



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Aislamiento y Determinación de la Estructura
Molecular de Algunos Metabolitos Secundarios de
las Partes Aéreas de *Schkuhria pinnata*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

MARTHA ALEJANDRA LEÓN CABRERA



FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Presidente	Dr. Cecilio Álvarez Toledano
Vocal	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Secretario	Dr. Guillermo Delgado Lamas
Primer Suplente	Dr. Andrés Guillermo Martínez Casas
Segundo Suplente	M. en C. Oscar Salvador Yáñez Muñoz

Sitio donde se desarrollo el tema

Edificio C, Instituto de Química, UNAM

Asesor:

Dr. Guillermo Delgado Lamas



Supervisor Técnico:

M. en C. María Isabel Chávez Uribe



Sustentante:

Martha Alejandra León Cabrera



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 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la propia Universidad Nacional (Proyecto IN233202).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas, por la asesoría brindada en la elaboración de éste trabajo, y por el apoyo e interés que manifiesta en la superación de cada uno de sus alumnos.

A la M. en C. María Isabel Chávez Uribe por la realización de los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear, por su paciencia, asesoría y por el apoyo que me brindó para la realización de esta tesis.

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

Al personal de la biblioteca Jesús Romo Armería.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Lety, José Manuel, Fernovi, Edgar, y Bety, quienes colaboraron en la realización de este trabajo, mucho más de lo que parece.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el apoyo, el amor y la confianza que me han brindado gracias a los cuales hoy es posible la culminación de esta meta.

A ti mamá por tu amor incondicional, y por alentarme a seguir adelante.

A ti papá gracias por quererme y por enseñarme que cada meta culminada, sólo es el inicio de la próxima.

A mis hermanos Verónica, Héctor, Silvia y Angélica por su apoyo y cariño.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a sus profesores.

DEDICATORIA

A mis padres
Martha y José
con todo mi amor, cariño y admiración.

A mis hermanos
Verónica, Héctor, Silvia y Angélica.

A mis amigos incondicionales.

ÍNDICE

	Página
Lista de tablas.....	ii
Lista de figuras.....	ii
Abreviaturas y símbolos.....	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS Y METAS.....	3
III. HIPÓTESIS.....	4
IV. ANTECEDENTES.....	5
A. Metabolitos Secundarios.....	5
B. Familia <i>Compositae</i>	6
C. Lactonas sesquiterpénicas.....	6
D. Flavonoides.....	12
V. MATERIAL Y EQUIPO.....	16
VI. PARTE EXPERIMENTAL.....	18
1. Pectolinarigenina (1).....	20
2. 11,13-Dehidroeriolina (2).....	21
3. Dieschkuhriolina (3).....	22
4. Hispidulina (4).....	24
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
1. Pectolinarigenina (1).....	25
2. 11,13-Dehidroeriolina (2).....	26
3. Dieschkuhriolina (3).....	28
4. Hispidulina (4).....	40
VIII. CONCLUSIONES.....	42
IX. ESPECTROS	
Espectro 1. RMN- ¹ H, Pectolinarigenina (1).....	43
Espectro 2. RMN- ¹ H, 11,13-Dehidroeriolina (2).....	44
Espectro 3. RMN- ¹³ C, 11,13-Dehidroeriolina (2).....	45
Espectro 4. IR, Dieschkuhriolina (3).....	46
Espectro 5a. RMN- ¹ H, Dieschkuhriolina (3).....	47
Espectro 5b. RMN- ¹ H, Dieschkuhriolina (3).....	48
Espectro 6. g-COSY, Dieschkuhriolina (3).....	49

Espectro 7a. RMN- ¹³ C, Dieschkuhriolina (3).....	50
Espectro 7b. RMN- ¹³ C, Dieschkuhriolina (3).....	51
Espectro 8. HETCOR, Dieschkuhriolina (3).....	52
Espectro 9. NOESY, Dieschkuhriolina (3).....	53
Espectro 10. HMBC, Dieschkuhriolina (3).....	54
Espectro 11. EM, Dieschkuhriolina (3).....	55
Espectro 12. RMN- ¹ H, Hispidulina (4).....	56
Espectro 14. RMN- ¹³ C, Hispidulina (4).....	57
Espectro 15. FLOCK, Hispidulina (4).....	58
X. BIBLIOGRAFÍA.....	59

LISTA DE TABLAS

1. Fraccionamiento del extracto acetónico de <i>Schkuhria pinnata</i>	20
2. Desplazamientos químicos de RMN ¹ H y RMN ¹³ C de la 11-13-dehidroeriolina (2)	28
3. Desplazamientos químicos de RMN ¹ H y RMN ¹³ C de dieschkuhriolina (3).....	29
4. Datos cristalográficos.....	37
5. Colección de datos y refinamiento.....	38
6. Longitudes de enlace [Å] y ángulos de enlace [°] para dieschkuhriolina (3).....	38
7. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN ¹ H y RMN ¹³ C de la hispidulina (4) y la pectolarigenina (1).....	41

LISTA DE FIGURAS

1. Clasificación de algunas lactonas de acuerdo a su esqueleto.....	7
2. Estructuras y numeración de los carbonos en cinco núcleos de lactonas sesquiterpénicas.....	8
3. Biogénesis de los cuatro cationes precursores de sesquiterpenos.....	9
4. Biogénesis del anillo lactónico de lactonas sesquiterpénicas.....	10
5. Interrelaciones biogenéticas entre varias clases de lactonas sesquiterpénicas.....	11
6. Arreglo C ₆ -C ₃ -C ₆ de los flavonoides.....	12
7. Ruta biosintética de flavonoides.....	13
8. Clasificación de algunos flavonoides de acuerdo a su variante estructural.....	14

9. Interacciones NOESY relevantes de 11,13-dehidroeriolina (2).....	27
10. Interacciones HMBC relevantes de dieschkuhriolina (3).....	32
11. Posibilidades regio-isoméricas de cicloadición para la formación de dieschkuhriolina (3).....	33
12. Estereoisómeros posibles generados a partir de la cicloadición [4+2] Diels-Alder.....	34
13. Interacciones NOESY de dieschkuhriolina (3).....	36
14. Estructura molecular de dieschkuhriolina (3) con numeración secuencial para los átomos de carbono y oxígeno.....	37

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etilo
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCP	Cromatografía en Capa Fina Preparativa
CCV	Cromatografía en Columna a Vacío
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CHCl ₃	Cloroformo
COSY	Correlación Espectroscópica Homonuclear (RMN- ¹ H)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
<i>d</i>	Señal doble (doblete)
δ	Desplazamiento químico (ppm)
EM	Espectrometría de Masas
EtOH	Etanol
FLOCK	Correlación Heteronuclear a dos o tres enlaces de distancia (Multiple Bird long Range Correlation Spectroscopy)
HETCOR	Correlación Heteronuclear a un Enlace de Distancia
HMBC	Correlación Heteronuclear de Enlace Múltiple
HSQC	Correlación Espectroscópica Heteronuclear
IE	Impacto Electrónico
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento (Hz)
<i>m</i>	Señal múltiple
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
<i>M</i> ⁺	Ion molecular
MeOH	Metanol
NOESY	Efecto Nuclear Overhauser
<i>pf</i>	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de ¹ H
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de ¹³ C
<i>s</i>	Señal simple (singulete)
<i>t</i>	Señal triple (triplete)
TMS	Tetrametilsilano
UV	Espectroscopía de Ultravioleta
<i>v</i>	Número de onda

I. INTRODUCCIÓN

Ciertos organismos vivos, en el curso de su proceso evolutivo, han desarrollado procesos biosintéticos de sustancias denominadas metabolitos secundarios ó productos naturales, los cuales se producen como mecanismos de defensa. En el caso de las plantas, se conoce ahora que estas sustancias las protegen de otras plantas, insectos, hongos, bacterias y de parásitos que pueden depredarlas. También se conoce que algunas de tales sustancias desempeñan funciones de protección a la radiación ultravioleta del sol, o bien, están involucradas en procesos de transferencia de energía luminosa.

Durante las últimas décadas, y debido al advenimiento de numerosas técnicas eficientes de separación y análisis químico, se ha generado un cúmulo importante de conocimiento referente a las estructuras moleculares de las sustancias presentes en muchas fuentes naturales. Esto, aunado al conocimiento biológico, ha permitido proponer algunas relaciones entre ciertos tipos de estructuras químicas y la taxonomía de los organismos.

Así, resulta evidente que la biodiversidad constituye una fuente única de sustancias, cuyo conocimiento químico y biológico coadyuvará al conocimiento y preservación de este importante recurso natural.

México posee una de las mayores diversidades biológicas del orbe [1], por lo que el estudio multidisciplinario de la biodiversidad es de notable importancia para nuestro país, con el objetivo general de su conservación y eventual aprovechamiento racional.

En todas las culturas del mundo existe una amplia y reconocida tradición en el uso de las plantas por diferentes grupos étnicos, y a partir de estudios químicos biológicos, se han aislado diversas sustancias de interés terapéutico, agronómico, cosmetológico, entre otras [2]. Así podemos citar por ejemplo, algunas especies que han sido y son objeto de intensos estudios químico-farmacológicos, entre estos podemos citar: *Hypericum perforatum* o Hierba de San Juan, la cual se recomienda para el tratamiento de la ansiedad y la depresión, *Ginkgo biloba*, utilizada para mejorar la circulación, la memoria y las funciones mentales [3-5].

Teniendo en cuenta la importancia del conocimiento de la estructura molecular de los constituyentes químicos presentes en la flora nacional, este trabajo se refiere al aislamiento y determinación estructural de algunos metabolitos secundarios de la especie vegetal *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze var. *wislizenii* (A. Gray) B. L. Turner, perteneciente a la familia

Compositae. Esta planta se considera una maleza y se encuentra distribuida ampliamente en el territorio nacional [6]. Se conoce, por análisis previos, que este vegetal biosintetiza lactonas sesquiterpénicas [13]. Sin embargo, el estudio de esta especie aportará conocimientos adicionales sobre la constancia o variabilidad en el contenido metabólico.

II. OBJETIVO Y METAS

OBJETIVO

Generar conocimiento referente a la estructura molecular de algunos metabolitos secundarios presentes en la flora de nuestro país. Específicamente, se analizarán algunos productos naturales de la especie vegetal *Schkuhria pinnata*, mediante la aplicación de la metodología convencional de investigación en química orgánica.

METAS

1. Extraer los constituyentes químicos mediante la preparación de extractos con disolventes de diferente polaridad a partir de las partes aéreas de la especie vegetal.
2. Aislar y purificar algunos productos naturales presentes en *Schkuhria pinnata* por medio de la aplicación sucesiva de diversas técnicas cromatográficas y cristalizaciones fraccionadas.
3. Determinar la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados mediante el análisis e integración de datos espectroscópicos.
4. Comparar e integrar los conocimientos adquiridos con los informados en la literatura.

III. HIPÓTESIS

Considerando que se han aislado lactonas sesquiterpénicas de la especie vegetal *Schkuhria pinnata* [13,46-47], y dada su amplia distribución geográfica, es esperable la obtención de este tipo de sustancias a partir de esta fuente natural, pero con ciertas variaciones estructurales, atribuibles a variables en su hábitat.

IV. ANTECEDENTES

A. METABOLITOS SECUNDARIOS

Paralelamente a los metabolitos primarios, entre los cuales se consideran a los aminoácidos, las proteínas, los carbohidratos, los lípidos y a los ácidos nucleicos, se biosintetizan otro tipo de compuestos que, por sus características particulares y específicas, se denominan metabolitos secundarios. Estas sustancias poseen una gran heterogeneidad en su estructura molecular. En algunos casos, no es fácil establecer la diferencia entre metabolitos primarios y secundarios.

Debido a que los ácidos grasos, los alcanos y sustancias relacionadas, ciertos monoterpenos y sesquiterpenos, triterpenos, carotenoides, ácidos cinámicos, flavonoides son ubicuos, todas las plantas poseen las rutas biosintéticas que los producen. Esto demuestra que las dos formas de metabolismo están interrelacionadas; el metabolismo primario provee un cierto número de moléculas pequeñas que son empleadas como materiales precursores de las rutas metabólicas secundarias importantes.

La gran variedad de características químicas en los metabolitos secundarios deriva de un grupo reducido de precursores. Existen tres precursores principales:

1. El ácido shikímico, precursor de muchos compuestos aromáticos, incluyendo los aminoácidos aromáticos, los ácidos cinámicos y ciertos polifenoles.
2. Los aminoácidos, que dan origen a los alcaloides y a los antibióticos peptídicos, incluyendo las penicilinas y las cefalosporinas.
3. El acetato, precursor de los poliacetilenos, las prostaglandinas, antibióticos macrocíclicos, polifenoles e isoprenoides (terpenos, esteroides y carotenoides) a través de dos caminos biosintéticos totalmente separados.

Los precursores de estos metabolitos secundarios también son utilizados para la biosíntesis de ciertos metabolitos primarios: proteínas, ácidos grasos, etc. Las reacciones biológicas que están involucradas en la síntesis de los metabolitos primarios y secundarios están catalizadas por una serie definida de enzimas diferentes [7].

B. FAMILIA COMPOSITAE

La familia de las compuestas (Asteraceae) comprende alrededor de 1000 géneros y aproximadamente 15000 especies de plantas distribuidas por todo el mundo [8]. Son en su mayoría hierbas anuales, aunque también podemos encontrar arbustos y árboles. Por su estructura floral y por su composición química, se considera la familia más evolucionada de las dicotiledóneas.

Varios miembros de esta familia tienen aplicaciones terapéuticas debido a su actividad antihelmíntica, antibiótica, citotóxica, bactericida, fungicida y espasmolítica entre otras. La familia de las compuestas biosintetiza principalmente compuestos acetilénicos, terpenoides, flavonoides, cumarinas y alcaloides [9].

El género *Schkuhria* pertenece a la tribu Heliantheae de la familia Compositae. Este grupo de plantas se localiza principalmente en América con excepción de unas pocas reportadas en África. En México se encuentra en la parte central de la república.

El género *Schkuhria* se caracteriza por biosintetizar generalmente lactonas sesquiterpénicas, y algunas especies son utilizadas como insecticidas o repelentes de insectos, particularmente para eliminar pulgas [10].

C. LACTONAS SESQUITERPÉNICAS

Las lactonas sesquiterpénicas poseen un esqueleto de 15 átomos de carbono, que deriva de la unión cabeza-cola de tres fragmentos de isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Parte del esqueleto es un anillo de metilbutenólida [11].

De acuerdo a su esqueleto se clasifican en germacranólidas, guayanólidas, pseudoguayanólidas, eudesmanólidas, elemanólidas, eremofilanólidas y xantanólidas, entre otros (Figura 1).

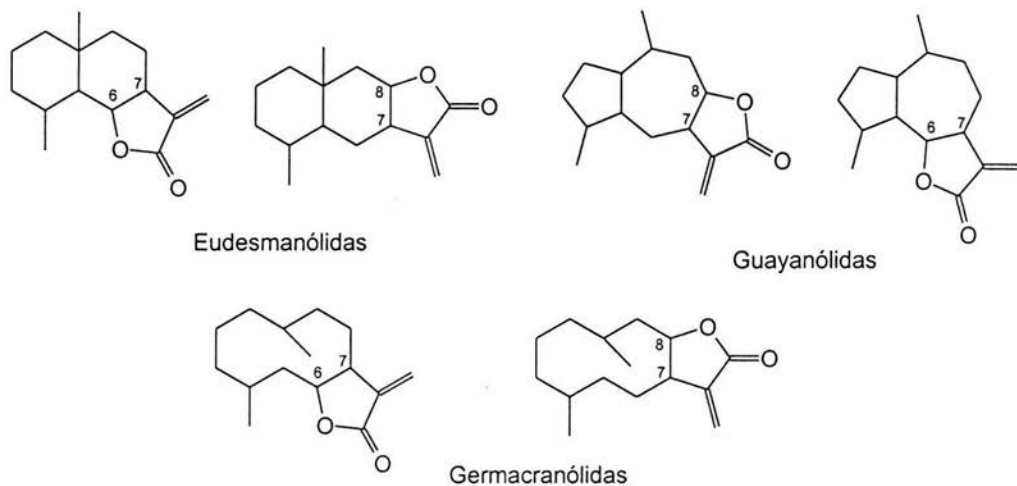


Figura 1. Clasificación de algunas lactonas de acuerdo a su esqueleto.

Las lactonas sesquiterpénicas se clasifican comúnmente de acuerdo con el tipo de núcleo que posean con la terminación -ólida que indica la existencia de un grupo funcional lactona. La figura 1 y 2 muestran varios núcleos de lactonas sesquiterpénicas, y la manera como se numeran los átomos de carbono del núcleo base.

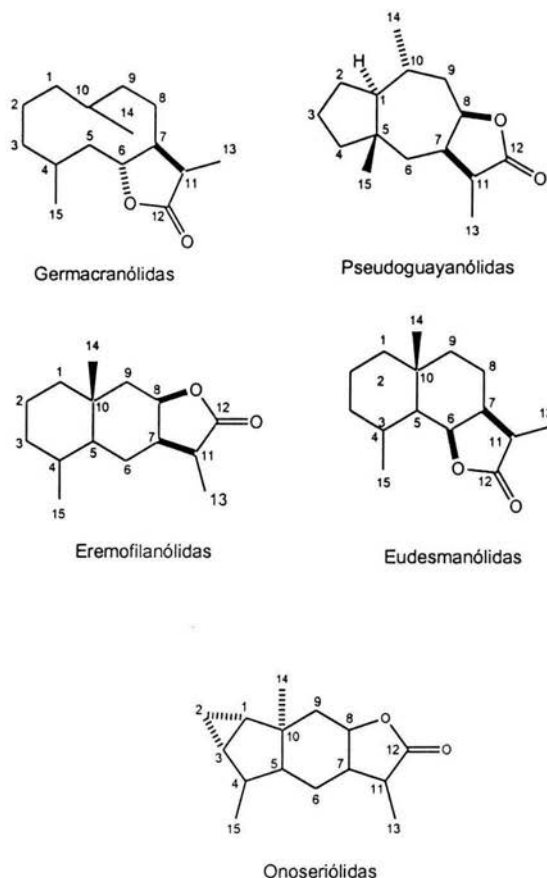


Figura 2. Estructuras y numeración de los carbonos de algunos tipos de lactonas sesquiterpénicas

Las lactonas sesquiterpénicas se originan a partir del pirofosfato de farnesilo, como los demás sesquiterpenos naturales. La Figura 3 muestra la biogénesis de los cationes I, II, III y IV, a partir de los cuales se origina la mayoría de sesquiterpenos.

La lactonización del precursor sesquiterpenoide parece producirse por un mecanismo de oxidación de un grupo metilo hasta carboxilo, la oxidación de un carbono adyacente y

finalmente la deshidratación entre los grupos carboxilo e hidroxilo formados. La figura 4 describe este proceso.

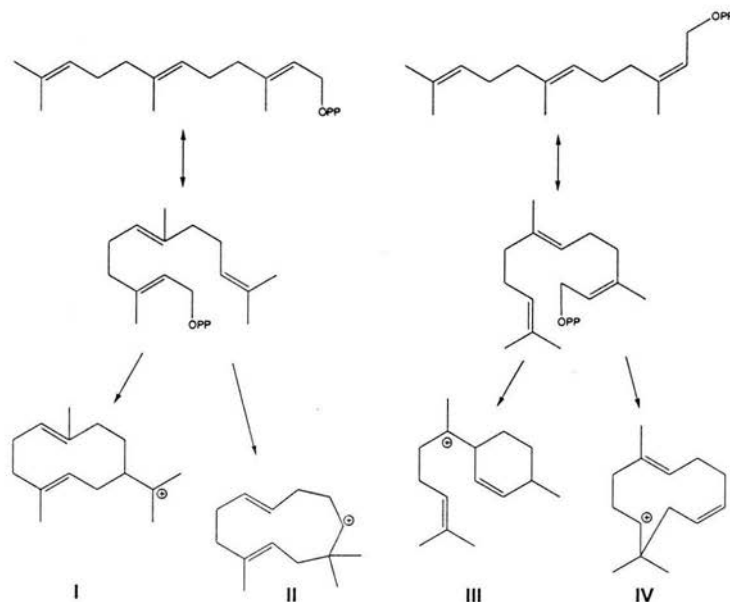


Figura 3. Biogénesis de los cuatro cationes precursoros de Sesquiterpenos

De manera análoga, se presupone la biosíntesis de todas las variantes estructurales de lactonas sesquiterpénicas. La Figura 5 muestra las relaciones biogénicas propuestas para las diversas clases de lactonas sesquiterpénicas.

