



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Farmacia**

**Identificación de cumarinas en especies
autóctonas del género pterocaulon ell.**

Nº 311

Sebastián Barata Vallejo

Tutora: Silvia Laura Debenedetti

Departamento de Investigaciones
Julio 2010

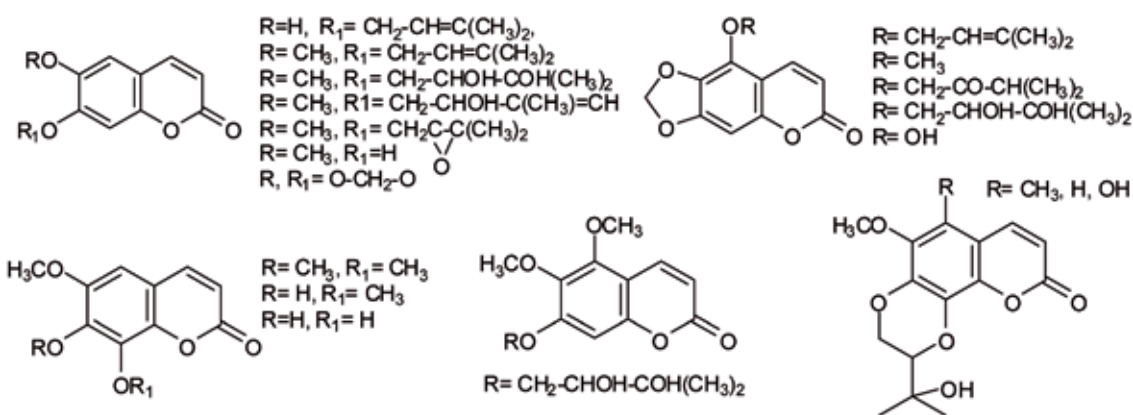
A mis abuelos, Amalia, Umberto, Negra y Nino

Resumen

El género *Pterocaulon* (Asteraceae) en Argentina está compuesto por 11 especies. La mayor parte de ellas tiene uso en la medicina tradicional como digestivas, para tratar úlceras y heridas, para mordedura de serpientes, en casos de insolación y para ahuyentar pulgas y moscas. Las pocas especies fitoquímicamente estudiadas presentan como característica particular la presencia de cumarinas di, tri y tetraoxigenadas, predominando las cumarinas con un grupo 6,7-metilendioxi. A partir de *P. polystachyum*, *P. virgatum* y *P. purpurascens* se aislaron e identificaron más de 10 cumarinas con nuevas estructuras. Dos de ellas 5-metoxi-6,7-metilendioxi y 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina demostraron una interesante actividad antiproliferativa y diferenciante sobre la línea promonocítica U-937. Por otra parte, al ser núcleos cumarínicos poco comunes pueden ser usados como marcadores quimio-taxonómicos. En el presente trabajo se analizan por cromatografía en capa delgada y cromatografía líquida de alta resolución los extractos diclorometánicos de nueve especies de *Pterocaulon* autóctonas de escasas o ninguna referencia fitoquímica y se identifican las cumarinas presentes en cada extracto contra 19 muestras patrones de cumarinas previamente aisladas e identificadas de las distintas especies de *Pterocaulon* estudiadas.

Especies estudiadas: *Pterocaulon alopecuroides* (Lam.) DC., *Pterocaulon angustifolium* DC., *Pterocaulon balansae* Chodat, *Pterocaulon cordobense* Kuntze, *Pterocaulon lanatum* Kuntze, *Pterocaulon lorentzii* Malme, *Pterocaulon polypterum* (DC.) Cabrera, *Pterocaulon polystachyum* DC., *Pterocaulon purpurascens* Malme, *Pterocaulon rugosum* (Vahl) Malme.

Muestras patrones utilizadas:



Las cumarinas presentes en cada uno de los extractos de las nuevas especies estudiadas serán identificadas según sus tiempos de retención relativos ($T_{RR'}$, HPLC), relaciones de frente (R_f , ccd), y co-inyecciones (spikes, HPLC) de las muestras patrones disponibles. En el presente trabajo se correlacionan por primera vez los patrones de oxigenación cumarínicos de las nuevas especies del género *Pterocaulon*.

Agradecimientos

Agradezco a la Prof. Dra. Silvia L. Debenedetti por dirigir este trabajo de investigación, por su confianza, cariño y soporte brindado.

Agradezco al Prof. Dr. Alberto Postigo por codirigir este trabajo, su permanente disposición, confianza en mi persona y en el tema de investigación.

Deseo agradecer también:

A la Dra. Norma S. de Nudelman del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, por permitirme realizar los análisis por HPLC y técnicas espectroscópicas.

Al Lic. Cristian Rodríguez por su colaboración en la realización de los espectros de RMN y MS.

A la Dra. Raquel Goldberg por sus consejos, apoyo y especial ayuda en la realización de los espectros U.V.

A la Dra. Etilde D. Spegazzini por su colaboración en la determinación taxonómica del material botánico utilizado.

A la Dra. Erica Wilson por su colaboración con en análisis por HPLC.

A la Dra. Gilsane Lino von Poser de la Universidad Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, por facilitarme gran parte del material botánico utilizado en este trabajo.

A la Lic. Elida Matus y a la Prof. Analia Garrido por guiar mis primeros pasos en el camino de la ciencia.

A los docentes y personal administrativo de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Belgrano.

Agradezco muy especialmente:

A mis padres, Mario y Cristina, por su confianza, esfuerzo para mi formación profesional y su amor incondicional.

A mis abuelos, Amalia, Umberto, Negra y Nino, por su constante aliento, amor y ejemplo de vida.

A mis hermanos, Ana Julia y Santiago.

A Elsa y Mirta por su cariño y compañía desde siempre.

A Nora, Carlos, Adriana y Alan, por su afecto y contención durante mis primeros años en Buenos Aires y por su cariño permanente.

A Humberto, por su confianza, permitiéndome realizar mi primera experiencia laboral.

A Chiche y Lucio, Nora y Bernardo, Silvina y Juan Carlos, por ser mis segundas familias.

A Pato, Fran, Marita, Mechi, Viqui y Agustín, por su autenticidad y amistad incondicional.

A todos aquellos que con afecto, apoyo, compañía y comprensión, acompañaron mis días. A quienes de una manera u otra contribuyeron indispensablemente en mi formación personal y profesional. A aquellos que con una sonrisa hicieron más llevadero el camino. A los que confiaron en mí y espero no haber defraudado. A todos y cada uno de ellos, GRACIAS.

5.6.- <i>Pterocaulon lorentzii</i>	56
5.7.- <i>Pterocaulon polypterum</i>	58
5.8.- <i>Pterocaulon polystachyum</i>	59
5.9.- <i>Pterocaulon purpurascens</i>	61
5.10.- <i>Pterocaulon rugosum</i>	63
5.11.- Distribución de los patrones de oxigenación cumarínicos en las distintas especies	64
5.12.- Aislamiento de la 6,7,8-trimetoxicumarina	65
5.13.- Aislamiento de la isofraxidina	66
6.- CONCLUSIONES	66
7.- REFERENCIAS	68
APÉNDICE 1: Fórmulas y cálculos de errores	70
APÉNDICE 2: Acrónimos	72
APÉNDICE 3: Nomenclatura IUPAC de las cumarinas utilizadas como testigo	72
APÉNDICE 4: Cromatogramas por HPLC	74
1.- 6,7,8-trimetoxicumarina	74
2.- Fraxetina	75
3.- Escopoletina	76
4.- Isofraxidina	77
5.- 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina	78
6.- 5-hidroxi-6,7-metilendioxicumarina	79
7.- 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina	80
8.- Purpurasolol	81
9.- 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-5,6-dimetoxicumarina	82
10.- Ayapina	83
11.- Purpurasol	84
12.- Virgatenol	85
13.- Purpureol	86
14.- 7-(3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina	87
15.- 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina	88
16.- Preniletina	89
17.- 5-(3-metil-2-oxobutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina	90
18.- 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina	91
19.- 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina	92
20.- <i>Pterocaulon alopecuroides</i>	93
21.- <i>Pterocaulon angustifolium</i>	94
22.- <i>Pterocaulon balansae</i>	95
23.- <i>Pterocaulon cordobense</i>	96
24.- <i>Pterocaulon lorentzii</i>	97
25.- <i>Pterocaulon polypterum</i>	98
26.- <i>Pterocaulon polystachyum</i>	99
27.- <i>Pterocaulon purpurascens</i>	100
28.- <i>Pterocaulon rugosum</i>	101
APÉNDICE 5: Datos espectroscópicos	102
1.- 6,7,8-trimetoxicumarina	102
2.- Isofraxidina	103

Listado de Figuras

3.1	Unidades de prenilo que sustituyen al anillo aromático	29
3.2	Unidades de prenilo que sustituyen a un oxígeno fenólico	30
3.3	Ciclizaciones oxidativas de cumarinas 8- y 6- alquiladas.....	31
3.4	Mecanismo biosintético de escopoletina e hidrangetina	37
4.1	<i>Pterocaulon alopecuroides</i>	41
4.2	<i>Pterocaulon angustifolium</i>	41
4.3	<i>Pterocaulon balansae</i>	42
4.4	<i>Pterocaulon cordobense</i>	42
4.5	<i>Pterocaulon lorentzii</i>	42
4.6	<i>Pterocaulon polypterum</i>	42
4.7	<i>Pterocaulon polystachyum</i>	43
4.8	<i>Pterocaulon purpurascens</i>	43
4.9	<i>Pterocaulon rugosum</i>	43
5.1	Hidrólisis ácida de 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxycumarina	56

Listado de Tablas

1.1	Ejemplos de principios activos con uso medicinal	11
3.1	Cumarinas 7-oxigenadas	18
3.2	Cumarinas 6,7-dioxigenadas	18
3.3	Otras cumarinas 6,7-dioxigenadas	20
3.4	Cumarinas 5,6,7-trioxigenadas	20
3.5	Otras cumarinas 5,6,7-trioxigenadas	21
3.6	Cumarinas 6,7,8-trioxigenadas	22
3.7	Otras cumarinas 6,7,8-trioxigenadas	23
3.8	Cumarinas 5,6,7,8-tetraoxigenadas	23
4.1	Programa de elución de solventes.....	45
5.2	Tiempos de retención (HPLC) relativos promedio (t_{RR}) determinados para las cumarinas usadas como testigos	47
5.2	Relaciones de frente (R_p por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas utilizadas como testigos	48
5.3	Tiempos de retención (HPLC) relativos promedio (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. alopecuroides</i> y su asignación a los testigos correspondientes ..	49
5.4	Relaciones de frente (R_p por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. alopecuroides</i> y su asignación a los testigos correspondientes.....	50
5.5	Tiempos de retención (HPLC) relativos promedio (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. angustifolium</i> y su asignación a los testigos correspondientes....	51
5.6	Relaciones de frente (R_p por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. angustifolium</i> y su asignación a los testigos correspondientes.....	51
5.7	Tiempos de retención (HPLC) relativos promedio (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. balansae</i> y su asignación a los testigos correspondientes	52
5.8	Relaciones de frente (R_p por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. balansae</i> y su asignación a los testigos correspondientes .	53
5.9	Tiempos de retención (HPLC) relativos promedio (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. cordobense</i> y su asignación a los testigos correspondientes.....	54
5.10	Relaciones de frente (R_p por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. cordobense</i> y su asignación a los testigos correspondientes.....	55
5.11	Tiempos de retención (HPLC) relativos promedio (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. lorentzii</i> y su asignación a los testigos correspondientes	56
5.12	Relaciones de frente (R_p por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. lorentzii</i> y su asignación a los testigos correspondientes....	57
5.13	Tiempos de retención (HPLC) relativos promedio (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. polypterum</i> y su asignación a los testigos correspondientes	58
5.14	Relaciones de frente (R_p por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. polypterum</i> y su asignación a los testigos correspondientes.....	58
5.15	Tiempos de retención (HPLC) relativos promedio (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. polystachyum</i> y su asignación a los testigos correspondientes...	59
5.16	Relaciones de frente (R_p por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. polystachyum</i> y su asignación a los testigos correspondientes.....	60
5.17	Tiempos de retención (HPLC) relativos promedio (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. purpurascens</i> y su asignación a los testigos correspondientes...	61
5.18	Relaciones de frente (R_p por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. purpurascens</i> y su asignación a los testigos correspondientes.....	62
5.19	Tiempos de retención (HPLC) relativos promedio (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. rugosum</i> y su asignación a los testigos correspondientes.....	63
5.20	Relaciones de frente (R_p por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de <i>P. rugosum</i> y su asignación a los testigos correspondientes ..	63

5.21 Número de cumarinas identificadas en cada patrón de oxigenación y su porcentual relativo en el extracto total según el presente trabajo	64
5.22 Correlación entre las especies del género <i>Pterocaulon</i> estudiadas por otros autores y los patrones de oxigenación observados	65

1.- Introducción

La búsqueda de nuevos medicamentos y de estructuras moleculares novedosas con fines terapéuticos se ha incrementado considerablemente en los últimos años. La existencia de enfermedades para las cuales no existen medicamentos efectivos, la resistencia de los agentes patógenos, los avances en las técnicas de biología molecular que han propiciado la identificación de un número cada vez mayor de moléculas “blanco” y la correlación de anomalías estructurales y funcionales a nivel de receptores y canales iónicos con diferentes patologías, son algunos de los factores que han acuciado el interés en la búsqueda de nuevos fármacos capaces de ejercer acciones específicas y potentes. Tal búsqueda, que puede llamarse *prospección química*, ha resultado muy exitosa, particularmente en lo que se refiere al descubrimiento de sustancias aplicables a la medicina. Muchas de las drogas con efectos terapéuticos más importantes provienen de la naturaleza o son sintetizadas por el hombre imitando productos naturales. Una considerable cantidad de estos productos fue hallada siguiendo pistas dejadas hace mucho tiempo por pueblos que descubrieron las propiedades benéficas de plantas y animales.

Entre más de 260.000 especies diferentes de plantas superiores que crecen en nuestro planeta, se calcula que solo el 10% ha sido química o biológicamente estudiada. Por esta razón es necesario poner de manifiesto que varias sustancias nuevas de actividad biológica comprobable podrán ser descubiertas, constituyendo una importante contribución, directa o indirecta, a la terapéutica moderna y a las industrias relacionadas. En nuestros días, el 35% de los medicamentos contienen principios activos de origen natural. Los productos naturales poseen una gran diversidad estructural y, además, muchos son relativamente pequeños y tienen propiedades similares a las de los fármacos, es decir, pueden ser absorbidos y metabolizados. La mayoría de los bioactivos de origen natural pueden ser obtenidos como parte de una familia de moléculas relacionadas; de tal forma es posible obtener un gran número de homólogos y precisar así la información sobre estructura-actividad. Por otra parte, los compuestos líderes obtenidos a partir de fuentes naturales pueden ser optimizados por la química tradicional o con el empleo de enfoques combinatorios. A pesar de los grandes progresos científicos y técnicos en la química combinatorial, en la actualidad, las drogas derivadas de los productos naturales todavía hacen una enorme contribución en el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos.

Solo en el campo de los anticancerígenos, podemos señalar que, en un análisis del número de agentes quimioterápicos y de sus fuentes de obtención, se indica que más del 60% de las drogas aprobadas derivan de compuestos naturales. La introducción de compuestos activos derivados de fuentes naturales dentro del arsenal de drogas antitumorales y antileucémicas ha cambiado la historia de muchos tipos de cáncer humanos.

Teniendo en cuenta que muchas de las drogas que se comercializan actualmente derivan de productos naturales y que éstos han servido como excelentes “compuestos líderes” o “cabeza de serie” la búsqueda de nuevas estructuras naturales a partir de plantas medicinales continúa siendo ampliamente usada como método para encontrar nuevas moléculas. Así mismo, los productos naturales nos ofrecen no solo la oportunidad de evaluar clases químicas totalmente novedosas como agentes terapéuticos sino también mecanismos de acción nuevos y potencialmente relevantes.

Las investigaciones que se han llevado adelante durante varios años en los países industrializados, muestran que uno o varios principios activos presentes en plantas superiores se encuentran en el 25% de las medicinas prescritas. Ya en 1980, el mercado mundial de medicamentos a base de productos naturales había sido estimado en 8 mil millones de dólares (Farnsworth, 1977; Príncipe 1989; Wijsekera, 1991). Hoy se estima que ha crecido a razón del 10% anual, manteniendo un pronóstico de crecimiento sostenido para los próximos años.

Existe una innumerable cantidad de ejemplos de principios activos naturales utilizados en terapéutica (ver tabla 1.1) y es cada vez más frecuente el empleo de productos naturales en la agroquímica.

Tabla 1.1: Ejemplos de principios activos con uso medicinal.

Principio Activo	Clase terapéutica	Especie vegetal
Artemisinina	Antimalárico	<i>Artemisia annua</i> L.
Atropina	Anticolinérgico	<i>Atropa belladonna</i> L.
Colchicina	Antirreumático	<i>Colchicum autumnale</i> L.
Digoxina/digitoxina	Tónicos cardíacos	<i>Digitalis purpurea</i> L. , <i>D. lanata</i> Ehrhart
Escopolamina	Antiparkinsoniano	<i>Datura</i> spp.
Estrofantina (ouabaína)	Tónico cardíaco	<i>Estrophantus</i> spp.
Fisostigmina	Antiglaucomatoso	<i>Physostigma venenosum</i> Balf.
Morfina/codeína	Analgésico/antitusivo	<i>Papaver somniferum</i> L.
Pilocarpina	Antiglaucomatoso	<i>Pilocarpus jaborandi</i> Colmes
Quinina	Antimalárico	<i>Cinchona</i> spp.
Reserpina	Anti-hipertensivo	<i>Rawolfia</i> spp.
Tubocurarina	Bloqueante neuro-muscular	<i>Chondodendrum tomentosum</i> Ruiz y Pavon
Vinblastina/vincristina	Antitumoral	<i>Catharanthus roseus</i> G. Don

Principios activos como el taxol, empleado en tratamiento de tumores, son de más reciente aplicación y muchos otros se encuentran en estudios avanzados como la hipericina (naftodiantrona) del *Hypericum perforatum* con potencial aplicación como antiviral (Weber y col., 1994). Si se miran los productos naturales en un contexto más amplio, varios grupos importantes de medicinas sintéticas tienen su origen en los productos naturales: la cocaína ha servido como modelo para anestésicos locales; una serie de parasimpaticolíticos han derivado de la atropina y una serie de analgésicos de la morfina.

Un estudio realizado en 1985, que recibió apoyo de la Organización Mundial de la Salud, identificó que 119 sustancias (aisladas de 90 plantas superiores) actualmente empleadas en terapéutica, aún se extraen de las plantas.

Innumerables productos naturales están aún por ser descubiertos; entre ellos, compuestos con estructuras moleculares que no podrían haber sido predichas, por ejemplo, la *ivermectina* (Ramos-E-Silva y De Moura, 2002), aislada de un hongo del Japón, es uno de los antihelmínticos más eficaces que existen, que fue recientemente descubierto y genera ventas por alrededor de mil millones de dólares anuales a la compañía que la produce. Lo mismo ocurre con la *ciclosporina* y con el *FK 50* (Weiwad y col., 2006) sustancias provenientes de hongos que suprimen la respuesta inmune utilizadas para evitar el rechazo de órganos transplantados, y para el *taxol*, conocido agente antitumoral extraído de un árbol del noroeste de los Estados Unidos (Wu y col., 2007), el tejo (*Taxus baccata*). No existen maneras de predecir lo que encontrará la prospección química, pero se tiene la certeza de que la búsqueda rendirá sus frutos, ya que la mayor parte de las especies, especialmente las especies autóctonas, nunca han sido estudiada químicamente.

Este creciente interés de la industria farmacéutica y agroquímica en la obtención de nuevos productos que impliquen un menor riesgo en la salud y en el medio ambiente, ya sea por el aumento de la eficacia, disminución de efectos colaterales, disminución de toxicidad etc. ha determinado que más de 200 compañías, la mayoría de ellas en el hemisferio Norte, están intentando obtener productos farmacéuticos derivados de plantas.

Más de 1000 especies autóctonas tienen registro de uso en la medicina tradicional argentina, sin embargo existen pocos estudios farmacobotánicos, fitoquímicos o farmacológicos referidos a las mismas. Es importante rescatar este conocimiento y estudiar algunas de estas especies desde el punto de vista integral botánico, fitoquímico y de sus actividades biológicas, buscando nuevas moléculas líderes, a partir de las cuales puedan desarrollarse drogas útiles para la terapéutica y a la vez validar sus usos medicinales a través del estudio de sus actividades biológicas. (Parejo y col., 2004; Pieters y Vlietinck, 2005)

La búsqueda de nuevas moléculas a partir de plantas medicinales constituye un camino en el descubrimiento de nuevas drogas y/o moléculas líderes que sirvan de base para desarrollar nuevos agentes terapéuticos o agroquímicos.

El género *Pterocaulon* (Asteraceae) está ampliamente distribuido en Norte y Sudamérica. De las 18 especies del género (Cabrera y Ragonese, 1978), 11 están registradas como medicinales utilizadas por distintos grupos étnicos. En la Argentina este género está representado por 11 especies (Zuloaga y Morrone, 1999) de las cuales 7 han sido utilizadas en la medicina tradicional y solo 6 (*P. alopecuroides*, *P. balansae*, *P. lanatum*, *P. polystachyum*, *P. purpurascens* y *P. virgatum*) han sido parcialmente investigadas en su composición fitoquímica (Maes y col., 2006).

La mayoría de los trabajos publicados de análisis fitoquímico referidos al género *Pterocaulon*, hacen referencia al aislamiento de cumarinas. Estos compuestos presentan una extensa variedad de acciones farmacológicas destacándose entre ellas la de anticoagulante, estrogénica, antiproliferativa, diferenciante, fotosensibilizante, antiinflamatoria, antimicrobiana, antihelmíntica, vasodilatadora, moluscicida, sedativa, hipnótica, analgésica y antipirética (Hoult y Payá, 1996; Ojala, 2001; Riveiro y col., 2004).

Conociendo las amplias acciones farmacológicas que presentan las cumarinas simples y la presencia de estas cumarinas en especies del género *Pterocaulon*, resulta sumamente interesante identificar por métodos cromatográficos las cumarinas presentes en las especies autóctonas de este género.

Contribuir con el estudio fitoquímico de nuestra flora como fuente potencial de nuevos productos, se hace imprescindible, no solo para aportar desde nuestra aérea nuevas estructuras bioactivas o nuevas fuentes de obtención de algunas ya conocidas, sino como forma de salvaguardar el conocimiento tradicional y la biodiversidad de las especies.

2.- Objetivos

1. Detectar por cromatografía (HPLC y ccd) las cumarinas presentes en las especies *Pterocaulon alopecuroides* (Lam.) DC., *P. angustifolium* DC., *P. balansae* Chodat, *P. cordobense* OK., *P. lorentzii* Malme, *P. polypterum* (DC.) Cabrera, *P. polystachyum* DC., *P. purpurascens* Malme, *P. rugosum* (Vahl) Malme, e identificarlas por comparación (t_{RR} y R_f) con 19 cumarinas testigos cuya elucidación estructural ha sido previamente informada
2. Aislar e identificar las cumarinas mayoritarias presentes en la especie *Pterocaulon purpurascens* Malme.
3. Relacionar los patrones de oxigenación de las cumarinas identificadas en las distintas especies estudiadas.

3.- Antecedentes

3.1.- Antecedentes del género *pterocaulon* ell.

3.1.1.- Antecedentes etnobotánicos

El nombre del género *Pterocaulon* proviene del griego *Pteros*= alas y *caulon*= tallos, aludiendo a los tallos alados que posee. Este género pertenece a la familia *Asteraceae* y dentro de ella a la tribu *Plucheeae* (Anderberg, 1991). Fue creado por Elliot en 1823 para una especie de *Conyza* del sur de los Estados Unidos. Posee un área geográfica bicéntrica que lo hace sumamente interesante como ejemplo de este tipo de distribución (Cabrera y Ragonese, 1978). Este género está dividido en 18 especies: 12 de ellas son americanas, extendiéndose desde el sur de los Estados Unidos hasta el centro de Argentina y 6 especies australianas, algunas se extienden a Nueva Caledonia, Indonesia y al sudeste de Asia. Este género está ausente en Europa, África, la mayor parte de Asia, Polinesia y Nueva Zelanda. También falta en las regiones templadas y frías de América.

Distribución geográfica de las especies de *Pterocaulon*

Para estudiar su distribución geográfica (Cabrera y Ragonese, 1978) resulta conveniente clasificar las especies de este género en americanas y no americanas.

De las 18 especies existentes 11 están registradas en bibliografía como medicinales usadas por distintos grupos étnicos.

Especies no Americanas***Pterocaulon niveum* Cabr.**

Especie endémica del norte de Australia en las regiones de Kimberley (Western Australia) y Arnhem Land (Northern Territory). Vegeta en laderas graníticas con sabanas de gramíneas.

***Pterocaulon redolens* (Willd.) F. Villar¹**

Especie con caracteres de maleza hallada en el sudeste de Asia: India, Camboya, China, Tailandia, Laos, Camboya y Vietnam; en Filipinas, Nueva Guinea, Papua, Nueva Caledonia y Australia.

***Pterocaulon serrulatum* (Montr.)²**

Ejemplar hallado en Australia y Nueva Caledonia.

Pterocaulon sphacelatum* (Labill)

Frecuente en Indonesia, Nueva Caledonia y Australia.

***Pterocaulon spherantoides* De Candolle**

Hallado únicamente en el oeste de Australia.

***Pterocaulon verbascifolium* (Muell. Ex Benth.), Bentham et Hooker ex Mueller**

Frecuente en suelos arenosos y rocosos del oeste de Australia, en el Northern Territory y en Queensland. Hallado también en Java y en las Islas Menores de Sonda.

Especies Americanas***Pterocaulon alopecureioides* (Lam.) De Candolle***

Se encuentra en las regiones cálidas del continente Americano, desde Cuba y otras islas del Caribe hasta el centro de la Argentina. Vegeta preferentemente en sabanas. En el nordeste de la Argentina esta especie tiene características de planta invasora, siendo muy frecuentemente encontrada a los costados de caminos y vías férreas.

Pterocaulon angustifolium* De Candolle

Esta especie se encuentra en los campos del sur de Brasil desde Sao Paulo a Rio Grande do Sul, Paraguay, Uruguay y nordeste de Argentina desde Misiones a Entre Ríos.

***Pterocaulon balansae* Chodat**

Vegeta en el Sur de Brasil, desde Minas Geraes a Rio Grande do Sul, Paraguay, Uruguay y norte de Argentina en Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Tucumán, Córdoba y Buenos Aires. Su límite austral aparentemente está en Punta Lara (Argentina). Vegeta en suelos arenosos húmedos, bordes de selva, etc.

***Pterocaulon cordobense* O. Kuntze**

Esta especie habita en campos del extremo sur de Brasil, Uruguay, y noreste y centro de Argentina.

***Pterocaulon lanatum* O. Kuntze**

Especie distribuida por el sudeste de Bolivia, en los Departamentos de Beni y Santa Cruz, y por el Paraguay, en la Sierra de Amambay y en las serranías del centro del país. Hallada una sola vez en Argentina en la provincia de Salta.

1. Utilizada por distintos grupos étnicos

2. Utilizada por distintos grupos étnicos

***Pterocaulon lorenzii* Malme³**

Vegeta en el sur de Brasil, desde Sao Paulo a Rio Grande do Sul, en el sudeste de Bolivia, en Paraguay, Uruguay y nordeste de Argentina hasta el Río de la Plata. También ha sido coleccionada en Tucumán. Es muy característica de dunas y suelos arenosos, hallándose también en suelos secos y en palmares de *Butia yatay*.

***Pterocaulon polypterum* (DC.) Cabrera**

Encontramos esta especie en el sur de Brasil, en los estados de Santa Catarina y Rio Grande do Sul, norte del Uruguay y provincias de Misiones y Corrientes en la Argentina.

Pterocaulon polystachyum* De Candolle

Vive en campos fértiles del sur de Brasil, en el Estado de Rio Grande do Sul, en el Paraguay, en el Uruguay y en el nordeste de la Argentina en las provincias de Formosa, Misiones, Chaco, Santa Fe, Corrientes y Entre Ríos.

Pterocaulon purpurascens* Malme

Especie característica de la provincia fitogeográfica del Chaco, frecuente en suelos gredosos algo salobres del Paraguay y norte de la Argentina. Hallada también en Bolivia y Brasil.

Pterocaulon pycnostachyum* (Michx.) Elliott.

Vegeta en pinares, suelos modificados y lugares arenosos del sudeste de los Estados Unidos, en los estados de Mississippi, North Carolina, South Carolina, Georgia y Florida.

Pterocaulon rugosum* (Vahl) Malme

Vegeta en sabanas de América del Sur cálida : Venezuela, Colombia, Brasil, Paraguay y norte de Argentina hasta Córdoba y Entre Ríos.

Pterocaulon virgatum* (L.) De Candolle

Esta especie se encuentra desde el estado de Texas (Estados Unidos) y México, por las Antillas y Honduras. Reaparece en el sur de Brasil, Bolivia, Paraguay, Uruguay y norte de la Argentina hasta Buenos Aires. Vegeta en campos, preferentemente en suelos sueltos. La localidad típica es Jamaica.

3.1.2.- Antecedentes etnofarmacológicos

Once especies del género *Pterocaulon* (Americanas y no Americanas), han sido utilizadas con fines medicinales.

Las especies de *Pterocaulon*, conocidas en el sur de Brasil como “quitoco” fueron empleadas en el tratamiento de enfermedades de la piel popularmente conocidas como “micosis” en animales, cuya etiología puede ser bacteriana o fúngica (Stein y col., 2006).

Pterocaulon alopecureioides

Martinez Crovetto en 1964, la menciona como remedio usado por los indios tobas del este del Chaco para curar granos, su decocción se bebe para las purgaciones, como antiblenorrágico y para la piel y otros hongos. El mismo autor en 1965 agrega que los indios Vilelas del Chaco usan esta especie para curar el reumatismo, aplicando sobre el lugar dolorido del cuerpo, las hojas enrolladas y secadas al sol a las que se prende fuego hasta que la quemadura alcanza la piel. En 1981, señala además, que el té de las hojas es hepático y que la decocción de la planta se aplica externamente para lavar granos, heridas y picaduras.

Cabrera y Ragonese en 1978 la citan como planta medicinal usada en forma de baños y pediluvios contra la fiebre intermitente.

Tousarkissian en 1980 señala que es usada como cicatrizante y antiartrítica. Finalmente Zardini en 1984 en su estudio sobre la “Etnobotánica de las Compuestas Argentinas con Especial Referencia a su uso Farmacológico” toma algunos de los autores anteriores complementando con referencias de uso del Paraguay y le atribuye propiedades anticefálgicas, aromáticas, astringentes, béquicas, diuréticas e insecticidas.

Schmeda-Hirschmann y Rojas de Arias en 1992, también mencionan esta especie como insecticida y vermífuga.

3. Utilizada por distintos grupos étnicos

Pterocaulon angustifolium

Martinez Crovetto en 1981, menciona los mismos usos que para *P. alopecureioides*, el té de las hojas es hepático y la decocción de la planta se aplica externamente para lavar granos, heridas y picaduras.

Pterocaulon lorentzii

Martinez Crovetto en 1964 y 1981 le atribuye propiedades antiblenorrágicas, antifúngicas y para la piel, curativa de granos, heridas y picaduras; señalando además que es usada su decocción para el lavado de bichera de caballos para matar a los gusanos. Tousarkissian, 1980 y Zardini, 1983, también la menciona con las mismas propiedades.

Pterocaulon pycnostachyum

Cabrera y col. en 1978 dicen que la raíz ha sido usada como alterativo y para limpiar viejas úlceras. Krag en 1976 señala que la infusión de la raíz es utilizada por indios de Norteamérica como emenagogo y abortifaciente.

Pterocaulon polystachyum

Cabrera en 1978 dice que debido a su olor muy fuerte los campesinos le atribuyen la propiedad de ahuyentar pulgas y moscas.

Martinez Crovetto en 1981 menciona que su decocción es usada para lavar la cabeza en casos de insolación.

Palacios y col. en 1999, Ciccía y col. en 2000, y Vera y col. en 2001 también señalan el uso de infusiones o decocciones de esta planta como repelente de moscas y pulgas.

Stein y col. en 2006 también hacen referencia al uso tradicional de esta planta para el tratamiento de micosis en animales.

Frainer Knoll y col. en 2006 señalan que la infusión de las hojas de esta planta es utilizada en Brasil para tratar problemas digestivos.

Pterocaulon purpurascens

Arenas en 1983 describe los usos que le daban a esta planta los indígenas Maka del Chaco boreal, diciendo que es utilizada en forma externa cuando la oveja o el caballo se agusanan, mascando las hojas hasta formar una pasta, ésta es colocada a la manera de un emplastro sobre la parte afectada o se introduce en el orificio provocado por el insecto. También hace referencia a que es usada para calmar dolores de dientes, introduciendo dentro de la caries una porción de la pasta de la hoja.

Debenedetti y col. en 1991 y 1992 hacen referencia al uso de esta especie como insecticida y contra picaduras de serpiente. Ciccía y col. en 2000 también señalan el uso de esta planta contra las picaduras de serpiente y repelente de moscas.

Filipoy en 1994 también le atribuye su uso contra picaduras de serpiente.

Pterocaulon redolens

Kanlayavattanakul y col. en 2003 citan el uso popular de esta especie en Tailandia como insecticida y agente contra picaduras de serpientes.

Pterocaulon rugosum

Al igual que las otras especies Martinez Crovetto en 1981 menciona que su decocción es usada para lavar granos heridas y picaduras y que el té de sus hojas es usado como hepático.

Pterocaulon serrulatum

O'connell y col. en 1983, señalan que esta planta es usada en el centro de Australia por los Alyawara en forma de emplastro o lavados para el tratamiento de resfríos y otras afecciones respiratorias. Semple y col. en 1999 también citan el uso de esta planta para el tratamiento de la fiebre, jaquecas y lesiones de la piel.

Pterocaulon sphacelatum

Esta especie ha sido usada por poblaciones aborígenes de varias regiones de Australia para el tratamiento de resfríos, fiebre, jaquecas, y lesiones de la piel (Semple y col. 1999).

Pterocaulon virgatum

Sorarú y Bandoni en 1978 señalan a esta planta como una hierba digestiva. En 1981, Arenas señala que sus hojas y ramas son empleadas como contraveneno de la mordedura de la víbora coral. También

Arenas en 1983 dice que la planta es utilizada cuando la oveja o el caballo se agusanan, se mascan las hojas hasta formar una pasta, ésta es colocada a la manera de un emplasto sobre la parte afectada o se introduce en el orificio provocado por el insecto; también hace referencia a que es usada para calmar dolores de dientes, introduciendo dentro de la caries una porción de la pasta de la hoja.

Zardini en 1984, recoge información de Bandoni de 1972 donde le atribuye un uso como emenagoga e insecticida en uso externo y la de Martínez Crovetto de 1981 donde habla del uso de la decocción en forma externa para lavar granos heridas y picaduras

Boelcke en 1981 la menciona como emenagoga, insecticida, etc. Este uso como emenagoga también es consignado por Amat en 1983, donde agrega que esta especie es también usada como diurética.

En el "Inventario de Plantas Medicinales do Stado de Bahía" es citado el uso de sus raíces en infusiones diuréticas.

Penso en 1978 en su "Inventario de Plantas Medicinales usadas en los diferentes países" menciona que la decocción de toda la planta se ha preconizado con éxito para curar la gonorrea.

Debenedetti y col. en 1994^A señalan es uso de esta especie contra picaduras de serpiente, emenagoga e insecticida.

3.1.3.- Antecedentes de actividad biológica

Pterocaulon alopecureioides

Fournet y col. en 1994 ensayaron la actividad antileishmánica y antitripanosómica de esta especie, obteniendo resultados favorables contra *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani* y *Trypanosoma cruzi* en extractos etanólico (100 µg/mL) y acetato de etilo (100 µg/mL) de plantas enteras secas.

Stein y col. en 2005 demostraron la actividad antifúngica in vitro contra una serie de levaduras y hongos filamentosos, utilizando el extracto metanólico de partes aéreas de esta planta. La fracción hexánica del extracto crudo metanólico demostró tener marcada actividad, especialmente contra dermatofitos *Trichophyton rubrum* (MIC 25 µg/mL) y *Trichophyton mentagrophytes* (MIC 25 µg/mL).

Pterocaulon balansae

Stein y col. en 2005 verificaron al igual que en *P. alopecuroides* y *P. polystachyum* la actividad antifúngica in vitro contra una serie de levaduras y hongos filamentosos, utilizando el extracto metanólico de partes aéreas de esta planta. El extracto crudo metanólico de esta especie fue el menos activo de los tres ensayados, pero cabe destacar que las fracciones lipofílicas del extracto mostraron marcada actividad principalmente contra dermatofitos. La fracción hexánica del extracto crudo metanólico demostró ser la más activa contra *Trichophyton rubrum* (MIC 12,5 µg/mL) y *Trichophyton mentagrophytes* (MIC 12,5 µg/mL).

Pterocaulon cordobense

Towers y col. en 1977, realizaron un estudio sobre la actividad antibiótica mediada por luz U.V. contra *Candida albicans* de 80 especies de la familia de las Compuestas. En esta investigación incluye a *P. cordobense* O. Kuntze refiriendo una actividad fototóxica (causante de un halo de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* luego de la incubación bajo luz U.V. de onda larga- 360-370 nm-, pero no luego de la incubación en la oscuridad) para las hojas y fototóxica y antibiótica (causante de un halo de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* tanto en la oscuridad como bajo la luz UV) para ramas, raíces y achenios. Menciona a otra especie de *Pterocaulon* argentino como *Pterocaulon sp.* con actividad antibiótica de sus ramas, raíces y achenios.

Pterocaulon polystachyum

Debenedetti y col. en 1994^B demostraron que la infusión de las partes aéreas secas de esta especie es activa contra *Artemia salina*.

Paya y col. en 1996 obtuvieron resultados positivos en la inhibición de ciertas reacciones mediadas por radicales libres para infusión y extractos diclorometánico y metanólico de partes aéreas secas de esta especie.

Desmachelier y col. en 1997, obtuvieron una débil actividad antioxidante de la infusión de las partes aéreas secas de esta planta.

Mongelli y col. en 2000, demostraron la actividad antiproliferativa del extracto diclorometánico obtenido de las partes aéreas secas para las células tumorales de Crown Gall.

Ciccía y col. en 2000 obtuvieron resultados positivos del extracto diclorometánico de partes aéreas secas contra larvas de *Aedes aegypti*.

Riveiro y col. en 2004 demostraron la actividad antiproliferativa y diferenciante del extracto de éter de petróleo de partes aéreas de esta planta sobre la línea celular promonocítica de humanos U-937. Comprobaron que dos cumarinas 5,6,7-trioxigenadas aisladas del mismo extracto, inhibían en tiempo y concentración dependiente a la línea celular leucémica anteriormente mencionada.

