



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO, DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA
MOLECULAR Y BIOEVALUACION PRELIMINAR DE
LOS TERPENOIDES Y COMPUESTOS FENOLICOS
PRESENTES EN *Schkuhria schkuhrioides*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
**MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
FARMACIA (QUIMICA FARMACEUTICA)**
P R E S E N T A
VERONICA TEJEDA GONZALEZ

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

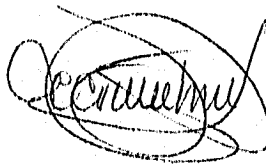
Presidente:	Dr. Eugene A. Bratoef Titell
Primer Vocal:	Dra. Ofelia Espejo González
Secretario:	Dr. Leovigildo Quijano
Primer Suplente:	Dr. Raymundo Cruz Almanza
Segundo Suplente:	Dr. Francisco Yuste López

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

INSTITUTO DE QUIMICA UNAM

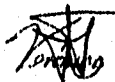
ASESOR:

Dr. Guillermo Delgado Lamas



SUSTENTANTE:

Q.F.B. Verónica Tejeda González



DEDICATORIA

A mis padres: Martha y Arturo

A mis hermanas: Blanca, Martha y Sandra

A mi sobrina Angélica

A Paco Aguilar Pérez.

Esta tesis se realizó en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Guillermo Delgado Lamas, y con apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Registro 86475) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la propia Universidad Nacional (proyecto IN212195).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas por la asesoría y por el apoyo que me brindó para la realización de esta tesis.

Al Dr. Leovigildo Quijano por sus observaciones a esta tesis.

A la M. en C. Ma. Luisa Villarreal y a los químicos Víctor Navarro y Daniel Alonso, de la Unidad de Investigación Biomédica de Sur, Xochitepec, Morelos, IMSS.

Al personal técnico académico de los laboratorios de espectroscopía y espectrometría del Instituto de Química de la UNAM.

Al personal de la biblioteca Jesús Romo Armería, del Instituto de Química, en especial, al señor Abelardo Cuéllar.

A mis compañeros de laboratorio, quienes colaboraron en la realización de este trabajo, mucho más de lo que parece.

CONTENIDO

Introducción	1
Objetivos	3
Antecedentes	4
Discusión de Resultados	
1. Melampólidas:	
Acido frutescínico	11
Allo-eschkuhiólida	16
6-Acetil-(11R)-11,13-Dihidroeschkuhiólida	19
6-Acetil-(11S)-11,13-Dihidroeschkuhiólida	19
2. Fenilpropanoides	
8-Hidroxi-6-metoxi-7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol	22
7-Hidroxi-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol	22
3. Triterpenos	
Acetil β Amirina	25
Estigmasterol	25
4. Flavonas	
Pectolarigenina	26
Dinatina	27
5. Bioevaluación preliminar	28
Desarrollo Experimental	30
Resumen y Conclusiones	52
Espectros	
1. IR (KBr) del Ácido frutescínico(28)	54
2. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del Ácido frutescínico (28)	55
3. COSY del Ácido frutescínico (28)	56
4. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de Ácido frutescínico (28)	57
5. EM (70 eV) del Ácido frutescínico (28)	58
6. RMN ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N, 75 °C) del Ácido frutescínico (28)	59
7. RMN ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N, -30 °C) de Ácido frutescínico (28)	60
8. IR (CDCl ₃) de la Pirazolina α del frutescinato de metilo (30)	61
9. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de Pirazolina α del frutescinato de metilo(30)	62
10. COSY de la Pirazolina α del frutescinato de metilo(30)	63
11. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de la Pirazolina α del frutescinato de metilo (30)	64
12. EM (70 eV) de la Pirazolina α del frutescinato de metilo(30)	65

13. IR (CDCl ₃) de la Pirazolina β del frutescinato de metilo(31)	66
14. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la Pirazolina β del frutescinato de metilo (31)	67
15. COSY de la Pirazolina β del frutescinato de metilo(31)	68
16. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de la Pirazolina β del frutescinato de metilo (31)	69
17. EM (70 eV) de la Pirazolina β del frutescinato de metilo(31)	70
18. IR (CDCl ₃) de <i>Allo</i> -eschkuhriólida (32)	71
19. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de <i>Allo</i> -eschkuhriólida (32).	72
20. RMN ¹ H (300 MHz, DMSO) de <i>Allo</i> -eschkuhriólida (32)	73
21. COSY de <i>Allo</i> -eschkuhriólida (32)	74
22. RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO) de <i>Allo</i> -eschkuhriólida (32)	75
23. EM (70 eV) de <i>Allo</i> -eschkuhriólida (32)	76
24. IR (CDCl ₃) de la Acetil <i>allo</i> -eschkuhriólida (33)	77
25. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la Acetil <i>allo</i> -eschkuhriólida (33)	78
26. IR (CDCl ₃) de la 6-Acetil-(1 <i>R</i>)-11,13-dihidroeschkuhriólida (35)	79
27. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la 6-Acetil-(1 <i>R</i>)-11,13-dihidroeschkuhriólida (35)	80
28. COSY de la 6-Acetil-(1 <i>R</i>)-11,13-dihidroeschkuhriólida (35)	81
29. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de la 6-Acetil-(1 <i>R</i>)-11,13-dihidroeschkuhriólida (35)	82
30. RMN ¹ H (300 MHz, C ₆ D ₆) de la 6-Acetil-(1 <i>R</i>)-11,13-dihidroeschkuhriólida (35)	83
31. IR (CDCl ₃) de la 6-Acetil (1 <i>S</i>)-11,13-dihidroeschkuhriólida (36)	84
32. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la 6-Acetil (1 <i>S</i>)-11,13-dihidroeschkuhriólida (36)	85
33. RMN ¹ H (300 MHz, C ₆ D ₆) de la 6-Acetil (1 <i>S</i>)-11,13-dihidroeschkuhriólida (36)	86
34. IR (CDCl ₃) de 8-Hidroxi-6-metoxi-7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (37) y 7-Hidroxi-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (38)	87
35. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de 8-Hidroxi-6-metoxi-7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (37) y 7-Hidroxi-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (38)	88
36. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de 1,8-Diacetiloxi-6-metoxi-7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propano (39) y 1,7-Diacetiloxi-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propano (40)	89
37. RMN ¹ H (300 MHz, C ₆ D ₆) de 1,8-Diacetiloxi -6-metoxi -7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propano (39) y 1,7-Diacetiloxi -6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propano (40)	90
38. CDSY de 1,8-Diacetiloxi-6-metoxi -7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propano (39) y 1,7-Diacetiloxi-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propano (40)	91
39. RMN ¹³ C (75 MHz, C ₆ D ₆) de 1,8-Diacetiloxi-6-metoxi -7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propano (39) y 1,7-Diacetiloxi-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propano (40)	92
40. EM (70 eV) de 1,8-Diacetiloxi-6-metoxi -7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propano (39) y 1,7-Diacetiloxi-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propano (40)	93
Bibliografía	94

INTRODUCCION

Es conocido que la supervivencia del ser humano ha dependido de las plantas, ya que las ha usado como alimento, para vestido y albergue, para la elaboración de jabones, perfumes, condimento, y múltiples preparaciones medicinales. En otro sentido, los bosques y la vegetación regulan el clima, controlan inundaciones y erosiones, y proveen de recreación.

Después de siglos de uso empírico de preparaciones con hierbas, el aislamiento de principios activos permitió ponderar cabalmente el uso de las plantas medicinales, paralelamente al inicio de la investigación moderna. El estudio de fármacos derivados de plantas medicinales decayó alrededor de 1945 debido al desarrollo de la química sintética y la fermentación microbiana. Sin embargo, a partir de los ochentas, el interés en los fitofármacos ha venido en aumento. Se estima que aproximadamente el 25 % de las medicinas prescritas en el mundo incluyen sustancias derivadas de las plantas. Una de las razones del renovado interés en los fármacos aislados de las plantas ha sido la eficacia de numerosas preparaciones, como el ginseng, el ginkgo, ó la valeriana, demostrada por estudios que aplican el mismo estándar científico para fármacos sintéticos.¹ Otros de los factores que han influido en el interés creciente por las preparaciones medicinales vegetales, son los avances en los bioensayos, en las técnicas de separación y la elucidación estructural, en el conocimiento de las rutas bioquímicas y fisiológicas, en la biotecnología, y en la recuperación de las fuentes históricas de diversas culturas que registran a la flora útil. Asimismo la pérdida de practicantes de la medicina tradicional, la pérdida de la diversidad biológica y por ende la pérdida de la diversidad química influyen en el creciente interés por las preparaciones medicinales.¹

Actualmente se carece de agentes curativos para un número importante de enfermedades. Casi la quinta parte de la población mundial padece enfermedades tropicales tales como malaria, esquistosomiasis, tripanosomiasis, lepra, leishmaniasis, entre otras. En México, las infecciones resistentes a los antibióticos (tales como algunas enfermedades gastrointestinales y de las vías respiratorias), del corazón y muchas otras aún carecen de un tratamiento adecuado.²

Los productos naturales son una fuente rica de nuevos prototipos de fármacos con diferentes estructuras y mecanismos de acción, y por lo tanto, con baja probabilidad de toxicidades similares a los fármacos ya existentes.

Las plantas medicinales son usadas básicamente en dos formas diferentes: (a) como mezclas complejas que contienen varios constituyentes (infusiones, aceites esenciales, tinturas, extractos); (b) como principios activos puros, químicamente definidos.

Para la obtención de nuevos prototipos de fármacos, la selección de la especie a estudiar es un factor crucial. Se pueden hacer recolecciones basadas en relaciones quimiotaxonómicas, o de acuerdo a la información etnomédica. Las plantas usadas en medicina tradicional tienen mayor probabilidad de tener compuestos farmacológicamente activos.³

El presente trabajo se refiere al estudio estructural y bioevaluación preliminar de los constituyentes secundarios de *Schkuhria schkuhrioides* (Link & Otto) Telling (Asteraceae). Este vegetal está relacionado con la planta medicinal *Schkuhria virgata*,⁴ por lo que la selección del vegetal se realizó por criterio taxonómico. Se conoce, por análisis previos, la diversidad metabólica de *Schkuhria*, en particular, de lactonas sesquiterpénicas. Estos compuestos poseen diversas actividades biológicas tales como antitumoral, y

antimicrobiana, antialimentaria de insectos, citotóxica, antibacteriana, y reguladora del crecimiento entre otras.^{5,7}

La contribución del presente trabajo al conocimiento químico consistió en el aislamiento y elucidación estructural de cuatro nuevas lactonas sesquiterpénicas (germacradienólidas): ácido frutescínico (**28**), *allo*-eschkuhiólida (**32**), (11*R*)-11,13-dihidroeschkuhiólida (**35**); (11*S*)-11,13-dihidroeschkuhiólida (**36**); y de dos fenilpropanoides: 8-hidroxi-6-metoxi-7-isovaleroiloxi-fenil-propanol (**37**) y 7-hidroxi-6-metoxi-8-isovaleroiloxi-fenil-propanol (**38**).

Adicionalmente se aislaron y caracterizaron algunos triterpenos y flavonoides ya descritos en la literatura. Cabe destacar la notable variación infraespecífica de este vegetal, que biosintetiza una notable diversidad de metabolitos secundarios.

Se realizó la bioevaluación preliminar de algunos metabolitos aislados de este vegetal⁸⁻¹¹ y de algunos derivados. Para la bioevaluación se usaron ensayos simples, reproducibles, sensibles y selectivos, como está informado en la literatura, tales como toxicidad frente a *Artemia salina*,¹¹ la actividad antibacteriana (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans*), la actividad antifúngica (*Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton gypsum*)¹² y la actividad antitumoral (K.B. UISO, COLON).¹⁴⁻¹⁵

Este trabajo de investigación permitió la generación de conocimiento referente a nuevos constituyentes bioactivos presentes en la flora de nuestro país.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de investigación es la obtención de conocimiento referente a los constituyentes químicos presentes en la flora de nuestro país y la ponderación de la bioactividad de los metabolitos secundarios aislados, mediante la aplicación de ensayos biológicos preliminares.

Se seleccionó a la especie *Schkuhria schkuhrioides* como material de estudio debido a que a este género pertenecen las plantas de uso medicinal *Schkuhria virgata* y *Schkuhria senecioides* cuyo contenido metabólico se describe en el capítulo de antecedentes. En la selección del vegetal se aplicaron, por lo tanto, criterios quimiotaxonómicos.

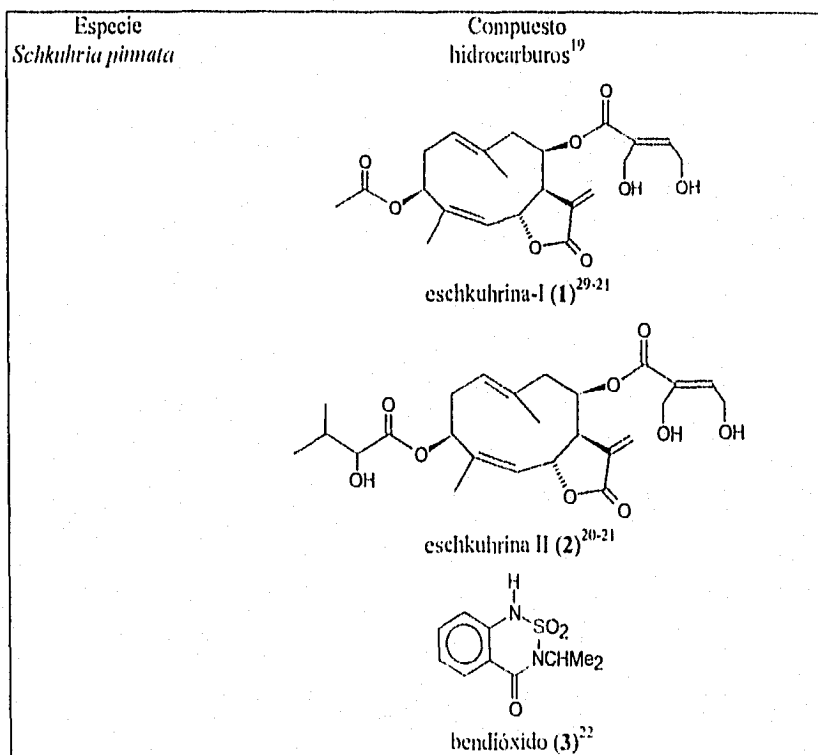
Para el logro del objetivo general se procedió al planteamiento de las metas específicas referentes al estudio químico y biológico de *Schkuhria schkuhrioides*, por lo que sucintamente pueden mencionarse los siguientes objetivos específicos.

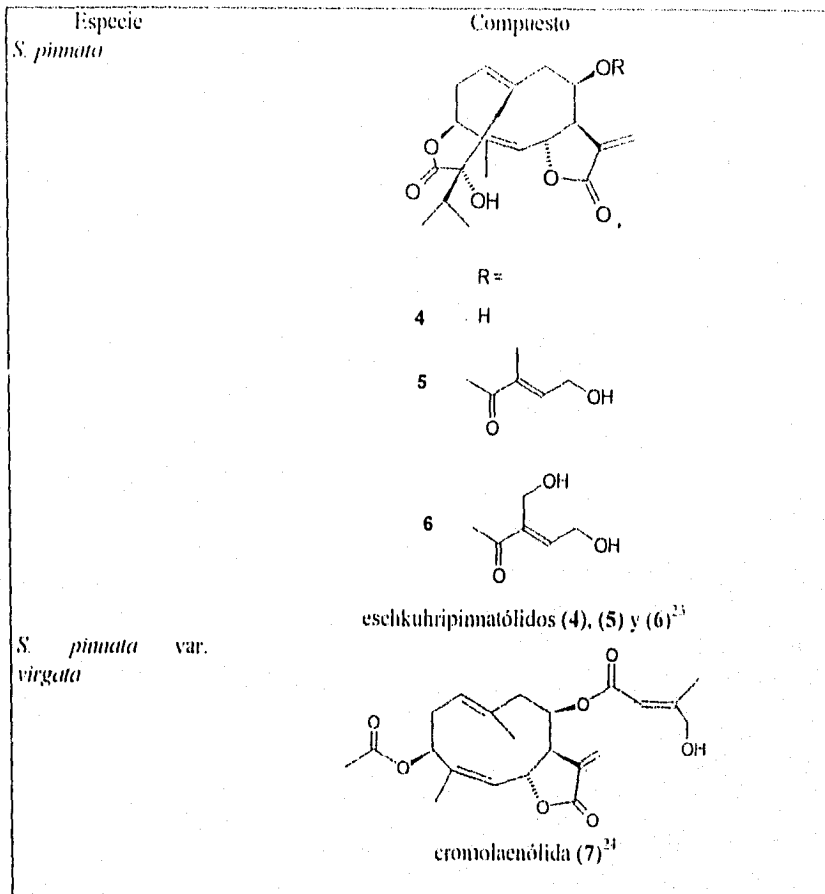
1. Extracción, aislamiento y determinación de la estructura molecular de los metabolitos secundarios presentes en *Schkuhria schkuhrioides* mediante la aplicación de la metodología convencional de investigación en química orgánica.
2. Evaluación biológica preliminar de los metabolitos secundarios aislados de esta especie, principalmente de las lactonas y sus derivados, considerándolos como posibles prototipos de fármacos.
3. Integración de los conocimientos adquiridos con los informados en la literatura con el fin de proporcionar antecedentes para estudios subsecuentes.

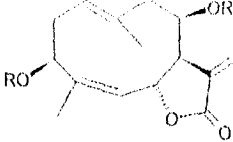
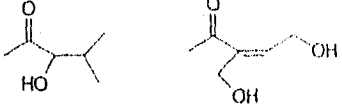
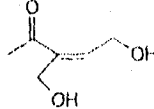
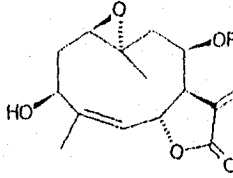
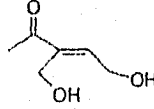
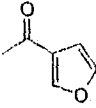
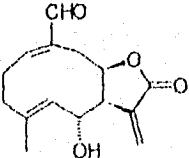
ANTECEDENTES

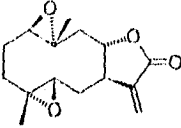
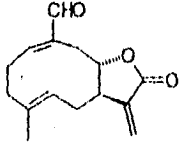
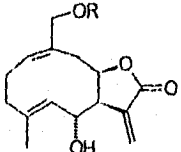
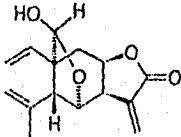
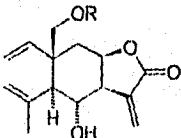
La familia de las compuestas incluye cerca de 1000 géneros y aproximadamente 15000 especies. Varios miembros de esta familia tienen diversos usos terapéuticos debido a su actividad espasmolítica, antihepatotóxica, anticolerética, bactericida, fungicida, y citotóxica.¹⁶ Tienen aplicación en la industria alimenticia, empleándose como edulcorantes y condimentos; además de tener otros usos de aplicación industrial como insecticidas y aceites de uso farmacéutico.¹⁷ Se conoce que las compuestas biosintetizan, en términos generales, terpenoides, flavonoides y compuestos acetilénicos, y en menor proporción, alcaloides.


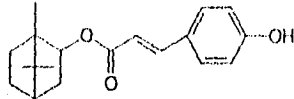
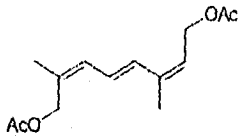
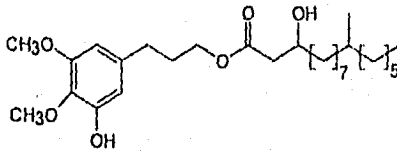
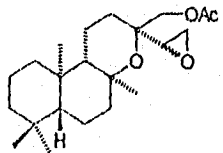
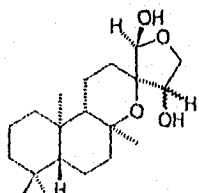
El género *Schkuhria* pertenece a esta familia y se localiza principalmente en América. En México se encuentra en la parte central de la república. Se han establecido seis especies de *Schkuhria* con algunas variedades y subvariedades.¹⁸ Este grupo de plantas se caracterizan por biosintetizar lactonas sesquiterpénicas. A continuación se muestra una lista de las especies de *Schkuhria* analizadas hasta ahora y las sustancias aisladas.

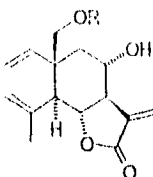




Especie	Compuesto
	
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="783 486 800 509">R</div> <div data-bbox="965 486 982 509">R'</div> </div>
8	
9	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div data-bbox="783 711 800 731">Ac</div>  </div>
	
	R
10	
11	
<i>S. schkuhrioides</i>	heliangólidas (8), (9), (10) y (11) ²¹
	
	eschkuhriólida (12) ⁵

Especie <i>S. schkuhrioides</i>	Compuesto
	 <p data-bbox="762 615 1010 648">11,13-dihydroeriolina (13)¹⁰</p>
	 <p data-bbox="797 799 978 833">frutescina (14)^{9,25-26}</p>
	 <p data-bbox="748 1001 1025 1034">R= iBu: eschkuhrioidina (15)¹⁰ R= H: eschkuhrioidiol (16)¹⁰</p>
	 <p data-bbox="762 1217 1010 1250">elemanschkuhriólida (17)⁹</p>
	 <p data-bbox="748 1432 1025 1515">R= COCH(OH)CH(CH₃)₂ eschkuhrioidina A (18)¹¹ R= H eschkuhrioidina B (19)¹¹</p>

Especie	Compuesto
<i>S. senecioides</i>	
	compuestos acetilénicos (20) ²⁷
	
	p-hidroxi-cinamato de bornilo (21) ²⁷
	
	derivado del deshidronerol (22) ²⁷
	
	eschkuhrianol (23) ²⁷
<i>S. multiflora</i>	compuestos acetilénicos (20) ²⁸
	
	acetoeschkuhrianol (24) ²⁸
	
	cicloeschkuhriadiol (25) ²⁸

Especie	Compuesto
<i>S. anthemoidea</i>	
	26 R=H 27 R=Ac
	elemanólidas (26) y (27) ²⁹

Las lactonas sesquiterpénicas son constituyentes característicos en ciertos géneros de las compuestas,¹⁷ aunque no son exclusivas de esta familia. Se clasifican de acuerdo a su esqueleto carbocíclico como germacranólidas, guayanólidas, pseudoguayanólidas, eudesmanólidas, elemanólidas, eremofilanólidas y xantanólidas, principalmente. Una especie generalmente biosintetiza un solo tipo de esqueleto, con variaciones oxidativas sobre el mismo. Cuando existe una amplia distribución geográfica de una especie, esta puede mostrar variación infraespecífica. Tal es el caso de *Schkuhria schkuhrioides* de la cual se han aislado germacradienólidas (12-16) y elemanólidas (17-19) con diferentes grados de oxidación.⁸⁻¹¹

Las lactonas sesquiterpénicas son interesantes como posibles prototipos de fármacos debido a sus actividades biológicas diversas.⁵⁻⁷ Las actividades antitumoral,³⁰⁻³² citotóxica,³³⁻³⁷ neurotóxica,³⁸⁻³⁹ antialimentaria,⁴⁰⁻⁴¹ hepatotóxica, hepatoprotectora,⁴² esquistosomocida,⁴³ fitotóxica,⁴⁴ causante de dermatitis por contacto⁴⁵ y profiláctica contra la migraña,⁴⁶ han sido asociadas con la presencia del grupo α -metileno- γ -lactona, aunque también han mostrado otras actividades que no tienen relación con la presencia de este grupo. Estas actividades son: actividad antimicrobiana,⁴⁷⁻⁵⁰ antimalárica,⁵¹ antiparasitaria,⁵² inhibidora de la formación de melanina,⁵³ antiinflamatoria,⁵⁴⁻⁵⁵ y antialérgica.⁵⁶

El estudio de la actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas ha ido más allá de las pruebas *in vitro*. Actualmente existen preparaciones farmacéuticas de aplicación terapéutica, algunas de estas aplicaciones son: el tratamiento de enfermedades de la piel,^{53,57} la reducción de la incidencia y severidad de las migrañas⁵⁸ y el tratamiento del SIDA con derivados semisintéticos,⁵⁹ además de tener aplicación en la preparación de cosméticos.⁶⁰

Hay otras especies en el género *Schkuhria* que han mostrado actividad biológica. Las lactonas sesquiterpénicas de *Schkuhria pinnata*, eschkuhrina I (1) y eschkuhrina II (2) exhiben actividad antialimentaria en insectos, antimicrobiana y citotóxica. La eschkuhrina I (1) aislada de *S. virgata*, posee actividad significativa contra leucemia linfocítica P388 en ratón.^{4,20}

El mecanismo de acción de las lactonas sesquiterpénicas ha sido extensamente investigado, algunos de sus mecanismos de acción consisten en la inhibición de la fosfofructoquinasa⁶¹ o la ATPasa-calceio.⁶² La acción citotóxica de las lactonas sesquiterpénicas está relacionada a la alquilación selectiva de grupos nucleofílicos de enzimas.⁶³

Cabe destacar que recientemente se ha puesto en el mercado un medicamento, Tenacet 125^k, que ha sido aprobado por la oficina de administración de drogas y alimentos de Estados Unidos (FDA) como un fármaco preventivo de la migraña,⁵⁸ cuyo principio activo es la lactona sesquiterpénica partenólida. Es evidente que este grupo de sustancias son muy importantes desde el punto de vista de su actividad biológica.

DISCUSION DE RESULTADOS

Del extracto acetónico de *Schkuhria schkuhrioides* se separaron varias fracciones mediante cromatografía en columna, empujando mezclas de éter de petróleo-acetato de etilo de polaridad creciente para la elución de la columna, como informa la parte experimental.

La elucidación estructural se describió de acuerdo al grupo estructural al cual pertenecen las sustancias aisladas: lactonas sesquiterpénicas (melampólidas) fenilpropanides, triterpenoides y flavonoides.

Melampólidas

Ácido frutescínico (28)

De la fracción H del extracto acetónico de *S. schkuhrioides* se aisló una nueva sustancia a la cual se denominó trivialmente ácido frutescínico (28). Esta sustancia, mostró en el IR (KBr, Espectro 1) las absorciones características de ácido carboxílico (3448 y 1690 cm^{-1}) y carbonilo de γ -lactona (1763 cm^{-1}). En espectrometría de masas (Espectro 5) se observa el M^+ de m/z 262, lo cual indica la fórmula molecular $C_{15}H_{18}O_4$, la cual explica la funcionalidad deducida para los oxígenos: un ácido carboxílico y una lactona. Las siete insaturaciones son debidas a la presencia de dos carbonilos (uno del ácido y otro de la lactona), de un anillo lactónico, de un ciclo y tres dobles enlaces. Estas deducciones se confirman por las señales del espectro de RMN¹H y ¹³C, las cuales se describen a continuación y que son notablemente similares a las de la melampólida frutescina (14)^{25,26} (Tabla 2).

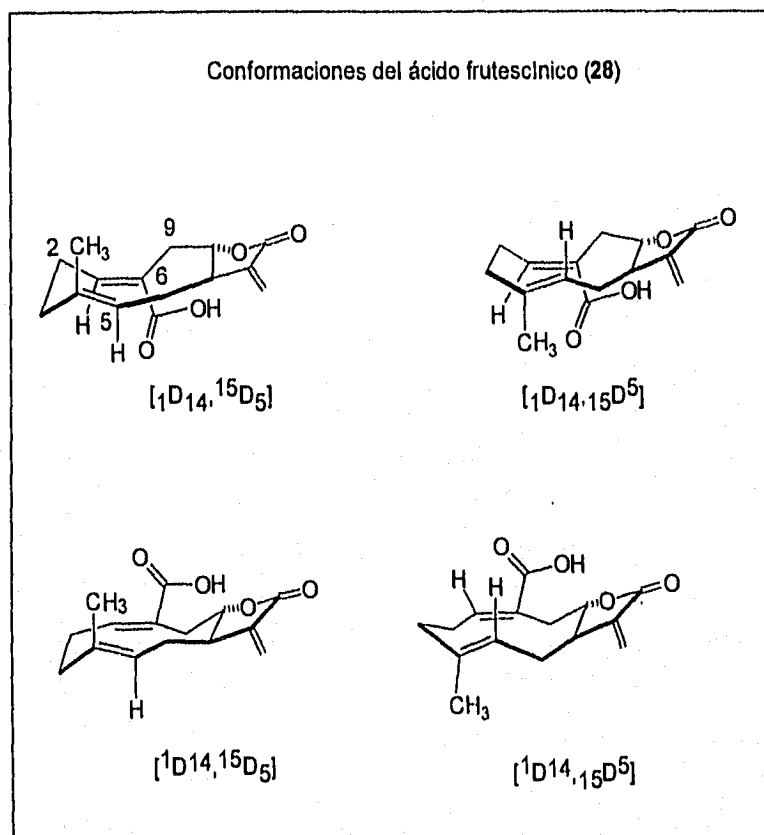
El espectro de RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, Espectro 2, Tabla 1) mostró dos señales dobles, una a δ 6.21 (J 3.3 Hz) y otra a δ 5.51 (J 2.8 Hz), asignables a los hidrógenos del metileno exocíclico de una γ -lactona- α,β -insaturada. Se observa un triplete ancho en δ 7.05 (J 8.3 Hz), perteneciente a un hidrógeno vinílico conjugado con un carbonilo. El desplazamiento químico de este hidrógeno δ 7.05 indica una disposición *cis* con respecto al grupo carboxilo, debido al efecto desprotector que este grupo funcional ejerce sobre el protón.⁶⁴ Esta señal se asigna a H-1 de una melampólida. En δ 5.14 se observó una señal múltiple, que por su desplazamiento y multiplicidad corresponde a un hidrógeno vinílico, el cual se encuentra acoplado con un metileno vecinal y con un metilo a larga distancia, que se manifiesta como una señal simple y ancha centrada en δ 1.67. El hidrógeno vinílico se asignó a H-5 y el metilo se ubica en C-4. En δ 3.96 se observó otra señal múltiple, que se asignó a H-8 por tener un desplazamiento similar al asignado para el hidrógeno geminal al oxígeno de la lactona en la frutescina (14) (δ 3.93), indicando que el cierre de la lactona es 7 \rightarrow 8. Si el cierre fuera 7 \rightarrow 6 el hidrógeno geminal a oxígeno de la lactona tendría un desplazamiento a campo más bajo, ya que sería alílico.⁶⁴

Para el establecimiento de la estereoquímica de la fusión de una γ -lactona en sesquiterpenos, Samek propuso una regla empírica⁶⁵ donde las lactonas *cis* presenta $J_{7,13} < 3$ y las *trans* $J_{7,13} > 3$. Sin embargo, cuando uno de los protones del metileno exocíclico tiene $J < 3$ y el otro $J > 3$, es necesario conocer la J_{7-8} para una asignación correcta. Precisamente la frutescina (14), cuya estereoquímica en la fusión de la lactona fué asignada inicialmente *cis*, fué corregida posteriormente a *trans*.^{25,26} El ácido frutescínico es uno de estos casos

especiales ($J_{7,14a}$ 3.3, $J_{7,15b}$ 2.8). Por medio de un experimento COSY se estableció el desplazamiento de H-7 ó 2.09. Sin embargo, la señal no mostró una resolución adecuada que permitiera conocer las constantes de acoplamiento.

Para tener una mejor resolución del espectro RMN¹H (Espectro 2) y así conocer la $J_{7,8}$ se efectuaron experimentos en piridina, en un rango de temperatura entre 75 y -30°C. No se logró el objetivo deseado ya que los espectros no mostraron señales resueltas (C₅D₅N, 300 MHz, Espectros 6 y 7), lo cual sugirió que esta sustancia, en solución, existe presumiblemente en una mezcla de conformeros, como se ha descrito en la literatura⁷² Figura 1.

Figura 1



La estereoquímica de la fusión de la γ -lactona se determinó por derivatización química, como se describe a continuación.

La presencia de un ácido carboxílico fue confirmada por la formación del éster metílico con diazometano (29) (Tabla 1). El diazometano también reaccionó con el metileno exocíclico, adicionándose por ambas caras, dando una mezcla de pirazolinias isoméricas.

Tomando en consideración que H-7 es α en todas las germacranólidas aisladas de plantas superiores para las cuales la estereoquímica absoluta ha sido establecida,²⁰ y que el nitrógeno unido a C-11 afecta directamente el desplazamiento de H-7, se asignó como la pirazolina α (30) (CDCl_3 , 300 MHz, Espectro 9) al compuesto donde H-7 presentó un desplazamiento paramagnético desplazándose en δ 3.24, a campo más bajo en comparación con el desplazamiento de H-7 en el ácido frutescínico (28) (δ 2.81). Este compuesto es resultado de la adición del diazometano por la cara *re* del metileno exocíclico. En la pirazolina β (31) (CDCl_3 , 300 MHz, Espectro 14) no se observó este efecto y H-7 se desplazó diamagnéticamente (δ 2.61) con respecto a la sustancia con el metileno exocíclico. Este compuesto es producto de la adición del diazometano por la cara *si* del metileno exocíclico.

La presencia de la pirazolina también influye en el desplazamiento de H-8. Para la pirazolina α - H-8 resuena en δ 4.09, valor similar al del ácido frutescínico (δ 3.95), pero en la pirazolina β - el desplazamiento de H-8 cambió sensiblemente (δ 4.83). Este desplazamiento se explica por la presencia de H-8 con orientación β al igual que el nitrógeno-1 de la β - pirazolina. Esta discusión permite concluir que la fusión de la lactona es *trans*.

El espectro RMN-¹³C del ácido frutescínico (CDCl_3 , 75 MHz, Espectro 4, Tabla 2) muestra señales para 15 carbonos, los espectros RMN-¹³C de la pirazolina α - del frutescinato de metilo (30) (CDCl_3 , 75 MHz, Espectro 11) y de la pirazolina β - del frutescinato de metilo (31) (CDCl_3 , 75 MHz, Espectro 16) mostraron 17 señales cada uno. Las asignaciones se hicieron por comparación con las informadas en la literatura para compuestos similares, y en especial, con eschkuhriólida⁸ (12) (Tabla 2). El ácido frutescínico (28) mostró una señal triple en δ 120.2 correspondiente a C-13 que indica la presencia de la α - metilen- γ -lactona, una señal doble en δ 144.6 para el carbono insaturado β - al carbonilo del ácido carboxílico, dos señales para carbonos carbonílicos, una en δ 169.9 para la γ - lactona y otra en δ 172.2 para el ácido carboxílico, la cual difiere notablemente de la señal para carbonilo de aldehído que presenta la eschkuhriólida (12) en δ 195.7. El desplazamiento de la señal asignada al metilo vinílico C-15 sobre el doble enlace 4,5 (δ 18.7) es característica de un metilo sobre un doble enlace *trans*.²⁰

Las señales en δ 142.3 y en δ 142.6 que presentan la pirazolina α - (30) y la pirazolina β - (31) del frutescinato de metilo respectivamente, corresponden al carbono insaturado C-1, β - al carbonilo (RMN-¹³C, CDCl_3 , 75 MHz Espectros 11 y 16), desplazamiento a campo más alto que para el ácido frutescínico (δ 144.6). La variación en el desplazamiento se explica debido a que el efecto resonante del carbonilo del éster α - β -insaturado es menor que el efecto resonante del carbonilo del ácido carboxílico α - β -insaturado.⁶⁷

El desplazamiento del carbonilo de la γ -lactona de las pirazolinas (δ 167.8) varió en dos unidades con respecto a la γ -lactona de la eschkuhríólida (δ 169.8) y del ácido frutescínico (δ 169.9), debido a la ausencia del metileno exocíclico (Tabla 2).

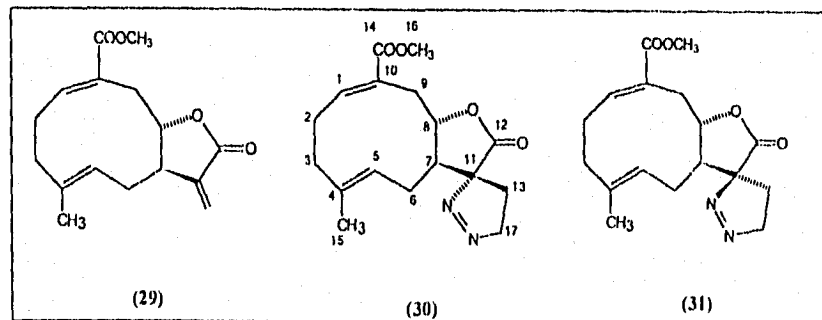
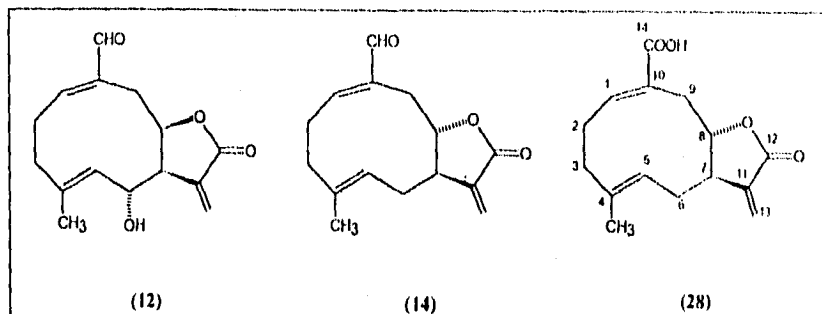


Tabla 1 Datos espectroscópicos RMN¹H (CDC₃) de eschkultríolida (12), frutescina (14), ácido frutescínico (28), frutescinato de metilo (29), pirazolina α- del frutescinato de metilo (30), pirazolina β- del frutescinato de metilo (31).

