

95



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

"METABOLITOS AISLADOS DE LAS FRACCIONES BIOACTIVAS DE MAYOR POLARIDAD DE *Flourensia cernua* (D.C) [Asteraceae]"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA PRESENTA: MARIBEL RAMIREZ LANDEROS



MÉXICO, D. F.

278295

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Prof. María Isabel Aguilar Laurents
VOCAL: Prof. Perla Carolina Castañeda López
SECRETARIO: Prof. Irma Susana Rojas Tomé
PRIMER SUPLENTE: Prof. José Fausto Rivero Cruz
SEGUNDO SUPLENTE: Prof. Laura Alicia Acevedo Arteaga

Sitio donde se desarrolló el tema:

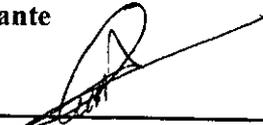
Laboratorio 124, Departamento de Farmacia, Edificio "E".
Facultad de Química, U N A M.

Asesor



Dr. Perla Carolina Castañeda López

Sustentante



Maribel Ramírez Landeros

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los siguientes proyectos “Bioactive Agents from Dryland Plants of Latin America” a través del programa “International Cooperative Biodiversity Group Program” (NIH-Grant 5U01TW/**00316-03) y DGAPA (Dirección General de Asuntos de Personal Académico) IN205197.

De manera especial agradezco la beca que se me otorgó a través del proyecto “Bioactive Agents from Dryland Plants of Latin America” a través del programa “International Cooperative Biodiversity Group Program” para la realización de mi tesis de licenciatura.

A los maestros Isabel Chávez y Beatriz Quiroz del Instituto de Química de los laboratorios de RMN del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de RMN.

A la Q. Rocío Patiño del laboratorio de Espectroscopía IR del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros en el IR.

Al I.Q. Luis Velasco y al M. en C. Javier Pérez del laboratorio de Espectrometría de Masas del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de masas.

A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis.

A la Dra. Rachel Mata por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo, así como por sus valiosos comentarios y observaciones realizadas al presente trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio 124 por el apoyo que me brindaron en todo momento.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

*A la Dra. Perla Carolina Castañeda López:
Por sus sabios consejos, su apoyo, paciencia y
motivación, así como por haberme concedido
su tiempo, sus conocimientos, su experiencia y
su afable disposición profesional durante la
realización de este trabajo*

Mil gracias.

DEDICATORIAS

A mis padres Carmen Landeros y Francisco Ramírez por su apoyo y motivación para culminar uno de mis más grandes sueños, por su ejemplo de tenacidad para salir adelante en los momentos más difíciles, por enseñarme a luchar por las cosas que se desean, por mostrarme el valor que tiene la unión familiar, por haberme dado la oportunidad de culminar mis estudios profesionales lo cual constituye la herencia más valiosa que pudieron haberme dado, por sus valiosos consejos a lo largo de mi vida y por su incondicional apoyo para la realización de este trabajo.

A mis hermanos Paco, Adrián y Ale que admiro y agradezco profundamente todo lo que han hecho por mi, por su apoyo y cariño, por todos los momentos compartidos, por estar conmigo en los buenos y en los malos momentos, y por ser los mejores hermanos.

A ti Rosalio, por todo el apoyo y comprensión que me has brindado para seguir adelante, por todos los momentos que hemos compartido, por que a pesar de todo siempre hemos estado juntos, por quererme y respetarme como lo has hecho, por la alegría que das a mi vida con tu presencia, y por hacer más agradables los momentos difíciles.

INDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE ESQUEMAS	ii
LISTA DE ESPECTROS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv

CONTENIDO

	Página
I. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	1
II. INTRODUCCION	5
2.1 Antecedentes del género <i>Flourensia</i>	5
2.2 Antecedentes sobre la especie <i>Flourensia cernua</i> (D.C) [Asteraceae]	18
III. PARTE EXPERIMENTAL	21
3.1 Procedimientos generales	21
3.1.1 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales	22
3.2 Material vegetal	23
3.3 Preparación del extracto orgánico	24
3.4 Fraccionamiento primario del extracto total de <i>Flourensia cernua</i>	24
3.5 Fraccionamiento secundario de la fracción activa F006	27
3.6 Aislamiento y purificación del Paquipodol (3,7,3'-éter trimetilico de la quercetina <u>41</u>) y de la Kumatakenina (3,7-éter dimetilico del camperol <u>42</u>) de la fracción activa F006-VII	28
3.7 Fraccionamiento terciario de las fracciones activas F006-IV, F006-V y F006-VI	28
3.8 Fraccionamiento secundario de la fracción activa F007	30
3.9 Aislamiento y purificación de la Ermanina (3,4'-éter dimetilico del camperol <u>43</u>)	31

IV. RESULTADOS Y DISCUSION	32
4.1 Identificación del Paquipodol (3,7,3'-éter trimetílico de la quercetina <u>41</u>)	33
4.2 Identificación de la Kumatakenina (3,7-éter dimetílico del camperol <u>42</u>)	45
4.3 Identificación de la Ermanina (3,4'-éter dimetílico del camperol <u>43</u>)	56
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES	65
VI. PERSPECTIVAS	66
VII. BIBLIOGRAFIA	67

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1 Especies del género <i>Flourensia</i> y metabolitos secundarios aislados	5
Cuadro 2 Flavonoides aislados del género <i>Flourensia</i>	7
Cuadro 3 Sistemas de elución utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina	23
Cuadro 4 Resumen del fraccionamiento primario empleando cromatografía en columna abierta del extracto crudo de las hojas de <i>Flourensia cernua</i>	26
Cuadro 5 Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción activa F006 de <i>F. cernua</i>	27
Cuadro 6 Resumen del fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta de las fracciones activas F006-IV, F006-V y F006-VI	29
Cuadro 7 Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción activa F007 de <i>F. cernua</i>	30
Cuadro 8 Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del PaquipodoI (3,7,3'-éter trimetílico de la quercetina <u>41</u>)	34
Cuadro 9 Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la Kumatakenina (3,7-éter dimetílico del camperol <u>42</u>)	46
Cuadro 10 Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la Ermanina (3,4'-éter dimetílico del camperol <u>43</u>)	57

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 <i>Flourensia cernua</i> (D.C.) [Asteraceae]	20
Figura 2 Espectro COSY del compuesto (41)	35
Figura 3 Estructura parcial del compuesto (41)	37
Figura 4 Patrón de fragmentación del Paquipodol (3,7,3'-éter trimetílico de la quercetina <u>41</u>)	39
Figura 5 Estructura parcial del compuesto (42)	47
Figura 6 Patrón de fragmentación de la Kumatakenina (3,7-éter dimetílico del camperol <u>42</u>)	49
Figura 7 Estructura parcial del compuesto (43)	58
Figura 8 Patrón de fragmentación de la Ermanina (3,4'-éter dimetílico del camperol <u>43</u>)	59

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 Proceso de extracción de las hojas de <i>Flourensia cernua</i>	25
---	----

LISTA DE ESPECTROS

		Página
Espectro 1	Espectro de masas del Paquipodol (41)	40
Espectro 2	Espectro en el IR del Paquipodol (41)	41
Espectro 3	Espectro de RMN ^1H del Paquipodol (41)	42
Espectro 4	Espectro de RMN ^{13}C del Paquipodol (41)	43
Espectro 5	Espectro de RMN ^{13}C modalidad DEPT del Paquipodol (41)	44
Espectro 6	Espectro en el IR de la Kumatakenina (42)	50
Espectro 7	Espectro de masas de la Kumatakenina (42)	51
Espectro 8	Espectro del RMN ^1H de la Kumatakenina (42)	52
Espectro 9	Espectro de RMN ^{13}C de la Kumatakenina (42)	53
Espectro 10	Espectro de RMN ^{13}C modalidad DEPT de la Kumatakenina (42)	54
Espectro 11	Espectro de RMN ^1H modalidad COSY de la Kumatakenina (42)	55
Espectro 12	Espectro en el IR de la Ermanina (43)	60
Espectro 13	Espectro de masas de la Ermanina (43)	61
Espectro 14	Espectro de RMN ^1H de la Ermanina (43)	62
Espectro 15	Espectro del RMN ^{13}C de la Ermanina (43)	63
Espectro 16	Espectro de RMN ^{13}C modalidad DEPT de la Ermanina (43)	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
°C	Grados centígrados
Hex	Hexano
CL₅₀	Concentración letal media
<i>d</i>	Doblete
δ	Desplazamiento químico
<i>dd</i>	Doblete dobleteado
g	Gramos
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
MeOH	Metanol
ppm	Partes por millón
RMN ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
<i>s</i>	Singulete
<i>m/z</i>	Relación masa carga
mL	Mililitros
TMS	Tetrametilsilano

nm	Nanómetros
L	Litros
kg	Kilogramos
Acetona-d₆	Acetona deuterada
hrs	Horas
mm	Milímetros
ccf	Cromatografía en capa fina
COSY	Correlated spectroscopy
IR	Infrarrojo
CDCl₃	Cloroformo deuterado
DMSO	Dimetilsulfóxido

I. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Las plantas medicinales constituyen hoy en día, materias primas valiosas para realizar estudios conducentes a la búsqueda de principios activos de interés medicinal. Estas investigaciones han permitido obtener compuestos bioactivos de interés terapéutico, para el tratamiento de las enfermedades más frecuentes que afectan a un vasto sector de la población no sólo de México sino de todo el mundo. Afortunadamente, en la actualidad el interés científico por el estudio de las plantas medicinales ha cobrado fuerza a nivel mundial y es cada vez más notable el incremento de instituciones gubernamentales y empresas farmacéuticas que se interesan por incorporar en su esquema de investigación, estudios sobre especies vegetales empleadas en la medicina tradicional.

De esta forma, surge un gran interés por establecer programas que contemplen la conservación de la biodiversidad, en particular, la de especies medicinales para el posible descubrimiento de fármacos. En este contexto, se generó el programa internacional denominado "International Cooperative Biodiversity Group Program" (ICBG), el cual está patrocinado por las siguientes instituciones gubernamentales de los Estados Unidos de América del Norte: National Science Foundation (NSF), U.S. Agency for International Development (USAID) y National Institute of Health (NIH).

Los objetivos generales del programa internacional ICBG (Suffnes *et al.*, 1995) son los siguientes:

1. Proponer estrategias para identificar y preservar los recursos naturales renovables en países en vías de desarrollo.

2. Establecer nuevas industrias que promuevan la investigación de los recursos naturales para el descubrimiento de fármacos novedosos.
3. Contribuir al crecimiento de la infraestructura de investigación de los países que participan en el programa.
4. Buscar nuevos fármacos de origen natural para tratar algunas de las enfermedades más frecuentes que ocasionan problemas en un amplio sector de la población mundial.
5. Proporcionar apoyo para formar investigadores capacitados para realizar estudios sobre los recursos naturales renovables de los países que participan en el programa.
6. Implementar proyectos de investigación de bajo costo para el estudio de los recursos naturales renovables regionales que presenten un gran potencial terapéutico.
7. Desarrollar a largo plazo, las estrategias tanto ecológicas como económicas que permitan el establecimiento de cultivos de recursos naturales con importancia terapéutica en países subdesarrollados.

En el programa internacional, participan algunos países de América Latina en una labor conjunta con los Estados Unidos de América del Norte, en el proyecto de investigación "Bioactive Agents from Dryland Plants of Latin America"; estos son:

Chile, Argentina y México. Las instituciones científicas norteamericanas que desarrollan el programa antes mencionado son: la Universidad de Arizona y las compañías American Cyanamid Company, Wyeth-Ayerst Laboratories y GWL Hansen's Disease Center. En Chile, la Universidad Católica de Chile; en Argentina participa la Universidad Nacional de la Patagonia y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y, por último, en México, participa la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Facultad de Química y del Instituto de Biología.

La Facultad de Química a través de un convenio con la Universidad de Arizona realiza las siguientes actividades:

- a) Preparar los extractos orgánicos de las especies que han sido seleccionadas previamente mediante un criterio etnomédico.
- b) Enviar los extractos para las evaluaciones biológicas que se realizan en los laboratorios de las compañías American Cyanamid Company, GWL Hansen's Disease Center y Wyeth-Ayerst Laboratories.
- c) Realizar el fraccionamiento biodirigido de los extractos que presentan actividad biológica potencial.
- d) Aislar y purificar los compuestos responsables de la actividad presentada.
- e) Identificar, mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos, los compuestos aislados de las fracciones activas.

En el convenio establecido con la Universidad de Arizona, está contemplada una cláusula de confidencialidad que tiene como fin no dar a conocer los resultados de la

actividad biológica hasta establecer las patentes pertinentes. Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis no se describirá ningún resultado de tipo biológico.

Una de las principales metas del proyecto “Bioactive Agents From Dryland Plants of Latin America”, es el descubrimiento de nuevos fármacos potenciales a partir de algunas especies medicinales de las zonas áridas de México.

Dentro de este contexto, se generó el presente trabajo de tesis, seleccionando la especie *Flourensia cernua* (D.C.) con base en los resultados demostrados por el extracto total de esta especie en los ensayos biológicos preliminares.

Esta investigación tiene como objetivo general, realizar el aislamiento y la caracterización de los principios activos responsables de la actividad biológica demostrada, para lo cual se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar la investigación bibliográfica sobre la especie *Flourensia cernua*.
2. Preparar el extracto orgánico de las hojas de *F. cernua*, vía un proceso de maceración.
3. Realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico de la planta, mediante métodos cromatográficos adecuados.
4. Aislar y purificar los compuestos de las fracciones bioactivas.
5. Establecer la estructura química de los compuestos aislados mediante el empleo de métodos espectroscópicos, espectrométricos y químicos.
6. Contribuir al conocimiento fitoquímico de la especie *Flourensia cernua*.

II. INTRODUCCION

2.1 Antecedentes del género *Flourensia*

El género *Flourensia* pertenece a la familia Asteraceae, tribu Heliantheae, subtribu Ecliptinae (Bohlmann *et al.*, 1984), e incluye 15 especies algunas de las cuales, han sido objeto de numerosos estudios conducentes a la determinación de su contenido metabólico. Estas investigaciones han permitido el aislamiento de un gran número de metabolitos secundarios; en el Cuadro 1 se resumen las especies incluidas en el género *Flourensia*, así como los metabolitos secundarios aislados de las mismas.

Cuadro 1. Especies del género *Flourensia* y metabolitos secundarios aislados.

Espece	Metabolitos secundarios aislados	Referencia
<i>F. campestris</i>	Flavonoides	Dillon y Mabry, 1977; Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. dentata</i>	Flavonoides	Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. taxa</i>	Flavonoides	Dillon y Mabry, 1977; Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. thurifera</i>	Flavonoides Cumarinas Benzofuranos Benzopiranos	Faini <i>et al.</i> , 1977.

Cuadro 1. Especies del género *Flourensia* y metabolitos secundarios aislados (continuación).

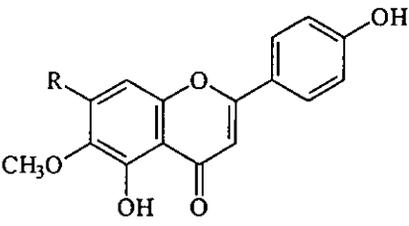
Espece	Metabolitos secundarios aislados	Referencia
<i>F. cernua</i>	Flavonoides	Dillon <i>et al.</i> , 1976; Dillon y Mabry, 1977; Estell <i>et al.</i> , 1994 _a ; Estell <i>et al.</i> , 1994 _b ; Estell <i>et al.</i> , 1996; Fredrickson <i>et al.</i> , 1994; King <i>et al.</i> , 1996 _b ; Kingston <i>et al.</i> , 1975; Rao <i>et al.</i> , 1970; Wollenweber y Yatskievych, 1985.
	Taninos	Estell <i>et al.</i> , 1994 _a ; Estell <i>et al.</i> , 1996; King <i>et al.</i> , 1996 _a ; Fredrickson <i>et al.</i> , 1994.
	Compuestos fenólicos	Estell <i>et al.</i> , 1994 _a ; Estell <i>et al.</i> , 1996; Fredrickson <i>et al.</i> , 1994; King <i>et al.</i> , 1996 _a ; King <i>et al.</i> , 1996 _b ; Schowalter, 1996.
	Terpenoides	Estell <i>et al.</i> , 1994 _a ; Estell <i>et al.</i> , 1994 _b ; Estell <i>et al.</i> , 1996; Fredrickson <i>et al.</i> , 1994; King <i>et al.</i> , 1996 _a ; King <i>et al.</i> , 1996 _b ; Kingston <i>et al.</i> , 1971; Kingston <i>et al.</i> , 1975; Naidu y Rao, 1979; Pattersen <i>et al.</i> , 1975; Schowalter, 1996.
	Acetofenonas	Bohlmann y Grenz, 1977; Estell <i>et al.</i> , 1994 _a ; Estell <i>et al.</i> , 1996.
	Alcaloides	Estell <i>et al.</i> , 1994 _a ; Estell <i>et al.</i> , 1996.
	Benzopiranos	Bohlmann y Grenz, 1977; Fredrickson <i>et al.</i> , 1994; Naidu y Rao, 1979.
	Benzofuranos	Fredrickson <i>et al.</i> , 1994.
	Cetonas	Bohlmann y Grenz, 1977.
<i>F. monticola</i>	Flavonoides	Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. resinosa</i>	Flavonoides	Bohlmann y Grenz, 1977; Wollenweber y Yatskievych, 1985.
	Terpenoides	Rodríguez y Rodríguez, 1972; Wollenweber y Yatskievych, 1985.
	Acetofenonas	Bohlmann y Grenz, 1977.
	Benzofuranos	Bohlmann y Grenz, 1977.
<i>F. retinophylla</i>	Flavonoides	Dillon y Mabry, 1977; Stuppner y Müller, 1994; Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. illicifolia</i>	Flavonoides	Dillon y Mabry, 1977; Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. pulcherrima</i>	Flavonoides	Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. macrophylla</i>	Flavonoides	Bohlmann <i>et al.</i> , 1984; Wollenweber y Yatskievych, 1985.
	Terpenoides	Bohlmann <i>et al.</i> , 1984.
	Acetofenonas	Bohlmann <i>et al.</i> , 1984.
<i>F. oolepis</i>	Flavonoides	Guerreiro <i>et al.</i> , 1979; Wollenweber y Yatskievych, 1985.
	Terpenoides	Guerreiro <i>et al.</i> , 1979; Priotti y Zygadlo, 1977.
<i>F. heterolepis</i>	Flavonoides	Bohlmann y Jakupovic, 1979; Wollenweber y Yatskievych, 1985.
	Terpenoides	Bohlmann <i>et al.</i> , 1984; Bohlmann y Jakupovic, 1979.
	Benzopiranos	Bohlmann y Jakupovic, 1979.
	Acetofenonas	Bohlmann <i>et al.</i> , 1984; Bohlmann y Jakupovic, 1979.
	Compuestos Aromáticos de tipo C ₆ -C ₃	Bohlmann y Jakupovic, 1979.

Cuadro 1. Especies del género *Flourensia* y metabolitos secundarios aislados (continuación).

