



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Estudio Fitoquímico de *Roldana lineolata*

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
Q. Jhon Ironzi Maldonado Rodríguez



TUTOR: DR. ALFONSO ROMO DE VIVAR ROMO

AÑO: 2006

Este trabajo se realizó en el laboratorio 2-7 del Instituto de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. ALFONSO ROMO DE VIVAR ROMO y con el apoyo financiero de la beca otorgada por la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) y la beca otorgada por el Sistema Nacional de Investigadores (SNI)



AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo** y la **Maestra Amira Arciniegas Arciniegas** del Instituto de Química de la UNAM.

A las Maestras **Ana Lidia Pérez Castorena** y **Emma Maldonado Jiménez** del Instituto de Química de la UNAM.

A la **QFB Josefina Tenopala**, y todo el grupo de la dirección y secretaria del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM

A Dr. Raymundo Cea Olivares, director **del Instituto de química** de la UNAM

Al **Dr. Guillermo Ávila** de la Fes-Iztacala y a la **Dra. Ana Luisa Anaya Lang** del Instituto de Ecología de la UNAM.

A la **Bióloga Blanca Estela Hernández** del laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología.

A **Don Jesús Martínez García** y el **personal de biblioteca**

A **Doña Celia Sánchez** del Instituto de Química de la UNAM

Al **personal de espectroscopia** del Instituto de Química

A **todo el personal del posgrado** en Ciencias Químicas, del Instituto de Química, y de la sección de control escolar de la Facultad de Química de la UNAM.

A **mis compañeros y amigos** de la UNAM.

A **mis padres Gilma Rodríguez Ortega** y **José Del Carmen Maldonado Sáenz**.

A **la DGEP**: Dirección General de Estudios de Posgrado por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

A **el SNI**: Sistema Nacional de Investigadores, por su apoyo económico del cual fui partícipe como ayudante investigador nivel III a través del Dr. Alfonso Romo de Vivar y por lo cual estoy enteramente agradecido.

GRACIAS MÉXICO



CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	4
Familia Asteraceae	4
Descripción morfológica de la familia Asteraceae	4
Química de la familia Asteraceae	5
Tribu Senecioneae	6
Género <i>Roldana</i>	7
Morfología General	8
Distribución del Género	8
Química del Género <i>Roldana</i>	10
Biogénesis de lactonas sesquiterpénicas	13
Biosíntesis de flavonoides	16
<i>Roldana lineolata</i>	18
PARTE EXPERIMENTAL	19
Equipo utilizado	19
Material Vegetal	20
Preparación de extractos	20
Fraccionamiento de los extractos	21
Preparación de derivados	26
Pruebas de actividad biológica	30
RESULTADOS	37
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
RESUMEN	67
CONCLUSIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	69
ESPECTROS	74

INTRODUCCIÓN

Dentro del contexto histórico de la humanidad, existen relatos que muestran el uso que el hombre ha dado a las plantas en la cura de muchas enfermedades, sin embargo, sólo hasta comienzos del siglo XIX se aisló en forma pura un compuesto bioactivo, la morfina proveniente del opio.¹

Desde entonces ha habido un gran interés en la búsqueda de nuevos compuestos naturales bioactivos, adquiriendo importancia indiscutible los países con una gran diversidad como México, Colombia, Brasil, Zaire, Madagascar, Indonesia, China, Ecuador, Kenia, Perú, África del Sur, India y Venezuela.²

Con el desarrollo de las técnicas analíticas de alta resolución el aislamiento y la caracterización estructural de nuevas sustancias se ha hecho más rápido y eficiente, lo cual ha permitido ahondar en otras áreas no solo de interés farmacológico, sino también, desde el punto de vista de las correlaciones quimiotaxonómicas con base en una serie de metabolitos característicos para una familia, un género o una especie en particular.

Siguiendo este orden de ideas, el género *Roldana* constituye una clase de interés fotoquímico, por tratarse en primer lugar de un género con un número limitado de especies, siendo 48 en total, todas ellas distribuidas en territorio mexicano y de las cuales sólo seis se han estudiado químicamente. En segundo lugar, las especies de este género fueron segregadas del género *Senecio* de acuerdo a criterios taxonómicos³ lo cual nos induce a llevar a cabo estudios fitoquímicos en aras de establecer si existe o no alguna diferencia entre las especies del género *Roldana* y las especies del género *Senecio* desde el punto de vista quimiotaxonómico.

Adicionalmente, muchas especies del género *Senecio*, se utilizaron en la medicina tradicional para el tratamiento de varias enfermedades como es el caso de las infecciones de la piel, por citar sólo una de ellas. Aunque por otro lado, numerosas intoxicaciones, tanto de animales como de personas, han sido atribuidas a la presencia de alcaloides pirrolizidínicos característicos de dicho género.⁴ Por tal motivo, es de interés también, establecer algún tipo de actividad biológica de los metabolitos del género *Roldana* y la existencia o no de alcaloides pirrolizidínicos dada su cercanía con el género *Senecio*.

Como parte de los estudios sistemáticos que se han venido realizando en el Instituto de Química de la UNAM sobre la química del género *Roldana* y como contribución al establecimiento de un patrón quimiotaxonómico entre sus especies, en el presente trabajo se describe el estudio fitoquímico de *Roldana lineolata* y los resultados de la actividad biológica de los metabolitos aislados y de algunos de sus derivados.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- * Contribuir al estudio fitoquímico de las especies del género *Roldana*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * Aislar, purificar e identificar los principales metabolitos secundarios de *Roldana lineolata*
- * Realizar pruebas de actividad biológica de los metabolitos aislados
- * Establecer una relación quimiotaxonómica de las especies del género *Roldana*

MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

FAMILIA ASTERACEAE:

La familia Asteraceae, también llamada Compositae, se divide en 13 tribus,⁵ y se encuentra ampliamente distribuida en México contando con un gran número de géneros y especies. Varios autores estiman que la familia comprende entre 1100 y 1300 géneros y entre 25.000 y 30.000 especies distribuidas en todos los continentes excepto la Antártida.⁵ Se estima que por lo menos 3000 especies ocurren en territorio mexicano,^{5,8} siendo por lo tanto la mas ampliamente representada en México como se ilustra en los cuadros 1⁷ y 2⁵. Es interesante observar que 27 de los 32 estados de la república mexicana tienen elementos de la familia restringidos a su territorio.

Familia	Géneros	Familia	Géneros
Asteraceae	362	Euphorbiaceae	44
Poaceae	166	Apiaceae	37
Orchidaceae	157	Bignoniaceae	36
Fabaceae	92	Apocynaceae	34
Rubiaceae	92	Mimosaceae	34
Cactaceae	72	Cucurbitaceae	34
Scrophulariaceae	55	Solanaceae	33
Malvaceae	52	Lamiaceae	31
Acanthaceae	47	Rosaceae	30
Brassicaceae	47		

Cuadro 1: Familias de plantas Vasculares de México con mayor número de géneros.

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LA FAMILIA ASTERACEAE

Los miembros de esta familia son plantas herbáceas o arbustivas, rara vez arbóreas o trepadoras, y se pueden reconocer por sus inflorescencias primarias (capítulos), constituidas por una cabezuela pseudántica, flores gamopétalas, cáliz ausente o

modificado y estambres singenésicos.⁶ Sus frutos tienen forma de aquenio llevando en ocasiones en su extremo superior un vilano.

TRIBUS	GENEROS	ESPECIES	VARIETADES O SUBESPECIES	TOTAL
Anthemideae	13	26	1	27
Astereae	38	338	42	380
Calenduleae	1	1	0	1
Cardueae	4	47	2	49
Eupatorieae	61	589	51	640
Heliantheae	171	1175	180	1355
Inuleae	15	70	3	73
Lactuceae	25	75	6	81
Liabeae	3	23	0	23
Mutisieae	8	90	11	101
Senecioneae	19	228	15	243
Tageteae	19	128	20	148
Vernonieae	10	71	11	82
TOTAL	387	2861	342	3203

Cuadro 2: Número de géneros, especies y variedades o subespecies de asteráceas presentes en México y su distribución.

QUÍMICA DE LA FAMILIA ASTERACEAE

En relación a la composición química de las asteráceas, varias clases de metabolitos están presentes, entre los que cabe mencionar las lactonas sesquiterpénicas que se manifiestan mayoritariamente en la familia.¹⁰ Adicionalmente, se encuentran también compuestos acetilénicos, ácidos grasos, fructosanos, ésteres del ácido cafeico, aceites esenciales, entre otros (Cuadro 3).

Clase de compuesto	Localización
<u>Presentes en todas las tribus</u>	
Fructosanos tipo inulina	En órganos de almacenamiento
Ácidos grasos característicos	En semilla
Lactonas sesquiterpénicas	Principalmente en hojas
Alcoholes triterpénicos pentacíclicos	En pericarpios de frutas
Ésteres del ácido cafeico	En hojas. La cinarina es diurética
Flavonoides metilados	En hojas y flores (pigmentos amarillos)
<u>Presentes en la mayoría de tribus</u>	
Compuestos acetilénicos	En raíces y hojas
Aceites esenciales	En hojas y frutas
Ciclitoles	En hojas
Cumarinas	En hojas y flores
<u>Presentes en pocas tribus</u>	
Caucho de poliisopreno	En raíces y tallo
Alcaloides pirrolizidínicos	En hojas ⁴
Ácidos triterpénicos	En flores y hojas (libres o con azúcares)
Diterpenos	En todos los tejidos
Glicósidos cianogénicos	En hojas y frutos
Cromenos	En hojas y raíces
Amidas de ácidos grasos	En raíces (insecticidas).

Cuadro 3: Patrón Químico de la Familia Compositae

TRIBU SENECTIONEAE

Esta tribu es considerada como un grupo monofilético. Para 1873, Bentham reconocía 4 subtribus que fueron: Senecioneae, Liabinae, Tussilaginatae y Othonninae. Para 1977 se propuso dividir a la tribu Senecioneae en dos subtribus: Senecioninae y

Blennospermatinae.^{9,11,12} La primera incluía las subtribus Tussilagininae y Othonninae; y la segunda incluía todos aquellos géneros con afinidades taxonómicas poco precisas. Actualmente, la tribu Senecioneae se divide en dos subtribus, Senecioninae y Tussilagininae.³

La tribu Senecioneae está constituida por especies arbóreas, arbustos y hierbas que pueden ser perennes o anuales, con tallos lisos o variadamente pubescentes. Sus hojas pueden ser alternas y algunas veces opuestas o rosuladas, sésiles o pecioladas, aunque algunas veces peltadas (unidas directamente).

En términos de citotaxonomía, el número más frecuente de cromosomas son múltiplos de 10, aunque aún no se conocen para todos los géneros de la tribu Senecioneae.

GENERO ROLDANA

En 1901, J. M., Greenman³, hizo una monografía de las especies del género *Senecio* de América del Norte y de América Central, dividiendo al género en 22 secciones, entre las que se encontraba la sección Fruticossi y la denominada sección Palmatinervii que para ese entonces no estaba completa; hasta que para el año de 1968, Gibson finalmente la completa.

Posteriormente, en el año de 1974, Robinson y Brettell³ reconocieron la sección Palmatinervii como un género distinto bajo el nombre de *Roldana*, e incluyeron en este nuevo género parte de la sección Fruticossi, todo el género pericalia y la especie *Senecio heteroidea*. Por último, para el año de 1996, Barkley, Clark, y Funston³ perfilan al género *Roldana* como un género segregado de *Senecio* y de *Cacalia* y lo ubican dentro de la subtribu Tussilagininae con 48 especies en total. Es de notarse que el suelo mexicano es rico en especies del género *Roldana*.⁷

MORFOLOGÍA GENERAL

Dentro del género *Roldana*, se pueden encontrar especies herbáceas ramificadas y perennes de 1 m de alto o más bajas. También las hay herbáceas erectas, de un solo tallo o grupo de tallos débilmente leñosos hacia la base, que pueden crecer hasta 4 m de altura. También se pueden encontrar arbustos o especies casi arbóreas con tallos ramificados, solitarios o agrupados.

Por otro lado, la corteza de las especies arbóreas es lisa con algunas fisuras, y la de las especies arbustivas y herbáceas es roja o verde crema, con una textura que va desde lisa hasta vellosa.

Se caracterizan por poseer un caudex típicamente vellosa y propagado de rizomas. Con excepción de *R. acutangula* y *R. hatwegii*, la forma es típicamente redonda. En términos de citotaxonomía, se sabe que el género *Roldana* presenta un número alto de cromosomas ($X=30$).¹¹

DISTRIBUCIÓN DEL GENERO

Las especies de *Roldana* se distribuyen desde el extremo sur de Arizona y Nuevo México en los E.UA., hasta la cordillera de Talamanca en Panamá. Se encuentran en bosques de pino encino entre los 2000 y 4000 m de altitud aunque también han sido encontradas especies a alturas tan bajas como los 900 m³. En México existen 8 regiones fisiogeográficas de distribución de *Roldana*: Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, Sierra Madre del Sur, Sierras de Chiapas y Guatemala, Mesa del Centro, Eje Neovolcánico, Llanura Costera del Sur del Golfo y Cordillera Centroamericana (**Figura 1**).



<u>Sierra Madre Occidental:</u>	<u>Sierra Madre Oriental</u>		<u>Sierra Madre del Sur</u>		
<i>R. barba-johannis</i>	<i>R. albornervia</i>	<i>R. neogibsonii</i> *	<i>R. angulifolia</i>	<i>R. petasitis</i>	
<i>R. cordovensis</i>	<i>R. angulifolia</i>	<i>R. petasitis</i>	<i>R. anisophylla</i> *	<i>R. pinetorum</i> *	
<i>R. gentryi</i> *	<i>R. aschenborniana</i>	<i>R. platanifolia</i>	<i>R. lobata</i>	<i>R. reticulata</i>	
<i>R. gonzalezae</i>	<i>R. barba-johannis</i>	<i>R. reticulata</i>	<i>R. barba-johannis</i>	<i>R. suffulta</i>	
<i>R. guadalajarensis</i>	<i>R. grimesii</i>	<i>R. sessilifolia</i>	<i>R. cordovensis</i>	<i>R. schaffneri</i>	
<i>R. hartwegii</i>	<i>R. hartwegii</i>	<i>R. sundbergii</i>	<i>R. heteroidea</i> *	<i>R. tlacotepeca</i> *	
<i>R. heracleifolia</i>	<i>R. heracleifolia</i>	<i>R. metepeca</i> *	<i>R. jurgensenii</i>	<i>R. subcymosa</i>	
<i>R. mezquitlanensis</i> *	<i>R. hirsuticaulis</i>	<i>R. lineolata</i>	<i>R. langlassei</i> *	<i>R. lineolata</i>	
<i>R. sessifolia</i>	<i>R. lobata</i>		<i>R. robinsoniana</i>	<i>R. lanicaulis</i>	
<i>R. subpeltata</i> *	<u>Llanura Costera del sur del Golfo</u>		<i>R. aschenborniana</i>	<i>R. mexicana</i>	
<i>R. suffulta</i>	<i>R. schaffneri</i>				
<u>Sierra de Chiapas y Guatemala</u>		<u>Eje Neovolcánico</u>		<u>Mesa del Centro</u>	<u>Cordillera C.A</u>
<i>R. albonervia</i>	<i>R. galicana</i>	<i>R. lanicaulis</i>	<i>R. angulifolia</i>	<i>R. acutangula</i>	
<i>R. acutangula</i>	<i>R. aliena</i>	<i>R. glinophylla</i>	<i>R. lineolata</i>	<i>R. cordovensis</i>	<i>R. heterogama</i>
<i>R. barba-johannis</i>	<i>R. angulifolia</i>	<i>R. gonzalezae</i>	<i>R. lobata</i>	<i>R. heracleifolia</i>	<i>R. jurgensenii</i>
<i>R. greenmanii</i>	<i>R. aschenborniana</i>	<i>R. grimessi</i>	<i>R. mexicana</i>	<i>R. hirsuticaulis</i>	<i>R. lanicaulis</i>
<i>R. heterogama</i>	<i>R. cordovensis</i>	<i>R. hartwegii</i>	<i>R. petasitis</i>	<i>R. lineolata</i>	<i>R. petasitis</i>
<i>R. jurgensenii</i>	<i>R. chrismarii</i>	<i>R. heracleifolia</i>		<i>R. pentafolia</i> *	<i>R. schaffneri</i>
<i>R. petasitis</i>	<i>R. chrismarii</i>	<i>R. heracleifolia</i>			
<i>R. schaffneri</i>	<i>R. robinsoniana</i>	<i>R. schaffnerii</i>			
<i>R. subcymosa</i>	<i>R. suffulta</i>	<i>R. sessilifolia</i>			

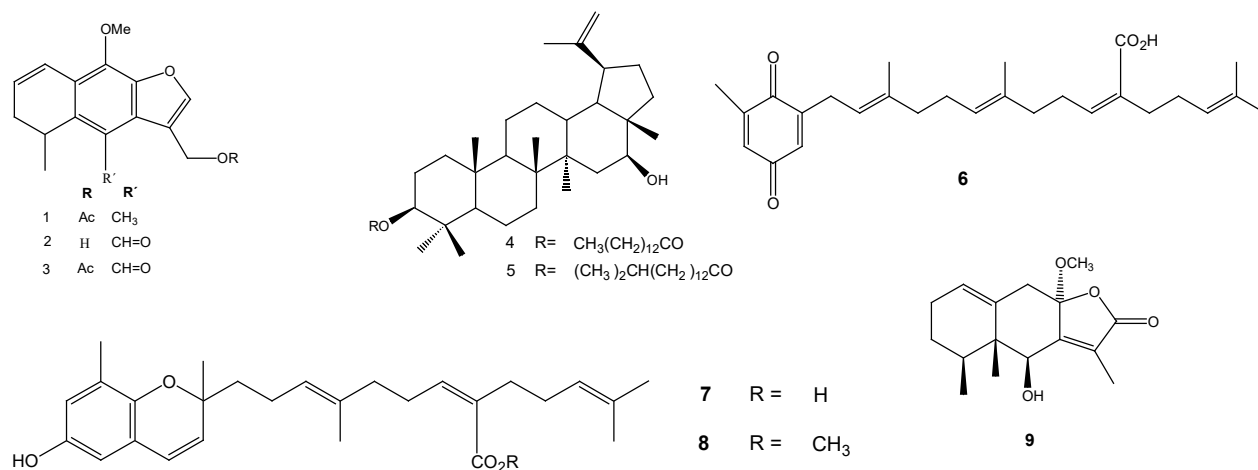
Figura 1: Distribución geográfica de las especies del género *Roldana* en México. Los asteriscos señalan especies endémicas.³

QUIMICA DEL GENERO *ROLDANA*

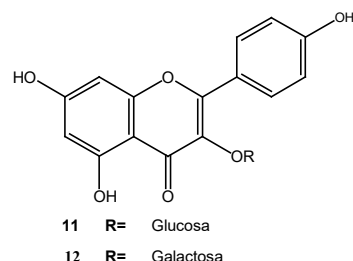
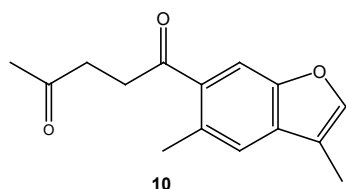
Con respecto a la química del género *Roldana*, se debería esperar un patrón similar o por lo menos cercano al de la tribu de procedencia, y de la cual ya se ha hecho una ligera descripción. Sin embargo, sólo se han estudiado químicamente 6 especies, lo que no permite hacer aún una descripción más detallada y libre de especulaciones.

Esas seis especies son: *Roldana barbajohannis*, *R. aschenborniana*, *R. sessilifolia*, *R. heterogama*, *R. mexicana* y *R. ehrenbergiana*. Todas ellas han mostrado en común sesquiterpenos del tipo eremofilano, localizados preferiblemente en la raíz de la planta.

De la raíz de *R. barbajohannis*, se han descrito compuestos del tipo eremofilano (**1-3**)¹⁵. De la parte aérea se han aislado la lactona **9**, los triterpenos **4** y **5** y sustancias antioxidantes estructuralmente relacionadas a la vitamina E, como son el sargacromenol (**7**) y la plastoquinona (**6**)¹³, las cuales también presentaron actividades inhibitoras del crecimiento de insectos.¹⁴

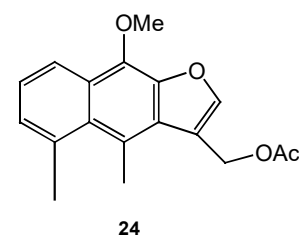
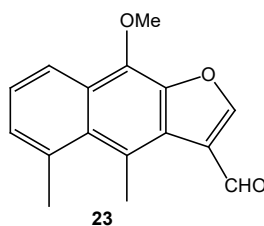
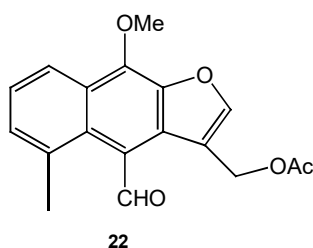
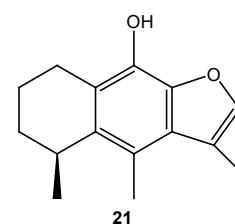
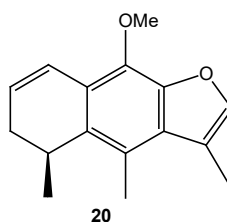
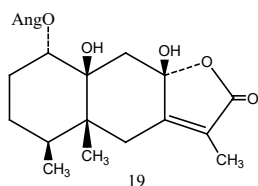
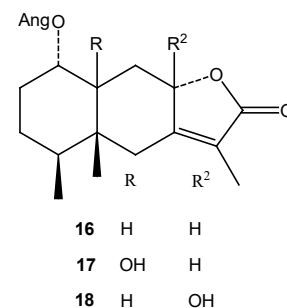
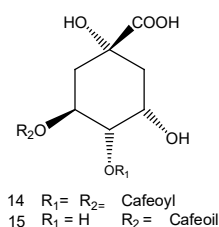
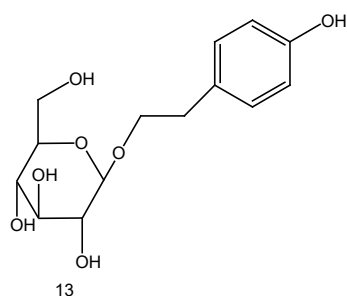


Del mismo modo, de la parte aérea de *Roldana aschenborniana*, se aislaron el secofuranoeremofilano **10**, los flavonoides astragalina (**11**) y trifolina (**12**); y los compuestos fenólicos salidrósido (**13**), ácido 3,4-dicafeoilquinico (**14**) y ácido clorogénico. (**15**).¹⁶



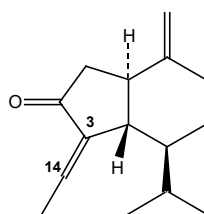
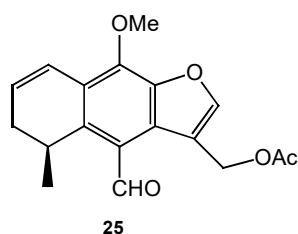
Los metabolitos **9** y **10** han sido los únicos dos compuestos de tipo eremofilano descritos de partes aéreas en las especies del género *Roldana*.¹³

Moléculas del tipo eremofilano también se encontraron en extractos de raíz de *R. sessilifolia* y *R. heterogama* cuyos reportes hablan de varios de estos compuestos que presentan en su estructura un grupo angeloxi (**16-19**), y eremofilanos derivados del cacalol, (**20-25**)^{17,18,19}

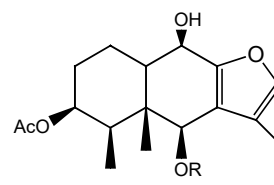
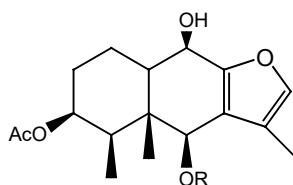
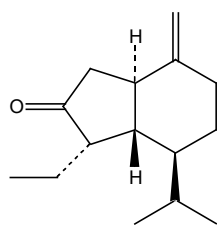
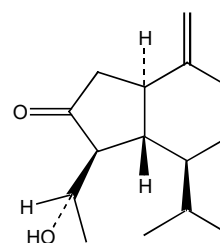


La *Roldana sessilifolia* es un miembro del complejo de plantas medicinales conocido como “cachana”, “cachane” o “cachani”, de cuyas raíces mezcladas con otras plantas se prepara un té que es usado en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la esterilidad femenina. Dicho complejo, conocido también como “raíz de peyote”, es usado como una tintura la cual se aplica sobre el cuerpo para aliviar dolores reumáticos¹⁸. En este sentido sería válido llevar a cabo estudios encaminados a establecer alguna relación de los compuestos de tipo eremofilanos presentes en raíces con dichas propiedades.

Los reportes sobre *Roldana mexicana* indican la presencia en esta especie, de algunos derivados de oplopano, ya antes encontrados en otras especies de la tribu Senecioneae. En este caso, los compuestos **26-28** se encontraron en raíz y parte aérea, y el compuesto **29**, solamente en la parte aérea.^{20, 21} Por último, de la raíz de *R. ehrenbergiana*, se han reportado los dos nuevos compuestos tipo eremofilano **30** y **31**.²²



27 E (3,14)

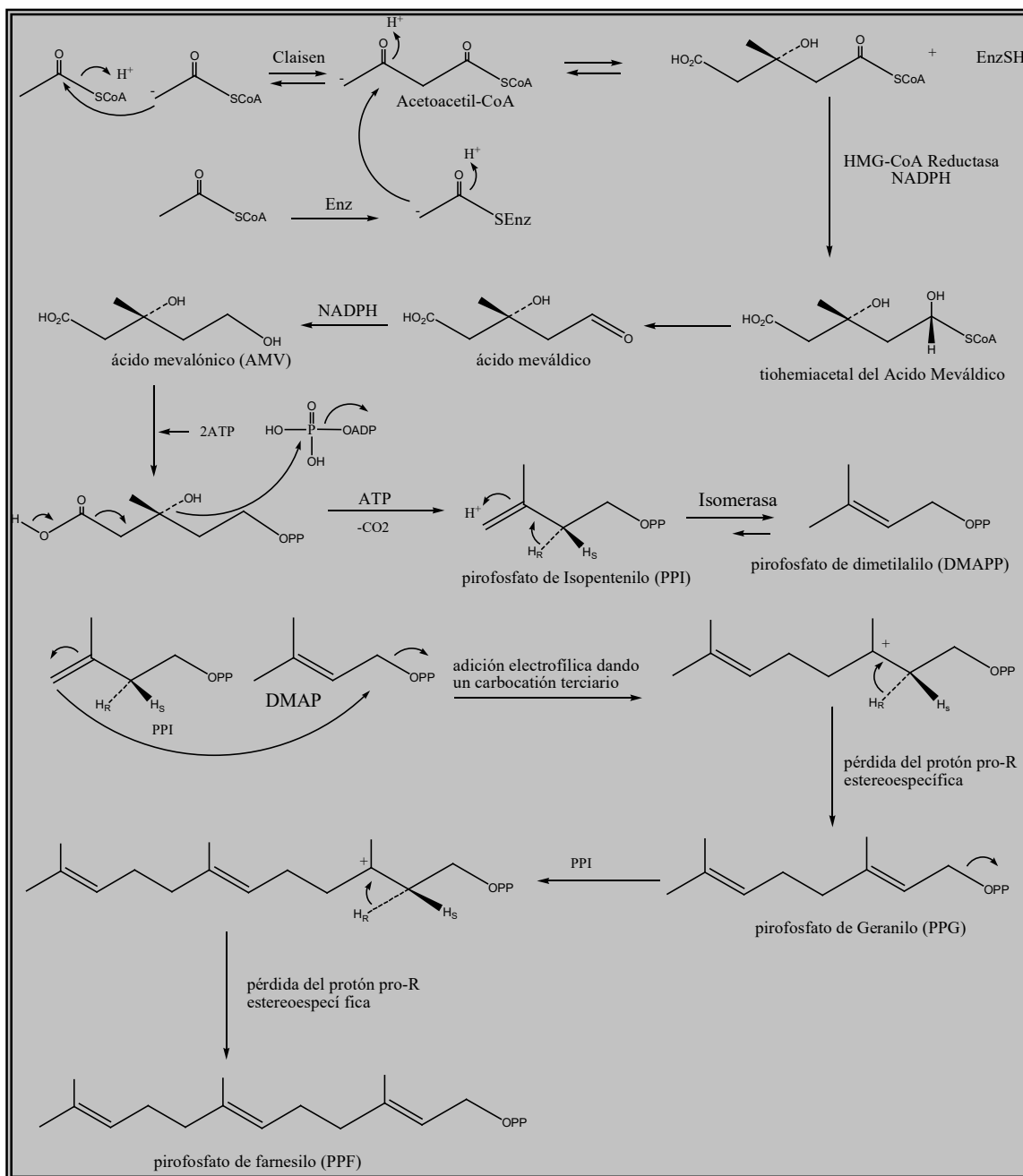


BIOGÉNESIS DE LACTONAS SESQUITERPENICAS

La biosíntesis de sesquiterpenos sucede tanto por la ruta del ácido mevalónico, como por la ruta de la 1-deoxy-D-xylulose/2-C-metyl-D-Erythritol-4-phospate (DOXP/MEP).²³ En la biosíntesis de lactonas sesquiterpénicas, dos unidades de acetil-CoA reaccionan a través de una condensación de claisen para formar acetoacetil-CoA. Posteriormente se incorpora una tercera molécula de Acetoacetil-CoA a través de una condensación aldólica para generar el 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). En un proceso de dos etapas, el HMG-CoA, es reducido al ácido (3R)-mevalónico (AMV) con participación de una molécula de NADPH y catalizado por la enzima HMG-CoA reductasa. En el siguiente paso, con la ayuda de dos enzimas dependientes de ATP, el ácido mevalónico es fosforilado dos veces consecutivas generando el mevalonato-5-pirofosfato, el cual se descarboxila para formar el pirofosfato de isopentenilo (PPI), siendo éste el primer bloque de construcción de los terpenos. Se ha demostrado que aproximadamente el 50% del PPI que se incorpora a los sesquiterpenos tiene un origen no mevalónico.²³ El PPI, que es una unidad de 5 carbonos denominada isopreno activo, es isomerizado a otra unidad de isopreno denominada dimetilalil-pirofosfato (DMAPP), por medio de una enzima estereoespecífica que abstrae el protón pro-R, (H_R en el esquema) del C-2 e incorpora un protón del agua sobre el C-4. Este proceso es reversible y se encuentra desplazado hacia el DMAPP, en vista de que la salida del grupo difosfato genera un carbocatión alílico que se estabiliza por deslocalización de cargas, cosa que no ocurre en el PPI. Subsecuentemente, una vez formado el carbocatión alílico, éste puede reaccionar con PPI a través de una adición electrofílica donde se forma un carbocatión terciario que es estabilizado por la pérdida estereoespecífica del protón pro-R y originando el pirofosfato de geranilo (PPG) donde el nuevo enlace es *trans*.²⁴

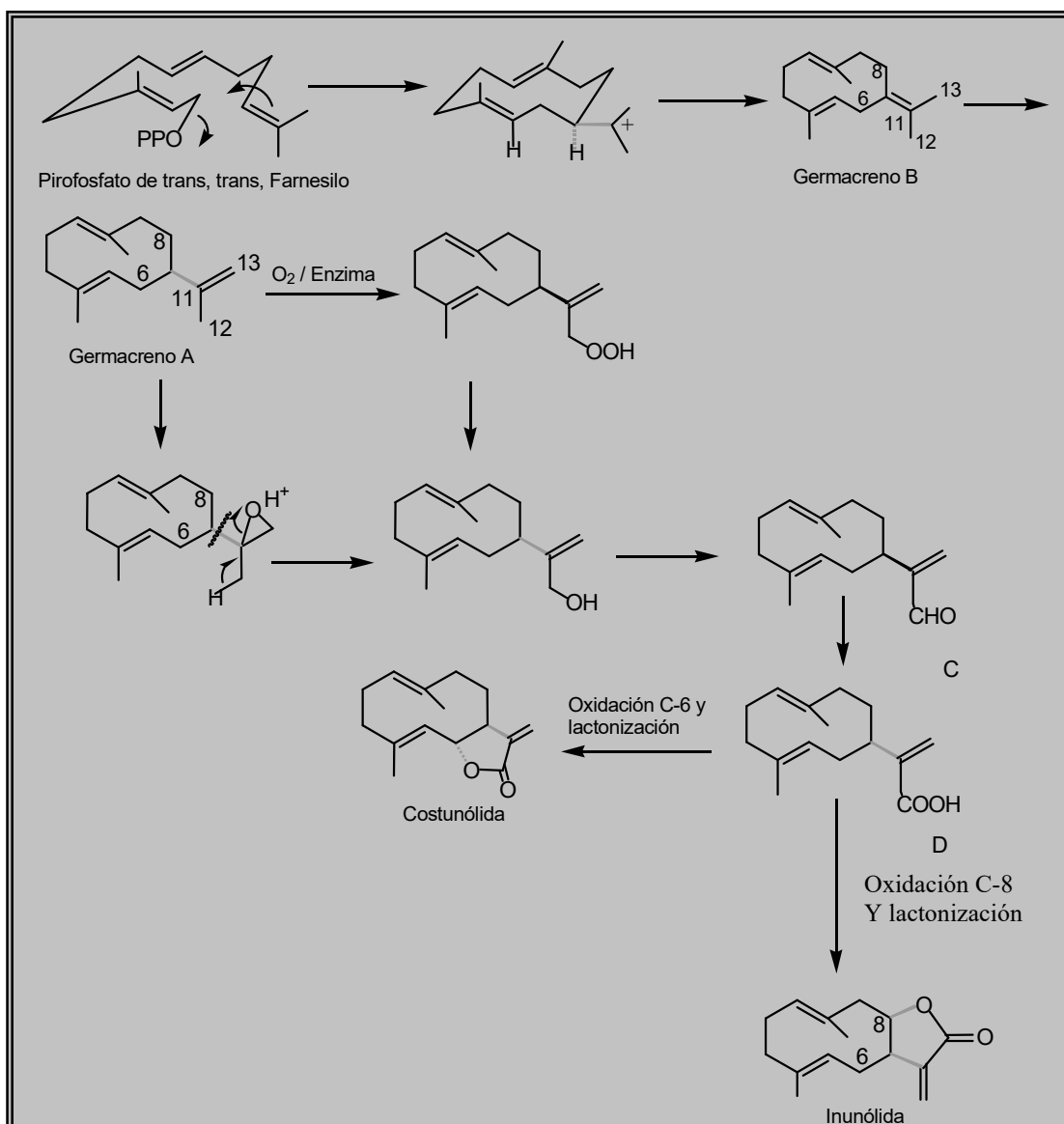
El pirofosfato de geranilo sufre una adición de PPI, acoplándose cabeza a cola para producir el pirofosfato de farnesilo (**Esquema 1**). El pirofosfato de *trans, trans*-farnesilo en un proceso de ciclación forma el germacreno A cuyos carbonos no olefínicos están alílicamente activados para la hidroxilación, excepto en el C-8. Del mismo modo, se

puede formar el germacreno B, en el cual la hidroxilación del C-8 y el C-6 pueden ser posibles debido a la activación alílica en esas posiciones. Posteriormente, siguiendo con el germacreno A, la incorporación de un oxígeno en el C-12 bien sea por la vía de un epóxido intermediario, o por una reacción mediada enzimáticamente, conlleva al alcohol alílico en C-12.



Esquema 1: Biosíntesis de sesquiterpenos

Por último, sucesivas oxidaciones de A llevan hacia el aldehído C y posteriormente al ácido D. Este ácido se puede hidroxilar en el C-6 o en el C-8, dando origen a las lactonas sesquiterpénicas inunólida y costunólida ²⁵ según el caso. Por lo tanto, es de esta forma como el germacreno A puede dar origen a diferentes tipos de esqueleto de lactonas sesquiterpénicas (**esquema 2**).



