

*Lejarr*



**Universidad Nacional Autónoma de México**

FACULTAD DE QUIMICA

**"ESTUDIO QUIMICO Y BIOLÓGICO PRELIMINAR DE  
Conyza filaginoides (D.C.) HIERON. (ASTERACEAE)"**



**TESIS MANCOMUNADA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLÓGICO**

P R E S E N T A N:

**LAURA ALICIA ACEVEDO ARTEAGA**

**SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO**

MEXICO, D.F.,

1995.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** DRA. YOLANDA CABALLERO ARROYO  
**VOCAL:** M. en C. MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS  
**SECRETARIO:** DRA. RACHEL MATA ESSAYAG  
**1er. SUPLENTE:** M. en C. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LOPEZ  
**2do. SUPLENTE:** M. en C. MARIA ADELINA JIMENEZ ARELLANES

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

**LABORATORIO 124, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, EDIFICIO E  
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM**

**SUSTENTANTES:**



**LAURA ALICIA ACEVEDO ARTEAGA**



**SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO**

**ASESOR:**



**DRA. RACHEL MATA ESSAYAG**

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al Dr. Robert Bye del Jardín Botánico del Instituto de Biología, por proporcionar e identificar el material vegetal utilizado en el presente estudio.

A los M. en C. Federico del Río, Rubén Gaviño e Isabel Chávez de los laboratorios de RMN del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de RMN.

A la QFB. Graciela Chávez y a la Q. Marisela Gutiérrez de la Facultad de Química, por el registro de los espectros de IR, UV y rotación óptica.

Al IQ. Luis Velasco y Q. Javier Pérez del Instituto de Química, por la obtención de los espectros de masas.

A la M. en C. Alejandra Rojas de la UAQ, por su colaboración en el presente trabajo con la realización de los ensayos biológicos conducentes a determinar la actividad espasmolítica de los productos aislados.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA), por su apoyo financiero a través de los proyectos IN202493 e IN203494.

Laura A Acevedo agradece al Sistema Nacional de Investigadores (SNI), por la beca de ayudante de investigador nivel III, recibida durante la realización de esta investigación

A la M. en C. Isabel Aguilar y a la Dra. Yolanda Caballero, por sus valiosos comentarios durante la revisión de éste trabajo.

Al M. en C. Fernando Calzada por la colaboración que brindó durante la realización de esta tesis.

A todos nuestros compañeros del laboratorio 124: Adelina, Claudina, Daniel, Elizabeth, Fernando S., Fausto, Griselda, Guadalupe, Isabel, José Luis, Leda, Leticia, Martha, Perlita C., Perla S., Rocío, Susy, Tere y Tommy, por su ayuda y amistad brindada.

## **AGRADECIMIENTOS.**

### **A la Dra. Rachel Mata**

Con admiración y profundo respeto, por su valiosa dirección para la realización de esta tesis y por habernos permitido formar parte de su grupo de trabajo.

Gracias por su confianza y su tiempo.

Señor te doy mi persona y todo lo que tengo,  
encuentro mi alegría en alabarte y mi vida pongo en tus manos.

En cada cosa Señor tu gloria puedo ver;  
con el corazón me entrego hoy a ti.

Señor por donde tu me guies, quiero seguir.

Te doy gracias por el amor y el cuidado que tienes por mí.

Sin tu amor yo estaría perdido Señor,  
pero tu reinas en mi corazón.

Tu amor me ha hecho amar,  
tu cruz me ha liberado,  
por siempre Señor, contigo quiero estar.

## **DEDICATORIAS.**

### **A mis Padres,**

Por su comprensión, tenacidad, entusiasmo y paciencia han alentado nuestras metas, porque con su amor han dirigido mi vida y respetado mis decisiones y con su ejemplo han inculcado el sentido de la responsabilidad.

### **A mis hermanos.**

Miguel gracias por tu alegría y porque he aprendido de ti; Paco por demostrar siempre amor a tu profesión; Paty gracias por escucharme y tenerme confianza; Hugo gracias porque con tus locuras siempre nos haces sonreír; Rocio gracias por ser mi inseparable amiga y por todos los momentos compartidos; a mis sobrinos Dany y Carlitos y los que faltan porque tienen un lugar especial en mi corazón; a mis cuñados por serlo. Gracias por su apoyo.

### **A mis Abues y Tíos.**

Por ser una familia unida y compartir conmigo esta alegría.

A la memoria de mi padrino Jaime Acevedo.

### **A mis amigos de toda la vida.**

Susana D., Rocio, Alan, porque apesar de la distancia permaneceremos unidos; a Christian, por tus llamadas de atención y tus palabras de aliento; a Caty, por tu ternura y porque siempre has estado conmigo; a Mirza, porque siempre me tendiste la mano en momentos difíciles; a Pablo, gracias por confiarme tus problemas; a Susy R., porque hemos reído y llorado juntas; a Rebe, por tus críticas ya que me han servido para mejorar; a Lupita, por escucharme y brindarme tus consejos; a Olivia, por tu gran amistad; a Maru, porque apesar de ser aprensiva eres muy linda; a Mario, siempre me decías vale la pena y sabes tienes razón; a Carlos, porque eres una persona muy linda; a Alicia C., porque eres una buena compañera de trabajo; a Luis Jesus, porque de ti siempre recibí una palmada de ánimo; a Lilian, por compartir conmigo el estudio y un juego de tenis; a Gerardo, porque en algún tiempo nos pasó algo muy similar, Juan Manuel, por compartir momentos felices y tristes de nuestra vida; a Efraín, porque siempre encontré en ti a un amigo; A Lolita M., por los momentos compartidos, a José Luis, a Lore, Irma, Liliana y Juan Carlos, por compartir desvelos, alegrías y preocupaciones.



A Berthita, Mary y Beto, Gelos, Franco, Jaime, Lucy, Norma, Angel, Héctor, Sandra, Gaby, Magda, Daniel, Chayo y a todos los que compartimos juntos una vida de comunidad. A Víctor A., porque siempre me escuchas y me das un buen consejo.

A Enrique Espinoza, por permitirme, realizar una de las actividades que complementa mi vida, mi deporte favorito la Gimnasia Artística y a todo el equipo, gracias por su amistad.

A ti Fernando, porque me has regalado tu amor, apoyo y comprensión para seguir adelante, porque das alegría a mi vida y me has brindado tu amistad.

A todos aquellos que escapan a mi memoria, pero que a lo largo de mi vida me han ayudado, regalándome una sonrisa y alguna palabra de aliento.

**A Samuel.**

Por compartir tu trabajo con el mío, por tu amistad, paciencia que no fue mucha, por tu confianza y sobre todo tu alegría la cual da un toque especial a las dificultades.

*Laura Alicia Accuedo Arteaga.*

## **DEDICATORIAS.**

### **A mis padres**

Por todo el amor, la confianza y el apoyo incondicional que me han brindado, y que gracias a ellos he logrado todas mis metas.

### **A mis hermanos**

Pepe, Rolando, Sandra, Marina, Jorge, Ricardo y Cristóbal por el invaluable cariño que me han dado, a quienes les deseo lo mejor en la vida. Porque ellos representan el tesoro máspreciado que puedo tener.

### **Al resto de mi familia**

Por los maravillosos momentos que hemos compartido.

### **A Laurita**

Por su amistad, profesionalismo y principalmente por haberme soportado durante todo este tiempo.

### **A mis amigos**

Aída, Alejandro C., Alejandro F., Agustín, Adriana, Alicia, Elizabeth, Fa, Fernando, Javier, José Luis, Lalo, Lino, Olga, Pablo C., Sally, Sergio, Tere, Tommy y Zenón por haberme brindado su amistad.

**A mis amigos de mi queridísimo pueblo**

Tío Tito, Padrino Jorge, José María, Maestro Enrique, Oscar, Julio, Roberto y Rubén por sus valiosos consejos y por su amistad incondicional.

**A Marisa**

Quien fue uno de mis principales alicientes para concluir mi carrera.

**A mis entrenadores y compañeros.**

Por haberme dado la dicha de pertenecer al equipo de fútbol representativo de la Universidad.

Como nadie es perfecto en la vida; ruego a todo aquel que omití en esta lista, me disculpe por este olvido abominable.

*Samuel Enoch Estrado Soto.*

## INDICE.

	Página
LISTA DE CUADROS	i
LISTA ESPECTROS	ii
ESQUEMAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE GRAFICAS	iv
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi

## CONTENIDO.

I. INTRODUCCION	1
II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.	22
III. PARTE EXPERIMENTAL.	27
1. Material vegetal.	27
2. Análisis cromatográficos.	27
3. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales y sus derivados.	28
4. Pruebas biológicas.	29
4.1 Determinación de la toxicidad para <i>Artemia salina</i> Leach.	29
4.2 Determinación de la actividad fitoinhibidora.	30
4.2.1 Método de caja petri.	30
4.2.2 Método bioautográfico.	31
4.3 Determinación de la actividad citotóxica	32
4.4 Determinación del efecto de las fracciones y compuestos puros sobre la inhibición de la contracción espontánea de ileo de rata.	32

5. Extracción de la planta entera <i>Conyza filaginoides</i> .	33
6. Fraccionamiento biodirigido del extracto total.	33
7. Aislamiento y purificación del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno ( <b>9</b> ) y del 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <b>92</b> ) de la fracción activa C.	36
8. Aislamiento y purificación del $\alpha$ -espinasterol ( <b>57</b> ) del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <b>93</b> ) de la fracción primaria activa D.	38
8.1 Obtención de la 5-hidroxi-7-metoxiflavanona ( <b>94</b> ) y de la $\beta$ -amirina ( <b>53</b> ).	39
9. Obtención de la mezcla de ácidos grasos de la fracción primaria activa E.	40
10. Obtención del derivado acetilado del 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <b>92a</b> ).	42
11. Obtención del acetato del $\alpha$ -espinasterol ( <b>57a</b> ).	42
12. Obtención del acetato de 3 $\beta$ -28-diacetoxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <b>93a</b> ).	43
13. Saponificación del 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <b>92</b> ).	43
14. Prueba de Lieberman-Burchard para triterpenoides y esteroides.	43
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSION.</b>	<b>44</b>
4.1 Evaluaciones biológicas preliminares del extracto total y de las fracciones primarias de <i>Conyza filaginoides</i> .	44
4.2 Aislamiento y caracterización del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno ( <b>9</b> ).	49
4.3 Aislamiento y caracterización del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <b>93</b> ) y del 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <b>92</b> ).	60
4.4 Aislamiento y caracterización de la 5-hidroxi-7-metoxiflavanona ( <b>94</b> ).	84
4.5 Identificación como ésteres metílicos de los componentes de la mezcla de ácidos grasos obtenidos de la fracción activa E.	95

4.6 Aislamiento y caracterización del $\alpha$ -espinasterol ( <b>57</b> ) y de la $\beta$ -amirina ( <b>53</b> ).	113
4.7 Evaluaciones biológicas de los productos aislados de las fracciones primarias activas.	120
V. CONCLUSIONES.	125
VI. OBSERVACIONES COMPLEMENTARIAS.	127
VII. BIBLIOGRAFIA.	128

## LISTA DE CUADROS.

	Página
Cuadro 1	Propiedades medicinales de <i>Conyza filaginoides</i> . 4
Cuadro 2	Metabolitos secundarios aislados del género <i>Conyza</i> . 6
Cuadro 3	efecto del extracto de <i>Conyza filaginoides</i> sobre la contracción espontánea de ileo de rata. 24
Cuadro 4	Sistemas de elución utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina. 28
Cuadro 5	Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina. 28
Cuadro 6	Fraccionamiento biodirigido del extracto total de <i>Conyza filaginoides</i> . 35
Cuadro 7	Fraccionamiento secundario biodirigido de la fracción activa C. 36
Cuadro 8	Resumen de la cromatografía en columna abierta de la fracción C-VII. 37
Cuadro 9	Resumen del proceso cromatográfico en columna abierta de la fracción primaria D. 38
Cuadro 10	Resumen del proceso cromatográfico en columna abierta de la fracción secundaria D-III. 40
Cuadro 11	Resumen del proceso cromatográfico en columna abierta de la fracción primaria E. 41
Cuadro 12	Citotoxicidad del extracto total de <i>Conyza filaginoides</i> y de las fracciones derivadas del fraccionamiento primario del mismo. 45
Cuadro 13	Evaluación del efecto relajante de las fracciones primarias derivadas del extracto de <i>C. filaginoides</i> sobre la contracción espontánea de ileo de rata. 48
Cuadro 14	Identificación de los ésteres metílicos de los ácidos obtenidos de la fracción activa E. 98
Cuadro 15	Efectos de los productos (57), (92), (93) y (94) sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crus-galli</i> . 123
Cuadro 16	Efecto relajante de los compuestos puros sobre la contracción espontánea de ileo de rata 124

## LISTA DE ESPECTROS.

		Página
Espectro 1	Espectro de IR del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno ( <u>9</u> ).	53
Espectro 2	Espectro de masas del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno ( <u>9</u> ).	54
Espectro 3	Espectro de RMN- $^1\text{H}$ del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno ( <u>9</u> ).	55
Espectro 3a	Espectro COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno ( <u>9</u> ).	56
Espectro 4	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno ( <u>9</u> ).	57
Espectro 4a	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ modalidad DEPT del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno ( <u>9</u> ).	58
Espectro 5	Espectro HETCOR del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno ( <u>9</u> ).	59
Espectro 6	Espectro de IR del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <u>93</u> ).	66
Espectro 7	Espectro de masas del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <u>93</u> ).	67
Espectro 8	Espectro de RMN- $^1\text{H}$ del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <u>93</u> ).	68
Espectro 8a	Espectro COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <u>93</u> ).	69
Espectro 9	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ modalidad DEPT del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <u>93</u> ).	70
Espectro 9a	Espectro HETCOR del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <u>93</u> ).	71
Espectro 10	Espectro de RMN- $^1\text{H}$ del derivado acetilado del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <u>93a</u> ).	73
Espectro 11	Espectro IR del 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <u>92</u> ).	78
Espectro 12	Espectro de masas del 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <u>92</u> ).	79
Espectro 13	Espectro RMN- $^1\text{H}$ del derivado acetilado del 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <u>92a</u> ).	80
Espectro 14	Espectro de RMN- $^1\text{H}$ 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <u>92</u> ).	82
Espectro 14a	Espectro COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ del derivado acetilado del 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <u>92a</u> ).	83
Espectro 15	Espectro de IR de la 5-hidroxi-7-metoxiflavanona ( <u>94</u> ).	88
Espectro 16	Espectro de UV de la 5-hidroxi-7-metoxiflavanona ( <u>94</u> ).	89
Espectro 17	Espectro de masas de la 5-hidroxi-7-metoxiflavanona ( <u>94</u> ).	90



Espectro 18	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la 5-hidroxi-7-metoxiflavanona (94).	91
Espectro 18a	Espectro de COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H de la 5-hidroxi-7-metoxiflavanona (94).	92
Espectro 19	Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la 5-hidroxi-7-metoxiflavanona (94).	93
Espectro 19a	Espectro de RMN <sup>13</sup> C modalidad DEPT de la 5-hidroxi-7-metoxiflavanona (94).	94
Espectro 20	Espectro de IR de la mezcla de ácidos grasos.	99
Espectro 21	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la mezcla de ácidos grasos.	100
Espectro 22	Espectro de masas del éster metílico del ácido nonadecico (95).	101
Espectro 23	Espectro de masas del éster metílico del ácido tetradecanoico (96).	102
Espectro 24	Espectro de masas del éster metílico del ácido pentadecanoico (97).	103
Espectro 25	Espectro de masas del éster metílico del ácido hexadecanoico (98).	104
Espectro 26	Espectro de masas del éster metílico del ácido heptadecanoico (99).	105
Espectro 27	Espectro de masas del éster metílico del ácido 6-octadecanoico (100).	106
Espectro 28	Espectro de masas del éster metílico del ácido 14-metilheptadecanoico (101).	107
Espectro 29	Espectro de masas del éster metílico del ácido eicosanoico (102).	108
Espectro 30	Espectro de masas del éster metílico del ácido docosanoico (103).	109
Espectro 31	Espectro de masas del éster metílico del ácido tricosanoico (104).	110
Espectro 32	Espectro de masas del éster metílico del ácido tetracosanoico (105).	111
Espectro 33	Espectro de masas del éster metílico del ácido hexacosanoico (106).	112

Espectro 34	Espectro de IR del $\alpha$ -espinasterol ( <u>57</u> ).	115
Espectro 35	Espectro de masas del $\alpha$ -espinasterol ( <u>57</u> ).	116
Espectro 36	Espectro de RMN- $^1\text{H}$ del $\alpha$ -espinasterol ( <u>57</u> ).	117
Espectro 37	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del $\alpha$ -espinasterol ( <u>57</u> ).	118
Espectro 37a	Espectro RMN $^{13}\text{C}$ modalidad DEPT del $\alpha$ -espinasterol ( <u>57</u> ).	119

## ESQUEMAS.

	Página
Esquema 1	
Proceso de extracción de la planta entera de <i>Conyza filaginoides</i> .	34

## LISTA DE FIGURAS.

Figura 1	<i>Conyza filaginoides</i> (D.C) Hieron.	2
Figura 2	Patrón de fragmentación del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <b>93</b> ).	61
Figura 3	Patrón de fragmentación de la 5-hidroxi-7-metoxiflavanona ( <b>94</b> ).	86
Figura 4	Patrón de fragmentación para la formación de los iones m/z 31, 59, 74 y 87 de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.	96
Figura 5	Cromatograma de gases de los ésteres metílicos de la mezcla de ácidos grasos.	97

## LISTA DE GRAFICAS.

	Página
Gráfica 1 Efecto del extracto total de <i>Conyza filaginoides</i> sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crus-galli</i> .	46
Gráfica 2 Efecto del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno ( <b>9</b> ) sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crus-galli</i> .	122

## LISTA DE TABLAS.

		Página
Tabla 1	Constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno ( <u>9</u> ).	52
Tabla 2	Constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <u>93</u> ).	65
Tabla 3	Resonancia magnética nuclear protónica del derivado acetilado del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <u>93</u> ).	72
Tabla 4	Constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas del 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <u>92</u> ).	77
Tabla 5	Resonancia magnética nuclear protónica del derivado acetilado del 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno ( <u>92</u> ).	81
Tabla 6	Constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas de la 5-hidroxi-7-metoxiflavanona ( <u>94</u> ).	87
Tabla 7	Constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas del $\alpha$ -espinasterol ( <u>57</u> ).	114

## LISTA DE ABREVIATURAS.

AcOEt	Acetato de etilo
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de Plata
°C	Grados Centígrados
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
Cl <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
COSY	Espectroscopia de correlación
cm	Centímetros
d	Doblete
δ	Desplazamiento químico
dd	Doblete dobleteado
DE <sub>50</sub>	Dosis efectiva media
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
EMFAB	Espectrometría de masas por bombardeo rápido de átomos
g	Gramos
HCl	Acido clorhídrico
HETCOR	Correlación heteronuclear
Hex	Hexano
hrs	Horas
Hz	Hertz
Int rel	Intensidad relativa
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de Potasio
KOH	Hidróxido de Potasio
m	Multiplete
m/z	Relación masa carga

MeOH	Metanol
mg	Miligramos
$\mu$ g	microgramos
ml	mililitros
pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono
s	Singulete
sa	Singulete amplio
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

## INTRODUCCION.

***Conyza filaginoides.*** (D.C.) Hieron (Figura 1), conocida popularmente como "simonillo" y "zacachichi" (hierba amarga), es un arbusto perteneciente a la familia Asteraceae (tribu Asteraea, subtribu Conyzinae). En México se encuentra distribuída principalmente en el Valle de México y en los estados de Morelos, Michoacán, Hidalgo y Oaxaca. Además del "simonillo", el género *Conyza* incluye 49 especies distribuidas en varias partes del mundo, principalmente en las regiones tropicales (Grau, 1977; Sanz *et al.*, 1991).

Martínez (1989) en su libro *Las Plantas Medicinales de México* hace la siguiente descripción de la planta "es una hierba que alcanza 30 a 40 cm de altura, de tallo simple, ramificado solamente en la parte superior; hojas alternas, dentadas, lanosas, lo mismo que el tallo, de 3 a 4 cm. de longitud; inflorescencias terminales, solitarias, de 2-3 capítulos; involucre de brácteas biseriadas, con el centro verde y la punta morada, las flores femeninas y filiformes de menor longitud que el estilo, las flores hermafroditas tubulosas y regulares con los estambres incluidos".

El simonillo se emplea en la medicina tradicional desde tiempos inmemoriales; los indígenas lo han usado para combatir algunas enfermedades gastrointestinales. Fray Francisco Ximénez, en *Los Cuatro Libros de la Naturaleza*, dice que "hevacua por vómito todos los humores principales de cólera y la flema", pero que "no se debe dar atrevidamente a los enfermos que tienen calentura". Además, "cura la represión y el ahito, despierta la gana de comer y aprovecha notablemente a los que se les aceda la comida en el estómago por falta de calor natural" (Martínez 1989)



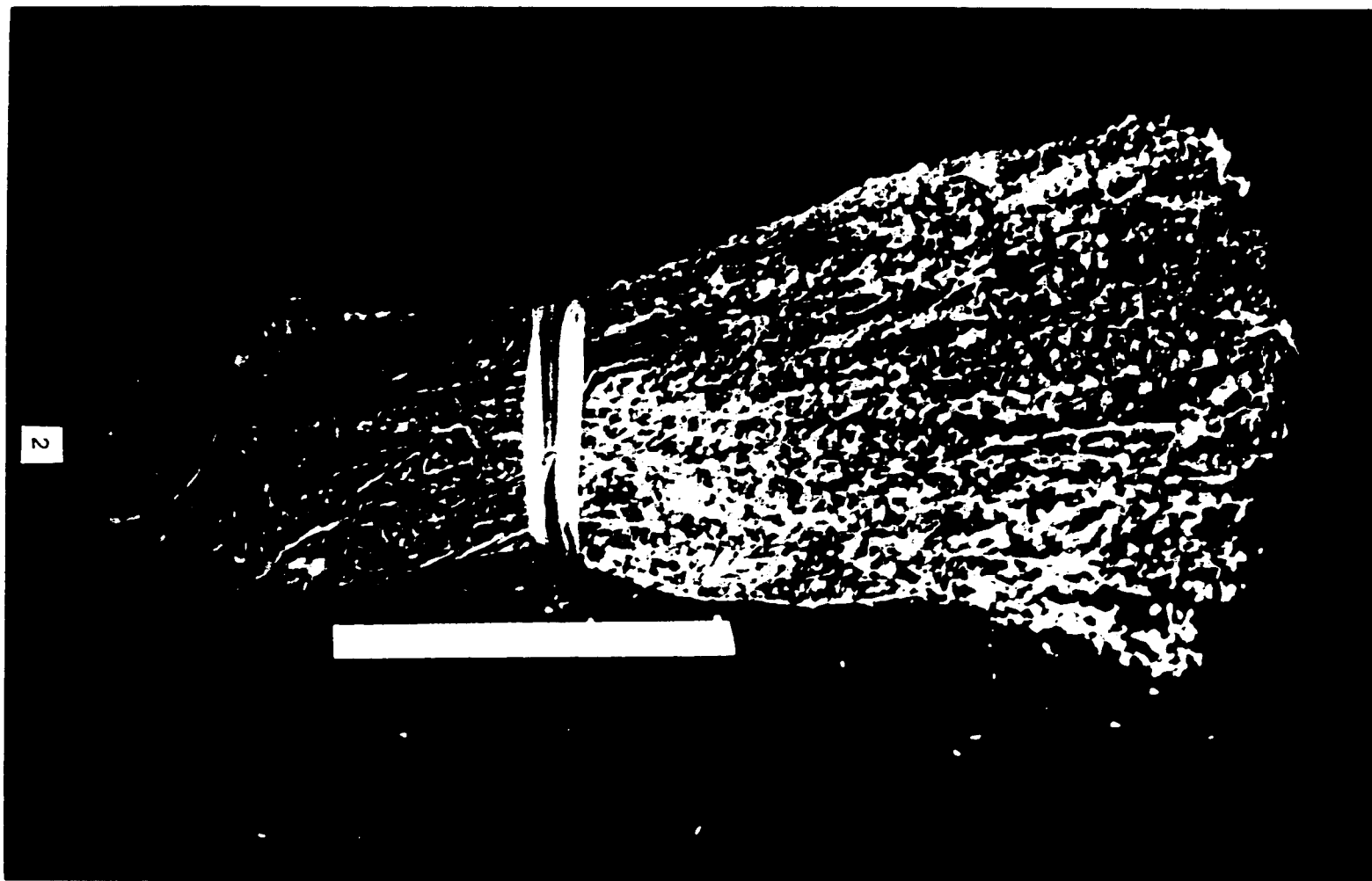


Figura 1. *Conyza filaginoides* (D.C.) Hieron.

En su texto de *Materia Médica*, Altamirano (1894) menciona que varios médicos han prescrito el simonillo como amargo tónico en los catarros gástricos acompañados de dispepsia y falta de apetito. Pero su principal uso es para curar los cólicos hepáticos mediante el empleo de la infusión de la planta, tomándola diariamente en ayunas por largo tiempo.

Posteriormente, el Dr. Villaseñor del Instituto Médico Nacional en 1907 observó que el simonillo aumentaba la secreción del jugo gástrico y la bilis, y excitaba los movimientos peristálticos del estómago y los intestinos (Martínez 1989).

Según Martínez (1989), el Dr. Eduardo Liciaga empleó un cocimiento de esta hierba con resultados muy satisfactorios en numerosos casos de "catarro de las vías biliares" observándose en todos los casos tratados una disminución de la ictericia y el dolor. También los efectos colagogos fueron notables.

Por último, al simonillo se le han atribuido otras propiedades medicinales (Díaz 1976), mismas que se resumen en el Cuadro 1, que incluye también la parte empleada de la planta y la vía de administración.

Otras especies del género *Conyza* se utilizan como agentes curativos en la medicina tradicional de diversas regiones del mundo. Así por ejemplo, la *C. linifolia* y la *C. canadensis* se emplean como antiespasmódico y agente antiséptico, respectivamente, (Harráz *et al.*, 1988); la *C. blinii*, planta endémica del suroeste de China, se ha utilizado como sedante, antipirético, antiinflamatorio y para el tratamiento de la laringofaringitis, la hepatitis y el dolor de dientes (Yang *et al.*, 1989); por último, la *C. trihecatactis* es de uso común para la cura de los desórdenes gastrointestinales y el reumatismo aunque produce dermatitis por contacto (Torrenegra *et al.*, 1994). Así mismo, cabe

**Cuadro 1.** Propiedades medicinales de *Conyza filaginoides*.

Uso popular	Parte de la planta usada	Vía de administración
Enfermedades de los ojos	Fruto	Local
Anticatarral	Planta entera	Oral
Colecistitis		
Cólicos biliosos		
Hepatotóxico		
Nauseas		
Nefrotóxico		
Cólicos hepáticos		
Aperitivo	Planta entera	Oral
Catártico		
Dispepsia		
Emético		
Represión		
Contra el aire	-----	Oral
Diurético	Planta entera	Oral
Colagogo		
Eupéptico		
Ictericia		
Gastroenteritis		
Favorece el peristaltismo		
Analgésico		
Angicolitis		
Alexitere	-----	-----
Antipirético	Planta entera	Rectal
Astringente		
Carminativo	Planta entera	Rectal

destacar que el extracto de la planta entera de *C. dioscoridis* se emplea como un insecticida natural (Mohamed *et al* ,1989).

Desde el punto de vista químico, la especie *C. filaginoides* ha sido objeto de dos investigaciones previas. Primero, en el Instituto Médico Nacional se hizo un análisis del extracto acuoso de la planta, encontrándose sales, sustancias

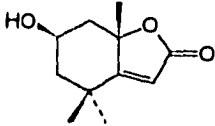
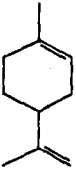
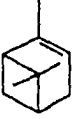
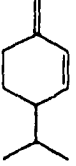
pépticas y una materia amarga, posiblemente de naturaleza alcaloidea (Martínez 1989). En 1972, Domínguez y colaboradores aislaron e identificaron el  $\alpha$ -espinasterol, la  $\beta$ -amirina y el triacontano. Por otra parte, los estudios químicos realizados a la fecha sobre especies relacionadas han permitido el aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios que se indican en el Cuadro 2. Estos metabolitos incluyen:

- a) Monoterpenoides simples (mentanos y pinanos) e irregulares, como la loliólida (**1**) (Harráz *et al.*, 1988).
- b) Sesquiterpenoides de los tipos, germacrano, eudesmano, farnesano, cariofilano (**9**) y bisabolano (Bohlmann, 1978; Bohlmann *et al.*, 1979; Metwally *et al.*, 1989; Ahmed *et al.*, 1990; Zdero *et al.*, 1990 y Sanz *et al.*, 1991).
- c) Diterpenoides, principalmente de los tipos lineales, labdano, clerodano y clerodanos modificados (Sen *et al.*, 1975; Tandon *et al.*, 1979; Mahato *et al.*, 1981; Bohlmann *et al.*, 1982; Pandey *et al.*, 1984; Jolad *et al.*, 1988; Yang *et al.*, 1989; Zdero *et al.*, 1990; Ahmed *et al.*, 1990 y Torrenegra *et al.*, 1994).
- d) Triterpenoides derivados de la  $\beta$ -amirina, del escualeno, de la friedelina y del lupeol (**49**) (Domínguez *et al.*, 1972; Harráz *et al.*, 1988 y Metwally *et al.*, 1989).
- e) Flavanoles y flavanonoles (Sen, 1976; Tandon, 1977, Ismail *et al.*, 1979 y Zdero *et al.*, 1990).
- f) Cumarinas (Bohlmann *et al.*, 1979).
- g) Compuestos aromáticos simples (Bohlmann *et al.*, 1981; Harráz *et al.*, 1988; Ahmed *et al.*, 1990 y Ahmed, 1991).
- h) Esteroles (Domínguez *et al.*, 1972; Harráz *et al.*, 1988 y Metwally *et al.*, 1989).
- i) Ácidos grasos y compuestos acetilénicos (Bohlmann *et al.*, 1979; Pandey

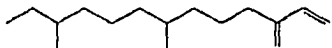
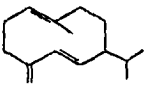
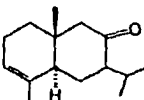
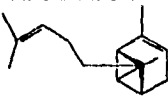
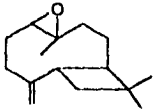
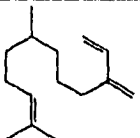
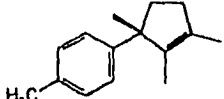
et al., 1984; Zdero et al., 1990 y Sanz et al., 1991).

Los compuestos acetilénicos y los diterpenoides de los tipos labdano, clerodano y clerodano modificado constituyen los metabolitos más abundantes del género.

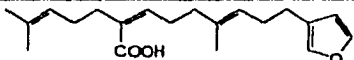
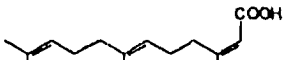
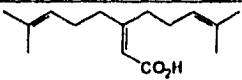
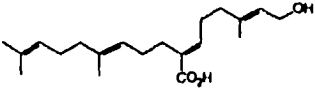
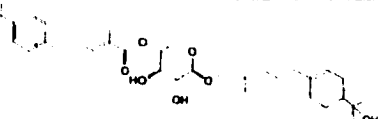
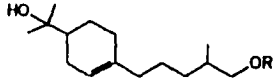
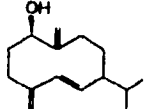
**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados del género *Conyza*

MONOTERPENOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. linifolia</i>	 <p>loliólida (1)</p>	Harraz et al., 1988
<i>C. linifolia</i>	 <p>limoneno (2)</p>  <p>pineno (3)</p>  <p><math>\beta</math>-felandreno (4)</p>	Ahmed y Ahmed 1990a

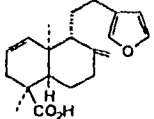
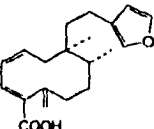
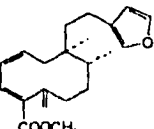
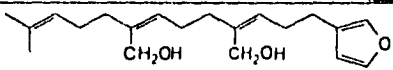
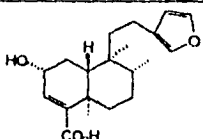
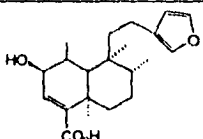
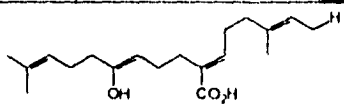
**Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados del género *Conyza* (Continuación)**

SESQUITERPENOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. Ulmifolia</i>	 3-(4,8-dimetildecanyl)-1,3-butadieno (5)	Bohlmann <i>et al.</i> , 1978
	 germacra-4(15),5,10(1)-trieno (6)	
	 eudesma-3-en-8-oxo (7)	
<i>C. canadensis</i>	 $\alpha$ -trans-bergamoteno (8)	Bohlmann <i>et al.</i> , 1978
<i>C. aegyptica</i> <i>C. sumatrensis</i>	 epóxido del $\beta$ -cariofileno (9)	Metwally <i>et al.</i> , 1989 Zdero <i>et al.</i> , 1990a
<i>C. bipinnae</i> <i>C. aegyptica</i> <i>C. sumatrensis</i> <i>C. linifolia</i>	 $\beta$ -farneseno (10)	Bohlmann <i>et al.</i> , 1979 Metwally <i>et al.</i> , 1989 Zdero <i>et al.</i> , 1990a Ahmed y Ahmed 1990a
<i>C. aegyptica</i> <i>C. sumatrensis</i> <i>C. linifolia</i>	 curcumeno (11)	Metwally <i>et al.</i> , 1989 Zdero <i>et al.</i> , 1990a Ahmed y Ahmed 1990a

**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados del género *Conyza* (Continuación)

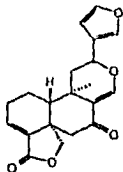
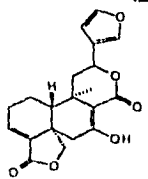
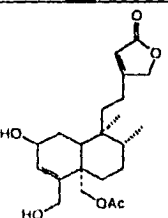
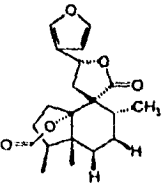
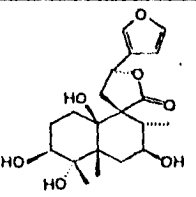
SESQUITERPENOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. Welwitschii</i>	 <p>ácido 2(4'-metil-3'penten)-2,6,10(12),11-tetraen-12,13-epoxitridecanoico (<b>12</b>)</p>	Zdero <i>et al.</i> , 1990a
<i>C. stricta</i>	 <p>ácido farnesílico (<b>13</b>)</p>	Ahmed y Ahmed 1990b
<i>C. schimperi</i>	 <p>ácido-10-sesquigeranoico (<b>14</b>)</p>	Zdero <i>et al.</i> , 1990b
<i>C. pyrifolia</i>	 <p>ácido-6-E-19-oico-geranil-geraniol (<b>15</b>)</p>	Zdero <i>et al.</i> , 1990b
<i>C. pyrifolia</i> <i>C. aegyptica</i>	 <p>coniaegyptina (<b>16</b>)</p>	Zdero <i>et al.</i> , 1990b
<i>C. aegyptica</i>	 <p>R (17) H 14-hidroxi-12,13-dihidro-sesquiterpineol (18) Xil 14-hidroxi-12,13-dihidro-sesquiterpineol-O-xilopiranosido</p>	Zdero <i>et al.</i> , 1990b
<i>C. bonariensis</i>	 <p>germacra-4(15),5,10(14)-trien-1β-ol (<b>19</b>)</p>	Sanz <i>et al.</i> , 1991

**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados del género *Conyza* (Continuación)

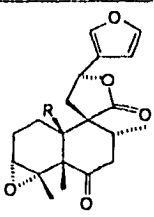
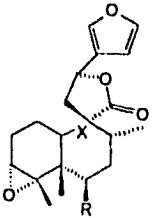
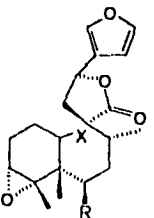
<b>DITERPENOIDES</b>		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. stricta</i>	 ácido conyzico (20)	Sen <i>et al.</i> , 1975
<i>C. stricta</i>	 ácido estrictico (21)	Tandon <i>et al.</i> , 1979
<i>C. stricta</i>	 ester metílico del ácido estrictico. (22)	Mahato <i>et al.</i> , 1981
<i>C. podocephala</i>	 conipododiol. (23)	Bohlmann <i>et al.</i> , 1982
<i>C. japonica</i>	 ácido 2α-hidroxihardwickico (24)	Pandey <i>et al.</i> , 1984
<i>C. coulteri</i>	 ácido 2β-hidroxihardwickico (25)	Jolad <i>et al.</i> , 1988
<i>C. schimperi</i> <i>C. pyrifolia</i>	 6 E-18-hidroxi-19-oico geranylgeraniol (26)	Zdero <i>et al.</i> , 1990



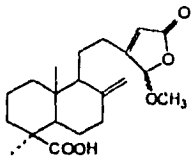
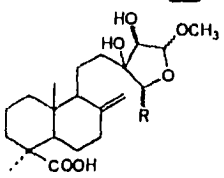
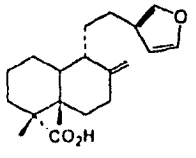
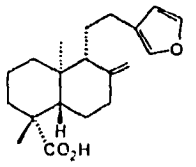
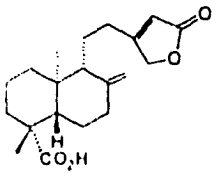
**Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados del género *Conyza* (Continuación)**

DITERPENOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. podocephala</i> <i>C. aegyptica</i>	 <p>conicefaloide (27)</p>  <p>7-hidroxi-17-oxo-7,8-dihidroxi-8,17-dihidro conicefaloide (28)</p>	<p>Bohlmann <i>et al.</i>, 1982</p> <p>Zdero <i>et al.</i>, 1990b</p>
<i>C. blinii</i>	 <p>blinina (29)</p>	<p>Yang <i>et al.</i>, 1989</p>
<i>C. aegyptica</i> <i>C. schimperi</i>	 <p>isochiliolidalactona (30)</p>	<p>Zdero <i>et al.</i>, 1990b</p>
<i>C. aegyptica</i>	 <p>3β,4α,7β,10β-tetrahydroxi-15,16-epoxi-labda-13(16),14-dien-20,12-ólida (31)</p>	<p>Zdero <i>et al.</i>, 1990b</p>

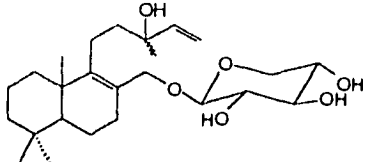
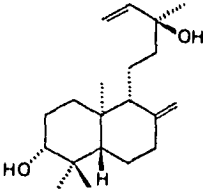
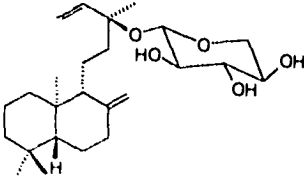
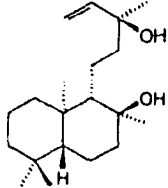
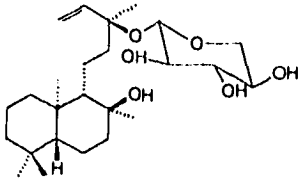
**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados del género *Conyza* (Continuación)

<b>DITERPENOIDES</b>		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. pyrifolia</i>		Zdero <i>et al.</i> , 1990b
	R=H 6-oxo-3α,4α,15,16-bisepoxi-labda-13(16),14-dien-20,12-ólida. (32)	
	R=OH 10β-hidroxi-6-oxo-3α,4α,5,16-bisepoxi-labda-13(16),14-dien-20,12-ólida. (33)	
<i>C. pyrifolia</i>		Zdero <i>et al.</i> , 1990b
	(34) X=O R=OSen 6β-senecioiloxi-pirropapólida	
	(35) αOAng H α-angeloiloxi-10-desoxo-pirropapólida	
	(36) αOH OAng 6β-angeloiloxi-10α-hidroxi-10-desoxo-pirropapólida	
<i>C. pyrifolia</i> <i>C. schimperi</i>		Zdero <i>et al.</i> , 1990b
	(37) X=O R=H Pirropapólida	
	(38) O OAng 6β-Angeloiloxi-pirropapólida	

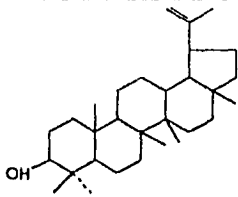
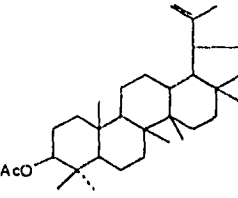
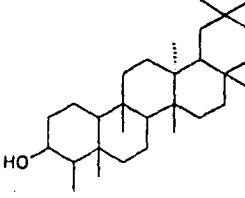
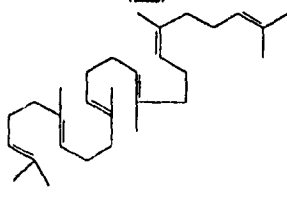
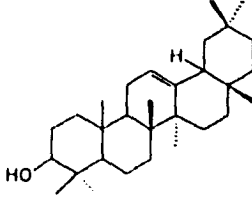
**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados del género *Conyza* (Continuación)

<b>DITERPENOIDES</b>		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. stricta</i>	 <p>ácido 6-metoxi-labda-8(17),13-dieno-15,19-dioicobutanóido <b>(39)</b></p>	Ahmed y Ahmed 1990b
	 <p>conyzanol R= A: αOMe B: βOMe <b>(40)</b></p>	
<i>C. Welwitschii</i>	 <p>ácido danielólico <b>(41)</b></p>	Zdero <i>et al.</i> , 1990a
<i>C. schimperi</i>	 <p><i>ent</i>-labda-8(17),13(15),14-trien-19-oico-15,16-epoxi <b>(42)</b></p>	Zdero <i>et al.</i> , 1990b
	 <p><i>ent</i>-labda-8(17),13-dien-19-oico-ácido-15,16-ólida <b>(43)</b></p>	

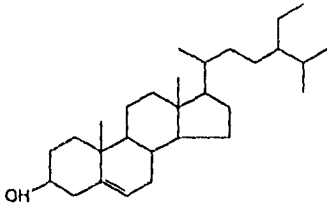
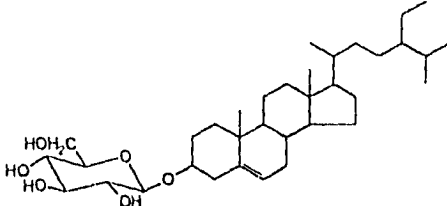
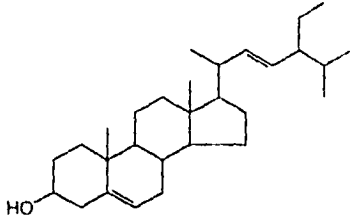
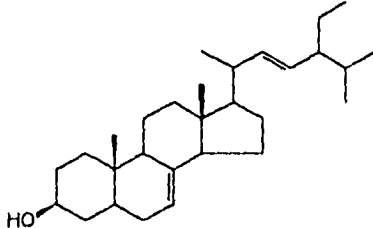
**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados del género *Conyza* (Continuación)

<b>DITERPENOIDES</b>		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. steudellii</i>	 <p style="text-align: center;">13,17-dihidroxi-labda-8,14-dieno-17-O-xylopiranosido <b>(44)</b></p>	Ahmed <i>et al.</i> , 1991
<i>C. trihecatactis</i>	 <p style="text-align: center;"><i>ent</i>-3β-hidroxi-manool <b>(45)</b></p>  <p style="text-align: center;"><i>ent</i>-manool-13-O-β-D-xilopiranosido <b>(46)</b></p>  <p style="text-align: center;"><i>ent</i>-esclareol <b>(47)</b></p>  <p style="text-align: center;"><i>ent</i>-esclareol-13-O-β-D-xilopiranosido <b>(48)</b></p>	Torrenegra <i>et al.</i> , (1994)

