



100
Rij

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"ESTUDIO QUIMICO Y BIOLOGICO DE LA PLANTA
MEDICINAL *Xanthocephalum gymnospermoides*
VAR *ERADIATUM* (ASTERACEAE)"

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :
ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ
JOSE LUIS TREJO MIRANDA



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: PROF. YOLANDA CABALLERO ARROYO
VOCAL: PROF. MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS
SECRETARIO: PROF. RACHEL MATA ESSAYAG
1er. SUPLENTE: PROF. JOSE GUSTAVO AVILA ZARRAGA
2do. SUPLENTE: PROF. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO 6, UNIDAD DE INVESTIGACION DE PLANTAS MEDICINALES DEL INSTITUTO DE QUIMICA Y LA FACULTAD DE QUIMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

SUSTENTANTES:

Rivero Cruz Isabel

ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ



JOSE LUIS TREJO MIRANDA

ASESOR:

Rachel Mata de Espindola

DRA. RACHEL MATA DE ESPINDOLA

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los proyectos DGAPA (Dirección General de Asuntos de Personal Académico) IN206795 y CONACYT (Convenio No.400313-S-2576PM).

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

Al Dr. Federico del Río y a las M. en C. Isabel Chávez y Beatriz Quiroz de los laboratorios de RMN del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de RMN.

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

A la Q. F. B. Imelda Villaseñor del laboratorio de Espectroscopía IR del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de IR.

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

De manera muy especial agradecemos a la M. en C. Ma. Isabel Aguilar por su colaboración durante el desarrollo del presente trabajo. También agradecemos sus valiosos comentarios que mejoraron la versión final de esta tesis.

Isabel Rivero agradece a la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA), por la beca otorgada a través del proyecto DGAPA IN206795.

José Luis Trejo agradece al Subprograma 127 "Formación Básica en la Investigación" de la Facultad de Química por el apoyo recibido como ayudante de Profesor durante la realización de esta investigación.

A la Dra. Yolanda Caballero, por sus valiosos comentarios durante el proceso de revisión de éste trabajo.

A todos nuestros compañeros del laboratorio 124, muy especialmente a Claudina, Perla Noenif, Leda y Daniel por sus valiosos consejos.

DEDICATORIAS

A la memoria de mi padre:

Si tan solo Dios te hubiese dado un poco más de tiempo.

A mi madre:

Porque todo lo que tengo y cuanto soy te lo debo a ti, no me resta más que agradecerte tanto amor, cariño y comprensión. Gracias.

A mi hermana Blanca:

Por ser más que mi hermana, mi mejor amiga y mi más grande tesoro, por ti soy feliz.

A mi hermano Fausto:

Porque aunque hay veces que peleamos eres mi mejor aliciente para superarme cada día, eres mi ejemplo a seguir.

A mis queridas tías Anatalia y Ma. Juana:

Por apoyar a mi madre en los momentos difíciles.

A ti José Luis:

Por brindarme la oportunidad de trabajar juntos, gracias hermano, por toda tu amistad y por otras tantas cosas que compartimos.

A mi banda gruesa:

Quienes ocupan un lugar muy especial, gracias por tenderme siempre su mano amiga, por todos esos inolvidables momentos, por estar conmigo en todo momento, con especial cariño dedico este trabajo a Irma y a Kay.

Agradezco a mis amigos: Claudina, Perla, Rocío, Verónica, Guadalupe, Luz, Erika, Samuel y Daniel por darme siempre lo mejor de ustedes y que tal vez yo no supe apreciar.

Finalmente agradezco a la Universidad Autónoma de México, en particular a la Facultad de Química y a todos sus profesores, por ayudarme a forjar un futuro mejor.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Por todo el amor y apoyo incondicional que me han brindado. Gracias a ellos he logrado todas mis metas.

A mi abuelita Mercedes; lo más hermoso que tengo.

A mis hermanos:

Martín, Rocío, Claudia y Pedro por todos los buenos y los malos momentos que me han dado, mismos que le han dado un toque especial a mi vida.

A tí Alicia:

Por haberle dado significado a mi vida, por todo ese amor, cariño, ternura y enojos que han complementado mi vida.

A Isabel:

Por tu amistad y todos los momentos inolvidables que pasamos juntos al pie de la columna.

A Samy, Fausto y Daniel:

Porque de ustedes he aprendido muchas cosas buenas, entre otras cosas.

A Samuel, Zenón, Martín y Ale:

Por el placer de degustar los buenos vinos.

A mis amigos: Fausto, Samuel, Ricardo, Carlos, Daniel, Zenón, Alejandro, Luis Jesús, Víctor, Manuel, Agustín, Alicia, Claudina, Adriana, Sally, Fa, Nancy, Gaby, Olga, Tere, Pedro, Jorge, por haberme brindado su amistad.

DEDICATORIAS

Dedicamos este trabajo a la Dra. Rachel Mata, por su constante e invaluable lucha para hacer grandes las cosas pequeñas. Todo nuestro agradecimiento y lo mejor de nuestros sentimientos.

INDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	I
LISTA DE TABLAS	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE ESQUEMAS	III
LISTA DE GRAFICAS	IV
LISTA DE ESPECTROS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VII

CONTENIDO

I. INTRODUCCION	1
1.1 Antecedentes botánicos y etnobotánicos de <i>X. gymnospermoides</i> var <i>eradiatum</i> .	1
1.2 Estudios químicos sobre el género <i>Xanthocephalum</i> .	2
II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	10
III. PARTE EXPERIMENTAL	14
3.1 Material vegetal.	14
3.2 Procedimientos generales.	14
3.2.1 Análisis cromatográficos.	14
3.2.2 Caracterización de los productos naturales o sus derivados.	15
3.3 Preparación de los derivados de los compuestos aislados.	16
3.3.1 Obtención de los derivados metilados.	16
3.3.2 Obtención de los derivados acetilados.	16
3.3.3 Obtención de los derivados epoxidados.	17
3.4 Determinación de la actividad fitoinhibidora.	17
3.4.1 Método de la caja de petri.	17

	Página
3.4.2 Método bioautográfico.	18
3.5 Extracción de la planta entera <i>X. gymnospermoides</i> var <i>eradiatum</i> .	19
3.6 Fraccionamiento preliminar del extracto total.	19
3.7 Aislamiento y purificación de los productos de las fracciones activas.	22
3.7.1 Aislamiento y purificación del acetato de lupeol (19) de la fracción primaria activa XG-C.	22
3.7.2 Aislamiento y purificación del 4,5-epoxi- β -cariofileno (20) de la fracción primaria activa XG-D.	22
3.7.3 Aislamiento de la β -amirina (21) de la fracción primaria activa XG-E.	24
3.7.4 Aislamiento y purificación del grindelato de metilo (22) de la fracción primaria activa XG-E.	24
3.7.5 Aislamiento del α -espinasterol (23) de la fracción primaria XG-F.	25
3.7.6 Aislamiento y purificación del 8,13- β -epoxilabdano-14S, 15 diol (24) y del ácido grindélico (25) de la fracción activa XG-H.	26
3.7.7 Aislamiento y purificación del ácido 7 α ,8 α -epoxigrindélico (26) bajo la forma de éster metílico de la fracción primaria XG-I.	29
3.7.8 Aislamiento y purificación del ácido 7 α -hidroxi-8 (17) deshidrogrindélico (27) bajo la forma de su éster metílico de la fracción inactiva primaria XG-L.	30
3.7.9 Aislamiento y purificación de los ácidos 17-hidroxigrindélico (28) y 6,18-dihidroxigrindélico (29) bajo la forma de sus ésteres metílicos de la fracción inactiva primaria XG-M.	31
3.7.10 Aislamiento del 3, 6-dimetil éter del camperol (30) de las fracciones inactivas primarias XG-L y XG-M.	33

	Página
3.7.11 Aislamiento del β -D-glucositolsterol (31) de la fracción inactiva primaria XG-L.	33
3.7.12 Aislamiento de la sacarosa (32) de la fracción inactiva primaria XG-N.	33
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	34
4.1 Obtención de los compuestos inhibidores del crecimiento vegetal de <i>X. gymnospermoides</i> var <i>eradiatum</i> .	34
4.2 Caracterización de los constituyentes activos.	42
4.2.1 Caracterización del 8,13- β -epoxilabdano-14S, 15 diol (24) de la fracción activa XG-H.	42
4.2.2 Caracterización del grindelato de metilo (22) y compuestos relacionados.	57
4.2.2.1 Grindelato de metilo (22) y ácido grindélico (25).	57
4.2.2.2 Acidos 7 α ,8 α -epoxigrindélico (26), 17-hidroxigrindélico (28) y 6,18-dihidroxigrindélico (29) bajo la forma de sus ésteres metílicos.	75
4.2.2.3 Acido 7 α -hidroxi-8 (17) deshidrogrindélico (27).	77
4.2.3 Caracterización del 3, 6-dimetil éter del camperol (30) de las fracciones primarias XG-L y XG-M.	99
4.2.4 Caracterización del acetato de lupeol (19), 4,5-epoxi- β -cariofileno (20), β -amirina (21) y α -espinasterol (23).	101
4.2.5 Caracterización de la sacarosa (32) y del β -D-glucositolsterol (31).	102
4.3 Evaluaciones biológicas de los constituyentes puros.	112
V. CONCLUSIONES	116
VI. PERSPECTIVAS	117
VII. BIBLIOGRAFIA	118

LISTA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Especies y variedades que conforman el género <i>Xanthocephalum</i> .	1
Cuadro 2	Metabolitos secundarios aislados del género <i>Xanthocephalum</i> .	3
Cuadro 3	Sistemas de elución utilizados para los análisis cualitativos en capa fina.	15
Cuadro 4	Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.	15
Cuadro 5	Fraccionamiento biodirigido del extracto total de <i>Xanthocephalum gymnospermoides</i> var <i>eradiatum</i> .	20
Cuadro 6	Fraccionamiento secundario biodirigido de la fracción activa XG-D.	23
Cuadro 7	Fraccionamiento secundario biodirigido de la fracción activa XG-E.	25
Cuadro 8	Fraccionamiento secundario biodirigido de la fracción activa XG-F.	26
Cuadro 9	Fraccionamiento secundario biodirigido de la fracción activa XG-H.	28
Cuadro 10	Fraccionamiento terciario biodirigido de la fracción activa XG-H3.	28
Cuadro 11	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria XG-I.	30
Cuadro 12	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria XG-L.	31
Cuadro 13	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria XG-M.	32
Cuadro 14	Metabolitos secundarios aislados de la especie <i>X. gymnospermoides</i> var <i>eradiatum</i> .	38

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 8, 13- β -epoxilabdano-14S, 15-diol (24).	46
Tabla 2	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del derivado acetilado del 8, 13- β -epoxilabdano-14S, 15-diol (24a).	53
Tabla 3	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del grindelato de metilo (22).	62
Tabla 4	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del ácido grindélico (25).	69
Tabla 5	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 7 α ,8 α -epoxigrindelato de metilo (26a).	79
Tabla 6	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 17-hidroxigrindelato de metilo (28a).	85
Tabla 7	Constantes físicas y espectroscópicas del 6, 18 dihidroxigrindelato de metilo (29a).	91
Tabla 8	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 7 α -hidroxi-8 (17) deshidrogrindelato de metilo (27a).	93
Tabla 9	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 3,6 dimetil éter del camperol (30).	105

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	<i>Xanthocephalum gymnospermoides</i> var <i>eradiatum</i> .	4
Figura 2	Distribución de los taxones anuales de <i>Xanthocephalum</i> .	5
Figura 3	Distribución de las especies perennes de <i>Xanthocephalum</i> .	6
Figura 4	Núcleo base 8, 13- β -epoxilabdano.	43
Figura 5	Núcleo base 9, 13- β -epoxilabdano.	57
Figura 6	Espectro COSY ^1H - ^1H del grindelato de melilo (22).	59
Figura 7	Patrón de fragmentación del ácido grindélico (25)	60
Figura 8	Estructuras posibles del compuesto (30).	103
Figura 9	Patrón de fragmentación del 3,6 dimetil éter del camperol (30).	104

LISTA DE ESQUEMAS

		Página
Esquema 1	Proceso de extracción de la planta entera de <i>X. gymnospermoides</i> var <i>eradiatum</i> .	21

LISTA DE GRAFICAS

	Página
Gráfica 1 Porcentajes de inhibición del extracto íntegro de <i>X. gymnospermoides</i> var <i>eradiatum</i> sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Physalis ixocarpa</i> .	36
Gráfica 2 Efecto de los compuestos aislados de <i>X. gymnospermoides</i> var <i>eradiatum</i> sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> .	114
Gráfica 3 Efecto de los compuestos aislados de <i>X. gymnospermoides</i> var <i>eradiatum</i> sobre el crecimiento radicular de <i>P. ixocarpa</i> .	115

LISTA DE ESPECTROS

		Página
Espectro 1	IR del 8,13- β -epoxilabdano-14S, 15 diol (24)	47
Espectro 2	EMIE del 8,13- β -epoxilabdano-14S, 15 diol (24)	48
Espectro 3	RMN- ¹ H del 8,13- β -epoxilabdano-14S, 15 diol (24)	49
Espectro 4	RMN- ¹³ C del 8,13- β -epoxilabdano-14S, 15 diol (24)	50
Espectro 4a	DEPT del 8,13- β -epoxilabdano-14S, 15 diol (24)	51
Espectro 5	HETCOR del 8,13- β -epoxilabdano-14S, 15 diol (24)	52
Espectro 3a	IR del derivado acetilado del 8,13- β -epoxilabdano-14S, 15 diol (24)	54
Espectro 3b	RMN- ¹ H del derivado acetilado del 8,13- β -epoxilabdano-14S, 15 diol (24)	55
Espectro 3c	EMIE del derivado acetilado del 8,13- β -epoxilabdano-14S, 15 diol (24)	56
Espectro 6	IR del grindelato de metilo (22)	63
Espectro 7	EMIE del grindelato de metilo (22)	64
Espectro 8	RMN- ¹ H del grindelato de metilo (22)	65
Espectro 9	RMN- ¹³ C del grindelato de metilo (22)	66
Espectro 9a	DEPT del grindelato de metilo (22)	67
Espectro 10	HETCOR del grindelato de metilo (22)	68
Espectro 11	IR del ácido grindélico (25)	70
Espectro 12	EMIE del ácido grindélico (25)	71
Espectro 13	RMN- ¹ H del ácido grindélico (25)	72
Espectro 14	RMN- ¹³ C del ácido grindélico (25)	73
Espectro 14a	DEPT del ácido grindélico (25)	74
Espectro 15	IR del 7 α ,8 α -epoxigrindelato de metilo (26a)	80
Espectro 16	EMIE del 7 α ,8 α -epoxigrindelato de metilo (26a)	81
Espectro 17	RMN- ¹ H del 7 α ,8 α -epoxigrindelato de metilo (26a)	82

		Página
Espectro 18	RMN- ¹³ C del 7 α ,8 α -epoxigrindelato de metilo (26a)	83
Espectro 18a	DEPT del 7 α ,8 α -epoxigrindelato de metilo (26a)	84
Espectro 19	IR 17-hidroxigrindelato de metilo (28a)	86
Espectro 20	EMIE 17-hidroxigrindelato de metilo (28a)	87
Espectro 21	RMN- ¹ H 17-hidroxigrindelato de metilo (28a)	88
Espectro 22	RMN- ¹³ C 17-hidroxigrindelato de metilo (28a)	89
Espectro 22a	DEPT 17-hidroxigrindelato de metilo (28a)	90
Espectro 23	RMN- ¹ H del 6, 18-dihidroxigrindelato de metilo (29a)	92
Espectro 24	IR del 7 α -hidroxi-8 (17) deshidrogrindelato de metilo (27a)	94
Espectro 25	EMIE del 7 α -hidroxi-8 (17) deshidrogrindelato de metilo (27a)	95
Espectro 26	RMN- ¹ H del 7 α -hidroxi-8 (17) deshidrogrindelato de metilo (27a)	96
Espectro 27	RMN- ¹³ C del 7 α -hidroxi-8 (17) deshidrogrindelato de metilo (27a)	97
Espectro 27a	DEPT del 7 α -hidroxi-8 (17) deshidrogrindelato de metilo (27a)	98
Espectro 28	IR del 3,6 dimetil éter del camperol (30)	106
Espectro 29	EMIE del 3,6 dimetil éter del camperol (30)	107
Espectro 30	RMN- ¹ H del 3,6 dimetil éter del camperol (30)	108
Espectro 30a	RMN- ¹ H del derivado acetilado del 3,6 dimetil éter del camperol(30)	109
Espectro 31	RMN- ¹³ C del 3,6 dimetil éter del camperol (30)	110
Espectro 31a	DEPT del 3,6 dimetil éter del camperol (30)	111

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo.
a	Rotación óptica.
^o C	Grados centígrados.
CDCl ₃	Cloroformo deuterado.
CHCl ₃	Cloroformo.
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria media.
cm	Centímetros
COSY	Correlación homonuclear.
d	Doblete.
dd	Doblete dobloteado.
δ	Desplazamiento químico.
EM	Espectrometría de masas.
EMFAB	Espectrometría de masas por bombardeo rápido de átomos.
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico.
EtOH	Etanol.
g	Gramos.
HETCOR	Correlación heteronuclear.
Hex	Hexano.
Hz	Hertz.
Int rel	Intensidad relativa.
IR	Infrarrojo.
J	Constante de acoplamiento.
KBr	Bromuro de potasio.
m	multiplete.
MeOH	Metanol.
mg	Miligramos
ml	Millilitro
m/z	Relación masa-carga.
μg	Microgramo.
NBA	Alcohol nitrobenílico.
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica.
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono.
s	Singlete.
sa	Singlete ancho.
TMS	Tetrametilsilano.

I. INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES BOTANICOS Y ETNOBOTANICOS DEL *Xanthocephalum gymnospermoides* (A. Gray) Benth & Hook var *eradiatum*. Lane (Asteraceae).

El género *Xanthocephalum* Willd, de la familia Asteraceae (tribu Astereae, subtribu Solidaginae) incluye ocho especies y tres variedades distribuídas principalmente en México y en la parte sur de los Estados Unidos de Norteamérica (Lane, 1983). En el Cuadro 1 se enlistan las especies y variedades del género y en las Figuras 2 y 3 se indica la distribución geográfica de algunos de estos taxones.

Filogenéticamente *Xanthocephalum* se encuentra estrechamente relacionado con los géneros *Olivaceae*, *Gutierrezia* y *Grindelia* (Lane, 1983).

Cuadro 1. Especies y variedades que conforman el género *Xanthocephalum*.

ESPECIE	VARIEDAD
<i>X. centauroides</i> Willd	
<i>X. durangense</i> M. A. Lane	
<i>X. humile</i> (Kunth) Benth	
<i>X. benthamianum</i> Hemsley	
<i>X. gymnospermoides</i> (A. Gray) Benth	<i>gymnospermoides</i> <i>intermedium</i> <i>eradiatum</i>
<i>X. wrightii</i> (A. Gray)	
<i>X. sericocephalum</i> (A. Gray)	
<i>X. megalcephalum</i> Fernald	

Xanthocephalum gymnospermoides (A. Gray) Benth. & Hook. var *eradiatum* Lane es una planta anual endémica de la sierra Tarahumara, estado de Chihuahua. Los individuos de esta variedad son arbustos de 1 a 1.5 m de altura, con tallos rectos y flores amarillas (Figura 1). Posiblemente este taxón deriva de la especie *X. gymnospermoides* (A. Gray) Benth y la diferencia más importante entre esta variedad y los otros miembros del género es la carencia de pétalos florales rayados (Lane, 1983).

Generalmente la planta crece a una altitud entre 2000 y 2400 m de altura bien sea en zonas silvestres formando poblaciones densas o en los bordes de campos cultivados de los valles montañosos de la Sierra Tarahumara. La especie es dominante en su habitat e inhibe el crecimiento de otras plantas anuales como especies de *Amaranthus*, *Bidens* y *Chenopodium*. Esta observación sugiere que *X. gymnospermoides* var *eradiatum* puede contener aleloquímicos de utilidad para el descubrimiento de agentes herbicidas potenciales. Los Indios Tarahumaras reconocen a esta planta con el nombre de "URISO" y la utilizan medicinalmente para la cura de dolores cutáneos y el lavado de heridas (Bye, 1996).

1.2 ESTUDIOS QUIMICOS SOBRE EL GENERO *Xanthocephalum*.

Las especies *X. benthamianum*, *X. centauroides*, *X. humile*, *X. seriocarpum*, *X. wrightii* y la variedad *X. gymnospermoides* var *gymnospermoides* han sido investigadas desde el punto de vista químico. Los metabolitos secundarios aislados y caracterizados en estos estudios incluyen diterpenoides de tipo labdano, poliacetilenos, triterpenoides del tipo friedelano y bacarano, fenilpropanoides y flavonoides de los tipos flavona y

flavonoles (Bohlmann, 1979). En el Cuadro 2 se ilustran las estructuras de los compuestos aislados de los distintos taxones investigados. Cabe destacar que Lane detectó mediante procedimientos cromatográficos la presencia de flavonoides en *X. gymnospermoides* var *eradiatum*. De manera adicional, el autor observó que la cantidad de estos metabolitos era considerablemente menor que las detectadas en *X. gymnospermoides*, *X. gymnospermoides* var *gymnospermoides* y *X. benthamianum* (Lane, 1983; Lane, 1989).

La literatura química describe también estudios del contenido metabólico secundario de *X. seriocarpum* y *X. wrightii*, sin embargo, estas especies fueron taxonómicamente reclasificadas en el género *Gutierrezia* (Lane, 1983).

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

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>X. benthamianum</i> <i>X. centauroides</i> <i>X. conoideum</i> <i>X. gymnospermoides</i> <i>X. wrightii</i> <i>X. humile</i>	$\text{Me}(\text{CH}=\text{CH})_2\text{O}=\text{CCH}=\text{CHCH}_2\text{OR}$ R=Ac (1) R=COC(Me)=CHMe (2)	Bohlmann <i>et al.</i> , 1979



Figura 1. *Xanthocephalum gymnospermoides* var. *eradiatum*. (Bye, 1996).

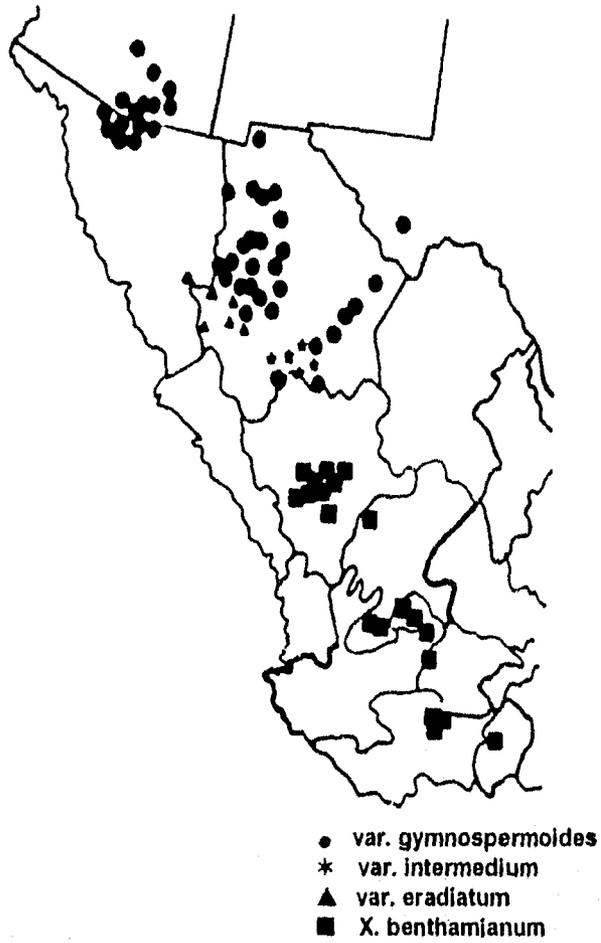
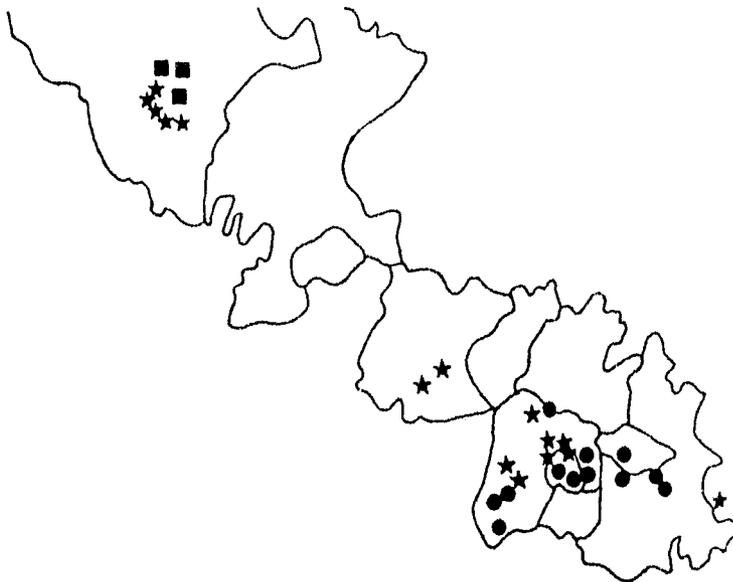


Figura 2. Distribución de los taxones anuales de *Xanthocephalum*.



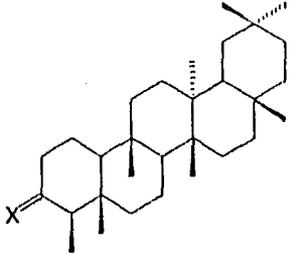
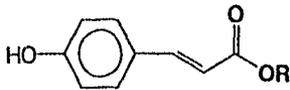
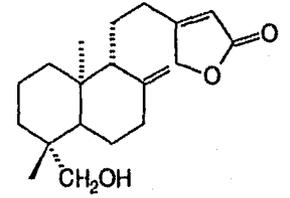
★ *X. centauroides* (Durango, sureste de Guanajuato y cd. de México)

■ *X. durangense* (Durango)

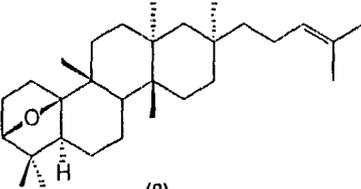
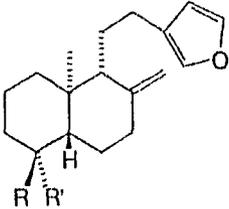
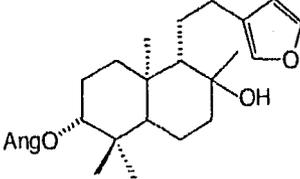
● *X. humile* (Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y valle de México)

Figura 3. Distribución de las especies perennes de *Xanthocephalum*.

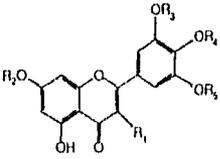
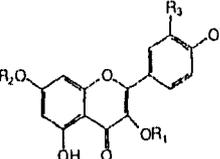
Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados del género *Xanthocephalum*
(Continuación)

<p><i>X. benthamianum</i> <i>X. centauroides</i> <i>X. wrightii</i></p>	 <p>X = O (3) X = OH, H (4)</p>	<p>Bohlmann <i>et al.</i>, 1979</p>
<p><i>X. benthamianum</i> <i>X. conoideum</i> <i>X. megaloccephalum</i></p>	 <p>R=(CH₂)₁₉Me (5) R=(CH₂)₂₁Me (6)</p>	<p>Bohlmann <i>et al.</i>, 1979</p>
<p><i>X. megaloccephalum</i></p>	 <p>(7)</p>	<p>Bohlmann <i>et al.</i>, 1979</p>

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

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>X. linearifolium</i>	 <p>(8)</p>	Bohlmann <i>et al.</i> , 1979
<i>X. linearifolium</i>	 <p>R R'</p> <p>R= Me ; R' = CH₂OH (9) R= CH₂OH ; R' = Me (10)</p>	Bohlmann <i>et al.</i> , 1979
<i>X. linearifolium</i>	 <p>(11)</p>	Bohlmann <i>et al.</i> , 1979

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

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA																								
<p><i>X.gymnospermoides</i> var <i>gymnospermoides</i></p>	 <table border="0"> <tr> <td>R₁</td> <td>R₂</td> <td>R₃</td> <td>R₄</td> <td>R₅</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Me</td> <td>H</td> <td>OMe</td> <td>H</td> <td>Me</td> <td>(12)</td> </tr> <tr> <td>Me</td> <td>Me</td> <td>OH</td> <td>Me</td> <td>H</td> <td>(13)</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>Me</td> <td>(14)</td> </tr> </table>	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅		Me	H	OMe	H	Me	(12)	Me	Me	OH	Me	H	(13)	H	H	OH	H	Me	(14)	<p>Sanggong Yu <i>et al.</i>, 1987.</p>
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅																						
Me	H	OMe	H	Me	(12)																					
Me	Me	OH	Me	H	(13)																					
H	H	OH	H	Me	(14)																					
<p><i>X.gymnospermoides</i> var <i>gymnospermoides</i></p>	 <table border="0"> <tr> <td>R₁</td> <td>R₂</td> <td>R₃</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Me</td> <td>H</td> <td>OMe</td> <td>(15)</td> </tr> <tr> <td>Me</td> <td>Me</td> <td>OH</td> <td>(16)</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>(17)</td> </tr> <tr> <td>Me</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>(18)</td> </tr> </table>	R ₁	R ₂	R ₃		Me	H	OMe	(15)	Me	Me	OH	(16)	H	H	OH	(17)	Me	H	H	(18)	<p>Sanggong Yu <i>et al.</i>, 1987.</p>				
R ₁	R ₂	R ₃																								
Me	H	OMe	(15)																							
Me	Me	OH	(16)																							
H	H	OH	(17)																							
Me	H	H	(18)																							

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

La búsqueda de principios bioactivos a partir de vegetales terrestres es un hecho bien documentado (Hamburger, 1991; Ghisalberti, 1993; Hosttletman & Marston, 1990; Kinghorn *et al.*, 1995; inter alia), y aunque recientemente se ha observado un creciente interés por la investigación de otras fuentes naturales alternas como los organismos marinos, fúngicos y protistas, las plantas continúan siendo una fuente potencial muy valiosa de productos naturales de interés para el desarrollo de agentes medicinales y pesticidas. En este sentido, la gran biodiversidad de la flora de México ofrece numerosas posibilidades para la búsqueda de productos naturales tanto de importancia medicinal como agroquímica. Cabe enfatizar también, que muchas de esas especies vegetales se encuentran en peligro de extinción, de tal suerte que para evitar la pérdida de datos científicos valiosos, y quizás irrecuperables, las investigaciones sobre estas especies deben estar enfocadas no sólo a la conservación de las mismas, sino también a la investigación química de su metabolismo secundario y al establecimiento de su potencialidad como fuentes de principios bioactivos.

En general la preselección de las materias primas ideales para la obtención de principios activos (tanto pesticidas como medicinales) se realiza con base en numerosos criterios, entre los que destacan por su importancia el etnomédico, el quimiotaxonómico y el ecológico. El criterio quimiotaxonómico considera las semejanzas del metabolismo secundario entre las especies filogenéticamente relacionadas. El criterio etnomédico se basa en la selección de las plantas de

reconocido uso medicinal. El aspecto más importante de este criterio de selección es el hecho de que las plantas medicinales contienen sustancias bioactivas relacionadas o no con las bondades medicinales que se le atribuyen a esas especies en la medicina popular.

Por último, el criterio ecológico se basa en la observación de los efectos de las interacciones, a veces complejas, entre dos organismos, los cuales pueden ser de la misma o de diferentes especies. En particular, la observación de las interacciones planta-planta (alelopatía), en su mayoría mediadas por metabolitos secundarios (aleloquímicos), es de gran utilidad para la selección de especies vegetales idóneas para el descubrimiento de "herbicidas verdes" (Rice, 1984).

En este último contexto la especie *Xanthocephalum gymnospermoides var eradiatum* puede constituir un candidato ideal para obtener pesticidas verdes, ya que las observaciones de campo (criterio ecológico) durante la recolección de la especie indicaron que esta es dominante en su hábitat y que inhibe el crecimiento de otras plantas anuales pertenecientes a los géneros *Amaranthus*, *Bidens* y *Chenopodium* (Bye, 1996). Estas observaciones sugieren que la planta puede contener agentes químicos (aleloquímicos) de importancia alelopática y por lo tanto de interés para el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes herbicidas de origen natural (Rice, 1984).

Los herbicidas de origen natural tienen la ventaja de ser menos tóxicos, presentar mecanismos de acción más específicos y, más importante aún son biodegradables. En contraste, los herbicidas sintéticos son tóxicos y en general tienen un mayor grado de persistencia. En consecuencia, la investigación de productos naturales

para la obtención de agentes herbicidas se encuentra plenamente justificada. Afortunadamente para la realización de estos estudios se cuenta con bioensayos sencillos y de fácil implementación. Entre los más utilizados se encuentran los ensayos de germinación de semillas y de crecimiento radicular (Anaya *et al.*, 1990; Ghisalberti, 1993). Estas evaluaciones aunque bastante preliminares permiten detectar compuestos y extractos apropiados para el desarrollo de agentes herbicidas (Ghisalberti, 1993).

Con base en las consideraciones anteriores y como parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas como fuentes potenciales de agentes herbicidas, se consideró conveniente realizar la investigación química y biológica de la especie *Xanthocephalum gymnospermoides* var *eradiatum*.

Los objetivos generales planteados para el desarrollo del presente trabajo son los siguientes:

1. Determinar el potencial fitotóxico del extracto íntegro de la variedad *Xanthocephalum gymnospermoides* var *eradiatum*.
2. Aislar y caracterizar los constituyentes fitotóxicos de la planta con la finalidad de obtener productos naturales de utilidad para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas.
3. Contribuir al conocimiento del contenido metabólico secundario de *X. gymnospermoides* var *eradiatum*.
4. Contribuir al conocimiento y a los estudios de carácter multidisciplinario de la flora medicinal mexicana.

Los objetivos particulares considerados para la implementación del proyecto se indican a continuación:

1. Preparar el extracto vegetal de la variedad *X. gymnospermoides* var *eradiatum*, mediante un proceso de maceración.
2. Determinar la fitotoxicidad del extracto total mediante la evaluación de sus efectos sobre el crecimiento radicular de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Physalis ixocarpa*.
3. Realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto activo.
4. Separar y purificar los principios fitotóxicos presentes en las fracciones activas mediante el empleo de las técnicas cromatográficas convencionales.
5. Determinar la fitotoxicidad de las fracciones y compuestos puros, mediante el empleo del bioensayo de crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Physalis ixocarpa*.
6. Realizar la elucidación estructural de los compuestos activos mediante el empleo de métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal (planta entera) utilizado en el presente estudio fue recolectado en el Municipio de Guachochic, Chihuahua, en el mes de Septiembre de 1994. La clasificación botánica de la especie estuvo a cargo del Dr. Robert Bye, director del Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM. Un ejemplar de referencia (Voucher: Bye 19286) se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional (MEXU), del Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM.

El proceso de desecación del material vegetal se realizó a temperatura ambiente, y la fragmentación del mismo se llevó a cabo en un molino Willey Modelo 4.

3.2 PROCEDIMIENTOS GENERALES

3.2.1 ANALISIS CROMATOGRAFICOS

Los análisis cromatográficos en columna abierta se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, en columnas de vidrio empacadas con gel de sílice Merck 60, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 3.5 a 7.0 ASTM. Para los análisis cromatográficos cualitativos y preparativos en capa fina se emplearon placas de aluminio con un espesor de 0.25 mm (Sílica gel 60 F254 Merck) y placas de vidrio (20X20 cm) recubiertas de gel de sílice de 2 ó 0.25 mm de espesor (Sílica gel 60 F254 Merck), respectivamente. En ambos casos se utilizaron diversos sistemas de elución y agentes cromógenos, los cuales se resumen en los Cuadros 3 y 4, respectivamente.

