 14 átomos de carbono, obtenido de especies de *Senecio*.¹⁹

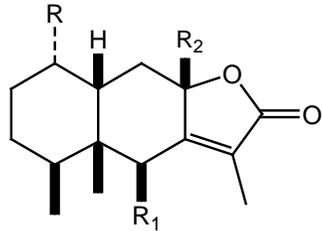


Las estructuras **9-15** pueden estar sustituidas con grupos hidroxilos principalmente en las posiciones 1, 3, 6, y 9. La presencia de cetonas y epóxidos es también frecuente.

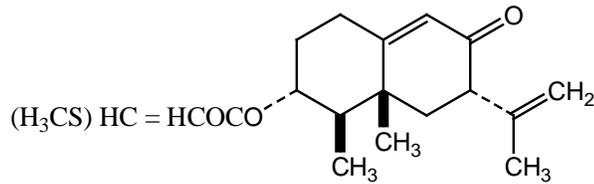
En la literatura se encuentran descritos diversos eremofilanos con actividad biológica, se ha descrito actividad anti-alimentaria de las eremofilanólidas **16-17**,^{20,21} los efectos espasmolíticos del tracto gastrointestinal del eremofilano s-



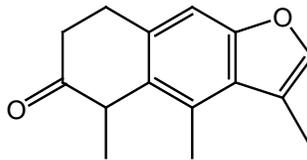
petasin (**18**),²² las actividades fungicida y antimicrobiana del cacalol^{23,24} (**12**) y las actividades anti-hiperglucémica y anti-inflamatoria²⁵ de **19**, entre otras.



16 R= OAc R₁ = H R₂ = OMe
17 R= OAng R₁ = OH R₂ = OMe



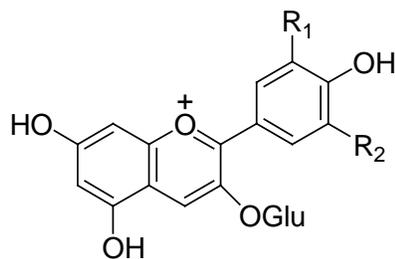
18



19

2.3.3 Flavonoides

Los flavonoides son un gran grupo de polifenoles presentes en los productos naturales, estos proveen el color a las plantas, por ejemplo, las antocianinas (**20**) que proporcionan el color a las flores, frutas y hojas que van desde el rojo al azul.²⁶



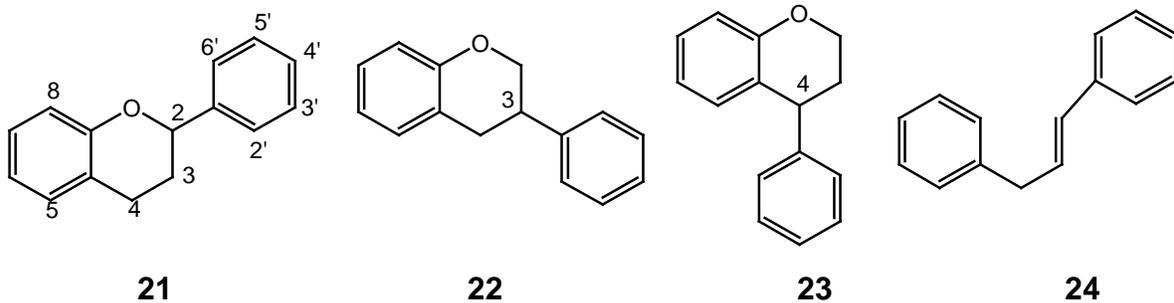
20

Cianidina	R ₁ = OH	R ₂ = H
Peonidina	R ₁ = OCH ₃	R ₂ = H
Delfinidina	R ₁ = OH	R ₂ = OH
Petunidina	R ₁ = OCH ₃	R ₂ = OH
Malvidina	R ₁ = OCH ₃	R ₂ = OCH ₃

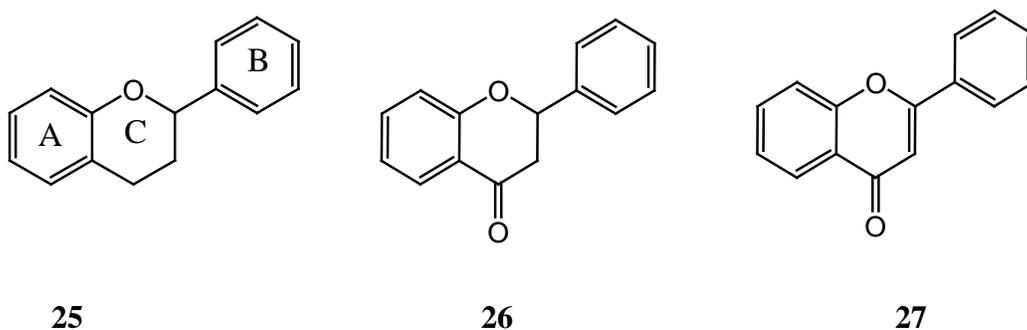


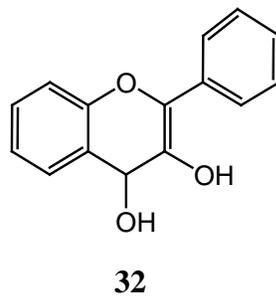
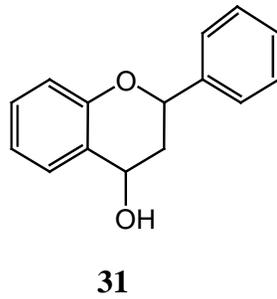
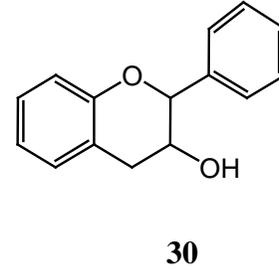
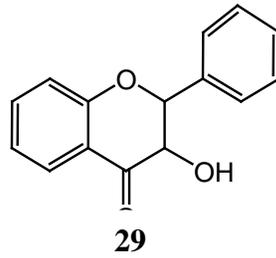
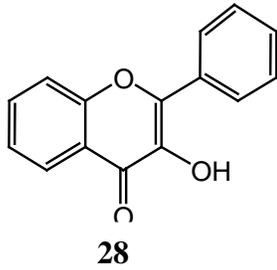
La estructura química de esta clase de compuestos está basada en un esqueleto de $C_6-C_3-C_6$, difieren en la insaturación del anillo C, en la colocación del anillo aromático B en el C-2 o en el C-3 y en los patrones de hidroxilación. La multiplicidad de modificaciones posibles es tan grande que en el último siglo se han reportado mas de 6000 compuestos diferentes.

Para su estudio, este grupo de compuestos se ha dividido en tres clases: los flavonoides (2-fenilbenzopiranos) **21**, los isoflavonoides (3-benzopiranos) **22** y los neoflavonoides (4 benzopiranos) **23**, todos tienen como precursor común la chalcona (**24**) además de que están biogénicamente y estructuralmente relacionados.



Los flavonoides, 2-fenilbenzopiranos, se agrupan según su grado de oxidación en el anillo C como: flavano (**25**), flavanona (**26**), flavona (**27**), flavonol (**28**), dihidroflavanol (**29**), flavan-3-ol (**30**), flavan-4-ol (**31**), flavan-3,4-diol (**32**).



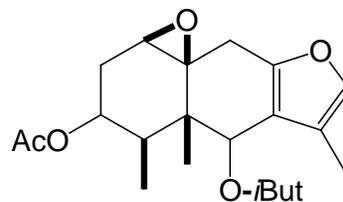


Los flavonoides tienen amplias propiedades biológicas, se reportan como antimicrobianos, antifúngicos, anti-alimentarios (en altas concentraciones ayudan a que la planta no sea comida por insectos), insecticidas y con actividad anti-inflamatorias y hepatoprotectoras.

En las plantas, los flavonoides, juegan un papel importante en el crecimiento, proveen protección de los rayos UV, ayudan a la reproducción y están involucrados en la fijación del nitrógeno.²⁷

2.4 Metabolitos aislados de *Pittocaulon praecox*

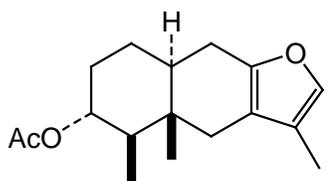
En 1974 se aisló de la raíz de *P. praecox* un sesquiterpeno identificado como Precoxilina A (**33**).¹⁰



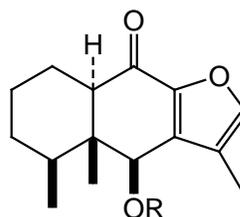
33



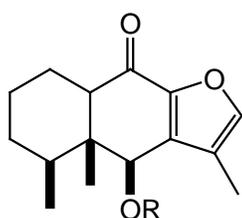
Posteriormente, en 1976, se aislaron un furanoeremofilano (**34**), y tres mezclas complejas de furanoeremofilanos (**35-38**, **39-41** y **42-47**).²⁹



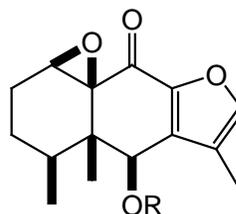
34



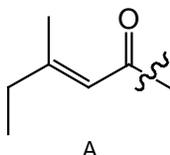
35 R = Val
36 R = A
37 R = B
38 R = Sen



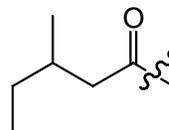
39 R = Val
40 R = A
41 R = B



42 R = Val
43 R = iBut
44 R = Ang
45 R = Met
46 R = A
47 R = B

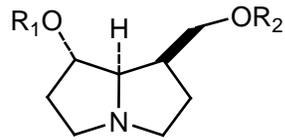


A

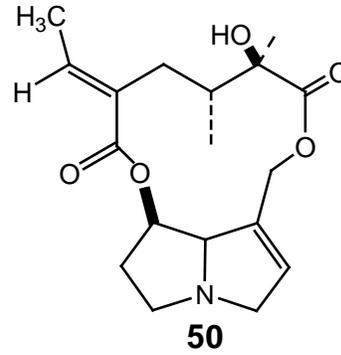


B

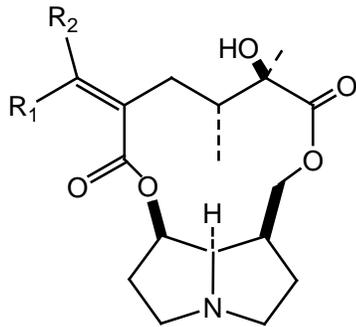
En el 2007, utilizando la técnica de análisis GC – MS se identificaron en la planta los alcaloides pirrolizidínicos: 7-angeloildihroxiheliotridano (**48**), 9-angeloildihroxiheliotridano (**49**), senecionina (**8**), integerrimina (**50**), platifillina (**51**), neoplatifillina (**52**), senkirkina (**53**) y neosenkirkina (**54**).⁹



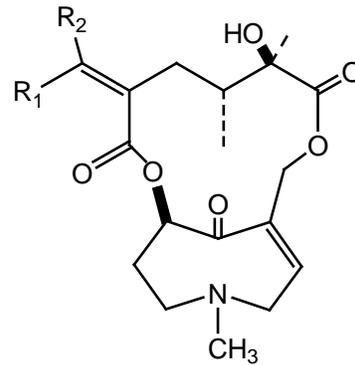
48 $R_1 = H$ $R_2 = Ang$
49 $R_1 = Ang$ $R_2 = H$



50

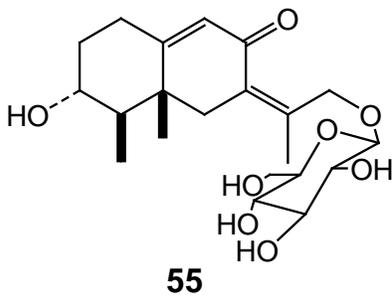


51 $R_1 = CH_3$ $R_2 = H$
52 $R_1 = H$ $R_2 = CH_3$

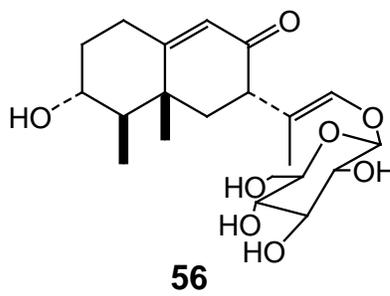


53 $R_1 = CH_3$ $R_2 = H$
54 $R_1 = H$ $R_2 = CH_3$

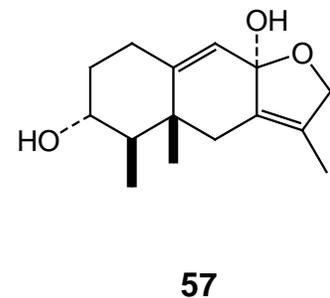
En el último estudio, publicado en 2009, se aislaron: 2 glucósidos de eremofilano (**55-56**), 3 eremofilanólidas (**57-59**), 7 eremofilanos (**44, 60-65**) y 3 flavonoides (**66-68**).¹¹



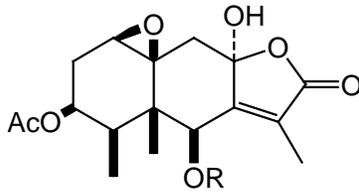
55



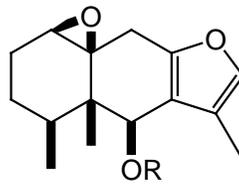
56



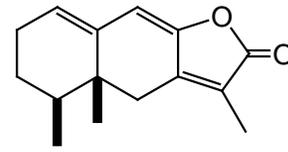
57



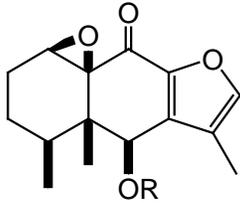
58 R= *i*Bu
59 R= Ang



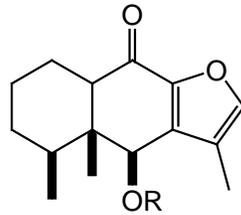
60 R= *i*Bu
61 R= Ang



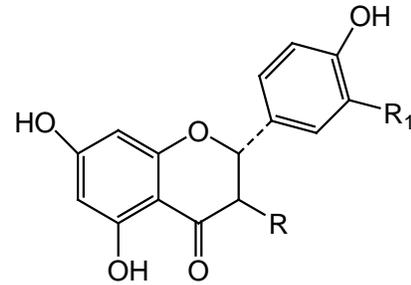
62



63 R= *i*Bu



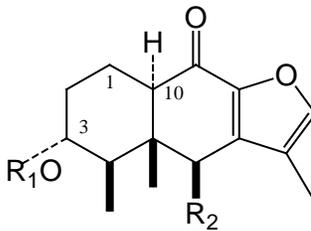
64 R= Ang
65 R= *i*Bu



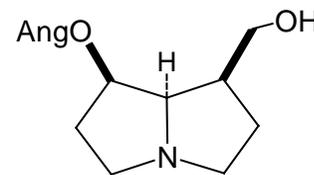
66 R = R₁ = H
67 R = OH R₁ = H
68 R = R₁ = OH

2.5 Metabolitos aislados de *Pittocaulon bombycophole*.

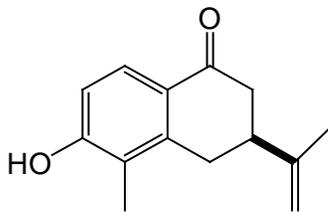
De *P. bombycophole* se aislaron 5 furanoeremofilanos (**69-73**), un *nor*-eremofilano (**74**), un oplopano (**75**) y el alcaloide pirrolizidínico 7- angeloilplatinecina (**76**).¹²



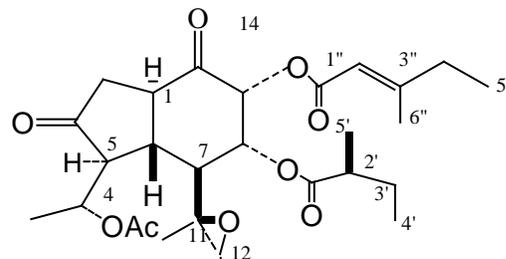
69 R₁ = A, R₂ = OAc
70 R₁ = A, R₂ = H
71 R₁ = Ang, R₂ = OAc
72 R₁ = Ang, R₂ = H
73 R₁ = *N*Val, R₂ = H



76



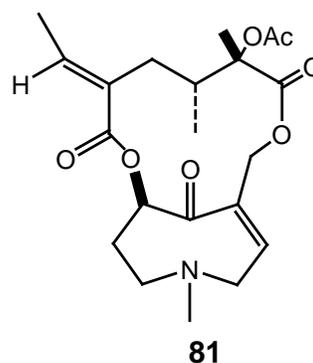
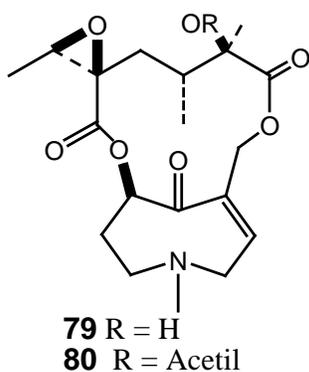
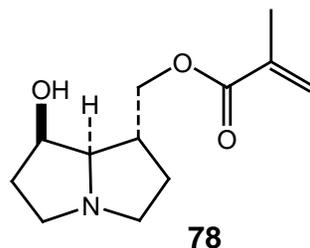
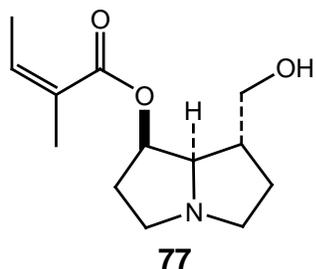
74



75

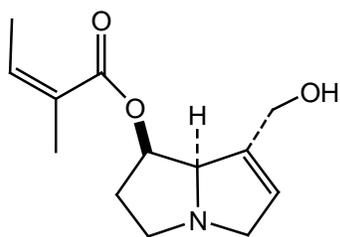


De igual manera, se ha reportado en *P. bombycophole* la presencia de los Aps: 7-angeloilturneforcidina (**77**), 9-angeloilturneforcidina (**78**), senkirkina (**8**), petasitenina (**79**), acetilpetasitenina (**80**) y neoligularidina (**81**).⁹

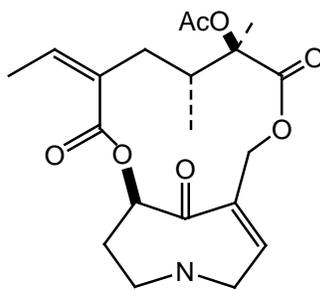


2.6 Alcaloides pirrolizidínicos aislados de *P. filare*, *P. hintonii* y *P. velatum*

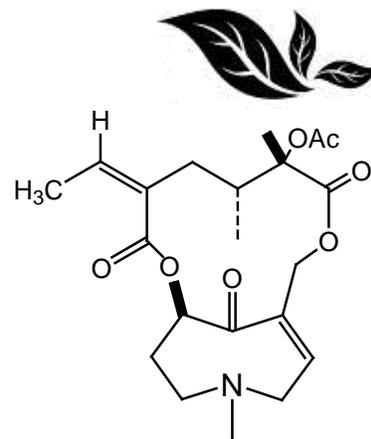
De estas tres especies solamente se encuentra reportado en la literatura su contenido alcaloidal. De *P. filare* han identificado los Aps: 7-angeloilturneforcidina (**77**), 7-angeloilretronecina (**82**), senecionina (**8**), intergerrimina (**50**), senkirkina (**53**), acetilsenkirkina (**83**) y neoligularidina (**81**). De *P. hintonii* se han obtenido: 7-angeloilturneforcidina (**77**), 9-angeloilturneforcidina, senkirkina (**8**), neosenkirkina (**54**), petasitenina (**79**), ligularidina (**84**), acetilsenkirkina (**83**) y acetilpetasitenina (**80**) y de *Pittocaulon velatum* se encuentran reportados: 7-Angeloilheliotridina (**77**), intergerrimina (**50**), senecionina (**8**), senkirkina (**53**) y acetilpetasitenina (**80**).⁹



82



83



84

2.7 Técnicas espectroscópicas

Las técnicas espectroscópicas son técnicas analíticas que sirven para identificar una estructura química, las mas comunes se describen a continuación:²⁸

Espectroscopia infrarroja (IR): La región infrarroja del espectro electromagnético abarca de 4000 a 400 cm^{-1} . La radiación infrarroja produce vibraciones de los enlaces de la molécula y proporciona información sobre los grupos funcionales presentes, ya que cada grupo funcional vibra a una frecuencia característica. El espectrofotómetro de IR registra la energía absorbida por los diferentes grupos funcionales presentes en la molécula.

Espectroscopia ultravioleta (UV): La región electromagnética del espectro entre 200 y 800 nm forma parte de la espectroscopia UV-VIS. Esta radiación es capaz de excitar electrones π y no enlazantes conjugados de la molécula. La unidad estructural asociada con la transición electrónica en el UV se llama cromóforo y de la longitud de onda de absorción se obtiene información que contribuye a determinar la estructura molecular.

Espectrometría de masas:

Impacto electrónico: En el experimento de EMIE se bombardea la molécula con electrones y como resultado de la colisión la molécula pierde



un electrón produciendo un ión de carga positiva $[M^+]$ llamado ion molecular, que corresponde al peso molecular de la sustancia. En este proceso el ión molecular también se fragmenta en iones de masa mas pequeña, estos iones son separados al pasar por un campo magnético y en espectro final se observan los iones de las diferentes masas obtenidas y su abundancia. El análisis de estos fragmentos contribuye a determinar la estructura del compuesto estudiado.

Experimento FAB (se usa para sustancias de alto punto de fusión) las moléculas se encuentran incluidas en una matriz, generalmente glicerol o polietilenglicol, y son bombardeados por átomos de Xenón o Argón de alta energía para producir generalmente iones de masa $[M+H]^+$, estos iones y sus fragmentos son analizados de la misma manera que en el espectro de impacto electrónico. En el experimento FAB de alta resolución se emplean aparatos que calculan de manera muy exacta la composición isotópica de cada elemento permitiendo obtener la masa molecular con cuatro cifras decimales y resultados equivalentes al análisis elemental de la molécula.

Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN): Permite determinar el entorno que rodea a los átomos de hidrógeno (o a los átomos de carbono), proporciona información sobre la estructura de los grupos alquilo y pautas sobre la presencia de grupos funcionales. Se basa en las transiciones de las orientaciones del spín nuclear.

RMN de 1H : En este espectro cada protón que tiene un ambiente diferente genera una señal, de manera que se obtiene información sobre:

- Cuántas clases de protones diferentes hay (número de señales).
- La cantidad de protones de cada clase, dada por la intensidad de los picos (área bajo la curva).
- El número de vecinos de cada protón (dado por la multiplicidad del pico del protón observado).



RMN de ^{13}C : Determina el número de átomos de carbono presentes en la molécula, ya que cada átomo de carbono en una molécula produce un solo pico en el espectro, el entorno magnético de los átomos de C en la molécula está dado por la posición de los picos.

