



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"COMPUESTOS BIOACTIVOS DE *Ratibida mexicana*
(WATS.) SHARP. (ASTERACEAE)"

TESIS MANCOMUNADA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :
PERLA NOEMI SANCHEZ MONTERRUBIO
DIEGO FERNANDO SOTO CARRILLO



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DR. ALFOSO ROMO DE VIVAR
VOCAL: DRA. YOLANDA CABALLERO ARROYO
SECRETARIO: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
1er. SUPLENTE: M. en C. ROGELIO GREGORIO PEREDA-MIRANDA
2do. SUPLENTE: M. en C. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LOPEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO 124, DEPTO DE FARMACIA, EDIFICIO E FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

PERLA NOEMI SANCHEZ MONTERRUBIO

SUSTENTANTES:

DIEGO FERNANDO SOTO CARRILLO

ASESOR:

DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rachel Mata, por su valiosa colaboración y dirección en el desarrollo de ésta tesis.

Al M. en C. Atilano Gutiérrez del Instituto de Química por el registro de los espectros de RMN.

A la Q.F.B. Graciela Chávez y a la Q. Marisela Gutiérrez de la Facultad de Química, por la medida de los espectros de IR y rotación óptica.

A la Q. Georgina Duarte de la Facultad de Química por la obtención de los espectros de masas.

Al Dr. Robert Bye del jardín botánico del Instituto de Biología, de la UNAM, por proporcionar e identificar el material vegetal.

Al M. en C. Rogelio Pereda-Miranda y a la M. en C. Perla Castañeda, por el apoyo proporcionado, en la revisión del presente estudio.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana Luisa Anaya y a la Bióloga Blanca Hernández del Instituto de Fisiología Celular, quienes realizaron los ensayos biológicos relativos a la medida de los efectos sobre crecimiento vegetal y actividad antifúngica de los extractos, fracciones compuestos naturales y derivados semisintéticos de *Ratibida mexicana*.

También agradecemos a la Facultad de Química de la UNAM por el apoyo brindado a través del subprograma 127 "Formación Básica para la Investigación" y muy especialmente a la Profesora Magdalena Acosta Segura, Directora de este subprograma

DEDICATORIAS

A mis Padres

Con filial cariño y gratitud.

A mis hermanos

*Ruth, Yolanda, Elsa, Toña y Carlos, a quienes admiro,
y deseo lo mejor en la vida.*

A la Dra. Rachel Mata

*Con profundo respeto y agradecimiento, por su
profesionalismo y gran calidad humana.*

A las M. en C. Perla Castañeda y Adelina Jiménez

por sus valiosos consejos y su sincera amistad.

A la Facultad de Química.

*Con mucho afecto a: Chayo, Lety, Alicia, Martha, Carolina
y Lilly.*

*En especial a los estudiantes y maestros del Laboratorio
124.*

A mis amigos y compañeros, por su apoyo y confianza.

Perla N. Sánchez Monterrubio.

DEDICATORIAS

A mis padres.

Por el apoyo, cariño y comprensión que siempre me han brindado.

A mis hermanos.

Para que en este trabajo vean que con esfuerzo se logra conseguir las metas forjadas.

A la Dra. Rachel Mata.

Por su gran calidad humana y su apoyo en la realización de éste trabajo.

A Magda Sánchez.

Porque cuando necesité de alguien, sin importar la situación, estuvo conmigo.

A todos mis compañeros del Lab. 124.

Deseando que todos sus propósitos se cumplan.

A Artemio, Arturo, Ezequiel, Francisco, Gustavo, Miguel C., Miguel R. y Pablo.

D. Fernando Soto Carrillo.

INDICE

	Página
Lista de Cuadros.	i
Lista de Espectros.	iii
Lista de Figuras.	vi
Lista de Gráficas.	vii
Lista de abreviaturas.	x
	Página
I. INTRODUCCION	1
1. Antecedentes de <i>Ratibida mexicana</i> .	1
2. Lactonas sequiterpénicas como agentes alelopáticos.	2
II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	13
III: PARTE EXPERIMENTAL	15
1. Material vegetal.	15
2. Métodos de extracción y fraccionamiento preliminar.	15
3. Análisis cromatográficos.	15
4. Fraccionamiento secundario de la fracción hexánica.	17
5. Aislamiento y purificación de los compuestos de la fracción hexánica.	18
5.1. Obtención de la isoalloalantolactona.	18
5.2. Obtención del (-)selin-11-en-4 α -ol.	19
5.3. Obtención de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida.	20
6. Fraccionamiento secundario de la fracción metanólica acuosa.	22
6.1. Procesamiento de la fracción A.	22

6.1.1.	Obtención de cantidades adicionales de la isoalloalantolactona.	23
6.1.2.	Obtención del (-)-selina-4 α ,11-diol y del (+)-8-acetoxi-selina-4 α ,11-diol	24
6.2.	Procesamiento adicional de la fracción B.	25
6.2.1.	Aislamiento de β -D-glucositosterol.	25
6.2.2.	Aislamiento de sacarosa.	26
7.	Caracterización de los compuestos aislados.	26
7.1.	Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.	26
8.	Preparación de los derivados de la isoalloalantolactona.	26
8.1.	Preparación de la 3 α ,4 α -epoxi-5,7,8 α H-eudesma-11-en-8,12-ólida	26
8.2.	Preparación de la pirazolina de la isoalloalantolactona.	27
8.3.	Preparación de la 5,7,8,11 α H-eudesma-3-en-8,12-ólida.	28
9.	Ensayos biológicos.	28
9.1.	Determinación de la toxicidad para <i>Artemia salina</i> Leach.	28
9.2.	Determinación de la actividad alelopática y antifúngica de las fracciones, compuestos puros y algunos de sus derivados	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSION		30
1.	Obtención y fraccionamiento preliminar del extracto metanólico activo de <i>Ratibida mexicana</i> .	30
2.	Obtención y caracterización de los compuestos bioactivos de la fracción hexánica.	33
3.	Obtención y caracterización de los compuestos de la fracción metanólica acuosa.	42
4.	Obtención y caracterización de los derivados de la isoalloalantolactona.	48

5. Actividades biológicas de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida y de la isoalloalantolactona y sus derivados.	57
---	----

V. CONCLUSIONES	77
-----------------	----

VI. BIBLIOGRAFIA	123
------------------	-----

LISTA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Clasificación de los agentes semioquímicos de acuerdo con Whittaker y Feeny (1971).	4
Cuadro 2	Efectos alelopáticos de algunas lactonas sesquiterpénicas.	7
Cuadro 2a	Ejemplos de lactonas sesquiterpénicas con actividad alelopática demostrada.	10
Cuadro 3	Actividad citotóxica <i>in vitro</i> del extracto metanólico de <i>R. mexicana</i> .	13
Cuadro 4	Agentes cromogénicos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.	16
Cuadro 5	Sistemas de eluyentes empleados para los análisis cromatográficos en capa fina.	16
Cuadro 6	Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna de la fracción hexánica de <i>Ratibida mexicana</i> .	17
Cuadro 7	Resumen de la cromatografía en columna de las fracciones tóxicas III del Cuadro 6.	18
Cuadro 8	Resumen de la cromatografía en columna tipo flash con AgNO_3 de las fracciones IX del Cuadro 7.	19
Cuadro 9	Resumen de la cromatografía en columna tipo flash con AgNO_3 de las fracciones X del Cuadro 7.	20
Cuadro 10	Fraccionamiento mediante cromatografía en columna tipo flash de la fracción tóxica II del Cuadro 6.	21

Cuadro 11	Resumen del proceso cromatográfico de la fracción XXXIII del Cuadro 10.	21
Cuadro 12	Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna de la fracción A de <i>Ratibida mexicana</i> .	23
Cuadro 13	Resumen de la cromatografía en columna tipo flash con AgNO_3 de las fracciones XLIII del Cuadro 12.	24
Cuadro 14	Resumen del fraccionamiento en columna de la fracción B de <i>Ratibida mexicana</i> .	25
Cuadro 15	Efecto de las fracciones hexánica y metanólica acuosa de <i>R. mexicana</i> sobre <i>A. salina</i> .	31
Cuadro 16	Efecto de la fracción hexánica, de <i>R. mexicana</i> , sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos.	31
Cuadro 17	Efecto de la fracción metanólica acuosa, de <i>R. mexicana</i> , sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos.	32
Cuadro 18	Efecto de las fracciones hexánica y metanólica acuosa de <i>R. mexicana</i> sobre el crecimiento radicular de las malezas <i>E. crusgalli</i> y <i>A. hypochondriacus</i> .	32
Cuadro 19	Actividades biológicas de las fracciones secundarias II y III, derivadas del extracto hexánico.	34
Cuadro 20	Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la Elema-1,3,11-trien-8,12-ólida.	35
Cuadro 21	Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la Isoalloalantolactona.	39
Cuadro 22	Constantes espectroscópicas y espectrométricas del (-)-salin-11-en-4 α -ol.	44

Cuadro 23	Constantes espectroscópicas y espectrométricas del (-)selina-4 α ,11-diol.	45
Cuadro 24	Constantes espectroscópicas y espectrométricas del (+)8 α -acetoxi(-)-selina-4 α ,11-diol.	46
Cuadro 25	Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la 3 α ,4 α -epoxi-5,7,8 α H-eudesma-11-en-8,12-ólida.	50
Cuadro 26	Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la pirazolina de la <i>isoalbalanolactona</i> .	52
Cuadro 27	Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la 5,7,8,11 α H-eudesma-3-en-12,8-ólida.	55

LISTA DE ESPECTROS

		Página
Espectro 1	Espectro de masas de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida.	78
Espectro 2	Espectro de IR de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida.	79
Espectro 3	Espectro de RMN- ¹³ C de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida.	80
Espectro 3a	Espectro DEPT de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida.	81
Espectro 3b	Espectro HETCOR de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida.	82
Espectro 4	Espectro de RMN- ¹ H de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida.	83
Espectro 4a	Espectro COSY de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida.	84
Espectro 5	Espectro de masas de la isoalloalantolactona.	85
Espectro 6	Espectro de IR de la isoalloalantolactona.	86
Espectro 7	Espectro de RMN- ¹³ C de la isoalloalantolactona.	87
Espectro 7a	Espectro DEPT de la isoalloalantolactona.	88
Espectro 8	Espectro de RMN- ¹ H de la isoalloalantolactona.	89
Espectro 9	Espectro de masas del (-)selin-11-en-4 α -ol.	90
Espectro 10	Espectro de IR del (-)selin-11-en-4 α -ol.	91
Espectro 11	Espectro de RMN- ¹³ C del (-)selin-11-en-4 α -ol.	92
Espectro 11a	Espectro DEPT del (-)selin-11-en-4 α -ol.	93
Espectro 12	Espectro de RMN- ¹ H del (-)selin-11-en-4 α -ol.	94
Espectro 12a	Espectro COSY del (-)selin-11-en-4 α -ol.	95
Espectro 12b	Espectro HETCOR del (-)selin-11-en-4 α -ol.	96
Espectro 13	Espectro de masas del (-)selin-4 α ,11-diol.	97
Espectro 14	Espectro de IR del (-)selin-4 α ,11-diol.	98
Espectro 15	Espectro de RMN- ¹³ C del (-)selin-4 α ,11-diol.	99

Espectro 15a	Espectro DEPT del (-)selin-4 α ,11-diol.	100
Espectro 16	Espectro de RMN- ¹ H del (-)selin-4 α ,11-diol.	101
Espectro 17	Espectro de masas del (+)8 α -acetoxi-selin-4 α ,11-diol.	102
Espectro 18	Espectro de IR del (+)8 α -acetoxi-selin-4 α ,11-diol.	103
Espectro 19	Espectro de RMN- ¹³ C del (+)8 α -acetoxi-selin-4 α ,11-diol.	104
Espectro 19a	Espectro DEPT del (+)8 α -acetoxi-selin-4 α ,11-diol.	105
Espectro 20	Espectro de RMN- ¹ H del (+)8 α -acetoxi-selin-4 α ,11-diol.	106
Espectro 20a	Espectro COSY del (+)8 α -acetoxi-selin-4 α ,11-diol.	107
Espectro 21	Espectro de masas de la 3 α ,4 α -epoxi-5,7,8 α H-eudesma-11-en-8,12- δ lida.	108
Espectro 22	Espectro de IR de la 3 α ,4 α -epoxi-5,7,8 α H-eudesma-11-en-8,12- δ lida.	109
Espectro 23	Espectro de RMN- ¹³ C del 3 α ,4 α -epoxi-5,7,8 α H-eudesma-11-en-8,12- δ lida.	110
Espectro 24	Espectro de RMN- ¹ H del 3 α ,4 α -epoxi-5,7,8 α H-eudesma-11-en-8,12- δ lida.	111
Espectro 25	Espectro de masas de la pirazolina de la isoalantalactona.	112
Espectro 26	Espectro de IR de la pirazolina de la isoalantalactona.	113
Espectro 27	Espectro de RMN- ¹³ C de la pirazolina de la isoalantalactona.	114
Espectro 27a	Espectro DEPT de la pirazolina de la isoalantalactona.	115
Espectro 28	Espectro de RMN- ¹ H de la pirazolina de la isoalantalactona.	116

Espectro 29	Espectro de masas de la 5,7,8,11 α H-eudesma-3-en-8,12- ólida.	117
Espectro 30	Espectro de IR de la 5,7,8,11 α H-eudesma-3-en-8,12- ólida.	118
Espectro 31	Espectro de RMN- ¹³ C de la 5,7,8,11 α H-eudesma-3-en- 8,12-ólida.	119
Espectro 31a	Espectro DEPT de la 5,7,8,11 α H-eudesma-3-en-8,12- ólida.	120
Espectro 32	Espectro de RMN- ¹ H de la 5,7,8,11 α H-eudesma-3-en- 8,12-ólida.	121
Espectro 33	Espectro de RMN- ¹ H de la 5,7,8,11 α H-eudesma-3-en- 8,12-ólida en C ₆ D ₆ .	122

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Espectro HETCOR de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida.	37
Figura 2	Espectro HETCOR de la <i>isoalloalantolactona</i> .	40
Figura 3	Espectro COSY de la <i>isoalloalantolactona</i> .	41
Figura 4	Espectro COSY de la pirazolina de la <i>isoalloalantolactona</i> .	53
Figura 5	Espectro HETCOR de la pirazolina de la <i>isoalloalantolactona</i> .	54

LISTA DE GRAFICAS

	Página
Gráfica 1	Efecto de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> . 58
Gráfica 2	Efecto de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos (1a lec.). 59
Gráfica 3	Efecto de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos (2a lec.). 60
Gráfica 4	Efecto de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos (1a lec.). 62
Gráfica 5	Efecto de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos (2a lec.). 63
Gráfica 6	Efecto de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> 64
Gráfica 7	Efecto de los derivados de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> . 69
Gráfica 8	Efecto de los derivados de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radicular de <i>E. crusgalli</i> . 70
Gráfica 9	Efecto de los derivados de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radial de <i>Pythium sp.</i> (1a lec.) 71
Gráfica 10	Efecto de los derivados de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radial de <i>Pythium sp.</i> (2a lec.). 72
Gráfica 11	Efecto de los derivados de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radial de <i>F. oxysporum</i> (1a lec.). 73

- Gráfica 12** Efecto de los derivados de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum* (2a lec.) **74**
- Gráfica 13** Efecto de los derivados de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radial de *Helminthosporium sp.* (1a lec.) **75**
- Gráfica 14** Efecto de los derivados de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radial de *Helminthosporium sp.* (2a lec.) **76**

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt:	Acetato de etilo.
CHCl ₃ :	Cloroformo.
CDCl ₃ :	Cloroformo deuterado.
C ₆ H ₆ -d ₆ :	Benceno deuterado.
Benc.:	Benceno.
MeOH:	Metanol.
Hex.:	Hexano.
d:	Doblete.
dd:	Doblete dobleteado.
m:	Multiplete.
s:	Singulete.
sa:	Singulete ancho.
td:	Triplete dobleteado.
dc:	Doblete cuarteteado.
J:	Constante de acoplamiento.
δ:	Desplazamiento químico.
Hz:	Hertz.
TMS:	Tetrametilsilano.
RMN- ¹ H:	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno.
RMN- ¹³ C:	Resonancia magnética nuclear de carbono 13.
IR:	Infrarrojo.
μl:	microlitros.
EMIE:	Espectro de masas por impacto electrónico.

EMIQ:	Espectro de masas por ionización química.
m/z:	Relación masa-carga.
int.rel.:	Intensidad relativa.
CL ₅₀ :	Concentración letal media.
DE ₅₀ :	Dosis efectiva media.
CI ₅₀ :	Concentración inhibitoria media.
KBr:	Bromuro de potasio.
p.f.:	Punto de fusión.
hrs.:	Horas.
N.D.:	No determinado.
Lec.:	Lectura.
Dec.:	Descomposición.

I. INTRODUCCION

1. ANTECEDENTES DE LA *Ratibida mexicana*.

El género *Ratibida* Richards pertenece a la familia Asteraceae (tribu Heliantheae) e incluye seis especies. Las especies *Ratibida latipalearis* Richards y *Ratibida mexicana* se utilizan ampliamente en la medicina tradicional Tarahumara (Watson), (W.M. Sharp). La primera se emplea en el tratamiento de heridas de la piel, inflamaciones y dolores de cabeza. Las raíces de la segunda se utilizan para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, resfriados, reumatismo, inflamaciones de la piel y como agente antiséptico. Por otra parte, las hojas de ésta se utilizan para los dolores de cabeza (Richards, 1969).

La *Ratibida mexicana* (sin.: *Lepachis mexicana* Watson) es una hierba perenne, endémica del estado de Chihuahua, donde los indios tarahumaras, le denominan "Howinowa" (Richards, 1969) y "ónawa" (Bye 1992, comunicación personal). La especie se localiza principalmente en los bosques de pinos y en los prados de la Sierra Madre Occidental, Chihuahua, donde crece de manera aislada. Esta observación sugiere que la especie contiene metabolitos secundarios de importancia ecológica (Bye 1993, comunicación personal).

Los estudios químicos acerca del género *Ratibida* son recientes y únicamente se han investigado las especies *R. columnifera*, *R. peduncularis* y *R. latipalearis*. Las investigaciones sobre *R. columnifera* y *R. peduncularis* condujeron al aislamiento e identificación de veintiseis lactonas sesquiterpénicas de los tipos xantanólidas (Elmayerer *et al.*, 1987, Herz *et al.*, 1985), ratibidanólidas (Herz *et al.*, 1985), elemanólidas (Herz *et al.*,

1985), y eudesmanólicas (Herz *et al.*, 1985, Ellmauerer *et al.*, 1987); tres flavonas (Herz *et al.*, 1985 Ellmauerer *et al.*, 1987), un fenilpropanoide (Ellmauerer *et al.*, 1987), tres acetilenos (Herz *et al.*, 1985, Ellmauerer *et al.*, 1987) y dos sesquiterpenos simples (Herz *et al.*, 1985).

Por otra parte, el estudio químico biodirigido de *R. latipalearis* mediante la determinación de la toxicidad para *A. salina* y del efecto sobre el crecimiento de bacterias y una levadura permitió el aislamiento e identificación de dos lactonas sesquiterpénicas citotóxicas y dos flavonoides antimicrobianos; las lactonas se caracterizaron como la ratibinólida I y la ratibinólida II; y los flavonoides como la hispidulina y la pedalitina. De manera adicional, se obtuvo un glicósido inactivo del tipo germacranólida el cual se caracterizó como la $2\alpha\text{-}\beta\text{-D-glucopiranosil-}\Delta^{10,4(15)}$ germacradien- $6\alpha,7\beta,11\beta\text{-}\text{ólida}$ (Rojas, 1990 y Jiménez, 1992).

Por último, en un trabajo reciente se demostró que el extracto metanólico de *R. mexicana* tiene propiedades citotóxicas, antifúngicas e inhibitorias del crecimiento vegetal. Sin embargo, el extracto resultó inactivo en contra de bacterias Gram (+) y Gram (-) y de la levadura *Candida albicans* (Cocoletzi, 1993).

2. LACTONAS SESQUITERPENICAS COMO AGENTES ALELOPATICOS.

Los organismos vivos de los reinos animal, vegetal y protista interaccionan con su medio ambiente inmediato por medio de moléculas químicas, estas moléculas son conocidas como semioquímicos (señaladores químicos).

Los semioquímicos son sustancias que un organismo puede detectar en su medio ambiente y que pueden modificar su comportamiento o

fisiología. Es decir, éstas son sustancias que transmiten mensajes químicos y que regulan las interacciones entre dos organismos, los cuales pueden ser de la misma (intraespecífico) o de diferente especie (interespecífico).

Whittaker y Feeny (1971) clasificaron a los agentes semioquímicos considerando la naturaleza inter o intraespecífica de la relación, y por otra parte, si los efectos resultantes de la interacción constituyen una ventaja en el proceso evolutivo de las especies participantes. Esta clasificación se resume en el Cuadro 1.

A los agentes semioquímicos que participan en las interacciones planta-planta y planta-microorganismo se les ha denominado de manera tradicional como agentes alelopáticos. La mayoría de los agentes alelopáticos descritos a la fecha forman parte de los denominados metabolitos secundarios y prácticamente casi todas las categorías estructurales de metabolitos secundarios incluyen ejemplos de éstos semioquímicos. Uno de los grupos de metabolitos secundarios que han sido más estudiados como agentes alelopáticos son las lactonas sesquiterpénicas (Fischer *et al.*, 1986, 1991; Picman, 1986; Elakovich, 1988; *inter alia*).

Las lactonas sesquiterpénicas son metabolitos secundarios de origen mevalónico. Se encuentran distribuidas en más de 15 familias de plantas, predominantemente en las Asteráceas, y representan uno de los grupos más grandes de productos naturales, incluyendo cerca de 3500 compuestos (Fischer *et al.*, 1979; Seaman, 1982; Picman, 1986). De manera adicional, las lactonas sesquiterpénicas se han encontrado en las hepáticas, donde se produce la serie enantiomérica opuesta a la biosintetizada en las plantas superiores (Asakawa, 1982). La biogénesis de varias clases de esqueletos de lactonas sesquiterpénicas fué revisada recientemente por Fischer (1990).

Cuadro 1. Clasificación de los agentes semioquímicos de acuerdo con Whittaker y Feeny (1971).

I. Efectos químicos interespecíficos (o efectos aleloquímicos).

A. Alomonas: ventaja adaptativa para el organismo que las produce.

1. Repelentes.
2. Sustancias de escape (tintas de cefalópodos, etc.).
3. Supresores (antibióticos, etc.).
4. Venenos.
5. Inductores.
6. Neutralizantes.
7. Atractores (atracción de la presa hacia el depredador).

B. Caíromonas: ventaja adaptativa para el organismo que las recibe.

1. Señuelos químicos.
2. Inductores que estimulan la adaptación.
3. Señales que advierten al organismo que las recibe acerca de peligro o toxicidad.

C. Depresores: Productos de desecho, etc. que inhiben o envenenan al organismo que los recibe sin una ventaja adaptativa para quien los produce.

II. Efectos intraespecíficos.

A. Autotoxinas: productos tóxicos de desecho para quien los produce sin una ventaja para otras especies.

B. Autoinhibidores de adaptación: limitan los niveles de población hacia su posición de equilibrio.

C. Feromonas:

Sexuales, sociales, de alarma y defensa y de limitación de territorio.

El grupo funcional común a la mayoría de las lactonas sesquiterpénicas de origen natural es la α -metileno- γ -lactona. Sin embargo, estos compuestos pueden presentar también grupos aldehídicos y cetónicos α,β -insaturados, ésteres y funciones epóxido. Todos estos grupos funcionales tienen propiedades alquilantes y pueden reaccionar con nucleófilos biológicos, en particular con los grupos tiol de muchas enzimas involucradas en numerosos procesos bioquímicos. En consecuencia, las lactonas sesquiterpénicas, además de los efectos alelopáticos y fitotóxicos ya mencionados, exhiben un amplio espectro de actividades biológicas (Rodríguez *et al.*, 1976, Stevens, 1984), incluyendo las siguientes: citotóxica y antitumoral (Cassady y Suffness, 1980), antimicrobiana (Lee *et al.*, 1977), insecticida (Smith *et al.*, 1983), molusquicida (Marston y Hostettmann, 1985), antimalárica (Klayman, 1985), e inmunoestimulante (Arlette y Mitchell, 1981), entre otras.

En relación a los efectos alelopáticos y fitotóxicos de las lactonas sesquiterpénicas, se han publicado algunas revisiones entre las que destacan las de Fischer (1986, 1991), Picman (1986) y Elakovich (1988). La mayoría de los estudios versan sobre los efectos de regulación del crecimiento y de la germinación de plantas cultivadas y malezas. En el Cuadro 2 se resumen las actividades demostradas por algunas lactonas sesquiterpénicas y en el Cuadro 2a se enlistan las estructuras correspondientes.

Como se desprende de la información del Cuadro 2, en la mayoría de los casos los efectos observados sobre el crecimiento vegetal y/o la germinación fueron inhibitorios, encontrándose una dependencia entre la concentración y la actividad demostrada. Sin embargo, en otras investigaciones, como en la realizada con la solstitólida (12), se encontró

que a bajas concentraciones (10-20 $\mu\text{g/ml}$) se estimuló el crecimiento radicular de la lechuga y, por el contrario, a altas concentraciones (mayores de 50 $\mu\text{g/ml}$) se inhibió el mismo (Stevens y Merrill, 1985). Las pseudoguayanólidas (1) y (3), las germacranólidas (14), (15) y (16), así como sus respectivos diepóxidos y 11,13-dihidroderivados sólo promueven la germinación de la maleza *Striga asiática* a concentraciones de 10^{-5} a 10^{-9} M (Fischer *et al.*, 1990).

Por último, las pseudoguayanólidas partenina (1) y coronopilina (2), constituyentes mayoritarios de *Pharthenium hysterophorus*, demostraron autotoxicidad en contra de plántulas y plantas viejas (Picman y Picman, 1984; Jarvis *et al.*, 1985).

Cuadro 2. Efectos alelopáticos de algunas lactonas sesquiterpénicas.

