

34
2eJ.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO QUIMICO Y BIOLOGICO PRELIMINAR
DE Ratibida mexicana (Watson) Sharp (Asteraceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MA. DE LOS ANGELES COCOLETZI GRANDE



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1993



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 está 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.

INDICE

	PAG
LISTA DE GRÁFICAS	I
LISTA DE CUADROS	II
APENDICE 1	III
LISTA DE FIGURAS	IV
ANTECEDENTES	1
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.	12
Objetivos particulares	12
PARTE EXPERIMENTAL	14
1. Determinación de la toxicidad para el crustáceo <u>Artemia salina</u> <u>Leach.</u>	14
Preparación de las muestras.	14
Incubación de los huevecillos de <u>Artemia salina.</u>	14
Bioensayo.	14
2. Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana.	15
Microorganismos de prueba.	15
Preparación de las muestras de prueba y los testigos.	15
Preparación de los inoculos de los microorganismos de prueba	15
Siembra de microorganismos.	16
3. Determinación del efecto del extracto metanólico y fracciones primarias sobre el crecimiento radicular de <u>A.hypochondriacus</u> y <u>E.crusgalli.</u>	17

	PAG
4. Determinación del efecto sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos	17
5. Material vegetal	17
6. Extracción y fraccionamiento preliminar.	18
7. Fraccionamiento secundario del extracto hexánico.	18
8. Análisis cromatográficos.	19
 AISLAMIENTO DEL ESTIGMASTEROL Y ESTIGMAST-22-EN-3-OL.	21
 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
a) Actividades biológicas del extracto metanólico de <u>R.mexicana</u>	23
b) Actividades biológicas de las fracciones primarias derivadas del extracto metanólico activo de <u>R.mexicana</u> .	31
c) Determinación de la porción activa de la fracción hexánica mediante la determinación de la toxicidad para <u>A.salina</u>	38
d) Aislamiento y caracterización del estigmasterol y estigmast-22-en-3-ol.	44
 RESUMEN Y CONCLUSIONES.	46
 BIBLIOGRAFÍA	53

Lista de Gráficas:

		PAG
Gráfica 1	Efecto del extracto metanólico de <u>R.mexicana</u> sobre el crecimiento de <u>A. hypochondriacus</u> y <u>E.crusgalli</u>	27
Gráfica 2	Efecto del extracto metanólico de <u>R.mexicana</u> sobre el crecimiento radial de <u>Pythium sp</u>	28
Gráfica 3	Efecto del extracto metanólico de <u>R.mexicana</u> sobre el crecimiento radial de <u>Fusarium oxiporum</u>	29
Gráfica 4	Efecto del extracto metanólico de <u>R.mexicana</u> sobre el crecimiento radial de <u>Helminthosporium sp.</u>	30 ^o
Gráfica 5	Efecto de la fracción hexánica de <u>R.mexicana</u> sobre el crecimiento de <u>A.hypochondriacus</u> y <u>E.crusgalli</u> .	33
Gráfica 6	Efecto de la fracción metanólica-acuosa de <u>R.mexicana</u> sobre el crecimiento de <u>A. hypochondriacus</u> y <u>E.crusgalli</u> .	34
Gráfica 7	Efecto de la fracción hexánica del extracto metanólico de <u>R.mexicana</u> sobre el crecimiento radial de <u>Pythium sp.</u>	35
Gráfica 8	Efecto de la fracción hexánica del extracto metanólico de <u>R.mexicana</u> sobre el crecimiento radial de <u>F.oxiporum</u>	36

	PAG
Gráfica 9 Efecto de la fracción hexanica del extracto metanólico de <u>R.mexicana</u> sobre el crecimiento radial de <u>Helminthosporium sp</u>	37
Gráfica 10 Efecto de la fracción metanólica-acuosa de <u>R.mexicana</u> sobre el crecimiento radial de <u>Pythium sp</u>	39
Gráfica 11 Efecto de la fracción metanólica-acuosa de <u>R.mexicana</u> sobre el crecimiento radial de <u>Fusarium oxiporum.</u>	40
Gráfica 12 Efecto de la fracción metanólica-acuosa de <u>R.mexicana</u> sobre el crecimiento radial de <u>Helminthosporium sp</u>	41

Lista de Cuadros:	II
	PAG
Cuadro 1 Metabolitos secundarios de <u>Ratibida columnifera</u> y <u>Ratibida peduncularis</u> .	3
Cuadro 2 Citotoxicidad del extracto metanólico de <u>Ratibida latipalearis</u> .	9
Cuadro 3 Resumen del fraccionamiento biodirigido vía cromatografía en columna del extracto hexánico de <u>Ratibida mexicana</u> .	19
Cuadro 4 Sistema de elución y reactivos cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos .	20
Cuadro 5 Resumen de la cromatografía en columna de la fracción combinada IV.	22
Cuadro 6 Citotoxicidad del extracto metanólico de <u>R. mexicana</u> sobre diferentes líneas celulares derivadas de tumores humanos.	25
Cuadro 7 Fracciones secundarias de la porción hexánica con actividad tóxica contra <u>Artemia salina</u> .	43

Apendice 1

		PAG
Espectro 1	Espectro de IR del estigmasterol.	49
Espectro 2	Espectro de RMN ¹ H del estigmasterol.	50
Espectro 3	Espectro de RMN ¹³ C del estigmasterol.	51
Espectro 4	Espectro de RMN ¹ H del estigmast-22-en-3-ol.	52

ANTECEDENTES.

El género Ratibida Richards pertenece a la familia Asteraceae (tribu Heliantheae) y dos de las especies que lo comprenden son utilizadas en la medicina tradicional, Ratibida latipalearis Richards y Ratibida mexicana (Watson) W.M Sharp. La primera se utiliza en el tratamiento de heridas de la piel, inflamaciones y dolores de cabeza. Las raíces de la segunda se utilizan para el tratamiento de desordenes gastrointestinales, resfriados, reumatismo, inflamaciones de la piel, y como agua de lavado. Por otra parte, las hojas de Ratibida mexicana se utilizan para los dolores de cabeza (Richards 1969).

La Ratibida mexicana es una hierba perenne, de tallo simple que mide de 55 a 117 cm de altura, posee hojas alternas, espinosas y moteadas en ambas superficies, sus flores son amarillas y miden de 1.5 a 4 cm de largo. (Figura 1). Cabe hacer notar que esta planta es endémica del estado de Chihuahua, donde los indios Tarahumaras la llaman " Howinowa" (Richards 1969).

Los estudios químicos del género son escasos y solamente las especies R. columnifera, R. peduncularis y R. latipalearis han sido investigadas. Las investigaciones sobre R. columnifera y R. peduncularis condujeron al aislamiento e identificación de veintiseis lactonas sesquiterpénicas (1-26) de los tipos xantanólidas, ratibidanólidas, elemanólidas y eudesmanólidas; dos flavonas (27,28); un fenil propanoide (29); dos sesquiterpenoides simples (30,31) y tres acetilenos (32,33,34) (ver Cuadro1).



Figura 1 Ratibida mexicana.

Cuadro 1. Metabolitos aislados de *R.columnifera* y *R.peduncularis*.

Lactonas sesquiterpénicas.

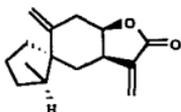
a) Ratibidanólidas

NOMBRE DEL COMPUESTO

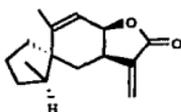
ESTRUCTURA

REFERENCIA

1
(4S,5S,7R,8R)-Ratibida-
11(13)-dien-8,12-ólida.

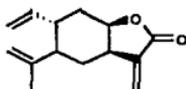
Herz *et al.*, 1985

2
(4S,5S,7R,8R)Ratibida-
9,11(13)-dien-8,12,ólida.

Herz *et al.*, 1985.

b) Elemanólidas.

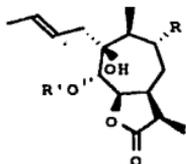
3
(5R,7R,8R,10S)-Elema-
1,3,11(13)-trien-8,12-ólida.

Herz *et al.*, 1985.

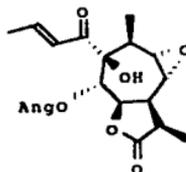
c) Xantanólidas

4,5,6
(1S,5S,6R,7S,10S,11R)-1-
hidroxi-2-oxo-5-aciloxi-xant-3-
en-6,12-ólidas.

4 **5** **6**
R H H H
R' An Ti iBu

Herz *et al.*, 1985.

7
1S,5S,6R,7R,9S,10S,11R)-8,9-
epoxi-1-hidroxi-2-oxo-5
angeloxi-xant-3-en-6,12-ólida.

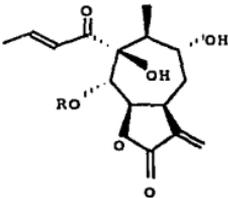
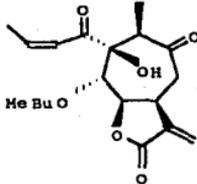
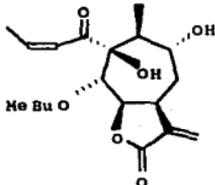
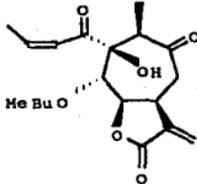
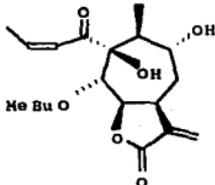
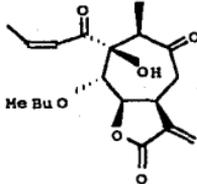
Herz *et al.*, 1985.

Cuadro 1 Metabolitos aislados de *R.columnifera* y *R.peduncularis*.