DEPT: Proporciona información de los hidrógenos unidos a cada carbono, se observan las señales de CH_3 , CH_2 y CH .

Técnicas bidimensionales:

COSY: Muestra la correlación entre protones a dos y tres enlaces, así como interacciones alílicas y homoalílicas en caso de haber conjugación.

NOESY: Muestra las interacciones entre hidrógenos a través del espacio, dando información sobre la estereoquímica de la molécula.

HSQC: Determina los protones que están unidos a cada carbono, permite asignar el desplazamiento de los carbonos primarios secundarios y terciarios presentes en la molécula.

HMBC: Muestra las correlaciones entre protón y carbono a dos y tres enlaces, permitiendo asignar carbonos cuaternarios y corroborar las estructuras propuestas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los extractos de las 5 especies del género *Pittocaulon* fueron estudiados por cromatografía de gases-espectroscopia de masas para determinar su contenido alcaloidal¹¹. *P. preacox* y *P. bombycophole* son las únicas especies del género que han sido objeto de un estudio fitoquímico completo.

Las especies del género *Pittocaulon*, se utilizan en medicina popular contra el reumatismo y para curar heridas.³ De *Pittocaulon velatum* no existen en la



literatura reportes de estudios químicos de sus metabolitos no alcaloideos, por lo tanto resulta interesante su estudio como posible fuente de sustancias anti-inflamatorias.

4. HIPÓTESIS

El extracto metanólico del tallo de *Pittocaulon velatum* debe contener sesquiterpenos de tipo eremofilano, alcaloides pirrolizidínicos y flavonoides. Dado que esta especie se utiliza en la medicina popular como anti-inflamatorio y para curar heridas se espera encontrar metabolitos con esta actividad.

5. OBJETIVOS GENERALES

- 1.- Contribuir a la química de género *Pittocaulon*.
- 2.- Determinar la actividad anti-inflamatoria de los compuestos aislados de *Pittocaulon velatum*.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar, purificar, identificar y cuantificar los principales metabolitos secundarios del extracto metanólico del tallo de *Pittocaulon velatum*.
- Evaluar la actividad anti-inflamatoria de los metabolitos aislados.



7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Equipo utilizado

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

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

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

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

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

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



7.2 Análisis cromatográfico

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

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

La Cromatografía en capa delgada (CCD) fue realizada utilizando placas de gel de sílice GF254 (Merck), para la cromatografía analítica se usaron placas de 0.25 mm de espesor y para la preparativa de 1.0 y 2.0 mm.

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

Las placas se visualizaron mediante exposición a luz UV (254 nm y 365 nm) y además se utilizó solución de sulfato cérico al 3% en ácido sulfúrico 2N como revelador.

7.3 Material vegetal

Pittocaulon velatum (Greenm.) H. Rob.& Brettell var. *Velatum*, originario de Taxco Guerrero, se recolectó en abril del 2007. Un ejemplar fue depositado en el herbario del Instituto de Biología (MEXU 1205023), Universidad Nacional Autónoma de México.

7.4 Preparación del extracto



El tallo (1480 g) se secó a temperatura ambiente, se trituró y se sometió a un proceso de percolación con metanol, el disolvente se evaporó en un evaporador rotatorio. El extracto metanólico (300 g) fue purificado por métodos cromatográficos.

7.5 Fraccionamiento y purificación

Columna 1:

El extracto metanólico (300 g) se fraccionó por cromatografía en columna al vacío (CCV) (C1) eluída con mezclas hexano-AcOEt en gradiente de polaridad creciente obteniendo 241 fracciones, las cuales se reunieron por su similitud en cromatografía en capa delgada (CCD) para su posterior purificación.

Fracciones C1	Polaridad	columnas
2	Hexano	C2
3-4	hexano	C3
5-6	hexano – AcOEt 95:15	C4
7-30	hexano – AcOEt 9:1	C5
31-51	hexano – AcOEt 9:1	C6
52-62	hexano – AcOEt 8:2	C7
63-74	hexano – AcOEt 8:2	C8
75-107	hexano – AcOEt 7:3	C9
108-132	hexano – AcOEt 1:1	C10
133-150	AcOEt	

Tabla 1. Fracciones obtenidas de la columna 1, relación de los disolventes en la que se obtuvieron y número de la columna en que se purificaron.

Columnas 2 y 3:

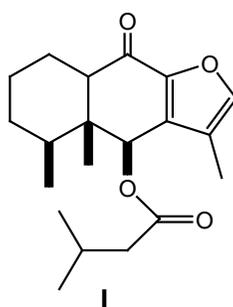
Las fracciones 2 (1.73 g) y 3-4 (23.38 g) de C1 fueron purificadas mediante las columnas C2 y C3 eluídas en hexano para obtener 180 mg y 13.1 g,



respectivamente, de un producto que se observó como un compuesto puro en cromatografía en capa delgada (CCD) en fase normal pero cuyo espectro de RMN de ^1H mostró que se trataba de una mezcla. Esta mezcla (100 mg) fue purificada por CCD en fase inversa (MeOH-H₂O 6:4, corrida 4 veces) seguida de una columna flash eluída con hexano-AcOEt 95:5, para obtener 28.3 mg del compuesto **I**.

6 β -isovalerianoxifuranoeremofilan-9-ona.²⁹ (**I**)

Aceite amarillo; $[\alpha]_D^{25}$ - 12.3 (c 0.26, CHCl₃); IR (CHCl₃): ν 1731, 1688, 792 cm⁻¹.

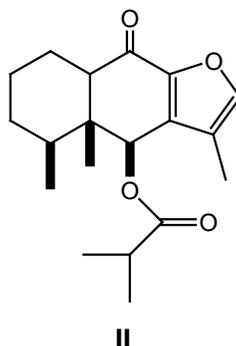


Columna 4:

La purificación de las fracciones 5-6 (30.86 g) mediante CCV (C4) eluída con hexano, dio lugar a una mezcla (16.5 g), de la cual se purificaron 120 mg por CCD en fase inversa (MeOH-H₂O 6:4, eluída 4 veces) para obtener 45 mg del compuesto **II**.

6 β -isobutiriloxifuranoeremofilan-9-ona.³⁰ (**II**)

Aceite amarillo; $[\alpha]_D^{25}$ - 37.1 (c 0.21, CHCl₃); IR (CHCl₃): ν 1730, 1688, 790 cm⁻¹.



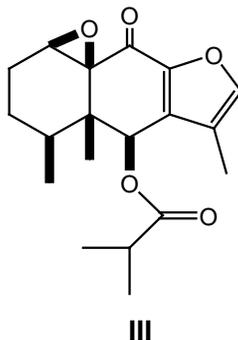


Columna 5:

Las fracciones 17-30 (25.28 g) de la primera columna fueron purificadas por CCV (C5) eluída con mezclas hexano-AcOEt en gradiente de polaridad creciente. De las fracciones eluídas con hexano-AcOEt 99:1 se separaron cristales de punto de fusión 132-134 °C, identificados como β -sitosterol. Las fracciones eluídas con hexano-AcOEt 98:2 (6.5 g) fueron sometidas a una columna flash (hexano-AcOEt 85:15) para obtener una mezcla (1.5 g) de la cual se purificaron 100 mg mediante 2 placas preparativas sucesivas en fase inversa (MeOH-H₂O 8:2 corrida 2 veces y MeOH-H₂O 6:4 corrida 4 veces) para obtener 9 mg del compuesto **III**.

6 β -isobutiriloxi-1,10 β -epoxifuranoeremofilano³¹ (**III**).

Aceite amarillo; $[\alpha]_D^{25} - 17.0$ (c 0.21, CHCl₃); IR (CHCl₃): ν 1735, 1668.



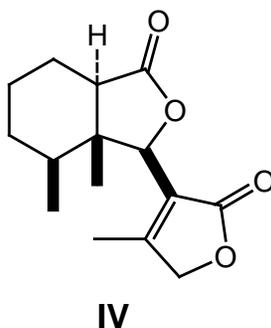
Columna 6:

Las fracciones 31-51 (20.36 g) de C1 se purificaron por CCV (C6) eluída con mezclas de hexano-AcOEt en gradiente de polaridad creciente. Las fracciones 7-8 (91.3mg) eluídas con hexano se purificaron por columna flash eluída con mezcla hexano-AcOEt 95:15 y se obtuvieron 10 mg del compuesto **I**. Las fracciones 20-25 (1.28 g) obtenidas con hexano se purificaron con dos columnas flash sucesivas eluídas con hexano-AcOEt (9:1) y benceno-AcOEt (98:2), respectivamente, para obtener una mezcla (120 mg) que fue purificada por CCD fase inversa (MeOH-H₂O 6:4, corrida 4 veces) obteniendo así 9 mg del compuesto **III**. De las fracciones 56-76 eluídas con hexano-AcOEt 9:1 se obtuvo el compuesto **IV** (678 mg).



Velatumólida (**IV**)

Prismas incoloros (hexano-AcOEt); pf 170-172 °C; $[\alpha]_D^{25} +116.4^\circ$ (*c* 0.28, CHCl₃); IR (CHCl₃): ν 1760 cm⁻¹ (espectro 1.9); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 217 nm (4.095); RMN ¹H (espectro 1.1); RMN ¹³C (espectro 1.2); EMIE (espectro 1.8) *m/z* (%): 264 (2) [M]⁺, 218 (6), 127 (44), 110 (96.6); EMAR-FAB⁺ *m/z*: 265.1447 (calculado 265.1440 para C₁₅H₂₁O₄, [M+H]⁺).

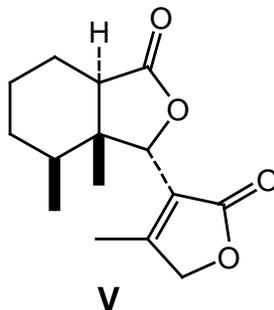


Columna 7:

Las fracciones 52-62 (9.2 g) de C1 se sometieron a una CCV (C7) eluída con mezclas de hexano-acetona en gradiente de polaridad creciente. Las fracciones 61-83 (3.5 g), eluídas con hexano-acetona 9:1, se purificaron por columna flash eluída con CH₂Cl₂-AcOEt 98:2 para obtener 200 mg del compuesto **IV**. Las fracciones 84-109 (1.5 g), eluídas con mezclas hexano-acetona 7:3 y 8:2, se purificaron por columna flash (eluída con CH₂CH₂-AcOEt 98:2) para obtener 50 mg. del compuesto **V**.

Epi-velatumólida (**V**)

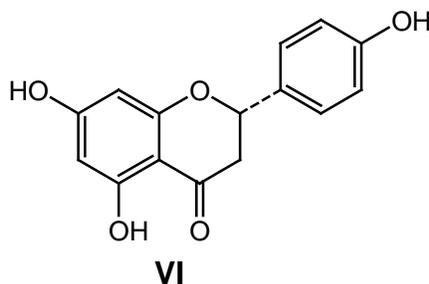
Prismas incoloros (hexano-acetona); pf 195-197 °C; $[\alpha]_D^{25} +80.8^\circ$ (*c* 0.24, acetona); IR (CHCl₃): ν 1777, 1759 cm⁻¹ (espectro 2.9); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 214 nm (4.038); RMN ¹H (espectro 2.1); RMN ¹³C (espectro 2.2); EMIE (espectro 2.8) *m/z* (%): 264 (3) [M]⁺, 218 (8), 127 (14), 110 (100); EMAR-FAB⁺ *m/z*: 265.1445 (calculado 265.1440 para C₁₅H₂₁O₄, [M+H]⁺).



Las fracciones 110-130 (900 mg) de C7 fueron purificadas por columna flash eluída con mezclas hexano-acetona 8:2 para obtener 6 mg del compuesto **VI**.

Naringenina³² (**VI**).

Cristales blancos (hexano-AcOEt); pf. 253-255 °C; $[\alpha]_D^{25} - 20.7^\circ$ (c 0.34, MeOH); IR (Nujol) ν 3288-3034, 1631 cm^{-1} .



Columna 8:

Las fracciones 63-74 (6.19 g) de C1 fueron purificadas por CCV eluída con mezcla de hexano-AcOEt en gradiente de polaridad creciente, de las fracciones eluídas con hexano-AcOEt 95:5 se obtuvieron 26.9 mg del compuesto **I** y de las fracciones eluídas con hexano-AcOEt 7:3 100 mg del compuesto **VI**.

Columna 9:

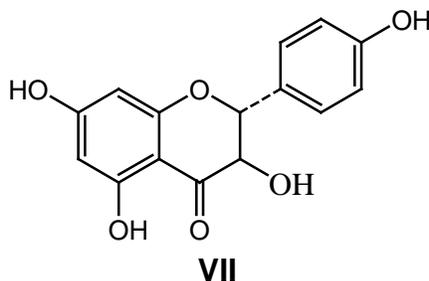
Las fracciones 75-107 (21.12g) de C1 se purificaron por CCV, en la elusión se emplearon mezclas de hexano-AcOEt en gradiente de polaridad creciente, para obtener 268.9 mg del compuesto **VI** de las fracciones eluídas con hexano-AcOEt 9:1. Las fracciones 109-126 (2.76 g), eluídas con hexano-AcOEt 85:15, fueron sometidas a una columna flash eluída con mezcla de hexano-AcOEt 6:4



obteniendo una mezcla (1.68 g) la cual fue purificada por columna flash eluída con hexano-acetona 65:35 para aislar el compuesto **VII**.(230.3mg).

Aromadendrina³³ (**VII**).

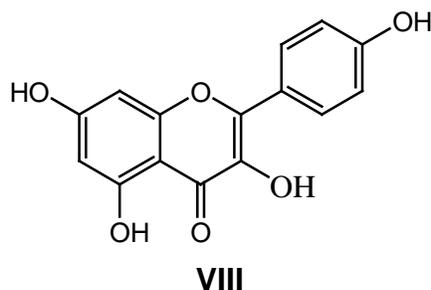
Cristales blancos (hexano-AcOEt); p.f. 237-239 °C; $[\alpha]_D^{25} + 12.9^\circ$ (c 0.27, EtOH); IR (Nujol) ν 3422-3363, 1638 cm^{-1} .



Las fracciones 127-155 (3.1 g) de C9 se sometieron a una columna flash eluída con hexano-AcOEt 8:2 de donde se obtuvo una mezcla (763.5 mg) la cual se purificó por columna flash eluída con hexano-acetona 7:3 para obtener el compuesto **VIII** (23.7mg).

Kaempferol³⁴ (**VIII**).

Cristales amarillos (hexano-AcOEt); p. f. 262-265 °C; IR (Nujol) ν 3420-3314, 1659, cm^{-1} .



Columna 10:

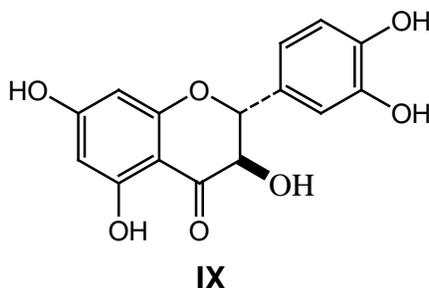
Las fracciones 108-132 (14.28 g) de C1 fueron purificadas por CCV eluída con mezclas de hexano-AcOEt en gradiente de polaridad creciente. De las fracciones



eluídas con hexano-AcOEt 7:3 se obtuvo el compuesto **VIII** (440 mg), y de las fracciones eluídas con hexano-AcOEt 65:35 se obtuvo el compuesto **VII** (10 mg). Las fracciones eluídas con hexano-AcOEt 6:4 produjeron una mezcla (290 mg) de la cual, mediante una CCD en placa preparativa (hexano-acetona 6:4, corrida 2 veces) se aislaron los compuesto **VII** (4 mg) y **IX** (10 mg).

Taxifolina³⁵(**IX**).

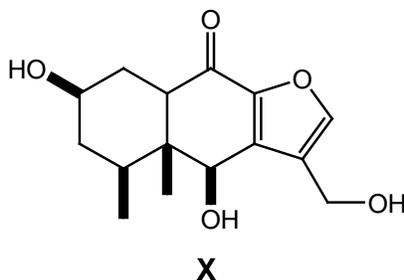
Cristales blancos (hexano–AcOEt); p.f. 229-232 °C; $[\alpha]_D^{25} + 18.5^\circ$ (c 0.23, acetona) ; IR (Nujol) ν 3341-3252, 1639-1595 cm^{-1} .



De las fracciones de C10 eluídas con hexano-AcOEt 1:1 se obtuvo un sólido que por recristalización (hexano-AcOEt) dio lugar al compuesto **X** (22.6 mg).

Velatumina (**X**).

Agujas incoloras (hexano-AcOEt); pf 222-224 °C; $[\alpha]_D^{25} - 27.3^\circ$ (c 0.11, MeOH); IR (KBr); ν 3348, 1662 cm^{-1} (espectro 3.9); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 275 nm (4.266); RMN ¹H (espectro 3.1); RMN ¹³C (espectro 3.2); EM-FAB⁺ (espectro 3.8) *m/z* (%): 281(10) [M+1]⁺, 55 (80) EMAR-FAB⁺ *m/z*: 281.1385 (calculado 281.1389 para C₁₅H₂₁O₅, [M+H]⁺).





De las fracciones 133-150 de C1 se obtuvo un sólido (700 mg) que se identificó como glucósido de β -sitosterol.

7.6 Metodología de las pruebas de actividad anti-inflamatoria.

La actividad anti-inflamatoria se determinó utilizando el modelo de edema inducido en oreja de ratón con acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA).³⁶

Se emplearon ratones macho (25-30g), los cuales se dividieron en grupos de tres ratones: control (se administró TPA más el vehículo), prueba (recibieron TPA más el compuesto de prueba) y referencia (recibieron TPA más indometacina).

Para anestésiarlos se les administró (vía intraperitoneal) 3.5 mg/kg de pentobarbital sódico. En la oreja derecha se aplicaron 10 μ l de solución etanólica de TPA (2.5 μ g/oreja) a todos los ratones, diez minutos después, en la misma oreja se aplicaron el compuesto de prueba o el fármaco de referencia (grupo de prueba y control respectivamente) disueltos en 20 μ l del vehículo. La oreja izquierda recibió 10 μ l de etanol y 20 μ l del vehículo del compuesto (control negativo). Cuatro horas después de la aplicación del TPA, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical para tomar de muestra de 7 mm de diámetro de ambas orejas.

El incremento del peso de la muestra derecha con respecto a la izquierda representa el edema. La inhibición del edema se calcula con fórmula:

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

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



8. RESULTADOS

8.1 Metabolitos aislados

Del estudio fitoquímico de tallo de *P. velatum* se aislaron 3 nuevos compuestos, el furanoeremofilano velatumina (**X**) y las seco eremofilanólidas velatumólida (**IV**) y *epi*-velatumólida (**V**). Además se aislaron 3 furano eremofilanos (**I**, **II**, **III**), 4 flavonoides (**VI**, **VII**, **VIII**, **IX**), β -sitosterol y glucósido de β sitosterol ya reportados en la literatura.

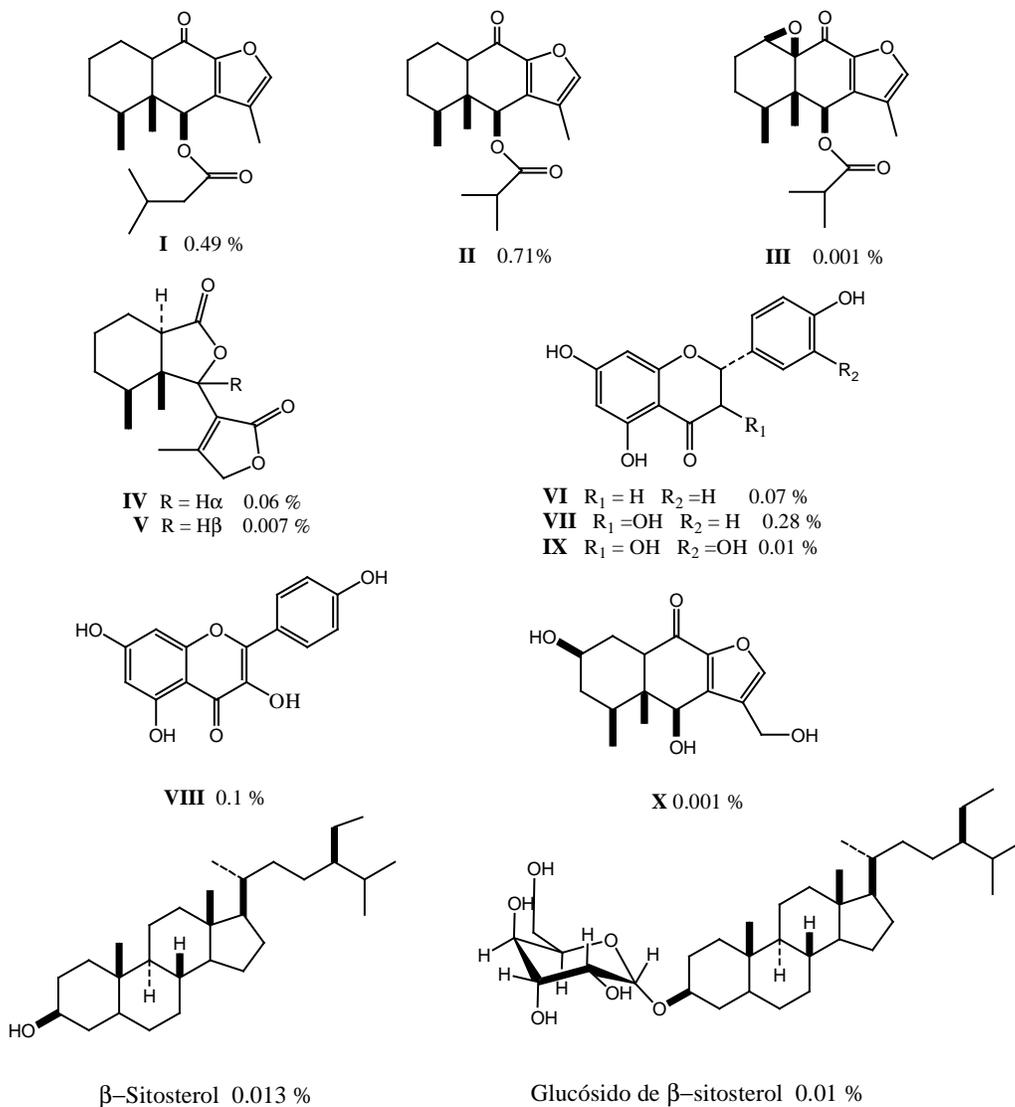


Figura 1. Metabolitos aislados de *Pittocaulon velatum* y sus rendimientos.