LACTONA SESQUITERPENICA	EFEECTO DEMOSTRADO	REFERENCIA
Partenina (1). Coronopilina (2).	Autotóxicas para plántulas y plantas viejas de <i>Partenium hysterophorus</i> .	Picman y Picman, 1984. Jarvis <i>et al.</i> , 1985.
Peruvina (4).	Inhibe la germinación de la lechuga y el crecimiento de plántulas de arroz a 250 µg/ml.	Watanabe <i>et al.</i> , 1981.
Tomentosina (7).	Inhiben la germinación de <i>Abutilon theophrasti</i> , maleza perjudicial para la agricultura, a la concentración de 10 ⁻³ M.	Spencer <i>et al.</i> , 1984.
Axivalina (6).	Inhibe el crecimiento radicular de <i>Abutilon theophrasti</i> a 10 ⁻³ M.	Spencer <i>et al.</i> , 1984.
11βH,13-Dihidrotartidina B (8).	A 10 µg/ml no tiene efectos sobre la germinación de <i>Brassica rapa</i> L. var. pervidis Bailey, pero inhibe significativamente el crecimiento de la raíz.	Sashida <i>et al.</i> , 1983.
Niveusina B (9). Niveusina C (10).	Producen reducción lineal en el crecimiento de coleóptilos de avena.	Spring <i>et al.</i> , 1981 y 1982.
Heliangina (11).	Inhibe la elongación de secciones de coleóptilos de avena y promueve la formación de raíces adventicias en hipocótilos de plántulas de <i>Phaseolus mungo</i> .	Shibaoka <i>et al.</i> , 1967.
Solstitólida (12).	A concentraciones de 10-20 µg/ml la lactona promueve la elongación de la raíz de la lechuga pero la inhibió a concentraciones arriba de 50 µg/ml.	Stevens y Merrill, 1985.
Cnicina (13).	A 200 µg/ml y concentraciones mayores inhibe la germinación de diversas dicotiledoneas y monocotiledoneas y retrasan el crecimiento de las raíces de estas especies.	Kelsey y Locken, 1987.

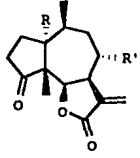
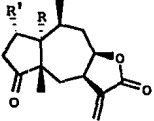
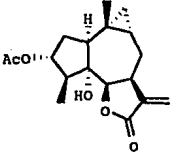
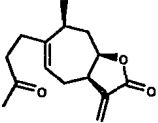
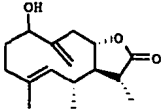
Cuadro 2. Efectos alelopáticos de algunas lactonas sesquiterpénicas (continuación).

LACTONA SESQUITERPENICA	EFEECTO DEMOSTRADO	REFERENCIA
Costunólida (14).	Promovió la germinación de pepino, zanahoria y sorgo e inhibió la del trigo, el centeno bállico y <i>Amaranthus palmieri</i> a concentraciones entre 50 y 100 μM .	Fischer y Quijano, 1985.
Isoalantodieno (17).	A 20 $\mu\text{g/ml}$ causó un incremento de seis veces la iniciación de la formación de raíces adventicias en hipocótilos de <i>Vigna radiata</i> . A 40 $\mu\text{g/ml}$ se triplicó la actividad de la nitrato reductasa en cortes de plántulas de <i>V. radiata</i> .	Kalsi <i>et al.</i> , 1989.
Zaluzanina C (18). Zaluzanina D (19). 8 α -Acetoxizaluzanina D (20).	A 100 $\mu\text{g/ml}$ la zaluzanina C y a 50 $\mu\text{g/ml}$ la zaluzanina D inhibieron totalmente la germinación y el crecimiento del arroz. A 50 $\mu\text{g/ml}$ la 8 α -acetoxizaluzanina D presentó los mismos efectos.	Asakawa <i>et al.</i> , 1981.
Artemisinina (21).	Inhibe la germinación y reduce el crecimiento de raíces y brotes de lechuga. Además afecta a otras málezas y plantas cultivadas. Se demostró que es una fitotoxina selectiva que reduce el crecimiento por un mecanismo diferente a la inhibición de síntesis de proteínas.	Duke <i>et al.</i> , 1987. Duke <i>et al.</i> , 1988.
3 β -Hidroxycostunólida (22).	Inhibe la germinación y el crecimiento radicular de plántulas de arroz a concentraciones entre 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$.	Asakawa <i>et al.</i> , 1984.
Confertiflorina (3). Partenina (1).	Incrementan significativamente la germinación de la <i>Striga asiática</i> , planta parásita de raíces de plantas comestibles, a concentraciones de 10^{-4} M.	Fischer <i>et al.</i> , 1989.

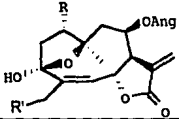
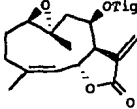
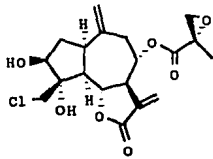
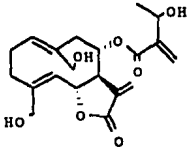
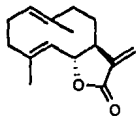
Cuadro 2. Efectos alelopáticos de algunas lactonas sesquiterpénicas (continuación).

LACTONA SESQUITERPENICA	EFECTO DEMOSTRADO	REFERENCIA
Dihidropartenólida (16).	Estimula en un 70% la germinación de la <i>Striga asiática</i> en un intervalo de concentración de 10^{-7} a 10^{-9} M.	Fischer <i>et al.</i> , 1989.
Costunólida (14). Partenólida (15). Dihidropartenólida (16).	Causan del 40 al 65% de estimulación de la germinación de <i>Striga asiática</i> a concentraciones entre 10^{-5} y 10^{-9} M.	Fischer <i>et al.</i> , 1990.
Peruvina (4). Burrodina (5).	Promueven significativamente la germinación de <i>Striga</i> a concentraciones de 10^{-4} y 10^{-6} M. A concentraciones 10^{-7} a 10^{-9} M no se observa efecto; en contraste, sus dihidroderivados mostraron una actividad significativa a la concentración de 10^{-9} M.	Fischer <i>et al.</i> , 1990.

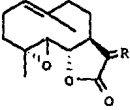
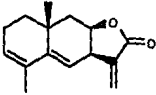
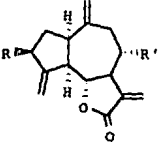
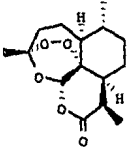
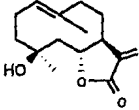
Cuadro 2a. Ejemplos de lactonas sesquiterpénicas con actividad alelopática demostrada.

 <p>The structure shows a bicyclic sesquiterpene lactone core. It features a five-membered lactone ring fused to a seven-membered ring. There are two methyl groups on the seven-membered ring, one with a wedge and one with a dash. A carbonyl group is attached to the seven-membered ring. Substituents R and R' are shown at various positions on the rings.</p>	<p>(1) Partenina, R=OH, R'=H. (2) Coronopilina, R=OH, R'=H. (3) Confertiflorina, R=H, R'=OAc.</p>
 <p>The structure is similar to the first one, showing a bicyclic sesquiterpene lactone core with a five-membered lactone ring and a seven-membered ring. It has two methyl groups on the seven-membered ring and a carbonyl group. Substituents R and R' are present.</p>	<p>(4) Peruvina, R=OH, R'=H. (5) Burrodina, R=H, R'=OH.</p>
 <p>The structure shows a bicyclic sesquiterpene lactone core. It has a five-membered lactone ring fused to a seven-membered ring. There are two methyl groups on the seven-membered ring and a carbonyl group. Substituents include an acetoxy group (AcO), a hydroxyl group (HO), and a hydrogen atom (H) on the seven-membered ring.</p>	<p>(6) Axivalina.</p>
 <p>The structure shows a bicyclic sesquiterpene lactone core. It has a five-membered lactone ring fused to a seven-membered ring. There is a double bond in the seven-membered ring and a carbonyl group. There are two methyl groups on the seven-membered ring.</p>	<p>(7) Tomentosina.</p>
 <p>The structure shows a bicyclic sesquiterpene lactone core. It has a five-membered lactone ring fused to a seven-membered ring. There is a double bond in the seven-membered ring and a carbonyl group. There are two methyl groups on the seven-membered ring and a hydroxyl group (OH) on the five-membered ring.</p>	<p>(8) 11βH,13-Dihidrotartidina B.</p>

Cuadro 2a. Ejemplos de lactonas sesquiterpénicas con actividad alelopática demostrada (Continuación).

	<p>(9) Niveusina B, R=H, R'=OH. (10) Niveusina C, R=OH, R'=H.</p>
	<p>(11) Heliangina</p>
	<p>(12) Solstitólida.</p>
	<p>(13) Cnicina.</p>
	<p>(14) Costunólida.</p>

Cuadro 2a. Ejemplos de lactonas sesquiterpénicas con actividad alelopática demostrada (Continuación).

	<p>(15) Partenólida, $R = CH_2$. (16) 11βH,13-Dihidropartenólida $R = 11\beta H, 11\alpha Me$.</p>
	<p>(17) Isoalantodieno.</p>
	<p>(18) Zalusanina C, $R = OH, R' = H$ (19) Zalusanina D, $R = OAc, R' = H$ (20) 8α-Acetoxizalusanina D, $R = R' = OAc$.</p>
	<p>(21) Artemisinina.</p>
	<p>(22) β-Hidroxycostunólida.</p>

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

En los estudios biológicos preliminares sobre *Ratibida mexicana* (Cocoletzi, 1993), se demostró que el extracto metanólico presenta una alta toxicidad para *Artemia salina* (CL_{50} de 62.27 $\mu\text{g/ml}$), y una considerable actividad citotóxica *in vitro* para los sistemas de tumores que se indican en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Actividad citotóxica *in vitro* del extracto metanólico de *R. mexicana* (Cocoletzi, 1993).

LÍNEA CELULAR	TIPO DE CÁNCER	DE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
BC-1	Cáncer de pecho humano	3.0
HT-1080	Fibrosarcoma humano	7.3
Lu-1	Cáncer pulmonar humano	3.4
Mel-2	Melanoma humano	2.8
Col-2	Cáncer de colon	2.6
KB	Carcinoma epidermoide	3.7
KB-V	Carcinoma epidermoide resistente a vinblastina	2.7
P-388	Leucemia de mórvidos	0.6
A431	Carcinoma epidermoide humano	4.9
LNCaP	Cáncer de próstata humano	1.8
ZR75-1	Cáncer de pecho humano	4.0
U373	Glioblastina	3.5

De manera adicional, el extracto inhibió significativamente el crecimiento radicular de las semillas de las especies *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*, obteniéndose dosis inhibitorias medias (CL_{50}) de 41.18 $\mu\text{g/ml}$ y 213.73 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Por último se demostró una actividad antifúngica para el extracto metanólico de esta especie ya que inhibió de manera selectiva, el crecimiento radial de dos especies fitopatógenas (*Helminthosporium sp.* y *Phytium sp.*) a las concentraciones ensayadas (50 y 200 µg/ml).

El fraccionamiento del extracto activo mediante un proceso de partición entre hexano y metanol acuoso seguido de las evaluaciones biológicas de las fracciones resultantes permitió comprobar que la actividad se concentraba principalmente en la fracción hexánica (Cocoletzi, 1993).

Con base en estos antecedentes y considerando que los extractos vegetales con propiedades biológicas demostradas constituyen fuentes valiosas de principios activos, el presente trabajo tiene como objetivo general aislar y caracterizar los principios activos responsables de las actividades antifúngicas, citotóxicas e inhibitorias del crecimiento vegetal detectadas en el extracto metanólico de *Ratibida mexicana*. Para el cumplimiento de éste propósito se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar el estudio químico biodirigido del extracto activo, mediante el empleo de técnicas fitoquímicas convencionales y los ensayos biológicos apropiados.
2. Caracterizar los compuestos activos mediante métodos químicos y espectroscópicos.
3. Preparar algunos derivados semisintéticos de los compuestos naturales más activos con la finalidad de evaluar el cambio de la actividad biológica en función de las modificaciones estructurales.

III. PARTE EXPERIMENTAL

1. MATERIAL VEGETAL.

Las raíces de *Ratibida mexicana* se colectaron en el municipio de Guachochic, Cusárare, Chihuahua en diciembre de 1991. Una muestra de referencia (voucher, Bye y Linares 18336) se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología, UNAM.

El material vegetal se secó a temperatura ambiente y se pulverizó en un molino de cuchillas modelo T. Wiley 4.

2. METODOS DE EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR.

El material vegetal molido (3.2 Kg) se extrajo seis veces con un volumen total de 72 litros de metanol anhidro, dejando entre cada extracción un período de 48 hrs. y al término de éstas se filtró y concentró al vacío, obteniéndose un total de 397 g de extracto seco.

El extracto obtenido se fraccionó de manera preliminar mediante un proceso de partición, disolviendo la muestra en un litro de metanol acuoso al 10% y extrayendo tres veces con 400 ml de hexano. Las dos fracciones primarias resultantes se concentraron al vacío para generar 56.5 g de la fracción hexánica y 340.5 g de la fracción metanólica acuosa.

3. ANALISIS CROMATOGRAFICOS.

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de

silice (sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck), varios sistemas de elución y diferentes agentes cromógenos. Los reactivos reveladores y los sistemas de eluyentes empleados se resumen en los Cuadros 4 y 5 respectivamente.

Cuadro 4. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

REACTIVO	AGENTES CROMOGENOS (COMPOSICION)	REFERENCIA
Sulfato cérico	12 g de sulfato cérico 22.2 ml de H ₂ SO ₄ concentrado 350 g de hielo picado	Stahl, 1969
H ₂ SO ₄ 10%	10 ml de H ₂ SO ₄ concentrado 90 ml de H ₂ O destilada	
Anisaldehído	0.5 ml de anisaldehído 9 ml de etanol 0.5 ml de H ₂ SO ₄ concentrado 1 ml de ácido acético	

*En todos los casos para el desarrollo de color fué necesario calentar por dos minutos a 110°C aproximadamente.

Cuadro 5. Sistemas de eluyentes empleados para los análisis cromatográficos en capa fina.

SIST. DE ELUYENTES	COMPOSICION	PROPORCION
A	Benceno/AcOEt	Diversas
B	Hexano/AcOEt	Diversas
C	CHCl ₃ /MeOH	Diversas
D	Hexano/Acetona	Diversas
E	Acetona/H ₂ O	9:1

4. FRACCIONAMIENTO SECUNDARIO DE LA FRACCION HEXANICA.

La fracción hexánica se fraccionó de manera secundaria mediante una cromatografía en columna preparativa, empleando como adsorbente gel de sílice (523 g de sílica gel G-60 Merck gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 70-230); el proceso de elución se llevo a cabo con hexano y hexano/AcOEt en diferentes proporciones. Se recogieron un total de 210 fracciones de 200 ml cada una y se analizaron por cromatografía an capa fina combinándose aquellas que presentaron características cromatográficas similares. En el Cuadro 6 se resumen los sistemas de eluyentes empleados, las fracciones combinadas y la toxicidad para *Artemia salina*. Esta última se puede expresar en terminos de concentración letal media (CL₅₀) o en % de mortalidad.

Cuadro 6. Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna de la fracción hexánica de *Ratibida mexicana*.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCION COMBINADA	CL ₅₀ (µg/ml)
Hexano	100	1-35	I	> 1000
Hexano/AcOEt	90:10	36-40	II	271.73
		41-46	III	90.77
		47-57	IV	> 1000
		58-99	V	> 1000
Hexano/AcOEt	80:20	100-164	VI	> 1000
Hexano/AcOEt	50:50	165-210	VII	> 1000

5. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS COMPUESTOS DE LA FRACCION HEXANICA.

5.1. Obtención de la Isoalloalantolactona (23).

La fracción tóxica III (Cuadro 6), se recromatografió en una columna abierta sobre 480 g de gel de sílice. Se recogieron un total de 184 fracciones de 50 ml cada una utilizando como eluyentes benceno, mezclas de benceno/AcOEt en diferentes proporciones y AcOEt. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina combinándose, como en el caso de la columna original, aquellas que resultaron similares. En el Cuadro 7 se resumen los sistemas de elución empleados, las fracciones combinadas y la toxicidad para *A. salina*.

Cuadro 7. Resumen de la cromatografía en columna de las fracciones tóxicas III del Cuadro 6.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCION COMBINADA	CL ₅₀ (µg/ml)
Benceno	100	1-17	VIII	> 1000
		18-30	IX	90.00
		31-61	X	> 1000
		62-85	XI	> 1000
Benc/AcOEt	95:05	86-95	XII	> 1000
		96-103	XIII	> 1000
Benc/AcOEt	85:15	104-121	XIV	> 1000
Benc/AcOEt	75:25	122-146	XV	> 1000
Benc/AcOEt	50:50	147-167	XVI	> 1000
AcOEt	100	168-184	XVII	> 1000

De las fracciones IX (Cuadro 7) cristalizaron espontáneamente 950.8 mg de la isoalloalantolactona (23), $[\alpha]_D^{25} = +119^\circ$ (1, CHCl_3) a 25°C y con $\text{pf} = 74-75^\circ\text{C}$, el cual fué separado por decantación. Es importante mencionar que al concentrar las fracciones XII-XVII al vacío se obtuvieron residuos con apariencia de polímero los cuales resultaron inactivos en las evaluaciones contra *A. salina*.

El aceite del cual cristalizó el compuesto anterior, fué cromatografiado en una columna tipo flash sobre gel de sílice desactivada al 10% con una solución al 10% de AgNO_3 se obtuvieron 70 fracciones de 20 ml cada una; el sistema de elución empleado fué hex./AcOEt en diferentes proporciones. El Cuadro 8 resume este proceso cromatográfico.

Cuadro 8. Resumen de la cromatografía en columna tipo flash con AgNO_3 de las fracciones IX del Cuadro 7.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCION COMBINADA	CL_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Hexano/AcOEt	90:10	1-28	XVIII	> 1000
Hexano/AcOEt	80:20	29-32	XIX	45.31
		33-36	XX	> 1000
Hexano/AcOEt	70:30	37-70	XXI	> 1000

De las fracciones XIX de ésta columna cristalizaron 778.8 mg adicionales del producto (23). La cantidad total de (23) obtenida de la fracción hexánica fué de 1.726 g.

5.2. Obtención de (-)selin-11-en-4 α -ol (24).

La fracción inactiva X del Cuadro 7 fué cromatografiada sobre gel de sílice (sílica gel para cromatografía flash 40 μm , Baker), impregnada al 10%

con una solución al 10% de AgNO_3 . Se obtuvieron 86 fracciones de 2.5 ml cada una. Las fracciones obtenidas se cromatografiaron en capa fina y se unieron de acuerdo con sus características cromatográficas. De la fracción XXV de esta columna (Cuadro 9) se obtuvieron 14 mg del (-)-selin-11-en-4 α -ol (**24**) (0.00044% de rendimiento en base a planta seca), cromatográficamente puro, de p.f. = 82-84°C y $[\alpha]_D = -23.90^\circ$ (1, CHCl_3), a 25°C.

Cuadro 9. Resumen de la cromatografía en columna tipo flash con AgNO_3 de las fracciones X del Cuadro 7.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCION COMBINADA	CL_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Hexano	100	1-8	XXII	> 1000
Hexano/AcOEt	90:10	9-17	XXIII	> 1000
Hexano/AcOEt	80:20	18-64	XXIV	> 1000
Hexano/AcOEt	70:30	65-78	XXV	> 1000
Hexano/AcOEt	50:50	79-81	XXVI	> 1000
AcOEt	100	82-86	XXVII	> 1000

5.3. Obtención de Elema-1,3,11-trien-8,12-óida (**25**).

La fracción tóxica II del Cuadro 6 se recromatografió en una columna tipo flash sobre 280 g de gel de sílice (sílica gel G 60 gránulos 0.2-0.5 mm, malla 70-230). La elución se llevo a cabo con una mezcla de hex/AcOEt 9:1. Se recogieron un total de 40 fracciones de 50 ml, uniéndose aquellas cromatográficamente similares. En el cuadro 10 se resumen éstos resultados.

La fracción XXXIII de ésta última columna (Cuadro 10) se recromatografió en una columna tipo flash, de la misma manera como se hizo anteriormente, utilizando 2.5 g de gel de sílice como adsorbente. En

esta ocasión los eluyentes fueron benceno, mezclas de benceno/AcOEt y AcOEt; se obtuvieron 39 fracciones de 50 ml cada una y se recromatografiaron en capa fina para unir aquellas que revelaran de manera similar. Estos resultados se presentan en el Cuadro 11.

Cuadro 10. Fraccionamiento mediante cromatografía en columna tipo flash de la fracción tóxica II del Cuadro 6.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCION	CL ₅₀ µg/ml
Hexano/AcOEt	90:10	1-8	XXVIII	> 1000
Hexano/AcOEt	90:10	9-12	XXIX	269.86
Hexano/AcOEt	90:10	13-17	XXX	25.77
Hexano/AcOEt	90:10	18-28	XXXI	> 1000
Hexano/AcOEt	90:10	29-33	XXXII	122.20
Hexano/AcOEt	90:10	34-40	XXXIII	33.46

Cuadro 11. Resumen del proceso cromatográfico de la fracción XXXIII del Cuadro 10.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCION COMBINADA	% DE MORTALIDAD A 100 µg/ml
Benceno	100	1-5	XXXIV	90
		6-13	XXXV	70
		14-19	XXXVI	0.0
		20-21	XXXVII	0.0
Benc/AcOEt	95:05	22-26	XXXVIII	0.0
		27-28	XXXIX	0.0
Benc/AcOEt	85:15	29-30	XL	0.0
Benc/AcOEt	80:20	31-33	XLI	0.0
Benc/AcOEt	70:30	34-39	XLII	3.33

La fracción XXXV del Cuadro 11 generó un sólido cristalino el cual fué purificado por sucesivas cromatografías en columna y en placa delgada, utilizando en todos los casos gel de sílice impregnada con solución de AgNO_3 al 10% y una mezcla de benc/AcOEt 9:1 como sistema de elución.

Como resultado de este proceso se obtuvieron 124 mg (0.0039% de rendimiento), del compuesto (25), $\text{pf} = 72-73^\circ\text{C}$.

6. FRACCIONAMIENTO SECUNDARIO DE LA FRACCION METANOLICA ACUOSA.

La fracción metanólica acuosa resultante del proceso de partición se disolvió en metanol precipitándose 63.3 g de un sólido chicloso que se denominó fracción "A". Las aguas madres se concentraron *in vacuo* para generar 277.2 g de un residuo que se designó como fracción "B".

6.1. Procesamiento de la fracción A.

La fracción tóxica A (44.532 g) se fraccionó de manera adicional mediante una columna preparativa, utilizando como adsorbente gel de sílice (600 g de sílica gel G-60 Merk malla 35-70); el proceso de elución se efectuó con benc/AcOEt, AcOEt, AcOEt/MeOH y MeOH en diferentes proporciones. Se recogieron un total de 112 fracciones de 250 ml cada una y se analizaron por cromatografía en capa fina, combinándose aquellas cromatográficamente similares. El Cuadro 12 resume los sistemas de eluyentes empleados, las fracciones combinadas y la toxicidad para *Artemia salina*.

Cuadro 12. Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna de la fracción A de *Ratibida mexicana*.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCION COMBINADA	CL ₅₀ µg/ml
Benc/AcOEt	90:10	1-3	XLIII	56.35
		4-5	XLIV	> 1000
		6-13	XLV	845.21
		14-32	XLVI	> 1000
Benc/AcOEt	80:20	33-57	XLVII	> 1000
Benc/AcOEt	50:50	58-82	XLVIII	> 1000
AcOEt	100	83-96	XLIX	> 1000
AcOEt/MeOH	50:50	97-108	L	> 1000
MeOH	100	109	LI	> 1000

6.1.1. Obtención de cantidades adicionales de la isoalloantolactona (23).

La fracción tóxica XLIII del cuadro 12 (5.5064 g) fué cromatografiada sobre gel de sílice (105 g de sílica gel para cromatografía flash, 40 µm, Baker) impregnada al 10% con una solución al 10% de AgNO₃. Se obtuvieron 85 fracciones de 30 ml cada una, cada fracción fué analizada por cromatografía en capa fina uniéndose aquellas cromatográficamente similares, en el Cuadro 13 se resumen estos resultados.

De la fracción LV de este cuadro se obtuvieron 775.3 mg adicionales del compuesto (23), dando un total de 2.5049 g (0.07829% de rendimiento en base a planta seca).

Cuadro 13. Resumen de la cromatografía en columna tipo flash con AgNO_3 de las fracciones XLIII del Cuadro 12.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCIÓN COMBINADA	Cl_{50} $\mu\text{g/ml}$
Hexano/AcOEt	80:20	1-4	LII	N.D.
		5-6	LIII	N.D.
		7-8	LIV	N.D.
		9-10	LV	41.00
		11-84	LVI	N.D.
AcOEt	100	85	LVII	N.D.

6.1.2. Obtención del (-)selina-4 α ,11-diol (**26**) y del 8-acetoxi(-)selina-4 α ,11-diol (**27**).

De la fracción inactiva XLIV del Cuadro 12 constituidas por dos componentes mayoritarios se obtuvo una mezcla de apariencia cristalina (37.1 mg). Los dos productos se separaron mediante una cromatografía preparativa en capa delgada.

Se utilizaron un total de dos placas de gel de sílice de 0.5 mm y como sistema de elución hexano/AcOEt 1:1, las placas se eluyeron 5 veces. Como resultado del proceso de separación se obtuvieron 26 mg del producto (**26**) (0.00081% de rendimiento en base a planta seca) como un sólido cristalino de punto de fusión de 125-127°C y $[\alpha]_D = -13.00^\circ$ (1, AcOEt), a 25°C y 8.60 mg (0.00027% de rendimiento) del compuesto (**27**), con un punto de fusión 69-72°C y $[\alpha]_D = +39.00^\circ$ (1, AcOEt), a 25°C.

6.2. Procesamiento adicional de la fracción B.

La fracción inactiva B (268 g) se fraccionó mediante una cromatografía en columna empleando como adsorbente gel de sílice (1.647 Kg de sílica gel G-60 Merck, malla 35-70), el proceso de elución se llevo a cabo con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ en diferentes proporciones y MeOH. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina combinándose aquellas que resultaron similares.

En el Cuadro 14 se resumen los sistemas de elución empleados, y el número de fracciones obtenidas con cada uno de ellos.

Cuadro 14. Resumen del fraccionamiento en columna de la fracción B de *Ratibida mexicana*.

ELUYENTE	PROPORCION	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCION COMBINADA
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	9:1	1-8	LVIII
		9-12	LIX
		13-24	LX
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	8:2	25-46	LXI
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	7:3	47-78	LXII
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	6:4	79-92	LXIII

6.2.1. Aislamiento del β -D-Glucositosterol.

De las fracciones LIX del Cuadro 14 se obtuvieron 10 mg (0.00031 % de rendimiento en base a planta seca), de β -D-glucositosterol como un polvo blanco de $\text{pf} = 274\text{-}276^\circ\text{C}$.