(continuación)

NOMBRE DEL COMPUESTO	ESTRUCTURA	REFERENCIA
c) Xantanólidas 8,9,10,11 (1S,5S,6R,7S,9R,10S,11R)-1,9-dihidroxi-2-oxo-5-(aciloxi)-xant-3-en-6,12-ólida.		Herz <i>et al.</i> , 1985.
8 R=OH R'=Ang 9 R=OH R'=Tig 10 R=OH R'=iBut 11 R=OAc R'=Ang		
12 (1S,4R,5S,6R,7S,10S,11R)-1,4-dihidroxi-2-oxo-5-angeloxi-xantan-6,12-ólida		Herz <i>et al.</i> , 1985.
13, 14 (1S,4R,5S,6R,7R,8R,9S,10R,11R)-8,9-epoxi-1-hidroxi-2-oxo-5-angeloxi-xantan-6,13-ólidas.		Herz <i>et al.</i> , 1985
13 R=H 14 R=Et		
15 5a-O-(2-metil-butirato)-9-oxo-seco-ratiferólida		Ellmauerer <i>et al.</i> , 1987.
R=MeBu.		

Cuadro 1 Metabolitos aislados de *R. columnifera* y *R. peduncularis*
(continuación)

NOMBRE DEL COMPUESTO	ESTRUCTURA	REFERENCIA
<p>c) Xantanolidas 16 5α-O-angelato-9-oxo-seco-ratiferólida R=Ang</p>		<p>Ellmauerer <i>et al.</i>, 1987.</p>
<p>17 5α-(2-metil-butirato-9α-hidroxi-seco-ratiferrólida R=MeBu</p>		<p>Ellmauerer <i>et al.</i>, 1987.</p>
<p>18 5α-O-isoButirato-9α-hidroxi-seco-ratiferrólida R=iBu</p>		<p>Ellmauerer <i>et al.</i>, 1987.</p>
<p>19 5α-O-angelato-9α-hidroxi-seco-ratiferrólida</p>		<p>Ellmauerer <i>et al.</i>, 1987.</p>
<p>20 5α-O-(2-metilbutirato)-9-3Z-seco-ratiferrólida.</p>		<p>Ellmauerer <i>et al.</i>, 1987.</p>
<p>21 5α-O-(2-metilbutirato)-9α-hidroxi-3Z-seco-ratiferrólida.</p>		<p>Ellmauerer <i>et al.</i>, 1987.</p>

**Cuadro 1 Metabolitos aislados de *R.columnifera* y *R.peduncularis*.
(continuación)**

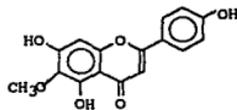
NOMBRE DEL COMPUESTO	ESTRUCTURA	REFERENCIA
c) Xantanólidas 22 2-hidroxi-4-acetoxi-xantan- 1(5)-en-6a-12-ólida		Ellmauerer <i>et al.</i> , 1987.
d) Eudesmanólidas.		
23		Herz <i>et al.</i> , 1985.
		Ellmauerer <i>et al.</i> , 1987
e) Lactonas sesquiterpénicas.		
25 (1S,5R,6R,7R,8R,9S,10S,11R) -8,9-epoxi-1-hidroxi-2-oxo-5- angeloxi-xantan-3-en-6,12- ólida		Herz <i>et al.</i> , 1985.
26 5a-O-(2-metilbutirato)- 9a-hidroxi-seco- ratiferólida		Ellmauerer <i>et al.</i> , 1987.

**Cuadro 1 Metabolitos aislados de *R.columnifera* *R.peduncularis*
(continuación)**

NOMBRE DEL COMPUESTO ESTRUCTURA REFERENCIA

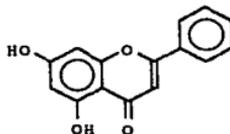
e) Flavonoides

27
5,7,6-trihidroxi-6-metoxi-
flavona



Herz *et al.*, 1985.

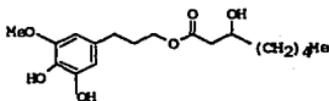
28
5,7-dihidroxi-flavona.



Ellmauerer *et al.*, 1987.

f) Fenilpropanoides

29
4-O-desmetil-sckuhrianol.



Ellmauerer *et al.*,
1987.

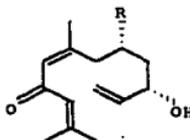
g) Sesquiterpenoides simples.

30
(-)-(3S,5R)-5-hidroxi-9-oxo-
nerólidol.

31
(-)-(3S,5R)-9-oxonerólidol.

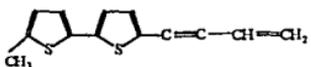
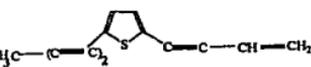
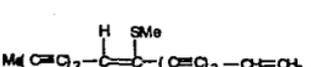
30 R=OH

31 R=H



Herz *et al.*, 1985

**Cuadro 1 Metabolitos aislados de *R.columnifera* *R.peduncularis*,
(continuación)**

NOMBRE DEL COMPUESTO	ESTRUCTURA	REFERENCIA
h) Acetilenos.		
<p>32 4'-(3-buten-1-il)-4-metil-2,2'-bitiofeno</p>		Herz <i>et al.</i> , 1985.
<p>33 2-(3-buten-1-il)-4-(1,3-pentadienil)-tiofeno</p>		Herz <i>et al.</i> , 1985
<p>34 7-metil-1,7-tridecadien-3,5,9-tetraeno</p>		Ellmauerer <i>et al.</i> , 1987.

Recientemente el estudio biodirigido de R. latipalearis , utilizando como bioensayo la determinación de la toxicidad para Artemia salina, permitió el aislamiento de dos lactonas sesquiterpénicas bioactivas. La ratibinólida I (35) ($CL_{50} = 62.75 \mu\text{g/ml}$), que posee el núcleo geigerano , y la ratibinólida II (36) ($CL_{50} = 69.53 \mu\text{g/ml}$), una eudesmanólida (Mata *et al.*,1990; Rojas *et al.*,1991). De manera adicional, se obtuvo la flavona hispidulina como constituyente inactivo ($CL_{50} > 100\text{ppm}$) (37), (Rojas 1990). En la Figura 2 se ilustran sus correspondientes estructuras.

Por último, en una reinvestigación química y biológica de esta especie , se demostró que el extracto metanólico presentaba una notable actividad antimicrobiana contra Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli y Candida albicans (Jiménez 1992). Además, se demostró su efecto citotóxico contra los sistemas de cultivos celulares humanos KB (carcinoma epidermoide humano), carcinoma de pecho, carcinoma de pulmón y adenocarcinoma de colon como se indica en el Cuadro 2. (Jiménez 1992).

Cuadro 2 Citotoxicidad del extracto metanólico de *Ratibida latipalearis*.

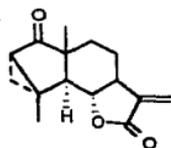
LINEA CELULAR	DE₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Sarcoma	4.6
Pecho	2.4
Pulmón	7.7
Colon	4.0
KB (carcinoma epidermoide)	6.2

En este mismo estudio, el fraccionamiento biodirigido del extracto activo mediante la determinación de la toxicidad contra Artemia salina y la determinación de la actividad antimicrobiana, permitió el aislamiento y la purificación de siete compuestos, los cuales fueron caracterizados mediante métodos químicos y espectroscópicos como la ratibinólida I (35), la ratibinólida II (36), la hispidulina (37), el β -sitosterol (38), el β -D-glucositosterol (39), la pedalitina (40) y el glicósido 2- α - β -glucopiranosil- $\Delta^1(10),4(5)$ -germacradien-6 $\alpha,7\beta,11\beta$ -ólida (41), representando este último un nuevo producto natural. Cabe destacar que la lactona antes mencionada es la primera germacranólida aislada del género Ratibida. En la Figura 2 se ilustran las estructuras de los metabolitos adicionales de R. latipalearis.

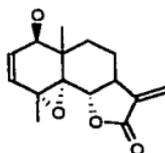
De los compuestos aislados de R. latipalearis solamente la ratibinólida I y la ratibinólida II desarrollaron una alta toxicidad para Artemia salina, en concordancia con los resultados previamente obtenidos (Rojas 1990, Mata *et al.*, 1990). Asimismo, ambos compuestos demostraron una actividad significativa en el sistema P-388 (leucemia de m \acute{u} ridos) con valores para la dosis efectiva media (DE₅₀) de 2.3 y 0.2 μ g/ml, respectivamente. Por otra parte, las flavonas hispidulina y pedalitina fueron los \acute{u} nicos compuestos que demostraron una moderada actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas. Posiblemente, la actividad que present \acute{o} el extracto original se deba a un efecto sin \acute{e} rgico de los dos flavonoides y a la presencia de otros compuestos a \acute{u} n no identificados.

Se evalu \acute{o} tambi \acute{e} n el potencial citot \acute{o} xico de la hispidulina, a pesar de que su toxicidad para Artemia salina fue > de 1000 μ g/ml. Esta flavona result \acute{o} activa en el sistema P-388 (ED₅₀ = 0.4 μ g/ml).

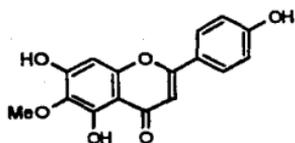
Figura 2 Metabolitos secundarios aislados de *Ratibida latipalearis* (Rojas, 1991 y Jiménez, 1992).



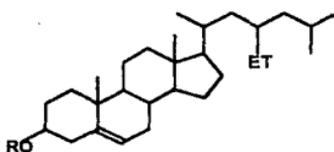
(35)



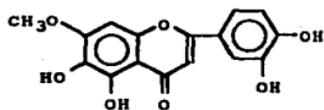
(36)



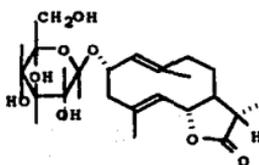
(37)



R= H (38)
R= β'-D-Glucosa (39)



(40)



(41)

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

El propósito del presente estudio es la investigación química y biológica preliminar de la especie medicinal Ratibida mexicana como parte de un estudio sistemático de plantas usadas en la medicina tradicional Tarahumara (Rojas 1990, y Jiménez 1992, *inter alia.*). La propuesta original de la presente investigación se realizó considerando que las plantas utilizadas en la medicina tradicional presentan una gran variedad de propiedades biológicas demostrables y constituyen fuentes potenciales valiosas de principios bioactivos (Hamburger y Hostettman 1991).

OBJETIVOS PARTICULARES.