8.2 Resultados de las pruebas de actividad anti-inflamatoria de los compuestos aislados.

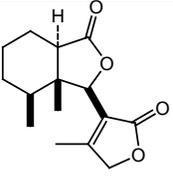
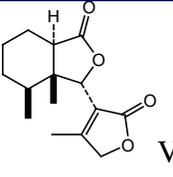
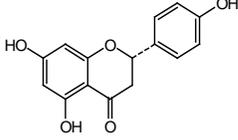
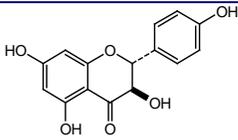
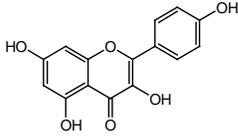
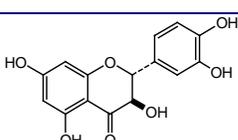
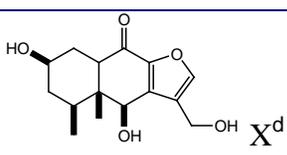
Compuesto	Dosis ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)	Edema (mg)	Inhibición (%)
Indometacina ^a	1.0	1.99 \pm 0.68	83.73
 IV ^a	1.0	5.37 \pm 3.57	53.03
 V ^c	1.0	8.58 \pm 1.15	20.36
 VI ^a	1.0	5.00 \pm 1.53	56.24
 VII ^a	1.0	2.83 \pm 0.74	75.20
 VIII ^a	1.0	2.17 \pm 0.58	81.04
 IX ^c	1.0	6.15 \pm 1.06	42.88
 X ^d	1.0	9.43 \pm 0.70	10.24
Extracto metanólico ^b	1.0	8.44 \pm 0.72	38.06

Tabla 2. Resultados de las pruebas de actividad sobre el edema inducido en oreja de ratón con TPA.



Control: ^a acetona (11.43 ± 1.30), ^b metanol (13.63 ± 1.59), ^c acetona (10.77 ± 0.45), ^d metanol (10.50 ± 0.36).

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

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

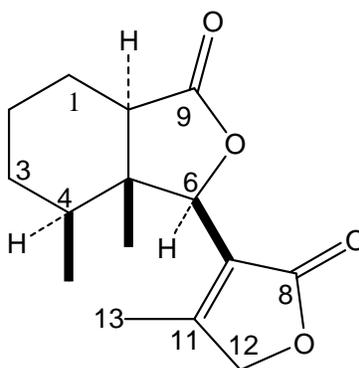
Las estructuras de los compuestos nuevos **IV**, **V** y **X** fueron elucidadas por medio de técnicas espectroscópicas: Masas, UV, IR y RMN de ¹³C y ¹H, mono y bidimensional, homo y heteronuclear. En el caso del compuesto **IV** la estructura fue confirmada por difracción de rayos x.

La identidad de los compuestos conocidos: **I**, **II**, **III**, **VI**, **VII**, **VIII**, **IX**, β -sitosterol y glucósido de β -sitosterol fue determinada mediante la comparación de sus datos espectroscópicos (espectrometría IR y de RMN de ¹H y de ¹³C) y constantes físicas con los reportados en la literatura y además , en el caso de los flavonoides (**VI**, **VII**, **VIII** y **IX**), el β -sitosterol y glucósido de β -sitosterol, los compuestos fueron comparados con muestras auténticas disponibles en el laboratorio.

A continuación se presenta la discusión de la elucidación de las estructuras de los nuevos compuestos **IV**, **V** y **X**. seguida de la discusión de los resultados de las pruebas de actividad anti-inflamatoria.



Velatumólida (IV)



El espectro de UV presentó una absorbancia máxima a λ 217 nm.

La espectroscopia IR (espectro 1.9) mostró una banda ancha en 1761 cm^{-1} característica de los ésteres cíclicos con anillo de cinco miembros denominados gamma lactonas.

La fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$, con número de insaturación de 6, fue deducida del ion molecular $[\text{M} + \text{H}]^+$ de m/z 265.1447 obtenido mediante el espectro de masas FAB^+ de alta resolución.

La presencia de 15 átomos de carbono en el espectro de RMN de ^{13}C (espectro 1.2, tabla 3) junto con los tres metilos a δ 2.22 (s), 0.84 (s) y 0.76 (d, $J = 6.8\text{ Hz}$) observados en el espectro de RMN ^1H (espectro 1.2) sugirió una estructura de sesquiterpeno de tipo furanoeremofilanólida (**11**).

En el espectro de RMN ^1H se observa a campo bajo (δ 4.98) una señal base de éster que fue asignada a H-6 por las correlaciones homoalílicas observadas en el experimento COSY con los protones 12 y 13. Siguiendo con el espectro se observan las señales de un metileno base de oxígeno (δ 4.76, d, $J = 17.6\text{ Hz}$ y 4.69, d, $J = 17.6\text{ Hz}$) que se asignaron al CH_2 -12. Se encuentra luego la señal de un metino α a grupo carbonilo que interacciona, en el experimento COSY, (espectro 1.5) con un metileno fue asignada a H-10 (δ 2.29, dd, $J = 3.2$ y 11.6 Hz).



Posición	RMN ¹ H, CDCl ₃ , 400 MHz	RMN ¹³ C, CDCl ₃ , 100 MHz	DEPT
1a	1.95 da (<i>J</i> = 11.2 Hz)	18.9	CH ₂
1b	1.40 m		
2a	1.86 m	25.2	CH ₂
2b	1.33 m		
3a	1.56 da (<i>J</i> = 13.2 Hz)	29.9	CH ₂
3b	1.21 m		
4	1.88 m	38.5	CH
5	-	50.4	C
6	4.98 s	84.4	CH
7	-	163.3	C*
8	-	173.2	C
9	-	175.6	C
10	2.29 dd (<i>J</i> = 2.8, 11.6 Hz)	52.4	CH
11	-	121.6	C*
12a	4.76 d (<i>J</i> = 17.6 Hz)	73.2	CH ₂
12b	4.69 d (<i>J</i> = 17.6 Hz)		
13	2.22 s	14.1	CH ₃
14	0.84 s	9.3	CH ₃
15	0.76 d (<i>J</i> = 6.8 Hz)	16.9	CH ₃

Tabla 3. Datos de RMN-¹H y ¹³C de velatumólida (IV). *Carbonos cuyas señales son intercambiables.

Con el espectro COSY (espectro 1.5) se pudo elucidar la secuencia del anillo A del eremofilano ya que se observaron las interacciones de H-10 con H-1a y H-1b que a su vez interaccionan con H-2a y H-2b, y el acoplamiento de H-2a con H-3b. Por otro lado se observó que H-4 tiene interacción con H-3a, H-3b y con el metilo 15.



En el espectro de RMN ^{13}C (espectro 1.2, tabla 3) se observaron, a campo bajo, las señales de 2 carbonilos de éster a δ 175.5 y 173.2, dos carbonos vinílicos a δ 163.3 y 121.5 un metino y un metileno base de oxígeno a δ 84.4 y 73.2, respectivamente.

Además en el espectro DEPT (espectro 1.3) se observó la presencia de tres metilos, 4 metilenos y 3 metinos, en concordancia con la estructura **IV**.

La asignación de los carbonos se logró con ayuda de los experimentos HSQC (espectro 1.4) y HMBC.

En el espectro HMBC (espectro 1.6) se observó el cruce de los picos entre el carbonilo a δ 173.2, asignado a C-8, con H-6, H-12 y H-13. El carbonilo a δ 175.6 correlacionó con H-10 por lo que le fue asignada la posición 9. Esto sugirió una modificación del esqueleto base de eremofilanólida con la ruptura del enlace 8 y 9 seguida de oxidación de los carbonos para formar dos gamma lactonas, en concordancia con el espectro IR, para formar una seco-gamma,gamma-eremofilanólida. Además, en este mismo experimento HMBC, se observaron las correlaciones de H-6 con C-4, C-5, C-7, C-8, C-10, C-11, C-12 y C-14 (figura 2).

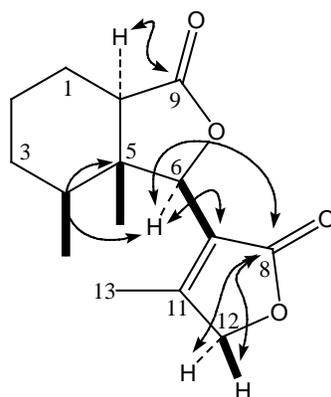


Figura 2. Principales interacciones HMBC de velatumólida.



En el experimento NOESY (espectro 1.7) se observó la correlación entre H-6, H-4 y H-10; indicando que están del mismo lado de la molécula y dado que biogenéticamente los metilos tienen orientación β^{37} , estos hidrógenos se propusieron con orientación α (figura 3).

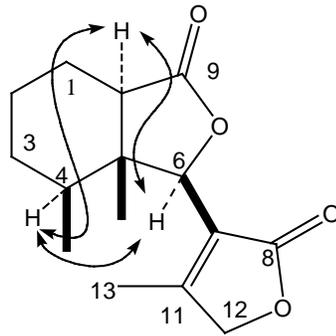


Figura 3. Principales interacciones NOESY de velatumólida.

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

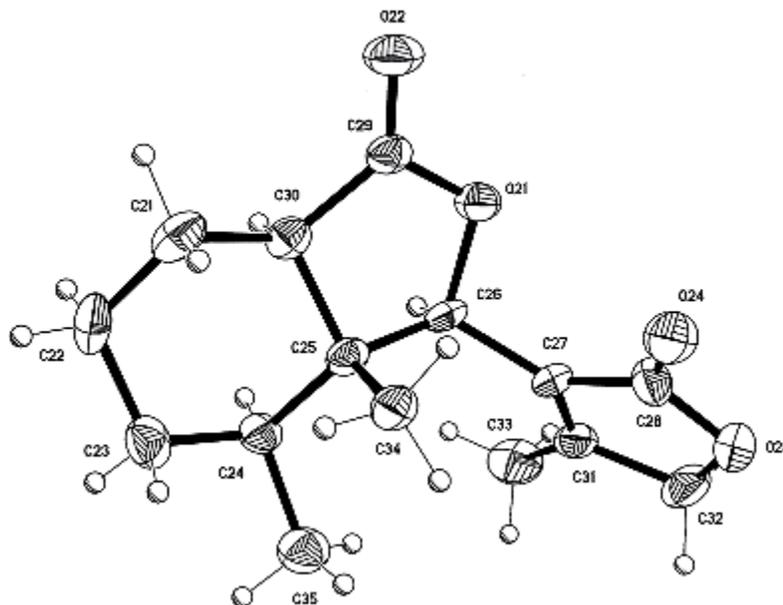
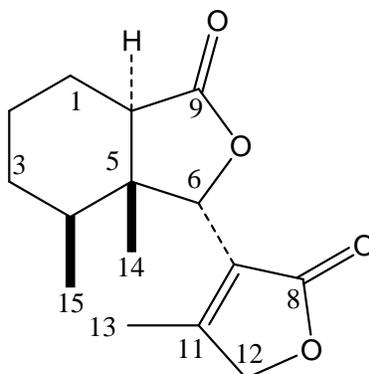


Figura 4. Estructura de velatumólida obtenida de rayos X.



***Epi*-velatumólida (V)**



El espectro de UV presentó una absorbancia máxima a λ 214 nm.

La espectroscopia IR (espectro 2.9) mostró dos bandas, a 1777 y 1759 cm^{-1} , característica de las gamma lactonas.

Este compuesto presentó la misma fórmula molecular que el compuesto **IV** $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$, determinada por el ion molecular $[\text{M} + \text{H}]^+$ de m/z 265.1440 observado en el espectro de masas FAB^+ de alta resolución.

El espectro de RMN ^1H (espectro 2.1, tabla 4) es muy similar al del velatumólida (**IV**). Se observa a campo bajo, al igual que en **IV**, la señal de H-6 (δ 5.05). La siguiente señal a δ 4.73, asignada al metileno base de éster 12, apareció en este compuesto como una señal simple, difiriendo de velatumólida en cuyo espectro se observó como un sistema AB. De igual manera la señal de H-10 (δ 3.04, dd, $J = 3.2$, y 12.0 Hz) se encuentra desplazada a campo bajo, con respecto a la señal del mismo protón en velatumólida, $\Delta\delta$ 0.75 ppm y la señal del metilo 14 tiene un $\Delta\delta$ 0.24 ppm comparado con su par en **IV**.

El experimento COSY (espectro 2.5) muestra las mismas interacciones en el compuesto **V** que en **IV**.



Posición	RMN ¹ H, CDCl ₃ , 400 MHz	RMN ¹³ C, CDCl ₃ , 100 MHz	DEPT
1a	1.95 da (<i>J</i> = 12.4 Hz)	18.9	CH ₂
1b	1.36 dd (<i>J</i> = 3.6, 12.4 Hz)		
2 a	1.81 da (<i>J</i> = 12.4 Hz)	25.1	CH ₂
2 b	1.26 m		
3 a	1.52 m	29.9	CH ₂
3 b	1.23 da (<i>J</i> = 12.4 Hz)		
4	1.44 d (<i>J</i> = 6.8)	36.4	CH
5	-	46.5	C
6	5.05 s	82.4	CH
7	-	163.1	C*
8	-	172.2	C
9	-	176.8	C
10	3.04 dd (<i>J</i> = 3.2, 12.0 Hz)	47.8	CH
11	-	122.8	C*
12	4.73 s	72.8	CH ₂
13	2.15 s	13.2	CH ₃
14	1.08 s	15.1	CH ₃
15	0.80 d (<i>J</i> = 6.4 Hz)	16.7	CH ₃

Tabla 4 Datos de RMN-¹H y ¹³C de *epi*-velatumólida. *Carbonos cuyas señales son intercambiables.

El espectro de RMN ¹³C (espectro 2.2) presentó 15 átomos de carbono, y se observaron el mismo número de metilos, metilenos y metinos en el experimento DEPT (espectro 2.3) que para el compuesto **IV**. Sin embargo, las señales de C-4, C-5, C-6 y C-10 se encuentran con respecto a las señales de los mismos carbonos en velatumólida desplazadas a campo bajo $\Delta\delta$ 2.1, 3.9, 2.2 y 4.6 ppm, respectivamente, y la señal del metilo 14 se desplazó a campo alto $\Delta\delta$ -5.9 ppm.



En el experimento HMBC (espectro 2.6) se observó la interacción de C-9 con H-6 y H-10 indicando la presencia de una 6,9- γ -lactona. El cruce de picos H-12 y H-13 con C-8 sugiere la presencia de una 8,12- γ -lactona y su unión a C-6 se observa por la interacción de H-6 con C-8 (figura 5).

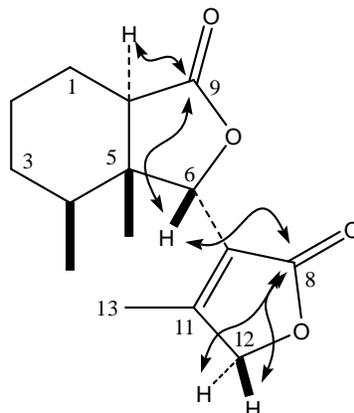


Figura 5. Principales interacciones HMBC de *epi*-velatumólida.

Con esta evidencia se llegó a la conclusión que la diferencia entre las estructuras de los compuestos **IV** y **V** debía ser de tipo estereoquímico. En efecto, en el experimento NOESY (espectro 2.7), se pudo observar la correlación de H-10 con H-4 y de H-6 con H-14. Esto indica que H-10 está orientado α , como en el compuesto **IV**, pero que H-6 tiene orientación β , por lo tanto **V** es el epímero en posición 6 de **IV** por lo que recibió el nombre de *epi*-velatumólida (figura 6).

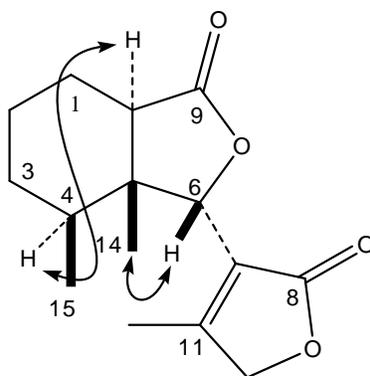
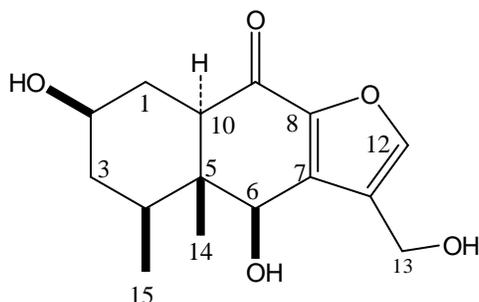


Figura 6. Principales interacciones NOESY de *epi*-velatumólida.



Velatumina (X)



El espectro de UV presentó una absorbancia máxima a λ 275 nm.

La espectroscopia IR mostró una banda ancha característica de los alcoholes a 3348 cm^{-1} y otra a 1662 cm^{-1} , característica del grupo carbonilo conjugado.

La fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_5$, con un número de insaturaciones de 6, fue deducida del ion molecular $[\text{M} + \text{H}]^+$ de m/z 281.1385 obtenida mediante el espectro de masas FAB^+ de alta resolución.

La presencia de 15 átomos de carbono en el espectro de RMN ^{13}C (espectro 3.2, tabla 5) junto con los metilos a δ 0.80 (s) y δ 1.19 (d, $J = 6.8\text{ Hz}$) y la señal simple perteneciente al hidrógeno aromático del furano a δ 7.48 (espectro 3.1), sugirió una estructura de sesquiterpeno de tipo furanoeremofilano (**10**)

En el espectro de RMN de ^1H (espectro 3.1) se observaron tres señales en la región de hidrógenos base de oxígeno. La primera fue asignada a H-6 por tratarse de una señal simple, cuyo desplazamiento a δ 4.93 indicó un protón germinal a grupo hidroxilo α al sistema conjugado. La segunda es la señal AB de un metileno (δ 4.64, d, $J = 14.0\text{ Hz}$ y 4.59, d, $J = 14.0\text{ Hz}$) que fue asignado a H-13 ya que presentó una interacción homoalílica, en el experimento COSY, con el protón aromático H-12. La tercera señal a δ 3.60 (dddd, $J = 11.6, 11.6, 3.6, 3.6, \text{ Hz}$), fue



asignada a H-2, ya que en el experimento COSY interactuó con los dos metilenos del anillo A.

La señal de un metino α al grupo carbonilo (dd, δ 2.48, $J = 3.2$ y 12.4 Hz) fue asignada a H-10, ya que en el experimento COSY se observó su correlación con H-1.

Posición	RMN ^1H , CD_3OD , 400 MHz	RMN ^{13}C , CD_3OD , 100 MHz	DEPT
1 α	2.30 ddd ($J = 13.2, 3.6, 3.2$ Hz)	30.9	CH ₂
1 β	1.29 ddd ($J = 13.2, 12.8, 11.6$ Hz)		
2 α	3.61 dddd ($J = 11.6, 3.6$ Hz)	70.2	CH ₂
3 α	1.66 da ($J = 12$ Hz)	41.9	
3 β	1.26 ddd ($J = 12.8, 12, 11.6$ Hz)		
4	1.89 dqd ($J = 3.2, 6.8, 12.8$ Hz)	42.6	CH
5	-	51.2	C
6	4.93 s	76.3	CH
7	-	140.4	C
8	-	147.4	C
9	-	188.5	C
10	2.48 dd ($J = 3.2, 12.4$ Hz)	54.5	CH
11	-	128.7	C
12	7.48 s	146.8	CH ₂
13 α	4.64 d ($J = 13.6$ Hz)	56.0	CH ₂
13 β	4.59 d ($J = 13.6$ Hz)		
14	0.80 s	19.1	CH ₃
15	1.19 d ($J = 6.8$ Hz)	6.8	CH ₃

Tabla 5. Datos de RMN- ^1H y ^{13}C de velatumina.

En el espectro de ^{13}C se observó, a campo bajo, una señal de carbonilo de cetona (δ 188.5), cuatro señales pertenecen a carbonos vinílicos (δ 146.8, δ 128.7, δ



140.4 y δ 147.4) dos metinos y un metileno base de oxígeno a δ 76.3, δ 70.2 y δ 56.0 respectivamente.

En el espectro DEPT (espectro 3.3) se observó que el compuesto tiene dos metilos, 3 metilenos y 5 metinos en concordancia con la estructura **X**.

La asignación de los carbonos se hizo con la ayuda de los espectros HSQC (espectro 3.4) y HMBC. En el espectro HMBC (espectro 3.6) se pudo confirmar la posición de un grupo hidroxilo en el C-2 puesto que H-2 correlacionó con C-1, C-3, C-4 y C-10. Se observó también la correlación de H-10 con el grupo carbonilo, la de H-6 con C-7, C-8 y C-11 al igual que la de H-13 con C-7, C-11 y C-12 (figura 7).

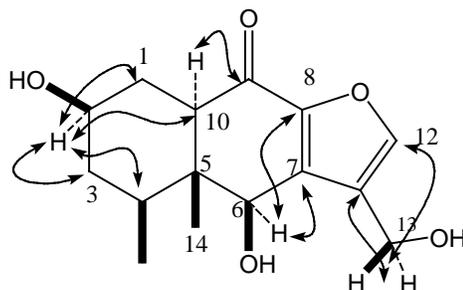


Figura 7. Principales interacciones HMBC de velatumina

En el espectro NOESY (espectro 3.7) se pueden observar las interacciones de H-2 con H-4, H-3a y H-10, y de H-6 con H-4 y H-10, indicando que los protones 2, 4, 6 y 10 tienen orientación α , puesto que los metilos 14 y 15 están biogénicamente orientados β ,³⁷ y por lo tanto los grupos hidroxilo tienen orientación β (figura 8).

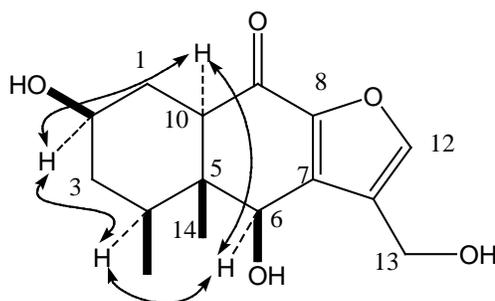


Figura 8. Principales interacciones NOESY de velatumina



Pruebas biológicas

En la tabla 2 se muestran los resultados del rastreo primario de actividad anti-inflamatoria en el modelo de edema inducido en oreja de ratón con TPA. La actividad se determinó por el porcentaje de inhibición del edema en la oreja con cada uno de los compuestos probados, utilizando el método descrito en la página 10. Los compuestos **I-III** no fueron evaluados debido a que en un estudio anterior¹¹ se había determinado que no tenían actividad.

Se puede observar que en los flavonoides la actividad se ve incrementada de 56.24 %, en naringenina (**VI**), a 75.20 % en aromadendrina (**VII**) con la presencia de un grupo hidroxilo en posición 3. Esta actividad es incrementada a 81.04 % en kaempferol (**VIII**), el cuál tiene un doble enlace en posición 2, indicando que probablemente la planaridad de la molécula es importante en el control de la inflamación. Estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura para actividad de flavonoides.^{37,38}

Por otro lado, la presencia de un grupo hidroxilo en 3' tiene un efecto negativo pues la actividad disminuyó a 42.88 % en taxifolina (**IX**).