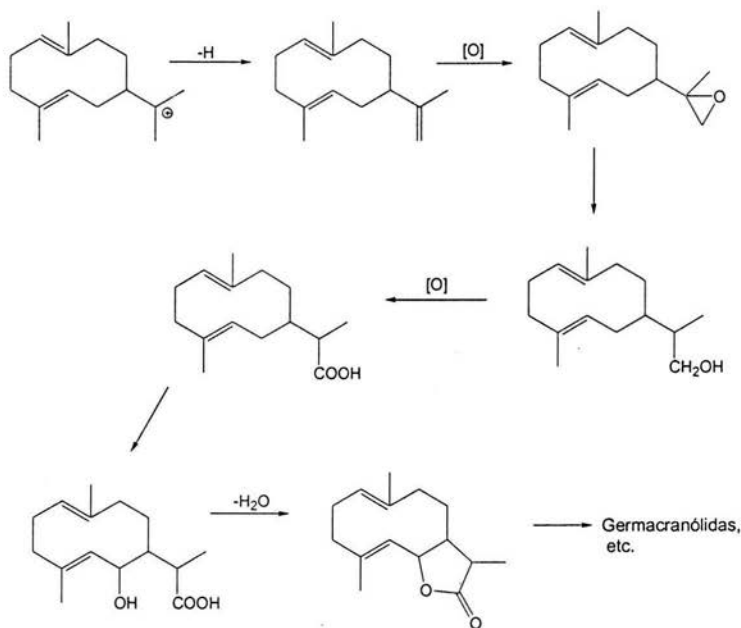


Figura 4. Biogénesis del anillo lactónico de lactonas sesquiterpénicas

Las lactonas sesquiterpénicas son constituyentes característicos de plantas de la familia Compositae, aunque se han encontrado en otras pocas plantas de familias como Magnoliaceae, Umbelliferae, y Lauraceae [11-14]

A las lactonas sesquiterpénicas se han asociado diversas actividades biológicas [14] tales como: acción citotóxica, antitumoral, insecticida, inhibidores del crecimiento de las plantas entre otras [4,15-17].

La actividad citotóxica de las lactonas sesquiterpénicas ha sido relacionada con el grupo exometileno de la lactona, aunque también han mostrado otras actividades que no tienen relación con la presencia de este grupo. Estas actividades son antimicrobiana, antiparasitaria, antimalárica, antialérgica, antiinflamatoria, entre otras [18-23].

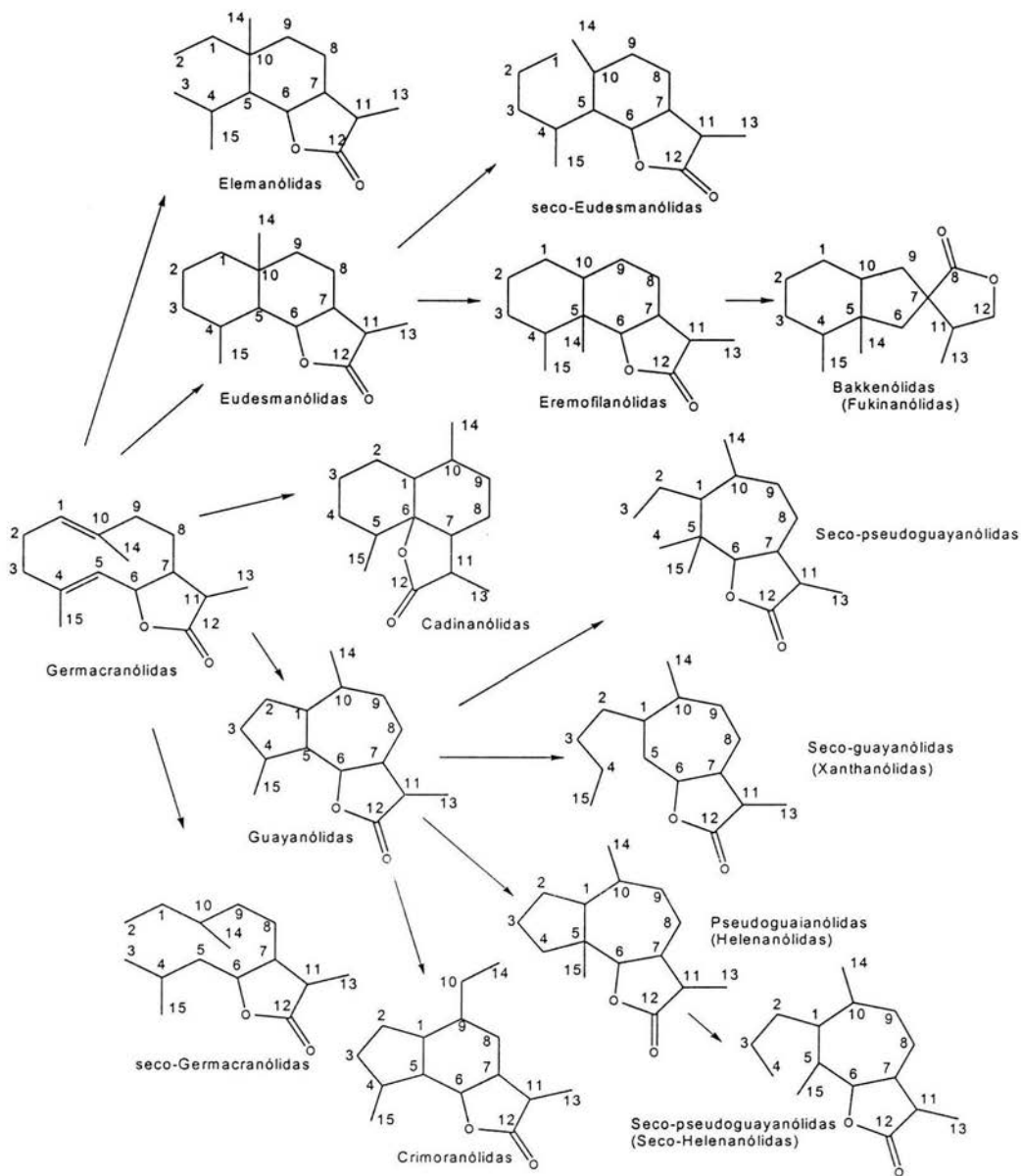


Figura 5. Interrelaciones biogénicas entre varias clases de lactonas sesquiterpénicas [12]

D. FLAVONOIDES

Los flavonoides son compuestos fenólicos que poseen 15 átomos de carbono en su núcleo base y presentan un arreglo $C_6-C_3-C_6$, en el cual dos núcleos bencénicos (A y B) están unidos por un anillo cromano en posición 2, 3 o 4.

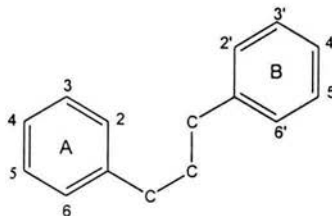


Figura 6. Arreglo $C_6-C_3-C_6$ de los flavonoides.

Se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales y son biosintetizados en parte a partir del ácido shikímico y en parte a partir de la acetilcoenzima A vía malonil-CoA, por lo que se consideran de biosíntesis mixta [24, 25].

Los flavonoides son sintetizados por numerosos grupos de plantas y con excepción de algunas flavonas localizadas en alas de mariposa, probablemente por ingestión, se podría decir que no se encuentran en animales [11, 25].

El anillo A proviene de la ruta de la malonilcoenzima A, el anillo B y la cadena C₃ provienen de la ruta del ácido shikímico. Un tricétido se cicliza y se condensa con una molécula de ácido *p*-cumárico. La enolización del ciclo proveniente de la ruta de la malonil-CoA, da origen al anillo aromático A en las chalconas y flavanonas. Estas, a su vez, son los precursores de las demás clases de flavonoides. Es importante mencionar que este proceso de biosíntesis sustenta el hecho de que en la mayoría de los flavonoides el anillo A sea oxigenado en *meta*, es decir, como es característico de los anillos aromáticos originados por la vía de la malonil-CoA; y por otro lado, el anillo B proveniente de la ruta del ácido shikímico, generalmente es orto-oxigenado (Figura 6).

Para el caso de la biogénesis de los isoflavonoides tales como las isoflavonas y rotenoides, los experimentos realizados por diversos investigadores sugieren que hay un proceso de migración 2,3.

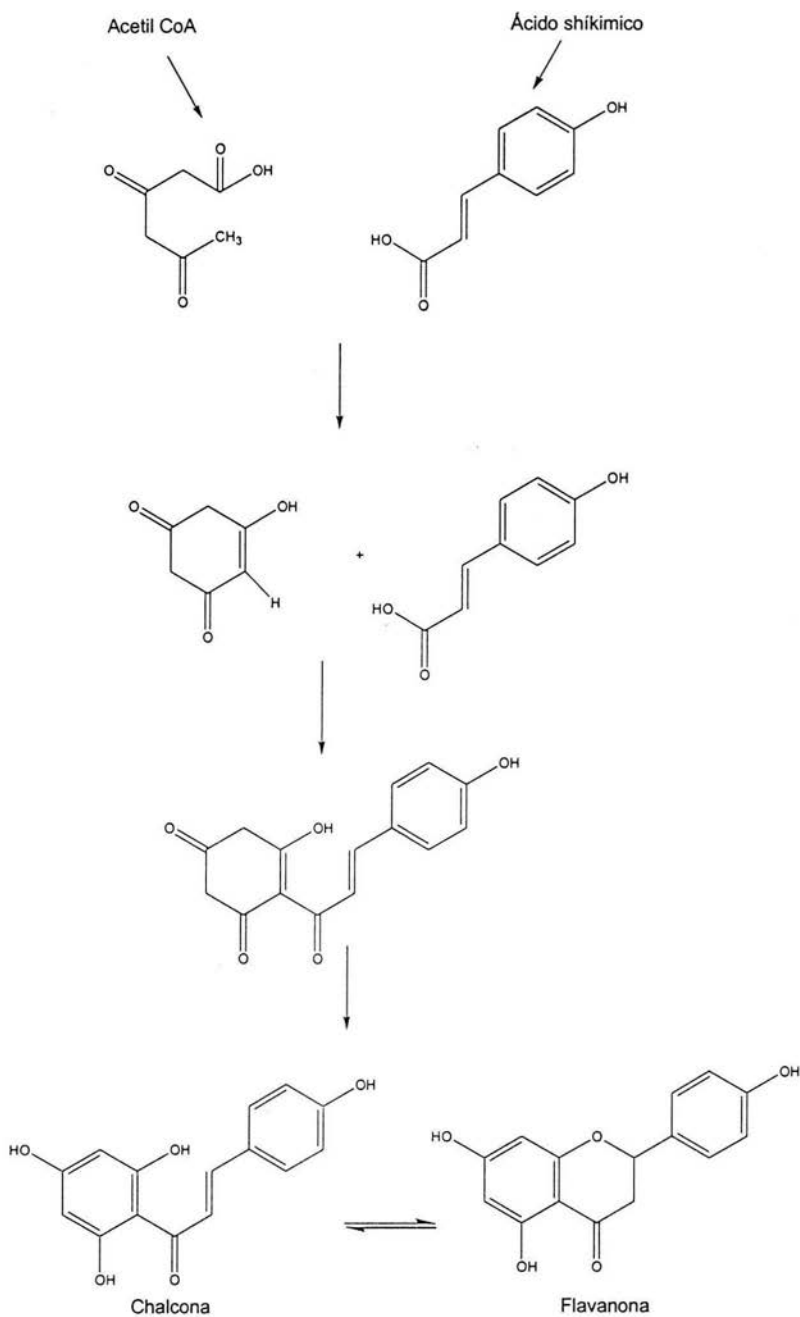


Figura 7. Ruta biosintética de flavonoides

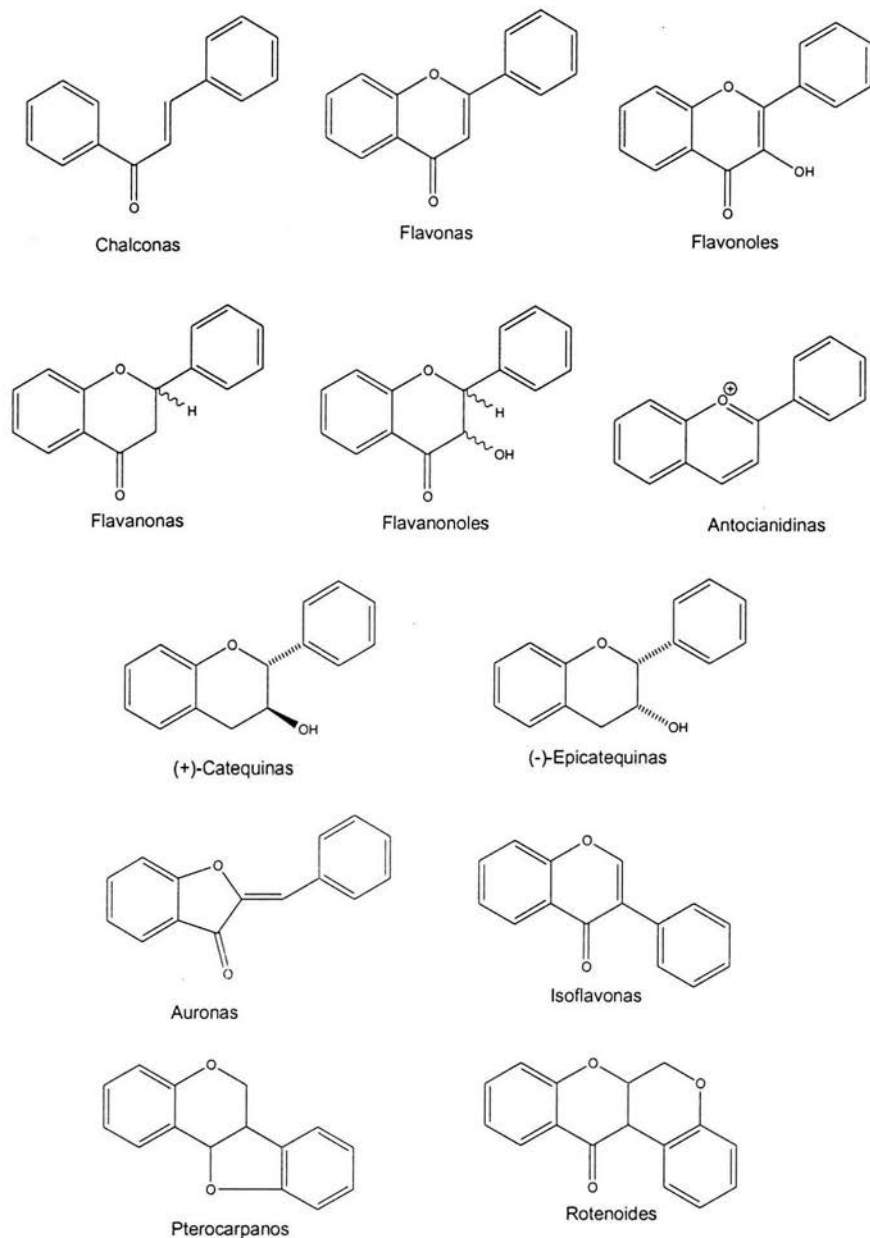


Figura 8. Clasificación de algunos flavonoides de acuerdo a su variante estructural.

Los flavonoides se clasifican de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central C3. La mayoría de agliconas flavonoides poseen nombres triviales con las terminaciones -ina u -ol.

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas verdes (especialmente angiospermas), y solo algunos pocos se han detectado en hongos y algas. Se han encontrado en las diferentes partes de las plantas, especialmente en las partes aéreas; y se les encuentra en forma libre (también llamados agliconas flavonoides), como glicósidos, como sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros. Los glicósidos pueden ser de dos clases: con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) es decir como O-glicósidos; o con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glicósidos. De todas estas formas naturales, los O-glicósidos son los más comunes. Las antocianinas se encuentran como sales principalmente en flores, frutos y tejidos con coloraciones que van del rojo hasta el violeta y el azul.

Las propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide considerado y su forma (libre, glicósido ó sulfato). Por ejemplo, las flavonas, flavonoles y auronas, debido al sistema conjugado son sólidos con colores que comprenden desde el amarillo muy tenue hasta el rojo. Las antocianidinas son de colores rojo intenso, morado, violeta y azul. Las flavanonas y flavanonoles debido al carbono quiral C2 presentan actividad óptica. Los glicósidos son en general sólidos amorfos, mientras que las agliconas son cristalinas.

La solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y *n*-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en disolventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en disolventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo [24-26].

Entre las propiedades que presentan este tipo de compuestos destacan las actividades antiinflamatorias, antitumorales, antihepatotóxicas, efectos en el sistema vascular, antimicrobiana, antiviral, antialérgica, hipoglucémico, anticoagulante, además inhiben la actividad de diferentes enzimas (reductasa aldosa, oxidasa xantina, AMPc, Bomba ATPasa-Ca²⁺, proteincinasa tirosina, β-glucuronidasa, aromataza, etc.) mientras que otros tienen actividad antioxidante [24-29].

V. MATERIAL Y EQUIPO

Material Vegetal

Partes aéreas de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze var. *wislizenii* (A. Gray) B.L. Turner (Compositae).

Material

- Columnas cromatográficas de diferentes tamaños
- Frascos viales diferentes tamaños (5, 10, 20 mL)
- Cámaras de elución de diferentes tamaños
- Capilares
- Embudos Hirsh de porcelana
- Embudos de vidrio de diferentes tamaños
- Pipetas graduadas (1, 5, 10 mL)
- Equipo para destilación simple y fraccionada
- Matraz bola (250, 500 y 1000 mL)
- Matraz Erlenmeyer (25, 50, 100 y 250 mL)
- Matraz kitazato (25, 50, 250 Y 500 mL)
- Probetas graduadas (10, 250, 500 y 1000 mL)
- Espátulas de acero inoxidable
- Vasos de precipitados (50, 100, 250 mL)
- Soportes
- Mangueras de látex

Reactivos

- Silica gel Merck malla 70-230 y 60 GF para las columnas cromatográficas (Merck).
- Sulfato de sodio anhidro (Aldrich).
- Sulfato cérico amoniacal (Aldrich).

Disolventes

- Acetato de etilo, grado técnico (disolventes y mezclas).
- *n*-hexano, grado técnico (disolventes y mezclas).

- Cloroformo, grado analítico (Merk).
- Etanol, grado técnico (Merck).
- Metanol, grado técnico (Merck).
- Acetona, grado técnico.
- DMSO grado analítico (Merk).
- Diclorometano, grado técnico.

Otros

- Cromatofolios Alugram SiG/UV₂₅₄, Macherey-Nagel

Equipo

- Aparato Fisher-Johns.
- Lámpara de UV Spectroline Modelo ENF-240C-20 a 365 y 254 nm
- Balanza analítica (OHAUS Analytical Plus, Modelo AP210S).
- Balanza semianalítica (OHAUS PORTABLE *Advanced*, Modelo No. CT1200).
- Baño de agua (Büchi R-124).
- Rotavapor (Büchi R-124).
- Espectrofotómetro de I.R. (Perkin Elmer, modelo 283 y 681).
- Espectrómetro de Masas (Hewlett Packard 5985 GC/MS system 70 eV).
- Espectrofotómetro de U.V. (Varian FT y VxR-3005).
- Espectrómetro de RMN Varian Unity XR-300
- Espectrómetro de RMN Varian Unity Plus 500
- Difractómetro Bruker Smart Apex CCD

VI. PARTE EXPERIMENTAL

Schkuhria pinnata (Lam.) Kuntze var. *wislizenii* (A. Gray) B. L. Turner. (Compositae) se recolectó 2 Km Norte de la carretera de León a Aguascalientes en septiembre del 2001. La referencia del material colectado se encuentra depositada en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM, con clave 1045201 y 1045203.

