

19  
21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

"COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA ESPECIE  
*Cosmos pringlei* (ASTERACEAE)"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

NORMA ANGELICA / CUEVAS GARIBAY

MEXICO, D.F.,

1997

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

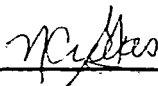
**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dra. CABALLERO ARROYO YOLANDA  
**VOCAL:** Dra. MATA ESSAYAG RACHEL  
**SECRETARIO:** Dr. PEREDA MIRANDA ROGELIO GREGORIO  
**1ER. SUPLENTE:** M en C. CASTAÑEDA LOPEZ PERLA CAROLINA  
**2DO. SUPLENTE:** Prof. GARCIA ORTEGA HECTOR

**SITIO EN QUE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

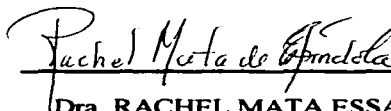
Laboratorio 124, Departamento de Farmacia, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

**SUSTENTANTE:**



\_\_\_\_\_  
NORMA ANGÉLICA CUEVAS GARIBAY

**ASESORA:**



\_\_\_\_\_  
Dra. RACHEL MATA ESSAYAG

## **DEDICATORIAS**

### ***A mis padres:***

Alfredo y Angélica,  
quienes con su apoyo  
y cariño me han  
impulsado a conseguir  
mis más grandes  
metas.

### ***A mis hermanos:***

Luis y Jorge por el  
ejemplo que me dan a  
cada momento y que  
siempre se dirige al éxito.

### ***A mis familiares y amigos:***

Por contar con su  
apoyo incondicional.

### ***A mis profesores:***

Con admiración y respeto  
por todas las enseñanzas  
que me han brindado.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme formar parte de ella.**

**Al la DGAPA (Dirección General de Asuntos de Personal Académico) - proyecto IN205197- y al CONACYT (Convenio No. 400313-S-2576PM) por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo.**

**A la Dra. Rachel Mata por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y por su valiosa asesoría.**

**A la Q.F.B. Laura Acevedo Arteaga por su valiosa asesoría técnica durante el desarrollo experimental de la tesis.**

**A mis compañeros de laboratorio: Laurita , Mari, José Luis, Fausto, Daniel, Samuel, Leda, Perlita, Martha, Susi, Tere, Mítzi y Jacqueline, por su apoyo, comprensión y experiencias compartidas.**

**Al Dr. Blas Lotina-Hennsen y a Katia Robles García por su valiosa contribución a este trabajo.**

**Al I.Q. Luis Velasco Ibarra y al M. en C. Javier Pérez del Instituto de Química, por la obtención de los espectros de masas.**

A las M. en C. Beatriz Quiroz e Isabel Flores Chávez del Instituto de Química, por la obtención de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

Al M. en C. José Luis Gallegos Pérez de la Facultad de Química, por la obtención de los espectros Gases-Masas.

A todos mis profesores, pero muy especialmente a aquellos que más que una enseñanza académica me dejaron una enseñanza de vida.

Al M. en C. Víctor Manuel Ugalde Saldivar por la amistad y las enseñanzas invaluable que me ha brindado.

A la Dra. Martha E. Sosa y a los integrantes (pasados y actuales) del lab. 212, por su amistad incondicional.

A Laura, Luis y Elena por su incomparable amistad.

Al I.Q. Jacob Zuleta por su comprensión y apoyo para la realización de este trabajo.

**Si tienes un ideal, nada te espante:  
persíguelo con celo diligente;  
en el peligro cierto, sé prudente;  
en el bien anhelado, sé constante.**

**La vida se construye a cada instante  
y es preciso vivirla intensamente,  
tender una mirada inteligente  
y un corazón gozoso y desbordante.**

**Si tienes un ideal, sé como el río  
que apunta hacia la meta del océano  
sin detener su curso, y crece en brío,  
y vivifica el suelo y canta ufano.**

*J.M. Galaviz*

## 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. ANTECEDENTES	1
1.1 Antecedentes botánicos y etnobotánicos de <i>Cosmos pringlei</i>	1
1.2 Estudios químicos sobre el género <i>Cosmos</i>	4
1.3 Potencial de las lactonas sesquiterpénicas como agentes herbicidas	11
II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	27
III. PARTE EXPERIMENTAL	30
3.1 Material vegetal	30
3.2 Análisis cromatográficos	30
3.3 Caracterización de los productos naturales	32
3.4 Pruebas biológicas	33
3.4.1 Determinación de la toxicidad para <i>Artemia salina</i> Leach	33
3.4.2 Determinación de la actividad fitotóxica.	34



3.4.2.1 Efecto sobre la germinación y del crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> del extracto crudo, fracciones y productos derivados de <i>C. pringlei</i>	34
3.4.2.1.1 Método de caja de Petri	34
3.4.2.1.2. Método bioautográfico	35
3.4.2.2 Efecto sobre la producción de biomasa de malezas	36
3.4.2.3 Determinación de la actividad inhibidora de la síntesis de ATP	38
3.5 Extracción de la raíz de la planta <i>Cosmos pringlei</i>	39
3.6 Fraccionamiento biodirigido del extracto total	39
3.7 Aislamiento de la dehidrocostus lactona ( <b>48</b> ) y de la costunólida ( <b>20</b> ) de la fracción primaria activa F	42
3.8 Aislamiento de la 15-isovaleriloxi costunólida ( <b>55</b> ) de la fracción primaria H	42
3.9 Aislamiento de la 15-isobutiriloxi costunólida ( <b>56</b> ) de la fracción primaria activa I	42
3.10 Aislamiento de la 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregn-16-en-20-ona ( <b>57</b> ) de la fracción primaria activa J.	43
3.11 Preparación del acetato de la 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregn-16-en-20-ona ( <b>57a</b> )	43
3.12 Aislamiento del estigmasterol ( <b>58</b> ) de la fracción primaria G	43
3.13 Aislamiento y purificación de los productos 59 y 60 de la fracción primaria activa E	44

IV. RESULTADOS Y DISCUSION	46
4.1 Selección de la especie <i>C. pringlei</i> como una fuente potencial de agetes fitotóxicos	46
4.2 Caracterización de los constituyentes activos	57
4.2.1 Caracterización de la dehidrocostus lactona ( <b>48</b> ) obtenida de la fracción activa F	57
4.2.2 Caracterización de la costunólida ( <b>20</b> ) obtenida de la fracción activa F	68
4.2.3 Caracterización de la 15-isovaleriloxi costunólida ( <b>55</b> ) obtenida de la fracción H	79
4.2.4 Caracterización de la 15-isobutiriloxi costunólida ( <b>56</b> ) obtenida de la fracción activa I.	90
4.2.5 Caracterización de la 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregn-16-en-20-ona ( <b>57</b> ) de la fracción J	100
4.2.6 Caracterización del estigmasterol ( <b>58</b> ) obtenido de la fracción G.	111
4.3 Evaluaciones biológicas de los productos aislados	114
V. CONCLUSIONES	125
VI. PERSPECTIVAS	127
VII. BIBLIOGRAFIA	128

## LISTA DE CUADROS

	Página	
Cuadro 1	Localización en México y nombres vulgares de algunas especies del género <i>Cosmos</i> .	2
Cuadro 2	Metabolitos secundarios aislados del género <i>Cosmos</i> .	5
Cuadro 3	Clasificación de los pesticidas en función de su uso.	12
Cuadro 4	Efectos alelopáticos de algunas lactonas sesquiterpénicas	21
Cuadro 4a	Ejemplos selectos de lactonas sesquiterpénicas con actividad alelopática demostrada.	23
Cuadro 5	Sistemas de elución utilizados en los análisis cualitativos en capa fina.	31
Cuadro 6	Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos.	31
Cuadro 7	Fraccionamiento biodirigido del extracto total de <i>Cosmos pringlei</i> .	41
Cuadro 8	Efecto del extracto de <i>C. pringlei</i> sobre la producción de biomasa de <i>A. hypochondriacus</i> .	50
Cuadro 9	Actividad biológica de las fracciones primarias.	54
Cuadro 10	Metabolitos secundarios aislados de la especie <i>C. pringlei</i> .	55
Cuadro 11	Efecto de la deshidrocostus lactona (48) y de la costunólida (20) sobre la germinación de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crugalli</i> .	115

	Pág.
Cuadro 12 Efecto de la deshidrocostus lactona ( <b>48</b> ) y de la costunólida ( <b>20</b> ) sobre la síntesis de ATP.	118
Cuadro 13 Efecto de la deshidrocostus lactona ( <b>48</b> ) sobre la producción de biomasa en plántulas de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> .	120

### LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la deshidrocostus lactona ( <b>48</b> ).	60
Tabla 2 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la costunólida ( <b>20</b> ).	71
Tabla 3 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la 15-isovaleriloxi costunólida ( <b>55</b> ).	82
Tabla 4 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la 15-isobutiriloxi costunólida ( <b>56</b> ).	92
Tabla 5 Constantes espectroscópicas y espectrométricas del 3 $\beta$ -hidroxi pregn-16-en-20-ona ( <b>57</b> ).	103
Tabla 6 Constantes espectroscópicas del 3 $\beta$ -acetoxi-pregn-16-en-20-ona ( <b>57a</b> )	111
Tabla 7 Constantes espectroscópicas y espectrométricas del estigmasterol ( <b>58</b> )	113

**LISTA DE FIGURAS**

		Página
Figura 1	<i>Cosmos pringlei</i> .	3
Figura 2	Rango de bioactividad de los agentes alelopáticos vegetales.	15
Figura 3	Estructura de algunos terpenoides fitotóxicos.	17
Figura 4	Biogénesis de los tipos de lactonas sesquiterpénicas.	18
Figura 5	Propiedades alquilantes de las lactonas sesquiterpénicas.	20
Figura 6	Separación de los compuestos 59 y 60 mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.	45
Figura 7	Efecto del extracto de <i>C.pringlei</i> sobre la apariencia de plántulas de <i>A. hypochondriacus</i> .	52

**LISTA DE ESQUEMAS**

Esquema 1	Proceso de extracción de la raíz de la planta <i>Cosmos pringlei</i> .	40
-----------	--	----

**LISTA DE GRAFICAS**

Gráfica 1	Efecto del extracto de <i>C. pringlei</i> sobre la germinación de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> .	48
Gráfica 2	Efecto del extracto de <i>C. pringlei</i> sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> .	49
Gráfica 3	Efecto de los compuestos aislados de <i>C. pringlei</i> sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> .	115
Gráfica 4	Efecto de los compuestos aislados de <i>C. pringlei</i> sobre el crecimiento radicular de <i>E. crusgalli</i> .	116
Gráfica 5	Efecto de la concentración de las lactonas <b>48</b> y <b>20</b> en la síntesis de ATP.	119

**LISTA DE ESPECTROS**

	<b>Página</b>
Espectro 1. IR de la deshidrocostus lactona (48)	61
Espectro 2. EMIE de la deshidrocostus lactona (48)	62
Espectro 3. RMN- <sup>1</sup> H de la deshidrocostus lactona (48)	63
Espectro 3a. COSY de la deshidrocostus lactona (48)	64
Espectro 4. RMN- <sup>13</sup> C de la deshidrocostus lactona (48)	65
Espectro 4a. DEPT de la deshidrocostus lactona (48)	66
Espectro 4b. HETCOR de la deshidrocostus lactona (48)	67
Espectro 5. IR de la costunólida (20)	72
Espectro 6. EMIE de la costunólida (20)	73
Espectro 7. RMN- <sup>1</sup> H de la costunólida (20)	74
Espectro 7. COSY de la costunólida (20)	75
Espectro 8. RMN- <sup>13</sup> C de la costunólida (20)	76
Espectro 8a. DEPT de la costunólida (20)	77
Espectro 8b. HETCOR de la costunólida (20)	78
Espectro 9. IR de la 15-isovaleriloxi costunólida (55)	83
Espectro 10. EMIE de la 15-isovaleriloxi costunólida (55)	84
Espectro 11. RMN- <sup>1</sup> H de la 15-isovaleriloxi costunólida (55)	85
Espectro 11a. COSY de la 15-isovaleriloxi costunólida (55)	86
Espectro 12. RMN- <sup>13</sup> C de la 15-isovaleriloxi costunólida (55)	87
Espectro 12a. DEPT de la 15-isovaleriloxi costunólida (55)	88
Espectro 12b. HETCOR de la 15-isovaleriloxi costunólida (55)	89

Espectro 13.	IR de la 15-isobutiriloxi costunólida (56)	93
Espectro 14.	EMIE de la 15-isobutiriloxi costunólida (56)	94
Espectro 15.	RMN- <sup>1</sup> H de la 15-isobutiriloxi costunólida (56)	95
Espectro 15a.	COSY de la 15-isobutiriloxi costunólida (56)	96
Espectro 16.	RMN- <sup>13</sup> C de la 15-isobutiriloxi costunólida (56)	97
Espectro 16a.	DEPT de la 15-isobutiriloxi costunólida (56)	98
Espectro 16b.	HETCOR de la 15-isobutiriloxi costunólida (56)	99
Espectro 17.	IR de la 3β-hidroxi-5α-pregn-16-en-20-ona (57)	104
Espectro 18.	EMIE de la 3β-hidroxi-5α-pregn-16-en-20-ona (57)	105
Espectro 19.	RMN- <sup>1</sup> H de la 3β-hidroxi-5α-pregn-16-en-20-ona (57)	106
Espectro 19a.	COSY de la 3β-hidroxi-5α-pregn-16-en-20-ona (57)	107
Espectro 20.	RMN- <sup>13</sup> C de la 3β-hidroxi-5α-pregn-16-en-20-ona (57)	108
Espectro 20a.	DEPT de la 3β-hidroxi-5α-pregn-16-en-20-ona (57)	109
Espectro 20b.	HETCOR de la 3β-hidroxi-5α-pregn-16-en-20-ona (57)	110
Espectro 21.	RMN- <sup>1</sup> H del 3β-acetoxi-5α-pregn-16-en-20-ona (57a)	112



## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ANOVA	Análisis de varianza
°C	Grados centígrados
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo.
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
cm	Centímetros
COSY	Espectroscopía de correlación
d	Doblete
δ	Desplazamiento químico
dd	Doblete dobleteado
d.s.	Desviación estándar
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
EtOH	Etanol
g	Gramos
HETCOR	Correlación heteronuclear
Hex	Hexano
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acido sulfúrico
Hz	Hertz
Int rel	Intensidad relativa
IR	Infrarrojo

J	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
m	Multiplete
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
μg	Microgramos
ml	Mililitros
m/z	Relación masa-carga
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono
s	singlete
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

## I. ANTECEDENTES

### 1.1 Antecedentes botánicos y etnobotánicos de *Cosmos pringlei* Rob. & Fern.

El género *Cosmos* de la familia Asteraceae (tribu Heliantheae, subtribu Coreopsidinae), es uno de los géneros arvenses con un mayor potencial ornamental, forrajero, alimenticio y medicinal. Este género incluye 33 especies, que se localizan desde el sur de los Estados Unidos hasta Panamá. En México se encuentran presentes todas estas, con excepción de *C. gracilis* y *C. pilosus*, en uno o varios estados de la República. A la fecha sólo en Baja California Norte y Campeche, no se ha descrito la presencia de especies del género (Sherff y Alexander, 1955). Las áreas de mayor diversidad genética y posible centro de origen del género *Cosmos*, corresponden a la región fisiográfica de la vertiente del Pacífico y la zona central de México. El género muestra una amplia adaptación a diversas condiciones climáticas y de altitud; prueba de ello es el hecho que cuando fué llevada de México a otros países, cambió su aspecto silvestre de plantas de más de un metro de altura, con flores pequeñas color magenta, carmesí o blanco; por plantas pequeñas con flores grandes, numerosas y con una gama mayor de colores (Ayala, 1997).

En el Cuadro I se enlistan las especies más conocidas en nuestro país (Martínez, 1979). Cabe resaltar que la especie *C. juxtlahuacensis* es de reciente descubrimiento (Panero y Villaseñor, 1996). *C. bipinnatus* es una de las especies más utilizada como ornamental (Starman *et al.*, 1995); mientras que el cocimiento de las flores de *C. sulphureus* se utiliza ampliamente para combatir los efectos del piquete de alacrán (Martínez, 1989).

Cuadro 1. Localización en México y nombres vulgares de algunas especies del género *Cosmos*.

ESPECIE	LOCALIZACION	NOMBRE VULGAR
<i>C. bipinnatus</i>	Hidalgo	Mirasol
	Michoacán.	Xaricamata
	Nayarit	Huaabe
<i>C. caudatus</i>	Chiapas	Cambray
	Yucatán	Chak-xul
<i>C. crithmifolius</i>	Sonora	Bavisa
<i>C. juxtlahuacensis</i>	Oaxaca	-----
<i>C. pringlei</i>	Chihuahua	Bavisa
<i>C. purpureus</i>	Morelos	Mirasol rojo
<i>C. sulphureus</i>	Guerrero	Sochipal
	Jalisco	Mirasol amarillo
	Michoacán	Ximula
	Morelos	Mirasol amarillo
	Puebla	Axal-xóchitl

*Cosmos pringlei* (Fig. 1) es una planta herbácea perenne, endémica de la Sierra de Chihuahua. Los individuos de esta especie miden de 60 a 90 cm de altura, tienen hojas opuestas, pinatífidas, con los segmentos lineares de 5-6 cm de largo por unos 5 mm de ancho, flores en cabezuelas de 6 cm rosadas, solitarias con muy largo pedúnculo. Generalmente la planta crece como hierba en bosques de encino o de pino, a una altitud de 2000- 2500 m; su floración ocurre en el período de julio-septiembre (Martinez, 1979; Sherff y Alexander, 1955).

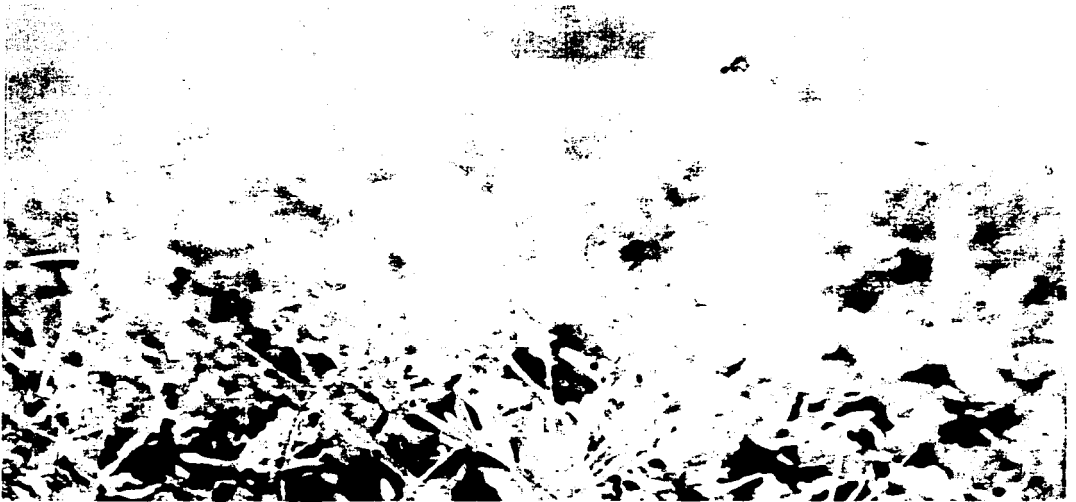


Figura 1. *Cosmos pringlei* (Bye, 1996).

Los indios tarahumaras reconocen esta planta con el nombre de "bavisa", y emplean la decocción de la raíz para el tratamiento de la úlcera gástrica (tomada como té) y de las hemorroides (aplicada en lavados), (Bye, 1996).

### **1.2 Estudios químicos sobre el género *Cosmos***

Hasta ahora la investigación fitoquímica del género *Cosmos* se ha dirigido predominantemente hacia las especies *C. bipinnatus*, *C. sulphureus* y *C. caudatus*.

Los metabolitos secundarios aislados y caracterizados en estos estudios incluyen:

\*Fenilpropanoides

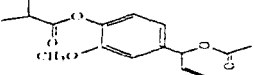
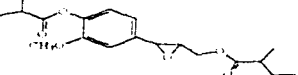
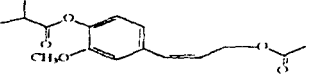
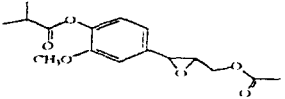
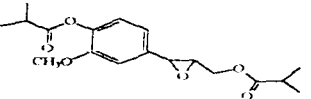
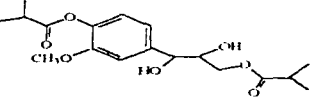
\*Polienos y poliacetilenos

\*Secotriterpenoides

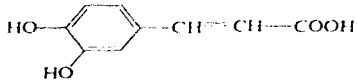
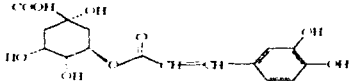
\*Flavonoides de los siguientes tipos: flavonas, flavononas, flavonoles, antocianinas, chalconas y auronas.

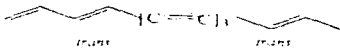
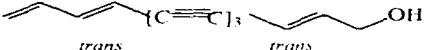
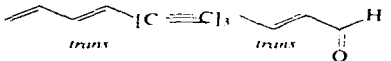
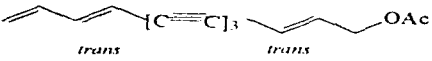
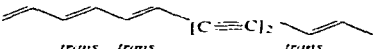
En el Cuadro 2 se ilustran las estructuras de los compuestos que hasta el momento se han aislado y caracterizado de las distintas especies de *Cosmos* estudiadas desde el punto de vista químico.

