



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Estudio fitoquímico, evaluación antiinflamatoria, regeneración
in vitro y cuantificación del acetato de maturina de la planta
medicinal *Psacalium peltatum* (MATARIQUE)”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. NADIA ASSENETH ROJANO VILCHIS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA. INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DR. ROBERT ARTHUR BYE BOETTLER. INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DR. VICTOR MANUEL CHÁVEZ AVILA. INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Estudio fitoquímico, evaluación antiinflamatoria, regeneración
in vitro y cuantificación del acetato de maturina de la planta
medicinal *Psacalium peltatum* (MATARIQUE)”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. NADIA ASSENETH ROJANO VILCHIS

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA. INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:
DR. ROBERT ARTHUR BYE BOETTLER. INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DR. VICTOR MANUEL CHÁVEZ AVILA. INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM**

MÉXICO, D.F. OCTUBRE 2015



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/608/15

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **8 de junio de 2015**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **ROJANO VILCHIS NADIA ASSENETH** con número de cuenta **501093611** con la tesis titulada: "**Estudio fitoquímico, evaluación antiinflamatoria, regeneración *in vitro* y cuantificación del acetato de maturina de la planta medicinal *Psacalium peltatum* (MATARIQUE)**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA**:

Presidente: DR. RICARDO REYES CHILPA
Vocal: DRA. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ
Secretario: DR. ROBERT BYE BOETTLER
Suplente: DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELAZQUEZ
Suplente: DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ AVILA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 17 de septiembre de 2015.

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/ipp



DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado a través de la beca crédito CVU 103038.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 2-10 del Departamento de Productos Naturales, en la Unidad de Pruebas Biológicas del Instituto de Química y en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, bajo la tutoría del Dr. Manuel Jiménez Estrada, el Dr. Robert A. Bye Boettler y el Dr. Victor M. Chávez Ávila. Así como por las asesorías de la M. en C. Ma. Teresa Obdulia Ramírez Apan y del M. en C. Antonio Nieto Camacho.

Agradezco a la técnica académica del Herbario Nacional MEXU, del Instituto de Biología, Gilda Ortiz Calderón y del Sr. Francisco Ramos Marchena, por la identificación taxonómica de la especie y de la vegetación asociada. A los diferentes profesores del Instituto de Química por el apoyo proporcionado en la realización de los diferentes espectros, cromatogramas, análisis cuantitativo y estudio de rayos X de los compuestos obtenidos: M. en C. Héctor Ríos Olivares, M. en C. Nieves Zavala, M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, Q.F.B. Ma. del Rocío Patiño Maya y Quím. María de los Ángeles Peña González responsables del laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de Sólidos. I. Q. Luis Velasco Ibarra y Dr. Francisco Javier Pérez Flores responsables del laboratorio de Espectrometría de Masas. Quím. Eréndira García Ríos responsable del laboratorio de Infrarrojo. M. en C. Lucía del Carmen Marqués Alonso responsable del laboratorio de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia. M. en C. Simón Hernández Ortega responsable en el laboratorio de Rayos X.

Agradezco a los miembros del comité tutorial y jurado, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. María Margarita Canales Martínez, Dr. Robert A. Bye Boettler, Dr. Victor M. Chávez Ávila y Dr. Marco A. Velasco Velázquez por los comentarios, sugerencias y tiempo dedicado a la revisión del presente proyecto de investigación.

Agradezco a los miembros del comité tutorial por otorgarme su confianza, paciencia, experiencia académica y facilidades para realizar el proyecto de investigación así como por el apoyo otorgado para participar en los diferentes cursos, talleres y congresos.

Agradezco a las personas involucradas en cada una de las publicaciones, Dr. Alejandro García Carrancá, Dr. Ángel J. Alonso-Castro, Q.F.B. Armando Torres Avilez, Ma. del Carmen Juárez-Vázquez, Dr. M. A. Rodríguez-Monroy y a todos los compañeros de los diferentes laboratorios por sus conocimientos personales y académicos que me otorgaron durante el transcurso del tiempo compartido. Así también a los diferentes alumnos de estancias cortas, por su participación en la realización de los diferentes fraccionamientos y subcultivos *in vitro*.

Finalmente, agradezco a cada miembro de mi familia por su apoyo personal, técnico y económico para realizar y llevar a buen término la investigación.

ÍNDICE	Página
Índice de Tablas	8
Índice de Figuras	9
Lista de Abreviaturas	11
Resumen	12
Abstract	14
1. Introducción	16
2. Objetivos	17
2.1. Objetivo general	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. Antecedentes	18
3.1. Plantas medicinales de la familia Asteraceae en México	18
3.2. Sesquiterpenos del género <i>Psacalium</i>	20
3.3. Inflamación	21
3.3.1. Compuestos antiinflamatorios	22
3.4. Evaluación biológica del proceso inflamatorio	24
3.4.1. Modelo de edema inducido en oreja de ratón con TPA	24
3.4.2. Modelo de edema inducido con carragenina en pata de rata	25
3.4.3. Efecto de la actividad de la enzima mieloperoxidasa	26
3.5. Producción de metabolitos secundarios por cultivo de tejidos vegetales	27
3.6. Clasificación taxonómica de <i>Psacalium peltatum</i> (Kunth) Cass. (Asteraceae)	30
3.6.1. Descripción botánica y etnobotánica de <i>P. peltatum</i> (Kunth) Cass.	31
3.6.2. Aspectos fitoquímicos, farmacológicos y biotecnológicos de <i>P. peltatum</i> (Kunth) Cass.	34
4. Planteamiento del Problema	36
5. Hipótesis	37
6. Metodología	38
6.1. Colecta y autenticación de <i>P. peltatum</i> (Kunth) Cass.	40
6.2. Estudio fitoquímico	40
6.2.1. Preparación de los diferentes extractos orgánicos a partir de las raíces de <i>P. peltatum</i> (Kunth) Cass.	40
6.2.2. Fraccionamiento del extracto hexánico de raíz	41
6.2.3. Cromatografía en capa fina	41
6.2.4. Cromatografía en columna abierta	41
6.2.5. Cromatografía en columna rápida	42
6.2.6. Cristalización	43
6.2.7. Elucidación estructural de los compuestos sesquiterpénicos	43
6.2.8. Espectrometría de Infrarrojo	43
6.2.9. Espectrometría de Masas	43
6.2.10. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	44

6.2.11. Difracción de rayos X	44
6.2.12. Determinación del punto de fusión	44
6.3. Evaluación biológica del proceso inflamatorio	45
6.3.1. Modelo de edema inducido en oreja de ratón con acetato de 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol (TPA)	45
6.3.2. Modelo de edema inducido con carragenina en pata de rata	47
6.3.3. Ensayo de la actividad enzimática de mieloperoxidasa (MPO) por el método de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina)	48
6.4. Cultivos de tejidos vegetales	49
6.4.1. Aclimatización de plantas silvestres	49
6.4.2. Establecimiento del método de desinfección de hojas	49
6.4.3. Establecimiento de los medios de cultivo para inducción de brote, individualización y enraizamiento <i>in vitro</i>	50
6.5. Identificación y cuantificación por cromatografía (HPLC, CG-EM) de los compuestos presentes en el extracto hexánico de las raíces de las plantas silvestres y de las raíces de las plantas regeneradas en los cultivos <i>in vitro</i> de <i>P. peltatum</i> (Kunth) Cass.	53
7. Resultados y discusión	55
7.1. Evaluación de las raíces colectadas de <i>P. peltatum</i> (Kunth) Cass. por cromatografía en capa fina	55
7.2. Fraccionamiento, purificación y elucidación de los compuestos sesquiterpénicos del extracto hexánico de raíz	58
7.2.1. Compuesto 1 (14-angeloiloxicacalohastina)	60
7.2.2. Compuesto 2 (Maturinina)	70
7.2.3. Compuesto 3 (Angelato de 3,4-dehidro-14-maturinol)	76
7.2.4. Compuesto 4 (Acetato de Maturina)	84
7.3. Evaluación biológica del proceso inflamatorio	95
7.3.1. Inhibición de la inflamación en el modelo de edema inducido en oreja de ratón con TPA	95
7.3.2. Inhibición de la inflamación en el modelo de edema inducido con carragenina en ratas	97
7.3.3. Efecto de la actividad de la enzima mieloperoxidasa	100
7.4. Cultivo de tejidos vegetales	102
7.4.1. Aclimatización y desinfección de hojas desarrolladas a partir de las plantas silvestres	102
7.4.2. Modificaciones del medio de cultivo base para la inducción de brotes adventicios de hoja	104
7.5. Identificación y cuantificación del acetato de maturina en los extractos orgánicos de raíz de las especies silvestres y de las plántulas <i>in vitro</i> de <i>P. peltatum</i>	108
8. Conclusiones	113

- Publicación 1.** Rojano-Vilchis, N.A., Jiménez-Estrada, M., Nieto Camacho, A., Torres-Avilez, A., Chavez-Avila, V.M., Canales-Martínez, M., Martínez-Elizalde K.S., Rodríguez-Monroy, A. (2013). Isolation and anti-inflammatory effects of maturin acetate from the roots of *Psacalium peltatum* (Asteraceae). *Journal of Medicinal Plants Research* Volume 7(22): 1600-1607.
- Publicación 2.** Juárez-Vázquez, M. del C., Alonso-Castro, A. J., Rojano-Vilchis, N., Jiménez-Estrada, M., García-Carrancá, A. (2013). Maturin acetate from *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass. (Asteraceae) induces immunostimulatory effects in vitro and in vivo. *Toxicology in Vitro*, Volume 2 (3):1001-1006.
- Publicación 3.** Rojano-Vilchis, N., Hernández-Ortega, S., Jiménez-Estrada, M., Torres-Avilez, A. (2012). 14-Angeloyloxyacalohastine from *Psacalium peltatum*. *Acta Cryst. Sec. E. Structure Reports*. E68, o672-o673.
- Publicación 4.** Rojano-Vilchis, N., Hernández-Ortega, S., Jiménez-Estrada, M., Torres-Avilez, A. (2012). Crystal Structure of Maturin acetate from *Psacalium peltatum* (Kunth) (matarique). *X-ray Structure Analysis Online*. (28):75-77.

ÍNDICE DE TABLAS**PÁGINA**

Tabla 1. Rendimiento obtenido de diferentes metabolitos secundarios con importancia farmacológica mediante el cultivo de células en suspensión (DiCosmo y Misawa, 1995)	29
Tabla 2. Taxonomía de <i>Psacalium peltatum</i> (Kunth) Cass	30
Tabla 3. Sustancias evaluadas (extractos, compuesto de prueba: acetato de maturina y de referencia: Indometacina) en el modelo de inflamación inducida por TPA	46
Tabla 4. Formulación del medio de cultivo base de Murashige y Skoog, 1962 (MS)	51
Tabla 5. Mezcla de vitaminas denominado R2	51
Tabla 6. Peso obtenido por tipo de estructura vegetal y tipo de extracto orgánico	58
Tabla 7. Fraccionamiento preliminar del extracto hexánico de raíz	59
Tabla 8. Efecto de la indometacina, acetato de maturina y de los diferentes extractos orgánicos de raíz de <i>P. peltatum</i> en el modelo de edema inducido con TPA	96
Tabla 9. Efecto antiinflamatorio del acetato de maturina, naproxeno sódico, ibuprofeno y de los extractos orgánicos de la raíz de <i>P. peltatum</i> (100 mg/kg) en el modelo de edema plantar inducido con carragenina	98
Tabla 10. Porcentaje (%) de formación de brotes adventicios por efecto de la concentración de ácido indolacético (AIA), bencil adenina (BA) y la cinetina (KIN)	105
Tabla 11. Rendimiento obtenido del acetato de maturina en las diferentes muestras	111

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1. Estructuras básicas de los diferentes cacalólidos presentes en el género <i>Psacalium</i> .	20
Figura 2. Representación de las lactonas sesquiterpénicas con propiedades antiinflamatorias.	23
Figura 3. Ejemplar de <i>Psacalium peltatum</i> (Kunth) Cass. var. <i>peltatum</i> , colectada en el poblado de la Estanzuela, Hidalgo, México. Escalas: A 1.5 m; B: 1 m; C: 1.3 cm; D: 40 cm, E: 25 cm; F: 22 cm.	32
Figura 4. Principales sesquiterpenos aislados e identificados de <i>P. peltatum</i> (Kunth) Cass.	34
Figura 5. Representación general de la ruta experimental del estudio fitoquímico, evaluación biológica, cultivo de tejidos vegetales de <i>P. peltatum</i> y evaluación del rendimiento del acetato de maturina.	39
Figura 6. Estructuras vegetales subterráneas de <i>P. peltatum</i> : rizomas primarios y secundarios (A). Exudado de la resina de los canales secretores en los rizomas primarios (B) y en los rizomas secundarios (C).	56
Figura 7. Diferencias en intensidad y desplazamiento químico (Rf) de los perfiles cromatográficos de los extractos hexánicos de la raíz y el rizoma (RI), eluidos con el sistema hexano: acetato de etilo (9:1).	57
Figura 8. Estructura del 14-angeloyloxyacalohastina.	60
Figura 9. Espectro de masas del 14-angeloyloxyacalohastina.	62
Figura 10. Espectro de IR (CHCl ₃) del 14-angeloyloxyacalohastina	63
Figura 11. Espectro del experimento DEPT del 14-angeloyloxyacalohastina.	64
Figura 12. Espectro del experimento HETCOR del 14-angeloyloxyacalohastina.	65
Figura 13. Espectro de RMN- ¹ H del 14-angeloyloxyacalohastina.	67
Figura 14. Espectro de correlación bidimensional de protones (COSY) del 14-angeloyloxyacalohastina.	68
Figura 15. Vista en perspectiva del cristal del 14-angeloyloxyacalohastina.	69
Figura 16. Estructura de la maturinina.	70
Figura 17. Espectro de masas de la maturinina.	71
Figura 18. Espectro de IR de la maturinina.	71
Figura 19. Espectro del experimento DEPT de la maturinina.	72
Figura 20. Espectro de RMN ¹ H de la maturinina.	73
Figura 21. Espectro de correlación bidimensional de protones (COSY) de la maturinina.	74
Figura 22. Espectro del experimento HETCOR de la maturinina.	75
Figura 23. Estructura del angelato de 3,4-dehidro-14-maturinol.	76
Figura 24. Espectro de masas del angelato 3,4-dehidro-14-maturinol.	77
Figura 25. Espectro de IR del angelato 3,4-dehidro-14-maturinol.	78
Figura 26. Espectro de RMN ¹ H del angelato 3,4-dehidro-14-maturinol.	80

Figura 27. Espectro de correlación bidimensional de protones (COSY) del angelato 3,4-dehidro-14-maturinol.	81
Figura 28. Espectro del experimento DEPT del 3,4-dehidro-14-maturinol.	82
Figura 29. Espectro del experimento HETCOR del 3,4-dehidro-14-maturinol.	83
Figura 30. Estructura del acetato de maturina.	84
Figura 31. Espectro de masas del acetato de maturina.	85
Figura 32. Espectro de IR del acetato de maturina.	86
Figura 33. Espectro de RMN- ¹ H del acetato de maturina.	87
Figura 34. Espectro del experimento de correlación bidimensional de protones (COSY) del acetato de maturina.	88
Figura 35. Espectro del experimento de HMBC que permitió el estudio de los acoplamientos ¹ H- ¹³ C a larga distancia (2, 3, 4 <i>J</i>) del acetato de maturina.	89
Figura 36. Espectro de RMN- ¹³ C del acetato de maturina.	91
Figura 37. Espectro del experimento DEPT del acetato de maturina.	92
Figura 38. Espectro del experimento de HSQC que permitió el estudio de los acoplamientos ¹ H- ¹³ C del acetato de maturina.	93
Figura 39. Vista en perspectiva del cristal de acetato de maturina.	94
Figura 40. Efecto de la aplicación tópica de acetato de maturina en la actividad de la mieloperoxidasa. Cada columna representada el promedio + promedio del error estándar de seis animales. ** P<0.01.	101
Figura 41. Desarrollo de las hojas mediante condiciones de fertirrigación constante (cada 15 días), ventilación e iluminación bajo sombra.	102
Figura 42. Explante de lámina foliar con desarrollo de brotes adventicios con aspecto de domo (A y B) y con la presencia de formación de brotes adventicios (C, D y E) de <i>P. peltatum</i> en medio de cultivo MsBrt/L. Línea: 1 cm.	106
Figura 43. Desarrollo de brotes adventicios (tallos y lámina foliar) con la combinación de fitoreguladores a una concentración de 2.5 mg/L de BA y 0.5 mg/L de AIA. Línea: 1 cm.	107
Figura 44. Desarrollo y formación de raíces a partir de brotes adventicios con la mitad de la concentración de sus sales orgánicas e inorgánicas del medio de cultivo MS50%/L. Línea: 7 cm.	107
Figura 45. Diferencias observadas en el desplazamiento (R _f) e intensidad de la mancha que muestra el perfil cromatográfico de los extractos metanólicos-etanólicos de los brotes obtenidos mediante cultivos <i>in vitro</i> de <i>P. peltatum</i> , eluidos con el sistema hexano: acetato de etilo (9:1) AM : Acetato de maturina; Brote : Extracto metanólico-etanólico.	108
Figura 46. Cromatograma mediante HPLC del acetato de maturina.	109
Figura 47. Cromatograma y espectro del acetato de maturina obtenido a partir de la cromatografía de gases acoplado a la espectrometría de masas.	110

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	Ácido indolacético
AM	Acetato de Maturina
ANA	Ácido naftalenacético
BAP	6-bencilaminopurina
°C	Grados centígrados
¹³ C	Carbono 13.
CCF	Cromatografía en capa fina
CHCl ₃	Cloroformo
CH ₃ OH	Metanol
COSY	Correlated Spectroscopy
DEPT	Distortion less Enhancement by Polarization Transfer
EM-IE ⁺	Espectro de masas por impacto electrónico
gL ⁻¹	Gramos por litro
g	Gramos
HETCOR	Heteronuclear Correlated Spectroscopy
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HMBC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSQC	Heteronuclear Simple Quantum Coherence (Correlación Heteronuclear a un enlace de distancia)
IR	Espectro de infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
mm	Milímetros.
min	Minutos
mM	Milimolar.
mL	Mililitros.
MHz	Mega Hertz.
M ⁺	Ion molecular.
MEXU	Herbario Nacional, UNAM
MS	Medio de cultivo base de Murashige y Skoog.
mg/L	Miligramos por litro de solución.
N	Normal.
PF	Peso fresco.
PS	Peso seco.
PM	Peso molecular.
R _f	Referencia frontal.
RMN	Resonancia magnética nuclear.
rpm	Revoluciones por minuto.
SD	Standard deviation. (Desviación estándar).
SE	Standard error. (Error estándar).
TMS	Tetrametilsilano.
UV	Luz ultravioleta.
v/v	Volumen sobre volumen.
μM	Micro molar.

Resumen

Se obtuvieron los extractos de hexano, cloruro de metileno, etanol, metanol y acuoso de las partes subterráneas denominadas rizomas (raíces) de la planta medicinal matarique (*Psacalium peltatum*). El extracto hexánico de raíz se fraccionó mediante cromatografía en columna abierta y flash. Los compuestos sesquiterpénicos que se obtuvieron fueron 14-angeloiloxicacalohastina, maturinina, angelato de 3,4-dehidro-14-maturinol y el acetato de maturina que se analizaron por cromatografía en capa fina y se caracterizaron mediante IR, MS, RMN¹H, RMN¹³C. Adicionalmente el análisis de difracción de rayos X permitió la determinación de la estereoquímica correcta del 14-angeloyloxycacalohastina y del acetato de maturina. Por otro lado, el acetato de maturina y los extractos de n-hexano, etanol y acuoso se evaluaron para conocer su actividad anti-inflamatoria. El acetato de maturina a la concentración de 1 mg/oreja presentó el mayor porcentaje de inhibición (95.41%) a diferencia de los diferentes extractos orgánicos que mostraron una inhibición significativa del edema en un rango del 2 al 52.30% por TPA y con carragenina el acetato de maturina a diferencia de los extractos orgánicos, exhibió un porcentaje de inhibición del 58.95 % al principio del evento (1h) que persistió hasta casi la quinta hora. También se observó que el acetato de maturina inhibió el aumento de la actividad de la MPO directamente proporcional a la concentración del acetato de maturina. Así mismo, se establecieron los cultivos *in vitro* de *P. peltatum* con explantes de hoja de 1 cm² con un método de desinfección optimizado con etanol al 70% y una solución de hipoclorito de sodio al 6%. La formación de brotes adventicios se obtuvo con la combinación de fitorreguladores a la concentración de 2.5 mg/L de 6-bencilaminopurina; 0.5 mg/L de AIA (ácido indol acético); 1 mg/L de glicina y 100 mg/L de ácido ascórbico. Se observó el desarrollo más abundante y rápido del tallo y la lámina foliar, sin oxidaciones evidentes y semejantes en apariencia con la forma de las plantas adultas colectadas de la zona de estudio. La individualización, formación y elongación de raíces de los brotes adventicios se obtuvo con el medio MS a la mitad de la concentración de sus sales orgánicas e inorgánicas, sin la adición de citocininas. Adicionalmente, se evaluó la producción del acetato de maturina mediante HPLC. Mostró un pico, con un tiempo de retención de 29.29 min. Se encontró que el acetato de maturina fue el principal compuesto presente con 228.75, 113.77 y 1.23 mg de acetato de maturina/g muestra en los extractos de n-hexano, etanol y metanol, respectivamente. Sin embargo, en

los cultivos *in vitro*, los análisis realizados por HPLC, indicaron la presencia del acetato de maturina con una señal en un tiempo de retención de 5.36 min diferente al del estándar (5.00 min) observando un desplazamiento en el tiempo de retención. Se confirmó con el análisis realizado por GC-MS y se corroboró definitivamente la presencia del acetato de maturina en los extractos de las raíces de las plántulas *in vitro*. Estos resultados indican que el acetato de maturina aislado de *P. peltatum* posee propiedades antiinflamatorias, lo cual justifica uno de sus usos medicinales atribuidos a la especie vegetal.

Abstract

Hexane, methylene chloride, ethanol, methanol and aqueous extracts were obtained from roots of the medicinal plant matarique (*Psacalium peltatum*). The hexane root extract was fractionated by open column and flash chromatography. The sesquiterpene compounds obtained were 14-angeloyloxycacalohastina, maturinina, angelate of 3,4-dehydro-14-maturinol and maturin acetate. They were analyzed by thin layer chromatography and characterized by IR, MS, ¹H NMR, ¹³C NMR. Additionally, the analysis of diffraction XR allowed the determination of the correct stereochemistry of the 14-angeloyloxycacalohastina and maturin acetate. Secondly, the maturin acetate and hexane, ethanol and aqueous extracts were evaluated for anti-inflammatory activity. The maturin acetate concentration of 1 mg / ear showed the highest percent inhibition of edema induced by TPA (95.41%), in contrast, the other organic extracts showed significant inhibition ranging from 2 to 52.30%. Maturin acetate exhibited a percent inhibition of 58.95% at the beginning of the event (1h) which persisted until about the fifth hour. Furthermore, the maturin acetate also inhibited the increase in MPO activity directly proportional to the concentration of the maturin acetate. Moreover, *in vitro* cultures of *P. peltatum* from leaf explants of 1 cm² were established employing a disinfection method optimized with 70% ethanol and a solution of sodium hypochlorite 6%. Adventitious shoot were formed using a combination of growth regulators at the concentration of 2.5 mg / L BA (6-benzylaminopurine); 0.5 mg / L IAA (indole acetic acid); 1 mg / L of glycine and 100 mg / L of ascorbic acid. The most abundant and rapid development of stem and leaf blade, with morphology similar to that of adult plants and without oxidation, was observed. Individualization, root elongation and formation of adventitious shoots were obtained with the MS medium at half the concentration of inorganic and organic salts, without the addition of cytokines. Additionally, maturin acetate was measured by HPLC resulting in one peak, with a retention time of 29.29 min. Maturin acetate was found to be the major compound with 228.75, 113.77 and 1.23 mg maturin acetate/g sample in the hexane, ethanol and methanol extracts, respectively analyzed. Using HPLC, maturin acetate was present *in vitro* cultures with a signal at a retention time of 5.36 min different with the standard (5.00 min). This was confirmed by GC-MS analysis. Although the presence of maturin acetate is definitely confirmed in root extracts of *in vitro* plantlets. These results

indicate that maturin acetate isolated of *P. peltatum* has anti-inflammatory properties, which justifies one of its medicinal uses.

1. INTRODUCCIÓN

La investigación utilizó como modelo biológico para el estudio fitoquímico, evaluación biológica, regeneración *in vitro* y cuantificación del acetato de maturina las hojas y órganos subterráneos (rizomas), comúnmente denominados raíces de la planta medicinal *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass. (Asteraceae) que forma parte del conjunto de plantas medicinales conocido como complejo “matarique” (Bye *et al.*, 1995). Las raíces de *P. peltatum* se emplean en forma de cocción como remedio para dolencias gastrointestinales, renales, tratamiento de la diabetes y para el reumatismo en cataplasmas (Roman-Ramos *et al.*, 1991; 1992; Bye *et al.*, 1995; Garduño *et al.*, 2001; Contreras-Weber *et al.*, 2002).

En otro aspecto, debido a la utilización excesiva de las raíces de *P. peltatum* para los diversos tratamientos y debido a su crecimiento cercano a los centros de venta, es un recurso que sufre de forma importante una sobreexplotación (Alarcón-Aguilar *et al.*, 1997; Zarate, 2006). Sin embargo, en investigaciones con cultivos de tejidos vegetales de *P. peltatum* fue evidente su regeneración propagativa y producción del compuesto sesquiterpénico, acetato de maturina mediante cultivos en suspensión (Hernández-Tejeda, 1999; Rojano-Vilchis, 2005) Además, el compuesto acetato de maturina mostró mediante un ensayo preliminar significativa actividad antiinflamatoria (Rojano-Vilchis, 2005).

Por estas observaciones, se realizó el estudio fitoquímico de los compuestos presentes en el extracto hexánico de las raíces de *P. peltatum*, la evaluación biológica como agente antiinflamatorio del acetato de maturina en diversos modelos de actividad antiinflamatoria. Así como, se desarrolló el protocolo de regeneración propagativa de la especie vegetal que permitió analizar y cuantificar la producción del acetato de maturina en las raíces de las plántulas regeneradas *in vitro* en comparación con la cantidad obtenida del acetato de maturina en los extractos orgánicos de las raíces silvestres de la especie vegetal. Todo lo anterior, con la finalidad de obtener elementos de discusión al conocimiento en la obtención e identificación de compuestos sesquiterpénicos de *P. peltatum*, su uso potencial en el tratamiento de patologías que cursen con procesos inflamatorios así como mostrar la producción de los compuestos mediante la capacidad regenerativa de la especie vegetal en cultivo de tejidos vegetales.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Implementar la metodología para la obtención de los diferentes extractos orgánicos, el aislamiento, la purificación e identificación de los diferentes compuestos sesquiterpénicos. Además de realizar la evaluación biológica del acetato de maturina como agente antiinflamatorio. Así como establecer el protocolo de regeneración *in vitro* de *P. peltatum* para evaluar el rendimiento de la producción del acetato de maturina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Aislar, purificar e identificar los compuestos sesquiterpénicos del extracto hexánico de las raíces obtenido de la colecta silvestre de *P. peltatum*, mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas (RMN, IR y UV), espectrométrica (EM) de alta resolución y propiedades físicas (punto de fusión y Rf).

2.2.2. Evaluar el potencial como antiinflamatorio del acetato de maturina, en los modelos de edema plantar inducido con los agentes químicos de TPA (éster de forbol), carragenina así como el efecto de la actividad de la enzima mieloperoxidasa.

2.2.3. Establecer las condiciones de aclimatización de las plantas colectadas, el método de desinfección de los explantes de hoja y los diferentes medios de cultivo *in vitro* para el desarrollo de plántulas regeneradas de *P. peltatum*.

2.2.6. Identificar y cuantificar el acetato de maturina en los extractos orgánicos de las raíces de las plantas silvestres y en las raíces de las plántulas regeneradas *in vitro* de *P. peltatum* mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

3. ANTECEDENTES

3.1. PLANTAS MEDICINALES DE LA FAMILIA ASTERACEAE

La familia Asteraceae también conocida como Compositae, constituye probablemente la familia más grande de las plantas con flores, agrupa el mayor número de plantas utilizadas con fines medicinales (Waizel, 2006). Es una de las familias ampliamente distribuida a nivel mundial, con aproximadamente 32,000 especies distribuidas en unos 2,000 géneros. Son especialmente diversas en las montañas tropicales, las subtropicales y las templadas más cálidas (Turner y Nesom, 1998). En México se reconocen 360 géneros y 3,021 especies de asteráceas (Villaseñor, 2003), con un porcentaje de endemismo del 50%. En comparación con China, con una superficie cinco veces mayor que la de México, solamente se tienen registrado 2,027 especies, pertenecientes a 167 géneros de asteráceas, de las cuales se incluyen especies introducidas (Turner y Nesom, 1998). La subfamilia Asteroideae comprende 10 tribus dentro de las cuales se encuentra la subtribu Senecioneae, que contiene alrededor de 3,000 especies y de la cual pertenece la especie *P. peltatum* (Romo de Vivar, 2007).

La región más importante de diversidad de géneros de esta familia es el norte y centro del país (Rzedowski, 1991). En las regiones montañosas (bosques de encino y coníferas) y desérticas (matorrales xerófilos y pastizales), desde casi 20% en la Meseta Central del norte de México y 4.4% en la región de las tierras bajas de la costa del Golfo de México (Turner y Nesom, 1998). En contraste, está pobremente representada o totalmente ausente en los bosques tropicales perennifolios (Rzedowski, 1972). En relación a las especies de la familia Asteraceae de México se calcula que el 31% de las especies son locales consideradas como especies amenazadas y que de éstas más de dos tercios están en peligro de extinción. Se calcula que de continuar el aumento de la población y la consecuente presión agrícola, se eliminarán de 600 a 800 especies, es decir la cuarta parte de las asteráceas mexicanas (Turner y Nesom, 1998).

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS), las especies vegetales analizadas son utilizadas por el 80% de la población mundial, principalmente en los países en vías de

desarrollo como México (Heinrich, 1998; Houghton, 2001; WHO, 2001; Facheux *et al.*, 2003) y representan el 5.2 % del total de plantas identificadas en el mundo (Cordell y Quinn-Beattie, 2005; Cordell y Colvard, 2005). El empleo de las plantas medicinales como recurso natural para el tratamiento primario de las enfermedades más comunes, principalmente en la población rural, constituye un conocimiento empírico que es transmitido en forma oral de generación en generación como parte de las tradiciones heredadas desde épocas inmemoriales (Linares *et al.*, 1999). Constituye una estrategia para la búsqueda de metabolitos con importante actividad biológica, como el salicilato, ingrediente activo del extracto de la corteza del *Salix alba* L. (sauce blanco), que se encuentra en la aspirina (Testa *et al.*, 1993).

El tratamiento de la inflamación con plantas medicinales es ampliamente reportado (Bingöl and Sener, 1995). La mayoría de las plantas medicinales que se utilizan en la medicina tradicional son utilizadas de diversas formas ya sea de forma aislada como son las flores, hojas, tallos, semillas, cortezas, raíces y frutos o en conjunto con otras plantas formando complejos (Waisel, 2006). Por ejemplo, de la especie *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray (arnica de la montaña), sus flores se utilizan para la malaria, fiebre, calambres musculares, trastornos gastrointestinales, heridas, erupciones de la piel y como antiinflamatorio. Las actividades biológicas probadas de la arnica fue como antipirético, antimalárico y antiinflamatorio (Heinrich *et al.*, 1998). Sin embargo, la información que existe del uso tradicional de algunas especies de plantas medicinales de la familia Asteraceae es diversa y en ocasiones poco claro debido a la variedad de atributos medicinales que presenta la misma planta (Romo de Vivar, 1985; Heinrich *et al.*, 1998; Tlahui-Medic, 2005). Por ejemplo, las flores de *Artemisia ludoviciana* Nutt. (estafiate) son utilizadas como antihelmíntico, para la tos, problemas menstruales, estimulante del apetito, etc. El producto pulverizado de *Helenium mexicanum* Kunth. (rosilla) es utilizado como insecticida así como las hojas y raíces de *Montanoa tomentosa* Cerv. (zoapatle) es utilizado como abortivo y acelerador del trabajo de parto (Waisel, 2006).

3.2. SESQUITERPENOS DEL GÉNERO *PSACALIUM*

Los sesquiterpenos son compuestos del metabolismo secundario que se derivan biosintéticamente de los metabolitos primarios mediante la ruta del acetato-mevalonato (Bruneton, 1999; Croteau y col., 2000). Los sesquiterpenos son compuestos de 15 átomos de carbono y se clasifican de acuerdo con el tipo de estructura núcleo y grupo funcional que presentan (Manitto, 1981). Muestran una gran diversidad estructural (lineales, monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos) con aproximadamente más de 200 diferentes estructuras (Connolly y Hill, 1991). Además, los sesquiterpenos son metabolitos secundarios que se pueden encontrar en una diversidad de plantas, hongos, microorganismos e insectos pero son característicos de la familia Asteraceae (Judd *et al.*, 2002). En el género *Psacalium* predominan compuestos sesquiterpénicos (Bohlmann, 1979) denominados cacalólidos. Se observó una estrecha relación biogenética entre el eremofilano (**Figura 1.1**), furanoeremofilano (**Figura 1.2**), cacalol (**Figura 1.3**), la decompostina (**Figura 1.4**) y la lactona sesquiterpénica (**Figura 1.5**), todos ellos utilizados como perfil de criterio para su clasificación (Romo de Vivar, 2007).

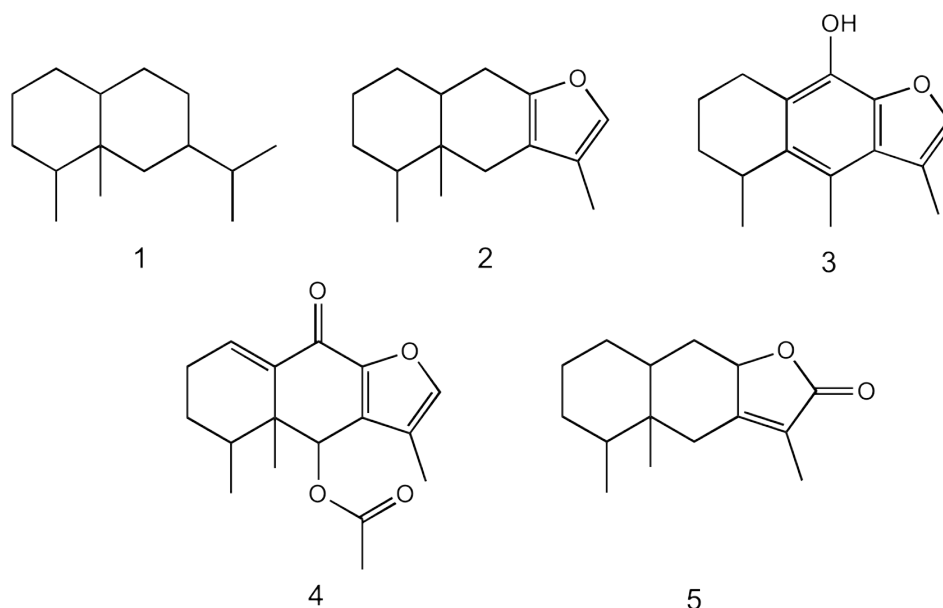


Figura 1. Estructuras básicas de los diferentes cacalólidos presentes en el género *Psacalium*

Los compuestos sesquiterpénicos tienen funciones indispensables desde el punto de vista farmacológico ya que pueden tener actividad antitumoral, antimigrañoso, antiinflamatoria y antihelmíntico, entre otros (Heinrich, 1998). Por eso la industria farmacéutica es la que tiene un mayor interés en cuanto a la investigación de la actividad farmacológica de algunos sesquiterpenos para desarrollarlos a futuro como agentes terapéuticos (Lixin, 2005).

3.3. INFLAMACIÓN

La inflamación es una respuesta fisiológica a diversos estímulos como infecciones y lesión tisular. La inflamación puede ser aguda o crónica (Robbins *et al.*, 1990). Los signos clínicos que caracterizan la inflamación son calor, rubor (enrojecimiento), edema (hinchazón o reacción inmediata y transitoria), dolor y pérdida de la función. Su objetivo es promover la eliminación del agente dañino y restaurar el funcionamiento normal del tejido u órgano afectado. Sin embargo, el balance puede perderse produciendo un daño de forma permanente, que a menudo tiene consecuencias patológicas (Medzhitov, 2008).

La inflamación aguda es de corto periodo de duración, siendo de varios minutos hasta varias horas o días. La inflamación aguda se caracteriza por el aumento del diámetro de los vasos sanguíneos (vasodilatación) que resulta en un aumento del volumen de sangre en la zona afectada y reducción de su flujo. Esto es la razón del enrojecimiento y aumento de la temperatura en la zona lesionada. Continuando con el aumento de la permeabilidad vascular, es decir las células endoteliales que recubren las vénulas disminuyen sus uniones intercelulares produciendo poros, permitiendo el paso de proteínas plasmáticas. El resultado es la acumulación de líquido (edema) en el tejido. Finalmente, se observa la migración de monocitos, neutrófilos y linfocitos (extravasación) hasta el lugar de la lesión mediante quimiotaxis (Kindt, 2007). La inflamación aguda se inicia con una serie de eventos moleculares como la producción de mediadores inflamatorios: citocinas proinflamatorias (Interleucinas:IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12; factor de necrosis tumoral: TNF- α e Interferón- γ :IFN- γ), mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos y factor activador de plaquetas:PAF), aminas (histamina y serotonina), óxido nítrico, especies reactivas del

oxígeno y proteasas plasmáticas (factor del complemento (C3) y cininas), entre otros (Rosenberg y Gallin, 1999).

En la inflamación crónica se observan fenómenos de larga duración (semanas o meses) se incluye el flujo de linfocitos, macrófagos y crecimiento de fibroblastos. Es una respuesta prolongada de la inflamación aguda que no ha podido ser reparada. Se caracteriza por la destrucción del tejido y por la pérdida de la función de la parte afectada. Un ejemplo de enfermedad que involucra la inflamación crónica, es la artritis reumatoide. Los compuestos antiinflamatorios disminuyen de manera inmediata las manifestaciones de ruborización, dolor, etc. Así como inhiben la vasodilatación y disminuyen el exudado plasmático reduciendo la formación del edema; modifican las interacciones entre los leucocitos y las células endoteliales alterando la migración hacia la zona lesionada (Pitzalis *et al.*, 2006); reducen la liberación de enzimas lisosomales, así como de mediadores proinflamatorios (Belvisi *et al.*, 2001).

3.3.1. COMPUESTOS ANTIINFLAMATORIOS

Los compuestos antiinflamatorios incluyen a dos grupos de agentes terapéuticos, los antiinflamatorios esteroideos y los no esteroideos (AINEs). Los antiinflamatorios esteroideos más importantes son los glucocorticoides (cortisol, cortisona, prednisolona y dexametasona). Actúan a través de receptores específicos citoplasmáticos, los cuales una vez activados migran al núcleo induciendo cambios en la transcripción de determinados genes implicados en la respuesta inflamatoria (Saklatvala, 2002). Los efectos de estos esteroides son el resultado de la inhibición de la expresión de citocinas proinflamatorias, como la IL-12, el TNF- α y la producción de prostaglandinas (Elenkov y Chrousos, 2002).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) constituyen un grupo de sustancias químicamente heterogéneo como la aspirina, el ibuprofeno, la indometacina, el piroxicam, el rofecoxib y el celecoxib, involucrados con el control terapéutico de la inflamación y con acciones analgésicas y antipiréticas (Devillier, 2001). Se ha demostrado que la indometacina es ampliamente conocida como un agente antiinflamatorio no esteroideo con actividad analgésica, antiinflamatoria y antipirética (Morrow y Roberts, 1994).

El mecanismo principal por lo que los AINEs ejercen sus efectos antiinflamatorios es la inhibición de la respuesta inflamatoria actuando como inhibidores de la expresión y actividad de las enzimas ciclooxigenasas COX-1 y COX-2, que inducen la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico (Kindt, 2007). Los AINEs favorecen el aumento de la permeabilidad vascular y la quimiotaxis de los neutrófilos en la reacción inflamatoria. Sin embargo, algunos estudios muestran que es la COX-2, la causante de los efectos antiinflamatorios porque se expresa en células implicadas en la respuesta inflamatoria como macrófagos y monocitos a su vez está regulada por mediadores de la inflamación como las prostaglandinas. Y la inhibición de la COX-1 produce lesión del conducto gastrointestinal, hemorragias en el estómago, disfunción plaquetaria y carece de efectos antiinflamatorios importantes (Kindt, 2007).

Algunos compuestos de origen vegetal con actividad antiinflamatoria no esteroideo se encuentran involucrados de manera directa o indirecta con distintas moléculas o mecanismos implicados en los procesos inflamatorios y actúan como inhibidores de la expresión y actividad de PLA₂, COX-2, lipooxigenasa 5 (5-LO), sinasa inducible del óxido nítrico (iNOS) y el factor de activación nuclear NF-κB (Palacios, 2006). Las lactonas sesquiterpénicas: alantolactona (**Figura 2.1**) e isoalantolactona (**Figura 2.2**) modulan procesos inflamatorios como la liberación de histamina y la inhibición de 5-LO, y del NF-κB (Siedle *et al.*, 2003).

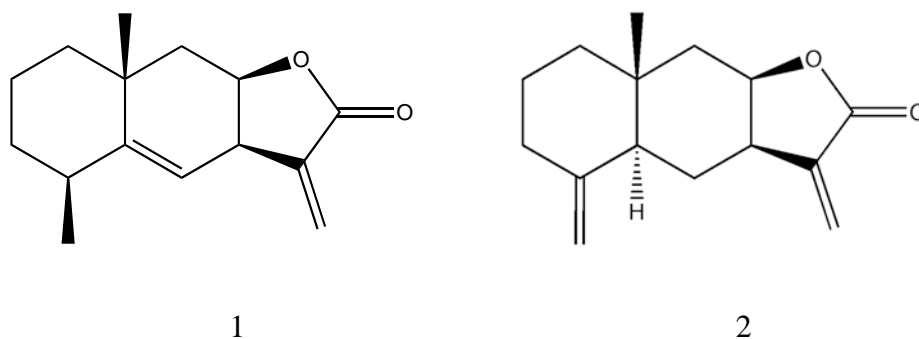


Figura 2. Representación de las lactonas sesquiterpénicas con propiedades antiinflamatorias

3.4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DEL PROCESO INFLAMATORIO

Existe una diversidad de modelos experimentales aplicables al estudio de principios activos antiinflamatorios. Los modelos de edema inducido mediante la aplicación de sustancias irritantes como TPA y carragenina, se caracterizan por inducir un efecto inflamatorio local y favorecer el incremento de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) (Ferrari *et al.*, 1989; Hu *et al.*, 1993; Sánchez y Moreno, 1999; Pugneiró *et al.*, 1998). La inhibición del edema es un indicativo del efecto antiinflamatorio de la sustancia que se evalúa (Willoughby, 2003). Los modelos de inhibición de la inflamación constituyen una herramienta de uso frecuente, con bastante fidelidad, de manera cuantitativa y eficaz. En especial los experimentos son sencillos y reproducibles, de corta duración y no precisan instrumental costoso o sofisticado además se realizan en animales disponibles como la rata y el ratón.

3.4.1. MODELO DE EDEMA INDUCIDO EN OREJA DE RATÓN CON TPA

Un buen modelo para la evaluación de agentes anti-inflamatorios ha sido la aplicación tópica de éster forbol (TPA) que produce una inflamación prolongada, intensa y bifásica en la epidermis.

La primera fase está caracterizada por el edema de la dermis y el aumento de los niveles de TNF- α . Debido a su estereoquímica como análogo conformacional del diacilglicerol, el TPA desencadena varios eventos vinculados con la activación de la proteína cinasa C (PKC por sus siglas en inglés), dependiente de calcio (Castagnag *et al.*, 1982; Fernandez-Arche, *et al.*, 2010). Además de activar los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (Holden *et al.*, 2008; Karin, 1997; Schlingemann *et al.*, 2003).

En la segunda fase se observa una inducción de la enzima COX-2. Se ha reportado que el TPA induce una respuesta inflamatoria de larga duración en comparación con el ácido araquidónico, asociada por la acumulación de células proinflamatorias y la producción de eicosanoides tales como el receptor de leucotrieno B₄ (LTB₄) y la prostaglandina E₂

(PGE₂) bloqueada por AINES e inhibidores de la lipooxigenasa, con un aumento en la permeabilidad vascular e infiltración de neutrófilos (Bradley *et al.* 1982).

Así mismo se observa un aumento de la actividad de la mieloperoxidasa en los sitios de aplicación (Sánchez y Moreno, 1999) e inducción de la iNOS entre otros eventos (Murakawa *et al.*, 2006).

3.4.2. MODELO DE EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA EN PATA DE RATA

El modelo del edema inducido con carragenina en ratas es uno de los modelos más utilizados para evaluar agentes antiinflamatorios, consiste en la administración subcutánea de una disolución de carragenina en la aponeurosis plantar de la rata; con ello se genera únicamente una reacción inflamatoria local, que no se modifica por factores ajenos (Winter *et al.*, 1962).

La respuesta inflamatoria es mediada inicialmente con una serie de eventos moleculares como la producción de histamina y posteriormente por una gran variedad de mediadores químicos que son activados en fases consecutivas. La histamina y la serotonina son los mediadores químicos de la fase activa que producen la vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular creando el edema (Crunkhorn *et al.*, 1971).

Los agentes físicos, las reacciones inmunes, los fragmentos del complemento C3a, C5a y los factores liberadores presentes en neutrófilos, monocitos y plaquetas, así como la interleucina 1 (IL-1), producen la liberación de histamina y serotonina a partir de las células cebadas (Smith y Reinard, 1992).

La formación del edema es el resultado de sinergismo entre varios mediadores de la inflamación que incrementan la permeabilidad vascular y/o incrementan los mediadores del flujo sanguíneo (Ialenti *et al.*, 1995).

3.4.3. EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA MIELOPEROXIDASA

Este modelo se ha utilizado como bioindicador de la irritación de la piel y la consecuente inflamación causada por agentes irritantes (Trush *et al.*, 1994).

En el proceso de la inflamación, los leucocitos polimórfonucleares (neutrófilos) son las primeras células que son reclutadas desde la sangre periférica hasta el sitio de inflamación, seguidas tiempo después por monocitos. La infiltración de estas células al tejido infectado o dañado está regulada y mediada por moléculas de adhesión, citocinas y componentes de la matriz extracelular tanto en las paredes de los vasos sanguíneos como en el tejido adyacente (Muller, 2002; Taylor and Gallo, 2006).

Una de las funciones de los neutrófilos es la liberación de proteínas y generación de radicales libres, los cuales contribuyen a la defensa contra patógenos, a la regulación del proceso inflamatorio y a combatir el daño causado al tejido. Un producto peculiar de los neutrófilos es la enzima mieloperoxidasa (MPO) que se almacena en grandes cantidades en los gránulos azurófilos de los neutrófilos polimorfo nucleares humanos, siendo una de las proteínas más abundantes de estas células, también se localiza en los monocitos y macrófagos tisulares (Klebanoff, 2005; Lau, *et al.*, 2006).

La MPO reacciona con el H_2O_2 proveniente de las células fagocitarias activadas por contacto con partículas extrañas, formando un complejo enzima-sustrato con una fuerte capacidad oxidativa. Este complejo forma el ácido hipocloroso (Weiss *et al.*, 1982; Malle *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003).

La respuesta de la inflamación inducida por el TPA en el edema agudo está asociada con un incremento en la actividad de la mieloperoxidasa (Lefkowitz *et al.*, 1999; Eleuteri *et al.*, 2009) y otras enzimas de la superfamilia de las peroxidasas (Ortiz de Montellano, 1992), así como también de su sustrato, el H_2O_2 (Kettle y Winterbourn, 1997), como resultado de la migración de los neutrófilos.

3.5. PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Las diferentes técnicas de cultivo de tejidos vegetales ofrecen una herramienta viable con las plantas medicinales para generar y/o aumentar la producción de diversos compuestos químicos a semejanza de la planta madre (Smith, 2000; Faisal *et al.*, 2005), en un ambiente controlado independiente de las variaciones ambientales (Sharp *et al.*, 1979).

Esto se explica con base en la propiedad de la totipotencialidad celular que refiere la capacidad que posee cualquier célula y tejido vegetal de formar todos los tipos celulares y de expresar el total de su potencial genético en la síntesis de un producto a semejanza de la célula madre en condiciones de cultivo apropiadas, así como de regenerar en una planta completa (Funk *et al.*, 1987; Lindsey y Jones, 1989; Pierik, 1997; Zhu *et al.*, 2000).

El cultivo *in vitro* puede realizarse con determinados órganos, es decir aquellos que poseen un tamaño y forma establecido, como las hojas, flores y frutos. El tamaño de dicho explante es importante, usualmente los explantes de mayor tamaño aumentan la probabilidad de tener un cultivo exitoso. Así mismo, es necesario tomar en cuenta la salud y edad de la planta madre, variaciones fisiológicas y morfológicas que puede tener de acuerdo a la estacionalidad y por variables como la ausencia de suministro permanente de nutrientes y el temprano trasplante de las plántula (George *et al.*, 2008). En especial, algunas especies con un déficit hídrico, generan una reducción en la expansión celular, ya que la turgencia de las células en crecimiento brinda la fuerza motriz para la expansión (Sánchez-Díaz *et al.*, 2000), además la fotosíntesis se ve afectada por la reducción de turgencia (Jumar *et al.*, 1994).

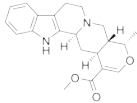
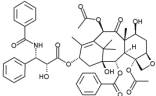


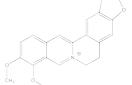
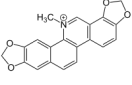
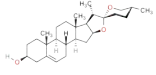
Las diferentes técnicas de cultivo de tejidos vegetales han sido investigadas en los últimos años, debido a los avances alcanzados para obtener la producción de los diferentes compuestos que presentan algunas plantas (Zenk, 1991; Ravishankar y Rao, 2000).

Por ejemplo, a partir del cultivo de raíces transformadas de *Chamomilla recutita* L., se han obtenidos compuestos como el cedrol e isovalerato de geranilo. En cultivos de células

en suspensión de *Vernonia cinérea* (L.) Less., se obtuvieron alcaloides y de los cultivos de callo de *Tagetes spp.* se obtuvieron piretrinas (Valdés, 2010). En especial cuando de manera constante, ilimitada, uniforme y con posibilidad de escalar la biomasa a biorreactores con diferentes capacidades (**Tabla 1**), favorecen que los experimentos en la industria farmacéutica para producir diferentes tipos de fármacos, sean reproducibles o sean un medio efectivo para la incorporación de materiales precursores, los cuales son difíciles de administrar en la especie vegetal completa (Lindsey y Jones, 1989; Gerats *et al.*, 1991; Payne *et al.*, 1992; Islam, 1996, Pedapudi *et al.*, 2000).