Las partes aéreas de *Schkuhria pinnata* se secaron al aire y a temperatura ambiente, para obtener 8 Kg de material vegetal seco. Este material fue pulverizado en un molino, y sometido a procesos de extracción sucesiva, inicialmente con hexano, por dos ocasiones, a temperatura ambiente, para obtener las sustancias menos polares, obteniéndose 276.9 g de residuo, al eliminar el disolvente a presión reducida. El material vegetal deslipidizado se extrajo con acetona, por dos ocasiones, a temperatura ambiente, para obtener, después de la eliminación del disolvente a presión reducida, 200 g de residuo que contiene a las sustancias de polaridad intermedia.

El análisis comparativo de los extractos hexánico y acetónico por cromatografía en capa fina permitió determinar la mayor abundancia de metabolitos secundarios en este último residuo. Por lo tanto, el extracto acetónico se adsorbió en 200 g de sílice, y se fraccionó por cromatografía en columna la cual fue empacada con 1 Kg de sílica gel. Como fase móvil del proceso cromatográfico se utilizaron mezclas de hexano-acetato de etilo de polaridad creciente obteniéndose eluatos de 450 mL. El desarrollo del cromatograma permitió la obtención de 305 fracciones, las cuales fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica, obteniéndose 19 fracciones, las cuales fueron denominadas A-S. El procedimiento de fraccionamiento se ilustra en el esquema 1.

Las fracciones A-C de menor polaridad presentaron lípidos y ceras, por lo que se decidió llevar a cabo la purificación de los metabolitos secundarios a partir de fracciones de mayor polaridad.

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

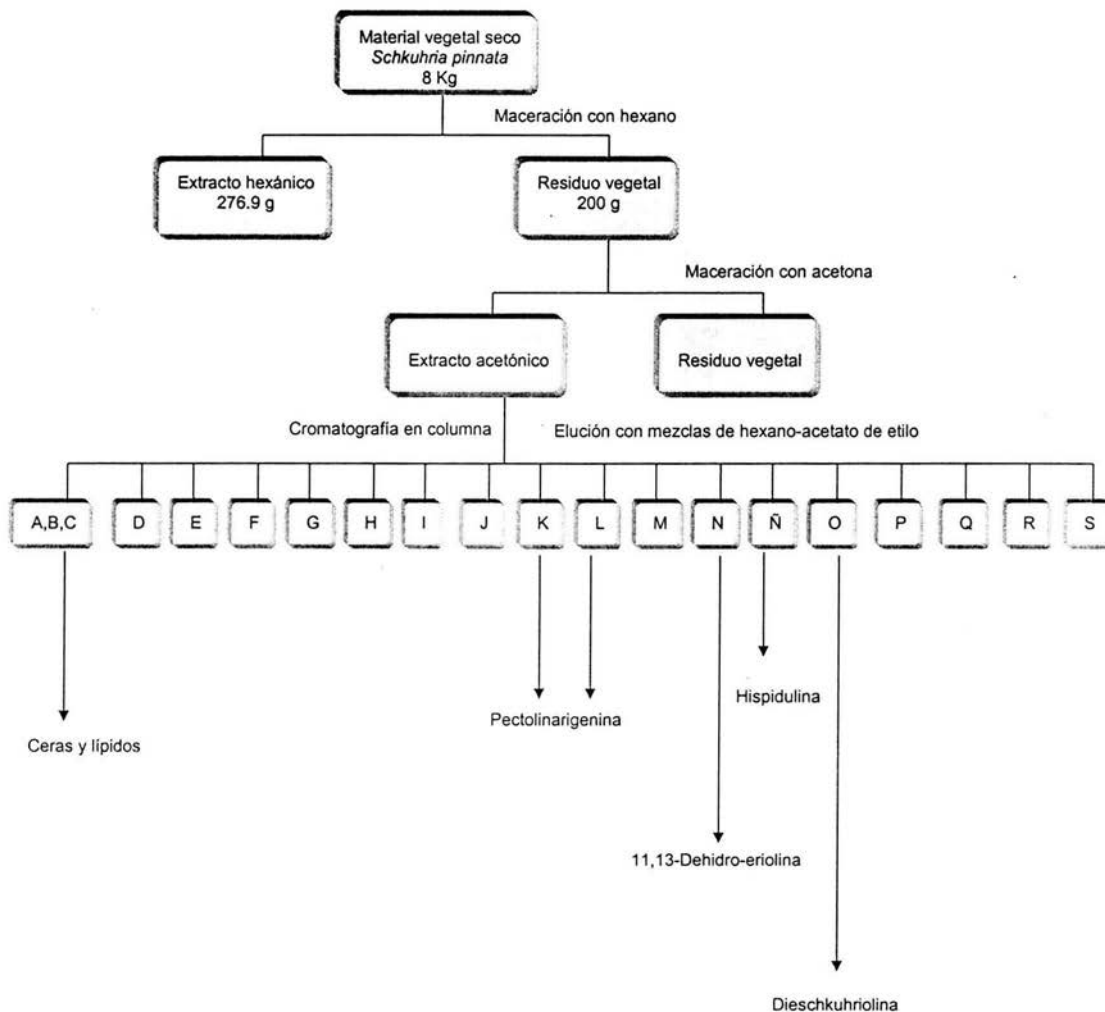


Tabla 1. Fraccionamiento del extracto acetónico de *Schkuhria pinnata*.

No. de eluato (vol. 450 mL)	Fracción	Eluyente (hexano/AcOEt)	Peso (g)
1-47	A	Hexano	6.15
47-61	B	95:5	5.20
62-68	C	90:10	4.12
68-85	D	90:10	2.47
86-96	E	90:10	1.0
97-102	F	85:15	5.60
103-106	G	85:15	4.58
107-121	H	85:15	3.81
122-132	I	85:15	2.42
133-142	J	80:20	1.50
143-151	K	80:20	4.30
152-161	L	80:20	2.97
162-178	M	80:20	21.92
179-190	N	70:30	13.80
191-210	Ñ	70:30	15.3
211-227	O	60:40	5.19
228-252	P	60:40	6.33
253-280	Q	50:50	4.73
281-290	R	AcOEt	7.10
291-305	S	AcOEt	4.04

Pectolinarigenina (1)

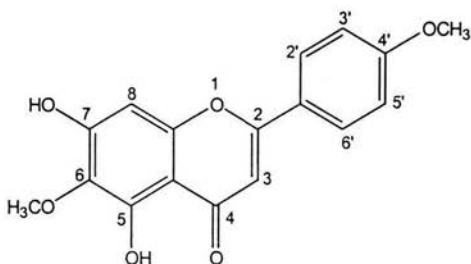
De la fracción K y L (7.2 g) fue aislado y purificado por cristalización de MeOH, 76.8 mg de un sólido cristalino amarillo verdoso, soluble en acetona, DMSO y parcialmente soluble en cloroformo y diclorometano, que mediante los estudios espectroscópicos permitieron caracterizar a esta sustancia como pectolinarigenina [30-35].

Características físicas y espectroscópicas:

p.f. 207-209°C (lit. [30]:210-211°C)

RMN¹H (300 MHz, DMSO, δ) (Espectro 1): 13.01 (1H, s, C(5)-OH), 8.01 (2H, d, J 8.7, H-2', 6'), 7.09 (2H, d, H-3', 5'), 6.84 (1H, s, H-3), 6.60 (1H, s, H-8), 3.74 (1H, s, OCH₃-6).

RMN¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): 163.82 (C-2), 102.37 (C-3), 182.09 (C-4), 152.78 (C-5), 131.34 (C-6), 157.21 (C-7), 94.22 (C-8), 152.38 (C-9), 104.09 (C-10), 121.22 (C-1'), 128.42 (C-2'), 115.96 (C-3'), 161.14 (C-4'), 115.93 (C-5'), 128.42 (C-6').



(1)

11,13-Dehidroeriolina (2)

De la fracción N se tomó una muestra (13.8 g) la cual se fraccionó en una columna de 4 cm de diámetro, empacada con 73.2 g de sílica gel, eluyendo con mezclas de hexano-AcOEt.

De las fracciones 74-90 [hexano-acetato de etilo (8:2)] fueron obtenidos cristales blancos en forma de agujas. Este sólido (768 mg) fue purificado por cromatografía en columna (2.1 cm de diámetro, empacada con 15 g de sílica gel), empleando mezclas de diclorometano-acetona de polaridad creciente. Mediante este procedimiento se obtuvieron cristales (510 mg), solubles en acetona, cloroformo y diclorometano correspondientes a 11,13-dehidroeriolina [45-47].

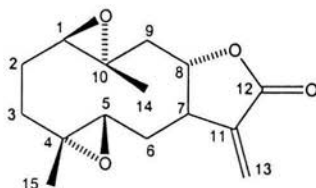
Características físicas y espectroscópicas:

p.f. 168-172°C (lit. [47]: 173-174°C)

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, δ) (Espectro 2): 2.83 (*dd*, J 11, H-1 α), 2.14 (*dddd*, J 14.0, 2.0, 2.0, 1.0, H-2 α), 1.51 (*dddd*, J 14.0, 11.0, 5.0, 4.0, H-2 β), 1.35 (*ddd*, J 13.0, 5.0, 1.0, H-3 α), 2.27 (*ddd*, J 13.0, 4.0, 2.0, H-3 β), 2.86 (*dd*, J 10.0, 1.0, H-5 α), 2.42 (*da*, J 15.0, H-6 α), 1.58 (*dd*, J 5.0, 10.0,

H-6 β), 2.90 (*m*, H-7 β), 4.21 (*ddd*, *J* 10.5, 7.0, 1.0, H-8 α), 1.53 (*dd*, *J* 14.0, 1.0, H-9 α), 2.75 (*dd*, *J* 14.0, 7.0, H-9 β), 5.69 (*d*, *J* 3.0, H-13a), 6.33 (*d*, *J* 3.0), 1.44 (*s*, CH₃-14), 1.29 (*s*, CH₃-15).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) (Espectro 3): 63.44 (C-1), 23.45 (C-2), 35.75 (C-3), 60.88 (C-4), 64.33 (C-5), 31.94 (C-6), 45.90 (C-7), 82.11 (C-8), 46.21(C-9), 57.78 (C-10), 138.64 (C-11), 168.59 (C-12), 122.46 (C-13), 17.95 (C-14), 15.92 (C15).



(2)

Dieschkuhriolina (3)

La fracción O (5.19 g) fue recromatografiada en una columna de 4 cm de diámetro empacada con sílica gel hasta una altura de 5 cm, empleando mezclas de hexano-acetato de etilo de polaridad creciente. De los eluatos 113-122 [hexano-acetato de etilo (8:2)] fue aislado un dímero de lactona sesquiterpénica (16.8 mg) como cristales transparentes en forma de agujas, solubles en diclorometano, cloroformo y acetona.

Características físicas y espectroscópicas:

p.f. 220-223°C.

[α]_D²⁵: -78.18 (0.0011 g/mL, CHCl₃).

U.V. λ_{\max} ^{CH₂Cl₂}: 230.5 nm (ϵ 1612.16).

IR (CHCl₃, cm⁻¹)(Espectro 4):3693, 2969, 2940, 2878, 1761, 1603, 1463, 1388, 1331,1308, 1150, 1094, 1061, 1026, 986, 943, 914.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, δ) (Espectro 5a, 5b): 2.81 (*dd*, *J* 9.0, 1.0, H-1 α), 2.14 (*da*, H-2 α), 1.43 (*m*, H-2 α), 1.24 (*m*, H-3 α), 2.21 (*ddd*, *J* 14.5, 3.5, 3.5, H-3 β), 2.54 (*d*, *J* 8.0, H-5 α), 1.28 (*ddd*, *J* 15.0, 10.0, 8.0, H-6 α), 1.80 (*d*, *J* 15.5, H-6 β), 2.02 (*ddd*, *J* 10.0, 10.0, H-7 α), 4.01 (*ddd*, *J* 10.0, 10.0, 1.5), 1.44 (*dd*, *J* 14.0, 10.0, H-9 α), 2.80 (*dd*, *J* 14.0, 1.5, H-9 β), 1.74 (*dd*, *J* 12.5, 3.0, H-13a), 2.06 (*dd*, *J* 12.5, 3.5, H-13b), 1.37 (*s*, CH₃-14), 1.21 (*s*, CH₃-15), 2.66 (*m*, H-2' β), 1.28 (*m*, H-3' α), 2.46 (*d*, *J* 8.5, H-3' β), 2.81 (*dd*, *J* 15.5, 3.5, H-6' α), 1.72 (*dd*, *J* 15.5, 10.5, H-6' β),

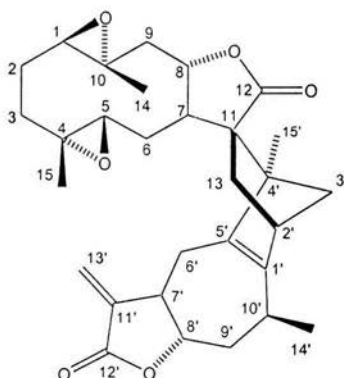
2.59 (dddd, J 10.5, 9.5, 3.5, 3.5, 3.5, H-7' α), 4.21 (ddd, J 12.0, 9.5, 2.0, H-8' β), 1.97 (ddd, J 13.0, 12.0, 5.5, H-9' α), 2.23 (ddd, J 13.0, 2.0, 2.0, H-9' β), 2.96 (ddq, J 5.5, 2.0, H-10' α), 5.55 (d, J 3.5, H-13'a), 6.22 (d, J 3.5, H-13'b), 1.18 (d, J 7.0, CH₃-14'), 1.28 (s, CH₃-15').

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) (Espectro 7a, 7b): 65.25 (C-1), 23.91 (C-2), 35.45 (C-3), 60.80 (C-4), 64.57 (C-5), 29.63 (C-6), 46.77 (C-7), 81.03 (C-8), 45.50 (C-9), 57.75 (C-10), 55.25 (C-11), 179.82 (C-12), 36.92 (C-13), 18.07 (C-14), 16.41 (C-15), 151.22 (C-1'), 48.36 (C-2'), 52.18 (C-3'), 62.42 (C-4'), 136.85 (C-5'), 26.74 (C-6'), 47.72 (C-7'), 80.72 (C-8'), 39.72 (C-9'), 32.68 (C-10'), 139.71 (C-11'), 169.76 (C-12'), 119.17 (C-13'), 19.05 (C-14'), 13.64 (C-15').

EMIE m/z-(Espectro 11): 39(7), 55(9), 77(15), 89(18), 107(20), 136(75), 154(100), 182(1), 226(0.6), 230(2), 245(4), 273(3), 289(17), 307(36), 335(5), 341(0.6), 369(0.6), 391(2), 442(0.6), 443(2), 460(5), 495(2).

EMIE (Alta Resolución) m/z- Observada 495.275, Estimada 495.2747

Rayos X: Dimensiones del cristal 0.418 x 0.274 x 0.100 mm (Difractómetro Bruker Smart Apex CCD), incoloro, prismático, $\lambda = 0.73071 \text{ \AA}$ C₃₀H₃₈O₆ $M_r = 494.60$, monoclinico, grupo espacial P2₁, celda unitaria $a = 11.162(1) \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ$, $b = 8.6749(5) \text{ \AA}$ $\beta = 109.018(1)^\circ$, $c = 14.221(1) \text{ \AA}$ $\gamma = 90^\circ$, $Z = 2$, $d_c = 1.262 \text{ mg/m}^3$, $\mu = 0.087 \text{ mm}^{-1}$, Intervalo θ para colección de datos 1.93 -25.02°, Intervalo de los índices $-13 \leq h \leq 13$, $-10 \leq k \leq 10$, $-16 \leq l \leq 16$, Reflexiones totales medidas 10765, Reflexiones independientes 4577 [$R(\text{int}) = 0.0558$], Factores de transmisión Max = 0.9922, Min = 0.9697.



(3)

Hispidulina (4)

Las fracciones 97-115 (2.6 g) [hexano-acetato de etilo (75:25)] correspondientes a la fracción Ñ fueron nuevamente recromatografiadas en una columna de 1.7 cm de diámetro empacada con 13.5 g de sílica gel, utilizándose como eluyente mezclas de hexano:acetato de etilo de polaridad creciente.

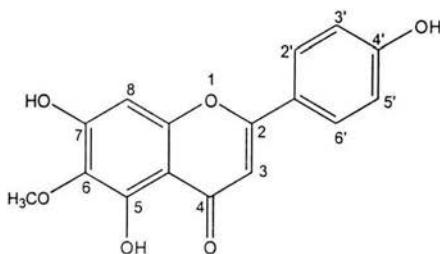
Las fracciones 21-30 presentaron sólidos amarillos (70 mg), solubles en metanol y DMSO, correspondientes a hispidulina [36-42].

Características físicas y espectroscópicas:

p.f. 250-253°C (lit.[41]: 287-289°C)

RMN¹H (300 MHz, DMSO, δ) (Espectro 12): 13.05 (1H, s, C(5)-OH), 7.89 (2H, d, *J* 8.7, H-2', 6'), 6.90 (2H, d, H-3', 5'), 6.73 (1H, s, H-3), 6.56 (1H, s, H-8), 3.74 (1H, s, OCH₃-6).

RMN¹³C (75 MHz, DMSO) (Espectro 13): 163.82 (C-2), 102.37 (C-3), 182.09 (C-4), 152.78 (C-5), 131.34 (C-6), 157.21 (C-7), 94.22 (C-8), 152.38 (C-9), 104.09 (C-10), 121.22 (C-1'), 128.42 (C-2'), 115.96 (C-3'), 161.14 (C-4'), 115.93 (C-5'), 128.42 (C-6').



(4)

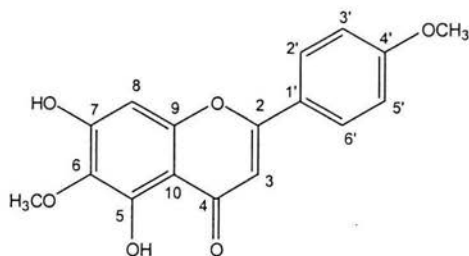
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De ciertas fracciones del extracto acetónico de las partes aéreas de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze var. *wislizenii* (A. Gray) B. L. Turner se aislaron cuatro sustancias: pectolinarigenina (1), 11,13-dehidroeriolina (2), dieschkuhriolina (3) e hispidulina (4). La discusión de la determinación estructural de los constituyentes aislados se llevará a cabo de acuerdo al orden de obtención de las sustancias en el proceso de elución de la columna cromatográfica en la que se aplicó el extracto acetónico.

Pectolinarigenina (1)

De la fracción K y L eluidas con hexano-acetato de etilo (8:2) se aisló por cromatografía y cristalizaciones sucesivas, un compuesto amarillo verdoso en forma de pequeñas agujas de p.f. 207-209°C.

En el espectro de RMN ^1H de esta sustancia (espectro 1) a campo bajo se observa una señal simple en δ 13.01 para un hidrógeno fenólico unido mediante enlace de hidrógeno a cetona (1H, C(5)-OH). En la región de los aromáticos, aparece un sistema AA'BB' centrado en δ 8.01 y δ 7.09 (J 8.7 Hz), indicando la presencia de un anillo aromático disustituido en *para*. La señal en δ 7.09 (d , J 8.7 Hz, 2H) corresponde a H-3' y H-5', en tanto que para H-2' y H-6' se asigna la señal doble δ 8.01 (d , J 8.7, 2H). Las señales simples en δ 3.84 y en δ 3.74 corresponden a los dos grupos metoxilos en posición C-6 y C-4'. Dos señales simples adicionales en δ 6.84 y en δ 6.60, que integran para un hidrógeno cada una corresponden a hidrógenos vinílicos o aromáticos, H-3 y H-8 respectivamente. La comparación con los datos espectroscópicos de la literatura [30-35] permitió establecer que la sustancia aislada es la flavona pectolinarigenina (1).



