



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA

**“AISLAMIENTO, DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR Y  
BIOEVALUACIÓN CITOTÓXICA Y ANTI-INFLAMATORIA DE LACTONAS  
SESQUITERPÉNICAS DE *MIKANIA MICRANTHA* Y *M. CORDIFOLIA*  
(FAM. COMPOSITAE)”**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:  
**M. en C. EUNICE RÍOS VÁSQUEZ**

TUTOR:  
**DR. GUILLERMO DELGADO LAMAS**  
INSTITUTO DE QUÍMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
**DR. EUGENE ATHANAS BRATOEFF** - FACULTAD DE QUÍMICA  
**DR. CARLOS CERDA GARCÍA-ROJAS** - PROGRAMA DE MAESTRÍA Y  
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

MÉXICO, D. F., MAYO 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO**

Presidente:	Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo
Vocal:	Dr. Eugene Athanas Bratoeff
Vocal:	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal:	Dr. Jesús Martín Torres Valencia
Secretario:	Dr. Andrés Navarrete Castro

Esta tesis fue realizada en el laboratorio 1, edificio C, del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Guillermo Delgado Lamas.

Sustentante:

Tutor:

M. en C. Eunice Ríos Vásquez

Dr. Guillermo Delgado Lamas

## AGRADECIMIENTOS

- A la coordinación de estudios de posgrado y al posgrado en Ciencias Químicas.
- Al Dr. Guillermo Delgado Lamas, por su valioso apoyo y acompañamiento, por su continua asesoría y por compartir sus conocimientos invaluable.
- A los miembros del Comité Tutelar: Dr. Eugene Athanas Bratoeff y Dr. Carlos Martín Cerda García-Rojas, por sus valiosos aportes y por las acertadas sugerencias en el desarrollo de la tesis.
- Al Dr. Francisco Espinosa y al M. en B. Ángel Bravo-Monzón por la colecta, identificación y clasificación del material vegetal.
- A los miembros del Jurado: Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo, Dr. Eugene Athanas Bratoeff, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dr. Jesús Martín Torres Valencia y Dr. Andrés Navarrete Castro, por los acertados comentarios y correcciones a la tesis.
- Al personal técnico académico del Instituto de Química.
- A todo el personal de la biblioteca “Jesús Romo Armería” del Instituto de Química, especialmente a la Lic. Sandra Guadalupe Rosas Poblano, por su constante apoyo y colaboración.
- A mi Universidad del Quindío, por el apoyo financiero y la oportunidad brindada.
- A la Dra. Alejandra León Cabrera y al Q. José Luis Ávila, por su amistad, constante apoyo y oportunas sugerencias. Gracias por acogerme en su familia.
- A todos mis familiares y amigos en Colombia, infinitas gracias por su decidido apoyo, acompañamiento y por su valiosa amistad.
- A todos los compañeros y amigos del laboratorio 1C. Gracias por este intercambio de conocimientos científicos y culturales (México, Ecuador, Colombia), que maravillosa experiencia.

*A mí amada madre Gabriela, a mí adorado hijo Santiago, a mí amadísimo esposo  
Eyder Antonio, a mis queridas hermanas Luz Amalia y Sandra, a mis queridos  
hermanos y sobrinos con todo mi infinito amor y agradecimiento.*

## ÍNDICE

	Página
Abstract	16
<b>1. Resumen</b>	18
<b>2. Introducción</b>	21
<b>3. Antecedentes</b>	23
3.1. Generalidades de la familia Asteraceae	23
3.1.1. Distribución y hábitat	23
3.1.2. Química y actividad biológica	23
3.1.3. Importancia económica y ecológica	25
3.2. Generalidades del género <i>Mikania</i>	25
3.2.1. Distribución y hábitat	25
3.2.2. Química del Género <i>Mikania</i>	26
3.2.3. Actividades biológicas	32
3.3. Conformación de las germacra 1-(10),4-dienólidas de <i>Mikania</i>	34
3.4. Análisis de LS por CLAR-DAD	35
<b>4. Justificación</b>	36
<b>5. Hipótesis</b>	36
<b>6. Objetivos</b>	37
6.1. Objetivo general	37

6.2.	Objetivos específicos	37
7.	Discusión de Resultados	38
7.1.	Selección de las especies de <i>Mikania</i>	38
7.1.1.	Estudio químico del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>Mikania micrantha</i> de Chiapas	38
7.1.2.	Estudio químico del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>M. micrantha</i> de Michoacán	42
7.1.3.	Estudio químico del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>M. micrantha</i> de Oaxaca	43
7.1.4.	Estudio químico del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>M. micrantha</i> de Guerrero	44
7.1.5.	Estudio químico de <i>M. micrantha</i> de Nuevo Padilla, Tamaulipas	45
7.1.6.	Estudio químico de <i>M. micrantha</i> de Abasolo, Tamaulipas	45
7.1.7.	Estudio químico de <i>M. micrantha</i> de Tampico, Tamaulipas	46
7.1.8.	Estudio químico de <i>M. micrantha</i> de Tuxpan, Veracruz	47
7.1.9.	Estudio químico de <i>M. micrantha</i> de Huimanguillo, Tabasco	47
7.1.10.	Estudio químico del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>Mikania cordifolia</i> de Michoacán	48
7.1.11.	Estudio químico del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>M. cordifolia</i> de Guerrero	51
7.1.12.	Estudio químico del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>M. cordifolia</i> de Chiapas	51
7.1.13.	Estudio de los extractos de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> y CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>Mikania houstoniana</i> de Catemaco, Veracruz	51
7.2.	Análisis conformacional de las melampólidas <b>2, 10-15</b>	52
7.3.	Análisis por CLAR-DAD de las LS de <i>Mikania</i>	54

7.4.	Ensayos biológicos de las LS aisladas de <i>Mikania</i>	57
7.4.1.	Determinación de la actividad citotóxica	57
7.4.2.	Determinación de la actividad anti-inflamatoria	60
<b>8.</b>	<b>Sección experimental</b>	<b>61</b>
8.1.	Materiales y equipos	61
8.2.	Clasificación del material vegetal	62
8.3.	Extracción, aislamiento y purificación	62
8.3.1.	Fraccionamiento del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>M. micrantha</i> de Chancalá, Chiapas	63
8.3.1.1.	Análisis espectroscópico y constantes físicas de <b>1 y 4</b>	64
8.3.2.	Fraccionamiento del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>M. micrantha</i> de Parácuaro, Michoacán	66
8.3.2.1.	Análisis espectroscópico y constantes físicas de <b>9, 7, y 8</b>	67
8.3.3.	Fraccionamiento del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>M. micrantha</i> de Dos Caminos, Oaxaca	69
8.3.3.1.	Análisis espectroscópico y constantes físicas de <b>5, 10-14</b>	70
8.3.4.	Fraccionamiento del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>M. micrantha</i> de Paraíso, Guerrero	76
8.3.5.	Fraccionamiento del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> y CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>M. micrantha</i> de Nuevo Padilla, Tamaulipas	76
8.3.5.1.	Análisis espectroscópico y constantes físicas de <b>6</b>	77
8.3.6.	Fraccionamiento del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> y CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>M. micrantha</i> de Abasolo, Tamaulipas	77
8.3.7.	Fraccionamiento del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> y CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>M. micrantha</i> de Tampico, Tamaulipas	78



8.3.8. Fraccionamiento de los extractos CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> y CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>M. micrantha</i> de Tuxpan, Veracruz	78
8.3.9. Fraccionamiento de los extractos CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> y CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>M. micrantha</i> de Huimanguillo, Tabasco	79
8.3.9.1. Análisis espectroscópico y constantes físicas de <b>3</b>	79
8.3.10. Fraccionamiento del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>Mikania cordifolia</i> de Los Reyes de Salgado, Michoacán	80
8.3.10.1. Análisis espectroscópico y constantes físicas de <b>2</b> y <b>15</b>	81
8.3.11. Fraccionamiento del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>M. cordifolia</i> de Lagunillas, Guerrero	82
8.3.12. Fraccionamiento del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH de <i>M. cordifolia</i> de Chancalá, Chiapas	83
8.3.13. Fraccionamiento del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> y CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH <i>M. houstoniana</i> de Catemaco, Veracruz	83
8.4. Cálculo de la energía conformacional de los principales conformeros de <b>10</b>	84
8.5. Análisis por CLAR-DAD de las LS de <i>Mikania</i>	84
8.6. Ensayos biológicos	85
8.6.1. Ensayo de citotoxicidad	85
8.6.2. Actividad anti-inflamatoria	86
<b>9. Conclusiones</b>	88
<b>10. Referencias</b>	90
<b>11. Anexos</b>	98

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Compuestos aislados de <i>M. micrantha</i> , <i>M. cordifolia</i> y <i>M. houstoniana</i>	20
<b>Figura 2.</b> Terpenos aislados de diferentes géneros de la familia Asteraceae	24
<b>Figura 3.</b> LS representativas de la familia de las compuestas	24
<b>Figura 4.</b> LS tipo germacrólidas de <i>M. scandens</i> y <i>M. cordata</i>	26
<b>Figura 5.</b> LS tipo germacrólidas aisladas de <i>M. micrantha</i>	27
<b>Figura 6.</b> LS tipo germacranólidas de <i>M. micrantha</i> de la República de China	27
<b>Figura 7.</b> LS tipo melampólidas de <i>M. micrantha</i> de Paraguay	28
<b>Figura 8.</b> LS tipo melampólidas aisladas de <i>M. cordifolia</i>	28
<b>Figura 9.</b> LS tipo melampólidas aisladas de <i>M. cordifolia</i> y <i>M. cordata</i>	29
<b>Figura 10.</b> LS tipo germacranólidas y elemanólidas aisladas de <i>M. minima</i>	29
<b>Figura 11.</b> LS aisladas de <i>M. minima</i>	30
<b>Figura 12.</b> LS aisladas de <i>M. ypacarayensis</i>	30
<b>Figura 13.</b> LS aisladas de <i>M. campanulata</i>	30
<b>Figura 14.</b> Diterpenos aislados de <i>M. pyramidata</i>	31
<b>Figura 15.</b> Diterpenos tipo <i>ent</i> -kaurenos aislados de especies de <i>Mikania</i>	31
<b>Figura 16.</b> Representación de las 4 conformaciones principales de las 1-(10)- <i>cis</i> -4 <i>trans</i> -dienólidas	34
<b>Figura 17.</b> Principales interacciones COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ y HMBC de <b>1</b>	40
<b>Figura 18.</b> Principales interacciones NOESY de <b>1</b>	40

<b>Figura 19.</b> Curva de DC experimental (en negro) y calculada (en rojo) para <b>1</b>	41
<b>Figura 20.</b> Estructura por Rayos-X de la 8- <i>epi</i> -mikanokriptina ( <b>1</b> )	41
<b>Figura 21.</b> Principales interacciones COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H y HMBC de <b>2</b>	50
<b>Figura 22.</b> Principales interacciones NOESY de <b>2</b>	51
<b>Figura 23.</b> Principales interacciones NOESY de la 15- <i>O</i> -4'-hidroxi-metacril-micrantólida ( <b>10</b> )	52
<b>Figura 24.</b> Energía mínima relativa (MM+) para los cuatro conformeros de 15- <i>O</i> -4'-hidroxi-metacril-micrantólida ( <b>10</b> ) ( <b>24a-24d</b> )	53
<b>Figura 25.</b> Perfil cromatográfico para las LS <b>1, 3-10</b>	55
<b>Figura 26.</b> Perfil cromatográfico para las LS <b>2, 10-15</b>	55

## LISTA DE DIAGRAMAS

<b>Diagrama 1.</b> Compuestos obtenidos de <i>M. micrantha</i> colectada en Chancalá, Chiapas	39
<b>Diagrama 2.</b> Compuestos obtenidos de <i>M. micrantha</i> colectada en Parácuaro, Michoacán	42
<b>Diagrama 3.</b> Compuestos obtenidos de <i>M. micrantha</i> colectada en Dos Caminos, Oaxaca	43
<b>Diagrama 4.</b> Compuestos obtenidos de <i>M. micrantha</i> colectada en Paraíso, Guerrero	44
<b>Diagrama 5.</b> Compuestos obtenidos de <i>M. micrantha</i> colectada en Nuevo Padilla, Abasolo y Tamaulipas	46
<b>Diagrama 6.</b> Compuestos obtenidos de <i>M. micrantha</i> colectada en Huimanguillo, Tabasco	48
<b>Diagrama 7.</b> Compuestos obtenidos de <i>M. cordifolia</i> colectada en Reyes de Salgado, Michoacán	49
<b>Diagrama 8.</b> Procedimiento general para separar, purificar y analizar los MS de <i>Mikania</i>	63

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tiempos de retención por CLAR de las LS de <i>Mikania</i>	56
<b>Tabla 2.</b> Presencia/ausencia de LS de <i>M. micrantha</i> analizadas por CLAR-DAD	57
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de la inhibición de la proliferación celular de las LS <b>1, 3-14</b> en líneas celulares humanas de cáncer (a 25 $\mu\text{g/mol}$ )	58
<b>Tabla 4.</b> $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) de LS de <i>Mikania</i>	59
<b>Tabla 5.</b> Porcentajes de inhibición (1 $\mu\text{Mol/oreja}$ ) de LS de <i>Mikania</i>	60
<b>Tabla 6.</b> Poblaciones y especies estudiadas de <i>Mikania</i>	62

## ESPECTROS

<b>Espectro 1.</b> EM-IE de 8- <i>epi</i> -mikanokriptina ( <b>1</b> )	99
<b>Espectro 2.</b> IR de 8- <i>epi</i> -mikanokriptina ( <b>1</b> )	100
<b>Espectro 3.</b> RMN $^{13}\text{C}$ de 8- <i>epi</i> -mikanokriptina ( <b>1</b> ) (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	101
<b>Espectro 4.</b> DEPT de 8- <i>epi</i> -mikanokriptina ( <b>1</b> ) (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	102
<b>Espectro 5.</b> RMN $^1\text{H}$ de 8- <i>epi</i> -mikanokriptina ( <b>1</b> ) (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	103
<b>Espectro 6.</b> NOESY de 8- <i>epi</i> -mikanokriptina ( <b>1</b> ) (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	104
<b>Espectro 7.</b> IR 11H $\beta$ -11,13-dihidromicrantólida ( <b>2</b> )	105
<b>Espectro 8.</b> RMN $^{13}\text{C}$ de 11H $\beta$ -11,13-dihidromicrantólida ( <b>2</b> ) (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	106

<b>Espectro 9.</b> RMN <sup>1</sup> H de 11Hβ-11,13-dihidromicrantólida ( <b>2</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	107
<b>Espectro 10.</b> NOESY de 11Hβ-11,13-dihidromicrantólida ( <b>2</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	108
<b>Espectro 11.</b> RMN <sup>1</sup> H de mikanokriptina ( <b>3</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	109
<b>Espectro 12.</b> RMN <sup>13</sup> C de mikanokriptina ( <b>3</b> ) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	110
<b>Espectro 13.</b> RMN <sup>1</sup> H de achalensólida ( <b>4</b> ) (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	111
<b>Espectro 14.</b> RMN <sup>13</sup> C de achalensólida ( <b>4</b> ) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	112
<b>Espectro 15.</b> RMN <sup>1</sup> H de xerantólida ( <b>5</b> ) (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	113
<b>Espectro 16.</b> RMN <sup>13</sup> C de xerantólida ( <b>5</b> ) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	114
<b>Espectro 17.</b> RMN <sup>1</sup> H de mikanólida ( <b>6</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	115
<b>Espectro 18.</b> RMN <sup>13</sup> C de mikanólida ( <b>6</b> ) (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	116
<b>Espectro 19.</b> RMN <sup>1</sup> H de dihidromikanólida ( <b>7</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	117
<b>Espectro 20.</b> RMN <sup>13</sup> C de dihidromikanólida ( <b>7</b> ) (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	118
<b>Espectro 21.</b> RMN <sup>1</sup> H de desoximikanólida ( <b>8</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	119
<b>Espectro 22.</b> RMN <sup>13</sup> C de desoximikanólida ( <b>8</b> ) (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	120
<b>Espectro 23.</b> RMN <sup>1</sup> H de miscandenina ( <b>9</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	121
<b>Espectro 24.</b> RMN <sup>13</sup> C de miscandenina ( <b>9</b> ) (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	122
<b>Espectro 25.</b> RMN <sup>1</sup> H de 15- <i>O</i> -4'-hidroxi-metacril-micrantólida ( <b>10</b> ) (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	123
<b>Espectro 26.</b> RMN <sup>13</sup> C de 15- <i>O</i> -4'-hidroxi-metacril-micrantólida ( <b>10</b> ) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	124
<b>Espectro 27.</b> RMN <sup>1</sup> H de 15- <i>O</i> -2'-hidroxi-isobutiril-micrantólida ( <b>11</b> ) (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	125
<b>Espectro 28.</b> RMN <sup>13</sup> C de 15- <i>O</i> -2'-hidroxi-isobutiril-micrantólida ( <b>11</b> ) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	126

<b>Espectro 29.</b> RMN <sup>1</sup> H de 15- <i>O</i> -3'-cloro-2'-hidroxi-metacril-micrantólida ( <b>12</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	127
<b>Espectro 30.</b> RMN <sup>13</sup> C de 15- <i>O</i> -3'-cloro-2'-hidroxi- metacril-micrantólida ( <b>12</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	128
<b>Espectro 31.</b> RMN <sup>1</sup> H de 15- <i>O</i> -4'-hidroxi-metacril-14-acetoxi-micrantólida ( <b>13</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	129
<b>Espectro 32.</b> RMN <sup>13</sup> C de 15- <i>O</i> -4'-hidroxi-metacril-14-acetoxi-micrantólida ( <b>13</b> ) (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	130
<b>Espectro 33.</b> RMN <sup>1</sup> H de 15- <i>O</i> -3'-hidroxi-isobutiril-micrantólida ( <b>14</b> ) (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	131
<b>Espectro 34.</b> RMN <sup>13</sup> C de 15- <i>O</i> -3'-hidroxi-isobutiril-micrantólida ( <b>14</b> ) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	132
<b>Espectro 35.</b> RMN <sup>1</sup> H de micrantólida ( <b>15</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	133
<b>Espectro 36.</b> RMN <sup>13</sup> C de micrantólida ( <b>15</b> ) (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	134
<b>Espectro 37.</b> RMN <sup>1</sup> H de 15- <i>O</i> -4'-hidroxi-metacril-micrantólida ( <b>10</b> ) (500 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> - 50°C)	135
<b>Espectro 38.</b> RMN <sup>13</sup> C de 15- <i>O</i> -4'-hidroxi-metacril-micrantólida ( <b>10</b> ) (125 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> - 50°C)	136
<b>Espectro 39.</b> NOESY de 15- <i>O</i> -4'-hidroxi-metacril-micrantólida ( <b>10</b> ) (500 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> - 50°)	137
Participación en eventos académicos y publicación	138

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ATF	Acetato de 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol
°C	Grados centígrados
CC	Cromatografía de columna

CCF	Cromatografía de capa fina
CCFP	Cromatografía de capa fina preparativa
CPP	Cromatografía de placa preparativa
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria mínima
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
CLAR-DAD	Cromatografía Líquida de Alta Resolución-Detector de Arreglo de Diodos
COSY	Espectroscopia de correlación (Correlation Spectroscopy)
d	Doblete
da	Doblete ancho
DC	Dicroísmo Circular
DEPT	Aumento sin Distorsión por Transferencia de Polarización (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
[ <sup>n</sup> D <sup>n</sup> , <sup>n</sup> D <sub>n</sub> ]	Nomenclatura para describir la conformación de germacranólidas
DCC	Dicroísmo Circular Calculado
dd	Doble de dobles
ddd	Doble de doble de dobles
δ	Desplazamiento químico
EM	Espectrometría de masas
EM-ARFAB	Espectrometría de masas de Alta Resolución por Bombardeo Rápido de Átomos.
EM-IE	Espectrometría de masas por Impacto Electrónico
eV	Electrón-Volt
FAB	Bombardeo Rápido de Átomos (Fast Atom Bombardment)
g	gramo
HSQC	Correlación Heteronuclear Cuántica Sencilla ( Heteronuclear Single Quantum Correlation)
HMBC	Correlación Heteronuclear de Múltiples Enlaces (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
Hz	Hertz

IE	Impacto Electrónico
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
LS	Lactonas sesquiterpénicas
$\lambda$	Longitud de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )
L	Litro
M+	Ión molecular
m	Múltiple
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MS	Metabolitos Secundario
$\mu\text{m}$	Micromolar
m/z	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
nm	Nanómetro
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
Pf	Punto de Fusión
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN $^1\text{H}$	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno-1
RMN $^{13}\text{C}$	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono- 13
$[\alpha]_D^{25}$	Rotación específica
RO	Rotación óptica
s	Singulete
sa	Singulete ancho
SRB	Sulforrodamina B
TMS	Tetrametilsilano
Tr	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta



## ABSTRACT

The aerial parts of nine populations of *Mikania micrantha* (four from The Pacific states and five from the Gulf of Mexico states), three populations of *M. cordifolia* (collected in Pacific states), and a population of *M. houstoniana* (collected in Veracruz), were studied. A total of 20 compounds were obtained: acetyl- $\beta$ -amyirin (**16**), lupeol (**17**),  $\beta$ -sitosterol (**18**), stigmasterol (**19**) and stigmasteryl- $\beta$ -D-glucopyranoside (**20**) and 15 sesquiterpene lactones (SL) (**1-15**), including two new substances: 8-*epi*-mikanokryptin (**1**) and 11H $\beta$ -11,13-dihydromicrantholide (**2**), and thirteen known which include three guaianolides: mikanokryptin (**3**), achalensolide (**4**) and xerantholide (**5**); four germacrolides: mikanolide (**6**), dihydromikanolide (**7**), deoxymikanolide (**8**) and miscandene (**9**); and six melampolides: 15-*O*-4'-hydroxy-methacryl-micrantholide (**10**), 15-*O*-2'-hydroxy-isobutyryl-micrantholide (**11**), 15-*O*-3'-chloro-2'-hydroxy-isobutyryl-micrantholide (**12**), 15-*O*-4'-hydroxy-methacryl-14-acetoxy-micrantholide (**13**), 15-*O*-3'-hydroxy-isobutyryl-micrantholide (**14**) and micrantholide (**15**) (Figure 1).

The relative and absolute configuration of **1** was determined by analysis of X-Ray diffraction and circular dichroism (CD), respectively. The NOESY experiments of **10** established the [ $^1D^{14}$ ,  $^{15}D_5$ ] conformation, which agreed with the theoretical calculations (HyperChem 8.0.6, MM+). Therefore, it could be inferred that this is the preferred conformation for micrantholides (**2**, **11-15**).

The SL **1**, **3-12** were tested in six human cancer cell lines, being better response in three of them (central nervous system, breast and lung). The SL **1**, **4**, **7-13** were evaluated as anti-inflammatory agents, using the model of mouse ear edema induced by TPA, and they displayed marginal activity.

Additionally, studies were performed by HPLC-DAD in order to develop a method to achieve the chromatographic profiles of the 15 SL obtained during the investigation. Once

developed the method, five populations of *M. micrantha* collected in the Gulf of Mexico were analyzed and the presence/absence of SL were determined.

According to the results, evidence is provided of the variability in the metabolic content of various populations studied both *M. micrantha* and *M. Mikania cordifolia*, and this variation can be correlated to its adaptability and wide distribution in different parts of the world.

## 1. RESUMEN

Se estudiaron las partes aéreas de nueve poblaciones de *Mikania micrantha* (cuatro provenientes de estados del Pacífico y cinco de estados del Golfo de México), tres poblaciones de *M. cordifolia* (colectadas en estados del Pacífico), y una población de *M. houstoniana* (colectada en Veracruz). Se obtuvieron en total 20 compuestos: acetil- $\beta$ -amirina (**16**), lupeol (**17**),  $\beta$ -sitosterol (**18**), estigmasterol (**19**) y  $\beta$ -D-glucopiranosido de estigmasterilo (**20**) y 15 lactonas sesquiterpénicas (LS) (**1-15**), entre ellas dos nuevas sustancias: 8-*epi*-mikanokriptina (**1**) y 11H $\beta$ -11,13-dihidromicrantólida (**2**), y trece conocidas las cuales incluyen 3 guayanólidas: mikanokriptina (**3**), achalensólida (**4**) y xerantólida (**5**); cuatro germacrólidas: mikanólida (**6**), dihidromikanólida (**7**), desoximikanólida (**8**) y miscandenina (**9**); y seis melampólidas: 15-*O*-4'-hidroxi-metacril-micrantólida (**10**), 15-*O*-2'-hidroxi-isobutiril-micrantólida (**11**), 15-*O*-3'-cloro-2'-hidroxi-isobutiril-micrantólida (**12**), 15-*O*-4'-hidroxi-metacril-14-acetoxi-micrantólida (**13**), 15-*O*-3'-hidroxi-isobutiril-micrantólida (**14**) y micrantólida (**15**). (Figura 1).

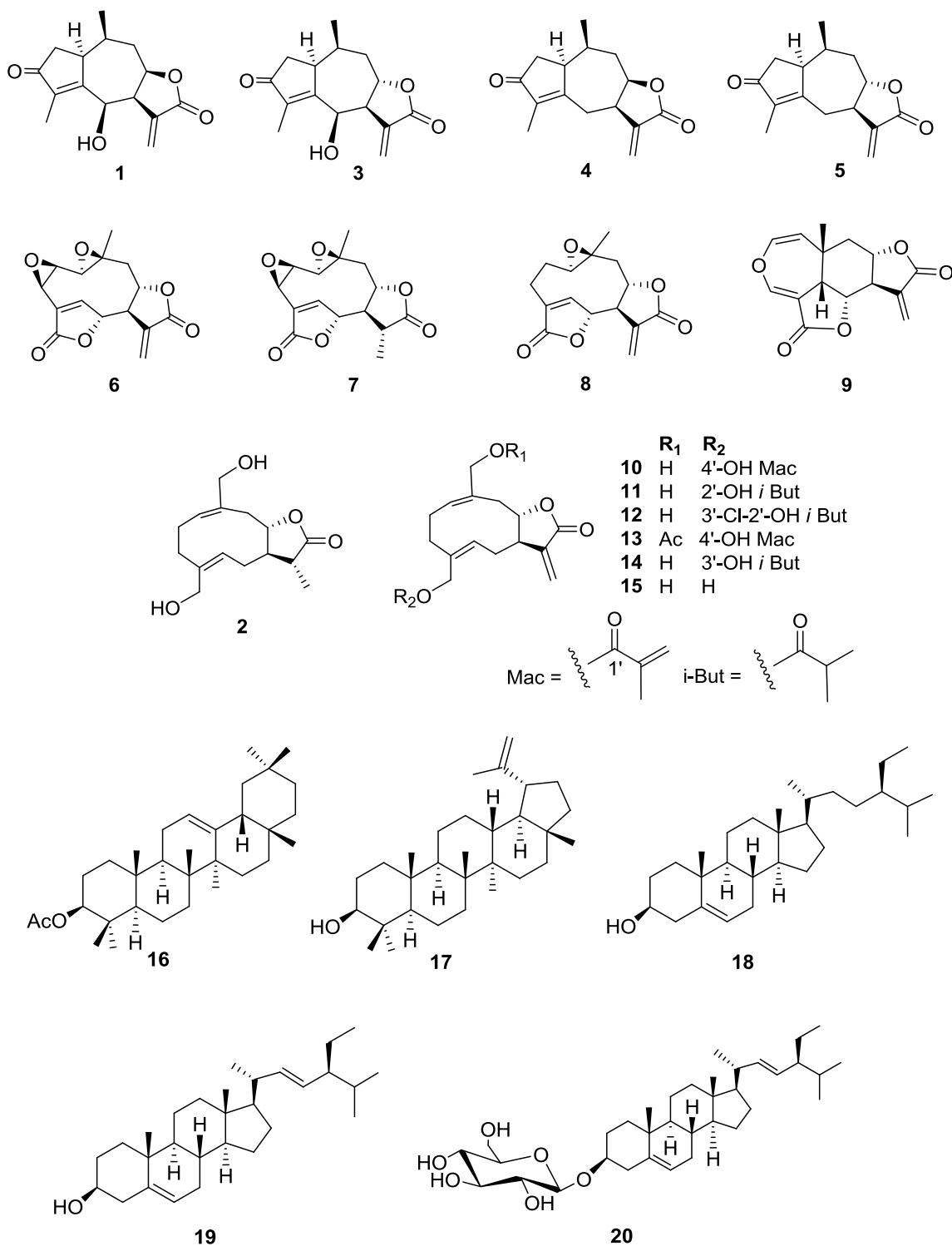
La configuración relativa y absoluta de **1** fue determinada por análisis de difracción de Rayos-X y por dicroísmo circular (DC), respectivamente. Los experimentos NOESY de **10** permitieron establecer su conformación como [ $^1D^{14}$ ,  $^{15}D_5$ ], la cual está de acuerdo con los cálculos teóricos (HyperChem 8.0.6, MM+). Por lo tanto, puede inferirse que esta es la conformación preferida para las micrantólidas (**2**, **11-15**).

Las LS **1**, **3-12** fueron evaluadas en seis líneas de células cancerosas humanas, encontrándose mejor respuesta en tres de ellas (sistema nervioso central, pecho y pulmón). Las LS **1**, **4**, **7-13** fueron evaluadas como agentes anti-inflamatorios, utilizando el modelo de edema en oreja de ratón inducido con ATF, las cuales mostraron actividad marginal.

Adicionalmente, se llevaron a cabo estudios por CLAR-DAD con el fin de desarrollar un método que permitiera obtener los perfiles cromatográficos de las 15 LS obtenidas durante la investigación. Una vez desarrollado el método, se analizaron cinco poblaciones de *M.*

*micrantha* colectadas en el Golfo de México y se determinó presencia/ausencia de las LS de referencia.

De acuerdo a los resultados, se provee evidencia de la variabilidad en el contenido metabólico de las diversas poblaciones estudiadas tanto de *M. micrantha* como de *M. cordifolia*, y esta variación puede ser correlacionada con su adaptabilidad y amplia distribución en diferentes partes del mundo.



**Figura 1.** Compuestos aislados de *M. micrantha*, *M. cordifolia* y *M. houstoniana*

## 2. INTRODUCCIÓN

El género *Mikania* (Asteraceae, tribu Eupatorieae, subtribu Mikaniinae), es nativo de América y sus especies se han adaptado en gran parte del mundo. En México, algunas especies de este género han sido reportadas en 19 estados; su distribución se presenta desde los estados de Nayarit y Tamaulipas, hasta la Península de Yucatán [1].

Algunas especies de *Mikania* han sido utilizadas en la medicina folclórica para el tratamiento de asma, bronquitis y tos, y preparaciones de algunas otras especies han mostrado diversas actividades biológicas [2]. Los extractos de *M. micrantha* han sido usados tradicionalmente en varias partes de México y los de *M. guaco* en Colombia, como emplastos para las mordeduras de serpientes, picaduras de escorpión y enfermedades de la piel [3-4]. Algunas preparaciones de *M. cordifolia* han mostrado actividad antitricomonal, antitripanosomal e insecticida [5-6].

*M. micrantha* es considerada como una de las malezas más invasivas en el mundo. En el sureste de Asia, se ha convertido en un grave problema, y desde hace varias décadas, causa graves daños a la vegetación nativa y cultivos [7-8]. Los estudios previos de los extractos de algunas especies de *Mikania* y sus constituyentes químicos han mostrado efectos fitotóxicos y propiedades alelopáticas [9-11].

*Mikania* contiene más de 430 especies y cerca del 15% han sido estudiadas químicamente [12-14]. De acuerdo a los metabolitos obtenidos de especies de éste género, se ha dividido en dos secciones, la primera sección es llamada Summikania, y esta caracterizada por la presencia de diterpenoides como constituyentes principales [15-17]. En la segunda sección se encuentran las LS y es llamada sección Mikania (complejo *M. scandens*) [18]. Por ejemplo, se han reportado LS tipo germacranólidas [18-20], eudesmanólidas [21] y melampólidas principalmente [17,22,23].

En la presente investigación se describe la composición química de 20 compuestos aislados de diferentes poblaciones de *Mikania micrantha*, *M. cordifolia* y una población de *M. hostuniana*, y el estudio de citotoxicidad y anti-inflamatorio de la mayoría de las LS obtenidas.

Estudios por CLAR-DAD fueron llevados a cabo con el fin de desarrollar un método rápido y obtener perfiles cromatográficos de las 15 LS aisladas en esta investigación. Se analizaron cinco poblaciones de *M. micrantha* colectadas en Golfo de México y determinó la presencia/ausencia de estos compuestos.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. GENERALIDADES DE LA FAMILIA ASTERACEAE

##### 3.1.1. Distribución y hábitat

La familia Asteraceae o de las compuestas, es una de las más grandes y ampliamente distribuidas de las angiospermas y comprende aproximadamente 1,300 géneros y entre 25,000 a 30,000 especies distribuidas en trece subfamilias y 17 tribus. Está ampliamente distribuida por todo el mundo, encontrándose en regiones semiáridas, tropicales y subtropicales, excepto en la Antártida [24]. El origen etimológico del nombre de la familia proviene del término latino “aster” que significa “estrella” y se refiere a la forma de las inflorescencias [25].

En México, se reconocen 387 géneros de la familia Asteraceae, la cual ocupa un lugar importante ya que el 65.9% de sus especies (3021), son endémicas [26-27]. En el estado de Oaxaca se reportan 133 especies endémicas y 116 muestran un endemismo compartido con los estados de Guerrero, Veracruz y Puebla [28].

##### 3.1.2. Química y actividad biológica

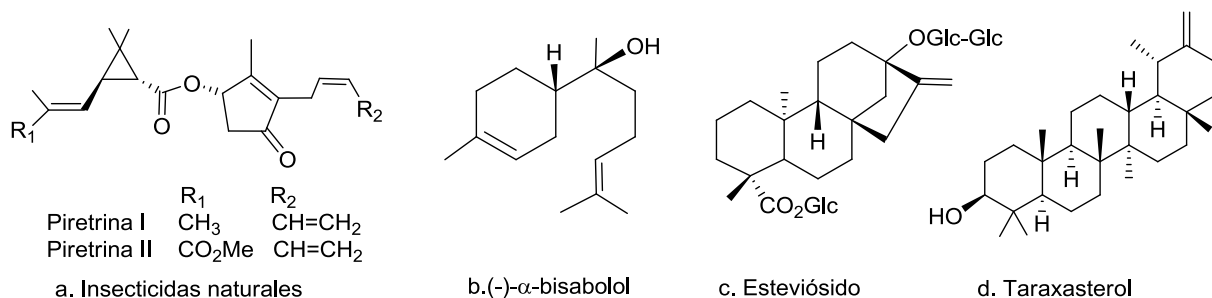
Básicamente de la biosíntesis de las compuestas, se obtienen diversos metabolitos, debido al gran número de especies que la conforman. Por mencionar, del género *Chrysanthemum* especialmente de *C. cinerariaefolium* se han obtenido monoterpenos irregulares, como son las piretrinas, que han sido usadas como insectidas naturales (Figura 2a) [29].

Del género *Matricaria*, se han obtenido sesquiterpenos, el  $\alpha$ -bisabolol fue aislado de *M. chamomilla*, y ha sido probado como un agente antimicrobiano (Figura 2b) [30].

Del género *Stevia*, se reporta el aislamiento de diterpenos, el esteviósido es conocido por ser un endulzante natural, el cual se obtuvo de *S. rebaudiana* (Figura 2c) [31].

Triterpenos como el taraxasterol (Figura 2d), fue obtenido de *Taraxacum officinales*.



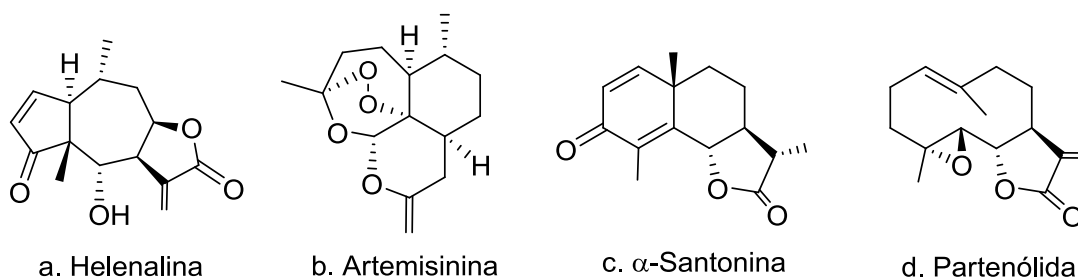


**Figura 2.** Terpenos aislados de diferentes géneros de la familia Asteraceae

Sin embargo, las LS pueden ser los compuestos de mayor interés en la familia de las compuestas, debido a las diversas actividades biológicas que se han encontrado en ellas. Por citar algunos ejemplos, la Helenalina obtenida de *Helenium mexicanum*, fue probada como agente anti-inflamatorio, mostrando una buena respuesta (Figura 3a) [32].

De *Artemisia annua*, fue reportada la artemisinina, conocida por su acción como agente antimalárico (Figura 3b) [33] y la  $\alpha$ -santonina, la cual se reporta del mismo género pero de *A. cinia*, y ha sido probada como agente antihelmíntico (Figura 3c) [34].

De *Tanacetum parthenium*, fue aislada la partenólida, la cual ha sido aprobado por la FDA como el único producto natural con actividad contra la migraña (Figura 3d) [35].



**Figura 3.** LS representativas de la familia de las compuestas

Diversos estudios químicos han demostrado la actividad citotóxica de numerosas LS, aisladas desde diferentes géneros de las compuestas. La relación entre la estructura química y

dicha actividad, ha sido demostrada gracias a la presencia del metileno exocíclico en el anillo lactónico, principalmente.

Los estudios mostraron que las LS reaccionan con tioles tales como en la cisteína por una adición rápida tipo Michael, inhibiendo el crecimiento tumoral por alquilación selectiva de macromoléculas biológicas reguladoras del crecimiento, tales como enzimas claves que controlan la división celular [36-37].

Otros compuestos reportados son los ácidos grasos, derivados de poliacetilenos, aceites esenciales, eremofilanos, alcaloides pirrolizidínicos, triterpenos, cumarinas y flavonoides [38-39].

### **3.1.3. Importancia económica y ecológica**

Las plantas de esta familia constituyen un numeroso grupo de especies de notable importancia ecológica y económica. Para uso alimenticio está por ejemplo *Helianthus annuus*, de donde se obtiene el aceite de girasol, *Lactuca sativa* más comumente conocida como la lechuga; algunas medicinales como la manzanilla (*Matricaria recutita*), la cual es usada para trastornos estomacales en general; ornamentales como los crisantemos, los girasoles y las dalias, entre otras. Otras especies incluyen malezas o son plantas tóxicas.

## **3.2. GENERALIDADES DEL GÉNERO MIKANIA**

### **3.2.1. Distribución y hábitat**

El género *Mikania* es originario de América y sus especies se han adaptado en casi todo el mundo. Pertenece a la familia Asteraceae (tribu Eupatorieae, subtribu Mikaniinae) y contiene más de 450 especies, de las cuales cerca de 50 han sido estudiadas químicamente [12-14]. En México ha sido reportado desde el Norte de México hasta Chiapas y la Península de Yucatán [1].

*M. micrantha*, una de las especies de esta investigación, es considerada como una de las peores especies invasivas al Sur de Asia, causando principal daño a la vegetación nativa y

cultivos de té, caucho y arroz [7] y aunque es la especie más colectada de éste género, *M. cordifolia*, parece ser, la especie de mayor distribución natural [8].

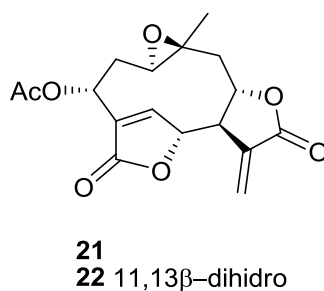
### 3.2.2. Química del Género *Mikania*

El estudio de éste género, contempla más de 300 compuestos aislados y caracterizados, los cuales incluyen esteroides, terpenoides, flavonoides, coumarinas y LS [2].

Como se ha mencionado, el género *Mikania* se encuentra dividido en dos secciones, de acuerdo a la clase de metabolitos que se aislen de sus especies. Entre algunos nombres que conforman la sección Summikania están: *M. congesta*, *M. lindbergii*, *M. leavigata*, *M. hirsutissima* y *M. oblogifolia*, entre otras, y donde principalmente se obtienen diterpenos tipo *ent*-kaurenos [15-17]. De la Sección Mikania, los constituyentes más comunes son las LS y hacen parte del complejo *M. scandens* como: *M. micrantha*, *M. minima*, *M. cordata* y *M. periplocifolia*, entre otras [17].

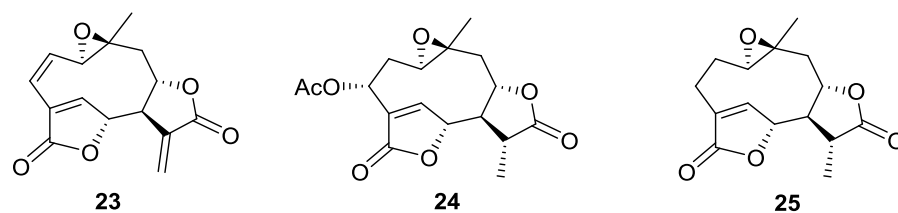
El primer reporte en éste género, fue hecho por Herz y colaboradores en el año 1967, en la cual caracterizaron de las partes aéreas de *M. scandens* la LS **6** (figura 1) [40]. De la misma especie, fueron aisladas las LS **7-9** (Figura 1); escandenólida (**21**) y la dihidroescandenólida (**22**) (Figura 4), las cuales inicialmente fueron consideradas como marcadores químicos para el complejo *M. scandens* [17-18]. **9** también fue aislada de *M. periplocifolia* (Figura 1)[41].

De *M. cordata*, especie nativa de Asia, fueron reportadas **6-7** y de una colección de Filipinas **6-8** y **21** (Figura 4) [42-43].



**Figura 4.** LS tipo germacrólidas de *M. scandens* y *M. cordata*

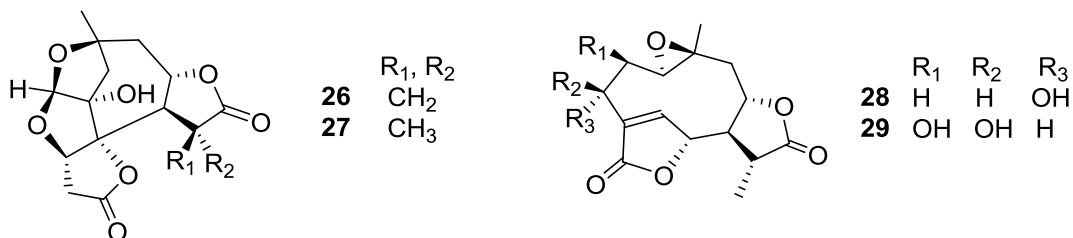
Es posible establecer que *M. micrantha* es la especie más estudiada de este género. Es así, como las estructuras **6-8** (Figura 1), **21-22** (Figura 4) junto con la anhidroescandénolida (**23**) (Figura 5) fueron obtenidas de una población de Tucumán-Argentina [20]. De una colección de Hong Kong fue reportada **7** y las nuevas LS 3-*epi*-dihidroescandénolida (**24**) y desacetoxi-dihidroescandénolida (**25**) (Figura 5) [44].



**Figura 5.** LS tipo germacrólidas aisladas de *M. micrantha*

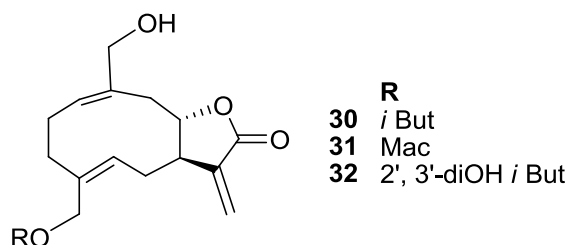
De la misma especie, de la zona del canal del Panamá se encontraron las dilactonas **6-7**, junto con la mikanokriptina (**3**), una guayanólida reportada por primera vez (Figura 1) [45-46]. Los estudios por difracción de Rayos X de **3**, **6-7**, **9** y **25** fueron publicados años más tarde [19, 47-48].

Otras dilactonas fueron reportadas de una colección de *M. micrantha* al sur de de la República de China. Mikamicranólida (**26**) y 11H $\beta$ -11,13-dihidromikamicranólida (**27**) han sido clasificadas como un inusual arreglo del esqueleto de las 12,8-germacranólidas, las cuales pueden ser consideradas como 3,4-seco-germacranólidas con un enlace adicional entre el C-2 y C-6. También se reporta la obtención de la 3 $\alpha$ -hidroxi-11 $\beta$ ,13-dihidrodesoximikanolida (**28**) y 2 $\beta$ ,3 $\beta$ -dihidroxi-11 $\beta$ ,13-dihidro-desoximikanólida (**29**) (Figura 6) [11].



**Figura 6.** LS tipo germacranólidas de *M. micrantha* de la República de China

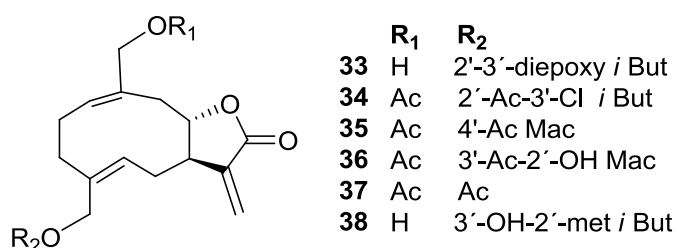
Un tercer tipo de esqueleto ha sido reportado de *M. micrantha*, las 14,15-dihidroxigermacra-1,10Z,4E-dien-12,8 $\alpha$ -óolidas más conocidas como melampólidas. 15-O-4'-hidroxi-metacril-micrantólida (**10**), micrantólida (**15**) (Figura 1), 15-O-isobutiril-micrantólida (**30**), 15-O-metacril-micrantólida (**31**) y la 15-O-2',3'-dihidroxisobutiril-micrantólida (**32**), fueron encontradas en una población de Paraguay (Figura 7), junto con **6**, **8-9** (Figura 1) [49].



**Figura 7.** LS tipo melampólidas de *M. micrantha* de Paraguay

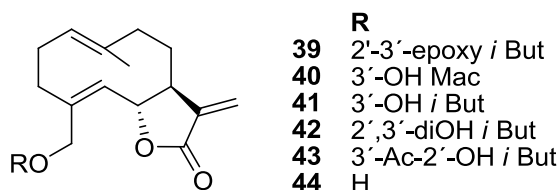
Otra de las especies estudiadas del género *Mikania* es *M. cordifolia*. De esta especie, los reportes indican que las lactonas tipo melampólidas son más comunes que en *M. micrantha*. De dos colecciones de Argentina se reportó el hallazgo de las lactonas **10-13**, **15** y **30-32**, adicionalmente se obtuvieron las LS 15-O-(2',3'-epoxi-isobutiril)-micrantólida (**33**), 15-O-2'-acetoxi-3'-cloro-isobutiril-14-acetoxi-micrantólida (**34**), 15-O-4'-acetoxi-metacril-14-acetoxi-micrantólida (**35**), 15-O-3'-acetoxi-2'-hidroxi-isobutiril-14-acetoxi-micrantolida (**36**) y la diacetoximicrantólida (**37**) (Figura 8) [23].

De una colección de Costa Rica de la misma especie, fueron aisladas las melampólidas **10-11**, **15** y **30-33**, junto con la nueva lactona 15-O-3'-hidroxi-2' metil-isobutiril-micrantólida (**38**) (Figura 8) [50].



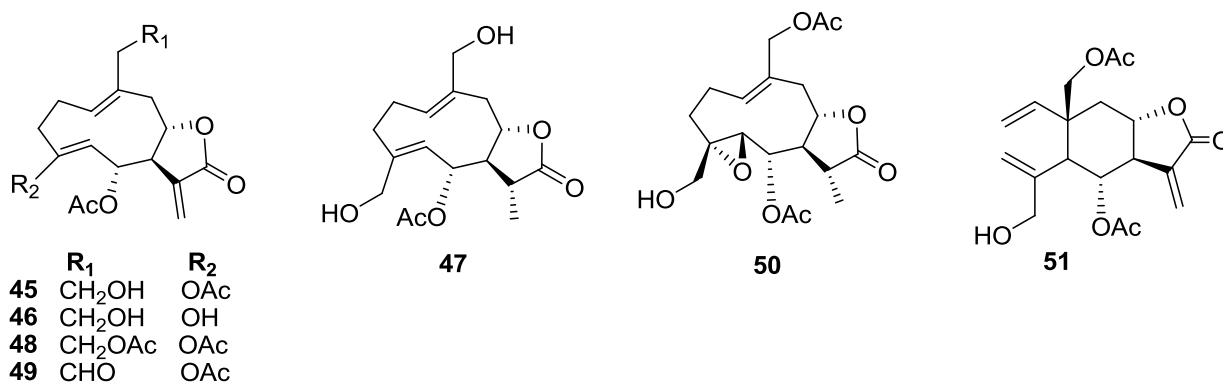
**Figura 8.** LS tipo melampólidas aisladas de *M. cordifolia*

De *M. cordifolia* y *M. cordata* se reportaron desde poblaciones de Brasil las LS 6,12 ólidas derivadas de las salonitenólidas. 15-*O*-(2',3'-epoxi-isobutiril)-8-desoxisalonitenólida (**39**), 15-*O*-(3'-hidroxi-metacril)-8-desoxisalonitenólida (**40**), 15-*O*-(3'-hidroxi-isobutiril)-8-desoxisalonitenólida (**41**), 15-*O*-(2',3'-dihidroxi-isobutiril)-8-desoxisalonitenólida (**42**), 15-*O*-(3'-acetoxi-2'-hidroxi-isobutiril)-8-desoxisalonitenólida (**43**) y la 8-desoxisalonitenólida (**44**) (Figura 9) [51].



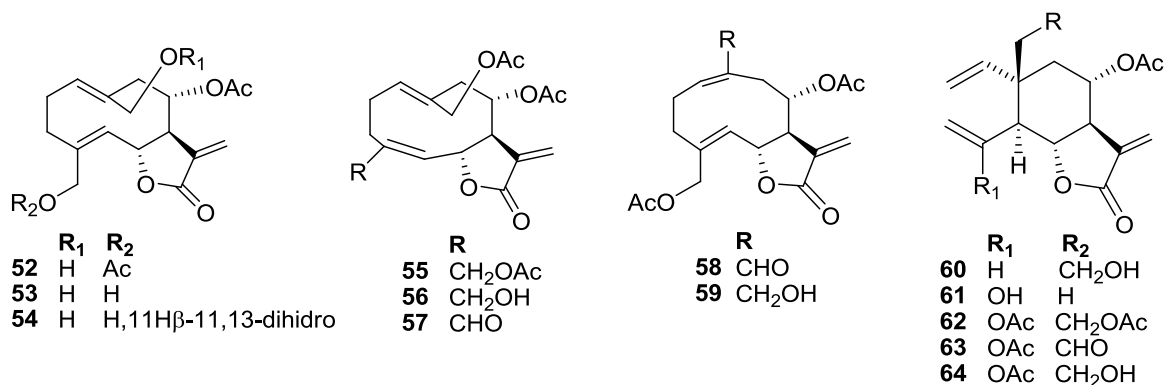
**Figura 9.** LS tipo melampólidas aisladas de *M. cordifolia* y *M. cordata*

De *M. minima* se han obtenido LS tipo germacrólidas (**45-47**) y algunos derivados semisintéticos (**48-50**), cuya conformación fue definida como [<sub>1</sub>D<sup>14</sup>, <sup>15</sup>D<sub>5</sub>]; adicionalmente se reporta un esqueleto tipo elemanólido (**51**) (Figura 10) [52].



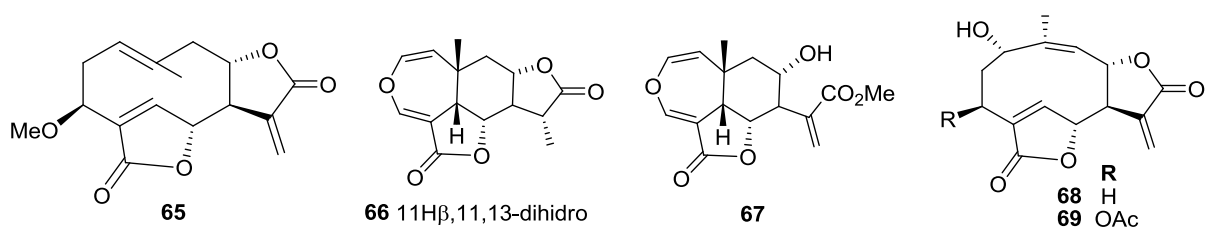
**Figura 10.** LS tipo germacránólidas y elemanólidas aisladas de *M. minima*

En esta misma especie se reportaron LS tipo germacradieno 6,12 ólidas, entre ellas las germacránólidas (**52-54**), previamente reportadas de *Dicoma anomala*; las heliangólidas (**55-57**), melampólidas (**58-59**), y elemadienólidas (**60-64**) (Figura 11) [53].



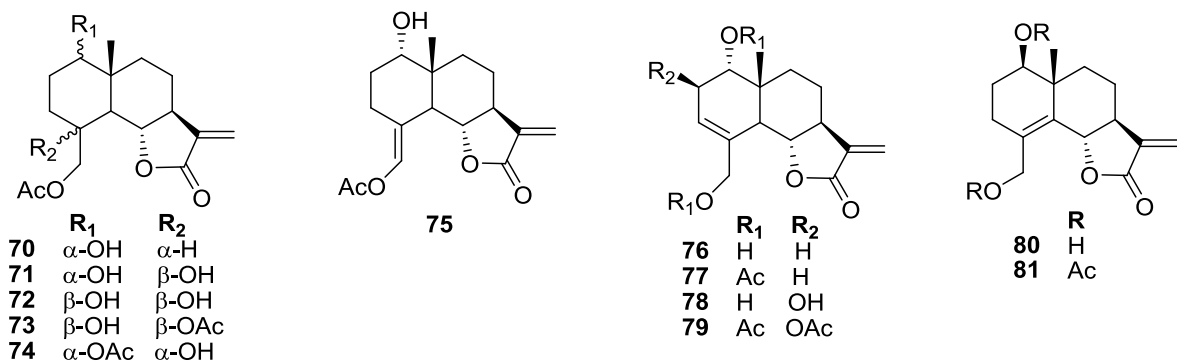
**Figura 11.** LS aisladas de *M. minima*

Otras LS como derivados de la isabelina (**65**), de la miscandenina (**66-67**) y de la mikaperiplocólida (**68-69**), fueron obtenidos de *M. ypacarayensis* de Argentina (Figura 12), al igual que las LS **6-9** y **21-23** [54].