Stein y col. en 2005 ensayaron la actividad antifúngica in vitro contra una serie de levaduras y hongos filamentosos. La fracción hexánica del extracto crudo metanólico de las partes aéreas de esta planta demostró tener marcada actividad, especialmente contra dermatofitos *Trichophyton rubrum* (MIC 50 µg/mL) y *Trichophyton mentagrophytes* (MIC 25 µg/mL).

Frainer Knoll y col. en 2006 demostraron en un modelo experimental utilizando *Allium cepa* que la infusión de hojas frescas de esta especie presenta actividad citotóxica y antiproliferativa.

Pterocaulon purpurascens

Desmachelier y col. en 1997, obtuvieron una débil actividad antioxidante para la infusión de partes aéreas secas.

Penna y col. en 1994 ensayaron la actividad antibacteriana de un extracto hidroalcohólico (5 mg/mL) de partes aéreas secas y obtuvieron resultados positivos contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.

Pterocaulon redolens

Kanlayavattanakul y col. en 2003 ensayaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico de partes aéreas de esta planta obteniendo resultados positivos contra *Mycobacterium tuberculosis*. También ensayaron la actividad citotóxica en células tumorales de mama y pulmón, en donde el flavonoide aislado presentó actividad citotóxica moderada en ambas líneas celulares.

Pterocaulon serrulatum

Macleod y Rasmussen en 1999 obtuvieron resultados positivos como antibacteriano para el extracto de hexano:diclorometano de partes aéreas secas, contra *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*.

Pterocaulon sphacelatum

Semple y col. en 1998 concluyen que el extracto etanólico obtenido de partes aéreas de esta especie inhibe en más del 75 % la proliferación de poliovirus en una concentración de 52 µg/mL, la cual no es citotóxica.

En 1999, Semple y col. aislan el flavonoide crisopenol C, responsable de la actividad antiviral. Este compuesto demostró ser activo contra el poliovirus en una concentración de 0,27 µg/mL, siendo la concentración máxima no citotóxica 3,91 µg/mL. Este flavonoide pertenece a un grupo de compuestos con potente actividad inhibitoria específica de la replicación de picornavirus. El crisopenol C inhibe la replicación de rinovirus, la causa más frecuentes del resfriado común.

3.1.4.- Antecedentes fitoquímicos

El primer registro referido a la composición química de este género es de Johns y col. en 1968 para *P. sphacelatum*. Estos autores describen el aislamiento de la 6,7-dimetoxicumarina (escoparona, **2**). La mayoría de los trabajos de análisis fitoquímico de este género hacen referencia al aislamiento de cumarinas, cuyas estructuras y especies en las que fueron identificadas se presentan en detalle (ver 3.1.4.1). Así mismo, el análisis por cromatografía en capa delgada reveló la presencia de 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina en *P. balansae*, *P. cordobense* y *P. rugosum*, ayapina en *P. alopecuroides*, y 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina en *P. balansae* y *P. cordobense* (Stein, 2005).

También han sido aislados monoterpenos, sesquiterpenos, flavonoides y poliacetilenos de *P. sphacelatum*, *P. balansae*, *P. lanatum*, *P. virgatum*, *P. alopecuroides* y *P. rugosum* (Vilegas y col. 1995) y dietanolamina para *P. sphacelatum* (Brown y Gray, 1986). Flavonoides, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico, y ácido 3,4-cafeilquinico de partes aéreas de *P. virgatum* (Martino y col. 1979; Debenedetti y col. 1993). Flavonoides y ácidos cafeilquinicos de *P. purpurascens* (Debenedetti y col. 1987, Debenedetti y col. 1993). Ácidos mono y dicafeilquinicos en *P. polystachyum* (Debenedetti y col. 1993). Cariófilenos y flavonoides en *P. serrulatum* (Macleod y Rasmussen, 1999). Sesquiterpenos (Vera y col. 2001), ácido clorogénico, isoclorogénico y flavonoides en *P. polystachyum* (Debenedetti y col. 1994^B).

3.1.4.1- Estructura química y nomenclatura de las cumarinas identificadas en el género *Pterocaulon*.

Tabla 3.1: Cumarinas 7-oxigenadas

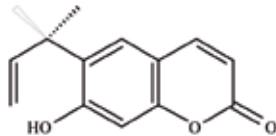
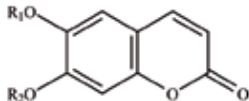
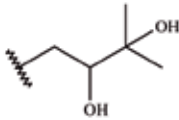
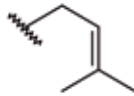
Nro.	Compuesto	Estructura	Especie	Referencia
1	6-(1,1-dimetil-2-propenil)-7-hidroxicumarina		<i>P. polystachyum</i>	Vera y col., 2001

Tabla 3.2: Cumarinas 6,7-dioxigenadas

					
Nro.	Compuesto	R ₁	R ₂	Especie	Referencia
2	6,7-dimetoxicumarina (Escoparona)	CH ₃	CH ₃	<i>P. sphacelatum</i>	Johns y col., 1968
3	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina	CH ₃		<i>P. alopecuroides</i>	Vilegas y col., 1995
				<i>P. balansae</i>	Magalhaes y col., 1981
				<i>P. lanatum</i>	
				<i>P. polystachyum</i>	Vera y col., 2001
				<i>P. virgatum</i>	Debenedetti y col., 1998
4	6,7-metilendioxicumarina (Ayapina)	-CH ₂ -		<i>P. polystachyum</i>	Palacios y col. 1999
				<i>P. redolens</i>	Vera y col., 2001 Stein y col., 2006 Kanlayavattanakul y col. 2003
				<i>P. serrulatum</i>	Macleod y Rasmussen, 1998
				<i>P. virgatum</i>	Debenedetti y col., 1998
5	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina	CH ₃		<i>P. polystachyum</i>	Palacios col., 1999
				<i>P. virgatum</i>	Vera y col. 2001 Debenedetti y col., 1998

6	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-hidroxi-cumarina (Preniletina)			<i>P. polystachyum</i>	Palacios y col., 1999 Vera y col., 2001
7	7-(2-hidroxi-3-metil-3-buteniloxi)-6-metoxicumarina (Virgatenol)			<i>P. polystachyum</i> <i>P. virgatum</i>	Palacios y col., 1999 Vera y col., 2001 Debenedetti y col., 1998
8	7-hidroxi-6-metoxicumarina (Escopoletina)	CH ₃	H	<i>P. polystachyum</i> <i>P. virgatum</i>	Palacios y col., 1999 Debenedetti y col., 1998
9	6,7-dihidroxicumarina (Esculetina)	H	H	<i>P. polystachyum</i>	Palacios y col., 1999
10	6-hidroxi-7-metoxicumarina (Isoescopoletina)	H	CH ₃	<i>P. polystachyum</i>	Vera y col., 2001
11	7-(4-hidroxi-3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (Haplopinol metil eter)		CH ₃	<i>P. polystachyum</i>	Vera y col., 2001
12	6-(2-hidroxi-3-metil-3-buteniloxi)-7-metoxicumarina (isovirgatenol)		CH ₃	<i>P. polystachyum</i>	Vera y col., 2001
13	7-(2-hidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (3'-desoxiobtusina)	CH ₃		<i>P. polystachyum</i>	Vera y col., 2001
14	7-(2-hidroxietiloxi)-6-metoxicumarina	CH ₃		<i>P. polystachyum</i>	Vera y col., 2001
15	7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina		CH ₃	<i>P. alopecuroides</i> <i>P. balansae</i> <i>P. virgatum</i>	Stein y col., 2006 Magalhaes y col., 1981 Bohlmann y col., 1981
16	7-(2-hidroxi-3-metil-3-metoxibutiloxi)-6-metoxicumarina (Virgatol)	CH ₃		<i>P. virgatum</i>	Debenedetti y col., 1998

Tabla 3.3: Otras cumarinas 6,7-dioxigenadas

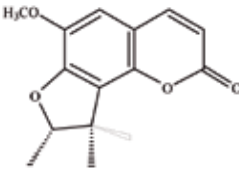
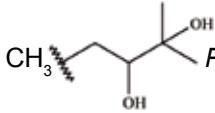
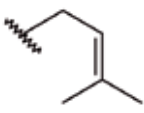
Nro.	Compuesto	Estructura	Especie	Referencia
17	Nieshoutin		<i>P. polystachyum</i>	Vera y col., 2001

Tabla 3.4: Cumarinas 5,6,7-trioxigenadas

Nro.	Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	Especie	Referencia
18	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-5-hidroxi-6-metoxicumarina	H			<i>P. alopecuroides</i>	Vilegas y col., 1995
19	5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina		-CH ₂ -		<i>P. balansae</i>	Debenedetti y col., 1997
					<i>P. polystachyum</i>	Palacios y col., 1999
					<i>P. virgatum</i>	Vera y col., 2001 Debenedetti y col., 1994 ^A
20	5-metoxi-6,7-metilendioxi-cumarina	CH ₃	-CH ₂ -		<i>P. alopecuroides</i>	Stein y col., 2006
					<i>P. balansae</i>	Stein y col., 2006
					<i>P. polystachyum</i>	Palacios y col., 1999 Vera y col., 2001 Stein y col., 2006
					<i>P. redolens</i>	Kanlayavattanakul y col., 2003
					<i>P. serrulatum</i>	Macleod y Rasmussen, 1998
	<i>P. virgatum</i>	Debenedetti y col., 1994 ^A				

21	7-hidroxi-5,6-dimetoxi-cumarina (Fraxidina)	CH ₃	CH ₃	H	<i>P. redolens</i>	Kanlayavattanakul y col., 2003
22	5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina				<i>P. balansae</i> <i>P. lanatum</i> <i>P. virgatum</i> <i>P. polystachyum</i> <i>P. redolens</i>	Debenedetti y col., 1997 Vera y col., 2001 Kanlayavattanakul y col., 2003
23	5-(2-hidroxiethyl)-6,7-metilendioxicumarina				<i>P. polystachyum</i>	Vera y col., 2001
24	5-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina				<i>P. balansae</i> <i>P. lanatum</i>	Debenedetti y col., 1997
25	5-(3-metil-2-oxobutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina				<i>P. virgatum</i>	Debenedetti y col., 1997
26	5-(2-hidroxi-3-metil-3-metoxibutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina				<i>P. virgatum</i>	Maes y col., 2006
27	5-(2-hidroxi-3-metil-3-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina				<i>P. virgatum</i>	Maes y col., 2006
28	5-hidroxi-6,7-metilendioxicumarina	H			<i>P. virgatum</i>	Maes y col., 2006
29	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-5,6-dimetoxi-cumarina	CH ₃	CH ₃		<i>P. virgatum</i>	Debenedetti, 1995

Tabla 3.5: Otras cumarinas 5,6,7-trioxigenadas

Nro.	Compuesto	Estructura	Especie	Referencia
30	5-hidroxi-8-(3-metil-2-butenil)-6,7-metilendioxicumarina		<i>P. polystachyum</i>	Vera y col. 2001

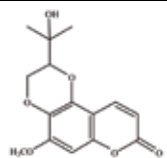
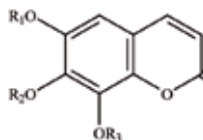
31	Isopurpurasol		<i>P. virgatum</i>	Debenedetti y col., 1999
----	---------------	---	--------------------	--------------------------

Tabla 3.6: Cumarinas 6,7,8-trioxigenadas



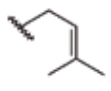

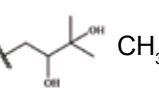
Nro.	Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	Especie	Referencia
32	7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina (Fraxetina)	CH ₃	H	H	<i>P. purpurascens</i>	Debenedetti y col., 1996
33	7-hidroxi-6,8-dimetoxicumarina (Isofraxidina)	CH ₃	H	CH ₃	<i>P. redolens</i>	Kanlayavattanakul y col., 2003
34	6,7,8-trimetoxicumarina	CH ₃	CH ₃	CH ₃	<i>P. serrulatum</i> <i>P. sphacelatum</i>	Macleod y Rasmussen, 1998 Semple y col., 1999
35	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6,8-dimetoxicumarina (Puberulina)	CH ₃		CH ₃	<i>P. lanatum</i> <i>P. redolens</i>	Magalhaes y col., 1981 Kanlayavattanakul y col., 2003
36	7-(2,3-epoxi-3metilbutiloxi)-6,8-dimetoxicumarina (2',3'-epoxipuberulina)	CH ₃		CH ₃	<i>P. lanatum</i>	Magalhaes y col., 1981
37	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,8-dimetoxicumarina (2',3'-dihidroxi-puberulina)	CH ₃		CH ₃	<i>P. redolens</i>	Kanlayavattanakul y col., 2003

Tabla 3.7: Otras cumarinas 6,7,8-trioxigenadas

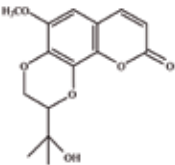
Nro.	Compuesto	Estructura	Especie	Referencia
38	Purpurasol		<i>P. purpurascens</i>	Debenedetti y col., 1992

Tabla 3.8: Cumarinas 5,6,7,8-tetraoxigenadas

Nro.	Compuesto	R ₁	R ₂	Especie	Referencia
39	Purpurenol	CH ₃	CH ₃	<i>P. purpurascens</i>	Debenedetti y col., 1991
40	Purpurasolol	H	CH ₃	<i>P. purpurascens</i>	Debenedetti y col., 1996

3.1.5- Aspectos morfológicos de las especies estudiadas (Cabrera y Ragones, 1978)

Pterocaulon alopecuroides (Lam.) DC.

Hierba perenne, con xilopodio más o menos globoso, del que nacen raíces delgadas y tallos erectos de 70-150 cm de altura, sencillos inferiormente y por lo general ramosos en la parte superior, 5-alados, tomentosos, hojosos hasta la inflorescencia. Alas enteras, discolores, de 2-3 mm de anchura. Entrenudos de 15-30 mm de largo. Hojas inferiores obovado-elípticas, agudas en el ápice, atenuadas y decurrentes en la base, menudamente dentadas o casi enteras, glabras y rugosas en el haz, densamente tomentosas en el envés, con nervaduras sobresalientes, de 6-11 cm de longitud por 1,8-4 cm de latitud. Hojas superiores ovado-oblongas, agudas en el ápice, ensanchadas y decurrentes en la base, menudamente denticuladas o enteras, de 5-7 cm de longitud por 1,2-1,8 cm de latitud.

Capítulos numerosos, dispuestos en gruesas espigas de glomérulos, superiormente continuas e inferiormente interrumpidas, de 3-17 cm de longitud, en los ápices de las ramas. Involucro acampanado de 4,5-5 mm de altura. Filarias lanosas, las exteriores ovadas, las internas lineales, receptáculo desnudo. Flores femeninas numerosas; las masculinas 1-3. Aquenios costados, velludos, con glándulas esféricas sésiles, de 1 mm de longitud. Pappus Blanco. (Ver figura 4.1)

Nota: Especie bastante variable en su ramificación y en la densidad de espigas, pero siempre fácilmente reconocible por su hojas ancha obovadas o elípticas.

Pterocaulon angustifolium DC.

Hierba perenne de cerca de 50 cm de altura. Raíz leñosa (xilopodio) gruesa, de la que nacen raíces fibrosas y varios tallos erectos, ramosos en la parte superior, redondeados, de unos 2 mm de diámetro, alados, mas o menos densamente grises-tomentosos o inferiormente glabrescentes, hojosos hasta el ápice. Alas enteras, discolores, de 0,5-1,5 mm de anchura. Entrenudos de 1-1,5 cm. Hojas alternas, lineales o lineal-oblongas, agudas o subobtusas en el ápice, atenuadas y decurrentes en la base, inconspicuamente denticuladas, glabras y algo rugosas en el haz, griseo-tomentosas en el envés, con nervadura central y nervaduras marginales conspicuas, de 40-80 mm de longitud por 4-10 mm de latitud.

Capítulos dispuestos en glomérulos terminales esféricos de 1,5-2,5 cm de diámetro. Involucro de 4-5 mm de altura por 3 mm de diámetro. Filarias lineales, las exteriores lanosas, las internas glabrescentes. Flores femeninas infinitas; las hermafroditas 2-3. Aquenios velludos, Papus blancuzco. Florece a fines del verano. (Ver figura 4.2)

Nota: Parecería haber dos formas extremas, una con hojas lineales angostas y agudas y otra con hojas más cortas y anchas, a veces subobtusas, pero hay muchos ejemplares intermedios o con hojas inferiores anchas y superiores estrechas.

***Pterocaulon balansae* Chod.**

Hierba perenne de 50-180 cm de altura. Raíz no o apenas engrosada. Tallo erecto, simple inferiormente y ramoso en la parte superior, 5-alado, densamente tomentoso, hojoso hasta la inflorescencia, de 5-10 mm de diámetro. Alas discolores, enteras, de alrededor de 3 mm de ancho. Entrenudos de 1-2,5 cm de longitud. Hojas alternas: las inferiores obovado o elíptico-lanceoladas, las superiores oblongo-lanceoladas, agudas en el ápice y decurrentes en la base, menudamente dentadas o enteras, lanuginosas o glabras en el haz y densamente tomentosas en el envés, de 80-150 mm de longitud, por 15-40 mm de anchura. Capítulos muy numerosos, sésiles (o los terminales brevemente pedicelados), dispuestos en una amplia panoja de espigas laxas de 15-20 cm de longitud por 7-8 cm de diámetro.

Involucroacampanado, de 5-6 mm de altura; filarias exteriores lanceoladas, tomentosas en el dorso, las interiores lineales, glabrescentes. Flores femeninas muy numerosas; las masculinas 2-5. Aquenios velludos. Papus blancuzco. (Ver figura 4.3)

Nota: Especie muy característica por su elevada altura, las hojas lanuginosas en el haz y, sobre todo, por sus grandes panojas de espigas laxas. Generalmente no existe un xilopodio bien desarrollado. Por su aspecto se parece a *P. polystachyum* DC., especie bien diferente por carecer de pubescencia tomentosa.

***Pterocaulon cordobense* O. K.**

Hierba perenne, con xilopodio más o menos desarrollado, de hasta 2,5 cm de diámetro, del cual nacen tallos erectos de 40-80 cm de altura, ramificados en la base o simples, tomentosos, 5-alados, hojosos hasta la inflorescencia. Alas enteras, discolores, de 0,5-1,5 mm de anchura. Entrenudos de 10-30 mm de longitud. Hojas inferiores, oblanceoladas, las medias y superiores lanceoladas o lineal-lanceoladas, todas agudas en el ápice, atenuadas y decurrentes en la base, más o menos conspicuamente denticuladas en el margen, glabras en el haz y densamente albo-tomentosas en el envés, las inferiores de 7-9 cm de largo por 1,5-3 cm de ancho; las superiores de 7-12 cm por 0.7-1,2 cm. Capítulos dispuestos en una panoja angosta de espigas, densa en la parte superior, interrumpida y ramificada en la inferior, de 10-17 cm de largo, por 2-4 cm de diámetro. Involucroacampanado, de 5 mm de altura: filarias exteriores lanceoladas, lanosas; las interiores lineales, glabras. Flores femeninas muy numerosas; las masculinas sólo 2-3. Aquenios velludos y glandulosos. Papus blanco o pardusco. (Ver figura 4.4)

Nota: Muy parecido a *P. virgatum* (L.) DC. Del que se diferencia por la espiga más densa y ramificada inferiormente y las hojas inferiores más anchas. También se parece a *P. alopecuroides*, pero se diferencia fácilmente por las hojas superiores lineal-lanceoladas.

***Pterocaulon lorentzii* Malme**

Hierba ascendente o erecta, de 40-100 cm de altura, con xilopodio grueso del que nacen raíces delgadas. Tallo generalmente simple, pero algunas veces ramificado en la base o en la parte superior, primero ascendente y luego erecto, con 4-5 alas, incano-tomentoso, densamente hojoso en la parte inferior y muy laxamente en la superior. Alas discolores, enteras, de 1,5-3 mm de anchura. Entrenudos de 2-3 cm de longitud. Hojas alternas, las inferiores oblanceoladas, agudas en el ápice y decurrentes en la base, enteras (más raramente aserradas) y revolutas en el margen, glabras y brillantes en el haz, densamente incano-tomentosas en el envés, de 60-130 mm de longitud por 10-20 mm de anchura. Hojas medias y superiores lineales, gradualmente menores.

Capítulos numerosos, dispuestos en una espiga terminal de glomérulos, cilíndrica, continua a algo interrumpida en la base, de 3-17 cm de longitud por 8 (en flor) a 20 (en fruto) mm de diámetro. Involucroacampanado, de 5-6 mm de altura. Filarias externas lanceoladas, lanosas en el dorso; las interiores lineales, glabrescentes. Receptáculo desnudo. Flores femeninas muy numerosas; las masculinas 2-5. Aquenios velludos y glandulosos, costados, de 1,5 mm de longitud. Florece a fines del verano. (Ver figura 4.5)

Nota: Los ejemplares ramificados podrían confundirse con *P. alopecuroides*, pero las hojas medias y superiores son siempre lineal-lanceoladas y bien características de *P. lorentzii*.

***Pterocaulon polypterum* D.C.**

Hierba perenne, erecta, de 50-80 cm de altura. Raíz gruesa, leñosa. Tallo simple, redondeado, de 4-5 mm de diámetro, 5-alado, con hojas amontonadas en la parte inferior y casi desnudo en la superior. Alas enteras, discoloras, de 2-2,5 mm de anchura. Hojas inferiores muy densas, obovadas, oblanceoladas o subespatuladas, generalmente redondeadas en el ápice y largamente atenuadas en la parte inferior, decurrentes, enteras en el margen, glabras en el haz y densamente tomentosas en el envés, de 80-200 por 25-50 mm. Hojas medias oblanceoladas, agudas, las superiores bracteiformes, muy reducidas. Capítulos androdioicos, numerosos, dispuestos en una espiga laxa de glomérulos o de capítulos solitarios, de 20-40 cm de longitud total. Eje de la inflorescencia densamente tomentoso. Glomérulos separados de 3 mm (los superiores) a 20 mm (los inferiores), formados por 1-5 capítulos. Involucros de las plantas masculinas y hermafroditas semejantes, de 5-6 mm de altura por 5 mm de diámetro. Filarias en varias series: las exteriores obovadas, agudas, con un diente a cada lado del ápice, lanosas exteriormente; las internas lanceoladas, agudas, rojizas en el ápice y algo lanosas. Receptáculo hemisférico, glabro, desnudo o con algunas páleas (filarias interiores) periféricas.

Capítulos masculinos con 20-23 flores violáceas o rojizas, tubulosas, de 5 mm de longitud, con lóbulos lanceolados de 1,7 mm, con glándulas esféricas exteriormente; anteras sagitadas en la base; estilo cortamente bifido, pubescente en la parte superior, con ramitas no abiertas. Aquenios pubescentes en la base, al parecer estériles. Pappus más corto que la corola.

Capítulos hermafroditas con numerosas flores femeninas; corola filiforme de 6 mm de longitud, papilosa y 3-5 lobada en el ápice. Aquenios obovados, de 2 mm de largo, con 5 costillas sobre las cuales son sericeo-velludos, con numerosas glandulitas esféricas sésiles entre las costillas. Pappus blanco, en 2-3 series, de 4-5 mm de longitud. Flores masculinas 3-infinitas, tubulosas, pentalobadas (lóbulos de 1,1-1,2 mm), con glandulitas esféricas exteriormente. Anteras sagitadas. Estilo cortamente bifido velludo superiormente. Aquenios al parecer estériles. Florece a fines del verano. (Ver figura 4.6)

Nota: Especie diferente de todas las otras del género por su carácter androdioico. En la mayoría de las plantas estudiadas todos los capítulos tienen flores isomorfas, tubulosas, con los dos sexos pero con ovarios estériles, de modo que funcionan como masculinas. Estos ejemplares pueden ser confundido fácilmente con un *Baccharis* si no fuera por las anteras claramente sagitadas y la estructura de los granos de polen típica de *Pterocaulon* y géneros afines. Pocos ejemplares presentan capítulos con flores dimorfas, como es característico en el género, las femeninas muy numerosas y pocas masculinas.

***Pterocaulon polystachyum* D.C.**

Hierba aromática, perenne, erecta, de 0,8-2 m de altura. Raíz principal corta, gruesa, leñosa, de 1-2 cm de diámetro. Tallos ramosos en la parte superior, redondeados, de 5-10 mm de diámetro, 5-alados, glanduloso-pubérulos con pelitos cortos capitados, densamente hojosos hasta la inflorescencia. Entrenudos de 5-15 mm de longitud. Hojas alternas, ovado-lanceoladas, agudas en el ápice y decurrentes en la base, aserrado-dentadas en el margen, rugosas y con glándulas verrugosas dispersas en el haz, más pálidas y con pelos glandulares dispersos y glándulas esféricas sésiles densas en el envés, de 50-100 mm de longitud por 15-40 mm de anchura.

Capítulos muy numerosos, brevemente pedicelados o subsésiles, dispuestos en racimos espiciformes en los extremos de las ramas, formando en conjunto una panoja más o menos triangular de 15-30 cm de longitud por 7-20 cm de diámetro. Pedicelos glanduloso-pubescentes. Involucro acampanado, de 4-5 mm de altura por unos 3 mm de diámetro. Filarias lineales, agudas, las exteriores glandulosas, las internas glabras. Receptáculo glabro. Flores femeninas muy numerosas. Flores del disco 1-3. Aquenios velludos. Pappus blancuzco. Florece a fines del verano. (Ver figura 4.7)

***Pterocaulon purpurascens* Malme.**

Hierba perenne, con xilopodio más o menos engrosado del que nacen raíces fibrosas y tallos ascendentes o rectos de 40-70 cm de altura, redondeados, densamente grises-tomentosos, 5-alados, con alas discoloras, enteras, de 1-1,5 mm de anchura, laxamente hojosos. Entrenudos de 1,5-4 cm de longitud. Hojas alternas, sésiles, decurrentes, las inferiores obovadas u obovado-lanceoladas, obtusas en el ápice y atenuadas en la parte inferior, de 4-8 cm de longitud por 2-3,5 cm de latitud; las superiores oblanceoladas, agudas, menores; todas enteras en el margen, glabras y lisas en el haz, densamente grises-tomentosas en el envés.

Capítulos sésiles dispuestos en una espiga terminal ovoide, densa y compacta, de color vinoso, de hasta 4 cm de longitud por 1,5 cm de diámetro. Involucro de 4-5 mm de altura por 3 mm de diámetro. Filarias caducas, purpurescentes en la parte superior, las externas ovadas, agudas, lanosas en el dorso, las internas lineal-lanceoladas, glabras. Flores femeninas numerosas; las hermafroditas 3-5. Aquenios sericeo-velludos. Florece a fines del verano. (Ver figura 4.8)

Nota: Esta especie es de aspecto muy parecido a *P. pycnostachyum* del sudeste de Estados Unidos, pero se diferencia fácilmente por el color vinoso de la espiga y por el número de flores masculinas.

***Pterocaulon rugosum* (Vahl) Malme.**

Hierba perenne de 30-75 cm de altura, con xilopodio de 1-2 cm de diámetro. Tallos erectos, inferiormente simples, más o menos ramificados en la parte superior, 5-alados, albo- u ocraceo-tomentosos. Alas enteras de 1-2 mm de anchura, lanuginosas en una de las caras y densamente flocoso-tomentosas en la otra. Entrenudos de 1-1,5 cm de longitud. Hojas ovado-elípticas, agudas o semiobtusas en el ápice, atenuadas o redondeadas y decurrentes en la base, menudamente dentadas, lanuginosas o glabrescentes y rugosas en el haz, densamente flocoso-tomentosas en el envés, con nervaduras muy sobresalientes formando un retículo conspicuo, de 4-6,5 cm de longitud por 1,8-2,5 cm de latitud.

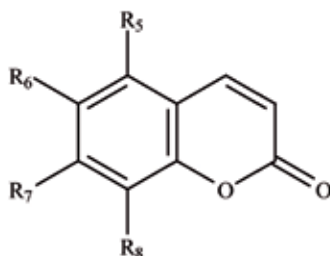
Capítulos numerosos, dispuestos en espigas más o menos globosas u ovoides, terminales, de 2-3 (-7) cm de longitud por 1,5-3 cm de diámetro, raramente con algunos capítulos aislados inferiormente. Involucro acampanado de 6-7 mm de altura; filarias lineal-lanceoladas, tomentosas en el dorso. Flores femeninas, muy numerosas; las masculinas 1-2. Aquenios velludos y con glándulas esféricas sésiles. (Ver figura 4.9)

Nota: Especie muy parecida a *P. alopecuroides* (Lam.) DC. de la cual podría ser tan sólo una variedad. Se diferencia por las espigas terminales globosas, las hojas con pubescencia lanuginosa persistente en el haz y los involucros algo más grandes, pero hay ejemplares de difícil identificación.

3.2- CUMARINAS

Las cumarinas son consideradas estructuralmente como derivados lactónicos del ácido o-hidroxi-Z-cinámico. Se caracterizan por poseer una variedad de patrones de oxigenación sobre el núcleo de la benzopirona, siendo la oxigenación en C-7 la más común entre las cumarinas naturales. La 7-hidroxi-cumarina (umbeliferona, **41**) es considerada el precursor directo de las cumarinas di- y tri-oxigenadas, comparada con los ácidos hidroxicinámicos que poseen el mismo patrón de oxigenación. La O-metilación enzimática (Tsang e Ibrahim, 1979^A y 1979^B, O-glucosilación (Ibrahim y Boulay, 1980) y la O-prenilación (Dillon y Brown, 1976) son reacciones terminales en la biosíntesis de cumarinas.

Las cumarinas simples y sus β-O-D-glicósidos existen en forma natural. Los glicósidos más ampliamente distribuidos son aquellos derivados de umbeliferona (**41**), esculetina (**9**), escopoletina (**8**), dafnetina (**42**), fraxetina (**32**) e isofraxidina (**33**).

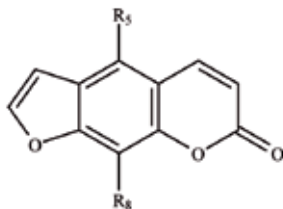


Nro.	Compuesto	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
41	Umbeliferona	H	H	OH	H
9	Esculetina	H	OH	OH	H
8	Escopoletina	H	OCH ₃	OH	H
42	Dafnetina	H	H	OH	OH
32	Fraxetina	H	OCH ₃	OH	OH
33	Isofraxidina	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

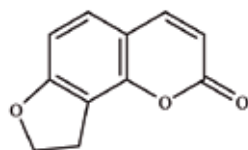
La prenilación del C-6 y C-8 de la umbeliferona es común que ocurra dando lugar a la elaboración de la furocumarina lineal (psoraleno, **43**) y la menos frecuente furocumarina angular (angelicina, **44**) respectivamente.

Ambos tipos pueden sufrir una posterior sustitución luego de la formación del anillo de la furanocumarina. La prenilación enzimática de la umbeliferona y la posterior hidroxilación del psoraleno formado conduce a la obtención de los correspondientes derivados 5-hidroxilado (bergaptol, **45**) y 8-hidroxilado

(xantotoxol, **47**). Ha sido demostrado que la O-metilación de estos últimos a sus respectivos metil éteres bergapteno (**46**) y xantotoxina (**48**), es catalizada por dos O-metiltransferasas específicas de posición (Sharma y col. en 1979 y Hauffe y col. en 1986), se cree que ambas enzimas actúan como mediadoras de la formación de la isopimpinellina (**49**) (Brown y Sampathkumar, 1977). Las furocumarinas son encontradas predominantemente en Rutáceas y Umbelíferas, frecuentemente asociadas con otras cumarinas simples.



Nro.	Compuesto	R ₅	R ₈
43	Psoraleno	H	H
45	Bergaptol	OH	H
46	Bergapteno	OCH ₃	H
47	Xantotoxol	H	OH
48	Xantotoxina	H	OCH ₃
49	Isopimpinellina	OCH ₃	OCH ₃



44 Angelicina

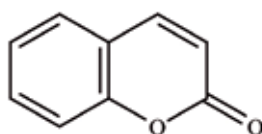
3.2.1.- Cumarinas simples

3.2.1.1.- Historia

El aislamiento de la cumarina (**50**) fue descrito por primera vez por Vogel en 1820 de un árbol de Guyana. Asoció el aroma característico con el del compuesto obtenido de *Melilotus officinalis* y concluyó que los cristales aislados de ambas especies eran idénticos.

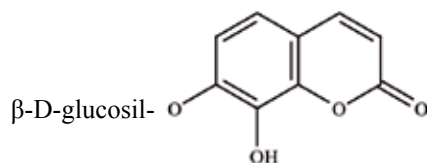
El nombre de cumarina se origina en una palabra del caribe "coumarou" con el que era conocida su fuente de obtención: el árbol conocido botánicamente como *Coumarouna odorata* Aub. Cumarina es el nombre trivial con que actualmente se conoce el compuesto cuya estructura fue deducida casi medio siglo después y es el nombre dado al grupo de lactonas naturales que poseen este esqueleto como unidad estructural fundamental.

Perkin en 1868 en su primera síntesis de perfumes de vegetales, tratando la sal de sodio del o-hidroxibenzaldehído con anhídrido acético, obtuvo una cumarina sintética idéntica a la aislada por Vogel. La estructura que Perkin sugirió en 1868 fue incorrecta lo mismo que la de Bäsecke en 1870, pero Fittig en 1868, Strecker en 1868 y Tiemann y Herzfeld en 1870, en forma independiente, arribaron a la fórmula de la lactona ahora universalmente aceptada.



50 Cumarina

Si bien la estructura **50** fue la primera cumarina dilucidada no fue la primera en haber sido aislada. Vauquelin en 1812 extrajo un glicósido de *Daphne alpina* posteriormente llamado daphnina. Su estructura permaneció desconocida hasta 1930 cuando Wessely y Sturm demostraron que era la 8-hidroxi-7-β-D-glucosiloxicumarina (**51**).



51 8-hidroxi-7-β-D-glucosiloxicumarina

Durante las tres décadas anteriores el interés por las cumarinas naturales ha tenido un notable incremento. Esto ha permitido su descubrimiento en cientos de especies vegetales y la dilucidación de nuevas estructuras.

Este progreso ha sido en parte debido al desarrollo de nuevos métodos de aislamiento combinados con modernas técnicas de dilucidación estructural. Es necesario mencionar que el creciente interés ha emanado del amplio rango de actividades fisiológicas que despliegan y por las características fluorescentes que la mayoría de las cumarinas presentan bajo irradiación U.V.

El descubrimiento de las reales o potenciales virtudes en el campo de los anticoagulantes, fotosensibilizadores dérmicos, estrógenos y vasodilatadores, para mencionar algunas de las más prominentes, condujo al aumento de la investigación y producción de cumarinas sintéticas. En todos los casos las cumarinas naturales han servido de prototipo las cuales, mediante modificaciones sintéticas, han conducido a congéneres con mayor actividad selectiva o en algunos casos antagonistas de actividades.

Como consecuencia de la rápida expansión del conocimiento acerca de las cumarinas naturales, han aparecido un número importante de trabajos de recopilación entre los que pueden destacarse Spath en 1936, 1937, Reppel en 1954, Dean en 1952, Soine en 1964, Stanley y col., 1965, Nielsen en 1970, Seshadri y Vishwapaul, 1973 y Gray y Waterman en 1978.

Murray y col. en 1982, en el Apéndice I de su libro "The Natural Coumarins" incluye aproximadamente 800 cumarinas naturales citadas en la bibliografía hasta mediados de 1980.

3.2.1.2.- Tipos estructurales

Todas las cumarinas naturales poseen oxígeno en una o más de las seis posiciones nucleares disponibles, ya sea como fenoles, éteres o grupos glicósidos.

Salvo pocas excepciones, se encuentran oxigenadas en C-7, en consecuencia la 7-hidroxycumarina (**41**) está biogénica y estructuralmente emparentada con las más complejas cumarinas.

Es común en muchas cumarinas la presencia de cadenas isoprénicas enlazadas a un carbono del núcleo, a un átomo de oxígeno o a ambos.

Estos grupos prenilos pueden encontrarse como una simple unidad de 3-metil-2-butenil, pero muchas veces es encontrado como su correspondiente epóxido o diol, o en una variedad de oxidaciones y formas acomodadas de estas cadenas isoprénicas (Figuras 3.1 y 3.2).

Es por lo tanto que en el campo de los productos naturales, las cumarinas ofrecen el mejor ejemplo de una clase de compuestos que exhiben el mayor número de modificaciones biogénicas en la unidad isoprénica simple.