(1)

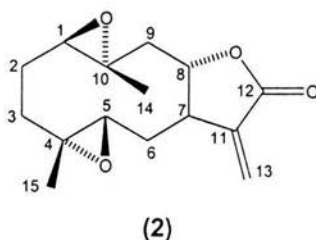
11,13-Dehidroeriolina (2)

De los eluatos 74-90 [hexano-acetato de etilo (8:2)] correspondientes a la fracción N fueron obtenidos cristales blancos en forma de agujas de p.f. 168-172°C.

La elucidación estructural se determinó por comparación de sus datos espectroscópicos mostrados en la tabla 2 y los reportados en la literatura [45-47].

Del espectro de RMN ^{13}C fue observada la proporcionalidad de 15 carbonos de los cuales 4 se encuentran unidos a oxígeno, 4 metinos, 5 metilenos y 2 metilos en el experimento DEPT, lo cual permitió suponer la presencia de parte de la estructura de la 11,13-dehidroeriolina (2).

En el espectro de RMN ^{13}C , se observan cuatro señales de carbonos unidos a oxígeno que corresponden a dos metinos y a dos carbonos cuaternarios, que sugieren la existencia de dos épidos ubicados en los carbonos C(1)-C(10) y C(4)-C(5).



En el espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) se observan dos señales dobles, una a δ 6.33 (J 3.0 Hz) y otra en δ 5.69 (J 3.0 Hz), las cuales se asignan a los hidrógenos del metileno exocíclico características de una γ -lactona α,β -insaturada, correspondientes a H-13b y H-13a respectivamente.

La señal en δ 4.21 *ddd* (J 10.5, 7.0, 1.0 Hz) fue asignada a H-8, la señal multiplete en δ 2.90 es asignada a H-7 α debido a que esta correlaciona con H-9 α , H-9 β , H-8, H-6 α y H-6 β .

H-1 α (δ 2.83, J 11.0, 2.0 Hz) señal doble de doble que se acopla tanto a H-2 α (δ 2.14, J 14.0, 2.02, 2.0, 1.0 Hz) como a H-2 β (δ 1.51, J 14.0, 11.0, 5.0, 4.0 Hz). Asimismo, estos dos protones se acoplan entre sí. H-3 α (δ 1.35, J 13.0, 5.0, 1.0 Hz) se acopla con H-3 β (δ 2.27, J 13.0, 4.0, 2.0 Hz). Mediante experimentos adicionales como son el COSY y el NOESY se determinó el desplazamiento químico de los protones situados en H-5 α (δ 2.86, J 10.0, 1.0 Hz), H-6 α (δ 2.42, J 15.0 Hz) y H-6 β (δ 1.58, J 15.0, 10.0 Hz), los cuales no habían sido asignados en la literatura [47] (Tabla 2).

Las señales simples en δ 1.44 y δ 1.29 que integran para tres hidrógenos corresponden a los grupos metilos situados en la posición CH₃-14 y CH₃-15 respectivamente.

La anterior descripción permite confirmar la estructura de la 11,13-dehidroeriolina como una sustancia natural presente en *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze var. *wislizenii*.

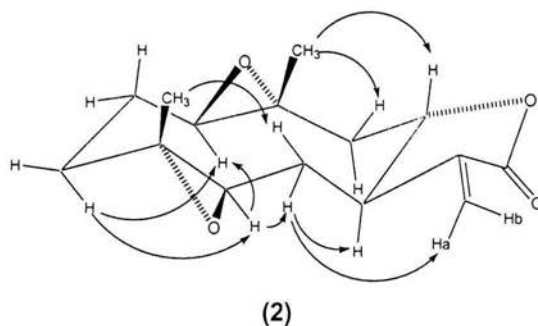


Figura 9. Interacciones NOESY relevantes de 11,13-dehidroeriolina (2).

Tabla 2. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y RMN ^{13}C de la 11,13-dehidroeriolina (2)

Posición	δ_{H} (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (CDCl_3 , 75 MHz)	Interacciones
			^1H - ^1H NOESY
1 α	2.83 <i>dd</i> (9.0, 1.5)	63.44	3 α
2 α	2.14 <i>m</i>	23.45	
2 β	1.48 <i>m</i>		
3 α	1.35 <i>dd</i> (13.0, 5.0)	35.75	1 α , 5 α
3 β	2.27 <i>ddd</i> (13.0, 4.0, 2.5)		
4	--	60.88	
5 α	2.86 <i>dd</i> (8.0, 2.5)	64.33	3 α , 6 β
6 α	2.42 <i>d</i> (15.0)	31.94	
6 β	1.60 <i>dd</i> (15.0, 10.5)		5 α , 7 α , H-13a
7 α	2.90 <i>m</i>	45.90	6 β
8 β	4.21 <i>ddd</i> (10.5, 7.0, 1.0)	82.11	CH ₃ -15
9 α	1.54 <i>m</i>	46.21	
9 β	2.75 <i>d</i> (14.0)		CH ₃ -14
10	--	57.78	
11	--	138.64	
12	--	168.59	
13 ^a	5.69 <i>d</i> (3.0)	122.46	
13b	6.33 <i>d</i> (3.0)		
14	1.44 <i>s</i>	17.95	9 β
15	1.29 <i>s</i>	15.92	6 α

Dieschkuhriolina (3)

La determinación estructural del compuesto (3) se realizó principalmente mediante el análisis detallado de los resultados espectroscópicos de 2D NMR como g-COSY, NOESY, g-HSQC y HMBC. Este análisis permitió llevar a cabo las asignaciones completas e inambiguas de las señales de RMN ^1H y RMN ^{13}C , las cuales se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y RMN ^{13}C de dieschkuhriolina (3)

Posición	δ_{H} (ppm) ^a	δ_{C} (ppm) ^b	^1H - ^1H g-COSY	^1H - ^{13}C HMBC	^1H - ^1H NOESY
1 α	2.81 <i>dd</i> (9.0, 1.0)	65.25	H-2 α , H-2 β	C-2(J^2), C-10(J^2)	H-5 α
2 α	2.14 <i>da</i> (2 α)	23.91	H-1 α , H-3 α , H-3 β	C-10(J^3)	H-3 β
2 β	1.43 <i>m</i> (2 β)		--		H-14 β
3 α	1.24 <i>m</i>	35.45	H-2 α , H-2 β	C-1(J^3)	H-5 α
3 β	2.21 <i>dd</i> (14.5, 3.5, 3.5)		--		H-2 α
4	--	60.80	--	--	--
5 α	2.54 <i>d</i> (15.0)	64.57	H-6 α , H-6 β	C-6(J^2), C-7(J^3)	H-1 α , H-3 α , H-5 α , H-6 α , H-9 α , H-7 α , H-8' α
6 α	1.28 <i>ddd</i> (15.0, 10.0, 8.0)	29.63	H-5 α , H-7 α	C-5(J^2), C-4(J^3)	H-5 α
6 β	1.80 <i>d</i> (15.0)			C-11(J^3)	H-15 β
7 α	2.02 <i>ddd</i> (10.0, 10.0)	46.77	H-6 α , H-6 β , H-8 β	C-11(J^2), C-13(J^3), C-4'(J^3), C-9(J^3), C-5(J^3)	H-5 α
8 β	4.01 <i>ddd</i> (10.0, 10.0, 1.5)	81.03	H-7 α , H-9 α , H-9 β	C-6(J^3)	H-9 β , H-14 β
9 α	1.44 <i>dd</i> (14.0, 10.0)	45.50	H-8 β	C-14(J^3)	H-5 α
9 β	2.80 <i>dd</i> (14.0, 1.5)			C-10(J^2)	H-8 β , H-14 β
10	--	57.75	--	--	--
11	--	55.25	--	--	--
12	--	179.82	H-13 α , H-13 β	--	--
13a	1.74 <i>dd</i> (12.5, 3.0)	36.92	H-2' α	C-12(J^3), C-3(J^3)	H-13b
13b	2.06 <i>dd</i> (12.5, 3.0)			C-1'(J^3)	H-2' α , H-3' β , H-13a
14 β	1.37 <i>s</i>	18.07	--	C-10(J^2), C-9(J^3), C-1(J^3)	H-2 β , H-8 β , H-9 β , H-15 β
15 β	1.21 <i>s</i>	16.41	--	C-4(J^2), C-3(J^3), C-5(J^3)	H-6 β , H-14 β

Tabla 3 (Continuación). Desplazamientos químicos de RMN ^1H y RMN ^{13}C de dieschkuhriolina

Posición	δ_{H} (ppm) ^a	δ_{C} (ppm) ^b	^1H - ^1H g-COSY	^1H - ^{13}C HMBC	^1H - ^1H NOESY
1'	--	151.22	--	--	--
2' α	2.66 <i>m</i>	48.36	H-3' α , H-3' β	C-4'(J ³)	H-3' α , H-10 α , H-13b
3' α	1.28 <i>m</i>	52.18	H-2' α	C-13(J ³), C-4'(J ²)	H-2' α , H-3' β
3' β	2.46 <i>d</i> (8.5)			C-5'(J ²), C-1'(J ³)	H-3' β , H-13b, H-15 α
4'	--	62.42	--	--	--
5'	--	136.85	--	--	--
6' α	2.81 <i>dd</i> (15.0, 3.5)	26.74	H-7' α	C-7'(J ²), C-4'(J ²)	H-7' α
6' β	1.72 <i>dd</i> (15.0, 10.5)			C-1'(J ³)	H-8 β
7' α	2.59 <i>dddd</i> (10.5, 9.5, 3.5, 3.5, 3.5)	47.72	H-6' α , H-6' β	--	H-6' α
8' β	4.21 <i>ddd</i> (12.0, 9.5, 2.0)	80.72	H-7' α , H-9' α , H-9' β	C-6'(J ³)	H-6 β , H-9' β , H-5 α
9' α	1.97 <i>ddd</i> (13.0, 12.0, 5.5)	39.72	--	C-10'(J ²), C-1'(J ³)	H-9' β , H-10' α
9' β	2.23 <i>ddd</i> (13.0, 12.0, 2.0)				H-8' β
10' α	2.96 <i>ddq</i> (5.5, 2.0)	32.68	H-9' α , H-9' β , H-14' β	C-14'(J ²)	H-2' α , H-9' α , H-14 β
11'	--	139.71	--	--	--
12'	--	169.76	--	--	--
13'a	5.55 <i>d</i> (3.5)	119.17	H-7' α	C-7'(J ³), C-11'(J ²)	H-13'b, H-6' β
13'b	6.22 <i>d</i> (3.5)			C-12'(J ³)	H-13'a
14'	1.18 <i>d</i> (7.0)	19.05	H-10' α	C-9'(J ³), C-10'(J ²), C-1'(J ³)	H-10 α
15'	1.28 <i>s</i>	13.64	--	C-3'(J ³), C-5'(J ³)	H-3' β

^a 500 MHz, CDCl₃; ^b 75 MHz, CDCl₃.

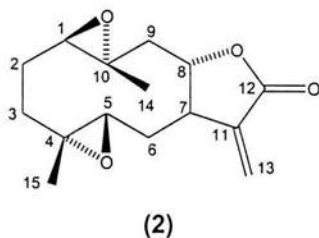
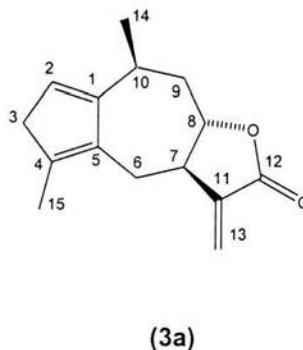
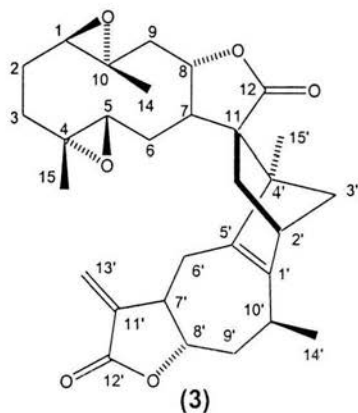
La dieschkuhriolina (**3**) fue aislada como un polvo cristalino de p.f. 220-223°C. La fórmula molecular fue establecida como C₃₀H₃₈O₆ mediante su espectro de masas de alta resolución ($M^+ + 1$: m/z 495.2750). Su espectro de IR mostró absorciones en 3693, 2969, 2940, 2878, 1761, 1603, 1463, 1388, 1331, 1308, 1150, 1094, 1061, 1026, 986, 943, 914 cm⁻¹, entre las cuales la banda de 1761 cm⁻¹, es asignable a carbonilo de γ -lactona.

La información anterior, así como la proporcionalidad de los 30 carbonos observados en el espectro de RMN ^{13}C , permitieron suponer que la estructura de (**3**) estaba constituida por la unión de dos lactonas sesquiterpénicas.

La elucidación de la estructura de una de las lactonas se inicia con el análisis del espectro de RMN ^1H , se observan señales características de γ -lactona (**2**) que se encuentra

formada por el doble enlace exocíclico C(11)=C(13) y el carbonilo C-12 que se une a la lactona (3a), para dar origen al compuesto (3). Esto se corrobora por el desplazamiento químico a campo alto de señales correspondientes a H-13a (δ 1.74) y H-13b (δ 2.06) y el acoplamiento ^1H - ^1H observado en el experimento g-COSY con H-2' α y principalmente por la correlación HMBC J^3 de estos hidrógenos (H-13a y H-13b) con C-1' (δ 151.22) y C-3' (δ 52.18).

Esta lactona se encuentra cerrada hacia C-8, debido existe una interacción HMBC J^3 de H-8 (δ 4.01) con el C-6 (δ 29.63). En el experimento de RMN ^{13}C se observan cuatro señales de carbonos unidos a oxígeno: dos para metinos y dos para carbonos cuaternarios, lo que sugiere proponer la existencia de dos epóxidos, que se confirman en los carbonos C(1)-C(10) y C(4)-C(5) principalmente por las correlaciones HMBC entre H-1 (δ 2.81) con C-2 (δ 23.91), con C-10 (δ 57.75) y con C-14 (δ 18.07), asimismo H-5 (δ 2.54) con C-7 (δ 46.77), C-15 (δ 16.41), este análisis permite determinar que esta lactona es del tipo germacranólida y que se trata de un fragmento muy similar a la 11, 13-dehidroeriolina, descrita anteriormente [45-47].



La elucidación de la estructura del otro fragmento, que corresponde a otra lactona (**3a**), se inicia con el análisis del espectro de RMN ^1H en el cual se observan dos señales dobles en δ 5.55 y δ 6.22 (δ 119.17), las cuales son señales características al doble enlace exocíclico H-13'a y H-13'b de γ -lactonas sequiterpénicas α,β -insaturadas, y los valores de las constantes de acoplamiento ($J > 3$ Hz) indican la lactonización *trans* en el anillo. El acoplamiento escalar observado en el espectro g-COSY de estas dos señales con un multiplete en δ 2.59 asignado a H-7' α (δ 47.72) y la interacción a larga de distancia que se muestra en el HMBC con el carbonilo (C-12') desplazado en δ 169.76 permiten confirmar la presencia de un anillo de γ -lactona cerrada en el C-8' (δ 81.03), principalmente por el acoplamiento HMBC a J^2 y J^3 de este carbono con los hidrógenos H-9 α' (δ 1.97), H-9 β (δ 2.23) y con los correspondientes al metileno H-6 α' (δ 2.81), H-6 β (δ 1.72) respectivamente. Es importante mencionar que en el espectro de RMN ^{13}C se muestran dos carbonos cuaternarios de doble enlace desplazados en δ 151.22 y δ 136.85 que se asignan a C-1' y C-5' debido a que se observan dos interacciones HMBC de H-6' con ambos carbonos.

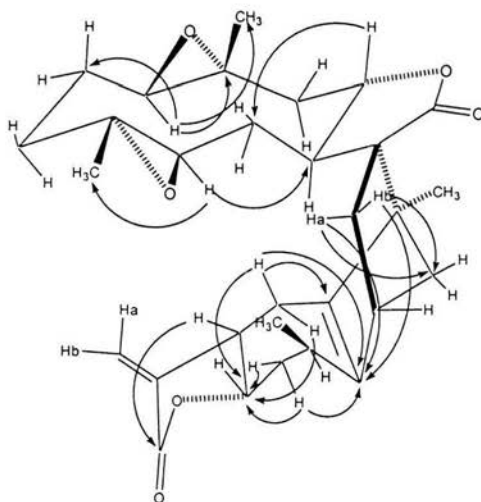


Figura 10. Interacciones HMBC relevantes de dieschkuhriolina (**3**).

Adicionalmente, se manifiesta la interacción a J^3 de H-9' con C-1', este análisis permite establecer la presencia de un anillo de siete miembros el cual incorpora a una γ -lactona del tipo guayanólida [12-13] de estructura (**3a**), que contiene un doble enlace conjugado formado por

los carbonos C(1)=C(2) y C(4)=C(5). Por lo tanto, la sustancia (3) es considerada un aducto de la reacción Diels–Alder derivado de la 11,13-dehidroeriolina (2), como dienófilo, y la 1',4'-guayanólida (3a), como dieno, que dan lugar a la formación de un ciclo adicional. Para la realización de esta cicloadición hay dos aspectos principales en la regio- y estereo-química de la reacción, los cuales son los siguientes:

- 1) que el C(11) se uniera al C(2') y el C(13) al C(4') de forma *exo*, por arriba (β) ó por abajo (α) ó de forma *endo*, por arriba (β) ó por abajo (α),
- 2) que el C(11) se uniera al C(4') y el C(13) al C(2') de forma *exo*, por arriba (β) ó por abajo (α) ó de forma *endo*, por arriba (β) ó por abajo (α).

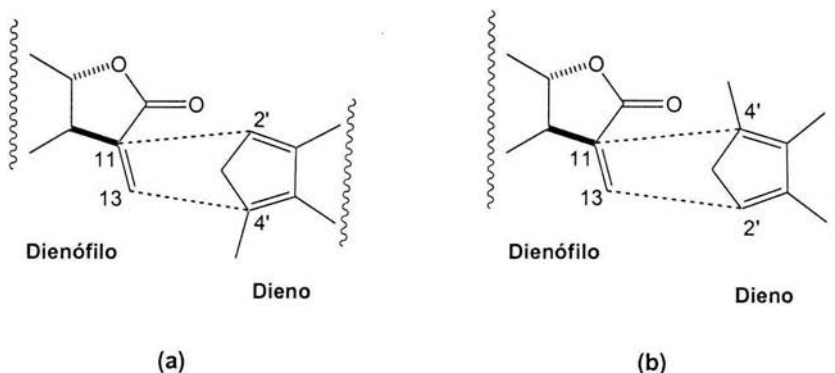


Figura 11. Posibilidades regio-isoméricas de cicloadición para la formación de dieschkuhriolina (3).

Estas posibilidades regio- y estereo-químicas generan 8 posibles estereoisómeros, los cuales se muestran en la figura 12. El análisis por difracción de rayos X permite definir que el producto natural corresponde a la estructura (3).