6.2.2. Aislamiento de sacarosa.

De las fracciones LXII del Cuadro 12 precipitaron espontáneamente 14.43 g de sacarosa, $pf = 165-186^{\circ}\text{C}$ (dec).

7. CARACTERIZACION DE LOS COMPUESTOS AISLADOS.

7.1. Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas

7.1.1. Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Electrothermal digital y se reportan sin corregir.

7.1.2. Los espectros de IR fueron registrados en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599, en pastilla de KBr.

7.1.3. Los espectros de masas se determinaron en un espectrofotómetro Hewlett-Packard 5995-B.

7.1.4. Los espectros de RMN fueron obtenidos en el Instituto de Química de la UNAM, en un aparato Varian VXR-3005 utilizando como disolventes CDCl_3 ó C_6H_6-d_6 , y como referencia interna TMS.

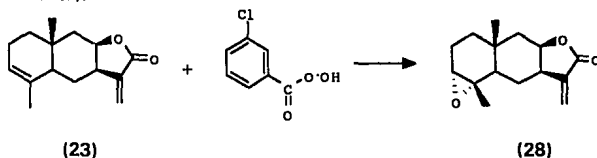
7.1.5. La rotación óptica fué medida en un polarímetro digital Jasco Dip 360.

8. PREPARACION DE LOS DERIVADOS DE LA Isoalloalantolactona.

8.1. Preparación de la 3 α ,4 α -epoxi-5,7,8 α H-eudesma-11-en-8,12-ólida (28).

A 50 mg del compuesto (23) en 10 ml de cloroformo, se le adicionaron 67.1 mg de ácido *m*-cloroperbenzoico. La mezcla resultante se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 90 min. Al cabo de este tiempo se adicionó una solución al 10% NaHCO_3 (50 ml) y se mantuvo con agitación por 30 min. Posteriormente se separó la fase orgánica de la

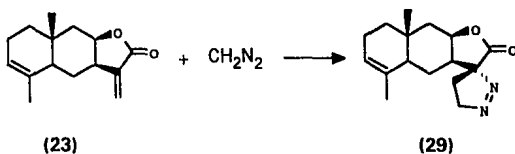
acuosa, la cual se concentró al vacío, obteniéndose un compuesto cristalino de color blanco con $pf = 133-135^{\circ}C$ y en una cantidad de 53.2 mg (99% de rendimiento).



8.2. Preparación de la pirazolina de la isoalloalantolactona (29).

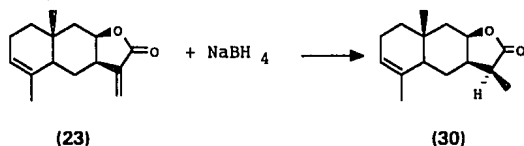
Para obtener el derivado (29) se utilizó una solución etérea de diazometano, la cual se generó con una solución de KOH (5 g en 7.5 ml de agua), 25 ml de metanol, 15 ml de éter etílico y 21.5g de N-metil-N-nitroso-*p*-toluilsulfonamida, por cada 100 mg de muestra. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua a una temperatura de $5^{\circ}C$, transcurridos 5 minutos, el diazometano etéreo se destiló utilizando un baño maría ($58-60^{\circ}C$) y se recolectó en un baño de hielo.

A 70 mg de una solución etérea del producto (23), se adicionó un exceso de la solución etérea de diazometano. La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente por 24 hrs.; al cabo de este tiempo, cristalizaron espontáneamente 82.24 mg de (29) (99.67% de rendimiento), como un sólido cristalino de $pf = 133-138^{\circ}C$.



8.3. Preparación de la 5,7,8,11 α H-eudesma-3-en-8,12-ólida (30).

A una solución del compuesto (23) (103.50 mg en 10 ml de metanol), sobre un baño de hielo, se adicionaron 154.70 mg de NaBH₄. La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente y con agitación continua por 36 hrs.; al cabo de este tiempo se añadieron 20 ml de agua destilada al crudo de la reacción y la mezcla resultante se extrajo con AcOEt (20 ml x 3); la fracción orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío originando 94 mg de un aceite amarillo cromatográficamente homogéneo y con un rendimiento del 90.06 %.



9. ENSAYOS BIOLÓGICOS.

9.1. Determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* Leach.

9.1.1. 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 ésta 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.

9.1.2. Incubación de los huevecillos de *A. salina*: los huevos de *A. salina* se incuban en un medio salino artificial durante un período de 48 hrs.

9.1.3. Bioensayo: se transfieren 10 crustáceos a cada uno de los frascos que contienen las muestras a evaluar y se afora a 5 ml con medio salino artificial, teniendo una concentración final de 1000, 100 y 10 $\mu\text{g/ml}$. Los frascos se mantuvieron con iluminación durante 24 hrs; transcurrido ese tiempo se procedió a contar el número de crustáceos sobrevivientes, para calcular la CL_{50} o el porcentaje de mortalidad: En el primer caso se utilizó el programa de análisis de probabilidad de Finney. Para que un extracto o fracción se considere activo la CL_{50} debe ser menor a 1000 $\mu\text{g/ml}$ y en el caso de un compuesto puro la CL_{50} debe ser menor a 200 $\mu\text{g/ml}$, (Anderson *et al.*, 1991).

9.2. Determinación de la actividad alelopática y antifúngica de las fracciones, compuestos puros y de algunos de sus derivados.

El potencial alelopático de las fracciones así como el de los compuestos puros se determinó midiendo el efecto sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.

Con respecto a la determinación de la actividad antifúngica los ensayos se realizaron sobre hongos fitopatógenos de los géneros *Fusarium*, *Helminthosporium* y *Pythium*. En todos los casos se determinó el efecto sobre el crecimiento radial.

Estas evaluaciones fueron realizadas en el laboratorio de la Dra. Ana Luisa Anaya del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por la bióloga Blanca Hernández. Las evaluaciones se realizaron de acuerdo a la metodología descrita para este tipo de bioensayos (Anaya *et al.*, 1990; Castañeda *et al.*, 1992).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

1. OBTENCION Y FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR DEL EXTRACTO METANOLICO ACTIVO DE *Ratibida mexicana*.

Con base en los resultados obtenidos en el estudio biológico preliminar del extracto metanólico de *R. mexicana* (Cocoletzi, 1993), en el presente trabajo se realizó el estudio químico biodirigido del extracto metanólico preparado a partir de 3.2 Kg de material vegetal, con la finalidad de obtener los principios activos responsables de los efectos biológicos previamente demostrados. Los ensayos biológicos utilizados para conducir el estudio incluyeron de nueva cuenta la determinación de la toxicidad para *A. salina*, la evaluación sobre el crecimiento radial de tres hongos fitopatógenos (*Helminthosporium sp.*, *Pythium sp.* y *Fusarium oxysporum*) y por último, la medida del efecto sobre el crecimiento radicular de las malezas *Echinochloa crusgalli* y *Amaranthus hypochondriacus*.

El extracto metanólico activo se fraccionó de manera preliminar mediante un proceso de partición entre metanol acuoso (10%) y hexano. Las fracciones primarias obtenidas se evaluaron mediante los ensayos biológicos antes señalados. En los Cuadros 15, 16, 17 y 18 se resumen los resultados obtenidos y, como se desprende de los mismos, la mayor actividad se concentró en la fracción hexánica primaria, aunque la fracción metanólica acuosa también demostró efectos significativos.

Cuadro 15. Efecto de las fracciones hexánica y metanólica acuosa de *R. mexicana* sobre *A. salina*.

FRACCION PRIMARIA	CL ₅₀ (µg/ml)
Metanólica acuosa	128.89
Hexánica	37.4

Cuadro 16. Efecto de la fracción hexánica, de *R. mexicana*, sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos.

<i>Pythium sp.</i>		
% Inhibición		
Tratamientos	1°. Lec. (48 hrs.)	2°. Lec. (72 hrs.)
Control	0.0	0.0
50 µg/ml	30.8*	2.3
200 µg/ml	54*	33.4*
<i>Fusarium oxysporum.</i>		
% Inhibición		
Tratamientos	1°. Lec. (72 hrs.)	2°. Lec. (192 hrs.)
Control	0.0	0.0
50 µg/ml	-1	4.5
200 µg/ml	0.0	12.2
<i>Helminthosporium sp.</i>		
% Inhibición		
Tratamientos	1°. Lec. (72 hrs.)	2°. Lec. (192 hrs.)
Control	0.0	0.0
50 µg/ml	45.7*	47.7*
200 µg/ml	85.7*	71.3*

Cuadro 17. Efecto de la fracción metanólica acuosa, de *R. mexicana*, sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos.

<i>Pythium sp.</i>		
% Inhibición		
Tratamientos	1°. Lec. (48 hrs.)	2°. Lec. (72 hrs.)
Control	0.0	0.0
50 µg/ml	16.2	16.0
200 µg/ml	32.3*	29.6*
<i>Fusarium oxysporum.</i>		
% Inhibición		
Tratamientos	1°. Lec. (72 hrs.)	2°. Lec. (192 hrs.)
Control	0.0	0.0
50 µg/ml	6.1	1.3
200 µg/ml	3.1	13
<i>Helminthosporium sp.</i>		
% Inhibición		
Tratamientos	1°. Lec. (72 hrs.)	2°. Lec. (192 hrs.)
Control	0.0	0.0
50 µg/ml	14.6	10.8
200 µg/ml	42*	44.1*

Cuadro 18. Efecto de las fracciones hexánica y metanólica acuosa de *R. mexicana* sobre el crecimiento radicular de las malezas *E. crusgalli*. y *A. hypochondriacus*.

MALEZAS	FRACCION PRIMARIA	Cl ₅₀ (µg/ml)
<i>Echinochloa</i>	Metanólica acuosa	563.67
<i>crusgalli.</i>	Hexánica	305.42
<i>Amaranthus</i>	Metanólica acuosa	347.49
<i>hypochondriacus.</i>	Hexánica	71.74

2. OBTENCION Y CARACTERIZACION DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA FRACCION HEXANICA.

El fraccionamiento secundario biodirigido de la fracción hexánica activa, mediante una cromatografía en columna sobre gel de sílice, permitió la obtención de sólo dos fracciones secundarias bioactivas (fracciones II y III del Cuadro 6, Sección Experimental). Las actividades biológicas presentadas por estas fracciones se indican en el Cuadro 19. Cabe mencionar que sólo estas dos fracciones demostraron actividad en los tres bioensayos de rutina utilizados en el presente estudio.

Cromatografías sucesivas en columna y en capa delgada sobre gel de sílice (impregnadas o no con AgNO_3) de la fracción II permitieron el aislamiento de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida (25) como único constituyente activo.

De la fracción III, siguiendo un procedimiento similar, sólo fué posible aislar un componente activo, la isoalloalantolactona (23). De manera adicional, durante el proceso de separación de este compuesto, se aisló un constituyente inactivo, el cual fué identificado como el (-)-selin-11-en-4 α -ol (24).

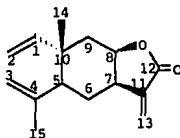
La isoalloalantolactona (23) y la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida (25), resultaron activas en las tres evaluaciones biológicas empleadas y los resultados de las mismas se discutirán en detalle en el inciso 5.

La elema-1,3,11-trien-8,12-ólida (25), se obtuvo como un sólido cristalino, ópticamente activo y en un rendimiento de 0.0039%. Su fórmula molecular se estableció como $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$ por espectrometría de masas y RMN- ^{13}C (Cuadro 20).

Cuadro 19. Actividades biológicas de las fracciones secundarias II y III, derivadas del extracto hexánico.

PRUEBAS BIOLÓGICAS	FRACCIÓN SECUNDARIA	
	II	III
<i>A. salina</i> (LC ₅₀ en µg/ml)	271.73	37.40
<i>A. hypochondriacus</i> (% inhibición a 50 µg/ml)	32.30	43.40
<i>A. hypochondriacus</i> (% inhibición a 100 µg/ml)	38.90	68.90
<i>A. hypochondriacus</i> (% inhibición a 200 µg/ml)	53.40	100.00
<i>E. crusgalli</i> (% inhibición a 50 µg/ml)	4.40	16.00
<i>E. crusgalli</i> (% inhibición a 100 µg/ml)	8.30	19.00
<i>E. crusgalli</i> (% inhibición a 200 µg/ml)	11.60	51.70
<i>Pythium sp.</i> (% inhibición a 50 µg/ml y 48 hrs.)	30.80	21.00
<i>Pythium sp.</i> (% inhibición a 50 µg/ml y 72 hrs.)	16.00	25.40
<i>Pythium sp.</i> (% inhibición a 100 µg/ml y 48 hrs.)	49.30	N.D.
<i>Pythium sp.</i> (% inhibición a 100 µg/ml y 72 hrs.)	13.50	N.D.
<i>Pythium sp.</i> (% inhibición a 200 µg/ml y 48 hrs.)	N.D.	25.60
<i>Pythium sp.</i> (% inhibición a 200 µg/ml y 72 hrs.)	N.D.	30.00
<i>F. oxysporum</i> (% inhibición a 50 µg/ml y 72 hrs.)	-3.00	-3.00
<i>F. oxysporum</i> (% inhibición a 50 µg/ml y 192 hrs.)	-2.70	-3.00
<i>F. oxysporum</i> (% inhibición a 200 µg/ml y 72 hrs.)	-44.10	0.00
<i>F. oxysporum</i> (% inhibición a 200 µg/ml y 192 hrs.)	6.80	-1.50
<i>Helminthosporium sp.</i> (% inhibición a 50 µg/ml y 72 hrs.)	28.00	N.D.
<i>Helminthosporium sp.</i> (% inhibición a 50 µg/ml y 192 hrs.)	20.30	N.D.
<i>Helminthosporium sp.</i> (% inhibición a 100 µg/ml y 72 hrs.)	56.00	N.D.
<i>Helminthosporium sp.</i> (% inhibición a 100 µg/ml y 192 hrs.)	54.00	N.D.

Cuadro 20. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la Elema-1,3,11-trien-8,12-ólida.



(25)

E.M.I.E., m/z (Int. rel.): (Espectro 1).

232 [M^+ (1)], 217 [$M^+ - 15$ (9)], 159 (25), 145 (34), 135 (24), 133 (20), 131(20), 121 (40), 119 (30), 108 (20), 107 (36), 105 (39), 95 (20), 93 (63), 91 (98), 81 (40), 79 (57), 77 (44), 69 (27), 68 (81), 67 (67), 65 (28), 55 (36), 53 (75), 43 (36), 41 (100), 39 (78).

IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : (Espectro 2).

3080, 2970, 2992, 2876, 1762, 1664, 1640.

RMN- ^{13}C , δ (CDCl_3): (Espectro 3).

147.30 (C-1), 113.00 (C-2), 111.00 (C-3), 137.30 (C-4), 46.10 (C-5), 26.40 (C-6), 39.20 (C-7), 75.90 (C-8), 42.80 (C-9), 40.00 (C-10), 145.70 (C-11), 170.40 (C-12), 120.30 (C-13), 16.40 (C-14), 24.80 (C-15).

RMN- ^1H , δ (CDCl_3): (Espectro 4).

5.71, dd, $J^* = 10.83$, 17.40 (H-1); 4.92, m, (H-2); 4.77, m, (H-2'); 4.86-4.95, m, (H-3, H-3'); 3.28, m, (H-7); 4.80, td, $J = 6.0$, 7.65, 10.65 (H-8); 6.34, d, $J = 3.46$ (H-13); 5.55, d, $J = 3.46$ (H-13'); 1.05, s, (H-14); y 1.72, sa, (H-15).

*Todas las constantes de acoplamiento están dadas en Hz.

El espectro de IR (Cuadro 20) presentó absorciones para γ -lactona (1762 cm^{-1}) y doble ligadura (3080, 1664 y 1640 cm^{-1}).

El análisis detallado de los espectros de RMN (Cuadro 20), y consideraciones de tipo quimiotaxonómico, (Ellmauerer *et al.*, 1987; Rojas, 1990; Jiménez, 1992) permitieron establecer que el producto natural era una elemanólida con el anillo lactónico *cis* fusionado en las posiciones C-7/C-8. Las observaciones más importantes que condujeron a esta conclusión se resumen a continuación:

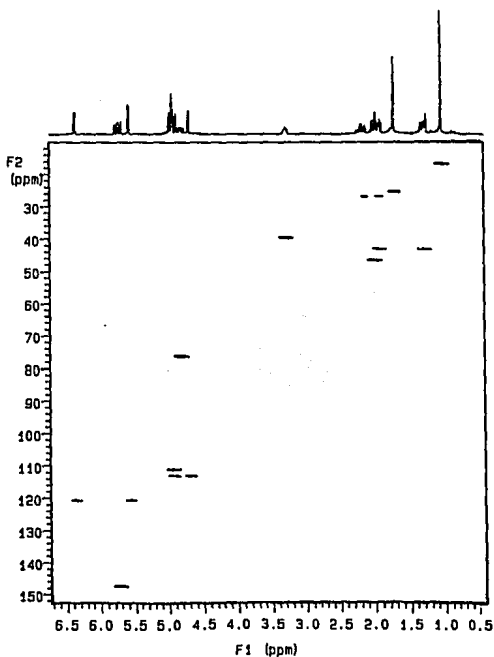
a) El espectro de RMN- ^{13}C (Cuadro 20) presentó señales para 15 átomos de carbono y, además de las resonancias características para la γ -lactona (δ 170.40, 145.70, 120.30, 75.90 y 39.20) (Marco y Carda, 1987a) se observaron las resonancias típicas para los carbonos C-1-C-4 [147.30 (d), 113.00 (t), 111.00 (t) y 137.30 (s)] y para los carbonos C-14 (δ 16.40) y C-15 (δ 24.80) de un elemento (Mata *et al.*, 1987).

b) El espectro de RMN- ^1H (Cuadro 20) presentó las siguientes señales diagnósticas: el sistema AB que conforman los hidrógenos H-13 y H-13' [δ 6.34, (d) y 5.45, (d) $J_{13,13'} = 3.46$ Hz] de una lactona sesquiterpénica α,β -insaturada; un doblete de doblete en δ 5.71 ($J = 10.83$ y 17.40 Hz), asignable al H-1 de una elemanólida; un triplete dobleteado en δ 4.80 correspondiente al hidrógeno geminal de la función lactónica y, por último, los singuletes correspondientes a los hidrógenos de los metilos en C-4 y C-10 en δ 1.72 y 1.05, respectivamente.

El patrón de acoplamiento (td, $J = 6.0, 7.65$ y 10.65 Hz) del hidrógeno geminal a la función lactónica era consistente con una lactona *cis* fusionada en las posiciones C-7/C-8 del esqueleto base (Greger *et al.*, 1986).

Las señales identificadas de manera independiente, en los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C correlacionaron en el espectro bidimensional heteronuclear HETCOR (Figura 1), mismo que permitió completar las asignaciones de los restantes núcleos. Las evidencias presentadas permitieron, identificar al producto natural como la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida (25), previamente aislada de la *Ratibida columnifera* (Herz *et al.*, 1985) y de *Liatris platylepis* (Bohlmann y Dutta, 1979).

FIGURA 1. Espectro HETCOR de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida.



Es importante destacar que las propiedades físicas y los espectros de RMN-¹H e IR eran idénticos a los previamente descritos (Herz *et al.*, 1985 y Bohlman y Dutta, 1979).

La isoalloalantolactona (**23**) se obtuvo como un sólido cristalino, ópticamente activo y en un rendimiento total de 0.07829%, constituyendo el compuesto bioactivo mayoritario de la fracción hexánica.

La fórmula molecular del compuesto (**23**) se estableció por espectrometría de masas como C₁₅H₂₀O₂, la cual permite cuatro insaturaciones (Cuadro 21). El espectro de IR (Cuadro 21), mostró bandas diagnósticas en 1762 cm⁻¹ (γ-lactona), 3020 y 3080 cm⁻¹ (doble ligadura).

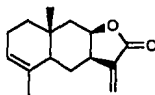
La RMN-¹³C confirmó (Cuadro 21) la presencia de 15 átomos de carbono y presentó el perfil característico de una γ-lactona α,β-insaturada del tipo eudesmano con una doble ligadura entre C-3 y C-4 (Marco y Carda, 1987a). Las señales características para la γ-lactona α,β-insaturada se observaron en δ 43.97, 77.03, 142.07, 170.52 y 120.23 y las de la doble ligadura trisustituida en δ 122.33 y 132.94. Los elementos estructurales del análisis parcial anterior satisfacían el número de insaturaciones y de oxígenos requeridos por la fórmula molecular.

Las características más relevantes de la RMN-¹H (Cuadro 21) fueron las siguientes:

a) En δ 6.14 (H-13) y 5.61 (H-13') se observaron los dobletes típicos para el metileno de la γ-lactona α,β-insaturada.

b) En δ 5.39 se observó un multiplete asignable al hidrógeno vinflico de la doble ligadura trisustituida previamente detectada en el espectro de RMN-¹³C. Este multiplete mostró una clara correlación con el metino olefínico en δ 122.33 (RMN-¹³C) en el espectro HETCOR (Figura 2).

Cuadro 21. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la Isoalloalantolactona.



(23)

E.M.I.E., m/z (int. rel.): (Espectro 5).

232 [M^+ (10)], 217 [$M^+ - 15$ (35)], 171 (37), 117 (21), 93 (36), 91 (100), 79 (84), 77 (70), 67 (42), 65 (49), 55 (41), 53 (96).

IR ν_{\max} . (KBr) cm^{-1} : (Espectro 6).

2912, 2846, 1762, 1150, 1118.

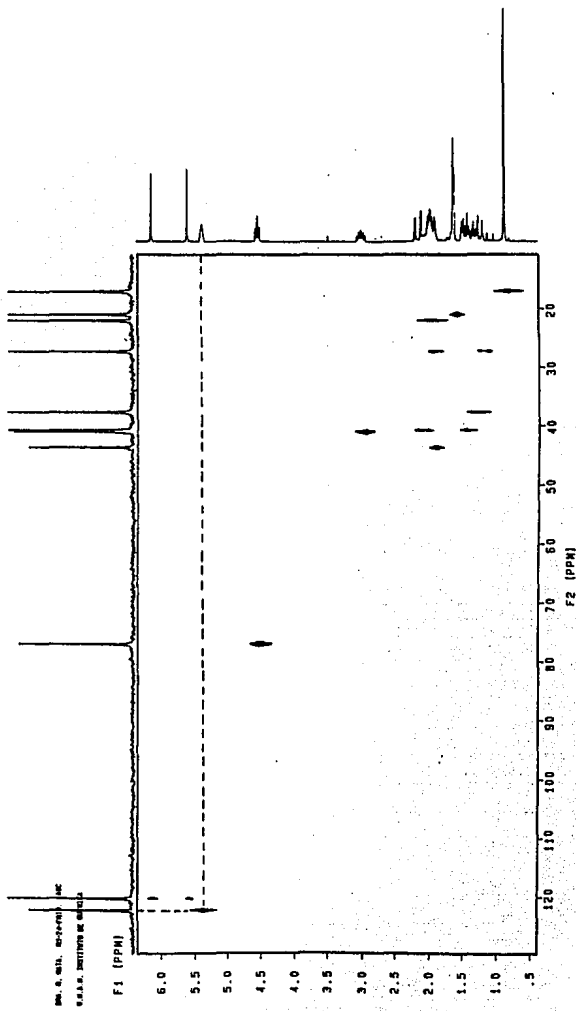
RMN- ^{13}C , δ (CDCl_3): (Espectro 7).

37.91 (C-1), 22.20 (C-2), 122.33 (C-3), 132.94 (C-4), 43.97 (C-5), 27.55 (C-6), 41.26 (C-7), 77.03 (C-8), 41.05 (C-9), 30.93 (C-10), 142.07 (C-11), 170.52 (C-12), 120.23 (C-13), 17.23 (C-14), 21.13 (C-15).

RMN- ^1H ; δ (CDCl_3): (Espectro 8).

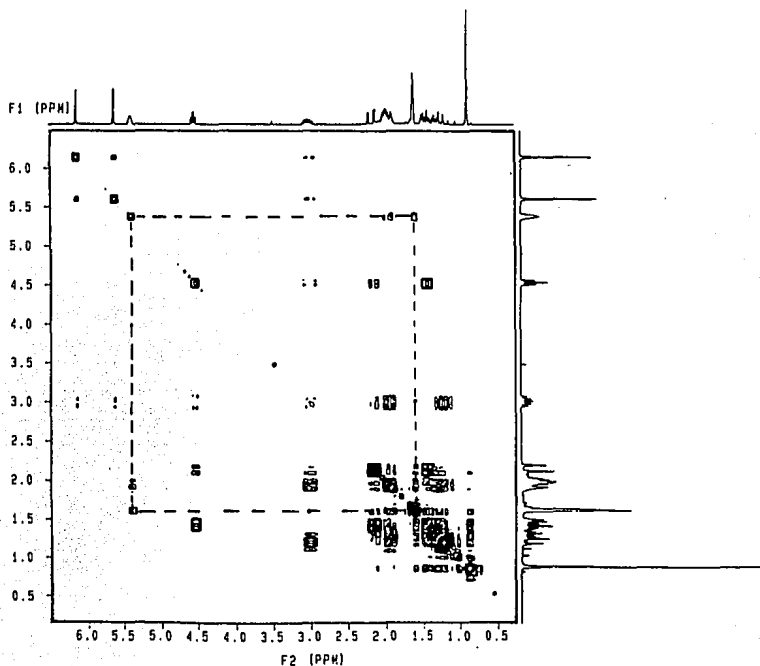
5.39, m, (H-3); 3.02, ddd, $J=5.56, 6.79$ y 11.66 (H-7); 4.54, td, $J=1.49, 5.14$ (H-8); 2.16, dd, $J=1.42, 15.46$ (H-9 β); 6.14, d, $J=1.60$ (H-13); 5.61, d, $J=1.60$ (H-13'); 0.88, s, (H-14); 1.63, sa, (H-15).

*Todas las constantes de acoplamiento están dadas en Hz.

FIGURA 2. Espectro HETCOR de la *isoalloalantolactona*.

c) En δ 0.88 (H-14) y 1.63 (H-15) se observaron resonancias atribuibles a dos metilos sobre carbono cuaternario. El desplazamiento químico del segundo sugirió su ubicación sobre una doble ligadura trisustituída, y congruente con esta afirmación fué la correlación observada entre el hidrógeno vinílico en δ 5.39 y el metilo en δ 1.63 en el espectro bidimensional homonuclear COSY (Figura 3). De manera adicional, esta última observación era consistente con la disposición de la doble ligadura entre C-3 y C-4.