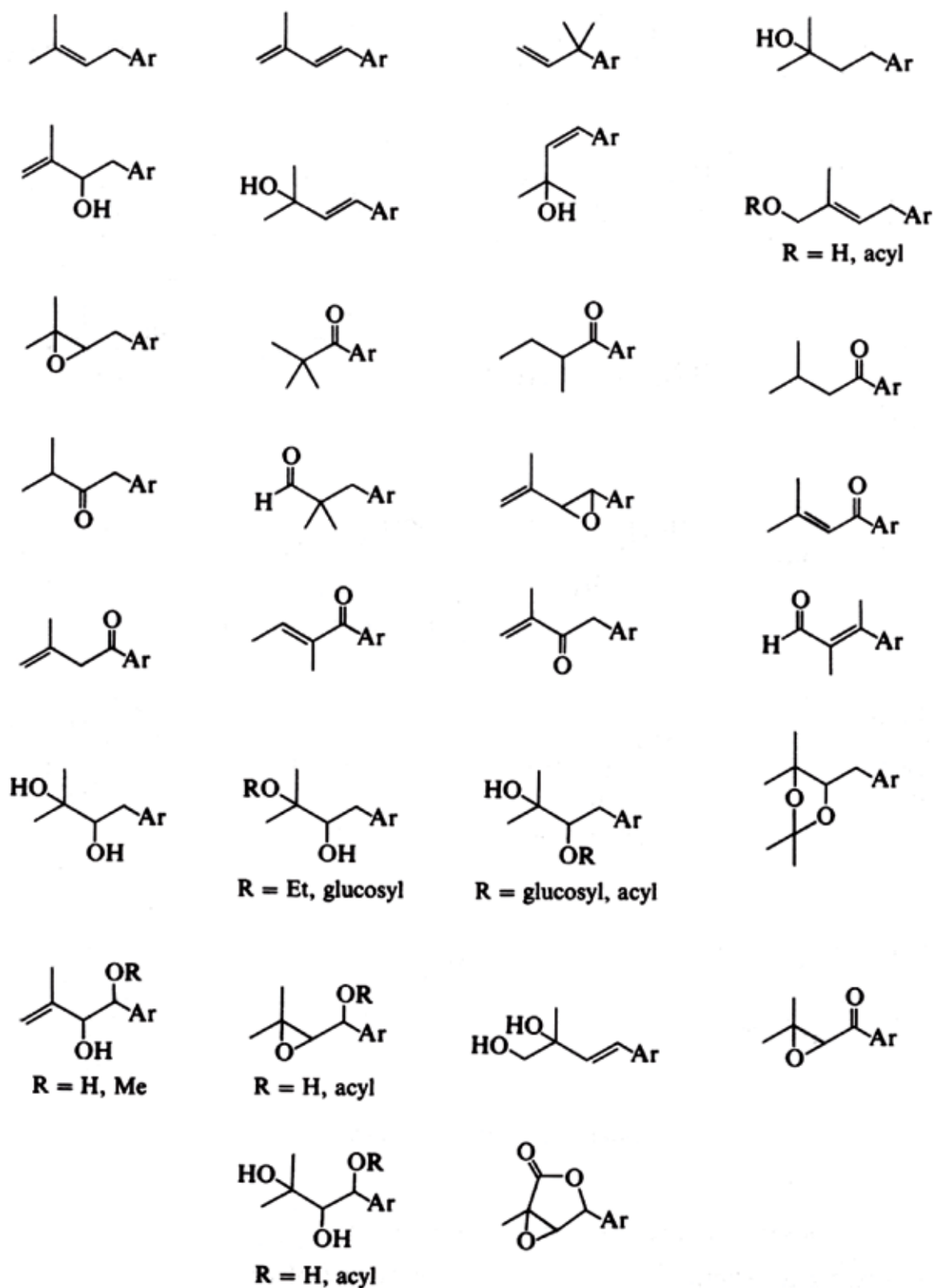


Figura 3.1. Unidades prenilo que sustituyen al anillo aromático

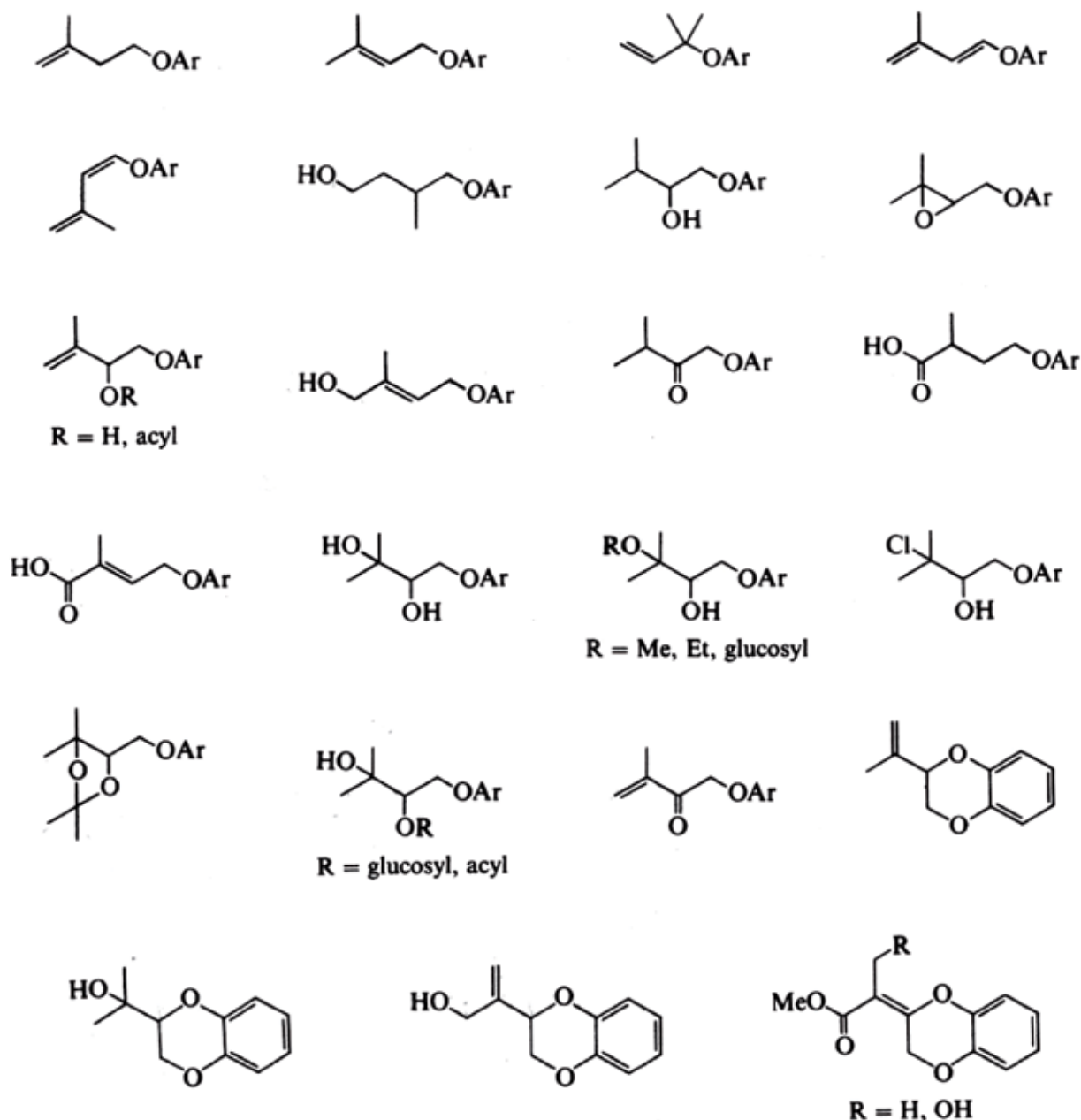


Figura 3.2. Unidades prenilo que sustituyen a un oxígeno fenólico.

Cuando el resto isoprenílico interactúa con un grupo ortofenol se puede formar biogénicamente un heterociclo adicional.

La interacción oxidativa puede llevar a la formación del resto hidroxiiisopropildihidrofurano (Figura 3.3), el cual por pérdida dihidrogenativa del grupo hidroxiiisopropilo conduce a la formación de un anillo furano no sustituido. Cuando la prenilación nuclear de la umbeliferona ocurre en C-6, da lugar a la desmetilsuberosina (**52**), marmesina (**53**) y finalmente a la furocumarina lineal, psoraleno (**54**). De la misma manera la alquilación en C-8 da lugar a las cumarinas angulares del tipo angelicina (**57**) vía ostenol (**55**) y columbianetina (**56**).

Un modo alternativo de ciclización oxidativa puede conducir a la formación de hidroxidihidropiranos los cuales por deshidratación producen piranocumarinas angulares y lineares, la seselina (**58**) y la xantiletina (**59**) respectivamente.

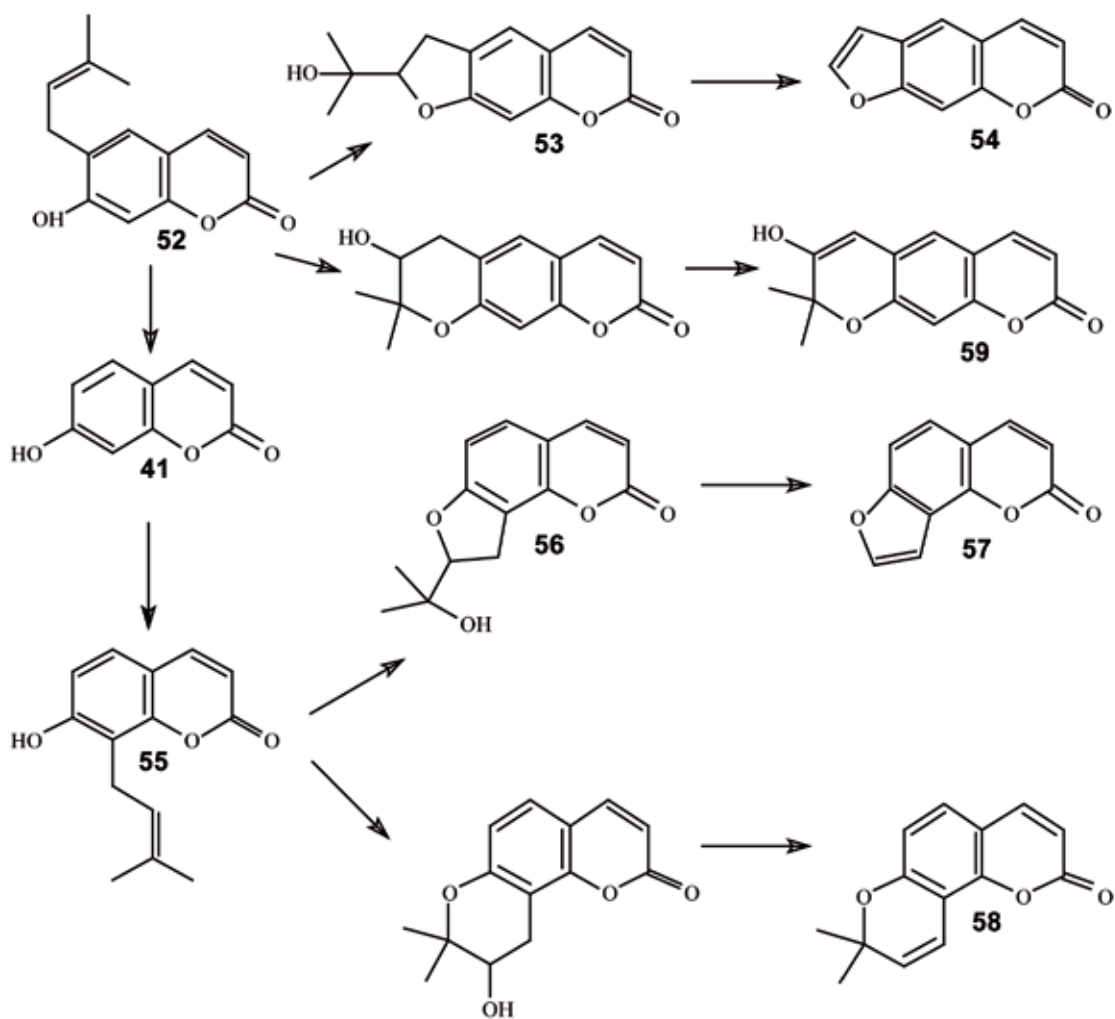
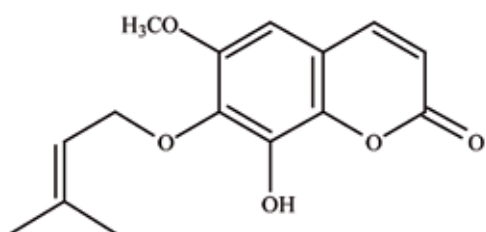
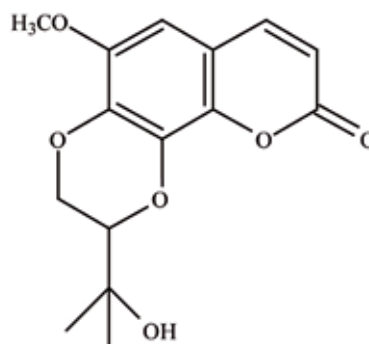


Figura 3.3. Ciclizaciones oxidativas de cumarinas 8- y 6- alquiladas.

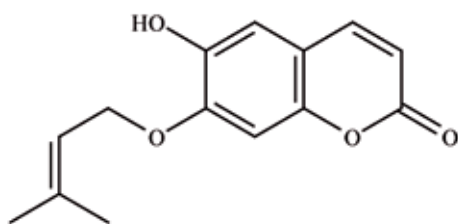
Si estos restos isoprénicos se encuentran unidos al núcleo por un átomo de oxígeno como en la capensina (**60**) o prenetina (**6**) pueden dar lugar, por el mismo mecanismo anterior, a anillos dioxánicos como purpurazol (**38**) u obliquina (**61**) respectivamente.



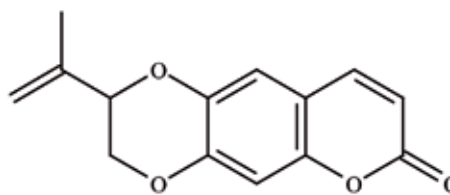
60 Capensina



38 Purpurazol



6 Preniletina



61 Obliquina

Muchos autores como Sethna y Shah en 1945, Reppel en 1954, Soine en 1964 y Nielsen en 1970 han clasificado a las cumarinas de acuerdo a sus estructuras en los siguientes tipos:

- 1- Simples: comprenden a la cumarina (**50**) y sus derivados hidroxilados alcoxilados, alquilados y glicosidados.
- 2- Furocumarinas: del tipo lineal (psoraleno, **43**) o angular (angelicina, **44**), con sustituyentes en una o ambas posiciones remanentes en el anillo bencénico. Se incluye en este grupo las dihidrofuranocumarinas.
- 3- Piranocumarinas: anillos de seis miembros análogos del grupo anterior.
- 4- Cumarinas sustituidas en el anillo pirona: tales como 4-hidroxicumarinas, 3 fenilcumarinas y 3,4 benzocumarinas.

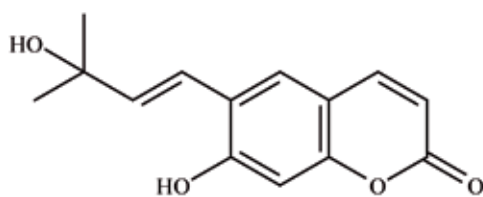
3.2.1.3.- Nomenclatura

A la mayoría de las cumarinas se les ha asignado un nombre de fantasía, trivial o común como forma de marcar una referencia sobre aquellas cumarinas cuyos estudios estructurales estaban en vías de investigación.

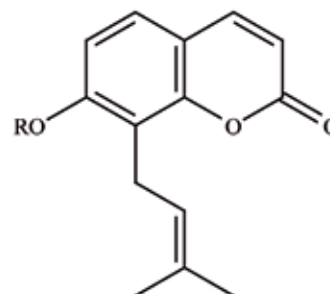
Gran parte de estos nombres triviales derivan del nombre de la familia o de la especie donde han sido encontrados o de una combinación de ambos. Otros se han originado del nombre común o local de sus fuentes de obtención o del lugar geográfico donde crece dicha fuente.

No es poco frecuente encontrar que a una misma cumarina se le han asignado dos o más nombres triviales. Esta duplicación de nombres es debida a que los investigadores que la citan como nueva no repararon que previamente figuraba bajo otro nombre en la bibliografía o bien cuando el mismo compuesto es descubierto de diferentes fuentes por dos grupos de investigadores simultáneamente.

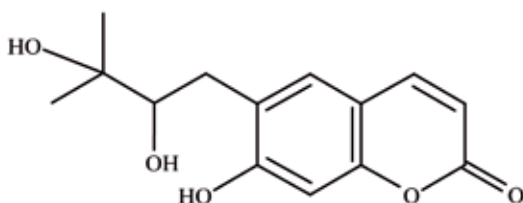
Sufijos comunes como **ona** y **ol** se encuentran en muchos nombres triviales pero a veces resultan inconsistentes con sus estructuras. Un ejemplo de ello está dado por suberenol (**62**) con una función alcohol, ostenol (**55**) es un fenol, peucedanol (**63**) un fenoxidiol y ostol (**64**) que se corresponde con un metil eter.



62 Suberenol

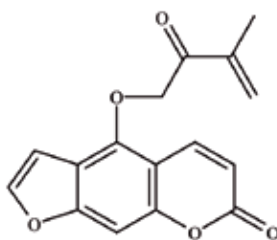


55 R=H Ostenol
64 R=CH₃ Ostol



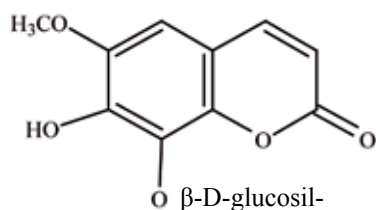
63 Peucedanol

El mismo caso ocurre con el sufijo **ona** donde pabulenona (**65**) es una cetona y umbeliferona es un fenol (**41**).

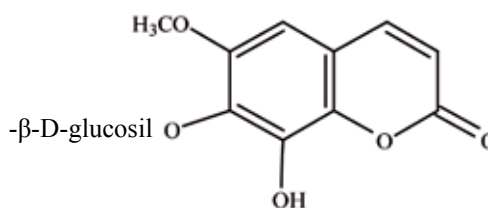


65 Pabulenona

El prefijo **iso** es usado para significar una diversidad de estructuras diferenciando una cumarina isomérica de otra conocida, pero no existen pautas claras para deducir la estructura de la **iso**-cumarina a partir de la conocida. A modo de ejemplo mencionamos al fraxósido (**66**) e isofraxósido (**67**) que difieren en cual de los 2 grupos hidroxilos de la fraxetina (7,8 dihidroxi-6 metoxi cumarina) lleva la unidad de β -D-glucosa.

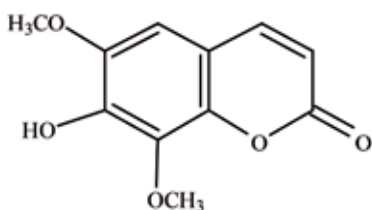


66 Fraxósido

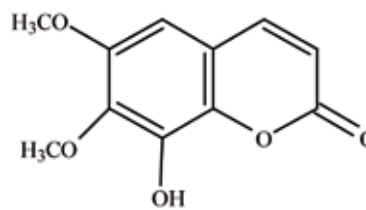


67 Isofraxósido

Por otro lado sus metil éteres son llamados isofraxidina (**33**) y fraxidina (**21**) respectivamente y no viceversa como podría anticiparse.



33 Isofraxidina



21 Fraxidina

Algunas cumarinas relacionadas estructuralmente llevan diferentes nombres y otras con nombres similares no necesariamente tienen estructuras relacionadas.

Es común encontrar el prefijo **oxi** usado para aquellas cumarinas naturales con cadenas epoxi en su estructura.

La gran desventaja de los nombres triviales para muchas de estas cumarinas naturales es la necesidad de contar con un índice de nombres comunes para poder verificar sus estructuras.

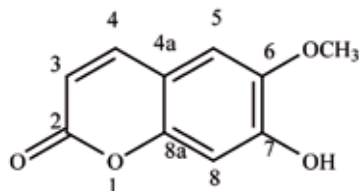
Por otro lado, el nombre trivial tiene la importante ventaja de la brevedad cuando se lo compara con la nomenclatura racional. Esta última posee un problema adicional en la numeración de las posiciones en el núcleo.

Como consecuencia, muchos investigadores han adoptado una nomenclatura no-sistemática basada en los nombres de algunos tipos de esqueletos básicos de cumarinas a los cuales le ha sido fijado un sistema de numeración.

La cumarina fue considerada inicialmente (desde un punto de vista de nomenclatura) como la resultante de la fusión de un benceno con un α -pirano, conduciendo al nombre de 5,6-benzopirano. Con el paso del tiempo el nombre correcto ha variado y el actualmente aceptado por la nomenclatura IUPAC para el núcleo de la cumarina sin sustituyentes es 2H-cromeno-2-ona. Comenzando a numerarse por el oxígeno heterocíclico y con la función ceto a la izquierda y en sentido de las agujas del reloj.

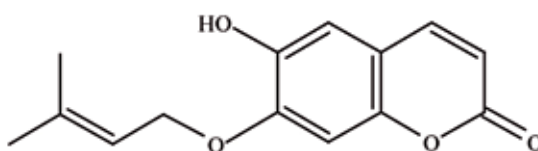


Dada la numeración anterior es deducible cualquier otra cumarina simple sustituida. La escopoletina (**8**), comúnmente distribuida en el reino vegetal será llamada según la IUPAC como 7-hidroxi-6 metoxi-2*H*-cromeno-2-ona.



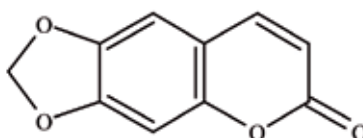
8 Escopoletina

En caso de tener cadenas isoprénicas unidas al anillo éstas también seguirán las reglas de la IUPAC. A modo de ejemplo la preniletina (**6**) será la 6-hidroxi-7-(3-metil-2-buteniloxi) 2*H*-cromeno-2-ona.



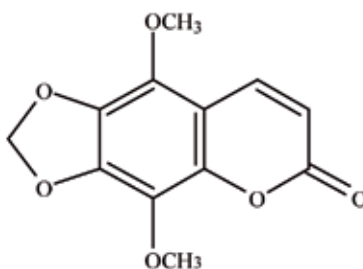
6 Preniletina

Cuando las cumarinas simples tienen unidos otros ciclos al núcleo benzopirano comienzan a numerarse en el oxígeno del anillo no involucrado en la fusión del núcleo. Colocando el ciclo a la derecha y en sentido de las agujas del reloj. Tal es el caso de la ayapina (**4**) a la que le corresponde el nombre de 6*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*g*]cromeno-6-ona



4 Ayapina

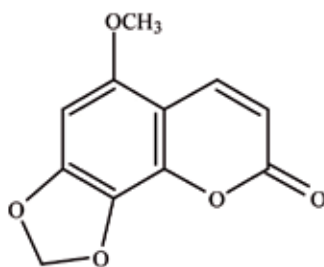
Para cualquier otra cumarina con la misma estructura base su nombre será derivado del anterior. La sabandina (**68**) llamada también 6,7-metilendioxi-5,8-dimetoxicumarina será según la IUPAC 4,9-dimetoxi-6*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*g*]cromeno-6-ona.



68 Sabandina

Si el ciclo formado por el grupo metilendioxi estuviese ocupando otra posición del núcleo de la cumarina

ésta será numerada con las reglas anteriores. La sabandinina (**69**) conocida como la 7,8-metilendioxi-5-metoxicumarina será llamada según IUPAC 5-metoxi-8*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*h*]cromeno-8-ona



69 Sabandinina

3.2.1.4.- Biosíntesis

El núcleo de las cumarinas simples pertenece al grupo de los fenil propanoides por ser derivados del ácido cinámico (C6 + C3). Estructuralmente pueden ser obtenidas por lactonización del carbonilo con el OH en C-2' del ácido 2'-hidroxicinámico (**70**).

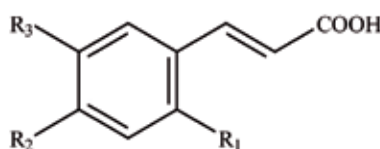
No está claro el mecanismo de conversión de ácidos cinámicos en cumarinas. Ante todo debe tenerse en cuenta que los ácidos cinámicos son *trans* por lo que para convertirlos en cumarinas deben isomerizarse a *cis* y además experimentar una *o*-hidroxilación. No es común encontrar *o*-hidroxifenilpropanos naturales, se presupone por lo tanto que la isomerización *cis-trans* va acompañada de una *o*-hidroxilación.

Existen dos tipos biosintéticamente fundamentales de cumarinas simples:

1. Aquellas oxigenadas en C-7, en posición *para* a la cadena del fenilpropano, al que pertenecen la mayoría de las cumarinas naturales.
2. Aquellas que no poseen oxigenación en C-7. A este último grupo pertenecen la cumarina propiamente dicha y muy pocas cumarinas naturales.

Brown en 1960 propuso al ácido *trans*-cinámico como el precursor común de todas las cumarinas y que su *orto* o *para* hidroxilación permitía la obtención de la cumarina o de la 7-hidroxi-cumarina.

Posteriormente en 1962, 1963^A y 1963^B el mismo autor usando lavanda (una de las pocas especies que sintetizan cumarina y 7-hidroxicumarina) demostró que el ác. *Trans*-[2-C]-2'-hidroxicinámico (**70**) así como su glucósido era un precursor selectivo de la cumarina y el ác. *Trans*- [2-C]-4'-hidroxicinámico (**71**) un precursor de la 7-metoxicumarina (herniarina).



70 $R_1 = OH, R_2 = R_3 = H$
71 $R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$

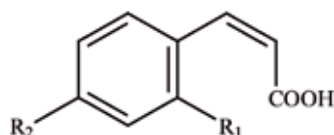
En la síntesis de la 7-hidroxicumarina la hidroxilación en *para*, por lo tanto, debe preceder a la *orto* hidroxilación, que es la etapa convenida en la formación del anillo lactónico. La confirmación dada por Floss y Mothes en 1964 y Austin y Meyer en 1965^A y 1965^B, para otras cumarinas han demostrado que este mecanismo es un mecanismo general. Por lo tanto existen dos rutas que deben ser consideradas en forma separada.

Acido cinámico a cumarina

Ha sido reconocido por muchos años que la cumarina existe en la planta en forma de glicósido hidrolizable a cumarina libre. Esta cumarina es el ác. *Cis*-2'-glucosiloxicinámico (**72**). La ruptura del enlace glicosídico conduce al ác. Inestable *cis*-2'-hidroxicinámico (**73**) que lactoniza espontáneamente a cumarina.

Rudorf y Shwartz en 1958 y Haskins y Gorz en 1961, concluyeron que la cumarina era formada como artefacto durante el proceso de aislamiento, siendo el resultado de la acción de una enzima endógena la β -glucosidasa específica para los *cis*-glicósidos.

Esta afirmación asume que enzima y sustrato están comparimentadas en algún lugar en la célula intacta, lo que prevendría la interacción. Esto explica el típico "olor a heno" que se forma en el pasto recién cortado, el ác. *O*-hidroxicinámico (melilotósido) precursor es inodoro, la cumarina formada es aromática.



72 R₁ = O-glucosil, R₂ = H

73 R₁ = OH, R₂ = H

Brown en 1962 administrando ¹⁴CO₂ interpreta sus resultados como indicativos de que existe un precursor común de cumarina y cumarinil glucósido, el ác. *trans*-2'-hidroxicinámico (**70**), el cual puede ser glucosidado a ác. *trans*-2'-glucosiloxicinámico o isomerizado directamente a cumarina. Los estudios cinéticos de Brown en 1962 después de la administración de ¹⁴CO₂ proveen una definitiva evidencia que el ác. *trans*-2'-glucosiloxicinámico es un intermediario en la formación de cumarina. Por otro lado Kleinhofs y col. en 1967 demuestran la glucosidación del ác. *trans*-2'-hidroxicinámico en extractos de *Melilotus alba*.

La conversión de ác. *trans*-cinámico a cumarinilglucósido debe comprender sucesivamente su 2'-hidroxilación, glucosidación en el hidroxilo 2' e isomerización a isómero *cis*.

La luz U.V. como mediadora de la isomerización *trans-cis* del cumarinilglucósido es actualmente aceptada y la posibilidad de que la reacción sea catalizada por una enzima es excluida. Haskins y col. en 1964 presentan evidencia de una reacción fotoquímica efectuada por longitud de onda mas corta que 360 nm.

Acido cinámico a cumarinas 7-oxigenadas

Así como la hidroxilación del ác. *trans*-cinámico conduce a la obtención de cumarina, la 4'-hidroxilación da lugar a la 7-hidroxicumarina. Esta última reacción es común a la biosíntesis de lignina y de numerosos productos fenólicos del metabolismo secundario de las plantas.

La conversión del ác. 4'-hidroxicinámico (**71**) a umbeliferona (**41**) y sus derivados implica obviamente una subsecuente 2'-hidroxilación. Kindl en 1971, informa la identificación de una enzima mediadora de la *orto*-hidroxilación en cloroplastos de *Hydrangea macrophylla* una especie que elabora cumarinas 7-oxigenadas. Esta especificidad difería de aquella hidroxilasa de Gestetner-Conn, la cual rápidamente convertía el ác. 4'-hidroxicinámico a umbeliferona y el ác. ferúlico a escopoletina presumiblemente vía los respectivos 2',4'-dihidroxiácidos los cuales rápidamente deben producir una *trans* isomerización y posterior lactonización.

Puede asumirse que virtualmente todas las especies de plantas superiores tienen 4'-hidroxilasa que es esencial para la formación de los monómeros de lignina y que por lo tanto no es el factor limitante en el control de la síntesis de umbeliferona. Aparentemente entonces, es la presencia o ausencia de una o ambas de estas 2'-hidroxilasas, las cuales controlan las especies que contienen cumarinas oxigenadas o no oxigenadas.

Los glucósidos juegan un rol importante en la formación de cumarinas 7-oxigenadas simples así como para la cumarina.

La herniarina (7-metoxicumarina) es también formada vía el ác. 4'-hidroxicinámico como lo demuestra Brown en 1962 y 1963^A, por un camino en el cual parecería participar el ác. *trans*-2'-glucosiloxi-4'-metoxicinámico. El paso en el cual ocurre la *O*-metilación permanece incierto pero Brown en 1965, creía que era probable que ocurra luego de la introducción de la función glucosiloxi; esta hipótesis podría implicar un intermediario como el ác. 2'-*trans*-glucosiloxi-4'-hidroxicinámico.

Muchos investigadores han trabajado sobre la biosíntesis de la escopoletina. el resultado estaría de acuerdo con la suposición que un camino análogo, implicando ácido 4'-hidroxicinámico, opera para el ácido cafeico y ácido ferúlico siendo por lo tanto intermediarios. La evidencia de mayor peso indica que la escopolina normalmente se origina por glucidación de escopoletina como indican los trabajos de Fritig y col. en 1967 y 1970 y Innerarity y col. en 1972.

Los resultados discutidos podrían sugerir un esquema general en el cual las cumarinas simples son derivadas de los ácidos hidroxicinámicos y sus análogos oxigenados, en los cuales no existiría ninguna oxigenación posterior a la formación del anillo lactónico. Aunque es evidente que en tal tendencia parecerían existir excepciones en cumarinas 6,7 y 7,8 dioxigenadas. Sato y Hasegawa en 1972 han realizado intentos para demostrar la biosíntesis de esculetina (6,7-dihidroxicumarina) en *Cichorium intybus* y daphnetina (7,8-dihidroxicumarina) en *Daphne odora*, desde el nivel de ác. cafeico *in-vivo*, obteniendo resultados negativos, sin embargo la conversión de ác. *cis*-cafeico a esculetina ha sido probada *in-vitro* en *Saxifraga stolonifera*. Estos descubrimientos junto con las anteriores demostraciones que umbeliferona, pero no el ác. ferúlico, es el precursor de la hidrangetina (7-hidroxi-8-metoxicumarina) por Bohn y col. en

1961 y Kindl y Bilek en 1964, sugieren que la oxigenación adicional puede algunas veces ocurrir en las cumarinas simples. Es también de interés, la observación en esta conexión, que la hidroxilación inicial puede ocurrir con posterioridad a la formación del núcleo de la cumarina en suspensiones de *Catharanthus roseus* y *Conium maculatum*, con la conversión de cumarina a umbeliferona.

Existen todavía aspectos no resueltos de la biosíntesis de las cumarinas simples oxigenadas. Un problema de interés es la biosíntesis comparativa de la 6,7 y la 7,8-dioxicumarinas. Uno podría observar las rutas de la figura 3.4, por las cuales la hidroxilación en *orto* del ácido ferúlico (**74**) (ruta 1) conduce a la formación de escopoletina (**8**) y por otro lado (ruta 2) de hidrangetina (**75**).

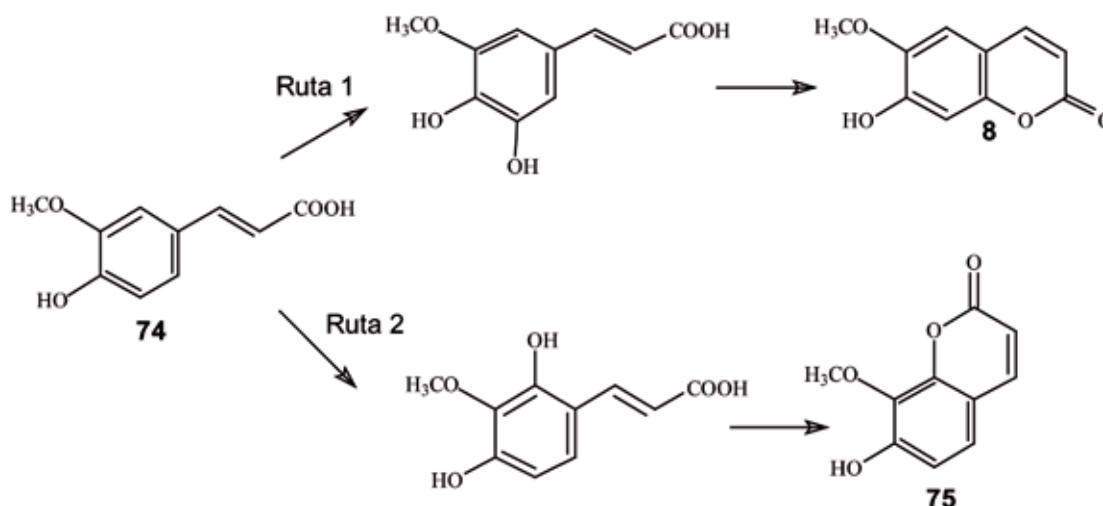


Figura 3.4. Mecanismo biosintético de escopoletina e hidrangetina.

Existe abundante evidencia, Steck, en 1967, Fritig y col., en 1970 y Kindl, en 1971, para la ruta 1, pero la conversión de ácido ferúlico en hidrangetina no pudo ser demostrada por Kindl y Bilek en 1964 en *H. macrophylla*, y la *orto*-hidroxilasa identificada en los cloroplastos de estas especies no formaron hidrangetina, sin embargo la escopoletina fue rápidamente sintetizada. Murray y col. en 1982 sostienen que se ven obligados a rechazar la ruta 1, parecería que la vía del ác. 4'-hidroxicinámico observada por Kindl y Bilek en 1964 sería la correspondiente para la formación de hidrangetina. Debe hacerse notar que nada es conocido aún sobre la biosíntesis de cumarinas simples polioxigenadas presentes en varias especies.

3.2.1.5.- Actividades biológicas de cumarinas simples

La búsqueda de medicamentos de origen vegetal ha conducido a un renovado interés farmacéutico en las estructuras cumarínicas. Las actividades biológicas de cumarinas simples son conocidas desde hace varias décadas mostrando potentes actividades farmacológicas y resultan ser de baja toxicidad para mamíferos. Entre las actividades biológicas encontradas para las cumarinas simples podemos mencionar las propiedades anticoagulante, estrogénica, antiproliferativa, diferenciante, fotosensibilizante, antiinflamatoria, antimicrobiana, antihelmíntica, vasodilatadora, molusquicida, sedativa, hipnótica, analgésica y antipirética (Hoult y Payá, 1996; Ojala, 2001, Riveiro y col., 2004).

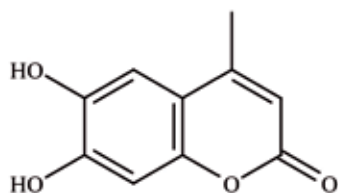
Actividad antiinflamatoria

Existen varios registros sobre la actividad antiinflamatoria de cumarinas simples en modelos experimentales de inflamación inducida por carragenanos.

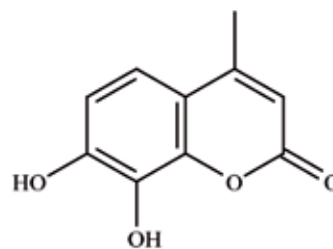
Los carragenanos estimulan la liberación de varios mediadores de la inflamación como la histamina, serotonina, bradicinina y prostaglandinas (Lino y col., 1997). Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) bloquean la síntesis de prostaglandinas inhibiendo la ciclooxigenasa (COX). La COX, junto con la 5-lipoxigenasa (5-LO) catalizan la peroxidación del ácido araquidónico. Es de esperar que polifenoles como cumarinas y flavonoides interfieran en este proceso (Hoult y col., 1994^B). Existen estudios que describen que la generación de leucotrienos B4 (productos de la 5-LO) es inhibida por las siguientes cumarinas: fraxetina (**32**), esculetina (**9**), 4-metilesculetina (**76**), dafnetina (**42**) y 4-metildafnetina (**77**) (Hoult y col. 1994^A).

La umbeliferona (**41**), demostró tener actividad antiinflamatoria y analgésica en ratas (Chen y col. 1995).

En 1997, Lino y col., demuestran que la cumarina (**50**) y la umbeliferona (**41**) presentan una acción similar a los AINEs en el modelo experimental inflamatorio inducido por carragenanos.



76 4-metilesculetina



77 4-metildafnetina

La cumarina (**50**) también demostró tener eficacia en el modelo inflamatorio inducido por dextrano realizado en patas de ratones. El ostol (**64**), demostró ser inhibidor selectivo *in vitro* de la 5-LO (Resch y col., 1998).

En el año 2000, García Argaez y colaboradores describen al ostol (**64**) con actividad antiinflamatoria. Estos autores concluyen que las cumarinas también pueden ejercer un efecto pro-inflamatorio dependiendo en la dosis en la que se administren.

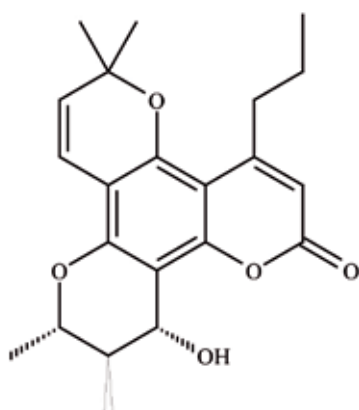
Actividad antimicrobiana

El notable incremento de la resistencia de los patógenos a los agentes antimicrobianos tanto en el plano farmacéutico como en el agroquímico, hace imprescindible la búsqueda de nuevos productos con actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria y antiviral.

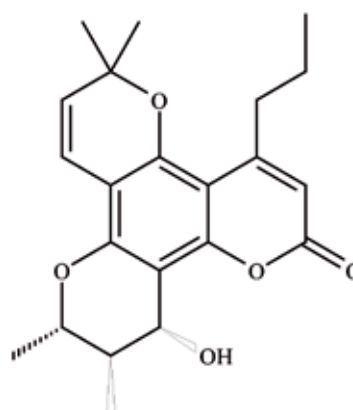
Existen numerosos registros que avalan la actividad de cumarinas simples y sus derivados químicos contra bacterias Gram positivo y Gram negativo así como también su actividad antifúngica, entre ellos podemos mencionar a Jurd y col., 1970 y 1971; Marston y col., 1995; Kwon y col., 1997; Kayser y Kolodziej, 1997; Shukla y col., 1999; Sardari y col., 1999; Bisignano y col., 2000; Zeid, 2002; de Souza y col., 2005; Stein y col., 2006.

Sardari y col. en 1999 hacen referencia a que el grupo hidroxilo libre en la posición 6 del núcleo cumarínico es una consideración estructural muy relacionada con la actividad antifúngica, así como también el grupo hidroxilo libre en posición 7 está muy relacionado con la actividad antibacteriana.

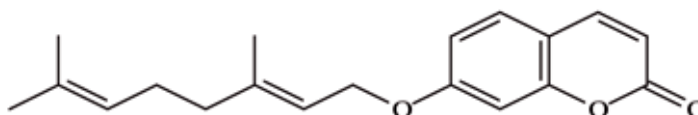
Se ha demostrado que ciertas cumarinas tienen actividad antiviral. El calanolide A (**78**), aislado de *Calopyllum lanigerum* var. *austrocoriaceum* (Fuller y col., 1994) y costatolide (**79**) del latex de *C. teysmanii* var. *inophylloide* han sido ensayados para validar su actividad anti-VIH ya que se ha demostrado que presentan efecto inhibitorio de la ADN-girasa (Matern y col. 1999). La colinina (**80**), aislada de *Zanthoxylum schinifolium* presentó actividad anti-HBV (Tsai y col., 2000).



78 calanolide A

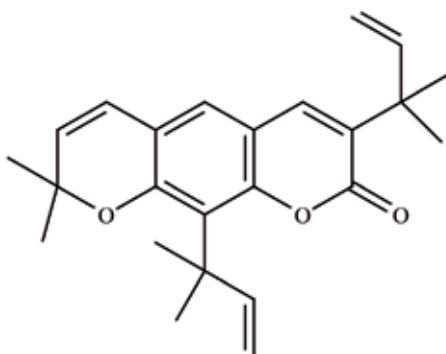


79 costatolide



80 colina

Yang y col., en 1992 hacen referencia a la actividad antimalárica atribuida a la dafnetina (**42**), extraída de plantas del género *Daphne*. Yenjai y col., en 2000, atribuyen esta misma actividad a la clausarina (**81**) aislada de la *Clausena harmandiana*.



