

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

F A C U L T A D      D E      Q U I M I C A



## ACETILHYMENOGRANDINA E HYMENORATINA, LACTONAS SESQUITERPENICAS AISLADAS DE LA PLANTA TOXICA HELENIUM INTEGRIFOLIUM

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
Q U I M I C O  
P R E S E N T A  
**ALFREDO TAKEJIRO OZAWA TANAKA**  
MEXICO, D. F. 1982



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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE:

PRESIDENTE            Prof. ALFONSO ROMO DE VIVAR  
V O C A L              Prof. HELIO FLORES RAMIREZ  
SECRETARIO            Prof. YOLANDA CABALLERO ARROYO  
1er. SUPLENTE        Prof. RUBEN TRINIDAD SANCHEZ OBREGON  
2do. SUPLENTE        Prof. EDUARDO MARAMBIO DENNETT

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

INSTITUTO DE QUIMICA, U.N.A.M.

S U S T E N T A N T E:

ALFREDO TAKEJIRO OZAWA TANAKA  
*Alfredo T. Ozawa T.*

A S E S O R D E L T E M A:

Dr. ALFONSO ROMO DE VIVAR

*A. Romo de Vivar*



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO DE QUIMICA

ESTA TESIS SE LLEVO A CABO  
BAJO LA DIRECCION DEL DR.  
ALFONSO ROMO DE VIVAR, EN  
EL INSTITUTO DE QUIMICA DE  
LA UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO.

Quiero mediante estas líneas manifestar mi agradecimiento al Dr. Alfonso Romo de Vivar por la ayuda que en diferentes aspectos me brindó, por la confianza que siempre me demostró, y por todo el tiempo que pacientemente esperó, desde el principio hasta la terminación de este trabajo.

## CON ADMIRACIÓN...

A los hombres comprometidos consigo mismos, conscientes de su naturaleza, situación y potencial, en búsqueda continua de nuevos retos y excelencia, que les permitan sentirse satisfechos en las diferentes etapas y actividades de su vida.

## CON RESPETO.....

A los hombres que intuyen su naturaleza y su potencial, pero que carecen de capacidad de decisión para salir de su cautiverio.

## Y CON ESPERANZA....

A los hombres con espíritu y actitud de dependencia, que desconocen su naturaleza y su potencial y viven en el mar de la insatisfacción y de la mediocridad.

## LA BUSQUEDA.

A mis padres

ANGELA YOKO

MACARIO KAZUHIRO

*Porque con su esfuerzo, su gran ejemplo y comprensión, hicieron posible esta realidad. Para ellos mi más grande amor, respeto y gratitud.*

A mis hermanas

SILVIA MITZUKO

MA. DE LOS ANGELES TERUKO

MA. DEL CARMEN TAZUKO

*Que de una manera u otra me ayudaron y estuvieron conmigo para seguir adelante.*

A mi cuñado y sobrino

OSCAR AKIRA

OSCAR KAZUHIRO

*Con cariño.*



## A KUNIO Y TOSHIKO

*Con cariño y agradecimiento  
por todo su apoyo, confianza,  
hospitalidad y comprensión  
que siempre me han brindado.*

## A MIS TÍOS Y PRIMOS

*A quienes no tengo que nombrar,  
ya que cada uno es especial, pero  
bien saben el cariño y comprensión  
que siempre nos unirá.*

## A MIS AMIGOS

*Los cuales de una forma franca  
y abierta u otra me dieron su  
ayuda y apoyo para la realiza-  
ción de mis estudios y que  
siempre me brindaron su amistad  
en los buenos y malos momentos.*

**Al M. C. E. Guillermo Delgado L.**

*Por su valiosa y desinteresada  
colaboración en la realización de  
la presente tesis.*



*Helenium integrifolium*  
(H.B.K.) Benth. & Hook.

## CONTENIDO

	PAG.
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. PARTE TEÓRICA.	8
III. ESPECTROS.	16
IV. RELACIONES QUIMIOTAXONÓMICAS.	24
V. PRUEBAS BIOLÓGICAS PRELIMINARES.	46
VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES.	52
VII. PARTE EXPERIMENTAL.	54
VIII. BIBLIOGRAFÍA.	63

## I. INTRODUCCIÓN.

## I. INTRODUCCION.

La familia Compositae es la más abundante - dentro de las Fanerógamas y una de las mejor distribuidas en la Tierra. Esta familia está más diversificada y mejor representada en el norte y en el centro de la República Mexicana que en el sur y sureste de su territorio. Esta diferencia está ligada, sobre todo, con factores ecológicos, - pues el clima húmedo y caliente es el menos favorable para este grupo de plantas, que en cambio alcanza su máxima representación en sitios secos y en lugares más frescos de las regiones montañosas. Tal distribución, en México, confirma en términos generales lo encontrado por Bentham<sup>1</sup> para la superficie terrestre, aunque cabe enfatizar que en nuestro país, además de los matorrales xerófilos y de los pastizales, también los bosques de *Pinus*, de *Abies* y de -- *Quercus* ofrecen poblaciones muy ricas en miembros de esta familia.<sup>2</sup>

En México, al igual que en la mayor parte - del continente americano, la tribu Heliantheae forma el -- grupo dominante de la familia. Esta tribu ha sido enriquecida con la incorporación de varias subtribus de la Heleni eae,<sup>3</sup> la cual ha desaparecido como tribu, apoyándose entre

otros argumentos en el hecho de que representaba un grupo artificial o polifilético<sup>4,5</sup>.

Las plantas de la familia Compositae contienen gran cantidad de aceites esenciales, compuestos acetilénicos, compuestos flavonoides y lactonas sesquiterpénicas<sup>6</sup>. Aunque ninguno de estos metabolitos secundarios son característicos de la familia, la mayoría de las numerosas lactonas sesquiterpénicas hasta ahora conocidas, se han -- aislado de especies pertenecientes a esta familia<sup>7</sup>.

Las lactonas sesquiterpénicas se forman biogénicamente a partir del *trans*, *trans* pirofosfato de farnesilo, el cual inicialmente se cicliza para dar un anillo de diez miembros que por medio de oxidaciones sucesivas -- produce un anillo lactónico cuya fusión puede ser *cis* o -- *trans*.

Los principales tipos de lactonas sesquiterpénicas son el resultado de ciclizaciones enzimáticas de tres unidades isoprenicas, clasificándose de acuerdo a su esqueleto en: germacranólidas, eudesmanólidas, guaianólidas, pseudoguaianólidas y xantanólidas<sup>8</sup>.

Las relaciones biogénicas propuestas para las lactonas sesquiterpénicas se muestran en la figura 1.

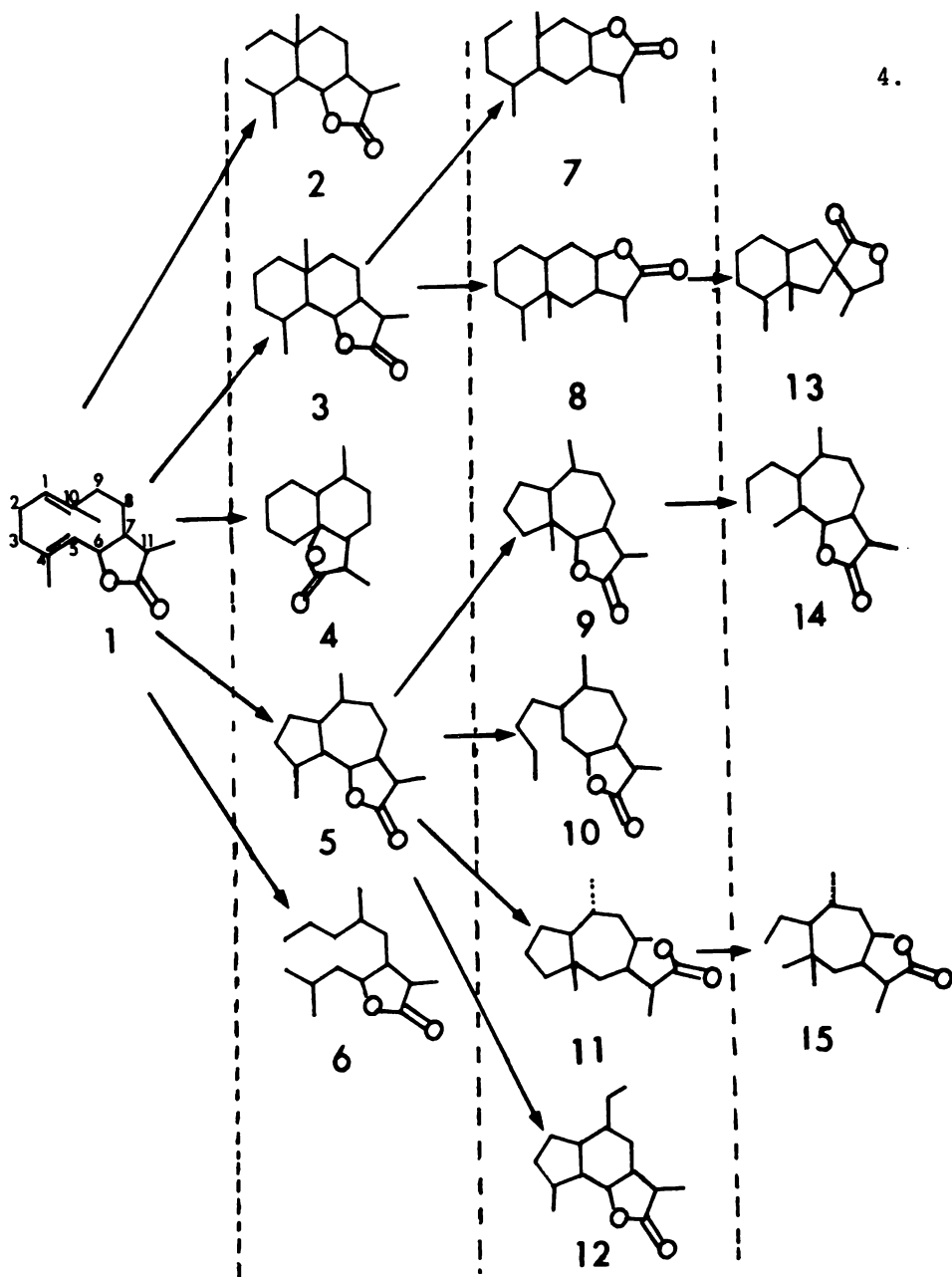
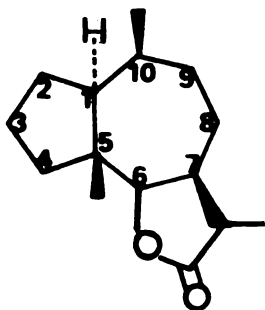


Figura 1. 1. Germacranólidas. 2. Elemanólidas. 3. Eudesmanólidas. 4. Cadinanólidas. 5. Guayanólidas. 6. Seco-germacranólidas. 7. Seco-eudesmanólidas. 8. Eremofilanólidas. - 9. Ambrosanólidas. 10. Xantanólidas. 11. Helenanólidas. 12. Crymoranólidas. 13. Bakkenólidas. 14. Seco-ambrosanólidas. 15. Seco-helenanólidas.

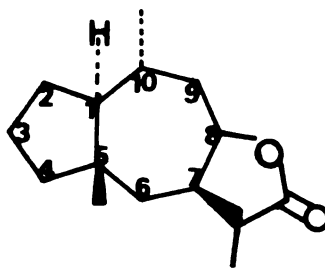
Las pseudoguaianólidas están constituidas por un sistema bicíclico de cinco y siete miembros con fusión *trans*, dicho esqueleto presenta un grupo metilo en C-5 y se subdivide en dos grupos<sup>9</sup>:

Ambrosanólidas(A), el grupo metilo en C-10 presenta configuración beta; el cierre de la fusión lactona es generalmente en C-6 y la función oxigenada unida a este carbono es beta.

Helenanólidas(B), el grupo metilo en C-10 es siempre alfa; el cierre de la lactona es principalmente en C-8 y la función oxigenada unida a este carbono presenta configuración alfa o beta.



Ambrosanólidas (A)



Helenanólidas (B)

Las lactonas sesquiterpénicas del subgrupo de las ambrosanólidas se han encontrado en la subtribu Ambrosiinae, mientras que las helenanólidas se han aislado -



principalmente en la subtribu Gaillardinae, ambas subtribus pertenecen a la tribu Heliantheae.

La presencia de lactonas sesquiterpénicas - en la familia Compositae, se encuentra asociada con un sabor amargo, que probablemente funcione como medida de protección de las plantas en contra de los herbívoros y parásitos<sup>10</sup>.

Un gran número de estos productos naturales han mostrado actividad biológica importante, como por ejemplo: actividad citotóxica, antitumoral, insecticida, antimicrobiana, dermatítica, alelopática y tóxica<sup>11</sup>.

Los metabolitos secundarios de la familia Compositae, tales como las lactonas sesquiterpénicas y los compuestos flavonoides no sólo tienen interés desde el punto de vista biológico, sino también quimiotaxonómico<sup>12</sup>, ya que la determinación estructural de los diferentes componentes de la planta, proporciona una gran ayuda a la clasificación botánica, ya que ha permitido diferenciar tribus, géneros y aún especies de esta familia<sup>13,14</sup>.