FIGURA 3. Espectro COSY de la isoalloalantolactona.



d) Por último, en δ 4.54 se observó un triplete dobleteado ($J = 1.49$ y 5.14 Hz), correspondiente al hidrógeno base de la lactona. Al igual que para el compuesto anterior el patrón de acoplamiento de este hidrógeno era consistente con una lactona *cis* fusionada entre las posiciones C-7 y C-8 de la estructura base (Greger *et al.*, 1986).

Con base en las evidencias presentadas, así como el valor (+) de la rotación óptica el compuesto se caracterizó como la *isoalloalantolactona* (23), la cual ha sido obtenida previamente de otras fuentes naturales (Kaur y Kalsi, 1985; Hubert *et al.*, 1987) y mediante un proceso de semisíntesis a partir de la (-)-artemisina (Marco y Carda, 1987b; Marco *et al.*, 1987). Una vez más las constantes espectroscópicas eran idénticas a las previamente descritas. Es importante hacer notar que el enantiómero correspondiente, la diplofilólida A, se ha obtenido como producto natural a partir de la hepática *Diplophyllum albicans* (Ohta *et al.*, 1977; Asakawa *et al.*, 1979; Benesová *et al.*, 1975).

El tercer compuesto aislado de la fracción activa II, no demostró toxicidad para *A. salina* ($CL_{50} > 1000$ $\mu\text{g/ml}$). Dada la similitud de este compuesto con dos de los aislados de la fracción metanólica acuosa, la discusión de la caracterización del mismo se realizará en la siguiente sección.

3. OBTENCION Y CARACTERIZACION DE LOS COMPUESTOS DE LA FRACCION METANOLICA ACUOSA.

De la fracción metanólica acuosa activa precipitó un sólido con apariencia de polímero (fracción A) que demostró una toxicidad para *A. salina* más baja que la de la fracción primaria, ($CL_{50} = 491.52$ $\mu\text{g/ml}$). Sin

embargo, la porción restante (fracción B) fué inactiva en la prueba antes indicada ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$).

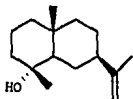
El subsecuente fraccionamiento biodirigido de la fracción A mediante la determinación de la toxicidad para *A. salina* (Cuadro 12, Sección Experimental) condujo a la obtención de dos fracciones cuaternarias activas [fracciones XLIII ($CL_{50} = 56.35 \mu\text{g/ml}$) y XLV ($CL_{50} = 845 \mu\text{g/ml}$)]. La cromatografía en columna sobre gel de sílice impregnada con AgNO_3 de la fracción tóxica XLIII permitió la obtención de cantidades adicionales de isoalloalantolactona como único constituyente activo. Este producto constituyó el compuesto mayoritario de la fracción hexánica, y el rendimiento total del mismo fué de 0.07829%.

De manera adicional, de la fracción consecutiva XLIV (inactiva) se aislaron los dos constituyentes mayoritarios, los cuales fueron caracterizados como el (-)-selin-4 α ,11-diól (26) y el (+)-8 α -Acetoxi-selina-4 α ,11-diól (27). A continuación se discutirán de manera comparativa las evidencias espectroscópicas y espectrométricas que permitieron la elucidación estructural de los productos (24), (26) y (27).

Los compuestos (24), (26) y (27) se aislaron como sólidos cristalinos, ópticamente activos. La fórmula molecular de cada uno se estableció mediante espectrometría de masas como $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$, $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{O}_2$ y $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_4$, respectivamente.

Los espectros de IR (Cuadros 22, 23 y 24) presentaron las absorciones características para grupo hidroxilo [(24): 3260 cm^{-1} , (26): 3370 cm^{-1} y (27): 3314 cm^{-1}] y para grupos C-H [(24): $2962, 2930, 2848 \text{ cm}^{-1}$; (26): $2968, 2928, 2852 \text{ cm}^{-1}$ y (27): $2976, 2928 \text{ cm}^{-1}$], en todos los casos.

Cuadro 22. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del (-) Selin-11-en-4 α -ol.



(24)

E.M.I.E., m/z (int. rel.): (Espectro 9).

222 [M⁺ (5)], 207 [M⁺-15 (4)], 204 [M⁺-18 (30)], 189 [M⁺-15-18 (25)],
149 [M⁺-15-18-41+1 (16)], 107 (44), 95 (58), 81 (86), 71 (77), 67 (74),
57 (45), 43 (100), 41 (69).

IR V_{max}- (KBr) cm⁻¹: (Espectro 10).

3260, 3064, 2962, 2930, 2848, 1640, 1450, 1378, 1172, 1088, 882.

RMN-¹³C, δ (CDCl₃): (Espectro 11).

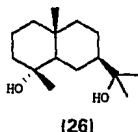
44.65 (C-1)*, 20.12 (C-2)**, 41.07 (C-3), 72.26 (C-4), 46.33 (C-5)***,
26.86 (C-6), 54.88 (C-7)***, 26.03 (C-8)**, 43.35 (C-9)*, 34.63 (C-10),
150.70 (C-11), 108.75 (C-12), 21.07 (C-13), 18.69 (C-14), 22.70 (C-15).

RMN-¹H, δ (CDCl₃): (Espectro 12).

4.71, m, (H-12, H-12'); 1.75, s, (H-13); 0.89, s, (H-14); 1.12, s, (H-15).

*., **., *** Indican que estos valores son intercambiables.

Cuadro 23. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del (-) Selin-4 α ,11-diol.



E.M.I.O., m/z (%):

240 (0.6), 225 (2), 207 (10), 182 (30), 162 (60), 59 (100), 43 (85).

E.M.J.E., m/z (Int. rel.): (Espectro 13).

225 [$M^+ - 15$ (1)], 207 [$M^+ - 15 - 18$ (2)], 204 [$M^+ - 36$ (1)], 182 [$M^+ - 59 + 1$ (5)], 149 [$M^+ - 59 - 18 - 15 + 1$ (100)], 59 (93), 123 (44), 109 (65), 108 (47), 97 (32), 96 (32) 81 (53), 71 (57), 43 (64).

IR ν_{max} . (KBr) cm^{-1} : (Espectro 14).

3370, 2968, 2928, 2852, 1474, 1382, 1336, 1182, 1120.

RMN- ^{13}C , δ ($CDCl_3$): (Espectro 15).

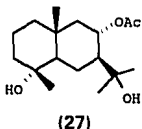
44.57 (C-1), 20.17 (C-2), 41.00 (C-3), 72.34 (C-4), 49.89 (C-5)**, 21.49 (C-6)*, 54.78 (C-7)**, 22.52 (C-8)*, 43.45 (C-9), 34.52 (C-10), 72.97 (C-11), 27.33 (C-12)***, 27.08 (C-13)***, 18.70 (C-14), 22.65 (C-15).

RMN- 1H , δ ($CDCl_3$): (Espectro 16).

1.21, s, (H-12 y H-13); 0.87, s, (H-14); 1.12, s, (H-15).

*** Indican que estos valores pueden ser intercambiables.

Cuadro 24. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del 8 α -Acetoxi-(-)-selina-4 α ,11-diol.



E.M.I.Q., m/z (%):

299 [M+1 (5)], 281 (100), 263 (10), 221 (48.9), 163 (40).

E.M.I.E., m/z (Int. rel.): (Espectro 17).

280 [M⁺-18 (1)], 206 [M⁺-59-18-15 (1)], 162 (37), 147 (16), 59 (100), 43 (92).

IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : (Espectro 18).

3314, 2976, 2928, 1732, 1244.

RMN-¹³C, δ (CDCl₃): (Espectro 19).

43.42 (C-1), 19.89 (C-2), 40.28 (C-3), 73.07 (C-4)*, 52.55 (C-5)**, 29.72 (C-6), 54.10 (C-7)**, 72.61 (C-8), 49.60 (C-9), 35.79 (C-10), 72.00 (C-11)*, 28.78 (C-12)***, 26.30 (C-13)***, 19.09 (C-14), 22.47 (C-15), 21.74 (C-16), 169.83 (C-17).

RMN-¹H, δ (CDCl₃): (Espectro 20).

3.60, m, (OH-4, OH-11); 5.07, ddd, J = 4.5, 11.4 (H-8); 1.20, s, (H-12)*; 1.21, s, (H-13)*; 0.97, s, (H-14); 1.10, s, (H-15); 2.05, s, (H-17).

*.,**.,*** indican que estos valores pueden ser intercambiables.

De manera adicional, el espectro de IR del compuesto (24) mostró bandas de absorción para dobles ligaduras (1645 cm^{-1}) y en el espectro del compuesto (27) se observaron las absorciones típicas para grupo acetato (1732 y 1244 cm^{-1}).

Los espectros de RMN resultaron muy similares (Cuadros 22, 23 y 24) en los tres casos y en particular los espectros de RMN- ^{13}C permitieron definir que los tres productos tenían como núcleo base el de un sesquiterpenoide de tipo selinano o eudesmano (De Pascual *et al.*, 1978; Mata *et al.*, 1987).

Las características más importantes de los espectros fueron las siguientes:

a) El compuesto (24) presentó resonancias para un grupo isopropilideno ($\delta\ ^{13}\text{C}$ 150.70, 108.75, 21.07; $\delta\ ^1\text{H}$ 1.75, 4.71) mismo que debía encontrarse en C-7 en armonía con el núcleo base (Cuadro 22).

Las señales antes indicadas para el compuesto (24) se encontraban sustituidas por un grupo isopropanol en los compuestos (26) y (27): [(26): $\delta\ ^{13}\text{C}$ 72.97, 27.33, 27.08 y $\delta\ ^1\text{H}$ 1.21; (27): $\delta\ ^{13}\text{C}$ 72.00, 28.78, 26.30 y $\delta\ ^1\text{H}$ 1.20, 1.21].

La presencia del isopropilideno en el compuesto (24) era consistente con la presencia del fragmento m/z 43, en el espectro de masas. Por otra parte, el ion a m/z 59 (fragmento $[\text{Me}_2\text{C}=\text{OH}]^+$) observado en los espectros de masas de (26) y (27) corroboraba el grupo isopropanol en los mismos.

b) Los espectros de RMN- ^{13}C de los selinanos (26) y (27) presentaron; además de la función carbinólica en C-11, una segunda señal para carbono de un alcohol cuaternario en δ 72.97 y δ 72.00, respectivamente. Esta función se debía encontrar en C-4, considerando el

valor de los desplazamientos químicos observados para el metilo C-15 en los espectros de RMN-¹³C [(26): 22.65, (27) 22.47]] y su apariencia como singuletes en los espectros de RMN-¹H. Mediante un razonamiento similar la única función carbinólica del compuesto (24) se ubicó en C-4. La pérdida de 36 unidades de masa a partir del ión molecular en los compuestos (26) [m/z 204] y (27) [m/z 262], confirmó la naturaleza diol de estos constituyentes.

c) La presencia de las señales para un grupo acetato en los espectros de RMN del producto (27) [δ ¹³C 21.74 y 169.83, y δ ¹H 2.05 y 5.07], indicaron que este producto era un acetoxi derivado de un 4,11-selin-diol. El patrón de acoplamiento (ddd, J= 4.5 y 11.4) del hidrógeno geminal a la función ester permitió establecer que el grupo acetoxi se encontraba ubicado en la posición 8 con una estereoquímica α . La disposición de este grupo, en las posiciones 1,2,3,6 ó 9, α ó β orientado hubiese traído como consecuencia un patrón de acoplamiento distinto al observado.

Por último, de las fracciones inactivas LIX y LXII (Cuadro 14) de la porción B del extracto metanólico acuoso, se obtuvieron dos compuestos inocuos identificados como el β -D-Glucositosterol (0.00031% de rendimiento en base a planta seca) y la sacarosa (0.4509% de rendimiento). La caracterización de estos compuestos se hizo por comparación directa con muestras auténticas

4. OBTENCION Y CARACTERIZACION DE LOS DERIVADOS DE LA isoalloalantolactona.

La isoalloalantolactona representó el producto mayoritario responsable de las actividades biológicas demostradas por el extracto metanólico original y las fracciones primarias derivadas del mismo. Considerando, la cantidad

disponible del producto natural se decidió entonces preparar varios derivados semisintéticos con la finalidad de analizar la variación de las actividades biológicas de la isoalloalantolactona en función de los cambios estructurales. Los productos semisintéticos obtenidos fueron el 3 α ,4 α -epoxi-5,7,8 α H-eudesma-11-en-8,12-ólida (28), la pirazolina de la isoalloalantolactona (29) y la 5,7,8,11 α H-eudesma-3-en-8,12-ólida (30). Es importante mencionar que la selección de los derivados se realizó de manera aleatoria, tomando en cuenta principalmente la disponibilidad de los reactivos necesarios para su preparación.

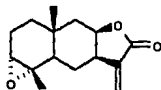
El epóxido (28) se obtuvo en un rendimiento del 99% por reacción de la isoalloalantolactona (23) con un exceso de ácido *m*-cloroperbenzoico. La caracterización de este compuesto se realizó por la comparación de los datos espectroscópicos y espectrométricos resumidos en el Cuadro 25, con las correspondientes a las de la isoalloalantolactona (23) (Cuadro 21). Los parámetros espectroscópicos de la 3 α ,4 α -epoxi-5,7,8 α H-eudesma-11-en-8,12-ólida (28) eran muy similares a las del producto natural y las diferencias más importantes entre los espectros de RMN son las siguientes:

a) Las señales correspondientes a la doble ligadura trisustituída del producto natural (δ ^1H 5.39; δ ^{13}C 122.33, 132.94) se encontraban reemplazadas por las de la función epóxido en el derivado (δ ^1H 2.96; δ ^{13}C 60.88, 57.63).

b) La señal de H-15 en (28), como era de esperarse, se encontraba desplazada paramagnéticamente ($\Delta = -0.40$) a δ 1.23 con relación a la correspondiente en la isoalloalantolactona.

Es importante destacar que el epóxido (28) no ha sido obtenido previamente como producto natural ni como derivado sintético.

Cuadro 25. Constantes espectrométricas y espectroscópicas de la 3 α ,4 α -epoxi-5,7,8 α H-eudesma-11-en-12,8-ólida.



(28)

E.M.I.E. m/z (int. rel): (Espectro 21).

248 [M⁺ (1)], 233 [M⁺-15 (16)], 91(17), 77(17), 67(18), 55(33), 53(34), 43(100), 41(47), 39(32).

IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹: (Espectro 22).

2932, 2868, 1754, 1664, 1262.

RMN-¹³C, δ (CDCl₃): (Espectro 23).

34.22 (C-1), 20.66 (C-2), 60.88 (C-3), 57.63 (C-4), 44.61 (C-5), 27.42 (C-6), 41.23 (C-7), 77.43 (C-8), 40.15 (C-9), 29.70 (C-10), 141.50 (C-11), 170.40 (C-12), 120.60 (C-13), 17.86 (C-14), 21.12 (C-15).

RMN-¹H, δ (CDCl₃): (Espectro 24).

2.96, sa, (H-3); 2.99, m, (H-7); 4.46, td, J=1.50, 4.95 (H-8); 2.07, dd, J<1.0 y J=15.0 (H-9 β); 6.16, d, J=1.20 (H-13); 5.64, d, J=1.20 (H-13'); 0.91, s, (H-14); 1.23, s, (H-15).

*Todas las constantes de acoplamiento están dadas en Hz

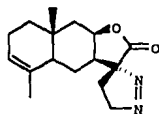
La reacción de la isoalloantolactona con un exceso de diazometano generó la pirazolina (29) en un rendimiento de 99.67%. En el Cuadro 26 se resumen sus constantes espectroscópicas, mismas que permitieron establecer claramente que las absorciones correspondientes al metileno exocíclico del producto natural se encontraban sustituidas por las correspondientes a un anillo pirazolínico.

En el espectro de RMN-¹H las resonancias para los hidrógenos que conforman el anillo pirazolínico formaban parte de un sistema A₂X₂. Las señales de la porción A₂ se observaron en δ 4.80 (ddd) y δ 4.54 (ddd). Así mismo una de las señales de la porción X₂ se observó en δ 2.11 (ddd) y la otra se encontraba sobrepuesta en la región comprendida entre δ 1.69-1.48 (Figura 4).

De las resonancias restantes del espectro, las únicas que sufrieron modificaciones importantes con respecto a las del producto original fueron las de H-7 y H-8. En este caso H-7 se encontraba desplazado diamagnéticamente debido a la pérdida de su carácter alílico y, H-8 se encontraba desplazado a campos más bajos debido posiblemente a un efecto paramagnético ocasionado por el grupo diazo del anillo pirazolínico.

Por otra parte, en el espectro de RMN-¹³C las señales correspondientes a los carbonos del anillo pirazolínico se observaron en δ 78.06 (C-16), δ 20.45 (C-13) y δ 102.94 (C-11). En el espectro HETCOR (Figura 5) la primera señal correlacionó con los hidrógenos de la porción A₂ del sistema A₂X₂ y la segunda con los hidrógenos de la parte X₂ del sistema antes mencionado.

Cuadro 26. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la pirazolina de la isoalloalantolactona.



(29)

E.M.I.E., m/z (Int. rel.): (Espectro 25).

246 [$M^+ - 28$ (35)], 231 [$M^+ - 15 - 28$ (100)], 145 (79), 143 (31), 131 (25), 121 (34), 119 (28), 107 (26), 105 (58), 93 (42), 91 (67), 81 (35), 79 (51), 77 (42), 67 (26) 41 (29).

IR V_{max} (KBr) cm^{-1} : (Espectro 26).

2906, 2840, 1772, 1550; 1452, 1374.

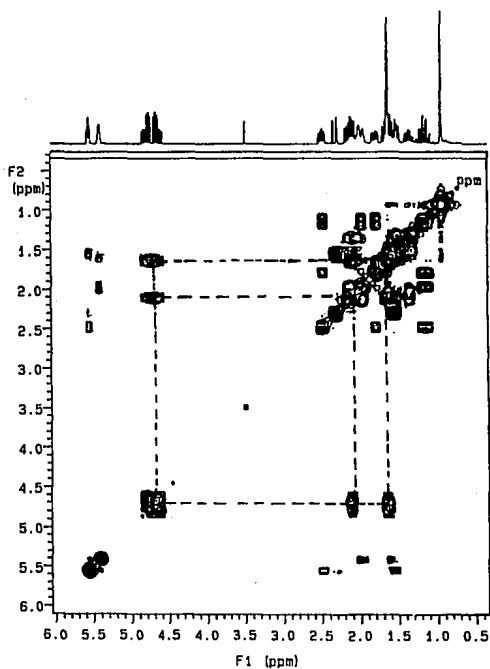
RMN- ^{13}C , δ ($CDCl_3$): (Espectro 27).

37.78 (C-1), 22.18 (C-2), 122.60 (C-3), 132.52 (C-4), 44.22 (C-5), 21.66 (C-6), 43.94 (C-7), 78.98 (C-8), 40.85 (C-9), 31.14 (C-10), 102.94 (C-11), 173.09 (C-12), 20.45 (C-13), 17.31 (C-14), 21.16 (C-15), 78.06 (C-16).

RMN- 1H , δ ($CDCl_3$): (Espectro 28).

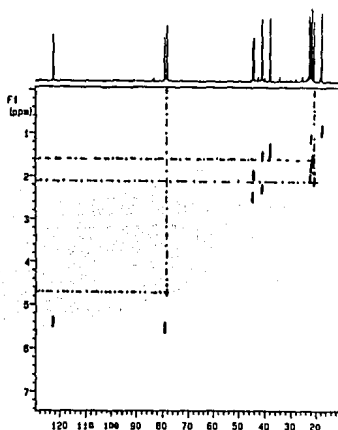
5.40, m, (H-3); 2.48, ddd, $J = 4.50$, 6.67, 12.22 (H-7); 5.55, td, $J = 1.80$, 4.50 (H-8); 2.11, ddd, $J = 4.80$, 9.0, 18.0 (H-13); 1.69-1.48, m, (H-13'); 0.94, s, (H-14); 1.63, sa, (H-15); 4.80, ddd, $J = 4.80$, 9.60, 18.0 (H-16); 4.64, ddd, $J = 7.50$, 9.30, 18.0 (H-16').

FIGURA 4. Espectro COSY de la pirazolina de la isoalloalantolactona.



La pirazolina (29) se ha sintetizado previamente a partir de la isoalloalantolactona (Kaur y Kalsi, 1985), sin embargo las constantes espectroscópicas de RMN- ^1H descritas por Kaur y Kalsi (1985) no concuerdan con las obtenidas en el presente estudio para la pirazolina (29). Por otra parte las resonancias de ^{13}C para este producto no han sido previamente descritas.

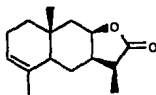
FIGURA 5. Espectro HETCOR de la pirazolina de la isoalloalantolactona.



El último compuesto preparado a partir de la isoalloalantolactona correspondió al Δ^{11-13} dihidroderivado (**30**), obtenido por tratamiento del producto natural con NaBH_4 . Al igual que en los casos anteriores el producto (**30**) se caracterizó mediante el análisis de sus constantes espectrométricas y espectroscópicas, mismas que se resumen en el Cuadro 27.

Como era de esperarse el ion molecular de (**30**) presentó dos unidades de masas más que el de la isoalloalantolactona. Por otra parte, en los espectros de RMN (Cuadro 27) no se observaron las señales diagnósticas para el metileno exocíclico de la γ -lactona α,β -insaturada presente en los espectros de (**23**). En su lugar, en el caso del espectro de RMN- ^1H se apreció un doblete ($J = 7.33 \text{ Hz}$) en $\delta 1.21$ (H-13) y un quinteto ($J = 7.05 \text{ Hz}$) en $\delta 2.82$ asignable a H-11. En el caso del espectro de RMN- ^{13}C las señales de los carbonos correspondientes se observaron en $\delta 9.34$ y $\delta 41.35$, respectivamente.

Cuadro 27. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la 5,7,8,11 α -H-eudesma-3-en-12,8-ólida.



(30)

E.M.I.E., m/z (Int. rel.): (Espectro 29).

234 [M^+ (20)], 232 [M^+-2 (3)], 219 [M^+-15 (63)], 145 (100), 133 (20), 131 (23), 119 (24), 107 (33), 105 (64), 93 (32), 91 (45), 79 (24), 77 (22), 55 (22).

IR V_{max} (KBr) cm^{-1} : (Espectro 30).

2966, 2926, 2850, 1756, 1452, 1378.

RMN- ^{13}C , δ ($CDCl_3$): (Espectro 31).

38.00 (C-1), 22.26 (C-2), 122.08 (C-3), 133.25 (C-4), 41.44 (C-5)*, 20.90 (C-6), 44.06 (C-7), 78.08 (C-8), 41.05 (C-9), 31.36 (C-10), 41.35 (C-11)*, 179.50 (C-12), 9.34 (C-13), 17.24 (C-14), 21.24 (C-15).

RMN- 1H , δ ($CDCl_3$): (Espectro 32).

5.38, m (H-3); 2.43, m (H-7); 4.50, td, $J=1.65$, 4.39 (H-8); 2.12, dd, $J=1.66$, 15.39 (H-9); 2.82, dc, $J=7.05$ (H-11); 1.21, d, $J=7.33$ (H-13), 0.87, s (H-14); 1.64, sa (H-15).

RMN- 1H , δ (C_6D_6): (Espectro 33).

5.28, m (H-3); 2.13, m (H-7); 3.83, td, $J=1.71$, 4.27 (H-8); 1.88, dd, $J=1.98$, 15.40 (H-9); 2.15, dc, $J=7.08$ (H-11); 0.99, d, $J=7.35$ (H-13); 0.90, s (H-14); 1.49, s (H-15).

La estereoquímica relativa del grupo metilo en C-11 se determinó como β con base en las siguientes consideraciones:

a) El valor de la constante de acoplamiento entre H-7 y H-11 y la multiplicidad observada para H-11.

b) El análisis del efecto de disolventes (benceno- d_6 y $CDCl_3$) sobre el desplazamiento químico del metilo C-13 en RMN- 1H .

En el primer caso, como ya se indicó, la señal de H-11 se observó como un quinteto ($J = 7.05$ Hz) debido a su acoplamiento de igual magnitud con H-7 y H-13. Este patrón de acoplamiento era consistente con la disposición pseudoaxial (α) de H-11 y en consecuencia con la orientación β (pseudoequatorial) del metilo C-13. Si la orientación del metilo hubiese sido α , la señal de H-11 se observaría como un cuarteto debido a que el valor de la constante de acoplamiento entre H-11 y H-7 se acerca a cero (Narayanan y Venkatasubramanian, 1968).

Por otra parte, en un estudio realizado por Narayanan y Venkatasubramanian (1968), se observó que los metilos pseudoequatoriales en el centro C-11 de las lactonas sesquiterpénicas con el anillo *cis* fusionado entre C-7 y C-8, se desplazan diamagnéticamente alrededor de 0.23 ppm, en soluciones de $C_6H_6-d_6$, en relación a los valores observados en soluciones de $CDCl_3$. En lactonas con las mismas características, pero con los metilos pseudoaxiales en C-11, el desplazamiento a campo alto es de una mayor magnitud ($\Delta = + 0.46$). En el caso del dihidroderivado (30) la diferencia en la magnitud de los desplazamientos químicos para H-1 ($\Delta\delta = \delta CDCl_3 - \delta C_6D_6 = 1.21 - 0.99$) fué de +0.22, consistente con la naturaleza pseudoequatorial del metilo C-13 y por lo tanto con la orientación β del mismo.

La orientación preferencial β del metilo C-13 era congruente con el curso estereoquímico de la reacción de reducción, que hidrogena al doble enlace C-11-C-13 por la cara menos impedida.

El producto (30) se ha obtenido como un producto secundario de la reducción catalítica (Ni) del 3-oxo-7,11 α ,8 α H-eudesma-4-en-8,12-ólida (Marco *et al.*, 1987; Marco y Carda, 1987b), y no se ha descrito previamente como producto natural.

