

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

Estudio Fitoquímico de *Senecio flaccidus* y *Senecio mairetianus*

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez



TUTOR: M. en C. Ana Lidia Pérez Castorena

AÑO: 2004

AGRADECIMIENTOS

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

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 2-7 del Instituto de Química, UNAM, bajo la dirección de M. en C. Ana Lidia Pérez Castorena.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Silvia Laura
Guzmán Gutiérrez

FECHA: 11/06/2004

FIRMA: Laura

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
ANTECEDENTES	3
Familia Asteraceae (Compositae)	3
Tribu Senecioneae	4
Género <i>Senecio</i>	4
<i>Senecio flaccidus</i> Less. Linnaea	6
<i>Senecio mairetianus</i> DC.	7
Metabolitos Secundarios Característicos de <i>Senecio</i>	7
Alcaloides Pirrolizidínicos	9
Eremofilanos	21
PARTE EXPERIMENTAL	26
<i>Senecio flaccidus</i>	30
Raíz de <i>Senecio mairetianus</i>	34
Parte aérea de <i>Senecio mairetianus</i>	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
RESUMEN Y CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	64
ESPECTROS	68

INTRODUCCIÓN

En la medicina tradicional herbolaria de diversos países, especies del género *Senecio* son utilizadas para aliviar infecciones de la piel, reumatismo y dolor de riñones. Por otro lado, estos vegetales también se han relacionado con intoxicaciones, tanto de personas como de ganado (Roeder, 1995 y 1999; Stewart *et al.*, 2001). Estudios fitoquímicos muestran que el género *Senecio* se caracteriza por sintetizar alcaloides pirrolizidínicos (APs) y eremofilanos.

Considerando estos antecedentes, algunos grupos de investigación han realizado estudios tendientes a establecer si los alcaloides pirrolizidínicos y/o eremofilanos presentan alguna actividad biológica, así se ha establecido que el eremofilano modificado cacalol presenta actividad antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* entre otros (Jiménez *et al.*, 1992; Garduño-Ramírez *et al.*, 2001). En el caso de los APs, estudios toxicológicos indican que la senecionina, monocrotalina y otros alcaloides estructuralmente relacionados con ellos, son hepatotóxicos, mutagénicos y teratogénicos (Liddell, 2001; Mattocks, 1986).

Tomando en cuenta lo anterior y considerando que México es un centro de diversificación del género *Senecio* y que varias de sus especies son endémicas, en el Instituto de Química se realiza la investigación fitoquímica sistemática de especies mexicanas de *Senecio*. Este proyecto que inició con la sección *Mulgediifolii*, se amplió hacia especies relacionadas filogenéticamente con esta sección y se ha extendido a taxones de géneros relacionados con el género *Senecio*.

En este contexto, el presente trabajo de tesis consistió en el análisis fitoquímico de dos especies del género *Senecio*, *Senecio flaccidus* y *Senecio mairetianus*, así como en la evaluación de la actividad citotóxica, antiinflamatoria y antioxidante de los extractos y de algunos de sus principales metabolitos secundarios.

OBJETIVOS

- ❖ Contribuir al conocimiento químico del género *Senecio*.
- ❖ Aislar, purificar, identificar y cuantificar los principales metabolitos secundarios de *Senecio flaccidus* y *Senecio mairetianus*.
- ❖ Evaluar la actividad antiinflamatoria, antioxidante y citotóxica de los extractos y metabolitos aislados.

ANTECEDENTES

FAMILIA ASTERACEAE (Compositae)

Las plantas de esta familia son herbáceas o arbustivas, rara vez arbóreas o trepadoras, sus hojas son opuestas o alternadas, en ocasiones todas radicales, sin estípulas, sus flores por lo general son pequeñas, agrupadas en capítulos, dispuestas sobre un receptáculo y en muchos casos acompañadas cada una por una bráctea individual o palea y el conjunto está rodeado por una o varias series de brácteas que constituyen el involucre. Las flores son hermafroditas, unisexuales o estériles. Las cabezuelas pueden llevar un solo tipo de flor, pero con mayor frecuencia en su periferia se sitúan las flores liguladas (femeninas o estériles), mientras que el resto está constituido por las "flores del disco", que suelen ser hermafroditas o en ocasiones masculinas. Los frutos tienen forma de aquenio y a menudo lleva en su extremo superior el vilano (Calderón *et al.*, 2001).

Hasta el momento, el número de miembros que componen la familia no se ha definido, por lo que su estimación a nivel mundial está sujeta a muy diversos criterios. Turner (1977), por ejemplo, estima en alrededor de 1300 el número de géneros y cerca de 22000 el número de especies; por su parte, Cronquist (1981) calcula que la familia agrupa más de 1100 géneros y unas 20000 especies (Villaseñor, 1993).

La familia ocupa un lugar preponderante en la flora de México, tanto a nivel de géneros como de especies y contribuye en gran número a la enorme riqueza florística de nuestro país (Villaseñor, 1993). El Cuadro 1 presenta el número de tribus, géneros, especies y variedades o subespecies de la familia Asteraceae que se localizan en México.

Tribus	Géneros	Especies	Variedades 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 1. Familia Asteraceae en México

TRIBU SENECTIONEAE

Las plantas de esta tribu son herbáceas o leñosas con hojas alternas y en ocasiones todas basales. Sus cabezuelas, con o sin flores liguladas fértiles, contienen las brácteas involucrales a menudo todas del mismo largo, excepto unas pocas exteriores que son mucho más cortas y angostas que forman el "calículo", receptáculo por lo general sin páleas ni cerdas. Las corolas son a menudo amarillas, las ramas del estilo de las flores hermafroditas con frecuencia se presentan truncadas y peniciladas en el ápice, el vilano casi siempre está formado de numerosas cerdas capilares (Calderón *et al.*, 2001).

GÉNERO *Senecio*

El género es muy vasto, tal vez de unas 1500 especies de distribución casi cosmopolita (Calderón *et al.*, 2001). Sus especies son herbáceas o arbustivas, a veces trepadoras, en ocasiones arborescentes; las hojas son alternas o radicales, o bien, aglomeradas en el extremo de las ramas; las inflorescencias están dispuestas en cimas corimbiformes o paniculado-racemosas; las cabezuelas son radiadas o discoides; el involucre es cilíndrico acampanulado o urceolado en la antesis, sus brácteas son iguales o similares, dispuestas en 1 ó 2 series, generalmente con un calículo de brácteas exteriores más angostas y pequeñas; las flores son liguladas y fértiles, pueden estar ausentes y en ocasiones notablemente reducidas, comunmente son amarillas o anaranjado-rojizas; las flores del disco son hermafroditas, sus corolas son pentadentadas, tubulosas, amarillas, blancas, de color crema, purpúreas o a veces anaranjado-amarillentas.

En América pocas especies del género *Senecio* son afines a las temperaturas del norte y del sur del continente. En México y Centro América crecen en regiones de gran altitud, alrededor de 1800 m s.n.m. En la región central de México, aquella que abarca el cinturón volcánico, la parte central y sur de la Sierra Madre Oriental, la Sierra Madre Occidental y además la Sierra Madre del Sur en donde se encuentra la zona montañosa de Oaxaca, existen 102 especies de *Senecio* que representan el 62 % del total que se localiza en América, 50 son endémicas (Figura 1). La zona montañosa de Guatemala que incluye el sur de Chiapas, algunas partes de El Salvador y su vecino Honduras, contiene el 22% de las especies. Las montañas de Costa Rica y el oeste de Panamá cuentan con el 16 % de los senecios. En el caso de Nicaragua a pesar de tener una gran extensión de montañas, el número de especies es reducido (Barkley, 1990). En la Figura 2 se muestra la distribución de especies de *Senecio* en México y Centro América.

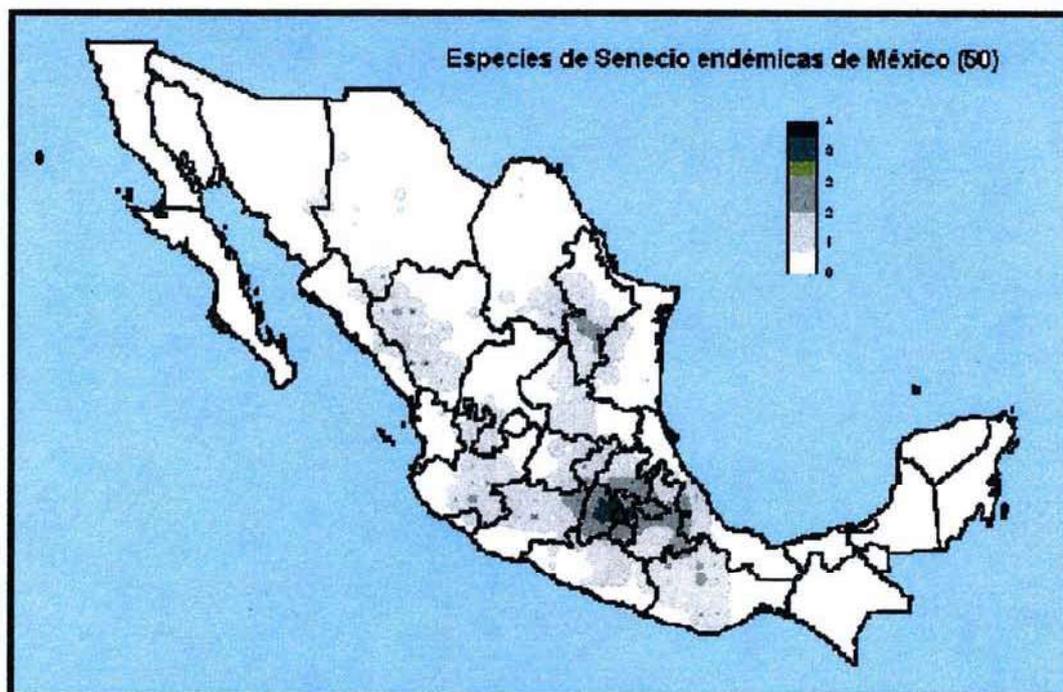


Figura 1. Distribución de especies endémicas de *Senecio* en México (Mapa proporcionado por el Dr. José Luis Villaseñor del Instituto de Biología, UNAM). 1 = 1, 2 = 2-3, 3 = 4-7, 4 = 8-15, 5 = 16-31

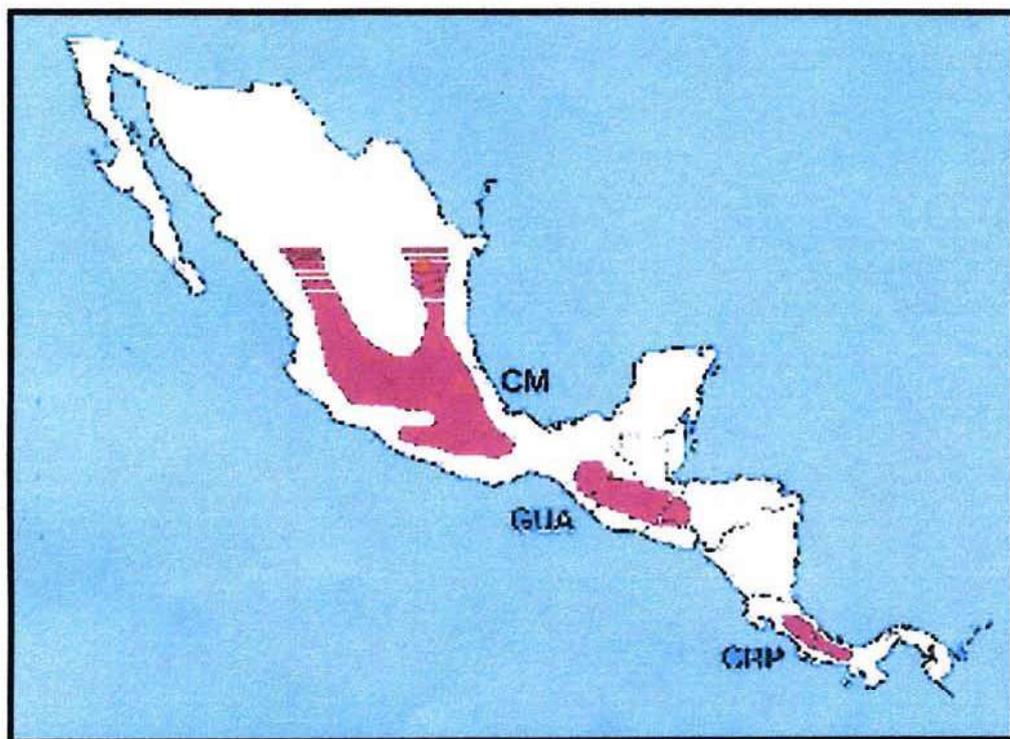


Figura 2. Distribución de especies de *Senecio* en México y en Centro América.

***Senecio flaccidus* Less. Linnaea**



Esta especie crece en praderas, cerros rocosos, barrancas, cerca de arroyos y bordes de caminos. Se clasifica como maleza o mala hierba porque también crece en terrenos donde pasta el ganado y a orillas de campos cultivados.

Se puede localizar en el suroeste de EUA, Sonora, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, norte de Jalisco, Veracruz (Ilanos de Perote), Hidalgo (Real del Monte), San Luis Potosí y Coahuila, a una altitud de 2000-2400 m s.n.m. Florece de Junio a Septiembre.

Es una planta arbustiva, perenne, leñosa en la base, de alrededor de 1 m de altura; puede ser poco o muy tomentosa; los pedúnculos frecuentemente son glabros, excepto alrededor de los nodos y en la base del involucro; sus hojas son angostas y lineales de 1 a 2 mm de ancho y de 3 a 8 cm de largo; las inflorescencias tienen brácteas angostas (involucro), el tipo de inflorescencias es corimbiforme de 10 a 20 cm de alto, o puede tener diversas inflorescencias pequeñas que en conjunto forman una terminal difusa con muchas cabezas; la cabeza central es comúnmente sobrepasada por las ramas jóvenes laterales; los pedúnculos son de 1 a 4 cm de largo; cabezas radiadas amarillas de 2.5 a 3 cm de ancho a través de sus rayos extendidos (de un lado al otro); lígulas de 8 a 12 mm de largo y de 2 a 2.5 mm de ancho; las flores del disco son alrededor de 35-55, delgadas en forma de embudo, con corola de 6 a 7.5 mm de largo, con lóbulos de 0.5 a 0.7 mm de largo. (Mc Vaugh, 1984).

Los sinónimos de *S. flaccidus* son: *S. flaccidus* var. *flaccidus*, *S. douglasii* var. *tularensis*, *S. douglasii* var. *jamesii*, *S. douglasii* var. *longilobus*, *S. orthophyllus*, *S. filifolius* y *S. regiomontanus* (datos proporcionados por el Dr. Jose L. Villaseñor. Instituto de Biología, UNAM).

Senecio mairetianus DC.

Esta especie crece a una altitud de 3500-4150 m s.n.m. en cimas de montañas, paradas alpinas y en bosque de *Pinus hartwegii*. Florece de Junio a Octubre. La especie se puede localizar en el Estado de México (desde Texcoco a Amecameca y en el Nevado de Toluca), D.F. (Cerro del Ajusco), Colima (Nevado de Colima), Puebla, Tlaxcala (La Malinche), Michoacán, Veracruz (Cofre de Perote), Chiapas y en su frontera con Guatemala (El Tacaná).

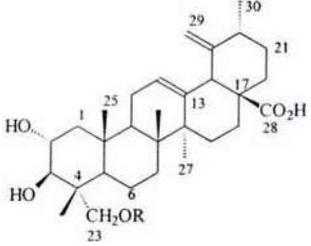
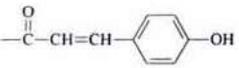
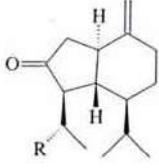
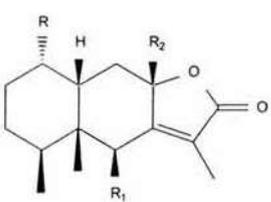
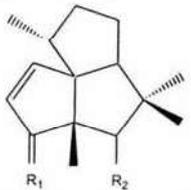
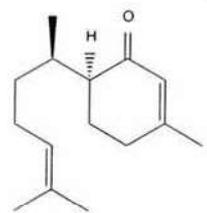
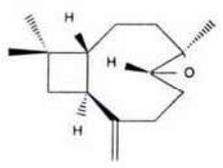
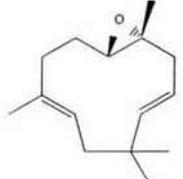
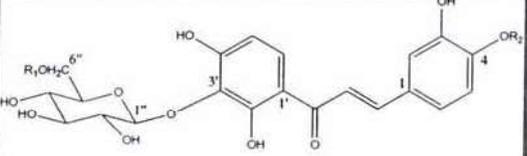
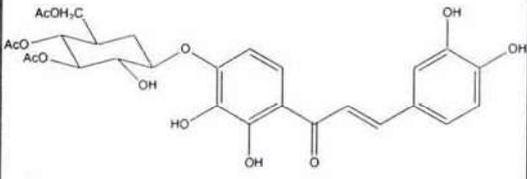
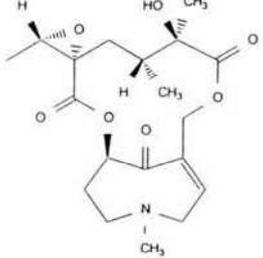
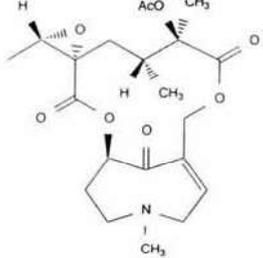
Es una planta subfrutescente o arbustiva, densamente ramificada desde la base que cuando se estruje presenta un fuerte olor a resina. El vegetal presenta una altura de 50 cm a 1 m, es tomentoso en la parte inferior y densamente tomentoso en la parte superior; sus tallos son estriados; las hojas son sésiles y coriáceas, alternas o dispuestas en fascículos, lineal-lanceoladas u oblanceoladas, de 1 a 8 cm de largo y de 2 a 7 mm de ancho, agudas en el ápice, márgenes con el borde entero a ligeramente denticulado, revoluto, glabras, tomentulosas en el haz, densa y blanco-tomentosas en el envés; las inflorescencias son corimbiformes, o bien los capítulos se encuentran solitarios en la parte terminal de las ramas; las cabezuelas son radiadas de 1 a 2 cm de alto; el involucro es ancho, campanulado y tiene de 20 a 25 brácteas tomentosas de forma lineal-lanceoladas u oblongo-lanceoladas que miden de 5 a 12 mm de largo, las flores liguladas de 18 a 23, de color amarillo brillante, sus láminas oblongas u oblongo-elípticas, de 8 a 24 mm de largo; las flores del disco son de 69 a 142 de color amarillo, de 8 a 11 mm de largo.

El sinónimo de *S. mairetianus* es: *S. chrysactis* Sch. Bip. ex Hemsl (Calderón *et al.*, 2001).

METABOLITOS SECUNDARIOS CARACTERÍSTICOS DE *Senecio*

Estudios químicos realizados a diversas especies de *Senecio* muestran que el género biosintetiza compuestos formados por la ruta acetato-mevalonato, ejemplo de ello son los triterpenos derivados del ácido ursólico **1**, **2** y **3** aislados de *S. pseudotites* (De Tommasi *et al.*, 1998); los sesquiterpenos con esqueleto de oplopano **4** y **5** aislados de *S. mexicanus* (Joseph-Nathan *et al.*, 1990); los eremofilanos **6**, **7** y **8** aislados de *S. miscer* (Reina *et al.*,

2001); los silfinenos **9**, **10**, **11**, **12** y **13**, el bisaboleno **14**, el cariofileno **15** y el humuleno **16** aislados de *S. palmensis* (Reina *et al.*, 2002). También se han aislado compuestos que derivan de la ruta del ácido shiquímico como las chalconas **17**, **18** y **19** de *S. pseudotites* (D'Agostino *et al.*, 1991). Otros metabolitos secundarios que caracterizan al género son los alcaloides pirrolizidínicos como la otosenina (**20**) y la florosena (**21**) aisladas de *S. glaber* (Villaruel *et al.*, 1997). En el Cuadro 2 se muestran las estructuras de los compuestos mencionados anteriormente.

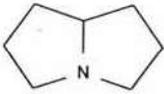
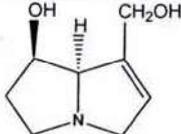
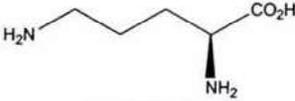
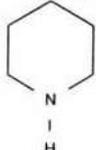
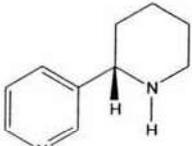
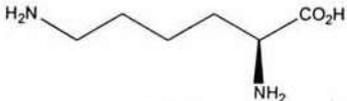
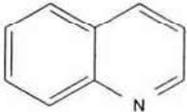
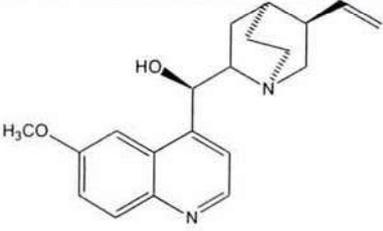
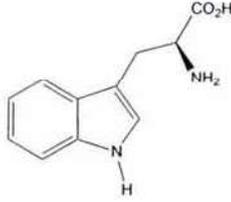
	<p> 1 R = H 2 R = Ac 3 R = </p> 	 <p> 4 R = OH 5 R = H </p>
 <p> 6 R = OAc R₁ = H R₂ = OCH₃ 7 R = OAng R₁ = OH R₂ = OCH₃ 8 R = OAng R₁ = R₂ = H </p>	 <p> 9 R₁ = O R₂ = α OSen 10 R₁ = O R₂ = α OTig 11 R₁ = O R₂ = α OAng 12 R₁ = OH, H R₂ = α OAng 13 R₁ = O R₂ = α OAc </p>	 <p>14</p>
 <p>15</p>	 <p>16</p>	 <p> 17 R₁ = Ac R₂ = CH₃ 18 R₁ = H R₂ = H </p>
 <p>19</p>	 <p>20</p>	 <p>21</p>

Cuadro 2. Compuestos aislados de algunas especies del género *Senecio*

ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS (APs)

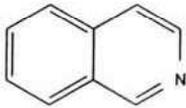
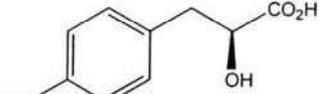
Los alcaloides son metabolitos secundarios que contienen uno o más átomos de nitrógeno generalmente como amina primaria, secundaria o terciaria. Esta función comúnmente les confiere carácter básico y el grado de basicidad varía enormemente dependiendo de la estructura de la molécula y de la presencia y posición de otros grupos funcionales. En la naturaleza también pueden encontrarse como sales cuaternarias de amonio.

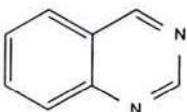
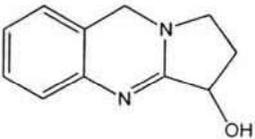
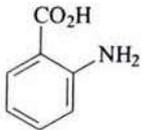
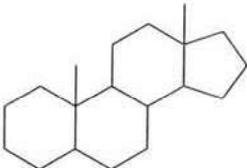
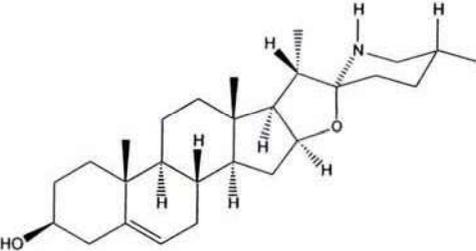
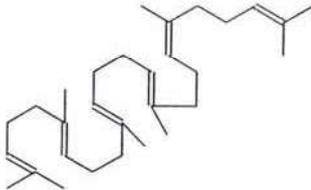
Los alcaloides se pueden clasificar de acuerdo a la naturaleza del núcleo carbonado que contiene el átomo de nitrógeno, como por ejemplo: pirrolidina, piperidina, quinolina, isoquinolina, indol, etc. El nitrógeno generalmente proviene de los aminoácidos ornitina, lisina, tirosina, triptofano e histidina, por lo que en la clasificación de los alcaloides este antecedente puede ser considerado. Las rutas metabólicas que participan en la biosíntesis de los alcaloides son: acetato-malonato, ácido shiquímico y acetato-mevalonato. (Dewick, 1997). En el Cuadro 3A se muestran algunos alcaloides junto con su estructura base y el aminoácido precursor. En el Cuadro 3B se muestran ejemplos de alcaloides que no provienen de aminoácidos (Mata, 2000).

Estructura base	Ejemplo	Precursor biosintético
 <p>pirrolizidina</p>	 <p>retronecina</p>	 <p>L-ornitina</p>
 <p>piperidina</p>	 <p>anabasina</p>	 <p>L-lisina</p>
 <p>quinolina</p>	 <p>quinina</p>	 <p>L-triptofano</p>

Cuadro 3A. Algunos alcaloides y su precursor

Continuación del cuadro 3A.

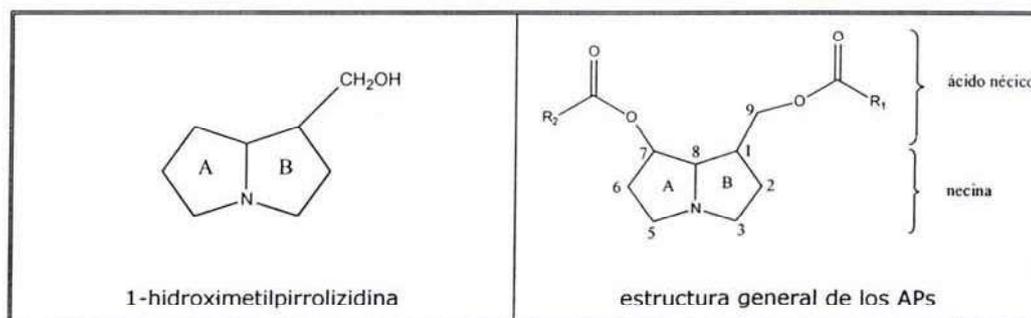
Estructura base	Ejemplo	Precursor biosintético
 isoquinolina	 morfina	 L-tirosina

Estructura base	Ejemplo	Precursor biosintético
 quinazolina	 peganina	 ácido antranílico
 ciclopentanoperhidrofenantreno	 solasodina	 escualeno

Cuadro 3B. Ejemplos de alcaloides que no provienen de aminoácidos.

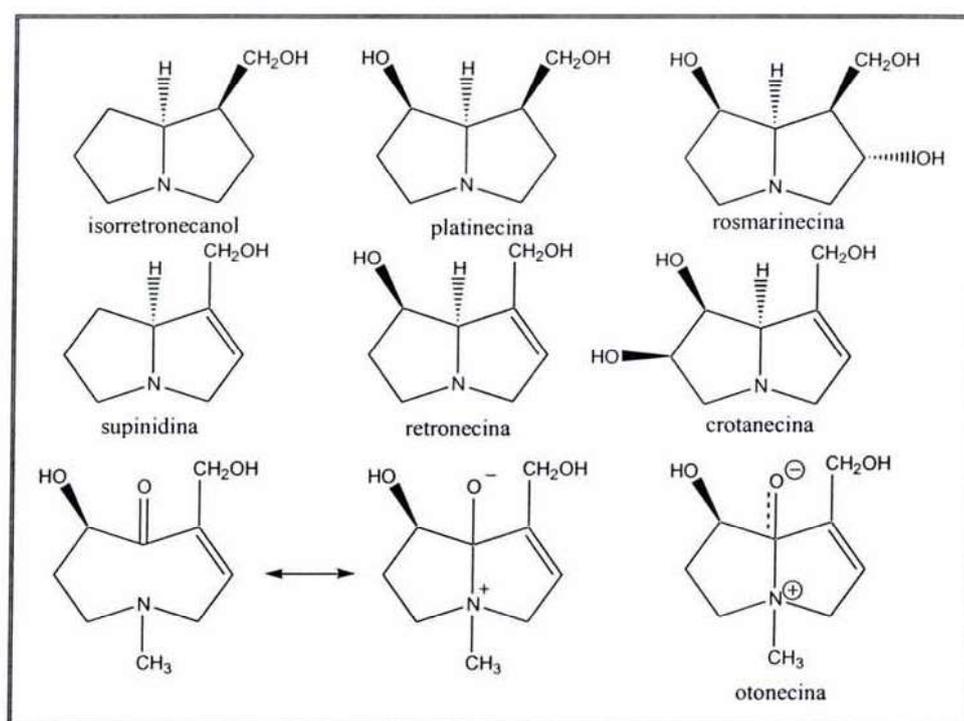
Necinas

Son aminoalcoholes bicíclicos derivados de 1-hidroximetilpirrolizidina y constituyen el núcleo principal de los APs.



Cuadro 4. Estructura general de las necinas

Las necinas pueden ser saturadas o tener una doble ligadura en las posiciones C-1 y C-2 (Cuadro 4) y con pocas excepciones el hidrógeno de la fusión de anillos presenta una orientación α (H-8). Estas bases pueden tener grupos hidroxilo en las posiciones C-2, C-5, C-6, C-7 y C-9. El Cuadro 5 muestra las necinas que con mayor frecuencia están presentes en los APs.

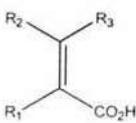
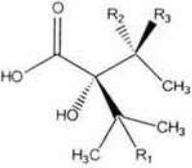
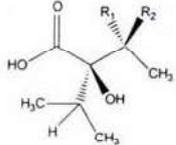


Cuadro 5. Necinas más frecuentes en los APs

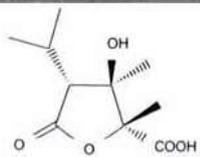
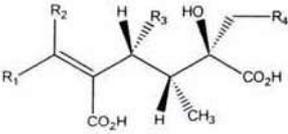
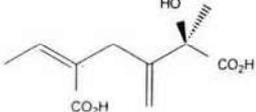
La otonecina es una necina especial ya que no es un auténtico biciclo, pero se considera como tal debido a la interacción transanular entre el átomo de nitrógeno y el grupo carbonilo. Por esta característica, los alcaloides derivados de otonecina se han considerado como un grupo diferente, pero se tiene evidencia de que derivan de la retronecina (Roeder, 1995).

Ácidos néricos

Estos ácidos están presentes en la mayoría de los APs, poseen de 5 a 10 átomos de carbono y pueden ser mono o dicarboxílicos de estructura lineal o cíclica, además suelen presentar hidroxilos, éteres, epóxidos y carboxilos, entre otros grupos. En el Cuadro 6 se muestran algunos de los ácidos monocarboxílicos que esterifican a las necinas y en el Cuadro 7 se muestran ejemplos de ácidos néricos con dos funciones carboxilo.

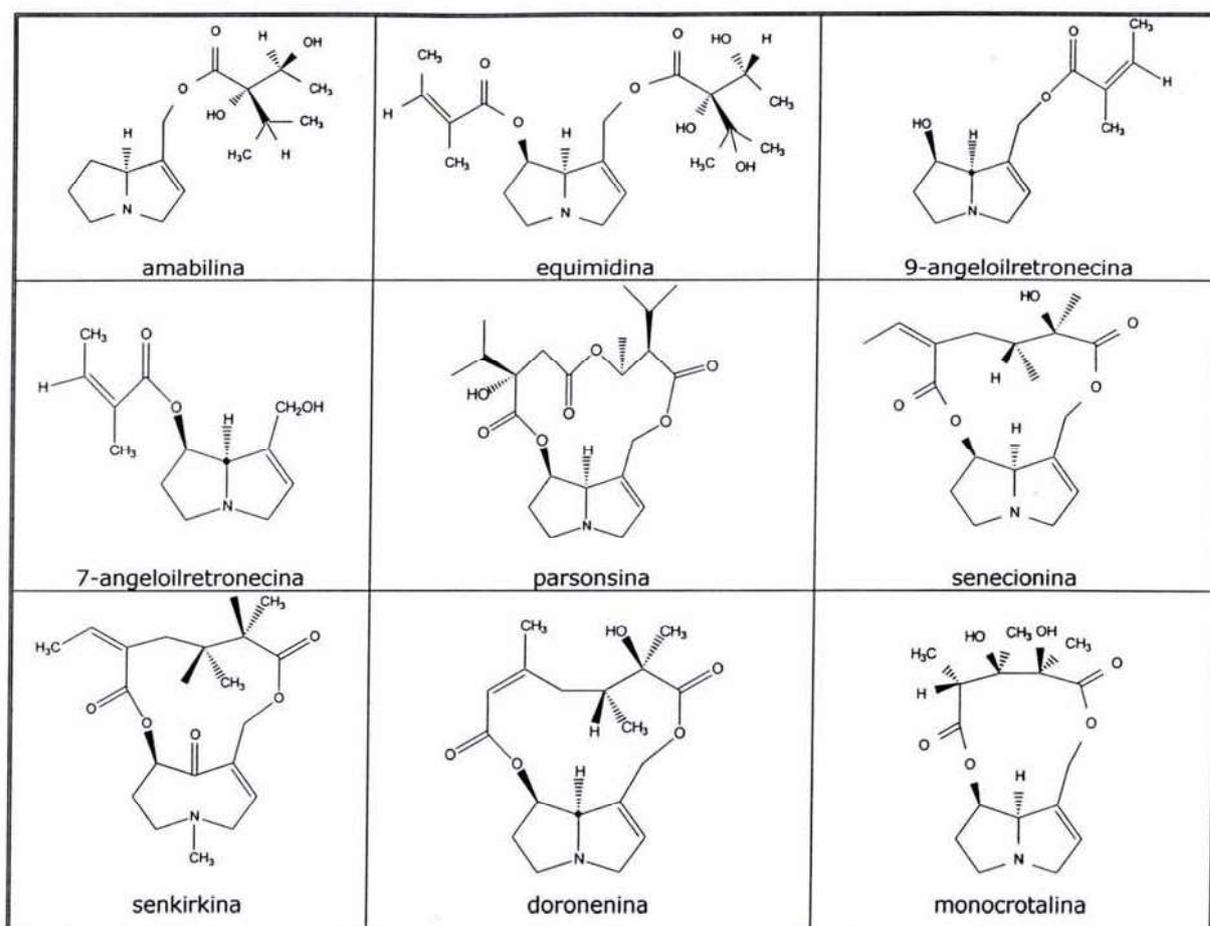
2-C		ácido acético																				
5-C		<table border="1"> <thead> <tr> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>H</td> <td>CH₃</td> <td>CH₃</td> <td>ácido senecioico</td> </tr> <tr> <td>CH₃</td> <td>CH₃</td> <td>H</td> <td>ácido tíglico</td> </tr> <tr> <td>CH₃</td> <td>H</td> <td>CH₃</td> <td>ácido angélico</td> </tr> <tr> <td>CH₂OH</td> <td>H</td> <td>CH₃</td> <td>ácido sarracínico</td> </tr> </tbody> </table>	R ₁	R ₂	R ₃		H	CH ₃	CH ₃	ácido senecioico	CH ₃	CH ₃	H	ácido tíglico	CH ₃	H	CH ₃	ácido angélico	CH ₂ OH	H	CH ₃	ácido sarracínico
R ₁	R ₂	R ₃																				
H	CH ₃	CH ₃	ácido senecioico																			
CH ₃	CH ₃	H	ácido tíglico																			
CH ₃	H	CH ₃	ácido angélico																			
CH ₂ OH	H	CH ₃	ácido sarracínico																			
7-C		<table border="1"> <thead> <tr> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>H</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>ácido(-)-viridiflórico</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>ácido (+)-traquelántico</td> </tr> <tr> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>ácido equimidínico</td> </tr> <tr> <td>OH</td> <td>OCH₃</td> <td>H</td> <td>ácido lasiocárpico</td> </tr> </tbody> </table>	R ₁	R ₂	R ₃		H	H	OH	ácido(-)-viridiflórico	H	OH	H	ácido (+)-traquelántico	OH	OH	H	ácido equimidínico	OH	OCH ₃	H	ácido lasiocárpico
R ₁	R ₂	R ₃																				
H	H	OH	ácido(-)-viridiflórico																			
H	OH	H	ácido (+)-traquelántico																			
OH	OH	H	ácido equimidínico																			
OH	OCH ₃	H	ácido lasiocárpico																			
7-C		<table border="1"> <thead> <tr> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>H</td> <td>OH</td> <td>ácido (-)-traquelántico</td> </tr> <tr> <td>OH</td> <td>H</td> <td>ácido (+)-viridiflórico</td> </tr> </tbody> </table>	R ₁	R ₂		H	OH	ácido (-)-traquelántico	OH	H	ácido (+)-viridiflórico											
R ₁	R ₂																					
H	OH	ácido (-)-traquelántico																				
OH	H	ácido (+)-viridiflórico																				

Cuadro 6. Ácidos néricos monocarboxílicos

10-C		ácido tricodésmico																				
10-C		<table border="1"> <thead> <tr> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> <th>R₄</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CH₃</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>ácido senécico</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>CH₃</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>ácido isatinécico</td> </tr> <tr> <td>CH₃</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>ácido retronécico</td> </tr> </tbody> </table>	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄		CH ₃	H	H	H	ácido senécico	H	CH ₃	H	OH	ácido isatinécico	CH ₃	H	H	OH	ácido retronécico
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄																			
CH ₃	H	H	H	ácido senécico																		
H	CH ₃	H	OH	ácido isatinécico																		
CH ₃	H	H	OH	ácido retronécico																		
10-C		ácido senecifílico																				

Cuadro 7. Ácidos néricos dicarboxílicos

El Cuadro 8 contiene estructuras que ejemplifican las diferentes posibilidades de esterificación de las necinas. Las bases pueden estar mono o diesterificadas con ácidos monocarboxílicos como en la amabilina y en la equimidina. Un caso diferente es la parsonsina, que presenta en uno de sus residuos ácidos dos funciones carboxilo, por lo que su estructura contiene una tercera función éster que da lugar a un macrociclo de 14 miembros. La diesterificación con ácidos dicarboxílicos puede dar lugar a macrociclos de 11 a 13 miembros como en el caso de la monocrotalina, senecionina, sinkirquina y doronenina (Roeder, 1995).