Esquema 2. Biosíntesis de lactonas sesquiterpénicas

BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES

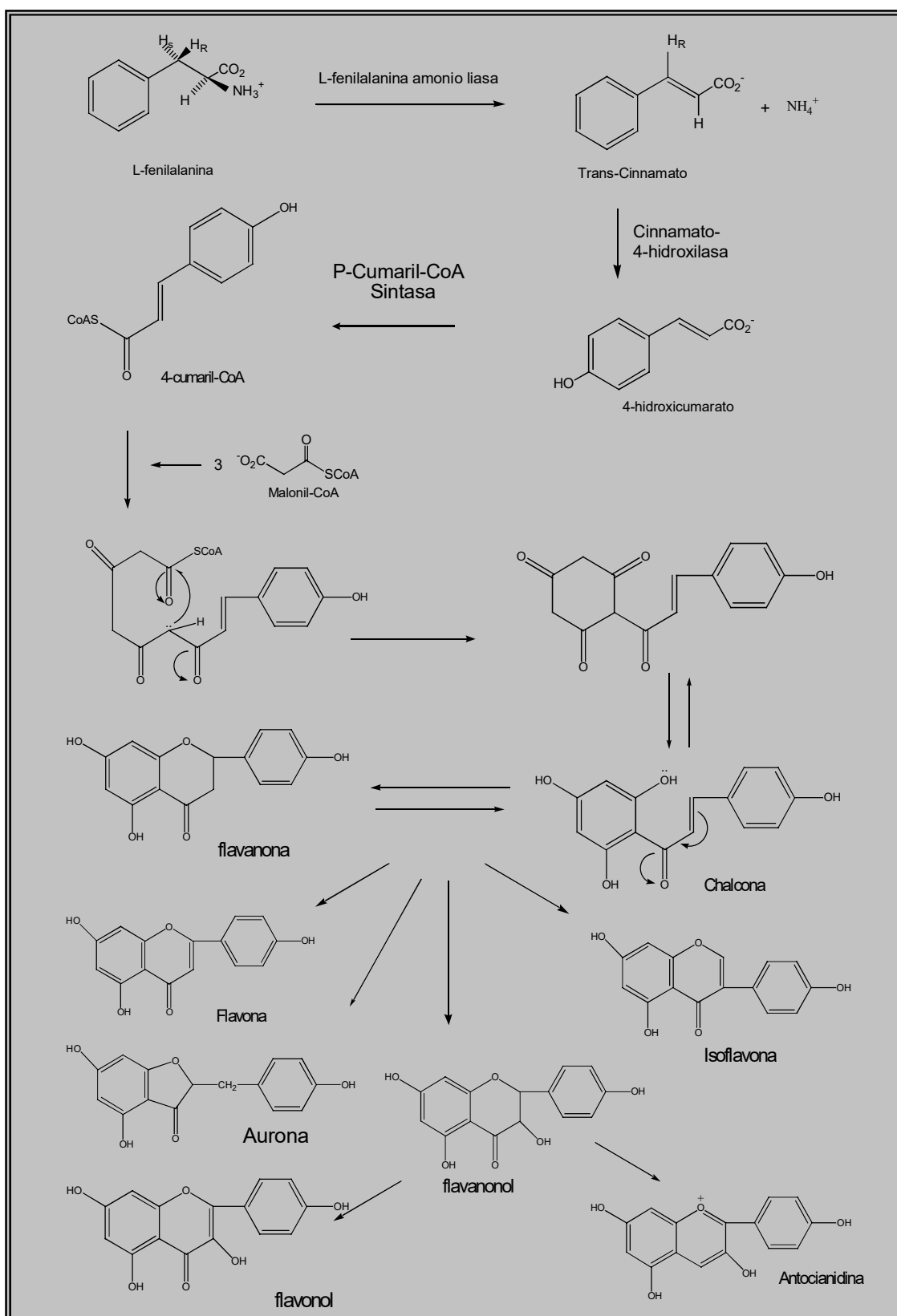
Los flavonoides comprenden un gran grupo de metabolitos que derivan de dos subunidades, proveniente una de la ruta del acetato y otra de la del shikimato.

La biosíntesis general involucra la desaminación enzimática estereoespecífica de la L-fenilalanina, catalizada por la L-fenilalanina amonio liasa (PAL) y en la cual se pierde el protón pro-S del L-aminoácido, dando origen al *trans*-cinamato.

El *trans*-cinamato, es hidroxilado luego por la enzima específica cinamato 4-hidroxilasa dando origen al ácido 4-hidroxi-coumárico y que a su vez es transformado a su respectivo éster 4-hidroxicumaril-CoA, a través de la enzima *p*-cumaril-CoA sintasa.

Posteriormente, la 4-hidroxicumaril-CoA se acopla con tres unidades de malonil-CoA para dar origen a una chalcona por medio de la enzima chalcona sintasa.

La formación de la chalcona es el punto clave intermedio en la formación de todos los flavonoides en donde generalmente ocurre un ataque nucleofílico tipo Michael de un grupo fenol sobre la cetona insaturada dando como resultado una flavanona ²⁶ **(Esquema 3).**



Esquema 3: Biosíntesis de flavonoides.

Roldana lineolata:

Esta planta es una hierba perenne o arbusto entre 1 y 2 metros de altura, que se encuentra distribuida hacia el centro y sur de México, entre los 2000 y 3500 m en bosques de pino encino de los estados de Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, y Veracruz. Su época de floración va de octubre a febrero y en ocasiones hasta marzo. Generalmente, tiene un solo tallo que emerge de un tronco engrosado en forma tuberosa con raíces fibrosas.

Sus tallos van desde lisos hasta densamente lanudos con pelos multicelulares y son redondos y de color verde o rojo oscuro.

Sus hojas son caulinares (unidas directamente al tallo sin pecíolo), eventualmente distribuidas uniformemente a la mitad superior del tallo, más abajo son caducas, se apiñan a medio tallo cuando se trata de herbáceas. La parte superior de la hoja es lisa y la inferior va desde densamente pubescente a vellosa.

El capítulo es radial en forma de embudo, 10-17 mm de largo y 3 mm a través de la base, de corolas amarillas con 2 o 3 brácteas caliculadas. Presenta 15-20 capítulos por rama y pedúnculos de 5-20 mm de largo y filiformes de 1-7 mm de largo. La superficie del receptáculo es alveolado y rígido, y las flores de disco están constituidas por una corola lisa en forma de embudo.³

PARTE EXPERIMENTAL

EQUIPO UTILIZADO

Para aislar y caracterizar los metabolitos secundarios descritos en este trabajo, se usaron la cromatografía en columna de sílice Kieselgel 60 G, 90% < 45 μm ; la cromatografía en capa delgada (CCD) de sílice gel 60G UV₂₅₄ 20 x 20 cm y 0.25 mm de espesor; y la cromatografía en placa preparativa (CCP) en cromatoplasas ALUMGRAM SIL 100 G/UV₂₅₄ y 200 G/UV₂₅₀ de 20 x 20 cm.

Los extractos fueron concentrados por evaporación del solvente en un rotavapor BÜCHI R-114 y baño de agua BÜCHI B-480.

El monitoreo de cada placa cromatográfica se llevó a cabo mediante la exposición a luz UV con dos longitudes de onda (254 nm y 365 nm) y posterior revelado por aspersion sobre la placa cromatográfica con una solución de sulfato cérico.

Los puntos de fusión y las rotaciones ópticas se determinaron en un aparato de punto de fusión Fisher-Johns serie No. 591 y polarímetro Jasco DIP-360, respectivamente.

Los datos espectroscópicos de RMN-¹H y RMN-¹³C se obtuvieron en equipos Varian-Unity 300 MHz, Varian-Gemini 200 MHz, Eclipse 300 MHz JEOL, y Varian-Unity Inova 500 MHz; utilizando en todos los casos disolventes deuterados y tetrametilsilano como referencia interna. (TMS)

Los espectros IR se obtuvieron en los equipos Perkin-Elmer 337 y Bruker Tensor 37; y los espectros UV, en un equipo Shimadzu 160U.

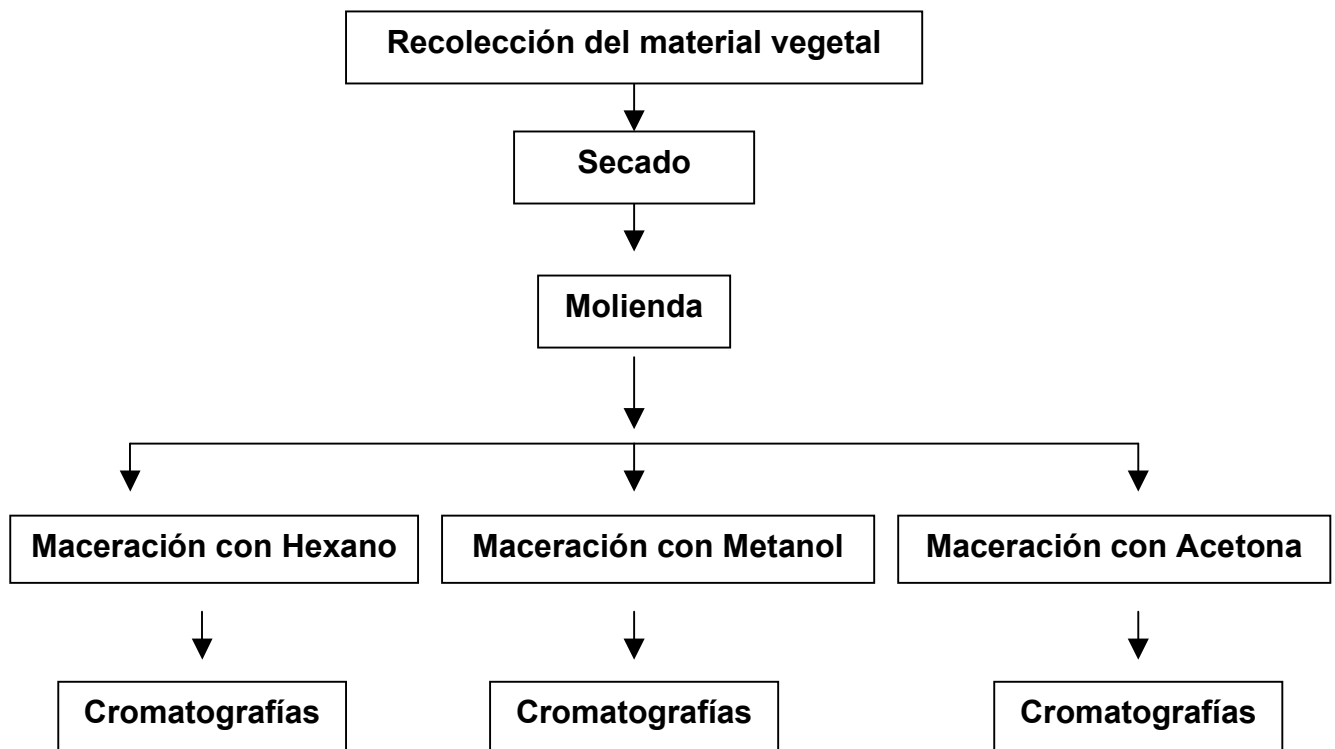
Los espectros de masas por las técnicas de Impacto Electrónico y FAB se obtuvieron en los espectrómetros JEOL JMS-AX5505HA (70 eV) y JEOL MS-SX1102A (10 KV) respectivamente.

MATERIAL VEGETAL: (*Roldana lineolata*)

Roldana lineolata (DC.) H. Rob & Brettell se recolectó en el municipio de Toluca, Estado de México, el 11 de octubre de 2002 en un camino de ascenso al Nevado de Toluca, a poco más de 3000 m sobre el nivel del mar. Fue identificada como *Roldana lineolata* por el Dr. José Luis Villaseñor Ríos, y se depositó una muestra del vegetal en el herbario Nacional (MEXU 1045512), en el Instituto de Biología de la UNAM. Luego de ser sometido a un proceso de secado a temperatura ambiente, el material vegetal se sometió a un proceso de molienda.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS:

Para la obtención de todos los extractos se siguió el esquema general mostrado a continuación:



Esquema 4. metodología general para la obtención de extractos

FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS

A 590 g de raíz seca y molida se le hicieron extracciones sucesivas por maceración con hexano, acetona y metanol. (**Esquema 4**), obteniéndose 29.52 g, 13.8 g y 33.4 g de extracto, respectivamente. A una pequeña muestra de cada uno de los extractos se le realizó la prueba de Dragendorff para detección de alcaloides, siendo negativa en todos los casos.

Fraccionamiento del extracto hexánico de raíz

El extracto hexánico (29.52 g) se redisolvió en una pequeña cantidad de hexano y se mezcló con celita. El extracto absorbido, una vez evaporado el solvente, se colocó en una columna empacada con 330 g de sílice. La columna fue eluida con un gradiente de polaridad creciente hexano-acetona-metanol.

Se obtuvieron 128 fracciones de 300 ml c/u. De las fracciones 22-24 eluidas con hexano-acetona 95:5, se obtuvieron 12.75 g de un aceite amarillo que fue identificado como el furanoeremofilano I.

Furanoeremofilano (I):

Aceite (de color amarillo), $[\alpha]_D^{25} + 18.82^\circ$ (CHCl₃, c 0.17)

UV (nm): 224 (log ε = 4.14)

IR ν_{\max} (CHCl₃) cm⁻¹: 3461.0, 1700, 1164, 1237

EM-FAB (M⁺ + 1), m/z: 331.1909 (observado), estimado para C₂₀H₂₇O₄, 331.1909.

EM-IE, m/z, (% de Intensidad relativa): 230 (100), 123 (71), 83 (49), 312 (28)

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS), δ, Mult., J (Hz): 5.52, td, (5.7, 1.8), H-1; 2.25, m, H-2; 5.22, dt, (3.6, 7.8), H-3; 2.39, qd, (7.2, 3.6), H-4; 4.84, dd, (1.2, 2.4), H-6; 3.38, da, (16.8), H-9a; 3.02, d, (16.8), H-9b; 7.04, qa, (1.2), H-12; 2.06, d, (1.2), H-13; 1.05, s, H-14; 0.98, d, (7.2), H-15; 6.08, qq, (7.2, 1.5), H-3'; 1.99, dq, (7.2, 1.5), H-4'; 1.90, qd, (1.5, 1.5), H-5'. (**Espectro 1a**)

RMN-¹³C (75.4 MHz, CDCl₃), δ: 119.52, d, C-1; 26.75, t, C-2; 70.38, d, C-3; 35.03, d, C-4; 45.75, s, C-5; 71.56, d, C-6; 120.61, s, C-7; 149.89, s, C-8; 30.90, t, C-9; 136.87, s, C-10; 119.80, s, C-11; 138.46, d, C-12; 9.17, q, C-13; 15.91, q, C-14; 9.27, q, C-15; 167.69, s, C-1'; 128.11, s, C-2'; 137.83, d, C-3'; 15.77, q, C-4'; 20.63, q, C-5'. (**Espectro 1b**)

Las fracciones 25-52, (2.93grs), eluidas con hexano-acetona 95:5 y 9:1 fueron sometidas a 3 cromatografías sucesivas en columna usando CH_2Cl_2 como eluyente para obtener 0.283 g de un aceite color amarillo pálido, identificado como la lactona **II** y 0.244 g del mismo compuesto en estado impuro. Este fue posteriormente purificado junto con fracciones del extracto acetónico de composición semejante.

Lactona (II):

Aceite (de color amarillo), $[\alpha]_D^{25} - 136^\circ$ (CHCl_3 , c 0.15)

UV (nm): 222 (log $\epsilon = 4.39$)

IR ν_{max} (CHCl_3) cm^{-1} : 3452.0, 1753.0, 1713.0, 1236.0, 1160.0.

EM-FAB, ($M^+ + 1$), m/z: 347.1853 (observado), estimado para $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_5$, 347.1858

EM-IE, m/z, (% de Int. Rva): 121 (100), 83 (68), 55 (41), 246 (43), 231 (10),

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS), δ , Mult. J (Hz): 5.65, sa, H-1; 2.31, m, H-2; 5.14, ddd, (3.3, 6.3, 9.3), H-3; 2.44, qd, (3.3, 6.9), H-4; 4.71, sa; H-6; 4.42, ddq, (10.5, 6.9, 1.5), H-8; 2.75, dd, (6.9, 12.0), H-9a; 2.14, dda, (12.0, 10.5), H-9b; 2.07, dd, (1.5, 1.5), H-13; 0.96, s, H-14; 0.99, d, (6.9), H-15; 6.12, qq, (7.2, 1.5), H-3'; 1.98, dq, (7.2, 1.5), H-4'; 1.90, qd, (1.5, 1.5), H-5'. (**Espectro 2a**)

RMN- ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) δ : 124.34, d, C-1; 26.97, t, C-2; 69.76, d, C-3; 34.56, d, C-4; 47.70, s, C-5; 75.20, d, C-6; 160.22, s, C-7; 78.66, d, C-8; 38.74, t, C-9; 134.44, s, C-10; 123.95, s, C-11; 174.54, s, C-12; 9.18, q, C-13; 15.99, q, C-14; 9.61, q, C-15; 167.83, s, C-1'; 127.79, s, C-2'; 138.66, d, C-3'; 15.81, q, C-4'; 20.57, q, C-5'. (**Espectro 2b**)

Fraccionamiento del extracto acetónico de raíz:

El extracto acetónico (13.88 g) se sometió a un proceso de separación por cromatografía en una columna empacada con 149 g de sílice. Se eluyó con gradiente de polaridad creciente hexano-acetona-metanol y se obtuvieron en total 170 fracciones de 100 ml c/u

Las fracciones 18-21 eluidas con hexano-acetona 95:5 proporcionaron 5.56 g adicionales del compuesto **I**. De las fracciones 76-85, eluidas con hexano-acetona 7:3, se obtuvieron 0.2 g del compuesto **II** el cual se purificó ulteriormente. Las fracciones 15-17 y 22-25 eluidas con hexano-acetona 95:5 (1.76 g) fueron nuevamente fraccionadas por cromatografía en columna obteniéndose 119 fracciones.

De las fracciones 5-7 de esta nueva columna, eluidas con hexano-acetona 95:5, se obtuvieron 0.485 g del compuesto I. Las fracciones 23-31 eluidas con hexano acetona 85:15 arrojaron 0.116 g del compuesto II todavía impuro.

Las fracciones 47-48 de esta misma columna, eluidas con hexano-acetona 85:15, arrojaron 17.8 mg del compuesto identificado como la lactona III:

Todas aquellas fracciones que contenían compuesto II impuro (0.56 g), se reunieron y se purificaron por cromatografía en columna en un sistema de polaridad creciente hexano-acetona, lo cual permitió obtener 404 mg de compuesto II puro.

Compuesto III:

$[\alpha]_D^{25} - 7.05$ (CHCl₃, c. 0.17)

Aceite (color amarillo)

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 3442.0, 1764.0, 1711.0.

UV (nm): 219 (log ε = 4.39)

EM-IE, m/z, (% de Int. Rva): 83 (100), 106 (69), 262 (12), 362 (1).

RMN (300MHz, CDCl₃, TMS), δ: Mult. J (Hz): 5.60, sa, H-1; 2.30, m, H-2; 5.16, ddd, (9.3, 5.4, 3.9), H-3; 2.41, dq, (3.9, 6.6), H-4; 4.79, sa, (1.5), H-6; 2.70, d, (13.2), H-9a; 2.50, da (13.2), 9b; 2.04, d, (1.5), H-13; 0.96, s, H-14; 1.01, d, (6.6), H-15; 6.11, qq, (7.2, 1.2), H-3'; 1.89, dq, (1.2, 7.2), H-4'; 1.97, dq (1.5, 1.5), H-5'; **(Espectro 3a)**

RMN-¹³C (75.4 MHz, CDCl₃) δ: Mult., J (Hz): 124.36, d, C-1; 26.99, t, C-2; 70.41, d, C-3; 34.58, d, C-4; 48.58, s, C-5; 74.52, d, C-6; 125.26, s, C-7; 102.48, s, C-8; 43.53, t, C-9; 134.77, s, C-10; 158.90, s, C-11; 172.23, s, C-12; 8.73, q, C-13; 15.89, q, C-14; 9.92, q, C-15; 168.27, s, C-1'; 127.70, s, C-2'; 139.11, d, C-3'; 15.26, q, C-4'; 20.56, q, C-5'. **(Espectro 3b)**

Fraccionamiento del Extracto Metanólico de raíz:

El extracto metanólico (33.34 g) fue sometido a un fraccionamiento por cromatografía en columna con 300 g de sílice y elusión en gradiente de polaridad creciente AcOEt-MeOH. De las fracciones eluidas con AcOEt-MeOH 9:1, se obtuvieron 10 mg de cristales con pf. 280-285°C, identificados como el glucósido de β-sitosterol. **(IV)**. De las fracciones eluidas con AcOEt-MeOH 8:2 y 7:3 se obtuvieron 1.63 g de unos cristales de pf. 180 -182°C, los cuales fueron identificados como sacarosa **(V)**

Extractos de Hoja:

A 2589 g de material vegetal seco y molido se le hicieron extracciones sucesivas por maceración con hexano, acetona y metanol para obtener los extractos, que pesaron 48.43 g, 71.7g y 309 g, respectivamente.

Fraccionamiento del extracto hexánico de hoja:

Los 48.43 g de extracto hexánico fueron fraccionados por cromatografía en columna con 500 g de sílice eluida con un gradiente de polaridad creciente hexano-acetona-metanol, lo que permitió obtener 187 fracciones de 500 ml c/u.

De las fracciones 48-50, eluidas con hexano-acetona 95:5 se obtuvieron 0.266 g de cristales de pf. 130-132°C identificados como una mezcla de β -sitosterol (**VI_a**) y estigmasterol (**VI_b**). Las aguas madres de dichas fracciones fueron cromatografiadas sucesivamente en columnas eluidas con hexano-acetato de etilo, hexano-acetona y hexano-diclorometano para obtener 0.975 g de una mezcla de ésteres de calenduladiol (**VII_a** y **VII_b**) (**Espectros 4a y 4b**).

Fraccionamiento del extracto Acetónico y Metanólico de Hoja:

Debido a que tanto el extracto acetónico de hoja (71.7g) como el extracto metanólico (309 g) mostraron el mismo perfil cromatográfico, se decidió reunir todo el extracto acetónico con 55.85 g del extracto metanólico. Los extractos combinados se fraccionaron por cromatografía en columna en gradiente de polaridad creciente Hexano-AcEOt-MeOH, para obtener 397 fracciones.

Las fracciones 140-220 (33.85 g), eluidas con hexano:acetato de etilo 9:1, 8:2 y 7:3 fueron nuevamente fraccionadas por cromatografía en columna con 300 g de sílice, eluidas con mezclas de polaridad creciente hexano-acetato de etilo. Se tomaron fracciones de 500 ml para obtener una fracción A constituida por las fracciones 13-26, (1.87 g), eluidas con hexano acetato de etilo (6:4). De las siguientes fracciones 27-35, eluidas también con hexano–AcOEt (6:4) cristalizaron 0.441 g de un compuesto identificado como el galactósido de quercetina **VIII**.

Compuesto VIII

$[\alpha]_D^{25}$ - 86.7 (piridina, c. 0.21)

Sólido (Color amarillo)

Pf = 243-245 °C

IR (Susp. nujol) cm^{-1} : 3456, 3264, 1655.

EM-IE, m/z, (% de Int. Rva.): 302 (100), 273 (7)

EM-FAB⁺, ($M^+ + 1$), m/z, (% de Int. Relat.): 154 (100), 136 (80).

RMN-¹H (500 MHz, DMSO, TMS), δ , Mult. J (Hz): 6.19, d, (2.2), H-6; 6.39, d, (2.2), H-8; 7.52, d, (2.2), H-2'; 6.80, d, (8.4), H-5'; 7.66, dd, (2.2, 8.4), H-6"; 5.37, d, (7.8), H-1"; 3.63, ta, (4.6), H-2"; 4.42, m, H-3"; 3.52, m., H-4"; 3.47, m, H-5"; 5.13, d, (4.6), H-6"a; 4.85, d, (5.4), H-6"b. **(Espectro 5a)**

RMN-¹³C (75.4 MHz, DMSO), δ : 156.19, s, C-2; 133.44, s, C-3; 177.42, s, C-4; 161.173, s, C-5; 98.64, d, C-6; 164.05, s, C-7; 93.46, d, C-8; 156.25, s, C-9; 103.89, s, C-10; 121.06, s, C-1'; 115.14, d, C-2'; 144.78, s, C-3'; 148.41, s, C-4'; 115.90, d, C-5'; 121.97, d, C-6'; 101.74, d, C-1"; 71.18, d, C-2"; 73.16, d, C-3"; 67.90, d, C-4"; 75.82, d, C-5"; 60.12, t, C-6". **(Espectro 5b)**

La fracción A (1.87 g) se sometió a un nuevo proceso cromatográfico para obtener mediante elusión con acetato de etilo, 30.8 mg de un compuesto de punto de fusión 163-165 °C, identificado como un derivado acetilado del galactósido de quercetina. **(IX)**

Compuesto IX:

$[\alpha]_D^{25}$ -27.8 (CH₃OH, c. 0.18)

Cristales amarillos

Pf = 163-165 °C

IR (KBr) cm^{-1} : 3400, 1732, 1657,

EM-FAB, m/z, (% de Int. Rva.): 55 (100), 43 (88), 69 (78), 303 (3), 507 (25).

RMN-¹H (500 MHz, DMSO, TMS), δ : Mult. J (Hz): 6.18, d., (2.0), H-6; 6.41, d., (2.0), H-8; 7.48, d., (2.5), H-2'; 6.81, d., (8.5), H-5'; 7.57, dd., (8.5, 2.5), H-6'; 5.40, d., (8.0), H-1"; 5.03, q., (8.0, 9.5), H-2"; 3.59, q., (3.5, 9.5), H-3"; 3.69, d., (3.5), H-4"; 3.28, q., (6.5, 10.0), H-5"; 3.43, q., (6.5, 10.0), H-6"a; 3.38, q., (6.5, 10.0), H-6"b; 2.01, CH₃-,s. **(Espectro 6a)**

RMN-¹³C (75.4 MHz, DMSO), δ : 156.27, s, C-2; 133.08, s, C-3; 177.13, s, C-4; 161.21, s, C-5; 98.66, d, C-6; 164.17, s, C-7; 93.49, d, C-8; 156.27, s, C-9; 103.89, s, C-10; 120.85, s, C-1'; 115.71, d, C-2'; 144.88, s, C-3'; 148.55, s, C-4'; 115.14, d, C-5'; 122.19, d, C-6'; 99.13, d, C-1"; 72.66, d, C-2"; 70.93, d, C-3"; 67.97, d, C-4"; 75.82, d, C-5"; 59.93, t, C-6"; 169.61, s, C-1" ; 21.08, q, CH₃ **(Espectro 6b)**

De la cromatografía original de los extractos acetónico y metanólico de hojas, se reunieron las fracciones 221-306 eluidas con Hexano-AcOEt 3:7, Hexano-AcOEt 1:9, AcOEt 100% y AcOEt-MeOH 9:1 y fueron nuevamente cromatografiadas con mezclas de acetato de etilo:metanol obteniéndose 46 fracciones. De las fracciones 11-21 eluidas con la mezcla acetato de etilo-metanol 98:2, se aislaron otros 0.439 g de galactósido de quercetina (**VIII**).

PREPARACIÓN DE DERIVADOS:

Oxidación del compuesto I:

El compuesto **I** (279 mg, 0.845 mmoles) se disolvió en 5 ml de acetona y posteriormente, esta solución se enfrió en baño de hielo ($T=10^{\circ}\text{C}$) bajo agitación constante y se le añadió lentamente (gota a gota) reactivo de Jones. El progreso de la reacción se siguió por cromatografía en placa. Al cabo de 1 hora, se detuvo la reacción por adición de 1 ml de metanol. Una vez terminado este procedimiento se agregaron 5 ml de agua y se hicieron tres extracciones consecutivas con cloroformo. La fase orgánica se lavó tres veces con agua destilada y se secó con sulfato de sodio. El producto obtenido se purificó por cromatografía en placa fina eluida con una mezcla de hexano-acetona 9:1, para obtener 70 mg, 0.213 mmoles (25.2%) del compuesto **X**.

Compuesto X:

Aceite amarillo, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 40.5^{\circ}$ (CHCl_3 , c 0.2)

UV (nm): 213 ($\log \epsilon = 4.08$)

IR (CHCl_3) cm^{-1} : 1713, 1683.

EM-FAB, ($M^+ + 1$), m/z, (% de Int. Rva.): 55 (100), 83 (90), 229 (50), 329 (15).

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), δ , Mult., J = (Hz): 5.59, ddd, (5.0, 3.0, 2.0), H-1; 2.36, ddd (12.9, 5.0, 5.2), H-2a; 2.205, m, H-2b; 4.87, ddd, (8.4, 5.2, 3.4), H-3; 2.84, qd, (3.4, 7.0), H-4; 3.39, d, (17.8), H-9 α ; 3.75, da, (17.8), H-9 β ; 7.07, sa, H-12; 2.18, d, (1.2), H-13; 1.29, s, H-14; 1.1, d, (7.0), H-15; 6.05, qq, (7.2, 1.4), H-3'; 1.98, dq, (7.2, 1.4), H-4'; 1.91, qd, (1.4, 1.4), H-5'. (**Espectro 7a**)

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 121.86, d, C-1; 27.40, t, C-2; 71.47, d, C-3; 33.51, d, C-4; 52.35, s, C-5; 197.28, s, C-6; 119.92, s, C-7; 164.17, s, C-8; 31.917, t, C-9; 135.02, s, C-10; 118.67, s, C-11; 139.47, d, C-12; 8.98, q, C-13; 20.76, q, C-14; 10.39, q, C-15; 167.35, s, C-1'; 128.15, s, C-2'; 137.5, d, C-3'; 15.79, q, C-4'; 20.57, q, C-5'. (**Espectro 7b**)

Acetilación del compuesto I:

A 304 mg (0.921 mmoles) del compuesto I se le adicionaron 1 ml de piridina y 1 ml de anhídrido acético. La solución se dejó reaccionar calentando suavemente y al cabo de una hora se detuvo la reacción por adición de agua destilada. Los productos de reacción se extrajeron tres veces con cloroformo y, posteriormente, la fase orgánica se lavó tres veces consecutivas con ácido clorhídrico diluido con el fin de remover remanentes de piridina. Luego, la misma fase orgánica se lavó con una solución de bicarbonato para eliminar el ácido acético y posteriormente se le adicionó sulfato de sodio para eliminar cualquier vestigio de agua. El filtrado se concentró y se purificó por cromatografía en columna con una mezcla de hexano-acetona 8:2 y, finalmente, por cromatografía en placa preparativa mediante elusión con hexano:acetona 9:1, dando origen a 165 mg, 0.444 mmoles (48 %) del compuesto XI.

Compuesto XI:

Aceite amarillo, $[\alpha]_D^{25} + 2.32^\circ$ (CHCl₃, c 0.22)

UV (nm): 217 (log ε = 4.02)

IR ν_{max} (CHCl₃) cm⁻¹: 1747, 1715

$[\alpha]_D^{25}$ (CHCl₃, 2.15 mg/ml) = + 2.32°

EM-FAB, m/z, (% de Int. Rva.): 55 (100), 213 (90), 313 (33), 373 (4), 271 (15).

RMN-H (CDCl₃, 200 MHz, TMS), δ, Mult., J (Hz): 5.56, ddd, (2.0, 2.0, 5.2), H-1; 2.42, ddd, (17.2, 5.2, 5.2), H-2a; 2.16, m, H-2b; 5.28, ddd, (9.4, 5.2, 3.8), H-3; 1.99, m, H-4; 6.2, sa; 3.45, da, (17.0), H-9a; 3.10, d, (17), H-9b; 7.04, sa, H-12; 1.85, d, (1.2), H-13; 1.11, s, H-14; 0.99, d, (7.0), H-15; 6.10, qq, (1.6, 7.2), H-3'; 1.98, dq, (1.6, 7.2), H-4'; 1.89, qd, (1.2, 1.2), H-5'; 2.15, s, H-2'. (Espectro 8a)

RMN-¹³C (CDCl₃), 75.4 MHz), δ: 120.836, d, C-1; 27.13, t, C-2; 70.08, d, C-3; 36.00, d, C-4; 44.66, s, C-5; 72.02, d, C-6; 119.67, s, C-7; 150.66, s, C-8; 30.78, t, C-9; 135.48, s, C-10; 117.25, s, C-11; 138.52, d, C-12; 8.62, q, C-13; 16.80, q, C-14; 9.81, C-15; 167.18, s, C-1'; 128.25, s, C-2'; 137.35, d, C-3'; 15.82, q, C-4'; 21.04, q, C-5'; 170.75, s, C-1''; 20.73, q, C-2'' (Espectro 8b)

Epoxidación del compuesto I:

Se disolvieron 330 mg (1 mmol) del compuesto I en 5 ml de cloroformo y luego se le adicionaron 520 mg, (1.6 mmoles) de ácido m-cloroperbenzoico. Inmediatamente hubo la formación de grumos color blanco, por lo que se adicionaron nuevamente 5 ml

de cloroformo. Esta reacción se dejó transcurrir por dos horas con agitación constante y presentó múltiples productos por cromatografía en placa fina. Los productos de reacción se purificaron mediante un fraccionamiento por cromatografía en columna y elusión con hexano-acetona 8:2. Esta reacción se llevó a cabo dos veces, y en la primera epoxidación se obtuvieron 22 mg, 0.06 mmol, (6.07%) de una sustancia identificada como la lactona **III** y 12 mg, 0.033 mmoles (3.2%) del compuesto **XII**. En la segunda epoxidación en las mismas condiciones, sólo fue posible recuperar por cromatografía en columna, 11.6 mg, 0.032 mmoles (3.2 %) del compuesto **XII** y nada del compuesto **III**.

Compuesto XII:

Aceite amarillo, $[\alpha]_D^{25}$ - 30.58 (CHCl₃, c 0.34)

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 3490, 1807, 1708,

EM-IE, m/z, (% de Int. Rva.): 121 (100), 83 (76), 55 (46), 120 (40), 262 (26).

RMN-H (CDCl₃, 500 MHz, TMS), δ , Mult., J (Hz): 5.62, sa, H-1; 2.23, m, H-2; 5.08, ddd, (8.5, 8.5, 3.5), H-3; 2.26, m, H-4; 4.12, d, (5.0), H-6; 2.96, ddd, (14.5, 5.0, 2.6), H-9a; 2.87, d, (14.5), H-9b; 3.18, q, (7.0,), H-11; 1.41, d, (7.0), H-13; 1.00, s, H-14; 0.90, d, (7.0), H-15; 6.10, qq, (1.5, 7.5), H-3'; 1.98, dq, (1.5, 7.5), H-4'; 1.88, qd, (1.5, 1.5), H-5'; (**Espectro 9a**)

RMN-¹³C (CDCl₃, 125.7 MHz), δ C: 124.40, d, C-1; 26.47, t, C-2; 69.43, d, C-3; 34.43, d, C-4; 45.12, s, C-5; 71.16, d, C-6; 66.80, s, C-7; 87.26, s, C-8; 30.99, t, C-9; 132.30, s, C-10; 40.08, d, C-11; 176.41, s, C-12; 11.23, q, C-13; 8.66, q, C-14; 16.06, q, C-15; 167.72, s, C-1'; 127.82, s, C-2'; 138.54, d, C-3'; 15.80, q, C-4'; 20.54, q, C-5'. (**Espectro 9b**)

Oxidación del compuesto II:

En la oxidación del compuesto **II** con trióxido de cromo (Reactivo de Jones), se tomaron 111 mg (0.321 mmol), del compuesto y se sometieron al procedimiento anteriormente descrito. El transcurso de la reacción se monitoreó por medio de cromatografía en placa fina. Después del proceso de extracción y purificación por cromatografía en placa preparativa mediante elusión con hexano-acetona 8:2, se obtuvieron 100.8 mg, 0.293 % (91%) de un compuesto **XIII**.

Compuesto XIII:

Aceite, $[\alpha]_D^{25}$ - 9.3° (CHCl₃, c 0.14)

UV (nm): 227 (log ε = 6.68)

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 2977, 1767, 1707.

EM-FAB, m/z, (% de int. Rva.): 154 (100), 55 (99), 135 (85), 83 (76), 345 (37).

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ., Mult., J (Hz): 5.84, ta, (3.4); H-1; 2.27, m, H-2; 4.88, ddd, (3.2, 5.2, 7.8), H-3; 2.76, qd, (3.2, 7.2), H-4; 4.80, ddd, (7.0, 4.6, 2.2), H-8; 3.00, dd, (7.0, 12), H-9a; 2.50, m, H-9b; 2.02, s, H-13; 1.19, s, H-14; 1.10, d, (7.2), H-15; 6.08, qq, (1.4, 7.2), H-3'; 1.93, dq, (1.4, 7.2), H-4'; 1.89, qd, (1.4, 1.4), H-5'. **(Espectro 10a)**

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.4 MHz), δ: 127.75, d, C-1; 27.94, t, C-2; 70.72, d, C-3; 33.95, d, C-4; 54.82, s, C-5; 197.66, s, C-6; 152.90, s, C-7; 80.07, d, C-8; 37.85, t, C-9; 132.00, s, C-10; 127.75, s, C-11; 172.49, s, C-12; 9.44, q, C-13; 20.71, q, C-14; 10.64, q, C-15; 167.19, s, C-1'; 130.28, s, C-2'; 138.32, d, C-3'; 15.80, q, C-4'; 20.79, q, C-5'. **(Espectro 10b)**

Acetilación del compuesto II:

El compuesto II (122 mg, 0.353 mmoles) fue acetilado por el mismo procedimiento descrito para el compuesto I y luego de la purificación por cromatografía en placa preparativa, eluida con hexano-acetona 8:2, se obtuvieron 71.7 mg, 0.185 mmoles (52.3 %) del compuesto XIV.

Compuesto XIV:

Aceite, $[\alpha]_D^{25}$ - 38.6° (CHCl₃, c 0.21)

UV (nm): 221 (log ε = 4.3)

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 2980, 1758., 1712.

EM-FAB m/z, (% de Int. Rva): 55 (100), 83 (90), 154 (55), 229 (85), 389 (88).