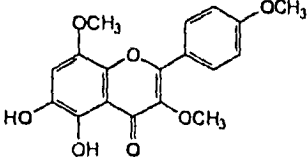
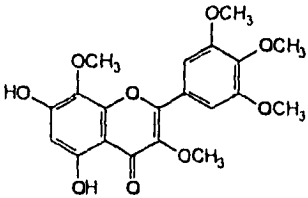
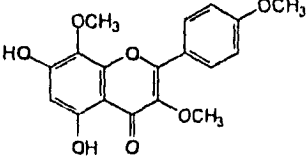
**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados del género *Conyza* (Continuación)

TRITERPENOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. linifolia</i>	 <p>lupeol (49)</p>	Harraz <i>et al.</i> , 1988
<i>C. linifolia</i>	 <p>acetil lupeol (50)</p>	Ahmed y Ahmed 1990
<i>C. aegyptiaca</i>	 <p>(51)</p>  <p>escualeno (52)</p>	Metwally <i>et al.</i> , (1989)
<i>C. filaginoides</i>	 <p><math>\beta</math>-amirina (53)</p>	Dominguez <i>et al.</i> , 1972

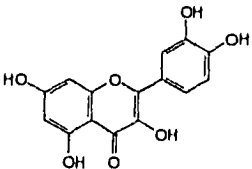
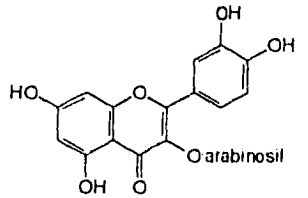
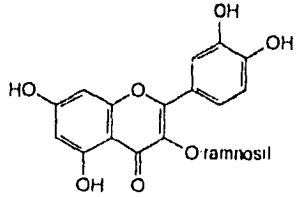
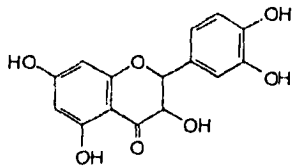
**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados del género *Conyza* (Continuación)

ESTEROLES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. linifolia</i>	 <p><math>\beta</math>-sitosterol (54)</p>	Harraz et al., 1988
	 <p><math>\beta</math>-D-glucositosterol (55)</p>	
<i>C. aegyptiaca</i>	 <p>estigmasterol (56)</p>	Metwally et al., 1989
<i>C. filaginoides</i>	 <p><math>\alpha</math>-spinasterol (57)</p>	Dominguez et al., 1972

**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados del género *Conyza* (Continuación)

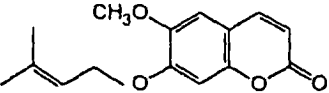
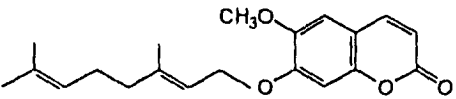
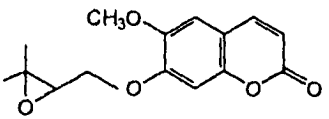
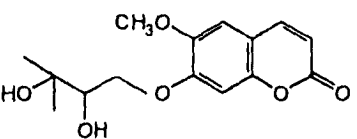
FLAVONOIDES.		
ESPECIE.	COMPUESTO.	REFERENCIA.
<i>C. stricta</i>	 <p>5,6-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxiflavona (<b>58</b>)</p>	Sen <i>et al.</i> , 1976
<i>C. stricta</i>	 <p>5,7-dihidroxi-3,8,3',4',5'-pentametoxiflavona (<b>59</b>)</p>	Sen <i>et al.</i> , 1976
<i>C. stricta</i>	 <p>5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxiflavona (<b>60</b>)</p>	Tandon <i>et al.</i> , 1977

**Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados del género *Conyza* (Continuación)**

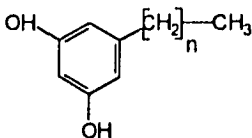
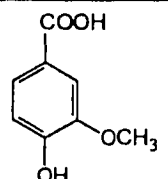
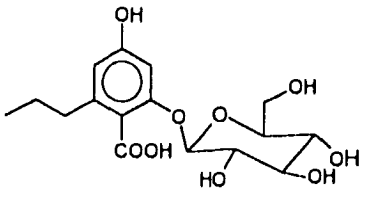
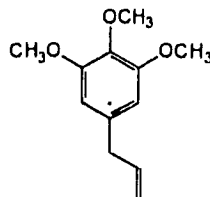
<b>FLAVONOIDES</b>		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<p><i>C. dioscoridis</i> <i>C. pallidiflora</i></p>	 <p>quercetina (61)</p>	<p>Ismail <i>et al.</i>, 1979  Zdero <i>et al.</i>, 1990</p>
<p><i>C. dioscoridis</i></p>	 <p>quercetina-7-arabinósido (62)</p>  <p>quercetina-3-ramnósido (63)</p>	<p>Ismail <i>et al.</i>, 1979</p>
<p><i>C. pallidiflora</i></p>	 <p>erodictiol (64)</p>	<p>Zdero <i>et al.</i>, 1990</p>



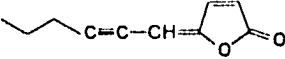
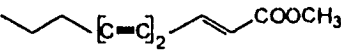
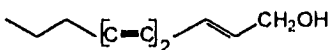
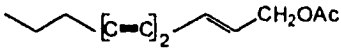
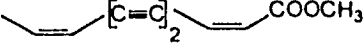
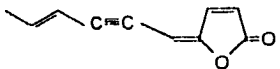
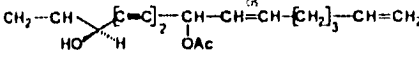
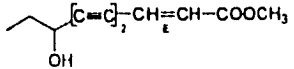
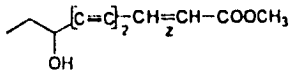
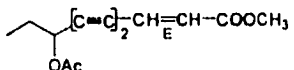
**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados del género *Conyza* (Continuación)

<b>CUMARINAS</b>		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. Obscura</i>	 <p>escopolatina-[2'en-3'metilbutil-(1')] éter <b>(65)</b></p>	Bohlmann <i>et al.</i> , 1979
	 <p>escopoletina-[2',6'-dien-3',7'-di metilooctil-(1')] éter <b>(66)</b></p>	
	 <p>escopoletina-[2',3'-epoxi-3'-metilbutil-(1')] éter <b>(67)</b></p>	
	 <p>escopoletina-[2',3'-dihidroxi-3'-metilbutil-(1')] éter <b>(68)</b></p>	

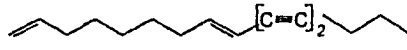
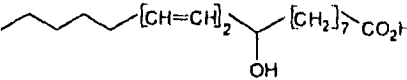
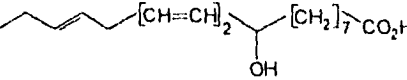
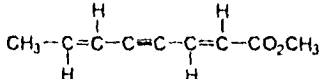
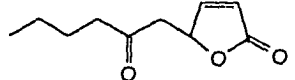

**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados del género *Conyza* (Continuación)

COMPUESTOS AROMATICOS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. podocephala</i>	 n=14 5-n-pentadecil-resorcinol(cardol) <b>(69)</b>	Bohlmann <i>et al.</i> , 1981
	n=15 5-n-hexadecil-resorcinol <b>(70)</b>	
	n=16 5-n-pentadecil-resorcinol <b>(71)</b>	
<i>C. linifolia</i>	 ácido vainillico <b>(72)</b>	Harraz <i>et al.</i> , 1988
<i>C. linifolia</i>	 ácido 2-n-propil-4-hidroxi-6-O-β-D-glucopiranosilbenzoico <b>(73)</b>	Ahmed y Ahmed 1990a
<i>C. steudellii</i>	 elemicina <b>(74)</b>	Ahmed <i>et al.</i> , 1991

**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados del género *Conyza* (Continuación)

ACIDOS GRASOS Y COMPUESTOS RELACIONADOS ACETILENICOS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. bipinnata</i>	 deca-2,4-dien-6-in-4-olida ( <b>75</b> )	Bohlmann <i>et al.</i> , 1979
	 deca-2-en-4,6-diin-oato de metilo ( <b>76</b> )	
	 deca-2-en-4,6-diin-1-ol ( <b>77</b> )	
	 acetato de deca-2-en-4,6-diino ( <b>78</b> )	
<i>C. canadensis</i>	 2,8-dien-4,6-diin-oato de metilo ( <b>79</b> )	Bohlmann <i>et al.</i> , 1979
<i>C. canadensis</i> <i>C. pallidiflora</i>	 deca-2,4,8-trien-6-in-4-olida ( <b>80</b> )	Bohlmann <i>et al.</i> , 1979 Zdero <i>et al.</i> , 1990b
<i>C. japonica</i>	 divinilhidroxiacetoxidieno ( <b>81</b> )	Pandey <i>et al.</i> , 1984
<i>C. newii</i>	 matricarianol ( <b>82</b> )	Zdero <i>et al.</i> , 1990a
	 8Z-matricarianol ( <b>83</b> )	
	 acetato de matricarianol ( <b>84</b> )	

**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados del género *Conyza* (Continuación)

ACIDOS GRASOS Y COMPUESTOS RELACIONADOS ACETILENICOS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. sumatrensis</i>	 heptadeca-1,8z-dien-11,13-diino (85)	Zdero et al., 1990a
<i>C. welwitschii</i> <i>C. volkensii</i>	 ácido 9-hidroxi-10E,12Z-octadecadienoico (86)	Zdero et al., 1990a
	 ácido 9-hidroxi-10E,12Z,15Z-octadecatrienoico (87)	
<i>C. pallidiflora</i>	 2Z,6Z-dien-4-in-octanoato de metilo (88)	Zdero et al., 1990b
<i>C. bonariensis</i>	 (R,S)-3-metoxi-6-oxodec-2-en-4-ólida (89)	Sanz et al., 1991
<i>C. bonariensis</i>	 éster metílico del ácido (Z)-deca-2-en-4,6,diin-oico (91)	Sanz et al., 1991

## II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

Las plantas medicinales constituyen sin lugar a dudas, el recurso terapéutico tradicional más vasto, conocido y empleado por la población mexicana. Se tiene registrado un número aproximado de 4500 especies botánicas con atribuidas propiedades medicinales y que son utilizadas por la población para tratar la sintomatología de los padecimientos más comunes (Meckes *et al.*, 1993). Sin embargo, el porcentaje de especies botánicas estudiadas desde un punto de vista farmacológico es relativamente bajo, y si bien es cierto que en los últimos 20 años la investigación científica de plantas medicinales en México se ha destacado por un notable y sostenido avance en el estudio fitoquímico de las especies botánicas del país, tan solo un escaso número de los compuestos aislados e identificados han sido evaluados para determinar sus propiedades biológicas.

De lo anterior se desprende que el potencial que ofrecen las plantas usadas en las prácticas médicas populares y tradicionales de México como fuente de nuevos y/o conocidos principios activos aún no se ha explorado adecuadamente.

Afortunadamente, hoy día el interés científico por el estudio de las plantas medicinales ha cobrado fuerza en México y es cada vez más notable la incorporación del esquema de trabajo interdisciplinario en los programas de estudio que se conducen en los distintos centros de investigación del país.

Este esquema de trabajo interdisciplinario cuenta con la participación de especialistas farmacólogos, bioquímicos y fitoquímicos, los cuáles basan sus diseños metodológicos de investigación de acuerdo a la información que proporcionan antropólogos y etnobotánicos.

Dentro de este contexto, y considerando que las plantas utilizadas en las prácticas populares medicinales constituyen fuentes potenciales valiosas de principios bioactivos (Cox y Balick, 1994), se ha establecido un programa interdisciplinario que incluye a la Facultad de Química, al Instituto de Biología y al Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, así como a la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Este programa investiga la potencialidad espasmolítica, citotóxica, antiséptica y herbicida de especies selectas de la flora medicinal de nuestro territorio nacional. Así mismo pretende, en lo posible, aislar los principios bioactivos responsables de las actividades biológicas demostradas en las distintas plantas seleccionadas e investigar el contenido metabólico secundario de las mismas. Una de las especies recientemente seleccionada para su investigación como fuente potencial de principios bioactivos con propiedades espasmolíticas, herbicidas, antisépticas y/o citotóxicas es la *Conyza filaginoides*.

El extracto metanólico de la planta entera demostró un efecto espasmolítico significativo *in vitro* sobre la contracción espontánea de ileo de rata (Rojas, 1995). Este efecto fue comparable al presentado por el extracto metanólico de la especie *Datura lanosa* (Solanaceae) utilizado como control positivo debido a su alto contenido de atropina y escopolamina. El Cuadro 3 resume el efecto de los dos extractos sobre la contracción espontánea de ileo de rata, especificándose los valores de la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>), la potencia relativa y del efecto máximo (Rojas, 1995).

De manera adicional, el extracto presentó una toxicidad significativa en el ensayo para *Artemia salina* Leach (Anderson *et al.*, 1991) presentando un valor de concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de 342 05 µg/ml (Gutiérrez y Barrientos,

Cuadro 3. Efecto del extracto de *C. filaginoides* sobre la contracción espontánea de ileo de rata (Rojas, 1995).

<b>Especie</b>	<b>Organo de prueba</b>	<b>E<sub>max</sub></b>	<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>Potencia</b>	<b>% de relajación</b>
<b><i>Conyza filaginoides</i></b>	ileo de rata	109.55±6.7	43.87±15	0.22	20
<b><i>Datura lanosa</i></b>	ileo de rata	86.98±4.07	9.65±1.16	1	100

1994). Sin embargo, el extracto no demostró actividad antimicrobiana en contra de bacterias Gram (+), Gram (-), hongos y levaduras (Gutiérrez y Barrientos, 1994 y Rojas, 1995).

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 objetivos generales:

- 1.- Aislar y caracterizar algunos de los principios activos responsables de la actividad citotóxica contra *Artemia salina* y del efecto relajante sobre ileo de rata, con la finalidad de obtener agentes potenciales con actividad antitumoral y espasmolítica, respectivamente.
- 2.- Determinar la potencialidad como agente regulador del crecimiento vegetal del extracto íntegro de la planta y de los compuestos aislados con el propósito de obtener agentes herbicidas potenciales.
- 3.- Contribuir al conocimiento del contenido metabólico secundario de *C filaginoides*.

Para el cumplimiento de los objetivos generales se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Preparar el extracto íntegro de la planta mediante un proceso de maceración.
- 2.- Determinar la toxicidad sobre *Artemia salina* y la actividad citotóxica en tres líneas celulares derivadas de tumores humanos [adenocarcinoma de colon (HT-29), carcinoma de mama (MCF-7) y carcinoma de pulmón (A-549)] del extracto total de la planta.
- 3.- Determinar el efecto del extracto total sobre el crecimiento radicular de dos malezas (*Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*).
- 4.- Realizar el fraccionamiento preliminar del extracto total mediante un proceso de cromatografía en columna abierta.
- 5.- Proporcionar las fracciones primarias derivadas del fraccionamiento preliminar indicado en el inciso 4, para la determinación del efecto relajante sobre una preparación de ileo de rata.
- 6.- Determinar la toxicidad para *Artemia salina* de las fracciones primarias y evaluar la citotoxicidad de las fracciones activas en las líneas celulares indicadas en el inciso 2.
- 7.- Aislar los compuestos tóxicos para *Artemia salina* de las fracciones primarias activas de menor polaridad.
- 8.- Determinar la citotoxicidad de los compuestos aislados de las fracciones tóxicas para *Artemia salina* contra las líneas celulares indicadas en el punto 2.
- 9.- Aislar los principios relajantes de la contracción espontánea de ileo de rata de las fracciones activas de menor polaridad.



10.- Caracterizar los compuestos activos aislados mediante el empleo de métodos espectroscópicos, espectrométricos y químicos.

11.- Determinar el efecto fitotóxico de los compuestos aislados sobre las dos especies de prueba señaladas en el inciso 3.

12.- Contribuir al conocimiento y a los estudios de carácter multidisciplinario de la Flora Medicinal Mexicana.

### III. PARTE EXPERIMENTAL.

#### 1. Material vegetal.

La planta entera de *Conyza filaginoides* se recolectó en la región de Juchitepec, en el Estado de México, el 25 de Noviembre de 1993. Un ejemplar de referencia se depositó en la colección etnobotánica del herbario Nacional (Mexu, Voucher: Bye 18865), Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La identificación de la especie estuvo a cargo del Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM).

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

#### 2. Análisis cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales en placas de vidrio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 GF<sub>254</sub> Merck), utilizando 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. Para los análisis cualitativos en capa fina se utilizaron placas con un espesor de 0.25 mm. Para la realización de las cromatografías preparativas se utilizaron placas de 20 X 20 cm de 2 ó 1 mm de espesor. Para efectuar las cromatografías en columna, se utilizó gel de sílice Merck 60 con gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 3.5 a 7.0 ASTM.

Cuadro 4. Sistemas de elución utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

SISTEMA DE ELUYENTES	COMPOSICION	PROPORCION
A	Hexano-CHCl <sub>3</sub>	Diversas
B	Hexano-AcOEt	Diversas
C	CHCl <sub>3</sub>	Diversas
D	CHCl <sub>3</sub> -MeOH	Diversas
E	CHCl <sub>3</sub> -AcOEt	Diversas
F	Benceno-AcOEt	Diversas
G	CHCl <sub>3</sub> -Acetona	Diversas
H	AcOEt-MeOH	Diversas
I	CHCl <sub>3</sub> -MeOH-H <sub>2</sub> O	62:31.5:6.5

Cuadro 5. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

REACTIVO	COMPOSICION	REFERENCIA
Sulfato Cérico.	12.0 g. de Sulfato Cérico 22.2 ml. de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. 350 g. de hielo picado	Stahl, 1969
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10%	10.0 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. 90.0 ml de H <sub>2</sub> O dest.	Stahl, 1969
AlCl <sub>3</sub> 5% aq.	5.0 g. de AlCl <sub>3</sub> 100.0 ml de H <sub>2</sub> O	Wannan, 1985

\* En todos los casos para el desarrollo de color fue necesario calentar aproximadamente 2 minutos a 110°C.

### 3. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales y sus derivados.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Jones y no están

corregidos. Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin- Elmer, modelo 599.

Los espectros de masas se determinaron en un aparato Hewlet-Packard 5890, serie II. El voltaje para el registro de los espectros de masas fue de 70 V. En el caso de los análisis mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), se utilizó el mismo espectrómetro de masas y la columna de separación empleada fue de tipo PAS 1701 Tested 1702 silicona HP con una longitud de 25 mm por 0.32 mm de diámetro interior; como gas acarreador se empleó Helio a presión con un flujo de 1ml/min; la temperatura de la columna se programó de 100° C a 270° C con una velocidad de calentamiento de 10° C/min; la temperatura de inyección fue de 260° C. La espectrometría de masas en su modalidad de Bombardeo rápido de Átomos (FAB), se registró en un aparato Jeol DX 300 con un sistema JMA-3500. Para el bombardeo de átomos se utilizó Xenón con 6 KeV.

Los espectros de RMN se registraron en un aparato Varian VXR-3005 utilizando como disolvente  $CDCl_3$  y como referencia interna TMS. Estos últimos y los espectros de masas se determinaron en el Instituto de Química de la UNAM.

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro digital JASCO DIP 360. Por último, el espectro UV de la flavanona aislada, se registró en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 202.

#### **4. Pruebas biológicas.**

##### **4.1 Determinación de la toxicidad para *Artemia salina* Leach**

Los huevecillos del crustáceo *Artemia salina* se incuban en un medio salino

artificial durante 48 horas, al término de este tiempo los crustáceos se encuentran en disposición de ser usados para el bioensayo.

Para la preparación de las muestras, se pesan 20 mg de la muestra de prueba (extracto, fracciones o compuestos puros) y se disuelven en 2 ml del disolvente apropiado. De la solución anterior se transfieren 5, 50 y 500  $\mu$ l a viales de manera independiente y por triplicado. El disolvente se deja evaporar a sequedad a temperatura ambiente o al vacío.

Se transfieren 10 crustáceos a cada uno de los viales que contienen las muestras de prueba y se aforan a 5 ml con un medio salino artificial. De esta forma se obtienen concentraciones finales de 1000, 100 y 10  $\mu$ g/ml, respectivamente.

Los frascos se mantienen con iluminación artificial durante 24 horas; transcurrido este tiempo se procede a contar el número de crustáceos sobrevivientes. Para el cálculo de la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) se utiliza 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  $\mu$ g/ml y en el caso de un compuesto puro, la  $CL_{50}$  debe ser menor a 200  $\mu$ g/ml (Anderson et al., 1991).

## **4.2 Determinación de la actividad fitoinhibidora.**

### **4.2.1 Método de caja de Petri.**

La determinación de la actividad fitoinhibidora de los extractos y compuestos puros se realizó midiendo el efecto sobre el crecimiento radicular de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*.

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri (Anaya et al., 1990) de 10

cm de diámetro interno. Cada una de las muestras de prueba se disolvió en  $\text{CHCl}_3$  ó en  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (1:1) y se prepararon soluciones a tres concentraciones diferentes (500, 250 y 100  $\mu\text{g/ml}$ ), 2 ml de cada una de estas soluciones se vertieron en las cajas de Petri sobre un disco de papel filtro (Whatman No. 1) y el disolvente se evaporó mediante una corriente de aire.

Posteriormente, se inició la germinación de 10 semillas de cada una de las dos especies vegetales de prueba, humedeciendo el papel filtro con 3 ml de agua destilada. El mismo procedimiento se utilizó para los controles conteniendo únicamente disolvente.

Las cajas de Petri se mantuvieron en la oscuridad a 30°C y la actividad fitotóxica se registró midiendo la longitud de las radículas después de 24 horas para *Amaranthus hypochondriacus* y 48 horas para *Echinochloa crus-galli*. En todos los casos se efectuaron cuatro réplicas.

Los resultados obtenidos, se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA, ( $p < 0.05$ ). Los valores de Concentración Inhibitoria media ( $\text{CI}_{50}$ ) se determinan mediante el mismo análisis Probit indicado en el inciso 4.1.

#### **4.2.2 Método bioautográfico.**

El método bioautográfico se realizó sobre placas cromatográficas de 20x5 cm recubiertas con gel de sílice. En cada placa se sembraron 10 mg del extracto; posteriormente se efectuó la elución utilizando AcOEt. Al cabo del proceso de elución se evaporó el disolvente y las cromatoplasas se cubrieron con 20 ml de una suspensión de agar al 1%. Se realizaron dos réplicas en todos los casos. Paralelamente dos placas sin muestra problema se eluyeron con AcOEt. Estas se utilizaron como testigo.

Posteriormente, cada una de las placas cromatográficas se cubrió completamente con las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*. Las placas con las semillas fueron incubadas a 28°C durante 24 horas (*A. hypochondriacus*) ó 48 horas (*E. crus-galli*) en una atmósfera húmeda. Transcurrido el tiempo de incubación se observó la zona de inhibición y se midió el *r<sub>f</sub>* correspondiente a la zona de inhibición (Inoue, 1992). Este último procedimiento se realizó por comparación con una placa conteniendo la muestra, eluida en las mismas condiciones y revelada con el agente cromógeno apropiado.

#### **4.3 Determinación de la actividad citotóxica.**

La determinación de la actividad citotóxica de los extractos, las fracciones y los compuestos puros se determinó sobre tres líneas celulares derivadas de tumores humanos: adenocarcinoma de colon (HT-29), carcinoma de mama (MCF-7) y carcinoma de pulmón (A-549). Los resultados se expresan en concentraciones efectivas medias (DE<sub>50</sub>).

Las evaluaciones se realizaron, de acuerdo a los protocolos previamente establecidos (Anderson *et al.*, 1991), en el Cell Culture Laboratory, School of Pharmacy and Pharmacal Sciences, Purdue University, Estados Unidos.

#### **4.4 Determinación del efecto de las fracciones y compuestos puros sobre la inhibición de la contracción espontánea de ileo de rata.**

La determinación de la actividad potencial espamolítica de las fracciones y compuestos puros se determinó midiendo el efecto de los mismos sobre la inhibición de la contracción espontánea del ileo de rata (Rojas, 1995).

Estas evaluaciones se realizaron bajo la dirección de la M. en C. María

Alejandra Rojas Molina, en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro.

### **5. Extracción de la planta entera *Conyza filaginoides*.**

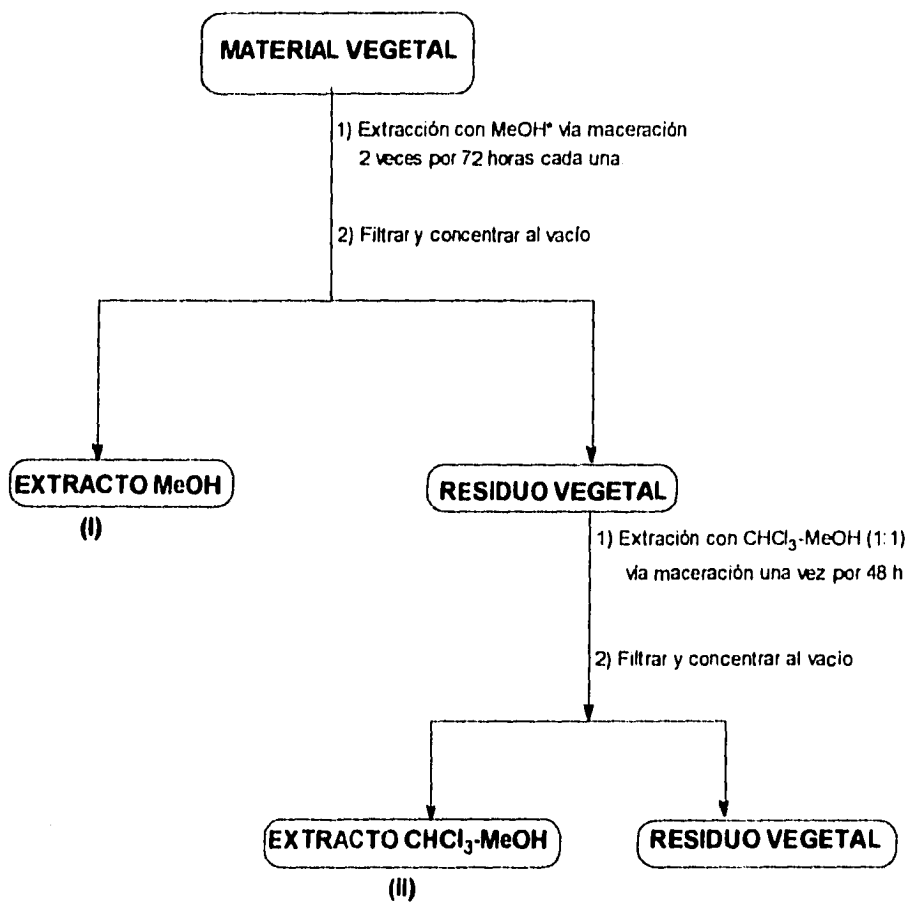
El material vegetal seco y molido (4.60 Kg) se extrajo inicialmente mediante un proceso de maceración con MeOH. Posteriormente, el material vegetal se sometió a una segunda maceración con una mezcla de CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:1). En el Esquema 1 se resume el procedimiento empleado. Los dos extractos resultantes se combinaron ya que demostraron una gran similitud en los análisis cromatográficos en capa delgada.

### **6. Fraccionamiento biodirigido del extracto total.**

El extracto combinado total (685.7 g) se fraccionó por medio de una cromatografía en columna abierta, empacada con 3.5 Kg de gel de sílice, la cual fue previamente desactivada con agua destilada (10% en relación a la cantidad total de adsorbente).

El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-CHCl<sub>3</sub> (diferentes proporciones), CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>-MeOH (diferentes proporciones) y MeOH. Se recolectaron 232 fracciones de 1 lt cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina y se combinaron aquellas que resultaron similares. En el Cuadro 6 se resume el fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto total de la planta entera de *Conyza filaginoides* y los valores de toxicidad para *Artemia salina* de las fracciones combinadas.





\* Volumen total de MeOH = 32 lt

\*\*Volumen total de CHCl<sub>3</sub>-MeOH = 16 lt

Peso total de los extractos I y II = 685.7 g

Esquema 1. Proceso de extracción de la planta entera *Conyza filaginoides*.

Cuadro 6. Fraccionamiento biodirigido del extracto total de *Conyza filaginoides*.

ELUYENTE	PROPORCION (%)	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE	PESO (g)	CL <sub>50</sub> * (µg/ml)	RELAJACION %**
Hexano	1:11		1-15	A	3.53	>1000	10.0
Hexano- CHCl <sub>3</sub>	90:10	12-29	16-38	B	5.35	>1000	82.4
	70:30	30-39	39-59	C	6.94	269.01	90.0
	50:50	40-46	60-97	D	13.80	>1000	81.6
	25:75	47-59	98-149	E	78.32	>1000	71.7
CHCl <sub>3</sub>	100	60-97	150-167	F	35.45	>1000	66.0
CHCl <sub>3</sub> -MeOH	99:1	98-105	168-178	G	17.22	>1000	70.0
	97:3	106-116	179-184	H	15.28	>1000	59.5
	95:5	117-139	185-198	I	56.64	521.42	73.3
	90:10	140-167	199-217	J	176.52	235.47	47.6
	80:20	168-178	218-226	K	169.6	140.01	73.6
	70:30	179-195	227-232	L	87.93	65.91	58.6
	60:40	196-215					
	40:60	216-226					
MeOH	100	227-232					

\* Toxicidad para *Artemia salina*.

\*\* Efecto espasmolítico.

**7. Aislamiento y purificación del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno (9) y del 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -Oleaneno (92) de la fracción activa C.**

La fracción activa primaria C (6.94 g) Cuadro 6 se recromatografió en una columna abierta, utilizándose como adsorbente 96.4 g de gel de sílice. El proceso de elución se llevó a cabo con hexano, hexano-CHCl<sub>3</sub> (diferentes proporciones), CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>-AcOEt (diferentes proporciones) y AcOEt. Se colectaron un total de 255 fracciones de 30 ml cada una y se analizaron por cromatografía en capa fina combinándose aquellas que presentaron características cromatográficas similares. En el Cuadro 7 se resume el fraccionamiento secundario de la fracción activa C.

**Cuadro 7. Fraccionamiento secundario biodirigido de la fracción activa C.**

ELUYENTE	PROPORCION (%)	NUMERO DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE	CL60** μg/ml
Hexano	100	1-16	1-22	C-I	>1000
Hexano-CHCl <sub>3</sub>	80:20	17-88	23-30	C-II	>1000
	70:30	89-165	31-37	C-III	>1000
	60:40	166-206	74-93	C-IV	>1000
	50:50	207-228	94-163	C-V	79.17
	CHCl <sub>3</sub>	100	229-234	164-187	C-VI
CHCl <sub>3</sub> -AcOEt	95:5	235-241	188-223	C-VII	>1000
	50:50	242-251	224-236	C-VIII	>1000
AcOEt	100	252-255	237-255	C-IX	>1000

Sucesivas cromatografías preparativas de la fracción secundaria activa C-V (Cuadro 7), utilizando como eluyente una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (95:5), permitieron el aislamiento de 429 mg del compuesto 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno (**9**) con un p f = 34-36°C.

La fracción C-VII del Cuadro 7 (0.9319 g) se recromatografió sobre una columna de gel de sílice (59.1 g), utilizando como fase móvil mezclas de hexano- $\text{CHCl}_3$  y  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt en diferentes proporciones. Se colectaron un total de 235 fracciones de 25 ml cada una combinándose aquellas que presentaron homogeneidad cromatográfica. El Cuadro 8 resume este proceso cromatográfico.

La cromatografía preparativa en capa fina de la fracción terciaria C-VIIId (Cuadro 8), permitió el aislamiento de 202.2 mg del producto (**92**) bajo la forma de un polvo blanco con un p f = 79-82 °C. El sistema de elución empleado fue  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (95:5).

Cuadro 8. Resumen de la cromatografía en columna abierta de la fracción C-VII.

ELUYENTE	PROPORCION (%)	NUMERO DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE
Hexano- $\text{CHCl}_3$	70:30	1-20	1-25	C-VIIa
	60:40	21-37	26-43	C-VIIb
	50:50	38-186	44-53	C-VIIc
$\text{CHCl}_3$	100	187-221	54-95	C-VIIId
AcOEt	100	222-235	96-131	C-VIIe
			132-179	C-VIIIf
			180-193	C-VIIIfg
			194-207	C-VIIIfh

**8.- Aislamiento y purificación del  $\alpha$ -espinasterol (57) y del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$  oleaneno (93) de la fracción primaria activa D.**

La fracción primaria activa D [Cuadro 6 (13.8 g)] previamente decolorada con carbón activado, se recromatografió en una columna abierta de gel de sílice (376.6 g). El proceso de elución se llevó a cabo con hexano, Hexano-AcOEt (diferentes proporciones) y AcOEt. Se recolectaron un total de 117 fracciones de 150 ml cada una combinándose aquellas que presentaron características cromatográficas similares. En el Cuadro 9 se resume el proceso cromatográfico de la fracción primaria D.

Cuadro 9. Resumen del proceso cromatográfico en columna abierta de la fracción primaria D.

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	NÚMERO DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE
Hexano	100	1-14	1-11	D-I
Hexano-AcOEt	90:10	15-67	12-13	D-II
	80:20	68-91	14-23	D-III
	70:30	92-99	24-40	D-IV
	50:50	100-109	41-50	D-V
AcOEt	100	110-117	51-59	D-VI
			60-73	D-VII
			74-91	D-VIII
			92-98	D-IX
			99-117	D-X

De la fracción secundaria D-IV (Cuadro 9) precipitó de manera espontánea un polvo cristalino de color blanco, que después de recristalizarse con una mezcla  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ , generó 302 mg de  $\alpha$ -espinasterol (**57**) con un  $p f = 159\text{-}160^\circ\text{C}$ . El producto (**57**) resultó idéntico en todos sus aspectos a una muestra auténtica de  $\alpha$ -espinasterol.

Sucesivas cromatografías en capa fina de la fracción secundaria D-VII (Cuadro 9), condujeron al aislamiento de 2.25 g de 3- $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno (**93**) bajo la forma de unos cristales blancos opacos en forma de agujas con un  $p f = 163\text{-}165^\circ\text{C}$ . El sistema de elución empleado para el análisis cromatográfico fue  $\text{CHCl}_3\text{-AcOEt}$  (80:20).

### **8.1 Obtención de la 5-hidroxi-7-metoxiflavanona (**94**) y de la $\beta$ -amirina (**53**).**

1.7 g de la fracción secundaria D-III (Cuadro 9) fueron recromatografiados sobre una columna abierta empacada con 57 g de gel de sílice. El proceso de elución se llevó a cabo con benceno, benceno-AcOEt (95:5) y AcOEt. Como resultado de este proceso cromatográfico se obtuvieron 103 fracciones de 25 ml cada una, combinándose aquellas que presentaron un perfil cromatográfico similar. El Cuadro 10 resume este fraccionamiento terciario.

De la fracción terciaria D-IIIa del Cuadro 10 (50.1 mg), se aislaron y purificaron 42.56 mg del compuesto (**94**) como un polvo amarillo con un  $p f = 82\text{-}85^\circ\text{C}$ . El proceso de purificación se efectuó mediante una cromatografía preparativa en placa delgada utilizando como sistema de elución benceno-AcOEt (95:5).

Por otra parte, de la fracción D-III<sub>d</sub> cristalizaron 285 mg de un sólido cristalino con  $pf = 190-193^{\circ} C$  el cual fue identificado como la  $\beta$ -amirina (**53**) por comparación con una muestra auténtica.

Cuadro 10. Resumen del proceso cromatográfico en columna abierta de la fracción secundaria D-III.

ELUYENTE	PROPORCION (%)	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE
Benceno	100	1-67	1-14	D-III <sub>a</sub>
Benc.-AcOEt	95.5	67-96	15-16	D-III <sub>b</sub>
AcOEt.	100	97-103	17-24	D-III <sub>c</sub>
			25-38	D-III <sub>d</sub>
			39-57	D-III <sub>e</sub>
			58-72	D-III <sub>f</sub>
			73-81	D-III <sub>g</sub>
			82-103	D-III <sub>h</sub>

### 9- Obtención de la mezcla de ácidos grasos de la fracción primaria activa E.

La fracción primaria activa E (Cuadro 6) se recromatografió en una columna abierta, utilizándose como adsorbente 193.4 g de gel de sílice. El proceso de elución se llevó a cabo con hexano- $CHCl_3$  (diferentes proporciones),  $CHCl_3$ ,  $CHCl_3$ -AcOEt (diferentes proporciones) y AcOEt. Se recolectaron un total de 306 fracciones de 50 ml cada una combinándose aquellas que presentaron

características cromatográficas similares. El Cuadro 11 resume este proceso cromatográfico.

Cuadro 11. Resumen del proceso cromatográfico en columna abierta de la fracción primaria activa E.

ELUYENTE	PROPORCION (%)	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE
Hex-CHCl <sub>3</sub>	50:50	1-14	1-5	E-I
	40:60	15-29	6-37	E-II
	30:70	30-44	38-65	E-III
	20:80	45-66	66-87	E-IV
	10:90	67-81	88-141	E-V
CHCl <sub>3</sub>	100	82-156	142-180	E-VI
CHCl <sub>3</sub> - AcOEt	95:5	157-205	181-237	E-VII
	90:10	206-219	238-275	E-VIII
	80:20	220-251	276-297	E-IX
	70:30	252-268		
	60:40	269-280		
	50:50	281-297		

La fracción E-III del Cuadro 11 con un peso de 830.2 mg contenía una mezcla de ácidos grasos. Para la separación e identificación de los ácidos grasos presentes en la fracción E-III, se prepararon los correspondientes ésteres



metílicos por tratamiento con diazometano. Para ello a 200 mg de la mezcla se adicionaron 40 ml de una solución etérea de diazometano preparada a partir de una solución de KOH (5.0 g en 7.5 ml de agua), 25 ml de etanol y 21.9 g de N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida (Diazald-Aldrich), en 45 ml de éter etílico. La mezcla de ácidos grasos se disolvió en 10 ml de metanol y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 h. Como resultado de esta reacción se obtuvieron 221.9 mg de la mezcla de ácidos grasos metilados. La cual fue analizada posteriormente mediante CG-EM de acuerdo a las especificaciones del inciso 3.

#### **10. Obtención del derivado acetilado del 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -Oleaneno(92a).**

A 55 mg del compuesto (92) se agregaron 0.7 ml de piridina y 0.7 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó por 48 h a temperatura ambiente y al término de este tiempo, el producto acetilado se separó de la manera convencional (Shriner *et al.*, 1980) obteniéndose 35.7 mg del derivado acetilado (92a) con un p f = 29-31° C.

#### **11. Obtención del acetato del $\alpha$ -espinasterol (57a).**

A 25 mg del compuesto (57) se agregaron 1 ml de piridina y 1 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó en reposo por 24 h y al término de este tiempo, el producto acetilado se separó de la manera convencional (Shriner *et al.*, 1980) obteniéndose 20 mg del derivado acetilado (57a) con un p f = 139-142° C.

#### **12. Obtención del acetato del 3 $\beta$ -28-diacetoxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno (93a).**

A 17.9 mg del compuesto (93) se le adicionaron 1 ml de piridina y un ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó en reposo por 56 h y al término de este tiempo, el producto acetilado se separó de la manera habitual (Shriner *et al.*, 1980) obteniéndose 21 mg del derivado acetilado (93a).

#### **13. Saponificación del 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -Oleaneno(92).**

A 2 mg del compuesto (92) se le agregaron 0.6 ml de MeOH y 0.6 ml de KOH 2M. La mezcla de reacción se calentó a reflujo por un tiempo de 11 h. Al cabo de este tiempo se adicionaron 2 ml de HCl 1N y posteriormente, se realizó una partición con CHCl<sub>3</sub> (tres veces, con 5 ml cada una); los extractos orgánicos combinados se evaporaron a sequedad al vacío, para obtener 3 mg de un producto sólido constituido por una mezcla de 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno y otro constituyente.

#### **14. Prueba de Liebermann-Burchard para triterpenoides y esteroides.**

A 1 mg de la sustancia de prueba, contenida en un tubo de ensayo, se adicionaron 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de CHCl<sub>3</sub>. Posteriormente, se adicionó por las paredes del tubo de ensayo, sumergido en un baño de hielo, una gota de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se observó la coloración desarrollada en la interfase. La formación de un anillo pardo o rojo indicó reacción positiva.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

### 4.1 Evaluaciones biológicas preliminares del extracto total y de las fracciones primarias de *Conyza filaginoides*.

El extracto clorofórmico-metanólico (1:1) de la planta entera de *Conyza filaginoides* demostró una toxicidad significativa para *Artemia Salina* Leach, ya que la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) fue de 145.2 µg/ml (Anderson *et al.*, 1991). Considerando que este ensayo se ha utilizado en múltiples ocasiones como prueba preliminar para predecir actividad citotóxica, antihelmíntica y antimalárica, entre otras (Anderson *et al.*, 1991), se decidió evaluar el extracto activo contra tres líneas celulares derivadas de tumores humanos. Las líneas celulares utilizadas incluyeron: adenocarcinoma de colon (HT-29), carcinoma de mama (MCF-7) y carcinoma de pulmón (A-549); como control positivo para estas pruebas se utilizó la adriamicina (Anderson *et al.*, 1991). Los resultados derivados de estas evaluaciones se indican en el Cuadro 12 y se expresan en forma de dosis efectivas medias (DE<sub>50</sub>). Los estudios previos (Anderson *et al.*, 1991) de determinación de la potencialidad citotóxica contra estas tres líneas celulares consideran como una actividad significativa aquellos valores de DE<sub>50</sub> < 20 µg/ml. En consecuencia, el extracto total de *C. filaginoides* demostró una pobre actividad citotóxica en contra de las líneas celulares de prueba y solo se observó un efecto citotóxico marginal para el adenocarcinoma de colon (HT-29).

De manera adicional, se evaluó el efecto del extracto y del lixiviado acuoso sobre el crecimiento radicular de dos malezas: *Amaranthus hypochondriacus* y

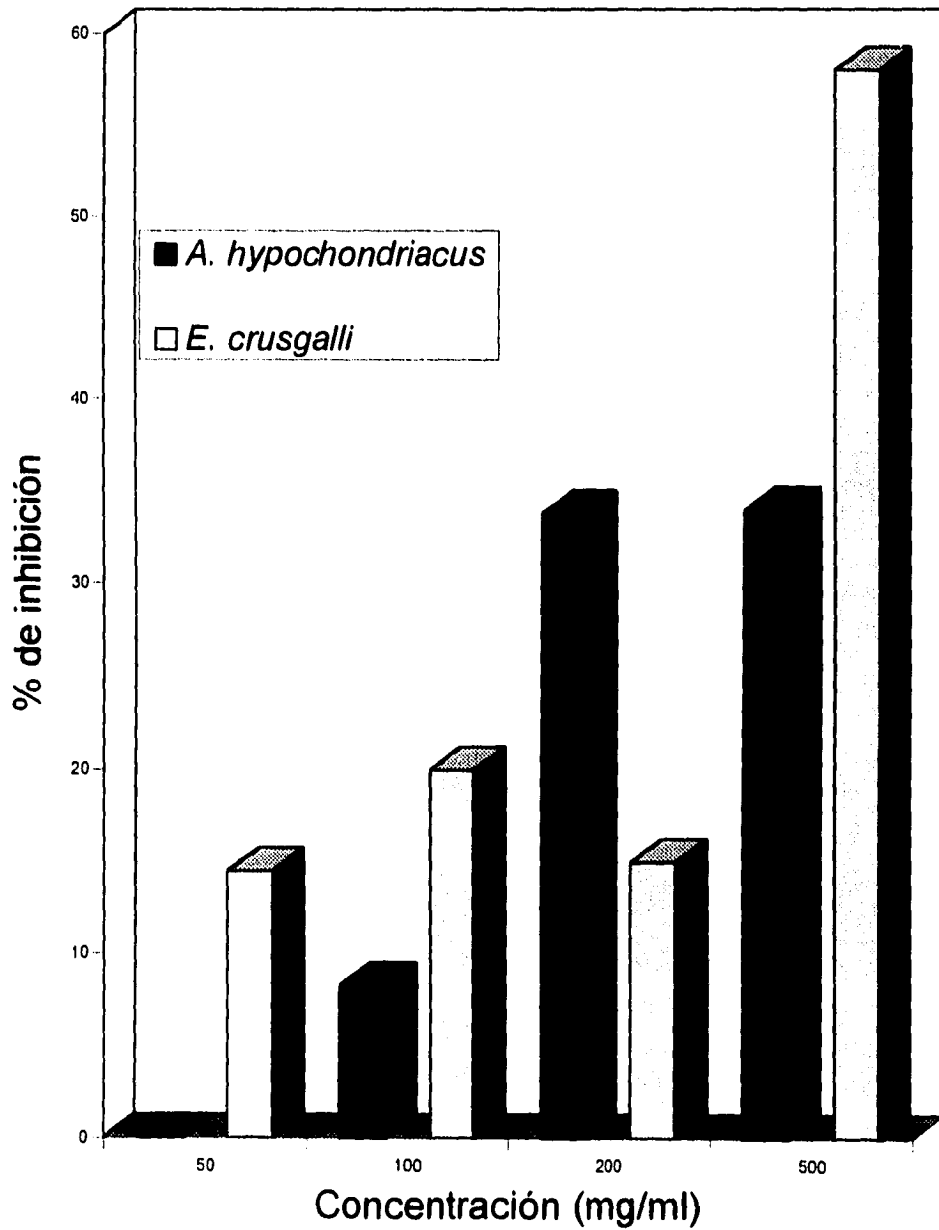
Cuadro 12. Citotoxicidad del extracto total de *C. filaginoides* y de algunas de las fracciones derivadas del fraccionamiento primario del mismo.