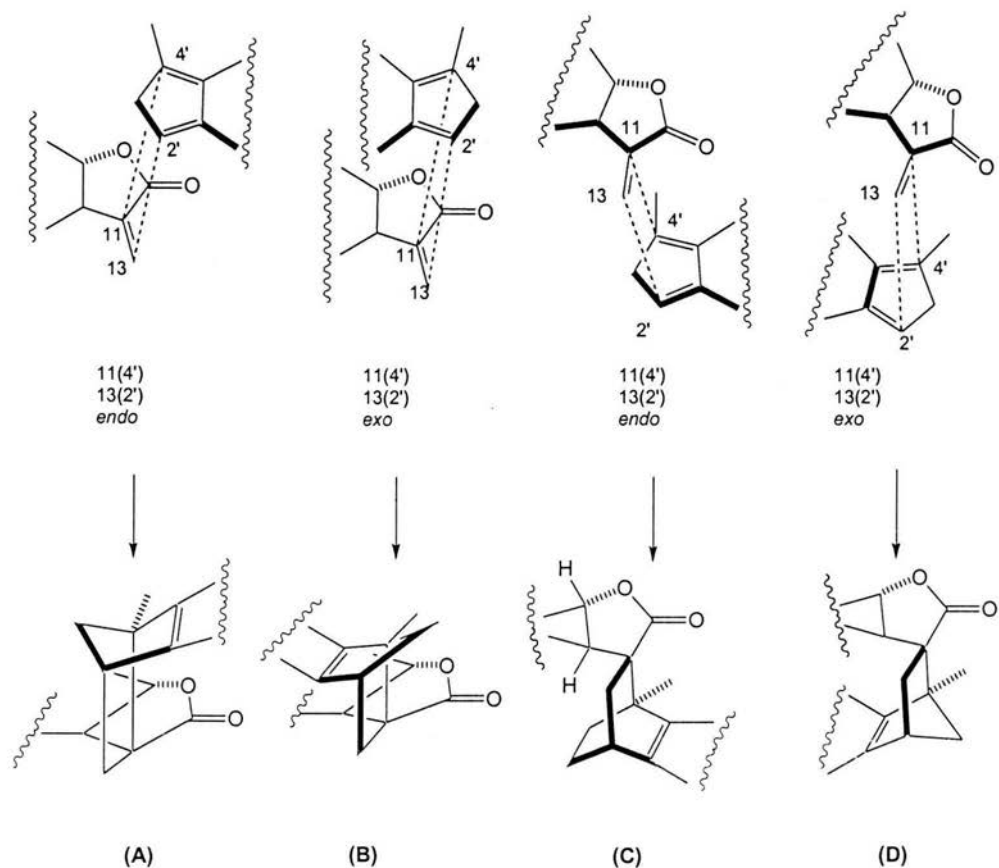


Figura 12. Estereoisómeros posibles generados a partir de la cicloadición [4+2] Diels-Alder

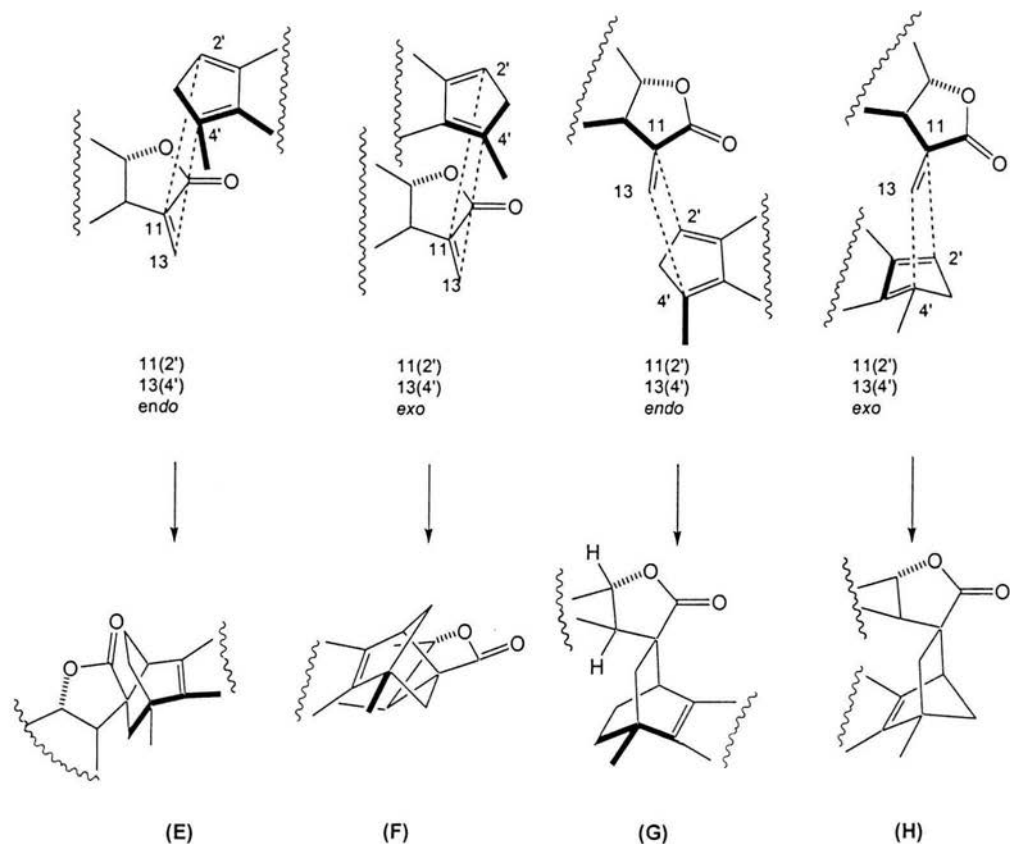


Figura 12. Estereoisómeros posibles generados a partir de la cicloadición [4+2] Diels-Alder

Para confirmar la estereoquímica y conformación de dieschkuhriolina (3), se realizó el análisis del experimento NOESY, en el cual se observan las interacciones dipolares siguientes (Tabla 3):

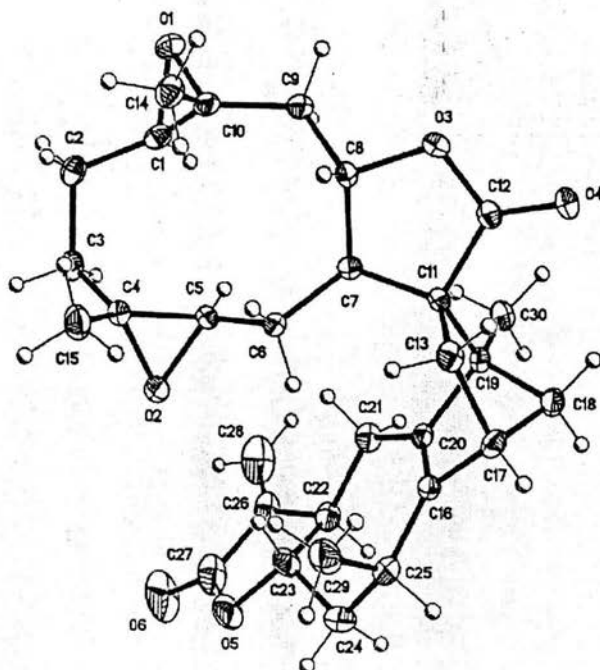


Figura 14. Estructura molecular de dieschkuhriolina (3) con numeración secuencial para los átomos de carbono y oxígeno.

Tabla 4. Datos cristalográficos

Dieschkuhriolina (3)	
Fórmula empírica	$C_{30}H_{38}O_6$
Color y Forma	Incoloro, prismático
Tamaño del cristal	0.418 x 0.274 x 0.100 mm
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	$P2_1$
Celda unitaria	$a = 11.162(1) \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ$ $b = 8.6749(5) \text{ \AA}$ $\beta = 109.018(1)^\circ$ $c = 14.221(1) \text{ \AA}$ $\gamma = 90^\circ$
Volumen	$1301.8(1) \text{ \AA}^3$
Peso fórmula	494.60
Densidad calculada	1.262 mg/m^3

Tabla 5. Colección de datos y refinamiento.

Dieschkuhriolina (3)	
Difractómetro	Bruker Smart Apex CCD
Longitud de onda	0.71073 Å
Temperatura	293(2) K
Intervalo θ para corrección de datos	193 – 25.02°
Intervalo de los índices	-13 \leq h \leq 13, -10 \leq k \leq 10, -16 \leq l \leq 16
Reflexiones totales medidas	10765
Reflexiones independientes	4577 [R(int) = 0.0558]
Factores de transmisión	Min = 0.9697, Max = 0.9922

Las longitudes de enlace y ángulos de enlace se enlistan en la tabla 6, con ello se corrobora la existencia de los dos grupos epóxidos en las posiciones C(1)-C(10) y C(4)-C(5) mencionados anteriormente en los análisis de RMN ¹H y RMN ¹³C, de igual manera se verifica el sitio de unión entre las dos lactonas.

Tabla 6. Longitudes de enlace [Å] y ángulos de enlace [°] para dieschkuhriolina (3)

O(1)-C(1)	1.435(3)	C(11)-C(19)	1.590(3)
O(1)-C(10)	1.458(3)	C(13)-C(17)	1.566(3)
O(2)-C(5)	1.439(3)	O(5)-C(27)	1.365(4)
O(2)-C(4)	1.448(3)	O(5)-C(23)	1.460(3)
O(3)-C(12)	1.339(3)	O(6)-C(27)	1.197(4)
O(3)-C(8)	1.464(3)	C(16)-C(20)	1.337(3)
O(4)-C(12)	1.210(3)	C(16)-C(17)	1.512(3)
C(1)-C(10)	1.471(4)	C(16)-C(25)	1.514(4)
C(1)-C(2)	1.503(3)	C(17)-C(18)	1.527(4)
C(2)-C(3)	1.532(3)	C(18)-C(19)	1.529(3)
C(3)-C(4)	1.504(3)	C(19)-C(30)	1.522(3)
C(4)-C(5)	1.462(4)	C(19)-C(20)	1.539(3)
C(4)-C(15)	1.500(4)	C(20)-C(21)	1.502(3)
C(5)-C(6)	1.498(3)	C(21)-C(22)	1.521(4)
C(6)-C(7)	1.535(3)	C(22)-C(26)	1.485(4)
C(7)-C(8)	1.534(3)	C(22)-C(23)	1.520(4)
C(7)-C(11)	1.550(3)	C(23)-C(24)	1.512(3)

Tabla 6 (Continuación). Longitudes de enlace [Å] y ángulos de enlace [°] para dieschkuhriolina (3)

C(8)-C(9)	1.523(3)	C(24)-C(25)	1.530(4)
C(9)-C(10)	1.505(3)	C(25)-C(29)	1.540(4)
C(10)-C(14)	1.501(3)	C(26)-C(28)	1.303(4)
C(11)-C(12)	1.522(3)	C(26)-C(28)	1.487(5)
C(11)-C(13)	1.560(3)		
C(1)-O(1)-C(10)	61.12(16)	O(2)-C(4)-C(3)	115.9(2)
C(5)-O(2)-C(4)	60.86(16)	C(5)-C(4)-C(3)	117.0(3)
C(12)-O(3)-C(8)	111.2(2)	C(15)-C(4)-C(3)	115.9(2)
O(1)-C(1)-C(10)	60.22(17)	O(2)-C(5)-C(4)	59.85(16)
O(1)-C(1)-C(2)	118.2(2)	O(2)-C(5)-C(6)	118.5(2)
C(10)-C(1)-C(2)	125.5(2)	C(4)-C(5)-C(6)	126.3(2)
C(1)-C(2)-C(3)	111.6(2)	C(5)-C(6)-C(7)	113.2(2)
C(4)-C(3)-C(2)	110.9(2)	C(8)-C(7)-C(6)	113.8(2)
O(2)-C(4)-C(5)	59.28(15)	C(8)-C(7)-C(11)	103.4(2)
O(2)-C(4)-C(15)	113.3(2)	C(6)-C(7)-C(11)	117.0(2)
C(5)-C(4)-C(15)	122.4(2)	O(3)-C(8)-C(9)	105.8(2)
O(3)-C(8)-C(7)	104.2(2)	C(30)-C(19)-C(18)	117.2(2)
C(9)-C(8)-C(7)	118.4(2)	C(30)-C(19)-C(20)	116.5(2)
C(10)-C(9)-C(8)	115.8(2)	C(18)-C(19)-C(20)	99.4(2)
C(1)-C(10)-C(1)	58.65(16)	C(30)-C(19)-C(11)	114.8(2)
O(1)-C(10)-C(14)	112.7(2)	C(18)-C(19)-C(11)	100.74(19)
C(1)-C(10)-C(14)	122.0(2)	C(20)-C(19)-C(11)	106.1(2)
O(1)-C(10)-C(9)	112.6(2)	C(16)-C(20)-C(21)	132.7(3)
C(1)-C(10)-C(9)	119.3(3)	C(16)-C(20)-C(19)	107.7(2)
C(14)-C(10)-C(9)	116.2(3)	C(21)-C(20)-C(19)	119.2(2)
C(12)-C(11)-C(7)	101.9(2)	C(20)-C(21)-C(22)	117.1(2)
C(12)-C(11)-C(13)	109.1(2)	C(26)-C(22)-C(23)	101.7(3)
C(7)-C(11)-C(13)	117.3(2)	C(26)-C(22)-C(21)	116.1(3)
C(12)-C(11)-C(19)	111.4(2)	C(23)-C(22)-C(21)	115.4(2)
C(7)-C(11)-C(19)	115.5(2)	O(5)-C(23)-C(24)	109.6(3)
C(13)-C(11)-C(19)	101.71(19)	O(5)-C(23)-C(22)	105.1(2)
O(4)-C(12)-O(3)	120.1(3)	C(24)-C(23)-C(22)	115.5(3)
O(4)-C(12)-C(11)	128.7(3)	C(23)-C(24)-C(25)	113.0(2)
O(3)-C(12)-C(11)	111.2(2)	C(16)-C(25)-C(24)	116.7(3)
C(11)-C(13)-C(17)	103.0(2)	C(16)-C(25)-C(29)	111.1(2)

Tabla 6 (Continuación). Longitudes de enlace [Å] y ángulos de enlace [°] para Dieschkuhriolina

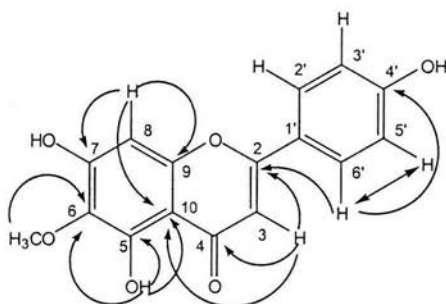
C(27)-O(5)-C(23)	108.9(3)	C(24)-C(25)-C(29)	110.0(2)
C(20)-C(16)-C(17)	106.6(2)	C(28)-C(26)-C(22)	130.3(4)
C(20)-C(16)-C(25)	135.8(3)	C(28)-C(26)-C(27)	123.0(4)
C(17)-C(16)-C(25)	117.5(2)	C(22)-C(26)-C(27)	106.6(4)
C(16)-C(17)-C(18)	100.8(2)	O(6)-C(27)-O(5)	121.7(5)
C(16)-C(17)-C(13)	108.4(2)	O(6)-C(27)-C(26)	129.5(5)
C(18)-C(17)-C(13)	100.2(2)	O(5)-C(27)-C(26)	108.8(3)
C(17)-C(18)-C(19)	94.0(2)		

Hispidulina (4)

De las fracciones 97-115 correspondientes a la fracción Ñ recromatografiadas fue obtenido un compuesto amarillo de p.f. 250-253°C.

Al analizar los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C se observó similitud con el perfil espectroscópico de la pectolinarigenina, siendo la principal diferencia la ausencia del grupo metoxilo en posición C-4' (tabla 7).

En el espectro de RMN ^1H puede observarse una señal simple en δ 13.03 correspondiente a un hidrógeno fenólico unido mediante un enlace de puente de hidrógeno a una cetona. Se manifiesta un sistema característico AA'BB' en δ 6.90 y δ 7.89 (J 8.7 Hz) lo que indica la presencia de un anillo aromático que se encuentra sustituido en posición *para*. La señal simple en δ 3.73 corresponde al grupo metoxilo en posición C-6 la cual fue verificada mediante experimentos adicionales como son el HETCOR y el FLOCK, donde efectivamente se observó la correlación del grupo O-CH₃ con el C-6.



(4)

Las señales simples adicionales en δ 6.74 y δ 6.56 corresponden a los hidrógenos aromáticos en posiciones C-3 y C-8 respectivamente. El análisis del espectro de RMN ^{13}C permitió establecer la presencia de 15 átomos de carbono.

La comparación con los datos de la literatura [34-44], permitieron establecer a esta flavona como hispidulina.

Tabla 7. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN ^1H y RMN ^{13}C de la hispidulina (4) y la pectolinarigenina (1)

Posición	Hispidulina		Hispidulina ^a		Pectolinarigenina		Pectolinarigenina ^b	
	DMSO-d ₆ (300 MHz)		DMSO-d ₆		DMSO-d ₆ (300 MHz)		DMSO-d ₆ (300 y 400 MHz)	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
C-2	163.95	--	163.7	--	163.82	--	163.7	--
C-3	102.82	6.74	102.3	6.74	102.37	6.84	102.4	6.86
C-4	182.22	--	182.0	--	182.09	--	182.1	--
C-5	152.87	--	152.7	--	152.78	--	152.8	--
C-6	131.43	--	130.5	--	131.34	--	131.3	--
C-7	157.33	--	157.9	--	157.21	--	157.1	--
C-8	94.22	6.56	69.8	6.58	94.22	6.60	94.8	6.63
C-9	152.50	---	157.9	--	152.38	--	152.4	--
C-10	104.18	--	94.3	--	104.09	--	104.1	--
C-1'	121.32	--	121.1	--	121.22	--	121.0	--
C-2'	128.54	7.89	128.4	7.92	128.42	8.01	128.4	8.03
C-3'	116.09	6.90	116.0	6.93	115.96	7.09	115.9	7.12
C-4'	161.24	--	161.2	--	161.14	--	161.9	--
C-5'	116.09	6.90	116.0	6.93	115.93	7.09	115.9	7.12
C-6'	128.54	7.89	128.4	7.92	128.42	8.01	128.4	8.03
OH-5	--	13.03	--	12.75	--	13.01	--	13.00
OMe-6	60.05--	3.73	--	3.79	--	3.84	--	3.86
OMe-4'	--	--	--	--	--	3.74	--	3.77

^{a,b} Desplazamientos tomados de la literatura [29, 37]

VIII. CONCLUSIONES

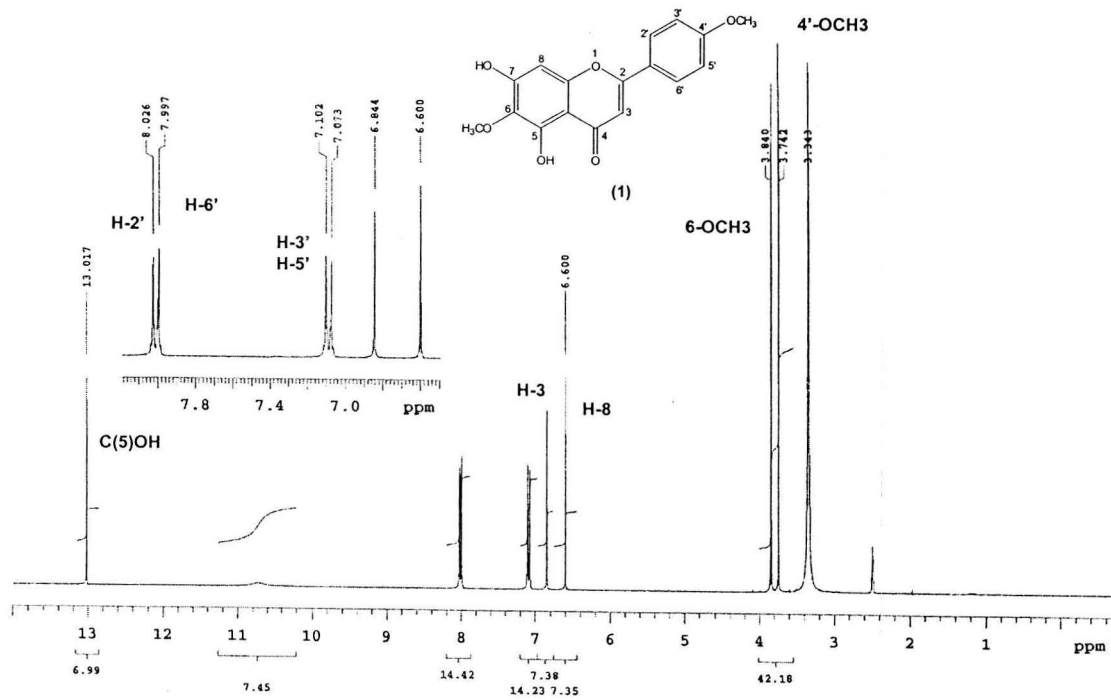
En esta investigación se realizó el aislamiento y la determinación estructural de cuatro metabolitos secundarios, pectolinarigenina (**1**), 11,13-dehidroeriolina (**2**), dieschkuhriolina (**3**) e hispidulina (**4**), mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas, lo cual permitió generar conocimiento referente a algunos de los constituyentes químicos de la especie vegetal *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze var. *wislizenii*.