Continuando con el estudio del género *Helenium*, con el cual se inició la investigación de las lactonas sesquiterpénicas en México, se llevó a cabo el estudio químico del *Helenium integrifolium*. La razón principal que

nos indujo a investigar químicamente esta especie de *Helénium*, 20 años después de terminados los estudios de *H. mexicanum*, fue el envenenamiento que sufren los borregos que pastan en las regiones en donde esta planta es endémica. - Se realizaron pruebas biológicas preliminares y se establecieron relaciones quimiotaxonómicas como parte de las aportaciones del presente trabajo.

8.

## II. PARTE TEÓRICA.

## II. PARTE TEORICA

El *Helenium integrifolium* (H.B.K.) Benth. & Hook., es una planta herbácea que crece en sitios húmedos en las estribaciones de las altas montañas que forman parte de la cadena montañosa denominada Cordillera Neovolcánica.

El *H. integrifolium* pertenece a la subtribu Gaillardiiinae<sup>15</sup>, tribu Heliantheae de la familia Compositae. La planta se recolectó en septiembre de 1978, en el lugar denominado Puerta las Trancas, en el Parque Nacional Cumbres del Ajusco, D. F.

Del extracto clorofórmico de la parte aérea de la planta, se aislaron tres sustancias cristalinas, cuya determinación estructural se describe a continuación:

De las fracciones de menor polaridad del cromatograma se aisló un compuesto cristalino ligeramente amarillo con p.f. de 224°-6° y cuyo peso molecular determinado por espectrometría de masas fue de 314.

En el espectro de UV (espectro 1), se aprecian tres máximos de absorción en 217 nm ( $\epsilon$  32572), 279 nm ( $\epsilon$  20515) y 334 nm ( $\epsilon$  23027) que son característicos de un compuesto flavonoide.

El espectro de IR (espectro 2), indica que la molécula posee grupo oxhidrilo por la vibración en  $3490\text{ cm}^{-1}$ . En  $1660\text{ cm}^{-1}$  aparece una banda que representa a un grupo carbonilo doblemente conjugado; las de  $1620\text{ cm}^{-1}$  y  $1580\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la vibración de doble ligadura aromática.

En el espectro de RMP-100 MHz (espectro 3), se aprecia un sistema típico  $A_2B_2$  de un anillo bencénico *p*-sustituido, en forma de dos dobletes centrados en 7.84 ppm ( $J=9\text{ Hz}$ ) para los protones H-2' y H-6' y en 7.00 ppm ( $J=9\text{ Hz}$ ) para los protones H-3' y H-5'. Dos singuletes -- que integran para un protón cada uno y aparecen en 6.65 ppm y 6.52 ppm, se asignan a los protones H-3 y H-8 respectivamente. La señal simple en 3.86 ppm indica la existencia de dos grupos metoxilos en la molécula ya que integra para seis protones.

Las constantes físicas y espectroscópicas de esta molécula son muy semejantes con las reportadas para la pectolinarigenina (5,7-dihidroxi-6,4'-dimetoxiflavona) I, flavona aislada anteriormente de *Iva nevadensis*<sup>16</sup>, *I. nevadensis* M.E. Jones<sup>17</sup>, *I. frutescens* L. ssp. *oraria* (Bartlett) Jackson<sup>18</sup> y de *Hymenoxys rusbyi* (Gray) Cockll<sup>19</sup>.

El producto obtenido de la metilación exha-

ustiva con MeI de esta molécula, resulta idéntico con la - tetrametilescutelareina (5,6,7,4'-tetrametoxiflavona), que dando así plenamente identificada la sustancia como I.

El compuesto de polaridad intermedia del -- cromatograma presenta un p.f. 139°-41°,  $|\alpha|_D^{20} = +66.66^\circ$  --- (CHCl<sub>3</sub>). El peso molecular obtenido por espectrometría de masas ( $M^+$  m/z 408), coincide al igual que el análisis elemental con una fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>8</sub>.

El espectro de IR (espectro 4) de esta molécula, muestra una banda en 1752 cm<sup>-1</sup> que representa al carbonilo de una  $\gamma$ -lactona y otra en 1740 cm<sup>-1</sup> correspondiente a carbonilo de acetato.

En el espectro de RMP-270 MHz (espectro 5) de esta sustancia, se observa un par de dobletes centrados en 6.26 ppm (J= 2.8 Hz) y 5.59 ppm (J= 2.8 Hz), característicos de los protones vinílicos de un metileno exocíclico conjugado con el carbonilo de la lactona, los que se encuentran acoplados con el protón alílico de H-7, cuya señal aparece como multiplete a 3.26 ppm.

El hidrógeno base de la lactona se localiza a 4.78 ppm como ddd (J= 3,8,12 Hz), ya que al irradiar H-7 H-13a y H-13b se transforman en singuletes y simultaneamen

te la base de la lactona se simplifica. La lactona debe estar cerrada hacia C-8 como lo indica su multiplicidad ddd, pues si hubiese estado cerrada hacia C-6, hubiese aparecido como doblete.

Las señales simples que aparecen en 2.13 -- ppm, 2.06 ppm y 2.03 ppm son asignados a los metilos de acetato. Las señales en 5.32 ppm (dd,  $J= 7,9$  Hz), 5.14 ppm (d,  $J= 7$  Hz) y 5.02 ppm (t,  $J= 9$  Hz) se asignan a los protones base de acetato, H-3, H-4 y H-2 respectivamente. Se comprueba esta asignación de los protones de la siguiente manera: al irradiar el protón base de acetato H-3, la señal de H-4 se transforma a singulete. Inversamente, al irradiar H-4 la señal de H-3 se simplifica a doblete.

El doblete centrado en 1.08 ppm ( $J= 7$  Hz) y el singulete en 1.03 ppm, integran para tres protones cada uno, indicando la presencia de los metilos en C-10 y C-5 respectivamente.

La comparación directa de los datos espectroscópicos (IR, RMP-270 MHz) indican que esta sustancia es idéntica con la acetilhymenograndina (II), goma aislada anteriormente de *Hymenoxys insignis* (Gray ex Wats) Cockll<sup>20</sup> a pesar de la diferencia del estado físico. La estructura y estereoquímica de esta molécula se han establecido por -

análisis de Rayos X de la hymenograndina.

La confirmación de esta identidad se obtiene al preparar el dihidroderivado, que resulta idéntico con el hymenolano, cuya estructura y estereoquímica se establecieron también por análisis de Rayos X<sup>21</sup>.

El tercer componente, el de mayor polaridad aislado de *H. integrifolium* tiene p.f. 166°-8° y peso molecular 266, determinado por espectrometría de masas.

Esta sustancia presenta en su espectro de IR (espectro 6) una banda ancha en 3390 cm<sup>-1</sup> que indica la presencia de grupo oxhidrilo. La banda intensa en 1750 cm<sup>-1</sup> representa al carbonilo de  $\gamma$ -lactona y la señal en 1660 -- cm<sup>-1</sup> corresponde a la vibración de doble ligadura carbono-carbono.

En el espectro de RMP-100 MHz (espectro 7), se muestra un par de dobletes a campo bajo, centrados en -6.29 ppm (J= 2 Hz) y 5.61 ppm (J= 2 Hz) correspondientes a los protones del metileno exocíclico conjugado con el carbonilo de la lactona. La señal que integra para un protón centrado en 4.78 ppm corresponde al protón base de lactona la que debe estar cerrada hacia C-8, ya que aparece como -multiplete.

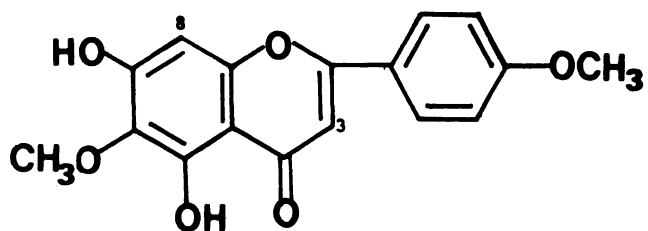


El singulete que integra para dos protones en 3.85 ppm debe corresponder a los hidrógenos hidroxílicos de la molécula, puesto que desaparece al equilibrarse la solución con óxido de deuterio. El multiplete y el doblete centrados en 4.00 ppm y 3.56 ppm ( $J = 7$  Hz) se asignan a los protones base de alcohol H-3 y H-4 respectivamente.

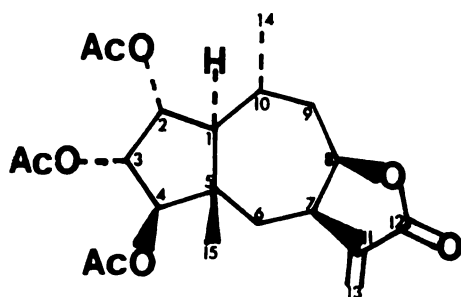
El doblete centrado en 0.99 ppm ( $J = 7$  Hz) y el singulete en 0.82 ppm que aparecen a campo alto e integran para tres protones cada uno, se asignan al metilo secundario y terciario respectivamente.

Los datos físicos y espectroscópicos de esta molécula resultan idénticos con los correspondientes a la hymenoratina (III), pseudoguaianólida aislada anteriormente de *Hymenoxys odorata* DC.<sup>22</sup> y *Baileya pauciradiata* - Harv. and Gray<sup>23</sup>

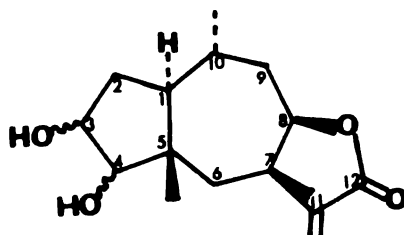
La identidad de esta molécula se comprueba al preparar el producto acetilado correspondiente.



Pectolinarigenina (I)



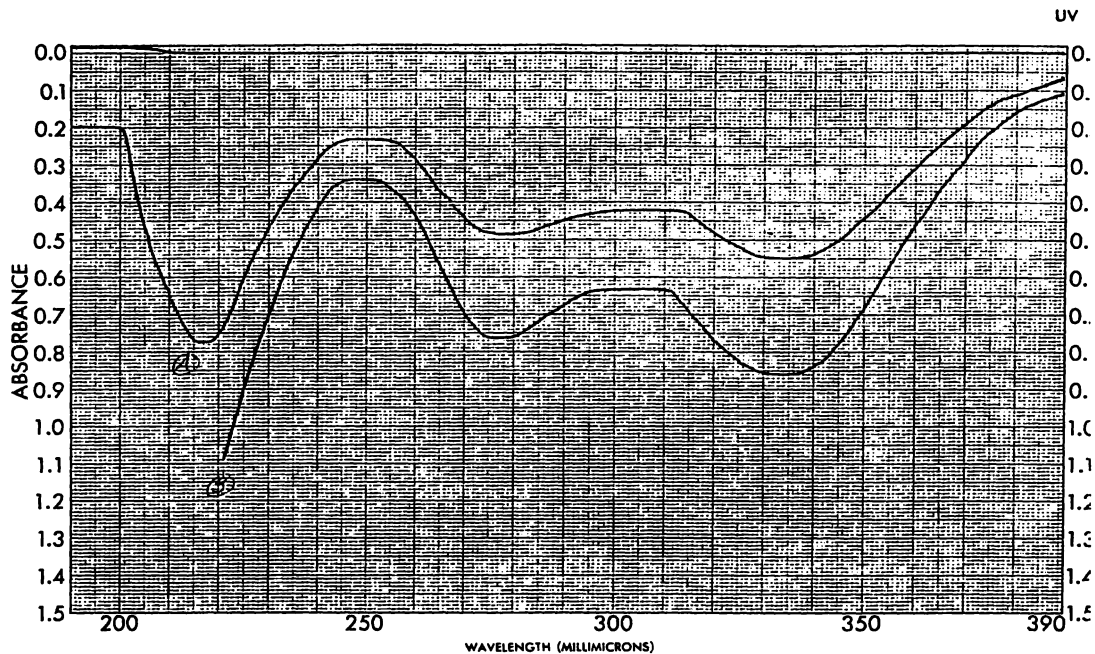
Acetylhymenograndina (II)



Hymenoratina (III)

16.

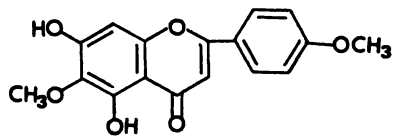
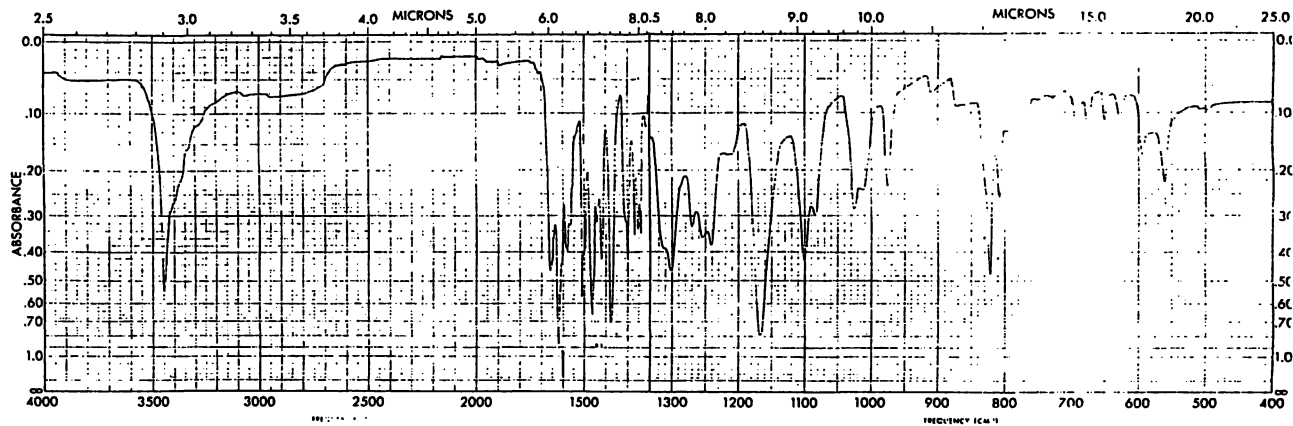
III. ESPECTROS.