Muestra	Línea celular		
	ED <sub>50</sub> * (µg/ml)		
	A-549	MCF-7	HT-29
Adriamicina	7.94 x 10 <sup>-3</sup>	3.32 x 10 <sup>-1</sup>	3.47 x 10 <sup>-2</sup>
Extracto total	>100	>100	30.98
Fracción C	>100	100	71.23
Fracción I	>100	>100	>100
Fracción J	>100	>100	>100
Fracción K	>100	>100	87.28
Fracción L	>100	>100	30.98

\*Concentración que inhibe el crecimiento celular en un 50%.

*Echinochloa crus-galli*. La Gráfica 1 ilustra los porcentajes de inhibición del crecimiento radicular de las dos especies de prueba inducidos por el extracto orgánico total. El lixiviado acuoso presentó una actividad inhibitoria del crecimiento radicular pronunciada, ya que se observó una inhibición del 68% en el caso de *A. hypochondriacus* y del 64.5% en el caso de *E. crus-galli*. El extracto orgánico inhibió significativamente el crecimiento radicular de *E. crus-galli*. La concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) fue de 523.42 µg/ml y el efecto fue dependiente de la concentración (ver Gráfica 1). La inhibición del crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* fue menor obteniéndose una CI<sub>50</sub> de 684.14 mg/ml.

Gráfica 1. Efecto del extracto total de *Conyza filaginoides* sobre el crecimiento radicular de *A.hypochondriacus* y *E.crusgalli*.



Con base en los resultados derivados de las evaluaciones biológicas preliminares (actividad inhibitoria de crecimiento vegetal, toxicidad para *A. salina* y efecto espasmolítico) realizadas con el extracto total de *C. filaginoides* es evidente que la especie constituye una fuente potencial de principios larvicidas, espasmolíticos y fitotóxicos.

Con la finalidad de obtener los compuestos activos el extracto se fraccionó de manera preliminar mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice; este proceso permitió la obtención de 12 fracciones primarias A-L (Cuadro 6, sección experimental). Las fracciones C, I, J, K y L, presentaron una actividad significativa contra *A. salina*, obteniéndose valores de  $CL_{50}$  de 269, 521.42, 235.47, 140.01 y 65.91  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. También se determinó la citotoxicidad de las fracciones anteriores contra las tres líneas celulares derivadas de tumores humanos antes indicadas, y los resultados se resumen en el Cuadro 12. De los resultados del Cuadro 12 se desprende que al igual que el extracto original, ninguna de las fracciones activas contra *A. salina* presentó una actividad citotóxica significativa: sólo las fracciones C y L demostraron una actividad marginal contra el adenocarcinoma de colon (HT-29).

La evaluación del efecto fitotóxico mediante el ensayo de bioautografía descrito en la sección experimental indicó que la actividad fitoinhibidora se concentraba en la fracción C del Cuadro 6 (sección experimental).

Por último, la evaluación del efecto relajante sobre la contracción espontánea de ileo de rata de las fracciones de A-L (Cuadro 6, sección experimental) permitió la detección de varias fracciones activas. El monitoreo de la actividad biológica se realizó evaluando todas las fracciones a una concentración equivalente a la concentración inhibitoria media del extracto

original (43.87 µg/ml). En el Cuadro 13 se resumen los resultados y de los mismos se concluye que la actividad espasmolítica se concentró en las fracciones C-L.

Cuadro 13. Evaluación del efecto relajante de las fracciones primarias derivadas del extracto de *C. filaginoides* sobre la contracción espontánea de ileo de rata.

FRACCION PRIMARIA*	% DE RELAJACION
A	10
B	82.4
C	90.0
D	81.6
E	71.7
F	66.0
G	70.0
H	59.5
I	73.3
J	47.6
K	73.6
L	58.6

\*Evaluadas a la CI<sub>50</sub> del extracto original.

## 4.2 Aislamiento y caracterización del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno (**9**).

Sucesivas cromatografías de la fracción activa C (Cuadro 7, sección experimental) permitieron el aislamiento del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno (**9**) [0.0093% de rendimiento] como el único constituyente tóxico para *A. salina* con una  $CL_{50}$  de 31.6  $\mu\text{g/ml}$ . De manera adicional, se aisló el 3- $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno (**92**) en un rendimiento de 0.0044%.

Las constantes espectroscópicas y espectrométricas del producto (**9**) se resumen en la Tabla 1. Su fórmula molecular se estableció como  $C_{15}H_{24}O$  mediante espectrometría de masas (Espectro 2) y permite cuatro insaturaciones. El espectro de IR (Espectro 1) presentó señales características para C-H (2928 y 2860  $\text{cm}^{-1}$ ) y para doble ligadura terminal (1630 y 890  $\text{cm}^{-1}$ ).

El espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Espectro 3) presentó resonancias diagnósticas para tres metilos ( $\delta_{\text{H}}$  1.11, 1.00 y 0.98) unidos a centros cuaternarios; un metileno olefínico [sistema AB conformado por dos dobletes ( $J=1.6$  Hz) en  $\delta_{\text{H}}$  4.97 y 4.86]; un hidrógeno base de una función oxigenada (posiblemente epoxídica) en  $\delta_{\text{H}}$  2.88 (dd,  $J=10.4$  y 4.0 Hz) y para un metino de carácter alílico en  $\delta_{\text{H}}$  2.61 (m).

El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Espectro-4) presentó el perfil típico de un sesquiterpenoide de tipo cariofilano (Berry *et al.*, 1985; Wolf-Rainer *et al.*, 1990; Dellar *et al.*, 1994 y Hinkley *et al.*, 1994) y mostró señales para 15 carbonos en congruencia con la fórmula molecular establecida.

El análisis detallado del espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  en su modalidad DEPT (Espectro 4a) indicó claramente que las resonancias correspondían a tres metilos, seis metilenos, tres metinos y a tres carbonos cuaternarios. De acuerdo a la teoría



del desplazamiento químico uno de los metinos ( $\delta_c$  63.71) y uno de los carbonos cuaternarios ( $\delta_c$  59.80) se encontraban unidos a una función oxigenada. Por otra parte, otro de los carbonos cuaternarios ( $\delta_c$  151.89) y uno de los metilenos ( $\delta_c$  112.77) eran de carácter olefínico. Esta última señal correlacionó con los hidrógenos del sistema AB en  $\delta_H$  4.97 y 4.86 en el espectro de correlación heteronuclear HETCOR (Espectro 5). Así mismo, el doblete de doblete en  $\delta_H$  2.88 correlacionó con el metino en  $\delta_c$  63.71.

Los elementos estructurales evidenciados hasta el momento (núcleo cariofilano y una doble ligadura) satisfacían tres de las cuatro insaturaciones y el número total de hidrógenos requeridos por la fórmula molecular. Por lo tanto, la insaturación y el oxígeno por justificar se podían atribuir a la presencia de una función epoxídica en la molécula. En este sentido, es importante hacer notar que los desplazamientos químicos en el espectro de RMN- $^{13}C$  para los carbonos oxigenados ( $\delta_c$  63.71 y 59.80) eran congruentes con la presencia de un epóxido en el producto natural (Silverstein *et al.*, 1991).

Una vez evidenciado el núcleo estructural y los grupos funcionales del compuesto (**9**) (el epóxido y la doble ligadura disustituída), el siguiente paso fue la ubicación relativa de los mismos en la estructura base. Para ello, el análisis comparativo de los desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN del producto (**9**) para los metilos y los metinos no oxigenados, con aquellos previamente descritos para compuestos relacionados fue de gran utilidad (Berry *et al.*, 1985; Wolf-Rainer *et al.*, 1990; Dellar *et al.*, 1994 y Hinkley *et al.*, 1994) Así, las resonancias en  $\delta_H$  1.0 (correlacionaba en el HETCOR con la señal en  $\delta_c$  29.80) y 0.98 (correlacionaba con la resonancia en  $\delta_c$  21.52 en el

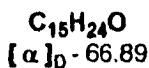
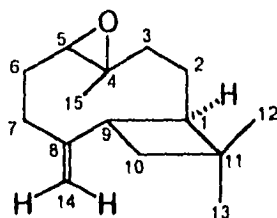
espectro HETCOR) eran fácilmente asignables a H-12 (C-12) y H-13 (C-13), respectivamente. Por otra parte, el metino en  $\delta_c$  50.67, que correlacionaba en el espectro HETCOR con la señal en  $\delta_H$  2.61, se pudo asignar a C-9. El análisis de las correlaciones en el espectro COSY  $^1H$ - $^1H$  (Espectro 3a) indicó que esta última señal mostraba un pico cruzado con los hidrógenos olefínicos, en consecuencia el metileno exocíclico debía encontrarse entre C-8 y C-14 y la función epóxidica entre C-4 y C-5 del núcleo estructural.

Por último, es importante mencionar que los desplazamientos químicos para los hidrógenos H-12 y H-13 y para los carbonos C-12 y C-13 eran consistentes con la fusión *trans* de los anillos de cuatro y nueve carbonos que conforman el núcleo base (Hinkley *et al.*, 1994).

Con base en los resultados analizados anteriormente se estableció la estructura del compuesto (9) como la del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno. Es importante mencionar que este compuesto ha sido aislado de otras fuentes naturales (Berry *et al.*, 1985; Wolf-Rainer *et al.*, 1990; Dellar *et al.*, 1994 y Hinkley *et al.*, 1994) incluyendo las especies *C. aegyptica* y *C. sumatrensis* (Metwally *et al.*, 1989 y Zdero *et al.*, 1990a).

La discusión de la elucidación estructural del producto (92) se realizará en el inciso 4.4 debido a su similitud estructural con el producto (93).

**Tabla 1.** Constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno (**9**).



**IR  $V_{max}$  (KBr)  $cm^{-1}$**  (Espectro 1):  
3068, 2928, 2860, 1630, 962, 890.

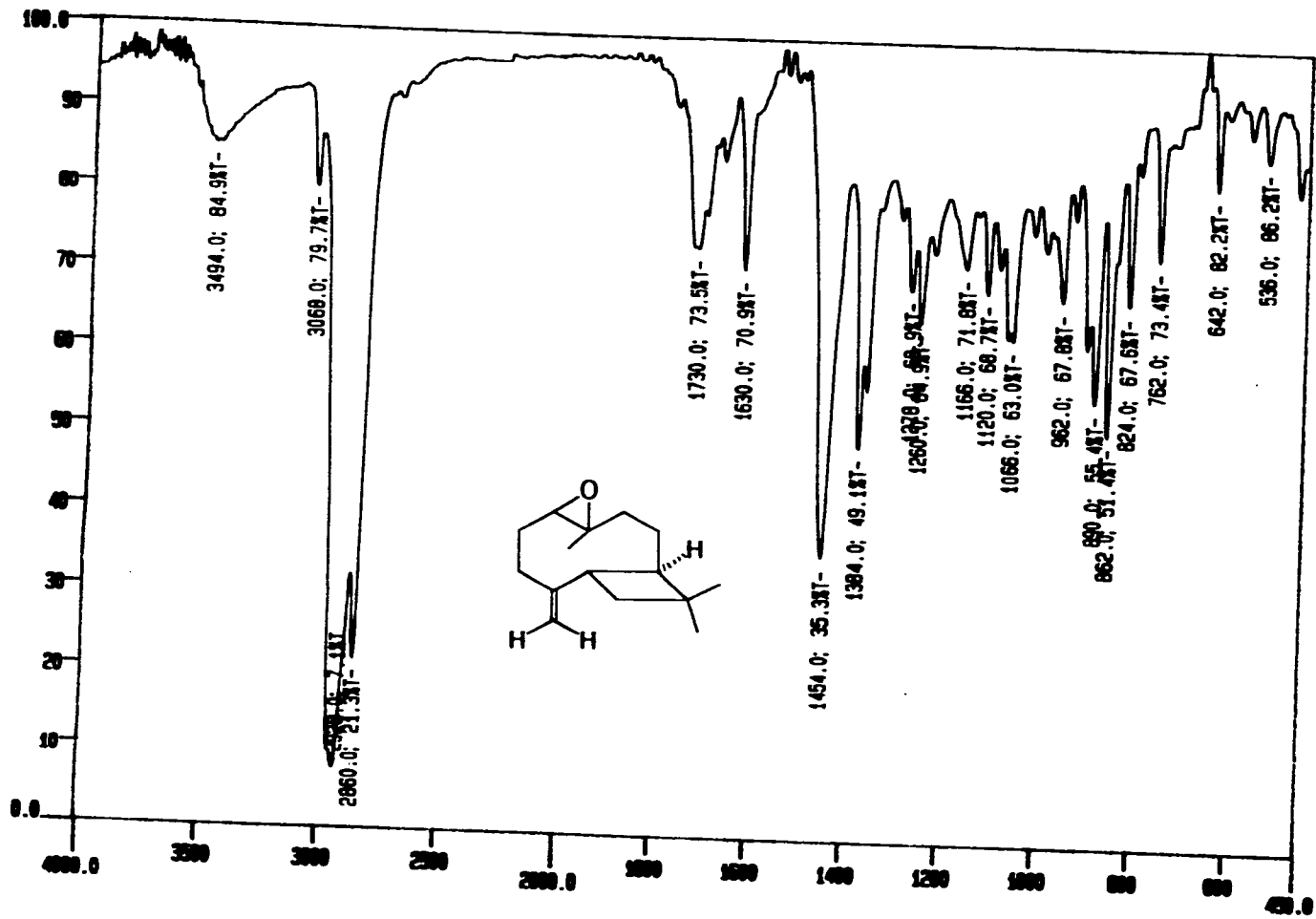
**EMIE,  $m/z$  (Int rel)** (Espectro 2):  
220 ( $M^+$ , (5)), 202 (17), 187 (52), 161 (43), 149 (47), 131 (67), 93 (100), 79 (71),  
55 (57), 41 (83).

**RMN- $^1H$ ,  $\delta$  ( $CDCl_3$ )** (Espectros 3 y 3a):  
2.88, dd,  $J=10.4$  y  $J=4.0$  (H-5); 2.61, m, (H-9); 1.00, s, (H-12); 0.98, s, (H-13);  
4.97, d,  $J=1.6$  (H-14a); 4.86, d,  $J=1.6$  (H-14b); 1.11, s, (H-15).

**RMN- $^{13}C$ ,  $\delta$  ( $CDCl_3$ )** (Espectros 4 y 4a):  
48.67 (C-1), 27.11 (C-2), 39.68 (C-3)\*, 59.80 (C-4), 63.71 (C-5), 29.70 (C-6),  
39.07 (C-7)\*, 151.89 (C-8), 50.67 (C-9), 30.10 (C-10), 33.93 (C-11), 29.80 (C-12),  
21.52 (C-13), 112.77 (C-14), 15.89 (C-15).

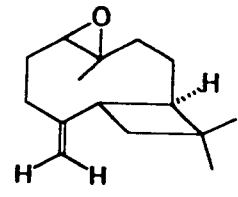
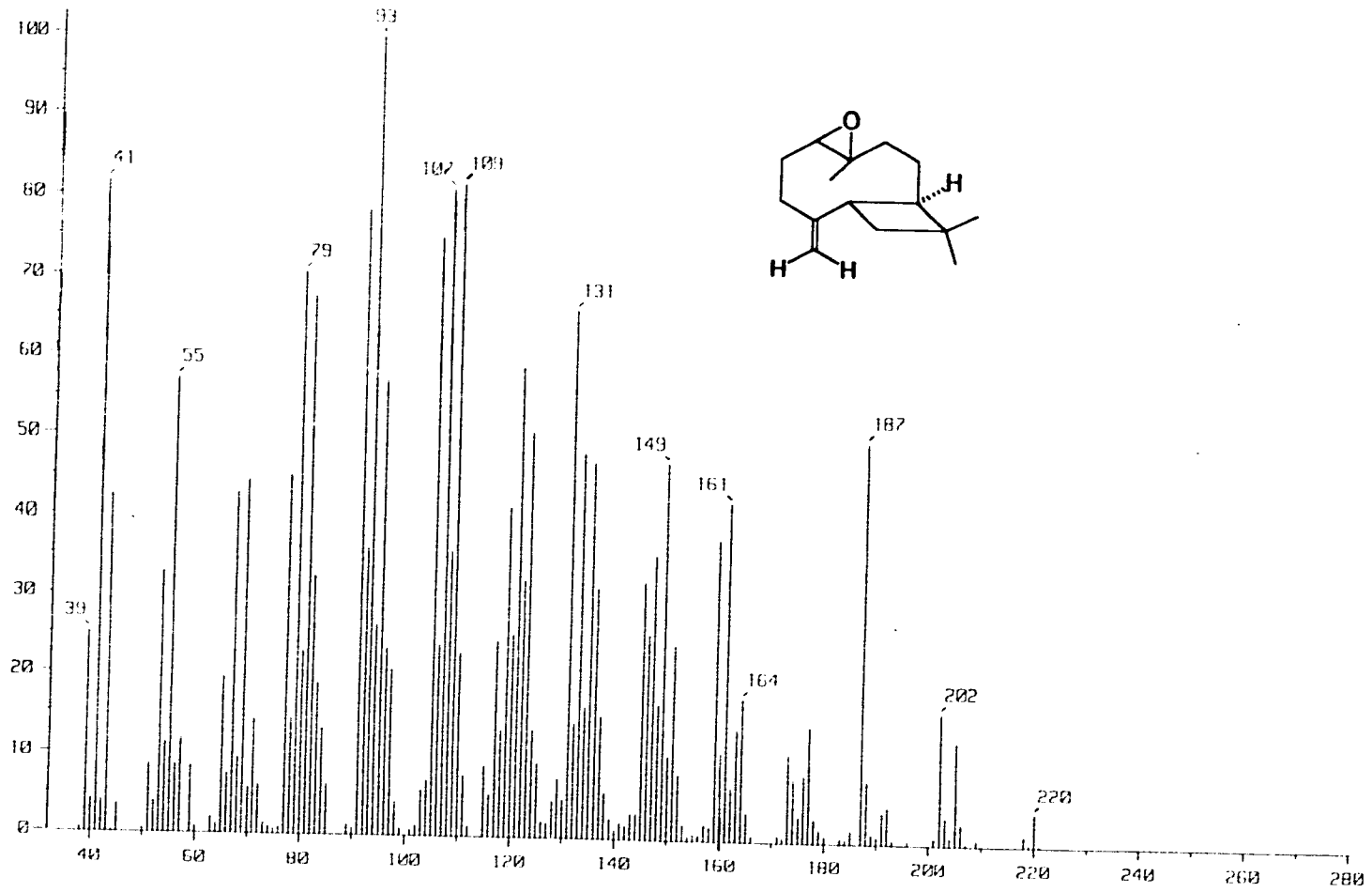
\*Señales intercambiables

J= Constante de acoplamiento expresada en Hz.

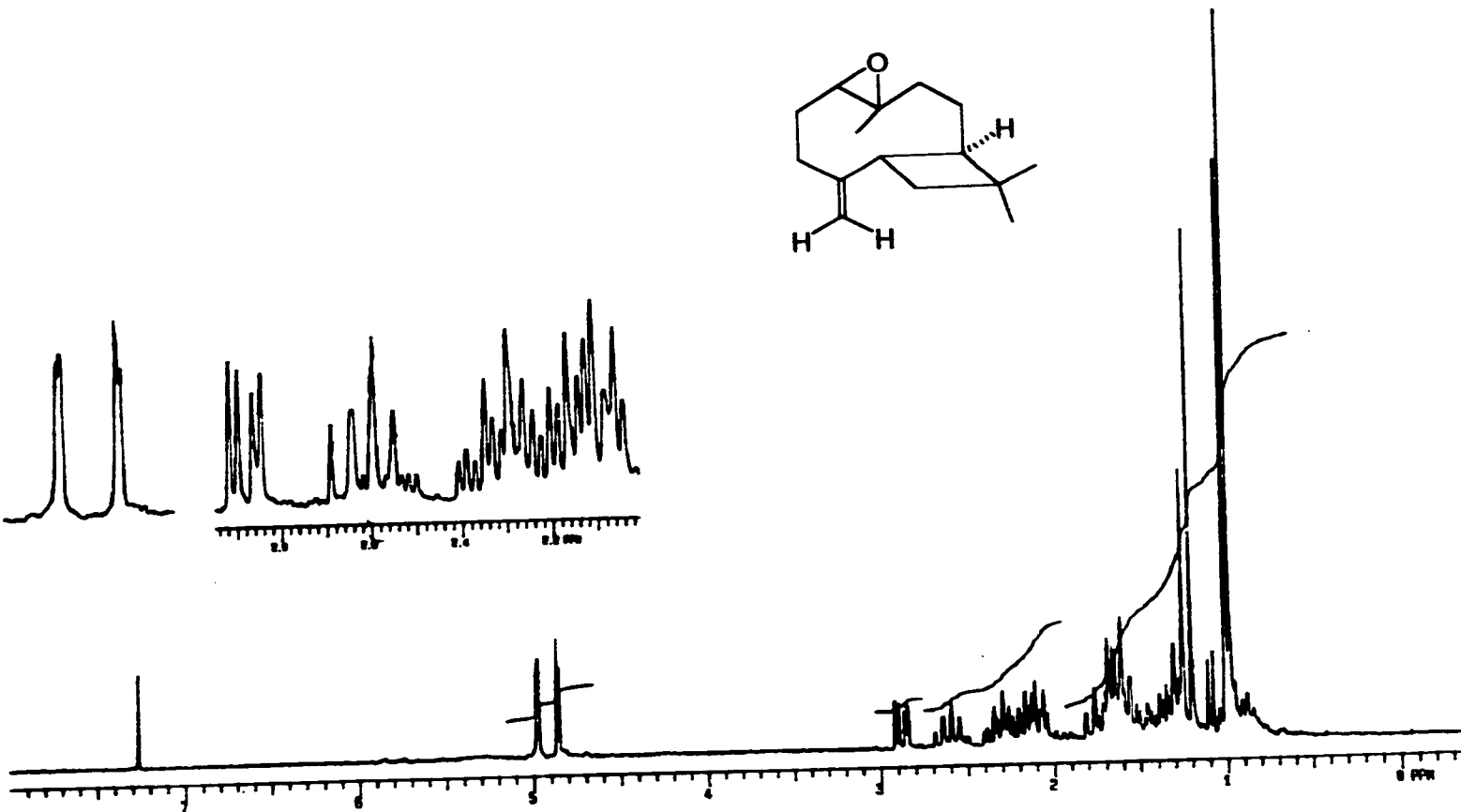
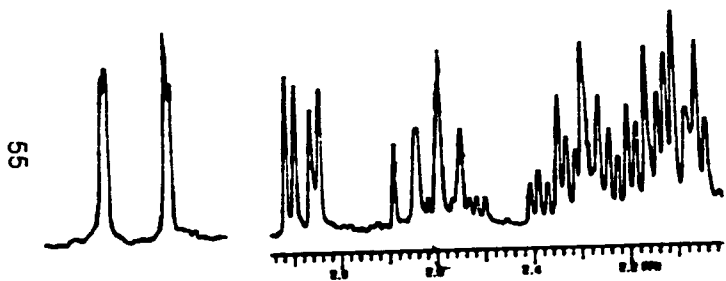
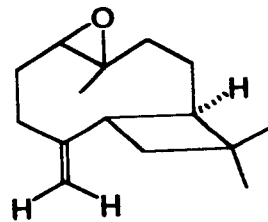


Espectro 1

54

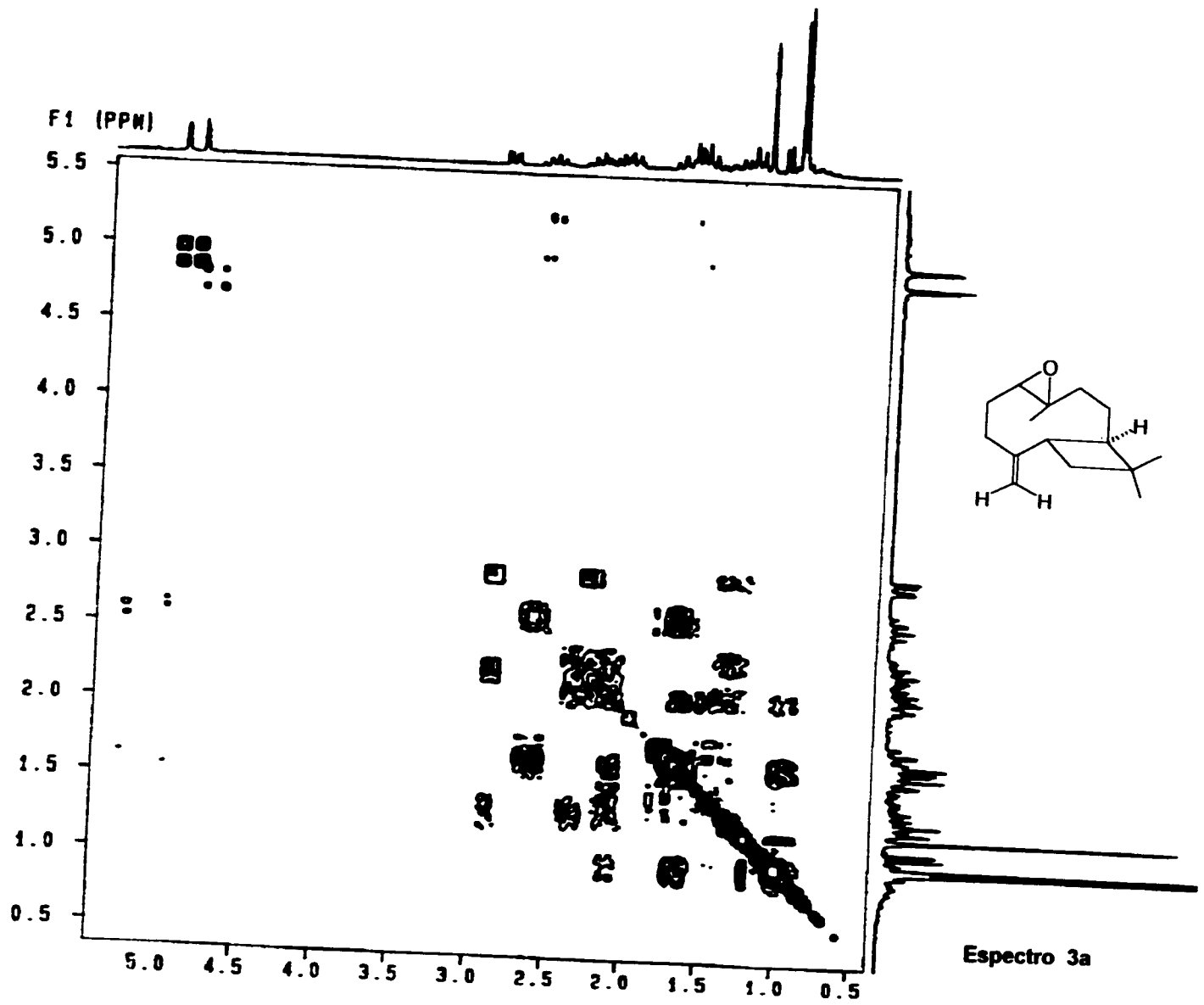


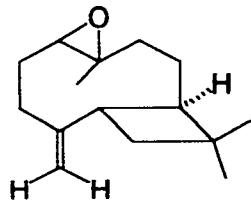
**Espectro 2**



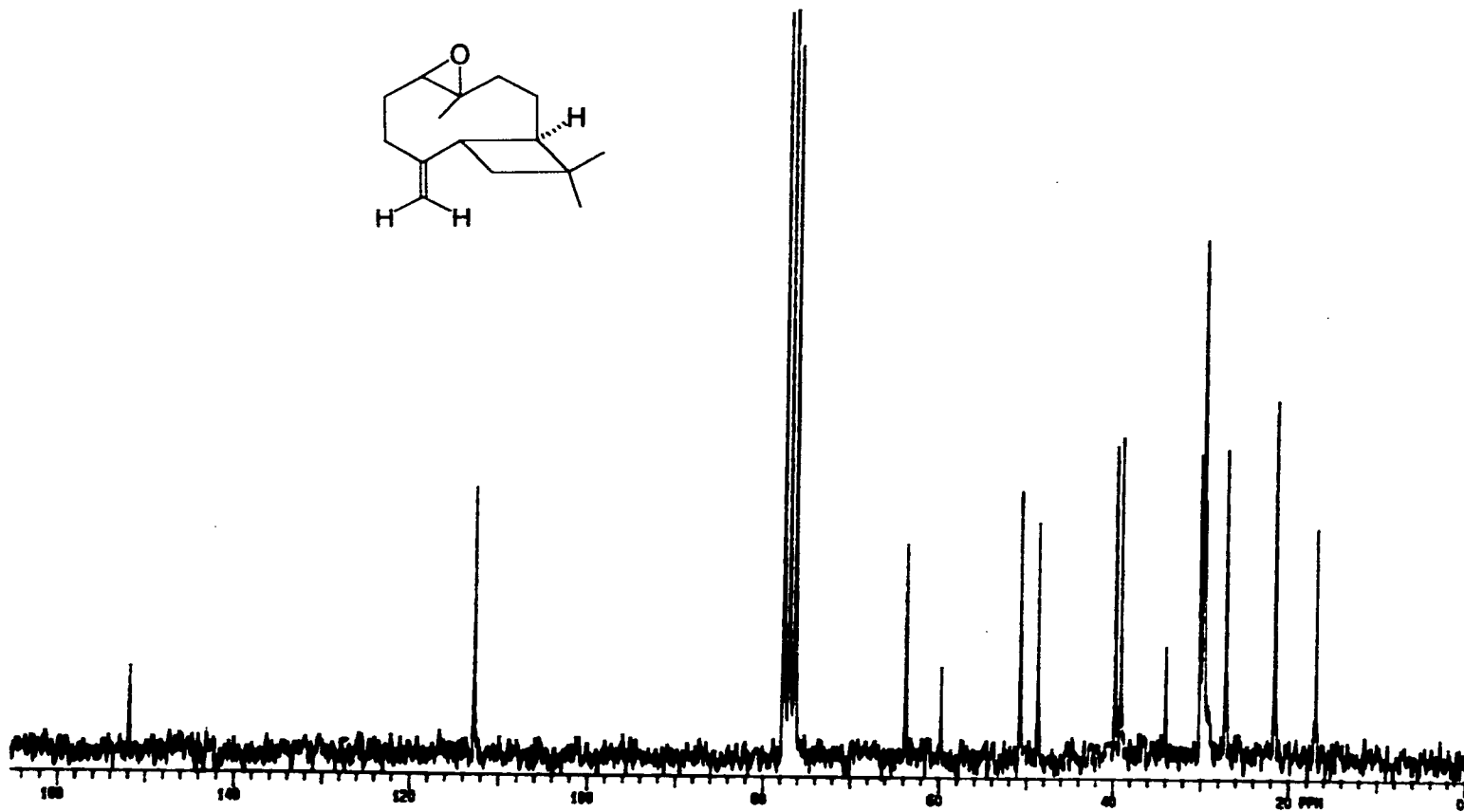
Espectro 3

56



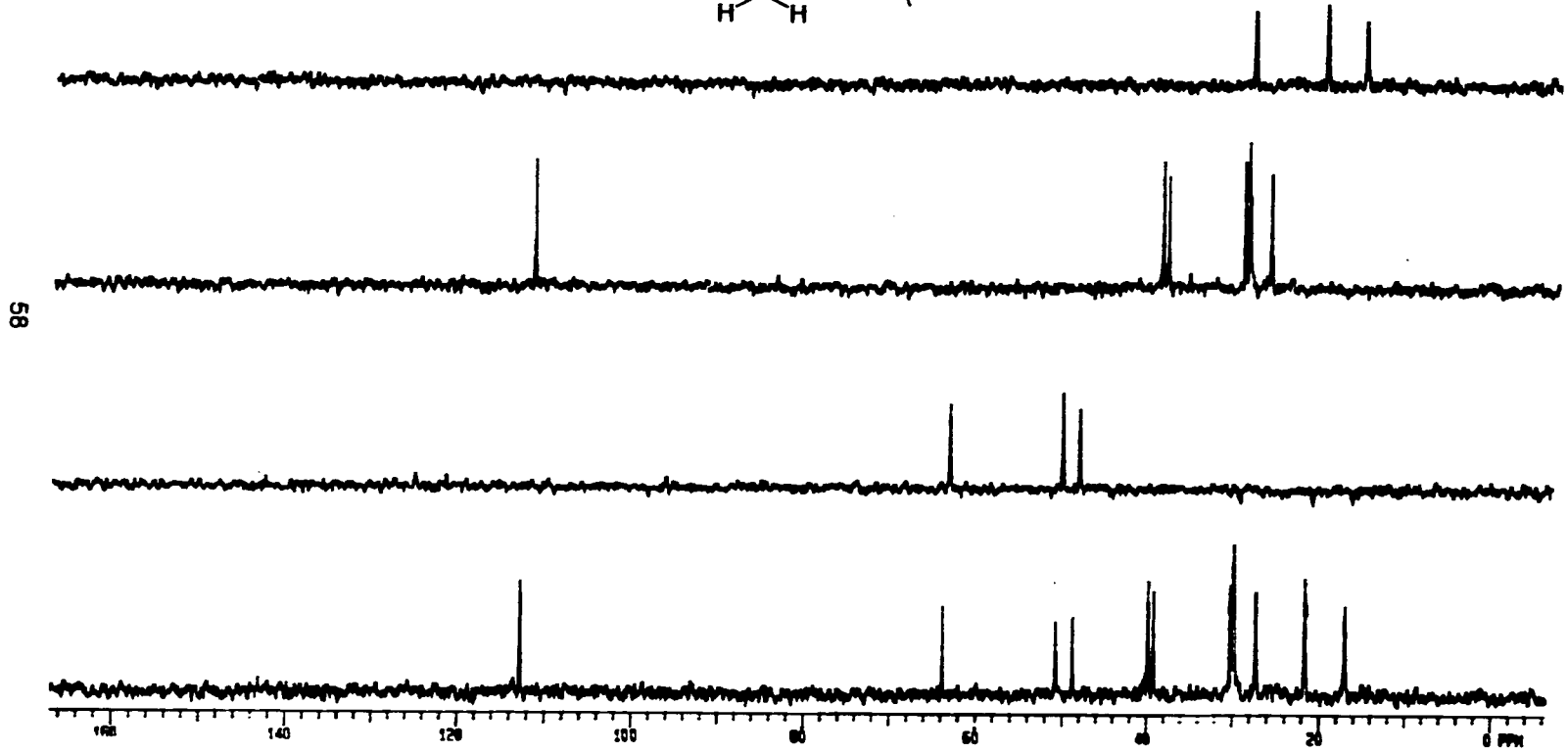
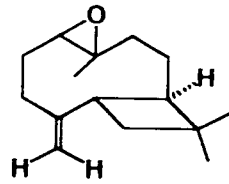


57

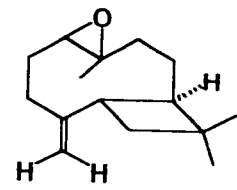
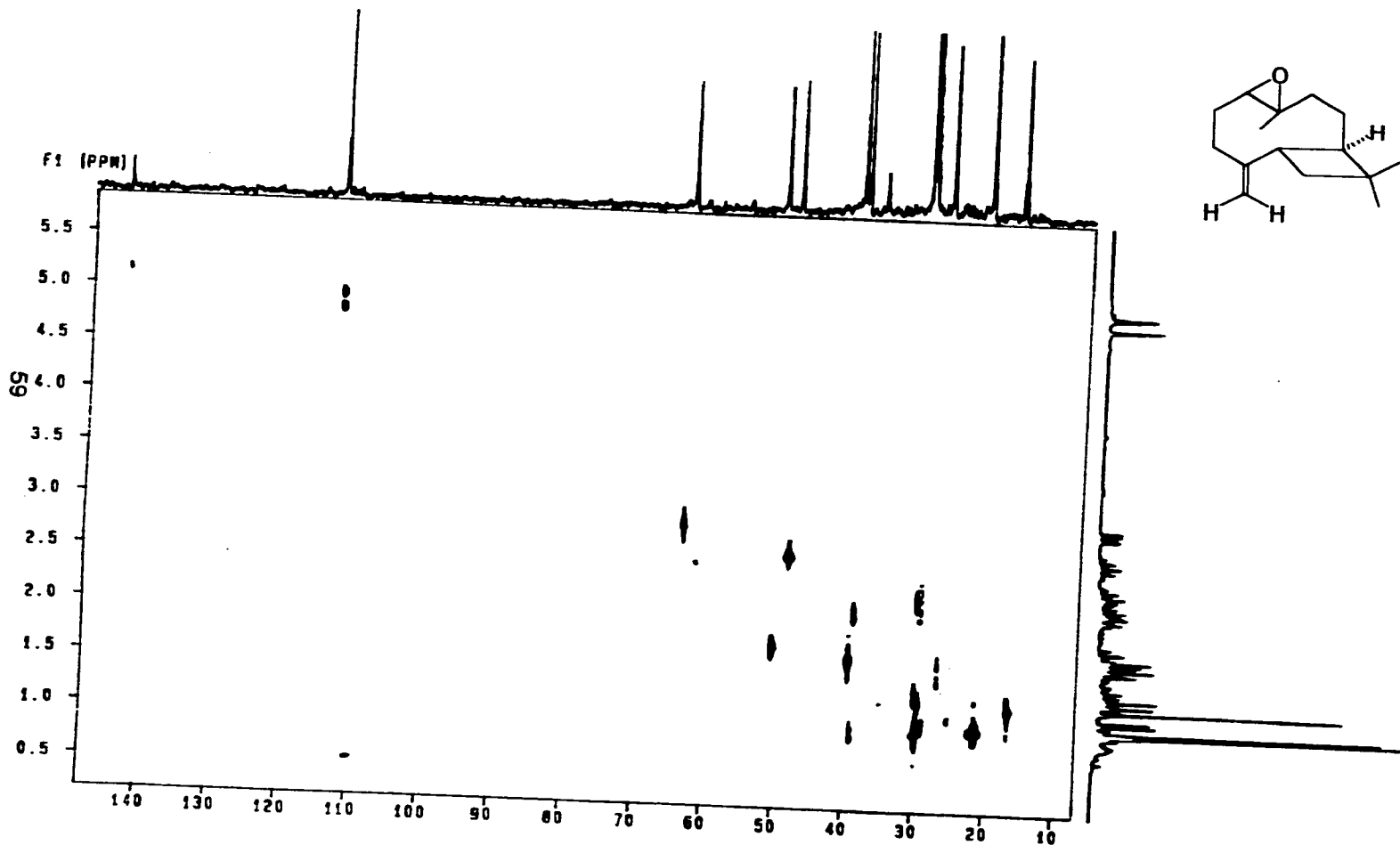


**Espectro 4**





**Espectro 4a**



**Espectro 5**

#### 4.3 Aislamiento y caracterización del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno (**93**) y del 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno (**92**) de la fracción activa C.

Sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada de la fracción secundaria D-VII (Cuadro 9, sección experimental) condujeron al aislamiento del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno (**93**). Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto (**93**) se resumen en la Tabla 2. El compuesto reaccionó en forma positiva frente al reactivo de Liebermann-Burchard. Su espectro de IR (Espectro 6) presentó absorciones para grupos hidroxilos (3380 cm<sup>-1</sup>) y para enlaces C-H (2850 cm<sup>-1</sup>).

La acetilación del producto natural con Ac<sub>2</sub>O/piridina generó el diacetato (**93a**) confirmándose químicamente la naturaleza dicarbinólica del compuesto. Los datos de RMN <sup>1</sup>H de (**93a**) se resumen en la Tabla 3.

El ión molecular observado en el espectro de masas (Espectro 7) mostró una m/z de 442 correspondiente a la fórmula C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>, sugiriendo que el producto (**93**) era un triterpenol. Otros picos importantes se observaron en m/z 424 (M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O), 412 (M<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>OH+H), 411 (M<sup>+</sup>-31), 409 (M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>), 406 (M<sup>+</sup>-2H<sub>2</sub>O), 234, 219, 218, 207, 203, 202, 189, 187 y 133. Los picos a m/z 234, 203, 133 y 189 son característicos para los triterpenos pentacíclicos de los tipos  $\Delta^{12}$ -urseno y  $\Delta^{12}$ -oleaneno (Budzikiewicz *et al.*, 1964). El pico intenso en m/z 203 (pico base) se genera mediante una fragmentación de RetroDiels-Alder (RDA) seguida de una pérdida de 31 unidades de masa a partir del fragmento 234. En la Figura 2 se muestra el patrón de fragmentación del compuesto (**93**).