La producción de metabolitos secundarios como los sesquiterpenos están directamente asociados a la intensidad de luz, que de acuerdo a su cantidad y calidad pueden inducir o no tener un efecto especial sobre el desarrollo de la planta, favorable para la biosíntesis o acumulación de estos compuestos, aun en condiciones controladas de cultivo *in vitro*. Por ej. *Digitalis lanata* Ehrh., acumuló digoxina en sus hojas durante su estadio vegetativo, mientras que en el invierno la acumulación se observó limitada (Linley *et al.*, 1985).

Tabla 1. Rendimiento obtenido de diferentes metabolitos secundarios con importancia farmacológica mediante el cultivo de células en suspensión (DiCosmo y Misawa, 1995).

Especie	Compuesto	Actividad biológica	Rendimiento	
			Cultivo <i>in vitro</i> (mgL ⁻¹ ; %, PS).	Planta completa (% en PS*).
<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	Ajmalicina 	Antihipertensivo	400 mgL ⁻¹	-
<i>Taxus brevifolia</i> Nutt.	Alcaloide Taxol	Anticancerígeno	9.89 mgL ⁻¹	-
<i>Taxus cuspidata</i> Siebold & Zucc.				
<i>Rauwolfia serpentina</i>	Diterpeno Ajmalicina	Antiarrítmico	1600 mgL ⁻¹	0.3
<i>Camptotheca acuminata</i> Decne.	Camptotecina 	Anticancerígena	0.00025 % PS	-
<i>Artemisia annua</i> L.	Alcaloide Artemisina 	Antimalárico	-	-
<i>Coptis japonica</i> Makino	Lactona sesquiterpénica Berberina 	Antiinflamatorio Antimicrobiano	10% PS; 700 mgL ⁻¹	2-4
<i>Papaver somniferum</i> L.	Alcaloide Sanguinarina 	Antimicrobiano	250 mgL ⁻¹	-
<i>Dioscorea deltoidea</i> Wall.	Alcaloide Diosgenina 	Anticonceptivo	2.0% PS	2.0
<i>Panax ginseng</i> C.A. Mey.	Esteroido Gingenósidos	Inmunoestimulante	0.4% PS; 150 mgL ⁻¹	4.5
<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold & Zucc.	Shikonina	Antibacterial, antiúlceras	20% PS; 1400 mgL ⁻¹	1.5

*PS: peso seco.

3.6. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass. (Asteraceae)

La clasificación taxonómica de *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass., (Syn. *Senecio peltiferus* Hemsl.) se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2. Taxonomía de *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass.

<i>Reino</i>	Plantae
<i>Subreino</i>	Tracheobionta
<i>División</i>	Magnoliophyta
<i>Clase</i>	Magnoliopsida
<i>Subclase</i>	Asteridae
<i>Orden</i>	Asterales
<i>Familia</i>	Asteraceae
<i>Tribu</i>	Senecionenae
<i>Género</i>	<i>Psacalium</i>
<i>Especie</i>	<i>Psacalium peltatum</i> (Kunth)

Para el género *Psacalium*, se considera que hay 47 especies distribuidas desde el suroeste de los E. U. A. hasta Guatemala (Barkley *et al.*, 1996). En México se calculan 36 especies nativas con 6 especies de distribución amplia, 25 de distribución regional, 8 de distribución local y 2 en peligro de extinción (Turner y Nelson, 1998).

La distribución que presenta es variable y compleja, con variedades según el lugar donde se colecta. Crece en el campo asociada a vegetación perturbada de los bosques de encino y juníferos en la Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental y en el Centro de México (Pippen, 1968; Linares y Bye, 1987).

3.6.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y ETNOBOTÁNICA DE *P. peltatum* (Kunth) Cass.

La descripción botánica de *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass., basada en Robinson y Brettell, 1973; Rzedowski y Rzedowski, 1985; Bye, 1986; Linares y Bye, 1987., refiere que es una planta herbácea perenne, subscaposa, erecta de 0.3 a 1.3 m. de alto (**Figura 3 A-B**). Las cabezuelas tienen 20 o más flores, sobre pedúnculos de 0.3 a 2 cm de largo, receptáculo plano y ligeramente alveolado. El color de las flores es crema a café, de 14 a 21 mm de largo (**Figura 3 C**). Tiene de 3 a 4 hojas basales en roseta, con pecíolos de 6 a 42 cm de largo (**Figura 3D**). Las hojas son principalmente peltadas con láminas suborbiculares peltadas y palmatinervias, profundamente multilobadas, con 6 a 8 nervaduras principales, y de 7 a 9 lóbulos o dientes más pequeños (**Figura 3E**). Además los tallos, hojas e inflorescencias son densamente pilosos con pelos multicelulares. El tallo principal es estriado-acanalado y meduloso, lanoso en la base cerca de la raíz. Con rizoma grueso; numerosos y delgados fascículos de raíces con orientación vertical que se extienden en una corona de pelos radiculares y con grupos de tricomas en las bases de los tallos; la unión del rizoma y el tallo está cubierta por una corona de abundantes pelos amarillos; además las raíces son de color ocre y carece de olor picante (**Figura 3 F**).



Figura 3. Ejemplar de *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass. var. *peltatum* colectada en el poblado de la Estanzuela, Hidalgo, México. Escalas: A 1.5 m; B: 1 m; C: 1.3 cm; D: 40 cm, E: 25 cm; F: 22 cm.

Los aspectos etnobotánicos de *P. peltatum* refieren que esta especie forma parte del

conjunto de plantas medicinales conocido como complejo “matarique”, constituido por: *P. peltatum* (Kunth) Cass., *P. sinuatum* (Cerv.) H. Robins & Brett., *P. decompositum* (Gray) H. Robins. & Brett., *P. radulifolium* (Kunth) H. Robins & Brett. y *Acourtia thurberi* (Gray) Reveal & King, especies que pertenecen a la familia Asteraceae y tienen rizomas gruesos, con numerosas y delgadas raíces con orientación vertical y copetes pilosos en la base del tallo (Linares y Bye, 1987; Bye *et al.*, 1995).

Los rizomas de *P. peltatum* (**Figura 3 F**), son utilizadas en forma individual o en conjunto con otras raíces como remedio natural para la diabetes, el reumatismo, enfermedades renales y gastrointestinales (Roman-Ramos *et al.*, 1991, 1992; Bye *et al.*, 1995; Garduño-Ramírez *et al.*, 2001; Contreras-Weber *et al.*, 2002).

Debido al efecto hipoglucemiante de estas especies, se originó la sobreexplotación nacional e internacional de las raíces de poblaciones de algunas de ellas, particularmente de *P. decompositum* considerada la especie dominante, más utilizada, costosa y que se encuentre en vías de extinción local (Linares y Bye, 1987) porque habita exclusivamente en la Sierra Tarahumara (Chihuahua) y es buscada por la gente que habita más allá de su área geográfica (Inman *et al.*, 1999; Alarcón-Aguilar *et al.*, 1997).

Las demás especies son consideradas substitutas, utilizadas dentro de su área geográfica de distribución natural, *P. peltatum* en el Valle de México, *P. radulifolium* en la Sierra de Álvarez (San Luis Potosí), *P. sinuatum* en la Sierra Madre Occidental y *A. thurberi* en el norte de la Sierra Madre Occidental (Sur de Arizona y Nuevo México) (Linares y Bye, 1987)

En especial, *P. peltatum* es la especie sustituta más utilizada a un costo más accesible debido a su crecimiento cercano a los centros de comercialización (Alarcón-Aguilar *et al.*, 1997).

3.6.2. ASPECTOS FITOQUÍMICOS, FARMACOLÓGICOS Y BIOTECNOLÓGICOS DE *P. peltatum* (Kunth) Cass.

Los compuestos aislados de *P. peltatum* fueron identificados parcialmente y comparados con los datos ya descritos para *P. decompositum*, especie que pertenece al complejo matarique (Romo y Joseph-Nathan, 1964; Correa y Romo, 1966 Rodríguez *et al.*, 1968; Jiménez *et al.*, 1997; Inman, *et al.*, 1999; Hernández, 1999; Reyes *et al.*, 2002). Las estructuras químicas mostraron estar relacionadas con el acetato de maturina (**Figura 4.1**), la maturinina totalmente aromática con un metilo (**Figura 4.2**), la maturina con un grupo hidroximetilo (**Figura 4.3**) y la maturinona (**Figura 4.4**) que presentó actividad como inhibidor de la peroxidación de lípidos de membrana en mitocondrias y microsomas (Doe *et al.*, 2005). Además se identificó por primera vez el angelato de 3,4-dehidro-14-maturinol (**Figura 4.5**) el cual podría ser considerado el marcador químico para la certificación y autenticidad de la especie (Rojano-Vilchis, 2005).

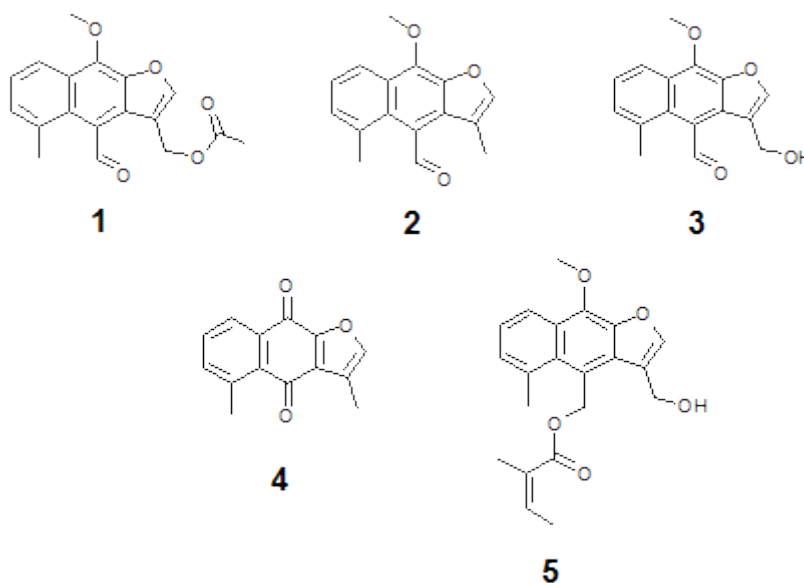


Figura 4. Principales sesquiterpenos aislados e identificados de *P. peltatum* (Kunth) Cass.

El estudio del efecto hipoglucemiante en ratones con la decocción de las raíces de *P. decompositum*, *P. peltatum* y *Acourtia thurberi*, demostró que no había relación con

algunos de los compuestos mencionados (Alarcón-Aguilar *et al.*, 1997). Contreras-Weber *et al.*, 2002 observó el efecto hipoglucémico con *P. peltatum* a través de la decocción de las raíces, sin atribuir propiedad medicinal alguna a compuesto aislado. En ensayos de actividad antiinflamatoria con ratones se observó que el compuesto acetato de matorina, aislado de *P. peltatum* presentó actividad antiinflamatoria (Hernández-Tejeda, 1999) cuyo valor se corroboró en el modelo de edema inducido con éster de forbol (TPA) en un porcentaje de inhibición del 95.41% (Rojano-Vilchis, 2005). Además, se analizó y se observó que el acetato de matorina carece de citotoxicidad contra células cancerígenas, estimula la viabilidad de macrófagos de ratón y esplenocitos, induce la actividad enzimática lisosomal, pinocitosis y actividad de las células NK (Natural Killer) e incrementa la producción de IL-2, IL-15 y IFN- γ en ratones inmunosuprimidos, lo cual indica que el acetato de matorina puede ser un buen auxiliar en la restauración de las funciones del sistema inmune en enfermedades que causan inmunosupresión (Juárez, M., *et al.* 2013).

Con respecto a los aspectos biotecnológicos, la producción de metabolitos secundarios por cultivo de tejidos vegetales, se observó en los cultivos de raíces transformadas de *P. decompositum* la producción de los compuestos que se obtienen de las raíces colectadas en campo, en contraste con los cultivos *in vitro* de callo y de células en suspensión en donde no se observó la síntesis de compuestos (Escalante, 2007). Sin embargo, los estudios del establecimiento de los diferentes cultivos *in vitro* de *P. peltatum* para monitorear la producción de los diferentes compuestos aislados e identificados del extracto hexánico muestran que en el estudio de inducción e incremento de los compuestos matorina, acetato de matorina y angelato de 3,4 dehidro-14-matorinol, por la adición de un homogenado fúngico de *Aspergillus niger* en los cultivos de células en suspensión de *P. peltatum*, se observó el incremento del acetato de matorina, del 0.2407 al 0.810 gL⁻¹ en peso seco, no así de la matorina y el angelato de 3-4 dehidro 14-matorinol. El rendimiento obtenido del acetato de matorina por efecto de la adición del homogenado fue del 73% comparado con lo obtenido en la planta *in vivo* (Hernández-Tejeda, 1999; Rojano-Vilchis, 2005).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La familia Asteraceae está ampliamente distribuida a nivel mundial y agrupa el mayor número de plantas medicinales utilizadas como remedio natural para el tratamiento de diversas enfermedades que afectan al hombre. El principal empleo de las raíces de la especie medicinal *Psacalium peltatum* (Kunth), es como agente hipoglucemiante. Sin embargo, no existe evidencia en la literatura del potencial que tiene el compuesto acetato de maturina identificado parcialmente de la especie vegetal *P. peltatum* como agente antiinflamatorio así como su producción en las raíces de las plántulas regeneradas de cultivos *in vitro*. Por lo tanto, ¿Existirá en la especie vegetal *P. peltatum*, la obtención e identificación estructural del acetato de maturina, que mediante evaluaciones de la actividad antiinflamatoria muestre tener la capacidad como agente antiinflamatorio y a su vez el compuesto acetato de maturina, se produzca en las raíces de plántulas regeneradas en cultivos *in vitro* de *P. peltatum*?

5. HIPÓTESIS

Se plantea que mediante la obtención de los diferentes extractos orgánicos de las raíces de la especie vegetal *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass., el aislamiento y elucidación estructural del compuesto sesquiterpénico, acetato de maturina, mostrará tener la capacidad como agente(s) antiinflamatorio(s) en los modelos de actividad antiinflamatoria del edema inducido en la oreja de ratón con 12-*O*-tetradecanoilphorbol acetato (TPA), carragenina y de la actividad de la enzima mieloperoxidasa. Así como, el compuesto, acetato de maturina, se producirá en las raíces de las plántulas regeneradas en cultivos *in vitro* de *P. peltatum*.

6. METODOLOGÍA

Los objetivos planteados del presente proyecto de investigación se llevaron a cabo en dos etapas. Ambas etapas de experimentación se complementan mediante el siguiente diagrama (**Figura 5**).

En la primera etapa se llevó a cabo el estudio del aislamiento, purificación, identificación de los compuestos sesquiterpénicos, así como la evaluación de la actividad biológica antiinflamatoria del acetato de maturina en los laboratorios del Instituto de Química. Laboratorio 2-10 del Departamento de Productos Naturales, Laboratorio de Pruebas Biológicas, Laboratorio de Cromatografía, Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear y Laboratorio de Espectrometría de Masas.

En la segunda etapa se realizó el establecimiento de la regeneración *in vitro* de *P. peltatum* mediante el establecimiento de los diferentes cultivos de tejido vegetal en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM.

Ruta experimental

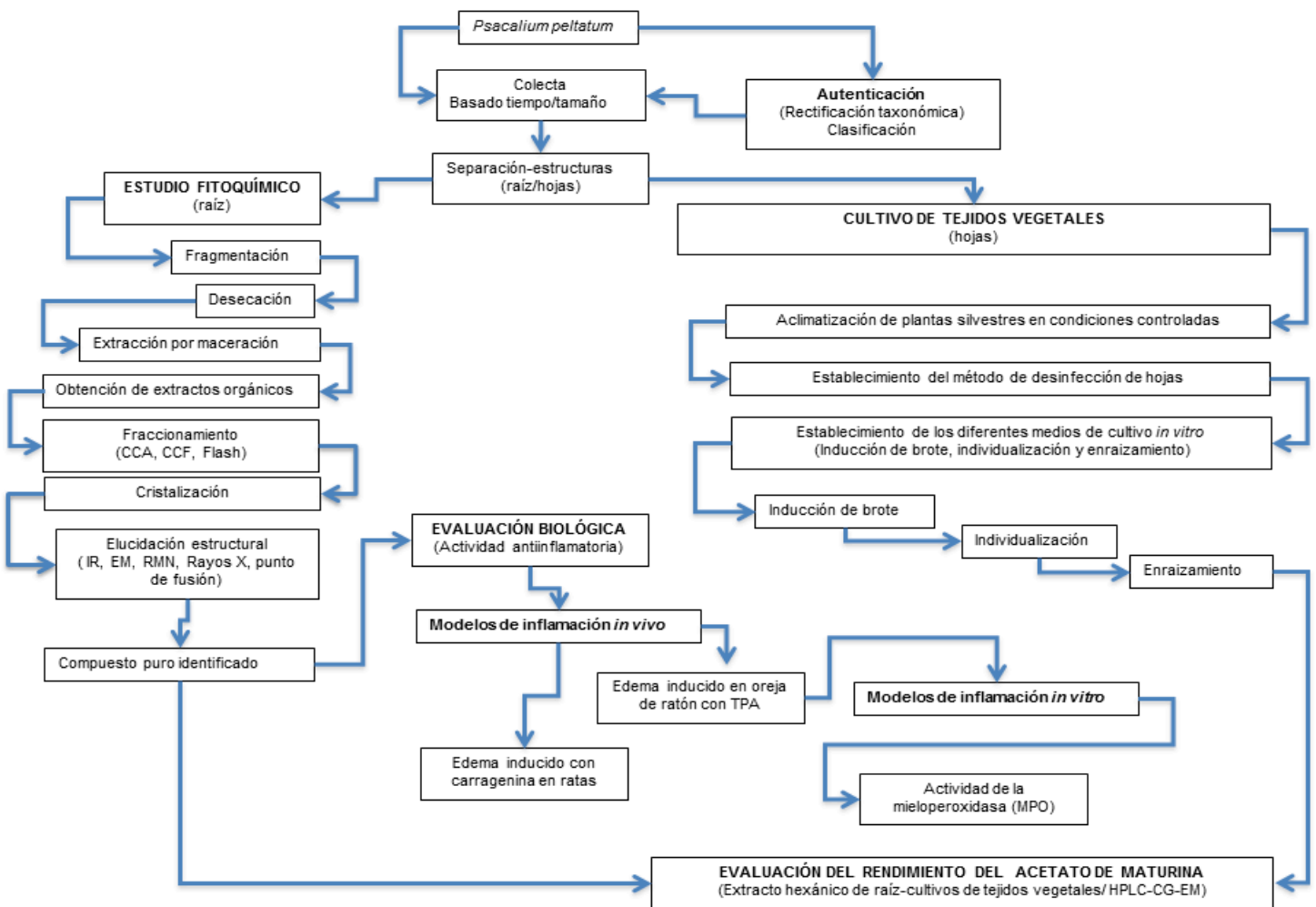


Figura 5. Representación general de la ruta experimental del estudio fitoquímico, evaluación biológica, cultivo de tejidos vegetales de *P. peltatum* y evaluación del rendimiento del acetato de maturina.

6.1. COLECTA Y AUTENTICACIÓN DE *P. peltatum* (Kunth) Cass.

Mediante la información del lugar de colecta por Hernández-Tejeda (1999) y de la búsqueda en el Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología de la UNAM de los diferentes lugares de localización y distribución de *P. peltatum*. La zona de la colecta de los organismos completos, rizomas primarios y secundarios de *P. peltatum* se realizó dentro de la región central de México, hábitat natural de *P. Peltatum* (Linares y Bye, 1987) en el Estado de Hidalgo en el Municipio de Mineral del Chico, en el poblado de la Estanzuela en los meses de septiembre y octubre del año 2008, 2009 y 2010. El perímetro de la zona de estudio fue de 2,453 m². Las coordenadas geográficas de la zona de estudio son 20°09'55" de latitud norte y 98° 45'08" de longitud oeste. La vegetación de la zona de estudio fue del tipo de vegetación de montaña de bosque de *Quercus rugosa* (Masam.) J.C. Liao (encino) y *Juniperus deppeana* Steud. (junípero), con un clima templado. La rectificación taxonómica de la especie fue realizada por la técnica académica del Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología de la UNAM, Gilda Ortiz Calderón. Un ejemplar de *P. peltatum*, fue depositado en el Herbario Nacional de la colecta 4Rojano (MEXU 1138692).

6.2. ESTUDIO FITOQUÍMICO

Los compuestos sesquiterpénicos fueron aislados, purificados e identificados a partir de los extractos hexánicos de los rizomas secundarios de *P. peltatum*, los cuales se utilizaron como patrón de referencia en los métodos analíticos. A continuación se menciona la preparación del extracto hexánico y el procedimiento cromatográfico optimizado.

6.2.1. PREPARACIÓN DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS ORGÁNICOS A PARTIR DE LAS RAÍCES DE *P. PELTATUM* (KUNTH) CASS.

Los rizomas primarios y secundarios de *P. peltatum* fueron separados manualmente para su análisis. Se cortaron en fracciones pequeñas de aproximadamente 1.5 cm. Posteriormente fueron colocadas en superficies limpias a temperatura ambiente, aproximadamente por 20 días para eliminar el agua contenida en los tejidos vegetales. Después se colocaron en recipientes de vidrio de diferentes capacidades, adicionando el

disolvente hasta que cubriera totalmente los rizomas, de esta forma el material vegetal fue sometido a una maceración exhaustiva con *n*-hexano, cloruro de metileno, etanol, metanol y agua. El tiempo de maceración fue de 24 a 72 horas, durante 7 días. Al término de cada extracción, las soluciones fueron filtradas y concentradas a sequedad mediante presión reducida con una temperatura máxima de 40° C en el rotavapor.

6.2.2. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE RAÍZ

La obtención, identificación y la elucidación estructural de los compuestos presentes, se realizó con el fraccionamiento del extracto hexánico de raíz. Para los procedimientos de extracción se utilizaron disolventes grado industrial, destilados en el laboratorio. Los disolventes y reactivos empleados para efectuar la purificación y los diferentes análisis fueron grado reactivo analítico (Sigma).

6.2.3. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía en capa fina (CCF) la cual se realizó en cromatofolios de aluminio cubiertos de gel de sílice G-200, UV 254 (Merck), de 0.2 mm de espesor e impregnadas con un indicador de fluorescencia 60 GF254 Alugram. Los compuestos fueron visualizados en una cámara con una lámpara de luz ultravioleta (U.V.) de onda corta (254 nm) y larga (365 nm) (Cole Palmer 9815 series Lamps). Posteriormente, los compuestos fueron revelados mediante la aspersion sobre la placa de una solución de sulfato cérico $Ce(SO_4)_2$ al 1% (p/v) disuelto en ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2N y hielo picado. Para el desarrollo del color fue necesario calentar la placa por 2 minutos aproximadamente a 110°C.

6.2.4. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA ABIERTA

El fraccionamiento del extracto hexánico, se llevó a cabo mediante cromatografía en columna abierta. Una porción del extracto hexánico se disolvió con la mínima cantidad de disolvente hasta la total disolución y se añadió gel de sílice en una proporción 1:3. Dependiendo de la porción obtenida de extracto hexánico se utilizaron columnas de vidrio

de diferentes capacidades, las cuales fueron empacadas con gel de sílice 60 Ahigram Sil G, kiesel, malla 70-230 (Merck) como fase estacionaria. Cada fracción obtenida se concentró en un rota evaporador hasta su sequedad. Para desarrollar la cromatografía se utilizaron mezclas de disolventes en orden creciente de polaridad, se inició la elución con n-hexano después se incrementó gradualmente la polaridad con un sistema hexano-acetato de etilo y metanol. Se recolectaron fracciones de 50-250 mL, se eliminó la fase móvil en rota evaporador y las fracciones concentradas se colectaron en frascos viales de vidrio. Se monitoreó el desarrollo de la cromatografía por cromatografía en capa fina (CCF) revelada con luz U.V. y sulfato cérico en ácido sulfúrico. Se reunieron aquellas fracciones que presentaron similitud cromatográfica.

6.2.5. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA RÁPIDA

Dependiendo de la muestra obtenida del extracto hexánico se utilizaron columnas de diferentes volúmenes que contienen en la parte inferior una placa porosa de fibra de vidrio. Se acopló a un matraz kitasato con salida a vacío. La fase estacionaria utilizada fue gel de sílice 60 H, la cual se empacó de forma uniforme, posteriormente se aplicó vacío y el adsorbente se comprimió manualmente. Después se vertió una cantidad de fase móvil para empaquetar aún más la fase estacionaria. Cuando la fase estacionaria se secó completamente, se agregó la muestra de extracto adsorbida en gel de sílice en la superficie del adsorbente. A continuación se añadió la fase móvil y se aplicó vacío. Para desarrollar la cromatografía se utilizaron mezclas de disolventes en orden creciente de polaridad como en la cromatografía en columna abierta, de la misma forma se recogieron fracciones de 50 a 100 mL. Las fracciones se colectaron y depositaron en frascos viales de vidrio y se monitoreó el desarrollo de la cromatografía por CCF reuniendo las fracciones que presentaron similitudes cromatográficas.

6.2.6. CRISTALIZACIÓN

En la mayoría de los casos se indujo la cristalización por medio del raspado de las paredes de los viales de vidrio donde se encontraba la muestra. Al cabo de unas horas se formaban los cristales. No fue necesario secarlos al vacío. Únicamente se concentraban en otro vial de color ámbar para evitar su oxidación y se conservaban a temperatura ambiente o en refrigeración a 4 °C.

6.2.7. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS SESQUITERPÉNICOS

Los compuestos obtenidos del extracto hexánico de los rizomas de *Psacalium peltatum* se enviaron para su análisis a los laboratorios de Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear, Espectrometría de Masas y Cromatografía del Instituto de Química, UNAM.

6.2.8. ESPECTROMETRÍA DE INFRARROJA

La espectrometría de absorción en la región infrarroja (IR) se realizó en un espectrofotómetro Nicolet modelo Magna FT-IR SX con la técnica de pastilla de bromuro de potasio (KBr) y en solución de cloroformo. Las frecuencias máximas de absorción se presentaron en cm^{-1} .

6.2.9. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Los experimentos se realizaron en un espectrómetro JEOL JMS AX 505 HA mediante la técnica de impacto electrónico (MS-EI) a 70 eV, fueron obtenidos por inyección directa en un equipo Jeol operando en modo EI^+ . Los resultados se mostraron como la relación de masa respecto de la carga (m/z), junto con los porcentajes de abundancia relativa (% a.r.).

6.2.10. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN de ^1H) se realizaron por medio de espectrómetros analíticos Varian Gemini 200 (200 MHz), Varian UNITY-300 (300 MHz) y Varian Unity-500 (500 MHz), los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN de ^{13}C) se realizaron por medio de espectrómetros analíticos de 125 MHz; se utilizaron los siguientes disolventes deuterados (Aldrich): cloroformo (CDCl_3) dimetil sulfóxido (DMSO-d_6) o metanol (CD_3OD). Los desplazamientos químicos se expresaron en partes por millón (ppm) referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Las constantes de acoplamiento (J) se dan Hz. Las abreviaturas empleadas para denotar la multiplicidad de las señales son: s, señal simple o singulete; d, señal doble o doblete; dd, señal doble de doble; m, señal múltiple o multiplete; t, señal triple o triplete.

6.2.11. DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Los estudios de difracción de rayos X se llevaron a cabo en un difractómetro Bruker Smart APEX AXS con detector de área. La radiación y longitud de onda aplicada fue MoKa con $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$, tipo de barrido de hemisferio, temperatura 298 K, rango de θ para la recolección de datos de 2.14 a 25.39°, 12 272 reflexiones colectadas, 2800 reflexiones independientes, el programa empleado para la determinación estructural fue el SHELXS-97. Los datos cristalográficos se depositaron en el Centro Cambridge de Datos Cristalográficos (CCDC) y pueden ser solicitados al director (The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (Fax: +44 (1223) 336-033) o por correo electrónico a la dirección deposit@ccdc.cam.ac.uk.

6.2.12. DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE FUSIÓN

Los puntos de fusión de cada compuesto se determinaron en un equipo Fisher Scientific empleando cubreobjetos redondos, el valor se reportó en °C.

6.3. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DEL PROCESO INFLAMATORIO

Los animales utilizados en los ensayos se adquirieron en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se manipularon de acuerdo con las condiciones establecidas en la norma NOM 062-ZOO-1999. En especial la colocación de los animales dentro de cajas de polipropileno translúcidas, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y en condiciones ambientales controladas (20-22 °C de temperatura y de 50-60 % de humedad). Los animales recibieron *ab libitum* agua y una dieta estándar de laboratorio.

6.3.1. MODELO DE EDEMA INDUCIDO EN OREJA DE RATÓN CON ACETATO DE 12-O-TETRADECANOILFORBOL (TPA)

El ensayo de edema inducido con acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA, Sigma) se realizó siguiendo la metodología descrita por Rao *et al.*, 1993 y Payá *et al.*, 1996. Se emplearon ratones machos de la cepa CD1 con pesos entre 25-30 g. Los animales se dividieron al azar en grupos (n=5) por cada tratamiento. Se colocaron en cajas de acrílico transparente a temperatura constante de 24 °C, con un fotoperiodo de 12/12 h luz/oscuridad y con agua y alimento *ad libitum*.

Los ratones se pesaron, marcaron y anestesiaron por vía *i.p.* con pentobarbital sódico a una dosis de 3.5 mg/Kg. Una vez anestesiados los ratones, se aplicó a nivel tópico con una microjeringa de vidrio marca Hamilton en ambos lados de la oreja derecha una solución de TPA (0.25 mg/mL) disuelto en 10 µL de etanol (5 µL por lado de la oreja). En la oreja izquierda (control) recibió el vehículo correspondiente 10 µL de etanol (5 µL por un lado de la oreja) y 20 µL del vehículo del compuesto (10 µL por el otro lado de la oreja). Después de 10 min, se aplicaron los extractos y el compuesto de prueba (acetato de matorina: MA), disueltos en 20 µL del vehículo correspondiente (metanol, etanol, acetona, diclorometano, acetato de etilo o mezcla de disolventes) sobre ambos lados de la oreja derecha en las dosis indicadas en la **Tabla 3**. La indometacina se aplicó en la oreja derecha del grupo control como fármaco de referencia en las dosis indicadas en la **Tabla 3**. El grupo control recibió en la oreja derecha la mezcla de disolventes correspondiente en la

misma cantidad que los tratados. La oreja izquierda sirvió como control negativo. Cuatro horas después de la aplicación del TPA, los extractos, el compuesto de prueba y la indometacina, los animales fueron sacrificados a eutanasia con bióxido de carbono (CO₂) para la toma de una biopsia con sacabocados de 7,0 mm de diámetro de ambas orejas de cada animal.

Tabla 3. Sustancias evaluadas (extractos, compuesto de prueba: acetato de matorina y de referencia: Indometacina) en el modelo de inflamación inducido por TPA

Extractos/compuestos	Dosis (mg/oreja)	Vehículo
EHRa	0.18,0.42,1	A
EetRa	0.18,0.42,1	B
EMRa	0.18,0.42,1	C
EARa	0.18,0.42,1	D
MA	0.18,0.31,0.42,0.56,1	E
Indometacina	0.04,0.08,0.15,0.26,0.46	E

EHRa: Extracto Hexánico de Raíz; EetRa: Extracto etanólico de Raíz; EMRa: Extracto Metanólico de Raíz; EARa: Extracto Acuoso de Raíz. MA: Acetato de Matorina. A: MeOH-acetona (1:1 v/v); B: EtOH-H₂O (1:1 v/v); C: MeOH; D: MeOH-H₂O (1:1 v/v) H₂O; E: EtOH-acetona (1:1 v/v).

La inflamación se evaluó como la diferencia de pesos (en mg) entre la biopsia de la oreja derecha respecto a la biopsia de la oreja izquierda de cada animal. El incremento del peso de la muestra derecha con respecto a la izquierda representa el edema. Los porcentajes de inhibición del edema (*EI%*) se calculó con la fórmula: % de Inhibición (*EI%*) = [(C-E) / C] 100. Donde C corresponde al valor promedio del edema del grupo control (tratado con TPA) y E corresponde al valor promedio del edema del grupo experimental tratado con las sustancias de prueba o el fármaco de referencia. Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguida de una prueba de Dunnett de comparación múltiple para aislar los grupos con diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) (Tallarida, 1987). La dosis inhibitoria 50 (*DI*₅₀ en mg/Kg), es la dosis que produce una respuesta igual a la mitad de la respuesta máxima. La dosis efectiva 50 se determinó trazando una línea horizontal del punto del 50% de respuesta en la región lineal de la curva de dosis-respuesta; en el punto de intersección con la curva se traza una línea vertical. El punto en el cual la línea intercepta la abscisa, es la *DI*₅₀.

6.3.2. MODELO DE EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA EN PATA DE RATA

El ensayo de edema inducido con carragenina se realizó siguiendo la metodología descrita por Winter *et al.*, 1962, con ciertas modificaciones. El ensayo se realizó con ratas macho Wistar con un peso en el rango de 180 a 200 g, distribuidas al azar en grupos de seis por tratamiento. El volumen basal (V_0 , mL) de la pata trasera derecha de cada rata se midió por triplicado en un pletismómetro previamente calibrado (modelo 7150, UGO Basile, Italia). Inmediatamente después, se administraron por vía intraperitoneal los extractos y el compuesto de prueba disueltos en una mezcla de Tween 80 (5%) en agua y DMSO (9:1 v/v) a la dosis de 100 mg/Kg porque fue la dosis con evidente efecto antiinflamatorio para con el ibuprofeno (In-Tae *et al.*, 2004) el diclofenaco (Ojewole, 2005) y los extractos que son comúnmente utilizados a esta concentración (Bolanle *et al.*, 2012, Arawwawala *et al.*, 2012; Prakash Babu *et al.*, 2011). Además, el naproxeno, se utilizó como control positivo porque es ampliamente aceptado como antiinflamatorio no esteroideo a una dosis-efecto dependiente (Delporte *et al.*, 2005). Los fármacos de referencia que se utilizaron fueron el naproxeno e ibuprofeno, administrados 30 minutos antes por vía intraperitoneal. El grupo control recibió el vehículo correspondiente.

Una hora después (t_0), el edema en la pata derecha fue inducido mediante la administración subcutánea de carragenina al 0.1 % (p/v) en solución salina fisiológica en el cojinete plantar de la pata derecha. El volumen de la pata se midió mediante la técnica volumétrica de desplazamiento de fluido con un pletismómetro durante un periodo de 5 horas después de la administración de la carragenina. La diferencia de los volúmenes a cada tiempo respecto a V_0 representó una medida del edema. Estos datos se utilizaron para calcular la variación del edema ($V_t - V_0$) en cada grupo. Los porcentajes de inhibición (I%) fueron determinados usando la siguiente fórmula: $I\% = 100 - (B \times 100) / A$, donde A es el valor promedio de la variación del edema ($V_t - V_0$) en el grupo control y B es el ($V_t - V_0$) en los grupos tratados con acetato de maturina y los fármacos de referencia. Los datos se expresaron como la media \pm error estándar. Con los datos estadísticamente significativos se construyeron curvas dosis-respuesta para cada tratamiento y se realizó un ajuste lineal, lo que permitió calcular los valores de la dosis inhibitoria 50 (DI_{50}) para cada tratamiento.

6.3.3. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MIELOPEROXIDASA (MPO) POR EL MÉTODO DE TMB (3, 3', 5, 5'-TETRAMETILBENZIDINA)

El ensayo se realizó con la muestra de oreja del ensayo de edema inducido en la oreja de ratón con TPA, según los protocolos de Suzuki *et al.* (1983) y Bradley *et al.* (1982). Después de la administración por vía tópica tanto de TPA como del compuesto a probar así como de indometacina en los grupos de ratones macho de la cepa CD-1. Los ratones se sacrificaron a las tres horas posteriores a la aplicación del TPA y se obtuvieron las biopsias de 7 mm de diámetro de ambas orejas de cada ratón, mientras que los ratones con indometacina se sacrificaron a las seis horas y se obtuvieron biopsias de ambas orejas en idénticas condiciones (Murakawa *et al.*, 2006). Las muestras de orejas de ambos grupos se pesaron y congelaron con hielo seco en un tubo eppendorf seco. Las muestras se homogenizaron mediante el homogeneizador de tejidos marca OMNI de 5 mL y se agregó 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 80 mM, pH 5.4 conteniendo 5% de HTAB (Bromuro de hexadecyltrimetil-amonio) y se homogeniza por 60 seg a 3000 rpm. Después se congeló y descongeló 3 veces el homogenado y se sonificó por 20 seg., se centrifugó por 20 min a 12,000 rpm a 4°C. Al término se pasaron por cuadruplicado 10 µL del sobrenadante a una micro placa de 96 pozos. El blanco o control sólo lleva 10 µL de HTAB 0.5 %. Las demás muestras se añadieron 180 µL de PBS (solución amortiguadora de fosfatos) 80 mM pH 5.4. La placa se calentó a 37°C y se mantuvo a esta temperatura durante el resto del ensayo. Se adicionaron 20 µL de H₂O₂ al 0.017%. La reacción se inició al adicionar 20 µL de clorhidrato de tetrametilbencidina TMB 18.4 M en una disolución acuosa de dimetilformamida DMF al 50%. Posteriormente se incubó a 37 °C durante 5 min con agitación constante. La reacción se detuvo adicionando 20 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2.0 M en un baño de hielo. La actividad enzimática se determinó colorimétricamente empleando un lector de placas, midiendo la absorbancia a 450 nm en un lector de micro placa Bio-Tek ELx808. El porcentaje de inhibición de la actividad enzimática (IA%) se calculó con la ecuación: $IA\% = (Ac - Ap / Ac) * 100$, en donde Ac es la absorbancia del grupo control y Ap es la absorbancia del grupo problema. Los datos se expresaron como la media \pm error estándar.

6.4. CULTIVOS DE TEJIDOS VEGETALES

Para llevar a cabo el establecimiento de los diferentes medios de cultivos de inducción de brotes, individualización y rizogénesis. Fue necesario establecer la aclimatización de las plantas trasplantadas a maceta, adicionando una solución fertilizante para obtener la máxima cantidad de hojas. Además se estableció el método de desinfección de las hojas que sirvieron como explantes para los diferentes medios de cultivo sólido. A continuación se menciona la forma de la aclimatización, el método de desinfección, la formulación y preparación de los medios de cultivo.

6.4.1. ACLIMATIZACIÓN DE PLANTAS SILVESTRES

Las plantas colectadas en campo fueron trasplantadas a macetas con un diámetro de 30 cm, favoreciendo que el sustrato no estuviera compactado, ya que no permitiría la distribución de agua y de la solución fertilizante. Fueron colocadas a la sombra con una temperatura promedio de 17°C. El riego de las plantas se realizó cada 7 días, con agua potable. Se utilizó una solución fertilizante comercial de la marca Miracle-Grow que tiene un porcentaje de nitrógeno, fosfato y potasio de 24:8:16, para favorecer la formación de hojas nuevas. Se probaron dos tratamientos con la solución fertilizante comercial, con dos grupos de tres plantas en maceta por grupo. El primer tratamiento se hizo con la adición de la solución fertilizante cada 15 días y el segundo tratamiento fue cada mes. En ambos tratamientos se utilizó la cantidad referida en el producto.

6.4.2. ESTABLECIMIENTO DEL MÉTODO DE DESINFECCIÓN DE HOJAS

A partir de la formación de hojas con la solución fertilizante. Se colectaron de forma aleatoria por cada maceta, ejemplares con un diámetro de 10 cm. La desinfección de las hojas, se realizó mediante el siguiente procedimiento: lavado con agua jabonosa, seguido de inmersión con agitación constante en etanol al 70% por 1 minuto, así como en solución de hipoclorito de sodio comercial con el 6 % de ingrediente activo al 10% (v/v). Después se removió la solución y se enjuagó exhaustivamente con abundante agua destilada estéril en condiciones de esterilidad. Se probaron tres tiempos de inmersión del tejido en el agua

jabonosa y de la solución de hipoclorito de sodio comercial, 0,7 y 10 minutos para cada solución. Al finalizar la desinfección a cada lamina foliar, se le realizaron cortes de 1 cm² en la parte central cerca de las nervaduras principales. De 4 a 5 explantes por lámina foliar se depositaron en los frascos con medio de cultivo.

6.4.3. ESTABLECIMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA INDUCCIÓN DE BROTE, INDIVIDUALIZACIÓN Y ENRAIZAMIENTO *IN VITRO*

El medio de cultivo usualmente consiste de una solución de sales inorgánicas, una fuente de carbono, vitaminas, reguladores del crecimiento y agentes gelificantes, siendo una composición específica para cada especie e inclusive para cada tipo de explante (George *et al.*, 2008).

Los medios de cultivo de inducción de brote, individualización y de enraizamiento, se prepararon con base en los componentes de los medios de cultivo de Murashige y Skoog, (1962) (MS) (**Tabla 4**). En los cultivos *in vitro* las plantas sintetizan las vitaminas en muy baja concentración, por lo cual se les adicionan para mejorar el rendimiento de los cultivos (Razdan, 2003), por lo tanto se utilizó una mezcla de vitaminas (R2) con base en la mezcla de vitaminas del medio de cultivo basal de Murashige y Skoog, (1962) (MS) (**Tabla 5**).

Tabla 4. Formulación del medio de cultivo base de Murashige y Skoog, (1962) (MS).

Compuesto	PM* (g)	mg/L
NH ₄ NO ₃	80.04	1650
KNO ₃	101.11	1900
(NH ₄) ₂ SO ₄	132.14	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.48	370
MnSO ₄ .H ₂ O	169.00	16.9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.54	8.6
CuSO ₄ .5H ₂ O	249.68	0.025
CaCl ₂ .2H ₂ O	147.02	440
KI	166.01	0.83
CoCl ₂ .6H ₂ O	237.93	0.025
KH ₂ PO ₄	136.09	170
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	138	-
H ₃ BO ₃	61.83	6.2
NaMoO ₄ .2H ₂ O	241.9	0.25
FeSO ₄ .7H ₂ O	278	27.8
EDTA.2H ₂ O	372.2	37.3
Fuente de carbono:		
Sacarosa	342.31	30,000

*PM: peso molecular

Tabla 5. Mezcla de vitaminas denominadas R2

Compuesto	PM	mg/L
Tiamina	337.3	0.10
Piridoxina	205.6	0.50
Ac. Nicotínico	123.1	0.50
Myo-inositol	180.2	100.0
Glicina	75.07	2.0

*PM: peso molecular

La fuente de energía proporcionada en el medio es usualmente la sacarosa, que durante el proceso de esterilización es convertida en glucosa y fructosa, siendo la glucosa la que representa casi en su totalidad la fuente de carbono primaria, mientras la segunda es utilizada únicamente cuando la glucosa se ha consumido completamente (Razdan, 2003). Por lo tanto, todos los medios de cultivo fueron complementados con 30 g/L de sacarosa.

Para preparar 1L de medio de cultivo se disolvieron 30 g/L de sacarosa y se adicionó cada una de las sales del medio MS, así como de vitaminas y fitorreguladores. Por tratamiento se utilizaron 10 explantes y se decidió evaluar modificaciones en concentración (mg/L) y tipo de regulador de crecimiento. Los fitorreguladores que se utilizaron para el establecimiento de la formación de los brotes adventicios de hoja fueron la auxina ácido indolacético (AIA) y las citocininas bencil adenina (BA) y la cinetina (KIN) en las siguientes concentraciones. Auxina: AIA (PM = 175.2): 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 y 1 mg/L. Citocininas BA (PM = 225.3) y KIN (PM = 215.3): 2, 2.3, 2.5, 2.7, y 5.0 mg/L., para obtener un total de 78 tratamientos. Posteriormente se ajustó el pH del medio de cultivo a pH 5.7, con hidróxido de sodio (NaOH) 1 N y ácido clorhídrico (HCl) 1 N. Después se adicionó el agente gelificante, se clarificó el medio y se vertió en los frascos para ser esterilizados.

Los medios de cultivo utilizados se vaciaron a frascos de 15 y 25 mL de capacidad con gellan como agente gelificante al 0.25% y se esterilizaron a 1.2 mm Hg/cm² de presión a una temperatura de 121° C durante 18 minutos. El proceso de esterilización, así como de siembra de los explantes y los diferentes subcultivos se llevó a cabo en condiciones de asepsia total en una campana de flujo laminar.

La respuesta obtenida a partir de los tratamientos para establecer la inducción de brotes, su individualización y enraizamiento *in vitro* se registró a los 15, 30 y 45 días, mediante registro del número de brotes generados por frasco, la coloración, morfología de los brotes generados y la presencia o ausencia de raíces.

6.5. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA (HPLC, CG-EM) DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN EL EXTRACTO HEXÁNICO DE LAS RAÍCES DE LAS PLANTAS SILVESTRES Y DE LAS RAÍCES DE LAS PLANTAS REGENERADAS EN LOS CULTIVOS *IN VITRO* DE *P. PELTATUM* (KUNTH) CASS.

La identificación y cuantificación de los compuestos presentes en el extracto hexánico de raíz y de las raíces de las plantas regeneradas en los cultivos *in vitro* fueron evaluados por cromatografía líquida de alta eficiencia (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) y por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) usando un equipo Jeol GC-Mate II.

La identificación y cuantificación de los compuestos en el extracto hexánico de las raíces de las plantas silvestres *P. peltatum* por HPLC se realizó mediante un cromatógrafo marca HP modelo 1100 con detector de arreglo de fotodiodos y columna fase reversa Synergi Polar-RP (150 x 2.00 mm, tamaño de partícula 4 µm; marca Phenomenex). La fase móvil consistió de agua desionizada (A) y acetonitrilo (B) grado HPLC. El gradiente de elusión fue desarrollado empezando con 70/30 % (A/B) cambiando la composición hasta el 100 % de B a los 25 min. La detección por longitud de onda, la velocidad del flujo y la temperatura de la columna fue de 254 nm, 0.2 ml/min y 40 °C, respectivamente. Una cantidad de 10 µl de todas las soluciones (muestra de referencia y muestras problema) fue inyectada. La curva de calibración fue establecida con la disolución de 1.00 mg del compuesto de referencia en 5.00 ml de metanol con una serie de diluciones y se utilizó solución de metanol como solución stock. Con el rango de concentración inyectada (200.0-2 g/ml) la respuesta del detector fue lineal (R_2 0.9948), con un valor límite de detección de 0.002 g/ml.

La detección y cuantificación por HPLC de los compuestos presentes en las raíces de las plántulas de los cultivos *in vitro* de *P. peltatum*, se empleó el mismo equipo sin embargo se utilizó una columna C18 en DP4K (15 x 4.6 mm, 5µm) con un sistema isocrático de acetonitrilo-agua (65:35), con una velocidad del flujo de 1 mL/min, a temperatura ambiente

y empleando el detector de índice de refracción. La determinación se llevó a cabo por triplicado utilizando de referencia los datos de los compuestos de referencia. La extracción se realizó con una cantidad considerable de tejido vegetal fresco, el cual fue congelado con CO₂ y después se molió en un mortero donde se le añadió metanol (1mL/g de tejido fresco) al cual se le adicionó butilhidroxitolueno (BTH) como agente antioxidante (1 mg/ml). El polvo obtenido fue extraído sucesivamente con una mezcla de disolventes de etanol: metanol (50:50) por maceración a medio ambiente durante 24 horas. El extracto obtenido fue concentrado mediante presión reducida a temperatura de 27° C, con un rota evaporador. Posteriormente se realizó un lavado del extracto con hexano. Del extracto obtenido (1 mg) se disolvió con acetonitrilo (CH₃CN), grado analítico antes de ser analizado y se inyectó de 10 a 20 µl de la muestra disuelta en el cromatógrafo.

Para la determinación de los compuestos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) se utilizó un cromatógrafo de gases marca JEOL modelo JMS-Gcmate II. La columna utilizada fue agilent del tipo 19091J-413 HP-5, con una longitud de 30 m y 0.32 mm de diámetro. Se empleó Helio con filtro de 0.25 µm como acarreador con flujo de 1 mL/min. La temperatura de la columna se programó de 40, 80 °C por 1 min hasta 300 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. La temperatura del inyector fue de 300 °C y de la cámara de ionización fue de 290 °C. Se utilizó la técnica de Ionización por Impacto Electrónico (IE), el voltaje para el registro de los espectros de masas utilizado fue de 70 eV. Las masas se registraron en un rango de 10 a 800 uma. Se reportó el tiempo de retención (R.T.), la relación (m/z), el ión molecular, [M+], y el pico base (Pb).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. EVALUACIÓN DE LAS RAÍCES COLECTADAS DE *P. PELTATUM* (KUNTH) CASS. POR CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA

En términos de farmacognosia, las especies vegetales con características medicinales están compuestas por raíces, rizomas y/o bulbos que se estudian bajo el mismo término: órganos subterráneos (Tyler *et al.*, 1979; De Oliveira, 1991). *P. peltatum* presentó un rizoma primario grueso de color amarillo pálido, que midió en promedio de 3 a 5 cm de diámetro a diferencia de las otras especies que presentan rizomas más delgados (Zarate, 2006). Fue de color amarillo pálido. La superficie externa del rizoma fue irregular y se observaron cicatrices relativamente grandes, que dejan las hojas, así como vestigios de raíces adventicias. Con abundantes tricomas muy pequeños. Los rizomas secundarios y terciarios fueron fibrosos, largos, delgados y verticales. Tanto el rizoma primario como los rizomas secundarios estaban cubiertos por abundantes pelos pubescentes, además *P. peltatum* en comparación con la especie vegetal *P. decompositum*, tiene los rizomas secundarios más largos y menos delgados (Linares y Bye, 1987; Manzanero, 1994; Zarate, 2006). Además, al corte transversal del rizoma primario con el secundario, el rizoma de *P. peltatum* a semejanza con el rizoma de *P. decompositum* como refiere Zarate (2006), presentó una resina de color café-rojiza que se presentó en la zona de los anillos de canales en ambos rizomas, tanto del primario como de los rizomas secundarios (**Figura 6**).

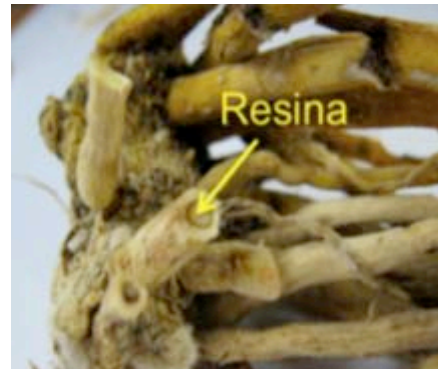
A**C**
B

Figura 6. Estructuras vegetales subterráneas de *P. peltatum*: rizomas primarios y rizomas secundarios (A). Exudado de la resina de los canales secretores en los rizomas primarios (B) y en los rizomas secundarios (C).