Cuadro 8. Diferentes posibilidades de esterificación de las necinas

Distribución de los APs

Los APs se han aislado de especies de las familias Fabaceae, Boraginaceae y Asteraceae. En estas familias su existencia está restringida a nivel de subtribus y de géneros. En el Cuadro 9 se muestran los géneros de los cuales se han aislado APs (Roeder, 1995), siendo uno de los más ricos el género *Senecio* de la subtribu *Senecioneae*, familia Asteraceae.

Familia	Subtribu	Género
Fabaceae (Leguminosae)	Crotalariaeae	<i>Crotalaria</i> <i>Chromolaena</i> <i>Lotononis</i>
Boraginaceae		Todos los géneros hasta ahora estudiados con excepción de <i>Pulmonaria officinalis</i>
Asteraceae (Compositae)	Eupatorieae	<i>Ageratum</i> <i>Eupatorium</i>
	Senecioneae	<i>Adenostyles</i> , <i>Brachyglottis</i> , <i>Cacalia</i> , <i>Chersodoma</i> , <i>Cineraria</i> , <i>Crassocephalum</i> , <i>Doronicum</i> , <i>Emilia</i> , <i>Erechtites</i> , <i>Farfugium</i> , <i>Gynura</i> , <i>Homogyne</i> , <i>Jacmaia</i> , <i>Kleinia</i> , <i>Ligularia</i> , <i>Nardosmia</i> , <i>Notonia</i> , <i>Odontocline</i> , <i>Packera</i> , <i>Petasites</i> , <i>Senecio</i> , <i>Syneilesis</i> , <i>Tussilago</i> , <i>Werneria</i>

Cuadro 9. Familias, subtribus y géneros que biosintetizan APs.

Clasificación de los alcaloides pirrolizidínicos

Una de las primeras clasificaciones de los APs fue propuesta por Culvenor y está basada en características estructurales que relaciona con los géneros y las familias de donde se aislaron los alcaloides. Partiendo de esta propuesta y considerando a los precursores biogénicos de los APs, Hartmann T. y Witte L. proponen la siguiente clasificación (Cuadro 10) (Hartmann *et al.*, 1995):

- Tipo senecionina (A).

Incluye alcaloides estructuralmente relacionados con senecionina. Son diésteres macrocíclicos de 12 o 13 miembros cuyos ácidos néricos derivan de isoleucina o leucina. Se subdividen en los grupos senecionina (A1), senecivernina (A2), nemorensina (A3) y rosmarinina (A4).

- Tipo triangularina (B).

Las necinas de estos compuestos presentan grupos hidroxilo en los carbonos C-7 y C-9 o C-2 y C-9, pueden ser acilpirroles o presentar un grupo 5-oxo reducido y acetilado. Los alcaloides son mono o diésteres, sus residuos de ácido contienen 5 átomos de carbono y provienen del ácido angélico, tíglico, seneciólico o de sus hidroxil derivados. Se subdividen en los grupos triangularina (B1), macrofilina (B2) y senampelina (B3).

- Tipo licopsamina (C).

La necina presenta dos grupos hidroxilo (C-7 y C-9) que pueden estar libres, mono o diesterificados. Los ácidos néricos son ramificados, contienen 7 átomos de carbono y derivan del ácido 2-isopropilbutanoico hidroxilado por lo que pueden formar una γ -lactona. Algunos alcaloides diesterificados presentan una unión entre sus dos ésteres, misma que da lugar a un macrociclo de 14 miembros. Se subdividen en los grupos licopsamina (C1), isolicopsamina (C2), latifolina (C3) y parsonsina (C4).

- Tipo monocrotalina (D).

Estos alcaloides contienen como base a la retronecina que se encuentra diesterificada formando macrociclos de 11 miembros.

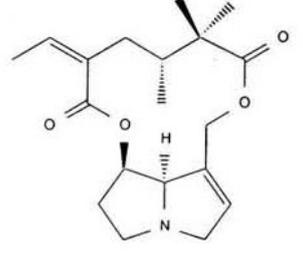
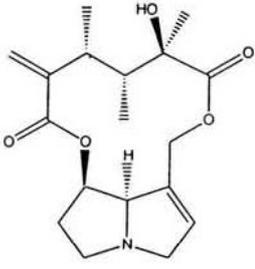
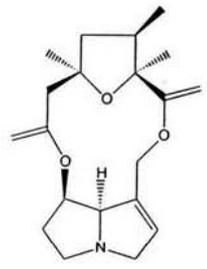
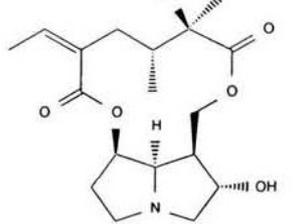
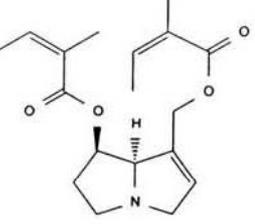
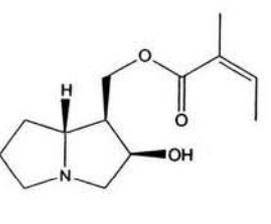
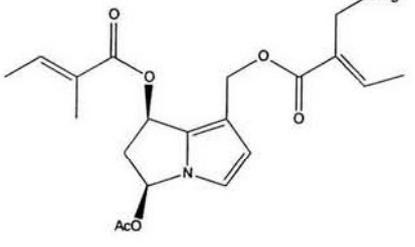
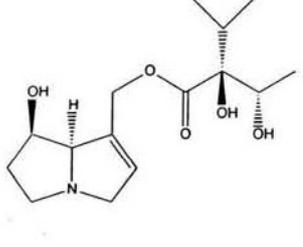
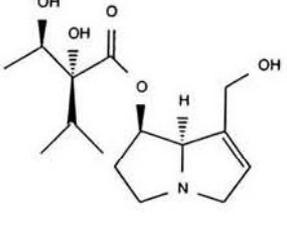
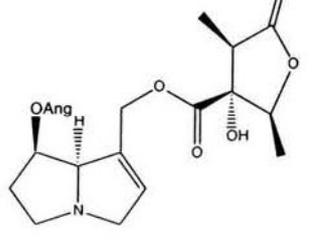
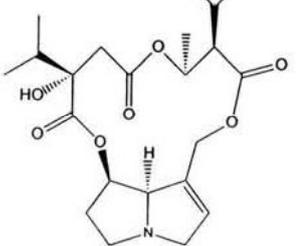
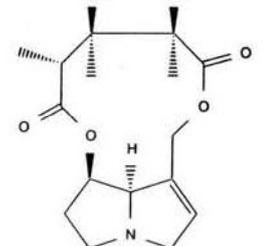
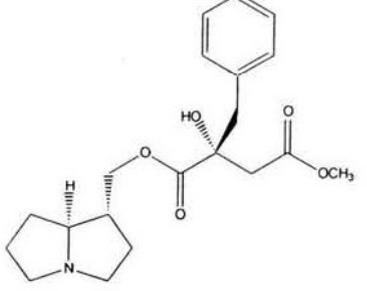
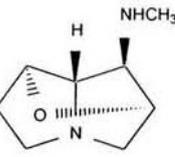
- Tipo falaenopsina (E).

Son ésteres de las bases néricas (-)-isorretronecanol, lindelofina, laburnina o (-)-traquelantamidina. Los ácidos néricos que las esterifican son aromáticos, arilalifáticos y raras veces alifáticos.

- APs diversos (M).

Estos alcaloides no se ajustan a los tipos antes mencionados. Pueden ser ésteres simples, glicósidos, necinas no esterificadas, o pueden contener átomos de azufre. Algunos

de los alcaloides incluidos en este grupo pueden ser artefactos o productos de degradación postmortem.

 <p>grupo A1</p>	 <p>grupo A2</p>	 <p>grupo A3</p>
 <p>grupo A4</p>	 <p>grupo B1</p>	 <p>grupo B2</p>
 <p>grupo B3</p>	 <p>grupo C1</p>	 <p>grupo C2</p>
 <p>grupo C3</p>	 <p>grupo C4</p>	 <p>grupo D</p>
 <p>grupo E</p>		 <p>grupo L</p>

Cuadro 10. Clasificación de los APs

- o Tipo lolina (L).

Los alcaloides de este grupo son derivados de 1-aminopirrolizidina y contienen un puente etéreo entre C-2 y C-7.

Biogénesis de necinas

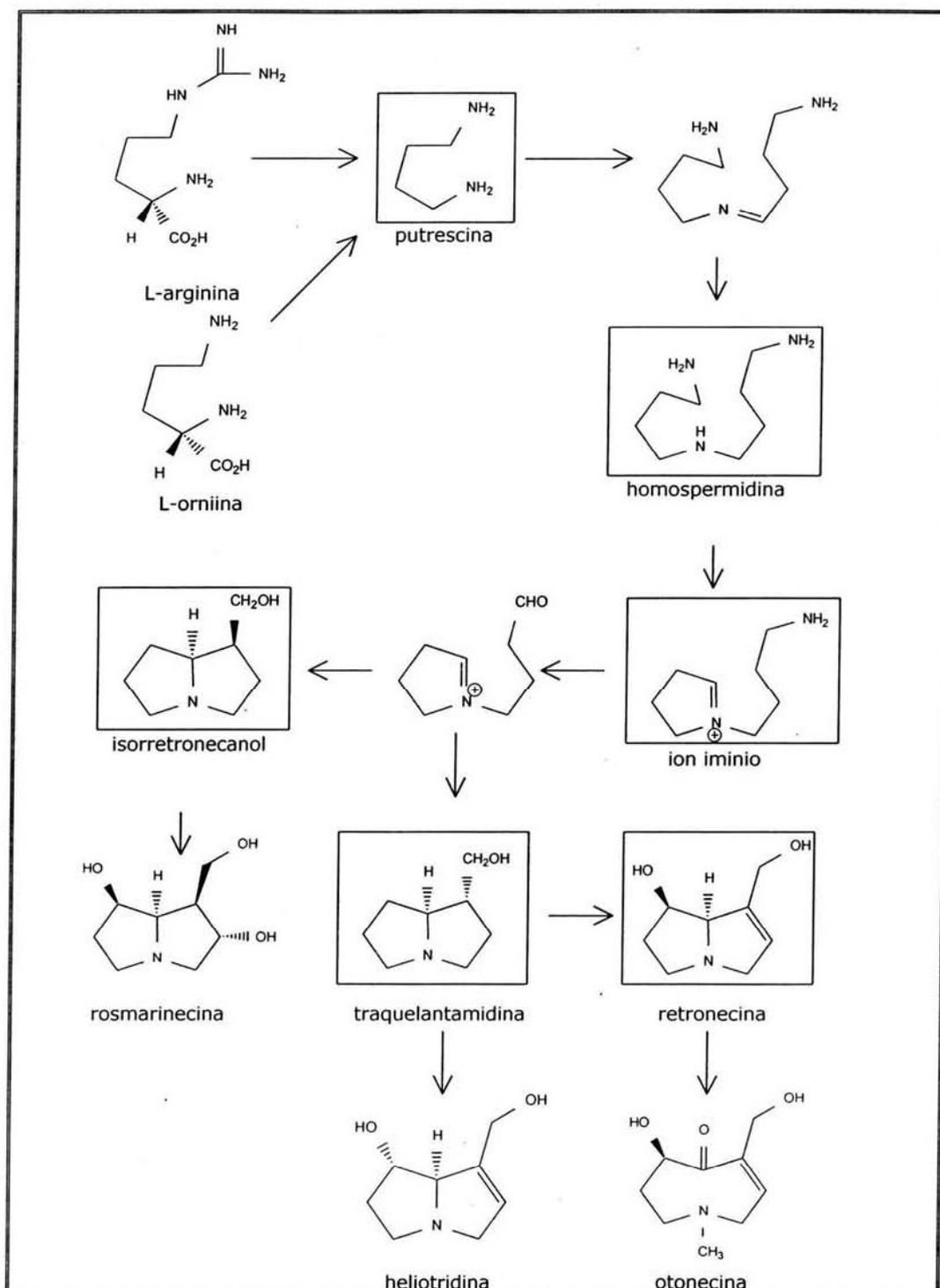
La ruta propuesta para la biogénesis de las necinas se basa en los resultados obtenidos de estudios biosintéticos que iniciaron desde hace más de 30 años. En estos estudios los precursores de los alcaloides se adicionaron a cultivos de raíces, tallos y en general a plantas jóvenes de diversas especies de *Senecio*, *Heliotropium* y *Crotalaria*, entre otros géneros. Los precursores fueron previamente marcados con T, D, ^{13}C , ^{14}C y/o ^{15}N . Las plantas que se seleccionaron biosintetizan alcaloides del tipo senecionina, por lo que se cuantificó la presencia de los marcadores en la base néctica que correspondió en la mayoría de los casos a retronecina. Estudios tendientes a establecer las enzimas que participan en la biogénesis, han contribuido al conocimiento de las características de algunas de ellas. El Cuadro 11 muestra la ruta biogénica propuesta, las sustancias que se encuentran en un recuadro corresponden a los metabolitos que se han identificado plenamente.

El primer paso corresponde a la formación de putrescina, existiendo una controversia en cuanto a sus precursores, Hartmann y colaboradores señalan a arginina como su único precursor, pero Birecka y colaboradores proponen que el precursor varía de acuerdo a la familia de la planta, y señalan a arginina como precursor de putrescina en especies de *Heliotropium* y a ornitina como precursor en especies de *Senecio* y *Crotalaria*. Las enzimas que participan en este paso no se han identificado, aunque se ha propuesto que la putrescina se forma por la vía agmatina.

La presencia del intermediario homospermidina se dedujo al observar que la retronecina contenía el equivalente a dos moléculas de putrescina, por lo que se propuso un intermediario equivalente a $\text{C}_4\text{-N-C}_4$. Este intermediario identificado como homospermidina se forma cuando un grupo butilamino es transferido a putrescina, proceso catalizado por la enzima homospermidina sintetasa dependiente de NAD^+ y que utiliza como fuente del grupo butilamino a espermidina.

Se ha comprobado la presencia de los intermediarios ion iminio, isoretronecanol y traquelantamidina, por lo que se ha propuesto que una vez formada la homospermidina, sufre una desaminación oxidativa cuyo producto hipotético aminoaldehído forma el ion iminio. Una segunda desaminación oxidativa del ion iminio y una ciclización, dan lugar a un endo alcohol (isoretronecanol) y a un exo alcohol (traquelantamidina). Estudios posteriores han mostrado que la base traquelantamidina es un buen precursor de retronecina y

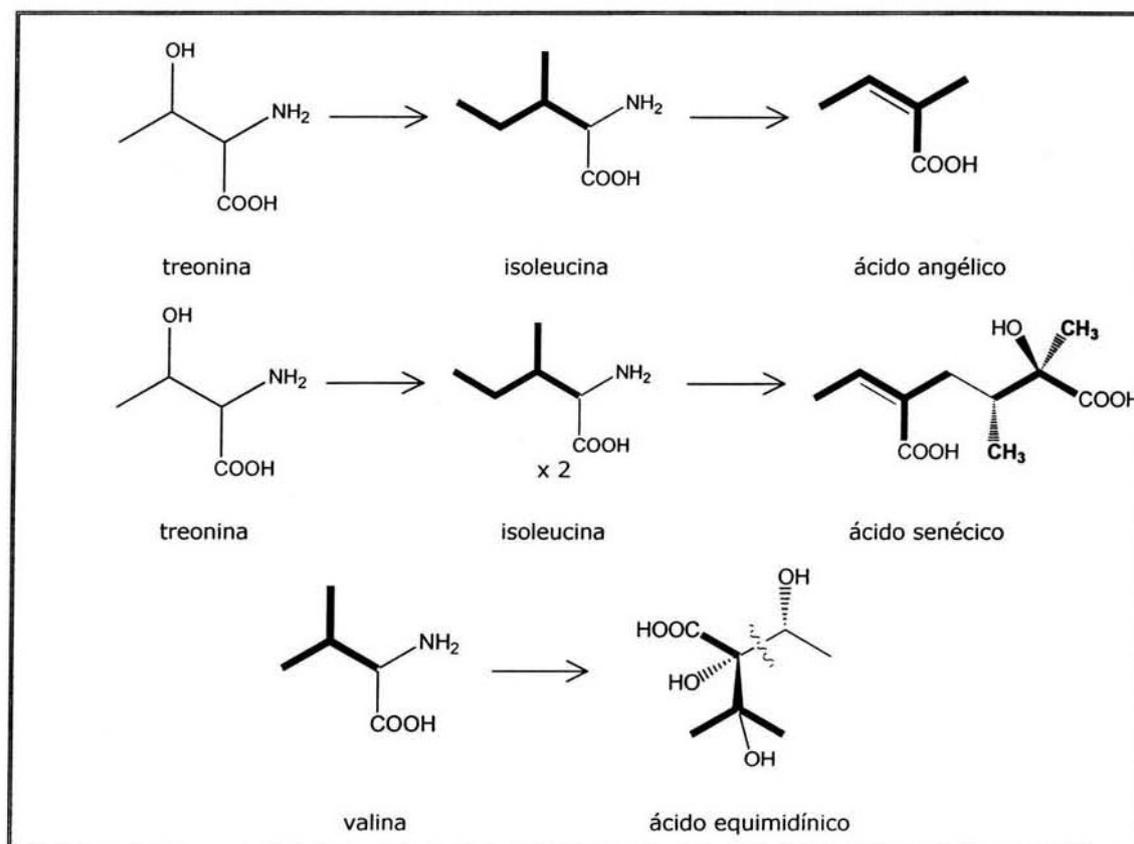
heliotridina, mientras que el isorretronecanol es precursor de rosmarinicina. (Dewick, 1997, Hartmann *et al.*, 2000, Robins, 1995).



Cuadro 11. Biogénesis de necinas

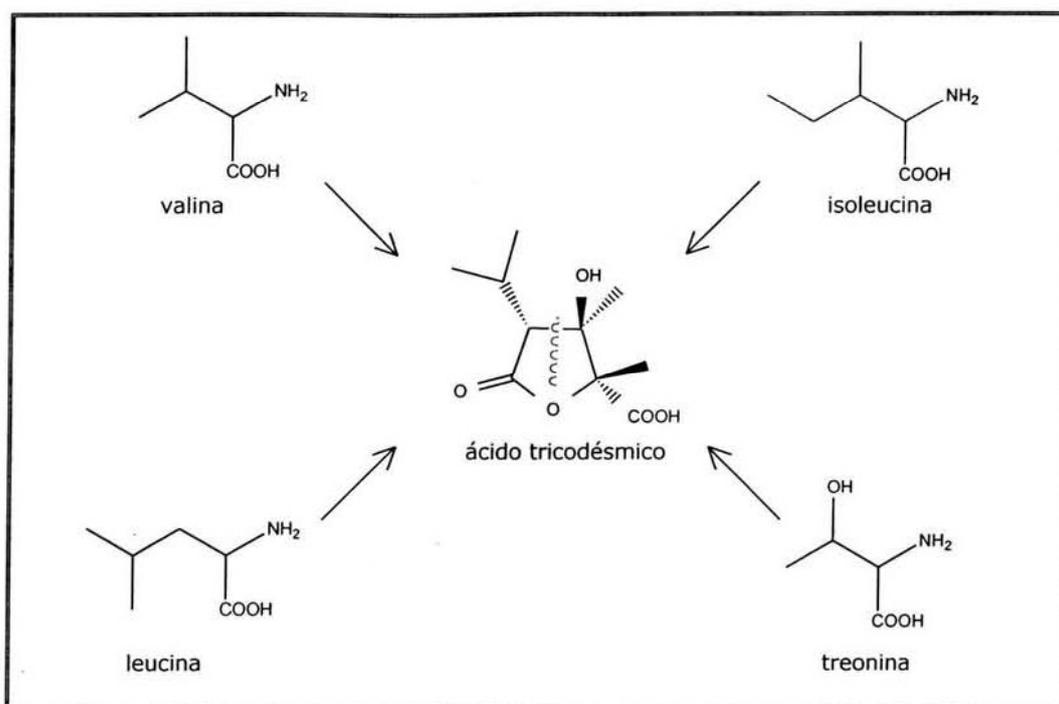
Biogénesis de ácidos néricos

Estudios realizados con treonina, valina, leucina e isoleucina marcadas con T, D, ^{13}C y ^{14}C , adicionadas a cultivos de diversas especies de *Eupatorium*, *Crotalaria* y *Senecio* entre otros, han mostrado que estos aminoácidos son los precursores biogénicos de los ácidos néricos. Por ejemplo, el ácido angélico es biosintetizado a partir de isoleucina, el ácido senécico a partir de dos unidades de isoleucina, y el ácido equimidínico es biosintetizado a partir de valina, aunque no se conoce el origen de dos de los carbonos presentes en este ácido (Cuadro 12) (Robins, 1995).



Cuadro 12. Precursores de los ácidos angélico, senécico y equimidínico

En la biosíntesis del ácido tricodésmico, se ha establecido que en la formación de la parte derecha del ácido interviene treonina o isoleucina, y en la formación de la parte izquierda interviene valina o leucina (Cuadro 13) (Devlin *et al.*, 1984).



Cuadro 13. Precursores del ácido tricodésmico.

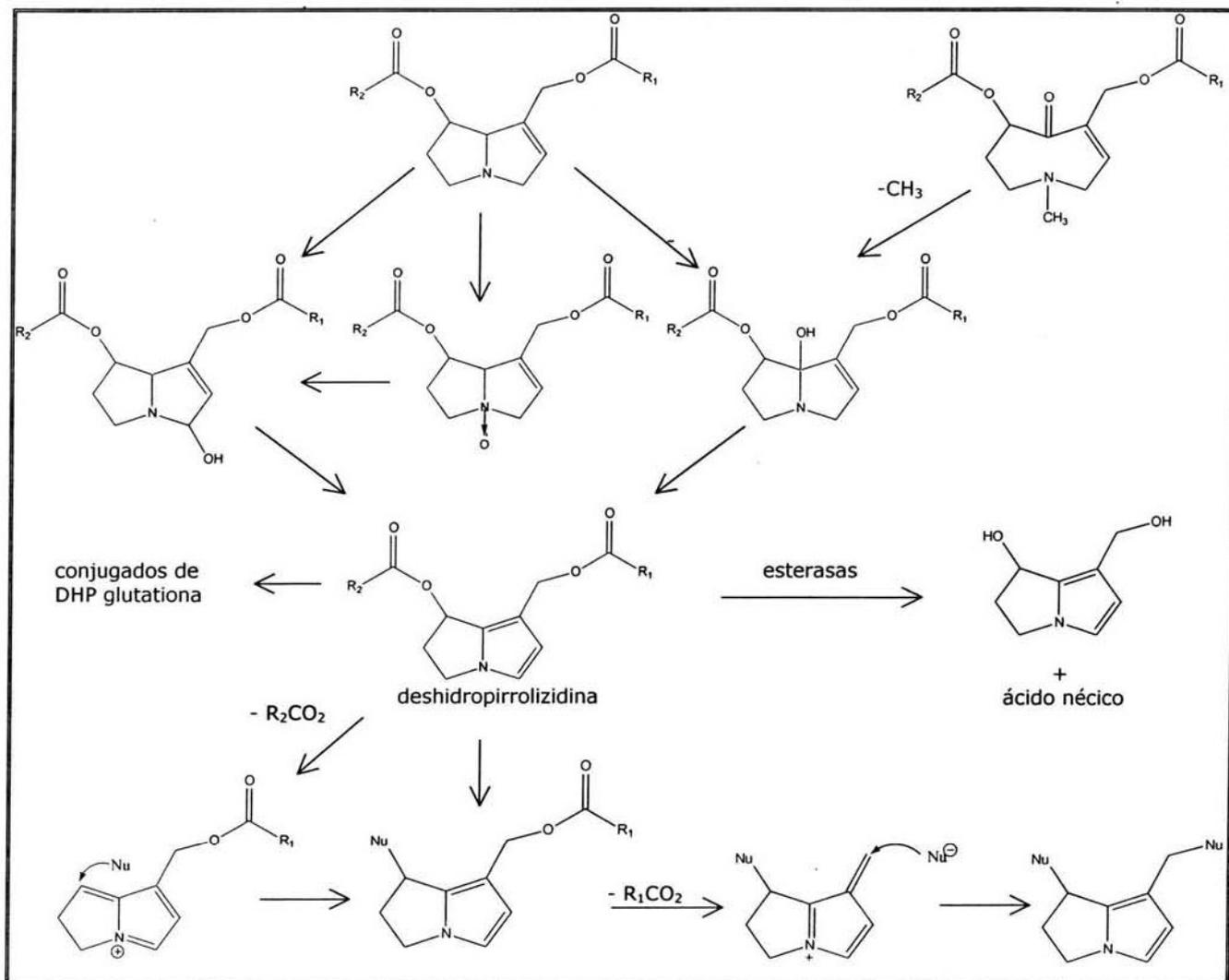
Toxicidad de los APs

Se han reportado numerosas intoxicaciones de ganado y personas por el consumo de alimentos contaminados con especies de *Heliotropium*, *Crotalaria* y *Senecio*. Por otra parte, especies de estos géneros son utilizadas en la medicina tradicional herbolaria de diversos países para el tratamiento de inflamaciones, cortadas, heridas, úlceras, enfermedades de los ojos, dolor de pecho, cólicos y mareos.

Estudios químicos y farmacológicos encaminados a la búsqueda del origen de la toxicidad de estas especies, determinaron que los APs son los principales responsables de los efectos dañinos. Estas investigaciones han mostrado que los APs esterificados con ácidos ramificados y que presentan un doble enlace entre los carbonos 1 y 2 son hepatotóxicos, mutagénicos y teratogénicos.

De manera general, el mecanismo de acción de los APs tóxicos es el siguiente: los APs que se encuentran en forma de N-óxido, son reducidos por reductasas de la flora bacteriana intestinal, posteriormente se absorben y una parte de ellos es hidrolizada por esterasas no específicas que se encuentran en la sangre; la otra parte de los alcaloides es transportada al hígado, donde oxigenasas microsomales hepáticas (FMO-P450) los transforman a N-óxidos. Posteriormente, los óxidos pueden sufrir una transposición y eliminación de agua produciendo deshidropirrolizidinas. Se ha propuesto que la hidroxilación de los carbonos 3 y 8 también puede ocurrir, y que la deshidratación de estos intermediarios inestables produce las deshidropirrolizidinas. En el caso de los APs tipo otonecina, después

de eliminar el grupo metilo, el alcaloide se transforma en el derivado inestable 8-hidroxi y posteriormente, en la deshidropirrolizidina (Cuadro 14). Las deshidropirrolizidinas pueden reaccionar con compuestos tales como enzimas, hemoglobina, bases púricas y pirimidínicas, ya que contienen grupos $-OH$, $-NH$ ó $-SH$, que intervienen en el ataque nucleofílico a la posición 7 de la deshidropirrolizidina (Roeder, 1999; Stewart *et al.*, 2001).



Cuadro 14. Rutas metabólicas de los APs tóxicos

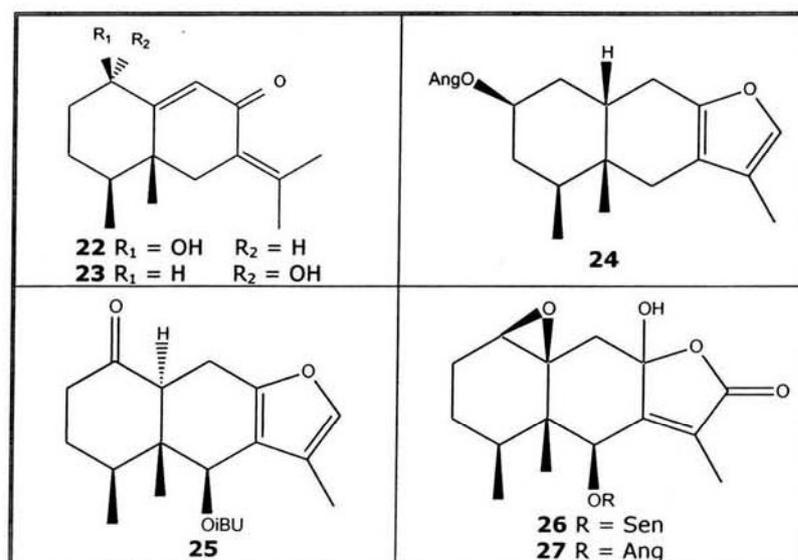
Una intoxicación ocasionada por APs produce un síndrome que es conocido como Enfermedad Hepática Venó-oclusiva y entre sus síntomas están: dolor repentino en el hígado, vómito, inflamación y hepatomegalia, con un elevado incremento en las aminotransferasas séricas. La toxicidad crónica se presenta con astenia, ascitis progresiva y otros signos como hipertensión portal (Stewart *et al.*, 2001).

Además de la hepatotoxicidad, también se ha reportado que algunos APs son mutagénicos y teratogénicos, por ejemplo se ha demostrado que la heliotridina y

monocrotalina son sustancias mutagénicas en *Drosophila melanogaster*. Los N-óxidos de estos alcaloides, también son mutagénicos aunque en un grado menor. Con respecto a la teratogenicidad se ha demostrado que una sola administración intraperitoneal de heliotrina a ratas durante la segunda semana de gestación, causa anomalías en los fetos (Hartmann *et al.*, 1995).

EREMOFILANOS

Los eremofilanos son estructuras de 15 carbonos que pueden tener unidos diferentes grupos funcionales (Cuadro 15). Ejemplo de lo anterior son los compuestos **22** y **23** aislados de *S. suaveolens* (Bohlmann *et al.*, 1979). Asimismo, pueden contener un anillo de furano dando lugar a los furanoeremofilanos como **24** aislado de *S. alatus* (Bohlmann *et al.*, 1980) y **25** aislado de *S. heliopsis* (Bohlmann *et al.*, 1985). Una variedad adicional está conformada por las eremofilanólidas como **26** y **27** aisladas de *S. isatideus* (Bohlmann *et al.*, 1985).



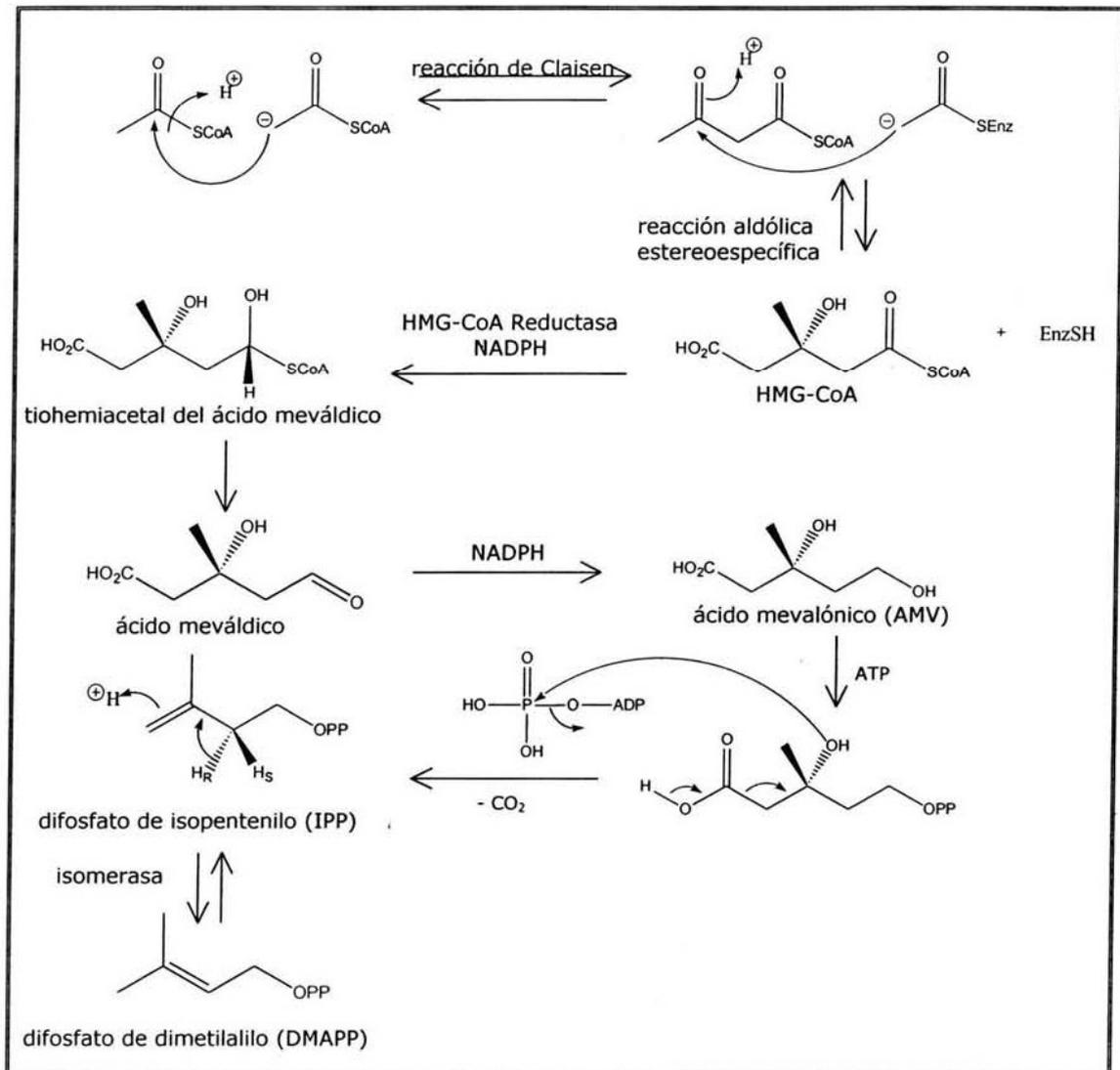
Cuadro 15. Eremofilanos aislados de *Senecio*

Biosíntesis de Sesquiterpenos

Se ha propuesto que en las plantas la biosíntesis de terpenos procede por dos rutas diferentes, una de ellas, la del acetato-mevalonato, se lleva a cabo en el citoplasma y da lugar a esteroides, sesquiterpenos y triterpenos; la segunda ruta, la de 5-fosfato de 1-desoxi-D-xilulosa (DOXP), se realiza en los plástidos y da lugar a carotenos, fitol, 9-plastoquinona, mono y diterpenos. En ambas rutas, el difosfato de isopentenilo (IPP) es el precursor de todos los terpenos (Lichtenthaler, 1999).

