

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

TRANSFORMACIONES MICROBIOLÓGICAS DE LOS SESQUITERPENOS DEL *PARTHENIUM BIPINNATIFIDUM*

171

T E S I S

Que para obtener el título de

Q U I M I C O

p r e s e n t a

GRACIELA

LEON

MONTAÑEZ

México, D. F.

171
1974



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.

CLAS Tesis
AÑO 1974
FECHA _____
PROC Mt. 162



QUÍMICA

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA :

PRESIDENTE: PROF. CARLOS DEL RIO ESTRADA
VOCAL: PROF. ALFONSO ROMO DE VIVAR
SECRETARIO: PROF. ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN
1er.SUPLENTE: PROF. JORGE SOTO SORIA
2o.SUPLENTE: PROF. MAURO CRUZ MORALES

SUSTENTANTE: GRACIELA LEON MONTAÑEZ

ASESOR DEL TEMA: DR. ALFONSO ROMO DE VIVAR.

ESTA TESIS SE LLEVO A CABO EN EL INSTITUTO DE
QUIMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO, BAJO LA DIRECCION DEL DR. ALFONSO ROMO --
DE VIVAR Y DEL M. EN C. JAVIER TABOADA RAMIREZ.

CON ETERNO AGRADECIMIENTO A MIS PADRES :

EUGENIA MONTAÑEZ DE LEON

JUAN LEON ESPINOSA

A MIS HERMANOS :

EDMUNDO ,

NELLY ,

JUAN Y

ALBERTO

AL DR. ALFONSO ROMO DE VIVAR

CON ESTIMACION Y AGRADECIMIENTO POR
SU VALIOSA ORIENTACION EN EL DESERRO-
LLO DE ESTA TESIS.

AL M. en C. JAVIER TABOADA R.

CON MI SINCERO AGRADECIMIENTO POR SU
ASESORAMIENTO EN ESTA TESIS

CON AGRADECIMIENTO:

AL DR. CARLOS DEL RIO ESTRADA

PROF. ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN

CON ESPECIAL AFECTO A LOS MIEMBROS DEL INSTITUTO DE
QUIMICA PORQUE EN ELLOS HE ENCONTRADO " AMISTAD "

A MIS AMIGOS

CONTENIDO

- I.- INTRODUCCION
- II.- GENERALIDADES
- III.- PARTE TEORICA
- IV.- PARTE EXPERIMENTAL
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- BIBLIOGRAFIA

I N T R O D U C C I O N

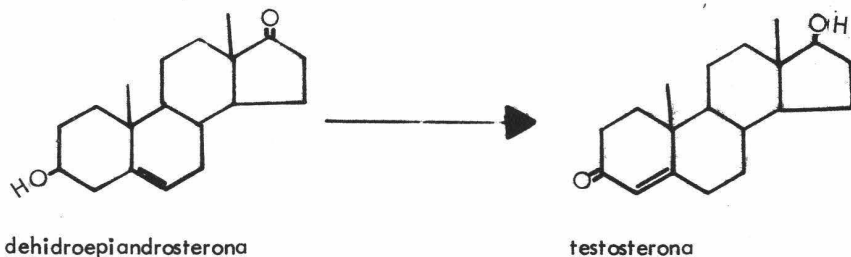
Las transformaciones microbiológicas de compuestos orgánicos han sido conocidas empíricamente desde el principio de la historia; en cada civilización, el hombre ha practicado la fermentación de frutas, granos ó leche para obtener productos necesarios ó complementarios para su alimentación. Se han tenido evidencias de que la producción de vinos se conoce desde aproximadamente el año 3 000 A.C.

La aplicación racional de estas técnicas se inició con el estudio de la química orgánica y de la microbiología, y se determinó que algunos microorganismos son responsables de alteraciones químicas de sustratos específicos. Lo anterior se dedujo de los trabajos de Louis Pasteur (1857) sobre la fermentación de azúcar a ácido láctico y etanol.

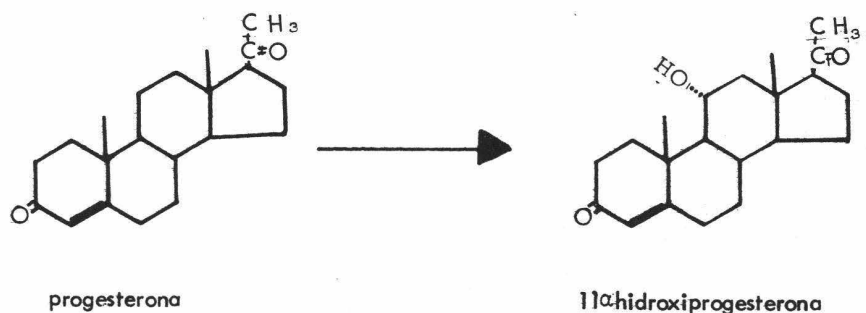
Conforme fué avanzando la ciencia, las técnicas se fueron refinando y las aplicaciones microbiológicas se extendieron a nuevos campos contribuyendo ampliamente al desarrollo de la tecnología, de la medicina y de la ciencia.

La microbiología aplicada a la química esteroidal ha tenido un notable desarrollo, puesto que por este medio se han podido obtener diversas series de compuestos de gran aplicación farmacéutica, cuya síntesis por medios químicos es difícilmente realizable y de alto costo. Pueden considerarse como pioneros de estos trabajos al italiano L. Mamoli, quien realizó la síntesis microbiana de

testosterona a partir de la dehidroepiandrosterona¹.

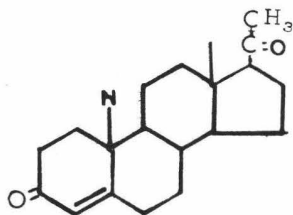


Y los americanos D.H. Peterson y Murray², quienes pudieron por primera vez hidroxilar con microorganismos la posición 11 de la molécula esteroidal, originando con esto una nueva tecnología para la fabricación de hormonas adrenocorticales, las cuales son de enorme importancia terapéutica.

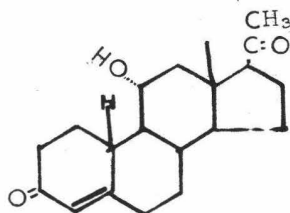


En México, el Dr. C. Casas-Campillo ha trabajado notablemente en la conversión microbiana de moléculas orgánicas. El ha logrado hidroxilar la 19-norprogesterona en posición 11 (α, γ, β) utilizando

hongos³.



19-norprogesterona



11α hidroxí 19-norprogesterona

Las transformaciones microbiológicas de sesquiterpenos constituyen un campo novedoso, que unicamente ha sido aplicado en oxidaciones de quayóxidos y ligulóxidos⁴ (sesquiterpenos con un anillo furánico) en donde fueron de gran ayuda en la elucidación de sus estructuras. Por lo que este campo está abierto para realizar estudios de importancia como sería la obtención de nuevos compuestos sesquiterpénicos ó su uso como intermediarios en síntesis parciales ó totales. Además podría tener gran aplicación farmacológica, puesto que se sabe que algunas lactonas sesquiterpénicas poseen acción citotóxica.

No solamente se pueden realizar transformaciones microbiológicas cuando la substancia aislada de la planta se pone en contacto directo con el microorganismo, sino que se pueden desarrollar en la misma planta microorganismos tales como hongos, que pueden efectuar cambios en los componentes naturales de ella. Por lo que hay que ser lo suficientemente cuidadoso para no cometer el error de afirmar que se han aislado productos naturales ó que éstos han sufrido algún cambio en el proceso de aislamiento, cuando lo que ha

sucedido es que los productos naturales ya habían sido modificados por microorganismos en la planta antes de ser aislados.

El presente trabajo trata sobre algunas transformaciones producidas por hongos en lactonas sesquiterpénicas características del Parthenium bipinnatifidum⁵ (Ortega) Rollins, planta anual que crece abundantemente en el altiplano mexicano desde el D.F. en el sur hasta la frontera norte. Los hongos desarrollados en la planta producen cambios tan específicos que por medios químicos sería difícil de realizar.

GENERALIDADES

ESTEROIDES:

Debido a la importancia biológica de los esteroides y a la accesibilidad de ellos como materia prima, se explica el que se haya desarrollado tanto el campo de las transformaciones microbiológicas en esteroides, en donde los microorganismos efectúan transformaciones muy difíciles de llevar a cabo por medios químicos.