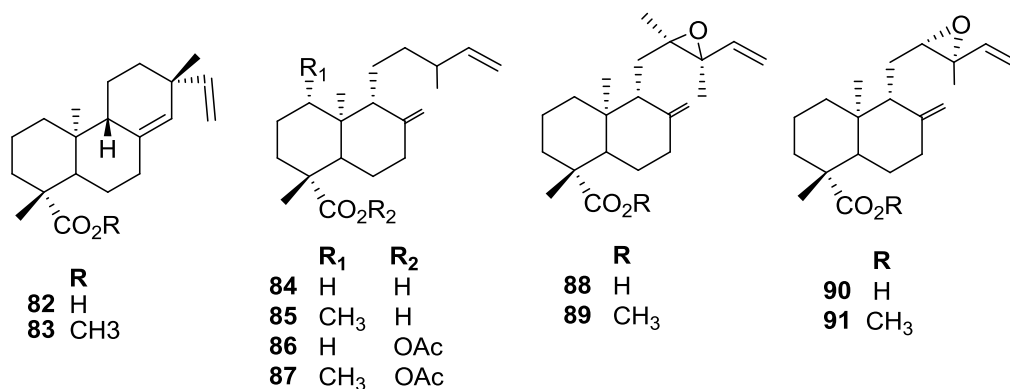
**Figura 12.** LS aisladas de *M. ypacarayensis*

LS tipo eudesmanólidas fueron obtenidas desde *M. campanulata* colectada en Argentina. Los compuestos **70-75**, **77**, **79** y **81**, se reportaron como nuevos productos naturales (Figura 13) [21].



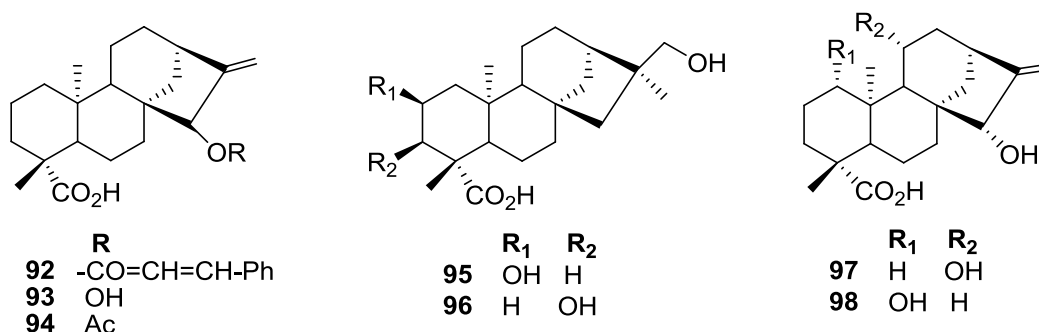
**Figura 13.** LS aisladas de *M. campanulata*

Los metabolitos tipo diterpenos, encontrados en las especies de la sección Summikannia, fueron reportados de *M. pyramidata*, algunos ácidos labdánicos, ácidos y derivados de ácido kaurénico se muestran en la Figura 14 [55].



**Figura 14.** Diterpenos aislados de *M. pyramidata*

De *M. oblongifolia* fueron obtenidos derivados del ácido cinamoilgrandiflórico (**92-94**) (Figura 15) [59]. Ácidos *ent*-kaurénicos fueron obtenidos de *M. hirsutissima* (**95-98**) (Figura 15) [56].



**Figura 15.** Diterpenos tipo *ent*-kaurenos aislados de especies de *Mikania*

Otros diterpenos fueron aislados desde *M. lindbergii* [16], *M. officinalis*, *M. belemii* y *M. sessilifolia* [57], *M. banisteriae* [58], y muchas otras especies, pertenecientes a la sección Summikannia, como se ha comentado anteriormente.



Monoterpenos y lignanos son otros metabolitos obtenidos de *M. saltensis* [14]; se encuentran también reportes de triterpenos aislados de *M. cordifolia* y *M. micrantha* [20,59]. Compuestos fenólicos también han sido aislados de *M. micrantha* y *M. cordata* [12,13]. El aceite esencial de *M. micrantha*, también ha sido evaluado, reportando al linalool y  $\alpha$ -pineno como los componentes mayoritarios [60].

### 3.2.3. Actividades biológicas

Muchas especies del género *Mikania*, han mostrado diversas acciones farmacológicas. Estudios previos han demostrado que los extractos de algunas especies de este género y sus componentes tienen efectos fitotóxicos y propiedades alelopáticas, las cuales han sido atribuidas principalmente a la composición de los aceites esenciales y a la presencia de LS, y que pueden ser nocivas contra herbívoros y contra microorganismos patógenos [9-11, 61].

Los extractos de *M. glomerata* han sido usados popularmente para el tratamiento de asma, bronquitis y fiebre [62]; también han sido probados en procesos anti-inflamatorios y poseen actividad en el sistema digestivo, inhibiendo la motilidad intestinal [2, 63].

Diversos estudios han demostrado que los extractos de *M. leavigata* y *M. glomerata*, han sido usados como expectorantes, en el tratamiento de enfermedades como la influenza y respiratorias, también fueron probados en enfermedades respiratorias broncoconstrictivas [64]. El extracto hidroalcohólico crudo al 70%, de *M. leavigata* ha presentado actividad antiulcerogénica [65] y las decocciones de sus hojas, actividad anti-inflamatoria al igual que las de *M. involucrata* [66].

Otros extractos evaluados como agente anti-inflamatorios usando el modelo de edema plantar inducido por carragenina, fueron los extractos hidroalcohólicos de *M. leavigata* Schultz Bip. Ex Baker, *M. involucrata* Hook. et. Arn. y *M. hirsutissima* DC, los cuales mostraron que los diterpenos, podrían ser los responsables de dicha actividad [66].

Los extractos de *M. cordata* y *M. scandens*, exhibieron potentes efectos, demostrando su acción depresiva en el sistema nervioso central [67]. Los extractos hidrometanólicos de hojas de *M. scandens*, fueron probados en actividad analgésica, demostrando una alta actividad [68].

La actividad anti-inflamatoria de los extractos polares de *M. cordifolia*, es atribuida a la presencia de los ácidos dicafeoilquínicos. Las preparaciones de *M. cordifolia* también exhibieron actividad antiofidica, insecticida, antitripanosomal y antitricomonal [2,5-6].

Los extractos de algunas especies de *Mikania* han sido usados contra mordedura de serpiente, picadura de alacrán y algunas enfermedades de la piel, tal es el caso de *M. micrantha* en México, *M. guaco* en Colombia y *M. glomerata* en Argentina [3-4, 64].

Las LS de éste género, han sido también probadas en diferentes actividades farmacológicas. La LS **21**, aislada de *M. cordata*, exhibió actividad anti-inflamatoria [69] y la LS **8** aislada de la misma especie, fue probada en actividad analgésica [70].

Las LS **7, 24-25** obtenidas de *M. micrantha* fueron probadas en actividades antivirales. La LS **24** exhibió una actividad moderada contra el virus respiratorio sincitial (VRS) (CI<sub>50</sub> 37.4 uM) y el virus de la parainfluenza de tipo 3 (CI<sub>50</sub> 37.4 uM), valores comparables con la ribavirina, que sirvió como control positivo [44].

Adicionalmente, se reporta la actividad antimicrobiana y antibacterial de las LS **6-9** y otros derivados, la cual ha sido más alta en patógenos gram-positivos que en gram-negativos, también se probaron sus actividades antifúngicas [2,37,71].

Las melampólidas aisladas de *M. minima*, presentaron actividad citotóxica, cuando se probaron en la línea P-388 de linfoma de ratón, y en las líneas celulares humanas de A-549 (carcinoma de pulmón) y HT-29 (carcinoma de colon) [22]. Las LS **6-7**, al igual que otras LS del género *Mikania*, fueron indicadas como inhibidores del ADN polimerasa [2].

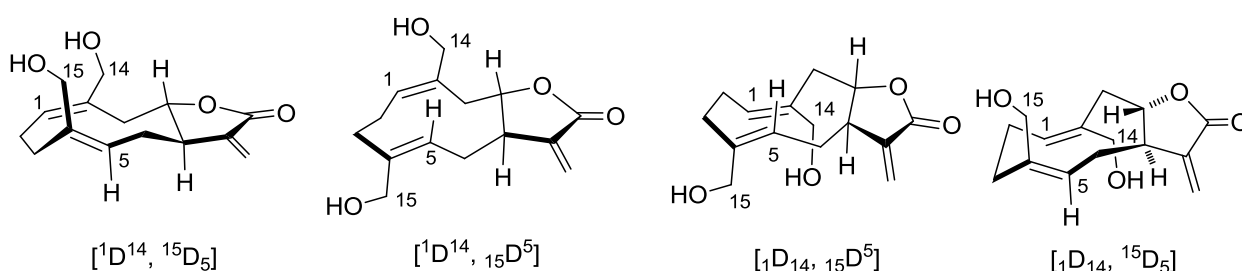
En general, se ha demostrado que las LS aisladas del género *Mikania*, exhiben actividad antiviral, citotóxica, anti-inflamatoria, antialérgica, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoaria, insecticida y tripanocida, entre otras [2,37].

### 3.3. Conformación de las germacra 1-(10),4-dienólidas de *Mikania*

La naturaleza del doble enlace *cis,trans*, de los anillos ciclodecadienos, tiene una fuerte influencia para poder determinar sus conformaciones [72]. Para lo anterior, y con el objetivo de describir las diferentes conformaciones de los ciclodecadienos, Samek y Harmatha [73], propusieron una nomenclatura para determinar tanto la configuración de los dobles enlaces del anillo como la conformación del mismo.

Si se considera una perspectiva ortogonal de los dobles enlaces al plano del macrociclo, se puede describir la orientación espacial de los sustituyentes sobre los enlaces dobles C(1)-C(10) y C(4)-C(5), utilizando la letra D (dos letras D, una por cada doble enlace), y usando *supra* y *sub*-índices a izquierda y derecha de cada una.

De acuerdo a los reportes sobre ésta clase de compuestos, se ha encontrado que las germacranólidas lactonizadas 6,7- tienen una conformación fija en solución, mientras que las lactonizadas 7,8- pueden ser más flexibles y pueden existir en más de una conformación. Por lo anterior, se conoce que las germacra-1-(10)-*cis*,4-*trans*-dienólidas pueden existir en cuatro conformaciones extremas, y en particular, para las micrantólidas son:  $[^1D^{14}, ^{15}D_5]$ ,  $[^1D^{14}, ^{15}D^5]$ ,  $[{}_1D_{14}, ^{15}D^5]$ ,  $[{}_1D_{14}, ^{15}D_5]$ , como se muestran en la Figura 16 [73].



**Figura 16.** Representación de las 4 conformaciones principales de las 1-(10)-*cis*-4-*trans*-dienólidas

De acuerdo a lo anterior, y a la orientación de los grupos sobre los dobles enlaces del anillo ciclodecadieno, es posible determinar cual es la conformación preferida para las melampólidas, especialmente para las micrantólidas de *Mikania*.

### **3.4. Análisis de LS por CLAR-DAD**

Varios estudios usando la cromatografía líquida de alta resolución empleando un detector de arreglo de diodos (CLAR-DAD), se han realizado para detectar o cuantificar LS reportadas en algunos géneros de la familia Asteraceae. LS de los géneros *Parthenium*, *Arnica*, *Melampodium*, *Tanacetum*, *Ambrosia*, *Scalesia* y *Neuroleana*, han sido analizadas por esta metodología. LS tipo germacranólidas, guayanólidas, pseudoguayanólidas, xantanólidas, melampólidas, furanoheliangólidas y eudesmanólidas, son los más comúnmente estudiadas utilizando la técnica de CLAR [74-76].

Sin embargo, del género *Mikania*, existe un único reporte utilizando CLAR, donde los autores realizaron un análisis comparativo de LS presentes en 3 poblaciones de *M. cordifolia* colectadas en Brasil, en este estudio se detectaron LS tipo melampólidas [77].

En esta investigación, se aislaron y caracterizaron las LS **1-15**, de diferentes poblaciones de *M. micrantha* y *M. cordifolia*, las cuales sirvieron de referencia para el estudio por CLAR-DAD.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

La presente investigación experimental constituirá una contribución significativa al conocimiento de la composición química de un grupo de plantas de importancia y de amplia reproducción en varias partes del mundo, y que tiene incidencia en las áreas del conocimiento y conservación de los recursos naturales, y en el área de la búsqueda de nuevos productos naturales con posible interés terapéutico.

#### **5. HIPÓTESIS**

Considerando que algunas especies del género *Mikania* (familia Compositae) se reproducen abundantemente en todo el mundo y que producen diversos constituyentes químicos, y que potencialmente estas sustancias puedan tener interés terapéutico, es plausible que el estudio químico de *M. micrantha*, *M. cordifolia* y *M. houstoniana*, permita el aislamiento y la determinación de la estructura molecular de nuevos metabolitos secundarios cuya bioevaluación como agentes citotóxicos y anti-inflamatorios permita ponderar su actividad biológica.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. Objetivo general**

Generar conocimiento científico original referente a los constituyentes químicos presentes en diferentes poblaciones de *Mikania micrantha*, *M. cordifolia*, y de una población de *M. houstoniana* y sus propiedades biológicas, para comparar los resultados obtenidos con la de otras colectas de estas especies estudiadas en diferentes partes del mundo.

### **6.2. Objetivos específicos**

- Compilar la información química y biológica relacionada con las especies vegetales del género *Mikania* y grupos de plantas taxonómicamente relacionados.
- Extraer, aislar y caracterizar estructuralmente los productos naturales presentes en las especies vegetales seleccionadas, mediante la aplicación de los procedimientos experimentales en química orgánica.
- Llevar a cabo evaluaciones biológicas que permitan ponderar la bioactividad de las sustancias puras como agentes citotóxicos, empleando el método de la sulforrodamina B contra seis líneas celulares de cáncer humano; y la actividad anti-inflamatoria usando el modelo de edema de oreja de ratón con ATF.
- Comparar los resultados químicos y biológicos obtenidos con los resultados informados a partir de otros vegetales del mismo género y contextualizar los mismos en el ámbito de la investigación de los productos naturales bioactivos.

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 7.1. Selección de las especies de *Mikania*

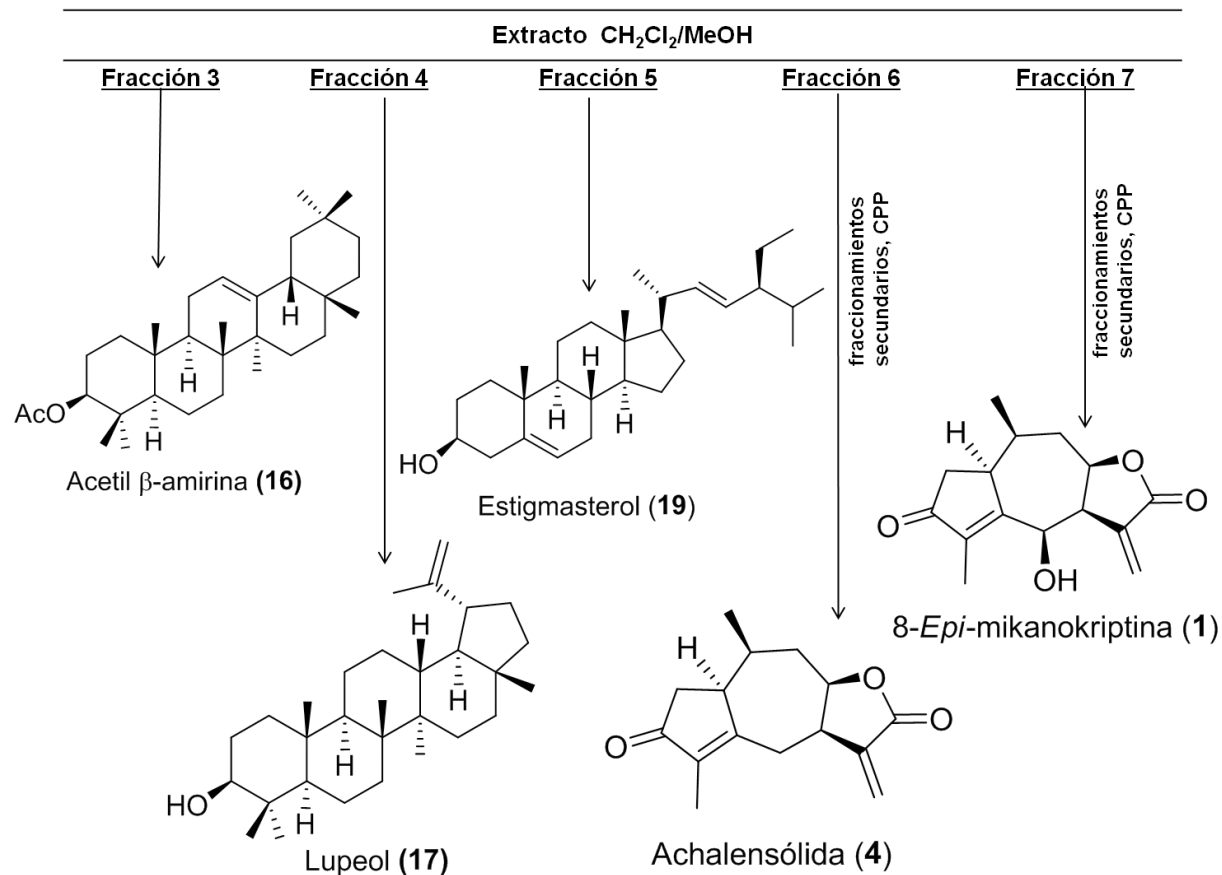
Para continuar con el estudio sobre LS, realizado por el grupo de investigación [78-81], se propuso investigar a tres especies del género *Mikania*, colectadas en 13 poblaciones de México. Es así, como *M. micrantha* fue colectada en 4 poblaciones del Pacífico: Chiapas, Michoacán, Oaxaca y Guerrero; y en 5 poblaciones del Golfo: Nuevo Padilla, Abasolo y Tampico en el estado de Tamaulipas, Tuxpan en Veracruz y Huimanguillo en Tabasco. *M. cordifolia* fue colectada en los estados de Michoacán, Guerrero y Chiapas. *M. houstoniana* fue colectada en Catemaco, Veracruz.

El objetivo principal de esta investigación fue aislar y caracterizar las LS y comparar el contenido metabólico de cada población, al igual que evaluar las propiedades citotóxicas y anti-inflamatorias de las LS aisladas. Dado los antecedentes y las investigaciones previas, la selección de las especies se hizo con base en un criterio quimiotaxónomico.

Todos los compuestos aislados fueron caracterizados. La identificación de los compuestos conocidos se hizo con base en sus características físicas y espectroscópicas reportadas en la literatura o por comparación con muestras auténticas disponibles en el laboratorio. La caracterización de los compuestos nuevos se realizó mediante el análisis de sus propiedades físicas y por métodos espectroscópicos y espectrométricos. Los resultados se discuten a continuación.

#### 7.1.1. Estudio químico del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *Mikania micrantha* de Chiapas

El estudio químico de las diferentes fracciones del extracto polar, permitió la obtención de la nueva LS 8-*epi*-mikanokriptina (**1**) y de la LS achalensólida (**4**) [82-83], junto con los compuestos conocidos acetyl β-amirina (**16**) [84], lupeol (**17**) [85] y estigmasterol (**18**) [86] (Diagrama 1).

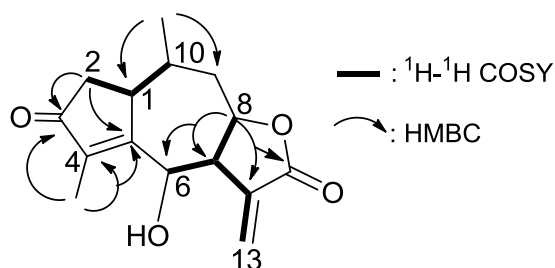


**Diagrama 1.** Compuestos obtenidos de *M. micrantha* colectada en Chancalá, Chiapas

El compuesto **1** fue obtenido como un sólido ópticamente activo. En el espectro de masas (EM-IE<sup>+</sup>) se observó el ión molecular en  $m/z$  262 (Espectro 1). Su fórmula fue establecida por EM-ARFAB<sup>+</sup> como C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub> (calculado para C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>O<sub>4</sub> 263.1281 [M+H]<sup>+</sup>, encontrado 263.1283). El espectro de IR (Espectro 2), exhibió bandas de grupo hidroxilo (3391 cm<sup>-1</sup>), de un grupo carbonilo correspondiente a una  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada (1759 cm<sup>-1</sup>), y un grupo carbonilo adicional (1700 cm<sup>-1</sup>). Estos datos sugirieron la presencia de una LS y esta fue confirmada por el espectro de RMN <sup>13</sup>C (Espectro 3), el cual mostró 15 señales de carbono. Estas señales fueron asignadas por DEPT (Espectro 4), a dos metilos, tres metilenos (uno vinílico, correspondiente a un grupo exometileno), cinco metinos y cinco carbonos cuaternarios (dos carbonilos y tres carbonos vinílicos tetrasustituidos). Esto indicó la presencia de un esqueleto correspondiente a una LS tipo guayanólida.

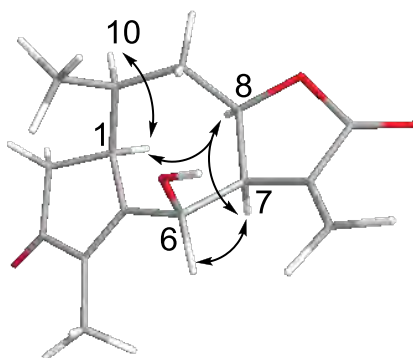


El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **1** (Espectro 5), mostró las señales correspondientes a los hidrógenos del doble enlace exocíclico, a  $\delta_{\text{H}}$  6.56 (1H, *d*,  $J = 2.8$  Hz) asignado a H-13a y  $\delta_{\text{H}}$  5.85 (1H, *d*,  $J = 2.4$  Hz) asignado a H-13b. También exhibió desplazamientos a  $\delta_{\text{H}}$  4.94 (*ddd*,  $J = 8.4, 8.4, 6.0$  Hz) y a  $\delta_{\text{H}}$  3.49 (*dddd*,  $J = 6.0, 2.8, 2.8, 2.4$  Hz), asignados a H-8 y H-7, respectivamente. Consecuentemente el espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , mostró acoplamientos entre el H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  3.49), H-6, H-8 y H-13a,b y entre H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  3.01), H-2a,b y H-10 (Figura 17). El análisis de HMBC mostró correlaciones entre H<sub>3</sub>-15 ( $\delta_{\text{H}}$  1.87) y C-3, C-4 y C-5, localizando la enona  $\alpha,\beta$ -insaturada; y correlaciones entre H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  4.94) y C-6, C-7, C-11, y C-12, estableciendo el anillo del cierre de la lactona hacia C-8 (Figura 17).



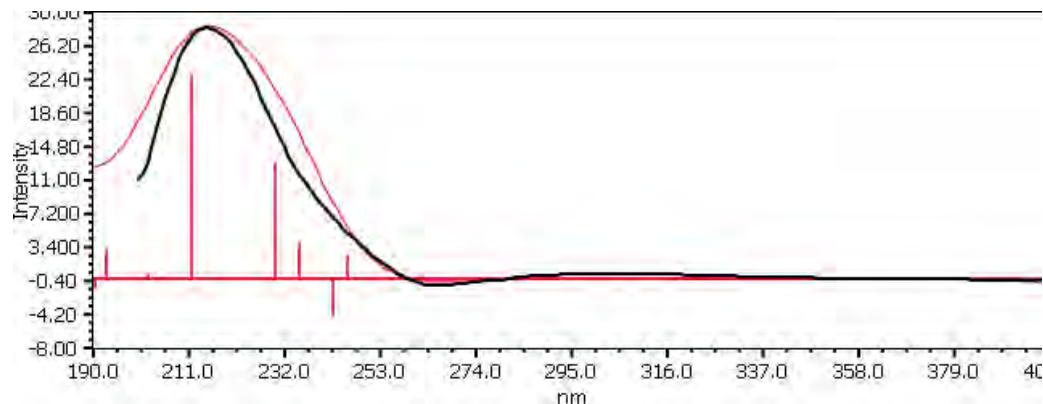
**Figura 17.** Principales interacciones COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  y HMBC de **1**

Finalmente, los experimentos NOESY de **1** (Espectro 6) (Figura 18) revelaron interacciones entre H-7 y H-8 y H-6; entre H-8 y H-1; y entre H-1 y H-10. Estas interacciones indicaron que estos hidrógenos están del mismo lado, siendo consistente con la fusión *cis* del anillo  $\gamma$ -lactona, deducido desde las constantes de acoplamiento entre H-7 y H-13a,b ( $J_{7,13} < 3$  Hz) [77].

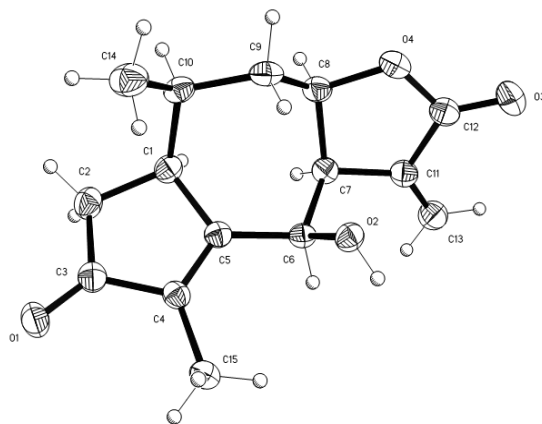


**Figura 18.** Principales interacciones NOESY de **1**

La curva de DC del compuesto **1** exhibió un efecto Cotton con un pico negativo en la región  $n-\pi^*$  ( $\lambda_{\max}$  267 nm,  $\Delta\epsilon$  -0.78) y un fuerte efecto Cotton positivo en la región  $\pi-\pi^*$  ( $\lambda_{\max}$  215 nm,  $\Delta\epsilon$  +28.4), la cual soporta evidencia para la fusión *cis* del anillo de lactona para la 8-*epi*-mikanokriptina (**1**) de acuerdo a la regla de Stöcklin-Waddell-Geissman [87]. La configuración relativa fue confirmada por difracción de Rayos-X de los cristales, y la configuración absoluta fue determinada por comparación de los espectros de las curvas de DC experimental y teórico (calculado considerando H-7 $\alpha$ ) (Figura 19) obteniendo un alto grado de correlación entre ellos, por lo tanto, la configuración absoluta para la 8-*epi*-mikanokriptina se determinó como se muestra en la estructura por difracción de Rayos-X (Figura 20) y es la fórmula **1**.



**Figura 19.** Curva de DC experimental (en negro) y calculada (en rojo) para **1**

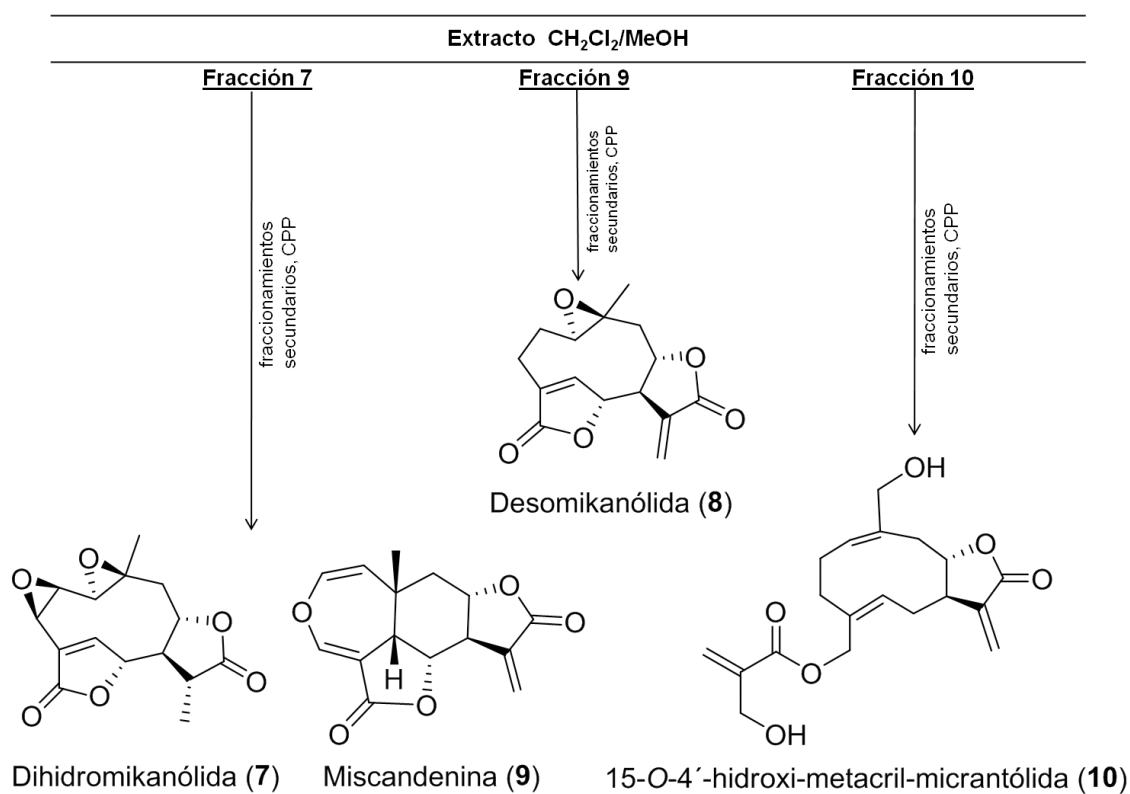


**Figura 20.** Estructura por Rayos-X de la 8-*epi*-mikanokriptina (**1**)

La LS Achalensólida (**4**), se aisló por primera vez el género *Mikania*. Su caracterización se llevó a cabo por comparación de sus constantes físicas y espectros de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectros 13 y 14, respectivamente), con los reportes previos desde *Stevia achalensis* y *Decachaeta thieleana* Liebig [82-83].

### 7.1.2. Estudio químico del extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ de *M. micrantha* de Michoacán

Del fraccionamiento del extracto polar, se aislaron y caracterizaron las LS conocidas dihidromikanólida (**7**) [20], desoximikanólida (**8**) [20], miscandenina (**9**) [20] y la 15-O-4'-hidroxi-metacril-micrantólida (**10**) [49], adicional al estigmasterol (**19**) [86] (Diagrama 2).



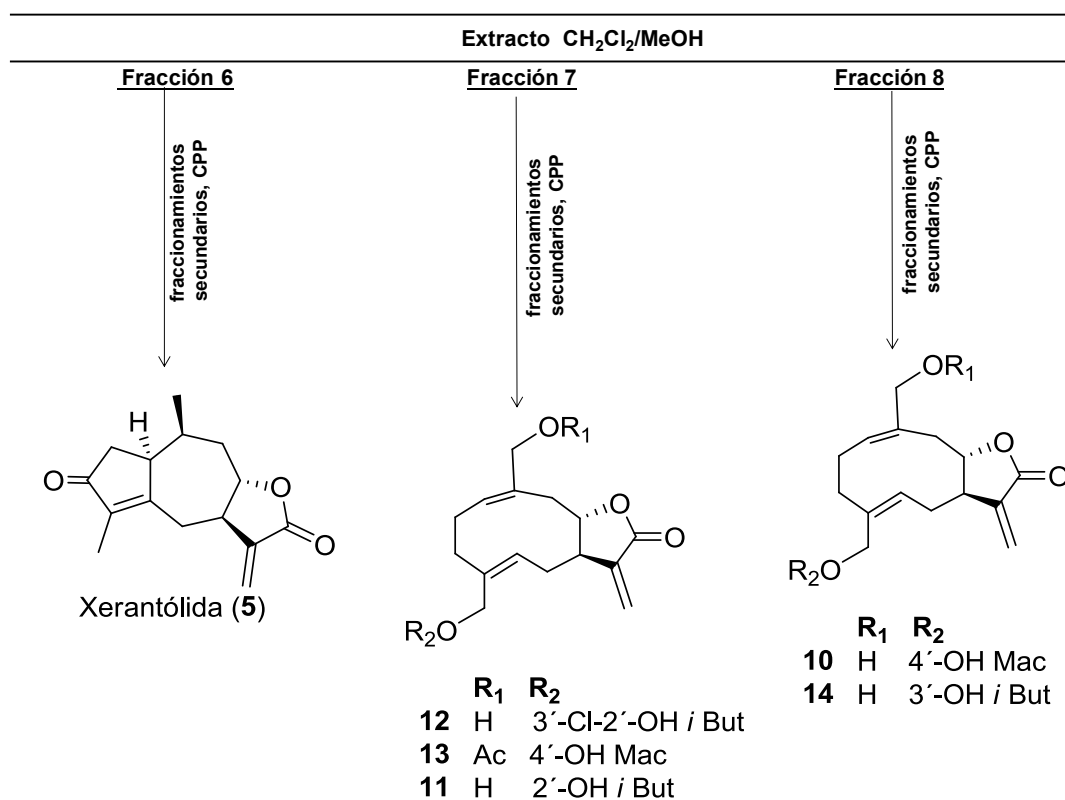
**Diagrama 2.** Compuestos obtenidos de *M. micrantha* colectada en Parácuaro, Michoacán

La elucidación estructural de las LS, se realizó por comparación de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 19) y RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectros 20) para **7**, RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 21) y RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 22) para **8**, RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 23) y RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 24) para **9**, RMN  $^1\text{H}$

(Espectro 25) y RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 26) para la LS **10**, con los datos espectroscópicos previamente reportados [20,49].

### 7.1.3. Estudio químico del extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ de *M. micrantha* de Oaxaca

El análisis químico de *M. micrantha* colectada en Dos Caminos, Oax. permitió el aislamiento de los compuestos acetil  $\beta$ -amirina (**16**), lupeol (**17**), estigmasterol (**19**), y el  $\beta$ -D-glucopiranosido de estigmasterilo (**20**) [88], junto con las melampólidas 15-*O*-4'-hidroximetacril-micrantólida (**10**) [23,49], 15-*O*-2'-hidroxisobutiril-micrantólida (**11**) [23,49], 15-*O*-3'-cloro-2'-hidroxisobutiril-micrantólida (**12**) [23,49], 15-*O*-4'-hidroximetacril-14-acetoximicrantólida (**13**) [23,49] y la 15-*O*-3'-hidroxisobutiril-micrantólida (**14**) [89-90], y la guayanólida xerantólida (**5**) [91-92] (Diagrama 3).

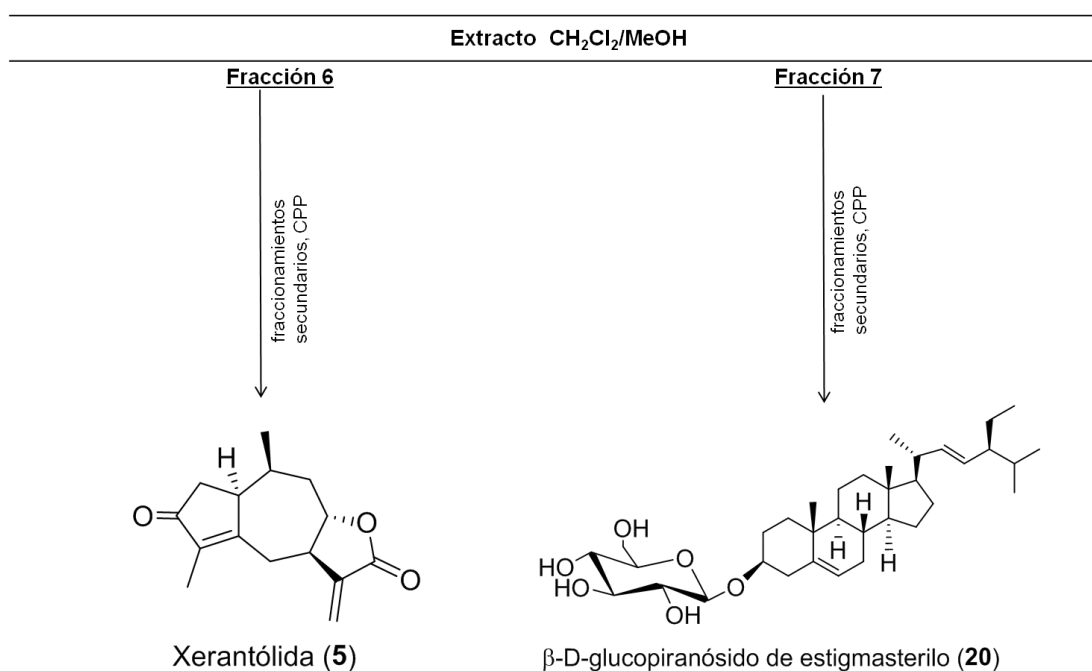


**Diagrama 3.** Compuestos obtenidos de *M. micrantha* colectada en Dos Caminos, Oaxaca

Para determinar las estructuras de las LS obtenidas, se realizó la comparación de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 15) y RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectros 16) para **5**, con datos reportados previamente y se aisló como un nuevo constituyente del género *Mikania*. La LS **10**, fue comparada con muestra auténtica disponible en el laboratorio. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 27) y RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectros 28) para **11**, RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 29) y RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 30) para **12**, RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 31) y RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 32) para **13**, fueron comparados con reporte previos [23]. Debido a que no hay reportes previos en la literatura científica de la LS **14**, sus espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 33) y RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 34) fueron comparados con datos previos reportados en una tesis doctoral [90].

#### 7.1.4. Estudio químico del extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ de *M. micrantha* de Guerrero

Del análisis químico del extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  de *M. micrantha* colectada en Paraíso, se obtuvieron los triterpenos acetil  $\beta$ -amirina (**16**), lupeol (**17**), estigmasterol (**19**) y el  $\beta$ -D-glucopiranosido de estigmasterilo (**20**); junto con **5**, como única LS (Diagrama 4).



**Diagrama 4.** Compuestos obtenidos de *M. micrantha* colectada en Paraíso, Guerrero

### **7.1.5. Estudio químico de *M. micrantha* de Nuevo Padilla, Tamaulipas**

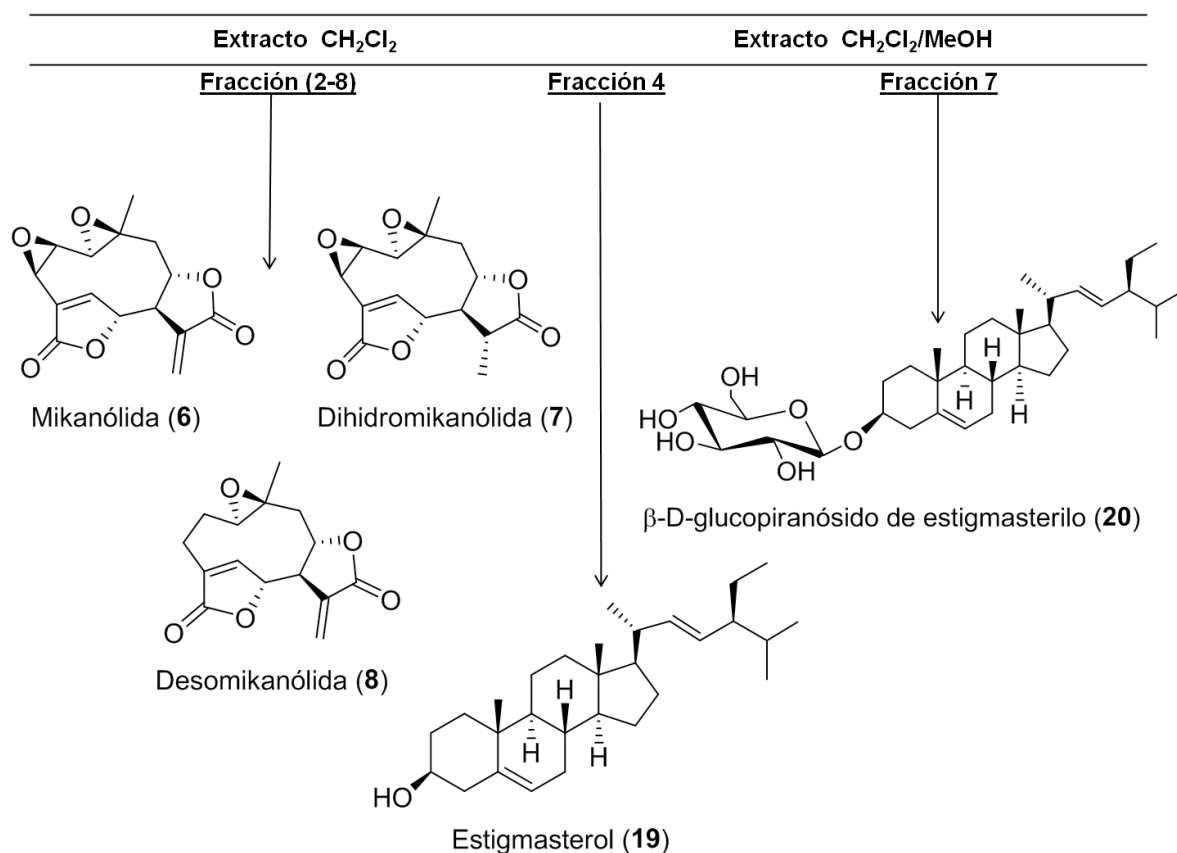
Con el objetivo de buscar una metodología más expedita para el análisis por CLAR-DAD y posterior aislamiento y purificación de las LS, se decidió realizar dos extracciones al mismo material vegetal de cada población, inicialmente con CH<sub>2</sub>/Cl<sub>2</sub> y seguido con CH<sub>2</sub>/Cl<sub>2</sub>/MeOH. El extracto de CH<sub>2</sub>/Cl<sub>2</sub> se fraccionó por CC, 5 fracciones de éste extracto fueron analizadas por CLAR-DAD, como se indica en la Sección 7.3. Luego cada fracción fue purificada, aislando y caracterizando las LS mikanólida (**6**) [19-20,40], dihidromikanólida (**7**) y desoximikanólida (**8**). Del extracto total se aisló el estigmasterol (**19**) y el β-D-glucopiranosido de estigmasterilo (**20**) (Diagrama 5).

Los compuestos fueron identificados por comparación con muestras auténticas disponibles en el laboratorio.

### **7.1.6. Estudio químico de *M. micrantha* de Abasolo, Tamaulipas**

Al material vegetal se le realizó el mismo procedimiento descrito en la sección 7.1.5. El extracto de CH<sub>2</sub>/Cl<sub>2</sub> se fraccionó por CC, 6 fracciones de éste extracto fueron analizadas por CLAR-DAD, como se indica en la Sección 7.3. Las fracciones fueron purificadas y se obtuvieron las LS mikanólida (**6**), dihidromikanólida (**7**) y desoximikanólida (**8**). Del extracto CH<sub>2</sub>/Cl<sub>2</sub>/MeOH se aisló el estigmasterol (**19**) y el β-D-glucopiranosido de estigmasterilo (**20**). (Diagrama 5).

Los espectros de RMN <sup>1</sup>H (Espectro 17) y de RMN <sup>13</sup>C (Espectro 18) de la LS **6**, fueron comparados con datos espectroscópicos reportados en la literatura [19-20,40]. Los demás compuestos, con muestras auténticas disponibles en el laboratorio.



**Diagrama 5.** Compuestos obtenidos de *M. micrantha* colectada en Nuevo Padilla y Abasolo, Tamaulipas

### 7.1.7. Estudio químico de *M. micrantha* de Tampico, Tamaulipas

Al material vegetal se le realizó el mismo procedimiento descrito en la sección 7.1.5. El extracto de CH<sub>2</sub>/Cl<sub>2</sub> se fraccionó por CC, 5 fracciones de éste extracto fueron analizadas por CLAR-DAD, como se indica en la Sección 7.3. Posteriormente, cada fracción se purificó y se aislaron y caracterizaron las LS mikanólida (6) y dihidromikanólida (7). Del extracto CH<sub>2</sub>/Cl<sub>2</sub>/MeOH se aisló el estigmasterol (19) y el  $\beta$ -D-glucopiranosido de estigmasterilo (20) (ver estructuras en Diagrama 5).

Los compuestos fueron identificados por comparación con muestras auténticas disponibles en el laboratorio.

#### **7.1.8. Estudio químico de *M. micrantha* de Tuxpan, Veracruz**

Al material vegetal se le realizó el mismo procedimiento descrito en la sección **7.1.5**. El extracto de CH<sub>2</sub>/Cl<sub>2</sub> se fraccionó por CC y 5 fracciones de éste extracto fueron analizadas por CLAR-DAD, como se indica en la Sección **7.3**. La purificación de las fracciones estudiadas por CLAR permitió aislar y caracterizar las LS mikanólida (**6**) y dihidromikanólida (**7**). Del extracto CH<sub>2</sub>/Cl<sub>2</sub>/MeOH se aisló el estigmasterol (**19**), únicamente (ver estructuras en Diagrama 5).

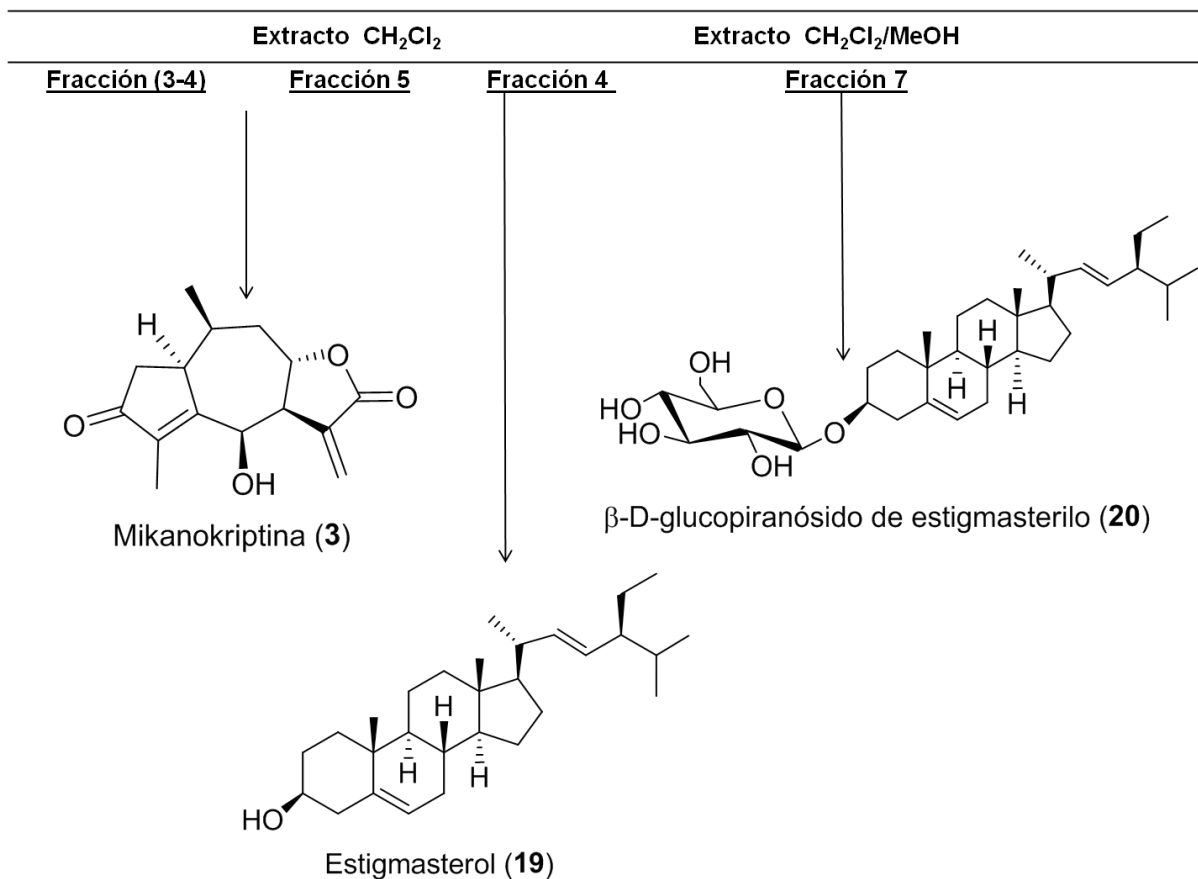
Los compuestos fueron identificados, comparándolos con muestras auténticas disponibles en el laboratorio.

#### **7.1.9. Estudio químico de *M. micrantha* de Huimanguillo, Tabasco**

Al material vegetal se le realizó el mismo procedimiento descrito en la sección **7.1.5**. El extracto de CH<sub>2</sub>/Cl<sub>2</sub> se fraccionó por CC y 2 fracciones de éste extracto fueron analizadas por CLAR-DAD, como se indica en la Sección **7.3**. Durante el fraccionamiento del extracto CH<sub>2</sub>/Cl<sub>2</sub> se aisló y caracterizó la guayanólida mikanokriptina (**3**) [45-46]. Después, las fracciones analizadas por CLAR, fueron purificadas y se obtuvo 3 mg de **3**. Del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH se aisló el estigmasterol (**19**) y el β-D-glucopiranosido de estigmasterilo (**20**) (Diagrama 6).

Los espectros de RMN <sup>1</sup>H (Espectro 11), RMN <sup>13</sup>C (Espectro 12) y las constantes físicas de la LS **3**, fueron comparados con datos reportados en la literatura.



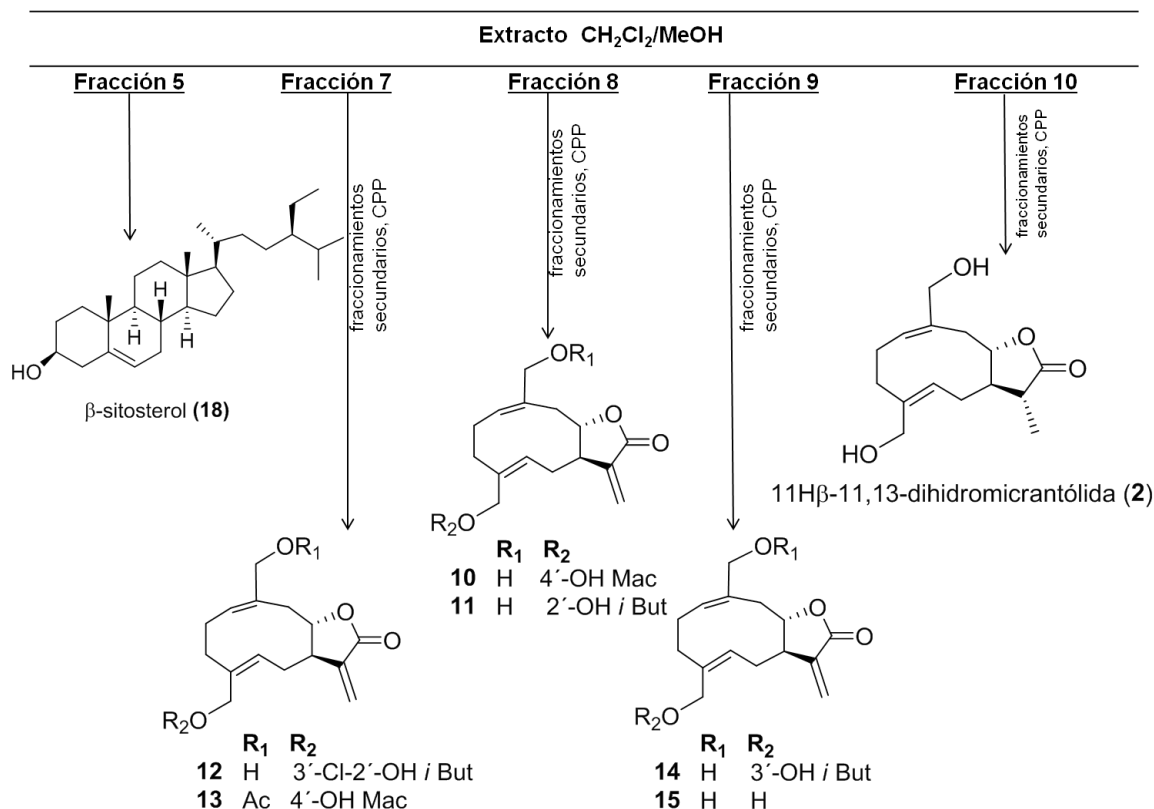


**Diagrama 6.** Compuestos obtenidos de *M. micrantha* colectada en Huimanguillo, Tabasco

#### 7.1.10. Estudio químico del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *Mikania cordifolia* de Michoacán

Del fraccionamiento del extracto polar, se caracterizaron las LS 11H $\beta$ -11,13-dihidromicrantólida (**2**), la cual se aisló como un nuevo producto natural; las melampólidas conocidas **10-14** y la micrantólida (**15**) [23,49], junto con la acetil  $\beta$ -amirina (**16**) y  $\beta$ -sitosterol (**18**) (Diagrama 7).

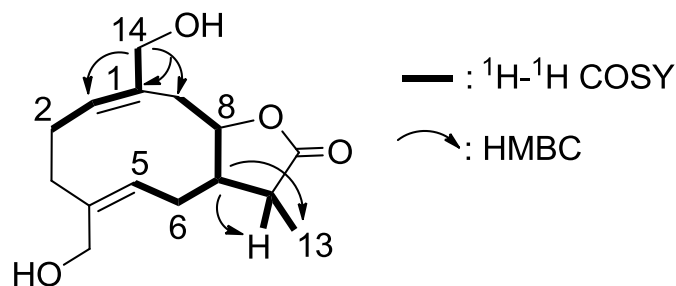
Las LS **10-14**, se caracterizaron por comparación con muestras auténticas disponibles en el laboratorio. Para LS **15**, se compararon sus espectros de RMN <sup>1</sup>H (Espectro 35) y RMN <sup>13</sup>C (Espectro 36), con los reportes de la literatura [49].