Formación del IPP por la ruta acetato-mevalonato

Tres moléculas de acetil-coenzima A (AcCoA) forman el ácido mevalónico (AMV) (Cuadro 16). Las primeras dos moléculas de AcCoA se combinan mediante una condensación de Claisen para dar acetoacetil-CoA, la tercera molécula que se encuentra unida a una enzima por un grupo tiol, se incorpora vía una adición aldólica estereoespecífica. La hidrólisis



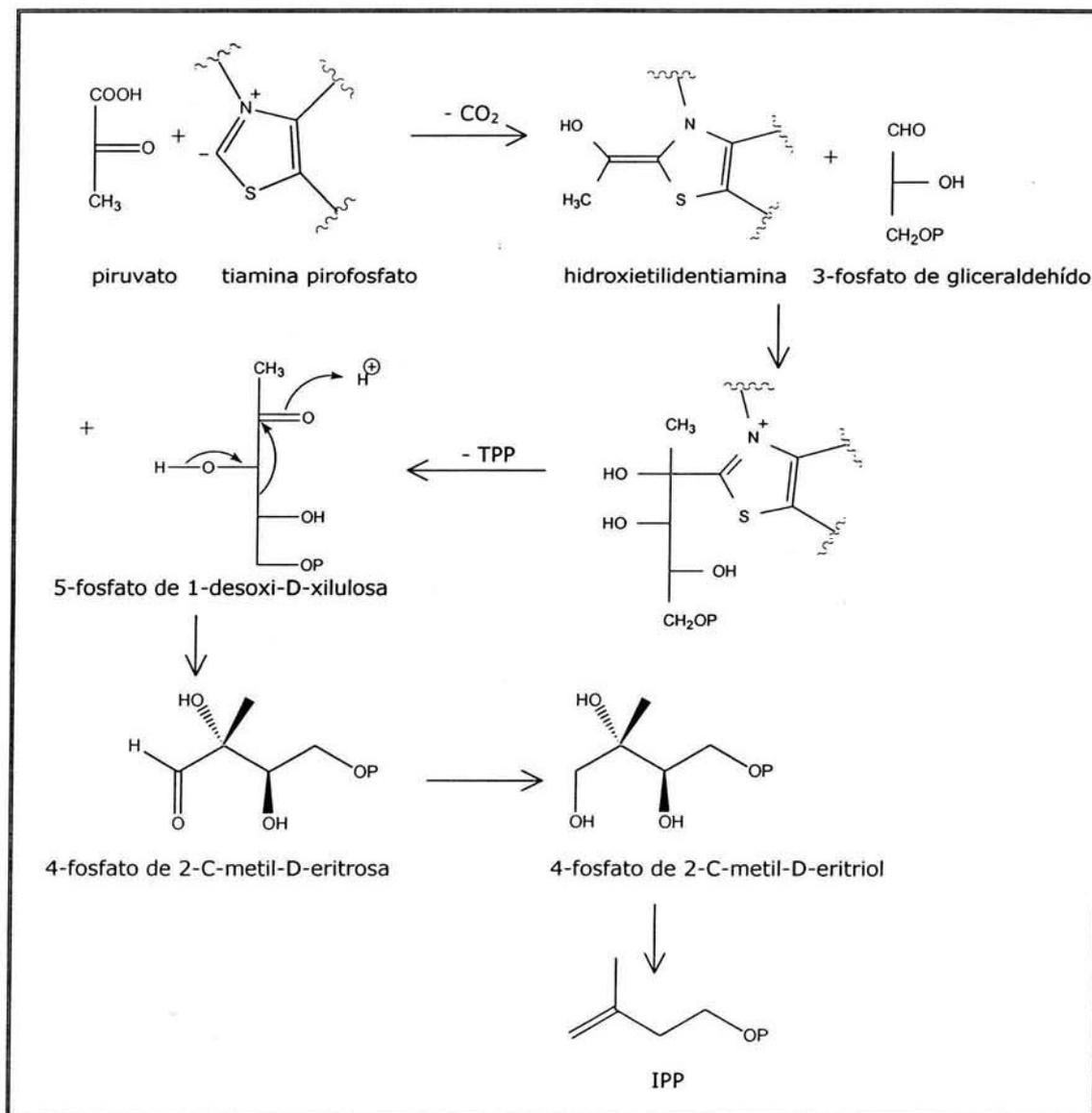
Cuadro 16. Formación del IPP por la ruta acetato-mevalonato

de la enzima da lugar a β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). La conversión del HMG-CoA en AMV se lleva a cabo a través de dos reacciones consecutivas en las que el ácido meváldico y su tiohemiacetal participan como intermediarios. Una vez formado el AMV, con ayuda de dos enzimas dependientes de ATP, sufre una fosforilación del alcohol primario y una descarboxilación/deshidratación formando el difosfato de isopentenilo. Por último el IPP se isomeriza a difosfato de dimetilalilo (DMAPP) interviniendo una isomerasa que elimina

estereoespecíficamente el protón pro-R del carbono dos. La isomerización es reversible y el equilibrio está desplazado hacia el DMAPP que es un reactivo electrofílico, ya que la salida del grupo difosfato genera un carbocatión alílico. Por el contrario el IPP al tener un doble enlace terminal actúa como nucleófilo (Dewick, 1997).

Formación del IPP por la ruta 5-fosfato de 1-desoxi-D-xilulosa (DOXP)

De acuerdo a resultados generados en experimentos con sustratos marcados con isótopos, se ha propuesto el esquema delineado en el Cuadro 17 para la formación del IPP.



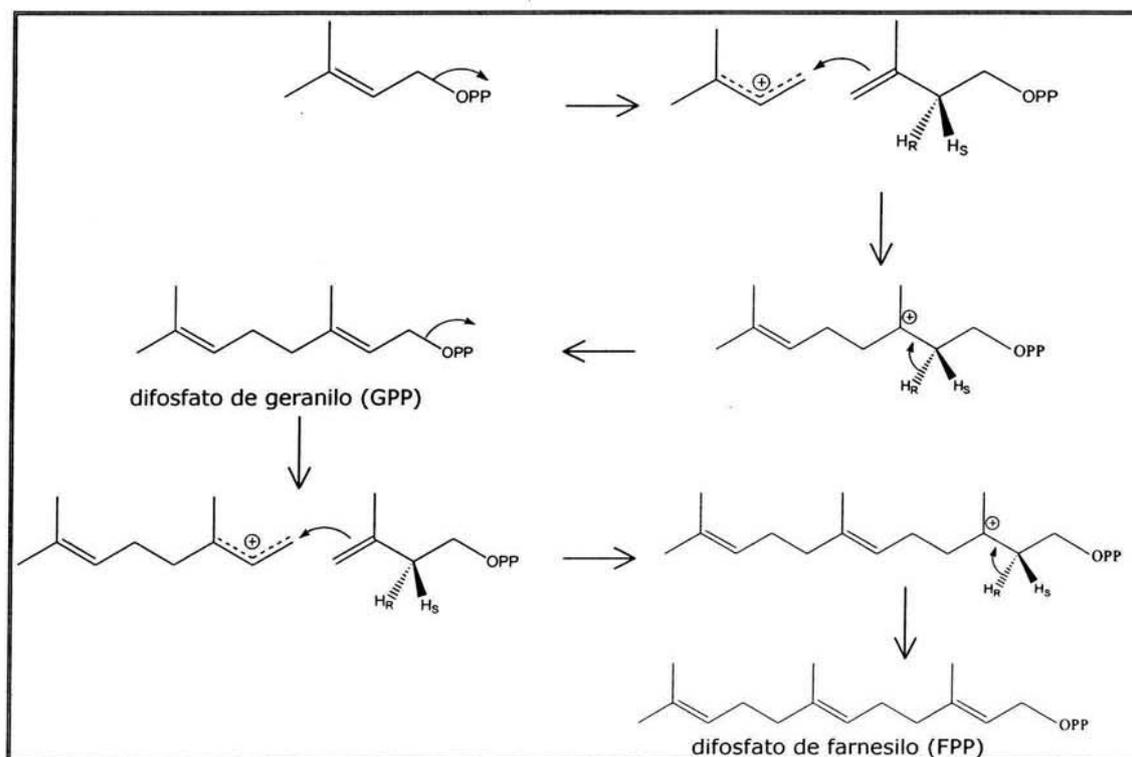
Cuadro 17. Formación del IPP por la ruta DOXP

Inicialmente la descarboxilación del piruvato origina una unidad de dos carbonos que probablemente se encuentra formando parte de la hidroxietilidiamina. Posteriormente, la condensación de esta tiamina y el 3-fosfato de gliceraldehído (GA-3P) da lugar a 5-fosfato

de 1-desoxi-D-xilulosa (DOXP). Se ha propuesto que el DOXP después de una transposición intramolecular origina al intermediario 4-fosfato de 2-C-metil-D-eritrosa que se transforma en 4-fosfato de 2-C-metil-D-eritriol que a su vez da lugar a difosfato de isopentenilo. Se ha sugerido que en estas dos últimas transformaciones intervienen varias enzimas (reductasas, deshidratasas, cinasas) y cofactores (Lichtenthaler, 1999).

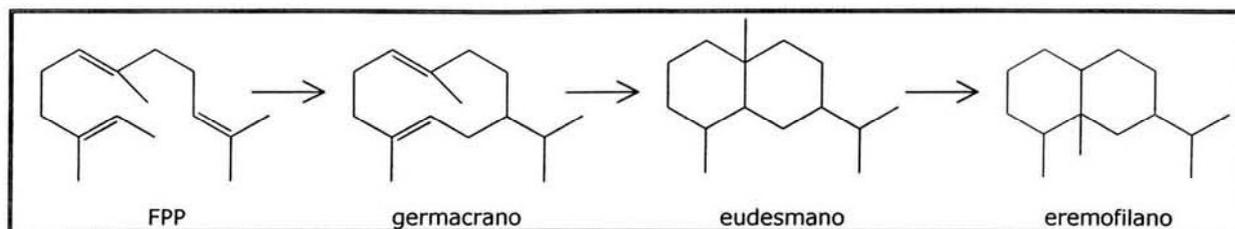
Formación de sesquiterpenos

La combinación del DMAPP y el IPP con ayuda de la enzima prenil-transferasa, genera el difosfato de geranilo (GPP) (Cuadro 18). Este proceso involucra la ionización del DMAPP a un catión alílico, la adición de este catión a la doble ligadura del IPP y la pérdida estereoselectiva del protón pro-R. La adición de una unidad de IPP al GPP en una secuencia similar a la anterior, da lugar al precursor fundamental de los sesquiterpenos, el difosfato de farnesilo (FPP) (Dewick, 1997).



Cuadro 18. Formación de difosfato de farnesilo

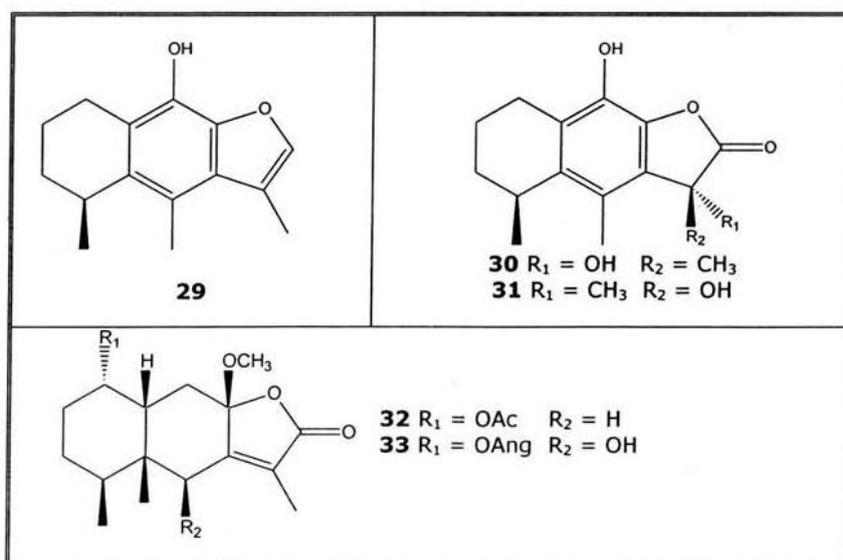
Una vez formado el FPP, éste genera un germacrano cuya ciclización da lugar a un eudesmano que posteriormente se transforma en eremofilano por la migración de un grupo metilo (Cuadro 19).



Cuadro 19. Precursores de los eremofilanos

Actividad biológica de eremofilanos

Se ha descrito la actividad biológica de algunos eremofilanos (Cuadro 20), como por ejemplo la actividad antimicrobiana del cacalol (**29**) contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* (Jiménez et al., 1992), y su capacidad de inhibir la germinación de *Amaranthus hypocondriacus* (Amaranthaceae) y *Echinochloa crusgalli* (Poaceae) (Anaya et al., 1996). La mezcla 1:1 del par de epímeros **30** y **31** aislados de *Psacalium decompositum*, tiene actividad antihiper glucémica (Inman et al., 1999). Otro ejemplo son las eremofilanólidas **32** y **33** aisladas de las partes aéreas de *S. miser* que presentan actividad antialimentaria y efectos negativos post ingesta en *Myzus persicae* y *Leptinotera decemlineata* (Reina et al., 2001).



Cuadro 20. Eremofilanos con actividad biológica

PARTE EXPERIMENTAL

Análisis cromatográficos

Para los análisis por cromatografía en columna abierta (CCA) se utilizó como fase estacionaria gel de sílice 60 G para cromatografía en placa preparativa Merck. Los análisis cromatográficos en capa delgada (CCD) se llevaron a cabo en placas de aluminio recubiertas con gel de sílice 60 G con indicador fluorescente UV₂₅₄ Macherey-Nagel de 20 x 20 cm y 0.25 mm de espesor; para visualizar las CCD se utilizó una lámpara de luz UV (onda corta 254 nm y onda larga 365 nm) y/o sulfato cérico. Para las cromatografías en placa preparativa (CPP) se utilizaron cromatoplasmas ALUMGRAM SIL 100 G/UV₂₅₄ y 200 G/UV₂₅₀ de 20 x 20 cm. Para los análisis por cromatografía en columna de exclusión de peso molecular se utilizó como fase estacionaria Sephadex™ LH-20.

Determinación de constantes físicas

- Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no se corrigieron.
- Los análisis de rotación óptica se realizaron en un polarímetro Jasco DIP-360.
- Los análisis de difracción de Rayos X se determinaron en un difractómetro Bruker Smart Apex CCD.
- Los espectros en el IR se obtuvieron en los espectrofotómetros Perkin-Elmer 337, Nicolet Magna 750 o en un Bruker Tensor 37.
- Los espectros en el UV se obtuvieron en un espectrofotómetro Shimadzu 160U.
- Los espectros de resonancia magnética nuclear se obtuvieron en un equipo Eclipse 300 JEOL.
- Los espectros de masas por la técnica de impacto electrónico se obtuvieron en un espectrómetro JEOL JMS-AX5505HA a 70 eV. Los espectros por la técnica de FAB se obtuvieron en un equipo JEOL JMS-SX1102A operado con una aceleración de voltaje de 10 KV, las muestras se adsorbieron en alcohol nitrobenzílico.

Prueba de detección de alcaloides con reactivo de Dragendorff

A una pequeña muestra de extracto disuelto en metanol-agua, se le agregaron dos gotas de H₂SO₄ acuoso al 2.5 %, y posteriormente dos gotas del reactivo de Dragendorff. La formación de precipitado color naranja indicó la presencia de alcaloides.

Agente cromogénico utilizado para los análisis de cromatografía en capa delgada

Se agregaron 22 ml de H_2SO_4 a 12 g de $Ce(SO_4)_2$ y 350 g de hielo molido, la mezcla se calentó en baño María hasta obtener una solución homogénea color anaranjado brillante.

Evaluación de actividad citotóxica

La actividad citotóxica se evaluó a través del bioensayo colorimétrico de sulforrodamina B (SBR), en las líneas celulares humanas: cáncer de próstata (PC-3), cáncer del sistema nervioso central (U251), leucemia mieloblástica crónica (K562), cáncer de colon (HCT-15) y cáncer de mama (MCF-7).

Las líneas celulares fueron adaptadas a un medio compuesto por: medio de cultivo RPMI-1640, suero fetal bovino (5%), mezcla de antibióticos-antimicóticos al 10% y glutamina 2 mM. Con excepción de la línea celular K562, las líneas restantes se adhirieron a las botellas de cultivo y para cosecharlas se adicionó 1 ml de solución de EDTA al 0.05% de tripsina. Cuando las células se desprendieron del sustrato plástico de la botella de cultivo, se les adicionaron de 5 a 10 ml de medio de cultivo para inactivar a la tripsina. Las células en suspensión se depositaron en tubos cónicos y se centrifugaron por 3 min, ya formado el paquete celular se le adicionó medio de cultivo para resuspender las células. De la suspensión se tomaron 0.05 ml y se adicionaron a 0.45 ml de azul de tripano, colorante que se utilizó para contar las células vivas. Una vez determinado el número de células por ml, se hicieron los ajustes necesarios para depositar el inóculo de células en un volumen de 100 μ l/pozo, la densidad de inóculo depositado en cada pozo se estableció previamente de acuerdo al tiempo de duplicación de cada línea celular.

Línea celular	Tiempo de duplicación (h)	Células / pozo
K562	19	5000
HCT-15	18.1	10000
MCF-7	25.6	5000
PC-3	28.7	7500
U251	25.4	7500

Dos placas de ELISA se inocularon con las líneas celulares por triplicado, posteriormente se incubaron por 24 h a 37 °C en una atmósfera de CO_2 (5%) y 100% de humedad relativa, una de las placas se tomó como basal y en la otra se probaron las sustancias problema.

Para el cernimiento primario de los extractos se empleó la concentración de 100 μ g/ml. Todas las muestras se disolvieron en DMSO y se tomaron 100 μ l que se adicionaron a las líneas celulares (volumen final 200 μ l). Posteriormente, las placas se incubaron por 48 h bajo las condiciones antes mencionadas. Al finalizar el periodo de incubación las células se precipitaron (o fijaron) añadiendo 50 μ l de una solución acuosa fría (4 °C aprox.) de ácido

tricloroacético al 50% para células adheridas o al 80% para células en suspensión, después se incubaron a 4 °C por 60 min, se desechó el sobrenadante y las placas se lavaron 5 veces con agua desionizada; posteriormente, se secaron a temperatura ambiente. Las células fijadas al sustrato se tiñeron con 100 µl de una solución de sulforrodamina B (SBR) al 0.4%, preparada en una solución de AcOH glacial al 0.1%, después se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Una vez concluida la incubación las células teñidas se lavaron tres veces con AcOH al 1%, se secaron a temperatura ambiente, se les agregaron 100 µl de solución de Tris[hidroximetil]aminometano (Tris) 10 mM, se agitaron por 10 min para favorecer la solubilidad del complejo y a continuación se midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515 nm. Los datos se procesaron obteniendo el promedio de la DO de los tres pozos/línea correspondientes a cada sustancia problema (DOT), los tres pozos tratados con el disolvente (DOC) y dos pozos testigo, es decir aquellos con muestra pero sin células (DOB). El porcentaje de inhibición del crecimiento (%IC) se calculó con la siguiente expresión (Skehan *et al.*, 1990):

$$\% \text{ IC} = (100 - [\text{DOT} - \text{DOB}/\text{DOC} - \text{DOB}])100$$

Evaluación de actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria se evaluó midiendo la inhibición del edema inducido tópicamente por TPA (acetato de 12-O-tetradecanoilforbol) en oreja de ratón. El extracto no alcaloideo de *S. flaccidus* se disolvió en EtOH-Me₂CO 1:1 y el extracto metanólico de esta misma especie así como el de *S. mairitianus* se disolvieron en MeOH. Se utilizaron dos grupos de tres ratones macho de la cepa CD1 (25-30 g). A uno de los grupos se le aplicó la sustancia problema y al otro se le aplicó el control positivo, indometacina. A los dos grupos bajo anestesia general con pentobarbital sódico (3.5 mg/ml), se les aplicó en la oreja derecha 10 µl de TPA (2.5 µg/oreja) y en la izquierda 10 µl de EtOH. Diez minutos después, al primer grupo se le aplicó en la oreja derecha 20 µl de la solución del extracto a evaluar y al grupo control positivo 20 µl de indometacina (0.31-1 mg disueltos en EtOH-Me₂CO 1:1). Los dos grupos recibieron 20 µl de vehículo (disolvente) en la oreja izquierda. Cuatro horas después de la aplicación de TPA, los animales se anestesiaron con éter y sacrificaron por dislocación cervical para tomar una muestra de 7 mm de diámetro de ambas orejas. El incremento de peso de la muestra de la oreja derecha con respecto al de la muestra de la oreja izquierda indicó el peso del edema después de aplicar la sustancia de prueba (Pérez-Castorena *et al.*, 2002; Tallarida *et al.*, 1981). El porcentaje de inhibición del edema se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ actividad} = ([\text{mg muestra derecha} - \text{mg muestra izquierda}]/\text{mg muestra derecha})100$$

Evaluación de la actividad antioxidante

➤ Capacidad atrapadora del radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo)

Para el cernimiento primario se utilizaron concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm de los extractos disueltos en MeOH. La concentración mínima inhibitoria (IC₅₀) se calculó con los resultados de tres experimentos independientes (Tallarida *et al.*, 1981). Se utilizó como control positivo el α -tocoferol (Burda *et al.*, 2001).

Tres pozos de una placa de ELISA recibieron cada uno 50 μ l de una solución de extracto y 150 μ l de una solución etanólica de DPPH 133.33 μ M (concentración final 100 μ M). La mezcla se protegió de la luz y se dejó reaccionar por 30 min con agitación constante a temperatura ambiente, posteriormente se leyó su densidad óptica (DO) en un lector de ELISA a 515 nm (Pérez-Castorena *et al.*, 2002). La actividad antioxidante frente al radical DPPH se expresó como porcentaje de inhibición y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = ([DO_{\text{control}} - DO_{\text{problema}}] / DO_{\text{control}}) 100$$

$$DO_{\text{control}} = \text{DPPH } 100 \mu\text{M}$$

$$DO_{\text{problema}} = \text{DPPH } 100 \mu\text{M más sustancia problema}$$

➤ Lipoperoxidación inducida con FeSO₄ y determinación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Se evaluó la capacidad del extracto metanólico total de la parte aérea de *S. mairetianus*, de inhibir en células de cerebro de rata la lipoperoxidación inducida por FeSO₄. En la evaluación primaria se utilizaron 10, 100 y 1000 ppm de extracto disuelto en solución acuosa al 15 % de MeOH. La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) se calculó con los resultados de tres experimentos independientes (Tallarida *et al.*, 1981). Se utilizaron como controles positivos quercetina y 2,6-diterbutil p-cresol (BHT) (Callaway *et al.*, 1998).

Se determinó el contenido de proteínas por el método 280/205 (Hirs *et al.*, 1983) al homogeneizado de cerebro de rata en buffer de fosfatos 4.5 mM (pH 7.4) y después se ajustó a 2.5 mg de proteínas/ml de homogeneizado. Se agregaron 400 μ l del homogeneizado de cerebro y 50 μ l de solución del extracto a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, la mezcla se incubó a 37 °C con agitación constante durante 30 min, posteriormente se agregaron 50 μ l de una solución salina (0.9 % de NaCl) de FeSO₄ 100 μ M (concentración final 10 μ M) y se incubó la mezcla a 37 °C con agitación constante durante 60 min. Después, se agregaron 500 μ l de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1% (mezcla 1:1 de una solución de NaOH 0.05 N y solución de ácido tricloroacético al 30 %), se incubó en hielo durante 5 min, se centrifugó por 10 min a 10000 rpm a temperatura ambiente, se calentó en baño María a 90 °C por 30 min y se tomaron 1000 μ l del sobrenadante para determinar su densidad óptica (DO) a 532

nm. Los valores de DO se interpolaron en una curva estándar de malondialdehído (MDA) para obtener los nmoles de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) por mg de proteína (Fernández *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000). El porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación se obtuvo empleando la siguiente fórmula:

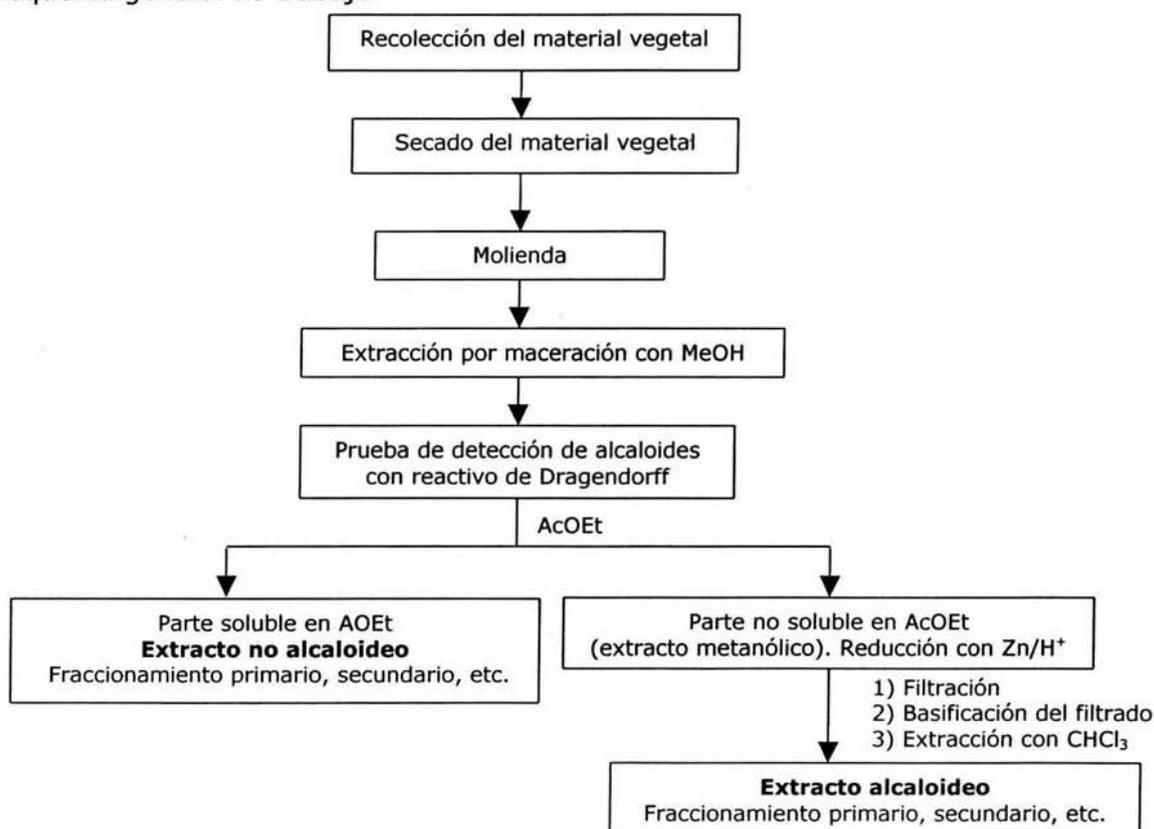
$$\% \text{ de inhibición de la lipoperoxidación} = [(TBARS_0 - TBARS_1/TBARS_0)]100$$

TBARS₀ = nmoles de TBARS por mg de proteína en la reacción control

TBARS₁ = nmoles de TBARS por mg de proteína en presencia del extracto.

Parte aérea de *Senecio flaccidus*

Esquema general de trabajo



Material vegetal

La planta se recolectó el 12 de Julio de 2000 en el Municipio de Zaragoza, San Luis Potosí. Fue clasificada por el Dr. Jose L. Villaseñor, Instituto de Biología, UNAM. Se depositó una muestra del vegetal en el Herbario Nacional (MEXU 892587), Instituto de Biología, UNAM. El material vegetal se seco a temperatura ambiente y se molió.

Preparación de extractos

El material vegetal seco y molido (466.9 g) se extrajo por maceración con MeOH. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida en un rotavapor. A una muestra del extracto se le realizó la prueba de detección de alcaloides con el reactivo de Dragendorff dando un resultado no claro. Al extracto se le agregó AcOEt y la parte soluble en este disolvente se nombró extracto no alcaloideo (7.87 g).

Extracto alcaloideo

La parte del extracto metanólico (24.88 g) no soluble en AcOEt se acidificó con H₂SO₄ acuoso al 2.5 % hasta pH 2, se le agregaron 2.56 g de Zn y se dejó a temperatura ambiente con agitación constante por una noche. Posteriormente, la mezcla se filtró, el filtrado se basificó con hidróxido de amonio hasta pH 10, se extrajo con CHCl₃, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró. Se obtuvieron 400 mg de extracto alcaloideo. De este extracto precipitaron 266 mg de sólidos color blanco.

Aislamiento de retrorsina (I), usaramina (II), senecionina (III) e integerrimina (IV)

Los sólidos (266 mg) del extracto alcaloideo se purificaron por CCA eluida con CHCl₃-MeOH. Se obtuvieron 37 fracciones de 5 ml.

Tabla 1

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas
CHCl ₃ -MeOH	98:2	1-21	1-2
	97:3	22-30	3-36
	96:4	31-34	
	90:10	35-36	

Las fracciones 3 a 36 presentaron sólidos color beige que se identificaron como una mezcla de retrorsina (**I**) y de su isómero 15E, usaramina (**II**) (Logie *et al.*, 1994; Roeder, 1995), 104 mg, p.f. 197-201 °C.

Las fracciones 1 y 2 (118.8 mg) se purificaron por CPP eluida dos veces con CHCl₃-MeOH 90:10. De esta cromatografía se obtuvieron 53 mg de una mezcla de **I** y **II**, p.f. 182-187 °C. También se obtuvieron sólidos color café que se recrystalizaron con hexano-Me₂CO y se identificaron como mezcla de senecionina (**III**) y de su isómero 15E, integerrimina (**IV**) (Logie *et al.*, 1994; Roeder, 1995), 4.5 mg, p.f. 190-193 °C.

Las aguas madres del extracto alcaloideo (314 mg) se analizaron por CCA eluida con CHCl₃, CHCl₃-MeOH y MeOH. Se obtuvieron 39 fracciones de 25 ml. De las fracciones 26 a 29 por cristalización se obtuvo una mezcla de **I** y **II**, 47.4 mg, p.f. 180-183 °C.

Tabla 2

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas
CHCl ₃	100	1-14	26-29
CHCl ₃ -MeOH	99:1	15-16	
	98:2	17-23	
	96:4	24-26	
	93:7	27-29	
	90:10	30-35	
	85:15	36-38	
MeOH	100	39	

Extracto no alcaloideo

Aislamiento de β-sitosterol (V), estigmasterol (VI) y glucósido de β-sitosterol (VII)

El extracto se analizó por CCA eluida con hexano, hexano-AcOEt, AcOEt, Me₂CO y MeOH. Se obtuvieron 88 fracciones de 75 ml.

Tabla 3

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas
hexano	100	1-3	10-14
hexano-AcOEt	95:5	4-8	31-40
	90:10	9-27	80-81
	85:15	28-45	82-86
	80:20	46-62	
	75:25	63	
	70:30	64-65	
	60:40	66-73	
	50:50	74	
	40:60	75-76	
		77-84	
		20:80	85-86
AcOEt	100	85-86	
CH ₃ CO	100	87	
CH ₃ OH	100	88	

Las fracciones 10-14 presentaron sólidos que se recristalizaron (hexano-Me₂CO) e identificaron como mezcla de β-sitosterol (V) y estigmasterol (VI), 37.1 mg, p.f. 127-135 °C.

Las fracciones 82-86 presentaron sólidos color blanco que se identificaron como glucósido β-sitosterol (VII), 57.8 mg, p.f. 295-297 °C.

Las fracciones 80, 81, y 87 se reunieron con las aguas madres de VII y el residuo (1.3238 g) se analizó por CCA utilizando como fase móvil CHCl₃-MeOH y MeOH. Se obtuvieron 19 fracciones de 25 ml.

Tabla 4

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas
CHCl ₃ -MeOH	95:5	1-7	9-11
	92.5:7.5	8-18	
MeOH	100	19	

En las fracciones 9 a 11 precipitaron sólidos color café claro identificados como VII, 1.7 mg, p.f. 289-294 °C.

Aislamiento de (-)-10-hidroxi-4-oplopanona (VIII)

Las fracciones 31 a 40 (263.5 mg) provenientes de la primera cromatografía en columna (Tabla 3), se analizaron por CCA que se eluyó como se muestra en la Tabla 5. Se obtuvieron 11 fracciones de 25 ml.

Tabla 5

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas
hexano-AcOEt	70:30	1-9	4-7
AcOEt	100	10	
Me ₂ CO	100	11	

Las fracciones 4 a 7 (146.6 mg) se purificaron por CCA usando como eluyente hexano-AcOEt. Se obtuvieron 15 fracciones de 25 ml.

Tabla 6

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas
hexano-AcOEt	80:20	1-14	6-11
	75:25	15	

De las fracciones 6 a 11 se aisló un compuesto en forma de aceite que se identificó como (-)-10-hidroxi-4-oplopanona (**VIII**) (Takeda *et al.*, 1966), $[\alpha]_D^{27} -11^\circ$ (c 0.1, dioxano), 10.5 mg.

Aislamiento de N-óxido de senecionina (IX), N-óxido de integerrimina (X), N-óxido de retrorsina (XI) y N-óxido usaramina (XII)

La fracción 88 (670.5 mg) de la primera cromatografía en columna (Tabla 3) se purificó por cromatografía de exclusión de peso molecular eluida con Me₂CO-MeOH 33:67. Se obtuvieron 12 fracciones de 20 ml. Las fracciones 4 a 7 se reunieron (349.5 mg) y purificaron por CCA eluida con CHCl₃-MeOH y MeOH. Se obtuvieron 22 fracciones de 15 ml.