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

SISTEMA DE ELUYENTES	COMPOSICION	PROPORCION
A	Hexano- CHCl_3 -MeOH	Diversas
B	Benceno-AcOEt	Diversas
C	Hexano-AcOEt	Diversas
D	Benceno- CHCl_3	Diversas
E	CHCl_3 -MeOH	Diversas

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

REACTIVO	AGENTE CROMOGENO	REFERENCIA
Sulfato cérico	12.0 g de sulfato cérico 22.2 ml de ác. sulfúrico concentrado 350 g de hielo picado	Lowery <i>et al.</i> , 1993
Anisaldehído	0.5 ml de anisaldehído 9 ml de EtOH 0.5 ml de ác. sulfúrico concentrado 1 ml de ác.acético	Touchstone, J. C.1992

3.2.2 Caracterización de los productos naturales y sus derivados

De manera general la caracterización de los productos aislados o sus derivados se realizó por métodos espectroscópicos y espectrométricos.

Los espectros de masas se determinaron en un aparato Hewlet-Packard 5890, serie II, con un voltaje de 70V para el registro. La Espectrometría de Masas en su modalidad de Bombardeo Rápido de Átomos (FAB), se registro en un aparato Jeol DX 300 con un sistema IMA-3500, utilizando Xenón como elemento para el bombardeo con 6 KeV, y NBA como disolvente.

Los espectros de RMN se registraron en un aparato Varian VXR-3005 utilizando como disolventes CDCl₃ y como referencia interna TMS. Estos últimos y los espectros de masas se determinaron en el Instituto de Química, UNAM.

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro digital JASCO DIP 360. Los espectros de IR fueron registrados en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599, en película y en pastilla de KBr.

3.3 Preparación de los derivados de los compuestos aislados.

3.3.1 Obtención de los derivados metilados.

Para obtener los derivados metilados de los compuestos se utilizó una solución etérea de diazometano, preparada con hidróxido de potasio (5.0 g en 7.5 ml de agua), 25 ml de metanol y 21.9 g de **N**-metil-**N**-nitroso-**p**-toluensulfonamida (Diazald, Aldrich) en 45 ml de éter etílico. Por cada 100 mg del producto a metilar se utilizaron 20 ml de la solución etérea de diazometano. El producto a metilar se disolvió en metanol o éter etílico y la mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas (Pavia, 1995).

3.3.2 Obtención de los derivados acetilados.

Para obtener los derivados acetilados de los compuestos, se utilizaron 1 ml de piridina y 1 ml de anhídrido acético por cada 100 mg de muestra. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 24 horas y al término de este tiempo los productos acetilados fueron separados de la manera convencional (Pavia, 1995).

3.3.3 Obtención de los derivados epoxidados.

Para obtener los derivados epoxidados de los compuestos, se utilizaron 1 mg de ácido *meta*-cloroperbenzoico por cada mg de muestra. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas y al término de este tiempo se aisló el producto epoxidado de acuerdo a la metodología convencional (Pavia, 1995).

3.4 Determinación de la actividad inhibidora del crecimiento vegetal.

3.4.1 Método de la caja de petri.

La determinación de la actividad inhibidora del crecimiento vegetal de los extractos y compuestos puros se realizó midiendo el efecto sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* (Amarantaceae) y *Physalis ixocarpa* (Solanaceae) de acuerdo a la metodología previamente descrita en la literatura (Anaya *et al.*, 1990).

Los bioensayos se realizaron en cajas de petri de 10 cm de diámetro interno. Cada una de las muestras de prueba se disolvió en CHCl₃ o en CHCl₃-MeOH (1:1) y se prepararon soluciones a diferentes concentraciones (1000, 100, 5 µg/ml); un 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, agua y el control positivo 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, Sigma).

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 *A. hypochondriacus* y 72 horas para *P. ixocarpa*. 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 la Concentración Inhibidora media (CI_{50}) se determinaron mediante un análisis Probit a partir de los porcentajes de inhibición.

3.4.2 Método bioautográfico.

El método bioautográfico se realizó sobre placas cromatográficas de 5x20 cm recubiertas con gel de sílice. En cada placa se sembraron 5 mg del extracto; posteriormente se efectuó la elución utilizando $CHCl_3$ -MeOH (1:1). 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 $CHCl_3$ -MeOH (1:1). Estas se utilizaron como testigo.

Posteriormente, cada una de las placas cromatográficas se cubrió completamente con las semillas de *A. hypochondriacus* y *P. ixocarpa*. Las placas con las semillas fueron incubadas a 28 °C durante 24 horas (*A. hypochondriacus*) ó 72 horas (*P. ixocarpa*) en una atmósfera húmeda.

Transcurrido el tiempo de incubación se observó 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.

3.5 Extracción de la planta entera *Xanthocephalum gymnospermoides* var *eradiatum*.

El material seco y molido (2.09 kg) se extrajo mediante un proceso de maceración con 24 litros de una mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1). En el Esquema 1 se resume el procedimiento empleado. Este proceso permitió la obtención de 142.0 g de extracto crudo.

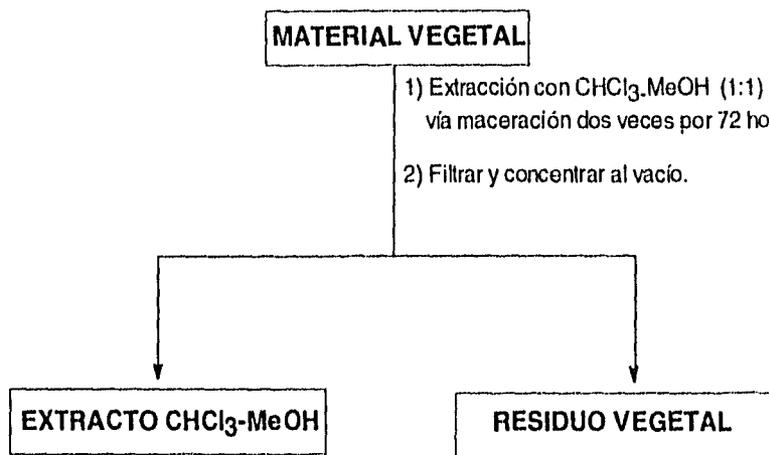
3.6 Fraccionamiento preliminar del extracto total.

El extracto total (142.0 g) se fraccionó en una columna cromatográfica abierta, utilizando como adsorbente 900 g de gel de sílice inactivándola al 10 %. El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano- CHCl_3 en diferentes proporciones, y MeOH. Se colectaron 178 fracciones de 1 lt cada una. Cada una de las fracciones fué analizada por cromatografía en capa fina y se combinaron todas aquellas que resultaron similares. Este proceso generó un total de 14 fracciones primarias. En el Cuadro 5 se resume el fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto total de la planta entera *X. gymnospermoides* var *eradiatum*.

Cuadro 5. Fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta del extracto crudo de la planta entera *X. gymnospermoides* var *eradiatum*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
Hexano	100	1-13	1-31	XG-A	4.24
Hex-CHCl ₃	90-10	14-29	32-41	XG-B	1.96
	80-20	30-44	42-44	XG-C	0.63
	70-30	45-70	45-50	XG-D*	2.91
	60-40	71-74	51-55	XG-E*	3.11
	50-50	75-85	56-60	XG-F	6.43
	40-60	86-98	61-83	XG-G*	6.62
	30-70	99-102			
	20-80	103-106			
CHCl ₃	100	107-117	84-112	XG-H*	9.04
CHCl ₃ -MeOH	99-1	118-126	113-125	XG-I	6.16
	95-5	127-133	126-130	XG-J	1.57
	90-10	134-146	131-133	XG-K	2.50
	80-20	147-161	134-135	XG-L	3.01
	70-30	162-163	136-149	XG-M	5.56
	60-40	164-165			
	50-50	166-176			
MeOH	100	177-178	150-178	XG-N	24.40

*Fracciones fitotóxicas de acuerdo al ensayo bioautográfico.



PESO TOTAL DEL EXTRACTO 142 g.

VOLUMEN TOTAL DE CHCl₃-MeOH (1:1) 24 litros.

Esquema 1. Proceso de extracción de la planta entera *X. gymnospermoides* var *eradiatum*.

3.7 Aislamiento y purificación de los productos de las fracciones activas.

3.7.1 Aislamiento y purificación del acetato de lupeol (19) de la fracción primaria activa XG-C.

Sucesivas cromatografías preparativas de la fracción primaria activa XG-C 0.6352 g, utilizando como eluyente una mezcla de benceno- CHCl_3 (8:2), permitieron el aislamiento de 5.8 mg del producto bajo la forma de un polvo blanco, el cual fue caracterizado como acetato de lupeol (19) por comparación con una muestra auténtica aislada de la *Guarea grandifolia* (Meliaceae) (Villarreal, 1996).

3.7.2 Aislamiento y purificación del 4,5-epoxi- β -cariofileno (20) de la fracción primaria activa XG-D.

La fracción primaria activa XG-D 2.9131 g, se recromatografió en una columna abierta de gel de sílice (27.5 g). El proceso de elución se llevó a cabo con hexano, hexano-acetato de etilo en diferentes proporciones, y acetato de etilo. Se colectó un total de 238 fracciones de 15 ml cada una y se analizaron por cromatografía en capa fina combinándose aquellas que presentaron homogeneidad cromatográfica.

Este proceso generó un total de tres grupos de fracciones secundarias.

En el Cuadro 6 se resume este proceso cromatográfico.

Cuadro 6. Fraccionamiento secundario biodirigido de la fracción activa XG-D.

ELUYENTE	PROPORCION (%)	NUMERO DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE	PESO (g)
Hexano	100	1-21	1-28	XG-D1	0.07
Hexano-AcOEt	99-1	22-65	29-47	XG-D2	0.21
	97-3	66-100	48-244	XG-D3	1.10
	96-4	101-155			
	95-5	156-195			
	90-10	196-204			
	80-20	205-240			
	70-30	241			
	60-40	242			
50-50	243				
AcOEt	100	244			

Sucesivas cromatografías preparativas de la fracción activa secundaria XG-D2 (Cuadro 6), utilizando como eluyente una mezcla de benceno-CHCl₃ (7:3), permitieron el aislamiento de 22.4 mg de 4,5-epoxi-β-cariofileno (**20**). Este producto se obtuvo como un sólido cristalino de punto de fusión 79-82 °C, caracterizado por comparación con una muestra auténtica aislada de *Conyza filaginoides* (Asteraceae) (Acevedo y Estrada, 1995).

3.7.3 Aislamiento de la β - amirina (21) de la fracción primaria activa XG-D.

De la fracción primaria activa XG-D 2.9131 g (Cuadro 5), cristalizaron de manera espontánea 5.6 mg de un sólido cristalino blanco, con punto de fusión de 190-193 °C, idéntico en todos sus aspectos a una muestra auténtica de β amirina (21), obtenida también de la especie *Conyza filaginoides* (Asteracøae) (Acevedo y Estrada, 1995).

3.7.4 Aislamiento y purificación del grindelato de metilo (22) de la fracción primaria activa XG-E.

La fracción activa primaria XG-E 3.11 g (Cuadro 5), se recromatografió en una columna abierta de gel de sílice (30.0 g). El proceso de elución se llevó a cabo con benceno, benceno-AcOEt en diferentes proporciones, y AcOEt. Se colectaron un total de 66 fracciones de 20 ml cada una y se analizaron por cromatografía en capa fina combinándose aquellas que presentaron características cromatográficas similares. Este proceso generó dos grupos de fracciones secundarias. En el Cuadro 7 se resume el proceso cromatográfico anterior.

Sucesivas placas preparativas de la fracción activa secundaria XG-E1 (Cuadro 7), utilizando como eluyente benceno-AcOEt (9:1), permitieron el aislamiento de 11.9 mg del grindelato de metilo (22) como un sólido vítreo de color amarillo claro.

Cuadro 7. Fraccionamiento secundario biodirigido de la fracción activa XG-E.

ELUYENTE	PROPORCION (%)	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE	PESO (g)
Benceno	100	1-53	1-26	XG-E1	1.41
Benceno- AcOEt	90-10 80-20	54-61 62-63	27-66	XG-E2	0.28
AcOEt	100	64-66			

3.7.5 Aislamiento del α -espinasterol (23) de la fracción primaria XG-F.

Con la finalidad de separar el producto mayoritario de la fracción primaria inactiva XG-F 6.43 g (Cuadro 5), se procedió a recromatografiar la fracción en una columna abierta de gel de sílice (60.0 g). El proceso de elución se llevó a cabo con hexano, hexano-AcOEt en diferentes proporciones, y AcOEt. Se colectaron un total de 77 fracciones de 30 ml cada una. De nueva cuenta el análisis por cromatografía en capa delgada de todas las fracciones permitió la combinación de aquellas similares. Este proceso cromatográfico se resume en el Cuadro 8.

De la fracción secundaria XG-F2 (Cuadro 8), cristalizaron de manera espontánea 40.0 mg de un sólido cristalino de color blanco con un punto de fusión de 159-160 °C. Este producto se caracterizó por comparación con una muestra auténtica de α -espinasterol, previamente aislada de *Conyza filaginoides* (Asteraceae) (Acevedo y Estrada, 1995).

Cuadro 8. Fraccionamiento secundario biodirigido de la fracción XG-F.

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE	PESO (g)
Hexano	100	1-11	1-25	XG-F1	1.60
Hexano-AcOEt	95-5	12-24	26-38	XG-F2	0.73
	90-10	25-42	39-77	XG-F3	1.07
	80-20	43-60			
	70-30	61-72			
	50-50	77-76			
AcOEt	100	77			

3.7.6 Aislamiento y purificación del 8,13- β -epoxilabdano-14S,15 diol (24) y del ácido grindélico (25) de la fracción activa XG-H.

La fracción activa primaria XG-H 9.04 g (Cuadro 5), se recromatografió en una columna abierta de gel de sílice (180.0 g). El proceso de elución se llevó a cabo con benceno, benceno-AcOEt en diferentes proporciones, y AcOEt. Se colectaron un total de 238 fracciones de 50 ml cada una y se analizaron por cromatografía en capa fina combinándose aquellas que presentaron características cromatográficas similares. En el Cuadro 9 se resume el fraccionamiento secundario de la fracción activa XG- H.

Sucesivas cromatografías preparativas en placa delgada utilizando como sistema de elución benceno-AcOEt (8:2) de la fracción activa secundaria XG-H2 (Cuadro 9), permitieron aislar y purificar 145.30 mg del producto (25) como un

sólido vítreo de color amarillo claro. La metilación de este producto (100 mg) de acuerdo a la metodología indicada en el inciso 3.3.1 generó 115.69 mg del producto (22).

La fracción secundaria activa XG-H3 (Cuadro 9), contenía una mezcla de dos componentes mayoritarios, uno de los cuales correspondía al ácido grindélico (25), en consecuencia para facilitar la separación del otro constituyente la mezcla se metiló por tratamiento con diazometano. Para ello, a 100 mg de la mezcla disueltos en 5 ml de metanol se le adicionaron 20 ml de una solución etérea de diazometano. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas y como resultado de esta reacción se obtuvieron 116.4 mg de una mezcla de dos constituyentes mayoritarios pero con distinto valor de factor de retención; de acuerdo al análisis por cromatografía en capa delgada. La mezcla anterior se resolvió mediante una cromatografía en columna abierta, utilizándose como adsorbente 15.0 g de gel de sílice. El proceso de elución se llevó a cabo con benceno, benceno-AcOEt en diferentes proporciones, AcOEt y AcOEt-MeOH en diferentes proporciones. Se colectaron un total de 29 fracciones de 15 ml cada una, las cuáles se analizaron por cromatografía en capa fina combinándose aquellas que presentaron características cromatográficas similares como en los casos anteriores. Este proceso generó un total de tres grupos de fracciones terciarias (Cuadro 10).

Cuadro 9. Fraccionamiento secundario de la fracción activa XG-H.

ELUYENTE	PROPORCION (%)	NUMERO DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE	PESO (g)
Benceno	100	1-36	1-66	XG-H1	0.65
Benceno-AcOEt	99-1	37-52	67-112	XG-H2	0.19
	95-5	53-68	113-130	XG-H3	0.14
	90-10	69-168	131-238	XG-H4	0.19
	80-20	169-208			
	70-30	209-228			
	60-40	229-230			
	50-50	231-232			
	30-70	233-236			
AcOEt	100	237-238			

Cuadro 10. Fraccionamiento terciario biodirigido de la fracción secundaria XG-H3.

ELUYENTE	PROPORCION (%)	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE	PESO (g)
Benceno	100	1-22	1-25	XG-H3-A	0.0036
Benceno-AcOEt	90-10	23-24	26-28	XG-H3-B	0.03
	70-30	25			
	50-50	26			
AcOEt	100	27			
AcOEt-MeOH	50-50	28-29	29	XG-H3-C	0.04

De la fracción terciaria XG-H3-B (Cuadro 10), precipitaron de manera espontánea 25.0 mg de unos cristales blancos, con un punto de fusión de 59-61 °C, este

producto correspondía al diol (24). La acetilación de 10.0 mg del diol (24) generó el diacetil derivado (15.8 mg) (24a).

Por otra parte, de la fracción secundaria XG-H3-A (Cuadro 10) se aislaron cantidades adicionales del ácido grindélico (25), bajo la forma del grindelato de metilo (22). Este producto resultó ser idéntico al producto natural aislado de la fracción XG-E. A su vez, el tratamiento de 2 mg del producto (22) con ácido *meta*-cloroperbenzoico generó 2.5 mg del epóxido (26a).

3.7.7 Aislamiento y purificación del ácido 7 α , 8 α -epoxigrindélico (26) bajo la forma de éster metílico de la fracción primaria XG-I.

6.16 g (Cuadro 5) de la fracción primaria XG-I, se metilaron por tratamiento con un exceso de diazometano. La fracción metilada fue recromatografiada en una columna abierta de gel de sílice (60.0 g), y el proceso de elución se llevó a cabo con benceno, benceno-AcOEt en diferentes proporciones, y AcOEt. Se colectaron un total de 94 fracciones de 20 ml cada una y se combinaron aquellas que presentaban características cromatográficas similares. El proceso generó un total de tres grupos de fracciones secundarias. En el Cuadro 11 se resume el proceso antes descrito.

Sucesivas cromatografías preparativas en capa fina de la fracción secundaria XG-I2 (Cuadro 11), utilizando como eluyente benceno-AcOEt (9:1), permitieron el aislamiento de 16.2 mg del éster metílico del producto (26) como un sólido vítreo de color amarillo.

Cuadro 11. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria XG-I.

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE	PESO (g)
Benceno	100	1-61	1-63	XG-I1	0.02
Benceno- AcOEt	99-1 97-3	62-66 67-93	64-80	XG-I2	0.04
AcOEt	100	94	81-94	XG-I3	0.27

3.7.8 Aislamiento y purificación del ácido 7 α -hidroxi-8(17) deshidrogrindélico (27) bajo la forma de su éster metílico de la fracción inactiva primaria XG-L.

La fracción inactiva primaria XG-L 3.0 g (Cuadro 5), se recromatografió en una columna abierta de gel de sílice (38.0 g). El proceso de elución se llevó a cabo con CHCl₃, CHCl₃-MeOH en diferentes proporciones, y MeOH. Por este procedimiento se colectaron un total de 258 fracciones de 20 ml cada una, mismas que se analizaron por cromatografía en capa fina combinándose aquellas que presentaron homogeneidad cromatográfica. Este proceso generó un total de tres grupos de fracciones secundarias y los resultados se resumen en el Cuadro 12.

La fracción XG-L2 (Cuadro 12) se metiló por tratamiento con un exceso de diazometano. Posteriormente sucesivas cromatografías preparativas de la fracción metilada, utilizando como eluyente una mezcla de hexano-CHCl₃ (7:3), se aislaron 33.0 mg del éster metílico del ácido 7 α -hidroxi-8 (17) deshidrogrindélico (27a) el cual se obtuvo bajo la forma de un sólido vítreo de color amarillo.

Cuadro 12. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria XG-L.

ELUYENTE	PROPORCION (%)	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE	PESO (g)
CHCl ₃	100	1-105	1-113	XG-L1	0.36
CHCl ₃ MeOH	99:1	106-227	114-164	XG-L2	0.34
	95:5	228-247	165-258	XG-L3	0.73
	90:10	248-249			
	80:20	250-251			
	70:30	252-253			
	60:40	254-255			
	50:50	256-257			
MeOH	100	258			

3.7.9 Aislamiento y purificación de los ácidos 17-hidroxigrindélico (28) y 6, 18-dihidroxigrindélico (29) bajo la forma de sus ésteres metílicos de la fracción inactiva primaria XG-M.

La fracción primaria inactiva XG-M 5.6 g (Cuadro 5), se recromatografió en una columna abierta de gel de sílice (60.0 g), el proceso que se llevó a cabo mediante la elución con CHCl₃, CHCl₃-MeOH en diferentes proporciones, y MeOH. De este fraccionamiento se recolectaron un total de 225 fracciones de 20 ml cada una, que fueron combinadas de acuerdo a su similitud en composición mediante el análisis por cromatografía en capa delgada. El proceso cromatográfico se resume en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria XG-M.

ELUYENTE	PROPORCION (%)	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE	PESO (g)
CHCl ₃	100	1-34	1-58	XG-M1	0.59
CHCl ₃ -	99:1	35-161	59-75	XG-M2	0.29
MeOH	97:3	162-231	76-142	XG-M3	0.99
	90:10	232	143-236	XG-M4	1.28
	80:20	233			
	50:50	234			
MeOH	100	235-236			

La fracción secundaria XG-M2 (Cuadro 13) se sometió al procedimiento de metilación y el producto mayoritario de la reacción se purificó por sucesivas cromatografías preparativas de la fracción secundaria XG-M2 metilada, utilizando como eluyente una mezcla de hexano-CHCl₃ (1:1), lo que permitió el aislamiento de 6.0 mg del éster metílico del ácido 17-hidroxigrindélico (**28a**). Este producto se obtuvo como un sólido vítreo de color amarillo.

Por otra parte, de la fracción secundaria XG-M3 (Cuadro 13) metilada cristalizaron de manera espontánea 7.4 mg del éster metílico del ácido 6, 18-dihidroxigrindélico (**29a**), como un sólido cristalino blanco.

3.7.10 Aislamiento del 3, 6-dimetil éter del camperol (30) de las fracciones inactivas primarias XG-L y XG-M

De las fracciones inactivas primarias XG-L y XG-M (Cuadro 5), cristalizó espontáneamente un sólido cristalino de color amarillo con un punto de fusión de 229-230 °C, y cuyo factor de retención en ambos casos fue el mismo, que se identificó como el compuesto (30).

3.7.11 Aislamiento del β -D-glucositolsterol (31) de la fracción inactiva primaria XG-L.

De la misma fracción primaria inactiva XG-L (Cuadro 5), cristalizaron espontáneamente 90 mg de un sólido cristalino de color blanco, con un punto de fusión de 274-276 °C, que fue identificado como el β -D-glucositolsterol (31) por comparación con una muestra auténtica.

3.7.12 Aislamiento de la sacarosa (32) de la fracción inactiva primaria XG-N.

De la fracción primaria inactiva XG-N (Cuadro 5), cristalizaron 80.0 mg de un sólido cristalino en forma de prismas de color blanco con un punto de fusión de 165-180 °C, que fue identificado como sacarosa por comparación con una muestra auténtica.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Obtención de los compuestos inhibidores del crecimiento vegetal de *X. gymnospermoides* var *eradiatum*.

La obtención de los constituyentes activos a partir de la especie *Xanthocephalum gymnospermoides* var *eradiatum*, se realizó mediante un estudio fitoquímico biodirigido. Este tipo de estudio ha demostrado en diversas ocasiones ser el más eficiente para la obtención de metabolitos secundarios bioactivos, tanto de interés medicinal como agroquímico (Hamburger, 1991; Ghisalberti, 1993; Hostetman & Marston, 1990; Kinghorn *et al.*, 1995; inter alia).

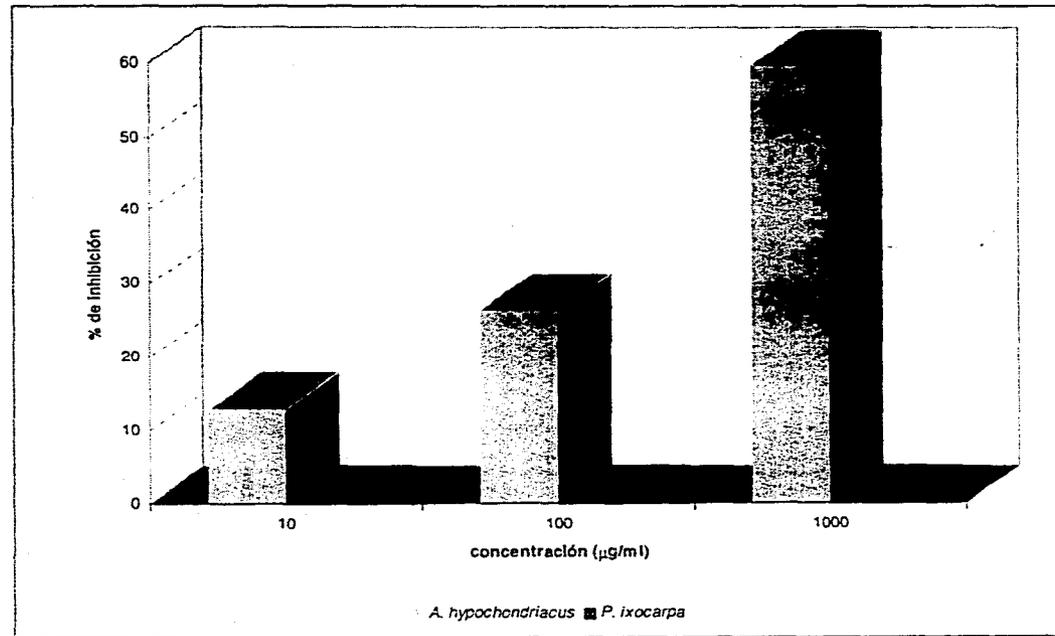
La estrategia de trabajo implementada en el presente estudio abarcó las etapas siguientes:

1. Preselección e identificación taxonómica del material vegetal.
2. Selección del material mediante la evaluación biológica preliminar del extracto íntegro de la planta.
3. Preparación del extracto total a mayor escala.
4. Fraccionamiento biodirigido del extracto crudo.
5. Separación y purificación de los constituyentes presentes en las fracciones activas.
6. Caracterización de los constituyentes bioactivos.
7. Evaluaciones biológicas de los compuestos puros o sus derivados.

La preselección de la planta *X. gymnospermoides* var *eradiatum* se realizó fundamentalmente con base en dos de los criterios más utilizados para la detección de fuentes potenciales de principios bioactivos: el quimiotaxonómico y el ecológico. El primero se basó en los antecedentes de la familia de las Asteraceae como fuente valiosa de compuestos fitotóxicos (Fischer, 1986; Fischer, 1991). El segundo, se fundamenta en las observaciones de campo realizadas por el botánico colector de la planta. Estas observaciones indicaban en primer lugar que la variedad es dominante en su habitat y en segundo lugar que impide el crecimiento de otras hierbas anuales, de ahí su uso frecuente como cultivo de cobertura (Bye, 1996).

La identificación y recolección de la especie, así como, las observaciones de campo fueron realizadas por el Dr. Bye, director del Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM.

Posteriormente se determinó el efecto inhibitor del crecimiento vegetal del extracto íntegro de la planta midiendo su efecto sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *P. ixocarpa*. Los resultados de esta determinación se ilustran en la Gráfica 1, de los cuales se infiere que el extracto de la planta inhibió de manera significativa el crecimiento radicular de la maleza *A. hypochondriacus*, CI_{50} de 185.92 $\mu\text{g/ml}$. Al realizarse el ensayo sobre *P. ixocarpa* el resultado fue contrario al anterior, ya que hubo estimulación del crecimiento radicular encontrándose en este caso una CI_{50} mayor a 1000 $\mu\text{g/ml}$.



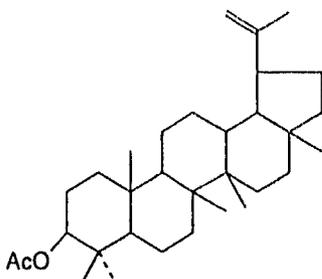
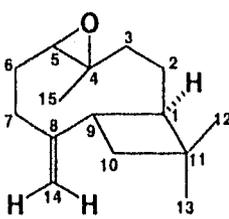
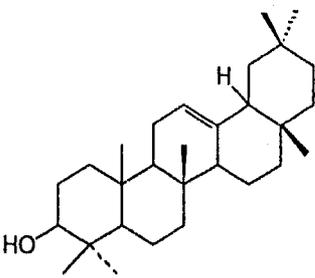
Gráfica 1. Porcentajes de inhibición del extracto íntegro de *X. gymnospermoides* var *eradiatum* sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Physalis ixocarpa*.

La preparación del extracto en gran escala se realizó mediante un procedimiento de maceración tal como se indicó en la sección experimental. A continuación, el extracto fitotóxico se fraccionó mediante el uso de una columna cromatográfica abierta, usando gel de sílice como fase estacionaria. Este proceso generó un total de 14 fracciones primarias XG-A-XG-N (Cuadro 5, sección experimental).

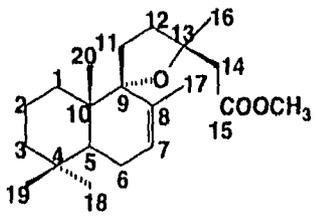
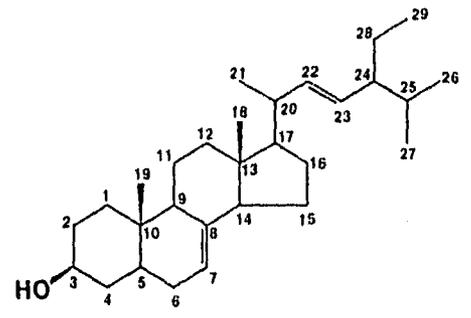
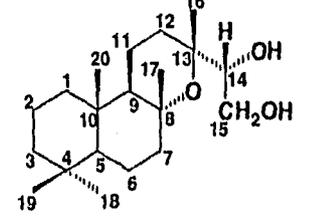
Para realizar el análisis de la actividad inhibidora del crecimiento vegetal se utilizó un procedimiento bioautográfico (Inoue, 1992; sección experimental inciso 3.4.2). De esta manera se evaluaron tanto el extracto íntegro como las fracciones primarias, encontrándose que la actividad de las últimas coincidía con la zonas de inhibición detectadas en el extracto original. De acuerdo a los resultados derivados de estas evaluaciones la actividad inhibidora del crecimiento vegetal se concentraba en las fracciones XG-D, XG-E, XG-G y XG-H.

El aislamiento y la purificación de los compuestos presentes en las fracciones activas e inactivas se realizó mediante el empleo de técnicas cromatográficas y procedimientos químicos. Cabe destacar que aunque los métodos químicos no son aconsejables para la separación de productos bioactivos, en el caso del estudio de la fracción activa XG-I no quedó otra alternativa, debido a la complejidad de la misma y a la poca resolución obtenida en los diferentes sistemas cromatográficos de prueba. En el Cuadro 14 se resumen los metabolitos secundarios aislados de la especie *X. gymnospermoides* var *eradiatum* y los rendimientos correspondientes.

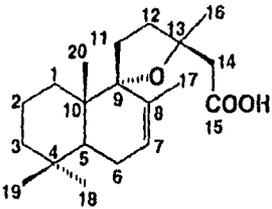
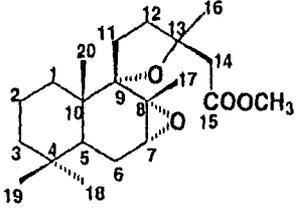
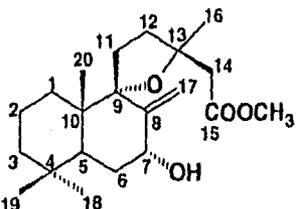
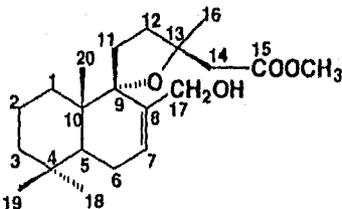
Cuadro 14. Metabolitos secundarios aislados de la especie *X. gymnospermoides* var *eradiatum*.

COMPUESTO	RENDIMIENTO (%)
 <p>Acetato de lupeol (19)</p>	0.000036
 <p>4,5-epoxi-β-carofileno (20)</p>	0.00065
 <p>β-amirina (21)</p>	0.00016

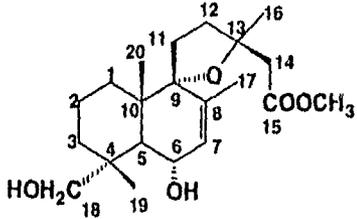
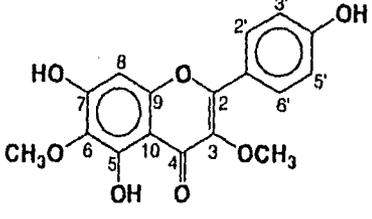
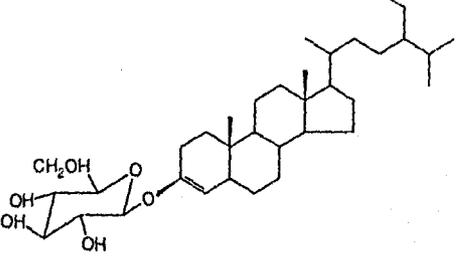
Cuadro 14. Metabolitos secundarios aislados de la especie *X. gymnospermoides* var *eradiatum* (Continuación).

COMPUESTO	RENDIMIENTO (%)
 <p data-bbox="314 825 571 864">Grindelato de metilo (22)</p>	0.00037
 <p data-bbox="342 1222 542 1262">α-espinaesterol (23)</p>	0.00257
 <p data-bbox="257 1500 628 1530">8,13-β-epoxilabdano-14S,15 diol (24)</p>	0.00230

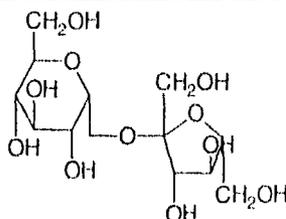
Cuadro 14. Metabolitos secundarios aislados de la especie *X. gymnospermoides* var *eradiatum* (Continuación).

COMPUESTO	RENDIMIENTO (%)
 <p>Acido grindélico (25)</p>	0.01311
 <p>7α,8α-epoxigrindelato de metilo (26a)</p>	0.00010
 <p>7α-hidroxi-8(17) deshidrogrindelato de metilo (27a)</p>	0.00099
 <p>17-hidroxigrindelato de metilo (28a)</p>	0.00034

Cuadro 14. Metabolitos secundarios aislados de la especie *X. gymnospermoides* var *eradiatum* (Continuación).

COMPUESTO	RENDIMIENTO (%)
 <p>6,18-dihydroxigrindelato de metilo (29a)</p>	0.00041
 <p>3,6-dimetil éter del camperol (30)</p>	0.00300
 <p>β-D-glucitosterol (31)</p>	0.00270

Cuadro 14. Metabolitos secundarios aislados de la especie *X. gymnospermoides* var *eradiatum* (Continuación).

COMPUESTO	RENDIMIENTO (%)
 <p>Sacarosa (32)</p>	0.01920

4.2 CARACTERIZACION DE LOS CONSTITUYENTES ACTIVOS.

La caracterización de los compuestos aislados se realizó mediante el empleo de técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales, y mediante el empleo de algunos procedimientos químicos.