**Diagrama 7.** Compuestos obtenidos de *M. cordifolia* colectada en Reyes de Salgado, Michoacán

La LS 2 fue obtenida como una sustancia ópticamente activa y su fórmula molecular fue establecida como C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub> por el espectro de EM-ARFAB (calculado para C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub> 266.1510; encontrado 266.1518). El espectro de IR (Espectro 7) mostró absorciones de grupo hidroxilo (3605, 3432 cm<sup>-1</sup>), de grupo carbonilo de  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada (1767 cm<sup>-1</sup>). El análisis del espectro de RMN <sup>13</sup>C (Espectro 8), junto con los experimentos de DEPT y HSQC, mostraron la presencia de 15 señales que correspondieron a un metilo, seis metilenos, cinco metinos y tres carbonos cuaternarios. El espectro de RMN <sup>1</sup>H (Espectro 9) confirmó estas asignaciones, debido a la presencia de un doblete a  $\delta_H$  1.27 (3H, *d*, *J* = 7.0 Hz) asignado a H-13 y a  $\delta_H$  2.27 (1H, *dq*, *J* = 11.5, 7.0 Hz) asignado a H-11. Una señal a  $\delta_H$  1.91 (1H, *dddd*, *J* = 11.5, 7.0, 4.5, 4.0 Hz) asignado a H-7 y a  $\delta_H$  3.9 (m) asignado a H-8. Los experimentos de COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H confirmaron las correlaciones entre H-2  $\rightarrow$  H-1  $\rightarrow$  H-14 y entre H-5  $\rightarrow$  H-6  $\rightarrow$

H-7 → H-8 → H-9 del sistema spin de las germacra-1(10),4-dienólida y las interacciones entre H-7 → H-11 → H-13 del anillo de lactona (Figura 21). Por HMBC se observaron las correlaciones de los hidrógenos H-14a,b  $\delta_H$  4.13 (2H, d,  $J = 12.0$  Hz) con los carbonos a  $\delta_C$  139.1 (C-10), a  $\delta_C$  127.5 (C-1), y a  $\delta_C$  30.9 (C-9), y la correlación de los hidrógenos H-11 y H-13 con el carbono a  $\delta_C$  51.5 (C-7) (Figura 21).

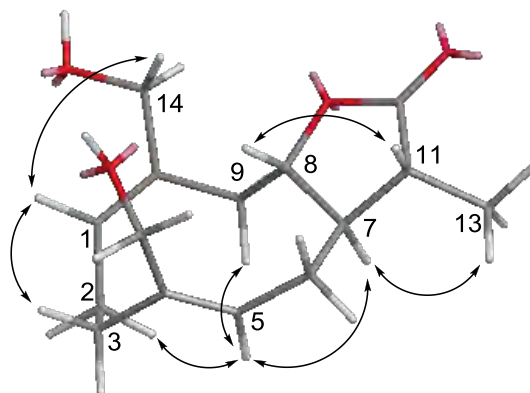


**Figura 21.** Principales interacciones COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  y HMBC de **2**

La configuración *E* del doble enlace entre C(1)-C(10) de **2**, fue definida por las correlaciones observadas en NOESY (Espectro 10), entre H-1 y H-14 (Figura 22), la relación *syn* entre H-7 y H<sub>3</sub>-13 fue determinada por el NOESY entre estos hidrógenos, y la interacción observada entre H-8 y H-11 determinó la fusión *trans* de la lactona. Adicionalmente, también fueron observadas las interacciones entre H-1 y H-2 y H-14a; y H-5 con H-7, H-9 y H-2.

Por lo anterior, este compuesto fue designado como 11H $\beta$ -11,13-dihidromicrantólida (**2**).

Considerando la orientación  $\alpha$  del H-7 (como en todas las LS provenientes de la familia Asteraceae de configuración absoluta conocida), la configuración absoluta más probable para **2** esta descrita en la Figura 1.



**Figura 22.** Principales interacciones NOESY de **2**

#### 7.1.11. Estudio químico del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *M. cordifolia* de Guerrero

Las melampólidas **10-14** [22,26-27], junto con los triterpenos acetil β-amirina (**16**), lupeol (**17**) y β-sitosterol (**18**), se obtuvieron desde el estudio químico del extracto polar de *M. cordifolia* colectada en Lagunillas, Guerrero (Ver estructuras en Diagrama 7).

#### 7.1.12. Estudio químico del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *M. cordifolia* de Chiapas

La acetil-β-amirina (**16**), lupeol (**17**) y β-sitosterol (**18**), junto con las LS **10-14**, fueron obtenidas del fraccionamiento del extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *M. cordifolia*, colectada en Chancalá, Chiapas (Ver estructuras en Diagrama 7).

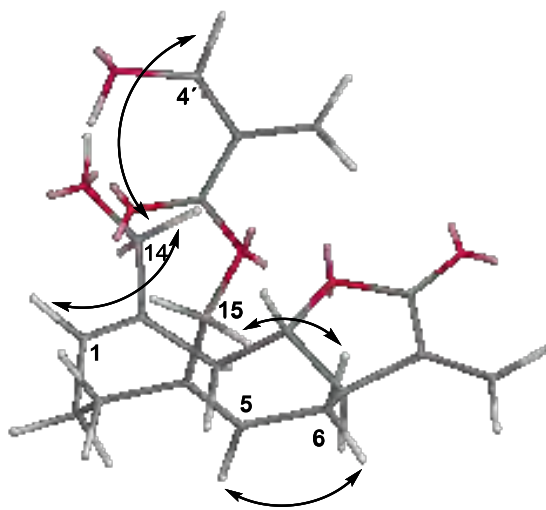
#### 7.1.13. Estudio de los extractos de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *M. houstoniana* de Catemaco, Veracruz

Con el fin de obtener más información sobre el contenido metabólico en otras especies de *Mikania*, fue posible obtener una población de *M. houstoniana* colectada en Catemaco, Veracruz. El análisis químico de este material permitió establecer la presencia de la acetil-β-amirina (**16**) y estigmasterol (**19**) en ambos extractos, y del extracto más polar se obtuvo β-D-glucopiranosido de estigmasterilo (**20**) (Ver estructuras en Diagramas 1 y 4). Debido a que no se aislaron LS en esta especie, se podría considerar que pertenece a la sección Summikania, tal como se había mencionado anteriormente [11-12].

## 7.2. Análisis conformacional de las melampólidas 2, 10-15

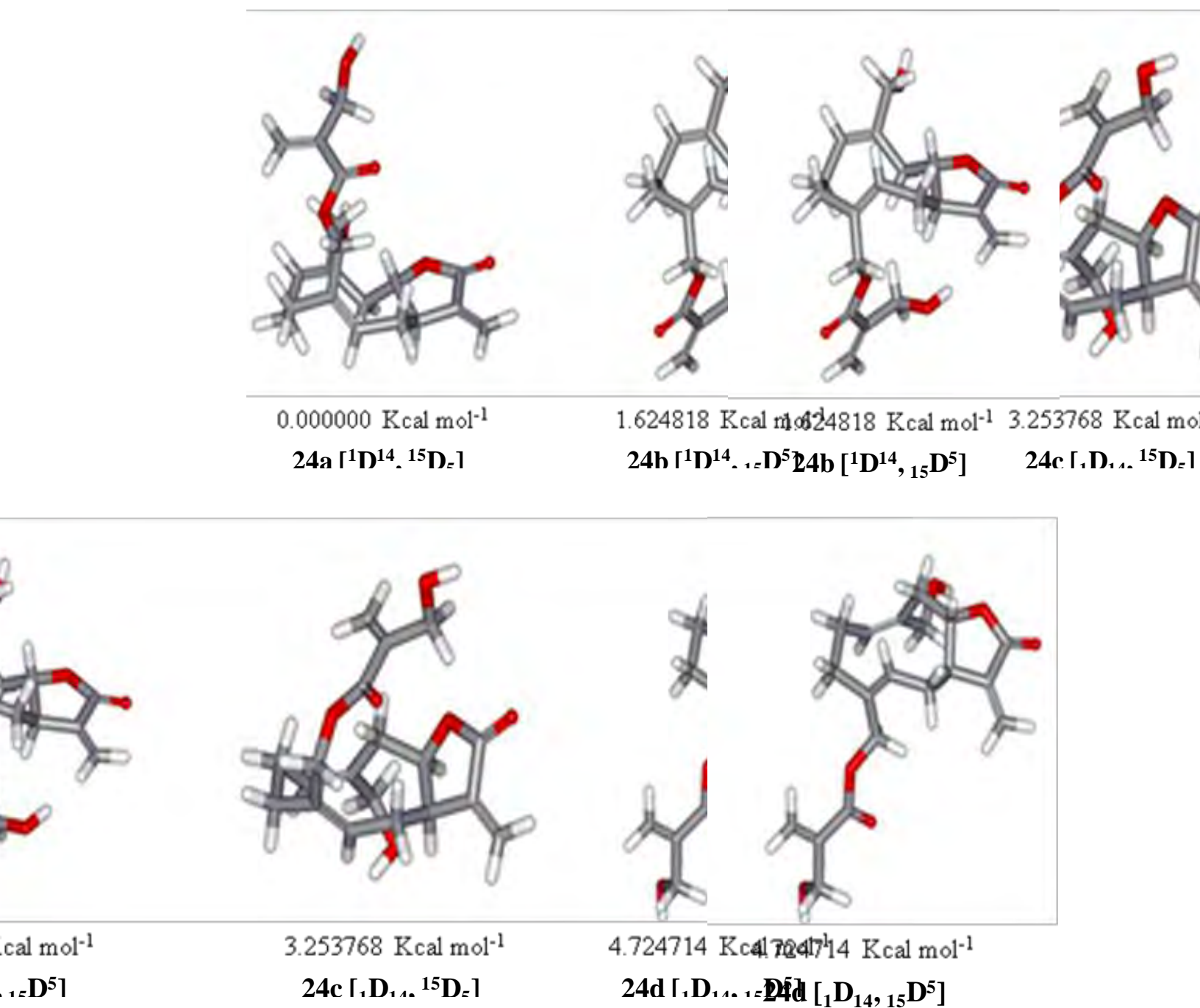
Para determinar la conformación preferida de los compuestos **2**, **10-15**, se analizaron los datos espectroscópicos por RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$ , los cuales se relacionaban muy estrechamente entre sí, observando sólo diferencias en la cadena del éster (sobre C-15). Por lo anterior, se llevaron a cabo experimentos a temperatura variable ( $50^\circ\text{C}$ ) con la LS **10** (debido a la pequeña cantidad y la inestabilidad de las otras melampólidas). Se analizaron los espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 37), RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 38) y NOESY (Espectro 39).

Los experimentos NOESY, permitieron observar claramente interacciones entre el H-6 $\alpha$  y H-5, entre H-15 y H-6 $\beta$ , y entre H-1 y H-14 (Figura 23); por lo tanto, el análisis estableció la conformación [ $^1\text{D}^{14}$ ,  $^{15}\text{D}_5$ ] para la LS **10** (una de las cuatro conformaciones extremas de las germacra-1(10),4-dienólidas como se mostró en la Figura 16) y éste arreglo fue confirmado por las interacciones observadas entre H-14 and H-4' (Figura 23).



**Figura 23.** Principales interacciones NOESY de la 15-*O*-4'-hidroxi-metacril-micrantólida (**10**)

La energía mínima relativa de los cuatro conformeros extremos de la 15-*O*-4'-hidroxi-metacril-micrantólida (**10**) (Figura 24a-24d) fue calculada usando el método de la Mecánica Molecular (MM+) y la comparación de estas energías relativas señaló que la conformación [ $^1\text{D}^{14}$ ,  $^{15}\text{D}_5$ ] fue la más estable para **10** (Figura 24a), la cual estuvo en concordancia con las correlaciones observadas por NOESY.



**Figura 24.** Energía mínima relativa (MM+) para los cuatro conformeros de 15-O-4'-hidroxi-metacril-micrantólida (**10**) (**24a-24d**)

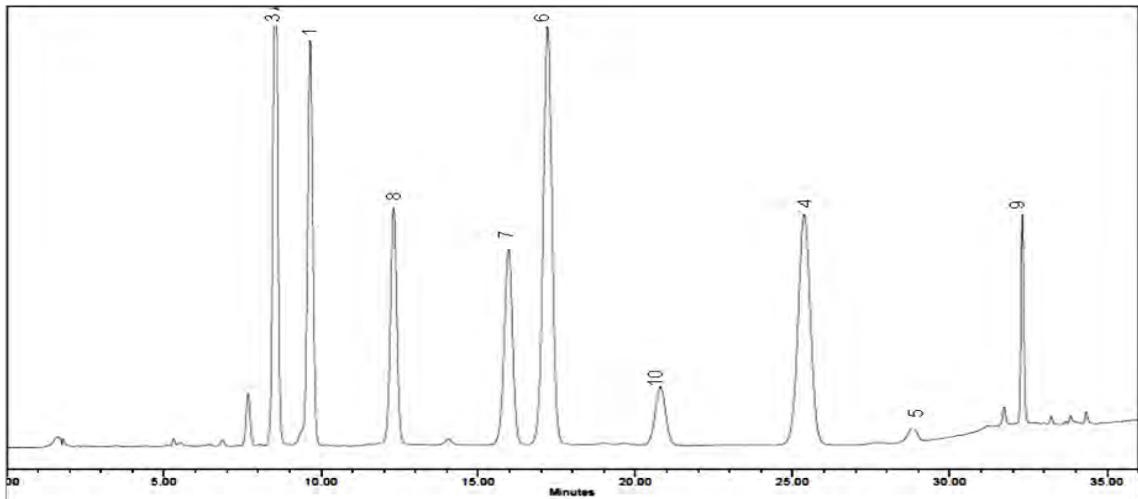
De acuerdo a los resultados, y considerando las similitudes entre los datos de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  para las melampólidas aisladas, se puede concluir que la conformación inferida para **10** es el mismo arreglo para todas las melampólidas aisladas en esta investigación (**2**, **11-15**).

La conformación preferida [ $^1\text{D}^{14}$ ,  $^{15}\text{D}_5$ ] para las micrantólidas (**2**, **10-15**) de *Mikania*, fue diferente con el arreglo [ $^1\text{D}_{14}$ ,  $^{15}\text{D}_5$ ] previamente determinado para las 6 $\alpha$ -acetoxi-*cis*-1(10)-*trans*-4-germacradien-11 $\alpha$ H-dihidro-8 $\beta$ ,12-ólida, schkuhriólida (14-oxo-6 $\alpha$ -hidroxi-*cis*-1(10)-*trans*-4-germacradien-8 $\beta$ ,12-ólida) [80,93] y 8 $\alpha$ ,15-diacetoxi-14-hidroxi-*cis*-1(10)-*trans*-4-germacradien-6 $\alpha$ ,12-ólida [22]. Esta diferencia indica que el anillo de cierre de la lactona hacia C-8 $\beta$  o C-6 $\alpha$ , provoca un cambio en la disposición espacial de la melampólida, en particular para el doble enlace C(1)-C(10). Estos resultados demostraron que los cambios estructurales menores en el esqueleto, pueden resultar en grandes cambios en las preferencias conformacionales del anillo ciclodecadieno.

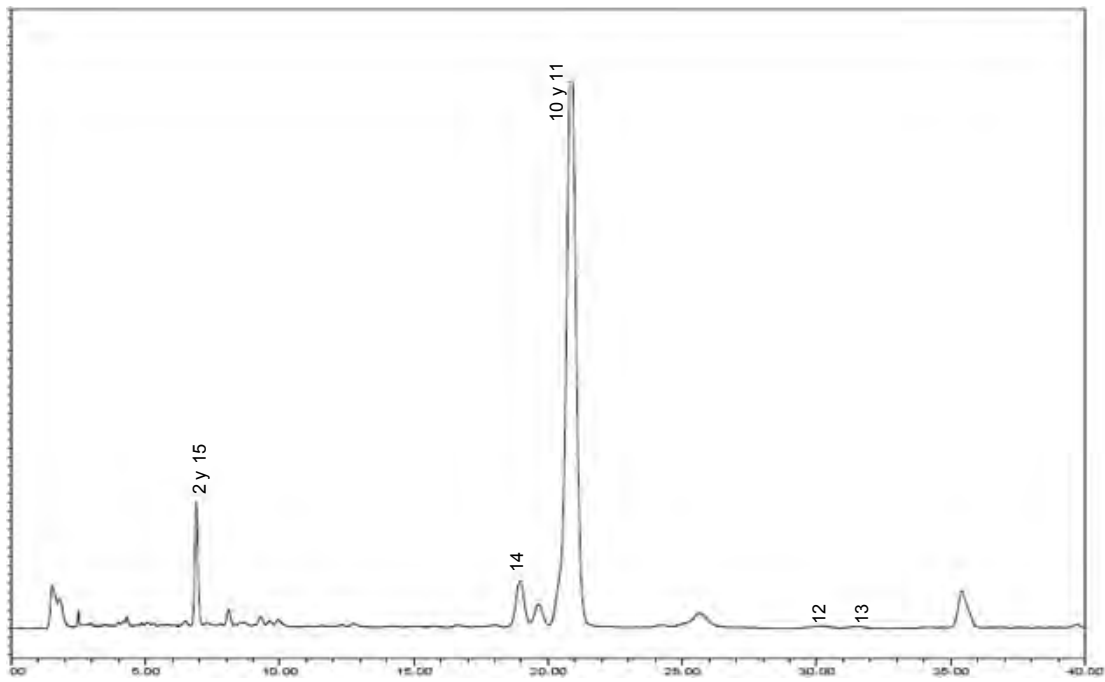
### 7.3. Análisis por CLAR-DAD de las LS de *Mikania*

Con el fin de realizar análisis comparativos de diferentes poblaciones de *M. micrantha* y *M. cordifolia* de manera expedita, se decidió establecer un procedimiento específico para determinar los perfiles de cromatográficos y tiempos de retención diferenciados por CLAR-DAD de las LS aisladas en el transcurso de la presente investigación.

Es así como las LS **1-15** (Figura 1), fueron analizadas de acuerdo a las condiciones descritas en la sección experimental (**8.5**). En las Figuras 25 y 26 se muestran los perfiles cromatográficos de estas y los tiempos de retención ( $T_r$ ) en la Tabla 1.



**Figura 25.** Perfil cromatográfico para las LS 1, 3-10



**Figura 26 .** Perfil cromatográfico para las LS 2, 10-15



**Tabla 1.** Tiempos de retención por CLAR de las LS de *Mikania*

LS	$T_r$ (min)
<b>1</b>	8.5
<b>2 y 15</b>	6.9
<b>3</b>	9.6
<b>4</b>	25.5
<b>5</b>	28.8
<b>6</b>	17.4
<b>7</b>	16.3
<b>8</b>	12.4
<b>9</b>	32.4
<b>10 y 11</b>	20.8
<b>12</b>	30.5
<b>13</b>	31.0
<b>14</b>	19.0

Una vez desarrollado el método cualitativo por CLAR-DAD, se procedió a analizar el extracto de diclorometano de 5 poblaciones de *M. micrantha*, 3 de ellas colectadas en Tamaulipas, Nuevo padilla, Abasolo y Tampico, una en Tuxpan (Veracruz) y otra en Huimanguillo (Tabasco). Los extractos fueron fraccionados y se inyectaron en total 23 fracciones. Todas las LS presentes en estas poblaciones fueron comparadas con los tiempos de retención y espectros *UV* de los estándares previamente analizados.

De Nuevo Padilla fueron analizadas 6 fracciones, de Abasolo, Tampico y Tuxpan se analizaron 5 fracciones de cada población y de Huimanguillo, Tabasco 2. En general, se detectó la presencia de las germacrólidas **6-9**, y la guayanólida **3**, únicamente. La LS **6** ( $T_r$  17.4), fue la más común en las poblaciones analizadas de Tamaulipas y la de Veracruz. La LS **7** ( $T_r$  16.3) se detectó en las poblaciones de Nuevo Padilla, Abasolo y Tampico; mientras que **8** ( $T_r$  12.4) fue más frecuente en Nuevo Padilla y Abasolo y en proporciones más bajas en Tampico y Tuxpan; la miscandenina (**9**) ( $T_r$  32.4) estuvo presente en muy bajo porcentaje en

Nuevo Padilla, Abasolo y Tuxpan, más no se detectó en Tampico y Huimanguillo. La guayanólida **3** (*T<sub>r</sub>* 9.6), fue el mayor componente en Huimanguillo. Las demás LS no fueron detectadas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Presencia/ausencia de LS de *M. micrantha* analizadas por CLAR-DAD

<b>LS</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>Población</b>					
Nuevo Padilla	ND	D	D	D	D
Abasolo	ND	D	D	D	D
Tampico	ND	D	D	D	ND
Tuxpan	ND	D	ND	D	D
Huimanguillo	D	ND	ND	ND	ND

\*D: detectada; ND: no detectada

Luego estas fracciones fueron purificadas por CC (ver resultados en secciones **7.1.5** a **7.1.9**; y sección experimental **8.3.5** a **8.3.9**).

#### **7.4. Ensayos biológicos de las LS aisladas de *Mikania***

##### **7.4.1. Determinación de la actividad citotóxica**

Las LS **1, 3-14**, fueron evaluadas empleando el ensayo colorimétrico de la sulforrodamina B [94], en seis líneas celulares de cáncer humano. Los resultados de los porcentajes de inhibición de la proliferación celular, se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Porcentaje de la inhibición de la proliferación celular de las LS **1, 3-14** en líneas celulares humanas de cáncer (a 25 µg/mL).

Compuesto	% de inhibición del crecimiento por la línea celular					
	U251 SNC	PC-3 Próstata	K562 Leucemia	HCT-15 Colon	MCF-7 Pecho	SKLU-1 Pulmón
1	100	88.3	54.3	90.5	99.7	100
3	100	86.4	52.3	88.6	99.1	100
4	100	80.5	17.0	92.8	100	98.9
5	100	82.2	20.0	89.3	100	100
6	100	75.5	50.0	85.2	98.2	96.7
7	100	88.5	52.9	93.2	100	100
8	100	100	84.9	100	100	100
9	100	100	78.7	98.3	100	100
10	100	41.3	63.8	90.4	100	81.3
11	100	42.5	40.5	96.9	100	44.7
12	100	100	99.7	81.0	61.7	88.1
13	100	7.5	sa	85.0	39.0	29.5
14	sa	sa	sa	3.5	sa	Sa

\*(s.a.= sin actividad)

Para evaluar la capacidad citotóxica de los compuestos probados en las pruebas preliminares, se realizaron curvas de dosis respuesta obteniendo así el valor de la concentración necesaria para inhibir al 50 % la proliferación de las células cancerosas (CI<sub>50</sub>). Se seleccionaron las LS **1, 3-12**, las cuales mostraron mejor respuesta en tres líneas celulares cancerosas U251 (sistema nervioso central), MCF-7 (pecho) y SKLU-1 (pulmón). Los valores obtenidos de CI<sub>50</sub> se encuentran consignados en la Tabla 4.

**Tabla 4.** CI<sub>50</sub> (μM) de LS de *Mikania*

Compuesto	U251 <sup>a</sup>	MCF-7 <sup>b</sup>	SKLU-1 <sup>c</sup>
<b>1</b>	7.8 ± 0.2	5.8 ± 0.4	4.9 ± 0.3
<b>3</b>	5.7 ± 0.7	6.3 ± 0.5	4.2 ± 0.3
<b>4</b>	9.5 ± 0.8	9.5 ± 0.8	7.6 ± 0.3
<b>5</b>	5.9 ± 0.4	7.0 ± 0.4	7.1 ± 0.4
<b>6</b>	12.8 ± 1.2	12.8 ± 0.9	6.3 ± 0.6
<b>7</b>	7.5 ± 0.7	5.2 ± 0.5	5.4 ± 0.3
<b>8</b>	5.7 ± 0.4	2.9 ± 0.06	3.9 ± 0.2
<b>9</b>	2.1 ± 0.1	3.3 ± 0.2	1.9 ± 0.1
<b>10</b>	7.2 ± 0.7	8.9 ± 0.7	6.9 ± 0.5
<b>11</b>	16.9 ± 1.6	25.5 ± 1.4	22.1 ± 1.3
<b>12</b>	14.0 ± 1.2	14.4 ± 0.5	13.1 ± 1.2
Helenalina <sup>d</sup>	0.43 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.21 ± 0.02

<sup>a</sup>Sistema Nervioso Central. <sup>b</sup>Pecho. <sup>c</sup>Pulmón. <sup>d</sup>Control positivo.

Un análisis comparativo indicó que las potencias antiproliferativas de estos compuestos pueden estar mediadas por sus características específicas estructurales. El grupo hidroxilo en C-6 de la 8-*epi*-mikanokriptina (**1**) incrementa su potencia en las tres líneas celulares tumorales (U251: 7.8 ± 0.2 μM, MCF-7: 5.8 ± 0.4 μM y SKLU-1: 4.9 ± 0.3 μM) comparado con **4** (U251: 9.5 ± 0.8 μM, MCF-7: 9.5 ± 0.8 μM y SKLU-1: 7.6 ± 0.3 μM). La ausencia del doble enlace exocíclico y la presencia de un epóxido adicional [C(2)-C(3)] en **7** decrece esta actividad (U251: 7.5 ± 0.7 μM, MCF-7: 5.2 ± 0.5 μM y SKLU-1: 5.4 ± 0.3 μM) cuando es comparado con **8** (U251: 5.7 ± 0.4 μM, MCF-7: 2.9 ± 0.06 μM y SKLU-1: 3.9 ± 0.2 μM). Por otro lado, el anillo oxepina en **9** incrementa su actividad en las líneas U251 y SKLU-1 (2.1 ± 0.1 μM y 1.9 ± 0.1 μM, respectivamente) comparado con **7** y **8**. La función hidroximetacrilato en **10** confiere mejor actividad en las tres líneas comparadas con **11** y **12**, los cuales contienen una función isobutirato, ya sea con un grupo hidroxilo adicional (**11**) o un grupo cloro (**12**).

De acuerdo a los resultados obtenidos para las LS de *Mikania* sugieren que la presencia de dobles enlaces, y algunas veces, la presencia de un oxígeno o un grupo γ-lactona-α-metileno,

hacen una contribución significativa a la actividad biológica. La Helenalina (Figura 3a), un doble aceptor de Michael, se utilizó como control positivo, ya que es una conocida LS citotóxica.

Los resultados encontrados en las LS probadas, fueron similares con los reportados para las melampólidas aisladas de *Mikania minima* [22] probadas en diferentes líneas de cáncer.

#### 7.4.2. Determinación de la actividad anti-inflamatoria

Las LS **1, 4, 7-13** fueron evaluadas en el modelo de edema en oreja de ratón inducido con ATF [95], como agentes anti-inflamatorios, encontrándose actividad marginal. Sin embargo, las melampólidas **10-13** mostraron mejor actividad que las LS **1, 4, 7-9**, en comparación con la Indometacina (83.7%), la cual fue usada como fármaco de referencia. Los datos encontrados están reportados en la Tabla 5 y representan el promedio de cuatro animales  $\pm$  el error estándar de la media ( $\bar{x} \pm EEM$ ).  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*) se consideran significativamente diferentes respecto al control.

**Tabla 5.** Porcentajes de inhibición (1 $\mu$ Mol/oreja) de LS de *Mikania*

Compuesto	% de Inhibición
<b>1</b>	27.2
<b>4</b>	12.4
<b>7</b>	9.9
<b>8</b>	10.7
<b>9</b>	7.9
<b>10</b>	37.5*
<b>11</b>	39.9*
<b>12</b>	33.5*
<b>13</b>	35.5*
Indometacina	83.7

## 8. SECCIÓN EXPERIMENTAL

### 8.1. Materiales y equipos

La separación y purificación de los constituyentes químicos de las especies de *Mikania* se realizó por cromatografía en columna (CC) empleando como fase estacionaria gel de sílice ( $\text{SiO}_2$ ) 70-230 y 230-400 ASTM, la cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) empleando cromatofolios TLC sílica gel 60  $\text{F}_{254}$  (Merck) y cromatoplasas de sílice gel 60  $\text{F}_{254}$  (20x20 cm y 2 mm de espesor) marca Merck para la cromatografía de placa preparativa (CPP). El análisis por cromatografía en capa fina (CCF) se llevó a cabo utilizando cromatofolios de sílice gel de la marca Merck 60  $\text{F}_{254}$  (0.20 mm de espesor). Para la detección de las sustancias por CCF se utilizó una lámpara *UV spectroline* ENF-240C ( $\lambda$  254 y 365 nm), como revelador una solución de sulfato cérico amoniacal ( $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4$ ) al 1% en ácido sulfúrico 2N. Se utilizaron solventes como hexano, benceno, acetato de etilo y diclorometano en diferentes polaridades. Para los puntos de fusión se utilizó un aparato *Fisher Johns* y las mediciones no fueron corregidas. Los experimentos de rotación óptica se realizaron en un polarímetro *Perkin-Elmer 341* usando una lámpara de sodio 589 nm. Los espectros de *UV* fueron obtenidos en un espectrómetro *Shimadzu UV-160U*. Los espectros de dicroísmo circular se determinaron en un espectrómetro *JASCO J-720*. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrómetro *Tensor Bruker FT-IR 27*. Los experimentos de RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , y bidimensionales (DEPT, HMBC, COSY, NOESY) se realizaron a 25°C y 50°C en espectrómetros: *Varian Inova 500* (a 500/125 MHz) y *Bruker Avance III* (400/100 MHz). Los espectros fueron obtenidos en  $\text{CDCl}_3$ , DMSO y acetona- $\text{d}_6$  utilizando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los desplazamiento químicos fueron expresados en ppm ( $\delta$ ). Los espectros de masas utilizando la técnica de impacto electrónico (IE) (a 70 eV) fueron obtenidos en un espectrómetro *JEOL JMS-AX505HA* y en un *JEOL JMX-SX102A* para la técnica de ionización por bombardeo rápido de átomos ( $\text{FAB}^+$ ). El análisis por difracción de Rayos X se llevó a cabo en un difractómetro automático *Bruker Smart Apex* con un detector de área CCD usando radiación de monocromada de grafito  $\text{Mo K}\alpha$  ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ).

## 8.2. Clasificación del material vegetal

Las partes aéreas de *Mikania micrantha* H.B.K. fueron colectadas en diferentes poblaciones del Pacífico y Golfo de México y fueron depositadas en los Herbarios del Instituto de Ecología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. Las partes aéreas de *M. cordifolia* fueron depositadas en el mismo Herbario. Las partes aéreas de *M. houstoniana*, fueron colectadas en Catemaco, Veracruz. El material vegetal fue colectado e identificado por el M. en B. Angel E. Bravo-Monzón. Para números de depósito y poblaciones ver Tabla 6.

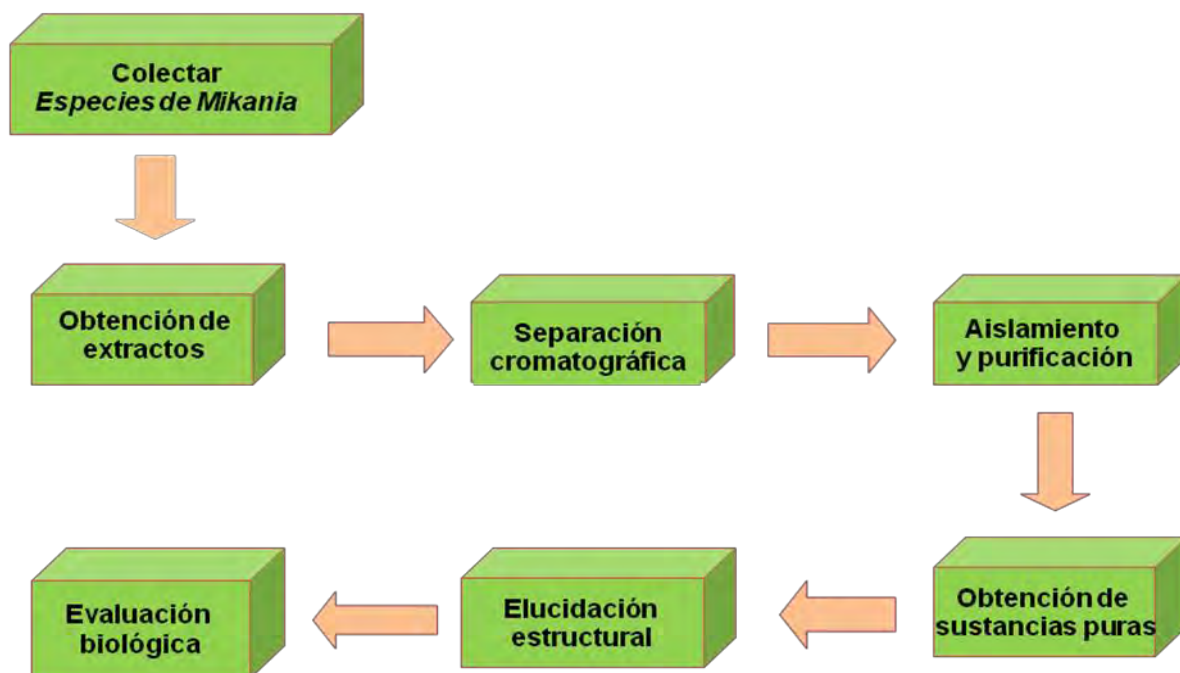
**Tabla 6. Poblaciones y especies estudiadas de *Mikania***

Especie	Población	Número de depósito	Herbario
<i>Mikania micrantha</i> Pacífico de México	Chancalá, Chiapas	22686	EBUM
	Parácuaro, Michoacán	20403	EBUM
	Dos Caminos, Oaxaca	22689	EBUM
	Paraiso, Guerrero	Sin depósito	
<i>Mikania micrantha</i> Golfo de México	Nuevo Padilla, Tamaulipas	196627	IE-Bajío
	Abasolo, Tamaulipas	196629	IE-Bajío
	Tampico, Tamaulipas	196630	IE-Bajío
	Tuxpan, Veracruz	196631	IE-Bajío
	Huimanguillo, Tabasco	196628	IE-Bajío
<i>Mikania cordifolia</i> Pacífico de México	Lagunillas, Guerrero	22696	EBUM
	Los Reyes de Salgado, Michoacán	22698	EBUM
	Chancalá, Chiapas	sin depósito	
<i>M. houstoniana</i> Golfo de México	Catemaco, Veracruz	sin depósito	

## 8.3. Extracción, aislamiento y purificación

Las partes aéreas de cada material vegetal fueron secadas al aire, pulverizadas y extraídas por maceración a temperatura ambiente con hexano (por 3 veces, usando 1L por cada 100 g de material vegetal), una vez extraído el solvente, el residuo del material vegetal seco se sometió nuevamente a maceración con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1:1, por 3 veces, usando 1L por cada 100 g de

material vegetal) por 48 h. Los extractos fueron concentrados a presión reducida. Cada extracto polar fue adsorbido en gel de sílice 1:1. El procedimiento en general se muestra en el Diagrama 8. Posteriormente, se procedió a separar y purificar como se describe a continuación.



**Diagrama 8.** Procedimiento general para separar, purificar y analizar los MS de *Mikania*

### 8.3.1. Fraccionamiento del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *M. micrantha* de Chancalá, Chiapas

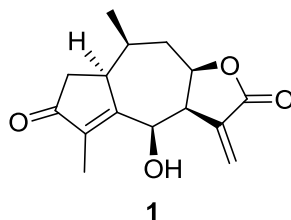
A partir de 0.60 kg de material vegetal, fue obtenido 12 g del extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH. Este residuo fue separado por CC usando sílice gel (120 g, 230-400 mesh, 9×40 cm), eluyendo con hexano y mezclas de *n*-hexano:AcOEt (9:1→100) y (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO (100), en orden de polaridad creciente. Fueron obtenidos 250 eluatos, los cuales fueron seguidos por CCF y reunidos de acuerdo a su similitud cromatográfica en 10 fracciones principales (1-10). Las fracciones 3, 4 y 5 fueron purificadas por CC para obtener **16** (10 mg), **17** (14 mg) y **19** (20 mg), respectivamente. La fracción 6 (1.7 g) fue sometida a CC usando sílice gel (90 g, 230-



400 mesh, 4×30 cm) usando mezclas de solventes *n*-hexano:AcOEt con incremento de la polaridad, para obtener 13 subfracciones (6a–6m). La subfracción 6j (350 mg) fue fraccionada nuevamente usando sílice gel (15 g, 230-400 mesh, 2×30 cm) y eluyendo con un gradiente de *n*-hexano:AcOEt con incremento de la polaridad para dar 10 subfracciones (6j1-6j10). La subfracción 6j8 (135 mg) fue purificada por CPP (20×20 cm, 2 mm) usando *n*-hexano:AcOEt (1:1, dos eluciones) para obtener **4** (36 mg). La fracción 7 (1.4 g) fue fraccionada en sílice gel por CC (90 g, 230-400 mesh, 4×30 cm) eluyendo con una mezcla de *n*-hexano:AcOEt para obtener 5 subfracciones (7a-7e). La subfracción 7d (200 mg) fue purificada por CPP (20×20 cm, 2 mm) usando *n*-hexano:AcOEt (1:1, una elución) obteniendo 32 mg del nuevo producto natural 8-*epi*-mikanokriptina (**1**).

### 8.3.1.1. Análisis espectroscópico y constantes físicas de **1** y **4**

#### 8-*epi*-mikanokriptina (**1**)



Cristales amarillos (recristalizado de AcOEt:MeOH 1:1)

R<sub>f</sub>: 0.44 (*n*-Hexano/AcOEt 3:7)

Pf: 112-114 °C

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +302 (*c* 1.4 × 10<sup>-3</sup>, MeOH)

UV (MeOH) λ<sub>max</sub>(log ε) = 239 (4.2) nm

CD (MeOH, Δε) λ<sub>max</sub> 215 (+28.4), 267 (-0.78), 308 (+0.56) nm.

IR (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub>. (Espectro 2). 3391 (OH), 1759 (C=O), 1700 (C=O), 1643 (C=C) cm<sup>-1</sup>

**RMN** <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (Espectro 5). δ 6.56 (1H, *d*, *J* = 2.8 Hz, H-13a), 5.85 (1H, *d*, *J* = 2.4 Hz, H-13b), 5.03 (1H, *da*, *J* = 2.8 Hz, H-6α), 4.94 (1H, *ddd*, *J* = 8.4, 8.4, 6.0 Hz, H-8), 3.49 (1H, *dddd*, *J* = 6.0, 2.8, 2.8, 2.4 Hz, H-7), 3.10 (1H, *m*, H-1), 2.43 (1H, *dd*, *J* = 18.8, 6.0 Hz, H-2α), 2.36 (1H, *dd*, *J* = 18.8, 2.0 Hz, H-2β), 2.27 (1H, *m*, H-10), 2.25 (2H, *m*, H-9), 1.87 (3H, *dd*, *J* = 2.0, 0.4 Hz, H-15), 0.78 (3H, *d*, *J* = 6.4 Hz, H-14).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Espectro 3).  $\delta$  208.4 (C-3), 169.1 (C-12), 166.9 (C-5), 142.4 (C-4), 136.3 (C-11), 124.1 (C-13), 78.4 (C-8), 70.7 (C-6), 44.7 (C-7), 42.7 (C-1), 38.7 (C-2), 36.2 (C-9), 30.9 (C-10), 14.6 (C-14), 8.5 (C-15).

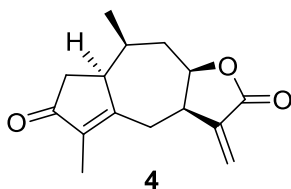
**EM-IE $^+$**   $m/z$  (porcentaje intensidad relativa): 262  $[\text{M}]^+$  (7), 233 (20), 124 (100), 93 (15), 67 (9).

**EMAR-FAB $^+$**  (Espectro 1).  $m/z$ : 263.1283  $[\text{M} + \text{H}]^+$  Observado; Calculado: 263.1281,  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_4$ .

**Datos cristalográficos por Rayos-X para 1.** La estructura fue resuelta por métodos de refinamiento usando matrices de mínimos cuadrados sobre  $F^2$  y el programa SHELXL-97 [96]. El compuesto pertenece al sistema ortorómbico con grupo espacial  $P2_12_12_1$ ,  $Z = 4$ ,  $a = 6.2987(6)$  Å,  $b = 9.6324(10)$  Å,  $c = 22.813(2)$  Å,  $V = 1384.1(2)$  Å $^3$ ;  $D_{\text{calcd}} = 1.345$  Mg/m $^3$ ;  $F(000) = 600$ ,  $\mu = 0.100$  mm $^{-1}$ .

**Espectro DCC para 1.** El espectro DCC fue calculado por aproximaciones por TDDFT a un nivel funcional y base B3LYP/6-31+g(d) usando la estructura optimizada por análisis de Rayos-X. Los cálculos de rotación se llevaron a cabo usando el paquete Gaussian09 [97].

**Achalensólida (4)** [82-83]



Cristales amarillos (recristalizados de AcOEt:MeOH 1:1)

$R_f$ : 0.46 ( $n$ -Hexano/AcOEt 3:7)

Pf: 175-177 °C

$[\alpha]_D^{25} +186.4$  ( $c$   $1.4 \times 10^{-3}$ , MeOH)

UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$ (log  $\epsilon$ ) = 238 (2.2) nm

CD (MeOH,  $\Delta\epsilon$ )  $\lambda_{\text{max}}$  236 (+11.9), 267 (-0.34), 314 (-1.2) nm.

**IR** ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$ . 1763 (C=O), 1701 (C=O), 1665 (C=C)  $\text{cm}^{-1}$

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 13). δ 6.41 (1H, *d*, *J* = 3.2 Hz, H-13a), 5.72 (1H, *d*, *J* = 2.8 Hz, H-13b), 4.93 (1H, *ddd*, *J* = 12.8, 8.4, 2.8 Hz, H-8), 3.53 (1H, *dddd*, *J* = 8.4, 6.4, 4.4, 3.2, 2.8 Hz, H-7), 3.0 (1H, *dd*, *J* = 5.6, 4.8 Hz, H-1), 2.94 (1H, *dd*, *J* = 18.4, 4.4 Hz, H-6α), 2.70 (1H, *dd*, *J* = 18.4, 6.4 Hz, H-6β), 2.43 (1H, *dd*, *J* = 18.8, 4.8 Hz, H-2α), 2.23 (1H, *dd*, *J* = 18.8, 4.8 Hz, H-2β), 2.33 (2H, *ddd*, *J* = 16.4, 6.0, 2.0 Hz, H-9α), 2.29 (1H, *ddd*, *J* = 6.4, 4.8, 2.0 Hz, H-10), 1.48 (1H, *ddd*, *J* = 16.4, 12.8, 2.0 Hz, H-9β), 1.74 (3H, *s*, H-15), 0.75 (3H, *d*, *J* = 6.4 Hz, H-14).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 14). δ 208.0 (C-3), 169.0 (C-12), 168.3 (C-5), 138.3 (C-11), 138.1 (C-4), 123.6 (C-13), 77.9 (C-8), 42.7 (C-1), 38.4 (C-7), 38.0 (C-2), 36.9 (C-9), 32.0 (C-6), 30.0 (C-10), 14.9 (C-14), 8.3 (C-15).

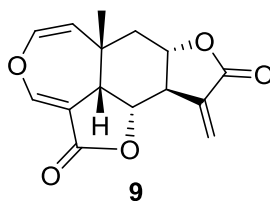
**EM-IE<sup>+</sup>** *m/z* (% intensidad relativa): 246 [M]<sup>+</sup> (7), 231 (30), 246 (100), 91 (58), 77 (28).

### 8.3.2. Fraccionamiento del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *M. micrantha* de Parácuaro, Michoacán

0.54 kg de material vegetal dio 25.3 g de extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, el cual fue fraccionado por CC con sílice gel (253 g, 230-400 mesh, 9×40 cm) usando un gradiente de solventes *n*-hexano:AcOEt (9:1→100) y (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO (100). Se obtuvieron 141 eluatos, los cuales fueron combinados en 12 fracciones principales (1-12). De la fracción 5 se obtuvo **19** (15 mg). La fracción 7 (1.3 g) fue purificada por CC usando sílice gel (80 g, 230-400 mesh, 4×20 cm) y una mezclas de solventes *n*-hexano:AcOEt con incremento de la polaridad, para obtener 7 subfracciones (7a-7g). El compuesto **9** (9 mg), fue obtenido de la subfracción 7f y el compuesto **7** (147 mg) de la subfracción 7g. La fracción 9 (1.20 g) fue purificada por CC con sílice gel (120 g, 230-400 mesh, 4×40 cm) eluyendo con mezclas de *n*-hexano:AcOEt con incremento de la polaridad, donde fueron obtenidos 185 eluatos, los cuales se unieron en 8 subfracciones (9a-9h). Por recromatografía de la subfracción 9e se purificó el compuesto **8** (30 mg). La fracción 10 (200 mg) fue purificada por CPP (20×20 cm, 2 mm) usando AcOEt como eluyente (dos eluciones) para obtener **10** (4 mg).

### 8.3.2.1. Análisis espectroscópico y constantes físicas de 9, 7 y 8

#### Miscandenina (9) [20]



Sólido cristalino

R<sub>f</sub>: 0.58 (*n*-Hexano/AcOEt 4:6)

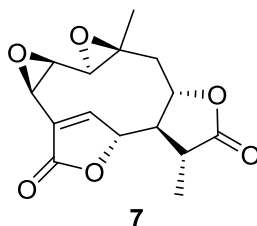
Pf: 229-233 °C

**IR** (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$ : 1766 (C=O), 1680 (C=O), 1653 (C=C) cm<sup>-1</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 23).  $\delta$  7.53 (1H, *d*, *J* = 3.0 Hz, H-3), 6.23 (1H, *d*, *J* = 3.0 Hz, H-13a), 6.17 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, H-2), 5.90 (1H, *d*, *J* = 3.0 Hz, H-13b), 4.79 (1H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-1), 4.77 (1H, *dd*, *J* = 10.0, 7.0 Hz H-6), 3.99 (1H, *ddd*, *J* = 11.0, 8.0, 3.5 Hz, H-8), 3.51 (1H, *dd*, *J* = 6.5, 3.0 Hz, H-5), 2.72 (1H, *dddd*, *J* = 11.0, 8.0, 4.0, 4.0 Hz, H-7), 2.22 (1H, *dddd*, *J* = 12.0, 9.0, 3.0, 3.0 Hz, H-9a), 1.92 (1H, *t*, *J* = 12.5 Hz, H-9b), 1.31 (3H, *s*, H-14).

**RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 24).  $\delta$  170.20 (C-15), 168.80 (C-12), 151.34 (C-3), 138.80 (C-11), 135.42 (C-2), 120.92 (C-13), 119.06 (C-1), 105.71 (C-4), 75.46 (C-6), 74.45 (C-8), 51.24 (C-7), 50.24 (C-5), 39.34 (C-9), 38.77 (C-10), 29.45 (C-14).

#### Dihidromikanólida (7) [20]



Polvo cristalino blanco

R<sub>f</sub>: 0.53 (*n*-Hexano/AcOEt 1:1)

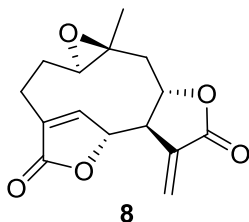
Pf: 238-240°C

**IR** (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$ : 1753 (C=O), 1656 (C=C) cm<sup>-1</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 19). δ 7.17 (1H, *d*, *J* = 1.8 Hz, H-5), 5.17 (1H, *dd*, *J* = 3.5, 2.5 Hz, H-6), 4.27 (1H, *ddd*, *J* = 7.5, 7.0, 3.5 Hz, H-8), 4.06 (1H, *m*, H-3), 3.36 (1H, *dd*, *J* = 1.5, 1.5 Hz, H-2), 2.93 (1H, *s*, H-1), 2.65 (1H, *ddd*, *J* = 6.5, 3.5 Hz, H-11), 2.40 (1H, *ddd*, *J* = 4.0, 3.5, 3.5 Hz, H-7), 2.23 (1H, *dd*, *J* = 18, 7.5, H-9a), 2.03 (1H, *dd*, *J* = 18.0, 7.0 Hz, H-9b), 1.48 (3H, *d*, *J* = 6.5, H-13), 1.15 (3H, *s*, H-14).

**RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 20). δ 174.6 (C-12), 169.9 (C-15), 145.7 (C-5), 131.6 (C-4), 80.9 (C-6), 77.3 (C-8), 58.4 (C-1), 57.4 (C-10), 54.9 (C-2), 54.0 (C-7), 50.8 (C-3), 43.2 (C-9), 42.1 (C-11), 21.3 (C-14), 13.6 (C-13).

### Desoximikanólida (**8**) [20]



Polvo cristalino amarillo

R<sub>f</sub>: 0.56 (*n*-Hexano/AcOEt 35:65)

Pf: 196-198°C

**IR** (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub>: 1760 (C=O), 1660 (C=C) cm<sup>-1</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 21). δ 7.19 (1H, *s*, H-5), 6.51 (1H, *dd*, *J* = 3.5, 1.0 Hz, H-13a), 5.93 (1H, *dd*, *J* = 3.0, 0.5, H-13b), 5.27 (1H, *dd*, *J* = 3.5, 2.0, H-6), 4.49 (1H, *ddd*, *J* = 11.0, 8.0, 4.5 Hz, H-8), 3.41 (1H, *dddd*, *J* = 8.0, 3.5, 3.0, 1.5 Hz, H-7), 2.80 (1H, *m*, H-3a), 2.68 (1H, *dd*, *J* = 11.0, 2.5, H-1), 2.58 (1H, *ddd*, *J* = 19.0, 12.5, 6.5, H-3b), 2.24 (1H, *dd*, *J* = 14.0, 4.5, H-9a), 2.18 (1H, *m*, H-2a), 2.12 (1H, *dd*, *J* = 14.0, 11.0, H-9b), 1.59 (1H, *m*, H-2b), 1.25 (3H, *s*, H-14).

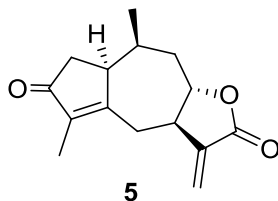
**RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 22). δ 171.2 (C-15), 167.4 (C-12), 145.9 (C-5), 136.2 (C-11), 133.9 (C-4), 123.7 (C-13), 81.3 (C-6), 77.9 (C-8), 61.7 (C-1), 56.8 (C-10), 50.4 (C-7), 43.8 (C-9), 22.7 (C-2), 22.2 (C-3), 20.3 (C-14).

### 8.3.3. Fraccionamiento del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *M. micrantha* de Dos Caminos, Oaxaca

Partiendo de 0.14 kg de material vegetal, fueron obtenidos 14 g de extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH. El extracto fue purificado por CC con sílice gel (140 g, 230-400 mesh, 9×45 cm) eluyendo con una mezcla de solventes con incremento de la polaridad *n*-hexano:AcOEt (9:1→100), 160 eluatos fueron obtenidos y se combinaron en 10 fracciones principales (1-10). De las fracciones 2, 3 y 4 fueron aislados y purificados los compuestos **16** (13 mg), **17** (18 mg) y **19** (70 mg), respectivamente. La fracción 6 (29 mg) fue purificada por CPP (20×20 cm, 2 mm) usando *n*-hexano:AcOEt (1:1, dos eluciones) para obtener **5** (2.8 mg). La fracción 7 (305 mg) fue purificada por CC (10 g, 230-400 mesh, 2×30 cm) eluyendo con mezclas de benceno-AcOEt para obtener 6 subfracciones (7a-7g). La subfracción 7b (52.9 mg) fue purificada por CPP (20×20 cm, 2 mm) usando benceno-AcOEt (2:3, dos eluciones) obteniendo **13** (4.6 mg). La subfracción 7c (195.6 mg) fue fraccionada por CC usando sílice gel (10 g, 230-400 mesh, 2×20 cm) eluyendo con benceno-AcOEt para obtener 5 subfracciones (7c1-7c5). La subfracción 7c3 (36.4 mg) fue purificada por CPP (20×20 cm, 2 mm) usando benceno-AcOEt (3:7, dos eluciones) para obtener **12** (4.2 mg). La subfracción 7d (37.7 mg) fue separada por CPP (20×20 cm, 2 mm) usando benceno-AcOEt (2:3, dos eluciones) para obtener **11** (3.2 mg). La fracción 8 (745 mg) fue separada usando CC (100 g, 230-400 mesh, 3×30 cm) y la columna se eluyó con una mezcla benceno-AcOEt con diferente polaridades, para dar 5 subfracciones (8a-8e). La subfracción 8b (83 mg) fue purificada por CPP (20×20 cm, 2 mm) con benceno-AcOEt (3:7, dos eluciones) obteniendo **10** (15.8 mg). La subfracción 8c (26 mg) fue purificada por CPP (20×20 cm, 2 mm) usando benceno-AcOEt (1:9, dos eluciones) para obtener **14** (8 mg).

### 8.3.3.1. Análisis espectroscópico y constantes físicas de 5, 10-14

#### Xerantólida (5) [91-92]



Cristales amarillos (recristalizado de AcOEt:MeOH 1:1)

R<sub>f</sub>: 0.5 (*n*-Hexano/AcOEt 1:4)

Pf: 187-189°C

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +234 (*c* 1.2 × 10<sup>-3</sup>, MeOH)

UV (MeOH) λ<sub>max</sub>(log ε) = 239.5 (4.3) nm

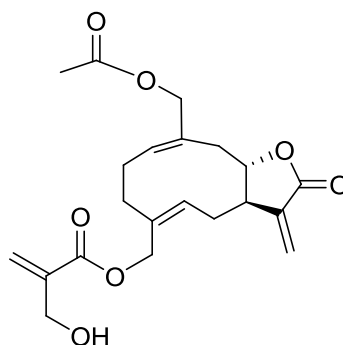
CD (MeOH, Δε) λ<sub>max</sub> 238 (+14.4), 273 (+0.6), 315 (-0.67) nm.