En cuanto a los nuevos compuestos **IV** y **V** se puede observar que velatumólida (**IV**) tiene una mayor actividad anti-inflamatoria, con 53.03 % de inhibición del edema, que *epi*-velatumólida (**V**), con 20.36 % de inhibición, lo que nos dice que la estereoquímica juega un papel importante en el control de la respuesta inflamatoria.

El furanoeremofilano velatumina (**X**) no tuvo actividad anti-inflamatoria importante ya que solamente produjo un 10.22 % de inhibición del edema.



10. CONCLUSIONES.

-Del estudio de *P. velatum* se aislaron 3 nuevos metabolitos: dos seco-eremofilanólidas, velatumólida (**IV**) y *epi*-velatumólida (**V**) y un furanoeremofilano polihidroxiado, velatumina (**X**).

-Este es el primer reporte de seco-eremofilanólidas aisladas del género *Pittocaulon*.

-Velatumólida (**IV**) y *epi*-velatumólida presentan (**V**) estructuras novedosas de seco-gamma, gamma-dilactonas.

-La presencia de furanoeremofilanos polihidroxiados es frecuente en las especies de la tribu Senecioneae, pero estos están generalmente esterificados y la presencia del grupo hidroxilo en 2 es poco frecuente. Velatumina (**X**) es el primer metabolito con estas características aislado del género *Pittocaulon*.

- Los compuestos **I**, **II**, **III**, **VI**, **VII**, y **IX** ya habían sido aislados con anterioridad de *P. praecox*.^{11,29}

De los resultados de las pruebas de actividad anti-inflamatoria puede concluirse que::

- Las actividades detectadas de los compuestos nuevos **IV**, **V** y **X** fueron bajas con respecto al compuesto de referencia (indometacina).
- Los flavonoides **VI**, **VII** y **VIII** presentan actividades anti-inflamatorias importantes, que corresponden a las reportadas en la literatura.^{38,39}
- Es probable que la actividad anti-inflamatoria atribuída a esta planta se deba a la presencia de flavonoides.



11. BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Mata, R., Rivero, J. F. Curso teórico de Farmacognosia, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Farmacia, **1998**, 4-6.
- 2.- González, A. G., Ferro, B. E., González, C. M., Luis J. G., Bazzochi, I. L., Dorta R. L. Plantas Iberoamericanas como fuente de moléculas bioactivas, fundación AIETI, 19-27.
- 3.-Martínez M. Las plantas medicinales de México, **1959**, 4ª Ed.,470-471.
- 4.-Marín-Loaiza, J. C., Ávila, J. G., Canales, M., Hernández, T., Céspedes, C. L. Antifungal and antibacterial activities of endemic *Pittocaulon* ssp. from México, *Pharmaceutical Biology*, **2008**, 46, 66-71.
- 5.-Villaseñor, J. L. La familia Asteraceae en México, *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, **1993**,117-124.
- 6.-Barkley, T. M.,Clark, B. L., Funston A.M. The segregate genera of *Senecio sensu lato* and *cacalia sensu lato* (Asteraceae: Senecioneae) in México and central América, *Royal Botanic Gardens*, **1996**, 1, 613-620.
- 7.- Robinson, H., Brettell, R. Studies on the Senecioneae (Asteraceae). I. A new genus, *Pittocaulon*, *Phytologia*, **1973**, 26, 454-453.
- 8.-Olson, M. Wood, bark, and pith anatomy in *Pittocaulon* (Senecio, Asteraceae): Water storage and systematics, *J. of the Torrey Botanical Society*, **2005**, 173-186.
- 9.- Marín-Loaiza, J. C., Ludger, E., Beverle, T., Theuring, C., Céspedes, C. L., Hartmann, T. Pirrolizidine alkaloids of the endemic Mexican genus *Pittocaulon* and assignment of the stereoisomeric 1,2-saturated necine bases, *Phytochemistry*, **2008**, 69, 147-167.
- 10.- Ortega, A., Romero, M., Díaz, E. Furanoeremofilanos del *Senecio Praecox*, *Rev. Latinoamer. Quím.*, **1975**, 6, 136-142.
- 11.-Arciniegas, A., Pérez-Castorena A. L., Gastélum E., Villaseñor, J. L., Romo de Vivar, A. Eremofilane derivatives from *Pittocaulon Praecox*, *Heterocycles*, **2009**, 78,1253-1263.
- 12.-Maldonado, .J. I., Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A. L., Villaseñor, J. L.,



- Romo de Vivar, A. Furanoeremophilanes and other constituents of *Pittocaulon Bombycopholne*, *Heterocycles*, **2008**, 75, 3035-3042.
- 13.-Roeder, E. Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids, *Pharmazie*, **1995**, 50, 83-95.
- 14.-Romo de Vivar, A., Pérez-Castorena, A. L., Arciengas, A., Villaseñor, J. L. Secondary Metabolites from Mexican Species of the Tribe Senecioneae (Asteraceae), *J. Mex. Chem. Soc.*, **2007**, 51, 160-172.
- 15.-Asano, N., Nash, R. J., Molineax, R. J., Flete, W. J. Tetrahedron Asymmetric, **2000**, 11, 1645-1680.
- 16.- Kedrowski, B. L., Hoppe R.W., A concise Synthesis of (±)-Cacalol, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 5177-5179.
- 17.- Casares, A., Maldonado, L. A. The structure of cacalone, *Tetrahedron Letters*, **(1976)**, (29), 2485-2488.
- 18.-Pérez-Castorena, A. L., Arciniegas, A., Hernández, M. L., Toscano, R. A., Contreras J. L., Romo de Vivar, A. 8,9-Seco-eremophilanolides from *Roldana ehrenbergiana*, *J. Mex. Chem. Soc.*, **2006**, 50, 157-159.
- 19.- Torres, P., Chinchilla, R., Asensi, M. C., Grande, M. Furanoeremophilanes from *Senecio linifolius*, *Phytochemistry*, **(1989)** 3093-3095.
- 20.- Reina, M., González-Coloma, A., Gutiérrez, C., Cabrera, R., Rodríguez, M. L., Fajardo, V., Villarreal, L., Defensive Chemistry of *Senecio miser*, *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64, 6-11.
- 21.- Isman, M. B., Brard, N., Nawrot, J., Harmatha, J. Antifeedant and growth inhibitory effects of bakkenolide-A and other sesquiterpene lactones on the variegated cutworm, *Peridroma saucia* Hübner (Lep., Noctuidae), *J. Appl. Ent.*, **1989**, 107, 524-529.
- 22.-Wun-Chang, K., Chien-Bang L., Yun-Lian L., Chieh-Fu, C. Mechanisms of relaxant action of S- petasin and S-isopetasin, sesquiterpenes of *Petasites formosanus*, in isolated guinea pig trachea, *Planta Médica*, **2001**, 67, 224-229.
- 23.- Anaya, A. L., Hernandez-Bautista, B. E.; Torres-Barragan, A., Leon-Cantero, J., Jimenez-Estrada, M. Phytotoxicity of cacalol and some derivatives obtained from the roots of *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob. & Brettell



- (Asteraceae), Matarique or Maturin, *Journal of Chemical Ecology*, **1996**, 22, 393-403.
- 24.- Jimenez E. M., Lozano R., Valdes M. J., Leon C.J., Alarcon, G., Sveshtarova P. B. Antimicrobial activity of cacalol and its derivatives, *Rev. Latinoamer. Quím*, **1992**, 23, 14-17.
- 25.- Inman, W. D., Luo J., Jolad, S. D., King, S. R., Cooper, R. Antihyperglycemic Sesquiterpenes from *Psacalium decompositum*, *J. Nat. Products*, **1999**, 62, 1088-1092.
- 26.- Harborne, J. B. The Handbook of Natural Flavonoids, John Wiley and sons, 1,7-13.
- 27.-Grotewoly, E. The science of Flavonoids, Editorial Springer, E.U., **2006**.
- 28- Solomons, T. M., Fryhle C. B. Organic Chemistry, 9th Edition, **2007**, 364-415.
- 29.-Bohlmann, F., Zdero, C. Neue Furanoeremophilane aus mexikanischen Senecio-Arten, *Chem. Ber.*, **1976**,109, 819-825.
- 30.- Villaroel, L., Torres, R. 9-oxo-10 α H-furanoeremophilanes from *Senecio chilensis* and *Senecio Putagonicus*, *J. Nat. Products*, **1991**, 2, 588-590.
- 31.- Wang, Y., Yuang, C., Han, Y., Jia, Z. Sesqiterpenes from rotos of *Lingularia vertchiana*, *Pharmazie*, **2003**, 58, 349-352.
- 32.- Shen, C., Chang Y., Kang, L., Nuclear magnetic resonance studies of 5, 7-Dihydroxiflavonoides, *Phytoqhemistry*, **1993**, 843-845.
- 33.-Takahashi, H., Shaoshun, L., Harigaya, Y., Onda M. Heterocycles. XXII.Stereoselective Synthesis of (+)-Aromadendrin Trimethyl Ether and Its Enantiomer, and Their Reduction, *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, 36 , 1877-1881.
- 34.-Markham, K. R., Stanley, R., Geiger, H., Mabry, T. J. Carbon-13 NMR studies of flavonodis-III, *Tetrahedrom*, **1997**, 34, 1389-1397.
- 35.- Shen, C., Chang, Y. S., Kang, L. Nuclear Magnetic Resonance studies of 5,7-dihydroxyflavonoids, *Phytochemistry*, **1993**, 34, 843-845.
- 36.- Payá, M., Ferrándiz, M. L., Erradi, F, Terencio, M. C., Kijjoa, A., Pinto, M., Alcaraz, M.J., Inhibition of inflammatory responses by a series of novel dolabrane derivatives. *European Journal of Pharmacology*, **1996**, 312, 97-105.



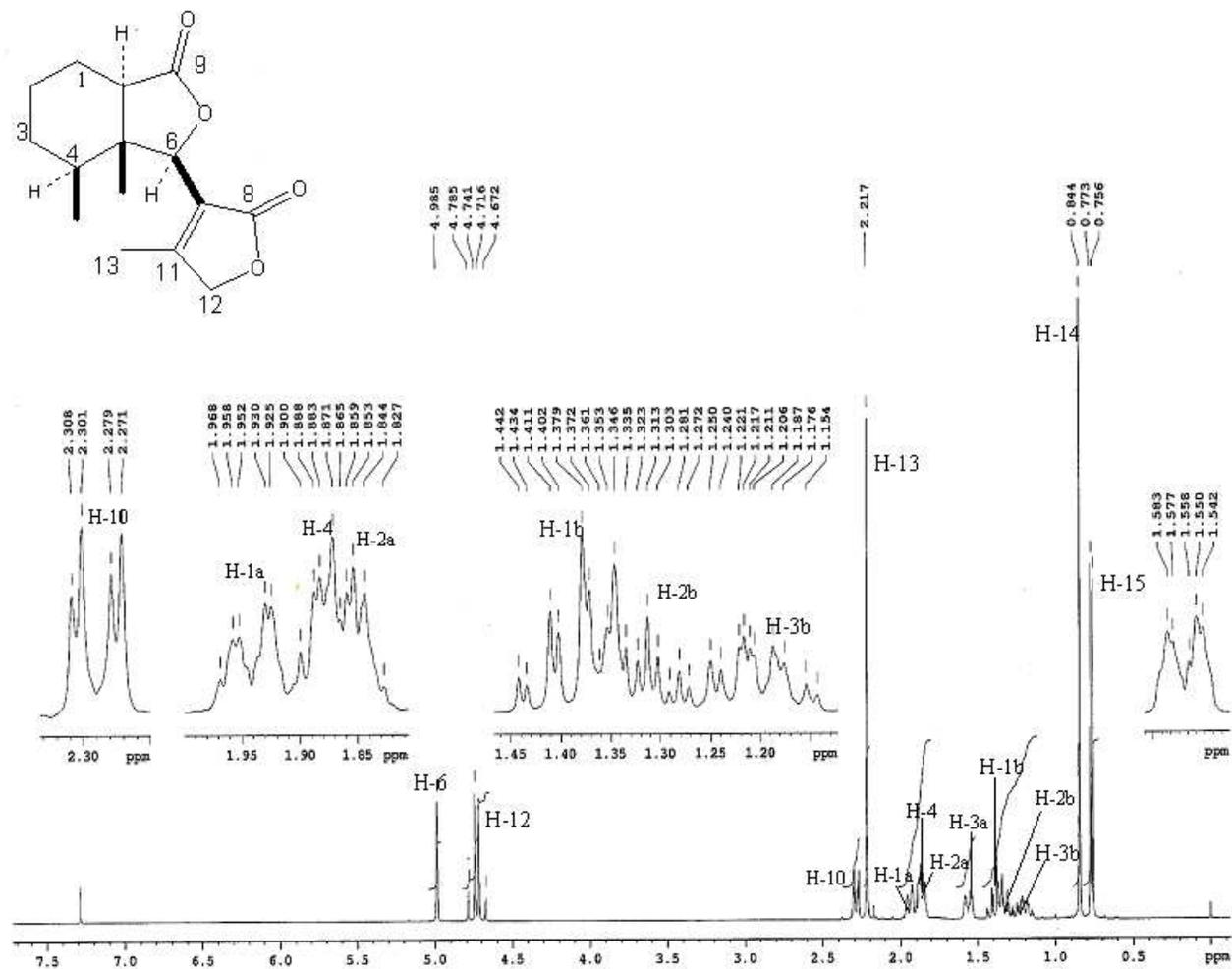
37- Hendricson, J. B. Stereochemical implications in sesquiterpene biogenesis
Tetrahedron, **1959**, 7, 82-89.

38-.Soberon, J. R., Sgariglia, H., Sampiefro, D. A., Quiroga, E. N., Vattone M., A.
Free radical scavenging activities on inflammatory enzymes of phenolics isolated
from *Tripodanthus acutifolius*, *Journal of Ethnopharmacology*, **2010**, 2,329-333.

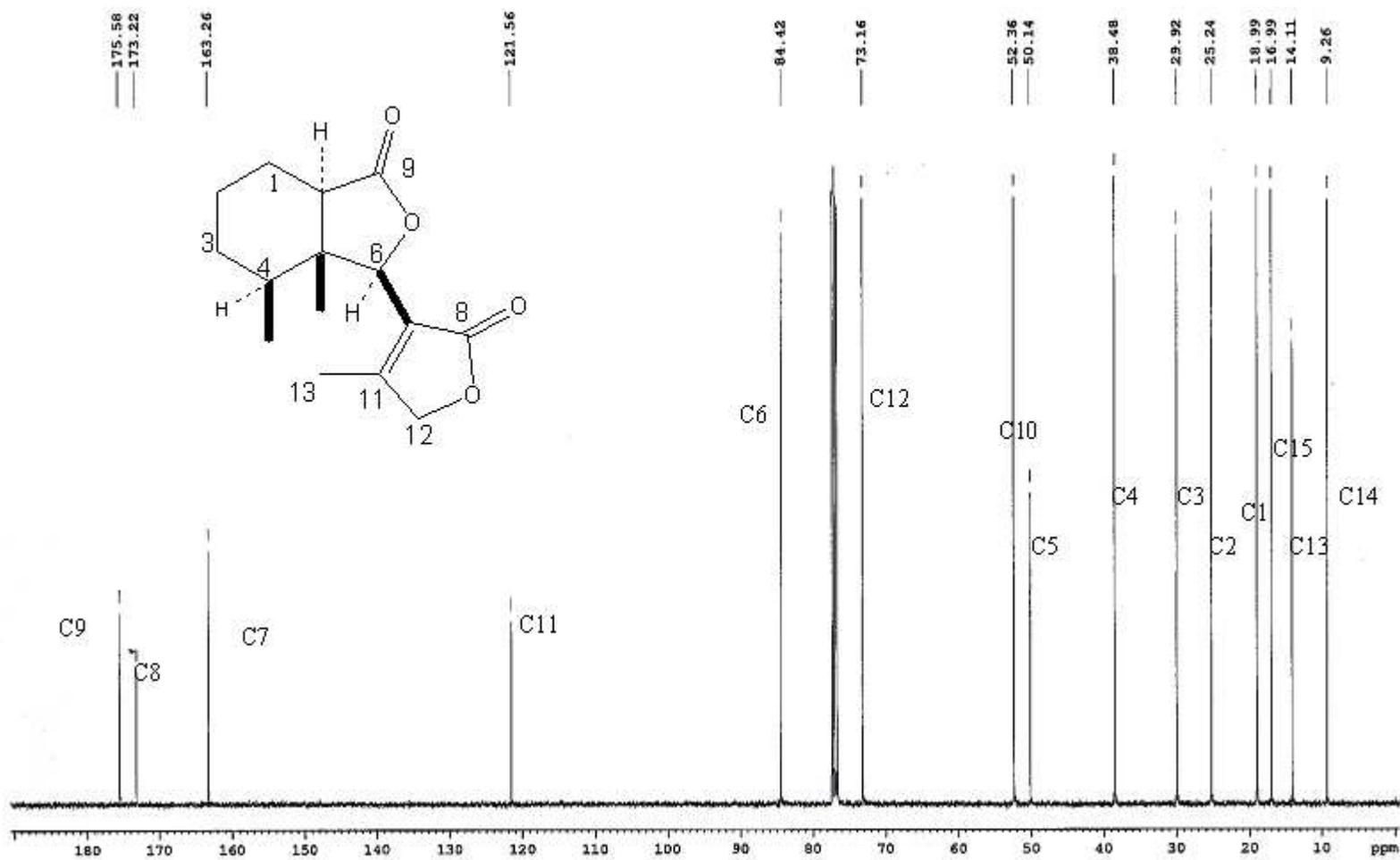
39.-Mueller, M., Hobifer, S., Junghaber, A. Anti-inflammatory activity of extracts from
fruits, herbs and species, *Food Chemistry*, **2010**, 4, 987-996.



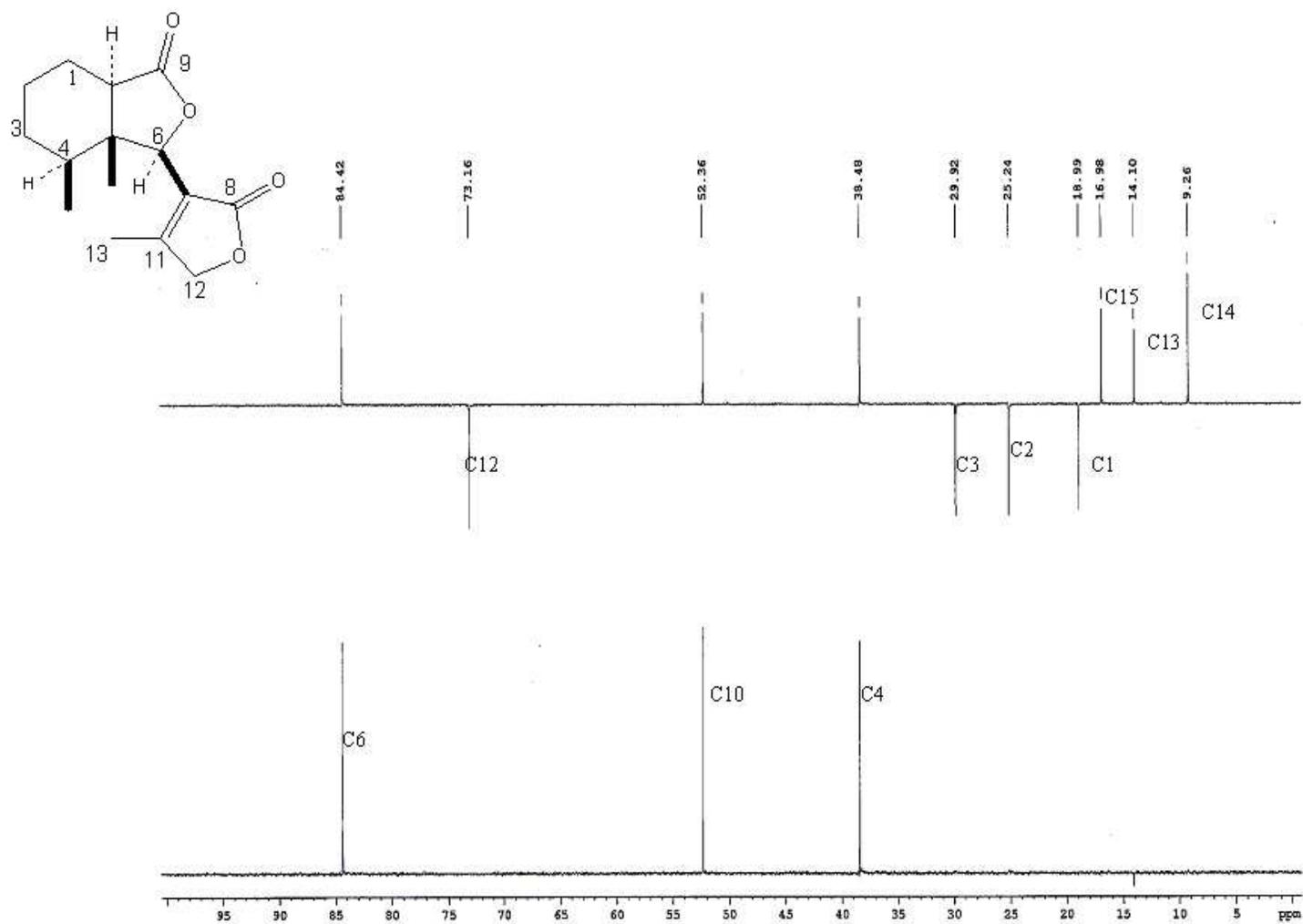
APÉNDICE



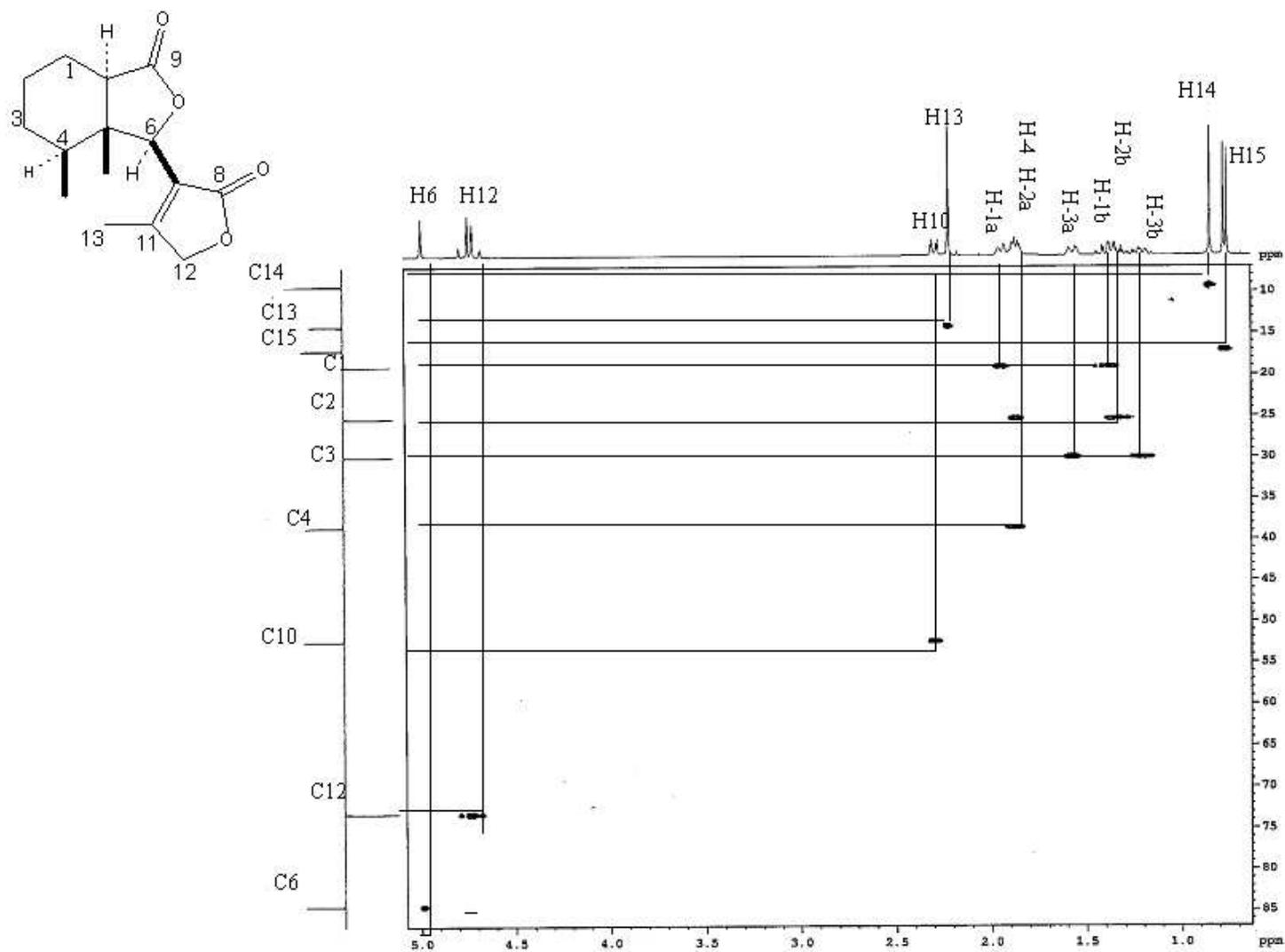
Espectro 1.1: RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de velatumólida (IV)