4.2.1 CARACTERIZACION DEL 8,13 β -EPOXILABDANO-14S, 15-DIOL (24) DE LA FRACCION ACTIVA XG-H.

El 8,13 β -epoxilabdano-14S,15 diol (24) se obtuvo mediante sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada de la fracción primaria XG-H. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto natural se resumen en la Tabla 1.

El espectro de IR (Espectro 1) presentó una absorción intensa para grupo hidroxilo en 3417 cm^{-1} . La acetilación del producto natural con Ac_2O / piridina generó el diacetato **24a** confirmándose químicamente la naturaleza dicarbinólica del producto natural.

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del derivado **24a** se resumen en la Tabla 2.

El ion molecular de 310 uma observado en el espectro de masas del producto natural (Espectro 2) corresponde a la fórmula $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_3$, la cual permite cinco insaturaciones.

Esta fórmula sugirió que el producto (**24**) era un diterpenoide. Otros picos importantes se observaron en m/z 293 (M^+-15), 279 (M^+-31), 263 ($\text{M}^+-15-31-\text{H}$), 245 ($\text{M}^+-15-18-31-\text{H}$), 189, 163, 137, 123, 81, 69 y 43. El pico intenso en m/z 245 (pico base) se genera mediante una pérdida de dieciocho unidades de masa a partir del fragmento 263.

La información proporcionada por la espectrometría de masas y el análisis de los espectros de RMN- ^{13}C (Espectro 4, 4a y 5) del producto (**24**) permitieron comprobar que el producto era un diterpenoide con un núcleo del tipo 8,13 β -epoxilabdano [Figura 4] (Valverde *et al.*, 1977; Von Carstenn *et al.*, 1975; Fernández, 1986; *inter alia*).

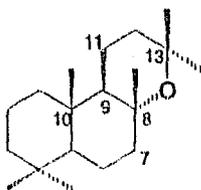


Figura 4. Núcleo base del 8,13 β -epoxilabdano.

Cabe destacar que la estructura base propuesta satisfacía el número de insaturaciones requeridas por la fórmula molecular.

El espectro de RMN-¹³C (Espectro 4) mostró señales para veinte átomos de carbono y el análisis del espectro de RMN-¹³C en su modalidad DEPT (Espectro 4a) indicó claramente que las mismas correspondían a cinco metilos, ocho metilenos, tres metinos y a cuatro carbonos cuaternarios. De acuerdo a la teoría del desplazamiento químico, uno de los metinos (δ_c 75.77) y uno de los metilenos (δ_c 63.56) se encontraban unidos a funciones oxigenadas. Estas señales eran congruentes con la presencia en la molécula de un alcohol primario y otro secundario. Por otra parte, los carbonos cuaternarios en δ_c 76.57 y 77.40 también se encontraban unidos a una función oxigenada y eran asignables a los carbonos C-8 y C-13 del núcleo base, respectivamente.

Los espectros de RMN-¹H del producto natural y de su derivado (Espectros 3 y 3b) presentaron señales para:

1. Cinco metilos unidos a carbonos cuaternarios en δ_H 1.28 (H-16), δ_H 1.13 (H-17), δ_H 0.86 (H-20) y δ_H 0.80 (H-18 y H-19) en el caso del producto natural y en δ_H 1.26, δ_H 1.22, δ_H 0.86 y δ_H 0.79 en el derivado acetilado.
2. Un sistema ABX en δ_H 3.75 (d, $J=11.4$ y 6.0 Hz); δ_H 3.60 (m) y δ_H 3.48 (m) el cual se desplazó paramagnéticamente en el derivado acetilado (**24a**) [δ_H 4.08, δ_H 4.46 y δ_H 5.03]. Las señales del sistema ABX correlacionaban en el espectro de correlación heteronuclear (HETCOR) con el metino en δ_c 75.77 (C-14) y el metileno en δ_c 63.56 (C-15). Cabe destacar que el conjunto de estas señales era congruente con la

presencia de un diol vecinal unido a un centro terciario en el producto natural. En consecuencia esta porción de la estructura solo se podía encontrar ubicado sobre el C-13 del núcleo base.

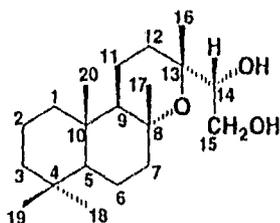
3. Un multiplete centrado en δ_H 2.14. Esta señal correlacionaba con el metileno en δ_C 29.36 en el espectro de correlación heteronuclear HETCOR (Espectro 5). Este multiplete se desplazó a campo más bajo en el espectro de RMH- 1H del derivado diacetilado (24a), donde se observa sobrepuesto con otras señales en la región de los metilenos.

4. Dos grupos hidroxilo δ_H 2.89 (d, J=5.40 y 2.77 Hz) que desaparecen al equilibrar el espectro con agua deuterada.

Los espectros de RMN- 1H del producto (24) resultaron ser idénticos a los descritos para el barbatol, un *ent*-labdano previamente aislado de *Sideritis arborescens* Salzm. (Lamiaceae). Sin embargo, el signo de la rotación óptica fué contrario, por lo que se propone que el producto natural (24) aislado de *X. gymnospermoides* var *eradiatum* corresponde al barbatol de la serie normal (8,13- β -epoxilabdano-14S,15 diol), y representa un nuevo producto natural.

El espectro de RMN- ^{13}C para el isómero *ent* no se encuentra descrito en la literatura. En el presente trabajo las señales se asignaron mediante el empleo de modelos adecuados (Fernández *et al.*, 1986) y el análisis del espectro HETCOR.

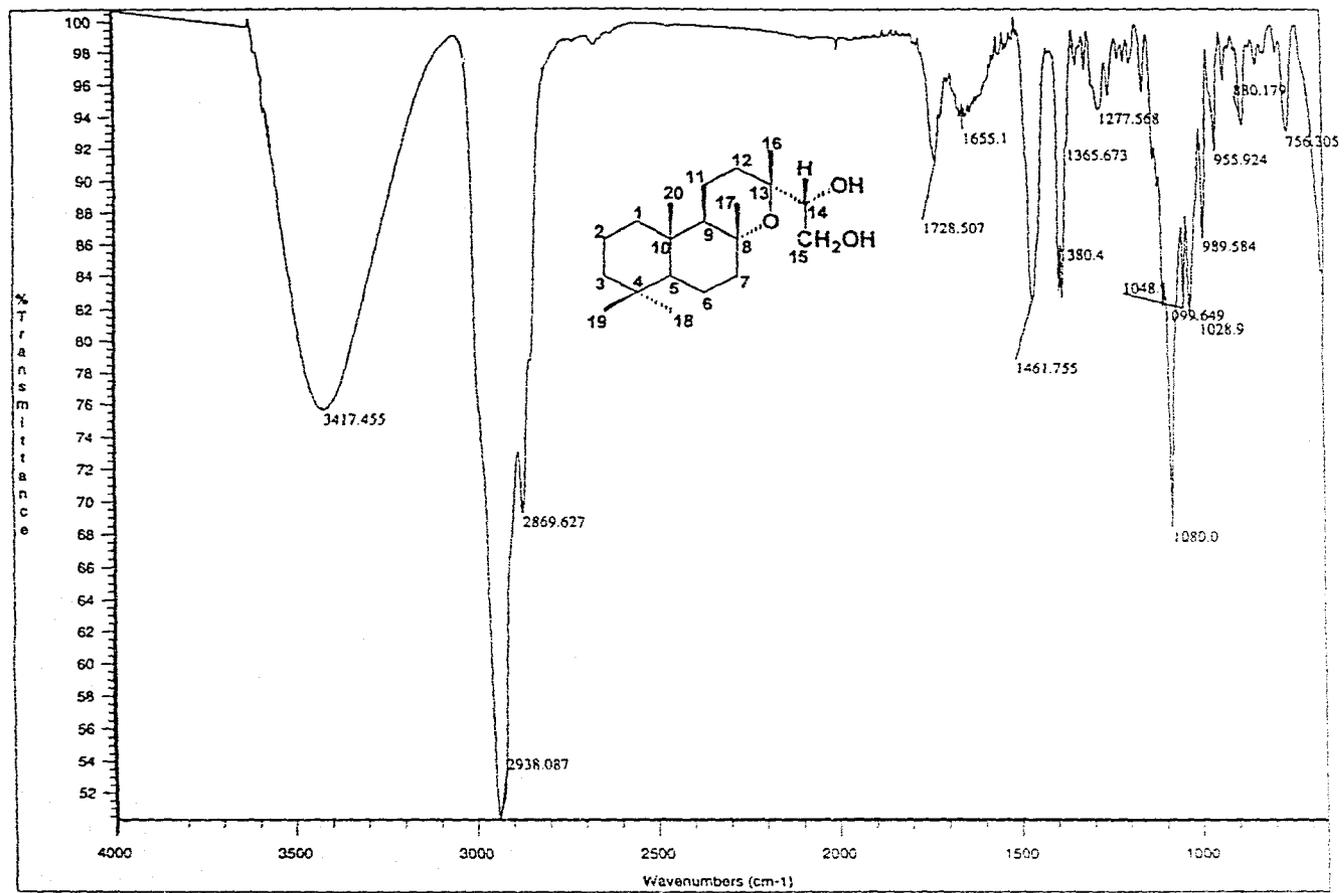
Tabla 1. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 8,13 β-epoxilabdano-14S,15 diol (24).



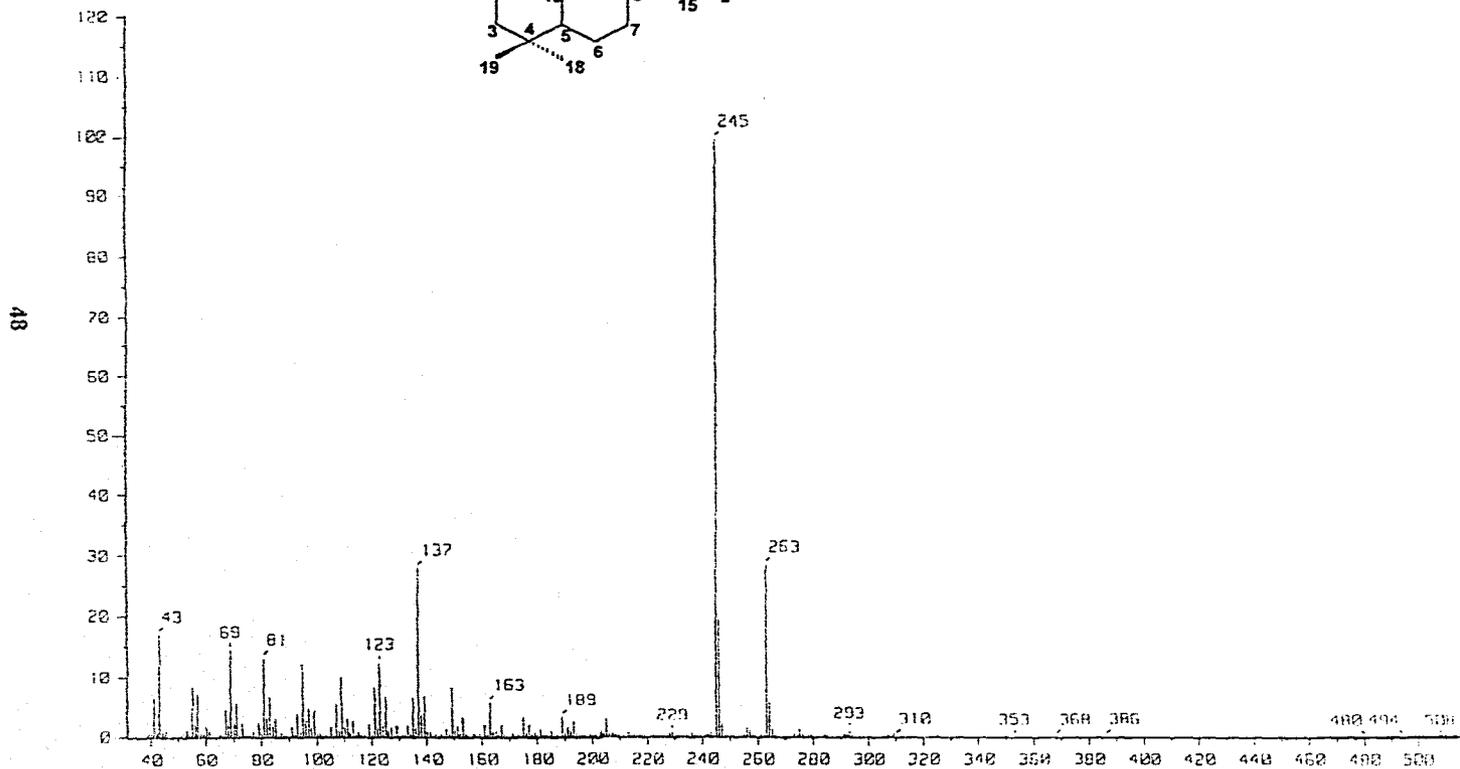
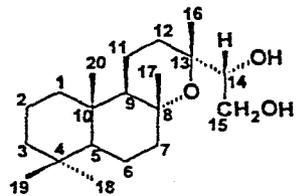
IR, ν_{max} (película) cm^{-1} (Espectro 1):	3417, 2938, 2869 y 1099.
EMIE, m/z (Int rel) (Espectro 2):	310 [M^+ (0.18)], 293 (0.18), 263 (28.6), 245 (100.0), 229 (0.18), 189 (3.27), 163 (5.7), 137 (28.6), 123 (12.3), 81 (13.1), 69 (14.7) y 43 (17.2).
RMN- ^1H δ (300 MHz, CDCl_3), ppm (Espectro 3):	3.75 [dd, $J=11.4$ y $J=6.0$ (H-15 $_{\text{A}}$)], 3.60 (m, H-15 $_{\text{B}}$), 3.48 (m, H-14 $_{\text{x}}$), 2.89 [d, $J=5.4$ (OH-14)], 2.77 (m, OH-15), 2.14 (m, H-12 $_{\text{A}}$), 1.29 (s, H-16), 1.13 (s, H-17), 0.86 (s, H-20) y 0.80 [s, (H-18 y H-19)].
RMN- ^{13}C δ (75 MHz, CDCl_3), ppm (Espectro 4):	38.92 (C-1), 18.41 (C-2), 43.75 (C-3), 33.17 (C-4), 53.66 (C-5), 20.01 (C-6), 41.97 (C-7), 76.57 (C-8), 56.49 (C-9), 37.11 (C-10), 14.35 (C-11), 29.36 (C-12), 77.40 (C-13), 75.77 (C-14), 63.56 (C-15), 25.27 (C-16), 25.21 (C-17), 33.30 (C-18), 21.33 (C-19) y 15.1 (C-20).
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$	+20 $^{\circ}$

J= Constante de acoplamiento expresada en Hz

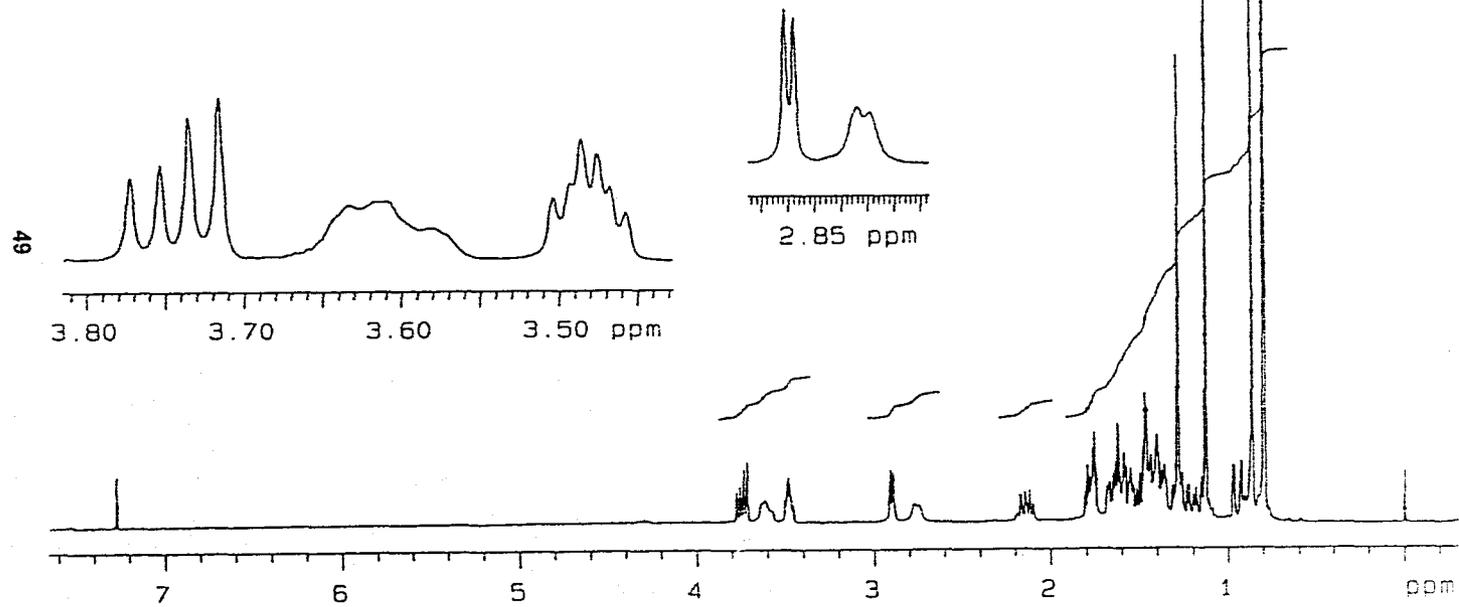
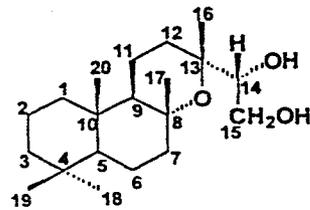
47



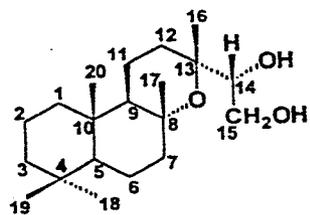
Espectro 1. IR del 8,13-β-epoxilabdano-14S, 15 diol (24)



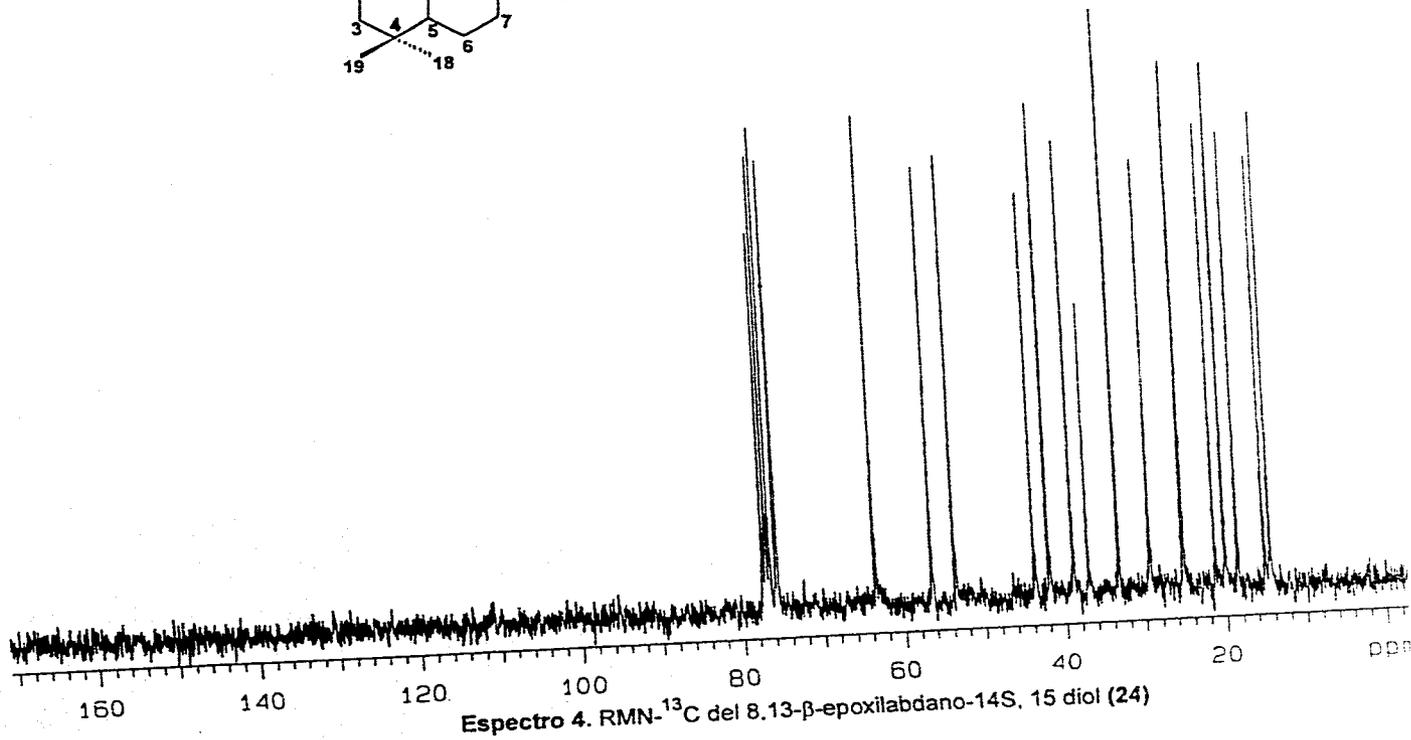
Espectro 2. EMIE del 8,13-β-epoxilabdano-14S, 15 diol (24)

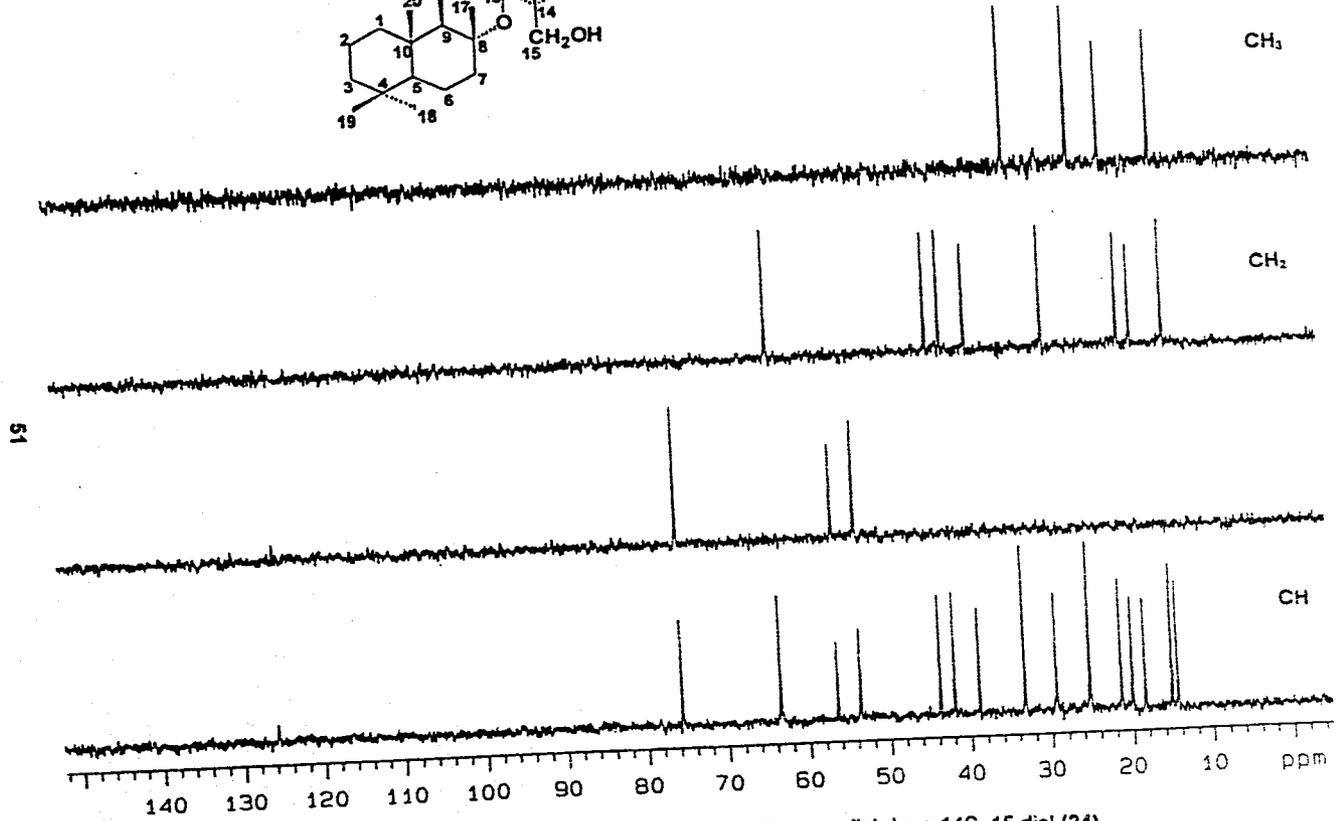
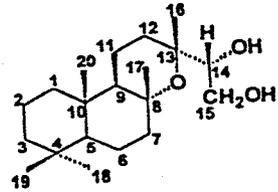


Espectro 3. RMN-¹H del 8,13-β-epoxilabdano-14S, 15 diol (24)

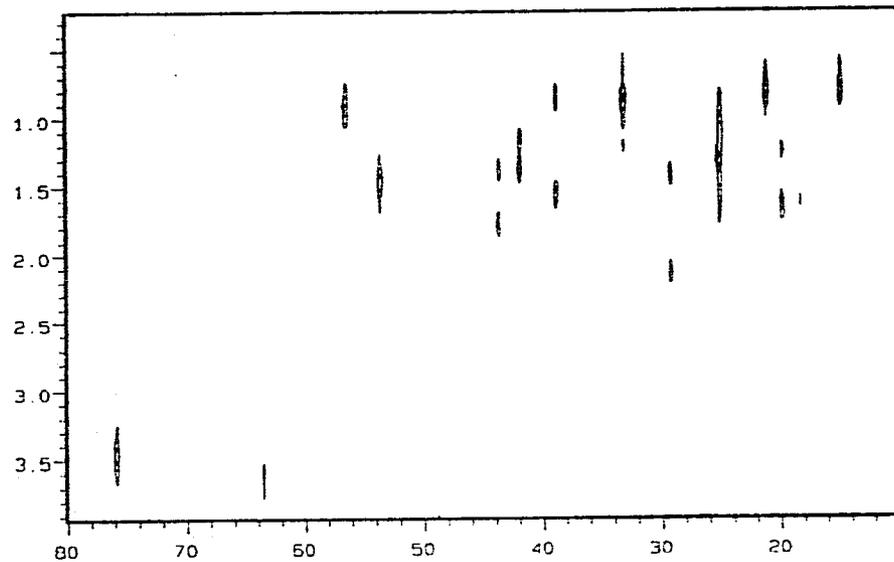
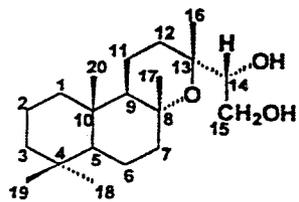


50



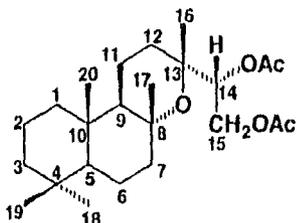


Espectro 4a. DEPT del 8,13-β-epoxilabdano-14S, 15 diol (24)



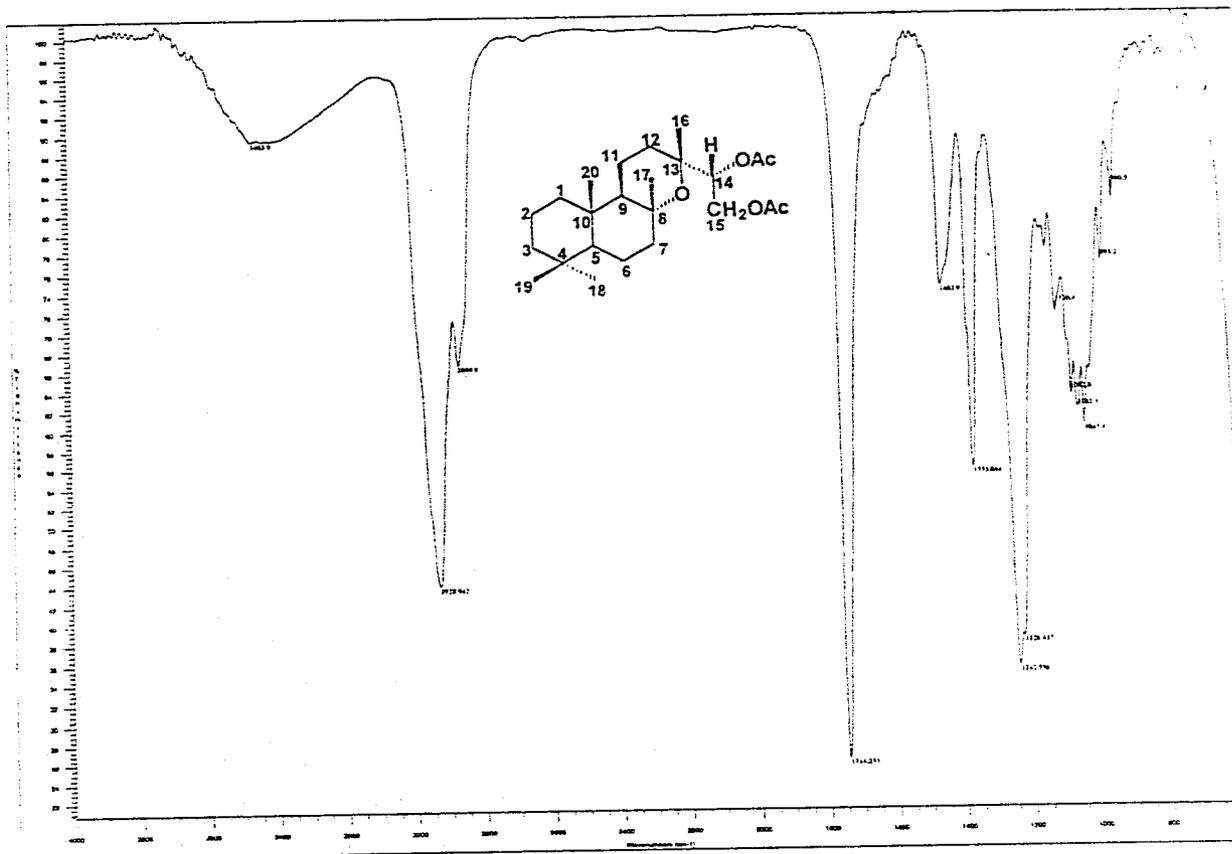
Espectro 5. HETCOR del 8,13-β-epoxilabdano-14S, 15 diol (24)

Tabla 2. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del derivado acetilado del 8,13 β-epoxilabdano-14S,15 diol (24a).

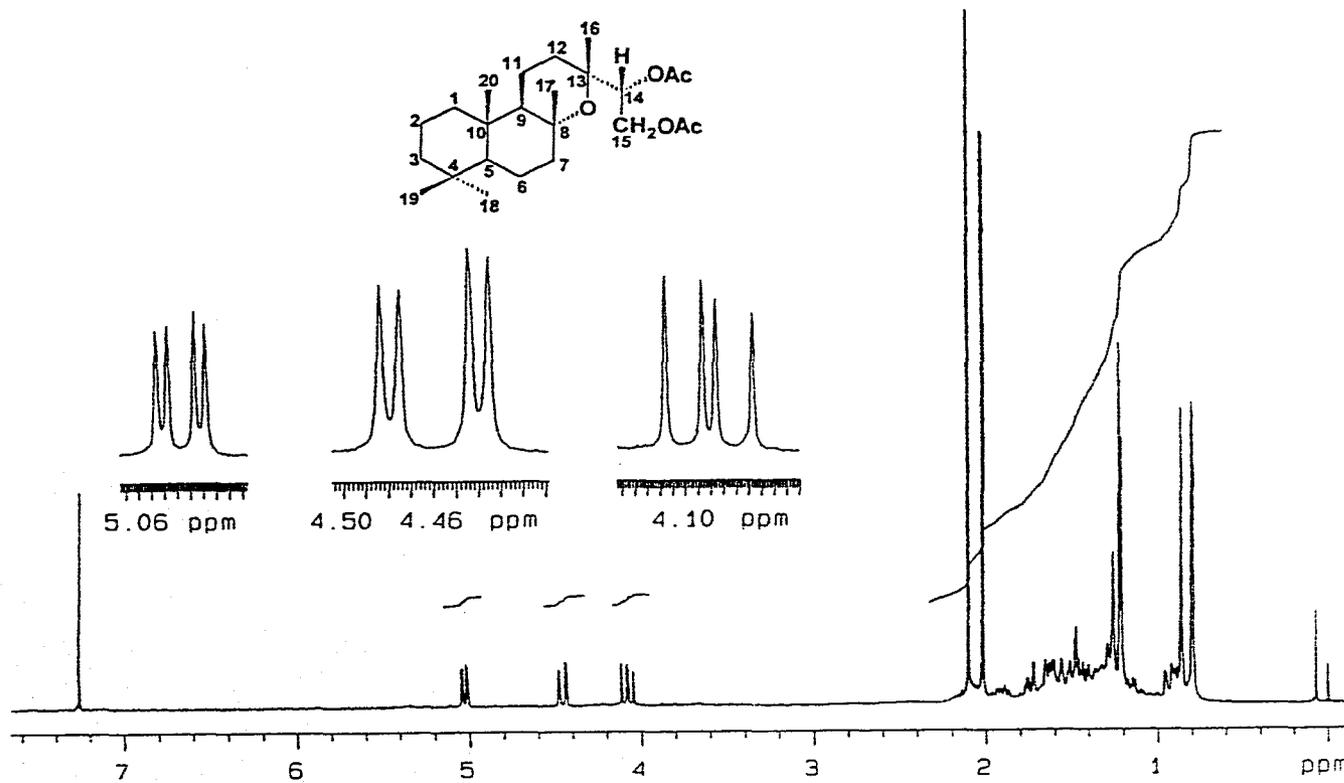


IR, ν_{\max} (película) cm^{-1} (Espectro 3a):	2930, 2869, 1745, 1458, 1373, 1242, 1043 y 993.
RMN- ^1H δ (300 Mhz, CDCl_3), ppm (Espectro 3b):	5.03 [dd, $J=8.85$ y $J=2.60$ (H-15 _a)], 4.46 [dd, $J=12.0$ y $J=2.70$ (H-14 _B)], 4.08 [dd, $J=11.85$ y $J=8.6$ (H-14 _A)], 2.10 (s, OMe), 2.02 (s, OMe), 1.20 (s, H-16 ó H-17), 1.19 (s, H-17 ó H-16), 0.86 (s, H-20) y 0.80 (s, H-18 y H-19).
EMIE, m/z (int rel) (Espectro 3c):	273 [M^+ (0.10)], 263 (98.6), 245 (100.0), 205 (8.18), 189 (9.27), 163 (25.7), 137 (68.6), 123 (29.3), 81 (25.1), 69 (24.7) y 43 (53.2).