SAMPLE <i>PT-40</i>	CURVE NO. <i>6031</i>	SCAN SPEED <i>S</i>	OPERATOR <i>Nintze</i>
ORIGIN <i>G. P. M. W.</i>	CONC. <i>0.25 mg/ml</i>	SLIT <i>25mm</i>	DATE <i>7 SEP. 79</i>
SOLVENT <i>H<sub>2</sub>O</i>	CELL PATH <i>QUARTZ 1cm</i>	REMARKS <i>Associates (B) 0.15 ml/ml</i>	
	REFERENCE <i>H<sub>2</sub>O</i>	② <i>0.23 ml/ml J<sub>2</sub> narrow</i>	

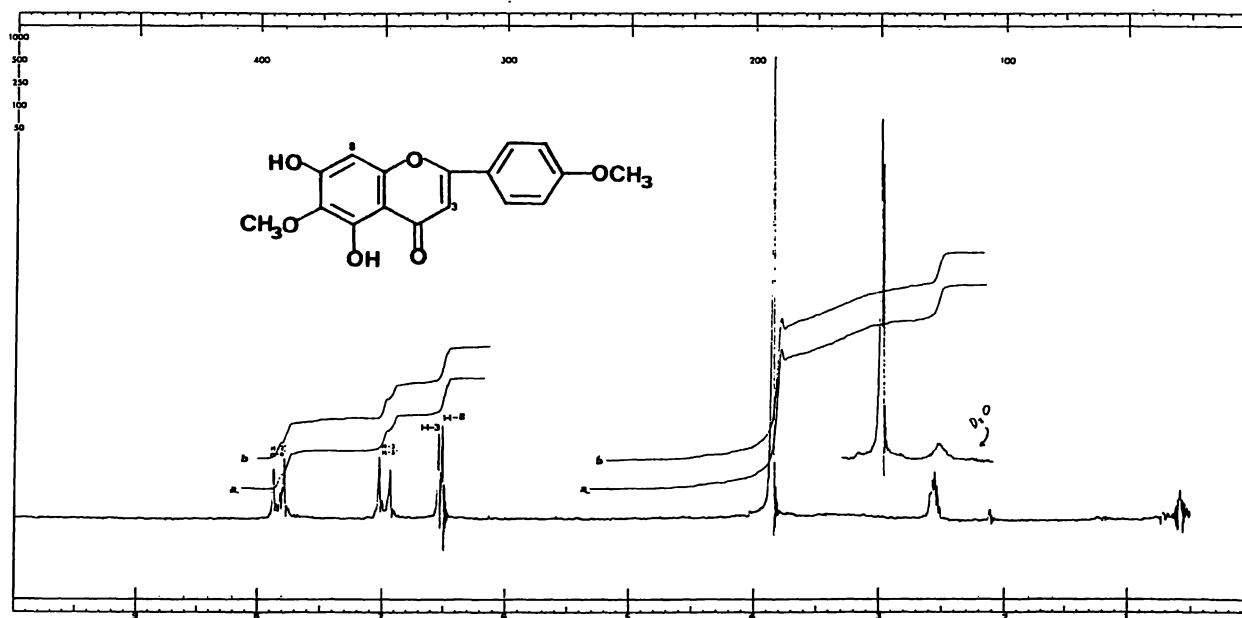
PERKIN-ELMER

ESPECTRO 1

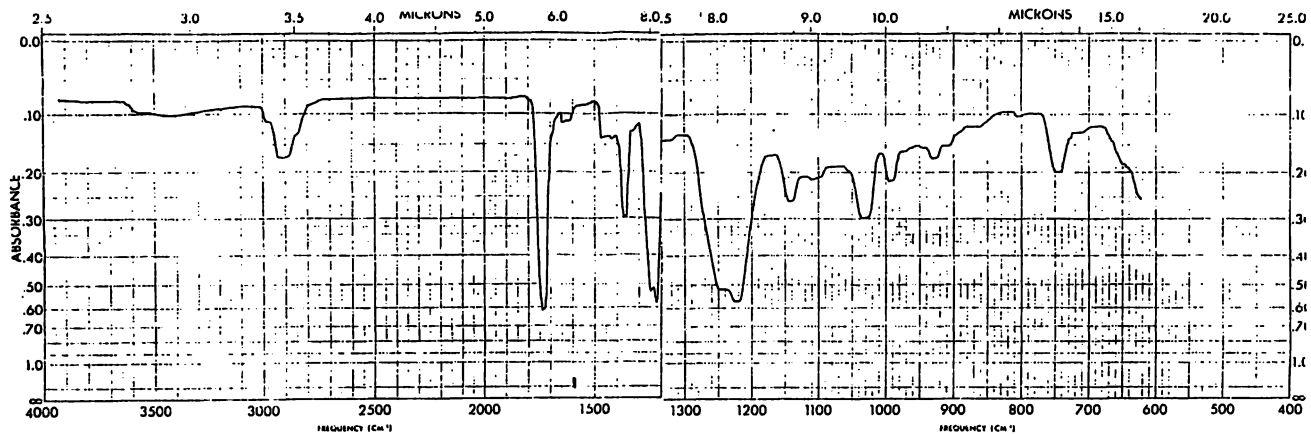


SAMPLE	CURVE NO.	SCAN SPEED	OPERATOR
ORIGIN	CONC.	SLIT	B
SOLVENT	CELL PATH	REMARKS	
PART NO. 337-1306	REFERENCE	PERKIN ELMER®	

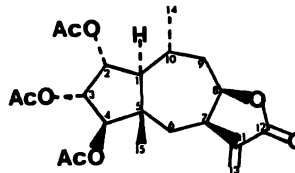
ESPECTRO 2



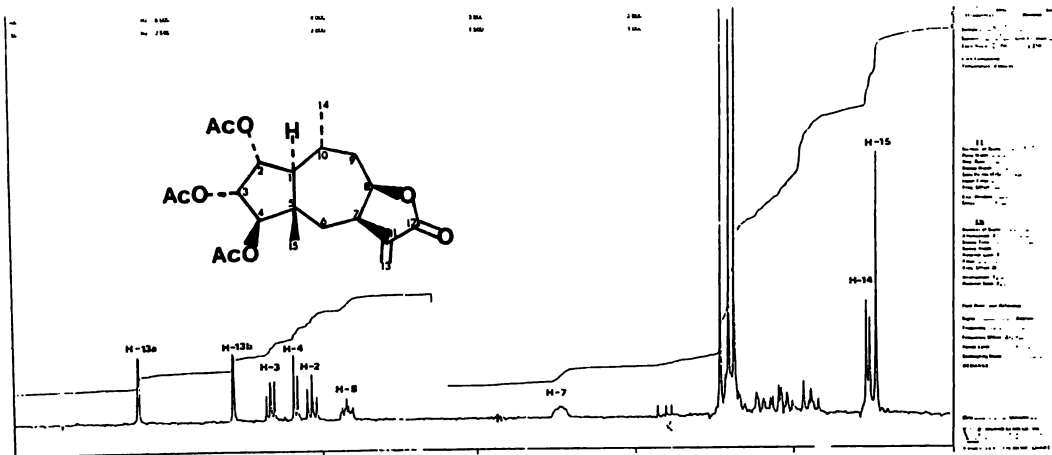
ESPECTRO 3



SAMPLE <u>8.128</u>	CURVE NO. <u>12015</u>	SCAN SPEED <u>F</u>	OPERATOR
DATE <u>8/12/64</u>	CGMC <u>ALC/MSA</u>	SLIT <u>2</u>	DATE <u>8/12/64</u>
ANALYST <u>A. B. W.</u>	CELL PATH <u>0.6</u>	REMARKS <u>SAMPLE 8.128</u>	
SOLVENT <u>CCl₄</u>	REFERENCE <u>None</u>		
PART NO. J37-1302		PERKIN-ELMER	

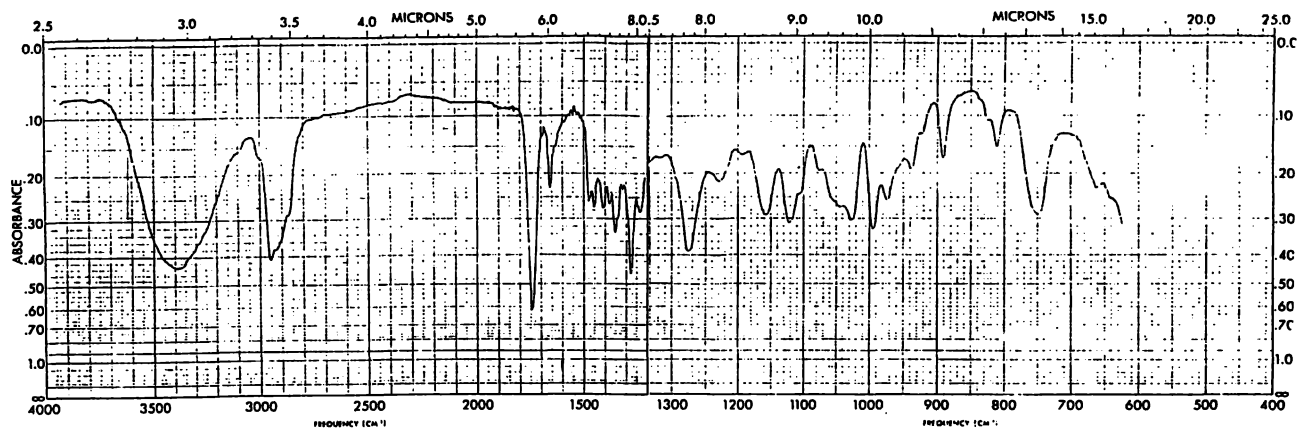


ESPECTRO 4



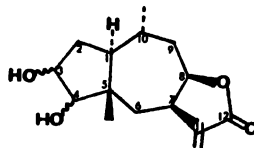
ESPECTRO 5



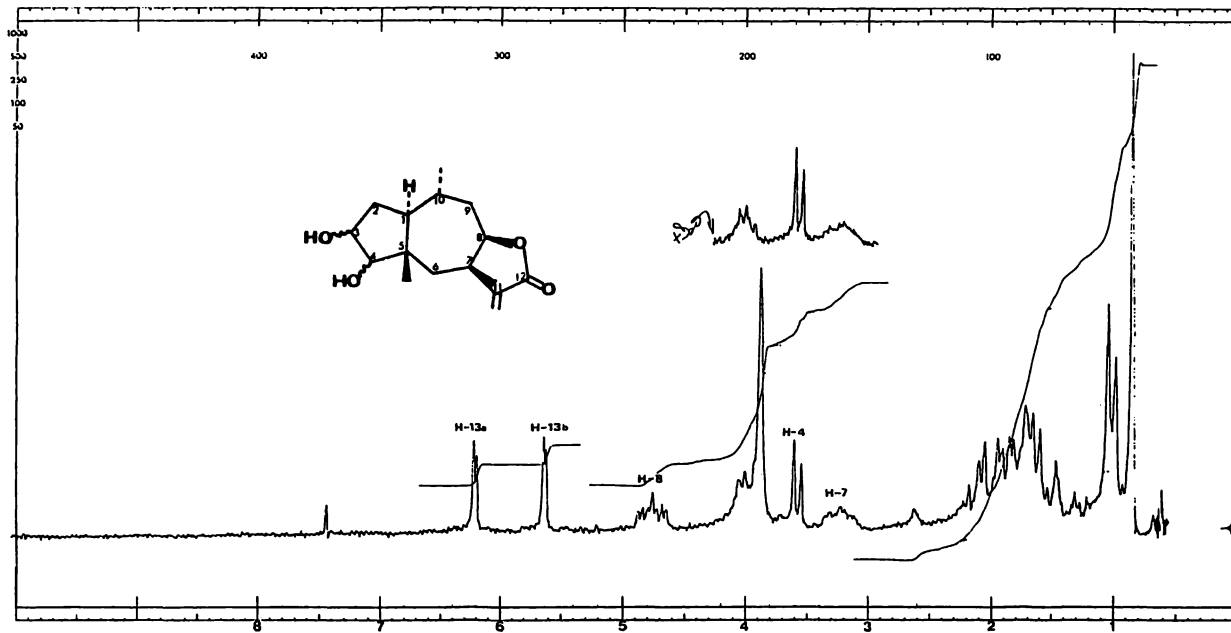


SAMPLE <u>A-186</u>	CURVE NO. <u>11870</u>	SCAN SPEED <u>F</u>	OPERATOR <u>ALBERT</u>	SAMPLE <u>A-186</u>	CURVE NO. <u>11870</u>	SCAN SPEED <u>F</u>	OPERATOR <u>ALBERT</u>
CONC. <u>AS PREP</u>	CELL PATH <u>AP1</u>	DATE <u>1/1</u>	REMARKS <u>SM. R. MULLER</u>	CONC. <u>AS PREP</u>	CELL PATH <u>AP1</u>	DATE <u>1/1</u>	REMARKS
SOLVENT <u>CHL</u>	REFERENCE <u>CHL</u>			SOLVENT <u>CHL</u>	REFERENCE <u>CHL</u>		

PERKIN-ELMER® PART NO. 337-1307      PERKIN-ELMER® PART NO. 337-1308



ESPECTRO 6



ESPECTRO 7

24.