La información proporcionada por la espectrometría de masas y el análisis detallado de los espectros de RMN <sup>1</sup>H (Espectros 8 y 8a) del producto (**93**) y su

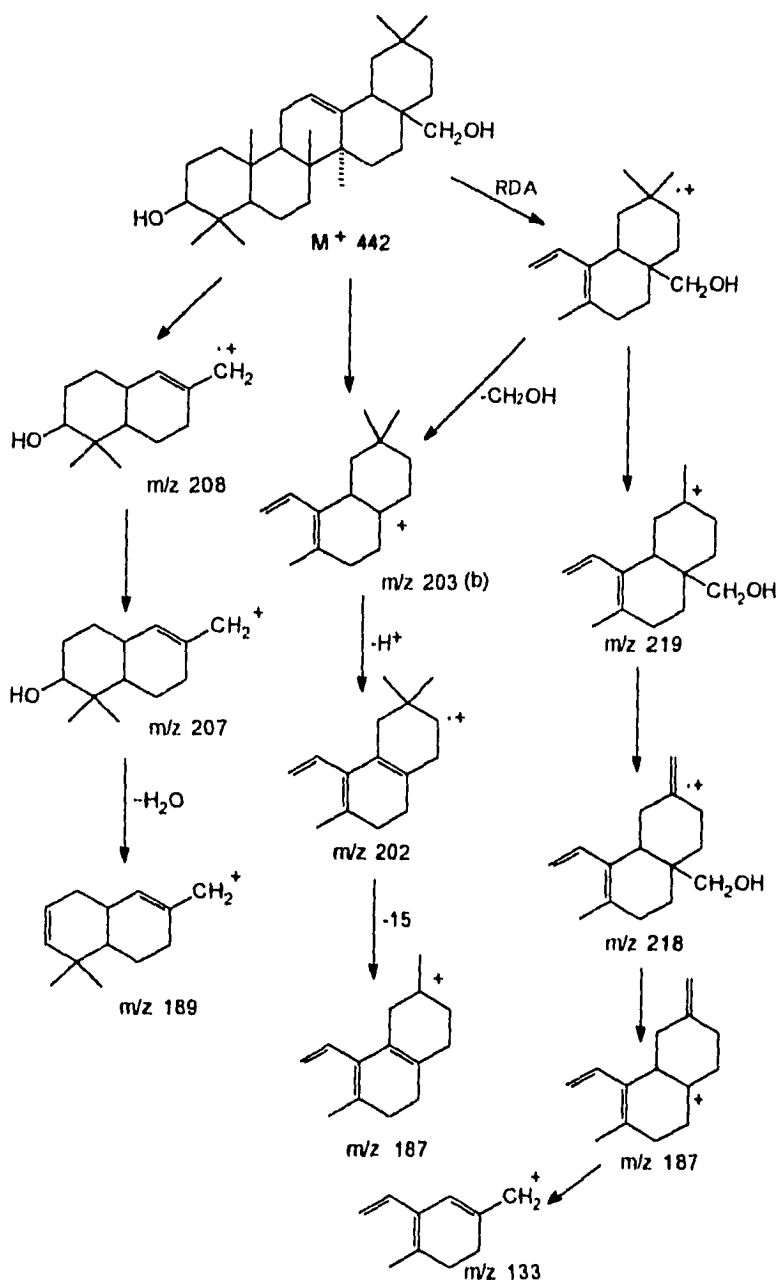


Figura 2. Patrón de fragmentación del 3β-28-dihidroxi-Δ<sup>12</sup>oleaneno.

derivado acetilado (**93a**) (Espectro 10) permitieron comprobar que el producto era un triterpendiol con un núcleo del tipo  $\Delta^{12}$ -oleaneno (Cheung y Williamson 1969; Hui-Zheng *et al.*, 1988; *Inter alia*). Las evidencias más importantes se discuten a continuación.

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  presentaron señales para:

1.- Siete metilos terciarios en  $\delta_{\text{H}}$  1.17, 0.99, 0.94, 0.93, 0.89, 0.87 y 0.79 en el producto natural y en  $\delta_{\text{H}}$  1.25, 1.16, 0.95, 0.88, 0.87 y 0.86 en el derivado acetilado.

2.- Un sistema AB ( $\delta_{\text{H}}$  3.55 y 3.21,  $J=11$  Hz) el cual se desplazó paramagnéticamente en el derivado acetilado (**93a**) [ $\delta_{\text{H}}$  4.03 y 3.70]. Este sistema era congruente con la presencia de un grupo hidroximetileno unido a un centro cuaternario en el producto natural. La pérdida de 31 unidades de masa del ión molecular generó el fragmento  $m/z$  411, el cual es consistente con la presencia de este grupo funcional. Así mismo, la pérdida de 31 unidades de masa del fragmento a  $m/z$  234, resultante de la fragmentación de tipo RDA, indicaba claramente que este grupo se encontraba ubicado sobre el C-17 del núcleo base (Figura 2).

3.- Un multiplete centrado en  $\delta_{\text{H}}$  3.23 el cual se encontraba sobrepuesto en la rama inferior del sistema AB. Este multiplete se desplazó a campo más bajo en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del derivado diacetilado (**93a**), donde se observó como un doblete de doblete ( $J=9$  y 7 Hz) en  $\delta_{\text{H}}$  4.48 y era asignable al hidrógeno base de una función éster del carbinol secundario. Con base en consideraciones biogénicas la función carbinólica en el producto natural debía encontrarse en la posición C-3. Por otra parte, la estereoquímica  $\beta$  del grupo funcional se estableció tomando en cuenta el valor del desplazamiento químico para el H-3 y los valores

de las constantes de acoplamiento de H-3 con los hidrógenos vecinales. Los valores del desplazamiento químico para H-3 observado en el presente trabajo son similares a aquellos descritos previamente para el H-3  $\alpha$  axial de numerosos triterpenos pentacíclicos de los tipos  $\Delta^{12}$ -urseno y  $\Delta^{12}$ -oleaneno (Hui-Zheng *et al.*, 1988; Tomai *et al.*, 1989; Doddrell *et al.*, 1974; Mahato y Pal, 1987; Cheung y Williamson, 1969; *Inter alia*).

En relación a la constante de acoplamiento, un hidrógeno axial ( $3\alpha$ ) en un anillo de seis miembros presenta una interacción de tipo *trans* diaxial con un valor de 9 Hz y un acoplamiento axial-ecuatorial de aproximadamente 7 Hz (Hui-Zheng *et al.*, 1988; Tomai *et al.*, 1989; Doddrell *et al.*, 1974; *inter alia*). El patrón de acoplamiento (dd, J=9, 7 Hz) observado para el H-3 en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del derivado diacetilado (**93a**) era congruente con la disposición  $3\alpha$  del mismo y en consecuencia con la disposición  $3\beta$  del hidroxilo del producto natural (**93**).

4.-Una señal en  $\delta_{\text{H}}$  5.19 (m) que indicaba la presencia de una doble ligadura trisustituída. Este multiplete se observó en el espectro del derivado diacetilado (**93a**) en  $\delta_{\text{H}}$  5.17.

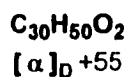
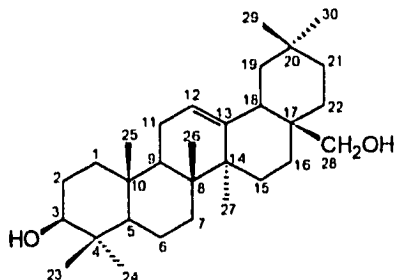
El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Espectro 9) mostró señales para 30 átomos de carbono y presentó el perfil característico de un triterpenoide del tipo  $\Delta^{12}$ -oleaneno (Hui-Zheng *et al.*, 1988; Temai *et al.*, 1989; Doddrell *et al.*, 1974; *inter alia*). La asignación de las resonancias se realizó utilizando como modelo los datos previamente descritos en la literatura fitoquímica para compuestos relacionados (Hui-Zheng *et al.*, 1988; Temai *et al.*, 1989; Doddrell *et al.*, 1974; Mahato y Pal, 1987; *inter alia*).

Es importante destacar que los valores de desplazamiento químico observados para los carbonos C-2, C-4, C-23 y C-24 ( $\delta_{\text{C}}$  27.21, 38.77, 28.08 y

15.54, respectivamente) confirmaron la presencia de grupo hidroxilo  $\beta$  orientado en C-3. Las resonancias para los carbonos C-2, C-4, C-23 y C-24 en los oleanenos con una función carbinólica  $3\beta$  aparecen a campos sensiblemente más bajos que en aquellos isómeros con el hidroxilo  $\alpha$  orientado.

Con base en el análisis anterior la estructura del metabolito (93) se estableció como la del  $3\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno, conocido también como eritrodíol (Hui-Zheng *et al.*, 1988; Temai *et al.*, 1989; Doddrell *et al.*, 1974; Mahato y Pal, 1987; *inter alia*).

**Tabla 2.** Constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno (**93**).



**IR  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$**  (Espectro 6):  
 3380, 2850, 2320, 1464, 1384, 1044, 1004.

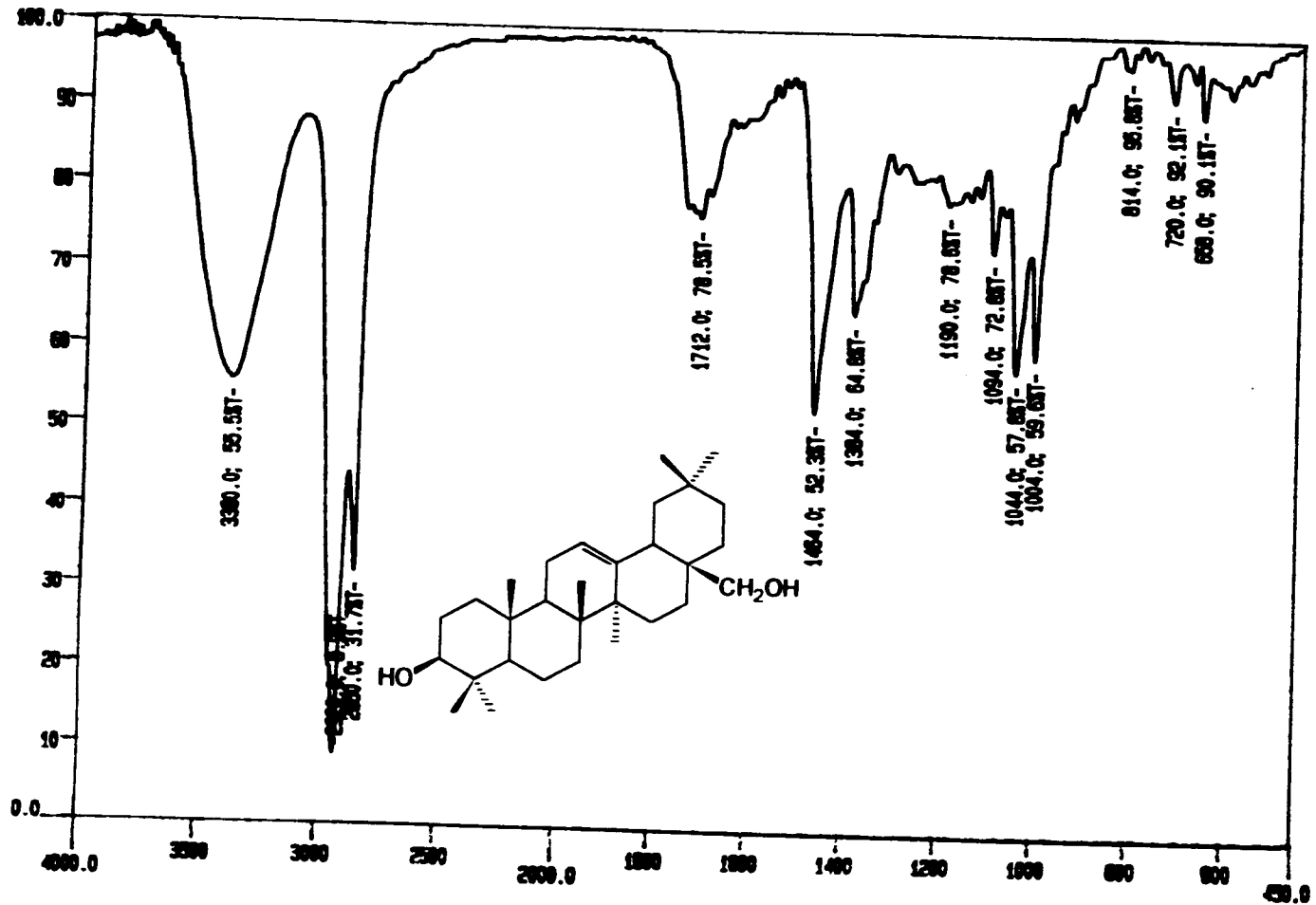
**E M I E,  $m/z$  (int rel)** (Espectro 7):  
 442 [ $M^+$  (23)], 424 [ $M^+$  -H<sub>2</sub>O (8)], 406 [ $M^+$  -2H<sub>2</sub>O (3)], 412 [ $M^+$  -31 +1 (11.5)],  
 411 [ $M^+$  -31 (28)], 409 [ $M^+$  -H<sub>2</sub>O - CH<sub>3</sub> (8)], 234 (13), 219 (3), 218 (3), 208 (3)  
 207 (8), 203 (100), 202 (5), 189 (9), 187 (8), 133 (8).

**RMN-<sup>1</sup>H,  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>)** (Espectro 8 y 8a):  
 5.19, m, J=2.1 (H-12); 3.55, d, J=11 (H-28); 3.21, d, J=11 (H-28'); 3.22, m, J=9 y  
 7 Hz (H-3); 1.18, s, (-CH<sub>3</sub>); 0.99, s, (-CH<sub>3</sub>); 0.94, s, (-CH<sub>3</sub>); 0.93, s, (-CH<sub>3</sub>);  
 0.89, s, (-CH<sub>3</sub>); 0.87, s, (-CH<sub>3</sub>); 0.79, s, (-CH<sub>3</sub>).

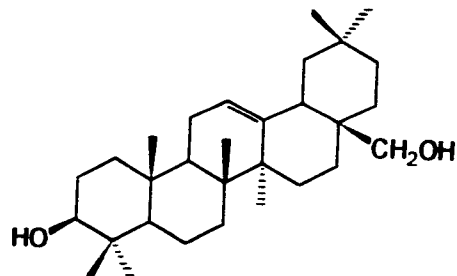
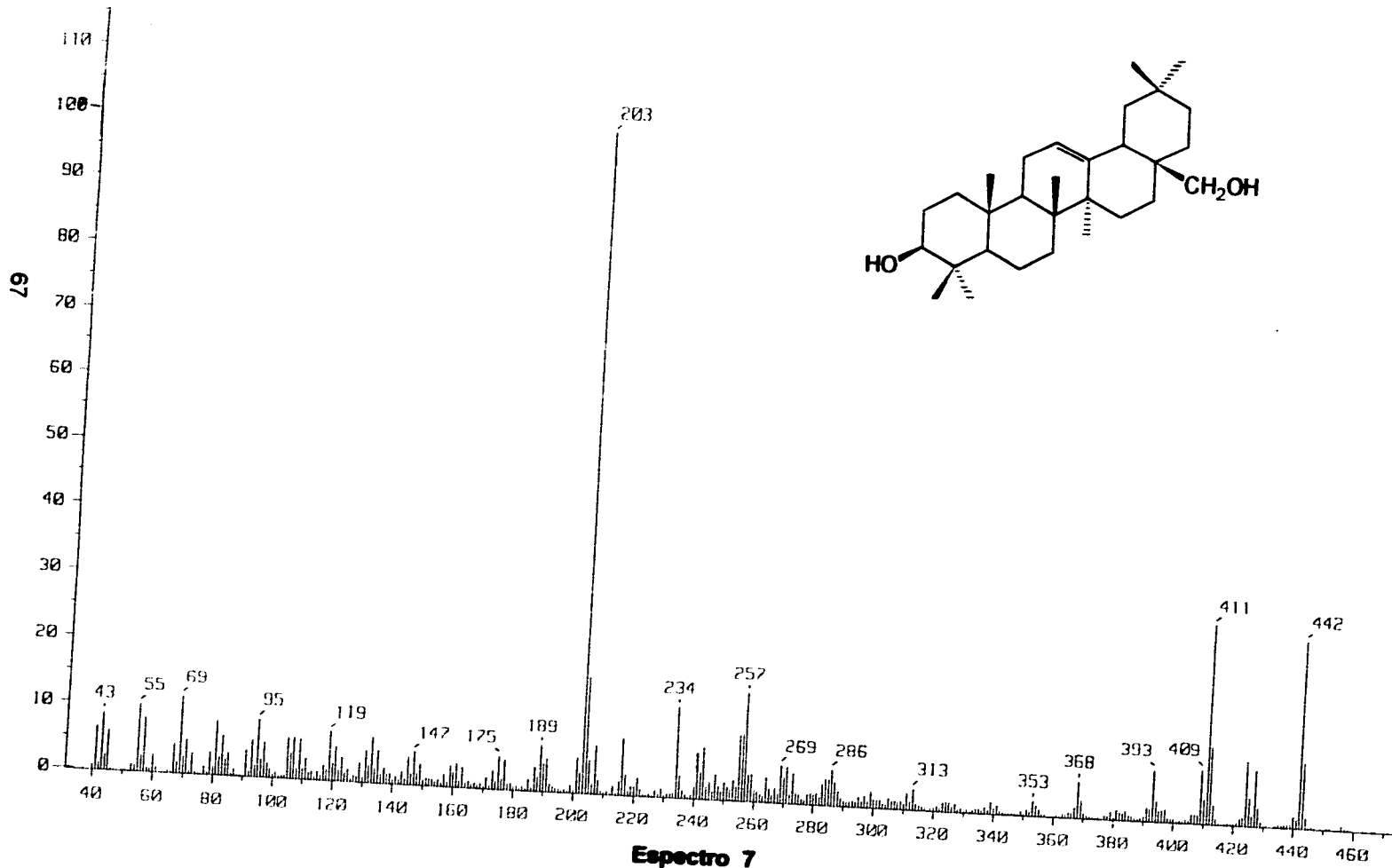
**RMN-<sup>13</sup>C,  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>)** (Espectro 9):  
 38.60 (C-1), 29.21 (C-2), 79.01 (C-3), 38.77 (C-4), 55.19 (C-5), 18.35 (C-6),  
 32.58 (C-7), 39.79 (C-8), 47.59 (C-9), 36.93 (C-10), 23.52 (C-11), 122.40 (C-12),  
 144.23 (C-13), 41.73 (C-14), 25.55 (C-15), 22.02 (C-16), 36.93 (C-17), 42.35 (C-  
 18), 46.48 (C-19), 31.02 (C-20), 34.09 (C-21), 30.94 (C-22), 28.08 (C-23),  
 15.54 (C-24), 15.49 (C-25), 16.72 (C-26), 25.92 (C-27), 69.69 (C-28), 33.17 (C-  
 29), 23.57 (C-30).

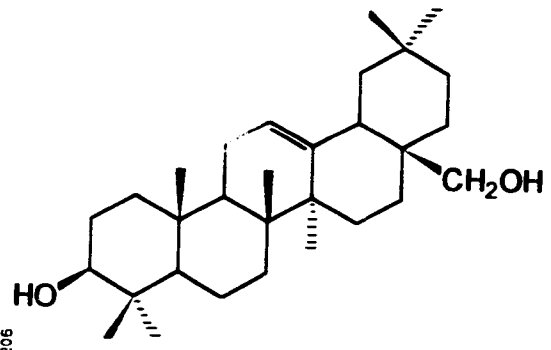
J= Constante de acoplamiento expresada en Hz.



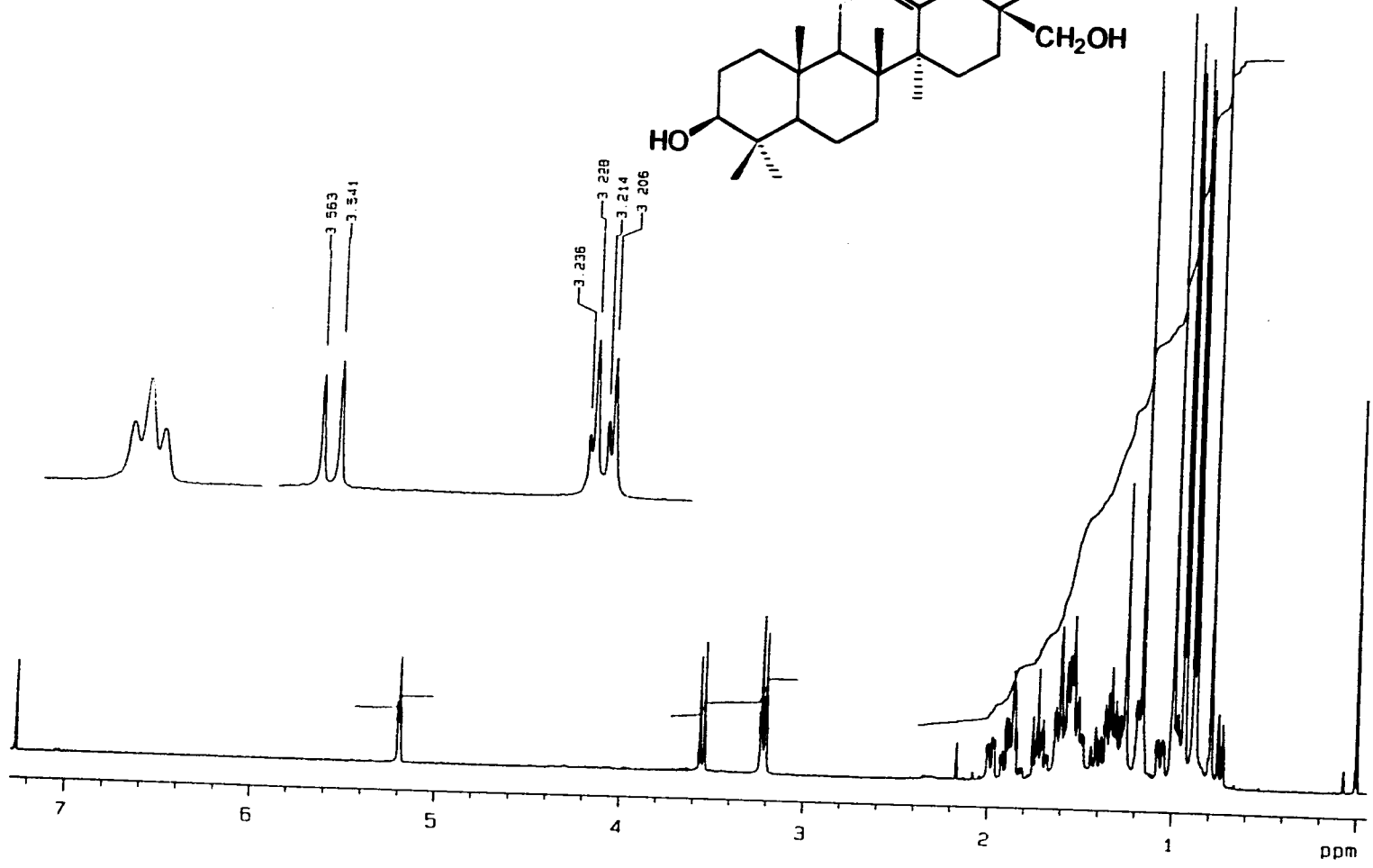


Espectro 6



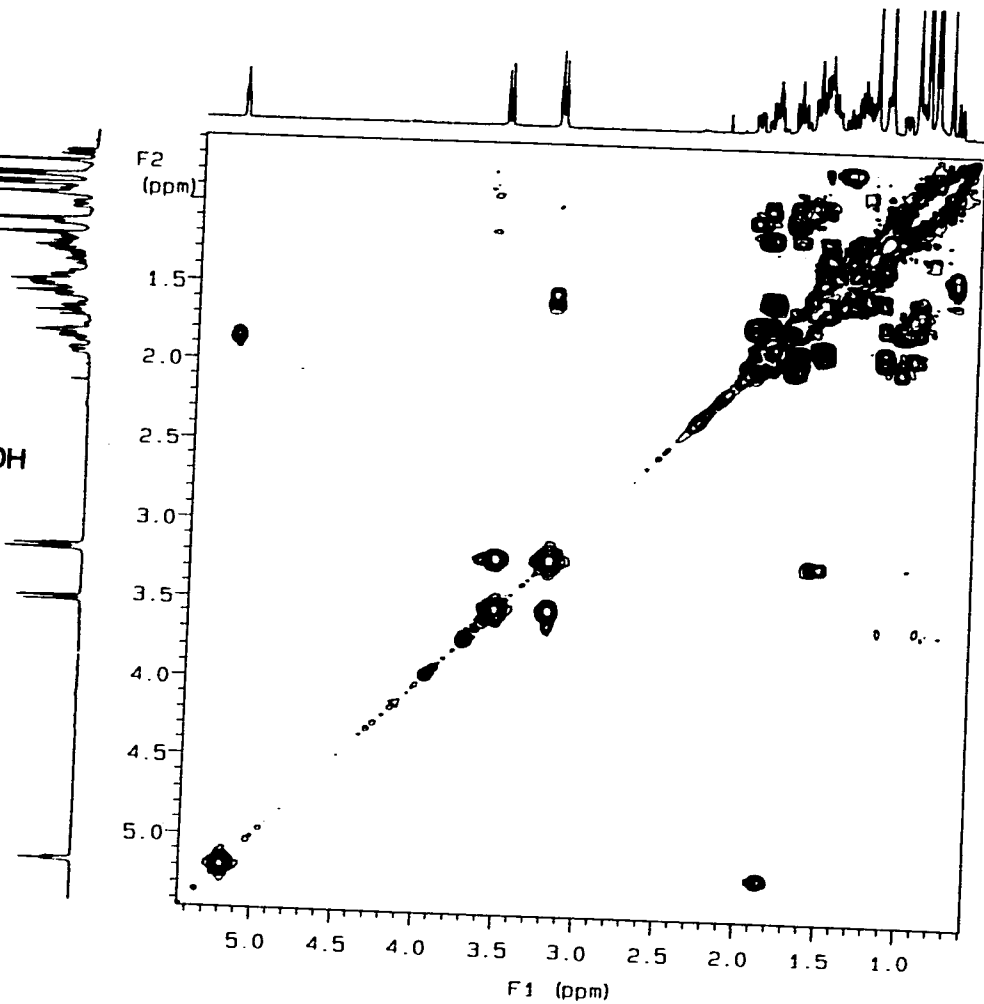
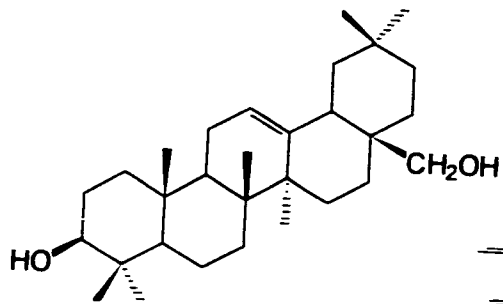


89

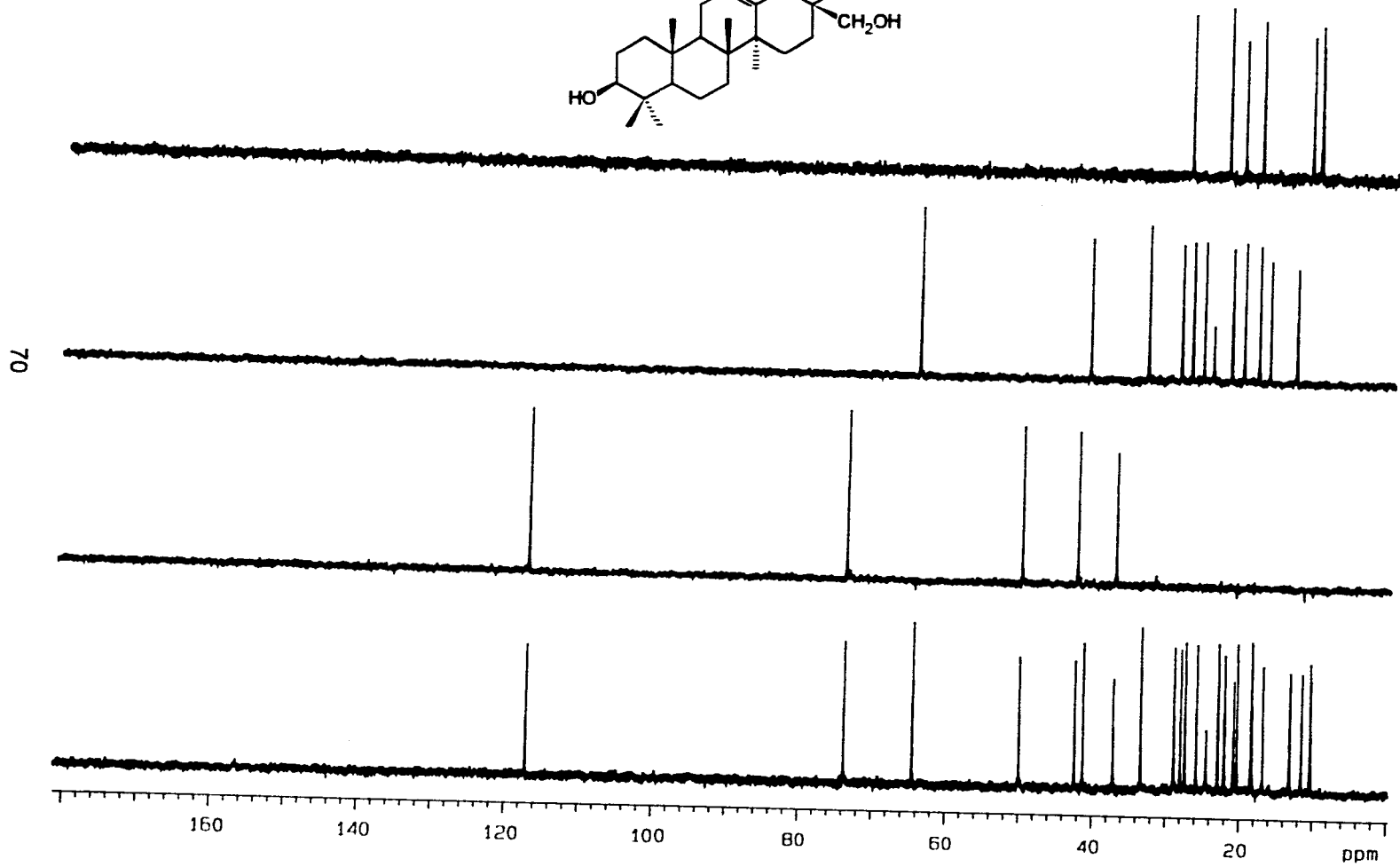
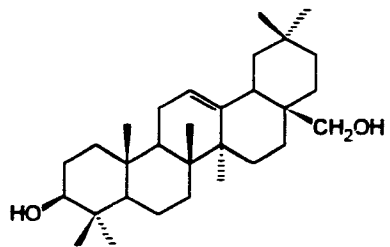


**Espectro 8**

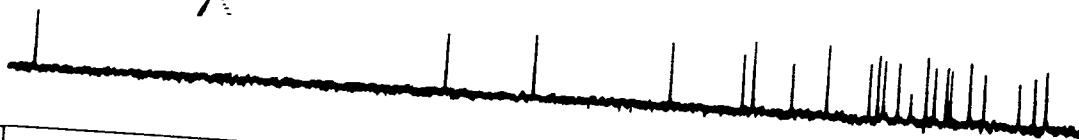
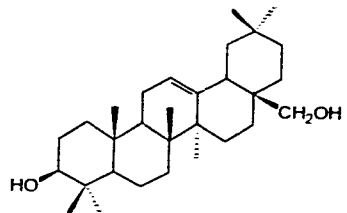
69



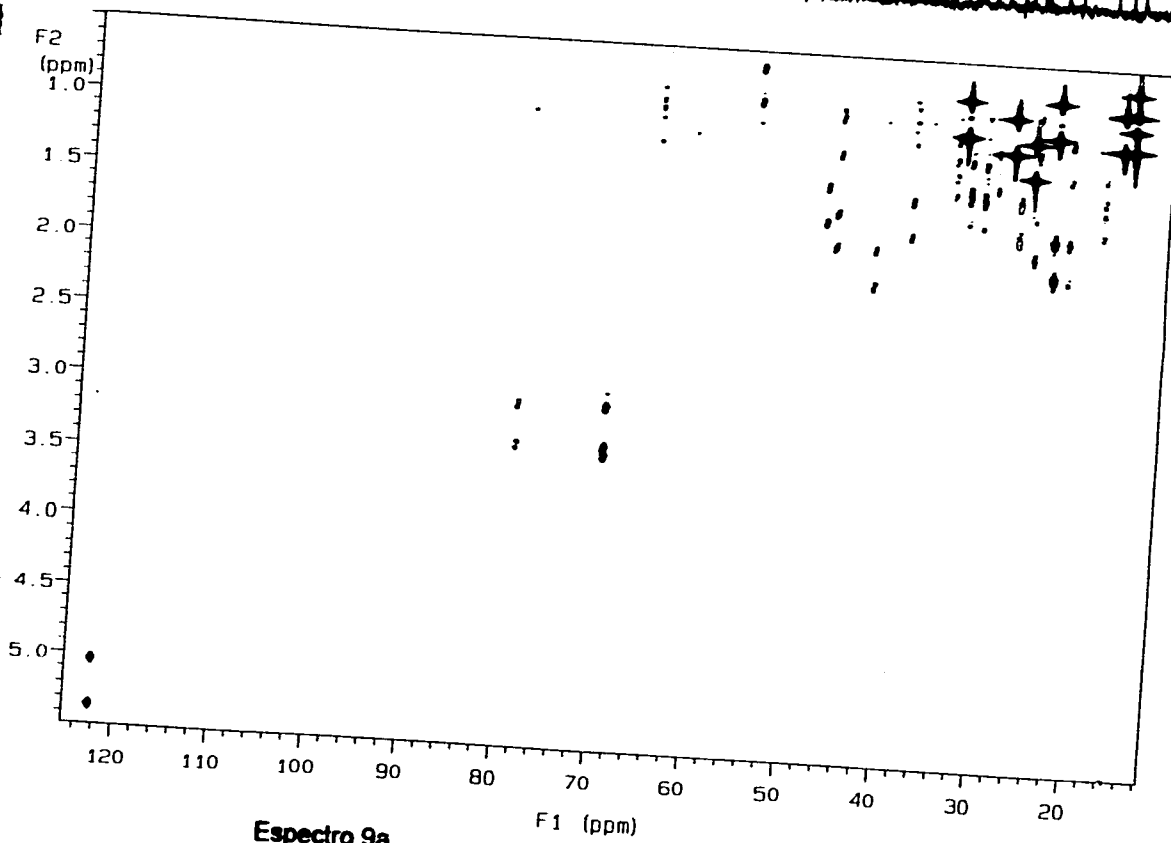
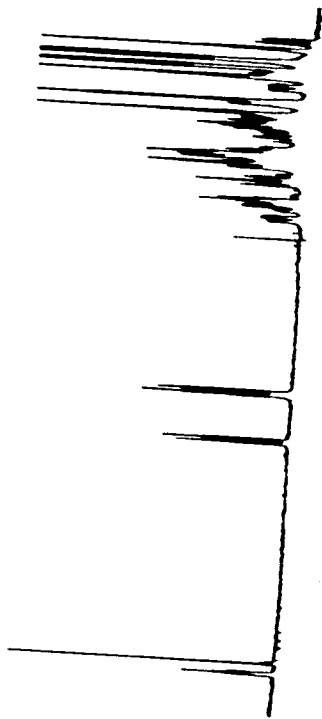
Espectro 8a



**Espectro 9**

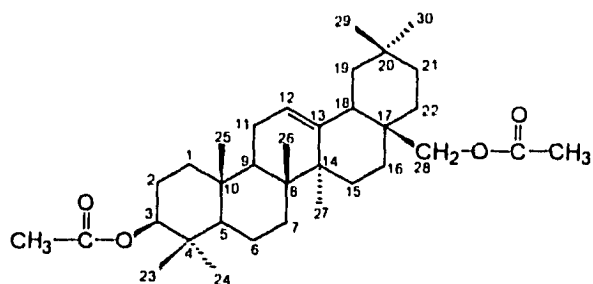


71



Espectro 9a

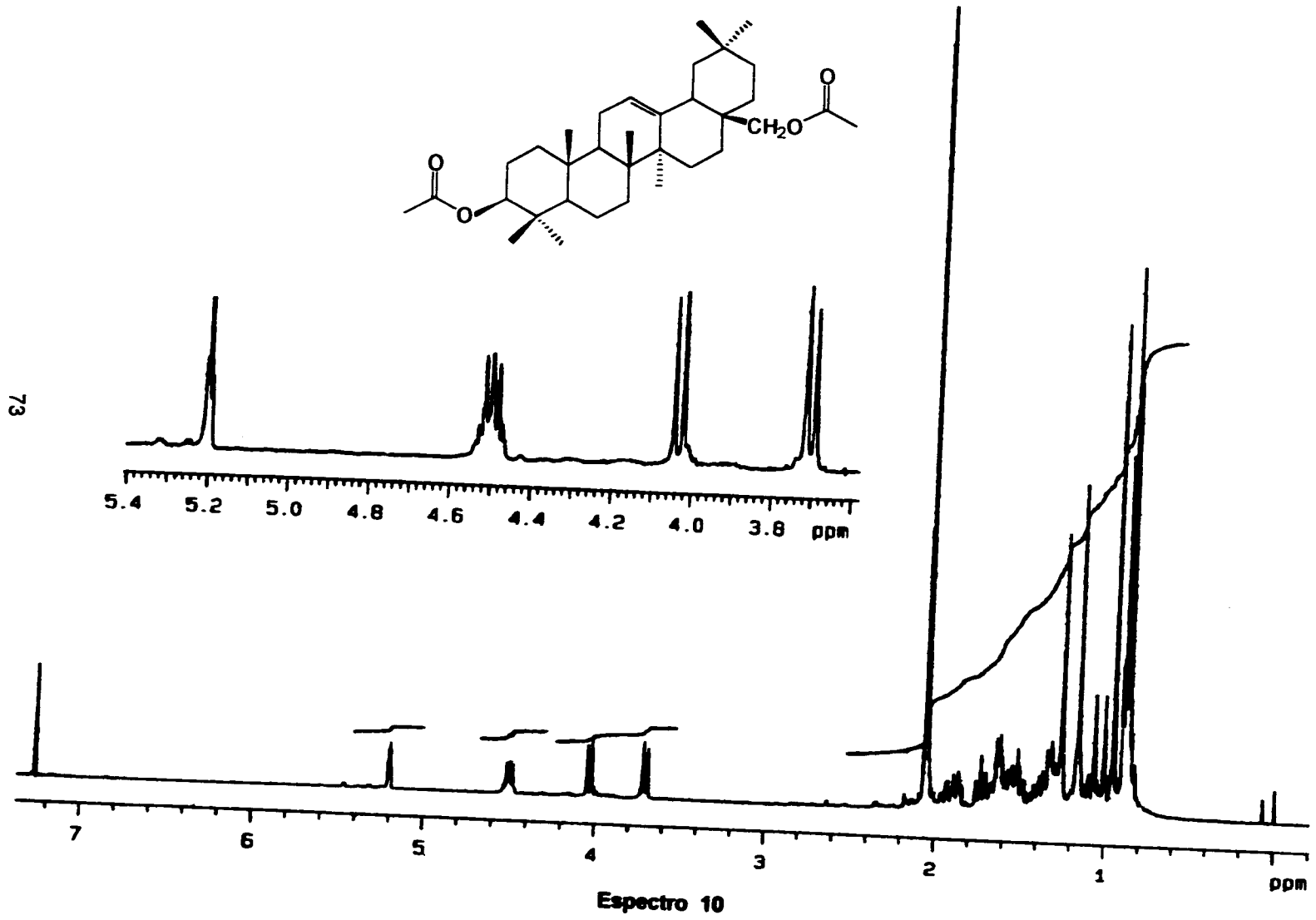
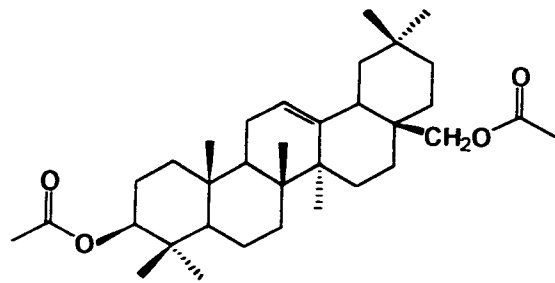
**Tabla 3.** Resonancia Magnética Nuclear Protónica del derivado acetilado del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno (**93a**).



**RMN-<sup>1</sup>H,  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>) (Espectro 10):**

5.17, m, J=3.5 (H-12); 4.98, m, (H-3); 4.03, d, J=11 (H-28); 3.70, d, J=11 (H-28');  
 2.07, s, (CH<sub>3</sub>-C=O); 1.25, s, (-CH<sub>3</sub>); 1.57, s, (-CH<sub>3</sub>); 0.96, s, (-CH<sub>3</sub>); 0.89, s, (-  
 CH<sub>3</sub>); 0.88, s, (-CH<sub>3</sub>); 0.87, s, (-CH<sub>3</sub>); 0.86, s, (-CH<sub>3</sub>).

J= Constante de acoplamiento expresada en Hz.





Como se especificó en el inciso 4.2, de la fracción primaria activa C (Cuadro 6, sección experimental), se aisló también el compuesto 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno (**92**), estructuralmente relacionado con el producto (**93**). Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas se resumen en la Tabla 4.

El espectro de IR (Espectro 11) del producto (**92**) mostró señales para hidroxilo (3448 cm<sup>-1</sup>) y para grupo carbonilo de éster (1732 cm<sup>-1</sup>). Al igual que el compuesto (**93**) reaccionó positivamente frente al reactivo de Lieberman-Burchard (inciso 14, sección experimental). Sin embargo, el compuesto (**92**) formó el derivado monoacetilado (**92a**) por tratamiento con anhídrido acético y piridina, confirmándose químicamente la presencia de una función alcohólica, en lugar de dos como en el caso del producto (**93**). Las constantes de RMN <sup>1</sup>H del derivado (**92a**) se resumen en la Tabla 5.

El espectro de masas (Espectro 12) en su modalidad de Bombardeo Rápido de Átomos (FAB), utilizando como matriz alcohol nitrobenílico (nba), permitió determinar la fórmula molecular de C<sub>43</sub>H<sub>74</sub>O<sub>3</sub>, la cual permitía siete insaturaciones, una más que las del producto (**93**) y que fácilmente podía atribuirse al carbonilo del éster evidenciado en el espectro IR.

Los espectros de RMN <sup>1</sup>H (Espectro 13 y 14) del compuesto (**92**) y del derivado monoacetilado (**92a**) presentaron gran similitud con los de (**93**) y (**93a**) y sugirieron que este producto era también un  $\Delta^{12}$ -oleaneno.

Las semejanzas más importantes de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de los productos (**92**) y (**92a**) con las de los compuestos (**93**) y (**93a**) fueron las siguientes:

- 1.- La presencia de un sistema AB ( $\delta_H$  3.55 y 3.2, J=11 Hz). Al igual que

para el producto (**93**) este sistema permitió comprobar la presencia del grupo hidroximetileno unido a un centro cuaternario. En el derivado acetilado (**92a**) este sistema se desplazó a campo más bajo ( $\delta_H$  4.03 y 3.70).

2.- En  $\delta_H$  5.19 se observó la señal que indicaba la presencia de una doble ligadura trisustituída entre C-12 y C-13. En el derivado acetilado la señal correspondiente se encontró en  $\delta_H$  5.2.

3.- Por último, los espectros de (**92**) y (**92a**) presentaron señales para ocho metilos en la región comprendida entre  $\delta_H$  0.8 y 1.2.

Por otro lado, las diferencias más importantes entre los dos grupos espectros fueron las siguientes:

1.- En los espectros de (**92**) y (**92a**) se apreció un multiplete ( $J=7.6$  y  $8.8$  Hz) en  $\delta_H$  4.49 asignable a H-3. Esta señal se encontraba desplazada paramagnéticamente en relación a la señal de H-3 del compuesto (**93**). Esta última observación era consistente con la presencia de una función éster en C-3 en el producto natural (**92**).

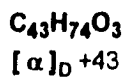
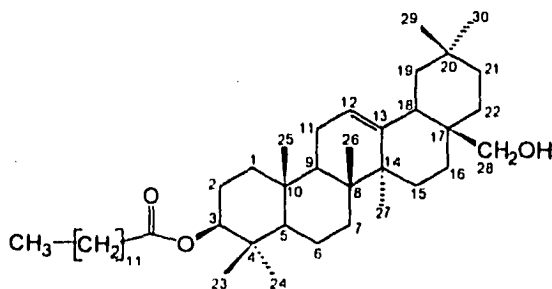
2.- Los espectros de (**92**) y (**92a**) presentaron en  $\delta_H$  2.29 un triplete ( $J=7.4$  Hz) asignable al metileno alfa al carbonilo de la función éster. De manera adicional, se observó en los espectros una señal intensa en  $\delta_H$  1.25 atribuible a la presencia de varios metilenos en las moléculas.

La saponificación del compuesto (**92**) (inciso 13, sección experimental) permitió obtener un producto idéntico en todos sus aspectos al compuesto 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno (**93**). Esta reacción confirmó químicamente la naturaleza éster del producto natural previamente evidenciada por los espectros de IR y de RMN<sup>1</sup>H. La porción ácida del éster se caracterizó como el ácido tridecanoico considerando que el espectro de masas presentó a  $m/z$  425 un

fragmento generado por la pérdida de 214 unidades de masa del  $M^{+}+1$  ( $m/z$  639). Esta pérdida era asignable a la porción aciloxi del producto natural y era consistente con un ácido saturado de 13 átomos de carbono. Otros picos importantes del espectro de masas se observaron en  $m/z$  393, 203, 113, 99, 85, 71, 57 y 43; el segundo de ellos correspondió al fragmento b de la Figura 2 y es consistente con el 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno como la función alcohólica del éster (**93**). Con la excepción de los picos en  $m/z$  393 (425-CH<sub>2</sub>OH) y 203 los otros arriba indicados correspondían al patrón de fragmentación característico de compuestos con cadenas alquílicas lineales (Silverstein *et al.*, 1991).