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

ESPECIE	FENILPROPANOIDES COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. caudatus</i>	 <p>1'-acetoxi-4-O-isobutiril eugenol (1)</p>	Fuzzati <i>et al.</i> , 1995
	 <p>alcohol 1'2'-epoxi-4-O-isobutiril-3'-(2-metilbutiril) coniferilico (2)</p>	
	 <p>alcohol 3'-O-acetil-4-O-isobutiril coniferilico (3)</p>	
	 <p>alcohol 1,2'-epoxi-3'-O-acetil-4-O-isobutiril coniferilico (4)</p>	
	 <p>alcohol 1',2'-epoxi-3',4-di-O-isobutirilconiferilico (5)</p>	
	 <p>alcohol 1',2'-dihidroxi-3',4-O-isobutiril coniferilico (6)</p>	

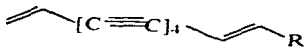
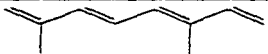
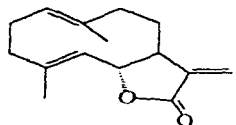
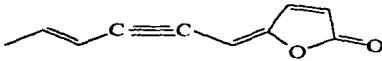
Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados del género *Cosmos* (Continuación)

FENILPROPANOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. bipinnatus</i>	 <p>Acido cafeico (7)</p>	Saito, 1979.
	 <p>Acido clorogénico (8)</p>	

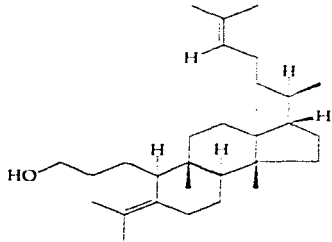
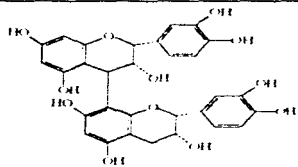
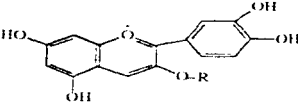
POLIENOS Y COMPUESTOS ACETILENICOS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. hybridus</i>	 <p>1,3,11-tridecatrien-5,7,9-triino (9)</p>	Bohlmann <i>et al.</i> , 1964
	 <p>2,10,12-tridecatrien-4,6,8-triino-1-ol (10)</p>	
<i>C. sulphureus</i>	 <p>2,10,12-tridecatrien-4,6,8-triino-1-al (11)</p>	
	 <p>13-acetoxy-1,3,11-tridecatrien-5,7,9-triino (12)</p>	
	 <p>1,3,5,11-tridecatetraen-7,9-diino (13)</p>	



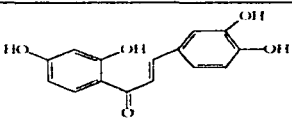

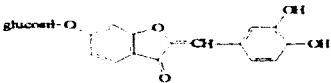
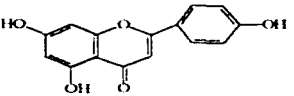
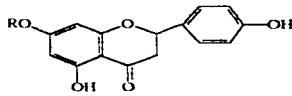
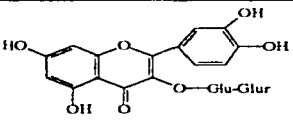
Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados del género *Cosmos* (Continuación)

POLIENOS Y COMPUESTOS ACETILENICOS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. sulphureus</i>	1-acetoxi-8,10,14,16- octadecatetraen-12-in-3-oxo. (14)	Bohlmann <i>et al.</i> , 1966
<i>C. diversifolius</i>	 R CH3 1,11-tridecadien-3,5,7,9-tetraeno. (15) CHO 2,12-tridecadien-4,6,8,10-tetraen-1-al. (16) CH2-OAc 1-acetoxi-2,12 tridecadien-4,6,8,10- tetraenilo. (17) CH2-OH 2,12-tridecadien-4,6,8,10-tetraen-1-ol (18)	Bohlman <i>et al.</i> , 1964
<i>C. bipinnatus</i> <i>C. caudatus</i>	 2,6-dimetil-1,3,5,7-octetraeno. (19)	Bohlman <i>et al.</i> , 1964
<i>C. sulphureus</i>	 Costunólida (20)   Matricarialactona (21)	Bohlmann <i>et al.</i> , 1964

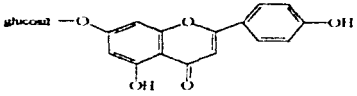
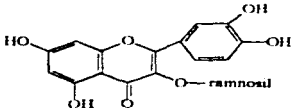
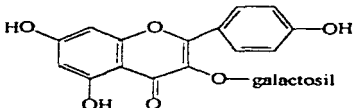
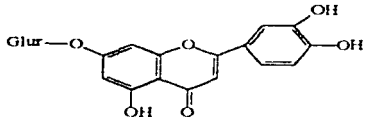
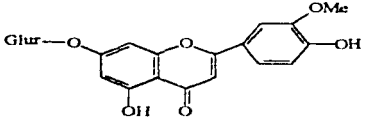
Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados del género *Cosmos* (Continuación)

TRITERPENOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. bipinnatus</i>	 <p>Helianol (22)</p>	Akihisa <i>et al.</i> , 1996
FLAVONOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. bipinnatus</i>	 <p>Procianidina (23)</p>	Bate-Smith, 1980
<i>C. sulphureus</i> <i>C. caudatus</i>	 <p>R= rutinosil 3-rutinosil-cianidina (24) R= glucosil 3β-D-glucopiranosil-cianidina (25)</p>	Samata <i>et al.</i> , 1977

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

FLAVONOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. sulphureus</i> <i>C. bipinnatus</i>	 <p style="text-align: center;"><b>Buteína. (26)</b></p>	Geissman, 1941 Bohm, 1975
<i>C. sulphureus</i> <i>C. bipinnatus</i>	 <p style="text-align: center;"><b>Corepsina. (27)</b></p>  <p style="text-align: center;"><b>Sulfureina. (28)</b></p>	Shimokoriyama y Geissman, 1960 Bohm, 1975
<i>C. bipinnatus</i>	 <p style="text-align: center;"><b>Apigenina (29)</b></p>  <p style="text-align: center;">R= H            <b>Naringenina (30)</b> R= glucosil    <b>Prunina (31)</b></p>	Chabannes y Pacheco, 1971
<i>C. bipinnatus</i>	 <p style="text-align: center;"><b>Quercetina-3- glucoglucurónido (32)</b></p>	Nakaoki <i>et al.</i> , 1961

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

FLAVONOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>C. bipinnatus</i>	 <p>Apigenina 7-O-glucósido. (33)</p>	Kaneta <i>et al.</i> , 1978
	 <p>Quercetina-3-ramnósido. (34)</p>	
<i>C. bipinnatus</i>	 <p>Trifolina. (35)</p>	Saito, 1974
	 <p>Luteolina-7-glucurónido. (36)</p>	
<i>C. bipinnatus</i>	 <p>Crisoeriol-7-glucurónido. (37)</p>	Saito, 1976

### 1.3 Potencial de las lactonas sesquiterpénicas como agentes herbicidas.

Los **pesticidas** son agentes químicos ó biológicos con la capacidad de controlar o eliminar aquellas plantas o animales que son perjudiciales a la salud o economía humanas. Estos agentes han jugado un papel importante en el incremento de la productividad agrícola de las últimas décadas por contribuir a la erradicación de las plagas que afectan a los cultivos económicamente importantes (Manno, 1991).

Los agentes pesticidas se clasifican con base en varios criterios y los más importantes son los siguientes: su estructura química, el modo de acción, el método de aplicación, la toxicidad y el uso en el control de una plaga específica. Este último criterio, es el más utilizado para clasificar a los agentes pesticidas (ver Cuadro 3) (Frear, 1948).

Los pesticidas como su nombre lo indica (del latín *pestis* y *caedo*, que significa: asesino de plagas), son capaces de inducir efectos tóxicos irreversibles en los sistemas biológicos indeseables. Desafortunadamente a veces la toxicidad de estos agentes no es selectiva, y pueden provocar efectos adversos en humanos u otras especies expuestas a ellos (Manno, 1991). Además, el uso de los pesticidas *per se* puede producir fenómenos indeseables a nivel ecológico como: el surgimiento de plagas secundarias, toxicidad por bioconcentración y resistencia en las especies que se pretende atacar (Arnold, 1992).

La producción y uso de los **herbicidas** se ha incrementado más rápido que para cualquier otro tipo de pesticidas.

Se estima que cerca de 250 especies vegetales de importancia económica padecen de algún problema ocasionado por malezas (Holm *et al.*, 1977), y que aproximadamente 75 especies de malezas son las responsables del 90% de las

pérdidas en los cultivos principales. Las malezas disminuyen la calidad, cantidad y valor económico de los cultivos por competir por espacio, luz, agua y nutrientes; por ello, los herbicidas son y seguirán siendo un medio indispensable para el control de las plantas dañinas.

Cuadro 3. Clasificación de los pesticidas en función de su uso.

USO	TIPO DE PESTICIDA
Control de insectos	1. Insecticidas (venenos estomacales, venenos de contacto y fumigantes)
	2. Atrayentes
	3. Repelentes
	4. Sustancias auxiliares
Control de hongos	1. Fungicidas (erradicantes y protectores)
	2. Fungistático
Control de malezas	Herbicidas
Control de roedores, moluscos y nemátodos.	1. Rodenticidas
	2. Molusquicidas
	3. Nematicidas

Los herbicidas pueden clasificarse en función de los siguientes criterios: su estructura química, su selectividad, la naturaleza de su acción (de contacto o de traslocación de floema), la región de aplicación (en suelo o en follaje), y su etapa de aplicación (de pre-siembra, pre-emergentes o post-emergentes).

Las características ideales que debe poseer un herbicida para tener éxito comercial son: a) controlar un amplio espectro de malezas en pocas

aplicaciones, b) poseer una actividad sistémica pre y post-emergente, c) no ser tóxico a los cultivos, d) tener un período de persistencia corto y e) generar los mínimos efectos ambientales y toxicológicos (Roberts, 1987).

La mayoría de los herbicidas sintéticos son peligrosos, debido a sus altos índices de persistencia en el ambiente y a su toxicidad inespecífica; aún más, muchos de ellos poseen actividad carcinogénica y mutagénica (Duke, 1988a; Epstein *et al.*, 1967).

Otro de los problemas que ocasiona el uso recurrente de los herbicidas sintéticos, es la inducción de problemas de resistencia, lo cual cobra mayor relevancia en herbicidas con múltiples mecanismos de acción, pues se genera el fenómeno de multiresistencia (LeBaron, 1991).

En la búsqueda de nuevos herbicidas naturales, una estrategia eficiente es el "screening" (rastreo) de los compuestos que participan en las interacciones planta-planta (agentes alelopáticos). Este tipo de compuestos semioquímicos pueden contribuir al desarrollo de herbicidas, con la ventaja de ser menos tóxicos para aquellos organismos que no se quiera dañar, además de tener un menor tiempo de permanencia en el ambiente (Macías, 1995). Por otro lado, mientras que los herbicidas comerciales tienen sitios moleculares de acción ya conocidos, las fitotoxinas muestran sitios de acción únicos y diferentes a estos. Así es como se ha llegado a considerar que los miles de compuestos secundarios producidos por las plantas, proporcionan una gran diversidad de estructuras químicas que ofrecen oportunidades para el desarrollo de nuevos herbicidas, estimulantes o reguladores del crecimiento (Duke y Abbas, 1995; Duke, 1991).

Existen varias revisiones sobre el uso potencial de los aleloquímicos vegetales como posibles agentes herbicidas (Putnam, 1988; Vaughn, 1988). Su uso potencial se discute sobre las bases de su *estabilidad en el suelo* (algunos de los productos de degradación son más activos que sus precursores, particularmente las fitotoxinas), la *seguridad ambiental* (biodegradabilidad), el *sitio de acción* (el conocimiento de los sitios potenciales de acción herbicida es el comienzo para el diseño bioracional de herbicidas), la *accesibilidad* (el conocimiento de la localización de los principios activos dentro de la planta podría ser crucial para determinar las posibilidades reales de sus aplicaciones prácticas en la agricultura) y el *nivel de actividad* (para tener éxito, las fitotoxinas naturales deben ser activas a bajas concentraciones en comparación con los herbicidas sintéticos).

El intervalo de concentración de prueba para la actividad aleloquímica es de  $10^{-4}$  a  $10^{-9}$  M, o bien de 0.1 a  $10^4$  ppm; y se consideran como buenos candidatos para el desarrollo de agentes herbicidas, aquellos que presentan una actividad inhibitoria del crecimiento vegetal en un intervalo de 10 a  $10^3$  ppm, o bien de  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$  M (Macias, 1995).

Mediante el análisis de la Fig.2, en la que se indica la actividad fitotóxica de los diferentes tipos de aleloquímicos aislados de plantas superiores, se puede establecer que los aleloquímicos naturales más potentes son los terpenoides (monoterpenoides, sesquiterpenoides, incluyendo las lactonas sesquiterpénicas y los triterpenoides). Estos productos presentan una actividad fitotóxica en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.25 y  $10^5$  ppm. Ejemplos selectos de terpenoides con una potente fitotoxicidad son los siguientes:



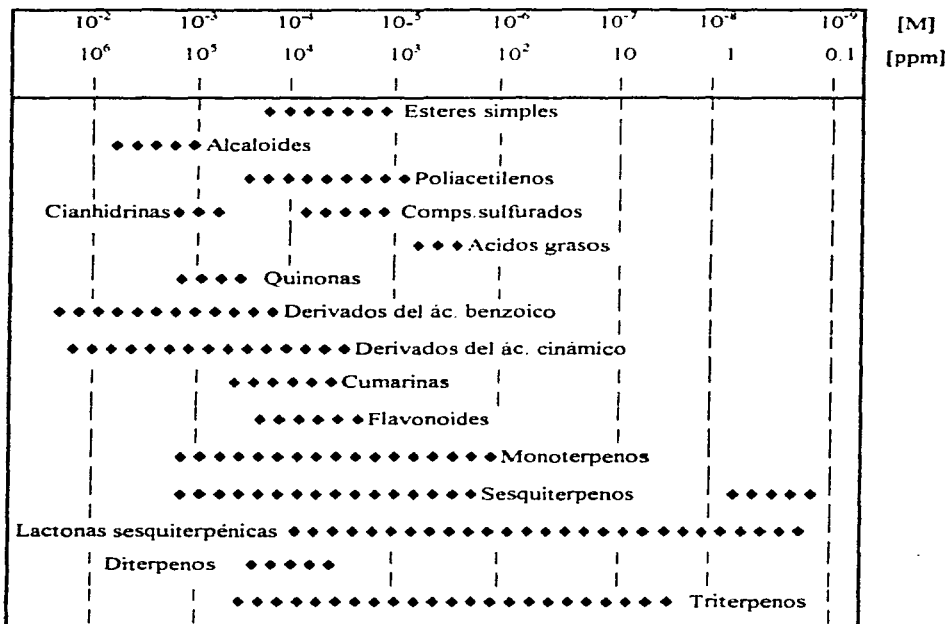


Figura 2. Rango de bioactividad de los agentes alelopáticos vegetales (Macías, 1995).

- Los *derivados monoterpénicos* alcanfor, pulegona y 1,8-cineol (Fig. 3). Este último compuesto es producido por varias especies vegetales, y constituye una de las primeras y más potentes fitotoxinas estudiadas. Su derivado semisintético, el cinmetilino (Fig.3) se encuentra bajo desarrollo como un herbicida comercial (Grayson *et al.*, 1987), ya que ha demostrado una baja

toxicidad para mamíferos y una baja persistencia en el ambiente. En esta misma categoría de derivados, se encuentra el camfeno (Fig.3), fitotoxina relativamente débil, y cuando es polihalogenada, dá origen al toxafeno, el cual presenta una doble actividad: insecticida y herbicida; pero que ha sido retirado del mercado por razones toxicológicas (Duke, 1991).

- Las lactonas sesquiterpénicas son generalmente más fitotóxicas que otros sesquiterpenoides (Duke, 1991), y sobre las mismas profundizaremos más adelante. Sin embargo cabe mencionar que entre ellas se han destacado por su elevado potencial fitotóxico la artemisinina (52) y la vernolepina (43) (Duke *et al.*, 1987; Sequeira *et al.*, 1968). Además la dihidropartenólida (40) ha demostrado una actividad fitotóxica comparable a la del estrigol (Fig.3) contra ciertas malezas parásitas (*Striga sp*) (Fischer *et al.*, 1989b).

De tal forma que, en el estudio de los metabolitos secundarios con una actividad alelopática elevada, destaca la investigación de las **lactonas sesquiterpénicas**.

Las lactonas sesquiterpénicas son metabolitos secundarios de origen mevalónico. Se encuentran distribuidas en 15 familias de plantas, predominantemente en la Asteraceae. De las 13 tribus que conforman a esta familia, solo en cuatro (Asterea, Arctoteae, Calenduleae y Mutiseae) no se ha demostrado la existencia de estos metabolitos secundarios (Swain y Williams, 1977), los cuales representan uno de los grupos más grandes de productos naturales, incluyendo aproximadamente unos 3500 compuestos.

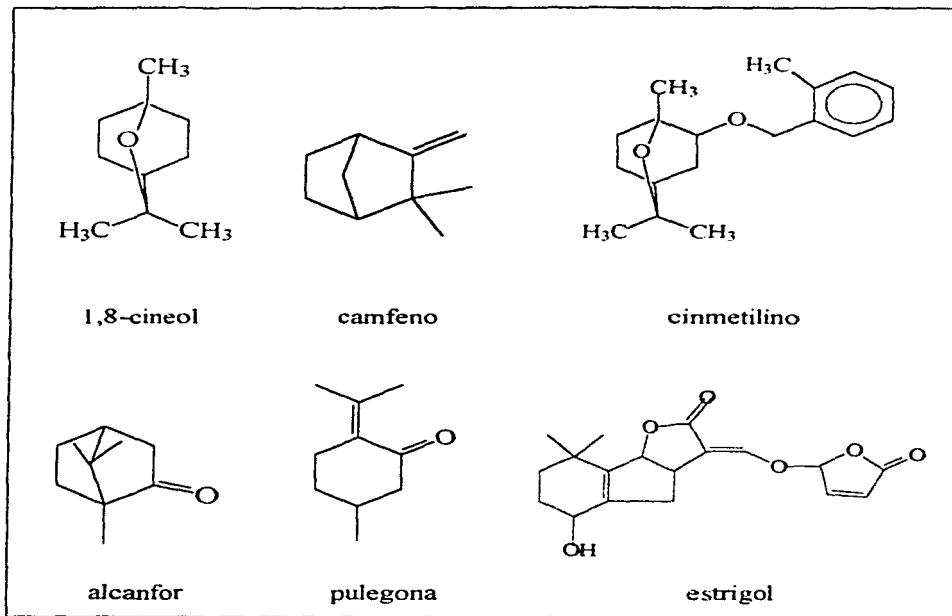


Figura 3. Estructura de algunos terpenoides fitotóxicos.

La biogénesis de los diferentes tipos de lactonas sesquiterpénicas se representa de manera general en la Fig.4 (Fischer, 1986).

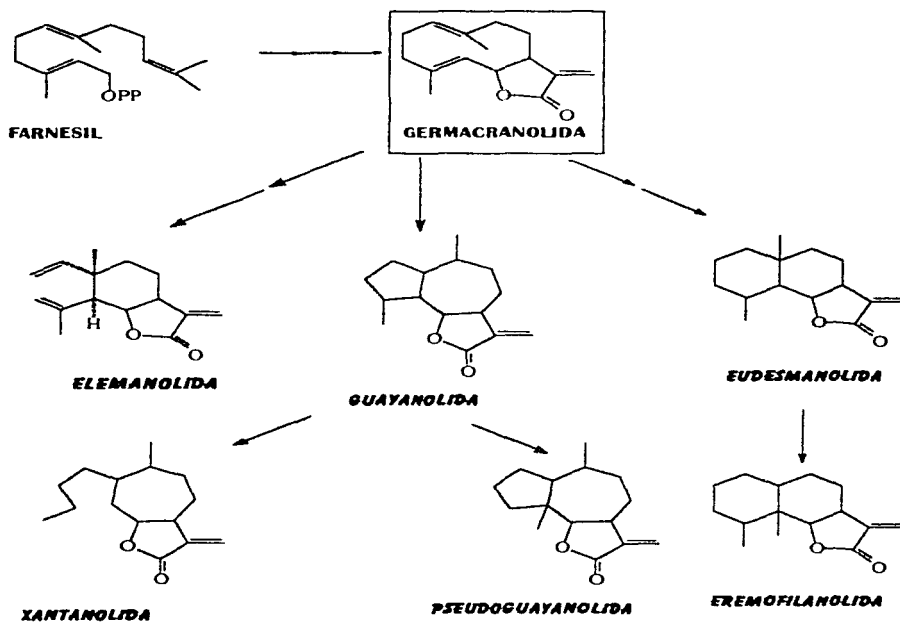


Figura 4. Biogénesis de los tipos de lactonas sesquiterpénicas (Fischer, 1986).

El grupo funcional más común de la mayoría de las lactonas sesquiterpénicas de origen natural es la  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona. Sin embargo, estos compuestos pueden presentar también grupos aldehídos y cetónicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, ésteres y epóxidos, entre otros. Todos estos grupos funcionales tienen propiedades alquilantes (Fig.5), pues son receptores potentes para nucleófilos biológicos, en particular para aquellos que poseen grupos tiol, como es el caso de muchas enzimas involucradas en procesos biológicos importantes entre las que destacan la síntesis de DNA y RNA, la síntesis de proteínas, la síntesis de purinas, la glicólisis, el ciclo del ácido cítrico y el transporte de electrones. (Beekman *et al.*, 1997). En consecuencia estos compuestos exhiben un amplio espectro de actividades biológicas que incluyen entre otras:

- Citotoxicidad y propiedades antitumorales (Cassady y Suffnes, 1980).
- Antimicrobiana (Lee *et al.*, 1977).
- Antifúngica (Gören *et al.*, 1990)
- Insecticida (Smith *et al.*, 1983).
- Molusquicida (Marston y Hostettman, 1985).
- Antimalárica (Klayman, 1985).
- Inmunoestimulante (Arlett y Mitchell, 1981).
- Alergénica (Hausen y Spring, 1989).
- Antiulcérica (Yamahara *et al.*, 1985; Yoshikawa *et al.*, 1993).