	12 ^a	14 ^b	14 ^d	28 ^c	28 ^d	29 ^d	30 ^d	31 ^d
H-1	6.64 <i>m</i>	6.66 <i>ta</i> (8)	6.65 <i>ta</i> (8.4)	7.05 <i>ta</i>	7.05 <i>m</i>	6.96 <i>ta</i>	6.94 <i>ta</i> (8.7)	6.93 <i>ta</i> (8.55)
H-2					2.31 <i>m</i>		2.32 <i>m</i>	2.3 <i>m</i>
H-3					1.94 <i>m</i>		2.30 <i>m</i>	1.9 <i>m</i>
H-5	4.86 <i>dc</i> (10, 1.5)	5.05 <i>ddl</i> (10, 6)	5.06 <i>ddl</i> (9.6, 5.7)	5.14 <i>m</i>	5.14 <i>m</i>	5.11 <i>m</i>	5.06 <i>m</i>	5.05 <i>m</i>
H-6 _a	4.07 <i>t</i> (10)				2.7 <i>m</i>		1.92 <i>m</i>	2.18 <i>m</i>
H-6 _b	-----				2.09 <i>m</i>		-----	-----
H-7	2.61 <i>ddkl</i> (10, 5, 1, 1)				2.81 <i>m</i>		3.24 <i>m</i>	2.44 <i>m</i>
H-8	5.52 <i>dkkl</i> (12, 5, 5)	3.93 <i>m</i>	3.93 <i>m</i>	3.96 <i>m</i>	3.95 <i>m</i>	4.02 <i>m</i>	4.09 <i>m</i>	4.83 <i>m</i>
H-9 _a					2.91 <i>m</i>		2.98 <i>m</i>	3.00 <i>m</i>
H-9 _b					2.54		2.77 <i>m</i>	2.67 <i>m</i>
H-13 _a	6.29 <i>d</i> (1.1)	6.18 <i>d</i> (3)	6.20 <i>d</i> (3.3)	6.21 <i>d</i> (3.3)	6.21 <i>d</i> (2.7)	6.21 <i>d</i> (3.3)	1.8 <i>ta</i> (7.5)	1.5 <i>m</i>
H-13 _b	5.77 <i>d</i> (1.1)	5.52 <i>d</i> (2.8)	5.53 <i>d</i> (2.7)	5.51 <i>d</i> (2.8)	5.53 <i>d</i> (2.7)	5.53 <i>d</i> (3)	-----	-----
H-14	9.47 <i>d</i> (1.7)	9.47 <i>d</i> (0.8)	9.47 <i>s</i>					
H-15	1.82 <i>d</i> (1.5)	1.69 <i>d</i> (1.0)	1.69 <i>sa</i>	1.67 <i>sa</i>	1.67 <i>sa</i>	1.67 <i>sa</i>	1.63 <i>sa</i>	1.62 <i>sa</i>
H-16						3.80 <i>s</i>	3.80 <i>s</i>	3.81 <i>s</i>
H-17 _a							4.64 <i>m</i>	4.78 <i>dddl</i> (18.15, 9.9, 5)
H-17 _b							"	4.65 <i>dddl</i> (18.3, 9.6, 7.2)

El análisis se efectuó a diferentes frecuencias: ^a(80 MHz)⁽¹⁰⁾, ^b(90 MHz)⁽²⁰⁾, ^c(200 MHz), ^d(300 MHz).

Tabla 2 Datos espectroscópicos . RMN¹³C de eschkuhriólida (12), ácido frutescínico (28), pirazolina α -del frutescinato de metilo (30), pirazolina β -del frutescinato de metilo (31)

	12 ^a	38 ^b	30 ^b	31 ^b
C-1	155.2 <i>d</i>	144.6	142.6	142.3
C-2	26.1 <i>t</i>	29.0	24.8	23.1
C-3	37.1 <i>t</i>	35.7	35.0	35.4
C-4	138.4 <i>s</i>	130.4	130.3	130.5
C-5	126.9 <i>d</i>	121.1	120.0	120.8
C-6	65.5 <i>d</i>	29.0	22.1	22.9
C-7	49.8 <i>d</i>	46.9	48.6	52.0
C-8	77.3 <i>d</i>	83.9	84.0	84.4
C-9	27.5 <i>t</i>	34.2	28.6	28.5
C-10	141.0 <i>s</i>	139.7	137.0	142.3
C-11	134.7 <i>s</i>	136.3	137.0	142.3
C-12	169.8 <i>s</i>	169.9	167.8	167.8
C-13	124.7 <i>t</i>	120.2	22.1	22.9
C-14	195.7 <i>d</i>	172.4	173.0	172.2
C-15	16.8 <i>q</i>	18.8	19.1	18.8
C-16			19.1	19.0
C-17			78.0	78.0

El análisis se efectuó a diferentes frecuencias: ^a(20 MHz), ^b(75 MHz, las asignaciones fueron realizadas de acuerdo al experimento DEPT).

Allo-eschkuhriólida (32)

De la fracción I se aisló por cromatografía un sólido, cuyas características espectroscópicas son similares a las que presentan las melampólidas aisladas en esta especie,⁸⁻¹¹ en particular, a la eschkuhriólida (12).

En el espectro de RMN¹H (DMSO, 300 MHz, Espectro 20, Tabla 3) se observó un par de señales dobles a campo bajo, una en δ 6.08 (J 3 Hz) y otra en δ 5.47 (J 3 Hz) características de una α - metilén- γ - lactona, que a su vez mostró la absorción característica en el IR en 1759 cm⁻¹ (CDCl₃, Espectro 18), y las señales correspondientes en el espectro RMN¹³C (DMSO, 75 MHz, espectro 22, Tabla 3), en especial la señal triple en δ 119.3 para C-13.

El espectro RMN¹H (DMSO, 300 MHz, Espectro 20) presentó una señal en δ 9.34 característica de un protón de aldehído, una señal triple y ancha en δ 6.64 (J 7.8 Hz) para un hidrógeno vinílico con desprotección paramagnética por estar conjugado y en disposición *cis* con respecto al aldehído.⁶⁸⁻⁷⁰ La señal doble y ancha en δ 5.06 (J 10.6 Hz) se asignó al hidrógeno vinílico H-5, el cual está acoplado con un metilo vinílico (H-15) en disposición *trans* y con el hidrógeno alílico H-6, el cual se observa como una señal triple en δ 4.99 (J 9.6 Hz) y que por su constante de acoplamiento (J_{5,6} \approx 10) se deduce que se encuentra en relación *trans*- respecto a H-5, y por su desplazamiento se trata de un hidrógeno vecino a oxígeno. La señal múltiple en δ 4.9 se asignó a H-8.

El desplazamiento de H-6 en δ 5.12 (en RMN¹H, CDCl₃, 300 MHz, Espectro 19, Tabla 3), a campo más bajo que el desplazamiento de H-6 para compuestos donde este

hidrógeno esta unido a oxígeno de hidroxilo, como es el caso de la eschkuhriólida, (12, H-6: δ 4.07) así como el desplazamiento de H-8 (δ 5.23) a campo más alto en comparación con eschkuhriólida que presenta la γ -lactona con fusión 7- \rightarrow 8 (δ 5.52), proporcionó evidencia de que la fusión en este compuesto es 7,6 *trans*.

Esta estructura corresponde a la alloeschkuhriólida (32) (RMN¹H, CDCl₃, 300 MHz, Espectro 19), cuyos datos de RMN¹H y ¹³C en CDCl₃ están informados en la literatura. La obtención de los parámetros de resonancia para esta sustancia en CDCl₃ y su comparación con los informados, permitió establecer la identidad de ambas. La comparación directa con una muestra auténtica obtenida en nuestro laboratorio confirmó esta identidad.

Las variaciones en las señales de RMN¹H del derivado acetilado de la alloeschkuhriólida (33) obtenida por acetilación de (32), son las esperadas: desplazamiento a campo bajo de H-8 ($\Delta\delta = 6.37 - 5.20 = 1.17$ en CDCl₃) y la variación de $\Delta\delta$ entre H-13a y H-13b (Tabla 3), (RMN¹H, CDCl₃, 300 MHz, Espectro 25). La disposición estereoquímica *cis* de H-8 con respecto a H-7 se dedujo de la $J_{8,7} = 9.7$ (Tabla 3). De esta forma, se comprobó que el metabolito secundario aislado es la alloeschkuhriólida (32), compuesto que había sido previamente obtenido como derivado de eschkuhriólida (12) y no como producto natural.⁸

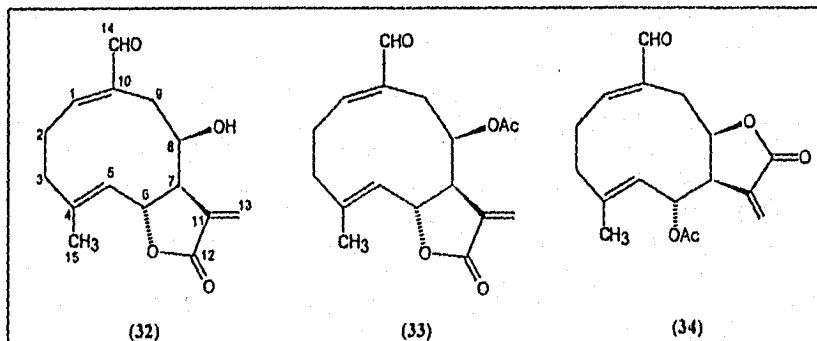


Tabla 3. Datos espectroscópicos RMN¹H de *allo*-eschkuhriólida (32), acetil *allo*-eschkuhriólida (33) y acetil *eschkuhriólida* (34).

	32 ^a	32 ^b	32 ^c	32 ^d	33 ^a	33 ^b	34 ^a
H11	6.57 <i>dkdl</i> (8, 8, 2)	6.59 <i>dkdl</i> (9, 7.3, 2.1)	6.64 <i>ta</i> (7.8)	6.63 <i>dkdl</i> (9.5, 7.5, 1.6)	6.60 <i>dkdl</i> (8, 8, 1)	6.60 <i>dkdl</i> (9.9, 7.6, 2.2)	6.62 <i>m</i>
H15	4.99 <i>dk</i> (10, 1)	5.03 <i>da</i> (11.1)	5.06 <i>da</i> (10.2)	5.04 <i>da</i> (10.0)	4.95 <i>da</i> (9.1)	5.03 <i>sa</i>	4.76 <i>da</i> (10.0)
H16	5.12 <i>dd</i> (10,10)	5.12 <i>dd</i> (9.7, 9.6)	4.99 <i>dd</i> (9.6, 9.6)	4.98 <i>dd</i> (9.7, 9.7)	5.00 <i>dd</i> (9, 9)	5.05 <i>sa</i>	5.22 <i>t</i> (10.0)
H18	5.20 <i>m</i> (obsc.)	5.23 <i>ta</i> (9.4)	4.9 <i>m</i>	4.9 <i>m</i>	6.37 <i>dkdl</i> (9, 8, 2)	6.39 <i>dkdl</i> (9.7, 7.5, 2.1)	5.51 <i>dkdl</i> (6, 12, 6)
H19a			2.5 <i>m</i>			2.76 <i>dd</i> (14.1, 7.5)	
H13a	6.35 <i>d</i> (3.5)	6.33 <i>d</i> (3.6)	6.08 <i>d</i> (3.3)	6.06 <i>d</i> (3.5)	6.23 <i>d</i> (4.0)	6.23 <i>d</i> (3.3)	6.22 <i>d</i> (1.5)
H13b	5.56 <i>d</i> (3.5)	5.57 <i>d</i> (3.0)	5.47 <i>d</i> (3.0)	5.46 <i>d</i> (3.0)	5.56 <i>d</i> (3.5)	5.57 <i>d</i> (3.3)	5.76 <i>d</i> (1.5)
H14	9.37 <i>d</i> (1.5)	9.42 <i>d</i> (2.1)	9.34 <i>d</i> (1.2)	9.33 <i>d</i> (1.5)	9.40 <i>d</i> (1.5)	9.43 <i>d</i> (1.5)	9.42 <i>d</i> (2)
H15	1.94 <i>d</i> (1)	1.93 <i>sa</i>	1.84 <i>sa</i>	1.90 <i>sa</i>	1.95 <i>d</i> (1)	1.92 <i>s</i>	1.94 <i>sa</i>
OCOC H ₂					2.05 <i>s</i>	2.03 <i>s</i>	1.96 <i>s</i>

El análisis se efectuó a diferentes frecuencias y en diferentes disolventes: ^a(CDCl₃, 80 MHz), ^b(CDCl₃, 300 MHz), ^c(DMSO, 300 MHz), ^d(DMSO, 500 MHz)

6-Acetil-(11R)-11,13-Dihidroeschkuhriólida (35)

6-Acetil-(11S)-11,13-Dihidroeschkuhriólida (36)

La acetilación del residuo de algunas fracciones de la cromatografía, permitió la purificación de las sustancias 35 y 36, cuya elucidación estructural se describe a continuación.

Estas sustancias presentaron en el IR absorciones correspondientes a la γ -lactona α,β -insaturada, dobles enlaces e hidroxilo. En los espectros de RMN¹H se observaron las señales características de lactonas sesquiterpénicas del grupo de las melampólidas: los hidrógenos de aldehído y vinílico de enona conjugada, dos señales para hidrógenos geminales a oxígeno, una señal simple para metilo de acetilo y dos señales simples de metilo, uno de estos vinílico.

El análisis del espectro RMN¹H del compuesto (35) (CDCl₃, 300 MHz, espectro 27, Tabla 4) y la comparación con los datos de la literatura⁷⁻¹⁰ permitieron hacer las siguientes asignaciones: la señal doble en δ 9.44 (J 1.5 Hz) se asignó al hidrógeno de aldehído, una señal triple de dobles en δ 6.62 (J 7.5, 2.1 Hz) se asignó al hidrógeno vinílico H-1, β al aldehído (los desplazamientos y las constantes de acoplamiento del hidrógeno de aldehído y de H-1 fueron característicos del doble enlace *cis* 1,10). La señal doble de triples en δ 5.77 (J 12, 5.1 Hz) se asignó al hidrógeno de metino geminal al oxígeno de la lactona H-8, la señal doble de doble δ 5.14 (10.6, 10.6) característica del hidrógeno alílico geminal a oxígeno de hidroxilo se asignó a H-6. La señal doble y ancha en δ 4.69 corresponde al hidrógeno vinílico H-5 acoplado con un hidrógeno alílico y con el metilo C-15 en disposición *trans*, que se presenta como una señal simple en δ 1.94.

El espectro de RMN¹H de esta lactona sesquiterpénica (35) evidenció la ausencia de las dos señales dobles correspondientes a los hidrógenos del metileno exocíclico de una lactona α,β -insaturada. Una señal doble en δ 1.36 (J 7.8 Hz) que integró para tres hidrógenos se asignó al metilo C-13 por estar acoplado con H-11, que se presenta a su vez como una señal cuádruple en δ 2.62 (J 7.8 Hz) justificando la ausencia del metileno exocíclico.⁷⁷ Por análisis del espectro COSY (CDCl₃, 300 MHz, Espectro 28) se asignó la señal múltiple en δ 1.98 a H-7, que se encontraba comparativamente a campo más alto que la señal asignada para H-7 en eschkuhriólida (12) (δ 2.61).

La fusión *cis* de la lactona esta de acuerdo con el desplazamiento de H-8 en δ 5.77 y con la constante de acoplamiento entre H-7 y H-8 (J 12 Hz).

El establecimiento de la orientación espacial del metilo en C-11 se realizará posteriormente y en comparación con la estructura 36.

En el espectro RMN¹H del compuesto 36 (CDCl₃, 300 MHz, espectro 32) se puede apreciar que tiene características espectroscópicas similares al compuesto 35 (Tabla 4) teniendo como diferencia fundamental el desplazamiento de la señal doble asignada a H-13, que en este compuesto se desplaza δ 1.20 (J 6.8 Hz), 0.16 ppm a campo más alto, y el desplazamiento del cuádruple asignado a H-11, en δ 2.96 (J 6.8 Hz), 0.34 ppm a campo más bajo. Con los datos anteriores se deduce que 35 y 36 son epímeros de la 11,13-dihidroeschkuhriólida, ya que solo difieren en la orientación del metilo H-11.

La configuración del metilo en C-11 en 35 y 36 se determinó como se ilustra en las figuras 2 y 3 tomando en consideración dos argumentos principales que son los siguientes:

- a) la diferencia en los desplazamientos químicos ($\Delta\delta$) de ciertas señales (H-11 y H-13) al correr los espectros de RMN¹H en CDCl₃ y C₆D₆,^{71,72}
- b) la forma de la señal para el hidrógeno H-11, la cual es función del ángulo diedro que forma con H-7.

Considerando a la cara α del macrociclo como la parte convexa de la molécula (Figura 2), es presumible una complejación de tipo π del benceno por esta cara con el carbonilo de la lactona, por lo que los grupos orientados hacia esa dirección experimentarán el efecto diamagnético del benceno.

Se observa que los H-13 de la sustancia **35** experimentan mayor desplazamiento ($\Delta\delta = \delta_{\text{CDCl}_3} - \delta_{\text{C}_6\text{D}_6} = 0.30$) comparativamente con **36** ($\Delta\delta = 0.13$) indicando que el metilo en **35** es α . De acuerdo con esto, H-11 de **36** sufre mayor desplazamiento ($\Delta\delta = \delta_{\text{CDCl}_3} - \delta_{\text{C}_6\text{D}_6} = 0.84$) que H-11 de **35** ($\Delta\delta = -0.01$) indicando que el metilo en **36** es β (Figura 3).

Referente a la forma de la señal de H-11, en el compuesto **35** se presenta como una señal cuádruple debido a la $J_{7,11} \approx 0$, lo cual implica un ángulo diedro $\langle 7,11 \rangle \approx 90^\circ$, que solo es posible si el metilo es α (ver la figura 3). Complementariamente esta misma señal para H-11 en **36** se manifiesta como una señal quintuple $J_{7,11} = 6.5$ lo cual está de acuerdo con una $J_{11,13}$ similar a la $J_{7,11}$ indicando que el ángulo diedro $\langle 7,11 \rangle \approx 25^\circ$. Lo anterior determina la orientación β del metilo C-13. Los argumentos independientes descritos conducen a la misma conclusión.

Estas conclusiones son coincidentes con las informadas en la literatura donde se describen lactonas sesquiterpénicas que tienen el metilo 13 en orientación α , y H-11 se manifiesta como cuarteto.⁷³⁻⁷⁷

Los datos descritos permiten concluir que las sustancias **35a** y **36a** son los productos naturales presentes en las partes aéreas de *Schkuhria schkuhrioides*

Fig. 2 La parte convexa de la molécula macrocíclica **35** y **36** es la cara α .

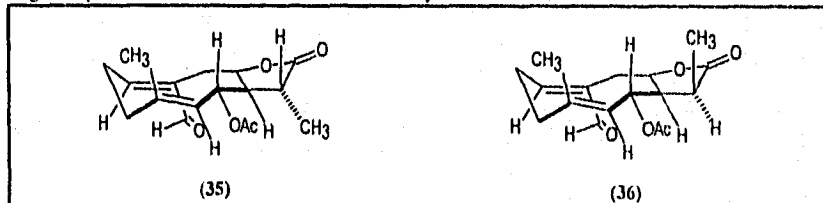


Fig. 5 Variación en los desplazamientos químicos de H-11 y H-13 en 35 y 36

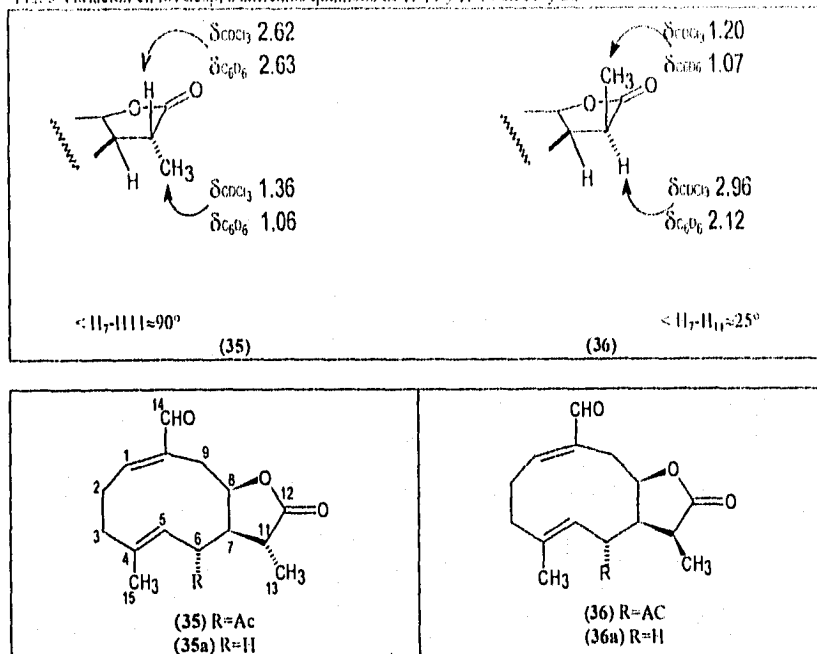


Tabla 4. RMNIII datos espectroscópicos de 6-Acetil-(11R)-11,13-Dihidroeschkuhriólida (35) 6-Acetil-(11S)-11,13-Dihidroeschkuhriólida (36)

	35 ^a	35 ^b	36 ^a	36 ^b
H-1	6.62 <i>ddd</i> (9.4, 7.4, 2.1)	5.57 <i>ddd</i> (8.1, 6.7, 1.9)	6.63 <i>ddd</i> (9.6, 7.2, 2.3)	5.57 <i>ddd</i> (9.4, 7, 2.6)
H-5	4.69 <i>da</i> (10.5)	4.35 <i>da</i> (10.2)	4.65 <i>da</i> (9.6)	4.30 <i>da</i> (9.1)
H-6	5.14 <i>dd</i> (10.6, 10.6)	5.29 <i>dd</i> (10.6, 10.6)	5.29 <i>dd</i> (10.6, 10.6)	5.38 <i>dd</i> (10.3, 10.6)
H-8	5.77 <i>dt</i> (12, 5.1)	5.86 <i>dt</i> (11.4, 5)	5.53 <i>dt</i> (12, 5.8)	5.43 <i>dt</i> (12, 5.8)
H-9a	2.82 <i>dda</i> (12, 5.1)	2.63 <i>m</i>	2.8 <i>dda</i> (14.4, 4.29)	2.56 <i>dda</i> (14.4, 4.2)
H-11	2.62 <i>c</i> (7.8)	2.63 <i>e</i> (7.7)	2.96 <i>q</i> (6.8)	2.12 <i>q</i> (7.1)
H-13	1.36 <i>d</i> (7.8)	1.06 <i>d</i> (8.1)	1.20 <i>d</i> (6.8)	1.07 <i>d</i> (7.3)
H-14	9.11 <i>d</i> (1.8)	9.02 <i>d</i> (1.8)	9.46 <i>d</i> (1.8)	9.06 <i>d</i> (1.8)
H-15	1.94 <i>d</i> (1.2)	1.59 <i>d</i> (1.2)	1.92 <i>s</i>	1.53 <i>s</i>
OCOCH ₃	2.01 <i>s</i>	1.52 <i>s</i>	1.96 <i>s</i>	

El análisis se efectuó en diferentes disolventes: ^a(CDCl₃), ^b(C₆D₆).

8-Hidroxi-6-metoxi-7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (37)
7-Hidroxi-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (38)

De la fracción I obtenida por elución con éter de petróleo-acetato de etilo (3:2), se aisló por cromatografías sucesivas un aceite rojo el cual reveló como una sola mancha por cromatografía en capa fina. En el IR (CHCl_3 , espectro 34) se observó una banda de hidroxilo en 3387 cm^{-1} y una banda de carbonilo en 1749 cm^{-1} . El análisis de RMN^1H (CDCl_3 , 300 MHz, Espectro 35) evidenció la presencia de dos compuestos, 37 y 38 en diferente proporción (aproximadamente 2:1), exhibiendo en común varias señales con ligeras diferencias en los desplazamientos químicos. Entre las señales similares se encuentran las señales dobles, en δ 6.45 y 6.36, para el compuesto 37 (mayoritario), y en δ 6.60 y 6.50, para el compuesto 38 (minoritario), indicando la presencia de dos hidrógenos aromáticos en posición *meta*. Una señal triple en δ 3.68 (J 6.4 Hz) para el compuesto 37 y en δ 3.67 (J 6.1 Hz) para el compuesto 38 son asignables a hidroximetilenos. Se observan dos señales simples de metoxilo uno en δ 3.78 (mayoritario) y otro en δ 3.88 (minoritario). Un triplete en δ 2.63 (J 7.6 Hz) para 37 y 38 es asignable a un metileno bencílico.

Los anteriores datos espectroscópicos permitieron suponer que se trataba de una mezcla de benzenoides sustituidos con una cadena alifática y sustituyentes oxigenados que podrían ser metoxilo e hidroxilo. Se procedió entonces a comparar las características espectroscópicas de este compuesto con las de sustancias similares, especialmente que hubiesen sido aislados del género *Schkuhria* en estudios fitoquímicos previos. Se encontró similitud con un fenilpropanoide denominado eschkuhrianol (23) que fue aislado de la especie *Schkuhria senecioides*.²⁵ En base a esto se confirmaron las asignaciones ya hechas y fué posible las asignaciones de las otras señales.

Las señales que se presentan como triplete en δ 3.68 para 37 y en δ 3.67 para 38 se asignan a los hidrógenos de los hidroximetilenos H-1.^{25,78} El multiplete en δ 1.96 se asignó al metileno vecino H-2.

El anillo bencénico tiene tres sustituyentes oxigenados; uno de ellos es un metoxilo que se observó en RMN^1H como una señal simple en δ 3.78 para el compuesto 37 y en δ 3.88 para el compuesto 38. El otro sustituyente oxigenado es un éster, lo que se deduce por la presencia de una banda en 1749 cm^{-1} en el IR (CHCl_3 , espectro 34), y por una señal múltiple parcialmente superpuesta en δ 2.70 (J 6.9 Hz), para un metino (H-2') α al carbonilo, en cada uno de los compuestos. El último sustituyente oxigenado sobre el benceno se trata de un hidroxilo, lo cual se dedujo después de analizar los productos de acetilación.

En el espectro de RMN^1H (Espectro 35) también se observa una señal triple δ 1.04 (J 7.5 Hz) para el compuesto 37 y otra en δ 1.06 (J 6.6 Hz) para el compuesto 38, asignados a un metilo acoplado con un metileno, que aparece como señal múltiple en δ 1.63. Estas señales se atribuyen al fragmento $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ (H-3' y H-4') del éster. Se observa otro metilo que se presenta como una señal doble a campo más bajo en δ 1.32 (J 7.2 Hz) para 37 y en δ 1.31 (J 7.2 Hz) para 38 asignable a H-5', que se encuentra acoplado con el metino α al

carbonilo (H-2'). Esta descripción establece al fragmento α -metil-butirato (2-metil-butiriloxi) como sustituyente.

En el espectro de la mezcla de fenilpropanoides acetilados, RMN¹H (CDCl₃), 300 MHz espectro 36), se observó que la señal del oximetileno correspondiente a H-1 experimentó una variación en el desplazamiento ($\Delta\delta$) de 0.43 ppm a campo bajo, con respecto al producto natural, encontrándose en δ 4.11 (t, J 6.4 Hz) con lo que se confirmó la presencia de un hidroximetileno en el producto natural. En los productos acetilados 39 (mayoritario) y 40 (minoritario), se observaron tres señales simples que corresponden a cuatro acetilos, las señales en δ 2.26 y δ 2.24 correspondientes a los acetatos aromáticos de 39 y 40, mientras que la señal simple en δ 2.05 corresponde a los dos acetatos alifáticos.

En el trazo de RMN¹H de la mezcla de los dos fenilpropanoides naturales 37 y 38 se observó que la principal diferencia entre ellos era el desplazamiento de las señales asignadas a los hidrógenos aromáticos y al metoxilo. Esto mismo se observó para la mezcla de los dos derivados acetilados 39 y 40 (RMN¹H, CDCl₃, 300 MHz, Espectro 36), lo que estableció que la diferencia entre los dos compuestos reside en la ubicación de los sustituyentes en el anillo aromático.

Como ya se mencionó, la acetilación provocó cambios en los desplazamientos de las señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos (Tabla 5). En el metabolito secundario 37 los hidrógenos aromáticos se observan en δ 6.36 (d, J 1.5 Hz) para H-5 y en δ 6.45 (d, J 1.5 Hz) para H-9, mientras que en el derivado acetilado 39 resuenan en δ 6.61 (d, J 1.8 Hz) para H-5 y δ 6.66 (d, J 1.8 Hz) para H-9, registrándose de esta forma una variación en el desplazamiento de las señales ($\Delta\delta=0.22$ para H-9 y 0.25 para H-5) a campo más bajo en el derivado acetilado.

En el metabolito secundario 38 los desplazamientos para los hidrógenos aromáticos fueron δ 6.50 (d, J 1.8 Hz) para H-5 y δ 6.60 (d, J 1.5 Hz) para H-9 y en el derivado acetilado 40 fueron de δ 6.59 (d, J 1.8, Hz) para H-5, y alrededor de 6.66 para H-9, (ya que está superpuesto) observándose de esta forma, una variación en el desplazamiento de las señales en 0.09 ppm a campo más bajo para H-5 y 0.06 ppm para H-9 en el derivado acetilado.

La mayor variación en los desplazamientos por acetilación ubica al hidroxilo fenólico en posición *orto* o *para* a los hidrógenos aromáticos. Cuando la variación en el desplazamiento es pequeña, el hidroxilo fenólico se encuentra posición *meta* con respecto a los hidrógenos aromáticos.

La ubicación relativa del éster y del metoxilo en el anillo aromático se determinó al comparar el desplazamiento químico del metilo del metoxilo en los productos naturales y en los derivados acetilados. El desplazamiento a campo alto de esta señal en el derivado acetilado (debido al efecto protector del carbonilo del acetilo sobre el metilo del metoxilo) implica una relación *orto* entre el hidroxilo fenólico y el metoxilo, como esta informado en la literatura.^{79,80} En el metabolito secundario 37 esta señal se encuentra en δ 3.78 y en su derivado acetilado (39) esta señal se desplazó a campo bajo, a δ 3.80. En el metabolito secundario 38 el metilo del metoxilo se encuentra en δ 3.88, y se desplazó a campo más alto, a 3.82 en el derivado acetilado 40.

Esta discusión establece a las estructuras moleculares 37 (mayoritario) y 38 (minoritario) como productos naturales presentes en *S. Schkuhrioides*, que representan nuevas sustancias en la naturaleza.

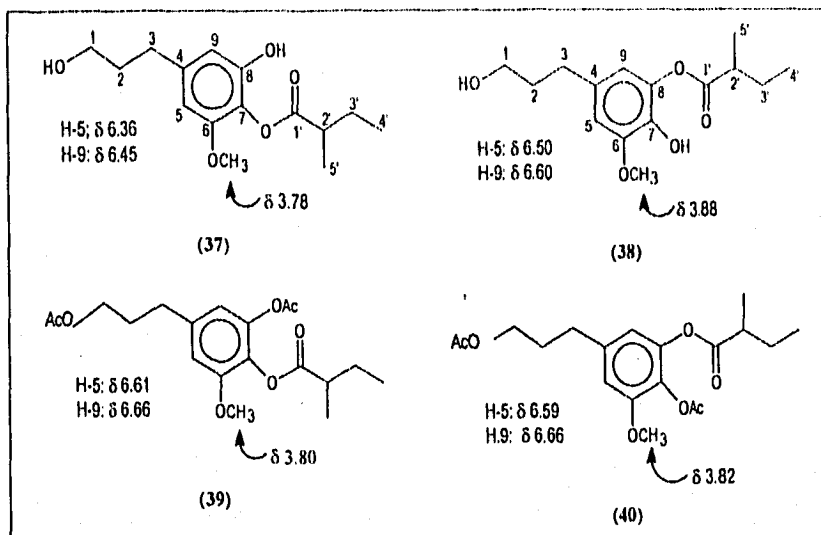


Tabla 5 RMN¹H (300 MHz) datos espectroscópicos de 8-11hidroxi-6-metoxi-7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (37), de 7-11hidroxi-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (38), de 1,8-Diacetiloxi-6-metoxi-7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propano (39) y de 1,7-Diacetiloxi-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propano (40)

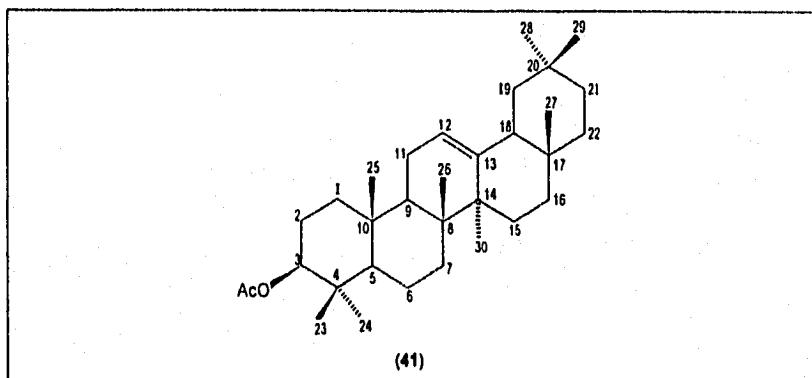
	37 ^a	38 ^a	39 ^a	40 ^a	39 ^b	40 ^b
H-2'	2.70 m (6.9)				2.57 m (6.7)	2.44 m (6.9)
H-3'	1.63 m (7.5)	1.63 m (6.6)	1.59 m (6.4)		1.45 m (7.5)	1.45 m (6.8)
H-4'	1.04 t (7.2)	1.06 t (7.2)	1.04 t (6.9)	1.05 m (6.7)	0.95 t (6.9)	0.89 t (7.2)
H-5'	1.32 d (7.2)	1.31 d (7.2)	1.30 d (6.9)	1.28 m (6.7)	1.20 d (6.9)	1.13 d (7.2)
H-1	3.68 t (6.4)	3.67 t (6.1)	4.11 t (6.4)	4.11 t (6.4)	3.92 t (6.3)	3.93 t (6.6)
H-2	1.87 m (7.6)	1.87 m (7.6)	1.96 m (6.7)	1.96 m (6.4)	1.60 m (6.4)	1.60 m (7.8)
H-3	2.63 t (7.6)	2.48 t (7.6)	2.66 t (6.7)	2.42 t (6.4)	2.30 tu (6.4)	2.31 m (7.8)
H-5	6.36 d (1.5)	6.50 d (1.8)	6.61 d (1.8)	6.59 d (1.8)	6.30 d (1.9)	6.30 d (1.9)
H-9	6.45 d (1.5)	6.60 d (1.8)	6.66 d (1.8)	6.66 d (1.8)	6.60 d (1.9)	6.66 d (1.8)
OCH11	3.78 s	3.88 s	3.80 s	3.82 s	3.27 s	3.28 s
OAc-7				2.24 s		
OAc-8			2.26 s		1.95 s	1.85 s

El análisis se efectuó en diferentes disolventes: ^a(CDCl₃), ^b(C₆D₆).

Triterpenos

Acetil β Amirina (41)

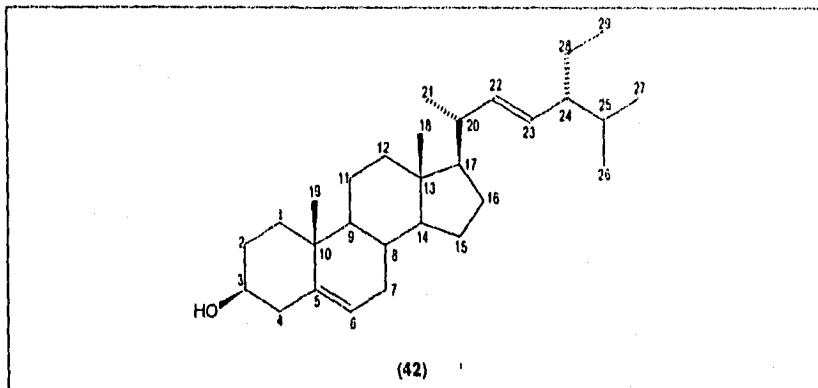
De la fracción menos polar (fracción A) obtenida por elución con éter de petróleo-acetato de etilo (95:5), se obtuvieron por recromatografía y recristalización cristales blancos. En el espectro de RMN¹H se observó una señal triple en δ 5.18 (J 3.6 Hz) que integró para un hidrógeno, este desplazamiento es característico de un hidrógeno vinílico. Se observó otra señal doble de dobles en δ 4.5 (J 9.5, 7.2 Hz) correspondiente a un hidrógeno geminal a oxígeno. La presencia de señales múltiples entre δ 0.9 y 2.0, así como de varias señales simples a campo alto sugieren la estructura de un triterpeno policíclico, ya que se manifiestan 32 señales en el espectro de RMN¹³C. La señal simple de metilo de acetilo en δ 2.04 aunado a la banda de carbonilo en 1719 cm⁻¹ en el IR y a la señal singulete en δ 170.97 en RMN¹³C establece la presencia del grupo acetato. El peso molecular de 468 obtenido por EMI-E y la comparación con los datos espectroscópicos de la literatura permitieron identificar al compuesto como el acetil β -amirina.⁸¹ La comparación con una muestra auténtica disponible en el laboratorio comprobó su identidad.