Las transformaciones microbiológicas son prácticamente desconocidas en sustratos no esteroidales, sólo se conocen los cambios conocidos como fermentaciones por medio de las cuales se obtienen moléculas como : etanol, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, antibióticos, etc

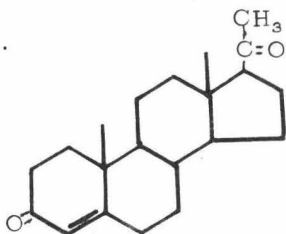
En esteroides se conocen los siguientes tipos de transformaciones bajo los efectos catalíticos de las enzimas microbianas:^{1,6}

- 1).- Procesos oxidativos.- Dentro de ellos se tienen:
 - a).- Oxidación de un alcohol secundario a una cetona.
 - b).- Deshidrogenación del anillo A de la molécula esteroideal en posición 1-2 y 4-5.
 - c).- Aromatización del anillo A de la molécula esteroideal.
 - d).- Oxidación del grupo metileno a un grupo ceto.
 - e).- Rompimiento de la cadena lateral con formación de alcohol.
 - f).- Rompimiento de la cadena lateral del pregnano en C-17 y apertura del anillo con formación de testolactona.

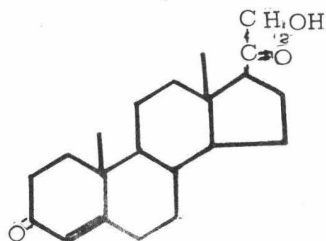
- g).- Eliminación de la cadena lateral de C-17 en esteroides con esqueleto de pregnano formando un grupo ceto.
- h).- Rompimiento de la cadena lateral con formación de un grupo ceto.
- i).- Deshidrogenación del anillo B de la molécula esteroidal.
- j).- Formación de epóxidos.
- k).- Introducción de hidroxilos ^{1,7,10} .- Este proceso es uno de los más estudiados en este campo. La introducción de oxhidrilos en posiciones específicas del esteroide, ha sido un proceso difícil de realizar por medios químicos, requiriendo en ocasiones varios pasos de reacción y dando usualmente bajos rendimientos. Por éllo este proceso fué uno de los principales estímulos para el uso de enzimas microbianas en síntesis de esteroides. - Krámlí y Horvath⁸ en 1948, hidroxilaron por este medio la posición 7 del esteroide y en 1952 Peterson y Murray² pudieron introducir utilizando microorganismos, un grupo oxhidrilo en posición 11 en la progesterona, facilitando considerablemente la síntesis parcial de corticoides. tan importantes en terapéutica.

Se han podido formar alcoholes primarios, secundarios y terciarios dentro de la molécula esteroidal. Como ejemplo se tienen los siguientes:

- a).- Formación de un alcohol primario.-

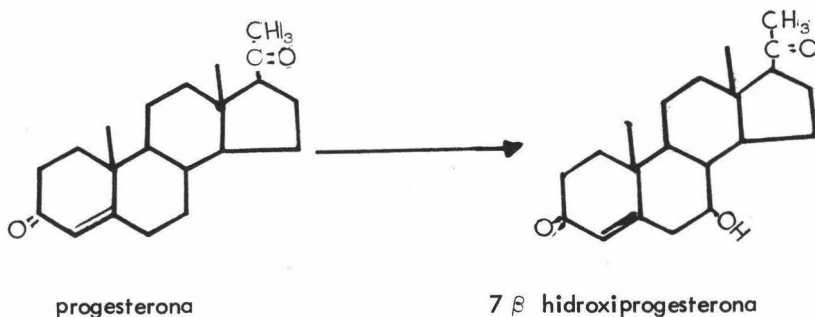


progesterona

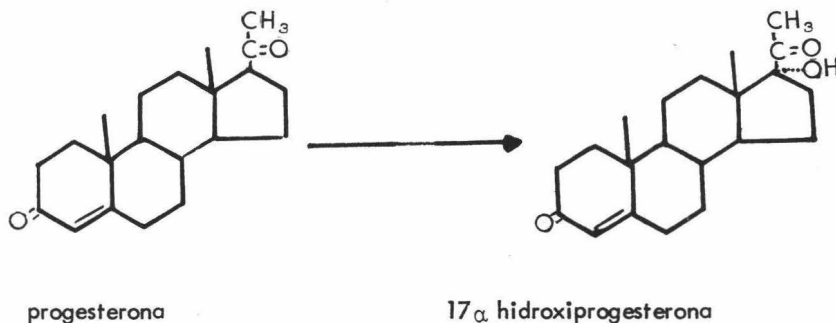


cortexona

b).- Formación de un alcohol secundario.- Se han podido hidroxilar en varias posiciones: 1α , 1β , 2β , 6β , 7α , 7β , 11α , 11β , 12β , 15α , 16α y 16β . Como ejemplo se tiene el siguiente:



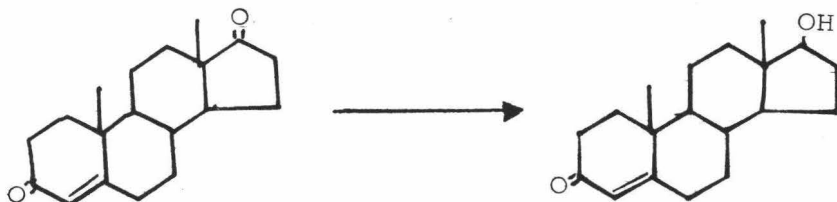
c).- Formación de un alcohol terciario.- Se ha observado esta hidroxilación en posiciones: 5β , 9α , 14α , 17α . Como ejemplo se tiene:



II.- Procesos reductivos.-

Existen varios procesos reductivos tales como la reducción de aldehidos a alcoholes primarios, la eliminación de grupos oxhidrilos secundarios, etc. La reducción de un grupo ceto a un alcohol secundario constituyó un proceso importante desde que -

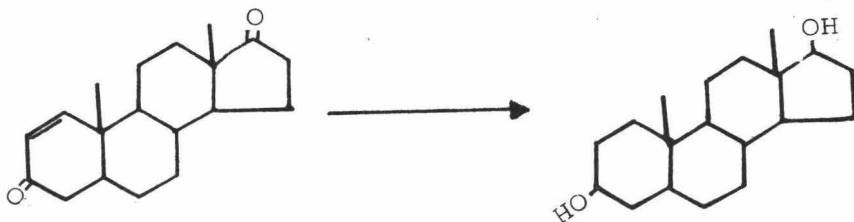
Mamoli redujo el grupo ceto de C-17 de los derivados del androsteno en los correspondientes oxhidrilos.⁶



Δ^4 androsten 3, 17 diona

testosterona

Una de las transformaciones reductivas más común es la hidrogenación, la cual ha podido realizarse con gran cantidad de microorganismos sobre todo con hongos. Butenandt pudo hidrogenar la posición 1-2 de la molécula androsten 3β , 17 diona utilizando hongos.¹

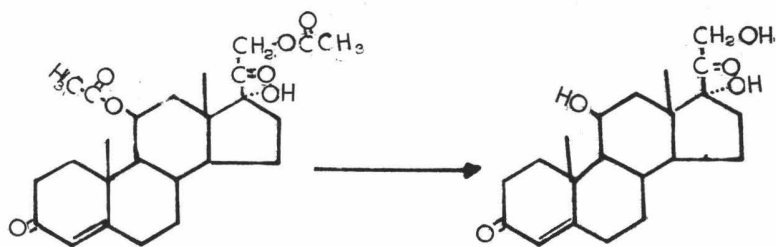


Δ^1 androsten 3, 17 diona

androstan 3β ,17 β diol

III.- Hidrólisis.-

Por hidrólisis microbiana de ésteres esteroidales, se ha podido obtener los alcoholes correspondientes. Charney y colaboradores⁵ pudieron saponificar el diacetato 11β , 21 cortisol.

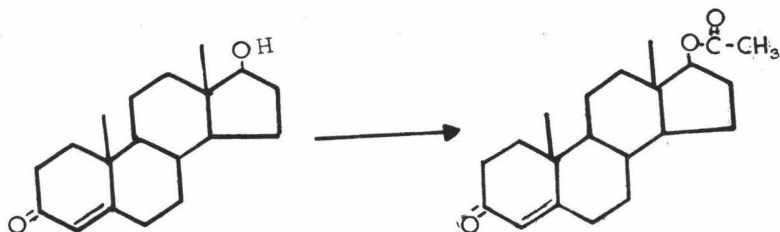


diacetato de 11β, 21 cortisol

cortisol

IV.- Esterificación.-

McGuire⁹ pudo acetilar la testosterona por estos medios.



testosterona

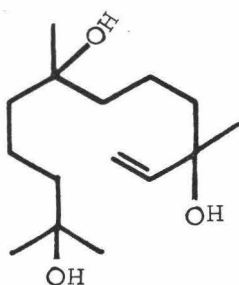
acetato de testosterona

Para todo tipo de transformación microbiológica se debe conocer las características bioquímicas y biológicas de los microorganismos, para determinar el microorganismo específico, útil en determinado proceso. Las enzimas microbianas que catalizan estas transformaciones pueden tener gran especificidad para determinado sustrato, por lo que aún habiendo grupos análogos en la misma posición del esqueleto esteroideal, puede modificarse la actividad enzimática.