**IR** (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub>: 1767 (C=O), 1694 (C=O), 1636 (C=C) cm<sup>-1</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 15). δ 6.30 (1H, *d*, *J* = 3.2 Hz, H-13a), 5.60 (1H, *d*, *J* = 3.2 Hz, H-13b), 4.14 (1H, *ddd*, *J* = 4.5, 4.0, 4.0 Hz, H-8), 3.20 (1H, *m*, H-1), 3.13 (1H, *dd*, *J* = 1.5, 2.0 Hz, H-9b), 3.10 (1H, *dddd*, *J* = 4.0, 4.0, 4.0, 3.2 Hz, H-7), 2.68 (1H, *dd*, *J* = 1.0, 1.0 Hz, H-2α), 2.64 (1H, *dd*, *J* = 1.5, 1.0 Hz, H-2β), 2.42 (1H, *dd*, *J* = 4.5, 4.0 Hz, H-6b), 2.40 (1H, *m*, H-9a), 2.30 (1H, *m*, H-10), 1.94 (1H, *m*, H-6a), 1.75 (3H, *s*, H-15), 0.75 (3H, *d*, *J* = 9.5 Hz, H-14).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 16). δ 206.9 (C-3), 169.6 (C-12), 169.3 (C-5), 140.0 (C-4), 139.0 (C-11), 120.2 (C-13), 81.2 (C-8), 45.2 (C-7), 4.3 (C-1), 41.5 (C-2), 40.4 (C-6), 33.0 (C-9), 30.1 (C-10), 12.8 (C-14), 8.3 (C-15).

**15-O-4'-hidroxi-metacril-14-acetoxi-micrantólida (13)** [23, 49]



**13**

Aceite amarillo pálido

R<sub>f</sub>: 0.60 (Benceno/AcOEt 1:9)

PM : 390 g/mol

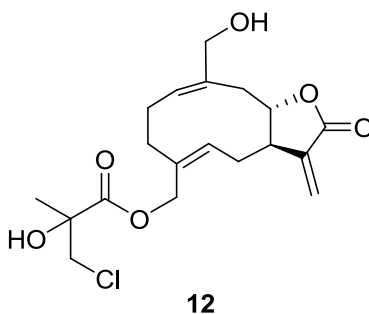
**IR** (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$ : 3402 (OH), 1762 (C=O), 1713 (C=O), 1633 (C=C) cm<sup>-1</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, a 25°C). (Espectro 31).  $\delta$  6.25 (1H, *sa*, H-3'a), 5.88 (1H, *sa*, H-3'b), 6.24 (1H, *sa*, H-13a), 5.58 (1H, *d*, *J* = 2.5 Hz, H-13b), 5.55 (1H, *sa*, H-5), 5.61 (1H, *dd*, *J* = 10.0, 6.0 Hz, H-1), 4.73 (1H, *d*, *J* = 12.0 Hz, H-15a), 4.58 (H, *d*, *J* = 12.5 Hz, H-14a), 4.52 (1H, *d*, *J* = 12.5 Hz, H-15b), 4.51 (H, *d*, *J* = 12.0 Hz, H-14b), 4.33 (2H, *da*, H-4'a,b), 3.83 (1H, *sa*, H-8), 2.87 (1H, *m*, H-9 $\alpha$ ), 2.82 (1H, *sa*, H-7), 2.80 (1H, *m*, H-3 $\alpha$ ), 2.75 (1H, *m*, H-6 $\alpha$ ), 2.36 (1H, *m*, H-9 $\beta$ ), 2.35 (1H, *m*, H-6 $\beta$ ), 2.34 (1H, *m*, H-3 $\beta$ ), 2.32 (1H, *m*, H-2 $\alpha$ ), 2.17 (1H, *m*, H-2 $\beta$ ), 2.08 (1H, *s*, H-6').

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 32).  $\delta$  170.7 (C-5'), 169.5 (C-12), 166.0 (C-1'), 142.3 (C-1), 141.7 (C-4), 139.4 (C-11), 139.2 (C-10), 134.0 (C-2'), 126.0 (C-3'), 128.6 (C-5), 120.8 (C-13), 83.6 (C-8), 67.8 (C-14), 63.4 (C-15), 62.4 (C-4'), 47.0 (C-7), 35.6 (C-9), 31.1 (C-6), 29.7 (C-3), 28.7 (C-2), 20.9 (C-6').



**15-O-3-cloro-2'-hidroxi-isobutiril-micrantólida (12)** [23, 49]



Aceite amarillo pálido

R<sub>f</sub>: 0.58 (Benceno/AcOEt 1:9).

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -10 (*c* 5.0 x 10<sup>-4</sup>, CHCl<sub>3</sub>)

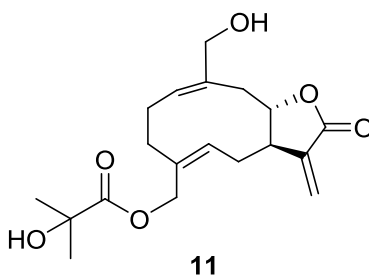
UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) = 204.2 (3.4) nm

**IR** (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub>: 3200 (OH), 1762 (C=O), 1715 (C=O) cm<sup>-1</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, a 25°C). (Espectro 29). δ 6.25 (1H, *d*, *J* = 3.5 Hz, H-13a), 5.58 (1H, *d*, *J* = 2.5 Hz, H-13b), 5.64 (1H, *m*, H-1), 5.61 (1H, *m*, H-5), 4.74 (1H, *m*, H-15a), 4.47 (1H, *m*, H-15b), 4.15 (2H, *sa*, H-14a,b), 3.80 (1H, *d*, *J* = 10 Hz, H-3'a), 3.72 (1H, *m*, H-8), 3.56 (1H, *d*, *J* = 10 Hz H-3'b), 2.82 (1H, *sa*, H-7), 2.75 (1H, *m*, H-6α), 2.65 (1H, *m*, H-3α), 2.63 (1H, *m*, H-9α), 2.53 (1H, *m*, H-9β), 2.41 (1H, *m*, H-2β), 2.34 (1H, *m*, H-6β), 2.30 (1H, *m*, H-3β), 2.00 (1H, *m*, H-2α), 1.47 (3H, *s*, H-4').

**RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 30). δ 173.7 (C-1'), 169.7 (C-12), 139.1 (C-4), 138.5 (C-10), 135.1 (C-11), 128.9 (C-5), 125.5 (C-1), 121.0 (C-13), 84.3 (C-8), 75.1 (C-3'), 66.5 (C-14), 64.9 (C-15), 51.1 (C-2'), 46.6 (C-7), 35.5 (C-9), 31.0 (C-6), 30.0 (C-3), 28.5 (C-2), 23.6 (C-4').

**15-O-2'-hidroxi-isobutiril-micrantólida (11)** [23,49]



Aceite amarillo pálido

R<sub>f</sub>: 0.49 (Benceno/AcOEt 1:9).

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -4.3 (c 6.0 x 10<sup>-4</sup>, CHCl<sub>3</sub>)

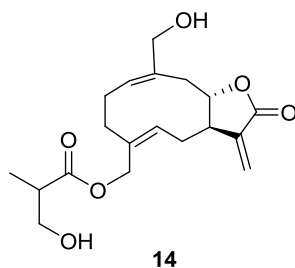
UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) = 204.6 (4.2) nm

**IR** (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub>: 3392 (OH), 1764 (C=O), 1707 (C=O), 1618 (C=C) cm<sup>-1</sup>

**RMN** <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, a 25°C). (Espectro 27). δ 6.25 (1H, *d*, *J* = 3.6 Hz, H-13a), 5.58 (1H, *d*, *J* = 3.2 Hz, H-13b), 5.63 (1H, *m*, H-1), 5.60 (1H, *m*, H-5), 4.63 (1H, *d*, *J* = 12.4 Hz, H-15a), 4.51 (1H, *d*, *J* = 12 Hz, H-15b), 4.13 (2H, *sa*, H-14a,b), 3.85 (1H, *m*, H-8), 2.89 (1H, *sa*, H-7), 2.85 (1H, *m*, H-6α), 2.79 (1H, *m*, H-9α), 2.73 (1H, *m*, H-3α), 2.39 (1H, *m*, H-9β), 2.37 (1H, *m*, H-6β), 2.34 (1H, *m*, H-3β), 2.33 (1H, *m*, H-2β), 2.22 (1H, *m*, H-2α), 1.45 (3H, *s*, H-4'), 1.42 (3H, *s*, H-3').

**RMN** <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 28). δ 176.9 (C-1'), 169.8 (C-12), 139.1 (C-4), 138.1 (C-10), 135.4 (C-11), 128.2 (C-5), 124.9 (C-1), 121.0 (C-13), 84.3 (C-8), 72.3 (C-2'), 66.0 (C-14), 64.1 (C-15), 46.6 (C-7), 35.5 (C-9), 30.8 (C-6), 30.0 (C-3), 28.3 (C-2), 27.3 (C-4'), 27.0 (C-4').

**15-O-3'-hidroxi-isobutiril-micrantólida (14)** [89-90]



Aceite amarillo pálido

R<sub>f</sub>: 0.40 (Benceno/AcOEt 1:9).

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -9.4 (*c* 1.8X10<sup>-3</sup>, CHCl<sub>3</sub>)

UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) = 208.5 (3.7) nm

**IR** (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub>: 3391(OH), 1759 (C=O), 1700 (C=O), 1643 (C=C) cm<sup>-1</sup>

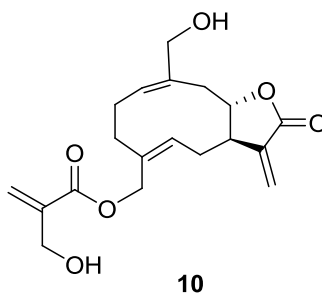
**RMN** <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 33). δ 6.27 (1H, *d*, *J* = 3.2 Hz, H-13a), 5.60 (1H, *d*, *J* = 2.8 Hz, H-13b), 5.64 (1H, *da*, H-1), 5.62 (1H, *da*, H-5), 4.65 (1H, *d*, *J* = 12.0 Hz, H-15a), 4.45 (1H, *d*, *J* = 12.0 Hz, H-15b), 4.16 (2H, *da*, H-14a,b), 3.83 (1H, *m*, H-8), 3.78 (1H, *m*, H-3'a), 3.68 (1H, *m*, H-3'b), 2.85 (1H, *m*, H-7), 2.81 (1H, *m*, H-6α), 2.75 (1H, *m*, H-9α), 2.68 (1H, *m*, H-2'), 2.44 (1H, *m*, H-9β), 2.35 (1H, *m*, H-6β), 2.30 (1H, *m*, H-2α), 2.28 (1H, *m*, H-3α), 2.25 (1H, *m*, H-3β), 2.21 (1H, *m*, H-2β), 1.18 (3H, *d*, *J* = 7.2 Hz, H-4').

**RMN** <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 34). δ 175.5 (C-1'), 169.7 (C-12), 139.0 (C-11), 138.1 (C-10), 135.7 (C-4), 127.9 (C-5), 125.2 (C-1), 121.1 (C-13), 84.2 (C-8), 66.4 (C-14), 64.6 (C-3'), 63.4 (C-15), 46.6 (C-7), 42.0 (C-2'), 35.4 (C-9), 31.2 (C-6), 30.0 (C-3), 28.5 (C-2), 13.4 (C-4').

**EM-FAB**<sup>+</sup> *m/z* (% intensidad relativa): 351 [M+1]<sup>+</sup> (7), 329 (18), 307 (20), 154 (100), 136 (75).

**EMAR-FAB** *m/z*: 350.1732 [M] observado; Calculado 350.1729, C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>.

### 15-O-4'-hidroxi-metacril-micrantólida (10) [23,49]



Aceite amarillo pálido

R<sub>f</sub>: 0.42 (Benceno/AcOEt 1:9)

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +15 (*c* 1.8 x 10<sup>-3</sup>, CHCl<sub>3</sub>)

UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) = 204.8 (4.2) nm

**IR** (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$ : 3300 (OH), 1762 (C=O), 1715 (C=O), 1633 (C=C) cm<sup>-1</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, a 25°C). (Espectro 25).  $\delta$  6.23 (1H, *da*, H-3'a), 5.86 (1H, *d*, *J* = 1.2 Hz, H-3'b), 6.20 (1H, *d*, *J* = 3.2 Hz, H-13a), 5.55 (1H, *d*, *J* = 2.8 Hz, H-13b), 5.56 (1H, *m*, H-5), 5.53 (1H, *m*, H-1), 4.68 (1H, *d*, *J* = 12.0 Hz, H-15a), 4.57 (1H, *d*, *J* = 12.0 Hz, H-15b), 4.33 (2H, *da*, H-4'a,b), 4.14 (2H, *da*, H-14a,b), 3.82 (1H, *m*, H-8), 2.83 (1H, *m*, H-7), 2.72 (1H, *m*, H-6 $\alpha$ ), 2.69 (1H, *m*, H-9 $\alpha$ ), 2.68 (1H, *m*, H-2'), 2.38 (1H, *m*, H-9 $\beta$ ), 2.34 (1H, *m*, H-6 $\beta$ ), 2.32 (1H, *m*, H-3 $\alpha$ ), 2.28 (1H, *m*, H-2 $\alpha$ ), 2.11 (1H, *m*, H-2 $\beta$ ), 2.08 (1H, *m*, H-3 $\beta$ ).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 26).  $\delta$  169.8 (C-12), 166.1 (C-1'), 139.4 (C-4), 139.1 (C-2'), 138.4 (C-10), 135.6 (C-11), 126.1 (C-3'), 127.9 (C-5), 124.8 (C-1), 121.0 (C-13), 84.3 (C-8), 66.0 (C-14), 63.3 (C-15), 61.8 (C-4'), 46.6 (C-7), 35.3 (C-9), 29.8 (C-6), 30.8 (C-3), 28.3 (C-2).

**RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, a 50°C). (Espectro 37).  $\delta$  6.16 (1H, *dd*, *J* = 3.0, 1.5 Hz, H-3'a), 5.87 (1H, *dd*, *J* = 3.5, 1.5 Hz, H-3'b), 6.06 (1H, *d*, *J* = 3.5 Hz, H-13a), 5.62 (1H, *d*, *J* = 3.0 Hz, H-13b), 5.66 (1H, *dd*, *J* = 12.0, 5.0 Hz, H-5), 5.60 (1H, *dd*, *J* = 7.0, 3.5 Hz, H-1), 4.80 (1H, *d*, *J* = 12.0 Hz, H-15a), 4.55 (1H, *d*, *J* = 12.0 Hz, H-15b), 4.26 (2H, *da*, H-4'a,b), 4.08 (1H, *d*, *J* = 13.0 Hz, H-14a), 4.03 (1H, *d*, *J* = 13.0 Hz, H-14b), 3.94 (1H, *m*, H-8), 2.95 (1H, *dddd*, *J* = 13.0, 5.0, 3.5, 3.0 Hz, H-7), 2.86 (1H, *ddd*, *J* = 13.0, 5.0, 5.0 Hz, H-6 $\alpha$ ), 2.75 (1H, *d*, *J* = 14 Hz, H-9 $\alpha$ ), 2.68 (1H, *m*, H-2'), 2.40 (1H, *ddd*, *J* = 13.5, 5.0, 2.5 Hz, H-9 $\beta$ ), 2.33 (1H, *m*, H-3 $\alpha$ ), 2.36 (1H, *dddd*, *J* = 13.0, 12.0, 5.0 Hz, H-6 $\beta$ ), 2.24 (1H, *m*, H-3 $\beta$ ), 2.30 (1H, *m*, H-2 $\alpha$ ), 2.16 (1H, *m*, H-2 $\beta$ ).

**RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 38).  $\delta$  169.9 (C-12), 166.5 (C-1'), 142.2 (C-4), 141.5 (C-2'), 139.3 (C-10), 136.3 (C-11), 129.0 (C-5), 125.3 (C-3'), 124.2 (C-1), 119.8 (C-13), 84.7 (C-8), 66.3 (C-14), 64.1 (C-15), 61.5 (C-4'), 47.5 (C-7), 35.7 (C-9), 32.2 (C-3), 29.3 (C-6), 29.1 (C-2).

#### 8.3.4. Fraccionamiento del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *M. micrantha* de Paraíso, Guerrero

De 0.18 kg de material vegetal, fueron obtenidos 8 g de extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, el cual fue purificado por CC con sílice gel (140 g, 230-400 mesh, 9×45 cm) eluyendo con una mezcla de solventes con incremento de la polaridad *n*-hexano:AcOEt (9:1→100) y finalmente (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO (100), se colectaron 184 eluatos los cuales se combinaron en nueve fracciones (1-9). De las fracciones 2, 3 y 4 fueron aislados y purificados los compuestos **16** (10 mg), **17** (7 mg) y **19** (15 mg), respectivamente. De la fracción 7 se obtuvo un sólido, el cual fue recrystalizado con AcOEt:MeOH (1:1), para obtener 140 mg de cristales de color amarillo los cuales correspondieron a **5**. De la fracción 9 en el fraccionamiento primario se obtuvo el compuesto **20** (35 mg).

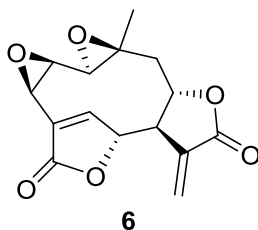
Para el análisis espectroscópico de **5** ver sección 8.3.3.1.

#### 8.3.5. Fraccionamiento del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *M. micrantha* de Nuevo Padilla, Tamaulipas

282.3 mg del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y 668.9 mg del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, se obtuvieron a partir de 14 g de material vegetal, ambos extractos fueron sometidos a CC usando sílice gel eluyendo con mezclas de *n*-hexano:AcOEt (9:1→100) de polaridad creciente y (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO (100). Del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se obtuvieron 133 fracciones las cuales se reunieron en 10 fracciones principales (1-10). 5 de estas fracciones (4-8) se analizaron por CLAR-DAD. Luego estas fracciones fueron purificadas por CC, obteniendo 5 mg de **6**, 4 mg de **7** y 2 mg de **8**. Del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH se obtuvieron 106 fracciones que fueron reunidas en 7 fracciones (1-7). De la fracción 4 se obtuvo **19** (7 mg) y de la fracción 7 se obtuvo **20** (9 mg).

### 8.3.5.1. Análisis espectroscópico y constantes físicas de 6

Mikanólida (6) [19-20, 40]



Agujas cristalinas

R<sub>f</sub>: 0.50 (*n*-Hexano/AcOEt 55:45)

Pf: 225-227 °C

IR (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub> 1770 (C=O), 1663 (C=C) cm<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 17). δ 7.19 (1H, *d*, *J* = 1.5 Hz, H-5), 6.51 (1H, *d*, *J* = 3.6 Hz, H-13a), 6.03 (1H, *d*, *J* = 3.6 Hz, H-13b), 5.29 (1H, *ddd*, *J* = 3.0, 2.5, 2.5 Hz, H-6), 4.42 (1H, *ddd*, *J* = 8.5, 8.5, 1.0 Hz, H-8), 4.05 (1H, *d*, *J* = 4.0 Hz, H-3), 3.38 (1H, *d*, *J* = 4.0 Hz, H-2), 3.24 (1H, *m*, H-7), 2.99 (1H, *s*, H-1), 2.24 (1H, *dd*, *J* = 1.0, 1.0 Hz, H-9α), 2.20 (1H, *dd*, *J* = 1.0, 1.0 Hz, H-9β), 1.17 (3H, *s*, H-14).

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 18). δ 171.3 (C-15), 168.5 (C-12), 148.2 (C-5), 138.0 (C-11), 133.0 (C-4), 126.0 (C-13), 84.1 (C-6), 82.5 (C-8), 59.2 (C-1), 56.9 (C-10), 55.1 (C-2), 51.8 (C-7), 51.5 (C-3), 45.0 (C-9), 22.8 (C-14).

Los análisis espectroscópicos y constantes físicas de 7 y 8, están descritos en la sección 8.3.2.1.

### 8.3.6. Fraccionamiento del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *M. micrantha* de Abasolo, Tamaulipas

De 14.5 g de material vegetal, se obtuvieron 324.6 mg del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y 705.9 mg del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, ambos extractos fueron sometidos a CC usando gel de sílice, eluyendo con mezclas de *n*-hexano:AcOEt (9:1→100) de polaridad creciente y (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO (100). Del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se obtuvieron 140 fracciones las cuales se reunieron en 9 fracciones principales (1-9), 6 de ellas (3-8) fueron analizadas por CLAR-DAD. Luego estas

fracciones fueron purificadas por CC, obteniendo 6 mg de **6**, 3 mg de **7** y 2 mg de **8**. Del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH se obtuvieron 114 fracciones que fueron reunidas en 7 fracciones (1-7). De la fracción 5 se obtuvo **19** (9 mg) y de la fracción 7 se obtuvo **20** (11 mg).

Para el análisis espectroscópico y constantes físicas de **6**, **7** y **8**, ver las secciones **8.3.5.1** y **8.3.2.1**.

### **8.3.7. Fraccionamiento del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *M. micrantha* de Tampico, Tamaulipas**

Partiendo de 9 g de material vegetal, se obtuvieron 310.8 mg del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y 584.2 mg del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, ambos extractos fueron sometidos a CC usando gel de sílice eluyendo con mezclas de *n*-hexano:AcOEt (9:1→100) de polaridad creciente y (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO (100). Del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se obtuvieron 107 fracciones las cuales se reunieron en 8 fracciones principales (1-8), de las cuales 5 fracciones (3-7) fueron analizadas por CLARIDAD. Posteriormente, estas fracciones fueron purificadas por CC, obteniendo 3 mg de **6** y 2 mg de **7**. Del extracto total se obtuvieron 101 fracciones que fueron reunidas en 7 fracciones (1-7). De la fracción 3 se obtuvo **19** (6 mg) y de la fracción 7 se obtuvo **20** (8 mg).

En las secciones **8.3.5.1** y **8.3.2.1**, se encuentran descritos el análisis espectroscópico y constantes físicas para las LS **6-7**.

### **8.3.8. Fraccionamiento de los extractos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *M. micrantha* de Tuxpan, Veracruz**

De 8 g de material vegetal, fueron obtenidos 158.6 mg del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y 103.5 mg del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, ambos extractos fueron sometidos a CC usando sílice gel eluyendo con mezclas de *n*-hexano:AcOEt (9:1→100) de polaridad creciente y (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO (100). Del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se obtuvieron 101 fracciones las cuales se reunieron en 8 fracciones principales (1-8), de las cuales 5 fracciones (3-7) fueron analizadas por CLARIDAD. Las fracciones fueron purificadas por CC, obteniendo 2 mg de **6** y 2 mg de **7**. Del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH se obtuvieron 22 fracciones que fueron reunidas en 6 fracciones (1-6). De la fracción 3 se obtuvo **19** (4 mg).

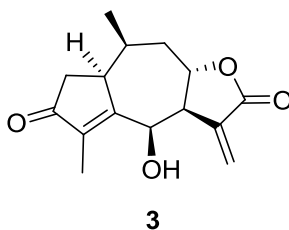
En las secciones **8.3.5.1** y **8.3.2.1**, están descritos el análisis espectroscópico y constantes físicas de **6** y **7**, respectivamente.

### **8.3.9. Fraccionamiento de los extractos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *M. micrantha* de Huimanguillo, Tabasco**

Partiendo de 8 g de material vegetal, se obtuvieron 129.4 mg del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y 336.9 mg del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, ambos extractos fueron sometidos a CC usando gel de sílice eluyendo con mezclas de *n*-hexano:AcOEt (9:1→100) de polaridad creciente y (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO (100). Del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se obtuvieron 121 fracciones las cuales se reunieron en 8 fracciones principales (1-8), de las cuales 2 fracciones (3-4) fueron analizadas por CLARIDAD. La fracción 5 se purificó por CC, y se obtuvieron cristales de color amarillo, los cuales fueron recristalizados con AcOEt-MeOH (1:1), para obtener 8 mg de **3**. Las fracciones estudiadas por CLAR, fueron purificadas por CC, para dar 3 mg de **3**. Del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH se obtuvieron 115 fracciones que fueron reunidas en 6 fracciones (1-9). De la fracción 4 se obtuvo **19** (6 mg) y de la fracción 7 se obtuvo **20** (8 mg).

#### **8.3.9.1. Análisis espectroscópico y constantes físicas de 3**

**Mikanokriptina (3)** [45-46]



Cristales amarillos (recristalizado de AcOEt/MeOH 1:1)

R<sub>f</sub>: 0.46 (n-Hexano/AcOEt 1:4)

Pf: 245-247°C

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +162 (c 1.0 × 10<sup>-3</sup>, MeOH)

UV (MeOH) λ<sub>max</sub>(log ε) = 239.5 (4.0) nm

CD (MeOH, Δε) λ<sub>max</sub> 214 (+8.5), 238 (+5.8), 265 (-0.035), 275 (+0.42), 310 (+0.99) nm.

IR (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub> 3369 (OH), 1765 (C=O), 1700 (C=O), 1638 (C=C) cm<sup>-1</sup>



**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 11). δ 6.45 (1H, *d*, *J* = 3.6 Hz, H-13a), 5.70 (1H, *d*, *J* = 3.2 Hz, H-13b), 5.13 (1H, *sa*, H-6α), 4.84 (1H, *ddd*, *J* = 12.8, 8.8, 3.6 Hz, H-8), 3.1 (1H, *m*, H-1), 3.0 (1H, *dddd*, *J* = 12.8, 5.2, 3.6, 3.2 Hz, H-7), 2.7 (1H, *dd*, *J* = 7.2, 6.8 Hz, H-2α), 2.5 (1H, *ddd*, *J* = 12.8, 7.2, 3.6 Hz, H-9β), 2.3 (1H, *m*, H-10), 2.20 (1H, *dd*, *J* = 7.2, 2.0 Hz, H-2β), 1.95 (1H, *ddd*, *J* = 12.8, 8.8, 6.0 Hz, H-9α), 1.56 (3H, *d*, *J* = 1.6 Hz, H-15), 0.85 (3H, *d*, *J* = 7.2 Hz, H-14).

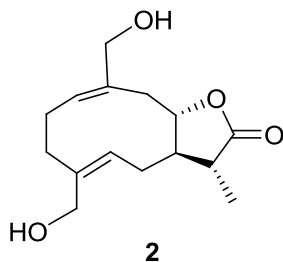
**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 12). δ 207.4 (C-3), 169.1 (C-12), 168.2 (C-5), 144.3 (C-4), 136.3 (C-11), 120.7 (C-13), 74.8 (C-8), 64.7 (C-6), 50.5 (C-7), 45.1 (C-1), 41.3 (C-2), 40.4 (C-9), 33.0 (C-10), 12.8 (C-14), 9.1 (C-15).

### **8.3.10. Fraccionamiento del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *Mikania cordifolia* de Los Reyes de Salgado, Michoacán**

60 g del extracto polar, fueron obtenidos desde 2.7 kg de material vegetal, el cual fue purificado por CC usando sílice gel (600 g, 230-400 mesh, 10.5×50 cm) eluyendo con una mezcla de solventes hex:AcOEt (9:1→100) de polaridad creciente y AcOEt (100) para obtener 162 eluatos los cuales fueron reunidos en 10 fracciones (1-10). Las fracciones 4 y 5 fueron purificadas por CC para obtener **16** (12 mg) y **18** (8 mg), respectivamente. Las fracciones 7, 8 y 9 fueron purificadas como se ha descrito en la sección **8.3.3**, para obtener **13** (5.2 mg), **12** (6.7 mg), **11** (3.4 mg), **10** (2.8 mg), **14** (4.6 mg) y **15** (1.4 mg). La fracción 10 (4.2 g) se llevó a CC (60 g, 230-400 mesh, 5×30 cm) utilizando mezclas de *n*-hexano-AcOEt como eluyentes para dar 6 subfracciones (10a-10g). La subfracción 10e (52.9 mg) fue purificada por CPP (20×20 cm, 2 mm) usando benceno-AcOEt (1:9, dos eluciones) obteniendo **15** (6.0 mg). La subfracción 10f (16 mg) fue purificada por CPP (20×20 cm, 2 mm) usando benceno-AcOEt (1:9, dos eluciones) obteniendo el nuevo producto natural 11Hβ-11,13-dihidromicrantólida (**2**) (6.2 mg).

### 8.3.10.1. Análisis espectroscópico y constantes físicas de 2 y 15

#### 11Hβ-11,13-dihidromicrantólida (2)



Aceite amarillo pálido

R<sub>f</sub>: 0.33 (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>:AcOEt 0.5:95)

PM : 266 g/mol

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -4.5 (c 1.1 × 10<sup>-3</sup>, CHCl<sub>3</sub>)

UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) = 203.5 (3.5) nm

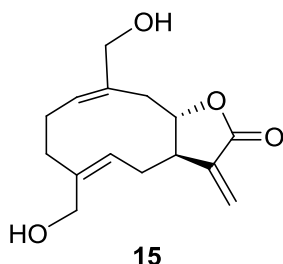
**IR** (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub>. (Espectro 7). 3605 (OH), 3432 (OH), 1767 (C=O) cm<sup>-1</sup>

**RMN** <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 9). δ 5.63 (1H, *dd*, *J* = 9.0, 3.5 Hz, H-1), 5.40 (1H, *da*, *J* = 8.5 Hz, H-5), 4.13 (2H, *d*, *J* = 12.0 Hz, H-14a,b), 4.10 (2H, *d*, *J* = 12.0 Hz, H-15a,b), 3.9 (1H, *m*, H-8), 2.55 (1H, *m*, H-9a), 2.23 (1H, *m*, H-9b), 2.33 (1H, *m*, H-6a), 2.27 (1H, *m*, H-6b), 2.27 (1H, *dc*, *J* = 11.5, 7.0 Hz H-11), 2.24 (2H, *m*, H-2), 2.21 (1H, *m*, H-3a), 2.10 (1H, *m*, H-3b), 1.91 (1H, *dddd*, *J* = 11.5, 7.0, 4.5, 4.0 Hz, H-7), 1.27 (3H, *d*, *J* = 7.0 Hz, H-13).

**RMN** <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (Espectro 8). δ 178.5 (C-12), 139.1 (C-10), 138.0 (C-4), 127.5 (C-1), 126.1 (C-5), 84.0 (C-8), 66.6 (C-14), 61.7 (C-15), 51.5 (C-7), 42.3 (C-11), 30.9 (C-9), 28.5 (C-6), 29.6 (C-2), 29.2 (C-3), 13.3 (C-13).

**EMAR-FAB** *m/z*: 266.1518 [M] observado; Calculado 266.1510, C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>

**Micrantólida (15)** [23,49]



Aceite amarillo pálido.

R<sub>f</sub>: 0.38 (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>:EtOAc 0.5:95)

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -8.0 (*c* 5.0 × 10<sup>-4</sup>, CHCl<sub>3</sub>)

UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) = 206 (4.1) nm

**IR** (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub>. 3689 (OH), 3349 (OH), 1766 (C=O), 1602 (C=C) cm<sup>-1</sup>

**RMN** <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 35). δ 6.24 (1H, *d*, *J* = 3.0 Hz, H-13a), 5.56 (1H, *d*, *J* = 3.0 Hz, H-13b), 5.67 (1H, *dd*, *J* = 7.0, 7.0 Hz, H-1), 5.46 (1H, *da*, *J* = 7.5 Hz, H-5), 4.16 (2H, *d*, *J* = 12.0 Hz, H-14a,b), 4.00 (2H, *d*, *J* = 12.0 Hz, H-15a,b), 3.91 (1H, *m*, H-8), 2.82 (1H, *m*, H-7), 2.77 (1H, *m*, H-9a), 2.70 (1H, *m*, H-6a), 2.42 (1H, *m*, H-9b), 2.34 (1H, *m*, H-6b), 2.22 (2H, *m*, H-2), 2.18 (1H, *m*, H-3a), 2.12 (1H, *m*, H-3b).

**RMN** <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (Espectro 36). δ 165.5 (C-12), 135.0 (C-10), 133.9 (C-4), 123.2 (C-1), 121.1 (C-5), 116.5 (C-13), 80.0 (C-8), 62.4 (C-14), 57.5 (C-15), 42.5 (C-7), 32.9 (C-9), 26.8 (C-6), 25.6 (C-2), 24.5 (C-3).

El análisis espectroscópico y constantes físicas de las melampólidas **10-14**, están descritos en la sección **8.3.3.1**.

**8.3.11. Fraccionamiento del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *M. cordifolia* de Lagunillas, Guerrero**

Desde 0.46 kg de material vegetal, se obtuvieron 20 g del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, el cual fue llevado a CC usando gel de sílice (200 g, 230-400 mesh, 10×40 cm) eluyendo con mezclas de *n*-hexano:AcOEt (9:1→ 100) para obtener 240 eluatos que fueron reunidos en 12 fracciones (1-12). Las fracciones 3, 4 y 5 fueron purificadas por CC para dar **16** (7 mg), **17** (9 mg) y **18** (12 mg), respectivamente. Las demás fracciones fueron purificadas como se describió en la

sección **8.3.3.** para obtener **13** (20.2 mg), **12** (16.7 mg), **11** (20.2 mg), **10** (16.6 mg) y **14** (8.6 mg).

El análisis espectroscópico y constantes físicas de las melampólidas **10-14**, están descritos en la sección **8.3.3.1.**

#### **8.3.12. Fraccionamiento del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH de *M. cordifolia* de Chancalá, Chiapas**

Partiendo de 0.60 kg de material vegetal, se obtuvieron 32 g del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, el cual fue llevado a CC usando gel de sílice (320 g, 230-400 mesh, 10×40 cm), eluyendo con mezclas de *n*-hexano:AcOEt (9:1→100) para obtener 212 eluatos, los cuales se reunieron en 10 fracciones (1-10). Las fracciones 2, 3 y 5 fueron purificadas por CC para dar **16** (9 mg), **17** (11 mg) y **18** (8 mg), respectivamente. Las demás fracciones fueron purificadas como se describió en la sección **8.3.3.** para obtener **13** (4 mg), **11** (3.1 mg), **12** (4.7 mg), **10** (5.8 mg) y **14** (2.3 mg).

El análisis espectroscópico y constantes físicas de las melampólidas **10-14**, están descritos en la sección **8.3.3.1.**

#### **8.3.13. Fraccionamiento del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH *M. houstoniana* de Catemaco, Veracruz**

De 480 g de material vegetal, se obtuvieron 5.2 g del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y 2.8 g del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, ambos extractos fueron purificados por CC usando sílice gel eluyendo con mezclas de *n*-hexano:AcOEt (9:1→100) de polaridad creciente y finalmente con (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO (100). Del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se obtuvieron 85 fracciones los cuales se reunieron en 8 fracciones principales (1-8). De las fracciones 2 y 3 se obtuvo **16** (7 mg) y **19** (10 mg), respectivamente. Del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH se obtuvieron 60 fracciones que fueron reunidas en 7 fracciones (1-7). De las fracciones 2 y 3 se obtuvo **16** (4 mg) y **19** (6 mg), respectivamente, de la fracción 7 se obtuvo **20** (13 mg).

#### 8.4. Cálculo de la energía conformacional de los principales conformeros de 10

Las geometrías moleculares iniciales de los cuatro conformeros de **10** fueron obtenidos con parámetros estándar usando el programa ChemDraw Ultra 10.0. La energía conformacional se obtuvo por optimización de la geometría (Paquete HyperChem 8.0.6), utilizando los parámetros estándar del Método de la Mecánica Molecular (MM+) a través del algoritmo Polak-Ribiere gradiente RMS 0.1 kcal A<sup>o-1</sup> Mol<sup>-1</sup>.

#### 8.5. Análisis por CLAR-DAD de las LS de *Mikania*

Los análisis por CLAR-DAD se llevaron a cabo en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia marca Agilent, con una bomba binaria modelo 1200, desgasificador en línea, automuestreador y detector de arreglo de diodos (DAD) 2996 Waters. Los datos fueron procesados con el software Empower (Waters Corp.). Las separaciones se hicieron utilizando en una columna de fase reversa marca Synergi 4 $\mu$  Polar-RP 80A<sup>o</sup> (150 x 4.60mm, 4 $\mu$ m). Los solventes utilizados fueron acetonitrilo marca MERCK<sup>®</sup> y agua. La fase móvil fueron mezclas de agua (eluyente A):acetonitrilo (eluyente B) usando gradientes de: 0 min 20% B; 2 min 22%B; 12 min 23% B; 25 min 24% B; 40 min 100% B; 45 min 100% B; 46 min 20% B. El flujo de velocidad fue de 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 10  $\mu$ L. El rango de detección en *UV* fue de 200-600 nm, y los cromatogramas fueron detectados a 220 nm.

Para el análisis por CLAR-DAD, se obtuvieron los extractos de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de las partes aéreas de 5 poblaciones de *M. micrantha* colectados en 3 poblaciones de Tamaulipas (Nuevo Padilla, Abasolo y Tampico); de Veracruz (Tuxpan) y de Tabasco (Huimanguillo). Los extractos de cada población, fueron fraccionados por CC y se obtuvieron 23 fracciones en total, los cuales fueron analizadas bajo las mismas condiciones. Para el fraccionamiento por CC ver las secciones **8.3.5** a **8.3.9**.

## 8.6. Ensayos biológicos

### 8.6.1. Ensayo de citotoxicidad

Los compuestos **1**, **3-12** fueron evaluados *in vitro* en líneas celulares cancerosas humanas de: colón (HCT-15), pecho (MCF-7), leucemia (K562), sistema nervioso central (U251- glya), próstata (PC-3) y pulmón (SKLU-1), las cuales fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos de América (INC-USA). La citotoxicidad de los compuestos fue determinada usando el método colorimétrico de la sulforrodamina B (SRB) mediante el ensayo de proliferación celular [94]. Las líneas celulares fueron cultivadas en el medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., Ltd., St. Louis, MO, USA), enriquecido con Suero Bovino Fetal al 10% 2  $\mu\text{M}$  de L-glutamina, 100 IU/mL de penicilina, 10  $\mu\text{g/mL}$  de sulfato de estreptomicina, 25  $\mu\text{g/mL}$  de anfotericina B (Gibco) y 1% de aminoácidos no-esenciales (Gibco). Los cultivos fueron mantenidos a 37 °C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Como se determinó con azul de tripano, la viabilidad de la célula utilizada en los experimentos superó el 95%.

Las células se retiraron del cultivo tisular mediante tratamiento con tripsina, y se diluyeron con medio fresco. Alícuotas de suspensiones celulares de 100  $\mu\text{L}$ , que contenían 5.000-10.000 células por pozo, fueron transferidas en 96 placas de microtitulación (Costar) y se incubaron a 37 °C durante 24 h en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

Las soluciones madre de los compuestos probados fueron disueltos inicialmente en DMSO (20 mM), se prepararon y se diluyeron adicionalmente en un medio para producir las concentraciones deseadas. 100  $\mu\text{L}$  de las soluciones diluidas de los compuestos, se adicionaron a cada pozo. Los cultivos se expusieron durante 48 h a cada compuesto a concentraciones de 50  $\mu\text{M}$ . Después del período de incubación, las células fueron fijadas al sustrato plástico por adición de 50  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético acuoso frío al 50%. Las placas se incubaron a 4 °C durante 1 h, se lavaron con H<sub>2</sub>O del grifo, y se secaron al aire. Las células fijadas al ácido tricloroacético se tiñeron mediante la adición de 0.4% de SRB. La solución libre de SRB fue removida por lavado con ácido acético acuoso 1%. Las placas fueron secadas al aire, y el colorante unido se solubilizó mediante la adición de 100  $\mu\text{L}$  de Tris base 10 mM no tamponada.

Las placas se colocaron en agitación durante 5 minutos, antes del análisis. Las densidades ópticas de las soluciones coloreadas que fueron extraídas se leyeron en un Lector Ultra de Microplatos (*Elx 808, Bio-Tek Instruments, Inc.*) a una longitud de onda de 515 nm. Los resultados fueron expresados como porcentajes de la inhibición de la proliferación celular y como concentraciones inhibitorias medias ( $CI_{50}$ ), los cuales se calcularon de acuerdo a los protocolos de Monks [98], es decir, la curva dosis-respuesta fue graficada para cada sustancia y la concentración  $CI_{50}$  obtenida fue estimada mediante las ecuaciones de una regresión lineal. Para los valores de porcentaje de inhibición del crecimiento celular ver tabla 2 (sección 7.4.1). Los valores  $CI_{50}$  para cada sustancia están reportados como la media  $\pm$  error estándar, y se encuentran registrados en la tabla 3 (sección 7.4.1).

### 8.6.2. Actividad anti-inflamatoria

Los compuestos **1**, **4**, **7-13** fueron evaluados usando el modelo de edema inducido con acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (ATF) de acuerdo a la siguiente metodología: se emplearon ratones machos de la cepa CD1 (25-30 g). Los animales (n=4) se colocaron en cajas de acrílico transparente a temperatura constante de  $22 \pm 2$  °C, con un fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad y con agua y alimento *ad libitum*. Bajo anestesia general con pentobarbital sódico (31.5 mg/Kg intraperitoneal), en la oreja derecha se aplicaron tópicamente 10  $\mu$ L de una solución etanólica de ATF (0.25 mg/mL) aplicando 5 mL en la parte interna y 5 mL en la parte externa de la oreja. Diez minutos después en la misma oreja, se aplicaron 1  $\mu$ mol de los compuestos **1**, **4**, **7**, **8** y 0.31  $\mu$ mol de **9** disueltos en 10% de DMSO en diclorometano y 1  $\mu$ mol de los compuestos **10**, **11**, **12** y **13** disueltos en un volumen de 20  $\mu$ L en metanol. La oreja izquierda recibió solamente 20  $\mu$ L de la mezcla de disolventes y 10  $\mu$ L etanol. Cuatro horas después de la aplicación del ATF, los animales se sacrificaron con CO<sub>2</sub> y se tomó una muestra de 7 mm de diámetro de ambas orejas. Las muestras se pesaron y el incremento del peso de la muestra derecha con respecto a la izquierda represento el edema. La inhibición del edema se calculó con la siguiente fórmula: % de inhibición =  $[(C - E) / C] \times 100$  en donde C representa el edema del grupo control (tratado con ATF) y E corresponde al edema del grupo experimental (ATF más el compuesto). Los resultados obtenidos se analizaron mediante una prueba de t Student, los valores de  $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.01$  se consideraron diferencia significativa

con respecto al control [95]. Se usó la indometacina disuelta en etanol, como fármaco de referencia. La dosis inhibitoria media se calculó mediante una regresión lineal de los puntos significativos, graficando el logaritmo de la dosis contra el porcentaje de inhibición del edema. Para los valores de porcentaje de inhibición ver tabla 4 (sección **7.4.2**).



## 9. CONCLUSIONES

- ✓ El estudio químico de las especies *Mikania micrantha*, *M. cordifolia* y *M. houstoniana*, colectadas en varias poblaciones de México, permitió el aislamiento e identificación de 20 compuestos. (1-15) fueron caracterizadas como LS. 8-*Epi*-mikanokriptina (1) y 11H $\beta$ -11,13-dihidromicrantólida (2) se reportan como nuevos productos naturales, la achalensólida (4) y xerantólida (5) se reportan por primera vez en el género *Mikania*. Adicionalmente, la acetil  $\beta$ -amirina (16), lupeol (17),  $\beta$ -sitosterol (18), estigmasterol (19) y el  $\beta$ -D-glucopiranosido de estigmasterilo (20), también fueron encontrados en las diferentes especies estudiadas.
- ✓ El estudio por RMN a temperatura variable, permitió establecer la conformación [ $^1D^{14}$ ,  $^{15}D_5$ ], para las 14,15-dihidroxi-*cis*-1(10)-*trans*-4-germacradien-8 $\alpha$ ,12-ólicas (2, 10-15), las micrantólidas aisladas de *Mikania* y éste arreglo fue confirmado por cálculos teóricos.
- ✓ Se evaluó la capacidad citotóxica de las LS 1, 3-12, de las cuales 8 y 9 presentaron mejor actividad, comparadas con la Helenalina. Esta actividad puede ser correlacionada con algunas funciones estructurales presentes.
- ✓ Se evaluó la respuesta anti-inflamatoria de las LS 1, 4, 7-13, la cual fue marginal, en comparación con la indometacina (83.7%), la cual fue usada como fármaco de referencia, aunque las LS 10-13, presentaron mejor actividad que las LS 1, 4, 7-9.
- ✓ Se estableció un procedimiento para determinar los tiempos de retención diferenciados por CLAR de las LS 1-15 y se analizaron 5 poblaciones del Golfo de México.
- ✓ Los resultados proporcionan evidencia de la variabilidad en el contenido metabólico de las diferentes poblaciones: las guayanólidas (1, 3-5) y melampólidas (2, 10-15) están presentes en las poblaciones del Pacífico, mientras que las germacrólidas (6-9) se encuentran principalmente en las poblaciones del Golfo. Sin embargo, cabe señalar la

similitud de los resultados descritos para *M. micrantha* y *M. cordifolia* con los obtenidos a partir de poblaciones de Sudamérica.

- ✓ El hallazgo de las dilactonas sesquiterpénicas (**6-9**), de las guayanólidas (**1, 3-5**) y las melampólidas (**2, 10-15**) en diferentes poblaciones de *M. micrantha*, proporcionó evidencia de los cambios significativos en el contenido metabólico de diversas poblaciones de esta especie, y esto está de acuerdo con los análisis recientes de la mezcla de terpenoides foliares volátiles [98].

Esta diversidad puede correlacionar con su amplia capacidad de adaptación y distribución en diferentes partes del mundo. En comparación, *M. cordifolia*, biosintetiza principalmente melampólidas (**2, 10-15**), y la distribución de esta especie parece estar más restringido.

Sin embargo, la presencia de LS en estas especies, estaba de acuerdo con los hallazgos previos sobre la composición de las especies que pertenecen a la sección de Mikania; en contraste, los diterpenos se encuentran principalmente en la sección Summikania [3,16,17]. Los triterpenos y fitoesteroles parecen ser más comunes en las diferentes especies de *Mikania*.

## 10. REFERENCIAS

- [1] Villaseñor, J.L.; Espinosa, F.J. In *Catálogo de malezas de México*. UNAM y Fondo de Cultura Económica, México, 1998, pp 407.
- [2] Rufatto, L.C.; Gower, A.; Schwambach, J.; Moura S. Genus *Mikania*: chemical composition and phytotherapeutical activity. *Braz. J. Pharmacogn.* **2012**, *22*,1384-1403.
- [3] Aguilar A. *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social*, IMSS, México, **1994**, pp 52.
- [4] Vásquez, J.; Jiménez, S.L.; Gómez, I.C.; Rey, J.P.; Henao, A.M.; Marín, D.M.; Romero, J.O.; Alarcón, J.C. Snakebites and ethnobotany in the Eastern region of Antioquia, Colombia- The traditional use of plants. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *146*, 449-455.
- [5] Arias, A.R.; Ferro, E.; Inchausti, A.; Ascurra, M.; Acosta, N.; Rodríguez, E.; Fournet, A. Mutagenicity, insecticidal and trypanomicidal activity of some Paraguayan Asteraceae. *J. Ethnopharmacol.* **1995**, *45*, 35-41.
- [6] Serrano, S.M.; Nogal, J.J.; Diaz, M.R.A.; Escario, J.A.; Fernández, A.R.; Barrio, A.G. In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *71*, 101-107.
- [7] Parker C. The *Mikania* problem. PANS: Pest articles & news summaries. **1972**, *18*, 312-315.
- [8] Holmes, W.C. The Genus *Mikania* (Compositae, Eupatorieae) in Mexico. *Sida, Bot. Misc.* **1990**, *5*, 27-28.
- [9] Zhang, L.Y.; Ye, W.H.; Cao, H.L.; Feng, H.L. *Mikania micrantha* H.B.K. in China - an overview. *Weed Res.* **2004**, *44*, 42-49.
- [10] Shao, H.; Peng, S.; Wei, X.; Zhang, D.; Zhang, C. Potential allelochemicals from an invasive weed *Mikania micrantha* H.B.K. *J. Chem. Ecol.* **2005**, *31*, 1657-1668.
- [11] Huang, H.; Ye, W.; Wu, P.; Lin, L.; Wei, X. New Sesquiterpene Dilactones from *Mikania micrantha*. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 734-736.
- [12] Aguinaldo, A.M.; Padolina, W.G.; Abe, F.; Yamauchi, T. Flavonoides from *Mikania cordata*. *Biochem. System. Ecol.* **2003**, *31*, 665-688.
- [13] Wei, X.; Huang, H.; Wu, P.; Cao, H. Phenolic constituents from *Mikania micrantha*. *Biochem. Syst. Eco.* **2004**, *32*, 1091-1096.
- [14] Cuenca, M.R.; Catalán, C.A.N.; Díaz, J.G.; Herz, W. Monoterpenes and Lignanes from

- Mikania saltensis*. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1162-1164.
- [15] Herz, W.; Kulanthaivel, P. Diterpenes and sesquiterpene lactones from *Mikania congesta*. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1761-1768.
- [16] Fabbri, H.; Rodríguez de Oliveira, D.; Vichnewski, W.; Herz, W. Diterpenes of *Mikania lindbergii* Baker. *Biochem. Syst. Ecol.* **1997**, *25*, 562-564.
- [17] Herz, W. Terpenoid Chemistry of *Mikania* species. *J. Indian. Chem. Soc.* **1998**, *75*, 559-564.
- [18] Herz, W.; Subramaniam, P.S.; Santhanam, P.S.; Aota, K.; Hall, A.L. Structure Elucidation of Sesquiterpene Dilactones from *Mikania scandens* (L.) Willd. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 1453-1463.
- [19] Bakir, M.; Facey, P.C.; Hassan, I.; Mulder, W.H.; Porter, R.B. Mikanolide from Jamaican *Mikania micrantha*. *Acta. Crystallogr. Sect. C.* **2004**, *60*, 798-800.
- [20] Cuenca, M.D.R.; Bardon, A.; Catalán, C.A.N. Sesquiterpene lactones from *Mikania micrantha*. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 625-626.
- [21] Krautmann, M.; C. de Riscalá, E.; Burgueño-Tapia, E.; Mora-Pérez, Y.; Catalán, C.A.N.; Joseph-Nathan, P. C-15 Functionalized Eudesmanolides from *Mikania campanulata*. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1173-1179.
- [22] Barrero, A.F.; Oltra, J.E.; Rodríguez-García, I.; Barragán, A.; Álvarez, M. Preparation, Stereochemistry, and Cytotoxic Activity of the Melampolides from *Mikania minima*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 305-307.
- [23] Gutiérrez, A.; Oberti, J.C.; Sosa, V.; Herz, W. Melampolides from *Mikania cordifolia*. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2315-2320.
- [24] Rodríguez-Cabrera, L.; Villaseñor, J.L. Revisión bibliográfica sobre el conocimiento de la familia Compositae en México. *Biótica*, **1987**, *12*, 131-147.
- [25] Herwood, V.H.; Harborne, J.B.; Turner, B.L. The biology and chemistry of the Compositae. Academic press, London, **1977**.
- [26] Villaseñor, J. L. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia* **2003**, *28*, 160-167.
- [27] Villaseñor, J.L. Clave genérica para las compuestas de la cuenca del río Balsas. *Bol. Soc. Bot. Méx.* **1987**, *47*, 65-86.
- [28] Suárez-Mota, M. R.; Villaseñor, J.L. Las compuestas endémicas de Oaxaca, México:

- Diversidad y distribución. *Bol. Soc. Bot. Méx.* **2011**, 85, 55-66.
- [29] Khambay, B. Pyrethroid Insecticides. *Pesticide Outlook* **2002**, 49-54.
- [30] Dulger, B.; Gonuz, A. Antimicrobial Activity of Certain Plants use in Turkish Traditional Medicine. *Asian J. Plants Sciences*, **2004**, 3, 104-107.
- [31] Geuns, J.M. Molecules of interest. Stevioside. *Phytochemistry* **2003**, 64, 913-921.
- [32] Herz, W.; Romo de Vivar, A.; Romo, J.; Viswanathan, N. Constituents of Helenium Species. XIII. The Structure of Helenalin and Mexicanin A. *J. Amer. Chem. Soc.* **1963**, 85, 19-26.
- [33] Gelb, M.H. Drug discovery for malaria: a very challenging and timely endeavor. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, 11, 440-445.
- [34] Wagner, H. In the Biology and Chemistry of the Compositae. **1977**, 1, 411-433.
- [35] Vogler, B.K.; Pittler, M.H.; Ernst, E. Feverfew as a preventive treatment for migraine: a systematic review. *Cephalalgia*, **1998**, 18, 704-708.
- [36] Kupchan, S.M.; Eakin, M.A.; Thomas, A.M. Tumor inhibition: structure-cytotoxicity relations among the sesquiterpene lactones. *J. Med. Chem.* **1971**, 14, 1147-1152.
- [37] Picman, A, K. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. Eco.* **1986**, 14, 225-281.
- [38] Hansen, L.; Boll, P.M. The polyacetylenic falcarinol as the major allergen in *Schefflera arboricola*. *Phytochemistry* **1986**, 25, 529-530.
- [39] Heinrich, M.; Robles, M.; West, J.E.; Ortíz de Montellano, B.R.; Rodriguez, Eloy. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1998**, 38, 539-565.
- [40] Herz, W.; Santhanam, P.S.; Subramaniam, P.S.; Schmid, J.J. The structure of mikanolide, a new sesquiterpene lactone from *Mikania scandens* (L.) Will. *Tetrahedron Lett.* **1967**, 3111-3115.
- [41] Gutiérrez, A.B; Oberti, J.C.; Kulanthaivel, P.; Herz, W. Sesquiterpene lactones and diterpenes from *Mikania periplocifolia*. *Phytochemistry* **1985**, 24, 2967-2971.
- [42] Kiang A.K.; Sim, K.Y.; Yoong, S.W. Constituents of *Mikania cordata* (Burm. F.) B. L. Robinson (Compositae)- II. *Phytochemistry* **1968**, 7, 1035-1037.
- [43] Aguinaldo, A.M.; Abe, F.; Yamauchi, T.; Padolina, W.G. Germacranolides of *Mikania*

- cordata*. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1441-1443.
- [44] But, P.P.H.; He, Z-D.; Ma, S.C.; Chan, Y.M.; Shaw, P.C.; Ye, W.C.; J, R.W. Antiviral Constituents against Respiratory Viruses from *Mikania micrantha*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 925-928.
- [45] Herz, W.; Srinivasan, A.; Kalyanaraman, P.S. Mikanokryptin, a new guianolide from *Mikania*. *Phytochemistry* **1975**, *14*, 233-237.
- [46] Reynolds, W.; Enriquez, R.; Chávez, M.A.; Silva, A.; Martinez, M. Total assignment of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectra of mikanokryptin and comparison of its solution and solid state conformation. *Can. J. Chem.* **1985**, *63*, 849-853.
- [47] Cox, P.J.; George, A.; Sim, J. Sesquiterpenoids. Part XVII. X-Ray Crystallographic Determination of the Stereochemistry and Conformation of Dihydromikanolide, a germacranolide diepoxide. *Chem. Soc. Perkin Trans 2*, **1974**, 1355-1358.
- [48] Bovill, M.J.; Guy, M.H.P.; Sim, J.A.; White, D.N.J. Sesquiterpenoids, Part 26. X-Ray Crystallographic. Analysis of Mikanokryptin, a Cytotoxic Guaianolide. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, **1979**, 53-56.
- [49] Boeker, R.; Jakupovic, J.; Bohlmann, F.; Schmeda-Hirschmann, G. Germacra-1,10Z,4E, dien-12,8 $\alpha$ -olides from *Mikania micrantha*. *Planta Med.* **1987**, *53*, 105-106.
- [50] Castro, V.; Jakupovic, J.; Bohlmann, F. Germacranolides from *Mikania* species. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 527-530.
- [51] Bohlmann, F.; Natu, A.A.; Mahanta, P.K. Neue diterpene und germacranolide aus *Mikania* Arten. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 483-485.
- [52] Cuenca, M.D.R.; Catalán, C.A.N. 14,15-dihydroxygermacranolides and other constituents of *Mikania minima*. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 686-691.
- [53] Cuenca, M.D.R.; Borkosky, S.; Catalán, C.A.N.; Goedken, V.L.; Díaz, J.G.; Herz, W. Sesquiterpene lactones of *Mikania minima*. *Phytochemistry* **1993**, *32*, 1509-1513.
- [54] Zamorano, G.; Catalán, C.A.N.; Díaz, J.G.; Herz, W. Sesquiterpene dilactones from *Mikania ypacarayensis*. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1257-1260.
- [55] Vichnewski, W.; Filho, H.F.L.; Murari, R.; Herz, W. Cinnamoylgrandifloric acid from *Mikania oblongifolia*. *Phytochemistry* **1977**, *16*, 2028-2029.
- [56] Ohkoshi, E.; Kamo, S.; Makino, M.; Fujimoto, M. Ent-kaurenoic acids from *Mikania hirsutissima* (Compositae). *Phytochemistry* **2004**, *65*, 885-890.