RMN-H (200 MHz, CDCl₃, TMS), δ., Mult. J (CH₃): 5.71, tda, (1.6, 3.4), H-1; 2.31, m., H-2; 5.09, ddd, (3.4, 5.4, 6.0), H-3; 2.45, m, H-4; 5.66, da. (1.4), H-6; 4.55, ddd, (1.4, 7.2, 7.4), H-8; 2.85, dd, (7.2, 12), H-9a; 2.27, m., H-9b; 1.88, sa, H-13; 1.04, s., H-14; 1.01, d, (7.2), H-15; 6.06, qq, (1.6, 7.2), H-3'; 1.98, dq, (1.6, 7.2), H-4'; 1.88, qd, (1.6, 1.6), H-5', 2.23, s, H-2". **(Espectro 11a)**

RMN-¹³C (75.4 MHz, CDCl₃), δ: 125.66, d, C-1; 27.75, t, C-2; 69.88, d, C-3; 35.98, d, C-4; 45.78, s, C-5; 76.00, d, C-6; 157.04, s, C-7; 78.40, d, C-8; 38.94, t, C-9; 132.98, s, C-10; 123.16, s, C-11; 167.21, s, C-12; 8.56, q, C-13; 10.85, q, C-14; 16.40, q, C-15; 173.80, s, C-1'; 127.83, s, C-2'; 138.036, d, C-3'; 15.79, q, C-4'; 20.68, q, C-5'; 169.86, s, C-1"; 20.81, s, C-2". **(Espectro 11b)**

Epoxidación del compuesto II:

A 128 mg (0.369 mmoles) del compuesto II se le adicionaron 5 ml de cloroformo y 193 mg (0.6 mmoles) de ácido m-cloroperbenzoico. La mezcla se dejó reaccionar con agitación constante, y al cabo de una hora, en vista de que se observó presencia de abundante lactona sin reaccionar, se le adicionaron otros 70 mg (0.45 mmoles) del ácido extendiendo el tiempo de reacción por una hora mas. Se aislaron compuestos en los que fue evidente la epoxidación del doble enlace en el grupo angelato, (XV), la epoxidación 1(10), (XVI) y la epoxidación en ambas posiciones (XVII), sin embargo, dado que cada uno de estos estaba acompañado por mezclas de esteroisómeros, no fue posible purificarlos.

Hidrólisis del Calenduladiol:

Se tomaron 74 mg de ésteres del Calenduladiol y se disolvieron en 5 ml de metanol, se adicionaron 100 mg de KOH y se dejó reaccionar a reflujo por 7 horas. El transcurso de la reacción fue seguido por cromatografía en placa fina y una vez terminada, todo el disolvente se evaporó y el residuo fue extraído con cloroformo para obtener 13 mg de calenduladiol y un sólido conteniendo las sales de los ácidos orgánicos. Dichas sales fueron disueltas en agua destilada y aciduladas hasta pH 3.0 para librar los ácidos los cuales fueron extraídos con cloroformo. Un análisis de gases masas de sus ésteres metílicos permitió identificarlos como los ácidos isopalmítico y mirístico.

PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA:

Todos los extractos se sometieron a ensayos de actividad biológica contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*.

También se hicieron pruebas contra los hongos *Fusarium sporotrichum*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solanii*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Aspergillus niger* para los compuestos I y II.

Los derivados **X**, **XI**, **XIII** y **XIV** fueron evaluados contra el hongo *Trichophyton mentagrophytes*, debido a que las pruebas contra hongos de los compuestos **I** y **II** mostraron actividad contra dicho hongo.

Se evaluó el efecto del compuesto **I** sobre la germinación de semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), del pasto mijo mexicano (*Echinochloa crus-galli*), y del jitomate (*Lycopersicon esculentum*); además sobre el crecimiento radial de los hongos *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici*.

a) Bioensayos con Bacterias

Se utilizó el método de difusión en agar ²⁷ como se describe a continuación:

MEDIO

Se seleccionó como medio de cultivo estándar el agar Mueller-Hinton.

INÓCULO:

Usando un hisopo estéril de poliéster se tocaron las superficies convexas de 4 ó 5 colonias de los microorganismos a ensayar (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *shigella boydii*, etc.). Se sumergió el hisopo en 3 ml de caldo tripteína soya (Bioxon III); se enjuagó bien el líquido para descargar todo el material y, posteriormente, se retira el hisopo. El tubo de cultivo se incubó a 37 °C durante aproximadamente 2 a 3 horas, o hasta que la turbidez del medio fué equivalente a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/ml por comparación directa con el estándar 3 de Mc Farland.

Se igualó la turbidez de la suspensión de organismos a la del estándar mediante adición de solución salina, y una vez logrado esto, se sumergió un segundo hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión bacteriana y antes de retirarlo se eliminó el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inoculó la superficie de una placa con agar Mueller-Hinton.

Por último, se sembró mediante estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría. Una vez seco el inóculo, la placa quedó lista para la aplicación de las muestras de prueba:

Aplicación de sustancias de prueba:

Para este caso se usaron sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel whatman del No. 5. En todos los casos se hicieron las diluciones necesarias para que los sensidiscos llevaran la cantidad deseada del extracto.

Al llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocaron manualmente en la superficie del agar. Se colocaron utilizando una pinza estéril a por lo menos 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que hubiera superposición de zonas de inhibición, o se extendieran hasta el margen de la placa. Al final sobre cada sensidisco se colocó la concentración de cada extracto a evaluar.

Preparación de Muestras:

Los sensidiscos se impregnaron con soluciones valoradas de las muestras hasta llegar a la concentración deseada de sustancia por disco, en este caso, se utilizaron solventes como el metanol y el cloroformo para solubilizar los compuestos y posteriormente impregnar los discos dejando evaporar el solvente durante 12 horas.

Controles Negativos:

Discos a los que se les agregó metanol, o cloroformo y que se dejaron evaporar durante 12 horas al igual que los experimentales (10 µl/ sensidisco)

Control Positivo:

se utilizaron discos de kanamicina de 30 µg (Bigaux E-03).

Incubación:

Todas las placas se incubaron a 35 ° C colocando siempre placas con discos sin sustancias a evaluar como control negativo.

Interpretación de Resultados:

Las zonas de inhibición se midieron con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hizo por triplicado y se reportaron los valores promedio.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la concentración bactericida mínima.

Preparación de reactivos y diluciones:

La solución con el agente antimicrobiano de trabajo se preparó diluyendo la droga en el caldo Mueller-Hinton a la mayor concentración final deseada.

La prueba se realizó en tubos de ensayo de 13 por 100 mm con tapa rosca o con tapones de algodón. Para un pequeño número de pruebas se prepararon diluciones al doble directamente en los tubos de la siguiente forma: Se colocaron 2 ml de la solución patrón de la droga en el primer tubo de la serie de diluciones. En cada uno de los tubos restantes se añadieron 1 ml de caldo Mueller-Hinton.

Por medio de una pipeta estéril se transfirió 1 ml desde el primero al segundo tubo y después de mezclar bien el contenido del segundo tubo, se transfiere con otra pipeta estéril (en ésta y en todas las transferencias sucesivas) al tercer tubo.

El proceso se continuó hasta el penúltimo tubo, al cual se le quita 1 ml que se descarta. El último tubo no recibe agente antimicrobiano y sirve de control de crecimiento.

Inoculación e incubación de los tubos:

Se preparó un inóculo que contenía de 10^6 a 10^7 UFC/ ml (unidades formadoras de colonia por mililitro) ajustando la turbidez del cultivo (de aproximadamente 12 horas de crecimiento) a un estándar de turbidez (en este caso se utilizó el estándar 0.5 de McFarland correspondiente a sulfato de bario al 10 % en agua). Posteriormente se diluyó 1:200 y se añadió a cada tubo 1 ml de este inóculo. Todos los tubos se incubaron a 35 °C durante 16-20 horas. No se usó atmósfera de CO₂ debido a que se trabajaron bacterias aeróbicas.

Interpretación de los resultados:

La menor concentración de antimicrobiano que produce inhibición completa del desarrollo visible representó la Concentración Mínima Inhibitoria. (CMI) Una turbidez muy ligera o un pequeño botón de desarrollo de turbidez definida se consideró como si la droga hubiera sido incapaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración.

Determinación de la Concentración Bactericida Mínima:

Para determinar la capacidad de un antimicrobiano para matar a una población de microorganismos se empleó el mismo sistema de la prueba de determinación de CMI. Se tomó como número inicial de microorganismos el inóculo inicial para dicha prueba, mediante el sembrado de una serie de diluciones 1:100 sucesivas en placas de agar Mueller-Hinton. El número inicial de UFC se obtuvo de contar las colonias presentes 24 horas después de la inoculación de las placas, tomando en cuenta el factor de dilución.

En cuanto se determinó la CMI, se tomaron 100 μ l de cada tubo (que representa una concentración de antimicrobiano) y se inocularon en placas de agar Mueller-Hinton. El número de colonias que se desarrollaron en estos cultivos luego de incubar por 24 horas se comparó con el número de UFC / ml del inóculo inicial, el tubo con la concentración que impidió el crecimiento bacteriano se le denominó concentración bactericida mínima (CBM).

b) Bioensayos con hongos patógenos

El ensayo de actividad antifúngica con los hongos *Fusarium sporotrichum*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solanii*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Aspergillus niger*, se llevó a cabo en cajas de petri (100 X 25 mm) conteniendo agar papa y dextrosa (10ml). Después de que la colonia de micelios se desarrolló, se colocaron discos de papel blanco estériles (0.625 cm de diámetro) a una distancia de 0.5 cm desde el borde de la colonia. Una alícuota de 6 μ l conteniendo 10 μ g de cada uno de los compuesto fue adicionada al disco. Las cajas fueron incubadas a 23 °C por 72 horas hasta que las cajas conteniendo el control desarrollaron crecimiento micelial y las cajas conteniendo los compuestos a evaluar, respectivamente, desarrollaron halos de inhibición alrededor del disco.²⁸

Para el análisis cuantitativo, cada uno de los agentes evaluados que inhibieron el crecimiento radial, se adicionaron al agar papa y dextrosa hasta alcanzar concentraciones finales de 33.5, 67.5, 125, 250 y 500 μ g/ml, siendo mezclados rápidamente y vertidos dentro de tres cajas de petri de 6 cm por separado. Después de que el agar se enfrió a temperatura ambiente, se inoculó una pequeña cantidad de micelio (1 X 1 mm) a cada caja. Para el control negativo se empleó el solvente usado para diluir los compuestos (metanol) y para el control positivo se empleó Ketoconazol a 7 μ g/ml. Después de la incubación a 23 °C por 96 horas, se midió el área de la colonia micelial del control negativo y el crecimiento del micelio de los hongos y por comparación con el control negativo se determinó la DL₅₀, que corresponde al crecimiento del 50% de micelio con relación a dicho control.

c) Bioensayos con hongos fitopatógenos:

Se probó el efecto fungicida del compuesto I sobre el crecimiento radial de los hongos *Alternaria solanii*, *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici*.

En el experimento se utilizó una concentración de 250 ppm del compuesto I, debido a que los hongos, en general, son más resistentes que las semillas al efecto fitotóxico. Se pesaron 15 mg del compuesto y se diluyeron en 0.1 ml de metanol.

Posteriormente se aforó a un volumen de 30 ml con agua destilada estéril (solución patrón). En una caja de petri de 5 cm de diámetro se añadieron 3 ml de la solución patrón y 3 ml de PDA (Merk) estéril, para obtener la concentración final de 250 ppm. El control consistió en una muestra de agua-disolvente. Cada uno de los hongos se tomó de cultivos en PDA de 10 días de edad, incubados en la oscuridad en una estufa de crecimiento a 25 °C. El crecimiento radial del micelio se midió a los 6 días de iniciado el bioensayo; tomando dos medidas perpendiculares del diámetro que fueron promediadas.

d) Bioensayo sobre el efecto fitotóxico en el crecimiento radicular de semillas:

Para este experimento fueron seleccionadas semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), el pasto mijo mexicano (*Echinochloa crus-galli*) y jitomate (*Lycopersicon esculentum*), por tener una alta viabilidad. Se pesaron 8 mg del compuesto y se disolvieron en 0.1 ml de metanol. Posteriormente, se le añadieron 40 ml de agua destilada para obtener una solución patrón de 200 ppm. En cajas de petri de 5 cm de diámetro previamente lavadas, se depositaron 3 ml de agar al 2% mas 3 ml de agua destilada. Una vez solidificado el agar, se colocaron 10 semillas de cada especie en cada caja y se realizaron 4 repeticiones por tratamiento. Las cajas se mantuvieron en una incubadora a 27°C en la oscuridad durante 36, 48 y 72 horas para *Amaranthus*, *Echinochloa* y *Lycopersicon* respectivamente. Los porcentajes de inhibición/ estimulación en cada tratamiento se calcularon con base en los datos del control el cual consistió de 3 ml de agar al 2% mas 3 ml de agua destilada.

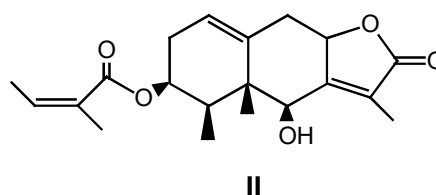
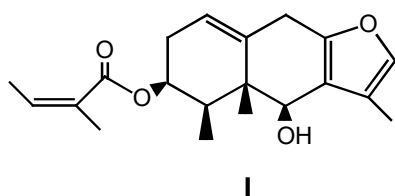
RESULTADOS

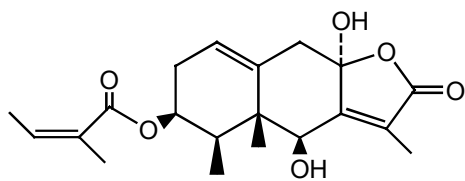
Como resultado del estudio fitoquímico de *R. lineolata*, (**Esquema 5**) se aislaron tres sesquiterpenos: El furanoeremofilano **I** aislado por primera vez en forma pura, una nueva eremofilanólida **II** y una lactona **III** que también se aisló por primera vez en forma pura, ya que su estructura había sido propuesta, al igual que la del compuesto **I** formando parte de una mezcla constituida por los ésteres tíglico, seneciólico y angélico encontrada en *Senecio pericalia*.²⁹ En el presente trabajo se dan a conocer los datos espectroscópicos y constantes físicas de los compuestos **I** y **III**, no disponibles en la literatura.

Se aislaron también los flavonoides **VIII** y **IX**, una mezcla de ésteres del calenduladiol (**VII_a** y **VII_b**), una mezcla de sitosterol-estigmasterol, (**VI_a** y **VI_b**), glucósido de sitosterol (**IV**), y sacarosa (**V**).

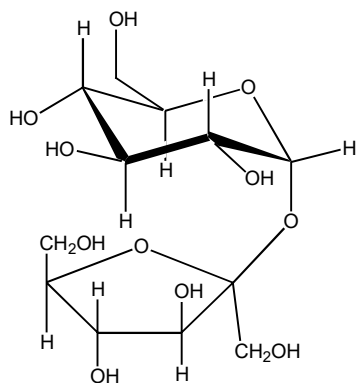
Las estructuras de los compuestos **I**, **II** y **III** se elucidaron por métodos espectroscópicos y preparación de derivados, la de los compuestos **VIII** y **IX**, por comparación de sus datos espectroscópicos y constantes físicas con las reportadas en la literatura y la de los compuestos **V**, **VI_a** y **VI_b**, por comparación con muestras auténticas.

Las estructuras de los compuestos **VII_a** y **VII_b**, que se encontraron mezclados, se determinaron por métodos espectroscópicos y comparación de sus datos con los de una mezcla auténtica.¹³ Sus estructuras se confirmaron por medio de una saponificación de la mezcla de ambos ésteres, de la que se obtuvo calenduladiol y dos ácidos grasos que fueron identificados como ácido mirístico y ácido isopalmítico.

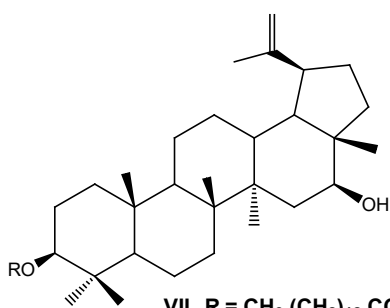




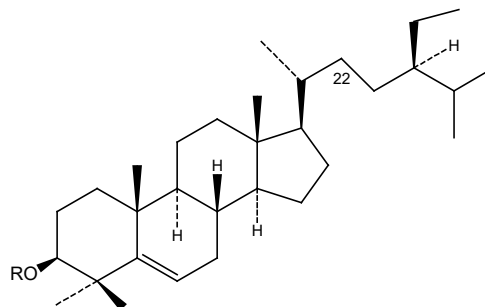
III



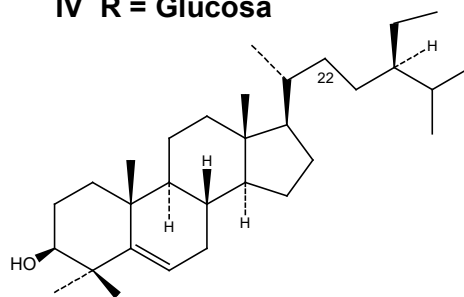
V



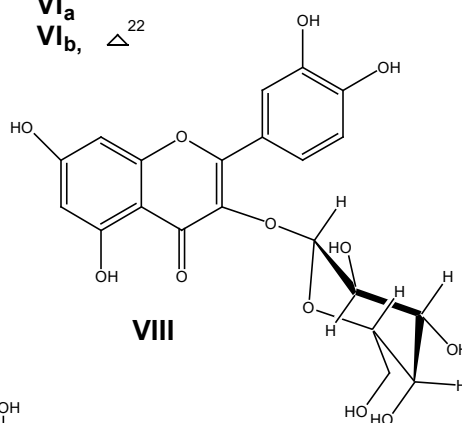
VII_a R = CH₃ (CH₂)₁₂ CO
VII_b R = (CH₃)₂ CH (CH₂)₁₂ CO



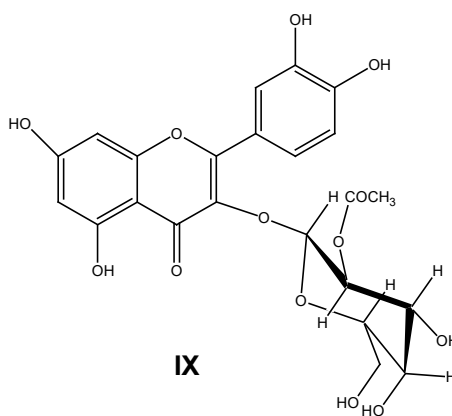
IV R = Glucosa



VI_a Δ^{22}
VI_b



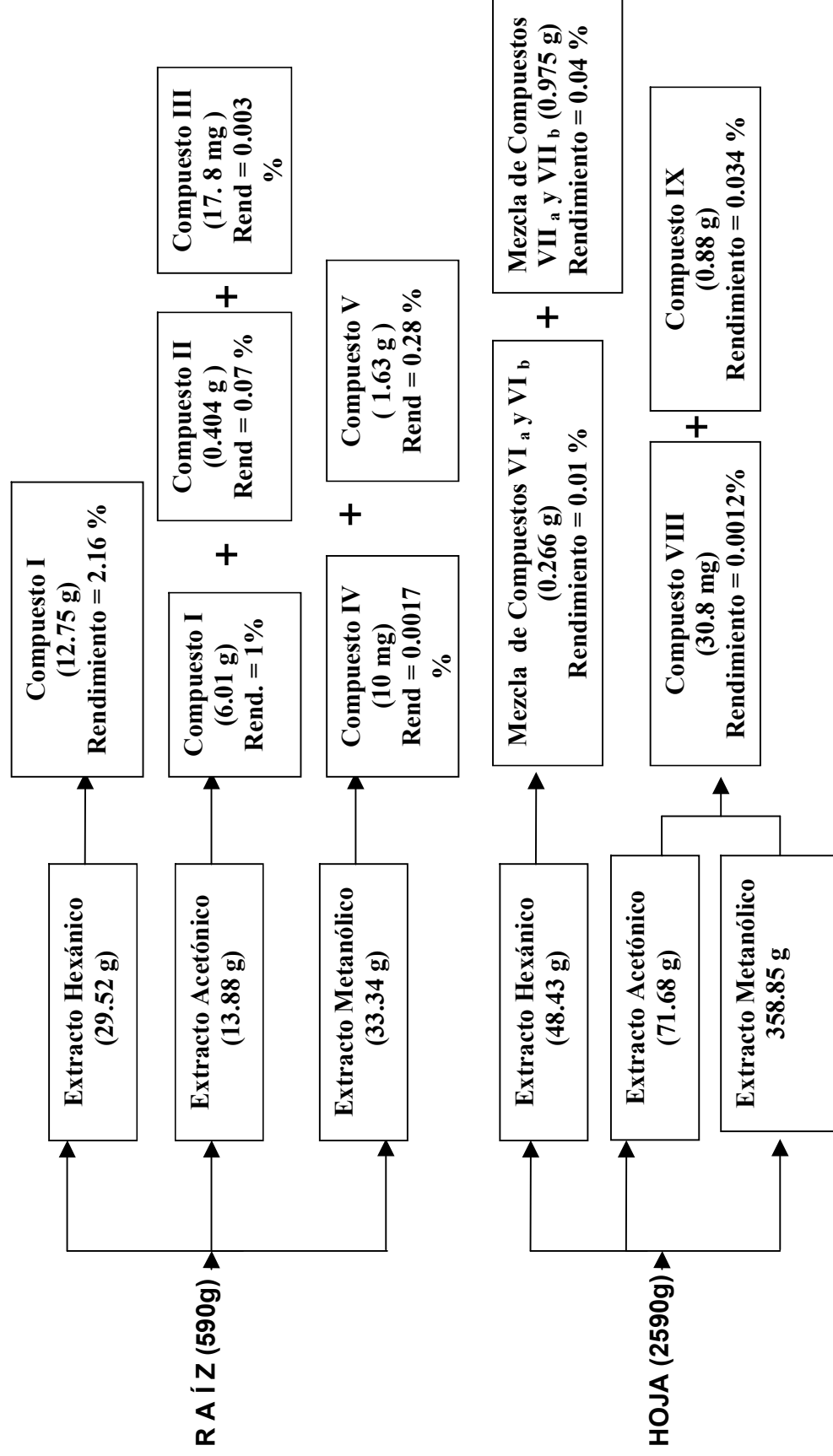
VIII



IX

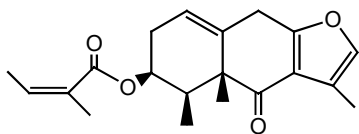
RESULTADOS (PARTE QUÍMICA)

METABOLITOS OBTENIDOS DE *Roldana lineolata*



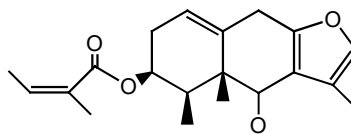
Esquema 5: diagrama de obtención de los metabolitos

DERIVADOS PREPARADOS:



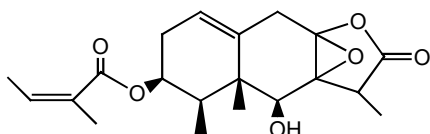
X

Rendimiento = 25.2 %



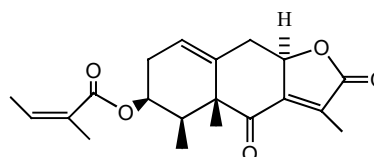
XI

Rendimiento = 48 %



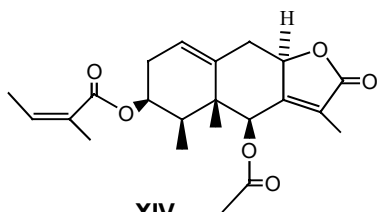
XII

Rendimiento = 3.2 %



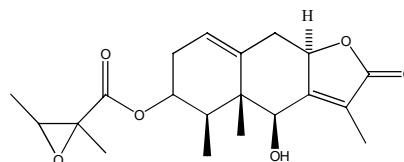
XIII

Rendimiento = 91.3 %



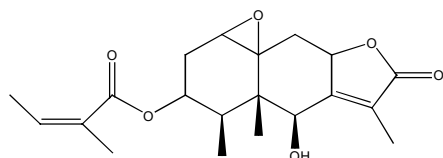
XIV

Rendimiento = 48%



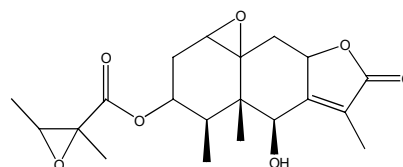
XV

(Mezcla de estereoisómeros)



XVI

(mezcla de estereoisómeros)



XVII

mezcla de estereoisómeros)

RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Sólo los extractos hexánico y acetónico de tallo mostraron actividad biológica contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Vibrio Cholerae*, mientras que el furanoeremofilano I y II mostraron actividad contra hongos.

Tabla de resultados de la actividad del extracto hexánico de tallo:

Bacteria	* CIM ($\mu\text{g/ml}$)	** CBM ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Staphylococcus. aureus</i>	750	1000
<i>Vibrio Cholerae</i>	325	500

* Concentración inhibitoria mínima, ** Concentración bactericida mínima

Tabla de resultados de la actividad del extracto acetónico de tallo:

Bacteria	* CIM ($\mu\text{g/ml}$)	** CBM ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Staphylococcus. aureus</i>	-----	1000
<i>Vibrio Cholerae</i>	750	500

* Concentración inhibitoria mínima, ** Concentración bactericida mínima

Tabla de resultados de la actividad en hongos de los compuesto I y II (DL_{50} $\mu\text{g} / \text{ml}$):

Microorganismo (hongo)	DL_{50} de I	DL_{50} de II
<i>Fusarium sporotrichum</i>	> 1000	750
<i>Fusarium monoliforme</i>	500	750
<i>Rhizoctonia solanii</i>	> 1000	1000
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	250	125 (CFM = 500)
<i>Aspergillus Níger</i>	> 1000	> 1000

CFM = Concentración fungicida mínima

DL_{50} = Dosis letal media

Tabla de resultados de la actividad sobre el hongo *Trichophyton mentagrophytes* de los compuestos I, II y sus respectivos derivados oxidados y acetilados (DL₅₀):

Sustancia	I	X	XI	II	XIV	XV
DF ₅₀ (µg /ml)	250	250	250	125	500	No activo

Tabla de resultados sobre el efecto del compuesto I en la germinación de semillas (% de crecimiento):

Tratamientos	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	<i>Echinochloa crusgalli</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Control	100	100	100
25 µg / ml	46.7*	98.0	85.9
50 µg /ml	20.2*	79.3	67.2*
75 µg /ml	0.0*	67.0*	62.4*
100 µg /ml	0.0*	60.6*	62.8*

* Significativo respecto al control, P < 0.05

Tabla de resultados sobre el crecimiento radial de tres especies de hongos fitopatógenos (% de crecimiento) en presencia del compuesto I (250 µg / ml):

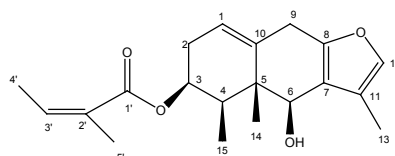
Tratamiento	<i>Alternaria Solanii</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Phytophthora capsici</i>
Control	100	100	100
250 µg / ml	47.0*	64.8*	63.5*

*significativos respecto al control

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS AISLADOS:

COMPUESTO I:

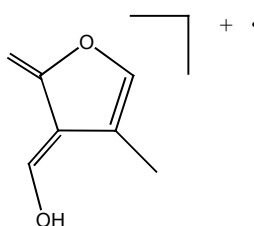


Este compuesto ha sido reportado previamente en la literatura formando parte de una mezcla de ésteres de eremofilano ²⁹. En el presente trabajo se obtuvo por primera vez en forma pura.

El espectro IR, mostró una banda a 3461 cm^{-1} que indicó la presencia de un grupo hidroxilo; una banda a 1700 cm^{-1} característica para el grupo carbonilo de un éster α, β insaturado y bandas pronunciadas a 1164 cm^{-1} y 1237 cm^{-1} , correspondientes a la presencia de dobles enlaces y una banda a 848 cm^{-1} , indicativa de un anillo de furano ³⁰.

Por espectroscopia de masas de alta resolución FAB, se determinó una masa de m/z : 331.1909 que corresponde a $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_4$ $[\text{M} + 1]^+$. Adicionalmente, el análisis del grado de insaturaciones ($\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$) para una molécula de fórmula $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_4$ arrojó el equivalente a 8 insaturaciones.

Por la técnica de impacto electrónico se observaron además del pico base a m/z 230 proveniente de la pérdida del ácido angélico $[\text{M} - 100]^+$, un fragmento de m/z 124 (64%) que corresponde a un ión proveniente del furano y que es común a los furanoeremofilanos. ²⁹



Este fragmento constituye una prueba más de la presencia del anillo de furano en la molécula que se había deducido de acuerdo a la señal observada en el IR a 848 cm^{-1} .

El espectro de RMN - ^1H (**espectro 1a**) mostró en la región de campo alto, las dos señales características para los metilos 14 y 15 de un compuesto de tipo eremofilano; la primera como singlete a δ : 1.05, y la segunda como doblete a δ : 0.98 con $J = 6.8\text{ Hz}$.

En el espectro COSY (**espectro 1c**), se observó claramente la correlación del metilo 15 con el hidrógeno unido al C-4 al cual está unido dicho grupo.

La presencia de un grupo angelato en la molécula, se hizo evidente por la presencia de los metilos vinílicos a δ 1.987 (dq J, 7.2, 1.5 Hz) y 1.903, (qd, J, 1.5, 1.5) atribuidas a los metilos 4' y 5', respectivamente; y el desplazamiento del protón vinílico 3' a 6.1 ppm permitió distinguirlo del grupo tiglató cuyo protón vinílico 3' debe aparecer a un campo mas bajo, usualmente alrededor de 6.8 ppm.

Adicionalmente, en el espectro de RMN - ^{13}C (**Espectro 1b**) se observó a δ 167.7 ppm la señal para el único grupo carbonilo presente en la molécula, el que corresponde al angelato.

La señal típica para el protón 12 del anillo de furano a δ 7.04 1H, qa, (1.2, Hz) mostró un acoplamiento con una señal a δ 2.06, d (1.2) que integra para tres hidrógenos la cual se atribuyó al metilo 13. Estas asignaciones fueron corroboradas en el experimento COLOC por los acoplamientos observados a 2 y 3 enlaces de H-12 con los carbonos 11 y 7 respectivamente.

Con base en las señales descritas hasta ahora fue posible deducir que el compuesto que nos ocupa es un sesquiterpeno del tipo furano-eremofilano con un grupo angelato.

La unión del grupo angelato al carbono 3 se dedujo del hecho que H-3 apareció desplazado a campo bajo (δ 5.22, dt, J, 3.6, 7.8). Por otro lado, en el experimento COSY

se observaron interacciones de este hidrógeno con el metino H-4 y con el metileno H-2. La señal observada a δ 4.85, dd, (1.2, 2.4) se atribuyó al hidrógeno 6, base del grupo hidroxilo, el cual muestra correlación COSY con H-9a y H-9b. Por otro lado, en el espectro COLOC se observaron correlaciones a tres enlaces entre H-6 y los carbonos 8, 11 y 14. Finalmente, la señal de H-6, δ 4.84, desapareció por oxidación de la molécula con el reactivo de Jones.

La señal a δ 5.52, td, (5.7, 1.8) se atribuyó al hidrógeno vinílico H-1 el cual mostró una correlación en el espectro COSY con los hidrógenos del carbono 2 y con uno de los hidrógenos unidos al metileno C-9. Todas las asignaciones concuerdan con las señales observadas en el experimento DEPT y las interacciones mostradas en los experimentos HETCOR Y COLOC

Con respecto a la estereoquímica de la molécula, si asumimos que la orientación del metilo unido al carbono 4 es β de acuerdo a criterios biogénéticos, entonces, debido a que existe efecto NOE entre H-4 y H-6, la orientación del OH en C-6 debe ser β .

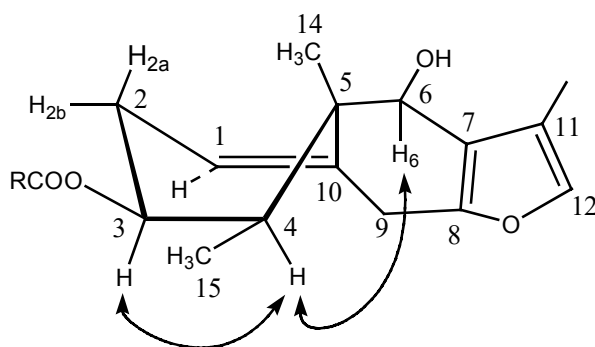
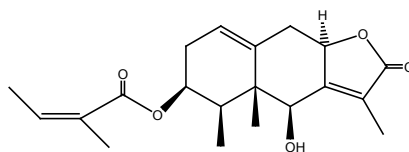


Fig. 2 : Principales efectos NOE en el furano-eremofilano I

Compuesto II:



No existe ningún reporte hasta la fecha para la molécula II, sin embargo, el hecho de que posee el mismo esqueleto que el compuesto I y sólo difiere en tener un anillo lactónico en lugar del furano, facilitó en gran manera su análisis espectral.

El espectro UV (λ_{\max} 222 nm, $\log. \epsilon = 4.14$), y dos bandas en el IR a 1737 cm^{-1} y 1753 , indicaron la presencia de un éster y una γ -lactona α, β , insaturada.

Una banda en el IR a 3452 cm^{-1} corroboró la presencia del grupo hidroxilo en la estructura propuesta. También, se dedujo la presencia de un éster α, β insaturado²⁹ a partir de la banda de carbonilo a 1737 cm^{-1} y las de dobles enlaces 1236.0 y 1160 cm^{-1}

Por espectroscopia de masas de alta resolución (FAB), se obtuvo una masa estimada de m/z 347.1858 $[M + 1]^+$, que corresponde a una fórmula molecular de $C_{20}H_{26}O_5$, cuyo valor concuerda con la masa para la estructura propuesta de fórmula $C_{20}H_{26}O_5$.

El análisis del grado de insaturaciones ($C_n H_{2n+2}$) para ésta molécula de fórmula $C_{20}H_{26}O_5$ arrojó el equivalente a 8 insaturaciones que en la estructura propuesta corresponden a los dos grupos carbonilo, 3 dobles enlaces y 3 ciclos.

El espectro obtenido por la técnica de impacto electrónico, muestra una señal $[M]^+$ de m/z 346, que corresponde al ión molecular de la estructura propuesta.

El ión molecular de esta lactona presenta 16 unidades adicionales con respecto al ión molecular para la molécula **I**, de lo cual se dedujo, la presencia de un átomo de oxígeno más en la molécula, sugiriendo el anillo de lactona.

Se observó también un fragmento de m/z 246 (40%) equivalente a la pérdida del grupo angelato $[M - \text{Ang}]^+$. Esto corrobora el patrón de fragmentación típico en este tipo de moléculas. El pico base fue un fragmento de m/z 121 (100%) que posiblemente representa un fragmento de $[C_9H_{13}]^{33}$. Del mismo modo, la señal de m/z 83 (68%), corresponde a un fragmento $[\text{RCO}]^+$ que proviene del grupo angelilo.

Los cambios estructurales en la molécula **II** con respecto al compuesto **I** se hacen muy evidentes en el espectro de RMN- ^1H , (**espectro 2a**), en donde, no se observó la señal que correspondía al hidrógeno 12 puesto que ahora se tiene un anillo de lactona en lugar de furano y el hidrógeno 12 fue reemplazado por un grupo carbonilo. Adicionalmente, en la región comprendida entre 4-5 ppm, apareció una nueva señal a δ 4.42 ppm, que corresponde al hidrógeno unido al carbono 8. Esta señal se observó como un ddq ($J = 10.8, 6.9, 1.5$), producto de su acoplamiento con los hidrógenos 9 y el metilo 13, de acuerdo a las correlaciones vistas para dicho hidrógeno en el experimento COSY (**espectro 2c**).

La señal para los hidrógenos del metilo 13 aparecieron a δ 2.07 como un dd, debido a un acoplamiento homoalílico con los hidrógenos 6 y 8, razón por la cual, la señal para el hidrógeno 6 se observó como un singulete ancho. De acuerdo a la literatura, para que haya un acoplamiento entre H-6 y H-13, debe existir un ángulo cercano a 90° entre ambos.^{31, 32}.

Su espectro de RMN- ^{13}C (**espectro 2b**), mostró a campo alto, señales para 5 metilos y todas ellas presentaron correlación HETCOR (**espectro 2d**) con sus respectivos hidrógenos. El mismo espectro exhibió también a campo bajo, las dos señales para carbonilo correspondientes a la lactona y al angelato a δ 174.54 y 167.83 ppm, respectivamente.

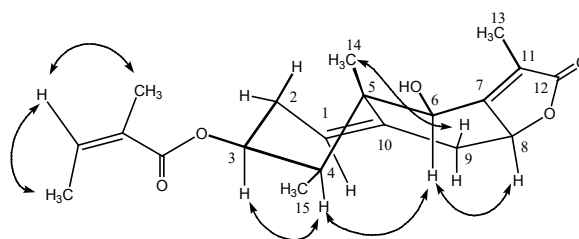
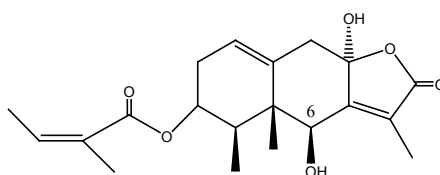


Fig. 3 : Principales efectos NOE de la furanoeremofilanólida II

En el experimento NOESY (**Espectro 2e**), **Fig. 3** se obtuvo una interacción del hidrógeno 8 con el hidrógeno 6 y debido a que este último presenta una interacción con el hidrógeno 4 que biogénicamente debe encontrarse en la cara α de la molécula, se asumió que el hidrógeno 8 debe tener a su vez una orientación α . Con respecto a los hidrógenos unidos al carbono 9, se consideró que la señal que aparece a δ 2.75 ppm, corresponde al hidrógeno 9α por cuanto no presentó interacción Noe con el metilo 14 que sabemos, se debe encontrar β . La señal que apareció a δ 2.14 ppm, se atribuyó al hidrógeno 9β , que si mostró una interacción Noe con el metilo 14 β .