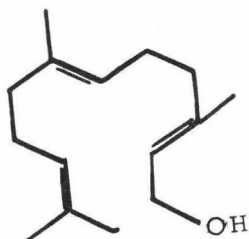
SESQUITERPENOS

Otro tipo de compuestos en el que se ha observado también actividad biológica son los terpenos, los cuales se asemejan a los esteroides en que ambos son reguladores primarios de procesos celulares. Los terpenos tienen gran importancia fisiológica para el crecimiento y funciones reproductivas de las plantas. - Uno de los más importantes grupos dentro de los terpenos son los sesquiterpenos, algunos de los cuales son biológicamente activos, unos son hormonas, otros fagorepelentes, antibióticos, etc.¹¹

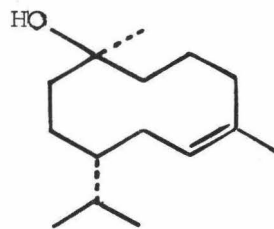
Los sesquiterpenos¹² son compuestos naturales que forman el grupo más numeroso dentro de los terpenos, se han reportado más de 1 000¹³. Estos compuestos están constituidos por 15 átomos de carbono, con un esqueleto formado por tres unidades de isopreno. Pueden ser hidrocarburos cíclicos ó acíclicos y pueden presentar grupos funcionales, tales como: alcohol, cetona, lactona, etc. - Como ejemplo de ellos se tienen:



caparratriol



farnesol

 α cadinol

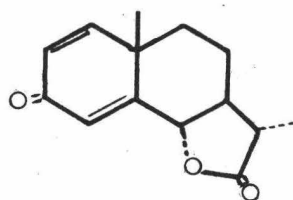
Dentro de estos compuestos se han estudiado muy especialmente a las lactonas sesquiterpénicas¹⁴, las cuales han presentado un gran interés debido a que algunas de ellas poseen acción citotóxica¹¹, como es el caso del acetato de euparotina; en otras se ha observado una acción analgésica como en la amaralina ó -- también amebicidas como la santonina.

Las lactonas sesquiterpénicas¹⁴ están formadas generalmente por tres unidades isoprenicas, una de las cuales forma parte de una lactona; en ocasiones no se presentan los 15 átomo de carbono correspondientes a un sesquiterpeno debido a transformaciones biogenéticas que ocurren dentro de la planta.

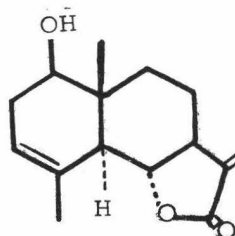
Las lactonas sesquiterpénicas en general se han clasificado de acuerdo al esqueleto fundamental del hidrocarburo del cual se derivan¹², pudiéndose encontrar los siguientes:

- a).- Eudesmenólidos.
- b).- Elemenólidos.
- c).- Guayanólidos.
- d).- Germacranólidos.
- e).- Pseudoguayanólidos.

Los eudesmenólidos están formados por la fusión de dos anillos de 6 miembros, uno de los cuales está unido a una lactona. Presentan un esqueleto fundamental que deriva del selineno (α, β, γ). Como ejemplo de ellos se tienen:

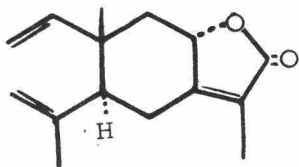


α santonina

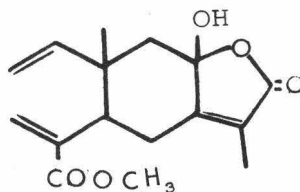


Santa Marina

Los elemenólidos están formados por un anillo de 6 miembros, una lactona cerrada a C-6 ó C-8 y dos unidades etilénicas, una unida a C-10 y otra a C-5, pudiéndose presentar grupos funcionales como aldehído, etc. Su esqueleto fundamental deriva del elemeno (α , β , δ). Como ejemplos se tienen:

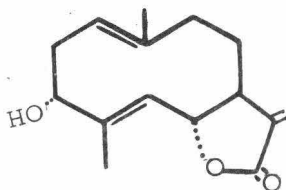


isogermafurénolido



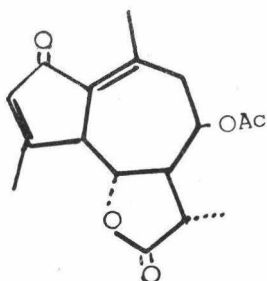
sericealactona

Los germacránolidos están formados por un anillo de 10 -- miembros conjugado con una lactona. Su esqueleto fundamental deriva de los germacranos A,B,C y D. Como ejemplo se tiene:



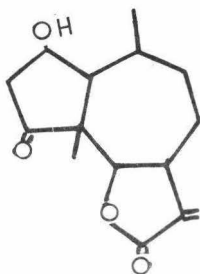
tamaulipina B

Los guayanólidos presentan el esqueleto del guayano, estando el anillo de 7 miembros fusionado a una lactona. Como ejemplo se tiene:

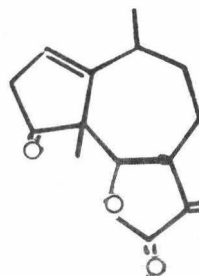


matricarina

Los pseudoguayanólidos ¹⁵ presentan el mismo esqueleto que los guayanólidos, sólo que el metilo de C-4 se encuentra en C-5. Dentro de este grupo, se encuentran los compuestos tratados en esta tesis. Los pseudoguayanólidos han sido aislados generalmente de la familia de las Compuestas: dentro de la tribu Helianthea y Helenium, en los géneros Ambrosia, Iva y Parthenium; y dentro de la tribu Heleniae, de los géneros: Gaillardia y Balduina. Como ejemplo de pseudoguayanólidos se tienen los siguientes: histerina, ambrosina, partenina, bipinatina, neoambrosina, etc



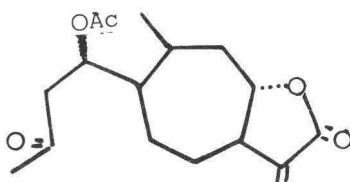
bipinatina



neoambrosina

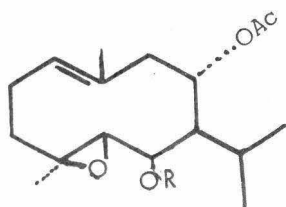
Actividad biológica.-

Algunos sesquiterpenos son hormonas vegetales, como el ácido abscísico, una de las hormonas inhibidores más importantes de la planta; interviene directamente en el control del crecimiento de la planta estando muy relacionada su función con otras hormonas de la planta. Existen otros compuestos de importancia menor pero que también intervienen en el crecimiento de las plantas, como la xantina¹⁶, presente en muchas especies de Xanthium



xantina

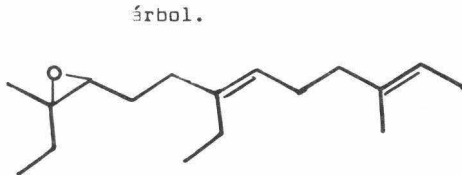
Se han aislado sesquiterpenos que poseen efecto fagorepelente sobre algunos insectos, ocasionando la inanición de los mismos siendo ésto un medio de controlar plagas. En 1968, se aisló el shiromodiol y el diacetato de shiromodiol, observándose en ellos este efecto.



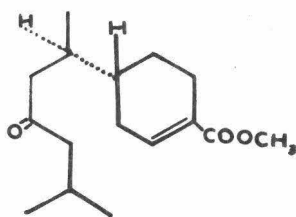
R = H acetato de shiromodiol

R = Ac diacetato de shiromodiol

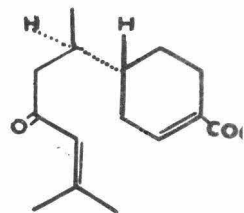
La hormona juvenil¹¹, un sesquiterpeno secretado por la "corpora allata", es una de las hormonas que controlan el desarrollo de los insectos. Hay algunas sustancias aisladas de ciertas coníferas que tienen acción de hormona juvenil, como la juvabiona y la dehidrojuvabiona¹⁷, cuya presencia causa a los insectos que la ingieran, una detención de su desarrollo postembrionario; siendo ésto una manera de autodefensa del árbol.



hormona juvenil

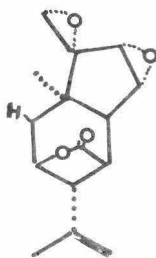


juvabiona

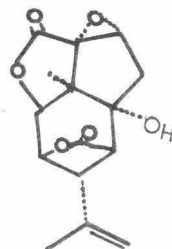


de hidrojuvabiona

Existen sesquiterpenos altamente tóxicos, como son las toxinas del grupo picrotoxina y coriamirtina¹⁸. La picrotoxina es una sustancia de estructura complicada que causa una excitación intensa del sistema nervioso central; la coriamirtina y sus derivados hidroxilados presentan una acción similar a la picrotoxina; además causan una estimulación de la respiración y del centro vasomotor del cerebro.