Con el propósito de implementar el presente proyecto de investigación se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Preparar el extracto vegetal metanólico de Ratibida mexicana mediante un proceso de maceración.
2. Determinar la toxicidad para Artemia salina del extracto metanólico de Ratibida mexicana.
3. Determinar la actividad antimicrobiana potencial del extracto de Ratibida mexicana sobre bacterias Gram (+) , Gram (-) y la levadura Candida albicans.
4. Determinar el efecto del extracto metanólico de Ratibida mexicana sobre el crecimiento radicular de Echinochloa crusgalli y Amaranthus hypochondriacus.

5. Determinar la actividad antifúngica potencial del extracto metanólico de R.mexicana en contra las especies Pythium sp., Fusarium oxiporum y Helminthosporium sp.
6. Determinar la citotoxicidad en diferentes líneas celulares tumorales del extracto metanólico.
7. Efectuar el fraccionamiento preliminar del extracto metanólico activo de R.mexicana mediante un proceso de partición entre MeOH acuoso-(10%)-hexano.
8. Determinar la actividad biológica de las fracciones primarias resultantes del proceso de partición utilizando los ensayos indicados en los puntos 2,3 y 4.
9. Fraccionar de manera secundaria, mediante métodos cromatográficos, la fracción primaria que presente mayor toxicidad para Artemia salina.
10. Determinar la toxicidad para Artemia salina de las fracciones secundarias derivadas de la fracción primaria más activa.

PARTE EXPERIMENTAL.

1. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD PARA EL CRUSTÁCEO Artemia salina Leach.

Para determinar la toxicidad para A. salina se utilizó el método descrito por Anderson y colaboradores (1991). El procedimiento se describe a continuación :

Preparación de las muestras.

Las muestras (compuestos puros, fracciones y/o extractos) se preparan disolviendo 20 mg del material en 2 ml del disolvente apropiado. De esta solución se transfieren 500, 50 y 5 μ l a tres viales; se deja evaporar el disolvente a temperatura ambiente o al vacío, cada concentración se prepara por triplicado.

Incubación de los huevecillos de Artemia salina.

Los huevos de Artemia salina se incubaron en un medio salino artificial durante un periodo de 48 hrs.

Bioensayo.

Se transfieren 10 crustáceos a cada uno de los frascos que contenían las muestras a evaluar y 5 ml de medio salino artificial , teniendo una concentración final de 1000 , 100 y 10 μ g/ml. Los frascos se mantuvieron con iluminación durante 24 hrs; transcurrido ese tiempo se procedió a contar el número de crustáceos sobrevivientes, y la CL_{50} (concentración letal media) para calcular el porcentaje de mortalidad, utilizando el programa de análisis de probabilidad Finney.

2. EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Microorganismos de prueba.

Para la evaluación biológica se emplearon bacterias Gram positivas (+), Gram negativas (-) y una levadura. A continuación se enumeran los microorganismos de prueba utilizados, indicando además las cepas correspondientes :

Gram positivas (+)	Gram negativas (-)	Levadura
<u>Staphylococcus aureus</u> (ATCC 6538),	<u>Pseudomona aeruginosa</u> (ATCC 9027)	<u>Candida albicans</u> (ATCC 10231)
<u>Bacillus subtilis</u> (ATCC 6633)	<u>Escherichia coli</u> (ATCC 8739)	

Preparación de las muestras de prueba y los testigos :

A 2 mg de las muestras de prueba se adicionaron 2 ml de disolvente (mezclas de dimetilsulfoxido en agua en proporciones no mayores de 50:50 o solución al 10% en agua de Tween 20 y Tween 80). Como controles positivos se utilizaron soluciones de estreptomina (1 mg/ml) para las bacterias y de nistatina (3 mg/ml) para la levadura.

Preparación de los inoculos de los microorganismos de prueba:

Las bacterias se desarrollaron en caldo nutritivo (Merck) y se incubaron durante un periodo de 24 hrs a 37 °C.

La levadura (Candida albicans) se desarrolló en caldo glucosa 2% Sabouraud (Merck) y se incubó por 48 hrs a 28 °C.

Una vez desarrollados los microorganismos fue necesario estandarizar su número a una concentración aproximada de 10^6 células/ml, empleando como referencia la mitad de la turbidez del patrón No1 de Mc Farland (0.1 ml de $BaCl_2$ 1% y 9.9 ml de H_2SO_4 1%) mediante la dilución del cultivo con solución salina isotónica (Bailey, 1986).

Siembra de microorganismos.

Se llenaron cajas petri estériles con 20 ml de agar antibiotico No 1 (para bacterias) y de agar glucosa 4% (para levadura). Se dejaron a temperatura ambiente el tiempo suficiente hasta solidificar. Estas cajas se incubaron a una temperatura de 37 °C las que contenían agar antibiótico y a 28 °C las de agar glucosa por 24 hrs. Transcurrido este tiempo, se desecharon las cajas que estaban contaminadas .

Se sembró 1 ml de la solución de microorganismos estandarizados de manera uniforme en cada caja petri. Con un horador cilíndrico de 10 mm de diámetro se removió el agar de las placas para producir tres perforaciones de 11 mm de diámetro aproximadamente. Posteriormente, se adicionó a cada perforación de manera independiente 100 y 50 μ l de la solución problema y 100 μ l del control positivo.

Las cajas ya preparadas se mantuvieron a temperatura ambiente por un período de 1 a 2 hrs para facilitar la difusión de las muestras (problemas y patrones). Transcurrido ese tiempo, las placas se incubaron durante 24 hrs a 37°C para las bacterias y por 48 hrs a 28° C para las levaduras.

3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO Y FRACCIONES PRIMARIAS SOBRE EL CRECIMIENTO RADICULAR DE Amaranthus hypochondriacus y Echinochloa crusgalli.

Los ensayos conducentes a la determinación sobre el crecimiento radicular de A.hypochondriacus y E.crusgalli fueron realizados por la química bióloga Blanca Hernández bajo la dirección de la Dra. A.L. Anaya en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

4. DETERMINACIÓN DEL EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO RADIAL DE HONGOS FITOPATOGENOS

Los ensayos conducentes a la determinación sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos fueron realizados por la química bióloga Blanca Hernández bajo la dirección de la Dra. A.L. Anaya en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

5. MATERIAL VEGETAL.

El material vegetal (raíces) de Ratibida mexicana se recolectó en el municipio de Guachochic, Cusararé, Edo. de Chihuahua en noviembre de 1991 y se identificó por el Dr. Robert Bye, del Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM.

Una muestra de referencia se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional (Voucher: R.Bye y E. Linares 18366).

El material vegetal se secó a temperatura ambiente y se trituró en un molino tipo Wiley 4.

6. EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR.

400 g del material vegetal se extrajeron vía maceración, empleando como disolvente MeOH anhidro (1.25 litros), tres veces por periodos de 24 hrs cada uno; después de concentrar al vacío, se obtuvieron 49.6 g de extracto metanólico.

Al extracto metanólico se le realizó un fraccionamiento preliminar, mediante una partición entre metanol acuoso (10%) y hexano en una proporción (1:1), obteniéndose una fracción hexánica (7.06 g) y una fracción metanólica acuosa (41.41 g).

7. FRACCIONAMIENTO SECUNDARIO DEL EXTRACTO HEXÁNICO.

El extracto hexánico (6.5 g) se fraccionó mediante una cromatografía en columna utilizando como adsorbente gel de sílice (70 g) (Sílica Gel Merck G60, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 70-230). El proceso de elución se llevó a cabo con hexano, hexano : acetato de etilo en diferentes proporciones y acetato de etilo, obteniéndose un total de 196 fracciones de 25 ml cada una. Las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina y se combinaron aquellas que resultaron semejantes.

En el Cuadro 3 se enumeran los sistemas de elución empleados y las fracciones obtenidas.

8. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS.

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice (Silica Gel 60 GF254 Merck), utilizando varios sistemas de elución y diferentes agentes cromógenos. Los sistemas de eluyentes y los reactivos reveladores empleados se resumen en el Cuadro 4.

Cuadro 3 Resumen del fraccionamiento biodirigido vía cromatografía en columna del extracto hexánico de Ratibida mexicana.

ELUYENTE	PROPORCION	FRACCIONES COMBINADAS	NOTACIÓN DE LA FRACCIÓN COMBINADA
Hexano		1 - 35	I
Hex:AcOEt	9 : 1	36 - 40	II
Hex:AcOEt	9 : 1	41 - 46	III
Hex:AcOEt	9 : 1	47 - 57	IV
Hex:AcOEt	9 : 1	58 - 65	V
Hex:AcOEt	9 : 1	66 - 85	VI
Hex:AcOEt	9 : 1	86 - 99	VII
Hex:AcOEt	8 : 2	100 - 114	VIII
Hex:AcOEt	8 : 2	115 - 136	IX
Hex:AcOEt	8 : 2	137 - 156	X
Hex:AcOEt	8 : 2	157 - 164	XI
Hex:AcOEt	1 : 1	165 - 178	XII
Hex:AcOEt	1 : 1	179 - 194	XIII
Hex:AcOEt	1 : 1	195 - 196	XIV

Cuadro 4 Sistema de elución y reactivos cromógenos utilizados para los análisis cromatograficos en capa fina.

SISTEMAS DE ELUYENTES	COMPOSICIÓN	PROPORCIÓN
I	Hex - AcOEt	9:1
II	Hex - AcOEt	8:2
III	Hex- AcOEt	1:1
IV	AcOEt	---

REACTIVO	COMPOSICIÓN DEL AGENTE CROMÓGENO	REFERENCIA
Sulfato cérico *	12 g de Sulfato cérico 22.2 ml de H ₂ SO ₄ con. 350 g de hielo picado.	Sthal 1969

*Para el desarrollo de color es necesario calentar por 2 min a 110 °C.

AISLAMIENTO DEL ESTIGMASTEROL (43) Y ESTIGMAST-22-EN-3-OL(44)

De la fracción combinada IV de la columna original (Cuadro 3) cristalizaron espontáneamente 7.6 mg de un sólido blanco cristalino, de pf = 118-120°C.