Del mismo modo, existen interacciones NOESY del protón vinílico 3' con los metilos 4' y 5', cosa que no ocurriría si fuera un grupo tigolato, y la ausencia de una interacción entre ambos metilos, permitió ratificar la presencia del grupo angelato en la molécula.

COMPUESTO III



Esta lactona tuvo una estructura muy parecida a la de **II**. Su diferencia radicó en que contiene un sustituyente en la posición 8, puesto que en su espectro de RMN- ^1H ya no se vio la señal a δ 4.42 ppm que corresponde a H-8 en **II** y en RMN- ^{13}C apareció la señal de C-8 desplazada a δ 102.48 ppm, lo que indicó que se trataba de un átomo de carbono de tipo hemiacetalico.

El espectro IR para este compuesto mostró al igual que la lactona **II**, bandas para hidroxilos a 3442 cm^{-1} , para γ -lactona a 1753 cm^{-1} y la correspondiente al carbonilo del grupo éster a 1711 cm^{-1} .

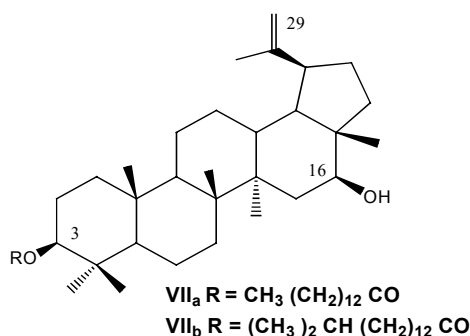
La espectroscopia de masas de impacto electrónico mostró un fragmento de m/z 362 (0.2 %) $[M]^+$. Correspondiente al ión molecular estimado para $C_{20}H_{26}O_6$, y representa 16 unidades mas con respecto al compuesto **II** lo que comprueba que los dos compuestos difieren en un átomo de oxígeno.

Esta molécula también presenta un acoplamiento entre el hidrógeno H-6 (sa, $J = 1.5$) y los hidrógenos del metilo 13 (d, $J = 1.5\text{ Hz}$), para lo cual se requiere, como se dijo antes, que haya un ángulo cercano a 90° ^{31,32} entre ambos, lo cual sugiere que la molécula presenta una estereoquímica similar al compuesto **II** y, por lo tanto, el grupo hidroxilo unido al carbono 6 deberá estar orientado β . Para lograr esta conformación es también necesario que el grupo OH de C-8 tenga orientación α .

Una lactona con la misma estructura fue reportada como uno de los componentes de una mezcla de lactonas encontradas en *Senecio pericalia*²⁹ (**Espectro 3a, 3b, 3c, y 3d,**)

Existen razones para pensar que tanto ésta molécula como la eremofilanólida **II**, posiblemente se hayan originado durante el proceso de extracción, siendo su molécula precursora el compuesto **I**. Una de tales razones es su bajo rendimiento con respecto al furano eremofilano **I**. Además existen evidencias de formación de eremofilanólidas a partir de furanos mediante transformaciones químicas y fotoquímicas.³⁴ También durante la reacción del compuesto **I** con el ácido *m*-cloroperbenzoico uno de los productos de reacción fue precisamente el compuesto **III**

Compuesto VIIa y VIIb



Las estructuras de estos compuestos que se obtuvieron en mezcla, se dedujeron por comparación de sus datos espectroscópicos de RMN-¹H con los de una muestra original del compuesto y su producto de hidrólisis, además de un análisis de gases masas. **(Espectro 4a).**

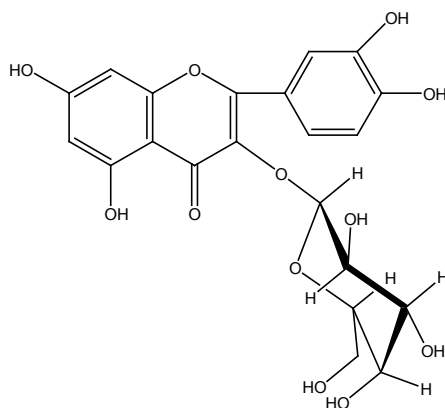
A primera vista, se observa una señal a δ 4.45 ppm, (dd, J = 5.2 Hz, 10.8 Hz) que corresponde al hidrógeno unido al carbono 3 del cual se desprende el grupo éster. Se observa también otra señal base de oxígeno a δ 3.60 ppm dd (J = 5.0 Hz, 11.2 Hz) correspondiente a hidrógeno unido al carbono 16, al cual está unido un grupo hidroxilo.

Se distinguen las señales para el par de protones olefínicos del C-29 a δ : 4.70 ppm y 4.59 (da, J_{gem} = 2.0) y un metilo vinílico a δ : 1.68, los cuales son característicos del grupo isopropilo. El espectro de RMN-H de ésta mezcla de ésteres resultó idéntico al aislado de *R. barba-johannis*.¹³

Su estructura se comprobó mediante una hidrólisis básica que produjo Calenduladiol cuyo espectro de RMN-¹H **(Espectro 4b)** resultó idéntico al de una muestra original. Allí se observó el desplazamiento a campo alto de la señal para el hidrógeno 3 como consecuencia de la pérdida del grupo éster.

Los ácidos grasos fueron identificados como mirístico e isopalmítico por medio de un análisis de gases masas de sus ésteres metílicos.

COMPUESTO VIII:



Este compuesto se obtuvo por cromatografía en forma cristalina con pf. 243-245 °C y su estructura se dedujo de acuerdo al siguiente análisis espectral:

En el espectro IR se observaron bandas para hidroxilo a 3264 y 3456 cm^{-1} , y banda para carbonilo a 1655 cm^{-1} .

El espectro de RMN- ^1H (**Espectro 5a**) mostró una señal simple a campo bajo (δ : 12.626 ppm) indicativa de un hidroxilo en el carbono 5 de una molécula de flavonoide cuyo desplazamiento se debe a la formación de puentes de hidrógeno con un grupo carbonilo en la posición 4.

En el mismo espectro se observaron también picos característicos de una hexosa, entre ellos H-1" a δ 5.37, d (7.8) y los hidrógenos 6" a 5.13, d (4.6) y 4.85, d (5.4) respectivamente.

La resonancia de carbono 13 (**Espectro 5b**) fue decisiva para deducir que dicho flavonoide era un flavonol, ya que los desplazamientos químicos de los carbonos C-2, C-3, y C-4 (C=O) que aparecieron a δ 156.2, 133.4, y 177.4 quedaron dentro del rango típico para flavonoles, C-2, 145-150, C-3, 136-139, C=O, 172-177. ³⁵

El hecho de que el C-3 apareciera a un campo ligeramente alto (133 ppm) y C-2 a un campo bastante más bajo, indicó que el carbono 3 se encontraba unido a una hexosa, ya que cuando el OH de C-3 se glicosila, la señal para dicho carbono se desplaza a campo alto mientras que C-2 se desplaza varias unidades a campo bajo (156 ppm).³⁵

La región en RMN-¹H, desde 6.2 ppm a 6.4 ppm, presentó 2 señales dobles, ambas asemejándose a un sistema AX ($J = 2.2$ Hz), cuyos desplazamientos eran característico para protones unidos al anillo A del flavonoide.³⁶

En vista de que se estaba proponiendo un flavonol sustituido en 3 por una hexosa, con un hidroxilo en 5, sólo teníamos la opción de asignar las dos señales dobles a dos hidrógenos que podrían estar unidos a los carbono 6 y 7, 7 y 8 o 6 y 8. La constante $J = 2.2$ Hz fue la clave para asignar la posición 6 y 8 lo cual nos garantizaba un sistema AX, por que el anillo A tenía oxhidrilos en 5 y 7. Solo restaba asignar los dos grupos OH del anillo B y para lograrlo, se observaron las dos señales a 6.80 ppm como un doblete ($J = 8.4$ Hz) y 7.65 ppm como un doble de dobles ($J = 2.2$ Hz y 8.4 Hz), adicionalmente, una señal doble a 7.66 ppm, presentó la misma constante de acoplamiento que se observó para la señal doble a 7.65 ppm ($J = 2.2$) y su magnitud indicó un acoplamiento *meta*.

Lo anterior condujo a asignar dichas señales a los hidrógenos 5', 6' y 2' respectivamente. Las señales que aparecieron entre 3.2 ppm y 5.4 ppm, eran características para los hidrógenos de la galactosa.

El espectro de RMN-¹³C (**espectro 5b**) mostró 21 señales que indicaban que el flavonol estaba sustituido por una hexosa. A campo bajo, se observó una señal para carbonilo ($\delta C = 177.4$ ppm), cuyo desplazamiento químico sugirió que se trataba del carbono C-4 de un flavonol.

El espectro DEPT, mostró 10 señales metino (CH), y un metileno (CH₂), corroboraron la estructura propuesta **VIII**.

En el espectro de masas IE se observó un fragmento de m/z 302 (100%) que se originó por la pérdida del grupo galactosil como se muestra en la fig. 4.

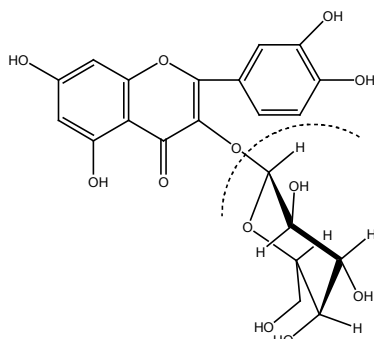


Fig. 4

Se observó también un fragmento de m/z 153 (5%) que se originó por un proceso de fragmentación del tipo Retro-Diels-Alder, característico en flavonoides ³⁷, y que corresponde al fragmento conteniendo el anillo A, mostrado en la figura 5. Este fragmento también fue observado como pico base en el espectro de masas FAB a m/z 154 (100%)

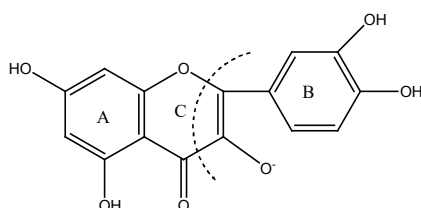


Fig. 5

Un fragmento de m/z 109 (3%) indicó un patrón de fragmentación como el que se muestra a continuación, y dicho valor, equivale al peso del fragmento conteniendo el anillo A. ^{35,37}

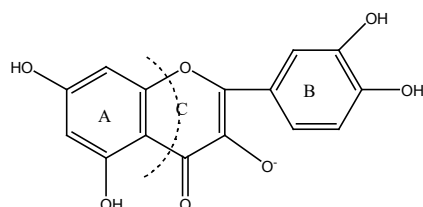
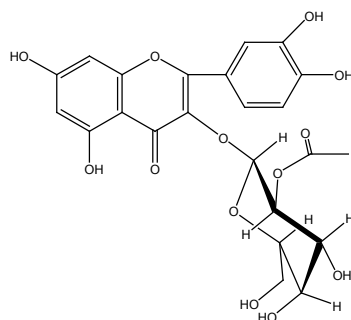


Fig. 6

Todos los datos para el compuesto **VIII** correspondieron al Galactósido de Quercetina, el cual ya ha sido reportado. ^{35,36}

COMPUESTO IX:



Este compuesto mostró un perfil espectroscópico de RMN-¹H (**espectro 6a**) muy similar al compuesto anterior, sin embargo, apareció una señal adicional que integró para tres hidrógenos en δ 2.01 ppm, lo cual hizo pensar que se trataba del galactósido de Quercetina con un grupo metilo adicional en la molécula, que por su desplazamiento químico podría ser de un acetato.

El espectro de RMN-¹³C (**espectro 6b**), mostró, al igual que el compuesto **VIII**, los desplazamientos químicos para C-3 y C-2 de acuerdo con los de un flavonol glicosilado en C-3; difiriendo de **VIII** en tener un total de 23 señales, es decir, dos señales más que el galactósido de quercetina. Aunado a eso una de esas dos señales apareció en la región de carbonilos, por lo que dicha molécula correspondía a un derivado acetilado de **VIII**.

El desplazamiento de la señal en RMN-¹H para el hidrógeno 2" a campo bajo (δ 5.03) con respecto a la señal para el hidrógeno 2" del galactósido de Quercetina (δ 3.63 ppm), permitió deducir que el grupo acetilo se encontraba en dicha posición.

El espectro IR de ésta molécula, mostró una banda ancha para hidroxilo a 3400 cm⁻¹, y bandas para carbonilo a 1657 cm⁻¹ y 1732 cm⁻¹ como era de esperarse de acuerdo a la estructura propuesta.

Por espectrometría de masas FAB⁺ se observó un fragmento de m/z 507 (0.4%) que correspondió al ión molecular, estimado para una fórmula molecular C₂₃H₂₂O₁₃.

El patrón de fragmentación característico en este tipo de moléculas y representado en la figura 6, fue evidente por la presencia de dos fragmentos: Uno de m/z 109 (30%), que corresponde al fragmento conteniendo el anillo A; y otro de m/z 397 (1.2%) que correspondió al fragmento conteniendo el anillo B. También se observó un fragmento de m/z 154 (15%) que corresponde al fragmento conteniendo el anillo A en el patrón de fragmentación de la **fig. 5**

Se vieron acoplamientos en el experimento COSY entre el H-6 y H-8 ($J = 2\text{Hz}$), H-2' y H-6' ($J = 2.5\text{ Hz}$), H-5' y H-6' ($J = 8.5\text{ Hz}$), H-1'' y 2'' ($J = 8\text{Hz}$), H-2'' y 3'' ($J = 9.5\text{ Hz}$), H-3'' y 4'' ($J = 3.5\text{Hz}$), H-5'', H-6 a y b ($J = 6.5\text{ y } 10\text{ Hz}$).

En el espectro HMBC todas las interacciones estuvieron de acuerdo con la estructura propuesta en donde cabe mencionar la correlación del carbonilo del grupo acetilo con el hidrógeno 2'', lo que ratificó la posición de dicho acetilo.

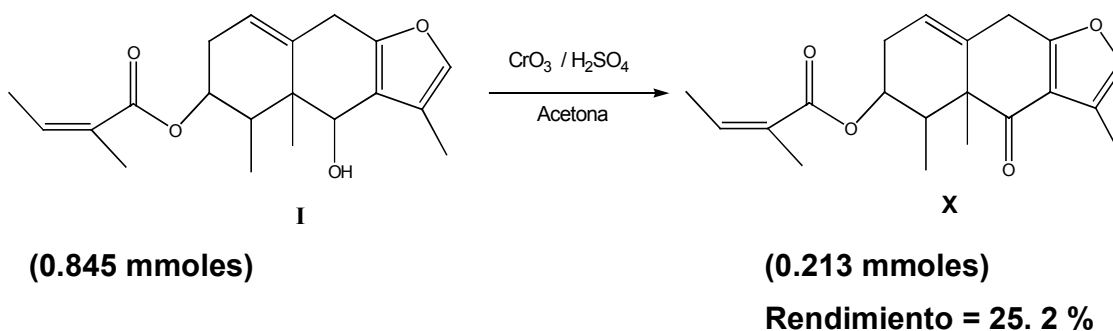
El experimento HETCOR fue consecuente con la asignación para todas las señales de RMN- ^{13}C y RMN- ^1H .

En el experimento DEPT se observaron 10 señales para metinos (CH), una señal para metilo y el resto corresponde a 11 carbonos cuaternarios todo ello ratificando la estructura propuesta para la molécula **IX**.

Finalmente, la estructura se comprobó por comparación de los datos espectroscópicos de RMN- ^1H y RMN - ^{13}C obtenidos, con los reportados para el galactósido de Quercetina acetilado en el carbono 2''.³⁸

DERIVATIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

Oxidación de I:



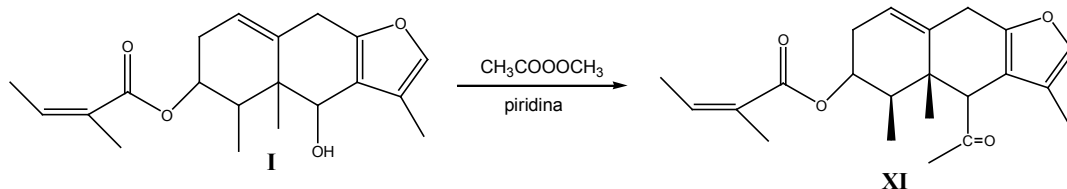
La oxidación del furanoeremofilano con reactivo de Jones produjo la cetona **X** con un rendimiento bajo. Es de notar que debido a que el grupo furano es sensible a los reactivos oxidantes, el rendimiento del compuesto **X** fue bajo (25%) con respecto a la oxidación de la lactona **II** que fue muy alto (91%)

El espectro de RMN-¹H (**espectro 7a**) mostró la desaparición del protón H-6 y el de IR, la presencia de un nuevo grupo carbonilo a 1683 cm⁻¹.

El espectro RMN-¹³C (**Espectro 7b**), mostró un nuevo carbonilo a 197.28 ppm, corroborando así la oxidación del compuesto.

El espectro de masas FAB ratificó también la oxidación a través de una señal de m/z 329 (17%), que corresponde al ión molecular, y está constituido por dos unidades menos que el ión molecular del compuesto **I**, lo cual demuestra la pérdida del hidrógeno 6 y el hidrógeno del grupo hidroxilo durante el proceso de oxidación.

Acetilación de I:



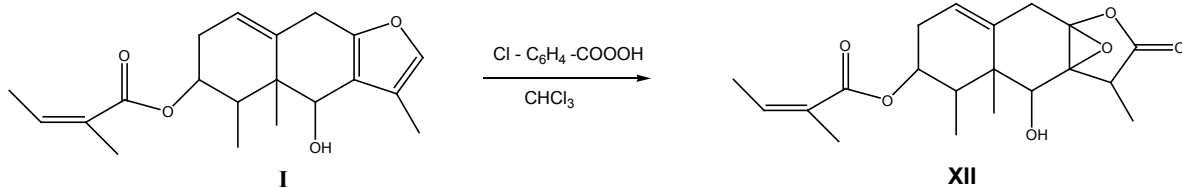
(0.921 mmoles)

(0.444 mmoles)

Rendimiento = 48 %

La acetilación del compuesto **I** produjo en buen rendimiento el acetato **XI** en cuyo espectro de IR se observó la banda de acetato a 1747 cm^{-1} , y la desaparición del grupo hidroxilo. Lo anterior se comprobó con la señal en RMN- ^1H (**Espectro 8a**) a δ 2.15 ppm para los hidrógenos H-2" y las dos señales en RMN- ^{13}C (**espectro 8b**) δ 170.75 ppm y 20.73 ppm para los carbonos 1" y 2" respectivamente.

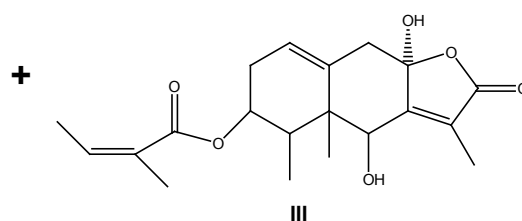
Epoxidación de I



(1 mmol)

(0.0331 mmol)

Rendimiento = 3.2 %

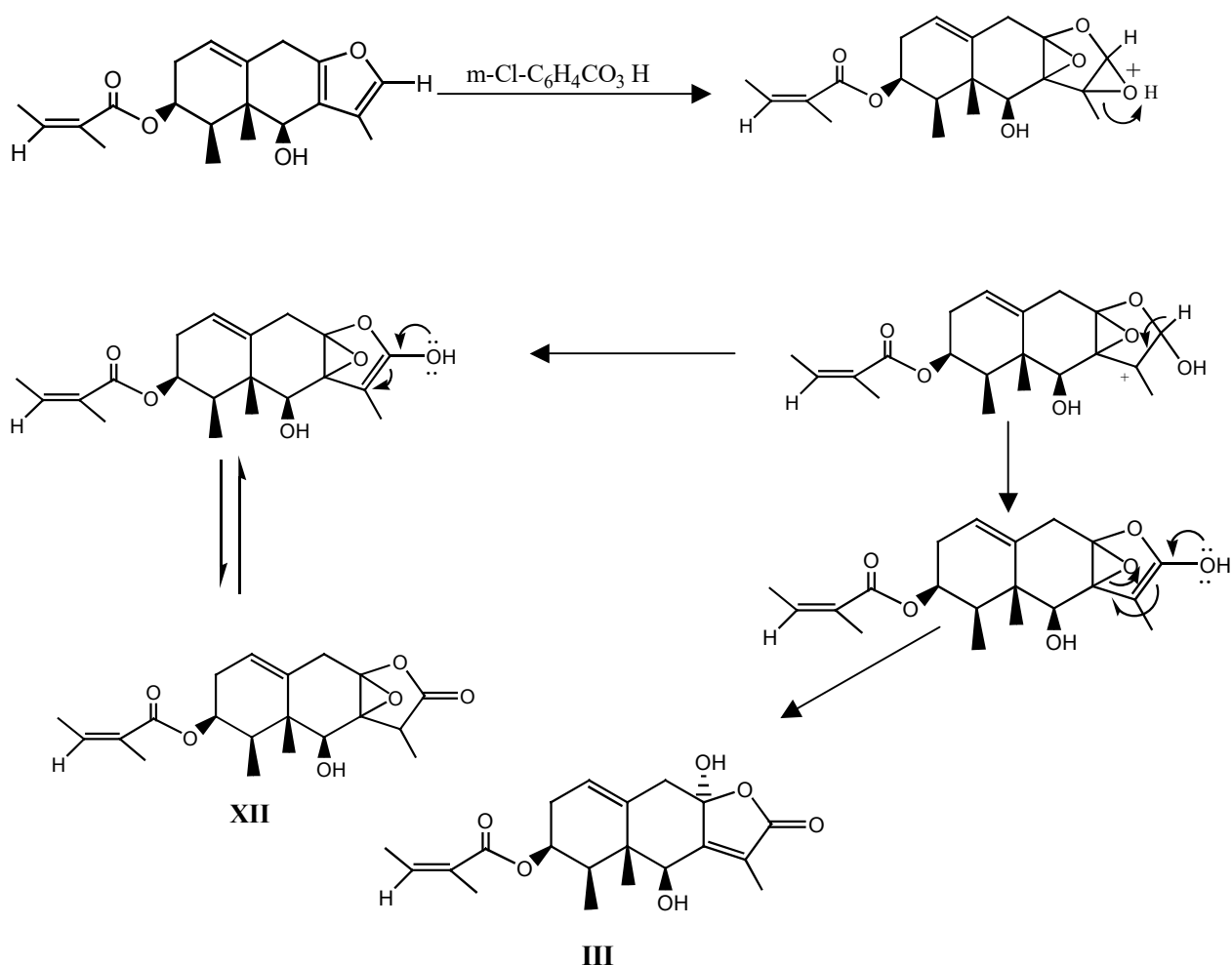


(0.0607 mmoles)

Rendimiento = 6.07 %

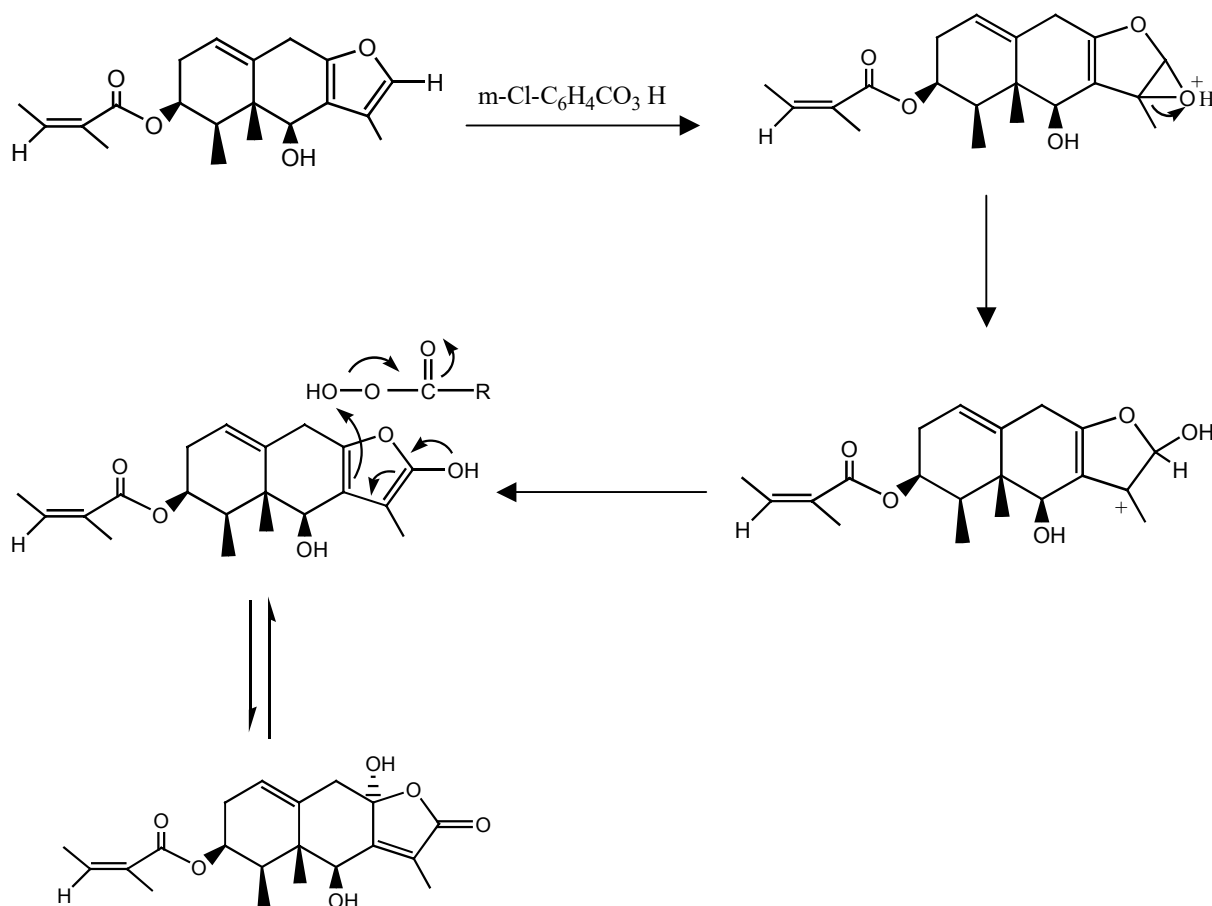
Cuando se intentó preparar el epóxido 1(10) del compuesto I, mediante reacción con el ácido m-clororperbenzoico, se obtuvo una mezcla de compuestos, todos ellos como productos de reacción del perácido sobre el furano, dejando intacto el doble enlace 1(10). Entre los productos que se pudieron aislar se encontró la lactona **III** cuya estructura se comprobó por comparación con el producto natural ya descrito. Otro producto obtenido fue la lactona **XII**, la cual posee el raro epóxido 7-8 y representó el producto mayoritario de la epoxidación equivalente a un rendimiento de 6.07%.

Para la formación de los compuestos **III** y **XII** se propuso como mecanismo probable la indicada en el esquema No. 6:



Esquema No. 6 (Mecanismo probable de reacción del furanoeremofilano I con perácido)

Debido a lo interesante de la reacción de furanoeremofilanos con perácidos, se pretende seguirla explorando para poder establecer su mecanismo que de acuerdo a las evidencias disponibles podría ser el siguiente:



La estructura del compuesto **XII** fue propuesta en base al siguiente análisis espectral:

En el espectro RMN- ^1H , (**espectro 9a**) se observó la ausencia de la señal para el hidrógeno 12 al rededor de 7 ppm.

La presencia de un epóxido en los carbonos 7-8, se propuso con base en el desplazamiento a campo alto de los carbonos 7 y 8 a δ 66.80 ppm y δ 87.26 ppm respectivamente en el espectro de RMN- ^{13}C (**espectro 9b**)

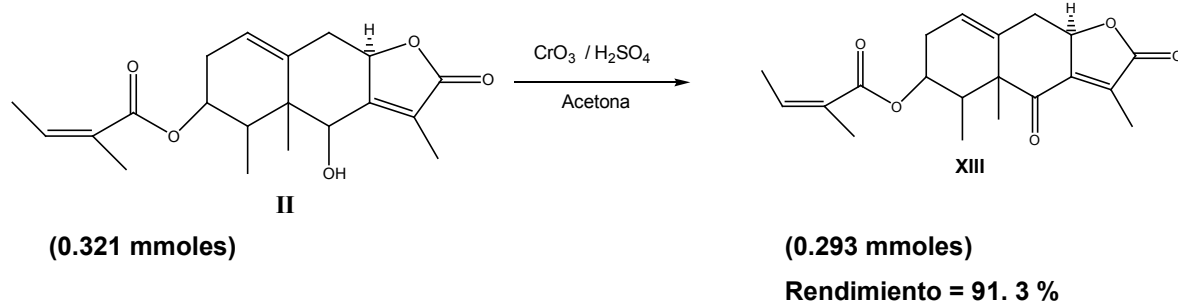
Además el mismo espectro muestra una señal para carbonilo adicional, a δ 176.40 ppm que se atribuyó al carbonilo C-12.

El espectro IR mostró además de la banda a 1708 cm^{-1} , otra banda a 1807 cm^{-1} que se atribuyó a la γ -lactona saturada.

En el espectro de masas IE se observó un fragmento de m/z 262 (25%) que fue equivalente a la pérdida del grupo angelato $[M - 100]^+$, sugiriendo la presencia de dos átomos de oxígeno adicionales con base en el mismo fragmento para el compuesto I.

En el espectro NOE, (**espectro 9c**) la señal para el hidrógeno 3, mostró correlación con la señal para el hidrógeno 6, y esta última con el hidrógeno 4. Por lo tanto, de acuerdo al patrón biogenético en este tipo de compuestos, los hidrógenos 3, 6 y 4 deben estar orientados hacia la cara α de la molécula.

Oxidación de II:

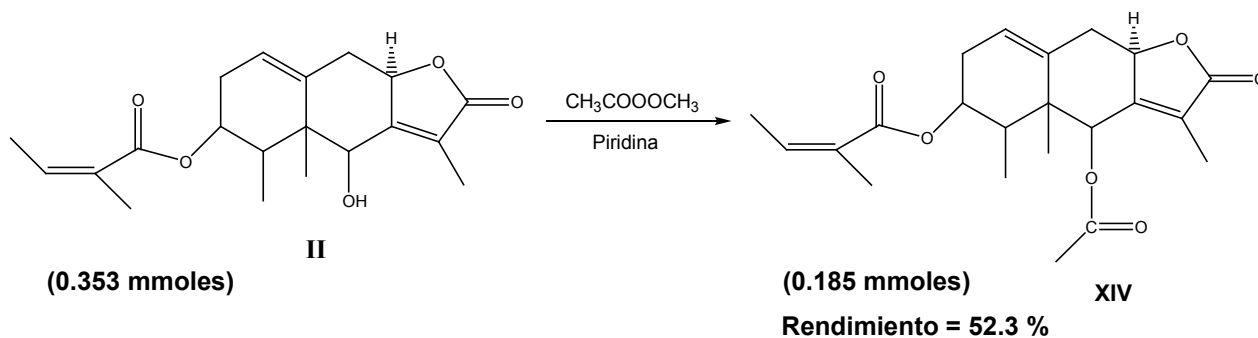


La oxidación de la lactona II con el reactivo de Jones condujo a la cetona XIII, en un rendimiento bastante alto, (91%) lo cual es un indicativo de la facilidad con que estos compuestos se pueden oxidar. Al igual que en la oxidación del compuesto I; el espectro de RMN- ^1H (**Espectro 10a**), mostró la desaparición de la señal para el hidrógeno H-6 mientras que en el espectro de RMN- ^{13}C (**Espectro 10b**) se observó una señal adicional para carbonilo con respecto a su precursor, a δ 197.66 ppm correspondiente al C-6.

De igual manera en el espectro IR se observó la desaparición de la señal del grupo hidroxilo, el cual fue reemplazado por un carbonilo cuya señal aparece a 1707 cm^{-1}

El espectro de masas FAB, también corrobora la oxidación en C-6, por medio de una señal de m/z 345 (35%) que corresponde al ión molecular $[M]^+$ el cual presenta dos unidades menos con respecto a su precursor, como consecuencia de la pérdida del hidrógeno unido al carbono 6 y el hidrógeno del grupo hidroxilo, los cuales se pierden en la reacción de oxidación.

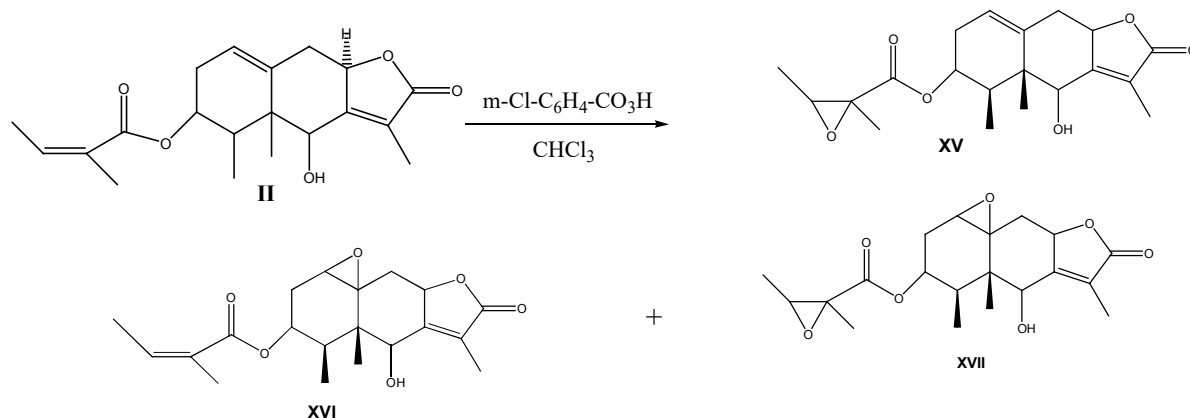
Acetilación de II:



El espectro de RMN- ^1H (**espectro 11a**) para éste compuesto, presentó la señal para el hidrógeno 6 desplazado a campo bajo, δ 5.66, da, (1.4), lo cual es indicativo de la presencia del grupo acetilo en dicha posición y su desplazamiento es consecuencia del efecto de desprotección del grupo acetilo, cuyo metilo apareció a δ 2.23.

En el espectro de de RMN- ^{13}C (**espectro 11b**), se corroboraron también las dos señales del acetato

Epoxidación de II:



Sabiendo que el furano es muy reactivo y que se pudo convertir por medio de oxidación a lactona, era de esperarse que la reacción con perácido de la lactona **II**, prosiguiera mejor que la del furanoeremofilano **I**. Sin embargo, en este caso se obtuvo una mezcla de varias sustancias de la cual se pudieron separar los productos de epoxidación en el doble enlace del angelato (**XV**), y en el doble enlace 1(10) (**XVI**). No obstante, los espectros de $\text{RMN-}^1\text{H}$ de ambos compuestos mostraron señales duplicadas indicando que se trataba de mezclas de estereoisómeros. También, se pudo separar **XVII** en el que se epoxidaron los dos dobles enlaces no lactónicos dando una mezcla de estereoisómeros.

Con respecto a **XV**, en su espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ (**Espectro 12a**), la señal del protón vinílico del angelato (3') se desplazó a campo alto δ 3.30 ppm y siguió presentando la de H-1 (δ :5.64), lo cual indicó que la epoxidación sólo se llevó a cabo en el doble enlace del éster.

Adicional a esto, las señales para los metilos 4' y 5' se desplazaron a campo alto, lo cual contribuyó a reforzar dicha hipótesis.

En el espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ (**espectro 13a**), de la molécula **XVI**, también se obtuvo la duplicación de señales y fue fácil distinguir la ausencia de la señal alrededor de 5.6 ppm para el hidrógeno 1, que hizo pensar en su desplazamiento a campo alto a raíz de una

posible epoxidación 1(10). Además, la señal del hidrógeno vinílico 3' (δ : 6.04 ppm) se siguió observando en la misma región, lo cual indicó que allí no se pudo llevar a cabo dicha reacción. Por último, **XVII**, no presentó en su espectro RMN-¹H (**espectro 14a**) la señal alrededor de 5.6 ppm correspondiente al hidrógeno 1, ni la señal alrededor de δ 6.11 ppm para el hidrógeno 3'. La razón se debió al desplazamiento de esas señales a campo alto como consecuencia de una epoxidación en ambas posiciones 1(10) y 2'-3'.

PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA:

Los compuestos **I** y **II**, tuvieron actividad inhibitoria sobre los hongos *Fusarium sporotrichum*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, y *Trichophyton mentagrophytes*; siendo este último el más sensible al compuesto **II**.

El hongo *Trichophyton mentagrophytes* es causante de un cuadro clínico conocido como *tina pedis*, que recibe el nombre de erosio interdigitalis, epidermofitosis interdigitoplantar y pie de atleta, el cual se presenta principalmente en hombres, sobre todo deportistas.

Generalmente es una infección leve pero si progresa, la piel se hace mas macerada y blanquecina y puede llegar a cortarse, produciendo lastimaduras más profundas y dolorosas. La piel se inflama y hay mayor prurito. Puede desarrollarse una infección colateral bacteriana secundaria que sólo puede controlarse con antibacterianos además de los antifúngicos.

Usualmente, el tratamiento farmacológico se basa en el uso de antifúngicos de aplicación tópica cutánea del tipo de los imidazoles.

La búsqueda de nuevas moléculas que sean efectivas frente a agentes causantes de afecciones dermatológicas como en este caso, el pie de atleta, es de interés frente a la resistencia natural de estos patógenos a los medicamentos y a las reacciones adversas de estos últimos. En este sentido, si bien la actividad biológica del compuesto **II** no es

muy relevante frente a un producto comercial, este resultado es un buen preámbulo para seguir en la búsqueda de este tipo de agentes antimicóticos en las especies de *Roldana*.