Cabe destacar que la sustancia aislada y elucidada como dieschkuhriolina (**3**) es un aducto de la reacción de cicloadición Diels-Alder que no ha sido informada con anterioridad en la literatura. Su aislamiento y determinación estructural constituyó un logro importante, no solo por la complejidad de su estructura molecular, sino por la baja proporción en que se encuentra en esta fuente natural. Como es sabido, las lactonas sesquiterpénicas poseen una amplia variedad de actividades biológicas conocidas, por lo que es necesario realizar bioevaluaciones que proporcionen mayor conocimiento acerca de este compuesto.

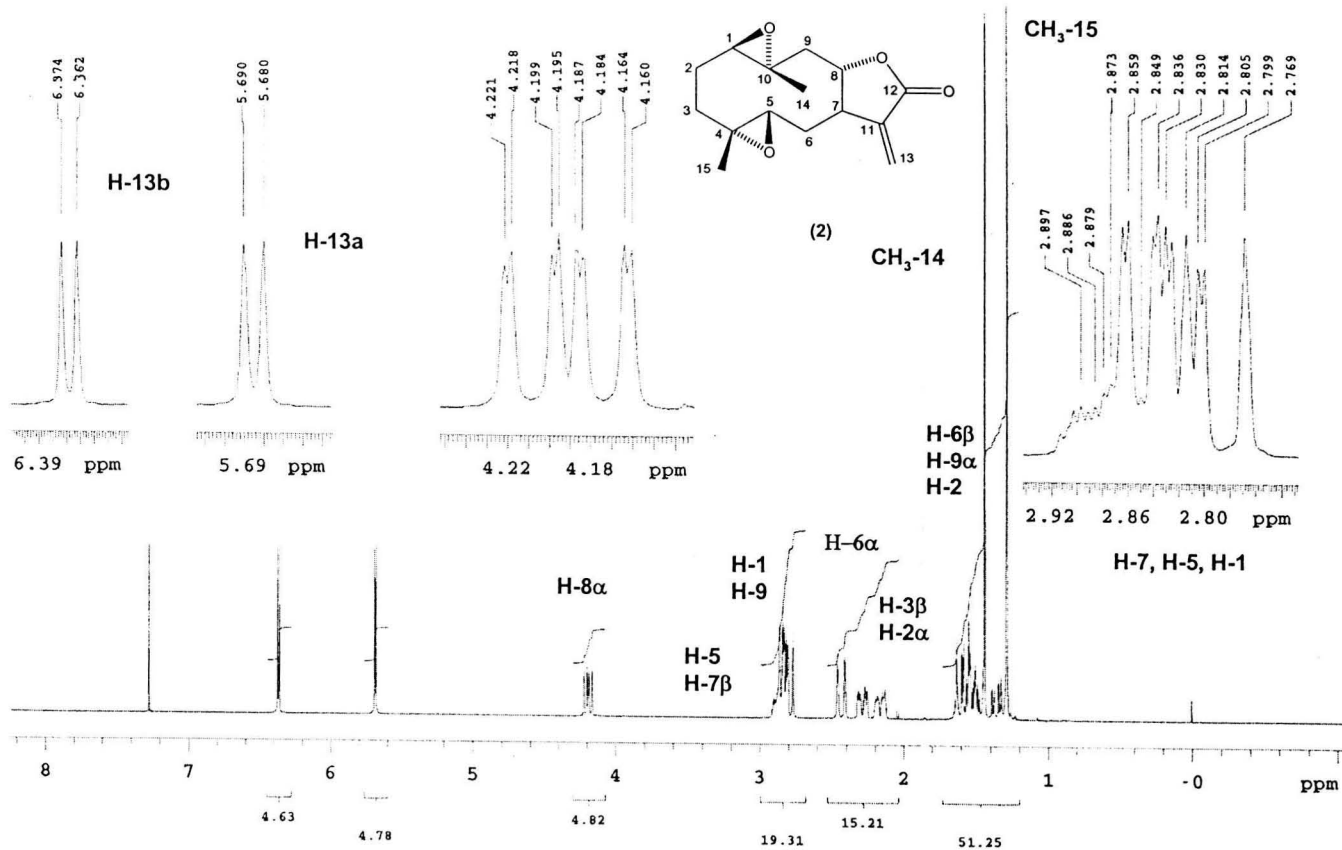
Estos resultados generan información acerca de la variación que existe en relación a los constituyentes presentes en esta especie vegetal.

Finalmente, es pertinente subrayar la relevancia del conocimiento referente a la composición química de la vegetación de nuestro país, ya que permite sentar las bases para investigaciones referentes (a) a las interacciones ecológicas de los metabolitos secundarios, (b) la aplicación práctica de estas sustancias, (c) al establecimiento de las relaciones quimiotaxonómicas, (d) al estudio de la reactividad química de las sustancias entre otros muchos aspectos.

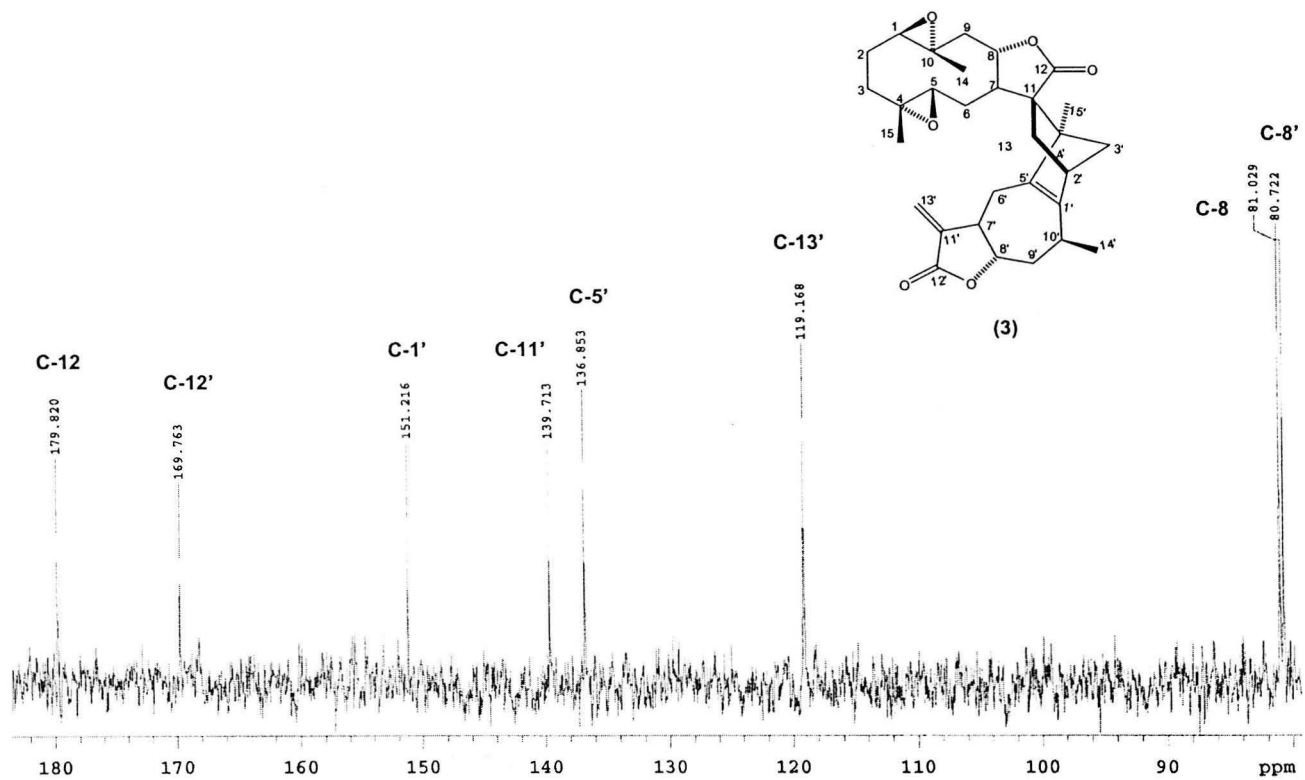
IX. ESPECTROS



Espectro 1. (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) RMN ^1H de la pectolinarigenina (1)

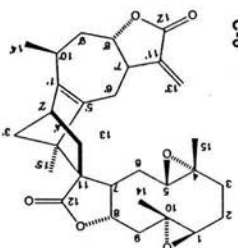
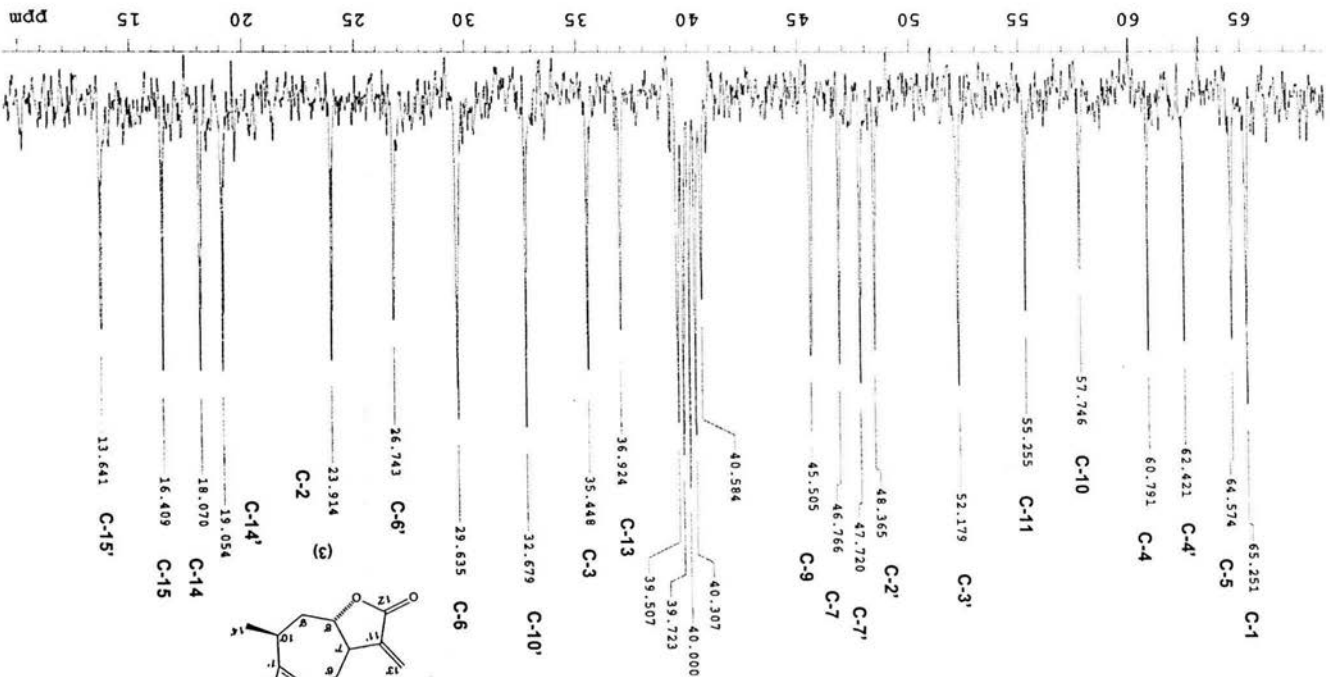


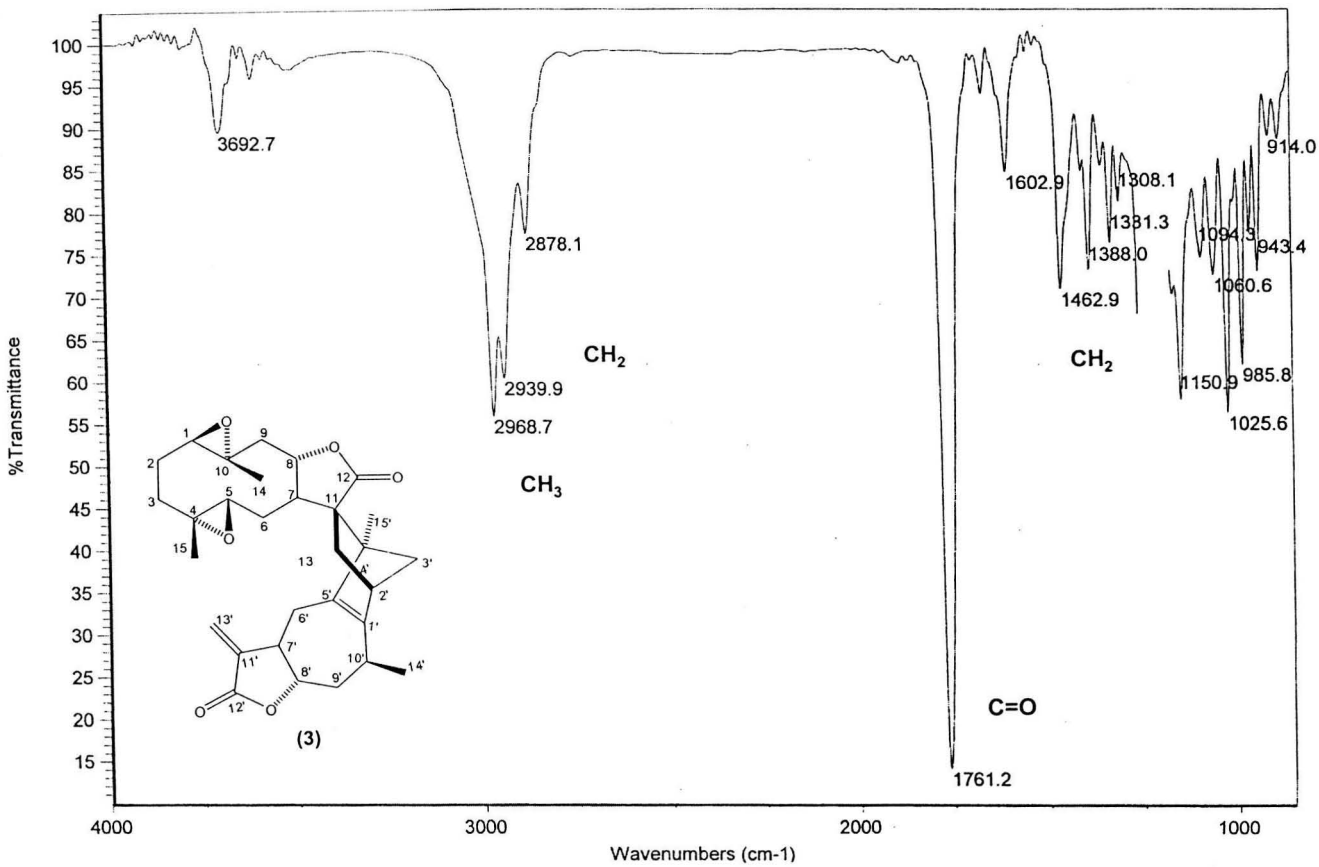
Espectro 2. (300 MHz, CDCl₃). RMN ¹H de la 11,13-dehidroeriolina (2)



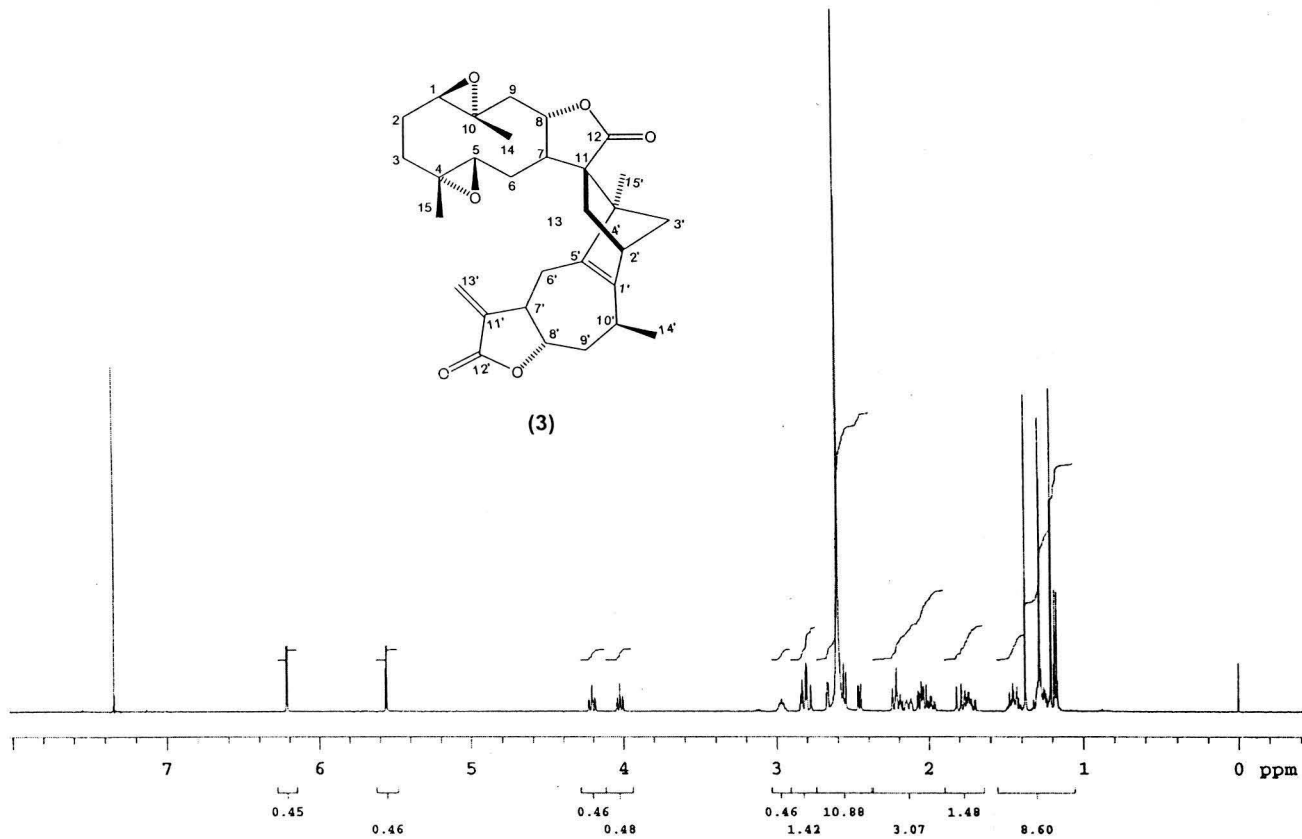
Espectro 3. (75 MHz, CDCl₃) RMN ¹³C de dieschkuhriolina (3)

Espectro 3 (cont.), (75 MHz, CDCl₃) RMN ¹³C de dieschkuhnlina (3)