En relación a los *efectos alelopáticos y fitotóxicos* de las lactonas sesquiterpénicas, hay numerosos estudios que sugieren que estos metabolitos pueden actuar como reguladores del crecimiento vegetal (Gross, 1975; Fischer *et al.*, 1989a; Fischer, 1986; Fischer, 1991; Duke, 1991; Elakovich, 1988).

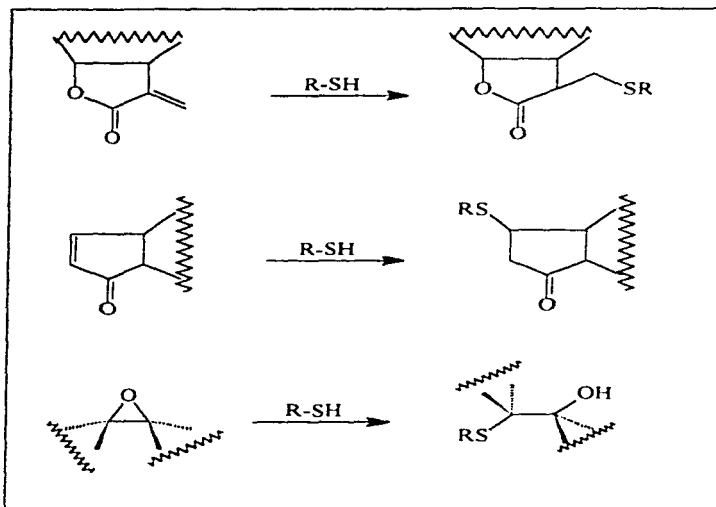


Figura 5. Propiedades alquilantes de las lactonas sesquiterpénicas.

Varias investigaciones han permitido comprobar que algunas lactonas son las responsables de las propiedades alelopáticas de algunas plantas por afectar la germinación y el crecimiento de otras especies (Fischer *et al* 1989a). A la fecha se han publicado algunas revisiones entre las que destacan las de Fischer (1986,1991), Picman (1986a) y Elakovich (1988). En el Cuadro 4 se resumen las actividades demostradas por algunas lactonas sesquiterpénicas sobre el crecimiento y la germinación de plantas cultivadas y malezas; en el Cuadro 4a se enlistan las estructuras correspondientes.

Cuadro 4. Efectos alelopáticos de algunas lactonas sesquiterpénicas.

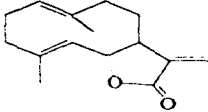
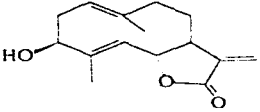
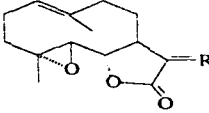
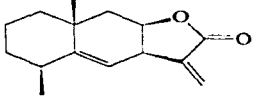
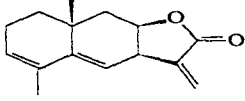
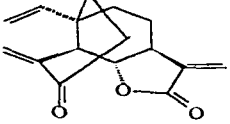
LACTONA SESQUITERPENICA	EFFECTO DEMOSTRADO	REFERENCIA
Costunólida (20)	Promueve la germinación de sorgo, pepino y zanahoria, pero inhibe la del trigo, el centeno bállico y <i>Amaranthus palmeri</i> a concentraciones entre 50 y 100 $\mu$ M.	Fischer y Quijano, 1985.
Costunólida (20)	Promueve la formación de raíces en <i>Phaseolus aureus</i> a concentraciones de 15-20 ppm.	Kalsi <i>et al.</i> , 1983.
Costunólida (20) Partenólida (39) Dihidropartenólida (40)	Causan del 40 al 65% de estimulación de la germinación de <i>Striga asiatica</i> a concentraciones entre $10^{-5}$ y $10^{-9}$ M.	Fischer <i>et al.</i> , 1990.
3 $\beta$ -hidroxycostunólida (38)	Inhibe la germinación y el crecimiento radicular de plántulas de arroz a concentraciones entre 100 y 200 $\mu$ g/ml.	Asakawa, 1984.
Alantolactona (41)	Inhibió la germinación, crecimiento y respiración de <i>Phaseolus mungo</i> .	Dalvi <i>et al.</i> , 1971.
Isoalantodieno (42)	A 20 $\mu$ g/ml causó un incremento de seis veces la iniciación de la formación de raíces adventicias en hipocótilos de <i>Vigna radiata</i> . A 40 $\mu$ g/ml se triplicó la actividad de la nitrato reductasa en cortes de plántulas de <i>V. radiata</i> .	Kalsi <i>et al.</i> , 1989.
Vernolepina (43)	Inhibe el crecimiento de secciones de coleoptilos de avena, pero no tiene efecto sobre su respiración.	Sequeria <i>et al.</i> , 1968.
Partenina (44) Confertiflorina (45)	Incrementan significativamente la germinación de la <i>Striga asiatica</i> , planta parásita de raíces de plantas comestibles, a concentraciones de $10^{-1}$ M.	Fischer <i>et al.</i> , 1989b.

Cuadro 4. Efectos alelopáticos de algunas lactonas sesquiterpénicas (continuación).

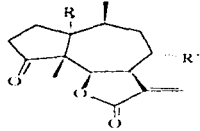
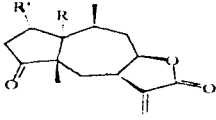
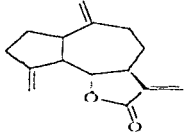
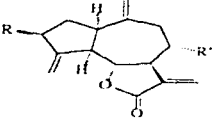
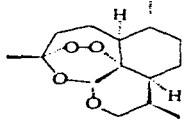
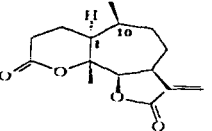
LACTONA SESQUITERPENICA	EFFECTO DEMOSTRADO	REFERENCIA
Peruvina (46)	Inhibe el crecimiento de vástagos de arroz y la germinación de lechuga a concentraciones de 250 ppm.	Watanabe <i>et al.</i> , 1981.
Peruvina (46) Burrodina (47)	Promueven significativamente la germinación de <i>Striga asiatica</i> a concentraciones de $10^{-4}$ y $10^{-6}$ M. A concentraciones de $10^{-7}$ y $10^{-9}$ M no se observa efecto; en contraste sus dihidroderivados mostraron una actividad significativa a $10^{-9}$ M.	Fischer <i>et al.</i> , 1990.
Deshidrocostus lactona (48)	Promueve la formación de raíces de <i>Phaseolus aureus</i> y de <i>Vigna radiata</i> a 25 ppm. Inhibe el % de germinación, el % longitud de tallo y raíz de <i>Lactuca sativa</i> a concentraciones de $10^{-4}$ M.	Kalsi <i>et al.</i> , 1977. Talwar <i>et al.</i> , 1992. Macias <i>et al.</i> , 1992.
Zaluzanina C (49) Zaluzanina D (50) 8 $\alpha$ -Acetoxizaluzanina D (51)	A 100 $\mu$ g/ml la zaluzanina C y a 50 $\mu$ g/ml la zaluzanina D inhibieron totalmente la germinación y el crecimiento del arroz. A 50 $\mu$ g/ml la 8 $\alpha$ -acetoxizaluzanina D presentó los mismos efectos.	Asakawa <i>et al.</i> , 1981.
Artemisinina (52)	Inhibe la germinación y reduce el crecimiento de raíces y brotes de lechuga. Además afecta a otras malezas y plantas cultivadas. Se demostró que es una fitotoxina selectiva que reduce el crecimiento por un mecanismo diferente a la inhibición de síntesis de proteínas.	Duke <i>et al.</i> , 1987. Duke <i>et al.</i> , 1988h.
Psilostachina C (53) Psilostachina B (54)	Inhiben la germinación y crecimiento de varias especies asociadas, a 250 ppm. Además fueron autoinhibitorias.	Del Amo y Anaya, 1978.



Cuadro 4a. Ejemplos selectos de lactonas sesquiterpénicas con actividad alelopática demostrada.

	(20) Costunólida.
	(38) 3β-hidroxicostunólida.
	(39) Partenólida, R= CH <sub>2</sub> . (40) 11βH, 13-Dihidropartenólida R=11βH, 11 α Me.
	(41) Alantolactona.
	(42) Isoalantodieno.
	(43) Vernolepina.

Cuadro 4a. Ejemplos selectos de lactonas sesquiterpénicas con actividad alelopática demostrada (continuación).

 <p>The structure shows a sesquiterpene lactone core with a five-membered lactone ring fused to a seven-membered ring, which is further fused to a five-membered ring. Substituents include a methyl group, a double bond, and R and R' groups.</p>	<p>(44) Partenina, R= OH, R'=H, doble lig. 2-3.</p> <p>(45) Confertiflorina, R=H, R'=OAc.</p>
 <p>The structure is similar to the first row but with a different arrangement of substituents, including a methyl group, a double bond, and R and R' groups.</p>	<p>(46) Peruvina, R=OH, R'=H.</p> <p>(47) Burrodina, R=H, R'=OH.</p>
 <p>The structure shows a sesquiterpene lactone core with a five-membered lactone ring fused to a seven-membered ring, which is further fused to a five-membered ring. It features a methyl group, a double bond, and a carbonyl group.</p>	<p>(48) Deshidrocostus lactona</p>
 <p>The structure shows a sesquiterpene lactone core with a five-membered lactone ring fused to a seven-membered ring, which is further fused to a five-membered ring. It features a methyl group, a double bond, and R and R' groups.</p>	<p>(49) Zaluzanina C, R=OH, R'=H.</p> <p>(50) Zaluzanina D, R=OAc, R'=H.</p> <p>(51) 8α-Acetoxizaluzanina D, R=R'=OAc.</p>
 <p>The structure shows a sesquiterpene lactone core with a five-membered lactone ring fused to a seven-membered ring, which is further fused to a five-membered ring. It features a methyl group, a double bond, and a carbonyl group.</p>	<p>(52) Artemisinina.</p>
 <p>The structure shows a sesquiterpene lactone core with a five-membered lactone ring fused to a seven-membered ring, which is further fused to a five-membered ring. It features a methyl group, a double bond, and a carbonyl group.</p>	<p>(53) Psilostachina C.</p> <p>(54) Psilostachina B, doble lig 1-10.</p>

Se tiene poco conocimiento sobre los mecanismos mediante los cuales las lactonas sesquiterpénicas ejercen su efecto fitotóxico. La artemisinina (52) es una de las lactonas sesquiterpénicas que ha sido estudiada de manera exhaustiva; no sólo por ser un potente agente antimalárico, sino también por presentar propiedades fitotóxicas sobre varias especies, entre las que se encuentran: *Phaseolus vulgaris* (Chen y Leather, 1990), *Lactuca sativa*, *Amaranthus retroflexus*, *Ipomea lacumosa* y *Portulaca oleracea* (Duke et al., 1987). DiTomaso y Duke, explican la actividad de la artemisinina mediante una aparente inhibición de la síntesis vegetal de putrescina (Duke, 1991).

En ocasiones la actividad inhibidora del crecimiento es acompañada por la estimulación de la respiración, como es el caso de las lactonas sesquiterpénicas de *Artemisia*, las cuales inhiben el crecimiento radicular del pepino, pero incrementan la respiración. De igual manera, la alantolactona (41) e isoalantolactona inhiben el crecimiento de las células de *Chlorella*, pero estimulan su respiración. En otras ocasiones se observa la inhibición tanto del crecimiento, como de la respiración: la alantolactona (41), inhibe la germinación, el crecimiento y la respiración de *Phaseolus mungo*. En este mismo grupo se encuentra la partenina (44), pues inhibe tanto la formación de raíces, como la respiración del maíz y del frijol (Picman, 1988).

Por último, se han descrito casos de lactonas sesquiterpénicas que afectan el crecimiento, sin alterar la respiración; tal es el caso de la vernolepina (43), que inhibe el crecimiento de los coleptilos de avena sin afectar su respiración (Sequeria et al., 1968).

También se ha estudiado el efecto de varias lactonas sesquiterpénicas sobre la fotosíntesis en cloroplastos aislados de espinaca. Entre estas lactonas se encuentran el cacalol, la zaluzanina C (49), la ivalina y la isoalloalantolactona

(Lotina-Hennsen *et al.*, 1991; Calera *et al.*, 1995). Como característica común estos compuestos interfieren con el proceso fotosintético al inhibir el transporte de electrones. Por otro lado el piquerol A inhibe además la transferencia de energía (Mendoza *et al.*, 1994).

Todos estos resultados sugieren un efecto variable de las lactonas sesquiterpénicas sobre la fisiología de las plantas, que depende tanto de la especie como de la lactona evaluada (Picman, 1988). También con estos estudios se ha demostrado que existe una relación de la actividad observada, ya sea inhibidora o estimulante, en función de la concentración de la lactona sesquiterpénica a la que son expuestas las especies de estudio.

El potencial alelopático de las lactonas sesquiterpénicas se relaciona con dos factores estructurales: **a)** la presencia de ciertos grupos funcionales alquilantes (donde la  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona juega un papel importante) y **b)** la conformación de la molécula. Este último determina la accesibilidad para la reacción de alquilación (Macías *et al.*, 1992).

Algunas lactonas con actividad específica sobre malezas, podrían ser usadas como agentes herbicidas, ayudando así a la resolución de los problemas agrícolas que muchas de estas especies generan. (Picman, 1988; Macías, 1995; Duke y Abbas, 1995; Rice, 1984; Einhellig y Leather, 1988).

## II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

El uso de herbicidas sintéticos ha sido una herramienta eficiente en el control de especies de malezas que afectan a los cultivos económicamente importantes. Sin embargo, estos han producido daños enormes e irreversibles al ecosistema debidos a su toxicidad y altos índices de persistencia; además, han inducido un gran número de especies resistentes (Duke, 1988a; Cremlyn, 1991; Epstein *et al.*, 1967). En consecuencia, el interés por la búsqueda de nuevos herbicidas naturales se ha incrementado recientemente.

En este sentido, el reino vegetal constituye una fuente muy valiosa en la búsqueda de agentes herbicidas; ya que las plantas han desarrollado ciertos mecanismos de protección, entre los que se incluyen la biosíntesis de metabolitos secundarios que intervienen en las interacciones planta-planta (**aleloquímicos**). Estos agentes semioquímicos pueden constituir la base o los prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos herbicidas con un menor grado de toxicidad para el hombre y otros animales, que sean biodegradables, con un mecanismo de acción más específico y efectivos a bajas concentraciones (Macías, 1995; Benner, 1993; Rodgers, 1993).

Entre los agentes herbicidas derivados de materias primas vegetales, se encuentran el cineol y su derivado semisintético el cinmetilino, el cual ha sido seleccionado como candidato para su desarrollo como herbicida comercial por la compañía Du Pont (Worsham, 1989; Duke, 1991; Grayson *et al.*, 1987).

La biodiversidad en México constituye un reservorio invaluable de materias primas para el descubrimiento de productos naturales útiles para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas. Desafortunadamente la gran mayoría de estas

plantas no ha sido objeto de estudios sistemáticos que permitan la caracterización de sus principios activos. Es por ello que se inició un proyecto de naturaleza multidisciplinaria que busca primordialmente determinar el potencial alelopático de diversas especies de la flora mexicana con importancia ecológica y/o medicinal con el fin de obtener aleloquímicos susceptibles de utilizarse como agentes herbicidas.

Con base en los antecedentes presentados, el presente trabajo tiene como **objetivo general:**

◆ Establecer la potencialidad herbicida del extracto y de los productos aislados de *Cosmos pringlei*, con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes herbicidas, que presenten ventajas en cuanto a especificidad de su acción, menor tiempo de persistencia ambiental, disminuyendo así la acción contaminante y que no presenten acciones tóxicas contra el hombre u otros animales.

Para el cumplimiento del objetivo general se plantearon los siguientes **objetivos específicos:**

1. Determinar la potencialidad fitotóxica del extracto total de *Cosmos pringlei*, evaluando su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*, así como en la producción de biomasa en plántulas jóvenes de estas especies.
2. Determinar la toxicidad el extracto contra el crustáceo *A. salina* , con la finalidad de detectar actividades biológicas más complejas, que escapan del objetivo primordial del presente proyecto.

3. Obtener los principios activos mediante un proceso fitoquímico biodirigido, monitoreando el estudio a través de la determinación de la actividad fitotóxica y la toxicidad contra *A. salina*.
4. Caracterizar los compuestos aislados mediante el empleo de métodos espectroscópicos y espectrométricos.
5. Realizar las evaluaciones biológicas secundarias de los compuestos puros aislados.
6. Evaluar el efecto de los compuestos fitotóxicos sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca, con la finalidad de explorar en forma más detallada el potencial herbicida de los mismos.
7. Contribuir al conocimiento de la flora medicinal mexicana mediante el establecimiento del contenido metabólico secundario y de la potencialidad biológica de la especie *Cosmos pringlei*.
8. Fomentar la investigación multidisciplinaria de las plantas medicinales.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Material Vegetal.

El material vegetal (raíz) utilizado en el presente estudio fue recolectado en la región El Alamillo, en el Municipio de Guerrero, estado de Chihuahua, el 8 de Octubre de 1996. La identificación de la especie estuvo a cargo del Dr. Robert Bye, (Instituto de Biología, UNAM). Un ejemplar de referencia (Voucher: Bye 21336) 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 Análisis cromatográficos.

Los análisis cualitativos en capa fina se realizaron en placas de aluminio con un espesor de 0.25mm (Silica gel 60 F<sub>254</sub> Merck). Para la realización de las cromatografías preparativas se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cm recubiertas de gel de sílice, de 2 ó 0.25 mm de espesor (Silica gel 60 F<sub>254</sub> Merck). En ambos casos se utilizaron diversos sistemas de elución y agentes cromógenos, los cuales se resumen en los Cuadros 5 y 6, respectivamente.

Los análisis en columna abierta se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, en columnas de vidrio empacadas con gel de sílice Merck 60, gránulos de 0.2-0.5mm, malla 3.5 a 7.0 ASTM.

El aislamiento y la purificación de los productos (59) y (60) se realizó mediante el empleo de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), en un



equipo Waters integrado a una bomba modelo 600 y a un detector de arreglo de fotodiodo 996. Se empleó una columna preparativa de fase reversa (Nova-Pak HRC<sub>18</sub>, 19X300 mm, diámetro de partícula de 6 µm.).

Cuadro 5. Sistemas de elución utilizados en los análisis cualitativos en capa fina.

SISTEMA DE ELUYENTES	COMPOSICION	PROPORCION
A	Hexano-CHCl <sub>3</sub>	Diversas
B	Hexano-AcOEt	Diversas
C	CHCl <sub>3</sub>	Diversas
D	CHCl <sub>3</sub> -AcOEt	Diversas
E	CHCl <sub>3</sub> -MeOH	Diversas
F	AcOEt	Diversas
G	AcOEt-MeOH	Diversas
H	Acetona	Diversas
I	Acetona-H <sub>2</sub> O	9:1
J	CHCl <sub>3</sub> -MeOH-H <sub>2</sub> O	60:13:1

Cuadro 6. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos.

REACTIVO	COMPOSICION	REFERENCIA
Sulfato cérico	12.0 g de sulfato cérico 22.2 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. 350 g de hielo picado.	Lowery, 1993
Anisaldehido	0.5 ml de anisaldehido 9 ml de EtOH 0.5 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. 1 ml de ác. acético.	Touchstone, 1992

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

### **3.3 Caracterización de los productos naturales.**

De manera general, la caracterización de los productos aislados se realizó mediante la determinación de sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

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

Los espectros de IR fueron registrados en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599-B o en un aparato Nicolet FT-5X, en pastilla de KBr o en película.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-<sup>1</sup>H) y de Carbono-13 (RMN-<sup>13</sup>C), se generaron en aparatos Varian Unity Plus 300 o Varian Unity Plus 500. En el primer caso se operó con una frecuencia de 300 (<sup>1</sup>H) ó 75 (<sup>13</sup>C) MHz, y en el segundo se operó con una frecuencia de 500 ó 125 MHz. Los espectros se obtuvieron en CDCl<sub>3</sub>, y los desplazamientos químicos se asignaron en unidades δ (ppm) referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Se utilizaron secuencias de pulso estándares Varian para el registro de los espectros de RMN bidimensional homonuclear (COSY) y heteronuclear (HETCOR).

Los espectros de masas se determinaron en un aparato Hewlet-Packard 5890-B mediante la introducción directa a 70 eV.

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro digital JASCO DIP 360.

Todos los análisis arriba indicados se efectuaron en el Instituto de Química de la UNAM.

Los análisis mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), se realizaron en un cromatógrafo de gases HP acoplado a un espectrómetro de masas de geometría inversa, modelo Jeol JMS-SX 102 A, mediante la inyección de 1 µl de cada una de las muestras de prueba en una columna capilar HP5 (30 m de largo, 0.32 mm de diámetro interno y 0.25 µm del espesor de la capa. Se utilizó helio como gas acarreador, a una presión manométrica de 0.4 kg/cm<sup>2</sup> y con un flujo de 1 ml/min. La temperatura del inyector se mantuvo en 280 °C, la temperatura de la columna inicial fue de 50°C y se programó para alcanzar una temperatura de 260 °C con un calentamiento gradual de 30 °C/min.

Para los registros de los espectros de masas por impacto electrónico se utilizó un voltaje de 70 eV. Cada uno de los espectros se registró con un barrido de 50 a 800 unidades de masa/carga (m/z) por segundo.

### **3.4 Pruebas biológicas.**

#### **3.4.1 Determinación de la toxicidad para *Artemia salina* Leach.**

Los huevecillos del crustáceo *Artemia salina* se incuban durante 48 horas, en un medio salino artificial, previamente oxigenado. Al término de este tiempo, los crustáceos se encuentran disponibles para realizar el bioensayo.

Las muestras se preparan pesando 20 mg de la sustancia de prueba (extracto, fracción o compuesto puro), y se disuelven en 2 ml del disolvente apropiado. De la solución anterior se transfieren 5, 50 y 500 µl a cada vial y por triplicado; se deja evaporar el disolvente hasta sequedad, ya sea a temperatura ambiente o al vacío.