En virtud de la presencia de la resina de color café-rojiza en el rizoma primario como en los rizomas secundarios (raíz) así como por la literatura consultada para el aislamiento de compuestos sesquiterpénicos del tipo furanoeremofilanos para con especies del mismo género (Romo y Joseph-Nathan, 1964; Correa y Romo, 1966) y de otras especies relacionadas (Bohlmann y Zdero 1978a,b; Bohlmann *et al.*, 1979; Bohlmann y Bapuji 1982; Pérez-Castorena *et al.*, 2004; Doe *et al.*, 2004), en donde no se especifica el aislamiento de compuestos en función del tipo de estructura vegetal. Se realizó un análisis con 50 g/g peso seco de ambas estructuras.

Los perfiles cromatográficos por CCF de los extractos hexánicos de ambas estructuras rizoma primario (RI) y rizoma secundario (RA) mostraron diferencias en intensidad y aparición de compuestos en relación a cada una de las estructuras vegetales. En especial, se observó de manera importante la semejanza en intensidad y desplazamiento químico (R_f) de una mancha con un $R_f \sim 0.20$ en ambos perfiles cromatográficos (**Figura**

7). Esto sugirió que la mancha o compuesto podría ser sintetizado independiente del tipo de estructura vegetal y que no sufre traslocación como algunos compuestos del metabolismo secundario de tipo constitutivo que son sintetizados en el rizoma principal para ser transportados al rizoma secundario (Ascensao y Pais, 1998) en respuesta principalmente a un mecanismo de defensa ante el ataque de ciertos organismos patógenos (Balandrin *et al.*, 1985; Wink, 1990; Eisner y Meinwald, 1995; Turlings *et al.*, 1995; Stowe *et al.*, 1995; Meinwald *et al.*, 1998, Taiz y Zeiger, 2002).

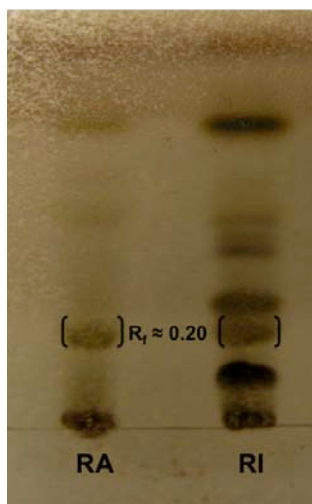


Figura 7. Diferencias en intensidad y desplazamiento químico (R_f) de los perfiles cromatográficos de los extractos hexánicos de la raíz y el rizoma (RI), eluidos con el sistema hexano: acetato de etilo (9:1).

El peso y la cantidad obtenida de los diferentes extractos por tipo de solvente y estructura vegetal son resumidos en la **Tabla 6**. Se observó que en ambas estructuras vegetales, la raíz presentó la mayor cantidad de extracto hexánico y metanólico a diferencia del rizoma. Sin embargo, fue mayor la cantidad de extracto acuoso que se obtuvo del rizoma a diferencia de la raíz, considerando la cantidad de peso fresco y seco de cada estructura vegetal. Dicha diferencia estuvo asociada a la pérdida de agua. Siendo mayor está pérdida en el rizoma que en las raíces.

Tabla 6. Peso obtenido por tipo de estructura vegetal y tipo de extracto orgánico

Estructura vegetal	Peso estructura (Kg)		Peso Extracto (g)		
	Fresco	Seco	Hexánico	Metanólico	Acuoso
Rizoma	8	2.1	39.10	27.64	42.2
Raíz	6.5	4.3	56.32	49.77	19.90

Debido a los resultados que mostraron los perfiles cromatográficos de ambas estructuras, con diferentes intensidades y desplazamientos químicos de los compuestos, así como por el peso obtenido del extracto hexánico, se decidió realizar el estudio fitoquímico con el rizoma secundario que aunado al uso frecuente en los diversos lugares de comercialización de este tipo de estructuras en donde se les conoce simplemente con el nombre de raíz y que en términos estrictos engloba a cualquier estructura subterránea, ya sea raíz o cierto tallo especializado como el rizoma (Manzanero, 1994), de aquí en adelante se le denominó al rizoma secundario simplemente como raíz.

7.2. FRACCIONAMIENTO, PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN DE LOS COMPUESTOS SESQUITERPÉNICOS DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE RAÍZ

La extracción, fraccionamiento e identificación de los compuestos sesquiterpénicos presentes en *P. peltatum* se realizó con una cantidad aproximada de 5 g de extracto hexánico de raíz. La extracción por columna abierta de gel de sílice que sirvió de modelo para las subsecuentes extracciones se generó un total de 74 fracciones con 7 sistemas de elución. En la **Tabla 7** se resume el fraccionamiento realizado mediante cromatografía en columna abierta del extracto hexánico de raíz.

Tabla 7. Fraccionamiento preliminar del extracto hexánico de raíz.

Sistema de elución (Proporción)	Fraciones de 250 mL
Hexano	
100	1-4
Hexano-acetato de etilo	
98:2	3-11
95:5	12-20
9:1	21-35
8:2	36-50
7:5	51-65
7:3	66-74

Las subsecuentes extracciones se realizaron con un total de 37 g de extracto hexánico de raíz, el fraccionamiento por columna abierta de gel de sílice incluyó un sistema de elución de disolventes en orden creciente de polaridad (hexano-acetato de etilo-metanol). Se recolectaron 914 eluatos de 20, 25, 50, 100, 125, 200 y 250 mL, de los cuales se realizó un monitoreo de su comportamiento por cromatografía en capa fina para reunir un total de 131 fracciones combinadas.

Las fracciones combinadas 61, 83, 215, 296 y 350 fueron purificadas por recristalización con hexano: acetona (50:50) y metanol.

7.2.1. Compuesto 1 (14-angeloiloxicacalohastina)

El compuesto 14-angeloiloxicacalohastina (**Figura 8**), se aisló de la fracción 61, como un compuesto sólido en forma de agujas de color blanco semi transparente. Se obtuvo 50 mg. El punto de fusión fue de 95-98°C, y un R_f de 0.62 con el sistema de elusión hexano/acetato de etilo (9:1). La revisión de la literatura (Bohlmann *et al.*, 1977; Abdo *et al.*, 1992) permitió asignar algunos datos espectrométricos y espectroscópicos del 14-angeloiloxicacalohastina, sin embargo fue necesario realizar la asignación de señales no descritas con base en sus desplazamientos químicos y con la ayuda de los experimentos de correlación COSY y HETCOR.

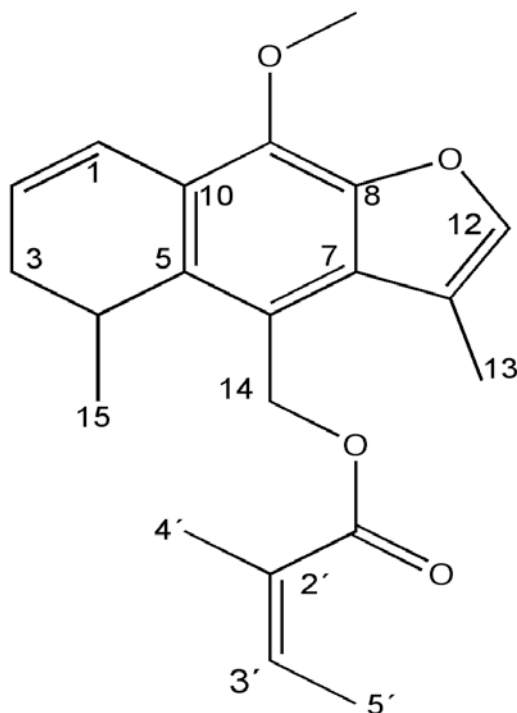


Figura 8. Estructura del 14-angeloiloxicacalohastina.

Por espectrometría de masas y utilizando la técnica de impacto electrónico, se registró el espectro de masas (EM-IE⁺) (**Figura 9**). Se observó como ión molecular (M⁺) la señal en 340 m/z con una intensidad del 40% que permitió calcular la fórmula molecular C₂₁H₂₄O₄. Se observó adicionalmente como pico base la señal en 225 m/z con una intensidad del 100

% y una señal en 211 m/z asignadas a los fragmentos generados por la eliminación de una cetona y del ácido angélico a partir del ión molecular. Además se observó el fragmento de 241 m/z que muestra la pérdida de un OH como agua.

El espectro de IR (**Figura 10**) presentó una banda a 1705 cm^{-1} correspondiente al grupo éster y unas bandas a 1610 cm^{-1} de los dobles enlace (C=C).

Los espectros DEPT y HETCOR (**Figura 11 y Figura 12**) nos permitieron establecer la presencia de cinco metinos (CH) en 142.33, 137.98, 124.88, 121.01 y 27.88 ppm observando la correspondencia de protones con las señales de los protones H-12 en 7.35 ppm, H-1 en 6.94 ppm, H-3' en 6.00 ppm, H-2 en 5.90 ppm y H-4 en 3.44 ppm. Además de dos metilenos (CH₂) en 58.96 y 30.52 ppm correlacionados con las señales de los protones de H-14 en 5.46 ppm y H-3 en 2.59 y 2.19 ppm. Así como de cinco metilos (CH₃) en 60.78, 20.87, 20.65, 15.74 y 10.21 ppm correlacionados con las señales de los protones asignados al metoxilo OCH₃-C-9 en 4.13 ppm, H-13 en 2.35 ppm, H-4' en 1.95 ppm, H-5' en 1.82 ppm y H-15 en 1.05 ppm.

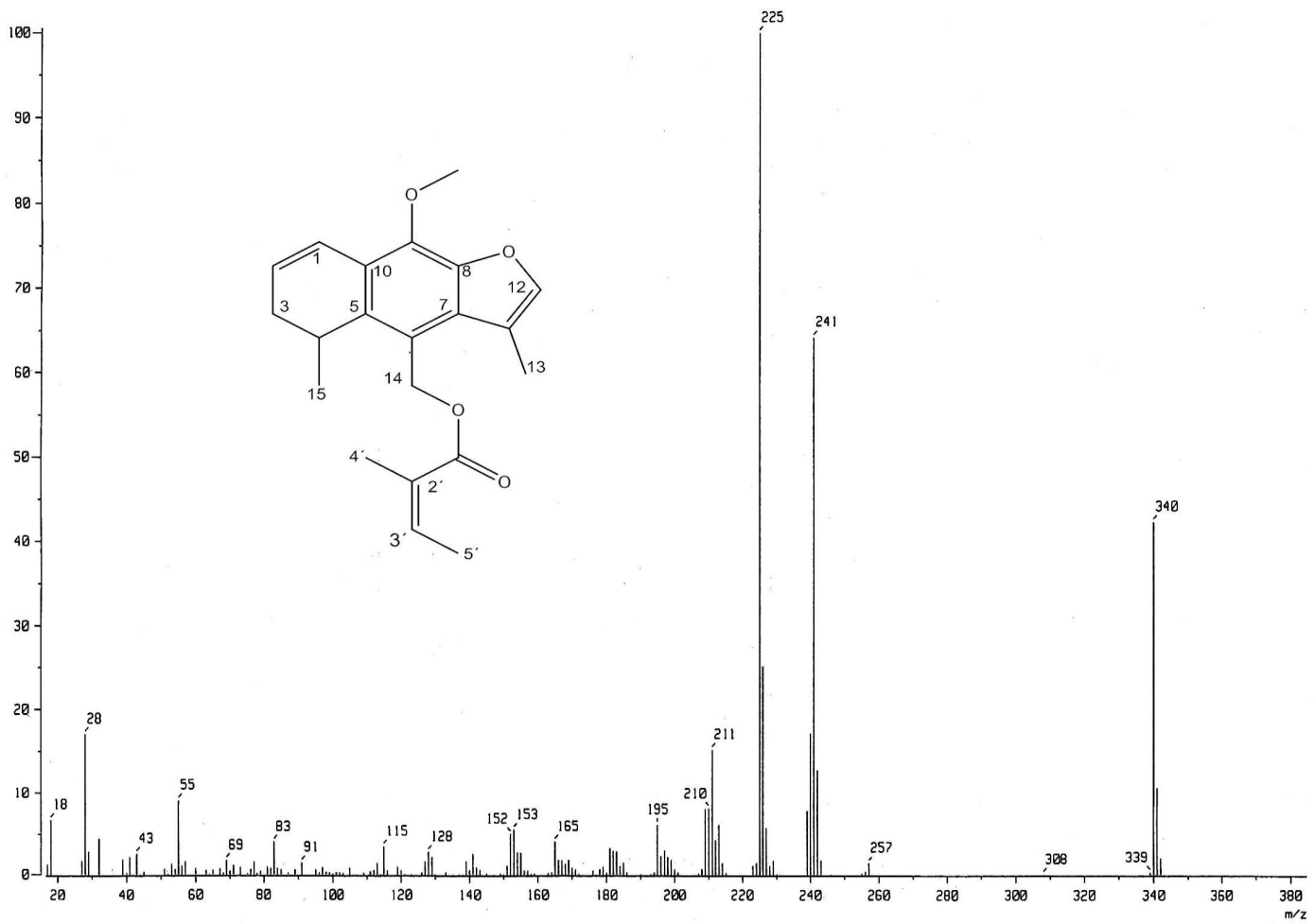
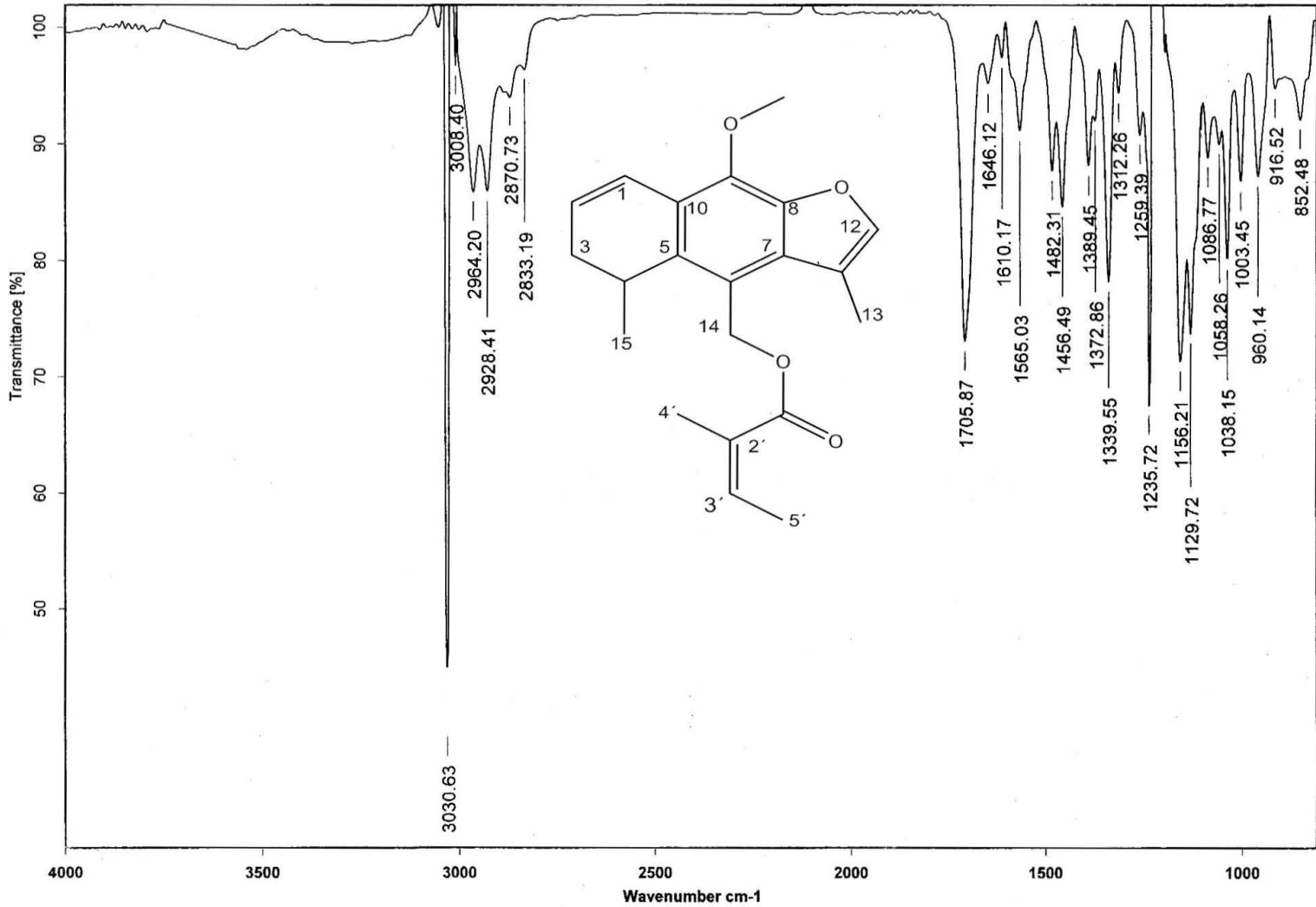


Figura 9. Espectro de masas del 14-angeloliloxicalohastina.

Figura 10. Espectro de IR (CHCl₃) del 14-angeloliloxicacalohastina.



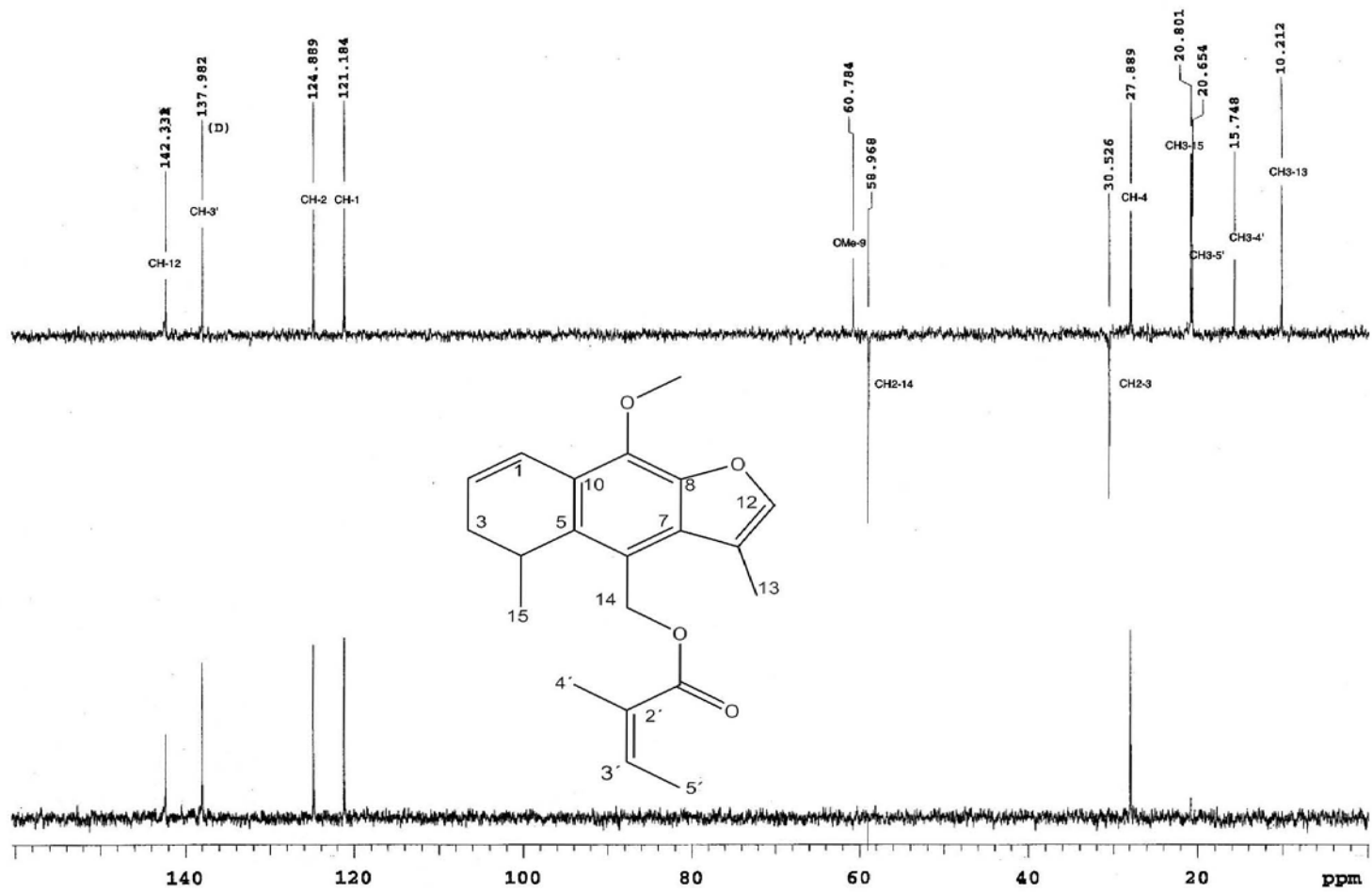
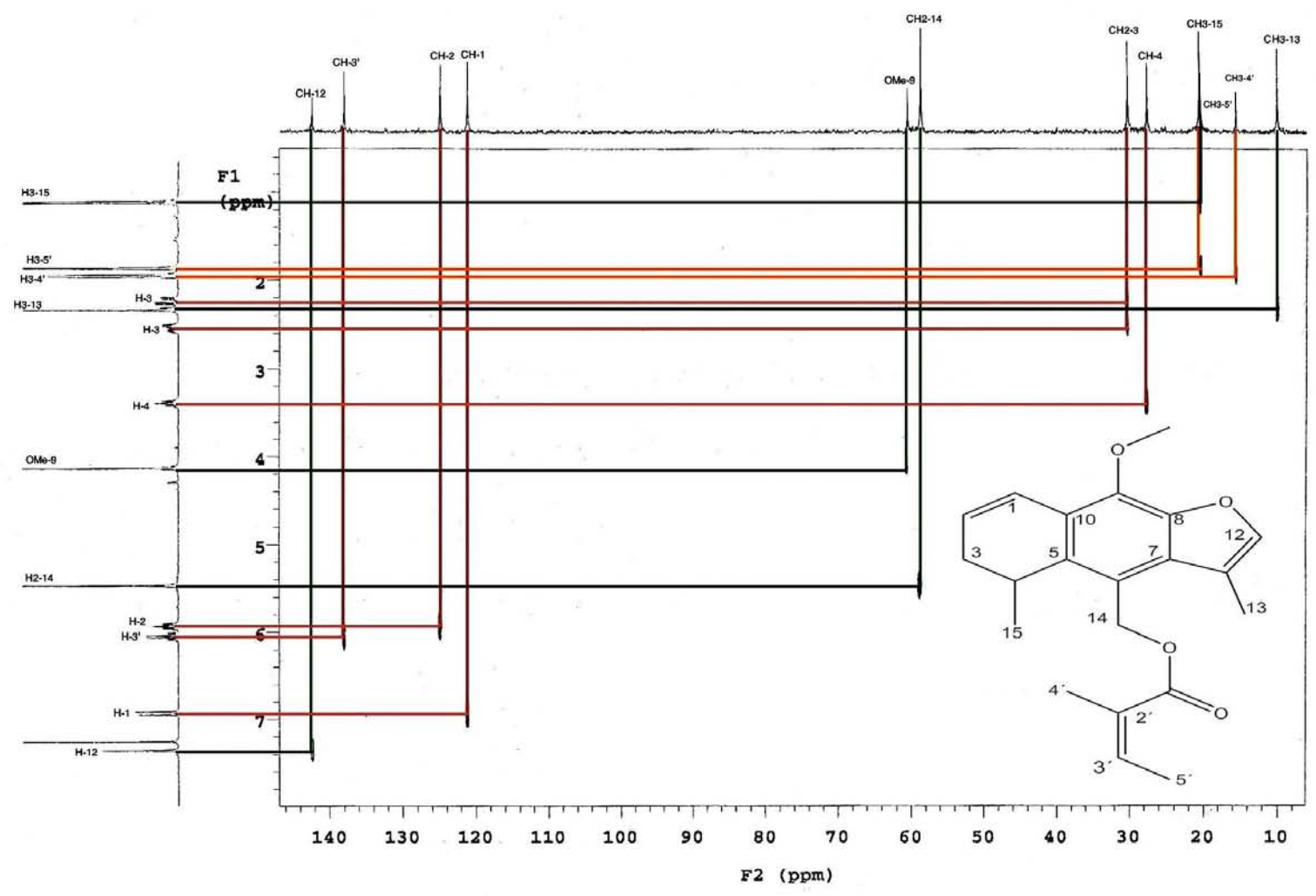


Figura 11. Espectro del experimento DEPT del 14-angeloliloxicalhastina.

Figura 12. Espectro del experimento HETCOR del 14- angeloloxicacalohastina.



El registro del espectro de RMN ^1H (**Figura 13**), permitió visualizar una señal simple a 7.35 ppm, que integró para un protón del C-12, este protón en el espectro de correlación bidimensional de hidrógeno (COSY) (**Figura 14**) muestra claramente un acoplamiento con una señal doble a 1.05 ppm la cual integra para tres protones que se asignó al metilo en C-13. Dos señales dobles centradas en 6.94 y 6.00 ppm que integraron para un protón del C-1 y C-3'. Una señal triple centrada en 5.90 ppm que integró para un protón del C-2, este protón presentó un acoplamiento con la señal doble del protón de C-1 en el espectro COSY. Así como el acoplamiento con la señal múltiple en 2.12 ppm la cual integró para un protón que se asignó a C-3. En 2.59 ppm se presentó una señal múltiple que integró para otro protón de C-3, el cual muestra en el espectro COSY un acoplamiento con la señal múltiple a 3.44 ppm que integró para un protón que se asignó a C-4. En 5.46 ppm se visualizó una señal doble que integró para dos protones de C-14. En 4.13 ppm se presentó una señal simple que integró para tres protones del metoxilo (O-CH_3), en C-9. En 2.35 se presentó una señal simple que integró para tres protones del metilo en C15. En 1.95 ppm se observó una señal doble que integró para tres protones del metilo en C-4' así como una señal simple en 1.82 ppm que integraron para tres protones del metilo en C-5'.

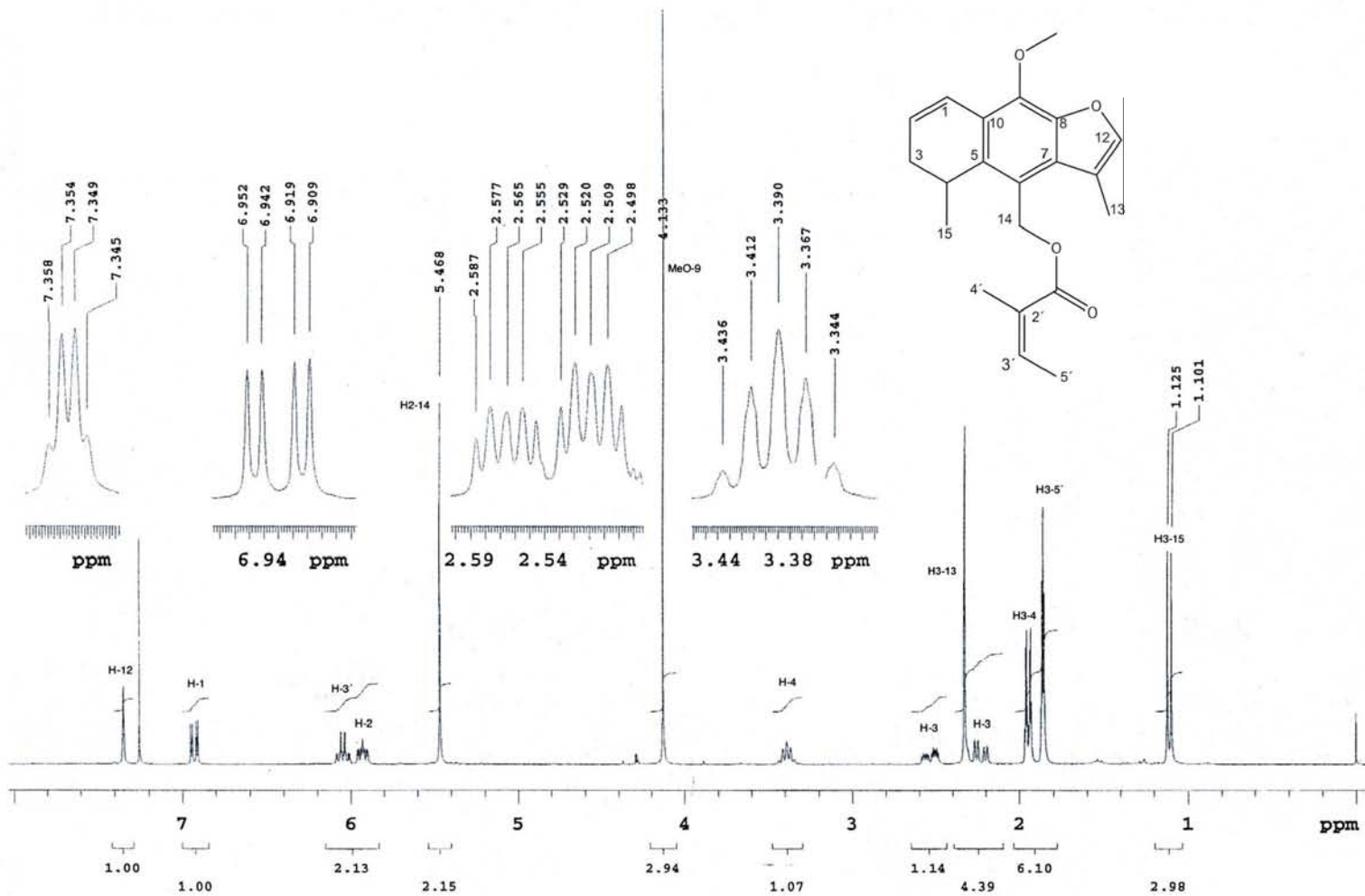


Figura 13. Espectro de RMN-¹H del 14-angeloloxicacalohastina.

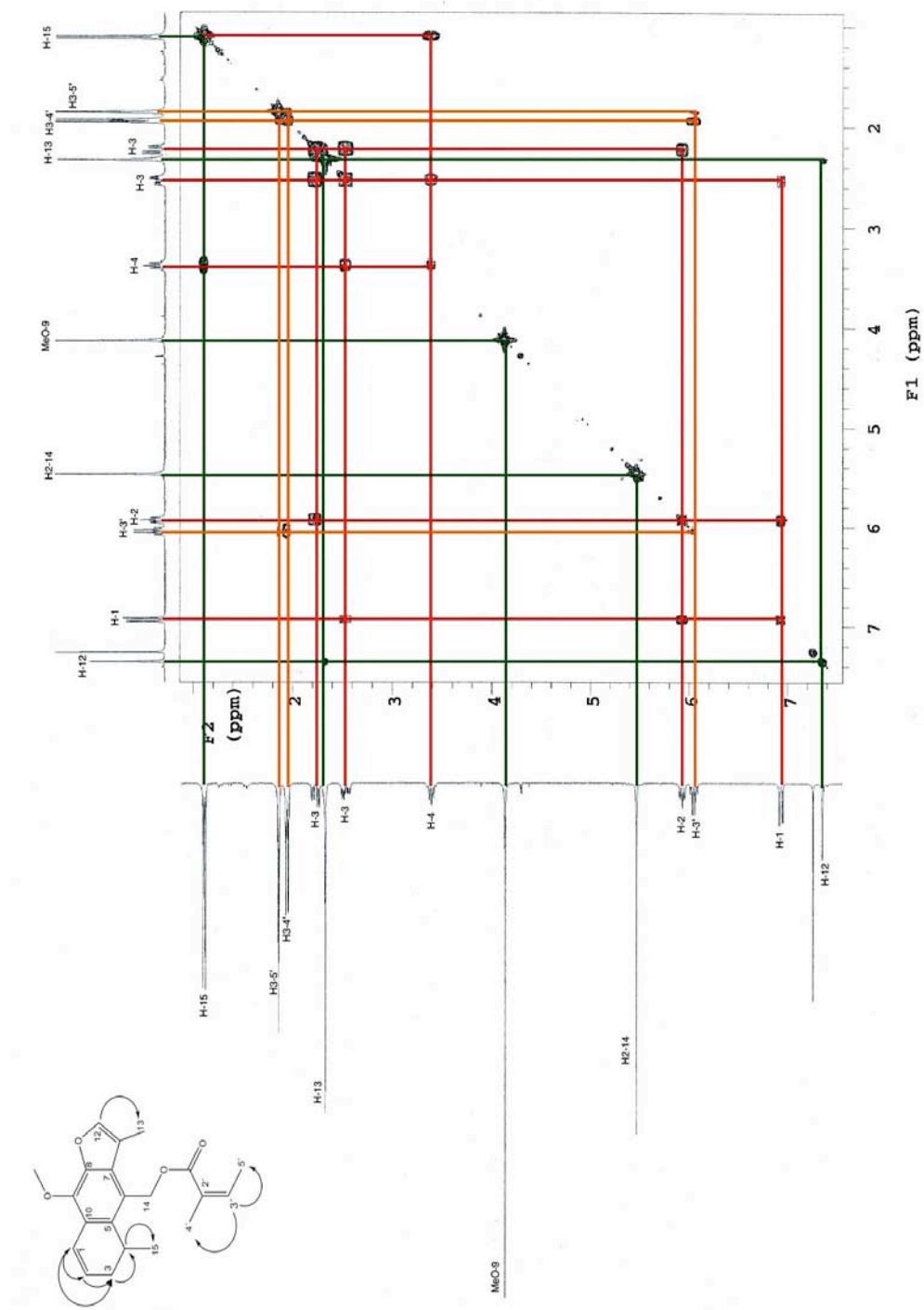


Figura 14. Espectro de correlación bidimensional de protones (COSY) del 14-angeloiloxicacalohastina.

La estructura del 14-angeloiloxicacalohastina se confirmó mediante el estudio de cristalografía. Los datos suplementarios y la figura son disponibles en los archivos electrónicos IUCr con la referencia: AA2037. Se observó que es una molécula casi plana con los átomos de C6 y C7 fuera del plano, formando un ángulo diedro de 26.9 (1) ° entre el anillo central del benceno y los átomos C4-C5-C6-C7. La estructura del angeloiloxi es casi perpendicular haciendo un ángulo diedro de 62.08 con respecto al esqueleto del furanoeremofilano. En ausencia de donador de átomos de H es notable el hecho que en la estructura de cristal, la molécula presenta interacciones intermoleculares por medio de uniones débiles C-H...O (Rojano-Vilchis *et al.*, 2012a) (**Figura 15**).

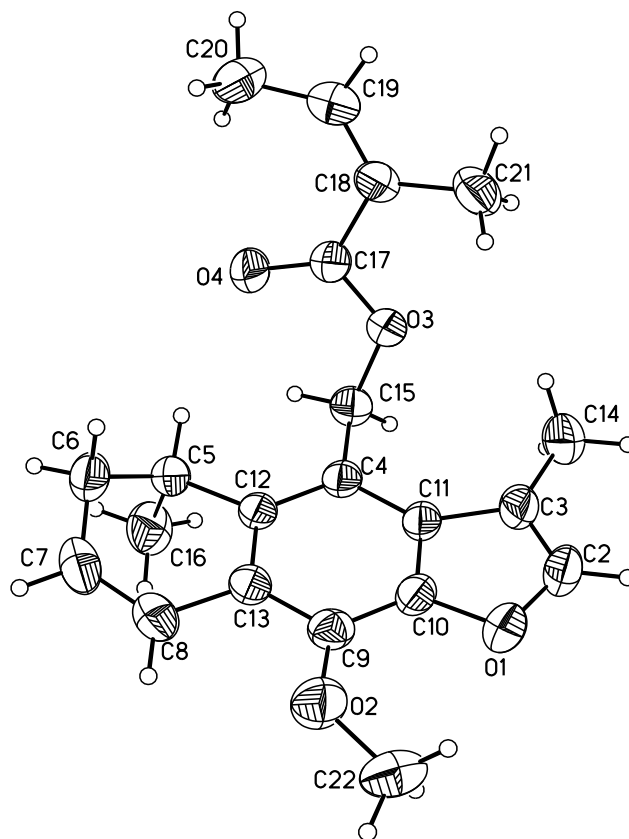


Figura 15. Vista en perspectiva del cristal del 14-angeloiloxicacalohastina.

7.2.2. Compuesto 2 (Maturinina)

La maturinina (**Figura 16**) es un compuesto de naturaleza sesquiterpénica del tipo furanoeremofilano. Para *P. peltatum*, este es el segundo reporte que se tiene de su identificación, su estructura se elucidó por comparación de sus datos espectroscópicos reportados para con *P. decompositum* (Correa y Romo, 1966) y *P. beamanii* (Pérez-Castorena y col., 2004).

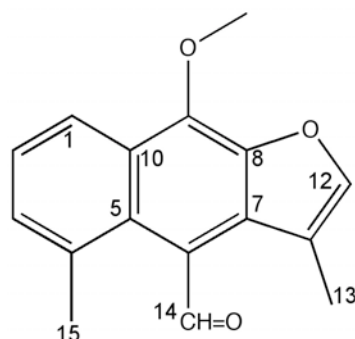


Figura 16. Estructura de la maturinina

La maturinina, se aisló de la fracción 215 y se obtuvo como un sólido en forma de agujas de color amarillo pálido. En la mayoría de las fracciones que se realizaron por cromatografía de columna abierta del extracto hexánico de raíz, se obtuvo 75 mg de maturinina. Por CCF tuvo un R_f de 0.66 con el sistema de elusión hexano/acetato de etilo (9:1) y un punto de fusión de 84-87°C. La fórmula molecular de la maturinina se determinó mediante espectrometría de masas (**Figura 17**) con introducción directa de la muestra y por impacto electrónico (EM-IE⁺). El ión molecular (M⁺), observado en 254 m/z con una intensidad del 94%, permitió calcular la fórmula molecular C₁₆H₁₄O₃. Además se presentó una señal en 237 m/z con una intensidad del 100 % correspondiente al pico base.

El espectro de Infrarrojo (IR) (**Figura 18**) presentó una banda a 1680 cm⁻¹ correspondiente al grupo aldehído del carbonilo C-14, otra banda a 1616 cm⁻¹ que se asignó a los dobles enlace (C=C). Además, se presentó una banda a 1264 cm⁻¹ que se asignó al anillo de furano.

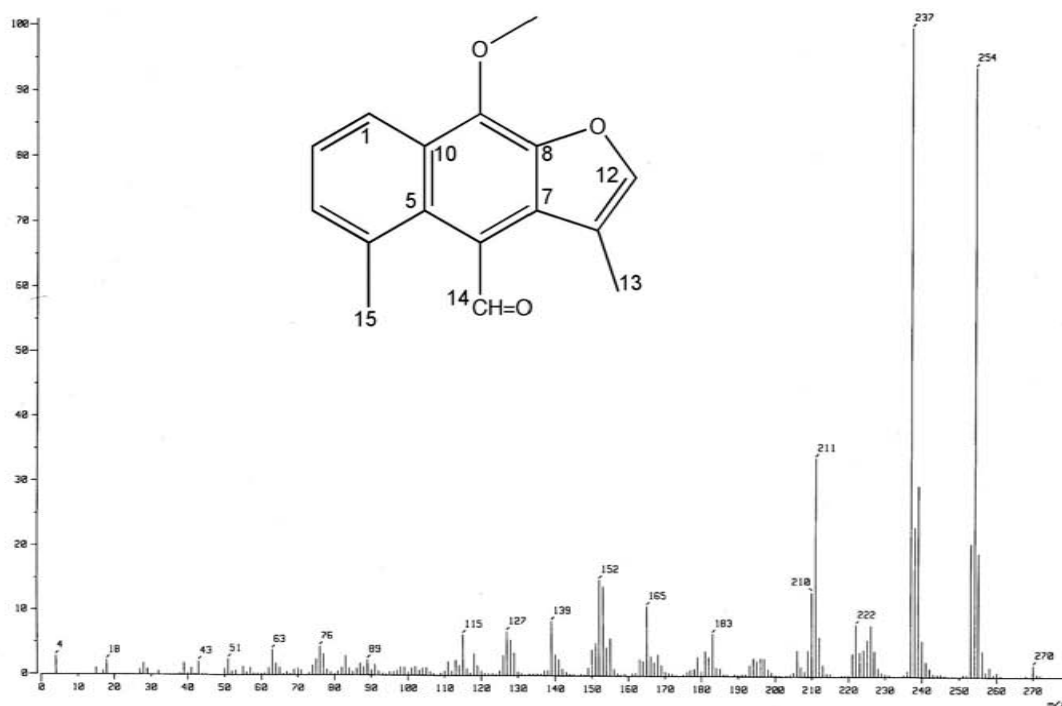


Figura 17. Espectro de masas (EM-IE⁺) de la maturinina.

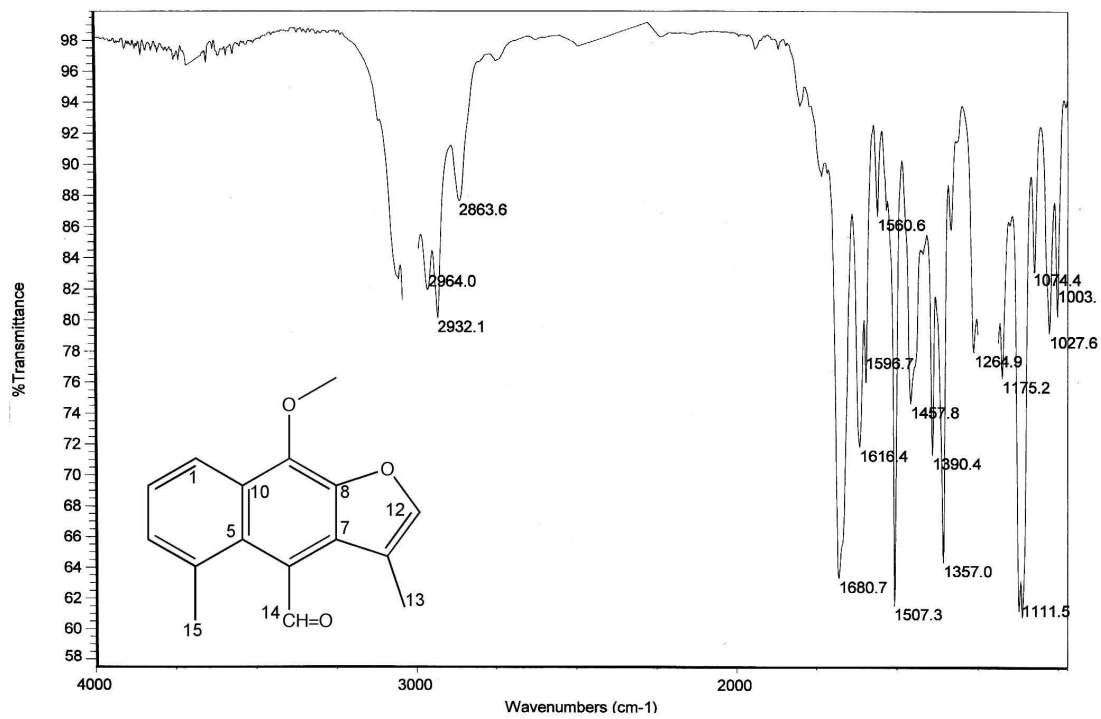


Figura 18. Espectro de IR de la maturinina.

El espectro del experimento DEPT (Figura 19) permitió establecer la presencia de tres metilos (CH₃) y cinco metilenos (CH).

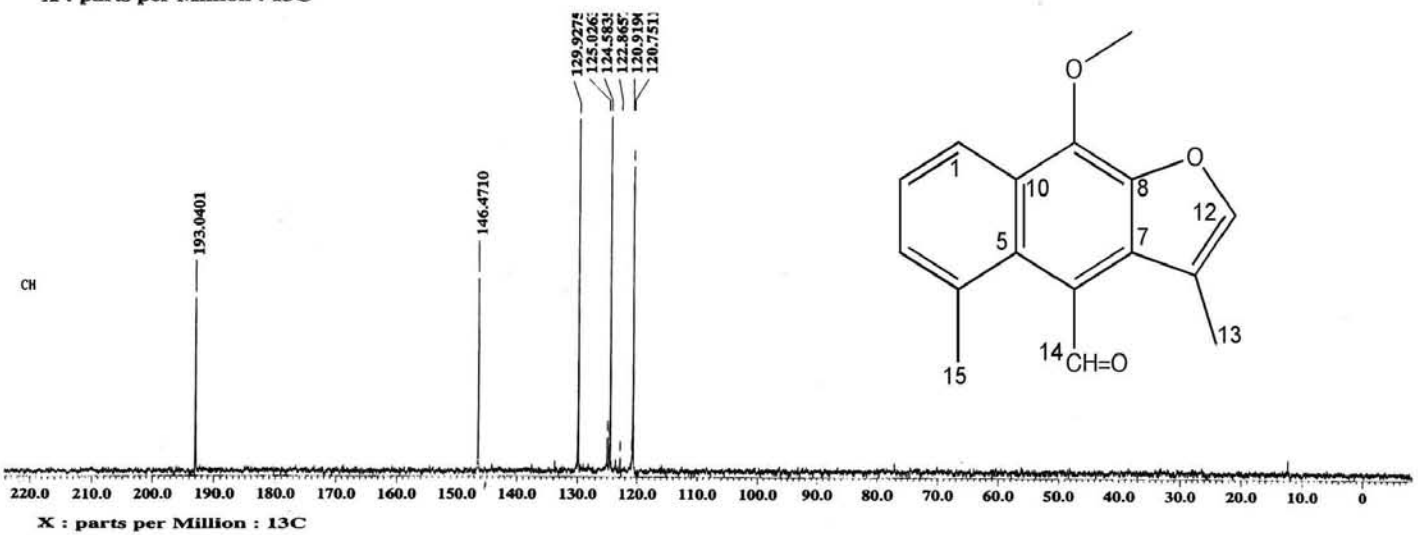
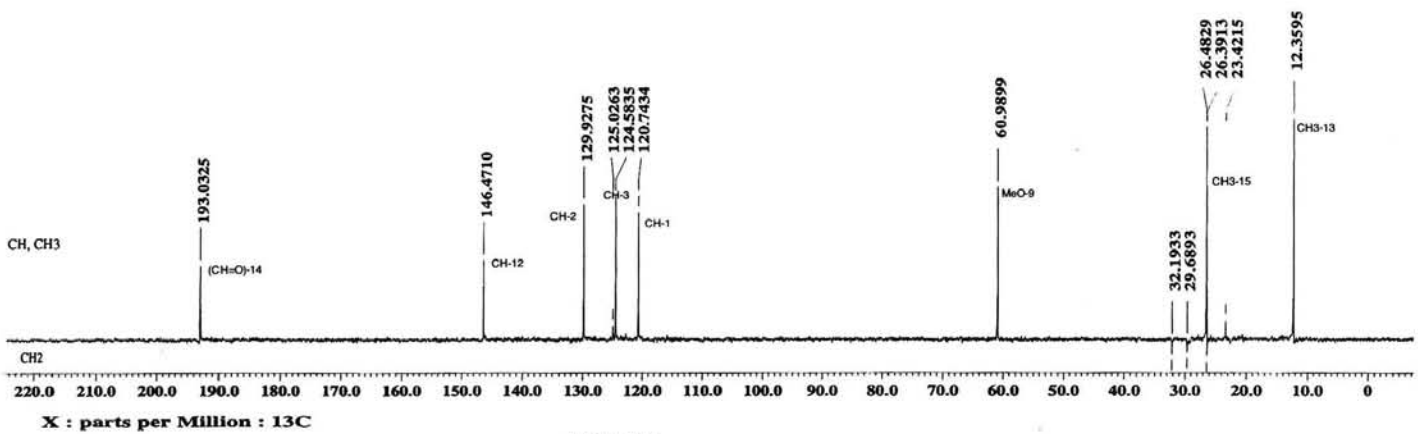


Figura 19. Espectro del experimento DEPT de la maturrina.

Los registros de los espectros de RMN ^1H (**Figura 20**), correlación bidimensional de hidrógeno (COSY) (**Figura 21**) y el del experimento HETCOR (**Figura 22**), permitieron visualizar una señal simple a 11.06 ppm, que integró para un protón de H-14 correspondiente al protón del aldehído. La señal triple centrada a 8.27 ppm integró para un protón de C-1 del anillo aromático, con un $J=7.62$ y $J=4.88$ Hz, que mostró un acoplamiento en el espectro 2D-COSY con una señal doble centrada en 7.40 ppm que integró un protón del C-2 con un $J=5.66$ Hz. A su vez, el protón del C-1 mostró un acoplamiento con la señal doble en 7.38 ppm que integró para un protón del C-3. En 7.55 ppm se observó una señal doble con un $J=1.34$, típica del protón perteneciente al C-12 del anillo furano, este protón en el espectro COSY, mostró claramente un acoplamiento con una señal doble a 2.32 ppm la cual integra para tres protones que se asignó al metilo en C-13. Además de estas señales, las señales simples a 4.42 y 2.68 ppm, integraron cada una para tres protones del metoxilo en C-9 y del metilo en C-15.

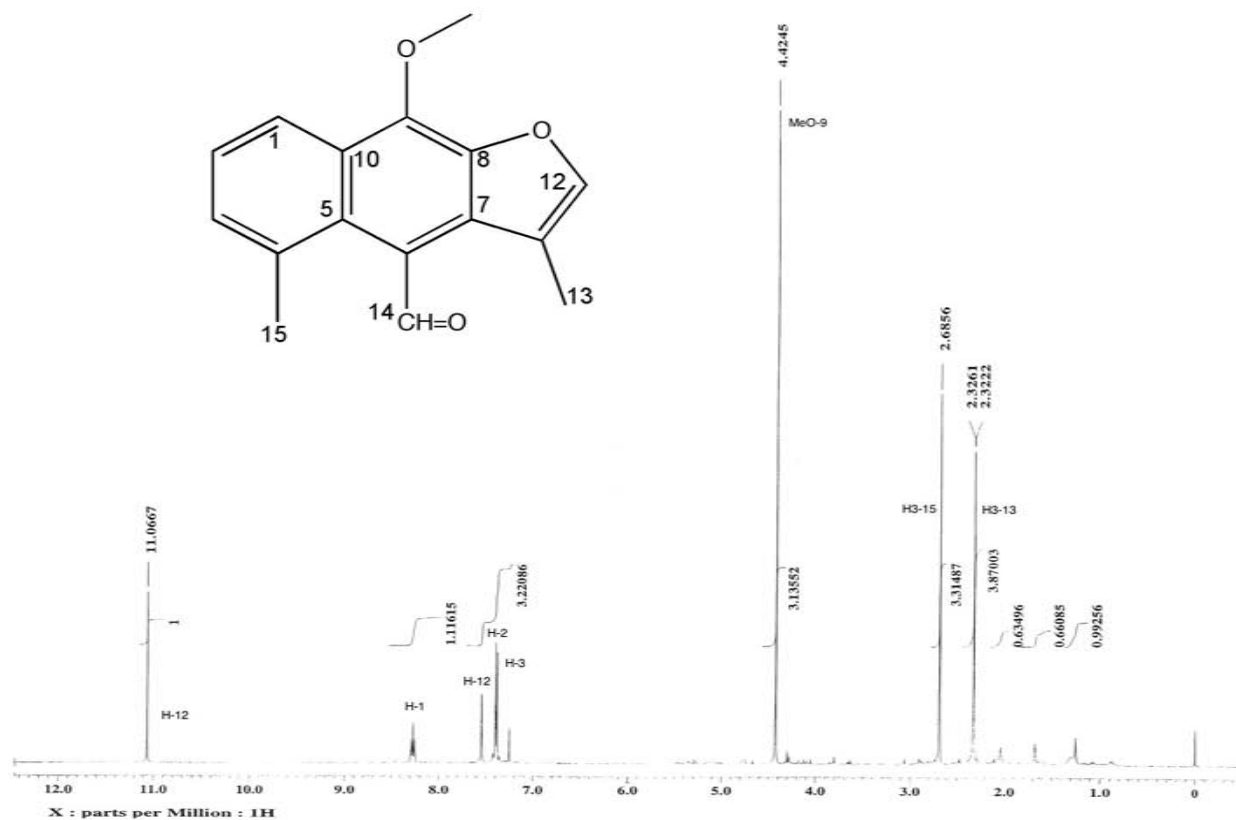


Figura 20. Espectro de RMN ^1H de la maturinina.