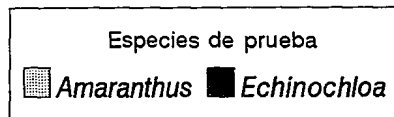
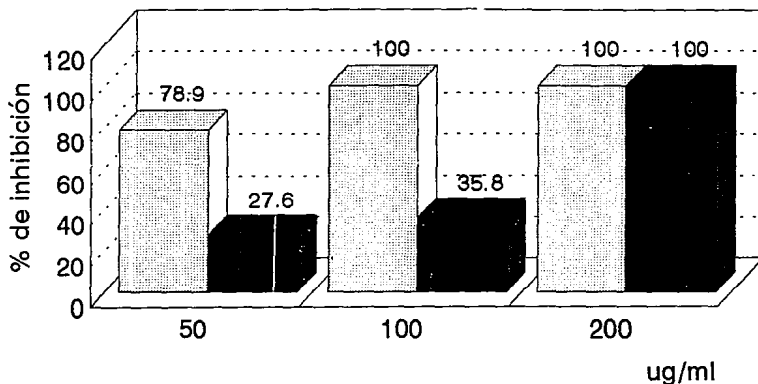
5. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LA elema-1,3,11-trien-8,12-ólida (25) Y DE LA Isoalloalantolactona (23) Y SUS DERIVADOS.

1. Actividades biológicas de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida (25).

La elema-1,3,11-trien-8,12-ólida (25) demostró una toxicidad moderada para *A. salina*. Su CL_{50} fué de 209.28 μ g/ml. Los resultados de su efecto sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli* y *Amaranthus hypochondriacus*, se ilustran en la Gráfica 1. Como se puede apreciar en la gráfica el producto natural a 200 μ g/ml inhibió totalmente el crecimiento de ambas especies. Sin embargo a 100 y 50 μ g/ml la especie *Amaranthus hypochondriacus* fué más sensible ya que su CL_{50} fué de 27.72 μ g/ml y, en el caso de *Echinochloa* fué de 89.02 μ g/ml. El efecto de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida (25) sobre los tres hongos fitopatógenos utilizados como pruebas de rutina se ilustran en las Gráficas 2 y 3. De acuerdo a los resultados ésta lactona demostró un efecto selectivo para *Helminthosporium sp.* y a todas las concentraciones evaluadas (50, 100, 150 y 200 μ g/ml), el crecimiento del hongo fué nulo.

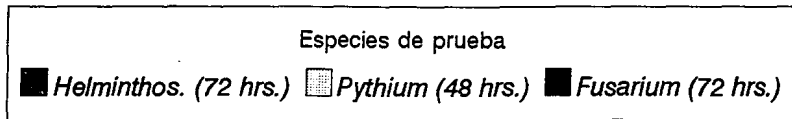
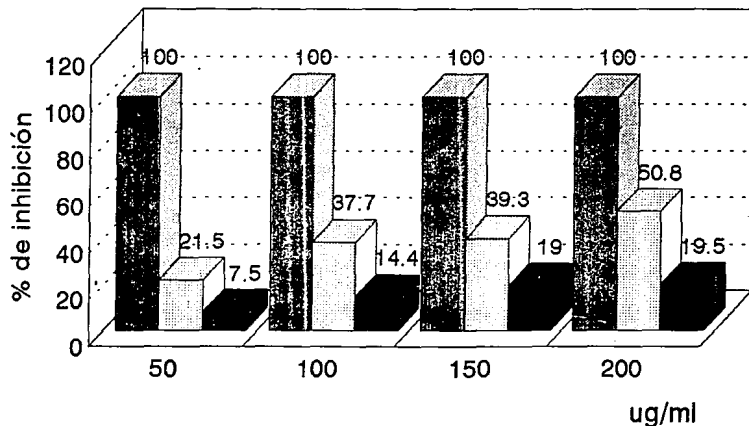
Desde el punto de vista biológico, éste constituye el primer trabajo acerca de las propiedades biológicas de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida.

Efecto de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida (25)
sobre el crecimiento radicular de
Amaranthus hypochondriacus y *Echinochloa crusgalli*



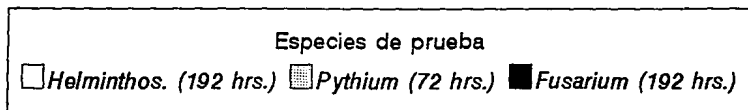
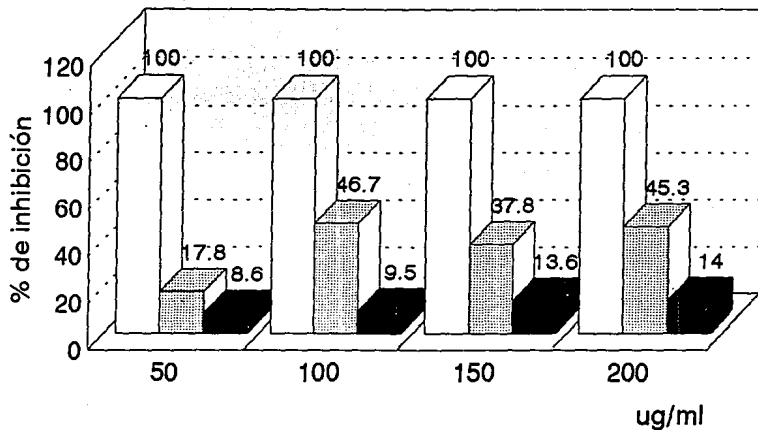
Gráfica N° 1

Efecto de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida (25) sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos



Gráfica N° 2

Efecto de la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida (25) sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos



Gráfica N° 3

El producto natural (25) al igual que su análogo la vernolepina (31) (Figura 6) demostró un efecto inhibitorio del crecimiento vegetal. Por otra parte la elemanólida sintética (32) presentó un efecto contrario al estimular el crecimiento radicular de *Phaseolus aureus* (Fischer, 1986).

Figura 6. Elemanólidas análogas a la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida (25) con actividad alelopática demostrada.

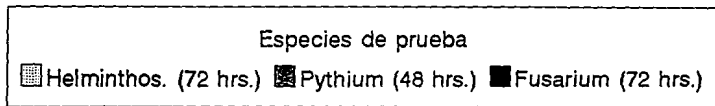
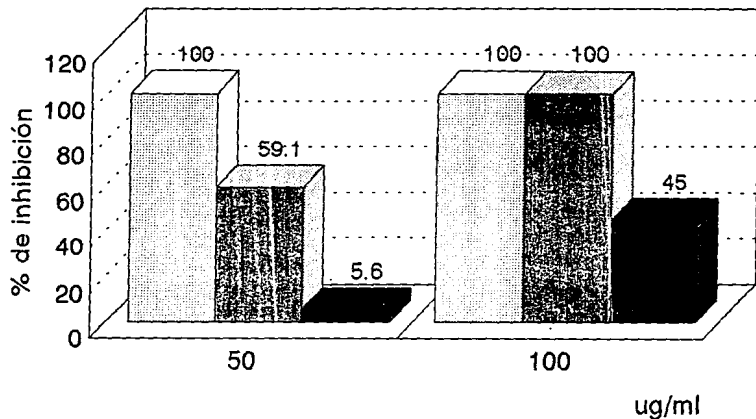


2. Actividades biológicas de la *isoalloalantolactona* (23) y sus derivados (28), (29) y (30).

La *isoalloalantolactona* (23) fué el producto natural aislado que presentó la mayor actividad en todos los bioensayos realizados, así su toxicidad para *A. salina* ($CL_{50} = 45.31 \mu\text{g/ml}$) fué cuatro veces mayor que la de la elemanodienólida (25). Los efectos antifúngicos (Gráficas 4 y 5) fueron muy similares a los del producto (25). De nueva cuenta *Helminthosporium sp.* fué la especie más sensible, observándose una inhibición del 100% de crecimiento a $50 \mu\text{g/ml}$.

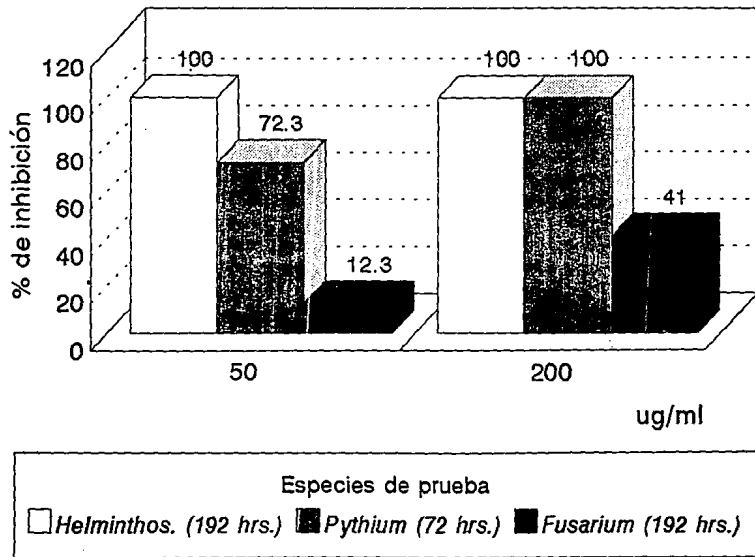
Por último, los resultados sobre el crecimiento radicular de *E. crusgalli* y *A. hypochondriacus* se ilustran en la Gráfica 6, y de la misma se desprende que al igual que en los casos del extracto original, fracciones secundarias y el compuesto (25), la especie más afectada es el *Amaranthus*

Efecto de la isoalloalantolactona (23) sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos



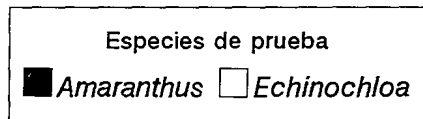
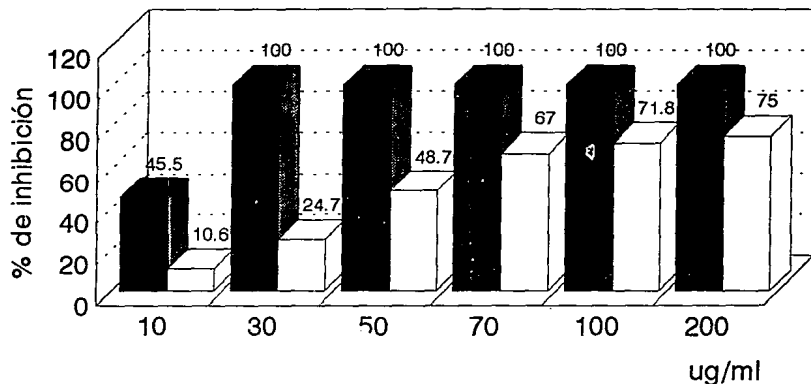
Gráfica N° 4

Efecto de la isoalloalantolactona (**23**) sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos



Gráfica N° 5

Efecto de la isoalloalantolactona (23) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*



Gráfica N° 6

hypochondriacus ($CI_{50} = 9.73 \mu\text{g/ml}$). A las concentraciones de 30, 50, 70, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ el crecimiento fué nulo. Por otra parte, la especie *Echinochloa crusgalli* fué menos sensible a la isoalloalantolactona que al producto (25), encontrándose que a 200 $\mu\text{g/ml}$ el efecto inhibitorio fué tan solo de 75%.

En un estudio previo (Kalsi y Kaur 1985) se encontró que este mismo producto a las concentraciones de 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$ estimulaba el crecimiento radicular de plantulas de *Phaseolus aureus*; lo cual demuestra que el efecto fitoinhibidor encontrado en la presente investigación es selectivo. Por otro lado el enantiómero correspondiente, la diplofilólida A, inhibió la germinación y el crecimiento radicular del arroz (Fischer, 1986). Por último, esta investigación constituye la primera descripción de las propiedades antifúngicas de la isoalloalantolactona.

Con la finalidad de determinar la variación de las actividades biológicas demostradas por la isoalloalantolactona, en función de algunas modificaciones estructurales se prepararon tres derivados del producto natural: el epóxido (28), la pirazolina (29) y el dihidroderivado (30). Como ya se indicó, las modificaciones de la estructura se realizaron de manera aleatoria, considerando únicamente la disponibilidad de los reactivos necesarios para efectuar las reacciones correspondientes. Una vez obtenidos los derivados se sometieron a las mismas evaluaciones que el producto natural y los resultados se resumen a continuación:

En el caso de la toxicidad para *Artemia salina* se encontró que los tres derivados eran menos activos que el producto original, ya que las CL_{50} disminuyeron notablemente. Es indudable que la γ -lactona- α,β -insaturada es el requisito estructural más importante para la actividad contra *A. salina*. Así

para los productos (29) y (30) la CL_{50} fué mayor de 1000 $\mu\text{g/ml}$, en cambio que para el epóxido la CL_{50} fué de 392.38 $\mu\text{g/ml}$.

Con relación al efecto fitoinhibidor sobre *A. hypochondriacus* los cambios en la actividad no fueron tan drásticos. El epóxido y el dihidroderivado demostraron un efecto inhibitorio del 100% a 200 $\mu\text{g/ml}$ y en el caso de la pirazolina la inhibición fué del 64% a la misma dosis. Sin embargo, a 50 $\mu\text{g/ml}$ la actividad se redujo casi a la mitad en los tres casos. Los resultados correspondientes se indican de manera comparativa (Gráfica 7).

Los requisitos estructurales necesarios para la actividad fitoinhibidora parecen ser diferentes según la especie de prueba. En el caso del efecto sobre *A. hypochondriacus* la lactona α,β -insaturada no es esencial para la actividad, ya que el dihidroderivado inhibe totalmente el crecimiento a 200 $\mu\text{g/ml}$; y la pirazolina lo inhibe en un 64% a la misma concentración. Esta misma tendencia no fué observada sobre *E. crusgalli* ya que los compuestos (29) y (30) demostraron un efecto inhibitorio mucho menor que el de la isoalloalantolactona a las concentraciones ensayadas (Gráfica 8).

Los resultados obtenidos sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos demostraron que el dihidroderivado no presentó actividad inhibitoria sobre las especies de prueba sino que, tanto para *Fusarium oxysporum* como para el *Helminthosporium sp.* se observó una estimulación del crecimiento (Gráficas 11-14). En el caso de la pirazolina en los tres casos la actividad se vió disminuida con respecto al producto natural (Gráficas 9-14). A diferencia de los otros compuestos ensayados, el epóxido presentó un 100% de inhibición sobre *Pythium sp.* (Gráficas 9 y 10) a las concentraciones de prueba y sobre *Helminthosporium sp.* (Gráficas 13 y 14) la inhibición no fué del 100%, como se observó para el producto natural.

Como en los casos anteriores, la actividad inhibitoria del crecimiento de *Fusarium oxysporum* no fué significativa. (Gráficas 11 y 12).

Con respecto a las propiedades antifúngicas de las dos lactonas naturales y de los productos de semisíntesis los siguientes comentarios son pertinentes:

1. Las lactonas sesquiterpénicas han demostrado previamente propiedades antimicrobianas sobre organismos Gram (+), Gram (-) y hongos patógenos para animales (Rodríguez, 1976; Goren, et al., 1990; *Interalia*). También se ha descrito el efecto de la partenina (1) en contra de los hongos fitopatógenos *Sclerospora graminicola* y *Aspergillus flavus* (Char y Shankarabhat, 1975), encontrándose que la lactona a 500 µg/ml inhibe la germinación del esporangio y la movilidad de las zoosporas de *S. graminicola*; a la misma concentración y a concentraciones mayores el producto no demostró efecto alguno sobre las esporas de *A. flavus*.

Aparte del trabajo de Char y Shankarabhat (1975) no se encontró reporte alguno acerca del efecto de las lactonas sesquiterpénicas sobre hongos fitopatógenos, en consecuencia la alta actividad demostrada por los productos (23), (25), (28), (29) y (30), en el presente estudio es de gran relevancia.

Los hongos afectados por las lactonas objeto de este estudio causan daños irreversibles a plantas de gran importancia económica, principalmente a especies de interés alimenticio. Así las especies de *Pythium* producen la enfermedad denominada "ahogamiento de las plantas". Esta enfermedad afecta semillas, plántulas y plantas adultas de casi todos los tipos de hortalizas, cereales y muchos árboles frutales y forestales. Las enfermedades producidas por *Pythium* se pueden tratar y/o prevenir mediante el empleo de diversas sustancias químicas. Los productos

mayor frecuencia se utilizan para tratar semillas o bulbos incluyen al cloranil, thiram, captán, diclone, ferban y diazoben. Por otra parte el fungicida sistémico ethazol controla el ahogamiento y las pudriciones de la raíz producidas por este hongo. (Agrios, 1986).

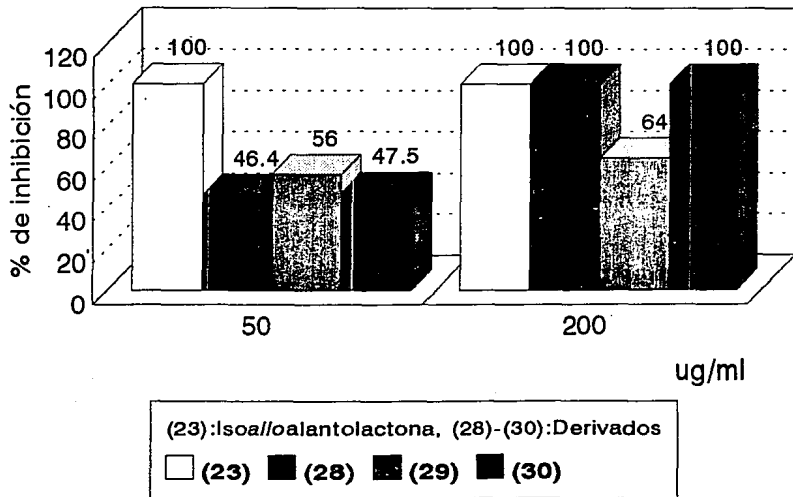
Los hongos del género *Helminthosporium* se encuentran ampliamente distribuidos por todo el mundo y producen severas infecciones en muchas plantas cultivadas incluyendo algunas gramíneas (maíz, cebada, trigo, arroz y avena principalmente), donde producen las enfermedades del tizón y manchas foliares. En ocasiones estos hongos producen también enfermedades en el manzano (pústula negra) y el peral (cáncer vejigoso). (Agrios, 1986).

Todas las enfermedades que ocasionan las distintas especies de *Helminthosporium* destruyen varias zonas de la superficie de la hoja, atacan y destruyen parte del tallo o de las raíces o bien atacan directamente a los granos y, en cualquiera de los casos producen pérdidas considerables en la producción. Los fungicidas empleados para el control de este género de hongos incluyen a la cicloheximida, cicloheximida-thiram, clorotalonil dyrene, maneb, y muchos otros. (Agrios, 1986).

El hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* produce los llamados "marchitamientos", los cuales afectan y ocasionan pérdidas considerables en la mayoría de las flores y hortalizas, muchas plantas del campo como el algodón y el tabaco, plantaciones tales como el plátano, yantén, café y caña de azúcar, así como algunos árboles de sombra. (Agrios, 1986).

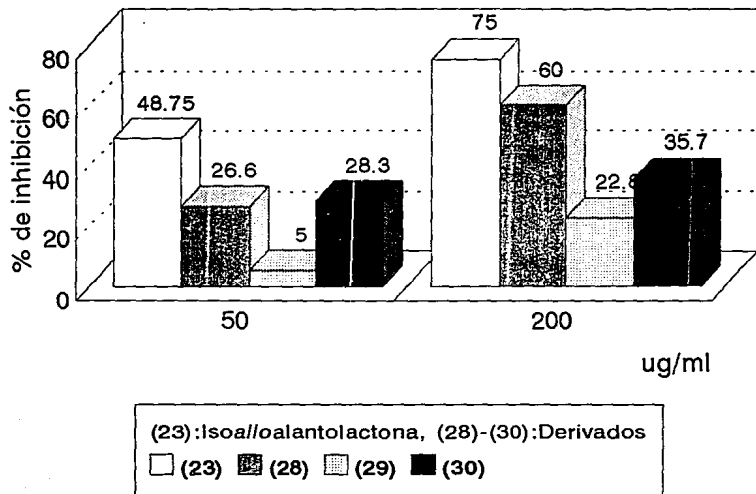
Hasta la fecha no se dispone de métodos químicos de control eficaz para combatir la marchitez producida por *Fusarium*, aunque en el caso del tomate el uso de variedades resistentes al hongo se ha utilizado como método práctico para controlar la enfermedad en el campo (Agrios, 1986).

Efecto de los derivados de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus*



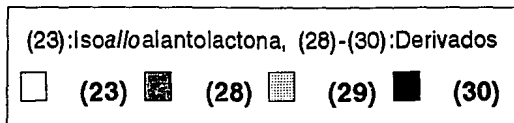
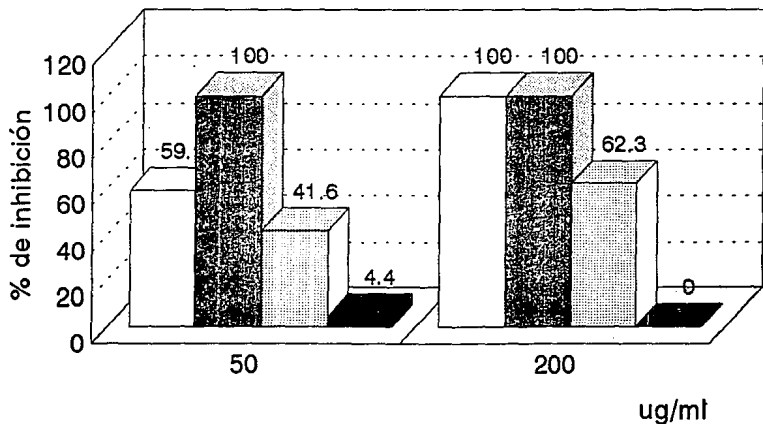
Gráfica N° 7

Efecto de los derivados de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli*



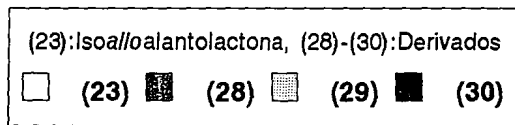
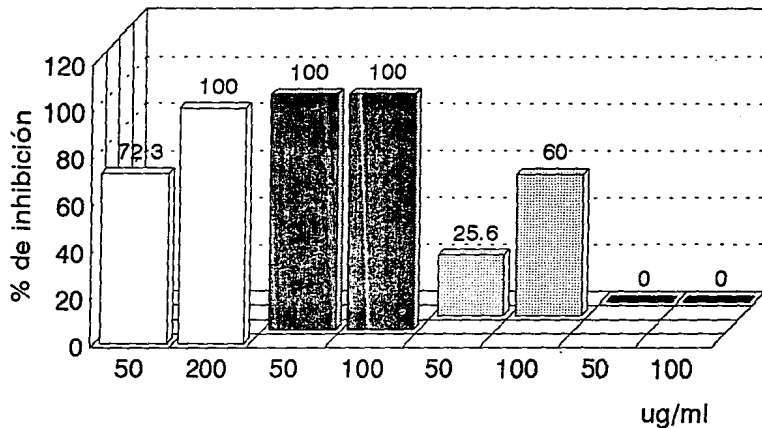
Gráfica N° 8

Efecto de los derivados de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radial de *Pythium* sp. (48 hrs.)



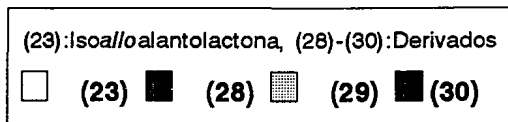
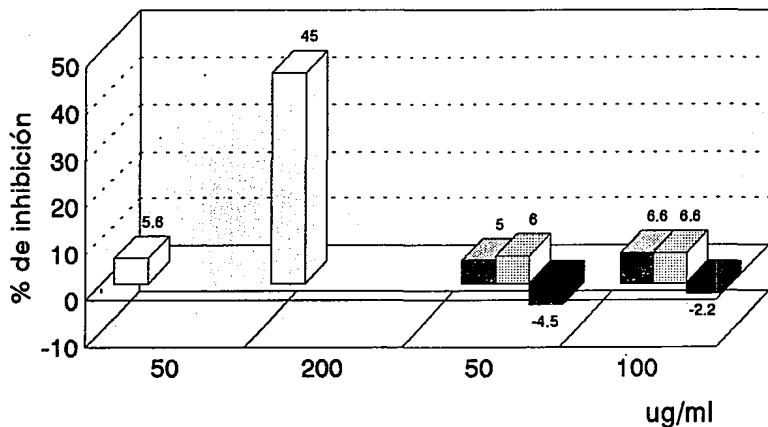
Gráfica N° 9

Efecto de los derivados de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radial de *Pythium sp.* (72 hrs.)



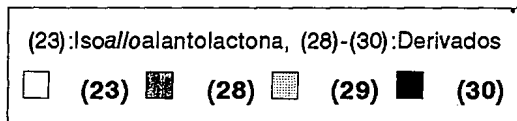
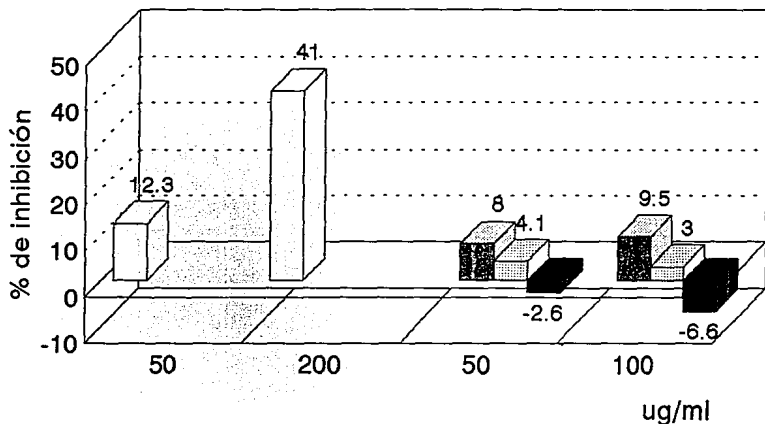
Gráfica N° 10

Efecto de los derivados de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* (72 hrs.)



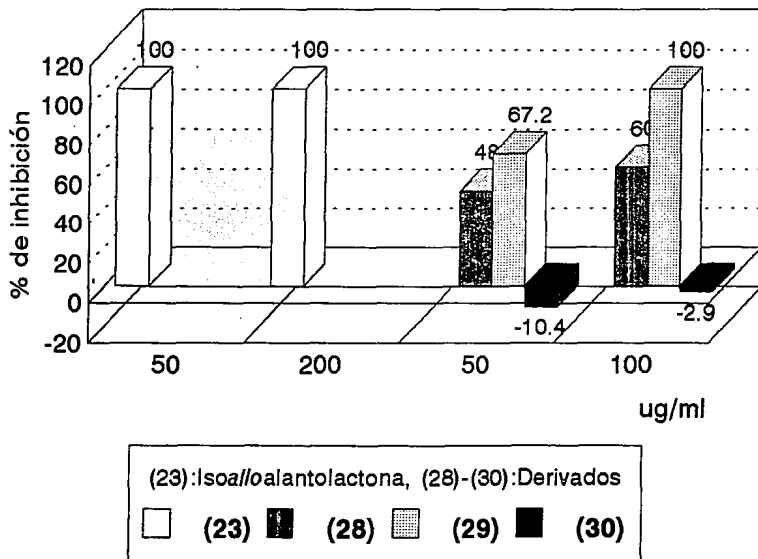
Gráfica N° 11

Efecto de los derivados de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radial de *Fusarium oxysporum*. (192 hrs.)