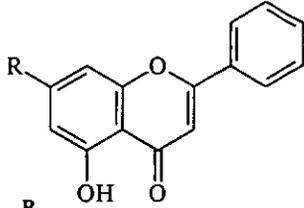
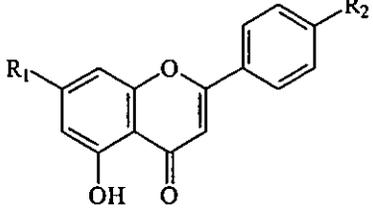
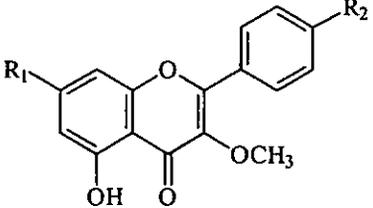
Espece	Metabolitos secundarios aislados	Referencia
<i>F. heterolepis</i>	Cetonas	Bohmann y Jakupovic, 1979.
<i>F. climax</i>	Flavonoides	Muller, 1940
<i>F. laurifolia</i>	Flavonoides	Guerrero y Flores, 1990.

De los compuestos incluidos en el Cuadro 1 se desprende que los flavonoides representan los constituyentes mayoritarios de este género (Fredrickson *et al.*, 1994). En consecuencia, se consideró apropiado realizar una recopilación de los flavonoides aislados a partir de las diferentes especies de *Flourensia*. En el Cuadro 2 se muestra la información derivada de la misma, indicando las estructuras de los flavonoides obtenidos hasta la fecha.

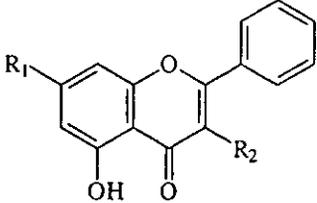
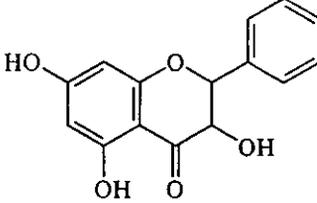
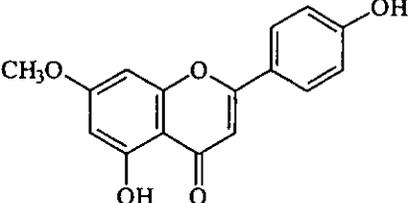
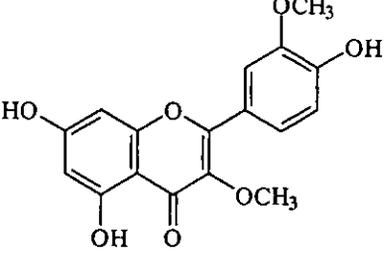
Cuadro 2. Flavonoides aislados del género *Flourensia*.

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>F. cernua</i>	 <p style="text-align: center;">R</p> <p>(1) OCH₃ 4',5-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona Circimaritina</p> <p>(2) OH 4',5,7-trihidroxi-6-metoxiflavona Hispidulina</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.

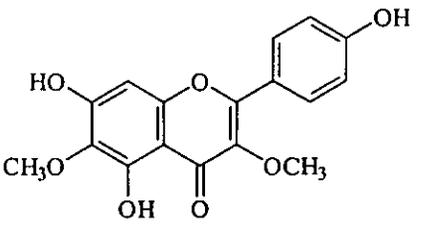
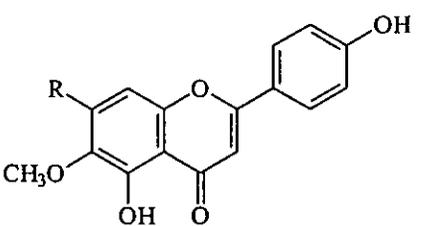
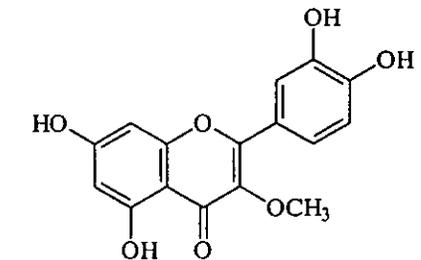
Cuadro 2. Flavonoides aislados del género *Flourensia* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>F. resinosa</i>	 <p>(3) $\text{R} = \text{OH}$ 5,7-dihidroxi flavona Crisina</p> <p>(4) $\text{R} = \text{OCH}_3$ 5-hidroxi-7-metoxi flavona Tectocrisina</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. resinosa</i>	 <p>(5) $\text{R}_1 = \text{OH}$ $\text{R}_2 = \text{OH}$ 5,7,4'-trihidroxi flavona Apigenina</p> <p>(6) $\text{R}_1 = \text{OH}$ $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$ 4'-éter metílico de la apigenina</p> <p>(7) $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$ $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$ 7,4'-éter dimetílico de la apigenina</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. resinosa</i>	 <p>(8) $\text{R}_1 = \text{OH}$ $\text{R}_2 = \text{OH}$ 3-éter metílico del camperol</p> <p>(9) $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$ $\text{R}_2 = \text{OH}$ 3,7-éter dimetílico del camperol Kumatakenina</p> <p>(10) $\text{R}_1 = \text{OH}$ $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$ 3,4'-éter dimetílico del camperol Ermanina</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.

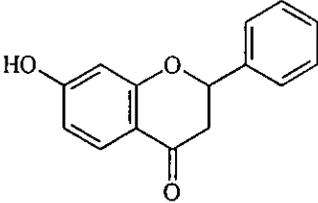
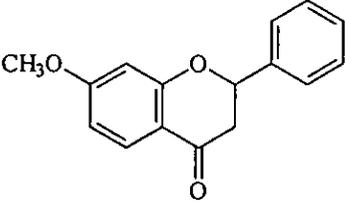
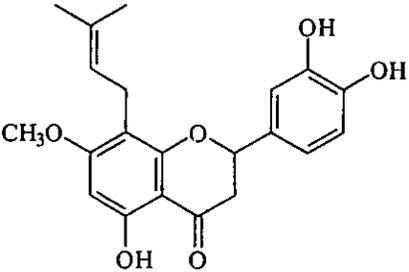
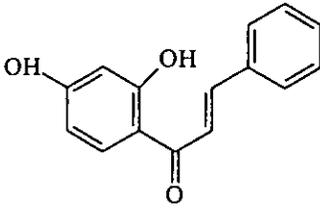
Cuadro 2. Flavonoides aislados del género *Flourensia* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>F. resinosa</i>	 <p style="text-align: center;"> R_1 R_2 (11) OH OH Galangina (12) OH OCH₃ 3-éter metílico de la galangina (13) OCH₃ OH 7-éter metílico de la galangina </p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. resinosa</i>	 <p style="text-align: center;">(14) Pinobanksina</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. resinosa</i>	 <p style="text-align: center;">(15) 7-éter metílico de la apigenina</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. resinosa</i>	 <p style="text-align: center;">(16) 3,3'-éter dimetílico de la quercetina</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.

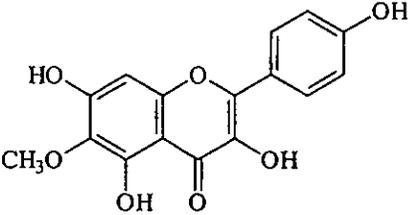
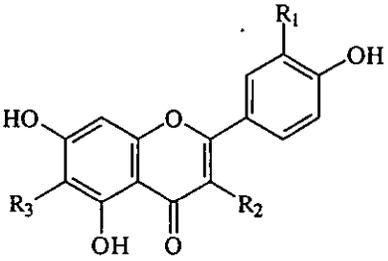
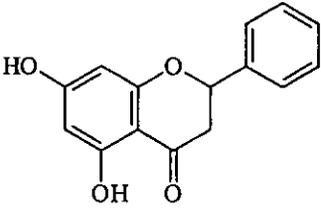
Cuadro 2. Flavonoides aislados del género *Flourensia* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>F. resinosa</i>	 <p>(17) 3,6-éter dimetílico de la galetina</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. cernua</i>	 <p>R</p> <p>(18) OH 6-éter metílico de la escutelareina</p> <p>(19) OCH₃ 6,7-éter dimetílico de la escutelareina</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. cernua</i>	 <p>(20) 3-éter metílico de la quercetina</p> <p>(9) 3,7-éter dimetílico del camperol</p> <p>Kumatakenina</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. illicifolia</i>	(8) 3-éter metílico del camperol	Dillon y Mabry, 1977.

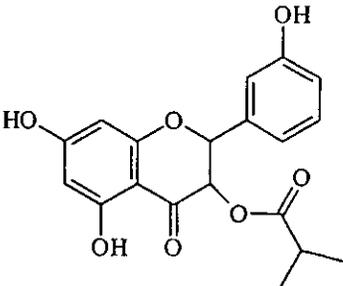
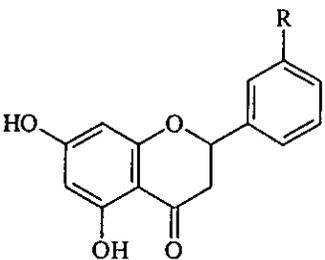
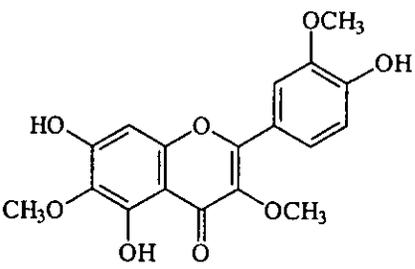
Cuadro 2. Flavonoides aislados del género *Flourensia* (Continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>F. heterolepis</i> <i>F. oolepis</i>	 <p>(21) 7-hidroxi flavanona</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. heterolepis</i>	 <p>(22) 7-metoxi flavanona</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. heterolepis</i>	 <p>(23) 7-metoxi-8-isopentenil-eriodictiol</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. oolepis</i>	 <p>(24) 2',4'-dihidroxi chalcona</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.

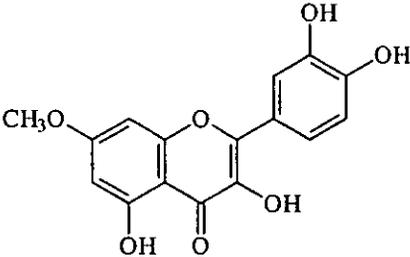
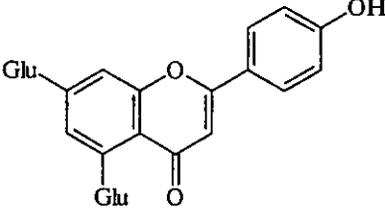
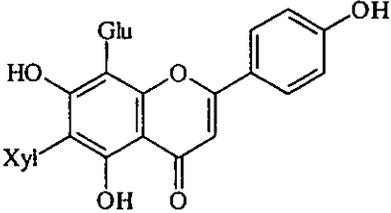
Cuadro 2. Flavonoides aislados del género *Flourensia* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>F. heterolepis</i>	 <p>(25) 6-éter metílico de la galetina (8) 3-éter metílico del camperol (17) 3,6-éter dimetílico de la galetina</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. illicifolia</i>	 <p>R₁ R₂ R₃ (26) OH OCH₃ OCH₃ 3,6-éter dimetílico de la quercetagetina (27) OCH₃ OCH₃ OCH₃ 3,6,3'-éter trimetílico de la quercetagetina</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. illicifolia</i> <i>F. retinophylla</i>	 <p>(28) 5,7-dihidroxi flavanona Pinocembrina</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.
<i>F. retinophylla</i>	<p>(9) 3,7-éter dimetílico del camperol Kumatakenina</p>	Wollenweber y Yatskievych, 1985.

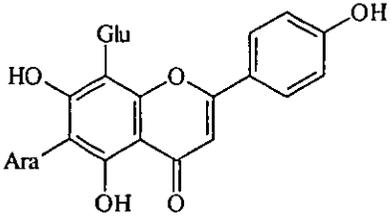
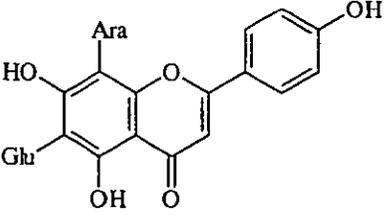
Cuadro 2. Flavonoides aislados del género *Flourensia* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>F. retinophylla</i>	 <p>(29) 5,7,3'-trihidroxi-3-isobutirilflavanonol</p>	Stuppner y Müller, 1994.
<i>F. retinophylla</i>	 <p>R</p> <p>(30) OCH₃ 5,7-dihidroxi-3'-metoxiflavanona (31) OH 5,7,3'-trihidroxi-3'-metoxiflavanona</p>	Stuppner y Müller, 1994.
<i>F. illicifolia</i>	 <p>(32) 3,6,3'-éter trimetílico de la quercetagina Jaceidina (9) 3,7-éter dimetílico del camperol Kumatakenina</p>	Dillon <i>et al.</i> , 1977.

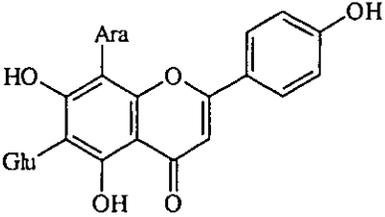
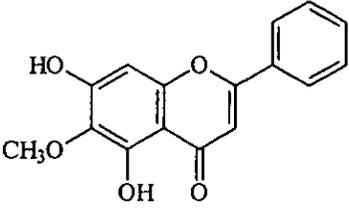
Cuadro 2. Flavonoides aislados del género *Flourensia* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>F. thurifera</i>	 <p>(33) 7-éter metílico de la quercetina</p>	Faini <i>et al.</i> , 1997.
<i>F. retinophylla</i>	<p>(9) 3,7-éter dimetílico del camperol Kumatakenina</p>	Stuppner y Müller, 1994.
<i>F. campestris</i> <i>F. illicifolia</i>	<p>(17) 3,6-éter dimetílico de la galetina</p>	Dillon <i>et al.</i> , 1977.
<i>F. heterolepis</i>	<p>(22) 7-metoxiflavanona</p>	Bohlmann y Jakupovic, 1979.
<i>F. cernua</i>	 <p>(34) 6,8-di-C-glucopiranosilapigenina Vicenina-2</p>	Dillon <i>et al.</i> , 1976.
<i>F. cernua</i>	 <p>(35) 6-C-xilopiranosil-8-C-glucopiranosil apigenina Vicenina-1</p>	Dillon <i>et al.</i> , 1976

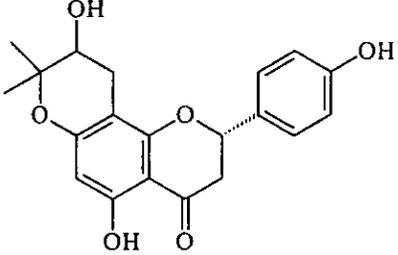
Cuadro 2. Flavonoides aislados del género *Flourensia* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>F. cernua</i>	 <p>(36) 6-C-arabinopiranosil-8-C-glucopiranosilapigenina Isoschaftosido</p>	Dillon <i>et al.</i> , 1976.
<i>F. retinophylla</i> <i>F. illicifolia</i>	(28) 5,7-dihydroxiflavanona Pinocembrina	Dillon <i>et al.</i> , 1976.
	 <p>(37) 6-C-β-D-glucopiranosil-8-C-α-L-arabinopiranosilapigenina Schaftosido</p>	
<i>F. resinosa</i>	(3) 5,7-dihydroxiflavona Crisina	Rodríguez y Rodríguez, 1972.
<i>F. illicifolia</i>	(25) 6-éter metílico de la galetina	Dillon <i>et al.</i> , 1977.
<i>F. oolepis</i>	(21) 7-hidroxi flavanona (24) 2',4'-dihidroxi chalcona	Guerrero <i>et al.</i> , 1979.
<i>F. retinophylla</i> <i>F. cernua</i>	(9) 3,7-éter dimetílico del camperol Kumatakenina	Dillon <i>et al.</i> , 1977.

Cuadro 2. Flavonoides aislados del género *Flourensia* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>F. cernua</i>	 <p>(38) 6-C-β-D-glucopiranosil-8-C-β-L-arabinopiranosilapigenina Neoschaftosido</p> <p>(1) 4',5-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona Circimaritina</p> <p>(2) 4',5,7-trihidroxi-6-metoxiflavona Hispidulina</p> <p>(9) 3,7-éter dimetílico del camperol Kumatakenina</p> <p>(20) 3-éter metílico de la quercetina</p>	Dillon <i>et al.</i> , 1976.
<i>F. retinophylla</i>	(28) 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona Pinocembrina	Stuppner y Müller, 1994.
<i>F. laurifolia</i>	 <p>(39) 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona Oroxylina A</p>	Guerrero y Flores, 1990.
<i>F. heterolepis</i>	(23) 7-metoxi-8-isopentenil-eriodictiol	Bohlmann y Jakupovic, 1979.

Cuadro 2. Flavonoides aislados del género *Flourensia* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>F. laurifolia</i>	 <p data-bbox="398 664 792 751">(40) 4',5,5''-trihidroxi-6'',6''-dimetil Δ^2-dihidropirano [2''-3''-h] flavanona Laurifolina</p>	Guerrero y Flores, 1990.

Cabe mencionar que desde el punto de vista biológico, son escasas las investigaciones realizadas sobre el género hasta el momento. Existen solamente dos estudios descritos conducentes a la determinación de la toxicidad de los extractos obtenidos de *F. cernua* y *F. thurifera*. En el caso del extracto de las flores de *F. cernua*, se empleó el bioensayo del pez dorado (Gersdorff, 1930), y los resultados obtenidos demostraron que la toxicidad de este extracto no es significativa (Kingston *et al.*, 1975).

Por otro lado, el extracto metanólico de las hojas y tallos de *F. thurifera* en el ensayo de toxicidad sobre *Artemia salina*, demostró una actividad significativa contra el crustáceo ($CL_{50} = 10.2$ ppm); los resultados derivados de este bioensayo permitieron establecer que diversas cumarinas y benzopiranos presentes en la planta son los compuestos responsables de la toxicidad demostrada por este extracto (Faini *et al.*, 1997).

2.2 Antecedentes sobre la especie *Flourensia cernua* (D.C.) [Asteraceae]

La especie *Flourensia cernua* (D.C.) se distribuye principalmente en el desierto de Chihuahua, así como en los estados de Coahuila, San Luis Potosí, Nuevo León, Durango, Sonora y Zacatecas; la especie se localiza también al sureste de Estados Unidos, en Nuevo México, Arizona y Texas (Estell *et al.*, 1994_a; Estell *et al.*, 1996; Fredrickson *et al.*, 1994; King *et al.*, 1996_b; Martínez, 1979, 1989).

F. cernua es un arbusto que usualmente mide menos de 1 m, pero puede alcanzar hasta 2 m de altura en algunos lugares; tiene flores amarillas, las ramas son de color verde amarillento y las partes aéreas tienen vellocidades; las hojas son olorosas y de sabor amargo (Martínez, 1979).