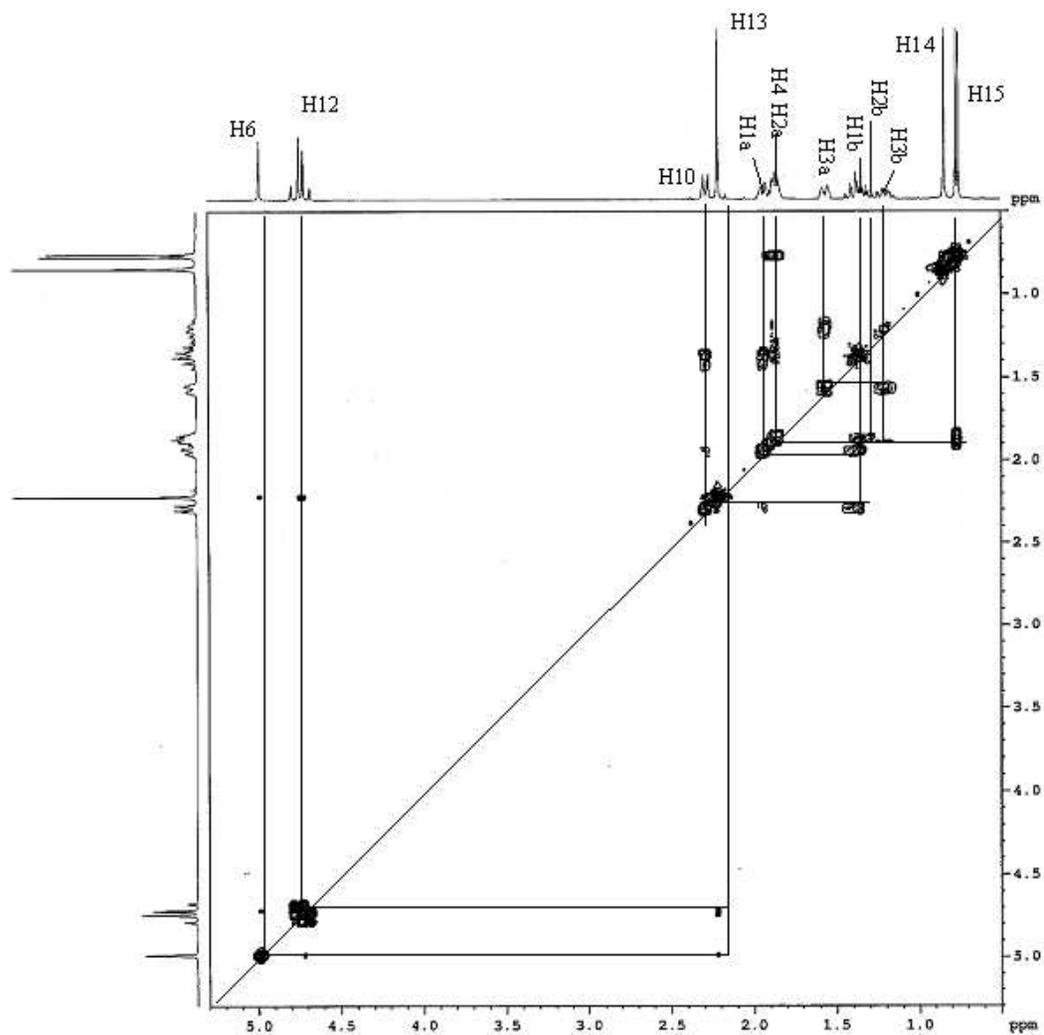
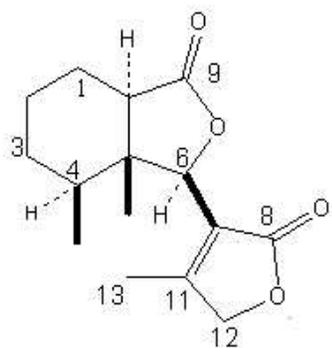
Espectro 1.2: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) de velatumólida (IV)



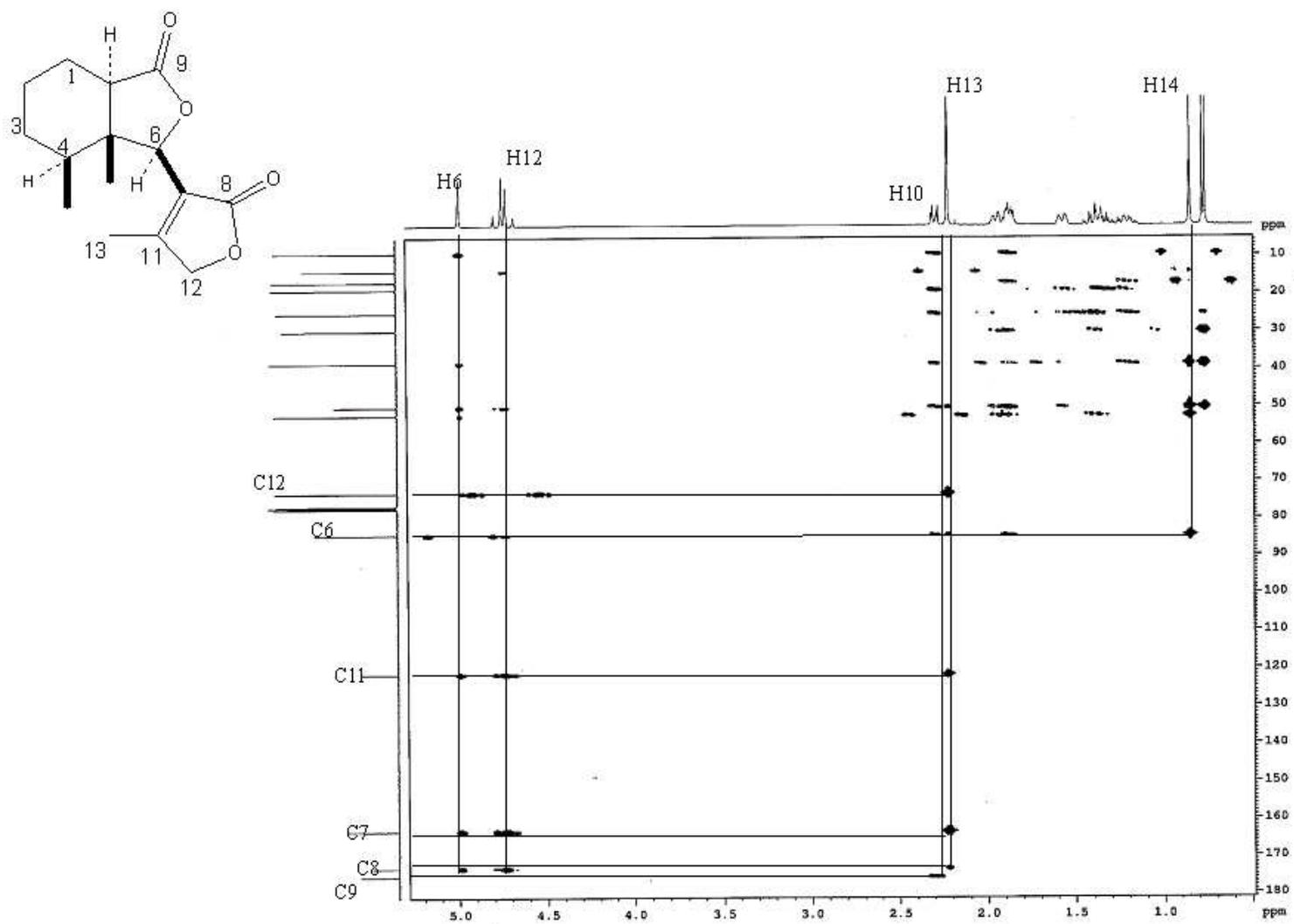
Espectro 1.3: DEPT (CDCl₃, 400 MHz) de velatumólida (IV)



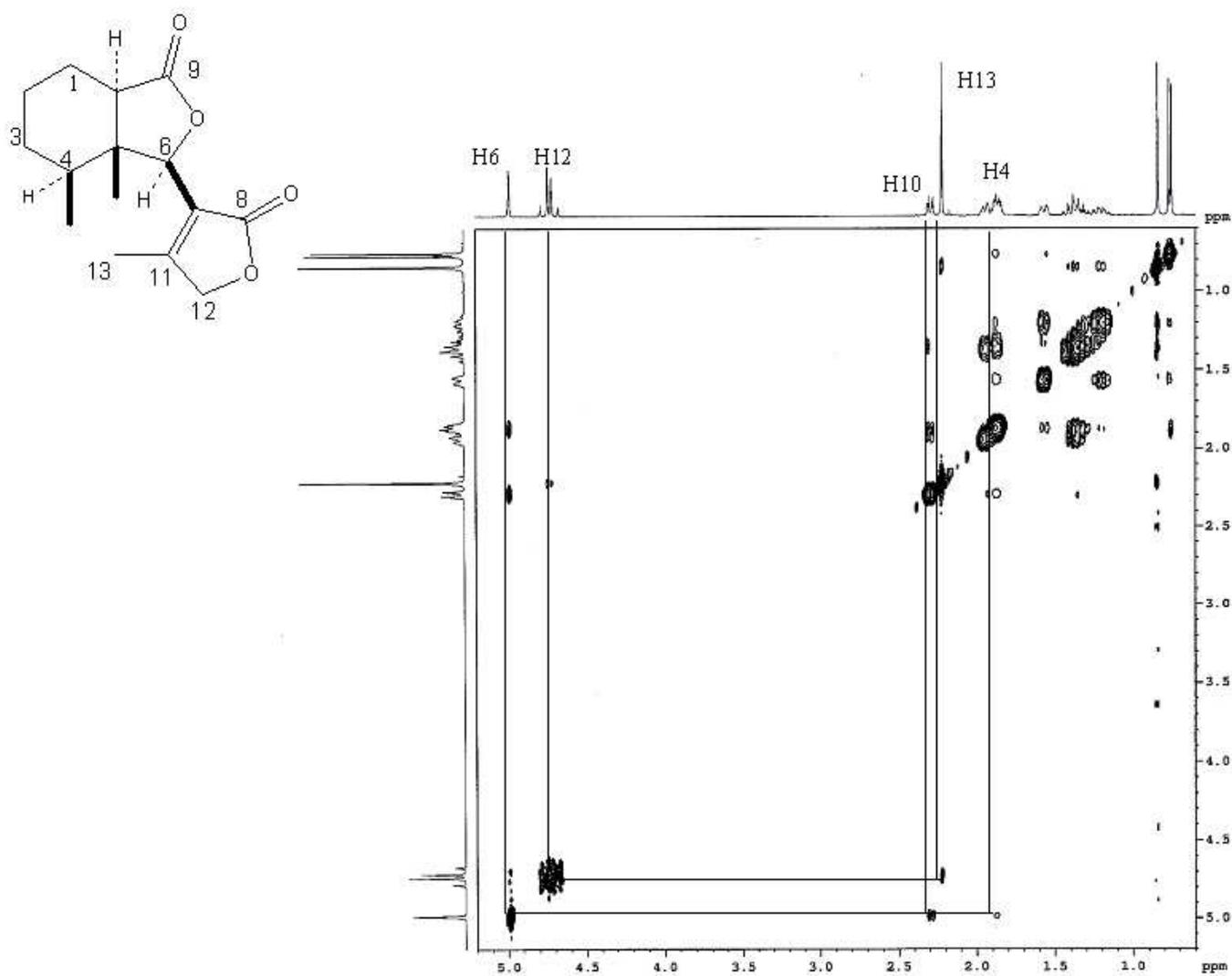
Espectro 1.4: HSQC (CDCl₃, 400 MHz) de velatumólida (IV)



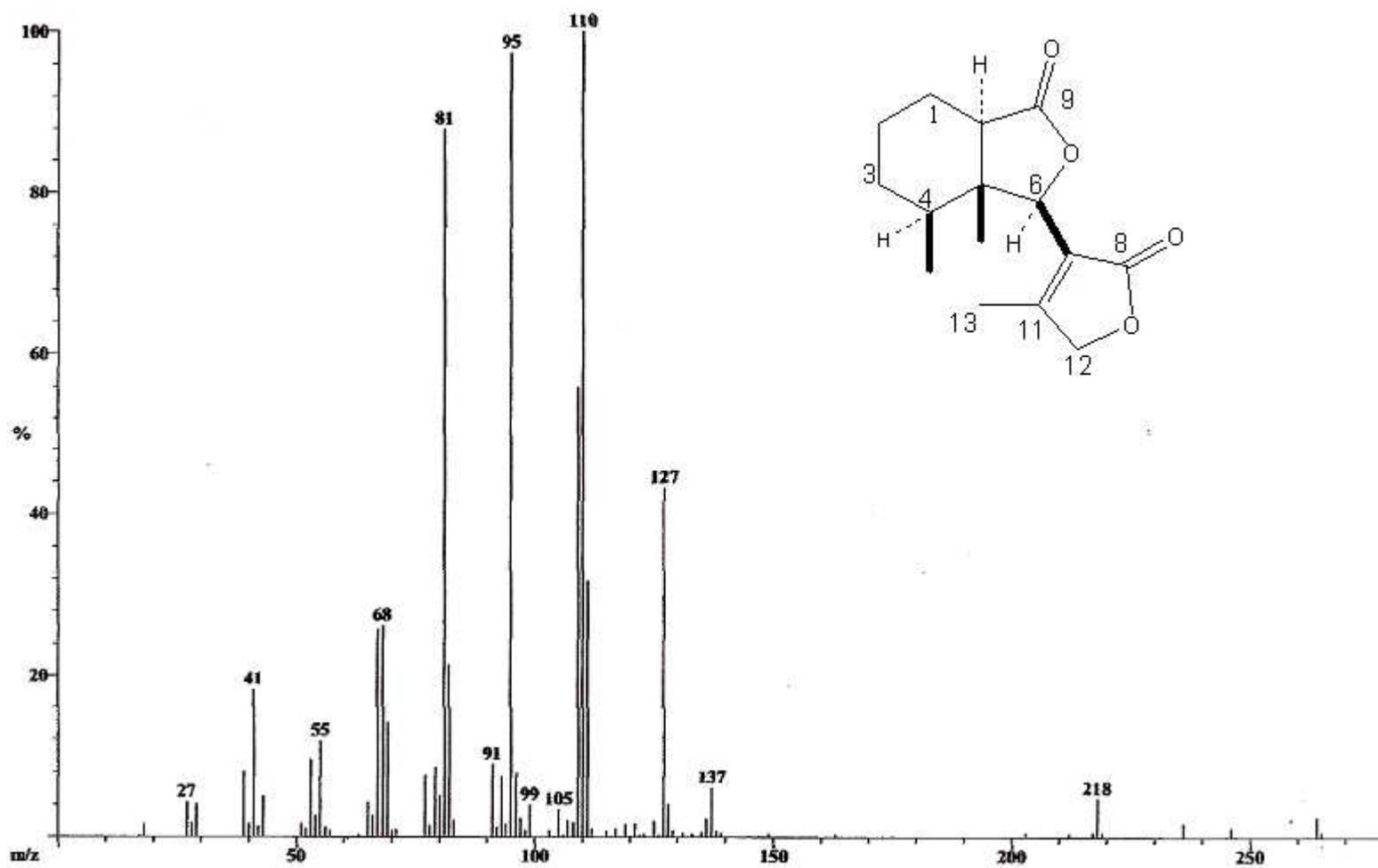
Espectro 1.5: COSY (CDCl_3 , 400 MHz) de velatumólida (IV)



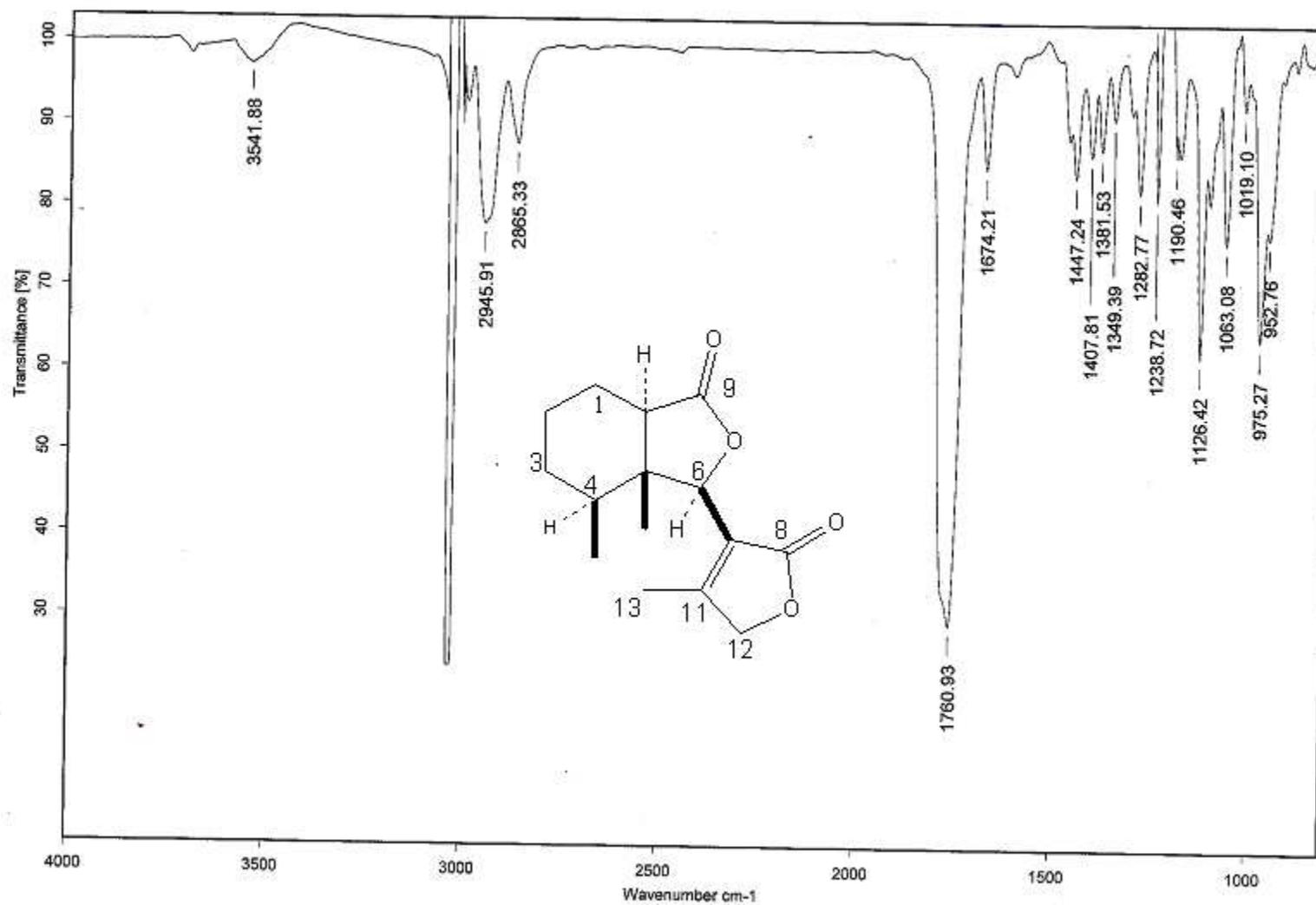
Espectro 1.6: HMBC (CDCl₃, 400 MHz) de velatumólida (IV)