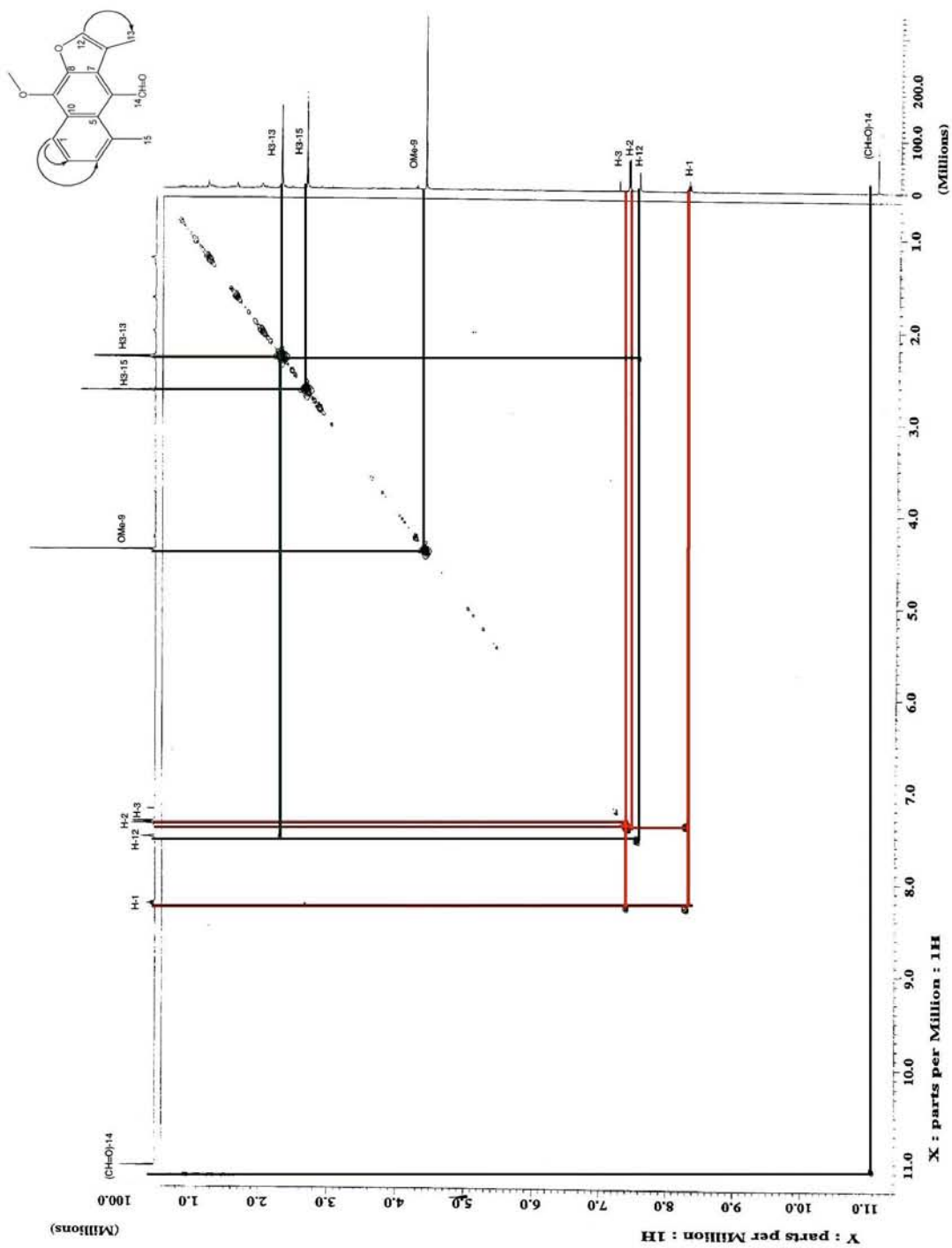


Figura 21. Espectro de correlación bidimensional de protones (COSY) y acoplamiento observado de la matorinina.

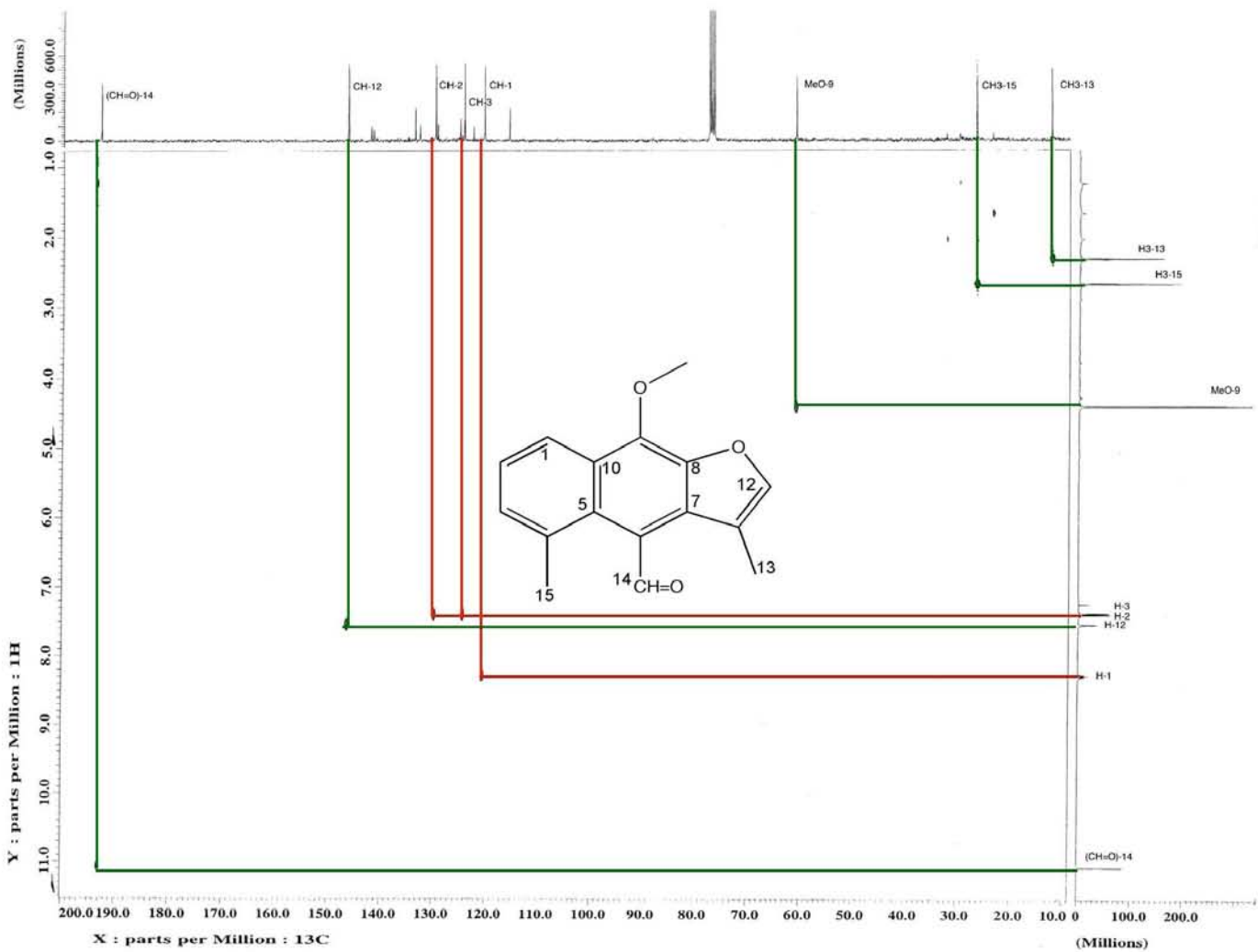


Figura 22. Espectro del experimento HETCOR de la matutina.

7.2.3. Compuesto 3 (Angelato de 3,4-dehidro-14-maturinol)

Es un compuesto nuevo que mostró por la revisión de la literatura que los datos espectrométricos y espectroscópicos del angelato de 3,4-dehidro-14-maturinol no están aún descritos y no existen reportes de su aislamiento como producto natural. Por lo que su asignación de las diferentes señales se hizo con base en sus desplazamientos químicos y con la ayuda de los experimentos de correlación DEPT, HETCOR y 2D-COSY.

El compuesto 3,4-dehidro-14-maturinol (**Figura 23**), se aisló de la fracción 350 y se obtuvo como un compuesto sólido de consistencia cerosa de color rojo intenso. El punto de fusión fue de 95-98°C, y un R_f de 0.10 con el sistema de elución hexano/acetato de etilo (9:1). Se obtuvo 50 mg del compuesto.

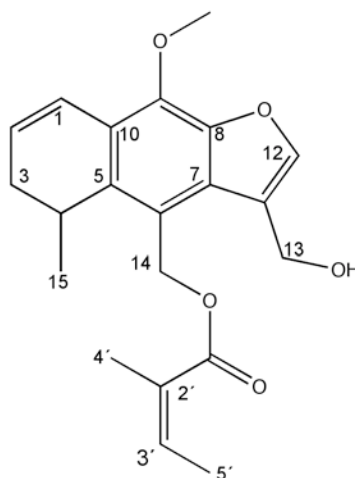


Figura 23. Estructura del angelato de 3,4-dehidro-14-maturinol.

Por espectrometría de masas y utilizando la técnica de impacto electrónico, se registró el espectro de masas (EM-IE⁺) (**Figura 24**). Se observó como ión molecular (M⁺) la señal en 356 m/z con una intensidad del 20% que permitió calcular la fórmula molecular C₂₁H₂₄O₅. Se observó adicionalmente como pico base la señal en 57 m/z con una intensidad del 100%. También se observó el fragmento de 241 m/z que mostró la pérdida de un OH como agua, así como una relación m/z de 226 y 211 asignada a los fragmentos generados por la eliminación de una cetona y del ácido angélico a partir del ión molecular.

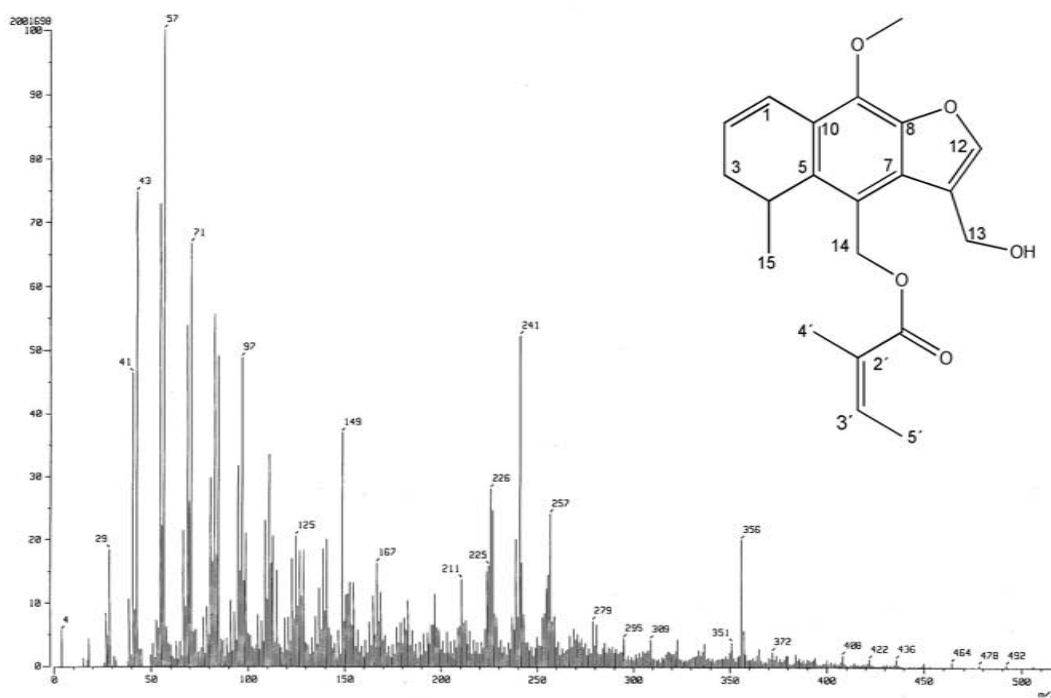


Figura 24. Espectro de masas del angelato 3,4-dehidro-14-maturinol.

El espectro de IR (**Figura 25**) presentó una banda a 1711 cm^{-1} correspondiente al grupo éster. Además de una banda a 1667 cm^{-1} correspondiente al grupo aldehído y una banda a 1607 cm^{-1} de los dobles enlaces ($\text{C}=\text{C}$).

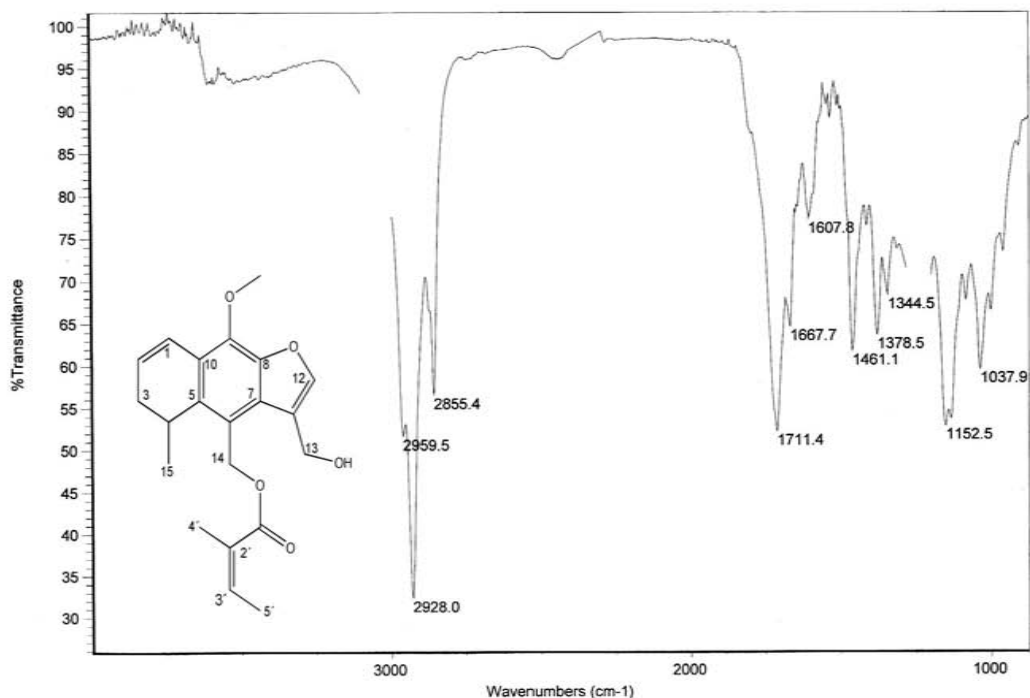


Figura 25. Espectro de IR del angelato 3,4-dehidro-14-maturinol.

El registro del espectro de RMN ^1H (**Figura 26**), permitió visualizar una señal simple a 7.59 ppm, que integró un protón del C-12, este protón en el espectro de correlación bidimensional de hidrógeno (COSY) mostró claramente un acoplamiento con la señal simple en 4.83 ppm la cual integró dos protones del C-13. En 6.95 ppm se visualizó una señal doble que integró un protón del C-1, este protón en el espectro (COSY) mostró claramente dos acoplamientos. El primer acoplamiento fue con una señal triple centrada en 5.90 ppm que integró para un protón del C-2, y el segundo acoplamiento fue con una señal múltiple centrada en 2.50 ppm que integró para un protón del C α -3. A su vez, la señal triple centrada en 5.90 ppm del protón C-2 presentó un acoplamiento con la señal múltiple en 2.30 ppm que integró para un protón del C β -3. El protón del C β -3 presentó claramente un acoplamiento con la señal triple en 3.44 ppm que integró para un protón del C-4. También, este protón del C-4 mostró un acoplamiento con la señal simple en 1.25 ppm que integró para tres protones del metilo en C-15. En 6.00 ppm se visualizó una señal doble que integró para un protón del C-3', este protón mostró claramente dos acoplamiento en el espectro COSY. El primero fue con la señal doble en 1.95 ppm que integró para tres protones del metilo en C4' y el segundo fue con la señal simple en 1.85 ppm que integró para tres

protones del metilo en C-5'. En 5.56 ppm se encontró una señal doble que integró para dos protones de C-14 y en 4.13 ppm se presentó una señal simple que integró para tres protones del metoxilo (O-CH₃), del C-9 (**Figura 27**).

Las diferentes asignaciones y correlaciones se corroboraron por medio de los espectros de los experimentos DEPT (**Figura 28**) y HETCOR (**Figura 29**) que nos permitieron establecer la presencia de cuatro metinos (CH) en 143.98, 138.44, 125.31, 121.01 y 27.99 ppm correlacionados con las señales de los protones de H-12 en 7.59 ppm, H-1 en 6.95 ppm, H-3' en 6.00 ppm, H-2 en 5.90 ppm y H-4 en 3.44 ppm. Además de tres metilenos (CH₂) en 59.85, 56.06 y 29.67 ppm correlacionados con las señales de los protones de H-14 en 5.56 ppm, H-13 en 4.83 ppm y H-3 en 2.30 ppm. Así como de cuatro metilos (CH₃) en 60.84, 20.59, 20.59 y 15.78 ppm asignados al metoxilo OCH₃-C-9 en 4.13 ppm, H-5' en 1.95 ppm, H-4' en 1.85 ppm y H-15 en 1.25 ppm.

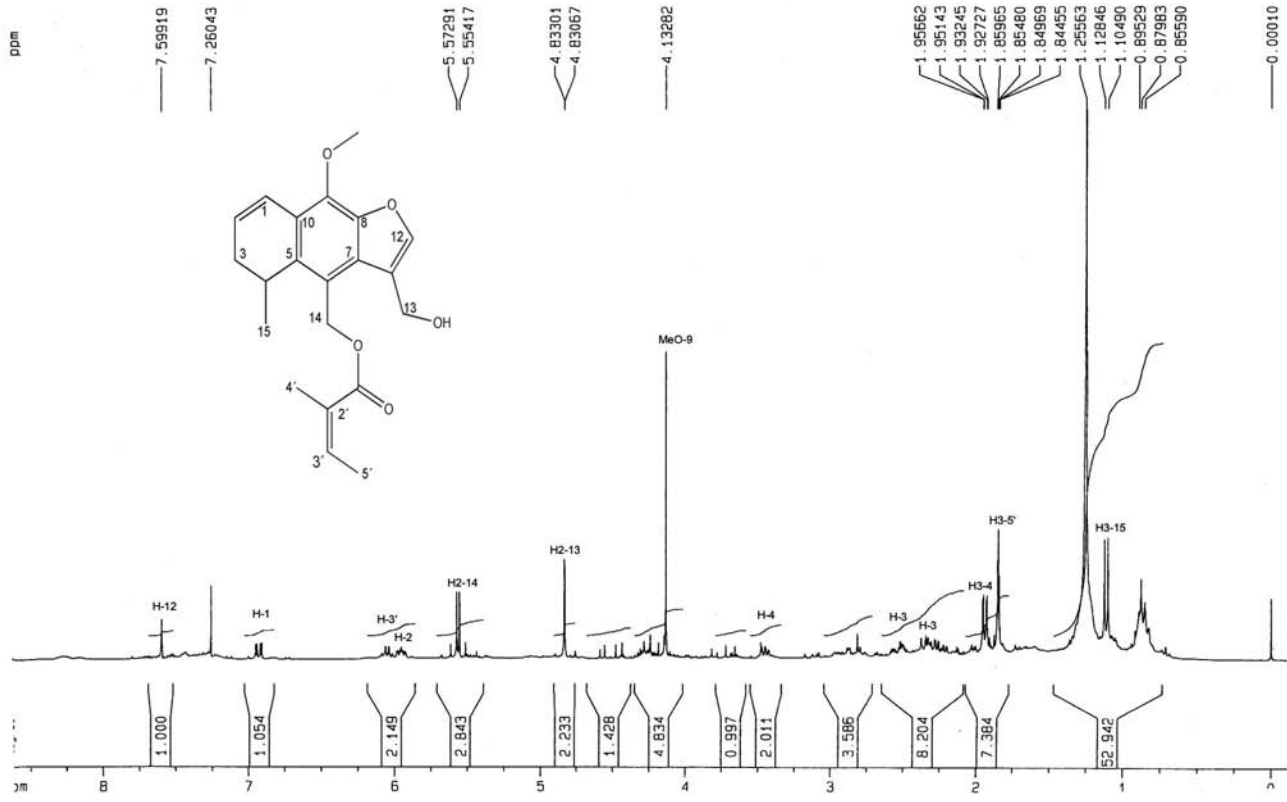


Figura 26. Espectro de RMN ^1H del angelato 3,4-dehidro-14-maturinol.

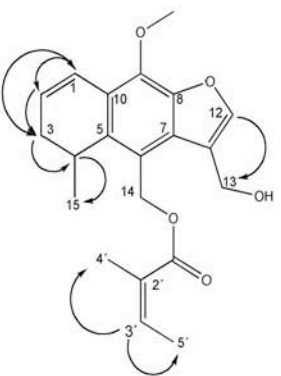
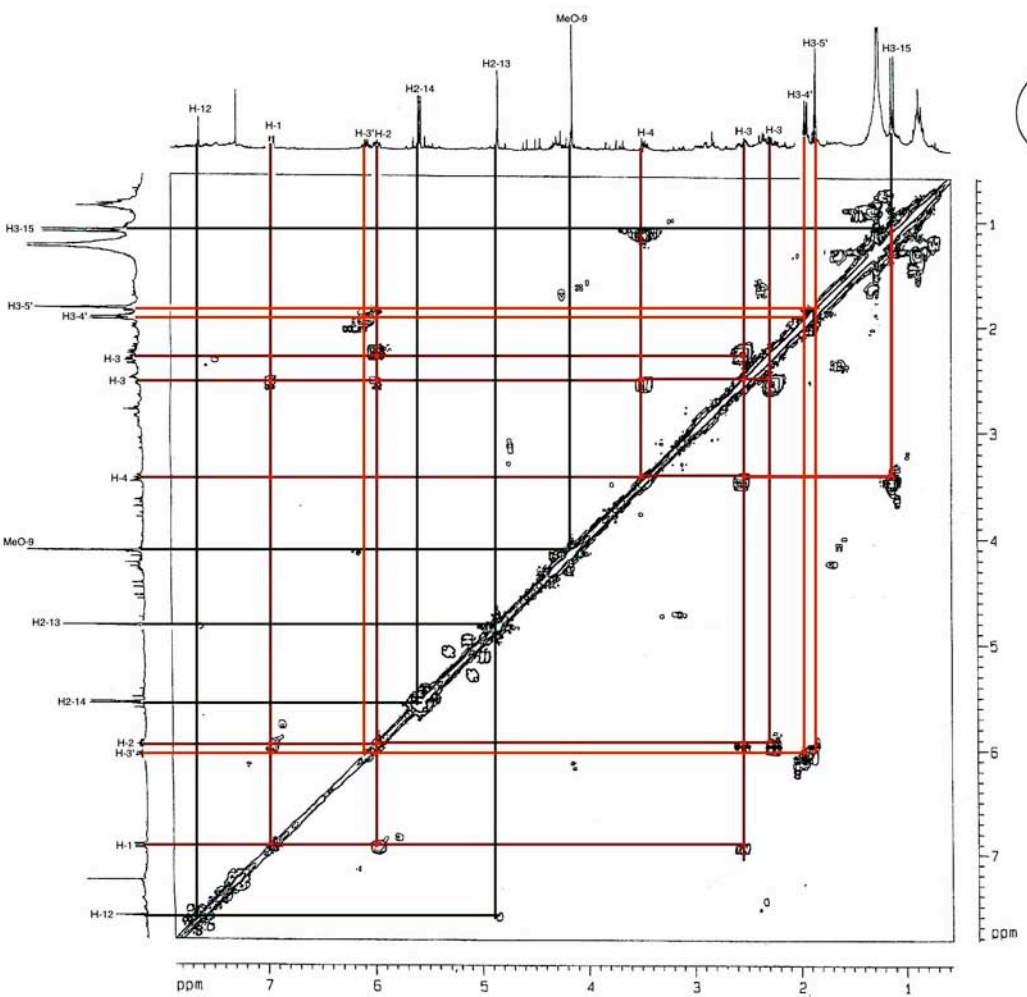


Figura 27. Espectro de correlación bidimensional de protones (COSY) del angelato 3,4-dihidro-14-matrinol.

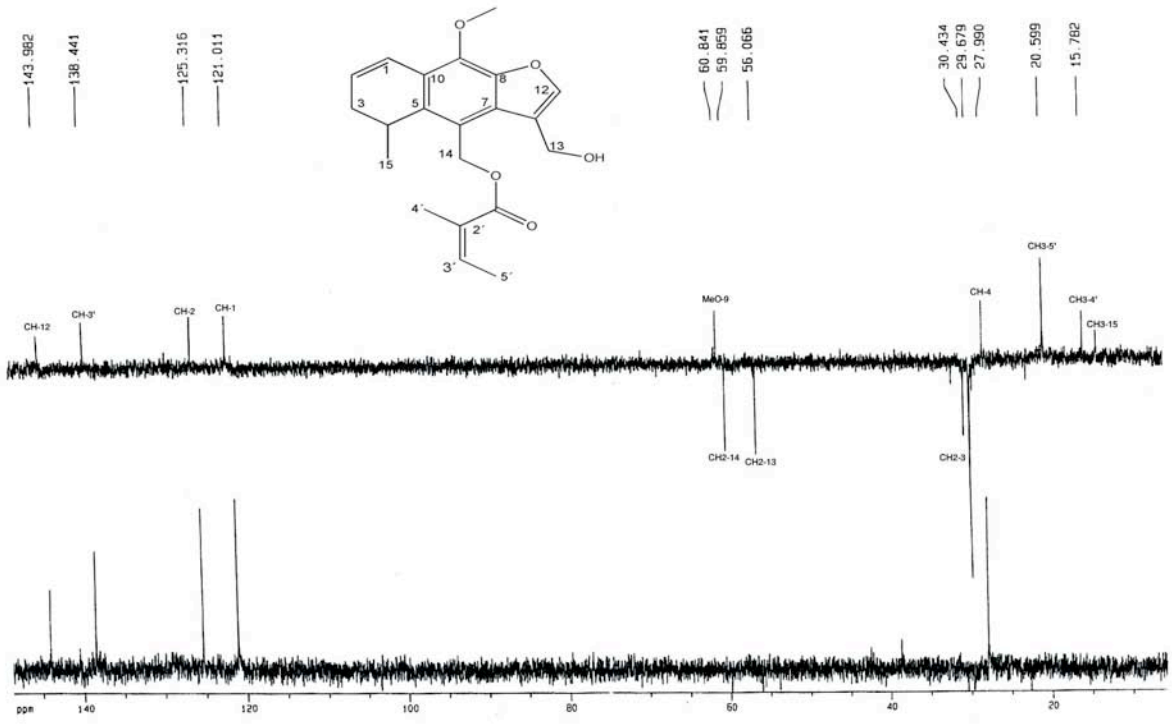


Figura 28. Espectro del experimento DEPT del 3,4-dehidro-14-maturinol.

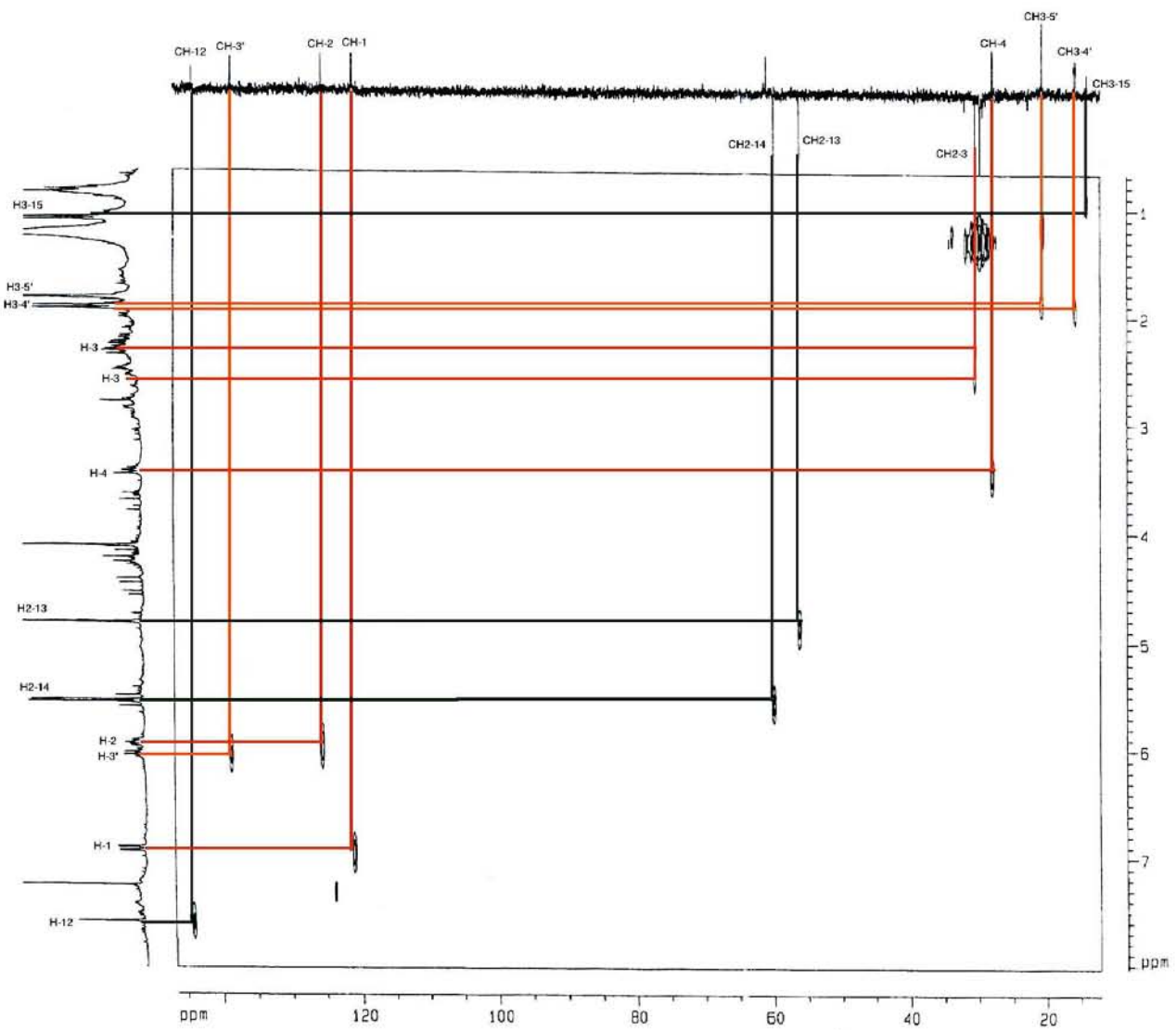
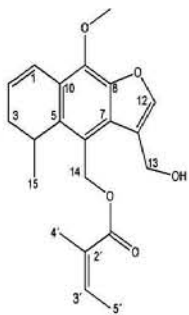


Figura 29. Espectro del experimento HETCOR del 3,4-dehidro-14-matrinol.

2.4. Compuesto 4 (Acetato de Maturina)

En la presente investigación se obtuvo el acetato de maturina de la fracción 296, sin embargo la cantidad obtenida en la mayoría de las fracciones que se realizaron por cromatografía de columna abierta del extracto hexánico de raíz, fue de 3.56 g. En algunas fracciones se realizó un fraccionamiento en placa preparativa con 100 mg de muestra de la fracción colectada para eliminar determinadas manchas que se presentaba por cromatografía en capa fina (CCF).

La estructura del acetato de maturina (**Figura 30**) fue confirmada por los datos del punto de fusión, Rf, los diferentes experimentos espectrométrico (EM), espectroscópicos (IR y RMN), de correlación DEPT, HSQC, COSY, HMBC, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, difracción de rayos X así como por su comparación con los datos descritos por Romo y Joseph-Nathan (1964). Es conveniente aclarar que Correa y Romo (1966) obtuvieron el acetato de maturina de *P. decompositum* por medio de un proceso de acetilación con anhídrido acético y piridina. Sin embargo, en *P. peltatum* el compuesto se obtuvo de forma natural y abundante. Así mismo, el acetato de maturina ha sido aislado de *P. beamanii* (Pérez-Castorena y col., 2004), así como de varias especies de *Senecio* de Sudáfrica, entre ellos a *Senecio digitalifolius* DC., *S. lydenburgensis* Hutch. & Burt Davy. y *S. affinis* Greenm. (Bohlmann y Zdero 1978b; Bohlmann y col., 1979; Bohlmann y Bapuji 1982); *Roldana heterogama* Benth ex Oerst. (Bohlmann y Zdero 1978a); y de *Trichilia cuneata* Radlk. (Doe y col., 2004).

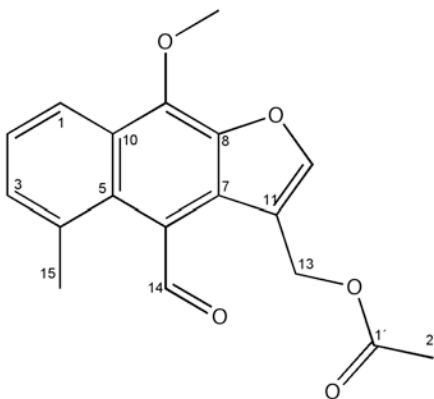


Figura 30. Estructura del acetato de maturina.

El compuesto acetato de maturina, cristalizó como un sólido en forma de agujas de color amarillo intenso, con un punto de fusión de 85-87°C. En CCF tuvo un R_f de 0.20 con el sistema de elusión hexano/acetato de etilo (9:1). Se recrystalizó con hexano-acetona (7:3).

Por espectrometría de masas y utilizando la técnica de impacto electrónico, en el registro del espectro de masas (EM-IE+) (**Figura 31**) se observó como ión molecular (M^+) y pico base la señal en 312 m/z con una intensidad del 100%, que correspondió a la fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_5$.

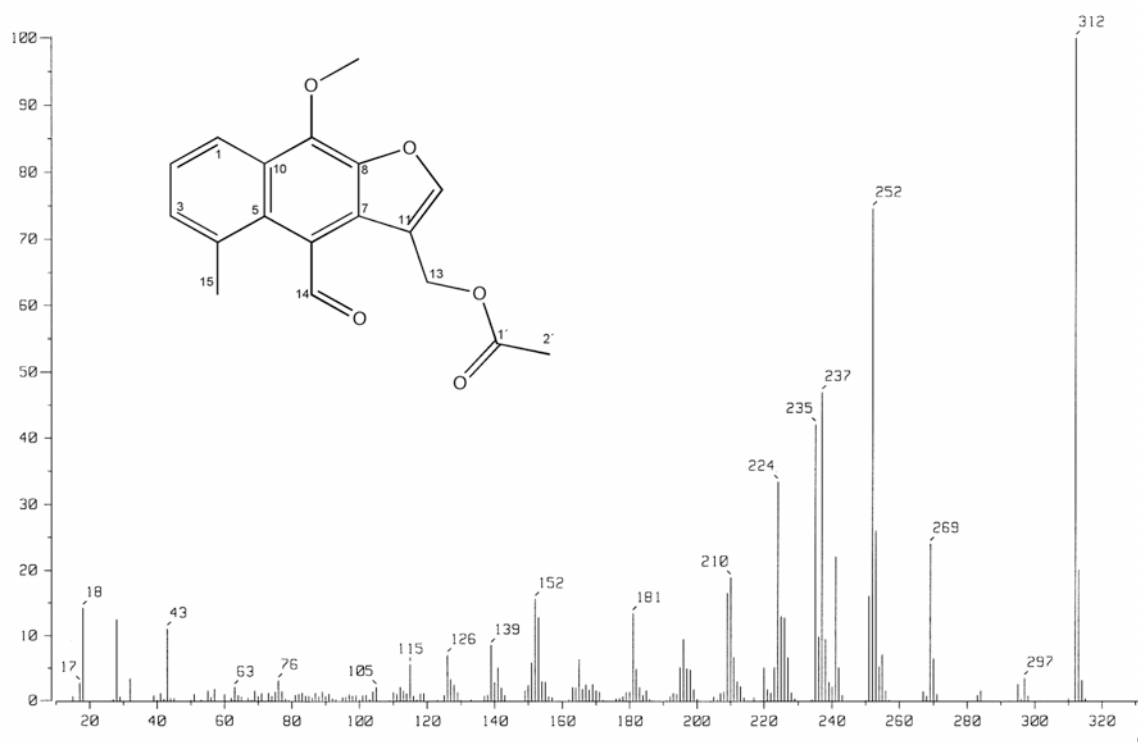


Figura 31. Espectro de masas del acetato de maturina.

El espectro de IR (**Figura 32**) mostró una banda a 1741 cm^{-1} correspondiente al grupo acetilo, una banda a 1677 cm^{-1} correspondiente a un grupo carbonilo del aldehído ($H=O$) y una banda a 1620 cm^{-1} de los dobles enlaces ($C=C$).

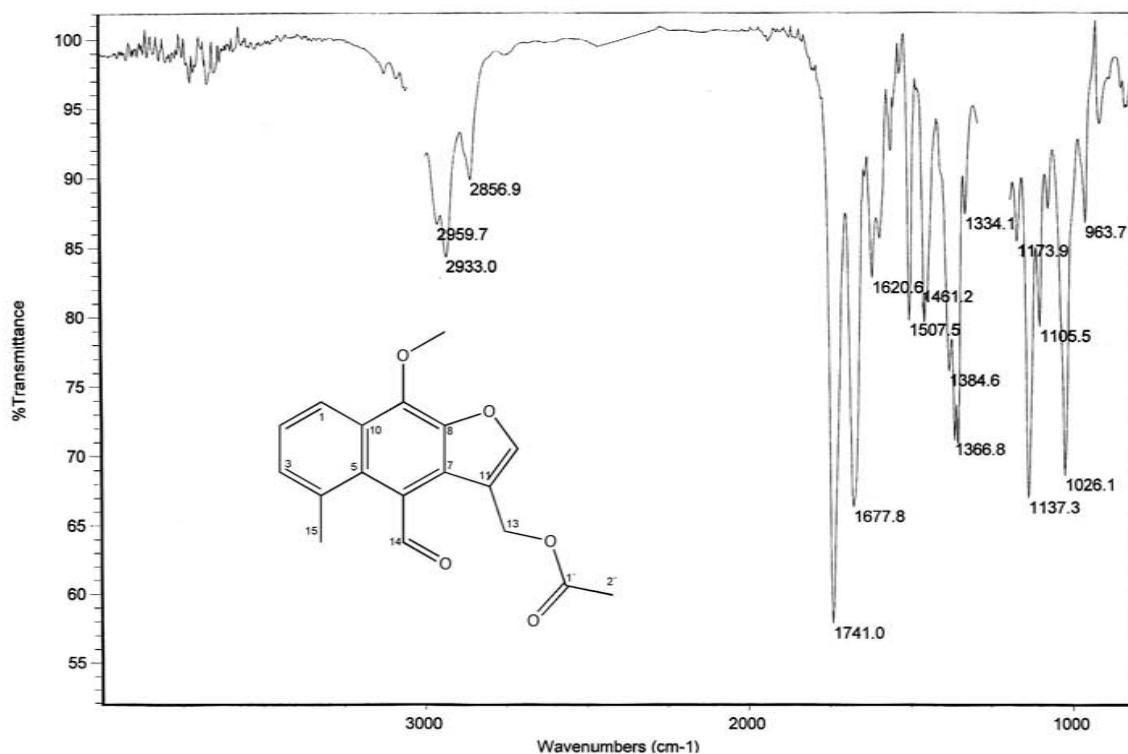


Figura 32. Espectro de IR del acetato de maturina.

El espectro de RMN de ^1H (**Figura 33**) mostró una señal simple a 11.07 ppm, que integró para un protón (^1H) del protón aldehídico en C-14. El triplete centrado a 8.30 ppm integró para un protón en C-3 del anillo aromático con un $J=7.24$ y $J=2.74$ Hz que acopló con el protón en C-2 y C-1 en 7.42 ppm. En 7.83 ppm se observó una señal típica simple del protón perteneciente al C-12 del anillo furano, este protón en el espectro del experimento COSY (**Figura 34**) muestra un acoplamiento alílico con una señal a 5.2 ppm la cual integra para dos protones que se asignó al C-13. Esta correlación se corroboró con el espectro del experimento de HMBC (**Figura 35**). El multiplete centrado en 7.42 ppm integró para dos protones correspondientes a H-2 y H-1 ($J=6.97$ y $J=0.74$ Hz). En 5.33 ppm se observó un singulete, que integró para dos protones correspondientes a los hidrógenos del metileno en C-13. Las señales simples en 4.44, 2.79 y 2.08 ppm integraron para tres protones cada uno correspondió al metoxilo en C-9 y a los metilos en C-15 y C-2'.

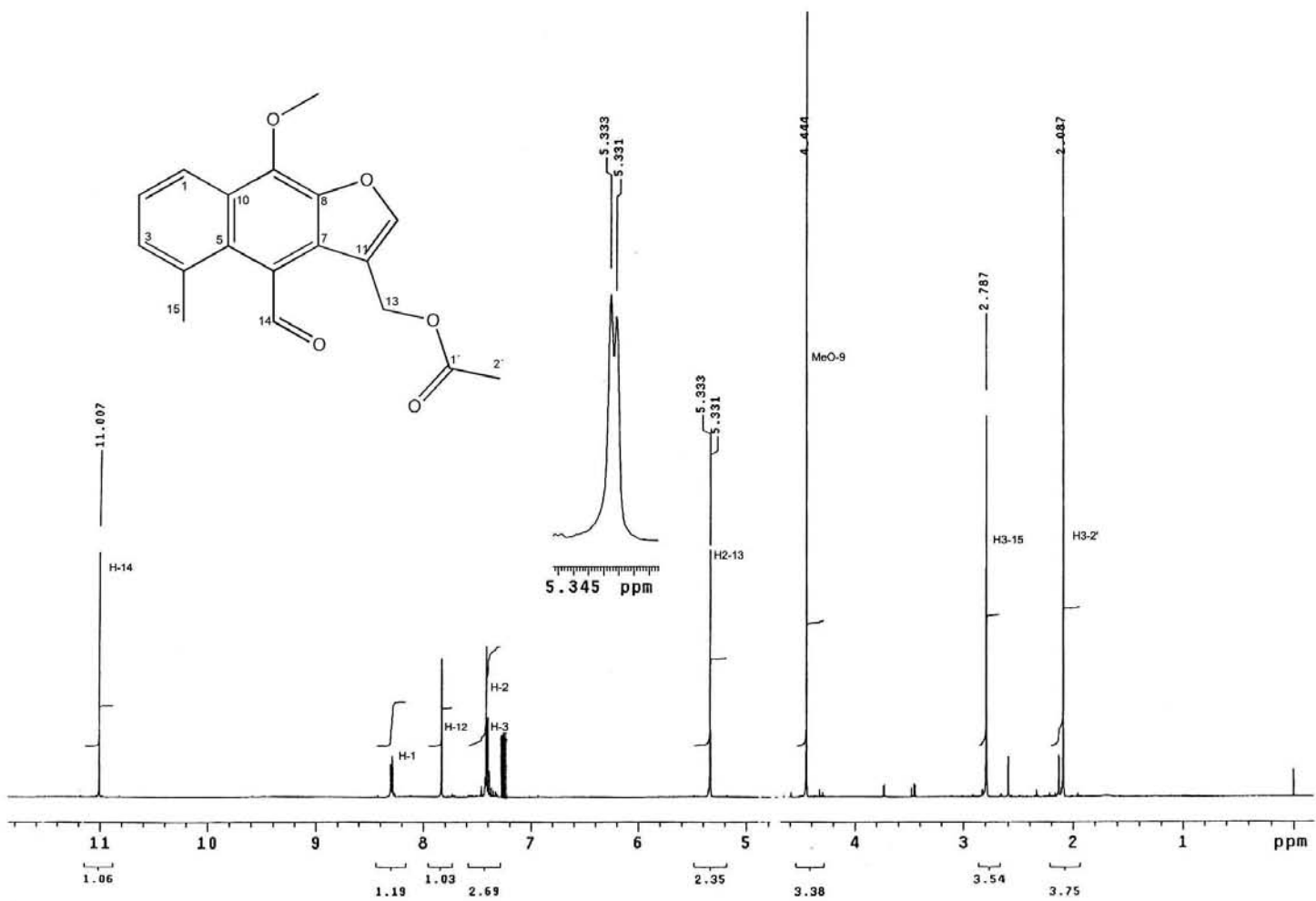


Figura 33. Espectro de RMN-1H del acetato de matorina.

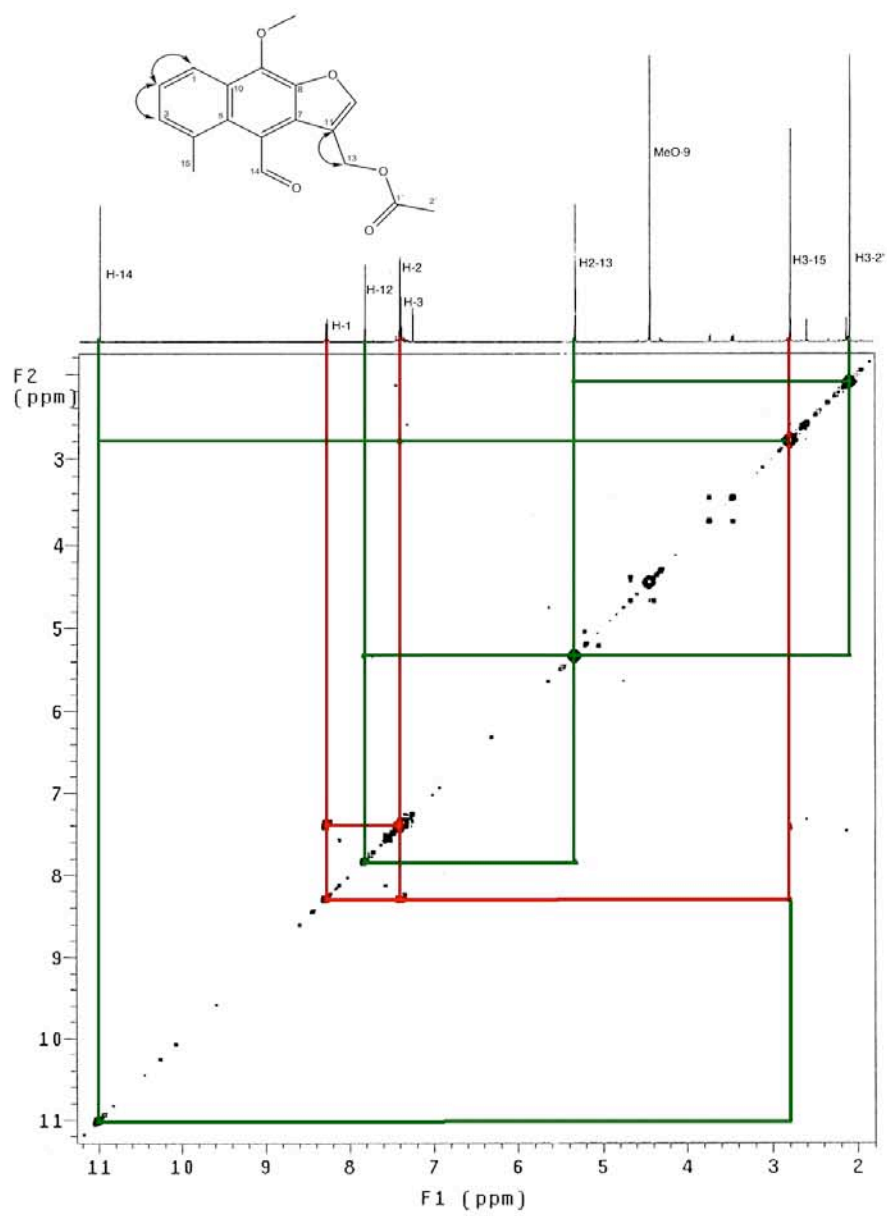


Figura 34. Espectro de correlación bidimensional de protones (COSY) del acetato de maturina.

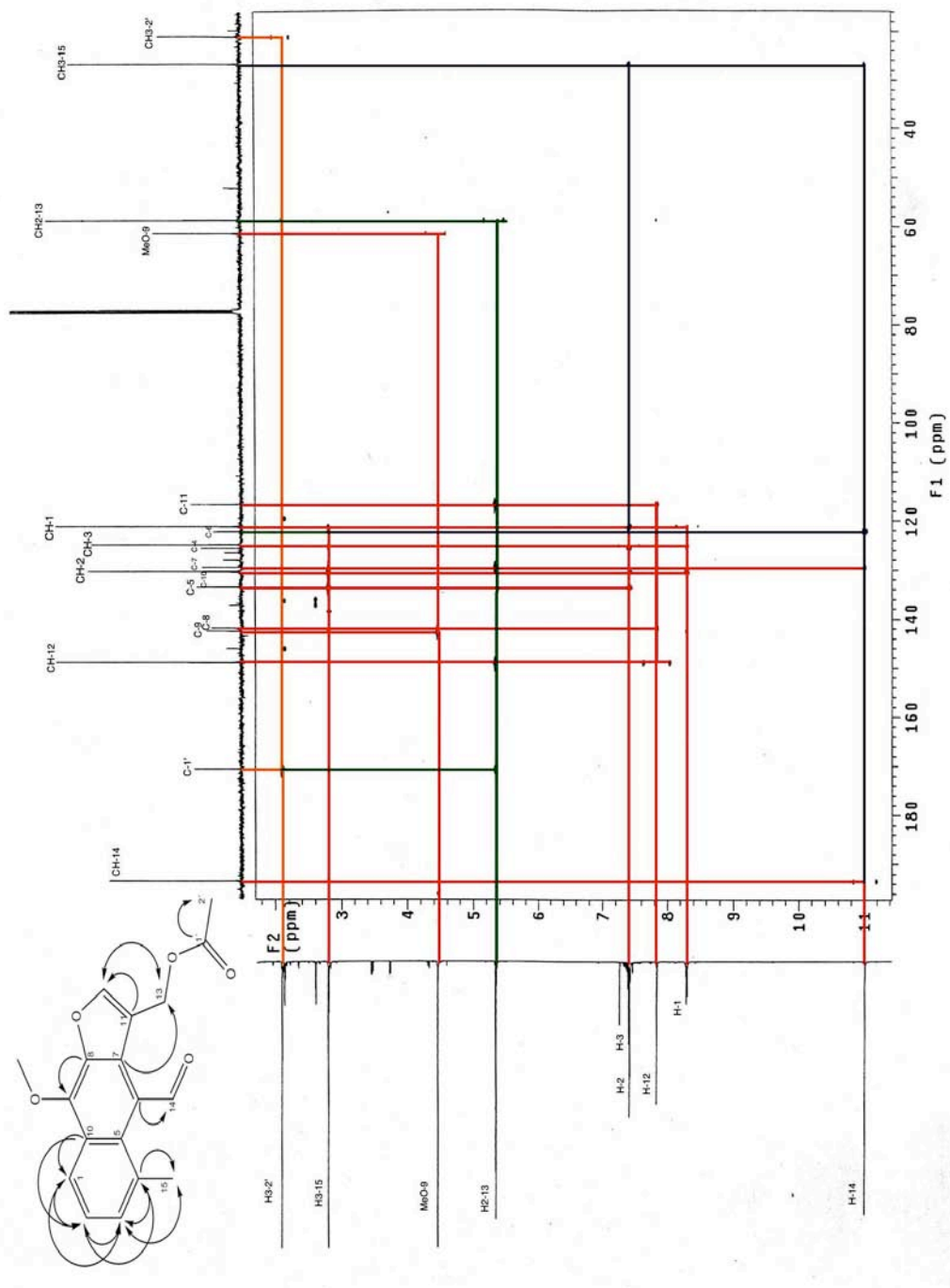


Figura 35. Espectro del experimento de HMBC que permitió el estudio de los acoplamientos ^1H - ^{13}C a larga distancia ($^{2,3,4}\text{J}$) del acetato de maturina.