La especie es llamada comúnmente hoja se, hoja sen, arbusto de remolacha, arbusto barnizado y cepillo negro (Estell *et al.*, 1994_b; Fredrickson *et al.*, 1994; Richerson y Boldt, 1995).

En México, la decocción de las hojas y las flores se utiliza como un remedio para la indigestión y otros malestares (Fredrickson *et al.*, 1994; Martínez, 1979, 1989; Richerson y Boldt, 1995). El Instituto Nacional Indigenista, reporta el uso de esta planta únicamente para las mujeres que presentan la suspensión de su período menstrual para lo cual, se toma la infusión de la raíz (Emes *et al.*, 1994). Otra utilidad terapéutica que se ha reportado es que la infusión de las hojas se emplea como expectorante en malestares de las vías respiratorias (Díaz, 1976_{a,b}).

A la fecha, se han descrito en la literatura algunas investigaciones acerca de la composición nutricional de esta especie; algunos autores han descrito que el perfil nutricional de la misma es similar al de la alfalfa, lo cual sugiere que una dieta a base de esta planta puede tener beneficios nutricionales para el ganado debido a su alto contenido de proteína cruda (King *et al.*, 1996_a) y minerales.

Algunos estudios reportados en la literatura, han indicado que las hojas de este arbusto pueden ser tóxicas para diversas especies de herbívoros (Estell *et al.*, 1994_b; Fredrickson *et al.*, 1994; Richerson y Boldt, 1995). Varios autores han reportado que tanto el fruto como las flores de *F. cernua* son tóxicas para el ganado, por lo que su consumo está restringido; por tal motivo, se sugiere que se determine en qué etapa del crecimiento de la planta es conveniente que se consuma (Estell *et al.*, 1994_a; Fredrickson *et al.*, 1994; King *et al.*, 1996). Así mismo, se ha determinado que la presencia de metabolitos secundarios de naturaleza terpenoide en la superficie de las hojas de *F. cernua*, son los compuestos responsables de la toxicidad observada al ser consumida por el ganado (Estell *et al.*, 1994_a). Como consecuencia de lo descrito previamente, se considera que *F. cernua* posee un mecanismo de defensa en contra de algunos herbívoros; por ejemplo, Estell y colaboradores (1996), reportaron que algunos alcaloides y terpenoides son los compuestos que están presentes durante la etapa temprana del desarrollo de esta especie.



Figura 1. *Flourensia cernua* (D.C) [Asteraceae].

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Procedimientos generales

Los análisis de cromatografía en columna abierta, se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales en columnas de vidrio de diferentes capacidades, empleando como agente adsorbente gel de sílice Merck 60, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 3.5-7.0 AST. Con el fin de monitorear el desarrollo de las mismas, se utilizó la técnica cromatográfica en capa fina (ccf). Los análisis correspondientes se realizaron en placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck), con un espesor de 0.25 mm. Para ello, se utilizaron varios sistemas de elución (Cuadro 3) y como agente cromógeno se empleó una disolución de sulfato cérico; antes de revelar con este reactivo, se procedió a visualizar cada placa con luz UV (onda corta 254 nm y onda larga 365 nm); para el desarrollo del color fue necesario calentar 2 minutos a 110 °C aproximadamente. Para efectuar las cromatografías en capa fina modalidad preparativa, se utilizaron placas de vidrio de 20X20 cm recubiertas con gel de sílice de 0.25 cm, utilizando diversos sistemas de elución y sulfato cérico como agente cromógeno (Lowery, 1993).

3.1.1 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros en el IR se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599-B o en un aparato Nicolet FT-5X, en pastilla de KBr o en película.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN ^1H) y de Carbono-13 (RMN ^{13}C) se generaron en un aparato Varian VXR-3005, el cual se operó a una frecuencia de 300 ó 75 MHz, respectivamente. Los espectros se obtuvieron en acetona- d_6 o $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$ y los desplazamientos químicos se asignaron en unidades δ (ppm) referidos al Tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Se utilizaron secuencias de pulso estándares Varian para el registro de los espectros de RMN bidimensional homonuclear (COSY).

Los espectros de masas se determinaron en un aparato Hewlet-Packard 5890-B mediante introducción directa a 70 eV.

Todos los análisis indicados arriba se efectuaron en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Cuadro 3. Sistemas de elución utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Sistemas de elución	Composición	Proporción
A	Hexano	100 %
B	Hexano-AcOEt	Diversas
C	AcOEt	100 %
D	AcOEt-MeOH	Diversas
E	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	Diversas

3.2 Material Vegetal

El material vegetal (hojas) utilizado en el presente estudio, se recolectó en un mercado de San Luis Potosí el 28 de octubre de 1995. Un ejemplar de referencia se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (Voucher R. Bye 20468). La identificación de la especie estuvo a cargo del Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM).

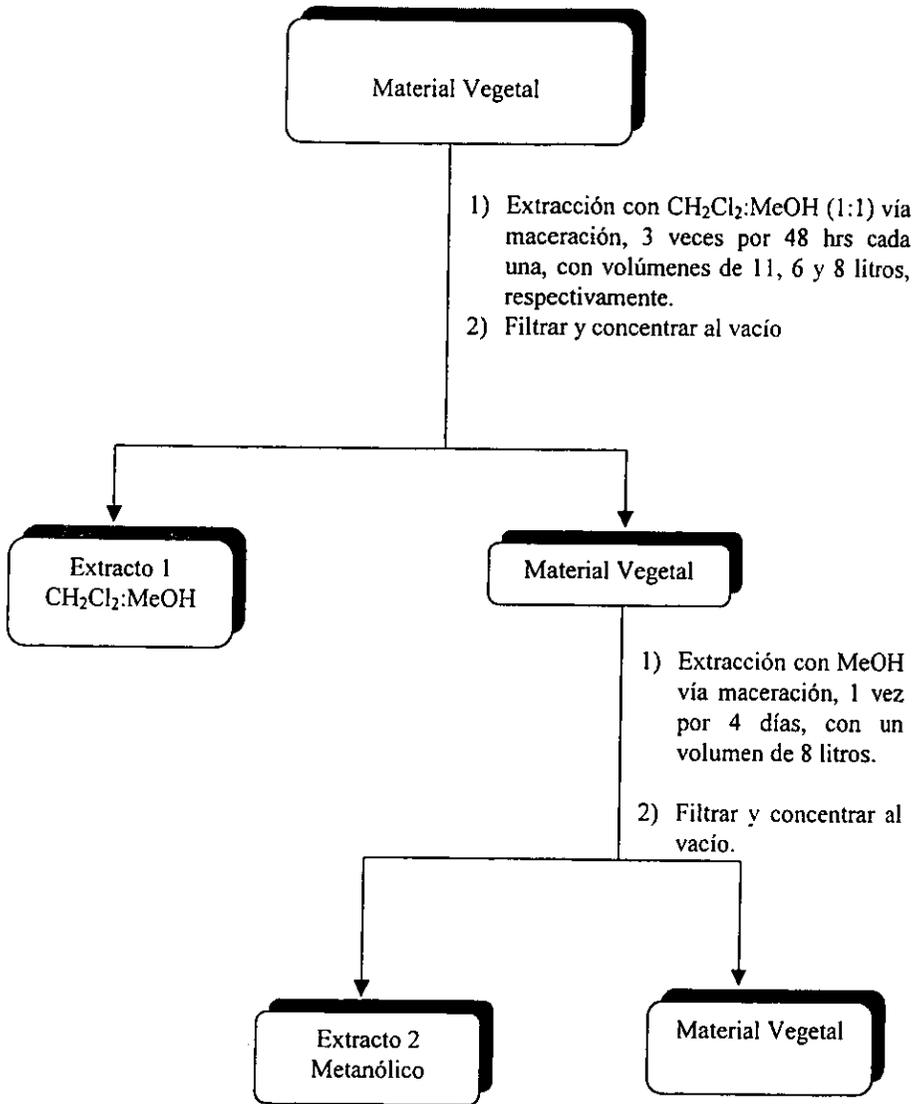
El material vegetal se secó a temperatura ambiente y se molió en un molino Thomas-Willey modelo 4.

3.3 Preparación del extracto orgánico

El material vegetal seco y molido (2.4 kg) se extrajo inicialmente mediante un proceso de maceración exhaustivo con una mezcla binaria de CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) y posteriormente con metanol 100 %. Los extractos de CH_2Cl_2 -MeOH y metanólicos resultantes, se combinaron luego de comprobarse mediante una cromatografía en capa fina, que no existían diferencias significativas entre ambos. En el Esquema 1 se describe el procedimiento empleado.

3.4 Fraccionamiento primario del extracto total de *Flourensia cernua*

El extracto total (599.9 g) se fraccionó en una columna cromatográfica abierta, utilizando como adsorbente 3.0 kg de gel de sílice. El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-acetato de etilo (diferentes proporciones), acetato de etilo y acetato de etilo-metanol (diferentes proporciones). Se colectaron un total de 178 fracciones de 1 L cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina y se combinaron aquellas que presentaron características cromatográficas similares. Este proceso generó un total de 10 grupos de fracciones primarias. En el Cuadro 4 se resume el fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto total de las hojas de *Flourensia cernua*.



Peso total de los extractos 1 y 2 combinados: 599.9 g.

Esquema 1. Proceso de extracción de las hojas de *Flourensia cernua*.

Cuadro 4. Resumen del fraccionamiento primario empleando cromatografía en columna abierta del extracto crudo de las hojas de *Flourensia cernua*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
Hexano	100	1-20	1-3	F001	0.6875
Hex-AcOEt	90:10	21-37	4-19	F002	1.1881
Hex-AcOEt	80:20	38-63	20-25	F003	15.8600
Hex-AcOEt	70:30	64-87	26-38	F004*	19.4142
Hex-AcOEt	60:40	88-101	39-67	F005*	44.4982
Hex-AcOEt	50:50	102-120	68-80	F006*	16.6629
AcOEt	100	121-138	81-119	F007*	76.8473
AcOEt-MeOH	90:10	139-152	120-141	F008	69.8481
AcOEt-MeOH	80:20	153-167	142-173	F009	93.1196
AcOEt-MeOH	70:30	168-175	174-178	F010	45.0150
AcOEt-MeOH	50:50	176-178	-	-	-

*Fracciones activas

3.5 Fraccionamiento secundario de la fracción activa F006

La fracción primaria activa F006 (Cuadro 4), se sometió a un fraccionamiento secundario en una columna cromatográfica abierta, utilizando 270.1 g de gel de sílice como adsorbente. El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-acetato de etilo (diferentes proporciones) y acetato de etilo. Se recolectaron un total de 109 fracciones de 80 mL cada una y se analizaron por cromatografía en capa fina, combinándose todas aquellas que presentaran homogeneidad cromatográfica. El proceso generó un total de 8 grupos de fracciones secundarias; en el Cuadro 5 se resume el fraccionamiento secundario.

Cuadro 5. Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción activa F006 de *F. cernua*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
Hexano	100	1-7	1-23	F006-I	0.2425
Hex-AcOEt	90:10	8-24	24	F006-II	0.0572
Hex-AcOEt	80:20	25-89	25-39	F006-III	1.0330
Hex-AcOEt	70:30	90-102	40-47	F006-IV*	1.2980
Hex-AcOEt	50:50	103-108	48-63	F006-V*	1.9750
AcOEt	100	109	64-79	F006-VI*	0.7615
-	-	-	80-107	F006-VII	3.2154
-	-	-	108-109	F006-VIII	0.6699

*Fracciones activas

3.6 Aislamiento y purificación del Paquipodol (3,7,3'-éter trimetilico de la quercetina 41) y de la Kumatakenina (3,7-éter dimetilico del camperol 42), de la fracción F006-VII

De la fracción secundaria F006-VII (Cuadro 6), precipitó de manera espontánea un sólido amorfo de color verde (415.1 g); el análisis cromatográfico del mismo, permitió detectar la presencia de dos constituyentes mayoritarios, por lo que se procedió a realizar la separación de los mismos mediante una cromatografía en capa fina modalidad preparativa (4 placas), utilizando como sistema de elución CH_2Cl_2 -MeOH (98:2). Una vez procesadas las placas de manera habitual, se separaron los dos constituyentes, los cuales se obtuvieron como sólidos amarillos: 12.8 mg del compuesto (41) y 8.2 mg del compuesto (42), con puntos de fusión de 153-157 °C y mayor de 200 °C, respectivamente.

3.7 Fraccionamiento terciario de las fracciones activas F006-IV, F006-V, y F006-VI

Considerando la similitud cromatográfica y la actividad biológica demostrada por las fracciones secundarias F006-IV, F006-V y F006-VI, se procedió a reunir las mismas para realizar un fraccionamiento terciario de las mismas mediante una cromatografía en columna abierta. Durante la reunión de estas fracciones, precipitó de la fracción F006-VI un sólido amorfo de color amarillo cuyo análisis cromatográfico permitió detectar la presencia de los

compuestos (41) y (42); en consecuencia, se obtuvieron 23.2 y 13.6 mg adicionales de estos compuestos, respectivamente.

Para el fraccionamiento terciario de las fracciones F006-IV, F006-V y F006-VI (4.0345 g), se emplearon 60 g de gel de sílice como adsorbente. El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-acetato de etilo (diferentes proporciones) y acetato de etilo. Se colectaron un total de 33 fracciones de 30 mL cada una. Todas las fracciones se analizaron por cromatografía en capa fina y se combinaron aquellas que resultaron similares, generando 4 grupos de fracciones terciarias. Los resultados obtenidos de este proceso se resumen en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Resumen del fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta de las fracciones activas F006-IV, F006-V y F006-VI.

Sistemas de elución	Proporción (%)	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
Hexano	100	1-5	1-10	F018	15.6
Hex-AcOEt	90:10	6-10	11-17	F019	2.2463
Hex-AcOEt	80:20	11-15	18-25	F020	416.9
Hex-AcOEt	70:30	16-20	26-33	F021	217.3
Hex-AcOEt	60:40	21-25	-	-	-
Hex-AcOEt	50:50	26-30	-	-	-
AcOEt	100	31-33	-	-	-

3.8 Fraccionamiento secundario de la fracción activa F007

La fracción primaria F007 (76.8473 g), se sometió a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta, empleando como fase estacionaria 533 g de sílica gel y se eluyó con un gradiente de polaridad de hexano-AcOEt según se indica en el Cuadro 7. Se colectaron un total de 46 fracciones de 250 mL cada una y se analizaron mediante cromatografía en capa fina reuniendo aquellas que mostraron similitud cromatográfica. Este proceso generó un total de 8 grupos de fracciones secundarias (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción activa F007 de *F. cernua*.

Sistemas de elución	Proporción (%)	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
Hexano	100	1-5	1-7	F007-I	0.0374
Hex-AcOEt	80:20	6-11	8-9	F007-II	1.748
Hex-AcOEt	70:30	12-19	10-11	F007-III	3.1457
Hex-AcOEt	60:40	20-29	12-17	F007-IV	5.8118
Hex-AcOEt	50:50	30-35	18-23	F007-V	20.5646
AcOEt	100	36-46	24-36	F007-VI	23.0102
-	-	-	37-44	F007-VII	4.1707
-	-	-	45-46	F007-VIII	0.6853

3.9 Aislamiento y purificación de la Ermanina (3,4'-éter dimetilico del camperol 43)

Durante el fraccionamiento primario de la fracción activa F007, precipitó de manera espontánea un sólido amorfo de color amarillo (978 mg). El análisis cromatográfico de este sólido reveló la presencia de un compuesto mayoritario.

Sucesivas cromatografías en capa fina preparativa del sólido de la fracción primaria F007 (Cuadro 4), utilizando como sistema de elución una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (98:2), permitió el aislamiento de 53.7 mg del producto (**43**) bajo la forma de un sólido amorfo de color amarillo con un punto de fusión mayor de 200 °C.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

La preselección de la especie *Flourensia cernua* como una fuente potencial de principios activos se realizó, por una parte, considerando el criterio etnomédico y, por otra con base en los resultados obtenidos de las evaluaciones biológicas preliminares, realizadas sobre el extracto total de la especie.

En primer lugar, se realizó un extracto a gran escala de las hojas de *F. cernua* (CH₂Cl₂:MeOH 1:1), mediante un proceso de maceración, tal como se indicó en la sección experimental (inciso 3.3). Posteriormente, el extracto activo se fraccionó de manera preliminar mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Este proceso permitió la obtención de diez grupos de fracciones primarias F001-F010 (Cuadro 4, sección experimental).

Las fracciones primarias F004, F005, F006 y F007 resultaron activas y el presente trabajo versó sobre el estudio de las fracciones primarias F006 y F007.

Como ya se mencionó previamente, en el presente trabajo no se describirá ningún resultado de tipo biológico debido a la cláusula de confidencialidad convenida en el proyecto "Bioactive Agents from Dryland Plants of Latin America".

Las fracciones activas F006 y F007 se sometieron a diversos procesos cromatográficos, lo que permitió el aislamiento de los tres metabolitos secundarios reportados en el presente trabajo: el 3,7,3'-éter trimetilico de la quercetina (Paquipodol **41**), el 3,7-éter dimetilico del camperol (Kumatakenina **42**) y el 3,4'-éter dimetilico del camperol (Ermanina **43**).

En la presente sección, se describe el análisis de los datos espectroscópicos y espectrométricos que permitieron proponer la estructura molecular de los productos naturales obtenidos.

4.1 Identificación del Paquipodol (3,7,3'-éter trimetilico de la quercetina 41)

El análisis cromatográfico en capa delgada de la fracción secundaria F006-VI y F006-VII (Cuadro 5, sección experimental), permitió la detección de dos cromóforos de color amarillo. Sucesivas cromatografías en capa fina preparativas de estas fracciones permitieron la separación de los dos constituyentes. El compuesto de menor polaridad se obtuvo como un sólido de color amarillo intenso con un punto de fusión de 153-157 °C. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del mismo se resumen en el Cuadro 8.

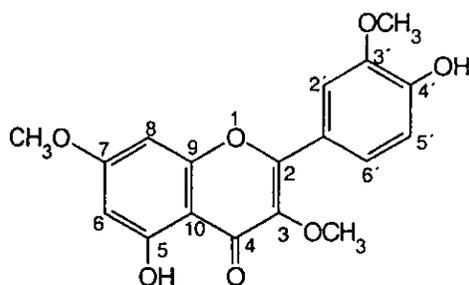
La fórmula molecular del producto natural se estableció como $C_{18}H_{16}O_7$ por espectrometría de masas (Espectro 1); el ion molecular se observa en una relación m/z de 344. Su espectro en el IR (Espectro 2), presenta bandas de absorción características para C-H (2956 cm^{-1}), para grupos hidroxilo (3352 cm^{-1}), para carbonilo de una γ -pirona (1657 cm^{-1}) y para anillo aromático (1599 cm^{-1} y 1462 cm^{-1}).

Las características cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas, así como el análisis detallado de los espectros de RMN permitieron sugerir la naturaleza flavonoide del compuesto.

El espectro de RMN ^1H en acetona- d_6 (Espectro 3) presenta las siguientes señales:

1. En δ 3.93, 3.90 y 3.88 se observan tres singuletes asignados a tres grupos metoxilo.

Cuadro 8. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del Paquipodol (3,7,3'-éter trimetílico de la quercetina **41**).