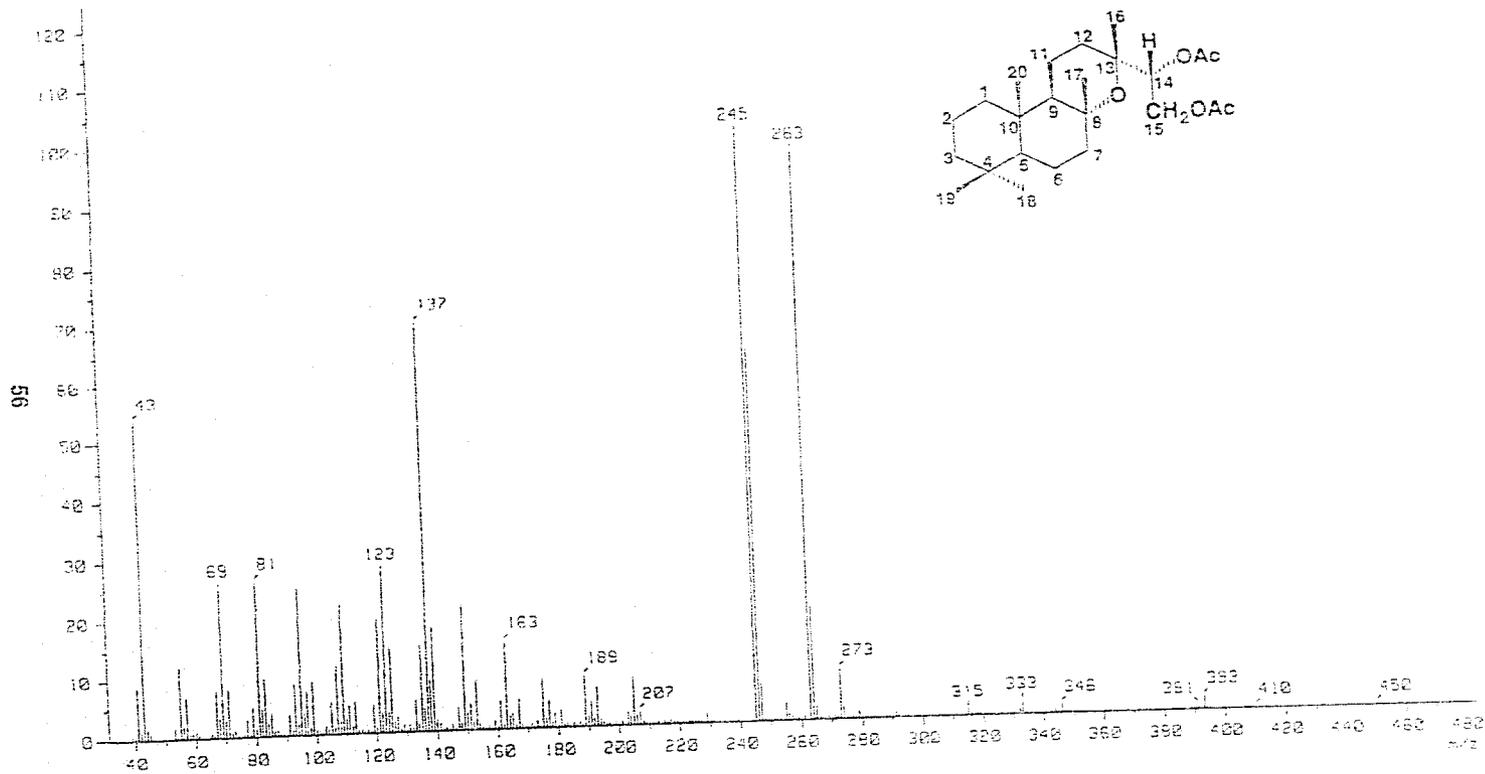
J= Constante de acoplamiento expresada en Hz



55



Espectro 3b. RMN- ^1H del derivado acetilado del 8,13- β -epoxilabdano-14S, 15 diol (24)



Espectro 3c EMIE del derivado acetilado del 8,13-β-epoxilabdano-14S, 15 diol (24)

4.2.2 CARACTERIZACION DEL GRINDELATO DE METILO (22) Y COMPUESTOS RELACIONADOS

4.2.2.1 Grindelato de metilo (22) y ácido grndélico (25).

El grindelato de metilo (22) se obtuvo por sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada de la fracción secundaria fitotóxica XG-E1. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto se resumen en la Tabla 3.

El espectro de IR (Espectro 6) presentó absorciones características para enlaces C-H (2962, 2920 cm^{-1}) y, para funciones éster (1740, 1224 cm^{-1}) y éter (1103 cm^{-1}).

La información proporcionada por la espectroscopía de masas y el análisis del espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 9) del producto (22) permitieron comprobar que el producto era un diterpenoide con un núcleo 9, 13 epoxilabdano [Figura 5] (Guerreiro *et al.*, 1980; Timmermann *et al.*, 1985; Adinolfi *et al.*, 1988; González *et al.*, 1984; *inter alia*).

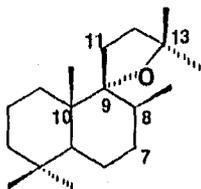


Figura 5. Núcleo base del 9, 13 epoxilabdano.

El ion molecular observado en el espectro de masas (Espectro 7) mostró una relación m/z de 334 uma y correspondió a la fórmula $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_3$. Esta fórmula permite cinco insaturaciones. Otros picos importantes en el espectro de masas (Espectro 7) se observaron en m/z 210 (M^+-124 , pico base), 187, 178, 149, 136 ($\text{M}^+-124-74$), 109, 82, 69, 55, 43 y 41. El pico intenso en m/z 210 (pico base) se genera mediante una

fragmentación de RetroDiels-Alder (RDA), seguida de una pérdida de 124 unidades de masa a partir del ion molecular. Este fragmento es característico para los derivados del ácido grindélico. En la Figura 7 se muestra el patrón de fragmentación del compuesto (22) (Timmermann *et al.*, 1985).

El espectro de RMN-¹³C (Espectro 9) mostró señales para 21 átomos de carbono. El análisis del espectro de RMN-¹³C en su modalidad DEPT (Espectro 9a) indicó claramente que las señales correspondían a seis metilos, siete metilenos y dos metinos; en consecuencia la molécula presenta seis carbonos cuaternarios.

De acuerdo a la teoría del desplazamiento químico, dos de los carbonos cuaternarios [δ_C 90.56 (C-9) y 81.60 (C-13)] se encontraban unidos a una función oxigenada, otro correspondía al grupo carbonilo de la función éster, el cuarto era de naturaleza olefínica (δ_C 134.38) y los dos últimos, de carácter alifático y fácilmente asignables a los C-4 (δ_C 33.20) y C-10 (δ_C 40.64) del núcleo base. El resto de las señales incluyendo el metoxilo en δ_C 51.41 fueron asignadas utilizando como modelos una serie de diterpenos derivados del ácido grindélico (Guerreiro *et al.*, 1980).

De manera adicional el espectro de RMN-¹H (Espectro 8) permitió evidenciar y comprobar la siguiente información:

1. La presencia de cinco metilos unidos a centros cuaternarios en δ_H 1.76 (H-17), 1.33 (H-16), 0.90 (H-19), 0.87 (H-18) y 0.81 (H-20) y de un grupo metoxilo (δ_H 3.65).

El desplazamiento en δ_H 1.76 indicó la presencia de un metilo sobre doble ligadura. La correlación observada en el espectro homonuclear COSY entre esta señal (Figura 6) y la vinílica en δ_H 5.51, confirmó esta propuesta.

La asignación de las señales de los metilos se realizó mediante las correlaciones observadas en el espectro HETCOR (Espectro 10).

2. La presencia del metileno vecinal (C-14) de la función carbonílica de los derivados del ácido grándélico, ya que las señales en δ_H 2.75 (d, J=14.1 Hz) y δ_H 2.61 (d, J=14.4 Hz) conforman el sistema AB diagnóstico para este metileno.

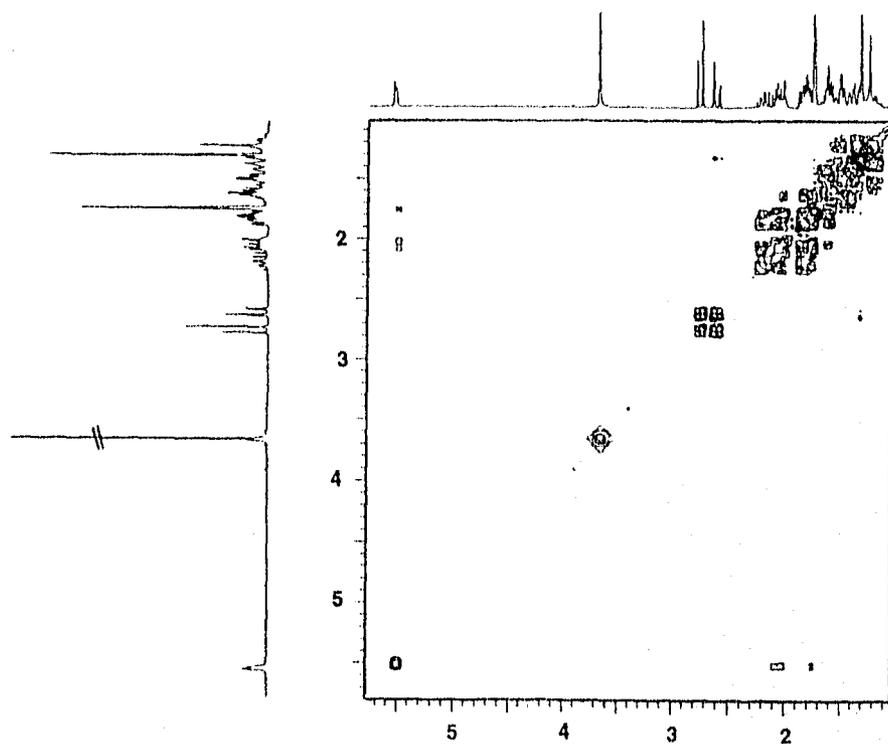


Figura 6. COSY 1H - 1H del grindelato de metilo (22).

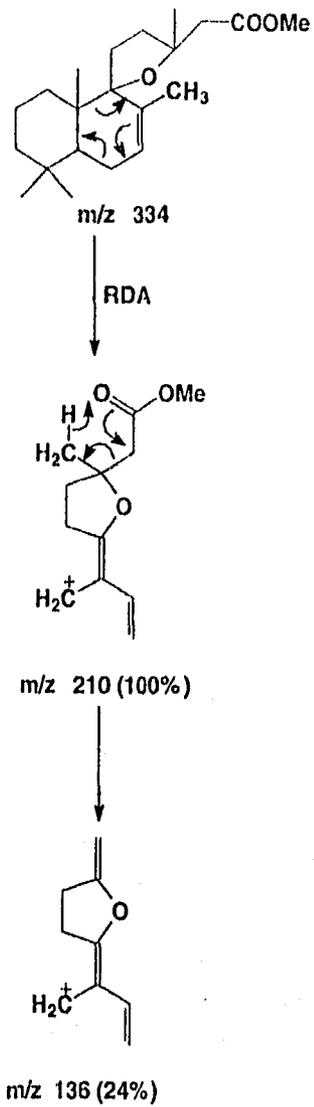


Figura 7. Patrón de fragmentación del grindelato de metilo (22).

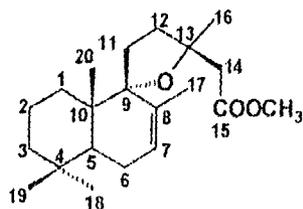
Con base en el análisis anterior la estructura del metabolito (22) se estableció como la del grindelato de metilo. Así mismo, el valor (negativo) de la rotación óptica permitió comprobar la configuración *normal* del núcleo labdano. Los parámetros espectroscópicos coincidieron con los publicados para el éster del ácido grindélico (Guerreiro *et al.*, 1980), sin embargo cabe hacer notar que a la fecha no se ha descrito previamente como producto natural.

El ácido grindélico (25) se obtuvo de la fracción secundaria activa XG-H3. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto (25) se resumen en la Tabla 4. El espectro de IR (Espectro 11) de este producto evidenció la presencia de una función ácida (3437, 2917 y 1707 cm^{-1}). El espectro de masas (Espectro 12), permitió determinar su fórmula molecular como $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$, la cual permitía cinco insaturaciones al igual que en el caso del producto (22). El ion molecular observado en m/z 320 tenía 14 unidades de masa menos que el producto (22).

Los espectros de RMN (Espectros 13, 14 y 14a) resultaron muy similares a los del producto (22), difiriendo fundamentalmente en la ausencia de las señales para el grupo metoxilo de la función éster. En su lugar en el espectro de RMN- ^1H (Espectro 13) se observó una banda ancha en δ_{H} 3.19 misma que desaparecía al equilibrar el espectro con D_2O . Estas observaciones, aunadas a la diferencia de 14 unidades de masa en el EM permiten inferir que el producto (25) era el ácido grindélico.

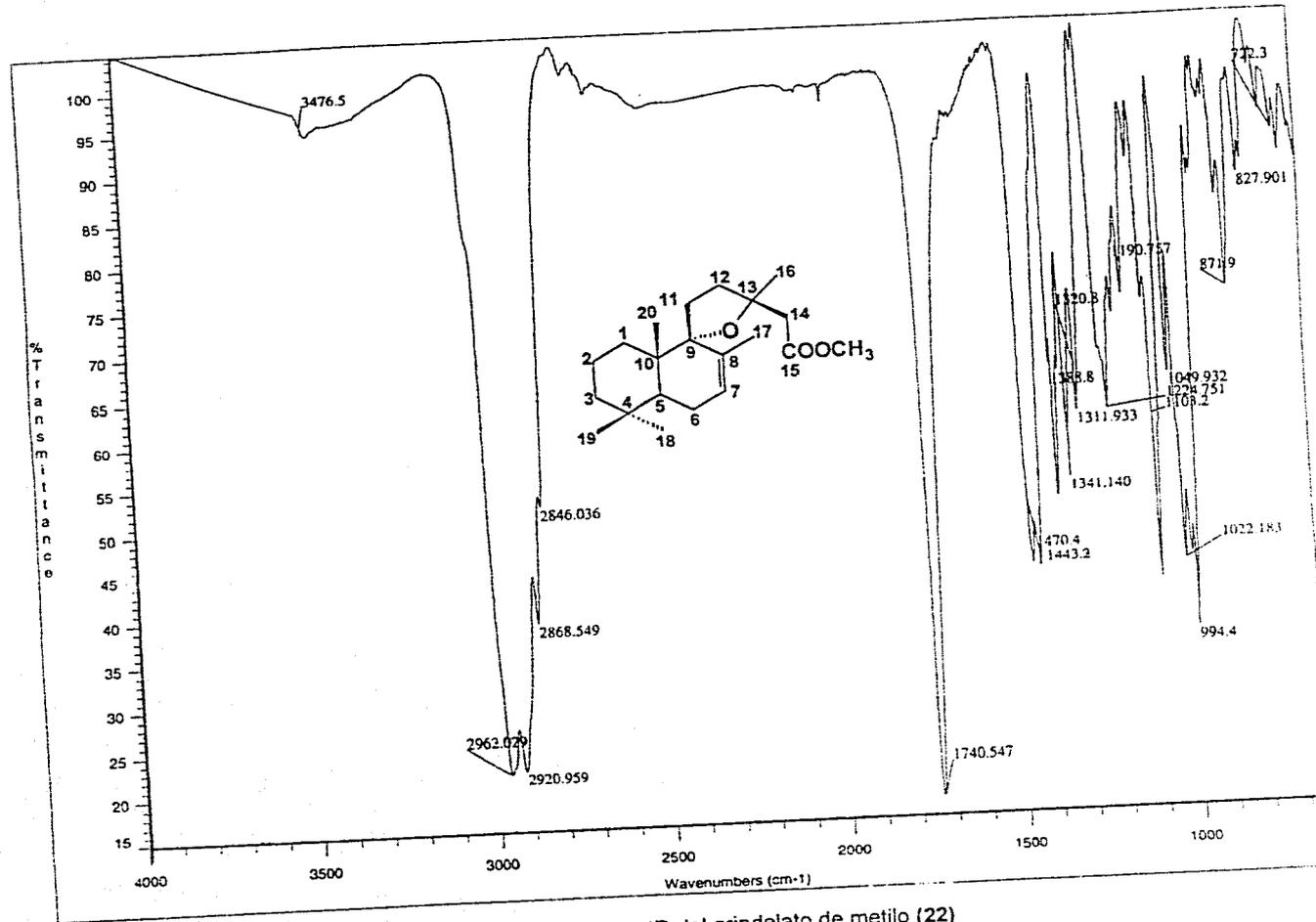
La metilación del producto (25) por tratamiento con diazometano confirmó químicamente la presencia de la función ácida. Esta reacción también permitió la correlación química entre los productos (22) y (25).

Tabla 3. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del grindelato de metilo (22).



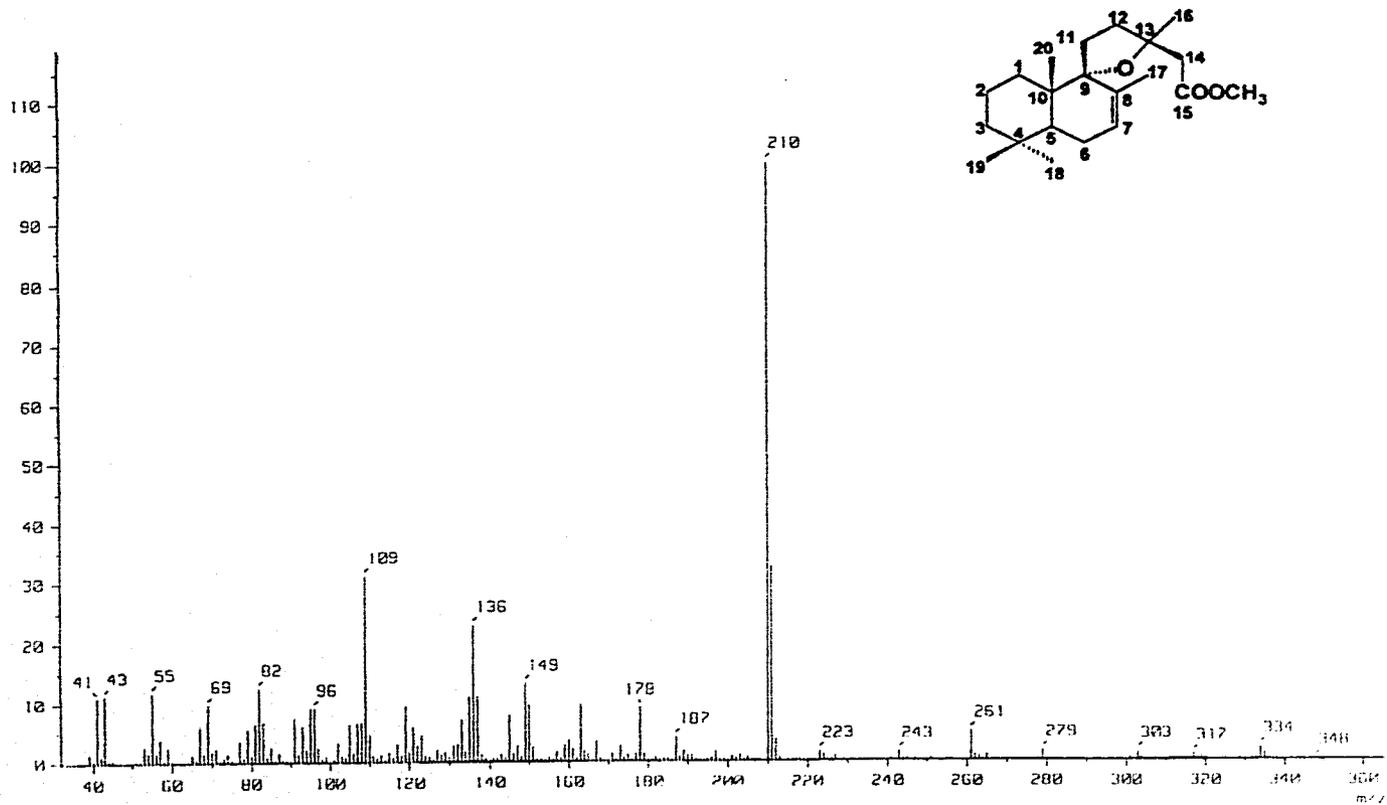
IR, ν_{\max} (película) cm^{-1} (Espectro 1):	2962, 2920, 1740, 1470, 1443 y 994
EMIE, m/z (int rel) (Espectro 2):	334 [M^+ (2.5)], 319 (0.8), 261 (5.0), 210 (100), 187 (4.1), 149 (13.3), 136 (24.2), 109 (32.5), 82 (13.39), 69 (10), 43 (11.67) y 41 (10.8).
RMN- ^1H δ (300 MHz, CDCl_3), ppm (Espectro 3):	5.51 (m, H-7), 3.65 (s, OCH ₃), 2.75 [d, J=14.1 (H-14 _a)], 2.61 [d, J=14.4 (H-14 _b)], 1.76 (sa, H-17), 1.33 (s, H-16), 0.90 (s, H-19), 0.87 (s, H-18) y 0.81 (s, H-20).
RMN- ^{13}C δ (75 MHz, CDCl_3), ppm (Espectro 4):	38.18 (C-1), 18.72 (C-2), 41.97 (C-3), 33.20 (C-4), 42.68 (C-5), 32.80 (C-6), 126.55 (C-7), 134.88 (C-8), 90.56 (C-9), 40.64 (C-10), 24.16 (C-11), 24.50 (C-12), 81.60 (C-13), 33.20 (C-14), 171.9 (C-15), 27.33 (C-16), 21.30 (C-17), 32.90 (C-18), 22.38 (C-19), 16.72 (C-20) y 51.41 (OMe).
$[\alpha]_D^{25}$	-83 ⁰

J= Constante de acoplamiento expresada en Hz

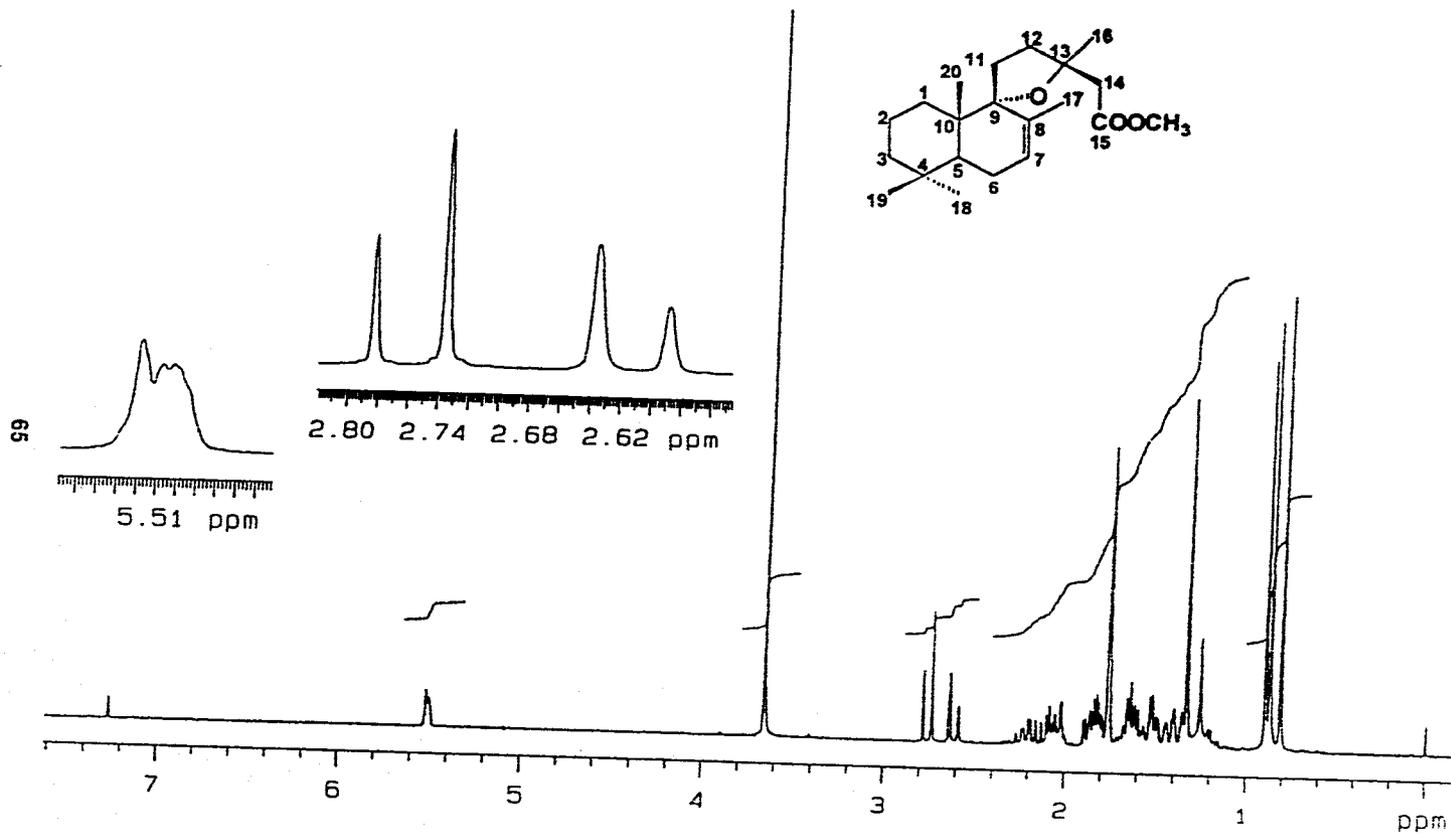


Espectro 6. IR del grindelato de metilo (22)

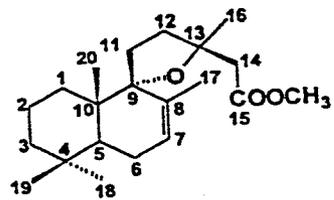
64



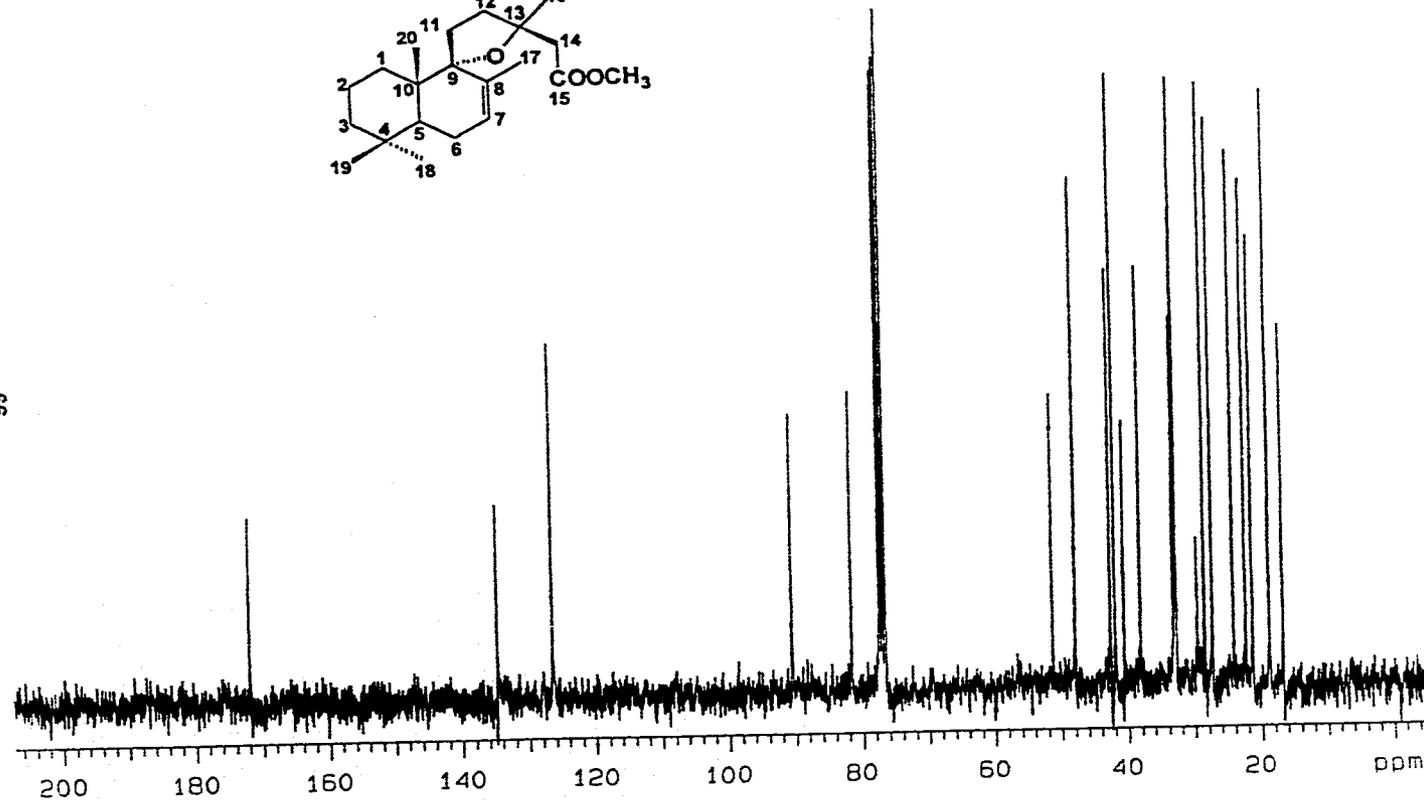
Espectro 7. EMIE del grindelato de metilo (22)



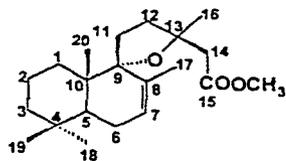
Espectro 8. RMN- ^1H del grindelato de metilo (22)



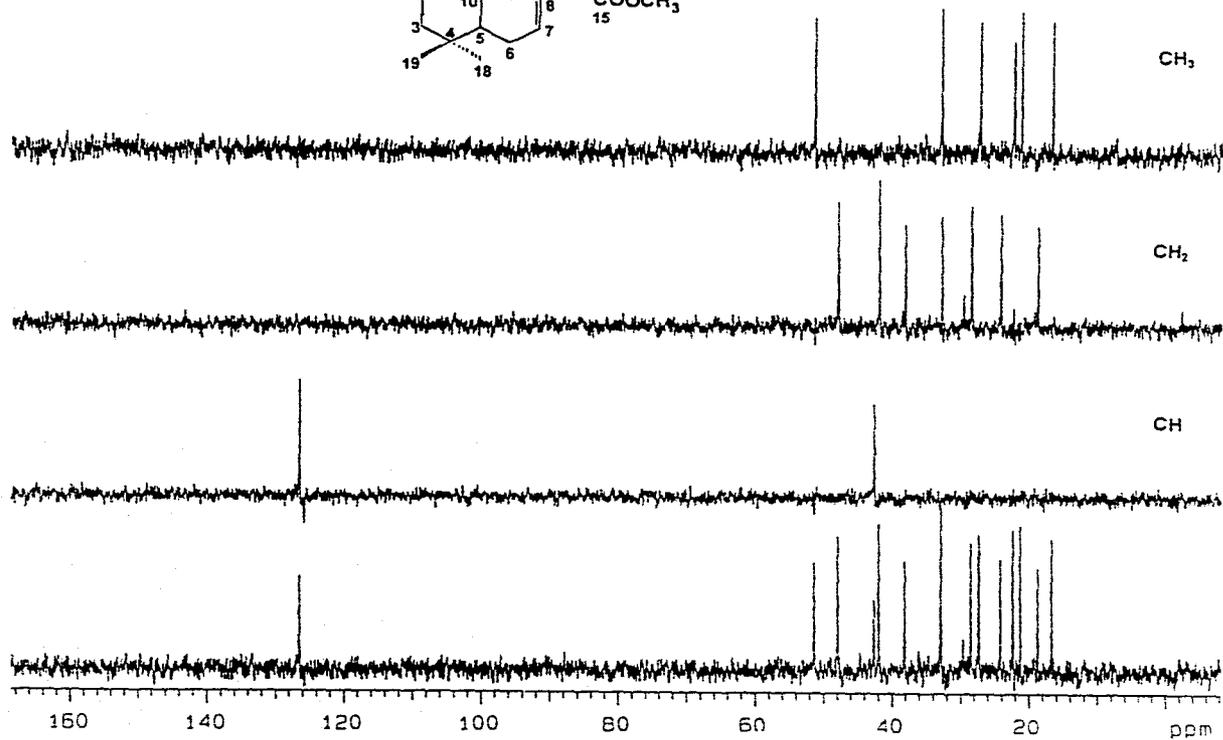
99



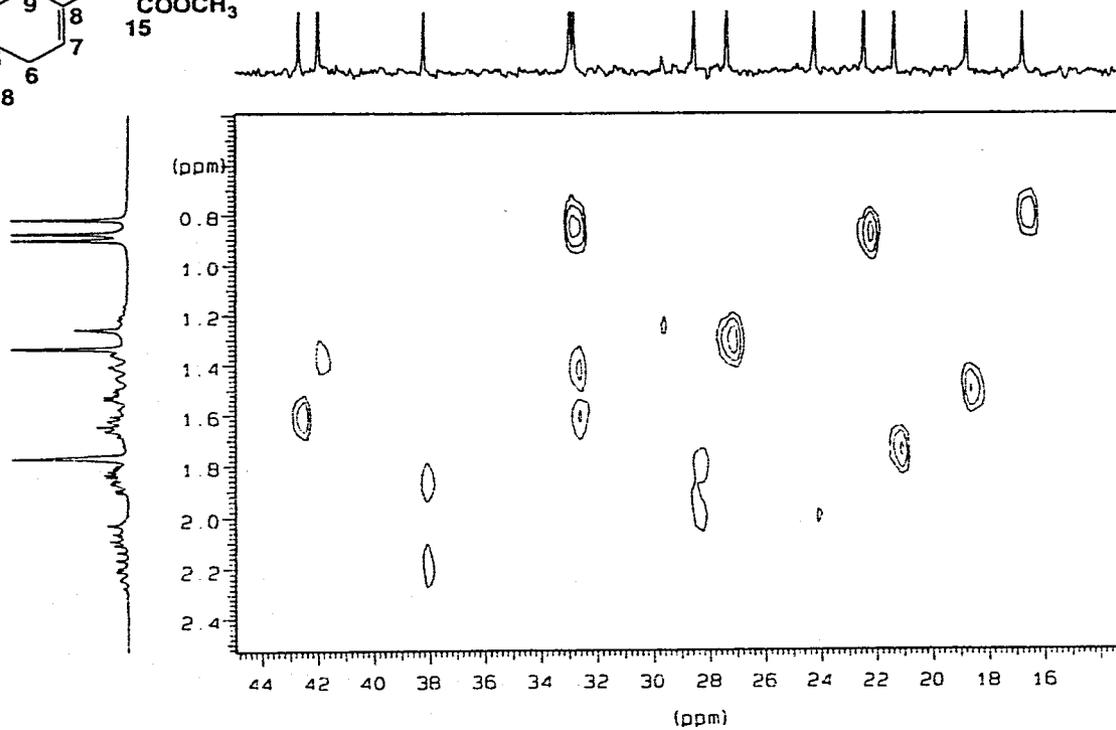
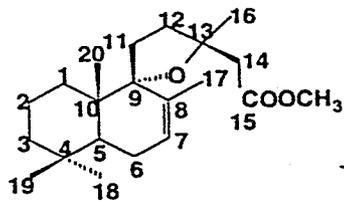
Espectro 9. RMN-¹³C del grindelato de metilo (22)



67

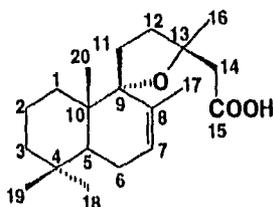


Espectro 9a. DEPT del grindelato de metilo (22)



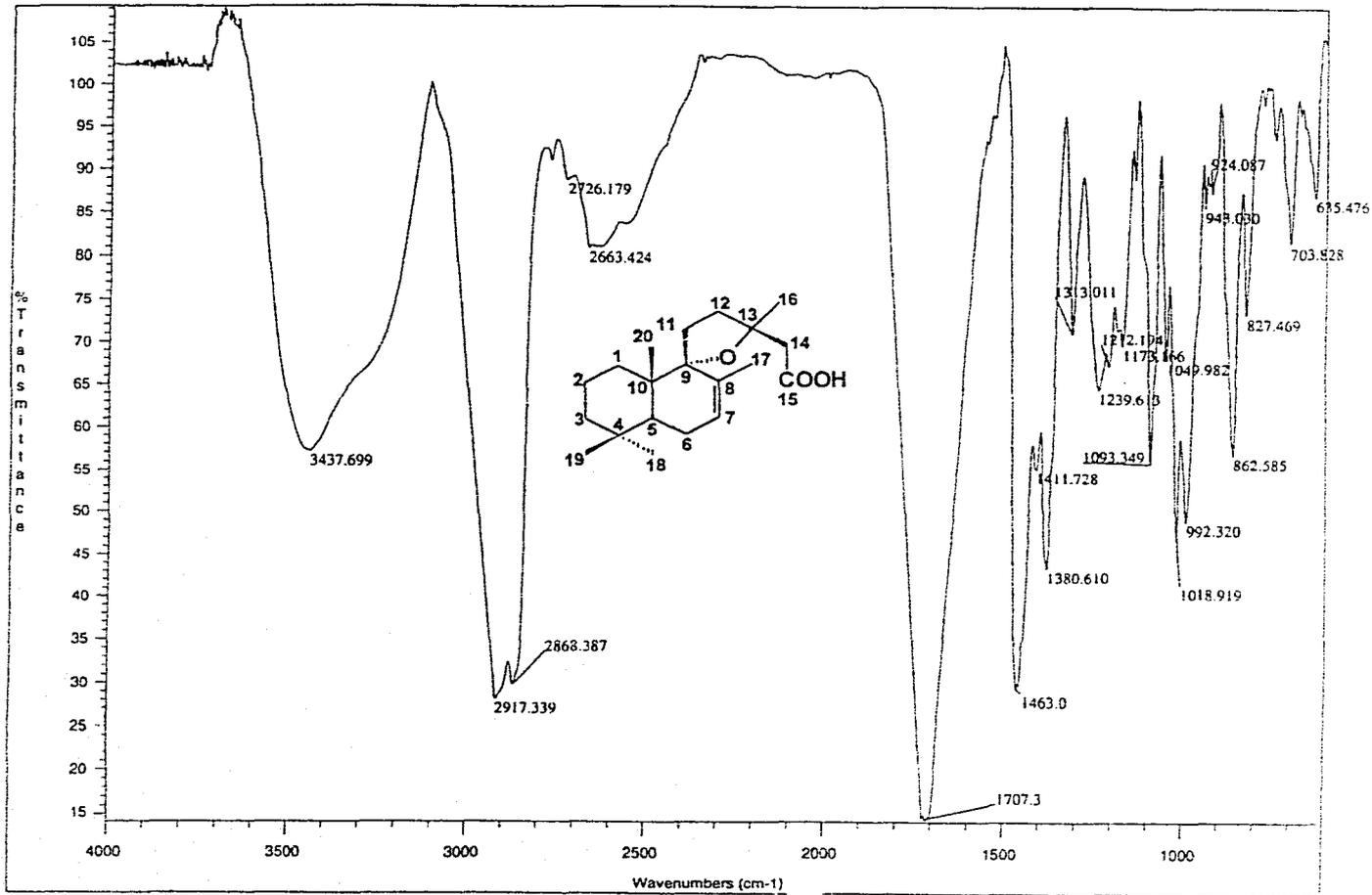
Espectro 10. HETCOR del grindelato de metilo (22)

Tabla 4. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del ácido grindelico (25).