Con base en las evidencias presentadas el compuesto se caracterizó como el 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno (**92**), el cual representa un nuevo producto natural.

**Tabla 4.** Constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas del 3β- tridecanoiloxi-28-hidroxi-Δ<sup>12</sup>-oleaneno (**92**).

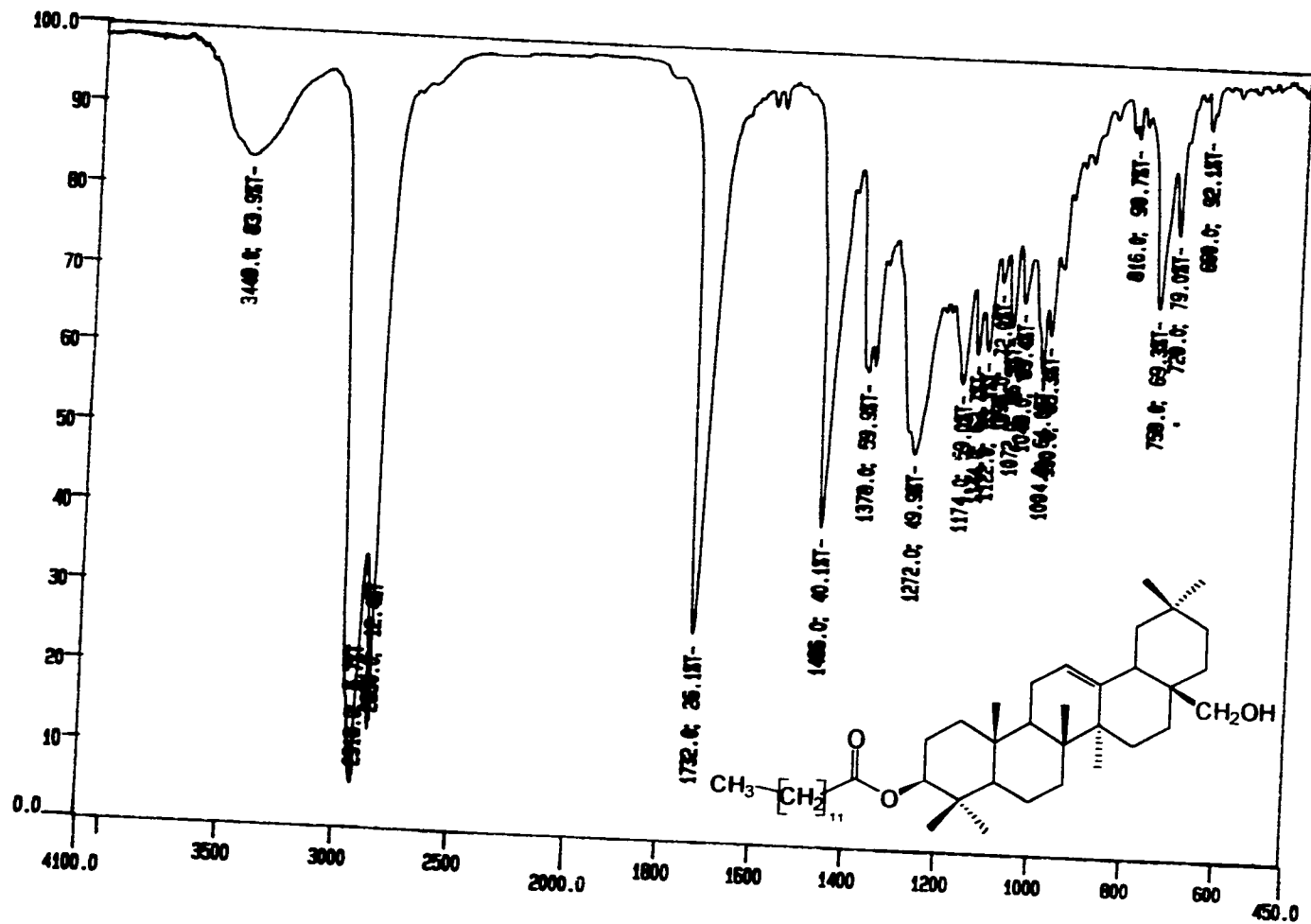


**IR V<sub>max</sub> (KBr) cm<sup>-1</sup>** (Espectro 11):  
 3448, 2918, 2850, 1732, 1466, 1272, 758.

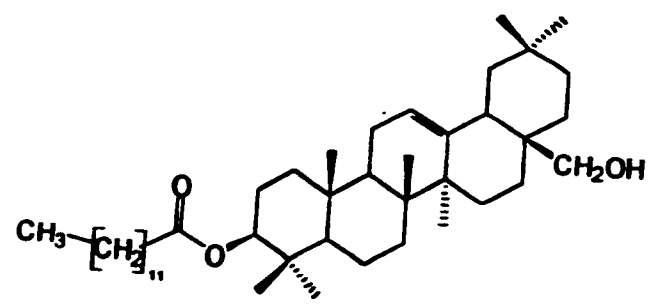
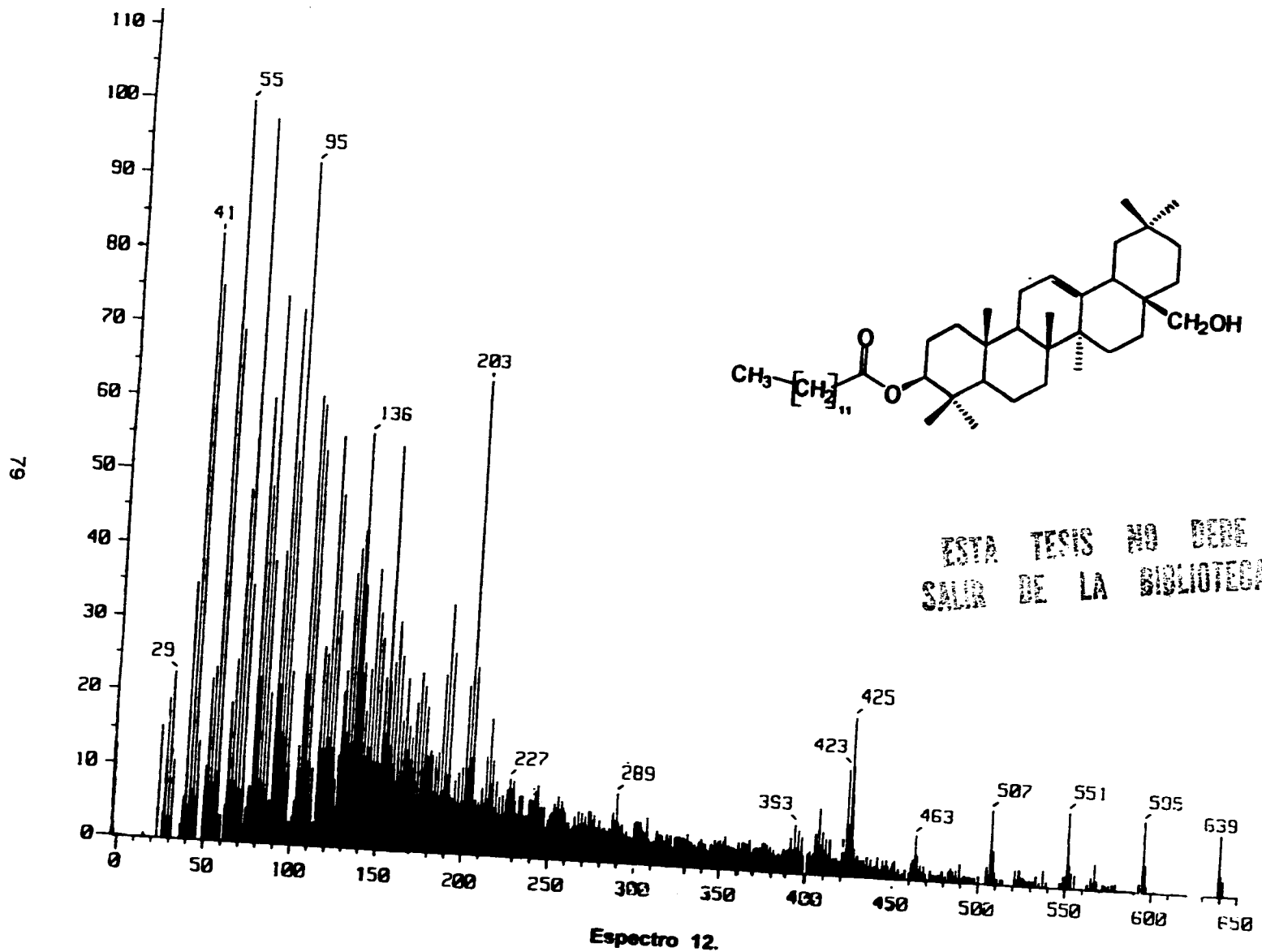
**EMFAB, m/z (int rel)** (Espectro 12):  
 639 [M<sup>+</sup>+1 (6)]; 425 (22); 393 (6); 203 (65); 189 (34); 113 (10); 99 (3); 85 (21);  
 71 (32); 57 (69); 55 (100) y 43 (75).

**RMN-<sup>1</sup>H, δ (CDCl<sub>3</sub>)** (Espectro 13):  
 5.19, t, J=3.6 (H-12); 4.49, dd, J=7.6 y 8.8 (H-3); 3.55, d, J=11 (H-28).  
 3.22, d, J=11 (H-28'); 2.23, t, J=7.4 (H-2''); 1.25, sa, (H-3'' H-12''); 1.16, s;  
 0.96, s; 0.94, s; 0.88, s; 0.87, s

J= Constante de acoplamiento expresada en Hz.

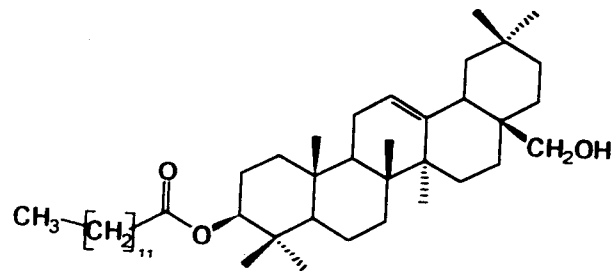


Espectro 11

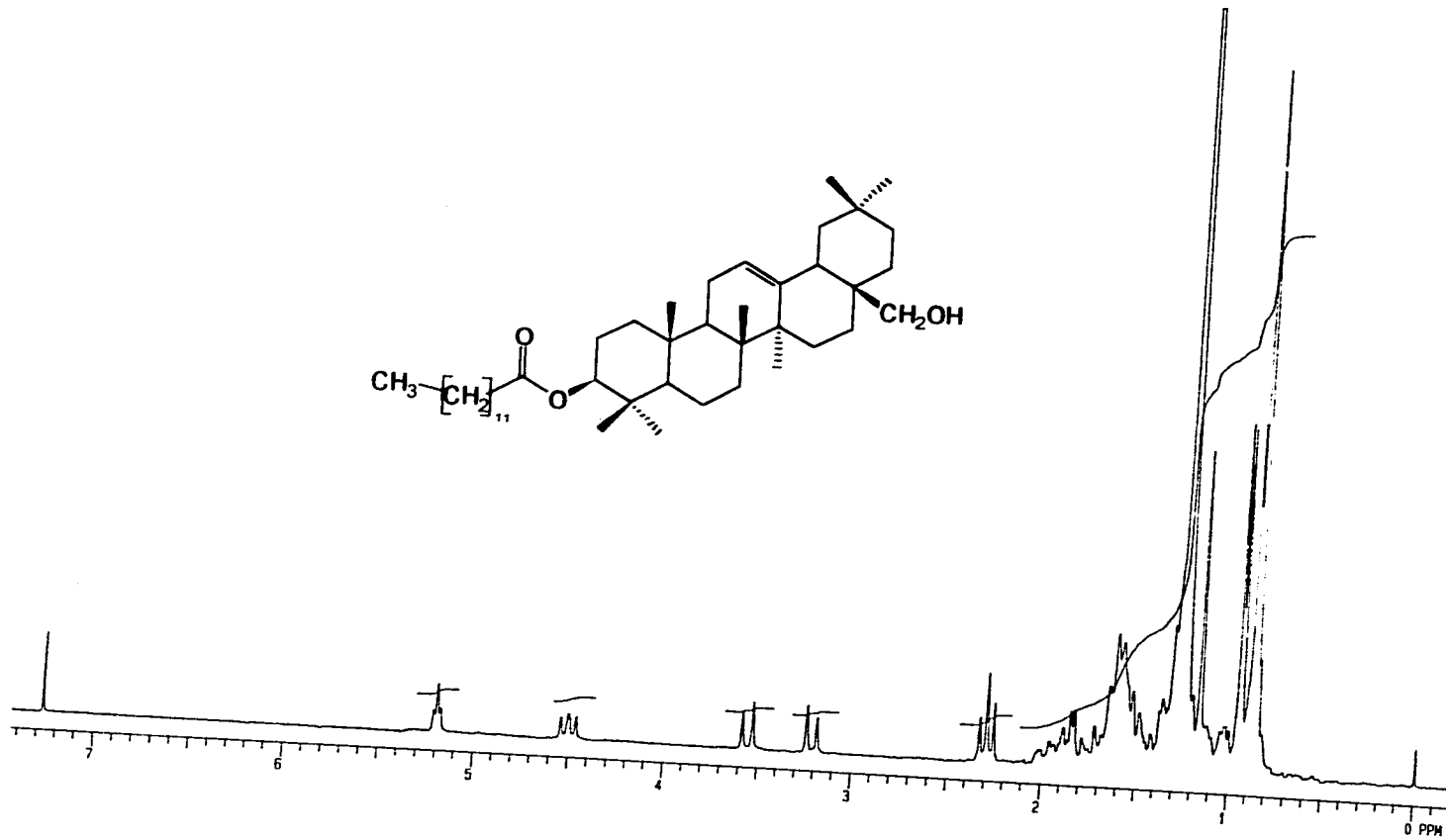


ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Espectro 12.

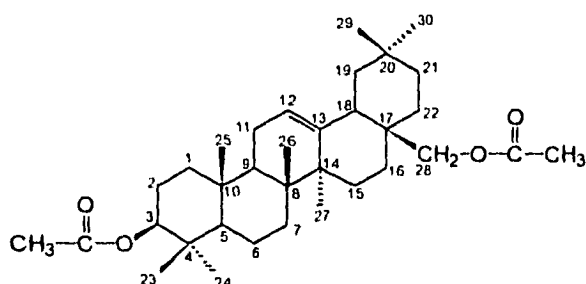


80



**Espectro 13**

**Tabla 3.** Resonancia Magnética Nuclear Protónica del derivado acetilado del 3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno (**93a**).



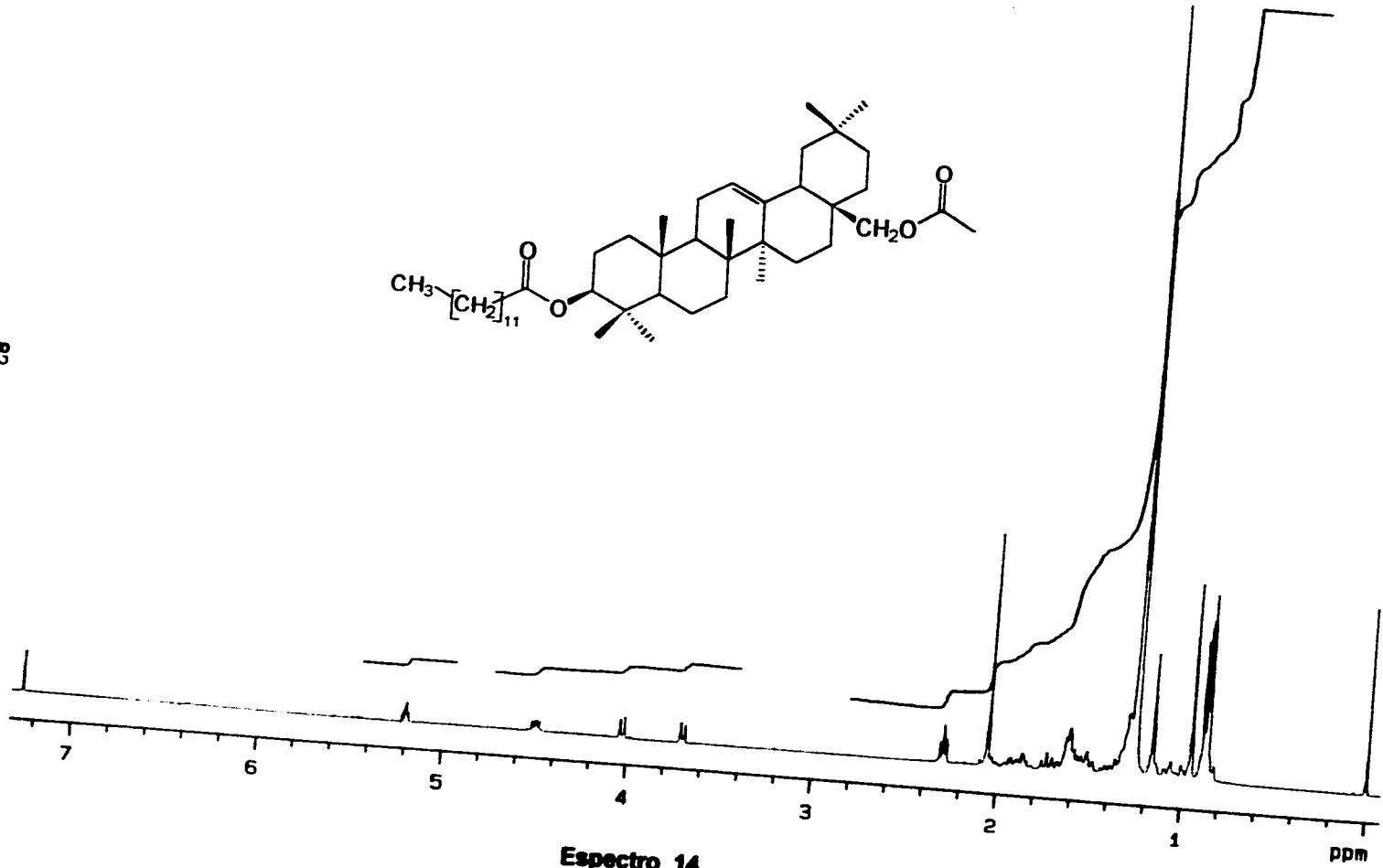
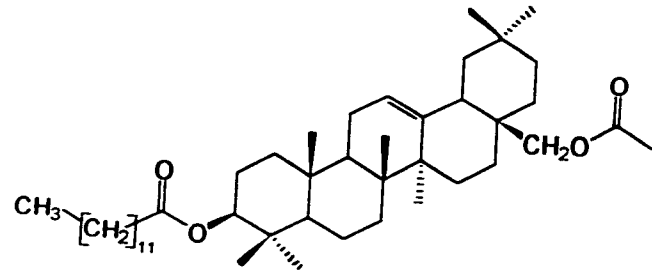
**RMN-<sup>1</sup>H,  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>) (Espectro 10):**

5.17, m, J=3.5 (H-12); 4.98, m, (H-3); 4.03, d, J=11 (H-28); 3.70, d, J=11 (H-28');  
 2.07, s, (CH<sub>3</sub>-C=O); 1.25, s, (-CH<sub>3</sub>); 1.57, s, (-CH<sub>3</sub>); 0.96, s, (-CH<sub>3</sub>); 0.89, s, (-  
 CH<sub>3</sub>); 0.88, s, (-CH<sub>3</sub>); 0.87, s, (-CH<sub>3</sub>); 0.86, s, (-CH<sub>3</sub>).

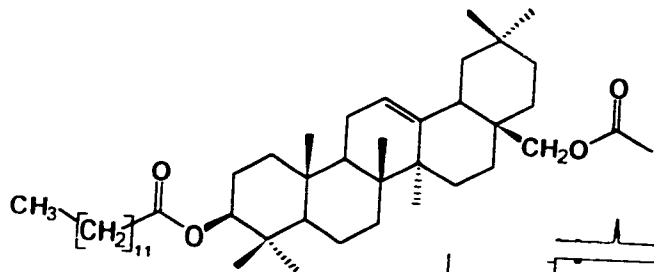
J= Constante de acoplamiento expresada en Hz.



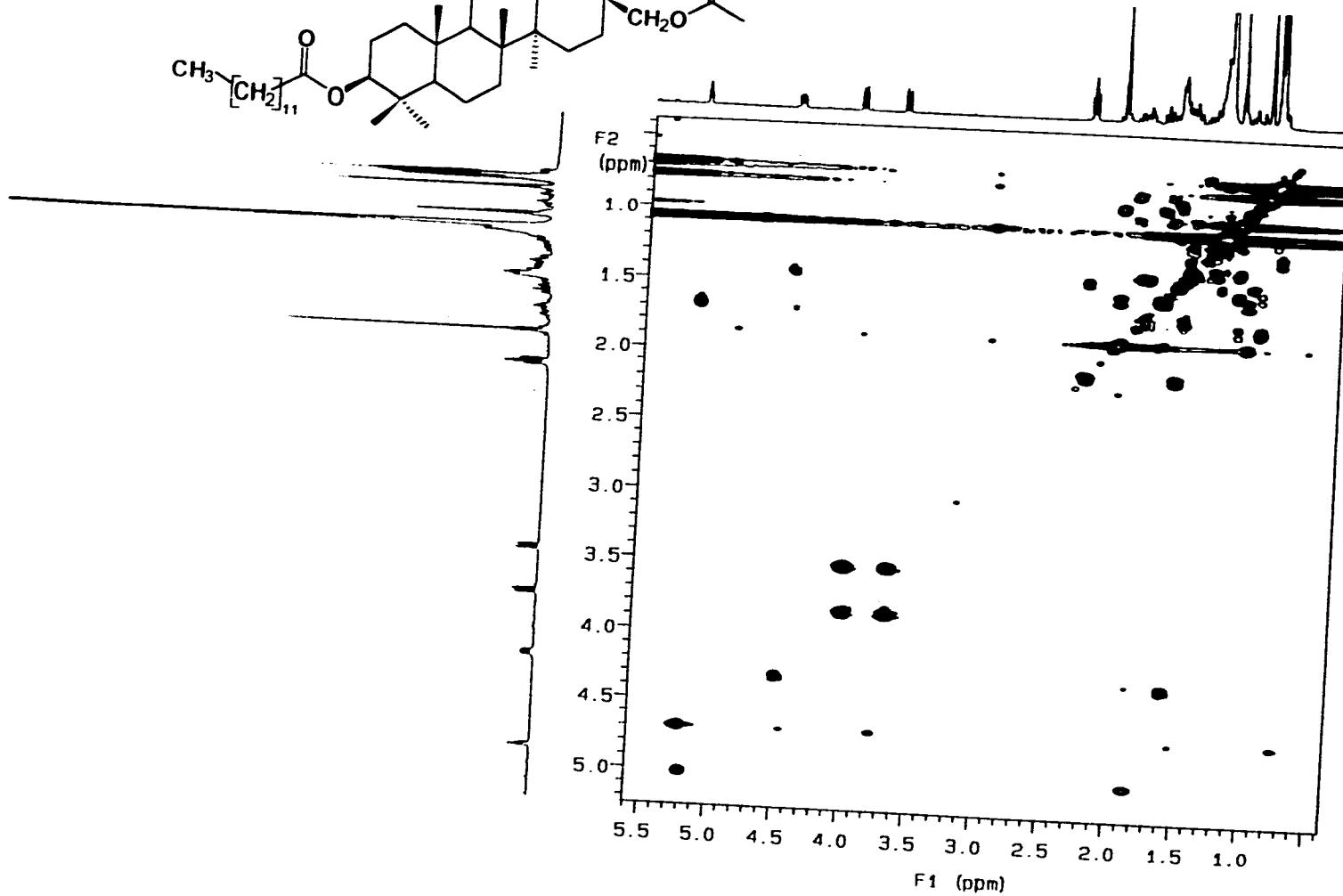
82



Espectro 14



83



Espectro 14a

#### 4.4 Aislamiento y caracterización del 5-hidroxi-7-metoxiflavanona (94).

El análisis cromatográfico en capa delgada de la fracción terciaria D-IIIa (Cuadro 10, sección experimental), permitió la detección de un cromóforo de color amarillo a la luz visible. Al revelarse las cromatoplasas con una solución reactivo de  $\text{AlCl}_3$  la coloración amarilla se intensificó notablemente. Sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada permitieron el aislamiento del compuesto como un polvo amarillo claro. Las constantes espectrométricas y espectroscópicas utilizadas para su identificación se resumen en la Tabla 6.

La fórmula molecular del producto natural se estableció como  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$  por espectrometría de masas. Su espectro de IR (Espectro 15) presentó señales para hidroxilo ( $3433\text{ cm}^{-1}$ ), anillo aromático ( $1622$  y  $1528\text{ cm}^{-1}$ ) y para carbonilo de  $\gamma$ -pirona ( $1644\text{ cm}^{-1}$ ).

Los espectros de UV, EM y RMN (Espectros 16, 17, 18 y 19), conjuntamente con el comportamiento cromatográfico, permitieron proponer que el producto natural era la 5-hidroxi-7-metoxi-flavanona (94). Las observaciones más importantes que sustentaron esta propuesta fueron las siguientes:

1.- La presencia en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de un sistema ABX en  $\delta_{\text{H}}$  5.40 (dd,  $J=12.90$ , Hz), 3.07 (dd,  $J=17.1$ , 12.9 Hz) y 2.81 (dd,  $J=17.1$ , 3 Hz), el cual es diagnóstico para los hidrógenos H-2 y H-3 del anillo C de una flavanona (Harborne *et al.*, 1975 y Markahan, 1985).

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  las señales asignables a C-2, C-3, y C-4 se observaron en  $\delta_{\text{C}}$  78.92, 43.10 y 195.4, respectivamente (Harborne *et al.*, 1975).

2 - Ambos espectros de RMN evidenciaron la presencia de un grupo metoxilo ( $\delta_{\text{C}}$  55.34 y  $\delta_{\text{H}}$  3.85,s)

3.- Centrado en  $\delta_H$  7.41 se observó un multiplete que integraba para cinco hidrógenos aromáticos asignables a los hidrógenos del anillo B. Los fragmentos de m/z 104 y 91 (Figura 3) presentes en el espectro de masas confirmaron que la flavanona tenía el anillo B no sustituido. Es importante hacer notar que el fragmento m/z 91 representa uno de los iones diagnóstico para la identificación de una flavanona (Harborne *et al.*, 1975).

De manera adicional, en el espectro de RMN  $^1H$  se apreció en  $\delta_H$  6.07 un segundo multiplete para dos hidrógenos aromáticos. De acuerdo al desplazamiento químico estos hidrógenos debían encontrarse entre dos funciones oxigenadas. El fragmento m/z 166 (Figura 3) observado en el espectro de masas y que se genera por una ruptura de tipo RetroDiels-Alder era consistente con la presencia de dos grupos oxigenados en el anillo A: un metoxilo, evidenciado claramente en los espectros de RMN y un grupo hidroxilo. La presencia de un singulete  $\delta_H$  11.98 (que desaparecía luego de equilibrar el espectro con  $D_2O$ ) señaló que el grupo hidroxilo se encontraba en la posición C-5. El desplazamiento químico observado para esta señal es diagnóstica para un hidrógeno quelatado con un grupo carbonilo. La ubicación del grupo hidroxilo en C-5 permitió entonces colocar al grupo metoxilo en C-7. En general las resonancias del espectro de RMN $^{13}C$  del producto (**94**) se asignaron por comparación con modelos apropiados (Harborne *et al.*, 1975; Markahan, 1985).

Con base en el análisis anterior la estructura del compuesto (**94**) se estableció como la de la 5-hidroxi-7-metoxiflavanona (pinostrobina), la cual ha sido aislada previamente de diversas fuentes naturales (Harborne *et al.*, 1975; Markahan, 1985).

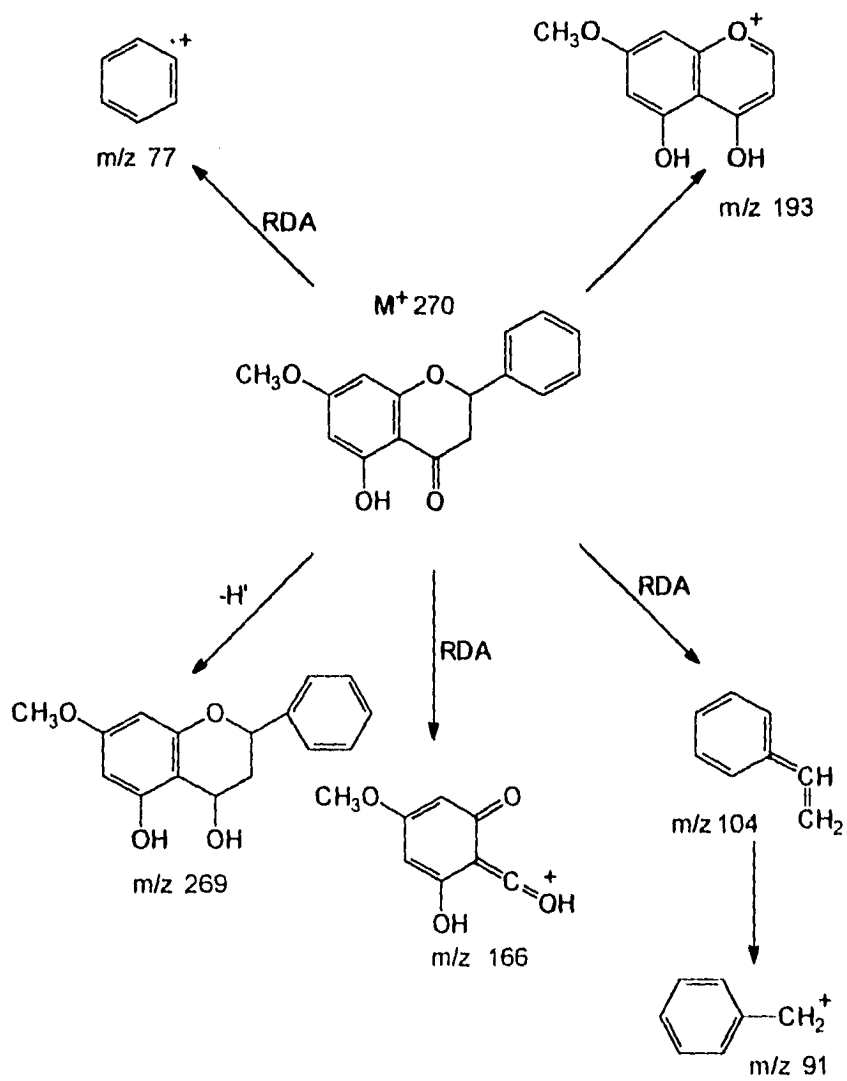
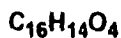
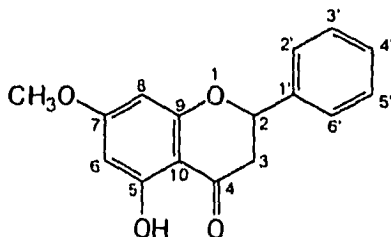


Figura 3. Patrón de fragmentación de la 5-hidroxi-7-metoxiflavanona.

**Tabla 6.** Constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas de la 5-hidroxi-7-metoxiflavanona (**94**).



**IR V<sub>max</sub> (KBr) cm<sup>-1</sup>** (Espectro 15):

3433, 2918, 2848, 1644, 1622, 1528, 1382, 1304, 840, 808.

**UV (MeOH) nm** (Espectro 16):

330 (h), 289.

**EMIE, m/z (int rel)** (Espectros 17):

270 [M<sup>+</sup> (100)]; 269 [M<sup>+</sup>-H (56)]; 193 [M<sup>+</sup>-H -C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> (83)]; 166 (69); 138 (31); 95 (20); 77 (8); 69 (8).

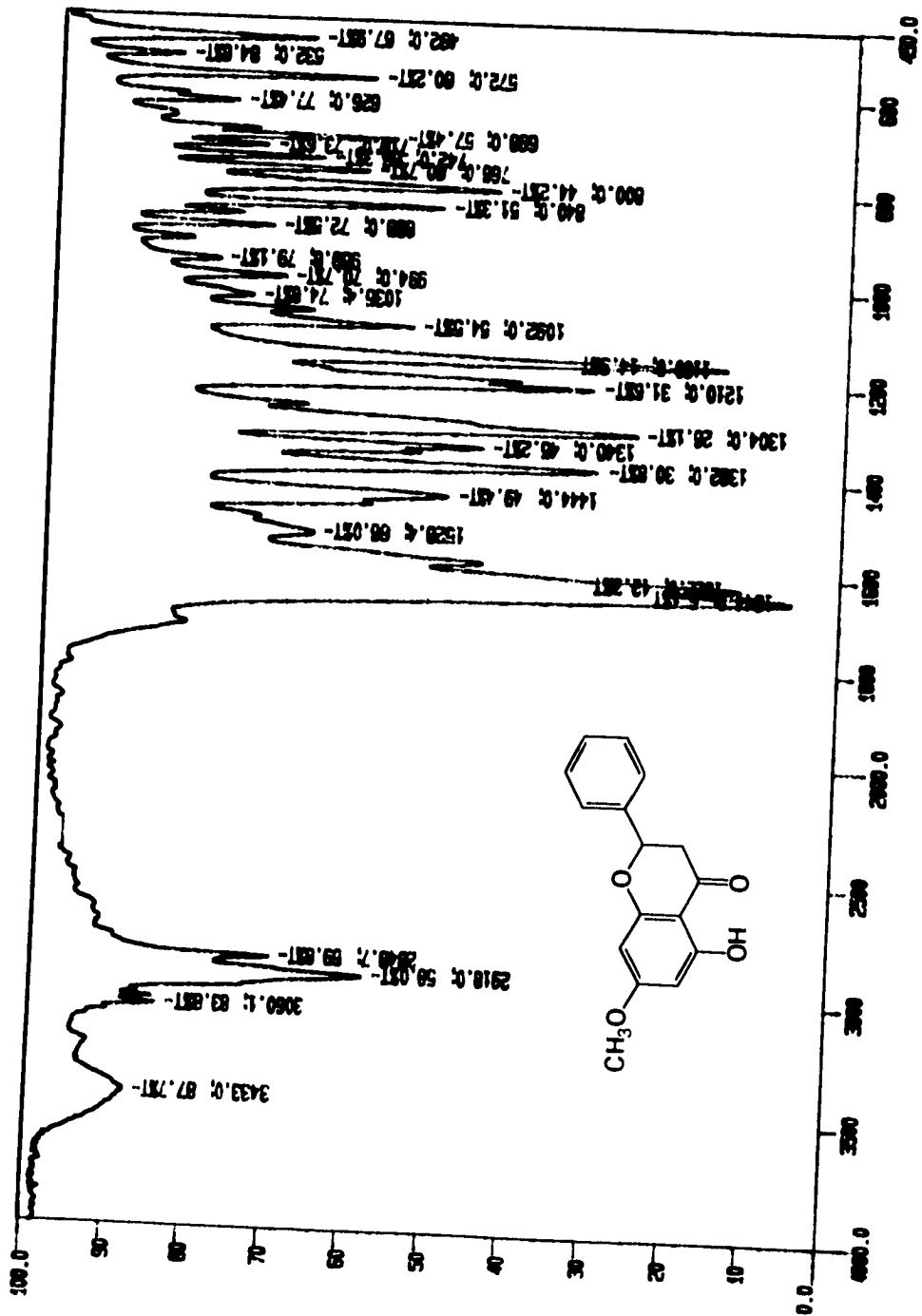
**RMN-<sup>1</sup>H, δ (CDCl<sub>3</sub>)** (Espectros 18 y 18a):

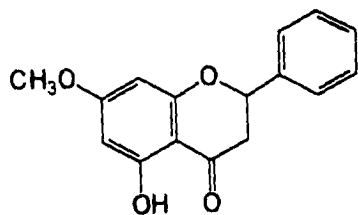
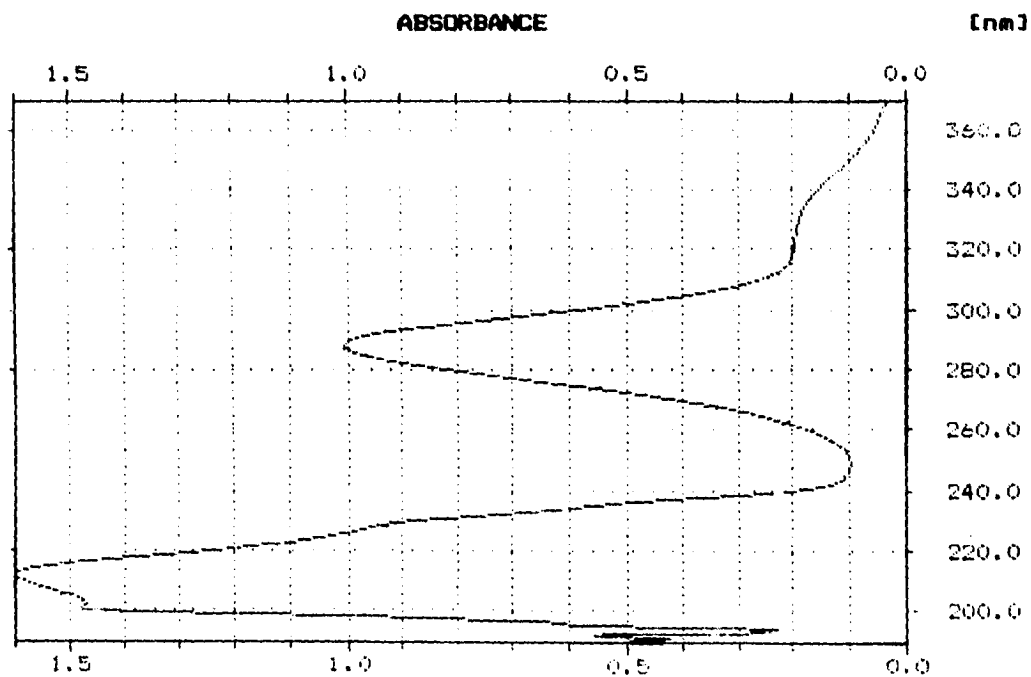
5.40, dd, J=12.90 y J=3.0 (H-2); 3.07, dd, J=17.1 y J=12.9 (H-3a); 2.81, dd, J=17.1, 3 (H-3b), 6.07, m, (H-6 y H-8); 7.41, m, (H-2' -H-6'); 3.85, s, (OCH<sub>3</sub>); 11.98, s, (OH-5).

**RMN - <sup>13</sup>C, δ (CDCl<sub>3</sub>)** (Espectros 19 y 19a):

78.92 (C-2), 43.10 (C-3), 195.40 (C-4), 163.92 (C-5), 94.90 (C-6), 167.80 (C-7), 94.90 (C-6), 167.80 (C-7), 94.0 (C-8), 162.52 (C-9), 102.91 (C-10), 55.34 (OCH<sub>3</sub>), 138.20 (C-1'), 125.80 (C-2', C-6'), 128.54 (C-3', C-4' y C-5').

J= Constante de acoplamiento expresada en Hz.