81 clausarina

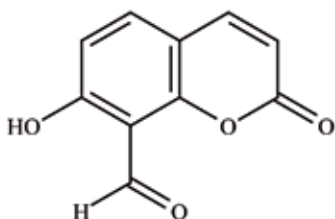
Actividad antitumoral

Kofinas y col. en 1998, comprueban que el extracto metanólico de *Tordylium apulum*, en el cual se encontraban umbeliferona (**41**) y una furocumarina (isoimperatorina), presentó actividad antiproliferativa de las células NSCLNC-N6 (línea de carcinoma de pulmón de células no pequeñas).

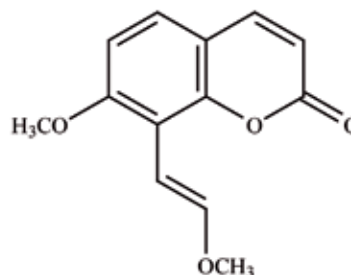
En 1999, Fujioka y col., demostraron que un extracto de la raíz de *Angelica japonica*, en el cual se identificaron escopoletina (**8**) y tres furocumarinas, tenía marcada actividad antiproliferativa frente a la línea celular KB de cáncer rinofaríngeo humano.

Rivero y col. en 2004, realizan un estudio *in vitro* donde detallan la actividad antiproliferativa y diferenciante de dos cumarinas 5,6,7-trioxigenadas aisladas de *Pterocaulon polystachyum*. Las cumarinas 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**) y 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**19**) inhiben la proliferación de las células promonocíticas humanas U-937, siendo este proceso tiempo y concentración dependiente. Los resultados llevaron a la conclusión que las cumarinas ensayadas pueden tener un rol potencial en el manejo terapéutico de la leucemia.

Chihiro y col. en 2005 con el objetivo de identificar nuevos agentes antitumorales, ensayaron *in vitro* 31 cumarinas aisladas de 11 plantas *Citrus* spp. (Rutaceae). La meta principal de este trabajo fue verificar el efecto inhibitorio de estas cumarinas sobre la activación del antígeno temprano del virus Epstein-Barr (EBV-EA) inducida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) en células Raji. Algunos de los compuestos ensayados sustituidos en la posición 8 del núcleo cumarínico: 8-formil-7-hidroxicumaina (**82**); ostenol (**55**); y ostenon (**83**); inhibieron significativamente la activación del EBV-EA (IC_{50} : 129 – 207 mol / 32 pmol TPA). En este mismo trabajo también se comprobó en un modelo *in vivo*, que el ostenol presenta un marcado efecto inhibitorio sobre la promoción del tumor de piel de ratones.



82 8-formil-7-hidroxicumaina

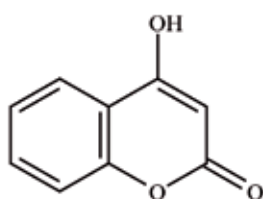


83 ostenon

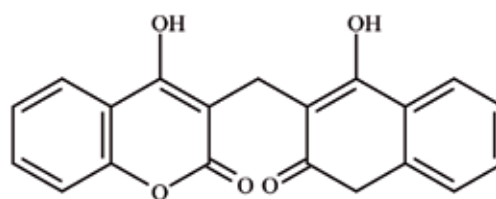
Actividad anticoagulante

Los derivados de la 4-hidroxicumarina (**84**) son los que se destacan en esta rama de las actividades biológicas. La acción anticoagulante de estos compuestos, en especial la de 3,3'-metilenbis(4-hidroxicumarina) comúnmente conocida como dicumarol (**85**), fue descubierta luego de una gran investigación llevada a cabo a causa de una masiva hemorragia presentada por el ganado vacuno. A través de la misma, se supo que este hecho tan dramático ocurrido en América del Norte en 1924 luego de la castración y descornación de los animales, era debido a la ingesta de *Melilotus* spp.; especies vegetales que contienen elevadas concentraciones de 4-hidroxicumarina (Murray y col., 1982; Hoult y Paya, 1996).

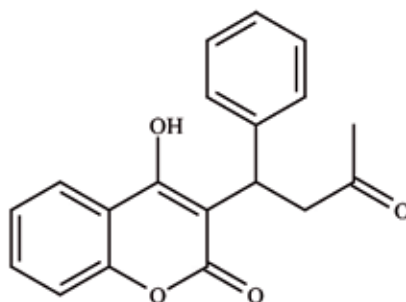
El dicumarol (**85**) fue el primer fármaco de administración oral en presentar acción anticoagulante, este compuesto fue utilizado como modelo en el desarrollo de una familia de anticoagulantes con el núcleo básico de la 4-hidroxicumarina. La warfarina (**86**) es un fármaco derivado del dicumarol, esta droga en la actualidad, es clínicamente muy utilizada como anticoagulante (Hoult y Paya, 1996).



84 4-hidroxicumarina



85 dicumarol



86 warfarina

Otras actividades

La escoparona (**2**), utilizada en la medicina china y aislada de la *Artemisia scoparia* (Asteraceae), demostró presentar actividad inmunosupresora, vasodilatadora, hipolipemiante e hipotensora. El ostol (**64**), también utilizado en la medicina china, causa hipotensión, es antiagregante plaquetario y relaja la musculatura lisa (Hoult y Paya, 1996).

El uso de las cumarinas y derivados ha demostrado grandes ventajas en varias áreas del análisis químico (Cooke y col., 1997). El alto rendimiento cuántico de fluorescencia presentado por estos compuestos es la clave de estas aplicaciones. Podemos mencionar entre otras aplicaciones, la estimación de actividad enzimática, la utilización como marcadores de proteínas, anticuerpos, ADN y lípidos y como agentes derivatizadores en cromatografía (Egan y col., 1990).

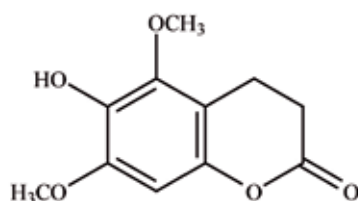
3.2.2.- Cumarinas como fitoalexinas

Las cumarinas son consideradas fitoalexinas ya que las plantas las producen como un mecanismo de defensa contra el ataque de otros organismos (Berenbaum, 1991).

Las fitoalexinas son sustancias con propiedades antimicrobianas producidas por las plantas cuando estas son infectadas por microorganismos fitopatogénicos (virus, bacterias y hongos), o cuando las plantas son sometidas a condiciones de estrés (sequías, frío, luz U.V., etc.). Estos compuestos se sintetizan generalmente en altas concentraciones en respuesta a una infección, desempeñando en las plantas un papel semejante al de los anticuerpos en los animales (Pinto y col. 2002).

En un trabajo realizado por Zeid en 2002, se sometió a estrés metabólico (mediante la inoculación de una suspensión conteniendo esporas de *Helminthosporium turcicum*, cloruro de mercurio y cloruro de cobre II) a hojas de *Corchorus olitorius* L. (Tiliaceae) y se describieron 5 cumarinas producidas por esta planta como fitoalexinas. Estos compuestos fueron aislados, purificados e identificados como escopoletina

(8), fraxinol (87), isopimpinellina (49), xantotoxol (47) y peucedanol (63). Estas cumarinas aisladas fueron ensayadas en cuanto a su actividad antimicrobiana y todas ellas presentaron actividad contra la totalidad de los microorganismos utilizados en el estudio.



87 Fraxinol

4.- Materiales y Métodos

4.1.- MATERIAL VEGETAL

Las partes aéreas secas de *Pterocaulon alopecuroides*, *P. angustifolium*, *P. balansae*, *P. cordobense*, *P. lorentzii*, *P. polypterum*, *P. polystachyum* y *P. rugosum* fueron cedidas por la Dra. Gilsane Lino von Poser de la Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Las partes aéreas de *P. purpurascens* fueron recogidas en marzo de 1996, en la Estación Experimental del I.N.T.A. (Concepción del Uruguay, Entre Ríos). Este material fue inmediatamente secado en estufa a 45 °C, se mantuvo seco y al abrigo de la luz.

La determinación taxonómica del material botánico utilizado fue realizada bajo la supervisión de la Dra. Etilé D. Spegazzini en la Cátedra de Farmacobotánica de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (U.N.L.P.).

Para la identificación botánica de las especies estudiadas, se compararon las muestras vegetales con los siguientes ejemplares de herbario depositados en el "Museo de Ciencias Naturales Pascasio Moreno, U.N.L.P.": *P. alopecuroides* (Lam.) DC. (Nº 24885, Figura 4.1); *P. angustifolium* DC. (Nº 12188, Figura 4.2); *P. balansae* Chodat (Nº 66285, Figura 4.3); *P. cordobense* OK. (Nº. 302333, Figura 4.4); *P. lorentzii* Malme (Nº 2446, figura 4.5); *P. polypterum* (DC.) Cabrera (Nº 077387, Figura 4.6); *P. polystachyum* DC. (Nº 052949, Figura 4.7); *P. purpurascens* Malme (Nº 21483, Figura 4.8); *P. rugosum* (Vahl) Malme (Nº 894543, Figura 4.9).



Figura 4.1: *P. alopecuroides*



Figura 4.2: *P. angustifolium*



Figura 4.3: *P. balansae*



Figura 4.4: *P. cordobense*



Figura 4.5: *P. lorentzii*



Figura 4.6: *P. polypterum*



Figura 4.7: *P. polystachyum*



Figura 4.8: *P. purpurascens*



Figura 4.9: *P. rugosum*

4.2.- EQUIPOS UTILIZADOS

El análisis por HPLC fue desarrollado en un equipo Hewlett Packard HP1100.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H (200 MHz) y ^{13}C (50 MHz) fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker AC200 en CDCl_3 u otro solvente deuterado indicado, con referencia interna de TMS.

Los puntos de fusión (P.F.) sin corregir fueron obtenidos en un aparato Fisher-Johnson.

Los espectros de masa (MS) fueron obtenidos mediante la técnica de inserción directa e ionización electrónica en un equipo GC-MS-QP5050A Shimadzu.

Los espectros ultra violeta fueron realizados en un equipo de doble haz UVIKON 943 Kontron Instruments.

4.3.- CUMARINAS TESTIGOS

Las cumarinas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**), 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**), ayapina (**4**), escopoletina (**8**), prenilletina (**6**), virgatenol (**7**), 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**22**), 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxi-cumarina (**19**), 5-(3-metil-2-oxobutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**25**), 5-hidroxi-6,7-metilendioxi-cumarina (**28**), 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**), 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-5,6-dimetoxicumarina (**29**), purpurasol (**38**), purpurasolol (**40**) y purpureanol (**39**) fueron cedidas por la Dra. Silvia L. Debenedetti. La 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**15**), fue gentilmente cedida por la Dra. Gilsane Lino von Poser. La fraxetina (**32**) fue adquirida comercialmente de Sigma-Aldrich[®]. La 6,7,8-trimetoxicumarina (**34**) y la isofraxidina (**33**) fueron aisladas e identificadas en el presente trabajo (ver 4.8).

4.4.- SOLVENTES DE EXTRACCIÓN Y CROMATOGRAFÍA

En los procesos de extracción y redisolución de material vegetal fueron utilizados CH_2Cl_2 , ACN y tolueno como solventes, obtenidos comercialmente y destilados antes de su uso.

Para la cromatografía en columna (cc), capa delgada (ccd) analítica y preparativa, y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se utilizaron los siguientes solventes: ACN, CH_2Cl_2 , tolueno, CH_3OH y EtOAc provistos por Merck[®] y destilados antes de su uso, agua MilliQ (filtro Millipore de 0,45 μm).

4.5.- FASES ESTACIONARIAS

La ccd analítica fue realizada sobre cromatofolios Merck[®] de Sílica gel 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm). La ccd preparativa fue realizada sobre placas de vidrio (20 x 20 cm), teniendo como adsorbente sílica gel GF₂₅₄ Merck[®].

La cc utilizó Sílica gel 60, Merck[®].

En la técnica HPLC, se utilizó una columna de fase reversa HP LiChrosorb RP18 (10 μm x 200 x 4,6 mm).

4.6.- ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA (CCD)

4.6.1.- Preparación de los extractos

Los extractos para análisis por ccd fueron preparados con aproximadamente 0,5 g de partes aéreas de cada muestra molidas en molino de cuchillas, las cuales fueron sometidas a maceración estática con 10 mL de CH_2Cl_2 a temperatura ambiente durante 24 horas. Luego de este período se filtraron los extractos a presión reducida. El marco de las filtraciones fue sometido a sonicación con 10 mL de CH_2Cl_2 a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los dos extractos diclorometánicos obtenidos para cada especie fueron reunidos y concentrados a presión reducida. hasta aproximadamente un volumen de 1 mL (Solución Muestra).

4.6.2.- Preparación de testigos

Se disolvió aproximadamente 1 mg de cada testigo en 1,5 mL de CH_2Cl_2 .

4.6.3.- Sistemas cromatográficos

Sistema 1:

- Fase estacionaria: Cromatofolios de sílica gel 60 HF₂₅₄.
- Fase móvil: Tolueno : EtOAc (7:3).
- Revelado: Luz U.V., $\lambda = 366 \text{ nm}$, $\lambda = 254 \text{ nm}$ y vapores de NH_3 .

Sistema 2:

- Fase estacionaria: Cromatofolios de sílica gel 60 HF₂₅₄.
- Fase móvil: CH₂Cl₂ : CH₃OH (96:4).
- Revelado: Luz U.V., $\lambda = 366$ nm, $\lambda = 254$ nm y vapores de NH₃.

4.7.- ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

4.7.1.- Preparación de los extractos

Los extractos diclorometánicos para análisis por HPLC fueron preparados de la misma manera que para el análisis por ccd. El CH₂Cl₂ fue evaporado a presión reducida hasta sequedad.

4.7.2.- Preparación de las soluciones muestra

Los extractos obtenidos en 4.6.1, fueron redisoluertos en 2,5 mL de ACN. Se centrifugaron durante 20 min. a 4000 rpm. Se recuperaron los sobrenadantes y se filtraron a través de filtros de C18 de 1 cm de diámetro.

Se comprobó por ccd analítica (ver 4.6.3, sistema 1), que el tratamiento al que se sometieron los extractos para la preparación de las soluciones muestra, conservaron el perfil cumarínico de los extractos obtenidos en 4.6.1.

4.7.3.- Preparación de testigos

2,0 mg de cada testigo se redisolvieron en 3 mL de ACN.

4.7.4.- Sistema cromatográfico

Sistema:

- Solvente 1: ACN
- Solvente 2: agua, 1% H₃PO₄
- Flujo: 1,2 mL/min.
- Detector: U.V. con longitud de onda fija a $\lambda = 320$ nm

Tabla 4.1: Programa de elución de solventes

Tiempo (min.)	% Solvente 1	% Solvente 2
0,00	0	100
2,00	15	85
32,00	85	15
35,00	100	0

4.7.5.- Estándar interno

La 6,7,8-trimetoxicumarina (**34**) previamente aislada, purificada e identificada en el presente trabajo fue utilizada como estándar interno para el análisis de los extractos y testigos de cumarinas por HPLC.

4.8.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CUMARINAS 6,7,8-TRIOXIGENADAS DE *P. PURPURASCENS*.

4.8.1.- Preparación de extractos

Se extrajeron 35 g de partes aéreas secas y molidas en molino de cuchillas de *P. purpurascens* con 500 mL de CH₂Cl₂ utilizando un aparato de extracción Soxhlet. Se realizaron 25 extracciones. El extracto obtenido se concentró a presión reducida hasta sequedad, con un rendimiento de 1,34 g. El extracto fue sometido a ccd analítica (ver 4.6.3, sistema 1), comprobando que el perfil de cumarinas es idéntico a aquel del extracto obtenido por extracción en frío según en tratamiento 4.6.1.

4.8.2.- Cromatografía en columna (cc)

El seguimiento de la cc se realizó dentro de un reactor fotoquímico provisto de 4 lámparas U.V. (80 W) de $\lambda = 366$ nm.

Sistema:

- Fase estacionaria: Sílica gel 60.
- Solventes de elución: Tolueno : Acetato de etilo (7:2,5)

La columna fue empacada en húmedo utilizando 30 g de sílica en tolueno con 3 gotas de TEA. El seguimiento de la cc se llevó a cabo mediante ccd analítica, con revelado de luz U.V. (sistemas 1 y 2, ver 4.6.3).

Se sembraron 1,20 g de extracto obtenido en 4.8.1 redisueltos en 1,5 mL de tolueno. Se eluyó la columna en forma isocrática obteniéndose 60 fracciones de 15 mL cada una (Fr 1-60). Las bandas en la columna fueron visualizadas mediante la fluorescencia provocada por la luz U.V. de $\lambda = 366$ nm en el interior del reactor fotoquímico.

4.8.2.1.- Aislamiento e identificación de la 6,7,8-trimetoxicumarina (34)

Las fracciones 9 a 13 inclusive fueron reunidas según su perfil cromatográfico (Fr 9-13), presentando un único compuesto con R_f de $0,37 \pm 0,01$ en el sistema cromatográfico 1 (ver 4.6.3). La Fr 9-13 resultante fue evaporada a presión reducida con un rendimiento de 210 mg, que por recrystalización en 5 mL de CH_3OH rindieron 51 mg de cristales amarillentos, fluorescentes a la luz U.V.

6,7,8-Trimetoxicumarina:

P.F. (sin corregir): 105-106 °C

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ (ppm, TMS): 3,90 (s, 3H); 3,99 (s, 3H); 4,04 (s, 3H); 6,34 (d, 1H, 10 Hz); 6,67 (s, 1H); 7,61 (s, 1H, 10 Hz).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm, TMS): 29,71; 56,32; 61,55; 61,86; 103,69; 114,35; 115,23; 141,18; 143,47; 145,94; 150,05; 160,54.

4.8.2.2.- Aislamiento de la isofraxidina (33)

Las fracciones 26 a 50 inclusive fueron reunidas por su perfil cromatográfico presentando como componente mayoritario un compuesto con R_f de $0,16 \pm 0,04$ en el sistema cromatográfico 1 y de $0,41 \pm 0,01$ en el sistema cromatográfico 2 (ver 4.6.3). La Fr 26-50 fue evaporada a presión reducida obteniéndose un rendimiento de 20 mg. Esta masa fue redisuelta en 2 mL CH_2Cl_2 : MeOH (96:4) y purificada por ccd preparativa utilizando como fase estacionaria: Sílica gel 60, fase móvil: CH_2Cl_2 : CH_3OH (96:4) y revelado con luz U.V., $\lambda = 366$ nm, U.V., $\lambda = 254$ nm y vapores de NH_3 .

Una banda de fluorescencia celeste al U.V. 366 nm de R_f $0,41 \pm 0,01$ fue aislada de la placa por raspado y colocada en un Erlenmeyer para ser eluida con 5 mL de MeOH. Se filtró y se concentró a presión reducida (6 mg).

UV λ_{max} (MeOH): 338, 317, 260 (sh)

UV λ_{max} (NaOMe): 400, 275 (sh), 264 (sh)

EIMS 70 eV, m/z rel. int.: 222 [M⁺] (100), 207 (33), 194 (32), 179 (30).

4.9.- HIDRÓLISIS ÁCIDA DE 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (19)

En un balón de 15 mL provisto de una barra de agitación magnética, se introdujeron 5 mg de 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (19) en 5 mL de una solución de HCl 1 % preparada en EtOH:agua (50:50).

Se sometió la mezcla a agitación magnética durante 1 hora a temperatura ambiente y posterior sonicación durante 15 minutos. Se monitoreó el avance de la reacción por ccd (sistema 1, ver 4.6.3) hasta desaparición del sustrato, lo cual ocurrió en 75 minutos. Se evaporó el solvente a presión reducida y se procedió a la purificación de la masa cruda por ccd preparativa (sistema 1, ver 4.6.3). Se comprobó la identidad de la 5-hidroxi-5,6-metilendioxicumarina (28) por comparación (ccd) con una muestra testigo (sistema 1, ver 4.6.3). También se comprobó la identidad del producto de hidrólisis purificado mediante comparación de su t_{RR} (HPLC) con el de un testigo (experimento Spike).

5.- Resultados y Discusión

Los extractos diclorometánicos de 9 especies del género *Pterocaulon* fueron analizados por ccd en distintos sistemas cromatográficos y por HPLC utilizando como estándar interno la 6,7,8-trimetoxicumarina. La identificación de las cumarinas en los extractos se realizó por ccd comparando las relaciones de frente, el color de la fluorescencia a la luz U.V. de 366 nm y 366 nm con NH_3 de las bandas de cada extracto con las relaciones de frente y color de fluorescencia de 19 cumarinas utilizadas como testigo. La identificación de las cumarinas por HPLC fue realizada comparando los tiempos de retención relativos (t_{RR}) de las señales obtenidas en el cromatograma de cada extracto, con los t_{RR} de las cumarinas testigos. Las cumarinas utilizadas como testigos fueron aisladas previamente de tres especies de *Pterocaulon* (*P. purpurascens*, *P. virgatum* y *P. polystachyum*) e identificadas por métodos espectroscópicos y técnicas especiales.

Así mismo se calculó el área porcentual de cada señal en los cromatogramas de cada especie. De acuerdo a la longitud de onda de trabajo ($\lambda = 320$ nm) en el análisis por HPLC, la absorptividad promedio de las cumarinas estudiadas es de aproximadamente 12.600 (Murray y col. 1982), lo que corresponde a un rango de concentración detectado por esta técnica de $1,6 \times 10^{-4}$ a 10^{-6} mol/L para las cumarinas analizadas.

5.1.- Cumarinas analizadas como testigos

Tabla 5.1: Tiempos de retención (HPLC) relativos promedio (t_{RR}) determinados para las cumarinas usadas como testigos.

Testigo	$t_{RR}^1 \pm 0,008$
Fraxetina (32)	0,599
Escopoletina (8)	0,713
Isofraxidina (33)	0,725
7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (3)	0,774
5-hidroxi-6,7-metilendioxicumarina (28)	0,783
5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (22)	0,860
Purpurasolol (40)	0,867
7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi) 5,6-dimetoxicumarina (29)	0,902
Ayapina (4)	0,945
Purpurasol (38)	0,962
6,7,8-trimetoxicumarina (34)	1,000
Virgatenol (7)	1,064
Purpureol (39)	1,115
7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (15)	1,167
5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (20)	1,199
Preniletina (6)	1,274
5-(3-metil-2-oxobutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (25)	1,335

7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**) 1,517

5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**19**) 1,721

¹ Los t_{RR} fueron determinados como el promedio de los tiempos de retención relativos, calculados éstos como los cocientes entre los tiempos de retención de los testigos y el tiempo de retención del estándar interno ($t_{RR} = t_{Ri1}/t_{Rref}$).

Tabla 5.2: Relaciones de frente¹ (R_f , por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas utilizadas como testigos.

Testigo	$R_f^1 \pm \varepsilon$	Color de la fluorescencia ²	Color de la fluorescencia ² con NH_3
5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (22)	$0,36 \pm 0,03^3$	celeste amarillento	no cambia
7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (3)	$0,39 \pm 0,03^3$	celeste	no cambia
Purpurasolol (40)	$0,10 \pm 0,05$ $0,52 \pm 0,02^3$	marrón	marrón verdoso
Purpurasol (38)	$0,11 \pm 0,05$ $0,67 \pm 0,02^3$	azul	no cambia
Virgatenol (7)	$0,11 \pm 0,05$ $0,72 \pm 0,02^3$	celeste	no cambia
Isofraxidina (33)	$0,16 \pm 0,04$	celeste	Amarilla
7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-5,6-dimetoxicumarina (29)	$0,17 \pm 0,04$ $0,43 \pm 0,03^3$	celeste amarillento	no cambia
Escopoletina (8)	$0,19 \pm 0,03$	celeste	verde
Fraxetina (32)	$0,20 \pm 0,08$	marrón	marrón verdoso
5-hidroxi-6,7-metilendioxicumarina (28)	$0,22 \pm 0,01$	marrón	marrón verdoso
Purpurenol (39)	$0,26 \pm 0,01$	amarillo-naranja	no cambia
7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (15)	$0,30 \pm 0,02$	celeste	no cambia
6,7,8-trimetoxicumarina (34)	$0,37 \pm 0,01$	celeste-grisáceo	no cambia
5-(3-metil-2-oxobutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (25)	$0,49 \pm 0,01$	celeste amarillento	no cambia
Preniletina (6)	$0,50 \pm 0,01$	celeste	rosa
7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (5)	$0,51 \pm 0,01$	celeste	no cambia

Ayapina (4)	0,55 ± 0,01	celeste	no cambia
5-metoxi-6,7-metilendioxi-cumarina (20)	0,625 ± 0,009	celeste amarillento	no cambia
5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (19)	0,712 ± 0,008	celeste amarillento	no cambia

¹ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 1 (ver 4.6.3)

² Color de la fluorescencia observada a $\lambda_{excitación} = 366 \text{ nm}$ (Murray y col., 1982)

³ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 2 (ver 4.6.3)

La exposición de cumarinas que presentan hidroxilos fenólicos a vapores de amoníaco, convierte a dicho grupo funcional en fenóxido, desplazando la longitud de onda máxima de absorción. Razón por la cual el máximo de emisión fluorescente también sufre un corrimiento a mayores longitudes de onda, lo que se observa con los respectivos cambios de color de la fluorescencia.

5.3.- PTEROCAULON ALOPECUROIDES

Tabla 5.3: Tiempos de retención (HPLC) relativos promedio (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. alopecuroides* y su asignación a los testigos correspondientes.

$t_{RR}^1 \pm 0,01$	Asignado a testigo	Area ² ± 0,5
0,73	Isofraxidina (33)	12,0
0,77	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (3)	35,0
0,87	Purpurasolol (40)	2,0
1,00	6,7,8-trimetoxicumarina ³ (34)	3,0
1,12	Purpureanol (39)	2,5
1,16	7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (15)	10,5
1,20	5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (20)	2,5
1,51	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (5)	8,0

¹ Los t_{RR} fueron determinados como el promedio de los tiempos de retención relativos, calculados como los cocientes entre los tiempos de retención de las cumarinas en el extracto y el tiempo de retención del estándar interno.

² Área porcentual (según HPLC, determinada a $\lambda = 320 \text{ nm}$).

³ La presencia de la 6,7,8-trimetoxicumarina fue verificada por la técnica spike.

Tabla 5.4: Relaciones de frente¹ (R_f , por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. alopecuroides* y su asignación a los testigos correspondientes.

$R_f \pm \epsilon$	Color de la fluorescencia ²	Color de la fluorescencia ² con NH_3	Asignado a testigo
$0,39 \pm 0,03$ ³	celeste	no cambia	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (3)
$0,11 \pm 0,05$ $0,52 \pm 0,02$ ³	marrón	marrón verdoso	Purpurasolol (40)
$0,16 \pm 0,04$	celeste	amarilla	Isofraxidina (33)
$0,25 \pm 0,01$	amarillo-naranja	no cambia	Purpurenol (39)
$0,30 \pm 0,02$	celeste	no cambia	7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (15)
$0,36 \pm 0,01$	celeste-grisáceo	no cambia	6,7,8-trimetoxicumarina (34)
$0,51 \pm 0,01$	celeste	no cambia	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (5)
$0,63 \pm 0,01$	celeste amarillento	no cambia	5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (20)

¹ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 1 (ver 4.6.3)

² Color de la fluorescencia observada a $\lambda_{excitación} = 366$ nm

³ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 2 (ver 4.6.3)

En el extracto diclorometánico de las partes aéreas de *P. alopecuroides* se identificaron por HPLC y ccd 8 cumarinas con 4 patrones de oxigenación diferentes. Cumarinas 6,7-dioxigenadas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**), 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**) y 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**15**); una cumarina 5,6,7-trioxigenada: 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**); cumarinas 6,7,8-trioxigenadas: isofraxidina (**33**) y 6,7,8-trimetoxicumarina (**34**); cumarinas 5,6,7,8-tetraoxigenadas: purpurenol (**39**) y purpurasolol (**40**).

Según la integración del área de las señales observadas por HPLC, el extracto está compuesto por 4 cumarinas mayoritarias: un 35 % de la cumarina **3**, 12 % de la cumarina **33**, 11 % de **15**, 8 % de **5** y 4 cumarinas minoritarias **34**, **20**, **39** y **40** que se encuentran en una proporción del 2 a 3 %. El 54 % de las cumarinas totales del extracto corresponden a cumarinas 6,7-dioxigenadas.

Otros autores (ver 3.1.4.1) identificaron en esta misma especie 2 cumarinas 6,7-dioxigenadas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**) y 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**15**); y 2 cumarinas 5,6,7-trioxigenadas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-5-hidroxi-6-metoxicumarina (**18**) y 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**).

Las cumarinas **5**, **33**, **34**, **38** y **40** son identificadas por primera vez en este trabajo en la especie *Pterocaulon alopecuroides*.

5.3.- *Pterocaulon angustifolium*

Tabla 5.5: Tiempos de retención (HPLC) relativos promedio (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. angustifolium* y su asignación a los testigos correspondientes.

$t_{RR}^1 \pm \varepsilon$	Asignado a testigo	Area $^2 \pm 0,5$
0,774 \pm 0,008	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (3)	42,0
0,86 \pm 0,03	Purpurasolol (40)	5,0
0,97 \pm 0,03	Purpurasol (38)	28,0

¹ Los t_{RR} fueron calculados como los cocientes entre los tiempos de retención de las cumarinas en el extracto y el tiempo de retención asignado al estándar interno. El tiempo de retención de la referencia fue calculado como valor promedio de 13,081 min.

² Área porcentual (según HPLC, $\lambda = 320$ nm).

Tabla 5.6: Relaciones de frente¹ (R_f , por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. angustifolium* y su asignación a los testigos correspondientes.

$R_f^1 \pm \varepsilon$	Color de la fluorescencia ²	Color de la fluorescencia ² con NH ₃	Asignado a testigo
0,39 \pm 0,04 ³	celeste	no cambia	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (3)
0,52 \pm 0,02 ³	marrón	marrón verdoso	Purpurasolol (40)
0,12 \pm 0,05 0,67 \pm 0,02 ³	azul	no cambia	Purpurasol (38)
0,18 \pm 0,04	celeste	Amarilla	Isofraxidina (33)
0,52 \pm 0,01	celeste	no cambia	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (5)
0,632 \pm 0,009	celeste amarillento	no cambia	5-metoxi-6,7-metilen-dioxicumarina (20)

¹ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 1 (ver 4.6.3)

² Color de la fluorescencia observada a $\lambda_{excitación} = 366$ nm

³ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 2 (ver 4.6.3)

En el extracto diclorometánico de las partes aéreas de *P. angustifolium* se identificaron 6 cumarinas con 4 patrones de oxigenación diferentes. Cumarinas 6,7-dioxigenadas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**) y 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**); cumarina 5,6,7-trioxigenada: 5-metoxi-6,7-metilen-dioxicumarina (**20**); cumarinas 6,7,8-trioxigenadas: isofraxidina (**33**) y purpurasol (**38**); cumarinas 5,6,7,8-tetraoxigenadas: purpurasolol (**40**).

Los compuestos **3**, **38** y **40** fueron identificados tanto por la técnica de ccd como por HPLC. Las cumarinas **5**, **20** y **33** fueron identificadas por co-cromatografía en ccd. La cumarina **33** no pudo ser

identificada por HPLC ($t_{RR} = 0,73$) puesto que coeluye con la cumarina **3** cuyo t_{RR} fue encontrado con un valor de $0,774 \pm 0,008$.

Según el análisis por HPLC, a la longitud de onda de trabajo, se observó que el 42 % de la composición del extracto corresponde a **3**, el 28 % a **38** y el 5,2 % a **40**, habiéndose podido identificar por esta técnica el 75 % de la composición total del extracto (monitoreado a $\lambda = 320$ nm).

Cabe señalar que en este extracto, las cumarinas 6,7-dioxigenadas y 6,7,8-trioxigenadas identificadas constituyen un 70 % del extracto cumarínico observado.

Esta especie no fue fitoquímicamente estudiada con anterioridad, siendo por lo tanto el primer registro en cuanto a la identificación de cumarinas.

5.4.- *Pterocaulon balansae*

Tabla 5.7: Tiempos de retención (HPLC) relativos promedio (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. balansae* y su asignación a los testigos correspondientes.

$t_{RR}^1 \pm 0,008$	Asignado a testigo	Area $^2 \pm 0,5$
0,772	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (3)	34,0
0,862	5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (22)	7,5
1,000	6,7,8-trimetoxicumarina ³ (34)	3,0
1,168	7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (15)	17,0
1,200	5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (20)	19,0
1,523	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (5)	3,5
1,720	5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (19)	5,5

¹ Los t_{RR} fueron determinados como el promedio de los tiempos de retención relativos, calculados como los cocientes entre los tiempos de retención de las cumarinas en el extracto y el tiempo de retención del estándar interno.

² Área porcentual (según HPLC, $\lambda = 320$ nm).

³ La presencia de la 6,7,8-trimetoxicumarina fue verificada por la técnica spike.

Tabla 5.8: Relaciones de frente¹ (R_f , por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. balansae* y su asignación a los testigos correspondientes.

$R_f \pm \varepsilon$	Color de la fluorescencia ²	Color de la fluorescencia ² con NH ₃	Asignado a testigo
0,40 ± 0,03 ³	celeste	no cambia	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (3)
0,37 ± 0,03 ³	celeste amarillento	no cambia	5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (22)
0,30 ± 0,02	celeste	no cambia	7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (15)
0,49 ± 0,01	celeste amarillento	no cambia	5-(3-metil-2-oxobutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (25)
0,52 ± 0,01	celeste	no cambia	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (5)
0,617 ± 0,009	celeste amarillento	no cambia	5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (20)
0,719 ± 0,008	celeste amarillento	no cambia	5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (19)

¹ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 1 (ver 4.6.3)² Color de la fluorescencia observada a $\lambda_{excitación} = 366$ nm³ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 2 (ver 4.6.3)

En el extracto diclorometánico de las partes aéreas de *P. balansae* se identificaron 8 cumarinas con 3 patrones de oxigenación diferentes. Cumarinas 6,7-dioxigenadas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**), 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**) y 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**15**); cumarinas 5,6,7-trioxigenadas: 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**19**), 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**), 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**22**) y 5-(3-metil-2-oxobutiloxi)-6,7-metilen-dioxicumarina (**25**) y una cumarina 6,7,8-trioxigenadas: 6,7,8-trimetoxicumarina (**34**).

Las cumarinas **3**, **5**, **15**, **19**, **20** y **22** fueron identificadas tanto por HPLC como por ccd. La cumarina **34** fue identificada solo por HPLC dado que su baja concentración en el extracto (2,7 % del total de cumarinas) hizo dudosa su identificación por ccd. La cumarina **25** ($t_{RR} = 1,33 \pm 0,008$) fue solo identificada por ccd dado que en el análisis por HPLC coeluye con un compuesto de identidad desconocida con tiempo

de retención relativo de 1,31 que representa aproximadamente el 7 % de los compuestos detectables en el extracto a la longitud de onda de trabajo.

La cumarina **22** presenta un tiempo de retención relativo ($t_{RR} = 0,860 \pm 0,008$) muy similar a la cumarina **40** ($t_{RR} = 0,867 \pm 0,008$). Esto fue resuelto por cdd (sistema 2, ver 4.6.3) descartándose la presencia de la cumarina **40** ($R_f = 0,52 \pm 0,02$) y confirmándose la presencia de la cumarina **22** ($R_f = 0,36 \pm 0,03$).

Según el análisis por HPLC y a la longitud de onda de trabajo, se pudo identificar el 89 % de la composición del extracto en estudio, siendo el 34 % atribuible a la cumarina **3**, el 19 % **20**, el 17 % **15**, el 8 % **22**, el 6 % **19**, el 3 % **5** y el 3 % **34**.

Cabe destacar que en el presente extracto se observa que el patrón de cumarinas 6,7-dioxigenadas identificadas representa un 39 % del extracto total, mientras que las cumarinas con un patrón 5,6,7-trioxigenadas identificadas, representan aproximadamente un 33 % de la composición del extracto observada a la longitud de onda de trabajo.

En estudios previos, otros autores (ver 3.1.4.1) identificaron en esta especie 2 cumarinas 6,7-dioxigenadas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**) y 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**15**); y 4 cumarinas 5,6,7-trioxigenadas: 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**19**), 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**), sabandinol (**22**) y 5-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**24**).

Este trabajo confirma la presencia de las cumarinas **3**, **15**, **19**, **20** y **22** previamente identificadas por otros autores. Las cumarinas **5**, **25** y **34** son identificadas por primera vez en la especie *Pterocaulon balansae*.

5.5.- *Pterocaulon cordobense*

Tabla 5.9: Tiempos de retención (HPLC) relativos promedio (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. cordobense* y su asignación a los testigos correspondientes.

$t_{RR}^1 \pm 0,008$	Asignado a testigo	Area $^2 \pm 0,5$
0,774	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (3)	7,0
0,903	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi) 5,6-dimetoxicumarina (29)	18,0
1,167	7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (15)	4,5
1,199	5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (20)	29,0
1,290	Preniletina (6)	2,0
1,528	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (5)	2,0
1,725	5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (19)	8,0

¹ Los t_{RR} fueron determinados como el promedio de los tiempos de retención relativos, calculados como los cocientes entre los tiempos de retención de las cumarinas en el extracto y el tiempo de retención del estándar interno.

² Área porcentual (según HPLC, $\lambda = 320$ nm).

Tabla 5.10: Relaciones de frente¹ (R_f , por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. cordobense* y su asignación a los testigos correspondientes.

$R_f \pm \varepsilon$	Color de la fluorescencia ²	Color de la fluorescencia ² con NH_3	Asignado a testigo
$0,39 \pm 0,03$ ³	Celeste	no cambia	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (3)
$0,44 \pm 0,03$ ³	celeste amarillento	no cambia	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-5,6-dimetoxicumarina (29)
$0,73 \pm 0,02$ ³	Celeste	no cambia	Virgatenol (7)
$0,29 \pm 0,02$	Celeste	no cambia	7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (15)
$0,48 \pm 0,01$	Celeste	rosa	Preniletina (6)
$0,52 \pm 0,01$	Celeste	no cambia	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (5)
$0,622 \pm 0,009$	celeste amarillento	no cambia	5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (20)
$0,719 \pm 0,008$	celeste amarillento	no cambia	5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (19)

¹ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 1 (ver 4.6.3)

² Color de la fluorescencia observada a $\lambda_{\text{excitación}} = 366 \text{ nm}$

³ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 2 (ver 4.6.3)

En el extracto diclorometánico de partes aéreas de *P. cordobense* se identificaron 8 cumarinas con 2 patrones de oxigenación diferentes. Cumarinas 6,7-dioxigenadas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**), 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**), preniletina (**6**), virgatenol (**7**) y 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**15**); y cumarinas 5,6,7-trioxigenadas: 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**19**), 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**) y 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-5,6-dimetoxicumarina (**29**).

Las cumarinas **3**, **5**, **6**, **15**, **19**, **20** y **29** fueron identificadas por HPLC y ccd. La cumarina **7**, fue solamente identificada por ccd dado que según el análisis por HPLC se halla en muy baja concentración otorgando a su identificación mucha incertidumbre.