- [57] Bohlmann, F.; Adler, A.; Schuster, A.; Gupta, R.; King, R. Diterpenes from *Mikania* species. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 1899-1902.
- [58] Castro, V.; Jakupovic, J. 4 $\beta$ ,19-Epoxy-Norkaurene and other diterpenes from *Mikania Banisteriae*. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2450-2451.
- [59] Abrao, P.; Casanova, I.C.; Rodríguez, D.C. Comparative analysis of triterpenoids from *Mikania cordifolia* collected from four different locations. *Phytochemistry* **2006**, *42*, 547-552.
- [60] Nicollier, G.; Thompson, A.C. Essential oil and terpenoids of *Mikania micrantha*. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 2587-2588.
- [61] Huang, H.; Ye, W.; Wei, X.; Zhang, C. Allelopathic potential of sesquiterpene lactones and phenolic constituents from *Mikania micrantha* H.B.K. *Biochem. Syst. Ecol.* **2009**, *36*, 867-871.
- [62] Agra, M.F.; Silva, K.N.; Basilio, I.J.D.; Franca, P.F.; Barbosa-Filho, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2008**, *18*, 472-508.
- [63] Salgado, H.R.N.; Roncari, A.F.F.; Moreira, R.R.D. Antidiarrheal effects of *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) leaf extract in mice. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, *15*, 205-208.
- [64] Gaspareto, J.C.; Campos, F.R.; Budel, J.M.; Pontarolo, R. *Mikania glomerata* Spreng. e *M. leavigata* Sch. Bip. Ex Baker, Asteraceae: estudos agronômicos, genéticos, morfoatómicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos y uso en programas de fitoterapia en Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2010**, *20*, 627-640.
- [65] Bighetti, A.E.; Antonio, M.A.; Kohn, L.K.; Rehder, V.L.G.; Flogio, M.A.; Possenti, A. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania leavigata* Schultz Bip. *Phytomedicine* **2005**, *12*, 72-77.
- [66] Suyenaga, E.S.; Reche, E.; Faria, F.M.; Schapoval, E.E.S.; Chaves, C.G.M.; Henriques, A.T. Anti-inflammatory investigation of some species of *Mikania*. *Phytother. Res.* **2006**, *16*, 519-523.
- [67] Dey, P.; Chandra, S.; Chatterjee, P.; Bhattacharya, S. Neuropharmacological properties of *Mikania scandens* (L.) Willd. (Asteraceae). *J. Advanced Pharm. Technol. Res.* **2011**, *2*, 255-259.
- [68] Hasan, S.M.R.; Jamila, M.; Majumder, M.M.; Akter, R.; Hossain, M.; Mazumder, E.H.; Alam, A.; Jahangir, R.; Rana, S.; Rahman, A.; Rahman, S. Analgesic and antioxidant

- activity of the hydromethanolic extract of *Mikania scandens* (L.) Willd. Leaves. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *4*, 1-7.
- [69] Ysrael, M.C.; Croft, K.D. Inhibition of leukotriene and platelet activating factor synthesis in leukocytes by the sesquiterpene lactone scandenolide. *Plant Med.* **1990**, *56*, 268-270.
- [70] Ahmed, M.; Rahman, M.T.; Alimuzzaman, M.; Shilpi, J.A. Analgesic sesquiterpene dilactone from *Mikania cordata*. *Fitoterapia* **2001**, *72*, 919-921.
- [71] Facey, P.C.; Peart, P.C.; Porter, R.B.R. The antibacterial activities of Mikanolide and its derivatives. *W. Indian Med. J.* **2010**, *59*, 249-252.
- [72] Fischer, N.H.; Olivier, E.J.; Fischer, H.D. En Progress in the chemistry of organic Natural Products, "The biogenesis and Chemistry of Sesquiterpene Lactones". **1979**, *38*, pp. 88-92.
- [73] Samek, Z.; Harmatha J. Use of structural changes for stereochemical assignments of natural  $\alpha$ -exomethylene  $\gamma$ -lactones of the germacra-1(10),4-dienolide type on the basis of allylic and vicinal couplings of bridgehead protons. Hydrogenation of endocyclic double bonds. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1978**, *43*, 2779-2799.
- [74] Merfort I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. *J. Chromatogr. A.* **2002**, 115-130.
- [75] Spring, O.; Priester, T.; Stransky, H.; Hager A. Sesquiterpene lactones in sunflower seedlings: distribution in the plant and occurrence in genetic varieties as determined by an isocratic HPLC technique. *J. Plant. Physiol.* **1985**, *120*, 321-329.
- [76] Spring, O.; Heil, N.; Eliasson U. Chemosystematic studies on the genus *Scalesia* (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **1999**, *27*, 277-288.
- [77] Oliveira P.A.; Gregorio, L.E.; Oliveira, D.C.R. Comparative analysis of sesquiterpene lactones from *Mikania cordifolia* collected from three different locations. *Chem. Nat. Comp.* **2007**, *43*, 140-142.
- [78] Arellano-Martínez, R.; Delgado G. Hypargyrin A, a Hemiacetalic Germacrolide from *Viguiera hypargyrea* (Asteraceae). *J. Mex. Chem. Soc.* **2010**, *54*, 117-121.
- [79] León, A.; Reyes, B.M.; Chávez, M.I.; Toscano, R.A.; Delgado G. Sesquiterpene Lactones, Acyl Phenyl Propanoids and Other Constituents from *Schkuhria pinnata* var. *wislizeni*. Antioxidant Evaluation. *J. Mex. Chem. Soc.* **2009**, *53*, 193-200.
- [80] Delgado, G.; Tejeda, V.; Salas, A.; Chávez, M.I.; Guzmán, S.; Bolaños, A.; Aguilar, M.I.; Navarro, V.; Villarreal, M.L. New Melampolides from *Schkuhria schkuhrioides*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1082-1085.



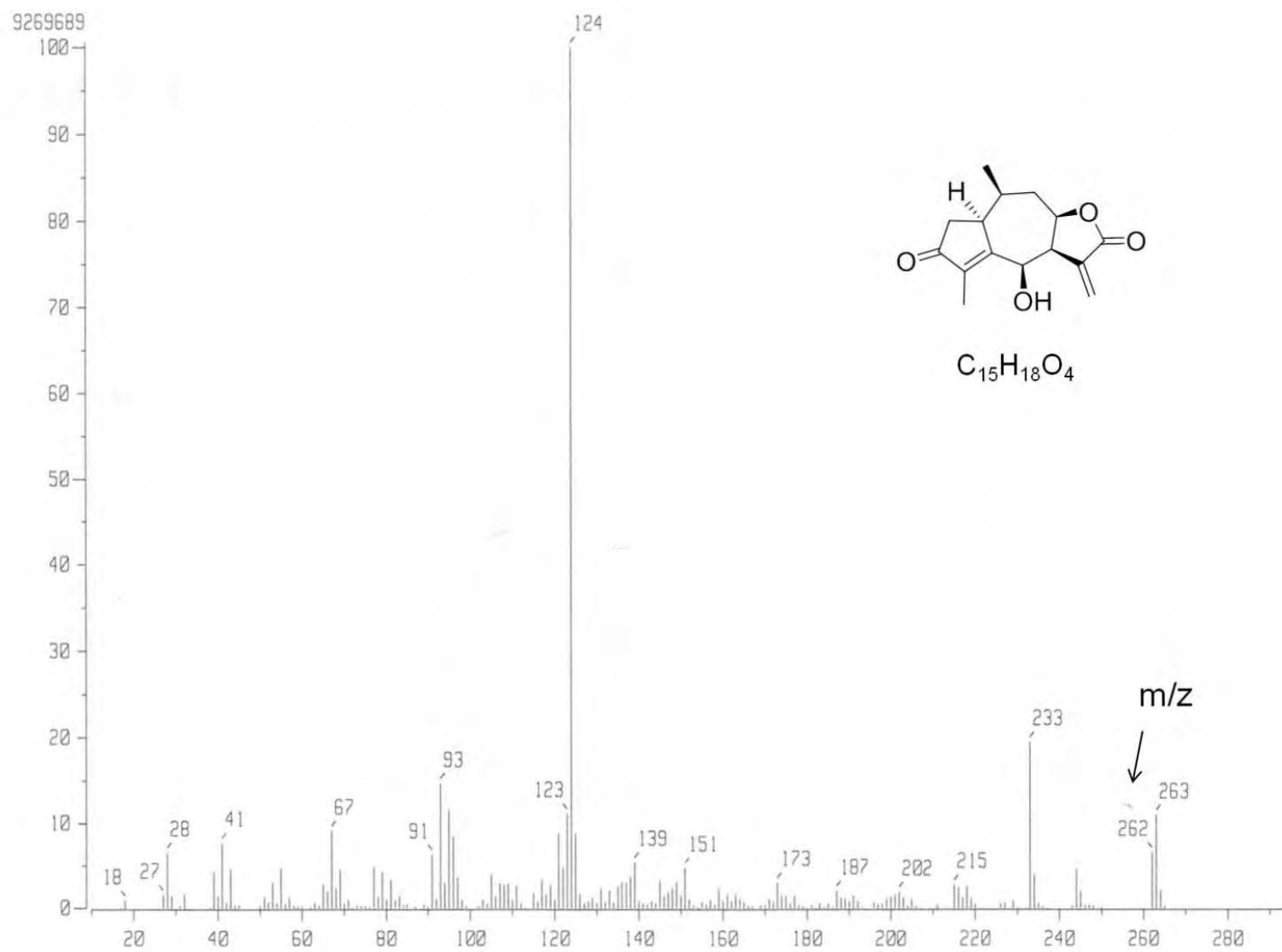
- [81] (a).Torres, Y.A. “Extracción, Aislamiento y Determinación de la Estructura Molecular de los Productos Naturales de *Mikania micrantha* (fam. Compositae, sin: Asteraceae). Tesis de Pregrado. Universidad Central del Ecuador. **2010**. (b). Elejalde C., N. R. Aislamiento, Determinación de la Estructura Molecular y Bioevaluación Preliminar de los Metabolitos Secundarios Presentes en *Mikania micrantha* ubicada en el Departamento del Quindío-Colombia. Tesis de Pregrado. Universidad del Quindío-Colombia. **2013**.
- [82] Oberti, J.C.; Sosa, V. Crystal Structure and Stereochemistry of Achalensolide, a new Guaianolide from *Stevia achalensis*. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4038-4043.
- [83] Castro, V.; Ciccio, J.F.; Alvarado, S.; Bohlmann, G.; Schmeda-Hirschmann, G.; Jakupovic J. Decathieleanolid, ein dimeres Guajanolid aus *Decachaeta thieleana* Liebig. *Ann. Chem.* **1983**, 974-981.
- [84] Ahmad, V.U; Rahman, A.U. *Handbook of Natural products Data, Pentacyclic Triterpenoids*. Vol. 2. Elsevier: New York, **1994**.
- [85] Burns, D.; Reynolds, W.F.; Buchanan, G.; Reese, P.B.; Enriquez, R.G. Assignment of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 488-493.
- [86] Kamboj, A.; Saluja, A.K. Isolation of Stigmasterol and  $\beta$ -Sitosterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae). *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2011**, *3*, 94-96.
- [87] Stöcklin, W.; Wadell, T.G.; Geissman, T.A. Circular dichroism and optical rotatory dispersion of sesquiterpene lactones. *Tetrahedron* **1970**, *26*, 2397-2409.
- [88] Khatun, M.; Billah, M.; Quader, A. Steroles and Sterol Glucoside from *Phyllanthus* Species. *Dhaka Univ. J. Sci.* **2012**, *60*, 5-10.
- [89] Siedle, B.; García, A.; Murillo, R.; Schulte-Monting, J.; Castro, V.; Rungeler, P.; Klaas, C.; Da Costa, B.; Kisiel, W.; Merfort I. Quantitative Structure-Activity Relationship of Sesquiterpene Lactones as Inhibitors of the Transcription Factor NF- $\kappa$ B. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6042-6054.
- [90] Klaas, C. “Phytochemische und pharmakologisch-biologische Untersuchungen von *Mikania Cordifolia*”. Universität Freiburg im Breisgau. Tesis doctoral, **2001**.
- [91] Samek, Z.; Holub, M.; Drozd, B.; Grabarczyk, H.; Hladon, B. Xerantholide- a new cytotoxically active sesquiterpenic lactone from *Xeranthemum cylindraceum*. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1977**, *42*, 2441-2447.
- [92] Miski, M.; De Luengo, H.; Mabry T. Guaiane Sesquiterpenes from *Decachaeta Scabrella*.

*Phytochemistry* **1987**, *26*, 199-200.

- [93] Delgado, G.; Guzmán, S.; Toscano, R.A. Studies on the chemical reactivity of *cis*-1(10)-*trans*-4-germacradienolides (Melampolides). Additional derivatives of schkuhriolide. *An. Esc. Nac. Cienc. Biol.* **1994**, *39*, 109-118.
- [94] Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757-766.
- [95] Carlson, R.P.; O'Neill-Davis, L.; Chang, J.; Lewis, A. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Agents and Actions* **1985**, *17*, 197-204.
- [96] Sheldrick, G.M. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr. Sect. C.* **2008**, *64*, 112-122.
- [97] Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H.P.; Izmaylov, A.F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J.L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, T.; Vreven, J.A.; Montgomery, Jr., Peralta, J.E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J.J.; Brothers, E.; Kudin, K.N.; Staroverov, V.N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J.C.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J.M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J.B.; Bakken V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.E.; Yazyev, O.; Austin, A.J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.W.; Martin, R.L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V.G.; Voth G.A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Dapprich, S.; Daniels, A.D.; Farkas, O.; Foresman, J.B.; Ortiz, J.V.; Cioslowski, J.; Fox, D.J. *Gaussian 09* (Revision A.02), **2009**, Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- [98] Bravo-Monzón, A.E; Ríos-V., E.; Delgado, G.; Espinosa-G., F.J. Chemical diversity among populations of *Mikania micrantha*: geographic mosaic structure and herbivory. *Oecologia* **2014**, *174*, 195-203.

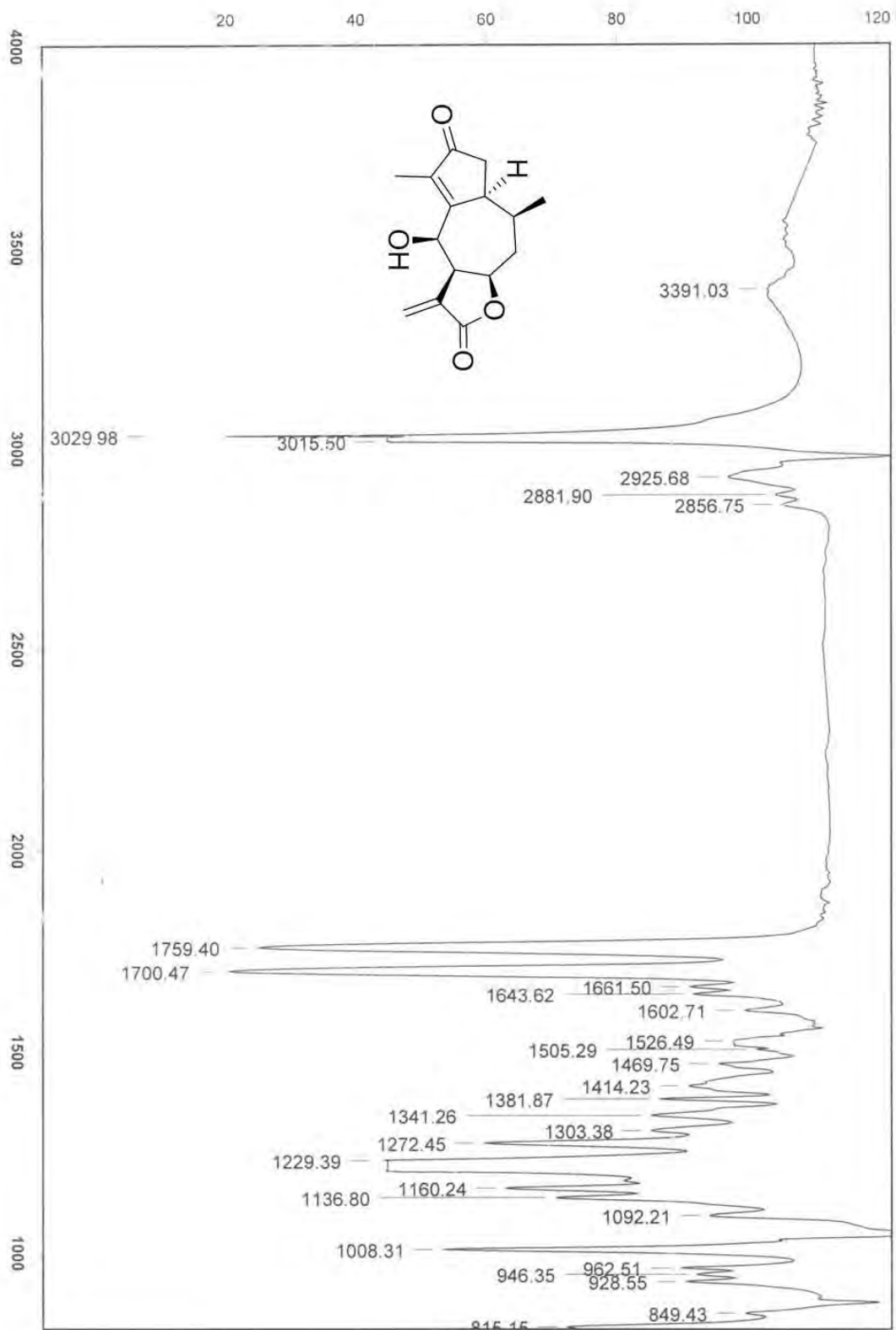
## 11. ANEXOS

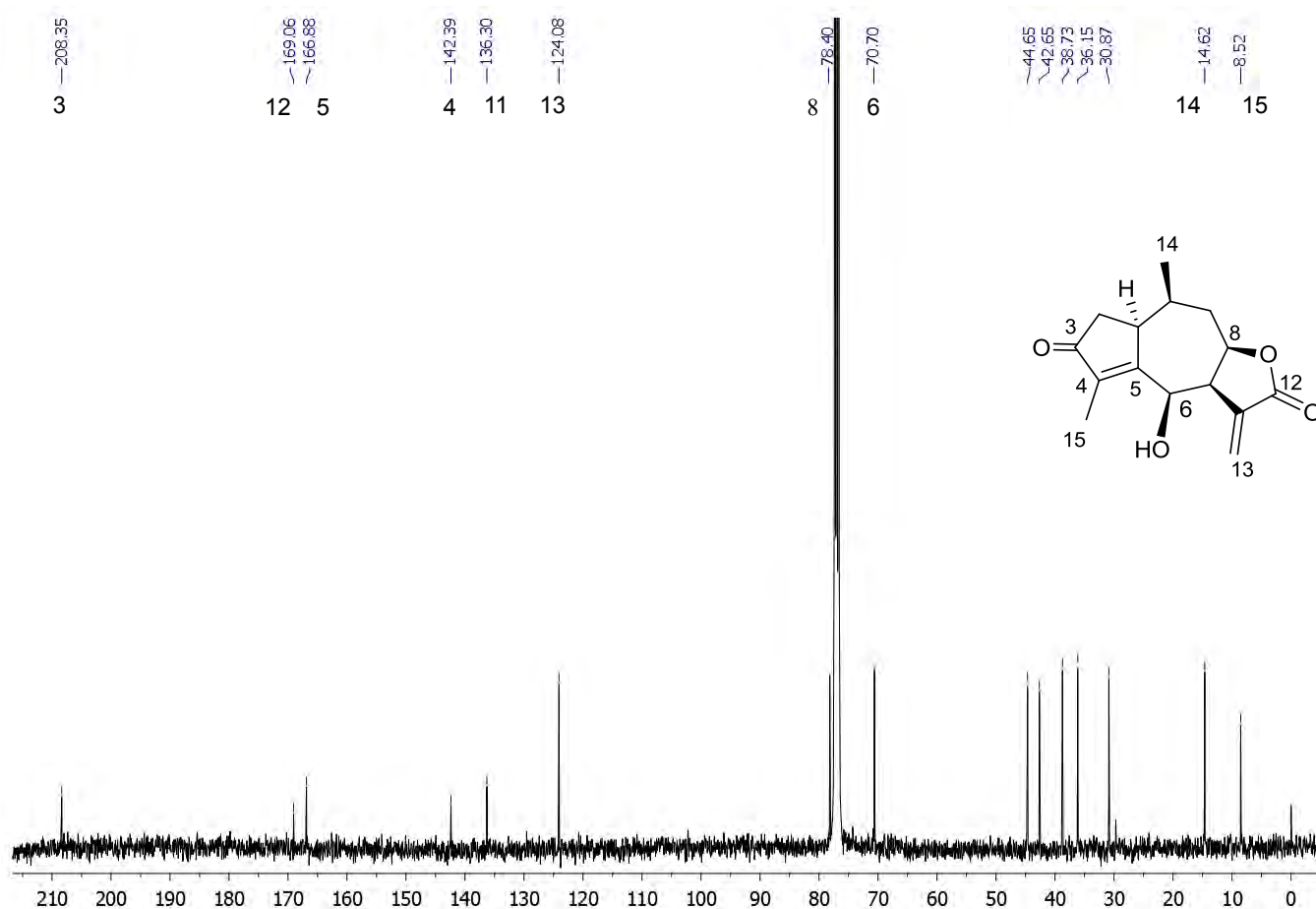
# ESPECTROS



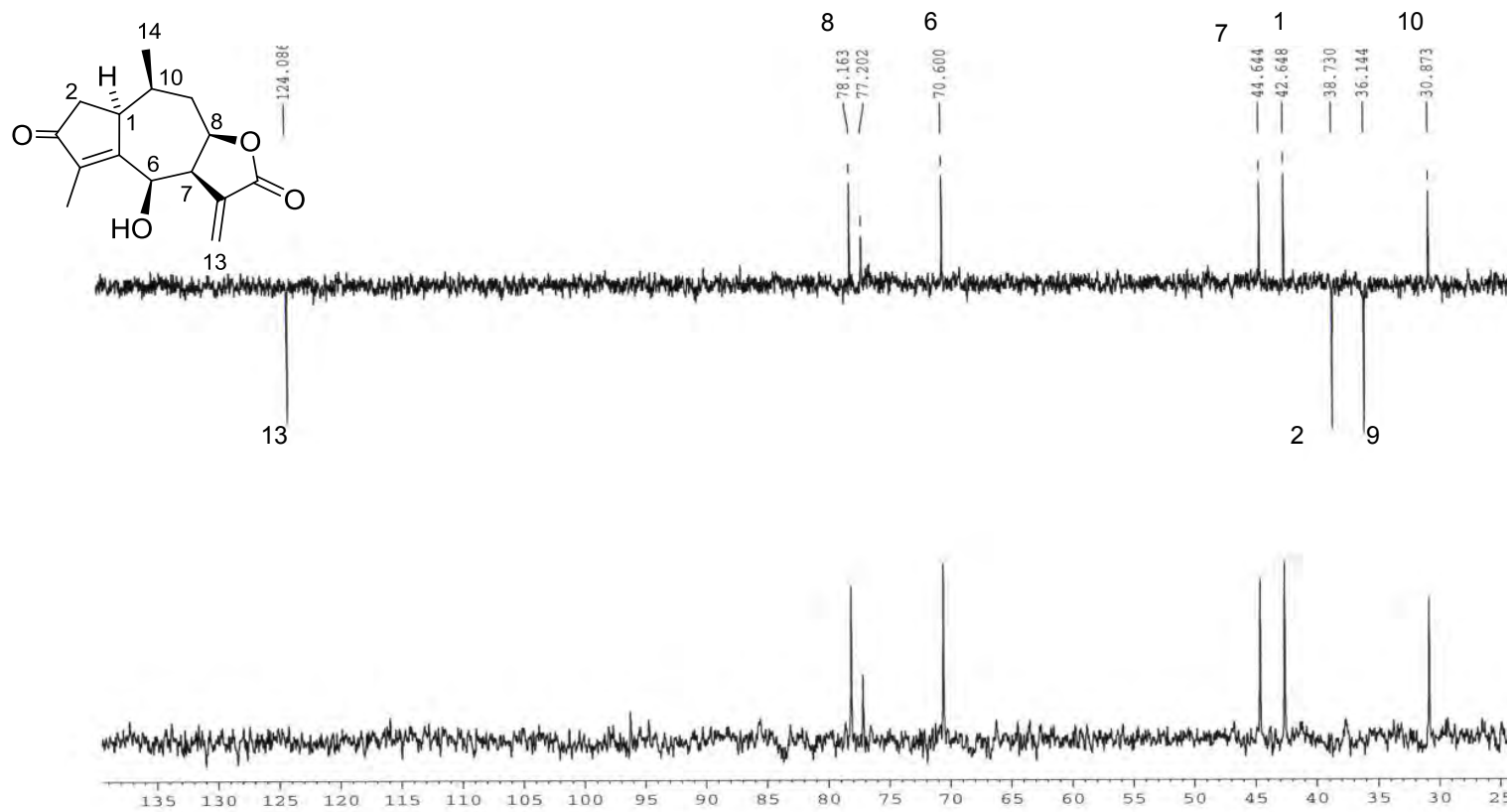
**Espectro 1.** EM-IE de 8-*epi*-mikanokriptina (**1**)

**Espectro 2. IR de 8-*epi*-mikanokriptina (1)**

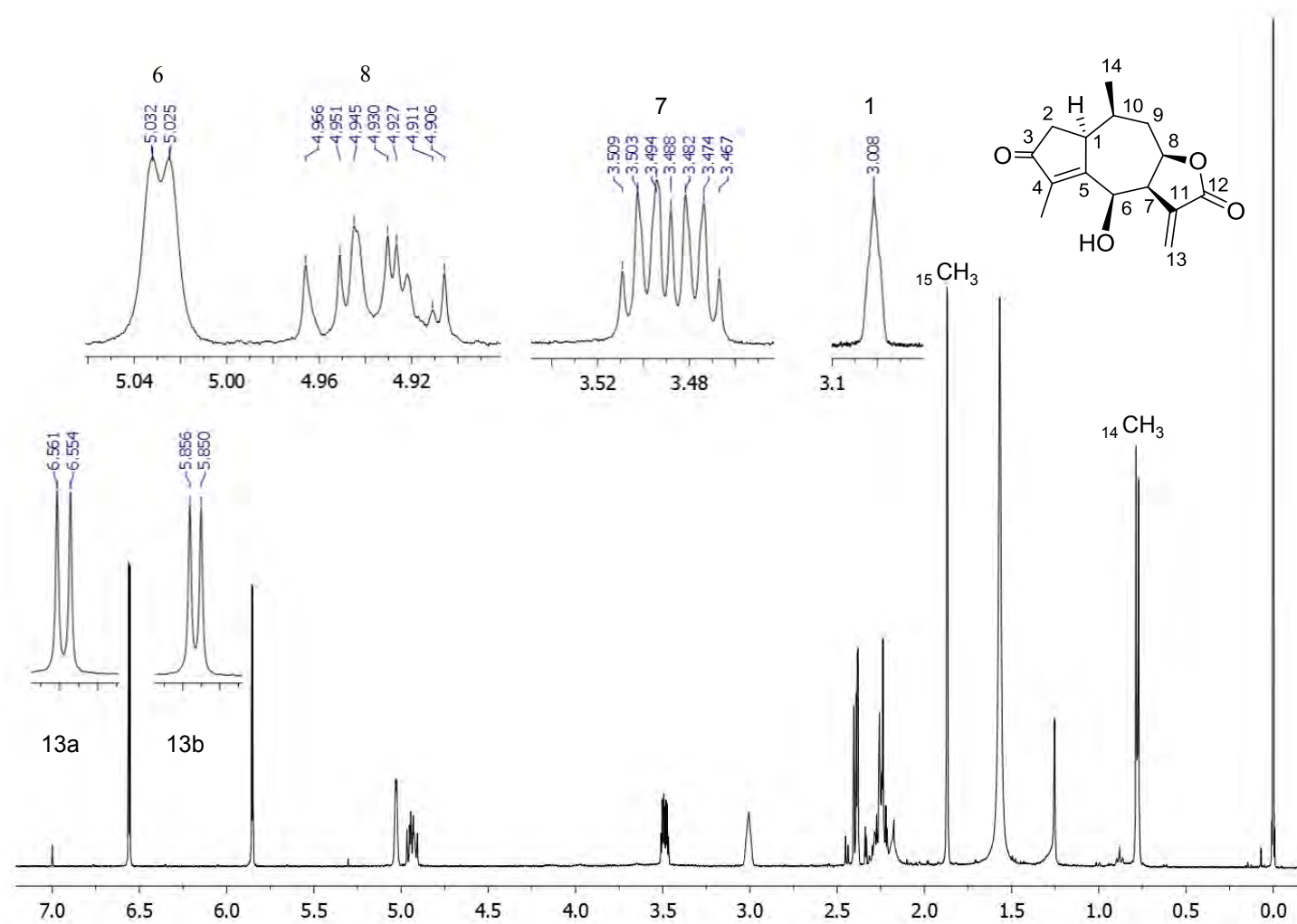




**Espectro 3.** RMN  $^{13}\text{C}$  de 8-*epi*-mikanokriptina (**1**) (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

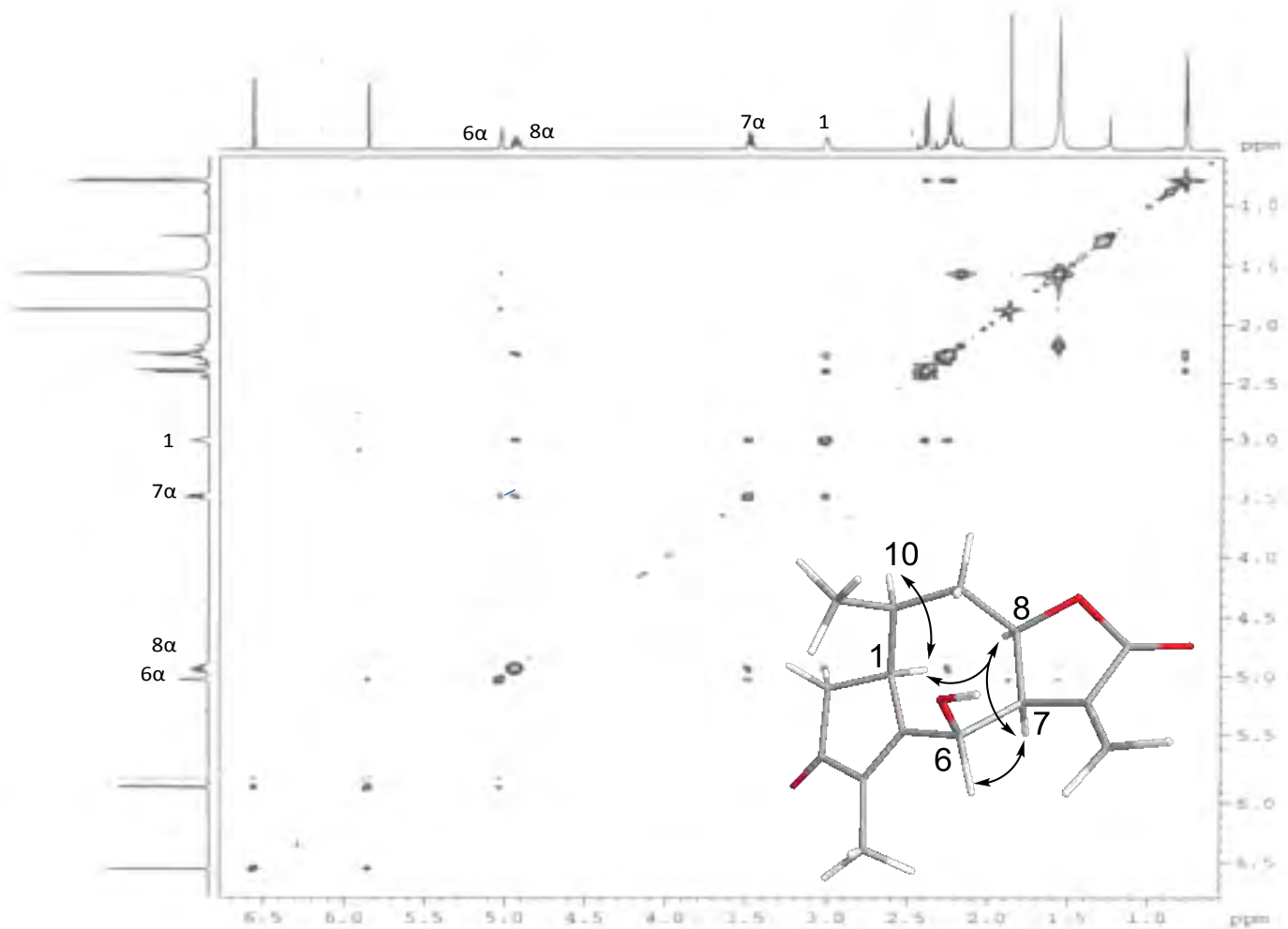


**Espectro 4.** DEPT de 8-*epi*-mikanokriptina (1) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



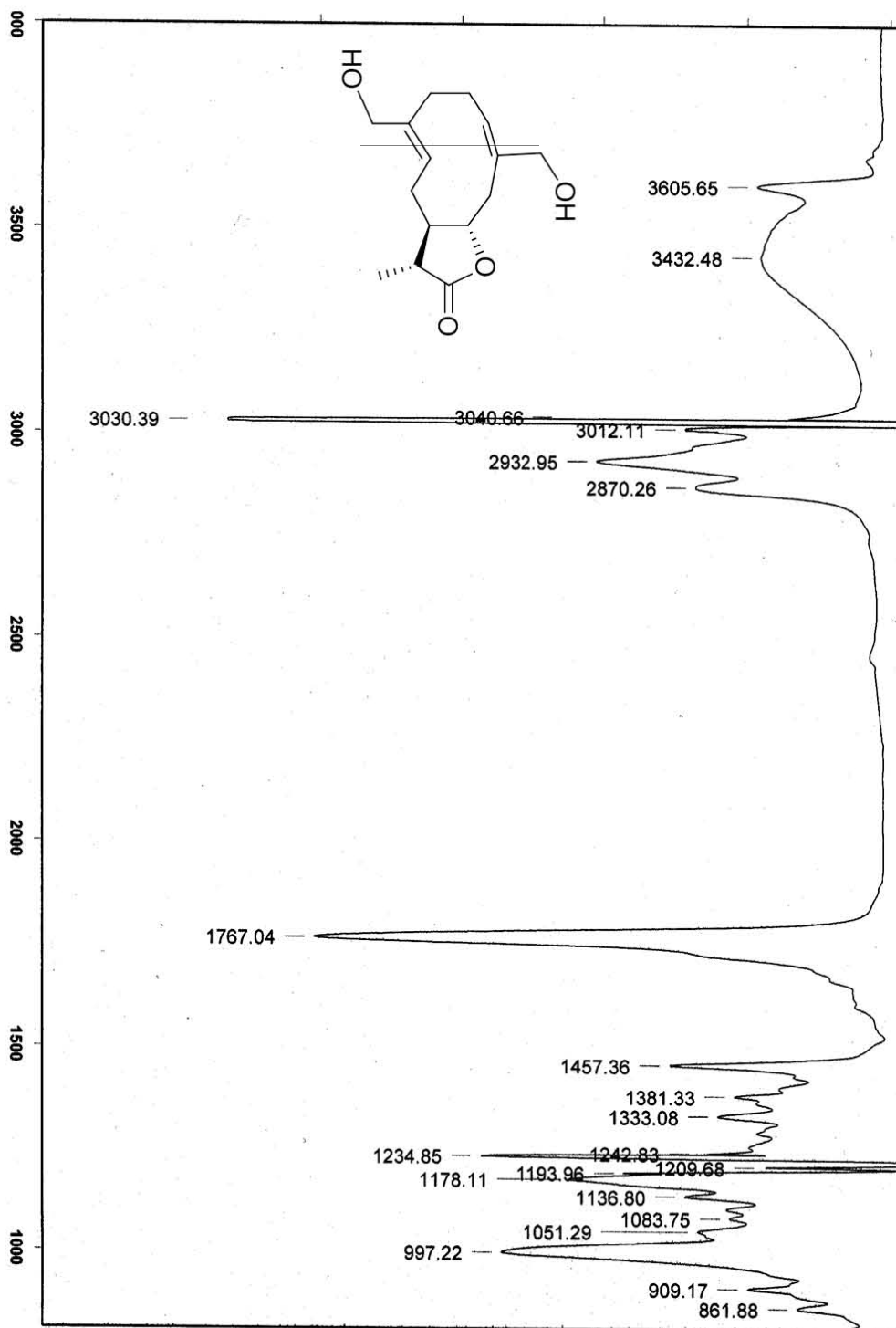
**Espectro 5.** RMN <sup>1</sup>H de 8-*epi*-mikanokiptina (**1**) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

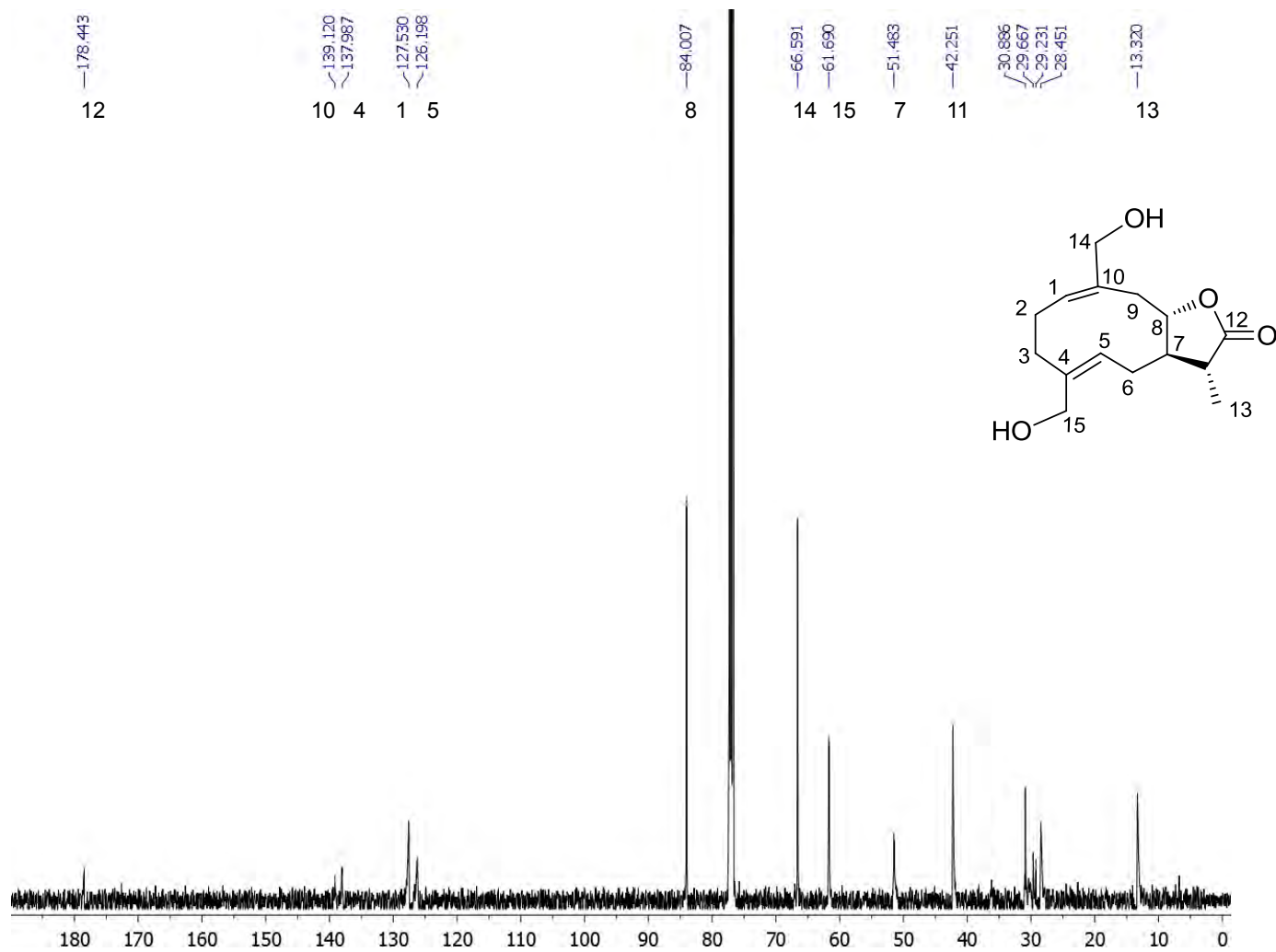




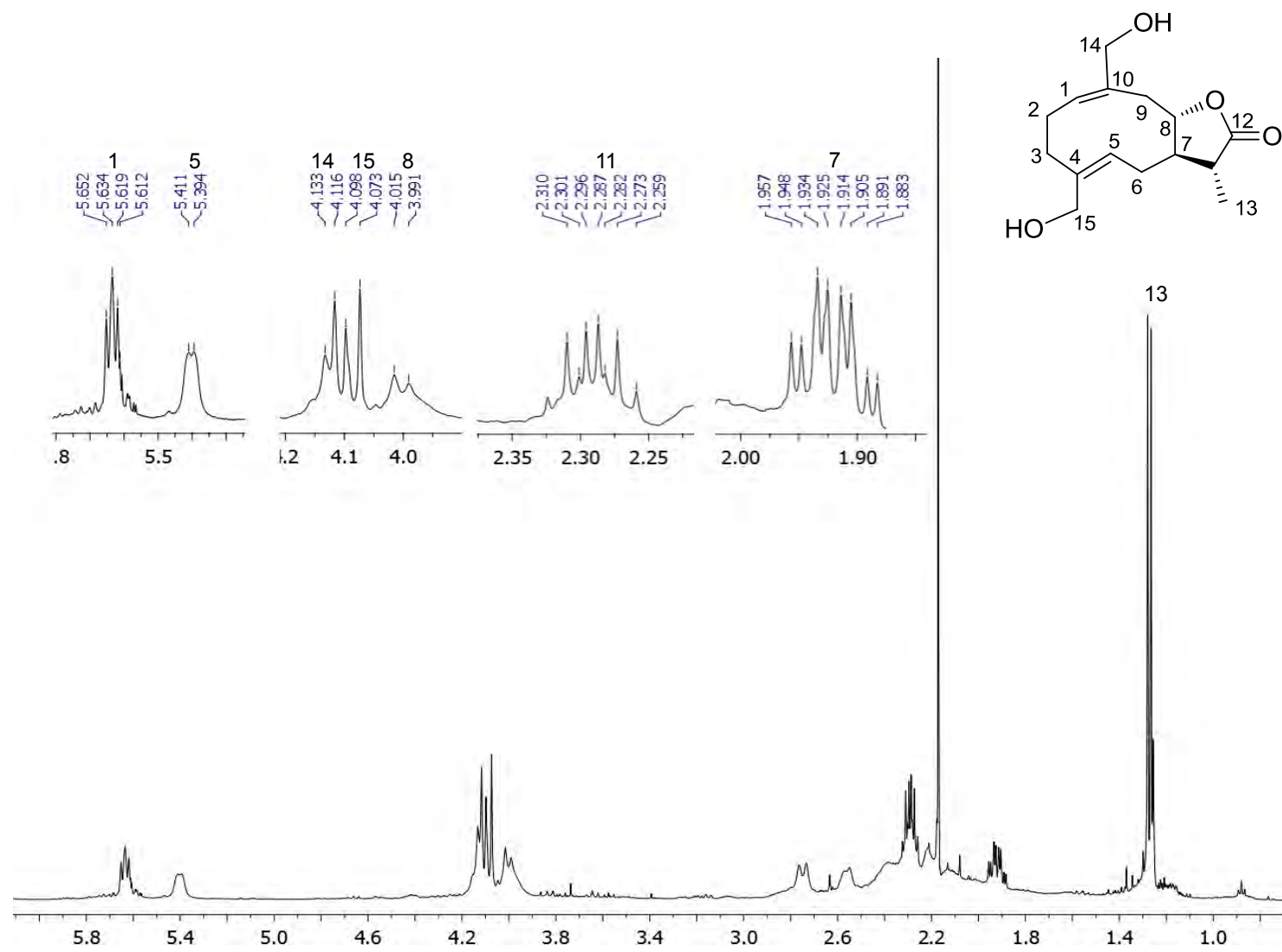
**Espectro 6.** NOESY de 8-*epi*-mikanokriptina (**1**) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**Espectro 7. IR de 11HB-11,13-dihidromicrantólida (2)**

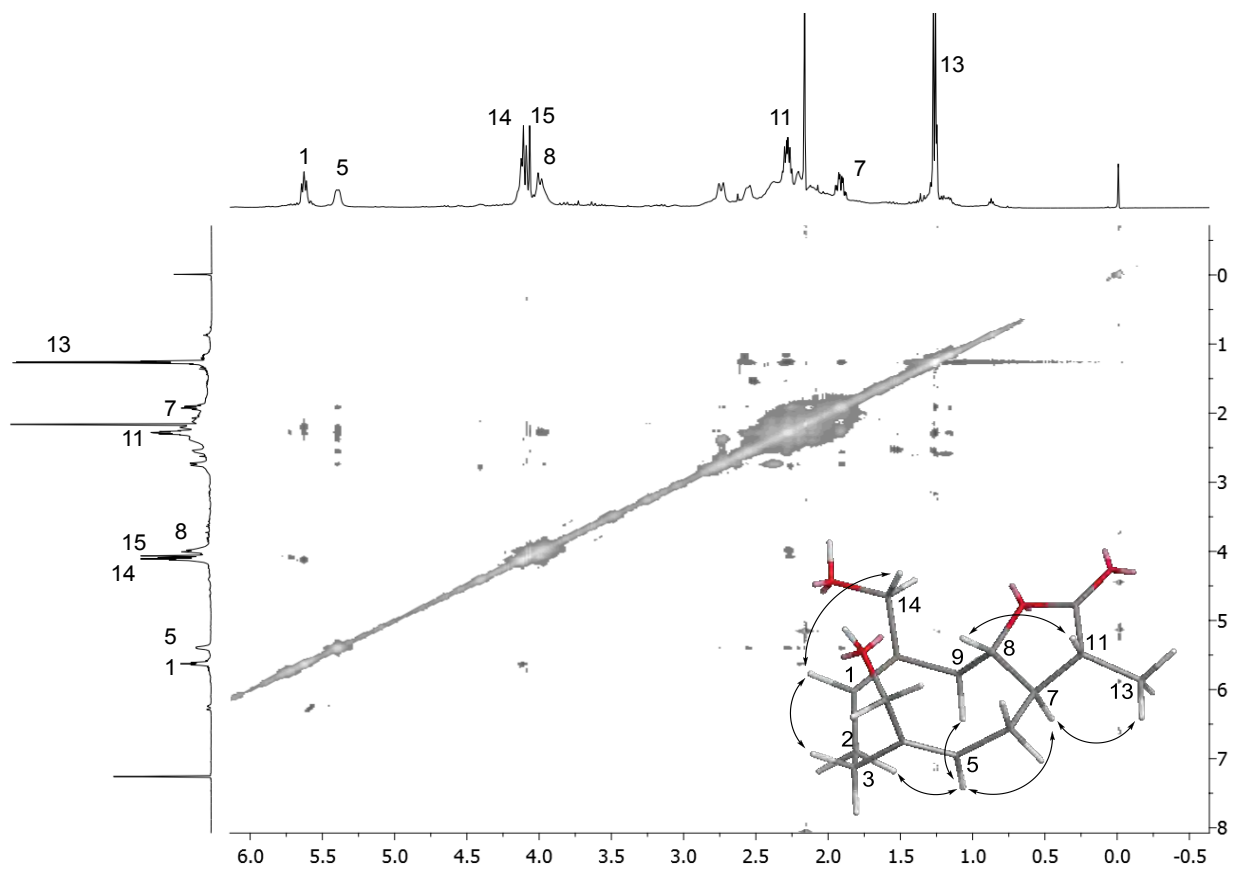




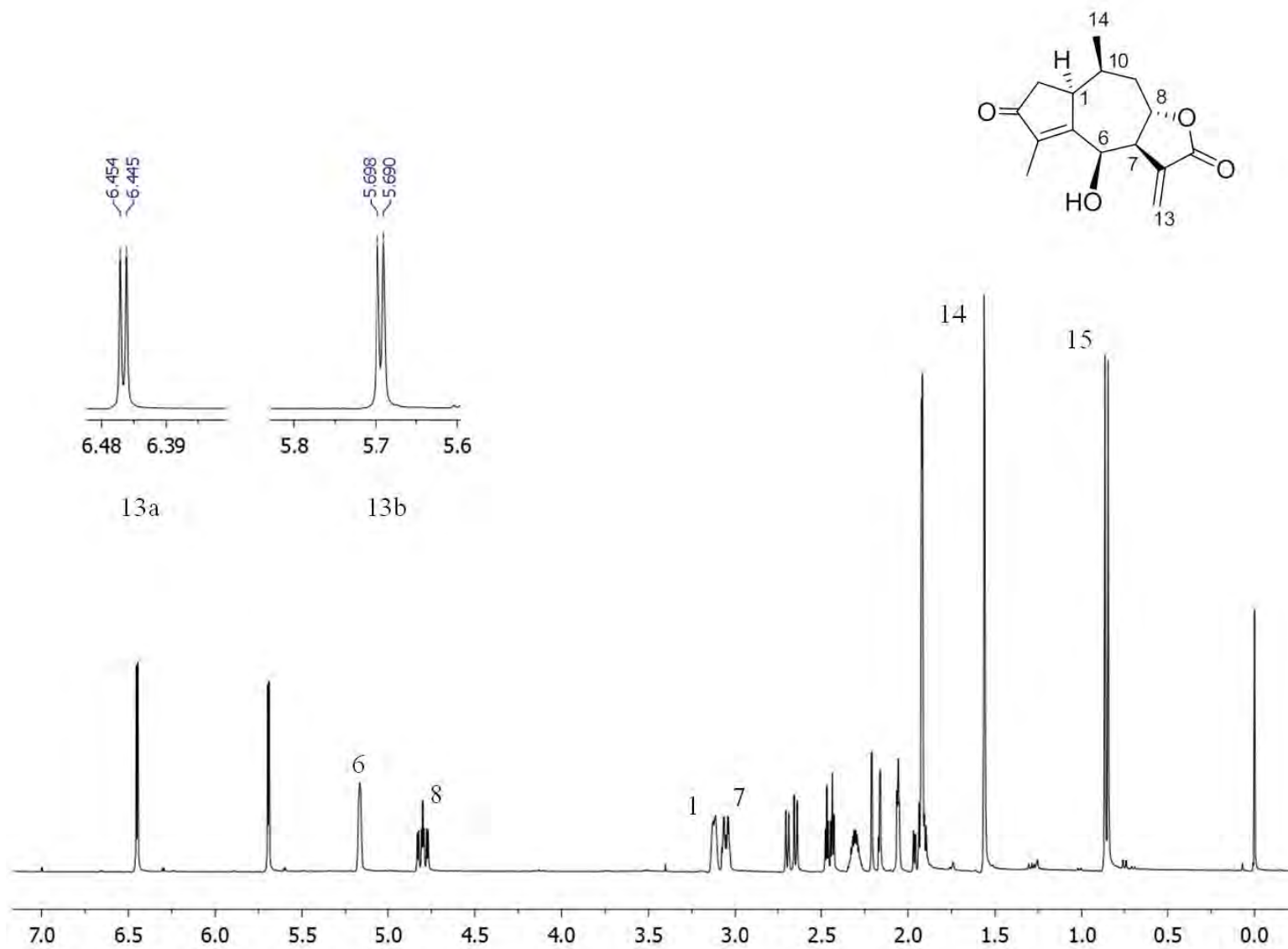
**Espectro 8.** RMN  $^{13}\text{C}$  de 11H $\beta$ -11,13-dihidromicrantólida (**2**) (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