Los espectros de RMN-¹³C (**Figura 36**) y los espectros de los experimentos DEPT (**Figura 37**) y HSQC (**Figura 38**) nos permitieron establecer la presencia de cinco metinos (CH) en 193.43, 148.89, 130.20, 124.73 y 121.01 ppm observando la correspondencia de protones con las señales de H-14 en 11.07 ppm, H-12 en 7.83 ppm, H-2 en 7.39 ppm, H-3 en 7.38 ppm, H-1 en 8.30 ppm correspondientes a C-14, C-12, C-2, C-3 y C-1. Además de un metileno (CH₂) en 58.47 ppm para el C-13 y tres metilos (CH₃) en 61.06, 26.60 y 20.98 ppm correlacionados con las señales de los protones del metoxilo (OCH₃)-C-9 en 4.44 ppm, H-15 en 2.79 ppm y H-2' en 2.08 ppm asignados al metoxilo de C-9, C-15 y C-2' respectivamente.

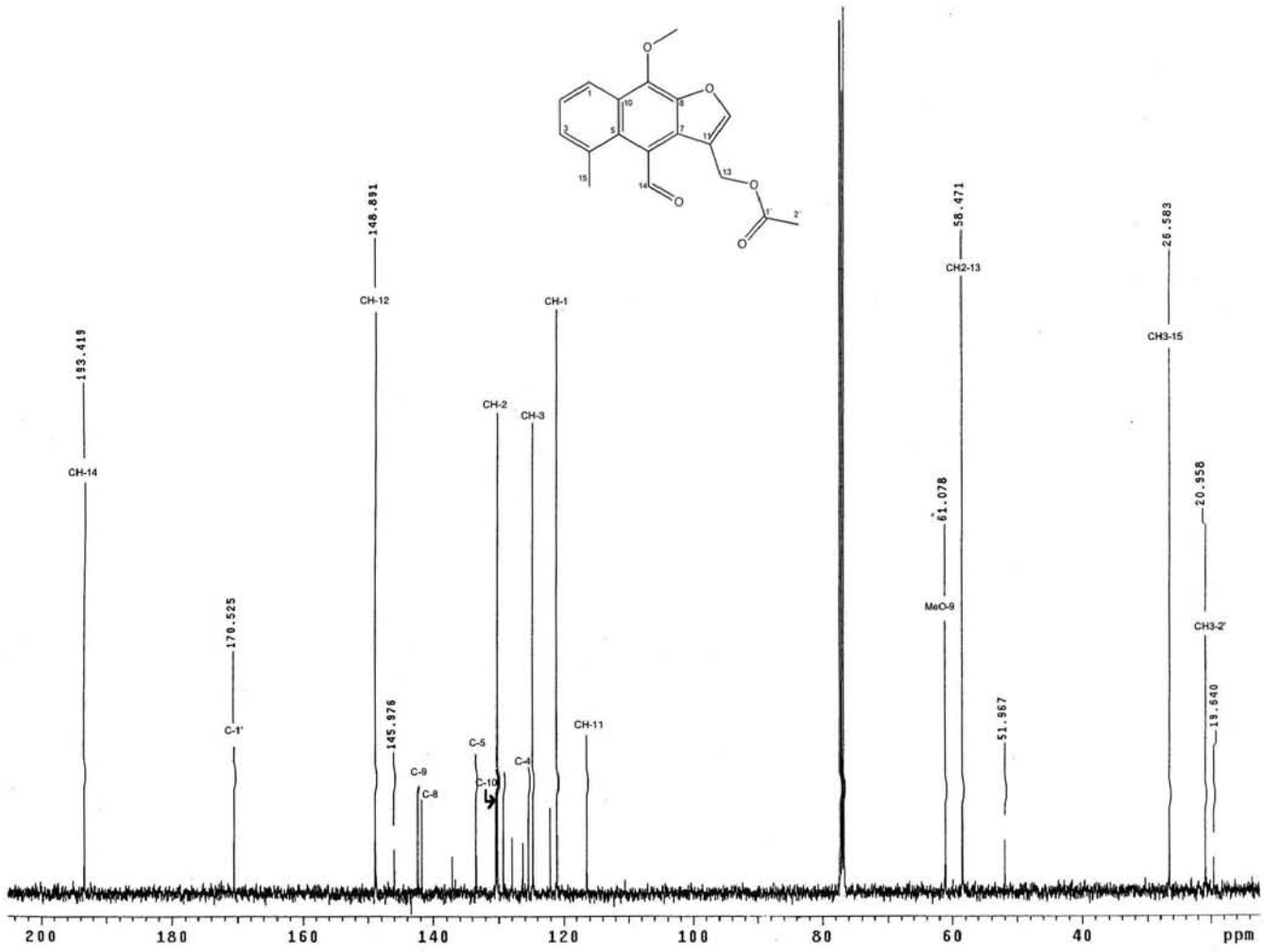


Figura 36. Espectro de RMN- ^{13}C del acetato de matorina.

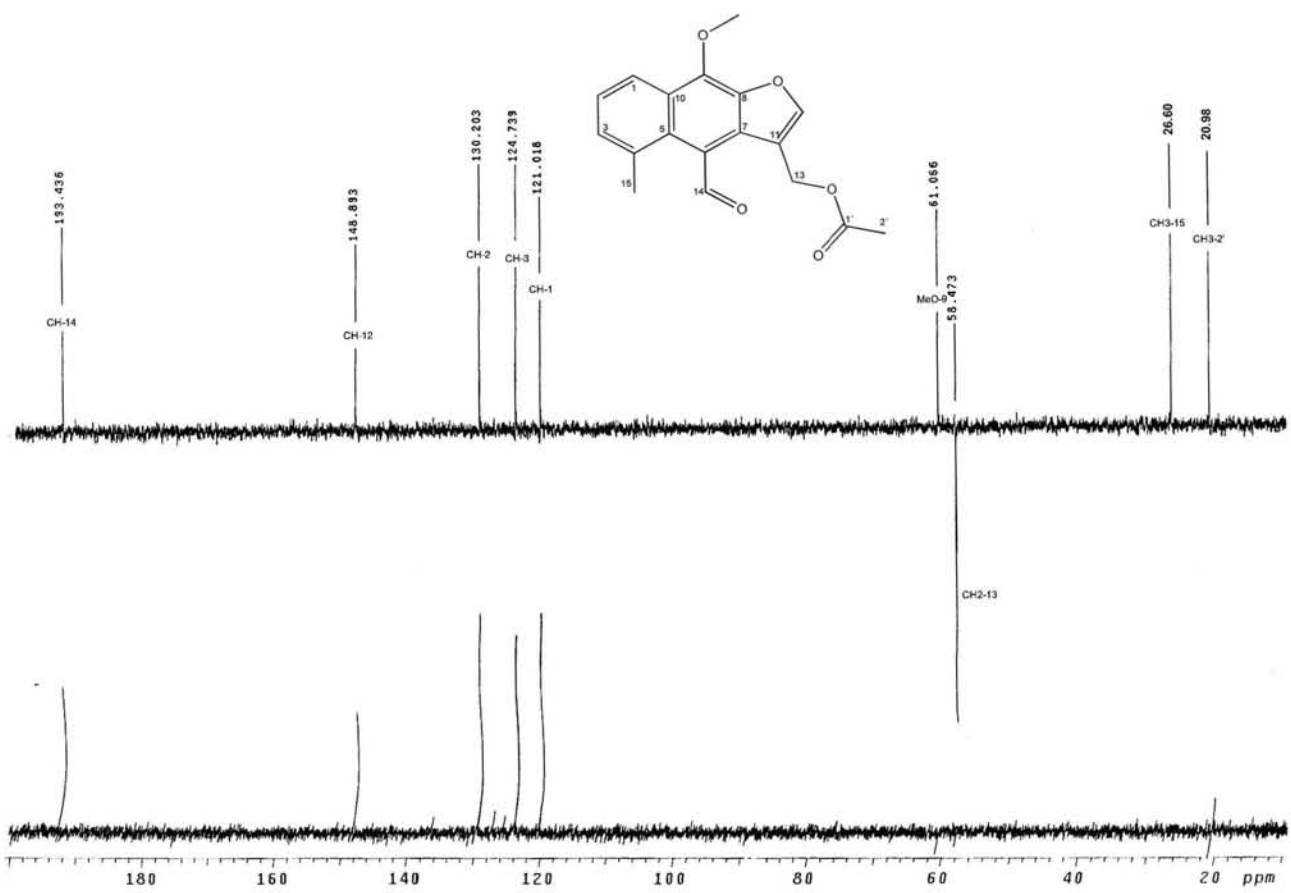


Figura 37. Espectro del experimento DEPT del acetato de maturina.

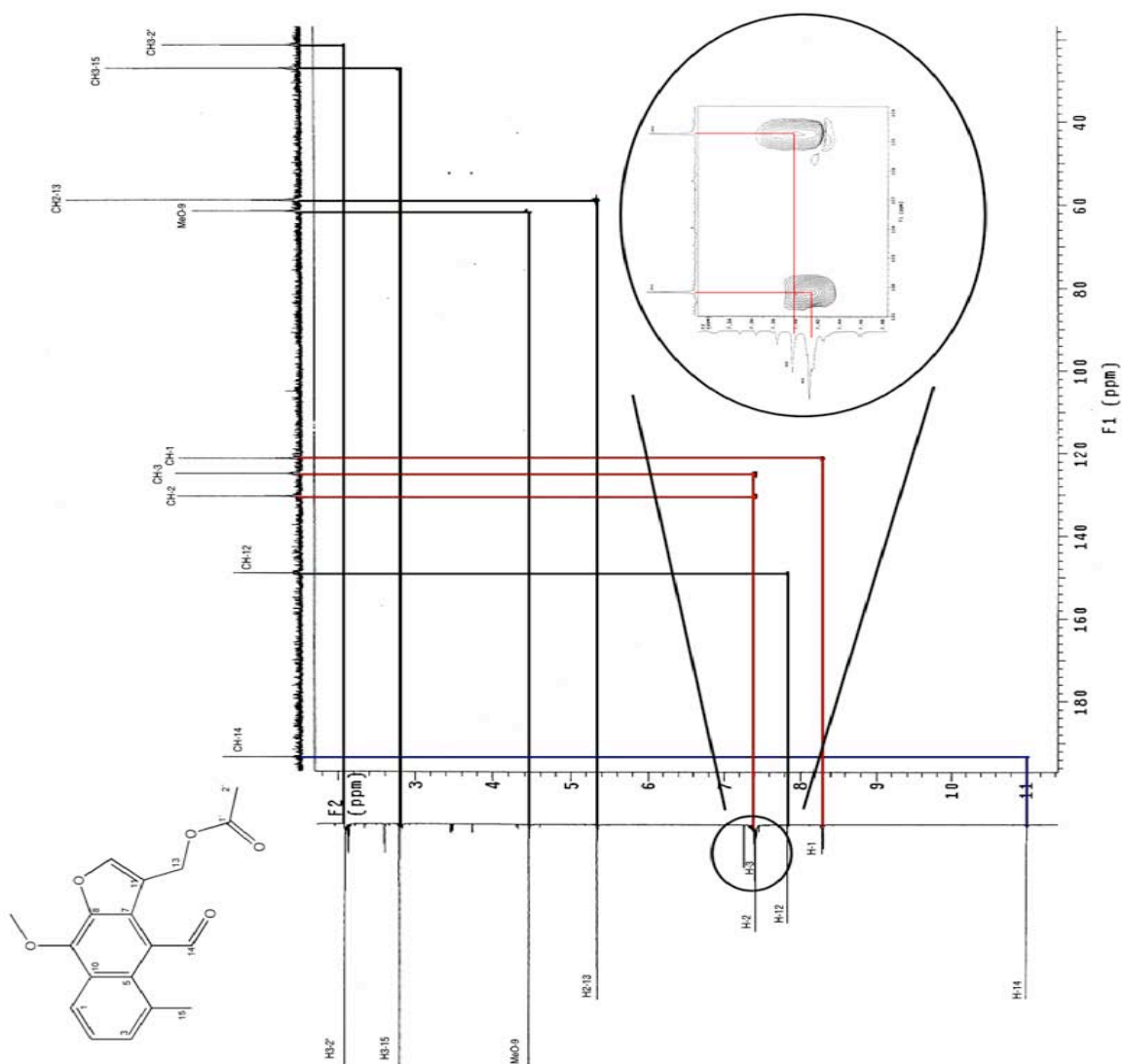


Figura 38. Espectro del experimento de HSQC que permitió el estudio de los acoplamientos ^1H - ^{13}C del acetato de maturina.

La estructura del acetato de maturina se confirmó mediante el estudio de cristalografía (**Figura 39**). Los datos suplementarios fueron depositados en el Centro de Datos de Cristalografía de Cambridge (CCDC) con la referencia: 882591. Se observó que es una molécula esencialmente plana. El grupo acetato gira alrededor de los átomos C10-O2 formando un ángulo diedro de $15.4 (1)^\circ$. El grupo formil forma un ángulo diedro de $9.4 (2)^\circ$ con la estructura plana. Las distancias de unión y los ángulos en el acetato de maturina

exhiben valores normales. El compuesto en el cristal es estable por uniones intermoleculares débiles C-H-O (C=O-H-C) (Rojano-Vilchis, *et al.*, 2012b).

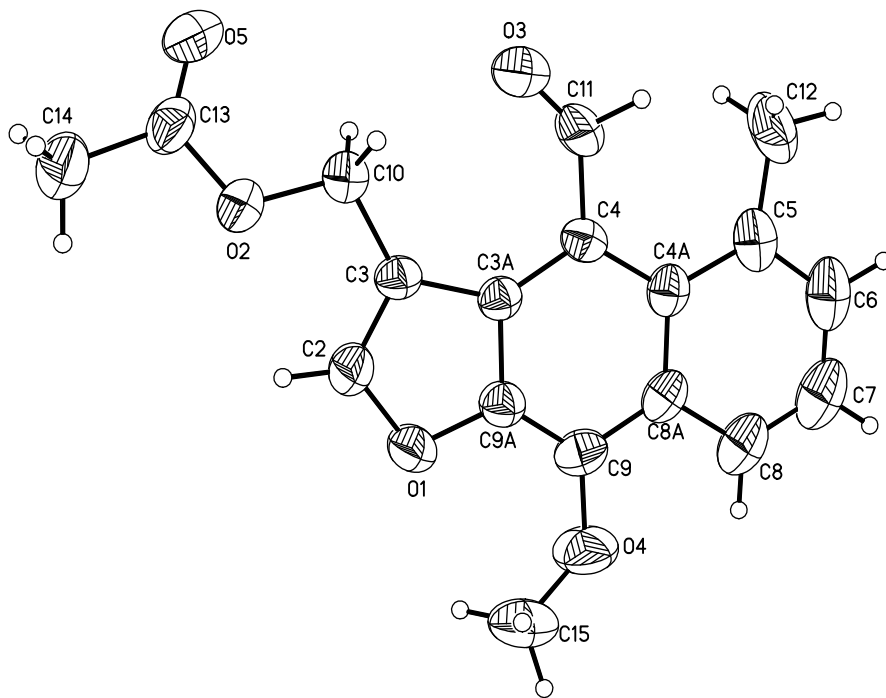


Figura 39. Vista en perspectiva del cristal del acetato de matorina.

7.3. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DEL PROCESO INFLAMATORIO

7.3.1. INHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN EL MODELO DE EDEMA INDUCIDO EN OREJA DE RATÓN CON TPA

El efecto de la aplicación tópica del acetato de matorina, la indometacina y los diferentes extractos orgánicos de raíz de *P. peltatum* son resumidos en la **Tabla 8**. La aplicación tópica del acetato de matorina y la indometacina significativamente inhibió el edema agudo inducido con TPA para todas las dosis administradas en comparación con los grupos de control ($P \leq 0.01$). El porcentaje de inhibición del edema de acetato de matorina (95.41%) fue máximo a la dosis de 1 mg/oreja menor al producido por la indometacina de 89.19% a la dosis de 0.46 mg/oreja. El efecto antiinflamatorio de acetato de matorina e indometacina muestran un efecto dosis dependiente con un valor de Dosis efectiva (DE 50) de 0.40 mg/oreja ($r^2 = 0.99$) y 0.097 mg/oreja ($r^2 = 0.97$), respectivamente. En relación con los diferentes extractos orgánicos, se puede observar que el acetato de matorina presentó el mayor porcentaje de inhibición del edema (95.41%) a diferencia de los diferentes extractos orgánicos los cuales mostraron una inhibición significativa del edema en un rango del 2 al 52.30% a la dosis de 1 mg/oreja. Los extractos hexánicos y etanólicos presentaron una inhibición máxima del 52.30 y 43.56% respectivamente a la dosis de 1 mg/oreja, en comparación con los extractos metanólicos y acuosos los cuales el porcentaje de inhibición máxima fue del 26.24 y 31.15 respectivamente a la dosis de 1 mg/oreja. Los resultados de los extractos orgánicos en especial del extracto hexánico, etanólico y metanólico sugirieron que la actividad inhibitoria del edema pudieran estar asociados a una determinada concentración del acetato de matorina.

Tabla 8. Efecto de la indometacina, acetato de matorina y de los diferentes extractos orgánicos de raíz de *P. peltatum* en el modelo de edema inducido con TPA.

Grupos	Dosis (mg/oreja)	Peso de las orejas (mg)	Porcentaje de inhibición del edema (I%)	DE50 (mg/oreja)
Control	-	16.24 ± 0.86		
Indometacina	0.05	10.53 ± 1.04*	35.15	
	0.08	8.18 ± 0.34 *	48.18	
	0.15	7.10 ± 1.34 *	56.29	0.097
	0.26	4.97 ± 1.70 *	69.42	
	0.46	1.57 ± 0.33 *	89.19	
Control	-	15.35 ± 0.42		
MA	0.18	12.26 ± 0.68	17.50	
	0.31	11.04 ± 0.23 *	25.71	
	0.42	6.78 ± 1.55 *	54.41	0.40
	0.56	3.64 ± 0.39 *	75.50	
	1	0.67 ± 0.19 *	95.41	
Control(Metanol:acetona)		15.34 ± 1.94		
Hexánico ⁽¹⁾	0.18	14.06 ± 1.89	8.34	
	0.42	13.14 ± 0.80 *	14.34	ND
	1	7.25 ± 0.73 **	52.30	
Control (etanol:agua)	-	13.36 ± 0.64	-	
Etanólico ⁽²⁾	0.18	10.98 ± 1.79*	17.81	
	0.42	9.44 ± 1.74 **	29.34	ND
	1	7.54 ± 1.19 **	43.56	
Control (metanol)	-	14.87 ± 0.81	-	
Metanólico ⁽³⁾	0.18	15.78 ± 1.44	- 6.08	
	0.41	14.78 ± 0.96	0.64	ND
	1	12.13 ± 1.81	26.24	
Control (Metanol:agua)	-	15.85 ± 0.76	-	
Acuoso ⁽⁴⁾	0.18	15.42 ± 0.93	2.71	
	0.41	15.02 ± 1.21	5.24	ND
	1	11.12 ± 0.42**	31.15	

(1) Extracto hexánico de raíz; (2) Extracto etanólico de raíz; (3) Extracto metanólico de raíz y (4) Extracto acuoso de raíz. El peso de las orejas representa el promedio ± el error estándar. Los resultados se analizaron mediante una prueba de Dunnett y los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control. DE 50 (mg/oreja) del control fue de 0.097 $r^2=0.97$ y del MA fue de 0.40 $r^2=0.99$.

Además, se confirmó en el mismo modelo de edema inducido en oreja de ratón con TPA con la misma dosis de un 1 mg/oreja que el acetato de matorina mostró el mayor efecto inhibitorio del edema comparado con el cacalol (45.5 % de inhibición del edema) (Jiménez-Estrada *et al.*, 2006), compuesto obtenido de *P. decompositum* y del cual se le atribuye la actividad hipoglucemiante (Inman *et al.*, 1996). Sin embargo el estudio del efecto hipoglucemiante en ratones con la decocción de las raíces de *P. decompositum*, *P. peltatum* y *Acourtia thurberi*, demostró que no había relación con algunos de los compuestos mencionados (Alarcón-Aguilar *et al.*, 1997) y Contreras-Weber *et al.*, 2002 observó el efecto hipoglucémico con *P. peltatum* a través de la decocción de las raíces, sin atribuir propiedad medicinal alguna a compuesto aislado. Finalmente, se observó que el acetato de matorina disminuyó la inflamación del edema en el modelo de TPA en un 75.50% a través de la disminución de la producción de TNF- α y de IL-1 β (citocinas pro-inflamatorias) (Rojano *et al.*, 2013).

7.3.2. INHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN EL MODELO DE EDEMA INDUCIDO CON CARRAGENINA EN RATAS

El ensayo del modelo de edema inducido con carragenina en ratas es el más utilizado para evaluar a posibles compuestos nuevos como agentes antiinflamatorios, que puedan tener la capacidad para reducir el edema local inducido en la zona plantar de la rata por la inyección del agente irritante (Winter *et al.*, 1962). Previo a la inyección de la carragenina, los valores promedio basales (V_0) en la zona plantar de la rata fueron de 0.69 y 1.00 ml (0.87 ± 0.04 ml), el promedio de las variaciones del edema ($V_t - V_0$) \pm P.E.S. en los grupos control de N=6 fueron de: 1h (0.42 ± 0.10 ml), 3 h (0.98 ± 0.12 ml) y 5 h (1.06 ± 0.06 ml). La inhibición del edema en los grupos del compuesto evaluado fue calculada con referencia a los valores del grupo control y al porcentaje de inhibición obtenido en cada grupo tratado como se muestra en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Efecto antiinflamatorio del acetato de maturina, naproxeno sódico, ibuprofeno y de los extractos orgánicos de la raíz de *P. peltatum* (100 mg/kg) en el modelo de edema plantar inducido con carragenina

Substancia	Inhibición del edema (%)		
	1h	3h	5h
Acetato de maturina	58.95±12.4 *	35.08±14.6 *	35.22±6.1
Naproxeno sódico	4.70±24.9	49.91±12.7 *	41.6±10.9 *
Ibuprofeno	47.05±8.9 *	41.79±7.9 *	9.7±8.3
Extractos			
Hexánico	22.74±5.0	5.92±11.5	14.30±12.6
Etanólico	29.02±13.6	35.70±12.1 *	28.30±6.6
Metanólico	60.00±8.2 *	30.96±7.4 *	27.98±4.8 *
Acuoso	-1.43±5.37	32.37±13.6 *	30.45±12.3 *

Cada valor representa el promedio ± el promedio del error estándar de seis animales. *P<0.05.

El acetato de maturina mostró una significativa inhibición de la inflamación ($P < 0.05$) inducida por la carragenina así como por los agentes antiinflamatorios naproxeno sódico y el ibuprofeno. El acetato de maturina exhibió un significativo porcentaje de inhibición (58.95 %) al principio del evento (1h) y el efecto persistió hasta casi la quinta hora. Esto sugiere la inhibición de diferentes aspectos y mediadores químicos de la inflamación (Ahmad *et al.*, 2005). El naproxeno mostró su máximo porcentaje de inhibición (49.91%) a la tercera hora, persistiendo hasta casi la quinta hora (41.6%) como el acetato de maturina (35.22%). Sin embargo, el ibuprofeno mantuvo su máximo porcentaje de inhibición (47.05-41.79%) al principio del evento persistiendo hasta la tercera hora para después disminuir considerablemente a la quinta hora (9.7%) a diferencia del acetato de maturina y del naproxeno donde continuó la inhibición del edema hasta la quinta hora. Estos resultados sugirieron que el acetato de maturina redujo la exudación en los procesos de inflamación aguda y en la fase inicial de la respuesta inflamatoria en donde se liberan los mediadores pro-inflamatorios, como la histamina, serotonina y las cininas. Los porcentajes de inhibición de los extractos de raíz (Hexánico, Etanólico, Metanólico y Acuoso), a la dosis de 100 mg/kg no resultaron significativamente superiores al 50%, excepto el extracto

metanólico con un porcentaje de inhibición del 60% al principio del evento, muy semejante al porcentaje de inhibición del acetato de maturina, sin embargo a la tercera y quinta hora el porcentaje de inhibición disminuyó drásticamente hasta en un 27.98% a diferencia del acetato de maturina que se mantuvo en un 35 % a la tercera y quinta hora. El desarrollo del edema en la zona plantar de la rata después de la inyección de carragenina ha sido descrito como un evento bifásico: la primera fase de la inflamación de 2.3 a 3 horas es debido a la liberación de aminas vasoactivas (histamina, serotonina y 5-hidroxitriptamina), la síntesis y liberación de óxido nítrico producido por la isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa (*n*-NOS) y la liberación de cininas, como la bradisinina, un potente agente que incrementa la permeabilidad vascular pero no posee actividad quimiotáctica. Algunos autores mencionan que se desarrolla una fase intermedia por la activación de la bradiquinina (Di Rosa, 1972; Pérez *et al.*, 2001). La segunda fase de 4.5 a 6 horas es atribuida a la producción de especies reactivas de oxígeno, infiltración de neutrófilos, aumento en la expresión y actividad de COX-2 que propicia una elevada producción de prostaglandinas inducidas por las proteasas, ciclooxigenasas y lisosoma (Olajide *et al.*, 2000) además de la liberación la isoforma inducible de óxido nítrico sintasa (*i*-NOS) por el óxido nítrico (Nantel *et al.*, 1999; Morris, 2003). Los radicales libres de oxígeno, liberados a partir de neutrófilos, monocitos y macrófagos, aumentan la permeabilidad, directamente o mediante la liberación de histamina de las células cebadas, son quimiotácticas para los monocitos e inhiben el movimiento de los neutrófilos y eosinófilos (Smith y Reinard, 1992). Los neutrófilos, monocitos y linfocitos circulantes reconocen moléculas de adhesión como la selectina E, sobre las paredes de los vasos sanguíneos, para luego adherirse a ellas y pasar a través de la pared celular hacia los espacios tisulares para participar en la depuración del agente dañino y la cicatrización del tejido (Kindt, 2007). Este comportamiento en el porcentaje de inhibición del edema del acetato de maturina puede explicarse en función de los eventos temporales característicos del modelo, por lo tanto la inhibición del edema a la primera hora puede interferir con la liberación de mediadores como las aminas vasoactivas o bradiquinina, mientras que después de la tercera hora y hasta la quinta sugiere que el acetato de maturina inhibe en una proporción significativa del 35% la síntesis de prostaglandinas mostrando un comportamiento similar al del naproxeno.

7.3.3. EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA MIELOPEROXIDASA

La MPO se libera en vacuolas fagocíticas durante la activación celular y su grado de actividad está directamente relacionado con la concentración de neutrófilos en el tejido inflamado, por lo que su medición de esta actividad enzimática ha sido considerada un sensible marcador cuantitativo de la quimiotaxis e infiltración de neutrófilos en el proceso inflamatorio (Cheng *et al.*, 2008). En el presente trabajo se aplicó TPA de forma tópica en la oreja derecha de ratones, a un grupo se le administró indometacina, mientras a otro grupo se le administró acetato de matorina. La mitad de ratones de ambos grupos se sacrificaron a las 3 horas, mientras que la otra mitad se sacrificaron a las 6 horas. Los resultados indicaron que TPA es capaz de inducir el aumento de la actividad de la MPO tanto a las 3 horas como a las 6 horas posteriores a su aplicación. A las tres horas el TPA indujo un aumento de casi dos veces de la actividad basal de MPO, mientras que a las seis horas aumentó casi cinco veces la actividad de esta enzima. Tras la aplicación tópica del acetato de matorina se produjo una reducción de los niveles de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) en los homogenados de oreja.

La disminución de la actividad de la MPO fue directamente proporcional a la concentración del acetato de matorina (0.31; 0.42 y 0.56 mg/oreja) con el 89, 96 y 98 % respectivamente (**Figura 40**), lo que indica que el acetato de matorina favoreció el control en la migración de los neutrófilos observada en la actividad de la inflamación a nivel tópico.

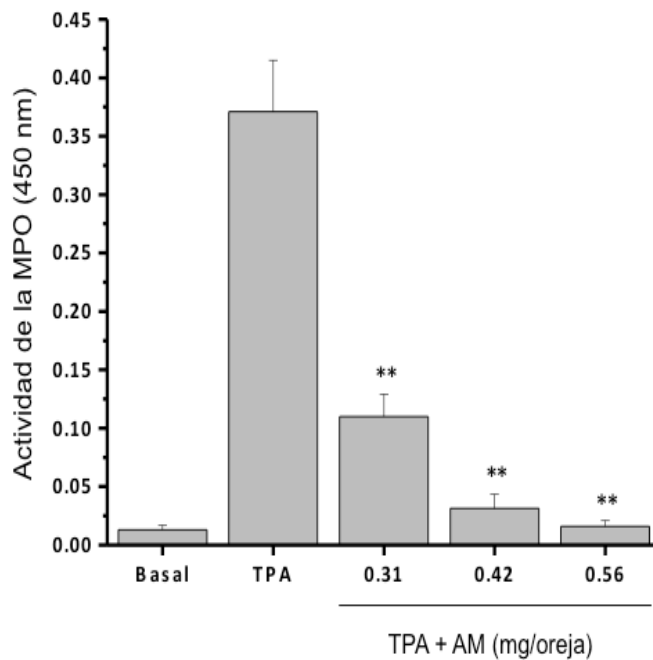


Figura 40. Efecto de la aplicación tónica de acetato de maturina en la actividad de la mieloperoxidasa. Cada columna representada el promedio \pm promedio del error estándar de seis animales. ** $P < 0.01$.

Los resultados son congruentes con lo reportado para TPA, sustancia que aumenta la infiltración de polimorfonucleares en el tejido tratado, lo que se refleja en un aumento de la actividad de MPO (Puigneró y Queralt, 1997; Murakawa *et al.*, 2006). Mediante este modelo ha sido posible encontrar extractos y compuestos de plantas activos frente a procesos inflamatorios.

7.4. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

7.4.1. ACLIMATIZACIÓN Y DESINFECCIÓN DE HOJAS DESARROLLADAS A PARTIR DE LAS PLANTAS SILVESTRES

Los tres ejemplares de plantas silvestres de *P. peltatum* que se obtuvieron en la primer colecta fueron trasplantados en macetas, con el fin de conservarlos y aclimatarlos a condiciones controladas, mediante condiciones de fertirrigación constante (cada 15 días), ventilación e iluminación bajo sombra. En especial, el nitrógeno fue esencial y fue requerido en grandes cantidades por la planta porque es uno de los factores limitantes en su crecimiento (Garnica *et al.*, 2009). Se observó que el desarrollo vegetativo fue más evidente en condiciones con riego, logrando el aumento en el tamaño de la hoja y en el número de éstas, lo cual puede explicarse también por el aumento en la tasa de asimilación de CO₂ (Figura 41).

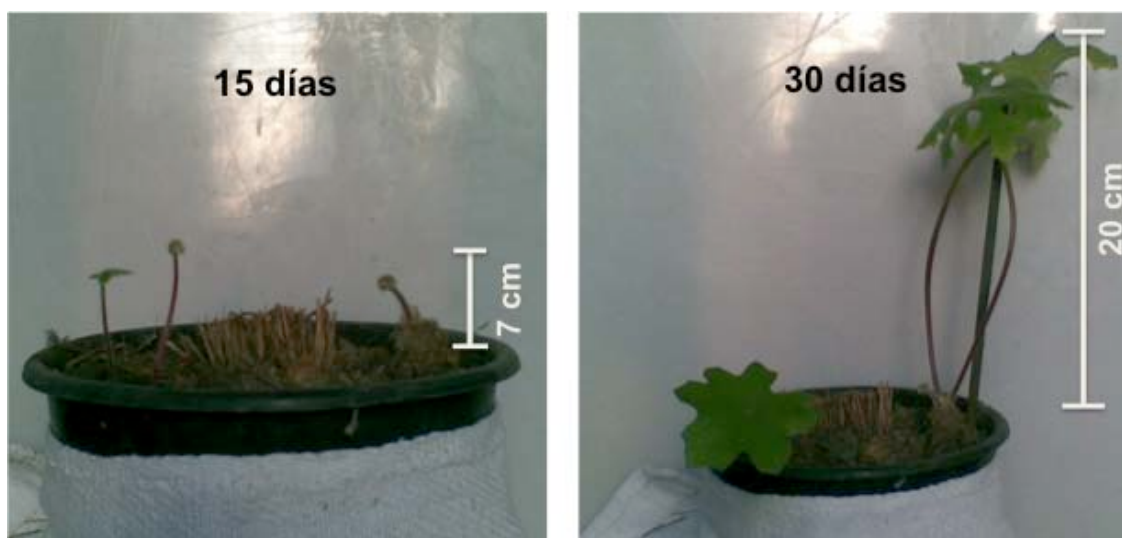


Figura 41. Desarrollo de las hojas mediante condiciones de fertirrigación constante (cada 15 días), ventilación e iluminación bajo sombra.

Las hojas que sirvieron de explante para la inducción de brotes (11 hojas), fueron las que mostraron un diámetro inferior de 20 cm, sin daño foliar y completamente formadas. Los diámetros de las hojas obtenidas fueron de 3 a 18 cm. Las hojas con un diámetro superior a los 20 cm no fueron apropiadas para ser empleadas como explantes, debido a la

rápida oxidación y daño en el tejido por deshidratación. Torres (1988), refiere que las partes viejas de las plantas no son apropiadas para ser empleadas como explantes por un bajo o nulo contenido de células meristemáticas, a diferencia de las hojas o partes jóvenes.

Por otro lado, George *et al.* (2008), refiere que la contaminación por microorganismos es una fuerte limitante para el desarrollo de los diferentes cultivos *in vitro* por lo tanto los explantes deben someterse a un proceso de desinfección que elimine los contaminantes que poseen, pero no reduzca la viabilidad del tejido, en algunos casos es necesario la aplicación de antibióticos que minimicen la infección porque existen microorganismos que son sistémicos. De esta manera, los resultados mostraron que el porcentaje de contaminación fue del 10%, valor considerado aceptable en la mayoría de los cultivos *in vitro* en el que se obtuvo el número adecuado de explantes vivos sin contaminación. El tratamiento para la desinfección de las hojas se realizó con agua jabonosa por 10 minutos e hipoclorito de sodio comercial con el 6 % de ingrediente activo al 10% (v/v) durante 7 minutos. Las especificaciones del método de desinfección de las hojas de las plantas en maceta fue el siguiente: las hojas seleccionadas fueron lavadas con agua jabonosa por 10 minutos durante 3 veces, seguido de inmersión en etanol al 70% por 1 minuto y posteriormente en solución de hipoclorito de sodio comercial con el 6% de ingrediente activo al 10 % (v/v) por 7 minutos, con agitación constante. Al término de este tiempo se removió la solución y se enjuagó exhaustivamente con abundante agua destilada estéril en condiciones de esterilidad. Después se continuó con el corte de cada lámina foliar u hoja. Los cortes con las hojas de *P. peltatum* fueron de 1 cm² en la parte central cerca de las nervaduras principales. El tamaño del corte para el explante es importante, usualmente los explantes de gran tamaño aumentan la probabilidad de tener un cultivo exitoso (George *et al.*, 2008). Sin embargo es necesario considerar la naturaleza y tamaño de la especie. Por ejemplo con especies de *Dahlia*, Hernández (1993), realizó cortes de 1-2 mm y de 3-4 cm² en órganos como ápices y receptáculos. González (1999), utilizó explantes de tallos de 0.5-0.8 cm², hojas de 0.5-1 cm² y de ápices de 1cm².

7.4.2. MODIFICACIONES DEL MEDIO DE CULTIVO BASE PARA LA INDUCCIÓN DE BROTES ADVENTICIOS DE HOJA

El proceso de morfogénesis es un evento en el que se da la generación de órganos a partir de tejidos organizados, implica en un inicio la organización de células que no poseían dicha característica. Los tejidos morfogenéticos, son capaces de generar órganos adventicios como tallos, raíces, hojas y flores. En la organogénesis directa se forman brotes adventicios directamente a partir de un explante que depende de los fitorreguladores o reguladores de crecimiento utilizados así como del genotipo de la planta y órgano utilizado como explante, originando brotes a partir de hojas, raíces, tallos o flores (George *et al.*, 2008). Los reguladores de crecimiento son compuestos que en muy bajas concentraciones son capaces de modificar el crecimiento y la morfogénesis de las plantas y de su presencia o ausencia dependerá el resultado del cultivo, necesitándose diferentes fitoreguladores en diferentes cantidades en cada etapa de la propagación (Razdan, 2003). Los reguladores de crecimiento para la mayoría de los cultivos *in vitro* no deben ser superiores las concentraciones de los 10 mg/L (Dixon, 1991; Pierik, 1997). En el caso de nuestro estudio, la formación de los brotes adventicios de hoja fue evidente en prácticamente todos los tratamientos (n=10), sin embargo se obtuvieron diferencias entre los tratamientos aplicados. Los resultados obtenidos permitieron obtener valores óptimos de balance hormonal necesario en el medio de cultivo para la formación de brotes mediante organogénesis directa a una concentración de 2.5 mg/L de bencil adenina (BA) y 0.5 mg/L de ácido indolacético (AIA). A diferencia de los brotes desarrollados con el incremento de la concentración de BA y de AIA superior a la dosis de 2.5 y 0.5 mg/L, con la disminución en la formación de brotes de tallos y hojas pequeñas, delgadas, poco definidas y oxidados (**Tabla 10**). En especial se decidió utilizar el ácido indol-3-acético (AIA) porque es rápidamente oxidado en el medio de cultivo y fácilmente metabolizado en la planta (Kende y Zeevaart, 1997). También se observó que la actividad de las citocininas fue lenta, sólo después del subcultivo al medio libre de hormonas fue cuando el efecto se presentó lo que indica que la concentración endógena de auxinas no fue capaz de contrarrestar la actividad inhibitoria de las citocininas, pues los niveles y por lo tanto su actividad se correlacionan inversamente (Woodward y Bartel, 2005), baja concentración de auxinas y alta concentración de citocininas (George *et al.*, 2008).

Tabla 10. Porcentaje (%) de formación de brotes adventicios por efecto de la concentración de ácido indolacético (AIA), bencil adenina (BA) y la cinetina (KIN)

	AIA mg/L					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	1
BA mg/L						
0	0	0	0	40	0	10
2	30	50	100	50	40	50
2.3	50	10	50	100	50	50
2.5	50	50	40	100	90	100
2.7	0	50	50	100	100	50
5	50	20	50	100	50	100
KIN mg/L						
0	0	0	0	40	0	10
2	50	20	50	0	40	70
2.3	20	50	50	20	50	30
2.5	40	50	60	90	100	30
2.7	0	20	100	90	50	100
5	0	20	0	50	90	50

Con respecto a los tratamientos con la cinetina (KIN), la mejor combinación en concentración de fitoreguladores fue de 2.5 mg/L de KIN y 0.7 mg/L de AIA. Sin embargo, la formación de los brotes como tallos y hojas fue más lento, menos definido y con casos evidentes de hiperhidratación y oxidación al término de la evaluación del ensayo. Por lo anterior y en comparación con los resultados del trabajo realizado por Hernández–Tejeda A.M. (1999), se decidió utilizar como medio de cultivo base para la formación de brotes, el medio de cultivo sólido de Murashige y Skoog, 1962 (MS), complementado con 2.5 mg/L de bencil adenina (BA); 0.5 mg/L de ácido indolacético (AIA); 1 mg/L de glicina y 100 mg/L de Ac. Ascórbico (**MSbrt/L**). Se observó que después de los 20 días iniciales de cultivo se obtuvieron las primeras respuestas, en las que observó un incremento en la formación de protuberancias fundamentalmente en la zona de corte transversal de la hoja (**Figura 42 A-B**) que en la mayoría de las ocasiones estos cortes permitieron poner en contacto directo algunos tejidos internos con el medio de cultivo y facilitar la absorción de los reguladores del crecimiento. Estas protuberancias fueron las precursoras de la formación de otras estructuras más organizadas como los brotes de tallos y hojas (**Figura 42 C, D y E**).



Figura 42. Explante de lámina foliar con desarrollo de brotes adventicios. Pequeñas protuberancias con aspecto de domo (A y B) y con la presencia de formación de brotes adventicios (C, D y E) de *P. peltatum* en medio de cultivo MSBrt/L. Línea: 1 cm.

Al contrario de lo que menciona Davies, (2007) y George *et al.*, (2008), el ácido indolacético (AIA) favoreció la elongación del tallo como resultado de un flujo de protones hacia el exterior de la célula. En adición con la bencil adenina (BA) y la cinetina (KIN) que promovieron la proliferación celular, haciendo evidente la relación proporcional que entre éstas debe existir y que permite así controlar el ciclo y el control de la diferenciación celular generando brotes adventicios. Las características de los brotes adventicios formados con una concentración de 2.5 mg/L de BA y 0.5 mg/L de AIA fue el desarrollo más abundante y rápido del tallo y la hoja, sin oxidaciones evidentes y muy semejante en apariencia con la forma de las plantas adultas colectadas de la zona de estudio (**Figura 43**).

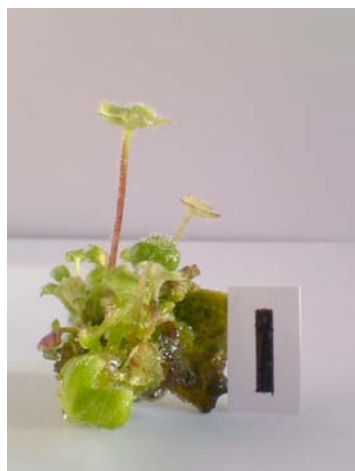


Figura 43. Desarrollo de brotes adventicios (tallo y hoja) con la combinación de fitorreguladores a una concentración de 2.5 mg/L de BA y 0.5 mg/L de AIA. Línea: 1 cm.

Para el proceso de individualización, formación y elongación de raíces se utilizó el medio de cultivo base de Murashige y Skoog, (1962) (MS), a la mitad de la concentración de sus sales orgánicas e inorgánicas (**MS50%/L**), sin la adición de citocininas. La formación de raíces está inhibida por la presencia de las citocininas a cualquier concentración, en ausencia de éstas se observó el crecimiento de raíces surgidas a partir de las estructuras meristemáticas. Con este medio de cultivo se hicieron subcultivos cada 45 días logrando el desarrollo y elongación de la raíz (**Figura 44**), después de 6 meses. Mediante este proceso fue posible obtener la cantidad de material biológico para el estudio fitoquímico.



Figura 44. Desarrollo de raíces con el medio de cultivo base de Murashige y Skoog, (1962) (MS), a la mitad de la concentración de sus sales orgánicas e inorgánicas (**MS50%/L**). Escala: Línea: 7 cm.

7.5. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ACETATO DE MATURINA EN LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DE RAÍZ DE LAS ESPECIES SILVESTRES Y DE LAS PLÁNTULAS *IN VITRO* DE *P. peltatum*

De los compuestos sesquiterpénicos que se tenían de referencia, el acetato de maturina, fue el único compuesto que se obtuvo consistentemente en todas las cromatografías tanto en los extractos provenientes de las plantas silvestres como en los extractos de las raíces de las plántulas obtenidas de la regeneración *in vitro*. Mediante cromatografía de capa fina, los extractos metanólico-etanólicos de los cultivos *in vitro*, mostraron la presencia de una mancha que presentó el mismo desplazamiento frontal (Rf) que el acetato de maturina (**Figura 45**). Por este motivo, las condiciones cromatográficas fueron optimizadas para obtener la mejor resolución en un corto periodo de tiempo.

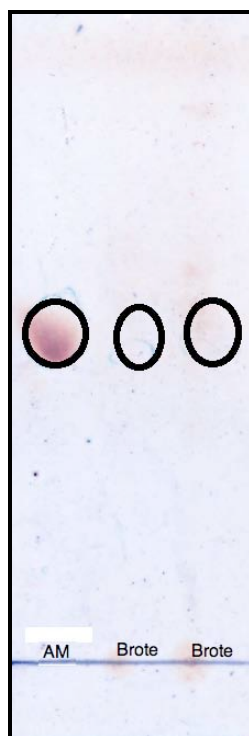


Figura 45. Diferencias observadas en el desplazamiento (Rf) e intensidad de la mancha que muestra el perfil cromatográfico de los extractos metanólicos-etanólicos de los brotes obtenidos mediante cultivos *in vitro* de *P. peltatum*, eluidos con el sistema hexano: acetato de etilo (9:1) **AM**: Acetato de maturina; **Brote**: Extracto metanólico-etanólico.

El cromatograma típico por HPLC del acetato de matorina mostró un pico con un tiempo de retención de 29.29 min (**Figura 46**).

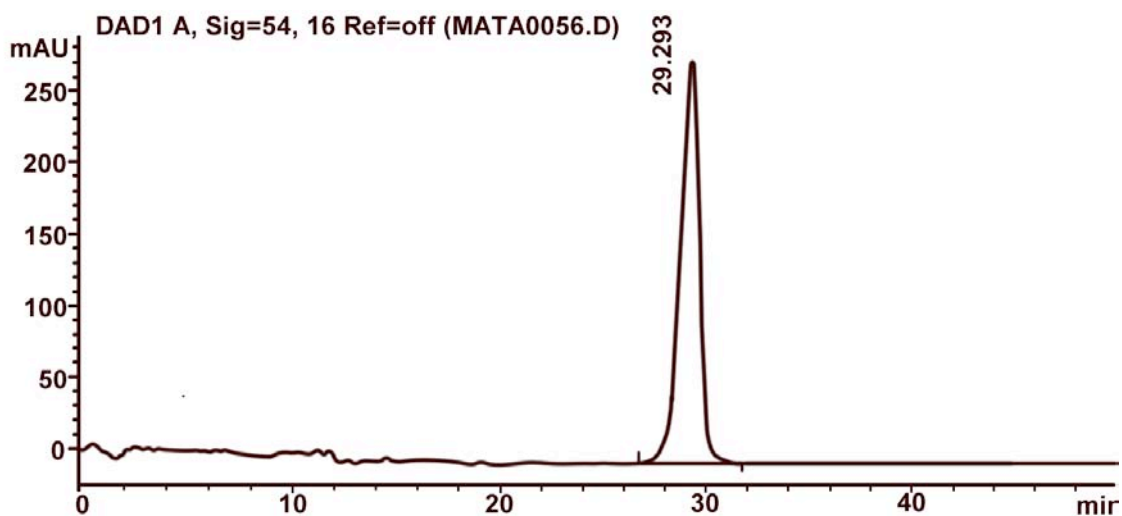


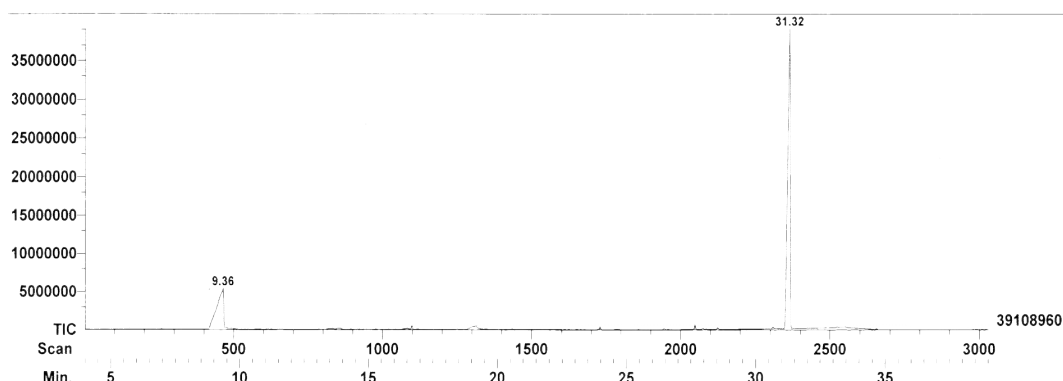
Figura 46. Cromatograma mediante HPLC del acetato de matorina.

Por cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas, fue evidente el acetato de matorina a los 31.32 minutos (**Figura 47**) que correspondió con la señal que se asignó al m/z 312 del ión molecular.

File: 2200-MJE-NARV-AM
Sample: Dr-Jimenez-Manuel
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

Date Run: 11-27-2009 (Time Run: 09:10:05)

Ionization mode: EI+



File: 2200-MJE-NARV-AM
Sample: Dr-Jimenez-Manuel
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

Date Run: 11-27-2009 (Time Run: 09:10:05)

Ionization mode: EI+

Scan: 2365 R.T.: 31.32
Base: m/z 312; 99.6%FS TIC: 37719696

#Ions: 157

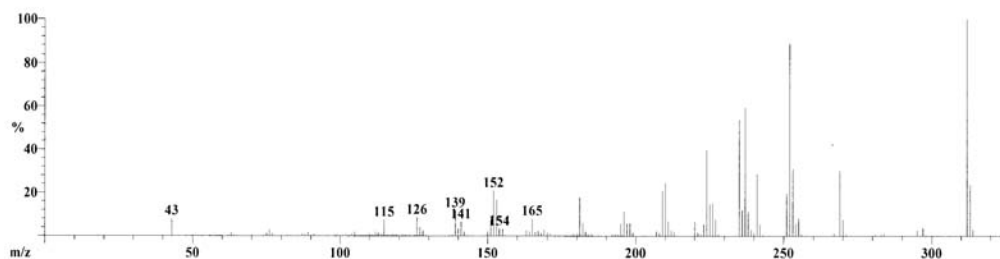


Figura 47. Cromatograma y espectro del acetato de maturina obtenido a partir de la cromatografía de gases acoplado a la espectrometría de masas.