El resultado de las transformaciones químicas en las moléculas I y II sobre el efecto inhibitorio del hongo *Trichophyton mentagrophytes* se puede resumir en el gráfico siguiente:

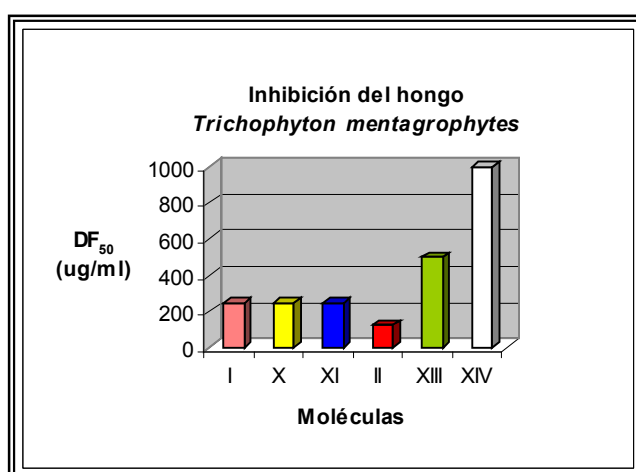


Gráfico 1: Actividad biológica de los compuestos I, II y sus Derivados, sobre el hongo *Trichophyton mentagrophytes*.

En el **gráfico 1** se observa que las modificaciones estructurales realizadas a la molécula I no tuvieron ninguna incidencia sobre la actividad inhibitoria del hongo, mientras que en el compuesto II hubo una pérdida de actividad cuando fue oxidada en el carbono 6 (XIII) y perdió completamente su actividad cuando fue acetilado (XIV).

De acuerdo a esos resultados y teniendo en cuenta que la molécula II difiere estructuralmente de la molécula I, en la presencia de un grupo carbonilo; es evidente que dicho grupo tiene una incidencia en la actividad contra el hongo *Trichophyton mentagrophytes* puesto que la molécula II posee un mayor efecto inhibitorio. No obstante, los resultados también mostraron que la molécula II necesita conservar el grupo hidroxilo para mantener la actividad puesto que tanto el derivado oxidado como su derivado acetilado la pierden significativamente.

El hecho de que las modificaciones del grupo hidroxilo (derivado oxidado y acetilado) del compuesto **I** no hayan presentado cambios en el efecto inhibitorio, mientras que las modificaciones del grupo hidroxilo de la lactona **II** (derivado oxidado y acetilado) si presentaron cambios en la actividad, sugiere que el sistema lactónico junto con un hidroxilo α en carbono 6 es responsable de alguna manera del efecto inhibitorio observado en la molécula **II**

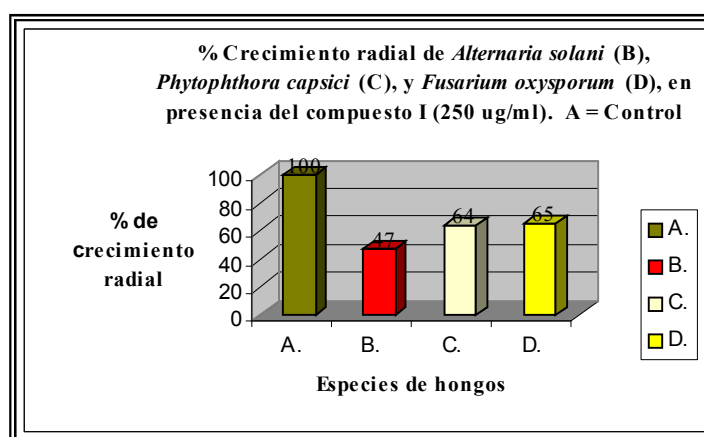


Gráfico 2: Actividad biológica en hongos fitopatógenos del compuesto I.

Con respecto al ensayo de actividad biológica en hongos fitopatógenos, el **gráfico 2**, muestra un claro efecto inhibitor del compuesto **I** sobre el desarrollo de hongos fitopatógenos, especialmente de *Alternaria solani*. Este hongo constituye una plaga para cultivos agrícolas, principalmente de papa y tomate; y que en condiciones climáticas favorables produce pérdidas en rendimiento que están directamente relacionadas con el momento en que se presenta la enfermedad durante el cultivo. Aunque este experimento fue un ensayo preliminar, no deja de ser interesante si se tiene en cuenta que es un producto natural y que abre la posibilidad de llevar a cabo estudios sobre modificación estructural a fin de mejorar su capacidad inhibitoria contra ese tipo de hongos.

Por último, la figura 7 es una forma de representar el efecto inhibitor del compuesto **I**

sobre la germinación de semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, puesto que a pesar de ser un ensayo preliminar, los resultados sugieren que la *Roldana lineolata* podría tener algún efecto alelopático en campo, siendo el furanoeremofilano I, en ese caso, el responsable para dicho fenómeno. La mayor actividad en una de las especies de semillas es una muestra de la especificidad del compuesto en este tipo de experimentos.

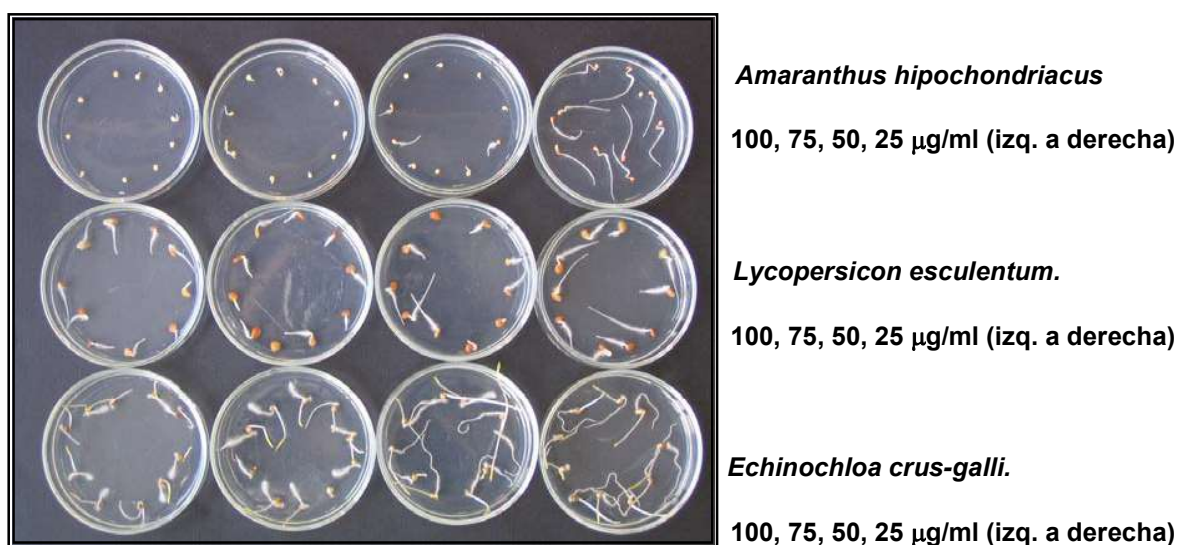


Figura 7: Efecto inhibitorio del compuesto I en germinación de semillas. Todos los valores se tomaron con respecto al control. (Crecimiento normal de las semillas)

De esta forma, los resultados obtenidos en los tres bioensayos, con hongos y semillas, puede que no sean del todo satisfactorios; pero una cosa cierta es que los dos compuestos del tipo eremofilano I y II, descritos mediante este trabajo mostraron ser moléculas activas lo que llama mucho la atención si se tiene en cuenta que hasta el momento se tienen estudiadas el 14.5 % de las especies de *Roldana* en México, y probablemente haya otro tipo de estructuras esperando ser descubiertas que posean mayores actividades.

RESUMEN

Roldana lineolata es la 7^a especie de este género constituido por 48 especies, que se estudia químicamente completando con ello el 14.5 % de las especies de *Roldana* estudiadas desde el punto de vista químico.

Como resultado del presente trabajo se lograron aislar el furanoeremofilano **I** y las lactonas **II** y **III**. La lactona **II** se aisló por primera vez, en tanto que los compuestos **I** y **III** habían sido reportados en forma de mezclas de varios compuestos. En este trabajo se dan a conocer en forma pura y se presentan sus datos espectroscópicos. Además se discuten algunas reacciones químicas entre ellas, la reacción de los compuestos **I** y **II** con ácido *m*-Cl-perbenzoico, que dio origen a una serie de compuestos de estructura interesante. Se aislaron además flavonoides y terpenoides.

CONCLUSIONES

Se pudo establecer que la furanoeremofilanólida **II** presenta un efecto inhibitor sobre el desarrollo normal del hongo *Trichophyton mentagrophytes* causante del cuadro clínico conocido como pie de atleta.

Se pudo establecer que el grupo carbonilo y el grupo hidroxilo en la furanoeremofilanólida son un factor determinante en la actividad inhibitoria del hongo *Trichophyton mentagrophytes*

Del mismo modo se pudo establecer que el furanoeremofilano **I** inhibe la germinación y el crecimiento radical de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli* y *Lycopersicon esculentum*, lo cual sugiere que dicho compuesto puede tener propiedades herbicidas o bien ser responsable de algún efecto alelopático en el entorno natural de *Roldana lineolata*.

Los sesquiterpenos del tipo eremofilano han mostrado ser una constante en las raíces de las especies del género *Roldana*, lo que indica que estos compuestos podrían constituir un marcador quimiotaxonómico; sin embargo, es necesario continuar con el estudio de otras especies.

El bajo contenido de las furanoeremofilanólidas **II** y **III** en comparación al alto contenido del furanoeremofilano **I** en la raíz de *Roldana lineolata*, y los antecedentes sobre furanos como precursores de lactonas, sugieren que dichos compuestos son un producto de transformación durante el proceso de extracción y purificación y no un producto natural.

Se encontró que la acción de los perácidos sobre furanoeremofilanos conduce a lactonas de estructuras variadas.

BIBLIOGRAFÍA

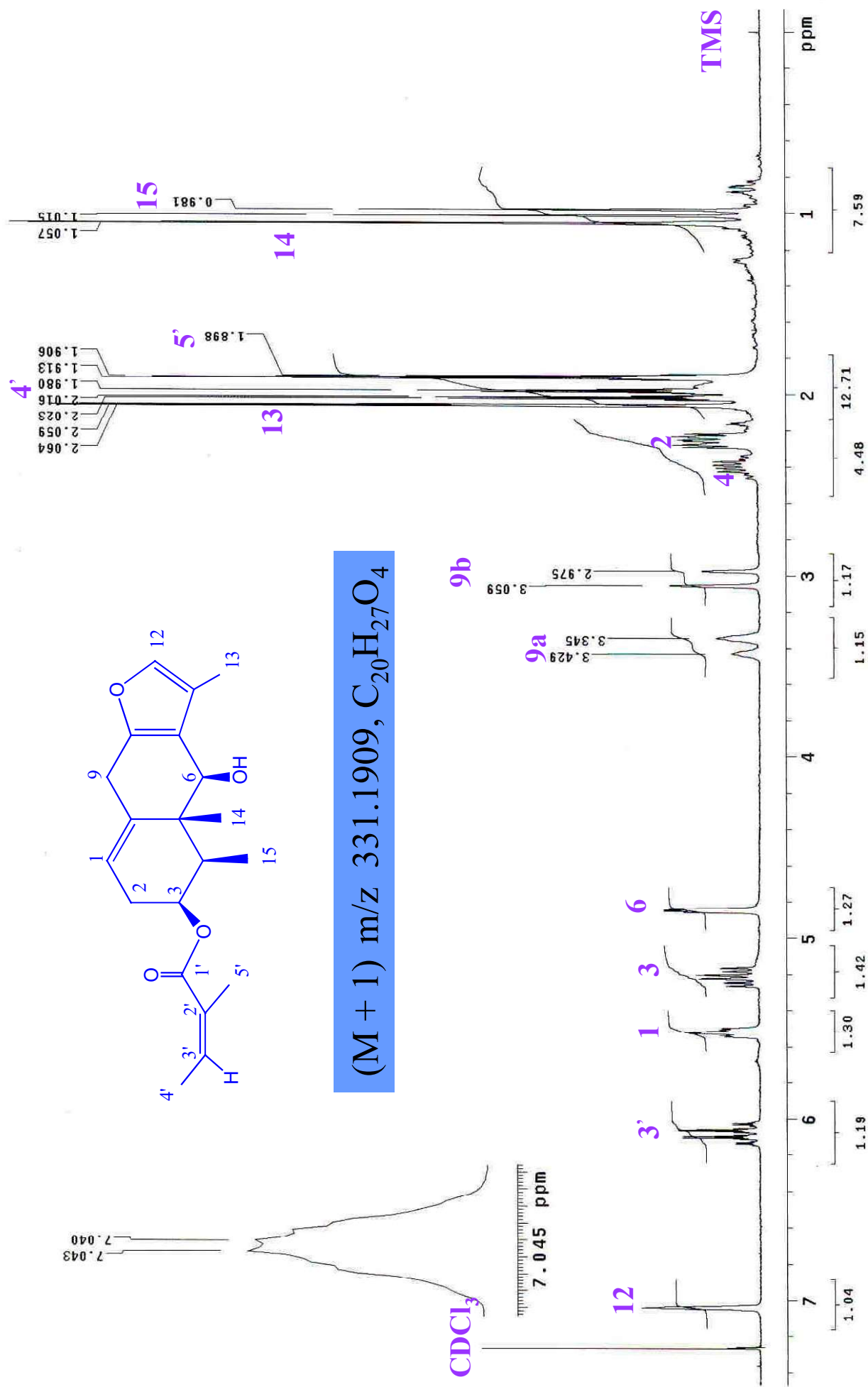
1. Partington, J.R.; A short history of chemistry, New York: Dover Publications, **1989**, 220.
2. Michiles, E.; Botsaris, A.S. Revista Fitos. **2004**, 1(01), 36-42.
3. Funston, A.M. A revision of the genus *Roldana* (Asteraceae: Senecioneae).
Tesis de Doctorado, Universidad del estado de Kansas, USA. **1999**
4. Villarroel, V. L. Torres R., Urzúa A.; Modak B. Henríquez J.; Salgado I.
Secondary Metabolites from genus *Senecio* and *Heliotropium*. *Rev. Latinoamer. Quim.* **1997**, 25, 3, 109-116
5. Villaseñor, J. L. La familia Asteraceae en México. *Rev. Soc. Mexi. Hist. Nat.*
1993, vol. Esp. (XLIV), 117-124
6. Cabrera, L.; Villaseñor, J. L. Revisión bibliográfica sobre el conocimiento de la familia compositae en México. *Biótica.* **1987**, 12(2)
7. Villaseñor, J. L. Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Bol. Soc. Bot. Mex.* **2004**, 75: 105-135
8. Heywood, V.H.; Harborne, J. B.; Turner, B.L. Turner B.L. An overture to the *Compositae*. The Biology and Chemistry of the Compositae VI. Academic Press, **1977**, 2-19
9. Jeffrey, C. Compositae Systematic 1975-1993 Developments and desiderata. *Advances in Compositae Systematics.* **1993**, p. 13, 14
10. Romo de Vivar, A. Productos Naturales de la flora Mexicana. Ed. Limusa, México, D.F **1985**

11. Bertil, N. Senecioneae and Liabeae systematic review, cap. 29 en : Heywood, V. H., Harborne J. B., Turner B.L. The Biology and Chemistry of the Compositae. Academic Press, **1977**, 800-823.
12. Jeffrey, C. The tribu Senecioneae (compositae) in the Mascarene Islands with an annotated world check-list of the genera of the tribe. *Kew Bulletin* **1993**, 47: 49-109.
13. Pérez-Castorena, A. L.; Arciniegas, A.; Ramírez, M. T.; Villaseñor, J. L.; Romo De Vivar, A. Evaluation of Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Plastoquinone derivatives Isolated from *Roldana barba-johannis*. *Planta Médica*, **2003**, 68: 645-647
14. Céspedes, L. C.; Torres, p.; Marín, C.J.; Arciniegas, A.; Romo de Vivar, A.; Pérez-Castorena, A.L.; Aranda, E. Insect growth inhibition by tocotrienols and hydroquinones from *Roldana barba-johannis*. *Phytochemistry* **2004**, 65 (13): 1963-1975.
15. Burgueño-Tapia, E.; Nathan, P. J. Cacalolides from *Senecio barba-johannis*. *Magn. Reson. Chem.* **2003**; 41: 386-390
16. Arciniegas, A.; Pérez-Castorena, A. L.; Villaseñor, J. L.; Romo de Vivar, A. Chemical constituents of *Roldana aschenborniana*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, 32 615-618.
17. Delgado, G.; García, P. 1α -Angeloyloxy- 8β , 10β -dihydroxyeremophil-7(11)-en- 8α , 12 -olide from *Roldana sessilifolia*. *Planta Medica*, **1993**, 59: 389
18. Delgado, G.; García, P.; Bye, Robert.; Linares, E. Eremophilanolides from *Roldana sessilifolia*. *Phytochemistry*, **1991**, 30 (5), 1716-1719

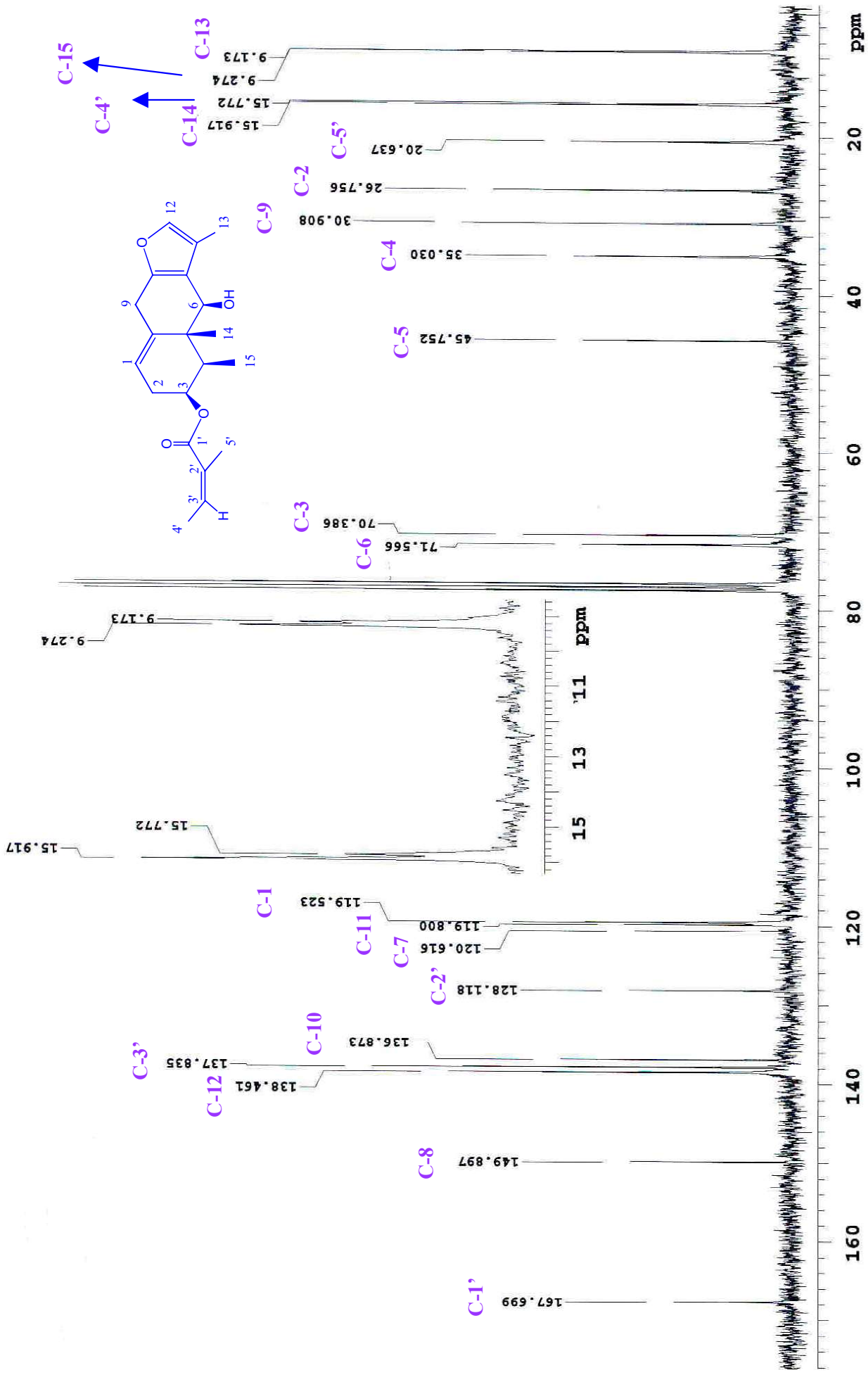
19. Bohlmann, F.; Zdero, C. New Cacalol Derivatives From *Roldana heterogama*
Phytochemistry, **1978**, 17: 565-566.
20. Joseph-Nathan, J.P.; Villagómez, R.; Rojas-Gardida, M.; Román, U.L.;
Hernández, D. J. Minor oplopanes from *Senecio mexicanus*
Phytochemistry, **1989**, 28: 2397-2401
21. Joseph-Nathan, J.P.; Villagómez, R.; Román, U. L.; Hernández, D.J.
Oplopanes from leaves of *Senecio Mexicanus*. *Phytochemistry*, **1990**
29 (3): 977-979
22. Pérez-Castorena, A.L.; Arciniegas, A.; Hernández Ma. L.; de la Rosa, I.;
Contreras L.J.; Romo de vivar, A. Furanoeremophilanes from *Roldana*
ehrenbergiana. *Z. Naturforsch.* **2005**; 60b, 1088-1092
23. Hampel, D.; Mosandl, A.; Wust, M. Biosynthesis of mono-and sesquiterpenes in
Carrot roots and leaves (*Daucus carota* L.): metabolic cross talk of
cytosolic mevalonate and plastidial methylerythritol phosphate pathways.
Phytochemistry, **2005**, 66, 305-311
24. Dewick, P. M.; Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach. Ed. John
Wiley and Sons. Chichester, **1997**, 155-174
25. Fisher, N. H.; Oliver E. J., Fisher H. D. The Biogenesis and Chemistry of
Sesquiterpene Lactones. Springer-Verlag. Wien, **1979**. 52-54
26. Haslam, E.; Shiquimic acid. Metabolism and Metabolites. Ed. John Wiley and
Sons. Chichester, **1993**.
27. Vanden-Berghe, D.A.; Vlietnick, A.J. Screening methods for antibacterial
and antiviral agents from higher plants. en: *Methods in plant biochemistry*.
Vol. 6 "Assays for bioactivity". Edited by Hostettmann, K. Series editor Dey
P.M. Academic Press. New York, USA. **1991**. Pp. 47-71.

28. Hexiang, W.; Tzi, B. Ng. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from Kiwi fruits. *Phytochemistry*, **2002**, 61: 1-6.
29. Mericli, A. H.; Mericli, F.; Jakupovic, J.; Bohlmann, F.; Dominguez, X.A.; Vega, H. Eremophilane Derivatives and the Constituents from Mexican *Senecio* species. *Phytochemistry*, **1989**, 28 (4): 1149-1153.
30. Silverstein, R. M.; Clayton, B. G.; Morrill, T. C. Spectrometric identification of organic compounds. Ed. John Wiley & sons, 3^a ed. U.S.A., **1974**. 102-104.
31. Naya, K.; Reizo, K.; Michikazu, R.; Sawada, M. The Photosensitized Oxidation of furanoeremophilanes. I. The Isomeric Hydroperoxides from Petasalin and Their Transformations to Lactones. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1975**, 48 (11), 3220-3225.
32. Moriyama, Y.; Takahashi, T. New Sesquiterpene Lactones of Eremophilane-Type from *Ligularia Fauriei* (F.R.) Koidz. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, 49 (11), 3196-3199.
33. Chen, P.H.; Kahn, W.F.; Will, F.; Ikeda, R. M. High Resolution Mass Spectrometric Studies of Some Bicyclic γ -Lactones. *Organic Mass Spectrometry*. **1970**, 3, 199-209.
34. Fisher, N. H.; Oliver, E.J.; Fisher, H. D. The Biogenesis and Chemistry of Sesquiterpene Lactones en: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. **1979**. pp. 257.
35. Markham, K. R.; Ternai, B.; Stanley, R.; Geiger, H.; Mabry, T.J. Carbon-13 NMR Studies of Flavonoids –III. Naturally Occurring Flavonoid Glycosides and Their Acylated Derivatives. *Tetrahedron*, **1978**, 34, 1389-1397.
36. Markham K. R. and Ternai B. ¹³C NMR Of Flavonoids-II, Flavonoids Other Than Flavone and Flavonol Aglicones. *Tetrahedron*. **1976**, 32, 2607-2612.

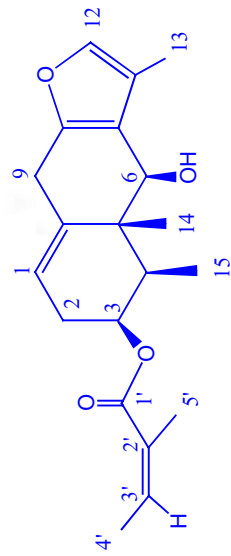
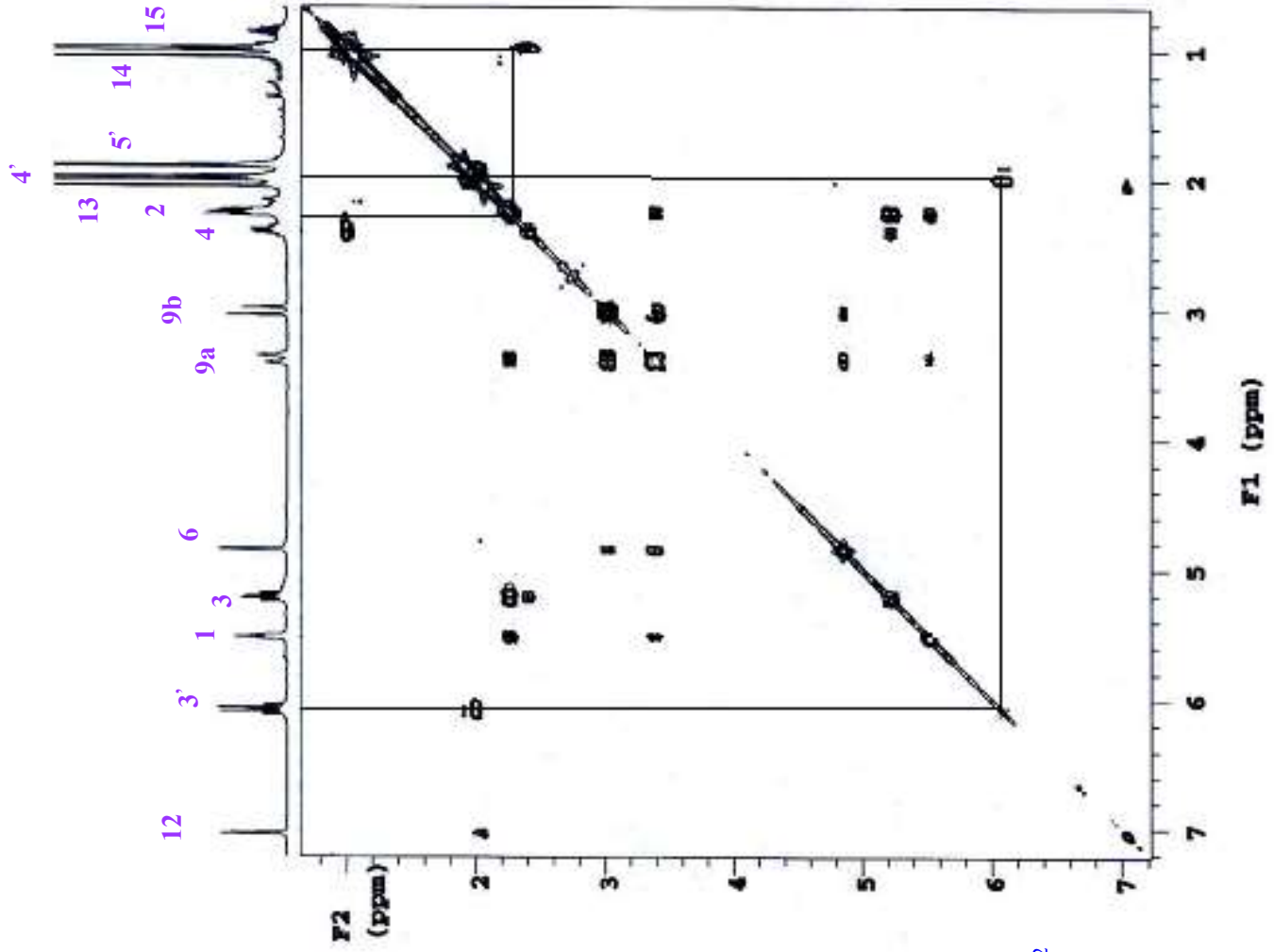
37. Hughes, R.J.; Croley, T.R.; Metcalfe, C.D.; March, R.E. A Tandem Mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids. *International Journal of Mass Spectrometric*. **2001**, 210/211, 371-385.
38. Jürgenliemk, G.; Nahrsted, A. Phenolic Compounds from Hypericum Perforatum. *Planta médica*, **2002**, 68, 88-91



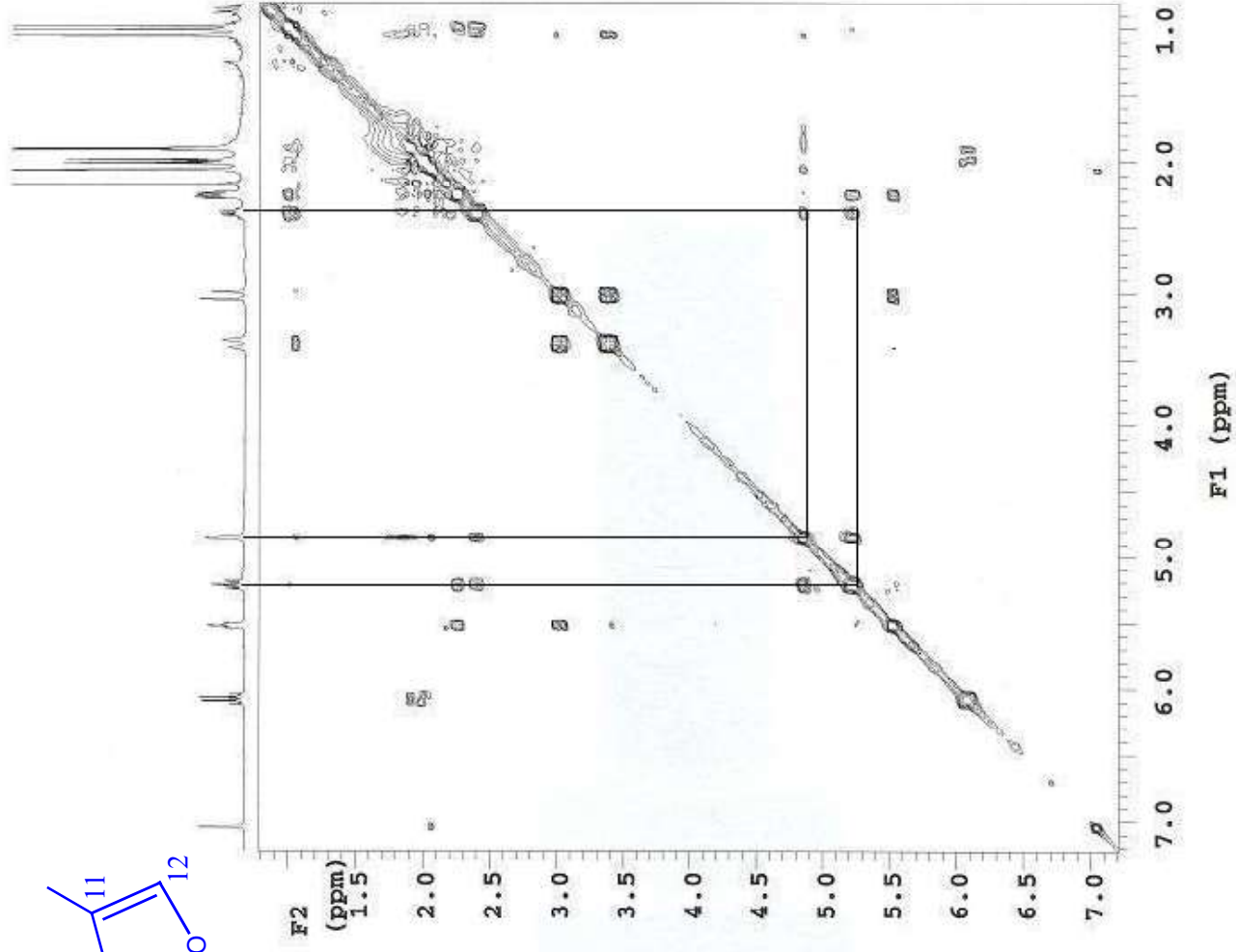
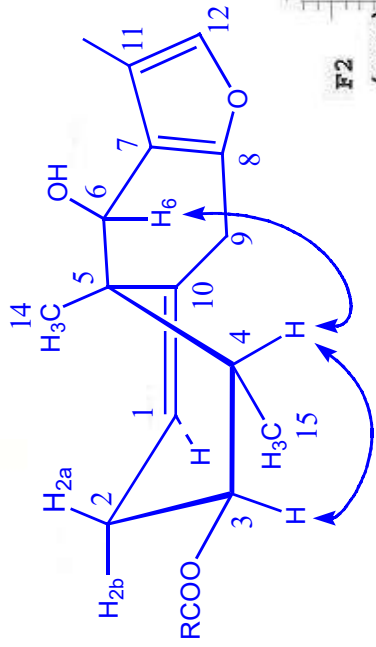
ESPECTRO 1a: RMN-¹H del compuesto I



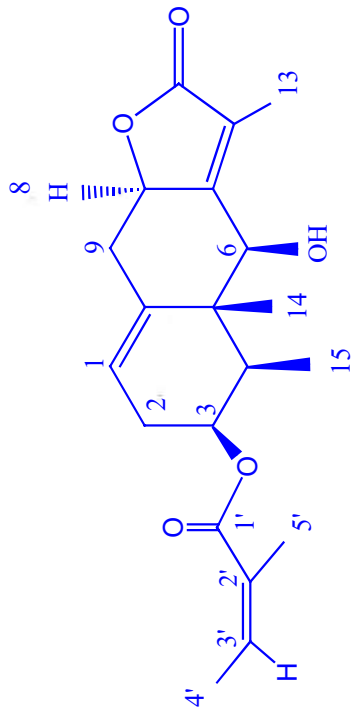
ESPECTRO 1b: RMN-¹³C del compuesto I



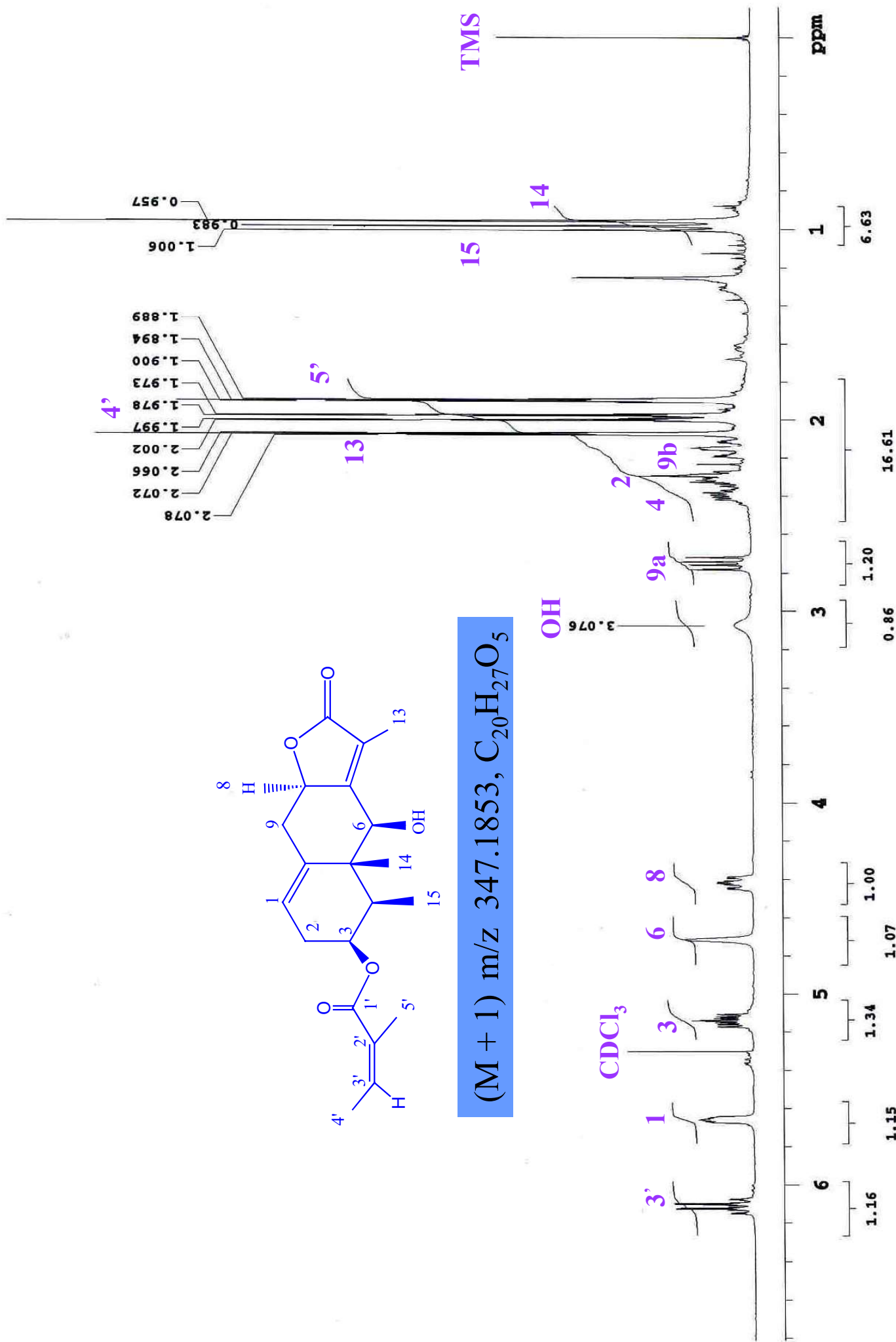
ESPECTRO 1c: Experimento COSY del compuesto I