Tabla 7

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas
CHCl ₃ -CH ₃ OH	95:5	1-6	12-16
	10:90	7	17-22
	20:80	8-17	
	40:60	18	
CH ₃ OH	100	19-22	

Las fracciones 12 a 16 (104.07 mg) se purificaron por CPP (CHCl₃-MeOH 60:40, × 2), seguida de una CCA eluida con CHCl₃-MeOH 70:30. Se obtuvieron 6.2 mg de una mezcla de N-óxido de senecionina (**IX**) y de N-óxido de integerrimina (**X**) (Logie *et al.*, 1994; Roeder, 1995).

Las fracciones 17 a 22 (74.8 mg) mostradas en la Tabla 7, se purificaron por CCA eluida con CHCl₃-MeOH y MeOH. Se obtuvieron 12 fracciones de 10 ml.

Tabla 8

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas
CHCl ₃ -MeOH	60:40	1-12	7-10
MeOH	100	13	

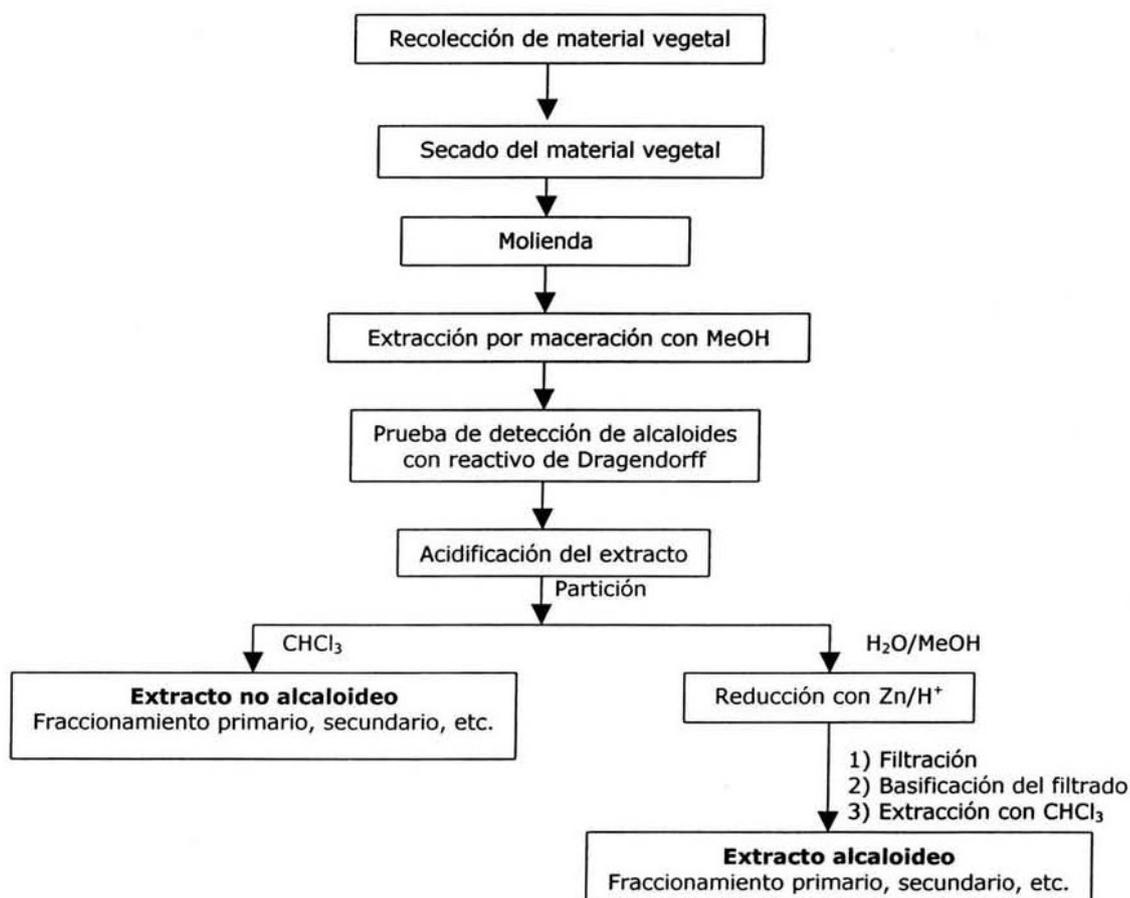
Las fracciones 7 a 10 presentaron sólidos color blanco que se identificaron como una mezcla de N-óxido de retrorsina (**XI**) y N-óxido usaramina (**XII**) (Logie *et al.*, 1994; Roeder, 1995), 16.4 mg, p.f. 140-144 °C.

Oxidación de senecionina

A una solución de senecionina (**III**, 30 mg) en CH₂Cl₂ (4ml) se le agregaron 20 mg de ácido meta-cloroperbenzoico. Después de 10 min la mezcla se purificó por CCA eluida con CH₂Cl₂-MeOH 80:20. Se obtuvieron 12.6 mg de sólidos color blanco identificados como N-óxido de senecionina, p.f. 133-135 °C.

Raíz de *Senecio mairitianus*

Esquema general de trabajo



Material vegetal

La planta se recolectó el 11 de Octubre de 2000, camino a la primera laguna del Nevado de Toluca, Estado de México y fue clasificada por el Dr. José L. Villaseñor, Instituto de Biología, UNAM. Se depositó una muestra del vegetal en el Herbario Nacional (MEXU 1045508), Instituto de Biología, UNAM. La raíz (576.96 g) se secó a temperatura ambiente y se molió.

Preparación de extractos

La raíz se sometió a un proceso de extracción por maceración utilizando como disolvente MeOH. Después de eliminar el disolvente por destilación a presión reducida en un rotavapor, se realizó la prueba de detección de alcaloides (reactivo de Dragendorff) que resulto positiva. Posteriormente, el extracto se acidificó con una solución acuosa de H₂SO₄ al 2.5 % hasta pH 2 y se extrajo con CHCl₃, la eliminación del disolvente dio el extracto no alcaloideo (10.46 g). La fracción acuosa ácida junto con 57 g de Zn se mantuvo con agitación constante a temperatura ambiente por 12 h. Después de filtrar la mezcla de reacción, el filtrado se basificó con hidróxido de amonio hasta pH 10 y se extrajo con CHCl₃ obteniendo el extracto alcaloideo (44.9 g).

Extracto alcaloideo

Aislamiento de retrorsina (I), usaramina (II), senecionina (III) e integerrimina (IV)

Directamente del extracto se obtuvieron sólidos de color blanco identificados como mezcla de **III** y **IV**, 182 mg, p.f. 195-227 °C; 340.7 mg, p.f 158-163 °C. Las aguas madres (3.724 g) se purificaron por CCA eluida con CHCl₃ y CHCl₃-MeOH. Se obtuvieron 45 fracciones de 75 ml.

Tabla 9

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas
CHCl ₃	100	1-20	1-36
CHCl ₃ -MeOH	99:1	24	37-43
	98:2	25	44-46
	96:4	26-35	
	94:6	36	
	90:10	37-45	
	50:50	46	

En las fracciones 1 a 36 precipitaron sólidos de color blanco identificados como mezcla de **III** y **IV**, 1.704 g, p.f. 181-183 °C.

Las fracciones 37 a 43 (85 mg) se purificaron por CPP (CHCl₃-MeOH 10:90, x 4). Se obtuvieron 23.7 mg de sólidos color café claro, p.f. 201-208 °C, identificados como mezcla de **I** y **II**.

Las fracciones 44 a 46 (183.4 mg) se analizaron por CCA eluida con CHCl₃-MeOH. Se obtuvieron 30 fracciones de 25 ml. De las fracciones 16 y 17 se aislaron sólidos color café identificados como mezcla de **I** y **II**, 17.3 mg, p.f. 198-200 °C.

Tabla 10

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones
CHCl ₃ -MeOH	97:3	1-6	16-17
	95:5	7-11	
	92:8	12-14	
	88:12	15-17	
	85:15	18-22	
	82:18	23-25	
	80:20	26-29	
	50:50	30	

Extracto no alcaloideo

Aislamiento de β-sitosterol (V) y estigmasterol (VI)

El extracto no alcaloideo (10.46 g) se fraccionó por CCA eluida con hexano, hexano-Me₂CO, Me₂CO y MeOH. Se obtuvieron 56 fracciones de 75 ml.

Tabla 11

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas
hexano	100	1	4-7
hexano-Me ₂ CO	97.5:2.5	2-12	20-25 27-32
	95:5	13-15	
	92.5:7.5	16	
	90:10	17-34	
	85:15	35	
	80:20	36-45	
Me ₂ CO	100	46-55	
MeOH	100	56	

De las fracciones 20 a 25 se obtuvieron cristales que se identificaron como mezcla de **V** y **VI**, 109 mg, p.f. 135-137 °C.

Aislamiento de 1(10)-epoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XIII) y 8-hidroxi-1(10)-epoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XIV)

Las fracciones 4 a 7 (1.639 g) se purificaron por CCA eluida con hexano, hexano-CHCl₃, CHCl₃ y CHCl₃-AcOEt. Se obtuvieron 60 fracciones de 25 ml.

Tabla 12

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones
hexano	100	1-3	39-46
hexano-CHCl ₃	95:5	4-7	57-59
	90:10	8-13	
	85:15	14-17	
	80:20	18-37	
	70:30	38-46	
	60:40	47-48	
	40:60	49-50	
	20:80	51-58	
CHCl ₃	100	59	
CHCl ₃ -AcOEt	65:35	60	

El componente principal de las fracciones 39 a 46 se purificó por CPP (hexano-AcOEt 20:80). Se obtuvieron 11.5 mg de sólidos color blanco identificados como 1(10)-epoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (**XIII**), p.f. 77-87 °C.

EM-FAB⁺ de alta resolución: m/z 249.1491 [M+H] ⁺ , calculado para C ₁₅ H ₂₁ O ₃ m/z 249.1491
EM-FAB⁺: m/z 137 (100), 107 (32), 89 (25), 77 (28)
[α]_D²⁸ -193° (c 0.2, CHCl ₃)
UV λ_{max}: 219 nm, ξ = 14589 (THF)
IR ν_{max}: 1747 (lactona) y 1686 cm ⁻¹ (doble enlace) (CHCl ₃)

El componente principal de las fracciones 57-59 (103 mg) se purificó por CPP (hexano-AcOEt 70:30, x 2). Se obtuvieron 21 mg de sólidos color blanco identificados como 8-hidroxi-1(10)-epoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (**XIV**), p.f. 122-129 °C.

EM-IE: m/z 264 [M] ⁺ (C ₁₅ H ₂₀ O ₄), 121 (100), 95 (39), 126 (39), 264 (10)
[α]_D^{29.5} -149.5° (c 0.2, MeOH)
UV λ_{max}: 220 nm, ξ = 12192 (MeOH)
IR ν_{max}: 3566 (alcohol), 1765 (lactona) y 1698 cm ⁻¹ (doble enlace) (CHCl ₃)

Aislamiento de 8-metoxi-1(10)-epoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XV)

Las fracciones 27 a 32 (386 mg) de la primera cromatografía en columna (Tabla 11) se purificaron por CCA eluida con hexano-AcOEt, AcOEt y MeOH. Se obtuvieron 21 fracciones de 15 ml.

Tabla 13

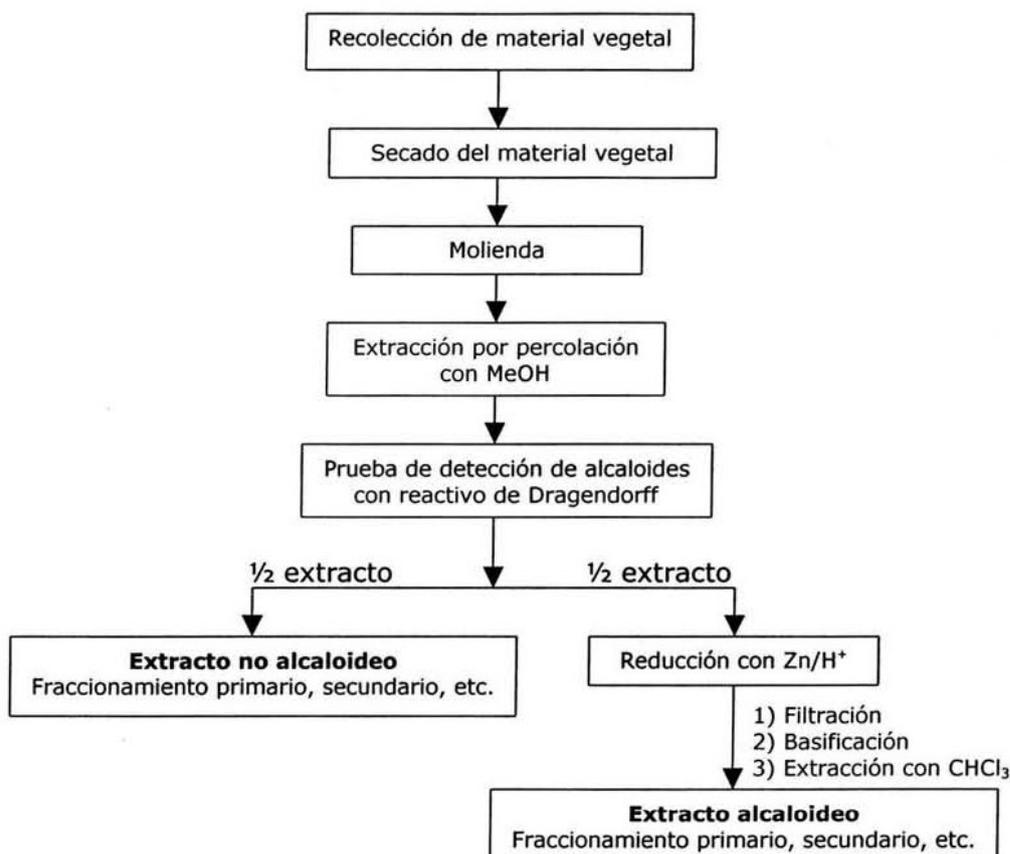
Eluyente	Proporción	Fracciones
hexano-AcOEt	85:15	1-17
	60:40	18-19
AcOEt	100	20
CH ₃ OH	100	21

En la fracción 5 se formaron cristales identificados como 8-metoxi-1(10)-epoxieremofil-1(11)-en-8(12)-ólida (**XV**) (Urones *et al.*, 1987), 44.1 mg, p.f. 140-143 °C.

EM-FAB⁺ alta resolución; m/z 279.1591 [M+H] ⁺ , calculado para C ₁₆ H ₂₃ O ₄ m/z 279.1596
EM-IE: m/z 232 (20), 218 (78), 173 (22), 140 (100), 95 (27)
[α]_D^{28.5} -215° (c 0.2, CHCl ₃)
UV λ_{max}: 220 nm, ξ = 12267 (EtOH)
IR ν_{max}: 1760 (lactona) y 1694 cm ⁻¹ (doble enlace) (CHCl ₃)

Parte aérea de *Senecio mairatianus*

Esquema general de trabajo



Material vegetal

La parte aérea (3.765 Kg) se secó a temperatura ambiente y se molió.

Preparación de extractos

El material vegetal se percoló utilizando como disolvente MeOH. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida en un rotavapor y se le realizó la prueba de detección de alcaloides con el reactivo de Dragendorff, que resultó positiva. Posteriormente, el extracto se dividió en dos partes, una de ellas se nombró extracto no alcaloideo (271 g). La segunda parte se sometió a un proceso reductivo con Zn/H⁺ y se trató de manera similar al extracto metanólico de *S. flaccidus*. Se obtuvieron 26.59 g de extracto alcaloideo.

Extracto alcaloideo

Aislamiento de senecionina (III) e integerrimina (IV)

El extracto alcaloideo (26.59 g) se analizó por CCA eluida con CHCl₃, CHCl₃-MeOH y MeOH. Se obtuvieron 79 fracciones de 200 ml.

Tabla 14

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas
CHCl ₃	100	1-4	2-8
CHCl ₃ -MeOH	99:1	5-18	17-24
	96:4	19-29	25-30
	93:7	30-38	
	90:10	39-53	
	85:15	54-64	
	75:25	65-77	
	50:50	78	
MeOH	100	79	

Mezclas de **XI** y **XII** se obtuvieron por cristalización, de las fracciones 25 a 30 (481.5 mg, p.f. 210–219 °C) y de las fracciones 31 a 33 (98.1 mg, p.f. 163-172 °C).

Aislamiento de 10-hidroxi-1-metoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XVII)

Las fracciones 2 a 8 (3.28 g) se purificaron por CCA eluida con hexano-CHCl₃, CHCl₃, CHCl₃-Me₂CO, Me₂CO y MeOH. Se obtuvieron 34 fracciones de 100 ml.

Tabla 15

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas
hexano-CHCl ₃	10:90	1-12	4-8
CHCl ₃	100	13-16	10-11
CHCl ₃ -Me ₂ CO	99:1	17-21	22-25
	97:3	22-24	
	95:5	25-26	
	90:10	27-29	
	80:20	30-32	
Me ₂ CO	100	33	
MeOH	100	34	

El componente principal de las fracciones 10 y 11 (81.9 mg) se purificó por CPP (CH₂Cl₂-Me₂CO 60:40). Se obtuvieron 15.3 mg de cristales identificados como 10-hidroxi-1-metoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (**XVII**), p.f. 165-170 °C.

EM-FAB⁺ alta resolución: m/z 281.1753 [M+H] ⁺ , calculado para C ₁₆ H ₂₅ O ₄ m/z 281.1753
EM-IE: m/z 231 (15), 137 (57), 107 (17), 89 (15), 77 (15)
[α]_D^{29.5} -106.5° (c 0.2, MeOH)
UV λ_{max}: 224 nm, ξ = 16806 (MeOH)
IR ν_{max}: 3594 (alcohol), 1740 (lactona) y 1682 cm ⁻¹ (doble enlace) (CHCl ₃)

Aislamiento de 1,10-epoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XIII), 10-hidroxi-1,8-dimetoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XVI), 8,10-dihidroxi-1-metoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XVIII) y 1,10-dihidroxi-1-metoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XIX)

Las fracciones 4 a 8 (1.54 g) de la anterior cromatografía en columna se purificaron por CCA eluida con hexano-AcOEt, AcOEt, Me₂CO y MeOH. Se obtuvieron 54 fracciones de 25 ml.

Tabla 16

Eluyente	Proporción	Fraciones	Fraciones reunidas
hexano-AcOEt	95:5	1-17	10-17 26-28
	92:8	18-40	
	88:12	41-50	
AcOEt	100	51	
Me ₂ CO	100	53	
MeOH	100	54	

De las fracciones 10 a 17 se obtuvieron 63.5 mg de cristales identificados como 10-hidroxi-1,8-dimetoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (**XVI**), p.f. 165-169 °C.

EM-FAB⁺ alta resolución: m/z 311.1862 [M+H] ⁺ , calculado para C ₁₇ H ₂₅ O ₅ m/z 311.1858
EM-IE: m/z 278 (82), 155 (100), 127 (59), 95 (85), 71(41)
[α]_D^{28.5} -130.5° (c 0.2, CHCl ₃)
UV λ_{max}: 225 nm, ξ = 11829 (MeOH)
IR ν_{max}: 3510 (alcohol), 1759 (lactona) y 1688 cm ⁻¹ (doble enlace) (CHCl ₃),

De las fracciones 26 a 28 se obtuvieron 20.6 mg de **XIII**, p.f. 97-99 °C.

Las fracciones 22 a 25 (270 mg) que se muestran en la Tabla 15, se purificaron por CCA eluida con hexano-AcOEt. Se obtuvieron 17 fracciones de 25 ml.

Tabla 17

Eluyente	Proporción	Fraciones	Fraciones reunidas
hexano-AcOEt	90:10	1-7	7-11
	85:15	8-15	
	30:70	16-17	

En las fracciones 7 a 11 se formaron cristales que se recrystalizaron con hexano-AcOEt y se identificaron como 8,10-dihidroxi-1-metoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (**XVIII**), 76.4 mg, p.f. 170-173 °C.

EM-FAB⁺ alta resolución: m/z 297.1709 [M+H] ⁺ , calculado para C ₁₆ H ₂₅ O ₅ m/z 297.1702
EM-IE: m/z 278 (41), 155 (81), 127 (52), 95 (100), 71 (41)
[α]_D^{29.5} -111° (c 0.2, CHCl ₃)
UV λ_{max}: 224 nm, ξ = 8014 (MeOH)
IR ν_{max}: 3539 (alcohol), 1762 (lactona) y 1687 cm ⁻¹ (doble enlace) (CHCl ₃),

Las fracciones 17 a 24 (4 g) de la primera cromatografía en columna (Tabla 14) se analizaron por CCA eluida con hexano-AcOEt. Se obtuvieron 30 fracciones de 50 ml.

Tabla 18

Eluyente	Proporción	Fraciones	Fraciones reunidas
hexano-AcOEt	60:40	1-15	4-12
	55:45	16-20	
	50:50	21-29	
	30:70	30	

Las fracciones 4 a 12 (1.88 g) se purificaron por CCA eluida con hexano-AcOEt, AcOEt y MeOH. Se obtuvieron 46 fracciones de 25 ml.

Tabla 19

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas
Hexano-Acetato de etilo	70:30	1-21	14-20
	67:33	22-27	
	64:36	28-33	
	60:40	34-43	
	50:50	44	
Acetato de etilo	100	45	
Metanol	100	46	

De las fracciones 14 a 20 se obtuvieron 316.3 mg de sólidos color blanco identificados como 1,10-dihidroxi-remofil-7(11)-en-8(12)-ólida (**XIX**), p.f. 176-178 °C.

EM-FAB⁺ alta resolución: m/z 267.1600 [M+H] ⁺ , calculado para C ₁₅ H ₂₃ O ₄ m/z 267.1596
EM-IE: m/z 248 (100), 230 (58), 163 (55), 125 (84), 110 (73), 95 (69), 83 (40), 69 (27), 43 (38)
[α]_D^{28.5} -120° (c 0.2, MeOH)
UV λ _{max} : 224 nm, ξ 15890 (MeOH)
IR ν _{max} : 3614 (alcohol), 1738 (lactona) y 1679 cm ⁻¹ (doble enlace) (CHCl ₃)

Oxidación de 1,10-dihidroxi-remofil-7(11)-en-8(12)-ólida (**XIX**)

El compuesto **XIX** (120 mg) se disolvió en la mínima cantidad de Me₂CO y la solución se colocó en un baño de hielo. Posteriormente, se agregó reactivo de Jones gota a gota hasta obtener una coloración naranja. Después de 15 min se agregó 1 ml de MeOH, la mezcla se dejó reposar 10 min, se le agregaron 5 ml de agua y se extrajo con CHCl₃. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró. Se obtuvieron 44 mg de **XXI**, p.f. 236-243 °C, 37 % de rendimiento.

Acetilación de 1,10-dihidroxi-remofil-7(11)-en-8(12)-ólida (**XIX**)

A 119 mg de **XIX** se les agregó 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina. La reacción se dejó 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 2 ml de agua y la mezcla se extrajo con CHCl₃. La fase orgánica se acidificó hasta pH 6 con una solución acuosa de HCl al 10 %, se lavó con agua, se basificó hasta pH 8 con una solución saturada de NaHCO₃ y se lavó nuevamente con agua. Por último, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró. Se obtuvieron 40 mg de **XXII**, p.f. 165-168 °C, 19 % de rendimiento.

Extracto no alcaloideo

Aislamiento de glucósido de β -sitosterol (III)

El extracto no alcaloideo (274.19 g) se analizó por CCA eluida con CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -MeOH y MeOH. Se obtuvieron 39 fracciones de 250 ml.

Tabla 20

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas
CH_2Cl_2	100	1	2-16
CH_2Cl_2 -MeOH	95:5	2-13	
	90:10	14-21	
	85:15	22-26	
	75:25	27-32	
	50:50	33-38	
MeOH	100	39	

De las fracciones 2 a 16 se aislaron sólidos color ámbar identificados como glucósido de β -sitosterol (**VIII**), 1.032 g, p.f. 280-285 °C.

Aislamiento de 1,10-dihidroxi-remofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XIX) y 1,8,10-trihidroxi-remofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XX)

Las aguas madres de **VIII** correspondientes a las fracciones 2 y 3 (20.05 g) fueron nuevamente analizadas por CCA eluida con CHCl_3 - Me_2CO y Me_2CO . Se obtuvieron 42 fracciones de 150 ml.

Tabla 21

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas
CHCl_3 - Me_2CO	85:15	1-17	8-17
	80:20	18-23	
	75:25	24-29	
	50:50	30-39	
Me_2CO	100	40-42	

Las fracciones 8 a 17 (4.42 g) se analizaron por CCA eluida con CHCl_3 -MeOH. Se obtuvieron 13 fracciones de 25 ml.

Tabla 22

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas
CHCl_3 -MeOH	97:3	1-12	6-8
	95:5	13	9-12

Las fracciones 6 a 8 (1.554 mg) se purificaron por CCA eluida con hexano-AcOEt y AcOEt. Se obtuvieron 21 fracciones de 25 ml.

Tabla 23

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas
hexano-AcOEt	70:30	1-17	7-9
	65:35	18-19	
	50:50	20	
AcOEt	100	21	

De las fracciones 7 a 9 se obtuvieron cristales que se identificaron como 1,8,10-trihidroxi-remofil-7(11)-en-8(12)-ólida (**XX**), 63 mg, p.f. 234-238 °C.

EM-FAB⁺ alta resolución: m/z 283.1548 [M+H] ⁺ , calculado para C ₁₅ H ₂₃ O ₅ m/z 283.1545
EM-IE: m/z 264 (25), 246 (18), 124 (100), 113 (32), 95 (44)
[α]_D^{29.5} -95° (c 0.2, MeOH)
UV λ _{max} : 224 nm, ξ = 17636 (MeOH)
IR ν _{max} : 3481 y 3397 (alcohol), 1761 (lactona) y 1687 cm ⁻¹ (doble enlace) (Nujol)

Se realizó una CCA con las fracciones 9 a 12 (915.8 mg) que se muestran en la Tabla 22. La cromatografía se eluyó con hexano-AcOEt. Se obtuvieron 21 fracciones de 25 ml.

Tabla 24

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas
hexano-AcOEt	70:30	1-17	7-17
	65:35	18-21	

De las fracciones 7 a 17 se obtuvieron 253.1 mg de cristales identificados como **XX**, p.f. 231-235 °C. Sus aguas madres (395.5 mg) se purificaron por CPP (hexano-AcOEt 50:50) y se obtuvieron 71.5 mg de **XIX**, p.f. 182-185 °C.

Oxidación de 1,8,10-trihidroxi-remofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XX)

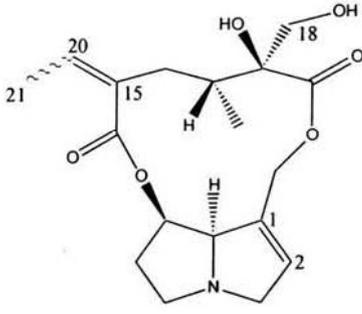
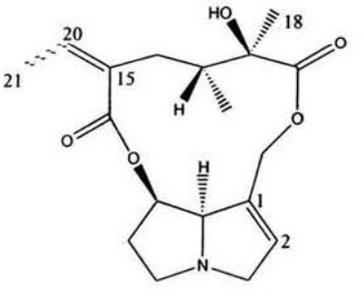
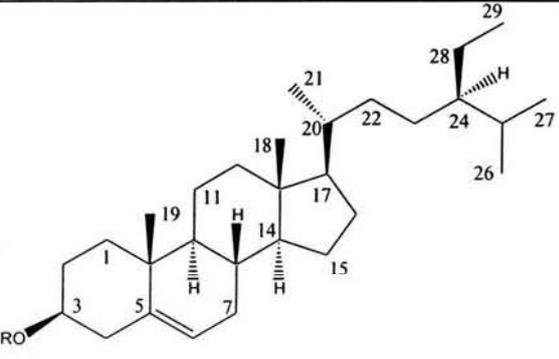
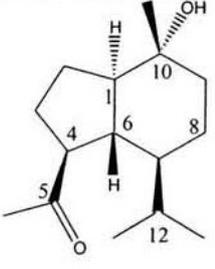
El compuesto **XX** (74.5 mg) se oxidó con el reactivo de Jones siguiendo la metodología descrita en la oxidación de **XIX**. Se obtuvieron 38.5 mg de **XXIII**, p.f. 235-239 °C, 48 % de rendimiento.

Acetilación de 1,8,10-trihidroxi-remofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XX)

El compuesto **XX** (67 mg) se acetiló con anhídrido acético (1ml) y piridina (1ml) siguiendo la metodología utilizada en la acetilación de **XIX**. Se obtuvieron 25.6 mg de **XXIV**, p.f. 156-159 °C, 29.46 % de rendimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el siguiente cuadro se muestran los compuestos aislados de *S. flaccidus*.

	<p>I $\Delta^{15,20}$ <i>Z</i> retrorsina II $\Delta^{15,20}$ <i>E</i> usaramina Rendimiento 4.38×10^{-2} %</p> <p>XI $\Delta^{15,20}$ <i>Z</i> N-óxido de retrorsina XII $\Delta^{15,20}$ <i>E</i> N-óxido de usaramina Rendimiento 3.51×10^{-3} %</p>
	<p>III $\Delta^{15,20}$ <i>Z</i> senecionina IV $\Delta^{15,20}$ <i>E</i> integerrimina Rendimiento 1.35×10^{-3} %</p> <p>IX $\Delta^{15,20}$ <i>Z</i> N-óxido de senecionina X $\Delta^{15,20}$ <i>E</i> N-óxido de integerrimina Rendimiento 1.33×10^{-3} %</p>
	<p>V R = H β-sitosterol VI R = H Δ^{22} estigmasterol Rendimiento 7.95×10^{-3} %</p> <p>VII R = Gluc glucósido de β-sitosterol Rendimiento 1.27×10^{-2} %</p>
	<p>VIII (-)-10-hidroxi-4-oplopanona Rendimiento 2.25×10^{-3} %</p>

Del extracto no alcaloideo se aislaron los compuestos esteroidales β -sitosterol (**V**) estigmasterol (**VI**), y glucósido de β -sitosterol (**VII**). También se aisló el sesquiterpeno (-)-10-hidroxi-4-oplopanona (**VIII**) (Takeda *et al.*, 1966) y los APs N-óxido de senecionina (**IX**), N-óxido de integerrimina (**X**), N-óxido de retrorsina (**XI**) y N-óxido de usaramina (**XII**). Del extracto alcaloideo se aislaron los mismos APs pero en su forma reducida (**I-IV**).

La identidad de los compuestos esteroidales y la del sesquiterpeno se establecieron por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los de muestras originales. Los APs se identificaron por comparación de sus datos espectroscópicos con los descritos en la literatura (Logie *et al.*, 1994; Roeder, 1990). Además, se realizó una oxidación de una muestra auténtica de senecionina con el objeto de comparar directamente los datos espectroscópicos de N-óxido de senecionina con los obtenidos de las mezclas alcaloideas.

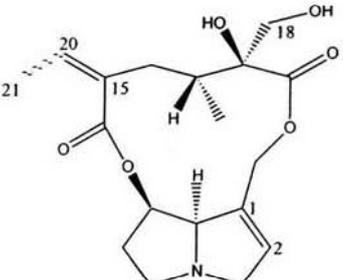
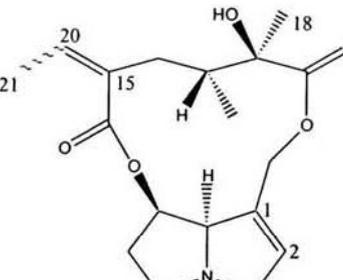
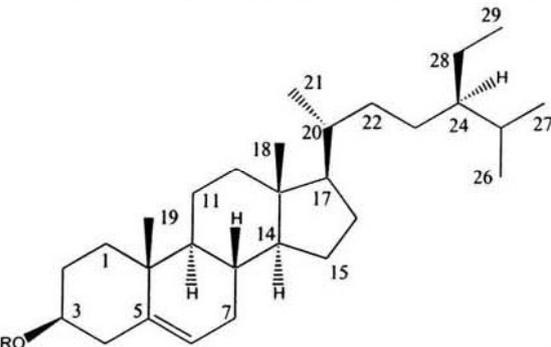
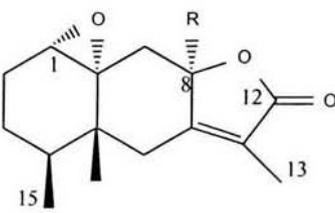
En 1979 y 1985 se describieron estudios fitoquímicos de *S. flaccidus* recolectado en el sudeste de Estados Unidos, aunque en ellos se le denomina con uno de sus sinónimos, *S. longilobus* (Johnson *et al.*, 1985; Molyneux *et al.*, 1979). Estos trabajos describen el aislamiento de senecifilina, retrorsina, senecionina y riddellina.

Una comparación entre el contenido alcaloideo que se describe en esta tesis y los señalados en 1979 y 1985 indican lo siguiente:

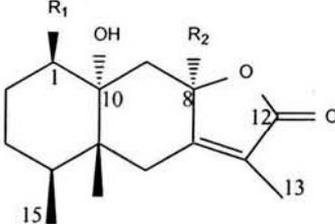
- retrorsina y senecionina son los alcaloides que coinciden en los tres estudios,
- todos los alcaloides aislados presentan la misma base néctica, retronecina,
- todos los alcaloides aislados presentan un macrociclo de 12 miembros,
- las diferencias estructurales residen en la presencia o ausencia de una instauración en C-12 (C-18) y en la estereoquímica del doble enlace C-15 (C-20).

Lo señalado anteriormente muestra que las tres colectas presentan una gran similitud en el contenido alcaloideo. Las pequeñas diferencias pueden ser consecuencia del habitat en el que se desarrolla la especie.

En el siguiente cuadro se muestran los compuestos aislados de *S. mairatianus*.