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

Los frascos viales se mantienen con iluminación artificial durante 24 horas; transcurrido este tiempo se procede a contar el número de crustáceos sobrevivientes. Para el cálculo de la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) se emplea el programa de análisis de probabilidad de Finney. Para que un extracto o fracción se considere activo, la  $CL_{50}$  debe ser menor a 1000  $\mu\text{g/ml}$  y en el caso de un compuesto puro, la  $CL_{50}$  debe ser menor a 200  $\mu\text{g/ml}$  (Anderson *et al.*, 1991).

### **3.4.2 Determinación de la actividad fitotóxica.**

**3.4.2.1. Efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli* del extracto crudo, fracciones y productos derivados de *C. pringlei*.**

#### **3.4.2.1.1. Método de caja de Petri**

La valoración de la actividad fitoinhibidora de los extractos y compuestos puros se realizó midiendo el efecto sobre el crecimiento radicular de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae) y *Echinochloa crusgalli* (Gramineae).

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri (Anaya *et al.*, 1990) de 10 cm de diámetro interno. Para cada una de las muestras de prueba se prepararon soluciones stock de tal forma que se obtuvieron concentraciones finales de 1000, 100 y 10  $\mu\text{g/ml}$ , 1 ml de cada una de estas soluciones se vertió 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 negativos que contenían únicamente el disolvente y agua; y para el control positivo (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

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 48 horas para *E. crusgalli*. En todos los casos se efectuaron cuatro réplicas.

Los resultados obtenidos, se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA, ( $p < 0.05$ ). Los valores de Concentración Inhibidora Media ( $CI_{50}$ ) se determinan mediante el mismo análisis Probit indicado en el inciso anterior, a partir de los % de inhibición obtenidos en cada caso.

#### **3.4.2.1.2. Método bioautográfico.**

La determinación de la actividad fitotóxica mediante el método bioautográfico se realizó sobre placas cromatográficas de 20 x 5 cm recubiertas con gel de sílice. En cada placa se sembraron 10 mg del extracto; posteriormente se efectuó la elución con el disolvente adecuado. 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 (control de disolvente) se eluyeron en el mismo sistema; mientras que otras dos placas también sin muestra (control blanco), se dejaron sin eluir.

Posteriormente, cada una de las placas cromatográficas (problema, control blanco y control de disolvente) se cubrió completamente con las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. Las placas con las semillas fueron incubadas a 28 °C durante 24 horas (*A. hypochondriacus*) ó 48 horas (*E. crusgalli*) en una atmósfera húmeda. Transcurrido el tiempo de incubación se observó la zona de inhibición y se midió el factor de retención (Rf) correspondiente a la zona de inhibición (Inoue *et al.*,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.

#### **3.4.2.2. Efecto sobre la producción de biomasa de malezas.**

El efecto fitotóxico a nivel de plántulas producido por el extracto y la dehidrocostus lactona (48) se determinó mediante la evaluación de la producción de biomasa de las plántulas de dos especies de malezas: *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. Cabe mencionar que aunque este efecto se ha determinado con metodologías similares ( Picman, 1986b; Picman 1988), no se ha descrito el empleo de estas especies prueba para la realización del bioensayo. La prueba se realizó en vasos desechables (con una capacidad de 200 ml aproximadamente), previamente horadados en la parte inferior, a los cuales se les adicionó tierra hasta llenar su capacidad. Posteriormente se sembraron en cada vaso cuatro semillas de cada una de las especies de prueba, hasta completar 15 vasos por cada muestra (extracto o compuesto puro). Se agregó agua a cada vaso hasta humedecer la superficie; esta operación se llevó a cabo diariamente durante el transcurso del ensayo. Todos los vasos fueron colocados en una cámara de crecimiento a una temperatura constante de 24 °C y un fotoperiodo de 12/12h durante dos semanas. Al término de este tiempo, las

macetas se trasladaron a una cámara de 19 °C en el invernadero, en donde permanecieron durante 1 ó 2 semanas, tiempo en el que se adaptaron a las nuevas condiciones y alcanzaron un desarrollo adecuado para realizar el ensayo.

Las soluciones de prueba se prepararon pesando 10 mg de la muestra (extracto o compuesto puro), los cuales se transfirieron a un matraz aforado de 10 ml, llevando al aforo con una solución de Tween 80 [0.1 ml/l]. De esta manera, la solución inicial tiene una concentración de 1000 µg/ml; a partir de la cual se hicieron diluciones 1:10 y 1:100 para obtener concentraciones de 100 y 10 µg/ml, respectivamente.

Las soluciones de la muestra a 1000, 100 y 10 µg/ml, los controles negativos de disolvente (Tween 80 a 0.1 ml/l) y agua, así como el control positivo (Paraquat a 10<sup>-2</sup> M), se aplicaron homogéneamente en la hojas y tallo de las plántulas. En todos los casos se utilizaron un total de 8 ó 9 plántulas por tratamiento.

A las 24 horas de la aplicación, se observaron las plántulas con intención de registrar los cambios en la apariencia de las mismas (e.g. decoloración de las hojas o clorosis, marchitamiento) en relación con los controles negativos y positivo. Cuando no se observaron cambios considerables, se realizaron aplicaciones adicionales cada tercer día durante una semana. La determinación de la biomasa se realizó al séptimo día después de la primera aplicación; para lo cual fue necesario extraer, limpiar e identificar cada plántula por separado, para posteriormente determinar su peso húmedo. Para determinar el peso seco cada plántula se desecó a 30 °C durante 48 horas.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA, (p<0.05), para establecer si los tratamientos afectaban de manera

significativa la biomasa de las especies de prueba en las condiciones de ensayo utilizadas.

#### **3.4.2.3 Determinación de la actividad inhibidora de la síntesis de ATP.**

La determinación de la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de hojas de espinaca se llevó a cabo en el Laboratorio 115 del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM mediante la metodología descrita por Dilley (1972).

La síntesis de ATP se midió registrando los cambios de pH en el medio de reacción entre 8.0 y 8.1, para lo cual se utilizó un microelectrodo combinado (Orion) y sensible conectado a un potenciómetro (Coming modelo 12) con escala expandida. El voltaje generado por los cambios de pH se transdujo en un registrador gráfico Gilson.

Para llevar a cabo la determinación, a 3 ml del medio de reacción (sorbitol 100 mM,  $MgCl_2$  5 mM, KCl 10mM, tricina 1 mM y MV 50  $\mu$ M, ajustado a pH 8 con KOH) se le adicionó ADP 1 mM,  $K_2HPO_4$  3 mM, el compuesto de prueba en un intervalo de concentraciones de 0 a 200  $\mu$ M y el equivalente a 60  $\mu$ g de clorofila. El cambio de pH en el medio de reacción se determinó después de un período de iluminación de 1 minuto. Como fuente de iluminación se empleó una lámpara de proyector de 250 watts. El haz luminoso se hizo pasar a través de una solución de  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$  al 2% que sirve como filtro de luz y calor (lente de Izawa). El  $H^+$  producido se cuantificó por titulación. Esto último se realizó mediante la adición de 10  $\mu$ l de una solución estándar de KOH 0.01N al medio de reacción, en presencia de cloroplastos sin iluminar (Peña-Valdivia *et al.*, 1991).



La velocidad de síntesis de ATP se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$V = AH/C$$

V= velocidad de la síntesis de ATP ( $\mu\text{Mol}$  de ATP\*  $\text{mg}^{-1}$ \*  $\text{clorofila hr}^{-1}$ ).

A=  $\mu\text{Mol}$  de  $\text{H}^+$  usados en la titulación con KOH / altura de la curva en cm.

H= altura de la curva obtenida en cm en un minuto de iluminación.

C= concentración de la clorofila empleada.

### **3.5 Extracción de la raíz de la planta *Cosmos pringlei*.**

Con la intención de evaluar la potencialidad fitotóxica de la especie *C. pringlei*, se realizó una extracción a pequeña escala a partir de una muestra de 25 g del material vegetal, el cual se extrajo mediante un proceso de maceración durante 72 horas, empleando 100 ml de una mezcla  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1).

La preparación del extracto total se realizó mediante el escalamiento de las condiciones arriba descritas, considerando el peso del material vegetal (3.0 kg).

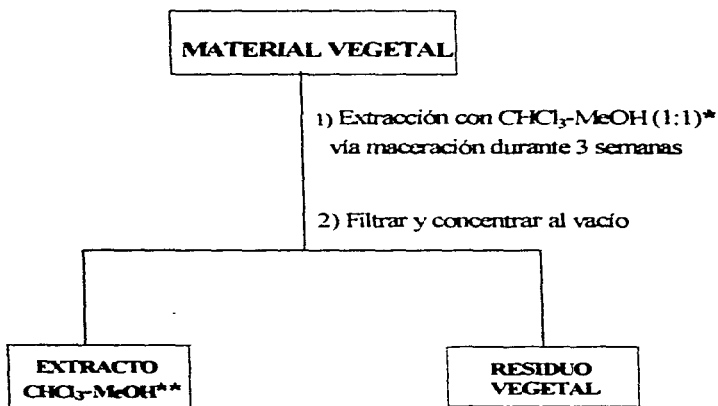
En el Esquema 1 se resume el procedimiento empleado.

### **3.6 Fraccionamiento biodirigido del extracto total**

El extracto total (467.6 g) se fraccionó por medio de una columna cromatográfica de vidrio, empacada con 3.0 Kg de gel de sílice, la cual fue previamente desactivada (10%) con agua destilada.

El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-AcOEt (diferentes proporciones), AcOEt, AcOEt-MeOH (diferentes proporciones) y MeOH. Se recolectaron 239 fracciones de 1 lt cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina y se combinaron aquellas que resultaron similares.

Este proceso generó un total de 16 fracciones primarias. En el Cuadro 7 se resume el fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto total de la raíz de la planta de *C. pringlei*. Cada una de las fracciones obtenidas se evaluó mediante los ensayos descritos en los incisos 3.4.1 y 3.4.2.1.2.



\* Volumen total de CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:1) = 24 lt

\*\* Peso total del extracto = 467.6 g

Esquema 1. Proceso de extracción de la raíz de la planta *Cosmos pringlei*.

Cuadro 7. Fraccionamiento biodirigido del extracto total de *Cosmos pringlei*.

ELUYENTE	PROPORCION	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE	PESO (g)
Hexano	100	1-22	1-7	A *	2.04
Hexano- AcOEt	95:5	23-32	8-23	B	0.14
	90:10	33-65	24-25	C	0.015
	80:20	66-108	26-29	D	12.66
	60:40	109-133	30	E * +	0.36
	40:60	134-152	31-45	F * +	88.91
	20:80	153-163	46-54	G *	2.91
AcOEt	100	164-187	55-64	H +	7.77
AcOEt- MeOH	90:10	188-199	65-75	I * +	4.61
	80:20	200-207	76-90	J *	3.57
	60:40	208-213	91-101	K	5.99
MeOH	100	214-239	102-136	L *	15.15
			137-168	M	7.76
			169-205	N	29.71
			199-201	O	2.41
			206-239	P	217.60

\* Fracciones tóxicas para *A. salina*.

+ Fracciones fitotóxicas.

### **3.7 Aislamiento de la deshidrocostus lactona (48) y de la costunólida (20) de la fracción primaria activa F.**

De la fracción primaria activa F, cristalizaron espontáneamente 45.73 g de un sólido cristalino amorfo incoloro con un punto de fusión de 56-57 °C, que fué identificado como la deshidrocostus lactona (48).

De la misma fracción F, cristalizaron de manera espontánea 5.28 g de un sólido cristalino incoloro en forma de pequeñas agujas con un punto de fusión de 105-106 °C, que fué identificado como la costunólida (20).

### **3.8 Aislamiento de la 15-isovaleriloxi costunólida (55) de la fracción primaria H.**

De la fracción primaria H, cristalizaron espontáneamente 1.47 g de un sólido cristalino amorfo de color blanco, con un punto de fusión de 122-124°C, el cual fué caracterizado como la 15-isovaleriloxi costunólida (55).

### **3.9 Aislamiento de la 15-isobutiriloxi costunólida (56) de la fracción primaria activa I.**

De la fracción primaria activa I se obtuvieron 113.3 mg de un sólido cristalino amorfo, de color blanco, que al ser analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, demostró estar constituido por dos compuestos, en una proporción de 66.6% y 33.3%. El compuesto que se encontraba en menor proporción fué identificado como el producto 55. La separación y purificación del compuesto mayoritario se logró mediante cristalizaciones progresivas del sólido que contenía la mezcla. Este proceso

permitió la obtención de 75.5 mg de un sólido cristalino de color blanco, con un punto de fusión de 108-110 °C, que fué caracterizado como la 15-isobutiriloxi costunólida (**56**).

### **3.10 Aislamiento de la 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregn-16-en-20-ona (**57**) de la fracción primaria activa J.**

De la fracción primaria activa J, cristalizaron de forma espontánea 86.3 mg de un sólido cristalino de color blanco, con un punto de fusión de 192-193 °C, caracterizado como la 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregn-16-en-20-ona (**57**).

### **3.11 Preparación del acetato de la 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregn-16-en-20-ona (**57a**).**

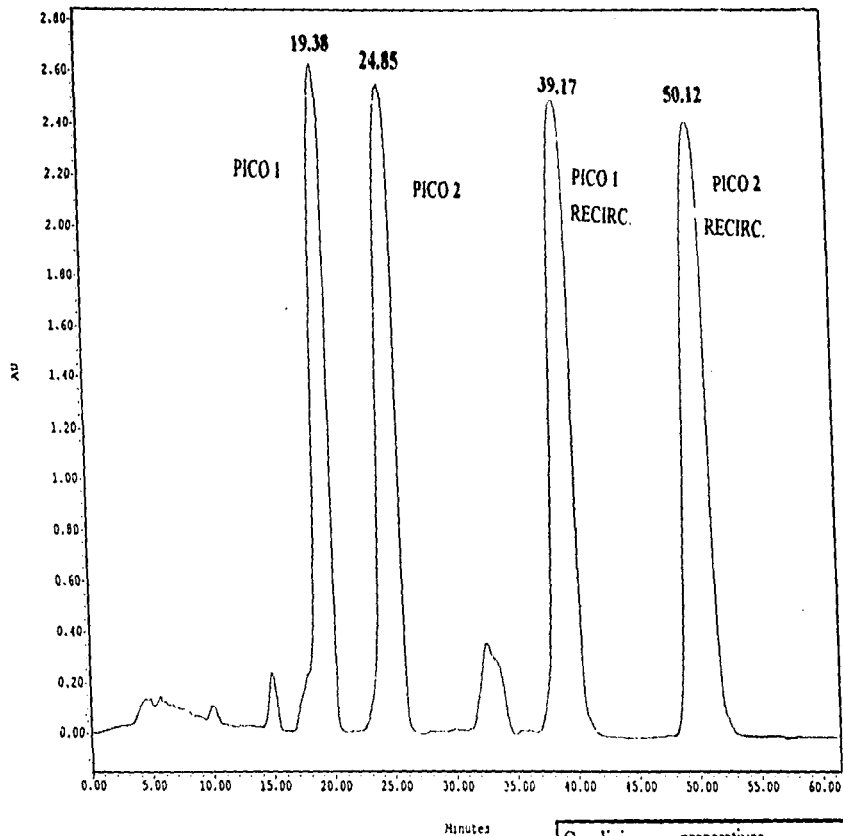
A 7.3 mg del compuesto **57** se agregaron 1 ml de piridina y 1 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó en reposo por 72 h y al término de este tiempo, el producto acetilado se separó de la manera convencional (Shriner *et al.*, 1980); obteniéndose 6.3 mg del derivado acetilado (**57a**) con un punto de fusión de 125-127 °C.

### **3.12 Aislamiento del estigmasterol (**58**) de la fracción primaria G.**

De la fracción primaria activa G, cristalizaron en forma espontánea 72 mg de un sólido cristalino en forma de agujas de color blanco, con un punto de fusión de 143-145 °C; el cual fué caracterizado como estigmasterol (**58**) por comparación con una muestra auténtica.

### **3.13 Aislamiento y purificación de los productos 59 y 60 de la fracción primaria activa E.**

La fracción activa E (150.5 mg) fue sometida a sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada, utilizando como eluyente una mezcla de hexano-AcOEt (7:3). Este proceso permitió la obtención de 25 mg de un aceite de color amarillo, aparentemente puro. Posteriormente el análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución de este aceite permitió comprobar que el mismo era una mezcla de cuatro productos, dos de ellos mayoritarios. Para la separación de los dos productos mayoritarios **59** y **60** se utilizó una columna preparativa de fase reversa, cuyas características han sido indicadas en el inciso 3.2. En este análisis el volumen de inyección fue de 500  $\mu$ l a partir de una solución del aceite amarillo a una concentración de 7.5 mg/ml la longitud de onda de detección fue de 205 nm y la fase móvil estuvo constituida por acetonitrilo-agua (7:3), con un flujo de 8.5 ml/min. Un proceso de reciclaje bajo estas condiciones permitió la separación de dos productos bajo la forma de un aceite de color amarillo (Fig. 6). El primero de ellos presentó un tiempo de retención (Rt) de 19.38 minutos y se obtuvo un rendimiento de 6.5 mg. El otro presentó un Rt de 24.85 minutos y un rendimiento de 7.0 mg.



PICO 1 (59)

PICO 2 (60)

Condiciones preparativas	
Detector	UV ( $\lambda_{max}$ : 205 nm)
Columna	Nova-Pak HRC <sub>18</sub> (19X300mm, 6 $\mu$ m)
Fase Móvil	ACN-H <sub>2</sub> O 7:3
Flujo	8.5 ml/min.
Inyección	500 $\mu$ l (7.5 mg/ml)

Figura 6. Separación de los compuestos 59 y 60 mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Selección de la especie *C. pringlei* como una fuente potencial de agentes fitotóxicos.

La obtención de los constituyentes bioactivos de la especie *Cosmos pringlei*, se realizó mediante un estudio fitoquímico biodirigido, ya que este tipo de estudios ha demostrado en diversas ocasiones ser el más eficiente para la obtención de metabolitos secundarios tanto de interés medicinal como agroquímico (Kinghorn *et al.*, 1995; Cox y Balick, 1994; Tanira *et al.*, 1994; Hosttetmann y Hamburger, 1993; Ghisalberti, 1993).

De manera general, el presente estudio comprendió las etapas siguientes:

1. Preselección del material vegetal de acuerdo a los criterios apropiados e identificación taxonómica del mismo.
2. Selección del material vegetal con base en los resultados de las evaluaciones biológicas preliminares. Estas evaluaciones incluyeron: determinación del potencial fitotóxico, mediante la inhibición de la germinación y del crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. De manera adicional, se evaluó el efecto del extracto sobre las plántulas de la primera de estas especies; por último, se determinó la toxicidad del extracto contra el crustáceo *Artemia salina* Leach.
3. Preparación del extracto a gran escala.
4. Obtención de los principios activos mediante un proceso biodirigido, monitoreando la actividad biológica mediante los mismos bioensayos que permitieron la selección del material vegetal (ver inciso 2).



5. Caracterización de los constituyentes bioactivos utilizando métodos espectroscópicos y espectrométricos.

6. Evaluaciones biológicas de los compuestos puros.

La preselección de la planta *Cosmos pringlei* se realizó con base en dos de los criterios más utilizados para la detección de fuentes potenciales de principios bioactivos: el quimiotaxonómico y el etnomédico. El primero se basó en los antecedentes de la familia Asteraceae como una fuente valiosa de compuestos fitotóxicos (Duke, 1991; González de la Parra *et al.*, 1981; Picman, 1986a; Seaman, 1982; Fischer y Quijano, 1985; Fischer, 1986; Fischer, 1991; Kil y Lee, 1987). El segundo se fundamentó en el uso medicinal que los indios tarahumaras le dan a la raíz de esta planta para el tratamiento de la úlcera gástrica y de las hemorroides. Con relación a este último criterio de selección, cabe destacar que un gran número de plantas medicinales en múltiples ocasiones han demostrado ser un punto de partida importante para el hallazgo de fitotoxinas (Duke *et al.*, 1987; Sánchez y Carrillo, 1993; Acevedo y Estrada, 1995).

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

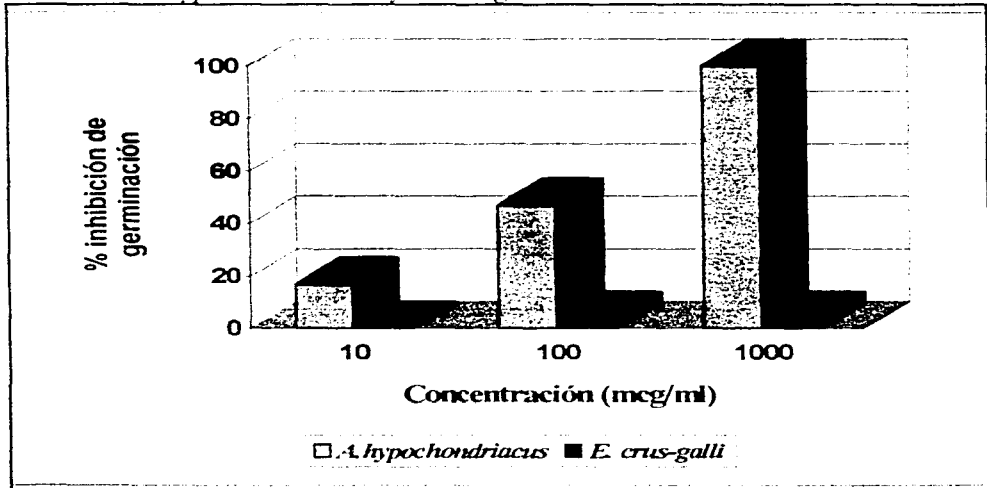
Posteriormente, se preparó un extracto clorofórmico-metanólico (1:1) en pequeña escala a partir de las raíces de la especie *C. pringlei*, con la finalidad de determinar su potencialidad fitotóxica y su toxicidad para el crustáceo *A. salina*.