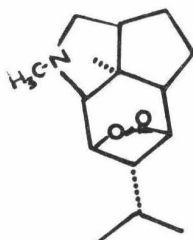


coriamirtina



picrotoxina

Algunos alcaloides sesquiterpénicos presentan toxicidad, el principal de ellos es la dendrobina¹⁹, que presenta efectos farmacológicos similares a la picrotoxina; en dosis pequeña es analgésica y antipirética, y disminuye la actividad cardíaca; en grandes dosis, causa convulsiones.



dendrobina

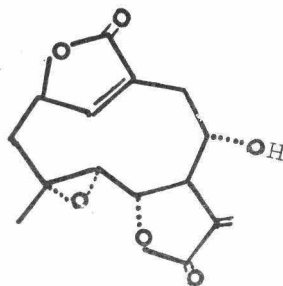
Como se observará los sesquiterpenos son muy versátiles, no solamente se han aislado de plantas, sino que se han obtenido de hongos con propiedades antibióticas, como la Verrucarina²⁰.

Recientemente se ha tomado interés en el hecho de que algunas lactonas sesquiterpénicas juegan un papel importante en la acción inhibidora "in vitro" de células de carcinoma humano.¹¹ Se han aislado lactonas sesquiterpénicas con esta acción, especialmente en plantas de la familia de las Compuestas. Cabe mencionar que durante mucho tiempo, algunas de estas sustancias tuvieron uso medicinal como tónicos.

Se ha observado que la presencia del metileno exocíclico de la lactona es esencial para la actividad citotóxica de estos compuestos y que la presencia de funciones adicionales puede -

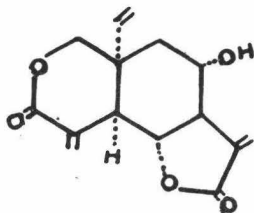
influir en la actividad²¹; además con el aumento de la lipofili-
 cidad aumenta la actividad. Se ha mostrado que el metileno de
 la lactona reacciona con la cisteína formando aductos estables
 y que su toxicidad está relacionada con la adición tiol; las -
 lactonas endocíclicas insaturadas reaccionan muy lentamente con
 la cisteína formando aductos inestables, por lo que son inacti-
 vos. Se han realizado experimentos para evaluar qué grupos fun-
 cionales contribuyen a la actividad citotóxica, ya sea aumentán-
 dola ó disminuyéndola; a estos grupos se les llamó grupos funcio-
 nalmente activos.

La elefantopina²¹, una lactona sesquiterpénica de gran cito-
 toxicidad, se sometió a diversas reacciones para obtener deriva-
 dos y determinar grupos funcionales activos. Los derivados obteni-
 dos por reducción fueron inactivos: la tetrahidroelefantopina y
 la hexahidroelefantopina. El derivado isomérico isobutirato de di-
 hidroelefantol mostró poca actividad; y así se realizaron otras
 series de derivados, concluyéndose que la lactona al igual que el
 metileno exocíclico contribuían esencialmente a la citotoxicidad
 y que además el ester conjugado de la cadena lateral aumentaba -
 esta toxicidad. La lactona²¹ endocíclica fué inactiva.



elefantopina

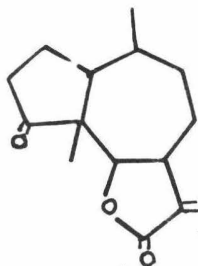
Una especificidad similar de los grupos funcionales activos, se encontró en los derivados de la vernolepina²¹. Mientras que la hexahidrovernolepina era inactiva, la dihidrovernolepina era tan activa como la vernolepina misma, ésto implicaba que el grupo metileno de la lactona era activo. La tetrahidrovernolepina, en el que el metileno de la lactona está saturado, muestra una disminución considerable en su actividad. Se hicieron otros experimentos similares y se encontró que la presencia de un ester conjugado, de un ciclopenteno y de un metileno a una lactona adicional, aumentaban la actividad. Además de los grupos funcionales activos existen otros parámetros que influyen en su actividad; puesto que parece ser que la citotoxicidad depende de la habilidad del compuesto para reaccionar con tioles, se pensó que la velocidad de adición del tiol influía en la actividad. Un grupo adyacente al metileno de la lactona como oxhidrilos aumenta la velocidad de adición de la cisteína.



Vernolepina

Aproximadamente se han reportado 50 lactonas sesquiterpénicas que muestran citotoxicidad. La damsina, un compuesto trata-

do en esta tesis, muestra una acción anticancerígena.

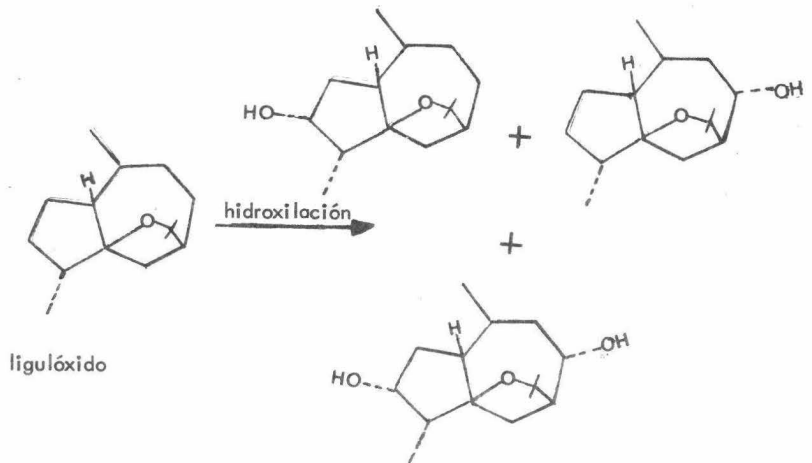
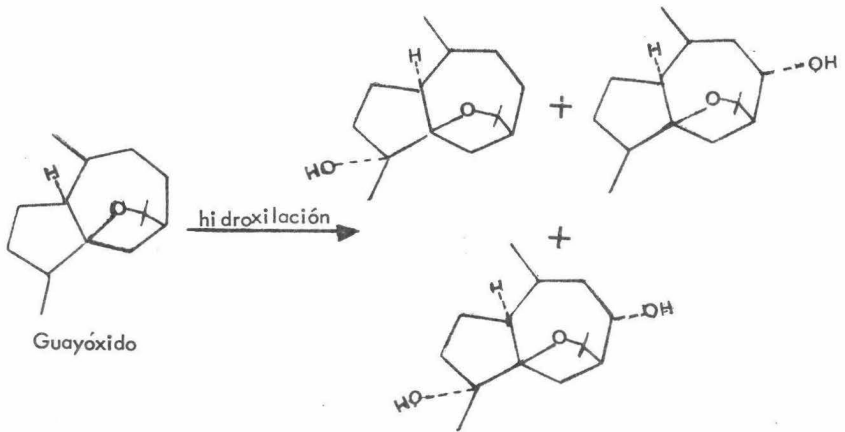


damsina

Transformaciones microbiológicas de sesquiterpenos.-

Las aplicaciones microbiológicas en este campo están muy poco desarrolladas; solamente se han utilizado en hidroxilaciones de guayóxidos^{3,22} y ligulóxidos²⁴ en posiciones específicas, difíciles de obtener químicamente.

TRANSFORMACIONES MICROBIOLÓGICAS DE GUAYOXIDOS
Y LIGULOXIDOS



De las familias de las Compuestas se han aislado gran cantidad de lactonas sesquiterpénicas, especialmente en el género Parthenium.

PARTHENIUM

El género Parthenium²⁵, proviene según un estudio hecho por Rollins (1950) del nombre dado por Linneo en su libro "Especies - Plantarum" y se basó en dos especies herbáceas: P. hysterothorus de la Isla de Jamaica y P. integrifolium de Virginia. Posteriormente se descubrieron numerosas especies (algunas leñosas) de este género, las cuales se clasifican en 4 secciones:

SECCION	ESPECIE
I.- Argyrochaeta	<u>P. hysterothorus</u>
	<u>P. bipinnatifidum</u>
	<u>P. confertum</u>
II.- Bolophytum	<u>P. ligulatum</u>
	<u>P. alpinum</u>
III.- Partheniastrum	<u>P. integrifolium</u>
	<u>P. hispidum</u>
IV.- Parthenichaeta	<u>P. tomentosum</u>
	<u>P. fruticosum</u>
	<u>P. cineraceum</u>

P. schottii

P. lozanium

P. argentatum

P. incanum

Haciendo una comparación muy general de sus características morfológicas más sobresalientes de estas secciones, se tiene lo siguiente:

Raíces.- En la sección Bolophytum , las raíces son generalmente expandidas a la corona. En la sección Partheniastrum, las raíces son distintivas porque son muy gruesas semejando un tubérculo. En la sección Parthenichaeta, el P. argentatum (guayule) presenta una tendencia de las raíces a exparcirse lateralmente penetrando a poca profundidad (no mayor de dos pies).