Estigmasterol (42)

De la fracción D obtenida por elución con éter de petróleo-acetato de etilo (9:1) se obtuvieron cristales en forma de agujas. El espectro de RMN¹H mostró una señal doble de doble a δ 5.16 (J 15.1, 8.1 Hz) y otra señal doble de doble a δ 5.00 (J 15.5, 8.05 Hz) integrando cada una para un hidrógeno, indicando la presencia de dos hidrógenos vinílicos, esta multiplicidad se debe al acoplamiento de cada hidrógeno vinílico con el otro hidrógeno vinílico vecino y con un hidrógeno alílico. Se manifestó asimismo una señal doble y ancha en δ 5.12 (J 5.2 Hz), para un hidrógeno vinílico. La señal múltiple en δ 3.51 se atribuye a un hidrógeno geminal a oxígeno, el cual está acoplado con más de dos hidrógenos. Entre δ 2.40 y 0.50 se observó un conjunto de señales múltiples que integraron para aproximadamente cuarenta y cinco hidrógenos. La comparación con los datos

espectroscópicos de la literatura y con una muestra auténtica permitió establecer que el compuesto se trata de estigmasterol.⁸²



Flavonas

Pectolinarigenina (43)

De la fracción G eluida con éter de petróleo-acetato de etilo (8:2), se aisló por cromatografía y cristalización un compuesto amarillo en forma de sólido amorfo, *mp* 197-198°C. En el IR mostró una banda ancha para hidroxilo en 3406 cm^{-1} y una banda para carbonilo en 1661 cm^{-1} . En el espectro de RMN^1H se observó una señal simple en δ 13.04 para un hidrógeno presumiblemente fenólico unido mediante enlace de hidrógeno a cetona.

Se manifiesta un sistema A_2B_2 centrado en δ 8.03 y 7.10 (J 8.7 Hz), lo cual establece la presencia de un anillo aromático disustituido en *para*. Las señales simples en δ 3.86 y en δ 3.76 corresponden a dos grupos metoxilos. Dos señales simples adicionales en δ 6.87 y en δ 6.63, que integraron para un hidrógeno cada una pueden corresponder a hidrógenos vinílicos o aromáticos. El análisis del espectro de RMN^{13}C permitió establecer que solamente existían dos anillos aromáticos en la molécula y que se encontraban unidos por un grupo carbonilo, características que se dan en las flavonas. El peso molecular de este compuesto es de 314, de acuerdo al ión molecular observado en el espectro de masas. La comparación con los datos espectroscópicos de la literatura (Tabla 5) permitió establecer que el compuesto aislado es de la flavona pectolinarigenina.⁸³⁻⁸⁶

Dinatina (44)

De la fracción I se aisló por cromatografía un compuesto sólido de color amarillo. Al analizar los espectros RMN^1H y RMN^{13}C se observó similitud con las características

espectroscópicas de la pectolarigenina (43), aislada en la fracción G, siendo la principal diferencia la ausencia del metoxilo en C-6, la comparación con los datos espectroscópicos de la literatura^{65,67} permitió establecer que se trata de la flavona dinatina (44). El peso molecular de este compuesto es de 300 de acuerdo al ión molecular observado en el espectro de masas. La tabla 5 muestra los datos de RMN¹³C de la pectolarigenina (43) y de la dinatina (44).

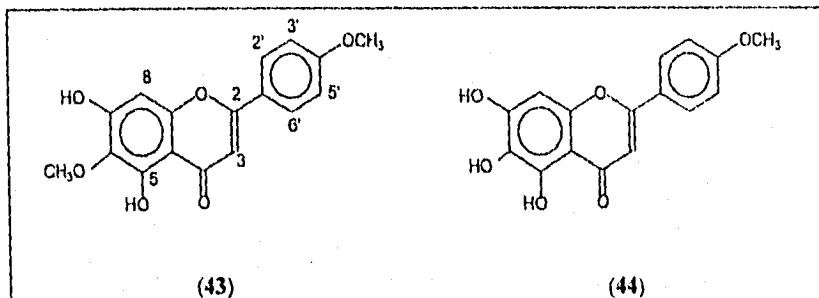


Tabla 5 RMN¹³C de la pectolarigenina (43) y de la dinatina (44)

	43 ^a	43 ^b	44 ^a	44 ^b
C-2	163.7	163.3	163.7	163.7
C-3	102.4	104.0	102.3	
C-4	182.1	182.1	182.0	182.0
C-5	152.8	152.7	152.7	152.7
C-6	131.3	131.4	130.5	
C-7	157.1	157.4	157.9	
C-8	94.8	94.3	69.8	
C-9	152.4	152.4	157.9	
C-10	104.1	103.0	94.3	94.3
C-1'	121.0	122.9	121.1	121.5
C-2'	128.4	128.3	128.4	128.4
C-3'	115.9	114.5	116.0	116.0
C-4'	161.9	162.3	161.2	161.2
C-5'	115.9	114.5	116.0	116
C-6'	128.4	128.3	128.4	128.4

El análisis se efectuó a diferentes frecuencias: ^aDesplazamientos tomados de la literatura^{65, 66} (75 MHz, DMSO), las asignaciones fueron hechas de acuerdo al experimento DEPT)

Bioevaluaciones preliminares

Se hicieron las siguientes bioevaluaciones: toxicidad frente a *Artemia salina*, actividad citotóxica frente a tres líneas celulares cancerígenas¹⁴⁻¹⁵ [tumor nasofaríngeo (KB), cáncer de cérvix (UISO) y cáncer de colon (COLON)], determinación de la actividad antibacteriana (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans*), y actividad antifúngica (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton gypseum*)¹² para las siguientes sustancias: 11,13-dehidroeriolina (13), frutescina (14), ácido frutescínico (28), eschkuhriólida (12) y de los derivados: *allo*-eschkuhriólida (32), isoeschkuhriólida (45), 4,4-epóxi-eschkuhriólida (46), acetil eschkuhriólida (47), 6-acetil eschkuhrioidiol (48), pirazolina de 11,13-dehidroeriolina (49), acetil β amirina (41). No se tiene el dato de toxicidad frente a *Artemia salina* de los compuestos (45, 46, 48, 49) debido a la falta de material suficiente.

La prueba de toxicidad frente a *Artemia salina* fue positiva para frutescina (14) (50.21 ppm). También fue positiva para los derivados: *allo*-eschkuhriólida (32) (453.5 ppm), 11,13-dehidroeriolina (13) (268.16 ppm) y acetil eschkuhriólida (46) (64.61 ppm), los compuestos que no mostraron actividad fueron los metabolitos secundarios 12, 28, 41.

Los resultados de la prueba de toxicidad frente a las tres líneas celulares cancerígenas (Tabla 6) señalan que el compuesto más activo es *allo*-eschkuhriólida (32), germacradienólida con un hidroxilo en C-8, isoeschkuhriólida (45) es el segundo compuesto más activo. La 4,5-epóxi-eschkuhriólida (46) también es más activo que la eschkuhriólida (12). Los anteriores resultados podrían sugerir que la presencia de sustituyentes hidrofílicos en las posiciones 4, 5 y 8 aumentan la actividad.⁵⁸

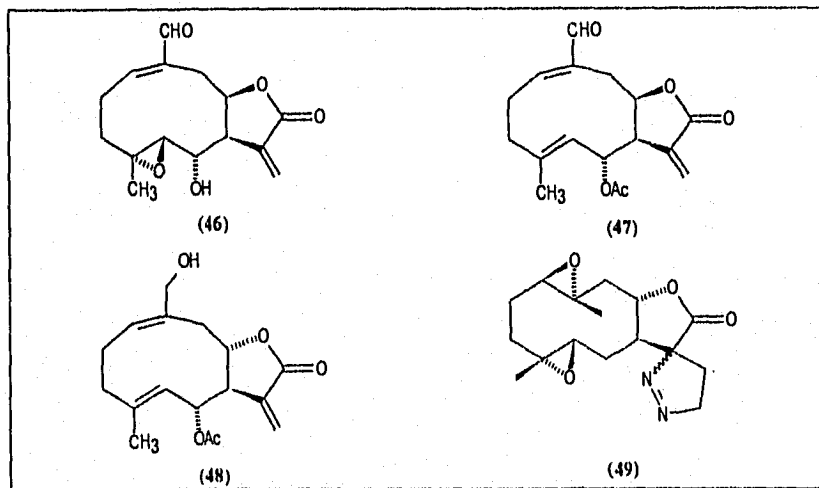
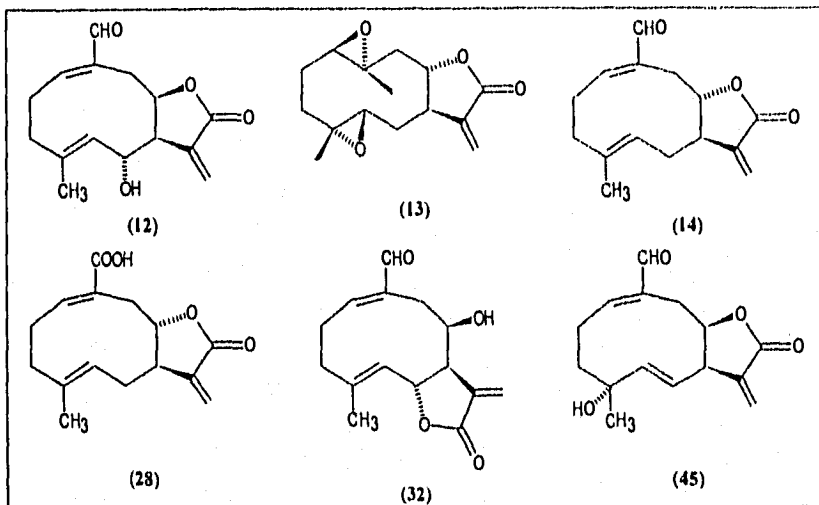
La pirazolina de 11, 13-dehidroeriolina (49) es el único compuesto que no presentó actividad citotóxica, debido presumiblemente a la ausencia del metileno exocíclico.^{5,6,58}

Dos de los compuestos analizados presentaron actividad específica: el ácido frutescínico (28), que es activo contra la línea celular KB (tumor nasofaríngeo), y eschkuhriólida (12) que es activo contra la línea celular COLON. Acetil eschkuhriólida (47) presentó cierta especificidad, solo fue activo contra dos líneas celulares: KB y COLON.

Tabla 6. Bioevaluaciones citotóxicas de eschkuhriólida (12), 11,13-dihidroeriolina (13), frutescina (14), ácido frutescínico (28), *allo*-eschkuhriólida (32), isoeschkuhriólida (45), 4,5-epóxi-eschkuhriólida (46), acetil eschkuhriólida (47), 6-acetil eschkuhrioidiol (48) y pirazolina de 11,13-dihidroeriolina (49).

Compuesto	KB DE ₅₀ µg/ml	UISO DE ₅₀ µg/ml	COLON DE ₅₀ µg/ml
<i>Allo</i> -eschkuhriólida (32)	0.000575	1.82	0.9
isoeschkuhriólida (45)	0.2398	1.44	1.3
Epóxido de eschkuhriólida (46)	0.3019	2.18	3
11,13-dehidroeriolina (13)	0.75	2.08	0.9
Acetil eschkuhriólida (47)	0.65	7.94	1.4
Frutescina (14)	1.25	1.81	6.3
Acido frutescínico (28)	1.58	6.91	8.32
6-Acetil-eschkuhrioidiol (48)	3.63	2.29	1.3
Eschkuhriólida (12)	34.67	4.57	3.6
Pirazolina de 11,13-dehidroeriolina (49)	4	20.89	20

referente a la actividad antibacteriana y antifúngica, ninguno de los compuestos se consideró activo, debido a que su concentración inhibitoria mínima fue mayor a 100 µg/ml. Los compuestos que presentaron mayor actividad fueron frutescina (14) (*Staphylococcus aureus* 200 µg/ml, *Candida albicans* 200 µg/ml) y 11,13-dehidroeriolina (13) (*Staphylococcus aureus* 200 µg/ml).



PARTE EXPERIMENTAL

1. *Schkuhria schkuhrioides* [Registro 636061 del Herbario Nacional (MEXU)] se recolectó en Teoloyucan, Estado de México, en noviembre de 1993, con la asesoría del Dr. Francisco Javier Espinosa García del Centro de Ecología de la UNAM. La referencia del material colectado se encuentra depositada en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM.

2. Métodos espectroscópicos:

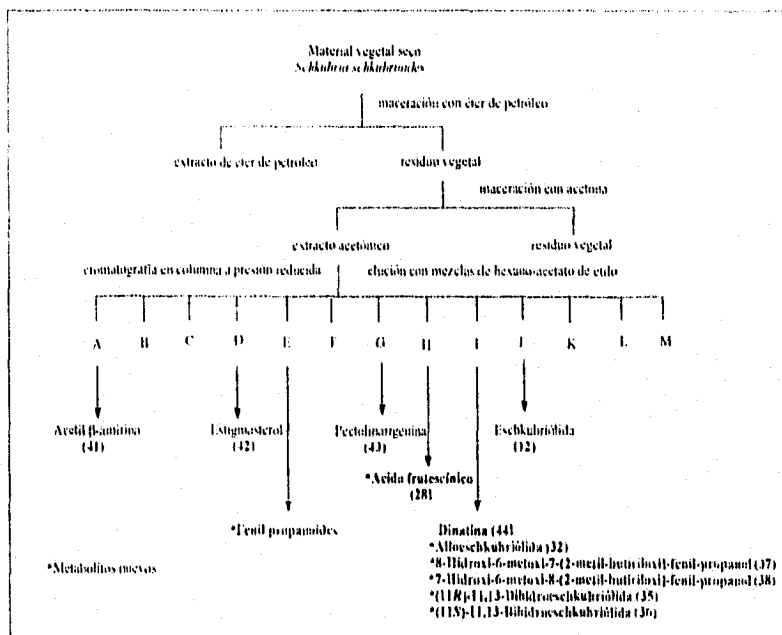
- Espectrómetro de UV: Perkin-Elmer 552.
- Espectrómetro de IR: Nicolet Magna-IR TM 750 y Perkin Elmer 283B.
- Espectrómetro de masas: JEOL JMS-AX 505 HA.
- Espectrómetro RMN: Varian Gemini 200 (200 MHz ^1H , 50 MHz ^{13}C); Varian VXR-300 (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C); Varian Unity-300 (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C).
- Polarímetro: Jasco DIP-360 digital.
- Aparato para punto de fusión: Fisher Johns.

3. Métodos cromatográficos:

- Cromatografía en capa fina, analítica: Alugram Sil G/UV 254 (5 x 3.2 x 0.25 mm)
- Cromatografía en capa preparativa: DC-Fertigplatten SilG-100 UV 54 (20 x 20 x 1 mm), PSC-Fertigplatten Kieselgel 60 F 254 (20 x 20 cm x 2 mm)
- Cromatografía en columna. Material de empaque: Silica gel GF 254.

Las partes aéreas secas de *Schkuhria schkuhrioides* (5 Kg) fueron extraídas con éter de petróleo (EP) y posteriormente el residuo vegetal se extrajo con acetona, obteniéndose 200 g del extracto acetónico. Una parte de éste extracto (177.1 g) se fraccionó por cromatografía en columna a presión reducida,⁸⁸ empleando una columna de vidrio de 9.4 cm de diámetro, empacada con sílica gel GF-254 a una altura de 16.5 cm. El procedimiento de fraccionación se ilustra en el esquema 1.

Esquema 1. Obtención de los extractos y de las principales fracciones en la purificación de los constituyentes de *Schkuhria schkuhrioides*.



Fraccionamiento del extracto acetónico.					
Nº de eluato (vol. l/l)	Fracción	Peso (gramos)	Rendimiento % W/Wi	Eluyente EP:AcOEt	Color
1-3	A	52.1	26.0	9:3:5	amarillo rojizo
4-6	B	12.6	6.3	9:5:5	naranja
7-9	C	8.4	4.2	9:1	amarillo verdoso
10-11	D	3.9	1.9	9:1	amarillo verdoso
12-15	E	2.9	1.4	9:1	verde amarillento
16-20	F	4.6	2.3	8:2	verde claro
21-28	G	15.1	7.5	8:2	café verdoso
29-33	H	12.5	6.2	7:3	amarillo verdoso
34-36	I	8.1	4.0	6:4	amarillo
37-40	J	10.8	5.4	5:5	amarillo verdoso
41-44	K	6	3.0	5:5	verde oscuro
45-53	L	7.85	3.9	3:7	café amarillento
54-65	M	23.9	11.9	0:1	café amarillento
....		31.25	15.6	0:1	

Aislamiento de Acefitil β Amirina (28)

De la fracción A (52.1 g.) se tomaron 17.62 g. (33.8%), los cuales se resolvieron en sus componentes mediante cromatografía en columna a presión reducida, (CCPR), en una columna de 4 cm de diámetro, empacada con 88 g (5:1 sílice/muestra) de gel de sílice 60 GF-264.

Fraccionamiento del residuo A.					
Nº de eluato (vol. 300 ml)	Fracción	Peso (gramos)	Rendimiento % W/Wi	Eluyente EP:AcOEt	Compuesto identificado
1-3	A.1	2.7	15.3	1:0	
4-20	A.2	3.2	18.2	1:0	28
21-32	A.3	0.3	1.7	1:0	
33-37	A.4	2.7	15.3	0.9:0.1	
38-55	A.5	1.9	10.8	0.7:0.3	
....		6.82	38.7		

La fracción A.2 presentó cristales blancos y ceras. Las ceras (2.79, 87.2%) solubles en hexano frío, fueron eliminadas por decantación. Los cristales (414 mg., 13%) se recrystalizaron de acetona a temperatura ambiente, obteniéndose 75.4 mg (18.2%).

Las características físicas y espectroscópicas son las siguientes:⁶²

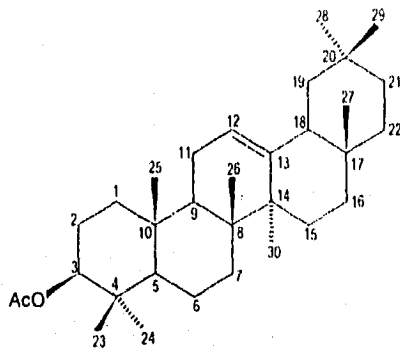
PF 236-238°C.

IR (CDCl₃, cm⁻¹): 2949, 1719, 1462, 1373, 1256, 1056.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ): 5.18 (1H, t, J 3.6, H-12); 4.5 (1H, dd, J 9.5, 7.2, H-3); 2.04 (3H, s, -COOCH₃); 1.13 (3H, s, CH₃-27); 0.97 (6H, s, CH₃-25,26); 0.87 (12H, s, CH₃-23,24,29,30); 0.83 (3H, s, CH₃-28).

RMN ¹³C (75.2 MHz, CDCl₃): 170.9 (s, CH₃CO₂-); 145.1 (s, C-13); 121.5 (d, C-12); 80.9 (d, C-3).

EMIE m/z (int. rel.): 468 (12); 218 (100); 203 (45); 189 (35); 175 (12); 147 (12); 135 (16); 119 (18); 109 (18); 95 (12); 93 (14); 81 (18); 69 (20); 43 (45).



(41)

Aislamiento del ácido oleico (50) y acil triterpenos lábiles

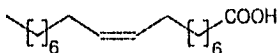
Se tomaron 6.9 g (54.6%) de la fracción B (12.6 g) y se fraccionaron utilizando cromatografía en columna de 3.4 cm de diámetro, empacada con 35 g (5:1 sílica/muestra) de sílica gel 60 GF-254, obteniéndose los siguientes resultados.

Fraccionamiento del residuo B.					
Nº de eluato (vol. 150 ml)	Fracción	Peso (gramos)	Rendimiento % W/Wi	Eluyente EP/AcOEt	Compuesto identificado
1-11	B.1	2.4	34.7	1:0	50
12-27	B.2	0.8	11.6	1:0	acil triterpenos
28-43	B.3	0.08	1.1	1:0	
47	B.4	3.4	48.3	9:1	acil triterpenos
48-63	B.5	0.22	3.2	9:1	

De la fracción B.1 se separó 50 empleando cromatografía en placa preparativa (20 x 20 cm, 2 mm) eluyente benceno:acetona, 95:5, Rf 0.2

Características físicas y espectroscópicas:

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ): 5.36 (2H, m, H-vinílicos); 2.35 (2H, t, J 7.4 CH₂CO); 1.26 (22H, s, CH₂); 0.88 (3H, m, CH₃)



(50)

De la fracción B.2 se aisló un acil triterpeno, utilizando cromatografía en placa preparativa (20 x 20 cm, 2 mm; eluyente benceno:acetona, 95:5). Esta sustancia revela color rojo intenso con CeSO₄/H₂SO₄, Rf 0.4, y es un sólido blanco soluble en acetona caliente, ligeramente soluble en hexano caliente.

Características físicas y espectroscópicas:

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ): 5.35 (m); 5.26 (da); 5.15 (1H, dt); 4.65 (m); 4.61 (m); 4.57 (m); 3.64 (t); 3.21 (m); 2.5-0.6 (m).

Después de que estuvo una semana a temperatura ambiente y en contacto con el aire, se encontró colorido, y se observó por cromatografía en capa fina una transformación parcial a compuestas más y menos polares. El espectro de RMN ¹H mostró señales adicionales a las del compuesto recién purificado. RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ): 7.2 (m); 5.35 (m); 5.26 (da); 5.15 (dt); 4.65 (m); 4.57 (m); 4.12 (q); 3.77 (m); 3.66 (m); 3.21 (m); 2.5-0.6 (m).

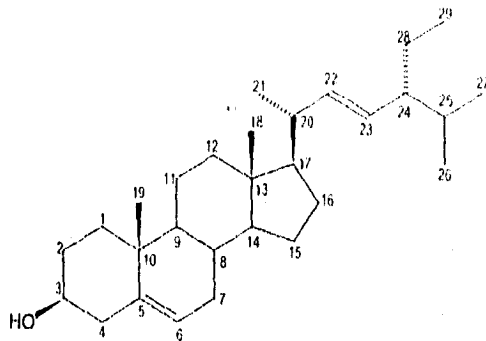
Aislamiento de Stigmasterol (42)

De la fracción D (3.9 g) se disolvieron 2.87 g (73.5%) en la mínima cantidad de hexano caliente, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, cristalizando espontáneamente 248 mg (8.6%) de cristales translúcidos en forma de agujas, 42.

Características físicas y espectroscópicas:⁸²

Pf 174-175°C

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ): 5.35 (1H, da, J 5.2, H-6); 5.16 (1H, dd, J 15.1, 8.10 H-22); 5.00 (1H, dd, J 15.5, 8.05, H-23); 3.51 (1H, m, H-3); 2.4-0.5 (45H, m).



(42)

Las aguas madres, 2.62 g, se concentraron y se tomaron 2.2 g (84%) para posterior fraccionamiento utilizando cromatografía a presión reducida, en una columna de 4 cm de diámetro, empacada hasta una altura de 5 cm con sílica gel GF 254.

Fraccionamiento del residuo D.					
Nº de eluato (vol. 200 ml)	Fracción	Peso (gramos)	Rendimiento % W/Wi	Eluyente EP/AcOEt	Compuesto identificado
1-2	D.1	0.049	2.2	100:0	
3-4	D.2	0.288	13.1	97:3	42
5-6	D.3	0.908	41.2	97:3	
7-9	D.4	0.3459	15.7	91:9	
10-12	D.5	0.355	16.1	85:15	

Pectolarigenina (43)

Del eluato 24 (1.34 g) de la fracción G, co-cristalizaron dos compuestos de RI similar. Para purificar el mayoritario, se aplicaron 43 mg (3.2%) de estos cristales sobre placas de 20 x 20 x 0.025 cm, empleando como eluyente benceno-acetato de etilo (95:5), obteniéndose 24.6 mg (57.2%) de 43.

Características físicas y espectroscópicas:⁸³⁻⁸⁶

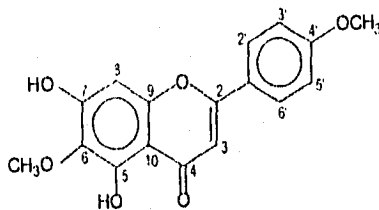
Pf 197-198°C.

IR (CDCl₃, cm⁻¹): 3589, 3406, 3020, 2925, 2853, 2005, 1661, 1608, 1509, 1215, 1033, 769.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO, δ): 13.04 (1H, s, OH-O=), 8.03 (2H, d, J 8.7, H-2',6'a), 7.10 (2H, d, J 8.7, H-3',5'), 6.87 (1H, s, H-3), 6.63 (1H, s, H-8), 3.86 (3H, s, OCH₃-1'), 3.76 (3H, s, OCH₃-6).

RMN ¹³C (75.2 MHz, DMSO): 163.31(C-2), 104.08(C-3), 182.15(C-4) 152.75(C-5), 131.37(C-6), 157.42(C-7), 94.30(C-8), 152.42(C-9), 103.05(C-10), 122.85 (C-1'), 128.30(C-2'), 114.55(C-3'), 162.28(C-4'), 114.55(C-5'), 128.30(C-6').

EMIE m/z (rel. int.) 314(100), 299(59), 271(72), 268(18), 256(4), 167(10), 139(16), 133(25), 118(5), 89(8), 83(7), 69(53), 43(12), 41(8).



(43)

Acido frutescínico (28)

De la fracción II (12.5 g) se tomó una muestra de 12.4 g (99.2%) que se fraccionó en una columna de 5.5 cm de diámetro, empacada con sílica gel CIF-254 a una altura de 5 cm.

Fraccionamiento del residuo II.					
Nº de eluato (vol. 100 ml)	Fración	Peso (gramos)	Rendimiento % W/Wi	Eluyente Et/AcOEt	Compuesto identificado
1-27	II.1	0.534	4.3	98:5 a 80:20	
28-40	II.2	6.2	50.0	78:22 a 70:30	28
41-44	II.3	0.721	5.8	70:30	
45-62	II.4	1.94	15.6	68:32 a 58:42	
otros		3	24.0		

La fracción **H.2** (4.62 g) se fraccionó en una columna de 4 cm de diámetro, empacada con sílica gel GF 254 hasta 5 cm de altura.

Fraccionamiento del residuo H.2					
Nº de eluato (vol. 50 ml)	Fracción	Peso (gramos)	Rendimiento % W/Wi	Eluyente EP:AcOEt	Compuesto identificado
1-10	H.2.1	0.348	7.5	88:12 a 80:20	
11-20	H.2.2	3.14	68.0	80:20 a 78:22	28
21-25	H.2.3	0.190	4.1	74:26	
otros		0.94	20.0		

Se tomaron 500 mg (16%) de la fracción **H.2.2** y se purificaron por cromatografía en cinco placas preparativas de (20 x 20 x 0.2 cm), empleando como eluyente CH_2Cl_2 -MeOH, 92:8. Se separó el compuesto de Rf 0.4, que reveló color café claro (67 mg, 13.4 %). El producto aislado se recromatografió en capa fina, eluyendo con la mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH, (98:2), que separaron tres bandas. La mayoritaria tuvo un Rf de 0.56, rendimiento 11 mg (2.2%).

429 mg (13.7%) de la fracción **H.2.2** se fraccionaron a presión reducida en una columna de 0.5 cm de diámetro, empacada hasta 4 cm de altura con sílica gel GF 254.

Fraccionamiento del residuo H.2.2.					
Nº de eluato (vol. 7 ml)	Fracción	Peso (mg)	Rendimiento % W/Wi	Eluyente CH_2Cl_2 -MeOH	Compuesto identificado
1-48	H.2.2.1	29.5	6.9	150:0.5	
49-146	H.2.2.2	47.4	11.0	150:0.5	28
147-168	H.2.2.3	37.1	8.6	150:1	28
169-170	H.2.3.4	94.6	22.5	150:1	
otros		221.0	51.0		

La fracción **H.2.2.2** (43.8 mg, 92%) se recromatografió por CCF (20 x 10 x 0.025 cm), empleando como eluyente CH_2Cl_2 -MeOH, 98:2. Se separaron 3 bandas. la mayoritaria fue una banda ancha Rf 0.56 (19.7 mg, 45%), que se identificó como el compuesto **28**.

Características físicas y espectroscópicas:^{25,26,64}

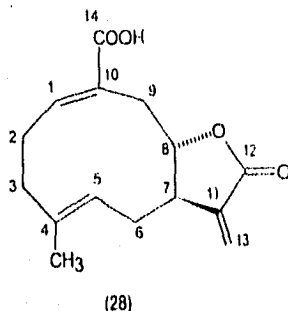
Pf 130-131°C

IR (KBr, cm^{-1}) (Espectro 1) 3448, 2928, 1763, 1690, 1262, 1143.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl_3 , 8 experimento COSY) (Espectros 2 y 3) 7.05 (1H, ta, J 8.3, H-1); 6.21 (1H, J 3.3 Hz, H-13a); 5.51 (1H, J 2.8 Hz, H-13b); 5.14 (1H, m, H-5); 3.96 (1H, m, H-8); 1.67 (3H, sa, CH_3).

RMN ¹³C (75.2 MHz, CDCl_3 experimento APT y DEPT) (Espectro 4) 144.59(C-1); 29.66(C-2); 35.74(C-3); 130.40(C-4); 121.14(C-5); 29.06(C-6); 46.93(C-7); 83.87(C-8); 34.26 (C-9); 139.72 (C-10); 136.35 (C-11); 169.97 (C-12); 120.19 (C-13); 172.46 (C-14); 18.78 (C-15).

EMIE m/z (rel. int.) (Espectro 5) M^+ : 262 (17); 244 (38); 216 (43); 138 (34); 105 (33); 91 (46); 81 (41); 68 (97); 55 (53); 43 (100); 41 (53).



α - y β - pirazolinas del frutescinato de metilo (30) y (31)

A la subfracción **H.2.2** (207.3 mg, 6.6%) se le adicionaron 1.5 ml de una solución etérea de diazometano a temperatura ambiente y se agitó hasta completa disolución y desaparición de la efervescencia. Posteriormente se agregaron unas gotas más de diazometano. Después se agregaron 10 ml de acetato de etilo y se lavó tres veces con 10 ml de una solución acuosa de NaHCO_3 al 10% y una vez con agua. La fase orgánica se concentró a sequedad y se fraccionó por cromatografía en capa fina (20 x 20 x 0.1 cm). eluyente éter de petróleo-acetato de etilo 6:4. Se obtuvieron 76.4 mg (36.8%) de un aceite café claro R_f 0.51 de la α pirazolina (30); y 21.8 mg de otro aceite café claro correspondiente la β pirazolina (14), R_f 0.432.

Características físicas y espectroscópicas de la α pirazolina (30)

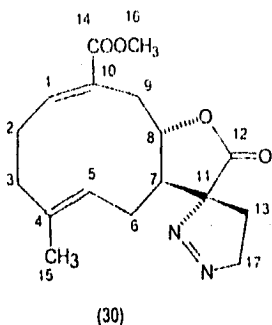
UV $_{\lambda_{\text{max}}}$ MeOH : 319 nm (ϵ 3325)

IR (CDCl_3 , cm^{-1}) (Espectro 8): 3020, 2953, 2937, 2865, 1776, 1714, 1437, 1216, 754, 669.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , experimento COSY δ) (Espectros 9-10): 6.94 (1H, ta, J 8.7, H-1); 2.32 (2H, m, H-2); 2.30 (2H, m, H-3); 5.60 (1H, m, H-5); 1.92 (2H, m, H-6); 3.24 (1H, m, H-7); 4.09 (1H, m, H-8); 2.98 (1H, m, H-9a); 3.00 (1H, m, H-9b); 1.80 (2H, ta, J 7.5, H-13); 1.63 (3H, s, CH_3 -15); 3.8 (3H, s, CH_3 -16); 4.64 (2H, m, H-17).

RMN ^{13}C (75.2 MHz, CDCl_3 , experimento APT y DEPT) (Espectro 11): 142.63 (C-1); 24.83 (C-2); 35.54 (C-3); 130.30 (C-4); 119.96 (C-5); 22.16 (C-6); 48.67 (C-7); 84.04 (C-8); 28.55 (C-9); 137.03 (C-10); 137.03 (C-11); 167.79 (C-12); 22.16 (C-13); 173.08 (C-14); 19.08 (C-15); 19.08 (C-17).

EMIE m/z- (rel. int.) (Espectro 12) M^+ : 318 (50); 305 (7); 290 (57); 272 (4); 258 (28); 231 (12); 230 (27); 213 (12); 190 (12); 185 (18); 162 (18); 145 (23); 131 (28); 110 (100); 105 (30); 81 (40); 68 (33); 53 (38); 41 (28); 39 (15).



Características físicas y espectroscópicas de la β pirazolina del frutescinato de metilo (31):

Aceite

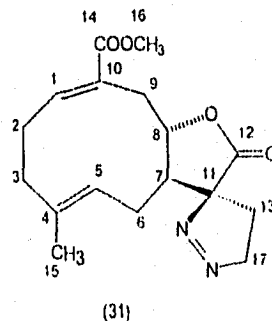
UV_{max} MeOH: 326 nm (ϵ 4290).

IR (CDCl₃, cm⁻¹) (Espectro 13): 3020, 2933, 2863, 1773, 1716, 1456, 1436, 1288, 1216, 1167, 1143, 1002, 888, 773, 668.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, experimento COSY δ) (Espectros 14 y 15): 6.93 (1H, ta, J 8.55, H-1); 2.3 (2H, m, H-2); 1.9 (2H, m, H-3); 5.05 (1H, m, H-5); 2.18 (1H, m, H-6); 2.44 (1H, m, H-7); 4.83 (1H, m, H-8); 3 (1H, m, H-9a); 2.68 (1H, 1Hm, -9bm); 1.5 (2H, m, H-13); 1.62 (3H, s, CH₃-15); 3.81 (3H, s, CH₃-16); 4.78 (1H, ddd, J 18, 15, 9.9, 5, H-17a); 6.65 (1H, ddd, J 18.3, 9.6, 7.2, H-17b).

RMN ¹³C (75.2 MHz, CDCl₃, experimento APT y DEPT) (Espectro 16): 142.28 (C-1); 23.15 (C-2); 35.51 (C-3); 130.49 (C-4); 120.78 (C-5); 22.98 (C-6); 52.02 (C-7); 84.38 (C-8); 28.47 (C-9); 142.28 (C-10); 142.28 (C-11); 167.76 (C-12); 22.98 (C-13); 172.19 (C-14); 18.81 (C-15); 19.0 (C-17).

EMIE m/z- (rel. int.) (Espectro 17) M⁺: 318 (1); 305 (1); 290 (7); 287 (6); 258 (29); 230 (27); 222 (22); 213 (12); 185 (18); 173 (9); 162 (18); 145 (22); 131 (25); 91 (32); 81 (40); 53 (38); 41 (29).



Dinatina (44)

Allo-eschkuhriólida (32)

8-Hidroxi-6-metoxi-7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (37)

7-Hidroxi-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (38)

(11R)-11,13-Dihidroeschkuhriólida (35)

(11S)-11,13-Dihidroeschkuhriólida (36)

De la fracción I (8.1 g) se tomó una muestra de 7.7 g (95%) para fraccionamiento en una columna de 5 cm de diámetro empacada hasta una altura de 5 cm.⁸⁸

Fraccionamiento del residuo I					
Nº de eluto (vol. 100 ml)	Fracción	Peso (gramos)	Rendimiento % W/Wi	Eluyente EP-AcDEI	Compuesto identificado
1-18	1.1			76:24	
19-27	1.2	3.3	43.0	74:26	32,35-38,44
28-36	1.3	1.58	20.5	68:32	12
37-42	1.4	0.22	2.8	62:38	
43-46	1.5			44:56	

El compuesto mayoritario de la fracción I fue eschkuhriólida (12), los compuestos minoritarios se encontraron presentes en la fracción 1.2.

1.2 (3.3 g) se reeromatografió en una columna de 3 cm de diámetro, empacada con gel de sílice GF-254 hasta 5 cm de altura.

Fraccionamiento del residuo 1.2.					
Nº de eluto (vol. 50 ml)	Fracción	Peso (gramos)	Rendimiento % W/Wi	Eluyente CH ₂ Cl ₂ -MeOH	Compuesto identificado
1-9	1.2.1	0.200	6.0	80:20 a 78:22	
10-15	1.2.2	0.703	21.3	78:22	
16-32	1.2.3	2.14	64.8	78:22 a 74:26	32,35-38,44
33-34	1.2.4	0.22	6.7	0:100	

1.2.3 (2.14 g) se volvieron a cromatografiar en una columna de 2 cm de diámetro empacada con gel de sílice GF-254 hasta 8.5 cm de altura.

Fraccionamiento del residuo 1.2.3					
Nº de eluto (vol. 30 ml)	Fracción	Peso (gramos)	Rendimiento % W/Wi	Eluyente CH ₂ Cl ₂ -MeOH	Compuesto identificado
1-9	1.2.3.1	0.007	1.3	80:20	
10-16	1.2.3.2	0.009	0.4	80:20	
17-20	1.2.3.3	0.17	7.9	80:20	32,35-38,44
21-28	1.2.3.4	0.488	22.8	80:20	
29-39	1.2.3.5	0.614	28.7	80:20	
40-47	1.2.3.6	0.395	18.4	80:20	
-----		0.294	13.7		

La subfracción **1.2.3.3** (170 mg) se adsorbió en 132 mg de sílica gel 70-230, fraccionándose en una columna de 1.2 cm de diámetro empacada con sílica gel GF-250 hasta 5.5 cm de altura.

Fraccionamiento del residuo 1.2.3.3.					
Nº de eluato (vol. 5 ml)	Fracción	Peso (mg)	Rendimiento % W/Wi	Eluyente CH ₂ Cl ₂ -MeOH	Compuesto identificado
1-18	1.2.3.3.1	2.2	1.3	81:19	
19-29	1.2.3.3.2	65.2	38.3	81:19	32
30-33	1.2.3.3.3	9.7	5.7	81:19	32
34-42	1.2.3.3.4	30.4	17.9	81:19	
43		62.5	36.8		

La fracción **1.2.3.3.2** se eluyó sobre un cromatofoljo (20 x 20 x 0.025 cm), empleando como eluyente la mezcla de benceno-acetato de etilo 75:25, aislandose 11.1 mg (17%) de *allo-eschkuhiólida* (**32**) con Rf 0.43

La subfracción **1.2.3.4** (459 mg) nuevamente se cromatógrafió en una columna de 1.2 cm de diámetro, empacada con sílica gel GF-254 hasta 6.5 cm de altura.