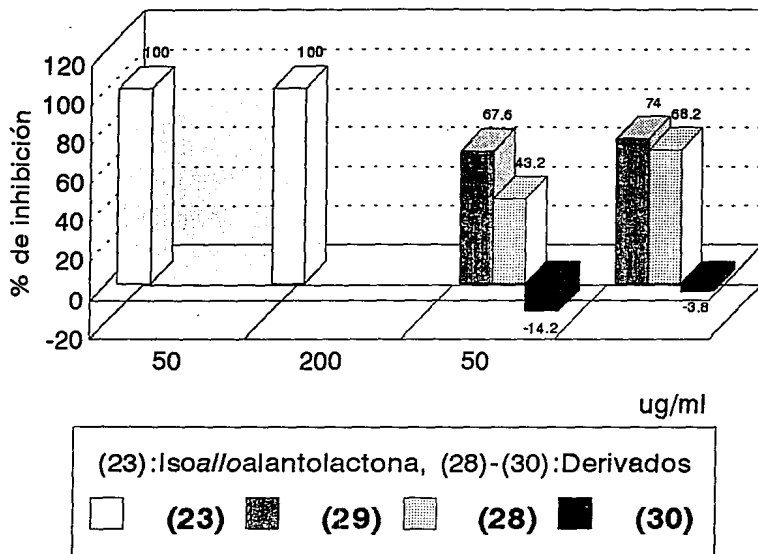
Gráfica N° 12

Efecto de los derivados de la isoalloantolactona sobre el crecimiento radial de *Helminthosporium sp.* (72 hrs.)



Gráfica 13

Efecto de los derivados de la isoalloalantolactona sobre el crecimiento radial de *Helminthosporium* sp. (192 hrs.)



Gráfica N° 14

V. CONCLUSIONES

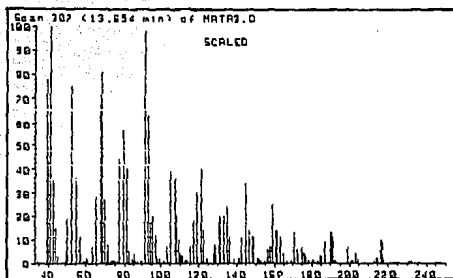
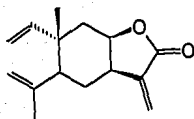
1. El estudio fitoquímico biodirigido del extracto metanólico de *Ratibida mexicana*, utilizando como bioensayos la determinación de la toxicidad para *Artemia salina*, el efecto sobre el crecimiento radicular de dos malezas (*Echinochloa crusgalli* y *Amaranthus hypochondriacus*) y la evaluación del crecimiento radial de tres hongos fitopatógenos (*Pythium sp.*, *Fusarium oxysporum* y *Helminthosporium sp.*), permitió el aislamiento de dos lactonas sesquiterpénicas fitoinhedoras, antifúngicas y potencialmente citotóxicas. Las lactonas bioactivas fueron caracterizadas mediante métodos espectroscópicos como la isoaloolantolactona (23) y la elema-1,3,11-trien-8,12-ólida (25).

2. La isoaloolantolactona constituyó el principio bioactivo mayoritario y en todas las evaluaciones realizadas demostró la mayor actividad.

3. El efecto inhibitorio del crecimiento vegetal demostrado por las dos lactonas fué selectivo y la especie más sensible fué *Amaranthus hypochondriacus*. Así mismo, el efecto antifúngico de ambos productos fué mayor sobre *Helminthosporium sp.*

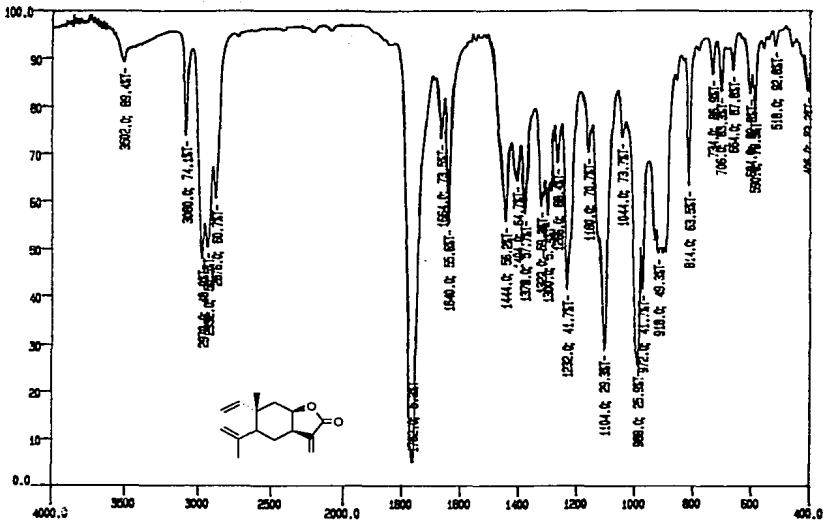
4. Se prepararon tres derivados semisintéticos el epóxido (28), el dihidroderivado (30) y la pirazolina (29). Los derivados presentaron efectos biológicos menores que los del producto natural.

5. De manera adicional, en el presente estudio se obtuvieron tres selinanos simples: el (-)-selin-11-en-4 α -ol (24), el (-)-selina-4 α ,11-diol (26) y el (+)8 α -acetoxi-selina-4 α ,11-diol (27); el β -D-glucosistosterol y la sacarosa.



Espectro 1

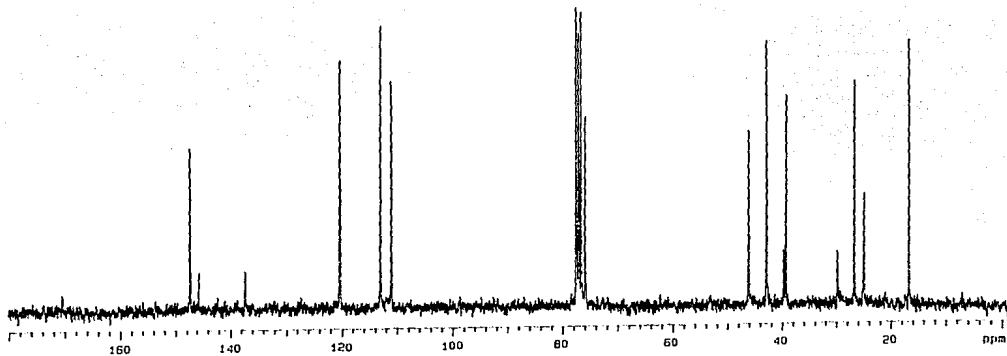
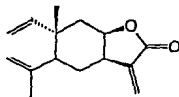
H



Dr-1
Espectro 2.

U.N.A.M. Instituto de Química
Dra. H. Mata. PP-24-30-2. AGC

DESPLAZO C13
FRECUENCIA 75.429 MHz
SPECTRAL WIDTH 19000.0 Hz
ACQUISITION TIME 0.401 sec
RELAXATION DELAY 0.600 sec
PULSE WIDTH 0.7 usec
SOLVENT TETRAPHENYLENE
NO



Espectro 3.

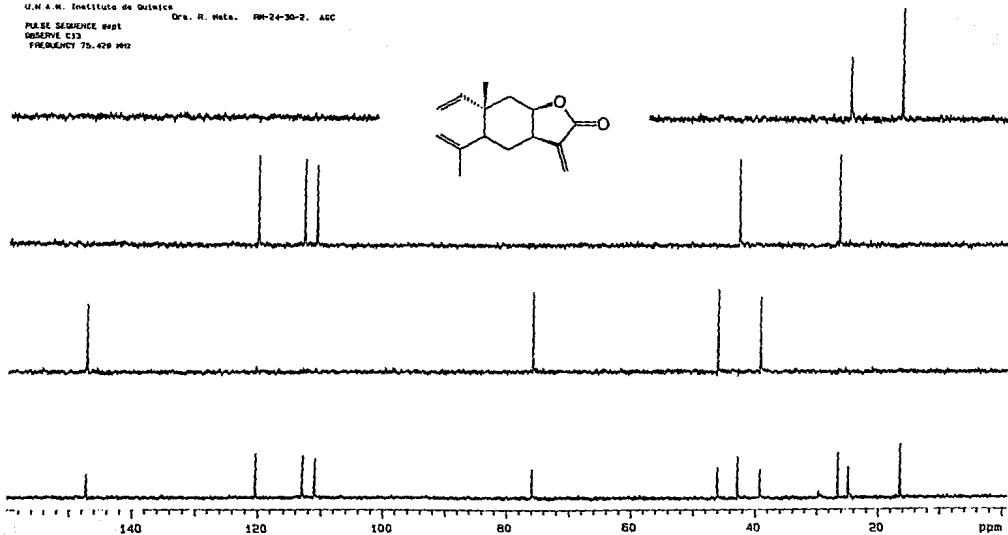
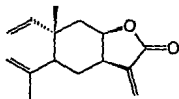
U.N.A.M. Instituto de Química

Dra. R. Mata. RM-24-30-2. AEC

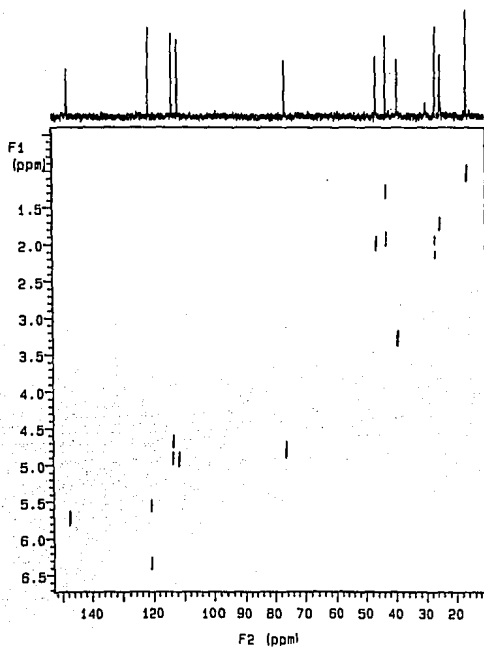
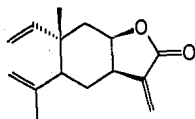
PULSE SEQUENCE: zgpg30

RESOLVE: C13

FREQUENCY: 75.428 MHz



Espectro 3a

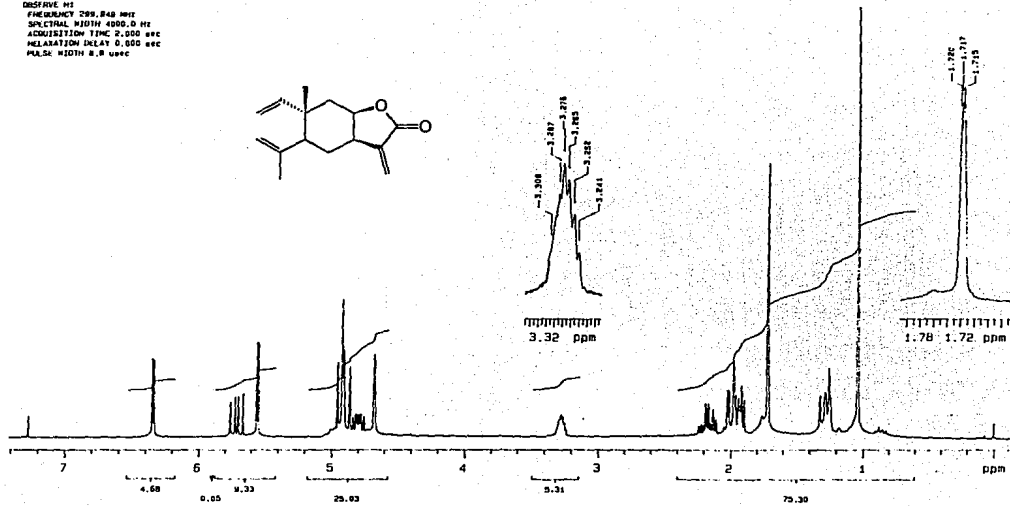
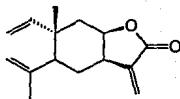


Espectro 3b

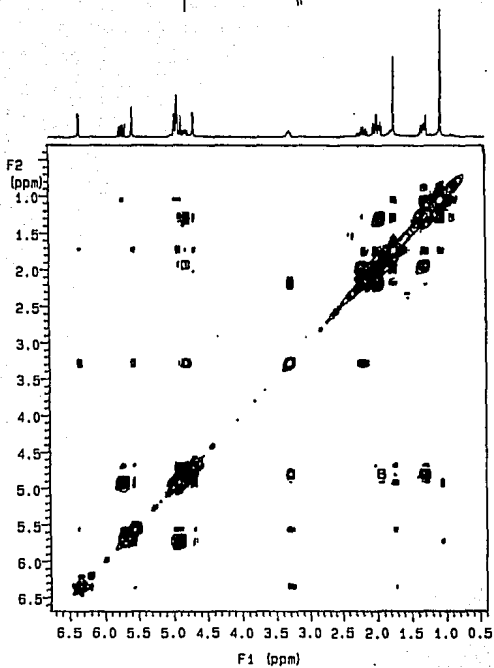
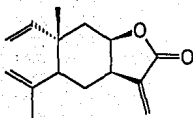
U.N.A.M. Instituto de Química

Dra. H. Mata. IM-24-30-2

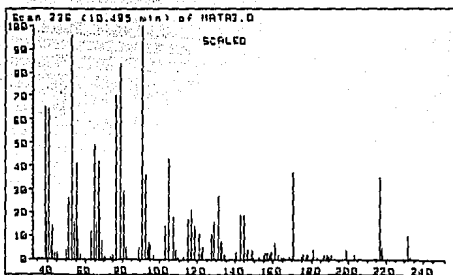
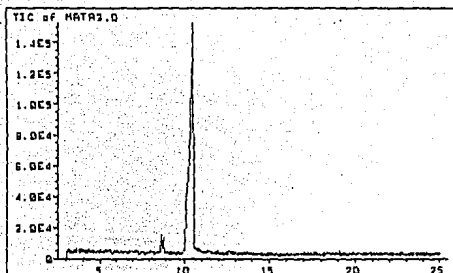
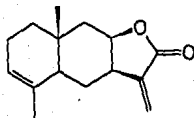
DESRIVE M1
FREQUENCY 299.848 MHz
SPECTRAL WIDTH 4000.0 Hz
ACQUISITION TIME 2.000 sec
RELAXATION DELAY 0.000 sec
PULSE WIDTH 8.8 usec



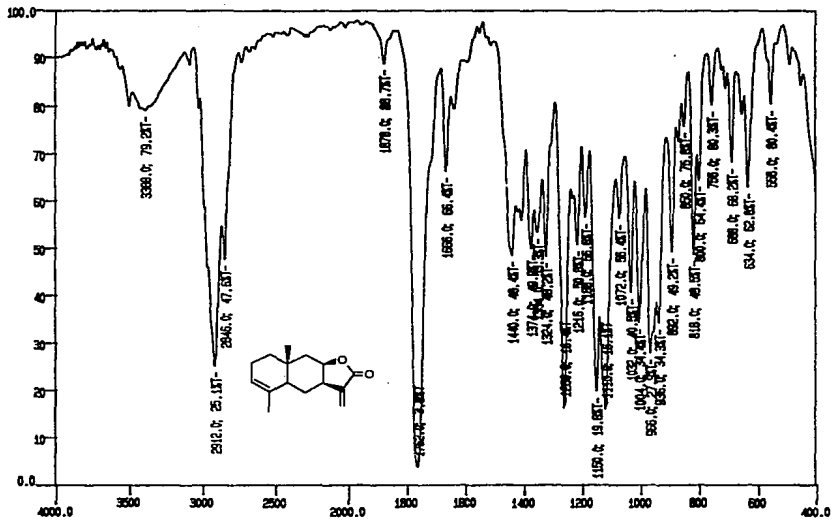
Espectro 4



Espectro 4a



Espectro 5



D-1

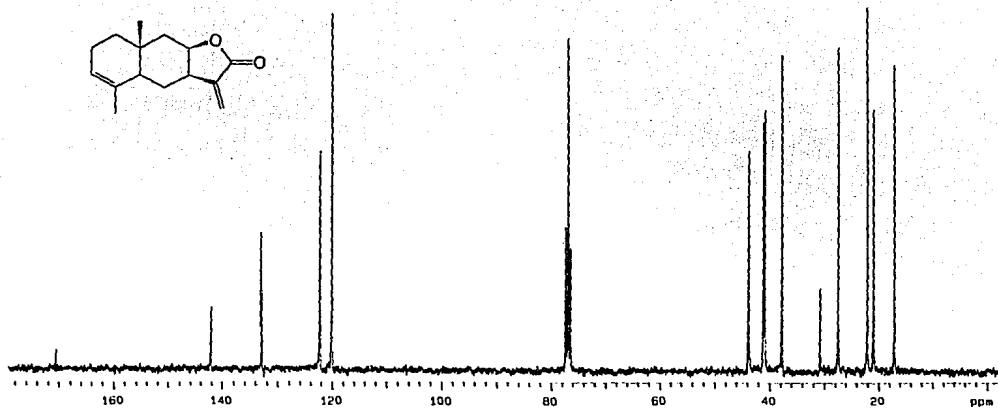
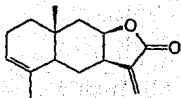
Espectro 6

U.N.A.M. Instituto de Químico

D^{ra}. R. Mata, RM-24-Fris. AGC

OBSERVE C13

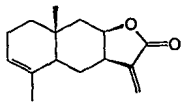
FREQUENCY 75.429 MHz



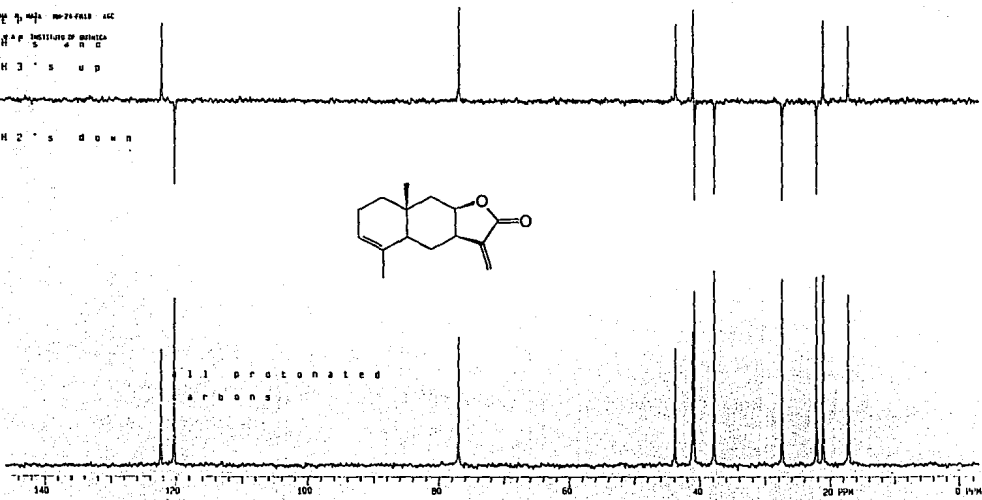
Espectro 7

0 001 01 0414 00-24-7618 ACC
C H A P INSTITUTE OF CHEMICALS
S A N C
C H 3 ' s u p

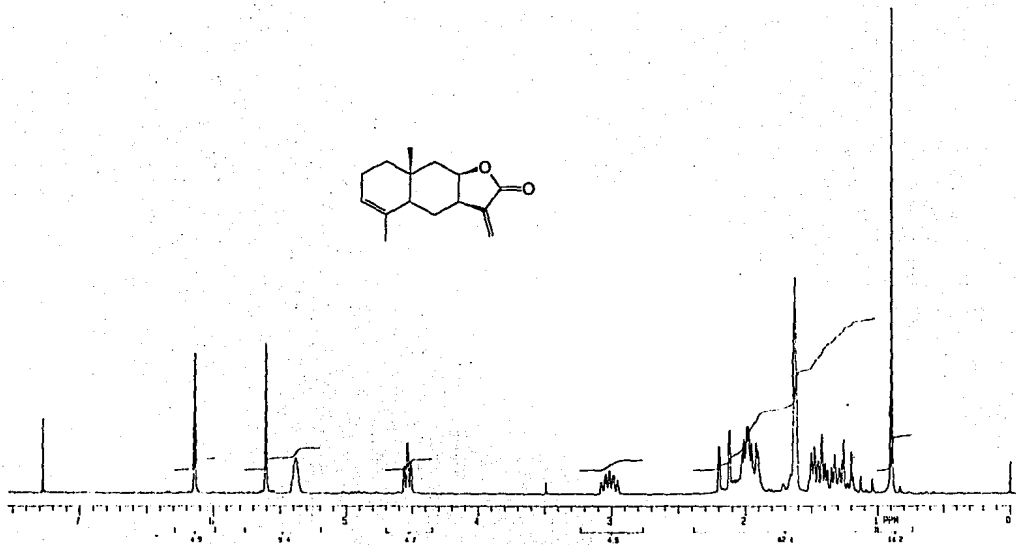
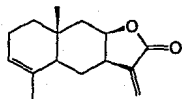
C H 2 ' s d o w n



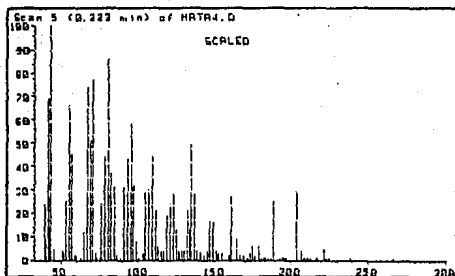
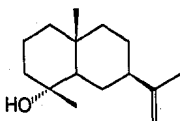
11 protonated
carbons



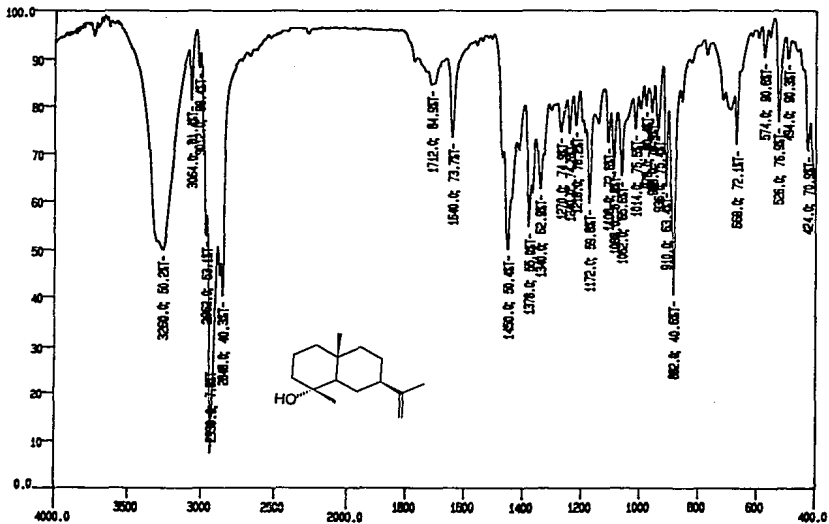
Espectro 7a



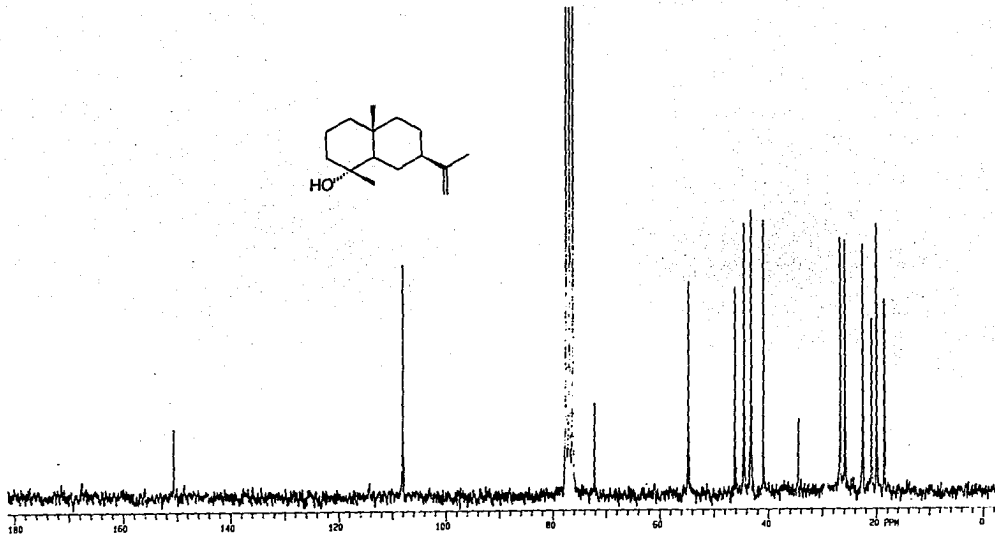
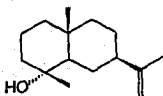
Espectro 8



11



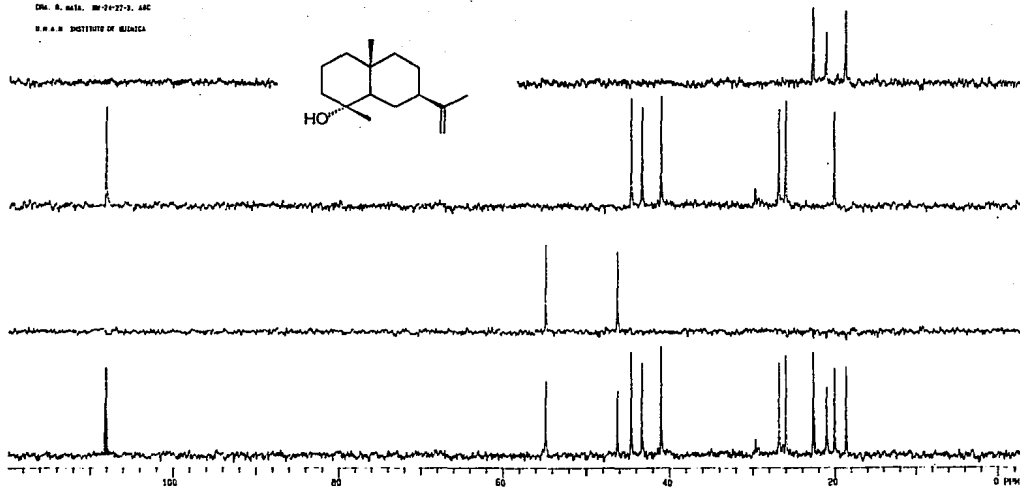
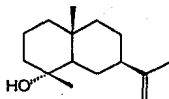
DR-1
Espectro 10