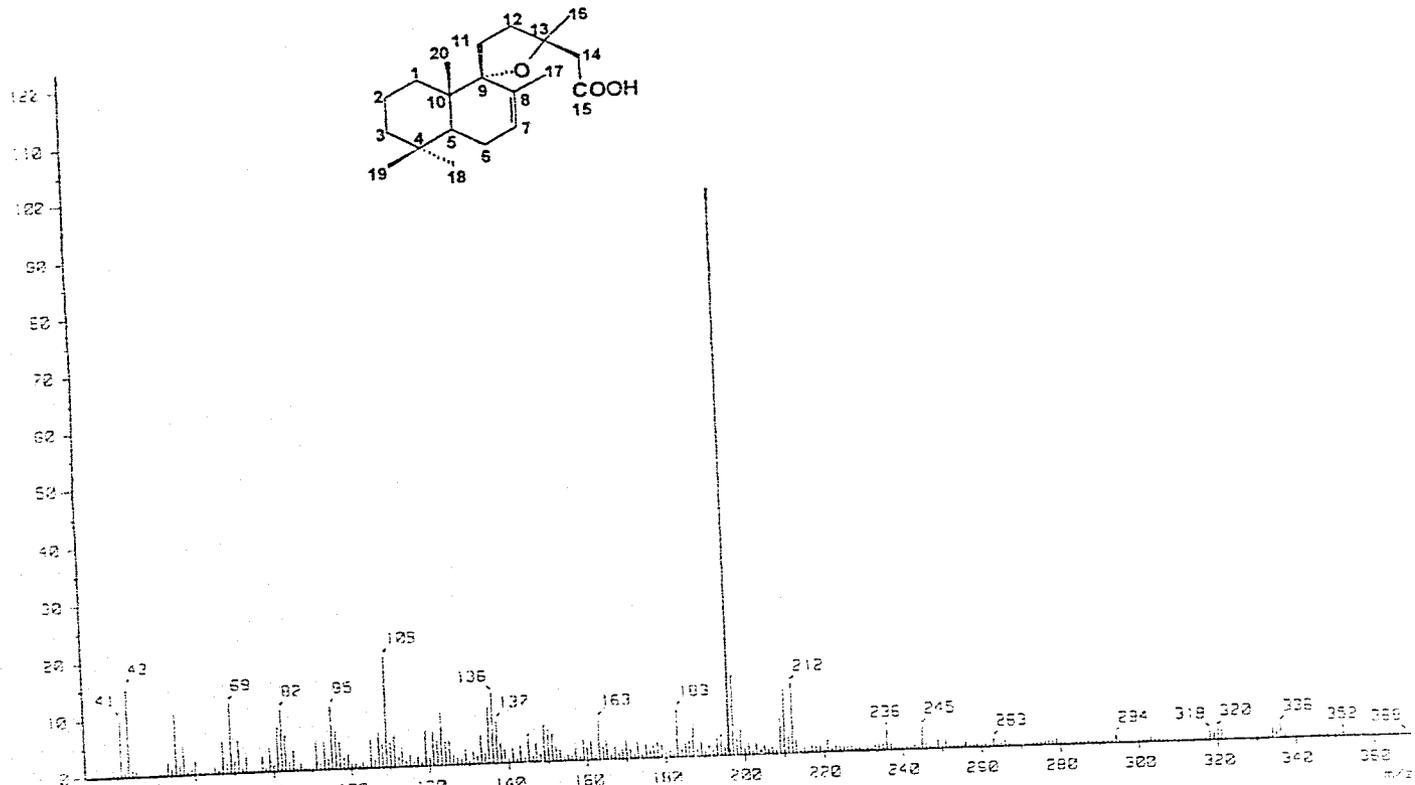
IR, ν_{\max} (película) cm^{-1} (Espectro 11):	3437, 2917, 2868, 1707, 1463, 1380, 1018 y 992.
EMIE, m/z (int rel) (Espectro 12):	334 [M^+ (1.6)], 320 (2.5), 318 (1.6), 245 (4.2), 212 (11.7), 196 (100.0), 183 (8.3), 163 (6.7), 137 (7.5), 136 (11.7), 109 (19.2), 95 (10.5), 82 (10.8), 69 (10.8), 43 (15.8) y 41 (10.0).
RMN- ^1H δ (300 MHz, CDCl_3), ppm (Espectro 13):	5.62 (m, H-7), 3.19 (sa, OH), 2.59 (s, H-14), 1.77 (sa, H-17), 1.25 (s, H-16), 0.91 (s, H-19), 0.88 (s, H-18) y 0.83 (s, H-20).
RMN- ^{13}C δ (75 MHz, CDCl_3), ppm (Espectro 14):	37.54 (C-1), 18.38 (C-2), 41.72 (C-3), 33.20 (C-4), 37.23 (C-5), 31.85 (C-6), 61.71 (C-7), 130.88 (C-8), 88.38 (C-9), 39.81 (C-10), 22.96 (C-11), 29.23 (C-12), 81.55 (C-13), 47.20 (C-14), 172.04 (C- 15), 26.60 (C-16), 23.18 (C-17), 32.62 (C-18), 22.65 (C-19) y 16.62 (C-20).

J= Constante de acoplamiento expresada en Hz.



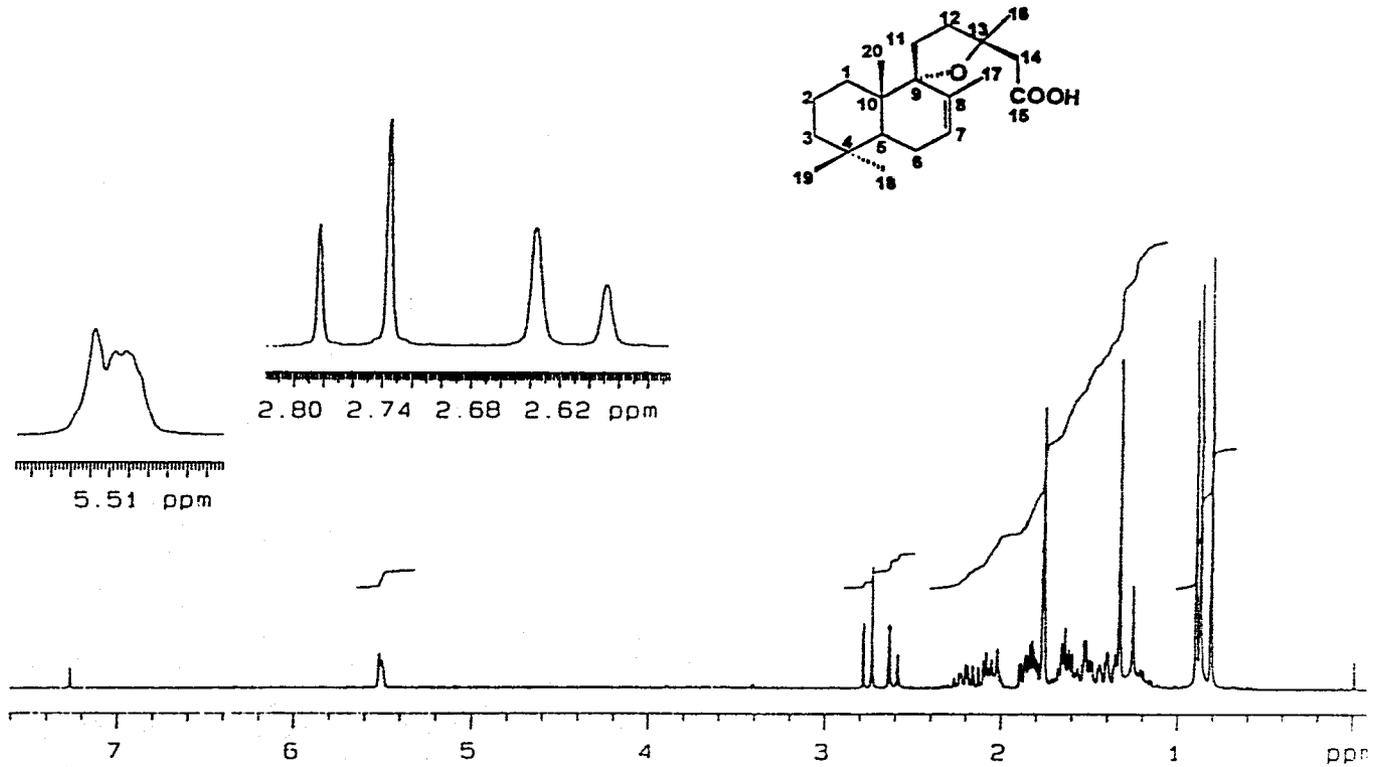
Espectro 11. IR del ácido grindílico (25)

71

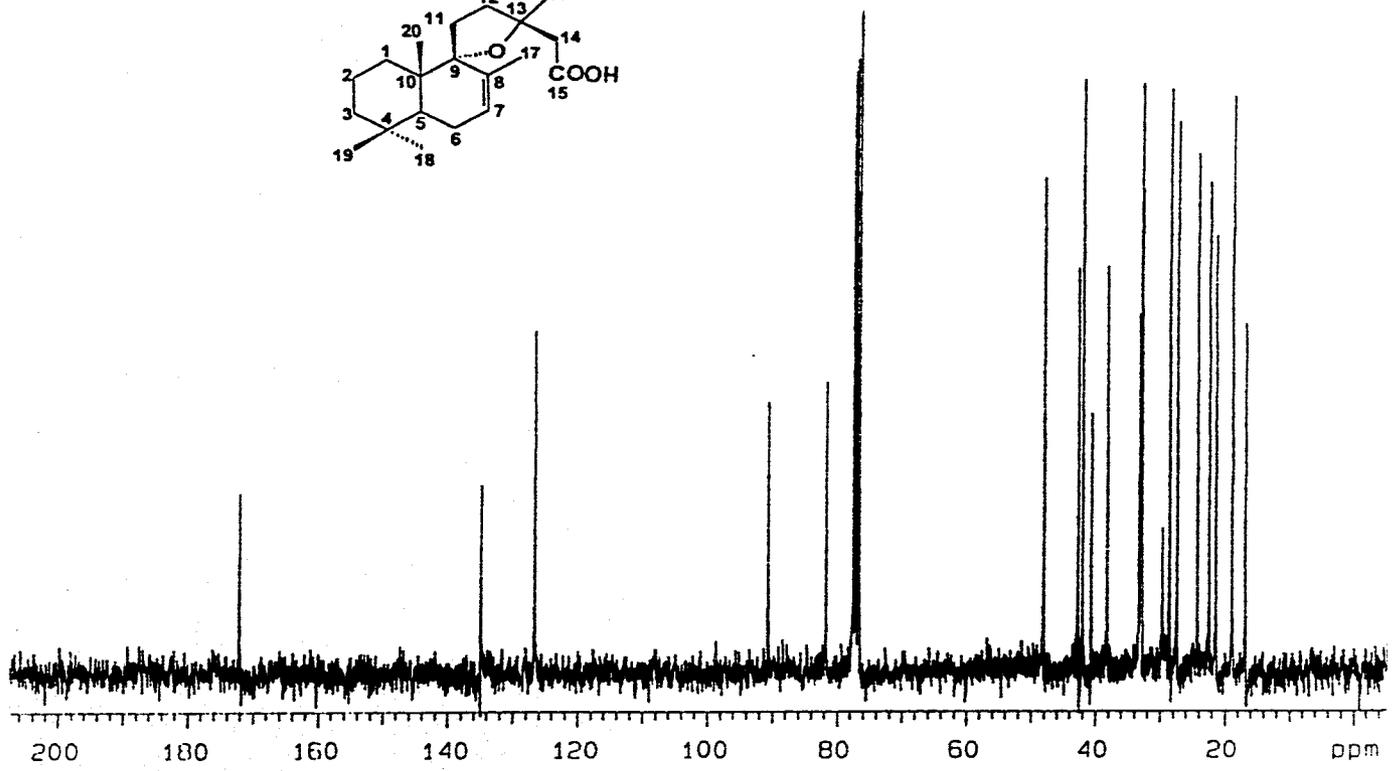
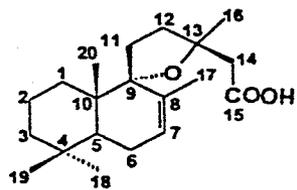


Espectro 12. EMIE del ácido griseofulvico (25)

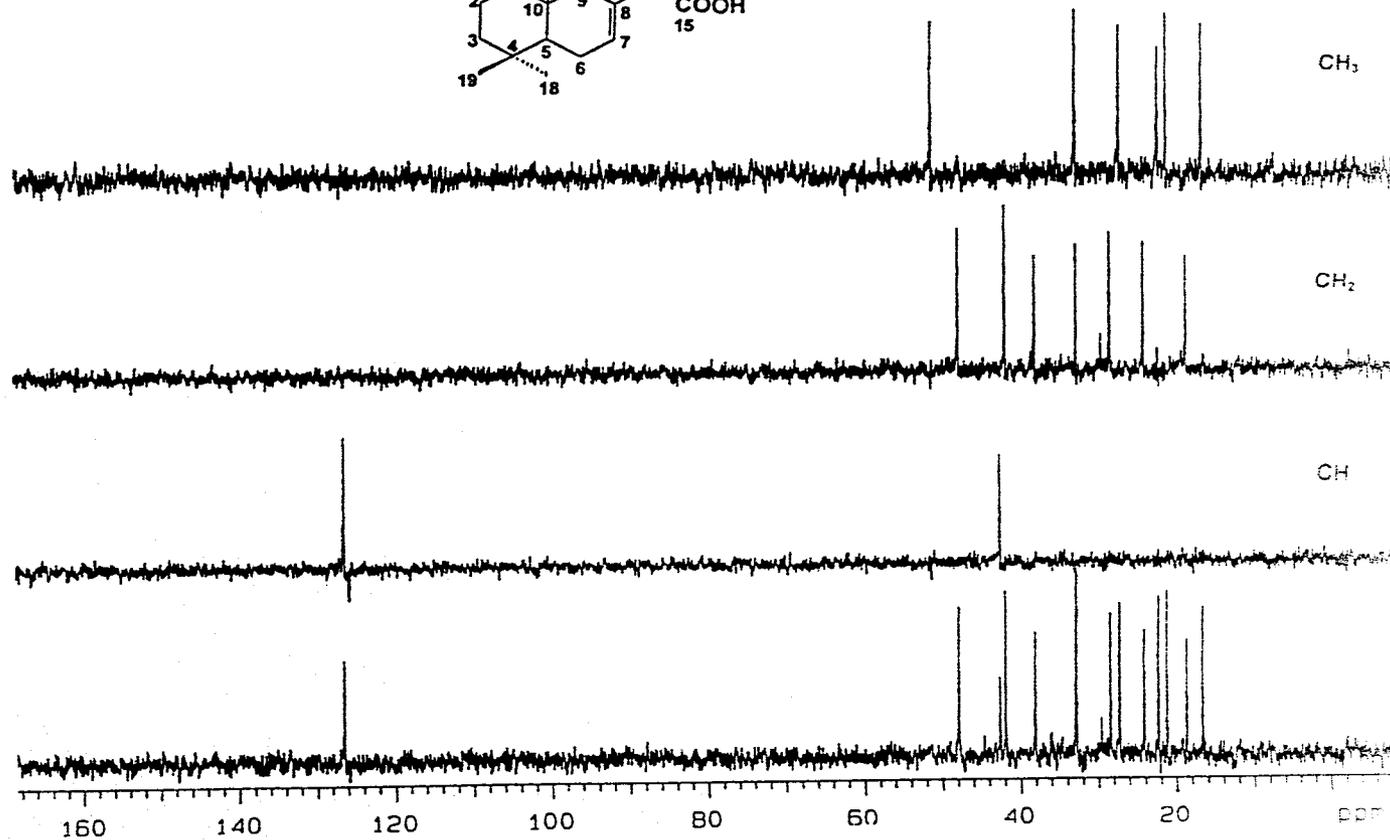
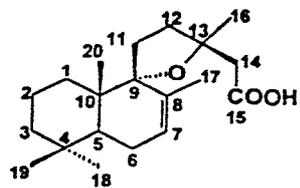
72



Espectro 13. RMN- ^1H del ácido grindélico (25)



Espectro 14. RMN-¹³C del ácido grindéico (25)



Espectro 14a. DEPT del ácido grindélico (25)

El producto de metilación del compuesto (25) fue idéntico en todos sus aspectos al producto natural (22).

4.2.2.2 Ácidos 7 α ,8 α -epoxigrindélico (26), 17-hidroxigrindélico (28) y 6,18-dihidroxigrindélico (29), bajo la forma de sus ésteres metílicos

De la fracciones primarias XG-I y XG-M se aislaron los productos (26) y (28) y (29), bajo la forma de sus ésteres metílicos (26a, 28a y 29a, respectivamente). Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los ésteres se resumen en las Tablas 5, 6 y 7, respectivamente.

La elucidación estructural de estos productos se realizó mediante el análisis comparativo de sus espectros de RMN y de masas con aquellos del compuesto (22), debido a la gran similitud existente entre todos estos compuestos.

El producto (26a) en su espectro de RMN-¹H (Espectro 17) presentó las señales diagnósticas para una función epóxido (δ_H 3.03; δ_C 61.71 y δ_C 130.88) y para un metilo sobre una función cuaternaria oxigenada (δ_H 1.43 y δ_C 23.18) en lugar de las señales para el metilo C-17 y para la doble ligadura entre C-7 y C-8, del compuesto (22).

Estas observaciones permitieron inferir que el producto (26) era el ácido 7 α ,8 α -epoxigrindélico. La configuración α del epóxido era evidente por la apariencia de la señal en δ_H 3.03 (H-7) como un singulete ancho en el espectro de RMN-¹H.

Una evidencia adicional de la presencia de la función epoxídica en el compuesto (26a) se obtuvo mediante el espectro de masas (Espectro 16) en el cual el pico base se observó en m/z 226 en lugar de m/z de 210, como en el caso del compuesto (22).

La epoxidación del producto (22) por tratamiento con ácido *meta*-cloroperbenzoico generó un producto idéntico en todos sus aspectos al éster metílico del producto natural (26). Esta correlación química confirmó la estructura molecular del compuesto (26), como el ácido 7 α ,8 α -epoxigrindélico (26).

Con respecto al producto (28a) las principales diferencias observadas en los espectros de RMN-¹H (Espectros 8 y 21) en comparación con el producto (22), fueron las siguientes: en lugar de la señal asignable al metilo en C-17 (δ_H 1.76), se observó la presencia de un sistema AB (δ_H 2.74, d, J=14.1Hz ; δ_H 2.64, d, J=14.1Hz) y de una banda en δ_H 4.15, que desaparecía al equilibrar el espectro con D₂O. Estas señales eran atribuibles a una función alcohólica primaria de tipo alílico; en consecuencia la estructura del compuesto (28) debía corresponder al ácido 17-hidroxigrindélico.

Por último, el espectro de RMN-¹H (Espectro 24) del producto (29a) fue muy similar al del grindelato de metilo (22). En lugar de las señales para el metilo en C-18 y para el metileno alílico en C-6, observados en el espectro de RMN-¹H del compuesto (22), el espectro del compuesto (29a) presentó un sistema AB (δ_H 3.38, d, J=11.6 Hz; δ_H 3.20, d, J=12.0 Hz) atribuible a un grupo hidroximetileno en C-18 y una señal para una función carbinólica secundaria α orientada en C-6 (δ_H 4.03). De nueva cuenta la ubicación de la función carbinólica en C-6 se realizó con base en la magnitud del desplazamiento químico observado para el hidrógeno geminal (δ_H 4.03), el cual era asignable a un metino carbinólico de naturaleza alílica. La estereoquímica α se asignó con base a la apariencia como singulete ancho de la señal. Con base en el análisis

anterior la estructura del compuesto (29) fue establecida como el ácido 6,18-dihidrogrindélico, el cuál constituye un nuevo producto natural.

4.2.2.3 Acido 7 α -hidroxi-8(17) deshidrogrindélico (27).

Sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada de la fracción secundaria XG-L2 metilada (Cuadro 12, sección experimental) permitieron el aislamiento del producto (27a) el cual fue caracterizado como el éster metílico del ácido 7-hidroxi,8(17) deshidrogrindélico (27a). Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas se resumen en la Tabla 8.

Su espectro de IR (Espectro 26) presentó señales para enlaces C-H (2933, 2869 cm^{-1}), para OH (3496 cm^{-1}) y para carbonilo (1739 y 1093 cm^{-1}). El ion molecular observado en el espectro de masas (Espectro 27), mostró una relación de m/z 350 uma y correspondió a la fórmula $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_4$. Esta fórmula permite cinco insaturaciones.

Los espectros de RMN (Espectros 28, 29 y 29a) también mostraron una gran similitud con los del compuesto (22) sugiriendo que este producto era también un derivado del ácido grindélico (Guerreiro *et al.*, 1980).

El espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 29) mostró señales para 21 átomos de carbono; el análisis del espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 29a) en su modalidad DEPT indicó que las señales del Espectro 29 correspondían a dos metinos (igual que el compuesto 22), cinco metilos (uno menos que el compuesto 22), ocho metilenos (uno más que el compuesto 22) y seis carbonos cuaternarios.

Los espectros de RMN indicaron también que el producto **27a** presentaba un metileno exocíclico (δ_{H} 5.09 y δ_{H} 4.89; δ_{C} 147.86 en C-8) en lugar del metilo sobre doble ligadura como en el caso del compuesto **22**.

De manera adicional, los espectros evidenciaron la presencia de una función carbinólica secundaria α orientada en C-7 (δ_{H} 4.27; δ_{C} 75.24). La ubicación de esta función en la posición C-7 se dedujo por la magnitud del desplazamiento químico de la señal, mismo que correspondía al de un alcohol secundario alílico. La estereoquímica α se infirió de la apariencia de la señal carbinólica como un singulete ancho. Si la disposición del hidrógeno hubiese sido β la señal se hubiese observado como un doblete de doblete ($J=10$ y 6 Hz).

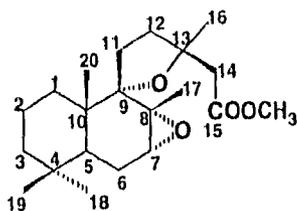
Con base en estas evidencias el éster metílico del producto natural (**27**) se caracterizó como el 7 α -hidroxi-B(17) deshidrogrindelato de metilo (**27a**).

Los productos naturales (**25-28**) han sido previamente descritos en otras fuentes naturales y las constantes físicas, espectrométricas y de RMN- ^1H de sus ésteres metílicos resultaron idénticas a las previamente descritas (Guerreiro *et al.*, 1980; Timmermann *et al.*, 1985; Adinolfi *et al.*, 1988; González *et al.*, 1984; *inter alia*).

Los productos **22** y **29** representan nuevos productos naturales.

En general los espectros de RMN- ^{13}C (Espectros 17-29a) de los productos obtenidos se asignaron por comparación con modelos apropiados, y mediante las correlaciones observadas en los espectros HETCOR. Cabe destacar que los espectros de RMN- ^{13}C de los productos naturales (**26-29**) y de sus derivados metilados correspondientes no han sido descritos en la literatura.

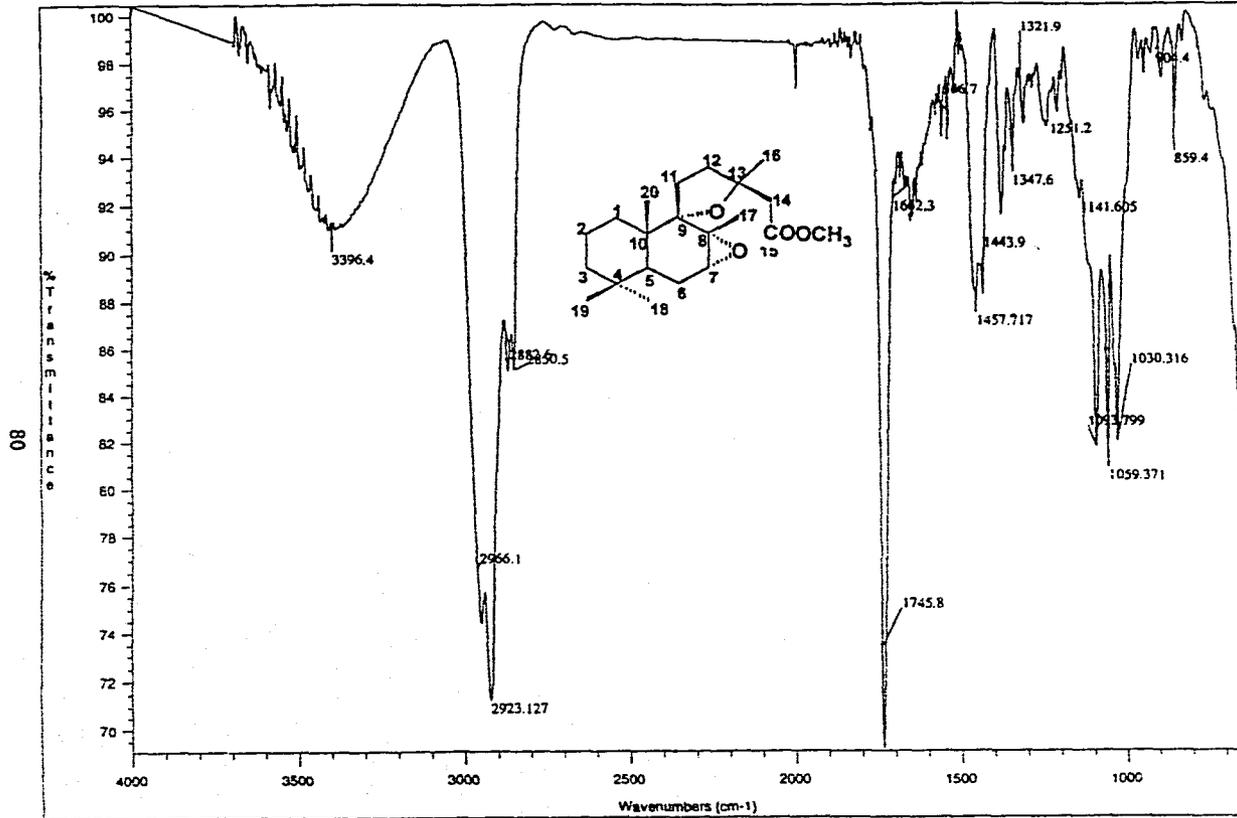
Tabla 5. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del
7 α , 8 α -epoxigrindelato de metilo (26a).



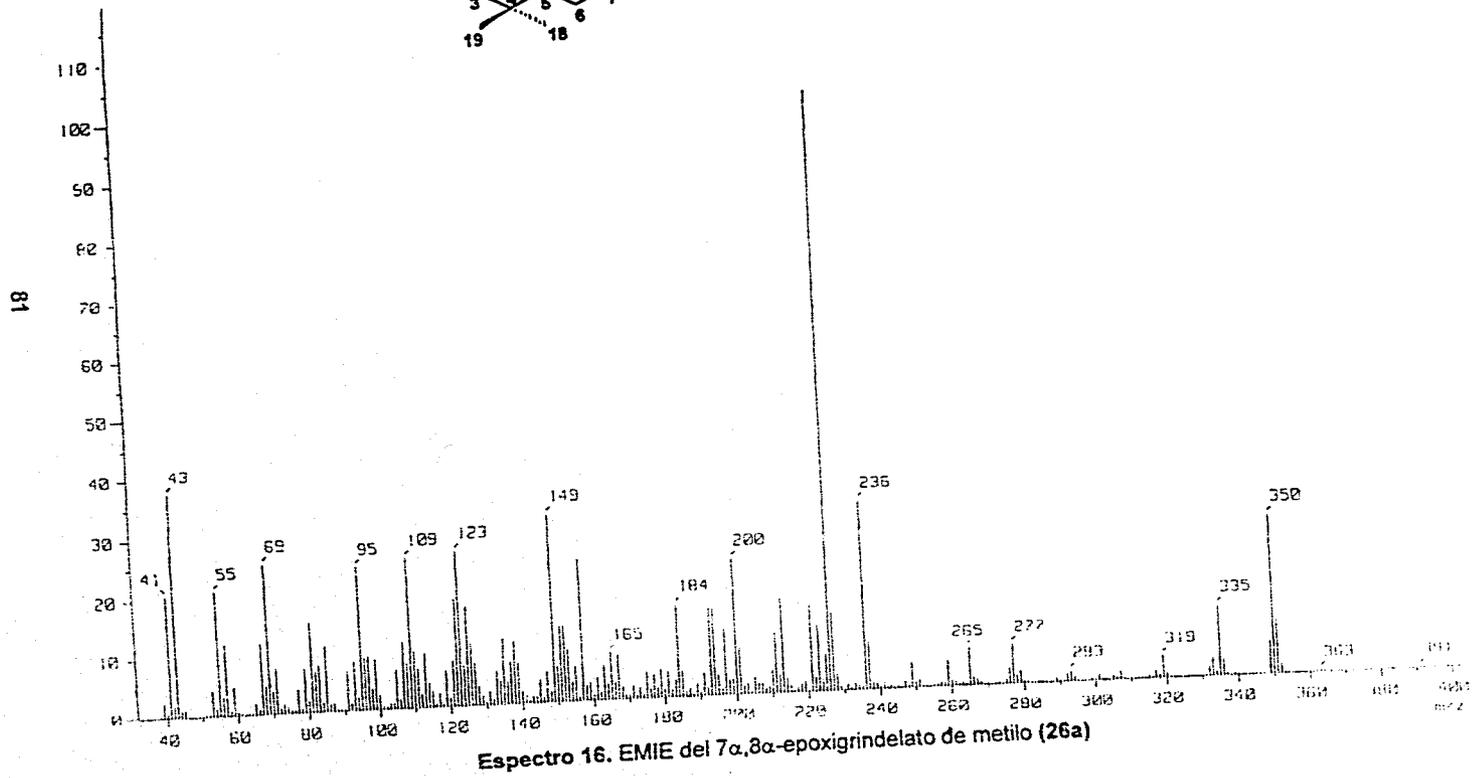
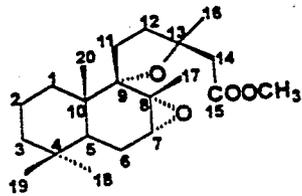
IR, ν_{\max} (película) cm^{-1} (Espectro 15):	2954, 2929, 1730, 1458, 1438, y 1029.
EMIE, m/z (Int rel) (Espectro 16):	350 [M^+ (27.5)], 335 [(15.8, M-15)], 319 (3.3), 277 (6.7), 265 (6.7), 236 (32.5), 226 (100.0), 200 (24.1), 184 (15.8), 165 (12.0), 149 (32.5), 123 (26.6), 109 (25.8), 95 (36.0), 69 (26.6), 55 (21.6), 43 (38.3) y 41 (20.8).
RMN- ^1H δ (300 MHz, CDCl_3), ppm (Espectro 17):	3.65 (s, OCH_3), 3.03 (m, H-7), 2.83 [d, $J=14.7$ (H-14 $_A$)], 2.73 [d, $J=14.4$ (H-14 $_B$)], 1.43 (s, H-17), 1.34 (s, H-16), 0.87 (s, H-19), 0.86 (s, H-18) y 0.83 (s, H-20).
RMN- ^{13}C δ (75 MHz, CDCl_3), ppm (Espectro 18):	37.54 (C-1), 18.38 (C-2), 41.72 (C-3), 33.20 (C-4), 37.23 (C-5), 31.85 (C-6), 61.71 (C-7), 130.88 (C-8), 88.38 (C-9), 39.81 (C-10), 22.96 (C-11), 29.23 (C-12), 81.55 (C-13), 47.20 (C-14), 172.04 (C-15), 26.60 (C-16), 23.18 (C-17), 32.62 (C-18), 22.65 (C-19), 16.62 (C-20), 51.38(OMe).