Las aguas madres de la fracción combinada IV (383 mg) se recromatografiaron en una columna de gel de sílice (11.24 g) utilizando como eluyentes benceno, benceno: AcOEt 9:1 y AcOEt. Se recolectaron un total de 147 fracciones cada una de 20 ml (Cuadro 5). Cada fracción se analizó mediante cromatografía en capa fina, combinándose aquellas que resultaron similares. De las fracciones combinadas 69-104 (Cuadro 5), cristalizaron 22.12 mg de una mezcla de estigmasterol y ~~estigmast-22-en-3-ol~~. Esta mezcla se resolvió en sus componentes individuales mediante una cromatografía preparativa en capa delgada de gel de sílice impregnada con AgNO_3 , utilizando como eluyente una mezcla de benceno: AcOEt (9:1). Como resultado de este proceso se obtuvieron 15 mg de estigmasterol (pf=118-120°C) y 7 mg de estigmast-en-22-3-ol (pf=169°C).

Cuadro 5 Resumen de la cromatografía en columna de la fracción combinada IV.

ELUYENTE	FRACCIONES ELUIDAS	FRACCIONES COMBINADAS
Benceno	1 - 139	1-20, 16-21, 22-38, 39, 40, 41-60, 61-68, 69-72, 73, 74-76, 77-79, 80-89, 90, 91, 92, 93, 94, 95-117, 118-120, 121, 122-139 .
Benceno:AcOEt	140 - 143	140 - 143
AcOEt	144 - 147	144 - 147

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a) Actividades biológicas del extracto metanólico de Ratibida mexicana.

Con el fin de determinar si la especie medicinal Ratibida mexicana constituye una fuente potencial de principios activos se realizó una serie de evaluaciones biológicas preliminares sobre el extracto metanólico de la especie. Los bioensayos realizados incluyeron: la determinación de la toxicidad para Artemia salina, la evaluación del potencial antimicrobiano, la determinación del potencial alelopático, la evaluación de la capacidad inhibitoria del crecimiento de hongos fitopatógenos de varias especies, y por último, la determinación del efecto citotóxico sobre varias líneas celulares de tumores humanos .

La determinación de la toxicidad para A. salina es un bioensayo simple que consiste en evaluar la letalidad inducida por extractos, fracciones y compuestos puros a diferentes concentraciones sobre las larvas con 48 hrs de desarrollo de este crustáceo. El tiempo de exposición de las larvas con los productos de prueba es de 24 hrs. Al cabo de este tiempo se determina el porcentaje de mortalidad y/o la dosis letal media mediante el método Finney. Los extractos naturales que presentan valores de $CL_{50} < a 1000 \mu\text{g/ml}$ se consideran activos (Anderson et al., 1991). En el caso de la evaluación del extracto metanólico de R. mexicana se obtuvo una CL_{50} de $62.27 \mu\text{g/ml}$, lo cual indica que el extracto presenta una actividad larvicida significativa.

Considerando que la toxicidad para A. salina se ha utilizado previamente como un indicador preliminar de la actividad citotóxica, se consideró pertinente evaluar el extracto como agente anticancerígeno potencial. Para ello el extracto fue enviado a la Universidad de Illinois, USA donde se evaluó en contra de las líneas celulares derivadas de tumores humanos que se incluyen en el Cuadro 6, donde se indican también los resultados de estas evaluaciones. Como se puede apreciar, en todos los casos los valores de DE_{50} son menores de 20 $\mu\text{g/ml}$, lo cual indica una importante actividad citotóxica del extracto metanólico de R. mexicana (Suffnes y Pezzuto 1991).

Cuadro 6 Citotoxicidad del extracto metanólico de Ratibida mexicana sobre diferentes líneas celulares derivadas de tumores humanos.

Línea celular	BC-1	HT-1080	Lu-1	Mel-2	Col-2	KB
DE₅₀ (µg/ml)	3.0	7.3	3.4	2.8	2.6	3.7

Línea celular	KB-V	P-388	A431	LNCaP	ZR75-1	U373
DE₅₀ (µg/ml)	2.7	0.6	4.9	1.8	4.0	3.5

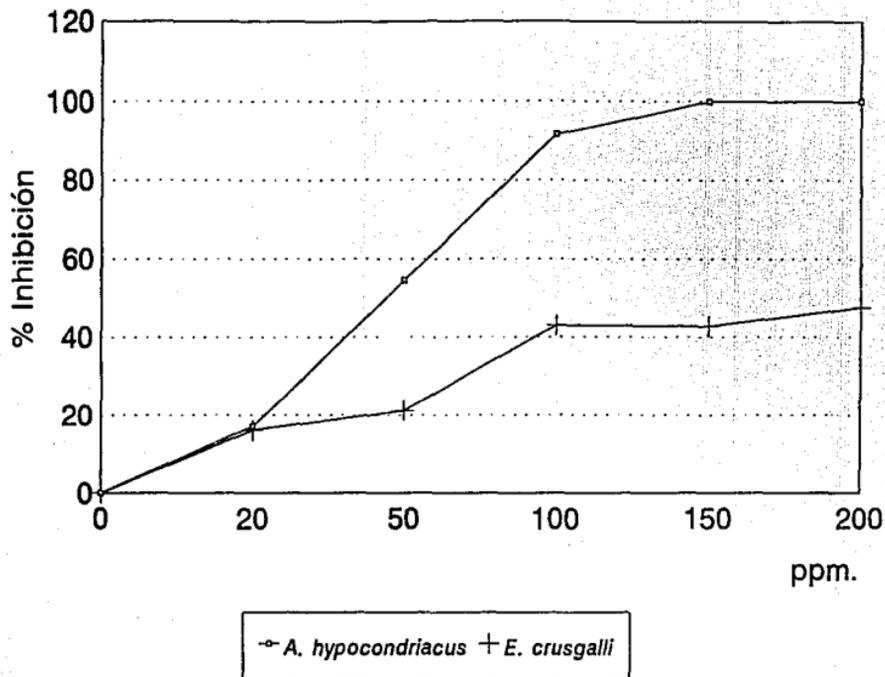
- BC-1 Cáncer de pecho humano.
 HT - 1080 Fibrosarcoma humano.
 Lu-1 Cáncer pulmonar humano.
 Mel-2 Melanoma humano.
 Col-2 Cáncer de colon.
 KB Carcinoma epidermoide.
 KB-V Carcinoma epidermoide resistente a vinblastina.
 P-388 Leucemia de múridos.
 A 431 Carcinoma epidermoide humano.
 LNCaP Cáncer de próstata humano.
 ZR75-1 Cáncer de pecho humano.
 U 373 Glioblastoma

En el caso de la evaluación de la potencialidad antimicrobiana los ensayos se realizaron sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas y la levadura Candida albicans siguiendo el método de difusión en agar, tal como se describió en la sección experimental . El extracto se evaluó a concentraciones de 1 mg /ml y en el caso de las bacterias se obtuvieron resultados negativos. En el caso de C.albicans se observó tan sólo una disminución del crecimiento.

La actividad potencial alelopática de Ratibida mexicana se determinó midiendo el efecto sobre el crecimiento radicular de Amaranthus hypochondriacus y Echinochloa crusgalli. El extracto metanólico se evaluó a cinco concentraciones diferentes (20,50,100,150, y 200 ppm). En la gráfica 1 se ilustran los resultados . Como se puede apreciar, el extracto demostró un efecto significativo inhibitorio sobre el crecimiento de A. hypochondriacus a las concentraciones de 50, 100,150, y 200 ppm. Por otra parte la segunda especie fue menos sensible al efecto del extracto metanólico . El valor de IC_{50} (dosis inhibitoria media) obtenido en el caso de A. hypochondriacus fue de 41.18 μ g/ml y en el caso de E. crusgalli de 213.73 μ g/ml .

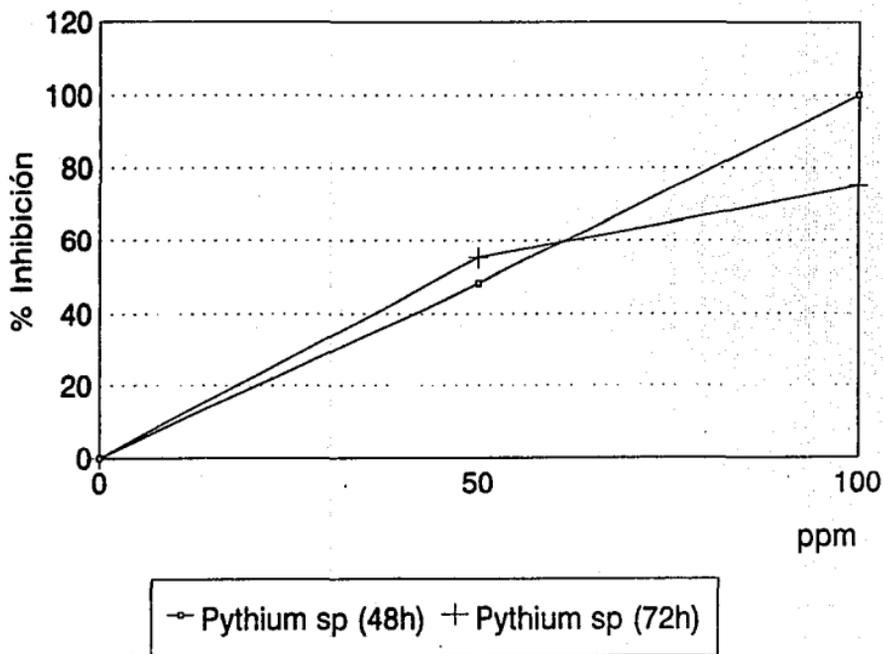
En relación a los ensayos sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos, se evaluó el extracto metanólico contra tres tipos de hongos (Pythium sp., Fusarium oxiporum y Helminthosporum sp) a dos diferentes concentraciones (50 y 200 ppm). Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas 2-4. El extracto metanólico inhibió significativamente el crecimiento de Helminthosporium y Pythium sp a las concentraciones ensayadas.