Espectro 11

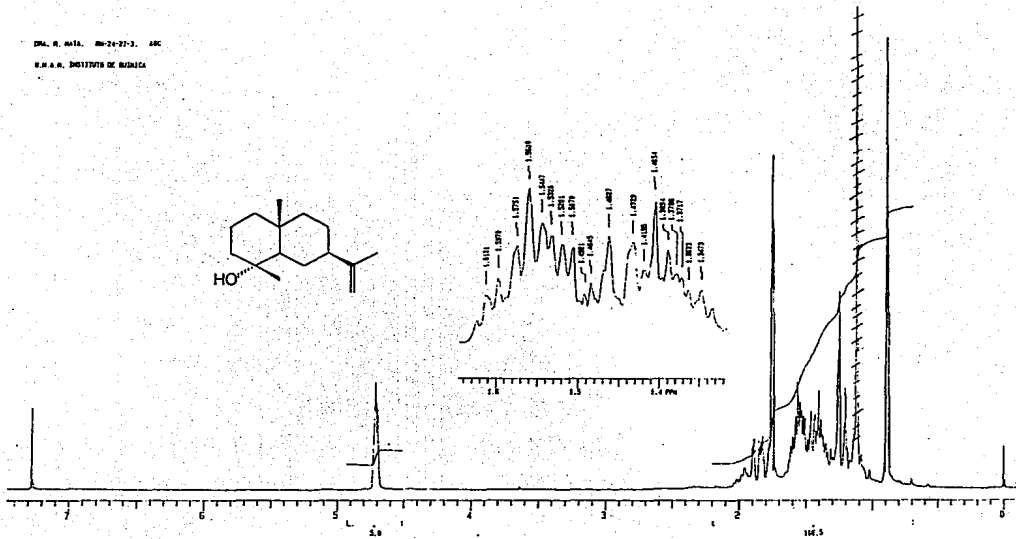
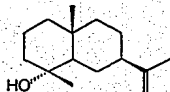
DM. R. 1111. 10-0-27-3. AAC

R. N. A. B. INSTITUTE OF MEDICINA

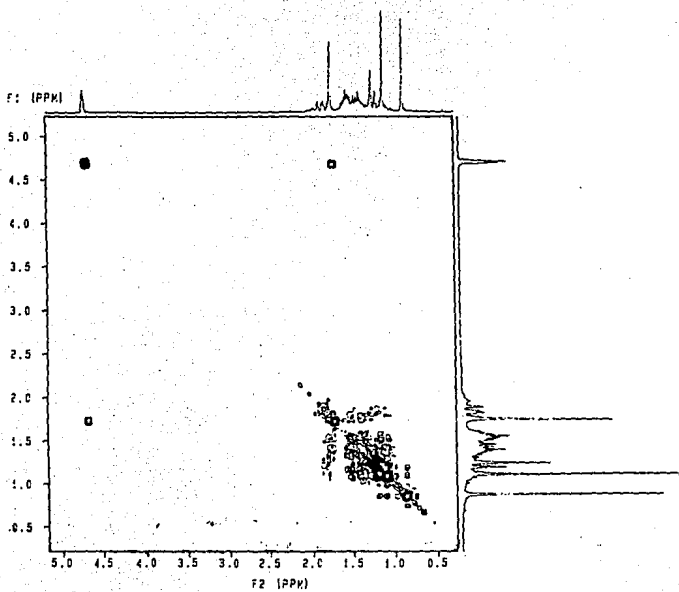
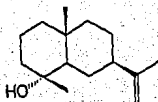


Espectro 11a

DR. R. MATA, No-24-27-3, ABC
I. N. A. N., INSTITUTO DE QUÍMICA



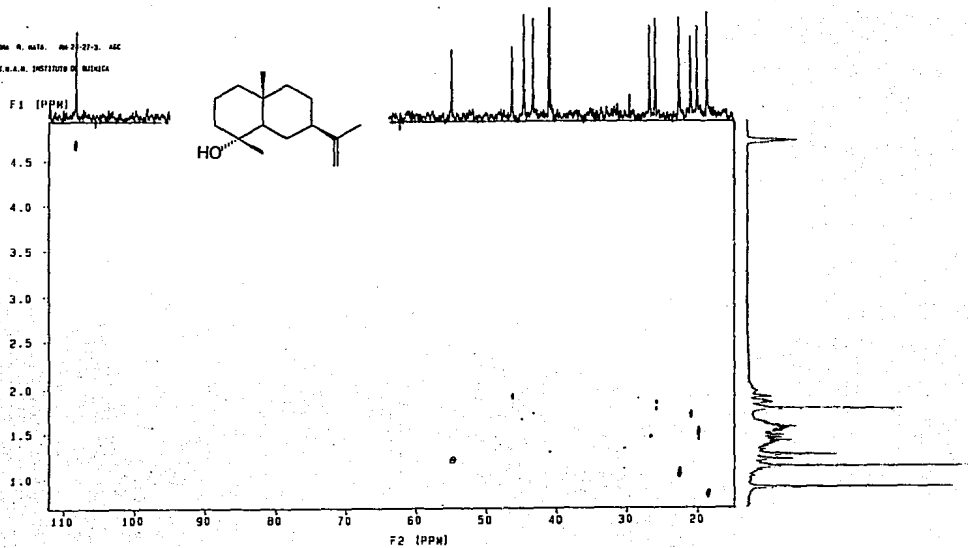
Espectro 12



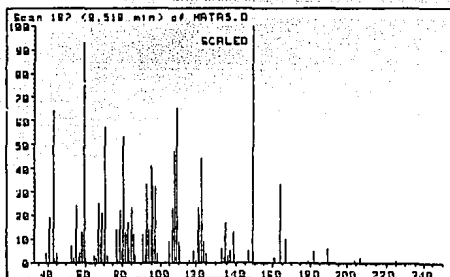
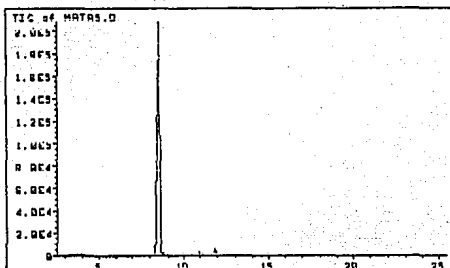
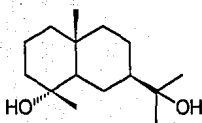
Espectro 12a

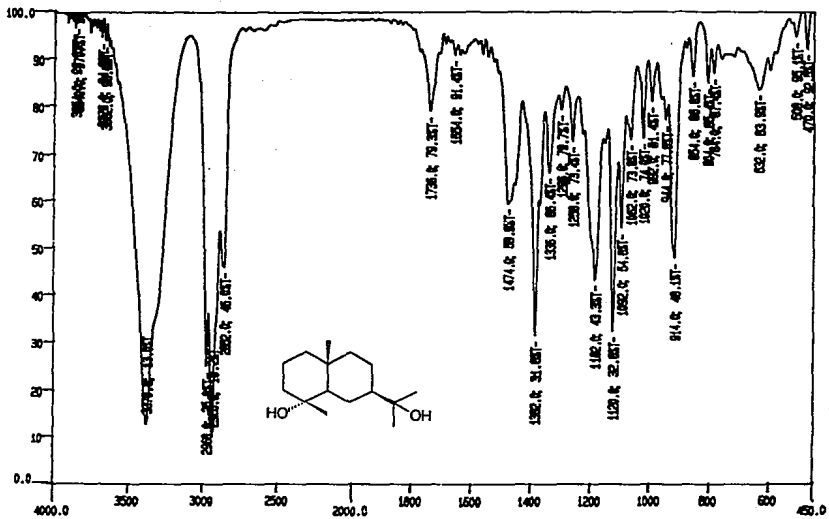
DM 4, mat. No 2-27-3. ASC

S.N.A.M. INSTITUTO DI RICHIECA



Espectro 12b



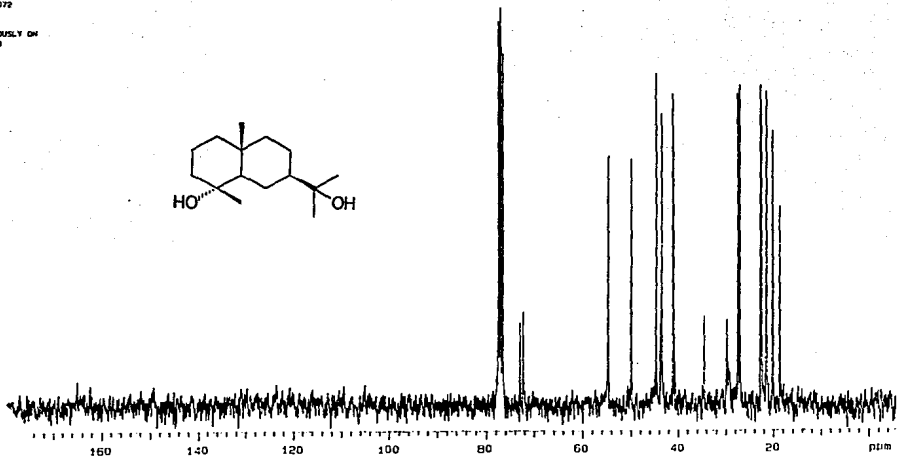
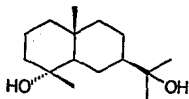


Dr-1
Espectro 14

U.N.A.M. Instituto de Químico

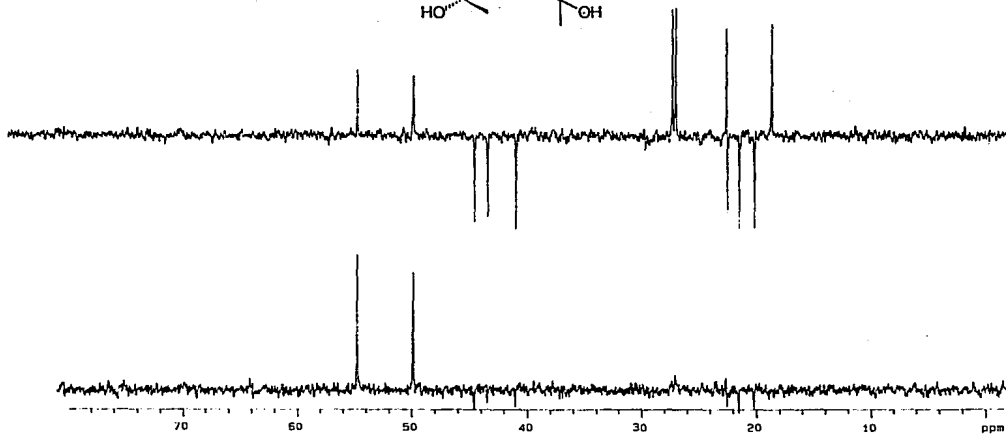
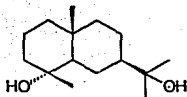
Dra. R. Melo Pineda-82. A6C

ORSENF C13
FREQUENCY 75.428 MHz
SPECTRAL WIDTH 19000.0 Hz
ACQUISITION TIME 0.401 sec
RELAXATION DELAY 0.500 sec
PULSE WIDTH 8.0 usec
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPEITIONS 3072
SCANS 64
HIGH POWER 80
DECOUPLER CONTINUOUSLY ON
MALTZ-18 MODERATED
0

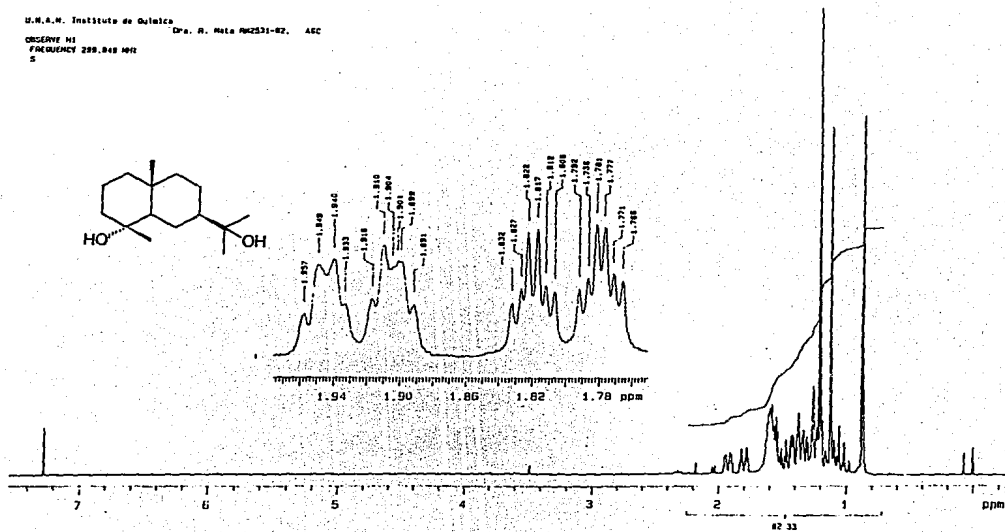
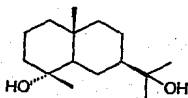


Espectro 15

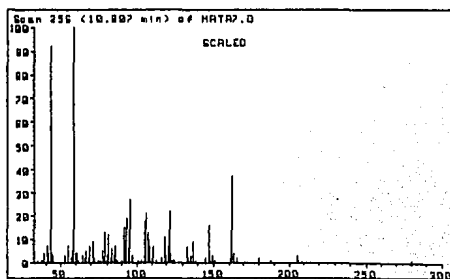
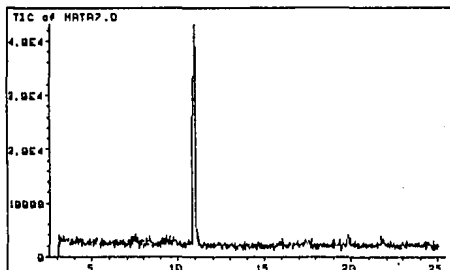
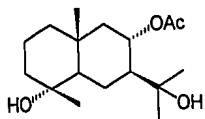
Dr. A. Mito. 10/23/82. ASC
PULSE SEQUENCE: zgpg30
OBSERVE: C13
FREQ: 75.429 MHz



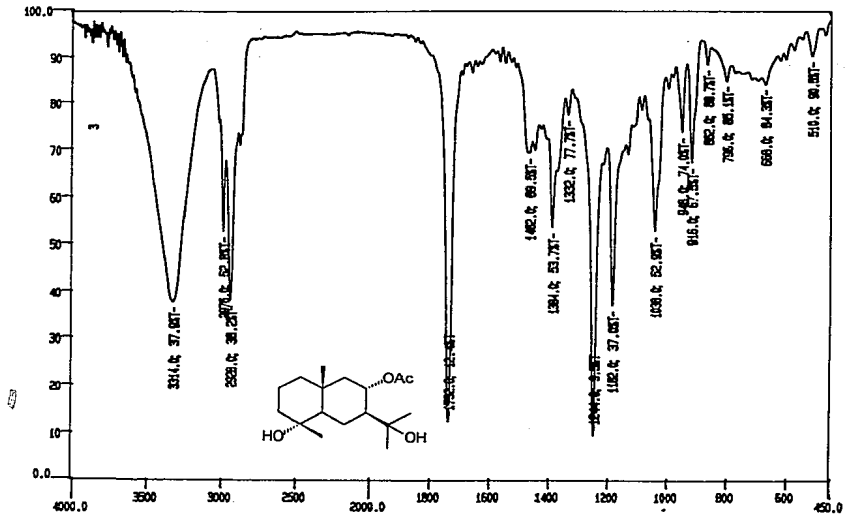
Espectro 15a



Espetro 16



14



DI-1
Espectro 18

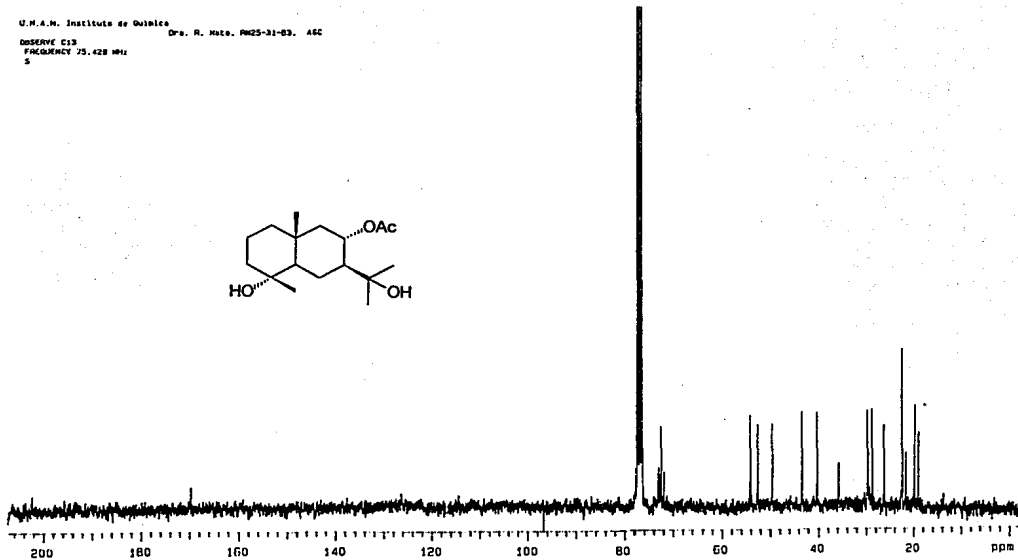
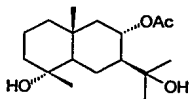
U.N.A.M. Instituto de Químico

Dra. R. Mate. RM25-31-03. ASC

OSSERYE C13

FREQUENCY 75.428 MHz

S



Espectro 19

Jr. R. Mata, RM25-31-03, 48C

PULSE SEQUENCE: gpcpt

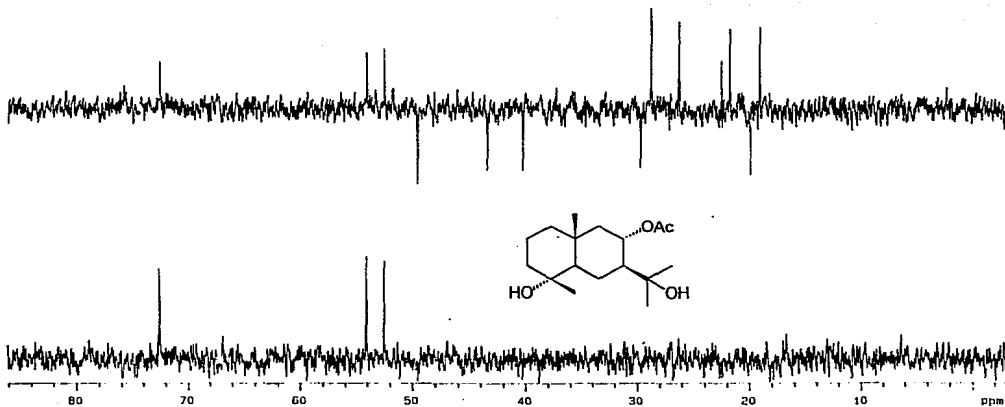
upper trace: CH and CD3 up, CD2 down

lower trace: CH only.

OBSERVE: C13

FREQUENCY: 75.428 MHz

SPECTRAL WIDTH: 19000.0 Hz

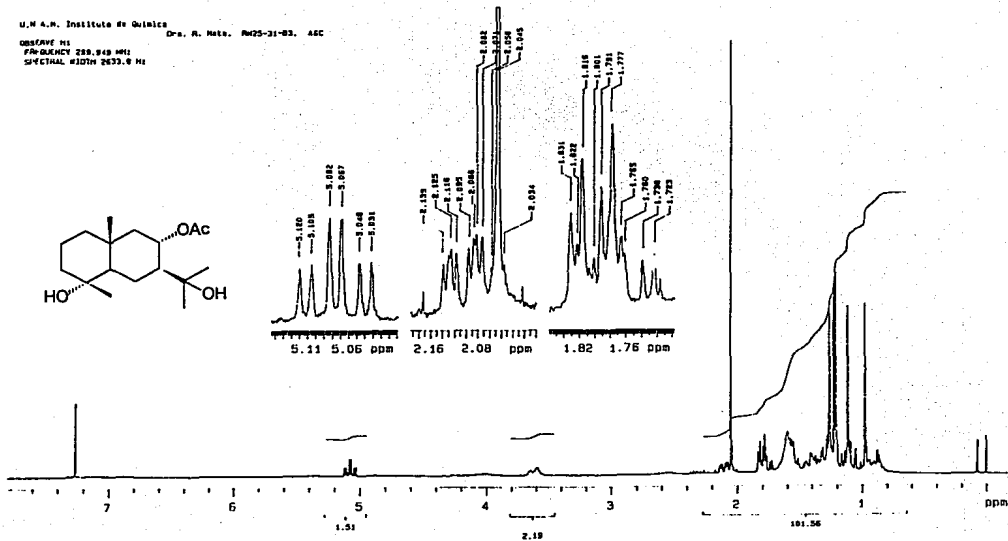
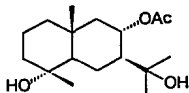


Espectro 19a

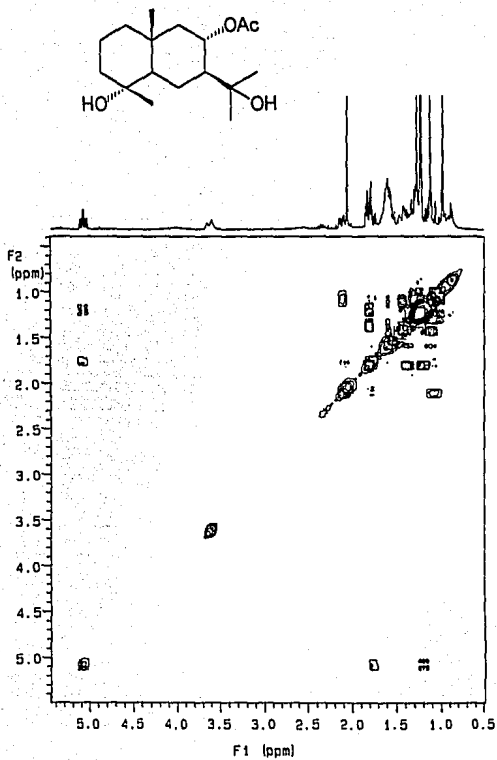
U.N.A.M. Instituto de Química

Dr. R. Melo. RM25-31-83. 45C

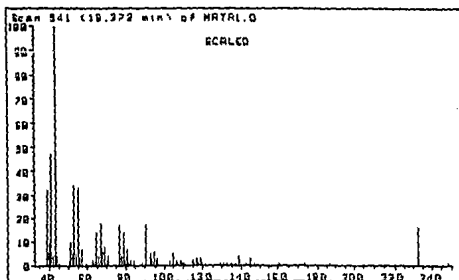
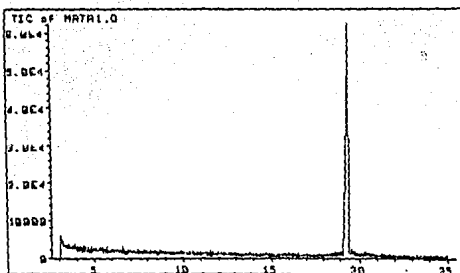
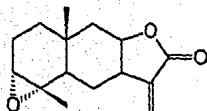
OBSERVE M1
FREQUNCY 250.949 MHz
SPECTRAL WIDTH 2633.0 Hz



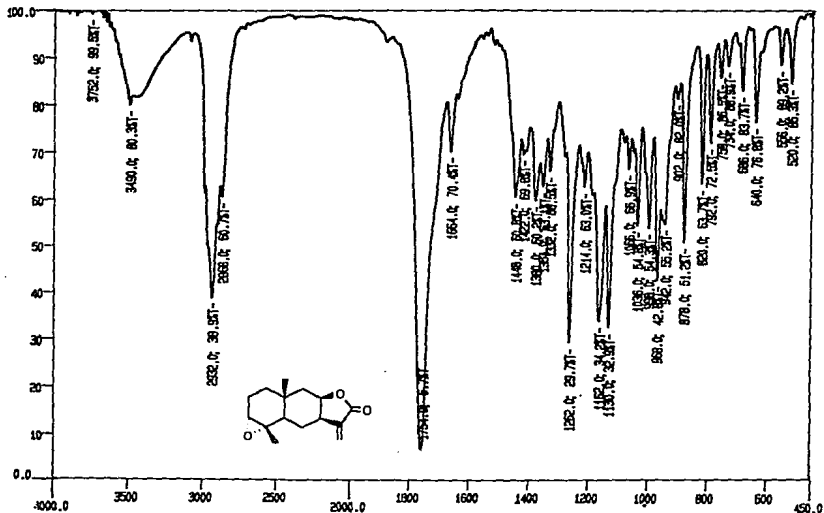
Espectro 20



Espectro 20a



KT



OK-1
Espectro 22

U.N.A.M. Instituto de Químico IDH

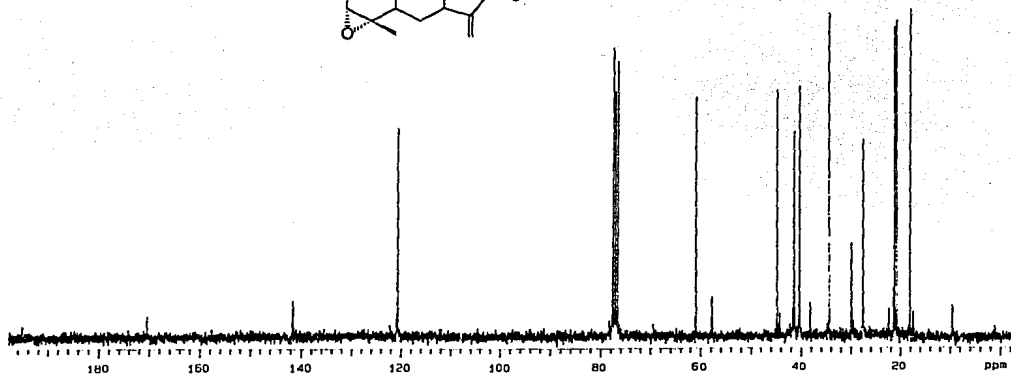
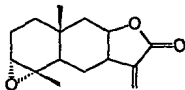
Dr. A. Neta, RA-24-33-1

OBSERVE C13

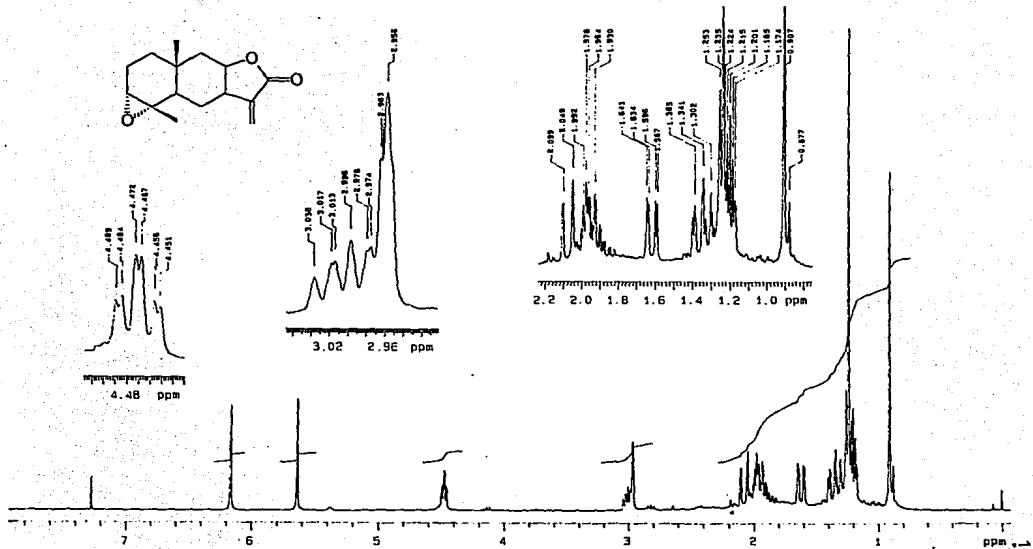
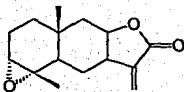
FREQUENCY 75.429 MHz

SPECTRAL WIDTH 19000.0 Hz

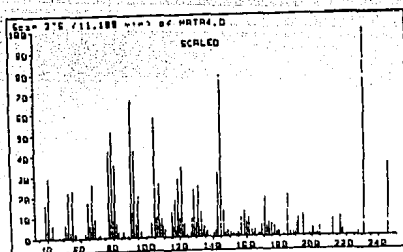
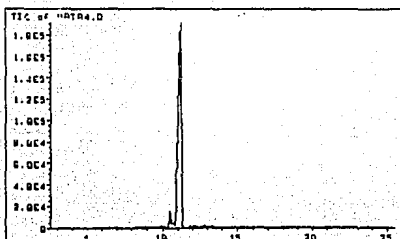
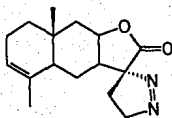
ACQUISITION 713M.