Como se indicó previamente, el potencial fitotóxico se determinó evaluando el efecto del extracto sobre la germinación y el crecimiento radicular de dos especies de arvenses (*A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*) mediante la

aplicación del método de la caja de petri (Anaya *et al.*, 1990). Cabe destacar que la selección de las especies de prueba se realizó considerando que ambas son representativas de especies de malezas no deseables en las prácticas agrícolas, y pertenecientes tanto a monocotiledóneas como a dicotiledóneas. Los resultados derivados de estos ensayos se indican en las Gráficas 1 y 2.

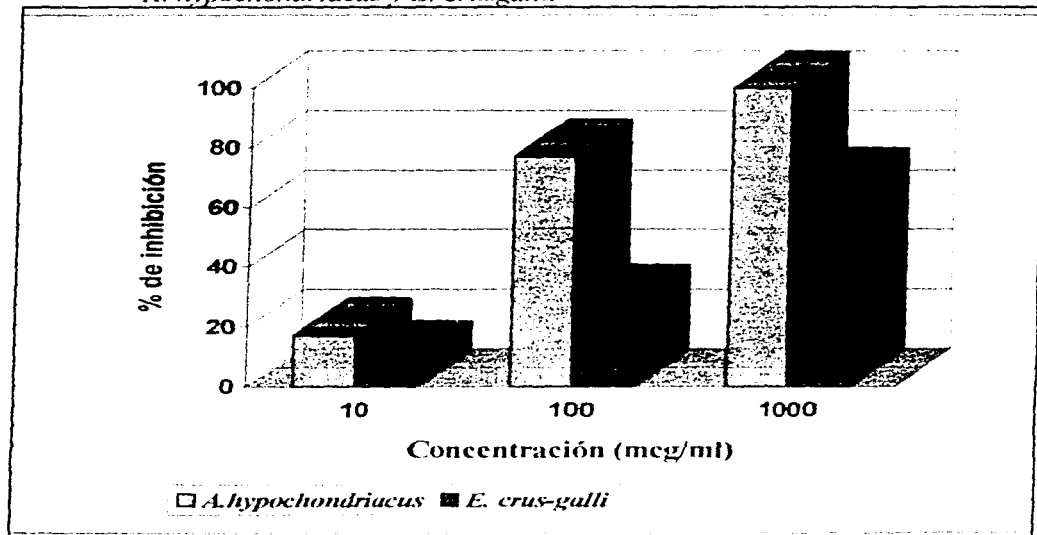
La Gráfica 1 ilustra los porcentajes de inhibición de la germinación de las dos especies de prueba inducidos por el extracto, observándose que el extracto afectó notablemente la germinación de *A. hypochondriacus* de manera dependiente de la concentración. La germinación de la especie *E. crusgalli* no se afectó de manera significativa, por los tratamientos del extracto.

Gráfica 1. Efecto del extracto de *C. pringlei* sobre la germinación de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*.



El efecto sobre el crecimiento radicular de las dos especies empleadas se ilustra en la Gráfica 2, de donde se desprende que el extracto demostró una actividad inhibitoria significativa. A la concentración de 1000 ppm la inhibición del crecimiento radicular fue total en el caso de *A. hypochondriacus* y del 67.4 % en el caso de *E. crusgalli*. Las concentraciones inhibitorias medias ( $CI_{50}$ ) del extracto fueron de 36.7  $\mu\text{g/ml}$  y de 352.2  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

Gráfica 2. Efecto del extracto de *C. pringlei* sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*.



Tomando en cuenta los resultados anteriores, y con el objetivo de extender el conocimiento de las propiedades fitotóxicas del extracto, se evaluó su efecto sobre la producción de biomasa en plántulas de la especie *A. hypochondriacus*. Los resultados se resumen en el Cuadro 8. El crecimiento de *A. hypochondriacus* medido como la producción de biomasa al séptimo día de tratamiento en plántulas de 5 semanas de desarrollo, se vió significativamente afectado por el tratamiento con una solución del extracto a una concentración de 61 µg/ml.

El efecto del extracto conllevó a una disminución del crecimiento de las plantas y por ende, una disminución en la biomasa. La actividad demostrada por el extracto fue mayor que la del Paraquat, un herbicida comercial utilizado como un control positivo.

Cuadro 8. Efecto del extracto de *C. pringlei* [61 µg/ml] sobre la producción de biomasa de *A. hypochondriacus*.

TRATAMIENTO (µg/ml)	B I O M A S A PESO SECO (mg/plántula) ±DS
Control	5.29 ± 0.87
Control positivo	4.15 ± 0.49 *
Extracto [61 µg/ml]	3.61 ± 0.59 *

Control: H<sub>2</sub>O y Tween 80 0.1ml/L.

Control positivo: Paraquat [2572 µg/ml]

\*Significativamente diferentes al control con P=0.05.

De manera adicional, el extracto a esta concentración afectó notablemente la apariencia de las plántulas de *A. hypochondriacus*, observándose marchitamiento en tallo y hojas a las 24 horas de la aplicación, un efecto similar al que demostró el control positivo. Este efecto puede evidenciarse en las fotos mostradas en la Figura 7.

Posteriormente, el extracto clorofórmico-metanólico (1:1) de la raíz de *Cosmos pringlei* demostró una toxicidad significativa para *Artemia salina* Leach., ya que la concentración letal media (CL<sub>50</sub>), fue de 16.4 µg/ml (Anderson *et al.*, 1991). La determinación de este efecto tiene la finalidad de predecir otras actividades biológicas potenciales (diferentes a la fitotoxicidad) tales como: antitumoral, citotóxica, antihelmíntica y antimalárica. Muchas de estas actividades han demostrado una correlación acertada con este bioensayo.

Las evaluaciones biológicas preliminares recién descritas, permitieron la selección de esta especie como una fuente de principios fitotóxicos de utilidad para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas potenciales, constituyendo así el punto de partida para realizar la investigación química de la especie medicinal *Cosmos pringlei* con el propósito de obtener los principios activos responsables de los efectos demostrados por el extracto total.

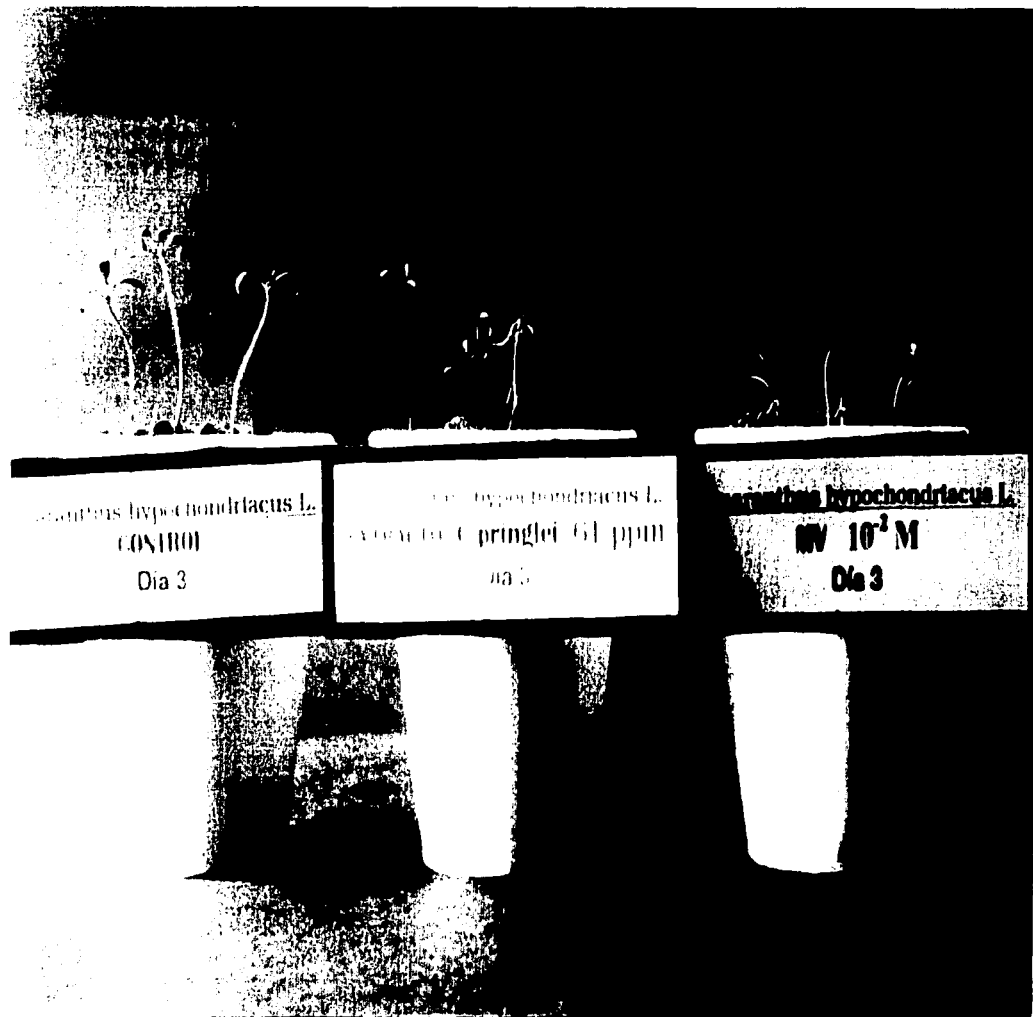


Figura 7 Efecto del extracto de *C. princei* sobre la apariencia de plantulas de *A. hypochondriacus*

Para efectuar el estudio químico, se preparó el extracto activo en gran escala por un proceso de maceración.

El extracto resultante se fraccionó en primera instancia mediante una cromatografía en columna abierta, usando gel de sílice como fase estacionaria; proceso que generó 16 fracciones primarias A-P (Cuadro 7; sección experimental). Cada una de las fracciones obtenidas se evaluó mediante los mismos bioensayos utilizados en la fase preliminar del estudio, es decir: determinación de la toxicidad contra *A. salina* y de la actividad fitotóxica contra la especie *A. hypochondriacus* utilizando en este caso el método bioautográfico (Inoue *et al.*, 1992). Estos bioensayos permitieron monitorear la actividad biológica durante el estudio fitoquímico, indicándonos cuales eran las fracciones activas, de donde más tarde se obtendrían los compuestos responsables de dicha actividad.

Los resultados de estas evaluaciones (Cuadro 9), nos permitieron establecer que las fracciones E, F e I son activas contra *A. salina* y fitotóxicas contra *A. hypochondriacus*; mientras que las fracciones A, G, J y L sólo presentaron una actividad contra *A. salina*, y la fracción H sólo presentó actividad fitotóxica.

El aislamiento y la purificación de los compuestos presentes en las fracciones activas se realizó mediante el empleo de técnicas de cristalización y cromatográficas. Como resultado de estos procedimientos se obtuvieron un total de ocho metabolitos secundarios, entre los que se encuentran: cuatro lactonas sesquiterpénicas (una de tipo guayanólida y tres de tipo germacranólida), dos derivados esteroidales (un estigmastano y un pregnano) y dos productos adicionales que se encuentran en proceso de caracterización. En

el Cuadro 10 se presentan las estructuras y los rendimientos correspondientes a seis de estos metabolitos.

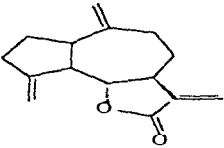
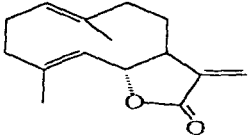
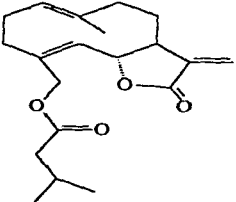
Cuadro 9. Actividad biológica de las fracciones primarias.

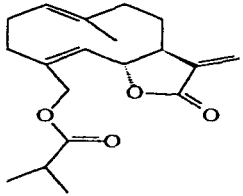
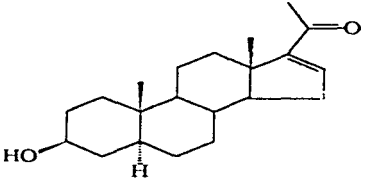
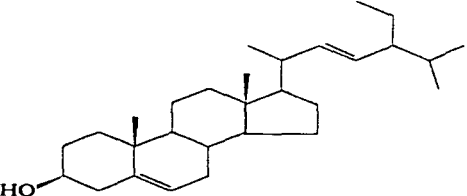
CLAVE	Actividad tóxica vs. <i>A. salina</i> CL <sub>50</sub> ( µg/ml)	Actividad fitotóxica *
A	385.4	-
B	>1000	-
C	-----	-----
D	>1000	-
E	77.6	+
F	28.06	+
G	149.7	-
H	>1000	+
I	333.3	+
J	848.5	-
K	>1000	-
L	912.5	-
M	>1000	-
N	>1000	-
O	>1000	-
P	>1000	-

\*De acuerdo a los resultados de la bioautografía.



Cuadro 10. Metabolitos secundarios aislados de la especie *C. pringlei*.

COMPUESTO	RENDIMIENTO (%) En base a planta seca
 <p data-bbox="199 503 536 530">Deshidrocostus lactona (48 )</p>	1.5244
 <p data-bbox="258 733 463 760">Costunólida (20 )</p>	0.1761
 <p data-bbox="154 1000 549 1027">15-isovaleriloxi costunólida (55 )</p>	0.0491

 <p>15-isobutiriloxi costunólida (56)</p>	<p>0.0025</p>
 <p>3β-hidroxi-5α-pregn-16-en-20-ona (57)</p>	<p>0.0029</p>
 <p>estigmasterol (58)</p>	<p>0.0024</p>

## 4.2 Caracterización de los constituyentes activos.

La caracterización de los compuestos aislados se realizó mediante el empleo de técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales, como se describe a continuación.

### 4.2.1. Caracterización de la deshidrocostus lactona (48) obtenida de la fracción activa F.

La deshidrocostus lactona (48) se obtuvo como un sólido cristalino con un punto de fusión de 56-57 °C, y en un rendimiento de 1.52%, constituyendo el compuesto mayoritario del extracto total.

Las constantes espectroscópicas y espectrométricas del producto se resumen en la Tabla 1.

La fórmula molecular del compuesto 48 se estableció por espectrometría de masas (Espectro 2) como  $C_{15}H_{18}O_2$ , la cual permite 7 insaturaciones.

El espectro de IR (Espectro 1) mostró bandas diagnósticas para  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada (1760 y 1648  $cm^{-1}$ ).

El análisis detallado de los espectros de RMN del producto 48 permitieron establecer que el producto era una lactona sesquiterpénica de tipo guayanólida con el anillo lactónico *trans*-fusionado en las posiciones C-6/C-7 (Taniguchi *et al.*, 1995; Yoshioka *et al.*, 1973; *Inter alia*).

El espectro de RMN- $^{13}C$  (Espectro 4) confirmó la presencia de 15 átomos de carbono, y el análisis en su modalidad DEPT (Espectro 4a) indicó que los mismos correspondían a siete metilenos, cuatro metinos y cuatro carbonos cuaternarios. Las señales de la  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada se observaron en  $\delta_c$  169.7 (C-12), 148.9 (C-11), 119.7 (C-13) y 84.8 (C-6). De manera adicional,

el espectro presentó señales para dos dobles ligaduras terminales [ $\delta_c$  112.1 (C-14) y 109.0 (C-15)]. Los grupos funcionales evidenciados mediante el análisis del espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  satisfacían cinco de las siete insaturaciones y los dos oxígenos requeridos por la fórmula molecular. En consecuencia se estableció que la lactona sesquiterpénica presentaba una estructura tricíclica, incluyendo el anillo de  $\gamma$ -lactona. La comparación del espectro de  $^{13}\text{C}$  generado por este compuesto con el de una serie de espectros (Kalsi *et al.*, 1995; Macías *et al.*, 1992; Taniguchi *et al.*, 1995; *Inter alia*) de lactonas sesquiterpénicas, permitió evidenciar que el producto era una guayanólida. Las características del espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Yoshioka *et al.*, 1973; Mathur *et al.*, 1965), reforzaron esta propuesta y permitieron establecer que la guayanólida presentaba su anillo lactónico *trans* fusionado en las posiciones C6/C7 del núcleo guayano.

Las características más relevantes del espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Espectro 3) se indican a continuación:

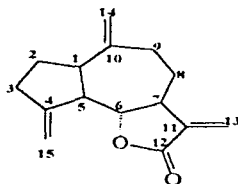
◆ En la región donde absorben los hidrógenos vinílicos se observaron los dobletes típicos para el metileno de la  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada en  $\delta_{\text{H}}$  6.17 ( $J=$  3.6 Hz, H-13a) y 5.50 ( $J=$  3.0 Hz, H-13b). De manera adicional, se encontraron en esta zona cuatro multipletes centrados en  $\delta_{\text{H}}$  5.24 (H-15a), 5.04 (H-15b), 4.89 (H-14a) y 4.79 (H-14b), correspondientes a dos metilenos de dobles ligaduras exocíclicas, mismos que se asignaron a las posiciones 15 y 14 respectivamente. Es importante hacer notar que estas asignaciones fueron consistentes con la ausencia de las señales en la región de absorción de los metilos, los cuales normalmente ocupan estas posiciones.

◆ En  $\delta_{H}$  3.93 se observó un triplete ( $J=9.15$  Hz) asignable al hidrógeno base de la función lactona (C-6). La correlación observada en el espectro de correlación homonuclear COSY (Espectro 3a) entre esta señal y el multiplete en  $\delta_{H}$  2.89, donde absorben H-5 y H-7, era congruente con el cierre de la lactona entre C-6 y C-7. Por otro lado, el valor de la constante de acoplamiento entre H-6 y H-7, y H-6 y H-5 [ $J=9.15$  Hz], es consistente con la fusión *trans* de la lactona (Jiménez *et al.*, 1993; Miyase *et al.*, 1991).

Las señales definidas de manera independiente en los espectros de RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  correlacionaron en el espectro bidimensional heteronuclear HETCOR (Espectro 4b), mismo que permitió completar las asignaciones de los núcleos restantes.

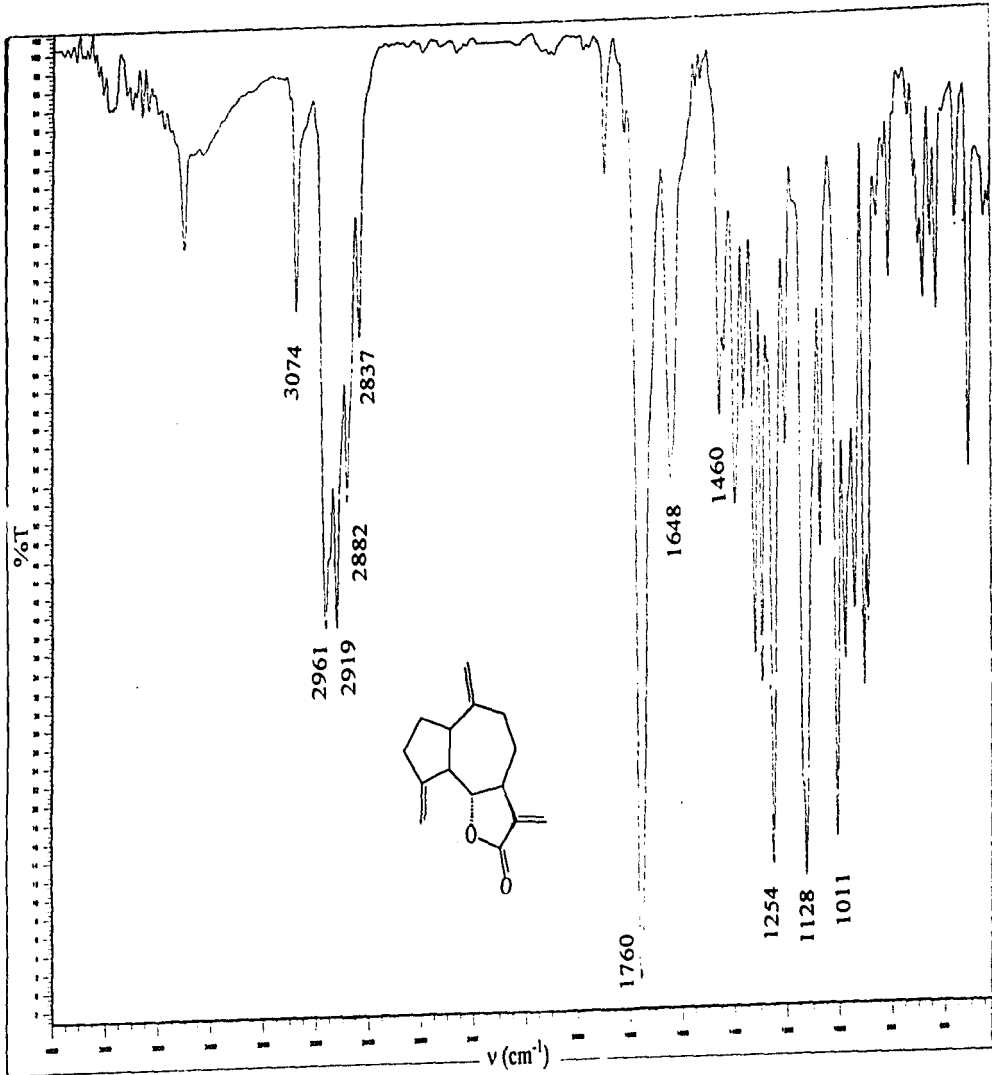
Con base en las evidencias presentadas, el compuesto se caracterizó como la deshidrocostus lactona (**48**), la cual ha sido obtenida previamente de otras fuentes naturales (Crabalona, 1948; Fischer *et al.*, 1979; Romauk *et al.*, 1956). Las constantes físicas y espectroscópicas fueron idénticas a las previamente descritas.

Tabla 1. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la deshidrocostus lactona (48).