Fraccionamiento del residuo 1.2.3.4.					
Nº de eluato (vol. 10 ml)	Fracción	Peso (gramos)	Rendimiento % W/Wi	Eluyente CH ₂ Cl ₂ -MeOH	Compuesto identificado
1-6	1.2.3.4.1	5.5	1.1	81:19	
7-15	1.2.3.4.2	279.6	60.9	81:19	32,35-38,44
16:30	1.2.3.4.3	24	5.2	81:19	
otros		149.9	36.7		

La fracción **1.2.3.4.3** (167 mg) se aplicó sobre placas preparativas (20 x 20 x 0.1 cm), eluyéndose tres veces con éter de petróleo-acetato de etilo 7:3, separándose tres bandas; Banda con Rf= 0.5 color amarillo 8.4 mg (5.2%) **44**; banda con Rf=0.42 color café claro 16.3 mg (9.7%) **32**; banda con Rf=0.38 color café rojizo 32.4 mg (19.4%) **35** y **36**.

Dinatina (**44**)

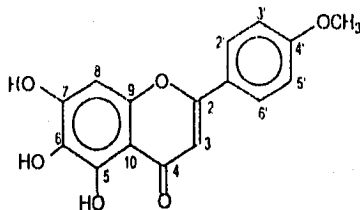
Características físicas y espectroscópicas:^{66,73}

Pf 182-183 °C

RMN¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) 13.06 (OH-5, s), 7.91 (2H, d, J 8.8, H-2' y H-6'), 6.93 (2H, d, J 8.8, H-3' y H-5'), 6.77 (1H, s, H-3), 6.59 (1H, s, H-8), 3.73 (3H, s, OCH₃-4').

RMN¹³C (75 MHz, DMSO δ) 182.05(C-4), 163.72 (C-2), 161.20(C-4'), 158.00(C-7), 152.71(C-5), 148.00(C-9), 131.00(C-6), 128.41(C-2', C-6'), 121.15(C-1'), 115.95(C-3', C-5'), 102.33(C-3), 94.27(C-10), 69.76(C-8)

EMIE m/z (rel. int.) M⁺ 300(100), 282(66), 271(11), 257(99), 254(25), 228(7), 226(5), 200(4), 181(4), 167(20), 153(14), 139(37), 119(36), 118(17), 91(14), 69(92), 55(21), 43(21), 41(16).



Allo-eschuriólida (32)

Características físicas y espectroscópicas:^{80-82,84-85}

Aceite

$[\alpha]_D^{25}$: -1.2 (0.01 g/l, CDCl₃)

UVλ_{max}^{MeOH}: 205 nm (ε 109538)

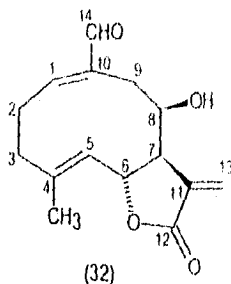
IR (CDCl₃ cm⁻¹) (Espectro 18) 3692, 3604, 3500, 3020, 2931, 2856, 2739, 2402, 1759, 1682, 1632, 1514, 1456, 1299, 1242, 1216, 1141, 1028, 983, 755, 669.

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, δ) (Espectros 19): 9.42 (1-H, d, J 2.1, H-14), 6.59 (1H, ddd, J 9, 7.3, 2.1, H-1), 6.33 (1H, d, J 3.6, H-13a), 5.57 (1H, d, J 3, H-13b), 5.23 (1H, ta, J 9.4, H-8), 5.12 (1H, dd, J 9.7, 9.6, H-6), 5.03 (1H, da, J 11.1, H-5), 1.93 (3H, s, CH₃-15).

RMN¹H (300 MHz, DMSO, experimento COSY, δ) (Espectros 20 y 21): 9.34 (1-H, d, J 1.2, H-14), 6.64 (1H, ta, J 7.8, H-1), 6.08 (1H, d, J 3.3, H-13a), 5.47 (1H, d, J 3.0, H-13b), 5.06 (1H, da, J 10.2, H-5), 4.99 (1H, dd, J 9.6, 9.6, H-6), 2.5 (1H, m, H-9a), 1.84 (3H, s, CH₃-15).

RMN¹³C (300 MHz, CDCl₃, experimento APT y DEPT) (espectro 22) 196.63(C-14), 169.72(C-12), 154.06(C-1), 143.14(C-10), 137.51(C-11), 137.05(C-4), 126.41(C-5), 119.31(C-13), 74.90(C-8), 62.35(C-6), 50.01(C-7), 36.57(C-3), 32.11(C-9), 25.72(C-2), 16.77(C-15).

EMIE m/z (rel. int.) (Espectro 23) 262 (2), 256 (5), 244 (12), 215-216 (7), 179 (14), 161 (27), 133 (23), 121 (13), 105 (31), 84 (62), 69 (100), 41 (93).



Acetil *allo*-eschkuhriólida (33)

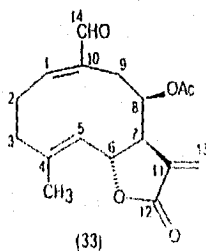
La fracción 1.2.2 52mg se acetiló, agregando 0.52 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se agitó durante 17 horas a temperatura ambiente. La reacción se concluyó mediante la adición de agua (hielo) y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con HCl (al 10%), NaHCO₃ saturado y con salmuera. El residuo orgánico se secó y se concentró al vacío hasta llevarlo a sequedad, obteniéndose 24.2 mg (46.5%). Este residuo se cromatógrafió en una placa de 20 x 20 x 0.025 cm, empleando como eluyente CH₂Cl₂-AcOEt 95:5. Se separaron dos bandas con buena resolución. La banda de Rf 0.65, 0.8 mg (3.3%) se trata se acetil eschkuhriólida (33) y la banda de Rf 0.66, 1 mg (4.1%) se trata de (11S)-11,13-dihidroeschkuhriólida (36).

Características espectroscópicas de acetil *allo*-eschkuhriólida (33).

Aceite

IR (CDCl₃ cm⁻¹) (Espectro 24) 3693, 2931, 2857, 1762, 1739, 1681, 1604, 1461, 1378, 1303, 1147, 1030, 987.

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃ δ) (Espectro 25): 9.43 (1H, d, J 1.5, H-14), 6.60 (1H, ddd, J 9.9, 7.6, 2.2, H-1), 6.39 (1H, ddd, J 9.7, 7.5, 2.1, H-8), 6.23 (1H, d, J 3.3, H-13a), 5.57 (1H, d, J 3.3, H-13b), 5.05 (1H, sa, H-6), 5.03 (1H, sa, H-5), 2.03 (3H, s, COOCH₃), 1.92 (3H, s, CH₃-15).



8-Hidroxi-6-metoxi-7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (37)

7-Hidroxi-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (38)

Características físicas y espectroscópicas:²⁷

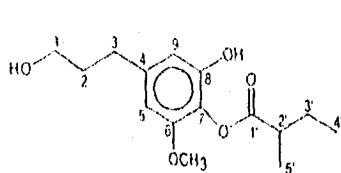
Aceite

$[\alpha]_D^{22} = -7.4 \times 10^{-3}$ (1.35 g/l, MeOH)

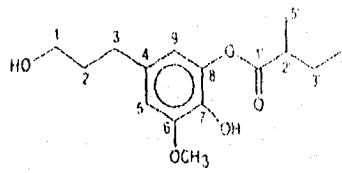
UV $_{\lambda_{max}}$ ^{MeOH} 273 nm (ϵ 9614)

IR (película, cm⁻¹) (Espectro 34) 3429, 2963, 2938, 2878, 1755, 1740, 1602, 1516, 1456, 1433, 1362, 1175, 1144, 1107.

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) (Espectro 35) Compuesto 37 6.45 (1H, d, J 1.5, H-9), 6.36 (1H, d, J 1.5, H-5), 3.78 (3H, s, OCH₃), 3.68 (1H, t, J 6.4, H-1), 2.70 (1H, m, J 6.9, H-2'), 2.63 (2H, t, J 7.6, H-3), 1.87 (2H, m, H-2), 1.32 (3H, d, J 7.2, CH₃-5'), 1.04 (3H, t, J 7.5, CH₃-4'). Compuesto 38: 6.60 (1H, d, J 1.8, H-9), 6.50 (1H, d, J 1.8, H-5), 3.88 (3H, s, OCH₃), 3.67 (2H, t, J 6.1, H-1), 2.48 (2H, t, J 7.6, H-3), 1.87 (2H, m, H-2), 1.31 (3H, d, J 7.2, CH₃-5'), 1.06 (3H, t, J 6.6, CH₃-4').



(37)



(38)

1,8-Diacetiloxi-6-metoxi-7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propano (39)

1,7-Diacetiloxi-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propano (40)

De la fracción 1.2.3.3.4 se aislaron otros 100 mg del compuesto con RF 0.38, se acetilaron agregando 1 ml de piridina y 1 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se agitó durante veinte minutos a temperatura ambiente. La reacción se concluyó mediante la adición de agua (hielo) y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con HCl (al 10%), NaHCO₃ saturado y con salmuera. El residuo orgánico se secó y se concentró al vacío obteniéndose 57 mg (57%). Este residuo se cromatografió en una placa de 20 x 20 x 0.025 cm, empleando como eluyente benceno-acetato de etilo (92:8). Se separaron dos bandas.

Una mezcla de compuestos con RF 0.47, 6 mg (17.8%) constituida por 1,8-Diacetiloxi-6-metoxi-7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propano (39) y 1,7-Diacetiloxi-6-metoxi-8-(2-metil-

butiriloxi)-fenil-propano (40), y otro compuesto con R_f 0.3 (6%): (11*R*)-11, 13-dihidroacetilchukuhriólida (35).

Características físicas y espectroscópicas de 39 y 40:^{77,79}

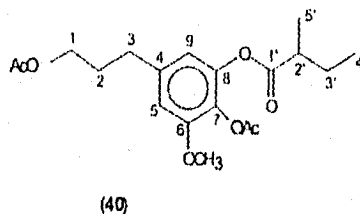
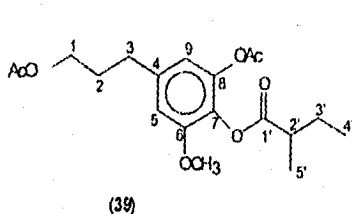
Aceite

UV $\lambda_{\text{máx}}$ MeOH 275.5 nm (ϵ 21028).

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) (Espectro 36): Compuesto 39 6.61 (1H, d, J 1.8, H-5), 6.66 (1H, d, J 1.8, H-9), 4.11 (2H, t, J 6.4, H-1), 3.8 (3H, s, OCH₃), 2.66 (2H, t, 6.7, H-3), 2.24 (3H, s, OAc), 1.96 (2H, m, H-2), 1.30 (3H, d, J 6.9, CH₃-5'), 1.04 (3H, t, J 6.4, CH₃-4'). Compuesto 40: 6.59 (1H, d, J 1.8, H-5), 4.11 (1H, t, J 6.4, H-1), 3.82 (3H, s, OCH₃), 2.42 (2H, t, J 6.4, H-3), 2.26 (3H, s, OAc), 1.96 (2H, m, H-2), 1.28 (1H, m, CH₃-5'), 1.05 (1H, m, CH₃-4').

RMN¹³C (75 MHz, C₆D₆) (Espectro 39) 172.68, 169.69, 167.08 (-C=O); 152.56, 146.84, 143.86, 139.28, (-C= aromático), 114.86, 109.57 (-CH= aromático); 26.71 (-CH- alifático); 40.95 (-CH-C=O); 63.19 (-CH₂-O); 55.00 (CH₃-O); 32.06, 29.88, 26.71 (-CH₂-); 21.94, 20.10, 19.85, 16.68, 16.60, 11.33 (CH₃-)

EMIE m/z - (rel. int.) (Espectro 40) 324 (4), 306 (4), 277 (5), 262 (6), 246 (45), 217 (58), 203 (13), 173 (47), 16 (26), 143 (55), 133 (18), 93 (28), 84 (46), 57 (43), 41 (30).



(11*R*)-11, 13- Dihidroacetilchukuhriólida (35)

Características físicas y espectroscópicas:⁷⁰⁻⁷⁷

Aceite

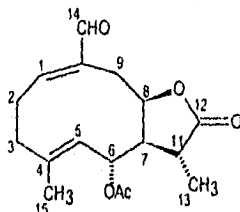
IR (CDCl₃ cm⁻¹) (Espectro 26) 2953, 2928, 2855, 1773, 1732, 1685, 1630, 1460, 1373, 1179, 1009, 945.

RMN¹H (300 MHz CDCl₃, experimento COSY δ) (Espectros 27 y 28): 9.44 (1H, d, J 1.5, H-14), 6.62 (1H, td, J 7.5, 2.1, H-1), 5.77 (1H, dt, J 12, 5.1, H-8), 5.14 (1H, t, J 10.6, H-6), 4.68 (1H, d, J 10.5, H-5), 2.82 (1H, dda, J 12.5, J, H-9a), 2.62 (1H, q, J 7.8, H-11), 2.51 (1H, m, J 6.3, H-2a), 2.37 (1H, ddd, J 12, 6.6, 1.6, H-3b), 2.21 (2H, ta, J 12.3, H-9b y H-2b), 2 (3H, s, CH₃-AcO-), 1.98 (1H, m, H-7), 1.94 (3H, s, CH₃-15), 1.36 (3H, d, J 7.8, CH₃-13).

RMN¹H (300 MHz C₆D₆, experimento COSY δ) (Espectro 30): 9.02 (3H, d, J 1.8, H-14), 5.86 (1H, dt, J 11.4, 5, H-8), 5.57 (1H, ddd, J 8.1, 6.7, 1.9, H-1), 5.29 (1H, t, J 10.6, 10.6,

H-6), 4.35 (1H, da, J 10.2, H-5), 2.63 (1H, e, J 7.7, H-11), 2.63 (1H, m, H-9a), 1.59 (3H, d, J 1.2, CH₃-15), 1.52 (3H, s, -COOCH₃), 1.06 (3H, d, J 8.1, CH₃-13).

RMN¹³C (75 MHz D₆D₆ δ) (Espectro 29) 195.56 (C-14), 178.12 (C-12), 154.84 (C-1), 141.34 (C-10), 137.31 (C-4), 123.74 (C-5), 70.38 (C-8), 48.95 (C-6), 41.23 (C-7), 37.35 (C-3), 29.69 (C-9), 27.63 (C-2), 17.05 (C-15), 14.78 (C-13).



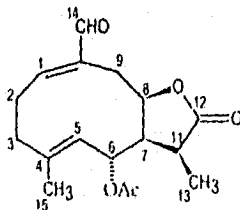
(35)

(11S)-11,13-Dihidroacetileschkulriólida (36)

IR (CDCl₃, cm⁻¹) (Espectro 32) 3686, 2937, 2857, 1769, 1730, 1687, 1522, 1429, 1011, 932.

RMN¹H (300 MHz CDCl₃, experimento COSY δ) (Espectro 32): 9.46 (1H, d, J 1.8, H-14), 6.63 (1H, ddd, J 9.6, 7.2, 2.3, H-1), 5.53 (1H, dt, J 12, 5.8, H-8), 5.29 (1H, dd, J 10.6, 10.6, H-6), 4.65 (1H, da, J 9.6, H-5), 2.96 (1H, q, J 6.8, H-11), 2.8 (1H, dda, J 14.4, 4.29, H-9a), 1.96 (3H, s, COOCH₃), 1.92 (3H, s, CH₃-15), 1.20 (3H, d, J 6.8, CH₃-13).

RMN¹H (300 MHz C₆D₆, experimento COSY δ) (Espectro 33): 9.06 (1H, d, J 1.8, H-14), 5.57 (1H, ddd, J 9.4, 7, 2.6, H-1), 5.43 (1H, dt, J 12, 5.8, H-8), 5.38 (1H, dd, J 10.3, 10.6, H-6), 4.30 (1H, da, J 9.1, H-5), 2.56 (1H, dda, J 14.4, 4.2, H-9a), 2.12 (1H, q, J 7.1, H-11), 1.53 (3H, s, CH₃-15), 1.53 (3H, s, -COOCH₃), 1.07 (3H, d, J 7.3, CH₃-13).



(36)

Bioensayo de letalidad frente a *Artemia salina*¹²

Material

1. *Artemia salina* (huevecillos)
2. Sal de mar.
3. Pecera pequeña.
4. Jeringas; 5 µl, 0.5 µl, 100 µl y 10 µl.
5. Viales (9 por muestra)

Procedimiento

- 1.- Preparar agua de mar de acuerdo a las instrucciones de la caja (aproximadamente 38 g de sal de mar por litro de agua).
2. Colocar el agua de mar en una pecera pequeña y adicionar huevecillos de *Artemia salina*. Colocar la luz de una lampara encima de la pecera. Mantener la temperatura del agua a 28 °C.
- 3.- Mantener las condiciones de temperatura y luz durante dos días para permitir la maduración de los huevecillos de *Artemia salina*.
- 4.- Preparar viales para el análisis: para cada fracción, analizar inicialmente a 1000, 100 y 10 µg/ml; preparar 3 viales a cada concentración para un total de nueve viales; pesar 20 mg de muestra y adicionar 2 ml de disolvente (20 mg por 2ml), de esta solución transferir 500, 50 o 5 µl a los viales correspondientes a 1000, 100 y 10 µg/ml, respectivamente. Evaporar el disolvente con nitrógeno y después colocar a alto vacío aproximadamente 30 minutos. Los disolventes volátiles pueden evaporarse durante 12 hrs.
- 5.- Después de 2 días (cuando la larva de *Artemia* ha emergido), adicionar 5 ml de agua salada a cada vial y agregar 10 individuos por vial (30 Artemias por dilución).
- 6.- 24 horas más tarde contar y registrar el número de sobrevivientes.
- 7.- Analizar los datos con el programa Finney de cómputo para determinar el valor de CL₅₀ y el intervalo de confianza de 95%.¹²

Resultado del ensayo frente a *Artemia salina* de extractos y fracciones de *Schikuria schikurioides*.

Extracto o fracción	Porcentaje de muertos a las 24 horas			CL ₅₀ ppm
	10 ppm	100 ppm	1000 ppm	
Extracto hexánico	0	1	2	>1000
Extracto acetónico	2	3	6	>1000
Fracción A *	0	1	0	>1000
" B *	1	2	3	>1000
" C *	2	4	8	>1000
" D *	1	2	9	>1000
" E *	3	4	6	>1000
" F *	2	3	3	>1000
" G *	2	3	5	>1000

Extracto o fracción	Porcentaje de muertos a las 24 horas			C.L., ppm
" H *	1	3	5	>1000
" Y *	0	2	7	>1000
" J *	0	0	5	>1000
" K *	1	1	3	>1000
" L *	1	3	5	>1000
" M *	1	1	2	>1000

Resultados del bioensayo frente a *Artemia salina* de los metabolitos secundarios aislados de *Schkueria schkuerioides* y derivados.

Compuesto	Porcentaje de muertos a las 24 horas			C.L., ppm
	10 ppm	100 ppm	1000 ppm	
Eschkubriólida (12)	0	3	13	>1000
Frutescina (14)	1	25	29	50.21
Acetil β -Amirina (41)	0	0	3	>1000
Acido Frutescínico (28)	1	3	4	>1000
Acetil eschkubriólida (47)	2	20	29	64.61
Allo-eschkubriólida (32)	0	1	24	454.5
11,13-Dihidroeriolina (13)	0	1	30	268.16

Pruebas antibacterianas¹³

Técnica

Método de dilución en agar para determinar la concentración mínima inhibitoria CMI.

1.- 10 mg de cada compuesto puro se disolvieron en 1 ml de DMSO (Con excepción del ácido frutescínico (28) que se disolvió en un ml de Twin-H₂O 50:50).

2.- En cada una de las cajas petri estériles se mezclaron 5 ml de agar No. 1 para antibióticos Art. 5272 (previamente esterilizado y caliente) con 50, 100 ó 200 μ l de la solución, del compuesto puro en estudio, para alcanzar una concentración de 100 200 ó 400 μ g por ml de agar.

3.- Se prepararon cajas petri control. Una con solamente agar No. 1 para antibióticos Art. 5272 (control 1) y otra con agar No. 1 para antibióticos Art. 5272 más 50, 100 o 200 ml de DMSO (control 2).

4. Una vez que el agar se solidificó, se colocaron en un punto de su superficie 2 μ l de una suspensión del microorganismo de ensayo que contiene 10⁴ Unidades Formadoras de Colonias/ml. Se pueden colocar más de dos microorganismos de ensayo en la misma caja, dejando una distancia considerable entre cada punto de aplicación para poder observar el aro de crecimiento de cada uno.

5.- Las cajas petri fueron incubadas a 37 °C y se observó el crecimiento del microorganismo a las 24 horas. Los resultados se expresaron como la concentración más baja del producto puro, que inhibe por completo el desarrollo de los microorganismos de ensayo, concentración mínima inhibitoria (MIC).

Concentración de ensayo

100 μ g/ml
200 μ g/ml
400 μ g/ml

Microorganismos de ensayo	clasificación
(<i>Sa</i>) <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC-29213
(<i>Ec</i>) <i>Escherichia coli</i>	ATCC-25922
(<i>Pa</i>) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC-27853
(<i>St</i>) <i>Salmonella typhi</i>	ATCC-06539
(<i>Cu</i>) <i>Candida albicans</i>	ATCC-10231

Resultados

Compuesto	CMI (µg/ml)				
	<i>Sa</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>St</i>	<i>Cu</i>
Eschkuhriólida (12)	*	*	*	*	*
Frutescina (14)	200	*	*	*	200
Acido frutescínico (28)	400	*	*	*	*
Acetil eschkuhriólida (47)	*	*	*	*	*
Allo-eschkuhriólida (32)	400	*	*	*	*
11,13-Dehidroeritolina (13)	200	*	*	400	400
Isoeschkuhriólida (45)	*	*	*	*	400
Pirazolina de 11,13-dehidroeritolina (49)	*	*	*	*	*
4,5-Epoxi-eschkuhriólida (46)	*	*	*	400	*

* >400 µg/ml

Pruebas antifúngicas

- 1.- 10 mg de cada compuesto se disolvieron en 1ml de DMSO (con excepción de el ácido frutescínico que se disolvió en 1 ml de twin-H₂O 50:50).
- 2.- En cada una de las cajas petri esteriles se mezclaron 3 ml de agar Glucosa 4 %-Sabouraud (previamente esterilizado y caliente) con 120 µl de la solución, del compuesto puro en estudio, para alcanzar una concentración de 400 µg por ml de medio de cultivo.
- 3.-Se prepararon cajas petri control. Una con solamente agar Glucosa 4 %-Sabouraud (control 1) y otra con agar Glucosa 4 %-Sabouraud más 120 ml de DMSO (control 2).
- 4.- Una vez que el agar se solidificó, se colocaron en un punto de su superficie 10 µl de una suspensión de esporas del microorganismo de ensayo (C=5 x 10⁶ esporas por ml).Se pueden colocar más de dos microorganismos de ensayo en la misma caja, dejando una distancia considerable entre cada punto de aplicación para poder observar el aro de crecimiento de cada uno.
- 5.-Las cajas petri fueron incubadas a 29 °C y se observó el crecimiento del microorganismo a las 72 horas. Los resultados se expresaron como la concentración más baja del producto puro, que inhibe por completo el desarrollo de los microorganismos de ensayo, concentración mínima inhibitoria (MIC).

Concentración de ensayo

400 µg/ml
200 µg/ml
100 µg/ml

Microorganismos de ensayo	Clasificación
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	NRRL 1911
<i>Trichophyton gypsum</i>	NRRL A-760

Resultados

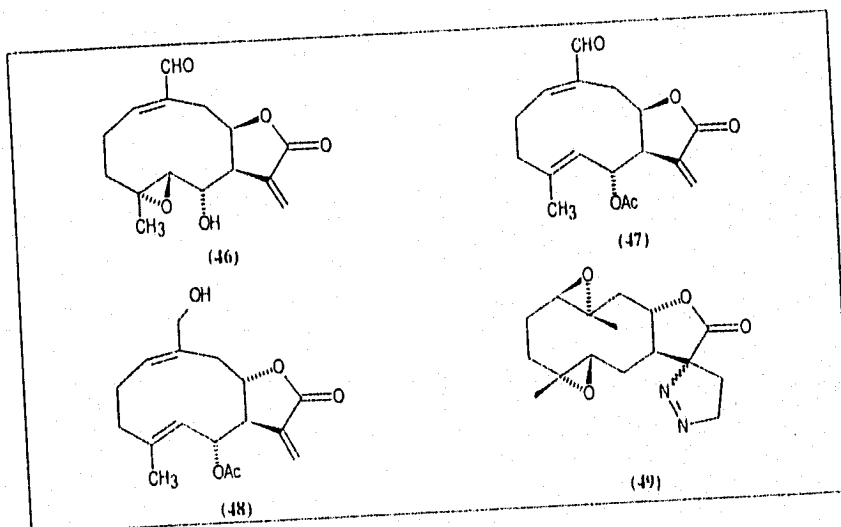
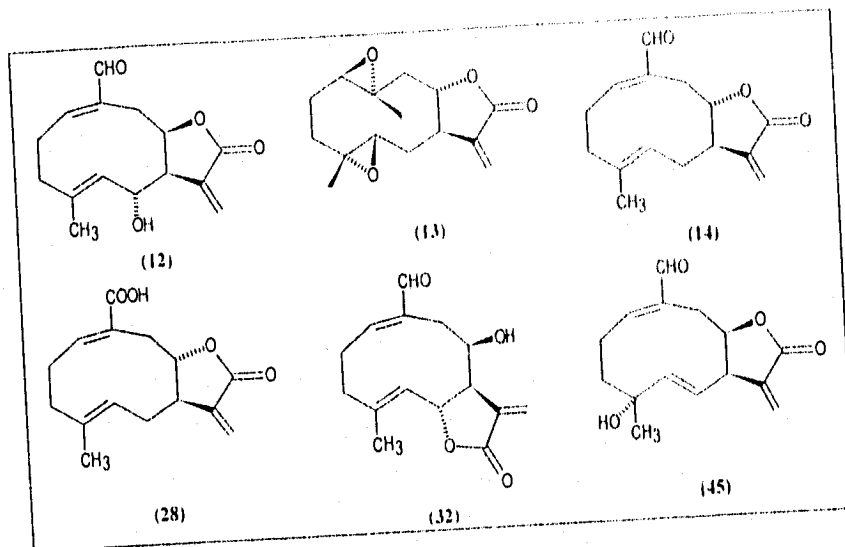
Compuesto	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. gypsum</i>
Eschkuhriólida (12)	*	*
Frutescina (14)	400	400
Acido Frutescínico (28)	*	*
Acetil eschkuhriólida (47)	400	400
<i>Allo</i> -eschkuhriólida (32)	*	*
11,13-Dehidroeriolina (13)	400	400
Isoeschkuhriólida (43)	*	400
Pirazolina de 11,13-dehidroeriolina (49)	*	*
4,5-Epoxi-eschkuhriólida (46)	*	*

* > 400 $\mu\text{g/ml}$

Bioevaluaciones citotóxicas¹⁴⁻¹⁵

KB, COLON y UISO, fueron cultivadas en medio basal Eagle (BME) conteniendo 10 % de suero bovino fetal y 1 % de un complejo de antibióticos (penicilina y estreptomocina). Las células fueron cultivadas en frascos T25 en una incubadora con atmosfera de CO₂-aire humedo, 5:95 a 37 °C. Las células se mantuvieron a 6-10 x 10⁴ células/ml intercambiando el medio 2-3 veces por semana y subcultivandolas al menos 2 semanas antes del tratamiento de las muestras. Para subcultivar las células adheridas se uso tripsina al 0.25 % p/v, y verseno 0.02 % p/v, en suero bovino fetal. Para determinar la citotóxicidad de los compuestos en las líneas celulares humanas cancerigenas, inicialmente 2.85 ml de suspensión celular (2.8 x 10⁴ células/ml) fueron adicionadas a cada tubo e incubadas a 37 °C por un día. Después 150 μl de muestra en DMSO al 10 %, con una concentración de 100, 10 y 1 $\mu\text{g/ml}$ fueron tratadas, los tubos fueron cultivados tres días. A la muestra se le determina el 50 % de inhibición del crecimiento celular comparado con el control no tratado. Las células viables fueron contadas indirectamente por el método de Lowry.

Compuesto	KB DE ₅₀ pg/ml	UISO DE ₅₀ pg/ml	COLON DE ₅₀ pg/ml
<i>Allo</i> -eschkuhriólida (32)	0.000575	1.82	0.9
Isoeschkuhriólida (45)	0.2398	1.41	1.3
4,5-Epoxi-eschkuhriólida (46)	0.3019	2.18	3
11,13-Dehidroeriolina (13)	0.75	2.08	0.9
Acetil eschkuhriólida (47)	0.65	7.94	1.4
Frutescina (14)	1.25	1.81	6.3
Acido frutescínico (28)	1.58	6.91	8.32
6-Acetil-eschkuhrioldiol (48)	3.63	2.29	1.3
Eschkuhriólida (12)	34.67	4.57	3.6
Pirazolina de 11,13-dehidroeriolina (49)	4	20.89	20



RESUMEN Y CONCLUSIONES

El análisis químico y evaluación biológica preliminar de *Schkuhria schkuhrioides* permitió la generación de conocimientos referentes tanto a los constituyentes de la flora como de la importancia de su actividad biológica.

En esta investigación se aislaron y caracterizaron por métodos químicos y espectroscópicos seis nuevos metabolitos secundarios: dos fenil propanoides, 8-hidroxi-6-metoxi-7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (37) y 7-hidroxi-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (38), y cuatro lactonas sesquiterpénicas del grupo de las melampólidas: ácido frutescínico (28), alloeschkuhriólida (32), (11R)-11,13-dihidroeschkuhriólida (35) y (11S)-11,13-dehidroeschkuhriólida (36). Estos resultados manifiestan la notable variación que existe en los constituyentes de este vegetal, ya que en estudios previos no se habían aislado, y por otra lado, varios metabolitos aislados previamente no se aislaron en esta ocasión. Tales variaciones pueden atribuirse a diversos factores (estado de madurez del vegetal, variaciones climáticas, edafológicas, la existencia de razas químicas, entre otros), por lo que es importante el estudio químico comparativo de esta especie incorporando variantes ecológicas.

En el estudio de letalidad frente a *Artemia salina* se observó que los extractos hexánico y acetónico no tuvieron actividad. Sin embargo algunos de los compuestos puros aislados del extracto acetónico fueron activos: ácido frutescínico (28), alloeschkuhriólida (32), eschkuhriólida (12), frutescina (14), 11,13-dehidroeriólina (13), así como acetil eschkuhriólida (47).

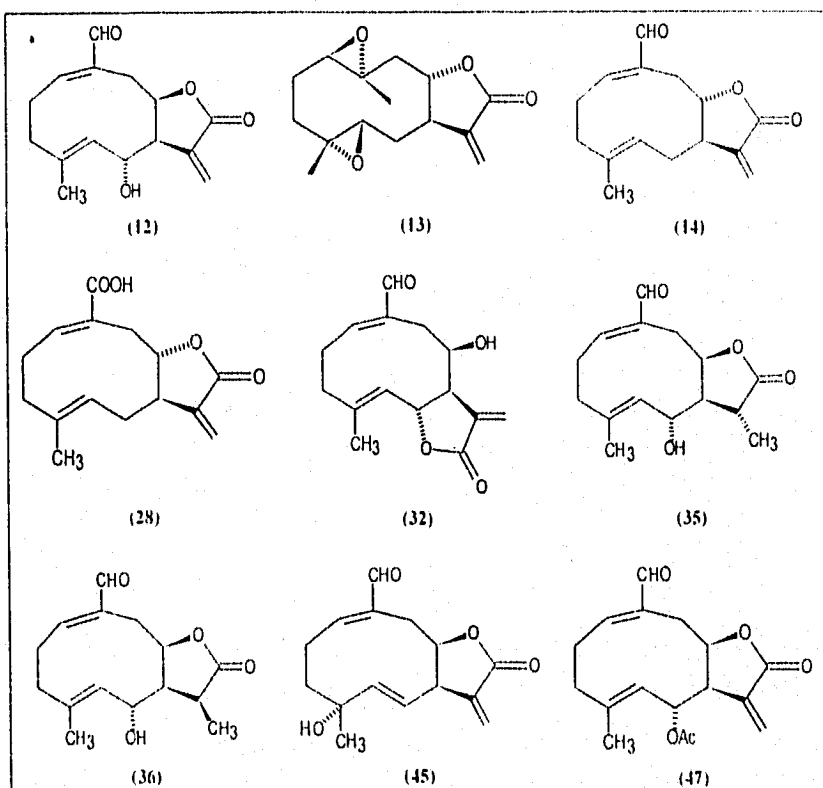
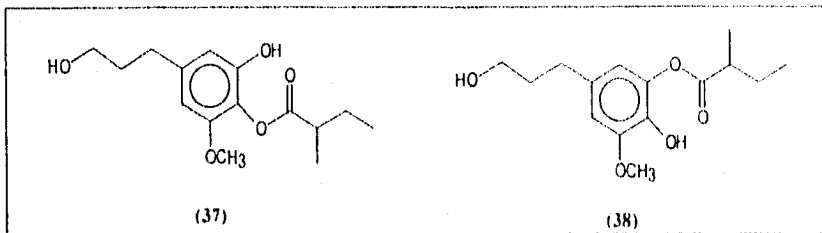
Es importante señalar que ninguna de las lactonas sesquiterpénicas bivalvadas mostraron actividad antibacteriana ni antifúngica, lo cual sugiere que no existe una relación directa entre toxicidad frente a *Artemia salina* y estas pruebas antimicrobianas.

Alla-eschkuhriólida (32), con el hidroxilo en C-8, e isoeschkuhriólida (45), con el hidroxilo en C-4 fueron compuestos más citotóxicos frente a las líneas celulares cancerígenas utilizadas: tumor nasofaríngeo (KB), cáncer de cérvix (HISO) y cáncer de colon (COLON), que aquellos que tienen el hidroxilo en C-6 o los que no tienen este grupo.

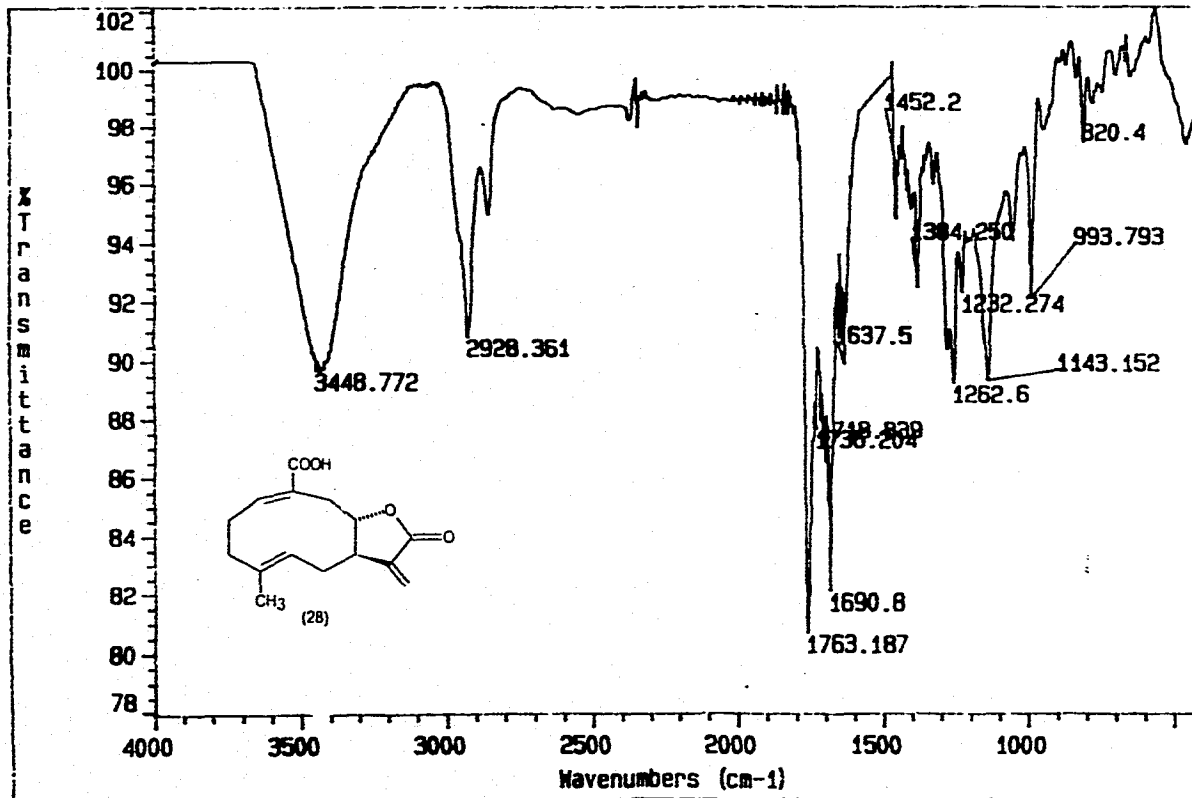
Schkuhria schkuhrioides tiene relación taxonómica con *Schkuhria pimata*²⁰ y con *Schkuhria virgata*,⁴ especies empleadas en la medicina tradicional, por lo que resulta interesante e importante conocer la potencialidad biológica de esta especie.

Conociendo que *Schkuhria schkuhrioides* tiene lactonas sesquiterpénicas citotóxicas frente a algunas líneas celulares cancerígenas, resulta conveniente conocer la actividad de estos compuestos en otras líneas celulares, así como de bioevaluar otras lactonas sesquiterpénicas presentes en esta especie, para poder establecer la relación entre la estructura molecular y la actividad biológica.