#### IV. RELACIONES QUIMIOTAXONÓMICAS.

#### IV. RELACIONES QUIMIOTAXONOMICAS

El género *Helenium* L. (Compositae, Heliantheae) pertenece a la subtribu Gaillardinae y consta de 40 especies, las cuales son hierbas anuales o perennes<sup>24</sup>.

Su distribución geográfica natural abarca desde el sureste de Canadá hasta Sudamérica, aunque se ha naturalizado en muchas partes del mundo debido a su gran adaptabilidad.

Frecuentemente estas especies se localizan en un habitat relativamente húmedo, como en las orillas de los arroyos, estanques, lagos y en las zanjas de los caminos.

La mayoría de las especies de *Helenium* se encuentran en Norteamérica, constituidas por 23 especies divididas en cinco secciones de acuerdo con la revisión botánica realizada por Bierner<sup>25</sup>.

Algunos autores como Rydberg<sup>26</sup> y Rock<sup>27</sup> han estudiado el género desde el punto de vista botánico exclusivamente. Bierner<sup>28</sup> ha establecido algunas relaciones quimiota<sup>xi</sup>nomicas basándose en los metabolitos secundarios aislados. Herz<sup>29</sup>, Romo<sup>30</sup> y Romo de Vivar<sup>31</sup> han realizado investigaciones enfocadas principalmente al aislamien

to y elucidación estructural de los constituyentes de *Helenum*.

Los resultados químicos obtenidos hasta ahora sobre lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Helenium* se muestran en la tabla I.

De acuerdo con los resultados obtenidos del *Helenium integrifolium* se observa una variante notable en la funcionalización de las lactonas sesquiterpénicas si se compara con los típicos de *Helenium*.

El aspecto del *H. integrifolium* es un poco diferente al de sus congéneres, lo mismo sucede con sus -- propiedades, ya que es bien conocido que los *Helenium* tienen cierta toxicidad<sup>32</sup>, sin embargo este *Helenium* es el -- que tiene más fama como planta tóxica, estas propiedades -- indeseables lo asemejan a las especies de *Hymenoxys*. Su -- composición química también lo asemeja, ya que contiene acetilhymenogrnadina e hymenoratina sustancias que, como se describe en la primera parte de este trabajo, fueron aisladas anteriormente de *Hymenoxys insignis* y de *Hymenoxys odora* respectivamente.

Este hallazgo es de gran relevancia ya que por primera vez se aíslan de *Helenium*, lactonas sesquiterpénicas típicas de *Hymenoxys*. Por lo que convierte a esta

TABLA I.

LACTONAS SESQUITERPENICAS AISLADAS EN EL GENERO *Helenium*.

ESPECIE:	DISTRIBUCION GEOGRAFICA:	COMPUESTO:	REFERENCIA:
<i>H. alternifolium</i> (Spreng.) Cabrera	Sudamérica	Tenulina (1)	41
		Linifolina A (2)	41
		Brevilina (3)	41
		Alternilina (4)	41
<i>H. aromaticum</i> (Hook.) L. H. Bailey	Sudamérica Polonia*	Helenalina (5)	42, 43*
		Mexicanina I (6)	42
		Aromatina (7)	42
		Aromaticina (8)	42
		Linifolina A (2)	42
<i>H. plantagineum</i> (DC.) Mac Bride	Sudamérica	Linifolina A (2)	44
		Mexicanina I (6)	44
<i>H. bloomquistii</i> Rock	México	Tenulina (1)	45
<i>H. virginicum</i> Blake	Canadá	Virginólida (9)	46
<i>H. integrifolium</i> (H.B.K.) Benth. & Hook.	México	Acetilhymenograndina (II)	++
		Hymenoratina (III)	++

\* Espécimen cultivado.

++ Presente trabajo.

ESPECIE:	DISTRIBUCION GEOGRAFICA:	COMPUESTO:	REFERENCIA:
Sección Hecubea (DC.) Gray			
<i>H. scorzoneraefolium</i> (DC.) Gray	México	Isómero de Helenalina	45
		Helenalina (5)	47
		Linifolina A (2)	47
Sección Leptopoda (Nutt.) Wood			
<i>H. brevifolium</i> (Nutt.) Wood	E. U.	Brevilina A (3)	48
<i>H. campestre</i> Small	E. U.	Helenalina (5)	49
<i>H. drummondii</i> Rock	E. U.		45
<i>H. flexuosum</i> Raf.	E. U.	Flexuosina A (10)	48,49,50
		Flexuosina B (11)	49,50
<i>H. pinnatifidum</i> (Nutt.) Rydb.	E. U.	Pinnatifidina (12)	48,51
<i>H. vernale</i> Walt.	E. U.	Helenalina (5)	48
Sección Tetrodus (Cass) DC.			
<i>H. arizonicum</i> Blake	E. U.	Isotenulina (13)	45
<i>H. bigelovii</i> Gray	E. U.	Bigelovina (14)	52
		Tenulina (1)	52
		Isotenulina (13)	52
		Desacetilisotenulina (15)	52

ESPECIE:	DISTRIBUCION GEOGRAFICA:	COMPUESTO:	REFERENCIA:
<i>H. elegans</i> DC. var. <i>elegans</i>	México, E. U.	Tenulina (1)	53,54
<i>H. elegans</i> DC. var. <i>amphibolum</i> (Gray) Bierner	México, E. U.	Tenulina (1) Mexicanina I (6)	47,54 47
<i>H. laciniatum</i> Gray	México, E. U.	Helenalina (5)	45
<i>H. linifolium</i> Rybd.	E. U.	Tenulina (1) Linifolina A (2) Linifolina B (16)	45 45 45
<i>H. mexicanum</i> H.B.K.	México, C. A.	Helenalina (5) Neohelrenalina (17) Mexicanina A (18) Mexicanina B Mexicanina C (19) Mexicanina E (20) Mexicanina H (21)** Mexicanina I (6)	47,55,56 47,55,56,57,58 47,55,56,57 55,56 55,56,58 56,59 56,60 61
<i>H. microcephalum</i> DC. var. <i>microcephalum</i>	México, E. U.	Helenalina (5) Mexicanina E (20) Isohelrenalina (22) Microhelrenalina A (23)** Microhelrenalina B (24)	53,62,63,64,65 66 67,68 65,66b 66

\*\* Poseen la misma estructura, con diferentes constantes físicas y espectroscópicas.



ESPECIE:	DISTRIBUCION GEOGRAFICA:	COMPUESTO:	REFERENCIA:
<i>H. microcephalum</i> DC. var. <i>microcephalum</i>		Microhelenina C (25)	66
		Microlenina (26a)	64,69
		Acetilmicrolenina (26b)	66b
		Isohelenol (27)	67
<i>H. microcephalum</i> DC. var. <i>ooclinium</i> (Gray) Bierner	México, E. U.	Neohelenalina (17)	45
		Mexicanina E (20)	45
<i>H. puberulum</i> DC.	México, E. U.	Puberólida (28)	70
		Desacetilisobigelo- vina (29)	70
<i>H. quadridentatum</i> Labill.	México, E. U.	Helenalina (5)	54,71,72
	Cuba	Mexicanina I (6)	72
		Aromatina (7)	72
		Carabrona (30)	72
<i>H. thurberi</i> Gray	México, E. U.	Tenulina (1)	73
		Thurberilina (31)	73
Sección Amarum Bierner			
<i>H. amarum</i> (Raf.) Rock	E. U., Cuba	Tenulina (1)	53,74,75,76,77
	Polonia*		78
* Espécimen cultivado.		Helenalina (5)	75*

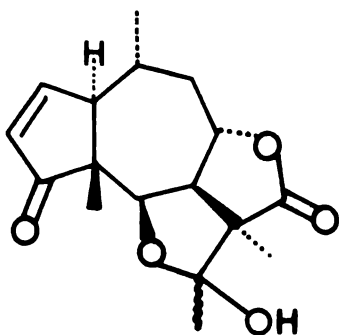
ESPECIE:	DISTRIBUCION GEOGRAFICA:	COMPUESTO:	REFERENCIA:
<i>H. amarum</i> (Raf.) Rock		Mexicanina I (6)	75*,76
		Aromatina (7)	78
		Aromaticina (8)	74,76
		Isotenulina (13)	79
		Amarilina (32)	74,76
		Heleniamarina (33)	76,80
<i>H. badium</i> (Gray) Greene	E. U.	Tenulina (1)	53
Sección Helenium			
<i>H. autumnale</i> L.	E. U., Canadá, Japón*	Tenulina (1)	81
		Mexicanina I (6)	81,82
		Flexuosina A (10)	81
		Helenalina (5)	82,83,84,85,86
		2-Metoxidihidrohe- lenalina (34)	85
		2-Acetilflexuosina A (35)	87
		Dihidromexicanina E (36)	88
		Autumnólida (37)	82,87,89
		Picrohelenina (38)	90

\* Espécimen cultivado.

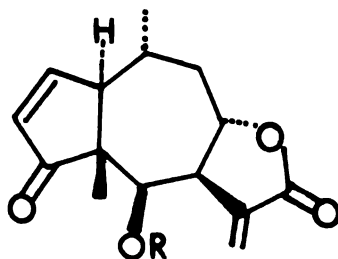
ESPECIE:	DISTRIBUCION GEOGRAFICA:	COMPUESTO:	REFERENCIA:
<i>H. autumnale</i> L.		Plenolina (39)	66b,83,91
		Sulferalina (40)	92
		4-O-Tigloil-11,13-di- hidroautumnólida (41)	93,95
		Carolena (42)	94.95
		Carolenalina (43)	94.95
		Carolenalona (44)	95,96
		Florilenalina (45)	97
		Dihidroflorilenalina (46)	98
		Halshalina (47)	92
		Akihalina (48)	92
		Helenium lactona (49)	99*
		3-O-Tigloilcarolenalina (50)	95
		11,13-dehidrocarolenali- na (51)	95
		4-O-β-D-Glucósido-carole- nalina (52)	95
		3-O-Tigloilcarolenalona (53)	95

\* Espécimen cultivado.

ESPECIE:	DISTRIBUCION GEOGRAFICA:	COMPUESTO:	REFERENCIA:
<i>H. autumnale</i> L.		3-O-Angeloilcarolenalona	
		(54)	95
		Carolenalol (55)	95
		Microhelenina C (25)	95
		11,13-dihidroarnifolina	
		(56)	95

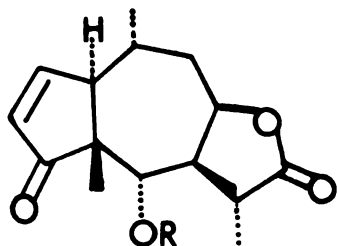


(1) Tenulina



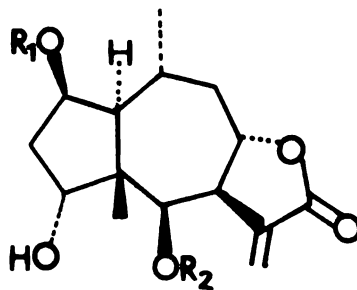
(2) Linifolina A; R = Ac

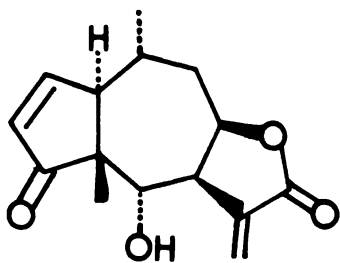
(6) Mexicanina I; R = H



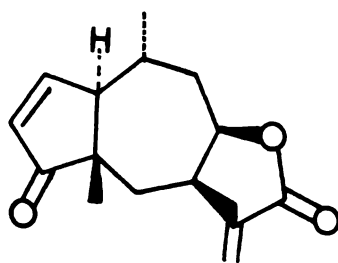
(3) Brevilina A; R = Ang

(19) Mexicanina C; R = H

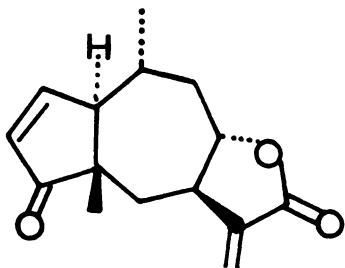
(4) Alternilina; R<sub>1</sub> = Ac, R<sub>2</sub> = H(10) Flexuosina A; R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = Ac(35) 2-Acetilflexuosina A;  
R<sub>1</sub> = Ac, R<sub>2</sub> = Ac