Punto de fusión	153-157 °C
IR ν_{max} (KBr) cm^{-1}	3352, 2956, 1657, 1599 y 1462
Espectro 2	
RMN ^1H , δ (acetona- d_6 , 300 MHz, ppm)	12.77 (OH-5), 7.77 (<i>d</i> , H-2', $J=2.4$), 7.64 (<i>dd</i> , H-6', $J=1.95$ y $J=8.25$), 6.95 (<i>d</i> , H-5', $J=8.5$), 6.65 (<i>d</i> , H-8, $J=2.1$), 6.63 (<i>d</i> , H-6, $J=2.1$), 5.32 (OH-4'), 3.93 (<i>s</i> , OCH ₃ -3'), 3.90 (<i>s</i> , OCH ₃ -7), 3.88 (<i>s</i> , OCH ₃ -3')
Espectro 3	
RMN ^{13}C , δ (acetona- d_6 , 75 MHz, ppm)	150.6 (C-2), 135.0 (C-3), 179.2 (C-4), 162.7 (C-5), 98.4 (C-6), 166.5 (C-7), 92.8 (C-8), 157.8 (C-9), 106.5 (C-10), 123.3 (C-1'), 112.6 (C-2'), 148.0 (C-3'), 156.5 (C-4'), 116.1 (C-5'), 122.1 (C-6'), 60.1 (OCH ₃ -3), 56.3 (OCH ₃ -7,3')
Espectro 4	

♦ Todos los valores de las constantes de acoplamiento (J) están dados en Hz.

- Un sistema AB [δ 6.63 (H-6) y 6.65 (H-8)] correspondiente a dos hidrógenos aromáticos; la magnitud de la constante de acoplamiento (2.1 Hz) para ambas señales es consistente con la disposición *meta* de estos hidrógenos ubicados en el anillo A.
- Un sistema ABX en δ 7.77 (*d*, $J=2.4$), δ 7.64 (*dd*, $J=1.95, 8.25$) y δ 6.95 (*d*, $J=8.5$) asignados a los hidrógenos H-2', H-6' y H-5', respectivamente del anillo B.

Como se puede apreciar en la Figura 2, el espectro COSY permite confirmar la presencia de ambos sistemas debido a las correlaciones observadas.

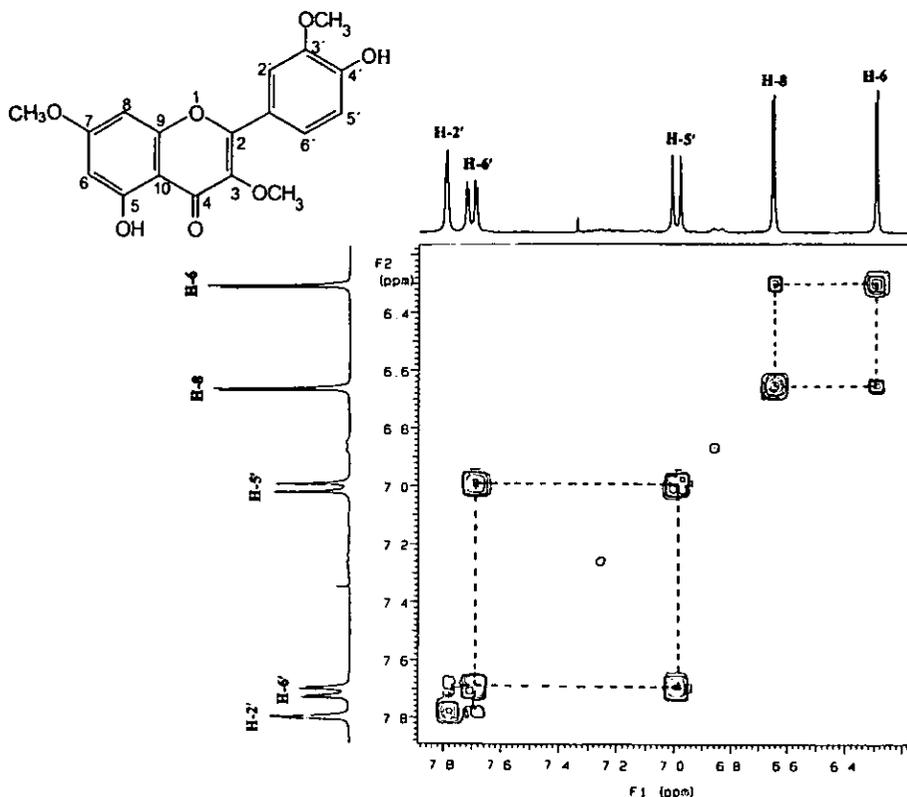


Figura 2. Espectro COSY del compuesto (41).

4. Las señales ubicadas en δ 12.77 y en δ 5.15 se asignaron a dos grupos hidroxilo; el primero de ellos, corresponde al hidroxilo quelatado con el grupo carbonilo de la γ -pirona de acuerdo al desplazamiento químico observado.

El espectro de RMN ^{13}C (Espectro 4) del producto (41), presenta señales para 17 átomos de carbono, lo cual indica la presencia de dos señales equivalentes; las resonancias se discriminaron de la siguiente manera:

- a) La señal observada en δ 179.2 se asignó al grupo carbonilo de una γ -pirona, previamente evidenciada por el espectro en el IR.
- b) Para los carbonos aromáticos base de oxígeno se observan 7 señales en δ 135.0, 148.0, 150.6, 156.5, 157.8, 166.7 y 166.5.
- c) En el espectro de RMN ^{13}C modalidad DEPT (Espectro 5), se aprecian claramente cinco señales correspondientes a metinos de naturaleza aromática en δ 92.3, 98.2, 112.2, 116.0 y 123.4.
- d) Finalmente, las señales en δ 56.3 y δ 60.1 se asignaron a tres grupos metoxilo.

Las evidencias presentadas hasta el momento, así como la ausencia de la señal característica para H-3 de una flavona, sugería que la molécula era un flavonol, sustituido con tres grupos metoxilo y dos grupos hidroxilo (Figura 3).

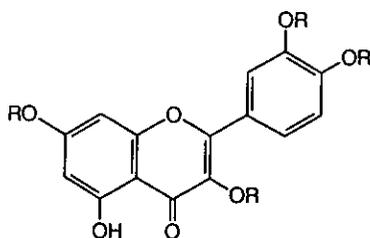


Figura 3. Estructura parcial del compuesto (41).

El análisis del espectro de masas del producto natural (41) y la comparación de los desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN con los descritos previamente en la literatura (Harborne *et al.*, 1975, 1986, 1994; Markham *et al.*, 1985), permitieron ubicar los sustituyentes antes mencionados. El fragmento en una relación de m/z 301 es consistente con la presencia de un grupo metoxilo en la posición C-3 del flavonol. Por otra parte, los fragmentos observados en m/z 166 y 138 permitieron ubicar al segundo grupo metoxilo en la posición C-7 del anillo A.

Finalmente, los fragmentos en una relación m/z de 151 y 124 evidenciaron la ubicación de los grupos metoxilo e hidroxilo en C-3' y C-4', respectivamente del anillo B. En la Figura 4 se muestran los fragmentos más importantes que apoyaron la propuesta antes descrita.

Las evidencias antes descritas permitieron identificar al compuesto (41) como el Paquipodol (3,7,3'-éter trimetílico de la quercetina). Es importante mencionar que este estudio constituye la primera descripción de la presencia de este producto natural en el

género *Flourensia*. Sin embargo, este compuesto ya había sido aislado previamente de otras especies tales como: *Isocoma veneta* (Clark *et al.*, 1987), *Heterotheca inuloides* (Jerga *et al.*, 1990), *Iochroma warscewiczii* (Wollenweber, 1990) y *Encelia palmeri* (Proksch *et al.*, 1988), entre otras.

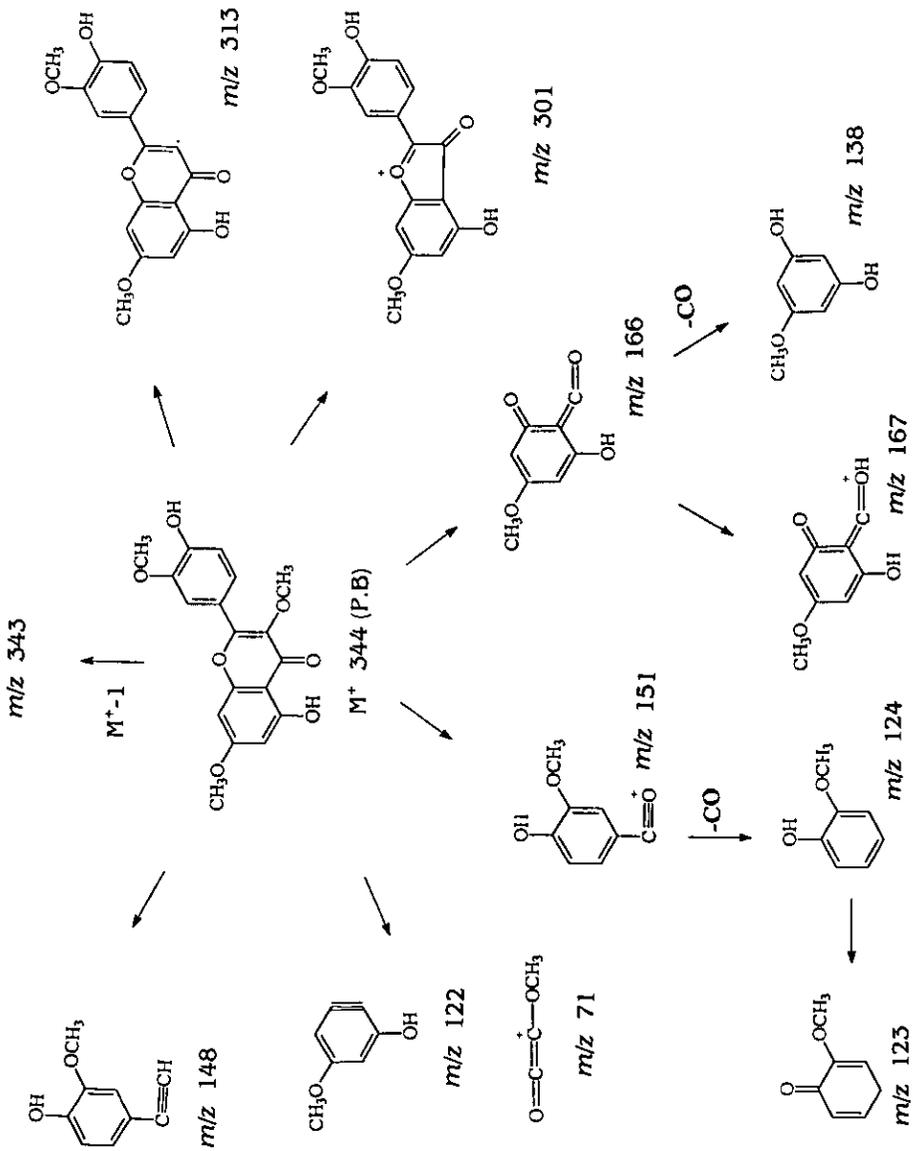
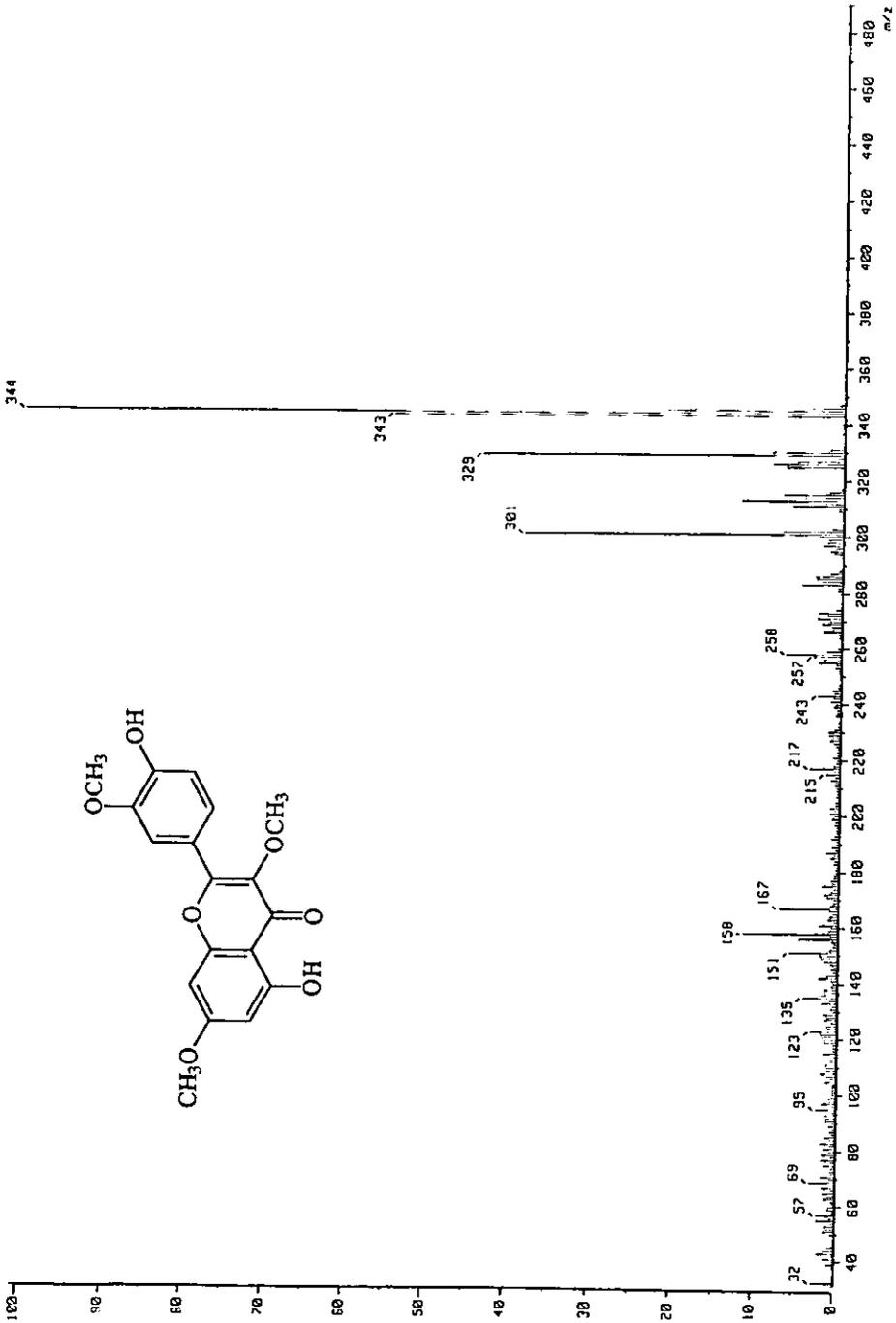
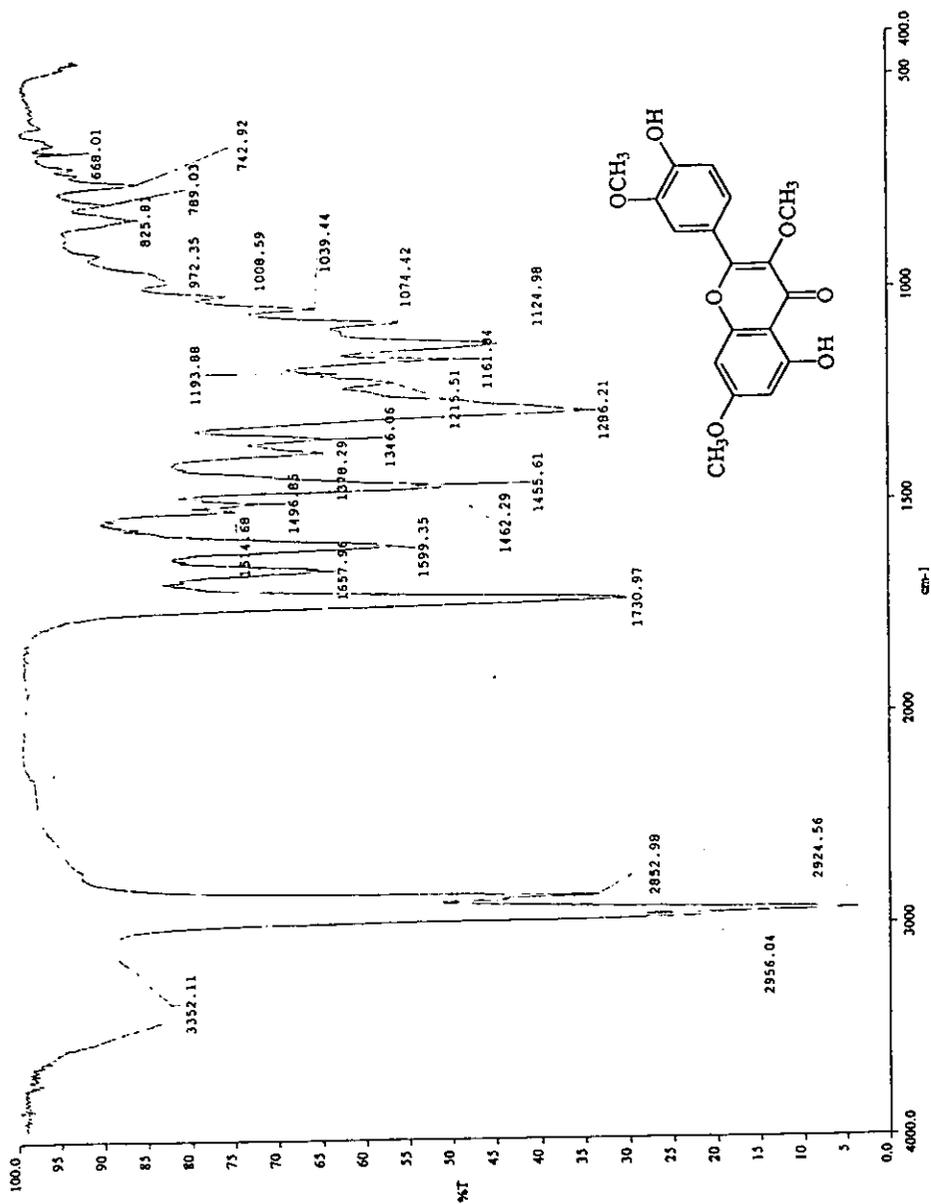