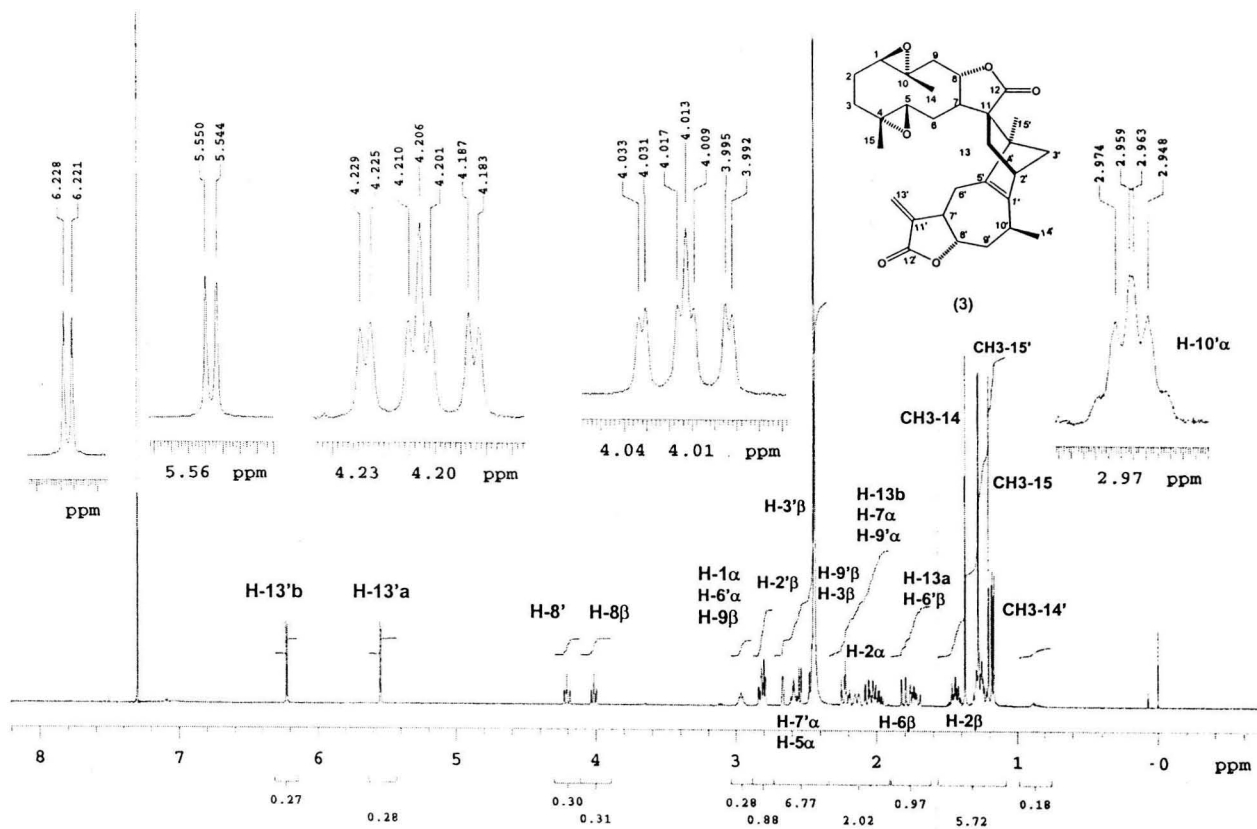




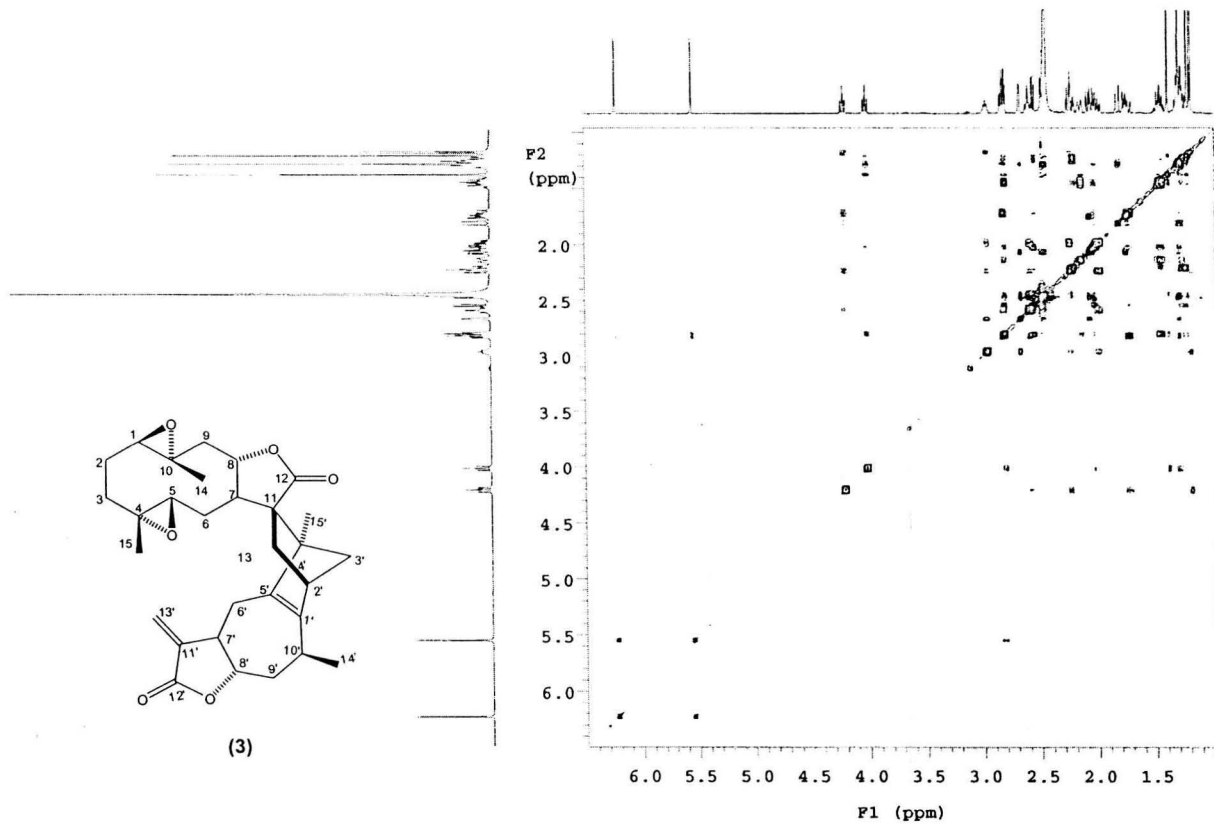
Espectro 4. (Sol., CHCl₃) I.R. de dieschkuhriolina (3)



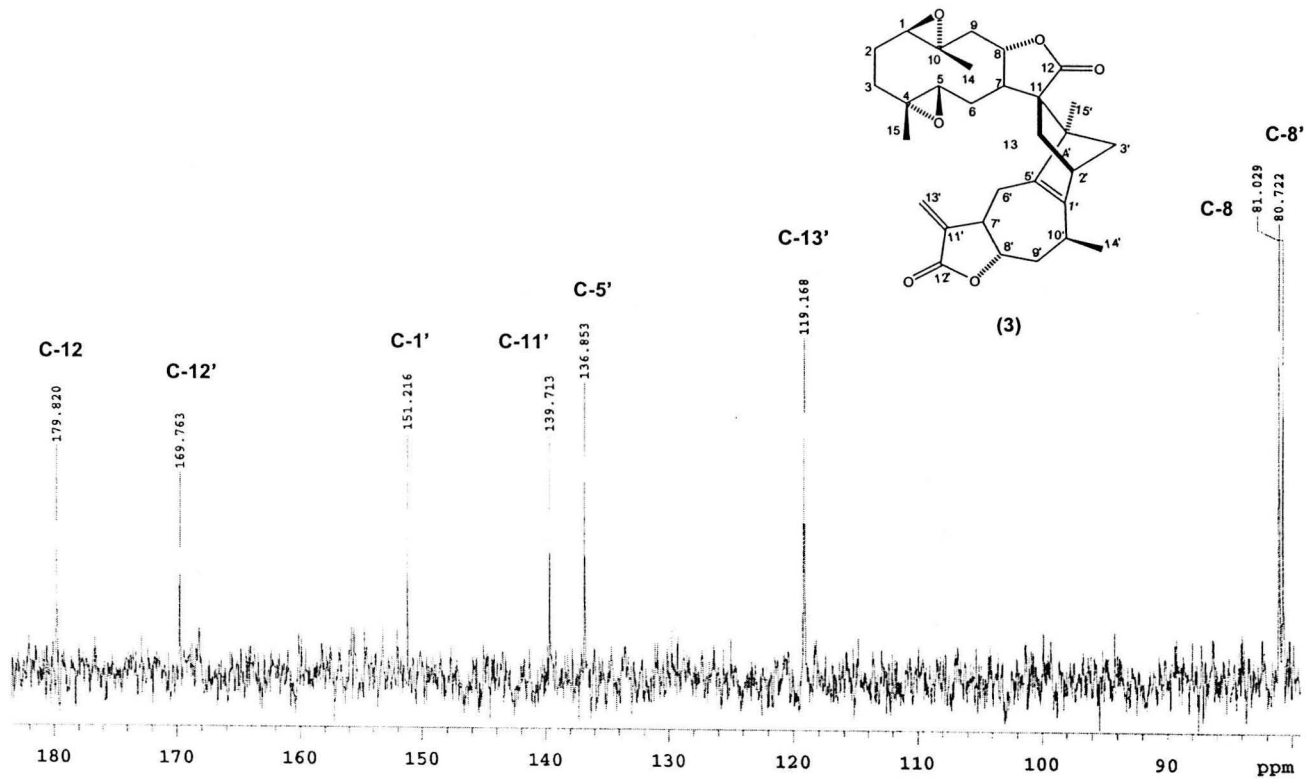
Espectro 5a. (500 MHz, CDCl₃) RMN ¹H de dieschkuhriolina (3)



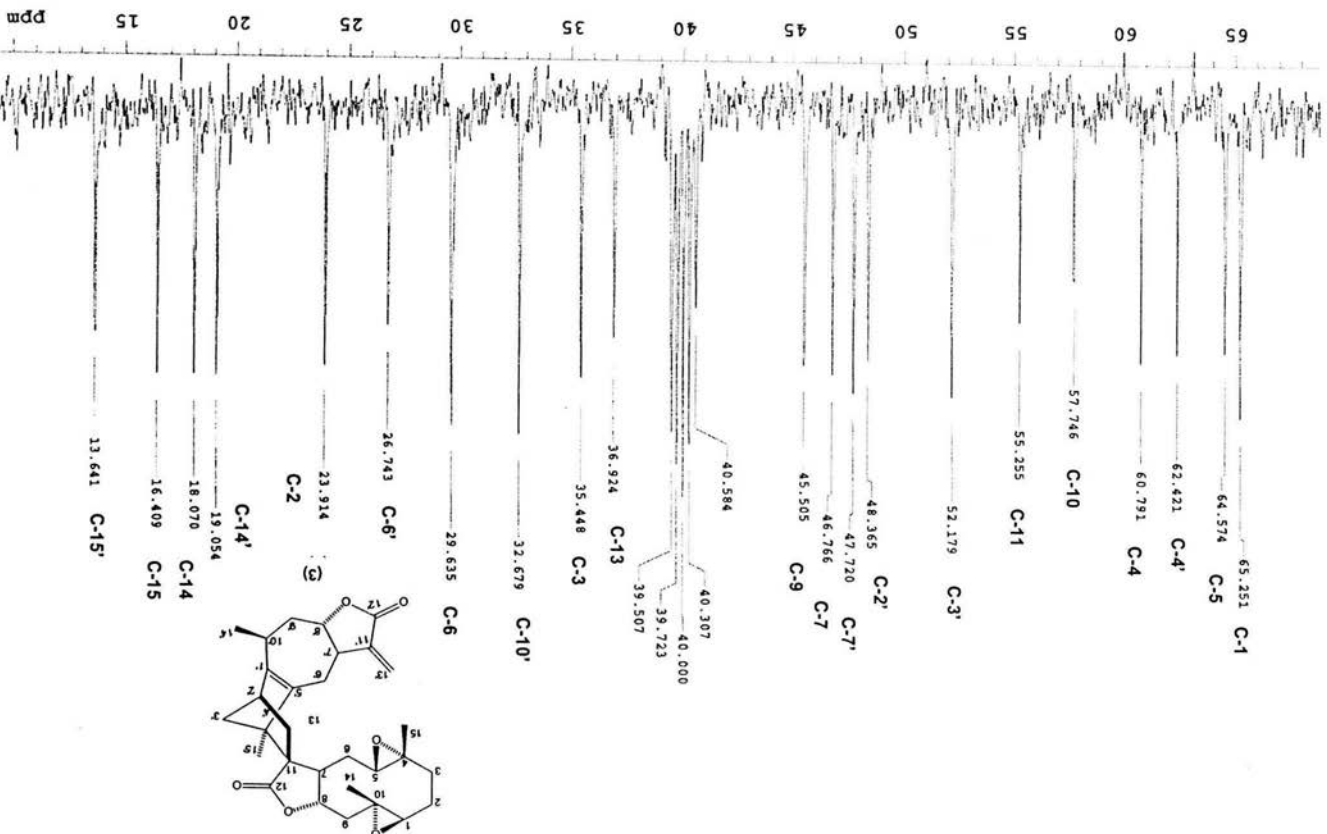
Espectro 5b. (500 MHz, CDCl_3) RMN ^1H de dieschkuhriolina (3)

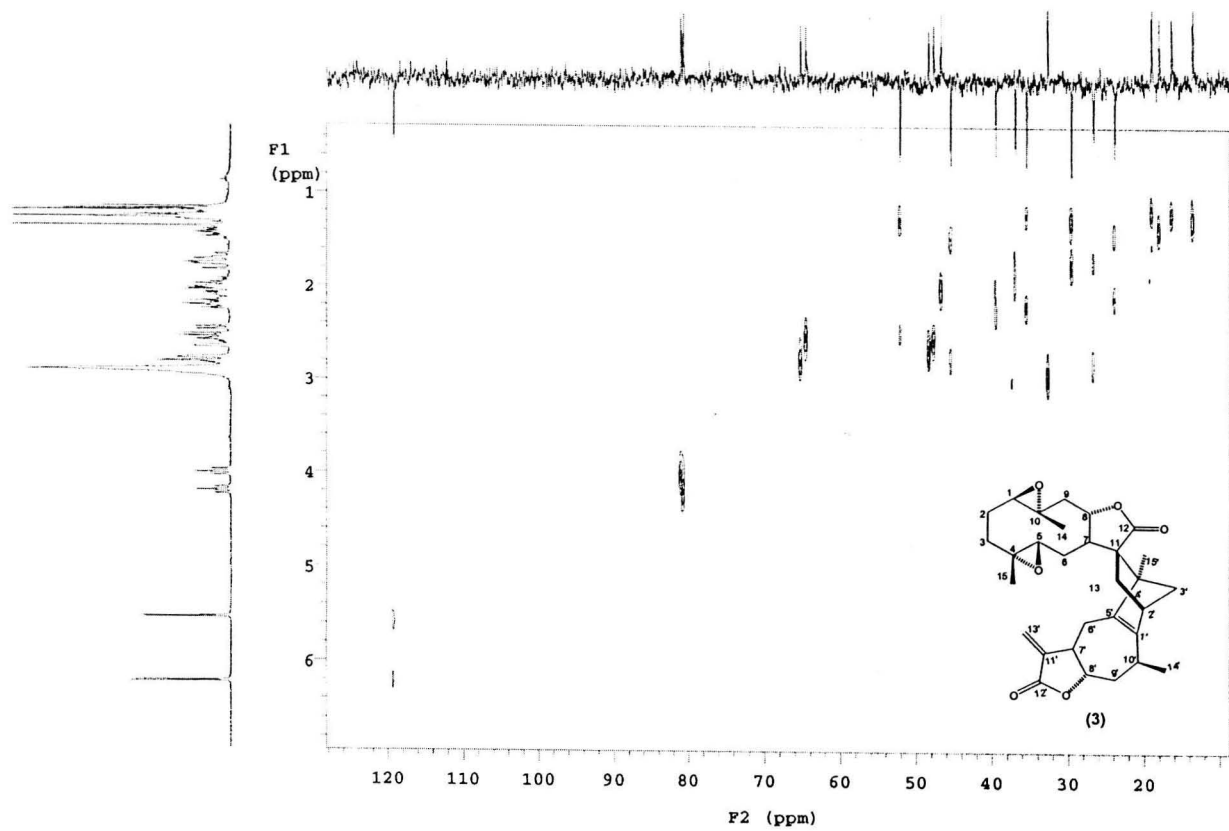


Espectro 6. (500 MHz, $CDCl_3$) g-COSY de diesckuhriolina (3)

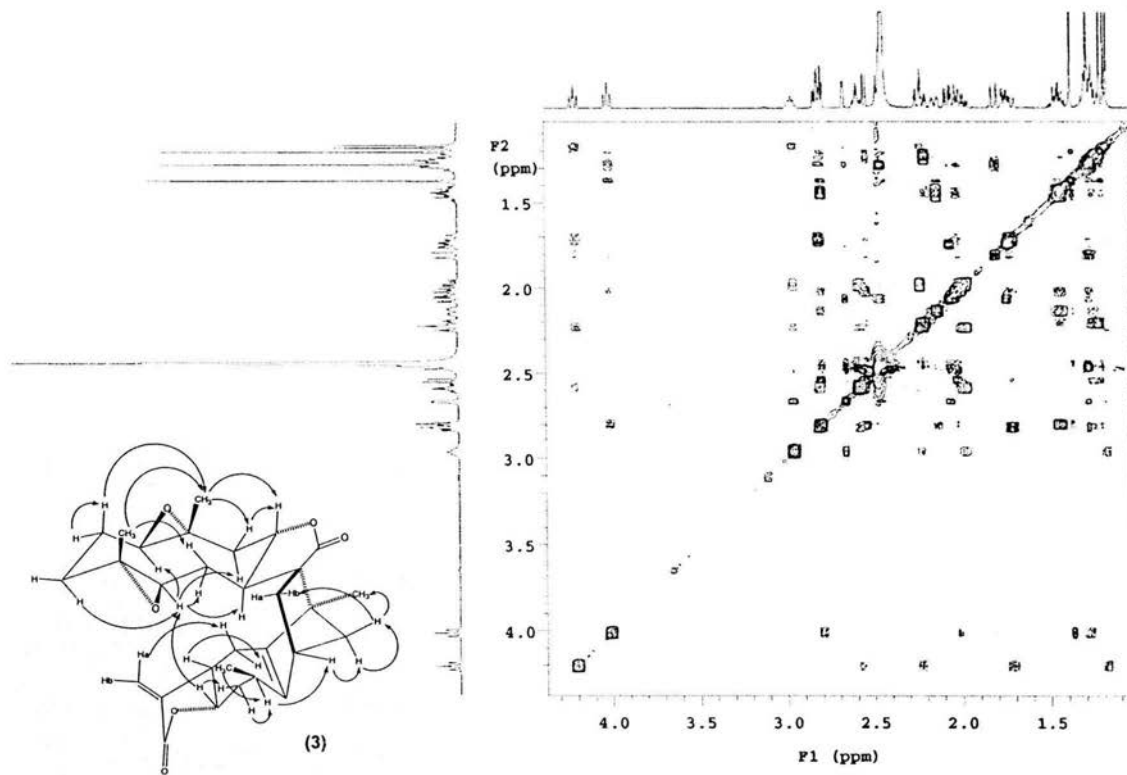


Espectro 7a. (75 MHz, CDCl_3) RMN ^{13}C de dieschkuhriolina (3)