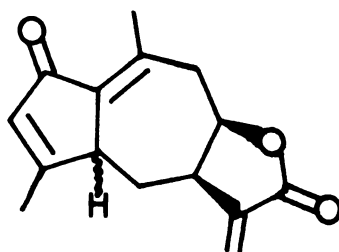
(5) Helenalina



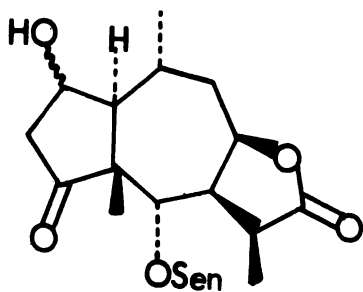
(7) Aromatina



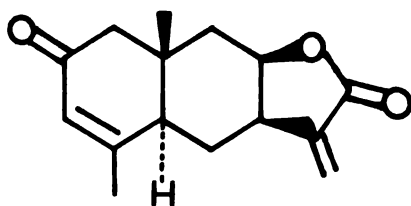
(8) Aromaticina



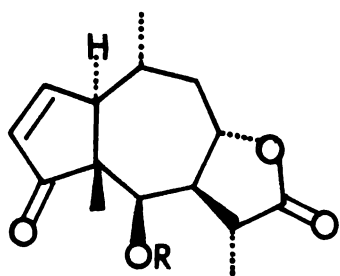
(9) Virginólida



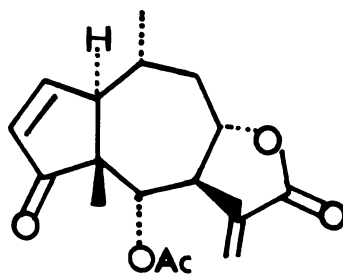
(11) Flexuosina B



(12) Pinnatifidina

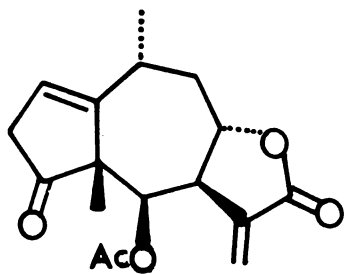


(13) Isotenulina; R = Ac

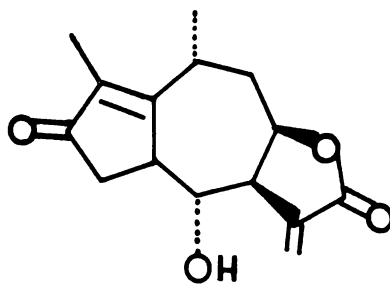
(15) Desacetylisotenulina;  
R = H

(14) Bigelovina

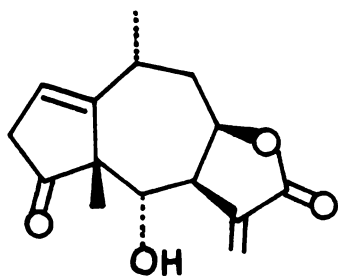
(31) Thurberilina; R = Ang



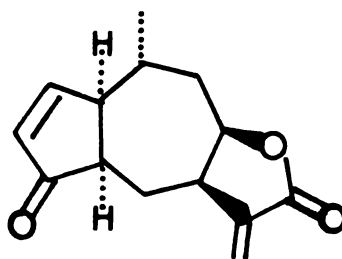
(16) Linifolina B



(17) Neohelenalina

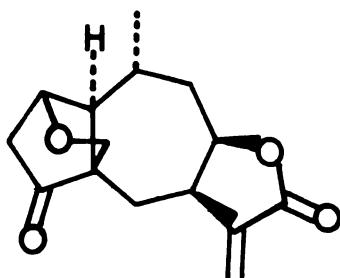


(18) Mexicanina A

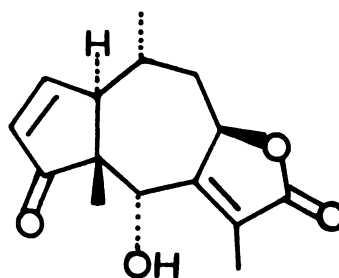


(20) Mexicanina E



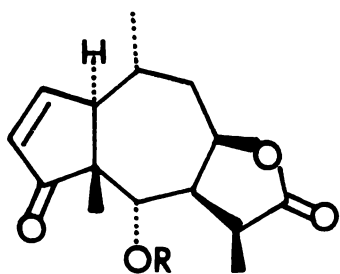


(21) Mexicanina H



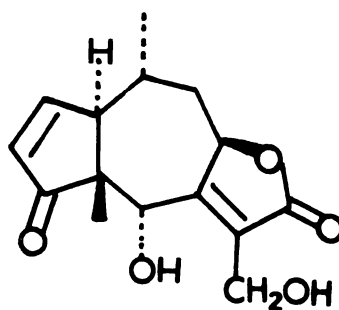
(22) Isohelenina

(23) Microhelenina A

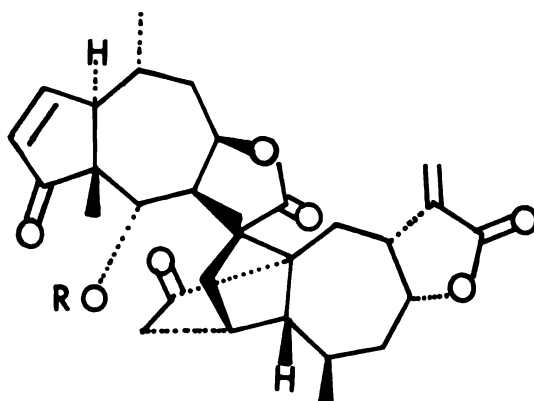
(24) Microhelenina B;  
R = 2-Mebut

(25) Microhelenina C;

(39) Plenolina; R = H

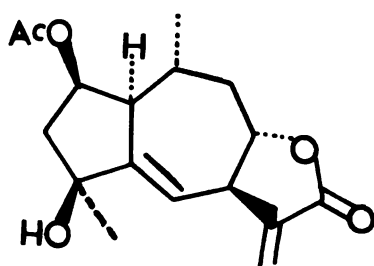


(27) Isohelenol

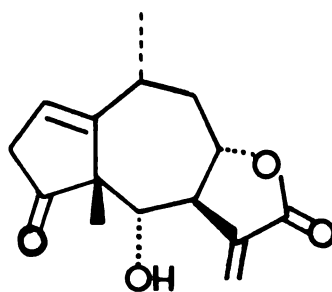


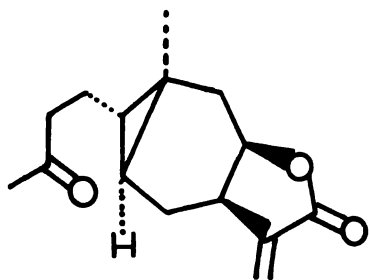
(26a) Microlenina; R = H

(26b) Acetilmicrolenina; R = Ac

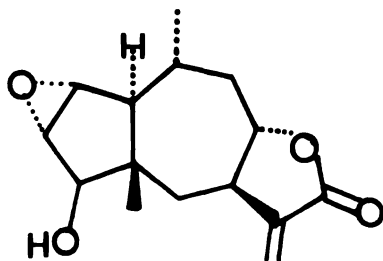


(28) Puberólida

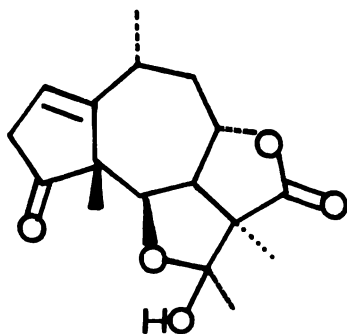
(29) Desacetilisobigelo-  
vina



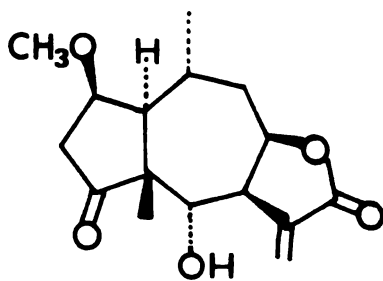
(30) Carabrona

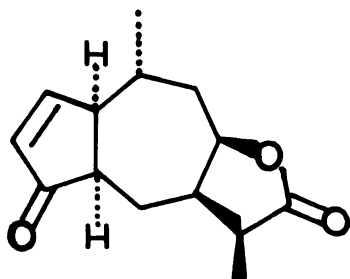


(32) Amarilina

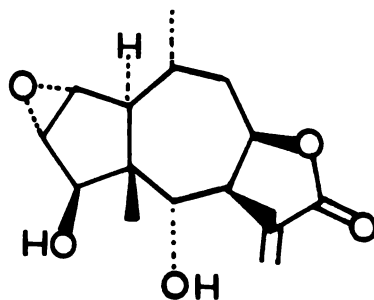


(33) Heleniamarina

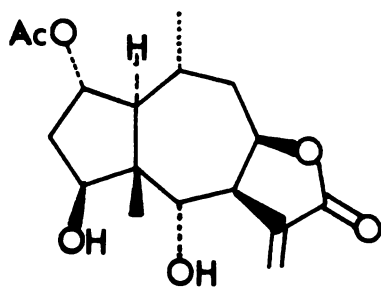
(34) 2-Metoxidihidro-  
helenalina



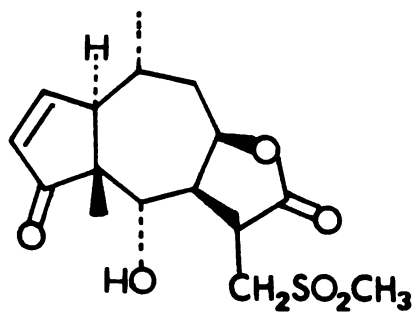
(36) Dihidromexicanina E



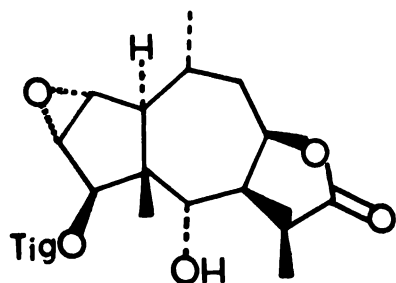
(37) Autumnólida



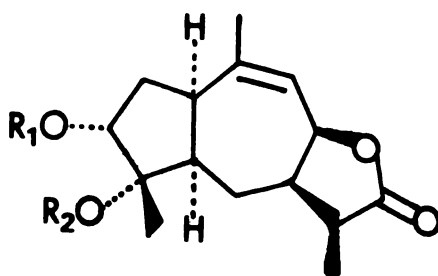
(38) Picrohelenina



(40) Sulferalina



(41) 4-O-Tigloil-11,13-dihydroautumnólida

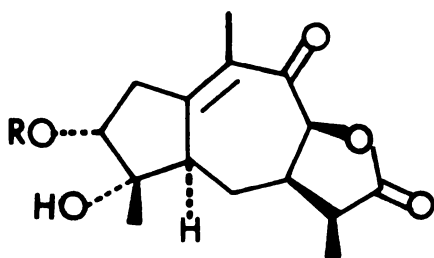


(42) Carolenina;  $R_1 = \text{Ang}$ ,  $R_2 = \text{H}$

(43) Carolenalina;  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{H}$

(50) 3-O-Tigloilcarolenalina;  
 $R_1 = \text{Tig}$ ,  $R_2 = \text{H}$

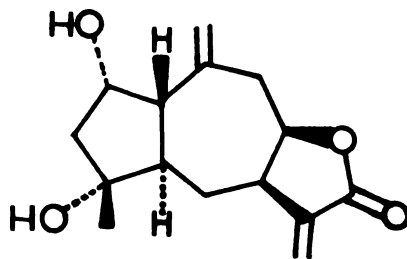
(52) 4-O- $\beta$ -D-Glucósidocarolenalina;  
 $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \beta\text{-D-Glucó}$   
sido



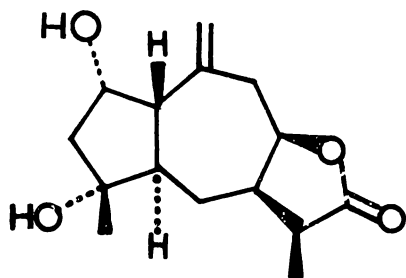
(44) Carolenalona;  $R = \text{H}$

(53) 3-O-Tigloilcarolenalona;  
 $R = \text{Tig}$

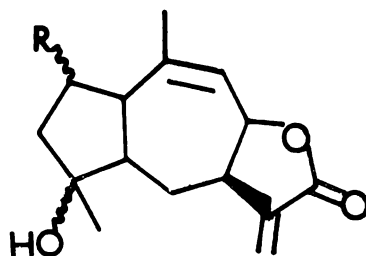
(54) 3-O-Angeloilcarolenalona;  
 $R = \text{Ang}$



(45) Florilenalina

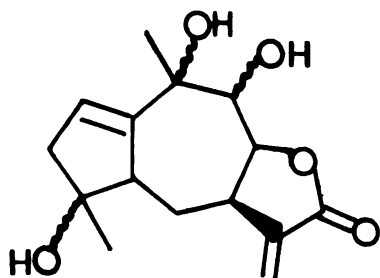


(46) Dihydroflorilenalina

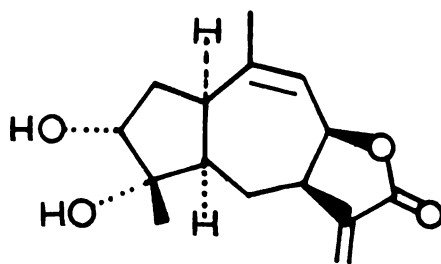


(47) Halshalina; R = OH

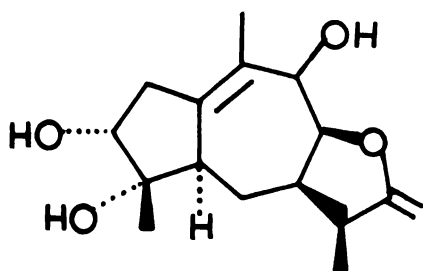
(49) Helenium lactona; R = H



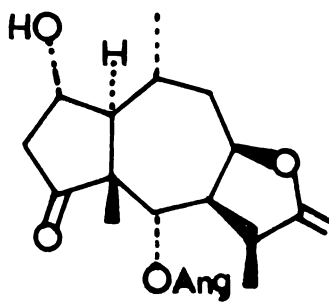
(48) Akihalina



(51) 11,13-dehidrocarolenalina



(55) Carolenalol



(56) 11,13-Dihidroarnifolina

planta en única en su género.