Con respecto a los cultivos *in vitro*, los análisis realizados por HPLC, indicaron la presencia tentativa del acetato de maturina, con una señal en un tiempo de retención de 5.36 min diferente al del estándar (5.00 min) utilizado en las mismas condiciones. Por tal motivo, se adicionó el estándar a la muestra y se demostró que efectivamente hay un desplazamiento en el tiempo de retención. Esto se confirmó con el análisis realizado por GC-MS, donde se corroboró definitivamente la presencia del acetato de maturina en los extractos de las raíces de las plántulas *in vitro*.

El contenido de acetato de maturina tuvo una gran variación entre los diferentes extractos atribuido a los diferentes procesos de fragmentación, desecación, extracción y a las condiciones de almacenamiento de los diferentes extractos. El contenido del acetato de maturina por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) en los extractos orgánicos de raíz fue determinado acorde a la curva de calibración. En la **Tabla 11**, se muestran los rendimientos que se obtuvieron por HPLC del acetato de maturina en las muestras de los diferentes extractos y de ambas estructuras subterráneas. Se recuerda que ambas estructuras son rizomas, sin embargo para denotar la diferencia entre rizoma principal y secundario se refiere simplemente como rizoma al rizoma primario y al rizoma secundario como raíz.

Tabla 11. Rendimiento obtenido del acetato de maturina en las diferentes muestras

Extracto	Rendimiento	
	mg acetato de maturina/ g muestra de extracto	
	Raíz	Rizoma
Hexánico	228.75	116.70
Etanólico	113.77	104.51
Metanólico	1.23	3.47

El acetato de maturina estuvo por debajo del límite de detección del extracto acuoso de raíz de *P. peltatum* por lo cual no se detectó. Se considera que debido a las condiciones estresantes que sufren algunas especies vegetales bajo condiciones *in vitro*, se pueden generar compuestos de mayor polaridad como algunas sustancias bioactivas que sufren glicosilación, por tal motivo su detección es poco probable.

La diferencia del rendimiento obtenido del acetato de maturina de la raíz y del rizoma, para los extractos hexánicos y etanólicos se explica en parte por el incremento en la concentración del compuesto en las raíces a diferencia de los rizomas. Wink (2000), refiere que la biosíntesis y acumulación de los metabolitos secundarios está regulada en espacio y tiempo de acuerdo a estados específicos del desarrollo del organismo, de células especializadas y a periodos de estrés causado por la defensa ante el ataque de microorganismos. Sintetizándose principalmente en las raíces para transportarse en

ocasiones a lugares diferentes por el floema o el xilema y acumulándose en pequeñas cantidades en ciertas estructuras como vacuolas, tricomas glandulares de las hojas (Ascensao y Pais, 1998). También, la distribución restringida de algunos metabolitos secundarios a un tipo de estructura vegetal está asociada a una disponibilidad menor de precursores y que presentan reacciones de síntesis complejas en una secuencia definida. En contraste, la amplia diversidad de los metabolitos secundarios está relacionada entre otras causas a su falta de movilidad y a las múltiples respuestas debido a condiciones de estrés con otros organismos e interacciones ambientales (Ferne, 2007). Por ejemplo, el alcaloide morfina, se encuentra mayoritariamente en las raíces de amapolas jóvenes (*Papaver somniferum*) y cuya concentración aumenta gradualmente en las hojas. En el estado de fructificación, la morfina desaparece de las hojas y se acumula en altas concentraciones en la cápsula del fruto (Waller y col., 2001). Por lo anterior, se podría considerar que el acetato de matorina se sintetiza en el rizoma primario (rizoma) y se acumula en el rizoma secundario (raíz) como una estrategia a condiciones de estrés hídrico. Incluso, algunos metabolitos secundarios son característicos de un tipo determinado de grupos biológicos, como familia, tribu, género y especie (Romo de Vivar, 2007). Un ejemplo en este sentido es el alcaloide nicotina, que se forma a través de una vía biosintética relativamente sencilla, puede encontrarse en diversas especies de plantas, mientras que el alcaloide brucina, mucho más complejo es sintetizado por un solo género de *Loganiaceae* (Anaya y Cruz-Ortega, 2001).

8. CONCLUSIONES

Conforme los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede concluir lo siguiente:

ESTUDIO FITOQUÍMICO

1. Se aislaron los compuestos 14-angeloyloxycacalohastina, maturinina, angelato de 3,4-dehidro-14-maturinol y el acetato de maturina.
2. Se determinó por primera vez la estructura química del angelato de 3,4-dehidro-14-maturinol no reportado para la especie vegetal en estudio.
3. Se confirmó mediante el estudio de cristalografía la estructura del 14-angeloyloxycacalohastina y del acetato de maturina.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

1. El acetato de maturina significativamente inhibió el edema agudo inducido con TPA para todas las dosis administradas. El porcentaje de inhibición del edema de acetato de maturina (95.41%) fue máximo a la dosis de 1 mg/oreja menor al producido por la indometacina de 89.19% a la dosis de 0.46 mg/oreja.
2. El acetato de maturina mostró un significativo porcentaje de inhibición (58.95 %) de la inflamación ($P \leq 0.05$) inducida por la carragenina al principio del evento (1h) y el efecto persistió hasta casi la quinta hora.
3. El acetato de maturina inhibió la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO), la disminución de la actividad de la MPO fue directamente proporcional a la concentración del acetato de maturina (0.31; 0.42 y 0.56 mg/oreja) con el 89, 96 y 98 %, respectivamente.

REGENERACIÓN *IN VITRO*

1. La formación de brotes adventicios se obtuvo con la combinación de fitorreguladores a la concentración de 2.5 mg/L de bencil adenina (BA); 0.5 mg/L de ácido indolacético (AIA); 1 mg/L de glicina y 100 mg/L de ácido ascórbico.

2. La individualización, formación y elongación de raíces de los brotes adventicios se obtuvo con la concentración a la mitad de sus sales orgánicas e inorgánicas del medio de cultivo base MS, sin la adición de citocinas.

IDENTIFICACIÓN-CUANTIFICACIÓN DEL ACETATO DE MATURINA

a) ESPECIE VEGETAL SILVESTRE

1. Por HPLC el acetato de maturina mostró un pico en un tiempo de retención de 29.29 min.
2. La concentración del acetato de maturina fue de 228.75, 113.77 y 1.23 mg de acetato de maturina por g de extracto hexánico, etanólico y metanólico respectivamente.

b) CULTIVOS *IN VITRO*

1. Por HPLC el acetato de maturina mostró un pico en un tiempo de retención de 5.36 min.
2. Por GC-MS se confirmó la presencia del acetato de maturina en los extractos de las raíces de las plántulas *in vitro*. Sin embargo, no fue posible cuantificarlo porque los valores estuvieron por debajo del límite de detección.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, V.U., Kousar, F., Khan, A., Zubair, M., Iqbal, S., Tareen, R.B. 2005. A New Ketone and a known anticancer triterpenoid from the leaves of *Onosma limitaneum*. Helvetica Chimica Acta 88(2): 309-311.
- Arawwawala L.D.A.M., Arambewela L.S.R., Ratnasooriya W.D. 2012. *Alpinia calcarata* Roscoe: A potent antiinflammatory agent. J. Ethnopharm. 139:889-892.
- Alarcón-Aguilar, F.J., Román-Ramos, R., Jiménez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R., González-Paredes B., Flores-Saenz J.L. 1997. Effects of three Mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. Journal of Ethnopharmacology 55:171-177.
- Ascensao, L. & Pais, M.S. 1998. The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: Histochemistry, ultrastructure and secretion. Annals of Botany 81:263-271.
- Balandrin, M.F., Klocke, J.A., Wurtele, E.S., Bollinger, W. H. 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. Science 228: 1154- 1160.
- Barkley, T. M., Clark, B.L., Funston, A.M. 1996. The segregate genera of *Senecio* sensu lato and *Cacalia* sensu lato (Asteraceae: senecioneae) in Mexico and Central America. In: Hind, D.J.N. y Beentje, H.J. (Ed.). Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew 1994. Royal Botanical Gardens, Kew 1:613-620.
- Belvisi, M. G., Brown, T. J., Wicks, S., Foster, M. L. 2001. New glucocorticosteroids with an improved therapeutic ratio. Pulmonary Pharmacology Therapeutics 14: 221-227.
- Bingöl, F. & Sener, B. 1995. A Review of Terrestrial Plants and Marine Organisms Having Antiinflammatory Activity. International Journal Pharmacognosy 33(2):81-97.
- Bohlmann, F. & Bapuji, M. 1982. Cacalol derivatives from *Senecio lydenburgensis*. Phytochemistry 21: 681-683.

- Bohlmann, F. & Zdero, C. 1978a. New cacalol derivatives from *Roldana heterogama*. *Phytochemistry* 17: 565-566.
- Bohlmann, F. & Zdero, C. 1978b. New Norsesquiterpenes from *Senecio digitalifolius*. *Phytochemistry* 17: 759-761.
- Bohlmann, F., Dupré, S., Nordenstame, B. 1990. Cacalol derivatives from Dominican *Senecio* species. *Phytochemistry* 29:3163-3165.
- Bohlmann, F., Zdero, C., Berger, D., Suwita, A., Mahanta, P., Jeffrey, C. 1979. Neue furanoeremophilane und weitere inhaltsstoffe aus Südafrikanischen *Senecio*-arten. *Phytochemistry* 18:79-93.
- Bohlmann, F., Knoll, K.H.; Zedro, C., Mahanta, P.K., Grenz, M., Suwita, A., Ehlers, D., Le Van, N., Abraham, W. R., Natu, A.A. 1977. Terpen-derivate aus *Senecio*-arten. *Phytochemistry* 16:965-985.
- Bolanle, I., Sowemimo A., Van Rooyen A., Van de Venter M. 2012. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of *Cyathula próstata* (Linn.) Blume (Amaranthaceae). *J. Ethnopharm.* 141:282-289.
- Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G. 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology* 78: 206-209.
- Bruneton, J. 1999. Pharmacognosy. *Phytochemistry Medicinal Plants*. Ed. Lavoisier, Paris. 1119 p.
- Bye, R., 1986. Medicinal plants of the Sierra Madre: Comparative study of Tarahumara and Mexican Market Plants. *Economic Botany* 40(1):103-124.
- Bye, R., Linares, E., Estrada, H. 1995. Biological diversity of medicinal plants in Mexico. En: J.T. Arnason *et al.* (Eds). *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Plenum Press, New York. pp: 5-82.
- Castagnag, M., Takai, Y., Kaubuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., Nishizuk, Y. 1982. Direct

- activation of Calcium-activated, Phospholipid-dependent Protein Kinase by Tumor-promoting Phorbol Esters. *The Journal of Biological Chemistry* 257:7847-7851.
- Cheng, A., Wan, F., Wang, J., Jin, Z., Xu, X. 2008. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* fish. *International Immunopharmacology* 8:43-50.
- Connolly, J.D., Hill, R.A. 1991. *Dictionary of Terpenoids. Mono and Sesquiterpenoids. Vol. 1.* Chapman & Hall, Londres. pp: 153-443.
- Contreras-Weber, C., S. Pérez-Gutiérrez, F. Alarcón-Aguilar, R. Román-Ramos. 2002. Anti-Hyperglycemic Effect of *Psacalium peltatum*. *Proceedings Western Pharmacology Society* 45:134-136.
- Cordell, G.A. & Colvard M.D. 2005. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 100:5-14.
- Cordell, G.A. & Quinn-Beattie M.L. 2005. Unpublished result from the NAPRALET database. University of Illinois at Chicago.
- Correa, J. & Romo, J. 1966. The constituents of *Cacalia decomposita* A. Gray. Structures of maturin, maturinin, maturone and maturinone. *Tetrahedron* 22: 685-691.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G. 2000. Natural Products (Secondary metabolites) En: Buchanan, W., Grisse, Jones, R (Eds.). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiology USA. pp: 1250-1317.
- Crunkhorn, P. & Meacock, S.C.R. 1971. Mediators of the inflammatory induced in the rat paw by carrageenan. *British Journal of Pharmacology*. 42:392-402.
- Davies, P.J. 2007. *Plant Hormones, Biosynthesis, signal Transduction, Action!*. 3ra. Ed. Springer, Netherlands. 750 p.
- De Oliveira, F., Akisue, G., Akisue, K. 1991. *Farmacognosia*. Atheneu Brasil. 412 p.
- Delporte, C., Backhouse, N., Erazo, S., Negrete, R., Vidal, P., Silva, X., López-Pérez, J.L.,

- San Feliciano, A., Muñoz, O. 2005. Analgesis-antiinflammatory properties of *Proustia pyrifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* 99:19-124.
- Devillier, P. 2001. Pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs and ENT pathology. *Press Medica* 30:70-79.
- DiCosmo F., Misawa M. 1995. Plant Cell and Tissue Culture: Alternatives for Metabolite Production. *Biotechnology Advances* 13(3):425-453.
- Di Rosa, M. 1972. Biological properties of carrageenan. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 24:89-102.
- Dixon, R. 1991. *Plant Cell Culture. The practical approach.* Series Oil Press. Oxford, England. pp: 15-20, 91-96, 127-164.
- Doe, M., Hirai, Y., Kinoshita, T., Shibata, K., Haraguchi, H., Morimoto, Y. 2004. Structure, synthesis, and biological activity of 14-methoxy-1,2- dehydrocacalol methyl ether, a new modified furanoeremophilane type sesquiterpene from *Trichilia cuneata*. *Chemistry Letters* 33(6):714-715.
- Doe, M., Shibue, T., Haraguchi, H., Morimoto, Y. 2005. Structures, biological activities, and total syntheses of 13-hydroxy- and 13-acetoxy-14-nordehydrocacalohastine. Novel modified furanoeremophilane-type sesquiterpenes from *Trichilia cuneata*. *Organic Letters* 7:9.
- Eisner, T. & Meinwald, J. 1995. Chemical ecology. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 92 (1):1.
- Elenkov, I. J. & Chrousos, G. P. 2002. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines and autoimmunity *Annals of New York Academy Sciences* 966:290-303.
- Eleuteri, E., Di Stefano, A., Ricciardolo, F.L., Magno, F., Gnemmi, I., Colombo, M., Anzalone, R., Cappello, F., La Rocca, G., Genta, F.T., Zummo, G., Giannuzzi, P. 2009. Increased nitrotyrosine plasma levels in relation to systemic markers of

- inflammation and myeloperoxidase in chronic heart failure. *International Journal of Cardiology* 135:386-90.
- Escalante, M. R. 2007. Establecimiento del modelo de estudio del metabolismo secundario en *Psacalium decompositum* L. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. 145 p.
- Facheux, C., Asaah E., Mpeck M. L., Tchounjeu, Z. 2003. Studying markets to identify medicinal species for domestication. *American Botanical Council* 60:38-46.
- Faisal, M., Ahmad, N., Anis, M. 2005. *In vitro* regeneration and mass propagation of *Ruta Graveolens* L. A multipurpose shrub. *HortScience* 40(5):1478-1480.
- Fernandez-Arche, A., Saenz, M.T., Arroyo, M., De la Puerta, R., Garcia, M.D. 2010. Topical anti-inflammatory effect of tirucallol, a triterpene isolated from *Euphorbia lactae* latex. *Phytomedicine* 17(2):146-148.
- Fernie, A.R. 2007. The future of metabolic phytochemistry: Large numbers or metabolites, higher resolution, greater understanding. *Phytochemistry* 68: 2861-2880.
- Ferrari, S., Tagliafico, E., Ceccherelli, G., Selleri, L., Calabretta, B., Donelli, A., Temperani, P., Sarti, M., Sacchi, S., Emilia, G. 1989. Expression of the myeloperoxidase gene in acute and chronic myeloid leukemias: relationship to the expression of cell cycle-related genes. *Leukemia* 3:423-430.
- Funk, C., Gügler, K., Brodelius, P. 1987. Increased secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor). *Phytochemistry* 26(2):401-405.
- Garduño-Ramírez, M.L., Trejo, A., Navarro, V., Bye R., Linares, E., Delgado, G. 2001. New modified eremophilanes from the roots of *Psacalium radulifolium*. *Journal of Natural Products* 64:432-435.
- Garnica, M., Houdusse, F., Yvin, J. C., García-Mina, J. M. 2009. Nitrate supply induces changes in polyamine content and ethylene production in wheat plants grown with

- ammonium. *Journal of Plant Physiology* 166(4):363-374.
- George, E. F., Hall, M. A., Klerk, G. J. Eds. 2008. *Plant propagations by tissue culture*. 3ra. Ed. Springer Dordrecht. pp: 501.
- Gerats, M.G.A., Haring, M. Huttinga, H., Jacobebesen, E., Koornneef, M., Puit, J., Stiekemena, J.W., Struik, C.P., Visser, L., Vlak, M.J., Van, Vloten-Doting, L. 1991. *Plant Tissue Culture*. En: Butterworth-Heinemman (Ed.) *Biotechnological Innovations in Crop Improvement*. U.K. pp: 66-114.
- González, A.S. 1999. *Regeneración in vitro de Dahlia excelsa Benth. y Dahlia imperialis Roezl*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México. 97 p.
- Heinrich, M., Robles, M., West, J., Ortiz de Montellano, B., Rodríguez, E. 1998. *Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae)*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 38: 539-565.
- Hernández, P.F. 1993. *Cultivo de tejidos de dalia (Dahlia spp.)*. Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, México. 42 p.
- Hernández-Tejeda, A. M. 1999. *Inducción de un cultivo en suspensión y micropropagación de Psacalium peltatum, planta silvestre utilizada para el control de la diabetes*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM. 187 p.
- Holden, N.S., Squires, P.E., Kaur, M., Bland, R., Jones, C.E., Newton, R. 2008. *Phorbol ester-stimulated NF-kB-dependent transcription: Roles for isoforms of novel protein kinase C*. *Cellular Signalling* 20:1338-1348.
- Houghton, P. 2001. *Old yet new pharmaceuticals from plants*. *Journal of Chemical Education* 78:175-184.
- Hu, Z.B., Ma, W., Uphoff, C.C., Metge, K., Gignac, S.M., Drexler, H.G. 1993. *Myeloperoxidase: expression and modulation in a large panel of human leukemia-lymphoma cell lines*. *Blood* 82:1599-1607.

- Ialenti, A., Ianaro, A., Moncada, S., Di Rosa, M. 1995. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *European Journal Pharmacology* 211:177-184.
- Inman, W.D., Luo J., Jolad, S.D., King, S.R., Cooper, R. 1999. Antihyperglycemic sesquiterpenes from *Psacalium decompositum*. *Journal of Natural Product* 62:1088-1092.
- In-Tae, K., Young-Mi, P., Kyung-Min, S., Joohun, H., Jongwon, C., Hyun-Ju, J., Hee-Juhn, P., Kyung-Tae, L. 2004. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the extract from *Kalopanax pictus*, *Pueraria thunbergiana* and *Rhus vernicilua*. *Journal of Ethnopharmacology* 94:165-173.
- Islam, A.S. 1996. Production of secondary metabolites through tissue cultures and its prospects for comercial use. In: Islam A.S. (Ed.). *Plant Tissue Culture*. Science Publishers U.S.A. pp: 161-168.
- Jiménez, M., Navarro, A., Villanueva, E., Paredes, B., Reyes, R., Román, R., F. 1997. Hydroperoxycacalone: A new furanoeremophilane from *Psacalium decompositum*. *Planta Médica* 63(4):387-388.
- Jiménez, M., Reyes, R., Apan, T., Lledias, F., Hansberg, W., Arrieta, D., Alarcón, F.J. 2006. Anti-inflammatory activity of cacalol and cacalone sesquiterpenes isolated from *Psacalium decompositum*. *Journal of Ethnopharmacology* 105:34-38.
- Juárez, M., Alonso, A.J., Rojano, N.A., Jiménez, M., García, A. 2013. Maturin acetate from *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass. (Asteraceae) induces immunostimulatory effects *in vitro* and *in vivo*. *Toxicology in Vitro* 27:1001-1006.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J. 2002. Secondary Plant Compounds. En: *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Second Edition. Sinauer Axxoc USA.
- Karin, M., Liu, Z., Zandi, E. 1997. AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 9:240-246.

- Kende, H. & Zeevaart, J. A. D. 1997. The five "Classical" Plant Hormones. *The Plant Cell* 9(1):197-121.
- Kettle, A.J. & Winterbourn, C.C. 1997. Myeloperoxidase: A Key Regulator of Neutrophil Oxidant Production. *Redox Reports* 3:3-15.
- Kindt, T. J. 2007. *Inmunología de Kuby*. 6ª. Ed. Macgraw-Hill Interamericana. México. pp: 327-346.
- Klebanoff, S.J. 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology* 77:598-625.
- Kumar, A., Singh, D.P., Singh, P. 1994. Influence of water stress on photosynthesis, transpiration, water use and efficiency and yield of *Brassica juncea* L. *Field Crop Research* 37:95-101.
- Lau, D. & Baldus, S. 2006. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology and Therapeutics* 111:16-26.
- Lefkowitz, D.L., Gelderman, M.P., Fuhrmann, S.R., Graham, S., Starnes, J.D., Lefkowitz, S.S., Bollen, A., Moguilevsky, N. 1999. Neutrophilic myeloperoxidase-macrophage interactions perpetuate chronic inflammation associated with experimental arthritis. *Clinical Immunology* 91:145-55.
- Linares, E. & Bye, R. 1987. A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology* 19:153-183.
- Linares, E., Bye, R., Flores, B. 1999. *Plantas Medicinales de México: Usos y remedios tradicionales*. Instituto de Biología, UNAM, México. pp: 155.
- Lindsey, K. & Jones, M.G. K. 1989. La biología de las células vegetales cultivadas. En: Lindsey K. y Jones M.G. K. (Eds.). *Biotecnología Vegetal Agrícola*. Acribia (Ed.). pp:17-38.
- Lixin, Z., & Demain A. L. 2005. *Natural Products Drug Discovery and Therapeutic Medicine*. Human Press, E.U.A. pp 197-205.

- Malle, E., Waeg, G., Schreiber, R., Grone, E. F., Sattler, W., Grone, H.J. 2000. Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H₂O₂/halide system in human atherosclerotic lesions: colocalization of myeloperoxidase and hypochlorite-modified proteins. *European Journal of Biochemistry* 267:4495-4503.
- Manitto, P. 1981. *Biosynthesis of natural products*. John Wiley and Sons, U.S.A. pp:213-295.
- Manzanero, G. 1994. Estudio de siete raíces medicinales del mercado de Sonora. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, Distrito Federal, México. pp: 173.
- Medzhitov, R. 2008. Original and physiological roles of inflammation. *Nature* Jul 24; 454(7203): 428-435.
- Meinwald, J. Huang, Q., Herath, K.B., Yang, Z.C., Shroeder, F., Attygalle, A.B., Iyengar, V.K., Morgan, R.C., Eisner, T. 1998. Mirasorvone: a masked 20- ketopregnane from defensive secretion of a diving beetle (*Thermonectus marmoratus*). *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 17; 95(6): 2733-2737.
- Morris, C.J. 2003. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in Molecular Biology* 225: 115-121.
- Morrow, J.D., & Roberts, L. J. 1994. Mass Spectrometric Method for Quantification of Prostanoids (F₂-Isoprostanes) Produced by a Non-Cyclooxygenase Free Radical Catalyzed Mechanism. *Methods Enzymology* 233:163-174.
- Muller, W.A. 2002. Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in the Inflammatory Response. *Laboratory Investigation* 82:521-533.
- Murakawa, M., Kumiko, Y., Yoshitana, T., Yoshiaki, F. 2006. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Biochemical Pharmacology* 71:1331-1336.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with

- tobacco Tissue Culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nantel, F., Denis, D., Gordon, R., Northey, A., Cirino, M., Metters, K.M., Chang, C.C. 1999. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *British Journal of Pharmacology* 128:853-859.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 58 p.
- Ojewole, J.A.O. 2005. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology* 99:13-19.
- Olajide, O.A., Awe, S.O., Makinde, J.M., Ekhelar, A.L., Olusola, A., Morebise, O., Okpako, D.T. 2000. Studies on the anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Alstonia boonei* stem bark. *Journal Ethnopharmacology* 71:179-186.
- Ortiz de Montellano, P.R. 1992. Catalytic sites of hemoprotein peroxidases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 32:89-107.
- Palacios, E. J. F. 2006. Compuestos analgésicos y antiinflamatorios de *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schltr; (Orquidaceae). Tesis Maestría en Ciencias Químicas Facultad de Química, UNAM, D.F., 136 p.
- Payá, M., Ferrándiz, M. L., Erradi, F., Terencio, M. C., Kijjoa, A., Pinto, M., Alcaraz, M. J. 1996. Inhibition of inflammatory responses by a series of novel dolabrane derivatives. *European Journal of Pharmacology* 312: 97-105.
- Pedapudi, S., Chin C-K., Pedersen, H. 2000. Production and elicitation of benzalacetone and the raspberry ketone in cell suspension cultures of *Rubus idaeus*. *Biotechnology Progress* 16:346-349.
- Pérez-Castorena, A.L., Arciniega, A., Villaseñor, J.L., Romo de Vivar, A. 2004. Furanoeremophilane derivatives from *Psacalium beamanii*. *Revista de la Sociedad de Química Mexicana* 48:21-23.

- Pierik, R. L. M. 1997. In vitro culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp: 21-30.
- Pippen, R.W. 1968. Mexican "cacalioid" genera allied to *Senecio* (Compositae). Contribution from United State National Herbarium 34:365-447.
- Pitzalis, C., Pipitone, N., Perretti, M. 2006. Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. Annals of the New York Academy of Sciences 966:108-118.
- Puigneró, V., Queralt, J. 1997. Effect of Topically Applied Cyclosporin A on Arachidonic Acid (aa) - and Tetradecanoylphorbol Acetate (TPA)-Induced Dermal Inflammation in Mouse Ear. Inflammation 21:357-369.
- Prakash Babu N, Pandikumar P, Ignacimuthu S. 2011. Lysosomal membrane stabilization and anti-inflammatory activity of *Clerodendrum phlomidis* L.f., a traditional medicinal plant. J. Ethnopharm. 135:779-785.
- Rao, T. S., Currie, J. L., Shaffer, A. F., Isakson, P. 1993. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA) induced dermal inflammation. Inflammation 10: 723-741.
- Ravishankar, G.A. & Rao, S.R. 2000. Biotechnological production of phytopharmaceuticals. Journal of Biochemistry and Molecular Biology and Biophysic 4:73-102.
- Razdan, M. K. 2003. Introduction to Plant Tissue Culture. 2da. Ed. Science Publishers, Inc., New Hampshire. 375 p.
- Reyes, R., Jiménez, M., Godínez, M.V., Hernández, S., Campos, M., Béjar, E. 2002. A novel cacalolide from *Psacalium decompositum*. Natural Product Letter 16(4): 239-242.
- Robbins, S., Cotran, R., Kumar, V. 1990. Patología estructural y funcional, Vols. I y II. 4ª edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill. Madrid, España.
- Robinson, H. & Brettell, R.D. 1973. Studies in the Senecioneae (Asteraceae). III. The

- Genus *Psacalium*. *Phytologia* 27(4): 254-264.
- Rodríguez, L., Guzmán, A., Romo, J. 1968. The constituents of *Cacalia decomposita* A. Gray-IV: Structure of decompostin. *Tetrahedron* 24(1): 477-483.
- Rojano, N. A., Jiménez, M., Nieto, A., Torres, A.J., Bye, R.; R. Chávez, V.M., Canales, M.; Martínez, K.S.; Rodríguez, M.A. 2013. Isolation and anti-inflammatory effects of maturin acetate from the roots of *Psacalium peltatum* (Asteraceae). *Journal of Medicinal Plant Research* 70(220):1600-1607.
- Rojano-Vilchis, N. A. 2005. Inducción de sesquiterpenos en cultivos celulares de *Psacalium peltatum*, planta antidiabética, por homogenado de *Aspergillus niger*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, D.F., México 114 p.
- Rojano-Vilchis, N., Hernández-Ortega, S., Jiménez-Estrada, M., Torres, A. A. 2012a. 14-Angeloyloxycacalohastine from *Psacalium peltatum*. *Acta Crystallographic Section E. Structure Reports Online* 68:o672-o673.
- Rojano-Vilchis, N., Hernández-Ortega, S., Jimenez-Estrada, M., Torres-Aviles, A. 2012b. Crystal Structure of maturin acetate from *Psacalium peltatum* (Kunth) (matarique). *X-ray Structure Analysis Online* (28):75-77.
- Roman-Ramos, R., Flores-Saenz, J.L., Partida-Hernandez, G., Lara-Lemus, A., Alarcon-Aguilar, F. 1991. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Archivos de Investigación Médica* 22:87-93.
- Roman-Ramos, R., Lara, A., Alarcon-Aguilar, F., Flores, J.L. 1992. Hypoglycemic activity of some antidiabetic plants. *Archives of Medical Research* 23:105-109.
- Romo de Vivar, A., Pérez-Castorena, A.L., Arciniega, A., Villaseñor, J.L. 2007. Secondary metabolites from Mexican Species of the Tribe Senecioneae (Asteraceae). *Journal of the Mexican Chemical Society* 51(3):160-172.
- Romo de Vivar, A. 1985. *Productos naturales de la flora mexicana*. Ed. Limusa. México. 219 p.

- Romo, J. & Joseph-Nathan, P. 1964. The constituents of *Cacalea decomposita*. A. Gray. Structures of cacalol and cacalome. *Tetrahedron* 20:2331-2337.
- Rosenberg, W. E. & Gallin, J.I. 1999. Inflammation. In: Paul W, ed. *Fundamental Immunology*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, Philadelphia. pp: 1050-1088.
- Rzedowski, J. & Rzedowski, G. 1985. *Flora Fanerogámica del Valle de México*. Vol. II. Instituto Nacional de Ciencias Biológicas del IPN e Instituto de Biología, UNAM, México. 596 p.
- Saklatvala, J. 2002. Glucocorticoids: do we know how they work?. *Arthritis Research* 4:146-150.
- Sánchez, T. & Moreno, J.J. 1999. Role of leucocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. *Biochemical Pharmacology* 58:877-879.
- Schlingemann, J., Hess, J., Wrobel, G., Breitenbach, U., Gebhardt, C., Steinlein, P., Kramer, H., Fürstenberger, G., Hahn, M., Angel, P., Lichter, P. 2003. Profile of gene expression induced by the tumour promoter TPA in murine epithelial cells. *International Journal of Cancer* 104: 699-708.
- Sharp, W.R., Larsen, P.O., Paddock, E.F., Raghavan, V. 1979. *Plant cell and tissue culture; principles and applications*. Ohio State University Press. Columbus, pp:115-120.
- Siedle, B., Gustavsson, L., Johansson, S., Murillo, R., Castro, V., Bohlin, L., Merfort, I. 2003. The effect of sesquiterpene lactones on the release of human neutrophil elastase. *Biochemical Pharmacology* 65: 897-903.
- Smith, C.M. & Reynard, A. M. 1992. *Textbook of Pharmacology*. Editorial Saunders College Co, Philadelphia, U.S.A. pp:401-430.
- Smith, R. 2000. *Plant Tissue Culture, techniques and experiments*. 2da. Ed. Academic Press, California. 231 p.
- Stowe, M.K., Turling, T.C., Loughrin, J.H., Lweis, W.J., Tumlinson, J.H. 1995. The

- chemistry of eavesdropping, alarm and deceit. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* Jan. 3 92(1): 23-28.
- Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., Fukikura, T. 1983. Assay method for myeloperoxidase in polymorphonuclear leucocytes. *Analytical Biochemistry* 132:345-352.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2002. Chapter 13. Secondary Metabolites and Plant Defense. En: *Plant Physiology*. Third Edition. Sinauer Associates. Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts. pp:285-308.
- Tallarida, R., J. & Murray, R. B. 1987. *Manual of pharmacologic calculation with computer programs*. II Edition. Springer Verlag, New York- Berlin-Heidelberg-London-Paris-Tokyo. pp: 145-148.
- Taylor, K.R. & Gallo, R.L. 2006. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB Journal* 20:9-22.
- Testa, B., Fuhrer, W., Kyborz, E., Giger, R., 1993. *Perspectives in medicinal chemistry*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Switzerland. pp: 475-487.
- Torres, C. 1988. *Tissue culture techniques for horticultural crops*. Van Nostrand Reinhold, N.Y. pp: 27-51.
- Trush, M.A., Egner, P.A., Kensler, T.W. 1994. Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation. *Food and Chemical Toxicology* 32: 143-147.
- Turlings, T.C., Loughrin, J.H., McCall, P.J., Rose, W.S., Lewis, W.J., Tumlinson, J.H. 1995. How the caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 92(10): 4169-4174.
- Turner, Billie L. & Neson, G. L. 1998. Biogeografía, diversidad y situación de peligro o amenaza de Asteraceae de México. En: T.P. Ramamoorthy., R. Bye., A. Lot y J. Fa

- (Compiladores), Diversidad Biológica de México. Origen y distribución. Instituto de Biología, UNAM, México. pp: 545-561.
- Tyler, V.E., Brady, L., Robbers, J. 1979. Farmacognosia. El Ateneo. Argentina. 459 p.
- Valdés, V. A. I. 2010. Regeneración *in vitro* de *Dahlia brevis* Sorensen y *Dahlia tenuicaulis* Sorensen, Especies endémicas de México. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental), UNAM, Posgrado en Ciencias Biológicas. 203 p.
- Villaseñor, J.L. 2003. La Familia Asteraceae en México. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural Vol. Esp. XLIV: 117-124.
- Waizel, B. J. 2006. Las Plantas Medicinales y las Ciencias. Una visión multidisciplinaria. ISBN: 970-36-0025-5. Editada en Mayo por el Instituto Politécnico Nacional: 345-387.
- Waller, G.R., Meow-Chang, F., Yoshiharu, F. 2001. Análisis bioquímico de los metabolitos secundarios de plantas, microorganismos y suelo. En: Anaya A.L., Espinoza-García F. y Cruz-Ortega R. (Coord.). Relaciones químicas entre organismos: Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. Plaza y Valdes pp: 163-230.
- Weiss, S.J., Klein, R., Slivka, A., Wei, M. 1982. Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. Journal of Clinical Investigation 70:598-607.
- Willoughby, D.A. 2003. *In vivo* models of inflammation. In: Inflammation protocols. Methods in Molecular Biology. Ed. Willoughby D.A. & Winyard.P.G. Human Press, Totowa, EUA. pp:109-138.
- Wink, M. 1990. Physiology of Secondary Product Formation in Plants. En: Charlwood B. y Rhodes E.J.M. (Eds.). Secondary Products from Plant Tissue Culture. Oxford Sc. Publishers. U. K. pp:23-42.
- Wink, D.A., Ridnour, L.A., Hussain, S.P., Harris, C.C. 2008. The reemergence of nitric

- oxide and cancer. *Nitric Oxide* 19:65-67.
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W. 1962. Carrageenin-induced edema in hind paws of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 111:544-547.
- Woodward, A.W. & Bartel, B. 2005. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* 95:707-735.
- World Health Organization. 2001. WHO. Monographs on selected medicinal plants. Vol.2 Geneva.
- Zarate-Rodríguez, J.E. 2006. Estudio etnobotánico, histológico y químico en el control de calidad del complejo medicinal “matarique” (*Psacalium* spp., Asteraceae). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, México 126 p.
- Zhang, C., Yang, J., Jacobs, J. D., Jennings, L.K. 2003. Interaction of myeloperoxidase with vascular NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species in vasculature: implications for vascular diseases. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* 285: H2563-H2572.
- Zhu, W., Asghari, G., Lockwood, G.B. 2000. Factors affecting volatile terpene and non-terpene biotransformation products in plant cell cultures. *Fitoterapia* 71:501- 506.

10. APÉNDICES

- Publicación 1. Rojano-Vilchis, N.A.,** Jiménez-Estrada, M., Nieto Camacho, A., Torres-Avilez, A., Chavez-Avila, V.M., Canales-Martínez, M., Martínez-Elizalde K.S., Rodríguez-Monroy, A. (2013). Isolation and anti-inflammatory effects of maturin acetate from the roots of *Psacalium peltatum* (Asteraceae). *Journal of Medicinal Plants Research* 7(22): 1600-1607.
- Publicación 2. Juárez-Vázquez, M. del C.,** Alonso-Castro, A. J., **Rojano-Vilchis, N.,** Jiménez-Estrada, M., García-Carrancá, A. (2013). Maturin acetate from *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass. (Asteraceae) induces immunostimulatory effects in vitro and in vivo. *Toxicology in Vitro* 2 (3):1001-1006.
- Publicación 3. Rojano-Vilchis, N.,** Hernández-Ortega, S., Jiménez-Estrada, M., Torres-Avilez, A. (2012). 14-Angeloyloxyacalohastine from *Psacalium peltatum*. *Acta Cryst. Sec. E. Structure Reports. E68, 0672-0673.*
- Publicación 4. Rojano-Vilchis, N.,** Hernández-Ortega, S., Jiménez-Estrada, M., Torres-Avilez, A. (2012). Crystal Structure of Maturin acetate from *Psacalium peltatum* (Kunth) (matarique). *X-ray Structure Analysis Online* (28):75-77.

Full Length Research Paper

Isolation and anti-inflammatory effects of maturin acetate from the roots of *Psacalium peltatum* (Asteraceae)

Nadia A. Rojano-Vilchis^{1*}, Manuel Jimenez-Estrada¹, A. Nieto Camacho¹, Armando Torres Avilez¹, Robert. A. Bye², Victor M. Chavez Avila², M. Canales-Martinez³, K. S. Martinez-Elizalde³ and M. A. Rodriguez-Monroy³

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

²Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Coyoacán 04510, México D.F., México.

³UBIPRO, F.E.S. IZTACALA, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM., Coyoacán 04510, México D.F. México.

Accepted 26 March, 2013

Anti-inflammatory effects of maturin acetate (MA) isolated from the roots of *Psacalium peltatum* were investigated using *in vitro* and *in vivo* models. Inhibitory effects of increasing concentrations of MA on the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) by lipopolysaccharide (LPS)-activated peritoneal macrophages were measured *in vitro*. MA at 75 μ g/ml concentration inhibited TNF- α production by 80% and IL-1 β by more than 85% ($p < 0.01$). MA inhibited inflammation by 75% when applied topically to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) induced, dose-dependent acute ear edema. Myeloperoxidase enzyme levels were also reduced in the inflamed tissue. MA showed a significant inhibition level of 58.95% at the onset of carrageenan-induced inflammation (1 h) and the effect persisted up to 5 h. Thus, MA shows high cytokine production and marked anti-inflammatory effects.

Key words: *Psacalium peltatum*, maturin acetate, pro-inflammatory cytokines, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced acute ear edema, myeloperoxidase enzyme, carrageenan-induced inflammation.

INTRODUCTION

The biological activity of natural plant products has motivated extensive worldwide research to determine the pharmaceutical applications of their active compounds. *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass. (synonyms: *Cacalia peltata* Kunth, *Senecio peltiferus* Hemsley) is an endemic medicinal plant, member of the matarique complex, which grows in central Mexico. The matarique medicinal plant complex consists of different plant species that are

grouped under the same common name, among them are *Acourtia thurberi*, *Psacalium decompositum*, *Psacalium sinuatum* and *Psacalium palmeri* (Linares and Bye, 1987). These plants share certain features, such as morphological characteristics of the employed plant and the same medical application. In Mexico, *P. peltatum* roots have traditionally been macerated in alcohol to treat conditions that cause inflammation such as wounds, skin

*Corresponding author. E-mail: nadiarojano@yahoo.com.mx.

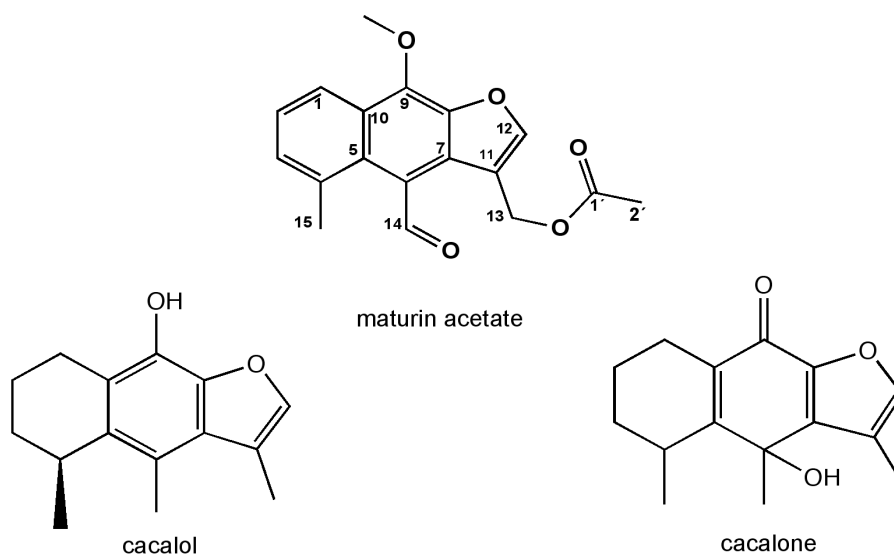


Figure 1. Structure of maturin acetate, cacalol and cacalone.

ulcers and rheumatism (Bye et al., 1995). The anti-diabetic effects of *P. peltatum* roots have also been studied (Contreras-Weber et al., 2002, 2005). The furanoeremophilane-type sesquiterpene named maturin acetate (MA) isolated from *P. peltatum* is similar to cacalol and cacalone isolated from *P. decompositum* (Figure 1). These two latter compounds are known to inhibit edema, showing a dose-dependent anti-inflammatory effect when tested in *in vivo* models (Jimenez-Estrada et al., 2006). Further investigations have shown that cacalone in a natural mixture with epicalalone exhibits higher anti-inflammatory effect than cacalol using an *in vivo* 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) model (Acevedo-Quiroz et al., 2008). The present work reports the anti-inflammatory effects of the bioactive compound MA isolated from *P. peltatum* using *in vitro* and *in vivo* models.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation and phytochemical analysis

Roots of *P. peltatum* were collected from the pine-oak forest at Mineral del Chico, Hidalgo, Mexico, [20° 09' 55" N and 98° 45' 08" W]. A voucher specimen was deposited at the National Herbarium (MEXU 1138692) of the Institute of Biology, UNAM, México. Air-dried and powdered roots (4.381 kg) of *P. peltatum* were sequentially extracted with n-hexane by thorough maceration (3 times × 2 l) at room temperature. The extract was filtered and concentrated. After the removal of solvent in vacuum, it afforded an oil residue. The n-hexane *P. peltatum* root extract (6.0 g) was fractionated by column chromatography over silica gel and eluted with n-hexane, ethyl acetate, and mixtures of these solvents. The collected fractions and compounds were monitored by thin layer

chromatography (TLC) on 0.2 mm pre-coated silica gel 60 F₂₅₄ plates (E. Merck), with the hexane/ethyl acetate (8:2) solvent system.

Compounds were observed under ultra violet (UV) light and by spraying with 1.0% ceric sulfate/H₂SO₄ solution. The isolated compound was recrystallized in acetone-hexane to yield a pure compound. The structure was examined using infrared spectra (IR), ¹H, ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra and mass spectra (MS). Uncorrected melting points (m.p.) were determined on a Fisher Jones apparatus. Infrared radiation (IR) was recorded with a Nicolet fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) SX spectrometer using chloroform as solvent. ¹H, ¹³C NMR spectra were measured with a Varian Gemini-2000 and a Varian VXR-300 (200 MHz) spectrometer. Chemical shifts are reported in ppm relative to tetramethylsilane (Me₄Si, δ = 0) in CDCl₃ as solvent and J values in Hz.

Electron impact mass spectra were measured with a Jeol JMS-AX 505 HA spectrometer. MA was detected and quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC). Sample solutions were prepared by dissolving the MA and *P. peltatum* root extract in methanol. A Synergi Polar-RP column (150 × 2.00 mm, 4 μm particle size; Phenomenex) was used. The mobile phase consisted of deionized water (A) and acetonitrile HPLC grade (B). Gradient elution was performed starting with 70A/30B and changing the composition to 100B after 25 min. The detection wavelength, flow rate and column temperature were set at 254 nm, 0.2 ml/min, and 40°C, respectively. For all solutions (samples and standard), 10 μl were injected. A sample of 1.00 mg of the compound was dissolved in 5.00 ml methanol and serial dilutions of this stock solution with methanol were done to obtain calibration curves. Within the concentration range injected (200.0 to 2 μg/ml), the detector response was linear (R² ≥ 0.9948), with a detection limit of less than 0.002 μg/ml (data not shown).

Experimental animals

Male ICR-CD1, BALB/c mice weighing 25 to 30 g and Wistar rats weighing 180 to 200 g were provided by the Instituto de Fisiología

Celular, UNAM, and approved by the Animal Care and Use Committee (NOM-062-ZOO-1999). All animals were housed under a 12 h light-dark cycle at $24 \pm 2^\circ\text{C}$, humidity $50 \pm 5\%$ with *ad libitum* access to food and water. All experiments were carried out using six animals per group.

In vitro determination of cytokine production in peritoneal macrophages

To obtain peritoneal macrophages, 8-week-old male BALB/c mice were killed by cervical dislocation. Peritoneal cells were obtained by lifting the peritoneal wall and injecting 4 ml of sterile phosphate buffered saline (PBS). The peritoneum was then massaged, and the fluid (approximately 4 ml) was drawn into a syringe. Cells were washed twice and re-suspended in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Sigma) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO) and 100 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin (GIBCO); later the concentration was adjusted to 3×10^6 cell/ml. Cell viability was determined as described in Badisa et al. (2003). Absorbance was measured on a microplate reader at 515 nm. Cytokines IL-1 β and TNF- α were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the supernatant of peritoneal macrophages. These cell supernatants used for cytokine determination were prepared as follows: macrophages were washed twice, adjusted to a density of 10^6 cells/ml, and cultured at 37°C in 5% CO_2 for 24 h in RPMI complete medium either alone or with 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS in the absence or the presence of increasing doses of maturated acetate (MA). After 24 h, samples were centrifuged at 2,500 rpm for 20 min at 18°C and the supernatant collected and assayed for IL-1 β (range of detection 63 to 4000 pg/ml) and TNF- α (range of detection 16 to 2000 pg/ml) using an ELISA kit (Peprotech) in a format of sandwich.

In vivo TPA-induced acute ear edema assay and myeloperoxidase (MPO) activity

The assay involving TPA-induced acute ear edema in mice was based on the method described by Merlos et al. (1991) modified by Jimenez-Estrada et al. (2006). Increasing concentrations of MA and indomethacin as positive control were dissolved in ethanol:acetone (1:1). The degree of neutrophil infiltration was indirectly quantified by determination of ear myeloperoxidase (MPO) activity (Bradley et al., 1982; Suzuki et al., 1983). Enzyme activity was determined by colorimetry at a wavelength of 450 nm, using a BIOTEK micro plate reader ELx808. Activity was expressed as absorbance increase and enzyme inhibition percentages.

In vivo carrageenan-induced rat paw edema assay

The assay involving carrageenan-induced rat paw edema was based on the method described by Winter et al. (1962), with certain modifications. Rats were administered sodium naproxen (Sigma) and MA at 100 mg/kg i.p. Sodium naproxen was used as positive control because it is widely accepted as a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) and is dose-related (Delporte et al., 2005). The 100 mg/kg MA dose was chosen as it is high enough to evidence anti-inflammatory effects; this has been shown in ibuprofen (In-Tae et al., 2004) and diclofenac (Ojewole, 2005). When there is no prior evidence of activity, natural extracts are commonly used at this concentration (Bolanle et al., 2012; Arawawala et al., 2012; Prakash Babu et al., 2011). Before treatment, the mean volume (from 3 or 4 measurements) of the

right paw of each animal was determined (V_0 , basal volume and V_t , edema at different time) using a Plethysmometer 7159, Ugo Basile. These individual records were used to calculate the variation of edema ($V_t - V_0$) in each group. Percentages of inhibition (I%) were determined using the following formula: $I\% = 100 - [B \times 100] / A$, where A is the mean variation of edema ($V_t - V_0$) in the control group and B is the ($V_t - V_0$) in the groups treated with MA and sodium naproxen.

Statistical analysis

Data obtained from animal experiments were expressed as mean values \pm standard error (\pm SEM). Statistical differences between the treated and control groups were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test for multiple comparisons. Values of $P \leq 0.05$ (*) and $P \leq 0.01$ (**) were considered to be statistically significant (Tallarida and Murria, 1981).

RESULTS AND DISCUSSION

Medicinal plants and their products have been used for many centuries to treat different kinds of acute and chronic inflammatory diseases such as wound-healing, edema and rheumatoid arthritis (Gayathri et al., 2007). MA has been isolated from the roots of Mexican species such as *P. beamanii* (Perez et al., 2004), *P. radulifolium* (Garduño and Delgado, 2003), *Roldana angulifolia* (Arciniega et al., 2006), *Trichilia cuneata* (Doe et al., 2004) and from the South African species *Senecio digitalifolius* (Bohlmann and Zdero, 1978), *Senecio lydenburgensis* (Bohlmann et al., 1979) and *Senecio affinis* (Bohlmann and Bapuji, 1982).