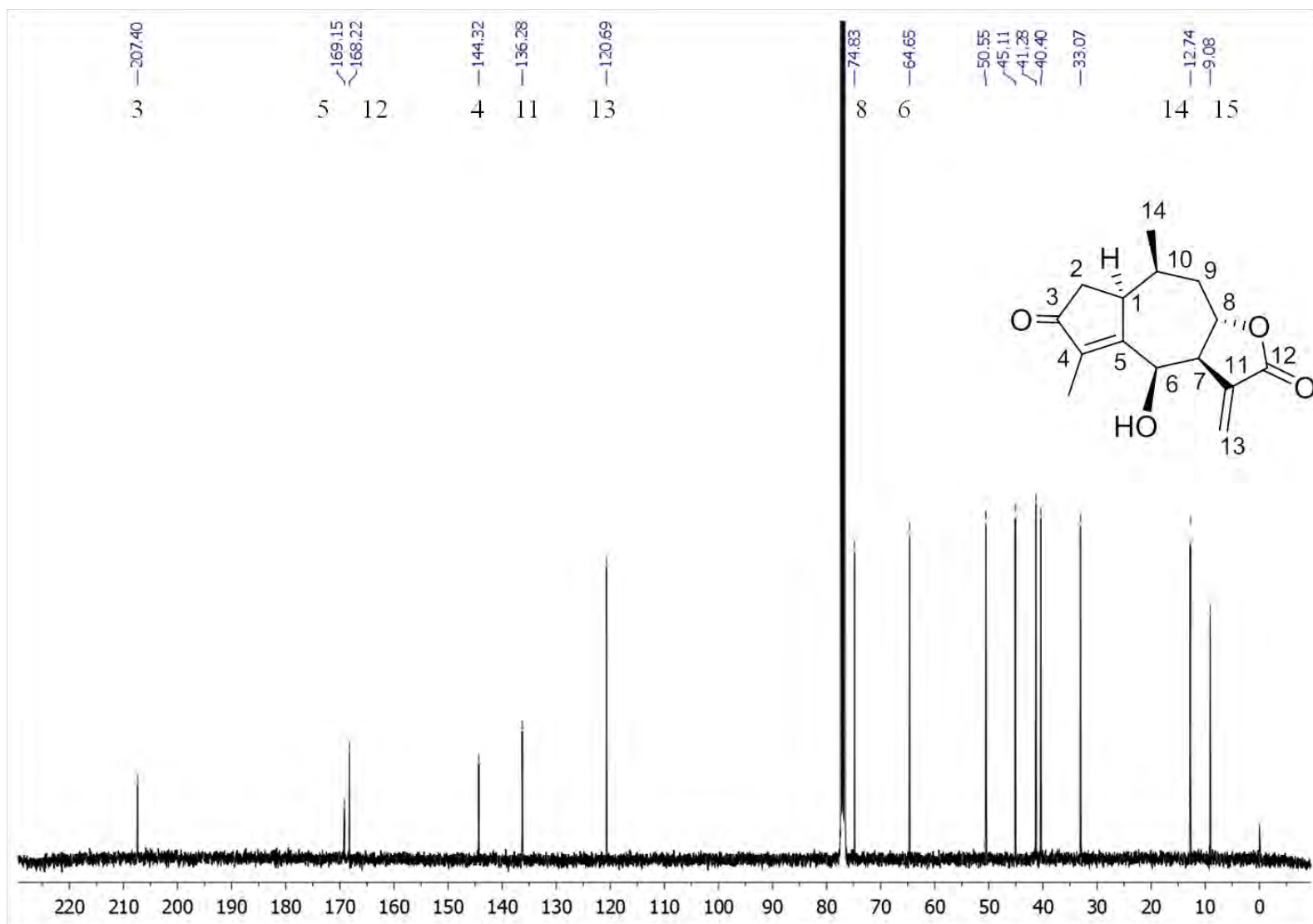
**Espectro 9.** RMN <sup>1</sup>H de 11Hβ-11,13-dihidromicrantólida (**2**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



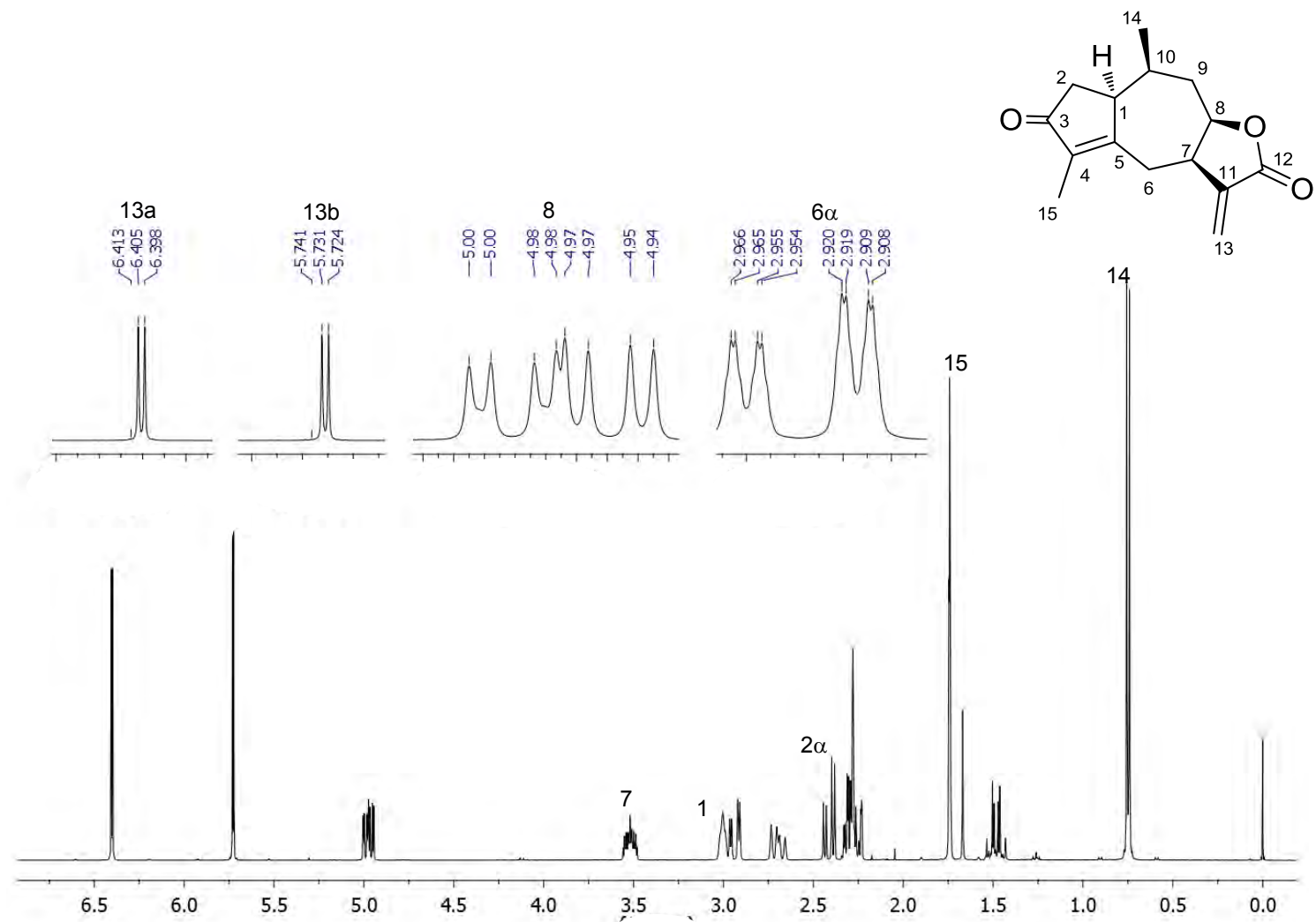
**Espectro 10.** NOESY de 11H $\beta$ -11,13-dihidromicrantólida (**2**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**Espectro 11.** RMN <sup>1</sup>H de mikanokriptina (3) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

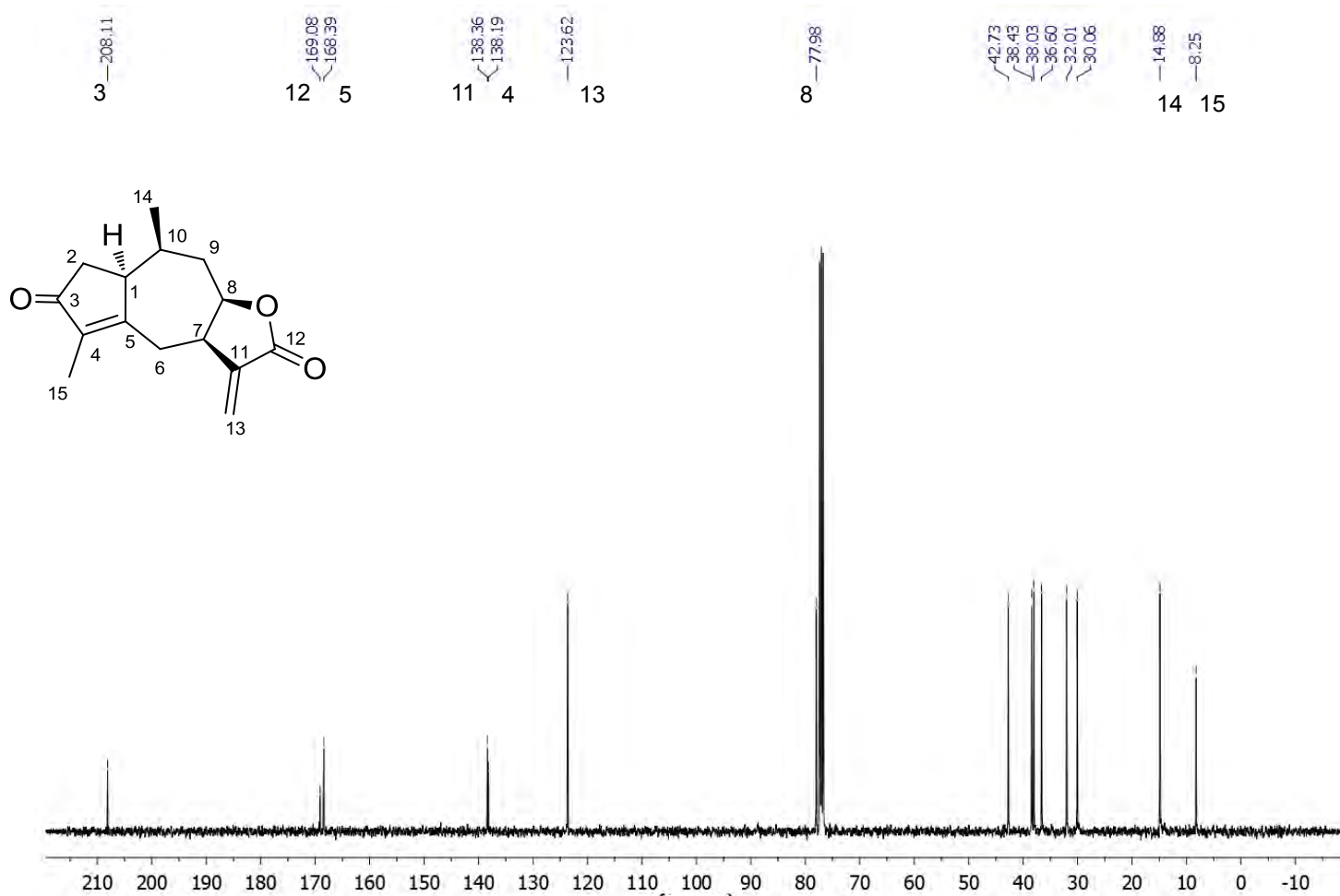


**Espectro 12.** RMN  $^{13}\text{C}$  de mikanokriptina (**3**) (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

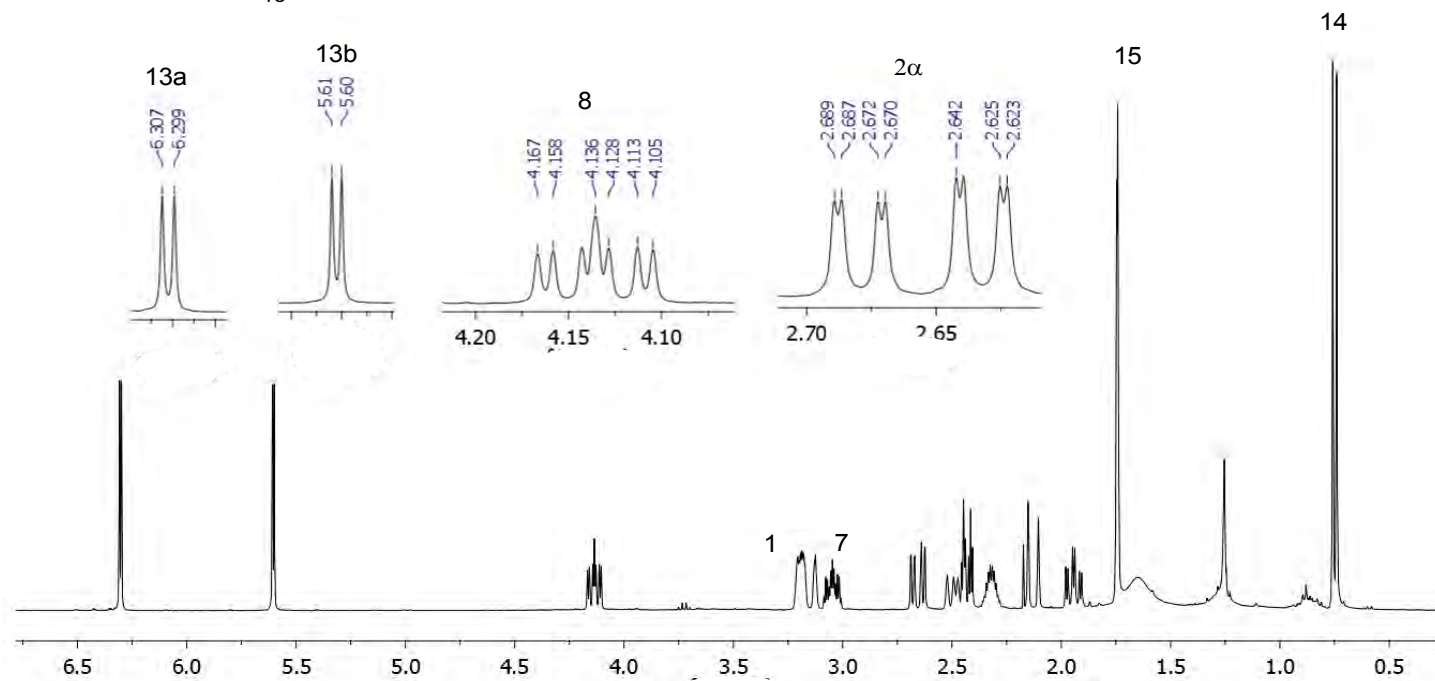
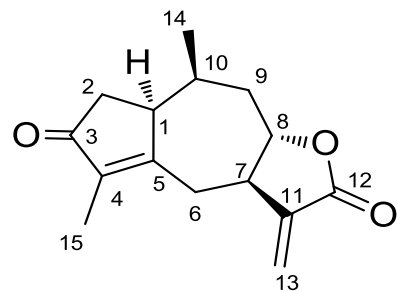


**Espectro 13.** RMN <sup>1</sup> H de achalensólida (**4**) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

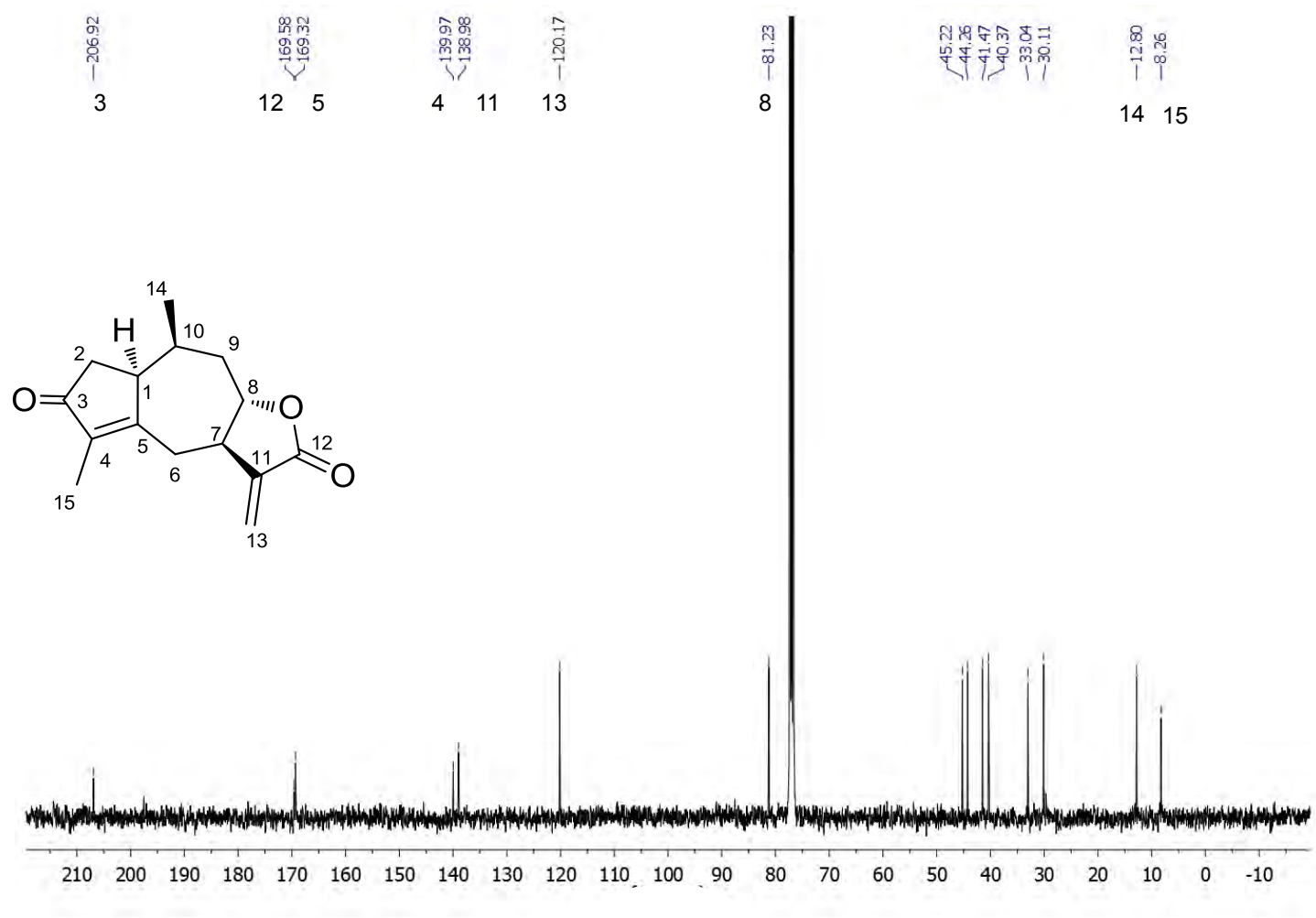




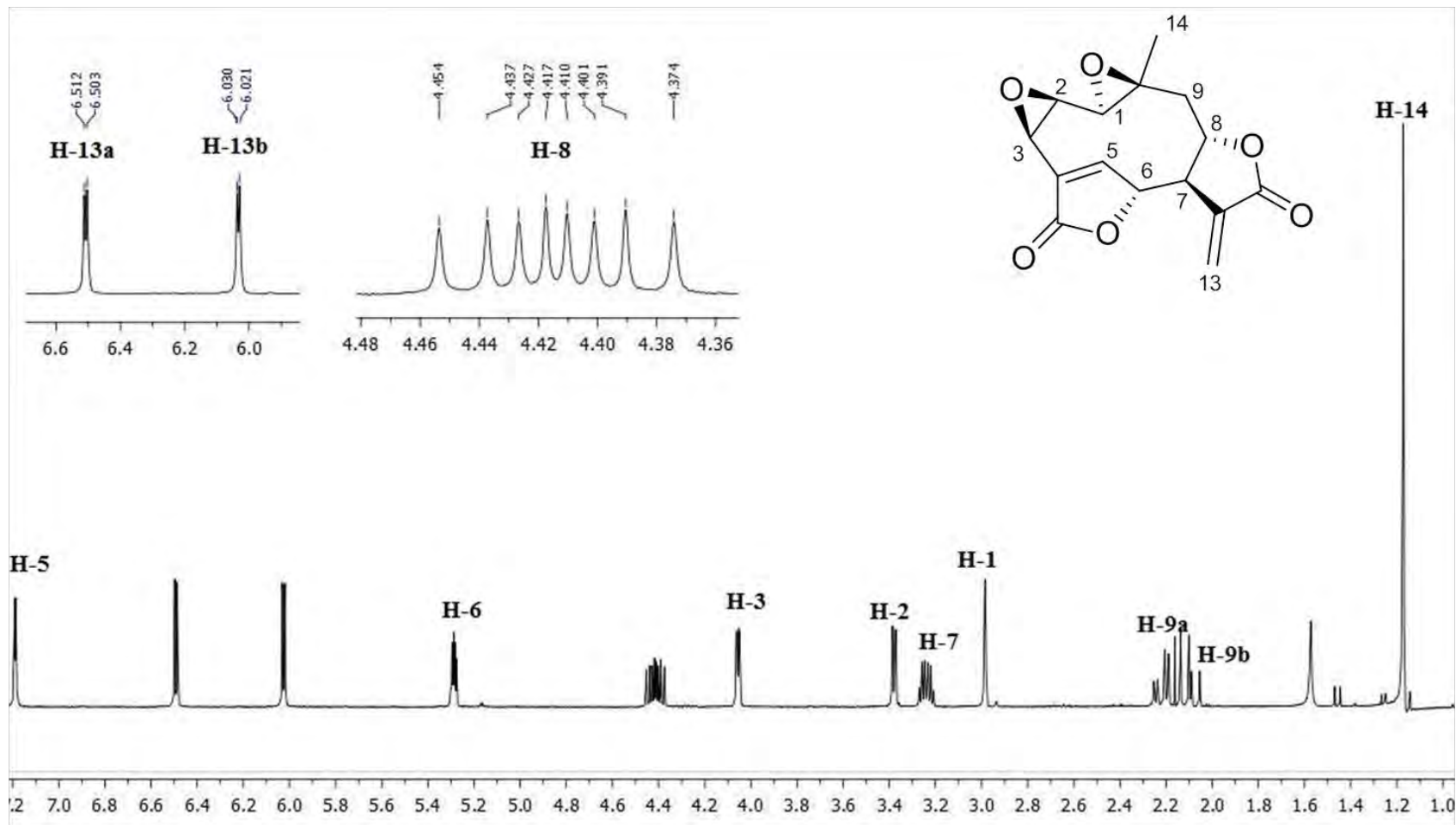
**Espectro 14.** RMN <sup>13</sup>C de achalensólida (**4**) (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



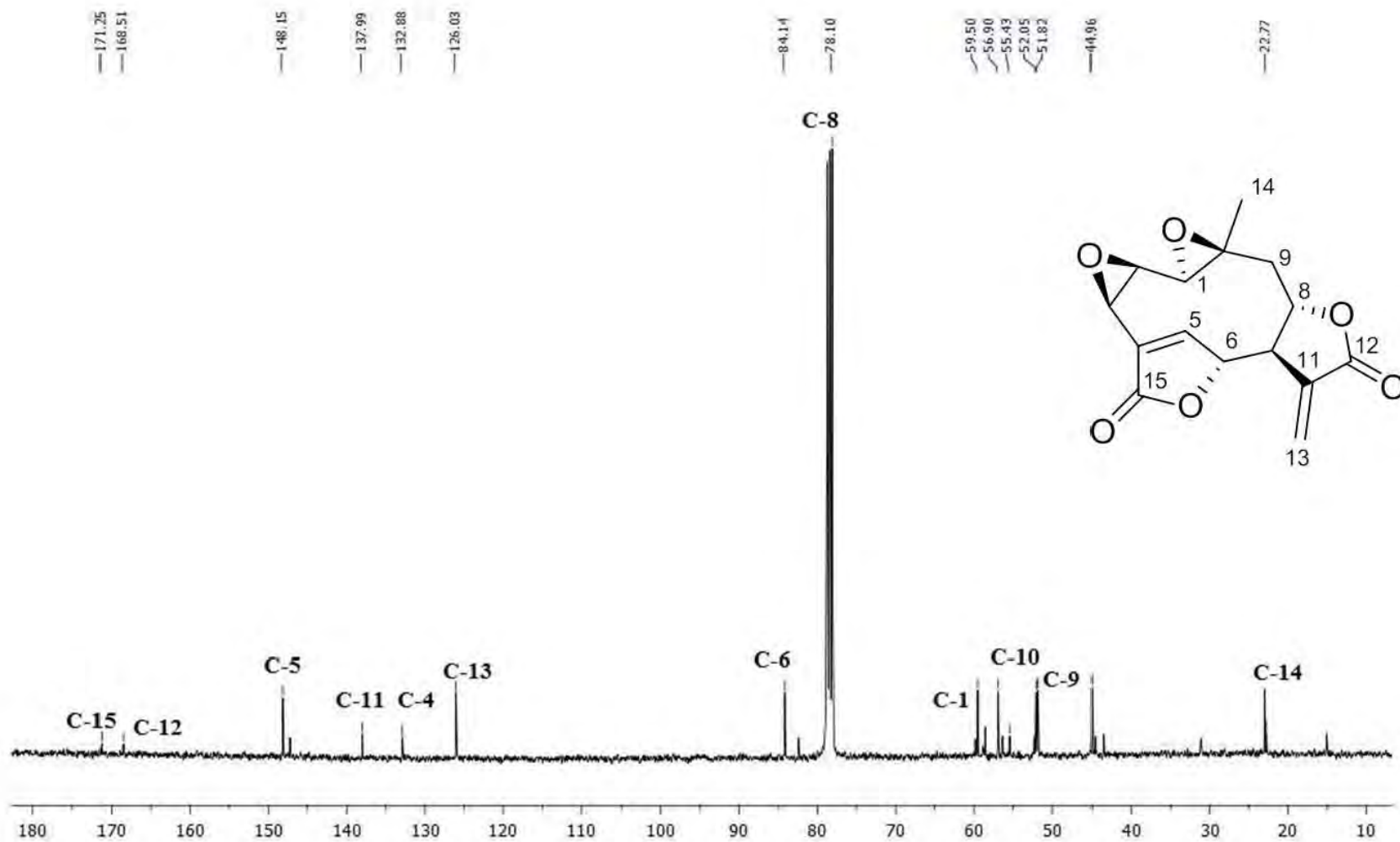
**Espectro 15.** RMN  $^1\text{H}$  de xerantólida (5) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



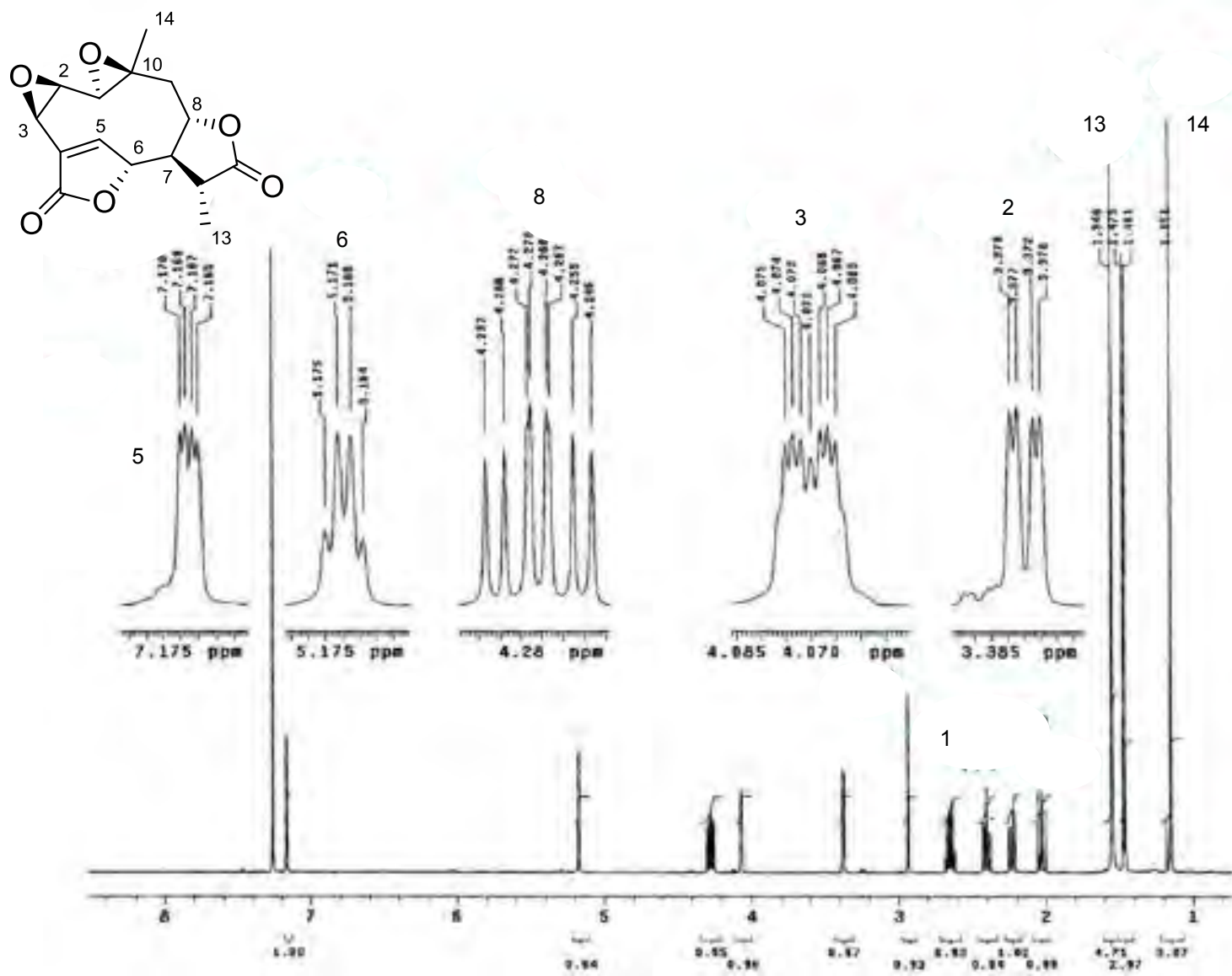
**Espectro 16.** RMN <sup>13</sup>C de xerantólida (**5**) (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



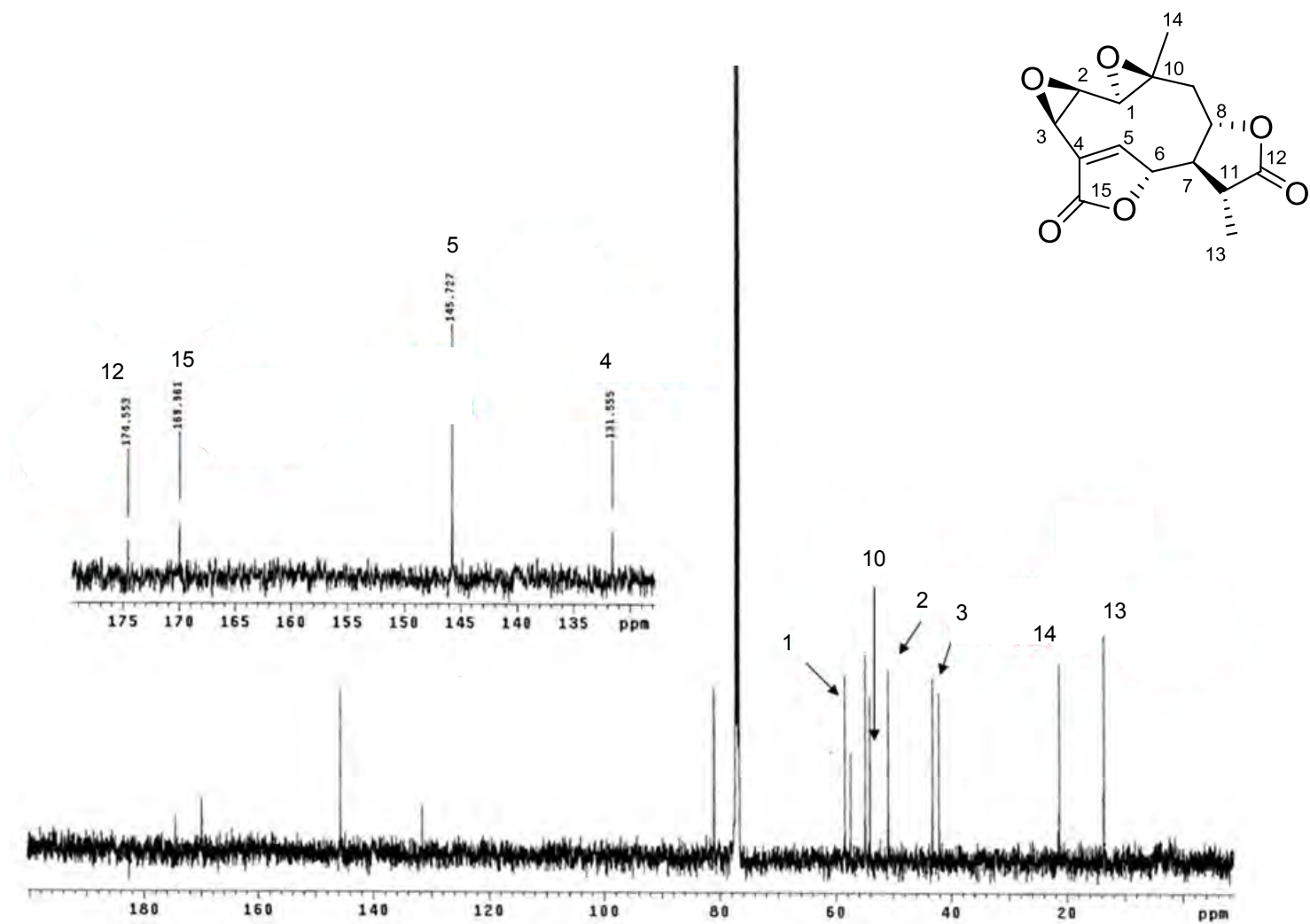
**Espectro 17.** RMN  $^1\text{H}$  de mikanólida (6) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



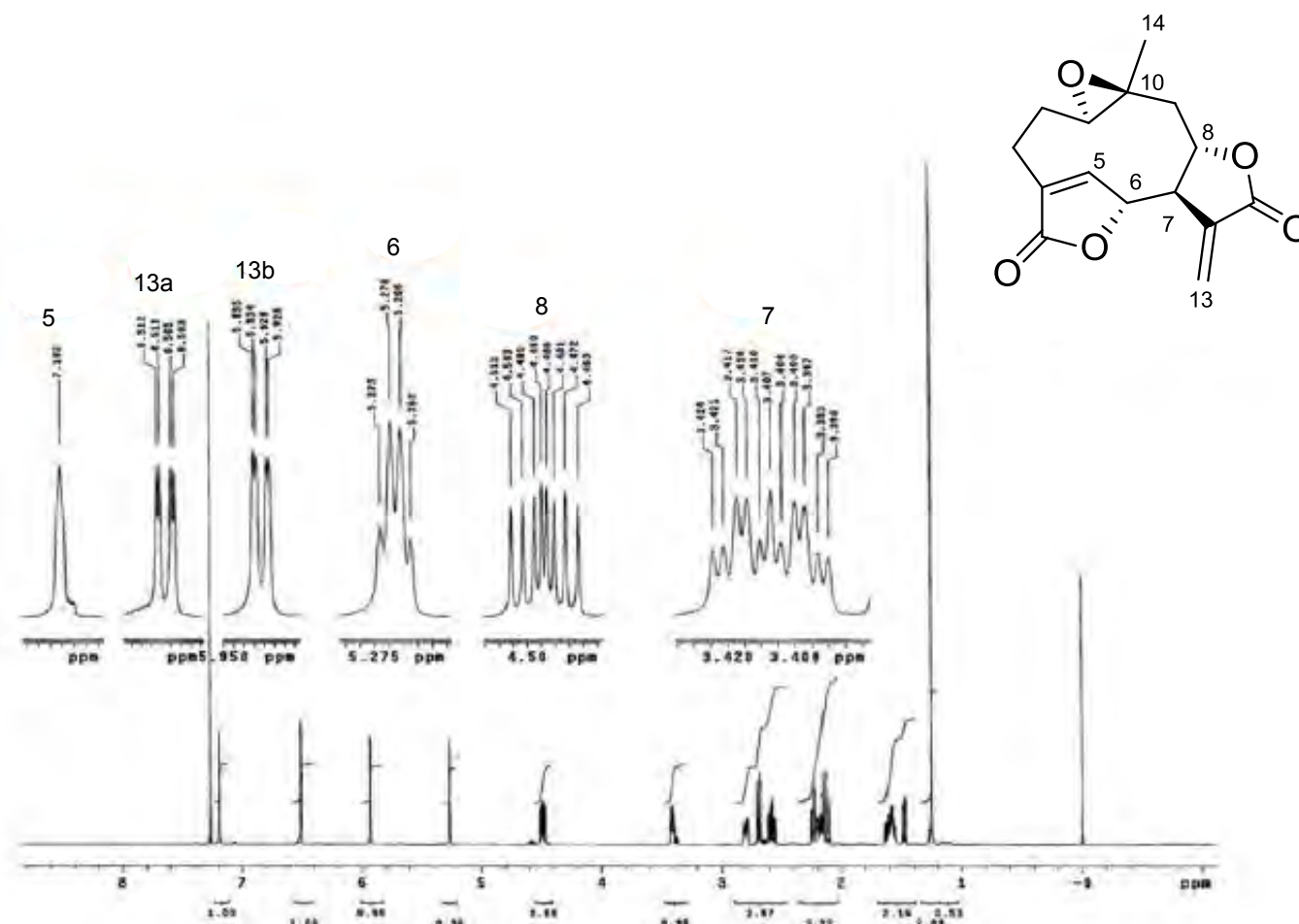
**Espectro 18.** RMN  $^{13}\text{C}$  de mikanólida (**6**) (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Espectro 19.** RMN  $^1\text{H}$  de dihidromikanólida (7) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

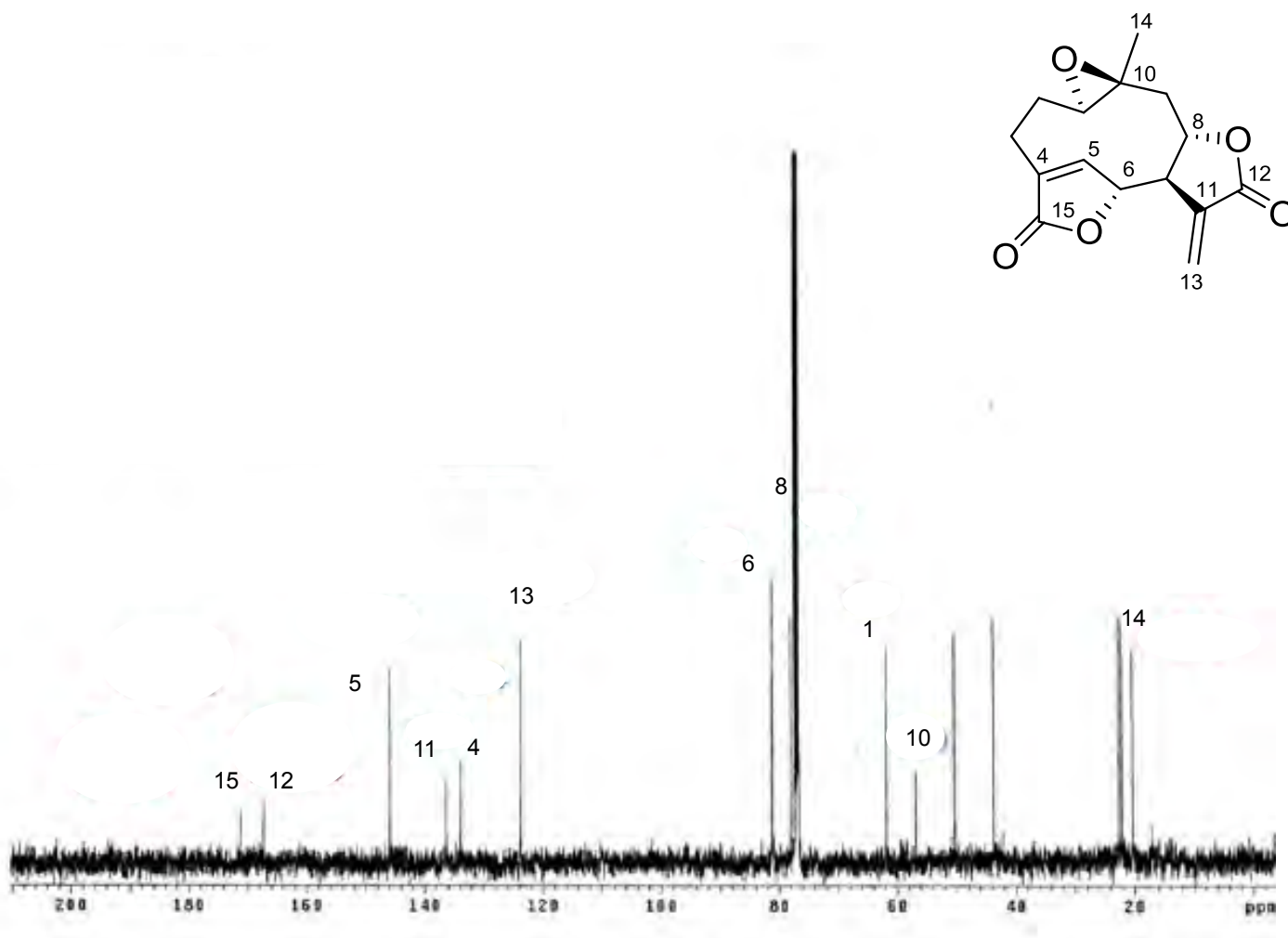


**Espectro 20.** RMN  $^{13}\text{C}$  de dihidromikanólida (**7**) (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

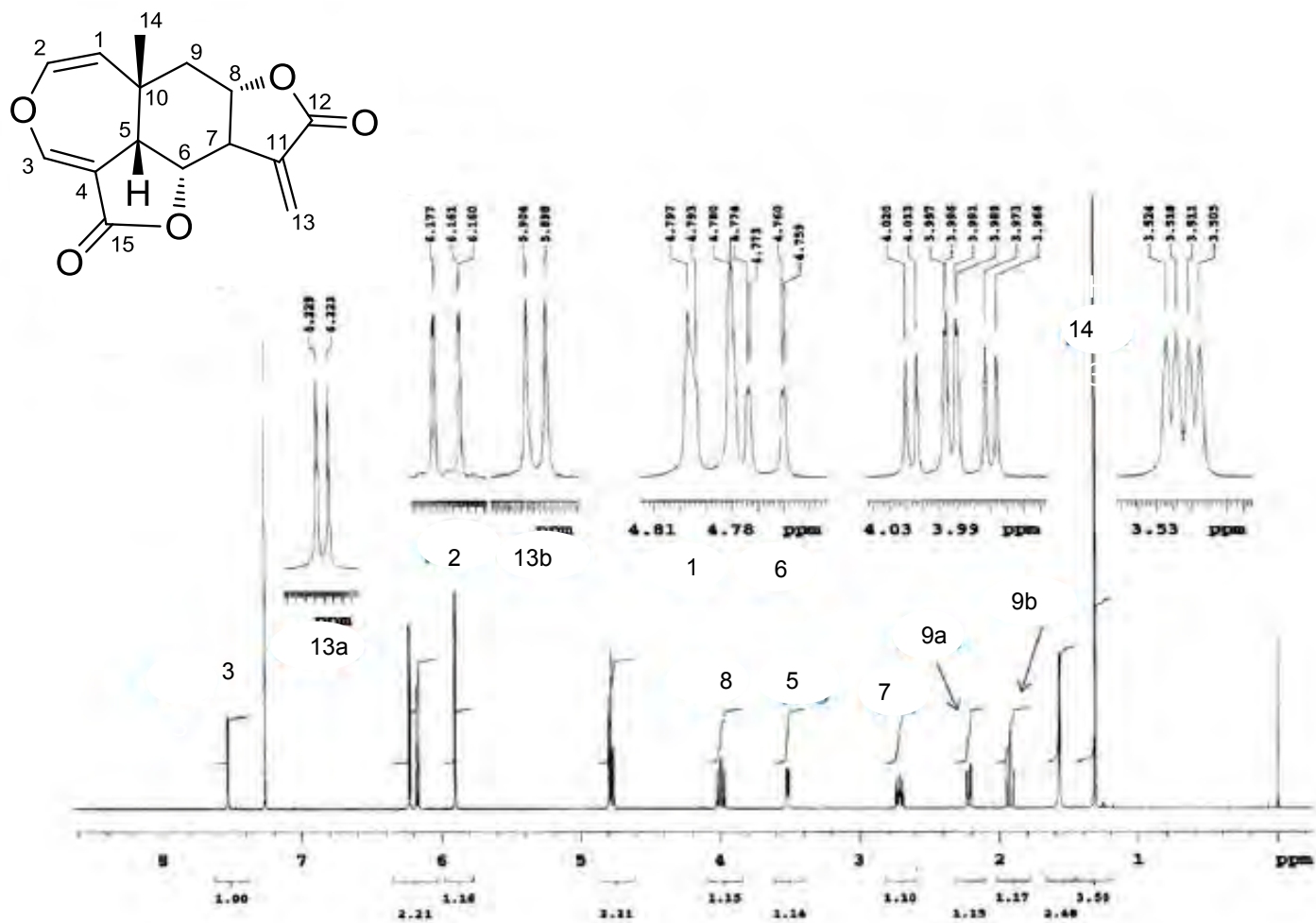


**Espectro 21.** RMN <sup>1</sup>H de desoximikanólida (**8**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

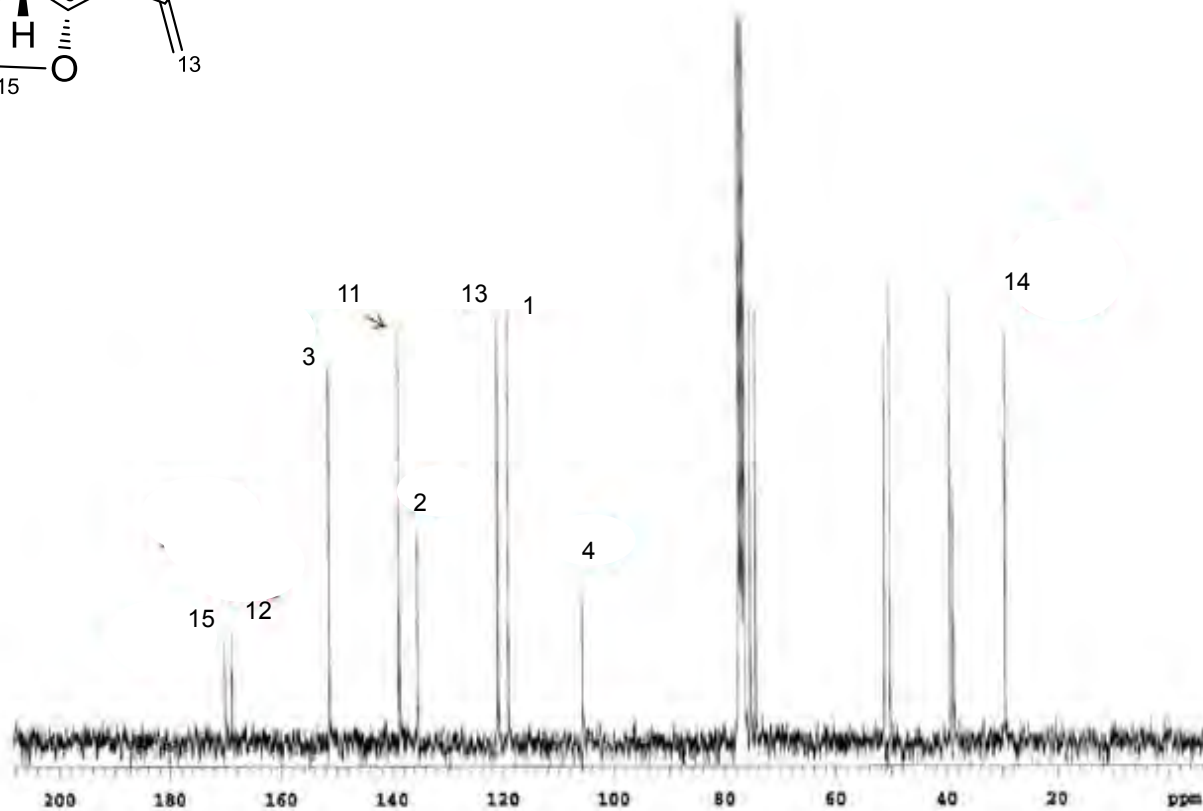
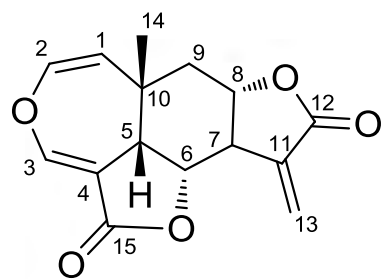




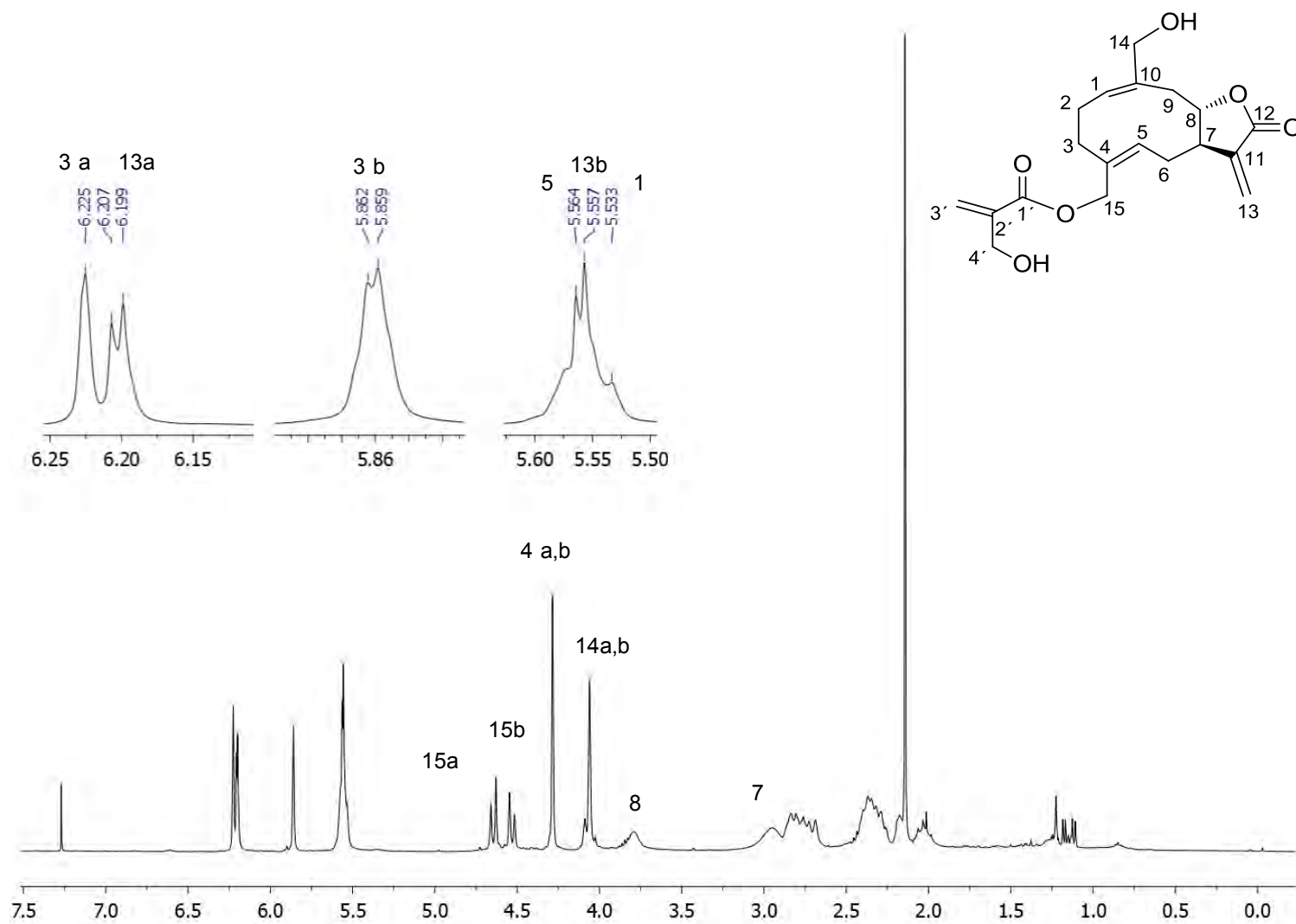
**Espectro 22.** RMN  $^{13}\text{C}$  de desoximikanólida (**8**) (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