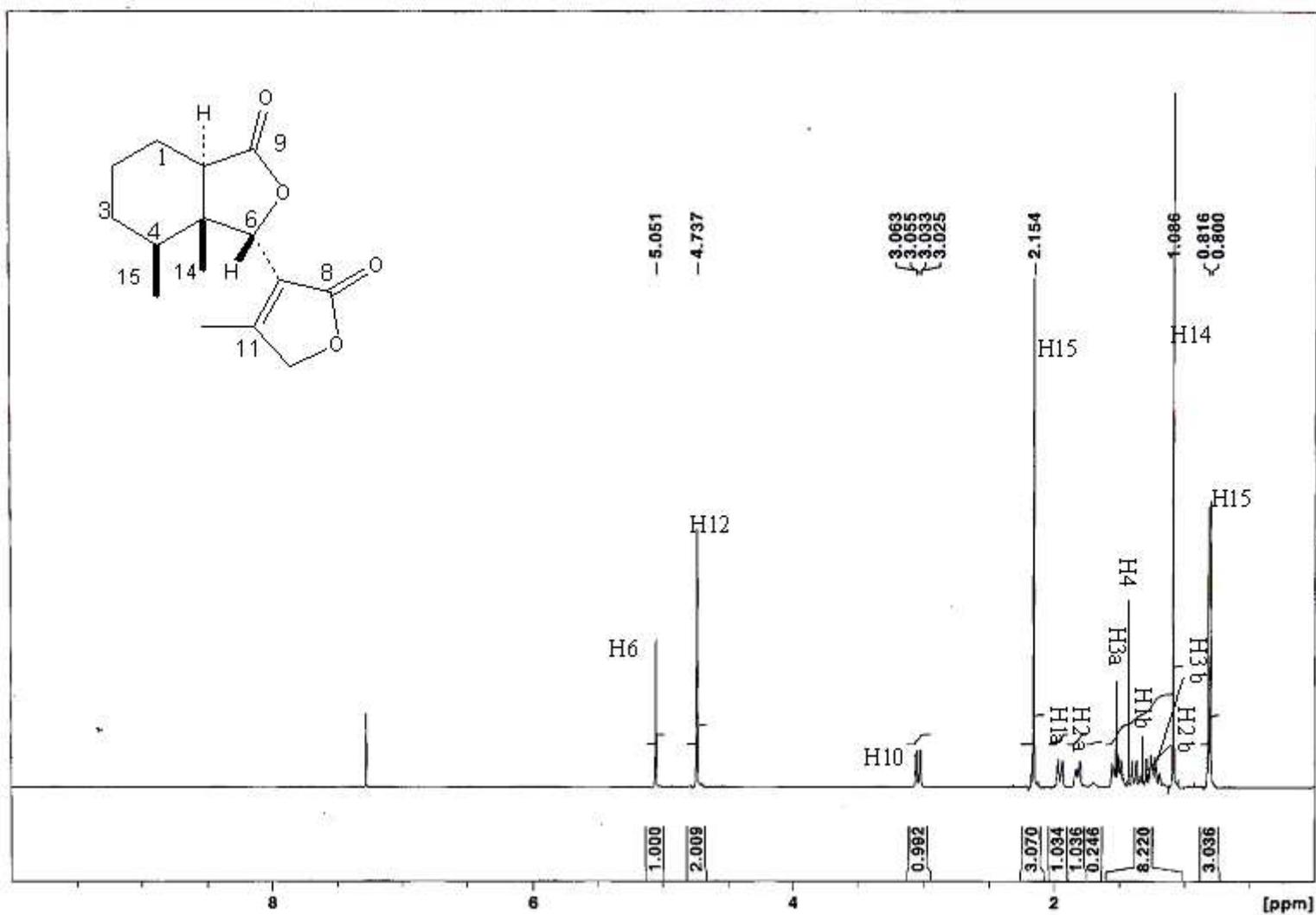
Espectro 1.7: NOESY (CDCl₃, 400 MHz) de velatumólida (IV)



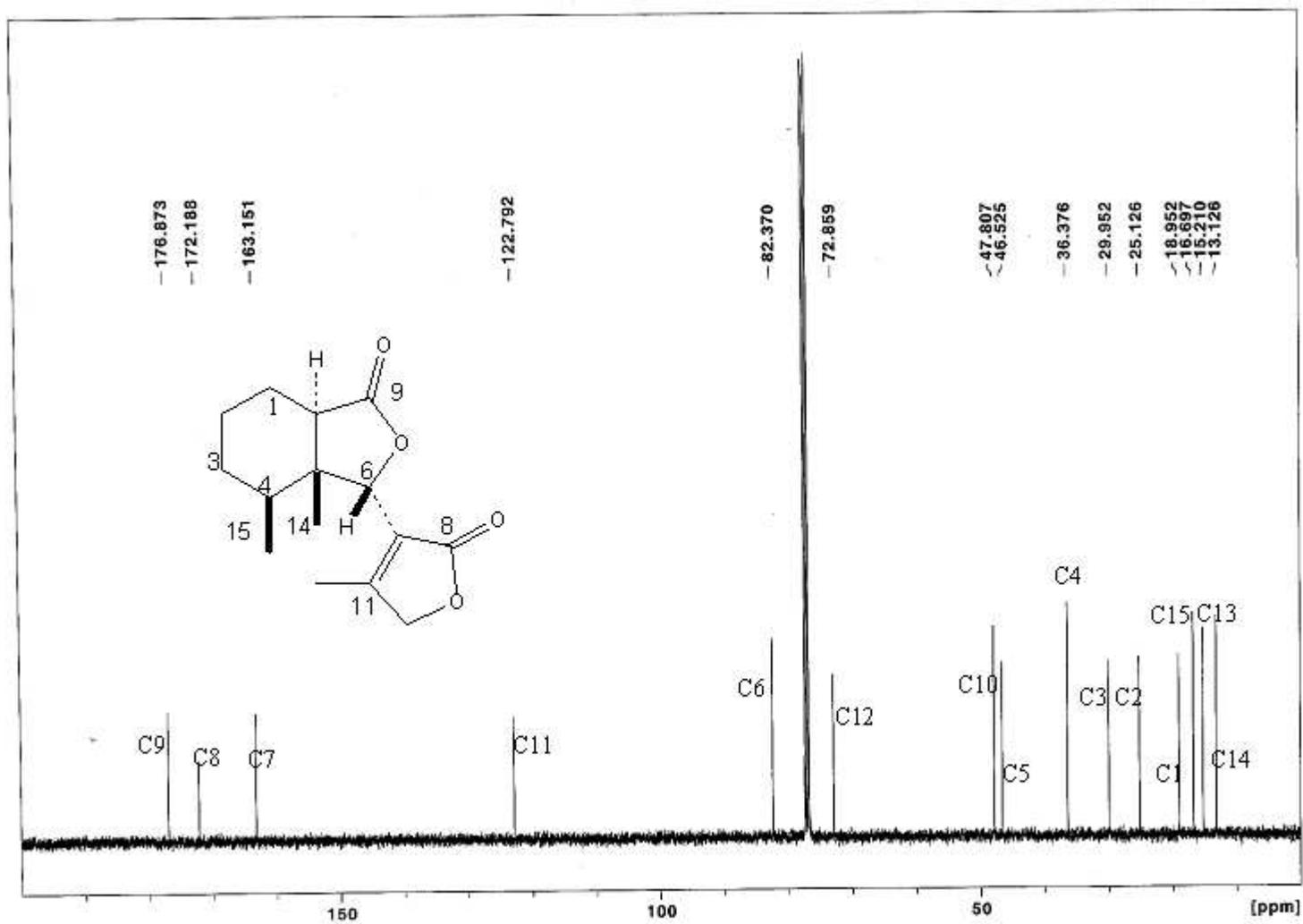
Espectro 1.8: Masas IE de velatumólida (IV)



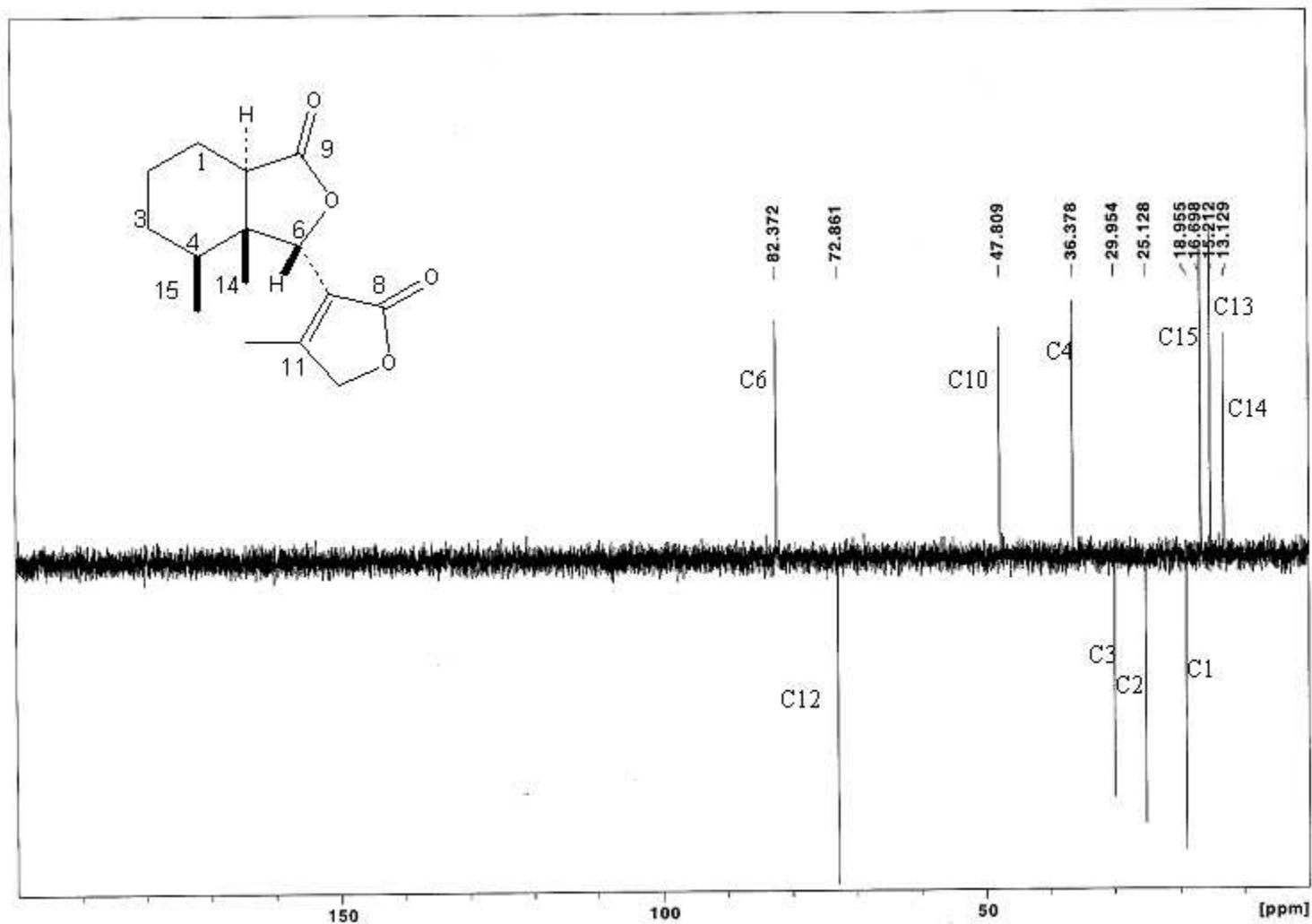
Espectro 1.9: IR (CHCl₃) de velatumólida (IV)



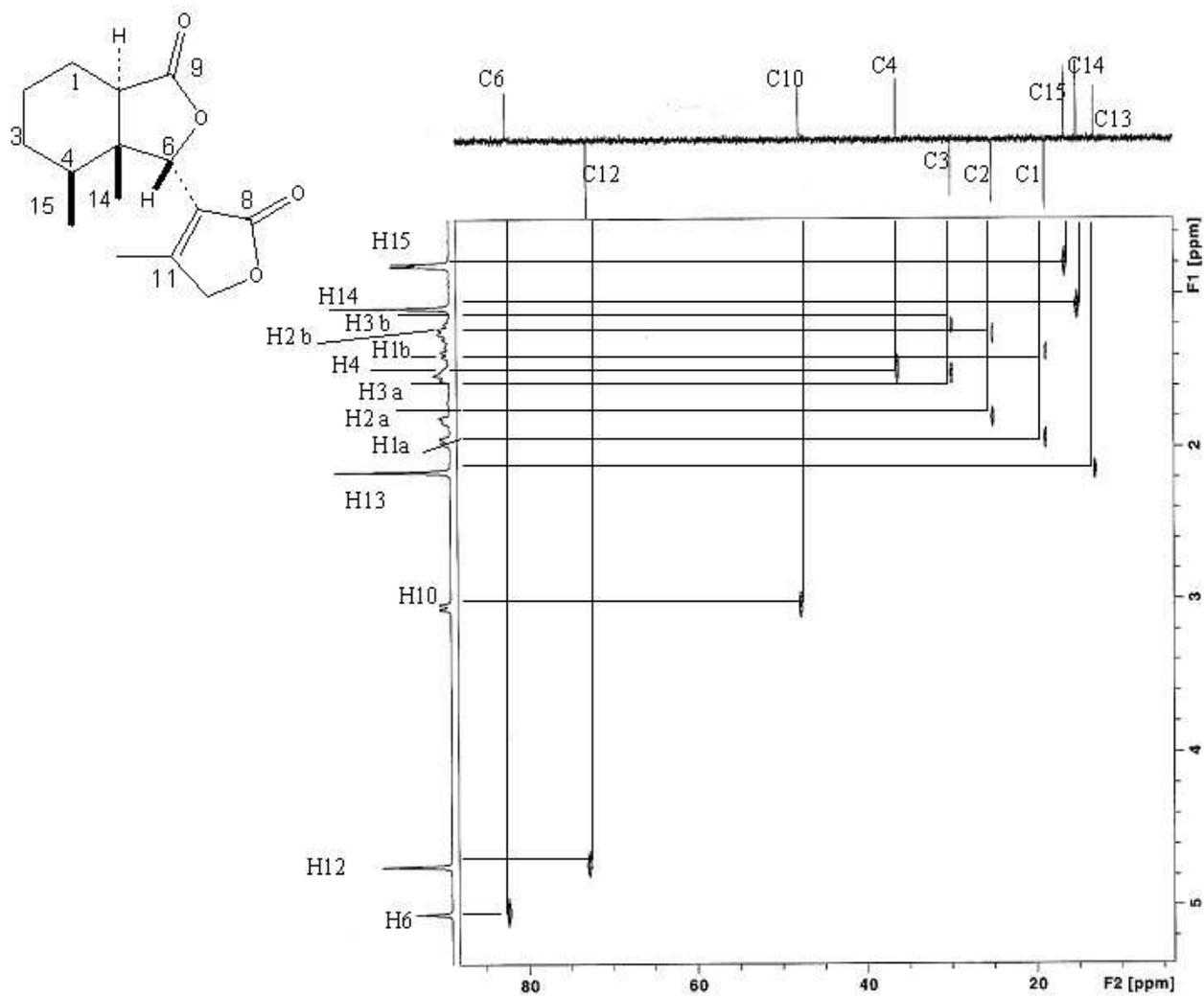
Espectro 2.1: RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de *epi*-velatumólida (V)



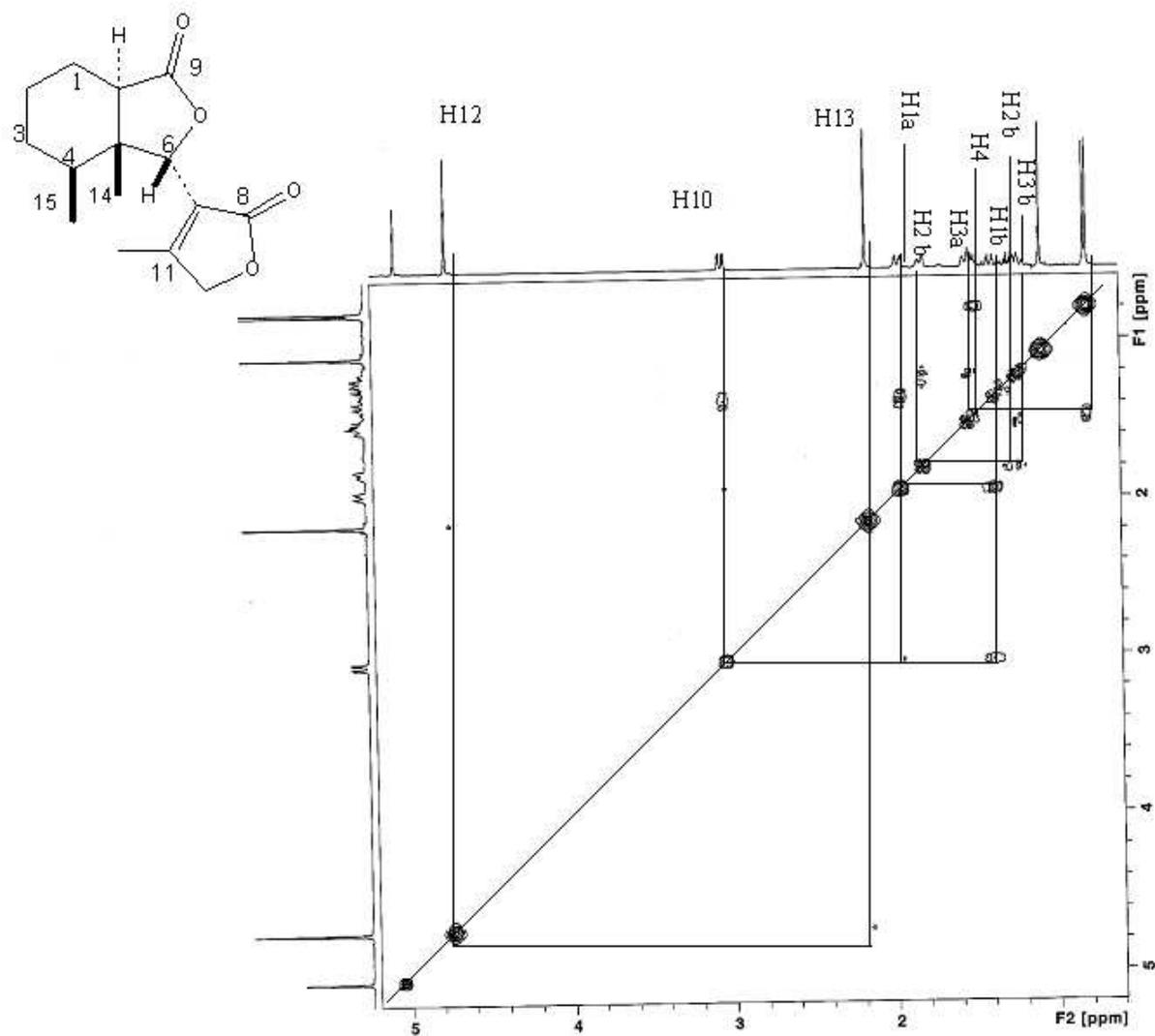
Espectro 2.2: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) de *epi*-velatumólida (V)



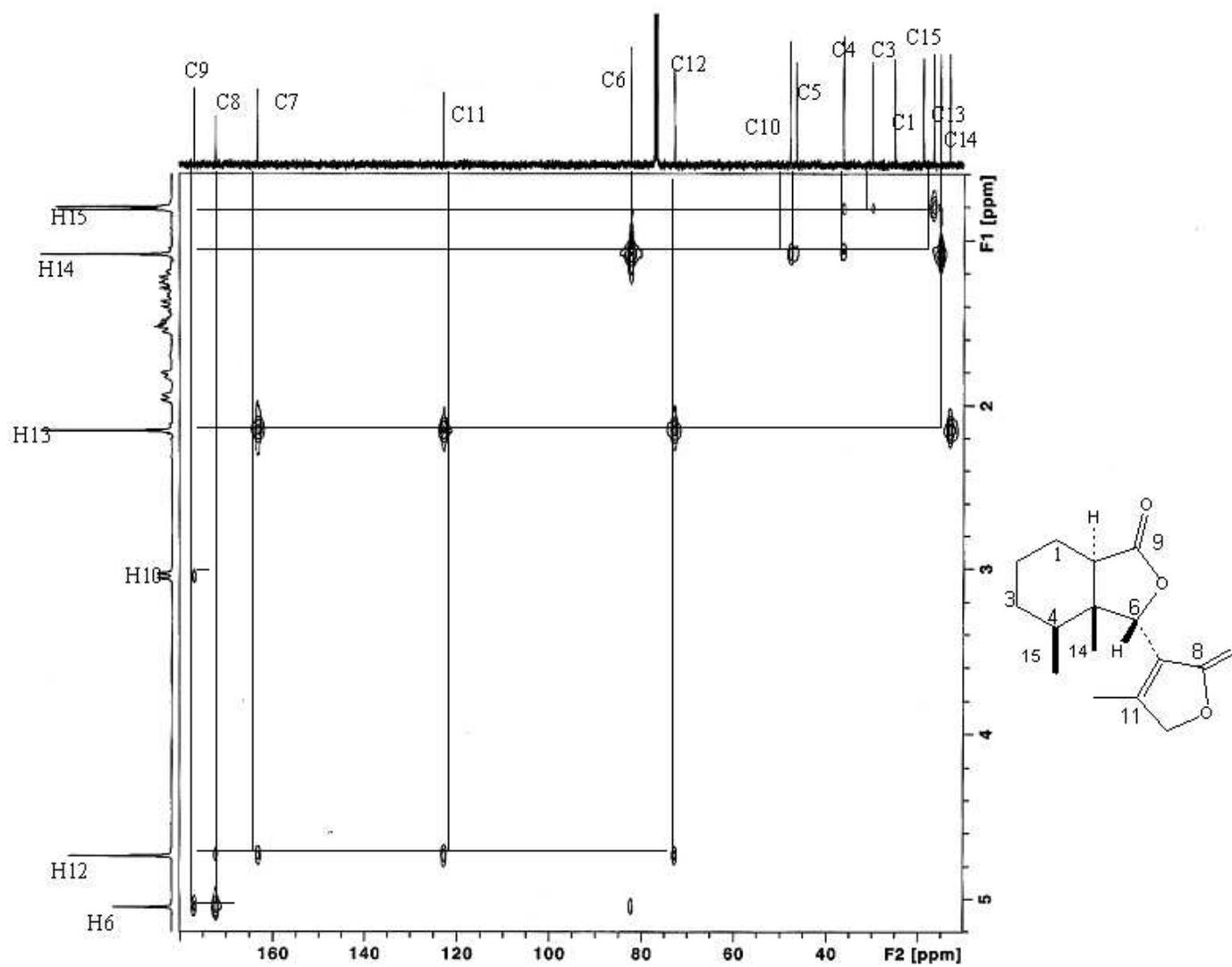
Espectro 2.3: DEPT (CDCl₃, 400 MHz) de *epi*-velatumólida (V)