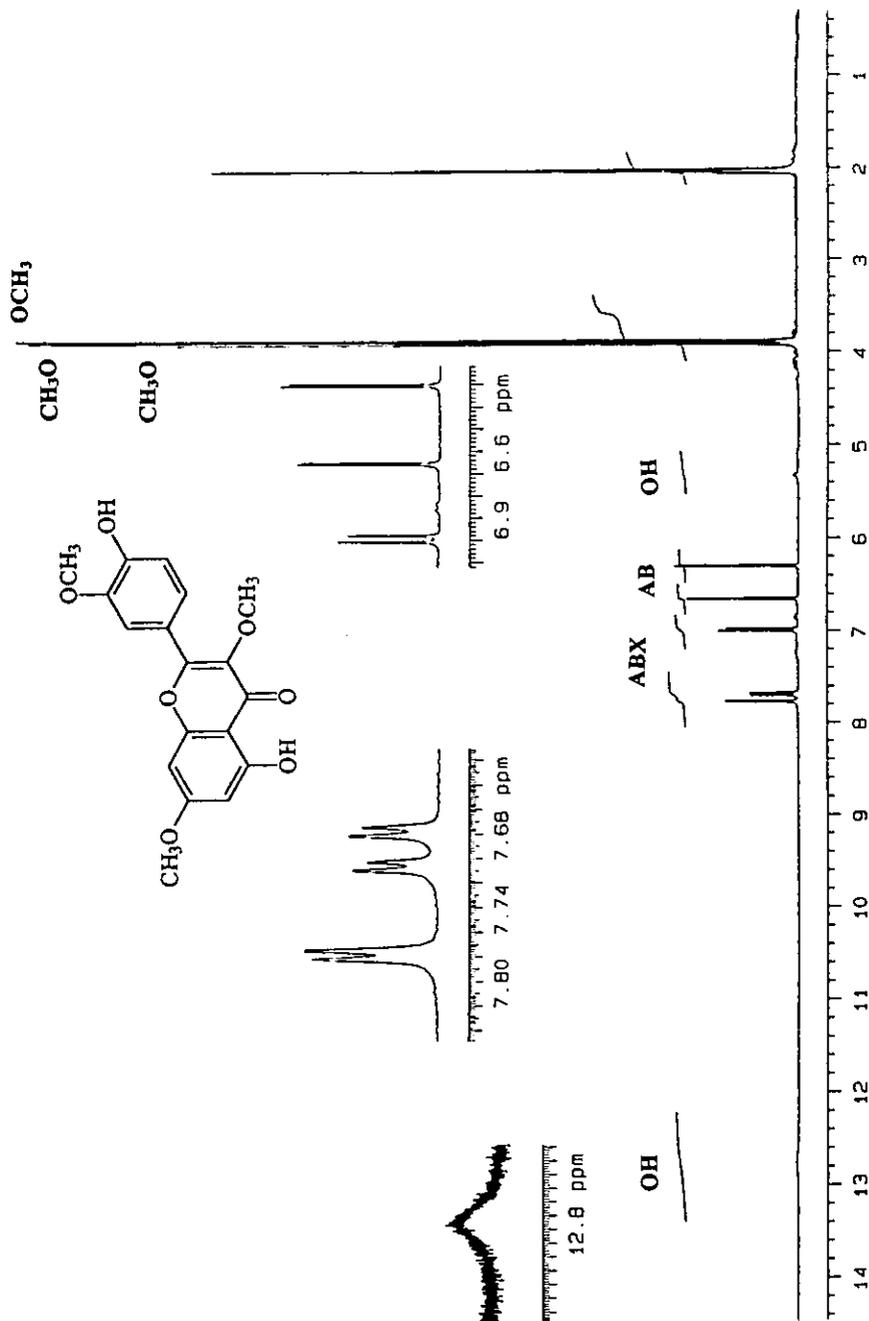
Figura 4. Patrón de fragmentación del paquipodol (3,7,3'-éter trimetilico de la quercetina 41).



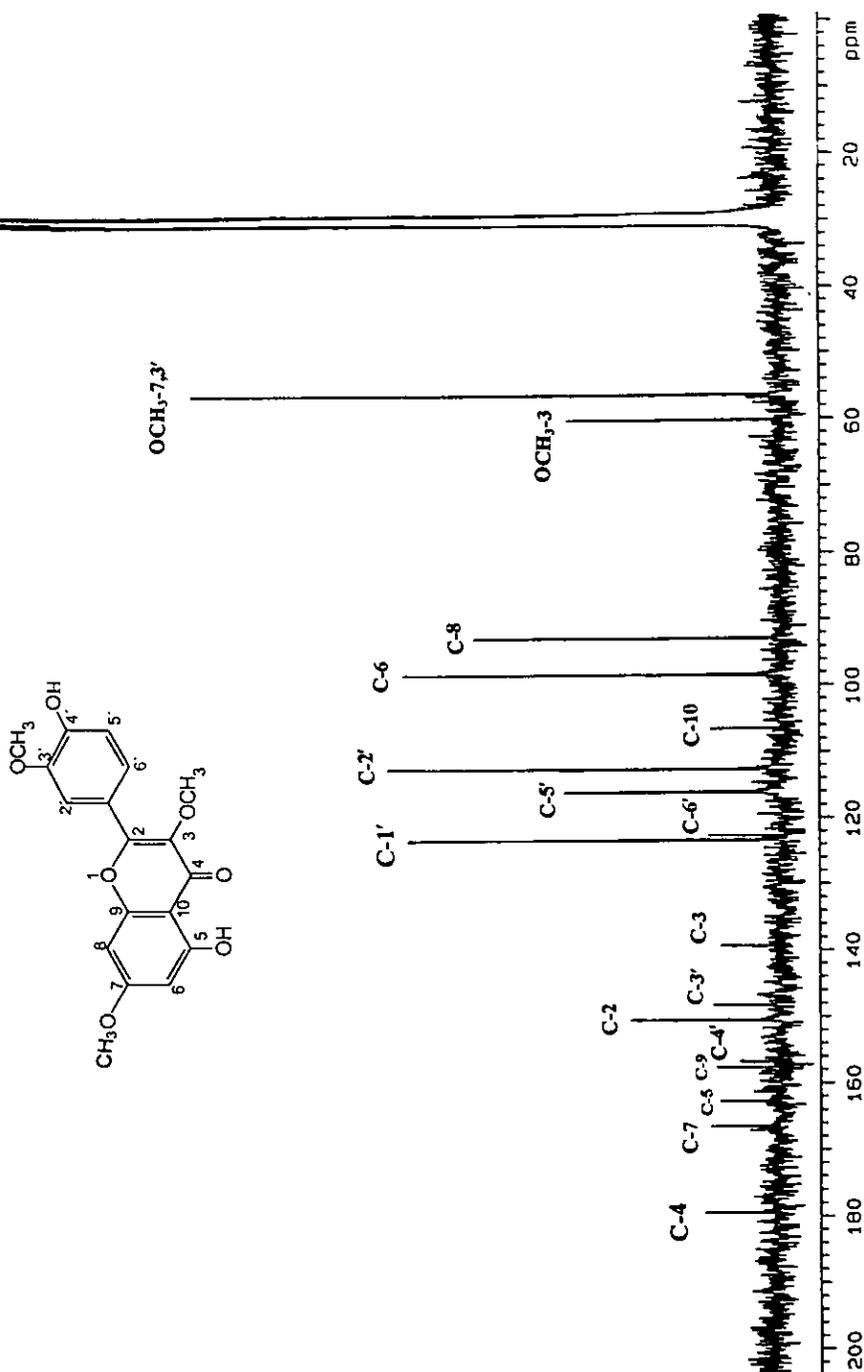
Espectro 1. Espectro de masas del Paquipodol (41).



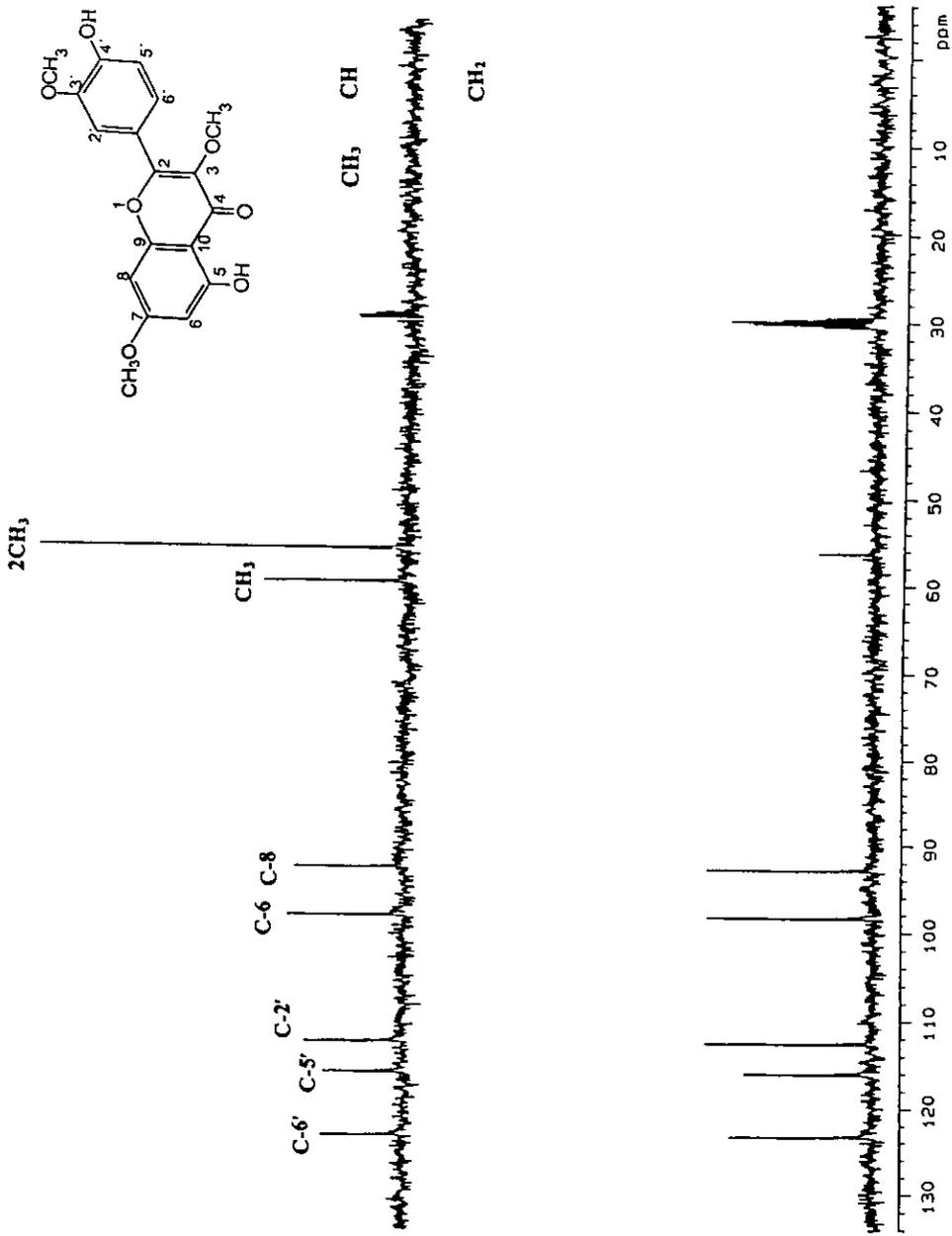
Espectro 2. Espectro en el IR del Paquipodol (41).



Espectro 3. Espectro de RMN ^1H del Paquipodol (41).



Espectro 4. Espectro de RMN ^{13}C del Paquipodol (41).



Espectro 5. Espectro de RMN ^{13}C modalidad DEPT del Paquipodol (41).

4.2 Identificación de la Kumatakenina (3,7-éter dimetilico del camperol **42**)

Como se mencionó previamente (inciso 4.1), en las fracciones secundarias bioactivas F006-VI y F006-VII, se detectó la presencia de dos constituyentes, los cuales se separaron mediante cromatografía en capa fina preparativa. El compuesto de mayor polaridad, se aisló como un sólido de color amarillo, con un punto de fusión mayor de 200 °C. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto se incluyen en el Cuadro 9.

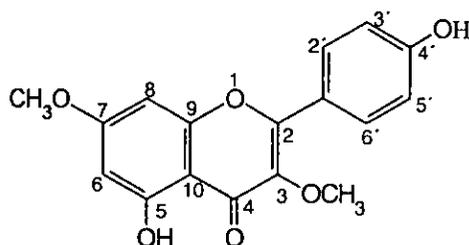
El análisis global de los datos incluidos en el Cuadro 9, permitió también establecer que el producto natural es un flavonol.

Su espectro de masas (Espectro 7) presenta 30 unidades de masa menos que el producto natural (**41**), y permite establecer su fórmula molecular como $C_{17}H_{14}O_6$. El espectro en el IR (Espectro 6), presenta bandas de absorción características para grupo hidroxilo (3335 cm^{-1}), CH (2955 cm^{-1}), carbonilo de γ -pirona (1666 cm^{-1}) y anillo aromático (1603 cm^{-1} y 1501 cm^{-1}).

Los espectros de RMN resultaron muy similares al producto natural (**41**); las diferencias principales entre ambos compuestos se enumeran a continuación:

1. En el espectro de RMN ^1H del compuesto (**42**), se observan únicamente dos singuletes, en δ 3.90 y δ 3.85 cada uno de ellos integrando para tres hidrógenos, atribuibles a dos grupos metoxilo.

Cuadro 9. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la Kumatakenina (3,7-éter dimetilico del camperol 42).



Punto de fusión	> 200 °C
IR ν_{max} (KBr) cm^{-1}	3335, 2955, 1666, 1603 y 1501
Espectro 6	
RMN ^1H , δ (acetona- d_6 , 300 MHz, ppm)	12.74 (s, OH-5), 8.03 (d, H-2', H-6', $J=9.0$), 7.00 (d, H-3', H-5', $J=8.7$), 6.63 (d, H-8, $J=2.1$), 6.3 (d, H-6, $J=2.1$),
Espectro 8	3.90 (s, OCH_3 3), 3.85 (s, OCH_3 -7)
RMN ^{13}C , δ (acetona- d_6 , 75 MHz, ppm)	142.0 (C-2), 135.8 (C-3), 178.6 (C-4), 160.2 (C-4', C-5),
Espectro 9	97.5 (C-6), 165.6 (C-7), 91.9 (C-8), 156.8 (C-9), 102.6 (C-10), 121.5 (C-1'), 130.3 (C-2', C-6'), 115.5 (C-3',C-5'), 59.2 (OCH_3 -3), 55.5 (OCH_3 -4')

♦ Todos los valores de las constantes de acoplamiento (J) están dados en Hz.

2. Así mismo, se observa un sistema A_2B_2 de un anillo aromático *para*-sustituido en δ 8.03 ($J=9.0$ Hz) y δ 7.02 ($J=8.7$ Hz).
3. Por otro lado, en el espectro de RMN ^{13}C en la región de los metinos aromáticos, se observa una señal adicional en δ 115.0

La información antes presentada permitió sugerir que el producto natural debía corresponder a un derivado del camperol sustituido con dos grupos metoxilo (Figura 5).

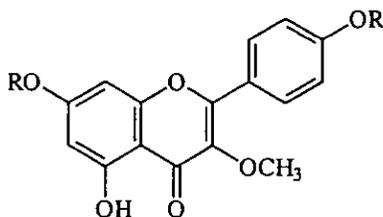


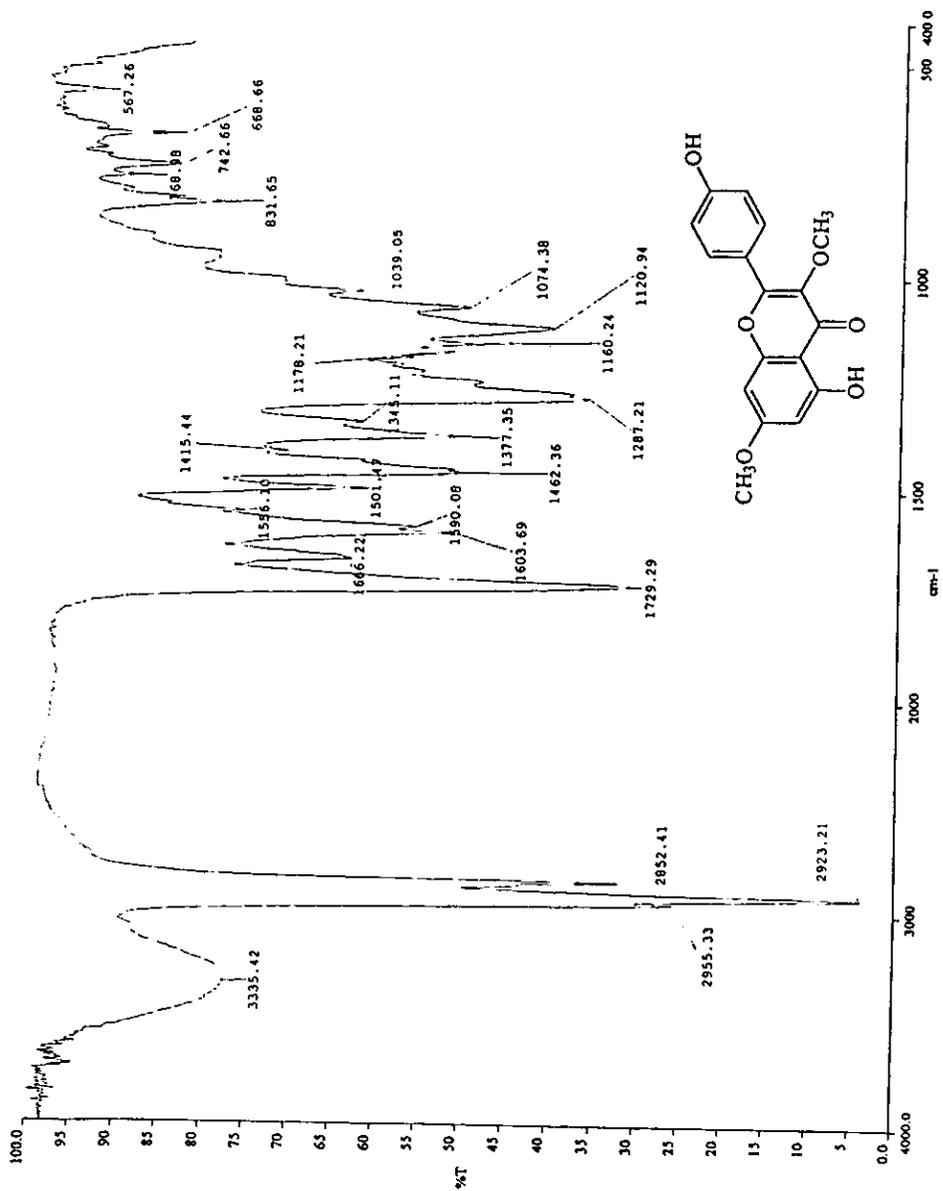
Figura 5. Estructura parcial del compuesto (42).

Una vez más, el análisis del espectro de masas, así como la comparación de los datos espectroscópicos observados para este compuesto y por los descritos en la literatura (Harborne *et al.*, 1975; Markham *et al.*, 1985), permitieron ubicar al grupo hidroxilo en el anillo B por los fragmentos observados en una relación m/z 121, 118, 94 y 93.