Según el análisis por HPLC, a la longitud de onda de trabajo, se observó que el 29 % de la composición total del extracto corresponde al compuesto **20**, el 18 % al **29**, el 8 % al **19**, el 7 % al **3**, el 4 % al **15**, el

2 % al **5** y el 2 % al **6**, habiéndose podido identificar por esta técnica el 70 % de la composición total del extracto a la longitud de onda de trabajo.

La cumarina 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**19**) fue identificada por comparación con un testigo y por una vía independiente. La vía independiente consistió en identificar el producto de hidrólisis ácida de **19**, es decir la 5-hidroxi-6,7-metilendioxicumarina (**28**, ver 4.9), según la figura 5.1.

Cabe destacar que según el análisis integratorio de áreas obtenidas por HPLC, las cumarinas 6,7-dioxigenadas identificadas representan un 15,5 % del extracto, mientras que las 5,6,7-trioxigenadas identificadas representan un 55 % del extracto.

Stein en 2005, describe la presencia de dos compuestos detectados por ccd con relaciones de frente correspondientes a 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**15**) y a 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina respectivamente (**20**).

No se han encontrado registros bibliográficos sobre el análisis fotoquímico de la especie *P. cordobense*. El presente trabajo es el primer informe donde se describe la presencia de las cumarinas **3**, **5**, **6**, **7**, **15**, **19**, **20** y **29** en esta especie.

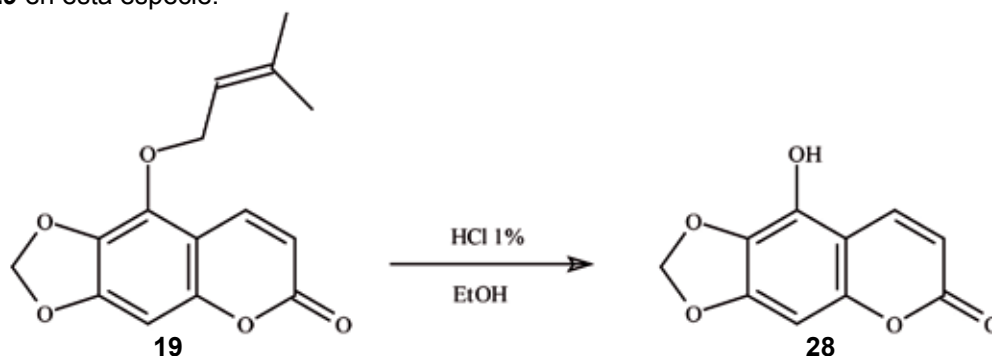


Figura 5.1

5.6.- PTEROCAULON LORENTZII

Tabla 5.11: Tiempos de retención (HPLC) relativos promedio (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. lorentzii* y su asignación a los testigos correspondientes.

$t_{RR}^1 \pm 0,008$	Asignado a testigo	Area $^2 \pm 0,5$
0,717	Escopoletina (8)	1,0
0,773	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (3)	6,5
0,863	5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (22)	41,0
1,165	7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (15)	6,0
1,196	5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (20)	3,0
1,718	5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (19)	1,5

¹ Los t_{RR} fueron determinados como el promedio de los tiempos de retención relativos, calculados como los cocientes entre los tiempos de retención de las cumarinas en el extracto y el tiempo de retención del estándar interno.

² Área porcentual (según HPLC, $\lambda = 320$ nm).

Tabla 5.12: Relaciones de frente¹ (R_f , por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. lorentzii* y su asignación a los testigos correspondientes.

$R_f \pm \epsilon$	Color de la fluorescencia ²	Color de la fluorescencia ² con NH_3	Asignado a testigo
$0,40 \pm 0,03$ ³	celeste	no cambia	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (3)
$0,37 \pm 0,03$ ³	celeste amarillento	no cambia	5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (22)
$0,31 \pm 0,02$	celeste	no cambia	7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (15)

¹ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 1 (ver 4.6.3)

² Color de la fluorescencia observada a $\lambda_{\text{excitación}} = 366 \text{ nm}$

³ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 2 (ver 4.6.3)

En el extracto diclorometánico de partes las aéreas de *P. lorentzii* se identificaron 6 cumarinas con 2 patrones de oxigenación diferentes. Cumarinas 6,7-dioxigenadas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**), escopoletina (**8**) y 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**15**); y cumarinas 5,6,7-trioxigenadas: 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**19**), 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**) y 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**22**).

Las cumarinas **3**, **15** y **22**, fueron identificadas por HPLC y ccd. Las cumarinas **8**, **19** y **20** fueron identificadas solo por HPLC, dada que sus bajas concentraciones en el extracto hicieron dificultosa su identificación por ccd.

La cumarina **22** presenta un tiempo de retención relativo ($t_{RR} = 0,860 \pm 0,008$) muy similar a la cumarina **40** ($t_{RR} = 0,867 \pm 0,008$). Sin embargo, el análisis por ccd (sistema 2, ver 4.6.3) no revela la presencia de la cumarina **40** ($R_f = 0,52 \pm 0,02$) pero sí la de la cumarina **22** ($R_f = 0,36 \pm 0,03$), descartándose la participación de la cumarina **40** en el extracto.

Según el análisis por HPLC, a la longitud de onda de trabajo, se observó que el 41 % de la composición total del extracto corresponde a **22**, el 6,5 % a **3**, el 6 % a **15**, el 3 % a **20**, el 1,5 % a **19** y el 1 % a **8**, habiéndose podido corresponder por esta técnica el 58 % del extracto con cumarinas provistas como testigos.

Cabe destacar que en el presente extracto las cumarinas 5,6,7-trioxigenadas identificadas representan un 45,5 % del total de cumarinas identificadas.

El presente trabajo constituye el primer registro de análisis fitoquímico de la especie *Pterocaulon lorentzii*. Las cumarinas **3**, **8**, **15**, **19**, **20** y **22** son identificadas por primera vez en esta especie.

5.7.- *Pterocaulon polypterum*Tabla 5.13: Tiempos de retención (HPLC) relativos (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. polypterum* y su asignación a los testigos correspondientes.

$t_{RR}^1 \pm \varepsilon$	Asignado a testigo	Area $^2 \pm 0,5$
0,73 \pm 0,03	Isofraxidina (33)	5,0
0,83 \pm 0,03	5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (22)	5,0
1,000 \pm 0,008	6,7,8-trimetoxicumarina ³ (34)	58,0
1,20 \pm 0,03	5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (20)	18,0
1,34 \pm 0,03	5-(3-metil-2-oxobutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (25)	1,5
1,55 \pm 0,04	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (5)	6,0

¹ Los t_{RR} fueron calculados como los cocientes entre los tiempos de retención de las cumarinas en el extracto y el tiempo de retención asignado al estándar interno.

² Área porcentual (según HPLC, $\lambda = 320$ nm).

³ La presencia de la 6,7,8-trimetoxicumarina fue verificada por la técnica spike.

Tabla 5.14: Relaciones de frente¹ (R_f , por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. polypterum* y su asignación a los testigos correspondientes.

$R_f^1 \pm \varepsilon$	Color de la fluorescencia ²	Color de la fluorescencia ² con NH ₃	Asignado a testigo
0,36 \pm 0,03 ³	celeste amarillento	no cambia	5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (22)
0,15 \pm 0,04	celeste	amarilla	Isofraxidina (33)
0,37 \pm 0,01	celeste-grisáceo	no cambia	6,7,8-trimetoxicumarina (34)
0,48 \pm 0,01	celeste amarillento	no cambia	5-(3-metil-2-oxobutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (25)
0,51 \pm 0,01	celeste	no cambia	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (5)

0,620 ± 0,009	celeste amarillento	no cambia	5-metoxi-6,7-metilen-dioxicumarina (20)
0,718 ± 0,008	celeste amarillento	no cambia	5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (19)

¹ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 1 (ver 4.6.3)

² Color de la fluorescencia observada a $\lambda_{excitación} = 366$ nm

³ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 2 (ver 4.6.3)

En el extracto diclorometánico de las partes aéreas de *P. polypterum* se identificaron 7 cumarinas con 3 patrones de oxigenación diferentes. Una cumarina 6,7-dioxigenadas: 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**); cumarinas 5,6,7-trioxigenadas: 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**19**), 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**), 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**22**) y 5-(3-metil-2-oxobutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**25**) y cumarinas 6,7,8-trioxigenadas: isofraxidina (**33**) y 6,7,8-trimetoxicumarina (**34**).

Las cumarinas **5**, **20**, **22**, **25**, **33** y **34** fueron identificadas por HPLC y ccd. La cumarina **19** fue solamente identificada por ccd dado que según el análisis por HPLC se halla en muy baja concentración otorgando a su identificación mucha incertidumbre.

La cumarina **22** presenta un tiempo de retención relativo ($t_{RR} = 0,860 \pm 0,008$) muy similar a la cumarina **40** ($t_{RR} = 0,867 \pm 0,008$). Sin embargo, mediante el análisis por cdd (sistema 2, ver 4.6.3) no se observa la presencia de la cumarina **40** ($R_f = 0,52 \pm 0,02$) pero sí la cumarina **22** ($R_f = 0,36 \pm 0,03$), confirmándose la presencia de esta última en el extracto.

Según el análisis por HPLC, a la longitud de onda de trabajo, se observó que la cumarina **34** representa el 58 % de la composición cumarínica total del extracto, mientras que el 18 % corresponde a la cumarina **20**, el 6 % a **5**, el 5 % a **22**, el 5 % a **33** y el 1,5 % a **25**, habiéndose podido identificar por esta técnica el 93 % del extracto analizado.

Hasta el momento la especie *Pterocaulon polypterum* no ha sido fitoquímica estudiada, siendo este el primer registro de identificación de las cumarinas **5**, **19**, **20**, **22**, **25**, **33** y **34** en esta especie.

5.8.- *Pterocaulon polystachyum*

Tabla 5.15: Tiempos de retención (HPLC) relativos (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. polystachyum* y su asignación a los testigos correspondientes.

$t_{RR}^1 \pm \epsilon$	Asignado a testigo	Area ² ± 0,5
0,72 ± 0,04	Escopoletina (8)	3,0
0,77 ± 0,04	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (3)	1,0
0,94 ± 0,03	Ayapina (4)	6,0
1,06 ± 0,03	Virgatenol (7)	2,0

1,15 ± 0,02	7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (15)	11,0
1,19 ± 0,03	5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (20)	27,0
1,27 ± 0,03	Preniletina (6)	5,0
1,52 ± 0,02	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (5)	29,0
1,70 ± 0,02	5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (19)	3,0

¹ Los t_{RR} fueron calculados como los cocientes entre los tiempos de retención de las cumarinas en el extracto y el tiempo de retención asignado al estándar interno. El tiempo de retención de la referencia fue calculado como valor promedio de 12,937 min.

² Área porcentual (según HPLC, $\lambda = 320$ nm).

Tabla 5.16: Relaciones de frente¹ (R_f , por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. polystachyum* y su asignación a los testigos correspondientes.

$R_f^1 \pm \epsilon$	Color de la fluorescencia ²	Color de la fluorescencia ² con NH_3	Asignado a testigo
0,11 ± 0,05 0,71 ± 0,02 ³	celeste	no cambia	Virgatenol (7)
0,20 ± 0,03	celeste	verde	Escopoletina (8)
0,30 ± 0,02	celeste	no cambia	7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (15)
0,49 ± 0,01	celeste	rosa	Preniletina (6)
0,52 ± 0,01	celeste	no cambia	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (5)
0,56 ± 0,01	celeste	no cambia	Ayapina (4)
0,619 ± 0,009	celeste amarillento	no cambia	5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (20)
0,718 ± 0,008	celeste amarillento	no cambia	5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (19)

¹ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 1 (ver 4.6.3)

² Color de la fluorescencia observada a $\lambda_{excitación} = 366$ nm

³ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 2 (ver 4.6.3)

En el extracto diclorometánico de las partes aéreas de *P. polystachyum* se identificaron 9 cumarinas con 2 patrones de oxigenación diferentes. Cumarinas 6,7-dioxigenadas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**), ayapina (**4**), 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**), preniletina (**6**), virgatenol (**7**), escopoletina (**8**) y 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**15**) y cumarinas 5,6,7-trioxigenadas: 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**19**) y 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**).

Las cumarinas **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **15**, **19** y **20**, fueron identificadas por HPLC y ccd. La cumarina **3** fue identificada solo por HPLC, dada que su baja concentración en el extracto hizo dificultosa su identificación por ccd.

Según el análisis por HPLC, a la longitud de onda de trabajo, se observó que el 29 % de la composición total del extracto corresponde a **5**, el 27 % a **20**, el 11 % a **15**, el 6 % a **4**, el 5 % a **6**, el 3 % a **19**, el 3 % a **8**, el 2 % a **7** y el 1 % a **3**. Habiéndose podido corresponder por esta técnica el 87 % del extracto con cumarinas provistas como testigos.

Cabe destacar que las cumarinas 6,7-dioxigenadas identificadas en el extracto representan un 57 % del extracto analizado, mientras que las cumarinas 5,6,7-trioxigenadas identificadas en el extracto representan un 30 % del total de las cumarinas identificadas.

La composición cumarínica de esta especie ha sido profusamente estudiada. Otros autores (ver 3.1.4.1) identificaron una cumarina 7-oxigenada: 6-(1,1-dimetil-2-propenil)-7-hidroxycumarina (**1**); 13 cumarinas 6,7-dioxigenadas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**), ayapina (**4**), 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**), preniletina (**6**), virgatenol (**7**), escopoletina (**8**), esculetina (**9**), isoescopoletina (**10**), haplopinol metil eter (**11**), isovirgatenol (**12**), 3'-desoxiobtusina (**13**), 7-(2-hidroxietiloxi)-6-metoxicumarina (**14**) y nieshoutin (**17**); y 5 cumarinas 5,6,7-trioxigenadas: 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**19**), 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**), 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**22**), 5-(2-hidroxietiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**23**) y 5-hidroxi-8-(3-metil-2-butenil)-6,7-metilendioxicumarina (**30**).

La cumarina **15** se identifica por primera vez para la especie *Pterocaulon polystachyum*.

5.9.- PTEROCAULON PURPURASCENS

Tabla 5.17: Tiempos de retención (HPLC) relativos promedio (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. purpurascens* y su asignación a los testigos correspondientes.

$t_{RR}^1 \pm 0,009$	Asignado a testigo	Area $^2 \pm 0,5$
0,725	Isofraxidina (33)	8,5
1,000	6,7,8-trimetoxicumarina ³ (34)	73,0
1,120	Purpurenol (39)	4,5
1,510	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxi-cumarina (5)	1,0

¹ Los t_{RR} fueron determinados como el promedio de los tiempos de retención relativos, calculados como los cocientes entre los tiempos de retención de las cumarinas en el extracto y el tiempo de retención del estándar interno.

² Área porcentual (según HPLC, $\lambda = 320$ nm).

³ La presencia de la 6,7,8-trimetoxicumarina fue verificada por la técnica spike.

Tabla 5.18: Relaciones de frente¹ (R_f , por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. purpurascens* y su asignación a los testigos correspondientes.

$R_f \pm \epsilon$	Color de la fluorescencia ²	Color de la fluorescencia ² con NH ₃	Asignado a testigo
0,11 ± 0,05 0,67 ± 0,02 ³	azul	no cambia	Purpurasol (38)
0,17 ± 0,04	celeste	Amarilla	Isofraxidina (33)
0,26 ± 0,01	amarillo-naranja	no cambia	Purpurenol (39)
0,37 ± 0,01	celeste-grisáceo	no cambia	6,7,8-trimetoxicumarina (34)
0,50 ± 0,01	celeste	no cambia	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (5)

¹ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 1 (ver 4.6.3)

² Color de la fluorescencia observada a $\lambda_{excitación} = 366$ nm

³ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 2 (ver 4.6.3)

En el extracto diclorometánico de las partes aéreas de *P. purpurascens* se identificaron 5 cumarinas con 3 patrones de oxigenación diferentes. Una cumarina 6,7-dioxigenadas: 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**); cumarinas 6,7,8-trioxigenadas: isofraxidina (**33**), 6,7,8-trimetoxicumarina (**34**) y purpurasol (**38**) y una cumarina 5,6,7,8-tetraoxigenadas: purpurenol (**39**).

Las cumarinas **5**, **33**, **34** y **39**, fueron identificadas por HPLC y ccd. La cumarina **38** ($t_{RR} = 0,962 \pm 0,008$) fue solo identificada por ccd dado que en el análisis por HPLC coeluye con la cumarina **34** cuyo tiempo de retención relativo es de $1,000 \pm 0,009$ y que representa el 73 % del total de los compuestos detectables a la longitud de onda de trabajo.

Según el análisis por HPLC y a la longitud de onda de trabajo se observó que el 73 % de la composición cumarínica total del extracto corresponde a **34**, el 9 % a **33**, el 4 % a **39** y el 1 % a **5**. Habiéndose podido identificar por esta técnica el 87 % de la composición total del extracto.

Cabe destacar que las cumarinas 6,7,8-trioxigenadas identificadas en el extracto representan un 82 % del extracto analizado.

En estudios previos, otros autores (ver 3.1.4.1) identificaron en esta especie dos cumarinas 6,7,8-trioxigenada: fraxetina (**32**) y purpurasol (**38**); y dos cumarinas 5,6,7,8-tetraoxigenadas: purpurenol (**39**) y purpurasolol (**40**).

A pesar de que la composición cumarínica de esta especie ha sido estudiada con anterioridad, el presente trabajo constituye el primer registro de identificación de las cumarinas **5**, **33** y **34** en la especie *Pterocaulon purpurascens*. Esto probablemente obedece a varias razones, entre las cuales figuran la época de recolección, las condiciones fitogeográficas y climáticas, el estado de estrés o fitopatológico de la planta.

5.10.- *Pterocaulon rugosum*Tabla 5.19: Tiempos de retención (HPLC) relativos (t_{RR}) de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. rugosum* y su asignación a los testigos correspondientes.

$t_{RR}^1 \pm \epsilon$	Asignado a testigo	Area $^2 \pm 0,5$
0,774 \pm 0,008	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (3)	60,5
1,12 \pm 0,02	Purpurenol (39)	2,0
1,19 \pm 0,02	5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (20)	4,0
1,52 \pm 0,02	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (5)	7,0

¹ Los t_{RR} fueron calculados como los cocientes entre los tiempos de retención de las cumarinas en el extracto y el tiempo de retención asignado al estándar interno. El tiempo de retención de la referencia fue calculado como valor promedio de 13,039 min.

² Área porcentual (según HPLC, $\lambda = 320$ nm).

Tabla 5.20: Relaciones de frente¹ (R_f , por ccd) y características fluorescentes de las cumarinas halladas en el extracto diclorometánico de *P. rugosum* y su asignación a los testigos correspondientes.

$R_f^1 \pm \epsilon$	Color de la fluorescencia ²	Color de la fluorescencia ² con NH ₃	Asignado a testigo
0,39 \pm 0,03 ³	celeste	no cambia	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (3)
0,09 \pm 0,05 0,52 \pm 0,02 ³	marrón	marrón verdoso	Purpurasolol (40)
0,15 \pm 0,04	celeste	amarilla	Isofraxidina (33)
0,51 \pm 0,01	celeste	no cambia	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (5)
0,63 \pm 0,01	celeste amarillento	no cambia	5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (20)

¹ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 1 (ver 4.6.3)

² Color de la fluorescencia observada a $\lambda_{excitación} = 366$ nm

³ ccd analítica desarrollada con el sistema cromatográfico 2 (ver 4.6.3)

En el extracto diclorometánico de las partes aéreas de *P. rugosum* se identificaron 6 cumarinas con 4 patrones de oxigenación diferentes. Cumarinas 6,7-dioxigenadas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**) y 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**); cumarinas 5,6,7-trioxigenadas: 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**); cumarinas 6,7,8-trioxigenadas: isofraxidina (**33**); y cumarinas 5,6,7,8-tetraoxigenadas: purpurenol (**39**) y purpurasolol (**40**).

Las cumarinas **3**, **5** y **20** fueron identificadas por HPLC y ccd. La cumarina **33** pudo ser identificada por ccd pero no así por análisis por HPLC ($t_{RR} = 0,730 \pm 0,008$) puesto que coeluye con **3** cuyo t_{RR} fue encontrado con un valor de $0,774 \pm 0,008$. La cumarina **40** fue identificada solo por ccd dado que según el análisis por HPLC se halla en muy bajas concentraciones otorgando a su identificación mucha incertidumbre. La cumarina **39** pudo ser identificada por HPLC y no por ccd, puesto que la concentración en la que se encuentra hace dificultosa su identificación por dicha técnica.

Según el análisis por HPLC (a la longitud de onda de trabajo) se observó que el 60 % de la composición total identificada del extracto corresponde a **3**, el 7,0 % a **5**, el 4,5 % a **20** y el 2,0 % a **39**. Habiéndose podido corresponder mediante esta técnica el 74 % del extracto con cumarinas utilizadas como testigos.

Cabe destacar que las cumarinas 6,7-dioxigenadas identificadas en el extracto representan un 68 % del extracto analizado.

El único registro previo de análisis fitoquímico de esta especie describe la presencia solo por ccd del compuesto 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**, Stein, 2005).

Las cumarinas **3**, **5**, **20**, **33**, **39** y **40** son identificadas por primera vez en la especie *Pterocaulon rugosum*.

5.11.- DISTRIBUCIÓN DE LOS PATRONES DE OXIGENACIÓN CUMARÍNICOS EN LAS DISTINTAS ESPECIES

Tabla 5.21: Número de cumarinas identificadas en cada patrón de oxigenación y su porcentual relativo en el extracto total según el presente trabajo.

Especie	6,7-di oxigenadas, (%)	5,6,7-tri oxigenadas, (%)	6,7,8-tri oxigenadas, (%)	5,6,7,8-tetra oxigenadas, (%)	Nro. de cumarinas identificadas ²
<i>P. rugosum</i>	2 (92)	1 (5)	1 ³	2 (3)	6
<i>P. alopecuroides</i>	3 (71) ⁴	1 (3) ⁴	2 (20)	2 (6)	8
<i>P. polystachyum</i>	7 (65) ⁵	2 (35) ⁵	-	-	9
<i>P. angustifolium</i>	2 (56)	1 ³	2 (37)	1 (7)	6
<i>P. balansae</i>	3 (52) ⁶	4 (44) ⁶	1 (4)	-	8
<i>P. lorentzii</i>	3 (23)	3 (77)	-	-	6
<i>P. cordobense</i>	5 (21)	3 (79)	-	-	8
<i>P. polypterum</i>	1 (7)	4 (26)	2 (67)	-	7
<i>P. purpurascens</i>	1 (1)	-	3 (93) ⁷	1 (6) ⁷	5

¹ Área porcentual relativa al extracto cumarínico identificado (según HPLC, $\lambda = 320$ nm).

² Número total de cumarinas identificadas en el presente estudio para cada especie.

³ Sólo identificado tentativamente por ccd.

⁴ Otros trabajos lograron identificar en esta especie 2 cumarinas en cada uno de estos patrones de oxigenación (ver 3.1.4.1).

⁵ Otros autores identificaron en esta especie 13 cumarinas con un patrón 6,7-dioxigenado y 5 cumarinas con un patrón 5,6,7-trioxigenado (ver 3.1.4.1).

⁶ Otros autores identificaron en esta especie 2 cumarinas con un patrón 6,7-dioxigenado y 4 cumarinas con un patrón 5,6,7-trioxigenado (ver 3.1.4.1).

⁷ Otros autores identificaron en esta especie 2 cumarinas con un patrón 6,7,8-trioxigenado y 2 cumarinas con un patrón 5,6,7,8-tetraoxigenado (ver 3.1.4.1).

Todas las especies estudiadas presentan un patrón 6,7-dioxigenado proveniente de la hidroxilación enzimática de un ac. cinámico 3'-4'-dioxigenado, posterior isomerización *trans-cis* y ulterior ciclación enzimática a un patrón cumarínico 6,7-dioxigenado.

Según la tabla 5.21, el porcentaje de las cumarinas 6,7-dioxigenadas desciende a lo largo de la columna, correspondiéndole a *P. rugosum* un 92% y a *P. purpurascens* un 1% de contenido cumarínico con dicho patrón de oxigenación.

También es observable que el porcentaje de cumarinas con un patrón 5,6,7-trioxigenado aumenta desde la especie *P. rugosum* a la especie *P. cordobense* a expensas, del porcentaje de las cumarinas 6,7-dioxigenadas. En el caso de la especie *P. polypterum*, las cumarinas con patrón 6,7,8-trioxigenado sobrepasan en importancia a las cumarinas con patrón 5,6,7-trioxigenado, esto puede indicar que en esta especie se ve favorecido un mecanismo enzimático que favorece la formación de cumarinas 6, 7,8- en lugar de 5,6,7-trioxigenadas.

Es evidente por lo tanto que el patrón de oxigenación en posiciones 6, 7 y 8 del núcleo cumarínico predomina en la especie *P. polypterum* como así también en la especie *P. purpurascens* sobre los demás patrones de oxigenación.

Cabe destacar que el patrón de oxigenación en posiciones 5, 6, 7 y 8 del núcleo cumarínico sólo es observable en las especies *P. rugosum*, *P. alopecuroides*, *P. angustifolium* y *P. purpurascens* con un porcentaje de cumarinas menor o igual a 7 del extracto cumarínico total identificado.

Solo 3 de las especies estudiadas, *P. rugosum*, *P. alopecuroides* y *P. angustifolium* presentan los 4 patrones de oxigenación: 6,7-dioxigenados, 5,6,7-trioxigenados, 6,7,8-trioxigenados y 5,6,7,8-tetraoxigenados.

Tabla 5.22: Correlación entre las especies del género *Pterocaulon* estudiadas por otros autores y los patrones de oxigenación observados (ver 3.1.4.1).

Especie	Nro. de cumarinas identificadas según patrón de oxigenación			
	6,7-di oxigenadas	5,6,7-tri oxigenadas	6,7,8-tri oxigenadas	5,6,7,8-tetra oxigenadas
<i>P. lanatum</i>	1	2	2	-
<i>P. redolens</i>	1	3	3	-
<i>P. serrulatum</i>	1	1	1	-
<i>P. sphacelatum</i>	1	-	1	-
<i>P. virgatum</i>	7	9	-	-

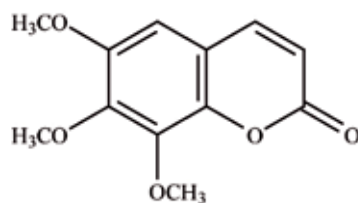
En la especie *P. virgatum* estudiada por otros autores (ver 3.1.4.1), fueron identificadas cumarinas con dos patrones de oxigenación distintos: 6,7-dioxigenado y 5,6,7-trioxigenado. Esta distribución en los patrones de oxigenación observada es similar a la hallada en el presente estudio para las especies *P. cordobense*, *P. lorentzii* y *P. polystachyum*.

En las especies *P. lanatum*, *P. redolens* y *P. serrulatum* estudiadas por otros autores (ver 3.1.4.1) fueron hallados patrones cumarínicos de 6,7-dioxigenación, 5,6,7-trioxigenación y 6,7,8-trioxigenación, los cuales también fueron encontrados por el presente estudio en las especies *P. balansae* y *P. polypterum*.

5.12.- AISLAMIENTO DE LA 6,7,8-TRIMETOXICUMARINA

El compuesto 6,7,8-trimetoxicumarina (**34**) se aisló y purificó del extracto de *P. purpurascens* (ver 4.5.3) según las técnicas descritas en materiales y métodos (ver 4.8.1). El compuesto **34** fue identificado mediante técnicas espectroscópicas usuales (RMN de ^1H y ^{13}C), coincidiendo el ^1H RMN y P.F. con los datos de literatura (King y col., 1954).

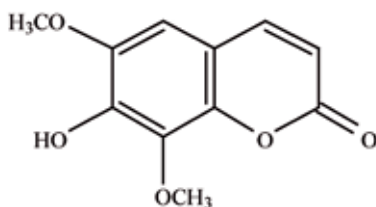
El compuesto **34** fue usado como referencia interna en todos los extractos analizados por HPLC ($t_{\text{Ref.}} = 12,59 \pm 0,09$ min.; $t_{\text{RR}} = 1,000 \pm 0,008$). Esta cumarina fue seleccionada como estándar interno debido a que su tiempo de retención es intermedio dentro del rango de tiempos de retención en el sistema de HPLC utilizado. (7,61 – 21,56 min).



34

5.13.- AISLAMIENTO DE LA ISOFRAXIDINA

El compuesto 7-hidroxi-6,8-dimetoxicumarina (isofraxidina, 33) se aisló y purificó del extracto de *P. purpurascens* (ver 4.5.3) según las técnicas descritas en materiales y métodos (ver 4.8.2). El compuesto 33 fue identificado tentativamente mediante técnicas espectroscópicas usuales (MS, U.V.) y por comparación con datos de la bibliografía (Takemoto y col., 1975; Borris y col., 1980; Okuyama y col., 2001). Se intentó registrar el espectro RMN H¹ del compuesto 33 pero debido a la baja concentración de la muestra no se pudo asignar irrevocablemente por esta técnica la identidad del compuesto 33 a la isofraxidina, sin embargo se identificó un cluster de señales esperadas para dicho compuesto (Takemoto y col., 1975; Borris y col., 1980; Okuyama y col., 2001).



33

6.- Conclusiones

El género *Pterocaulon* está representado por 18 especies de las cuales 12 se encuentran distribuidas en el continente Americano y 11 se encuentran descritas para la Argentina. En todas las especies de *Pterocaulon* fitoquímicamente estudiadas se destaca la presencia de cumarinas simples di, tri y tetraoxigenadas. De las 11 especies autóctonas solo 6 especies tienen antecedentes de estudios químicos siendo las cumarinas el grupo de polifenoles característico para las especies estudiadas.

El presente trabajo representa una contribución al estudio fitoquímico en 9 de las 11 especies autóctonas del género *Pterocaulon*, donde se presenta el análisis por ccd y HPLC de los extractos diclorometánicos de 9 especies permitiendo la identificación de cumarinas en todas las especies analizadas. Se aíslan e identifican por métodos espectroscópicos dos cumarinas en *P. purpurascens* que hasta el momento no se encontraban descritas para la especie. Se excluye el análisis de la especie *P. virgatum* por haber sido ampliamente estudiada con anterioridad por otros autores (ver 3.1.4.1) y la especie *P. lanatum* la cual fue hallada solo una vez en la provincia de Salta (Cabrera y Ragonese, 1978) por lo que fue imposible obtener un ejemplar para su estudio.

De 5 de las especies autóctonas *P. angustifolium*, *P. cordobense*, *P. lorentzii*, *P. polypterum* y *P. rugosum* no existen estudios fitoquímicos previos, por lo que el presente trabajo constituye el primer registro de identificación de cumarinas en dichas especies.

En la especie *P. alopecuroides* se identificaron 8 cumarinas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**), 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**), 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**15**), 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**), isofraxidina (**33**), 6,7,8-trimetoxicumarina (**34**), purpureol (**39**) y purpurasolol (**40**). Si bien las cumarinas **3**, **15** y **20** fueron descritas con anterioridad, este es el primer registro de identificación de las cumarinas **5**, **33**, **34**, **39** y **40** en esta especie.

En la especie *P. balansae* se identificaron 8 cumarinas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**), 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**), 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**15**),

5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**19**), 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**), 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**22**), 5-(3-metil-2-oxobutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**25**) y 6,7,8-trimetoxicumarina (**34**). Es la primera vez que se describe la identificación de las cumarinas **5**, **25** y **34** en esta especie.

En la especie *P. polystachyum* se identificaron 9 cumarinas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**), ayapina (**4**), 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**), preniletina (**6**), virgatenol (**7**), escopoletina (**8**), 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**15**), 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**19**) y 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**). Esta especie fue fitoquímicamente muy estudiada en cuanto a su contenido cumarínico por Palacios y col. en 1999 y Vera y col. en 2001. Igualmente se logró identificar una cumarina adicional (**15**), la cual representó el 11 % de la totalidad de los compuestos detectables a la longitud de onda de trabajo. Los resultados que surgieron del presente estudio, en comparación con los de Vera y col., en 2001 y Palacios y col., en 1999 en cuanto a la presencia de la cumarina **15**, reflejan que el perfil cumarínico de la especie es dependiente de numerosos factores, entre los cuales figuran la época de recolección, las condiciones fitogeográficas y climáticas, el estado de estrés o fitopatológico de la planta.

La especie *P. purpurascens* posee varios registros bibliográficos en cuanto a su composición fitoquímica (ver 3.1.4.1). Se pudieron identificar 5 cumarinas en la especie. Mediante los análisis por cromatografía (HPLC y ccd) se lograron identificar 3 cumarinas: 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**), purpurasol (**38**) y purpureol (**39**) de las cuales las cumarinas **38** y **39** fueron previamente descritas en la especie por otros autores, y es el primer registro de la identificación de la cumarina **5** en esta especie. Así mismo se describe el aislamiento e identificación por PF, UV, H-NMR y MS, de 2 cumarinas: isofraxidina (**33**) y 6,7,8-trimetoxicumarinas (**34**) las cuales hasta el presente no habían sido identificadas ni en esta especie ni en ninguna otra especie Americana del género *Pterocaulon*.

En la especie *P. cordobense* se identificaron 8 cumarinas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**), 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**), preniletina (**6**), virgatenol (**7**), 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**15**), 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**19**), 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**) y 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi) 5,6-dimetoxicumarina (**29**). Esta especie no fue fitoquímicamente estudiada con anterioridad, siendo el presente por lo tanto, el primer registro en cuanto a la identificación de cumarinas.

En la especie *P. lorentzii* se identificaron 6 cumarinas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**), escopoletina (**8**), 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**15**), 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**19**), 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**) y Sabandinol (**22**). Esta especie no fue fitoquímicamente estudiada con anterioridad, siendo este el primer registro en cuanto a la presencia de cumarinas.

En la especie *P. angustifolium* se identificaron 6 cumarinas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**), 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**), 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**), isofraxidina (**33**), purpurasol (**38**) y purpurasolol (**40**). Este es el primer registro de análisis fitoquímico para la especie.

En la especie *P. polypterum* se identificaron 7 cumarinas: 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**), 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**19**), 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (**20**), sabandinol (**22**), 5-(3-metil-2-oxobutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (**25**), isofraxidina (**33**) y 6,7,8-trimetoxicumarina (**34**). El presente trabajo constituye el primer registro de cumarinas presentes en esta especie, no estudiada fitoquímicamente con anterioridad.

En la especie *P. rugosum* se identificaron 5 cumarinas: 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**3**), 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (**5**), isofraxidina (**33**), purpureol (**39**) y purpurasolol (**40**). El presente trabajo constituye el primer registro de todas las cumarinas identificadas para esta especie, dado que no había sido fitoquímicamente estudiada con anterioridad.

El exhaustivo análisis bibliográfico y de identificación de las cumarinas presentes en las distintas especies del género *Pterocaulon* abre la posibilidad de continuar con un estudio quimiotaxonomico, analizando la correlación entre los distintos patrones de oxigenación encontrados y la posición de cada especie en la clave taxonómica del género.

La identificación de cumarinas en las distintas especies de *Pterocaulon* contribuye a la búsqueda de nuevas fuentes de obtención de cumarinas naturales de estructuras poco frecuentes en la naturaleza. Estas cumarinas han mostrado actividad en diferentes ensayos biológicos (actividad antifúngica, antiproliferativa diferenciante, etc) por lo que se constituyen en moléculas con potencial capacidad de transformarse en nuevas drogas y/o moléculas líderes que sirvan de base para desarrollar nuevos agentes terapéuticos o agroquímicos.

7.- Referencias

- Amat, A. G. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. **1983**, 2 (1), 23.
- Anderberg, A. A. *Plant Systematics and Evolution*. **1991**, 176, 75.
- Arenas, P. *Etnobotánica de la Lengua Maskoy*. Ed. FECYC: Buenos Aires, Argentina, 1981.
- Arenas, P. *Parodiana*. **1983**, 2 (2), 131.
- Austin, P. W.; Meyer, M. B. *Phytochemistry*. **1965^A**, 4, 245.
- Austin, P. W.; Meyer, M. B. *Phytochemistry*. **1965^B**, 4, 255.
- Bandoni, A. L.; Mendiondo, M. E.; Rondina, R. V. D.; Coussio, J. D. *Lloydia*. **1972**, 35 (1), 69.
- Bäsecke, H. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. **1870**, 154, 84.
- Berenbaum, M. R.; Nitao, J. K.; Zangerl, A. R. *Journal of Chemical Ecology*. **1991**, 17, 207.
- Bisignano, G.; Sanogo, R.; Marino, A.; Aquino, R.; D'Angelo, V.; Germano, M. P.; De Pasquale, R.; Pizza, C. *Letters in Applied Microbiology*. **2000**, 30, 105.
- Boelcke, O. *Plantas vasculares de la Argentina nativas y exóticas*. Ed. FECYC: Buenos Aires, Argentina, 1981.
- Bohlmann, F.; Jakupovic, J. *Phytochemistry*. **1981**, 20 (4), 825.
- Bohm, B. A.; Ibrahim, R. K.; Towers, G. H. N. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. **1961**, 39, 1389.
- Borris, R. P.; Cordell, G. A.; Farnsworth, N. R. *Journal of Natural Products*. **1980**, 43 (5), 641.
- Brown, L. S. R.; Gray, D. O. *Journal of Natural Products*. **1986**, 49 (5), 910.
- Brown, S. A. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. **1962**, 40, 607.
- Brown, S. A. *Canadian Journal of Biochemistry*. **1965**, 43, 199.
- Brown, S. A. *Lloydia*. **1963^A**, 26, 211.
- Brown, S. A. *Phytochemistry*. **1963^B**, 2, 137.
- Brown, S. A. *Zeitschrift für Naturforschung*. **1960**, 15 (B), 768.
- Brown, S. A.; Sampathkumar, S. *Canadian Journal of Biochemistry*. **1977**, 55, 686.
- Cabrera, A.L.; Ragonese A.M. *Darwiniana*. **1978**, 21 (2-4), 185.
- Chen, Y. F.; Tsai, H. Y.; Wu, T. S. *Planta Medica*. **1995**, 61, 2.
- Ciccía, G.; Coussio, J.; Mongelli, E. *Journal of Ethnopharmacology*. **2000**, 72 (1/2), 185.
- Cooke, D.; Fitzpatrick, B.; O'Kennedy, R.; McCormack, T.; Egan, D. *Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action*. Ed. John Wiley and Sons: Chichester, U.K., 1997.
- De Souza, S. M.; Delle Monache, F.; Smânia, A. Jr. *Zeitschrift für Naturforschung*. **2005**, 60 (C), 693.
- Dean, F. M. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*. **1952**, 9, 225.
- Debenedetti, S. L.; Nadinic, E. L.; Comez, M. A.; Coussio, J. D.; De Kimpe, N.; Boeykens, M. *Phytochemistry*. **1992**, 31 (9), 3284.
- Debenedetti, S. L. Tesis (doctorado), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, 1995.
- Debenedetti, S. L.; De Kimpe, N.; Boeykens, M.; Coussio, J. D.; Kesteleyn, B. *Phytochemistry*. **1997**, 45 (7), 1515.
- Debenedetti, S. L.; Nadinic, E. L.; Coussio, J. D.; De Kimpe, N.; Dupont, J. F.; Declerc, J. P. *Phytochemistry*. **1991**, 30 (8), 2757.
- Debenedetti, S. L.; Nadinic, E. L.; Coussio, J. D.; De Kimpe, N.; Boeykens, M. *Phytochemistry*. **1998**, 48 (4), 707.
- Debenedetti, S. L.; Nadinic, E. L.; Gomez, M. A.; Coussio, J. D. *Journal of Natural Products*. **1987**, 50 (3), 512.
- Debenedetti, S. L.; Nadinic, E. L.; Gomez, M. A.; Coussio, J. D.; De Kimpe, N.; Boeykens, M. *Phytochemistry*. **1996**, 42 (2), 563.
- Debenedetti, S. L.; Palacios, P. S.; Nadinic, E. L.; Coussio, J. D. *Journal of Natural Products*. **1994^A**, 57 (11), 1539.
- Debenedetti, S. L.; Palacios, P. S.; Wilson, E. G.; Coussio, J. D. *Fitoterapia*. **1994^B**, 65 (2), 188.
- Debenedetti, S. L.; Palacios, P. S.; Wilson, E. G.; Coussio, J. D. *Acta Horticulturae*. **1993**, 333, 191.
- Debenedetti, S. L.; Tehrani, K. A.; van Puyvelde, L.; De Kimpe, N. *Phytochemistry*. **1999**, 51, 701.
- Desmanchelier, C.; Bermudez, M. J. N.; Coussio, J.; Ciccía, G.; Boveris, A. *International Journal of Pharmacognosy*. **1997**, 35 (2), 116.
- Dillon, D.S.; Brown, S. A. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **1976**, 177, 74.
- Egan, D.; O'Kennedy, R.; Moran, E.; Cox, D.; Prosser, E.; Thornes, D. *Drug Metabolism Reviews*. **1990**, 22 (5), 503.
- Farnsworth, N.R.; Bingel, A.S. En *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutic Activity*. Ed. Springer-Verlag: New York, USA, 1977.