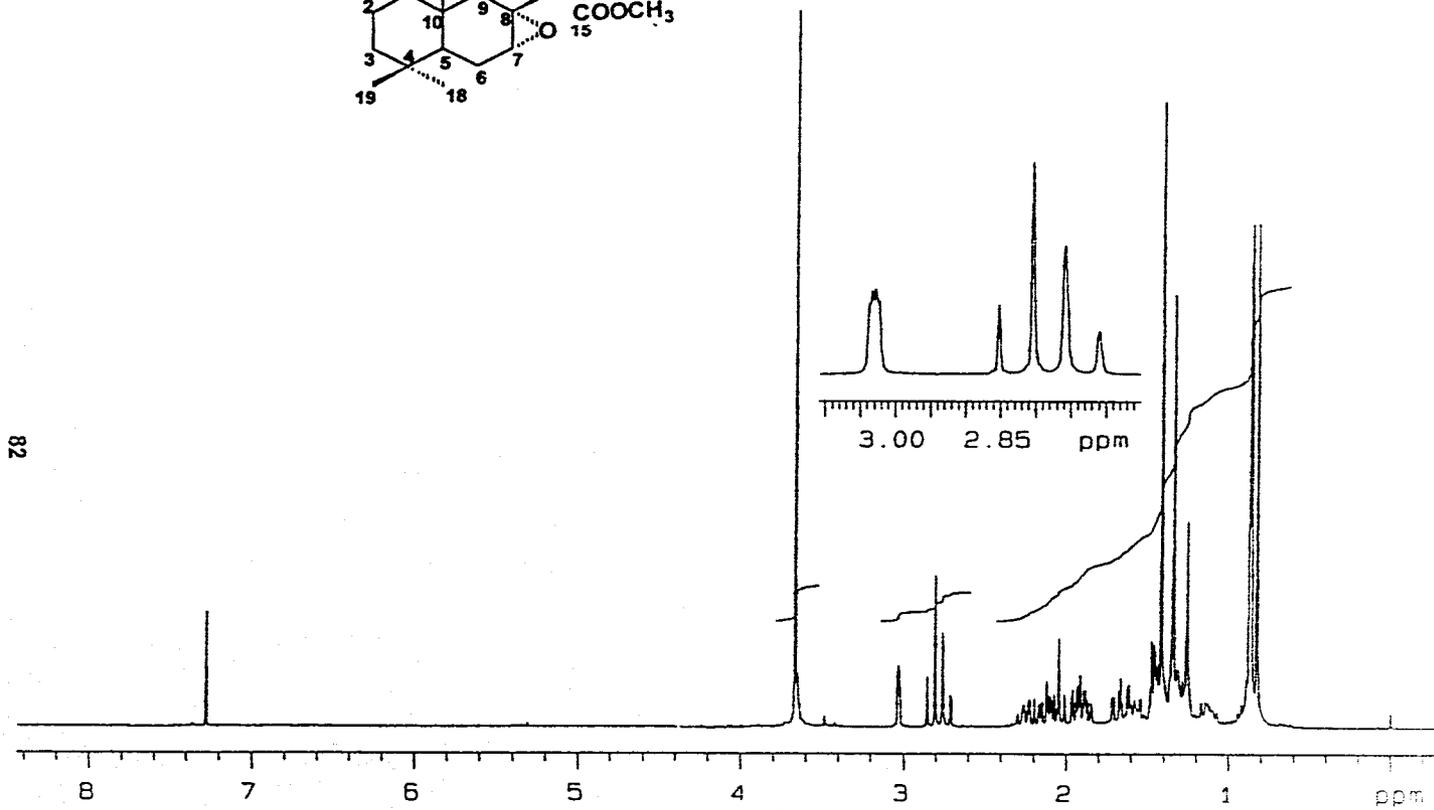
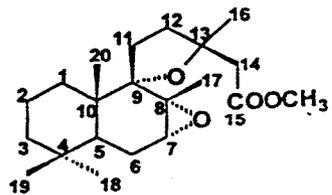
J= Constante de acoplamiento expresada en Hz.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

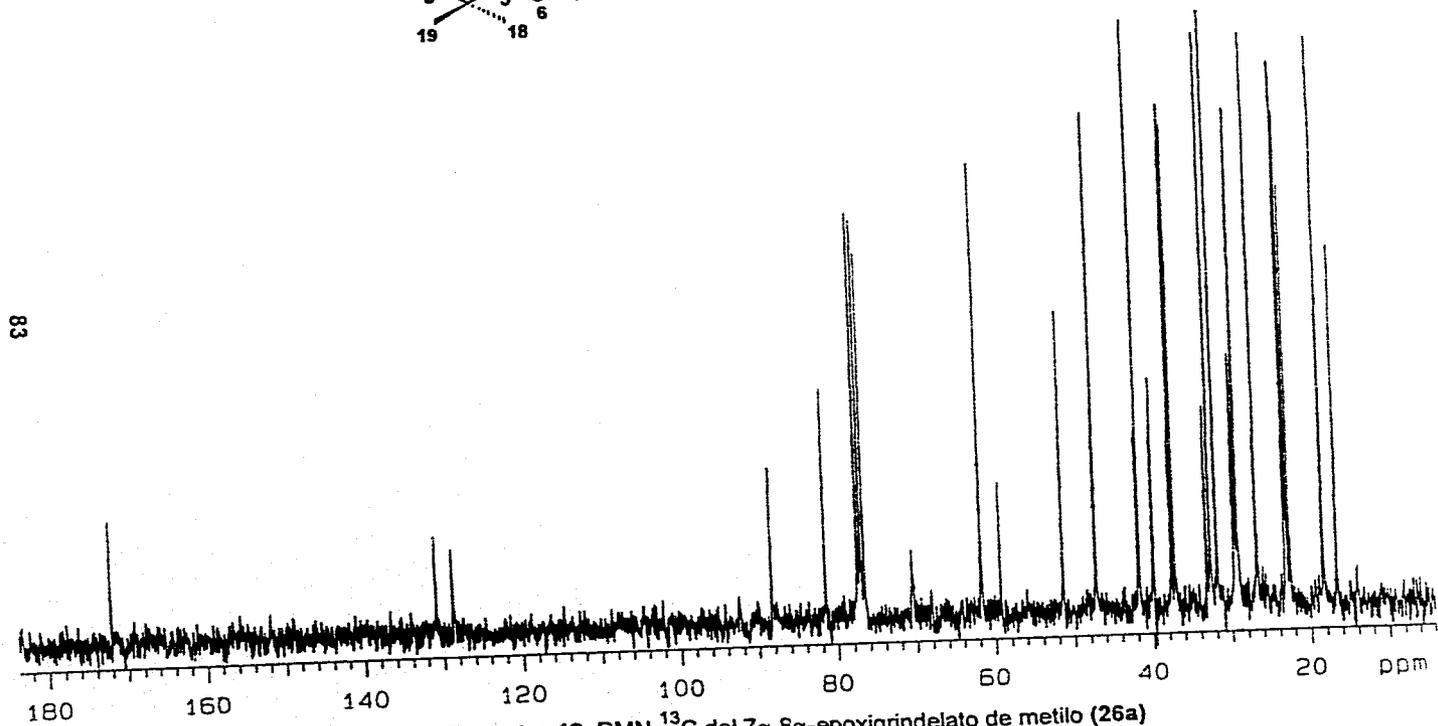
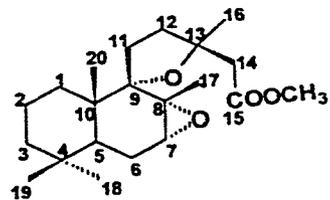


Espectro 15. IR del 7 α ,8 α -epoxigrindelato de metilo (26a)

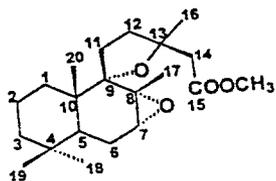




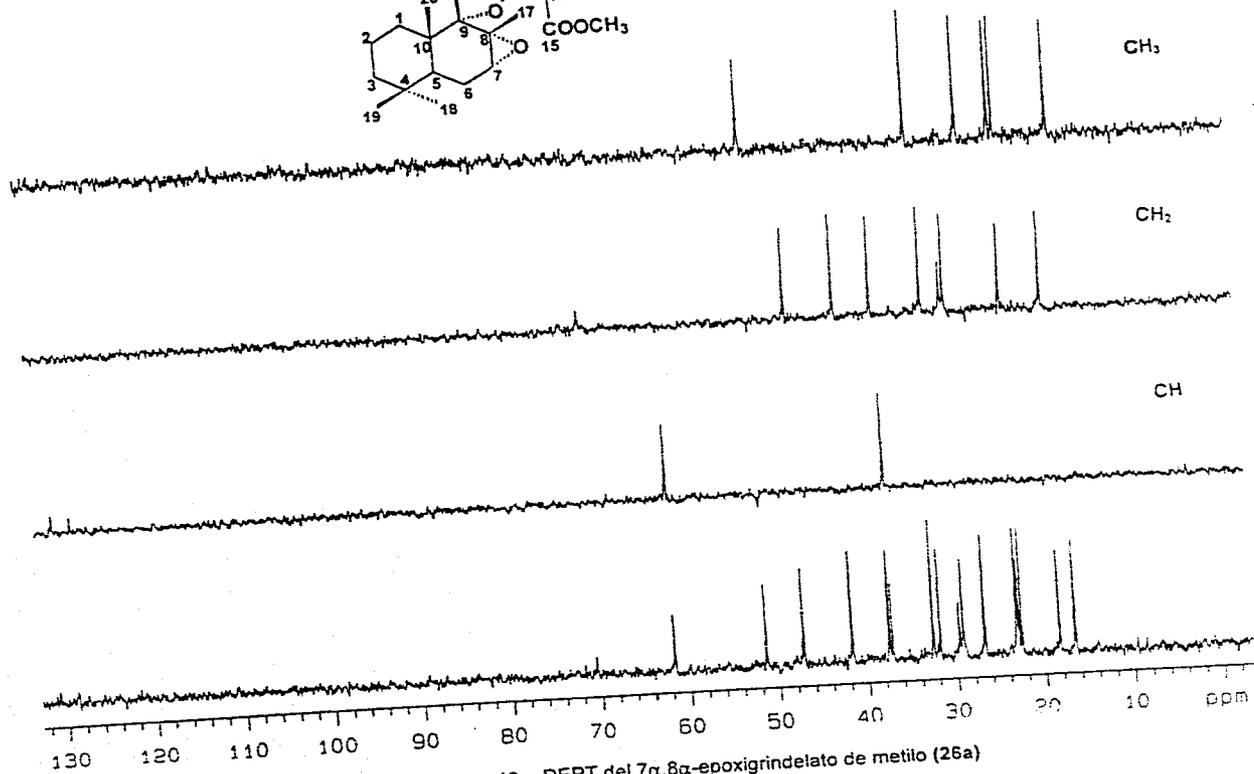
82



Espectro 18. RMN-¹³C del 7 α ,8 α -epoxigrindelato de metilo (26a)

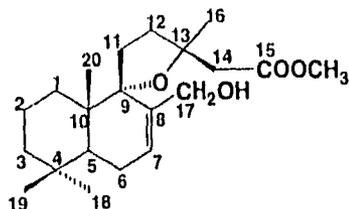


84



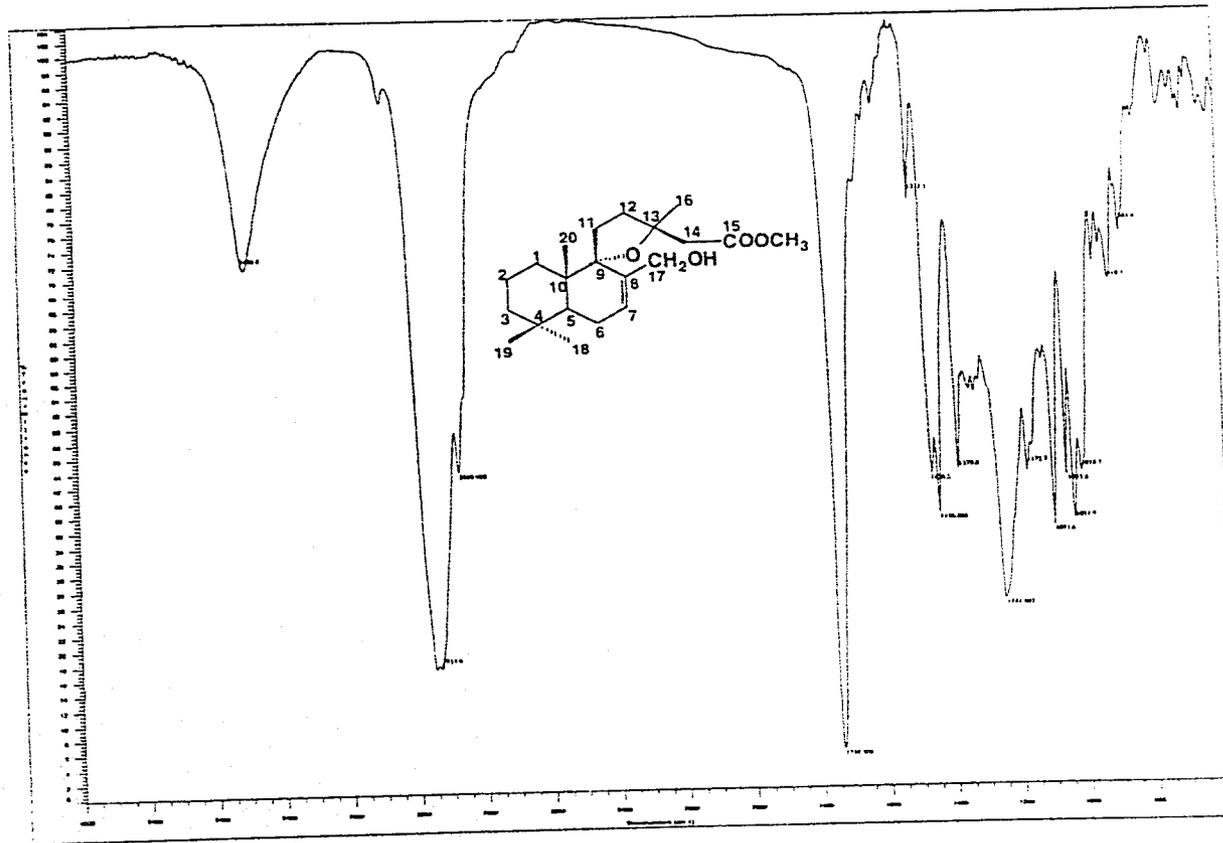
Espectro 18a. DEPT del 7 α ,8 α -epoxigrindelato de metilo (26a)

Tabla 6. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de 17-hidroxigrindelato de metilo (28a).



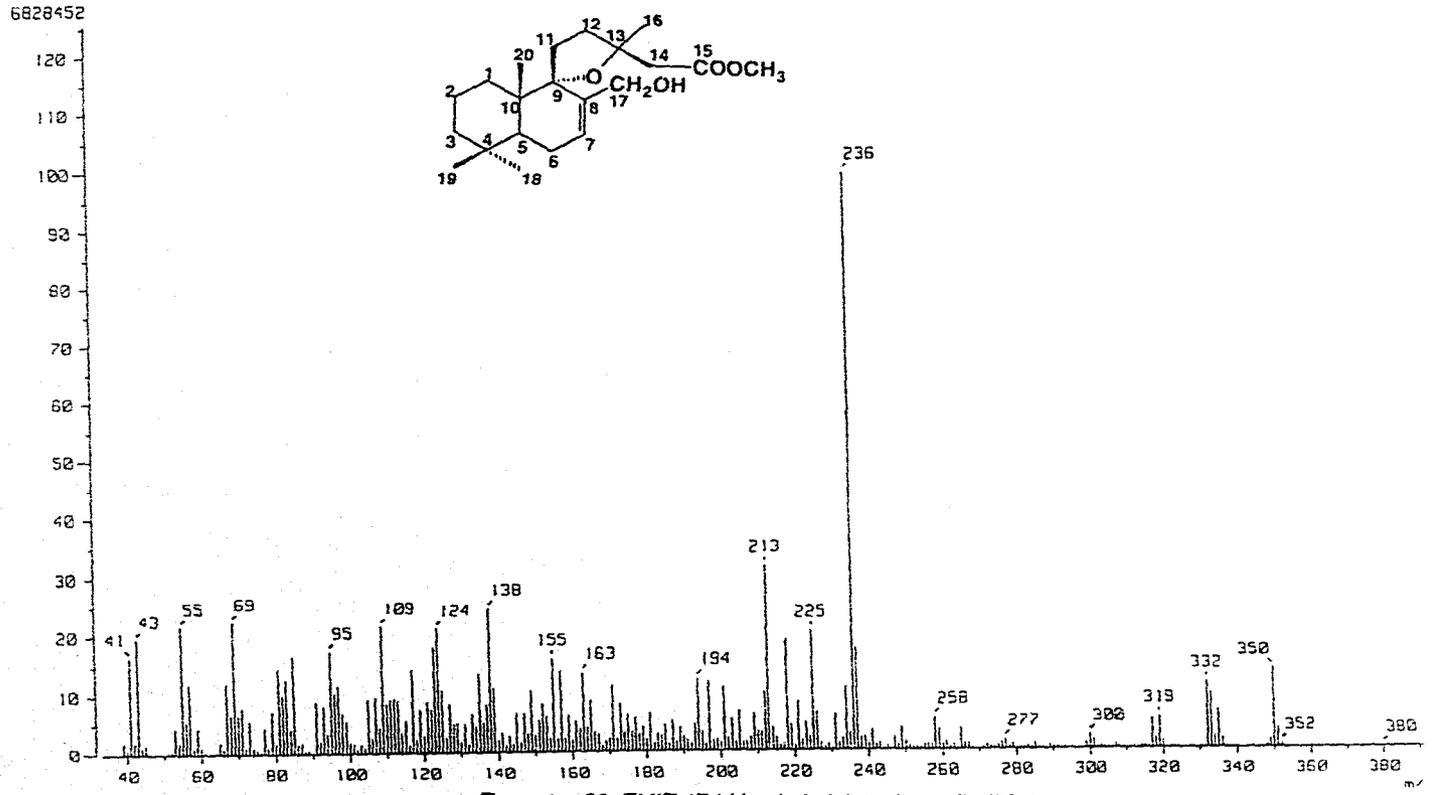
IR, ν_{max} (película) cm^{-1} (Espectro 19):	3437, 2951, 2923, 2869, 1739, 1456, 1436, 1093, 1008 y 991.
EMIE, m/z (Int rel) (Espectro 20):	350 [M^+ (14.17)], 236 (100), 194 (12.5), 163 (13.33), 138 (25.10), 109 (20.90), 95 (16.70), 69 (22.10), 55 (22.0), 43 (19.20) y 41 (16.0).
RMN- ^1H δ (300 MHz, CDCl_3), ppm (Espectro 21):	5.88 (m, H-7), 4.15 (m, H-17), 3.65 (s, OMe), 2.74 [d, $J=14.1$ (H-14 _A)], 2.64 [d, $J=14.1$ (H-14 _B)], 1.40 (s, H-16); 0.90 (s, H-19), 0.88 (s, H-18) y 0.80 (s, H-20)
RMN- ^{13}C δ (75 MHz, CDCl_3), ppm (Espectro 22):	38.52 (C-1), 18.72 (C-2), 41.97 (C-3), 29.67 (C-4), 42.21 (C-5), 32.58 (C-6), 130.18 (C-7), 139.43 (C-8), 89.82 (C-9), 40.80 (C-10), 24.22 (C-11), 27.94 (C-12), 81.86 (C-13), 47.47 (C-14), 171.91 (C-15), 27.36 (C-16), 65.50 (C-17), 32.77 (C-18), 22.13 (C-19), 16.90 (C-20) y 51.38 (OMe).

J= Constante de acoplamiento expresada en Hz

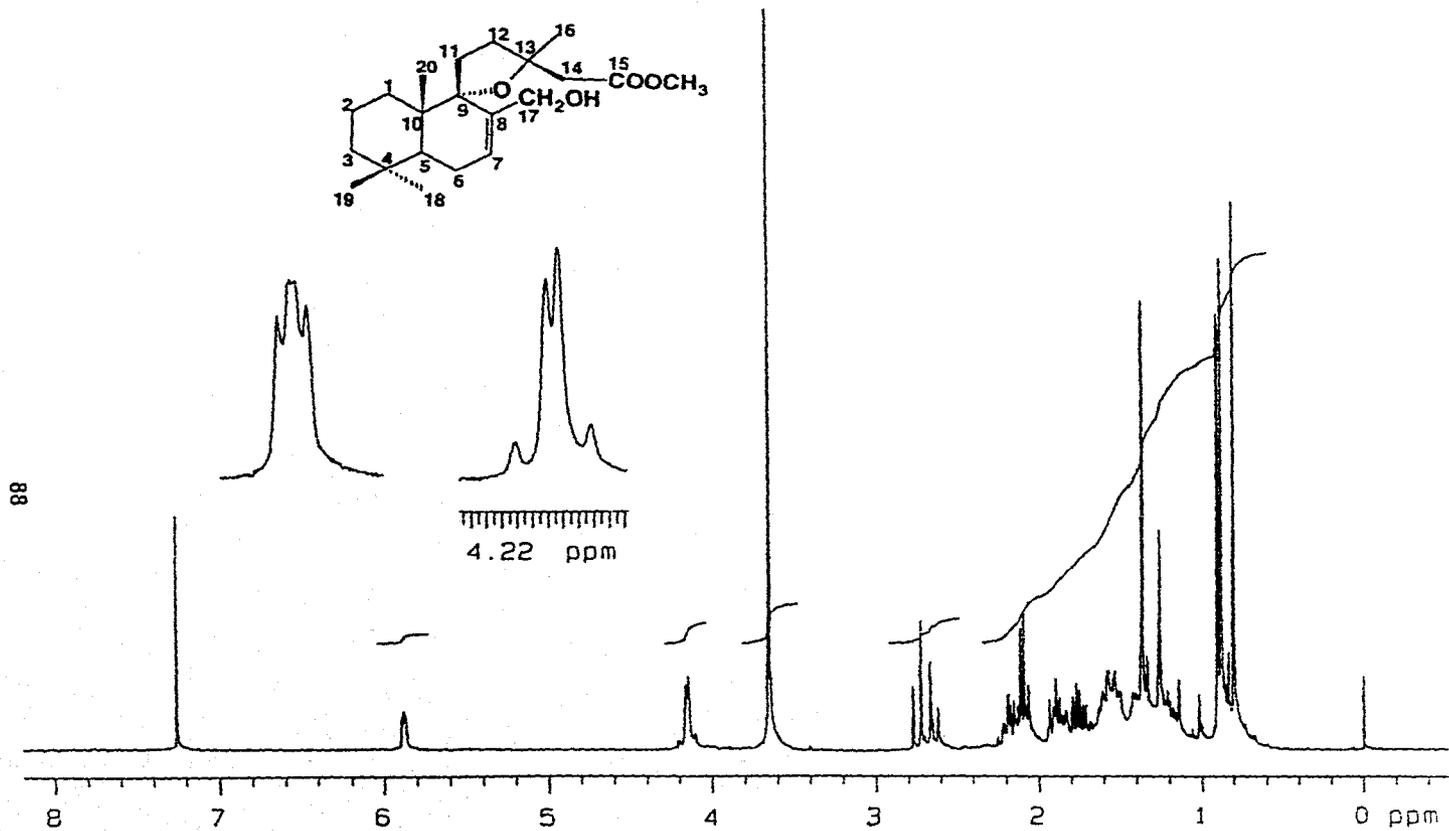
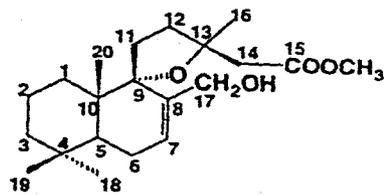


Espectro 19. IR 17-hidroxigrindelato de metilo (28a)

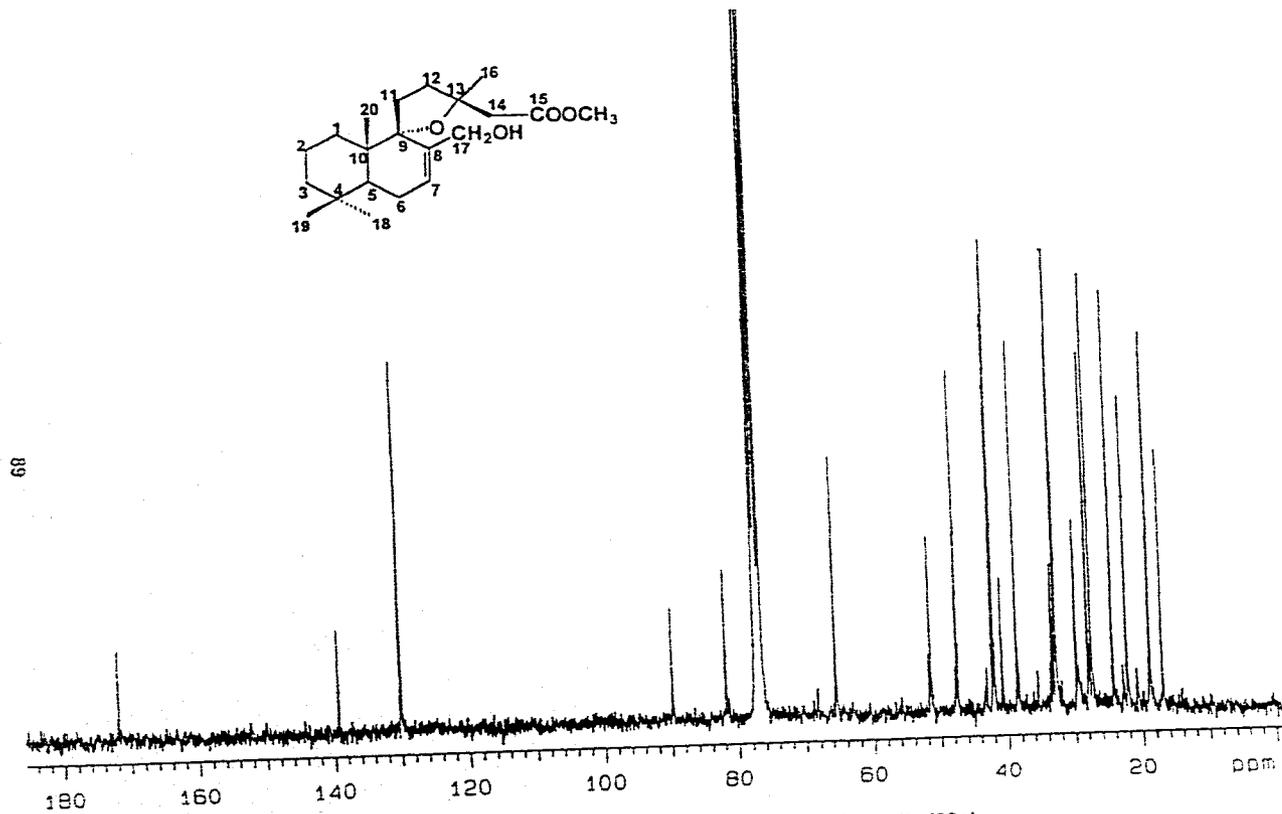
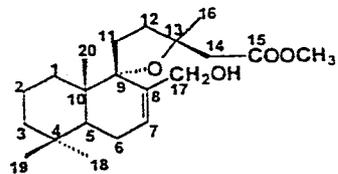
87



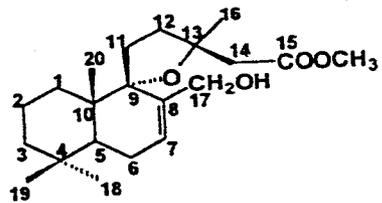
Espectro 20. EMIE 17-hidroxigrindelato de metilo (28a)



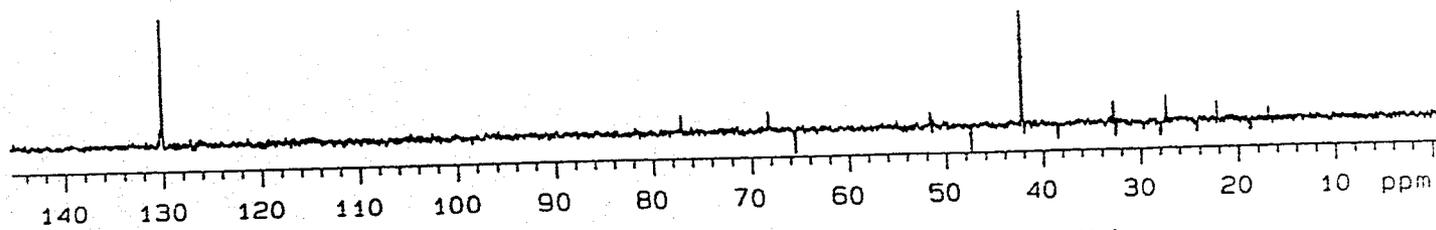
Espectro 21. RMN-¹H 17-hidroxi-grindelato de metilo (28a)



Espectro 22. RMN-¹³C 17-hidroxi-grindelato de metilo (28a)

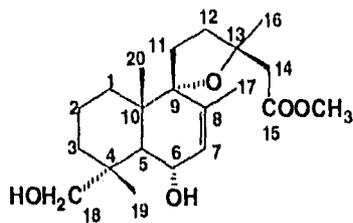


06



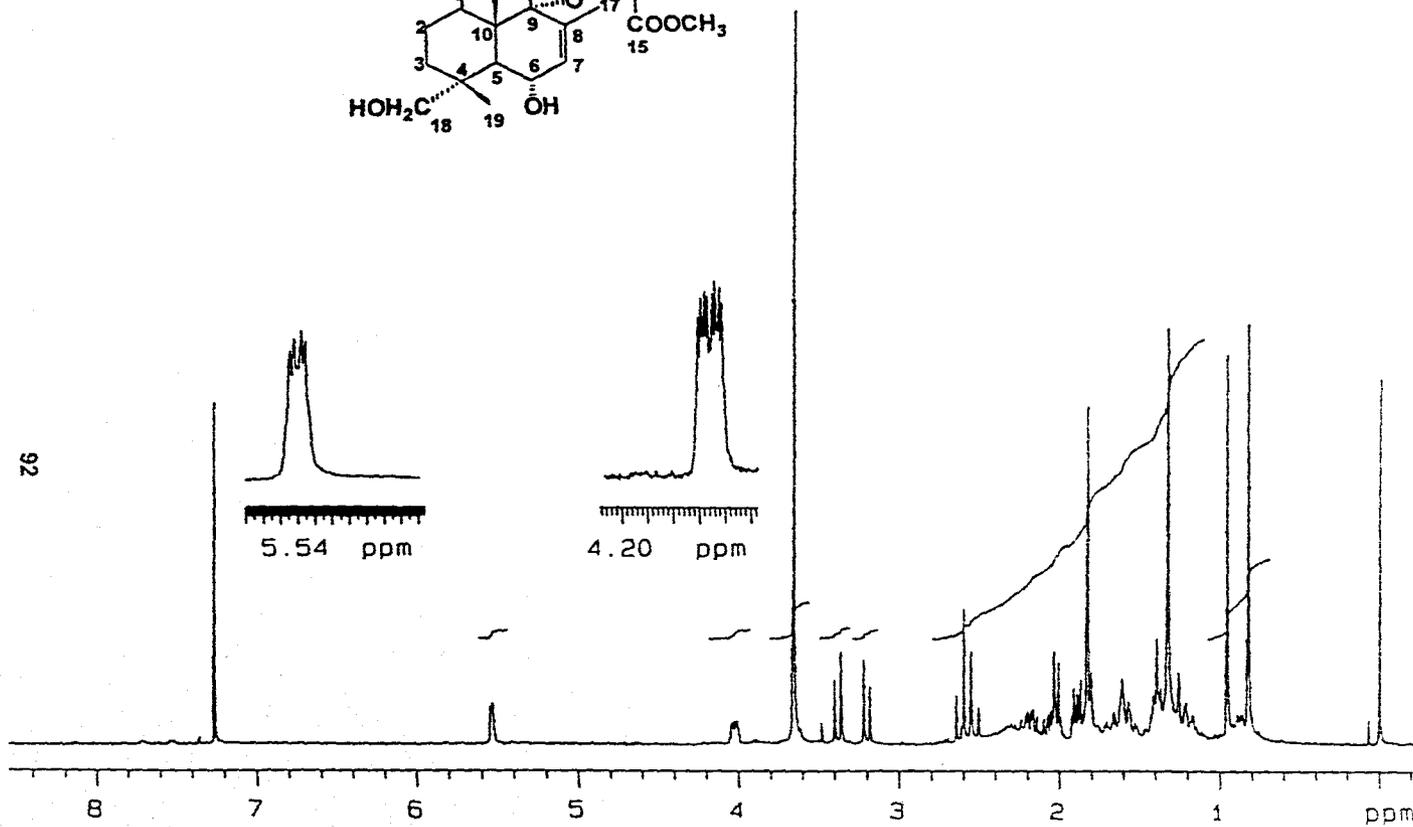
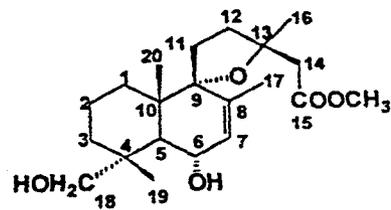
Espectro 22a. DEPT 17-hidroxi-grindelato de metilo (28a)

Tabla 7. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 6,18-dihidroxi-grindelato de metilo (29a).



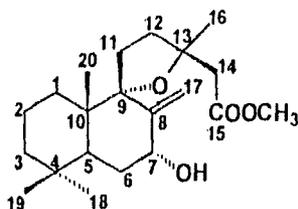
IR, ν_{max} (película) cm^{-1} :	3450, 2938, 2870 y 1120.
EMIE, m/z (Int rel):	348 [M-18 (0.3)], 332 [M-36 (20.0)], 319 (3.1), 261 (14.5), 210 (12.0), 183 (5.4), 136 (12.7), 109 (25.1), 82 (9.89), 69 (11.5), 43 (16.7) y 41 (11.5).
RMN- ^1H δ (300 MHz, CDCl_3), ppm (Espectro 23):	5.54 (m, H-7), 4.03 (m, H-6), 3.65 (s, OCH_3), 3.38 (d, $J=11.6$), 3.20 (d, $J=12.0$), 2.50 (d, H-14), 1.80 (s, H-17); 1.28 (s, H-16), 0.95 (s, H-19) y 0.82 (s, H-20).

J= Constante de acoplamiento expresada en Hz



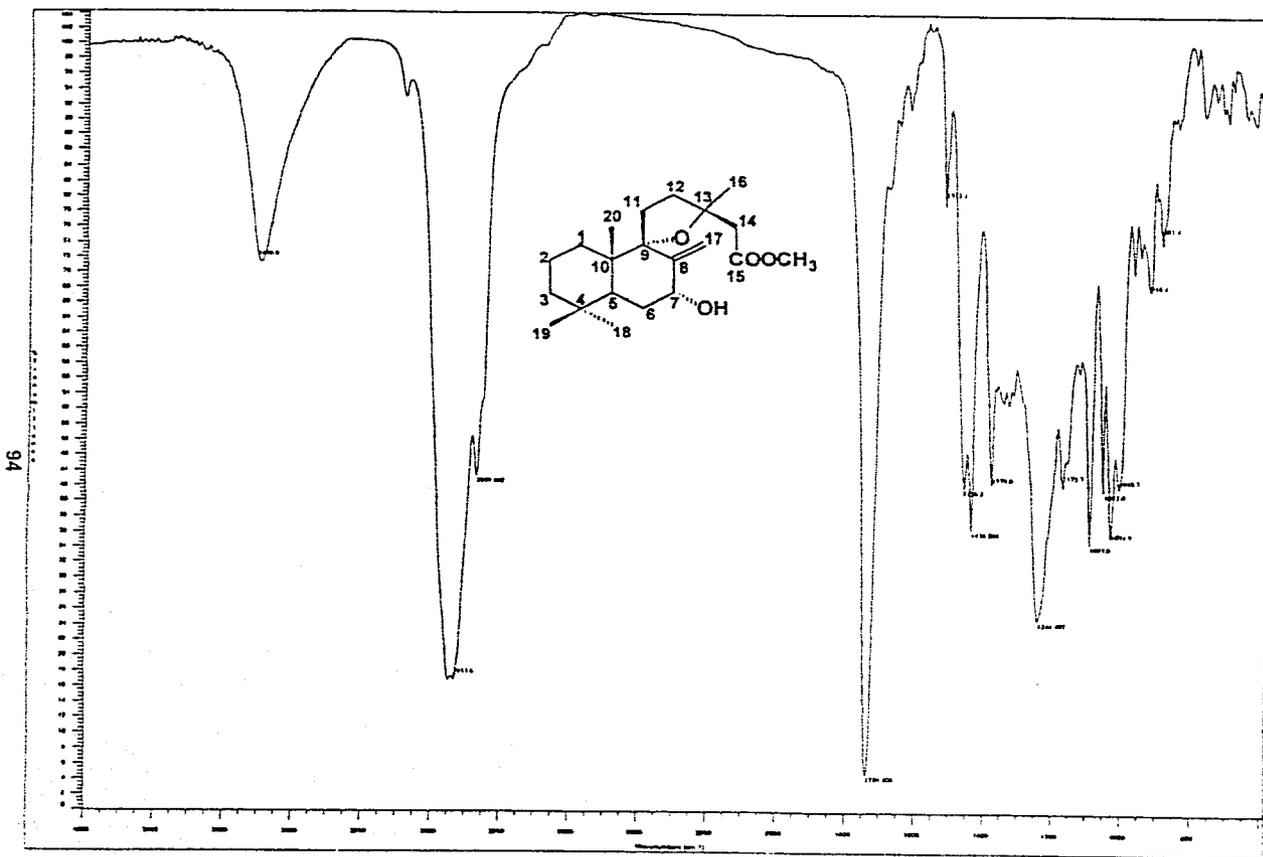
Espectro 23. RMN-¹H del 6, 18-dihidroxiacridato de metilo (29a)

Tabla 8. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrómetricas del éster metílico del 7 α -hidroxi-8 (17) deshidrogrindelato de metilo (27a).