	<p>I $\Delta^{15,20}$ <i>Z</i> retrorsina II $\Delta^{15,20}$ <i>E</i> usaramina Rendimiento 8.84×10^{-3} %</p>
	<p>III $\Delta^{15,20}$ <i>Z</i> senecionina IV $\Delta^{15,20}$ <i>E</i> integerrimina Rendimiento: - raíz 2.44×10^{-1} % - parte aérea 3.08×10^{-2} %</p>
	<p>V R = H β-sitosterol VI R = H Δ^{22} estigmasterol Rendimiento 1.89×10^{-2} % VII R = Gluc glucósido de β-sitosterol Rendimiento 5.49×10^{-2} %</p>
	<p>XIII R = H 1(10)-epoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida Rendimiento a partir del extracto no alcaloideo de raíz 1.99×10^{-3} % Rendimiento a partir del extracto alcaloideo de la parte aérea 1.38×10^{-3} % XIV R = OH 8-hidroxi-1(10)-epoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida Rendimiento a partir del extracto no alcaloideo de raíz 3.64×10^{-3} % XV R = OCH₃ 8-metoxi-1(10)-epoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida Rendimiento a partir del extracto no alcaloideo de raíz 7.64×10^{-3} %</p>

Continuación del cuadro anterior

	<p>XVI $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OCH}_3$ 10-hidroxi-1,8-dimetoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida Rendimiento a partir del extracto alcaloideo de la parte aérea $3.37 \times 10^{-3} \%$</p> <p>XVII $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{H}$ 10-hidroxi-1-metoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida Rendimiento a partir del extracto alcaloideo de la parte aérea $8.13 \times 10^{-3} \%$</p> <p>XVIII $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$ 8,10-dihidroxi-1-metoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida Rendimiento a partir del extracto alcaloideo de la parte aérea $4.06 \times 10^{-3} \%$</p> <p>XIX $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}$ 1,10-dihidroxi-1-metoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida Rendimiento a partir del extracto alcaloideo de la parte aérea $1.68 \times 10^{-2} \%$ Rendimiento a partir del extracto no alcaloideo de la parte aérea $4.12 \times 10^{-3} \%$</p> <p>XX $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OH}$ 1,8,10-trihidroxi-1-metoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida Rendimiento a partir del extracto no alcaloideo de la parte aérea $1.68 \times 10^{-3} \%$</p>
---	---

De los extractos alcaloideos de raíz y de la parte aérea, se aisló una mezcla de APs conformada por senecionina (**III**) e integerrimina (**IV**). Además, del primer extracto se aisló una mezcla de retrorsina (**I**) y usaramina (**II**). Adicionalmente, del extracto no alcaloideo de raíz se aislaron β -sitosterol (**V**) y estigmasterol (**VI**). Del extracto no alcaloideo de la parte aérea se aisló glucósido de β -sitosterol (**VII**).

EREMOFILANÓLIDAS

De la raíz de esta especie se aislaron dos nuevas epoxieremofilanólidas, **XIII** y **XIV**, y una ya conocida, **XV** (Urones *et al.*, 1987). La diferencia estructural entre estos tres compuestos radicó en el grupo unido a C-8. De la parte aérea se aislaron otras cinco nuevas eremofilanólidas, **XVI** a **XX**, que a diferencia de las anteriores no presentan una función epóxido entre los carbonos 1 y 10.

1(10)-Epoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XIII)

La epoxieremofilanólida **XIII** mostró en su espectro en el IR (Espectro 1) bandas de absorción en 1747 y 1686 cm^{-1} que indicaron la presencia de la función γ -lactona α, β insaturada. Esta función se corroboró en el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 3) donde se observaron tres señales simples, una en δ 174.61 correspondiente al carbonilo de la función

lactona y las otras dos en la zona de los carbonos vinílicos, δ 160.38 y 122.26, por lo que se asignaron a C-7 y C-11, respectivamente.

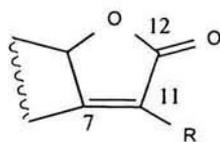
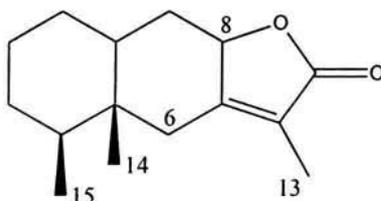
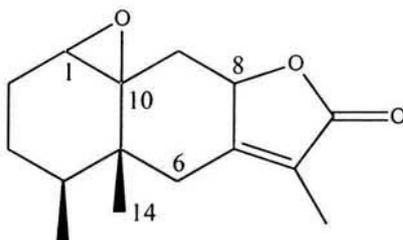


Figura A

En el espectro de RMN ^1H (Espectro 2) se observaron a campo alto tres señales que integraron cada una para tres hidrógenos, un singulete en δ 0.82 asignado al metilo 14, un doblete en δ 0.83 asignado al metilo 15 y un doble de doble en δ 1.85 correspondiente al metilo 13. La multiplicidad de la última señal indicó la existencia de dos acoplamientos que con base en el espectro bidimensional homonuclear COSY (Espectro 4) se identificaron como aquellos entre el metilo 13 y uno de los hidrógenos de C-6 y entre el mismo metilo y H-8.



En el espectro de RMN ^{13}C se observaron tres señales a campo bajo, un doblete en δ 77.43 asignado al carbono del cierre lactónico, un doblete en δ 59.94 y un singulete en δ 63.68 correspondientes a los carbonos 1 y 10, respectivamente. El desplazamiento químico de las dos últimas señales, junto con la correlación observada en el espectro heteronuclear COLOC (Espectro 5) entre el singulete y la señal del metilo 14, así como la presencia en RMN ^1H de un doblete en δ 3.05, $J = 3.51$ Hz (H-1), indicaron la existencia de una función epóxido entre los carbonos C-1 y C-10. Aunado a lo anterior, el peso molecular obtenido por espectrometría de masas de alta resolución (m/z 249.1491, $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_3$) corroboró que el compuesto presentaba tres oxígenos. Dos de ellos participan en la función lactona y el tercero en el grupo epóxido.



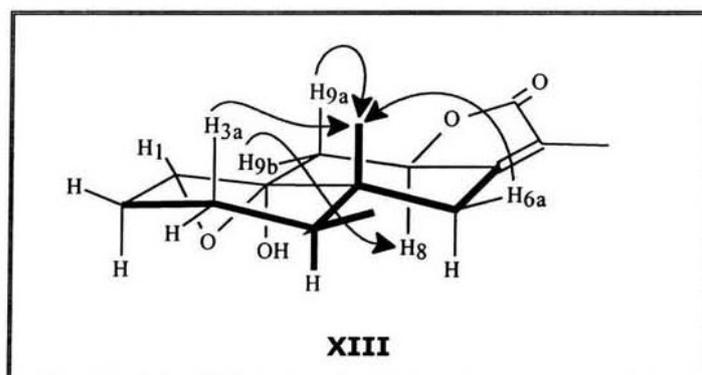
RMN ^1H (CDCl_3), Espectro 2

δ : 3.05, d, $J=3.5$ Hz, H-1; 1.95, m, H-2a; 1.95, m, H-2b; 1.25, m, H-3a; 1.25, m, H-3b; 1.9, m, H-4; 2.76, d, $J=13.5$ Hz, H-6a; 2.21, d ancho, $J=13.8$ Hz, H-6b; 4.91, dd ancho, $J=7.0$ y 10.8 Hz, H-8; 2, m, H-9a; 1.85, dd, $J=7.0$ y 12.6 Hz, H-9b; 1.85, dd, $J=1.5$ y 1.8 Hz, H-13; 0.82, s, H-14; 0.83, d, $J=7.0$ Hz, H-15.

RMN ^{13}C (CDCl_3), Espectro 3

δ : 59.94, d, C-1; 24.87, t, C-2; 22.18, t, C-3; 33.47, d, C-4; 38.83, s, C-5; 34.98, t, C-6; 160.38, s, C-7; 77.43, d, C-8; 38.48, t, C-9; 63.68, s, C-10; 122.26, s, C-11; 174.61, s, C-12; 8.14, c, C-13; 15.22*, c, C-14; 14.93*, c, C-15. *Señales intercambiables.

Con respecto a la estereoquímica, en el espectro NOESY (Espectro 6) se observaron interacciones entre el metilo 14 y los hidrógenos 3a, 6a y 9a. Si se considera que biogenéticamente los metilos 14 y 15 presentan una orientación β , los hidrógenos H-3a, H-6a y H-9a deben de presentar la misma orientación (β). Por lo tanto, la interacción observada entre H-8 y H-9b indicó que ambos hidrógenos se encontraban en la cara α del compuesto.

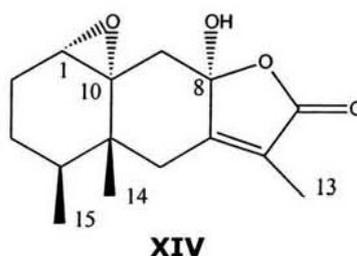


La configuración α propuesta para H-8 también se basó en espectro bidimensional COSY donde se observaron acoplamiento del metilo 13 con H-6 y H-8. Estos acoplamiento solo son posibles cuando la fusión de los anillos A y B del esqueleto de eremofilano es trans, lo que permite un ángulo dihedro cercano a 90° entre el metilo 13 y los hidrógenos H-6b y H-8. Cuando las características de estereoquímica antes mencionadas (fusión trans de anillos A/B, orientación α del grupo unido a C-8) se cumplen, se ha observado que la señal del metilo 15 se localiza a campo más bajo que la señal del metilo 14, además, la rotación específica de los compuestos es negativa (Naya *et al.*, 1975 y 1977). Ya que el compuesto **XIII** presentó la señal del metilo 15 en δ 0.83 y la del metilo 14 en δ 0.82, y una rotación específica negativa ($[\alpha]_D^{27} -193^\circ$), se propuso para esta nueva eremofilanólida la estructura y estereoquímica mostradas en **XIII**.

8-Hidroxi-1(10)-epoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XIV)

El espectro en el IR (Espectro 7) de este compuesto mostró las bandas características de la función γ -lactona α, β insaturada (1765 y 1698 cm^{-1}). El espectro de RMN ^1H (Espectro 8) presentó una gran similitud con el del compuesto **XIII**, siendo prácticamente la única diferencia la ausencia de señal atribuible a H-8. De igual manera, en el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 9) la diferencia principal residió en la señal de C-8 que se observó como un singlete en δ 103.08, lo que junto con el ion molecular (m/z 264) con 16 unidades de masa adicionales a las de **XIII**, indicaron la presencia de un grupo hidroxilo unido a C-8. La función alcohol se corroboró por la banda en 3566 cm^{-1} observada en el espectro en el IR.

Como consecuencia de la cantidad pequeña que se obtuvo de este compuesto, los espectros bidimensionales no se adquirieron, pero basándose en su rotación específica negativa ($[\alpha]_D^{29.5} -149.5^\circ$) y en la gran similitud de sus espectros de RMN ^1H y ^{13}C con los del compuesto **XIII**, se propuso para esta eremofilanolida la estereoquímica mostrada en la siguiente estructura:

**RMN ^1H (CDCl₃ + DMSO-d₆), Espectro 8**

δ : 2.95, d, $J=3.6$ Hz, H-1; 2, m, H-2a; 2, m, H-2b; 1.27, m, H-3a; 1.27, m, H-3b; 1.98, m, H-4; 2.61, d, $J=13.0$ Hz, H-6a; 2.38, d ancho, $J=13.0$ Hz, H-6b; 2.32, d, $J=14.1$ Hz, H-9a; 1.94, d, $J=14.1$ Hz, H-9b; 1.83, d, $J=1.5$ Hz, H-13; 0.81, s, H-14; 0.82, d, $J=6.6$ Hz, H-15.

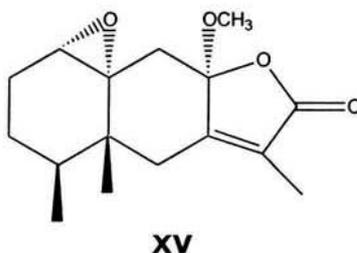
RMN ^{13}C (CDCl₃ + DMSO-d₆), Espectro 9

δ : 57.55, d, C-1; 24.34, t, C-2; 21.31, t, C-3; 32.60, d, C-4; 39.17, s, C-5; 33.12, t, C-6; 158.51, s, C-7; 103.08, s, C-8; 41.90, t, C-9; 62.87, s, C-10; 123.20, s, C-11; 171.99, s, C-12; 7.83, c, C-13; 14.90, c, C-14; 14.26, c, C-15.

8-Metoxi-1(10)-epoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XV)

En el espectro en el IR se observaron las señales características de la función γ -lactona α, β insaturada (1760 y 1694 cm^{-1}). El espectro de RMN ^1H (Espectro 10) presentó una gran similitud con el de **XIV** y la única diferencia significativa fue un singlete en δ 3.2

atribuido a un grupo metoxilo. Ya que la señal de C-8 se observó en δ 105.81 en el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 11), se propuso el grupo metoxilo unido a él.



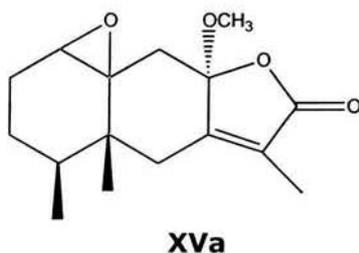
RMN ^1H (CDCl_3), Espectro 10

δ : 2.95, d, $J=3.8$ Hz, H-1; 1.93, m, H-2a; 1.92, m, H-2b; 1.29, m, H-3a; 1.28, m, H-3b; 2.0, m, H-4; 2.65, d, $J=12.9$ Hz, H-6a; 2.23, d, $J=12$ Hz, H-6b; 2.27, d, $J=14.4$ Hz, H-9a; 1.93, d, $J=14.4$ Hz, H-9b; 1.89, d, $J=1.5$ Hz, H-13; 0.81, s, H-14; 0.82, d, $J=6.7$ Hz, H-15; 3.2, s, MeO.

RMN ^{13}C (CDCl_3), Espectro 11

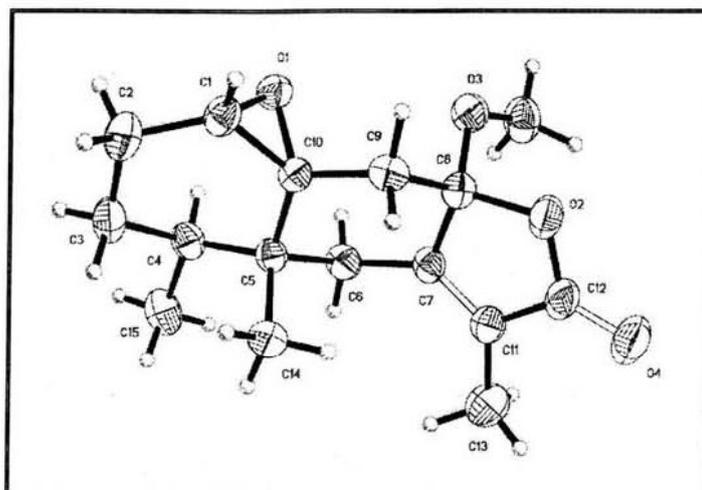
δ : 57.79, d, C-1; 24.63, t, C-2; 21.54, t, C-3; 32.87, d, C-4; 39.90, s, C-5; 33.62, t, C-6; 157.04, s, C-7; 105.81, s, C-8; 40.78, t, C-9; 62.75, s, C-10; 126.20, s, C-11; 171.56, s, C-12; 8.24, c, C-13; 15.18, c, C-14; 14.63, c, C-15; 50.58, c, MeO.

Por otro lado, los datos físicos y espectroscópicos de **XV** concordaron con los descritos para la eremofilanólida **XVa**, aislada de *Senecio gallicus* (Urones *et al.*, 1987) y de la que solo se propuso la estereoquímica de un estereocentro (C-8).



Una estructura idéntica a **XV** se propuso para otra lactona aislada de *Senecio flavus* (Torres *et al.*, 1999), sin embargo, las características físicas y espectroscópicas de la eremofilanólida descrita en este trabajo, no concordaron con las reportadas en aquel estudio.

En virtud de lo anterior, un monocristal de **XV** se analizó por difracción de rayos-X confirmándose así la estereoquímica propuesta en esta tesis.



Por lo tanto, la estructura de la lactona aislada de *Senecio gallicus* se debe de representar como **XV** y por consiguiente, la estereoquímica propuesta para la lactona aislada de *Senecio flavus* es errónea.

10-Hidroxi-1,8-dimetoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (**XVI**)

En su espectro de RMN ^1H (Espectro 12) adicional a las señales correspondientes a los tres metilos del esqueleto de eremofilano (δ 1.87, H-13; 0.78, H-14; 0.82, H-15), se observaron dos singuletes en δ 3.15 y 3.24 que se asignaron a dos grupos metoxilo. Las señales de los carbonos de estos grupos se observaron en el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 13) como cuartetos en δ 50.10 y 57.27. En el espectro de resonancia protónica no se observó ninguna señal que indicara la presencia de H-8, mientras que en el espectro de RMN ^{13}C la señal de C-8 se observó como un singulete en δ 106.20. Lo anterior llevó a proponer un grupo metoxilo unido a C-8.

RMN ^1H (CDCl_3), Espectro 12

δ : 3.08, t, $J=2.6$ Hz, H-1; 1.87, dddd, $J=3.2, 5.3, 14.3$ y 13.5 Hz, H-2a; 1.75, dddd, $J=2.3, 2.3, 4.1$ y 14.1 Hz, H-2b; 1.40, dddd, $J=4.8, 13.5, 13.5$ y 13.5 Hz, H-3a; 1.29, m, H-3b; 2.15, m, H-4; 2.40, d, $J=12.9$ Hz, H-6a; 2.24, d, $J=13.7$ Hz, H-6b; 2.46, d, $J=14.3$ Hz, H-9a; 2.05, d, $J=14.4$ Hz, H-9b; 1.87, d, $J=1.5$ Hz, H-13; 0.78, s, H-14; 0.82, d, $J=7.0$ Hz, H-15; 3.23, s, MeO; 3.15, s, MeO.

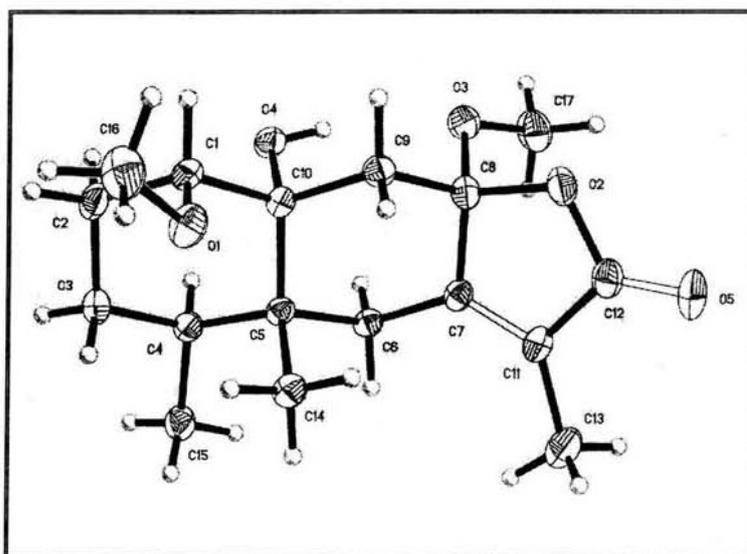
RMN ^{13}C (CDCl_3), Espectro 13

δ : 84.57, d, C-1; 22.89, t, C-2; 25.65, t, C-3; 34.58, d, C-4; 45.10, s, C-5; 33.61, t, C-6; 156.99, s, C-7; 106.20, s, C-8; 41.82, t, C-9; 73.90, s, C-10; 126.40, s, C-11; 171.27, s, C-12; 8.31, c, C-13; 14.14, c, C-14; 15.27, c, C-15; 57.27, c, MeO; 50.10, c, MeO.

Como la señal de H-1 se observó como un triplete con constante de acoplamiento de 2.64 Hz, se propuso su orientación ecuatorial, dando lugar así a una interacción ecuatorial-ecuatorial y a otra ecuatorial-axial con los hidrógenos del metileno de C-2. En el mismo espectro de RMN ^1H , la señal del metilo 14 (δ 0.78), se observó a campo alto con respecto a la del metilo 15 (δ 0.82), y como la rotación específica de esta eremofilanólida fue negativa ($[\alpha]_D^{28.5} -130.5^\circ$), se propuso una fusión de anillos A/B trans.

Por otro lado, las señales de los carbonos 1 y 10 se localizaron en δ 84.57 y 73.9, respectivamente, lo que junto con lo mencionado en el párrafo anterior, indujo a proponer al segundo grupo metoxilo (o grupo hidroxilo) unido a C-1 con una orientación β_a , y a un grupo hidroxilo (o grupo metoxilo) unido a C-10 con orientación α_a .

Con el objeto de corroborar la estructura propuesta, se llevó a cabo un análisis de difracción de rayos-X de un monocristal de **XVI**. El resultado confirmó tanto la estructura como la estereoquímica relativa propuesta para esta nueva eremofilanólida.



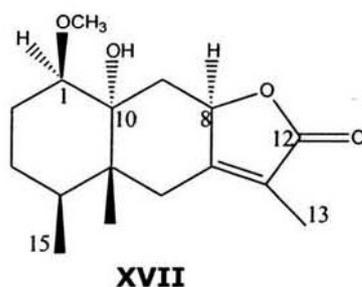
10-Hidroxi-1-metoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XVII)

La eremofilanólida **XVII** al igual que los compuestos anteriores presentó en su espectro en el IR (Espectro 14) bandas características de la función γ -lactona α, β insaturada (1740 y 1682 cm^{-1}). La presencia de esta función se corroboró en su espectro de RMN ^{13}C (Espectro 16) que mostró tres señales simples en δ 161.92, 121.49 y 175.26 asignados a C-7, C-11 y C-12 respectivamente.

En el espectro de RMN ^1H (Espectro 15) H-8 se observó como un triplete ancho en δ 5.07 ($J= 9.1\text{ Hz}$) y las señales de los metilos del esqueleto de eremofilano se observaron en δ 1.81, H-13; 0.80, H-14 y 0.87, H-15. En el mismo espectro se observó un singulete en δ

3.26 que se asignó a un grupo metoxilo, cuya presencia se comprobó por el cuarteto en δ 57.63 observado en el espectro de RMN ^{13}C . Los desplazamientos químicos de las señales de C-1 (δ 85.23) y C-10 (δ 75.85) indujeron a proponer que dichos carbonos se encontraban unidos a funciones oxigenadas diferentes a epóxido. Como la señal de H-1 se observó como un triplete en δ 3.07, se propuso unido a este carbono el grupo metoxilo, y por consiguiente, un grupo hidroxilo unido a C-10. La presencia de estos dos grupos concordó con el ion molecular (m/z 281.1753, $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{O}_4$) obtenido por espectrometría de masas de alta resolución.

Debido a la cantidad pequeña aislada de este compuesto no fue posible obtener los espectros bidimensionales, así que su estructura y estereoquímica relativa se propusieron con base a la similitud de sus espectros de RMN ^1H y ^{13}C con los del compuesto **XVI**.



RMN ^1H (CDCl_3), Espectro 15

δ : 3.07, t, $J=2.0$ Hz, H-1; 2.1, m, H-2a; 1.82, m, H-2b; 1.47, m, H-3a; 1.30, m, H-3b; 1.94, m, H-4; 2.46, d, $J=13.2$ Hz, H-6a; 2.39, d, $J=13.5$ Hz, H-6b; 5.07, dd, $J=8.8$ y 9.1 Hz, H-8; 2.11, dd, $J=7.6$ y 13.2 Hz, H-9a; 2.06, dd, $J=10.3$ y 13.2 Hz, H-9b; 1.81, s ancho, H-13; 0.80, s, H-14; 0.87, d, $J=6.8$ Hz, H-15; 3.26, s, MeO.

RMN ^{13}C (CDCl_3), Espectro 16

δ : 85.23, d, C-1; 23.37, t, C-2; 25.48, t, C-3; 35.39, d, C-4; 43.07, s, C-5; 34.81, t, C-6; 161.92, s, C-7; 79.19, d, C-8; 40.07, t, C-9; 75.85, s, C-10; 121.49, s, C-11; 175.26, s, C-12; 8.12, c, C-13; 14.27, c, C-14; 15.47, c, C-15; 57.63, c, MeO.

8,10-Dihidroxi-1-metoxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XVIII)

El compuesto **XVIII** presentó espectros de RMN ^1H (Espectro 17) y ^{13}C (Espectro 18) muy similares a los del compuesto **XVI**. Los espectros de **XVIII** mostraron la presencia un solo grupo metoxilo (δ_{H} 3.24, δ_{C} 57.36) y su posición se dedujo del espectro bidimensional COLOC (Espectro 19) que mostró la correlación de H-1 con el carbono del grupo metoxilo. El

desplazamiento de la señal de C-8 (δ 103.66) en el espectro de RMN ^{13}C sugirió que este carbono se encontraba unido a un alcohol.

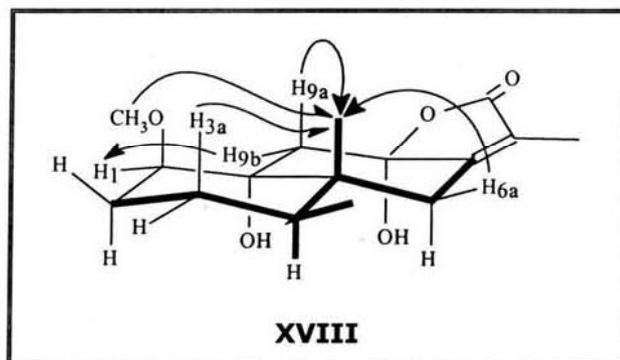
RMN ^1H (CDCl_3), Espectro 17

δ : 3.10, dd, $J=2.3$ y 2.6 Hz, H-1; 1.88, dddd, $J=3.2, 5.3, 14.4$ y 14.6 Hz, H-2a; 1.79, m, H-2b; 1.41, dddd, $J=5.0, 13.5, 13.5$ y 13.5 Hz, H-3a; 1.27, m, H-3b; 2.11, m, H-4; 2.40, s ancho, H-6a y H-6b; 2.48, d, $J=14.4$ Hz, H-9a; 2.05, d, $J=14.4$ Hz, H-9b; 1.79, s, H-13; 0.77, s, H-14; 0.84, d, $J=6.7$ Hz, H-15; 3.24, s, MeO.

RMN ^{13}C (CDCl_3), Espectro 18

δ : 84.37, d, C-1; 22.93, t, C-2; 25.56, t, C-3; 34.65, d, C-4; 44.90, s, C-5; 33.37, t, C-6; 159.84, s, C-7; 103.66, s, C-8; 41.75, t, C-9; 74.55, s, C-10; 123.46, s, C-11; 172.67, s, C-12; 8.05, c, C-13; 14.13, c, C-14; 15.30, c, C-15; 57.36, c, MeO.

Basándose en lo anterior se propuso para **XVIII** la estructura mostrada en la siguiente figura y que concuerda con los efectos NOE observados en el espectro bidimensional NOESY (Espectro 20).



1,10-Dihidroxi-remofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XIX)

El compuesto **XIX** al igual que el compuesto **XVII** presentó en su espectro de RMN ^1H (Espectro 21) un triplete ancho en δ 5.1 atribuido al hidrógeno del cierre lactónico (H-8), cuyo carbono dio lugar a un doblete en δ 79.35 en la resonancia de ^{13}C (Espectro 22).

La fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}_4$, obtenida por espectrometría de masas de alta resolución, indicó la presencia de cuatro átomos de oxígeno en la molécula. De éstos, dos deben participar en la función lactona y los otros en dos funciones alcohol.

El espectro en el IR mostró una banda en 3614 cm^{-1} que corroboró la función alcohol. En el espectro de RMN ^1H se observó la señal de H-1 en δ 3.67 que junto con la señal observada en RMN ^{13}C en δ 75.65 (C-1 y C-10), indujeron a proponer los carbonos 1 y 10 unidos cada uno a un grupo hidroxilo.

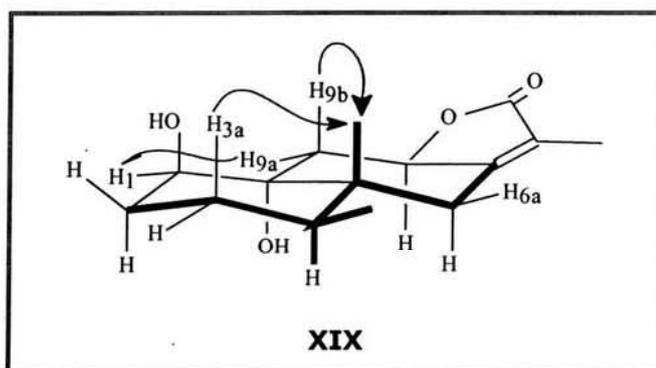
RMN ^1H (CDCl_3), Espectro 21

δ : 3.67, dd, $J=2.3$ y 2.6 Hz, H-1; 2.08, m, H-2a; 1.66, m, H-2b; 1.60, dddd, $J=4.1$, 13.5, 13.5 y 13.5, H-3a; 1.34, m, H-3b; 2.01, m, H-4; 2.46, s ancho, H-6a y H-6b; 5.1, dd, $J=8.2$ y 9.7 Hz, H-8; 2.19, dd, $J=7.3$ y 12.9 Hz, H-9a; 2.04, dd, $J=10.8$ y 12.9 Hz, H-9b; 1.81, d, $J=1.5$ Hz, H-13; 0.88, s, H-14; 0.89, d, $J=6.7$ Hz, H-15.

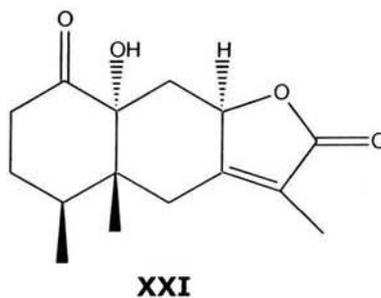
RMN ^{13}C (CDCl_3), Espectro 22

δ : 75.64, d, C-1; 29.07, t, C-2; 25.25, t, C-3; 35.27, d, C-4; 42.92, s, C-5; 35.04, t, C-6; 162.23, s, C-7; 79.35, d, C-8; 39.92, t, C-9; 75.64, s, C-10; 121.45, s, C-11; 175.49, s, C-12; 8.09, c, C-13; 15.48, c, C-14; 14.60, c, C-15.

La fusión trans de los anillos A y B, y la orientación α de H-8, se propusieron a partir de sus espectros de RMN ^1H y ^{13}C , de los efectos NOE observados en el espectro bidimensional NOESY y de la rotación específica negativa de este compuesto.



La presencia del alcohol secundario se comprobó al obtener el derivado **XXI**, mismo que dio lugar a un singulete en δ 211.54 en el espectro de RMN ^{13}C , asignado al carbono del grupo ceto.



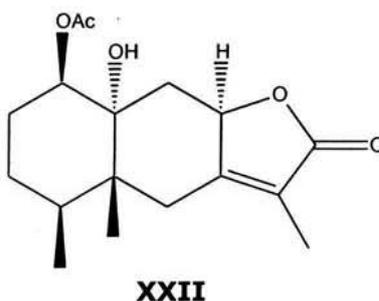
RMN ¹H (CDCl₃)

δ: 3.16, ddd, J=7.6, 13.5 y 13.5 Hz, H-2a; 2.17, ddd, J=1.5, 5.3 y 13.8 Hz, H-2b; 1.85, dddd, J=1.7, 4.1, 7.6 y 13.8 Hz, H-3a; 1.53, dddd, J=5.2, 13.8, 13.5 y 13.5 Hz, H-3b; 2.64, m, H-4; 2.55, s ancho, H-6a y H-6b; 5.03, dd, J=7.9 y 10.3 Hz, H-8; 2.52, dd, J=7.0 y 13.8 Hz, H-9a; 1.70, dd, J=11.4 y 13.8 Hz, H-9b; 1.80, s ancho, H-13; 0.54, s, H-14; 0.92, d, J=7.0 Hz, H-15.

RMN ¹³C (CDCl₃)

δ: 211.54, s, C-1; 36.51, t, C-2; 30.54, t, C-3; 33.59, d, C-4; 46.39, s, C-5; 33.05, t, C-6; 160.82, s, C-7; 79.02, d, C-8; 35.58, t, C-9; 79.46, s, C-10; 122.08, s, C-11; 175.31, s, C-12; 8.05, c, C-13; 12.73, c, C-14; 14.50, c, C-15.

La orientación β del alcohol en C-1 y la orientación α de H-8 se comprobaron a través del análisis del espectro bidimensional NOESY del derivado acetilado **XXII**. El espectro mostró efectos NOE del metilo 14 con el grupo acetilo y el hidrógeno 9β y entre H-8 y H-9α.

**RMN ¹H** (CDCl₃)

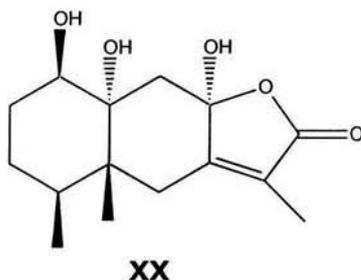
δ: 4.82, dd, J=2.6 y 2.9 Hz, H-1; 2.09, m, H-2a; 1.66, dddd, J= 2.3, 2.3, 4.4 y 14.9 Hz, H-2b; 1.44, dddd, J=4.1, 13.77, 13.8 y 13.8 Hz, H-3a; 1.38, m, H-3b; 2.09, m, H-4; 2.50, s ancho, H-6a y H-6b; 5.03, dd, J=7.3 y 9.1 Hz, H-8; 2.17, dd, J=7.6 y 12.9 Hz, H-9a; 1.77, dd, J=10.8 y 12.9 Hz, H-9b; 1.81, d, J=1.7 Hz, H-13; 0.86, s, H-14; 0.90, d, J=6.7 Hz, H-15; 2.03, s, AcO.

RMN ¹³C (CDCl₃)

δ: 75.91, d, C-1; 25.60, t, C-2; 25.74, t, C-3; 34.63, d, C-4; 43.02, s, C-5; 34.69, t, C-6; 161.65, s, C-7; 78.83, d, C-8; 39.45, t, C-9; 74.60, s, C-10; 121.63, s, C-11; 175.18, s, C-12; 8.09, c, C-13; 14.34, c, C-14; 15.40, c, C-15; 170.06, s y 21.22, c, AcO.

1,8,10-Trihidroxieremofil-7(11)-en-8(12)-ólida (XX)

La diferencia estructural entre este compuesto y la eremofilanólida **XIX** se hizo evidente en el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 24) de **XX**. El espectro mostró la señal de C-8 como un singlete en δ 105.22 lo que indicó la naturaleza hemiacetálica de dicho carbono. El peso molecular (m/z 283.1548 $[\text{M} + \text{H}]^+$) obtenido por espectrometría de masas de alta resolución presentó 16 unidades de masa adicionales con respecto al peso de **XIX**, confirmando así lo anterior.

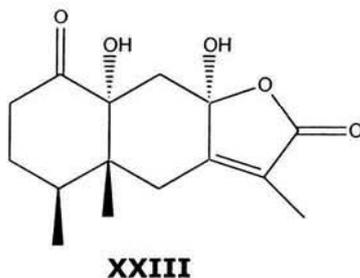
**RMN ^1H (CD $_3$ OD), Espectro 23**

δ : 3.53, dd, $J=2.4$ y 2.9 Hz, H-1; 2.15, m, H-2a; 1.51, m, H-2b; 1.58, m, H-3a; 1.28, m, H-3b; 2.15, m, H-4; 2.48, d, $J=13.2$ Hz, H-6a; 2.41, d, $J=13.2$ Hz, H-6b; 2.38, d, $J=13.8$ Hz, H-9a; 1.95, d, $J=14.1$ Hz, H-9b; 1.80, d, $J=1.2$ Hz, H-13; 0.87, s, H-14; 0.87, d, $J=6.7$ Hz, H-15.

RMN ^{13}C (CD $_3$ OD), Espectro 24

δ : 75.85, d, C-1; 29.55, t, C-2; 26.98, t, C-3; 36.07, d, C-4; 46.07, s, C-5; 34.64, t, C-6; 161.46, s, C-7; 105.22, s, C-8; 43.12, t, C-9; 75.64, s, C-10; 124.41, s, C-11; 174.17, s, C-12; 8.25, c, C-13; 15.01, c, C-14; 15.90, c, C-15.