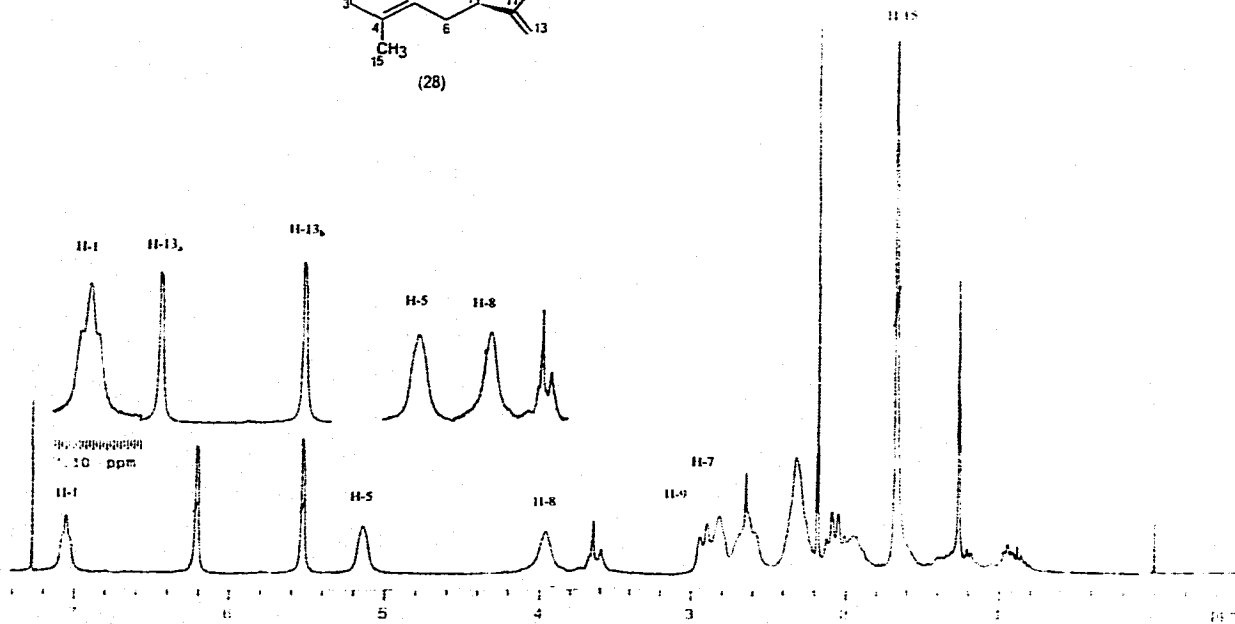
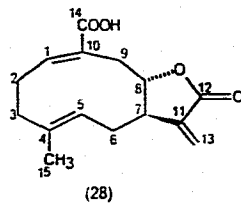
Puesto que las lactonas sesquiterpénicas tienen una amplia variedad de actividades biológicas es necesario realizar otras bioevaluaciones (por ejemplo fitotóxicas) que proporcionen un conocimiento más amplio al respecto.



ESPECTROS

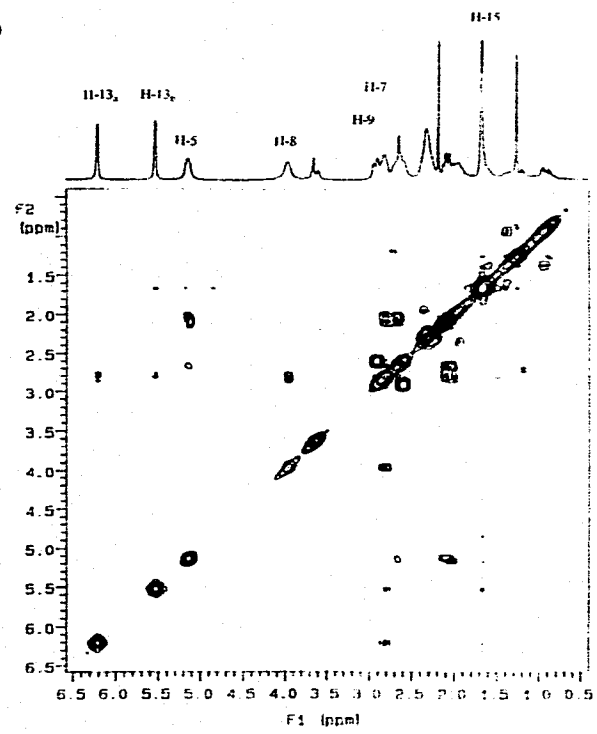
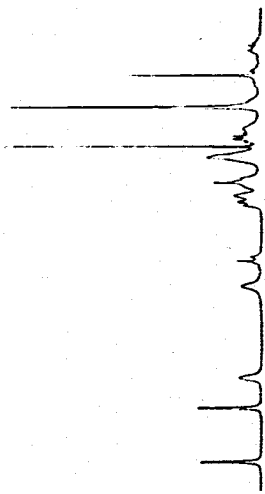
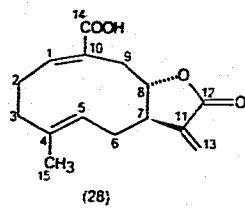


Espetro I. IR (KBr. cm⁻¹) del Ácido frutescínico (28)



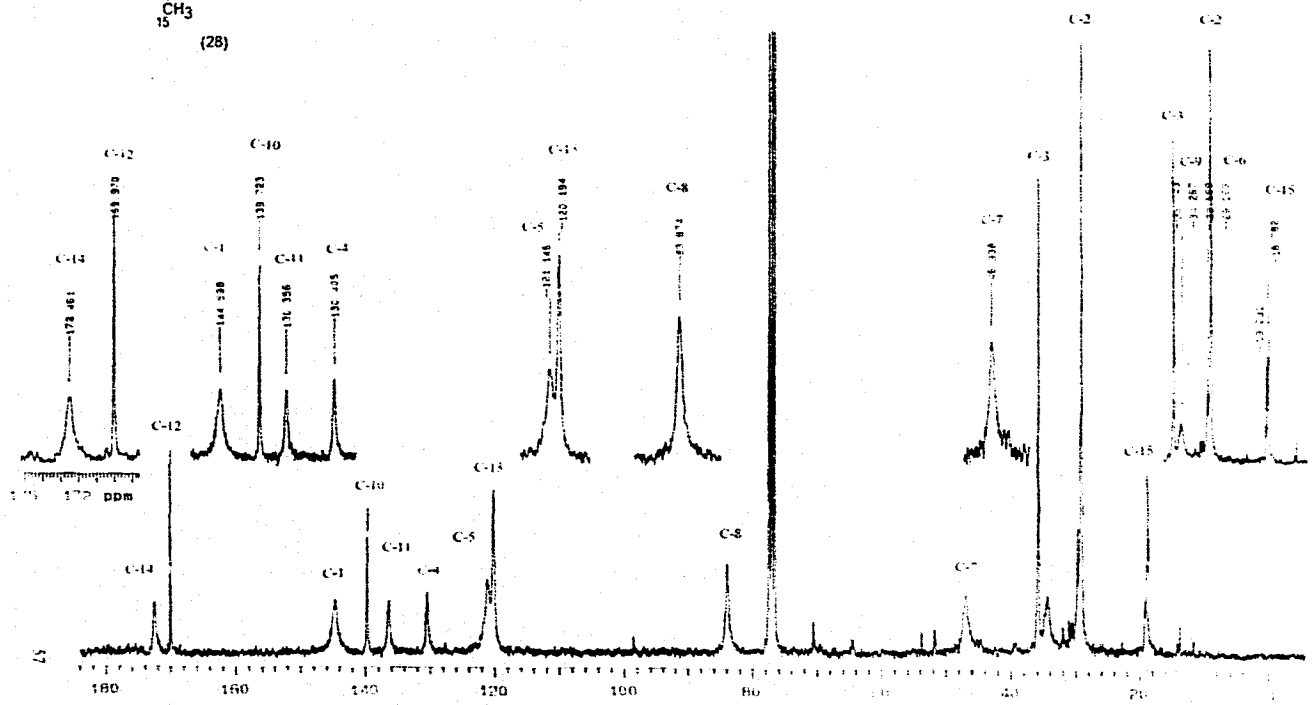
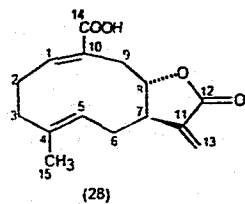
53

Espectro 2. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) del Ácido frutescínico (28)

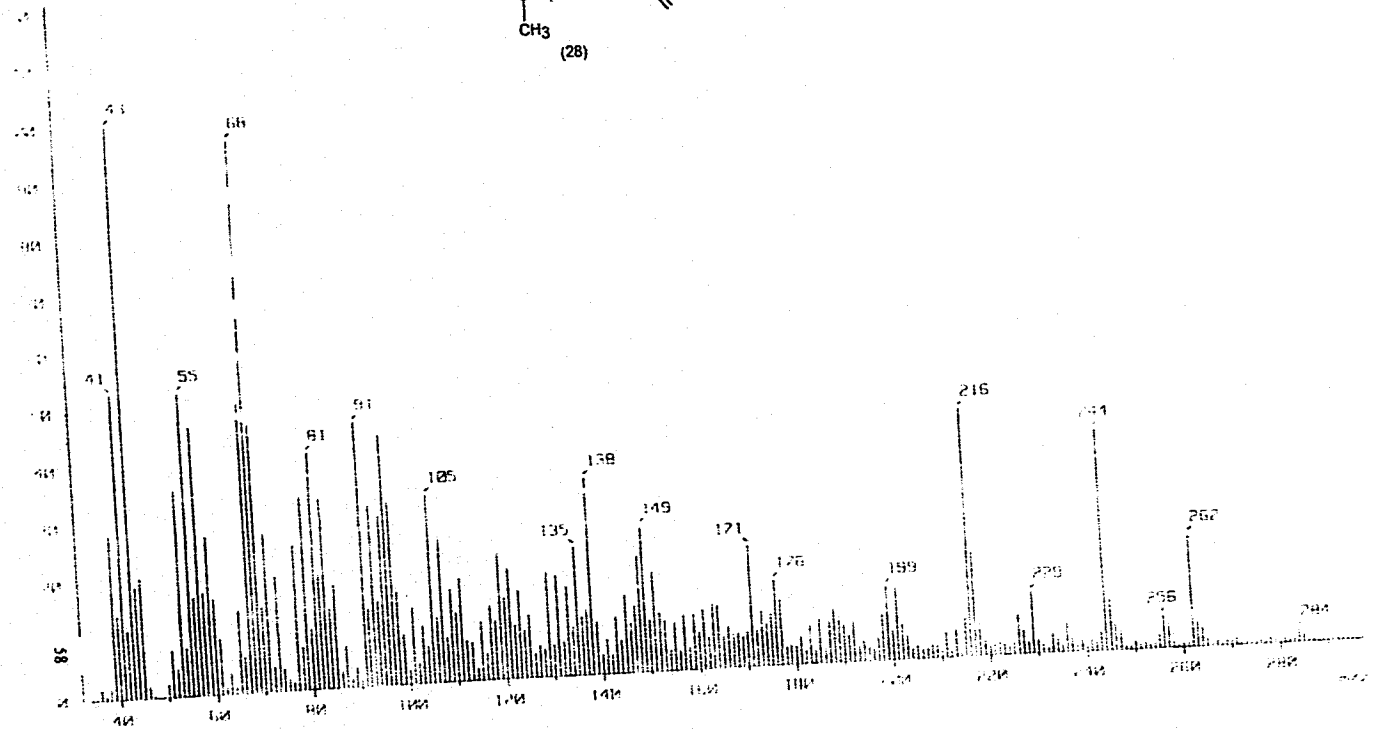
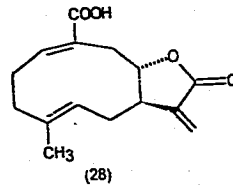


95

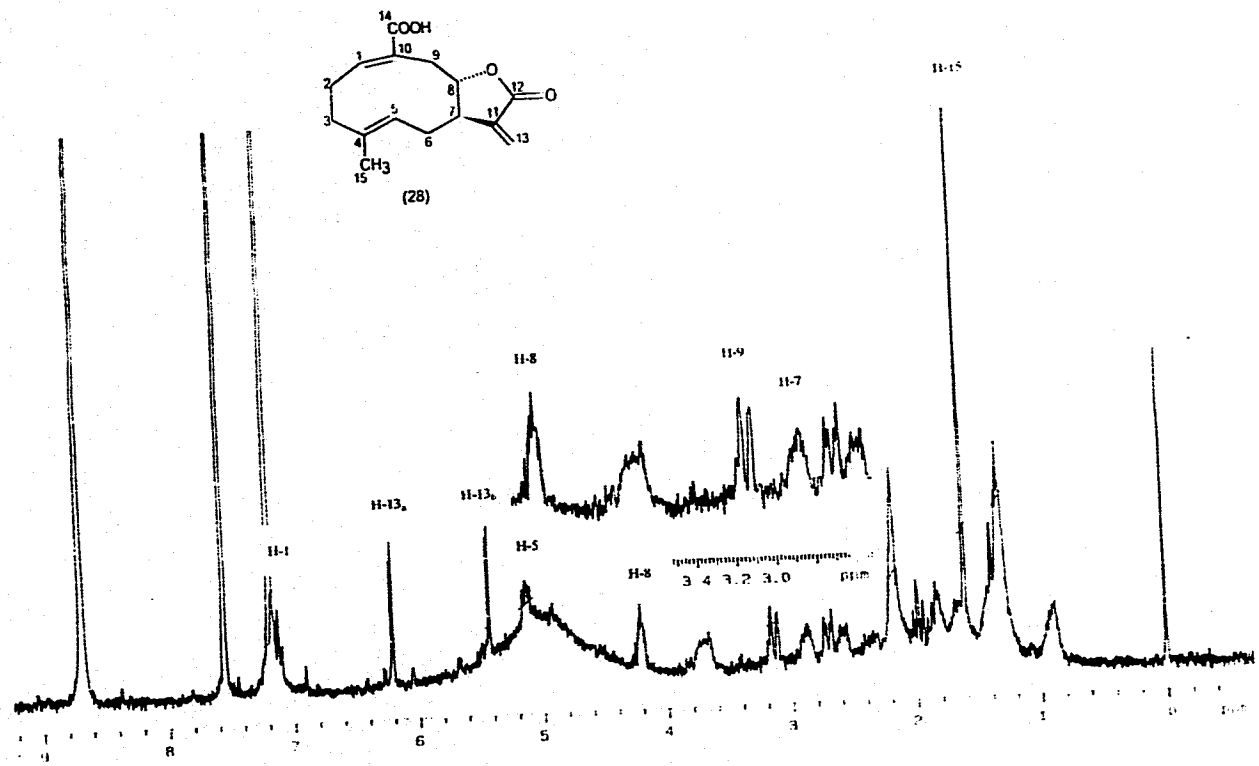
Espectro 3. COSY del Ácido frutescínico (28)



Espectro 4. RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) de Ácido frutescínico (28)

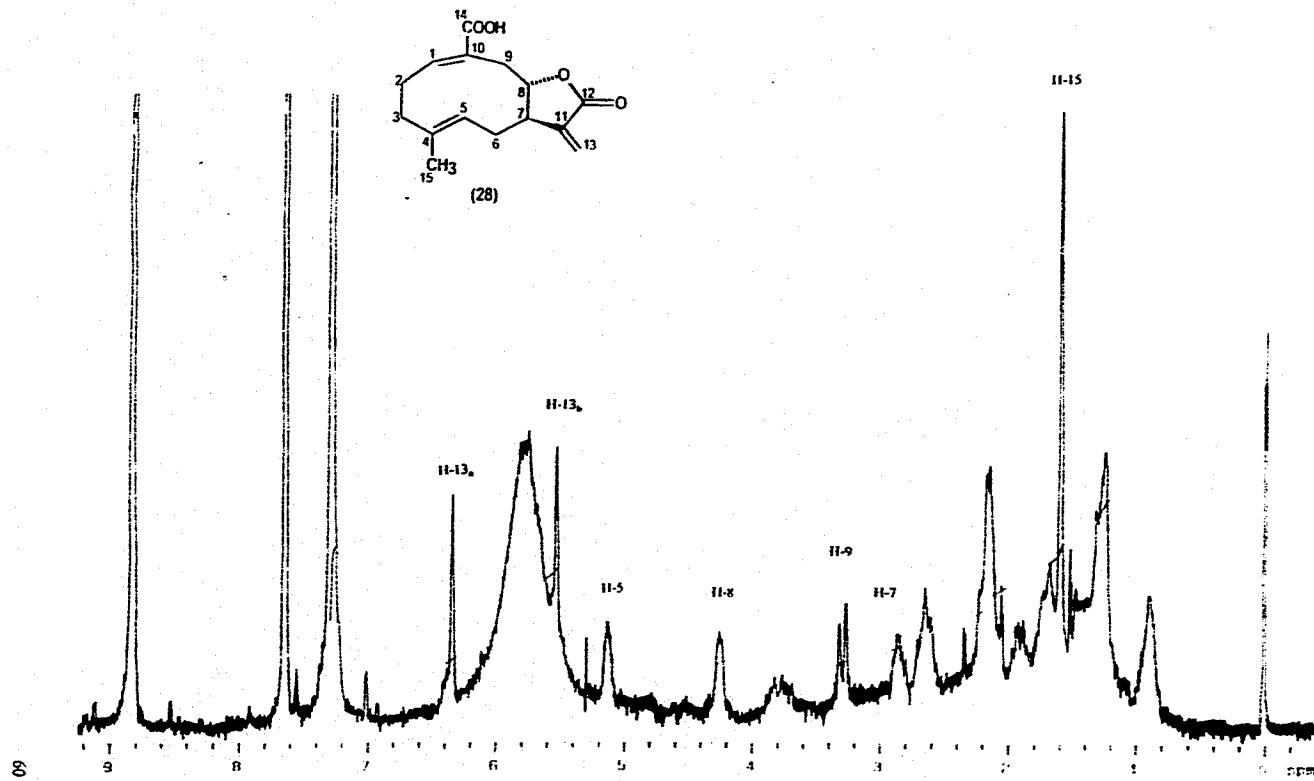


Espectro 5. EM (70 eV) del Ácido frutescínico (28)

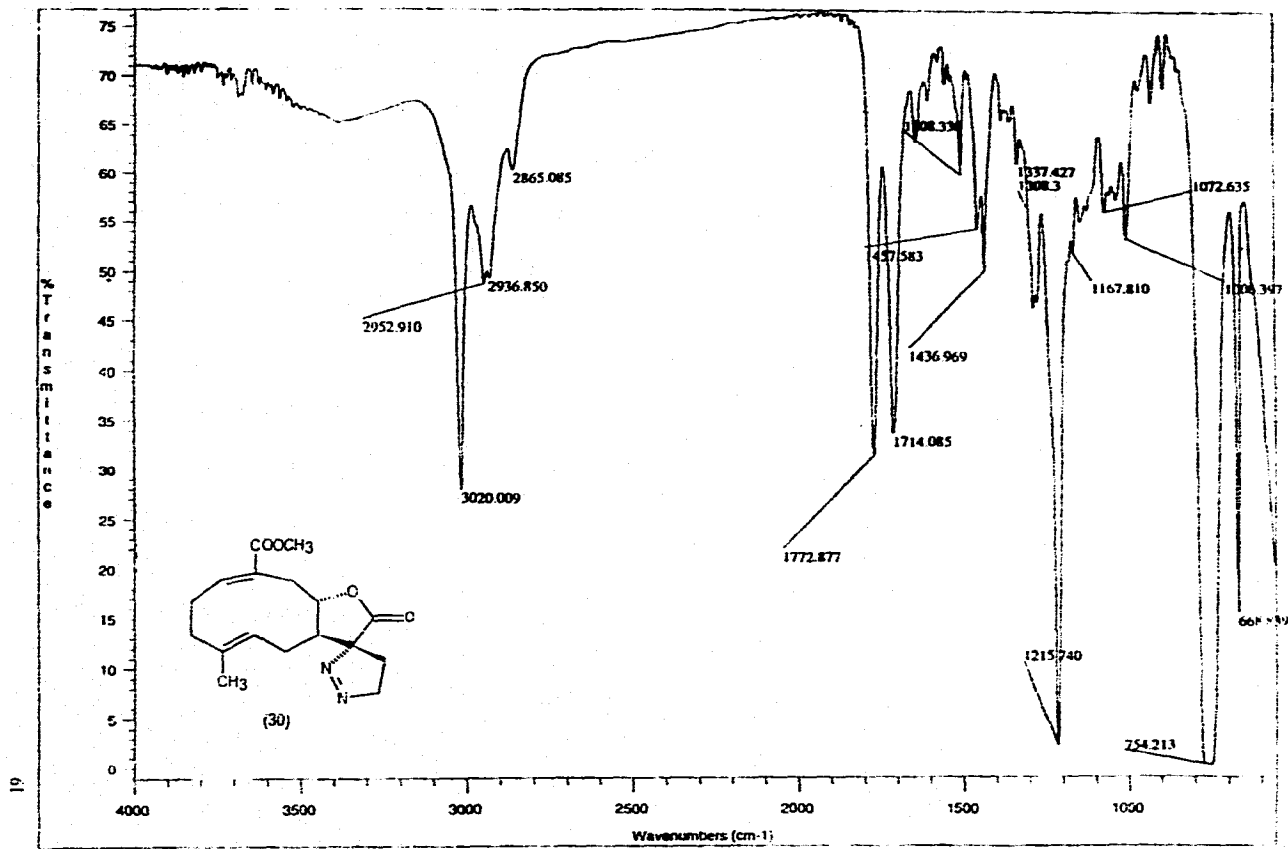


65

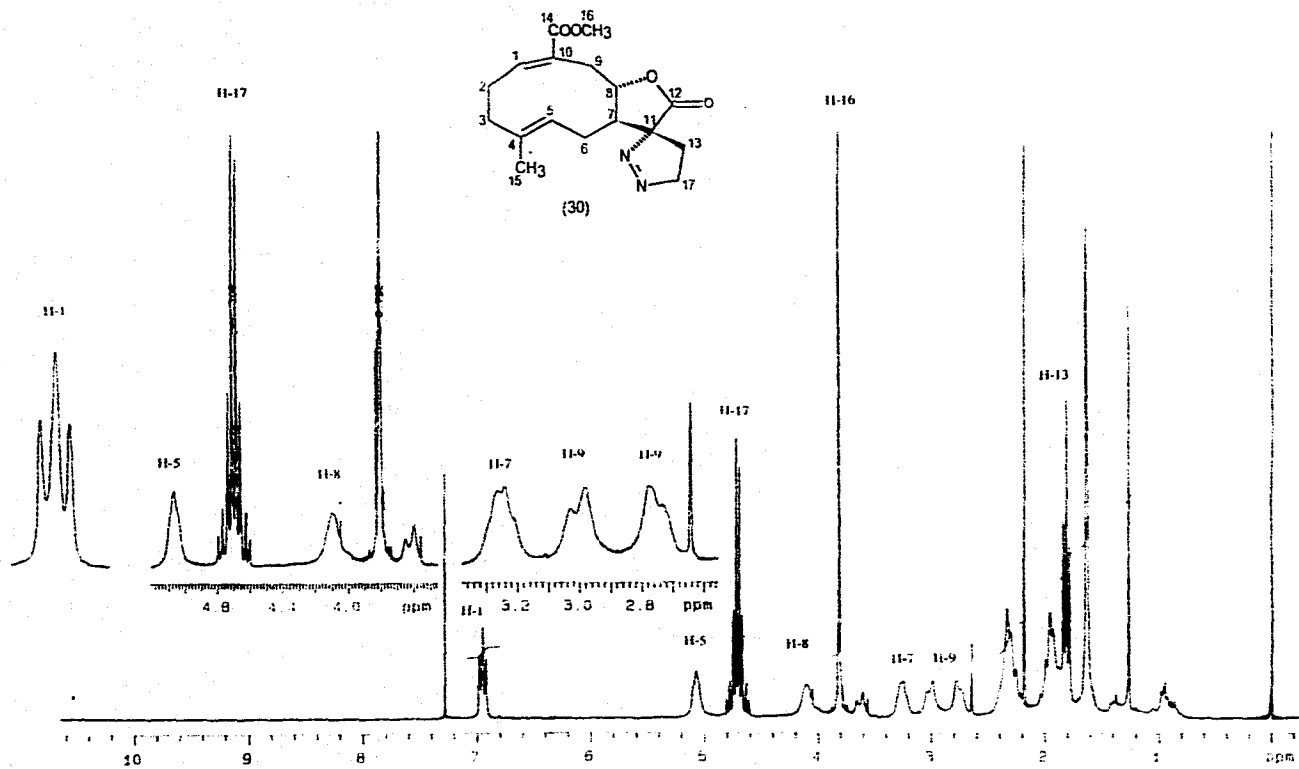
Espectro 6. RMN¹H (300 MHz, C₃D₃N, 75 °C) del Ácido frutescínico (28)



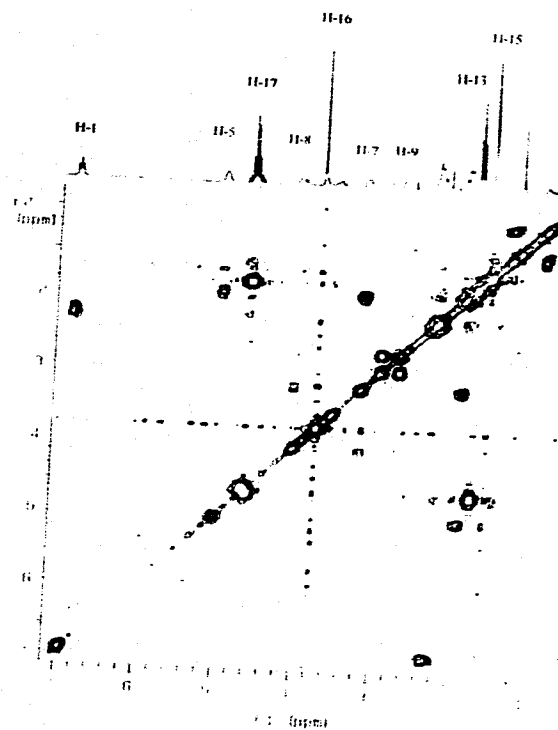
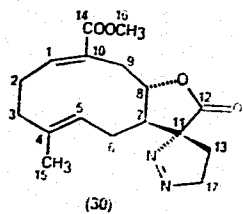
Espectro 7. RMN¹H (300 MHz, C₃D₃N, -30 °C) de Ácido itátescínico (28)



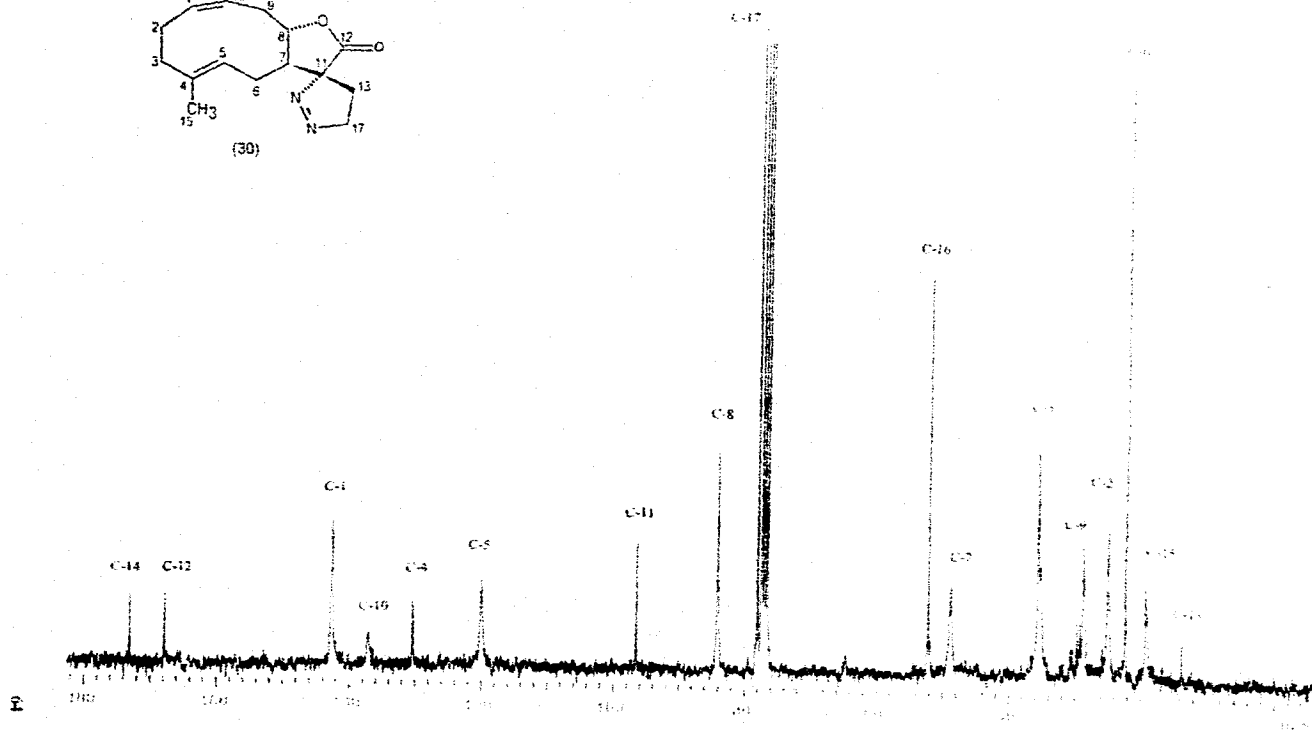
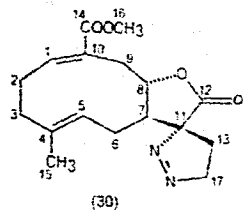
Espectro IR (CDCl₃, cm⁻¹) de la Pirazolina α del frutescinate de metilo (30)



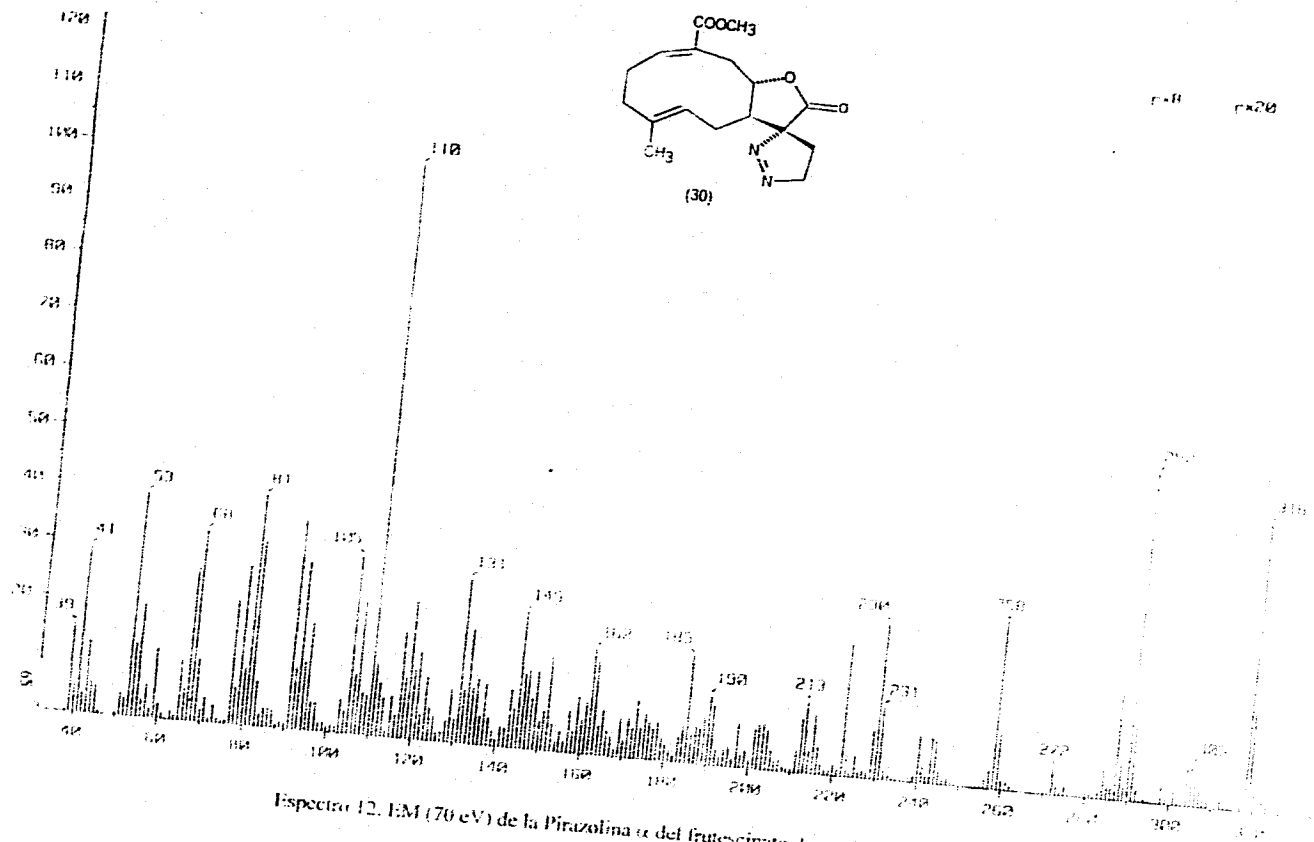
Espetro 9. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) de Pirazolina α del frutescinate de metilo (30)



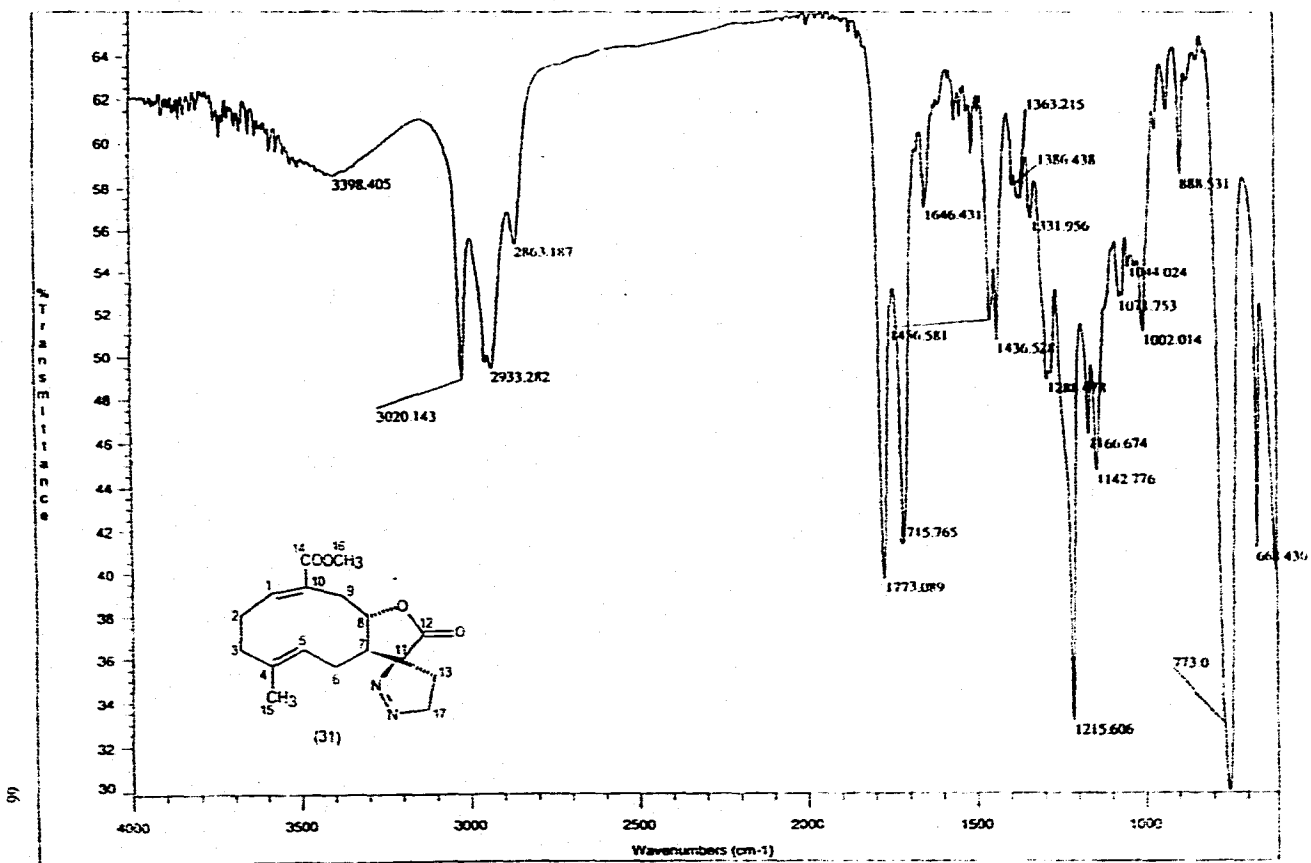
Espectro 10. COSY de la Pirazolina α del frutescinato de metilo(30)