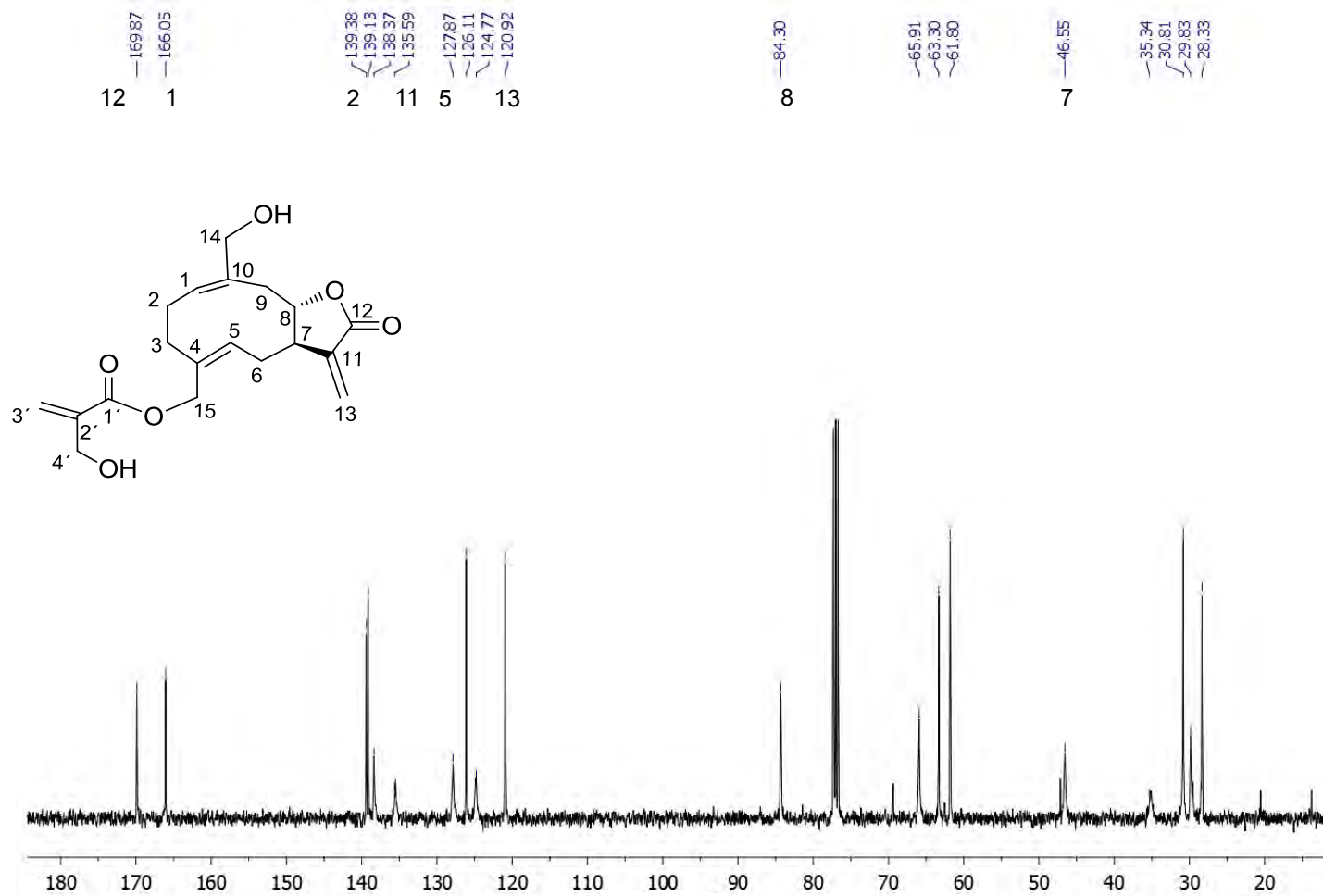
**Espectro 23.** RMN <sup>1</sup>H de miscandenina (9) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



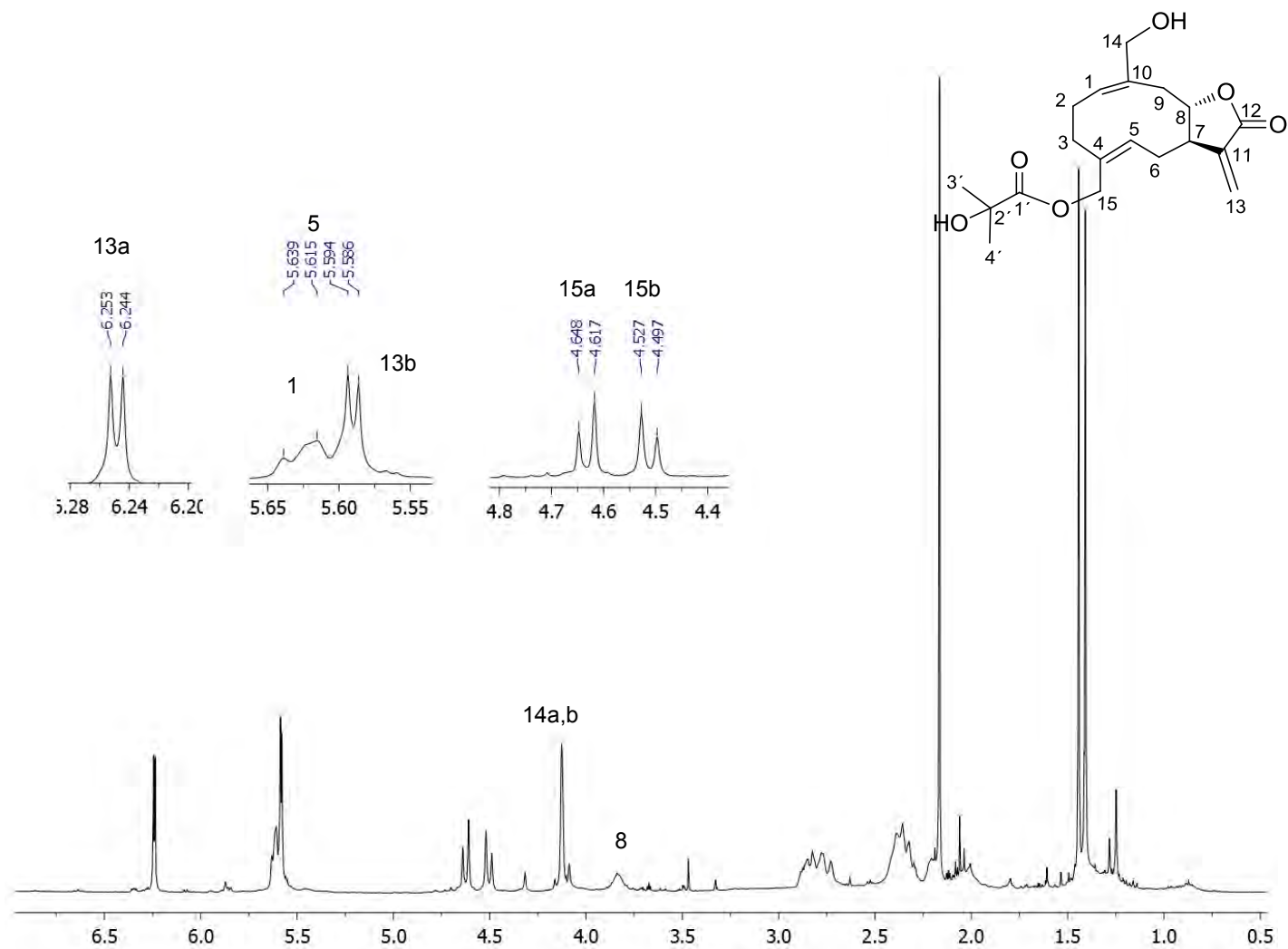
**Espectro 24.** RMN  $^{13}\text{C}$  de miscandenina (**9**) (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



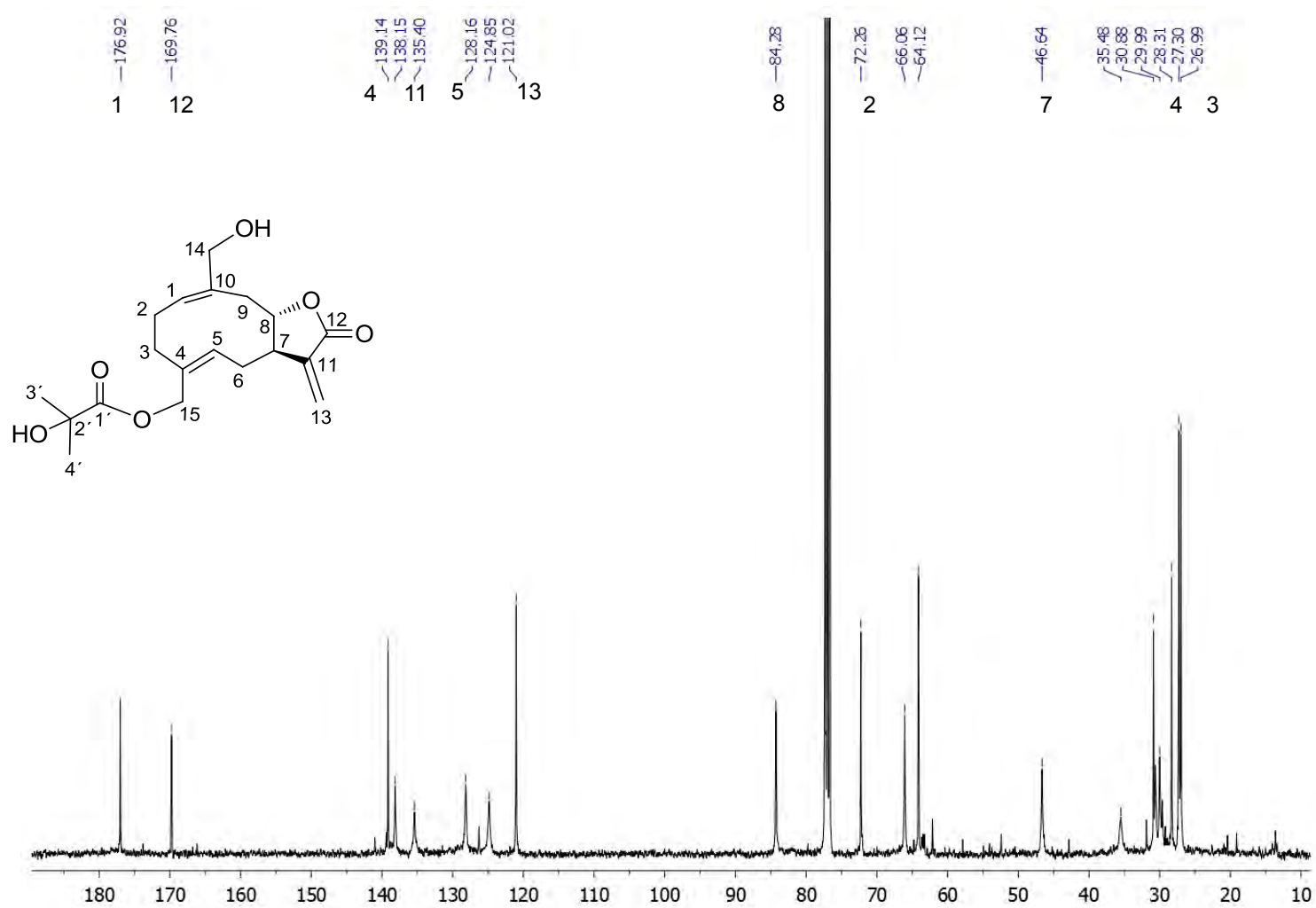
**Espectro 25.** RMN  $^1\text{H}$  de 15-O-4'-hidroxi-metacril-micrantólida (**10**) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



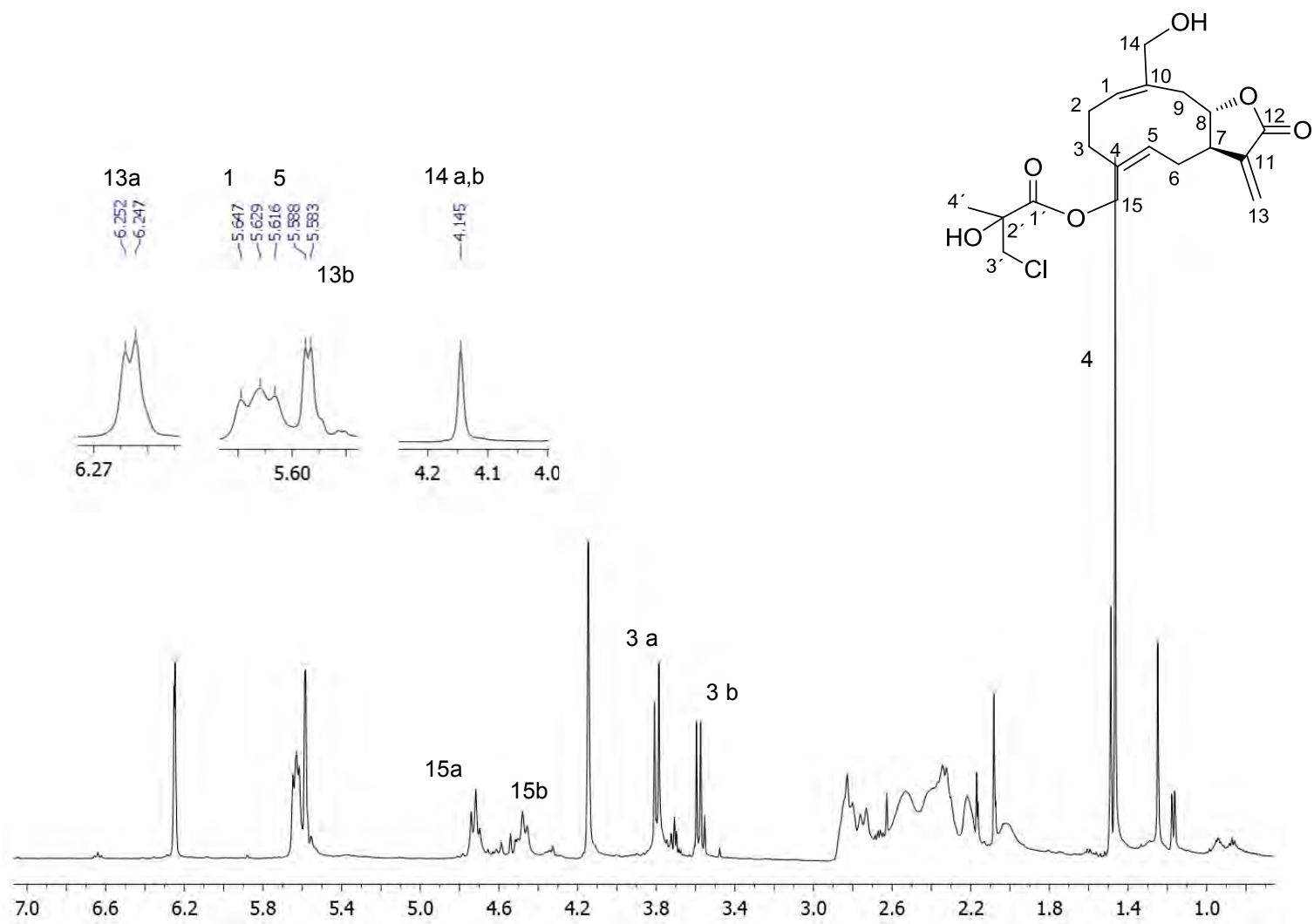
**Espectro 26.** RMN <sup>13</sup>C de 15-O-4'-hidroxi-metacril-micrantólida (**10**) (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**Espectro 27.** RMN <sup>1</sup>H de 15-O-2'-hidroxi-isobutiril-micrantólida (**11**) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

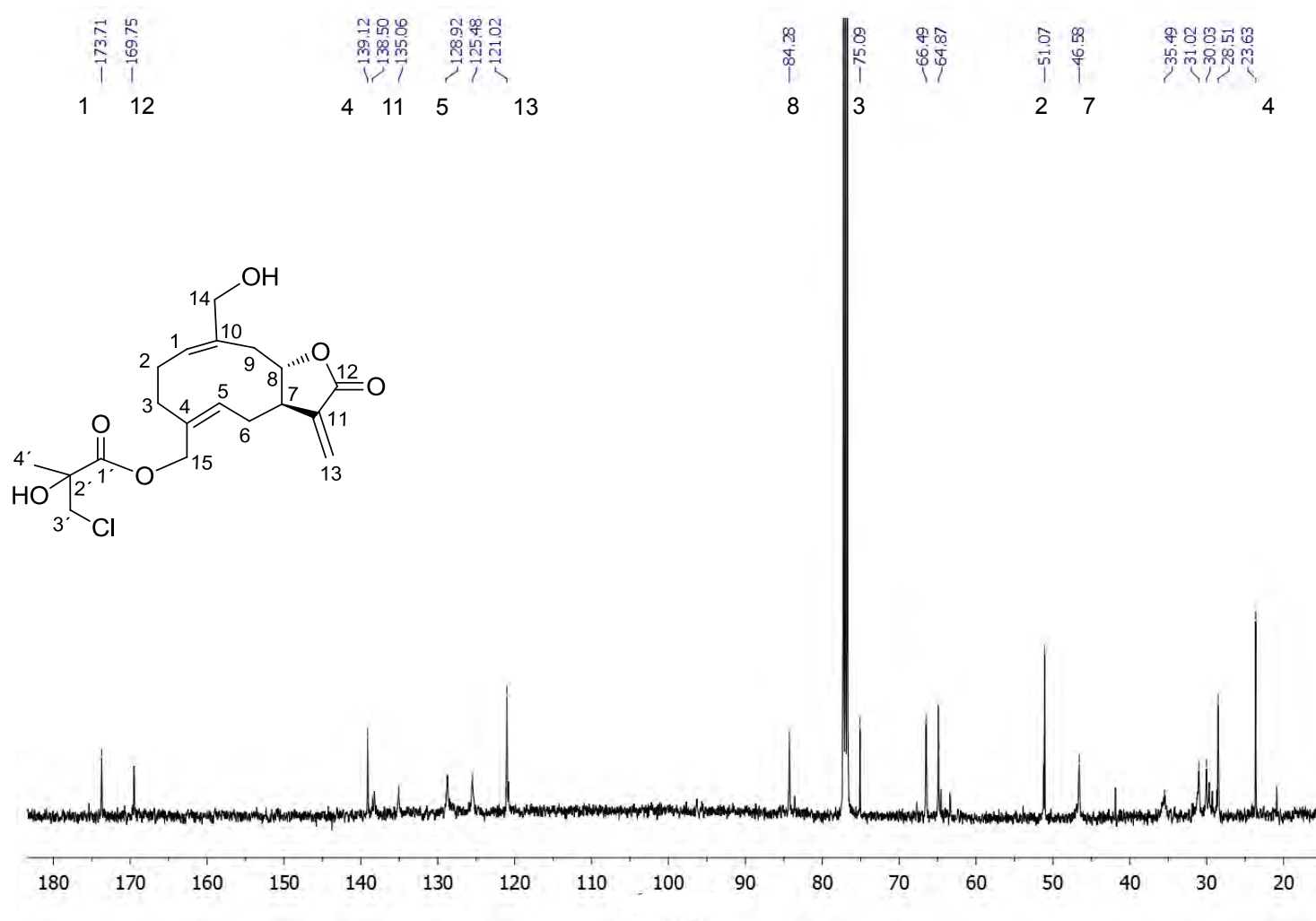


**Espectro 28.** RMN <sup>13</sup>C de 15-O-2'-hidroxi-isobutiril-micrantólida (**11**) (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

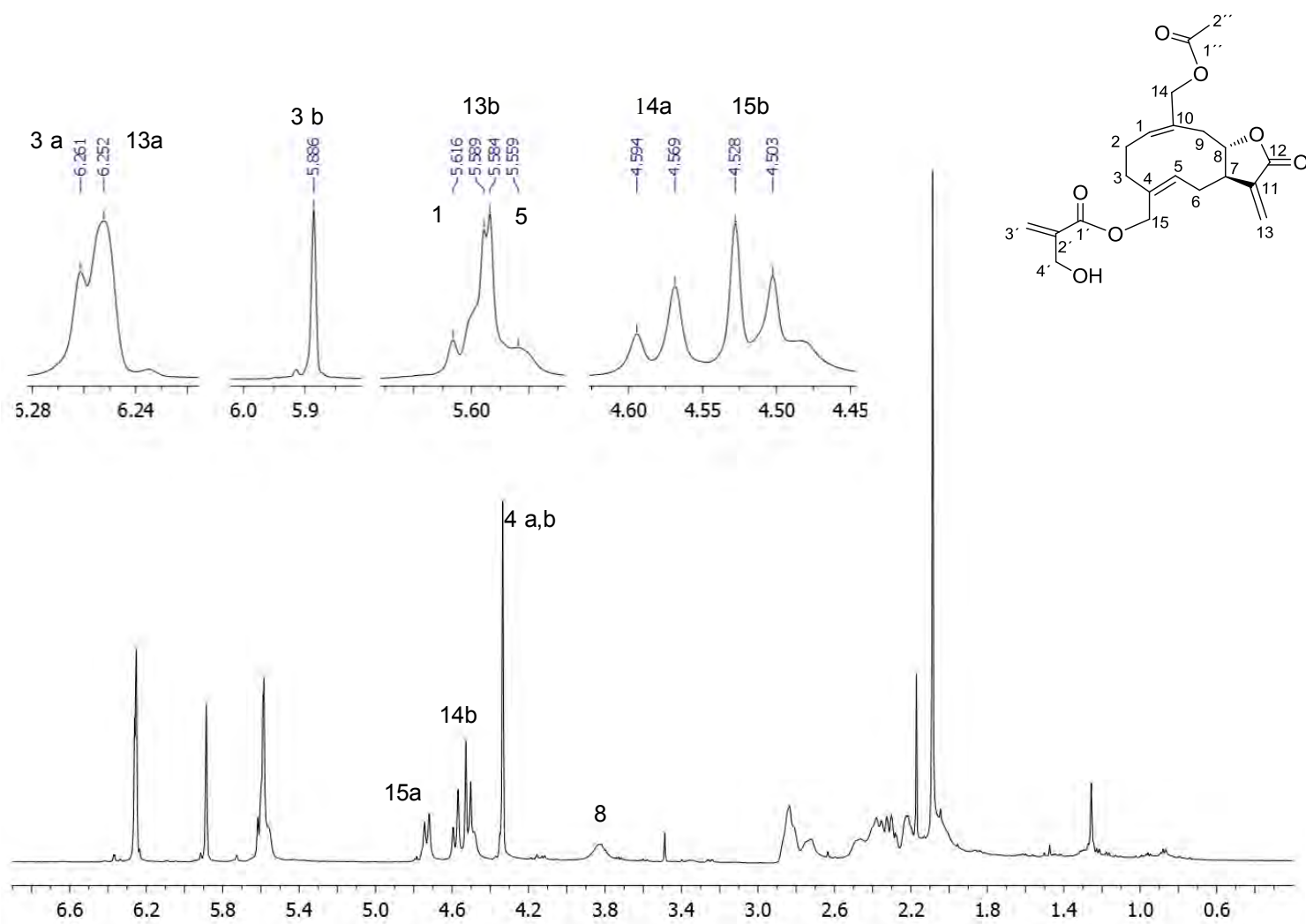


**Espectro 29.** RMN <sup>1</sup>H de 15-*O*-3'-cloro-2'-hidroxi-metacril-micrantólida (**12**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

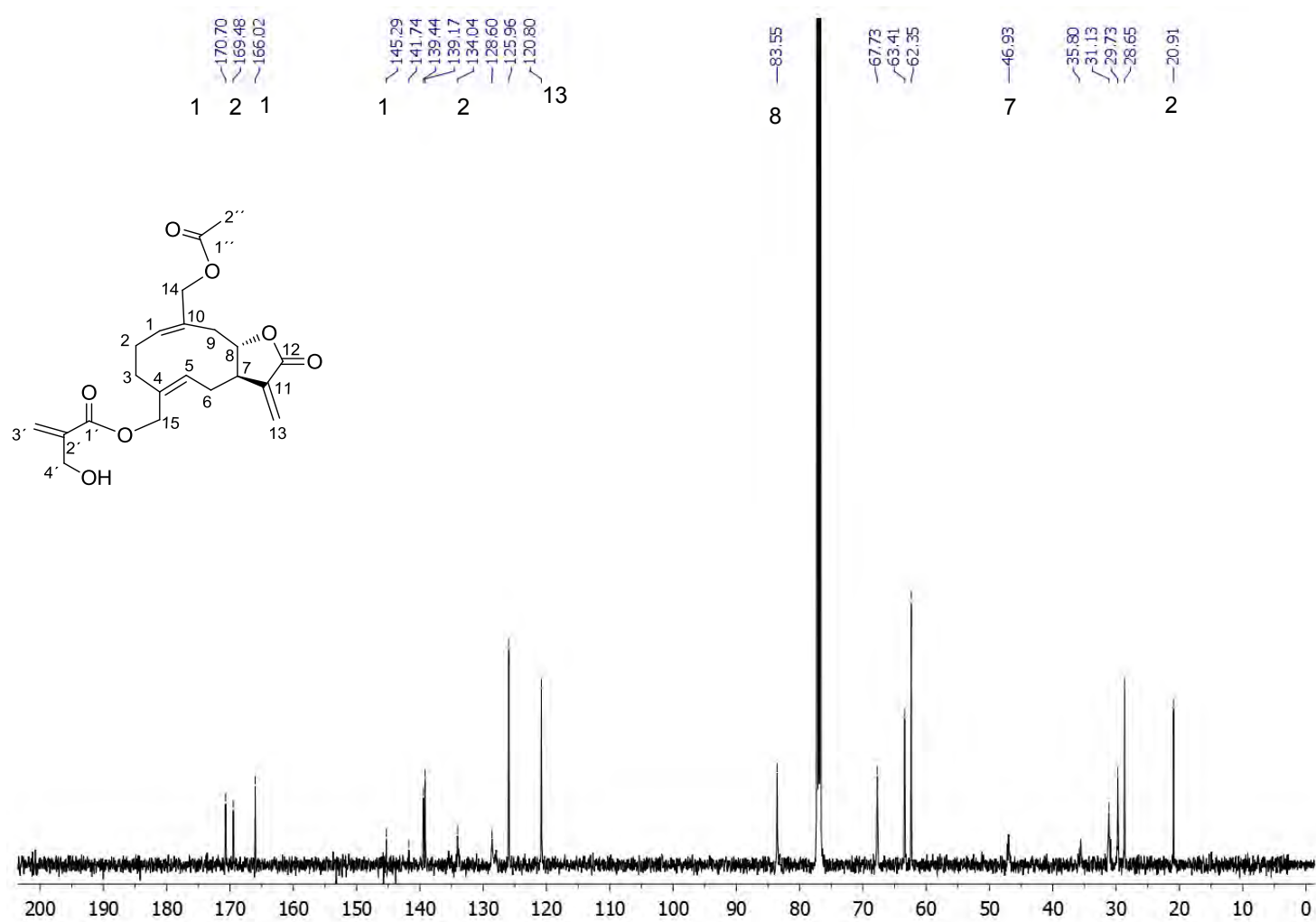




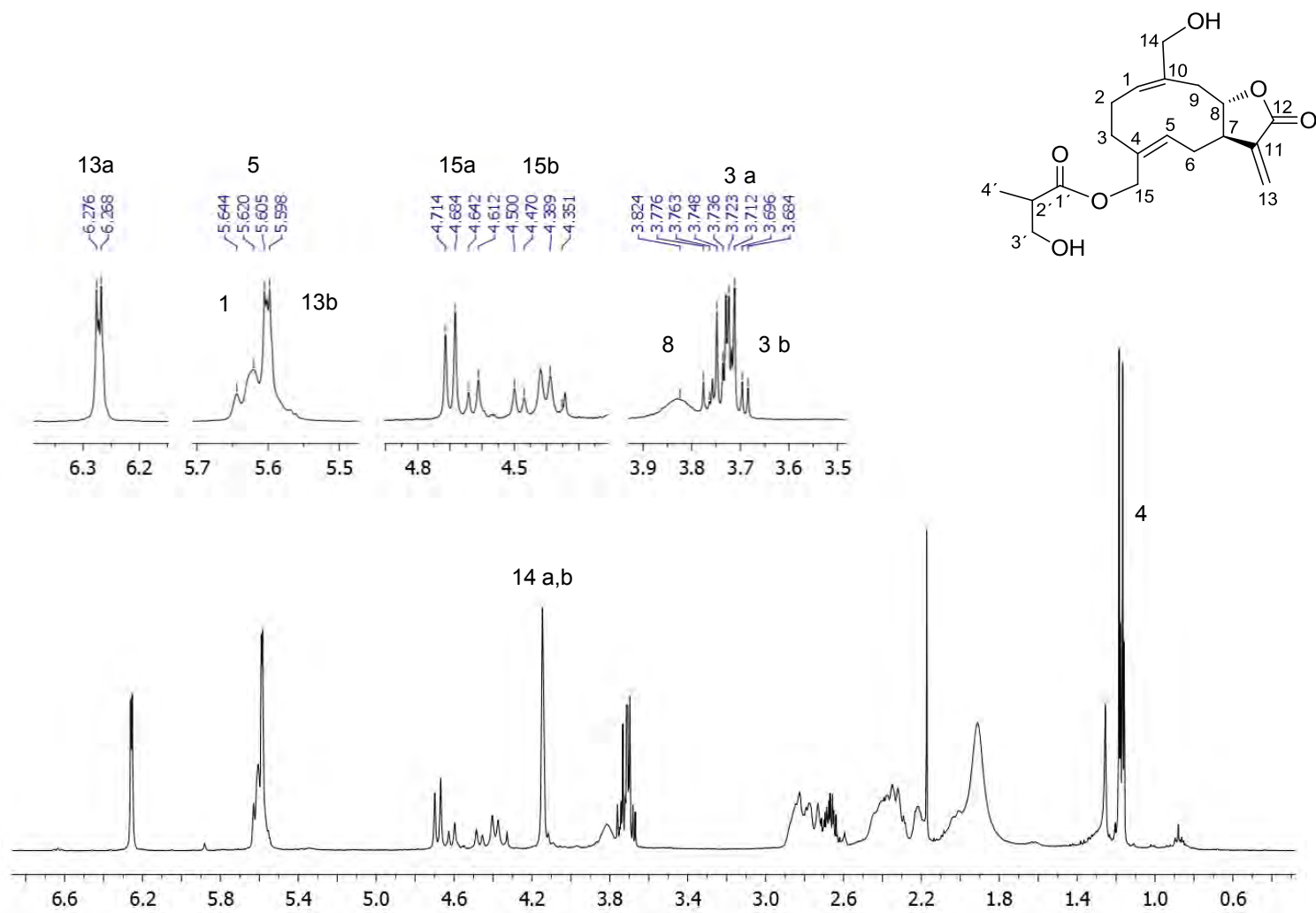
**Espectro 30.** RMN <sup>13</sup>C de 15-O-3'-cloro-2'-hidroxi- metacril-micrantólida (**12**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



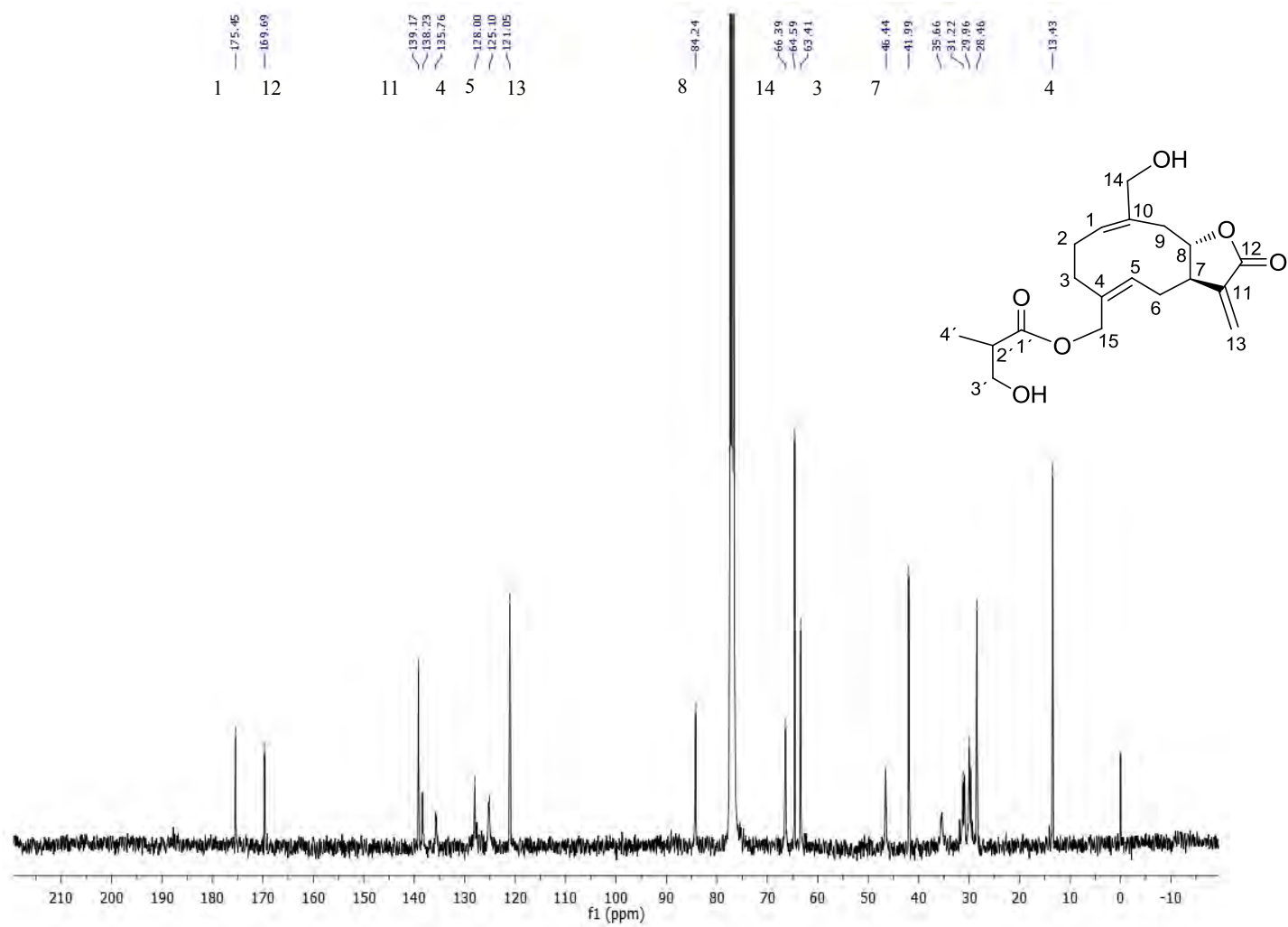
**Espectro 31.** RMN <sup>1</sup>H de 15-O-4'-hidroxi-metacril-14-acetoxi-micrantólida (**13**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



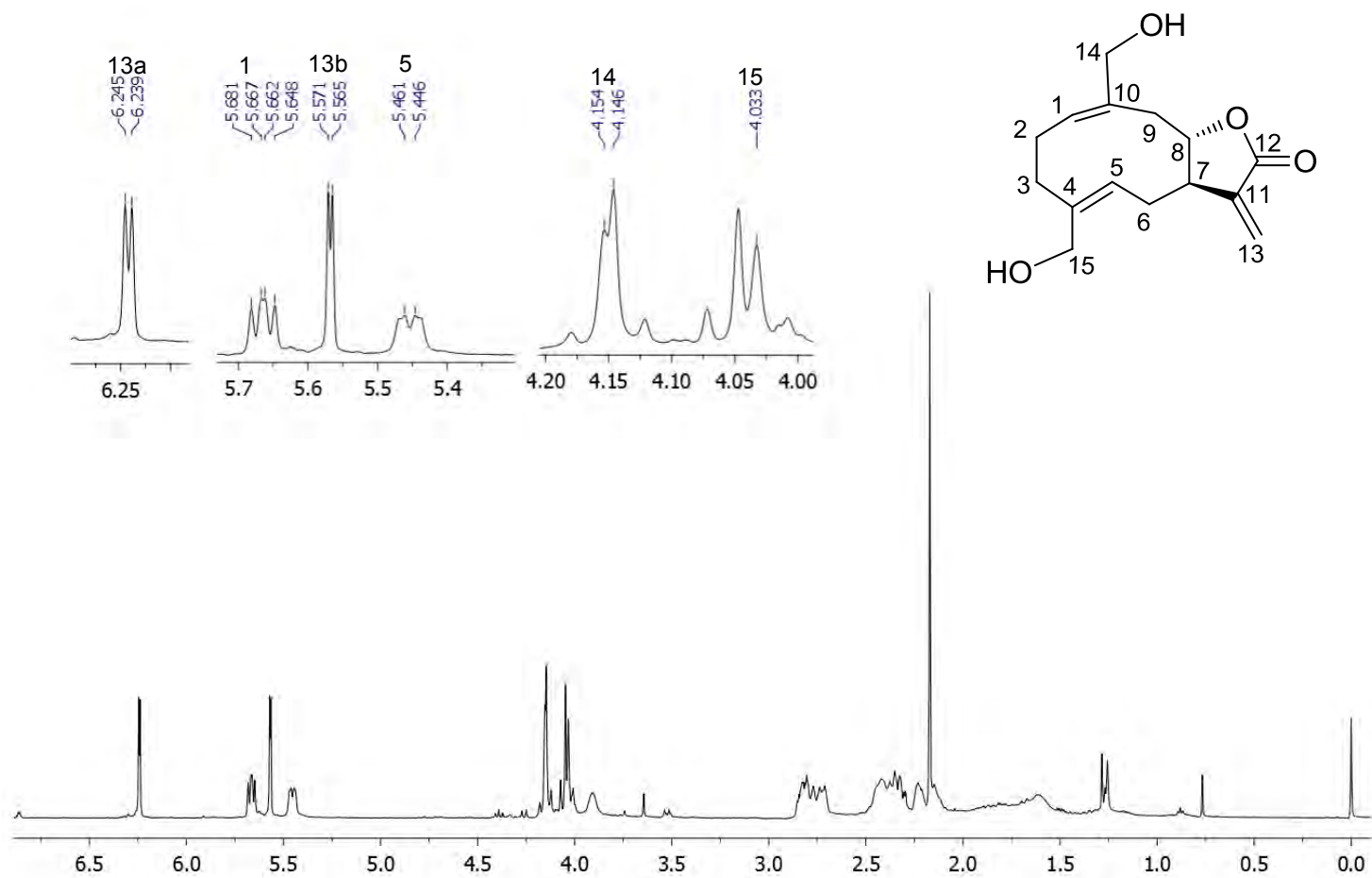
**Espectro 32.** RMN <sup>13</sup>C de 15-O-4'-hidroxi-metacril-14-acetoxi-micrantólida (**13**) (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



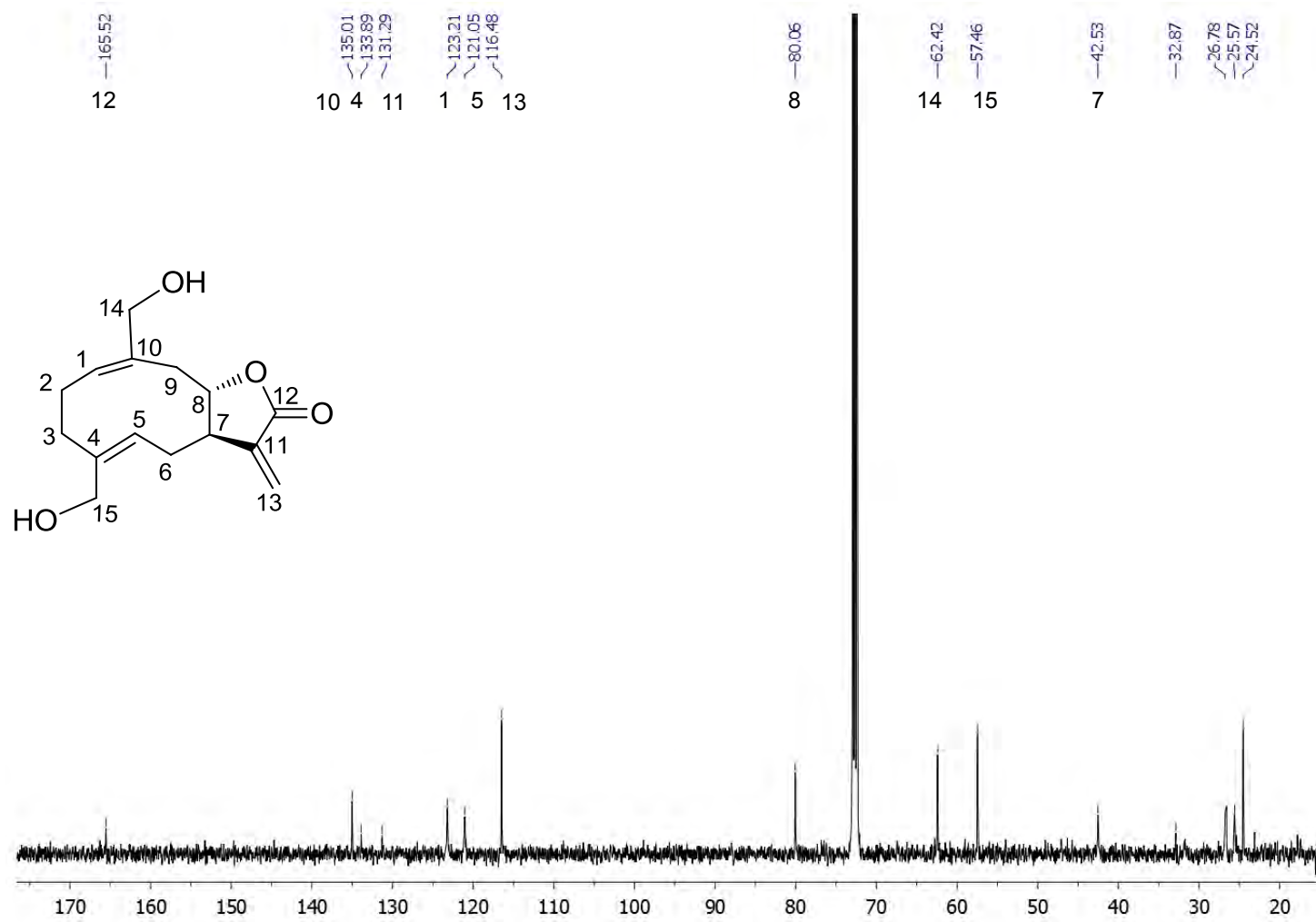
**Espectro 33.** RMN <sup>1</sup>H de 15-O-3'-hidroxi-isobutiril-micrantólida (**14**) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



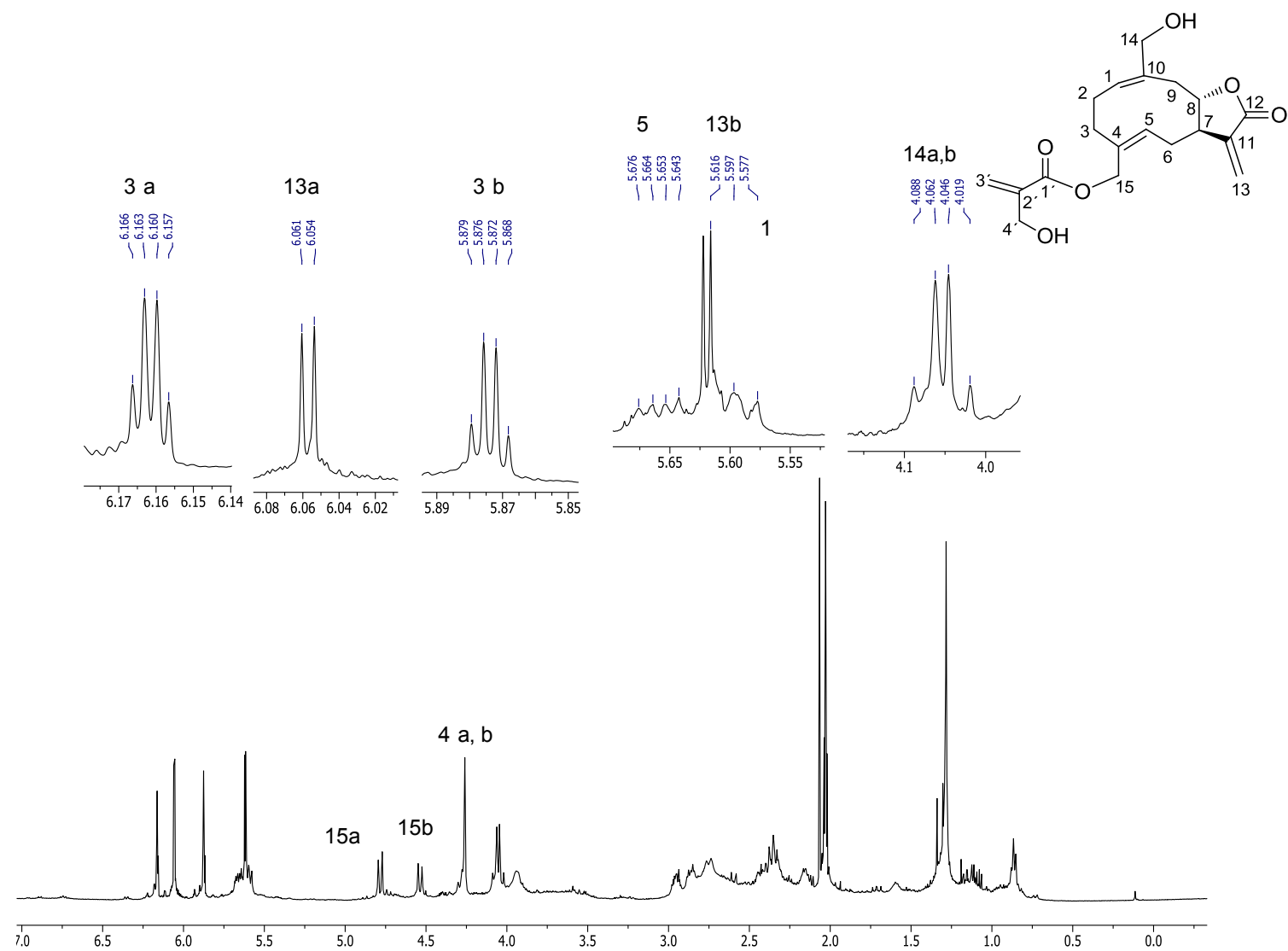
**Espectro 34.** RMN  $^{13}\text{C}$  de 15-*O*-3'-hidroxi-isobutiril-micrantólida (**14**) (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Espectro 35.** RMN  $^1\text{H}$  de micrantólida (**15**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

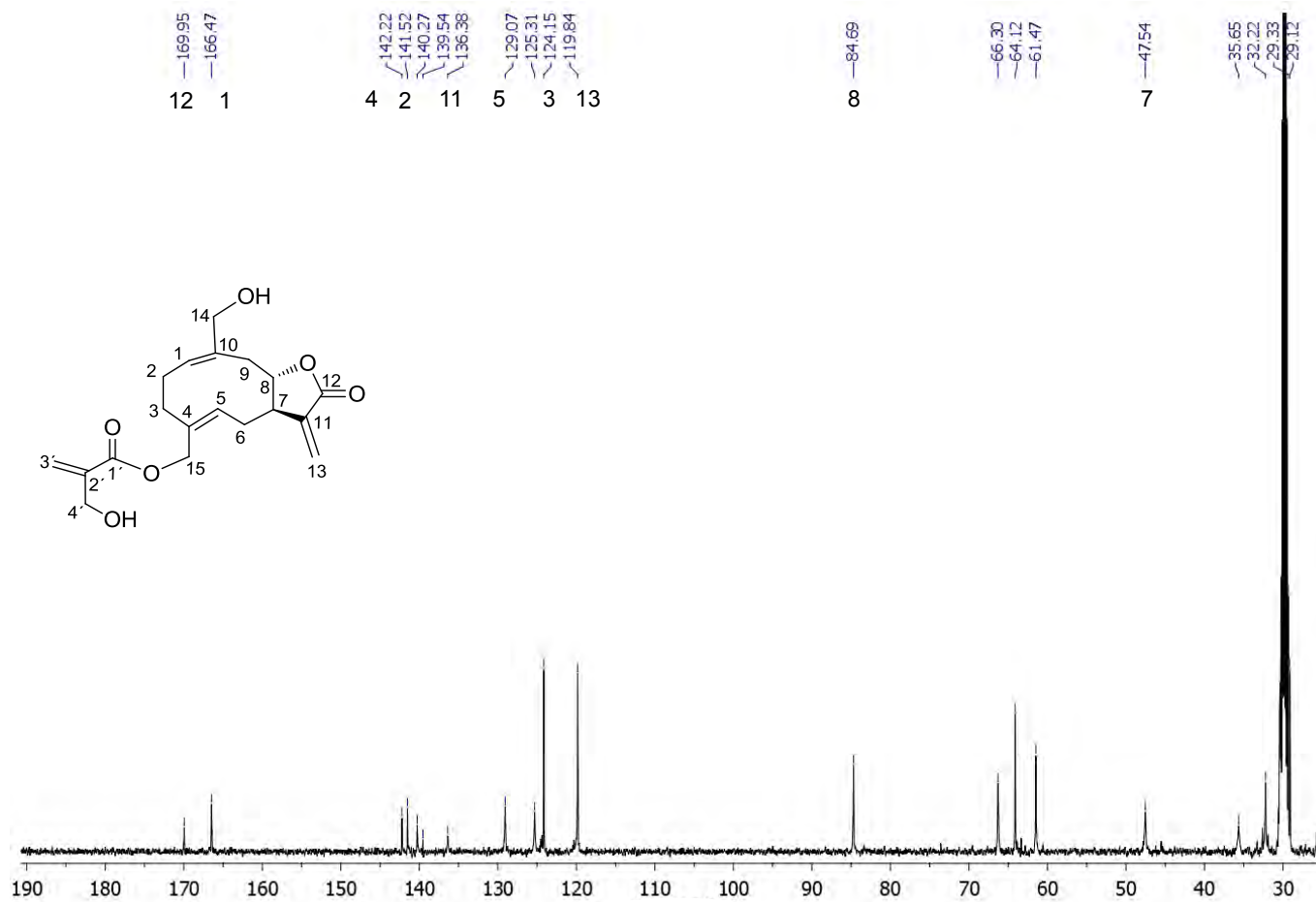


**Espectro 36.** RMN  $^{13}\text{C}$  de micrantólida (**15**) (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

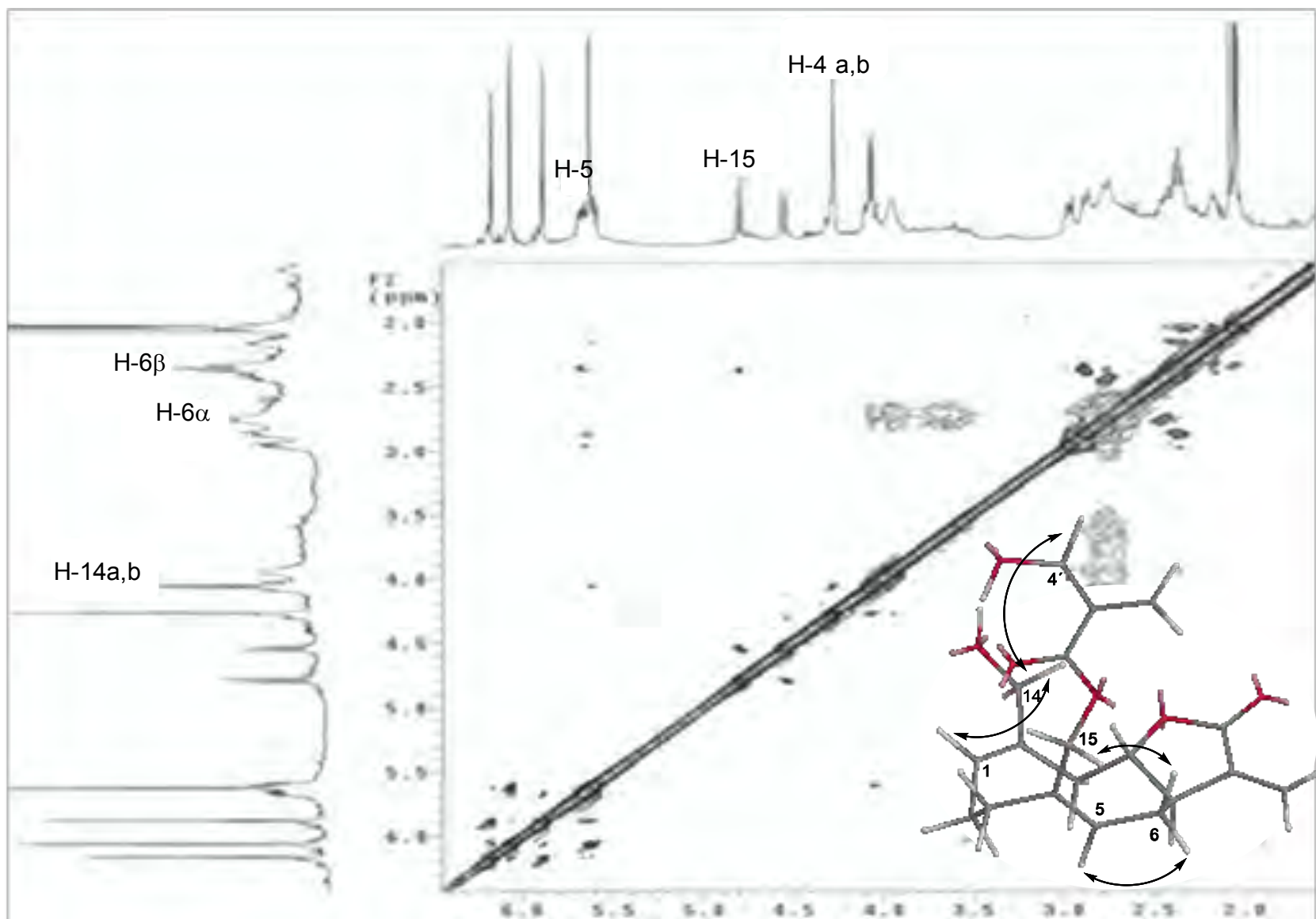


**Espectro 37.** RMN  $^1\text{H}$  de 15-O-4'-hidroxi-metacril-micrantólida (**10**) (500 MHz, acetona- $d_6$  -  $50^\circ\text{C}$ )





**Espectro 38.** RMN <sup>13</sup>C de 15-O-4'-hidroxi-metacril-micrantólida (**10**) (125 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub> - 50°C)



**Espectro 39.** NOESY de 15-*O*-4'-hidroxi-metacril-micrantólida (**10**) (500 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>-50

***PARTICIPACIÓN EN EVENTOS ACADÉMICOS  
Y PUBLICACIÓN***

## PARTICIPACIÓN EN EVENTOS ACADÉMICOS

### **Asistencia a congresos nacional e internacional.**

Ríos V., E.; León, A.; Torres, Y.; Bravo-Monzón, A.; Espinosa-García, F.; Delgado, G. Terpenoides de *Mikania micrantha* y *M. cordifolia* (Compositae), 46° Congreso Mexicano de Química, Querétaro, México. *Bol. Soc. Quím. Méx.* Número Especial 2, **2011**, 5, 86.

Ríos V., E.; Chávez, M. I.; León, A.; Bravo-Monzón, A.; Espinosa-García, F. J.; Delgado, G. Las Lactonas Sesquiterpénicas de *Mikania* (Compositae) y su evaluación biológica. 30° Congreso Latinoamericano de Química y 47° Congreso Mexicano de Química. México – Cancún. *Bol. Soc. Quím. Méx.* Número Especial 1, **2012**, 6, 211.