Tallos.- Existen en este género una gran variedad de tallos. En la sección Bolophytum, los tallos son herbáceos cortos y no presentan una clara separación con la raíz. En las secciones Partheniastrum y Argyrochaeta, se presentan - tallos herbáceos elongados; en esta primera sección las plantas son perennes, mientras que en la segunda hay especies anuales tales como P. hysterochorus y P. bipinnatifidum. En la sección Parthenichaeta, los tallos son leñosos y usualmente producen flores cuando los tallos aún herbáceos están en su primer año de crecimiento. Se encuentran tanto arbustos como árboles pequeños.

Hojas.- En este género, el tipo de hojas es muy variado. Por un extremo están las no diferenciadas, hojas achatadas, en las que es difícil distinguir entre peciolo y lámina, - éstas se presentan en la sección Bolophyta. Y por el - otro extremo, están las diferenciadas de las secciones Partheniastrum y Argyrochaeta, en esta última se distin gue un gran peciolo y las hojas están altamente dividi- das en tanto que, en la sección Partheniastrum se pre- sentan hojas enteras.

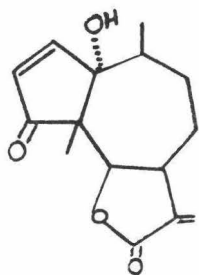
Tricomas.- Todas las especies de Parthenium están al menos par- cialmente cubiertas con tricomas. En algunas especies como P. argentatum, P. incanum y P. tomentosum presen- tan un recubrimiento total.

Flores y fruto.- Cabezuelas casi umbeladas en el extremo de las ramas, heterógamas, con las flores periféricas uniseria- das, femeninas, fértiles, pocas y cortamente liguladas; las flores del disco, tubulosas con pistilo abortado y estambres fértiles. Involucro acampanado ó hemisférico, con dos series de brácteas. Receptáculo con tricomas que envuelven las flores. Los aquenios de las flores peri- féricas comprimidos desde el dorso con una cresta en la cara inferior, con dos ó tres cerditas de vilano y con - alas laterales.

Cuando se trabaja una planta es indispensable la identifica- ción plena de élla, basándose primeramente en su taxonomía, se

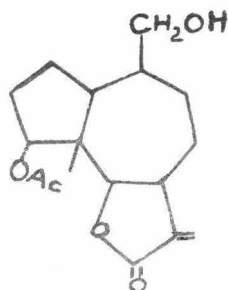
examinan ordenadamente sus características morfológicas sobresalientes hasta llegar a diferencias sólo de especie. Sin embargo, en ocasiones hay confusión en su clasificación debido a semejanzas muy cerradas, por lo que una manera definitiva de identificarla es basándose en su quimiotaxonomía, es decir, en la composición química característica de la planta. Este es el caso de la sección *Argyrochaeta*, en que las especies *P. hysterochophorus* y *P. bipinnatifidum* muestran gran similitud morfológica, siendo su composición química una manera definitiva de distinguirlas.

El *P. hysterochophorus* tiene como compuesto característico a la partenina²⁶, una lactona sesquiterpénica ($C_{15}H_{18}O_4$) de tipo pseudoguayanólido.



partenina

El *P. bipinnatifidum*, tratado en esta tesis, presenta como componente característico a la histerina²⁷, que frecuentemente viene acompañada de ambrosina²⁶, un pseudoguayanólido $C_{15}H_{18}O_3$.



histerina

PARTE TEORICA

A principios del mes de octubre de 1973, se recolectó de los alrededores de Matehuala, S.L.P., un lote de la planta --- anual Parthenium bipinnatifidum (Ortega)Rollins. La planta --- fresca fué almacenada por dos semanas, durante las cuales se - desarrollaron en abundancia diversas variedades de hongos.

La planta en estas condiciones fué trabajada en la forma acostumbrada, en busca de lactonas sesquiterpénicas, esperando encontrar histerina(1), que es la lactona más característica de P. bipinnatifidum; se esperaba también encontrar ambrosina - (2), damsina (3) ó ambas lactonas, ya que frecuentemente se encuentran las dos ó una de ellas acompañando a la histerina.

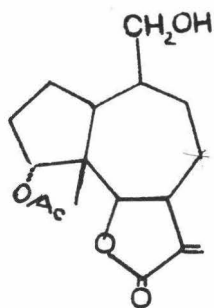
La composición de la planta fué en este caso bastante ex--- traña, ya que no se pudo aislar la histerina²⁷, el componente - característico de esta especie, obteniéndose en cambio dos --- pseudoquayanólidos, damsina²⁸ y franserina (4)²⁹.

La presencia de franserina, una substancia nunca antes ais- lada de esta especie(siendo ésta la segunda vez que se obtiene de fuente natural) nos hizo sospechar que la composición hubie- se variado debido a la acción de los hongos que se desarrolla- ron al almacenar la planta.

Para tratar de demostrar ésto, se realizó un experimento - en el cual un lote de P. bipinnatifidum recolectado en los alre- dedores de Ciudad Universitaria se dividió en dos partes, la par

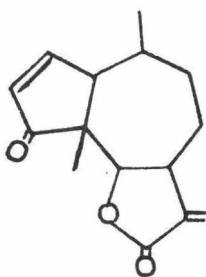
ESQUEMA 1

LACTONAS SESQUITERPENICAS



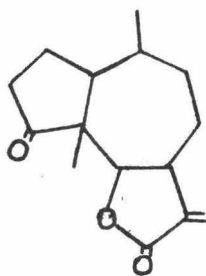
(1)

La histerina es un pseudoguyanólido de punto de fusión 167-168°C, de análisis $C_{17}H_{24}O_5$. Aislado por primera vez de un P. --- bipinnatifidum en este Instituto por el Dr. Romo de Vivar y colaboradores.



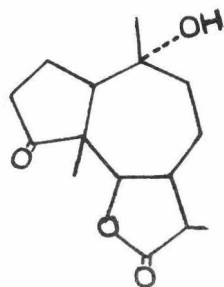
(2)

La ambrosina es un pseudoguyanólido de punto de fusión 146°C, de análisis $C_{15}H_{18}O_3$. Aislada de Ambrosia marítima.



(3)

La damsina es un pseudoguyanólido de punto de fusión 107°C, de análisis $C_{15}H_{20}O_3$. Aislada de Ambrosia marítima.



(4)

La franzerina es un pseudoguyanólido de punto de fusión 226-227°C, de análisis $C_{15}H_{22}O_4$. Aislada de la Franseria ambrosioides por el Dr. --- Romo y colaboradores.

te I se trabajó de inmediato en tanto que la parte II se almacenó fresca para que se desarrollaran espontáneamente los hongos que acostumbran a crecer en la planta.

Análisis de la parte I.-

El extracto clorofórmico de este lote pesó 29 gr y de él se obtuvieron 952 mg de histerina y la detección de ambrosina por cromatografía en placa fina.