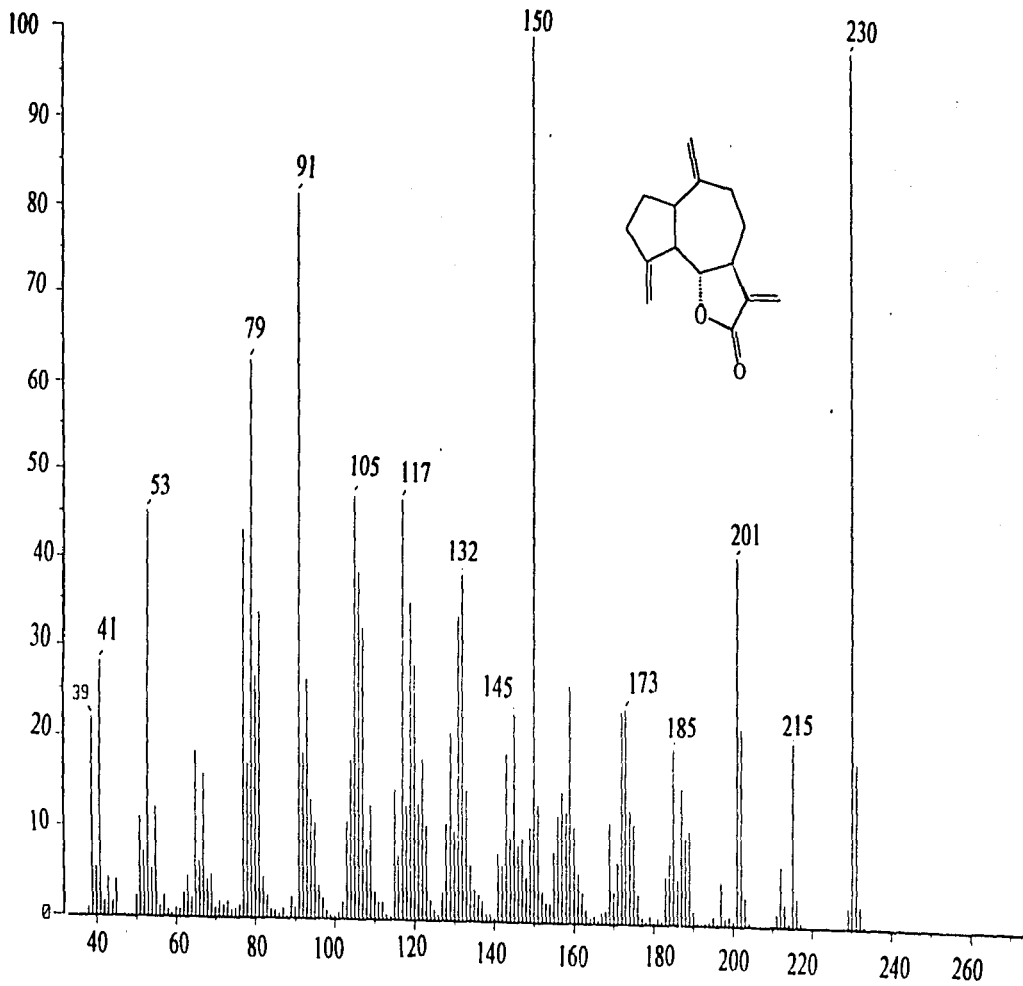


IR, $\nu_{max}$ (KBr) $cm^{-1}$ (Espectro 1)	3074, 2961, 2919, 2882, 2837, 1760, 1648, 1460, 1254, 1128 y 1011
EMIE, $m/z$ (int rel) (Espectro 2)	230 [ $M^+$ (98.0)], 215 (19.33), 201 (40.0), 185 (19.0), 173 (23.3), 150 (100.0), 145 (22.6), 132 (38.0), 117 (47.3), 105 (47.3), 91 (81.3), 79 (62.6), 53 (45.3), 41 (28.6) y 39 (22.0).
RMN- $^1H$ $\delta$ (300 MHz, $CDCl_3$ ) * (Espectro 3)	6.17 (d, $J=3.6$ , H-13a), 5.50 (d, $J=3.0$ , H-13b), 5.24 (dd, $J=0.9$ , $J=2.1$ , H-15a), 5.04 (dd, $J=0.9$ , $J=2.1$ , H-15b), 4.89 (d, $J=0.6$ , H-14a), 4.79 (t, $J=0.9$ , $J=1.2$ , H-14b), 3.93 (t, $J=9.15$ , H-6), 2.89 (m, H-5, H-7, H-1), 2.49 (m, H-3, H-9a), 2.20 (m, H-8a, H-9b), 1.90 (m, H-2) y 1.34 (m, H-8b).
RMN- $^{13}C$ $\delta$ (75 MHz, $CDCl_3$ ) * (Espectro 4)	169.7 (C-12), 151.0 (C-4), 148.9 (C-11), 139.5 (C-10), 119.7 (C-13), 112.1 (C-14), 109.0 (C-15), 84.8 (C-6), 51.6 (C-5), 47.1 (C-7), 44.7 (C-1), 35.9 (C-9), 32.2 (C-3), 30.5 (C-8) y 29.9 (C-2).

\* Las constantes de acoplamiento (J) expresadas en Hz se indican en el paréntesis.



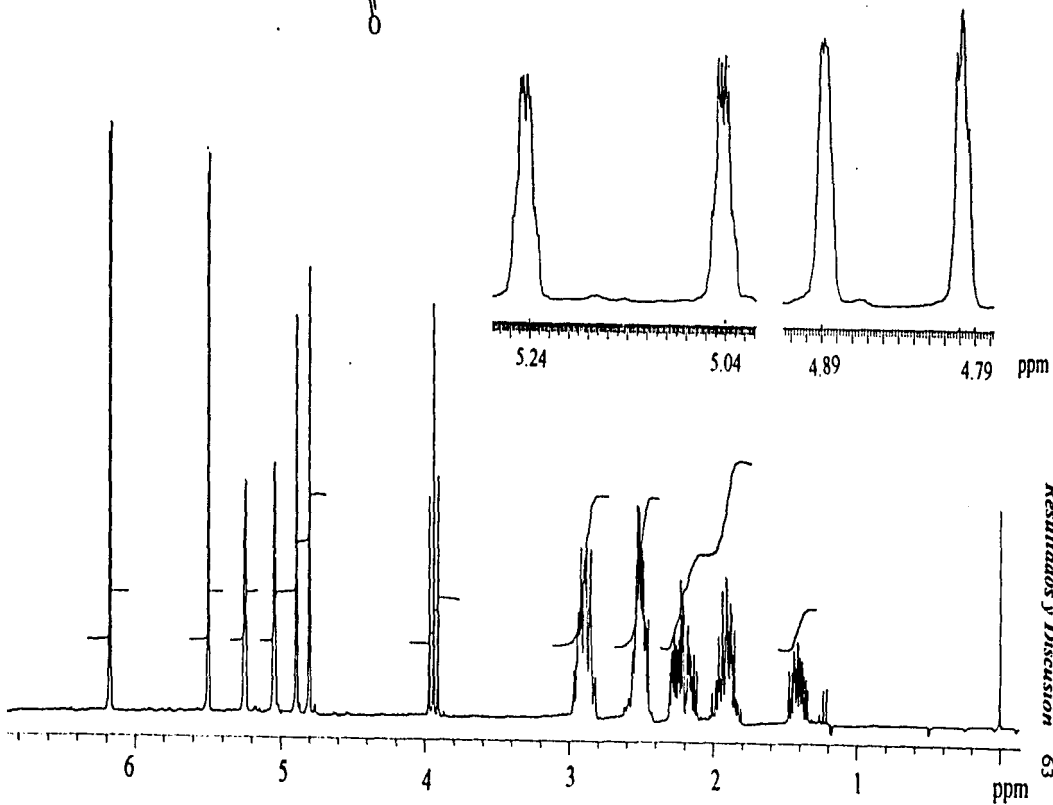
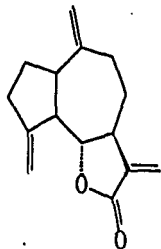
Espectro 1. Espectro de IR de la deshidrocostus lactona (48)



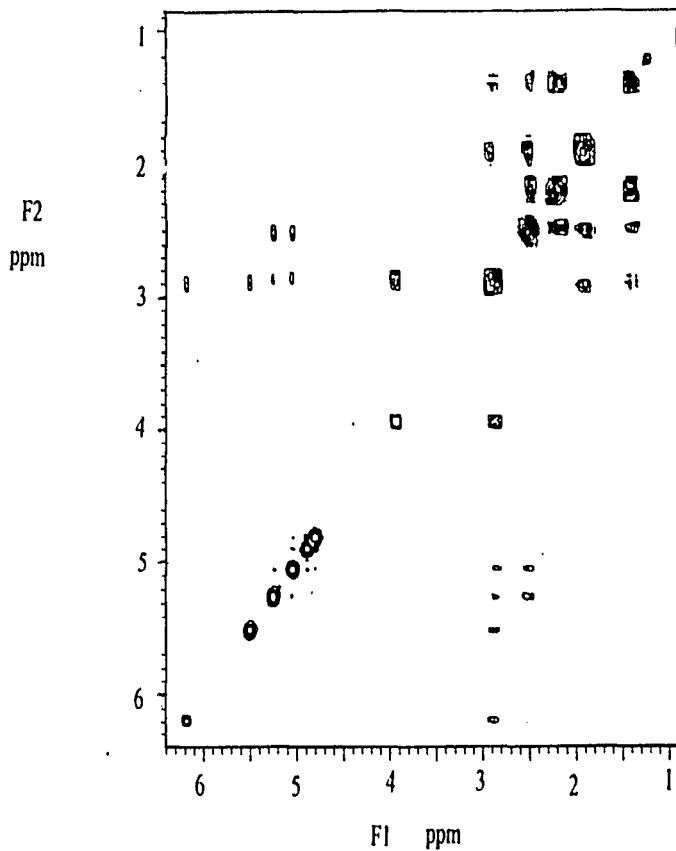
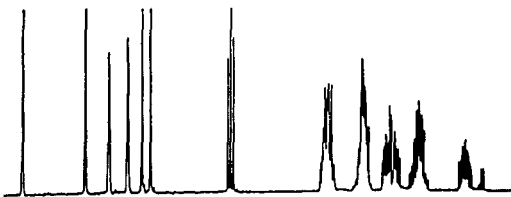
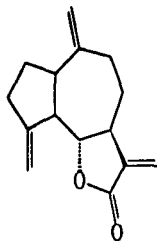
Espectro 2. EMIE de la deshidrocostus lactona (48)

m/z

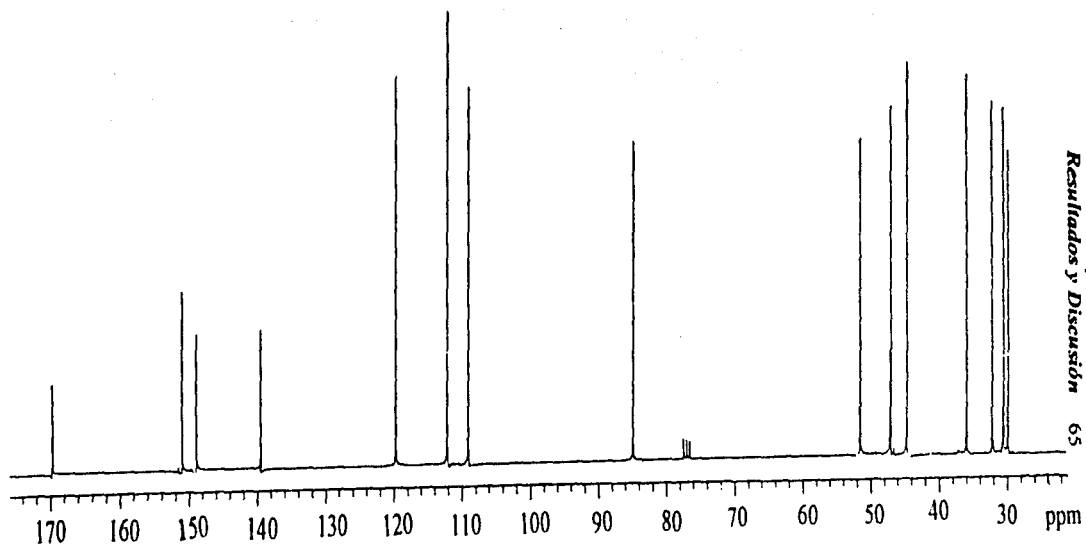
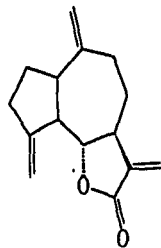




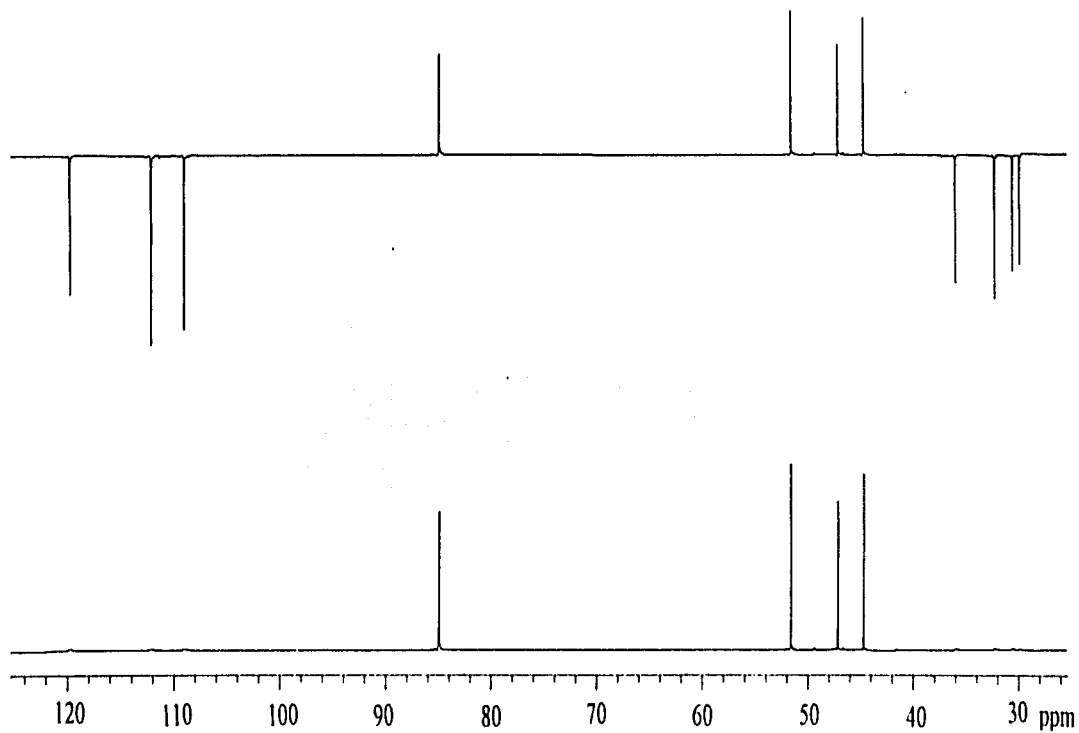
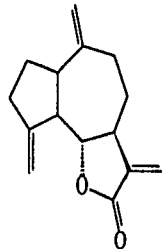
**Espectro 3.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de la deshidrocostus lactona (48)



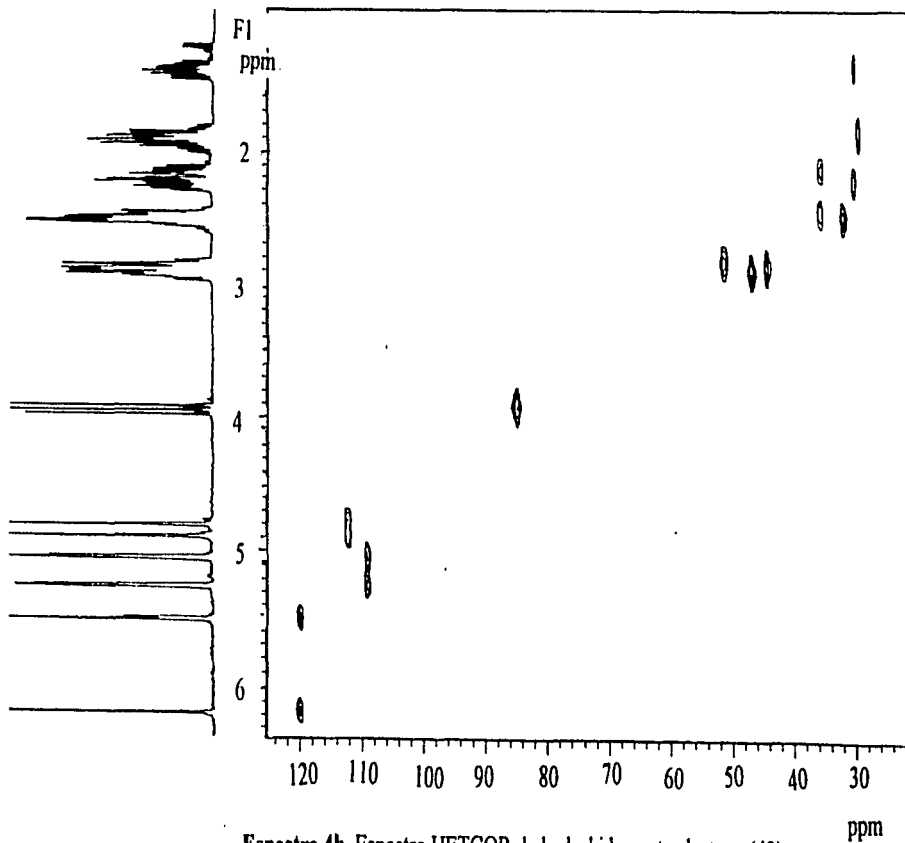
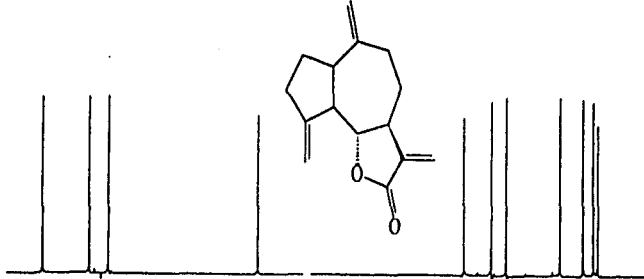
**Espectro 3a.** Espectro COSY de la deshydrocostus lactona (48)



**Espectro 4.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de la deshidrocostus lactona (48)



**Espectro 4a.** Espectro DEPT de la deshidrocostus lactona (48)



**Espectro 4b.** Espectro HETCOR de la deshidrocostus lactona (48)

#### 4.2.2. Caracterización de la costunólida (20) obtenida de la fracción activa F.

La costunólida (20) se obtuvo de la fracción activa F, de donde cristalizó espontáneamente como un sólido cristalino incoloro con un punto de fusión de 105-106 °C. Las constantes espectroscópicas y espectrométricas del producto natural se resumen en la Tabla 2.

El ión molecular de 232 uma observado en el espectro de masas (Espectro 6) corresponde a la fórmula molecular  $C_{15}H_{20}O_2$ , la cual permite 6 insaturaciones. El espectro de IR (Espectro 5) presentó señales características para una  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada (1764 y 1662  $cm^{-1}$ ).

El análisis detallado de los espectros de RMN del producto (20) permitieron establecer que el producto era una lactona sesquiterpénica del tipo germacranólida con el anillo lactónico *trans* fusionado en las posiciones C-6/C-7 (Taniguchi *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1996; Jiménez *et al.*, 1993)

El espectro de RMN- $^{13}C$  (Espectro 8) confirmó la existencia de quince átomos de carbono y el análisis en su modalidad DEPT (Espectro 8a) indicó claramente que las mismas correspondían a dos metilos, cinco metilenos, cuatro metinos y cuatro carbonos cuaternarios. De manera similar al producto 48 anteriormente descrito se observaron las señales correspondientes a la  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada en  $\delta_c$  170.4 (C-12), 140.1 (C-11), 119.6 (C-13) y 81.9 (C-6). Además, cabe hacer notar que, a diferencia de los espectros generados por el compuesto 48, los del producto 20 no presentaron las absorciones para los dos metilenos de tipo vinílico. En su lugar, en los espectros del producto 20 se observaron señales para dos metilos en  $\delta_c$  17.3 (C-15) y 16.0 (C-14). Adicionalmente se observaron las absorciones correspondientes a dos dobles

ligaduras trisustituídas en  $\delta_c$  141.4 (C-4), 136.9 (C-10), 127.3 (C-5) y 127.1 (C-1).

Los grupos funcionales evidenciados mediante el análisis del espectro de RMN- $^{13}C$  satisfacen cinco de las seis insaturaciones y los dos oxígenos requeridos por la fórmula molecular. Por ello, se estableció que la lactona sesquiterpénica presentaba una estructura bicíclica incluyendo el anillo de la  $\gamma$ -lactona. La existencia de un sistema bicíclico con las características mencionadas, permitió establecer que el producto era una germacranólida (Kuroda *et al.*, 1987; Taniguchi *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1996; *Inter alia*).

Las características del espectro de RMN- $^1H$  (Espectro 7) sustentaron esta propuesta, y permitieron establecer que la germacranólida presentaba su anillo lactónico *trans* fusionado en posiciones C-6/C-7 del núcleo germacrano. Dentro de las características más relevantes de este espectro se encuentran:

- ◆ En la región de absorción de los hidrógenos vinílicos, se observaron los dobletes típicos del metileno de la  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada en  $\delta_{H}$  6.26 ( $J=3.6$  Hz, H-13a) y 5.52 ( $J=3.6$  Hz, H-13b). Estos dobletes mostraron correlación en el espectro COSY (Espectro 7a) con un multiplete asignable al metino de H-7, centrado en  $\delta_{H}$  2.56.

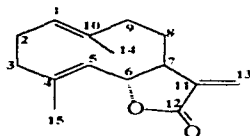
- ◆ Un doblete de doblete en  $\delta_{H}$  4.85 ( $J=3.98$  y 11.0 Hz) y un doblete en  $\delta_{H}$  4.74 ( $J=9.88$  Hz), correspondientes a los metinos de las posiciones 1 y 5 respectivamente. Estas señales mostraron correlación en el espectro COSY (Espectro 7a) con los singuletes anchos ubicados en  $\delta_{H}$  1.42 (H-14) y 1.70 (H-15), correspondientes a los metilos en C-10 y C-4 respectivamente; lo cual confirma que las posiciones de las dobles ligaduras endocíclicas son: 1(10) y 4(5).