La posición del alcohol secundario se corroboró al obtener el derivado oxidado **XXIII**. Su espectro bidimensional COLOC mostró una correlación entre el carbono del carbonilo (C-1) y los hidrógenos de C-3.



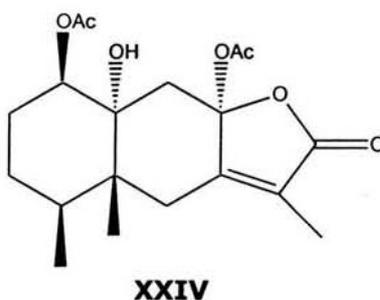
RMN ^1H (CD_3OD)

δ : 3.13, ddd, $J=7.6$, 13.5 y 13.5 Hz, H-2a; 2.09, ddd, $J=1.7$, 5.3 y 13.5 Hz, H-2b; 1.52, dddd, $J=1.8$, 5.3, 7.6 y 12.0 Hz, H-3a; 1.52, dddd, $J=5.3$, 13.5, 13.5 y 13.5 Hz, H-3b; 2.67, m, H-4; 2.60, d, $J=14.6$ Hz, H-6a; 2.5, d, $J=13.2$ Hz, H-6b; 2.18, d, $J=14.6$ Hz, H-9a; 2.04, d, $J=14.7$ Hz, H-9b; 1.81, d, $J=1.2$ Hz, H-13; 0.54, s, H-14; 0.94, d, $J=7.0$ Hz, H-15.

RMN ^{13}C (CD_3OD)

δ : 212.10, s, C-1; 37.49, t, C-2; 31.76, t, C-3; 34.83, d, C-4; 48.97, s, C-5; 32.45, t, C-6; 159.65, s, C-7; 104.67, s, C-8; 39.21, t, C-9; 79.99, s, C-10; 125.39, s, C-11; 173.70, s, C-12; 8.26, c, C-13; 12.86, c, C-14; 14.83, c, C-15.

La formación del derivado diacetilado **XXIV** confirmó la existencia del alcohol secundario y del alcohol hemiacetalico en la eremofilanólida **XX**.

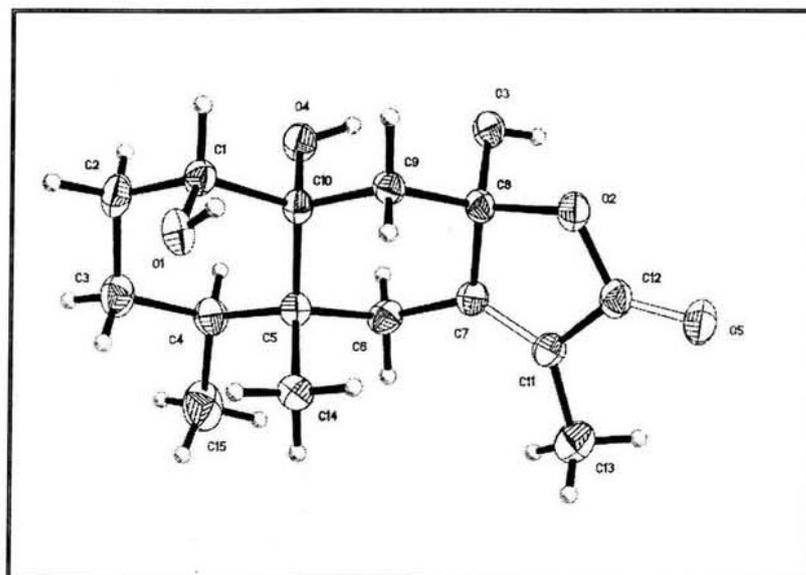
**RMN ^1H** (CDCl_3)

δ : 4.76, dd, $J=2.6$ y 3.2 Hz, H-1; 2.12, m, H-2a; 1.64, dddd, $J=2.3$, 2.3, 4.1 y 14.6 Hz, H-2b; 1.40, dddd, $J=4.4$, 13.8, 13.8 y 13.8 Hz, H-3a; 1.40, m, H-3b; 2.19, m, H-4; 2.49, d, $J=13.2$ Hz, H-6a; 2.44, d, $J=14.1$ Hz, H-6b; 2.37, d, $J=14.1$ Hz, H-9a; 2.12, d, $J=14.9$ Hz, H-9b; 1.88, s, H-13; 0.85, s, H-14; 0.88, d, $J=6.7$ Hz, H-15; 2.06, s, AcO; 2.03, s, AcO.

RMN ^{13}C (CDCl_3)

δ : 73.48, d, C-1; 25.42, t, C-2; 25.58, t, C-3; 33.98, d, C-4; 44.53, s, C-5; 33.19, t, C-6; 155.24, s, C-7; 104.34, s, C-8; 41.95, t, C-9; 75.39, s, C-10; 126.31, s, C-11; 170.92, s, C-12; 8.41, c, C-13; 14.26, c, C-14; 15.21, c, C-15; 21.92, c, AcO; 21.24, c, AcO; 167.42, s, AcO; 169.73, s, AcO.

La estereoquímica relativa propuesta para **XX** se corroboró a través del análisis de difracción de rayos-X de un monocristal.



EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA**Actividad antioxidante (DPPH)**

	Muestra	Concentración ppm	% de reducción del DPPH	IC ₅₀ ppm
<i>S. flaccidus</i>	DPPH	100*		369.87 ± 25.26
	Extracto no alcaloideo	100	16.96 ± 0.84	
		177.82	27.28 ± 1.65	
		316.22	45.18 ± 2.24	
		562.34	64.93 ± 2.39	
	Extracto metanólico,	1000	79.56 ± 2.49	
		31.62	7.65 ± 0.38	160.41 ± 1.62
		56.23	16.41 ± 0.72	
		100	28.86 ± 0.53	
	177.82	51.58 ± 0.92		
<i>S. mairetianus</i> (parte aérea)	Extracto metanólico	316.22	84.52 ± 0.37	68.48 ± 2.42
		17.78	11.61 ± 1.12	
		31.62	20.61 ± 1.53	
		56.23	36.22 ± 1.90	
		100	67.89 ± 2.08	
	α -tocoferol	177.83	90.59 ± 0.39	11.37 ± 0.67
		5.75	25.37 ± 1.72	
		7.66	29.52 ± 2.53	
		10.21	41.86 ± 3.23	
		13.62	53.86 ± 3.86	
		18.16	72.43 ± 5.26	
		24.22	87.94 ± 2.99	
		31.93	94.74 ± 0.28	
43.07	95.04 ± 0.25			

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett; los valores $p \leq 0.01$ se consideraron como diferencia significativa con respecto al control. * μ M

Inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata del extracto metanólico de *S. mairetianus* (parte aérea)

Tratamiento	TBARS (nmol/mg proteína)	% inhibición	IC ₅₀ ppm
Basal	0.92 ± 0.13		
FeSO ₄ (10 μ M)	8.34 ± 0.46		
Extracto (ppm)			90.91 ± 8.15
31.62	7.41 ± 0.25	10.68 ± 3.25	
56.23	5.94 ± 0.27*	28.61 ± 1.57*	
100	3.62 ± 0.47*	56.49 ± 5.03*	
177.83	1.43 ± 0.65*	84 ± 6.89*	
316.23	1.05 ± 0.47*	88.26 ± 4.99*	
Quercetina (ppm)			1.39 ± 0.09
1	8.33 ± 0.33	11.70 ± 2.14	
1.78	7.64 ± 0.47**	19.29 ± 3.32**	
3.16	6.21 ± 0.24**	34.16 ± 3.05**	
5.62	3.20 ± 0.55**	66.05 ± 5.62**	
10	1.27 ± 0.29**	86.61 ± 2.92**	
BHT			2.83 ± 0.14
2.20	5.86 ± 0.78**	23.98 ± 6.41**	
2.94	3.90 ± 0.71**	54.99 ± 7.25**	
3.92	1.09 ± 0.21**	82.15 ± 6.98**	
5.22	0.79 ± 0.18**	90.27 ± 2.51**	
6.97	8.74 ± 0.39**	91.56 ± 1.93**	

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett; los valores con $p \leq 0.01$ (*) y $p \leq 0.05$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

Actividad citotóxica

Muestra (100 µg/ml)	U251*	PC-3*	K562*	HCT-15*	MCF-7*
Extracto no alcaloideo de <i>S. flaccidus</i>	52.58	27.51	80.3	SA	11.07
Extracto metanólico de <i>S. flaccidus</i>	SA	SA	SA	SA	SA
Extracto metanólico de <i>S. mairetianus</i> (parte aérea)	49.08	46.76	32.02	24.38	31.99

*Porcentaje de inhibición del crecimiento (%IC)

Actividad antiinflamatoria

Muestra (1 mg/oreja)	Vehículo	% de inhibición
Indometacina	EtOH:Me ₂ CO (1:1)	70.51*
Extracto no alcaloideo de <i>S. flaccidus</i>	EtOH:Me ₂ CO (1:1)	40.36**
Extracto metanólico de <i>S. flaccidus</i>	MeOH	26.02**
Extracto metanólico de <i>S. mairetianus</i> (parte aérea)	MeOH	33.46**

Los datos se analizaron mediante una prueba t de Student, los valores con $P \leq 0.01$ (*) y $P \leq 0.05$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

En las pruebas de actividad antioxidante se utilizó como control positivo α -tocoferol que es considerado un buen atrapador del radical libre DPPH (Burda *et al.*, 2001). Los resultados mostrados en la primera tabla indican que solo el extracto metanólico de *S. mairetianus* presentó actividad antioxidante aunque moderada. Considerando este resultado, se decidió evaluar su capacidad de inhibir la peroxidación de lípidos. Los resultados de la segunda tabla señalan que la actividad de este extracto es menor a las actividades mostradas por los controles positivos, quercetina y BHT. Se evaluó también la actividad antioxidante frente al radical DPPH de las eremofilanólidas **XIII**, **XIX** y **XX** pero se obtuvieron resultados negativos.

En cuanto a la evaluación de la actividad antiinflamatoria, ninguno de los extractos presentó inhibición apreciable de la inflamación inducida en oreja de ratón con TPA.

Aunque las especies estudiadas (*S. flaccidus* y *S. mairetianus*) contienen alcaloides pirrolizidínicos tóxicos como lo son senecionina, integerrimina, retrorsina y usaramina, los extractos no presentaron actividad citotóxica apreciable, lo que puede ser consecuencia de que las células empleadas en las evaluaciones no tienen la capacidad metabólica de transformar a los APs a sus metabolitos tóxicos.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

- De *S. flaccidus* se aislaron dos mezclas de alcaloides, una conformada por seneccionina e intergerrimina, y la otra por retrorsina y usaramina. Se aisló también (-)-10-hidroxi-4-oplopanona, compuesto que pertenece a la familia de los oplopanos poco frecuentes en el género *Senecio*.
- El extracto no alcaloideo y el extracto metanólico de *S. flaccidus* no mostraron actividad apreciable en ninguna de las pruebas biológicas en las que se evaluaron.
- De *S. mairetianus* se aislaron ocho eremofilanólidas de las cuales siete correspondieron a nuevos metabolitos (**XIII, XIV, XVI-XX**).
- El extracto metanólico de la parte aérea de *S. mairetianus* presentó actividad antioxidante moderada frente al radical libre DPPH y en el modelo de inhibición de la lipoperoxidación inducida con FeSO₄ en homogenizado de cerebro de rata.
- La estructura de los nuevos metabolitos se determinó por el análisis de sus datos espectroscópicos en el IR y UV, así como de los espectros de: EM, RMN ¹H y RMN ¹³C, mono y bidimensionales como COSY, HETCOR, COLOC y NOESY.
- La comprobación de las estructuras se llevó a cabo por transformaciones químicas y por el análisis de difracción de rayos-X de monocristales de algunos de los nuevos metabolitos.
- La eremofilanólida **XV**, aislada previamente de *S. gallicus*, contaba sólo con la propuesta de la configuración de un estereocentro. En el presente trabajo se estableció la estereoquímica relativa total de este sesquiterpeno.
- El perfil químico de *S. flaccidus* y *S. mairetianus* fue análogo con el de otras especies de *Senecio* descritas previamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Anaya A. L.; Hernández-Bautista B. E.; Torres-Barragán A.; León-Cantero J.; Jiménez-Estrada M. Phytotoxicity of cacalol and some derivatives obtained from the roots of *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob & Brettell (Asteraceae), Matarique or Maturin. *J. Chem. Ecol.* 1996, 22, 393-403.
- Barkley T. M. A geo-historical perspective on the distribution and variation in *Senecio* s. l. (Asteraceae, Senecioneae) in México and C. America. *Pl. Syst. Evol.* 1990, Suppl 4, 113-119.
- Bohlmann F.; Koll K.-H. Zwei neue eremophilan-derivate aus *Senecio suaveolens*. *Liebigs Ann. Chem.* 1979, 470-472.
- Bohlmann F.; Zdero C.; Jakupovic J.; Misra L. N.; Banerjee S.; Singh P.; Baruah R. N.; Metwally M. A.; Schmeda-Hirschmann G.; Vincent L. P. D.; King R. M.; Robinson H. Eremophilane derivatives and other constituents from *Senecio* species. *Phytochemistry* 1985, 24, 1249-1261.
- Bohlmann F.; Ziesche J. Eremophilane derivatives from *Senecio* especies. *Phytochemistry* 1980, 19, 2681-2684.
- Burda S.; Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 2774-2779.
- Calderón R. G.; Rzedowski J. Flora fanerogámica del Valle de México. Segunda edición. Ed. Conabio. Instituto de Ecología A. C. D.F., 2001.
- Callaway J. K.; Beart P. M.; Jarrott B. A reliable procedure for comparison of antioxidants in rat brain homogenates. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 1998, 39, 155-162.
- D'Agostino M.; De Feo V.; De Simone F.; Pizza C. Three chalcones from *Senecio pseudotites*. *Phytochemistry* 1991, 30, 2440-2441.
- De Tommasi N.; Rastrelli L.; Lauro M. R.; Aquino R. Polyhidroxylated triterpenes from *Senecio pseudotites*. *Phytochemistry* 1998, 49, 1123-1125.
- Devlin J.; Robins D. Pyrrolizidine alkaloids. Biosynthesis of tricothecic acid. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1984, 1329-1332.
- Dewick P. M. Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach. Ed. John Wiley & Sons. Chichester, 1997.
- Fernández J.; Pérez-Alvarez J. A.; Fernández-López J. A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem.* 1997, 59, 345-353.

- Garduño-Ramírez M. L.; Trejo A.; Navarro V.; Bye R.; Linares E.; Delgado G. New modified eremophilanes from the roots of *Psacalium radulifolium*. *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 432-435.
- Hartmann T.; Ober D. Biosyntheses and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. Topics in current chemistry. Ed. Springer-verlag. Berlin. 2000, vol. 209.
- Hartmann T.; Witte L. Chemistry, biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids. En Alkaloids: Chemical and biological perspectives. Pelletier S. W. 1era edición. Ed. Pergamon. Gran Bretaña, 1995, vol. 9, capítulo 4, 155-195.
- Hirs C. H. W.; Timasheff S. N. *Methods in enzymology*. Peterson G. L. Determination of total protein. Ed. Academic. Orlando, 1983, vol. 91, 107-108.
- Inman W. D.; Luo J.; Jolad S. D.; King S. R.; Cooper R. Antihyperglycemic sesquiterpenes from *Psacalium decompositum*. *J. Nat. Prod.* 1999, 62, 1088-1092.
- Jiménez E. M.; Cruz L. R.; Valdés M. J.; León C. J. R.; Alarcón G.; Sueshtarova P. B. Actividad antimicrobiana del cacalol y sus derivados. *Rev. Latinoamer. Quím.* 1992, 23, 14-17.
- Johnson E. A.; Molyneux R. J.; Merrill G. B. Chemistry of toxic range plants. Variation in pyrrolizidine alkaloid content of *Senecio*, *Amsinckia*, and *Crotalaria* species. *J. Agric. Food Chem.* 1985, 33, 50-55.
- Joseph-Nathan P.; Villagómez J. R.; Román L. U. y Hernández J. D. Oplopanes from the leaves of *Senecio mexicanus*. *Phytochemistry* 1990, 29, 977-979.
- Lichtenthaler H. K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosyntheses in plants. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.* 1999, 50, 47-65.
- Liddell J. R. Pyrrolizidine alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 2001, 18, 441-547.
- Liu F. y Ng T. B. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Sciences* 2000, 66, 725-735.
- Logie C. G.; Grue M. R.; Liddell J. R. Proton NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry* 1994, 37, 43-109.
- Mata E. Curso teórico de farmacognosia. Segunda versión. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F., 2000.
- Mattocks A. R. Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. 1era edición. Ed. Academic Press. Orlando, 1986.
- McVaugh R. Flora Novo-Galiciana. A descriptive account of the vascular plants of western México, 1984, vol. 12, 820.

- Molyneux R. J.; Johnson A.; Roitman J. N.; Benson M. E. Chemistry of toxic range plants. Determination of pyrrolizidine alkaloid content and composition in *Senecio* species by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Agric. Food. Chem.* 1979, 27, 494-499.
- Pérez-Castorena A. L.; Arciniegas A.; Ramírez A. 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 Medica* 2002, 68, 645-647.
- Reina M.; González-Coloma A.; Gutiérrez C.; Cabrera R.; Rodríguez M. L.; Fajardo V.; Villarroel L. Defensive chemistry of *Senecio miser*. *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 6-11.
- Reina M.; Nold M.; Santana O.; Orihuela J. C.; González-Coloma A. C-5-Substituted antifeedant silphinene sesquiterpenes from *Senecio palmensis*. *J. Nat. Prod.* 2002, 65, 448-453.
- Robins D. J. Biosynthesis of pyrrolizidine and quinolizidine alkaloids. Cordell G. The alkaloids. Chemistry and pharmacology. Ed. Academic Press. E.U.A, 1995, vol. 46, 3-36.
- Roeder E. Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids. *Current Org. Chem.* 1999, 3, 557-576.
- Roeder E. Carbon-13 NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry* 1990, 29, 11-29.
- Roeder E. Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. *Pharmazie* 1995, 50, 83-98.
- Skehan P.; Storeng R.; Monks A.; McMahon J.; Vistica D.; Warren Jonathan T.; Bokesch H.; Kenney S.; Boyd M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Nat. Cancer Inst.* 1990, 28, 1107-1112.
- Stewart M. J.; Steenkamp V. Pyrrolizidine poisoning: A neglected area in human toxicology. *The Drug Monit.* 2001, 23, 698-708.
- Takeda K.; Minato H.; Ishikawa M. Studies on sesquiterpenoids-XII. Structure and absolute configuration of oplopanone, a new sesquiterpene from *Oplopanax japonicus* (Nakai) Nakai. *Tetrahedron, Supplement* 1966, 219-225.
- Tallarida J. R. y Murria B. R. *Manual of pharmacologic calculations with computer programs*. Segunda edición. Ed. Springer-Verlag. New York, 1981, 14-19.
- Torres P.; Ayala J.; Grande C.; Anaya J.; Grande M. Furanoeremophilane derivatives from *Senecio flavus*. *Phytochemistry* 1999, 52, 1507-1513.
- Urones J. G.; Teresa J. P.; Marcos I. M.; Fernández M. R. y Basabe B. P.; Cuadrado M. J. S. Acetophenones and terpenoids from *Senecio gallicus*. *Phytochemistry* 1987, 26, 1113-1115.

Villarroel V. L.; Torres R.; Urzúa A.; Modak B.; Henriquez J.; Salgado I. Secondary Metabolites from genus *Senecio* and *Heliotropium*. *Rev. Latinoamer. Quím.* 1997, 25, 3, 109-116.

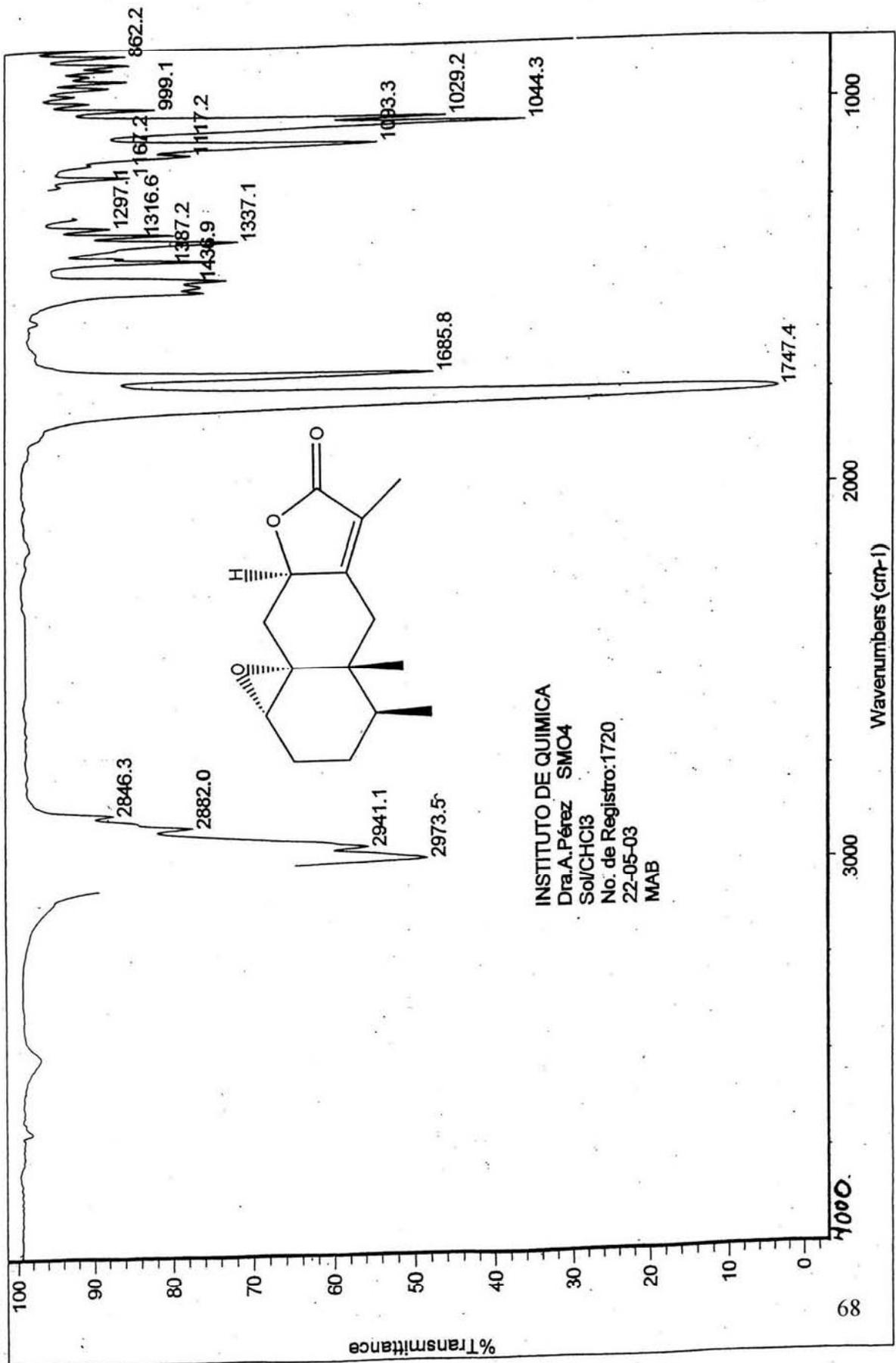
Villaseñor J. L. La familia Asteraceae en México. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 1993, Vol. Esp. (XLIV), 117-124.



Instituto de Química, UNAM

Laboratorio de Infrarrojo

Espectro 1



INSTITUTO DE QUIMICA

Dra. A. Pérez SMO4

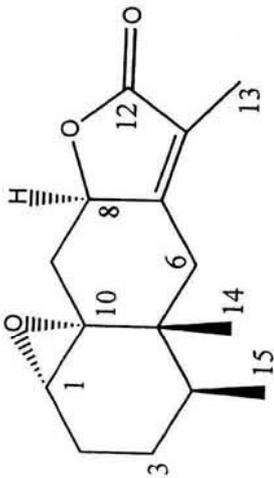
Sol/CHCl3

No. de Registro: 1720

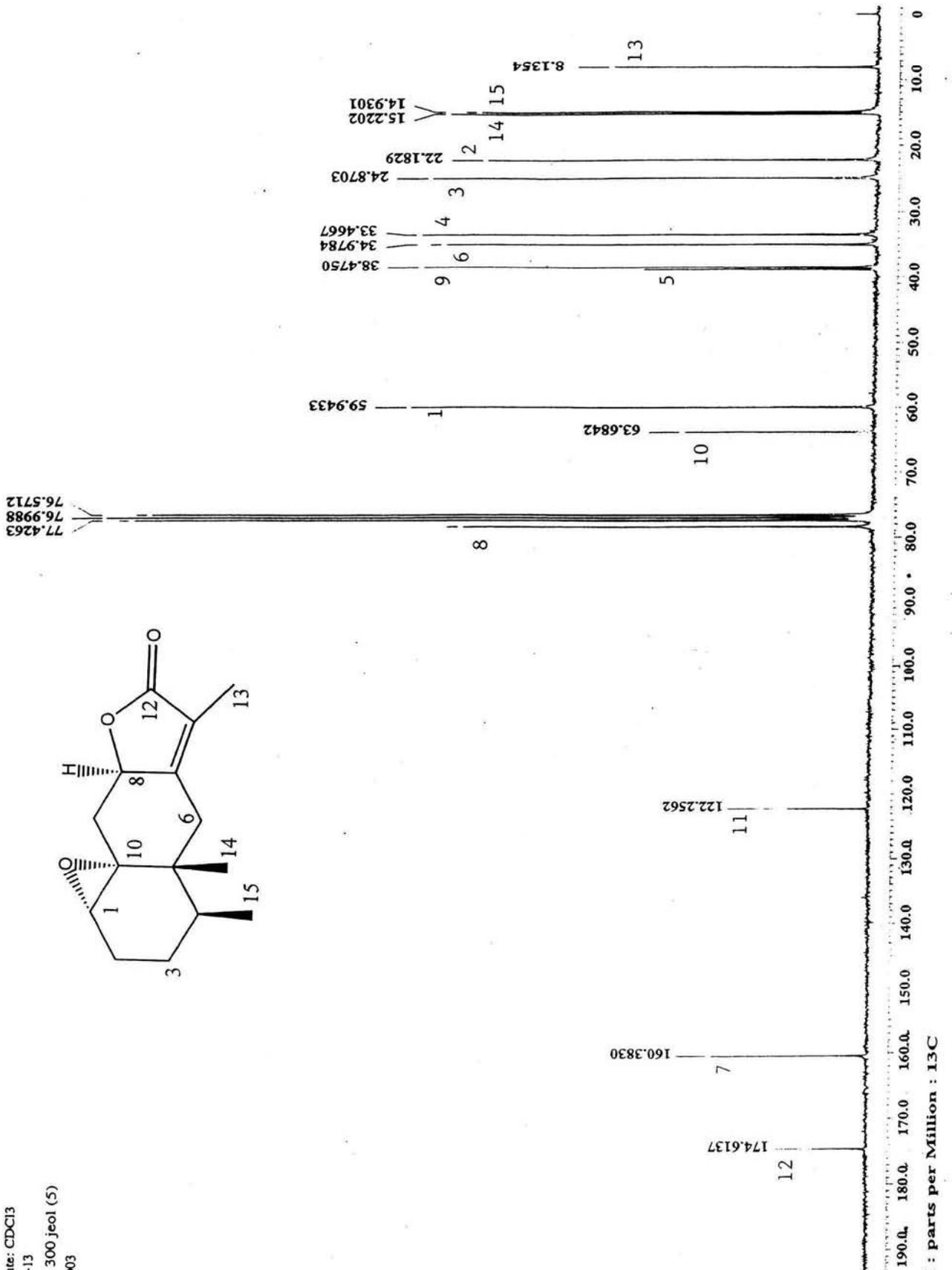
22-05-03

MAB

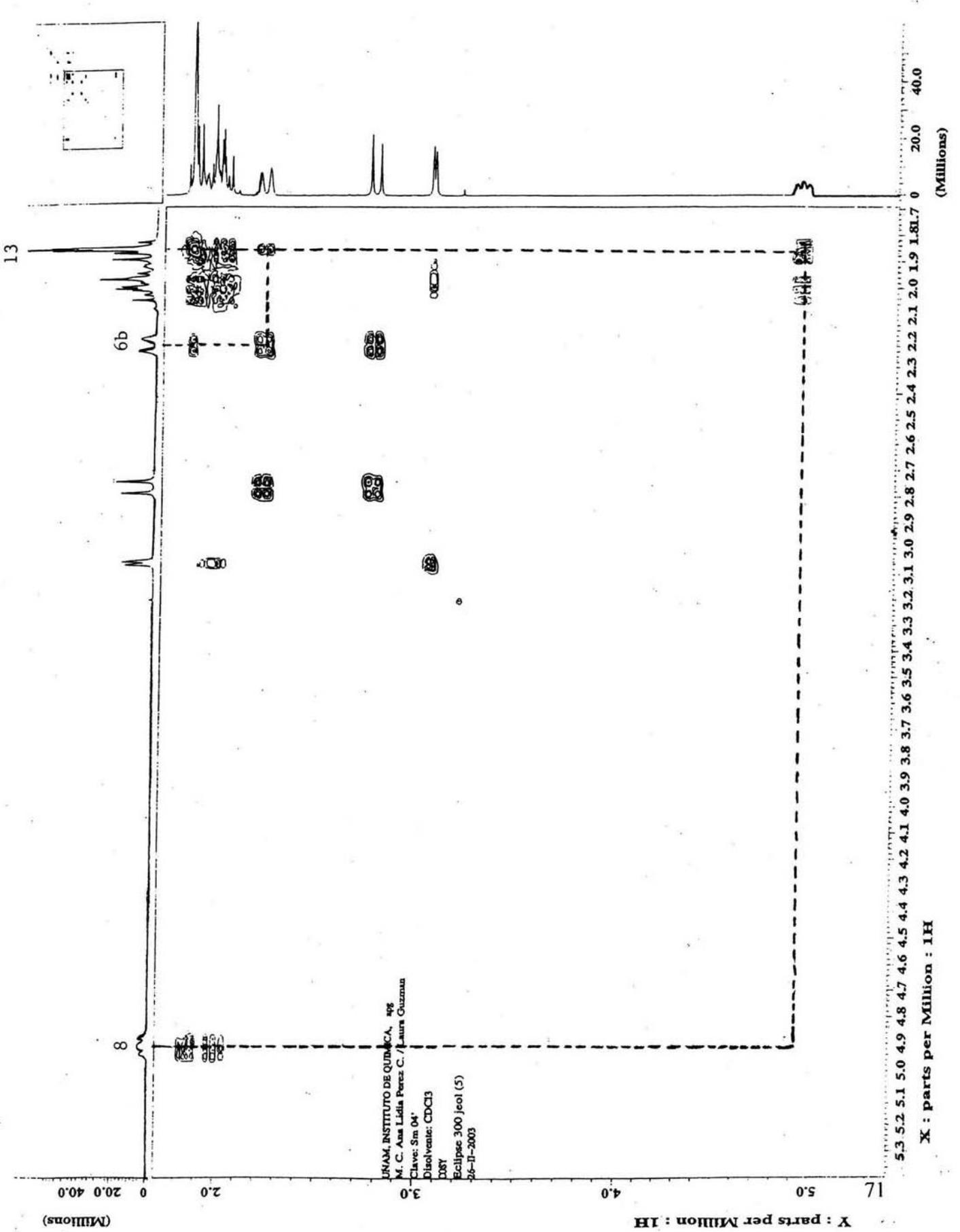
UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, 4pg
 M. C. Ana Lidia Pérez C. / Laura Guzman
 Clave: Sm 04'
 Disolvente: CDCl₃
 Carbono-13
 Eclipse 300 jeol (5)
 26-II-2003