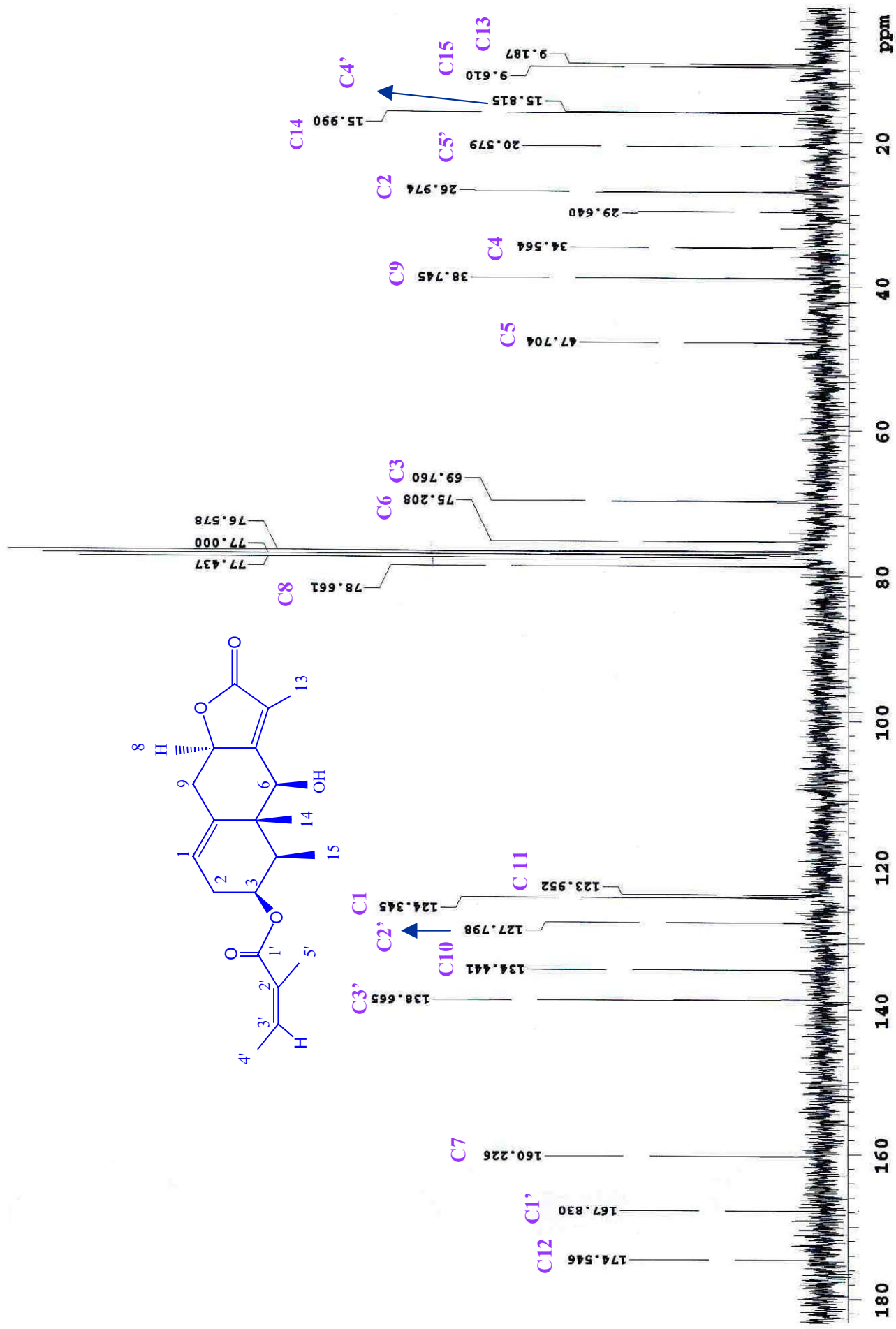


ESPECTRO 1d: Experimento NOESY del compuesto I

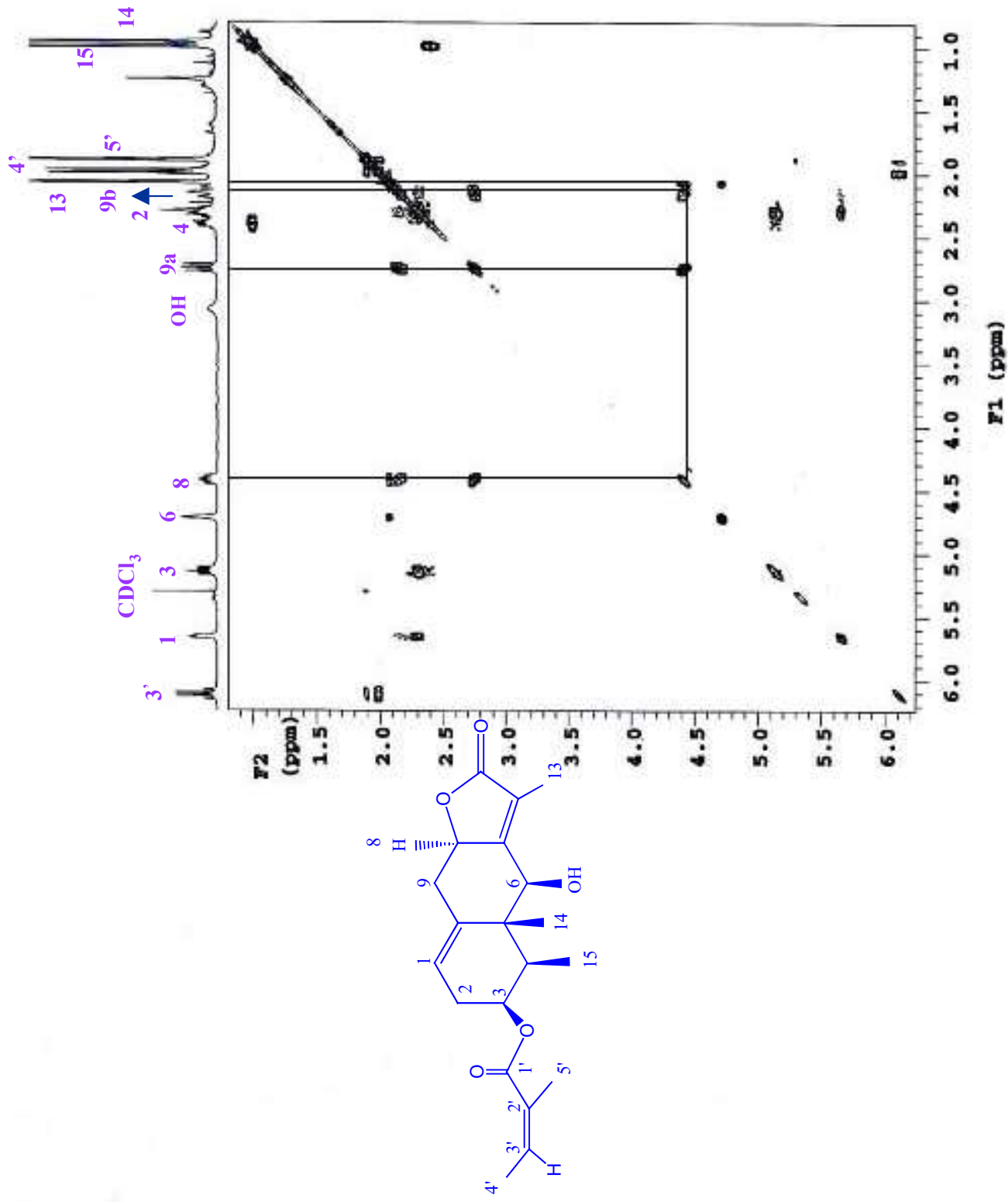


(M + 1) m/z 347.1853, C₂₀H₂₇O₅

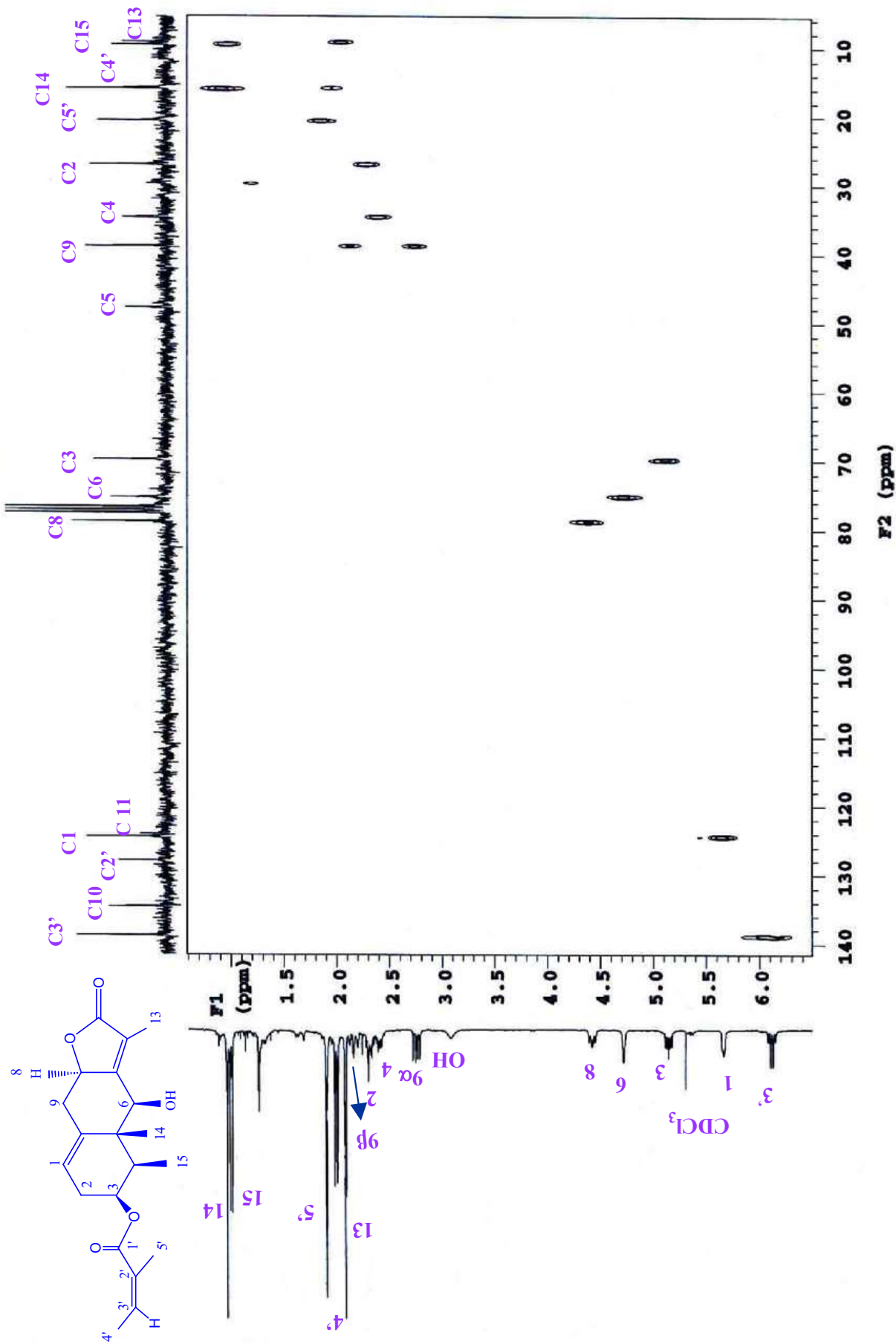




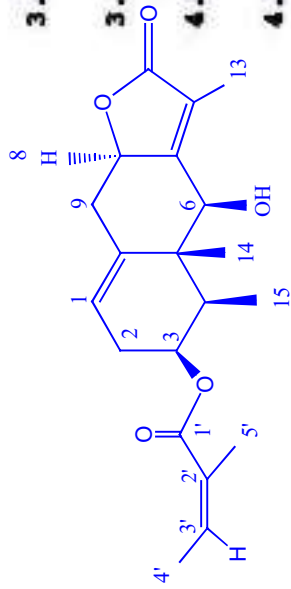
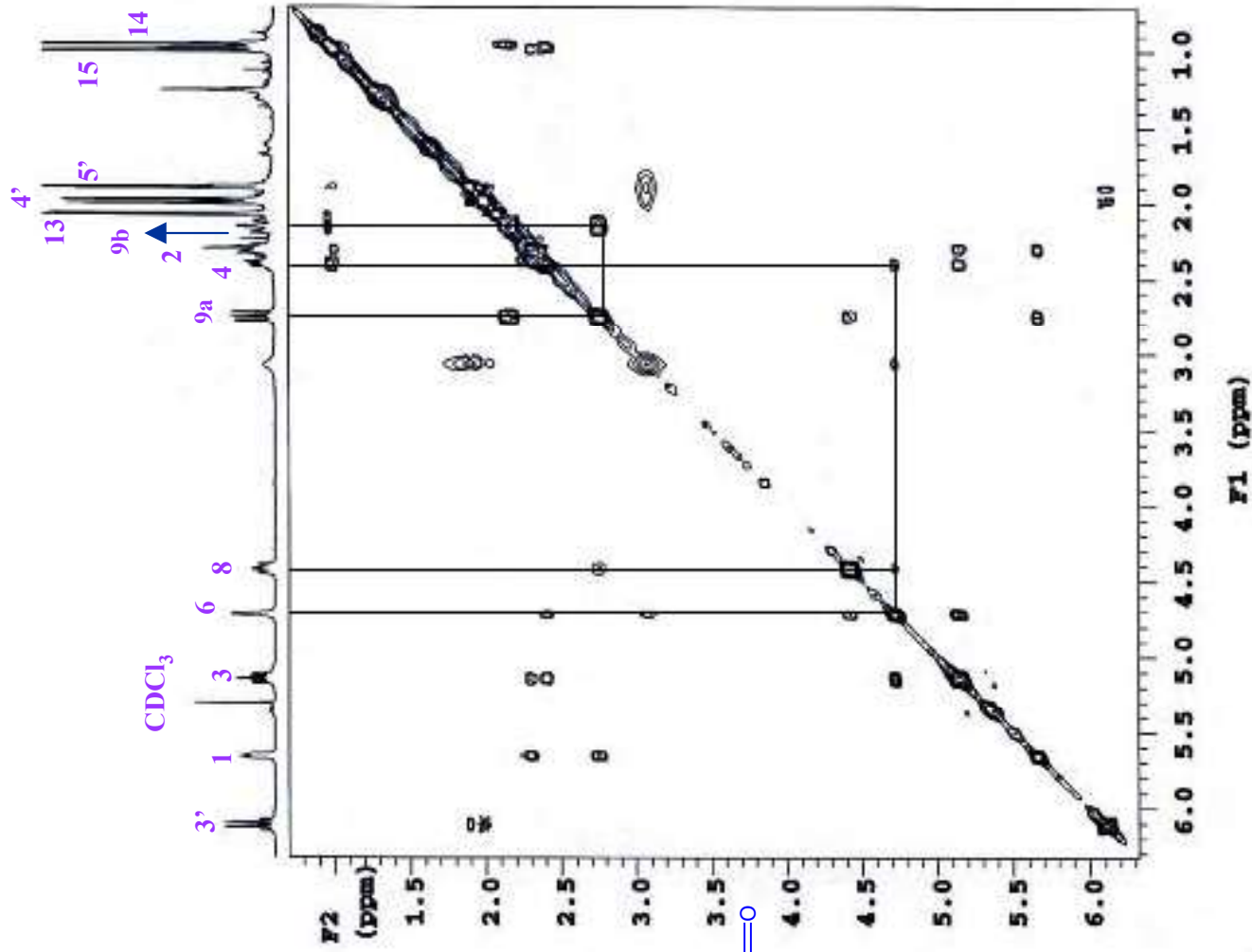
ESPECTRO 2b: RMN-¹³C del compuesto II



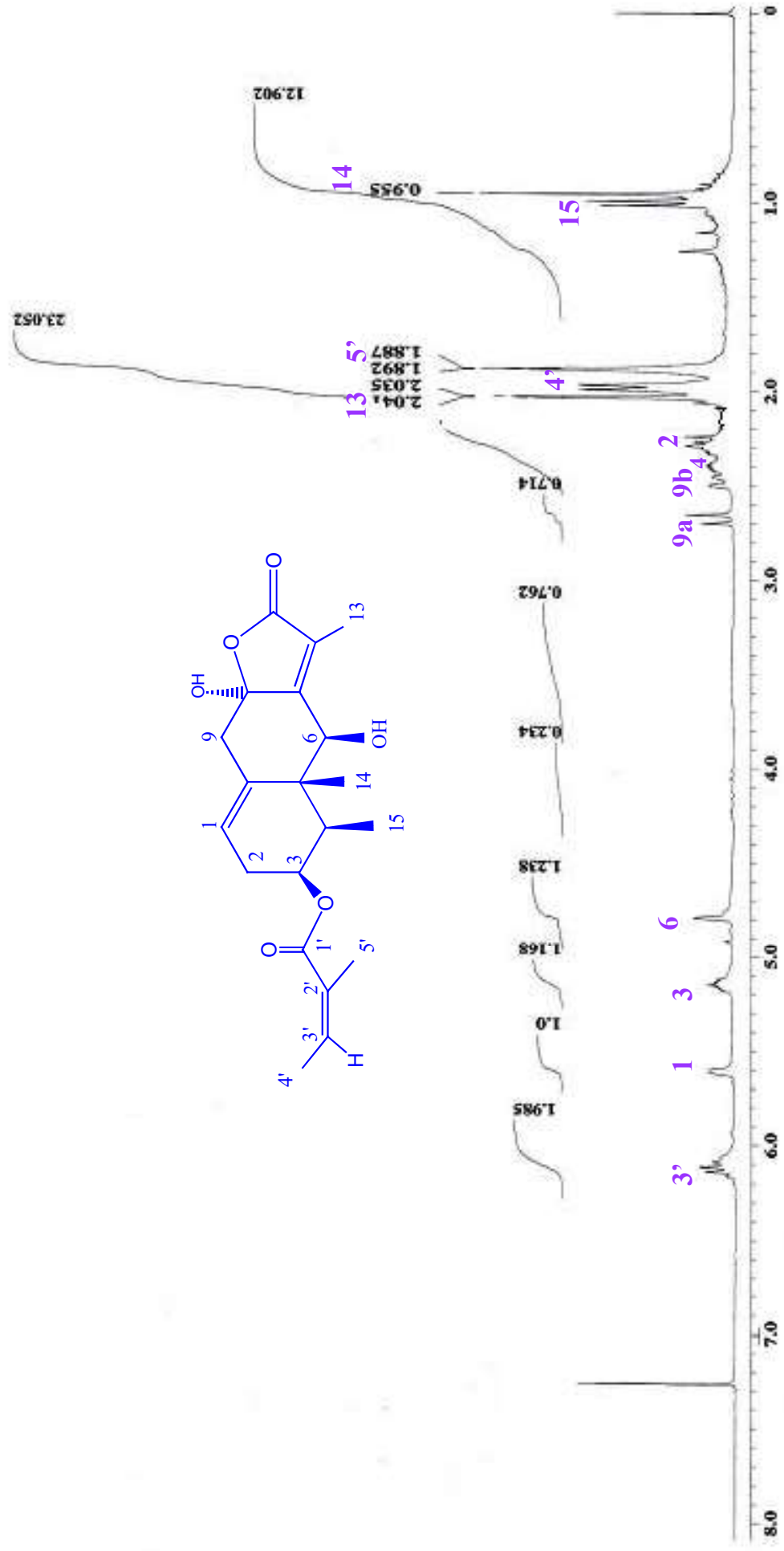
ESPECTRO 2c: Experimento COSY del compuesto II



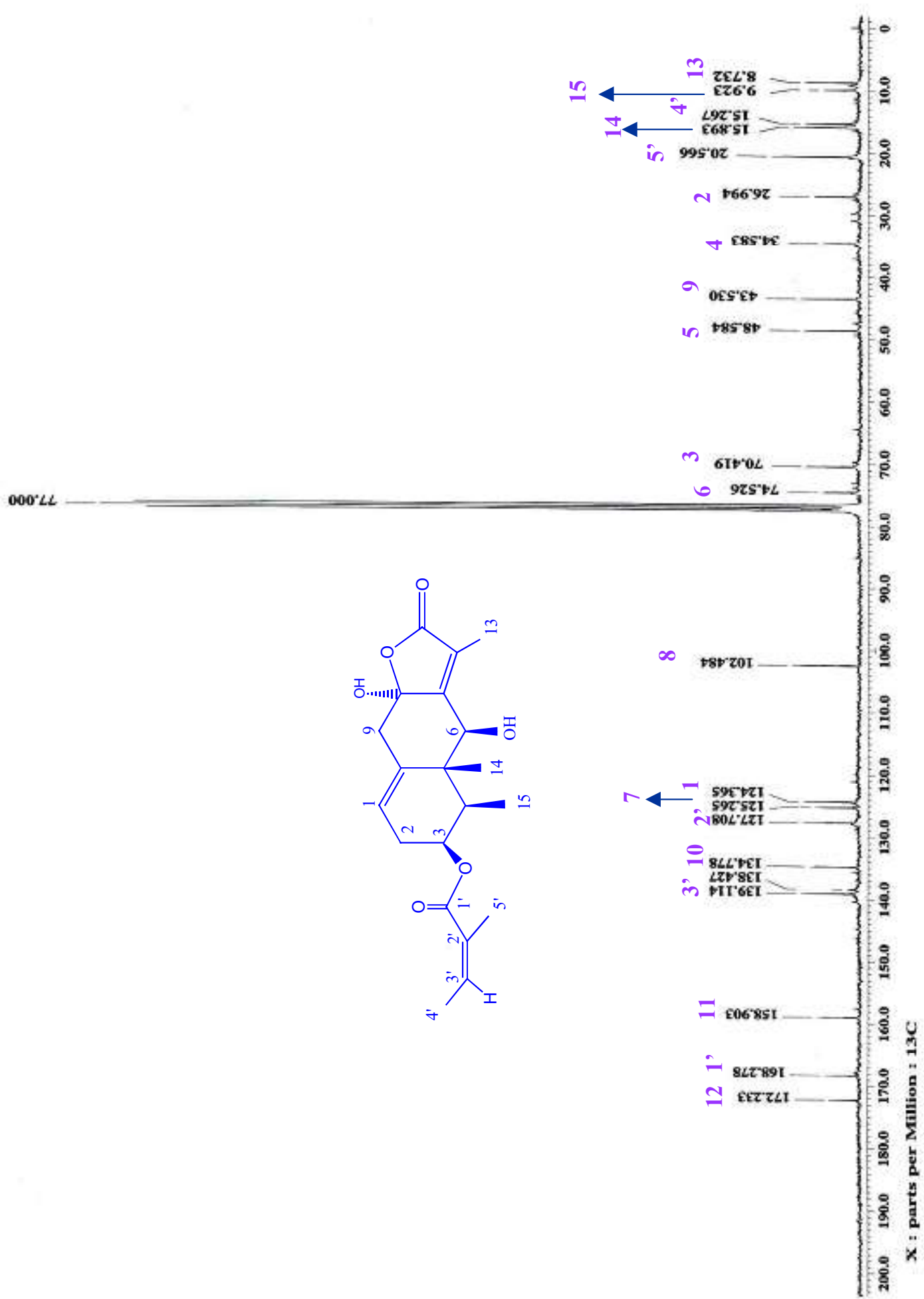
ESPECTRO 2d: Experimento HETCOR del compuesto II



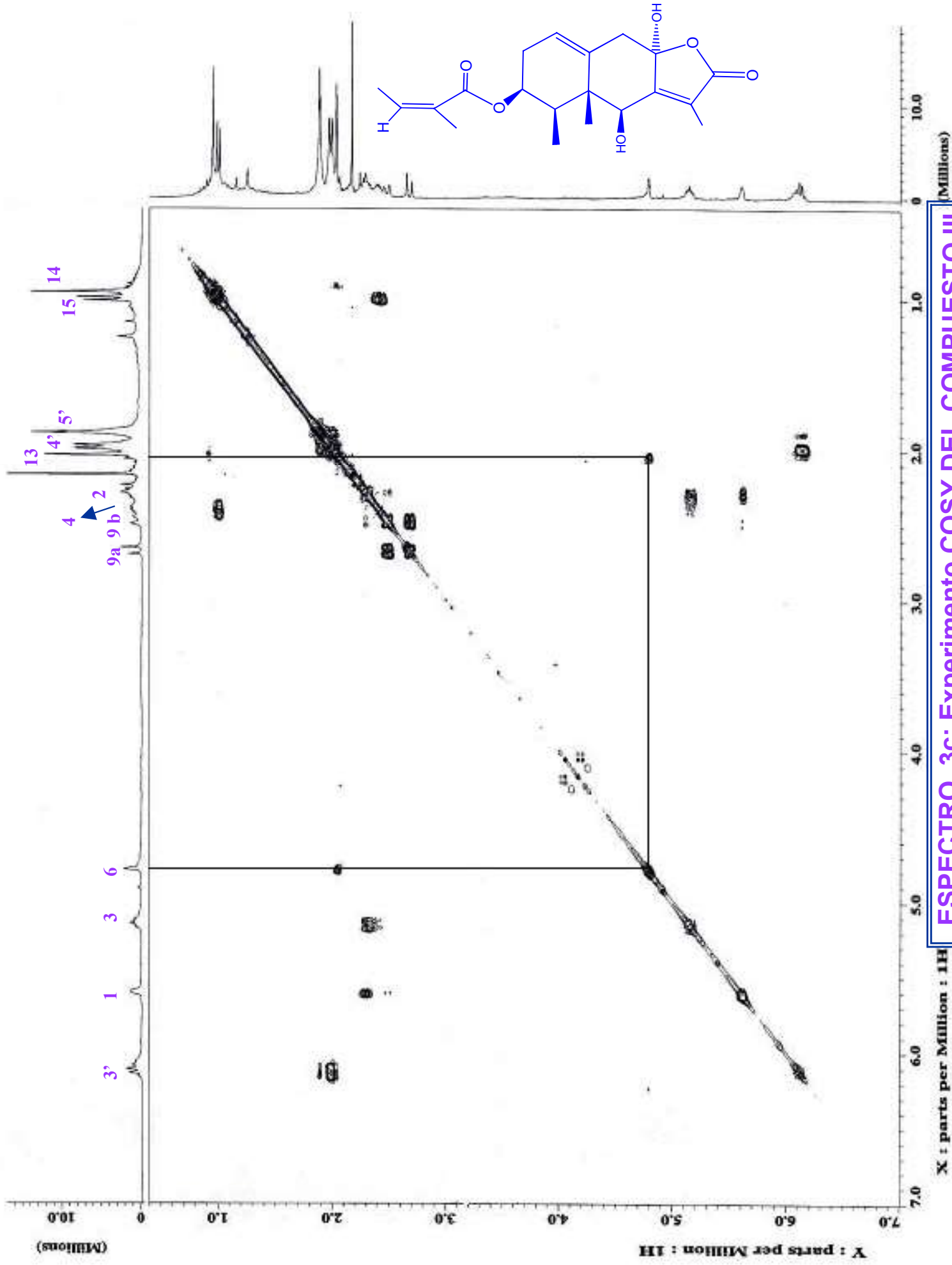
ESPECTRO 2e: Experimento NOESY del compuesto II

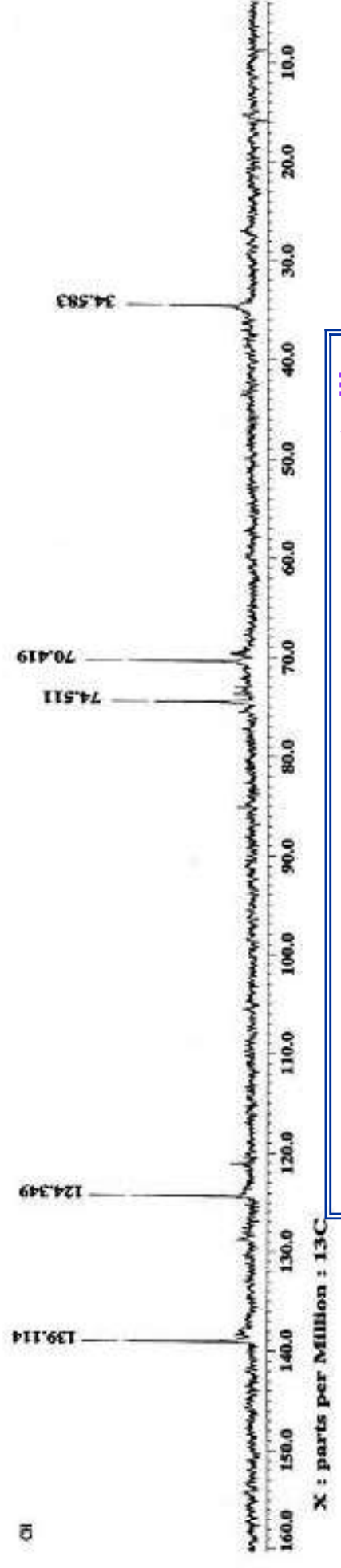
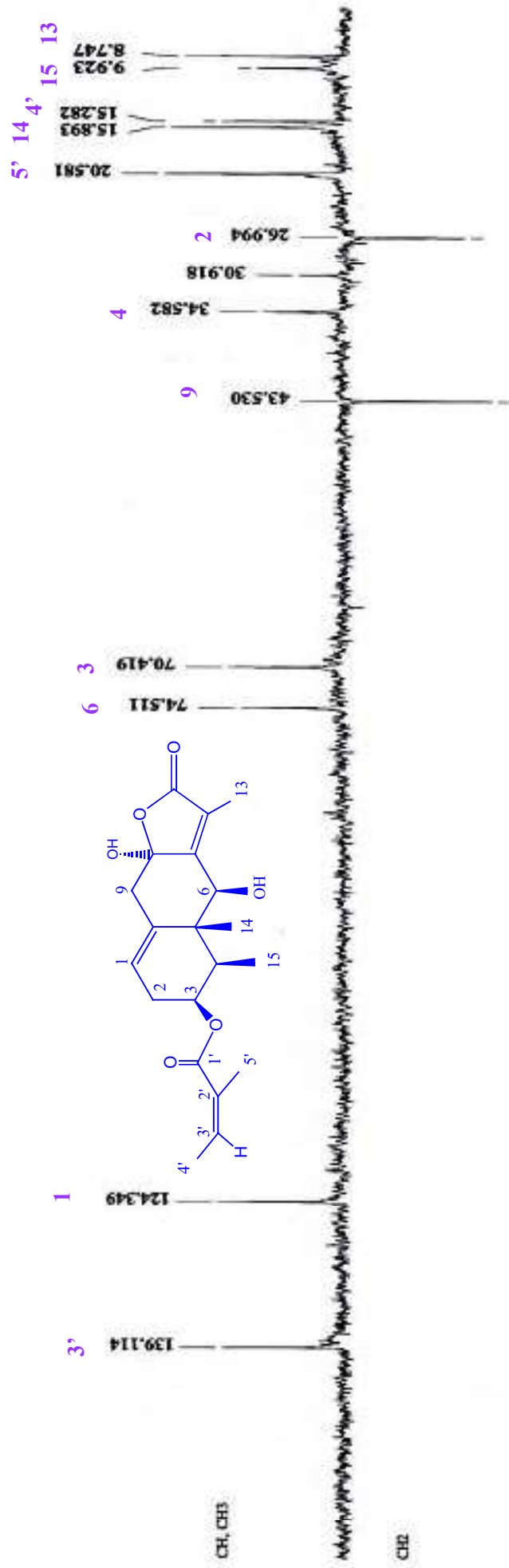