### **Simposios internos del Instituto de Química:**

Diciembre 2011: “Lactonas Sesquiterpénicas de *Mikania* y su evaluación biológica preliminar”

Diciembre 2012: “Lactonas Sesquiterpénicas en especies de *Mikania* (Compositae)

### **Quimi-Unam- 2013**

“Sesquiterpene Lactones of *Mikania* Species and Evaluation of their Biological Activities”



## Sesquiterpene lactones from *Mikania micrantha* and *Mikania cordifolia* and their cytotoxic and anti-inflammatory evaluation



Eunice Ríos V.<sup>a,b</sup>, Alejandra León<sup>b</sup>, María Isabel Chávez<sup>b</sup>, Yuridia Torres<sup>b</sup>,  
María Teresa Ramírez-Apan<sup>b</sup>, Rubén A. Toscano<sup>b</sup>, Ángel E. Bravo-Monzón<sup>c</sup>,  
Francisco J. Espinosa-García<sup>c</sup>, Guillermo Delgado<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Quindío, Carrera 15, Calle 12 Norte, Armenia, Quindío, Colombia

<sup>b</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F., Mexico

<sup>c</sup> Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, Antigua carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta, 58190 Morelia, Michoacán, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 November 2013

Accepted in revised form 11 February 2014

Available online 22 February 2014

#### Keywords:

*Mikania micrantha*

*Mikania cordifolia*

Sesquiterpene lactones

Cytotoxic activity

Anti-inflammatory activity

### ABSTRACT

The guaianolide 8-*epi*-mikanokryptin (**1**) and the melampolide 11H $\beta$ -11,13-dihydromicrantholide (**2**) along with known sesquiterpene lactones (**3–13**) and other constituents were isolated from the aerial parts of different populations of *Mikania micrantha* and *Mikania cordifolia* collected in several states of Mexico. The relative and absolute configurations of **1** were determined by X-ray diffraction and CD analysis, respectively. Considering the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR chemical shift similarities and the H–H coupling constant values, a [<sup>1</sup>D<sup>14</sup>, <sup>15</sup>D<sub>5</sub>] conformation was established for micrantholides (**2**, **8–13**). We tested nearly all the sesquiterpene lactones for antiproliferative activity in human cancer cell lines, and they exhibited moderate activity. Additionally, in a mouse ear model of edema induced by TPA, the anti-inflammatory activities were marginal.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Mikania* (Asteraceae, tribe Eupatorieae, subtribe Mikaniinae), the largest genus of the tribe Eupatorieae, is native from America and its species have adapted all over the world. In Mexico, several species from this genus have been reported from Northern Mexico to Chiapas and the Yucatan peninsula [1]. Some species of *Mikania* have been used as folk medicine for the treatment of asthma, bronchitis, and coughing, and preparations of some other species displayed diverse biological activities, such as anti-inflammatory, analgesic, antimicrobial, antiviral, and antiparasitic, among several others [2]. The extract of *Mikania micrantha* is used traditionally as a poultice for snake bites, scorpion stings and skin diseases in several parts of the

Mexico [3]. Preparations of *Mikania cordifolia* have shown antitrichomonal, antitrypanosomal and insecticide activities [4,5].

*M. micrantha* is considered one of the world's most invasive weeds. In Southeast Asia, it has become a major problem, and for several decades, it caused serious damage to native vegetation and crops [6,7]. Previous studies of the extracts of some *Mikania* species and their chemical constituents have shown phytotoxic effects and allelopathic properties [8–10].

*Mikania* includes more than 430 species and about 50 have been studied chemically [11–13]. These studies characterized over 300 different compounds including mainly sterols, terpenoids and flavonoids [2]. It has been noted that diterpenoids are the main constituents in species that belong to the Summikanian section, like *M. congesta*, *M. lindbergii*, *M. leavigata* and *M. hirsutissima* among others [14–16]. Sesquiterpene lactones (SLs) are common constituents of the Mikania section (*M. scandens* complex) [16]. For example, mikanolide was isolated from *M. micrantha* [17–19]; deoxymikanolide, scandenolide and

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 56224446; fax: +52 55 56162217.

E-mail address: [delgado@unam.mx](mailto:delgado@unam.mx) (G. Delgado).

dihydroscandanolide were isolated from *M. scandens* [17,19]; eudesmanolides were isolated from *M. campanulata* [20]; and melampolides from *M. minima* and *M. cordifolia* [16,21,22].

To follow up on our studies on bioactive SLs [23–25], in the present study we isolated and characterized thirteen SLs (**1–13**) from several populations of *M. micrantha* and *M. cordifolia*. We identified two new compounds: 8-*epi*-mikanokryptin (**1**) and 11 $\beta$ -11,13-dihydromicrantholide (**2**), and eleven known SLs. The later included three germacrolides: dihydromikanolide (**3**), deoxymikanolide (**4**) and miscandanine (**5**); two guaianolides: achalensolide (**6**) and xerantholide (**7**); and six melampolides: 15-*O*-3'-hydroxy-isobutyryl-micrantholide (**8**), 15-*O*-4'-hydroxy-methacryl-micrantholide (**9**), 15-*O*-4'-hydroxy-methacryl-14-acetoxy-micrantholide (**10**), 15-*O*-3'-chloro-2'-hydroxy-isobutyryl-micrantholide (**11**), 15-*O*-2'-hydroxy-isobutyryl-micrantholide (**12**), and micrantholide (**13**) (Fig. 1). We also evaluated the cytotoxic and anti-inflammatory properties of the majority of these SLs.

## 2. Experimental

### 2.1. General

Melting points were determined on a Fisher Johns apparatus and are uncorrected. Optical rotations were obtained on a Perkin-Elmer 341 polarimeter using a sodium lamp at 589 nm. UV data were measured on a Shimadzu UV-160U spectrophotometer. The CD spectrum was measured with a JASCO J-720 spectrometer. IR spectra were recorded on a

Tensor Bruker FT-IR 27 spectrometer.  $^1\text{H}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) experiments were registered on a Varian Inova.  $^1\text{H}$  (400 MHz) and  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) experiments were registered on Bruker Avance III spectrometer. Chemical shifts were expressed in ppm ( $\delta$ ) relative to TMS as internal standard. EI and HRFAB mass spectra were measured on JEOL JMS-AX 505 HA and JEOL JMX-SX 102 spectrometers, respectively. Analytical TLC was carried out on precoated silica gel 60F<sub>254</sub> sheets (Merck). Preparative TLC was performed on silica gel (20 × 20 cm, 2 mm) and detected the substance by UV (254 nm) and ceric ammonium sulfate. Acetone was used as solvent to recover the compounds. Column chromatography (CC) was performed using silica gel (230–400 mesh, Merck). All solvents were dried and distilled before use.

### 2.2. Plant material

Aerial parts of *Mikania micrantha* H.B.K. were collected in three different locations of Mexico in March, 2009 and deposited in the Herbarium of the Instituto de Ecología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacan, Mexico (EBUM), with the following registration numbers: Paracuaro, Michoacan (EBUM 20403); Chancala, Chiapas (EBUM 22686); and Dos Caminos, Oaxaca (EBUM 22689). Aerial parts of *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd. were collected in March, 2009 from Lagunillas, Guerrero (EBUM 22696); and Los Reyes de Salgado, Michoacan in March, 2010 (EBUM 22698). The plant material was collected and identified by Angel E. Bravo-Monzón.

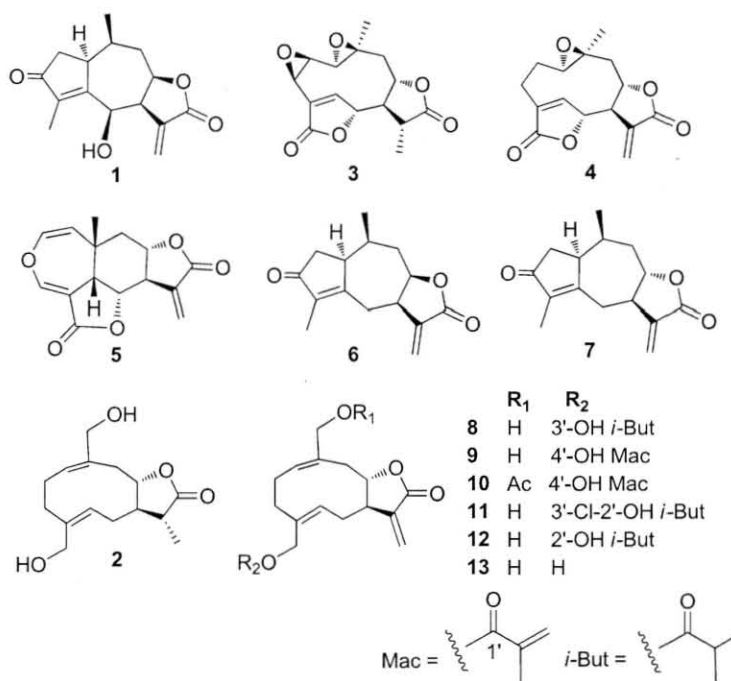


Fig. 1. Structures of compounds 1–13.

### 2.3. Extraction and isolation

Plant material was air-dried, powdered and extracted by maceration at room temperature consecutively with *n*-hexane ( $\times 3$ , using 1 L for each 100 g of plant material) and then with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (1:1,  $\times 3$ , using 1 L for each 100 g of plant material) for 48 h. The extracts were concentrated to dryness under reduced pressure.

#### 2.3.1. $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ extract from *M. micrantha* collected in Michoacan

25.3 g of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  extract was obtained from 0.54 kg of dry plant material of *M. micrantha* collected in Michoacan. This residue was fractionated by CC over silica gel (253 g, 230–400 mesh,  $9 \times 40$  cm) using a gradient solvent system of *n*-hexane–EtOAc (100:0, 9:1, 4:1, 7:3, 3:2, 1:1, 2:3, 3:7, 1:4, 1:9, 100). 141 eluates (200 mL each) were collected and combined to 12 main fractions (1–12). Fraction 5 afforded stigmaterol (91 mg). Fraction 7 (1.3 g) was subjected to CC over silica gel (80 g, 230–400 mesh,  $4 \times 20$  cm) using mixtures of *n*-hexane and EtOAc of increasing polarity, to obtain 7 subfractions (7a–7g). Compound **5** (9 mg), was obtained from subfraction 7f and compound **3** (147 mg) from subfraction 7g. Fraction 9 (1.20 g) was purified on a silica gel CC (120 g, 230–400 mesh,  $4 \times 40$  cm) eluted with mixtures of *n*-hexane–EtOAc of increasing polarity to afford 185 eluates, which were pooled to 8 subfractions (9a–9h). Rechromatography of subfraction 9e afforded **4** (30 mg). Fraction 10 (200 mg) was separated by preparative TLC ( $20 \times 20$  cm, 2 mm) using EtOAc as eluent (two developments) to yield **9** (4 mg).

#### 2.3.2. $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ extract from *M. micrantha* collected in Chiapas

12 g of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  extract was obtained from dry plant material of *M. micrantha* (0.60 kg) collected in Chiapas. This residue was chromatographed on a silica gel (120 g, 230–400 mesh,  $9 \times 40$  cm) column eluted with mixtures of *n*-hexane–EtOAc of increasing polarity (100:0, 9:1, 4:1, 7:3, 3:2, 1:1, 2:3, 3:7, 1:4, 1:9, 100). 250 eluates (100 mL each) were obtained and pooled to 10 fractions (1–10). Fractions 3, 4 and 5 were purified by CC affording acetyl- $\beta$ -amyrin (10 mg), lupeol (14 mg) and stigmaterol (20 mg), respectively. Fraction 6 (1.7 g) was subjected to CC (90 g, 230–400 mesh,  $4 \times 30$  cm) using mixtures of *n*-hexane–EtOAc of increasing polarity to obtain 13 subfractions (6a–6m). Subfraction 6j (350 mg) was fractionated by silica gel on CC (15 g, 230–400 mesh,  $2 \times 30$  cm) and eluted with a gradient of *n*-hexane–EtOAc of increasing polarity to give 10 subfractions (6j1–6j10). Subfraction 6j8 (135 mg) was purified by preparative TLC ( $20 \times 20$  cm, 2 mm) using *n*-hexane–EtOAc (1:1, two developments) to obtain **6** (36 mg). Fraction 7 (1.4 g) was fractionated by CC with silica gel (90 g, 230–400 mesh,  $4 \times 30$  cm) eluted with *n*-hexane–EtOAc mixtures yielding 5 subfractions (7a–7e). Subfraction 7d (200 mg) was purified by preparative TLC ( $20 \times 20$  cm, 2 mm) using *n*-hexane–EtOAc (1:1, one development) affording 8-epi-mikanokryptin (**1**) as a solid that was recrystallized from EtOAc–MeOH (32 mg),  $R_f$  0.44 (*n*-hexane:EtOAc 3:7).

#### 2.3.3. $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ extract from *M. micrantha* collected in Oaxaca

14 g of the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  extract of *M. micrantha* collected in Oaxaca was obtained starting from 0.14 kg of dry plant material. This extract was submitted to CC on silica gel (140 g, 230–400 mesh,  $9 \times 45$  cm) eluted with a mixture of *n*-hexane–EtOAc of increasing polarity (100:0, 9:1, 4:1, 7:3, 3:2, 1:1, 2:3, 3:7, 1:4, 1:9, 100). 160 eluates (100 mL each) were obtained and combined to obtain 10 fractions (1–10). Fractions 2, 3 and 4 were purified by CC to give acetyl- $\beta$ -amyrin (13 mg), lupeol (18 mg) and stigmaterol (70 mg), respectively. Fraction 6 (29 mg) was purified by preparative TLC ( $20 \times 20$  cm, 2 mm) using *n*-hexane–EtOAc (1:1, two developments) affording **7** (2.8 mg). Fraction 7 (305 mg) was subjected to CC (10 g, 230–400 mesh,  $2 \times 30$  cm) using mixtures of  $\text{C}_6\text{H}_6$ –EtOAc of increasing polarity to yield 6 subfractions (7a–7g). Subfraction 7b (52.9 mg) was purified by preparative TLC ( $20 \times 20$  cm, 2 mm) using  $\text{C}_6\text{H}_6$ –EtOAc (2:3, two developments) affording **10** (4.6 mg). Subfraction 7c (195.6 mg) was fractionated by silica gel CC (10 g, 230–400 mesh,  $2 \times 20$  cm) eluted with  $\text{C}_6\text{H}_6$ –EtOAc mixtures yielding 5 subfractions (7c1–7c5). Subfraction 7c3 (36.4 mg) was purified by preparative TLC ( $20 \times 20$  cm, 2 mm) using  $\text{C}_6\text{H}_6$ –EtOAc (3:7, two developments) to obtain **11** (4.2 mg). Subfraction 7d (37.7 mg) was separated by preparative TLC ( $20 \times 20$  cm, 2 mm) using  $\text{C}_6\text{H}_6$ –EtOAc (2:3, two developments) to yield **12** (3.2 mg). Fraction 8 (745 mg) was subjected to silica gel CC (100 g, 230–400 mesh,  $3 \times 30$  cm) and eluted with a gradient of  $\text{C}_6\text{H}_6$ –EtOAc to give five subfractions (8a–8e). Subfraction 8b (83 mg) was purified by preparative TLC ( $20 \times 20$  cm, 2 mm) using  $\text{C}_6\text{H}_6$ –EtOAc (3:7, two developments) affording **9** (15.8 mg). Subfraction 8c (26 mg) was purified by preparative TLC ( $20 \times 20$  cm, 2 mm) using  $\text{C}_6\text{H}_6$ –EtOAc (1:9, two developments) yielding 15-O-3'-hydroxy-isobutryryl-micrantholide **8** (8 mg).

#### 2.3.4. Polar extract from *M. cordifolia* collected in Guerrero

20 g of polar extract of *M. cordifolia* collected in Guerrero was obtained from 0.46 kg of dry plant material, and the extract was subjected to CC using silica gel (200 g, 230–400 mesh,  $10 \times 40$  cm) eluted with mixtures of *n*-hexane–EtOAc and EtOAc (100:0, 9:1, 4:1, 7:3, 3:2, 1:1, 2:3, 3:7, 1:4, 1:9, 100) to yield 240 eluates that were pooled into 12 fractions (1–12). Fractions 3, 4 and 5 were subjected to CC affording acetyl- $\beta$ -amyrin (7 mg), lupeol (9 mg) and  $\beta$ -sitosterol (12 mg), respectively. The other fractions were purified as described in Section 2.3.3 to give **10** (20.2 mg), **11** (16.7 mg), **12** (20.2 mg), **9** (16.6 mg) and **8** (8.6 mg).

#### 2.3.5. Polar extract from *M. cordifolia* collected in Michoacan

60 g of polar extract of *M. cordifolia* collected in Michoacan was obtained starting from 2.7 kg of dry plant material, and the extract was subjected to CC using silica gel (600 g, 230–400 mesh,  $10.5 \times 50$  cm) eluted with mixtures of *n*-hexane–EtOAc and EtOAc (100:0, 9:1, 4:1, 7:3, 3:2, 1:1, 2:3, 3:7, 1:4, 1:9, 100) to yield 162 eluates that were pooled into 10 fractions (1–10). Fractions 4 and 5 were subjected to CC affording acetyl- $\beta$ -amyrin (12 mg), and  $\beta$ -sitosterol (8 mg), respectively. The fractions 7, 8, and 9 were purified as described above to give **10** (5.2 mg), **11** (6.7 mg), **12** (3.4 mg), **9** (2.8 mg), **8** (4.6 mg), and **13** (1.4 mg). Fraction 10 (4.2 g) was subjected to CC (60 g, 230–400 mesh,  $5 \times 30$  cm)

using mixtures of *n*-hexane–EtOAc of increasing polarity to yield 6 subfractions (10a–10g). Subfraction 10e (52.9 mg) was purified by preparative TLC (20 × 20 cm, 2 mm) using C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>–EtOAc (1:9, two developments) affording **13** (6.0 mg). Subfraction 10f (16 mg) was purified by preparative TLC (20 × 20 cm, 2 mm) using C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>–EtOAc (1:9, two developments) yielding 11Hβ-11,13-dihydromicrantholide **2** (6.2 mg), *R*<sub>f</sub> 0.33 (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>:EtOAc 0.5:9.5). Compounds **3–13** were identified by direct comparison with data reported in the literature [19,22,26,27].

### 2.3.6. 8-Epi-mikanokryptin (**1**)

Yellow crystal (CHCl<sub>3</sub>); m.p. 112–114 °C; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +302 (c 1.4 × 10<sup>-3</sup>, MeOH); IR (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub> 3391, 1759, 1700, 1643 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH) λ<sub>max</sub>(log ε) = 239 (4.2) nm; CD (MeOH, Δε) λ<sub>max</sub> 215 (+28.4), 267 (−0.78), 308 (+0.56) nm. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data, see Table 1; EIMS *m/z* 262 [M]<sup>+</sup> (7), 233 (20), 124 (100), 93 (15), 67 (9); FABHRMS (positive) *m/z* 263.1283 [M + H]<sup>+</sup> (calc. for C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>O<sub>4</sub>, 263.1281).

**2.3.6.1. X-ray crystallographic data for 1.** The X-ray crystallographic data for **1** were measured on a Bruker Smart Apex automatic diffractometer with a CCD area detector at 298 (2) K using graphite-monochromated Mo Kα radiation (λ = 0.71073 Å). The structure was solved by direct methods and refined by full-matrix least-squares on *F*<sup>2</sup> using the program SHELXL-97 [28]. The crystal data are summarized as follows: empirical formula C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; formula weight sum 280.31 amu; crystal color and habit, colorless prism, orthorhombic, crystal size 0.334 × 0.332 × 0.126 mm, space group *P*2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, *Z* = 4, *a* = 6.2987(6) Å, *b* = 9.6324(10) Å, *c* = 22.813(2) Å, *V* = 1384.1(2) Å<sup>3</sup>; *D*<sub>calcd</sub> = 1.345 mg/m<sup>3</sup>; *F*(000) = 600, μ = 0.100 mm<sup>-1</sup>; 14,039 collected reflections (1.79° ≤ θ ≤ 27.90°), −8 ≤ *h* ≤ 8, −12 ≤ *k* ≤ 12, −30 ≤ *l* ≤ 30; 3312 independent reflections (*R*<sub>int</sub> = 0.0340); goodness-of-fit on *F*<sup>2</sup> is 0.951, final *R* indices for *I* > 2σ(*I*), *R*<sub>1</sub> = 0.0393, *wR*<sub>2</sub> = 0.0869, *R* indices for all data *R*<sub>1</sub> = 0.0481, *wR*<sub>2</sub> = 0.0899; refining 195 parameters and 3 restraints; the

largest difference peak and hole were 0.192 and −0.182 e.Å<sup>-3</sup>; completeness to θ (27.90°) 99.9%, maximum transmission 0.9884, minimum transmission 0.9704. Crystallographic data for the compound **1** have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center (deposition number: CCDC 888,013). Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ, UK [fax: +44-(0)-1223-336033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk].

**2.3.6.2. ECD spectrum for 1.** The ECD spectrum was calculated by TDDFT approach at the functional and basis set level B3LYP/6-31 + g(d) using optimized structure obtained by the X-ray analysis. The rotational strength calculations have been carried out in the velocity formalism using the Gaussian09 package [29].

### 2.3.7. 11Hβ-11,13-dihydroxymicrantholide (**2**)

Pale yellow oil (CHCl<sub>3</sub>); [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> −4.5 (c 1.1 × 10<sup>-3</sup>, CHCl<sub>3</sub>); IR (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub> 3605, 3432, 1767 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) = 203.5 (3.5) nm; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data, see Table 2; HRFABMS *m/z* 266.1518 [M] (calc. for C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub> 266.1510).

### 2.4. Conformational energy calculation of the main conformers of 9

Initial molecular geometries of the four conformers of **9** were obtained with standard parameters using ChemDraw Ultra 10.0 program. The conformational energy was obtained in vacuum by geometry optimization (Package HyperChem 8.0.6) using standard settings of Molecular Mechanics Method (MM+) through the algorithm Polak–Ribiere with RMS gradient 0.1 kcal A<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>.

### 2.5. Biological assays

#### 2.5.1. Cytotoxic assay

The compounds **1**, **3–7**, **9**, **11** and **12** were screened in vitro against six human cancer cell lines, which were supplied by National Cancer Institute (USA). The human tumor cytotoxicity was determined using the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) in microculture assay

**Table 1**  
<sup>1</sup>H (400 MHz) and <sup>13</sup>C (100 MHz) NMR data of compound **1** in CDCl<sub>3</sub> (δ in ppm, *J* values in Hz).

Position	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1	3.01 (brs)	42.7
2	2.43 (dd, <i>J</i> = 18.8, 6.0)	38.7
	2.36 (dd, <i>J</i> = 18.8, 2.0)	
3		208.4
4		142.4
5		166.9
6	5.03 (brd, <i>J</i> = 2.8)	70.7
7	3.49 (dddd, <i>J</i> = 6.0, 2.8, 2.8, 2.4)	44.7
8	4.94 (ddd, <i>J</i> = 8.4, 8.4, 6.0)	78.4
9	2.25 (m)	36.2
10	2.27 (m)	30.9
11		136.3
12		169.1
13a	6.56 (d, <i>J</i> = 2.8)	124.1
13b	5.85 (d, <i>J</i> = 2.4)	
14	0.78 (d, <i>J</i> = 6.4)	14.6
15	1.87 (dd, <i>J</i> = 2.0, 0.4)	8.5
–OH	2.18 (brs)	

**Table 2**  
<sup>1</sup>H (500 MHz) and <sup>13</sup>C (125 MHz) NMR data of compound **2** in CDCl<sub>3</sub> (δ in ppm, *J* values in Hz).

Position	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1	5.63 (dd, <i>J</i> = 9.0, 3.5)	127.5
2	2.24 (m)	29.6
3	2.21 (m), 2.10 (m)	29.2
4		138.0
5	5.40 (brd, <i>J</i> = 8.5)	126.1
6	2.33 (m), 2.27 (m)	28.5
7	1.91 (dddd, <i>J</i> = 11.5, 7.0, 4.5, 4.0)	51.5
8	3.9 (m)	84.0
9	2.55 (m), 2.23 (m)	30.9
10		139.1
11	2.27 (dq, <i>J</i> = 11.5, 7.0)	42.3
12		178.5
13	1.27 (d, <i>J</i> = 7.0)	13.3
14	4.13 (d, <i>J</i> = 12.0)	66.6
15	4.10 (d, <i>J</i> = 12.0)	61.7



to measure cell growth, as described in the protocols established by the NCI [30].

### 2.5.2. Anti-inflammatory activity

Compounds **1**, **3–6** and **9–12** were evaluated using the mouse ear model of edema induced by acetate 12-O-tetradecanoylphorbol (TPA), according to the methodology described in the literature [31].

## 3. Results and discussion

### 3.1. Structural elucidation

The aerial parts of *M. micrantha* and *M. cordifolia* were dried, milled and defatted with *n*-hexane. Then, they were extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, and the polar extracts were fractionated by column chromatography on silica gel. From the population of *M. micrantha* collected in the state of Michoacan, we isolated and characterized four known SLs (**3–5**, **9**), in addition to stigmaterol [19,26].

Fractionation of a *M. micrantha* population collected in the state of Chiapas, resulted in the characterization of acetyl β-amyryn, lupeol, stigmaterol and **6**. This last compound has not been reported previously from this genus, only from *Stevia* [32] and *Decachaeta* genera [33]. We also isolated a new SL, 8-*epi*-mikanokryptin (**1**). Compound **1** was obtained as an optically active compound and its molecular formula was established as C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub> from the FABHRMS spectrum (calculated for C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub> 263.1281 [M + H]<sup>+</sup>, found 263.1283). The IR spectrum exhibited bands for a hydroxy group (3391 cm<sup>-1</sup>), a carbonyl group corresponding to an α,β-unsaturated-γ-lactone (1759 cm<sup>-1</sup>), and an additional carbonyl group (1700 cm<sup>-1</sup>). These data suggested the presence of a SL and this was confirmed by the <sup>13</sup>C NMR spectrum (Table 1) which displayed 15 carbon signals. These signals were assigned by DEPT analysis to two methyls, three methylenes (one vinylic, corresponding to the exomethylene group), five methines and five quaternary carbons (two carbonyls and three tetrasubstituted vinyl carbons). This indicated the presence of a guaianolide skeleton, the same found for **6**, isolated from the same species in this study. Consequently, <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY spectrum showed coupling between H-7 (δ<sub>H</sub> 3.49), H-6, H-8 and H-13a,b and between H-1 (δ<sub>H</sub> 3.01), H-2a,b and H-10 (Table 1 and Fig. 2). The HMBC analysis showed correlations between H<sub>3</sub>-15 (δ<sub>H</sub> 1.87) and C-3, C-4 and C-5, locating the α,β-unsaturated enone; and the correlations between H-8 (δ<sub>H</sub> 4.94) and C-6, C-7, C-11, and C-12, established the lactonic closure at C-8 (Table 1 and Fig. 2). Finally, NOESY experiments (Fig. 3) revealed interactions between H-7, H-8 and H-6; between H-8 and H-1; and between H-1 and H-10. These interactions defined the *cis* fusion of the γ-lactone ring, deduced from the H-7 and H-13a,b couplings (*J*<sub>7,13</sub> < 3 Hz) [34].

The CD curve of Compound **1** exhibited a weak negative Cotton effect in the *n*-π\* region (λ<sub>max</sub> 267 nm, Δε –0.78) and a strong positive Cotton effect in the π-π\* region (λ<sub>max</sub> 215 nm, Δε +28.4), supporting the *cis* fusion of the lactone ring for 8-*epi*-mikanokryptin (**1**) according to the Stöcklin–Waddell–Geissman rule [35]. The relative configuration assigned by spectroscopic means was confirmed by X-ray

diffraction analysis of crystals. Cremer and Pople puckering parameters [36] for cyclopentenone ring [Q(2) = 0.1467 Å, φ(2) = 204.6089°], seven-membered ring [Q(2) = 1.1386 Å, φ(2) = 15.5424°; Q(3) = 0.0148 Å, φ(3) = 325.1919°] and γ-lactone ring [Q(2) = 0.1985 Å, φ(2) = 239.3385°] suggested a twisted conformation on C(1)–C(2), an intermediate conformation between boat and twist-boat and a twisted conformation on C(8)–C(7), respectively (see supporting information S39). In the absence of significant anomalous scattering effects, the Flack parameter is essentially meaningless. Accordingly, Friedel pairs were merged and the absolute configuration of **1** was determined by comparing its electronic CD spectra (ECD) with that calculated by the time dependent DFT method. The agreement between the experimental and calculated spectra in MeOH was very good (see supporting information S40), therefore, the absolute configuration of 8-*epi*-mikanokryptin (**1**) is that shown by the X-ray structure (Fig. 4).

The chemical analysis of the population of *M. micrantha* collected in Oaxaca led to the isolation of acetyl β-amyryn, lupeol, stigmaterol, stigmateryl-β-D-glucopyranoside, and the SLs **8–12** [22,37] along with **7** [38,39], now reported as an additional constituent from *Mikania* species.

Acetyl β-amyryn, lupeol, β-sitosterol, stigmaterol and melampolides **8–12** were isolated and characterized from the population of *M. cordifolia* collected in the state of Guerrero [22,26,27].

Fractionation of *M. cordifolia* population collected in the state of Michoacan, resulted in the characterization of acetyl β-amyryn, β-sitosterol and melampolides **8–13** [27] and the new compound **2**. Sesquiterpene lactone **2** was obtained as an optically active substance and its molecular formula was established as C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub> by FABHRMS spectrum (calculated for C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub> 266.1510; found 266.1518). Its IR spectrum showed absorptions for the hydroxyl groups (3605, 3432 cm<sup>-1</sup>), carbonyl group of an α,β-unsaturated-γ-lactone (1767 cm<sup>-1</sup>). The <sup>13</sup>C NMR (Table 2) spectrum analysis, with the aid of DEPT and HSQC experiments, showed the presence of 15 signals that corresponded to one methyl, six methylenes, five methines and three quaternary carbons. <sup>1</sup>H NMR spectrum (Table 2) confirmed these assignments, because it showed one doublet at δ<sub>H</sub> 1.27 (3H, d, *J* = 7.0 Hz) assigned to H-13 and at δ<sub>H</sub> 2.27 (1H, dq, *J* = 11.5, 7.0 Hz) assigned to H-11. COSY experiments confirmed the H-2 → H-1 → H-14 and the H-5 → H-6 → H-7 → H-8 → H-9 spin systems of the germacra-1(10),4-dienolide; and H-7 → H-11 → H-13

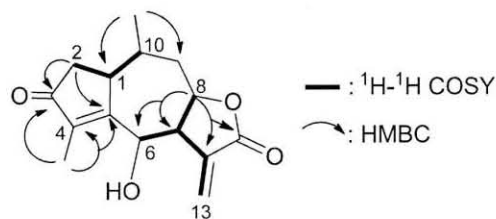


Fig. 2. Selected <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY and HMBC correlations of 8-*epi*-mikanokryptin (**1**).

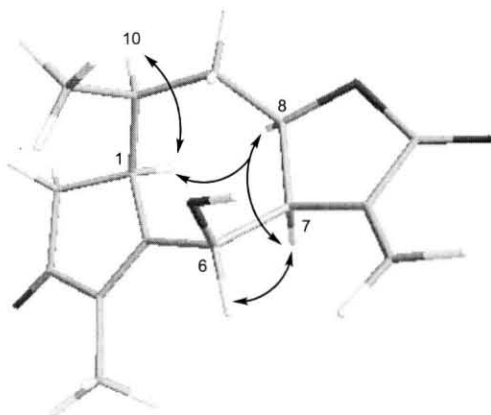


Fig. 3. Selected NOESY correlations of 8-*epi*-mikanokryptin (**1**).

of the ring lactone (Fig. 5). HMBC showed correlation of the hydrogens H-14a,b  $\delta_{\text{H}}$  4.13 (2H, d,  $J = 12.0$  Hz) with the carbons at  $\delta_{\text{C}}$  139.1 (C-10), at  $\delta_{\text{C}}$  127.5 (C-1), and at  $\delta_{\text{C}}$  30.9 (C-9), and the correlation of the hydrogens H-11 and H-13 with carbon at  $\delta_{\text{C}}$  51.5 (C-7) (Fig. 5). The *E*-configuration of the C(1)–C(10) double bond was defined by the observed NOESY correlation between H-1 and H-14 (Fig. 6), the syn relationship between H-7 and the H<sub>3</sub>-13 was determined by observing the NOESY between these hydrogens, and the observed NOESY interaction between H-8 and H-11 determined the *trans* fusion of the lactone. Additionally, interactions between H-1 and H-2 and H-14a; and H-5 with H-7, H-9 and H-2 were observed (Fig. 6). Therefore, this compound was designated as 11H $\beta$ -11,13-dihydromicrantholide (**2**). Considering the  $\alpha$  orientation of H-7 (as in all sesquiterpene lactones from Asteraceae of known absolute configuration), the most probable absolute configuration for **2** is that depicted in Fig. 1.

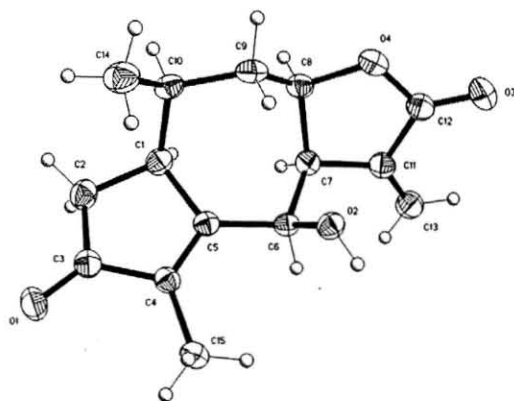


Fig. 4. X-ray ORTEP drawing of 8-*epi*-mikanokryptin (**1**) with atom labeling.

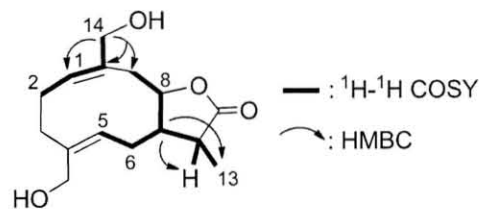


Fig. 5. Selected  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of 11H $\beta$ -11,13-dihydromicrantholide (**2**).

According to the above, sesquiterpene dilactones (**3**–**5**), guaianolides (**1**, **6**–**7**) and melampolides (**8**–**12**) were obtained mainly from the different populations of *M. micrantha* studied, and *M. cordifolia* only afforded the melampolides **2**, **8**–**13**. These findings provide evidence of the variability in the metabolic content of various populations of these species, and this variability could be correlated with their wide adaptability and distribution in different parts of the world.

### 3.2. Conformational analysis of the melampolides **2**, **8**–**13**

In order to determine the preferred conformation for compounds **2**, **8**–**13**, whose  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data closely resembled one another when allowance was made for the differences in the ester moieties, extensive NOE experiments with **9** were performed (due to the small amount and instability of the other melampolides). It is accepted that the germacra-1(10),4-dienolides may exist in four extreme conformations, and in particular, for the micrantholides these are: [ $^1\text{D}^{14}$ ,  $^{15}\text{D}_5$ ], [ $^1\text{D}^{14}$ ,  $^{15}\text{D}^5$ ], [ $^1\text{D}_{14}$ ,  $^{15}\text{D}^5$ ], and [ $^1\text{D}_{14}$ ,  $^{15}\text{D}_5$ ], as shown in Fig. 7 [34]. NOE experiments performed on compound **9** clearly showed interactions between H-6 $\alpha$  and H-5 and between H-15 and H-6 $\beta$  (Fig. 8); therefore, this analysis established a [ $^1\text{D}^{14}$ ,  $^{15}\text{D}_5$ ] conformation for **9** (Fig. 7) and this arrangement was confirmed by the observed interactions of H-4' and H-1 with H-14.

The relative minimum energies of four extreme conformers of 15-*O*-4'-hydroxy-methacryl-micrantholide (**9a**–**9d**) were calculated by Molecular Mechanics Methods (MM+) and comparison of the relative energies pointed out that the

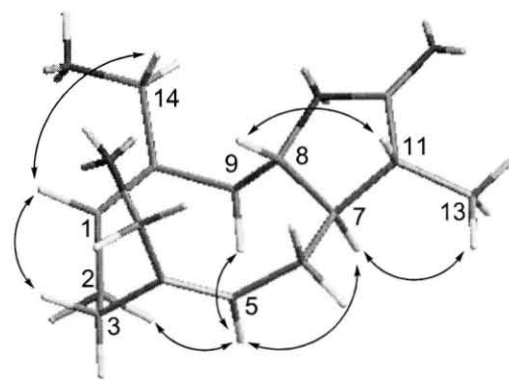


Fig. 6. NOESY correlations of 11H $\beta$ -11,13-dihydromicrantholide (**2**).

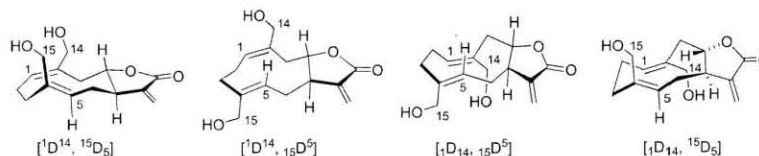


Fig. 7. Schematic representations for the four main conformations of micrantholide.

[ $^1\text{D}^{14}$ ,  $^{15}\text{D}_5$ ] arrangement was the most stable conformation (Fig. 9a), and this was in agreement with the observed NOESY correlations. From these results, and considering the close similarities in the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for the isolated melampolides, it could be inferred that the same conformation found for **9** was the preferred arrangement for the other micrantholides (**2**, **8**, **10–13**).

The preferred [ $^1\text{D}^{14}$ ,  $^{15}\text{D}_5$ ] conformation for micrantholides (**2**, **8–13**) was different from the [ $^1\text{D}_{14}$ ,  $^{15}\text{D}_5$ ] arrangement previously determined for 6 $\alpha$ -acetoxy-*cis*-1(10)-*trans*-4-germacradiene-11 $\alpha$ H-dihydro-8 $\beta$ ,12-olide, schkuhriolide (14-oxo-6 $\alpha$ -hydroxy-*cis*-1(10)-*trans*-4-germacradiene-8 $\beta$ ,12-olide) [25,40] and 8 $\alpha$ ,15-diacetoxy-14-hydroxy-*cis*-1(10)-*trans*-4-germacradiene-6 $\alpha$ ,12-olide [21]. This difference indicated that the C-8 $\beta$ - or C-6 $\alpha$  lactonic closure caused a change in the spatial arrangement of the melampolide, particularly for the diastereotopic orientation of the *cis*-C(1)-C(10) double bond. These results demonstrated that minor structural changes in the skeleton may result in major changes in the conformational preferences of the cyclodecadiene.

### 3.3. Biological assays

#### 3.3.1. Cytotoxic activities

The SLs **1**, **3–7**, **9**, **11** and **12** were tested *in vitro* as anti-proliferative agents in six human tumor cell lines, including

HCT-15 (colon), K562 (leukemia), U251 (glioblastoma), MCF-7 (breast), PC-3 (prostate), and SKLU-1 (lung) and we found that three cell lines (central nervous system glia, breast, and lung tumor cells) showed major responses. Their  $\text{IC}_{50}$  are summarized in Table 3.

A comparative analysis indicated that the antiproliferative potencies of these compounds may be mediated by specific structural features. The hydroxy group on C-6 of 8-*epi*-mikanokryptin (**1**) increased its potency in the three tumor cell lines (U251:  $7.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$ , MCF-7:  $5.8 \pm 0.4 \mu\text{M}$ , and SKLU-1:  $4.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ) compared to **6** (U251:  $9.5 \pm 0.8 \mu\text{M}$ , MCF-7:  $9.5 \pm 0.8 \mu\text{M}$ , and SKLU-1:  $7.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ) in the three tumor cell lines. The absence of the exocyclic double bond and the presence of an additional epoxide group in C(2)–C(3) for **3** decreased its activity (U251:  $7.5 \pm 0.7 \mu\text{M}$ , MCF-7:  $5.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$ , and SKLU-1:  $5.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ) when it is compared to **4** (U251:  $5.7 \pm 0.4 \mu\text{M}$ , MCF-7:  $2.9 \pm 0.06 \mu\text{M}$ , and SKLU-1:  $3.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ). On the other hand, the oxepin ring in **5** increased its activity in the cell lines U251 and SKLU-1 ( $2.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$  and  $1.9 \pm 0.1 \mu\text{M}$ , respectively) compared to **3** and **4**. The hydroxymethacrylate moiety in **9** conferred better activity in the three cell lines compared to **11** and **12**, which contained an isobutyrate moiety, with either an additional hydroxy group (**12**) or a chloro group (**11**). These results for the SLs of *Mikania* suggested that the double bonds, and sometimes the presence of an oxygen group or an  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactone group, made a significant contribution to the biological activity. Helenalin, a twofold Michael acceptor, was used as a positive control since it is a well known cytotoxic sesquiterpene lactone. Our results were similar to those reported for the melampolides isolated from *Mikania minima* [21] tested in different cancer cell lines.

#### 3.3.2. Anti-inflammatory activities

The anti-inflammatory activities of **1**, **3–6** and **9–12** were evaluated in the mouse ear model of edema induced by TPA. The inhibition percentages (using  $1 \mu\text{M}$  of compound) were 27.17, 9.94, 10.68, 7.97, and 12.40 for **1**, **3–6**, respectively, and for compounds **9–12** were 37.43, 35.48, 33.53, and 39.96, using indomethacin as positive control (83.73 % of inhibition). These results showed marginal inhibitory effects for **1**, **3–6** (in comparison with the control), although the micrantholides **9–12** displayed better activity.

## 4. Conclusions

Thirteen sesquiterpene lactones were isolated and identified from *M. micrantha* and *M. cordifolia* plants collected in Mexico. 8-*Epi*-mikanokryptin (**1**) and 11 $\beta$ -11,13-dihydromicrantholide

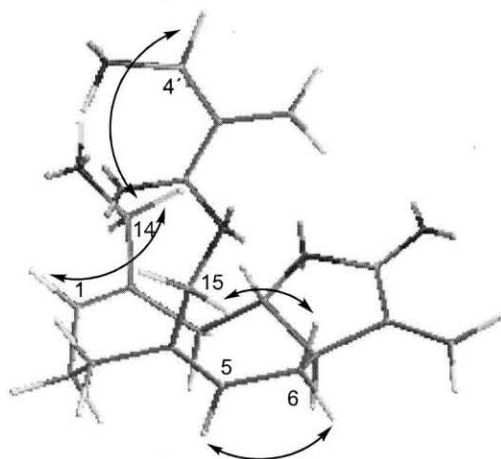


Fig. 8. Selected NOESY of 15-O-4'-hydroxy-methacryl-micrantholide (**9**).

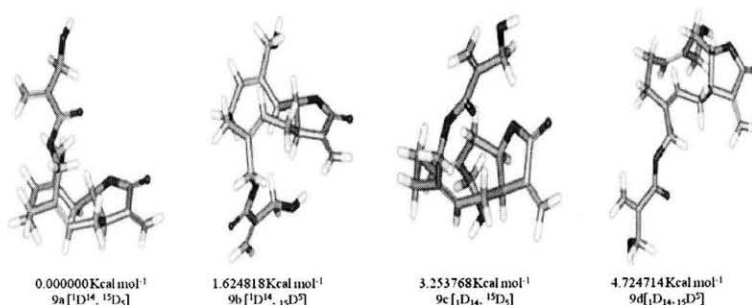


Fig. 9. MM + Minimum relative energy for the four extreme conformers of 15-O-4'-hydroxy-methacryl-micrantholide (9).

(2) represented new natural products.  $^1\text{H}$  NMR studies established the  $[\text{D}^{14}, \text{D}_3]$  conformation for the 14,15-dihydroxy-*cis*-1(10)-*trans*-4-germacradiene-8 $\alpha$ ,12-olides (micrantholides) of *Mikania* and this arrangement was confirmed by theoretical calculations. The majority of the SLs were evaluated as cytotoxic and anti-inflammatory agents, and they showed activity in the cytotoxicity tests that could be correlated with some structural features. The occurrence of sesquiterpene dilactones (3–5), guaianolides (1, 6–7) and melampolides (8–12) in different populations of *M. micrantha* and the variation in their relative proportions provided evidence of significant interpopulational changes in the metabolic content of this species, and this is in agreement with the recent analyses of the foliar volatile terpenoid blend [41]. This variability may correlate with its wide adaptability and broad distribution in different parts of the world. In comparison, the populations of *M. cordifolia* biosynthesized mainly the melampolides 2, 8–13, and the distribution of this species appeared to be more restricted. Nevertheless, the presence of sesquiterpene lactones in these species was in agreement with previous findings on the composition of species that belong to the *Mikania* section; in contrast, diterpenes are found mainly in the *Summikania* section [3,15,16]. Triterpenes and phytosterols appeared to be widespread in different *Mikania* species.

Table 3  
IC<sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) of some SLs of *Mikania*.

Compuesto	U251 <sup>a</sup>	MCF-7 <sup>b</sup>	SKLU-1 <sup>c</sup>
1	7.8 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 0.4	4.9 $\pm$ 0.3
3	7.5 $\pm$ 0.7	5.2 $\pm$ 0.5	5.4 $\pm$ 0.3
4	5.7 $\pm$ 0.4	2.9 $\pm$ 0.06	3.9 $\pm$ 0.2
5	2.1 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.1
6	9.5 $\pm$ 0.8	9.5 $\pm$ 0.8	7.6 $\pm$ 0.3
7	5.9 $\pm$ 0.4	7.0 $\pm$ 0.4	7.1 $\pm$ 0.4
9	7.2 $\pm$ 0.7	8.9 $\pm$ 0.7	6.9 $\pm$ 0.5
11	14.0 $\pm$ 1.2	14.4 $\pm$ 0.5	13.1 $\pm$ 1.2
12	16.9 $\pm$ 1.6	25.5 $\pm$ 1.4	22.1 $\pm$ 1.3
Helenalin <sup>d</sup>	0.43 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.02

<sup>a</sup> Central nervous system glia.

<sup>b</sup> Breast.

<sup>c</sup> Lung.

<sup>d</sup> Positive control. Results are means  $\pm$  s.e. for three replicates.

### Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### Acknowledgments

The authors thank Rocío Patiño, Antonio Nieto, Luis Velasco, Javier Pérez Flores, and Jimena Zulay Armas for their technical assistance. Financial supports from CONACyT (Project 102158), DGAPA-UNAM (Project PAPIIT 215511) and Programa de Posgrado en Ciencias Químicas-UNAM are gratefully acknowledged. This paper is dedicated to the memory of Professor Werner Herz (1921–2012).

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2014.02.006>.

### References

- Villaseñor JL, Espinosa FJ. Catálogo de malezas de México. México: UNAM y Fondo de Cultura Económica; 1998. p. 407.
- Rufatto LC, Gower A, Schwambach J, Moura S. Genus *Mikania*: chemical composition and phytotherapeutic activity. *Braz J Pharmacogn* 2012;22:1384–403.
- Aguilar A. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. México: IMSS; 1994. 52.
- Arias AR, Ferro E, Inchausti A, Ascurra M, Acosta N, Rodríguez E, et al. Mutagenicity, insecticidal and trypanomicidal activity of some Paraguayan Asteraceae. *J Ethnopharmacol* 1995;45:35–41.
- Serrano SM, Nogal JJ, Díaz MRA, Escario JA, Fernández AR, Barrio AG. In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *J Ethnopharmacol* 2000;71:101–7.
- Parker C. The *Mikania* problem. *PANS* 1972;18:312–5.
- Holmes WC. The genus *Mikania* (Compositae, Eupatorieae) in Mexico. *Sida Bot Misc* 1990;5:27–8.
- Zhang LY, Ye WH, Cao HL, Feng HL. *Mikania micrantha* H.B.K. in China—an overview. *Weed Res* 2004;44:42–9.
- Shao H, Peng S, Wei X, Zhang D, Zhang C. Potential allelochemicals from an invasive weed *Mikania micrantha* H.B.K. *J Chem Ecol* 2005;31:1657–68.
- Huang H, Ye W, Wu P, Lin L, Wei X. New sesquiterpene dilactones from *Mikania micrantha*. *J Nat Prod* 2004;67:734–6.
- Aguinaldo AM, Padolina WG, Abe F, Yamauchi T. Flavonoides from *Mikania cordata*. *Biochem Syst Ecol* 2003;31:665–8.
- Wei X, Huang H, Wu P, Cao H. Phenolic constituents from *Mikania micrantha*. *Biochem Syst Ecol* 2004;32:1091–6.
- Cuenca MR, Catalán CAN, Díaz JG, Herz W. Monoterpenes and lignanes from *Mikania saltensis*. *J Nat Prod* 1991;54:1162–4.
- Herz W, Kulanthai P. Diterpenes and sesquiterpene lactones from *Mikania congesta*. *Phytochemistry* 1985;24:1761–8.

- [15] Fabbri H, Rodríguez de Oliveira D, Vichnewski W, Herz W. Diterpenes of *Mikania lindbergii* baker. *Biochem Syst Ecol* 1997;25:562–4.
- [16] Herz W. Terpenoid chemistry of *Mikania* species. *J Indian Chem Soc* 1998;75:559–64.
- [17] Herz W, Subramaniam PS, Santhanam PS, Aota K, Hall AL. Structure elucidation of sesquiterpene dilactones from *Mikania scandens* (L.) Willd. *J Org Chem* 1970;35:1453–63.
- [18] Bakir M, Facey PC, Hassan I, Mulder WH, Porter RB. Mikanolide from Jamaican *Mikania micrantha*. *Acta Crystallogr C* 2004;60:798–800.
- [19] Cuenca MR, Bardon A, Catalán CAN. Sesquiterpene lactones from *Mikania micrantha*. *J Nat Prod* 1988;51:625–6.
- [20] Krautmann M, de Riscalá EC, Burgueño-Tapia E, Mora-Pérez Y, Catalán C, Joseph-Nathan P. C-15-funcionalized eudesmanolides from *Mikania campanulata*. *J Nat Prod* 2007;70:1173–9.
- [21] Barrero AF, Oltra JE, Rodríguez-García I, Barragán A, Álvarez M. Preparation, stereochemistry, and cytotoxic activity of the melampolides from *Mikania minima*. *J Nat Prod* 2000;63:305–7.
- [22] Gutiérrez A, Oberti JC, Sosa V, Herz W. Melampolides from *Mikania cordifolia*. *Phytochemistry* 1987;26:2315–20.
- [23] Arellano-Martínez R, Delgado G. Hypargyria A, a hemiacetalic germacrolide from *Viguiera hypargyrea* (Asteraceae). *J Mex Chem Soc* 2010;54:117–21.
- [24] León A, Reyes BM, Chávez MI, Toscano RA, Delgado G. Sesquiterpene lactones, acyl phenyl propanoids and other constituents from *Schkuhria pinnata* var. *wislizeni*. Antioxidant evaluation. *J Mex Chem Soc* 2009;53:193–200.
- [25] Delgado G, Tejeda V, Salas A, Chávez MI, Guzmán S, Bolaños A, et al. New melampolides from *Schkuhria schkuhrioides*. *J Nat Prod* 1998;61:1082–5.
- [26] Boeker R, Jakupovic J, Bohlmann F, Schmeda-Hirschmann G. Germacra-1,10Z,4E, dien-12,8 $\alpha$ -olides from *Mikania micrantha*. *Planta Med* 1987;53:105–6.
- [27] Castro V, Jakupovic J, Bohlmann F. Germacranolides from *Mikania* species. *Phytochemistry* 1989;28:527–30.
- [28] Sheldrick GM. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr C* 2008;64:112–22.
- [29] Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. Gaussian 09 (Revision A.02). Wallingford CT: Gaussian, Inc. 2009.
- [30] Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:757–66.
- [31] Carlson RP, O'Neill-Davis L, Chang J, Lewis A. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Agents Actions* 1985;17:197–204.
- [32] Oberti JC, Sosa V. Crystal structure and stereochemistry of achalensolide, a new guaianolide from *Stevia achalensis*. *J Org Chem* 1983;48:4038–43.
- [33] Castro V, Ciccio JF, Alvarado S, Bohlmann G, Schmeda-Hirschmann G, Jakupovic J. Decathieleanolid, ein dimeres Guaianolid aus *Decachaeta thieleana* Liebig. *Ann Chem* 1983;974–81.
- [34] Samek Z, Harmatha J. Use of structural changes for stereochemical assignments of natural  $\alpha$ -exomethylene  $\gamma$ -lactones of the germacra-1(10),4-dienolide type on the basis of allylic and vicinal couplings of bridgehead protons. Hydrogenation of endocyclic double bonds. *Collect Czech Chem Commun* 1978;43:2779–99.
- [35] Stöcklin W, Wadell TG, Geissman TA. Circular dichroism and optical rotatory dispersion of sesquiterpene lactones. *Tetrahedron* 1970;26:2397–409.
- [36] Cremer D, Pople JA. A general definition of ring puckering coordinates. *J Am Chem Soc* 1975;97:1354–8.
- [37] Siedle B, García A, Murillo R, Schulte-Monting J, Castro V, Rungeler P, et al. Quantitative structure–activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF- $\kappa$ B. *J Med Chem* 2004;47:6042–54.
- [38] Samek Z, Holub M, Drozd B, Grabarczyk H, Hladon B. Xerantholide—a new cytotoxically active sesquiterpenic lactone from *Xeranthemum cylindraceum*. *Collect Czech Chem Commun* 1977;42:2441–7.
- [39] Miski M, De Luengo H, Mabry T. Guaiane sesquiterpenes from *Decachaeta scabrella*. *Phytochemistry* 1987;26:199–200.
- [40] Delgado G, Guzmán S, Toscano RA. Studies on the chemical reactivity of *cis*-1(10)-*trans*-4-germacradienolides (Melampolides). Additional derivatives of schkuhriolide. *An Esc Nac Cienc Biol* 1994;39:109–18.
- [41] Bravo-Monzón AE, Guzmán S, Ríos VE, Delgado G, Espinosa G FJ. Chemical diversity among populations of *Mikania micrantha*: geographic mosaic structure and herbivory. *Oecologia* 2014;174:195–203.