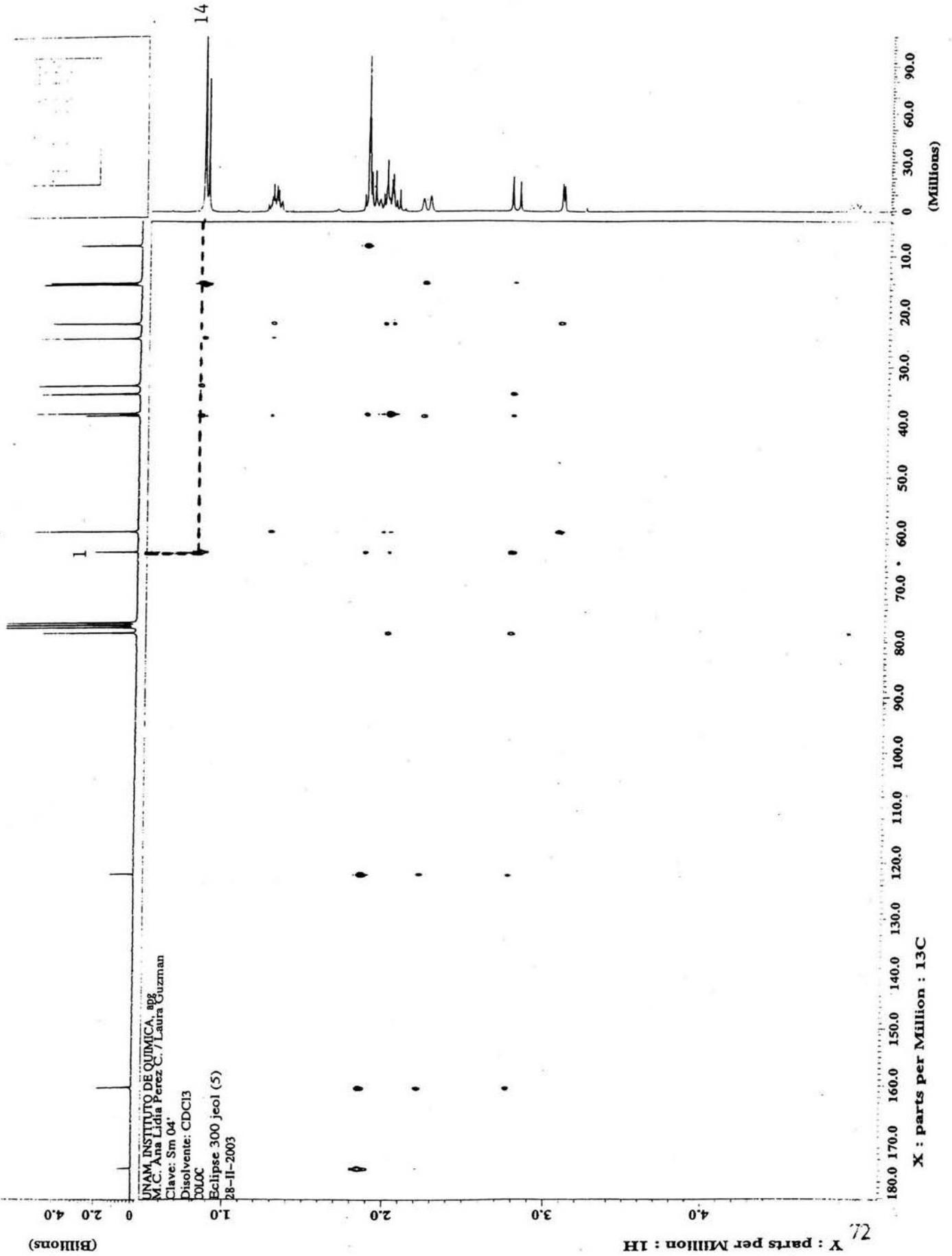
Espectro 3



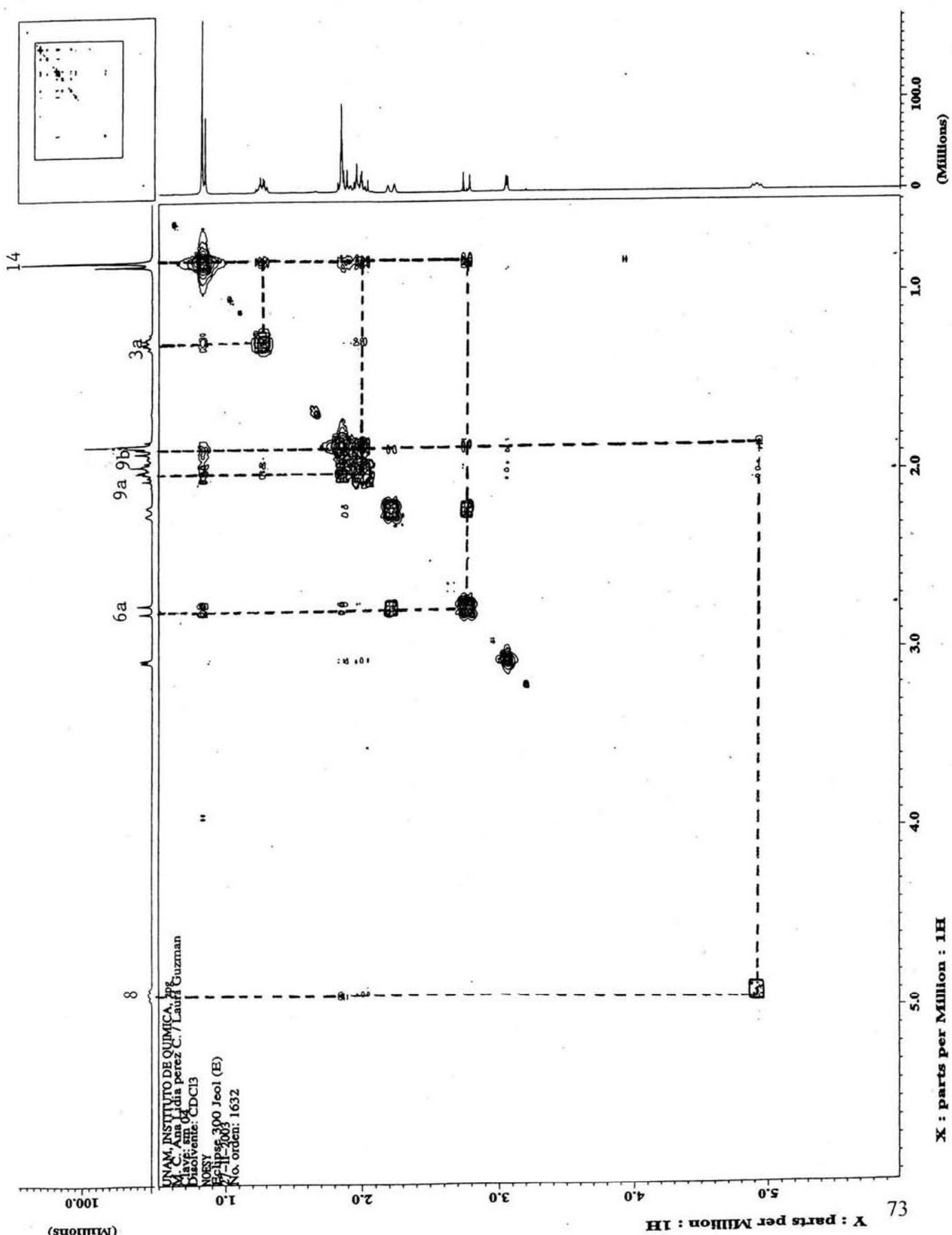
Espectro 4



Espectro 5



Espectro 6



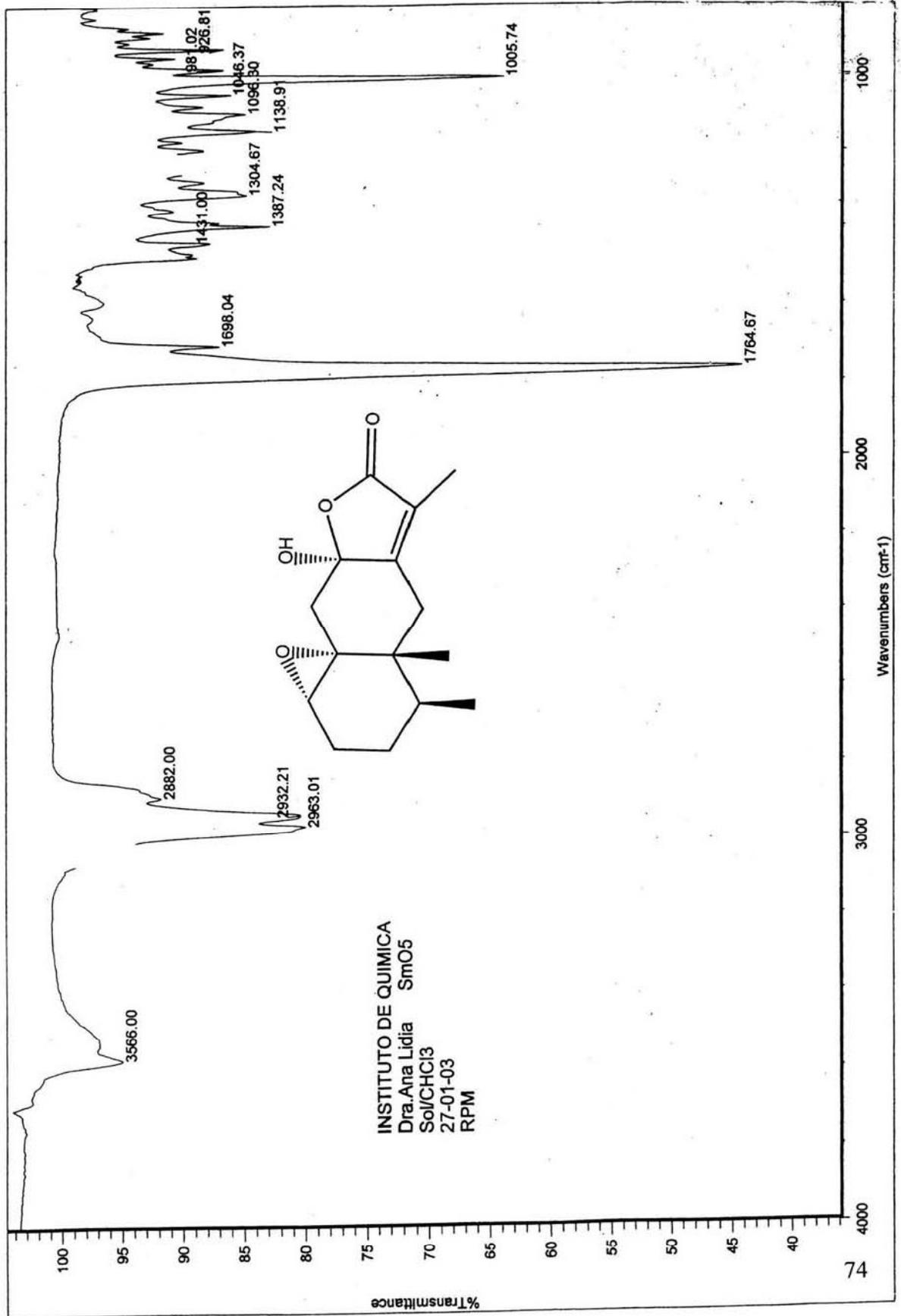
UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, Dr.
 M. C. Ana Lidia Perez C. / Laura Guzman
 Dpto. de Quimica Organica
 Disolvente: CDCl₃
 NOSEY
 PPMs: 300 Jool (E)
 No. orden: 1632



Instituto de Química, UNAM

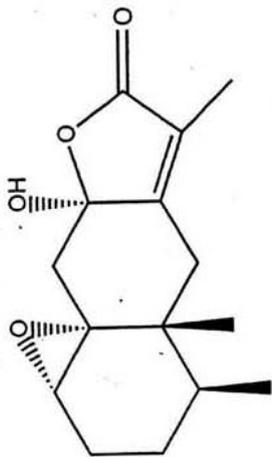
Laboratorio de Infrarrojo

Espectro 7

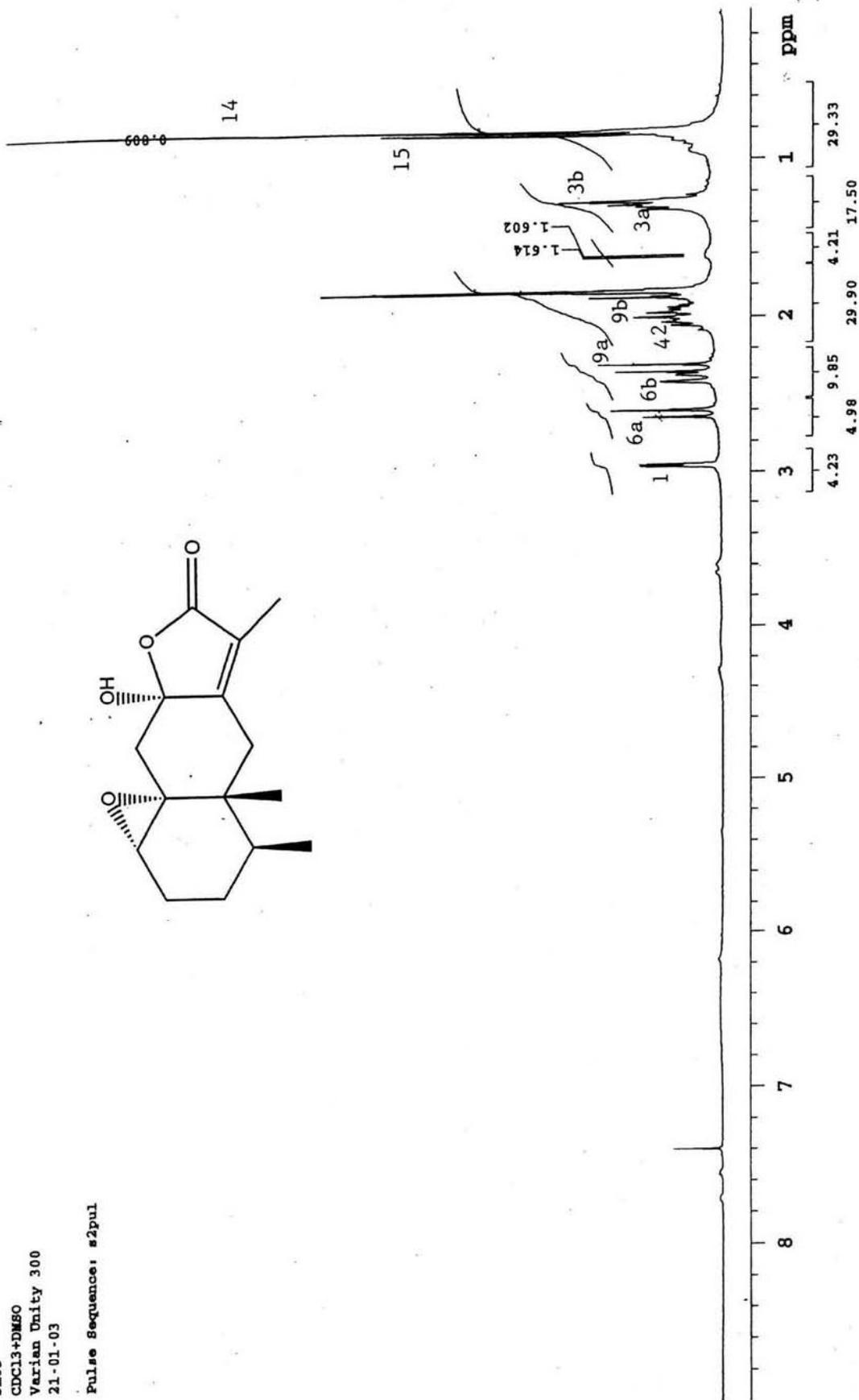


Instituto de Química URNM RG
M.C. A. Perez
SM05
CDC13+DMSO
Varian Unity 300
21-01-03

Pulse Sequence: s2pul

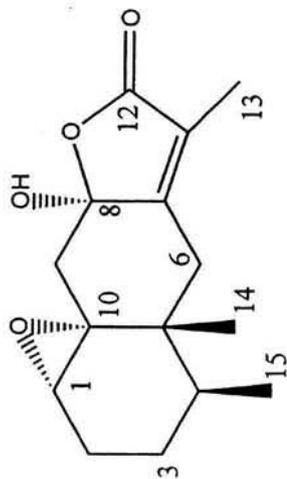


Espectro 8

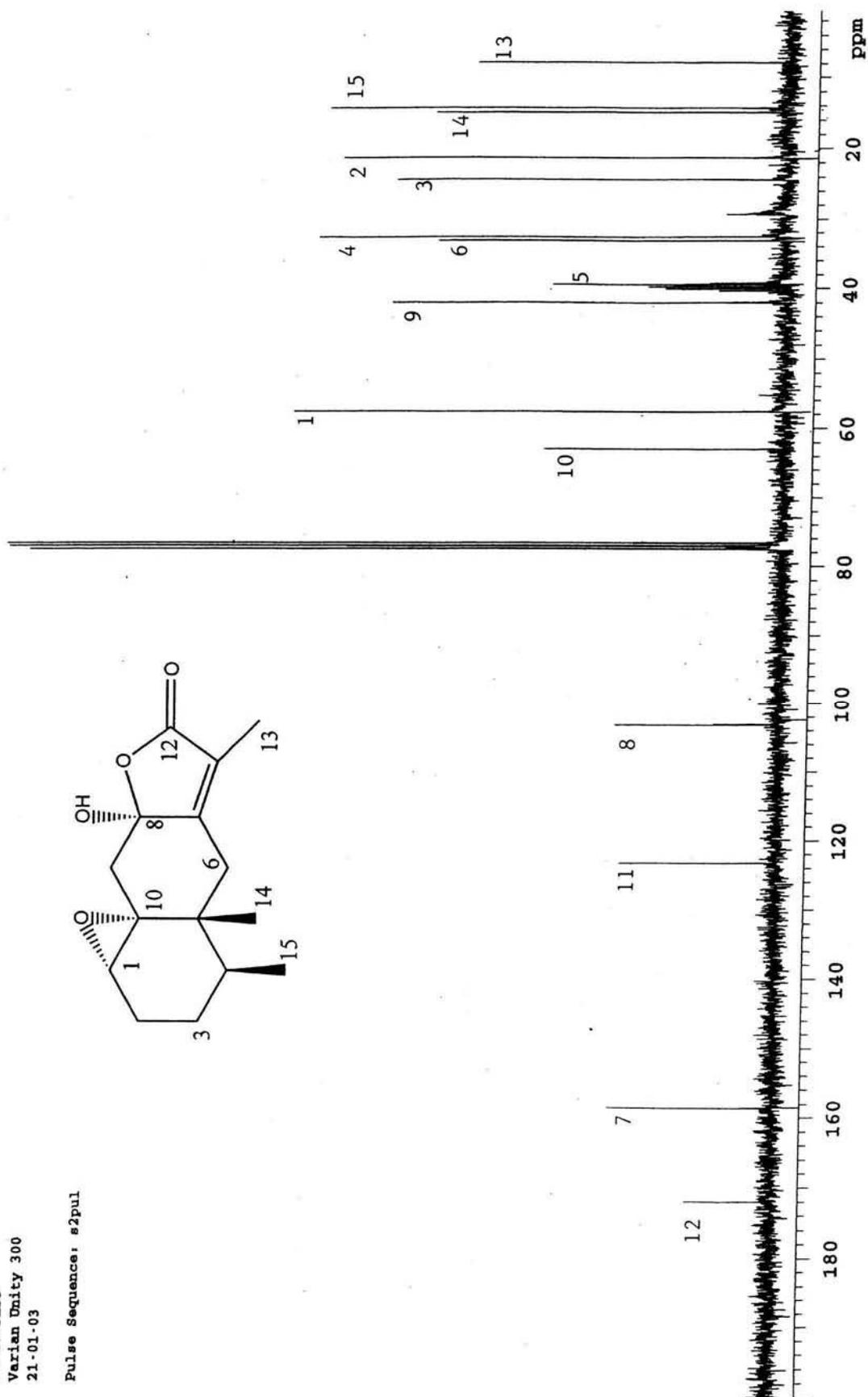


Instituto de Química UNAM RG
M. C. A. Perez
SM05
CDCl3+DMSO
Varian Unity 300
21-01-03

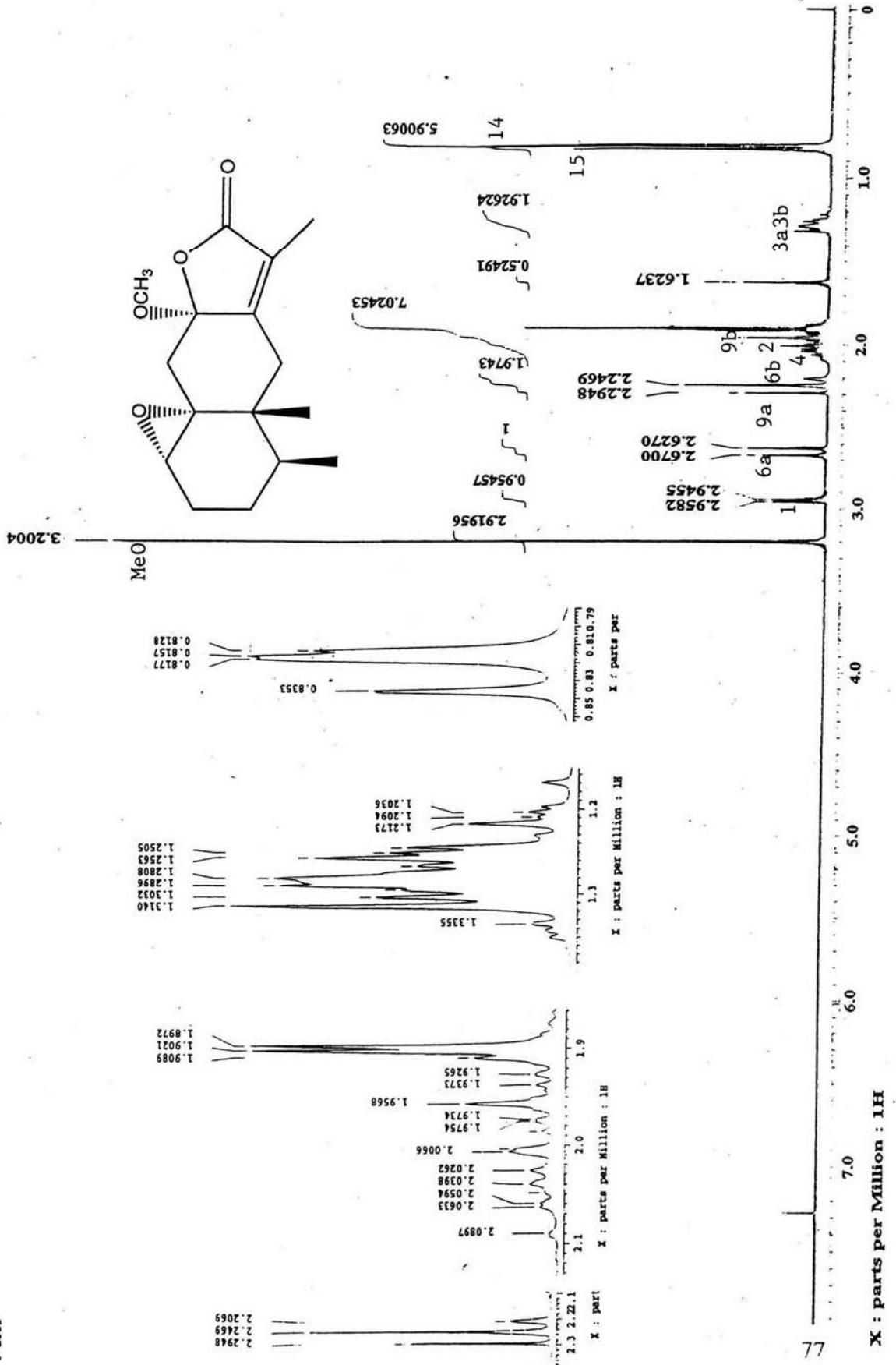
Pulse Sequence: s2pul



Espectro 9

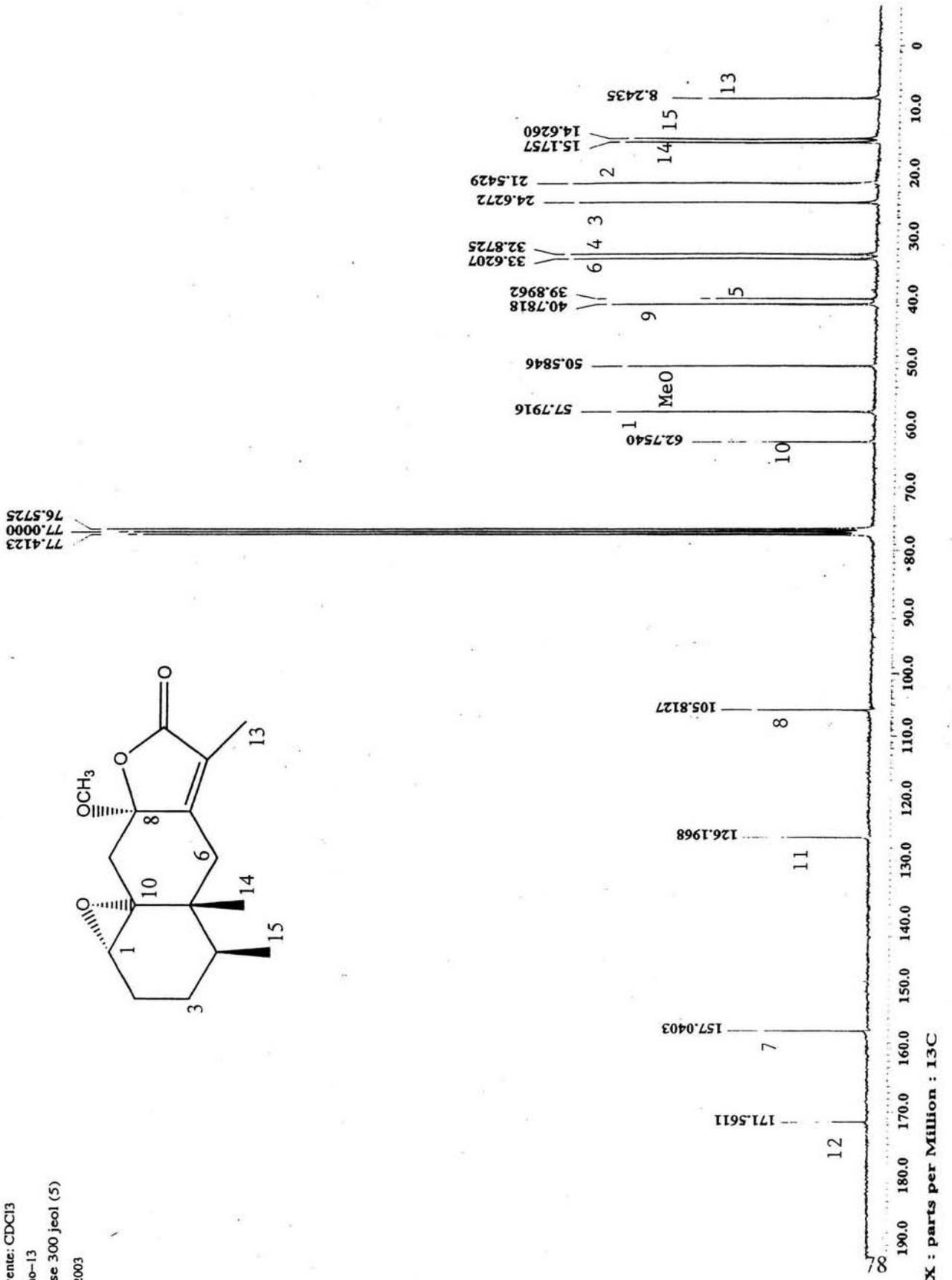


Espectro 10



UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, apg
M. C. Ana Lidia Perz C. / Laura Guzman
Clave: sm 07
Disolvente: CDCl₃
Hidrogeno-1
Eclipse 300 jeol (5)
28-1-2003

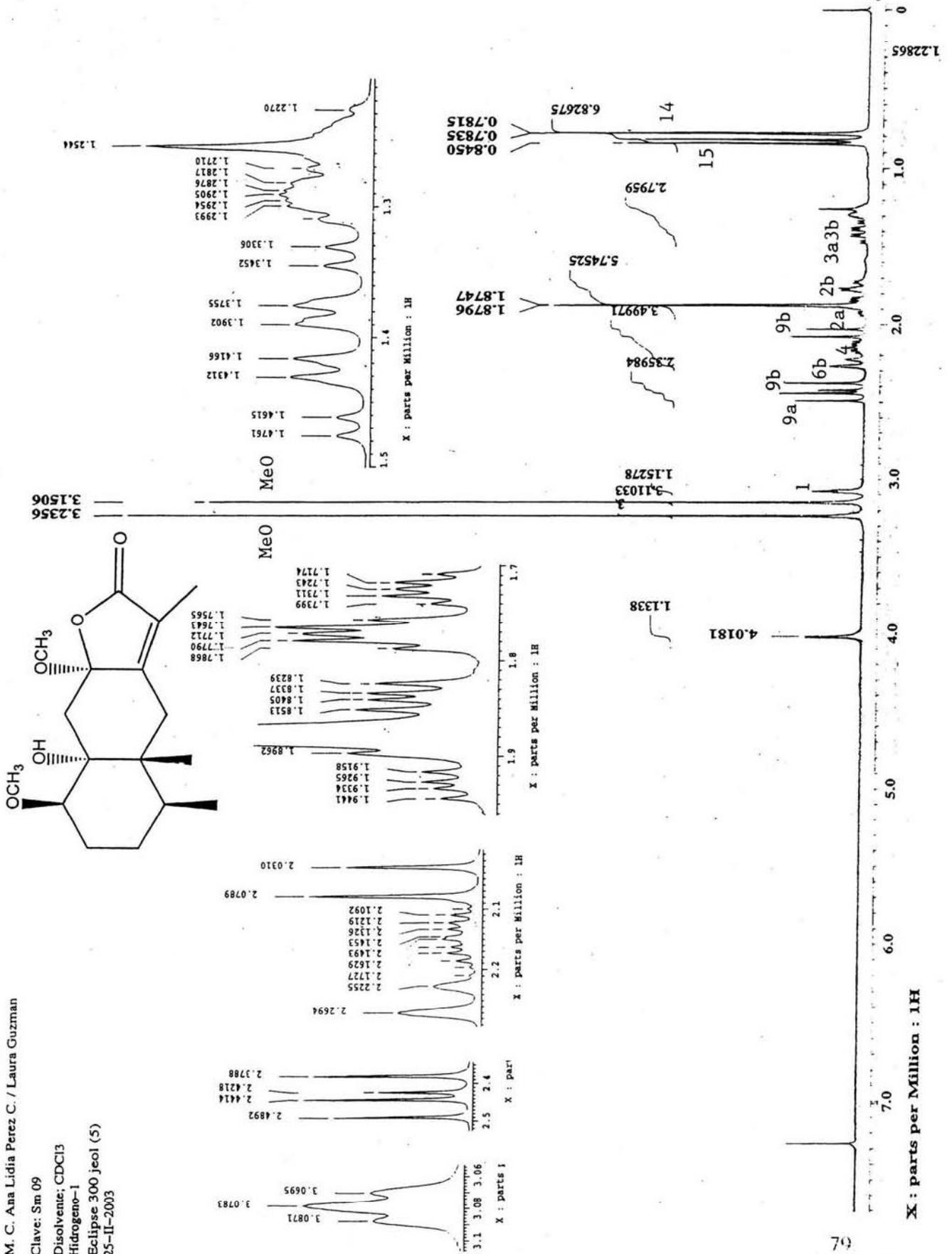
Espectro 11



UNAM INSTITUTO DE QUIMICA, apg
 M. C. Ana Lidia Perez C. / Laura Guzman
 Clave: sm 07
 Disolvente: CDCl₃
 Carbono-13
 Eclipse 300 jeol (5)
 27-1-2003

Espectro 12

UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, apg
 M. C. Ana Lidia Perez C. / Laura Guzman
 Clave: Sm 09
 Disolvente: CDCl₃
 Hidrogeno-1
 Eclipse 300 jeol (5)
 25-II-2003



ESTA TESIS NO SALE
 DE LA BIBLIOTECA

Espectro 13

INSTITUTO DE QUIMICA, apg
 Dra. Ana Lidia Perz C. / Laura Guzman

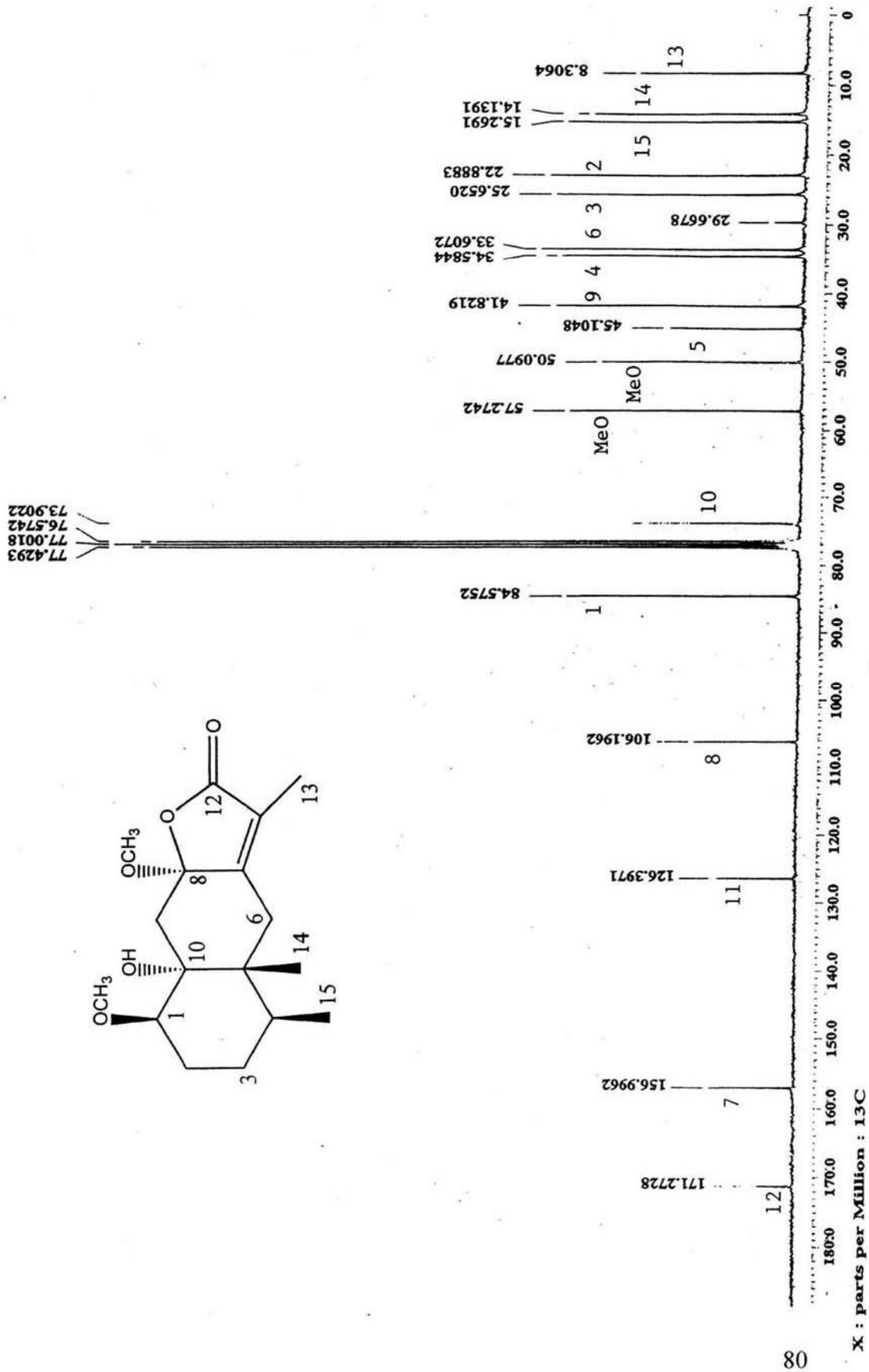
Clave: Sm-09

Disolvente: CDCl₃

Carbono-13

Eclipse 300 jeol (5)