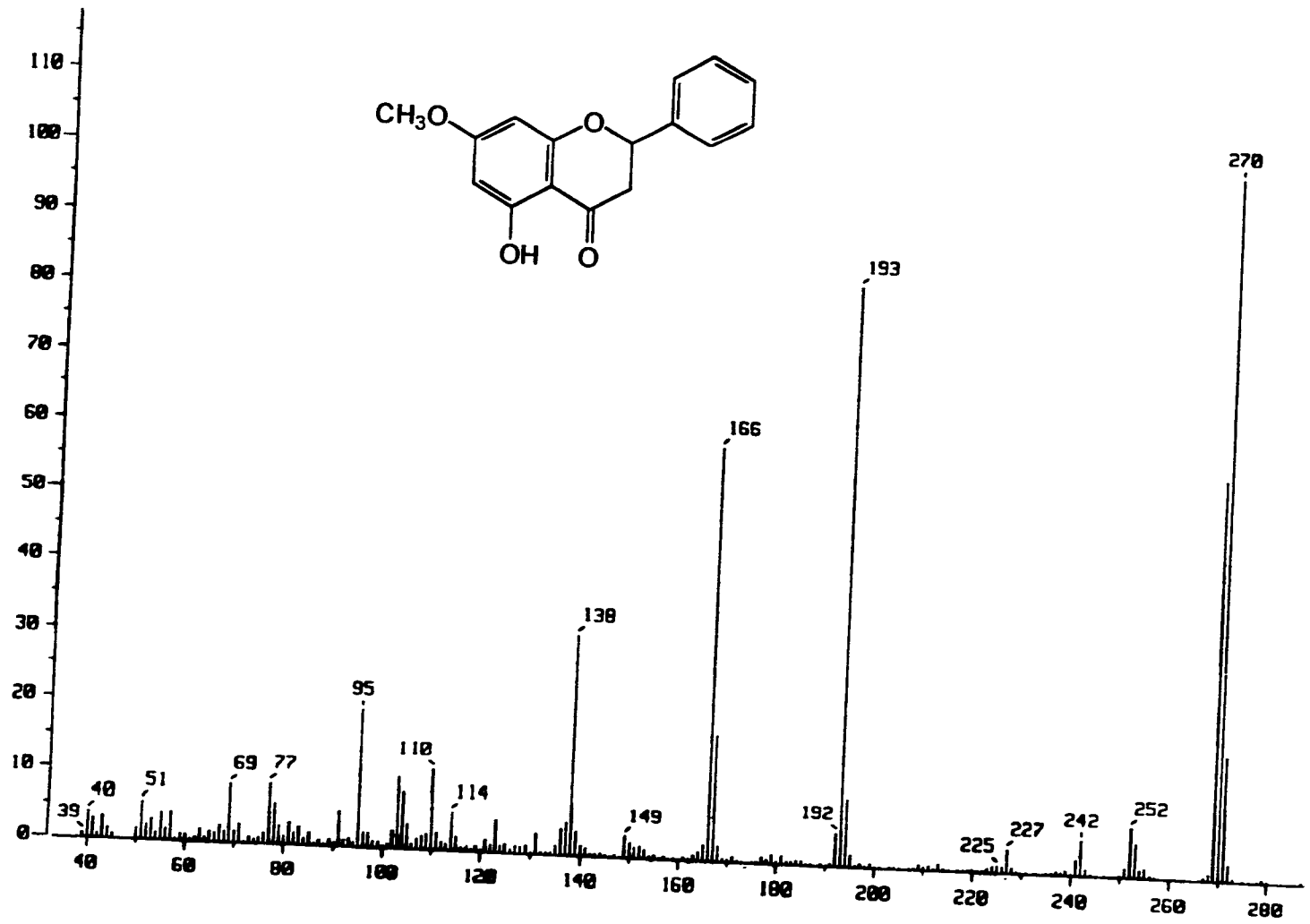


WAVELENGTH	DATA
288.1 nm (MAX)	1.009 ABS
249.4 nm (MIN)	0.101 ABS
212.2 nm (MAX)	1.602 ABS

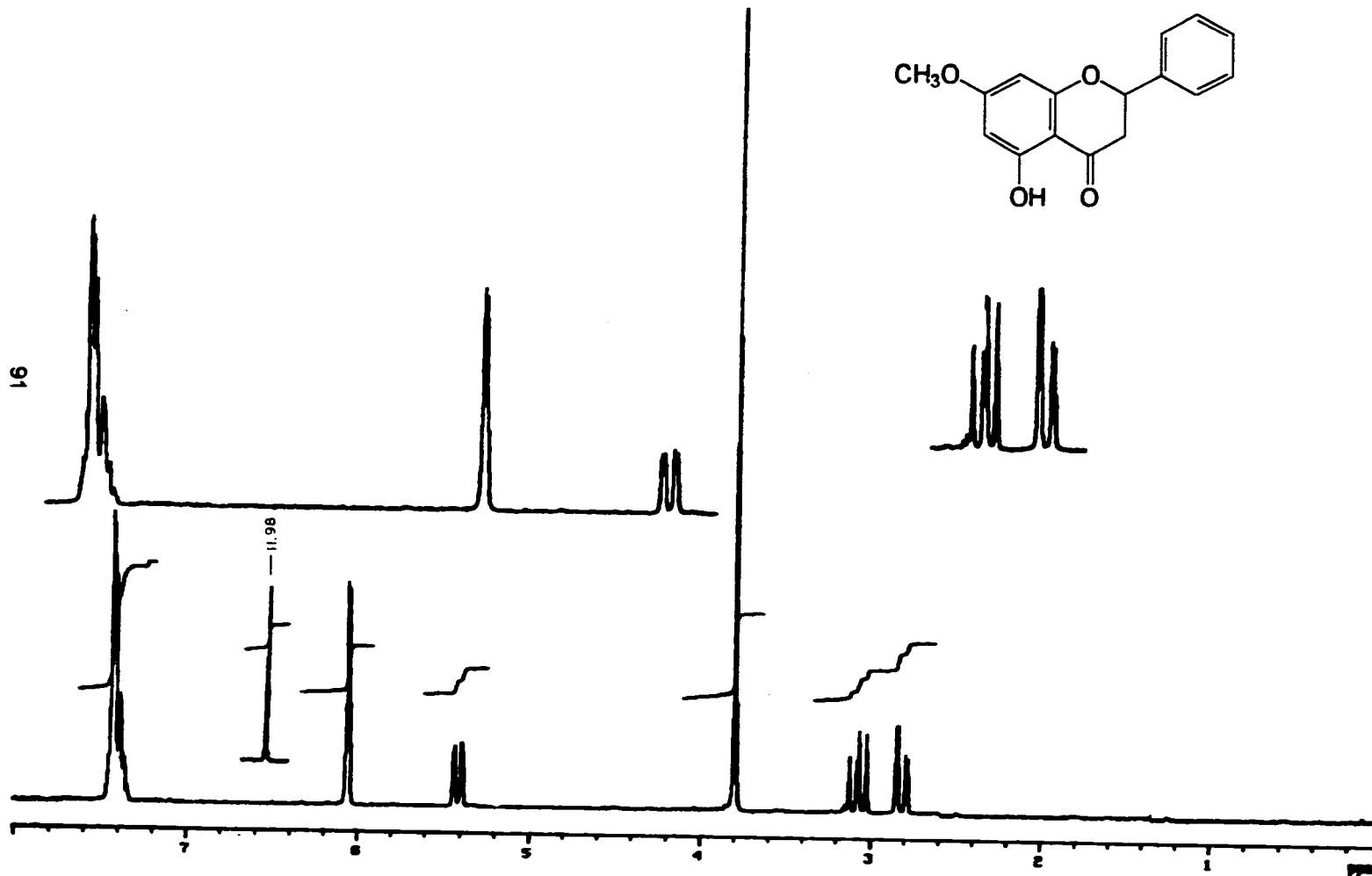
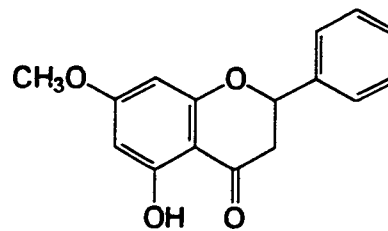
**Espectro 16**

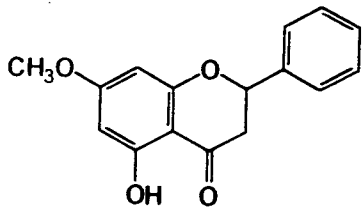


06

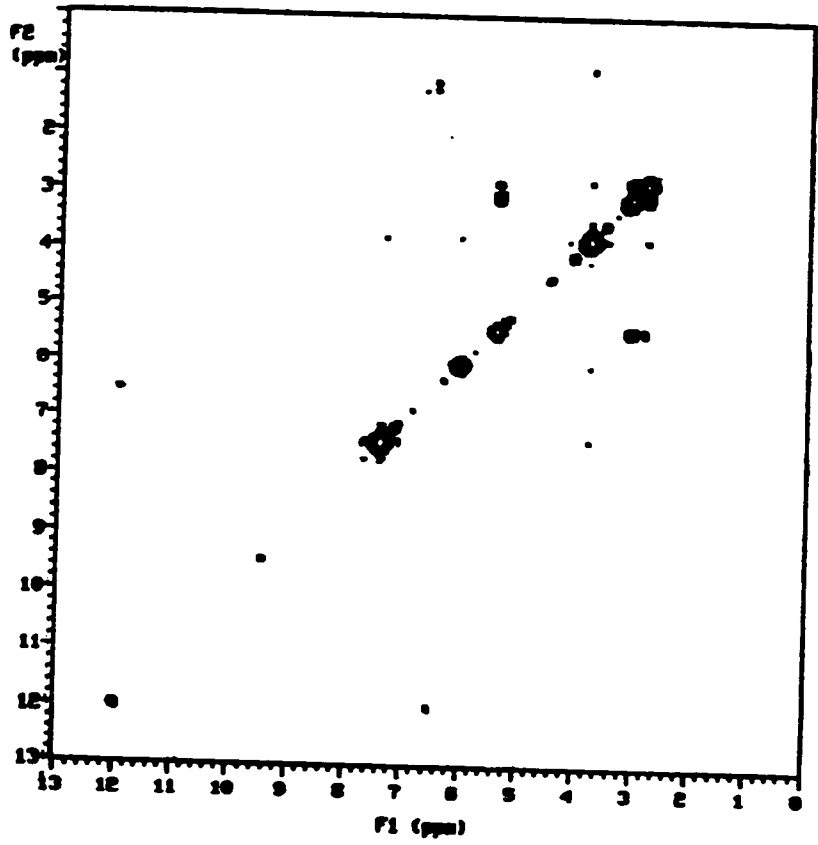
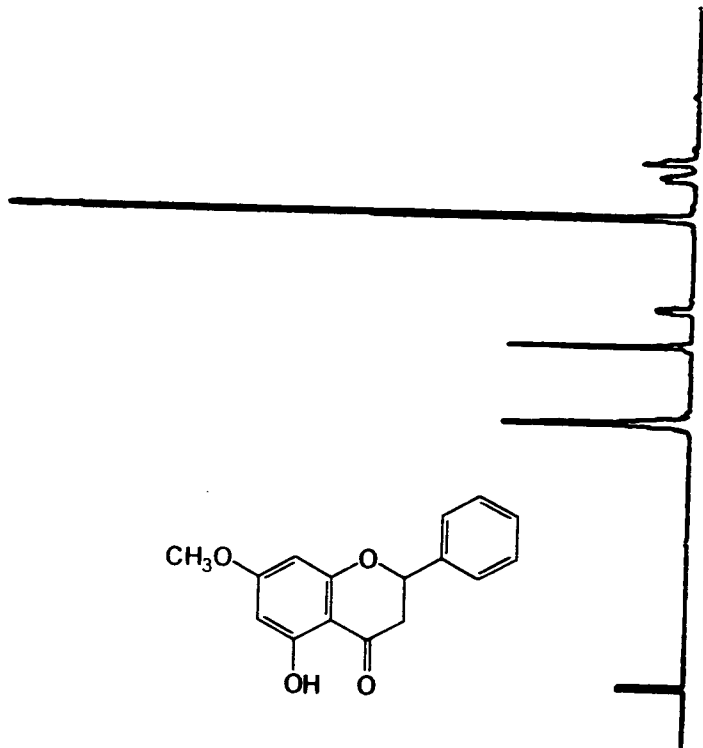


**Espectro 17**

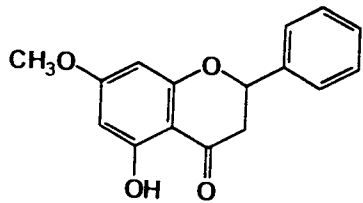




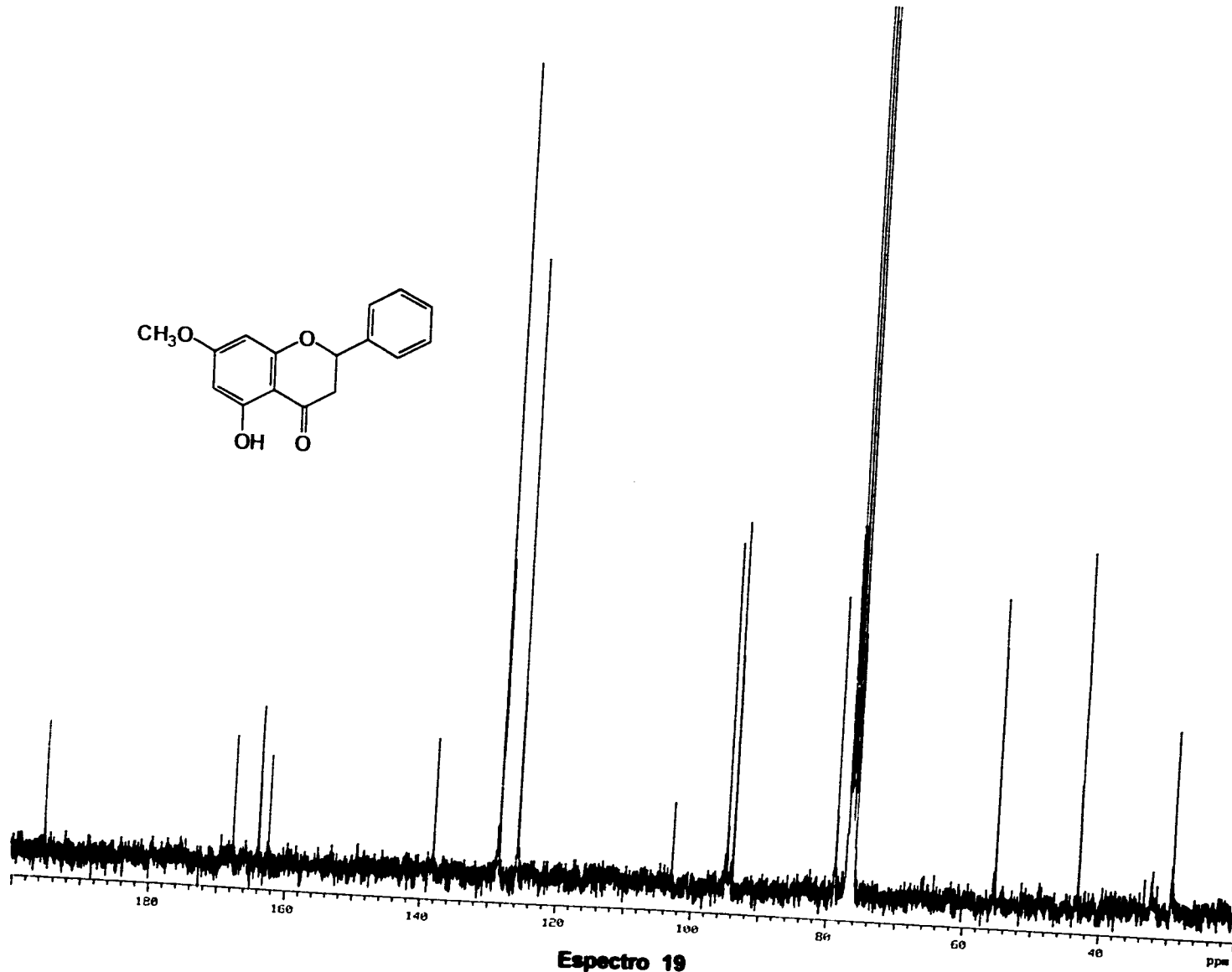
92

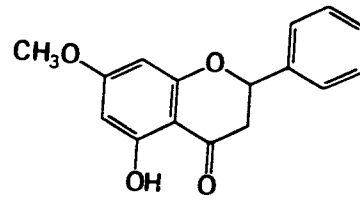


Espectro 18a

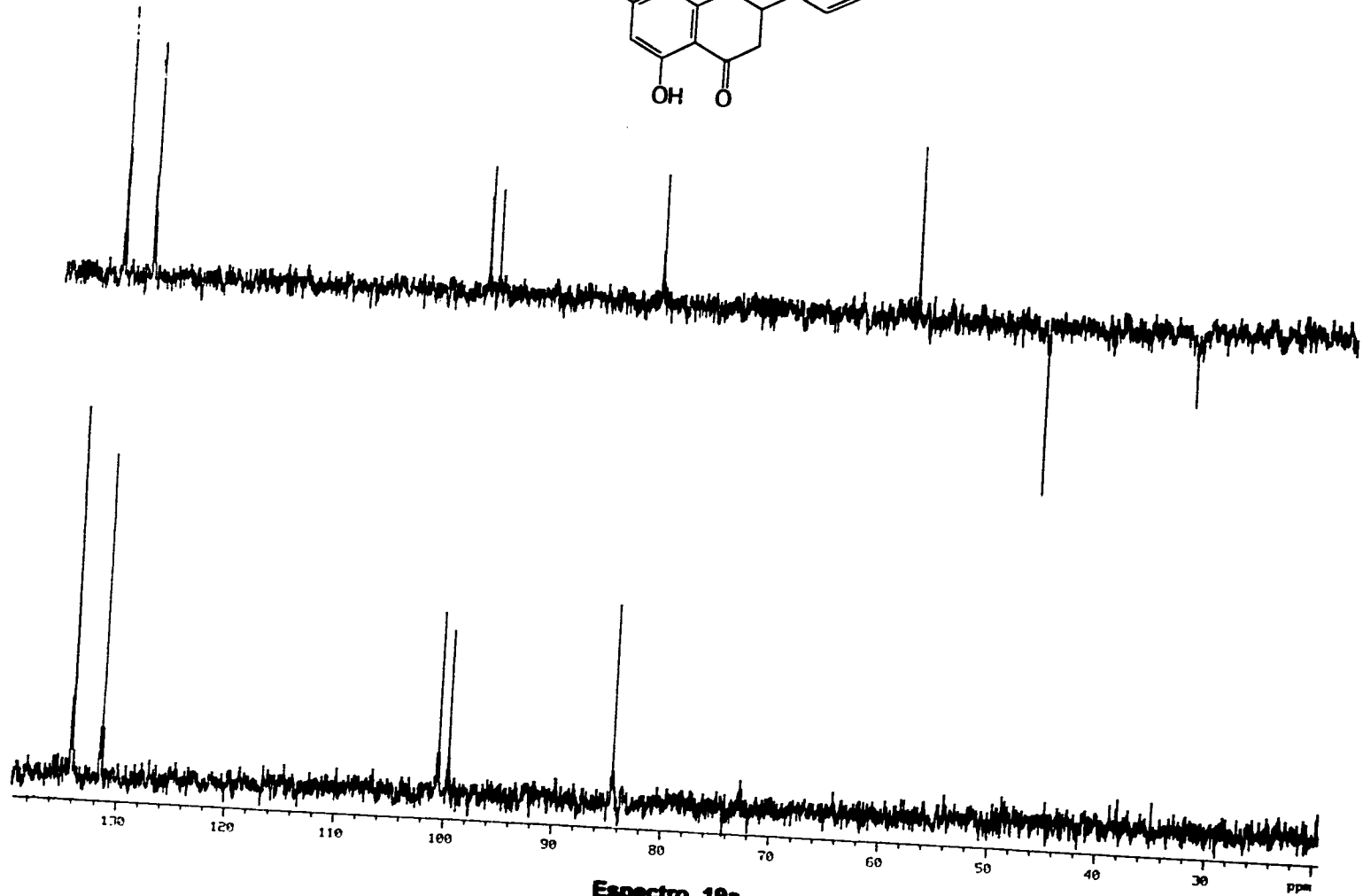


93





94



#### **4.5 Identificación como ésteres metílicos de los componentes de la mezcla de ácidos grasos obtenidos de la fracción activa E.**

La cromatografía en columna de la fracción primaria activa E (Cuadro 6), permitió el aislamiento de una mezcla de ácidos grasos. El análisis via cromatografía de gases-espectrometría de masas de la mezcla metilada (ver sección experimental) permitió la detección e identificación de 12 ésteres metílicos de ácidos grasos.

Los ésteres metílicos identificados corresponden a los ácidos nonanodioico (**95**), tetradecanoico (**96**), pentadecanoico (**97**), hexadecanoico (**98**), heptadecanoico (**99**), 6-octadecenoico (**100**), 14-metil-heptadecanoico (**101**), eicosanoico (**102**), docosanoico (**103**), tricosanoico (**104**), tetracosanoico (**105**) y hexacosanoico (**106**).

En el cuadro 14 se resumen los tiempos de retención, pico y los fragmentos de masa más importantes de cada uno de los compuestos antes mencionados y en la Figura 5 se ilustra el cromatograma correspondiente.

Los espectros de masas (Espectros 21-33), de los ésteres metílicos de los 12 ácidos fueron similares. En todos los casos se detectaron los fragmentos diagnósticos para los ésteres metílicos de ácidos a  $m/z$   $M^+ - 31$ , 74, 87 y 59 (Silverstein, Bassler y Morrill, 1991). El pico a  $m/z$  74 es el más característico y se debe a un rearrreglo de Mc Lafferty. Con la excepción del éster metílico del compuesto (**95**), en todos los casos se observó claramente el ión molecular. El éster del compuesto (**95**) presentó fragmentos generados por dos pérdidas consecutivas de 31 unidades de masa a partir del ión molecular en  $m/z$  185 ( $M^+ - 31$ ) y  $m/z$  154 ( $M^+ - 31 - 31$ ), respectivamente.

### Fe de erratas.

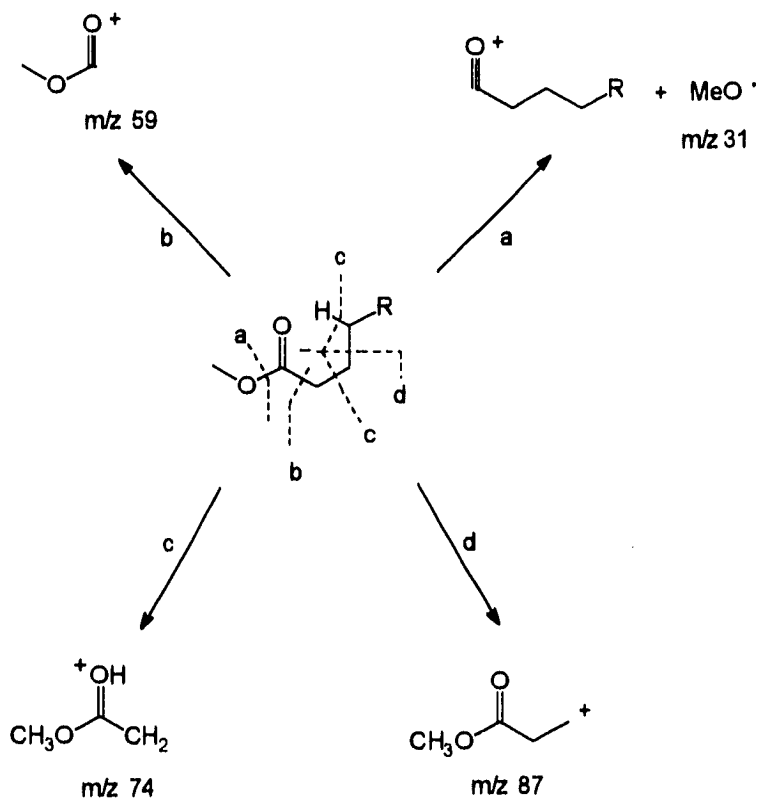


Figura 4. Patrón de Fragmentación para la formación de los iones  $m/z$  31, 59, 74, 87 de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

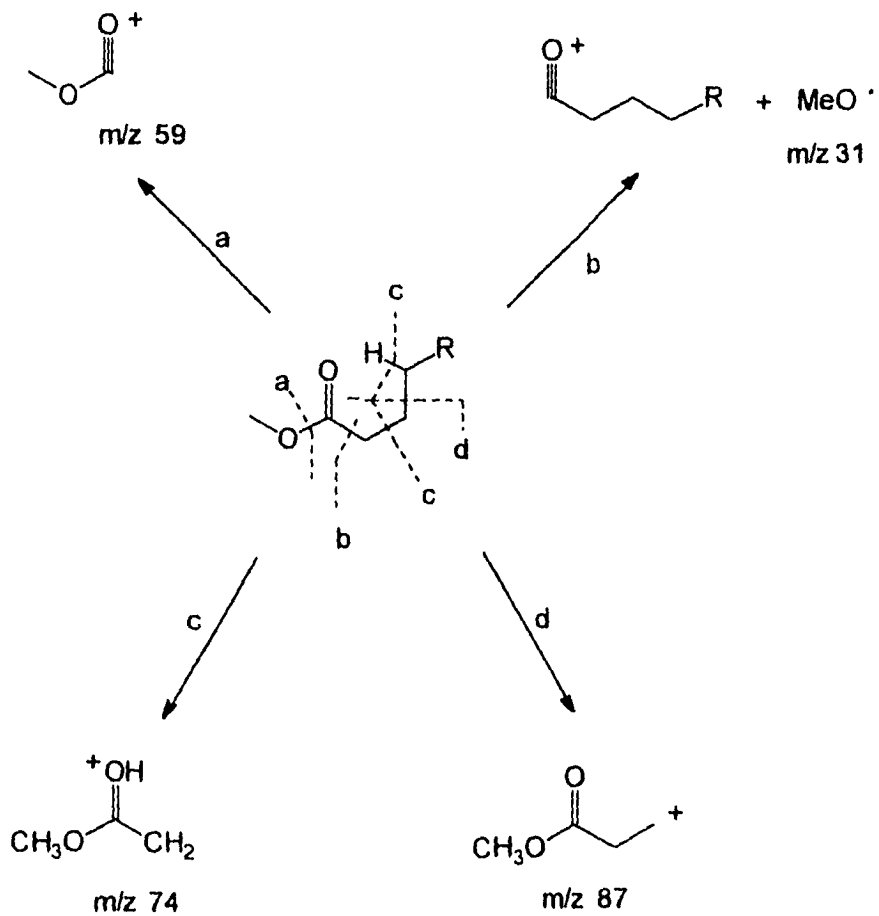


Figura 4. Patrón de Fragmentación para la formación de los iones  $m/z$  31, 59, 74, 87 de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.



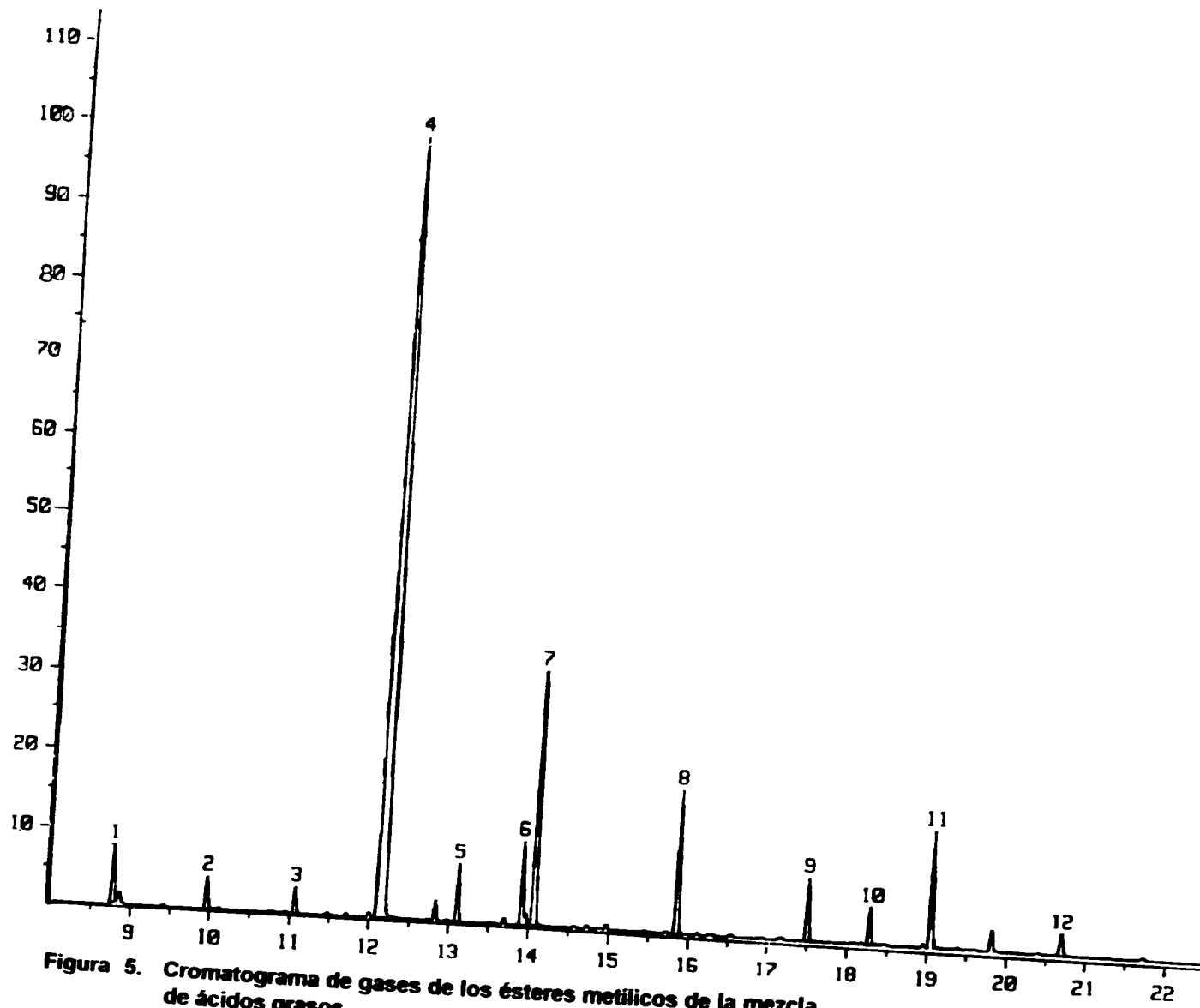
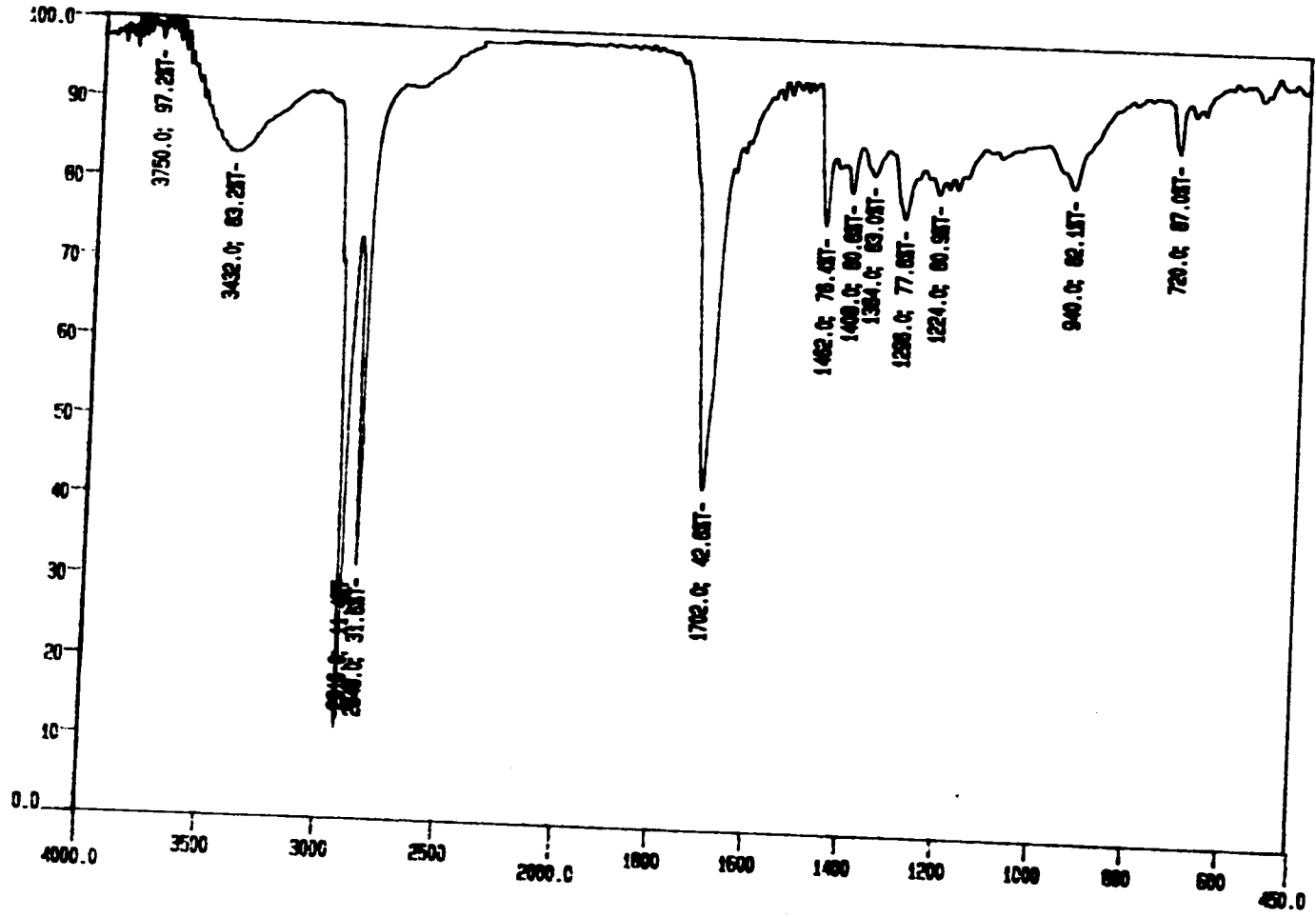


Figura 5. Cromatograma de gases de los ésteres metílicos de la mezcla de ácidos grasos.

Cuadro 14. Identificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos de la fracción activa E.

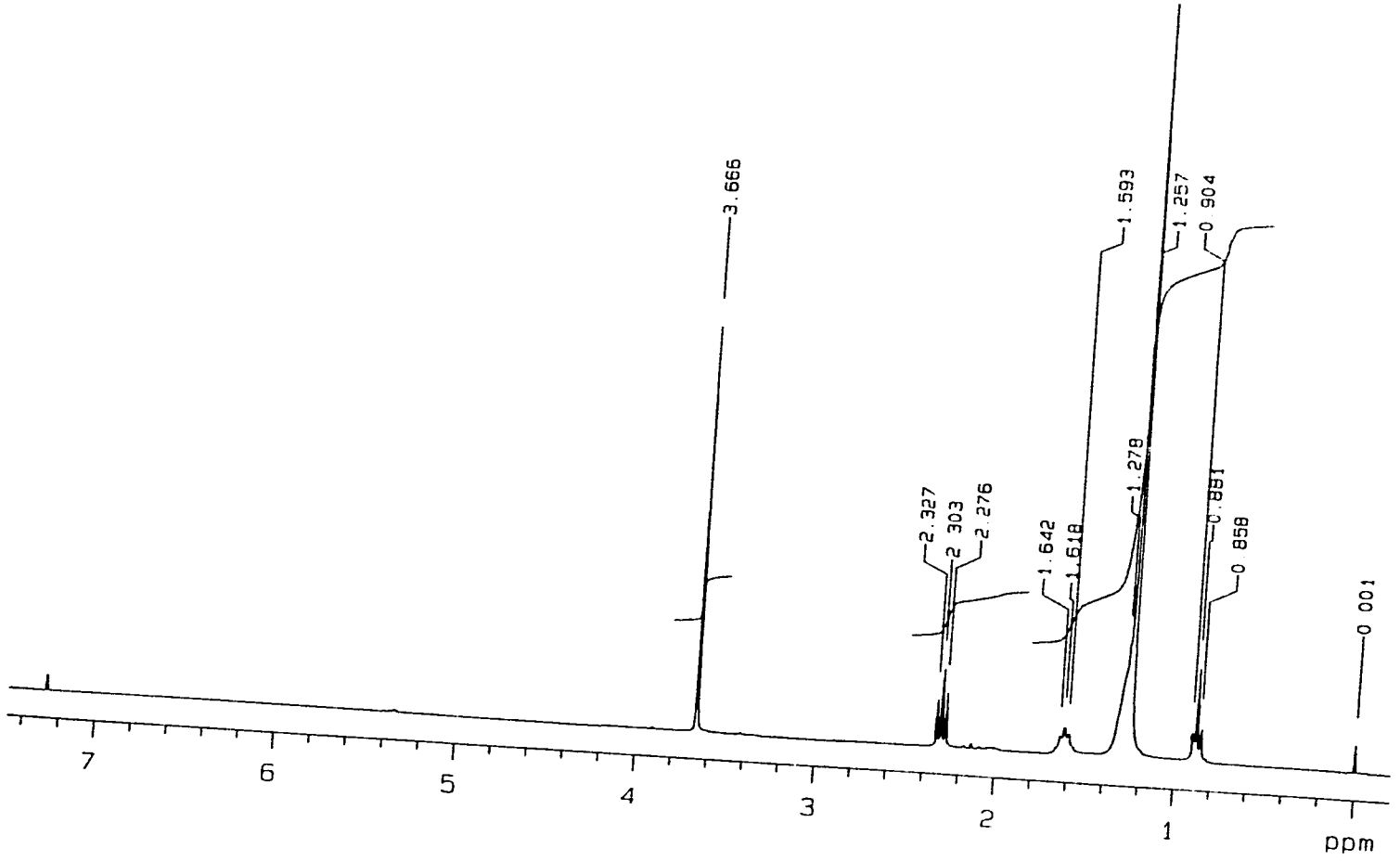
Nombre	TR (min)	NUMERO DE PICO *	FORMULA	PM	FRAGMENTOS DIAGNOSTICOS M+ M+-31 74 87	OTROS FRAGMENTOS	NUMERO DE ESPECTRO
ácido nonanodioico (95)	8.78	1	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	216	-- 66 53 21	152(100), 143(56), 111(45), 55(39) y 43(18)	22
ácido tetradecanoico (96)	9.96	2	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	242	38 14 100 62	199(23), 185(5), 143(24), 129(8), 101(7) y 43(15)	23
ácido pentadecanoico (97)	11.07	3	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256	43 12 100 68	213(17), 199(7), 157(7), 143(20) y 43(17)	24
ácido hexadecanoico (98)	12.18	4	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270	46 1 100 73	227(20), 185(7), 143(23), 129(9), 55(36) y 43(19)	25
ácido heptadecanoico (99)	13.11	5	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284	61 12 100 69	241(20), 185(10), 143(24), 129(9), 97(8) y 43(19)	26
ácido 6-octadecenoico (100)	13.92	6	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	296	19 26 78 39	264(69), 222(26), 180(21), 110(25), 57(90) y 41(100)	27
ácido 14-metil-heptadecenoico (101)	14.08	7	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	298	61 10 100 70	255(16), 199(10), 143(25), 129(9) y 43(20)	28
ácido eicosanoico (102)	15.86	8	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	326	20 -- 100 70	283(6), 143(13), 129(6) y 43(29)	29
ácido docosanoico (103)	17.50	9	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	354	45 5 100 70	311(10), 143(21), 129(7), 97(12) y 43(45)	30
ácido tricosanoico (104)	18.28	10	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	368	29 4 100 70	325(12), 143(21), 101(9), 56(30) y 43(40)	31
ácido tetracosanoico (105)	19.05	11	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	382	40 3 100 80	339(12), 283(6), 143(23), 129(9), 55(30) y 43(26)	32
ácido hexacosanoico (106)	20.69	12	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub> O <sub>2</sub>	410	43 3 100 75	367(10), 199(7), 185(6), 143(26), 97(16), 57(35), 55(30) y 43(29)	33

\*Figura 5.

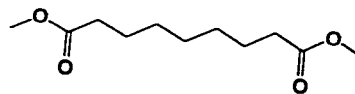
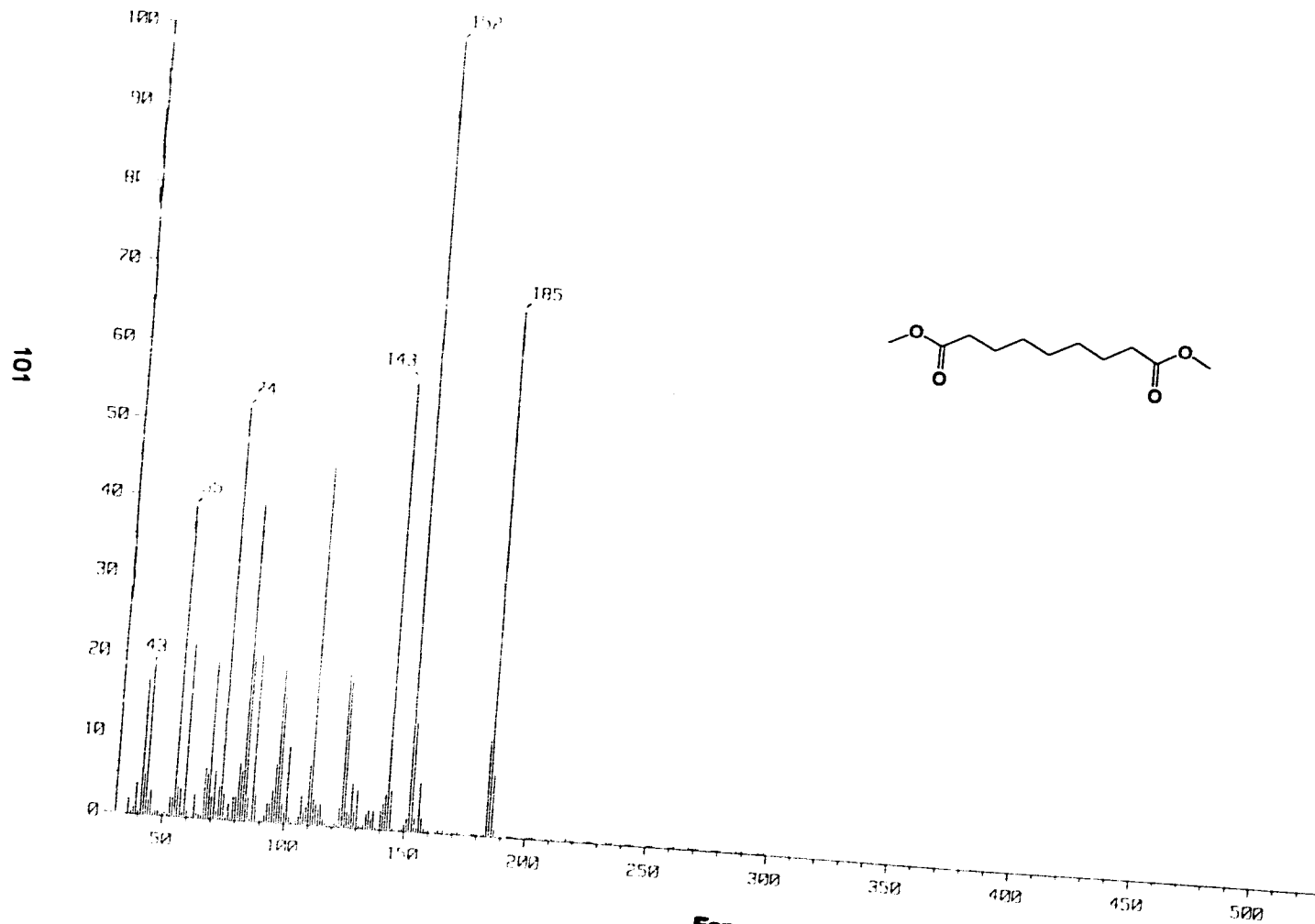


Espectro 20

100

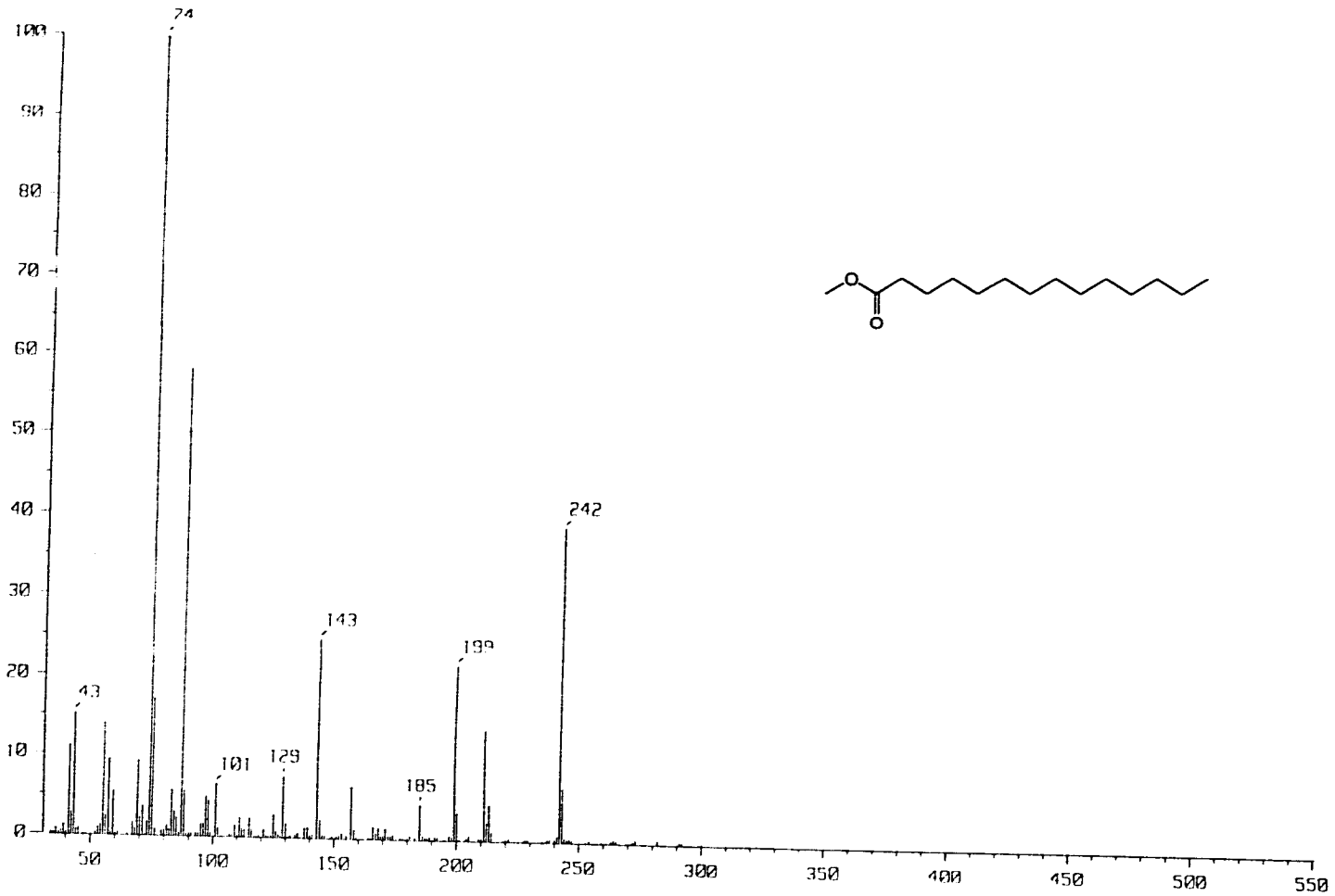


**Espectro 21**



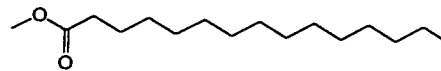
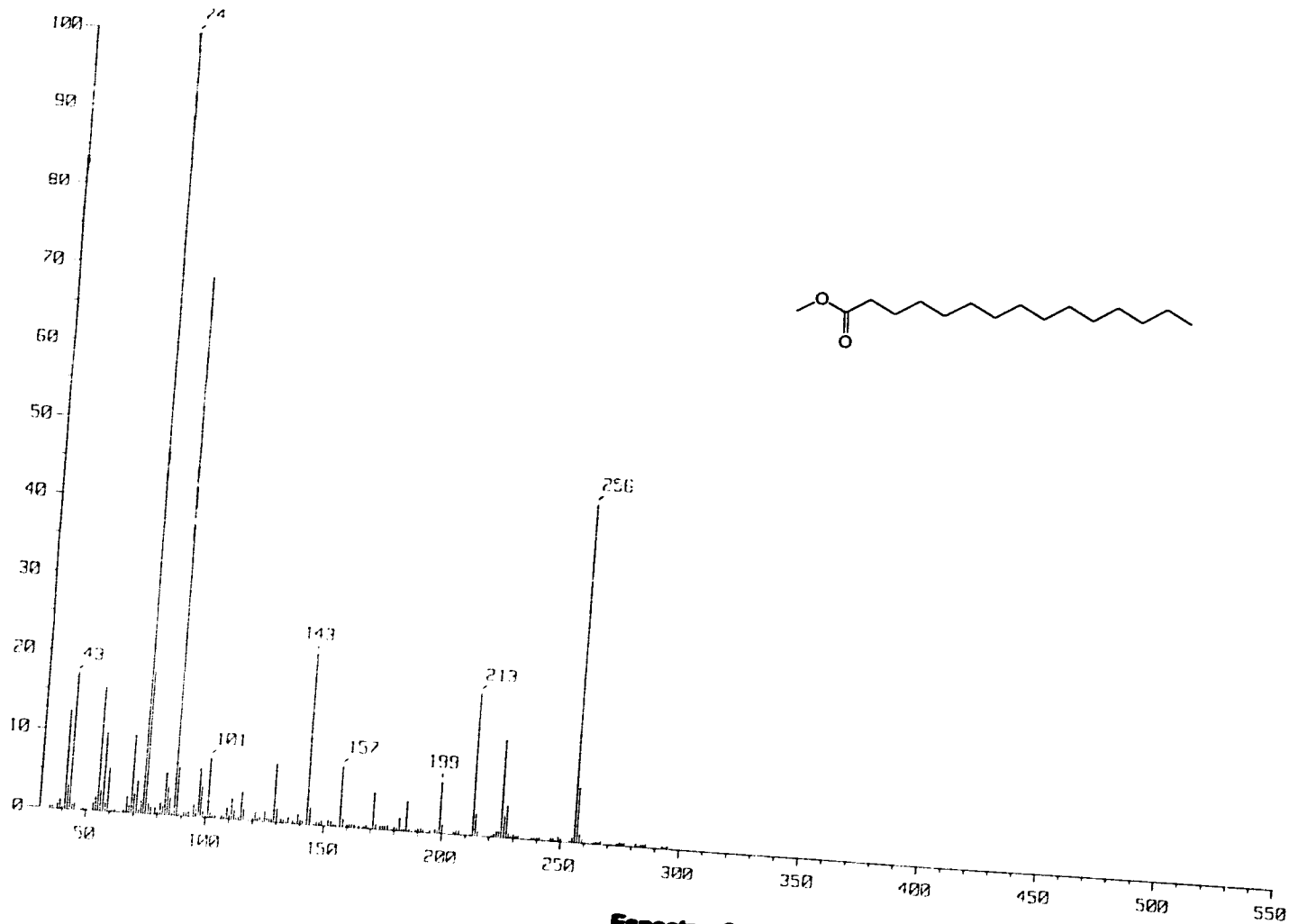
**Espectro 22**