ESPECTRO 3a: RMN-¹H del compuesto III

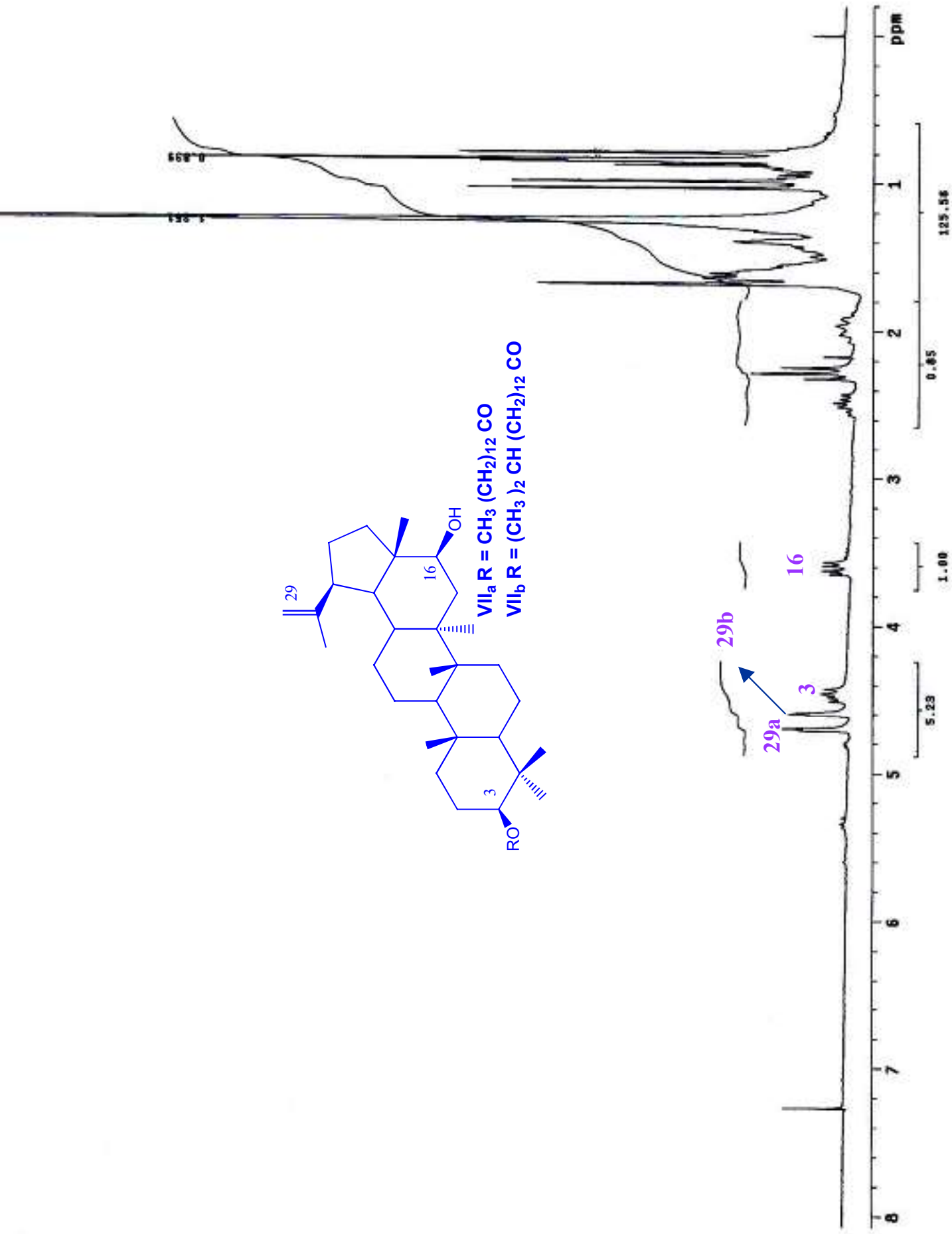


ESPECTRO 3b: RMN-¹³C del compuesto III

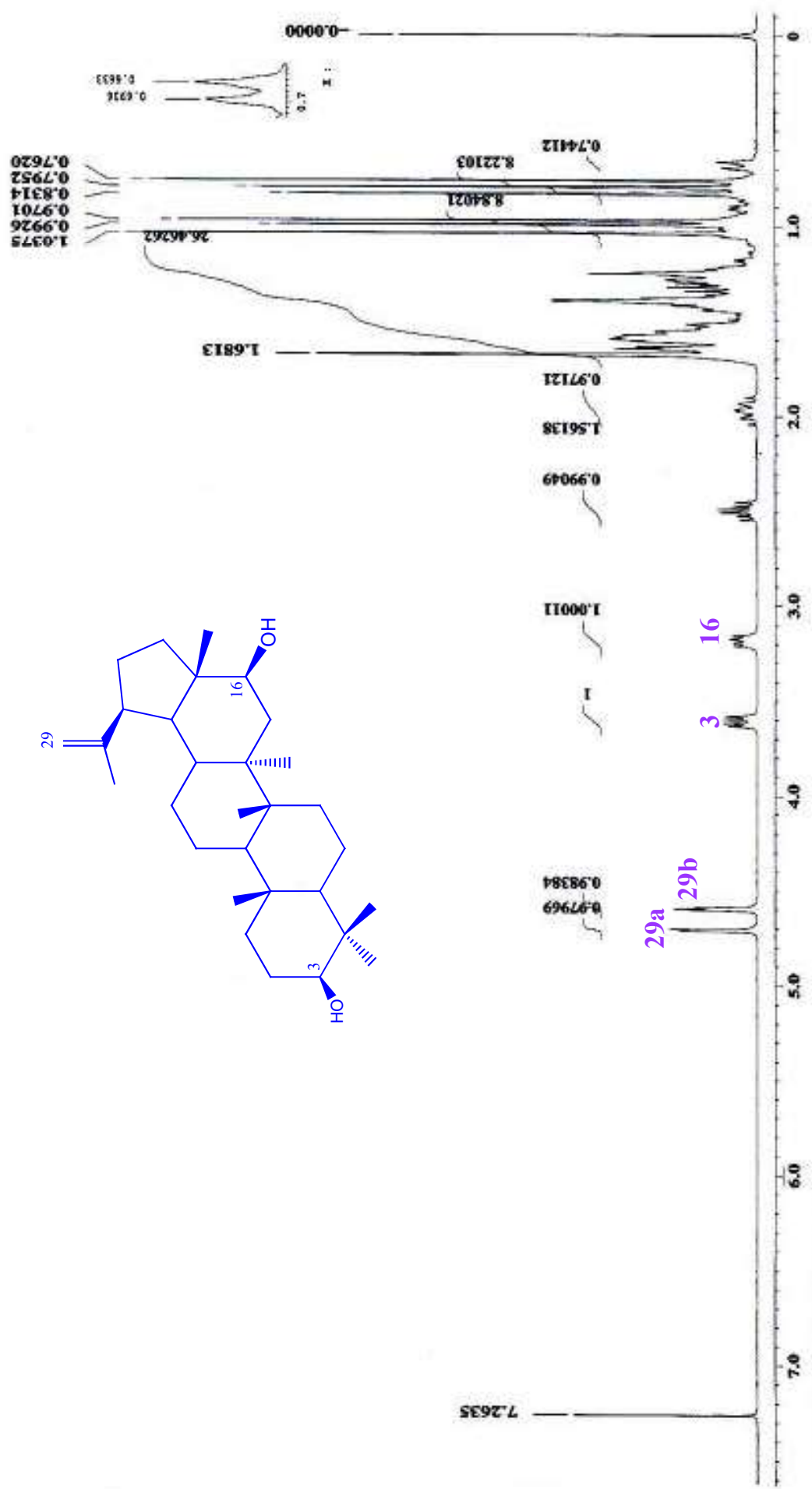




ESPECTRO 3d: Experimento DEPT del compuesto III

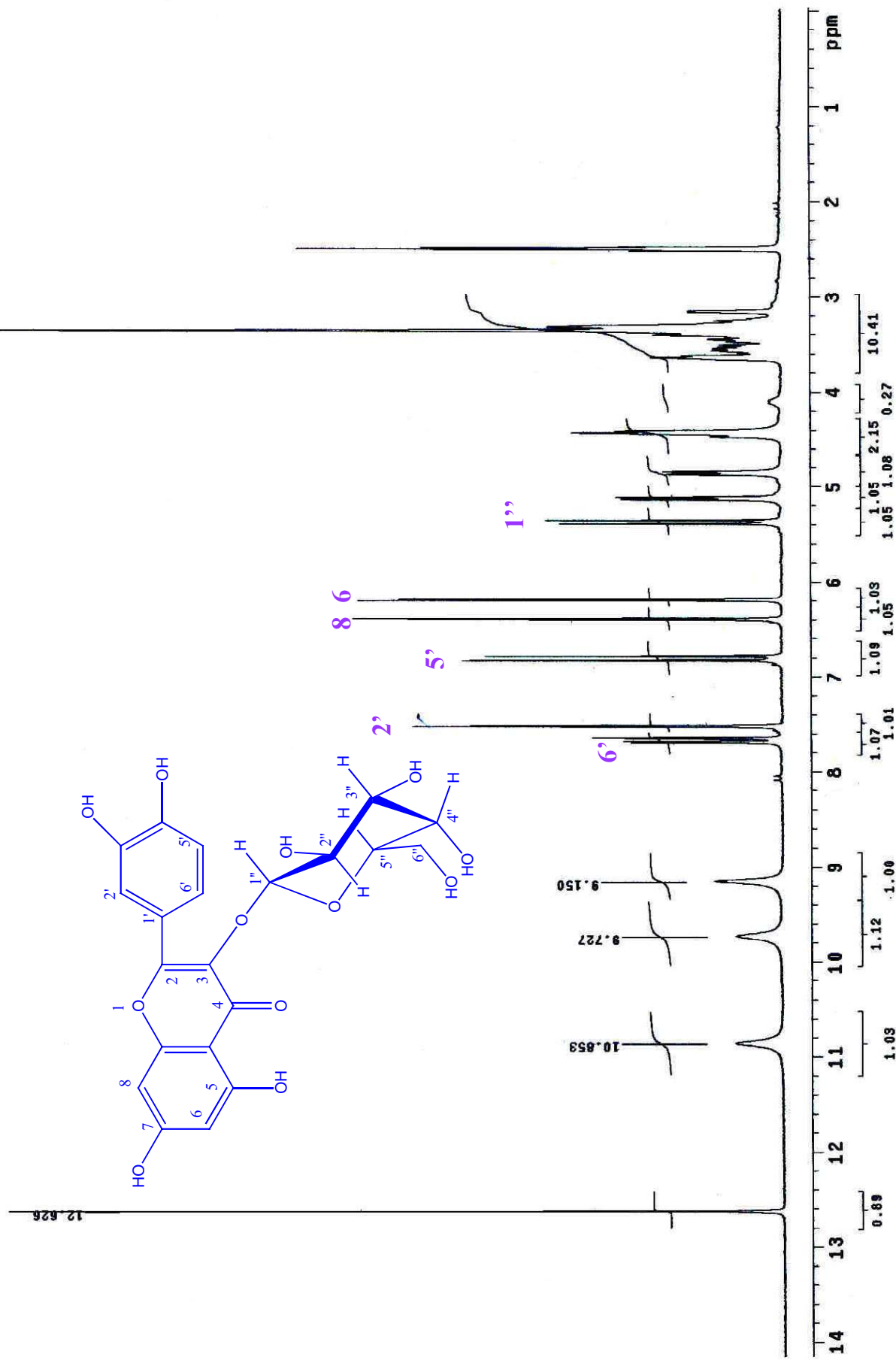


ESPECTRO 4a: RMN-¹H del compuesto VII

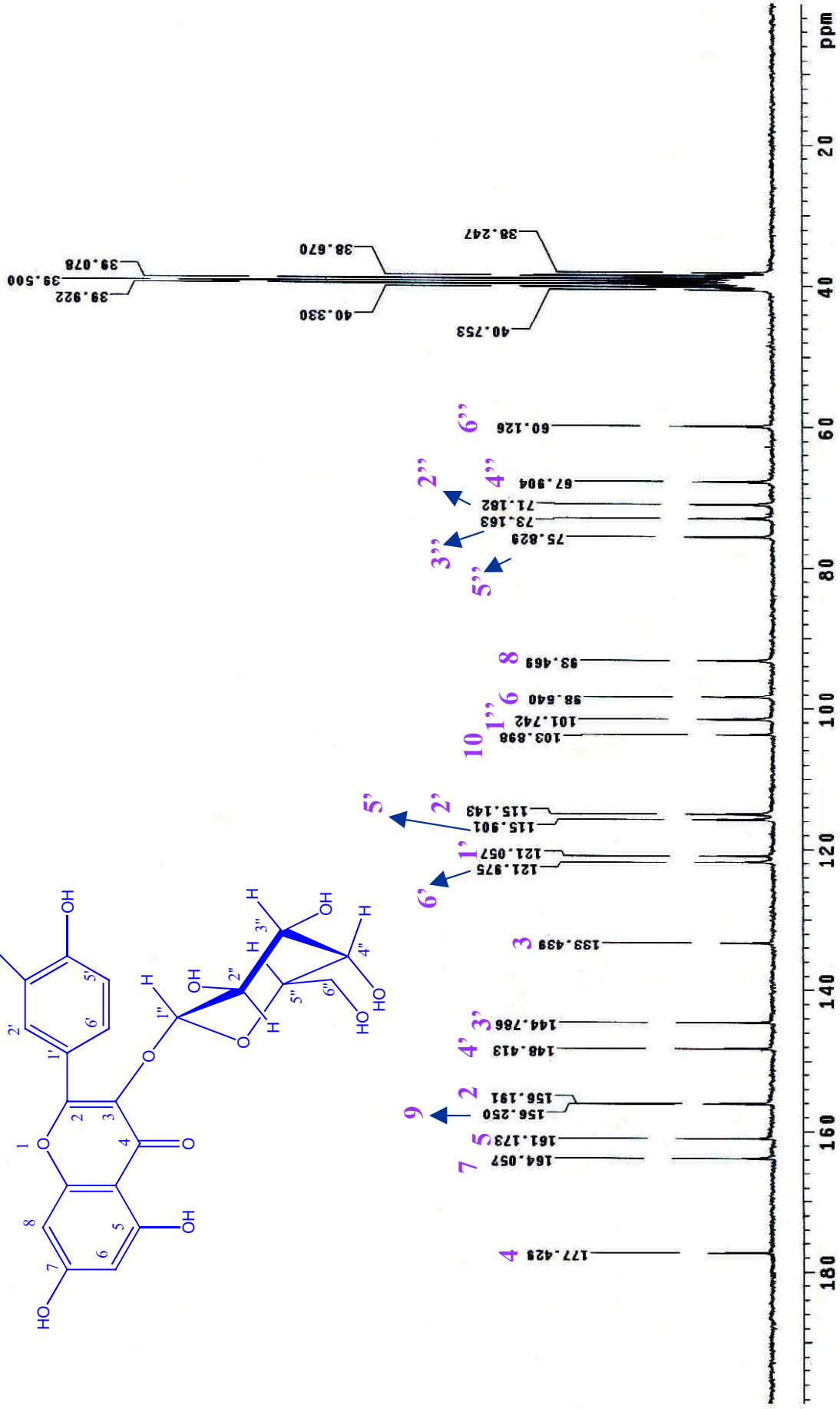
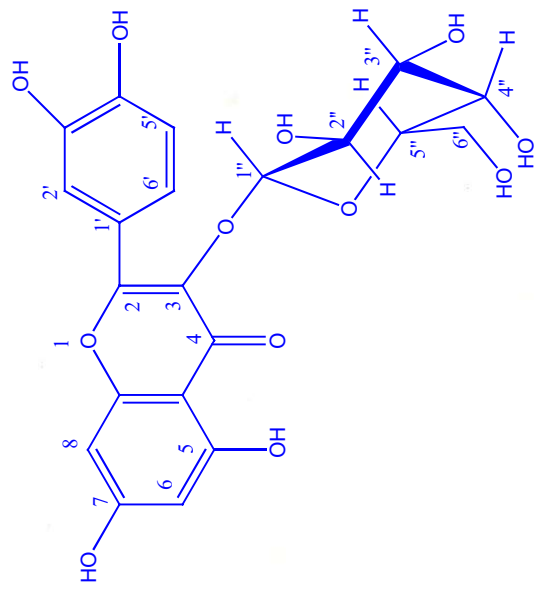


ESPECTRO 4b: RMN-¹H del Calenduladiol

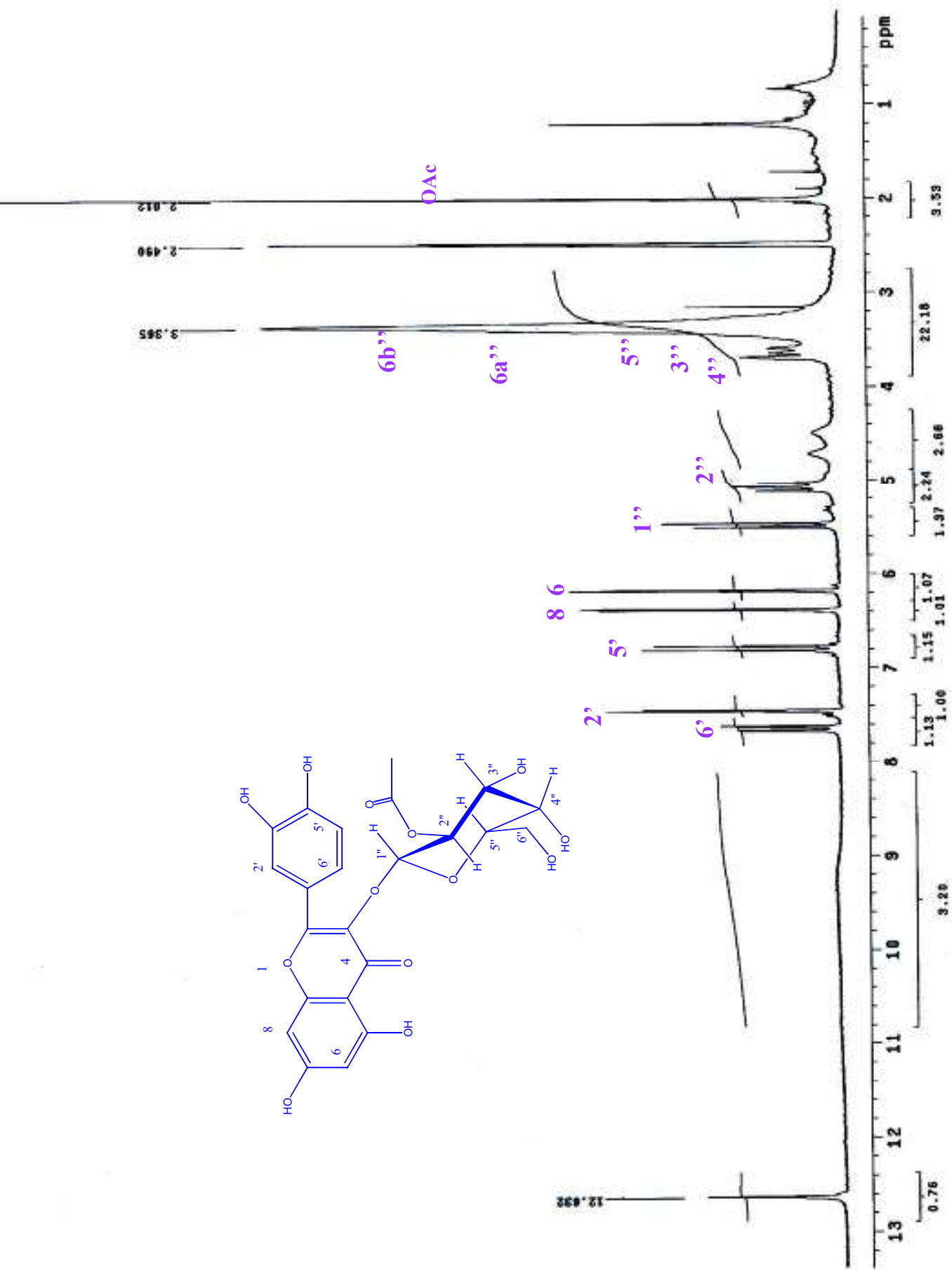
X : parts per Million : 1H



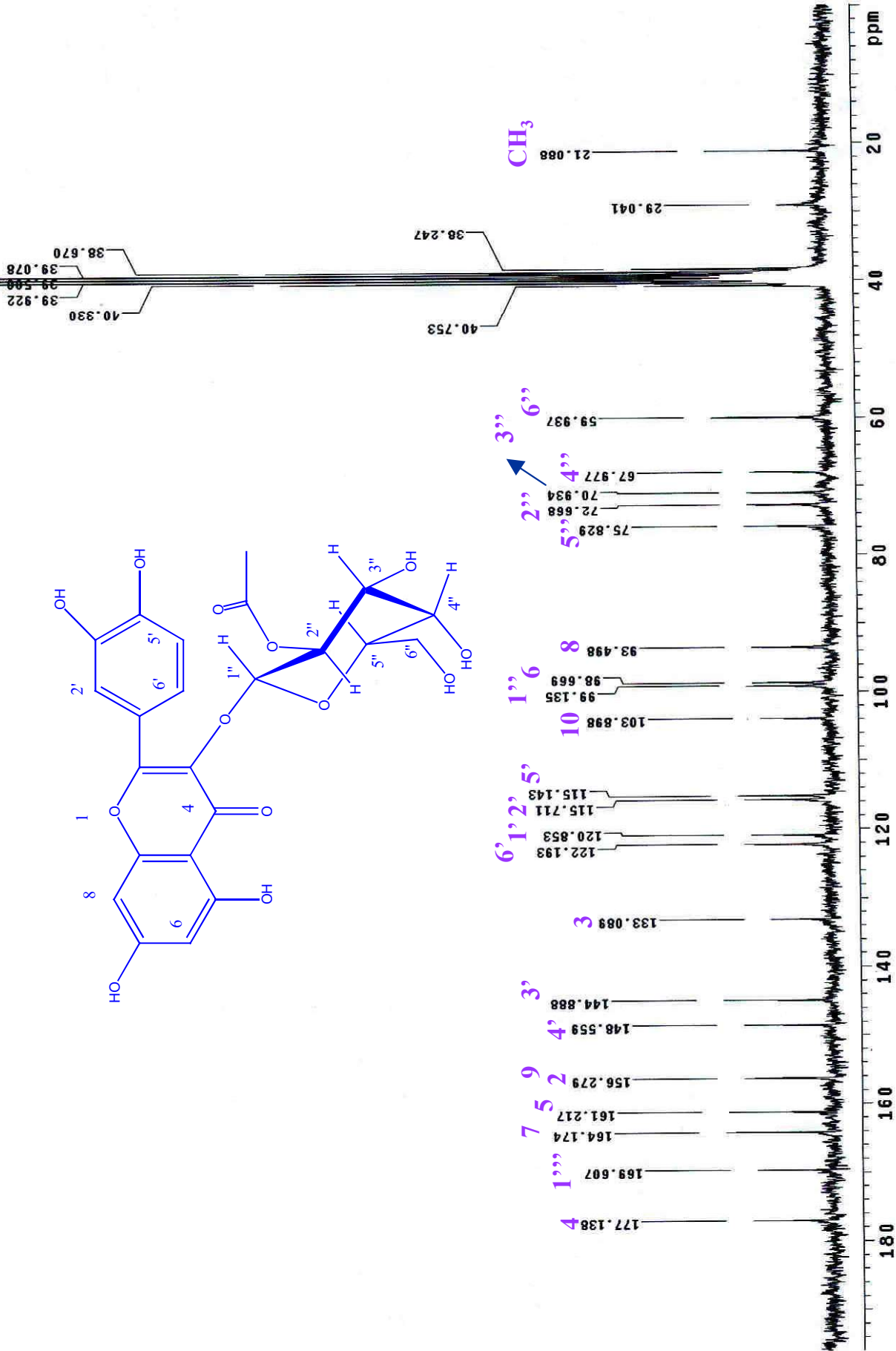
ESPECTRO 5a: RMN-¹H del compuesto VIII



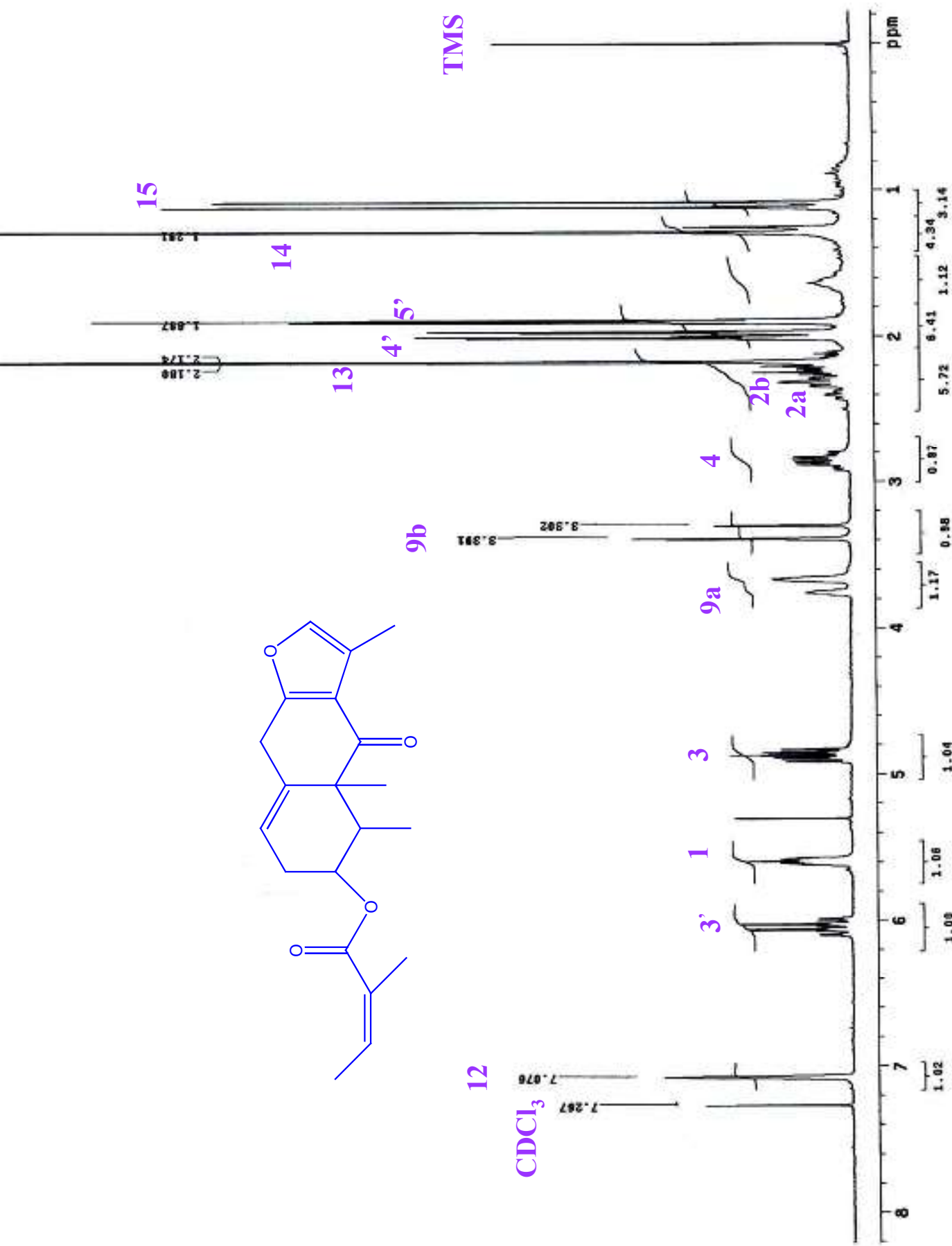
ESPECTRO 5b:RMN- ^{13}C del Galactósido de Quercetina



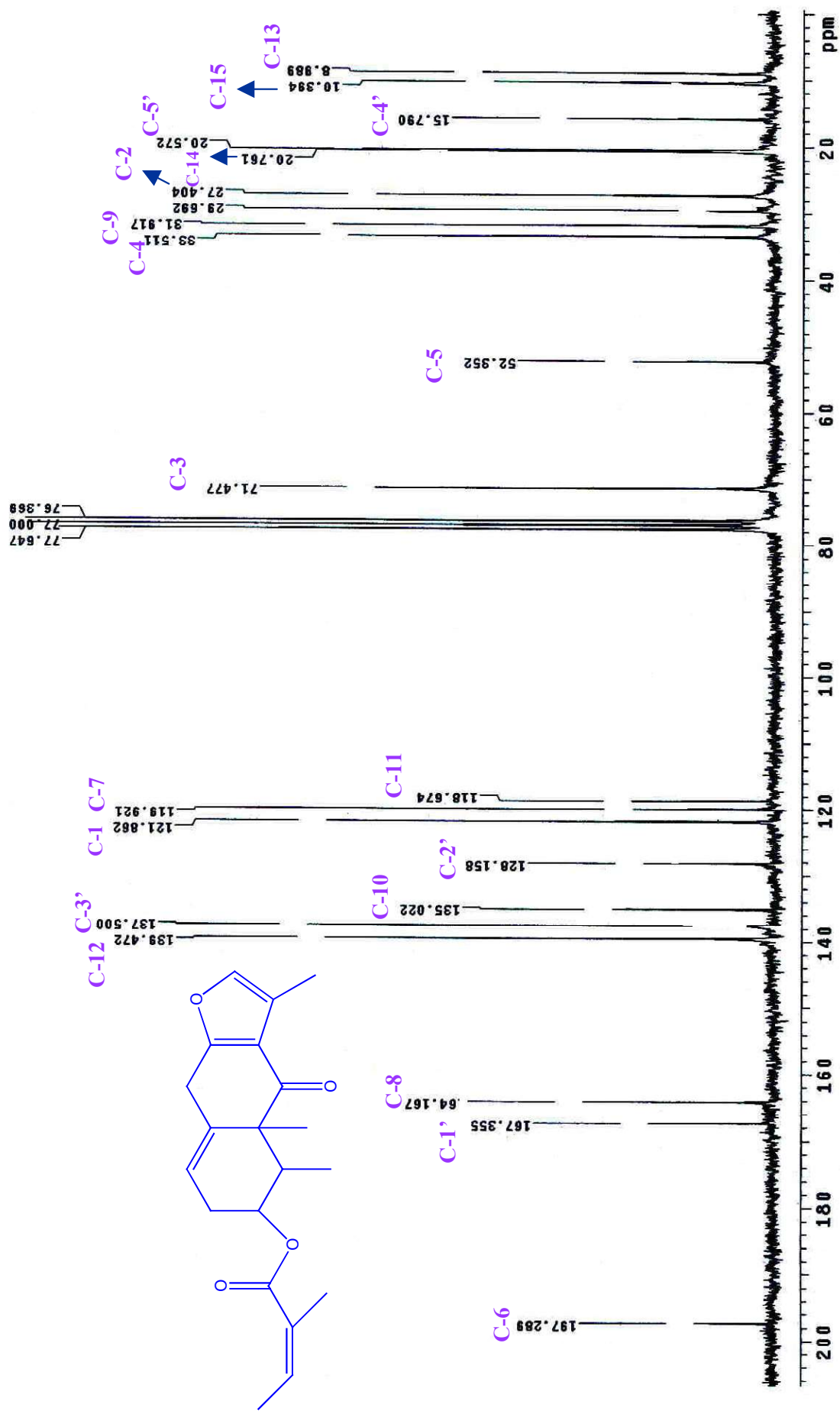
ESPECTRO 6a: RMN-1H del compuesto IX



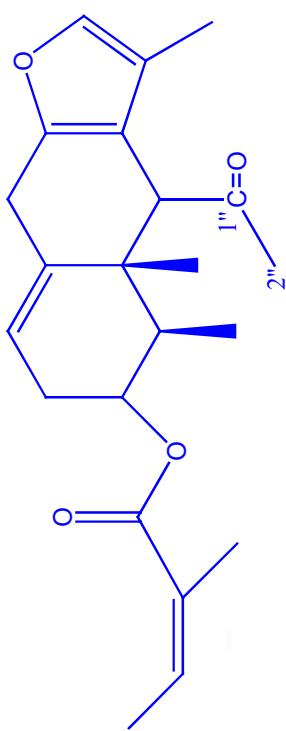
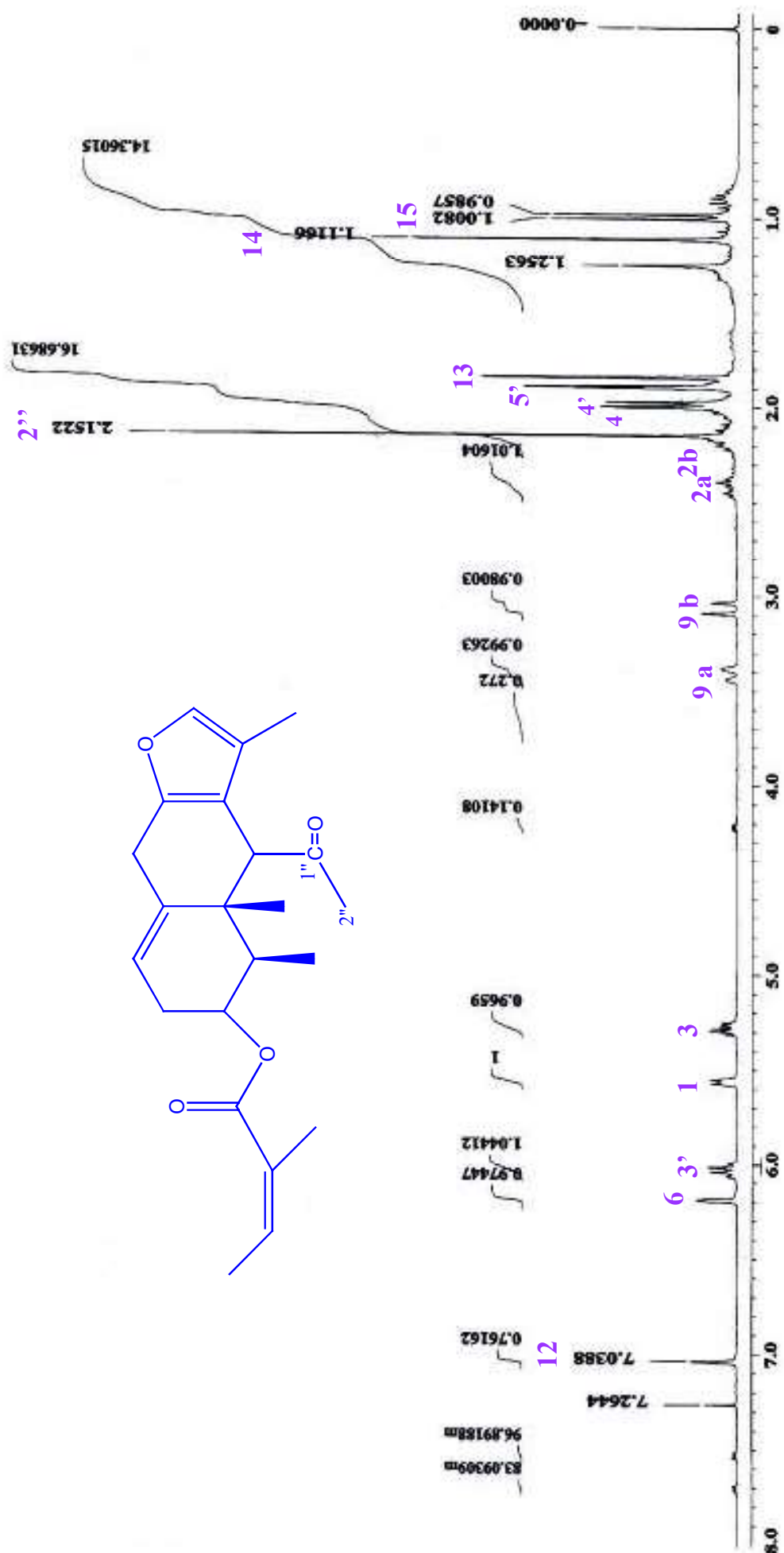
ESPECTRO 6b: RMN-¹³C del compuesto IX



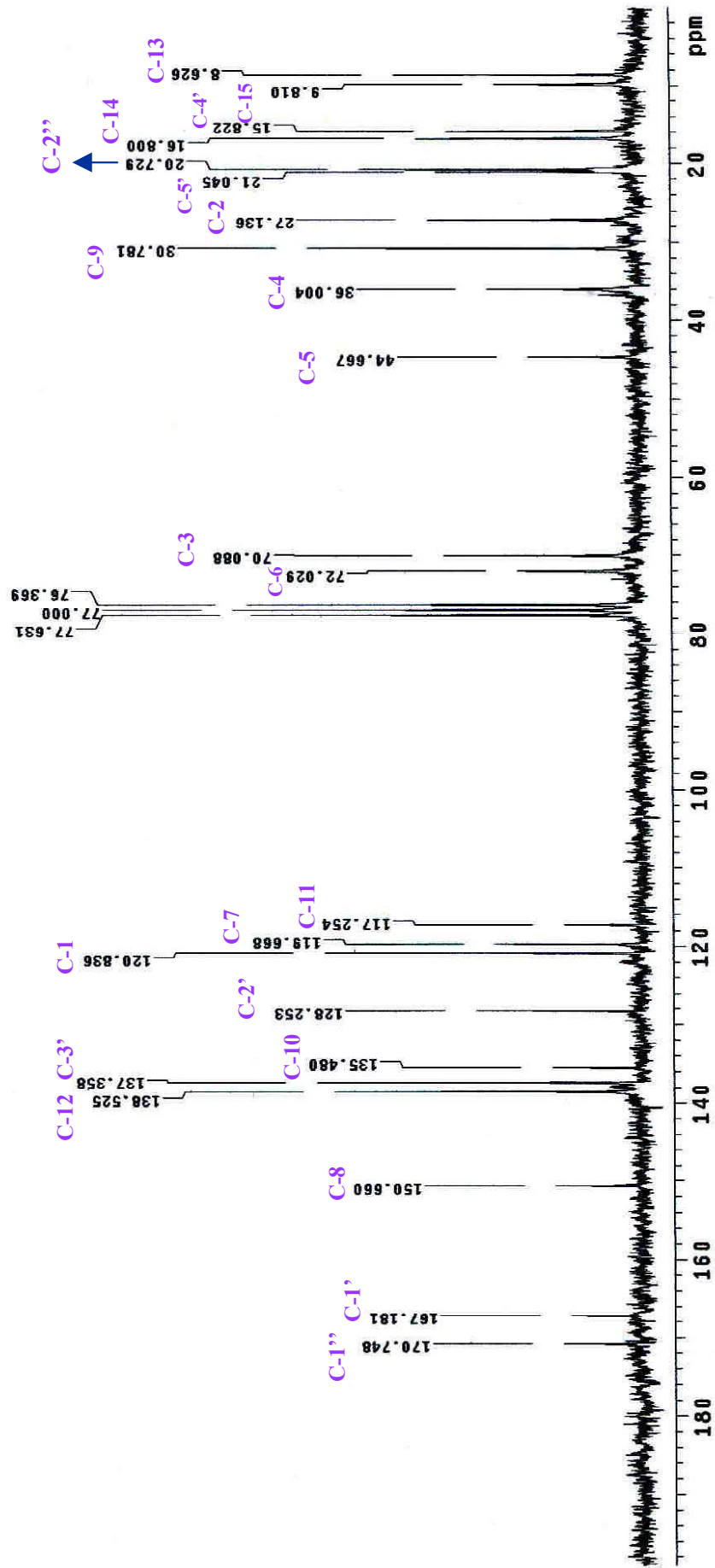
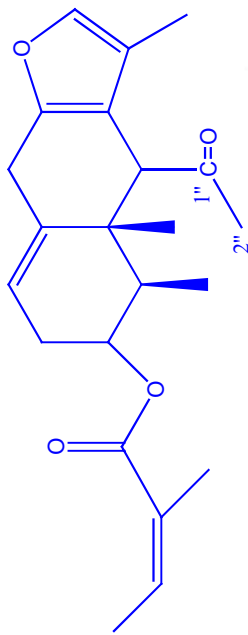
ESPECTRO 7a: RMN-¹H del compuesto X