Efecto del extracto metanólico de *R. mexicana* sobre el crecimiento de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*



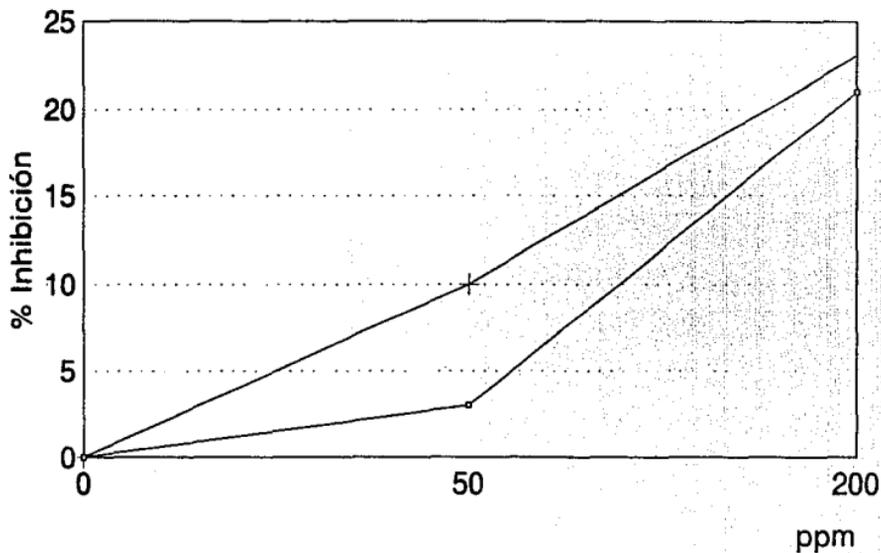
Gráfica 1

Efecto del extracto metanólico de *R.mexicana* sobre el crecimiento radial de *Pythium sp*



Gráfica 2

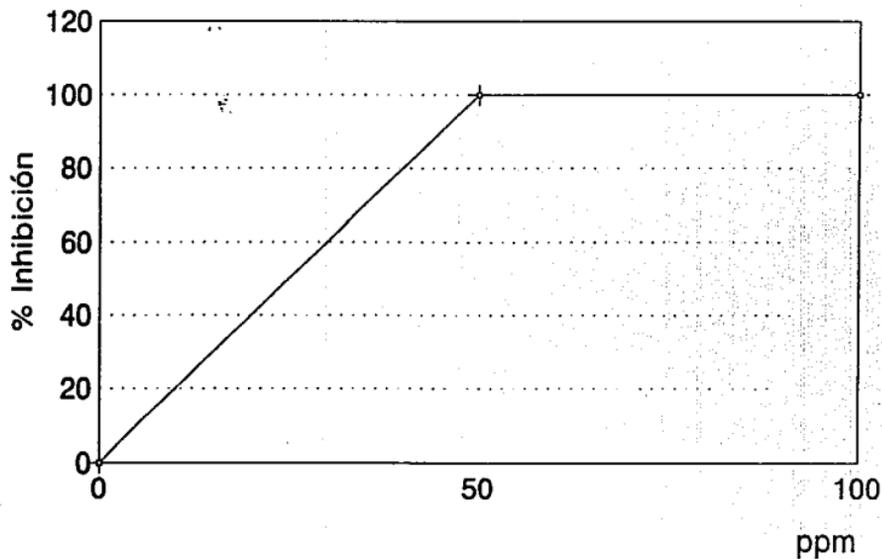
Efecto del extracto metanólico de *R. mexicana* sobre el crecimiento radial de *Fusarium oxiporum*



□ F.oxiporum (72 h) + F.oxiporum (192 h)

Gráfica 3

Efecto del extracto metanólico de *R.mexicana* sobre el crecimiento radial de *Helminthosporium* sp



— Helminthosporium (72h) + Helminthosporium(192h)

Gráfica 4

En relación al efecto inhibitorio sobre el crecimiento de Fusarium oxiporum, el extracto metanólico presentó una moderada inhibición a 200 ppm.

De los resultados anteriores se deduce claramente que el extracto metanólico de R. mexicana presenta una gran diversidad de actividades biológicas y que, por lo tanto, la especie constituye una fuente potencial de principios activos.

b) Actividades biológicas de las fracciones primarias derivadas del extracto metanólico activo de Ratibida mexicana.

Con la finalidad de determinar la polaridad de la porción activa del extracto de R. mexicana se decidió a realizar una partición entre metanol acuoso y hexano. De este proceso resultaron dos fracciones primarias, una hexánica y una metanólica-acuosa. Ambas fracciones primarias fueron sometidas a las mismas evaluaciones que el extracto original con la excepción de la actividad citotóxica.

Se determinó la toxicidad de ambas fracciones, hexánica y metanólica acuosa, para Artemia salina obteniéndose valores para la CL_{50} de 37.4 $\mu\text{g/ml}$ y 62.27 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. En ambos casos la CL_{50} resultó ser menor a 1000 ppm por lo que se deben considerar como bioactivas a las dos fracciones (Anderson *et al.*, 1991).

En relación a la actividad antimicrobiana de las fracciones hexánica y metanólica acuosa contra la levadura Candida albicans y bacterias Gram (+) y Gram (-), los resultados fueron negativos al igual que en el caso del extracto original.

Los resultados de la evaluación de las fracciones primarias sobre las especies A. hypochondriacus y E. crusgalli se ilustran en las gráficas 5 y 6

La fracción hexánica, demostró una inhibición significativa a las concentraciones evaluadas (10,30,50,70,100,150 y 200 µg/ml) sobre el crecimiento radicular de A. hypochondriacus. El efecto fue dependiente de la concentración. A las dosis de 150 y 200 µg/ml el crecimiento fué nulo ($IC_{50} = 94.81 \mu\text{g/ml}$).

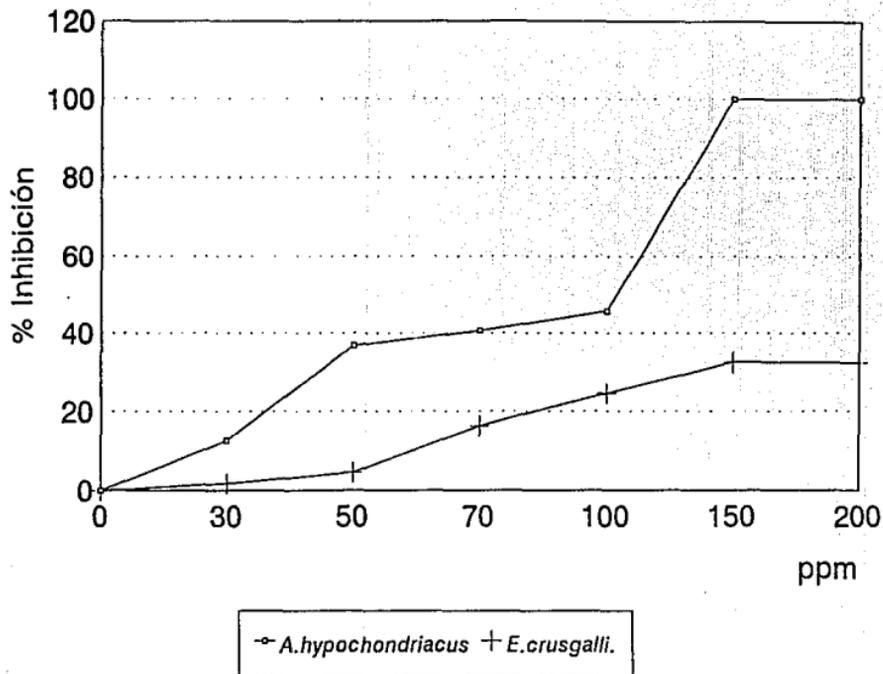
Por el contrario, y al igual que en el caso del extracto metanólico original, el efecto sobre la especie E. crusgalli fue mucho menor, encontrándose que a 150 y 200 µg /ml, la inhibición del crecimiento radicular fue de tan sólo el 30% .

La fracción metanólica acuosa no demostró un efecto significativo a las concentraciones de 50 y 100 µg/ml en el caso de Amaranthus . A 200 µg/ml el efecto inhibitorio observado fue del 27.4%. En el caso de E. crussgalli se observó que a la concentración de 200 µg/ml se obtenía una inhibición de 35% y a 100 µg/ml de 27.4%.

Por último, los resultados de las evaluaciones sobre hongos fitopatógenos de las fracciones primarias se ilustran en las gráficas 7-10 y 10-12

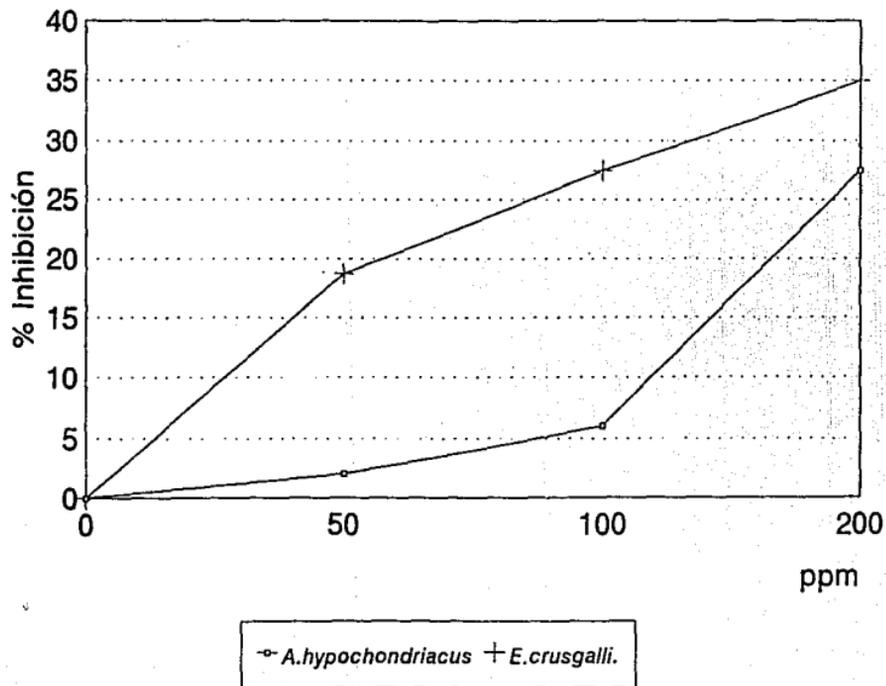
La fracción hexánica (gráficas 7-9) demostró un efecto inhibitorio significativo del crecimiento para Pythium sp y Helminthosporium sp. En el caso de Pythium se observó una inhibición del crecimiento del 30.8% y 54% a 50 y 200 ppm, respectivamente a las 48 hrs (1a lectura). Por otra parte, para Helminthosporium sp la inhibición del crecimiento a las 72 horas fue de 45.7% a 50 µg/ml y de 85.7% a 200 ppm.