Análisis de la parte II.-

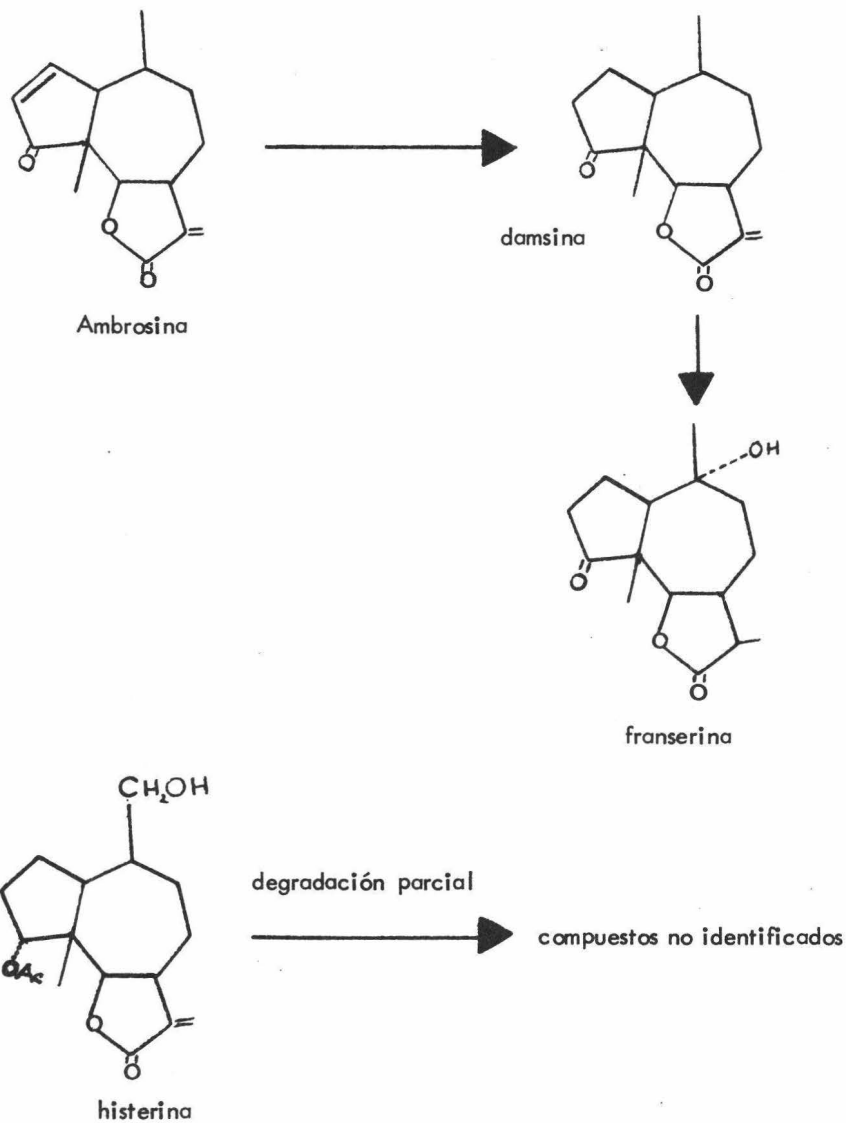
El extracto clorofórmico de este lote pesó 52 gr y se obtuvieron 820mg de histerina, y de las fracciones más polares se aislaron 70 mg de franserina.

Haciendo una comparación de los análisis I y II se puede observar lo siguiente: (Ver gráfica 1)

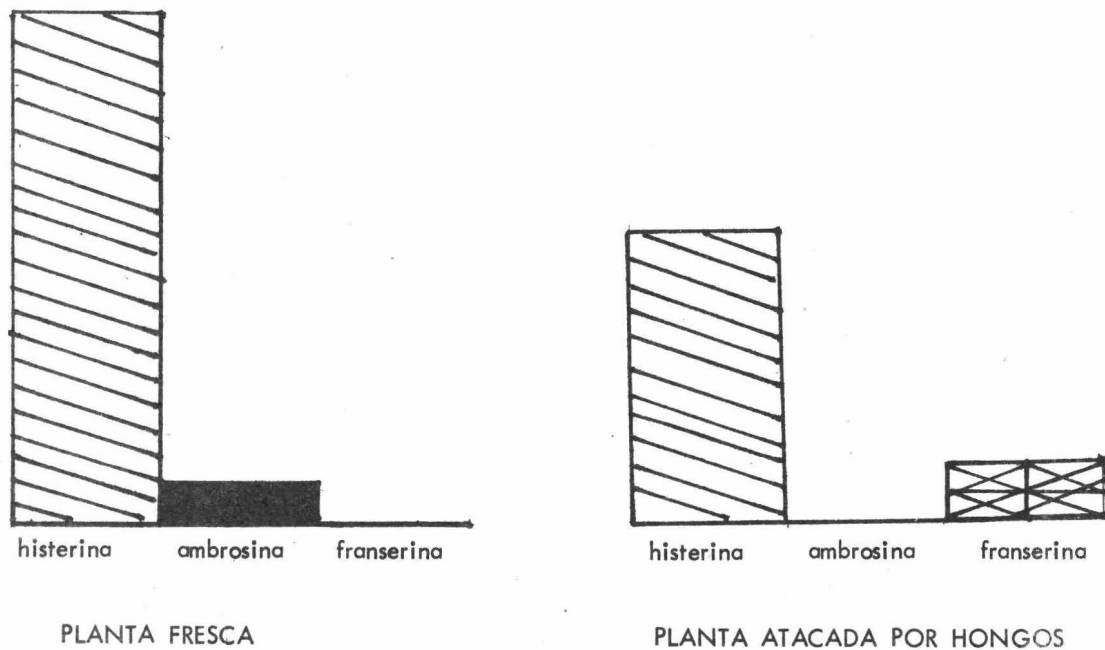
- a) La disminución tan notable en el porcentaje de histerina de 3.2 a 1.5%(de I a II).
- b) La presencia de ambrosina en I y la desaparición de élla en II.
- c) La presencia de franserina en II.

Considerando estos hechos, se puede deducir que la histerina es degradada parcialmente por los hongos en compuestos que no se pudieron identificar y que la ambrosina debe ser transformada en franserina ya que se sabe que algunos hongos frecuentemente saturan dobles ligaduras conjugadas; por lo que muy probablemente primero transformen la ambrosina a damsina, la que será posteriormente saturada e hidroxilada en la posición terciaria C-10.- (esquema 2).

T TRANSFORMACIONES MICROBIOLÓGICAS DE LOS SESQUITERPENOS DEL
PARTHENIUM BIPINNATIFIDUM



GRAFICA 1
CONTENIDO EN SESQUITERPENOS



Es conocido que algunos hongos hidroxilan posiciones terciarias con cierta facilidad, lo cual se ha observado en las hidroxilaciones microbiológicas de esteroides^{1,6}. Para estas reacciones microbiológicas se han propuesto diversos mecanismos según el compuesto en cuestión. Estos mecanismos se basan en los siguientes hechos comprobados experimentalmente:^{5,10}

- a).- El átomo de oxígeno que interviene en la oxidación proviene del oxígeno atmosférico.
- b).- La estereoquímica del átomo de carbono oxidado se preserva (la configuración del grupo oxhidrilo introducido es la misma que la del grupo hidrógeno desplazado).
- c).- La oxidación se lleva a cabo por medio de una sustitución directa del hidrógeno, la cual implica la participación de enzimas.

Anteriormente se había trabajado el P. bipinnatifidum fresco de la región de Matehuala en este Instituto, habiéndose encontrado histerina y ambrosina, como constituyentes más abundantes y damsina en una proporción menor.

En base a lo anterior se puede considerar el caso de Matehuala(planta trabajada en esta ocasión) como un extremo: no se encontró presencia de histerina, mientras que tanto damsina como franserina se encontraron en proporciones considerables. De esto puede deducirse que en el lote de Matehuala se habían efectuado en su mayor parte los procesos de transformación microbiológica de los componentes de la planta.

Es evidente que la hipótesis anterior puede comprobarse - aislando los hongos de la planta e incubándolos directamente con ambrosina. De esta forma se conocería cual de ellos satura dobles ligaduras y cual hidroxila posiciones terciarias. Como no fué posible aislar dichos hongos, ya que esta planta anual fué trabajada en una época en que estaba finalizando su ciclo vital, se utilizó Fusarium moniliforme (Sheld), que era uno de los cultivos - que se tenían en forma accesible.

Se experimentó también con cultivos de Aspergillus flavus - (Link- ex Fr.), que no proporcionaron resultados satisfactorios, por lo que se complementaron los experimentos empleando únicamente el F. moniliforme.

Se realizaron diferentes incubaciones con este hongo, usando ambrosina como sustrato, con el fin de conocer el tiempo óptimo de reacción.

De la incubación realizada durante 7 días se obtuvo en su mayor parte, ambrosina recuperada y damsina.

La incubación realizada durante 11 días dió resultados óptimos, ya que se obtuvo damsina en cantidad preponderante, aunque también se logró identificar una cantidad muy pequeña de ambrosina.

De la incubación realizada durante 18 días, se observaron - diversos compuestos por cromatografía en placa fina, de los cuales solamente se identificaron ambrosina recuperada y damsina, ambas presentes en cantidad mínima.

Por lo que se tomó como tiempo adecuado de incubación el de 11 días, ya que produjo los resultados más satisfactorios.

El hecho de haber obtenido damsina por la acción microbiológica sobre ambrosina, es un medio de comprobación parcial de la hipótesis y de cierta manera confirma la suposición de que preponderantemente se satura la doble ligadura conjugada con la cetona en posición 4.

Posteriormente se llevó a cabo la incubación empleando damsina como sustrato durante un tiempo de 11 días, con el fin de verificar la formación de franserina. Sin embargo lo que se aisló como uno de los productos principales de esta reacción fué la dihidrodamsina (la cual se identificó por comparación con una muestra auténtica), se aisló también damsina recuperada.