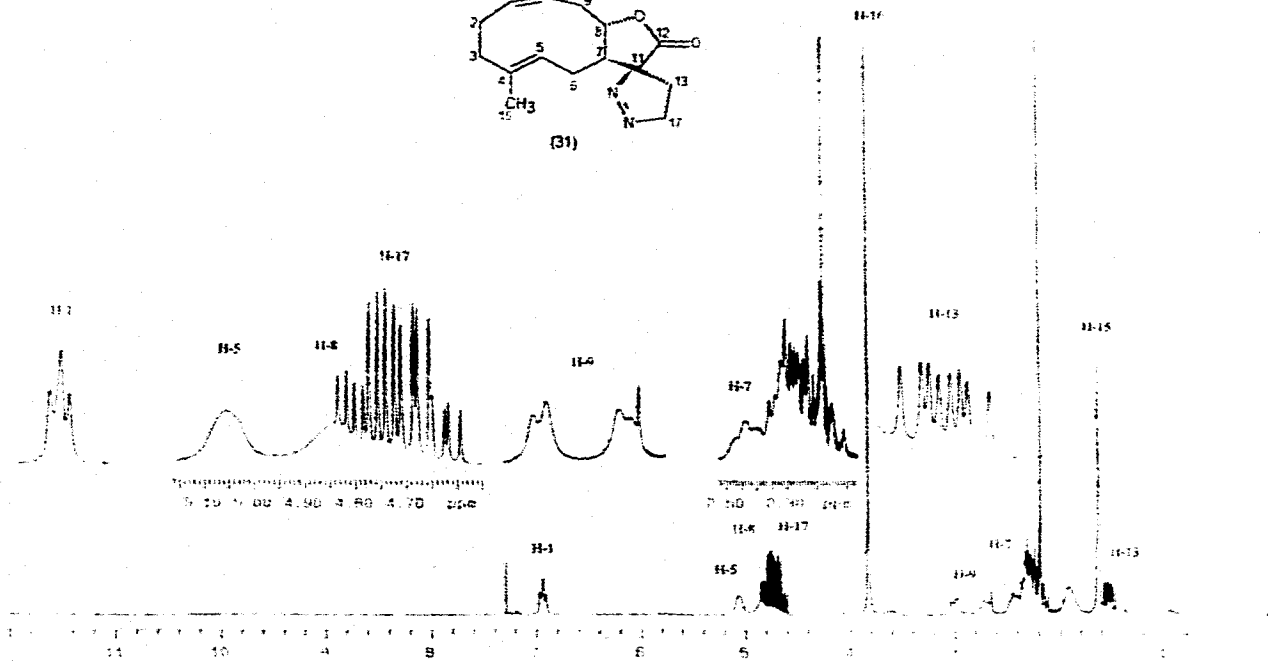
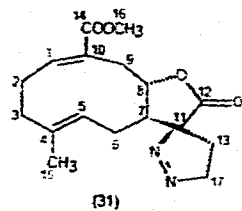
Espectro 11. RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) de la Pirazolina α del frutescinato de metilo (30)



Espectro 12. EM (70 eV) de la Pirazolina α del frutescimo de metilo (30)

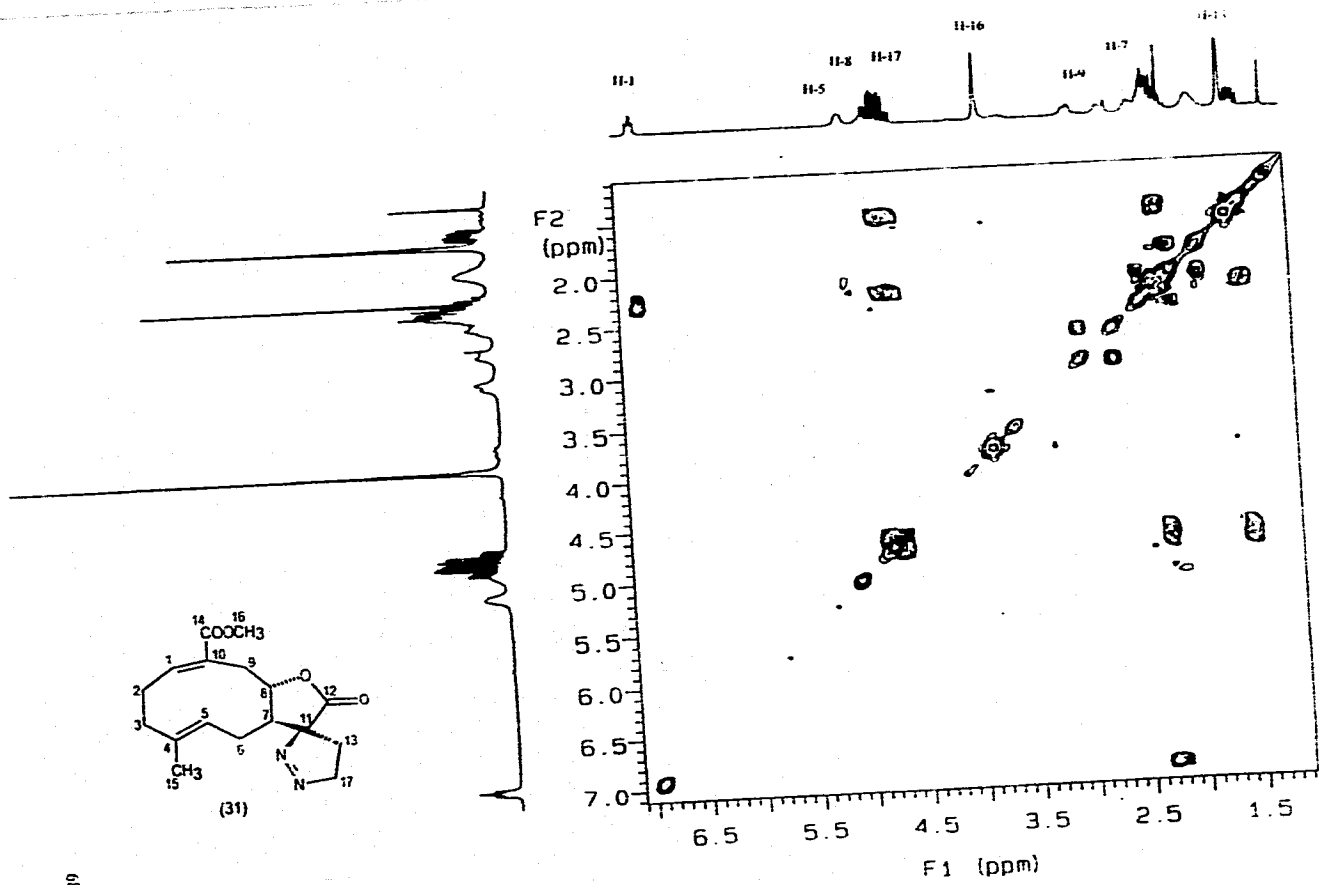


Espectro IR (CDCl₃, cm⁻¹) de la Pirazolina β del frutescinato de metilo(31)

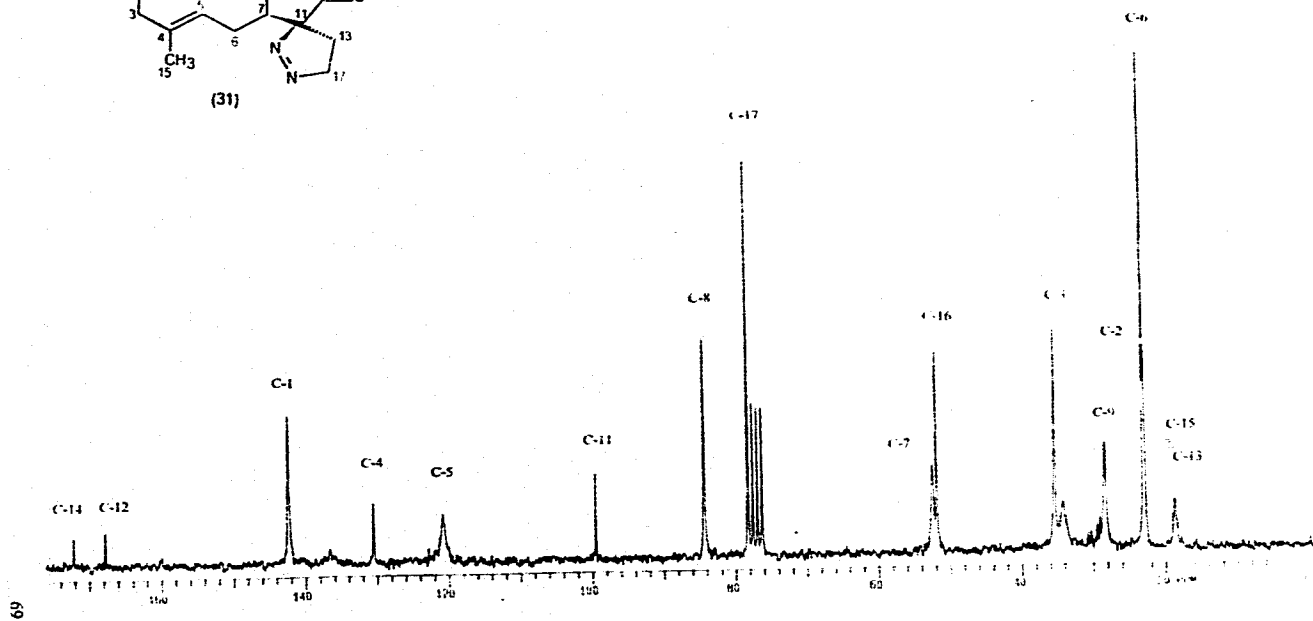
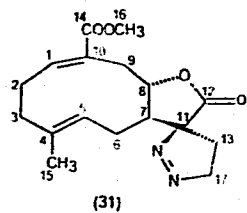


07

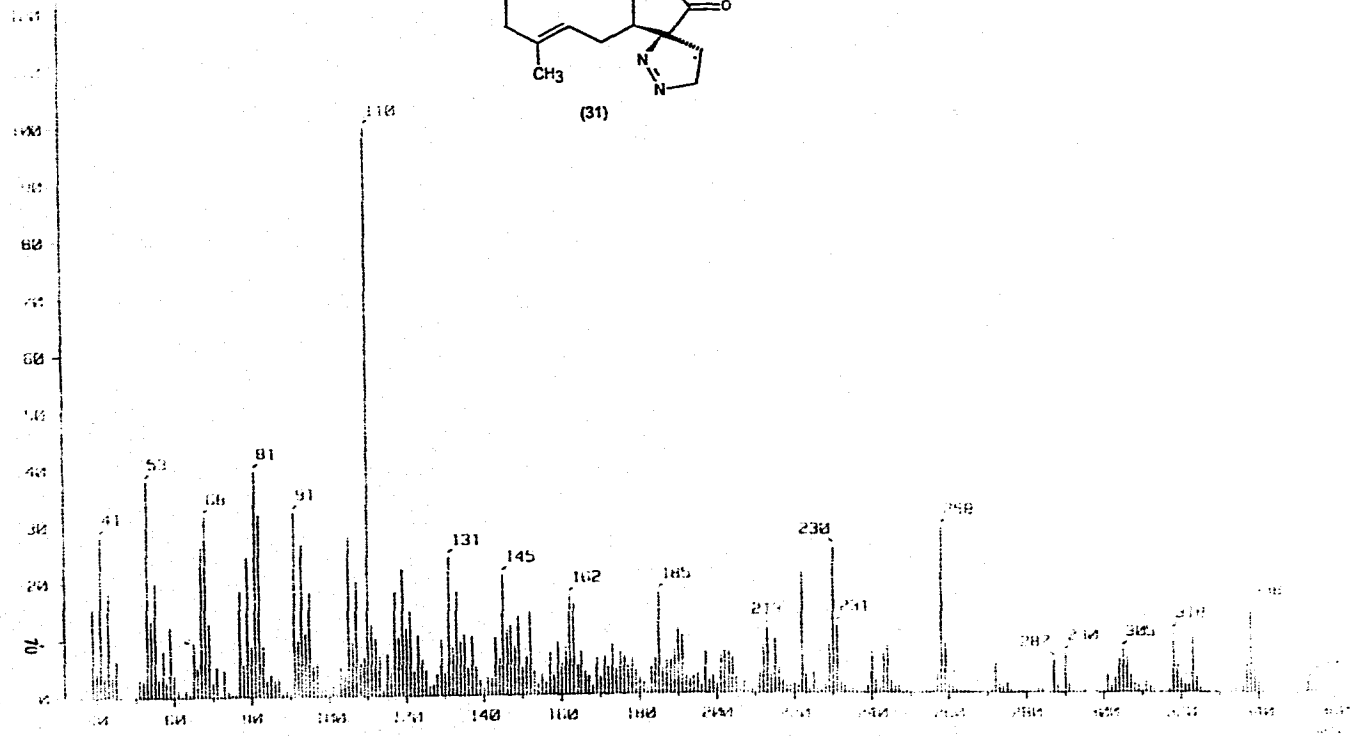
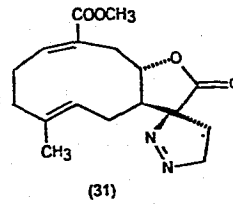
Espectro 14. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) de la Pirazolina β del frutescinate de metilo (31)



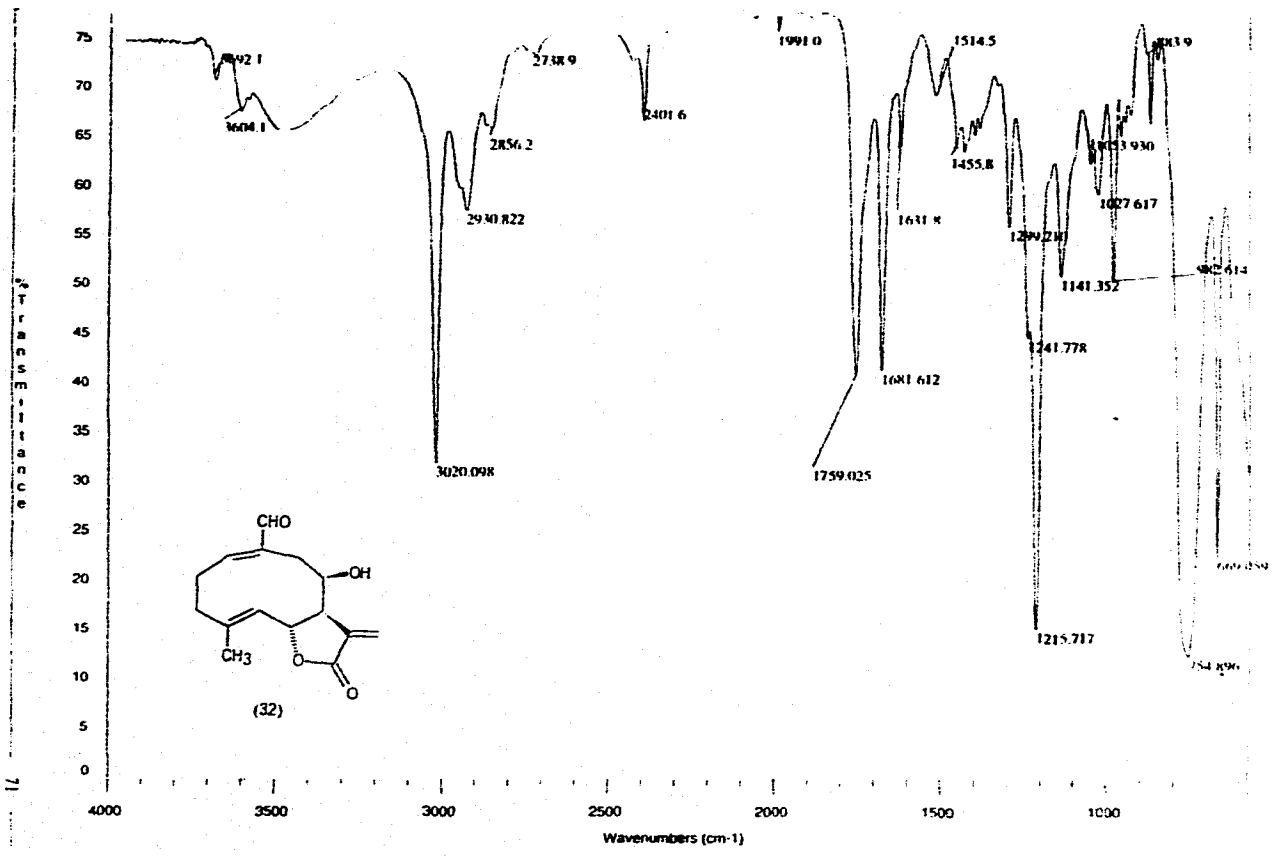
Espectro 15. COSY de la Pirazolina β del frutescinato de metilo(31)



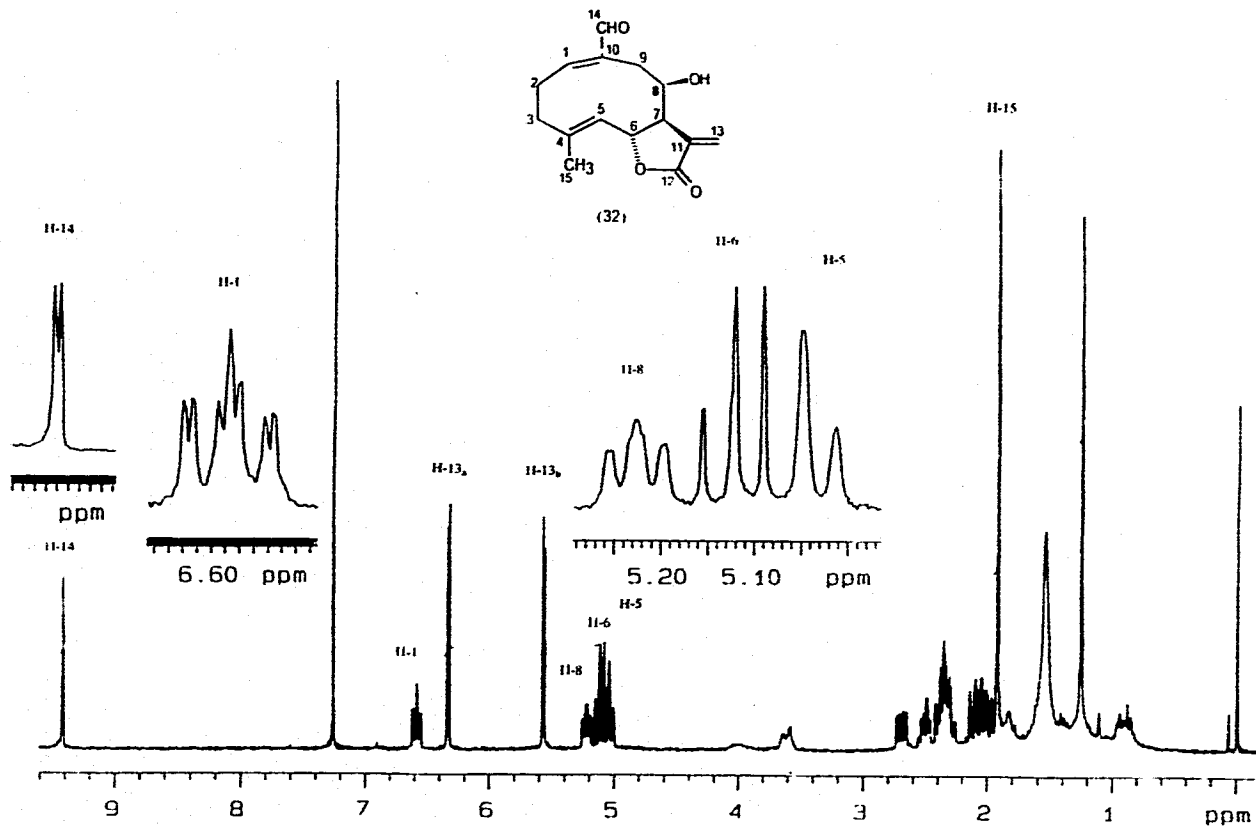
Espectro 16. RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) de la Pirazolina β del frutescato de metilo (31)



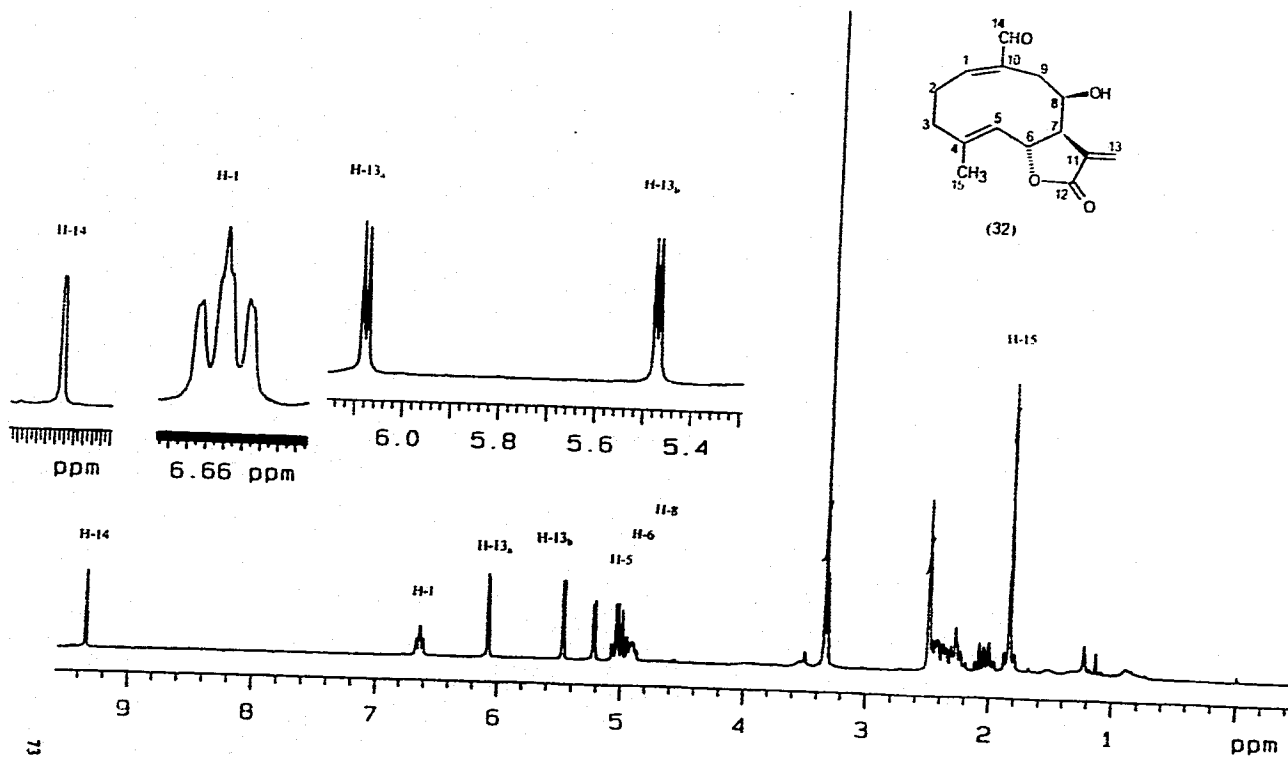
Espectro 17. EM (70 eV) de la Pirazolina β del frutescinaro de metilo(31)



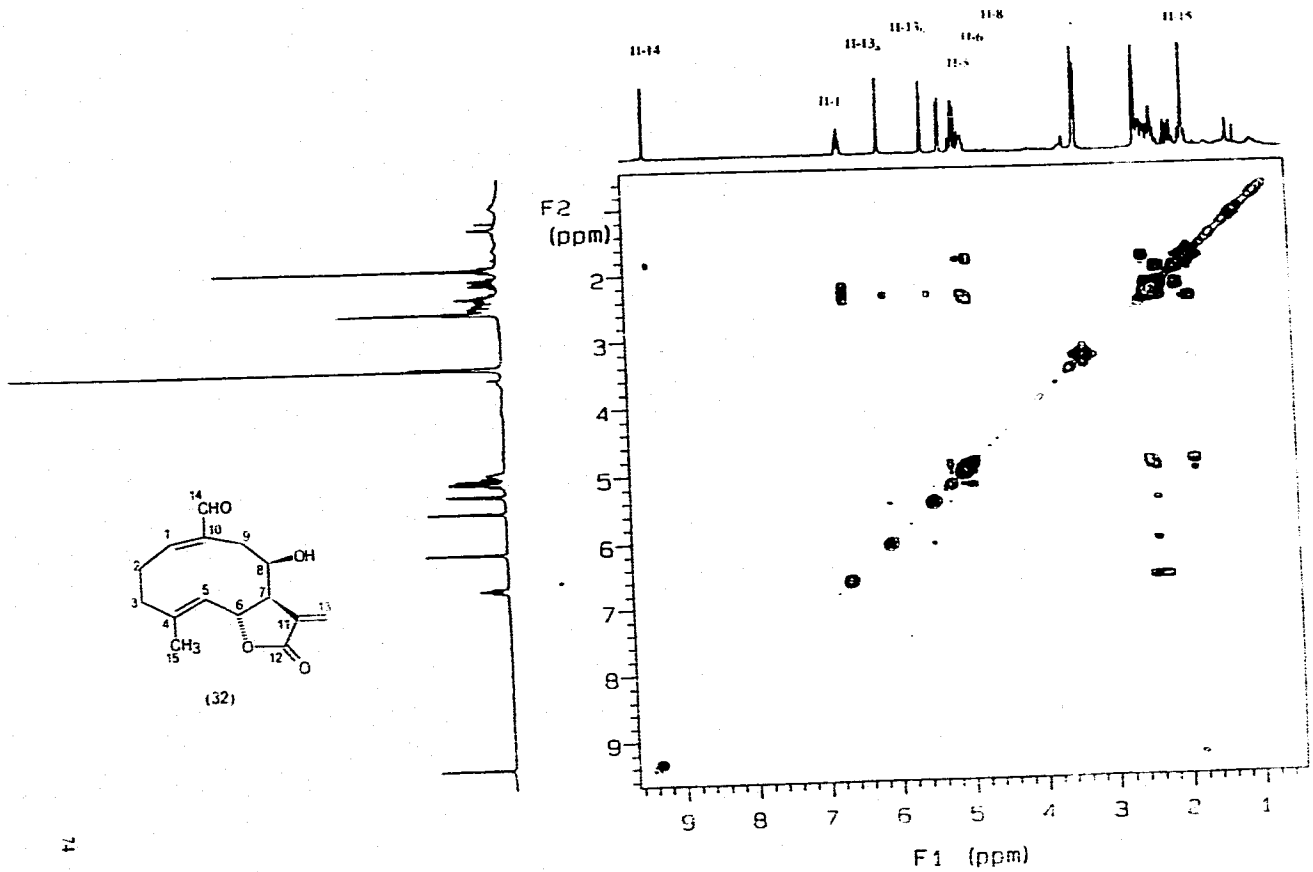
Espectro IR (CDCl₃, cm⁻¹) de *Allo-eschkuhiolida* (32)



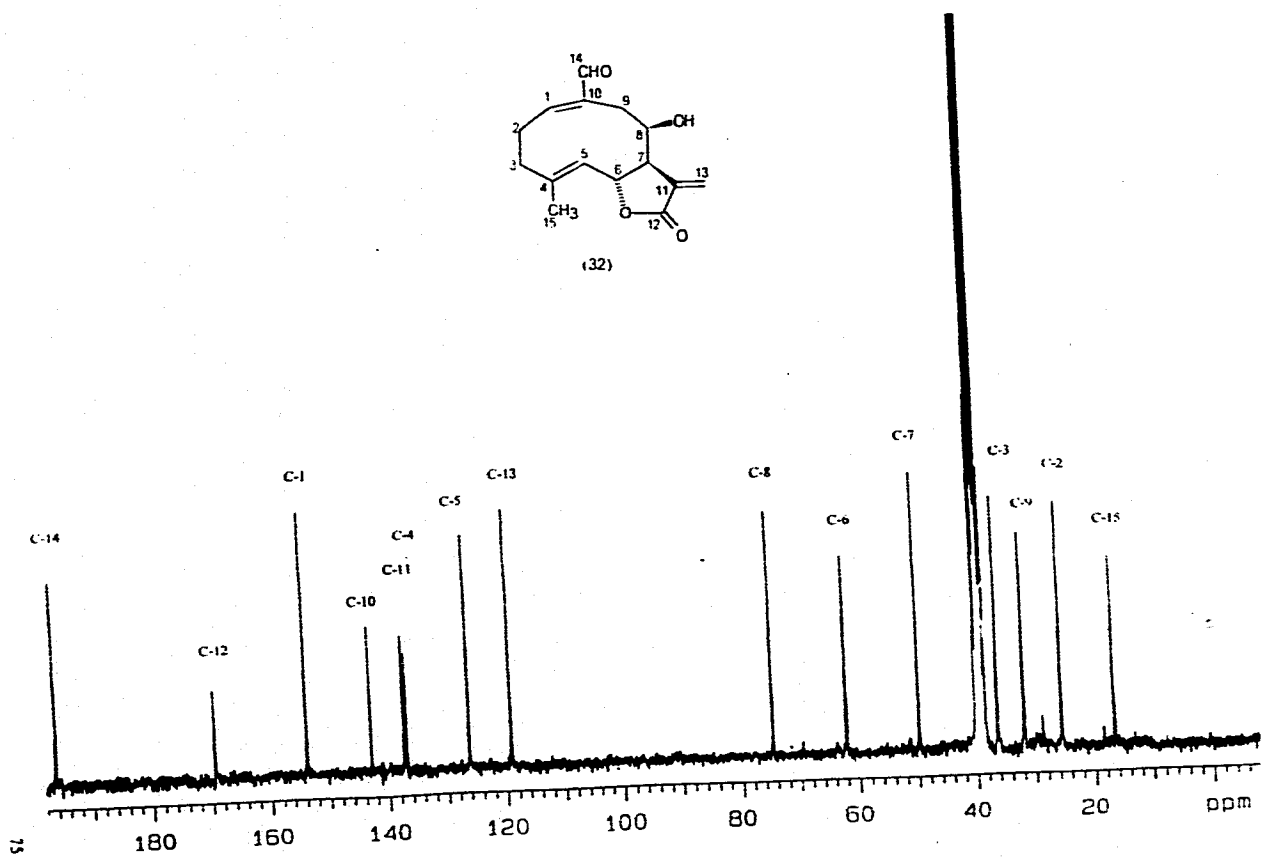
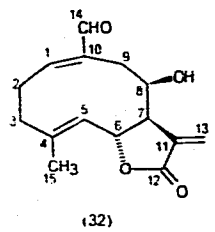
Espectro 19. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) de *Allo-eschkuhiolida* (32)



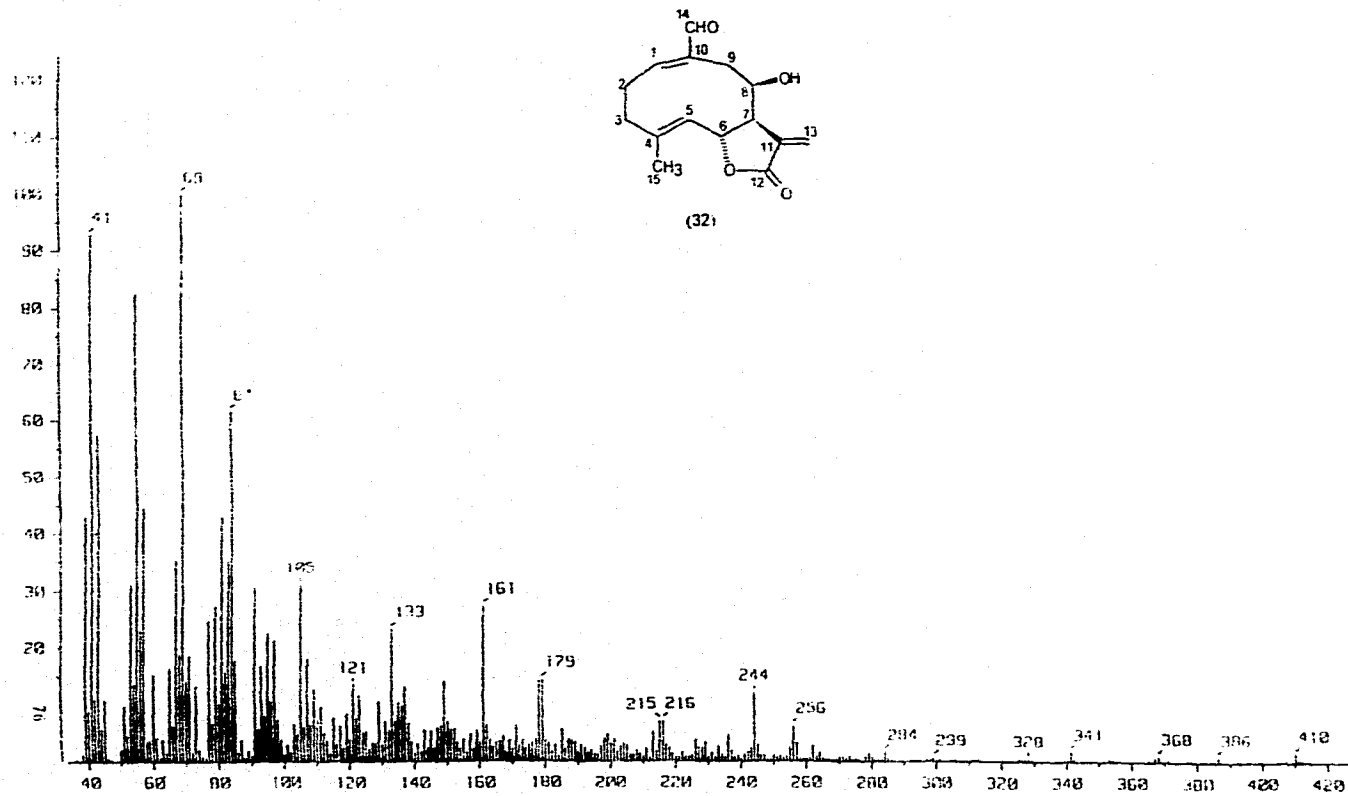
Espectro 20. RMN^1H (300 MHz, DMSO) de *Allo-eschkuhriólida* (32)



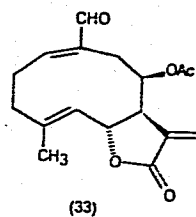
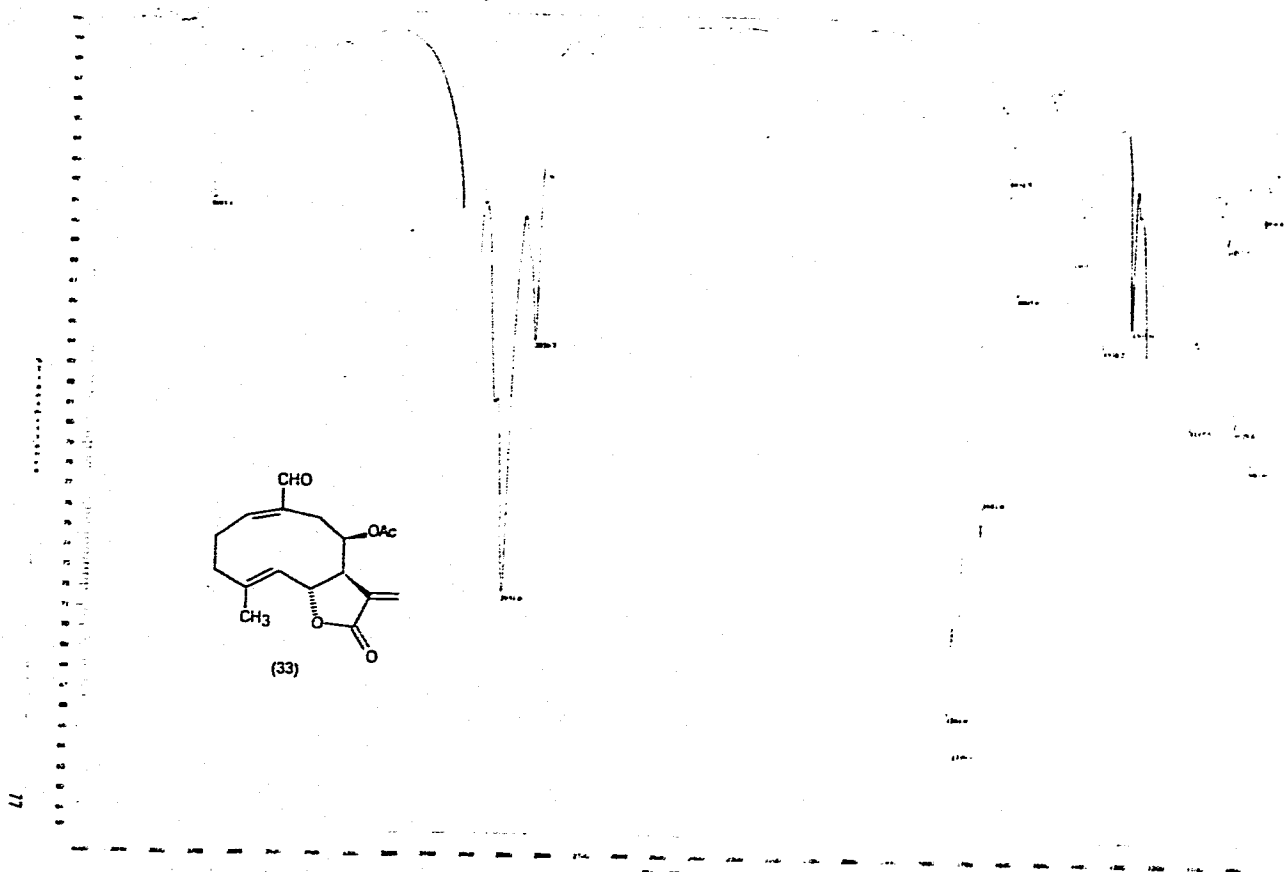
Espectro 21. COSY de *Allo-eschkuhriólida* (32)