Espectro 23

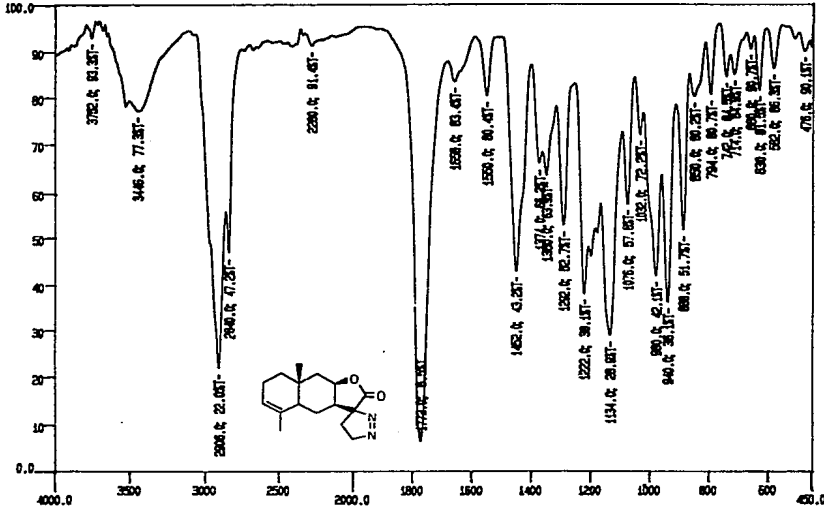


Espectro 24



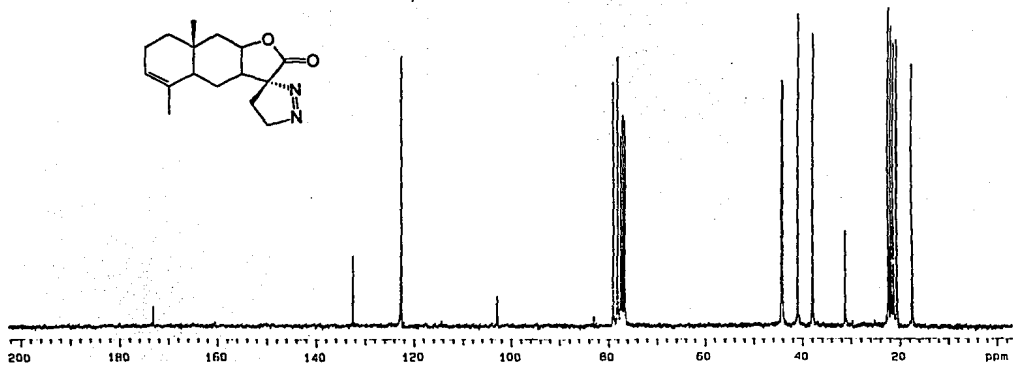
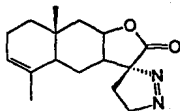
Espectro 25

14



CH-1
Espectro 26

U.N.A.M. Instituto de Quimica
Dr. R. Hols. Pq25-27. AGC
CASERVA C13
FREQUENCY 75,428 MHz
SPECTRAL WIDTH 19000.0 Hz
ACQUISITION TIME 0.500 sec

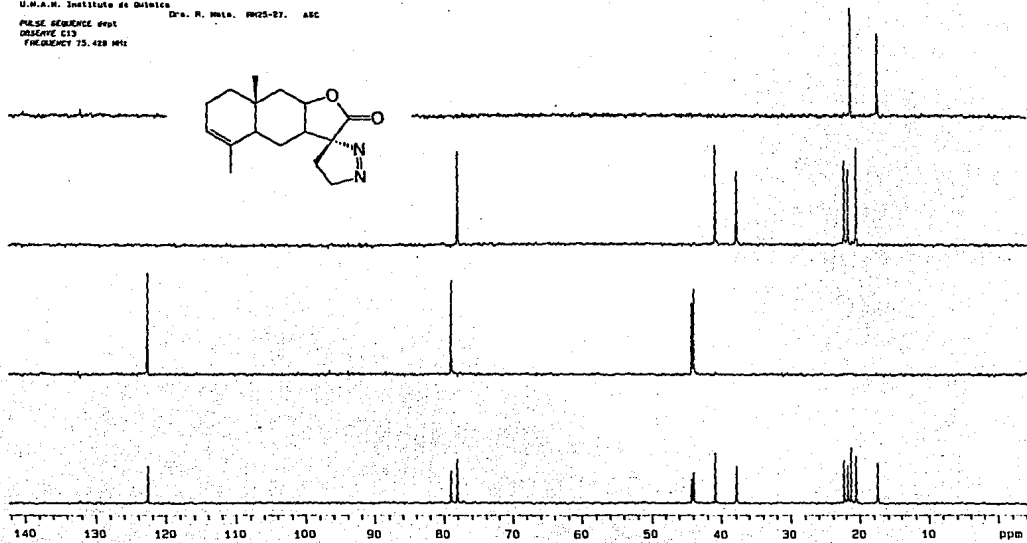
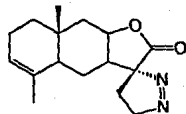


Espectro 27

U.N.A.M. Instituto de Químico

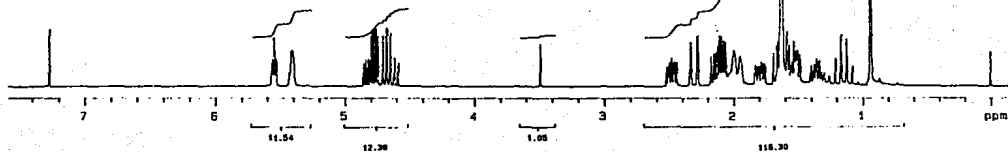
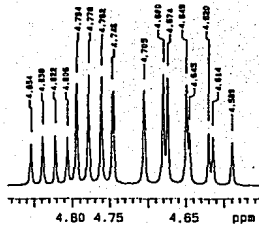
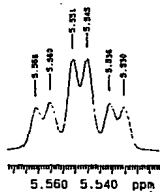
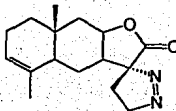
Dra. R. Melo, 1925-27, ASC

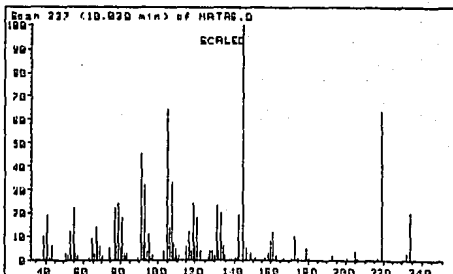
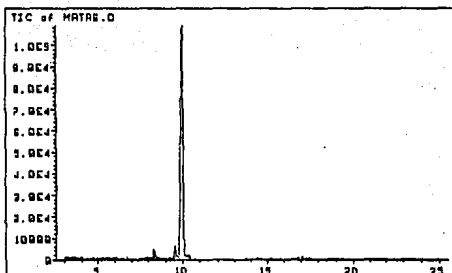
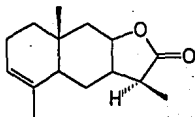
PULSE SEQUENCE gpcp
ORSEATE C13
FREQUENCY 75.429 MHz



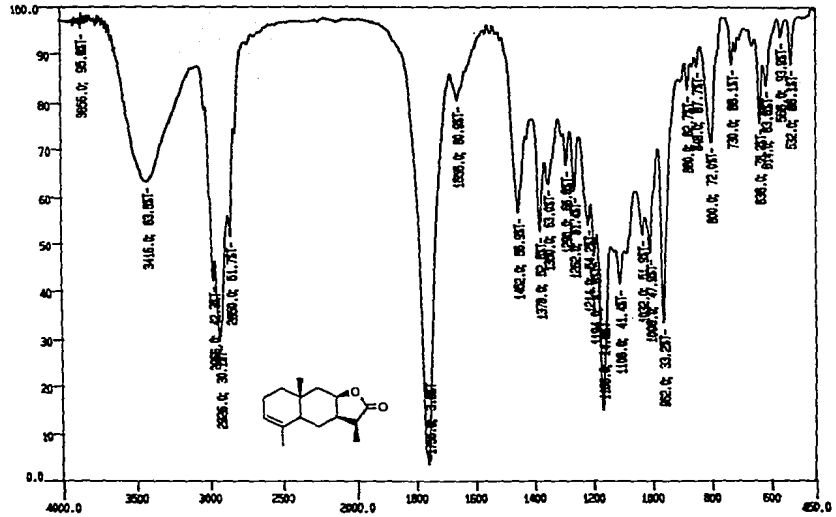
Espectro 27a

CHEMICAL
 CHANNELS 200.848 MHz
 SPECTRAL WIDTH 2633.0 Hz
 ACQUISITION TIME 3.499 sec
 DELAY TIME 1.906 sec
 PULSE WIDTH 9.0 usec
 AMBIENT TEMPERATURE
 NO. REPEATS 64
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 FT SIZE 32768
 101





11



CP-1
Espectro 30

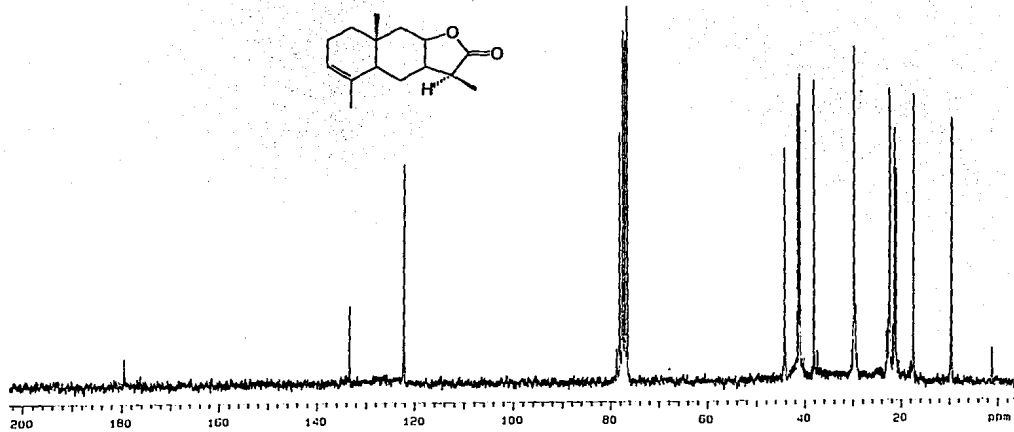
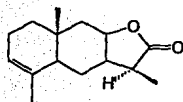
U.N.A.M. Instituto de Químico

Dr. H. Mat. 1925-26. ASC

OBJETO C13

FRECUENCIA 75.429 MHz

SPECTRA



Espectro 31

U.N.A.M. Instituto de Químico

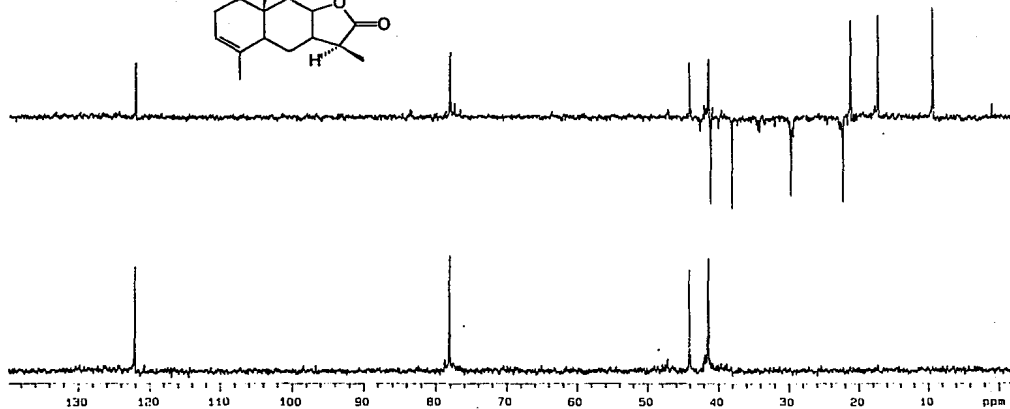
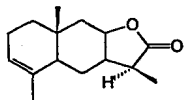
D^o. H. Noto. RM25-26. AGC

PULSE SEQUENCE: zgpg30

OBSERVE: C13

FREQUENCY: 75.429 MHz

SPECTRAL WIDTH: 3



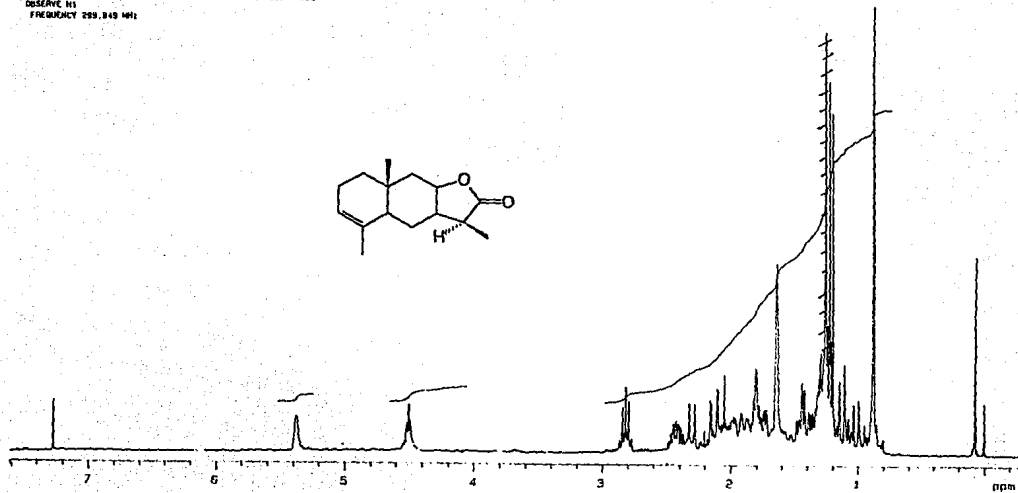
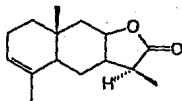
Espectro 31a

U.N.A.M. Instituto de Químico

Dra. H. Melo. H925-29. AGC

OSERVE N1

FREQUENCY 299.849 MHz

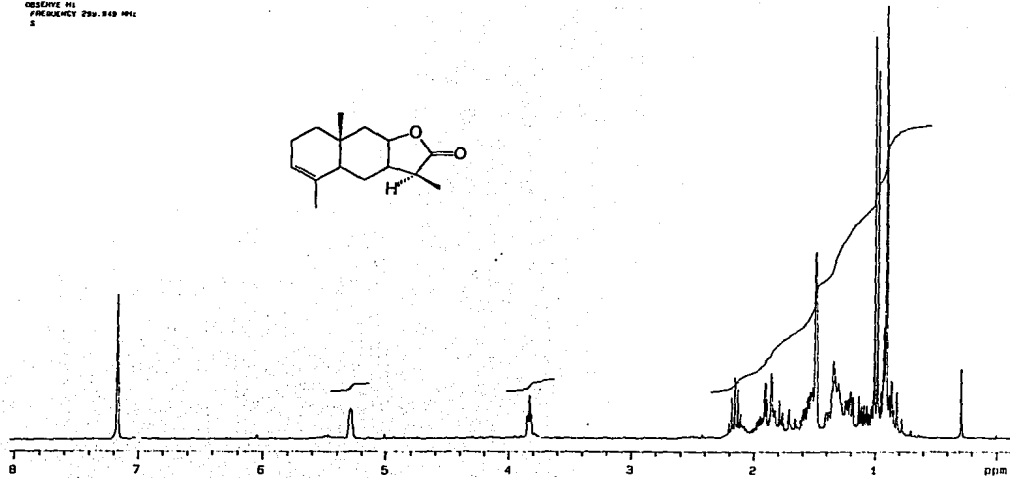
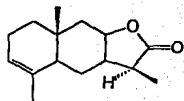


Espectro 32

U.N.A.M. Instituto de Químico

Dra. R. Neta. RM25-70. 45C

OBJETIVO M1
FRECUENCIA 290.849 MHz
5



Espectro 33

VI. BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G.N.; *Fitopatología*, cap. 10, Ed. Limusa, México, (1985).
- Anaya, A.; Calera, M.; Mata, R. y Pereda-Miranda, R. *J. Chem. Ecol.* **16** (9) 2145, (1990).
- Anderson, J. E.; Goetz, G. E.; Mclaughlin, J. L. y Suffness, M.; *Phytochem. Anal.* **2**, 107, (1991).
- Asakawa, Y.; Toyota, M. y Takemoto, T.; *Phytochemistry* **20**, 257, (1981).
- Asakawa, Y.; *Rev. Latinoamer. Quim.* **14**, 109; *Chem. Abstr.* **101**, 3891f. (1984).
- Asakawa, Y.; *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **42**, 1, (1982).
- Arlette, J. y Mitchell J. C.; *Contact. Dermatitis* ; **7**, 129, (1981).
- Benesová, V.; Samek, Z. y Vasicková, S.; *Collect. Czech. Chem. Commun* **40**, 1966, (1975).
- Bolhmann, F. y Dutta, L.; *Phytochemistry* **18**, 1228, (1979).

Cassady, J. M.; y Suffness, M.; *Medicinal Chemistry* Vol. 16: Anticancer Agents Based on Natural Products Models, Chapter 7, Academic London (1980).

Castañeda, P.; García, M. R.; Hernández, B. E.; Torres, B. A.; Anaya, A. L. y Mata, R.; *J. Chem. Ecol.* 18, 1025, (1992).

Cocoletzi, A.; *Estudio químico y biológico preliminar de Ratibida mexicana* (Watson) Sharp (Asteraceae). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 1993.

Char, M. B. S. y Shankarabhat, S.; *Experientia*, 31, 1164, (1975).

De Pascual, T. J.; Bellido, I. S. y González, M. S.; *Anales de Química* 74, 91, (1978).

De Pascual, T. J.; Bellido, I. S. y González, M. S.; *Tetrahedron* 36, 371, (1980).

Duke, S. O.; Vaughn, K. C.; Croom, E. M. Jr. y Elsohly, H. N.; *Weed Sci.* 35, 499, (1987).

Duke, S. O.; Paul, R. N. y Lee, S. M.; *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 380, 318, (1988).

Elakovich, S. D.; *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 380, 250, (1988).

Ellmauerer, E.; Pathak, V. P.; Jakupovic, J.; Bohlmann, F. y Domínguez, X.; *Phytochemistry* **26**, 159, (1987).

Fischer, N. H.; Olivier, E. J. y Fischer, H. D.; En *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* Vol. **38**, 47-390, (1979).

Fischer, N. H. y Quijano, L.; En A. C. Thompson (Ed.) *The Chemistry of Allelopathy*. American Chemical Society, Washington, D. C., pp 133-147, (1985).

Fischer, N. H.; The function of mono and sesquiterpenes as plant germination and growth regulators. En *The Science of Allelopathy* (Ed. A. R. Putnam y C. S. Tang), pp 203-218, Wiley-Interscience, New York (1986).

Fischer, N. H.; Weidenhamer, J. D. y Bradow, J. M.; *Phytochemistry* **28**, 2315, (1989).

Fischer, N. H.; Weidenhamer, J. D.; Riopel, J. L.; Quijano, L. y Menelaou, M. A.; *Phytochemistry* **29**, 2479, (1990).

Fischer, N. H.; Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids. En *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe* (ed. J. B. Harborne y F. A. Tomas-Barberan), pp.377-398. Clarendon Press, Oxford. (1991).

Greger, H.; Zdero, C. y Bohlmann, F.; *Phytochemistry* **25**, 891, (1986).

Goren, N.; Jakupovic, J. y Topal, S.; *Phytochemistry* **29**, 1467, (1990).

Herz, W.; Kulanthaivel, P. y Goedken, V. L.; *J. Org. Chem.* **50**, 610, (1985).

Hubert, T. D. Adewole, L.; Okunade y Wiemer, D. F.; *Phytochemistry* **26**, 1751, (1987).

Jarvis, B. B.; Pena, N. B.; Madhusudana, M. R.; Comezoglu, N. S.; Comezoglu, T. F.; y Mandava, N. B. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **268**, 149, (1985).

Jímenez, 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 D. C.) Aiello*, Tesis de maestría, UNAM, (1992).

Kalsi, P. S.; Goyal, R.; Talwar, K. K. y Chhabra, B. R.; *Phytochemistry* **28**, 2093, (1989).

Kaur, B. y Kalsi, P. S.; *Phytochemistry* **24**, 2007, (1985).

Kelsey, R. G. y Locken, L. J.; *J. Chem. Ecol.* **13**, 19, (1987).

Klayman, D. L. *Science* **288**, 1049, (1985).

Lee, K. H.; Ibuka, T. Wu, R. Y. y Geissman, T. A.; *Phytochemistry* **16**, 1177, (1977).

Marco, J. A.; Arnó, M. y Carda M.; *Can. J. Chem.* **65**, 630, (1987).

Marco, J. A. y Carda, M., *Magn. Reson. Chem.* **25**, 1087, (1987a).

Marco, J. A. y Carda, M.; *Tetrahedron* **43**, 2523, (1987b).

Marston, A. y Hostettmann, K.; *Phytochemistry* **24**, 639, (1985).

Mata, R.; Navarrete, A.; Pereda-Miranda, R.; Delgado, G. y Romo de Vivar, A.; *Phytochemistry* **26**, 191, (1987).

Narayanan, C. R. y Venkatasubramanian, N. K.; *The Journal of Organic Chemistry*, **33**, 3156, (1968).

Ohta, Y.; Niels, H. Andersen y Liu, C. D.; *Tetrahedron* **33**, 617, (1977).

Picman, A. K.; *Biochem. System. Ecol.* **14**, 255, (1986).

Picman, J. y Picman, A. K. *Biochem. System. Ecol.* **12**, 287, (1984).

Richards, E. L.; *Rhodora* **70**, 348, (1969).

Rodríguez, E.; Towers, G. H. N. y Mitchell, J. C.; *Phytochemistry* 15, 1573, (1976).

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 traicional.* Tesis de maestría, UNAM, (1990).

Sashida, Y.; Nakata, H.; Shimomura, H. y Kagaya, M.; *Phytochemistry* 22, 1219, (1983).

Seaman, F. C.; *Bot. Rev.* 48, 121, (1982).

Shibaoka, H.; Shimokoriyama, M.; Iriuchijima, S. y Tamura, S.; *Plant. Cell. Physiol.* 8, 297, (1967).

Smith, G. M.; Kester, K. M. y Fischer, N. H.; *Biochem. System. Ecol.* 11, 377, (1983).

Spencer, G. F.; Wolf, R. B. y Weisleder, D.; *J. Nat. Prod.* 47, 730, (1984).

Spring, O.; Albert, K. y Gradmann, W.; *Phytochemistry* 20, 1883, (1981).

Spring, O. y Hager, A.; *Planta* 156, 433, (1982).

Stevens, K. L.; Biological activity and chemistry of sesquiterpene lactones. En *Isopentenoids in Plants* (Ed. W. D. Nes, G. Fuller y L. S. Tsai), pp 65-80, Dekker, New York (1984).

Stevens, K. L.; y Merrill, G. B. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **268**, 83, (1985).

Stahl, E.; *Thin Layer Chromatography*, Academic Press Inc, New York, pp 487, (1969).

Watanabe, S.; Kobayashi, A. y Yamashita, K.; *Agric. Biol. Chem.* **45**, 2919, (1981).

Whittaker, R. H. y Feeny, P. P.; *Science* **171**, 757, (1971).