Efecto de la fracción hexánica de *R.mexicana* sobre el crecimiento de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.



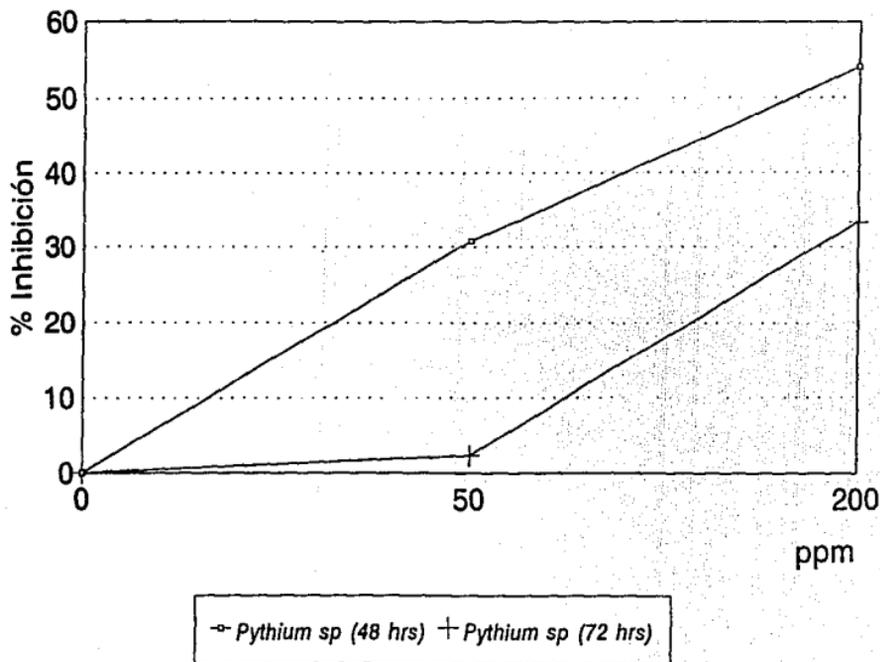
Gráfica 5

Efecto de la fracción metanólica-acuosa de *R.mexicana* sobre el crecimiento de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.



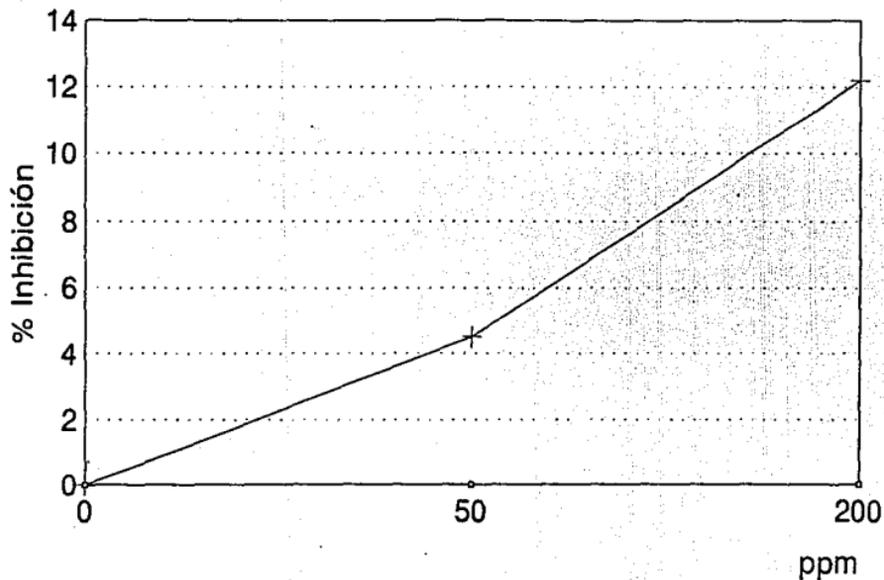
Gráfica 6

Efecto de la fracción hexánica del extracto metanólico de *R. mexicana* sobre el crecimiento radial de *Pythium sp*



Gráfica 7

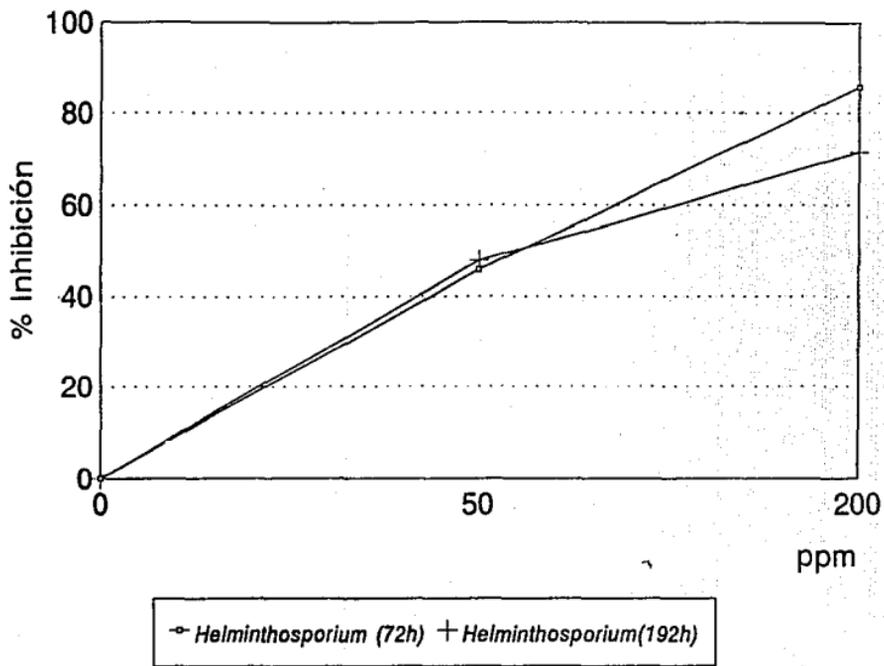
Efecto de la fracción hexánica del extracto metanólico de *R.mexicana* sobre el crecimiento radial de *Fusarium oxiporum*



○ *F.oxiporum* (72h) + *F.oxiporum* (192h)

Gráfica 8

Efecto de la fracción hexánica del extracto metanólico de *R.mexicana* sobre el crecimiento radial de *Helminthosporium sp*



Gráfica 9

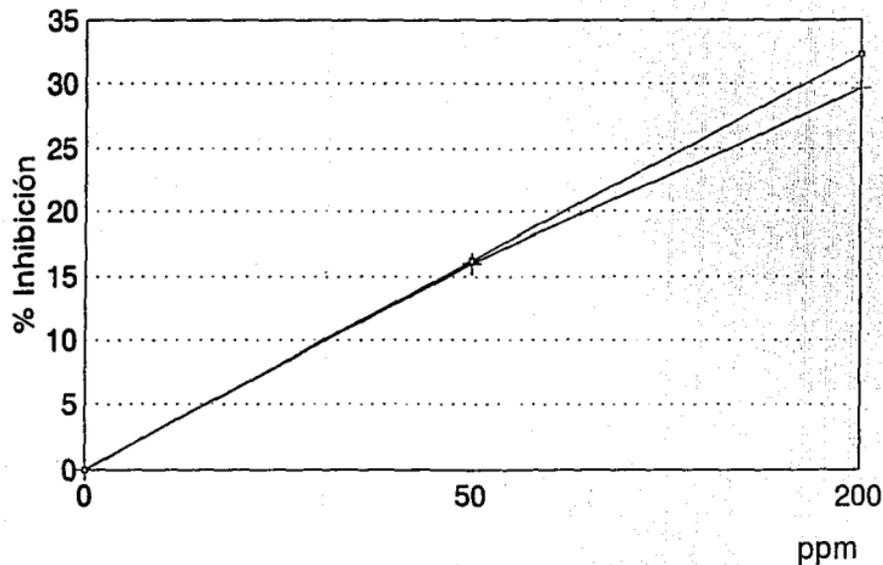
En el caso de la fracción metanólica acuosa (gráficas 10-12) se observó un efecto inhibitorio significativo sobre Pythium sp y Helminthosporium sp a la concentración de 200 ppm. A las 48 horas (1a lectura) el porcentaje de crecimiento de Pythium sp fue de 67.7 % (porcentaje de inhibición 32.3%). A la misma concentración (200 µg/ml) y al cabo de 72 horas (1a lectura) el porcentaje de crecimiento de Helminthosporium fue de 58% (42% de inhibición).

En conclusión, de los resultados obtenidos en las diferentes evaluaciones se deduce que la fracción primaria hexánica es la responsable en mayor grado de las actividades citotóxicas, e inhibidora del crecimiento vegetal y antifúngica.

c) Determinación de la porción activa de la fracción hexánica mediante la determinación de la toxicidad para A. salina.

Considerando que la fracción hexánica resultó ser la más activa de las fracciones secundarias derivadas del extracto metanólico, se procedió a fraccionarlo de manera adicional, mediante métodos cromatográficos. Para ello la fracción fue cromatografiada sobre una columna de gel de sílice, tal como se indicó en la sección experimental. De este proceso se obtuvieron 14 fracciones terciarias (I-XIV), como se indica en el Cuadro 3 de la sección experimental.