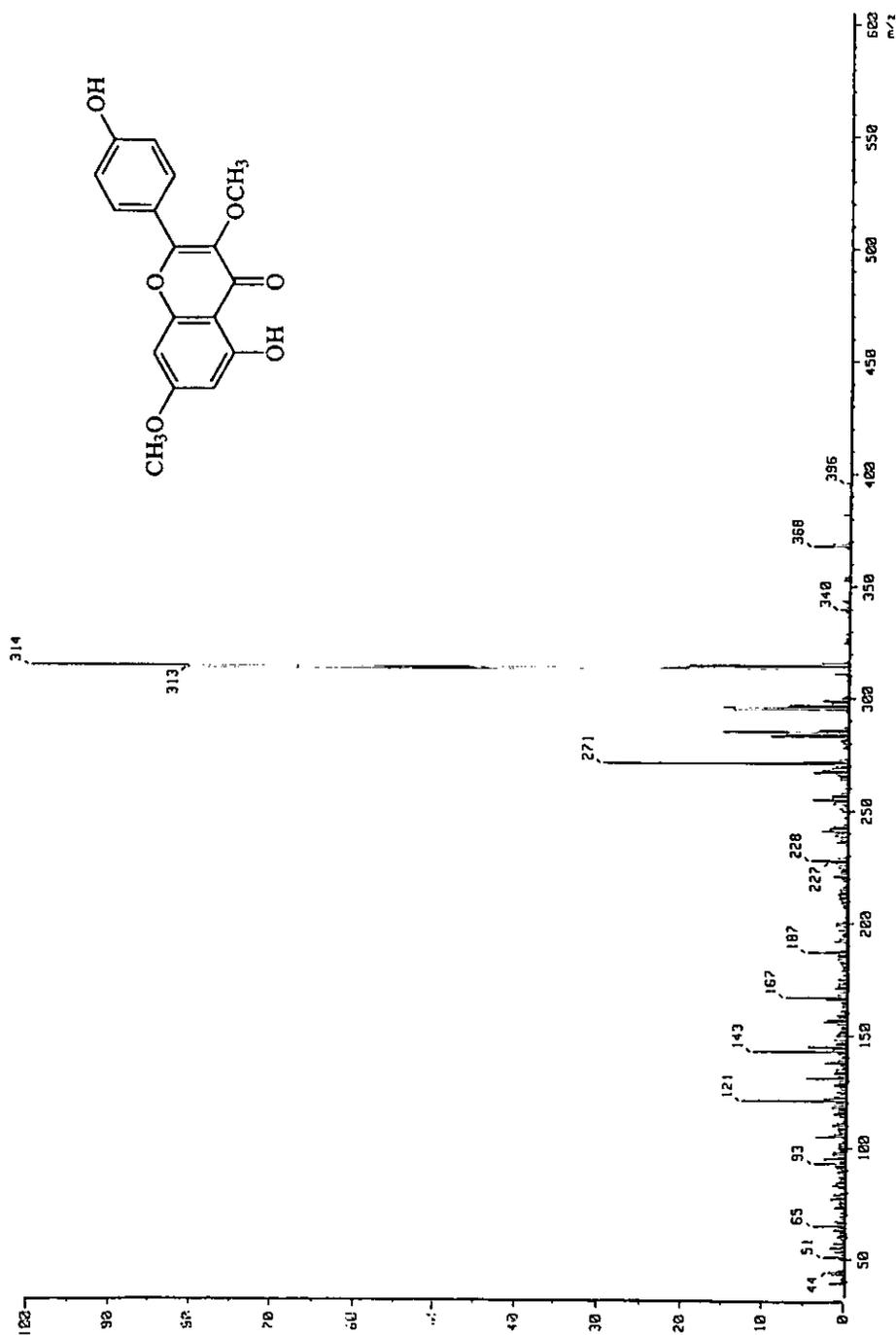
Adicionalmente, la ubicación del grupo metoxilo en el anillo A (C-7) se confirmó por los fragmentos en m/z 167, 138 y 122.

Las evidencias antes presentadas permitieron identificar el compuesto (42) como la Kumatakenina (3,7-éter dimetilico del camperol) el cual ya había sido aislado previamente de la especie *F. cernua* (Wollenweber y Yatskievych, 1985; Dillon *et al.*, 1976, 1977).

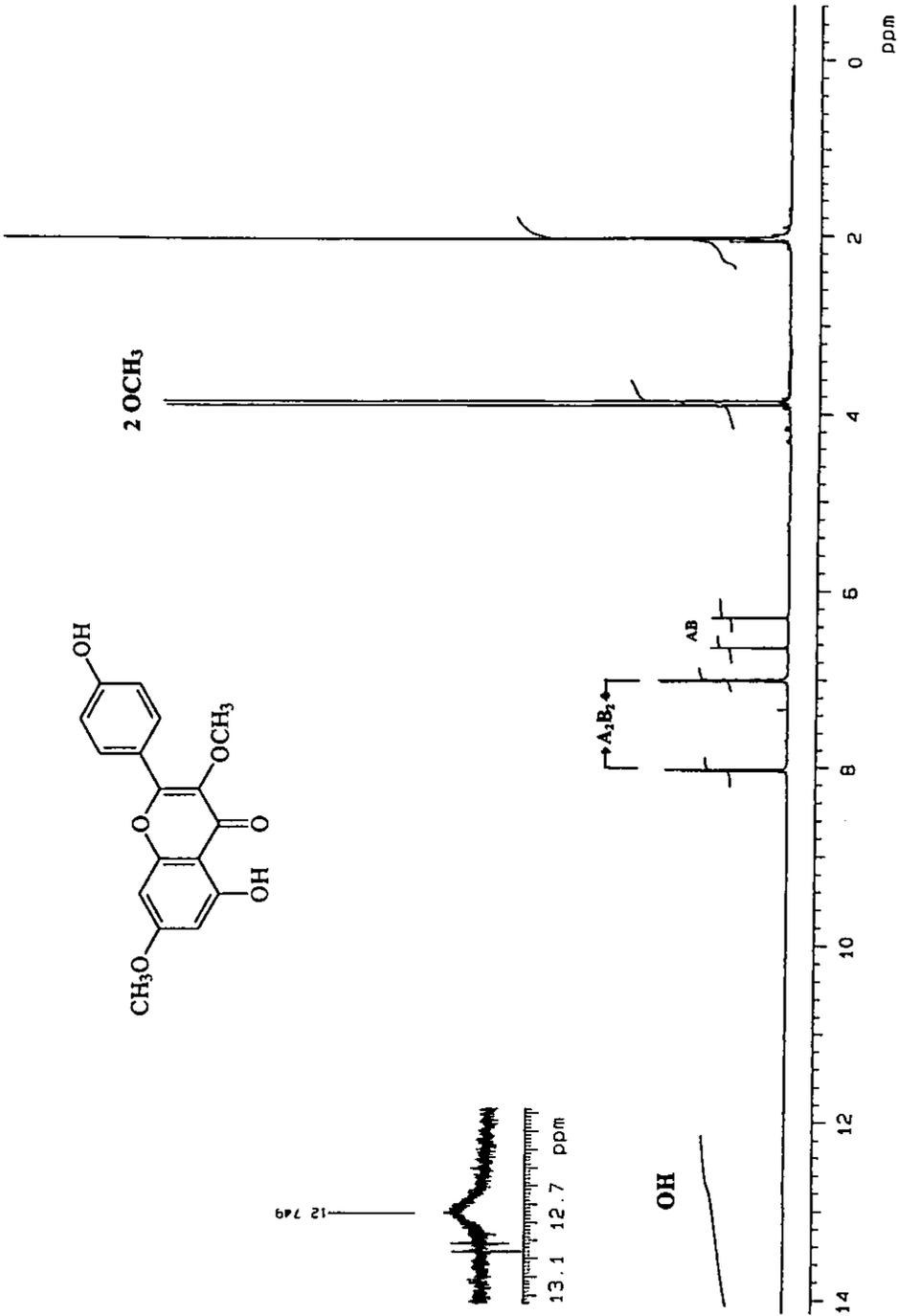
Cabe mencionar que este compuesto se ha aislado también de otras especies tales como: *Cistus palinhae* (J. de Pascual *et al.*, 1983), *Ambrosia eriocentra* (Herz *et al.*, 1973), *Ericameria diffusa* (Urbatsch *et al.*, 1976) y *Cnidosculus tehuacanensis* (Arredondo y Castorena, 1996), entre otras.



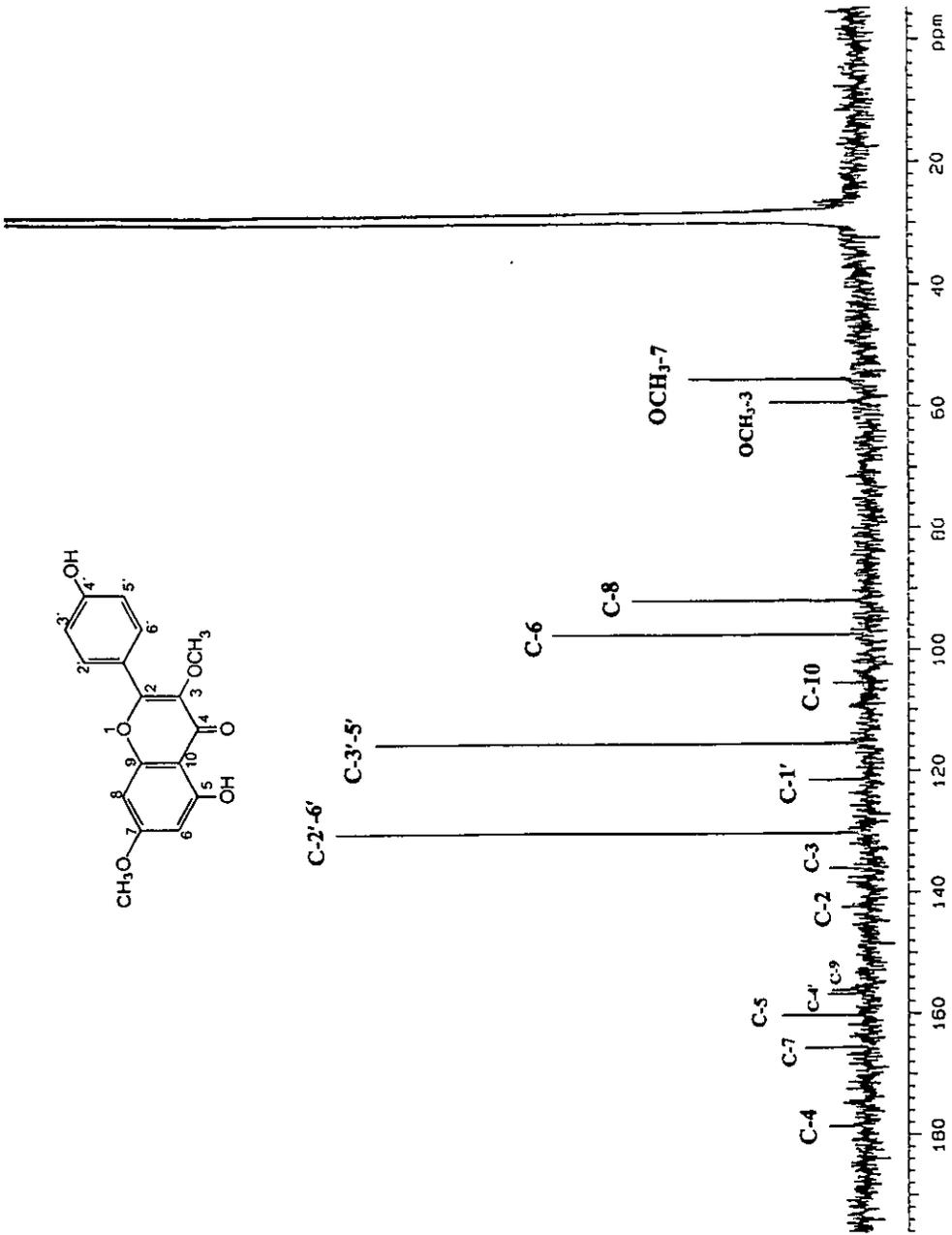
Espectro 6. Espectro en el IR de la Kumatakenina (42).



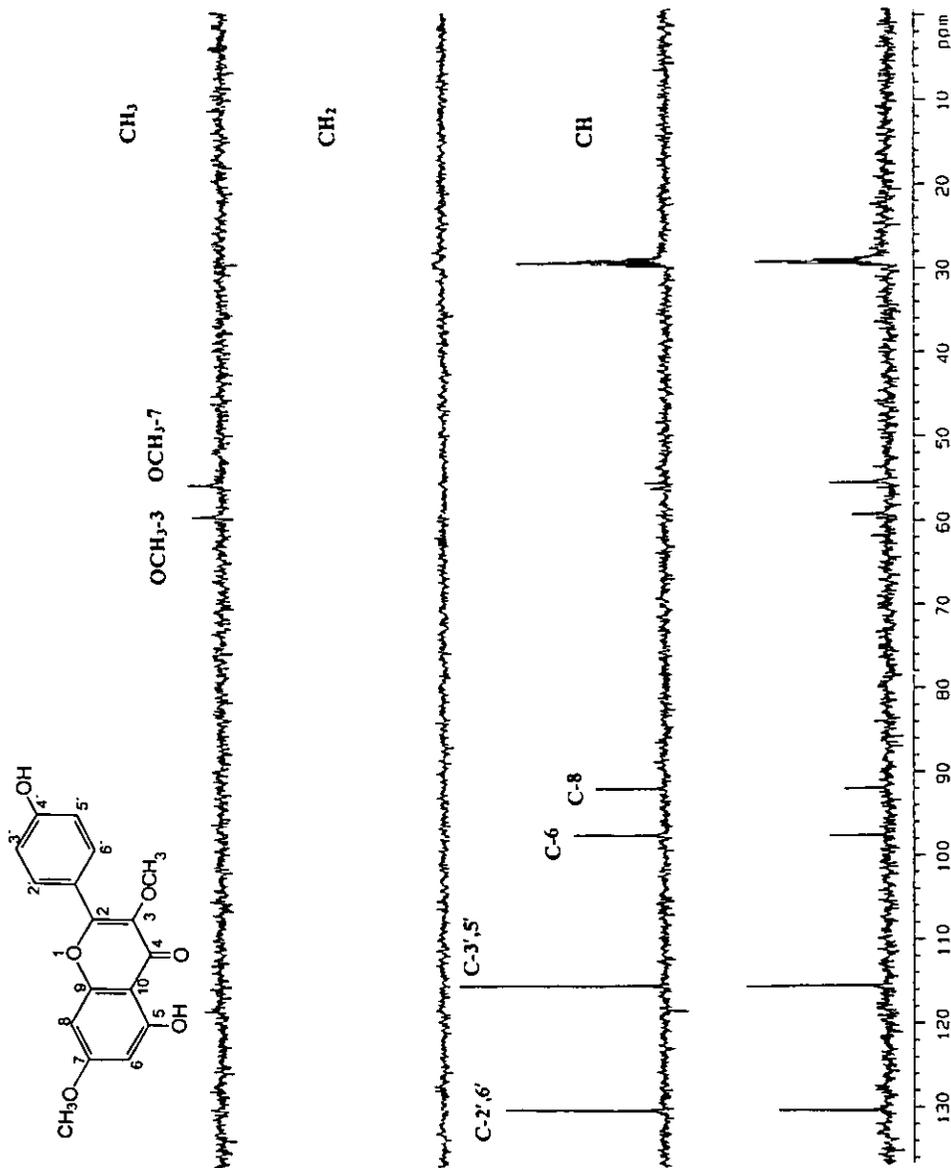
Espectro 7. Espectro de masas de la Kumatakenina (42).



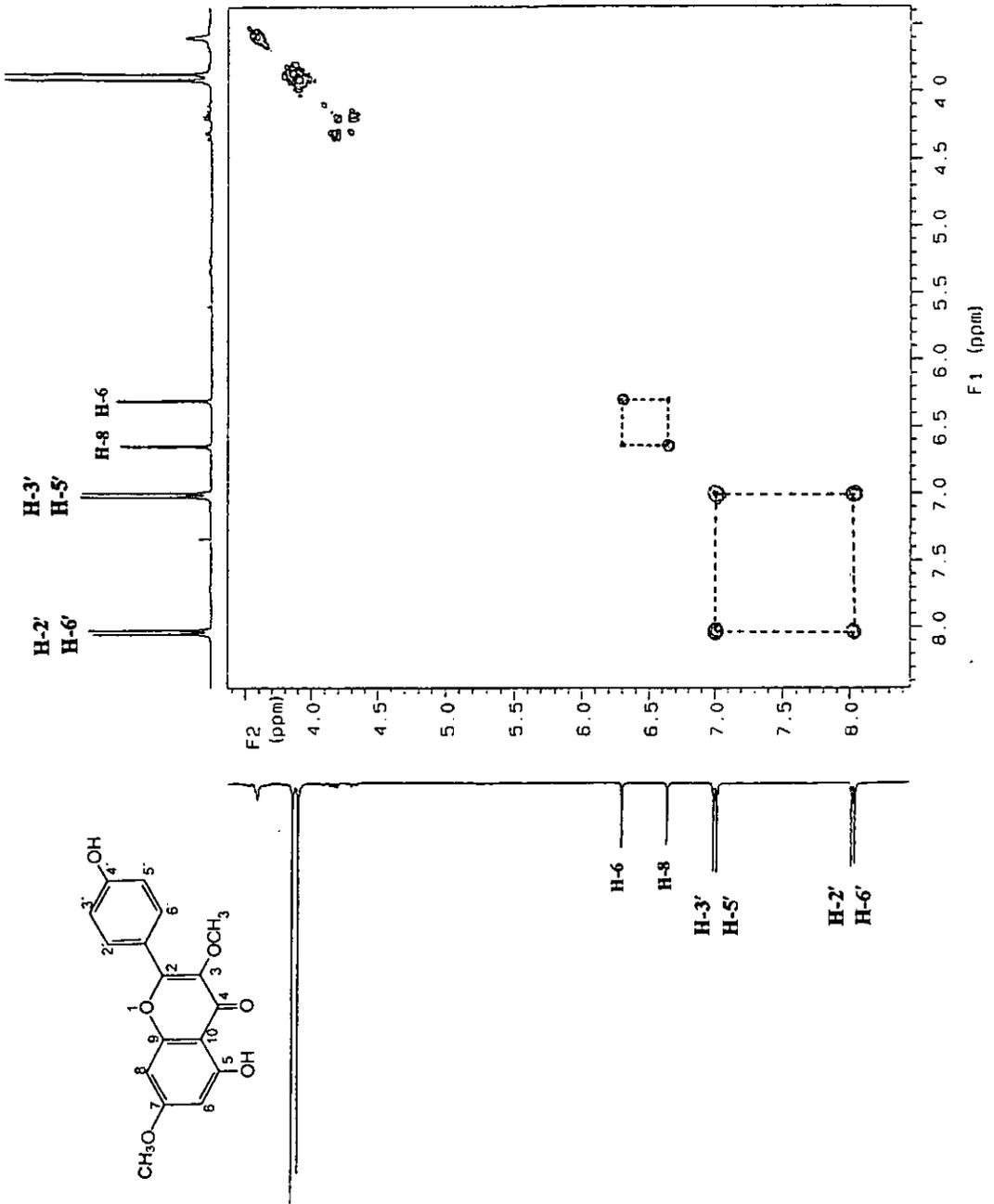
Espectro 8. Espectro de RMN ¹H de la Kumatakenina (42).