El *Helenium integrifolium* había sido identificada por varios autores como *Dugaldia integrifolia*, es decir, se consideraba una sinonimia e identidad entre ambas<sup>33</sup>.

De estudios de los compuestos flavonoides de los géneros *Helenium* y *Dugaldia* se ha derivado la observación de que cada uno de ellos contiene flavonoides característicos, esto ha permitido su diferenciación. Los flavonoles son típicas en *Dugaldia*<sup>34</sup>, mientras que las flavonas lo son en *Helenium*<sup>35</sup>.

De *Helenium integrifolium* se aisló como se describe en la primera parte del presente trabajo, una flavona que fue identificada como la 5,7-dihidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (pectolinarigenina), lo que indica que este especimen pertenece efectivamente al género *Helenium*.

Por otro lado, Bierner reporta la existencia de flavonoles en *Dugaldia integrifolia*, colectada en Norteamérica. Siendo por lo tanto, ambos géneros diferenciables químicamente.



V. PRUEBAS BIOLÓGICAS PRELIMINARES.

## V. PRUEBAS BIOLÓGICAS PRELIMINARES.

De las diversas plantas agrupadas en la tribu Heliantheae de la familia Compositae, se han aislado -- productos naturales que presentan gran actividad fisiológica, siendo ésta generalmente nociva para animales superiores, tal es la razón por el cual las plantas de esta tribu raramente se usan en la dieta humana o como forraje para los animales.<sup>36</sup>

Desde el punto de vista de la relación estructura-actividad, se ha encontrado que la actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas puede deberse en gran parte a la doble ligadura exocíclica conjugada con el carbonilo de la lactona, o al menos es un requisito esencial para dicha actividad, además, la presencia de una ciclopentenona  $\alpha, \beta$  -insaturada, cuya doble ligadura no debe estar sustituida en  $\beta$  también participa en la actividad biológica de las sustancias que la contienen.<sup>37</sup>

El mecanismo mediante el cual se explica la actividad biológica, consiste en el ataque nucleofílico, de los grupos sulfhidrilo o amino de biomoléculas esenciales, a la doble ligadura exocíclica y/o a la ciclopentenona, provocando una alteración en el sistema considerado.

La ingestión de plantas que contienen lactonas sesquiterpénicas es causa frecuente de envenenamiento en el ganado. Varias especies del género *Helenium* son reportadas como tóxicas para el mismo.<sup>32</sup>

El *H. integrifolium* aparentemente es una -- de las más tóxicas ya que causa considerables pérdidas, al ocasionar la muerte a los borregos que pastan en praderas húmedas entre los 2700 m y 3400 m sobre el nivel del mar.

Los casos de envenenamiento se presentan -- con mayor frecuencia en los meses de invierno que coinciden con la época de sequía.

La distribución geográfica de la especie en la República Mexicana no está bien establecida, pero se ha encontrado en los parques nacionales de Cofre de Perote, - Ver., Zoquiapan, Edo. de Méx. y Cumbres del Ajusco, D. F. En esta última región, la planta se conoce con el nombre de cuatezona.

De acuerdo con los datos facilitados por -- los pastores, los animales afectados por la ingestión de - la planta, se apartan del rebaño, dejan de comer, pierden peso, sufren vómito y finalmente mueren.

Esta especie no provoca estornudos en los - animales, en cambio tanto el ptialismo como el timpanismo

se presentan en forma muy marcada.

Estudios experimentales, mostraron que cuando se administraron al animal por vía oral, 56 g de hoja seca y molida por kg de peso, dividida en varias dosis, -- causó la muerte a los borregos. Los resultados de éste estudio indicaron la presencia de una sustancia fuertemente hepatotóxica.<sup>38</sup>

Para identificar cual de las lactonas sesquiterpénicas aisladas en el *Helenium integrifolium* era la responsable de la mencionada toxicidad, se realizaron bioensayos preliminares en peces.

Estas pruebas se llevaron a cabo con helenalina, acetilhymenograndina e hymenoratina. Existe un gran número de pruebas biológicas llevadas a cabo con helenalina.<sup>39</sup> En particular se han hecho ensayos similares de su toxicidad en peces,<sup>40</sup> de modo que es posible comparar la actividad de la acetilhymenograndina e hymenoratina con -- respecto a ésta sustancia.

Los productos se disolvieron en metanol---- agua, a una concentración específica, suministrando dosis progresivas de la sustancia a los peces y midiendo el lapso en que los animales mueren. De esta manera se puede predecir que a mayor dosis suministrada de la sustancia a pro

bar, se reduce el tiempo de vida. Asimismo mediante este ensayo, es posible comparar la actividad de las sustancias ya que la más tóxica manifestará su actividad a igual concentración en un menor tiempo relativo.

Los resultados obtenidos se ilustran en la tabla II, y al trazar la concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) contra el tiempo (min), se obtiene la gráfica 1, en donde se observa que la acetilhymenograndina es la más activa de las tres sustancias que se compararon, por un factor de 2 con respecto a la helenalina y de 6.65 con respecto a la hymenoratina.

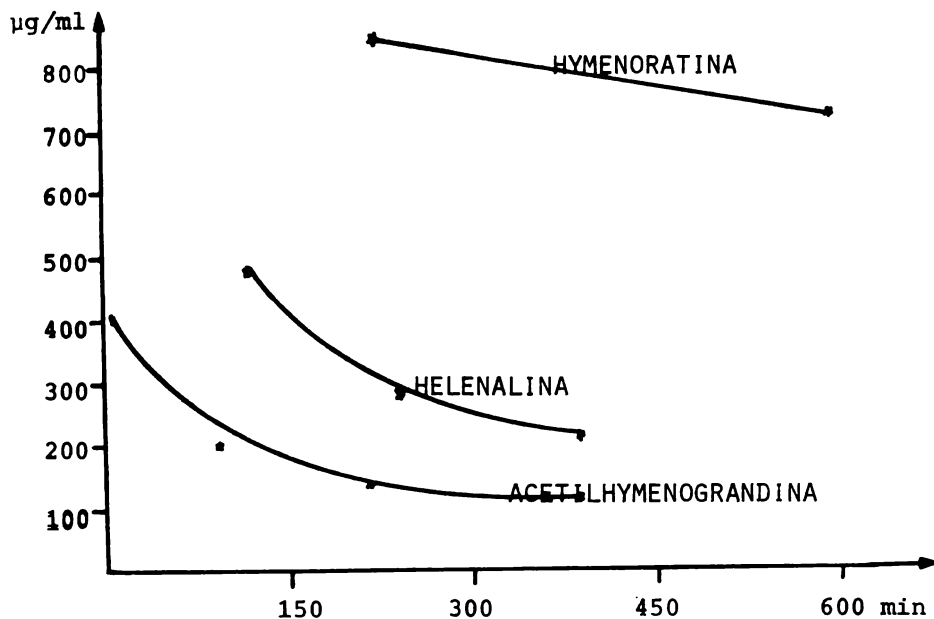
La hymenoratina muestra en este ensayo una actividad menor que la acetilhymenograndina y la helenalina. Por otro lado, la hymenoratina muestra actividad citotóxica en el sistema KB y no hay resultados en la prueba de P-388<sup>23</sup>, mientras que la acetilhymenograndina que en nuestro estudio resultó más activa, no se le han aplicado los ensayos mencionados por lo tanto es conveniente realizarlos.

De esta manera se deduce que de los componentes aislados del *H. integrifolium*, la acetilhymenograndina es el principal responsable de la alta toxicidad que presenta esta planta.

Tabla II. Resultados de las pruebas de toxicidad en peces.

Compuesto:	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Tiempo de vida (min)
Helenalina	476.2	120
"	285.7	240
"	208.3	386
Acetilhymenograndina	400.0	9
"	200.0	95
"	142.8	220
"	114.3	390
Hymenoratina	847.4	225
"	719.4	600

Gráfica 1.



52.

VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

## VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

Del estudio fitoquímico del *Helenium integrifolium* (H.B.K.) Benth. & Hook. se aislaron e identificaron dos lactonas sesquiterpénicas: acetilhymenograndina e hymenoratina, además de la flavona, pectolinarigenina (5,7-dihidroxi-6,4'-dimetoxiflavona).

El aislamiento de estas helenanólidas presenta cierta relevancia, ya que por primera vez se aislaron de *Helenium*, pseudoguaianólidas típicas de *Hymenoxys*, siendo por lo tanto este espécimen único en su género, en cuanto a su composición de lactonas sesquiterpénicas.

Acorde con estudios quimiotaxonómicos anteriores, el aislamiento de la pectolinarigenina permite establecer con certeza que la identidad de esta planta es *H. integrifolium*.

Dado que la planta es tóxica para los borregos, se realizaron pruebas biológicas preliminares para determinar cual de las sustancias es la responsable de la toxicidad. Los bioensayos realizados en peces muestran que la acetilhymenograndina es el principal constituyente tóxico aislado de esta planta.



54.

VII. PARTE EXPERIMENTAL.

El espécimen analizado fué identificado por el Dr. Jerzy Rzedowski del Departamento de Botánica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N., a quien expresamos nuestro agradecimiento. El espécimen se encuentra depositado en el Herbario Nacional, Instituto de Biología, U.N.A.M. *Helenium integrifolium* (H.B.K.) Benth. & Hook. Voucher: ARV 0048, Número de registro: 304950.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fischer-Jones y no están corregidos. Las cromatografías en columna se efectuaron en sílica-gel 60 Merck (70---230 mesh ASTM). La pureza de los productos y el desarrollo de las reacciones se siguió por cromatoplaqueta de sílica-gel Merck F-254, usando como revelador sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N.

Los espectros de UV se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, Modelo 202. Las rotaciones ópticas se efectuaron en un polarímetro digital Perkin-Elmer, Modelo 241. Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, Modelo 337, utilizando las técnicas de pastillas de KBr ó soluciones clorofórmicas. Los espectros de masas se determinaron en un espectrómetro Hitachi Perkin-Elmer, RMU 6D de doble foco. Los espectros de  ${}^1\text{H}$  se determinaron en los aparatos HA-100, FT-80A y FT-270 Varian. Los desplazamientos químicos están dados en ppm referidos al tetrametilsilano como referencia interna.

El análisis elemental fué efectuado por el Dr. Franz Pascher, en Bonn, República Federal de Alemania.

## VII. PARTE EXPERIMENTAL.

El *Helenium integrifolium* (H.B.K.) Benth. & Hook., fue colectado en septiembre de 1978 al oeste del -- volcan Ajusco, D.F. (19° 12' 16" latitud norte y 99° 16' - 28" longitud oeste).

De la parte aérea de la planta seca, 2020 g se extrajeron tres veces consecutivas con hexano a reflujo durante una hora, obteniéndose 61.8 g de residuo. Poste---riormente se repitió el procedimiento con cloroformo, obte niéndose 71.1 g de extracto clorofórmico. Este último ex--tracto se analizó por cromatografía en columna de vidrio, usando como soporte gel de sílice, en una relación de 1:30 con respecto al extracto. La columna se eluyó inicialmente con benceno, aumentando la polaridad con mezclas de bence--no-acetato de etilo, hasta llegar a 100% de este último.

De las fracciones eluidas con benceno-acetato de etilo (9:1) cristalizó la pectolinarigenina (5,7-di--hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona), 250.7 mg (0.012%), p.f. 219 -21°. Se recrystalizó varias veces de metanol hasta p.f. - constante, 224°-6°.

—

\* U.V. (MeOH) (espectro 1):  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$  217 nm, -  
( $\epsilon$  32572),  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$  279 nm ( $\epsilon$  20515),  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$  334 nm ( $\epsilon$  23027).

\* I.R. ( $\text{CHCl}_3$ ) (espectro 2):  $3490\text{ cm}^{-1}$  (grupo oxhidrilo),  $1660\text{ cm}^{-1}$  (carbonilo conjugado en anillo), -  $1620\text{ cm}^{-1}$  y  $1580\text{ cm}^{-1}$  (doble ligadura aromática).