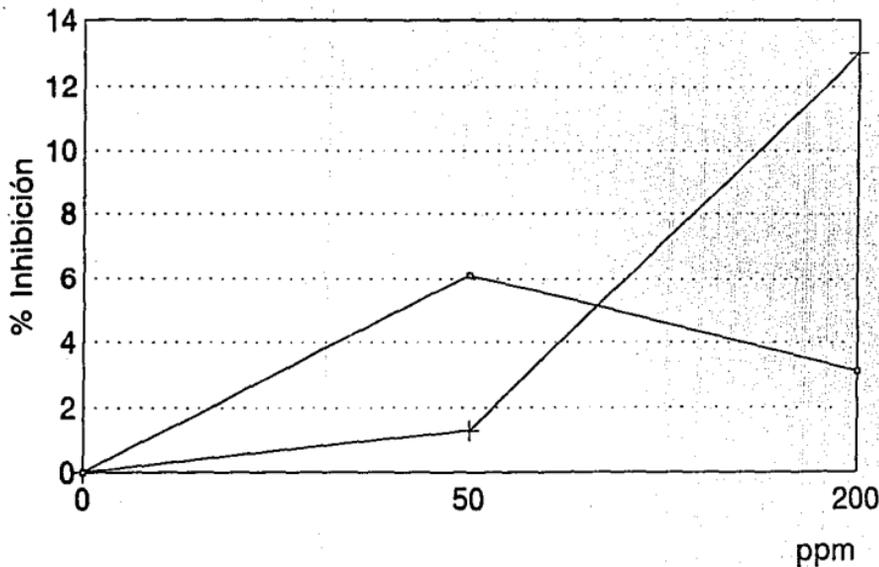
Efecto de la fracción metanólica-acuosa de *R.mexicana* sobre el crecimiento radial de *Pythium sp*



□ *Pythium sp*(48 hrs) + *Pythium sp* (72 hrs)

Gráfica 10

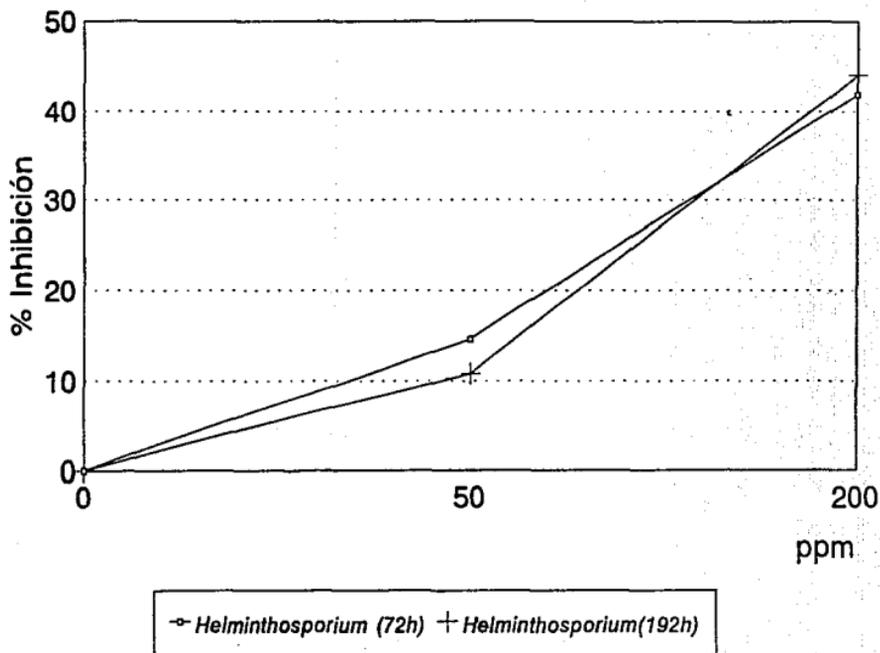
Efecto de la fracción metanólica-acuosa de *R.mexicana* sobre el crecimiento radial de *Fusarium oxiporum*



○- *F.oxiporum* (72h) + *F.oxiporum* (192h)

Gráfica 11

Efecto de la fracción metanólica-acuosa de *R.mexicana* sobre el crecimiento radial de *Helminthosporium sp*



Gráfica 12

Se evaluó el potencial tóxico para A. salina de cada una de las fracciones secundarias resultantes. Como se puede apreciar en el Cuadro 3. solo resultaron activas los subgrupos de fracciones combinadas II-IV (Ver Cuadro 7).

De los resultados presentados en el Cuadro 7, se concluye que la actividad tóxica de la fracción hexánica para el crustáceo A. salina se concentra en las fracciones terciarias de menor polaridad. Cabe hacer notar que estas fracciones terciarias se encuentran en proceso de evaluación para determinar la actividad antifúngica y alelopática .

Tomando en cuenta que el ensayo de Artemia salina ha correlacionado en múltiples ocasiones con la actividad citotóxica en varias líneas celulares de tumores humanos (Anderson *et al.*, 1991) , resulta altamente probable que el efecto citotóxico demostrado para el extracto metanólico original de R. mexicana se deba a los constituyentes presentes en esas fracciones .

Por otra parte , aunque no se han realizado estudios de correlación entre la inhibición de la toxicidad para A. salina y el efecto inhibitorio sobre el crecimiento radicular sobre las malezas A. hypochondriacus y E. crusgalli , es factible que en las fracciones de menor polaridad del extracto hexánico se encuentren también los principios activos responsables del efecto inhibitorio del crecimiento radicular que demostró la fracción hexánica .

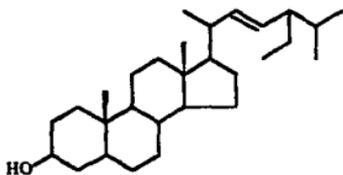
Cuadro 7 Fracciones secundarias de la porción hexánica con actividad tóxica contra Artemia salina.

NOTACIÓN DE LA FRACCIÓN COMBINADA	LC₅₀ (µg/ml)
I	
II	90.77
III	271.73
IV	178.66
V	>1000
VI	>1000
VII	>1000
VIII	>1000
IX	>1000
X	>1000
XI	>1000
XII	>1000
XIII	>1000
XIV	>1000

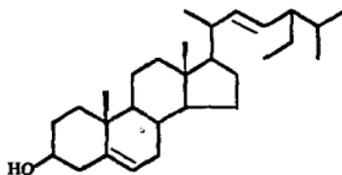
d) Aislamiento y caracterización del estigmasterol (42) y del estigmast-22-en-3-ol (43).

Durante el fraccionamiento de la fracción primaria hexánica, de la fracción combinada IV de la columna original precipitaron 7.6 mg (Cuadro 3) de un sólido blanco cristalino, el cual fue caracterizado como estigmasterol (42), por comparación con una muestra auténtica.

De manera adicional, la recromatografía en columna de gel de sílice de esta fracción permitió obtener una mezcla de dos esteroides, de acuerdo al análisis por cromatografía de gases - espectrometría de masas (Ver figura 3). La mezcla anterior se resolvió en sus componentes individuales mediante una cromatografía en capa delgada gel de sílice impregnada con AgNO_3 obteniéndose cantidades adicionales de estigmasterol y estigmast-22-en-3-ol (43), el cual también fue identificado por comparación con una muestra auténtica. En el apéndice 1 se ilustran los espectros de los esteroides.

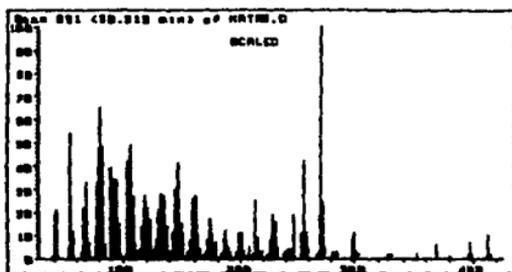
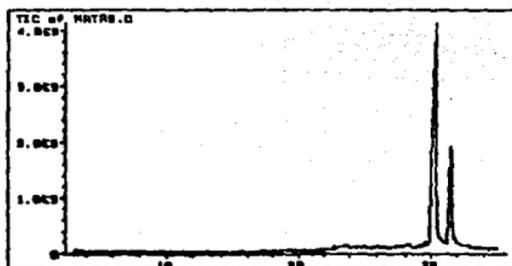


Estigmast-22-en-3-ol. (43)

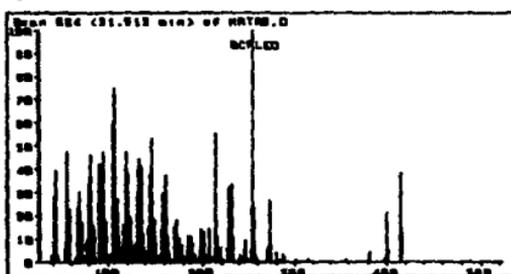


Estigmasterol. (42).

Es importante destacar que ninguno de los dos esteroides aislados demostró actividad contra A.salina ($\text{LC}_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$ en los dos casos),



(42)



(43)

Figura 3 Espectro de masas de la mezcla de estigmasterol (42) y estigmast-22-en-3-ol (43).

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

1. El extracto metanólico de Ratibida mexicana demostró las siguientes actividades: citotóxica en diferentes líneas celulares, antifúngica sobre Pythium sp. y Helminthosporium sp., tóxica para Artemia salina e inhibidora del crecimiento vegetal sobre las especies Amaranthus hypochondriacus y Echinochloa crusgalli. A diferencia del extracto metanólico de la especie relacionada R. latipalearis, el extracto de R. mexicana no presentó actividad antimicrobiana.

La actividad presentada por el extracto metanólico de las raíces de R. mexicana indican que esta especie medicinal constituye una fuente potencial importante de principios activos.

2. Al fraccionar el extracto activo mediante un proceso de partición entre hexano y metanol acuoso, y evaluar las fracciones secundarias resultantes mediante los mismos bioensayos, se encontró que la fracción activa del extracto correspondía a la fracción secundaria menos polar, es decir a la fracción hexánica.
3. El fraccionamiento adicional mediante métodos cromatográficos secundarios de la fracción hexánica permitió el aislamiento de dos sustancias esteroideas las cuales fueron identificadas como el estigmasterol y estigmast -22-en-3-ol.