De ésto podría pensarse que un intermediario en la transformación de damsina a franserina es la dihidrodamsina, resultante de la saturación del metileno exocíclico de la lactona.

Finalmente se realizó la incubación de histerina con este hongo durante 10 días. Por cromatografía en placa fina se observó una serie de productos intermedios menos polares que la histerina, difícilmente identificables por su mínima cantidad; además se observó la presencia de histerina recuperada como compuesto más abundante.

Como conclusión de los experimentos descritos, se puede decir que este hongo no efectúa la introducción de un grupo oxhidrilo en el átomo de c-10 del pseudoguayánolido, aunque si satura -

las dobles ligaduras de éste, comprobándose de cierta manera la tesis inicial.

Este trabajo se piensa completar posteriormente procurando identificar y estudiar las capacidades bioquímicas de los hongos desarrollados en la planta y probando la eficacia de cada uno de ellos con el sustrato específico. Igualmente se piensa extender la aplicación del trabajo a otros aspectos de la química de sesquiterpenos.

PARTE EXPERIMENTAL

PARTHENIUM BIPINNATIFIDUM DE ACTOPAN, HGO.-

El P. bipinnatifidum fué recolectado en el mes de septiembre alrededor del Km 90 de la carretera México-Laredo. La planta fresca y picada (recipiente pirex de 19 l.) se sometió a tres extracciones etanólicas en caliente, las cuales se concentraron a la mitad de su volumen, se reunieron y se defecaron con acetato de plomo; los lodos se eliminaron filtrándose con ayuda de celita, el filtrado se concentró y se extrajo tres veces con cloroformo.

La fase orgánica se lavó con agua para eliminar cualquier residuo etanólico y se secó con sulfato de sodio anhidro; el cloroformo se evaporó a sequedad, dejando un extracto que pesó 43 gr el cual se cromatografió* en una columna usando 860 gr de alúmina que se empezó a eluir con una mezcla benceno- hexano (90:10).

De la fracción eluida con benceno-acetato de etilo (80:20) se obtuvo una substancia cristalina con un punto de fusión** de 159-165°C, la cual se recrystalizó en acetona-hexano, obteniéndose 1.75gr de substancia con un punto de fusión de 166-167°C. La comparación de sus datos espectroscópicos (IR y RMN) y de su punto de fusión, dió que esta substancia correspondía a histerina. - Además se tomó el punto de fusión mezclado uniformemente con

* Para las cromatografías se usó alúmina Alcoa F-20.

** Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no estan corregidos.

una muestra auténtica de histerina, no observándose cambio en su valor. Se hizo una comparación en cromatoplaaca coincidiendo su Rf con el de histerina.

PARTHENIUM BIPINNATIFIDUM DE MATEHUALA, S.L.P.

Se recolectó Parthenium de esta especie en el mes de octubre en los alrededores de Matehuala; debido a que la planta se mantuvo almacenada en costales durante dos semanas fué atacada por hongos. La planta picada se extrajo con etanol en dos recipientes pirez de 19 l., siguiéndose el procedimiento del experimento anterior. Se obtuvo un extracto con un peso de 86.3 gr, el cual se cromatografió en columna usando 1.646 kg de alúmina e iniciándola con benceno.

De las fracciones eluidas con benceno-acetato de etilo (90:10) se obtuvo una substancia cristalina de punto de fusión 98º-104ºC, la cual se recrystalizó en acetona-eterisopropílico, se obtuvieron --- 1.305 gr. de una substancia con un punto de fusión 225º-227ºC. Esta substancia correspondió a franserina, llegándose a esta conclusión por comparación de sus datos espectroscópicos (IR^{***} y RMN^{****}) y de sus constantes físicas (punto de fusión y Rf).

*** Los espectros de IR fueron determinados por el M. en C. Noé Rosas, en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 337 en solución clorofórmica.

**** Los espectros de RMN los determinó el M. en C. Eduardo Díaz en espectrométros A-60 y HA-100 en solución de deutero cloroformo.

PARTHENIUM BIPINNATIFIDUM DE CIUDAD UNIVERSITARIA.-

Se hizo una recolección de P. bipinnatifidum en los alrededores de la UNAM en el mes de noviembre. Parte de esta recolección se sometió inmediatamente al procedimiento de extracción -- (en matraz de 5 l.) usado en los experimentos anteriores, obteniéndose un extracto de 29 gr., el cual se cromatografió en columna usando 580 gr de alúmina lavada e iniciándola con una mezcla hexano-benceno(10:90).

De las fracciones obtenidas con benceno-acetato de etilo -- (85:15) se pudo detectar por cromatografía en placa fina la presencia de ambrosina, la cual no se pudo aislar debido a la pequeña cantidad presente, pero se identificó por comparación de su R_F con una muestra auténtica.

De las fracciones eluidas con benceno-acetato de etilo (75:25) se obtuvo histerina con un punto de fusión de 1550-1610C, la cual se recrystalizó en acetona-hexano, obteniéndose 952mg con un punto de fusión de 1650-1670C, identificándose ésta por comparación con una muestra auténtica.

El resto del lote se dejó podrir por 15 días, al cabo de los cuales la planta estaba atacada por hongos, procediéndose a la extracción por el método ya descrito, obteniéndose un extracto de 52 gr., ésta se cromatografió en columna usando 1.1kg de alúmina lavada e iniciándola con benceno.

De las fracciones eluidas con benceno-acetato de etilo (80:20) se obtuvo histerina con un punto de fusión de 1600-1660C, la cual recrystalizada con acetona-hexano dió un punto de fusión de

166^o-167^oC con un peso de 820mg.

De las fracciones eluidas con benceno-acetato de etilo (60:40) se obtuvo una sustancia cristalina muy impura de un punto de fusión de 218^o-227^oC, pesando 152mg, recristalizándose en acetona-eter isopropílico, obteniéndose 70 mg con un punto de fusión de 226-227^oC, la que se identificó como franserina por comparación de sus constantes físicas (rF y punto de fusión) con una muestra auténtica, además se observó que no variaba el punto de fusión de una mezcla uniforme de esta sustancia con la muestra de franserina.

PARTHENIUM BIPINNATIFIDUM DE D.F. (salida camino a Puebla)

Se recolectó P. bipinnatifidum en los límites del D.F. (camino a Puebla) en el mes de enero. Se procedió a trabajar la planta en la forma ya descrita en los experimentos anteriores. Se obtuvo un extracto de 10gr., el cual se cromatografió en columna - usando 200gr de alúmina e iniciándola con benceno.

De las fracciones eluidas con benceno-acetato de etilo (80:20) se obtuvo una sustancia cristalina de un punto de fusión de 161^o-165^oC, la que se recristalizó en acetona-hexano, obteniéndose un producto con un punto de fusión de 167^oC, con un peso de - 652 mg, la cual se identificó como histerina por comparación con una muestra auténtica.

EXPERIMENTO CON HONGOSINCUBACION DE ASPERGILLUS FLAVUS CON AMBROSINA DURANTE
7 DIAS

Se incubo A. flavus en un medio líquido de extracto de malta (DIFCO) a una temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, con agitación constante de 90 oscilaciones/min; después de las primeras 24 horas se agregó al medio 40 mg de ambrosina continuándose la incubación durante 7 días más. Posteriormente se sometió a tres extracciones con cloroformo, las fracciones clorofórmicas se reunieron y enseguida se secaron con sulfato de sodio anhidro, al evaporarse a sequedad dejó un residuo blanquecino que por cromatoplaaca mostró 5 manchas. Estos compuestos fueron separados por cromatografía en capa fina usándose como eluyente una mezcla de benceno-acetato de etilo (80:20) corrida tres veces. El compuesto menos polar se atribuye como metabolito del hongo.

Debido a la mínima cantidad presente de cada compuesto, sólo se pudieron identificar por cromatoplaaca dos compuestos: ambrosina recuperada (que era el compuesto más abundante) y damsina.

INCUBACION DE FUSARIUM MONILIFORME CON AMBROSINA DURANTE
7 DIAS.

Se incubo el hongo por 24 horas en las mismas condiciones que el experimento anterior, sólo que esta vez se agregó 40 mg de ambrosina. Se le hicieron tres extracciones con cloroformo, se lavó con agua y la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhi-

dro, se evaporó a sequedad quedando un residuo rojizo que por cromatoplaça denotó 4 compuestos, los cuales fueron separados por cromatografía en placa fina usando una mezcla de acetato de etilo-benceno (20:80) corrida dos veces.

Se obtuvieron dos compuestos cristalinos que se identificaron como ambrosina (compuesto más abundante) y damsina, identificándose éstos por comparación con muestras auténticas.

Los demás compuestos no se pudieron identificar debido a su mínima cantidad presente, siendo el compuesto menos polar un metabolito del hongo.