\*RMP-100 MHz ( $\text{CDCl}_3$ -DMSO) (espectro 3): ---  
7.84 ppm (2H, d,  $J=9$  Hz) H-2', H-6'; 7.00 ppm (2H, d,  $J=9$  Hz) H-3', H-5'; 6.55 ppm (1H, s) H-3; 6.52 ppm (1H, s) - H-8; 3.86 ppm (6H, s) metilo de los metoxilos.

\*E.M.: m/z 314 ( $\text{M}^+$ ,  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6^+$ , 100%), m/z - 296 ( $\text{M}^+-18$ , 54.5%), m/z 271 ( $\text{M}^+-43$ , 55.7%), m/z 69 ( $\text{M}^+-245$  91.7%).

De las fracciones eluidas con benceno-acetato de etilo (4:1) se aisló la acetilhymenograndina, una -- sustancia cristalina, 535.6 mg (0.026%) con p.f.  $137^\circ-9^\circ$ . La muestra analítica de esta sustancia se obtuvo por re--- cristalizaciones sucesivas de acetona-éter isopropílico, - p.f.  $139^\circ-41^\circ$ .

\*  $[\alpha]_D^{20} = +66.66^\circ$  (c 0.111,  $\text{CHCl}_3$ ).

\* U.V. (MeOH):  $\lambda_{\text{máx}}$  215 nm ( $\epsilon$  8478).

\* I.R. ( $\text{CHCl}_3$ ) (espectro 4):  $1752\text{ cm}^{-1}$  (carbonilo de  $\gamma$ -lactona),  $1740\text{ cm}^{-1}$  (carbonilo de acetato).

\* RMP-270 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) (espectro 5): 6.26 -- ppm (1H, d,  $J=2.8$  Hz) H-13a; 5.59 ppm (1H, d,  $J=2.8$  Hz)

H-13b; 5.32 ppm (1H, dd, J= 7,9 Hz) H-3; 5.14 ppm (1H, d, J= 7 Hz) H-4; 5.02 ppm (1H, t, J= 9Hz) H-2; 4.78 ppm (1H, ddd, J= 3,8,12 Hz) H-8; 3.26 ppm (1H, m) H-7; 2.13 ppm (3H s), 2.06 ppm (3H, s) y 2.03 ppm (3H, s) metilo de los acetatos; 1.08 ppm (3H, d, J= 7 Hz) metilo en C-10; 1.03 ppm (3H, s) metilo en C-5.

\* Análisis elemental para:  $C_{21}H_{28}O_8$

Calculado: C = 61.75%, H = 6.91%, O = 31.34%

Encontrado: C = 61.50%, H = 6.90%, O = 31.96%

En las fracciones eluidas con benceno-acetato de etilo (1:1), cristalizó 1.2982 g (0.064%) de hymenonatina, p.f. 157°-9°. Por recristalizaciones sucesivas de acetona-éter isopropílico presentó p.f. 166°-8°.

\* I.R. ( $CHCl_3$ ) (espectro 6): 3390  $cm^{-1}$  (grupo oxhidrilo), 1750  $cm^{-1}$  (carbonilo de  $\gamma$ -lactona), 1660  $cm^{-1}$  (doble ligadura).

\* RMP-100 MHz ( $CDCl_3$ ) (espectro 7): 6.29 -- ppm (1H, d, J= 2 Hz) H-13a; 5.61 ppm (1H, d, J= 2 Hz) H-13b; 4.78 ppm (1H, m) H-8; 4.00 ppm (1H, m) H-3; 3.56 ppm (1H, d, J= 7 Hz) H-4; 3.20 ppm (1H, m) H-7; 0.99 ppm (3H, d, J= 7 Hz) metilo en C-10; 0.82 ppm (3H, s) metilo en C-5

\* EM: m/z 266 ( $M^+$ ,  $C_{15}H_{22}O_4$ , 4.55%), m/z --

248 ( $M^+ - 18$ , 11.55%),  $m/z$  230 ( $M^+ - 36$ , 28%),  $m/z$  107 ( $M^+ - 159$  100%).

Obtención de la tetrametilescutelareina (5,6,7,4'-tetrametoxiflavona).

A una solución de 44 mg de pectolinarigenina (5,7-dihidroxi-6,4'-dimetoxiflavona) en 200 ml de acetona se adicionaron 4 ml de yoduro de metilo y 8 g de carbonato de sodio anhidro. Después de 48 horas de reacción a reflujo, se filtró, evaporó y se extrajo el residuo con agua y a continuación con éter, obteniéndose del extracto etéreo un aceite el cual fue cromatografiado en una columna empacada con gel de sílice (1.5 g) en benceno. De las fracciones eluidas con benceno-cloroformo (3:1) cristalizó de acetona-hexano la tetrametilescutelareina, p.f. 165-6°.

\* I.R. (KBr): 1640  $cm^{-1}$  y 1605  $cm^{-1}$  (doble ligadura aromática).

\* RMP-80 MHz ( $CDCl_3$ ): 7.78 ppm (2H, d, J= 9 Hz) H-2', H-6'; 6.96 ppm (2H, d, J= 9 Hz) H-3', H-5'; 6.72 ppm (1H, s) H-3; 6.53 ppm (1H, s) H-8; 3.96 ppm (3H, s), 3.94 ppm (3H, s), 3.88 ppm (3H, s) y 3.85 ppm (3H, s) metilo de los metoxilos.

### Obtención de Hymenolano.

Se prehidrogenaron 10 mg de Pd/C al 10% en 3 ml de metanol. Cuando el catalizador dejó de tomar hidrógeno, se adicionaron 100.4 mg de acetilhymenograndina. La mezcla se dejó reaccionar hasta que dejó de consumir hidrógeno. El catalizador se eliminó por filtración sobre celita y se concentró a presión reducida. El producto hidrogenado, hymenolano, cristalizó de acetato de etilo-éter isopropílico, p.f. 218°-21°.

\* I.R. ( $\text{CHCl}_3$ ): 1770  $\text{cm}^{-1}$  (carbonilo de lactona), 1745  $\text{cm}^{-1}$  (carbonilo de acetato).

\* RMP-80 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ): 5.29 ppm (1H, dd, J= 7,9 Hz) H-3; 5.14 ppm (1H, d, J= 7 Hz) H-4; 4.98 ppm (1H, t, J= 9 Hz) H-2; 4.67 ppm (1H, m) H-8; 2.85 ppm (1H, m) H-7; 2.09 ppm (3H, s), 2.04 ppm (3H, s) y 1.99 ppm (3H, s) - metilo de los acetatos; 1.11 ppm (6H, d) metilo en C-10 y C-11; 1.05 (3H, s) metilo en C-5.

### Obtención del diacetato de hymenoratina.

89 mg de hymenoratina en 1 ml de piridina y 1 ml de anhídrido acético, se dejaron reaccionar a temperatura ambiente durante 8 horas. Luego se agregó agua y se -

extrajó con  $\text{CHCl}_3$ . La solución orgánica se lavó con solución de HCl al 10%, después con solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y por último con agua. Se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y el diacetato de hymenoratina cristalizó de cloroformo-hexano, p.f.  $129^\circ\text{-}31^\circ$  {lit. (22) p.f.  $132^\circ\text{-}3^\circ$ }.

\* I.R. ( $\text{CHCl}_3$ ):  $1760\text{ cm}^{-1}$  (carbonilo de  $\gamma$ -lactona),  $1740\text{ cm}^{-1}$  (carbonilo de acetato),  $1650\text{ cm}^{-1}$  (doble ligadura).

\* RMP-100 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ): 6.23 ppm (1H, d,  $J=2$  Hz) H-13a; 5.56 ppm (1H, d,  $J=2$  Hz) H-13b; 5.09 ppm (2H com) H-3, H-4; 4.74 ppm (1H, m) H-8; 3.26 ppm (1H, m) H-7; 2.12 ppm (3H, s) y 2.04 ppm (3H, s) metilo de acetatos; 1.02 ppm (3H, d,  $J=7$  Hz) metilo en C-10; 0.92 ppm (3H, s) metilo en C-5.

\* EM: m/z 350 ( $\text{M}^+$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_6$ ); m/z 308 ( $\text{M}^{+}-42$ , 61.82%); m/z 290 ( $\text{M}^{+}-60$ , 20.91%); m/z 248 ( $\text{M}^{+}-102$ , 100%).

### Bioensayos.

Las pruebas biológicas se llevaron a cabo con helenalina, acetilhymenograndina e hymenoratina, en grupos de 3, 4 y 2 peces, respectivamente, tomando un pez como testigo. Los peces utilizados fueron *Xiphophorus he-*



*lleri* Heckel (ca. 2.4 g de peso y ca. 12 cm de longitud), manteniéndolos con aeración esporádica.

La helenalina (100 mg) se disolvió en agua (100 ml), la acetilhymenograndina (40 mg) se disolvió en metanol (2 ml) y agua (98 ml) y la hymenoratina (111.2 mg) se disolvió en agua (100 ml). Al testigo se le colocó en una solución de metanol (1 ml) en agua (50 ml).

Para conocer la concentración aproximada de la dosis letal, se realizaron experimentos con concentraciones relativamente altas de manera que los peces muriesen en un tiempo relativamente corto (3-4 horas), encontrándose que tales concentraciones son del orden de 285  $\mu\text{g/ml}$ , 142  $\mu\text{g/ml}$ , 847  $\mu\text{g/ml}$ , para la helenalina, acetilhymenograndina e hymenoratina respectivamente. Posteriormente se procedió a hacer los ensayos a concentraciones menores y mayores, y se observó el tiempo de respuesta a la sustancia, los resultados se muestran en la tabla II.

Una observación notable, en los peces al sunistrarle la sustancia, fué la pérdida de coordinación y esto se consideró como un síntoma del efecto producido por la sustancia. Cuando se presenta este síntoma, se coloca al animal en agua libre de sustancia y se observa una recuperación gradual.

63.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Bentham, G., *J. Linn. Soc. London.* 13, 335 (1873).
2. Rzedowski, J., *Ciencia.* 26, 123 (1972).
3. Stuessy, T. F., *The Biology and Chemistry of the Compositae.* (Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L., eds.) Vol. 2, p. 621. Academic Press. London. ---- (1977).
4. Cronquist, A., *Amer. Midl. Natur.* 53, 478 (1955).
5. Turner, B. L. and Powell, A. M., *The Biology and Chemistry of the Compositae.* (Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L., eds.) Vol. 2, p. 700. Academic Press. London. (1977).
6. Mabry, T. J. and Bohlmann, F., *The Biology and Chemistry of the Compositae.* (Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L., eds.) Vol. 2, p. 1097. Academic Press. London. (1977).
7. Herz, W., *The Biology and Chemistry of the Compositae.* (Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L., eds.) Vol. 1, p. 337. Academic Press. London. (1977).
8. Herz, W., *Israel J. of Chem.* 16, 32 (1977).
9. Fischer, N. H., Olivier, E. J. and Fischer, H. D., *The Biogenesis and Chemistry of Sesquiterpene Lactones.* -- *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products.* (Herz, W., Grisebach, H. and Kirby, G. W., eds.) Vol. 38, p. 223. Springer-Verlag. Wien. (1979).
10. Burnett, W. C., *Biochem. System. and Ecology.* 2, 25 --

(1974).

11. Rodriguez, E., Towers, G. H. N. and Mitchell, J. C., *Phytochemistry*. 15, 1573 (1976).
12. Rodriguez, E., *Rev. Latinoamer. Quím.* 8, 56 (1977).
13. Herout, V., Chemataxonomy of the Compositae. Pharmacognosy and Phytochemistry. (Wagner, H. and Horhammer, L. eds.) p. 93. Springer-Verlag. Berlin. (1971).
14. Yoshioka, H., Mabry, T. J. and Timmermann, B. N., Sesquiterpene Lactones: Chemistry, NMR and Plant Distribution. Univ. of Tokyo Press. Tokyo. (1973).
15. Solbrig, O. T., *Taxon*. 12, 229 (1963).
16. Schmid, L. and Rumpel, W., *Monatsh.* 60, 8 (1932).
17. Farkas, L., Nogradi, M., Sudarsanam, V. and Herz, W., *J. Org. Chem.* 31, 3228 (1966).
18. Herz, W., Bhat, S. V. and Sudarsanam, V., *Phytochem.* - 11, 1829 (1972).
19. Herz, W., Aota, K. and Hall, A. L., *J. Org. Chem.* 35, 4117 (1970).
20. Herz, W., Govindan, S. V. and Bierner, M. W., *J. Org. Chem.* 45, 493 (1980).
21. Pettersen, R. C. and Kim, H. L., *J. Chem. Soc. Perkin II*. 1399 (1976).
22. Ortega, A., Romo de Vivar, A. and Romo, J., *Can. J. -- Chem.* 46, 1539 (1968).
23. Hoffmann, J. J., Jolad, S. D., Torrance, S. J., Luzbetak, D. J., Wiedhopf, R. M. and Cole, J. R. J., *J. ---*

- Pharm. Sci.* 67, 1633 (1978).
24. Stuessy, T. F., *The Biology and Chemistry of the Compositae*. (Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L., eds.) Vol. 2, p. 636. Academic Press. London (1977)
  25. Bierner, M. W., *Brittonia*. 24, 331 (1972).
  26. Rydberg, P. A., *North American Flora*. 34. 120 (1915).
  27. Rock, H. F. L., *Rhodora*. 59, 101 (1957).
  28. (a) Bierner, M. W., *Biochem. Syst.* 1, 55 (1973).  
(b) Bierner, M. W., *Biochem. Syst.* 1, 95 (1973).
  29. (a) Herz, W., *Recent Advances in Phytochemistry*. (Mabry, T. J., Alston, R. and Runeckles, V. C., eds.) p. 229. Appeton-Century-Crofts. New York. (1968).  
(b) Herz, W., *Chemistry in Botanical Classification*. - (Benzm G. and Santesson, J. eds.) p. 153. Academic --- Press. New York and London. (1973).
  30. Romo, J. and Romo de Vivar, A., *The Pseudoguaianolides Fortschitte der Chemie Organischer Naturstoffe*. (Zeichmeister, L. ed.) Vol. 25, p. 90. Springer. Wien. (1967)
  31. (a) *ibid.* Ref. 30.  
(b) Romo de Vivar, A., *Rev. Latinoamer. Quím.* 8, 63 -- (1977).
  32. Kingsbury, J. M., *Poisonous Plants of the United States and Canada*. Prentice-Hall. Englewood Cliffs. N. J. (1964).
  33. (a) *ibid.* Ref. 26.  
(b) Bierner, M. W., *Brittonia*. 26, 385 (1974).
  34. *ibid.* Ref. 33b.