IR, ν_{\max} (película) cm^{-1} (Espectro 24):	3496, 3050, 2933, 2869, 1739, 1610, 1456, 1436, 1093 y 918
EMIE, m/z (int rel) (Espectro 25):	350 [M^+ (14.17)], 332 (11.67), 236 (100), 225 (20), 213 (31.67), 194 (12.5), 163 (13.33), 155 (15.83), 138 (25.0), 124 (20.83), 109 (20.83), 95 (16.67), 69 (21.67), 55 (21.67), 43 (19.17) y 41 (15.83).
RMN- ^1H δ (300 MHz, CDCl_3), ppm (Espectro 26):	5.09 (sa, H-17), 4.89 (sa, H-17), 4.55 [da, $J=10$, (H $_7$ -OH)], 4.27 [m, (H-7)], 3.66 [s, (OCH $_3$)], 2.64 [d, $J=14.1$ (H-14 $_a$)], 2.58 [d, $J=14.1$ (H-14 $_b$)], 1.31 (s, H-16), 0.91 (s, H-19), 0.82 (s, H-18) y 0.75 (s, H-20).
RMN- ^{13}C δ (75 MHz, CDCl_3), ppm (Espectro 27):	37.54 (C-1), 19.1 (C-2), 41.78 (C-3), 33.23 (C-4), 40.5(C-5), 32.1 (C-6), 75.24 (C-7), 147.86 (C-8), 93.42 (C-9), 41.94 (C-10), 25.76 (C-11), 31.85 (C-12), 82.41 (C-13), 46.64 (C-14), 171.36 (C-15), 26.41 (C-16), 111.14 (C-17), 33.36 (C-18), 21.95 (C-19), 16.7 (C-20) y 51.47 (OMe).
$[\alpha]_D^{25}$	+85 $^{\circ}$

J= Constante de acoplamiento expresada en Hz.

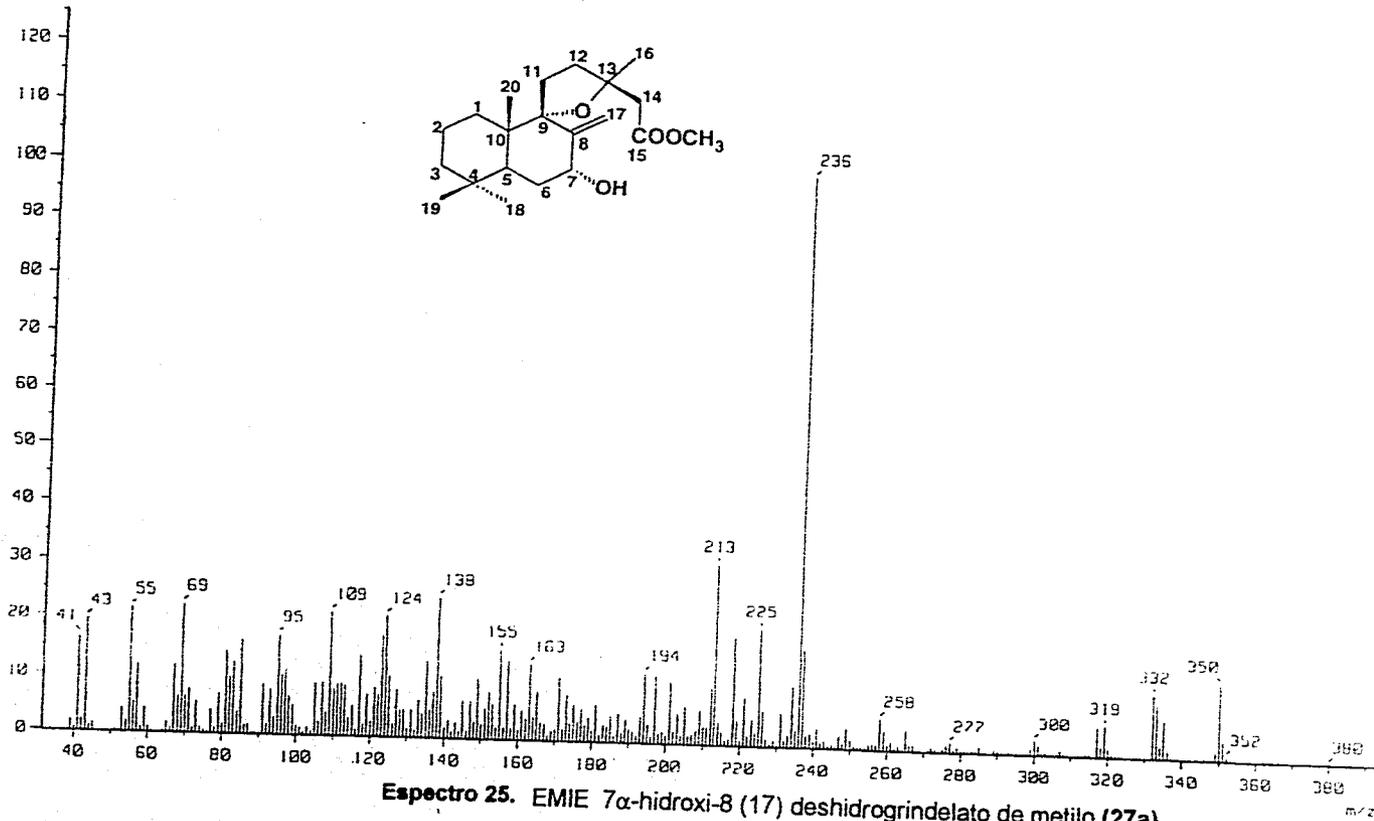


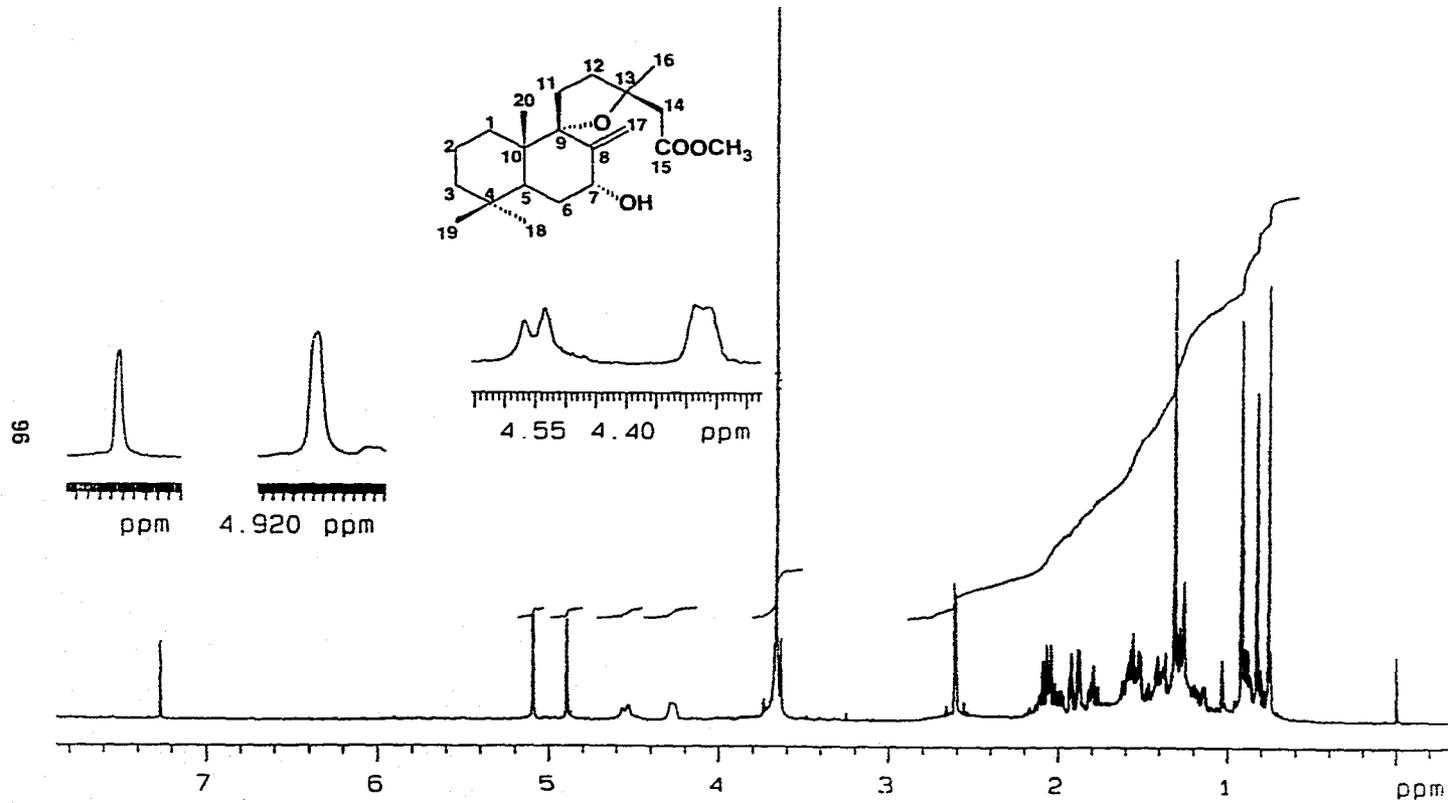
94

Espectro 24. IR 7 α -hidroxi-8 (17) deshidrogrindelato de metilo (27a)

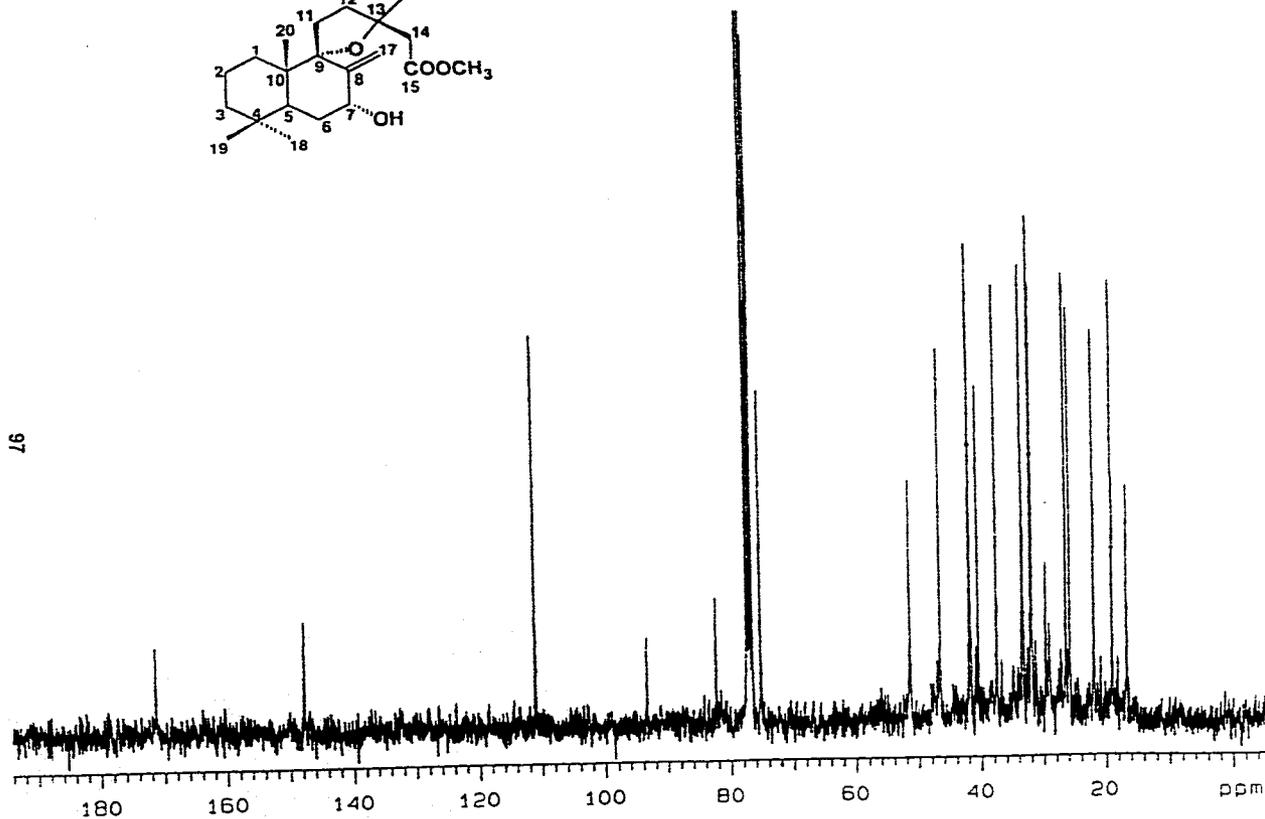
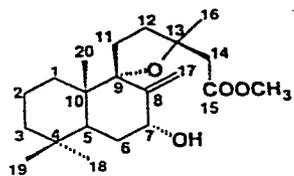
6828452

95

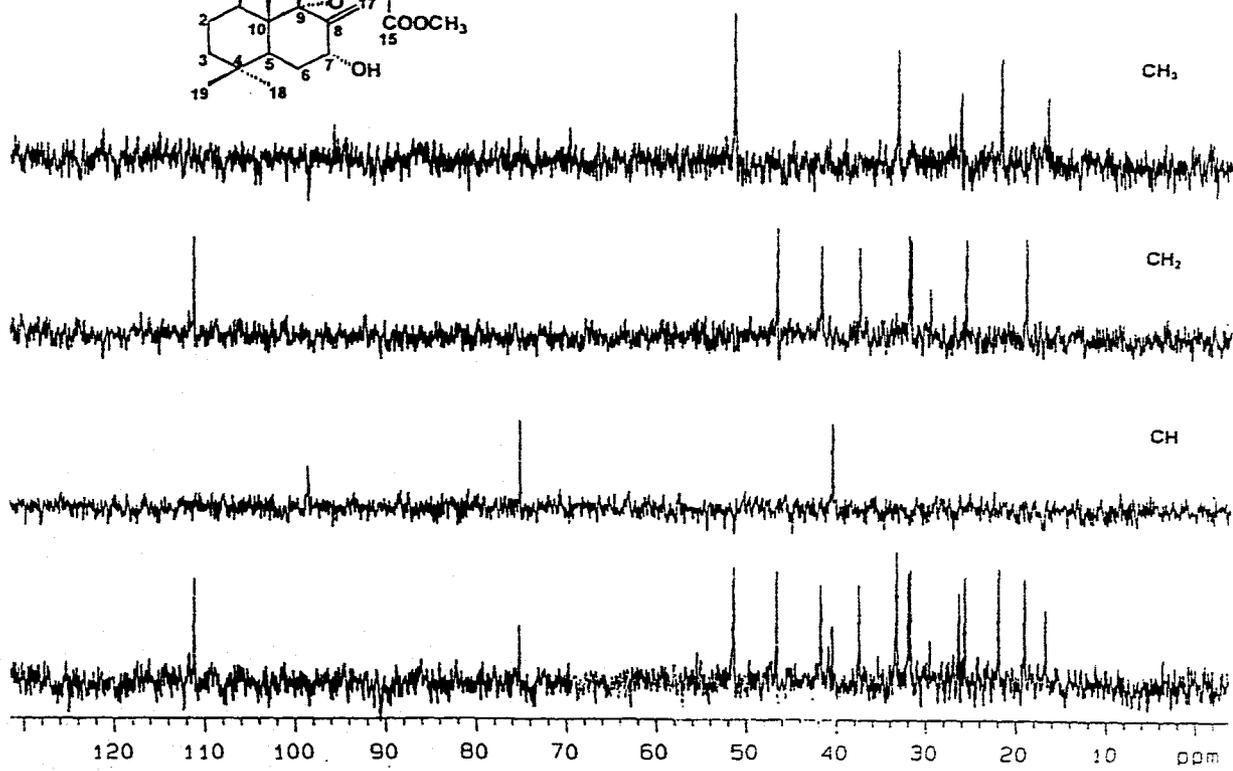
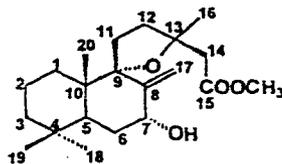




Espectro 26. RMN-¹H 7 α -hidroxi-8 (17) deshidrogrindelato de metilo (27a)



Espectro 27. RMN-¹³C 7 α -hidroxi-8 (17) deshidrogrindelato de metilo (27a)



86

Espectro 27a. DEPT 7 α -hidroxi-8 (17) deshidrogrindelato de metilo (27a)

4.2.3 CARACTERIZACION DEL 3,6-DIMETIL ETER DEL CAMPEROL (30) DE LAS FRACCIONES PRIMARIAS XG-L Y XG-M.

Este producto, fue aislado como un sólido cristalino, de color amarillo, con punto de fusión 229-230 °C.

El espectro de IR (Espectro 30), presentó bandas de absorción características para grupos hidroxilo (3358 cm⁻¹), carbonilo de γ pirona (1654 cm⁻¹) y dobles enlaces (1610, 1516, 950, 810 cm⁻¹).

Las constantes espectroscópicas y físicas antes mencionadas, así como, consideraciones de tipo quimiotaxonómico (Sanggong *et al.*, 1987), permitieron sugerir la naturaleza flavonoide del compuesto (Harborne *et al.*, 1975; Markham *et al.*, 1982; Markham *et al.*, 1985).

El análisis detallado de los espectros de RMN (Espectros 32, 32a, 33 y 33a) indicaron que el producto (30) era un flavonol (Harborne *et al.*, 1975; Macias *et al.*, 1994; Markham *et al.*, 1982; Markham *et al.*, 1985).

El espectro de RMN-¹H (Espectro 32) presentó las siguientes señales:

1. Dos singuletes (δ_H 3.83 y δ_H 3.96) asignables a dos grupos metoxilos.
2. Un singulete en (δ_H 6.52) atribuible a un hidrógeno aromático aislado.
3. Un sistema A₂B₂ (δ_H 6.97, d, J=9.0 Hz; δ_H 7.98, d, J=9.0 Hz.). Este sistema era congruente con la presencia de un anillo aromático *para*-sustituido.
4. Tres singuletes anchos en δ_H 12.87, δ_H 9.4 y δ_H 8.75 asignables a tres grupos hidroxilos. El primero de estos, debido a la magnitud del desplazamiento químico observado, debía estar quelatado con un grupo carbonilo.

La ausencia de la señal característica para H-3 de una flavona en el espectro de RMN-¹H (Markham *et al.*, 1982; Markham *et al.*, 1985), sugería que la molécula era un flavonol, sustituido con dos grupos metoxilo y tres grupos hidroxilo, uno de los cuales debía encontrarse en C-5, de acuerdo al desplazamiento químico observado en δ_H 12.87 en el espectro de RMN-¹H.

El espectro de RMN-¹³C (Espectro 33) mostró señales para 15 átomos de carbono. El análisis del espectro de RMN-¹³C en su modalidad DEPT (Espectro 33a) indicó que las señales correspondían a dos metilos, tres metinos y diez carbonos cuaternarios. Con base en la teoría del desplazamiento químico, uno de los carbonos cuaternarios (δ_c 178.83) se asignó al grupo carbonilo de la γ pirona y las señales en δ_c 159.95, 156.17, 152.38, 152.08, 137.84 y 130.08 se asignaron a carbonos cuaternarios base de oxígeno. Por último, las señales en δ_c 121.29 y 105.57, eran asignables a los restantes carbonos cuaternarios.

Así mismo, las señales observadas en δ_c 130.68, 115.63 y 93.58, fueron asignadas a los metinos aromáticos del anillo del flavonol, como se indica en la Tabla 9 respectivamente. Por último, las señales en δ_c 60.58 y 59.87 fueron asignadas a los grupos metoxilos evidenciados en el espectro de RMN-¹H.

En principio las evidencias anteriores podrían ser congruentes con cualquiera de las estructuras indicadas en la Figura 8.

Para discernir entre las estructuras A-F de la Figura 8 el análisis del espectro de RMN-¹H (Espectro 32a) del derivado acetilado (30a) y del patrón de fragmentación

(Figura 9) observado en el espectro de masas (Espectro 31) del producto natural fue de gran utilidad.

Así, en el espectro de RMN-¹H del derivado acetilado (**30a**) se observó que las señales atribuibles a la rama A₂ del sistema A₂B₂ del anillo aromático *para*-sustituido y la del protón aislado en el anillo A se encontraban desplazadas paramagnéticamente en δ_H 8.09 y 7.23. La magnitud de los desplazamientos [$\Delta_{3-5}=0.29$; $\Delta_6=0.71$] eran consistentes a la disposición de un hidroxilo en C-4' y otro en C-7. Por otro lado, la presencia en el espectro de masas del fragmento en *m/z* en 121 (Figura 9) era congruente también con la presencia de un grupo hidroxilo en C-4'. Estas observaciones indicaban que la estructura del flavonoide aislado era la correspondiente a la posibilidad A de la Figura 8. Esta estructura corresponde al 3,6 dimetil éter del campeol, flavonoide previamente descrito en otras fuentes naturales (Macías y Rojas, 1994).

4.2.4 CARACTERIZACIÓN DEL ACETATO DE LUPEOL (19), 4,5-EPOXI- β -CARIOFILENO (20), β -AMIRINA (21) y α -ESPINASTEROL (23).

De la fracción primaria activa XG-C (Cuadro 5, sección experimental), se aisló el acetato de lupeol (**19**) mediante sucesivas cromatografías preparativas.

Este producto natural se caracterizó por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con aquellas de una muestra auténtica aislada de la *Guarea grandifolia* (Meliaceae) (Villarreal, 1996).

De las fracciones primarias activas XG-D y XG-F (Cuadro 5, sección experimental) se obtuvieron el 4,5-epoxi- β -cariofileno (**20**), la β -amirina (**21**) y el α -espinasterol (**23**).

Estos productos naturales se caracterizaron por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con aquellas de muestras auténticas aisladas de la *Conyza filaginoides* (Asteraceae)(Acevedo y Estrada, 1995).

4.2.5 CARACTERIZACIÓN DE LA SACAROSA (32) Y DEL β -D-GLUCOSITOSTEROL (31).

De la fracción inactiva XG-N (Cuadro 6, sección experimental), cristalizó un polvo cristalino de color blanco con punto de fusión de 165-180 °C, que fue identificado como sacarosa (32) por comparación con una muestra auténtica.

De la fracción inactiva XG-L (Cuadro 6, sección experimental), se obtuvo un sólido cristalino blanco con punto de fusión de 274-276 °C, que fue identificado como β -D-glucositosterol (31) por comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas con aquellas de una muestra auténtica.

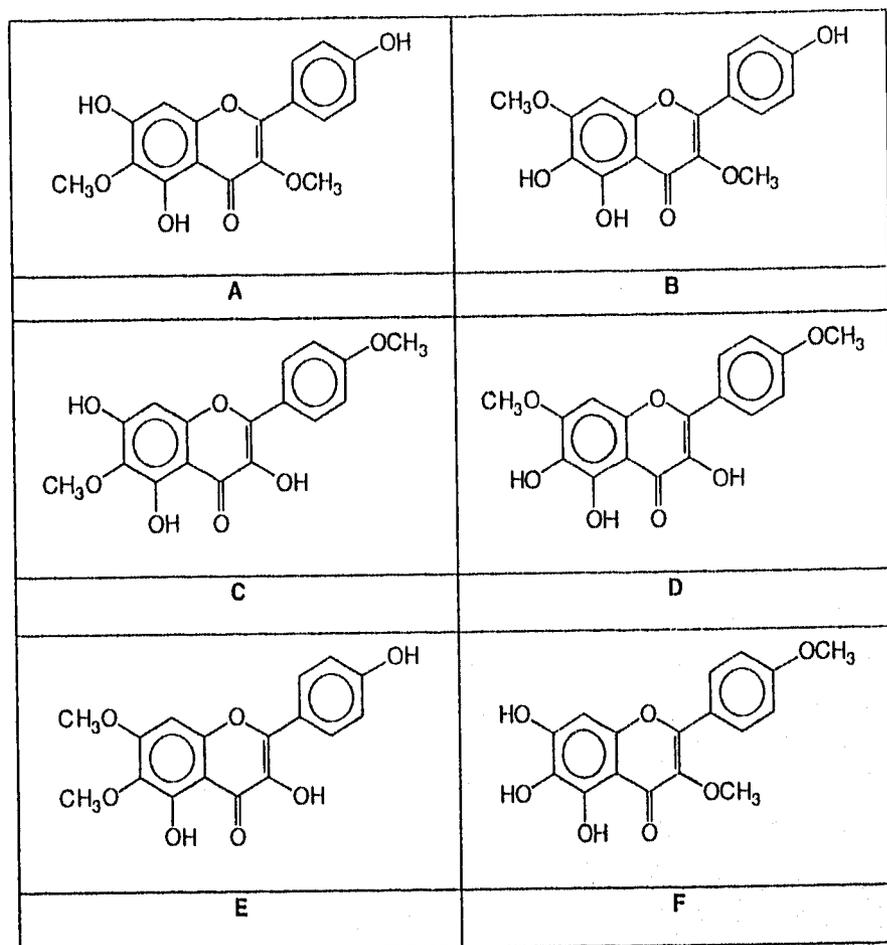


Figura 8. Estructuras posibles del compuesto (30).

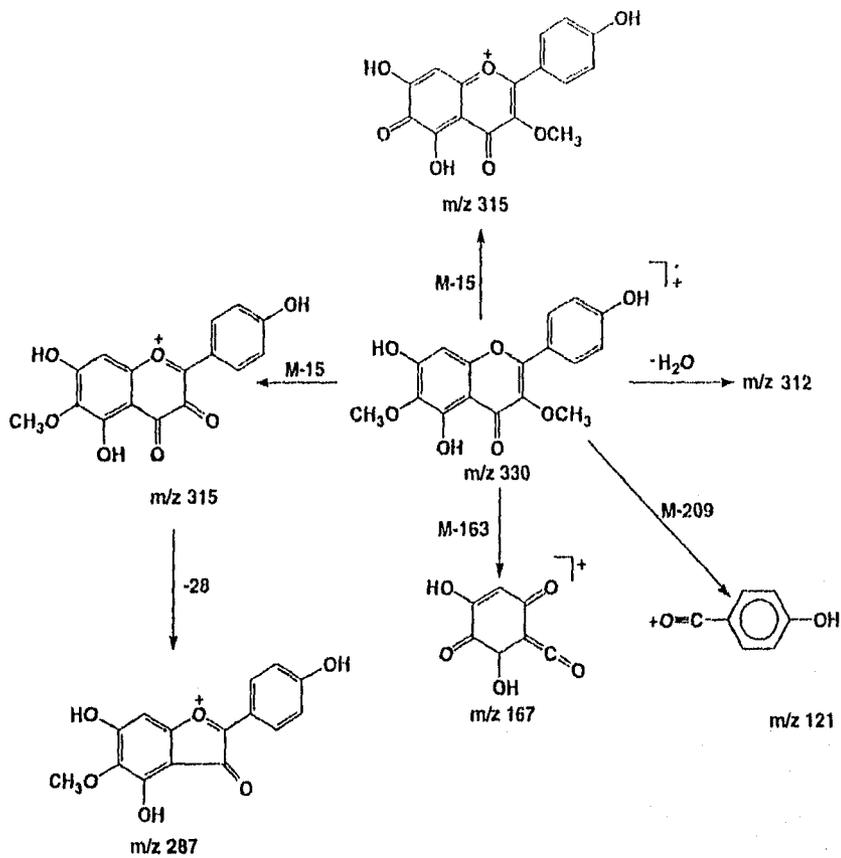
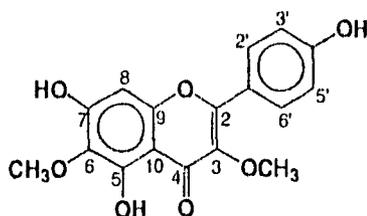


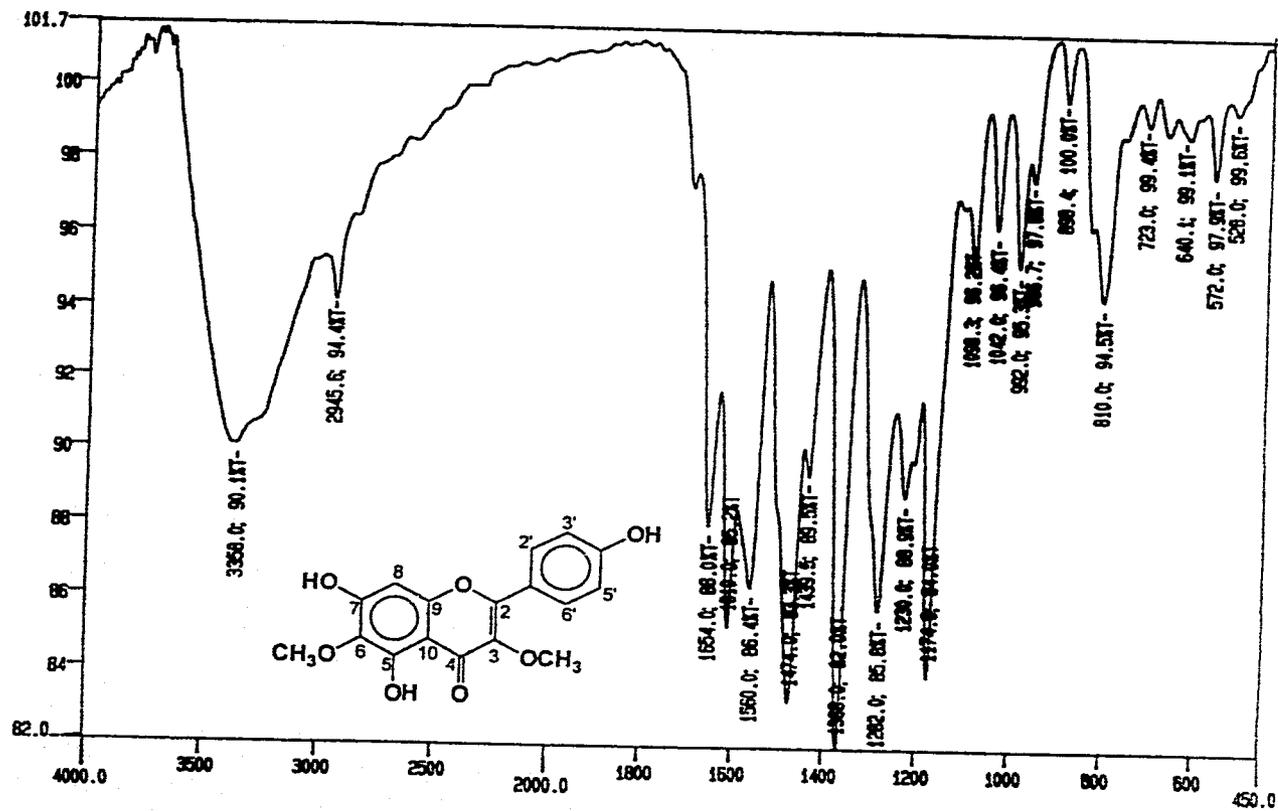
Figura 9. Patrón de fragmentación del 3,6 dimetil éter del camperol (30).

Tabla 9. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 3,6 dimetil éter del camperol (30).