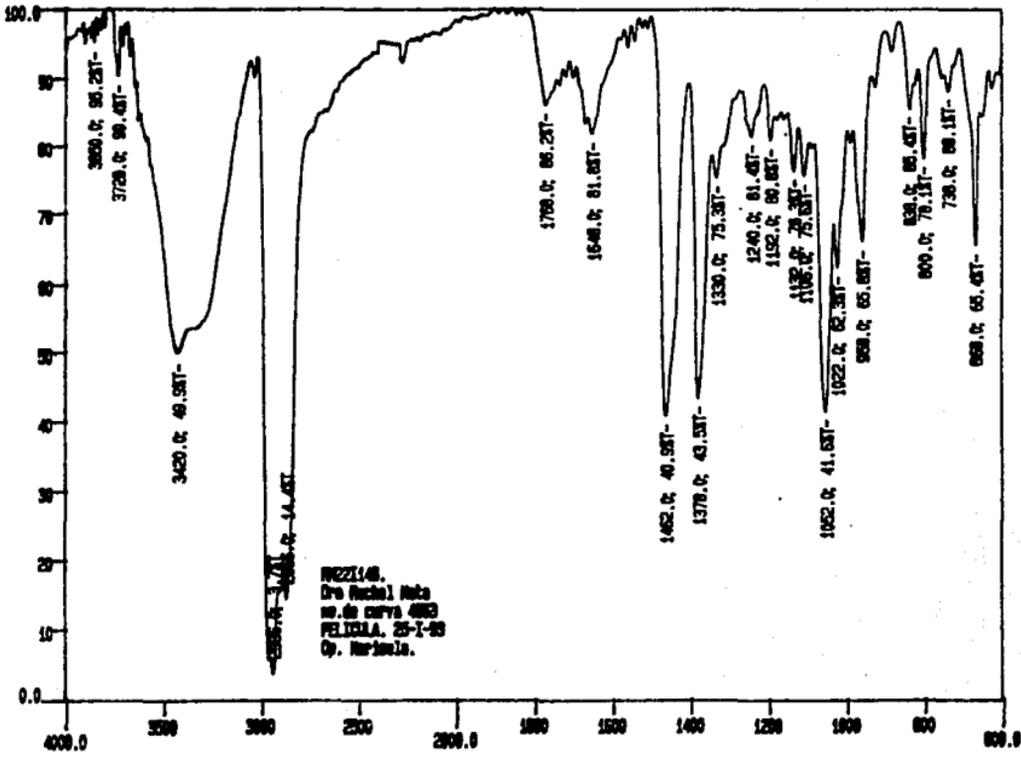
RECOMENDACIONES

Realizar el estudio fitoquímico biodirigido del extracto metanólico de Ratibida mexicana con la finalidad de aislar los principios activos de las actividades biológicas demostradas en la presente investigación

Appendice 1

ESTRUCUTURA
SABOR EN LA
PALLATEGA

14



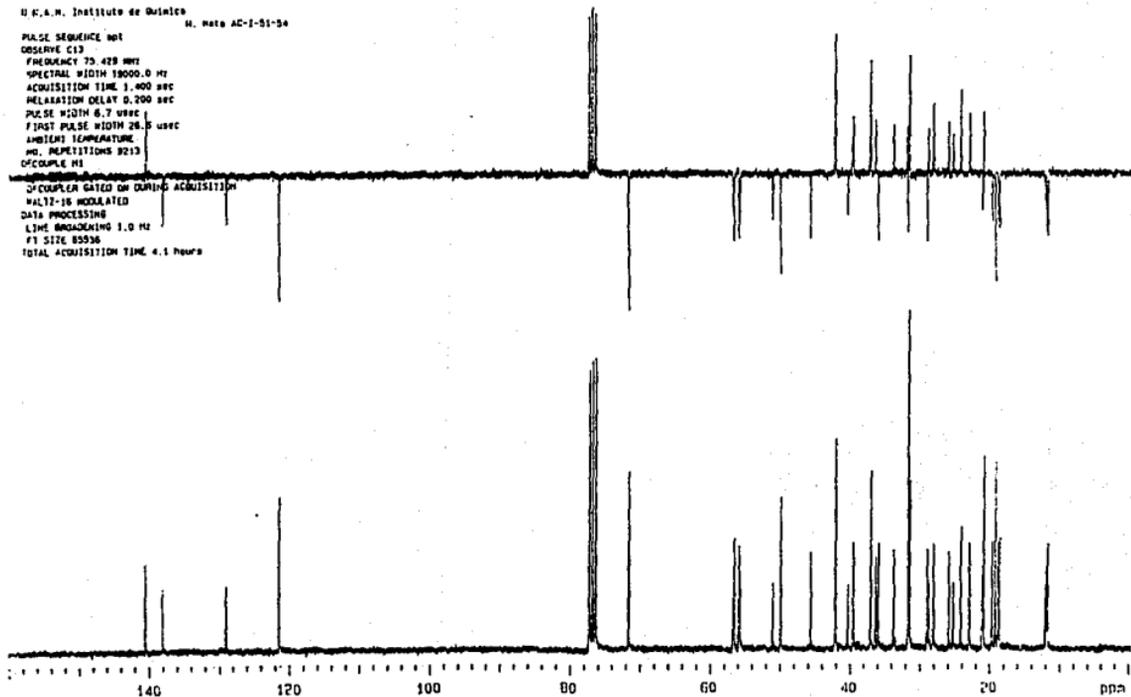
IR22146.
Dra Rachel Pato
no. de curva 683
FELICIA, 29-1-93
Op. Maribela.

Espectro 1

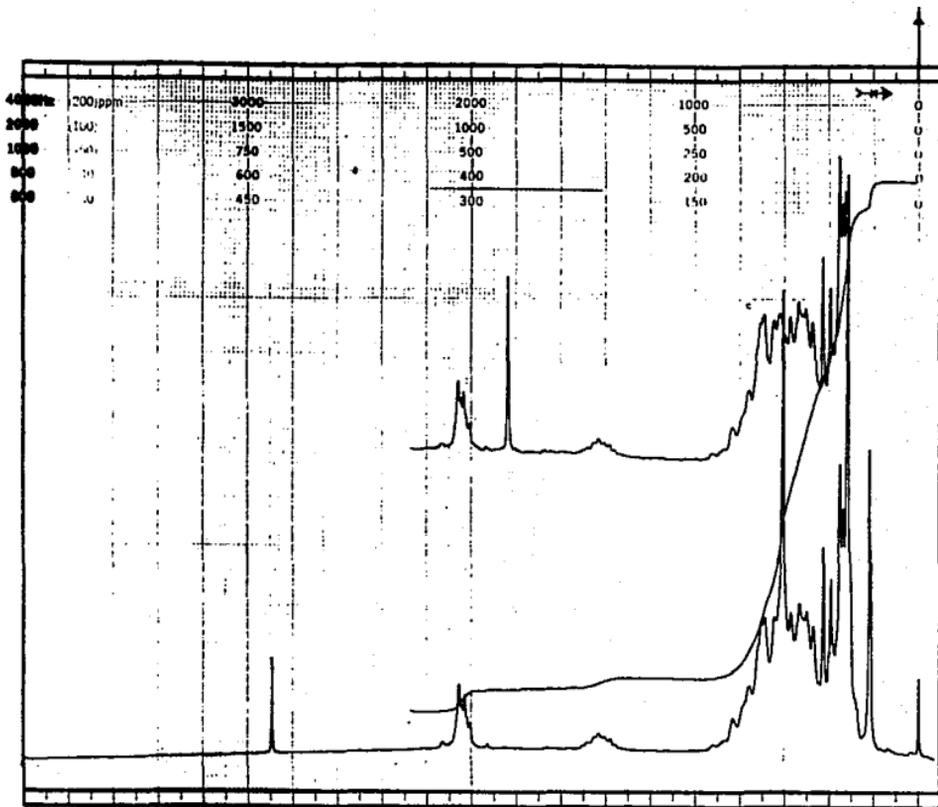
U. S. N. Institute de Quimica N. Mato AC-1-51-56

PULSE SEQUENCE 901
OBSERVE C13
FREQUENCY 75.428 MHz
SPECTRAL WIDTH 19000.0 Hz
ACQUISITION TIME 1.400 SEC
RELAXATION DELAY 0.200 SEC
PULSE WIDTH 6.7 USEC
P1 PULSE WIDTH 26.5 USEC
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPEITIONS 9213
DECUPLE 0 Hz

DC COUPLER GATED ON DURING ACQUISITION
PULS-18 MODULATED
DATA PROCESSING
LINE BRAGGING 1.0 Hz
F1 SITE 85936
TOTAL ACQUISITION TIME 4.1 hours



Espectro 3



Espectro 4

BIBLIOGRAFÍA:

- Anderson, J.E.; Goetz, G.E.; Mclaughlin, J.L. and Suffness, M.; *Phytochen. Anal.*, **2**, 107, 1991)
- Castañeda, P.; García, M.R.; Hernandez, B.E.; Torres, B.A.; Anaya, A.L. y Mata, R.; *Journal of Chemical Ecology*, **18**, 1025 (1992).
- Ellmauerer, V.; Pathak, P.; Jakupovic, J.; Bohlmann, F.; Dominguez, X.; *Phytochemistry*, **59** (1987).
- Hamburger, M. y Hostettmann., *Phytochemistry* **30**, 3869 (1991).
- Herz, W., Kulanthaivel, P.; Goekden, V.; *J. Org. Chem.*, **50**, 610 (1985).
- Jiménez, A.; Reinvestigación química y biológica de la planta medicinal *Ratibida latipalearis* Richards. Aislamiento e identificación de un polialcohol de las fracciones de mayor polaridad de *Cigarrilla mexicana* (Zucc et martius ex Dc aiello) Tesis Maestría, Facultad de Química, UNAM, 1992.
- Mata, R.; Rojas, A.; Soriano, M.; Villena, R.; Bye, R. y Linares, E.; *Heterocycles*, **31**, 1111 (1990).
- Pareda Miranda R.; Mata, R.; Anaya, A.L.; Wickamaratne, D.B.M.; Pezzuto, J.M.; Kinghorn, D.A., *Journal of Natural Products*, **56**, 571 (1993)
- Richards, L.; *Rhodora*, **70**, 390 (1969)

- Rojas, A; Constituyentes bioactivos de *Ratibida latipalearis* Richards y evaluación de la actividad antimicrobiana potencial de varios metabolitos secundarios aislados de plantas mexicanas usadas en la medicina tradicional. Tesis Maestría, Facultad de Química, UNAM, 1990.
- Rojas , A.; Villena, R.; Jimenez, A. y Mata, R.; *Journal of Natural Products*, 54, 1279 (1991).
- Suffnes, M y Pezzuto, J.M., Assays related to cancer drug discovery. en, "Methods in Plant Biochemistry, K. Hosttmann (Ed).,vol 6, pp 71 (1991).