Espectro 9. Espectro de RMN ^{13}C de la Kumatakemina (42).



Espectro de RMN ^{13}C modalidad DEPT de la Kumatakenina (42).



Espectro 11. Espectro de RMN ^1H modalidad COSY de la Kumatelesina (42)

4.3 Identificación de la Ermanina (3,4'-éter dimetilico del camperol 43)

El compuesto (**43**) se obtuvo durante la realización del fraccionamiento primario de la fracción activa F007 bajo la forma de un sólido amorfo de color amarillo, con un punto de fusión mayor de 200 °C. El análisis cromatográfico detectó la presencia de un compuesto mayoritario el cual se separó mediante sucesivas cromatografías en capa fina preparativa. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto natural se resumen en el Cuadro 10.

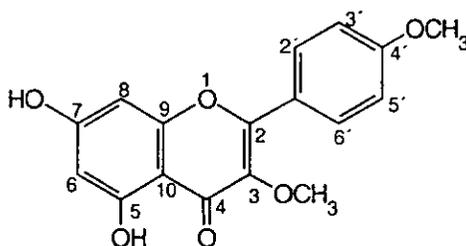
Su espectro en el IR (Espectro 12) presenta absorciones asociadas con grupos hidroxilo (3286 cm^{-1}), carbonilo de γ -pirona (1654 cm^{-1}), C-H (2841 cm^{-1}) y anillo aromático (1498 cm^{-1} y 1600 cm^{-1}).

El espectro de masas generado por este compuesto presenta el ion molecular en una relación de m/z de 314 (Espectro 13), idéntico al demostrado por la Kumatakenina (**42**). El espectro de RMN ^1H de este compuesto muestra la presencia de:

- a) Un sistema AB (δ 6.72 H-8, $J=2.1\text{ Hz}$; δ 6.64 H-6, $J=2.1\text{ Hz}$).
- b) Un sistema A_2B_2 (δ 7.84 H-2', H-6', $J=8.7\text{ Hz}$; δ 6.94 H-3', H-5', $J=9.0\text{ Hz}$).
- c) Dos grupos hidroxilo δ 12.89, OH-5 ; δ 10.12 y
- d) Dos grupos metoxilo (δ 3.96 y δ 3.81).

Las evidencias antes presentadas permitieron establecer que el compuesto (**43**) difería de la Kumatakenina tan solo en la ubicación de los sustituyentes para lo cual, los fragmentos observados en el espectro de masas (Espectro 13, Figura 8) fueron de gran utilidad:

Cuadro 10. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la Ermanina (3,4'-éter dimetílico del camperol **43**).



Punto de fusión	> 200 °C
IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1}	3286, 2841, 1654, 1600 y 1498
Espectro 12	
RMN 1H , δ (CDCl ₃ + DMSO, 300 MHz, ppm)	12.89 (s, OH-5), 10.12 (s, OH-7), 7.84 (d, H-2', H-6', $J=8.7$), 6.94 (d, H-3', H-5', $J=9.0$), 6.72 (d, H-8, $J=2.1$),
Espectro 14	6.64 (d, H-6, $J=2.1$), 3.96 (s, OCH ₃ -3), 3.81 (s, OCH ₃ -4').
RMN ^{13}C , δ (CDCl ₃ + DMSO, 75 MHz, ppm)	152.4 (C-2), 120.9 (C-1', C-3), 181.9 (C-4), 160.9 (C-5),
Espectro 15	90.5 (C-6), 163.9 (C-7), 102.4 (C-8), 158.1 (C-9), 105.1 (C-10), 127.7 (C-2', C-6), 115.6 (C-3', C-5'), 152.1 (C-4').

♦ Todos los valores de las constantes de acoplamiento (J) están dados en Hz.

- a) Los fragmentos en m/z 271, 135, 132 y 108 son consistentes con la presencia de los grupos metoxilo en las posiciones C-3 y C-4' del flavonol.
- b) Los picos en m/z 153, 152 y 126 permitieron ubicar al grupo hidroxilo restante en la posición C-7 del anillo A.

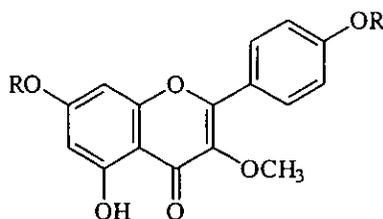


Figura 7. Estructura parcial del compuesto (43).

Lo antes descrito, permitió identificar al compuesto (43) como la Ermanina (3,4'-éter dimetilico del camperol), el cual ya había sido aislado de *F. resinosa* (Wollenweber y Yatskievych, 1985) y de otras especies tales como: *Achillea umbellata* (Wollenweber *et al.*, 1987), *Isocoma 4 spp* (Clark *et al.*, 1987), *Wyethia sp* (Mc Cormick *et al.*, 1987) y *Perityle vaseyi* (Bohm *et al.*, 1986), entre otras. Sin embargo, es importante mencionar que este estudio constituye el primer reporte de la presencia de la Ermanina (43) en la especie *Flourensia cernua*.

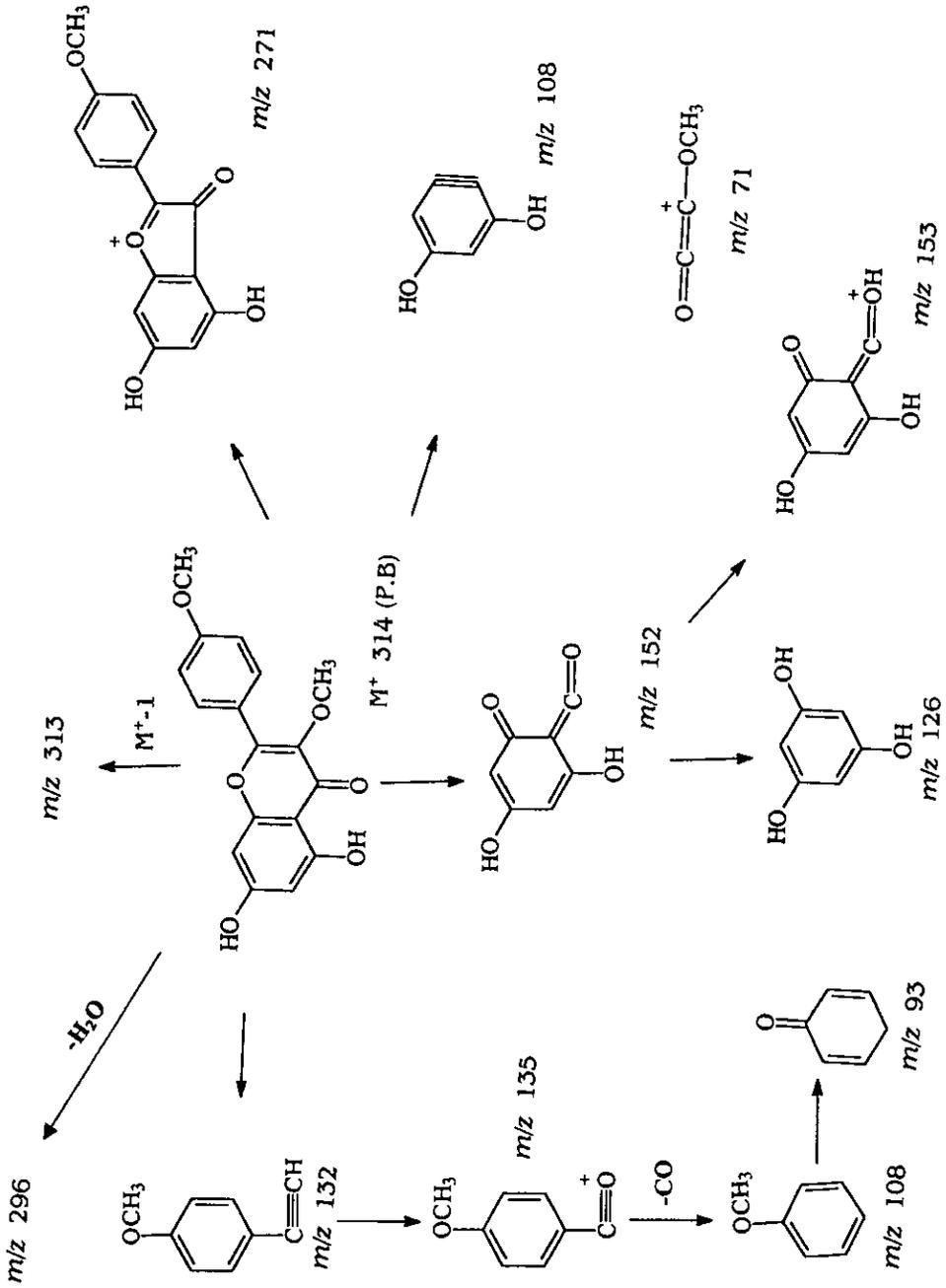
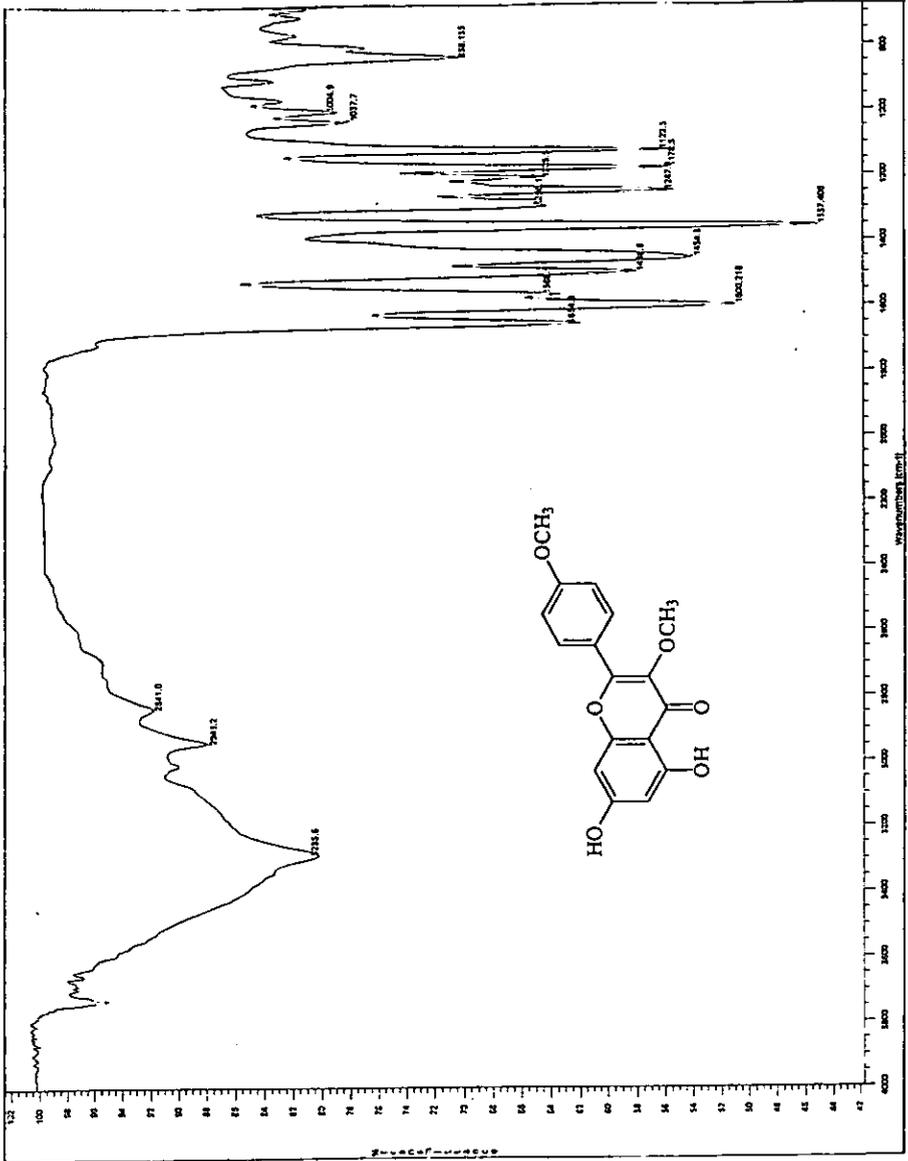
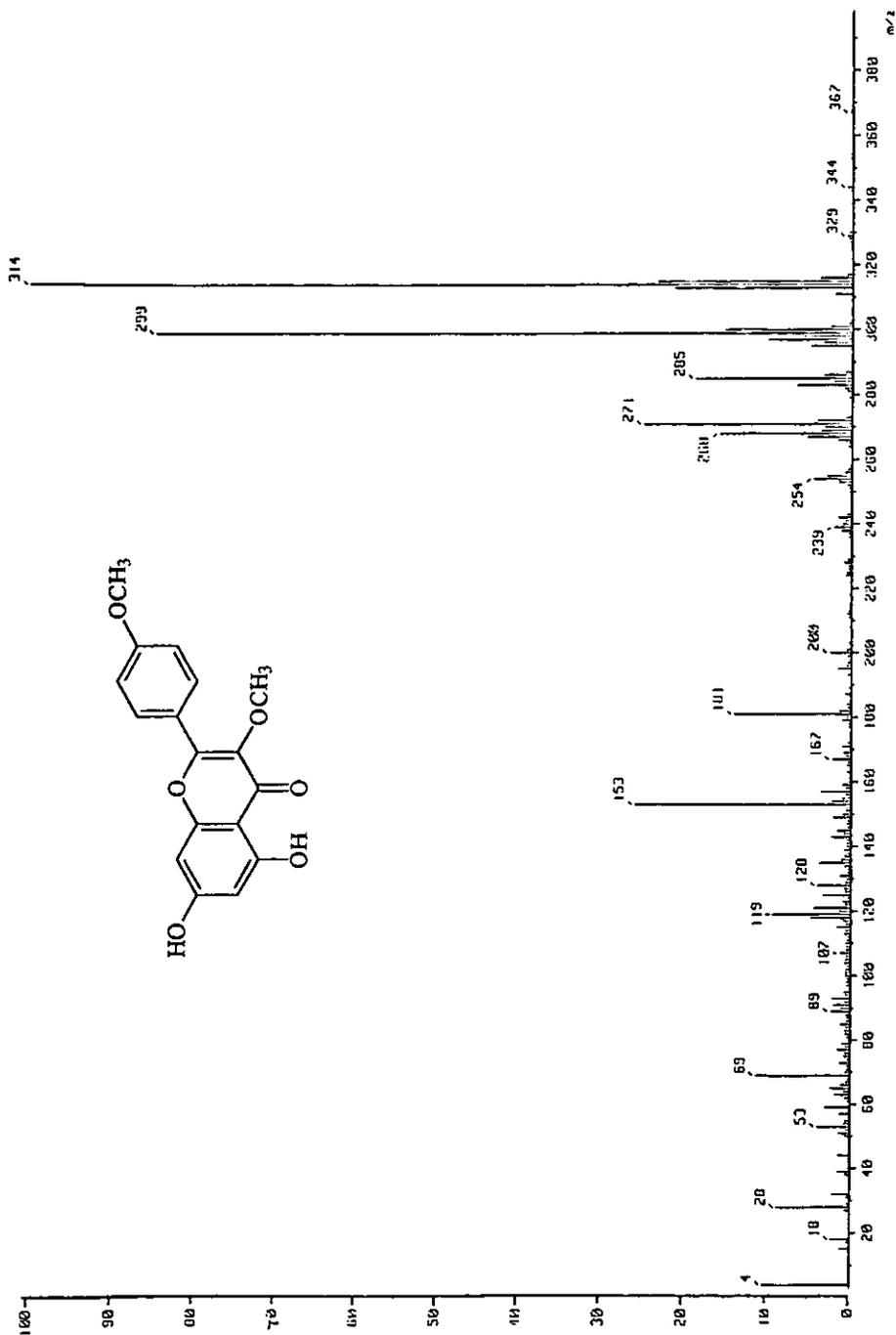


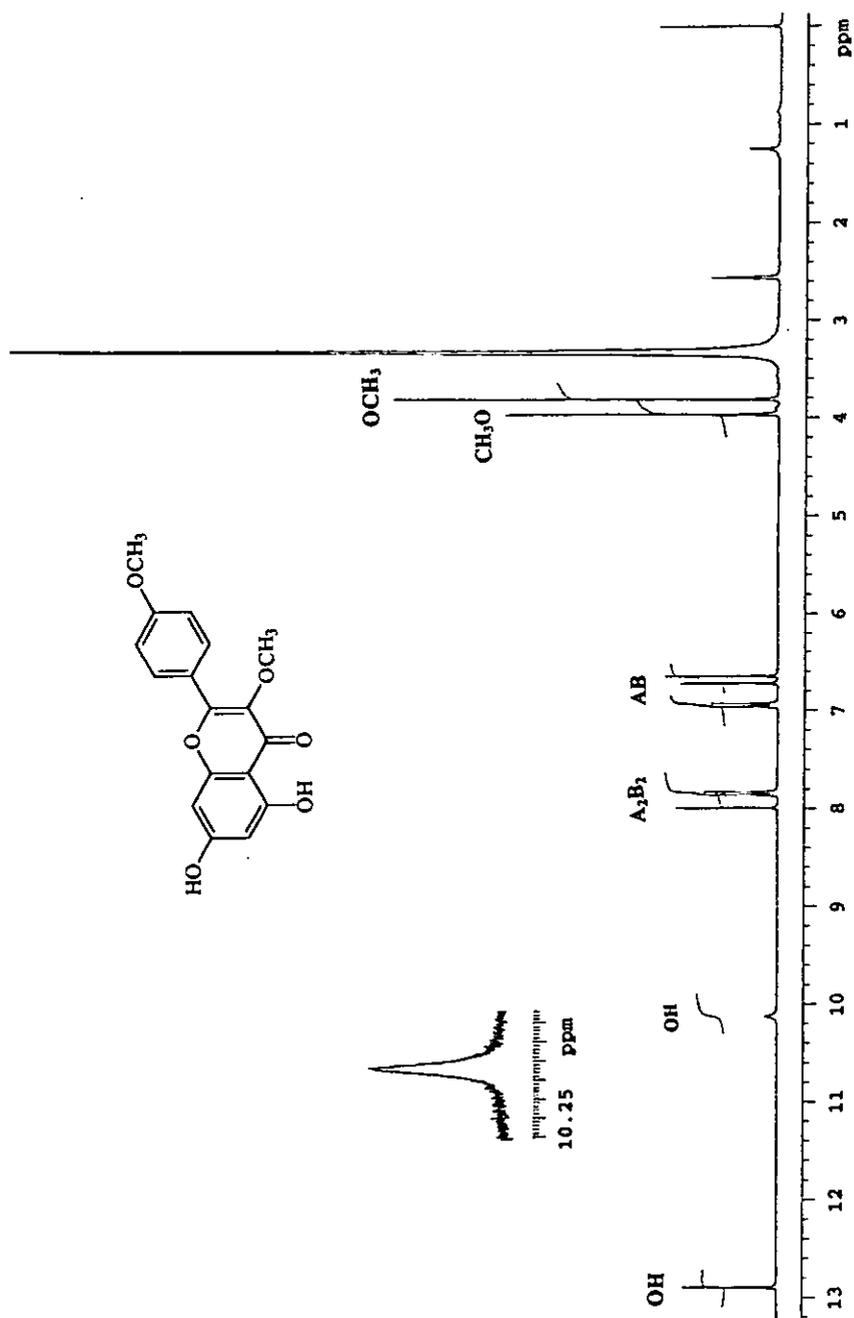
Figura 8. Patrón de fragmentación de la Ermanina (3,4'-éter dimetilico del camperol 43).