35. *ibid.* Ref. 28a.
36. Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L., *The Biology and Chemistry of the Compositae.* (Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L., eds.) Vol. 1, - p. 11. Academic Press. London. (1977).
37. (a) Kupchan, S. M., Giacobbe, T. J., Krull, I. S., Thomas, A. M., Eakin, M. A. and Fessler, D. C., *J. Org. - Chem.* 35, 3539 (1970).  
(b) Kupchan, S. M., Fessler, D. C., Eakin, M. A. and Giacobbe, T. J., *Science.* 168, 376 (1970).  
(c) Lee, K. H., Huang, E. S., Piantadosi, C., Pagano, J. S. and Geissman, T. A., *Cancer Res.* 31, 1649 (1971)  
(d) Lee, K. H., Ibuka, T. and Wu, R. Y., *Chem. Pharm. Bull.* 22, 2206 (1974).  
(e) Lee, K. H., Ibuka, T., Wu, R. Y. and Geissman, T. A., *Phytochem.* 16, 1177 (1977).  
(f) Kupchan, S. M., Eakin, M. A. and Thomas, A. M., *J. Med. Chem.* 14, 1147 (1971).  
(g) *ibid.* Ref. 11.  
(h) *ibid.* Ref. 12.  
(i) Cassady, J. M. and Suffness, M., *Anticancer Reagents Based on Natural Products.* p. 204. Academic Press. London. (1980).
38. Alline, S. M. S. and Paasch, L., *Veterinaria.* 4, 214 - (1973).
39. (a) *ibid.* Ref. 37c.  
(b) Pettit, G. R., Budzinski, J. C., Cragg, G. M., Brown, P. and Johnston, L. D., *J. Med. Chem.* 17, 1013 (1974).

- (c) Witzel, D. A., Ivie, G. W. and Dollahite, J. W.  
*Amer. J. Vet. Res.* 37, 859 (1976).
- (d) Hall, I. H., Lee, K. H., Mar, E. C. and Starnes, -  
*C. O. J. Med. Chem.* 20, 333 (1977).
- (e) Lee, K. H., Ibuka, T., Mar, E. C. and Hall, I. H.  
*J. Med. Chem.* 21, 698 (1978).
40. Clark, E. P., *J. Am. Chem. Soc.* 58, 1982 (1936).
41. Herz, W., Gast, C. M. and Subramaniam, P. S. *J. Org. -  
Chem.* 33, 2780 (1968).
42. Romo, J., Joseph-Nathan, P. and Diaz, F. *Tetrahedron.*  
20, 79 (1964). *ibid. Chem. and Ind.* 1839 (1963).
- 43\* Bloszyk, E., Drozd, B., Samek, Z., Toman, J. and Ho--  
lub, M., *Phytochem.* 14, 1444 (1975).
44. Silva, M., *J. Pharm. Sci.* 56, 922 (1967).
45. Herz, W., *J. Org. Chem.* 27, 4043 (1962).
46. Herz, W., Santhanam, P. S., *J. Org. Chem.* 32, 507 ----  
(1967).
47. Romo, J., Romo de Vivar, A. and Aguilar, M. *Bol. Inst.  
Quím. Univ. Nac. Autón. Méx.* 21, 66 (1969).
48. Herz, W., Mitra, R. B., Rabindran, K. and Rodhe, W. A.  
*J. Amer. Chem. Soc.* 81, 1481 (1959).
49. Herz, W., Jayaraman, P. and Watanabe, H., *J. Amer. ---  
Chem. Soc.* 82, 2276 (1960).
50. Herz, W., Kishida, Y. and Lakshmikantham, M. V., *Tetra  
hedron.* 20, 979 (1964).
51. Herz, W., Mitra, R. B., Rabindran, K. and Viswanathan,

- N., *J. Org. Chem.* 27, 4041 (1962).
52. Parker, B. A. and Geissman, T. A., *J. Org. Chem.* 27, 4127 (1962).
53. Clark, E. P., *J. Amer. Chem. Soc.* 61, 1836 (1939).
54. *ibid.* Ref. 28b.
55. Romo de Vivar, A. and Romo, J., *Chem. and Ind.* 882 -- (1959).
56. Romo de Vivar, A. and Romo, J., *Ciencia.* 21, 33 (1961)
57. Herz, W., Romo de Vivar, A., Romo, J. and Viswanathan, N., *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 19 (1963).
58. Herz, W., Romo de Vivar, A., Romo, J. and Viswanathan, N., *Tetrahedron.* 19, 1359 (1963).
59. (a) Romo de Vivar, A. and Romo, J., *J. Amer. Chem. Soc.* 83, 2326 (1961).  
(b) Romo, J., Romo de Vivar, A. and Herz, W. *Tetrahedron.* 19, 2317 (1963).
60. Romo, J., Romo de Vivar, A. and Joseph-Nathan, P., *Tetrahedron Lett.* 1029 (1966).
61. Dominguez, E. and Romo, J., *Tetrahedron.* 19, 1415 ---- (1963).
62. Adams, R. and Herz, W., *J. Amer. Chem. Soc.* 71, 2546 (1949).
63. (a) Szabunuiewicz, M. and Kim, H. L., *Southwest. Vet.* 25, 305 (1972). *Chem. Abst.* 81, 9772h (1972).  
(b) *ibid.* Ref. 39c.
64. Lee, K. H., Imakura, Y., Sims, D., McPhail, A. T. and



- Onan, K. D., *Chem. Commun.* 341 (1976).
65. Lee, K. H., Imakura, Y. and Sims, D., *J. Pharm. Sci.* - 65, 1410 (1976).
66. Lee, K. H., Imakura, Y., Sims, D., McPhail, A. T. and Onan, K. D., *Phytochem.* 16, 393 (1977).  
(b) Imakura, Y., Lee, K. H., Sims, D., Wu, R. Y., Hall I. H., Furukawa, H., Itoigawa, M. and Yonaha, K. J. -- *Pharm. Sci.* 69, 1044 (1980).
67. Sims, D., Lee, K. H., Wu, R. Y., Furukawa, H., Itoigawa, M. and Yonaha, K., *J. Nat. Prod.* 42, 282 (1979). - *Chem. Abst.* 91, 105165q (1979).
68. Buchi, G. and Rosenthal, D., *J. Amer. Chem. Soc.* 78, 3860 (1956).
69. Lee, K. H., Sims, D. and Hall, I. H., *J. Pharm. Sci.* - 67, 1228 (1978).
70. Bohlmann, F. and Jakupovic, J., *Phytochem.* 18, 131 --- (1979).
71. (a) Clark, E. P., *J. Amer. Chem. Soc.* 62, 597 (1940).  
(b) Giral, F. and Ladabaum, S., *Ciencia.* 21, 35 (1961)
72. Hernandez, R., Sandoval, A., Setzer, A. and Romo, J. - *Bol. Inst. Quím. Univ. Nac. Autón. Méx.* 20, 81 (1968).
73. Herz, W. and Lakshmikantham, M. V., *Tetrahedron.* 21, 1711 (1965).
74. Lucas, R. A., Rovinski, S., Kiesel, R. J., Dorfman, L. and Mac Phillamy, H. B., *J. Org. Chem.* 29, 1549 (1964)
- 75\* Tomczyk, H. and Kisiel, W., *J. Pharmacol. Pharm.* 27, - 101 (1975). *Chem. Abst.* 83, 4994p (1975).

76. Elsohly, M. A., Craig, J. C., Turner, C. E. and Sharma A. S., *J. Nat. Prod.* 42, 450 (1979); *Chem. Abst.* 91, 207461a (1979).
77. (a) Barun, B. H., Herz, W. and Rabindran, K., *J. Amer. Chem. Soc.* 78, 4423 (1956).  
(b) Ivie, G. W., Wietzel, D. A. and Rushing, D. D., *J. Agric. Food Chem.* 23, 845 (1975).
78. Waddell, T. G., Ridley, M. B., Evans, K. D. and Green, M. E., *J. Tenn. Acad. Sci.* 54, 103 (1979); *Chem. Abst.* 91, 181329m (1979).
79. (a) Hungnade, H. E. and Hendley, E. C., *J. Amer. Chem. Soc.* 70, 3921 (1948).  
(b) White, B. T. *J. Dairy Sci.* 44, 1791 (1961); *Chem. Abst.* 62, 4524a (1961).
80. Ottersen, T., Soerensen, U., Elsohly, M. A. and Turner C. E., *Acta Chem. Scand. Ser. B. B.* 32, 79 (1978).  
*Chem. Abstr.* 88, 191127w (1978).
81. Herz, W., Subramaniam, P. S. *Phytochem.* 11, 1101 ----- (1972).
82. *ibid.* Ref. 39b.
83. Lee, K. H., Ibuka, T., McPhail, A. T., Onan, K. D., -- Geissman, T. A. and Waddell, T. G., *Tetrahedron Lett.* 1149 (1974).
84. Lee, K. H., Ibuka, T., Kozuka, M., McPhail, A. T. and Onan, K. D., *Tetrahedron Lett.* 2287 (1974).
- 85\* Kondo, Y., Hamada, F. and Yoshizaki, F., *Heterocycles* 373 (1976); *Chem. Abstr.* 86, 90060x (1977).

86. (a) *ibid.* Ref. 40.  
(b) Wagner, H., Iyengar, M. A. and Herz, W., *Phytochem* 11, 446 (1972).
87. Herz, W., Subramaniam, P. S. and Dennis, N., *J. Org. - Chem.* 34, 2915 (1969).
88. Lucas, R. A., Smith, R. G. and Dorfman, L., *J. Org. -- Chem.* 29, 2101 (1964).
89. Von Dreele, R. B., Pettit, G. R., Gragg, G. M. and Ode R. H., *J. Am. Chem. Soc.* 97, 5256 (1975).
- 90\* Kondo, Y., Tomimori, T., Hiraga, N. and Takemoto, T., *Heterocycles.* 19 (1977); *Chem. Abstr.* 86, 68371c --- (1977).
91. McPhail, A. T. and Onan, K. D. *J. Chem. Soc. Perkin - Trans. II.* 487 (1975).
- 92\* Kondo, Y., Yoshizaki, F., Hamada, F., Imai, J. and Kusano, G., *Tetrahedron Lett.* 2155 (1977).
93. Furukawa, H., Itoigawa, M., Kumagai, N., Ito, L., Mc-- Phail, A. T. and Onan, K. D., *Chem. Pharm Bull.* 26, 1335 (1978).
94. (a) Furukawa, H., Lee, K. H., Shingu, T., Meck, R. and Piantadosi, C., *J. Org. Chem.* 38, 1722 (1973).  
(b) McPhail, A. T., Luhan, P. A., Lee, K. H., Furukawa H., Meck, R., Piantadosi, C. and Shingu, T., *Tetrahe-- dron Lett.* 4087 (1973).
- 95\* Itoigawa, M., Kumagai, N., Sekiya, H., Ito, K. and Kurukawa, H., *Yasugaku Zasshi.* 101, 605 (1981); *Chem. -- Abstr.* 95, 165583s (1981).

96. (a) McPhail, A. T., Onan, K. D., Furukawa, H. and Lee, K. H., *Tetrahedron Lett.* 1229 (1975).  
(b) McPhail, A. T. and Onan, K. D., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* 332 (1976).
97. (a) *ibid.* Ref. 84.  
(b) McPhail, A. T. and Onan, K. D., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* 492 (1975).
98. Kozuka, M., Lee, K. H., McPhail, A. T. and Onan, K. D. *Chem. Pharm. Bull.* 23, 1895 (1975).
- 99\* Hikino, H., Kuwano, D. and Takemoto, T., *Chem. Pharm. Bull.* 16, 1601 (1968).