102



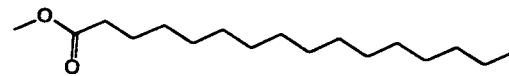
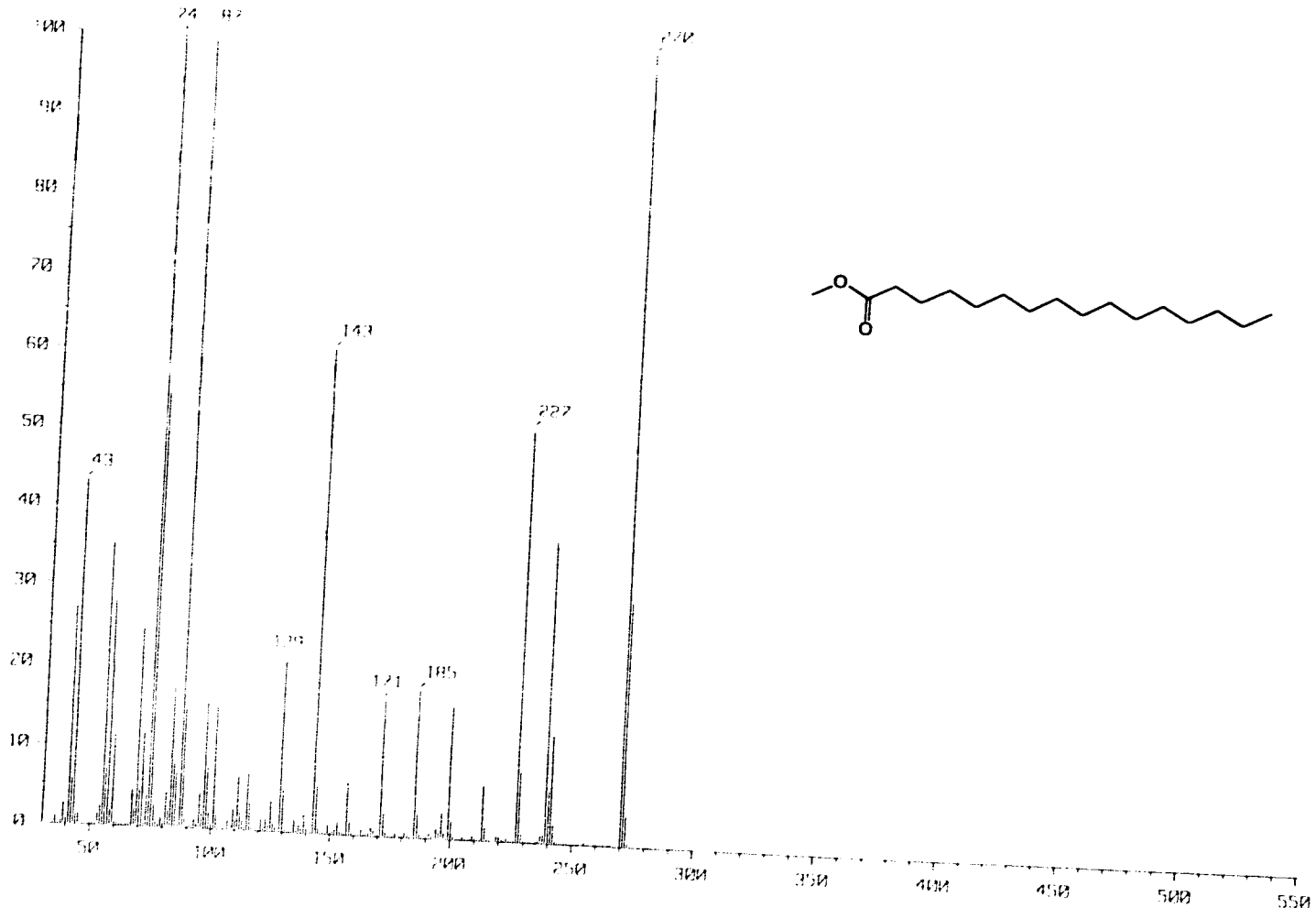
**Especro 23**

103



Espectro 24

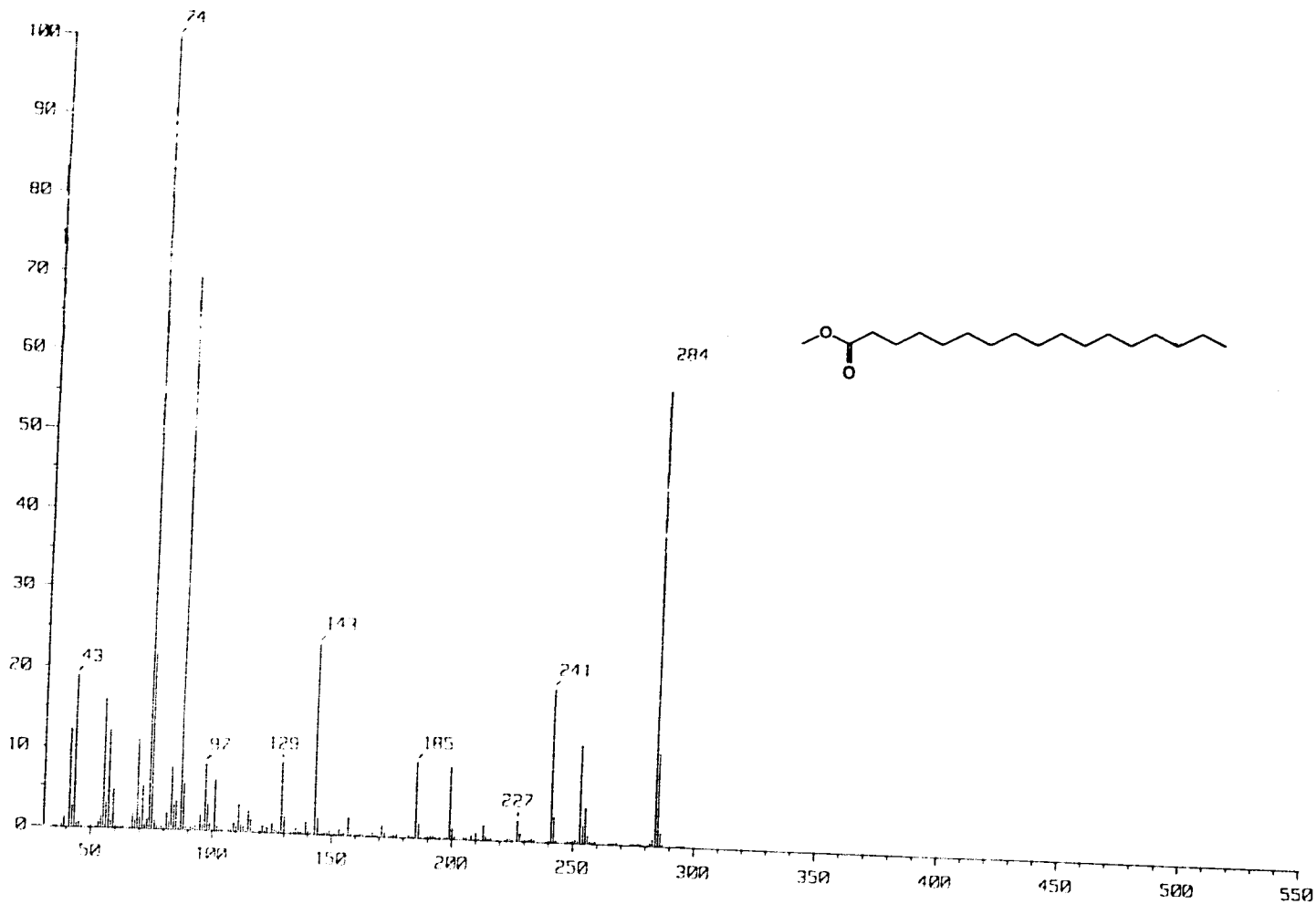
104



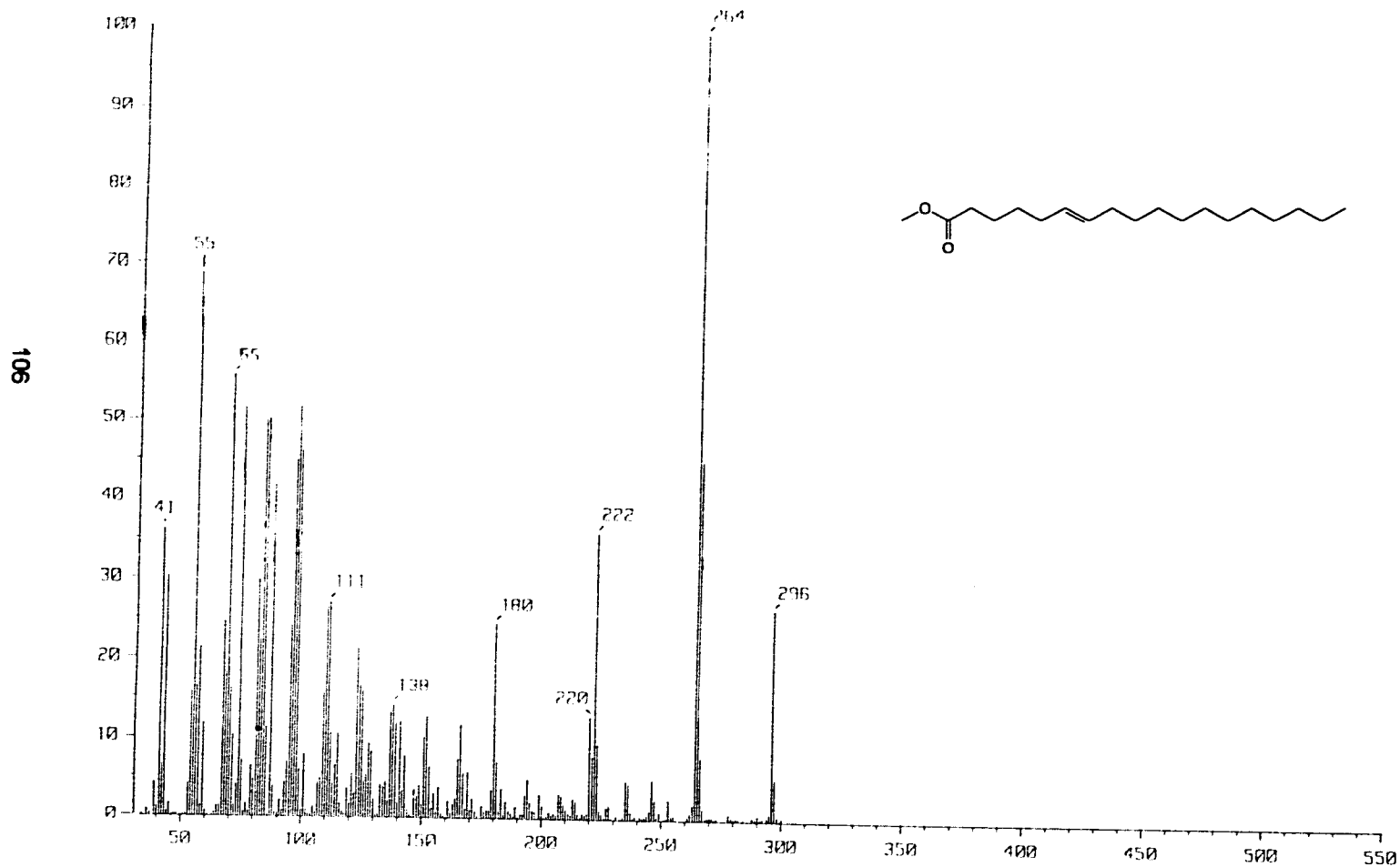
Espectro 25



105

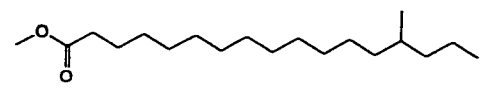
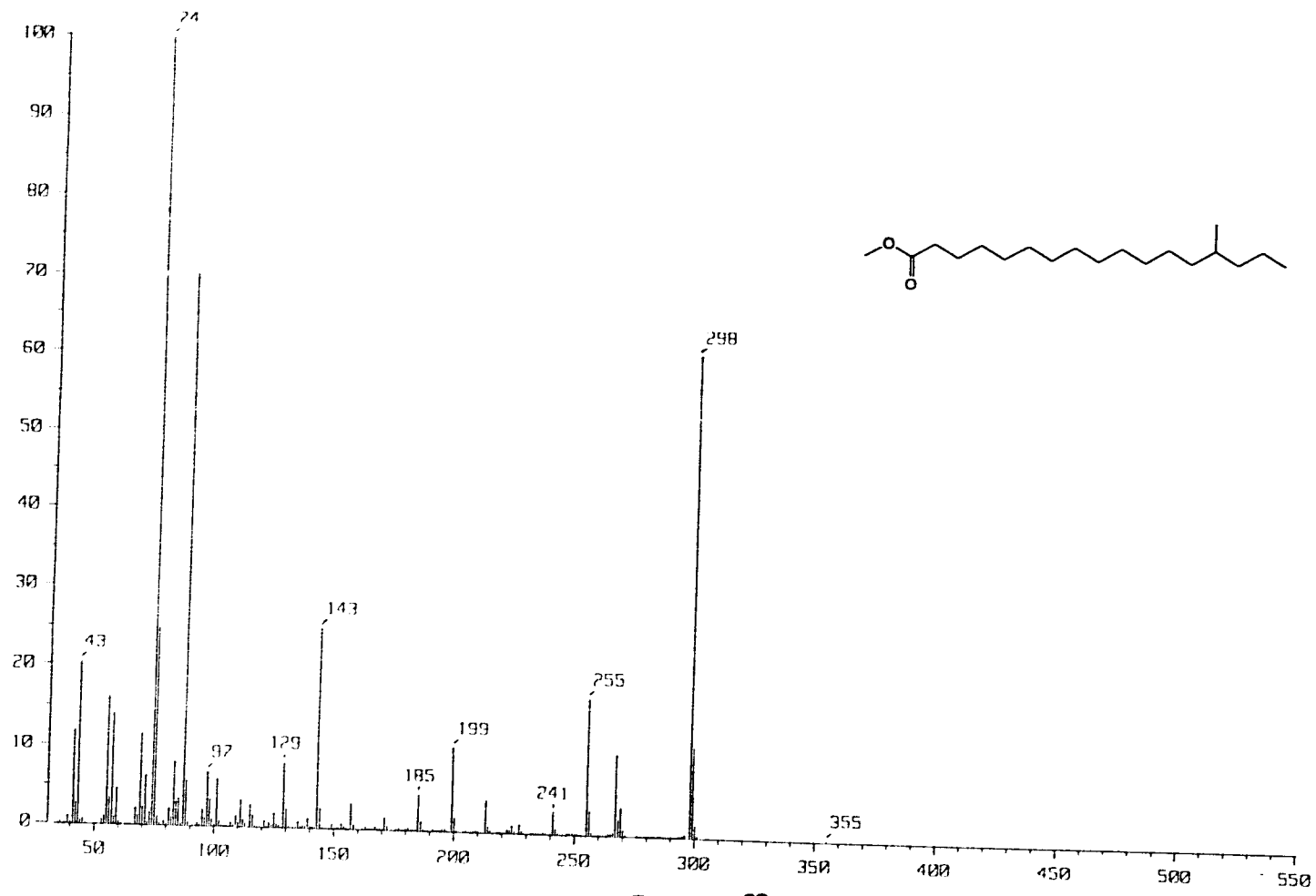


**Espectro 26**

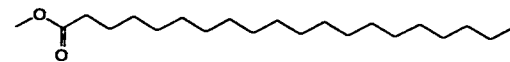
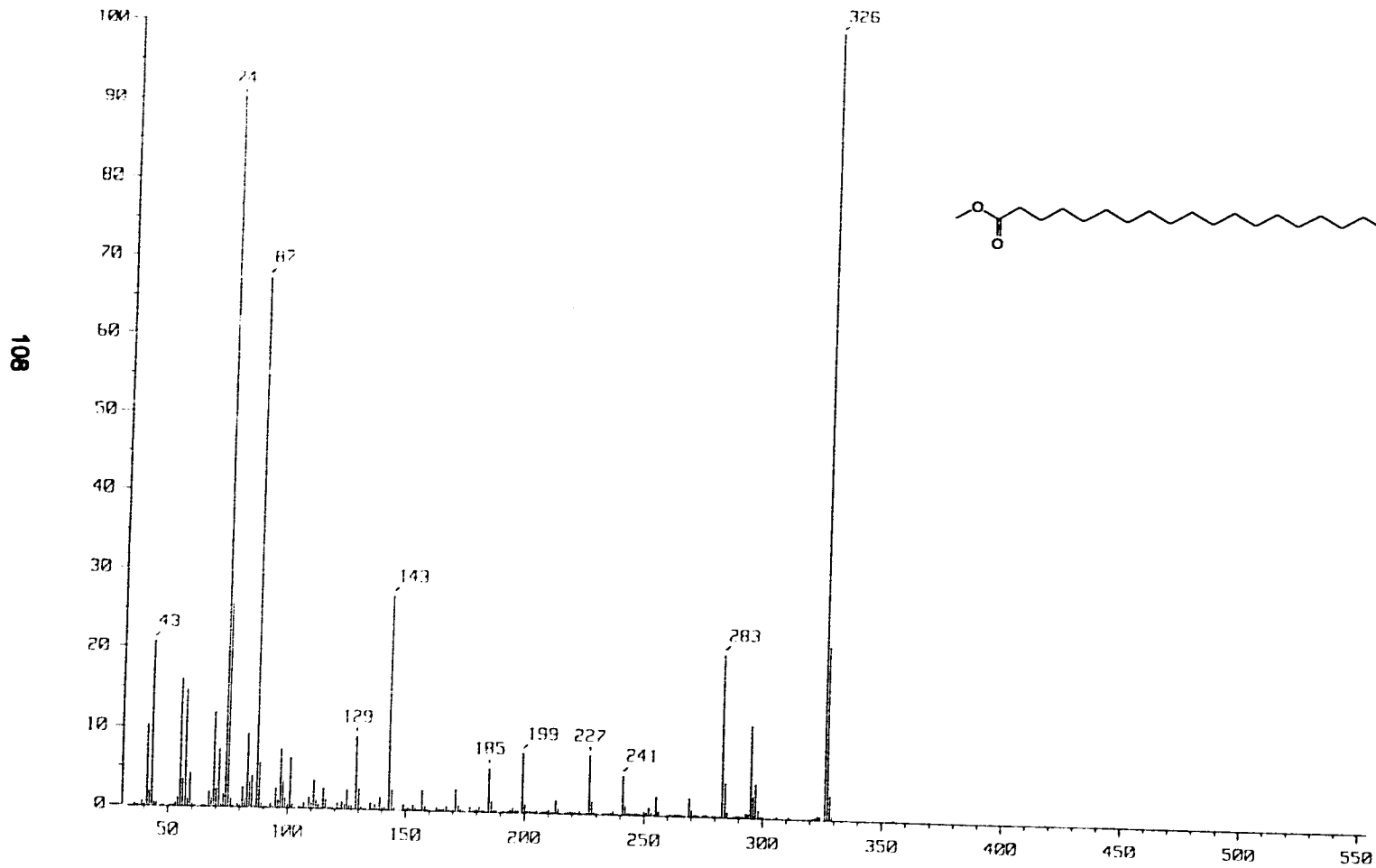


**Espectro 27**

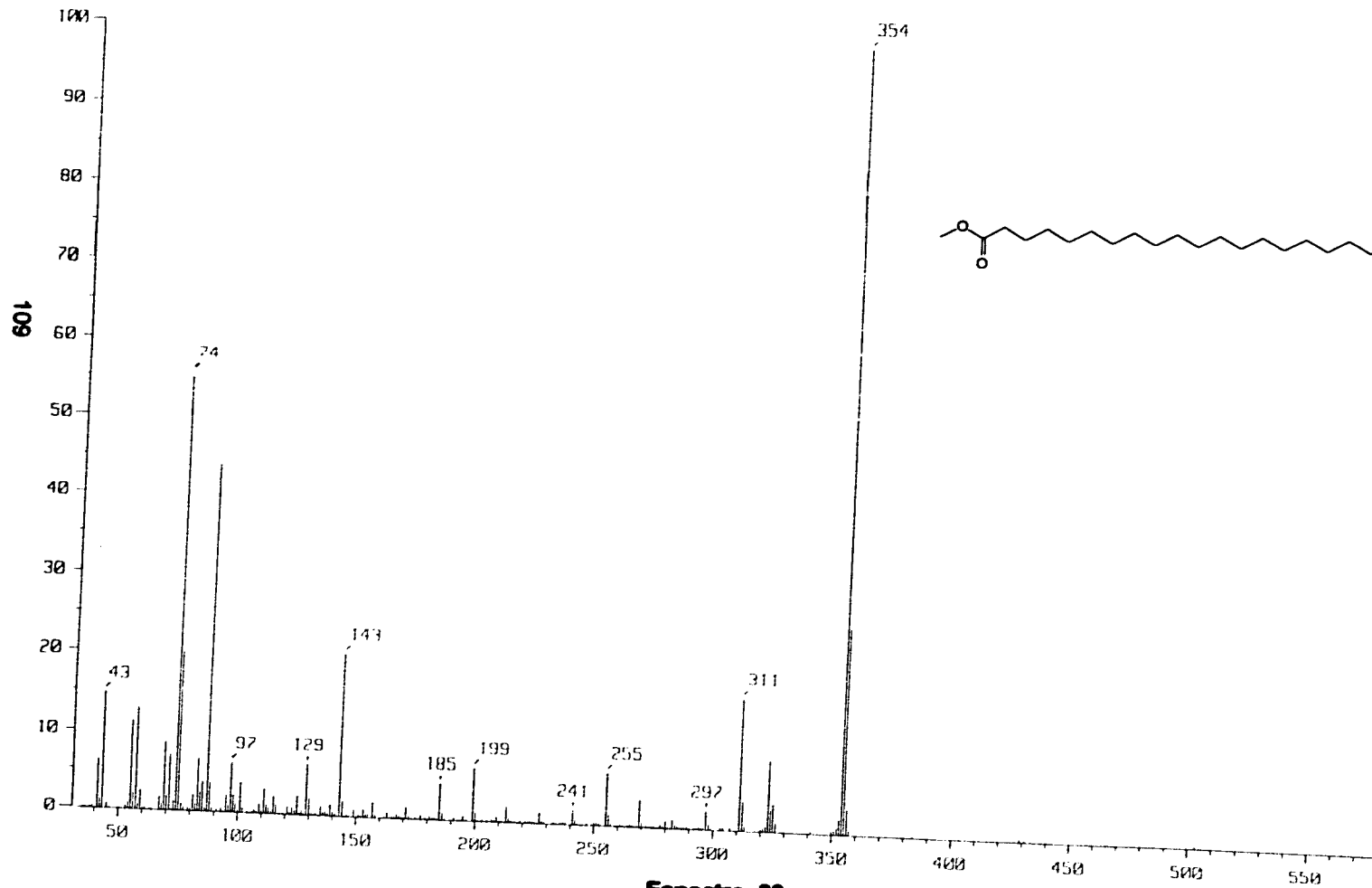
107



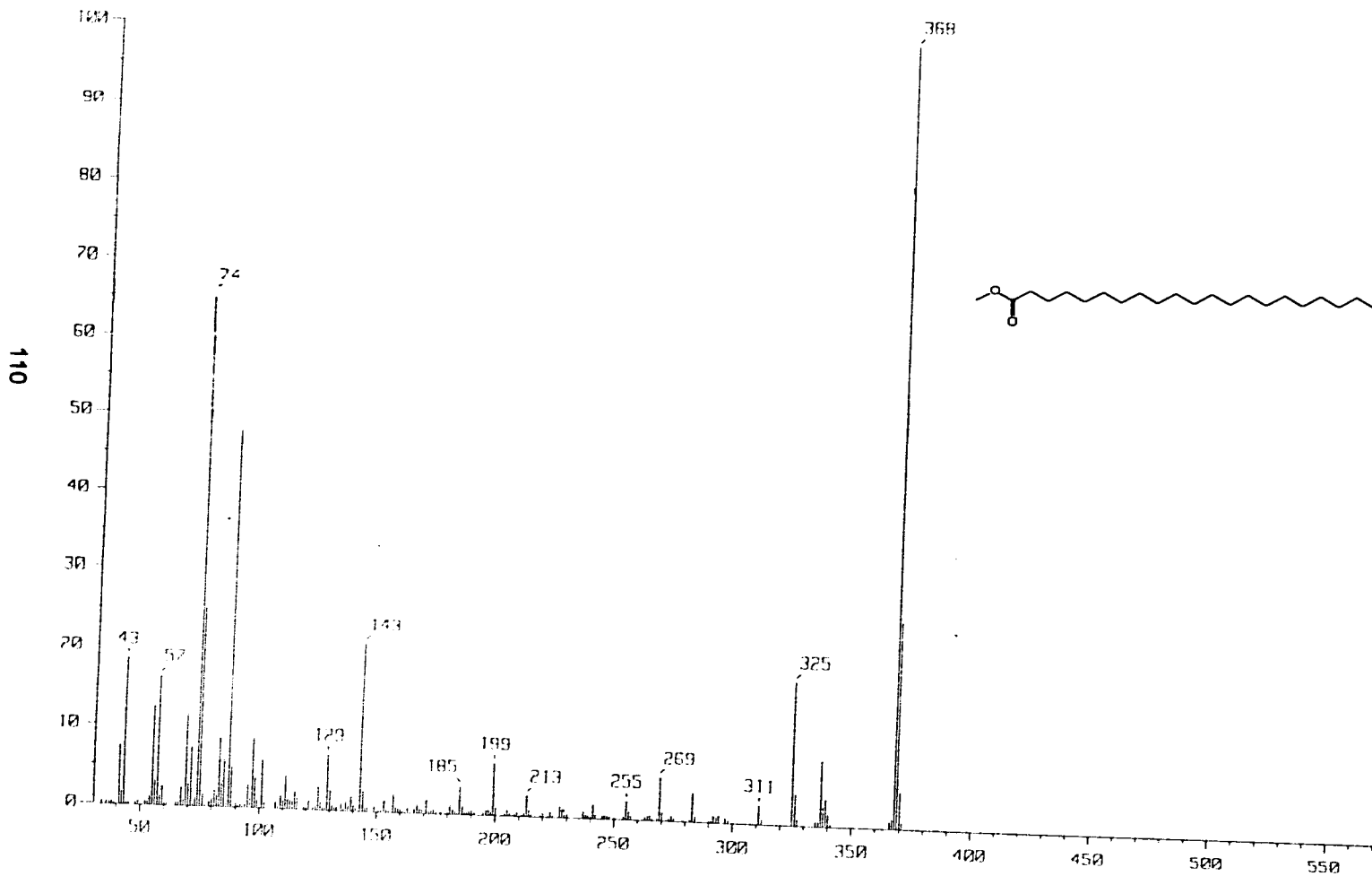
Espectro 28



**Espectro 29**

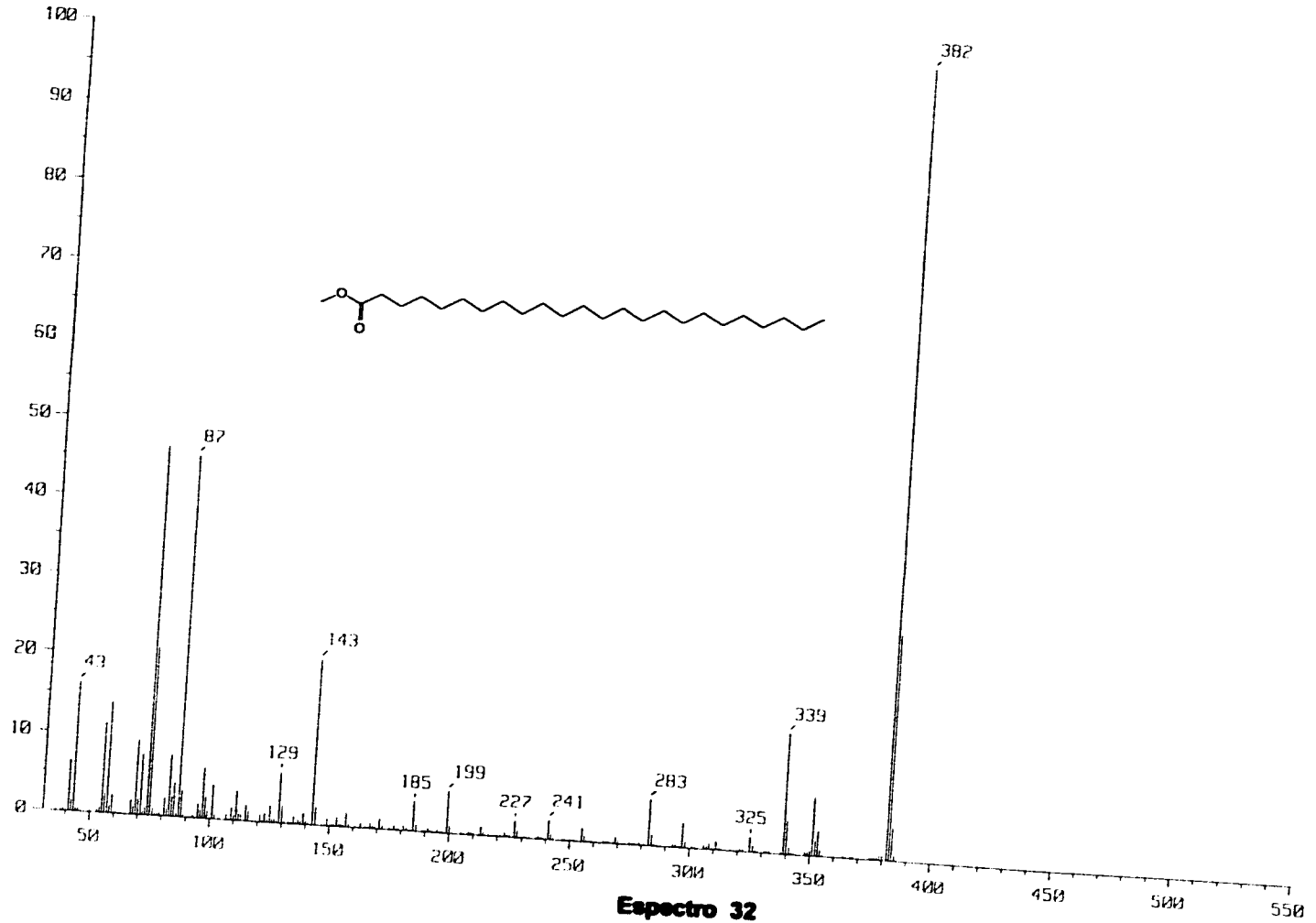


Espectro 30



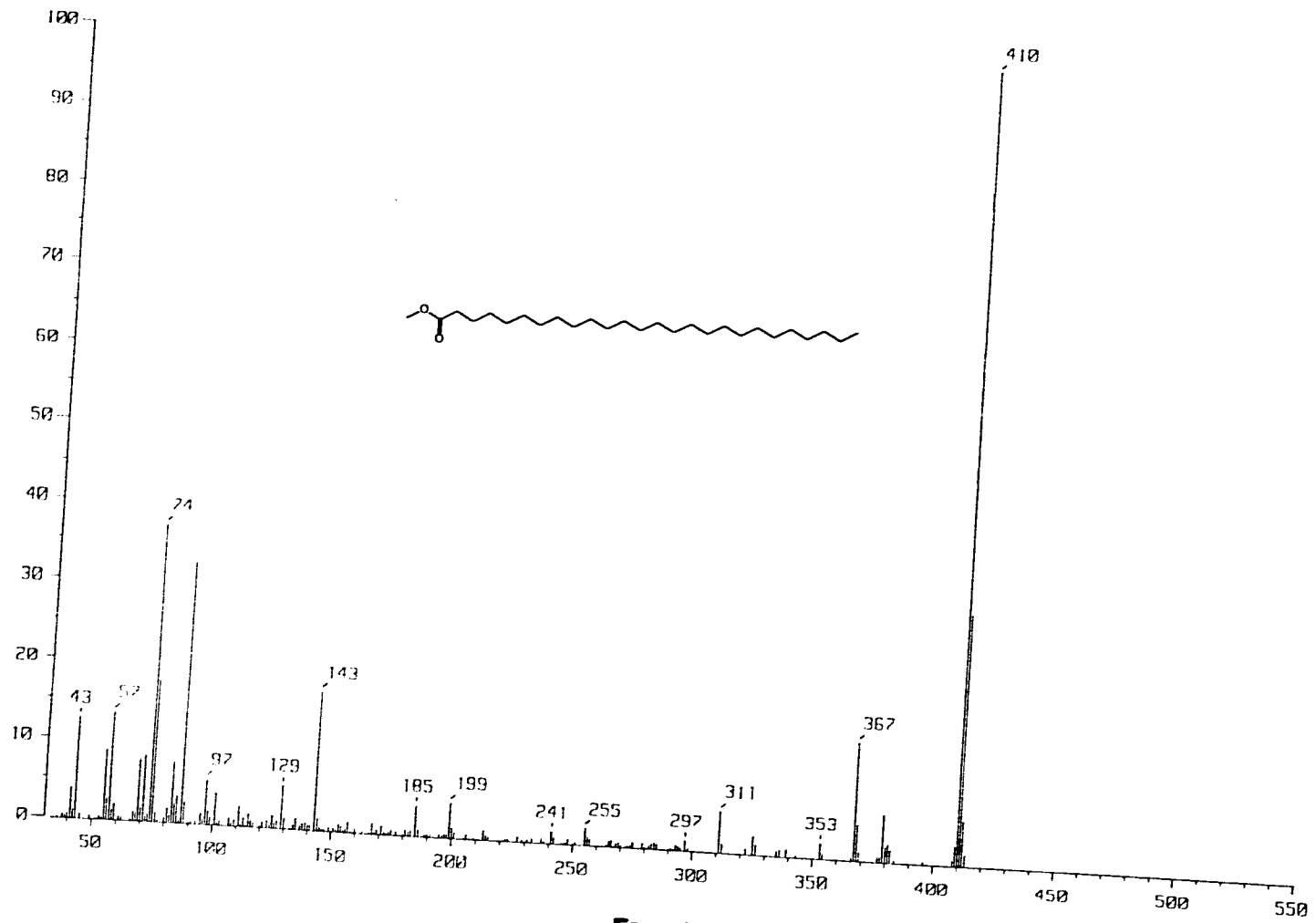
**Especro 31**

111



Espectro 32

112



**Espectro 33**



En la Figura 4 se representa el patrón de fragmentación general de ésteres metílicos de ácidos grasos, destacándose la formación de los iones en  $m/z$  74, 87 y 59.

El más abundante de los ácidos caracterizados fue el ácido hexadecanoico (**98**), que se encontró en una proporción de 45.66%.

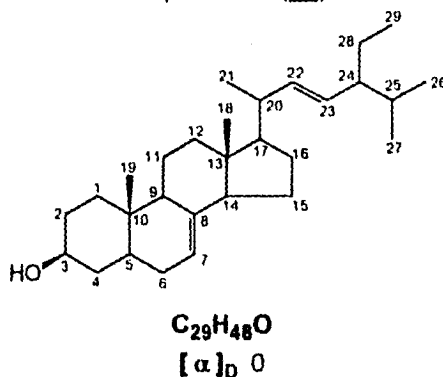
Es importante hacer mención que la identificación de los ácidos grasos fue verificada mediante la comparación de los datos obtenidos experimentalmente con aquellos proporcionados por la biblioteca de datos incorporada al espectrómetro de masas empleado.

#### **4.6 Aislamiento y caracterización de $\alpha$ -espinasterol (**57**) y de la $\beta$ -amirina (**53**).**

De la fracción primaria activa D (Cuadro 9 sección experimental), mediante sucesivas cromatografías en columna y capa delgada se aislaron el  $\alpha$ -espinasterol (**57**) [0.00657% de rendimiento en base a planta seca] y la  $\beta$ -amirina (**53**) [0.00633% de rendimiento en base a planta seca].

Los productos naturales (**57**) y (**53**) se caracterizaron por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las de una muestra auténtica.

**Tabla 7.** Constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas del  $\alpha$ -espinasterol (**57**).



**IR  $V_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$**  (Espectro 34):

3416, 2956, 2868, 1644, 1452, 1377, 1046 y 970.

**E M I E,  $m/z$  (int rel)** (Espectro 35):

412 [ $M^+$ (58)]; 397 [ $M^+$ -15(19)]; 369 [ $M^+$ -43(23)]; 351 [ $M^+$ - $H_2O$ -43(8)]; 300 [ $M^+$ -112(18)]; 271 [ $M^+$ -cadena lateral (100)]; 255(46); 147(27); 107(32); 93(28); 81(43); 55(41); 43(24).

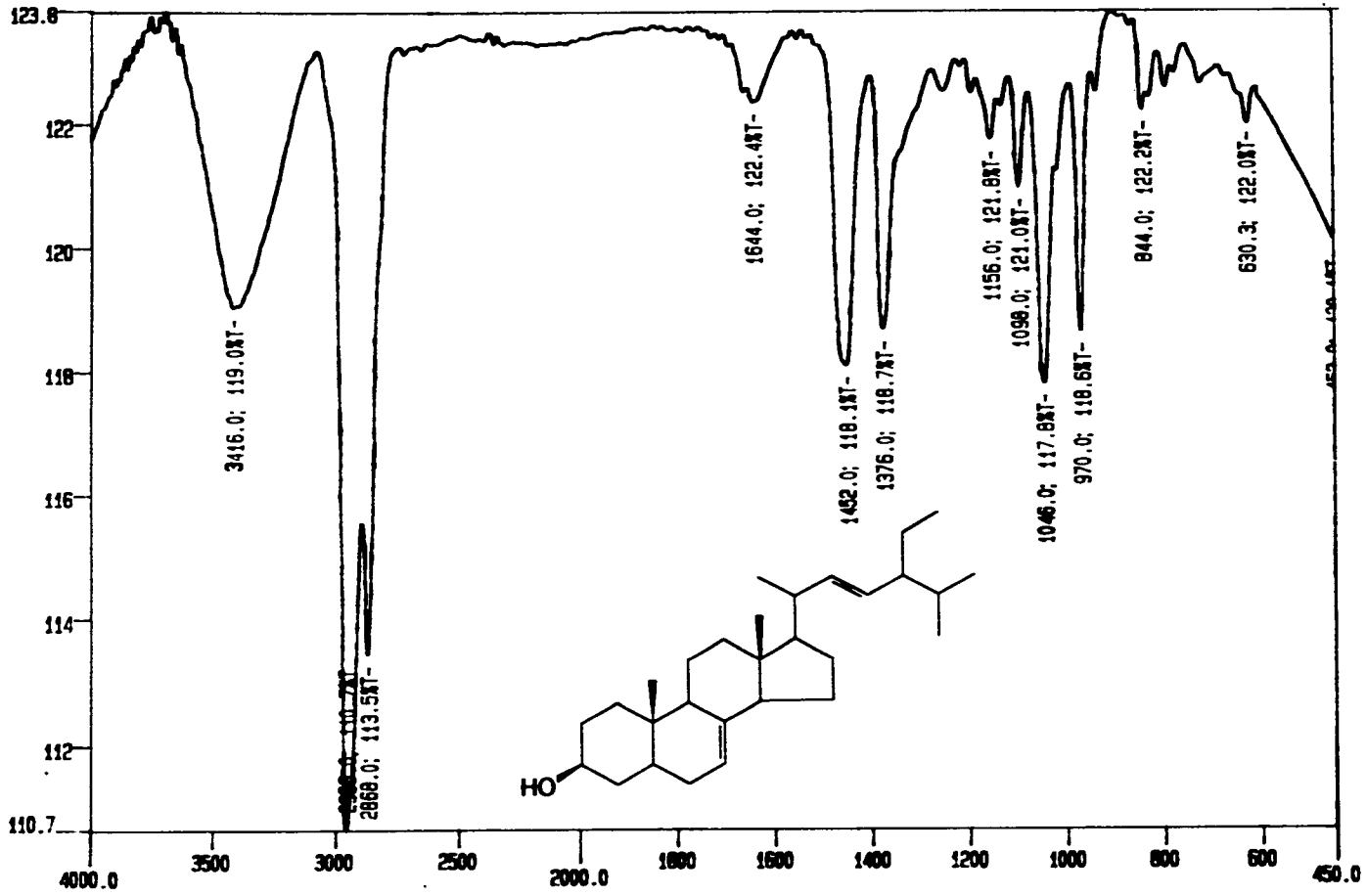
**RMN- $^1H$ ,  $\delta$  ( $CDCl_3$ )** (Espectro 36):

5.15, m, (H-7); 5.16, dd,  $J=15.3, 8.4$  (H-23); 5.02, dd,  $J=15.3, 8.4$  (H-22); 3.50, m, (H-3); 1.03, d,  $J=6.9$  (H-21); 0.85, d,  $J=6.40$  (H-26 ó 27); 0.80, d,  $J=6.3$  (H-26 ó 27); 0.81, s, (H-18); 0.80, m, (H-29); 0.55, s, (H-19).