◆ Un doblete de doblete ubicado en  $\delta_{H}$  4.56 ( $J=9.88$  y  $8.79$  Hz), asignable al hidrógeno base de la lactona (H-6), el cual mostró una correlación en el espectro COSY (Espectro 7a) con el multiplete asignable a H-7 ( $\delta_{H}$  2.56) y con el doblete asignable a H-5 ( $\delta_{H}$  4.74), lo cual es congruente con el cierre de la lactona entre C-6 y C-7. Por otro lado, el patrón de acoplamiento que mostró H-6 [dd,  $J_{5-6\beta}=9.88$  ;  $J_{6\beta-7\alpha}=8.79$  Hz ] era consistente con una lactona *trans* fusionada en las posiciones C-6/C-7 del esqueleto base (Jiménez A. *et al.*, 1993; Miyase *et al.*, 1991).

De nueva cuenta, las señales identificadas de manera independiente en los espectros de RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$  correlacionaron en el espectro bidimensional heteronuclear HETCOR (Espectro 8b), mismo que permitió completar las asignaciones de los núcleos restantes. Las evidencias presentadas permitieron identificar al producto natural **20** como la costunólida. Es importante mencionar que este compuesto ha sido aislado de otras fuentes naturales (Rao *et al.*, 1958; Herout y Sorm, 1959; Toribio y Geissman, 1969; Park *et al.*, 1996), incluyendo la especie *Cosmos sulphureus* (Bohlmann *et al.*, 1964). Las propiedades físicas y los espectros de RMN se encontraban en armonía a los previamente descritos.

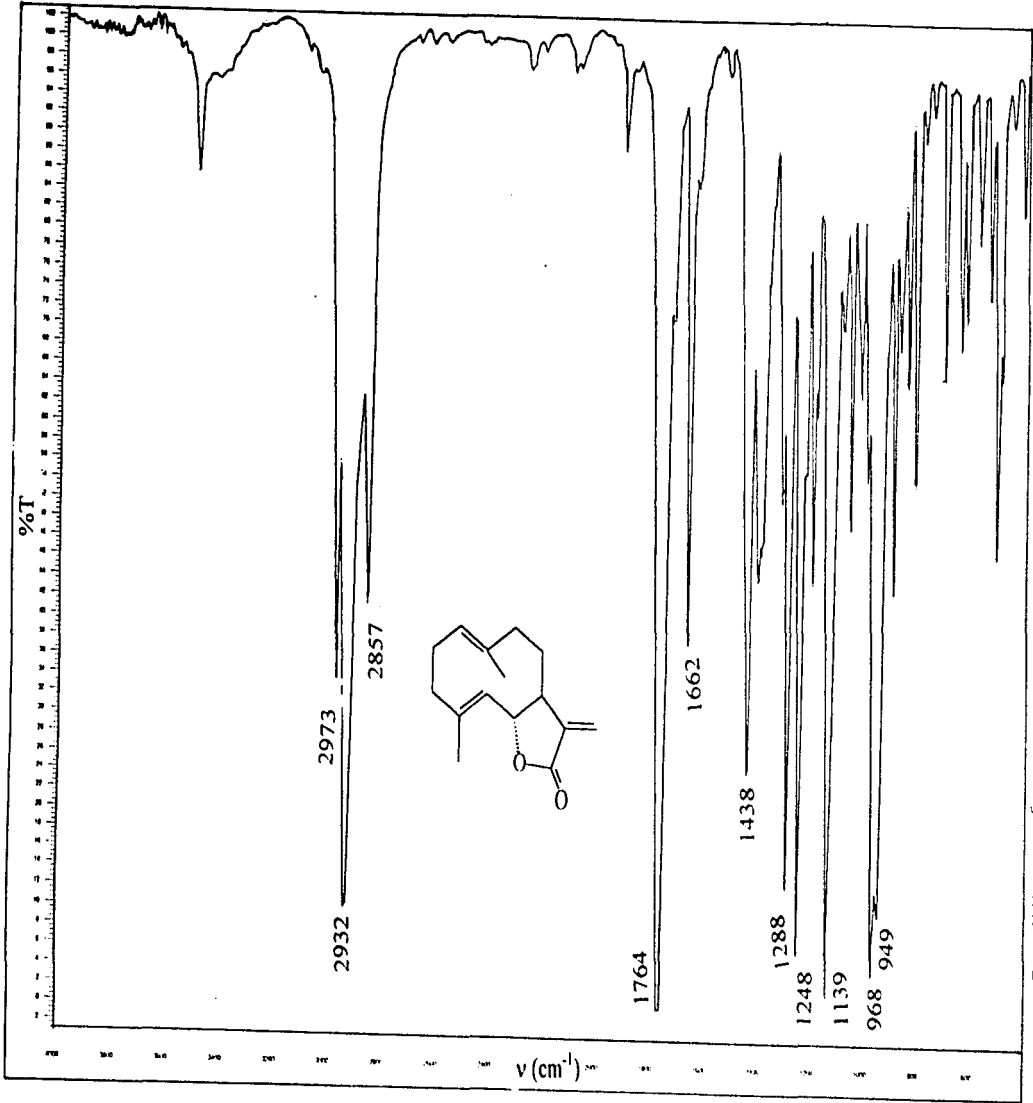


Tabla 2. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la costunólida (20)

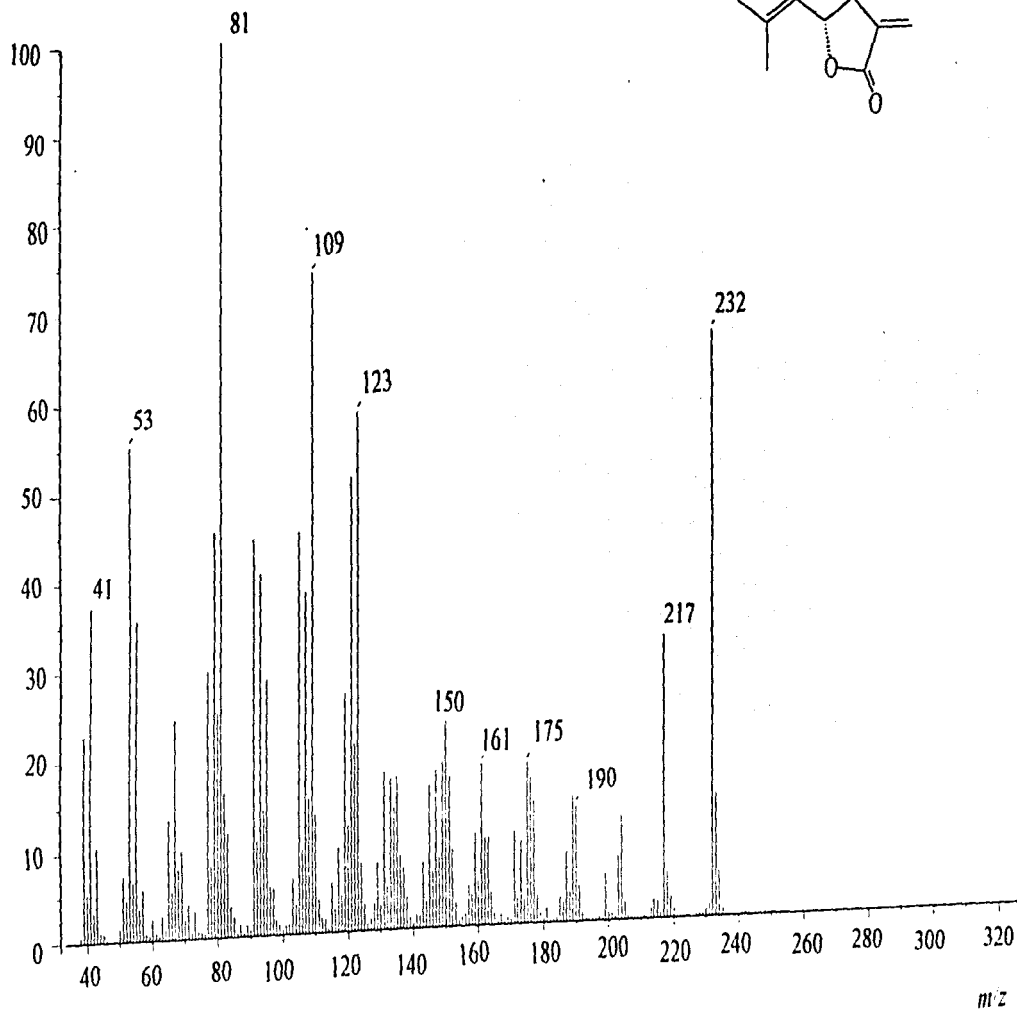
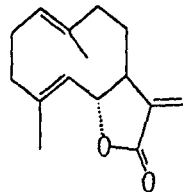


IR, $\nu$ max (KBr) $\text{cm}^{-1}$ (Espectro 5)	2973, 2932, 2857, 1764, 1662, 1438, 1288, 1248, 1139, 968 y 949.
EMIE, $m/z$ (int rel) (Espectro 6)	232 [ $\text{M}^+$ , (65.3)], 217 (31.3), 190 (12.6), 175 (18.6), 161 (18.6), 150 (23.3), 123 (58.6), 109 (74.0), 81 (100.0), 53 (55.3) y 41 (37.3).
RMN- $^1\text{H}$ $\delta$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) * (Espectro 7)	6.26 (d, $J=3.6$ , H-13a), 5.52 (d, $J=3.6$ , H-13b), 4.85 (dd, $J=3.98$ , $J=11.0$ , H-1), 4.74 (d, $J=9.88$ , H-5), 4.56 (dd, $J=9.88$ , $J=8.79$ , H-6), 2.56 (m, H-7), 2.45 (m, H-9a), 2.36-2.21 (m, H-3a, H-2), 2.21-1.8 (m, H-8a, H-9b y H-3b), 1.70 (m, H-15 y H-8b) y 1.42 (s, H-14).
RMN- $^{13}\text{C}$ $\delta$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) * (Espectro 8)	170.4 (C-12), 141.4 (C-4), 140.1 (C-11), 136.9 (C-10), 127.3 (C-5), 127.1 (C-1), 119.6 (C-13), 81.9 (C-6), 50.4 (C-7), 40.9 (C-9), 39.4 (C-3), 28.0 (C-8), 26.1 (C-2), 17.3 (C-15) y 16.0 (C-14).

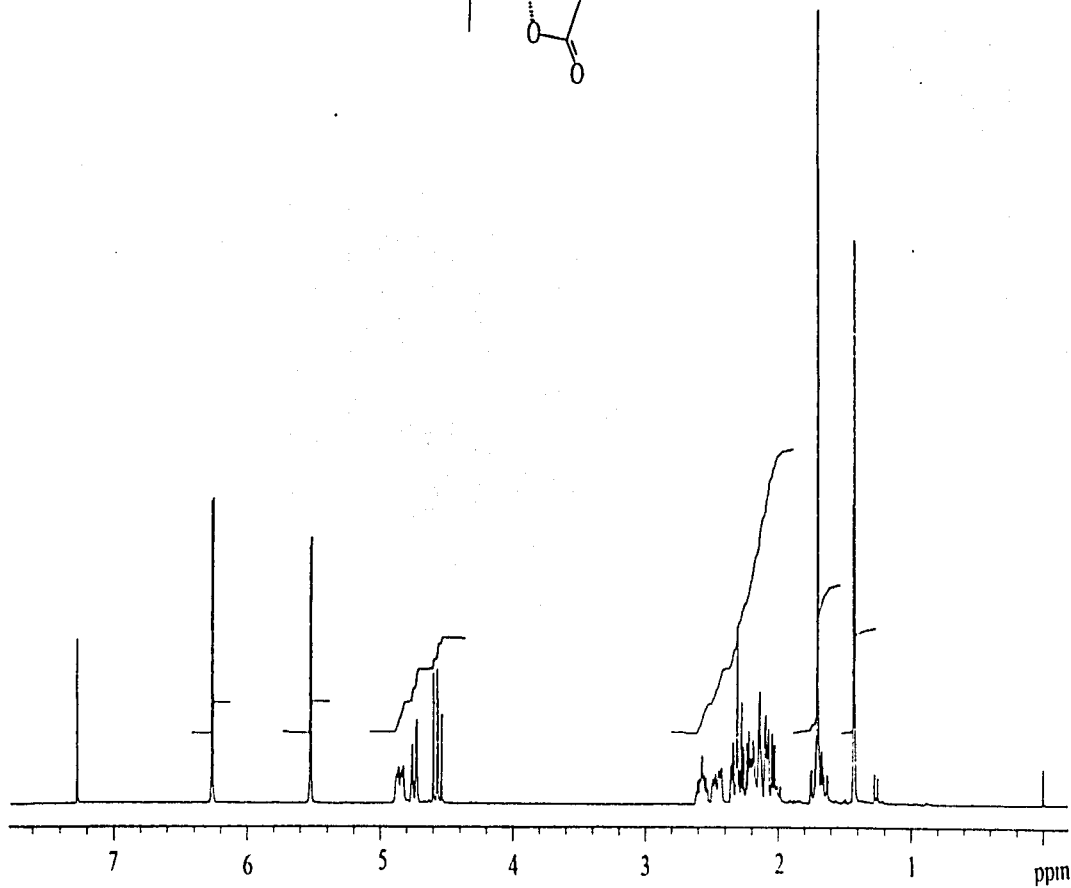
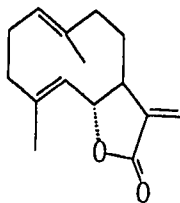
\*Las constantes de acoplamiento ( $J$ ) expresadas en Hz se indican en el paréntesis.



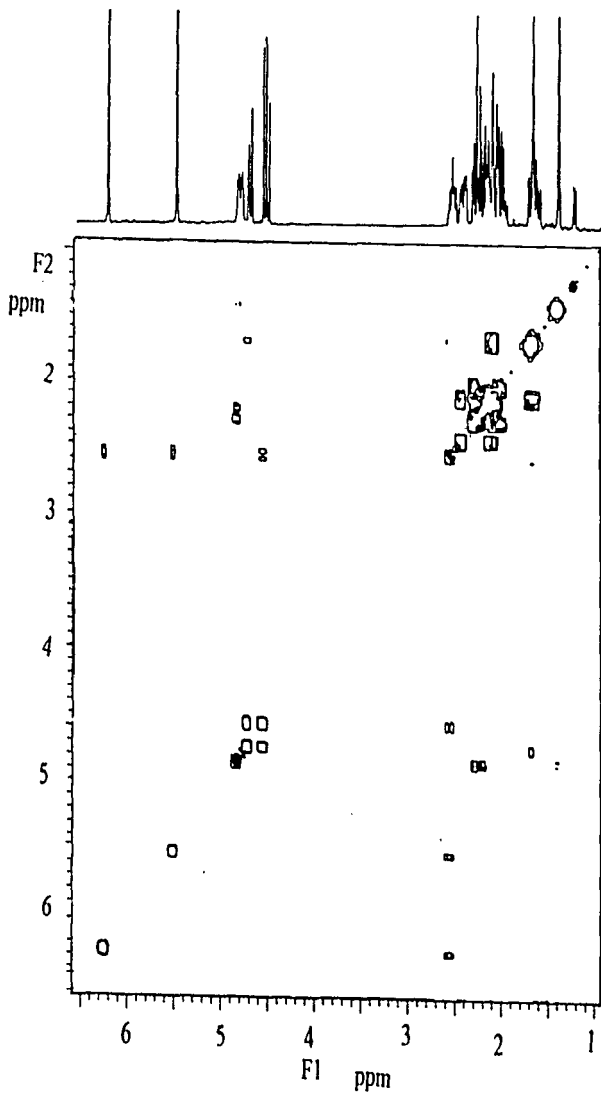
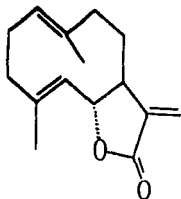
Spectro 5. Espectro de IR de la costunólida (20)



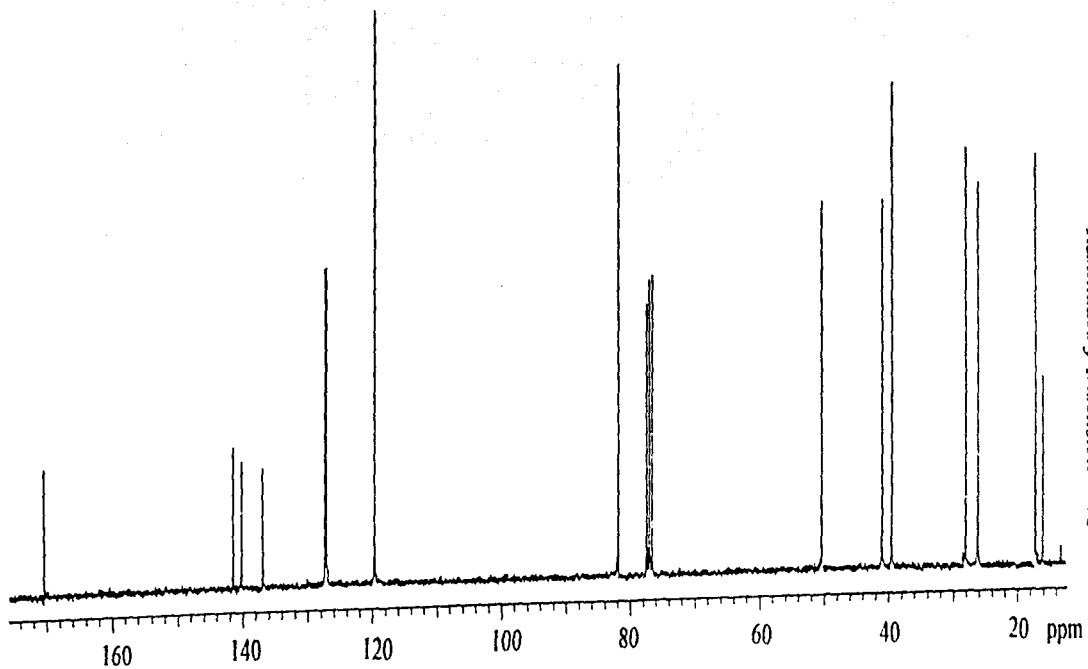
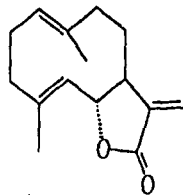
Espectro 6. EMIE de la costunólida (20)



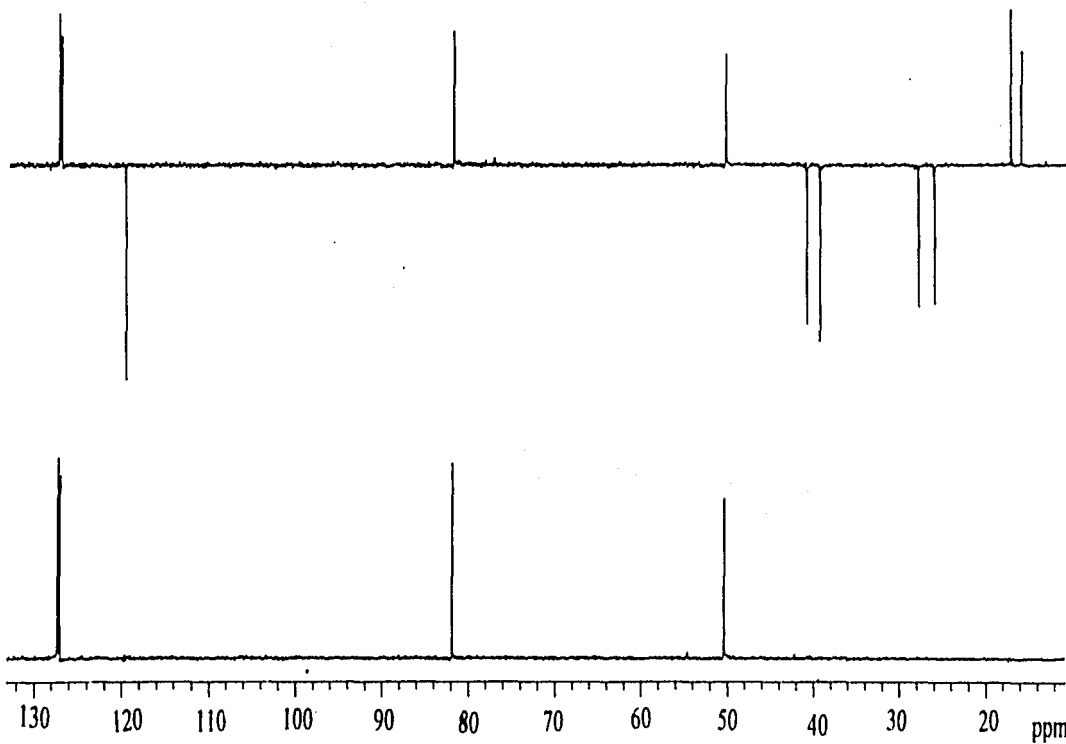
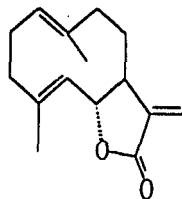
Espectro 7. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de la costunólida (20)



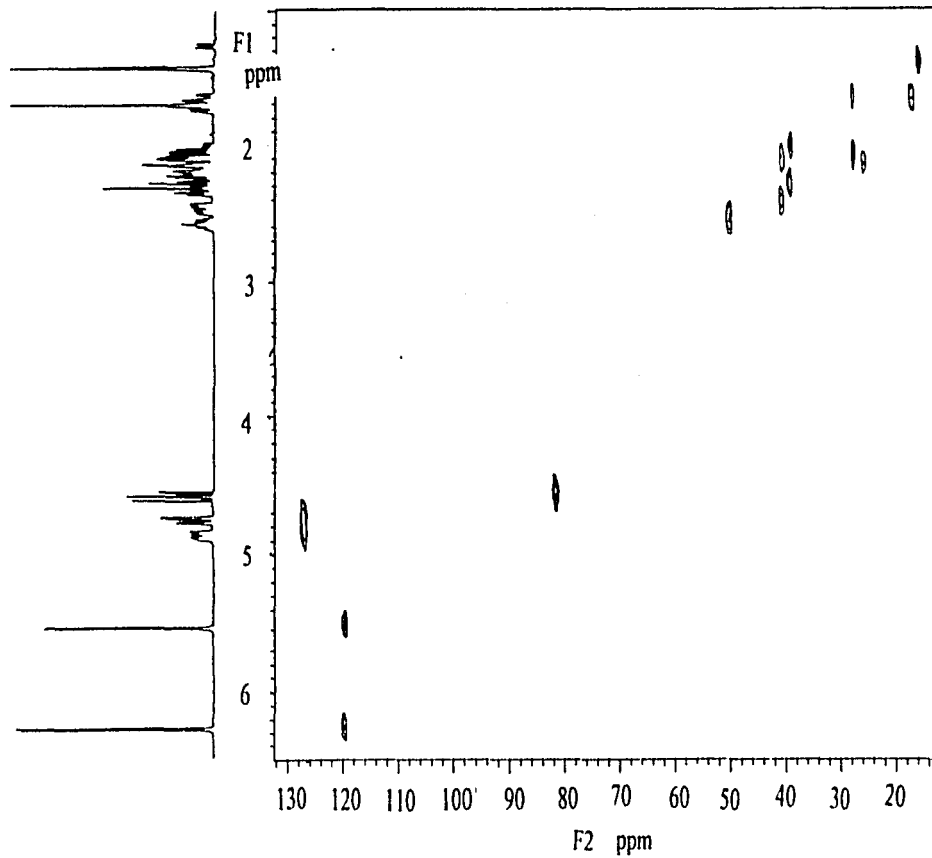
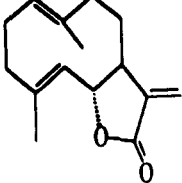
Espectro 7a. Espectro COSY de la costunólida (20)



**Espectro 8.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la costunólida (20)



Espectro 8a. Espectro DEPT de la costunólida (20)



**Espectro 8b.** Espectro HETCOR de la costunólida (20)



#### 4.2.3. Caracterización de la 15-isovaleriloxi costunólida (55) obtenida de la fracción H.

La 15-isovaleriloxi-costunólida (55) se obtuvo por cristalización en la fracción H.