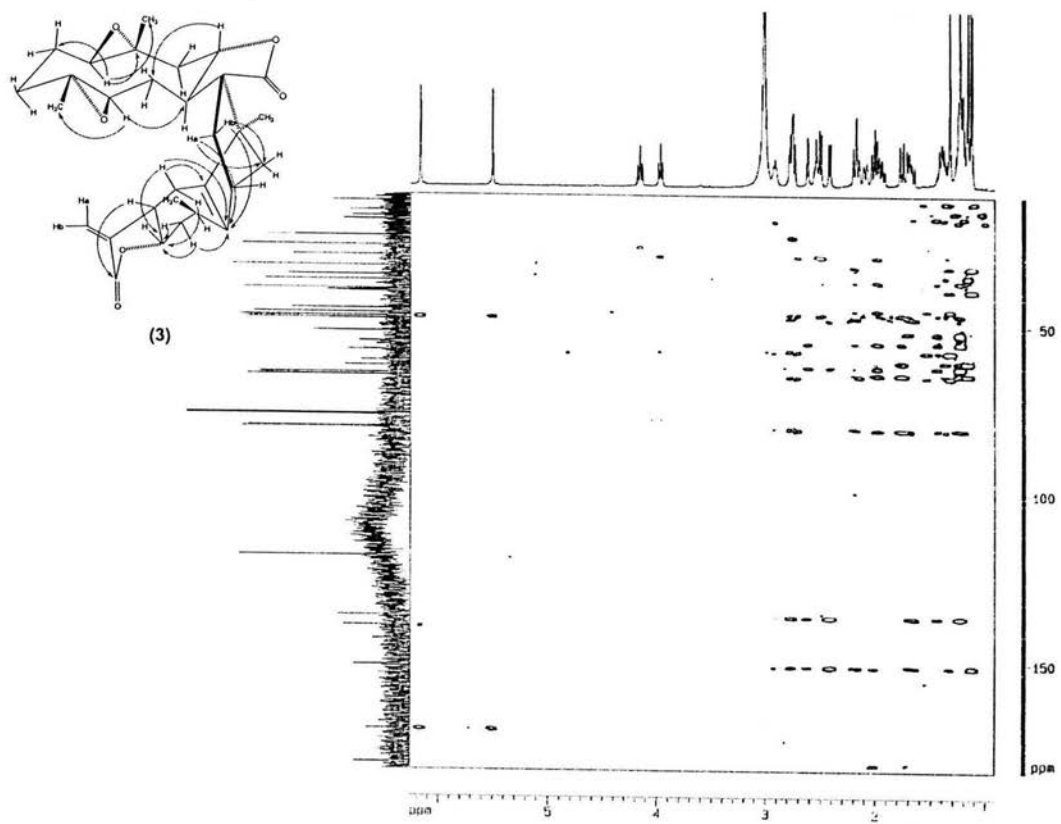
Espectro 7b. (75 MHz, CDCl₃) RMN ¹³C de dieschkurhriolina (3)



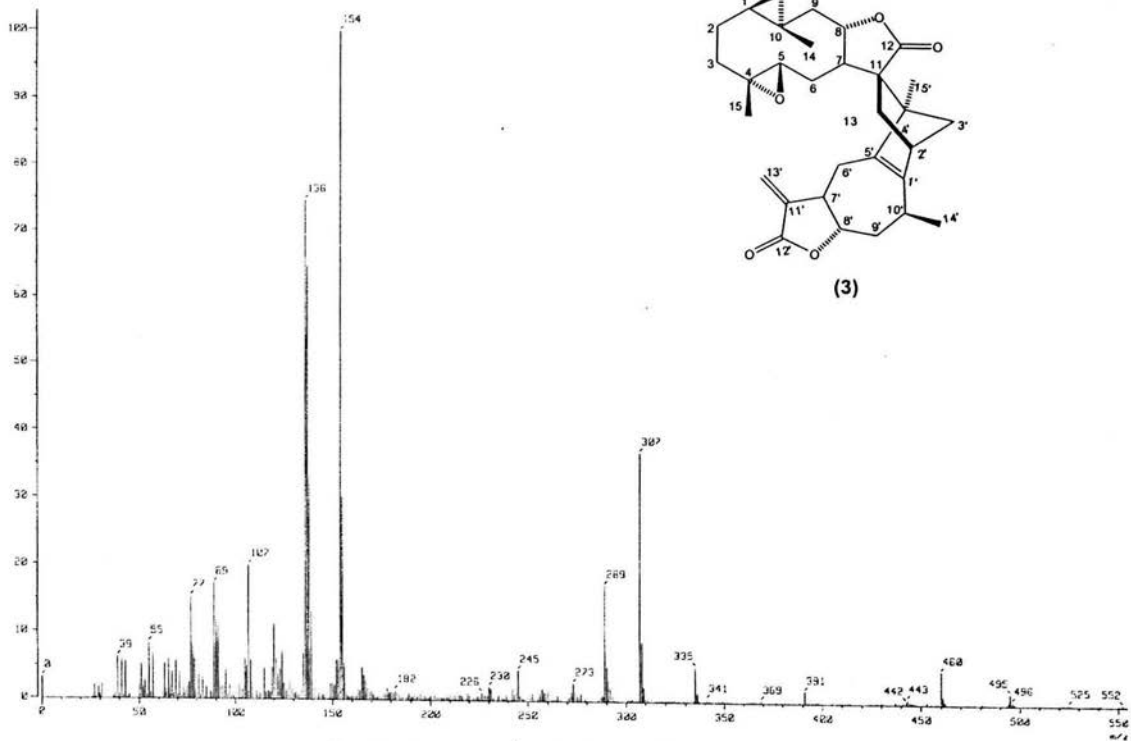
Espectro 8. (75 MHz, CDCl_3) HETCOR de dieschkuhriolina (3)



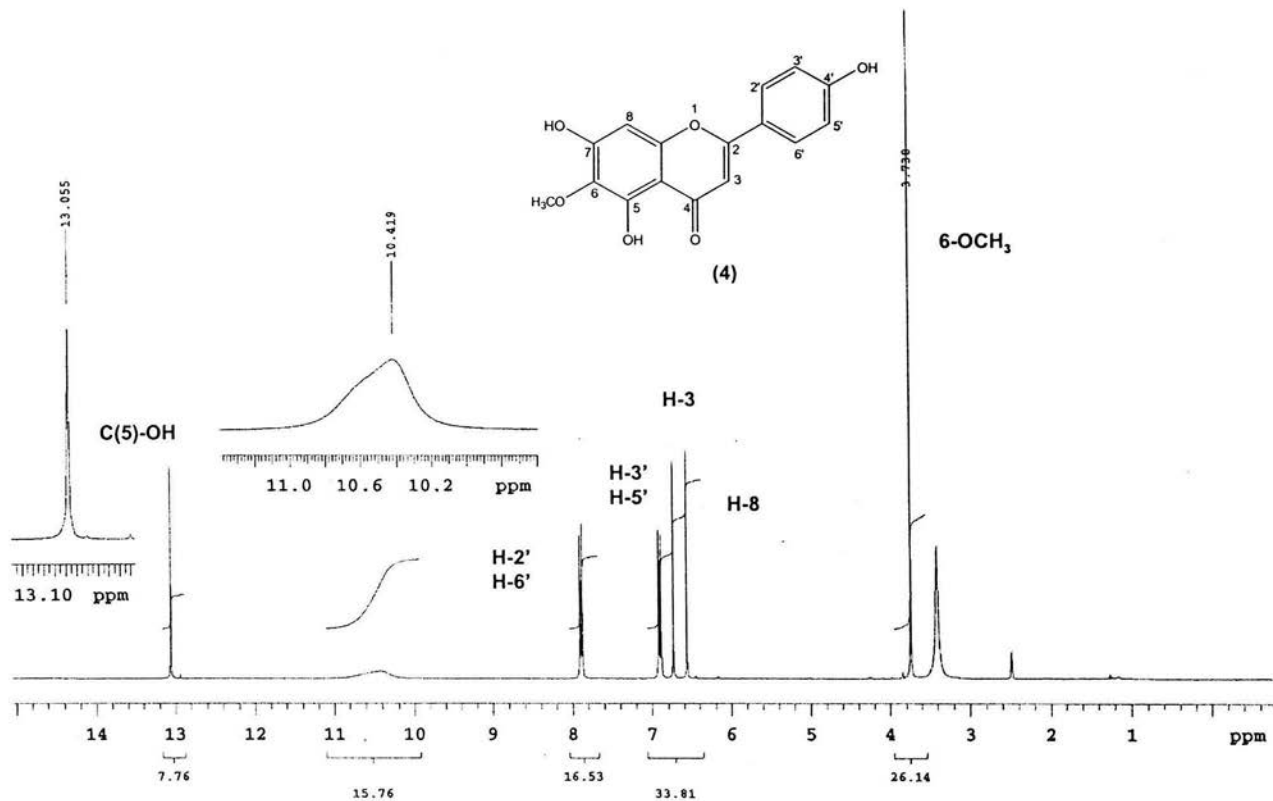
Espectro 9. (500 MHz, CDCl₃) NOESY de dieschkuhriolina (3)



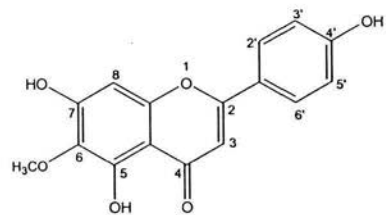
Espectro 10. (500 MHz, CDCl₃) HMBC de dieschkuhriolina (3)



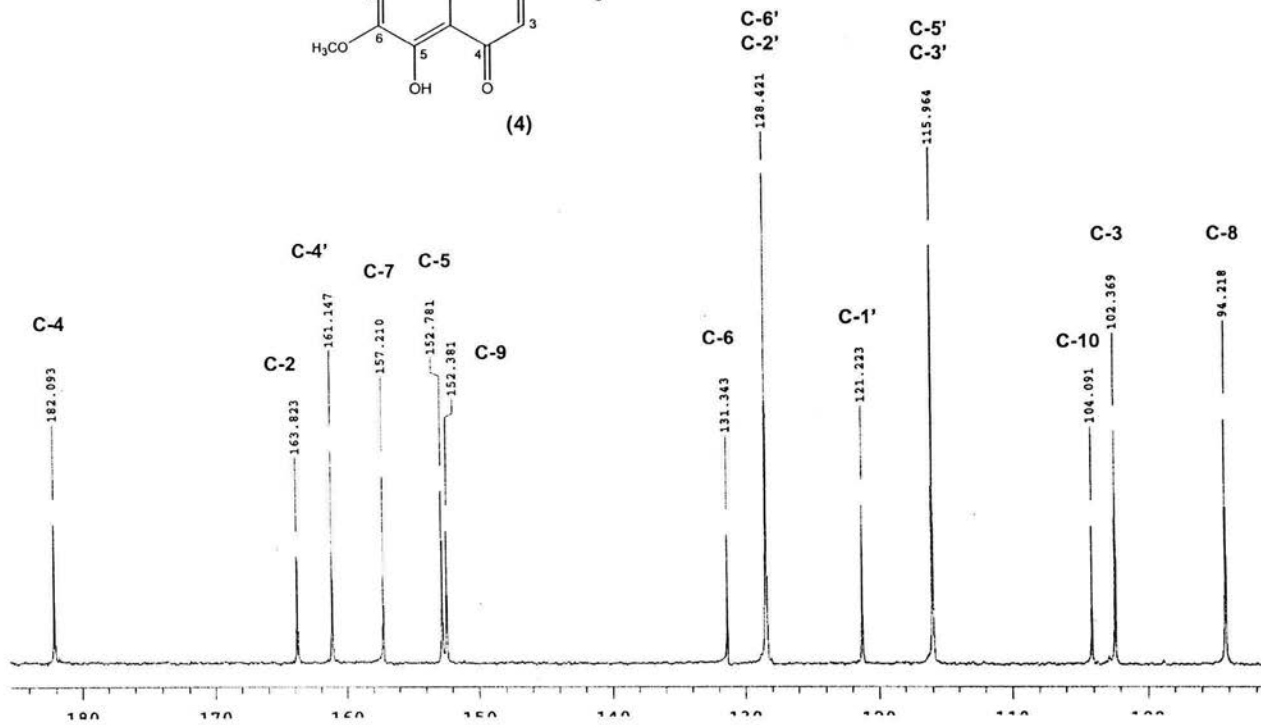
Spectro 11. (FAB ⁺) E.M. de dieschkuhriolina (3)



Espectro 12. (300MHz, DMSO) RMN ¹H de la hispidulina (4)



(4)



Espectro 13. (75 MHz, DMSO-*d*₆) RMN ¹³C de la hispidulina (4)

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Bye, R., Linares, E., Estrada, E. Biological Diversity of Medicinal Plants in México. Plenum Press. *Recent Advances in Phytochemistry* **1995**, 29, 65-82.
2. Espinosa-García, F.J.; Delgado, G. Relationship between ecology of plant defense and the prospection to secondary metabolites with potential medicinal or agricultural application *Rev. Latinoam. Quím* **1998**, 26, 13-29.
3. Southwell, I. A.; Bourke C. A. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). *Phytochemistry* **2001**, 56, 437- 441.
4. Kirakosyan, A.; Hayashi, H.; Inoue, K.; Charchoglyan, A.; Vardapetyan H. Stimulation of the production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* shoot cultures. *Phytochemistry* **2000**, 53, 345-348.
5. Jacobs, B. P.; Browner, W. S. *Ginkgo Biloba*: a living fossil. *Am. J. Med.* **2000**, 108, 341-342.
6. Espinosa-García, F. J.; Sarukhán, J. *Manual de Malezas del Valle de México*. Fondo de Cultura Económica. México (1997).
7. Anaya, A. L.; Espinosa-García F.; Cruz-Ortega, R. *Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación*. Plaza y Valdés. México (2001).
8. Heywood, V. H.; Harborne, J. B.; Turned B. L. *The Biology and Chemistry of the Compositae*. Vol. I and 2. Academic Press, London (1977).
9. Ghazanfar, S. A. *Handbook of Arabian Medicinal Plants*. CRC Press. United States of America (1994).
10. Heiser, C. B. Revision of the genus *Schkuhria*. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **1945**, 32, 265-278.
11. Domínguez, X. A. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Editorial Limusa. México (1973).
12. Fischer, N. H.; Olivier E. J.; Fischer H. D. The biogenesis and chemistry of sesquiterpene lactones. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1979**, 38, 47-390.
13. Romo, J.; Romo de Vivar, A. Progres dans la chimie des substances organiques naturelles *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1967**, 25, 90-130.
14. Romo de Vivar A. *Productos Naturales de la Flora Mexicana*. Editorial Limusa. México (1985).
15. Abdallah, O. M.; Ali, A. A.; Itokawa, H. Citotoxic Activity of Sesquiterpene Lactones, Isolated from *Ambrosia maritime*. *Pharmazie* **1991**, 46, 472; *CA*, 116, 120499e (1992).
16. Cordell, G. A; Farnsworth, N. R. *Experimental Antitumor Agents from Plants*, *Lloydia* **1977**, 1, 1974; *Chem Abstr.* 87, 11487m (1977).
17. Hall, I. H.; Lee, K. H.; Mar, E. C.; Starnes C. O.; Waddell. Antitumor agents. A proposed Mechanism for Inhibition of Cancer Growth by Tenulin and Helenalin and Related Cyclopentenones. *J. Med. Chem.* **1977**, 20, 333-337.

18. Kupchan, S. M.; Giacobbe, T. J.; Krull I. S. Reversible Thiol Addition as Protecting Reaction for Conjugated α -Methylene Groups of Lactones. *Tetrahedron Letters* **1970**, 2859-2862.
19. Goren, N.; Bozok-Johansson, C.; Jakupovic, J.; Lin, L. J.; Shieh, H. L.; Cordell, G. A.; Celik, N., Sesquiterpene Lactones with Antibacterial Activity from *Tanacetum densum* subsp. *Sivasicum*. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 101-104.
20. Koshimizu, K.; Ohigashi, H.; Huffman, M. A. Use of *Vernonia amygdalina* by Wild Chimpanzee: Possible Roles of its Bitter and Related Constituents. *Physiol. Behav* **1994**, *56*, 1209; CA. *122*, 142096x (1995).
21. Lee. I. S.; Hufford. Ch. D. Metabolism of antimalarial Sesquiterpene Lactones. *Pharmacol. Ther.* **1990**, *48*, 345; CA. *115*, 21411t (1991).
22. Asakawa, Y.; Muller, J. C.; Ourisson, G.; Foussereau, J.; Ducombs G. New Sesquiterpene Lactones of *Frullania* (Hepaticae). Isolation, Structures, Allergenic Properties. *Bull. Soc Chim. France* **1976**, 1465; *Chem Abstr* *86* 190227a (1977).
23. Zafra-Polo, M.; Blázquez, M. A. Antiinflammatory Activity of Sesquiterpene Lactones from *Artemisia barrelieri* in rats. *Phytother. Res.* **1991**, *5*, 91; CA. *115* 41302m (1991).
24. Martínez-Flórez, S.; González-Gallegos, J.; Culebras, J. M.; Tuñón, J. M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* **2002**, *6*, 271-278.
25. Harborne J. B.; Baxter H. *The Handbook of Natural Flavonoids*. Vol. 1. John Wiley & Sons. England (1999).
26. Harborne J. B. *Comparative Biochemistry of the flavonoids*. Academic Press. Great Britain (1967).
27. Harborne J. B.; Mabry T. J. *The Flavonoids: Advances in Research*. Chapman and Hall. Great Britain (1982).
28. Alcaraz, M. J.; Jiménez, M. J. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Fitoterapia* **1998**, *LIX*, 25-38.
29. Kupchan, S. M.; Sigel, C. W.; Hemingway, R. J.; Knox, J. R.; Udayamurthy, M. S. Tumor inhibitors-XXXIII. Citotoxic flavones from *Eupatorium* Species. *Tetrahedron* **1969**, *25*, 1603-1615.
30. Hase, T.; Ohtani, K.; Kasai, R.; Yamasaki, K.; Picheansoonthon, C. Revised Structure for Hortensin, a Flavonoid from *Millingtonia hortensis*. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 287-290.
31. Imre, S.; Öztunc, A.; Wagner, H. Flavone und Anthrachinone aus den Blättern Von *Digitalis Schischkinii*. *Phytochemistry*, **1977**, *16*, 799-800.

32. Farkas, L.; Nogradi, M.; Sudarsanam, V.; Herz, W. Constituents of *Iva* Species. V. Isolation, structure, and Synthesis of Nevadensin, a New Flavone from *Iva Nevadensis* M. E. Jones and *Iva Acerosa* (Nutt.) Jackson. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 3228-3232.
33. Cardona, M. L.; García, B.; Pedro, J. R.; Siniestra J. F. Flavonoids, Flavolignans and a Phenylpropanoid from *Onopordon corymbosum*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 629-631.
34. Harborne, J. B.; Williams, C. A. 6-Hydroxyluteolin and Scutellarein as Phyletic Markers in Higher Plants. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 367-378.
35. Herz, W.; Govindan S. V. Eucannabinolide and Other Constituents of *Schkuhria virgata*. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 1234-1237.
36. Herz, W.; Sumi, Y. Constituents of *Ambrosia hispida* Pursh. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 3438-3442.
37. Herz, W.; Sudarsanam, V. Flavones of *Iva hayesiana*. *Phytochemistry* **1970**, *9*, 895-896.
38. Doherty, G. O. P.; Haynes, N. B.; Whalley, W. B. 5,7,4'-Trihydroxy-6-methoxyflavone, a Minor Pigment from *Digitalis lanata*, *L. J. Chem. Soc.* **1963**, 5577-5578.
39. Shen, C. C.; Chang, Y. S.; Ho, L. K. Nuclear Magnetic Resonance Studies of 5,7-Dihydroxyflavonoids. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 843-845.
40. Bunyapraphatsara, N.; Blaskó, G.; Cordell G. A. Hortensin, An Unusual Flavone from *Millingtonia hortensis*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1555-1556.
41. Imre, S.; Tulus, R.; Sengün, I. Flavone aus *Digitalis ferruginea*. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 2317-2318.
42. Iwashina, T.; Kamenosono, K.; Ueno, T. Hispidulin and nepetin 4'-glucosides from *Cirsium oligophyllum*. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 1109-1111.
43. Vieira, L. M.; Kijjoa, A.; Pereira, J. A.; Gedris, T. E.; Herz, W. Germacranes and Flavonoids from *Achillea ageratum*. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 111-115.
44. Rangaswami, S. F. A. Sc; Venkata, R. E. Anthoxanthin Pigments of the Leaves of *Digitalis lanata* Ehrh. and the Constitution of a New Pigment Dinatin. *Proc. Indian Acad. Sci.* **1961**, *54A*, 51-54.
45. Calderón, J. S.; Quijano, L.; Gómez-Garibay, G. F.; Sánchez D. M.; Rios T.; Fronczek, F. R. Sesquiterpene lactones from *Stevia ovata* and crystal structure of 11,13-dehydroeriolin. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1747-1750.
46. Stewart, E.; Mabry, T. J. Sesquiterpene lactones from *Schkuhria anthemoidea* var. *wislizenii*. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2731-2732.

47. Romo de Vivar, A.; Pérez, C. A. L.; León, N. C.; Delgado, G. 11,13-Dehydroeriolin, schkuhrioidin and schkuhriolid, germacranolides from *Schkuhria species*. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 2905-2908.