- Farnsworth, N.R.; Morris, R.W. *American Journal of Pharmacy*. **1976**, 148, 46.
- Filipoy, A. *Journal of Ethnopharmacology*. **1994**, 44 (3), 181.
- Fittig, R. *Základy Chemie*. **1868**, 4, 595.
- Floss, H. G.; Mothes, U. *Zeitschrift für Naturforschung*. **1964**, 19 (B), 770.
- Fournet, A.; Barrios, A. A.; Nuñez, V. *Journal of Ethnopharmacology*. **1994**, 41 (1/2), 19.
- Frainer Knoll, M.; Ferreira da Silva, A. C.; Scotti do Canto-Dorow, T.; Bosio Tudesco, S. *Genetics and Molecular Biology*. **2006**, 29 (3), 539.
- Fritigg, B. L.; Hirth, L.; Ourisson, G. *Bulletin de la Societe Francaise de Physiologie Vegetale*. **1967**, 13, 51.
- Fritigg, B. L.; Hirth, L.; Ourisson, G. *Phytochemistry*. **1970**, 9, 1963.
- Fujioka, T.; Furumi, K.; Fuji, H.; Okabe, H.; Mihashi, K.; Nakano, Y.; Matsunaga, H.; Katano, M.; Mori, M. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1999**, 47 (1), 96.
- Fuller, R. W.; Bokesch, H. R.; Gustafson, K. R.; Mckee, T. C.; Cardellina, J. H.; McMahon, J. B.; Cragg, G. M.; Sojaerto, D. D.; Boyd, M. R. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **1994**, 4 (16), 1961.
- García Argaez, A. N.; Apan, T. O. R.; Delgado, H. P.; Velazquez, G.; Martinez-Vazquez, M. *Planta Medica*. **2000**, 66, 279.
- Gray, A. I.; Waterman, P. G. *Phytochemistry*. **1978**, 17, 845.
- Haskins, F. A.; Gorz, H. J. *Crop Science*. **1961**, 1, 320.
- Haskins, F. A.; Williams, L. G.; Gorz, H. J. *Plant Physiology*. **1964**, 39, 777.
- Hauffe, K. D.; Hahlbrock, K.; Scheel, D. *Zeitschrift für Naturforschung*. **1986**, 41 (c), 228.
- Hoult, J. R. S.; Forder, R. A.; Heras, B.; Lobo, I. B.; Paya, M. *Agents Actions*. **1994^A**, 42, 44.
- Hoult, J. R. S.; Moroney, M. A.; Paya, M. *Methods in Enzymology*. **1994^B**, 234, 443.
- Hoult, J. R. S.; Payá, M. *General Pharmacology*. **1996**, 27, 713.
- Ibrahim, R. K.; Boulay, B. *Plant Science Letters*. **1980**, 18, 177.
- Innerarity, L. T.; Smith, E. C.; Wender, S. H. *Phytochemistry*. **1972**, 11, 1389.
- Ito, C.; Itoigawa-M.; Ju-ichi, M.; Sakamoto, N.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Furukawa, H. *Planta Medica*. **2005**, 71, 84.
- Johns, S. R.; Lamberton, J. A.; Price, J. R.; Sioumis, A. *Australian Journal of Chemistry*. **1968**, 21, 3079.
- Jurd, D. L.; Corse, J.; King, A. D. Jr.; Bayne, H.; Mihara, K. *Phytochemistry*. **1971**, 10, 2971.
- Jurd, D. L.; King, J. R.; Mihara, K. *Experientia*. **1970**, 26, 1281.
- Kanlayavattanukul, M.; Ruangrunsi, N.; Watanabe, T.; Ishikawa, T. *Heterocycles*. **2003**, 61, 183.
- Kayser, O.; Kolodziej, H. *Planta Medica*. **1997**, 63, 508.
- Kindl, H. *Hoppe-Seylers Zeitschrift Physiologische Chemie*. **1971**, 352, 78.
- Kindl, H.; Billek, G. *Monatshefte für Chemie*. **1964**, 95, 1044.
- King, F. E.; Housley, J. R.; King, T. J. *Journal of the Chemical Society*. **1954**, 1392.
- Kleinhofs, A.; Haskins, F. A.; Gorz, H. J. *Phytochemistry*. **1967**, 6, 1313.
- Kofinas, C.; Chinou, I.; Loukis, A.; Harvala, C.; Roussakis, C.; Maillard, M.; Hostettmann, K. *Planta Medica*. **1998**, 64, 174.
- Krag, K. J., Ph. D. thesis, Harvard University, Cambridge, MA, USA, 1976.
- Kwon, Y. S.; Kobayashi, A.; Kajiyama, S. I.; Kawazu, K.; Kanzakil, H.; Kim, C. M. *Phytochemistry*. **1997**, 44 (5), 887.
- Lino, C. S.; Taveira, M. L.; Viana, G. S. B.; Matos, F. J. A. *Phytotherapy Research*. **1997**, 11, 211.
- Macleod, J. K.; Rasmussen, H. B. *Phytochemistry*. **1999**, 50 (1), 105.
- Maes, D.; Debenedetti, S. L.; De Kimpe, N. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2006**, 34, 165.
- Maes, D.; Debenedetti, S.; De Kimpe, N. *Biochemical systematics and ecology*. **2006**, 34, 165.
- Magalhaes, A. F.; Magalhaes, E. G.; Leitao Filho, H. F.; Frighetto, R. T. S.; Barros, S. M. G. *Phytochemistry*. **1981**, 20 (6), 1369.
- Marston, A.; Hostettmann, K.; Msonthi, J. D. *Journal of Natural Products*. **1995**, 58 (1), 128.
- Martinez Crovetto, R. *Bonplandia I*. **1964**, 279.
- Martinez Crovetto, R. *Bonplandia II*. **1965**, 1.
- Martinez Crovetto, R. *Instituto Miguel Lillo Miscelánea Nro. 69*. Tucumán. **1981**
- Martino, V. S.; Debenedetti, S. L.; Coussio, J. D. *Phytochemistry*. **1979**, 18, 2052.
- Matern, U.; Lüer, P.; Kreuzsch, D. *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Ed. Elsevier Science Ltd.: Oxford, U.K., 1999, Vol. 1.
- Mongelli, E.; Pampuro, S.; Coussio, J.; Salomón, H.; Ciccía, G. *Journal of Ethnopharmacology*. **2000**, 71 (1/2), 145.

- Murray, R. D. H.; Mendez, J.; Brown, S. A. *The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry*. Ed. John Wiley and Sons: Chichester, U.K., 1982.
- Nielsen, B. E. *Dansk Tidsskrift for Farmaci*. **1970**, *44*, 111.
- O'connell, J. K.; Latz, P. K.; Barnett, P. *Economic Botany*. **1983**, *37* (1), 80.
- Okuyama, E.; Hasegawa, T.; Matsushita, T.; Fujimoto, H.; Ishibashi, M.; Yamazaki, M. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. **2001**, *49* (2), 154.
- Ojala, T. Academic Dissertation, University of Helsinki, Helsinki, Finlandia, 2001.
- Palacios, P. S.; Rojo, A. A.; Coussio, J. D.; De Kimpe, N.; Debenedetti, S. L. *Planta Medica*. **1999**, *65*, 294.
- Parejo, I.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Codina, C. *Analytica Chimica Acta*. **2004**, *512* (2), 271.
- Paya, M.; Silla, M.; Vaya, E.; Alcaraz, M. J.; Coussio, J.; Martino, V.; Hnatyszyn, O.; Debenedetti, S.; Broussalis A.; Muschietti, L. *Phytotherapy Research*. **1996**, *10* (3), 228.
- Penna, C. A.; Radice, M.; Gutkind, G. O.; Van Baren, C.; Broussalis, A.; Muschietti, L.; Martino, V.; Ferraro, G. *Fitoterapia*. **1994**, *65* (2), 172.
- Penso, G. *Inventory of medicinal plants used in different countries*. World Health Organization: Ginebra, 1978.
- Perkin, W. H. *Journal of the Chemical Society*. **1868**, *21*, 53.
- Pieters L.; Vlietinck A.J. *Journal of Ethnopharmacology*. **2005**, *22*, 57.
- Pinto, A. C.; Bolzani, V. S.; Silva, D. H. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A. *Química Nova*. **2002**, *25* (1), 45.
- Principe, P. En *Economic and Medicinal Plant Research*. Ed. Academic Press: London, U.K., 1989; 655.
- Ramos-E-Silva, M.; De Moura Castro J. C. *Dermatology*. **2002**, *20* (2), 122.
- Reppel, L. *Pharmazie*. **1954**, *9*, 278.
- Resch, M.; Steigel, A.; Chen, Z. L.; Bauer, R. *Journal of Natural Products*. **1998**, *61* (3), 347.
- Riveiro, M. E.; Shayo, C.; Monczor, F.; Fernández, N.; Baldi, A.; De Kimpe, N.; Rossi, J.; Debenedetti, S.; Davio, C. *Cancer Letters*. **2004**, *210*, 179.
- Rudolf, W.; Schwarze, P. *Zeitschrift für Pflanzenzuchtung*. **1958**, *39*, 245.
- Sardari, S.; Mori, Y.; Horita, K.; Micetich, R. G.; Nishibe, S.; Daneshtalab, M. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **1999**, *7* (9), 1933.
- Sato, M.; Hasegawa, M. *Phytochemistry*. **1972**, *11*, 657.
- Schmeda-Hirschmann, G.; Rojas de Arias, A. *Phytotherapy Research*. **1992**, *6* (2), 68.
- Semple, S. J.; Nobbs, S. F.; Pyke, S. M.; Reynolds, G. D.; Flower, R. L. P. *Journal of Ethnopharmacology*. **1999**, *68*, 283.
- Semple, S. J.; Reynolds, G. D.; O'Leary, M. C.; Flower, R. L. P. *Journal of Ethnopharmacology*. **1998**, *60* (2), 163.
- Seshadri, T. R.; Vishwapaul, J. *Journal of Scientific and Industrial Research*. **1973**, *14* (B), 670.
- Sethna, S. M.; Shah, N. M. *Chemical Reviews*. **1945**, *36*, 1.
- Sharma, S. K.; Garret, J. M.; Brown, S. A. *Zeitschrift für Naturforschung*. **1979**, *34* (c), 387.
- Shukla, Y. N.; Srivastava, A.; Kumar, S. *Journal of Ethnopharmacology*. **1999**, *67*, 241.
- Soine, T. O. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1964**, *53*, 231.
- Sorarú, S. B.; Bandoni, A. L. *Plantas de la Medicina Popular Argentina*. Ed. Albatros: Buenos Aires, Argentina, 1978, 43.
- Späth, E. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. **1937**, *70* (A), 83.
- Späth, E. *Monatshefte für Chemie*. **1936**, *69*, 75.
- Stanley, W. L.; Waiss A. C. Jr.; Lundin, R. E.; Vannier, S. H. *Tetrahedron*. **1965**, *21*, 89.
- Steck, W. *Canadian Journal of Biochemistry*. **1967**, *45*, 889.
- Stein, A. C. Dissertação (mestrado), Universidad Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2005.
- Stein, A. C.; Álvarez, S.; Avancini, C.; Zacchino, S.; von Poser G. *Journal of Ethnopharmacology*. **2006**, *107*, 95.
- Stein, A. C.; Sortino, M.; Avancini, C.; Zacchino, S.; von Poser, G. *Journal of Ethnopharmacology*. **2005**, *99*, 211.
- Strecker, A. *Regnault-Streckre's Curses Lehrbush der Organischen Chemie*. **1868**, *5*, 743.
- Takemoto, T.; Uchida, M.; Koike, K.; Hoshina, Y.; Kusano, G. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. **1975**, *23*, 1161.
- Tiemann, F.; Herzfeld, H. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. **1877**, *10*, 283.
- Toursarkissian, M. *Plantas Medicinales de la Argentina*. Ed. Hemisferio Sur: Buenos Aires, Argentina,

1980.

- Towers, G. H. N.; Watt, C. K.; Graham, E. A.; Bandoni, R. J.; Chan, G. F. Q.; Mitchell, J. C.; Lam, J. *Journal of Natural products*. **1977**, *40* (5), 487.
- Tsai, I. L.; Lin, W. Y.; Teng, C. M.; Ishikawa, T.; Doong, S. L.; Huang, M. W.; Chen, Y. C.; Chen, I. S. *Planta Medica*. **2000**, *66*, 618.
- Tsang, Y. F.; Ibrahim, R. K. *Phytochemistry*. **1979^A**, *18*, 1131.
- Tsang, Y. F.; Ibrahim, R. K. *Zeitschrift für Naturforschung*. **1979^B**, *34* (c), 46.
- Vauquelin, L. N. *Annales de Chimie*. **1812**, *84*, 173.
- Vera, N.; Bardón, A.; Catalán, C. A. N.; Gedris, T. E.; Herz, W. *Planta Medica*. **2001**, *67*, 674.
- Vilegas, W.; Boralle, N.; Cabrera, A.; Bernardi, C. A.; Pozetti, G. L.; Fontes Arantes, S. *Phytochemistry*. **1995**, *38* (4), 1017.
- Vogel, A. *Gilbert's Annalen der Physik*. **1820**, *64*, 161.
- Weber, N.D.; Murray, B.K.; North, J.A.; Wood, S.J. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. **1994**, *5*, 83.
- Weiwad M.; Edlich F.; Kilka S.; Erdmann F.; Jarczowski F.; Dorn M.; Moutty MC.; Fischer G.; Biochemistry. **2006**, *45* (51), 15776.
- Wessely, F.; Sturm, K. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. **1930**, *63* (B), 1299.
- Wijesekera, R.O.N. *The Medicinal Plant Industry*. Ed. CRC Press: London, U.K., 1991.
- Wu Y.; Shen D.; Chen Z.; Clayton S.; Vadgama J.V. (2007). *Apoptosis*. **2007**, *12* (3), 593.
- Yang, Y. Z.; Ranz, A.; Pan, H. Z.; Zhang, Z. N.; Lin, X. B.; Meshnick, S. R. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **1992**, *46* (1), 15.
- Yenjai, C.; Sripontan, S.; Sriprajun, P.; Kittakoo, P.; Jintasirikul, A.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *Planta Medica*. **2000**, *66*, 277.
- Zardini, E. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. **1984**, *3* (1), 77.
- Zeid, A. H. S. A. *Food Chemistry*. **2002**, *76*, 187.
- Zuloaga, F.O.; Morrone, O. *Catálogo de plantas vasculares de la República Argentina*. **1999**, *2*, 179.

Apéndice 1

FÓRMULAS Y CÁLCULOS DE ERRORES

$$R_{fx} = d_x/d_s$$

R_{fx} : relación de frente del compuesto x en ccd

d_x : distancia recorrida por el compuesto x en ccd (en cm)

d_s : distancia recorrida por el solvente en ccd (en cm)

$$\varepsilon_{RFx} = \varepsilon_{dx}/d_x + \varepsilon_{ds}/d_s$$

ε_{dx} : error (σ) en la distancia recorrida por el compuesto x en ccd

ε_{ds} : error (σ) en la distancia recorrida por el solvente en ccd

$$t_{RRx} = t_{Rx}/t_{Rref}$$

t_{RRx} : tiempo de retención relativo del compuesto x en HPLC

t_{Rx} : tiempo de retención del compuesto x (en min) según HPLC

t_{Rref} : tiempo de retención de la referencia (en min) según HPLC

$$\varepsilon_{tRRx} = \varepsilon_{tRx}/t_{Rx} + \varepsilon_{tRref}/t_{Rref}$$

ε_{tRx} : error (σ) en el tiempo de retención del compuesto x en HPLC

ε_{tRref} : error (σ) en el tiempo de retención de la referencia según HPLC

Apéndice 2

ACRÓNIMOS

ác.: ácido
 ACN: acetonitrilo
 ADN: ácido desoxiribonucleico
 AINEs: Anti-inflamatorios no esteroides
 cc: cromatografía en columna
 ccd: cromatografía en capa delgada
 col. colaboradores
 COX: ciclooxigenasa
 etc.: etcétera
 EtOH: etanol
 EBV-EA: antígeno temprano del virus Epstein-Barr
 Fr: fracción
 HP: Hewlett Packard
 HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
 HBV: hepatitis B virus
 I.N.T.A.: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
 IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry
 MIC: concentración inhibitoria mínima
 P.F.: punto de fusión
 ppm: partes por millón
 r.p.m.: revoluciones por minuto
 RMN: resonancia magnética nuclear
 TEA: trietilamina
 TMS: tetrametilsilano
 TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
 UNLP: Universidad Nacional de La Plata
 U.V.: ultra violeta
 VIH: virus de la inmunodeficiencia humana
 5-LO: 5-lipooxigenasa

Apéndice 3

NOMENCLATURA IUPAC DE LAS CUMARINAS UTILIZADAS COMO TESTIGO

Estructura Número	Nombre convencional	Nombre IUPAC
3	7-(2,3-Dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutoxi)-6-metoxi-2 <i>H</i> -cromeno-2-ona
4	Ayapina	6 <i>H</i> -[1,3]dioxolo[4,5- <i>g</i>]chromeno-6-ona
5	7-(3-Metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina	6-metoxi-7-(3-metilbut-2-eniloxi)-2 <i>H</i> -cromeno-2-ona
6	Preniletina	6-hidroxi-7-(3-metilbut-2-eniloxi)-2 <i>H</i> -cromeno-2-ona

7	Virgatenol	7-(2-hidroxi-3-metilbut-3-eniloxi)-6-metoxi-2 <i>H</i> -cromeno-2-ona
8	Escopoletina	7-hidroxi-6-metoxi-2 <i>H</i> -cromeno-2-ona
15	7-(2,3-Epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina	7-((3,3-dimetiloxiran-2-il)metoxi)-6-metoxi-2 <i>H</i> -cromeno-2-ona
19	5-(3-Metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina	9-(3-metilbut-2-eniloxi)-6 <i>H</i> -[1,3]dioxolo[4,5-g]cromeno-6-ona
20	5-Metoxi-6,7-metilendioxicumarina	9-metoxi-6 <i>H</i> -[1,3]dioxolo[4,5-g]cromeno-6-ona
22	5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina	9-(2,3-dihidroxi-3-metilbutoxi)-6 <i>H</i> -[1,3]dioxolo[4,5-g]cromeno-6-ona
25	5-(3-Metil-2-oxobutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina	9-(3-metil-2-oxobutoxi)-6 <i>H</i> -[1,3]dioxolo[4,5-g]cromeno-6-ona
28	5-Hidroxi-6,7-metilendioxicumarina	9-hidroxi-6 <i>H</i> -[1,3]dioxolo[4,5-g]cromeno-6-ona
29	7-(2,3-Dihidroxi-3-metilbutiloxi)-5,6-dimetoxicumarina	7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutoxi)-5,6-dimetoxi-2 <i>H</i> -cromeno-2-ona
32	Fraxetina	7,8-dihidroxi-6-metoxi-2 <i>H</i> -cromeno-2-ona
33	Isofraxidina	7-hidroxi-6,8-dimetoxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona
34	6,7,8-Trimetoxicumarina	6,7,8-trimetoxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona
38	Purpurasol	2-(2-hidroxiopropan-2-il)-5-metoxi-2 <i>H</i> -[1,4]dioxino[2,3-h]cromeno-9(3 <i>H</i>)-ona
39	Purpurenol	2-(2-hidroxiopropan-2-il)-5,6-dimetoxi-2 <i>H</i> -[1,4]dioxino[2,3-h]cromeno-9(3 <i>H</i>)-ona
40	Purpurasolol	6-hidroxi-2-(2-hidroxiopropan-2-il)-5-metoxi-2 <i>H</i> -[1,4]dioxino[2,3-h]cromeno-9(3 <i>H</i>)-ona

Apéndice 4

CROMATOGRAMAS POR HPLC

1.- 6,7,8-trimetoxicumarina (34)

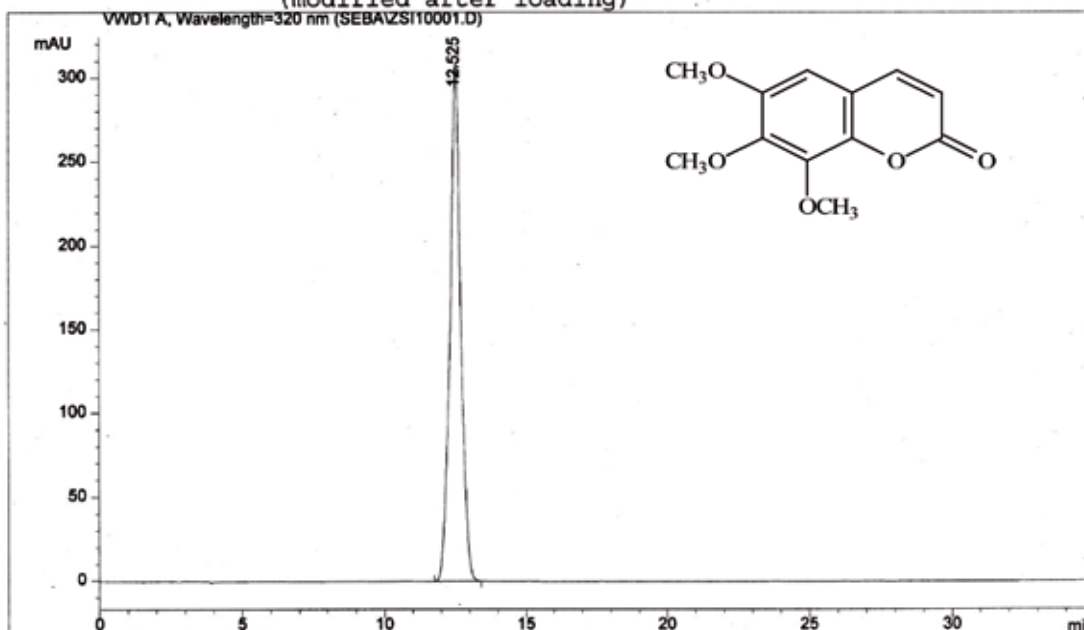
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\SI10001.D

Sample Name: SI1-320nm

```

=====
Injection Date   : 06/06/2007 13:46:40 PM
Sample Name     : SI1-320nm
Acq. Operator   : SEBASTIAN
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed    : 22/05/2007 21:10:13 PM by SEBASTIAN
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PURCOLU.M
Last changed    : 20/07/2007 12:04:48 PM by SEBASTIAN
                  (modified after loading)
    
```

Vial : 1



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	12.525	BB	0.3681	8069.45801	309.59784	100.0000

Totals : 8069.45801 309.59784

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

2.- Fraxetina (32)

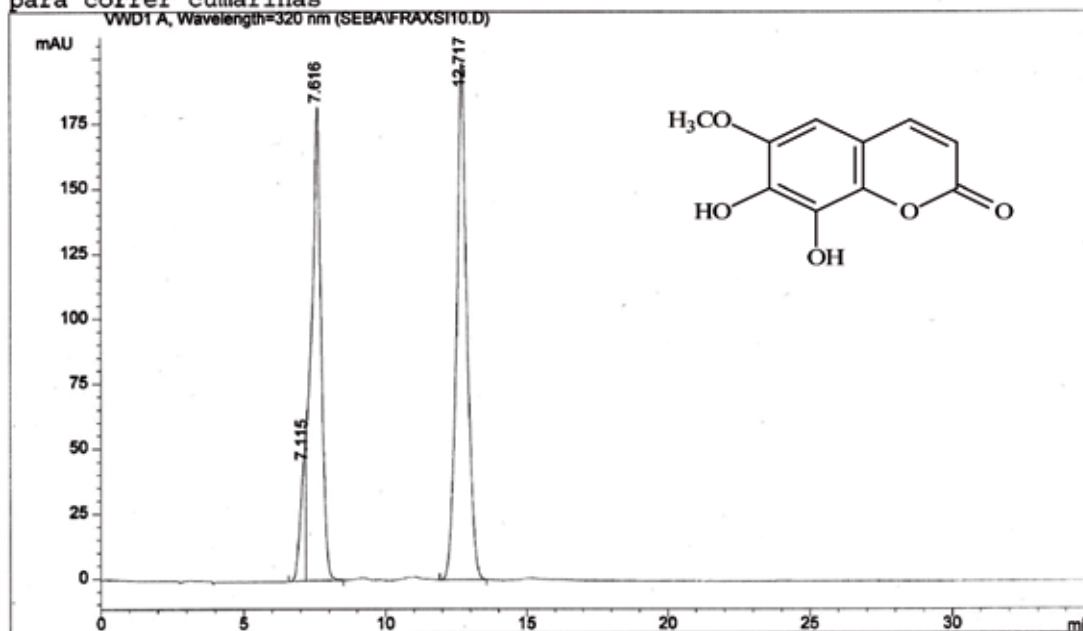
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\FRAXSI10.D

Sample Name: fraxet+SI1-320nm

```

=====
Injection Date : 23/05/2007 13:24:41 PM
Sample Name    : fraxet+SI1-320nm          Vial : 1
Acq. Operator  : SEBASTIAN
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed   : 23/05/2007 11:57:16 PM by SEBASTIAN
                (modified after loading)
    
```

para correr cumarinas



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	7.115	BV F	0.2190	657.78271	44.50175	6.4578
2	7.616	VB	0.3249	4365.54199	182.02538	42.8590
3	12.717	VB	0.3668	5162.48926	198.96011	50.6831

Totals : 1.01858e4 425.48724

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

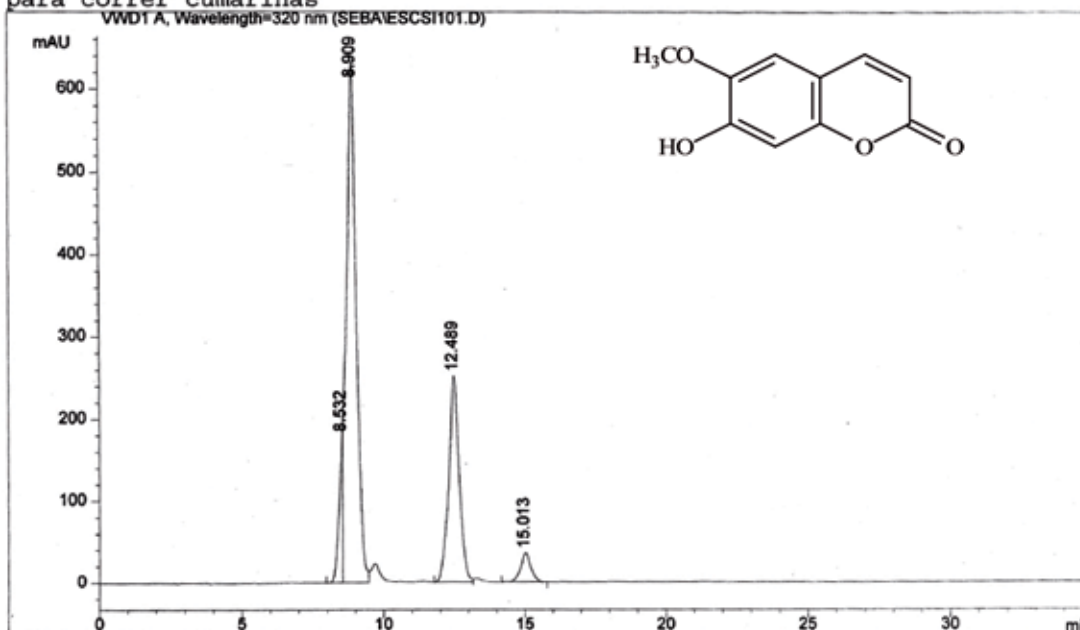
3.- Escopoletina (8)

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\ESCSI101.D

Sample Name: escop+SI1-320nm

```

=====
Injection Date : 06/06/2007 12:14:10 PM
Sample Name    : escop+SI1-320nm          Vial : 1
Acq. Operator  : SEBASTIAN
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed   : 22/05/2007 21:10:13 PM by SEBASTIAN
para correr cumarinas
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	8.532	BV F	0.1260	1658.26514	178.25824	6.8749
2	8.909	VV	0.3312	1.51073e4	632.30151	62.6326
3	12.489	VV	0.3649	6470.26318	250.88370	26.8248
4	15.013	BB	0.3545	884.67285	35.53633	3.6677

Totals : 2.41205e4 1096.97978

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

4.- Isofraxidina (33)

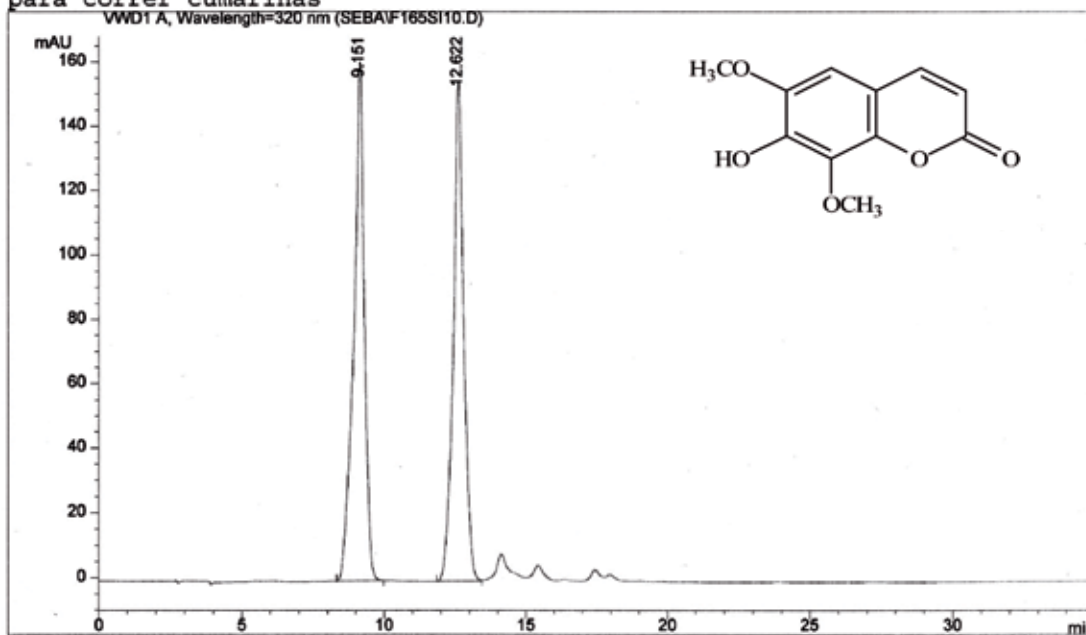
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\F165SI10.D

Sample Name: f16-50+SI1-320nm

```

=====
Injection Date   : 23/05/2007 16:38:51 PM
Sample Name     : f16-50+SI1-320nm           Vial :    1
Acq. Operator  : SEBASTIAN
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed   : 23/05/2007 11:57:16 PM by SEBASTIAN
                (modified after loading)
    
```

para correr cumarinas



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	9.151	PB	0.3523	4134.82568	160.85493	50.9870
2	12.622	BB	0.3620	3974.74072	154.88461	49.0130

Totals : 8109.56641 315.73955

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

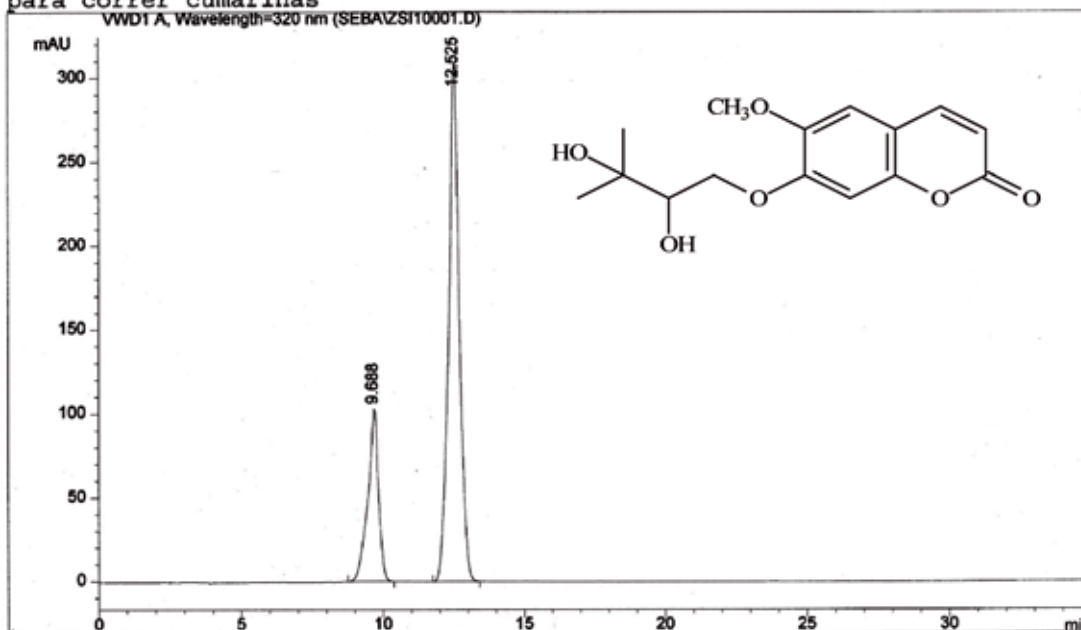
5.- 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (3)

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\ZSI10001.D

Sample Name: Z+SI1-320nm

```

=====
Injection Date   : 06/06/2007 13:46:40 PM
Sample Name     : Z+SI1-320nm
Acq. Operator  : SEBASTIAN
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed   : 22/05/2007 21:10:13 PM by SEBASTIAN
para correr cumarinas
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	9.688	BB	0.3579	2701.55908		103.18389	25.0817
2	12.525	BB	0.3681	8069.45801		309.59784	74.9183

Totals : 1.07710e4 412.78173

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

6.- 5-hidroxi-6,7-metilendioxicumarina (28)

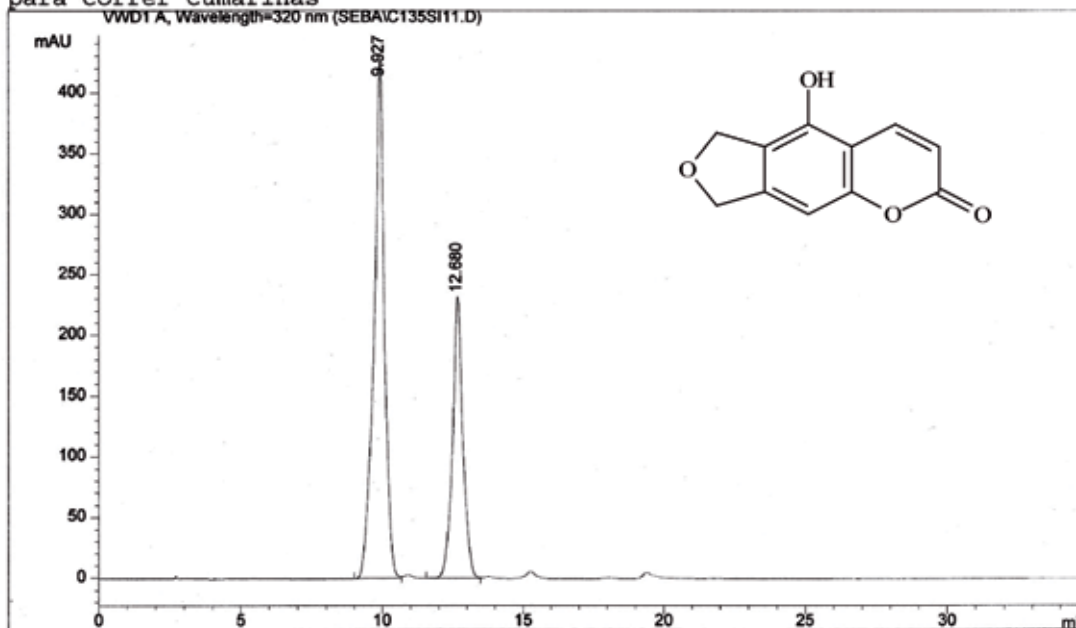
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\C135SI11.D

Sample Name: C135+SI.1-320nm

```

=====
Injection Date   : 22/05/2007 13:49:53 PM
Sample Name     : C135+SI.1-320nm           Vial :    1
Acq. Operator  : SEBASTIAN
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed   : 22/05/2007 13:02:14 PM by SEBASTIAN
                (modified after loading)
    
```

para correr cumarinas



Area Percent Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	9.927	BB	0.3541	1.10267e4	426.35376	65.1836
2	12.680	BB	0.3592	5889.63721	231.69554	34.8164

Totals : 1.69163e4 658.04930

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

7.- 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (22)