p5-II-2003

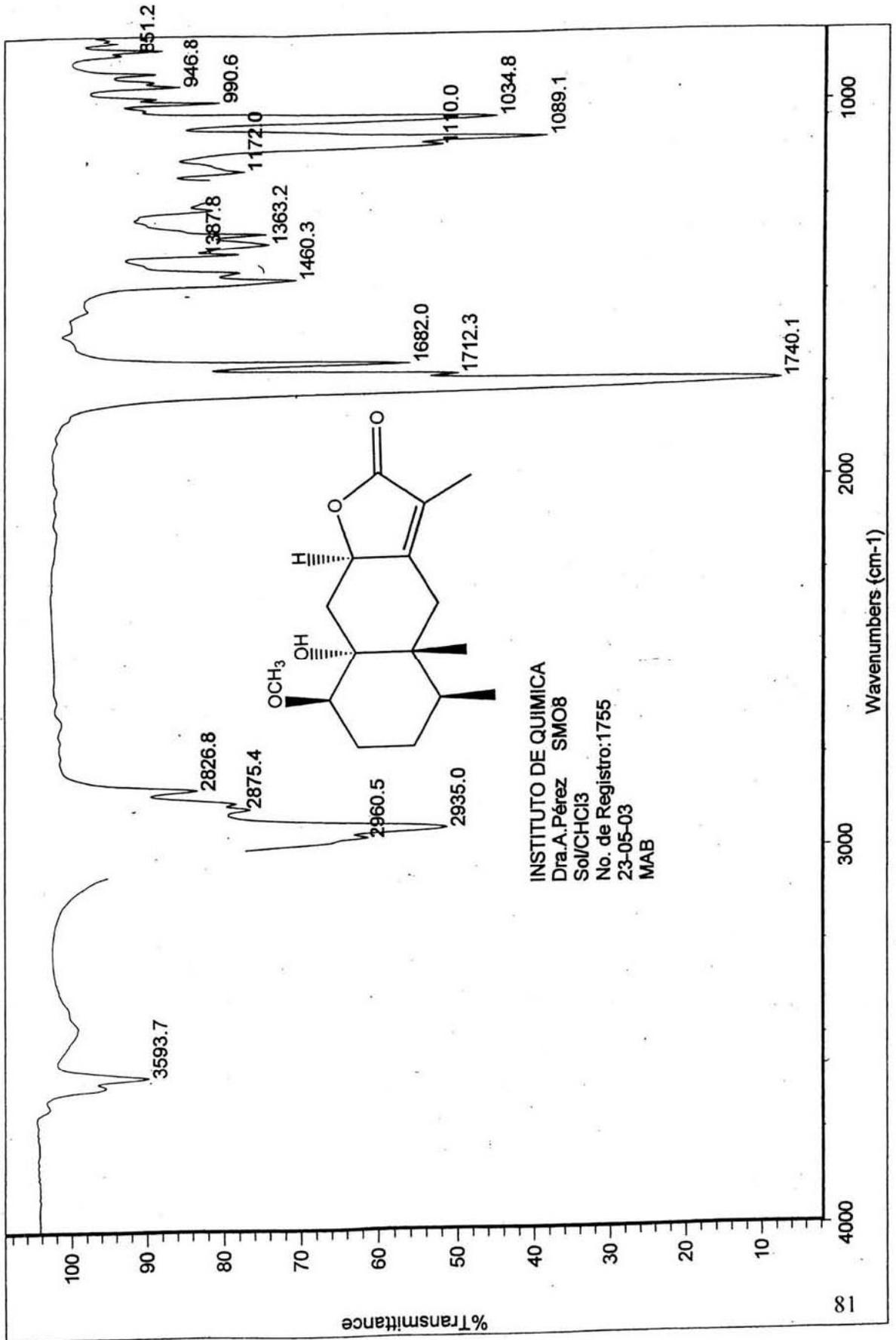




Instituto de Química, UNAM

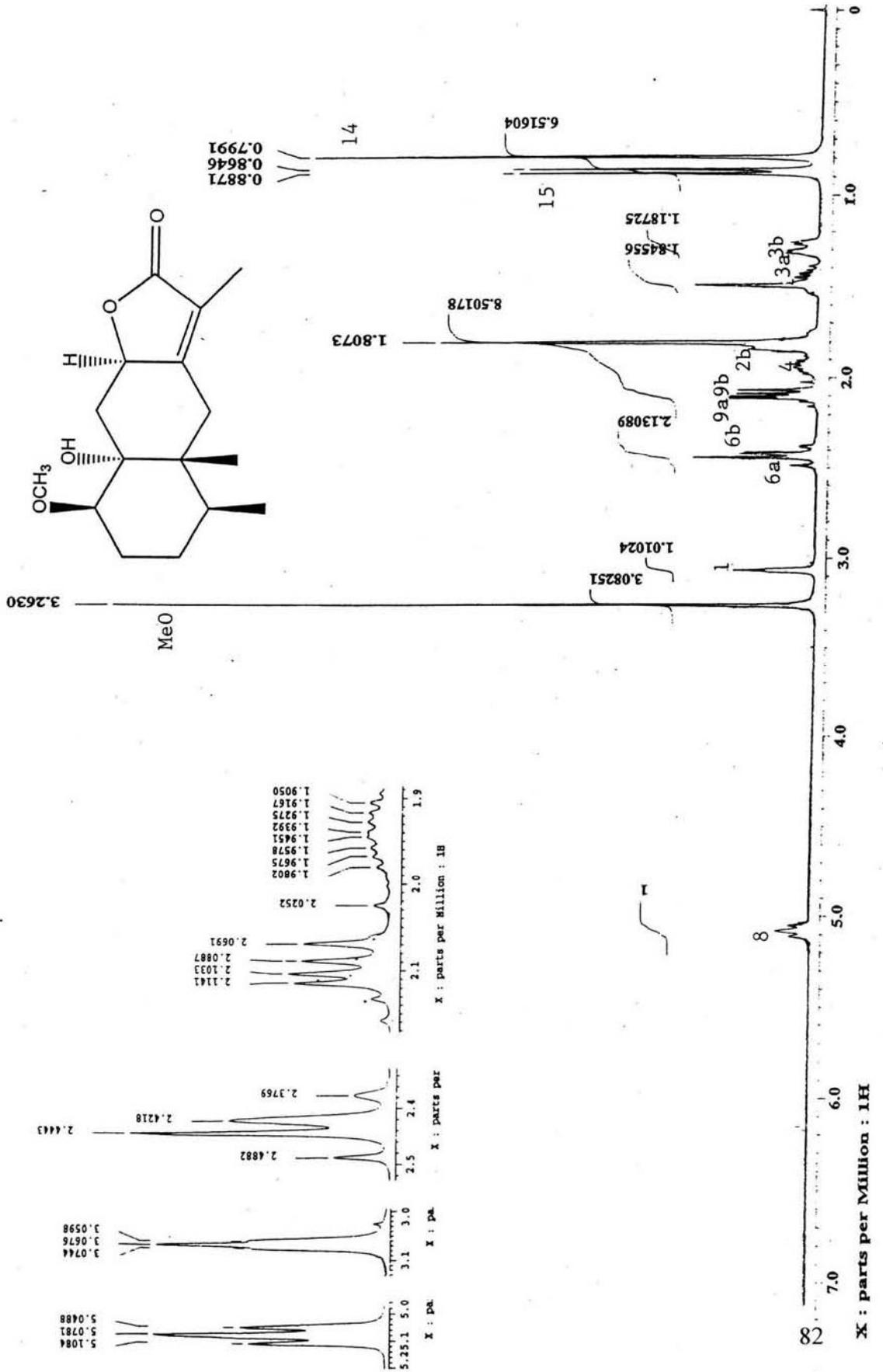
Laboratorio de Infrarrojo

Espectro 14



INSTITUTO DE QUIMICA
Dra. A. Pérez SMO8
Sol/CHCl₃
No. de Registro: 1755
23-05-03
MAB

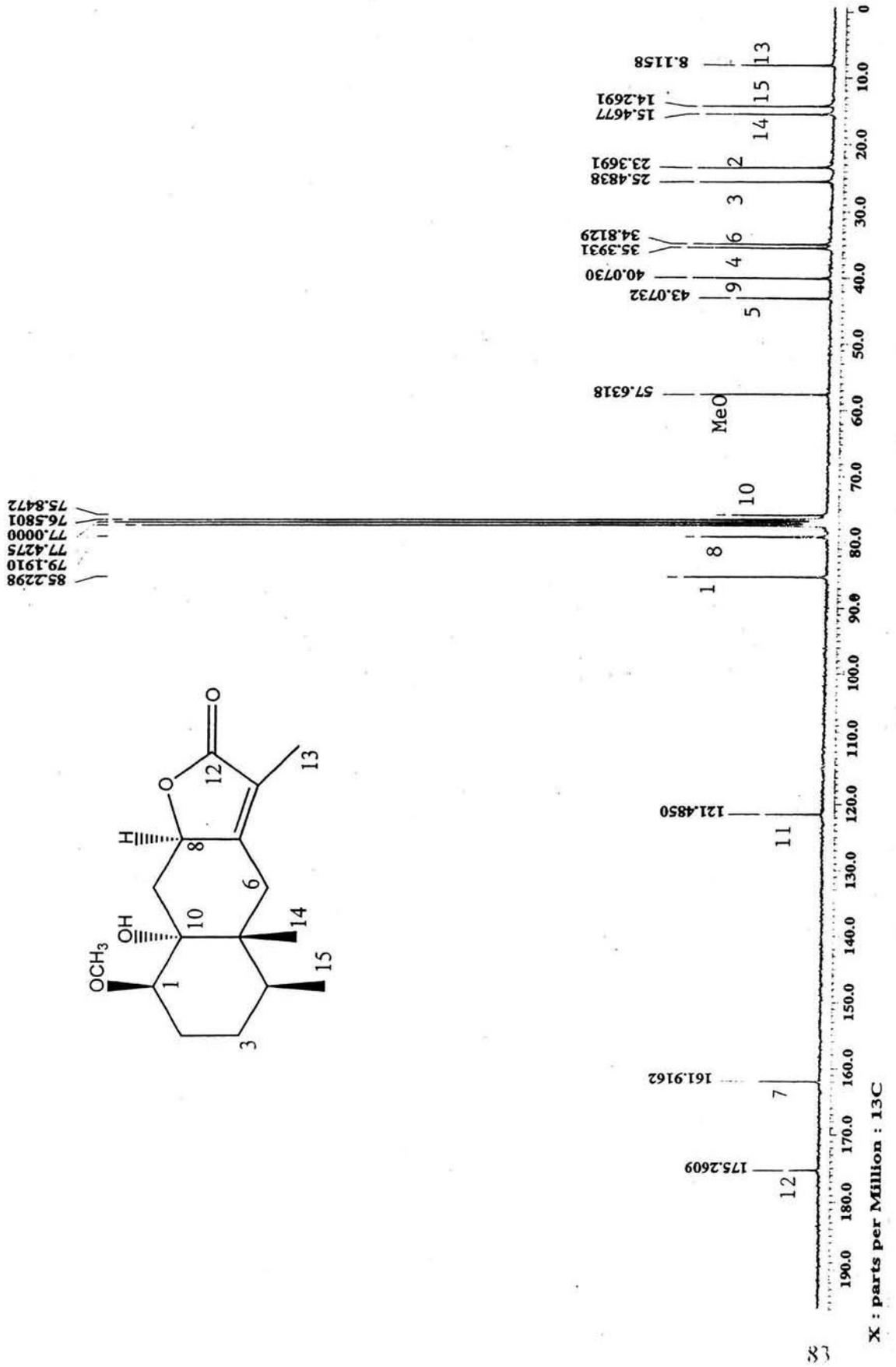
Espectro 15



INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/EHS
 M. en C. Ana Lidia P./Laura G.
 Clave: sm08
 Disolvente: CDCl₃
 hidrogeno-1
 Eclipse 300 MHz Jeol
 18-II-03

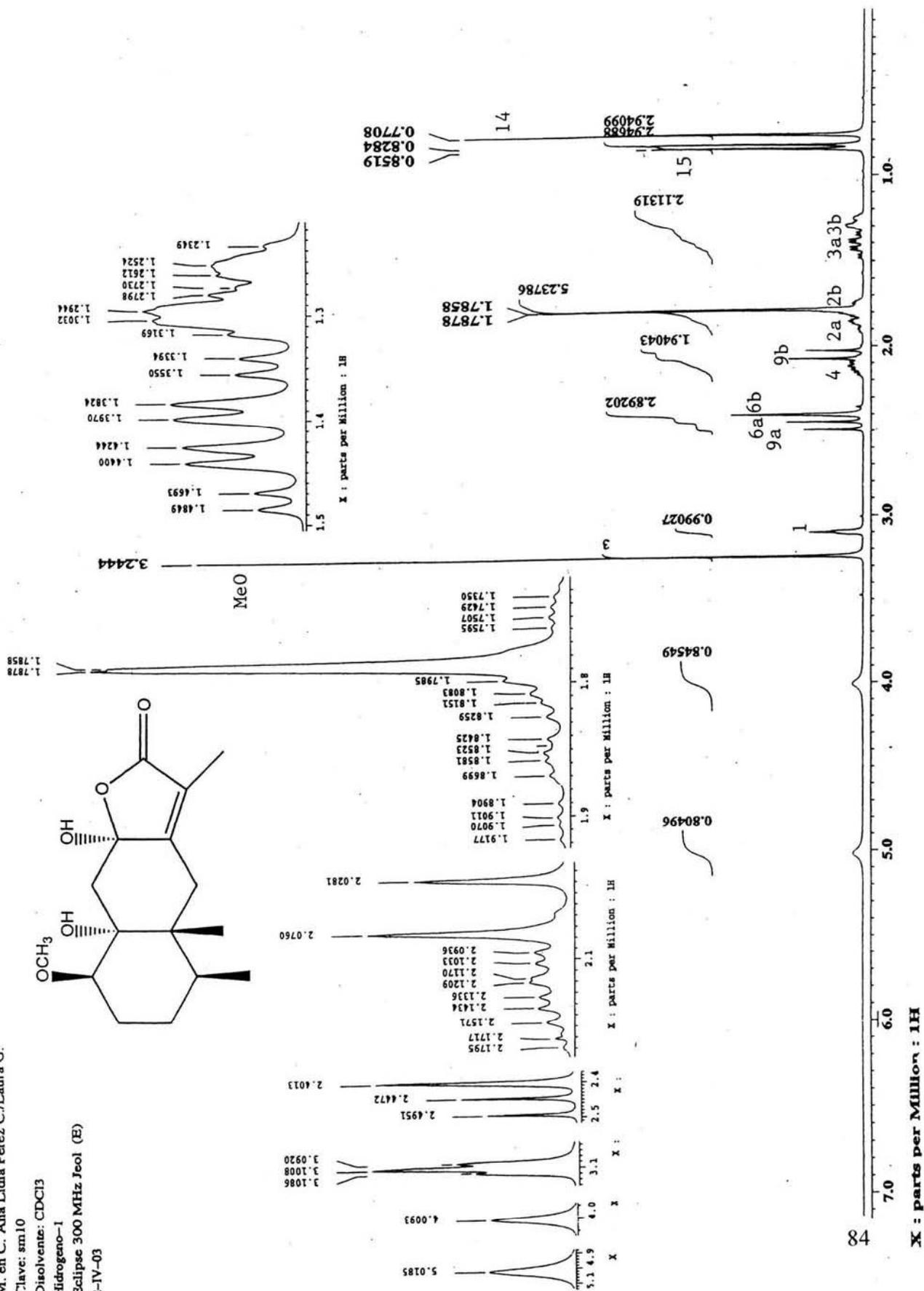
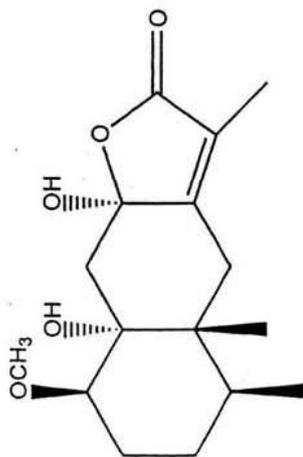
Espectro 16

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/EHS
 M. en C. Ana Lidia P. Laura G.
 Clave: sm08
 Disolvente: CDCl₃
 Carbono-13
 Eclipse 300 MHz Jeol
 18-II-03



Espectro 17

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/EHS
 No. de orden: 2036
 M. en C. Ana Lidia Perez C./Laura G.
 Clave: sm10
 Disolvente: CDCl₃
 Hidrogeno-1
 Eclipse 300 MHz Jeol (E)
 2-IV-03



X : parts per Million : 1H

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/EHS

No. de orden: 2036

M. en C. Ana Lidia Perez C./Laura G.

Clave: sm10

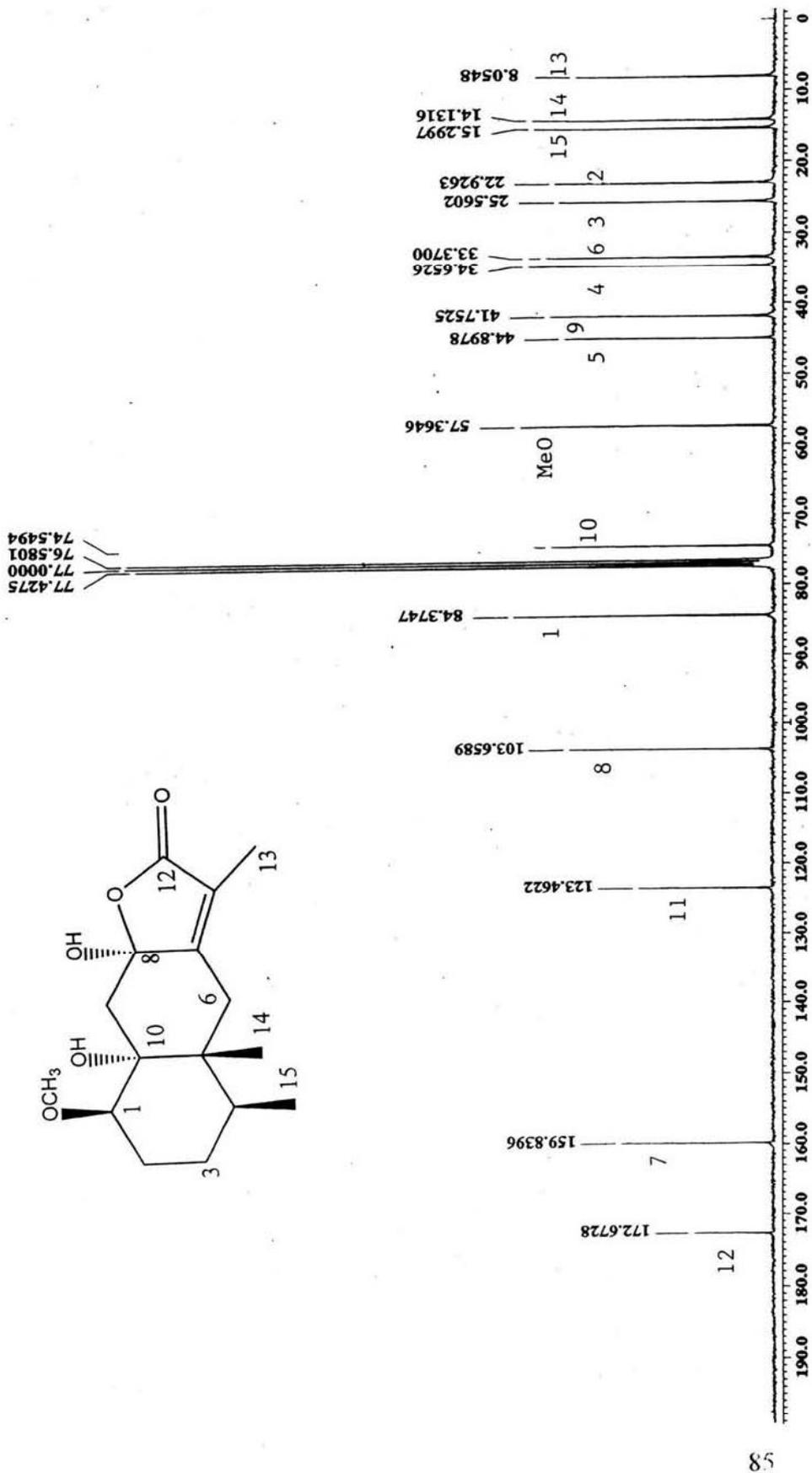
Disolvente: CDCl₃

Carbóno-13

Clipse 300 MHz Jeol (E)

17-IV-03

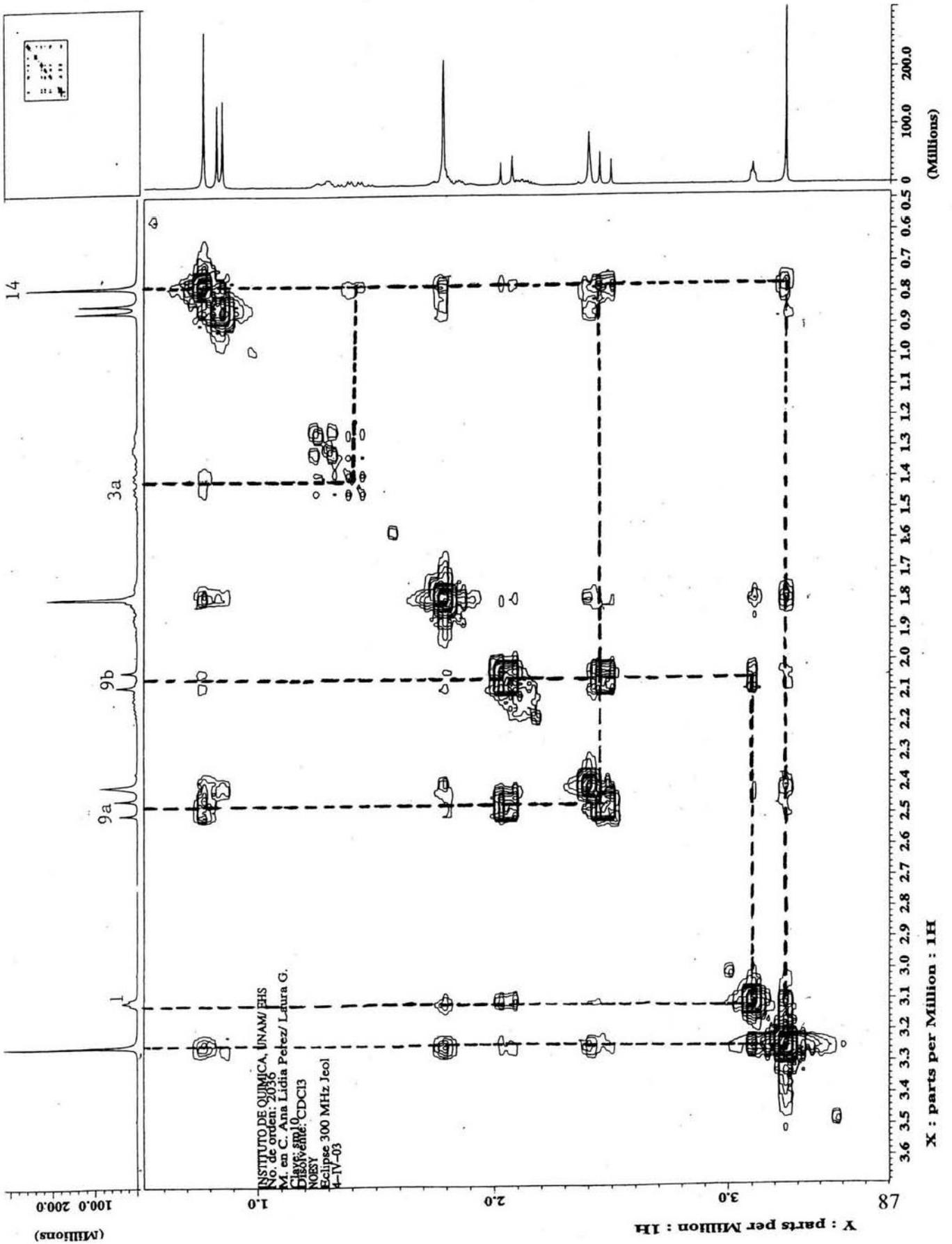
Espectro 18



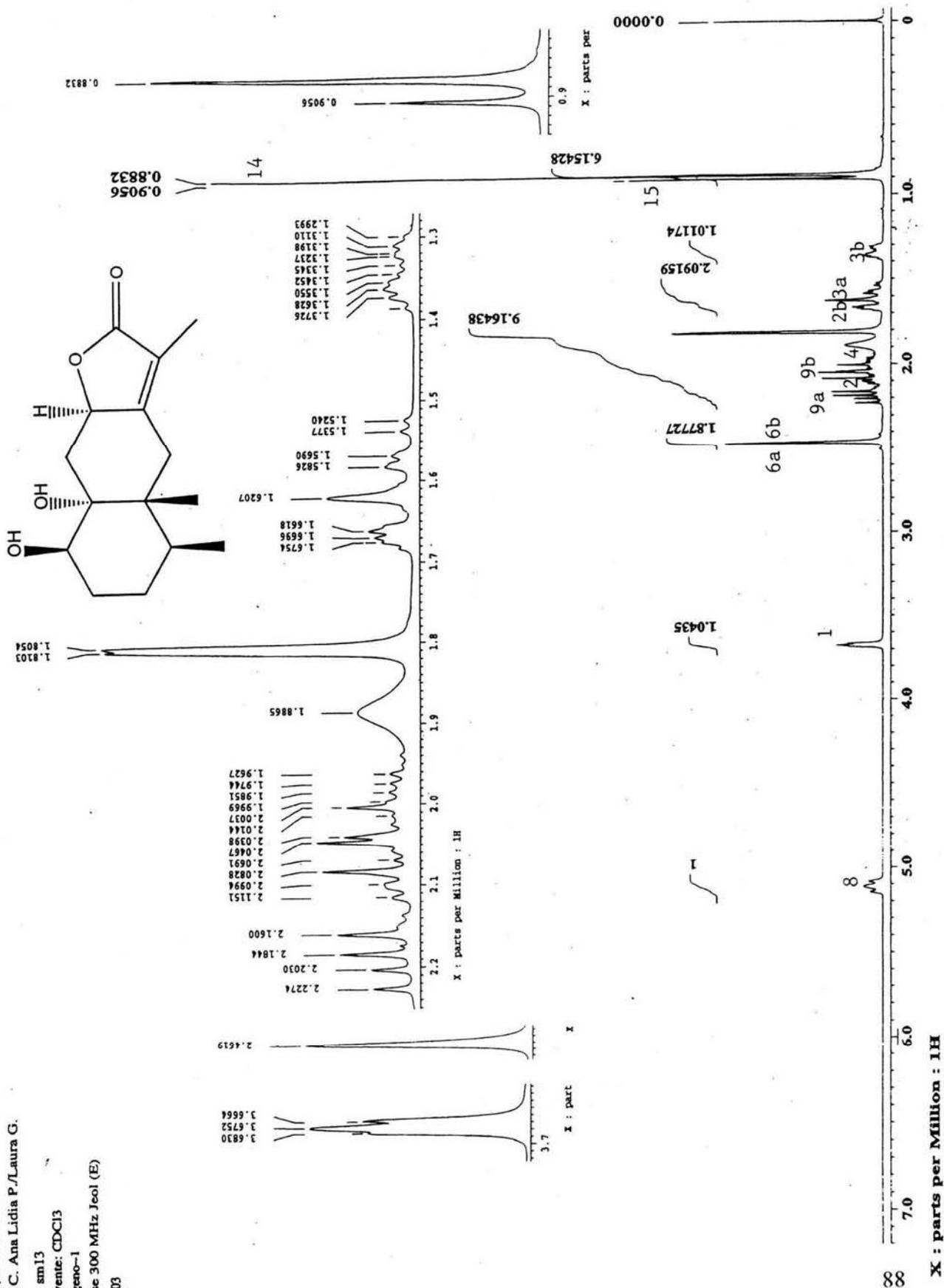
Espectro 19



Espectro 20



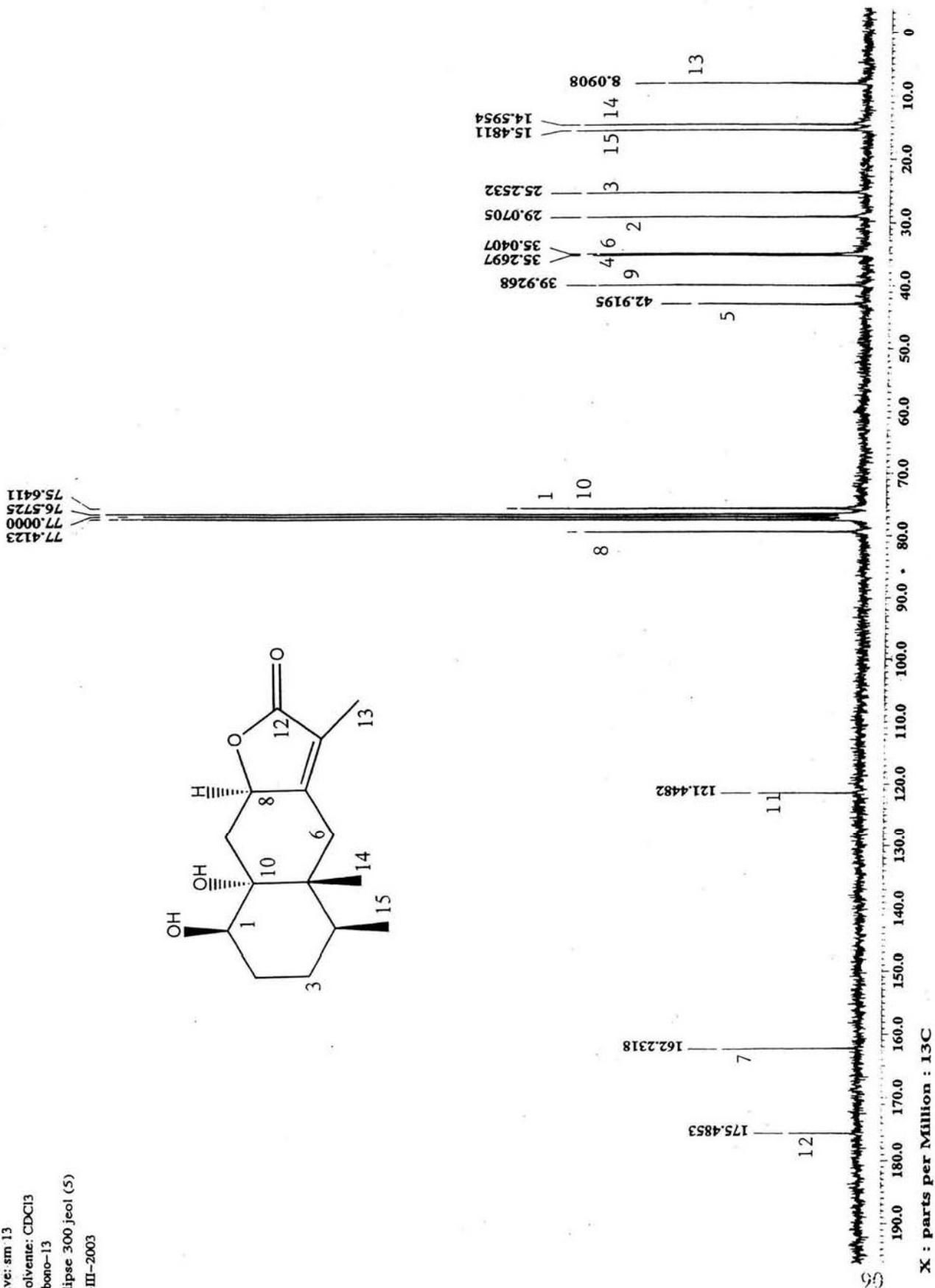
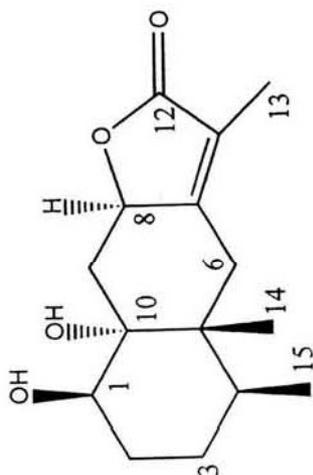
Espectro 21



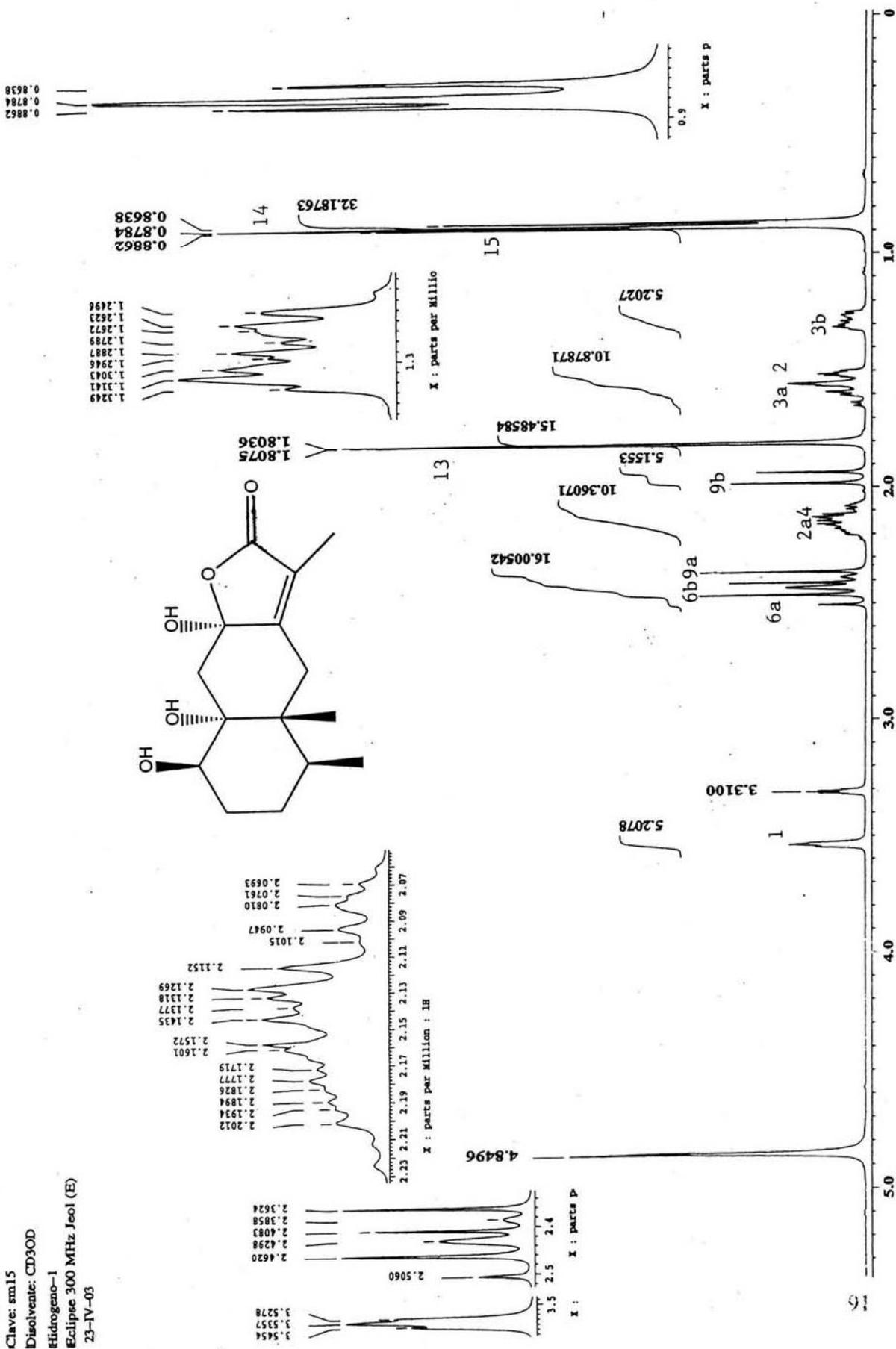
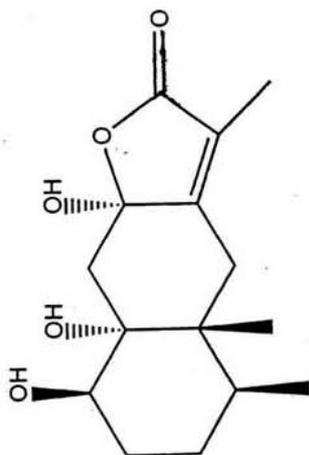
INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/EHS
 No. de orden: 2738
 M. en C. Ana Lidia P./Laura G.
 Clave: sm13
 Disolvente: CDCl3
 Hidrogeno-1
 Eclipse 300 MHz Jeol (E)
 29-V-03

Espectro 22

UNAM. INSTITUTO DE QUIMICA, apg
 M. C. Ana Lidia Perez C. / Laura Guzman
 Clave: sm 13
 Disolvente: CDCl₃
 Carbono-13
 Eclipse 300 jeol (5)
 12-III-2003



Espectro 23



INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/ EHS.

No. de orden: 2301

M. en C. Ana Lidia P./Laura G.

Clave: sm15

Disolvente: CD3OD

Hidrogeno-1

Eclipse 300 MHz Jeol (E)

23-IV-03

Espectro 24

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/EHS.
 No. de orden: 2301
 M. en C. Ana Lidia P./Laura G.
 Clave: sm15
 Disolvente: CD3OD
 Carbono-13
 Eclipse 300 MHz Jeol (E)
 P3-IV-03