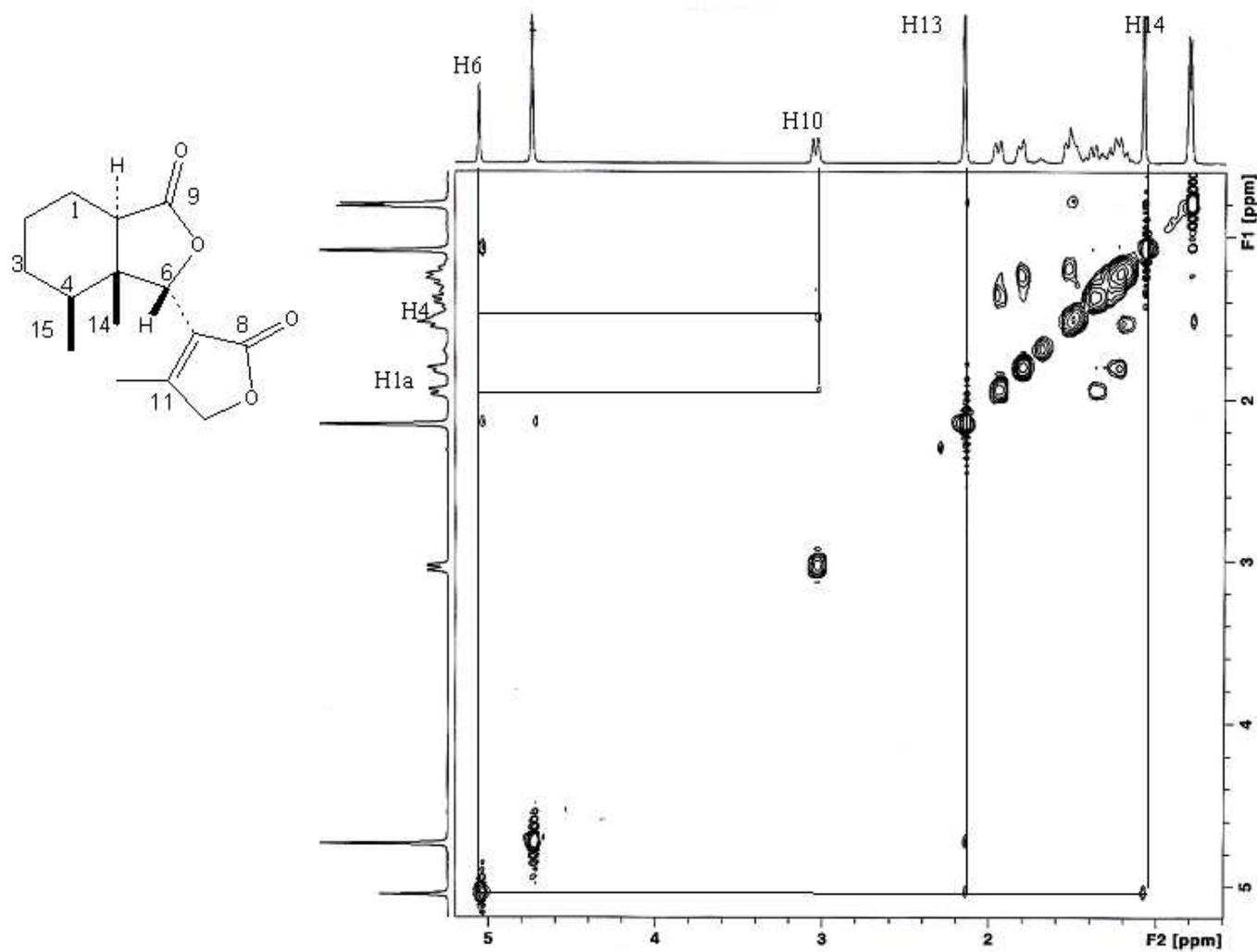
Espectro 2.4: HSQC (CDCl₃, 400 MHz) de *epi-velatumólida* (V)



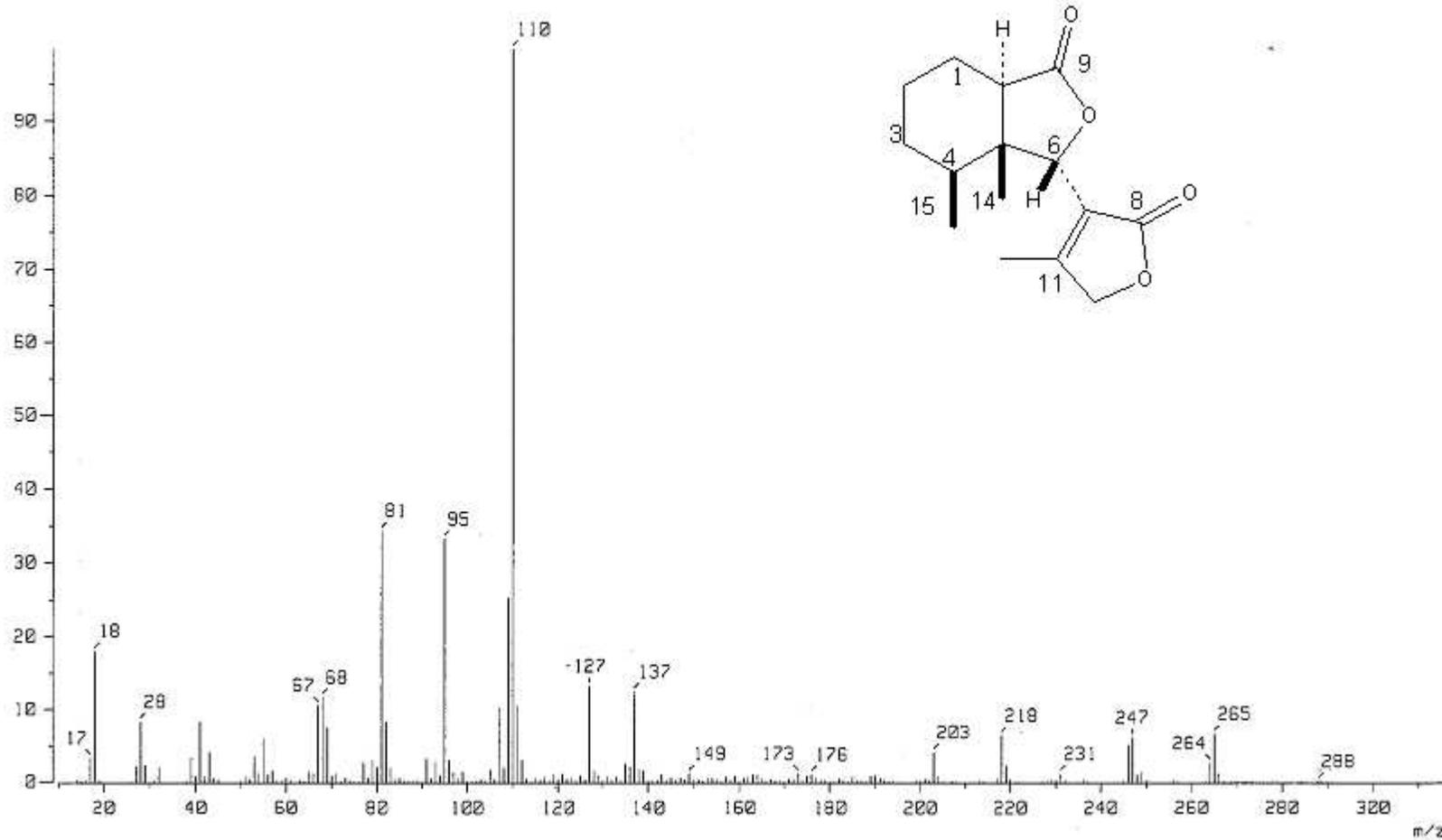
Espectro 2.5: COSY (CDCl₃, 400 MHz) de *epi*-velatumólida (V)



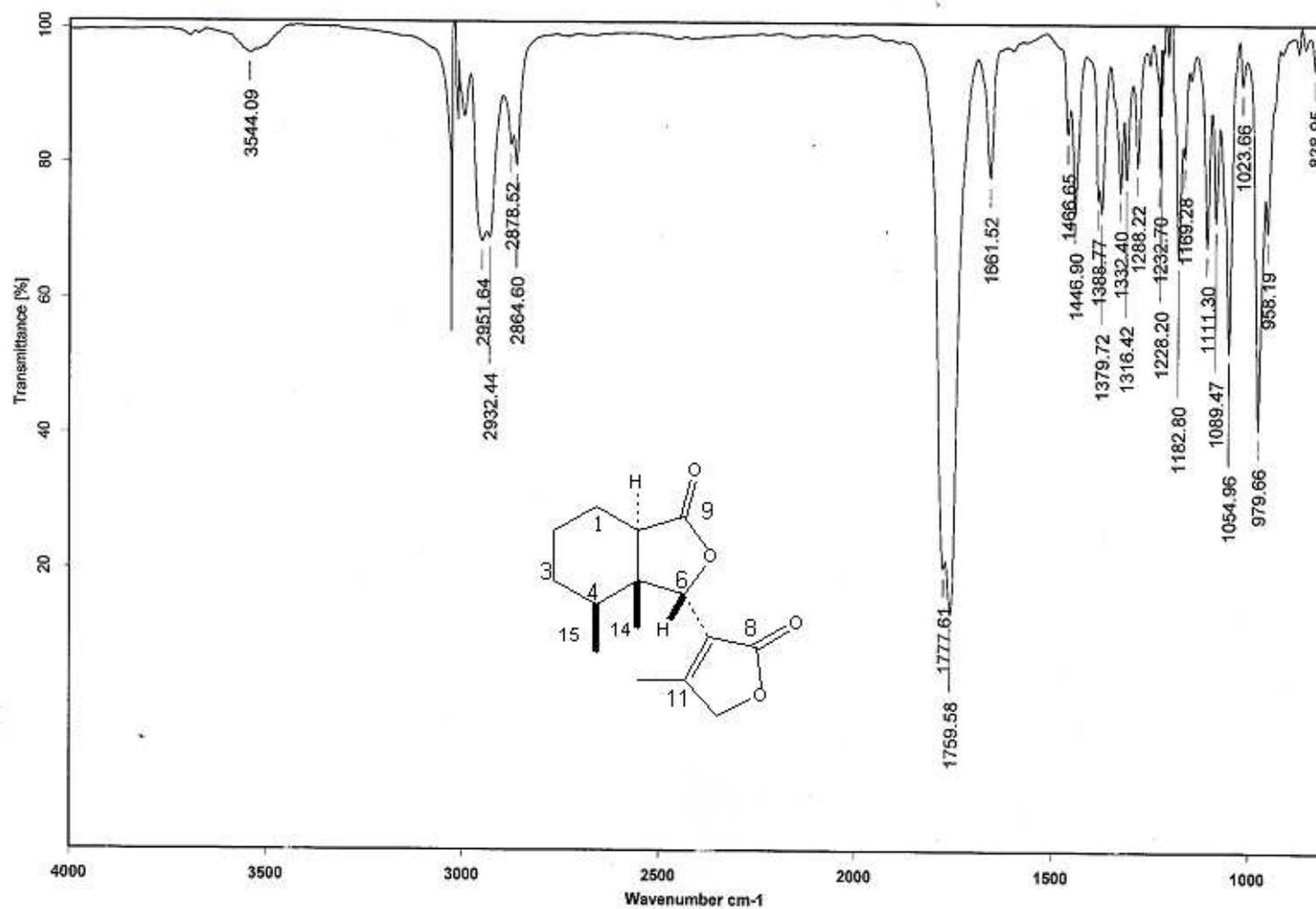
Espectro 2.6: HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) de *epi*-velatumólida (V)



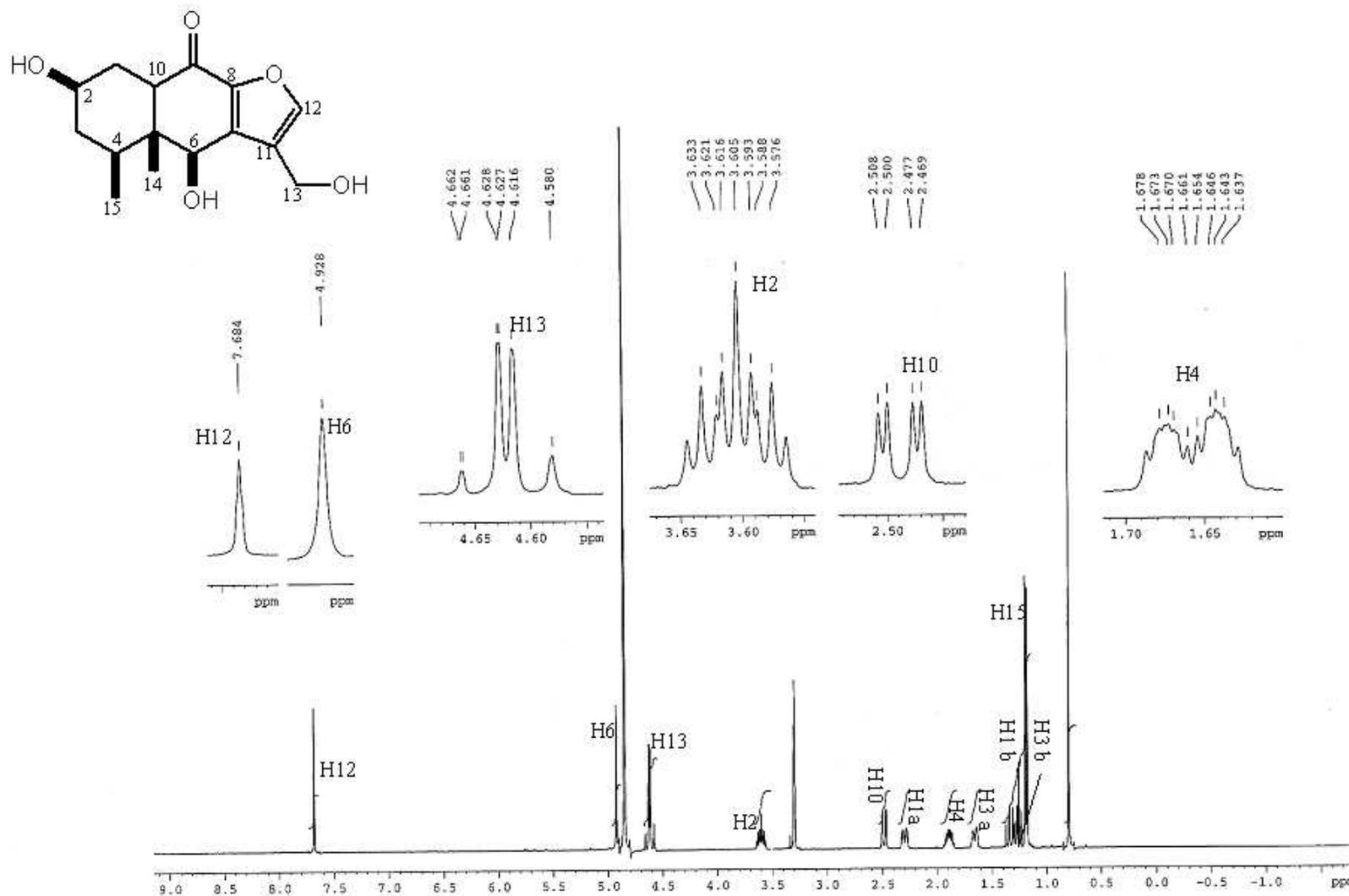
Espectro 2.7: NOESY (CDCl₃, 400 MHz) de *epi*-velatumólida (V)



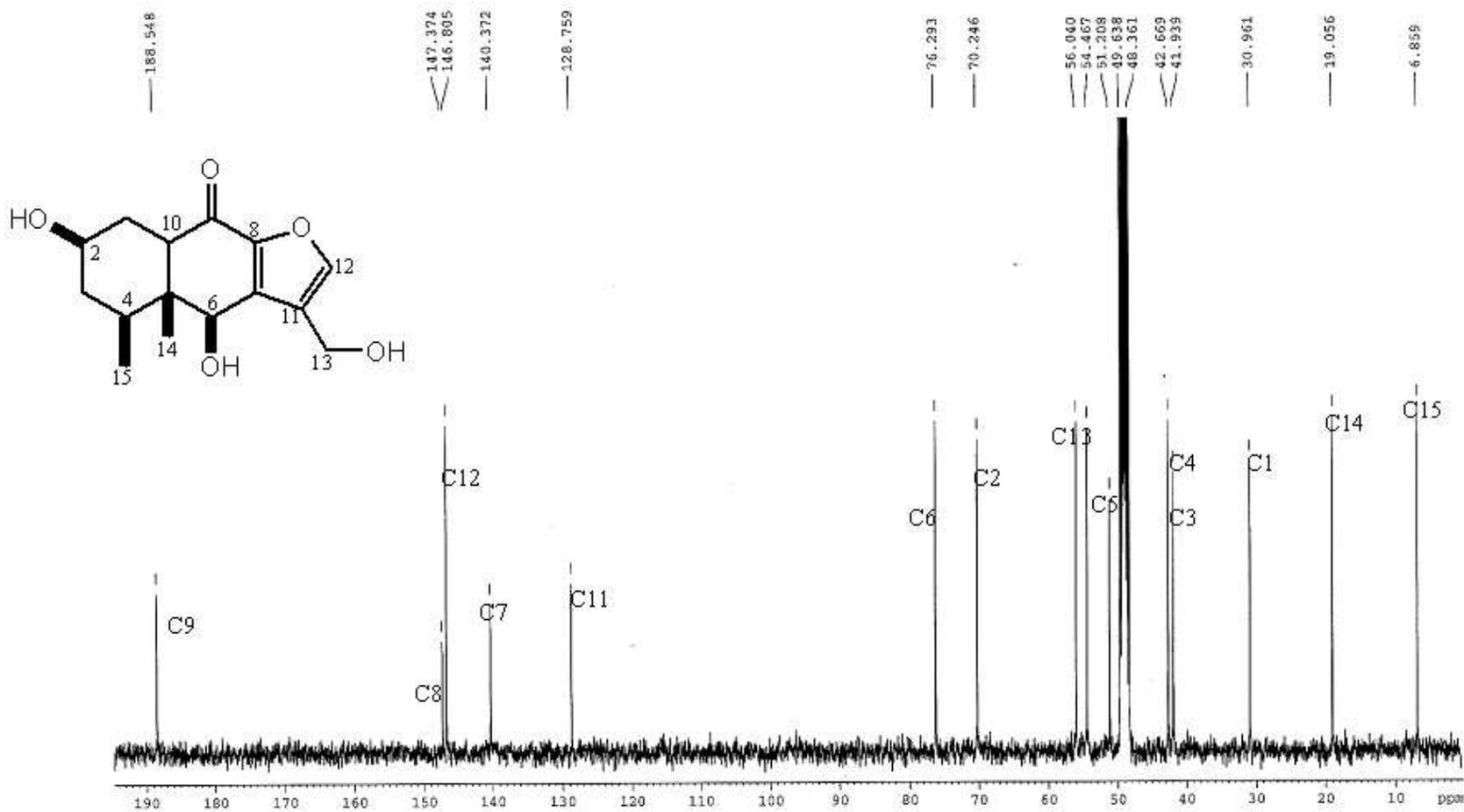
Espectro 2.8: Masas IE de *epi*-velatumólida (V)



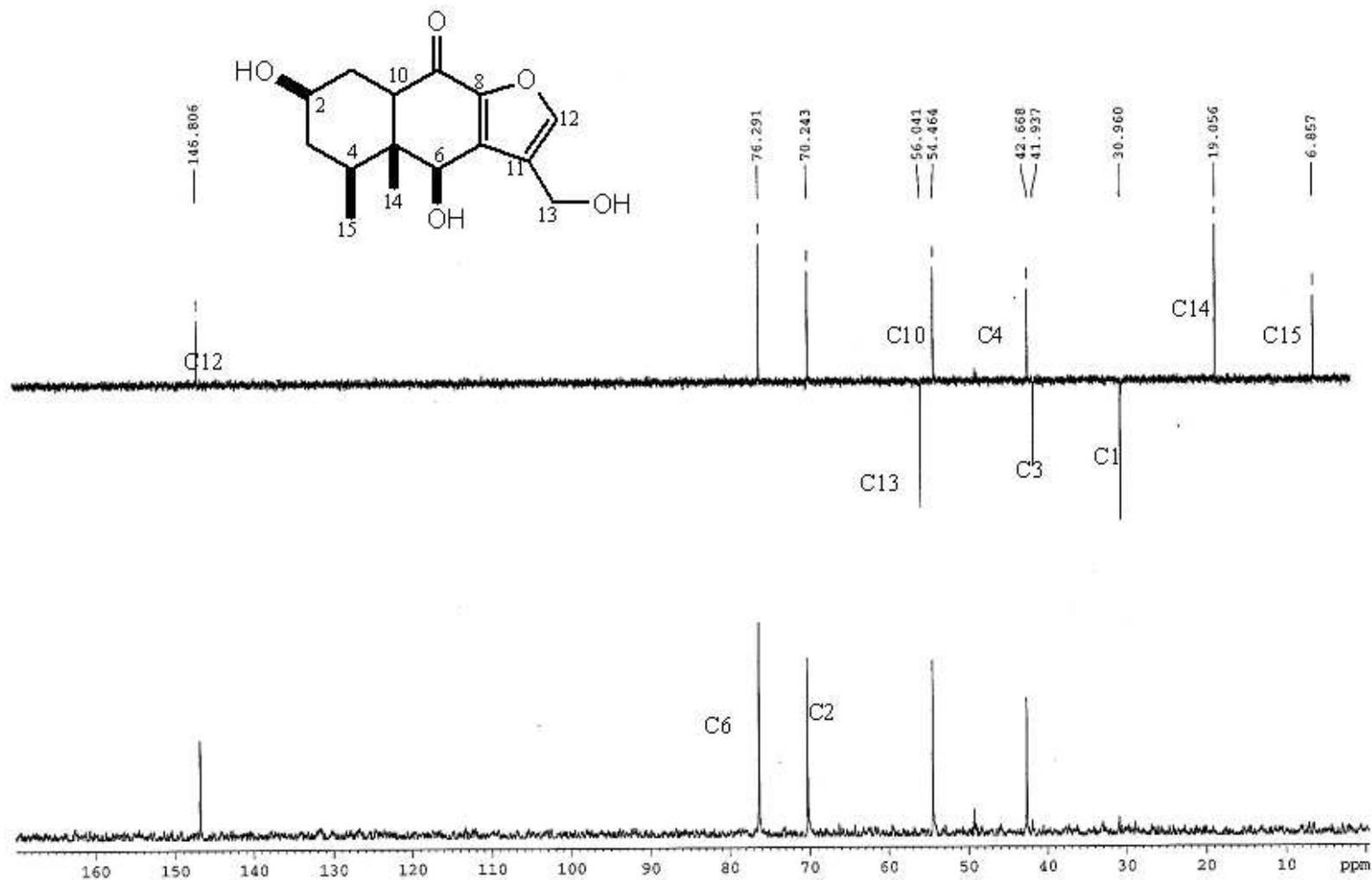
Espectro 2.9: IR (CHCl₃) de *epi*-velatumólida (V)