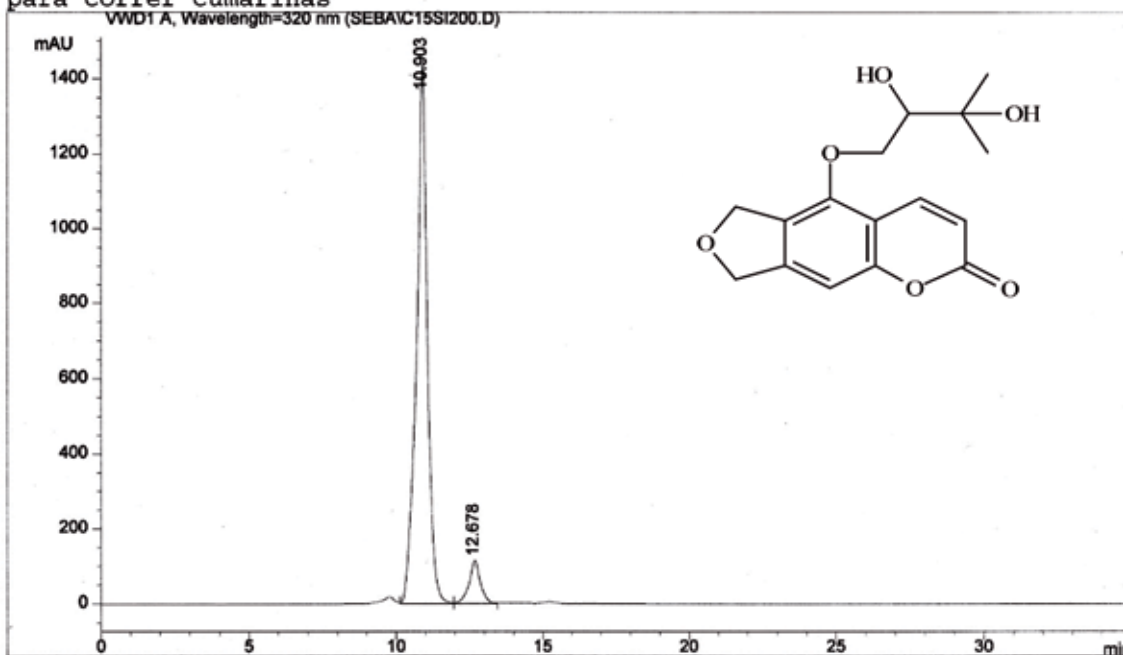
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\C15SI200.D

Sample Name: C15+SI.2-320nm

```

=====
Injection Date : 22/05/2007 16:11:01 PM
Sample Name   : C15+SI.2-320nm           Vial : 1
Acq. Operator : SEBASTIAN
Method        : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed  : 22/05/2007 16:07:20 PM by SEBASTIAN
                (modified after loading)
    
```

para correr cumarinas



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	10.903	VV	0.3567	3.71486e4	1438.15540	92.3600
2	12.678	VB	0.3745	3072.94116	114.95061	7.6400

Totals : 4.02216e4 1553.10601

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

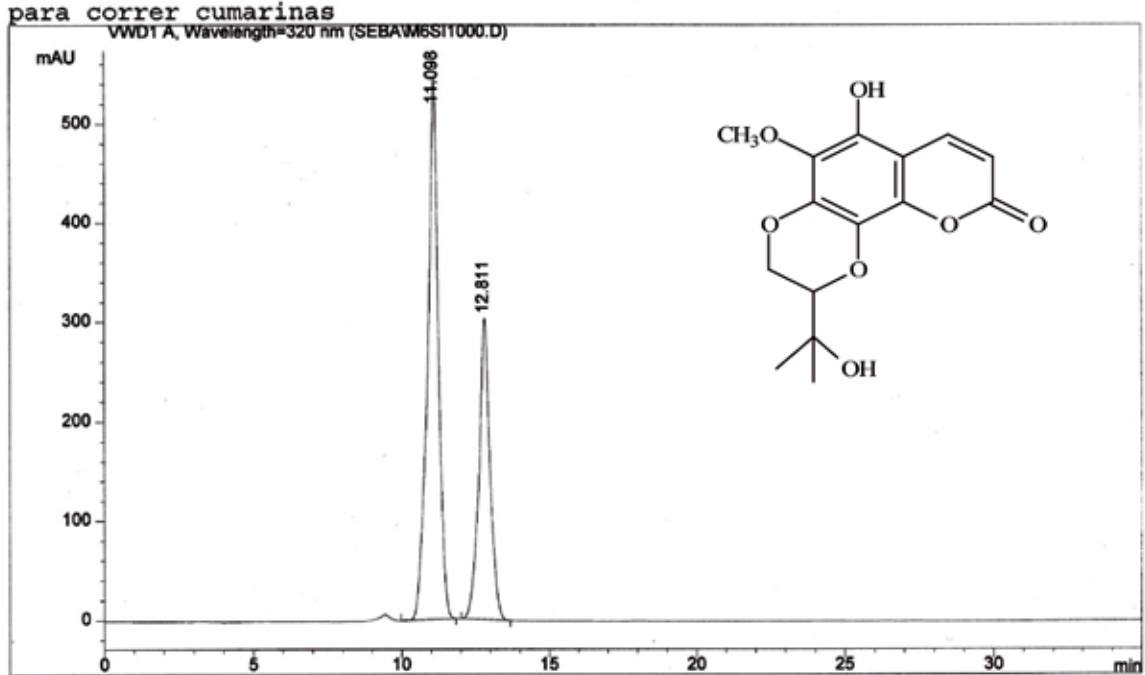
8.- Purpurasolol (40)

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\M6SI1000.D

Sample Name: M6+SI1-320nm

```

=====
Injection Date : 23/05/2007 11:59:54 PM
Sample Name    : M6+SI1-320nm                Vial : 1
Acq. Operator  : SEBASTIAN
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed   : 23/05/2007 11:57:16 PM by SEBASTIAN
                (modified after loading)
    
```



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	11.098	VB	0.3497	1.37570e4		545.23517	63.5105
2	12.811	PB	0.3686	7903.99414		302.75507	36.4895

Totals : 2.16610e4 847.99023

Results obtained with enhanced integrator!
 =====
 *** End of Report ***

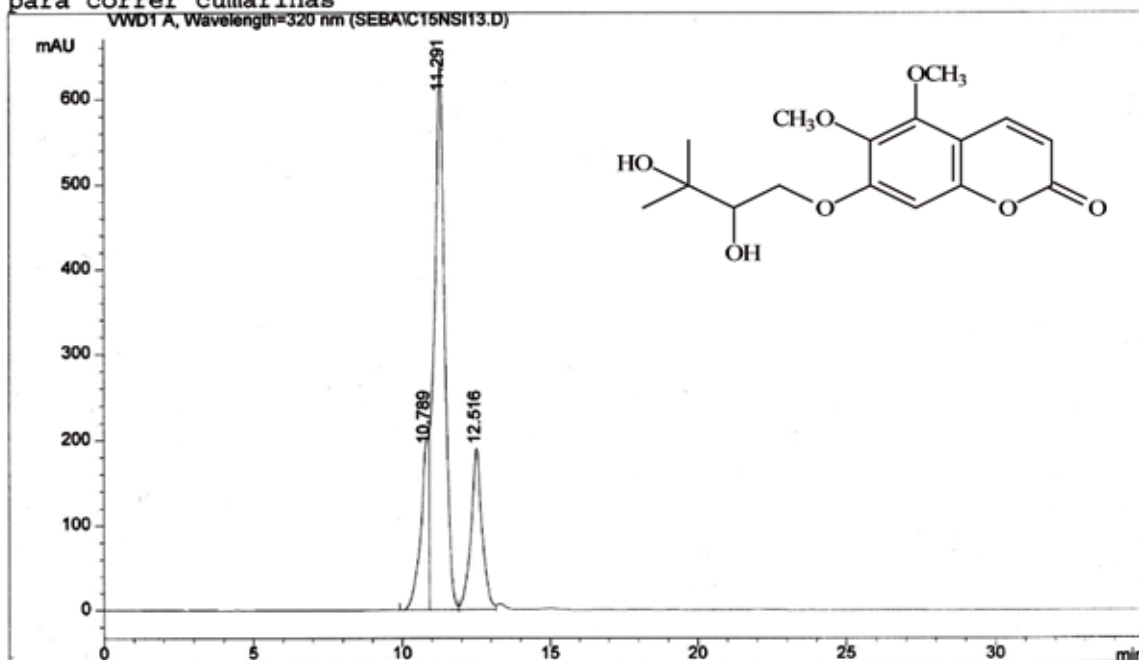
9.- 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi) 5,6-dimetoxicumarina (29)

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\C15NSI13.D

Sample Name: c15ndl-SI1-320nm

```

=====
Injection Date : 24/05/2007 14:39:18 PM
Sample Name    : c15ndl-SI1-320nm           Vial : 1
Acq. Operator  : SEBASTIAN
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed   : 22/05/2007 21:10:13 PM by SEBASTIAN
para correr cumarinas
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	10.789	VV F	0.2834	3890.90625	189.37109	15.8577
2	11.291	VV	0.3432	1.56715e4	638.41376	63.8704
3	12.516	VV	0.3707	4974.00537	189.27733	20.2719

Totals : 2.45365e4 1017.06218

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

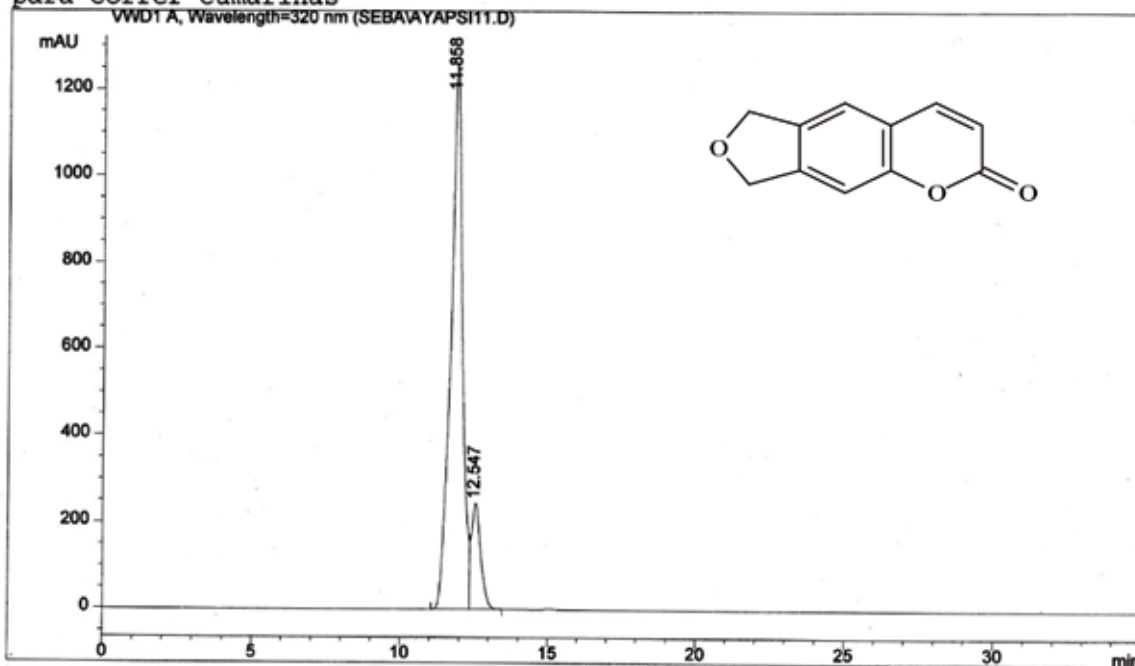
10.- Ayapina (4)

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\AYAPSI11.D

Sample Name: ayapin+SI1-320nm

```

=====
Injection Date   : 06/06/2007 15:22:10 PM
Sample Name     : ayapin+SI1-320nm           Vial :    1
Acq. Operator   : SEBASTIAN
Method          : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed    : 22/05/2007 21:10:13 PM by SEBASTIAN
para correr cumarinas
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	11.858	PV	0.3834	3.42958e4	1258.68848	86.2536
2	12.547	VB	0.3204	5465.79346	244.59483	13.7464

Totals : 3.97616e4 1503.28331

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

11.- Purpurasol (38)

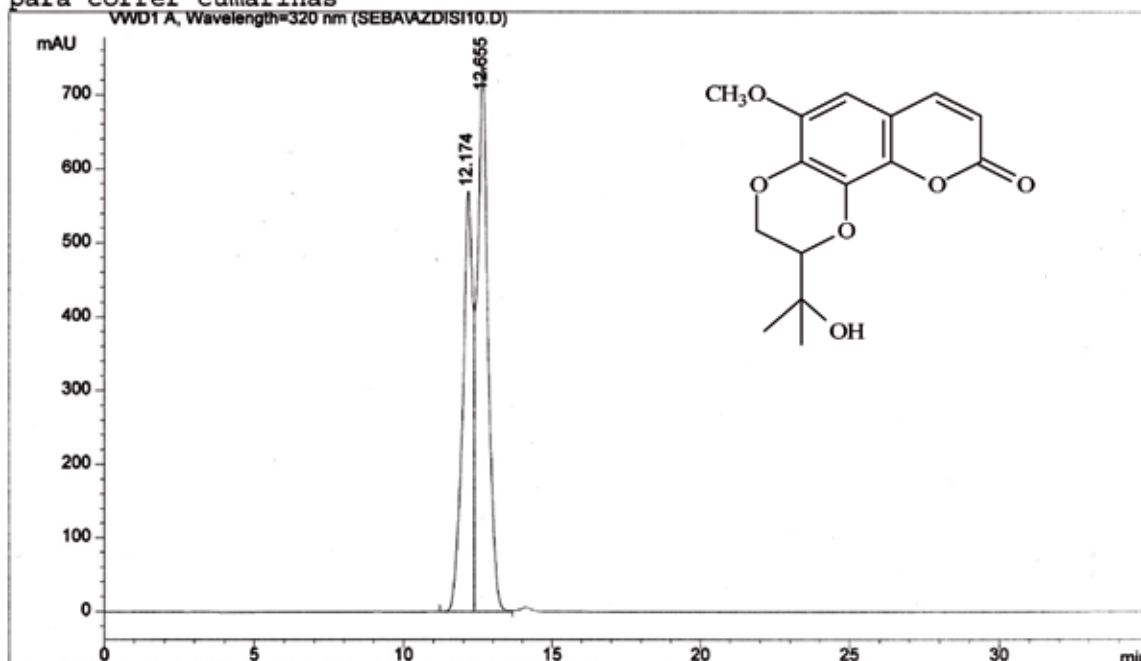
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\AZDISI10.D

Sample Name: azdil+SI.1-320nm

```

=====
Injection Date   : 22/05/2007 19:57:24 PM
Sample Name     : azdil+SI.1-320nm           Vial :    1
Acq. Operator   : SEBASTIAN
Method          : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed    : 22/05/2007 17:53:04 PM by SEBASTIAN
                  (modified after loading)
    
```

para correr cumarinas



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
    
```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	12.174	BV	0.3299	1.34942e4	570.30939	41.8268
2	12.655	VB	0.3565	1.87679e4	741.29840	58.1732

Totals : 3.22620e4 1311.60779

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

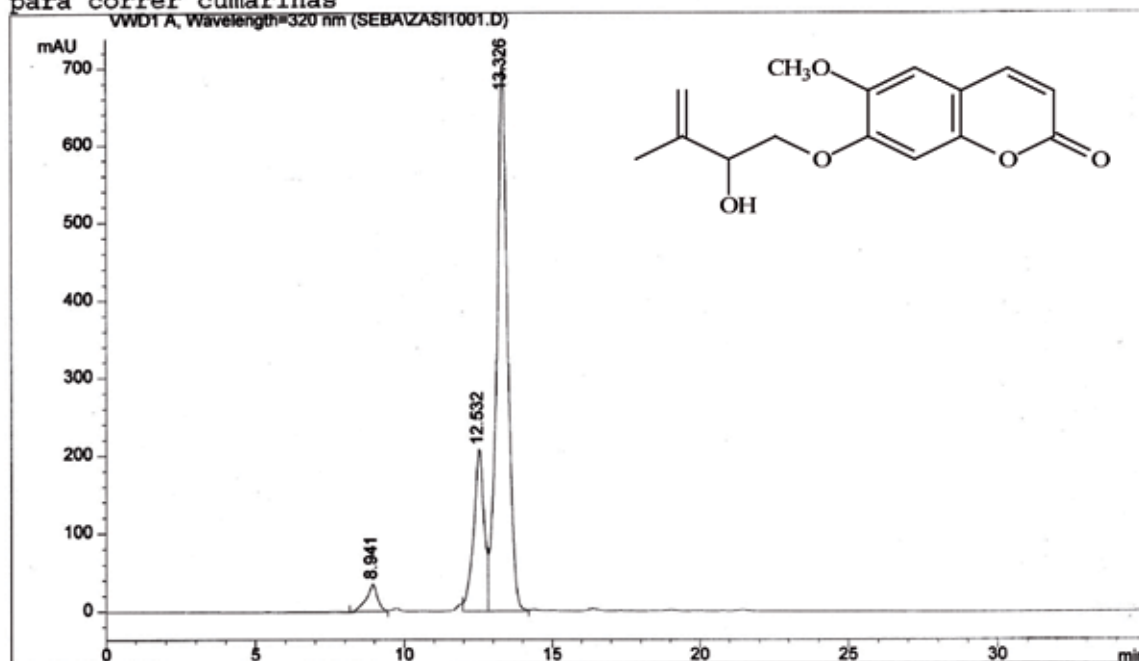
12.- Virgatenol (7)

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\ZASI1001.D

Sample Name: ZA+SI1-320nm

```

=====
Injection Date : 06/06/2007 16:51:18 PM
Sample Name   : ZA+SI1-320nm           Vial : 1
Acq. Operator : SEBASTIAN
Method        : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed  : 22/05/2007 21:10:13 PM by SEBASTIAN
para correr cumarinas
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	8.941	BV	0.3626	941.62573	35.41607	3.9462
2	12.532	VV	0.3542	5163.85156	207.65402	21.6408
3	13.326	VB	0.3556	1.77561e4	703.53052	74.4130

Totals : 2.38616e4 946.60061

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

13.- Purpurenol (39)

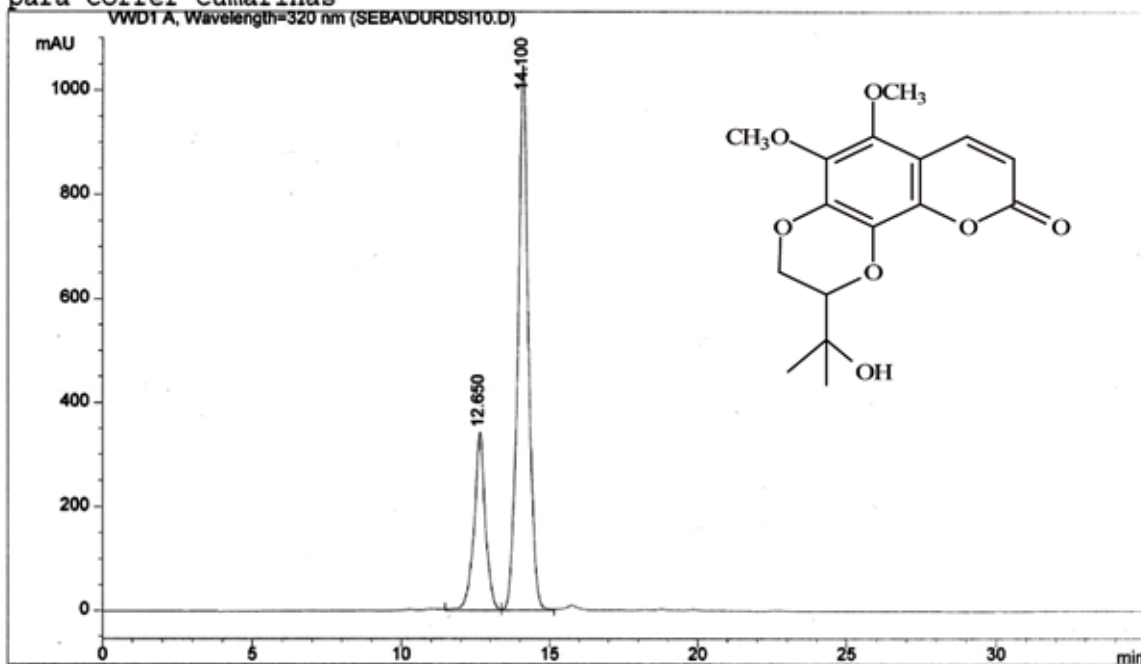
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\ DURDSI10.D

Sample Name: durdil+SI1-320nm

```

=====
Injection Date   : 23/05/2007 15:20:56 PM
Sample Name     : durdil+SI1-320nm           Vial :    1
Acq. Operator   : SEBASTIAN
Method          : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed    : 23/05/2007 11:57:16 PM by SEBASTIAN
                  (modified after loading)
    
```

para correr cumarinas



Area Percent Report

```

=====
Sorted By       :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	12.650	VV	0.3739	9124.16602		341.91309	25.8709
2	14.100	VB	0.3550	2.61439e4		1048.21619	74.1291

Totals : 3.52681e4 1390.12927

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

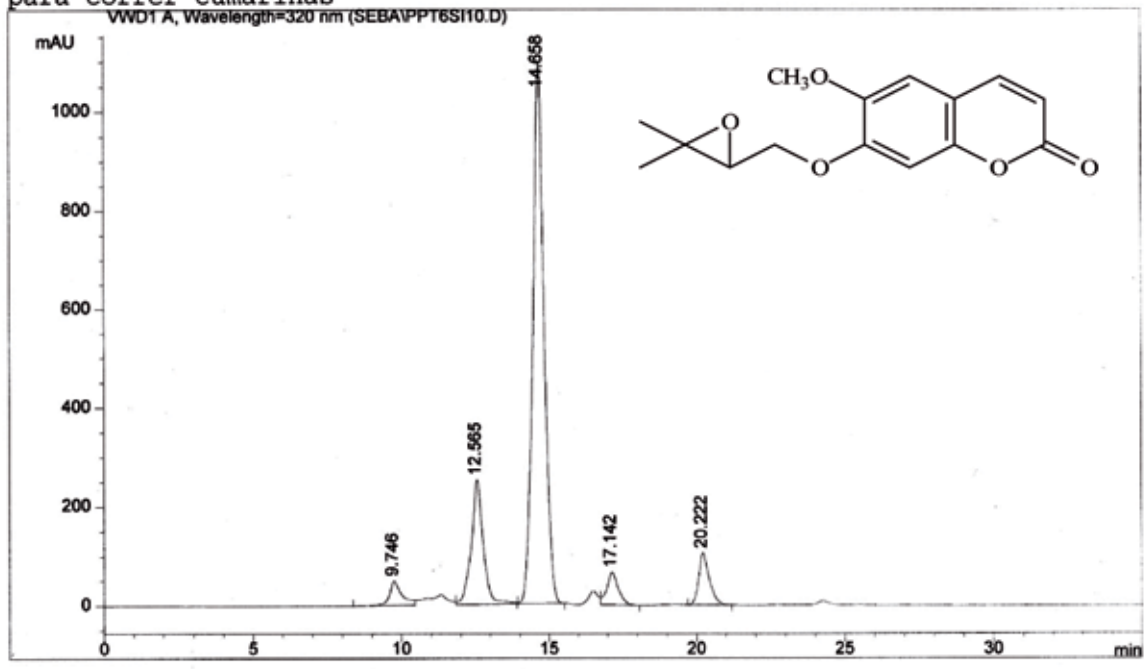
14.- 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (15)

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\PPT6SI10.D

Sample Name: ppt6+SI1-320nm

```

=====
Injection Date   : 07/06/2007 11:08:59 PM
Sample Name     : ppt6+SI1-320nm           Vial :    1
Acq. Operator  : SEBASTIAN
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed   : 22/05/2007 21:10:13 PM by SEBASTIAN
para correr cumarinas
    
```



```

=====
                          Area Percent Report
=====
    
```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier    :      1.0000
Dilution      :      1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	9.746	PV	0.4051	1478.91516		49.53371	3.5463
2	12.565	VB	0.3956	7140.00244		251.25163	17.1211
3	14.658	BB	0.3749	2.86320e4		1095.05054	68.6573
4	17.142	VP	0.3872	1806.59741		66.11472	4.3321
5	20.222	VB	0.3643	2645.30615		104.83297	6.3432

Totals : 4.17029e4 1566.78357

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***
    
```

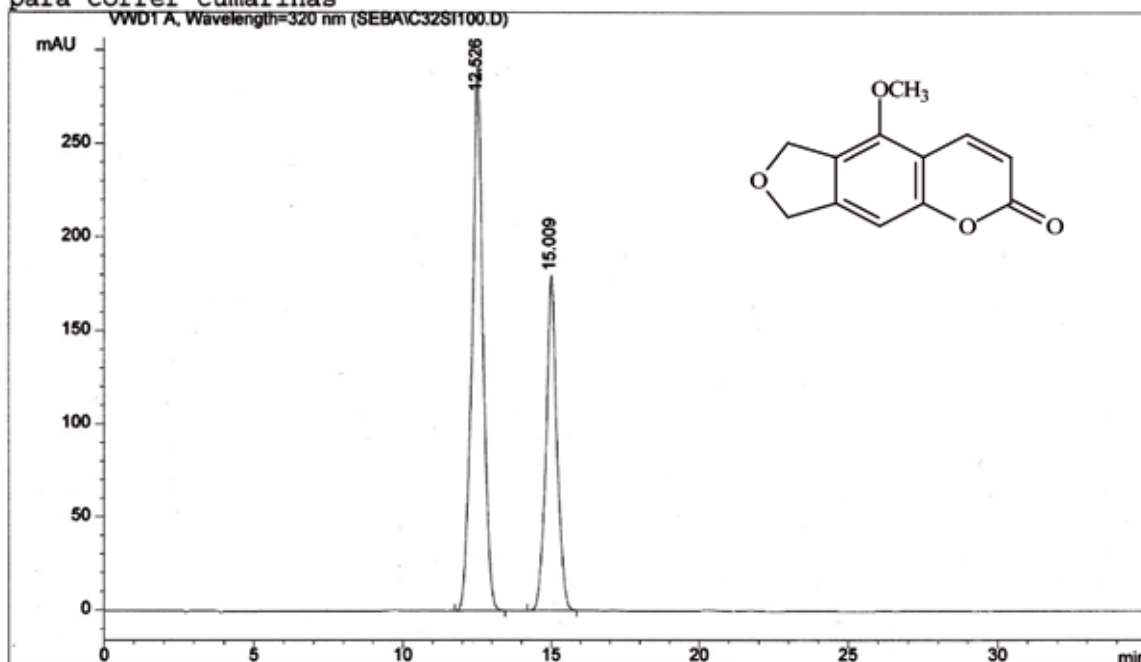
15.- 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina (20)

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\C32SI100.D

Sample Name: C32+SI1-320nm

```

=====
Injection Date   : 07/06/2007 12:27:07 PM
Sample Name     : C32+SI1-320nm                Vial :    1
Acq. Operator   : SEBASTIAN
Method          : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed    : 22/05/2007 21:10:13 PM by SEBASTIAN
para correr cumarinas
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	12.526	BB	0.3651	7536.18750	292.07806	62.0490
2	15.009	BB	0.3645	4609.36426	179.89029	37.9510

Totals : 1.21456e4 471.96835

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

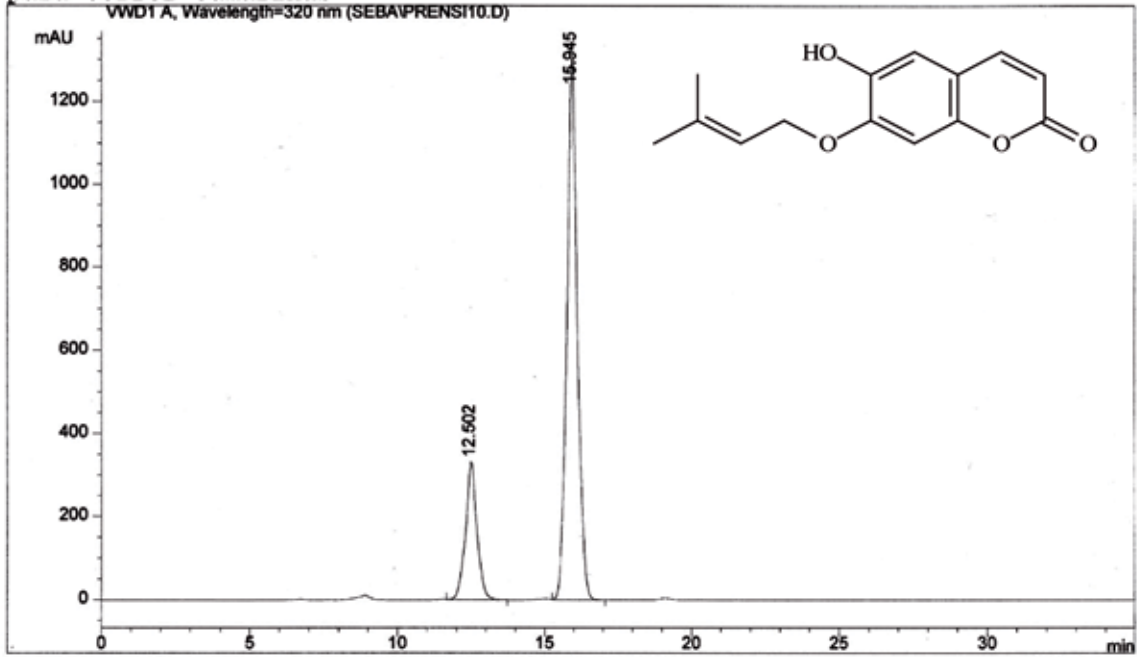
16.- Preniletina (6)

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\PRENSI10.D

Sample Name: pren+SI1-320nm

```

=====
Injection Date   : 07/06/2007 13:47:02 PM
Sample Name     : pren+SI1-320nm           Vial :    1
Acq. Operator  : SEBASTIAN
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed   : 22/05/2007 21:10:13 PM by SEBASTIAN
para correr cumarinas
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	12.502	VB	0.3783	8967.22754	332.92505	21.8556
2	15.945	VB	0.3510	3.20622e4	1303.42078	78.1444

Totals : 4.10294e4 1636.34583

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

17.- 5-(3-metil-2-oxobutiloxi)-6,7-metilendioxicumarina (25)

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\C1SI1000.D

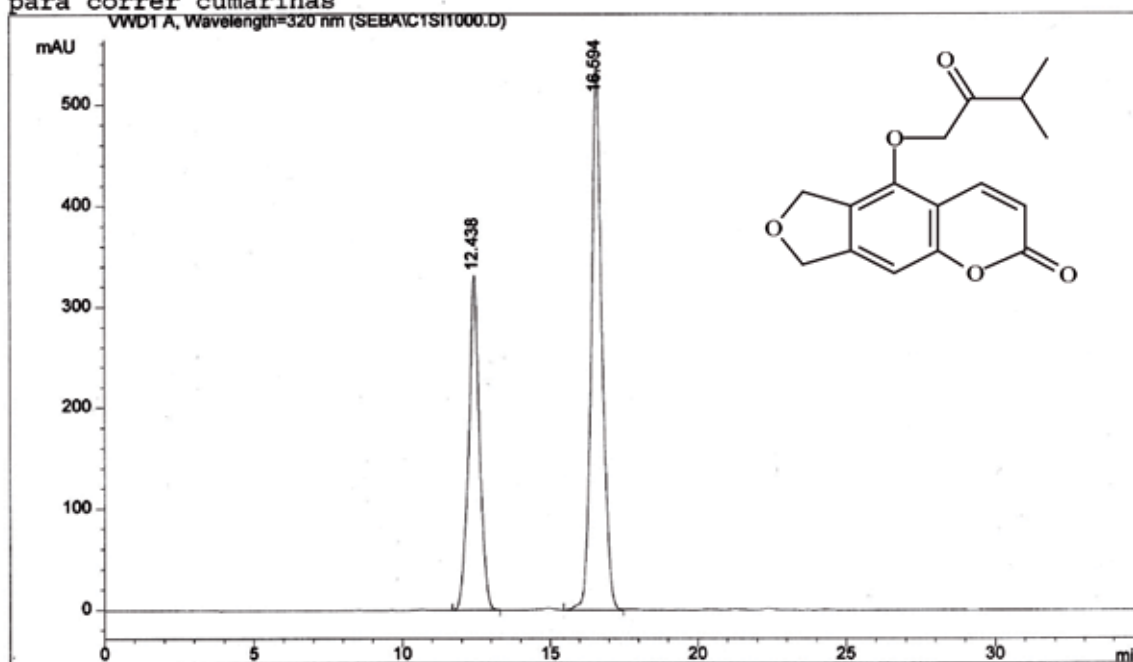
Sample Name: C1+SI1-320nm

```

=====
Injection Date : 07/06/2007 15:09:24 PM
Sample Name   : C1+SI1-320nm
Acq. Operator : SEBASTIAN
Method        : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed  : 22/05/2007 21:10:13 PM by SEBASTIAN
para correr cumarinas

```

Vial : 1



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000

```

Signal 1: WWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	12.438	BB	0.3626	8496.28125	332.00824	38.4104
2	16.594	VB	0.3641	1.36234e4	537.64703	61.5896

```
Totals :                2.21197e4  869.65527
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***
=====

```

18.- 7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (5)

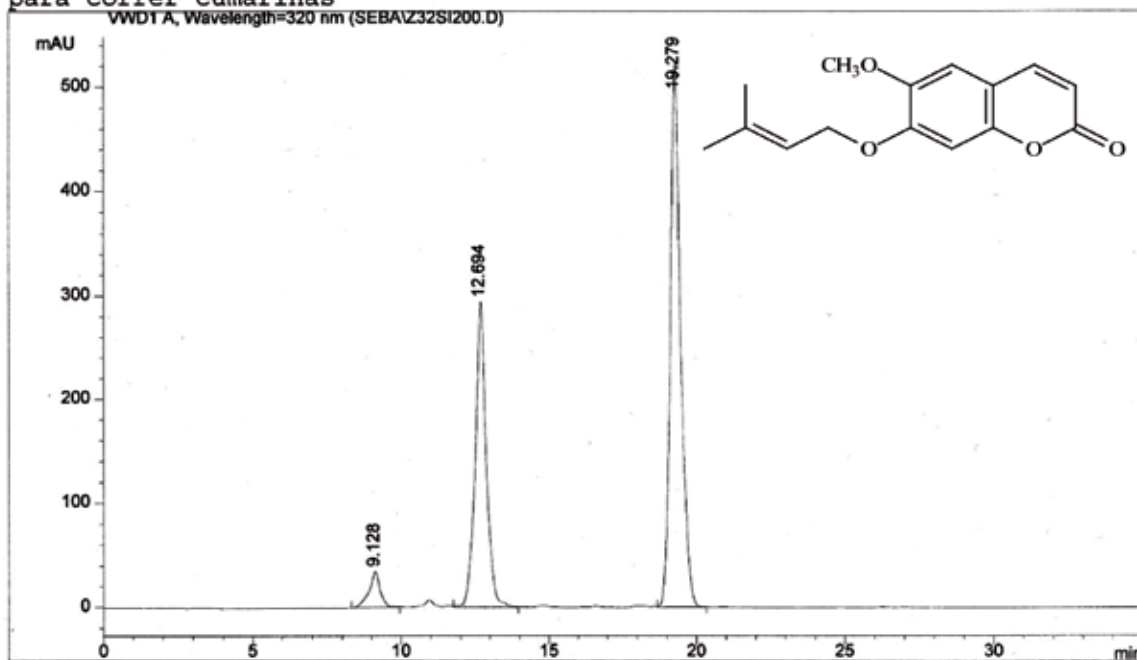
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\Z32SI200.D

Sample Name: Z32+SI.2-320nm

```

=====
Injection Date : 22/05/2007 13:05:52 PM
Sample Name    : Z32+SI.2-320nm           Vial : 1
Acq. Operator  : SEBASTIAN
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed   : 22/05/2007 13:02:14 PM by SEBASTIAN
                (modified after loading)
    
```

para correr cumarinas



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	9.128	BB	0.3574	899.69012	34.57575	4.2681
2	12.694	VB	0.3640	7596.33154	294.08246	36.0371
3	19.279	BB	0.3466	1.25832e4	522.33826	59.6948

Totals : 2.10792e4 850.99647

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

19.- 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilendioxicumarina (19)

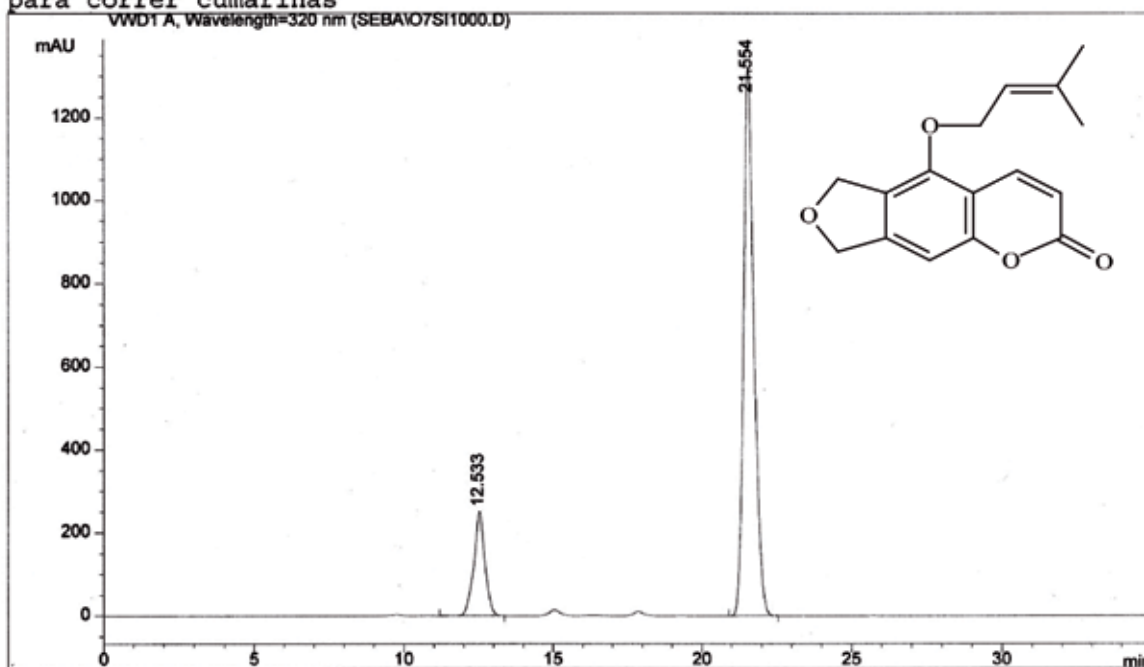
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\07SI1000.D

Sample Name: 07+SI1-320nm

```

=====
Injection Date   : 08/06/2007 11:47:16 PM
Sample Name     : 07+SI1-320nm
Acq. Operator  : SEBASTIAN
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed   : 22/05/2007 21:10:13 PM by SEBASTIAN
para correr cumarinas
    