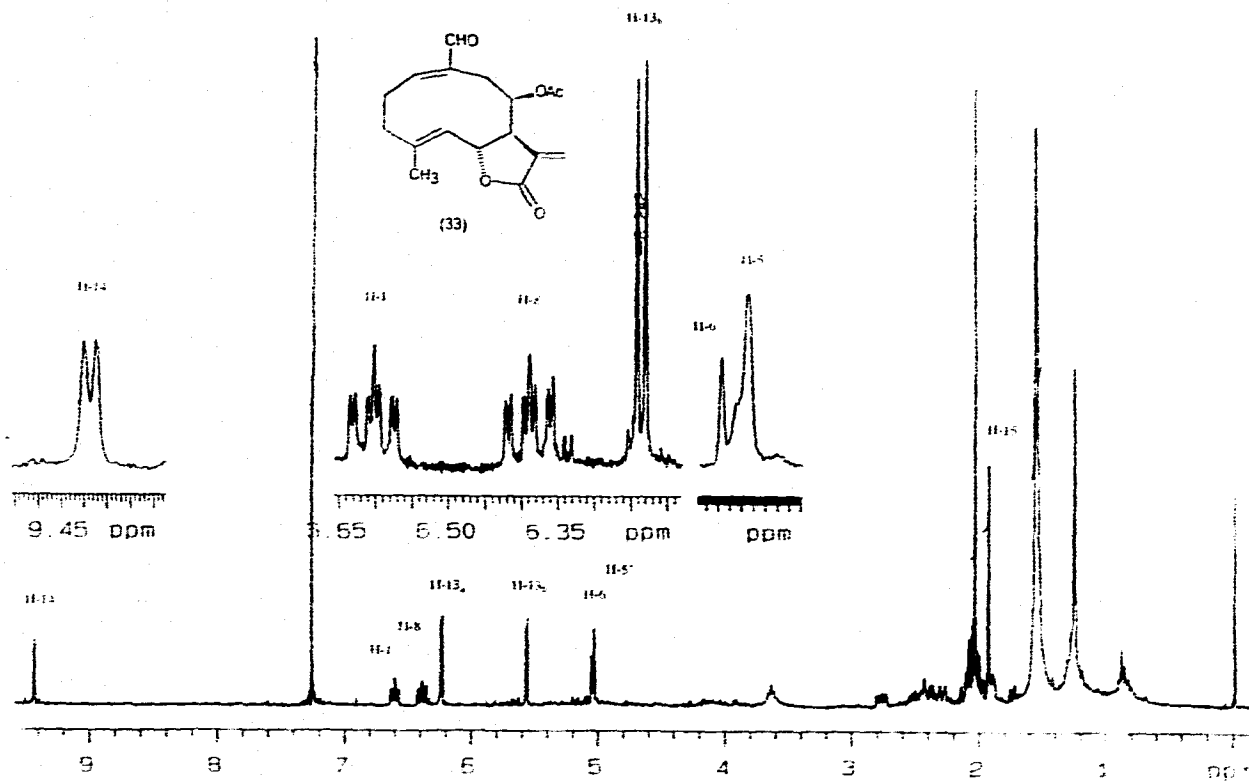
Espectro 22. RMN¹³C (75 MHz, DMSO) de *Allo-eschkuhiólida* (32)



Espectro 23. EM (70 eV) de *Allo-eschkuhiólida* (32)



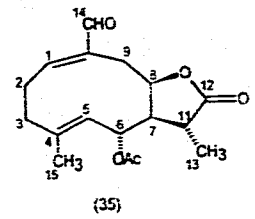
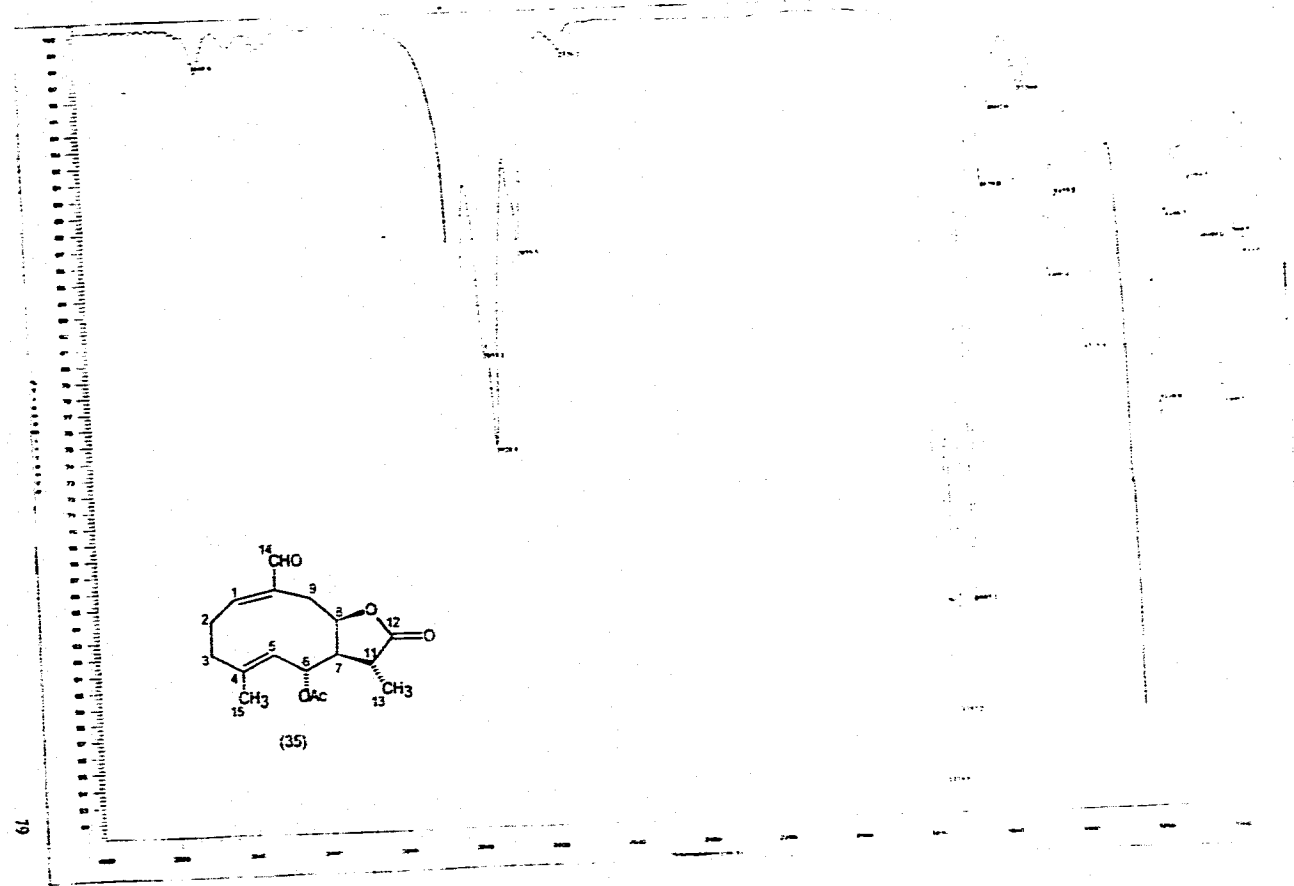
Espectro 24. IR (CDCl₃, cm⁻¹) de la Acetil *allo*-eschkuhriólida (33)



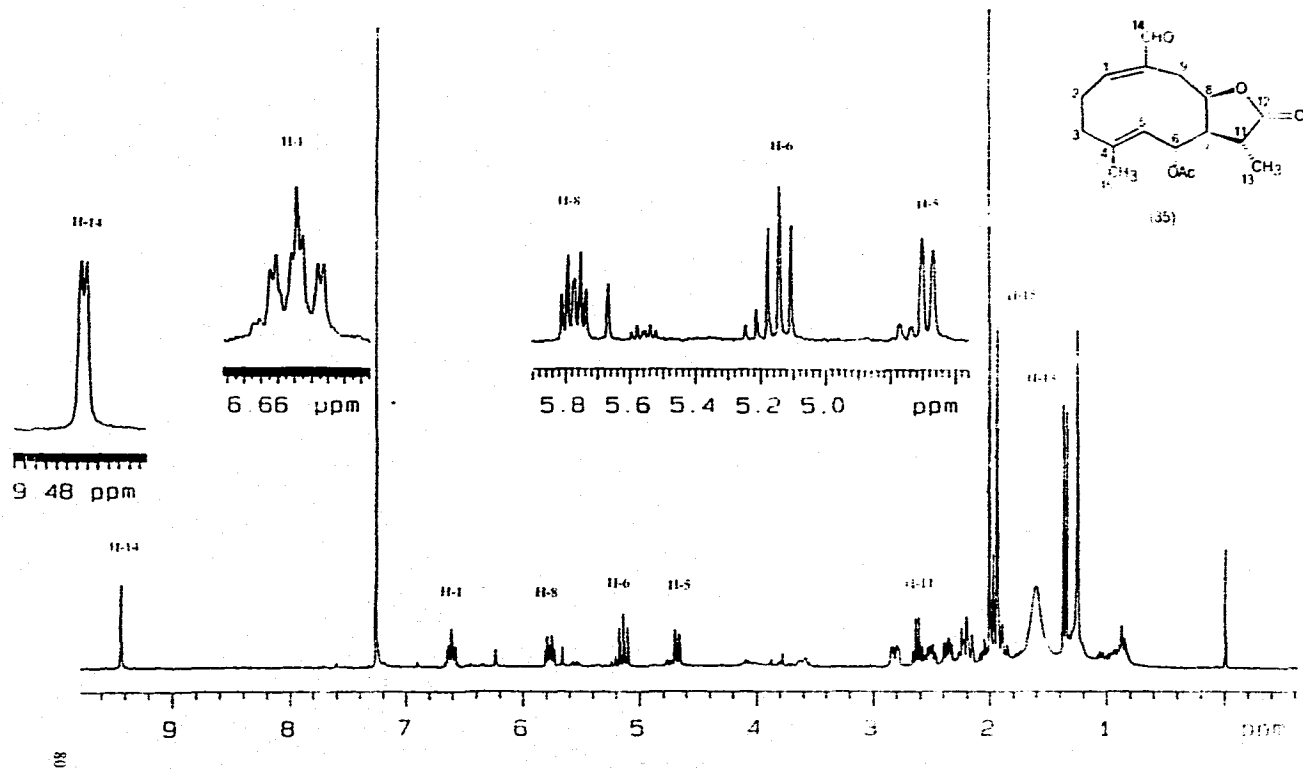
78

Espectro 25. RMN^1H (300 MHz, CDCl_3) de la Acetil *allo*-eschschkariólida (33)

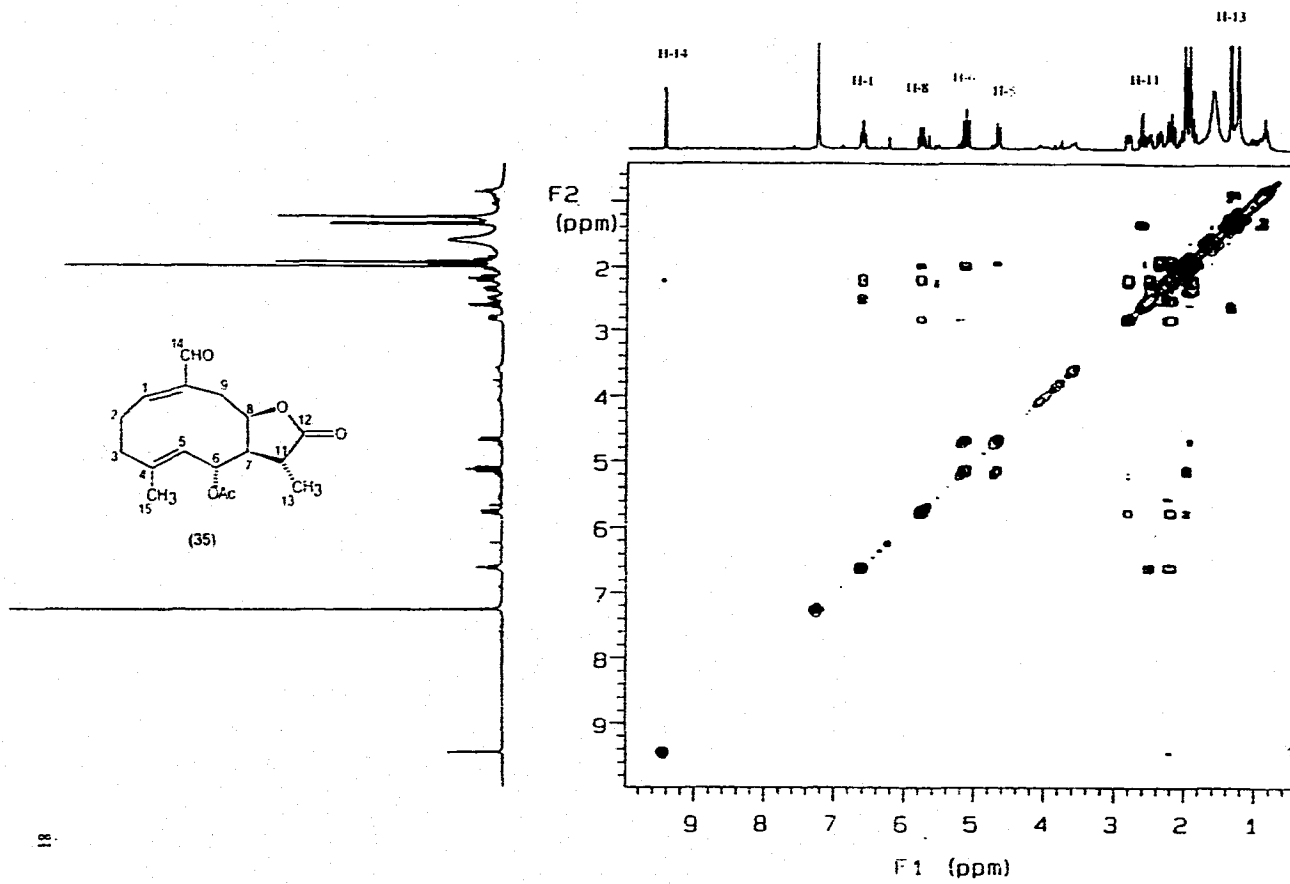
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



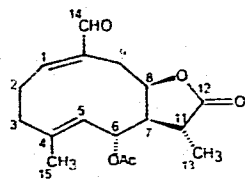
Espectro 26. IR (CDCl₃, cm⁻¹) de la 6-Acetil-(11R)-11,13-dihidroeschkuhiólida (35)



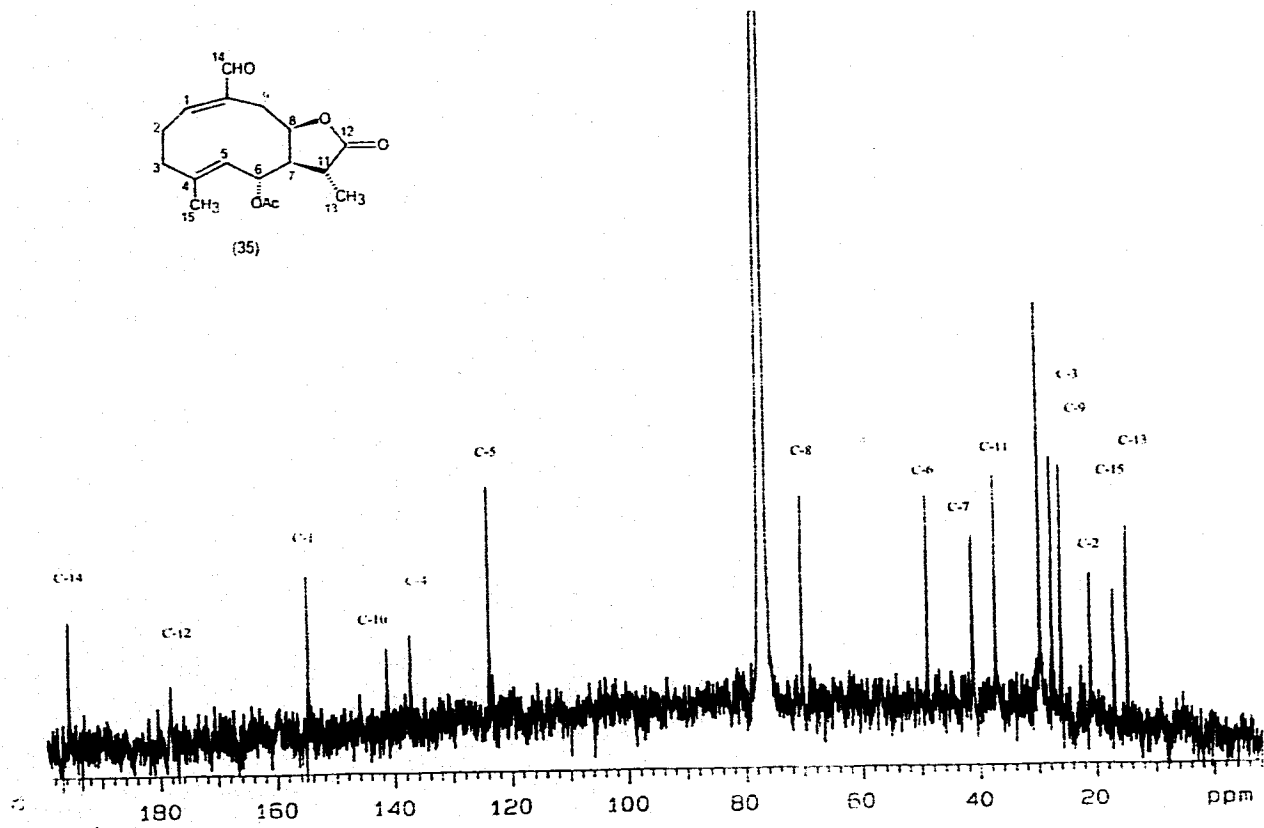
Espectro 27. RMN^1H (300 MHz, CDCl_3) de la 6-Acetil-(11R)-11,13-dihidroeschkuhiólida (35)



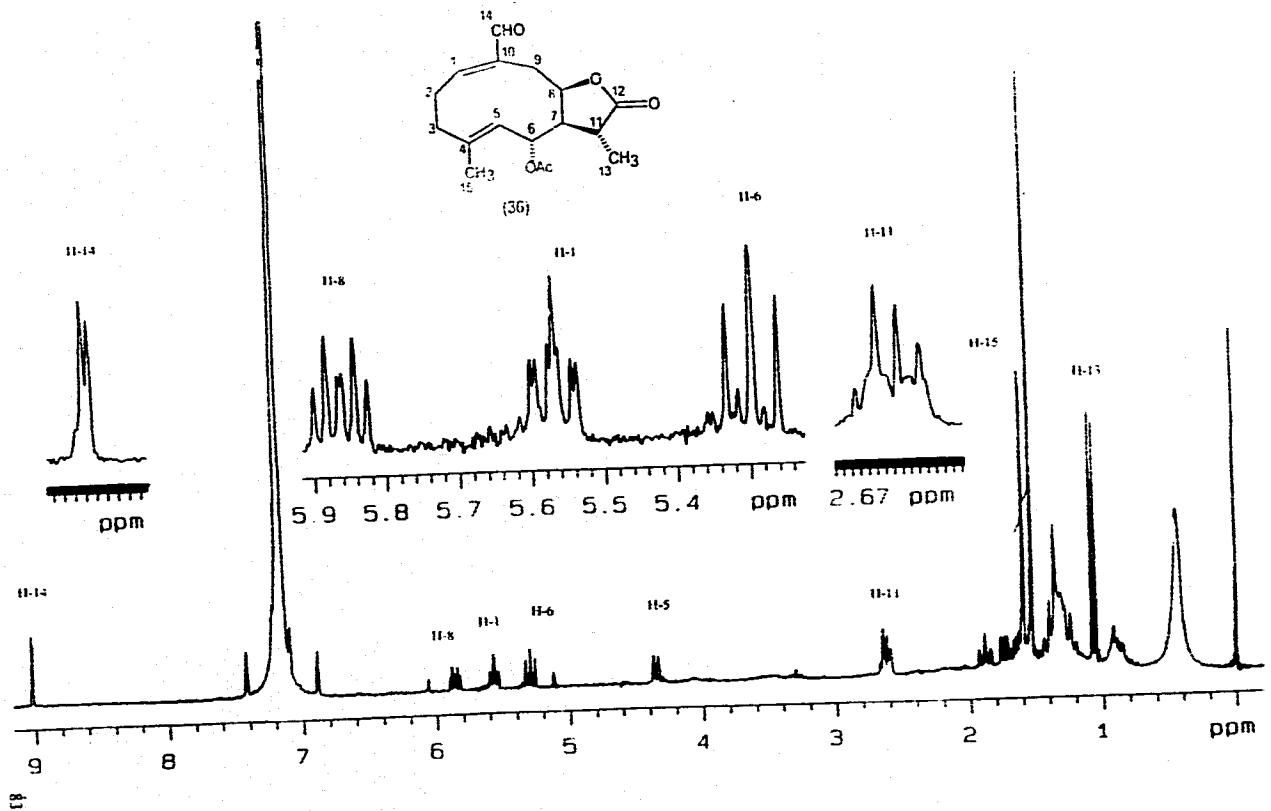
Espectro 28 COSY de la 6-Acetil-11 β -11.13-dihidroeschkuhriólida (35)



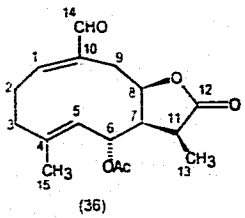
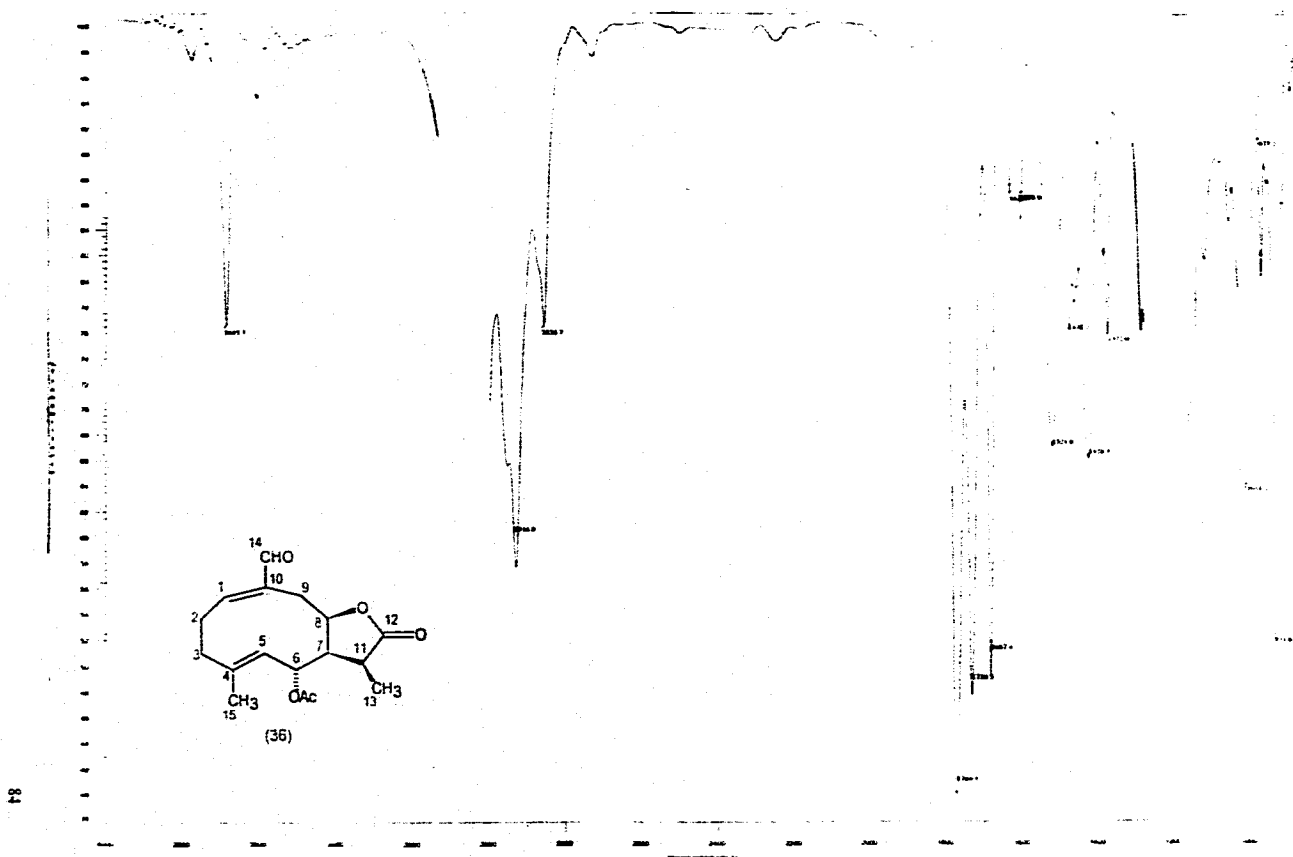
(35)



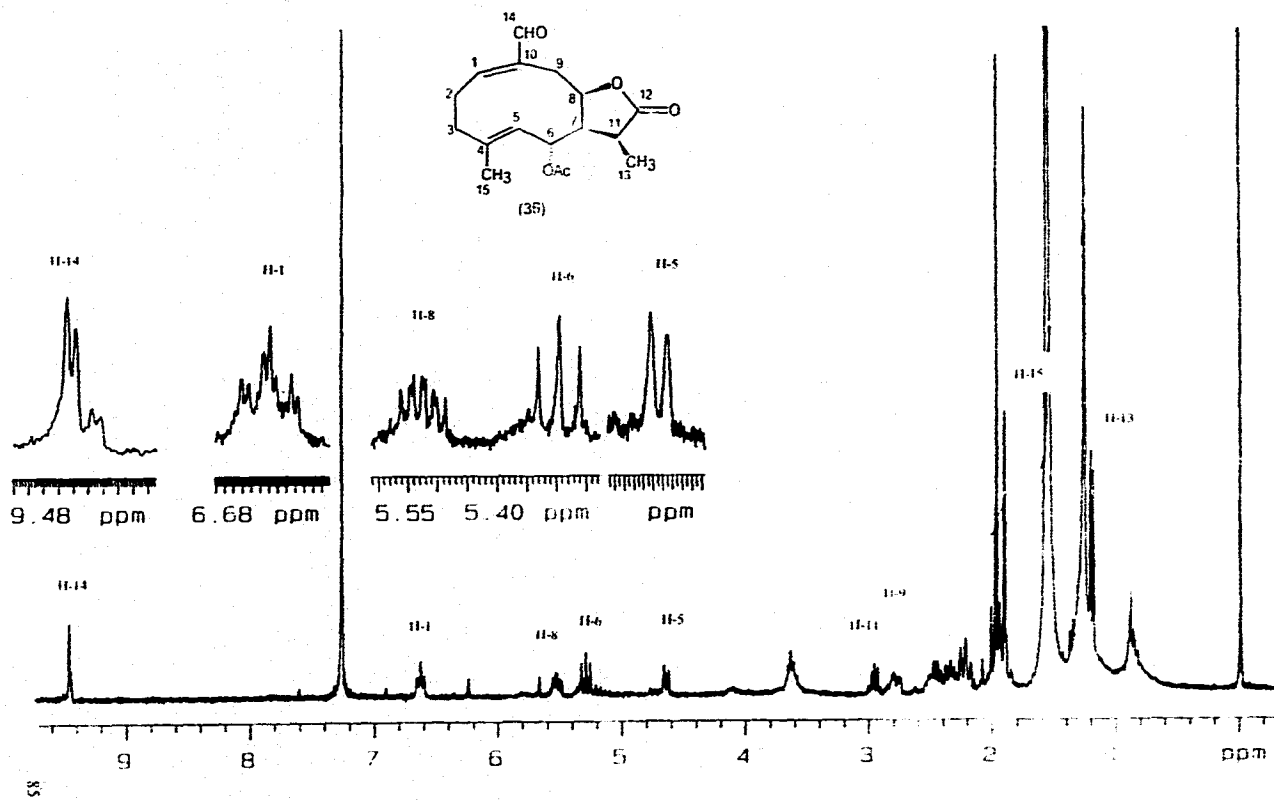
Espectro 29. RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) de la 6-Acetil-(1R)-11,13-dihidroeschkuhriólida (35)



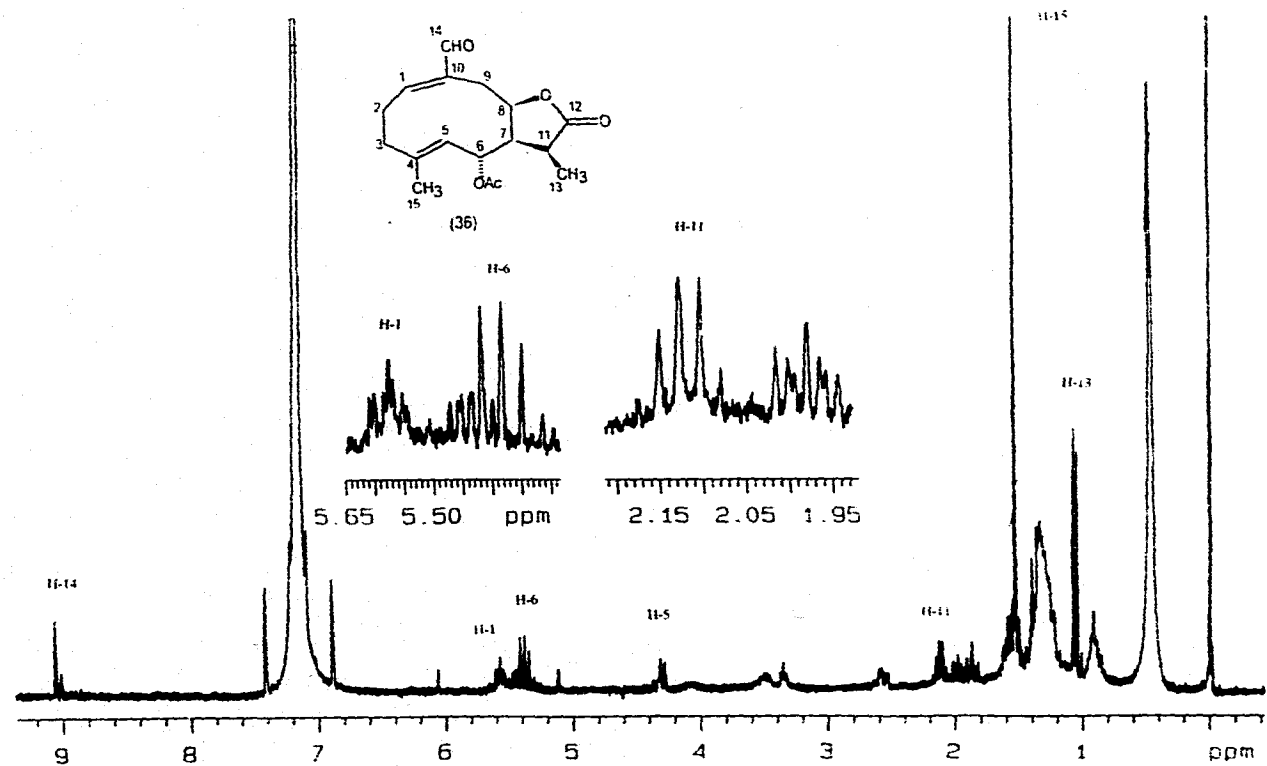
Espectro 30. RMN¹H (300 MHz, C₆D₆) de la 6-Acetil-(11R)-11,13-dihidroeschkuhiólida (35)



Espectro 31. IR (CDCl₃) de la 6-Acetil (11S)-11,13-dihidroeschkuiriólida (36)

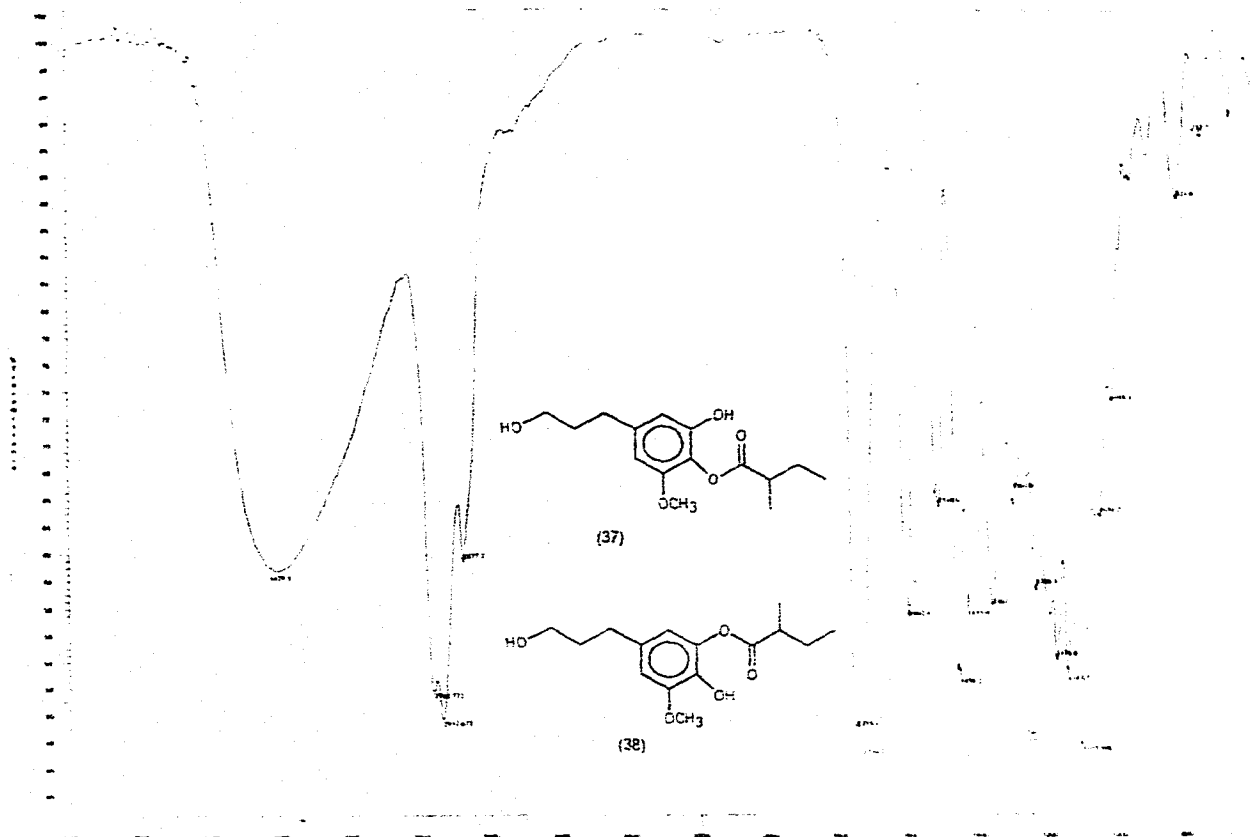


Espectro 32. RMN^1H (300 MHz, CDCl_3) de la 6-Acetil (11S)-11,13-dihidroeschkuhiolida (36)

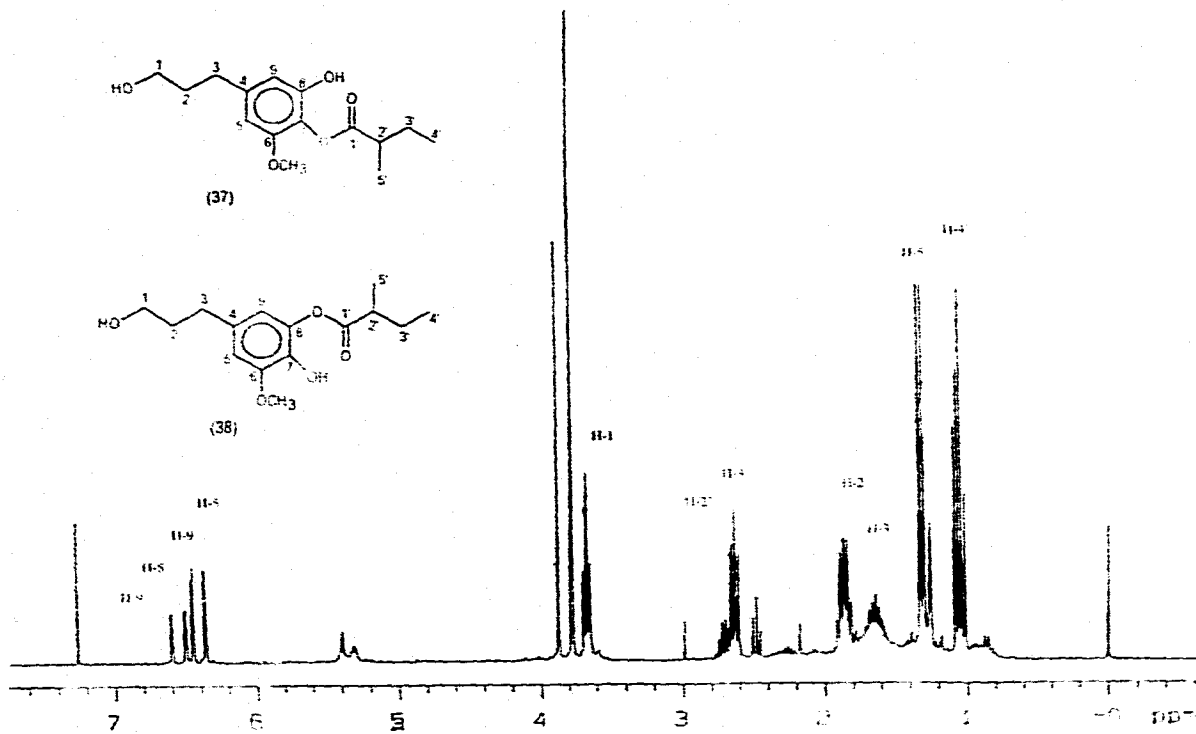


98

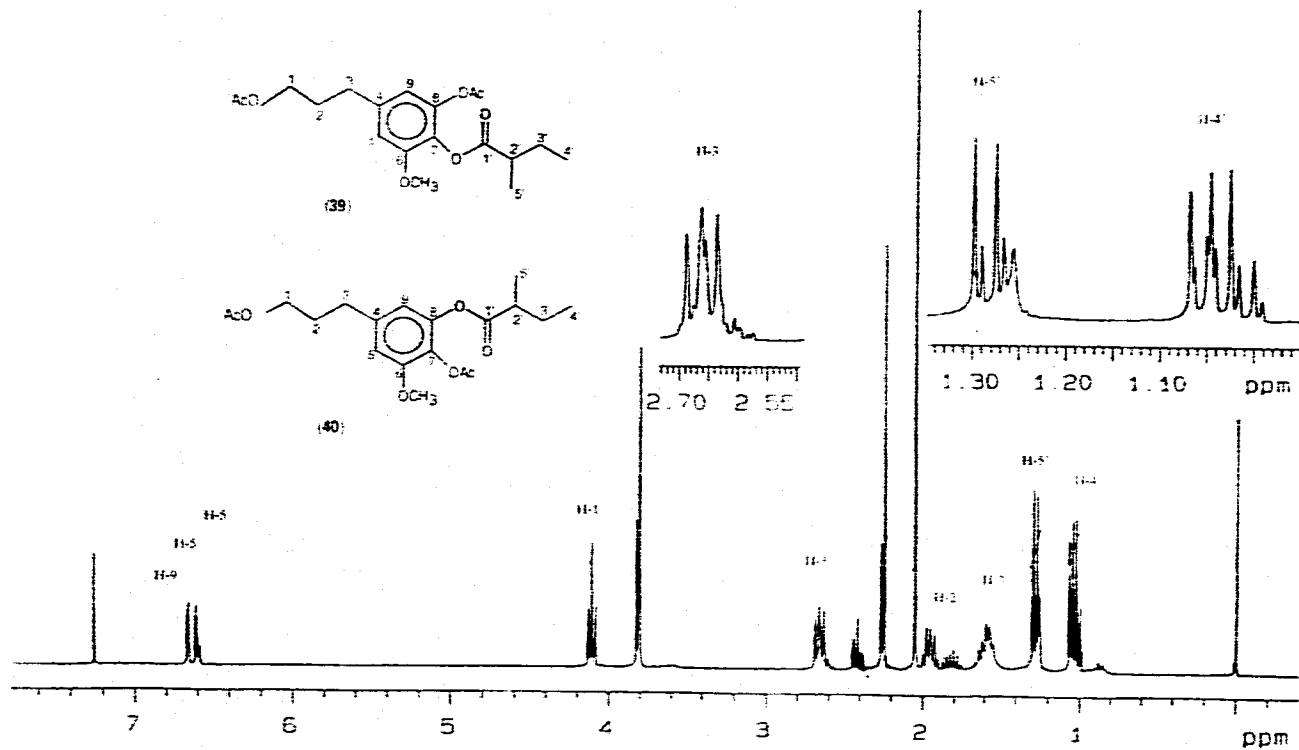
Espectro 33. RMN¹H (300 MHz, C₆D₆) de la 6-Acetil (11S)-11,13-dihidroeschkuhriólida (36)



Espectro 34. IR (CDCl₃) de 8-Hidroxi-6-metoxi-7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (37) y 7-Hidroxi-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (38)

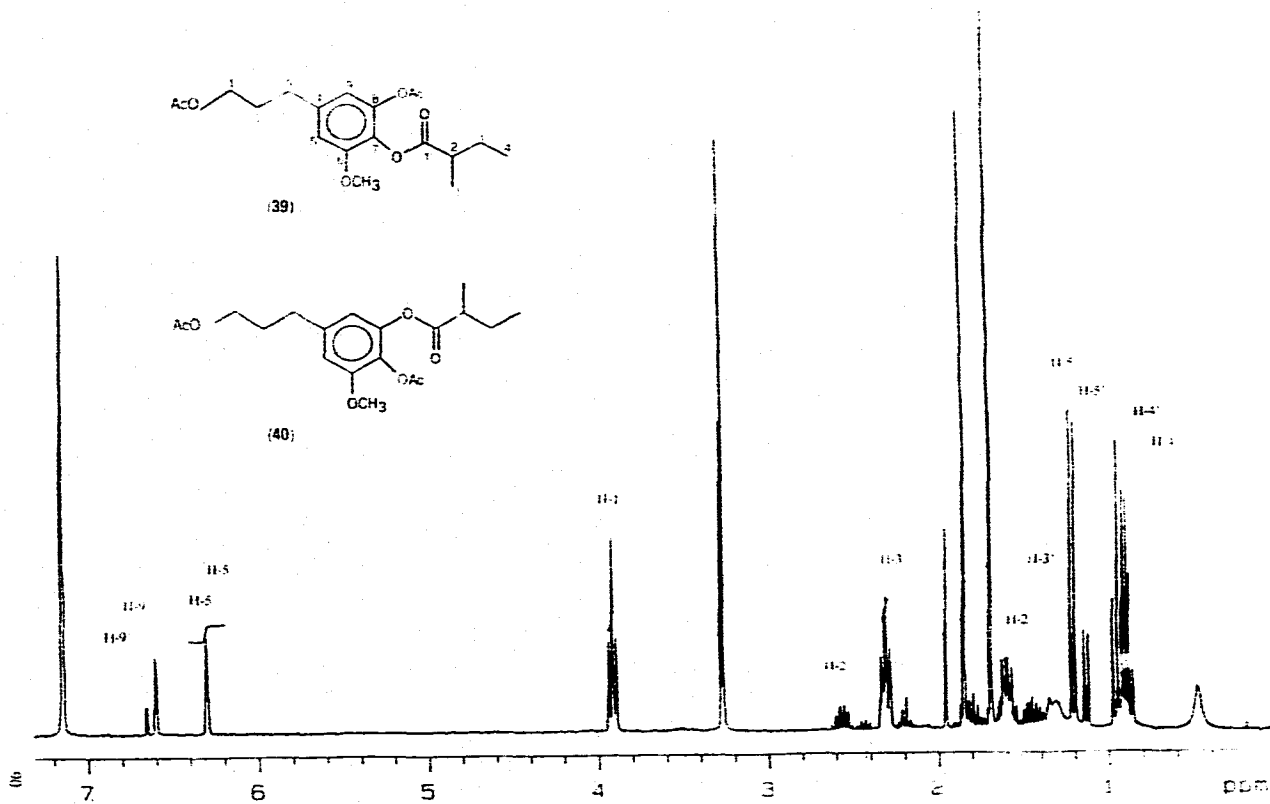


Espectro 35. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) de 8-Hidroxi-6-metoksi-7-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (37) y 7-Hidroxi-6-metoksi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenil-propanol (38).