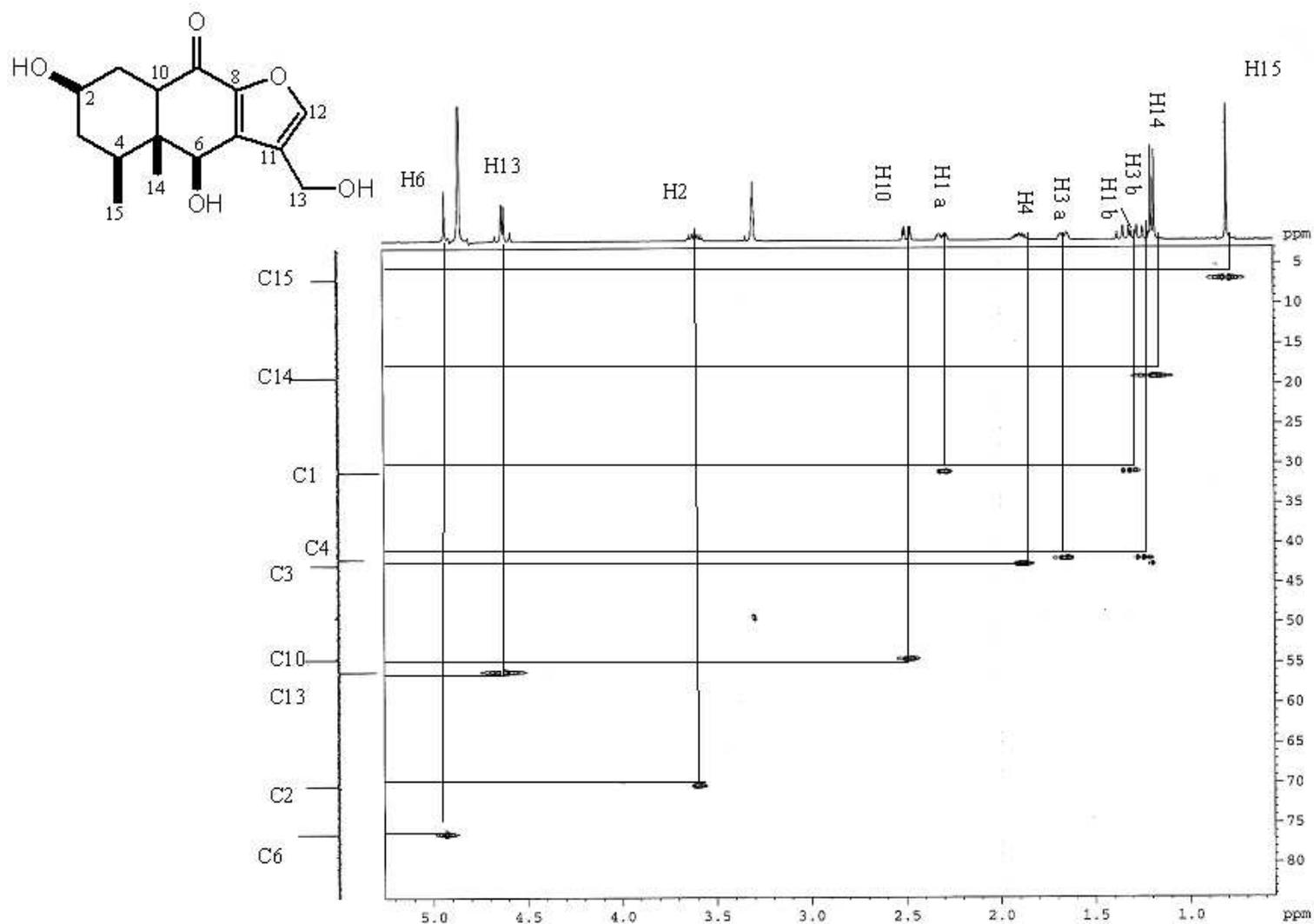
Espectro 3.1: RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) de velatumina (X)



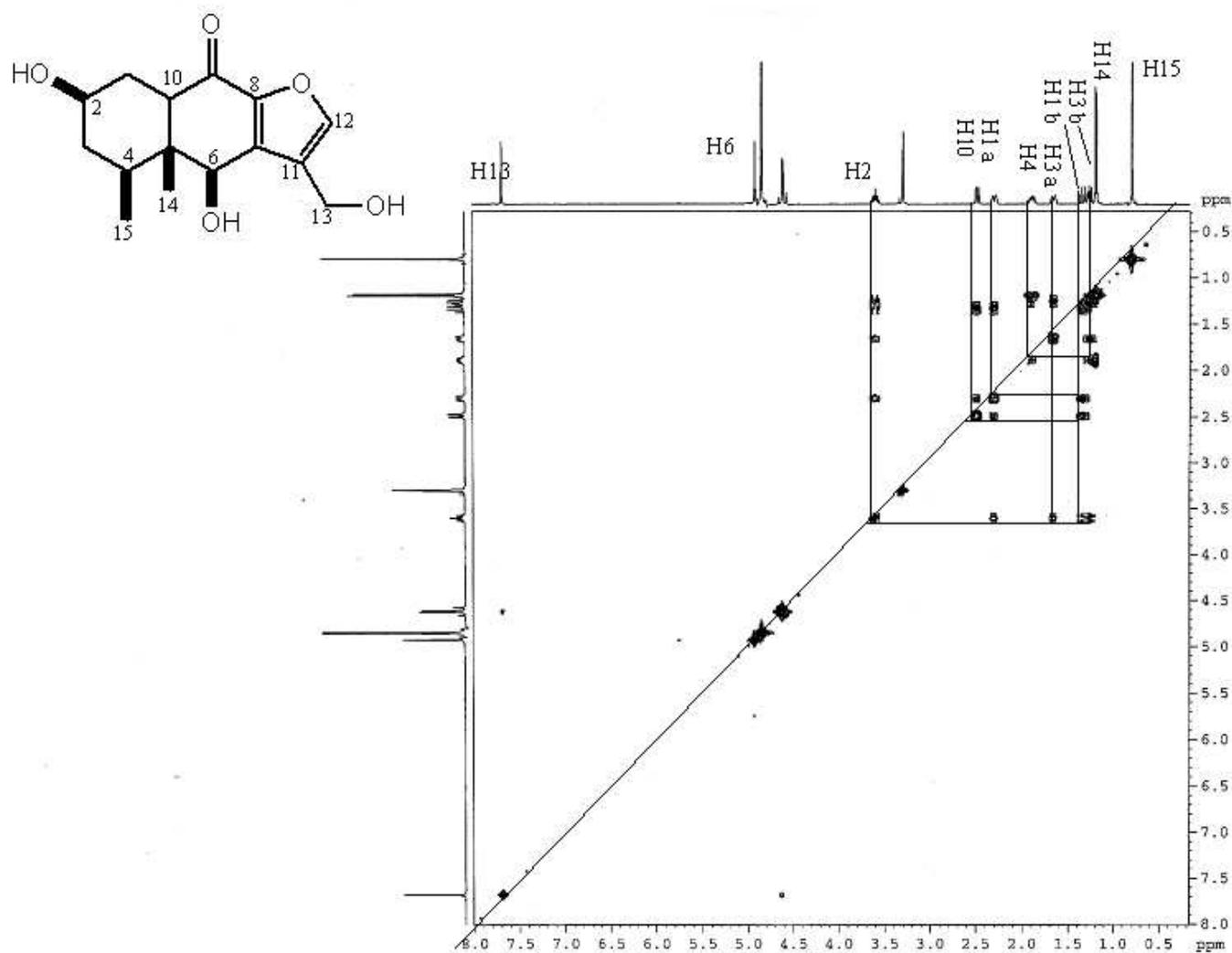
Espectro 3.2: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) de velatumina (X)



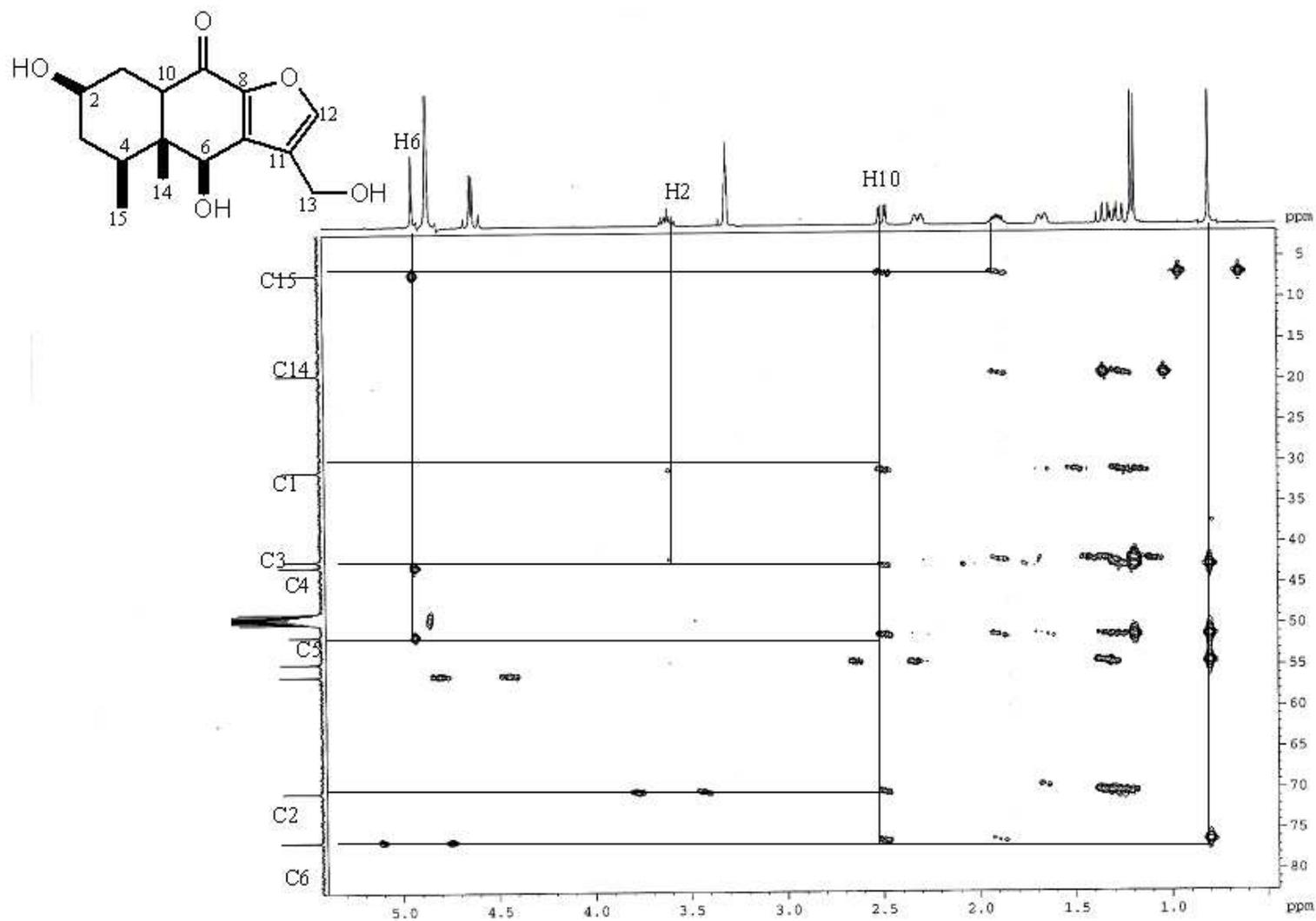
Espectro 3.3: DEPT (CDCl₃, 400 MHz) de velatumina (X)



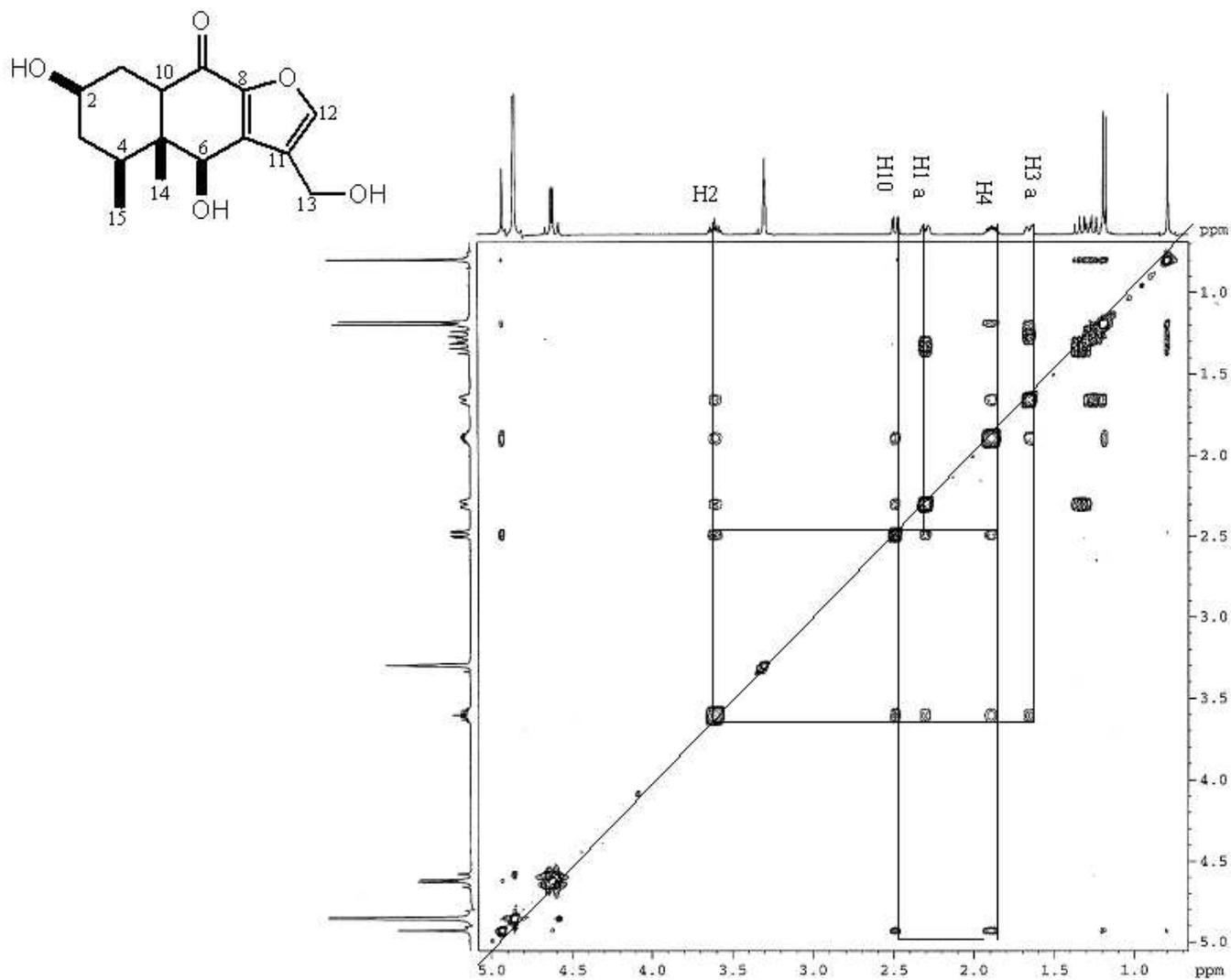
Espectro 3.4: HSQC (CDCl₃, 400 MHz) de velatumina (X)



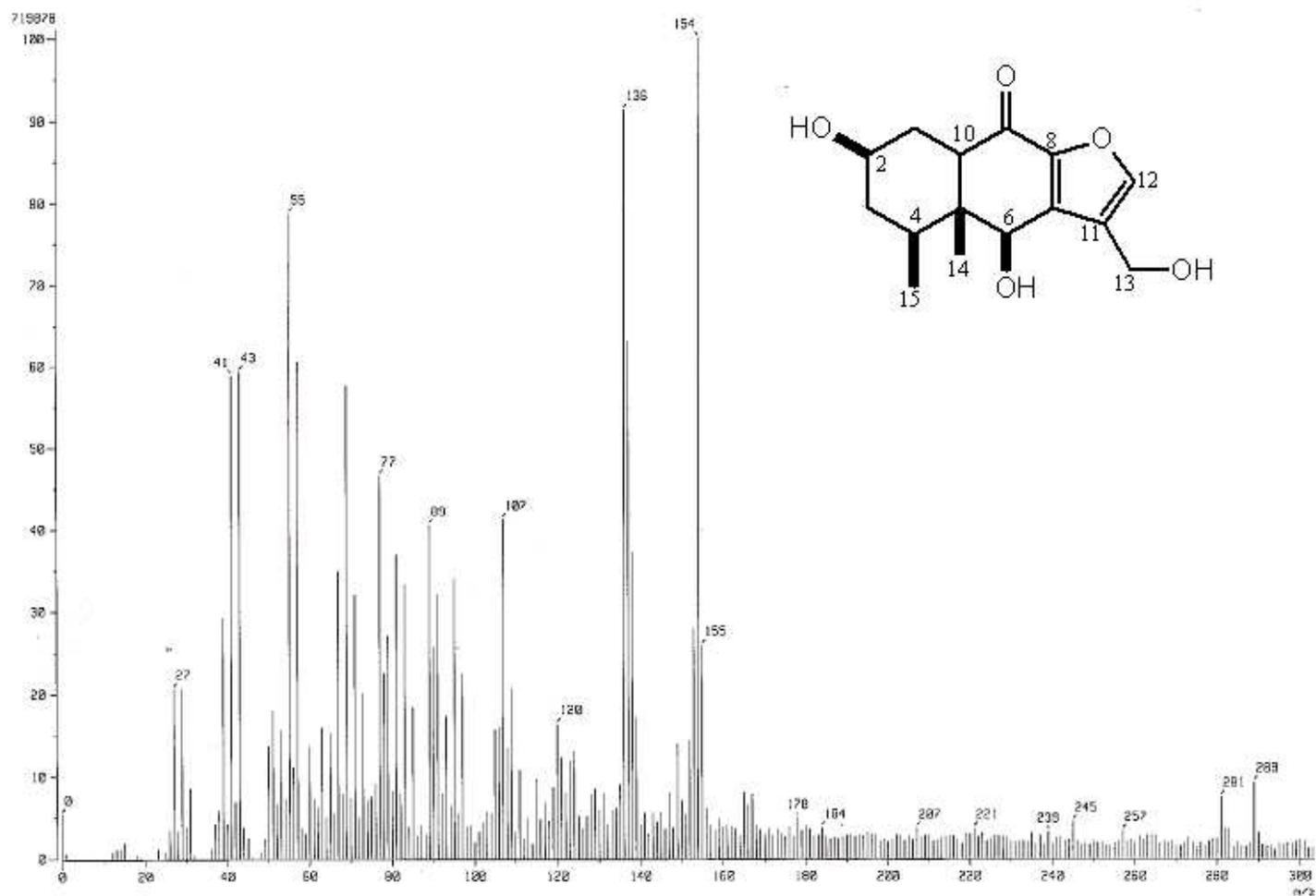
Espectro 3.5: COSY (CDCl₃, 400 MHz) de velatumina (X)



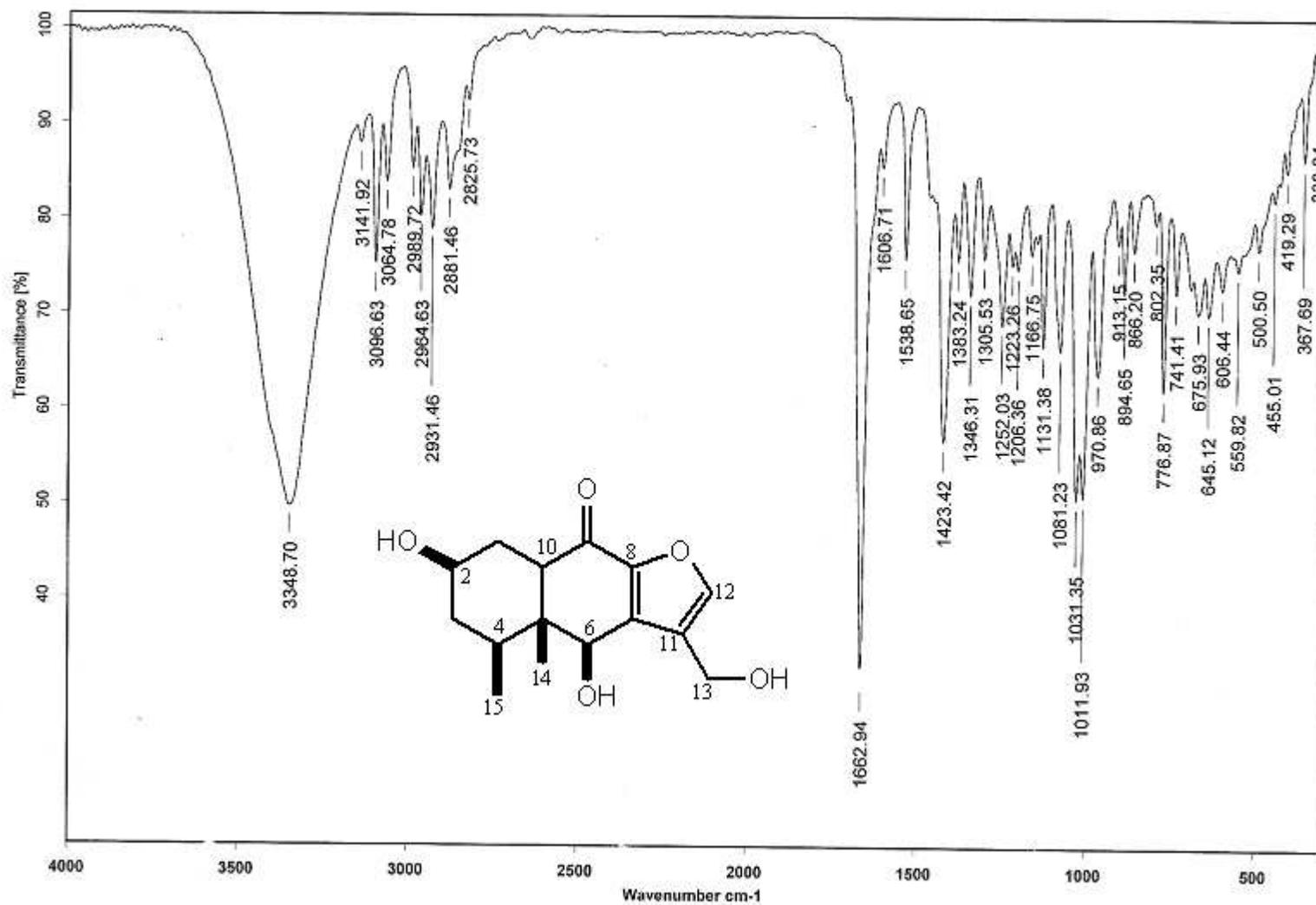
Espectro 3.6: HMBC (CDCl₃, 400 MHz) de velatumina (X)



Espectro 3.7: NOESY (CDCl₃, 400 MHz) de velatumina (X)



Espectro 3.8: Masas FAB⁺ de velatumina (X)



Espectro 3.9: IR (CHCl₃) de velatumina (X)