```

Vial : 1



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	12.533	VB	0.3663	6509.96289	251.28342	17.0764
2	21.554	BB	0.3500	3.16127e4	1323.49792	82.9236

Totals : 3.81227e4 1574.78134

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

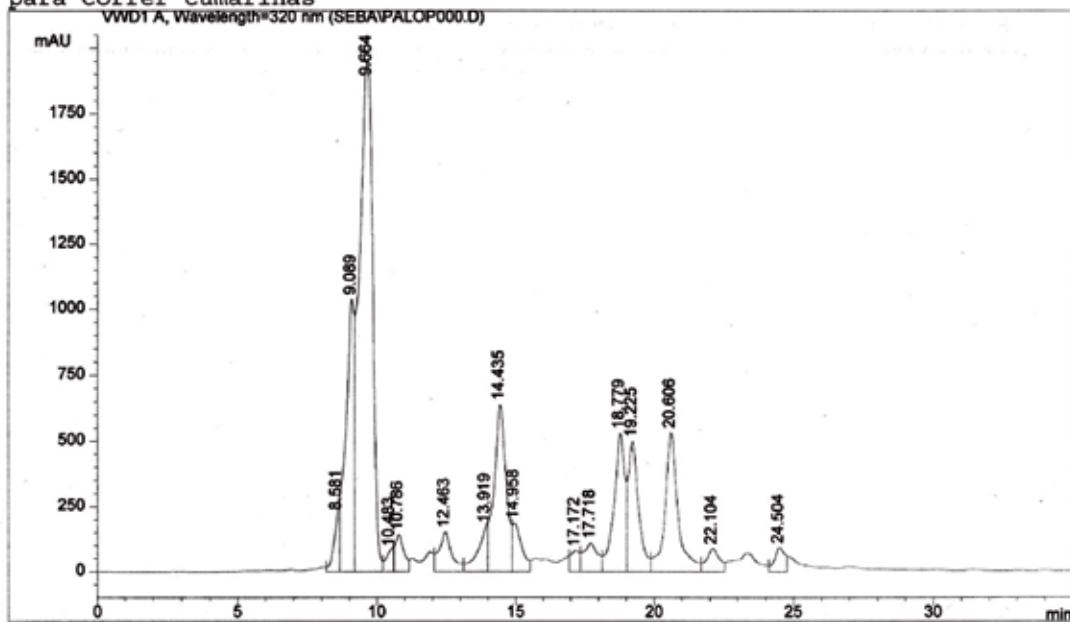
20.- *Pterocaulon alopecuroides*

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\PALOP000.D Sample Name: PalopNOSI1-320nm

```

=====
Injection Date : 12/06/2007 15:46:55 PM
Sample Name    : PalopNOSI1-320nm          Vial : 1
Acq. Operator  : SEBASTIAN
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed   : 22/05/2007 21:10:13 PM by SEBASTIAN
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed   : 12/06/2007 16:44:10 PM by SEBASTIAN
                (modified after loading)
    
```

para correr cumarinas



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	8.581	VV F	0.2015	3163.09790	219.62495	1.7189
2	9.089	VV	0.2901	2.19394e4	1038.91394	11.9222
3	9.664	VV	0.4818	6.48071e4	1953.02881	35.2171
4	10.483	VV F	0.2797	1584.64099	81.87065	0.8611
5	10.786	VV	0.3081	3133.80713	143.00241	1.7030
6	12.463	VV	0.4318	4932.36230	153.44737	2.6803
7	13.919	VV F	0.3289	4166.32129	172.16441	2.2640
8	14.435	VV	0.4317	1.96048e4	639.84094	10.6535
9	14.958	VV	0.3351	4382.47754	186.66788	2.3815
10	17.172	VV	0.3202	1802.45801	80.27193	0.9795
11	17.718	VV	0.4719	3930.19922	110.44511	2.1357
12	18.779	VV	0.3771	1.45316e4	531.65424	7.8967

In Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
13	19.225	VV	0.3635	1.30245e4	500.13882	7.0777
14	20.606	VV	0.4698	1.77009e4	533.93579	9.6189
15	22.104	VV	0.4477	2875.57764	89.12867	1.5626
16	24.504	VV	0.3747	2442.11401	93.04095	1.3271

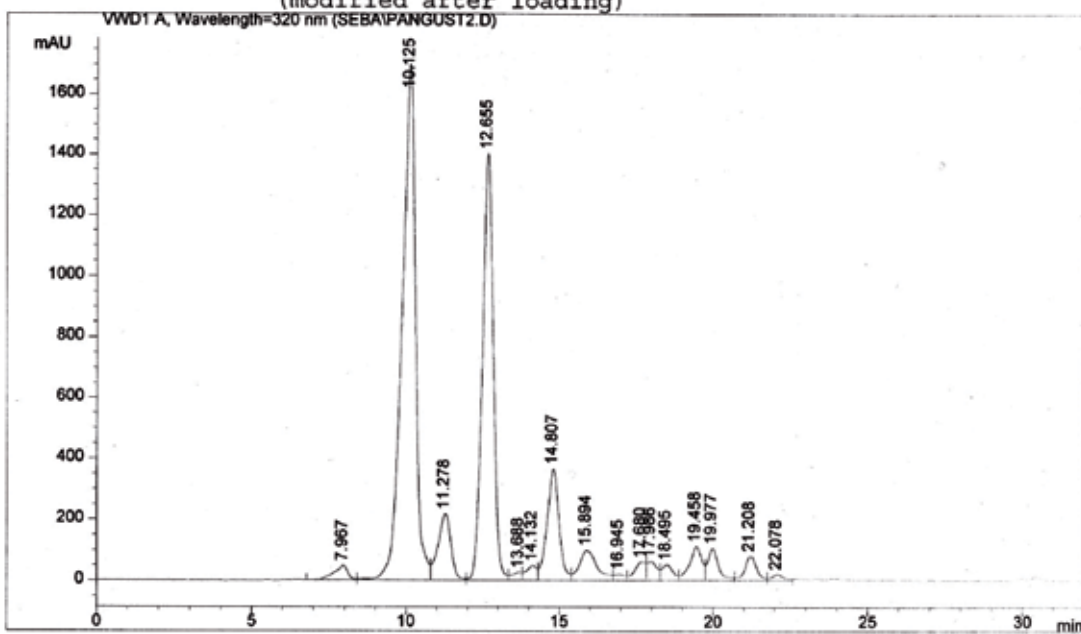
Totals : 1.84021e5 6527.17688

21.- *Pterocaulon angustifolium ulon lorentzii*

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\PANGUST2.D Sample Name: Pangustifo-320nm

```

=====
Injection Date   : 24/04/2007 15:06:15 PM
Sample Name     : Pangustifo-320nm           Vial :    1
Acq. Operator  : SEBASTIAN
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed   : 24/04/2007 15:04:18 PM by SEBASTIAN
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\PURCOLU.M
Last changed   : 20/07/2007 12:02:22 PM by SEBASTIAN
                (modified after loading)
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	7.967	VV	0.4199	1510.26953	48.13817	1.2276
2	10.125	VV	0.4271	5.16260e4	1699.85913	41.9644
3	11.278	VV	0.4361	6402.98877	216.94656	5.2047
4	12.655	VV	0.3648	3.43984e4	1402.13281	27.9610
5	13.688	VV	0.3151	596.14923	25.90269	0.4846
6	14.132	VV	0.3512	1195.41443	48.56267	0.8717
7	14.807	VV	0.3918	9930.25000	364.80530	8.0719
8	15.894	VV	0.6011	4011.62622	99.55883	3.2609
9	16.945	VV	0.3537	509.89908	20.74446	0.4145
10	17.680	VV	0.3654	1535.90283	61.24315	1.2485
11	17.986	VV	0.3221	1401.92090	61.98027	1.1396
12	18.495	VV	0.3790	1340.45740	52.06499	1.0896
13	19.458	VV	0.3957	3141.14014	112.47751	2.5533
14	19.977	VB	0.3591	2630.38232	106.63778	2.1381
15	21.208	BV	0.4050	2195.60425	81.39285	1.7847
16	22.078	VB	0.4012	596.73010	21.10474	0.4851

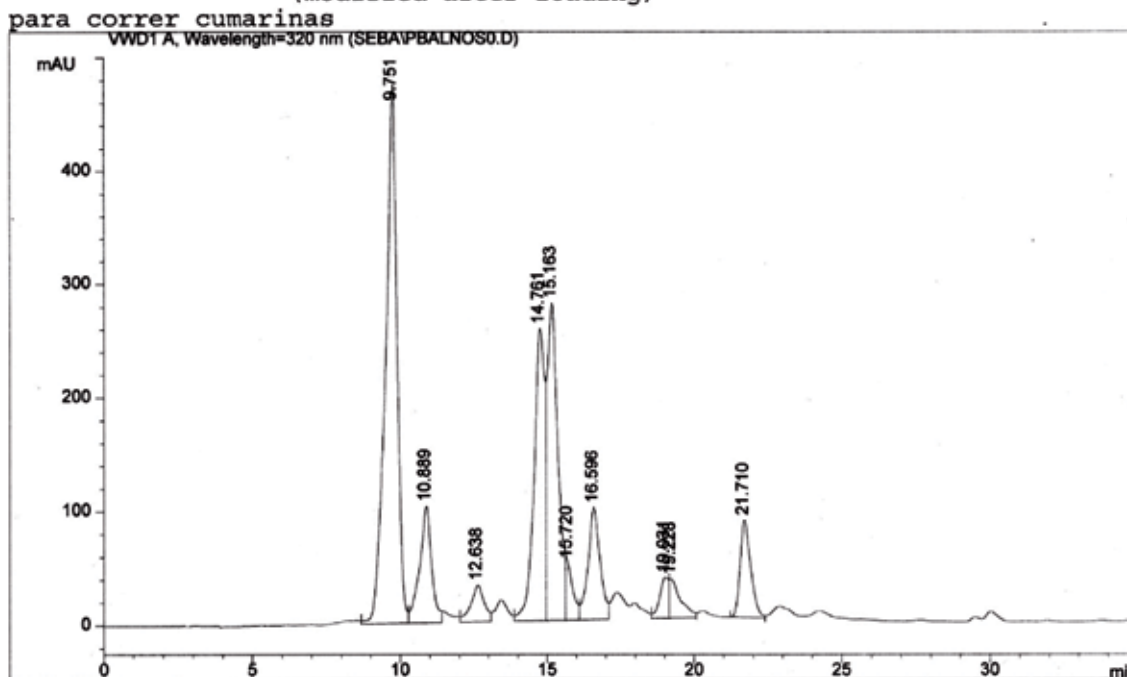
Totals : 1.23023e5 4423.55190

22.- Pterocaulon balansae

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\PBALNOS0.D Sample Name: PbalNOSI-320nm

```

=====
Injection Date   : 13/06/2007 11:13:06 PM
Sample Name     : PbalNOSI-320nm           Vial :    1
Acq. Operator   : SEBASTIAN
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed    : 22/05/2007 21:10:13 PM by SEBASTIAN
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed    : 13/06/2007 11:53:44 PM by SEBASTIAN
                  (modified after loading)
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	9.751	VV	0.3698	1.28534e4	474.61746	33.9090
2	10.889	VV	0.3864	2894.96753	102.45782	7.6373
3	12.638	VV	0.4390	1025.11255	32.40284	2.7044
4	14.761	VV	0.3549	6461.40527	256.59216	17.0460
5	15.163	VV	0.3611	7169.65576	278.83398	18.9145
6	15.720	VV B	0.2496	903.24219	50.11612	2.3829
7	16.596	VV	0.4034	2818.64258	98.59044	7.4359
8	19.031	VV	0.3111	758.75934	36.05102	2.0017
9	19.228	VV	0.3610	896.61786	34.22264	2.3654
10	21.710	BV	0.3642	2123.83496	85.46876	5.6029

Totals : 3.79057e4 1449.35324

23.- Pterocaulon cordobense

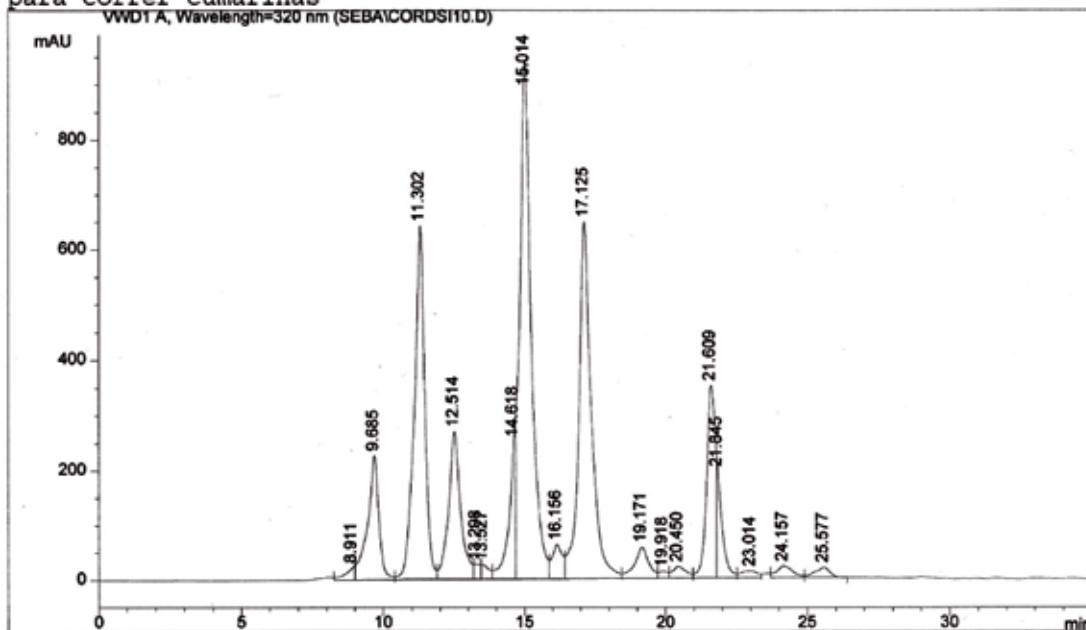
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\CORDSI10.D

Sample Name: Pcord+SI1-320nm

```

=====
Injection Date   : 08/06/2007 13:11:38 PM
Sample Name     : Pcord+SI1-320nm           Vial :    1
Acq. Operator   : SEBASTIAN
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed    : 22/05/2007 21:10:13 PM by SEBASTIAN
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed    : 08/06/2007 13:49:11 PM by SEBASTIAN
                  (modified after loading)
    
```

para correr cumarinas



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	8.911	VV F	0.3130	553.65070		22.63556	0.5517
2	9.685	VV	0.3795	6340.37842		227.15601	6.3182
3	11.302	VV	0.3588	1.66134e4		641.81671	16.5554
4	12.514	VV	0.4175	8116.39648		270.11325	8.0881
5	13.298	VV	0.2129	410.42877		27.35465	0.4090
6	13.527	VV	0.2731	492.88876		25.54812	0.4912
7	14.618	VV F	0.2226	4079.07397		251.64311	4.0648
8	15.014	VV	0.3977	2.68016e4		941.20398	26.7080
9	16.156	VV	0.3513	1567.03711		62.69925	1.5616
10	17.125	VV	0.4336	2.01938e4		647.68976	20.1233
11	19.171	VV	0.4768	2019.85168		57.70321	2.0128
12	19.918	VV	0.3244	286.02551		12.60667	0.2850
13	20.450	VV	0.4633	723.15955		21.60702	0.7206
14	21.609	VV	0.3189	7532.98193		350.82401	7.5067
15	21.845	VV B	0.1773	2576.77637		195.18947	2.5678
16	23.014	VV	0.5549	524.05316		12.31122	0.5222
17	24.157	VV	0.5953	849.93396		21.29141	0.8470
18	25.577	VP	0.4911	668.92633		18.65715	0.6666

Totals : 1.00350e5 3808.05056

24.- Pterocaulon lorentzii

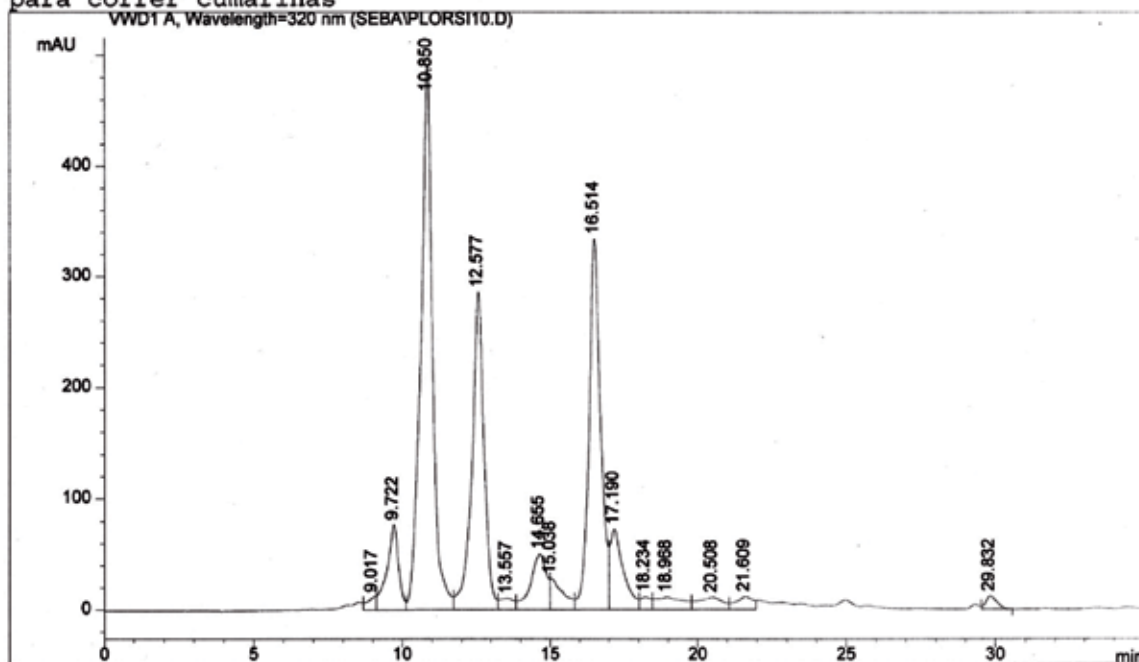
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\PLORSI10.D

Sample Name: Ploren+SI1-320nm

```

=====
Injection Date : 08/06/2007 15:18:29 PM
Sample Name   : Ploren+SI1-320nm           Vial :    1
Acq. Operator : SEBASTIAN
Method        : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed  : 08/06/2007 14:31:49 PM by SEBASTIAN
                (modified after loading)
    
```

para correr cumarinas



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	9.017	VV F	0.2883	252.01273	11.67040	0.6122
2	9.722	VV	0.3787	2133.52026	76.97151	5.1828
3	10.850	VV	0.3779	1.35163e4	491.00064	32.8339
4	12.577	VV	0.4007	8248.15527	285.87405	20.0365
5	13.557	VV	0.4389	339.49335	10.36504	0.8247
6	14.655	VV	0.5510	1894.60376	50.69447	4.6024
7	15.038	VV	0.4093	878.37451	28.25050	2.1338
8	16.514	VV	0.3871	9125.92871	334.13406	22.1688
9	17.190	VV	0.4319	2299.79419	72.94801	5.5867
10	18.234	VV	0.3420	283.17084	11.64332	0.6879
11	18.968	VV	0.8123	746.85229	11.48932	1.8143
12	20.508	VV	0.7493	651.69690	11.19074	1.5831
13	21.609	VV	0.5449	480.24490	11.94237	1.1666
14	29.832	VB	0.3860	315.50742	12.03403	0.7664

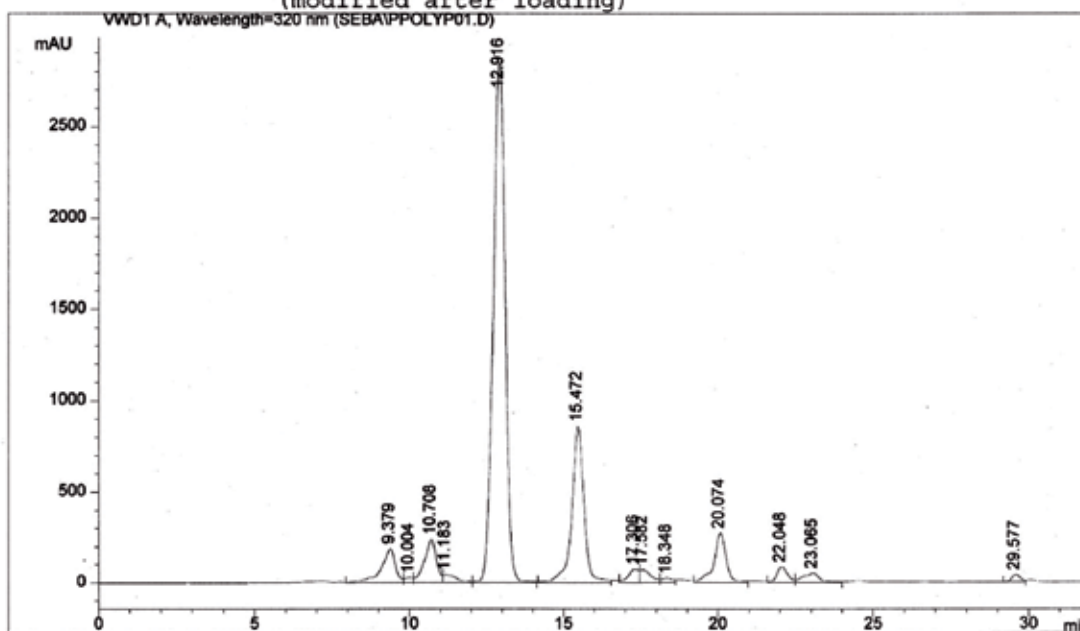
25.- *Pterocaulon polypterum*

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\PPOLYP01.D

Sample Name: P.Polyp-320nm

```

=====
Injection Date   : 20/04/2007 18:01:38 PM
Sample Name     : P.Polyp-320nm           Vial :    1
Acq. Operator  : SEBASTIAN
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed   : 17/04/2007 12:05:35 PM by SEBASTIAN
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\PURCOLU.M
Last changed   : 20/07/2007 12:04:48 PM by SEBASTIAN
                (modified after loading)
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

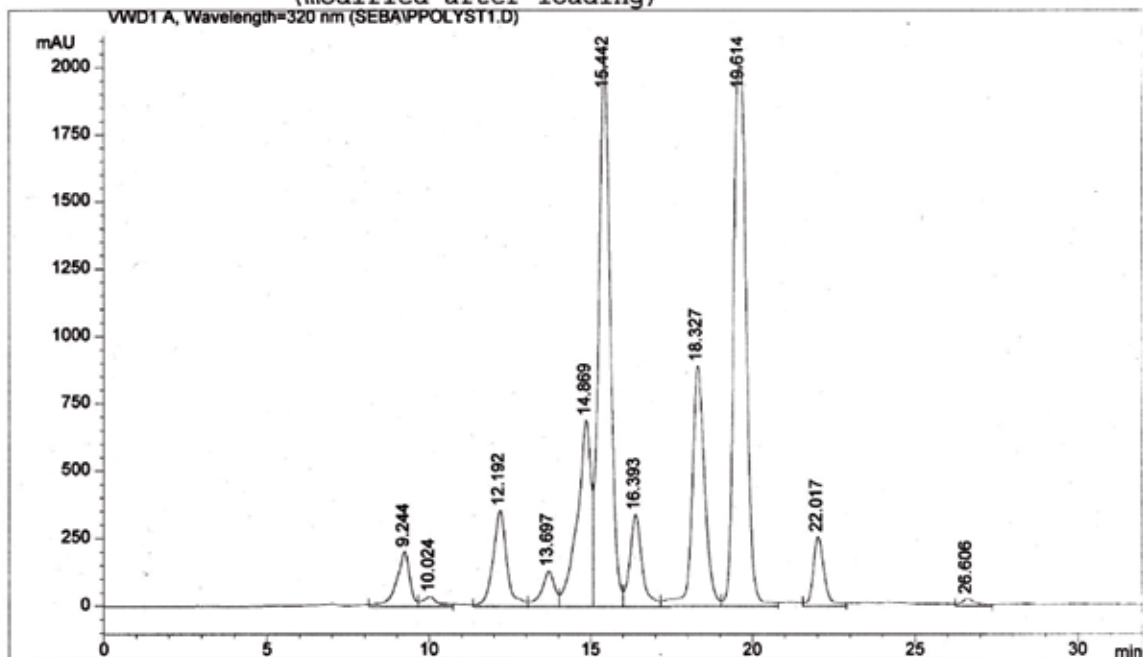
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	9.379	VV	0.4413	6189.46631	189.93105	4.6664
2	10.004	VV	0.2554	532.28778	29.52839	0.4013
3	10.708	VV	0.3827	6586.52930	241.17896	4.9657
4	11.183	VV	0.4133	1446.78455	45.48656	1.0908
5	12.916	VB	0.4092	7.70395e4	2843.82080	58.0815
6	15.472	BV	0.4027	2.37038e4	861.16968	17.8707
7	17.306	VV	0.3474	1825.93311	75.96384	1.8766
8	17.582	VV	0.3638	1825.54810	72.09503	1.3763
9	18.348	VV	0.3583	659.75305	26.02873	0.4974
10	20.074	VV	0.4108	7715.51514	274.56839	5.8169
11	22.048	VV	0.3677	2195.45435	89.52110	1.6552
12	23.065	VV	0.5171	2060.56665	53.75017	1.5535
13	29.577	PV	0.3184	859.25146	42.31713	0.6478

26.- *Pterocaulon polystachyum*

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\PPOLYST1.D Sample Name: P.polystac-320nm

```

=====
Injection Date : 20/04/2007 19:24:36 PM
Sample Name    : P.polystac-320nm          Vial :    1
Acq. Operator  : SEBASTIAN
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed   : 17/04/2007 12:05:35 PM by SEBASTIAN
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PURCOLU.M
Last changed   : 20/07/2007 12:04:48 PM by SEBASTIAN
                (modified after loading)
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	9.244	VV	0.4022	5936.47998	203.93353	3.1548
2	10.024	VV	0.4488	1259.93982	38.20951	0.6696
3	12.192	VV	0.4291	1.06759e4	355.39487	5.6735
4	13.697	VV	0.4102	3806.45190	131.61705	2.0229
5	14.869	VV	0.4094	2.05320e4	690.81268	10.9114
6	15.442	VV	0.3813	5.06224e4	2019.55261	26.9024
7	16.393	VV	0.3919	9033.59961	339.59982	4.8008
8	18.327	VV	0.4081	2.43254e4	892.79663	12.9273
9	19.614	VB	0.4313	5.47430e4	2010.35095	29.0923
10	22.017	VB	0.3671	6264.36963	258.55185	3.3291
11	26.606	VV	0.4663	970.72577	29.66107	0.5159

Totals : 1.88170e5 6970.48058

27.- *Pterocaulon purpurascens*

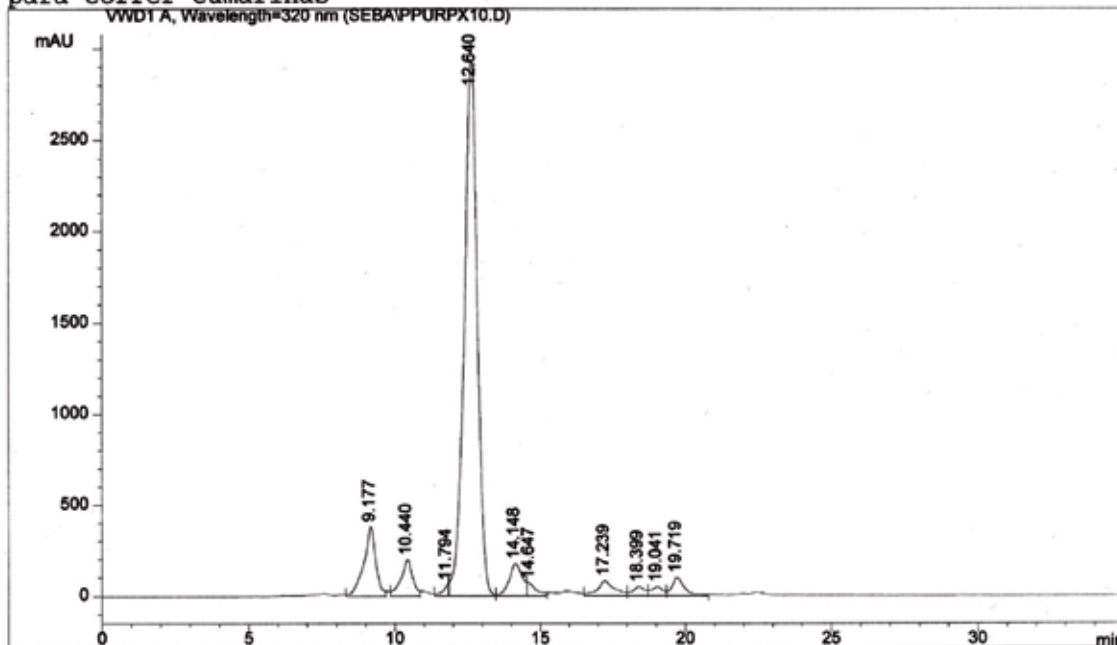
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\PPURPX10.D

Sample Name: Ppupsox1-320nm

```

=====
Injection Date   : 12/06/2007 19:06:00 PM
Sample Name     : Ppupsox1-320nm           Vial :    1
Acq. Operator   : SEBASTIAN
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed    : 12/06/2007 16:44:10 PM by SEBASTIAN
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed    : 12/06/2007 19:50:10 PM by SEBASTIAN
                  (modified after loading)
    
```

para correr cumarinas



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	9.177	VV	0.3875	1.08698e4	381.75293	8.6375
2	10.440	VV	0.3794	5497.68701	197.93010	4.3687
3	11.794	VV F	0.2052	894.79144	59.29329	0.7110
4	12.640	VV	0.4543	9.22274e4	2932.39746	73.2872
5	14.148	VV	0.4463	5509.25781	176.19705	4.3779
6	14.647	VV B	0.3242	1587.38538	67.05993	1.2614
7	17.239	VV	0.5423	3368.79004	82.42960	2.6770
8	18.399	VV	0.4063	1431.55579	49.00892	1.1376
9	19.041	VV	0.3912	1362.35156	48.57909	1.0826
10	19.719	VV	0.4328	3094.80151	99.89370	2.4592

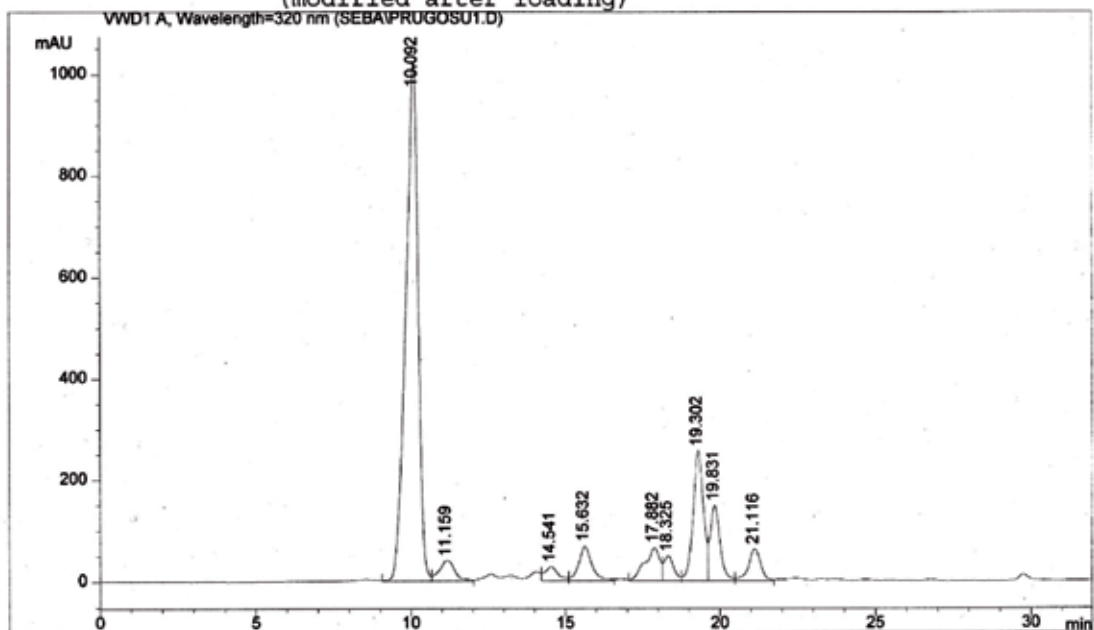
28.- *Pterocaulon rugosum*

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SEBA\PRUGOSU1.D

Sample Name: Prugosum-320nm

```

=====
Injection Date   : 24/04/2007 16:22:37 PM
Sample Name     : Prugosum-320nm           Vial : 1
Acq. Operator  : SEBASTIAN
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COUMARIN.M
Last changed   : 24/04/2007 15:04:18 PM by SEBASTIAN
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PURCOLU.M
Last changed   : 20/07/2007 12:04:48 PM by SEBASTIAN
                (modified after loading)
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=320 nm

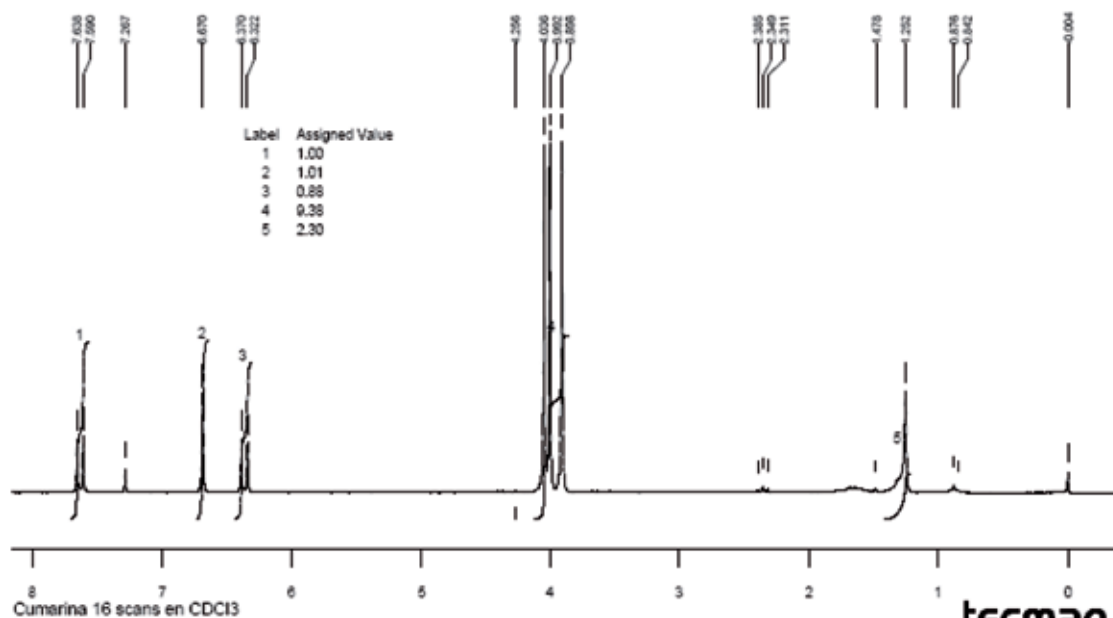
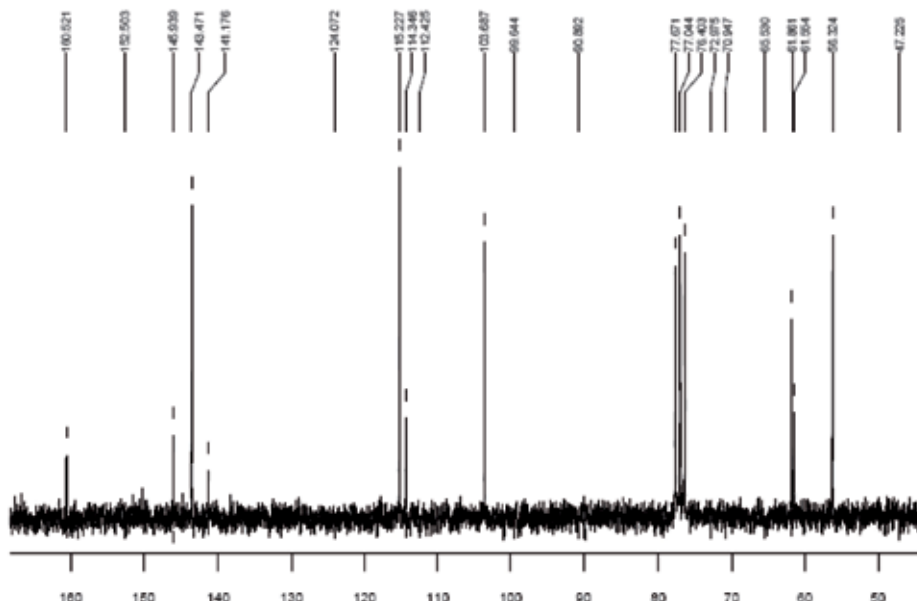
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	10.092	VV	0.3911	2.83852e4	1021.81683	60.4088
2	11.159	VV	0.5284	1438.17029	39.75397	3.0607
3	14.541	VV	0.4366	864.49799	28.40947	1.8398
4	15.632	VB	0.4280	2081.23950	68.91547	4.4292
5	17.882	VV	0.4522	2199.66797	65.87740	4.6813
6	18.325	VV	0.3221	1083.80115	48.99620	2.9065
7	19.302	VV	0.3453	5937.14160	255.59813	12.6353
8	19.831	VV	0.3271	3248.88916	147.34430	6.9142
9	21.116	VV	0.4164	1749.95190	63.16984	3.7242

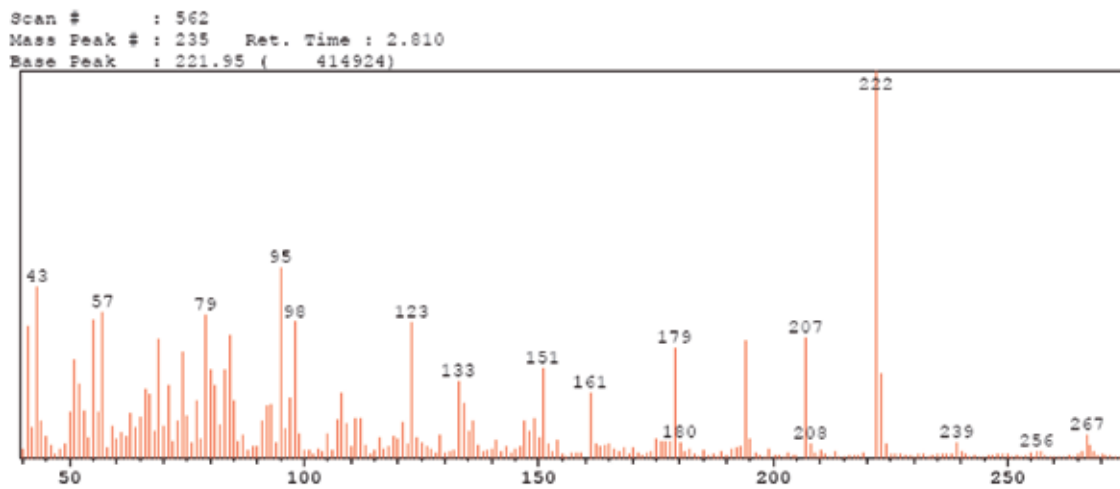
Totals : 4.69886e4 1739.88161

Apéndice 5

DATOS ESPECTROSCÓPICOS

1.- 6,7,8-trimetoxicumarina (34)

RMN ¹HPDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.comRMN ¹³C

2.- Isofraxidina (33)**MS****U.V.**