INCUBACION DE FUSARIUM MONILIFORME CON AMBROSINA DURANTE 11 DIAS.

Se incubó el hongo en las mismas condiciones que el experimento anterior, sólo que ahora se agregó 120 mg de ambrosina y la incubación duró 11 días; se procedió a extraerlo por el método seguido en los experimentos anteriores, obteniéndose un residuo rojizo que por cromatoplaça mostraba cuatro compuestos, los cuales fueron separados por cromatografía en placa fina usando una mezcla de benceno-acetato de etilo (90:10) como eluyente.

Uno de los compuestos cristalizó y se identificó como damsina, obteniéndose 55 mg con un punto de fusión de 96^o-104^oC, se cristalizó en acetona-eter isopropílico obteniéndose 42 mg con un punto de fusión de 106^o-107^oC.

Los otros compuestos no se pudieron identificar ya que se presentaban en una mínima cantidad, excepto uno de ellos que se

identificó como ambrosina por comparación de su Rf con una -- muestra auténtica.

INCUBACION DE FUSARIUM MONILIFORME CON AMBROSINA DURANTE 18 DIAS.

La incubación del hongo se hizo siguiendo el mismo procedimiento anterior excepto que ahora se trabajó con 80 mg de ambrosina y la incubación duró 18 días. El residuo rojizo obtenido después de la extracción con cloroformo mostraba la presencia de cuatro compuestos, los cuales fueron separados por cromatografía en placa fina usando una mezcla de benceno-acetato de etilo (70:30) como eluyente.

Uno de los compuestos menos polares denotó ser un hidrocarburo por infrarrojo. La siguiente mancha mas polar en la cromatopla en realidad correspondía a dos compuestos, uno de los cuales se identificó como damsina por comparación de sus constantes físicas y por su espectro de IR, no pudiéndose identificar el otro.

INCUBACION DE FUSARIUM MONILIFORME CON DAMSINA DURANTE 11 DIAS

Se incubó el hongo en las condiciones de los experimentos anteriores. Se trató 80 mg de damsina con este hongo durante 11 días obteniéndose después del proceso de extracción con cloroformo, un residuo que por cromatopla mostraba tres compuestos principales.

Estos compuestos se separaron por cromatografía en placa fina usando una mezcla de benceno- acetato de etilo (80:20) como -

eluyente.

El compuesto menos polar se atribuye como metabolito del hongo.

Uno de los compuestos resultó cristalino (30mg) con un punto de fusión de 99^o- 102^oC, que se identificó como damsina por comparación con una muestra auténtica.

El otro compuesto se obtuvo en una cantidad pequeña pero se pudo identificar por sus constantes físicas como dihidrodamsina por comparación con una muestra auténtica.

INCUBACION DE FUSARIUM MONILIFORME CON HISTERINA DURANTE 10 DIAS

Se realizó la incubación del hongo por el mismo procedimiento usado en todos estos experimentos. Se trató 120 mg de histerina durante 10 días, al cabo de los cuales se le hizo una extracción con cloroformo, obteniéndose un residuo que mostraba la presencia de varios compuestos por cromatoplaque, siendo tres los más abundantes, éstos se separaron por cromatografía en placa fina usando como eluyente una mezcla de acetato de etilo-benceno (50:50).

El compuesto menos polar se atribuye como metabolito del hongo. El otro compuesto más polar no se pudo identificar debido a la cantidad presente. El compuesto más polar (60mg) correspondió a histerina, identificada por comparación con una muestra auténtica.

CONCLUSIONES

Los hongos que crecen en la planta (Parthenium bipinnatifidum) cuando ésta es almacenada fresca, producen modificaciones en la estructura de sus sesquiterpenos característicos.

La ambrosina es transformada microbiológicamente a franserina, teniendo como intermediario a la damsina.

La histerina es parcialmente degradada por los hongos en compuestos no identificados todavía.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Capek, A., Oldrich, H. and Milan, T.
Microbial transformation of steroids.
pags. 19-40
Academic Publishing House of the Czechoslovak Academic
of Science.
Praga (1966).
- 2.- Peterson, D.H. and Murray, H. Microbiological oxygenation
of steroids to carbon 11. J. Am. Chem. Soc. 74, 1871 (1952).
- 3.- Casas-Campillo, C., Bower, A. and Djerassi, C. Microbiological
oxidations of 19-norprogesterone. Tetrahedron. 2, 164-166
(1958).
- 4.- Ishii, H., Tozjo, T and Minato, H. Structure elucidation of -
gualoxide by microbial oxidation. Chem. Comm. 12, 649 (1968).
- 5.- Rodríguez, E., Hirotsuke, Y. and Mabry, T. The sesquiterpene α -
lactones chemistry of genus Parthenium (Compositae). ---
Phytochemistry. 10, 1145 (1971).
- 6.- Charney, W. and Harshel, L.
Microbial transformation of steroids. A handbook.
Academic Press.
New York (1967).
- 7.- Cope, A. C., Martin, M., and McHarvey. The microbiological
hydroxylation of steroids. Quartely Review. 20, 119 (1966).
- 8.- Kramli, A. and Horvath, J. Microbiological oxidation of -
steroids. Nature. 162 (1958).
- 9.- McGuire, L.S. Formation of testosterone acetate by Saccharo
myces fragilis. Biochem. biophys. acta. 45, 392 (1958).
- 10.- Hayano, M. Hydroxylation of steroids by microorganism in the
presence of O₂. Biochem. biophys. acta. 21, 380 (1958).

- 11.- Goodwin, T. W.
Aspects of Terpenoids chemistry and biochemistry.
pags. 70-92
Academic Press.
New York (1971).
- 12.- Newman, A. A.
Chemistry of terpens and perpenoids.
Fags. 88-145.
Academic Press.
New York (1972).
- 13.- Devon, T.K. and Scott, A.I.
Handbook of naturally occurring compounds.
Vol. II Terpens. Pags. 55-184.
Academic Press.
New York (1972).
- 14.- Domínguez, X.
Métodos de investigación fitoquímica.
Cap. VII. Lactonas sesquiterpénicas. Pags. 93-110.
Ed. Limuss.
México (1973).
- 15.- Romo, J and Romo de Vivár, A.
Progress on the chemistry of organic natural productos.
Tomo XXV. The Pseudoguaianolide. Pags. 90-125.
Springer-Verlag/wien.
Austria (1967).
- 16.- Winter, T.E. and Gueisman, L. Sesquiterpens lactones of Xanthium species. J. Org. Chem. 34, 153 (1969).
- 17.- Cerny, V. Dolejs, L. Labler, L. Dehidrojuvabione- a new compound with juvenile hormone activity from Balsam fir. Coll. Czech. chem. comm. 32, 3926 (1967).
- 18.- Yamamura, S. and Hirata, Y. Structure of nobiline and dendrobine
Tetrahedron letter. 79 (1965).
- 19.- Porter, L.A. Picrotoxinin ans relates sustence. Chem rev. 67
441 (1967).

- 20.- Gutzwiller, J. and Tamm, Ch. Uber die struktur von Verrucarin A. Helv. Chim. acta. 48, 157 (1965).
- 21.- Kupchan, M., Eaken, M.A. and Thomas, A.M. Tumors inhibitors 69. Structure-citotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones. J. Med. Chem. 14, 1147 (1971).
- 22.- Doskotch, R.W. and Hufford, C.D. Damsine. J. Pharm.Sci. 58 186 (1969)
- 23.- Ishii, H. Tozyo, T. Microbial transformation of sesquiterpenoids I. Structure -elucidation of gualaxide with the aid of microbial hydroxylation. Tetrahedron. 26, 2751 (1970).
- 24.- Funke, E. Tozyo, T. Microbial transformation of sesquiterpenoids II. Hydroxylation of liguloxide with Mucor parasiticus Bain. J.chem.soc. 19, 2548 (1970).
- 25.- Polhamus, R. G.
World Crps Series.
Rubber. Pags. 112-115.
Interscience Publishers Inc.
New York (1962).
- 26.- Herz, W. Miyazaky, M. Structures of Parthenin and ambrosin. Tetrahedron Letter. 82 (1961).
- 27.- Romo de Vivar, Bratoeff, A. and Ríos, T. Structure of hysterin A new sesquiterpene lactone. J. Org. Chem. 31, 673 (1966).
- 28.- Abu-Shady, H. A. and Soine, T.D. The Chemistry of Ambrosia maritima I. The aislation and preliminary characterization of ambrosin and damsine. J. Am. Pharm. Assoc. 42, 387 (1953).
- 29.- Romo, J. Romo de Vivar, A. and Urbina, E. Franserin and confertin. A new pseudoguaianolide isolated from Franseria and Ambrosia species. Canad. J, Chem. 46, 1535 (1968).