In this work, phytochemical analysis of dried n-hexane *P. peltatum* root extract (6 g) by silica gel column chromatography revealed MA as the root's main constituent. Fractions eluted with hexane afforded a mixture of -sitosterol/stigmasterol (15 mg) (Voutquenne et al., 1999). Fractions eluted with hexane/ethyl acetate (99:1) yielded maturatedin (12 mg) (Correa and Romo, 1966) and MA (2.34 g) in the form of yellow needles (Figure 1). MA recrystallized from acetone-hexane. Crystallographic analysis of MA allowed the unambiguous assignment of the structure (Rojano-Vilchis, 2012). The ^{13}C NMR data from MA have not been reported before and were unequivocally assigned as: ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3) δ 121.03 (C-1), 130.24 (C-2), 124.77 (C-3), 130.36 (C-4), 133.44 (C-5), 122.05 (C-6), 129.38 (C-7), 142.41 (C-8), 141.78 (C-9), 125.42 (C-10), 116.44 (C-11), 148.94 (C-12), 58.48 (C-13), 193.45 (C-14), 26.62 (C-15), 61.10 (O- CH_3 -9), 170.56 (C-1') 21.00 (C-2') ppm. In the present work, MA was directly obtained from the n-hexane root extract without undergoing the procedure of preparing an acetylated product with acetic anhydride in pyridine from maturatedin, as has been the case in previous studies (Correa and Romo, 1966). Chromatographic conditions of isolated MA were

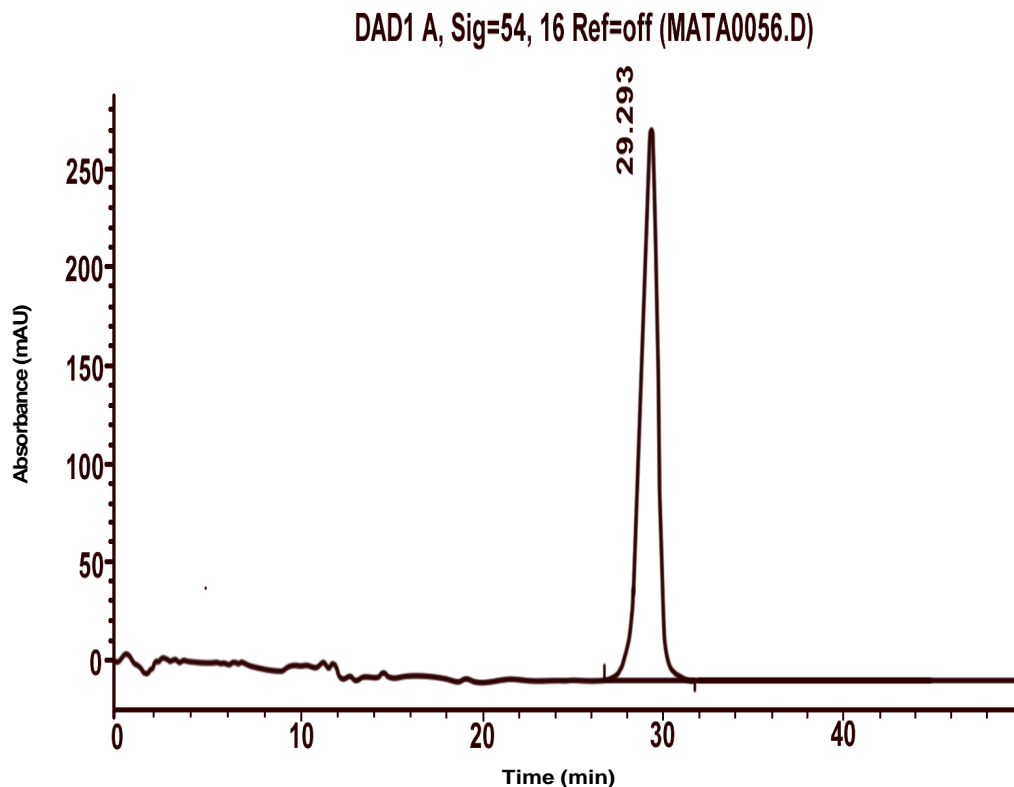


Figure 2. HPLC profile of maturin acetate.

optimized by HPLC to evaluate compound purity in the shortest period possible. MA showed one peak, with retention time of 29.29 min and with concentration of 228.75 mg/g in the n-hexane *P. peltatum* root extract. (Figure 2).

Cytokine synthesis is a primary mode of response of macrophages to inflammatory stimuli by bacterial products including LPS (Cheng et al., 2008). TNF- α is a cytokine with very diverse biological activities playing a role in various physiological and pathological phenomena, such as infection, inflammation, immunomodulation, cancer, cachexia and lethal septic shock. IL-1 β is among the most potent and multifunctional cell activators. IL-1 β is a key mediator in the series of host responses to infection and inflammation known as acute-phase response, and plays a particularly important role in the induction of acute-phase proteins whose synthesis is increased during inflammation. IL-1 β has been studied regarding its pathogenetic role in rheumatoid arthritis, vasculitis, Alzheimer disease, diabetes and autoimmune diseases in general (Mire-Sluis et al., 1998).

As shown in Figure 3, LPS-activated macrophages produced considerable levels of the two cytokines TNF- α and IL-1 β . The treatment of cells with MA induced a concentration-dependent inhibition of the production of

the two pro-inflammatory cytokines by LPS-stimulated macrophages. 75 μ g/ml of MA resulted in 80% inhibition of TNF- α and in more than 85% inhibition of IL-1 β ($p < 0.01$). These results confirm previously reported data, indicating that many medicinal plant extracts contain anti-inflammatory substances which act as inhibitors of pro-inflammatory responses (Calixto et al., 2004; Grabley et al., 1999; Tan et al., 2004).

Inflammation is a rapid local response to tissue damage with edema formation. Edema is characterized by reddening and swelling of the skin at the damage site (Ahamed et al., 2007). In this study, topical administration of MA and indomethacin significantly decreased acute ear edema induced by TPA at all administered doses compared with control groups ($p < 0.01$). Edema inhibition percentage (EI%) by indomethacin was 89.19% at a dose of 0.46 mg/ear, and MA showed its maximum inhibition level (75.50%) at a dose of 0.56 mg/ear. MA and indomethacin showed a dose-dependent anti-inflammatory effect and ID₅₀ values of 0.40 mg/ear ($r^2 = 0.99$) and 0.097 mg/ear ($r^2 = 0.97$), respectively (Table 1). MA showed a greater anti-inflammatory effect (75.50% edema inhibition) than cacalol (45.5% edema inhibition) in the same experimental model (Jimenez-Estrada et al., 2006). The TPA-induced acute ear edema response is

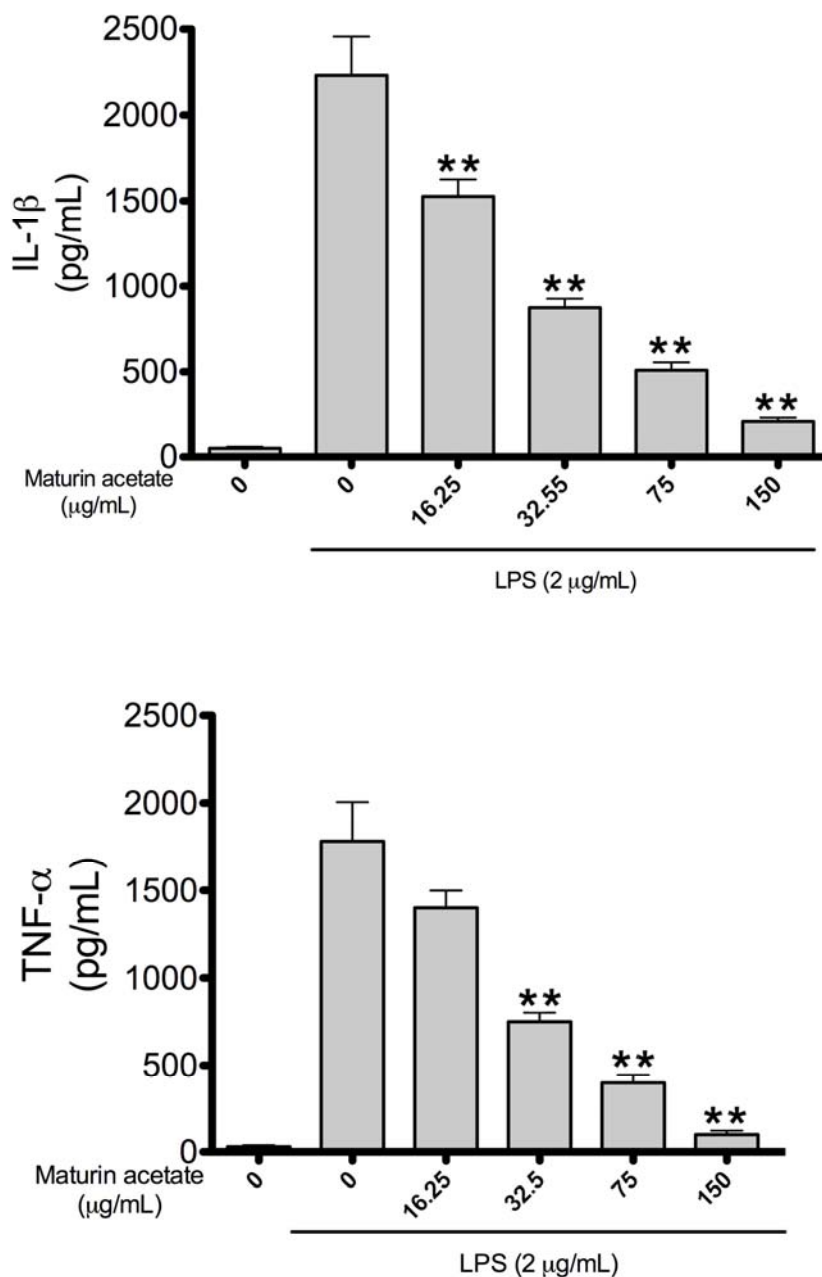


Figure 3. Effect of matorin acetate on LPS-induced cytokine secretion. Peritoneal macrophages ($1 \times 10^6/ml$) were plated in 24-well plates and stimulated with LPS ($2 \mu g/ml$) in the absence or presence of the indicated concentrations of compound for 24 h. At the end of the culture period, culture medium was collected for the determination of IL-1 β , TNF- α by ELISA kits. Results are expressed as mean \pm SEM of cytokine concentration ($\mu g/ml$). (** $p < 0.01$) versus LPS-stimulated cells.

associated with an increase in myeloperoxidase (MPO) concentration resulting from chemotaxis of neutrophils in the inflamed tissues (Smith, 1994). MA at doses of 0.31, 0.42 and 0.56 mg/ear reduced MPO activity (Figure 4).

Topical application of MA significantly reduced MPO levels in ear homogenates, indicating that neutrophil migration control participates in the observed topical anti-inflammatory activity. Anti-inflammatory effect observed

Table 1. Anti-inflammatory effects of increasing concentrations of indomethacin and maturin acetate on TPA-induced mouse ear edema.

Substance	Dose (mg/ear)	Weight of ears (mg)	Edema inhibition (%)	ID ₅₀ (mg/ear)
Control	-	16.24±0.86	-	0.097, r ² =0.97
	0.05	10.53±1.04**	35.15	
	0.15	7.10±1.34**	56.29	
Indomethacin	0.46	1.57±0.33**	89.19	
	-	15.35±0.42	-	
Control	0.31	11.04±0.23**	25.71	
	0.42	6.78±1.55**	54.41	
Maturin acetate	0.56	3.64±0.39**	75.50	
	-			

The weight of ears was represented as the mean ± SEM (standard error of mean) of six animals. **p < 0.01.

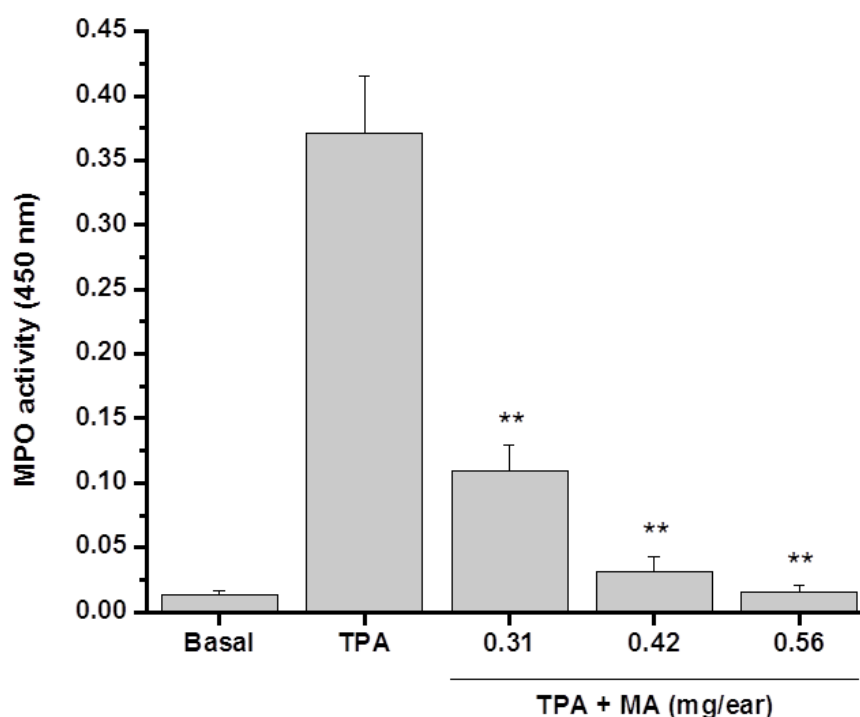


Figure 4. Measurement of myeloperoxidase (MPO) activity using neutrophil infiltration within the dermis, treated with TPA alone and TPA + MA. Values are expressed as mean ± SEM of absorbance at 450 nm. Each bar represents the mean of six replicates. The asterisk denotes the significance levels when compared with controls (** p < 0.01).

in TPA ear model was confirmed using the carrageenan-induced rat paw edema assay. Before injection of carrageenan in the paw edema assay, the basal paw volume values (V_0) ranged from 0.69 to 1.00 ml (0.87 ± 0.04 ml) and the mean variations of edema ($V_t - V_0$) ± standard error of mean (SEM) in the control group (N = 6) were 1 h (0.42 ± 0.10 ml), 3 h (0.98 ± 0.12 ml) and 5 h (1.06 ± 0.06 ml). MA showed significant (p < 0.05)

inhibition of 58.95% of the inflammation induced by carrageenan at the beginning of the inflammatory process (1 h), and the effect persisted up to 5 h (Table 2). Administration of MA inhibited edema starting from the first hour along all phases of inflammation, which was probably due to inhibition of different aspects and chemical mediators of inflammation (Ahamed et al., 2005). The development of edema in the rat paw after the

Table 2. Anti-inflammatory effects of sodium naproxen and maturin acetate (100 mg/kg) on carrageenan-induced paw edema.

Substance	Edema inhibition (%)		
	1 h	3 h	5 h
Sodium naproxen	4.70±24.9	49.91±12.7 *	41.6±10.9 *
Maturin acetate	58.95±12.4 *	35.08±14.6 *	35.22±6.1

Each value is represented as the mean ± SEM (standard error of mean) of six animals. *p < 0.05.

injection of carrageenan has been described as a biphasic event. The early phase (2.3 to 3 h) of inflammation is due to the release of vasoactive amines such as histamine and serotonin. The later phase (4.5 to 6 h) is due to the activation of kinin-like substances such as prostaglandins induced by cyclooxygenase, proteases and lysosomes (Olajide et al., 2000), producing an edema dependent on the mobilization of neutrophils (Vinegar et al., 1987; Hwang et al., 1996).

Present results indicate that MA reduces the exudation of the acute inflammation process and the early phase inflammatory response related to the release of pro-inflammatory mediators such as histamine and serotonin. This edematous response was reduced significantly in rats pretreated with indomethacin, a compound known to be a cyclooxygenase inhibitor.

Conclusions

Maturin acetate (MA) was isolated and quantified as the main constituent of the n-hexane *P. peltatum* root extract and exerted an important anti-inflammatory effect due to the modulation of macrophage responses and cytokine production. In addition, MA suppressed LPS-induced pro-inflammatory IL-1 β and TNF- α production by mouse peritoneal macrophages acting as *in vitro* anti-inflammatory agent. Furthermore, MA showed anti-inflammatory effects in experimental animal models of acute inflammation generated with TPA and carrageenan. MA displayed an effective anti-inflammatory response similar to the indomethacin, which has been found to be effective in the treatment of rheumatic conditions as a cyclooxygenase inhibitor limiting prostaglandin biosynthesis.

In this study, MA significantly reduced MPO levels by a mechanism related to the inhibition of neutrophil migration induced by carrageenan. MA showed a significant percentage of inhibition (58.95%) at the beginning of the inflammatory process (1 h) and the effect persisted up to 5 h, in comparison to sodium naproxen (4.70%). The present analysis confirms some of the beneficial effects ascribed in traditional medicine to the roots of *P. peltatum*. The anti-inflammatory effects produced by MA

may be therapeutically used for diverse inflammatory diseases. Further experiments are required to determine to what extent this sesquiterpenoid compound and the *P. peltatum* root extract can be used as therapeutic agents with anti-inflammatory activity.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to N. Zavala-Zegovia, Ma. A. Peña-González, R. Patiño-Maya, E. Huerta-Salazar, L. Velasco-Ibarra and F. J. Perez-Flores of the Institute of Chemistry for the determination of all spectra. We also thank E. Garcia-Ríos for technical assistance with the chromatographic analysis. M. I. Pérez Montfort corrected the English version of the manuscript. This paper constitutes a partial fulfilment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM). N.A. Rojano-Vilchis acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT) and UNAM.

REFERENCES

- Acevedo-Quiroz N, Domínguez-Villegas V, Garduño-Ramírez ML (2008). Structure–Activity relationships of modified eremophilanes and anti-inflammatory activity using the TPA mouse edema ear test. *Nat. Prod. Comm.* 3:313-317.
- Ahamed KFHN, Kumar V, Raja S, Mukherjee K, Mukherjee PK (2005). Anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of *Araucaria bidwillii* (Hook). *Iran J. Pharmacol. Ther.* 4:105-109.
- Arawwawala LDAM, Arambewela LSR, Ratnasooriya WD (2012). *Alpinia calcarata* Roscoe: A potent antiinflammatory agent. *J. Ethnopharm.* 139:889-892.
- Arciniegas A, Pérez AL, Villaseñor JL, Romo de, Vivar A (2006). Cacalol derivatives from *Roldana angulifolia*. *J. Nat. Prod.* 69:1826-1829.
- Badisa RB, Tzakou O, Couladis M, Pilarinou E (2003). Cytotoxic activities of some Greek Labiatae herbs. *Phytother. Res.* 17:472-476.
- Bohlmann F, Zdero C (1978). New Norsesquiterpenes from *Senecio digitalifolius*. *Phytochemistry* 17:759-761.
- Bohlmann F, Zdero C, Berger, D, Suwita, A, Mahanta P, Jeffrey C (1979). Neue furanoeremophilane und weitere inhaltsstoffe aus Südafrikanischen Senecio-arten. *Phytochemistry* 18:79-93.
- Bohlmann F, Bapuji M (1982). Cacalol derivatives from *Senecio Lydenburgensis*. *Phytochemistry* 21:681-683.
- Bolanle I, Sowemimo A, Van Rooyen A, Van de, Venter M (2012). Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of *Cyathula*

- prostrata* (Linn.) Blume (Amaranthaceae). J. Ethnopharm. 141:282-289.
- Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. J. Invest. Derm. 78:206-209.
- Bye R, Linares E, Estrada H (1995). Biological diversity of medicinal plants in Mexico. In: J.T. Arnason et al. (Eds). Phytochemistry of Medicinal Plants. Plenum Press New York pp. 65-82.
- Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR (2004). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part. II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. Plant Med. 70:93-103.
- Cheng A, Wan F, Wang J, Jin Z, Xu X (2008). Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* fish. Inter. Immunopharm. 8:43-50.
- Contreras-Weber C, Perez S, Alarcon FJ, Roman R (2002). Anti-hyperglycemic effect of *Psacalium peltatum*. Proc. West. Pharm. Soc. 45:134-136.
- Contreras-Weber C, Roman R, Perez C, Alarcon F, Zavala M, Perez S (2005). Hypoglycemic activity of a new carbohydrate isolated from the roots of *Psacalium peltatum*. Chem. Pharm. Bull. 53:1408-1410.
- Correa J, Romo J (1966). The constituents of *Cacalia decomposita*. A. Gray Structure of matorin, matorinin, matorone, and matorinone. Tetrahedron 22:685-691.
- Delporte C, Backhouse N, Erazo S, Negrete R, Vidal P, Silva X, López-Pérez JL, San Feliciano A, Muñoz O (2005). Analgesic-antiinflammatory properties of *Proustia pyrifolia*. J. Ethnopharm. 99:19-124.
- Doe M, Hirai Y, Kinoshita T, Shibata K, Haraguchi H, Morimoto Y (2004). Structure, synthesis, and biological activity of 14-methoxy-1,2-dehydrocacalol methyl ether, a new modified furanoeremophilane type sesquiterpene from *Trichilia cuneata*. Chem. Lett. 33:714-715.
- Garduño ML, Delgado G (2003). New eremophilanoids from the roots of *Psacalium radulifolium*. Hypoglycemic, antihyperglycemic and antioxidant evaluations. Rev. Soc. Quím. Méx. 47:160-166.
- Gayathri B, Manjula N, Vinaykumar KS, Lakshmi BS, Balakrishnan A (2007). Pure compound from *Boswellia serrata* extract exhibits anti-inflammatory property in human PBMCs and mouse macrophages through inhibition of TNF- α IL-1 β , No and MAP kinases. Int. J. Immunopharm. 7:473-482.
- Grabley S, Thiericke R (1999). Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application. Adv. Bioch. Engin. Biotech. 64:101-154.
- Hwang S, Lam M, Li C, Shen T (1996). Release of platelet activating factor and its involvement in the first phase of carrageenin rat foot edema. Eur. J. Pharm. 120:33-41.
- In-Tae K, Young-Mi P, Kyung-Min S, Joohun H, Jongwon C, Hyun-Ju J, Hee-Juhn P, Kyung-Tae L (2004). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the extract from *Kalopanax pictus*, *Pueraria thunbergiana* and *Rhus verniciflua*. J. Ethnopharm. 94:165-173.
- Jimenez-Estrada M, Reyes R, Ramirez T, Lledias F, Hansberg W, Arrieta D, Alarcon FJ (2006). Anti-inflammatory activity of cacalol and cacalone sesquiterpenes isolated from *Psacalium decompositum*. J. Ethnopharm. 105:34-38.
- Linares E, Bye R (1987). A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. J. Ethnopharm. 19:153-183.
- Merlos M, Gomez LA, Giral M, Vencat ML, Garcia RJ, Form J (1991). Effects of PAF-antagonists in mouse ear edema induced by several inflammatory agents. Brit. J. Pharm. 104:990-994.
- Mire-Sluis A, Thorpe R (1998). Cytokines. Academic Press pp. 1-13, 335-351.
- Ojewole JAO (2005). Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. J. Ethnopharm. 99:13-19.
- Olajide OA, Awe SO, Makinde JM, Ekhele AI, Olusola A, Morebise O, Okpako DT (2000). Studies on the anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Alstonia boonei* stem bark. J. Ethnopharm. 71:179-186.
- Perez AL, Arciniega A, Villaseñor JL, Romo de Vivar A (2004). Furanoeremophilane derivatives from *Psacalium beamanii*. Rev. Soc. Quím. Méx. 48:21-23.
- Prakash Babu N, Pandikumar P, Ignacimuthu S (2011). Lysosomal membrane stabilization and anti-inflammatory activity of *Clerodendrum phlomidis* L.f., a traditional medicinal plant. J. Ethnopharm. 135:779-785.
- Rojano-Vilchis N, Hernández-Ortega S, Jiménez-Estrada M, Torres-Avilés A (2012). Crystal structure of Matorin acetate from *Psacalium peltatum* (Kunth) (matarique). X-ray Structure Analysis Online 28:75-76.
- Smith JA (1994). Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. J. Leuk. Biol. 56:672-686.
- Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fukikura T. (1983). Assay method for myeloperoxidase in polymorphonuclear leucocytes. Anal. Biochem. 132:345-352.
- Tallarida RJ, Murria RB (1981). Manual of Pharmacologic Calculations. Springer-Verlag. New York.
- Tan BKH, Vanitha J (2004). Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: a review. Curr. Med. Chem. 11:1423-1430.
- Vinegar R, Truax JF, Selph JL, Johnston PR, Venable AL, McKenzie KK (1987). Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. Fed. Proc. 46:118-126.
- Voutquenne L, Lavaud C, Massiot G, Sevenet T, Hadi HA (1999). Cytotoxic polyisoprenes and glycosides of long-chain fatty alcohol from *Dimocarpus fumatus*. Phytochemistry 50:63-69.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW (1962). Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111:544-547.



Maturin acetate from *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass. (Asteraceae) induces immunostimulatory effects *in vitro* and *in vivo*

María del Carmen Juárez-Vázquez^a, Angel Josabad Alonso-Castro^{a,b,*}, Nadia Rojano-Vilchis^c, Manuel Jiménez-Estrada^c, Alejandro García-Carrancá^{a,d,*}

^a División de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, DF, Mexico

^b Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, DF, Mexico

^c Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, DF, Mexico

^d Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 January 2013

Accepted 30 January 2013

Available online 7 February 2013

Keywords:

Maturin acetate
Immunostimulatory
Macrophages
NK cells
Splenocytes

ABSTRACT

Maturin acetate (MA) is one of main constituents in *Psacalium peltatum*. The cytotoxic effects of MA on tumorigenic cells were evaluated using the MTT assay. The *in vitro* immunostimulatory effects of maturin acetate (MA) were evaluated on the viability of murine splenocytes and macrophages, and human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The effects of MA on the production of nitrous oxide, pinocytosis and lysosomal enzyme activity were assayed in murine macrophages RAW 264.7. The effects of MA on the NK cell activity were also assayed. The *in vivo* immunostimulatory activities of MA were evaluated on BALB/c mice immunosuppressed with cyclophosphamide (CY). MA lacks cytotoxic activity against human cancer cells (IC₅₀ > 200 μM). In the absence of LPS, MA 10 μM or higher stimulated significantly ($P \leq 0.05$), compared to untreated cells (-LPS), the viability of murine macrophages and splenocytes. In the absence of LPS, MA 10 μM or higher stimulated significantly ($P \leq 0.05$), compared to untreated cells (-LPS), the lysosomal enzyme activity and pinocytosis. In immunosuppressed mice, MA increases significantly ($P \leq 0.05$), compared to CY-treated mice, the production of IL-2 and IL-15 and IFN-γ. In conclusion, MA exerts immunostimulatory activities *in vitro* and *in vivo*.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Immune system is a complex organization of white blood cells, antibodies, and blood factors that protects the body from foreign invaders (Baniyash, 2006). The mammalian immune system is composed of many cell types like B cells, T cells, natural killer (NK) cells, neutrophils, basophils, eosinophils, macrophages, mast cells and mediators like cytokines that interact with non-immune cells to ensure protection against pathogens (Manu and Kuttan, 2009). Modulation of the immune system denotes to any change that can involve induction, expression, amplification or inhibition of the immune response (Alamgir and Uddin, 2010). Thus, immunomodulator is a substance used for its effect on the immune system. There are generally of two types immunomodulators based on

their effects: immunosuppressants and immunostimulators. Immunosuppressants decrease excessive immune function (e.g. autoimmune disease), whereas immunostimulators include the reconstitution of immune deficiency (e.g. AIDS) (Alamgir and Uddin, 2010). Many diseases such as cancer and infectious diseases might be caused by a deficiency in the number or function of immune cells (Patwardhan et al., 1990).

Psacalium peltatum (Kunth) Cass. (Asteraceae), an erect herbaceous vegetal which used empirically as an immunomodulatory agent (Alarcon-Aguilar et al., 2010) and for the empirical treatment of cancer (Argueta et al., 1994). Phytochemical studies have shown that furanoeremophilane-type sesquiterpene, maturin acetate (MA) (C₁₈H₁₆O₅) (4-formyl-9-methoxy-5-methyl-naphtho[2,3-b]furan-3-yl)methyl acetate (Fig. 1) is one of the main constituents of *P. peltatum* (Alarcon-Aguilar et al., 2010). MA has been isolated as the most abundant compound in other Mexican plant species such as *Psacalium radulifolium* (Garduño and Delgado, 2003), *Psacalium beamanii* (Perez-Catorena et al., 2004), *Roldana angulifolia* (Arciniegas et al., 2006) and *Trichilia cuneata* (Doe et al., 2004) and other medicinal plants such as *Senecio digitalifolius* (Bohlmann and Zdero, 1978), *Senecio lydenburgensis* (Bohlmann et al., 1979) and *Senecio affinis* (Bohlmann and Bapuji, 1982).

Abbreviations: DMEM, Dulbecco's modified eagle medium; FBS, fetal bovine serum; LPS, lipopolysaccharides; MA, maturin acetate; NK cells, natural killer cells; NO, nitrous oxide; *p*-NPP, *p*-nitrophenyl phosphate; MTT, thiazolyl blue tetrazolium bromide; OD, optic density; PBS, phosphate buffer saline.

* Corresponding authors. Address: Av. San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, Tlalpan, 14080 México, DF, Mexico. Tel.: +52 5556280433.

E-mail addresses: angeljosabad@hotmail.com (A.J. Alonso-Castro), carranca@biomedicas.unam.mx (A. García-Carrancá).

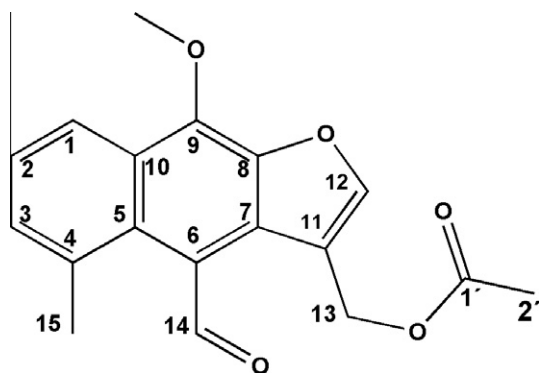


Fig. 1. Chemical structure of maturin acetate (MA).

Since *P. peltatum* is used as immunostimulatory agent and for the empirical treatment of cancer. We evaluated the immunomodulatory and cytotoxic effects of one of its main constituents, maturin acetate.

2. Materials and methods

2.1. Materials

DMEM, RPMI and fetal bovine serum (FBS) were from GIBCO BRL (Grand Island, NY). Lipopolysaccharides (LPS) and *p*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP), levamisole and cyclophosphamide were purchased from Sigma Chem. (St. Louis, MO). Sevoflurane was from Abbot Laboratories (Chicago, IL). ELISA kits for the quantitation of IL-6 and IL-23 (Superarray Biosciences, Frederick, MD), IL-2 and IL-15 (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ), and IFN- γ (Qiagen, Germantown, MD) were acquired.

2.2. Cells and culture conditions

Human tumor-derived cell lines from cervical (HeLa), colorectal (SW-480), breast (MDA-MB-231), leukemia (K562) and liver (HepG2) carcinomas as well as murine macrophages (RAW 264.7) were maintained in DMEM supplemented with 7% FBS and antibiotics (100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin). Ovarian (SKOV-3) and prostate (DU-145) carcinoma cell lines were maintained in RPMI medium supplemented with 7% FBS and antibiotics. All cell lines were obtained from ATCC (Manassas, VA). All cell cultures were grown at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. All the procedures (isolation of primary cultures from mice and human, and handling of experimental animals) carried out in this study were approved by the Research Ethic Committee from Instituto Nacional de Cancerología (Distrito Federal, México).

2.3. Animals

BALB/c mice, weighing 18–23 g, from the Experimental Animal Center at the Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, México, were used. The experiments were performed following the NIH Guide for Treatment and Care for Laboratory Animals and by the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999). The mice, having free access to food and water, were housed in cages with filtered air in a climate and light controlled room with a 12 h light/dark cycle.

2.4. Isolation of maturin acetate

The isolation of maturin acetate was carried out as described recently (Rojano-Vilchis et al., 2012). Briefly, roots of *Psacalium*

peltatum (Kunth) Cass., were collected from a pine-oak forest of Mineral del Chico, Hidalgo, Mexico, [20°09'55"N and 98°45'08"W]. A voucher specimen was deposited at the National Herbarium (MEXU 1138692) of the Institute of Biology, UNAM, Mexico. Air-dried and powdered roots (4.381 kg) of *P. peltatum* were sequentially extracted with n-hexane by exhaustive maceration (3 times X 2 l), at room temperature. Hexane extract of roots from *P. peltatum*, was separated in a column chromatographic process and eluted with hexane-ethyl acetate in a mixture gradient, from fraction (98:2) eluted of hexane-ethyl acetate was isolated maturin acetate and their spectroscopic features were compared with the described data (Correa and Romo, 1966; Bohlmann et al., 1977). The purification and characterization of MA was carried out recently when its crystal structure was elucidated (Rojano-Vilchis et al., 2012).

2.5. MTT assay

Human cancer cell lines were seeded in 96-well microplates at a density of 5000 cells/well. After 24 h of incubation, MA at concentrations ranging 1–200 μ M were added to the cells. Then, the assay was carried out as described by Jacobo-Salcedo et al. (2011) and optical density (OD) was measured at 590 nm using an ELISA reader (Biorad Laboratories, Hercules, CA). The wells without cells were considered as blank. The viability of treated cells was estimated from the relative growth as follows:

$$\text{Relative viability} = \frac{\text{control OD} - \text{sample OD}}{\text{control OD}} \times 100$$

2.6. Viability assay with murine splenocytes and macrophages

Murine splenocytes (obtained as described by Jacobo-Salcedo et al. (2011)) and RAW 264.7 macrophages were seeded in 96 wells plates at 2×10^5 cells/well and 5×10^4 cells/well, respectively. After 24 h of incubation, concentrations of MA between 1 and 25 μ M were added to the cells. Positive controls received lipopolysaccharides (LPS) 1 μ g/ml. In order to evaluate whether MA increases immunostimulatory activities in the presence of LPS, MA and LPS were incubated in combination. Parallel cultures received concentrations of MA in the presence of LPS 1 μ g/ml. After 48 h of treatment, cell viability assay was carried out as described above.

2.7. Viability assay with PBMC

Human peripheral blood mononuclear cells were obtained as described previously (Jacobo-Salcedo et al., 2011) and seeded in 96 well plates at 2.5×10^4 cells/well. After 24 h of incubation, different concentrations of MA (1–25 μ M) were added to cells. The assay was performed as described above.

2.8. Nitric oxide (NO) production

Nitric oxide (NO) production was determined based on Griess reaction (Green et al., 1981). RAW 264.7 macrophages were seeded (5×10^4 cells per well) in 96 well plates. After 24 h of incubation, macrophages were treated with various concentrations of MA (1–25 μ M) in the absence or presence of LPS 1 μ g/ml. Then, the assay was carried out as described by Jacobo-Salcedo et al. (2013) and the OD was read on a microplate reader at 515 nm. The nitrite concentration (μ M) was determined by interpolation of standard curves constructed with known concentrations of KNO₂.

2.9. Cellular lysosomal enzyme activity assay

The cellular lysosomal enzyme activity was used to determine acid phosphatase activity in macrophages (Suzuki et al., 1988). Briefly, RAW 264.7 macrophages were seeded (5×10^4 cells per well) in 96 well plates. After 24 of incubation, macrophages were treated with various concentrations of MA (1–25 μM) in the presence or the absence of LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ during 48 h. Then, the assay was carried out as described by Jacobo-Salcedo et al. (2013) and the absorbance was measured at 405 nm. The percentage of lysosomal enzyme activity was calculated by the following equation:

$$\text{Lysosomal enzyme activity (\%)} = \frac{\text{OD sample} - \text{OD negative control}}{\text{OD negative control}} \times 100$$

2.10. Neutral red uptake

The pinocytic activity of MA was evaluated using the neutral red assay according to described by Cheng et al. (2008) with some modifications. RAW 264.7 macrophages were seeded (5×10^4 cells per well) in 96 well plates. After 24 of incubation, macrophages were treated with various concentrations of MA (1–25 μM) in absence or presence of LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 48 h. Then, the assay was carried out as described by Jacobo-Salcedo et al. (2013). The optical density was measured at 540 nm in microplate reader. The red neutral uptake was calculated by the following equation:

$$\text{Red neutral uptake (\%)} = \frac{\text{OD sample} - \text{OD negative control}}{\text{OD negative control}} \times 100$$

2.11. NK cell activity

The activity of natural killer (NK) cells was measured as previously described (Tu et al., 2008) with some modifications. Briefly, K562 cells used as target cells, were seeded in 96-well plates at a density of 2×10^4 cells/well in RPMI medium. After 24 h, murine splenocytes, used as the effector cells, were added at 1×10^6 cells/well to give effector/target cells a ratio of 50:1. After incubation for 4 h, cells were treated with MA concentrations between 1 and 25 μM during 48 h. Then, cells were subjected to MTT assay. NK cell activity was calculated as follows:

$$\text{NK activity (\%)} = (\text{ODT} - (\text{ODS} - \text{ODE})) / \text{ODT} \times 100\%$$

where ODT, optical density value of target cells control, ODS, optical density value of test samples, ODE, optical density value of effector cells control.

2.12. Immunosuppressive assay

BALB/c mice were injected intraperitoneally with cyclophosphamide at 100 mg/kg. One day later, groups of five immunosuppressed mice were randomly divided and received intraperitoneally levamisole 2.5 mg/kg, doses of MA from 10 to 50 mg/kg, dissolved in 0.1 ml of 0.9% saline solution, daily over 14 days. The untreated animals received 0.1 ml of the vehicle solution. After 14 days of treatment, mice were anesthetized by sevoflurane inhalation and their blood was obtained by cardiac puncture. Serum samples were prepared by centrifuging the whole blood at $2000 \times g$ at 4 °C for 10 min. The supernatants and serum levels of cytokine for IL-2, IL-6, IL-15, IL-23 and IFN- γ were measured using commercially available kits according to the manufacturer's instructions. The optical density was measured at 450 nm in microplate reader.

2.13. Statistical analysis

Experimental values are expressed as the mean \pm the standard deviation of at least three experiments in hexaplicate. Statistically significant differences from the control group were identified by Student's t-test for paired data. The level of $P \leq 0.05$ was used to determine statistical significance. All calculations were performed using the Graph Pad Prisma V.3 software system (GraphPad Software, San Diego, CA).

3. Results

3.1. MA lacks toxic effects on human cancer cell lines

The results indicated that MA lacks ($\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{M}$) cytotoxic effects against the human cancer cell lines HeLa, SW-480, MDA-MB-231, HepG2, SKOV-3, DU-145 (results not shown).

3.2. MA induces the viability of murine macrophages and splenocytes

We evaluated the effects of MA on the viability of murine macrophages and splenocytes, and human peripheral blood mononuclear cells. In the absence of LPS, only MA at 25 μM stimulated significantly ($P \leq 0.05$), compared to untreated cells (-LPS), the viability of murine macrophages by 122% (Fig. 2A). In the presence of LPS, MA increased the viability of murine macrophages in a concentration dependent manner and tested at 25 μM stimulated the viability with higher potency ($P \leq 0.05$) than LPS (Fig. 2A). In the absence of LPS, MA induced the viability of murine splenocytes in a concentration dependent manner. Furthermore, MA at 10 and 25 μM stimulated significantly ($P \leq 0.05$), compared to untreated cells, the viability by 116% and 124%, respectively (Fig. 2B). In the presence of LPS, MA at 25 μM increased the viability of murine splenocytes by 149% with higher potency ($P \leq 0.05$) than LPS (Fig. 2B). In contrast, MA did not affect the viability of human PBMC in the absence or presence of LPS (Fig. 2C).

3.3. MA induces lysosomal enzyme activity and pinocytosis in RAW 264.7 murine macrophages

We also evaluated the effects of MA on the NO production, lysosomal enzyme activity and pinocytosis, activities that subsequently occur when macrophages are activated. In the absence of LPS, MA did not induce the NO production in murine macrophages compared to untreated cells (-LPS) (Fig. 3A). In the presence of LPS, MA at all tested concentrations induced the NO production with higher potency ($P \leq 0.05$) than LPS (Fig. 3A). In the absence of LPS, MA stimulated significantly ($P \leq 0.05$), compared to untreated cells, the lysosomal enzyme activity in a concentration dependent manner (Fig. 3B). In the presence of LPS, MA at 5, 10 and 25 μM induced the NO production by 132%, 140% and 138%, respectively, with higher potency ($P \leq 0.05$) than LPS (Fig. 3B). In the absence of LPS, only MA at 25 μM induced pinocytosis by 125% with higher potency ($P \leq 0.05$) compared to untreated cells (Fig. 3C). In the presence of LPS, MA at 25 μM stimulated the neutral red uptake by 138% with higher potency than LPS (Fig. 3C).

3.4. MA induces NK cell activity

MA induced significantly ($P \leq 0.05$), compared to untreated cells, NK cell activity in a concentration dependent manner: 5 μM (4.5%), 10 μM (6.9%) and 25 μM (7.3%) (Fig. 4).

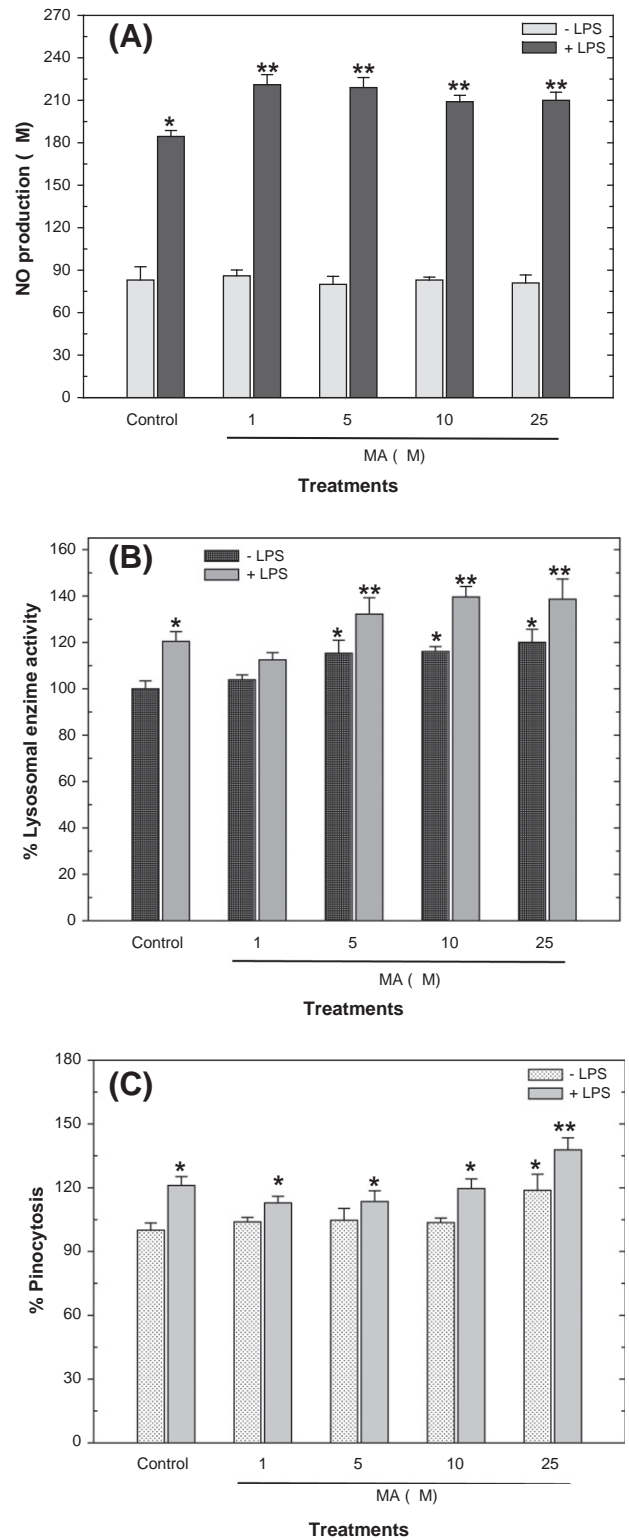
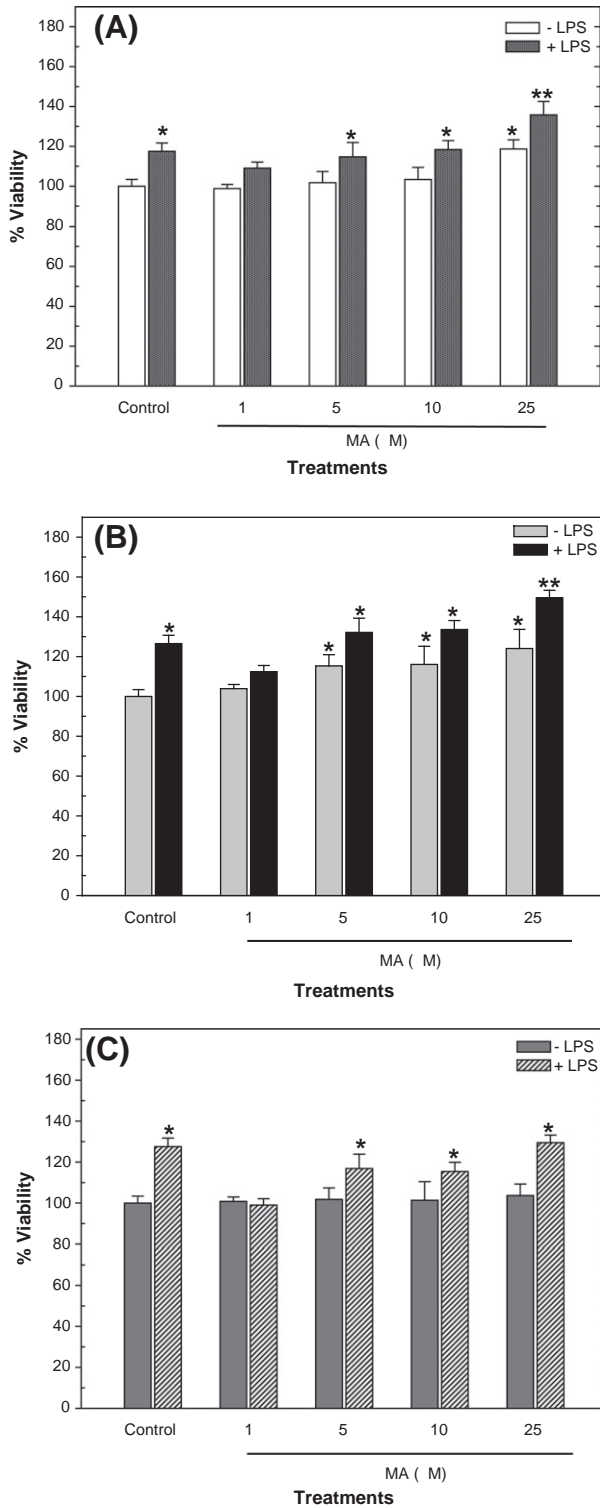


Fig. 2. Effect of maturin acetate (MA) on the viability of murine macrophages RAW 264.7 (A) and splenocytes (B), and human peripheral blood mononuclear cells (C). Primary cultures of murine splenocytes and human peripheral blood mononuclear cells were obtained as described in Section 2. Cell cultures were treated with DMSO 0.01% (untreated), LPS 1 μg/ml (positive control) or indicated concentrations of MA in the presence or absence of LPS 1 μg/ml for 48 h. Cell viability was measured with the MTT assay. Data are representative of at least three independent experiments in hexuplicate. Results represent the mean ± standard deviation. *, statistically significant ($P \leq 0.05$) compared to untreated cell cultures; **, statistically significant ($P \leq 0.05$) compared to LPS.

Fig. 3. MA induces cellular lysosomal enzyme activity and pinocytosis in murine macrophages. RAW 264.7 murine macrophages were treated with DMSO 0.01% (untreated), LPS 1 μg/ml (positive control) or indicated concentrations of MA in the presence or absence of LPS 1 μg/ml for 48 h. The amount of NO production (A), cellular lysosomal enzyme activity (B) and neutral red uptake (C) were measured as described in Section 2. Data are representative of at least three independent experiments in hexuplicate. Results represent the mean ± standard deviation. *, statistically significant ($P \leq 0.05$) compared to untreated cell cultures; **, statistically significant ($P \leq 0.05$) compared to LPS.

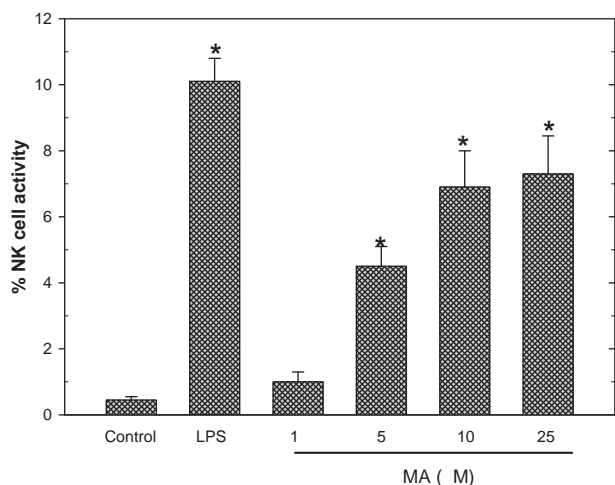


Fig. 4. MA stimulates NK cell activity. K562 cells used as target cells, were seeded in 96-well plates at a density of 2×10^4 cells/well. After 24 h, murine splenocytes, used as the effector cells, were added at 1×10^6 cells/well. After incubation for 4 h, cells were treated with MA concentrations between 1 and 25 μ M during 48 h. Then, cells were subjected to MTT assay. NK cell activity was calculated as described in Section 2. Data are representative of at least three independent experiments in hexaplicate. Results represent the mean \pm standard deviation. * $P < 0.05$, compared to the control values.

3.5. MA increases the production of immunostimulatory cytokines in immunosuppressed mice

The immunosuppressive compound cyclophosphamide (CY) decreased significantly ($P \leq 0.05$), compared to mice which did not receive CY (untreated), the serum levels of all immunostimulatory cytokines (Fig. 5). In contrast, the positive control levamisole restored the serum levels of all cytokines as much as the untreated mice (Fig. 5). Moreover, MA increased the release of IL-2, IL-15 and IFN- γ in a dose dependent manner with higher potency

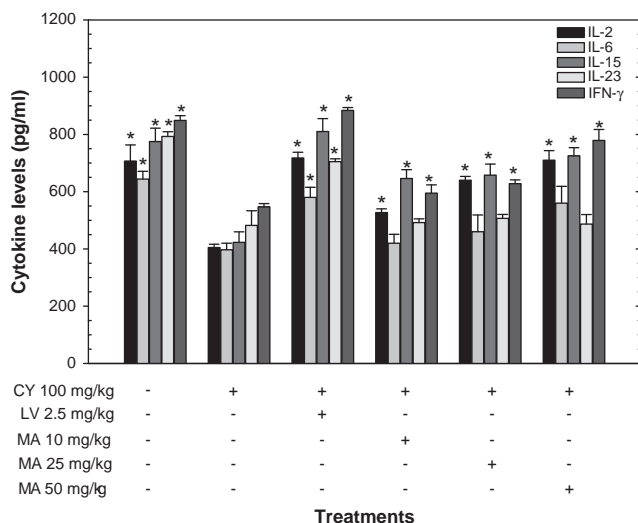


Fig. 5. Effect of MA on levels of cytokines in immunosuppressed BALB/c mice. Mice were treated with cyclophosphamide 100 mg/kg i.p. (CY) to induce immunosuppression. One day later, groups of mice received levamisole (LV) as positive control of immunostimulation or matorin acetate (MA) at the indicated doses. The untreated group refers to mice which not were treated with cyclophosphamide. After 14 days of treatment, serum from mice was obtained. The serum levels of IL-2, IL-6, IL-15, IL-23 and IFN- γ were measured. Data are representative of three independent experiments in quintuplicate. Results represent the mean \pm standard deviation (SD). * $P < 0.05$, compared to CY treated mice.

($P \leq 0.05$) than immunosuppressed mice (CY) (Fig. 5). Nevertheless, MA lacked effect on the production of IL-6 and IL-23 (Fig. 5).

4. Discussion

Immunomodulatory agents from natural products have been reported to increase the immune responsiveness of the body against pathogens by activating immune cells (Patwardhan et al., 1990). Thus the development of drugs for immunomodulation activity from natural compounds has become an attractive project. *P. peltatum* is used empirically as an immunomodulatory agent (Alarcon-Aguilar et al., 2010) and for the empirical treatment of cancer (Argueta et al., 1994). Phytochemical studies have shown that matorin acetate (MA) is the main constituent of *P. peltatum* (Alarcon-Aguilar et al., 2010). However, there are not studies regarding the immunomodulatory and cytotoxic effects of MA.