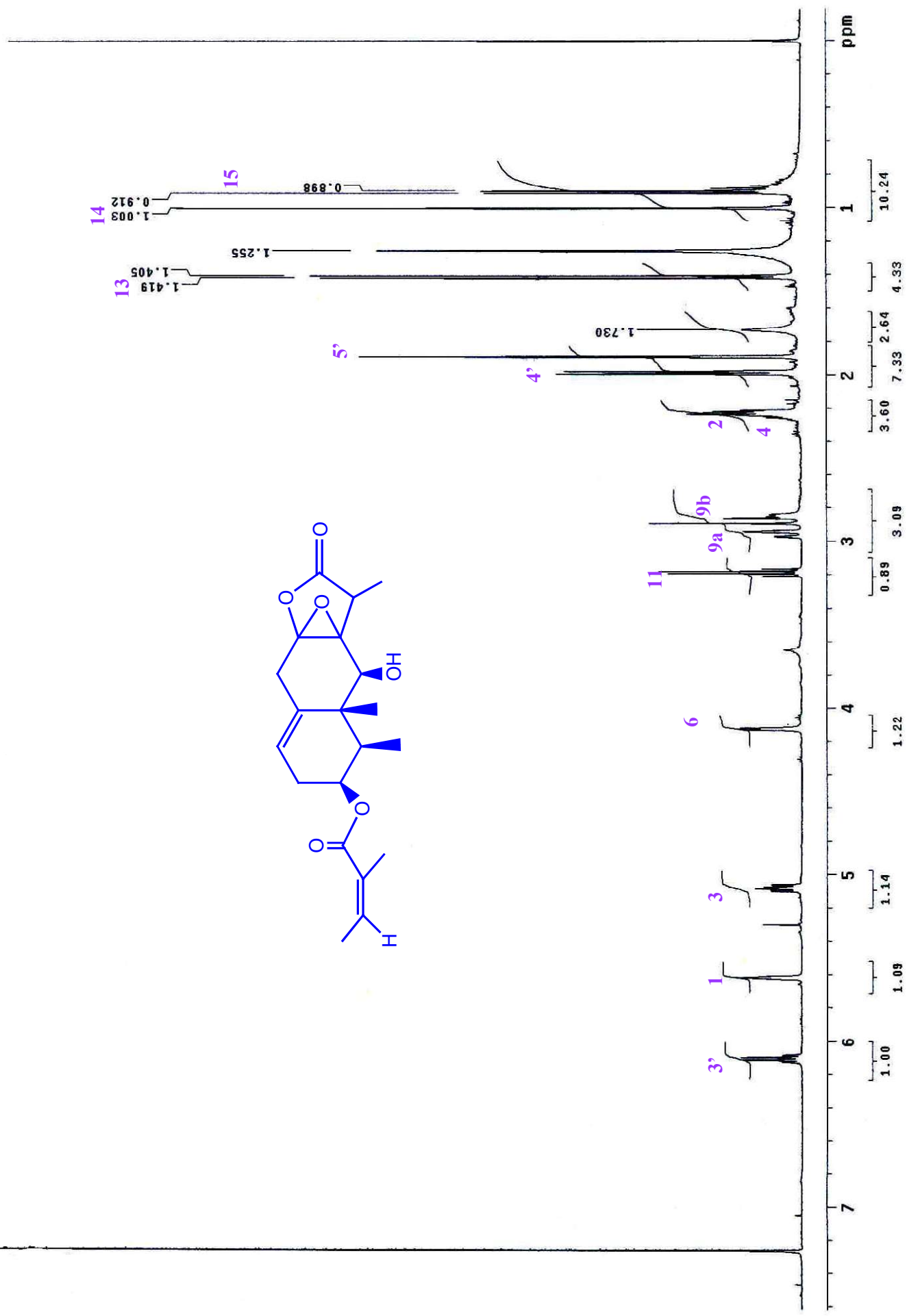
ESPECTRO 7b: RMN-¹³C del compuesto X



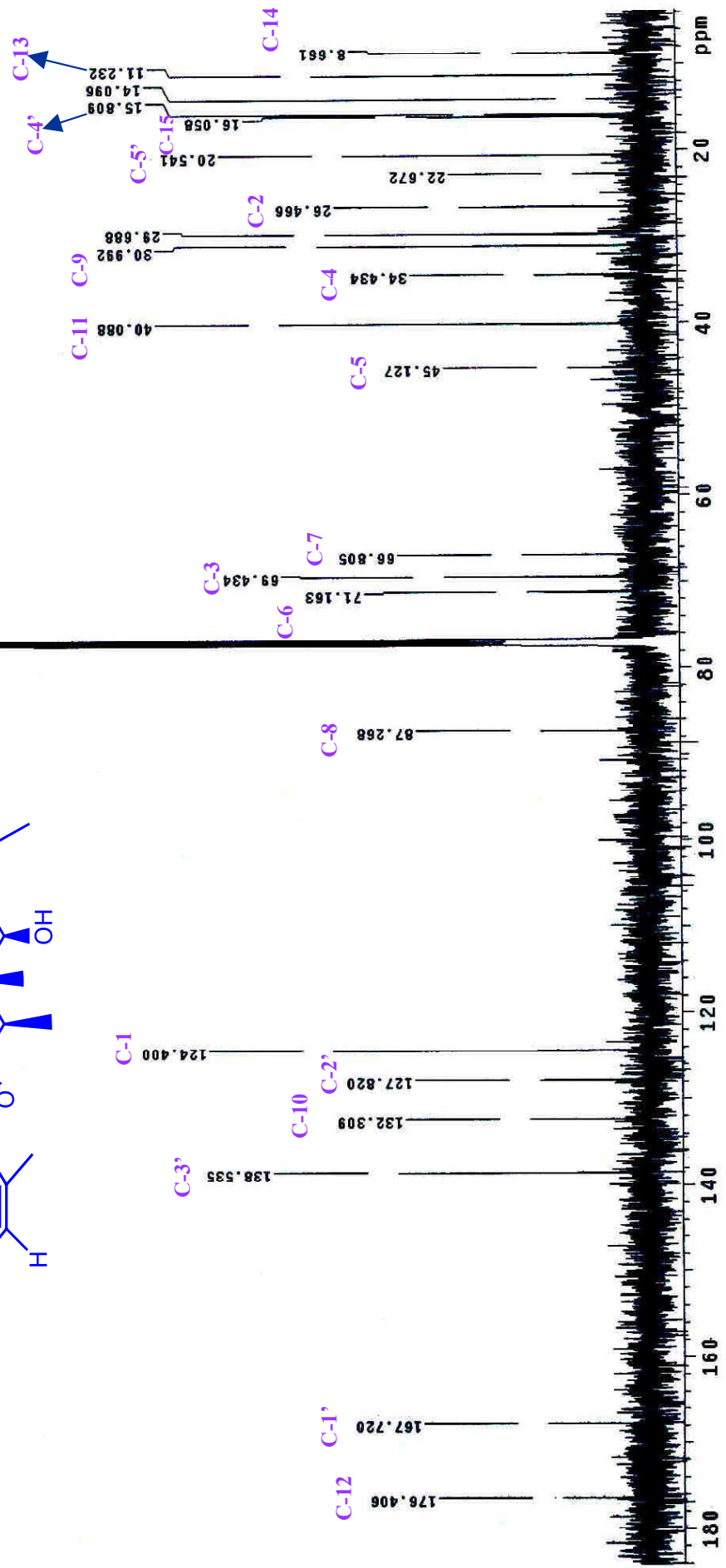
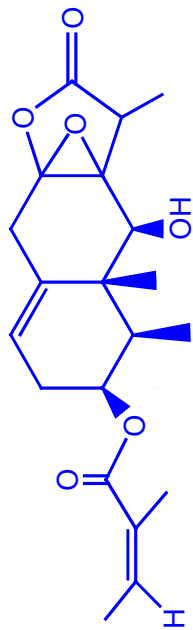
ESPECTRO 8a: RMN-¹H del compuesto XI



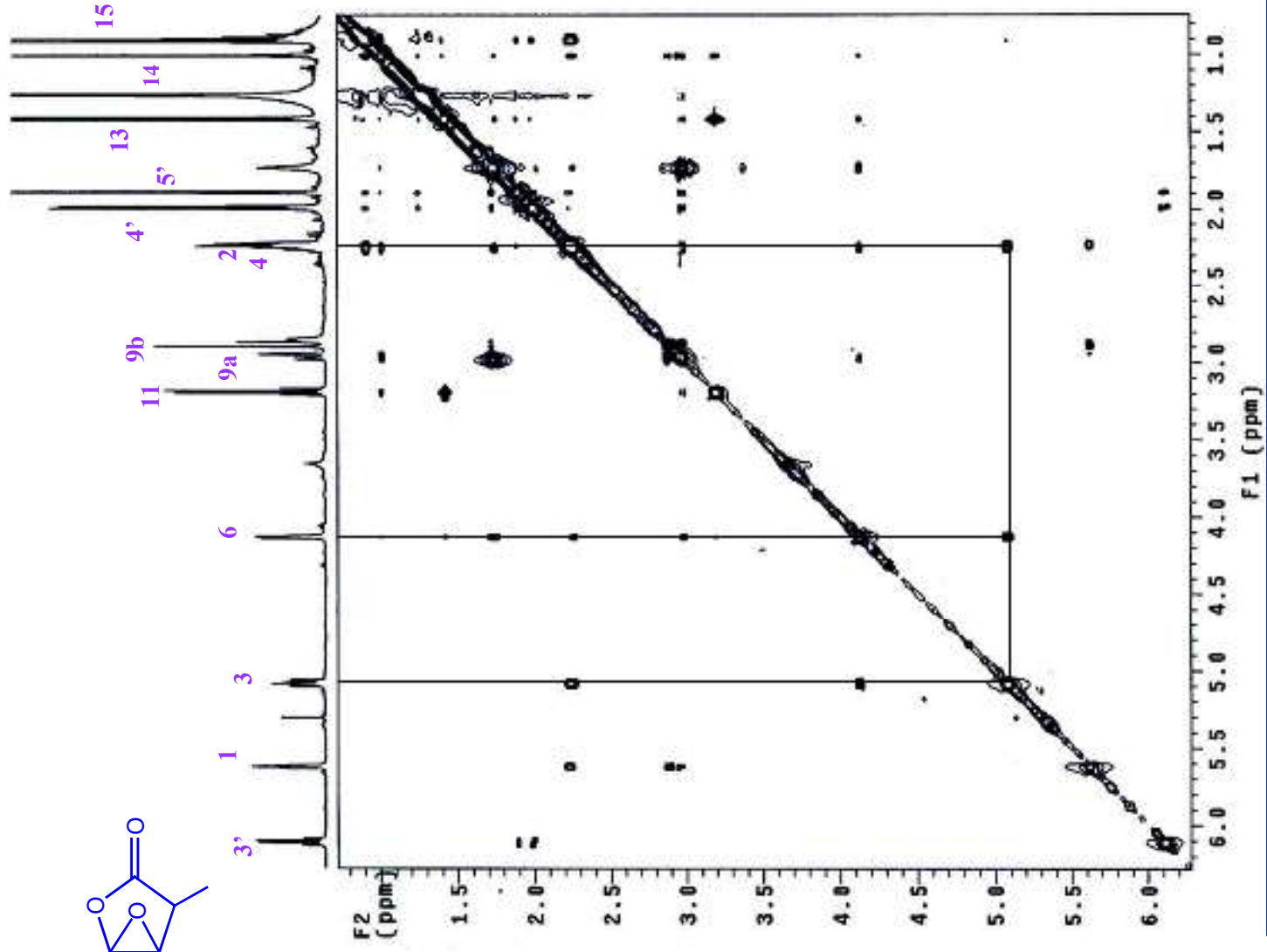
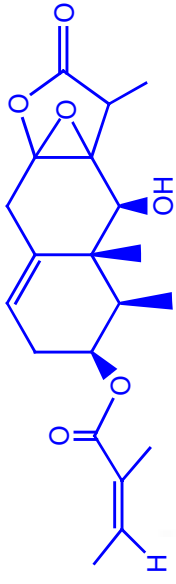
ESPECTRO 8b: RMN-¹³C del compuesto XI

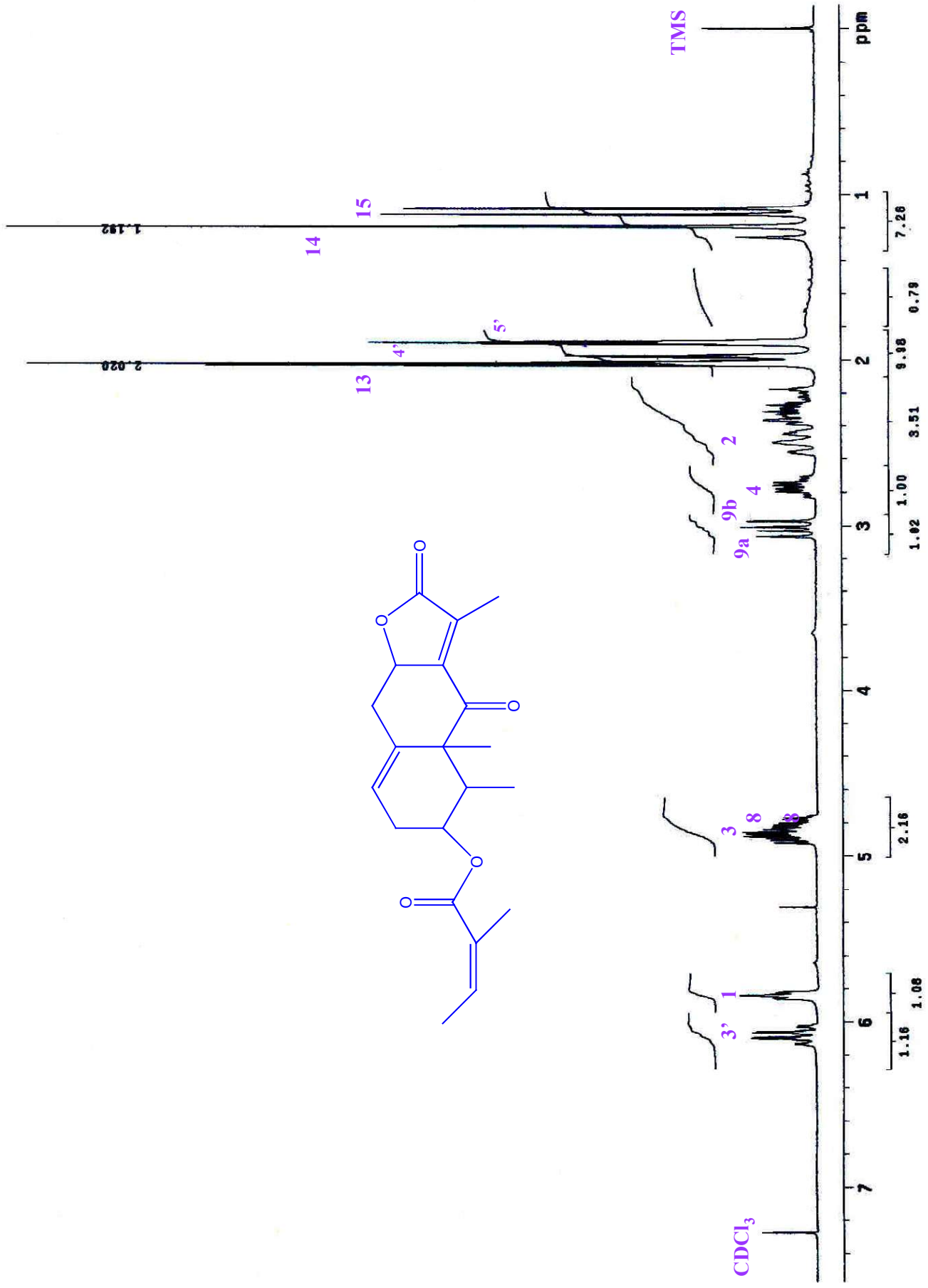


ESPECTRO 9a: RMN-¹H del compuesto XII

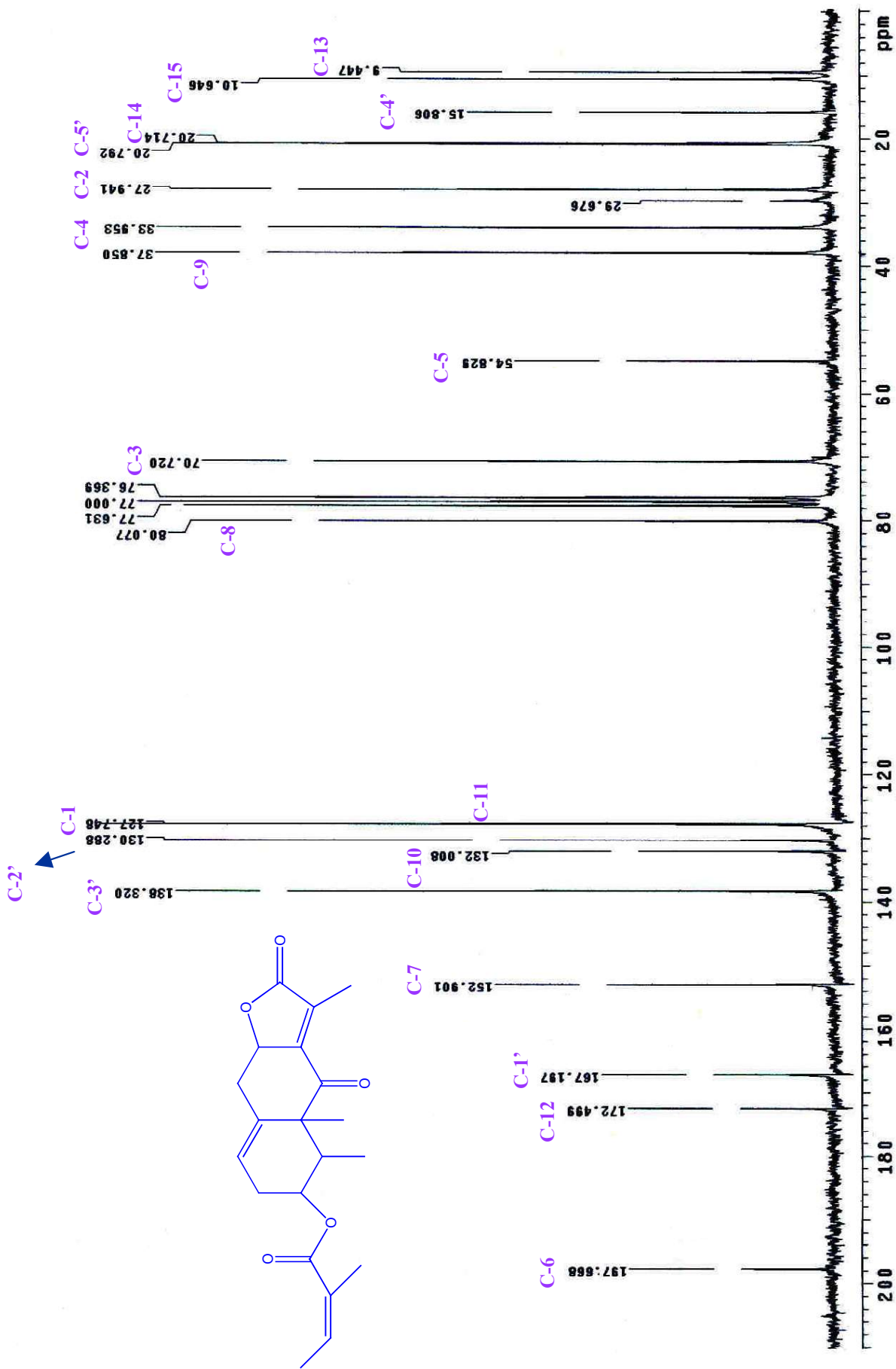


ESPECTRO 9b: RMN-¹³C del compuesto XII

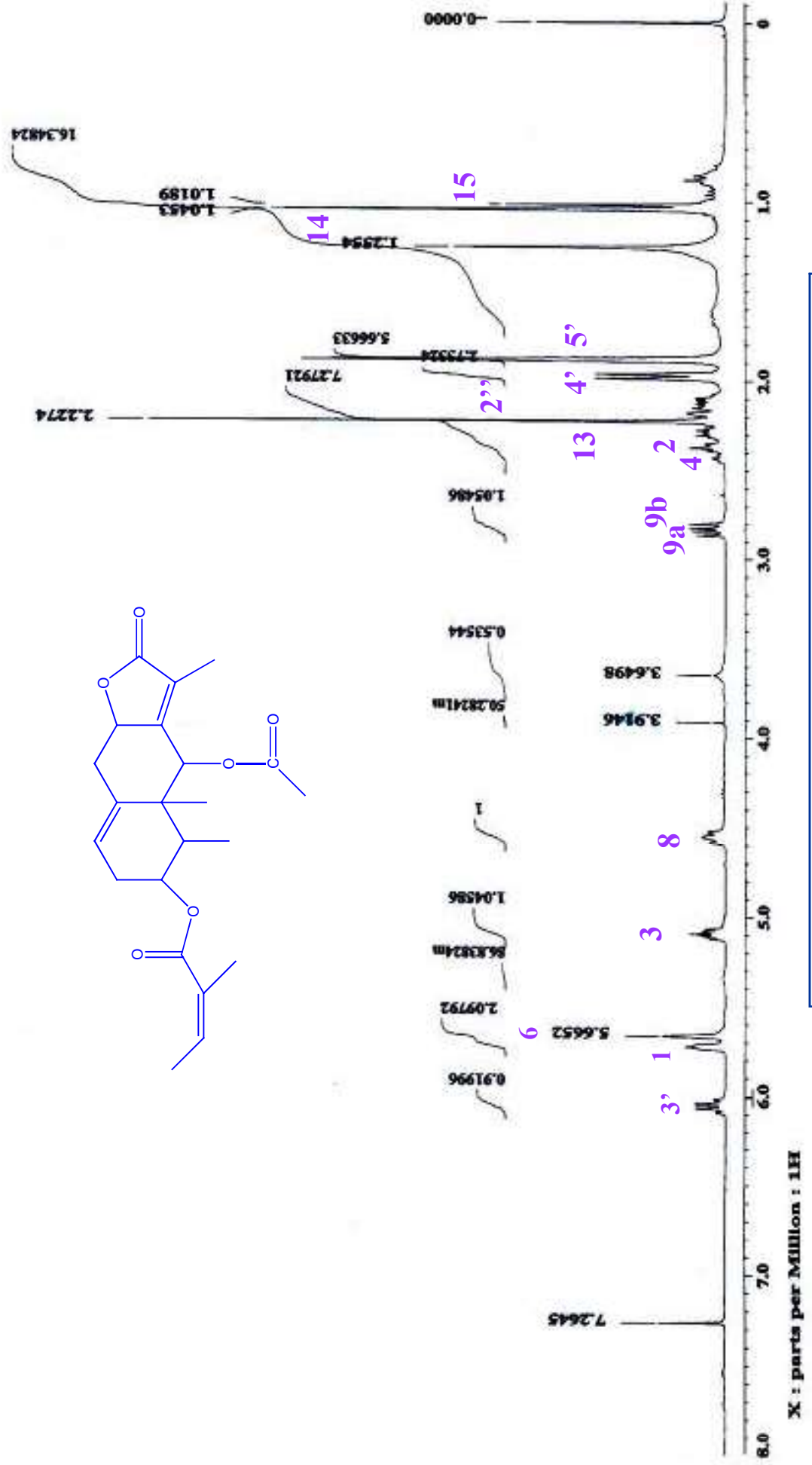
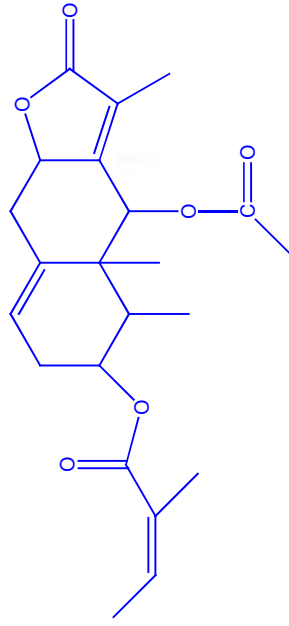




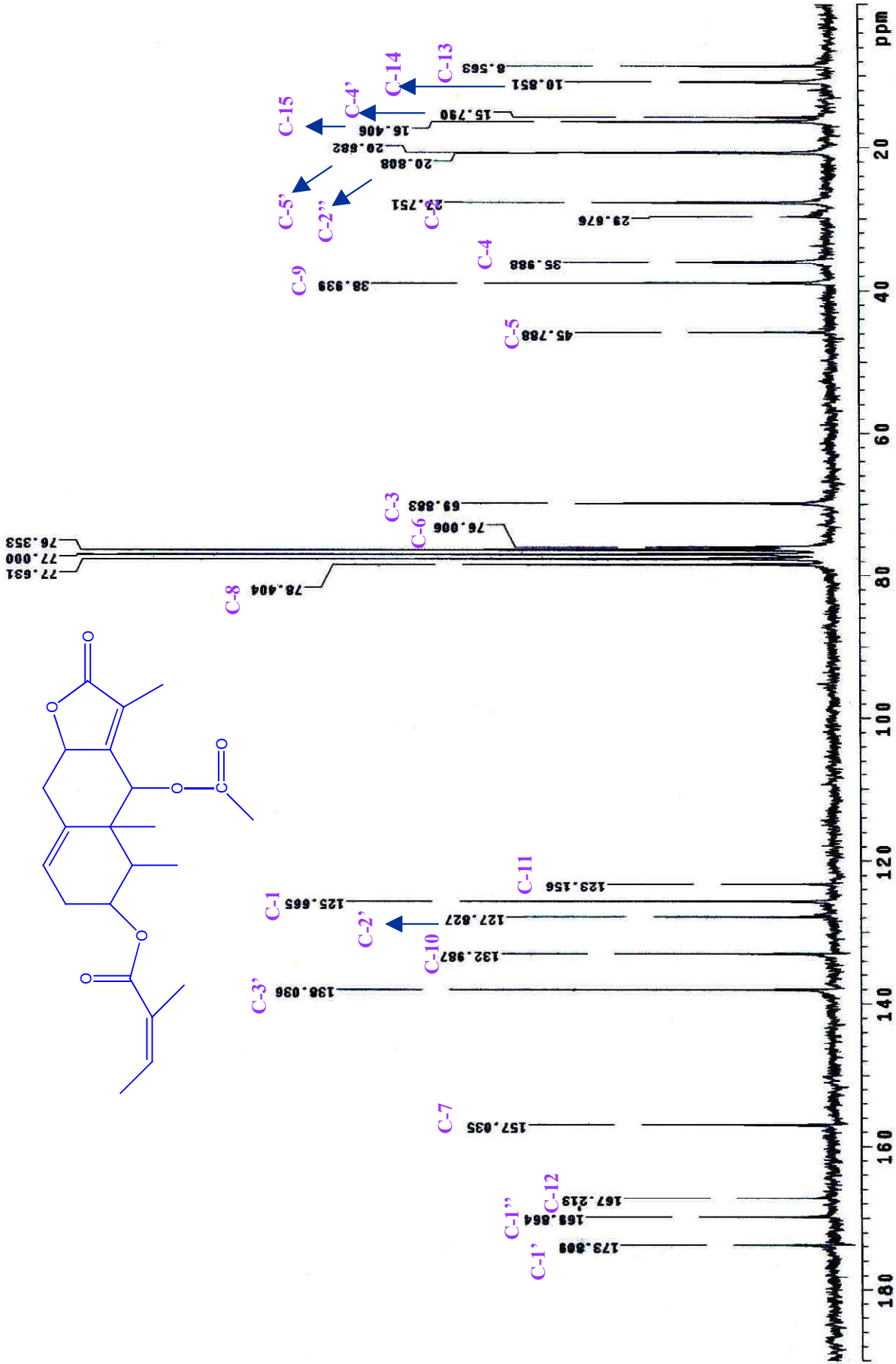
ESPECTRO 10a: RMN-¹H del compuesto XIII



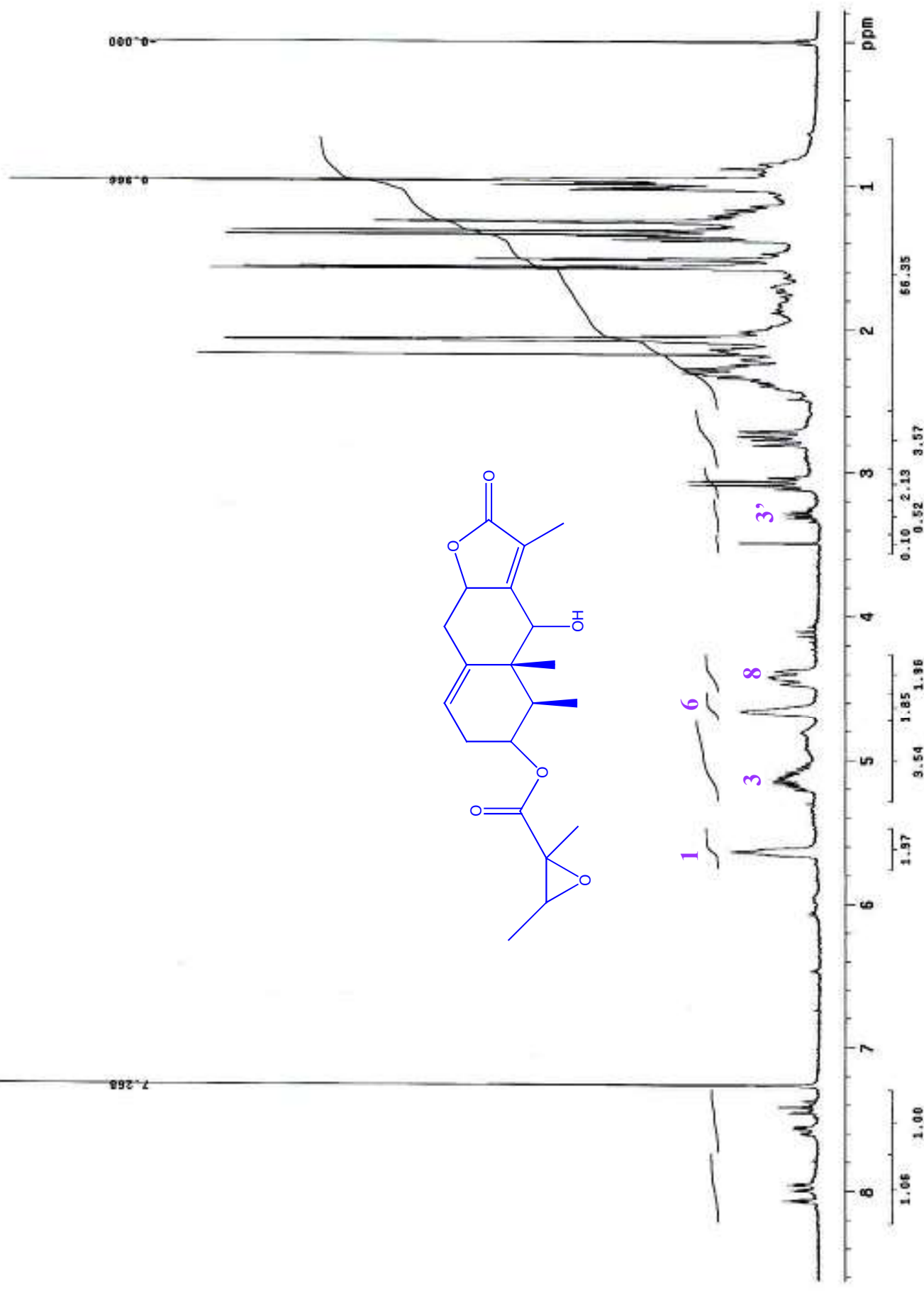
ESPECTRO 10b: RMN-¹³C del compuesto XIII



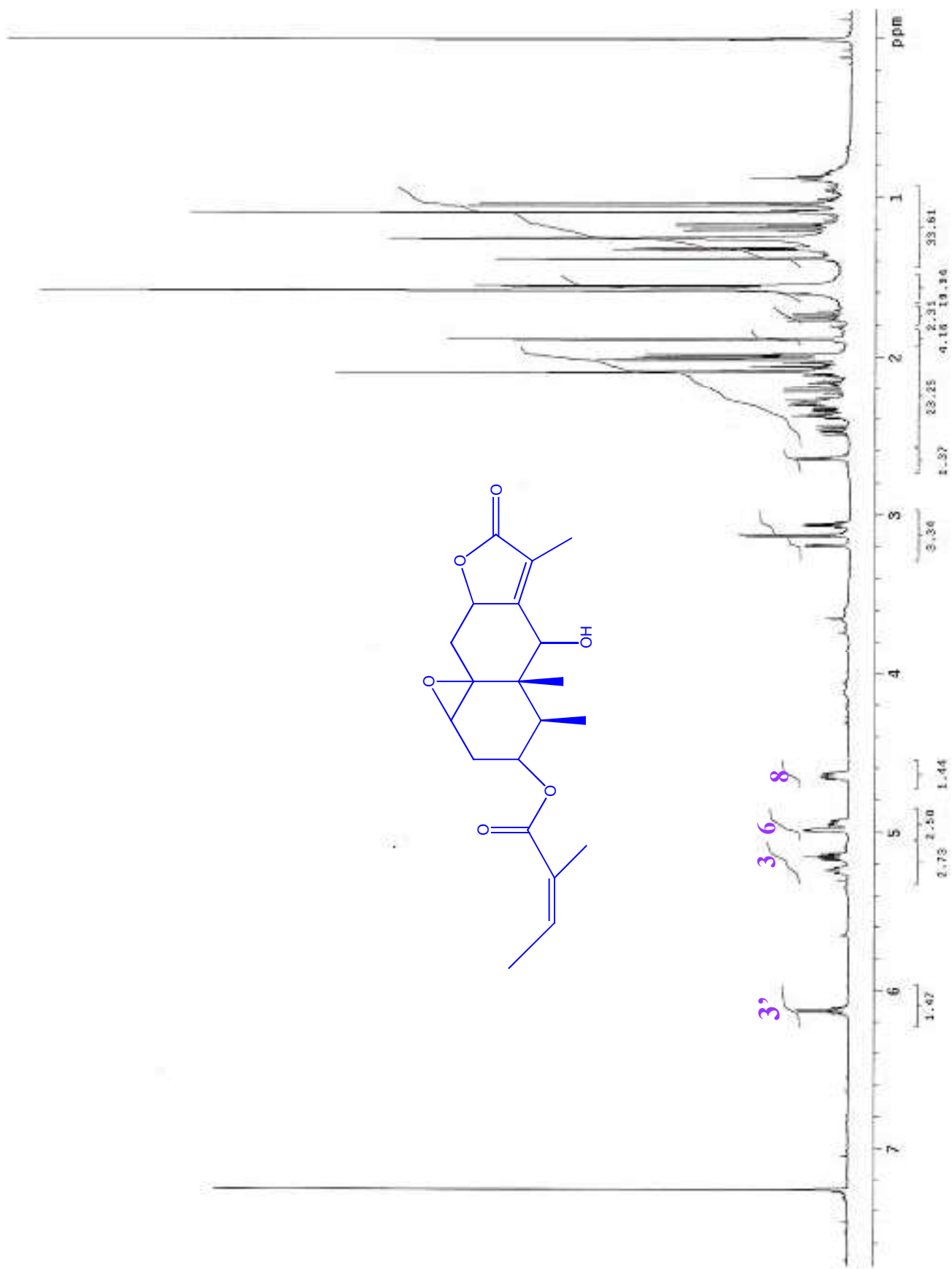
ESPECTRO 11a: RMN-1H del compuesto XIV

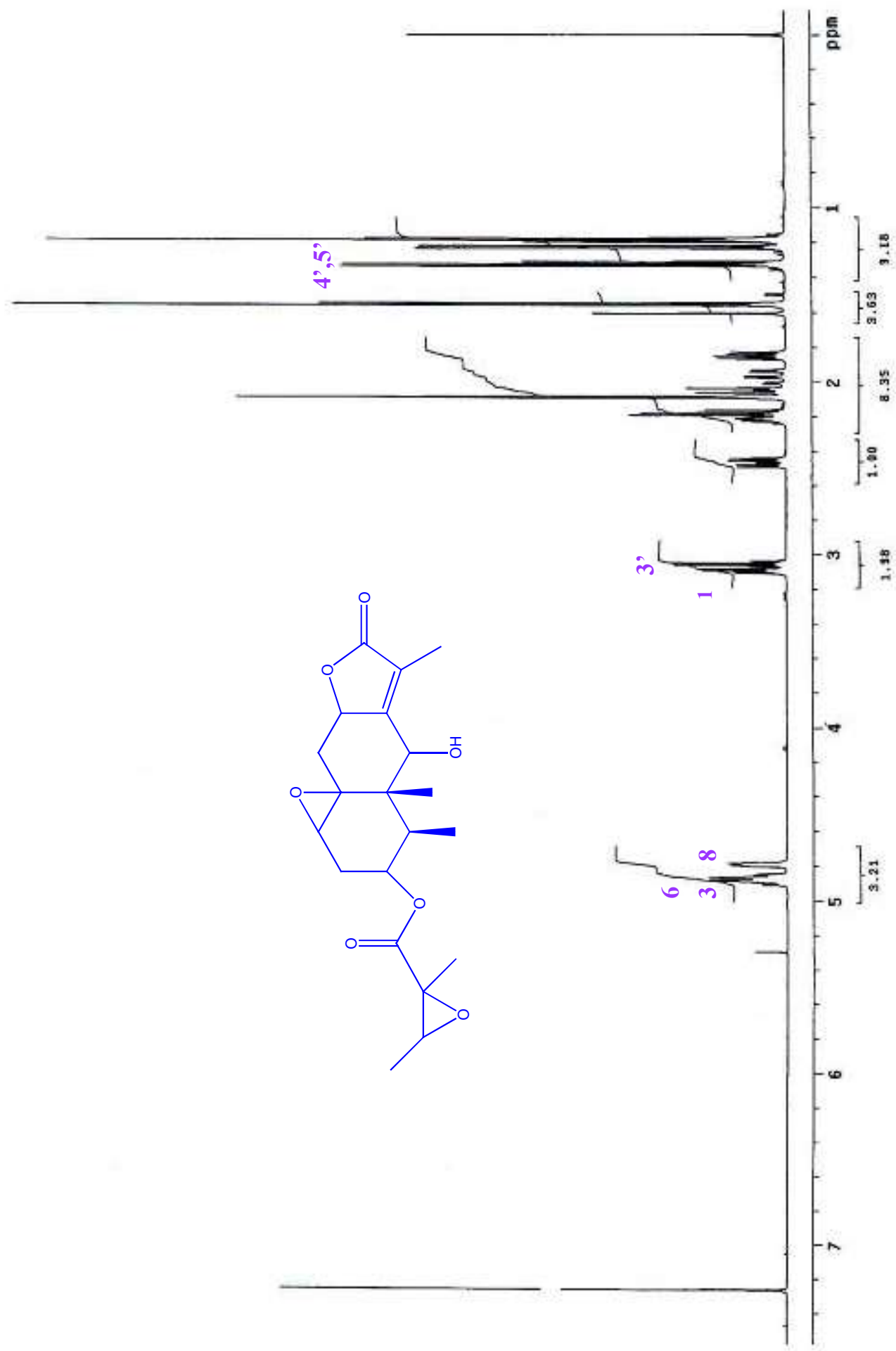


ESPECTRO 11b: RMN-¹³C del compuesto XIV



ESPECTRO 12a: RMN- ^1H de la mezcla de estereoisómeros XV





ESPECTRO 14a: RMN-¹H de la mezcla de estereoisómeros XVI