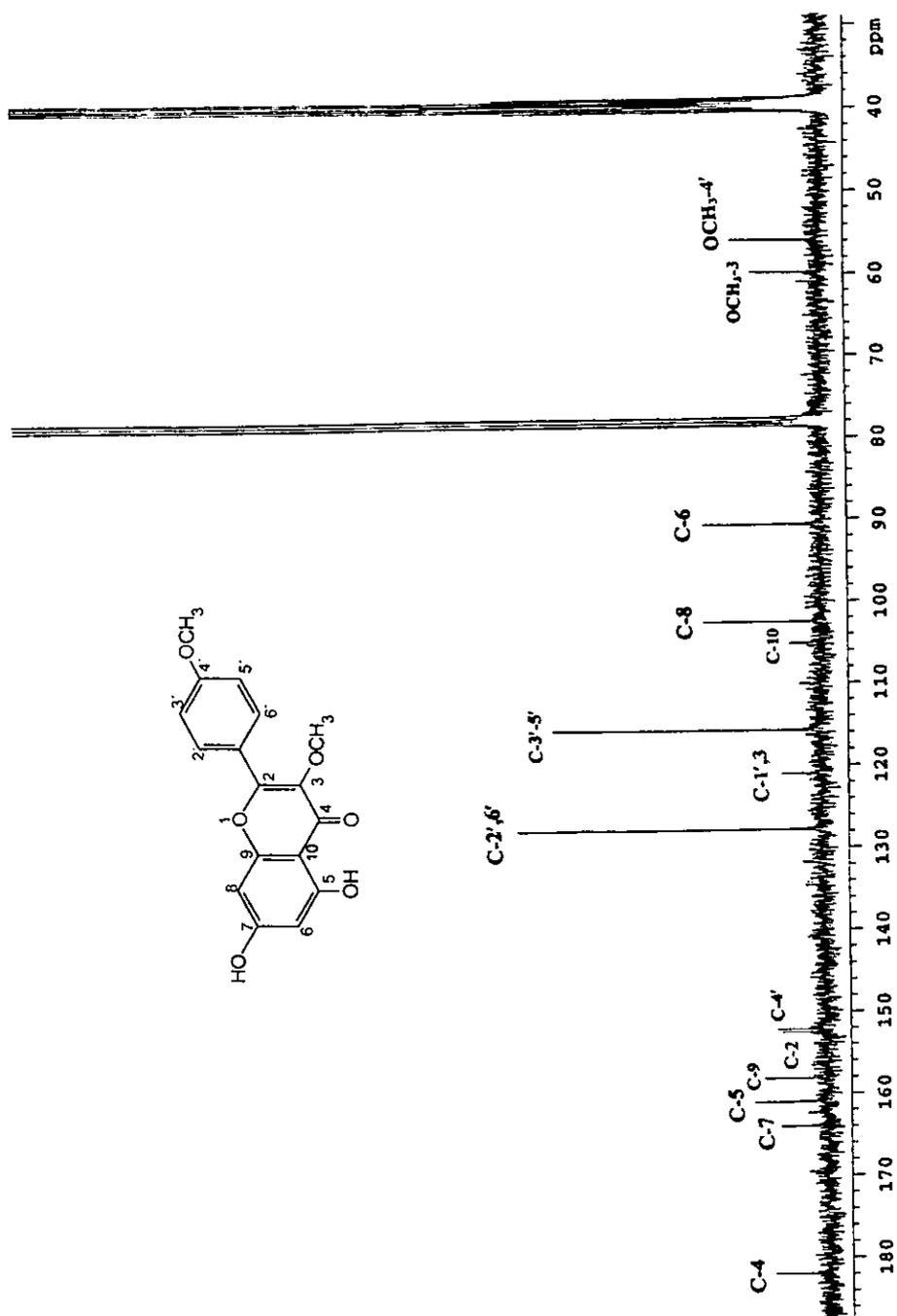
Espectro 12. Espectro en el IR de la Ermanina (43).



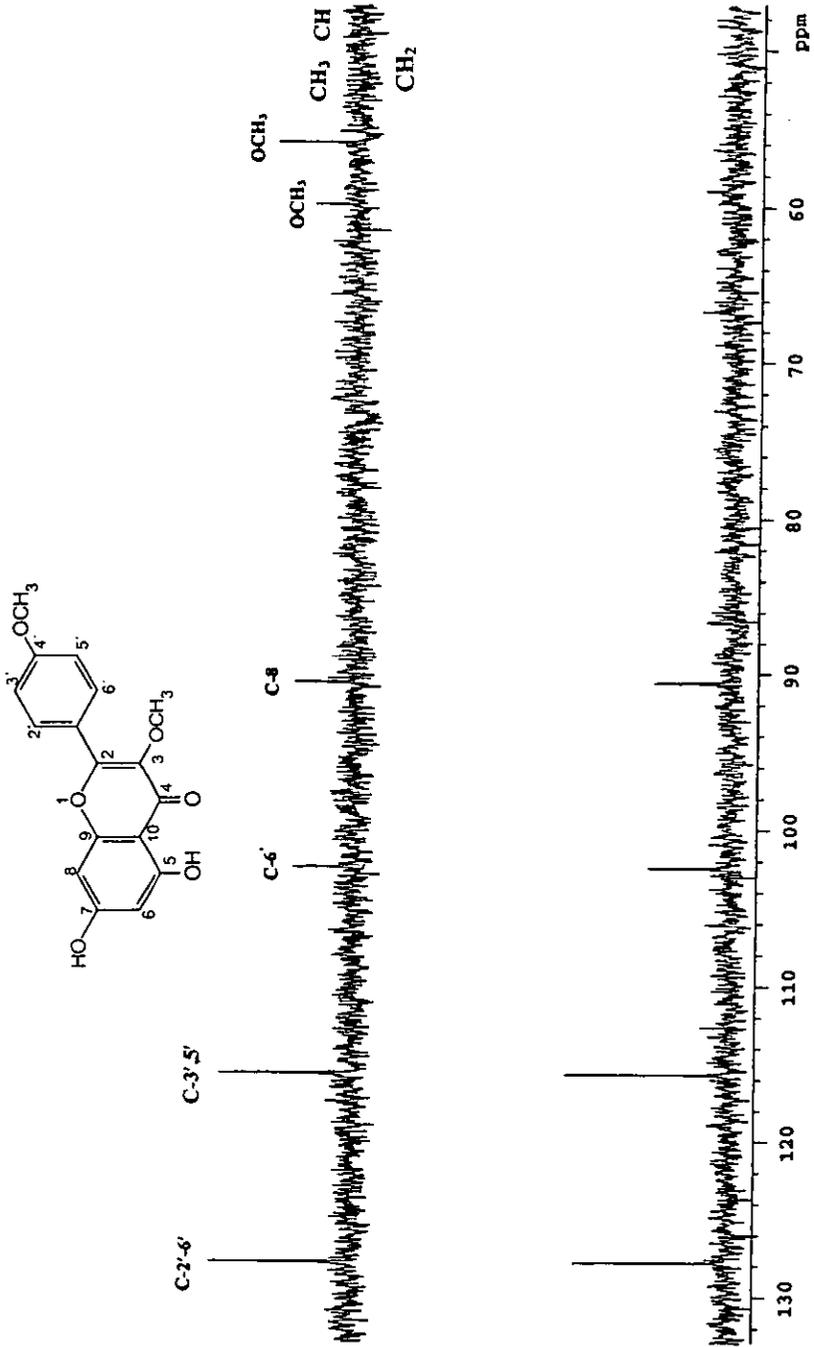
Espectro 13. Espectro de masas de la Ermanina (43).



Espectro 14. Espectro de RMN ^1H de la Ermanina (43).



Espectro 15. Espectro de RMN ^{13}C de la Ermanina (43).



Espectro 16. Espectro de RMN ¹³C modalidad DEPT de la Ermanina (43).

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

- I. El fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico activo de las hojas de *Flourensia cernua*, permitió el aislamiento de tres flavonoides: el **Paquipodol** (3,7,3'-éter trimetilico de la quercetina **41**), la **Kumatakenina** (3,7-éter dimetilico del camperol **42**) y la **Ermanina** (3,4'-éter dimetilico del camperol **43**). De manera general, la caracterización de los compuestos aislados se realizó mediante el empleo de métodos espectroscópicos y espectrométricos.

- II. Este trabajo constituye el primer reporte de la presencia del **Paquipodol** y la **Ermanina** en la especie *Flourensia cernua*.

- III. Los resultados derivados del presente trabajo confirman que los metabolitos secundarios de naturaleza flavonoide son característicos del género *Flourensia*.

VI. PERSPECTIVAS

- i. Continuar con el aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones bioactivas.

- ii. Completar el estudio fitoquímico de las fracciones bioactivas de menor polaridad, para así determinar de manera integral el contenido metabólico de la especie *Flourensia cernua*.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Arredondo, R. E. y Castorena, A. G. (1996). Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.
- Bohm, B. A. , Averet, J. E. y Michael, P. (1986). Non-polar flavonoids of *Perityle vaseyi* (Asteraceae). *Phytochemistry*, **25/11**, 2551-2553.
- Bohlmann, F. y Grenz, M. (1977). Über inhaltsstoffe der Gattung *Flourensia cernua*. *Chemistry Berlin*, **110**, 225-230.
- Bohlmann, F. y Jakupovic, J. (1979). Neue sequiterpene, triterpene, flavanone und andere aromatische verbindungen aus *Flourensia heterolepis*. *Phytochemistry*, **18**, 1189-1194.
- Bohlmann, F. , Jakupovic, J. , Schuster, A. , King, R. M. y Robinson, H. (1984). Eudesmanolides and costic acid derivatives from *Flourensia macrophylla*. *Phytochemistry*, **23**, 1445-1448.
- Clark, L. E. , Wollenweber, E. y Clark, W. D. (1987). *Journal Biochemical Systematics and Ecology*, **15**, 643.
- Díaz, J. L. (1976_a). Usos de las plantas medicinales de México. Monografías científicas II. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, A. C. IMEPLAM. pp. 47.
- Díaz, J. L. (1976_b). Indice y sinonimias de las plantas medicinales de México. Monografías científicas, Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, A. C. pp. 52.

- Dillon, M. O. , Mabry, T. J. , Besson, E. , Bouillant, M. L. y Chopin, J. (1976). New flavonoids from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, **15**, 1085-1086.
- Dillon, M. O. y Mabry, T. J. (1977). Flavonoid aglycones from *Flourensia*. *Phytochemistry*, **16**, 1318-1319.
- Emes, B. M. , Cruz, O. E. , Gloria, C. S. , Benito, P. G. (1994). Flora Medicinal de México. Instituto Nacional Indigenista, México D.F., pp. 52.
- Estell, R. E. , Havstad, K. M. , Fredrickson, E. L. y Gardea, T. J. L. (1994_a). Secondary chemistry of the leaf surface of *Flourensia cernua*. *Journal Biochemical Systematics and Ecology*, **22(1)**, 73-77.
- Estell, R. E. , Anderson, D. M. y Havstad, K. M. (1994_b). Effects of organic solvents on use of tarbush by sheep. *Journal of Chemical Ecology*, **20(5)**, 1137-1142.
- Estell, R. E. , Fredrickson, E. L. y Havstad, K. M. (1996). Chemical composition of *Flourensia cernua* at fourd grow stages. *Grass and Forage Science*, **51**, 434-441.
- Faini, F. , Labbe, C. , Salgado, I. , y Coll, J. (1997). Chemistry, toxicity and antifeedant activity of the resin of *Flourensia thurifera*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **25**, 189-193.
- Fredrickson, E. , Thilsted, J. , Estell, R. y Havstad, K. (1994). Effects of chronic ingestion of tarbush (*Flourensia cernua*) on ewe lambs. *Veterinary and Human Toxicology*, **36**, 409-415.
- Gersdoff, W. A. (1930). A method for the study of toxicity using goldfish. *Journal American Chemistry Society*, **52**, 3440-3445.

- Guerreiro, E. , Kavka, J. , Giordano, O. S. y Gros, E. G. (1979). Sesquiterpenoids and flavonoids from *Flourensia oolepis*. *Phytochemistry*, **18**, 1235-1237.
- Guerrero, R. y Flores, L. S. M. (1990). Los flavonoides de la *Flourensia laurifolia*. *Revista Latinoamericana de Química*, **21**, 95-96.
- Harborne, J. B. (1975). The flavonoids, J. B. Harborne, T. J. Mabry y Mabry, H. (eds), Academic Press, New York.
- Hrborne, J. B. (1986). The flavonoids, advances in Research Since 1986. Chapman and Hall.
- Hrborne, J. B. (1994). The flavonoids, advances in Research Since 1994. Chapman and Hall.
- Hert, W. , Fitzhenry, B. y Anderson, G. D. (1973). 5,4'-dihidroxy-3,7-dimethoxyflavone from *Ambrosia eriocentra*. *Phytochemistry*, **12**, 1181-1182.
- Jerga, C. , Merfort, I. y Willuhn, G. (1990). *Planta Medica*, **56**, 122.
- King, D. W. , Estell, R. E. , Fredrickson, E. L. , Havstad, K. M. , Wallace, J. D. y Murray, L. W. (1996_a). Effects of *Flourensia cernua* ingestion on intake, digesta kinetics, and rumial fermentation of sheep consuming tobosa. *Journal of Range Management*, **49**, 325-330.
- King, D. W. , Fredrickson, E. L. , Estell, R. E. , Havstad, K. M. , Wallace, J. D. y Murray, L. W. (1996_b). Effects of tarbush (*Flourensia cernua* D. C.) ingestion on nitrogen balance of sheep consuming low quality tobosa grass diets. *Journal of Range Management*, **49**, 331-335.

- Kingston, D. G. I. , Rao, M. M. , Spittler, T. D. , Petterson, R. C. y Cullen, D. L. (1975). Sesquiterpenes from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, **14**, 2033-2037.
- Lowery, C. (1993). *Reagent Chemicals*. American Chemical Society specification, Editores Washington, D. C., 90-91.
- Markham, K. R. y Mabry, T. J. (1975). Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids. En: *The Flavonoids* (Eds Harborne, J. B. , Mabry, T. J. and Mabry H.). Academic Press, New York, pp. 45-77.
- Markham, K. R. y Mabry, T. J. (1975). Mass Spectrometry of flavonoids. En: *The Flavonoids* (Eds Harborne, J. B. , Mabry, T. J. and Mabry H.). Academic Press, New York, pp. 19-134.
- Martínez, M. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica, México, pp. 446.
- Martínez, M. (1989). Las plantas medicinales de México 6ª. ed. Ediciones Botas, México, pp. 186.
- Mc Cormick, S. , Robson, K. , Maze, J. y Bohm, B. (1987). Flavonoids of *Wyethia* section *agnorhiza* *Phytochemistry*, **26**, 2421-2424.
- Muller, C. H. , (1940). Plant succession in the *Larrea-Flourensia climax*. *Ecology*, **21**, 206-212.
- Naidu, M. V. y Rao, G. S. K. (1980). Synthetic studies in aromatic hemiterpenes of natural origin: Part VI-Synthesis of 7-Methoxy-2,2-dimethyl-6-vinylchromene (Anhydroencecalinol), a natural product isolated from *Flourensia cernua*. *Indian J. Chem.* **19**, 313-315.

- Pascual de, J. T. , Urones, G. , Nuñez, L. M. y Basabe, P. (1983). Diterpenoids and flavonoids from *Cistus palinhae*. *Phytochemistry*, **22**, 2805-2808.
- Pettersen, R. C. , Cullen, D. L. , Spittler, T. D. y Kingston, D. G. I. (1975). The crystal and molecular structure of flourensadiol, a natural product sesquiterpene isolated from a west Texas shrub. *Acta Cryst.* **31**, 1124-1127.
- Priotti, Z. E. y Zygadlo, J. A. (1997). Essential oil of *Flourensia oolepis* S. L. Blake. *J. Essent. Oil Res.*, **9**, 345-347.
- Proksch, P. , Politt, U. , Wollenweber, E. , Wray, V. y Clark, C. (1988). Epicuticular flavonoids from *Ecelia*. *Planta Medica*. **54**, 542-546.
- Rao, M. M. , Kingston, D. C. I. y Spittler, T. D. (1970). Flavonoids from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, **9**, 227-228.
- Richerson, J. V. y Boldt, P. E. (1995). Phytophagous insect fauna of *Flourensia cernua* (Asteraceae:Heliantheae) in Trans-Pecos Texas and Arizona. *Environmental Entomology*, **24**, 588-594.
- Rodríguez, H. L. y Rodríguez, J. (1973). Resinona, un nuevo triterpeno aislado de *Flourensia resinosa*. *Revista Latinoamericana de Química*, **3(4)**, 148-153.
- Showalter, T. D. (1996). Arthropod associates and herbivory on tarbush in southern New Mexico. *The Southwestern Naturalist*, **41(2)**, 140-144.
- Stuppner, H. y Müller, E. P. (1994). Rare flavonoid aglycones from *Flourensia retinophylla*. *Phytochemistry*, **37/4**, 1185-1187.

- Suffness, M. , Cragg, G. , Grever, M. , Grifo, F. , Johnson, G. , Mead, J. , Schepartz, S. , Venditti, J. , Wolpert, M. (1995). The National Cooperative Natural Products Drug Discovery Group (NCNPDDG) and International Cooperative Biodiversity Group (ICBG) Programs. *International Journal of Pharmacognosy*. Vol 33, Supplement, 5-16.
- Urbatsch, L. E. , Mabry, T. J. , Miyakadu, M. , Ohno, N. Y Yoshiokalt. (1976). Flavonol methyl ethers from *Ericameria diffusa*. *Phytochemistry*, 15, 440-441.
- Wollenweber, E. , y Yatskievych, G. (1985). Flavonoides en la resina foliar de *Flourensia resinosa*, compuesta endémica de Hidalgo, México. *Revista Latinoamericana de Química*, 16(1), 46-47.
- Wollenweber, E. , Valant – Vetschera, K. M. , Ivancheva, S. y Kuzmanov, B. (1987). Flavonoids aglycones from the leaf surfaces of some *Achillea* species. *Phytochemistry* 26, 181-182.
- Wollenweber, E. , Iinuma, M. , Tanaka, T. y Mizuno, M. (1990). 5-hydroxy-6,2'-dimethoxyflavone from *Primula denticulata*. *Phytochemistry*, 29, 633-637.