First, we evaluated the cytotoxic effects of MA on human cancer cell lines. The results indicated that MA lacks ($IC_{50} \geq 200 \mu$ M) cytotoxic effects on human cancer cells. In addition, higher concentrations than 200 μ M might not be pharmacologically relevant for further *in vivo* studies. Thus, there was no correlation between the empirical use of *Psaclium peltatum* for cancer treatment and the pharmacological tests with MA.

Then, we evaluated the toxic effects of MA on murine splenocytes and macrophages, and human PBMC. The results showed that MA lacked toxic effects on murine splenocytes and macrophages, and human PBMC. In addition, the results indicated that MA induced the viability of murine macrophages and splenocytes with similar potency than the positive control LPS. This suggests that MA might exert mitogenic effects on macrophages and splenocytes. Moreover, MA in the presence of LPS increased the viability of murine macrophages and splenocytes with higher potency than LPS. This might suggest that MA increases the viability effects with LPS on immune cells.

Furthermore, it is well known that the activation of macrophages subsequently triggers an increase in the activity of lysosomal enzyme. In the absence of LPS, MA stimulated the lysosomal enzyme activity and the NK cell activity with similar potency than LPS. MA in the presence of LPS increased the lysosomal enzyme activity with higher potency than LPS. The lysosomal enzyme activity corresponds to the transformation of p-NPP to the colored compound by the acid phosphatase in the stimulated macrophages, which correlates to degranulation in phagocytes (Suzuki et al., 1988). Thus, our findings indicate that MA might participate in the activation of innate immune cells such as NK cells and macrophages.

Activated macrophages play an important role in the immune system due to their ability of phagocytosis, synthesis and release of NO, which is considered a cytotoxic agent toward certain infections (Mavrier and Edgington, 1984). The NO produced by macrophages inhibits mitochondrial respiration and DNA replication which affects essential enzymes in target cells (Hibbs et al., 1987). Neutral red is a weak cationic dye and penetrates cell membranes by nonionic diffusion, subsequently binding intracellular to sites of the lysosome. The uptake of this dye indicates an indirect pinocytic ability of macrophages (Cheng et al., 2008). The results indicated that MA induced the neutral red uptake with similar potency than the positive control LPS. This suggests that MA might exert pinocytic effects on macrophages. The results also indicated that MA in the presence of LPS induced the neutral red uptake with higher potency than LPS.

When an infection occurs, many macrophages and mast cells immediately release soluble mediators, such as proinflammatory cytokines like TNF and interleukins (Manu and Kuttan, 2009). The interleukins are the link in the communication between cells

of the immune system, facilitating innate immune reactions. It is known that cyclophosphamide administered at high doses induces high immunosuppressive effects (Singh et al., 1993). Finally, we used an immunosuppressed murine model to evaluate the immunostimulatory effects of MA *in vivo*. We analyzed whether MA might induce the release of immunity-related cytokines IL-2, IL-6, IL-15, IL-23 and IFN- γ *in vivo*. The MA doses used to evaluate immunostimulatory effects were selected based on preliminary studies carried out in our laboratory. The results indicated the MA restored the cytokine levels of IL-2, IL-15 and IFN- γ , compared to mice treated with cyclophosphamide, with similar levels than mice not treated with cyclophosphamide (normal mice). This indicates MA might be a good adjuvant in the restoration of immune system activities in diseases which cause immunosuppression.

It has been described that IL-2 and IL-6 induce, each, the stimulation of cytotoxic T cells and enhances cytolytic activity on NK cells (Mosmann and Coffman, 1989; Asano et al., 1997). IL-15 plays an essential role in supporting the survival of CD44high CD8+ memory T cells for long-lasting, high-avidity T cell response to infections (Ma et al., 2006). IL-23 is secreted by activated macrophages and dendritic cells and induces clonal expansion of memory CD4+ T cells. IL-23 can drive the development and induction of IFN- γ producing CD4+ T cells (Khader et al., 2005). IFN- γ is mainly produced by NK cells. IFN- γ exerts antitumor and antiviral effects, increases antigen presentation and lysosomal activity of macrophages and promotes NK cell activity (Schroeder et al., 2004).

In summary, the results indicate that MA lacks cytotoxic activity against human cancer cells. Moreover, MA stimulates the viability of murine macrophages and splenocytes, and induces lysosomal enzyme activity, pinocytosis and NK cell activity. Also, MA increases the production of IL-2 and IL-15 and IFN- γ in immunosuppressed mice. Nevertheless, it is needed to perform more studies to elucidate the molecular mechanisms by which MA exerts its immunostimulatory effects.

Conflict of interest

No conflict to disclose.

Acknowledgments

AJAC (174493) and NRV (101038) were endowed with graduate fellowships from CONACYT. We acknowledge generous grant support from Instituto de Ciencia y Tecnología del Gobierno del Distrito Federal (ICyT-GDF; GI/PIFUTP08-142 to AGC), and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México (CONACYT-México grant 127822 to AGC).

References

- Alamgir, M., Uddin, S.J., 2010. Recent advances on the ethnomedicinal plants as immunomodulatory agents. *Ethnomedicine*. In: Chattopadhyay, D. (Ed.), *A Source of Complementary Therapeutics*. Research Signpost, India, Kerala, pp. 227–244.
- Alarcon-Aguilar, F.J., Fortis-Barrera, A., Angeles-Mejia, S., Banderas-Dorantes, T.R., Jasso-Villagomez, E.I., Almanza-Perez, J.C., Blancas-Flores, G., Zamila, A., Diaz-Flores, M., Roman-Ramos, R., 2010. Anti-inflammatory and antioxidant effects of a hypoglycemic fructan fraction from *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass. in streptozotocin-induced diabetes mice. *J. Ethnopharmacol.* 132, 400–407.
- Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A.L., Villaseñor, J.L., Romo de Vivar, A., 2006. Cacalol derivatives from *Roldana angulifolia*. *J. Nat. Prod.* 69, 1826–1829.
- Argueta, A., Martínez, L., Cano, A., Rodarte, M.E., 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista, Tomo II, México, DF, pp. 985–990.
- Asano, Y., Kaneda, K., Hiragushi, K., Tsuchida, T., Higashino, K., 1997. The tumor bearing state induces augmented responses of organ-associated lymphocytes to high dose interleukin-2 therapy in mice. *Cancer Immunol. Immun.* 45, 63–70.
- Baniyash, M., 2006. Chronic inflammation, immunosuppression and cancer: new insights and outlook. *Semin. Cancer Biol.* 16, 80–88.
- Bohlmann, F., Zdero, C., Grenz, M., 1977. Natürlich vorkommende terpen-derivate, 78. Weitere Inhaltsstoffe aus südafrikanischen *Senecio*-Arten. *Chem. Ber.* 110, 474–486.
- Bohlmann, F., Zdero, C., 1978. New norsesquiterpenes from *Senecio digitalifolius*. *Phytochem.* 17, 759–761.
- Bohlmann, F., Zdero, C., Berger, D., Suwita, A., Mahanta, P., Jeffrey, C., 1979. Neue furanoeremophilane und weitere inhaltsstoffe aus Südafrikanischen *Senecio*-arten. *Phytochem.* 18, 79–93.
- Bohlmann, F., Bapuji, M., 1982. Cacalol derivatives from *Senecio Lydenburgensis*. *Phytochem.* 21, 681–683.
- Cheng, A.W., Wan, F.C., Wang, J.Q., Jin, Z.Y., Xu, X.M., 2008. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* fish. *Int. Immunopharmacol.* 8, 43–50.
- Correa, J., Romo, J., 1966. The constituents of *Cacalia decomposita* A. Gray structures of matorin, matorinin, matorone and matorinone. *Tetrahedron* 22, 685–691.
- Doe, M., Hirai, Y., Kinoshita, T., Shibata, K., Haraguchi, H., Morimoto, Y., 2004. Structure, synthesis, and biological activity of 14-Methoxy-1,2-dehydrocacalol methyl ether, a new modified furanoeremophilane type sesquiterpene from *Trichilia cuneata*. *Chem. Lett.* 33, 714–715.
- Garduño, M.L., Delgado, G., 2003. New eremophilanoids from the roots of *Psacalium radulifolium*. Hypoglycemic, antihyperglycemic and anti-oxidant evaluations. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 47, 160–166.
- Green, L.C., Luzuriaga, K.R., Wagner, D.A., Rand, W., Istfan, N., Young, V.R., Tannenbaum, S.R., 1981. Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7764–7768.
- Hibbs Jr., J.B., Vavrin, Z., Taintor, R.R., 1987. L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.* 138, 550–565.
- Jacobo-Salcedo, M.d.R., Gonzalez-Espindola, L.A., Alonso-Castro, A.J., Gonzalez-Martinez, M.d.R., Dominguez, F., Garcia-Carranca, A., 2011. Antimicrobial and cytotoxic effects of *Magnolia dealbata* Zucc and its active compounds. *Nat. Prod. Commun.* 6, 1121–1124.
- Jacobo-Salcedo, M.d.R., Juárez-Vázquez, M.d.C., Gonzalez-Espindola, L.A., Maciel-Torres, S.P., Garcia-Carranca, A., Alonso-Castro, A.J., 2013. Biological effects of aqueous extract from turkey vulture *Cathartes aura* (Cathartidae) meat. *J. Ethnopharmacol.* 145, 663–666.
- Khader, S.A., Pearl, J.E., Sakamoto, K., Gilmartin, L., Bell, G.K., Jelley-Gibbs, D.M., Ghilardi, N., deSavauge, F., Cooper, A.M., 2005. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN- γ responses if IL-12p70 is available. *J. Immunol.* 175, 788–795.
- Ma, A., Koka, R., Burkett, P., 2006. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Ann. Rev. Immunol.* 24, 657–679.
- Manu, K.A., Kuttan, G., 2009. Immunomodulatory activities of punarnavine, an alkaloid from *Boerhaavia diffusa*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 31, 377–387.
- Mavier, P., Edgington, T.S., 1984. Human monocyte-mediated tumor cytotoxicity. I. Demonstration of an oxygen-dependent myeloperoxidase-independent mechanism. *J. Immunol.* 132, 1980–1986.
- Mosmann, T.R., Coffman, R.L., 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv. Immunol.* 46, 111–171.
- Patwardhan, B., Kalbag, D., Patki, P.S., Nagsampagi, B.A., 1990. Search of immunomodulatory agents. *Indian Drugs* 28, 56–63.
- Perez-Catoreña, A.L., Arciniega, A., Villaseñor, J.L., Romo de Vivar, A., 2004. Furanoeremophilane derivatives from *Psacalium beamanii*. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 48, 21–23.
- Rojano-Vilchis, N., Hernández-Ortega, S., Jimenez-Estrada, M., Torres-Avilez, A., 2012. Crystal structure of matorin acetate from *Psacalium peltatum* (Kunth) (matarique). *X-Ray Struct. Anal. Online* 28, 75–76.
- Schroeder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A., 2004. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leuk. Biol.* 75, 163–189.
- Singh, K.P., Gupta, R.K., Shau, H., Ray, P.K., 1993. Effect of ASTA-Z 7575 (INN maphosphamide) on human lymphokine-activated killer cell induction. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 15, 525–538.
- Suzuki, I., Tanaka, H., Adachi, Y., Yadomae, T., 1988. Rapid measurement of phagocytosis by macrophages. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 4871–4875.
- Tu, J., Sun, H.X., Ye, Y.P., 2008. Immunomodulatory and antitumor activity of triterpenoid fractions from the rhizomes of *Astilbe chinensis*. *J. Ethnopharmacol.* 119, 266–271.

Acta Crystallographica Section E

Structure Reports

Online

ISSN 1600-5368

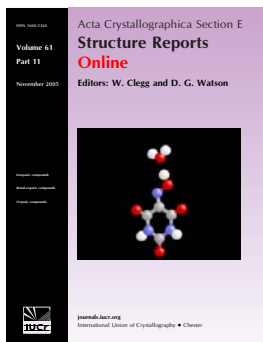
Editors: W. T. A. Harrison, H. Stoeckli-Evans,
E. R. T. Tiekink and M. Weil

14-Angeloyloxycacalohastine from *Psacalium peltatum*

Nadia Rojano-Vilchis, Simón Hernández-Ortega, Manuel Jimenez-Estrada
and Armando Torres Avilez

Acta Cryst. (2012). E68, o672–o673

This open-access article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Licence <http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/uk/legalcode>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original authors and source are cited.



Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online is the IUCr's highly popular open-access structural journal. It provides a simple and easily accessible publication mechanism for the growing number of inorganic, metal-organic and organic crystal structure determinations. The electronic submission, validation, refereeing and publication facilities of the journal ensure very rapid and high-quality publication, whilst key indicators and validation reports provide measures of structural reliability. The journal publishes over 4000 structures per year. The average publication time is less than one month.

Crystallography Journals **Online** is available from journals.iucr.org

14-Angeloyloxycacalohastine from *Psacalium peltatum*

Nadia Rojano-Vilchis, Simón Hernández-Ortega,* Manuel Jimenez-Estrada and Armando Torres Avilez

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

Correspondence e-mail: simonho@unam.mx

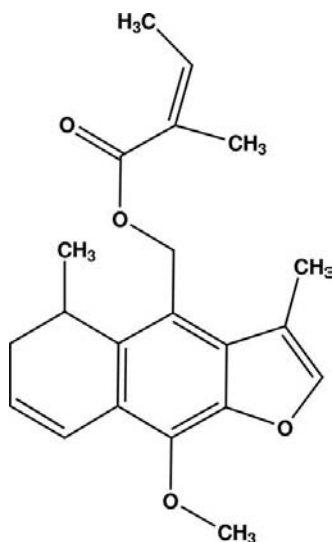
Received 31 October 2011; accepted 31 January 2012

Key indicators: single-crystal X-ray study; $T = 298$ K; mean $\sigma(\text{C}-\text{C}) = 0.003$ Å; disorder in main residue; R factor = 0.035; wR factor = 0.095; data-to-parameter ratio = 8.1.

The title compound [systematic name: (9-methoxy-3,5-dimethyl-5,6-dihydronaphtho[2,3-*b*]furan-4-yl)methyl 2-methylbut-2-enoate], $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_4$, was isolated from matarique, or *Psacalium peltatum* (Kunth). The structure is almost planar. The angeloyloxy group makes an angle of $62.08(2)^\circ$ with the furanoeremophilane skeleton. The carbonyl O atom is disordered between two positions with a 76:24 ratio. The molecules in the crystal are joined by very weak C—H—O interactions in the *ac* plane.

Related literature

For fundamental background information, see: Romo de Vivar *et al.* (2007). For biological activity, see: Acevedo-Quiroz *et al.* (2008); Alarcón-Aguilar *et al.* (2000); Bye *et al.* (1995); Contreras-Weber *et al.* (2002); Jimenez-Estrada *et al.* (2006). For compound isolation, see: Abdo *et al.* (1992); Bohlmann *et al.* (1977). For bond-length data, see: Allen *et al.* (1987).



Experimental

Crystal data

$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_4$	$V = 1811.1(7) \text{ \AA}^3$
$M_r = 340.40$	$Z = 4$
Orthorhombic, $P2_12_12_1$	Mo $K\alpha$ radiation
$a = 7.1627(17) \text{ \AA}$	$\mu = 0.09 \text{ mm}^{-1}$
$b = 10.276(2) \text{ \AA}$	$T = 298 \text{ K}$
$c = 24.605(6) \text{ \AA}$	$0.40 \times 0.40 \times 0.40 \text{ mm}$

Data collection

Bruker SMART APEX CCD area-detector diffractometer	1945 independent reflections
20061 measured reflections	1701 reflections with $I > 2\sigma(I)$
	$R_{\text{int}} = 0.037$

Refinement

$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.035$	21 restraints
$wR(F^2) = 0.095$	H-atom parameters constrained
$S = 1.12$	$\Delta\rho_{\text{max}} = 0.15 \text{ e \AA}^{-3}$
1945 reflections	$\Delta\rho_{\text{min}} = -0.15 \text{ e \AA}^{-3}$
241 parameters	

Table 1

Hydrogen-bond geometry (\AA , $^\circ$).

$D-H\cdots A$	$D-H$	$H\cdots A$	$D\cdots A$	$D-H\cdots A$
$\text{C15}-\text{H15A}\cdots\text{O2}^i$	0.97	2.62	3.536(3)	157
$\text{C6}-\text{H6B}\cdots\text{O4}^ii$	0.97	2.61	3.42(2)	142

Symmetry codes: (i) $x + 1, y, z$; (ii) $x - \frac{1}{2}, -y + \frac{3}{2}, -z + 2$.

Data collection: *SMART* (Bruker, 1999); cell refinement: *SAINT* (Bruker, 1999); data reduction: *SAINT*; program(s) used to solve structure: *SHELXS97* (Sheldrick, 2008); program(s) used to refine structure: *SHELXL97* (Sheldrick, 2008); molecular graphics: *SHELXTL* (Sheldrick, 2008); software used to prepare material for publication: *SHELXTL*.

NRV acknowledges a scholarship and financial support provided by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT: 101038) and the Programa en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Supplementary data and figures for this paper are available from the IUCr electronic archives (Reference: AA2037).

References

- Abdo, S., Bernardi, M., Marinoni, G., Mellerio, G., Samaniego, S., Vidari, G. & Vita Finzi, P. (1992). *Phytochemistry*, **31**, 3937–3941.
- Acevedo-Quiroz, N., Domínguez-Villegas, V. & Garduño-Ramírez, M. L. (2008). *Nat. Prod. Commun.* **3**, 313–317.
- Alarcón-Aguilar, F. J., Jiménez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R., González-Paredes, B., Contreras-Weber, C. C. & Roman-Ramos, R. (2000). *J. Ethnopharmacol.* **69**, 207–215.
- Allen, F. H., Kennard, O., Watson, D. G., Brammer, L., Orpen, A. G. & Taylor, R. (1987). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, pp. S1–19.
- Bohlmann, F., Knoll, K. H., Zedro, C., Mahanta, P. K., Grenz, M., Suwita, A., Ehlers, D., Le Van, N., Abraham, W. R. & Natsu, A. A. (1977). *Phytochemistry*, **16**, 965–985.
- Bruker (1999). *SMART* and *SAINT*. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Bye, R., Linares, E. & Estrada, H. (1995). *Phytochemistry of Medicinal Plants*, pp. 65–82. New York: Plenum Press.

Contreras-Weber, C., Perez-Gutierrez, S., Alarcón-Aguilar, F. J. & Roman-Ramos, R. (2002). *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **45**, 134–136.
Jimenez-Estrada, M., Reyes, R., Ramirez, T., Lledias, F., Hansberg, W., Arrieta, D. & Alarcón-Aguilar, F. J. (2006). *J. Ethnopharmacol.* **105**, 34–38.

Romo de Vivar, A., Pérez-Castorena, A. L., Arciniegas, A. & Villaseñor, J. L. (2007). *J. Mex. Chem. Soc.* **51**, 160–172.
Sheldrick, G. M. (2008). *Acta Cryst.* **A64**, 112–122.

supplementary materials

Acta Cryst. (2012). E68, o672-o673 [doi:10.1107/S1600536812004199]

14-Angeloyloxyacalohastine from *Psacalium peltatum*

Nadia Rojano-Vilchis, Simón Hernández-Ortega, Manuel Jimenez-Estrada and Armando Torres Avilez

Comment

The sesquiterpenes known as eremophilanes contain in its basis skeleton a decalin system and most of them are found as furanoeremophilanes (Romo de Vivar *et al.*, 2007). *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass., is an endemic medicinal plant, a member of matarique complex, widely distributed in the central part of Mexico. The roots of *P. peltatum* have been shown biological activities (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2000; Bye *et al.*, 1995; Contreras-Weber *et al.*, 2002). Sesquiterpenes as cacalol and cacalone, isolated from *P. decompositum*, have been shown a clear inhibition of edema with a dose dependent in anti-inflammatory effect using *in vivo* models (Jimenez-Estrada *et al.*, 2006). Even more, cacalone in a natural mixture with *epi*-cacalone reported the highest anti-inflammatory effect using *in vivo* 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) model (Acevedo-Quiroz, *et al.*, 2008). Although the title compound has been isolated from several species of *Senecio inaequidens*, *S. othonnae* (Bohlmann *et al.*, 1977) and *S. canescens* (Abdo *et al.*, 1992), no report on the crystal structure determination of this compound has appeared. Therefore, due to this lack of data, the *x*-ray crystal structure determination of 14-angeloyloxyacalohastine was made.

14-Angeloyloxyacalohastine (I) has a furanoeremophilane skeleton (Fig. 1). Bond lengths and angles in (I) exhibit normal values (Allen *et al.*, 1987). The structure is almost planar with C6 and C7 atoms out of the plane, forming a dihedral angle of 26.9 (1)° between central benzene ring and C4—C5—C6—C7 atoms. The angeloyloxy frame is almost perpendicular making a dihedral angle of 62.08 (2) to the furanoeremophilane skeleton. In absence of donor H atoms is noteworthy the fact that in the crystal structure, the molecules are linked by weak C—H···O intermolecular interaction (Table 1).

Experimental

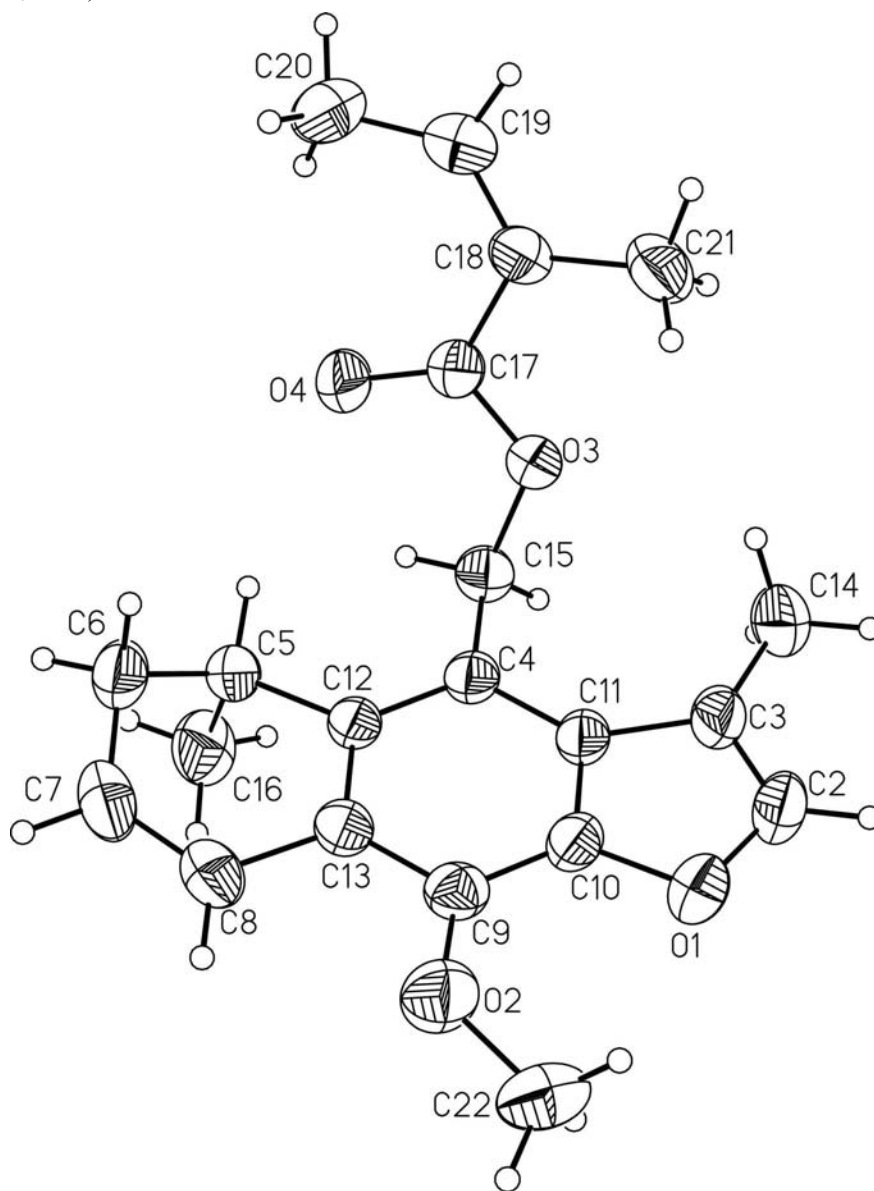
Roots of *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass., were collected from pine-oak forest of Mineral del Chico, Hidalgo, Mexico]. A voucher specimen was deposited at the National Herbarium (MEXU 1138692) of the Instituto de Biología, UNAM, Mexico. Air-dried and powdered roots of *P. peltatum* were sequentially extracted with *n*-hexane by exhaustive maceration (3 × 2 l), at room temperature. Hexane extract of roots from *P. peltatum*, was separated in a chromatographic column by elution with hexane - ethyl acetate in gradient mixture. 14-Angeloyloxyacalohastine was isolated from the fraction eluted by hexane.

Refinement

The positional parameters of H atoms were calculated geometrically (C—H = 0.93–0.98 Å). All H atoms were refined as riding with $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.5U_{\text{eq}}(\text{C})$ for methyl H-atoms and $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2U_{\text{eq}}(\text{C})$ for other H-atoms. The carbonyl oxygen is disordered and has been refined in two positions. The ratio of SOF is 76/24 for O4/O4A respectively. In absence of heavy atoms the absolute configuration was not determined and the Friedel pairs were merged.

Computing details

Data collection: *SMART* (Bruker, 1999); cell refinement: *SAINT* (Bruker, 1999); data reduction: *SAINT* (Bruker, 1999); program(s) used to solve structure: *SHELXS97* (Sheldrick, 2008); program(s) used to refine structure: *SHELXL97* (Sheldrick, 2008); molecular graphics: *SHELXTL* (Sheldrick, 2008); software used to prepare material for publication: *SHELXTL* (Sheldrick, 2008).

**Figure 1**

The structure of **I** with the numbering scheme. The thermal ellipsoids are drawn at 40% probability level. The disordered O4A atom was omitted for clarity.

(9-methoxy-3,5-dimethyl-5,6-dihydronaphtho[2,3-*b*]furan-4-yl)methyl 2-methylbut-2-enoate

Crystal data

$C_{21}H_{24}O_4$	$F(000) = 728$
$M_r = 340.40$	$D_x = 1.248 \text{ Mg m}^{-3}$
Orthorhombic, $P2_12_12_1$	Mo $K\alpha$ radiation, $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$
Hall symbol: P 2ac 2ab	Cell parameters from 9953 reflections
$a = 7.1627 (17) \text{ \AA}$	$\theta = 2.6\text{--}25.1^\circ$
$b = 10.276 (2) \text{ \AA}$	$\mu = 0.09 \text{ mm}^{-1}$
$c = 24.605 (6) \text{ \AA}$	$T = 298 \text{ K}$
$V = 1811.1 (7) \text{ \AA}^3$	Prism, colourless
$Z = 4$	$0.40 \times 0.40 \times 0.40 \text{ mm}$

Data collection

Bruker SMART APEX CCD area-detector diffractometer	1945 independent reflections
Radiation source: fine-focus sealed tube	1701 reflections with $I > 2\sigma(I)$
Graphite monochromator	$R_{\text{int}} = 0.037$
Detector resolution: 0.83 pixels mm^{-1}	$\theta_{\text{max}} = 25.4^\circ$, $\theta_{\text{min}} = 2.2^\circ$
ω scans	$h = -8 \rightarrow 8$
20061 measured reflections	$k = -12 \rightarrow 12$
	$l = -29 \rightarrow 29$

Refinement

Refinement on F^2	Secondary atom site location: difference Fourier map
Least-squares matrix: full	Hydrogen site location: inferred from neighbouring sites
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.035$	H-atom parameters constrained
$wR(F^2) = 0.095$	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0598P)^2]$
$S = 1.12$	where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
1945 reflections	$(\Delta/\sigma)_{\text{max}} = 0.001$
241 parameters	$\Delta\rho_{\text{max}} = 0.15 \text{ e \AA}^{-3}$
21 restraints	$\Delta\rho_{\text{min}} = -0.15 \text{ e \AA}^{-3}$
Primary atom site location: structure-invariant direct methods	

Special details

Geometry. All s.u.'s (except the s.u. in the dihedral angle between two l.s. planes) are estimated using the full covariance matrix. The cell s.u.'s are taken into account individually in the estimation of s.u.'s in distances, angles and torsion angles; correlations between s.u.'s in cell parameters are only used when they are defined by crystal symmetry. An approximate (isotropic) treatment of cell s.u.'s is used for estimating s.u.'s involving l.s. planes.

Refinement. Refinement of F^2 against ALL reflections. The weighted R -factor wR and goodness of fit S are based on F^2 , conventional R -factors R are based on F , with F set to zero for negative F^2 . The threshold expression of $F^2 > \sigma(F^2)$ is used only for calculating R -factors(gt) etc. and is not relevant to the choice of reflections for refinement. R -factors based on F^2 are statistically about twice as large as those based on F , and R -factors based on ALL data will be even larger.

Fractional atomic coordinates and isotropic or equivalent isotropic displacement parameters (\AA^2)

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	$U_{\text{iso}}^*/U_{\text{eq}}$	Occ. (<1)
O1	0.2416 (2)	0.31693 (16)	0.75432 (6)	0.0714 (5)	
O2	-0.0374 (2)	0.52184 (18)	0.78161 (7)	0.0781 (5)	
O3	0.6537 (2)	0.35107 (13)	0.92670 (5)	0.0575 (4)	
C2	0.4000 (4)	0.2430 (2)	0.75866 (9)	0.0744 (7)	
H2	0.4239	0.1717	0.7364	0.089*	
C3	0.5167 (3)	0.2821 (2)	0.79734 (9)	0.0609 (6)	

C4	0.4777 (3)	0.48417 (18)	0.86340 (7)	0.0474 (5)	
C5	0.3937 (4)	0.6883 (2)	0.91708 (8)	0.0600 (6)	
H5	0.4798	0.6518	0.9440	0.072*	
C6	0.2181 (4)	0.7334 (2)	0.94676 (10)	0.0741 (7)	
H6A	0.1798	0.6668	0.9723	0.089*	
H6B	0.2463	0.8117	0.9672	0.089*	
C7	0.0626 (4)	0.7604 (2)	0.90877 (11)	0.0724 (7)	
H7	-0.0248	0.8239	0.9176	0.087*	
C8	0.0457 (3)	0.6957 (2)	0.86251 (10)	0.0618 (6)	
H8	-0.0526	0.7154	0.8392	0.074*	
C9	0.1341 (3)	0.5079 (2)	0.80519 (8)	0.0529 (5)	
C10	0.2624 (3)	0.4122 (2)	0.79325 (7)	0.0521 (5)	
C11	0.4302 (3)	0.39708 (18)	0.82102 (7)	0.0487 (5)	
C12	0.3504 (3)	0.58296 (18)	0.87563 (7)	0.0464 (5)	
C13	0.1786 (3)	0.59388 (19)	0.84724 (7)	0.0500 (5)	
C14	0.6933 (4)	0.2148 (3)	0.81219 (10)	0.0830 (8)	
H14A	0.7065	0.1375	0.7907	0.124*	
H14B	0.6903	0.1919	0.8500	0.124*	
H14C	0.7971	0.2717	0.8055	0.124*	
C15	0.6592 (3)	0.4671 (2)	0.89264 (8)	0.0561 (5)	
H15A	0.7597	0.4593	0.8664	0.067*	
H15B	0.6836	0.5429	0.9150	0.067*	
C16	0.4913 (4)	0.8027 (2)	0.88907 (12)	0.0783 (8)	
H16A	0.4144	0.8343	0.8600	0.117*	
H16B	0.6091	0.7743	0.8747	0.117*	
H16C	0.5116	0.8712	0.9150	0.117*	
C17	0.6327 (3)	0.3665 (2)	0.97976 (9)	0.0557 (5)	
O4	0.5953 (19)	0.4714 (3)	0.99988 (18)	0.074 (2)	0.76 (3)
O4A	0.697 (5)	0.4664 (12)	0.9991 (6)	0.071 (4)	0.24 (3)
C18	0.6328 (3)	0.2407 (2)	1.00916 (8)	0.0562 (5)	
C19	0.6373 (3)	0.2364 (2)	1.06292 (10)	0.0677 (6)	
H19	0.6366	0.1532	1.0778	0.081*	
C20	0.6433 (5)	0.3438 (3)	1.10315 (9)	0.0836 (8)	
H20A	0.5185	0.3719	1.1111	0.125*	
H20B	0.7133	0.4153	1.0885	0.125*	
H20C	0.7021	0.3138	1.1359	0.125*	
C21	0.6300 (4)	0.1180 (2)	0.97545 (11)	0.0767 (7)	
H21A	0.6139	0.0440	0.9988	0.115*	
H21B	0.7457	0.1099	0.9561	0.115*	
H21C	0.5285	0.1219	0.9500	0.115*	
C22	-0.0716 (4)	0.4709 (3)	0.72916 (10)	0.0860 (8)	
H22A	-0.0871	0.3783	0.7314	0.129*	
H22B	0.0322	0.4906	0.7059	0.129*	
H22C	-0.1830	0.5093	0.7146	0.129*	

Atomic displacement parameters (\AA^2)

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{12}	U^{13}	U^{23}
O1	0.0921 (12)	0.0633 (10)	0.0588 (9)	0.0009 (10)	-0.0122 (9)	-0.0173 (8)
O2	0.0667 (10)	0.0908 (12)	0.0767 (11)	0.0047 (10)	-0.0186 (9)	-0.0119 (10)

O3	0.0778 (9)	0.0467 (7)	0.0479 (7)	0.0093 (8)	-0.0067 (8)	0.0009 (6)
C2	0.111 (2)	0.0586 (14)	0.0541 (13)	0.0083 (16)	0.0060 (14)	-0.0168 (11)
C3	0.0824 (15)	0.0526 (12)	0.0477 (11)	0.0086 (12)	0.0124 (11)	-0.0027 (10)
C4	0.0607 (12)	0.0424 (10)	0.0390 (10)	-0.0013 (10)	0.0045 (9)	0.0044 (8)
C5	0.0849 (16)	0.0449 (11)	0.0501 (11)	0.0098 (12)	-0.0100 (11)	-0.0052 (9)
C6	0.115 (2)	0.0514 (13)	0.0554 (12)	0.0123 (14)	0.0105 (13)	-0.0075 (11)
C7	0.0786 (16)	0.0509 (13)	0.0878 (18)	0.0144 (14)	0.0141 (14)	-0.0071 (13)
C8	0.0660 (14)	0.0470 (11)	0.0724 (14)	0.0065 (12)	0.0023 (12)	0.0059 (11)
C9	0.0608 (12)	0.0493 (11)	0.0486 (10)	-0.0041 (11)	-0.0022 (10)	0.0068 (9)
C10	0.0702 (13)	0.0453 (11)	0.0407 (9)	-0.0046 (11)	0.0000 (10)	-0.0025 (9)
C11	0.0669 (12)	0.0402 (10)	0.0389 (9)	0.0001 (10)	0.0074 (9)	0.0027 (8)
C12	0.0636 (12)	0.0372 (9)	0.0385 (9)	-0.0001 (10)	0.0013 (9)	0.0035 (8)
C13	0.0648 (12)	0.0396 (10)	0.0455 (10)	-0.0014 (10)	0.0036 (10)	0.0069 (8)
C14	0.101 (2)	0.0752 (17)	0.0732 (16)	0.0340 (16)	0.0106 (15)	-0.0099 (13)
C15	0.0649 (12)	0.0520 (12)	0.0514 (11)	0.0023 (12)	0.0032 (10)	0.0045 (10)
C16	0.0901 (18)	0.0530 (13)	0.0918 (18)	-0.0111 (14)	-0.0088 (15)	-0.0155 (13)
C17	0.0678 (13)	0.0483 (12)	0.0509 (11)	0.0002 (11)	-0.0043 (11)	-0.0024 (9)
O4	0.123 (6)	0.0456 (13)	0.0548 (15)	0.0098 (19)	0.006 (2)	-0.0040 (11)
O4A	0.105 (11)	0.050 (4)	0.059 (5)	0.003 (6)	-0.020 (6)	-0.009 (4)
C18	0.0589 (13)	0.0493 (11)	0.0603 (13)	0.0018 (11)	-0.0077 (10)	0.0068 (10)
C19	0.0669 (14)	0.0678 (14)	0.0685 (14)	0.0039 (13)	-0.0034 (12)	0.0160 (12)
C20	0.099 (2)	0.0994 (19)	0.0529 (13)	0.0107 (19)	-0.0019 (14)	0.0008 (13)
C21	0.0969 (19)	0.0458 (13)	0.0873 (16)	0.0053 (13)	-0.0173 (16)	0.0029 (12)
C22	0.0881 (18)	0.105 (2)	0.0646 (14)	-0.0133 (19)	-0.0220 (14)	0.0098 (14)

Geometric parameters (Å, °)

O1—C2	1.370 (3)	C10—C11	1.392 (3)
O1—C10	1.378 (2)	C12—C13	1.420 (3)
O2—C9	1.366 (3)	C14—H14A	0.9600
O2—C22	1.414 (3)	C14—H14B	0.9600
O3—C17	1.324 (2)	C14—H14C	0.9600
O3—C15	1.458 (2)	C15—H15A	0.9700
C2—C3	1.329 (3)	C15—H15B	0.9700
C2—H2	0.9300	C16—H16A	0.9600
C3—C11	1.456 (3)	C16—H16B	0.9600
C3—C14	1.487 (4)	C16—H16C	0.9600
C4—C12	1.397 (3)	C17—O4	1.216 (3)
C4—C11	1.415 (3)	C17—O4A	1.221 (8)
C4—C15	1.497 (3)	C17—C18	1.481 (3)
C5—C12	1.519 (3)	C18—C19	1.324 (3)
C5—C6	1.527 (4)	C18—C21	1.510 (3)
C5—C16	1.532 (4)	C19—C20	1.483 (4)
C5—H5	0.9800	C19—H19	0.9300
C6—C7	1.480 (4)	C20—H20A	0.9600
C6—H6A	0.9700	C20—H20B	0.9600
C6—H6B	0.9700	C20—H20C	0.9600
C7—C8	1.324 (3)	C21—H21A	0.9600
C7—H7	0.9300	C21—H21B	0.9600
C8—C13	1.463 (3)	C21—H21C	0.9600

C8—H8	0.9300	C22—H22A	0.9600
C9—C10	1.377 (3)	C22—H22B	0.9600
C9—C13	1.397 (3)	C22—H22C	0.9600
C2—O1—C10	104.50 (17)	C3—C14—H14B	109.5
C9—O2—C22	120.3 (2)	H14A—C14—H14B	109.5
C17—O3—C15	118.19 (16)	C3—C14—H14C	109.5
C3—C2—O1	114.2 (2)	H14A—C14—H14C	109.5
C3—C2—H2	122.9	H14B—C14—H14C	109.5
O1—C2—H2	122.9	O3—C15—C4	110.43 (18)
C2—C3—C11	105.3 (2)	O3—C15—H15A	109.6
C2—C3—C14	124.8 (2)	C4—C15—H15A	109.6
C11—C3—C14	129.9 (2)	O3—C15—H15B	109.6
C12—C4—C11	117.49 (19)	C4—C15—H15B	109.6
C12—C4—C15	123.27 (18)	H15A—C15—H15B	108.1
C11—C4—C15	119.24 (19)	C5—C16—H16A	109.5
C12—C5—C6	111.7 (2)	C5—C16—H16B	109.5
C12—C5—C16	109.76 (18)	H16A—C16—H16B	109.5
C6—C5—C16	111.0 (2)	C5—C16—H16C	109.5
C12—C5—H5	108.1	H16A—C16—H16C	109.5
C6—C5—H5	108.1	H16B—C16—H16C	109.5
C16—C5—H5	108.1	O4—C17—O3	122.2 (3)
C7—C6—C5	112.01 (19)	O4A—C17—O3	116.2 (10)
C7—C6—H6A	109.2	O4—C17—C18	125.1 (3)
C5—C6—H6A	109.2	O4A—C17—C18	122.9 (6)
C7—C6—H6B	109.2	O3—C17—C18	112.17 (19)
C5—C6—H6B	109.2	C19—C18—C17	121.1 (2)
H6A—C6—H6B	107.9	C19—C18—C21	121.5 (2)
C8—C7—C6	121.2 (2)	C17—C18—C21	117.43 (18)
C8—C7—H7	119.4	C18—C19—C20	130.0 (2)
C6—C7—H7	119.4	C18—C19—H19	115.0
C7—C8—C13	121.4 (2)	C20—C19—H19	115.0
C7—C8—H8	119.3	C19—C20—H20A	109.5
C13—C8—H8	119.3	C19—C20—H20B	109.5
O2—C9—C10	125.7 (2)	H20A—C20—H20B	109.5
O2—C9—C13	116.9 (2)	C19—C20—H20C	109.5
C10—C9—C13	117.22 (19)	H20A—C20—H20C	109.5
O1—C10—C9	125.70 (19)	H20B—C20—H20C	109.5
O1—C10—C11	110.82 (18)	C18—C21—H21A	109.5
C9—C10—C11	123.45 (19)	C18—C21—H21B	109.5
C10—C11—C4	119.90 (19)	H21A—C21—H21B	109.5
C10—C11—C3	105.17 (19)	C18—C21—H21C	109.5
C4—C11—C3	134.9 (2)	H21A—C21—H21C	109.5
C4—C12—C13	121.13 (17)	H21B—C21—H21C	109.5
C4—C12—C5	121.96 (19)	O2—C22—H22A	109.5
C13—C12—C5	116.80 (18)	O2—C22—H22B	109.5
C9—C13—C12	120.79 (19)	H22A—C22—H22B	109.5
C9—C13—C8	119.6 (2)	O2—C22—H22C	109.5
C12—C13—C8	119.60 (18)	H22A—C22—H22C	109.5

C3—C14—H14A 109.5 H22B—C22—H22C 109.5

Hydrogen-bond geometry (Å, °)

<i>D—H...A</i>	<i>D—H</i>	<i>H...A</i>	<i>D...A</i>	<i>D—H...A</i>
C15—H15A...O2 ⁱ	0.97	2.62	3.536 (3)	157
C6—H6B...O4 ⁱⁱ	0.97	2.61	3.42	142

Symmetry codes: (i) $x+1, y, z$; (ii) $x-1/2, -y+3/2, -z+2$.

Crystal Structure of Maturin acetate from *Psacalium peltatum* (Kunth) (*matarique*)

Nadia ROJANO-VILCHIS, Simón HERNÁNDEZ-ORTEGA,[†] Manuel JIMENEZ-ESTRADA, and Armando TORRES-AVILEZ

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México circuito exterior, ciudad universitaria, México 04510, México, D.F, México

Maturin acetate is a furanoeremophilane natural product compound (C₁₈H₁₆O₅) (4-formyl-9-methoxy-5-methyl-naphtho[2,3-b]furan-3-yl)methyl acetate (**I**), was isolated from *Psacalium peltatum* (Kunth), named *matarique*. The crystal has a monoclinic system, space group *P2₁/c*, *Z* = 4; the unit cell dimensions are: *a* = 19.205(3) Å, *b* = 10.356(2) Å, *c* = 7.695(1) Å, β = 97.236(3)°. The structure is essentially planar; the molecules in the crystal are joined by a weak interaction C-H...O and π - π stacking.

(Received May 26, 2012; Accepted June 30, 2012; Published on web October 10, 2012)

Psacalium peltatum (Kunth) Cass. is an endemic medicinal plant member of the *matarique* complex, widely distributed in the central part of Mexico. The roots of *P. peltatum* have been employed as alcoholic maceration to treat conditions that induce inflammation from such as wounds, skin ulcers and rheumatism.¹ Our research has shown that furanoeremophilane-type sesquiterpene, maturin acetate (**I**) is the main constituent of this resin. Although maturin acetate has been isolated as the most abundant natural product in of Mexican species, such as *P. beamanii*,² *Roldana angulifolia*,³ and *Trichilia cuneata*,⁴ no report on the crystal structure determination of this compound has appeared. Therefore, due to this lack of data and x-ray studies, the crystal structure determination of maturin acetate was undertaken.

Roots of *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass., were collected from a pine-oak forest of Mineral del Chico, Hidalgo, Mexico, [20°09'55" N and 98°45'08" W]. A voucher specimen was deposited at the National Herbarium (MEXU 1138692) of the Institute of Biology, UNAM, Mexico. Air-dried and powdered roots (4.381 kg) of *P. peltatum* were sequentially extracted with hexane by exhaustive maceration (3 times \times 2 L), at room temperature. Hexane extract of roots from *P. peltatum*, was separated in a column chromatographic process and eluted

with hexane-ethyl acetate in a mixture gradient, from fraction (98:2) eluted of hexane-ethyl acetate was isolated Maturin acetate and their spectroscopic features were compare with the described data.^{5,6}

A yellow crystal prism was mounted on a glass fiber. The X-ray intensity data were measured at 298 K on a Bruker Smart

Table 1 Crystal and experimental data

Chemical formula	C ₁₈ H ₁₆ O ₅
Formula weight	312.31
Temperature	298(2)K
Crystal system	Monoclinic
Space group	<i>P2₁/c</i>
Cell dimensions	<i>a</i> = 19.205(3) Å <i>b</i> = 10.356(2) Å <i>c</i> = 7.695(1) Å β = 97.236(3)°
Volume	1518.3(4) Å ³
<i>Z</i>	4
<i>D_x</i>	1.366 Mg/m ³
Radiation	0.71073 Å
μ (Mo <i>Kα</i>)	0.100 mm ⁻¹
<i>F</i> (0 0 0)	656
Crystal size	0.31 \times 0.12 \times 0.05 mm
No. of reflections collected	12272
No. of Independent reflections	2800
θ range for data collection	2.14 to 25.39°
Data/restraints/parameters	2800/0/211
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	0.821
Final <i>R</i> indices [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> 1 = 0.0466, <i>wR</i> 2 = 0.0891
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> 1 = 0.1129, <i>wR</i> 2 = 0.1008
(Δ / σ) _{max}	0.036
($\Delta\rho$) _{max}	0.192
($\Delta\rho$) _{min}	-0.219 e. Å ⁻³
Measurement	Bruker Smart APEX AXS CCD area detector/
Program System	Smart
Structure Determination	SHELXS-97
Refinement	SHELXL-97
CCDC deposition number	882591

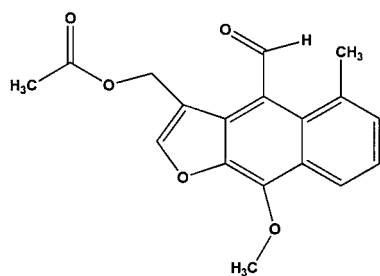


Fig. 1 Scheme diagram.

[†] To whom correspondence should be addressed.
E-mail: shernandezortega@gmail.com

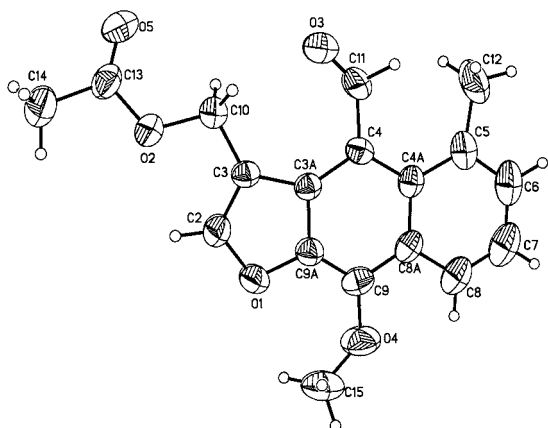


Fig. 2 Maturin acetate structure showing the atomic numbering scheme. The thermal ellipsoids are drawing at 40% of probability.

Apex diffractometer with a CCD area detector system equipped with Mo K_{α} radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). The Maturin acetate ($C_{18}H_{16}O_5$) crystallized in a monoclinic system. A total of 1800 frames were collected with a scan width of 0.3° in ω and an exposure time of 10 s/frame. The frames were integrated with the Bruker Saint software package,⁷ using a monoclinic unit cell. A total of 12272 reflections were collected in a range of $2.14 \geq \theta > 25.39^{\circ}$, of which 2800 ($R_{\text{int}} = 0.074$) reflections with $I > 2\sigma(I)$ were independent. The structure was solved by direct methods using the SHELXS-97 program.⁸ A least-squares refinement was based on the full matrix was carried out using the SHELXL-97 program.⁸ The non-hydrogen atoms were refined with anisotropic thermal parameters. Hydrogen atoms were input at calculated positions, and allowed to ride on the atoms to which they became attached. The isotropic thermal parameters were refined for H-atoms using a $U_{\text{eq}} = 1.2$ times the atom to which they are attached. The goodness-of-fit on F^2 was 0.821. The final indices were $R_1 = 0.0466$, $wR_2 = 0.089$ [$I > 2\sigma(I)$]. Crystallographic data (excluding structure factors) for maturin acetate were deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center as supplementary publication No. CCDC 882591.

Figure 2 shows an ORTEP drawing of Maturin acetate with thermal ellipsoids drawn at 40% probability. Details of the crystal and refinement are given in Table 1. The final atomic

coordinates and equivalent thermal parameters for all non-hydrogen atoms are given in Table S1. The bond distances and bond angles for all non-hydrogen atoms are given in Table S2. Hydrogen coordinates are given in Table S3.

Maturin acetate has a furanoeremophilane skeleton (Fig. 1) and the structure is essentially planar [O1-C9 atoms $0.0126(21) \text{ \AA}$]; the acetate group rotates around the C10-O2 bond by $15.4(1)^{\circ}$ and the formyl group forms a dihedral angle of $9.4(2)^{\circ}$ with a planar structure. The bond lengths and angles in the maturin acetate exhibit normal values.⁹ The compound in the crystal is stabilized by weak inter-molecular interaction C-H \cdots O (C=O-H-C) and type π - π .

Acknowledgments

N. A. Rojano-Vilchis acknowledges scholarship and financial support provided by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT: 101038), and Programa en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Thanks are given to the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) of Spain for the award of a licence for the use of the Cambridge Crystallographic Data Base (CSD).

References

1. R. Bye, E. Linares, and H. Estrada, *Phytochemistry of Medicinal Plants.*, **1995**, Plenum Press New York., p. 65.
2. A. L. Perez, A. Arciniega, J. L. Villaseñor, and A. Romo de Vivar, *Rev. Soc. Quím. Méx.*, **2004**, *48*, 21.
3. A. Arciniegas, A. L. Pérez, J. L. Villaseñor, and A. Romo de Vivar, *J. Nat. Prod.*, **2006**, *69*, 1826.
4. M. Doe, Y. Hirai, T. Kinoshita, K. Shibata, H. Haraguchi, and Y. Morimoto, *Chem. Lett.*, **2004**, *33*, 714.
5. J. Correa and J. Romo, *Tetrahedron*, **1966**, *22*, 685.
6. F. Bohlmann, C. Zdero, and M. Grenz, *Chem. Ber.*, **1977**, *110*, 474.
7. Bruker (2007). SAINT & SMART. Bruker AXS Inc. Madison, Wisconsin, USA.
8. G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.*, **2008**, *A64*, 112.
9. F. H. Allen, O. Kennard, D. G. Watson, L. Brammer, A. G. Orpen, and R. Taylor, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1987**, *2*, p. S1.