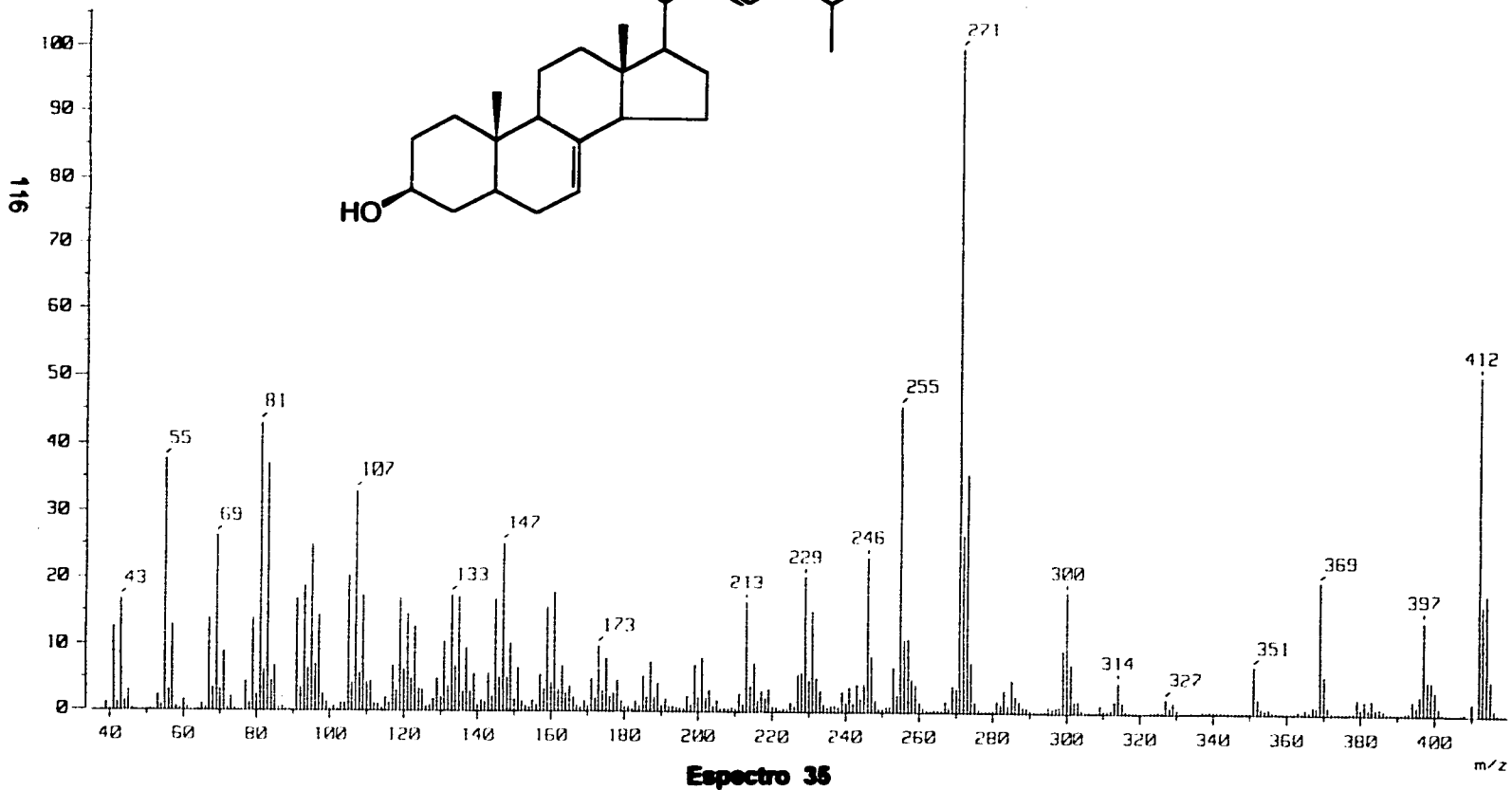
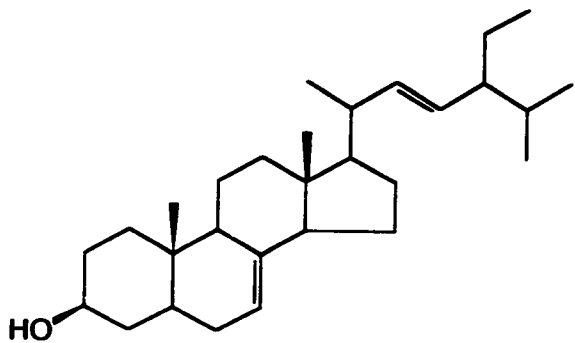
**RMN- $^{13}C$ ,  $\delta$  ( $CDCl_3$ )** (Espectros 37 y 37a):

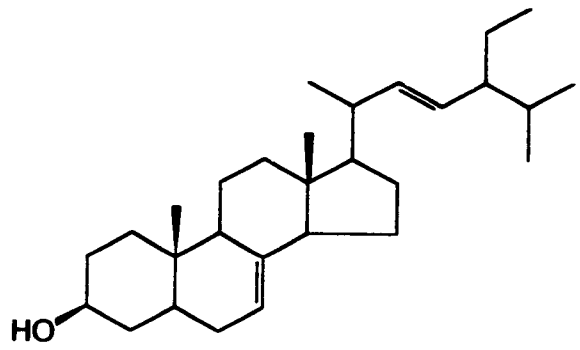
139.5 (C-8), 138.1 (C-7), 129.4 (C-23), 117.4 (C-22), 71.0 (C-3), 55.9 (C-14), 55.1 (C-17), 51.2 (C-9), 49.4 (C-5), 43.3 (C-13), 40.8 (C-24), 40.3 (C-20), 39.5 (C-16), 38.0 (C-1), 37.1 (C-28), 34.2 (C-10), 31.8 (C-25), 31.5 (C-4), 29.63 (C-6), 28.5 (C-12), 25.4 (C-15), 23.0 (C-2), 21.5 (C-27), 21.3 (C-26), 21.0 (C-11), 18.9 (C-21), 13.0 (C-29), 12.2 (C-28), 12.0 (C-19).

$J$ = Constante de acoplamiento expresada en Hz.

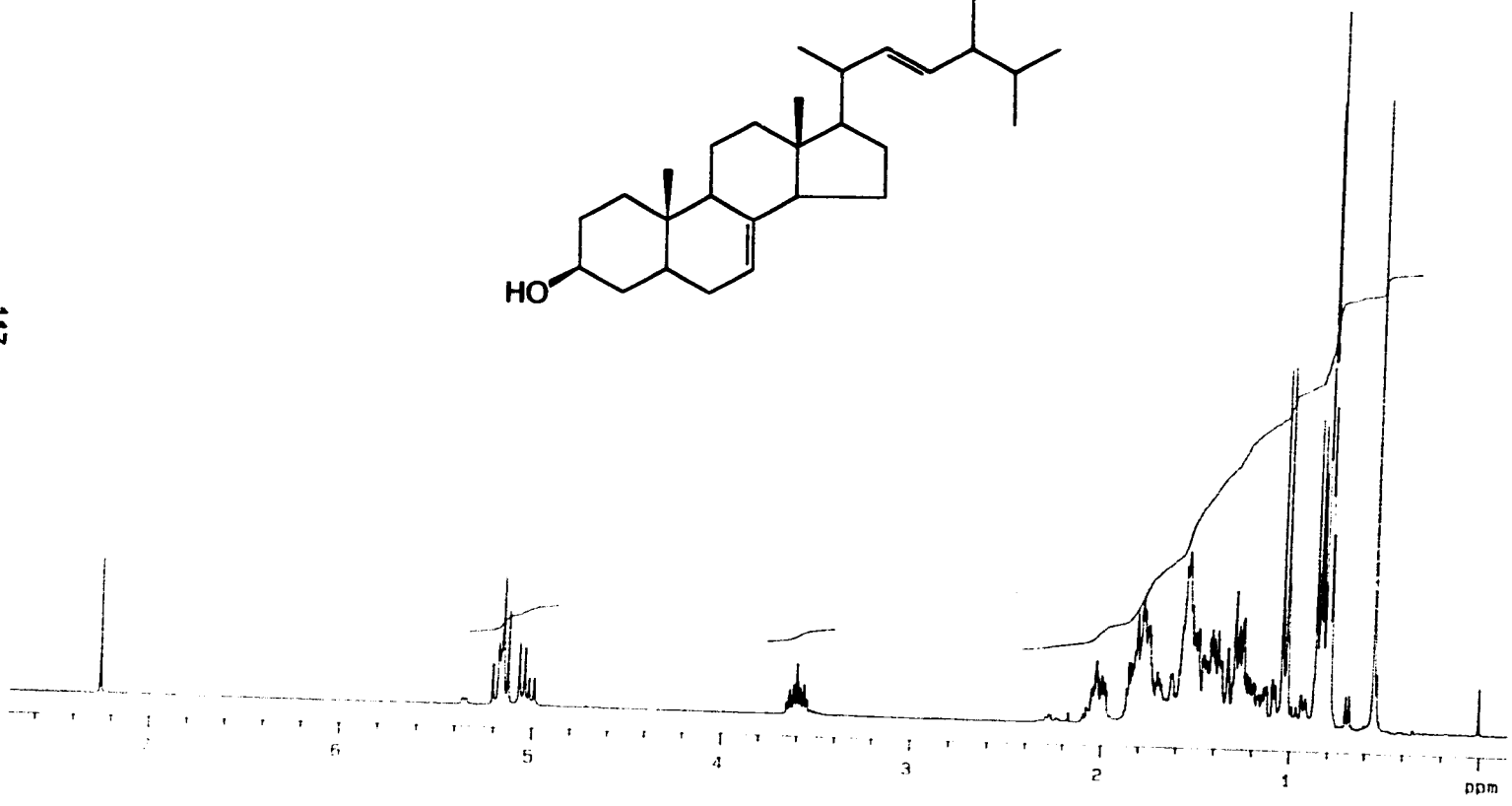


Espectro 34

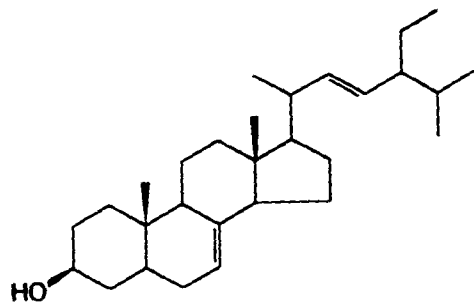




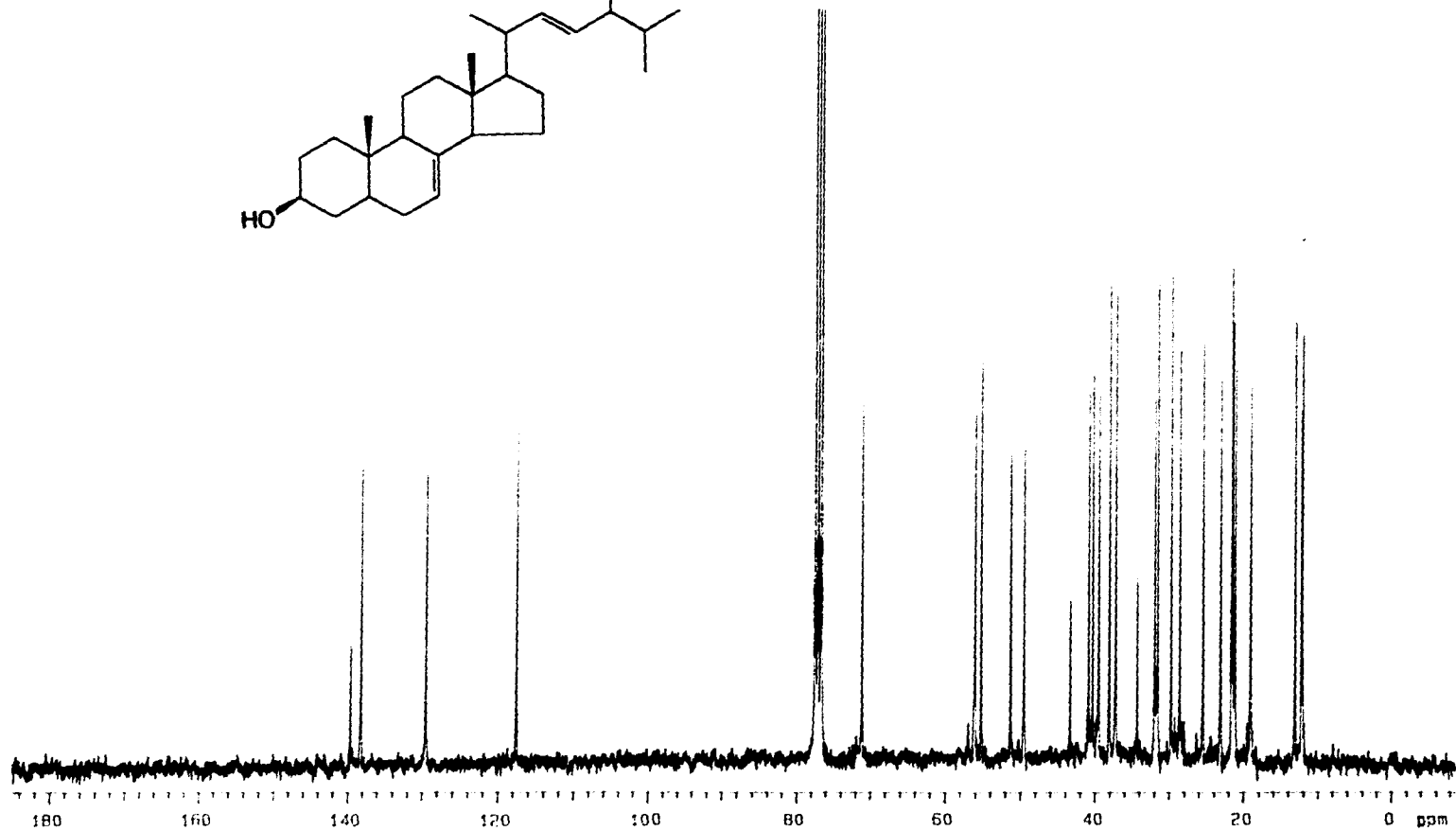
117



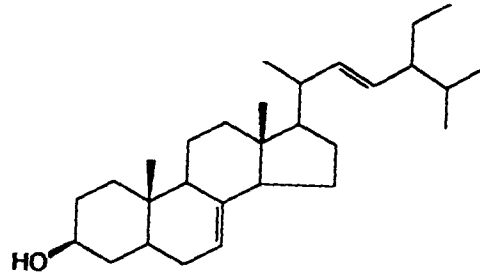
**Espectro 36**



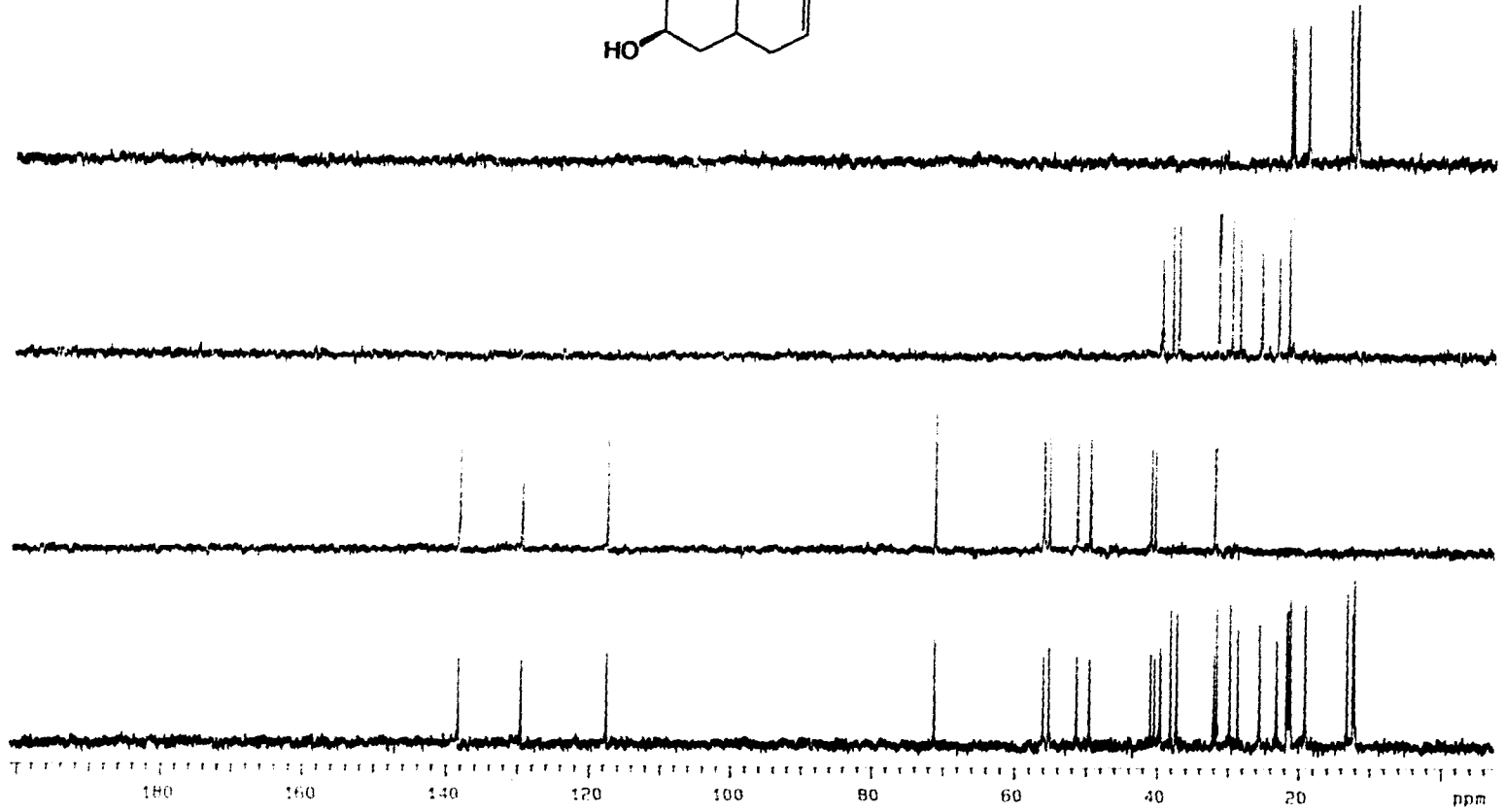
118



**Espectro 37**



119



**Espectro 37a**

#### 4.7 Evaluaciones biológicas de los productos aislados de las fracciones primaria activas.

El estudio biodirigido del extracto activo de *Conyza filaginoides* utilizando como pruebas de rutina la determinación de la toxicidad para *Artemia salina*, la evaluación del efecto sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli* y la valoración del efecto relajante sobre la concentración espontánea de ileo de rata permitió detectar una fracción (Fracción C) entre las de menor polaridad que demostró actividad biológica en todos los ensayos (ver inciso 4.1, sección experimental). El estudio fitoquímico de la misma permitió la obtención del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno (**9**) y del 3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno (**92**). El producto (**9**) presentó una actividad significativa contra *A. salina*; la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) obtenida fue de 31.6  $\mu$ g/ml con un 95% de intervalo de confianza entre 51.8-19.56  $\mu$ g/ml. Por otra parte, el producto (**92**) fue inactivo ya que demostró una CL<sub>50</sub> >1000  $\mu$ g/ml.

Como ya se indicó anteriormente la evaluación de la toxicidad para *A. salina* puede ser de gran utilidad para predecir actividad antitumoral (Anderson *et al.*, 1991). Por lo tanto, y a pesar de la pobre actividad citotóxica demostrada por el extracto original y las fracciones primarias (ver Cuadro 12) se decidió evaluar el potencial citotóxico del producto natural (**9**) empleando las mismas líneas celulares derivadas de tumores humanos A-549, MCF-7 y HT-29. De nueva cuenta en ninguno de los casos se obtuvieron resultados significativos. Los valores de DE<sub>50</sub> correspondieron a 73.71  $\mu$ g/ml, 60.41  $\mu$ g/ml, 42.67  $\mu$ g/ml, respectivamente.

Estos resultados indican que no en todos los casos la toxicidad para *A. salina* puede ser considerado como un buen ensayo preliminar para la



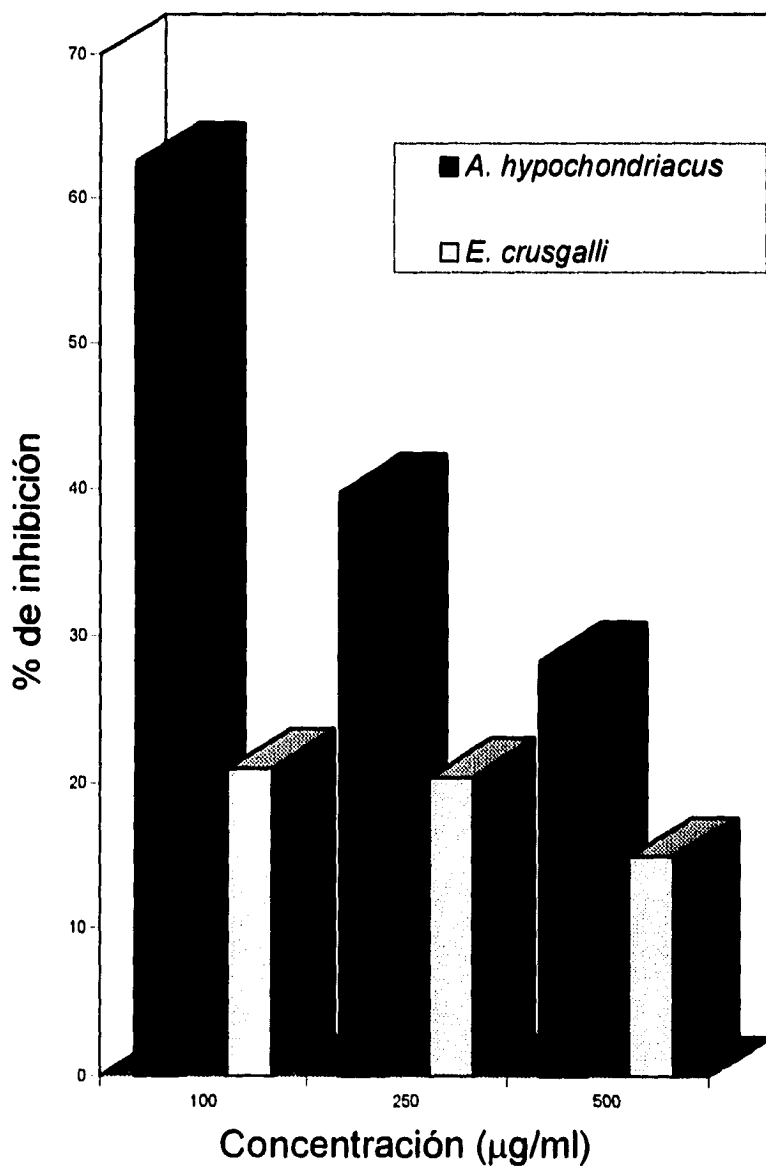
detección y monitoreo de la actividad citotóxica.

El efecto inhibitor del crecimiento vegetal del producto (9) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli* se ilustra en la Gráfica 2. La  $CI_{50}$  calculada mediante análisis probit para el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* correspondió a 317.61  $\mu\text{g/ml}$  con un intervalo de confianza de 467.7-244.5  $\mu\text{g/ml}$ . La especie *E. crus-galli* fue menos sensible al producto natural y en este caso el valor de  $IC_{50}$  resultó  $> 1000 \mu\text{g/ml}$ . En otras investigaciones el óxido de cariofileno ha demostrado un efecto fungistático contra el hongo fitopatógeno *Pestalotia subicularis* y sobre otras especies de hongos (Habbell *et al.*, 1983 y Langenheim, 1994). También se ha comprobado que el compuesto (9) impide el ataque de la hormiga *Atta lephots* sobre la especie *Hymenaea courbuil* y otros arboles tropicales (Langenheim, 1994). Así mismo, el cariofileno (9) afecta significativamente el crecimiento del lepidóptero *Heliothis virescens* que ataca al algodónero y al tabaco (Langenheim, 1994).

El producto natural (92) se obtuvo también de la fracción primaria activa responsable de la actividad fitoinhibidora. Sin embargo, en los ensayos cuantitativos no demostró un efecto inhibitorio significativo. A la concentración de 500  $\mu\text{g/ml}$  el triterpenoide ocasionó un ligero efecto estimulante sobre el crecimiento radicular de ambas especies de prueba. En el caso de *E. crus-galli* el efecto estimulante fue de 16.8 % y para *A. hypochondriacus* de 8.6 % (ver Cuadro 15).

A pesar de que los restantes metabolitos secundarios aislados en el presente estudio se obtuvieron de fracciones primarias que no demostraron actividad fitoinhibidora se decidió evaluar el efecto de los mismos sobre el crecimiento radicular de las dos semillas, encontrándose que los productos (92) y (94) estimulaban el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*. Los resultados obtenidos se resumen también en el Cuadro 15.

Gráfica 2. Efecto del 4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno (9) sobre el crecimiento radicular de *A.hypochondriacus* y *E.crusgalli*



El efecto estimulante más notorio lo desarrolló la 5-hidroxi-7-metoxiflavanona (**94**) y la especie más afectada fue *E. crus-galli*. Por último, cabe mencionar que el terpenoide (**93**) demostró un comportamiento similar al producto (**92**) a la concentración de 500 µg/ml.

Cuadro 15. Efecto de los productos (**57**), (**92**), (**93**) y (**94**) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*.

Concentración µg/ml	% DE INHIBICION	
	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	<i>Echinochloa crus-galli</i>
<b>3β-tridecanoiloxi-28-hidroxi-Δ<sup>12</sup>-oleaneno (92)</b>		
500	108.6	116.8
250	99.4	100.05
100	95.0	96.0
<b>3β-28-dihidroxi- Δ<sup>12</sup>-oleaneno (93)</b>		
500	113.1	102.0
250	95.3	91.9
100	85.9	89.5
<b>α-espinaesterol (57)</b>		
500	110.2	112.6
250	115.1	121.9
100	94.8	114.1
<b>5-hidroxi-7-metoxiflavanona (94)</b>		
500	111.0	105.6
250	108.2	126.5
100	122.4	127.48

Considerando que todos los productos aislados en el presente estudio se obtuvieron a partir de fracciones que demostraron un efecto relajante significativo de la musculatura lisa, se procedió a la valoración preliminar de los mismos como agentes espasmolíticos potenciales.

La evaluación del efecto espasmolítico potencial de los compuestos (9), (57), (92), (93), (94) y la mezcla de ácidos grasos (Cuadro 16) se realizó también a la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) del extracto original, utilizando la misma metodología que para el caso de las fracciones primarias y el extracto original (Rojas, 1995).

En el Cuadro 16 se resumen los resultados obtenidos y todos los productos demostraron un efecto relajante notable sobre la contracción espontánea de ileo de rata. La mezcla de ácidos grasos, y los productos (9) y (57) demostraron la mayor actividad.

Cuadro 16. Efecto relajante de los productos puros sobre la contracción espontánea de ileo de rata.

COMPUESTO	% DE RELAJACION
4,5-epoxi- $\beta$ -cariofileno	79.69
3 $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno	64.21
$\alpha$ -espinasterol	81.15
3 $\beta$ -28-dihidroxi- $\Delta^{12}$ -oleaneno	59.45
5-hidroxi-7-metoxiflavanona	67.61
Mezcla de ácidos grasos	77.40

De los resultados obtenidos en esta evaluación, no resulta sorprendente el efecto del flavonoide ya que se ha demostrado previamente que estos compuestos modifican la respuesta contractil de la musculatura lisa en diferentes tejidos [ileo, útero, aorta, bronquios, etc. (Fanning *et al.*, 1983; Middleton, 1988 y Capasso *et al.*, 1991)]. En relación a los restantes productos no se encontró ninguna referencia con relación a su actividad espasmolítica.

## V. CONCLUSIONES.

1. El extracto orgánico (CHCl<sub>3</sub>-MeOH 1:1) total y el lixiviado acuoso de la especie medicinal *Conyza filaginoides* (Asteraceae) demostraron un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*. De manera adicional, el extracto orgánico presentó un efecto notable para el crustáceo *A. salina* con un valor de concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de 145.2 µg/ml. Estos resultados así como el efecto espasmolítico previamente demostrado (Rojas, 1995) permitieron establecer la potencialidad de la especie como una fuente de principios bioactivos.
2. El fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico mediante la determinación de la toxicidad para *A. salina* y la evaluación del efecto inhibitorio sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*, *E. crus-galli* y la valoración del efecto relajante de la contracción espontánea de íleo de rata permitió el aislamiento de los siguientes compuestos bioactivos: 4,5-epoxi-β-cariofileno (**9**), 3β-tridecanoiloxi-28-hidroxi-Δ<sup>12</sup>-oleaneno (**92**), 3β-dihidroxi-Δ<sup>12</sup>-oleaneno (**93**), α-espinasterol(**57**), 5-hidroxi-7-metoxiflavanona (**94**), β-amirina (**53**) y los ácidos nanonodioico (**95**), tetradecanoico (**96**), pentadecanoico (**97**), hexadecanoico (**98**), heptadecanoico (**99**), 6-octadecanoico (**100**), 14-metil-heptadecanoico (**101**) eicosanoico (**102**), docosanoico (**103**), tricosanoico (**104**), tetracosanoico (**105**) y hexacosanoico (**106**). El triterpenoide (**92**) constituye un nuevo producto natural.
3. El 4,5-epoxi-β-cariofileno (**9**) fue el único producto natural activo en todas las evaluaciones. La concentración del compuesto **9** que ocasionó la inhibición del crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* en un 50 % correspondió a

317.61  $\mu\text{g/ml}$ ; la especie *E. crus-galli* fue menos sensible al producto natural y la  $\text{IC}_{50}$  resultó mayor a 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Este compuesto también constituye el principio activo de las fracciones de menor polaridad responsable de la toxicidad para *A. salina*. El valor de la concentración letal media demostrado por el producto natural fue de 31.6  $\mu\text{g/ml}$ . A pesar de la toxicidad significativa para *A. salina* el cariofileno solamente presentó citotoxicidad marginal sobre tres líneas celulares derivadas de tumores humanos que incluyeron colon (HT-29), mama (MCF-7) y pulmón (A-549). Los valores de  $\text{DE}_{50}$  correspondieron a 73.71, 60.41 y 42.67  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

Todos los compuestos obtenidos demostraron de forma preliminar un efecto relajante sobre la contracción espontánea de íleo de rata. Esta actividad farmacológica demostrada por el extracto y los compuestos podría estar relacionada con el uso popular de la especie para el tratamiento de trastornos gastrointestinales.

4. Los metabolitos secundarios aislados y caracterizados de esta especie presentan similitud con los descritos anteriormente en otras especies del género. La flavanona (5-hidroxi-7-metoxiflavanona) aislada en el presente trabajo constituye la primera de su tipo estructural en el género *Conyza*. Aunque los ésteres derivados de la  $\beta$ -amirina y compuestos relacionados presentan una distribución relativamente amplia en la naturaleza, su obtención de una especie del género *Conyza* resulta sin precedente. Es importante mencionar que los compuestos  $\alpha$ -espinasterol y la  $\beta$ -amirina fueron previamente aislados de esta planta por Domínguez y colaboradores (1972).
- 5 De manera general la caracterización de los compuestos se realizó por métodos espectroscópicos, espectrométricos y químicos. En el caso de los

ácidos grasos (derivatizados como ésteres metílicos) la identificación se realizó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

6. El presente trabajo representa una contribución adicional para el conocimiento del contenido metabólico secundario del género *Conyza* y de la flora medicinal mexicana.

## **VI. OBSERVACIONES COMPLEMENTARIAS.**

1. La obtención de los principios bioactivos de las fracciones de mayor polaridad se encuentra en proceso.
2. La evaluación del efecto espasmolítico de los compuestos aislados sobre la contracción de íleo de rata inducida eléctricamente y otros experimentos pertinentes se encuentran en proceso.
3. Aparentemente este trabajo constituye la primera descripción acerca del efecto relajante de la musculatura lisa de los compuestos aislados. Sin embargo, se recomienda revisar de nueva cuenta la bibliografía correspondiente para comprobar definitivamente esta afirmación.

## VII. BIBLIOGRAFIA.

- Anderson, A. L., Goetz, C. M. y McLaughlin, J. L. (1991). A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis*, **2** 107-111.
- Ahmed, M. y Ahmed, A. A. (1990a) A new glucoside from *Conyza linifolia*. *Pharmazie*, **45** 224-225.
- Ahmed, M. y Ahmed, A. A. (1990b). Terpenoids from *Conyza stricta*. *Phytochemistry*, **29** 2715-2716.
- Ahmed, A. A. (1991) A diterpene xyloside from *Conyza steudellii*. *Phytochemistry*, **30** 611-612.
- Anaya, A. L., Calera, M., Mata, R. y Pereda, M. R., (1990). Allelopathic potencial of compounds isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology*, **16** 2145-2152.
- Berry, K. M., Perry, N.B. y Weavers, R. T., (1985). Foliage sesquiterpenes of *Dacrydium cupressinum*: Identification, variation and biosynthesis. *Phytochemistry*, **24** 2893-2898.
- Bohlmann, F. y Jakupovic, J. (1979) 8-oxo-a-selinen und neue scopoletin-derivate aus *Conyza*-arten. *Phytochemistry*, **18** 1367-1370
- Bohlmann, F. y Wegner, P. (1982) Three diterpenes from *Conyza podocephala*. *Phytochemistry*, **21** 1693-1695.
- Bohn, A. B. (1975). Flavanones and dihydroflavonols en *The flavonoids* (Eds Harborne, J. B., Mabry, T. J., Mabry, H.). Academic Press, New York, pp 560-631
- Bohn, A. B. (1980). The minor flavonoids en *The Flavonoids Advances in Research since 1980* (Ed Harborne, J.B.). Chapman and Hall, London, pp 348-371



Bohn, A. B. (1994). The minor flavonoids en *The Flavonoids Advances in Research since 1986* (Ed Harborne J. B.). Chapman and Hall, London, pp 406-418.

Budzikiewicz, H. Djerassi, C. y Willians, D. H.; (1964). *Structure elucidation y Natural Products by Mass Spectrometry*, Vol 2. Holden-Day, San Francisco, pp 36.

Capasso, A., Pinto, A., Mascolo, N., Autore, G., y Capasso, F. (1991) Reduction of agonist-induced contractions of guinea-pig isolated ileum by flavonoids. *Phytother. Res.*, **5** 85-87.

Castañeda, P., Garcia, M. R., Hernández, B. E., Torres, B. A., Anaya, A. L. y Mata, R., (1992). Effects of some compounds Isolated from *Calaenodendron mexicanum* Standl (Euphorbiaceae) on seeds and phytopathogenic fungi. *Journal of Chemical Ecology*, **18** 1025-1037.

Cheung, H. T. y Williamson (1969). NMR Signals of metyl groups of triterpenes with oxygen functions at positions 2,3 and 23. *Tetrahedron* **25** 119-128.

Cox, A. P. y Balick, M. J. (1994). The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American*, 82-87.

Dellar, J. E., Cole, M. D., Gray, A. I., Gibbons, S. y Waterman, G. P. (1994). Antimicrobial sesquiterpenes from *Prostanthera aff melissifolia* y *P. rotundifolia*. *Phytochemistry*, **36** 957-960.

Diaz, J. L., (1976). Usos de las plantas medicinales de México, **2**, IMEPLAN, México D:F., pp 37-38, 132-271.

Doddrell, D. M., Khong, P. W y Lewis, K. G. (1974). The stereochemical dependence of  $^{13}\text{C}$  shifts in olean-12-enes and urs-12-enes as an aid to structural asignment. *Tetrahedron Letters* 2381-2384.

Dominguez, X. A., Quintero, G. y Butruill, D. (1972). Triterpenoids and triacontane from *Conyza filaginoides*. *Phytochemistry*, **11** 1855-1856.

Fanning, M. J., Macander, P., Drzewiecki, G. y Middleton, E. (1983). Quercetine inhibits anaphylactic contraction of guinea-pig ileum smooth muscle. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunot.*, **71** 371-373.

Grau, J. (1977) Astereae-systematic review en *The biology and chemistry of Compositae* eds Heywood, V. H., Harborne, J. B. y Turner, B. L., vol 1. Academic Press, London, pp 539-574.

Gutiérrez, M. T. y Barrientos, T. (1994) Determinación de la actividad antimicrobiana y citotóxica potencial de extractos derivados de treinta especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional mexicana. *Tesis de licenciatura*. Facultad de Química, Universidad nacional Autónoma de México.

Harraz, F. M. y Amer, M. E. (1988) Constituents of *Conyza linifolia* (Willd) Tackh. *Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences* **2** 127-129.

Hegnauer, R. (1977). The chemistry of the Compositae en *The biology and chemistry of The Compositae*. eds Heywood, V. H., Harborne, J. B. y Turner, B. L., vol 1. Academic Press London, pp 284-321.

Hinkley, F. R., Perry, N. B. y Weavers, R. T. (1994). Confirmation of structure and absolute stereochemistry of 9-epi- $\beta$ -caryophyllene from *Dacrydium cupressinum*. *Phytochemistry*, **35** 1489- 1494.

Hui-Zheng, X., Zhi-Zhen, L., Konno, C., Soejarto, D., Cordell, G., Fong, H. y Hodgson, W. (1988). 3 $\beta$ -(4-hidroxycinnamoyl)-erithrodial from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry*, **27** 233-235.

Hubbell, S. P., Wiemer, P. F. y Adejore, A. (1983). Antifungal terpenoid defends a neotropical tree (*Hymenaea*) against attack by fungus-growing ants. *Oecologia*, **60** 321-327.

Ismail, S. J., Hammouda, A. M., Rizk y El-kady, S. E. (1979). Flavonoid constituents of *Conyza discordis* L. and *C. aegyptiaca* A. *Pharmazie*, **34** 112.

Inoue, M., Nishimura, Hai-Hang, L. y Mizutani, J. (1992). Allelochemicals of *Polygonum sachalinense* FR.SCHM (Polygonaceae). *Journal of Chemical Ecology*, **18** 1833-1840.

Jolad, S. D., Timmermann, B. N., Hoffmann, J. J., Bates, R. B. y Camou F. A. (1988). Diterpenoids of *Conyza coulteri*. *Phytochemistry*, **27** 1211-1212.

Langenheim, J. H. (1994). Higher plant terpenoids; A phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*, **20** 1223-1280.

Markham, K. R. y Mabry, T. J. (1975). Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids en *The Flavonoids* (Eds Harborne, J. B., Mabry, T. J. y Mabry H.) Academic Press, New York, pp 45-77.

Markham, K. R. y Mabry, T. J. (1975). Mass Spectrometry of flavonoids en *The Flavonoids* (Eds Harborne, J. B., Mabry, T. J. y Mabry H.). Academic Press, New York, pp 78-126.

Markham, K. R., Chari, V. M. y Mabry, T. J. (1985). Carbon-13 NMR Spectroscopy of flavonoids, *ibid*, pp 19-28.

Mahato, S. B., Sen, A. K., Mazumdar, C. y Yamasaki, K. (1981) Diterpenes of *Conyza stricta* identification of Conyzic acid, seconidoresedaure and strictic acid. *Phytochemistry*, **20** 850-851.

Mahato, S. B. y Pal, B. C. (1987). Triterpenoid glycosides of *Corchorus acutangulus*. Lam. *Journal of Chemical Society*, Perkin Transactions I, 629-634.

Martinez, M. 1989., *Las plantas medicinales de México*. 2a. Edición., Ediciones Bota, México D.F., pp 291-293.

Meckes, M., Tortoriello, J. y Villarreal, M. L. (1993). Investigación farmacológica de las plantas medicinales en la investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana. Secretaría de salud, México D F, pp 157-170.

Metwally, M. A., (1989). Egyptian compositae 18. New triterpene from *C. aegyptiaca* *Chem. Sci.*, **44** 1584.

Pandey, U. C., Singhal, A. K., Barua, N. C., Sharma, R. P., Baruah, J. N., Watanabe, K., Kulanthaivel, P. y Herz, W. (1984). Stereochemistry of strictic acid and related furano-diterpenes from *Conyza japonica* and *Grangea maderaspatana*. *Phytochemistry*, **23** 391-397.

Peterson, G. S., Kandil, M. A. y Abdallah, M. D. (1989). Isolation and characterisation of biologically active compounds from some plant extracts. *Pestic Sci*, **25** 332-342.

Rojas, A. M., Cruz, S., Rauch, V., Bye, R., Linares y Mata, R. (1995). Spasmolytic potential of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine*, **2** en prensa.

Sanz, J. F. y Marco, J. A. (1991). Ein neues butenolid aus *Conyza bonariensis*. *Liebigs Ann Chem* 399-400.

Silverstein, R. M., Bassler, G. C. y Morrill, T. C. (1991). Spectrometric identification of organic compounds, 9ª Ed. John Wiley, Singapore.

Sen, A. K., Mahato, S. B. y Dutta, N. L. (1975). Conyzic acid, a new diterpene resin acid from *Conyza stricta*. *Indian Journal of Chemistry*, **13** 504-505.

Sen, A. K., Mahato, S. B. y Dutta N. L. (1976). Flavonoids of *Conyza stricta* (Compositae) Isolation of 5,6-dihidroxy-3,8,4'-trimetoxi- & 5,7-dihidroxi 3,8,3',4',5'-pentametoxi-flavones. *Indian Journal of Chemistry*, **14(B)** 849-851.

Shriner, R. L., Fuson, R. C. y Curtin, D. Y (1980) Identificación sistemática de compuestos orgánicos. Limusa, México D.F.

Stahl, E. (1969). Thin layer chromatography Academic Press Inc., New York, pp 487.

Tandon, S. y Rastogi, R. P. (1977). Conyzatin- a new flavone from *Conyza stricta*. *Phytochemistry*, **16** 1455-1456.

Tandon, S. y Rastogi, R. P (1979). Strictic Acid, a novel diterpene from *Conyza stricta*. *Phytochemistry*, **18** 494-495.

Tomai, M., Watanabe, N., Someya, M., Kondoh, H., Omura, S., Pei Ling, Z., Chang, R. y WüMing, C. (1989). New hepatoprotective triterpenes from *Canarium album*. *Planta medica*, **55** 44-47.

Torrenegra, R., Robles, J., Waibel, R., Löwel, M. y Achenbach, H. (1994). Diterpenes and diterpene xylosides from *Conyza trihecatactis*. *Phytochemistry*, **35** 195-199.

Wannan, B. S., Waterhouse, J. T., Gadek, P. A. y Quinn, C. J. (1985). Biflavonoids and affinities of *Blepharocarya*, biochemical systematic and ecology. *Phytochemistry*, **13** 105-108.

Wolf, A. A., Ludger, E. y Stumpf, B. (1990). Biotransformation of caryophyllene by *Diplodia gossypina*. *Phytochemistry*, **29** 115-120.

Yang, C. R., Tan He, Z., Cong Li, X., Tai, Z. Q., Hehg He, C., Yang, J. y Morita, T. (1990). Blinin, a neoclerodane diterpene from *Conyza blinii*. *Phytochemistry*, **28** 3131-3134.

Zdero, C., Ahemed, A. A., Bohlmann, F. y Mungai, G. M. (1990a). Seco-clerodanes and other diterpenes from *Conyza welwitschii*. *Phytochemistry*, **29** 2247-2252.

Zdero, C., Ahemed, A. A., Bohlmann, F. y Mungai, G. M. (1990b). Diterpenes and sesquiterpene xylosides from East African *Conyza* species. *Phytochemistry*, **29** 3167-3172.