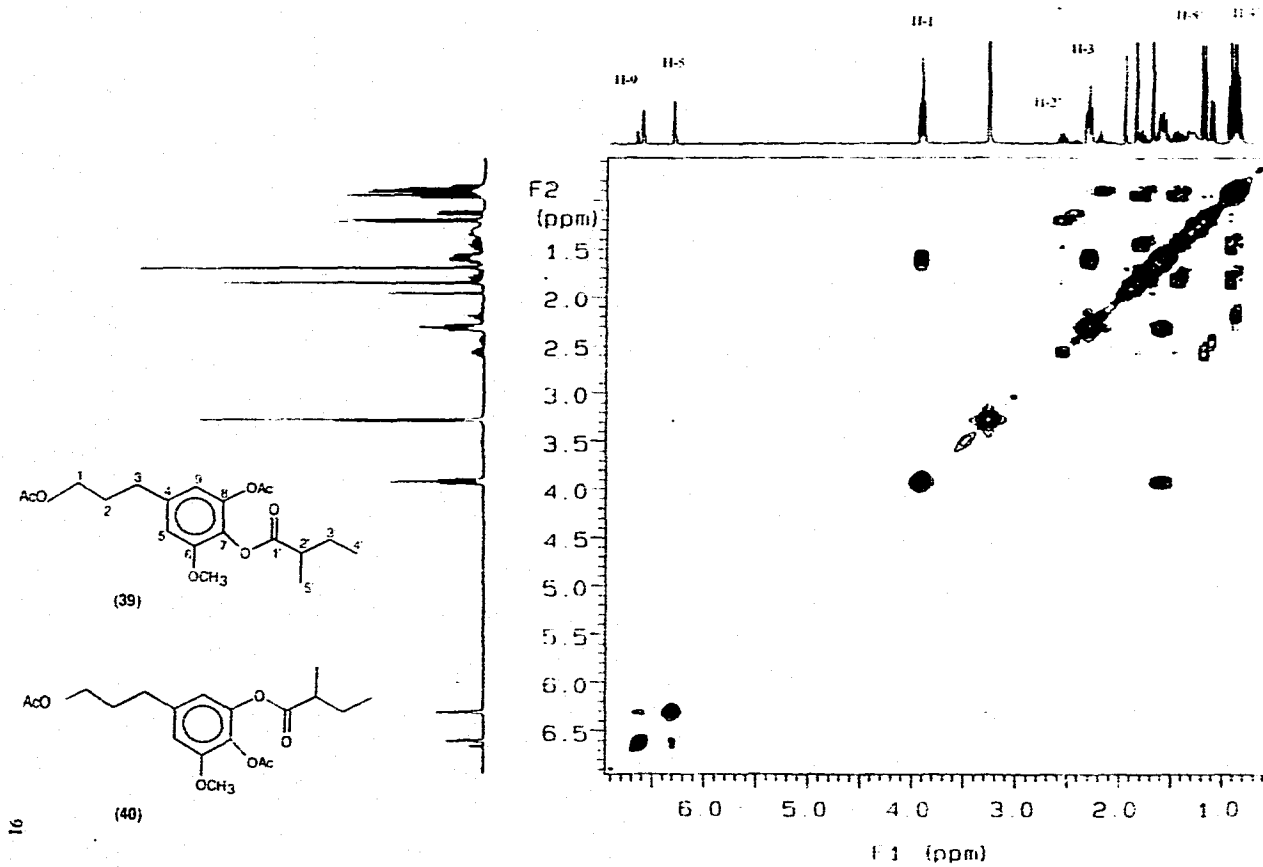


68

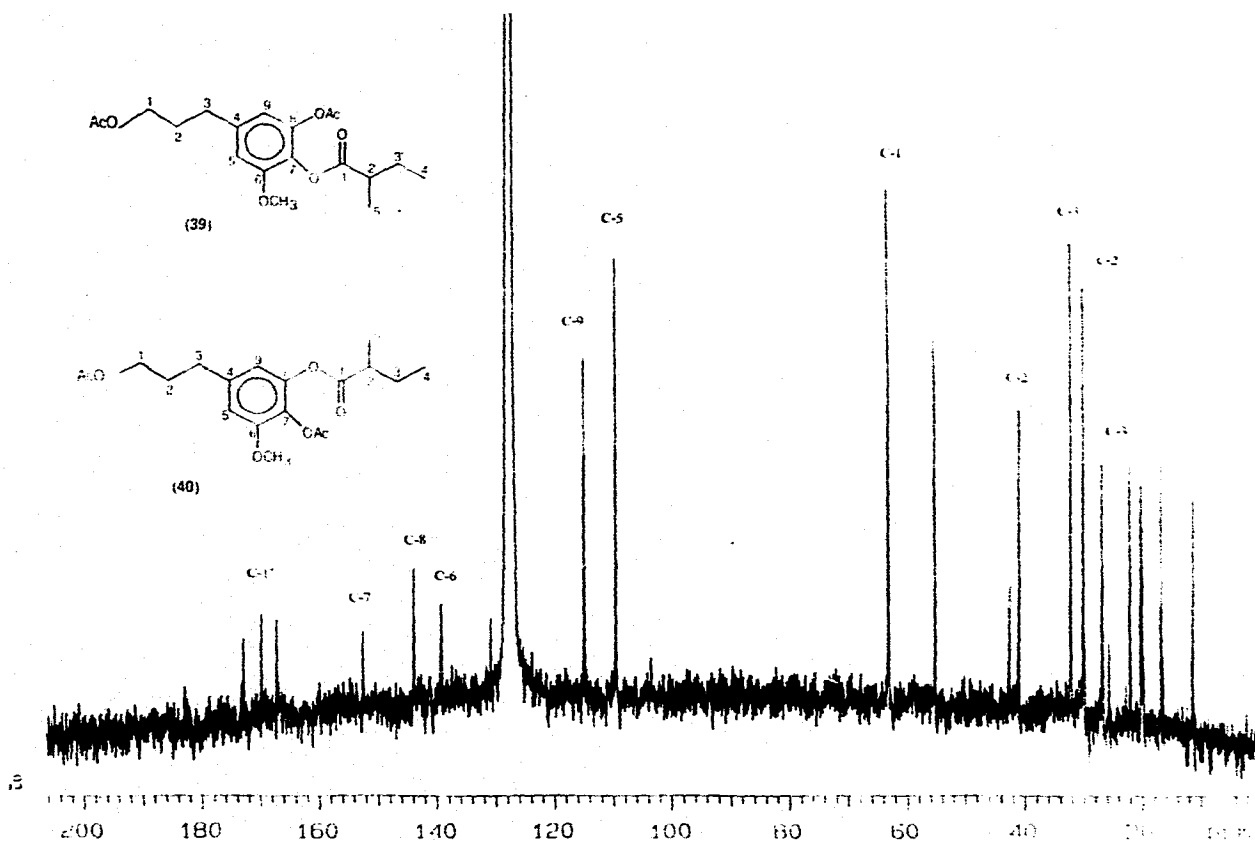
Espectro 36. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) de 1,8-Diacetoxi-6-metoxi-7-(2-metil-butiriloxi)-fenilpropano (39), y 1,7-Diacetoxi-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenilpropano (40)



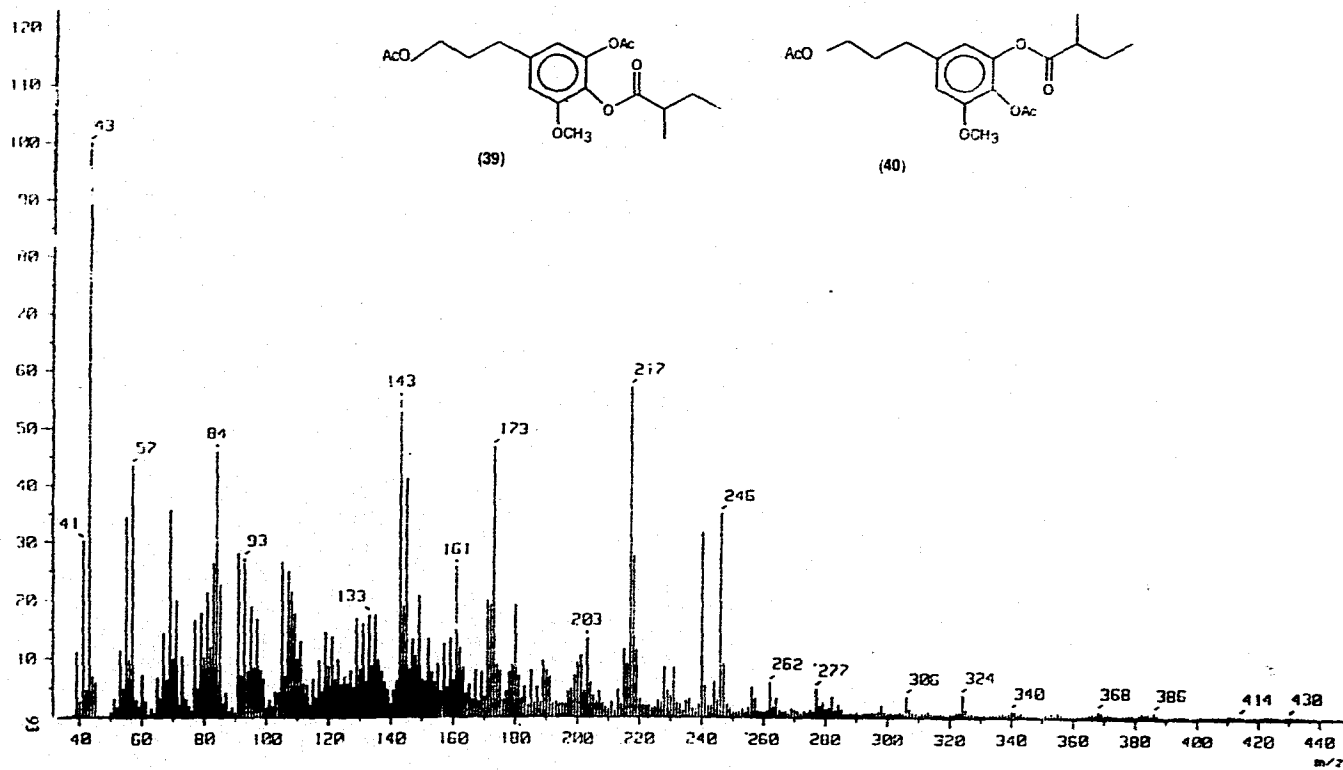
Espectro 37. RMN¹H (300 Mhz, C₆D₆) de 1,8- Diacetiloxi -6-metoxi-7-(2-metil-butiriloxi)-
fenilpropano (39), v 1,7-Diacetiloxi-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxi)-fenilpropano (40)



Espectro 38. COSY del 1,8-Diacetiloxy-6-metoxi-7-(2-metil-butiriloxy)-fenilpropano (39),
y 1,7-Diacetiloxy-6-metoxi-8-(2-metil-butiriloxy)-fenilpropano (40)



Espectro 39. RMN ¹³C (75 MHz, C₆D₆) de 1,8-Diacetoxi-6-metoxi-7-(2-metilbutiriloxi)-fenilpropano (39), y 1,7-Diacetoxi-6-metoxi-8-(2-metilbutiriloxi)-fenilpropano (40)



**Espectro 40. EM (70 eV) del 1,8-Diacetiloxy-6-metoxi-7-(2-metilbutiriloxy)-fenilpropano (39),
y 1,7-Diacetiloxy-6-metoxi-8-(2-metilbutiriloxy)-fenilpropano (40)**

BIBLIOGRAFIA

1. Hamburger, M. and Hostettmann, K., Bioactivity in Plants: The Link Between Phytochemistry and Medicine. *Phytochemistry* **30**, 3864 (1991).
2. Boletín Epidemiológico Anual, Dirección de Prestaciones Médicas, Coordinación de Salud Comunitaria, IMSS, 1994.
3. Spjut, R. W. and Perdue, R. E., Plant Folklore: a Tool for Predicting Sources of Antitumor Activity? *Cancer Treat. Rep.* **60**, 979 (1976).
4. Herz, W. and Govidan, S. V., Euemnaninolide and Other Constituents of *Schkuhria virgata*. *Phytochemistry* **19**, 1234 (1980).
5. Rodríguez, E., Towers, G. H. N. and Mitchell, J.C., Biologic Activity of Sesquiterpene Lactones. *Phytochemistry* **15**, 1573 (1976).
6. Lampretsa, E., Sesquiterpene Lactones, a Short Review. *Pharmazentike* **4**, 55 (1991); *CA*, **115**, 239399s (1991).
7. Kolodziej, H., Sesquiterpene Lactones. Biological Activities. *Dtsch. Apoth. Ztg.* **133**, 15 (1993).
8. Samek, Z., Holub, M., Bloszyk, E. and Drozd, B., Structure of schkuhriolide- a New Lactone from *Schkuhria schkuhrioides*. *Z. Chem.* **19**, 449 (1979); *CA*, **92**, 198558d (1980).
9. Delgado, G., Hernández, H. and Romo de Vivar, A., Structure of Elemanschkuhriolide. Melampolidides as Possible Biogenetic Precursors of C₁₄α,H₃β Elemanolides. *J. Org. Chem.* **49**, 2994 (1984).
10. Romo de Vivar, A., Pérez, A. L., León, C. and Delgado, G., 11,13-Dehydroeriolin, Schkuhrioidin and Schkuhriolid, Germacranolides from *Schkuhria* species. *Phytochemistry* **21**, 2905 (1982).
11. Delgado, G., Guzmán, S. and Romo de Vivar, A., Schkuhridin A and Schkuhridin B, C-14β,H-5α-elemanolides from *Schkuhria schkuhrioides*. *Phytochemistry* **26**, 755 (1987).
12. McLaughlin, J. L., Crow Gall Tumors on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractionation In: *Methods in Plant Biochemistry*, K. Hostettmann (editor) 61 Academic Press (1994).
13. Clark, A. M., El-Ferale, F. S., and Li, W. S., Antimicrobial Activity of Phenolic Constituents of *Magnolia grandiflora* L. *J. Pharm. Sci.* **70**, 951 (1981).
14. Fiebig, M., Pezzuto, J. M., Soerjarto, D. D. and Kinghorn, A. D., A Further Cytotoxic Carbazole Alkaloid from *Murraya Koenigi*. *Phytochemistry* **24**, 3041 (1985).
15. Wong, S. M., Pezzuto, J. M., Fong, H. H. S. and Farnsworth, N. R., Isolation and Characterization of a New Triterpene from *Iris missouriensis*. *J. Pharm. Sci.* **74**, 1114 (1985).
16. Kupchan, S. M. and Bauersehrmidt, E., Cytotoxic Flavonols from *Baccharis arathroides*. *Phytochemistry* **10**, 664 (1970).
17. Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L., *The Biology and Chemistry of the Compositae*. Vol. 1 and 2. Academic Press, London, (1977). 17b. Hind, D. J. H. and Beentje, H. J., *Compositae: Systematics*. Vol. 1 and 2. The Royal Botanic Gardens Kew, (1996).
18. Heiser, C. B., Jr., Revision of the genus *Schkuhria*. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **32**, 265 (1945).
19. Flematti, S. M. and Gros E. G., Hydrocarbons in *Schkuhria pinnata* var *pinnata* (Compositae). *An. Asoc. Quim. Argent.* **59**, 405 (1971); *CA*, **76**, 151051n (1972).
20. Pettei, M. J., Miura, Y., Kubo, Y. and Nakanishi, K., Insect Antifeedant Sesquiterpene Lactones from *Schkuhria pinnata*. *Heterocycles* **11**, 471 (1978).

21. Bohlmann, F. and Zdero, C., A Heliangolide from *Schkuhria pinnata*. *Phytochemistry* **20**, 2431 (1981).
22. Mulder, C. E. G. and Wortmann, G. B., Selective Weed Control with Bendioxide (Bentazon). *Proc. Nat. Weeds. Conf. S. Afr. 3rd* 159 (1979); *CA*, **95**, 1757 (1981).
23. Ganzer, V., and Jakupovic, J., Sekulripiignatolides, Unusual Sesquiterpene Lactones from *Schkuhria pinnata*. *Phytochemistry* **29**, 535 (1990).
24. Paccaroni, A. del V., Sosa, V. E., Espinar, L. A. and Oberti, J. C., Sesquiterpene Lactones from *Schkuhria pinnata*. *Phytochemistry* **39**, 127 (1995).
25. Herz, W., Bhat, S. V. and Sudarsanam, V., Sesquiterpene Lactones and Flavones of *Ica frutescens*. *Phytochemistry* **11**, 1829 (1972).
26. Herz, W.; Prasad S., Crystal and Stereochemistry of Frutescin. *J. Org. Chem.* **47**, 2206 (1982).
27. Bohlmann, F. and Zdero, C., Neue Nerolderivative und ein Neuartiges Dihydrozimtkohl-Derivat Aus *Schkuhria* arten. *Phytochemistry* **16**, 780 (1977).
28. Bohlmann, F., Jakupovic, J., Robinson, H. and King, R., Neue Diterpene aus *Schkuhria*-arten. *Phytochemistry* **19**, 881 (1980).
29. Stewart, E. and Mabry, T. J., Sesquiterpene Lactones from *Schkuhria anthemoidea* var. *wislizeni* H. *Phytochemistry* **24**, 2731 (1985).
30. Zong, Y., Yu, M., Huang, L., Chang, Y., Wang, Y. and Che, Ch., Studies of Tibetan Medicinal Plants. II. Antitumor activity of *Saussurea copymaca*. *Int. J. Pharmacogn.* **32**, 284 (1994); *CA*, **121**, 245422j (1994).
31. Lee, K. H., Mar, E.C. and Starnes, C. O., El Gabally, S. A., Sesquiterpene Antitumor Agents Inhibitors of Cellular Metabolism. *Science* **196**, 533 (1977).
32. Hanson, R. L., Lardy, H. A. and Kupchan, S. M., Inhibitors of Phosphofructoquinase by Quinone Methide and a Methylene Lactone Tumor Inhibitors. *Science* **169**, 378 (1970).
33. Mondranulis, I. O., Che, Ch. T., Rimando, A. M., Vajrodaya, S., Fong, H. H. S. and Farnsworth, N. R., Sesquiterpene Lactones and Other Constituents from a Cytotoxic Extract of *Michelia floribunda*. *Pharm. Res.* **7**, 1269 (1990); *CA*, **114**, 160714m (1991).
34. Abdallah, O. M., Ali, A. A. and Itokawa, H., Cytotoxic Activity of Sesquiterpene Lactones, Isolated from *Anbrasia maritima*. *Pharmazie* **46**, 472 (1991); *CA*, **116**, 120499e (1992).
35. Grippo, A. A., Hall, I. H., Kiyokawa, H., Murakami, O., Shen, Y. Ch. and Lee, K. H., The Cytotoxicity of Helenalin, its Mono and Difunctional Esters, and Related Sesquiterpene Lactones in Murine and Human Tumor Cells. *Drug Des. Discovery* **8**, 191 (1992); *CA*, **118**, 93860y (1993).
36. Zhou, B., Bai, N., Lin, L. and Cordell, G. A., Sesquiterpene Lactones from *Indula salsoloides*. *Phytochemistry* **36**, 721 (1994).
37. Woerdenbag, H. J., Merfort, I., Passreiter, C. M., Schmidt, T. J., Willuhn, G., Van Uden, W., Pras, N., Kampinga, H. H. and Konings, A. W. T., Cytotoxicity of Flavonoids and Sesquiterpene Lactones from *Arnica* Species Against the GLC4 and the COLO 320 Cell Lines. *Planta Med.* **60**, 434 (1994).
38. Riopelle, R. J. and Stevens, K. L., In Vitro Neurotoxicity Bioassay: Neurotoxicity of Sesquiterpene Lactones. *Bioact. Nat. Prod.* **457** (1993); *CA*, **120**, 47462p (1994).

39. Wang, Y., Hamburger, M., Cheng, C. H. K., Costall, B., Naylor, R. J., Jenner, P. and Hostettmann, K., Neurotoxic Sesquiterpenoids from the Yellow Star Thistle *Centaurea solstitialis* L. *Helv. Chim. Acta* **74**, 117 (1991).
40. Mullin, C. A., Alfatafta, A. A., Harman, J. L., Serino, A. A. and Everett, S. L., Corn rootworm Feeding on Sunflower and other Compositae. Influence of Floral Terpenoid and Phenolic Factors. *ACS Symp. Ser.* **449** (Nat. Occurring Pest Bioregul.), 278 (1991); CA, **115**, 46010z (1991).
41. Srivastava, R. P., Prokseh, P. and Wray, V., Toxicity and Antifeedant Activity of a Sesquiterpene Lactone from *Encelia* against *Spodoptera littoralis*. *Phytochemistry* **29**, 3445 (1990).
42. Syrov, V. N., Nabiev, A. N., Khushbaktova, Z. A., Sham'yanov, Y. D. and Abduazimov, B. Kh., Hepatotropic Action of Sesquiterpene Lactones. *Khim-Farm Zh.* **25**, 41 (1991); CA, **115**, 231u (1991).
43. Jisaka, M., Kawanaka, M., Sugiyama, H., Takegawa, K., Huffman, M. A., Ohigashi, H. and Koshimizu, K., Antischistosomal Activities of Sesquiterpene Lactones and Steroid Glucosides from *Fernandhi amygdalina*, Possibly Used by Wild Chimpanzees Against Parasite Related Diseases. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 845 (1992); CA, **117**, 103634y (1992).
44. Baruah, N. C., Sarma, J. C., Barua, N. C., Sarma, S. and Sharma, R. P., Germination and Grow Inhibitory Sesquiterpene Lactones and a Flavone from *Tithonia diversifolia*. *Phytochemistry* **36**, 29 (1994).
45. Hausen, B. M., Contact allergies from Pharmacognostic Plants and Extracts. *Dtsch. Apoth. Ztg.* **131**, 987 (1991); CA, **115**, 166414f (1991).
46. Barsby, R. W. J., Sakai, U., Knight, D. W. and Houtt, J. R. S., Feverfew and Vascular Smooth Muscle: Extracts from Fresh and Dried Plants Show Opposing Pharmacological Profiles Dependent upon Sesquiterpene Lactone Content. *Planta Med.* **59**, 20 (1993).
47. Mungarurire, J., A Phytochemical Investigation of Medicinal Plants of the Compositae from Rwanda. *Herba Hung* **29**, 73 (1990); CA, **115**, 203272f (1991).
48. Goren, N., Bozok-Johansson, C., Jakupovic, J., Lin, L. J., Shieh, H. L., Curdell, G. A. and Celik, N., Sesquiterpene Lactones with Antibacterial Activity from *Tanacetum densum* subsp. *sivasicum*. *Phytochemistry* **31**, 101 (1992).
49. Giesbrecht, A. M., Davino, S. C., Nassis, C. Z., Young, M. C. M., Lopes, J. L. C., Rodriguez, D. C., Viechniewski, W., Nasi, A. M. T. T., Dias, D. A. and Lopes J. N. C., Antimicrobial Activity of Sesquiterpene Lactones. *Quim. Nova* **13**, 312 (1990); CA, **116**, 37802c (1992).
50. Pieman, A. K. and Schneider, E. F., Inhibition of Fungal Growth by Selected Sesquiterpene Lactones. *Biochem Syst. Ecol.* **21**, 307 (1993); CA, **119**, 24490m (1993).
51. Lee, I. S. and Hillford, Ch. D., Metabolism of Antimalarial Sesquiterpene Lactones. *Pharmaceutical Ther.* **48**, 345 (1990); CA, **115**, 21411t (1991).
52. Koshimizu, K., Ohigashi, H. and Huffman, M. A., Use of *Fernandhi amygdalina* by Wild Chimpanzee: Possible Roles of its Bitter and Related Constituents. *Physiol. Behav.* **56**, 1209 (1994); CA, **122**, 142096x (1995).
53. Yokoyama, K., Matsugami, M., Koiso, Y., Katagiri, T. and Oonuki, K., Topical Preparations from Plant Extracts Containing Sesquiterpene Lactones. (Pola Kasei Kogyo

- KK) Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 05,306,231 [93,306,231] (Cl. A61K35/78), 19 Nov. 1993, Appl. 92/107,060,24 Apr 1992; 12 pp. CA, **120**, 200171q (1994).
54. Zafra-Polo, M. C. and Blazquez, M. A., Antiinflammatory Activity of Sesquiterpene Lactones from *Artemisia barrelieri* in rats. *Phytother. Res.* **5**, 91 (1991); CA, **115**, 41302m (1991).
55. Zitterl-Eglseer, K., Jurenisch, J., Korhammer, S., Haslinger, E., Sosa, S., Della Loggia, R., Kubelka, W. and Franz, C., Sesquiterpene Lactones of *Achillea setacea* with Antiphlogistic Activity. *Planta Med.* **57**, 444 (1991).
56. Wu, J. B., Chun, Y. T., Ebizuka, Y. and Sankawa, U., Biological Active Constituents of *Centipeda minima*: Sesquiterpenes of Potential Antiallergy Activity. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 3272 (1991).
57. Kaaru, R. S., Sesquiterpene Lactones for Treating Skin Diseases. (Dermatologic Research Corp.) Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 03, 170, 422 [91, 170, 422] (Cl. A61K31/35), 24 Jul 1991, Appl. 89/304, 520, 22 Nov 1989; 5 pp.; CA, **115**, 223449x (1991).
58. Marles, R. J., Pazos-Sanou, L., Compadre, C. M., Pezzuto, J. M., Drozd, B. and Arnason J. T., Phytochemistry of Medicinal Plants. Recent Advances in Phytochemistry **29**, 333 Plenum Press. (1994).
59. Thornfeldt, C. R., Treatment of AIDS and AIDS-Related Complex with Dihydroartemisin Derivatives and Sesquiterpene Derivatives. PCT Int. Appl. WO 90 10,442 (Cl. A61K31/335), 20 Sep 1990, Appl 89/18995, 13 Mar 1989; 7 pp.; CA, **114**, 240606 (1991).
60. Ioehkova L., Stepanka, L., Apostolova, V., Zakhariyeva, E. and Vasileva, M. Y., Burdock (*Arctium lappa*): Chemical Composition and Possible Applications in Cosmetics. *Med.-Biol. Inf.* **2**, 28 (1990); CA, **115**: 214498k (1991).
61. Hanson, R. L., Lardy, H. A. and Kupchan, S. M., Inhibition of Phosphofructokinase by Quinone Methide and α -Methylene γ -Lactone Tumor Inhibitors. *Science* **168**, 378 (1979).
62. Wietome, M., Starling, A. P., Sharma, R. P., East, J. M. and Lee, A. G., Inhibition of the Calcium ATPase by Sesquiterpene Lactones. *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 348S (1993); CA, **120**, 72127r (1994).
63. Huacuja, R. L., Carrao, A., Guzman, S.A., and Guerrero, C., Inactivation of Sulphydryl Groups with Sesquiterpene Lactones; Effects on Nuclear Decondensation Pattern/Motility Induced by Heparin in Human Spermatozoa. *Adv. Contracept. Delivery Syst.* **9**, 97 (1993); CA, **119**, 46177s (1993).
64. Maldonado, E., Mayorga, I. and Ortega, A., Perydiscolic Acid, a Germacranolide from *Perymenium* species. *Phytochemistry* **26**, 205 (1987).
65. Samek, Z., On the Validity of the "cis/trans" Lactone Rule for Allylic Coupling Constants of the α -Exomethylene Protons in Natural Sesquiterpene α -Exomethylene γ -Lactones. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **43**, 3210 (1978).
66. Tori, K., Horibe, I., Kuriyama, K., Tada, H. and Takeda, K., Conformational Isomers of Laurenbiolide, a New Ten-membered-ring Sesquiterpene Lactone. *Chem. Commun.* 1393 (1971).
67. Günther, H., NMR Spectroscopy, An Introduction, John Wiley Sons, Press 75. (1988).
68. Samek, Z., Terpenes. Part CCl.III. Use of Structural Changes for Stereochemical Assignments of Natural α -Exo-methylene γ -Lactones of Germacra-1-(10)-1-dienolide

- Type on the Basis of Allylic and Vicinal Couplings of Bridgehead Protons. Hydrogenation of Endocyclic Double Bonds. *Z. Chem.* **19**, 449 (1979).
69. Delgado, G., Guzmán, S. and Toscano, R. A., Studies On the Chemical Reactivity of *cis*-1-(10)-*trans*-4-germacradienolides (Melampolides). Additional Derivatives of Schkuliolide. *An. Esc. Nac. Cienc. Biol. (México)* **39**, 109 (1994).
70. Mahmoud, Z. F., Kaseem E. F., Abdel-Salam, N. A. and Zdero C., Sesquiterpene Lactones from *Lactuca sativa*. *Phytochemistry* **25**, 747 (1986).
71. Ledaal, T., The Effect of Aromatic Solvents in NMR Spectroscopy. *Tetrahedron Lett.* 1653 (1966).
72. Ledaal, T., Solvent Effects in NMR Spectroscopy. The Geometry of Solute/Solvent Collision Complexes. *Tetrahedron Lett.* 1683 (1968).
73. Tada, H. and Takeda, K., Structure of the Sesquiterpene Lactone Laurenobiolide. *Chem. Commun.* 1391 (1971).
74. Bohlmann, E., Singh, P. and Jakupovic, J., New Germacranolides and Other Sesquiterpene Lactones from *Dicoma* species. *Phytochemistry* **21**, 2029 (1982).
75. Nishimura, K., Miyase, T., Ueno, A., Noto, T., Kuroyanagi, M. and Fukushima, S., Sesquiterpene Lactones from *Lactuca laciniata*. *Phytochemistry* **25**, 2375 (1986).
76. Yoti, K., Horibe, U., Tamura, Y., Kuriyama, K., Tada, H., and Takeda, K., Re-Investigation of the Conformation of Laurenobiolide, a Ten-membered Ring Sesquiterpene Lactone by Variable-Temperature Carbon-13 NMR Spectroscopy. Evidence for the Presence of Four Conformational Isomers in Solution. *Tetrahedron Lett.* **5**, 387 (1976).
77. Cuena, M. del R. and Catalán, C. A. N., 14,13-Dihydroxygermacranolides and Other Constituents of *Mikania minima*. *J. Nat. Prod.* **53**, 686 (1990).
78. Rustaiyan, A., Saberi, M., Habibi, Z. and Jakupovic, J., Melampolides and Other Constituents from *Jurinea leptoloba*. *Phytochemistry* **30**, 1929 (1991).
79. Strack, D., Dahlbender, B., Grotjahn, L. and Wray, V., 1,2-Disinapolyglucose Accumulated in Cotyledons of Dark-Grown *Raphanus sativus* Seedlings. *Phytochemistry* **23**, 657 (1984).
80. Su, W., Fang, J. and Cheng, Y., Flavonoids and Lignans from Leaves of *Cryptameria japonica*. *Phytochemistry* **14**, 563 (1995).
81. Shingu, T., Yokoi, T., Niva, M. and Kikuchi, T., Application of Tris (Dipivaloylmethanate) Europium (III) to the Assignments of Methyl Resonances of Triterpene Acetates Related to β -Amirin. *Chem. Pharm. Bull.* **21**, 2252 (1973).
82. Chiu, P. L. and Patterson, G. W., Quantitative Estimation of C-24 Epimeric Sterol Mixtures by 220 MHz Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Lipids* **16**, 203 (1981).
83. Iin, C., Arisawa, M., Shimizu, M. and Morita, N., The constituents of *Cirsium japonicum* D. C. Var. *takaiense* Kitamura Isolation of Two New Flavonoids, Cirsitakaoside 8IV and Cirsitakaogenin (VI). *Chem. Pharm. Bull.* **26**, 2036 (1978).
84. Beechi, M. and Carrier, M., 6-Methoxyflavones of *Santolina chamaecyparissus*. *Planta Med.* **33**, 267 (1980).
85. Mabry, T.J., Markham, K. R. and Thomas, M. B., The Systematic Identification of Flavonoids, pp. 105, Springer-Verlag, (1970).

86. Farkas, I., Nogradi, M., Sudarsanam, V. and Werner, H., Constituents of *Iva* Species, Isolation, Structure, and Synthesis of Nevadensin, a New Flavone from *Iva nevadensis* M. E. Jones and *Iva axerosa* (Nutt) Jackson. *J. Org. Chem.* **31**, 3228 (1966).
87. Rangaswami, S. F. A. Sc. and Venkata, R. E., Anthoxanthin Pigments of Leaves of *Digitalis lanata*, Ehrh. *Proc. Indian Acad. Sci.* **54A**, 51 (1961).
88. Coll, J. C. and Bowden, B. F., The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the Separation of Terpene Mixtures. *J. Nat. Prod.* **49**, 934 (1986).