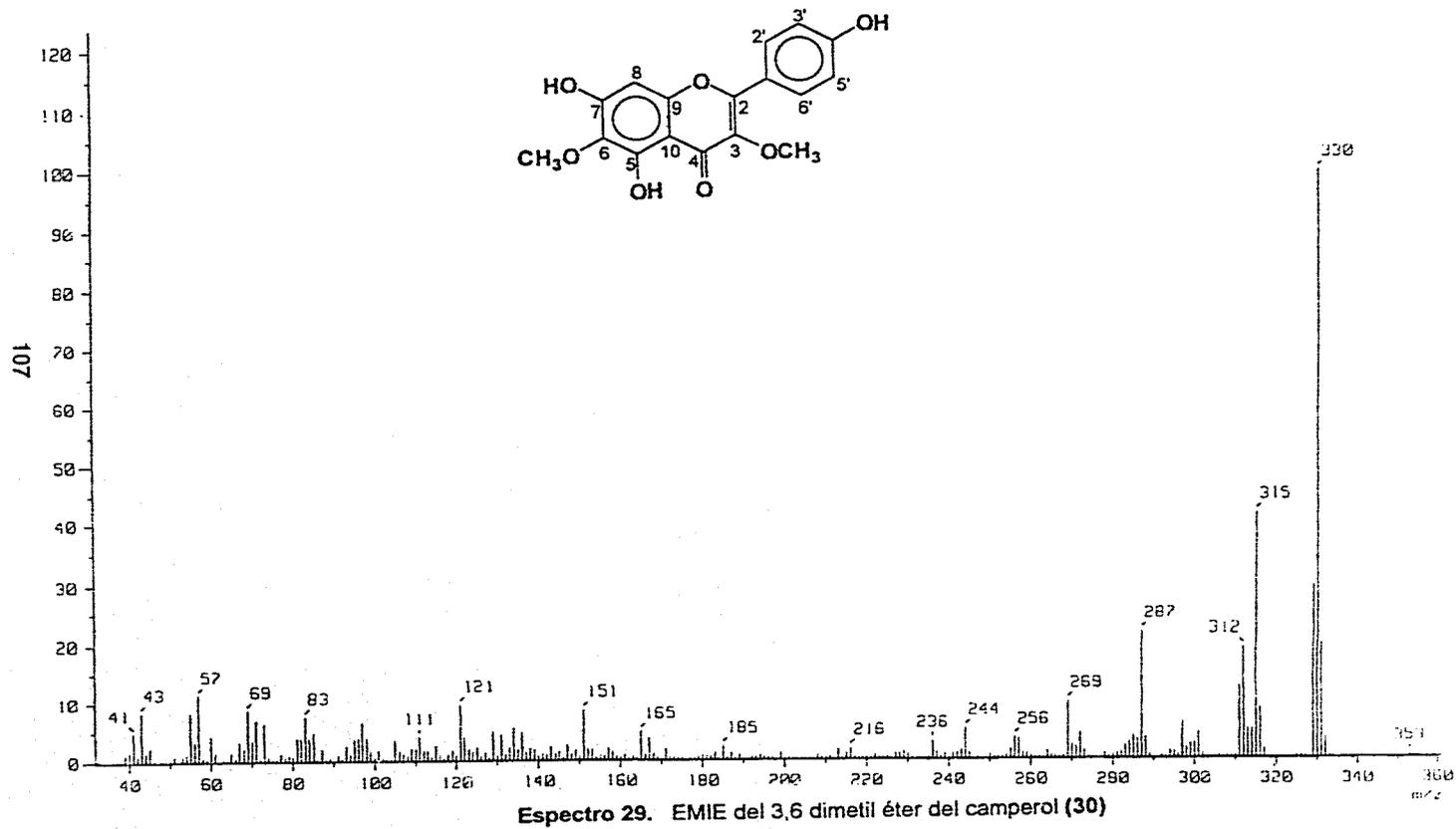


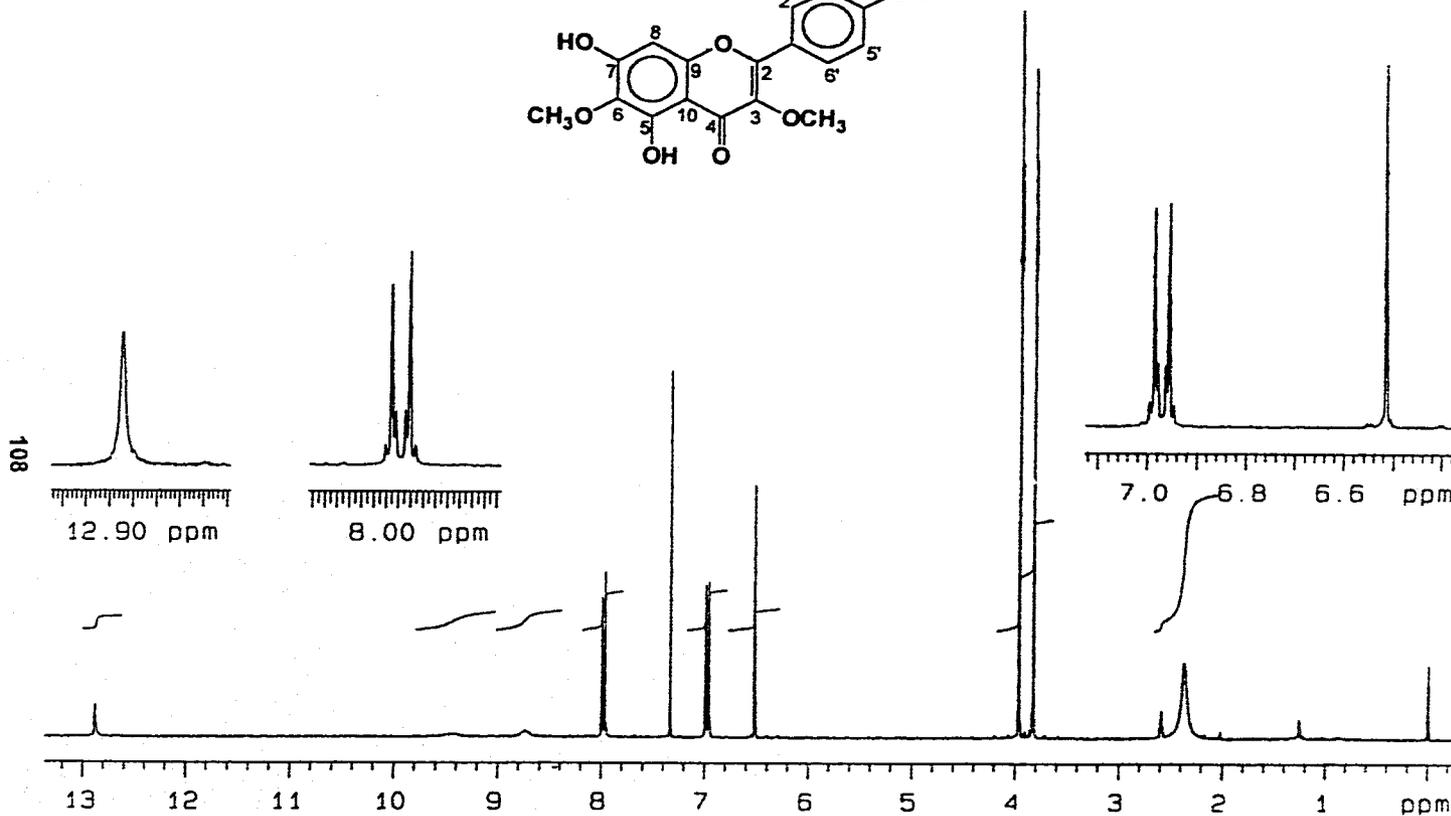
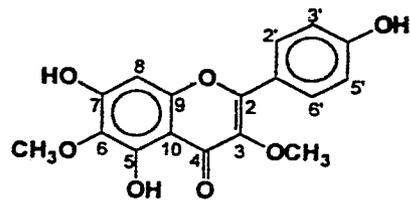
IR, ν_{\max} (película) cm^{-1} (Espectro 28):	3358, 2945, 1654 y 1610.
EMIE, m/z (int rel) (Espectro 29):	330 [M^+ (100)], 315 (41.67), 312 (18.33), 287 (20.83), 269 (9.17), 151 (9.17), 121 (9.17), 83 (7.5), 69 (9.17), 57 (11.67) y 43 (8.33)
RMN- ^1H δ (300 MHz, CDCl_3), ppm (Espectro 30):	12.87 (sa, OH-5), 9.40 (sa, OH-), 8.75 (sa, OH-), 7.98 (d, $J=9.0$, H-2', H-6'), 6.97 (d, $J=9.0$, H-3', H-5'), 6.52 (s, H-8), 3.96 (s, OCH_3 -6) y 3.83 (s, OCH_3 -3).
RMN- ^{13}C δ (75 MHz, CDCl_3), ppm (Espectro 31):	152.08 (C-2), 137.84 (C-3), 178.83 (C-4), 130.68 (C-6), 156.17 (C-7), 93.58 (C-8), 152.38 (C-9), 105.57 (C-10), 121.29 (C-1'), 130.08 (C-2' y C-6'), 159.95 (C-4'), 115.63 (C-3' y C-5'), 60.58 (OCH_3 -6) y 59.87 (OCH_3 -3)

J= Constante de acoplamiento expresada en Hz

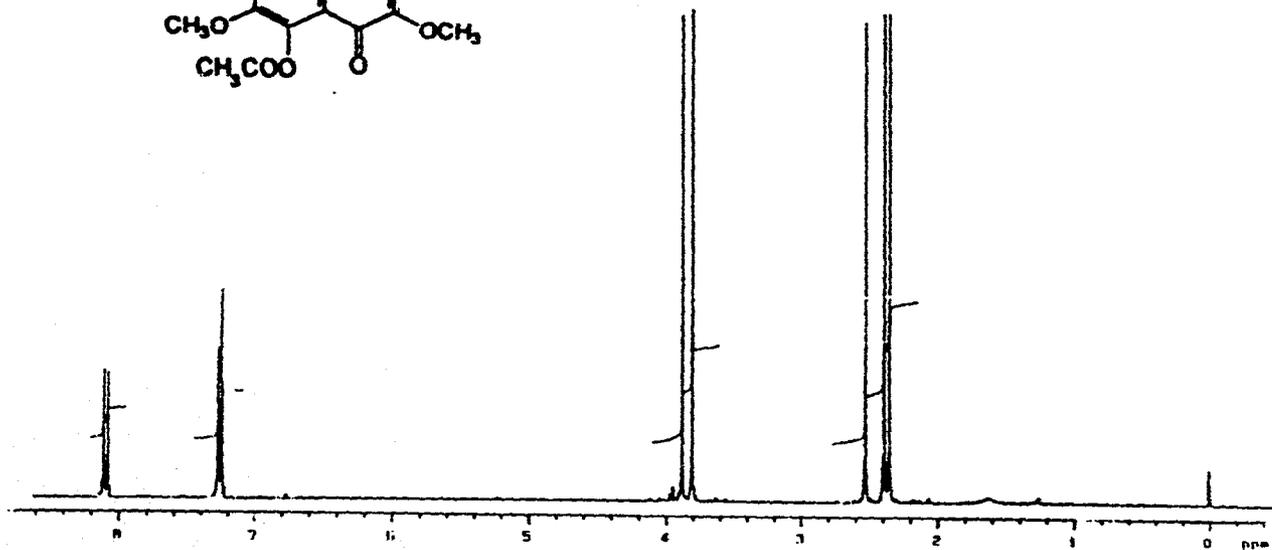
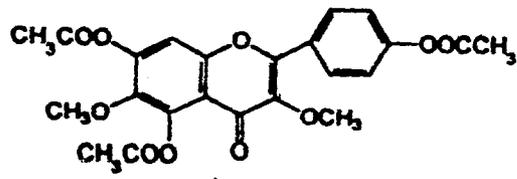


Espectro 28. IR del 3,6 dimetil éter del camperol (30)

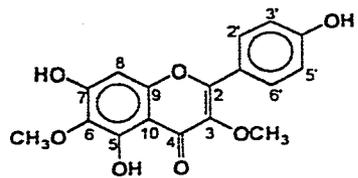




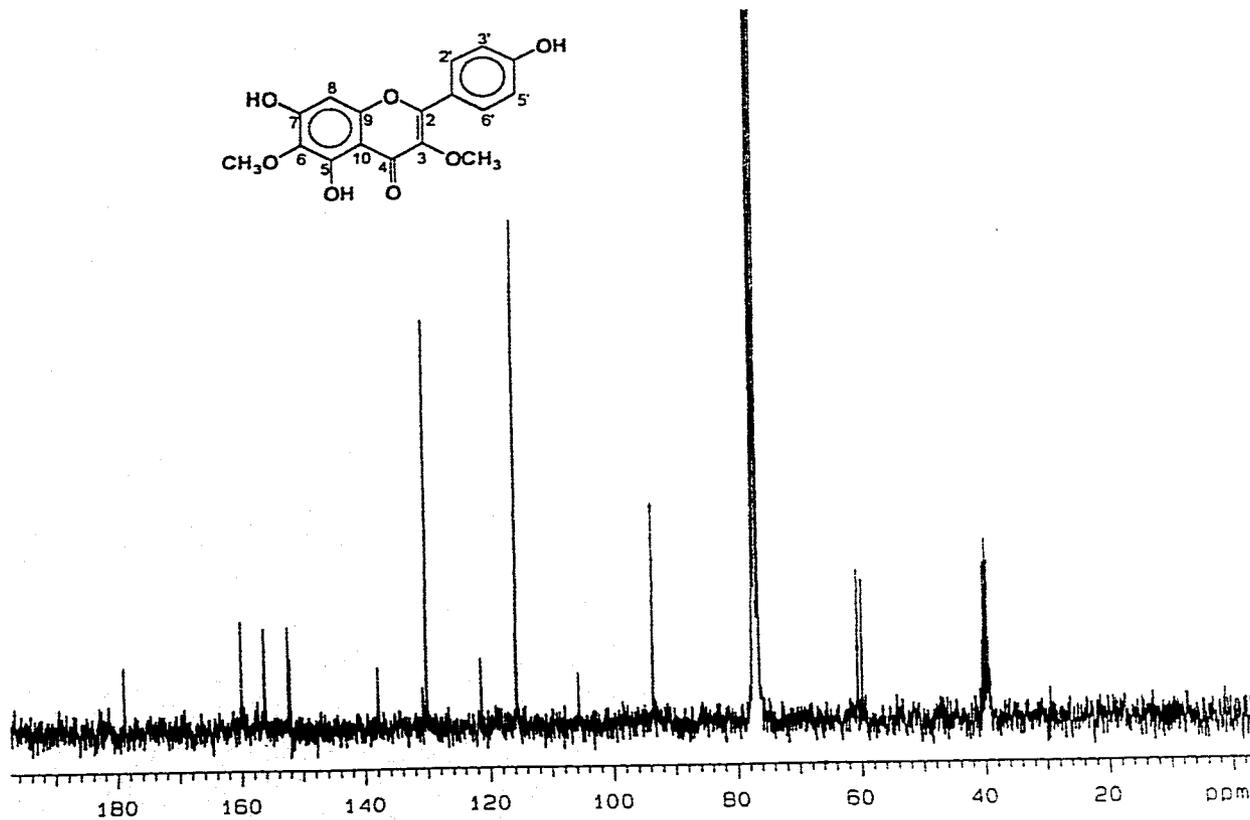
Espectro 30. RMN-¹H del 3,6 dimetil éter del camperol (30)



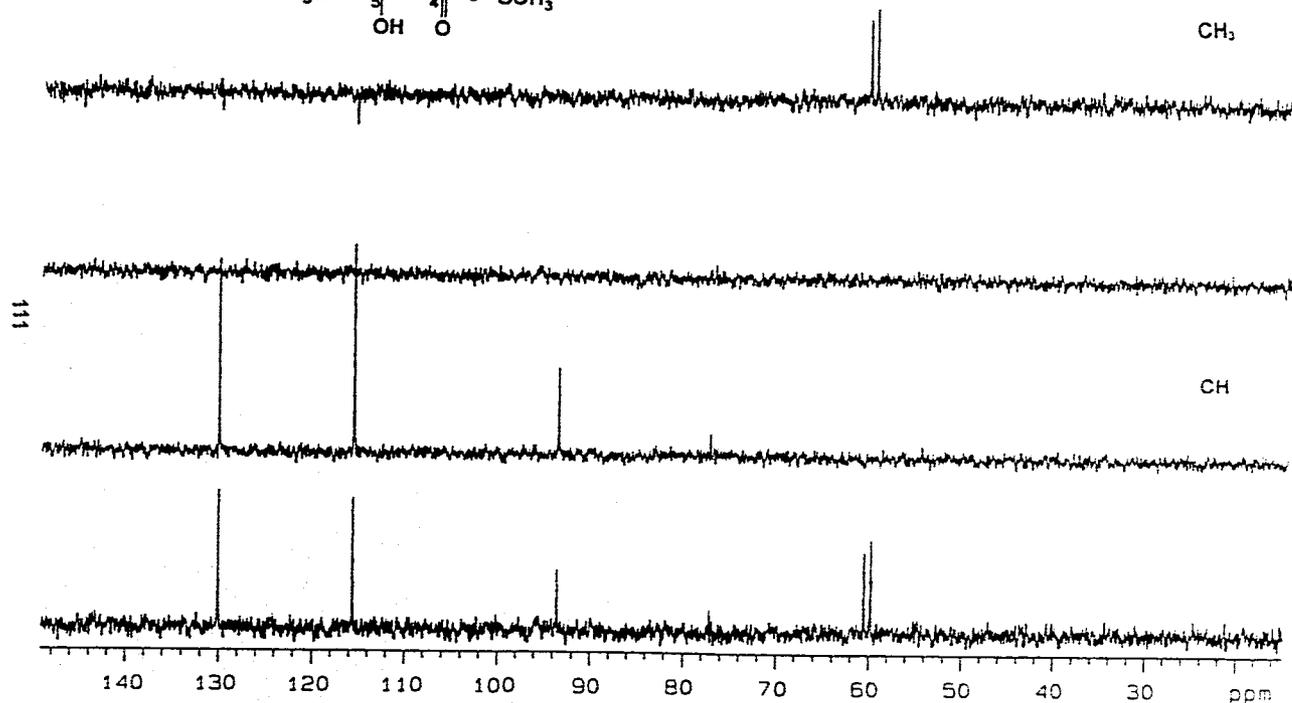
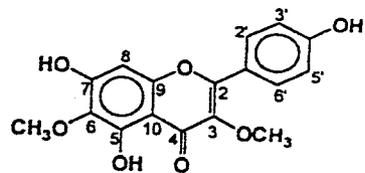
Espectro 30a. RMN-¹H del derivado acetilado del 3,6 dimetil éter del camperol(30)



110



Espectro 31. RMN-¹³C del 3,6 dimetil éter del camperol (30)



Espectro 31a. DEPT del 3,6 dimetil éter del camperol (30)

4.3. EVALUACIONES BIOLÓGICAS DE LOS CONSTITUYENTES PUROS.

El potencial alelopático de los productos naturales o sus derivados obtenidos del extracto fitotóxico de *X. gymnospermoides* var *eradiatum* se determinó también mediante la evaluación de la actividad inhibidora del crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *P. ixocarpa*. Los compuestos evaluados incluyeron los siguientes: grindelato de metilo (22), 8,13- β -epoxilabdano-14S,15 diol (24), ácido grindélico (25), 7 α ,8 α -epoxigrindelato de metilo (26a) y el 17-hidroxigrindelato de metilo (28a). Cabe destacar que los cuatro primeros se obtuvieron de fracciones fitotóxicas.

Los resultados de las evaluaciones conducidas con los productos antes señalados se indican en las Gráficas 2 y 3. Los resultados en todos los casos se encuentran expresados como porcentajes de inhibición del crecimiento radicular de las especies de prueba. Los constituyentes más activos incluyeron a los productos naturales grindelato de metilo (22) y ácido grindélico (25), así como al derivado metilado del ácido 17-hidroxigrindélico (28a). El compuesto (22) inhibió de manera significativa el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *P. ixocarpa*. El compuesto (25) resultó ser menos activo que el compuesto (22) inhibiendo de manera selectiva el crecimiento de *A. hypochondriacus*. *P. ixocarpa* fue menos sensible al producto natural.

La comparación de la actividad inhibidora del crecimiento vegetal demostrada por estos dos compuestos indica que la presencia del grupo éster confiere una mayor actividad biológica.

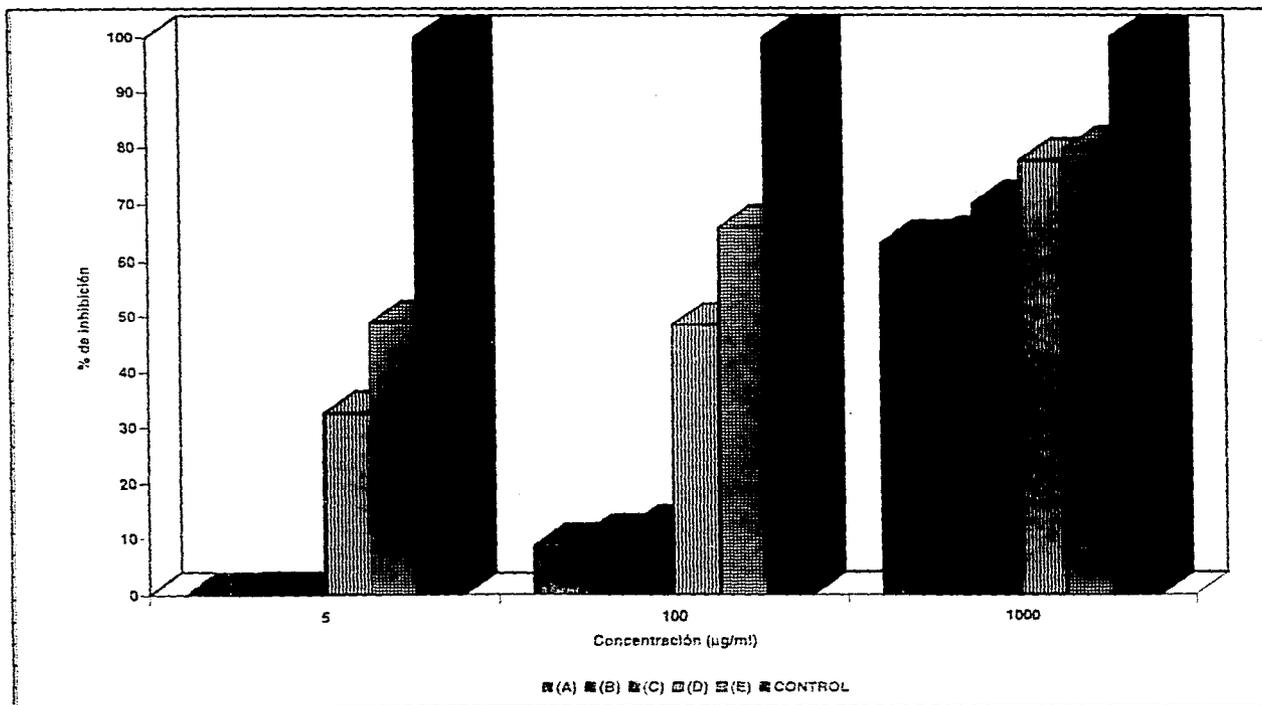
Los compuestos (24, 26a y 28a) inhibieron significativamente el crecimiento radicular de las dos especies de prueba solo a la concentración de 1000 μ g/ml. En este caso la especie *A. hypochondriacus* resultó mucho más sensible.

Por último el compuesto (27) demostró un efecto fitotóxico significativo sobre *P. ixocarpa* (87.42%); la especie *A. hypochondriacus* fue menos sensible con un porcentaje de inhibición de 63.71.

En un estudio previo se demostró que el 4,5-epoxi- β -cariofileno es un agente regulador del crecimiento vegetal que ocasiona una disminución significativa del crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* (Acevedo y Estrada, 1995), por lo tanto el efecto fitotóxico de la fracción XG-D se debe a la presencia del óxido de cariofileno.

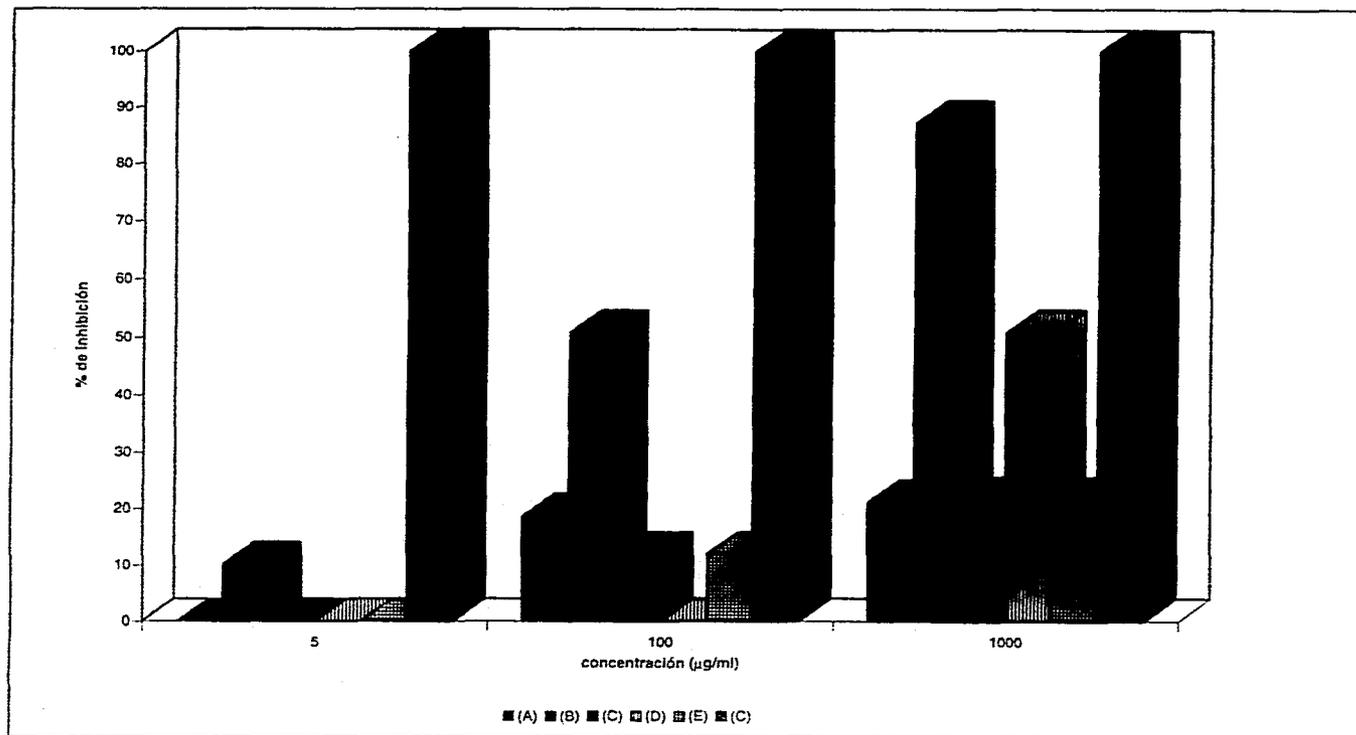
En relación al efecto demostrado por el 17-hidroxigrindelato de metilo (28a), previamente Fischer y colaboradores demostraron que este compuesto reduce el crecimiento radicular de *Rudbeckia hirta* en un 41% a 120 $\mu\text{g/ml}$. El aldehído correspondiente afectó también el crecimiento radicular y la germinación de *Schizachyrium scoparium* y *Leptochloa dubia* a concentraciones de 12 y 48 $\mu\text{g/ml}$ (Fischer *et al.*, 1986; Fischer *et al.*, 1994; Menelaou *et al.*, 1993). También estos autores proponen que los compuestos antes mencionados están involucrados en las interacciones alelopáticas de la especie *Chrysoma pauciflosculosa* en las comunidades de tipo matorral, del Estado de Florida, en los Estados Unidos de Norteamérica.

El efecto inhibitor del crecimiento vegetal sobre *A. hypochondriacus* demostrados por el extracto y los compuestos derivados de *X. gymnospermoides* var *eradiatum* podrían estar correlacionados con las observaciones de campo en relación al empleo de esta especie como cultivo de cobertura. También es altamente probable que los principios fitotóxicos detectados en esta especie participen en las interacciones alelopáticas de *X. gymnospermoides* var *eradiatum*.



- A 8,13β-epoxilabdano-14S,15 diol (24).
 B 17-hidroxigrindelato de metilo (28).
 C 7α,8α-epoxigrindelato de metilo (26).
 D Acido grindélico (25).
 E Grindelato de metilo (22).
 Control 2,4-diclorofenoxiacético.

Gráfica 2. Efecto de los compuestos aislados de *X. gymnospermoides* var *eradiatum* sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*.



- A 8,13 β -epoxilabdano-14S,15 diol (24).
 B 17-hidroxi-grindelato de metilo (28).
 C 7 α ,8 α -epoxigrindelato de metilo (26).
 D Acido grindélico (25).
 E Grindelato de metilo (22).
 Control 2,4-diclorofenoxiacético.

Gráfica 3. Efecto de los compuestos aislados de *X. gymnospermoides* var *eradiatum* sobre el crecimiento radicular de *P. ixocarpa*.

V. CONCLUSIONES

- En el presente estudio se demostró el potencial alelopático de la variedad *X. gymnospermoides* var *eradiatum* mediante la evaluación del efecto del extracto CHCl_3 -MeOH (1:1) sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Physalis ixocarpa*.
- El fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico activo permitió el aislamiento y caracterización de los siguientes compuestos: 8,13- β -epoxilabdano-14S,15 diol (**24**), grindelato de metilo (**22**), ácido grindélico (**25**), ácido 7 α ,8 α -epoxigrindélico (**26**), ácido 7 α -hidroxi-8(17) deshidrogrindélico (**27**), ácido 17-hidroxigrindélico (**28**), ácido 6,18-dihidroxigrindélico (**29**), 3,6 dimetil éter del camperol (**30**), α -espinasterol (**23**), 4,5-epoxi- β -cariofileno (**20**), acetato de lupeol (**19**) y β -amirina (**21**). Los diterpenos (**24**) y (**29**) constituyen nuevos productos naturales. En el caso de los compuestos (**26-29**) el aislamiento y caracterización se realizó bajo la forma de los ésteres metílicos correspondientes. En general, la caracterización de los productos naturales ó sus derivados se realizó por métodos químicos y espectroscópicos.
- Se determinó el efecto alelopático potencial de los productos naturales o sus derivados, encontrándose que, el éster metílico del ácido 17-hidroxigrindélico (**28**) inhibía de manera significativa el crecimiento radicular de *P. ixocarpa*, siendo la especie *A. hypochondriacus* menos sensible. Sin embargo, los productos naturales (**22**) y (**25**) demostraron una mejor actividad contra la especie *A. hypochondriacus*. Los demás productos naturales o sus derivados no demostraron un efecto fitotóxico significativo; la actividad demostrada por el compuesto (**25**) y su éster metílico

podría estar correlacionada con las observaciones de campo relacionadas con la inhibición del crecimiento de plantas anuales en el hábitat normal de la planta. En consecuencia estos productos constituyen prototipos estructurales novedosos para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas.

- La presente investigación fitoquímica constituye una contribución adicional para el conocimiento del contenido metabólico secundario del género *Xanthocephalum* y de la flora medicinal mexicana.

VI. PERSPECTIVAS

- Completar el estudio fitoquímico de las fracciones de mayor polaridad para así determinar de manera integral el contenido metabólico secundario de la especie *X. gymnospermoides* var *eradiatum*.
- Determinar el efecto sobre el crecimiento vegetal de los productos naturales y derivados utilizando otras semillas vegetales de prueba con la finalidad de ampliar el conocimiento de estos compuestos como agentes reguladores del crecimiento vegetal.
- Establecer mediante las evaluaciones apropiadas los posibles mecanismos de acción como agentes reguladores del crecimiento vegetal de los metabolitos diterpenoides obtenidos en la presente investigación.
- Evaluar la potencialidad antimicrobiana del extracto y los compuestos derivados de *X. gymnospermoides* var *eradiatum* con la finalidad de corroborar sus propiedades antisépticas.

VII. BIBLIOGRAFIA

Acevedo, L. A. y Estrada, S. E. (1994). Estudio químico y biológico preliminar de *Conyza filaginoides* (D.C) HIERON (Asteraceae). Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Adinolfi, M., DellaGreca, M. y Mangoni, L. (1988). The absolute configuration of grindelic acid. *Phytochemistry*, **27** 1878-1881.

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.

Bohlmann, F., Knauf, W., Grenz, M. y Lane, M. (1979). Ein neues diterpen aus *Xanthocephalum linearifolium*. *Phytochemistry*, **88** 2040-2042.

Bohlmann, F., Ahmed, M., Borthakur, N., Wallmeyer, M., Jakupovic, J., King, R.M. y Robinson, H. (1982). Diterpenes related to grindelic acid and further constituents from *Grindelia* species. *Phytochemistry*, **21** 167-172.

Brunn, T. (1962). Grindelic and oxygrindelic acids. *Acta Chemica Scandinavica*, **16** 1675-1681.

Bye, R. (1996). Comunicación personal.

Fernández, C., Fraga, B.M. y Hernández, M.G. (1986). Diterpenes from *Sidentis nutans*. *Phytochemistry*, **25** 2825-2827.

Fischer, N.H. (1986). The function of mono and sesquiterpenes as plant germination and growth regulators en *The Science of Allelopathy*. Putnam, A. R. y Tang, C. S., Editores, Willey-Interscience, Nueva York, pp 203-218

Fischer, N.H. (1991). Plant terpenoids as allelopathic agents en *Ecological Chemistry and Biochemistry of plant terpenoids*. Clarendon Press Oxford, pp 376-398.

Fischer, N.K., Williamson, G.B., Widenhamer, J.D. y Richardson, D.R. (1994). In search of allelopathy in the Florida scrub: the role of terpenoids. *Journal of Chemical Ecology*, **20** 1355-1379.

Ghisalberti, E. (1993). Detection and Isolation of Bioactive Natural Products en *Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination*. Colegate, S. y Molyneux, R., Editores, CRC Press, U.S.A., pp 10-49.

González, M., Colombo, M., Olivieri, A., Zudenigo, M. y Rúveda, E. (1984). Stereospecific transformation of grindelic acid into the antifeedant 6 α -hydroxygrindelic acid, its 6 β -epimer, and other related natural diterpene acids. *J. Org. Chem*, **49** 4984-4988.

Grau, J. (1993). Asteroae-systematic review en *The biology and chemistry of Compositae*. Heywood, V.H., Harborne, J.B. y Turner, B.L., Editores, Academic Press, Londres, **1** pp 539-565.

Guerreiro, E., Kavka, J., Saad, J. R., Oriental, M.A. y Giordano, O. S. (1981). Acidos diterpénicos en *Grindelia pulchella* y *G. chilensis* Cabr. *Revista Latinoamericana*, **12** 77-81.

Harborne, J. B., Mabry, T. J. y Mabry, H. (1975). The flavonoids. Academic Press, Nueva York, p 375.

Herz, W. (1993). Astereae-chemical review en The biology and chemistry of *Compositae*. Heywood, V.H., Harborne, J.B. y Turner, B.L., Editores, Academic Press, Londres, 1 pp 567-576.

Hamburger, M., Hosteltman, K. (1991). Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, 30(12) 3864-3874.

Hosteltmann K. y Marston A. (1990). Bioactive constituents of plants used in Africal traditional medicine. *Studies in natural products chemistry*, 7 405-437.

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

Kinghorn A. D. (1995). Novel strategies for plant-derived anticancer agents. *International Journal of Pharmacognosy*, 33 48-58.

Lane, M.A. (1983). Taxonomy of *Xanthocephalum* (Compositae: Astereae). *Systematic Botanic*, 8 305-316.

Lane, M.A. (1989). Annual *Xanthocephalum*. *Phytologia*, 66 482-487.

Lowery, C. (1993). *Reagent Chemicals*. American Chemical Society specification, Editores. Washington, D. C., pp 90-91.

Macías. M.L. y Rojas, I.S.(1994). Metabolitos secundarios de *Chamaesyce prostrata* (AIT) Millsp. (Euphorbiaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Markham, K.R. (1982). *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press Inc, Londres, p 113.

Markham, K.R., Chari, V. M. y Mabry, T. J. (1985). *Carbon-13 NMR spectroscopy of flavonoids*. Academic Press Inc, Londres, pp 19-28.

Menelaou, M. A. (1993). Diterpenes from *Chrysoma pauciflosculosa*: Effects on Florida sandhill species. *Phytochemistry*, **34** (1) 97-105.

Pavia, D., Lampman, G., Kriz, G. y Engel, R. (1995). *Organic laboratory techniques: A microscale approach*. Saunders College Publishing, U.S.A., p 345.

Rice, E. L. (1984). *Allelopathy*. Academic Press Inc, Orlando, Florida. pp 35-50.

Sanggong, Yu., Nianbai, F. y Mabry, T. J. (1987). Flavonoids aglycones from *Xanthocephalum gymnospermoides* var *gymnospermoides*. *Phytochemistry*, **26** (7) 2131-2133.

Solbrig, O.T. (1960). The status of the genera *Amphipappus*, *Amphiachynis*, *Greenella*, *Gutierrezia*, *Gymnosperma* and *Xanthocephalum* (Compositae). *Rhodora*, **62** 43-54.

Solbrig, O.T. (1961). Synopsis of the genus *Xanthocephalum* (Compositae). *Rhodora*, **63** 151-164.

Solbrig, O.T. (1965). The typification of *Xanthocephalum* (Compositae). *Rhodora*, **67** 182-184.

Touchstone, J. C. (1992). *Practice of thin layer chromatographic*. John Wiley and Sons, Inc. U.S.A., pp 157.

Timmermann, B. N., Hoffmann, J.J., Jolad, S.D. y Schram, K.H. (1985). Grindelane diterpenoids from *Grindelia squarrosa* and *G. camporum*. *Phytochemistry*, **24** 1031-1034.

Valverde, S. y Rodríguez, B. (1977). The use of ^{13}C -NMR in the determination of structures: a correction of the structure of Borjatriol. *Phytochemistry*, **16** 1841.

Villarreal, E. C. (1996). Estudio químico y biológico de *Guarea grandifolia* (Meliaceae). Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Von Carstern-Lichterfelde, C., Rodríguez, B. y Valverde, S. (1975). Barbatol, a new diterpenoid from a *Sideritis arborescens* Salzm. subespecie *Experientia*, **14** 757-758.

Yu, S., Fang, N. y Mabry, T.J. (1987). Flavonoid aglycones from *Xanthocephalum gymnospermoides* var *gymnospermoides*. *Phytochemistry*, **26** 2131-2133.