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto se resumen en la Tabla 3.

El ión molecular observado en el espectro de masas (Espectro 10) mostró una relación  $m/z$  de 332 una y correspondió a la fórmula  $C_{20}H_{28}O_4$ , la cual permite 7 insaturaciones.

El espectro IR (Espectro 9) presentó absorciones características para una  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada ( $1760$ , y  $1668\text{ cm}^{-1}$ ) y para una función éster ( $1727$ ,  $1290\text{ cm}^{-1}$ ).

El análisis de los espectros de RMN del producto 55 y la comparación de estos con los obtenidos para la costunólida (20), permitieron comprobar que el producto era también una lactona sesquiterpénica de tipo germacranólida. Este análisis comparativo también permitió comprobar que la principal diferencia entre los dos productos es que uno de los hidrógenos del metilo en C-4 se encontraba sustituido por un grupo isovaleriloxi.

El espectro de RMN- $^{13}C$  (Espectro 12) mostró señales para 19 átomos de carbono, lo que no era congruente con la fórmula molecular propuesta. Sin embargo, el análisis del espectro HETCOR (Espectro 12b), nos permitió saber que dos de los metilos presentes en la molécula eran isocronos; es decir presentaban el mismo desplazamiento químico. Los metilos isocronos correspondían a la señal en  $\delta_c$  22.4 la cual mostraba una correlación con la

señal doble en  $\delta_{\text{H}}$  0.97 misma que integraba para 6 protones, y que por lo tanto debía corresponder a dos metilos.

Teniendo en cuenta lo anterior, el análisis de RMN- $^{13}\text{C}$  en su modalidad DEPT (Espectro 12a), indicó que las señales presentes en el espectro 12 correspondían a tres metilos, siete metilenos, cinco metinos y cinco carbonos cuaternarios. El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  mostró una gran similitud al de la costunólida (20), observándose las señales características de la  $\gamma$ - lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada en  $\delta_{\text{C}}$  170.0 (C-12), 138.4 (C-11), 120.0 (C-13) y 80.1 (C-6) y los metinos olefinicos en  $\delta_{\text{C}}$  131.2 (C-5) y 126.6 (C-1). Sin embargo, el espectro presentó absorción solo para uno de los metilos ubicado sobre las dobles ligaduras endocíclicas en la costunólida (20). Por el desplazamiento químico observado, el único metilo presente debía corresponder al C-14. En lugar de la absorción para el metilo sobre C-4, se observaron señales para: un metileno unido a una función oxigenada ( $\delta_{\text{C}}$  61.2 ) y un residuo de tipo isovaleriloxi [  $\delta_{\text{C}}$  172.8 (C-16), 43.3 (C-17), 25.7 (C-18), 22.4 (C-19 y C-20)]. Estas características permitieron proponer que el producto natural 55 correspondía a un derivado de la 15-hidroxi costunólida, el cual se encontraba esterificado por un residuo de ácido isovalérico.

Las características más relevantes del espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Espectro 11) son las siguientes:

- ◆ La presencia de los dobletes típicos del metileno de la  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada, que se observaron en  $\delta_{\text{H}}$  6.28 (H-13a) y 5.54 (H-13b). Estas señales correlacionaron con el multiplete en  $\delta_{\text{H}}$  2.52 asignable al H-7 en el espectro COSY (Espectro 11a).

◆ Un multiplete en  $\delta_{\text{H}}$  4.58 que integraba para tres hidrógenos. Este multiplete mostraba correlación en el espectro HETCOR (Espectro 12b) tanto con el metileno en  $\delta_{\text{C}}$  61.2 como con el carbono base de la lactona en  $\delta_{\text{C}}$  80.1. En el espectro COSY (Espectro 11a) esta misma señal correlacionaba con el multiplete asignable al hidrógeno vinílico H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  4.91), lo cual permitió establecer que el cierre de la lactona era entre C-6/ C-7 al igual que en el caso de la costunólida.

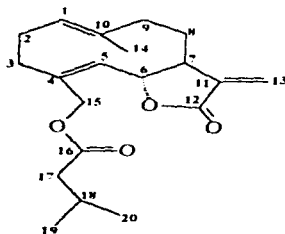
◆ Un doblete ( $J = 6.6$  Hz) en  $\delta_{\text{H}}$  0.97 asignable a los metilos del residuo isovaleriloxi.

Las señales asignadas individualmente en RMN- $^{13}\text{C}$  y RMN- $^1\text{H}$  correlacionaron en el espectro bidimensional heteronuclear HETCOR (Espectro 12b), mismo que permitió completar las asignaciones de los núcleos restantes.

Cabe resaltar que este trabajo constituye la primera descripción del espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  para este compuesto.

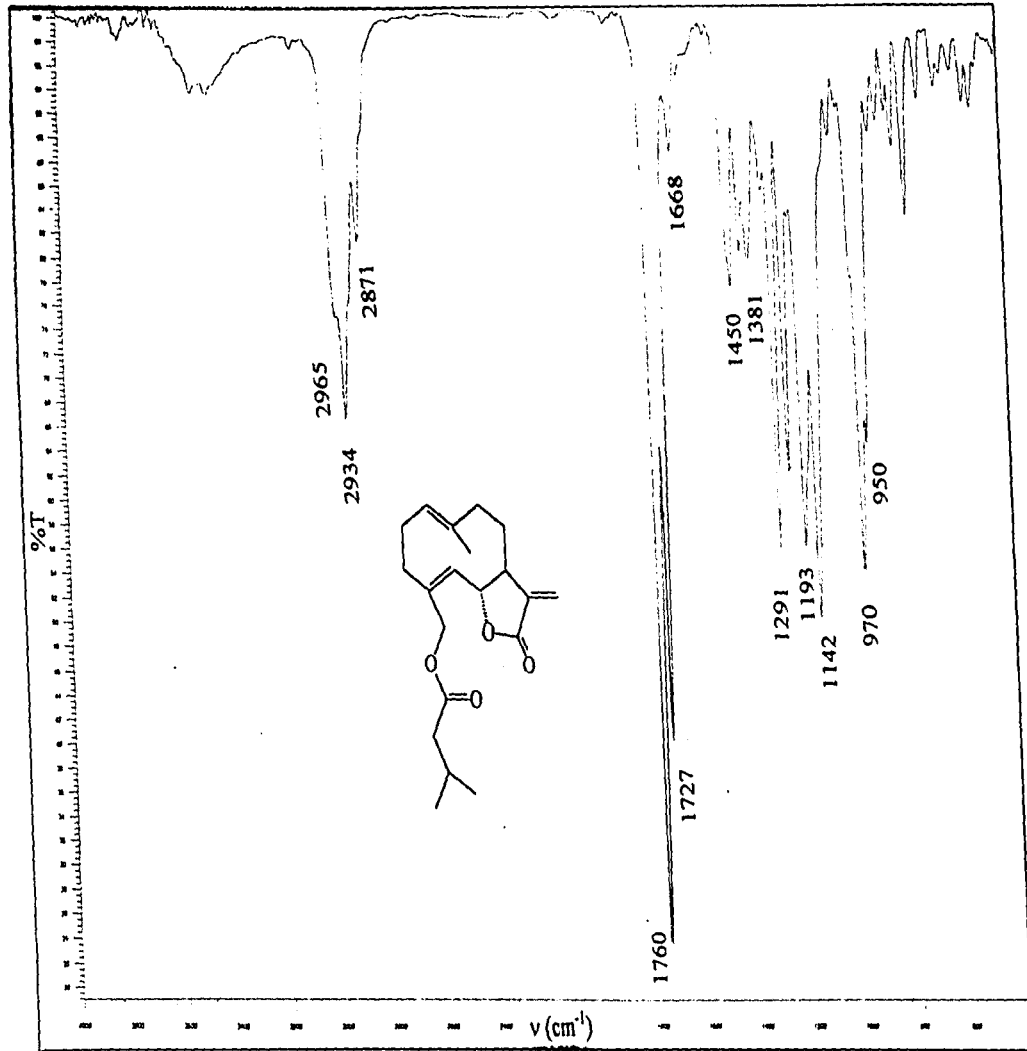
Con base en el análisis anterior, la estructura del metabolito **55** se estableció como la de 15-isovaleriloxi costunólida. Los parámetros espectroscópicos (IR y RMN- $^1\text{H}$ ) y características físicas coincidieron con los publicados previamente para este producto (Bohlmann *et al.*, 1978), el cual ya ha sido obtenido de otras fuentes naturales.

Tabla 3. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la 15-isovaleriloxi costunólida (55).

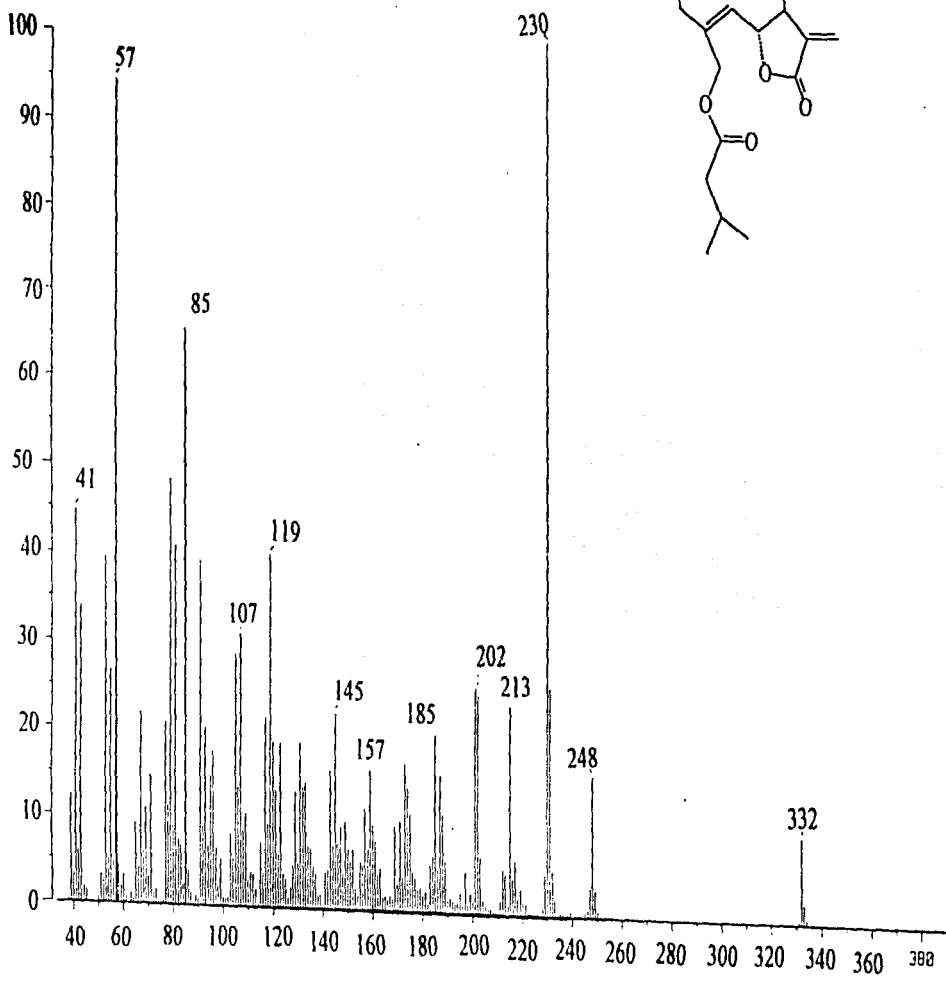


IR, $\nu_{\text{max}}$ (KBr) $\text{cm}^{-1}$ (Espectro 9)	2965, 2934, 2871, 1760, 1727, 1668, 1450, 1381, 1291, 1249, 1193, 1142, 970 y 950.
EMIE, $m/z$ (int rel) (Espectro 10)	332 [ $\text{M}^+$ (9.3)], 248 (15.3), 230 (100.0), 213 (23.3), 202 (26.0), 185 (20.0), 157 (15.3), 145 (22.0), 119 (40.0), 107 (31.3), 85 (66.0) 57 (94.0) y 41 (44.6).
RMN- $^1\text{H}$ $\delta$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) * (Espectro 11)	6.28 (d, $J=3.3$ , H-13a), 5.54 (d, $J=3.0$ , H-13b), 4.91 (m, H-1 y H-5), 4.58 (m, H-15 y H-6), 2.52 (m, H-7 y H-3), 2.11 (m, H-17, H-9, H-2, H-8a y H-18), 1.67 (m, H-8b), 1.38 (s, H-14), 0.97 (d, $J=6.6$ , H-19 y H-20)
RMN- $^{13}\text{C}$ $\delta$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) * (Espectro 12)	172.8 (C-16), 170.0 (C-12), 139.4 (C-4), 138.4 (C-11), 137.3 (C-10), 131.2 (C-5), 126.6 (C-1), 120.0 (C-13), 80.1 (C-6), 61.2 (C-15), 50.6 (C-7), 43.3 (C-17), 40.9 (C-9), 35.6 (C-3), 27.7 (C-8), 26.7 (C-2), 25.7 (C-18), 22.4 (C-19 y C-20) y 16.1 (C-14).

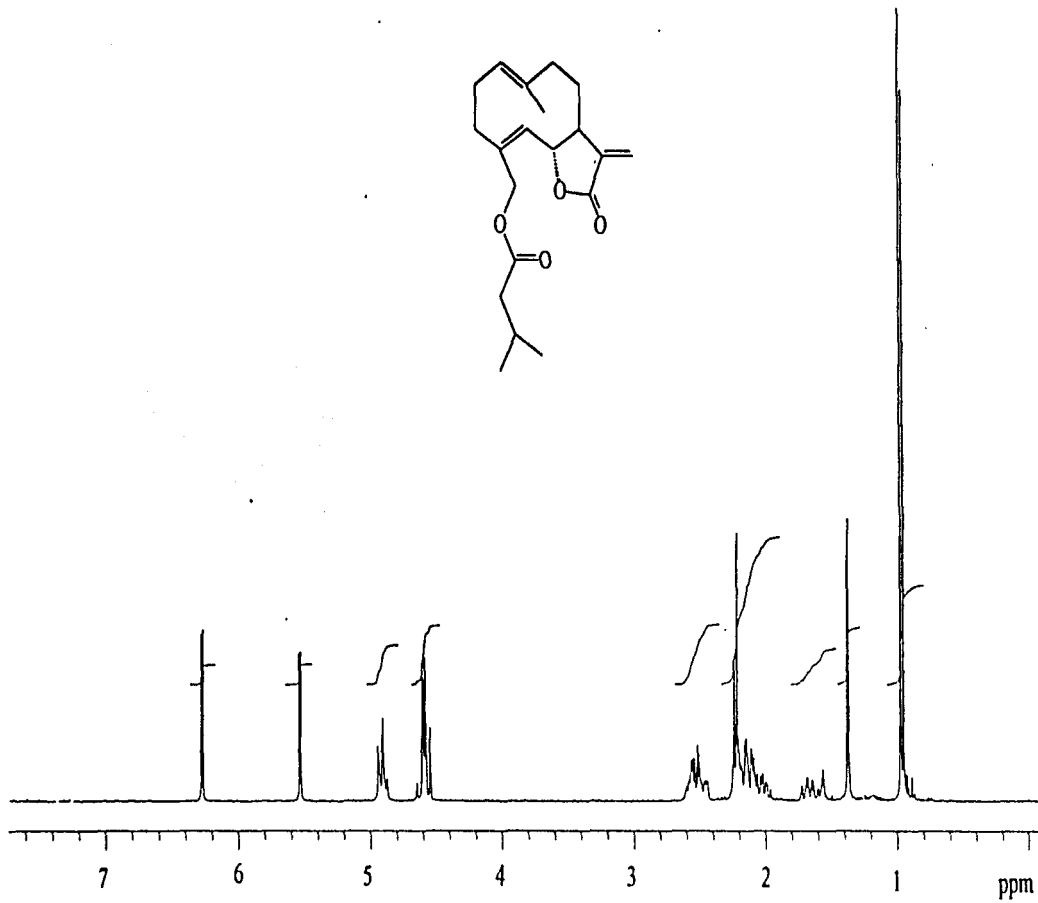
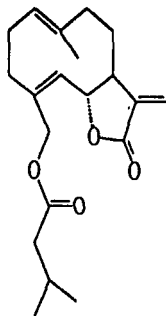
\* Las constantes de acoplamiento (J) expresadas en Hz se indican en el paréntesis.



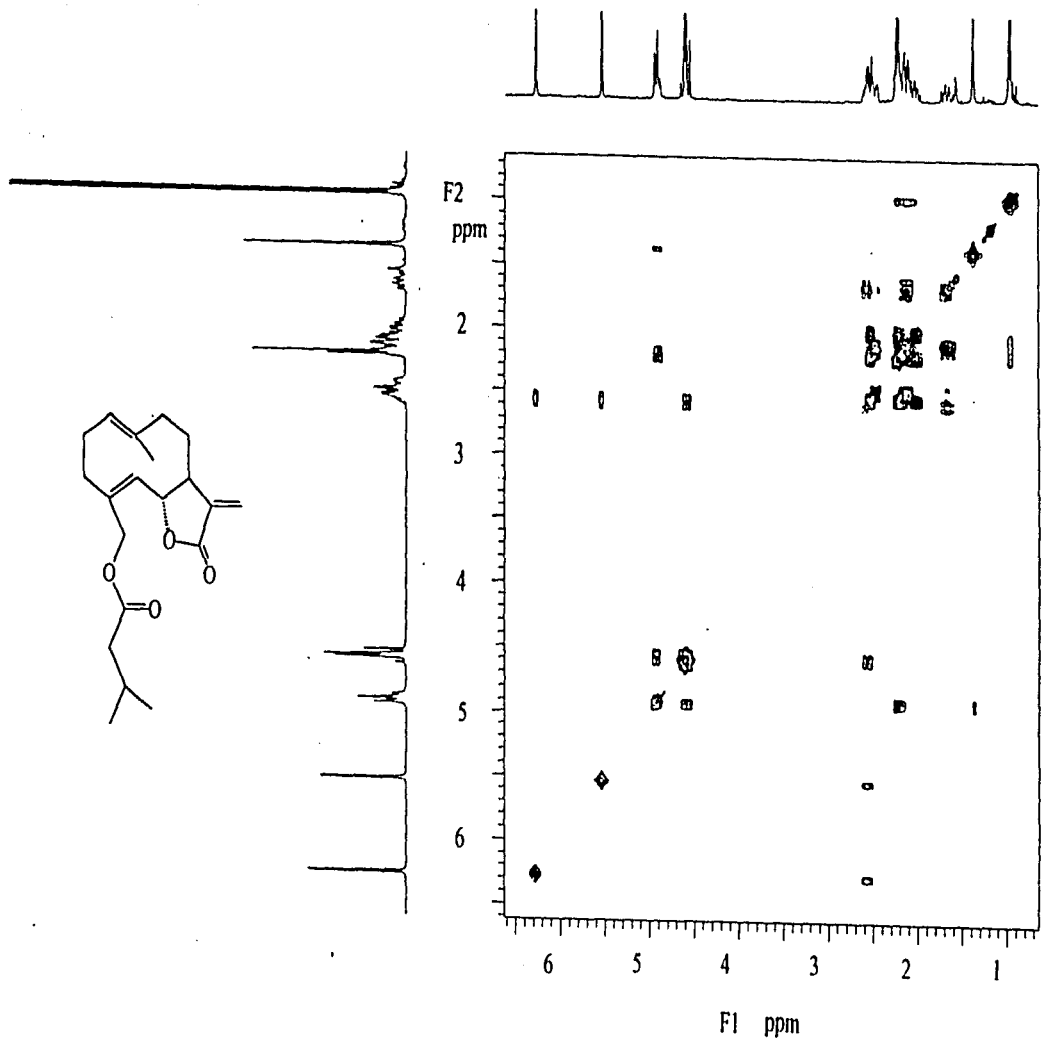
Espectro 9. Espectro de IR de la 15-isovaleriloxi costunólida (55)



**Espectro 10.** EMIE de la 15-isovaleriloxi costunólida (55)

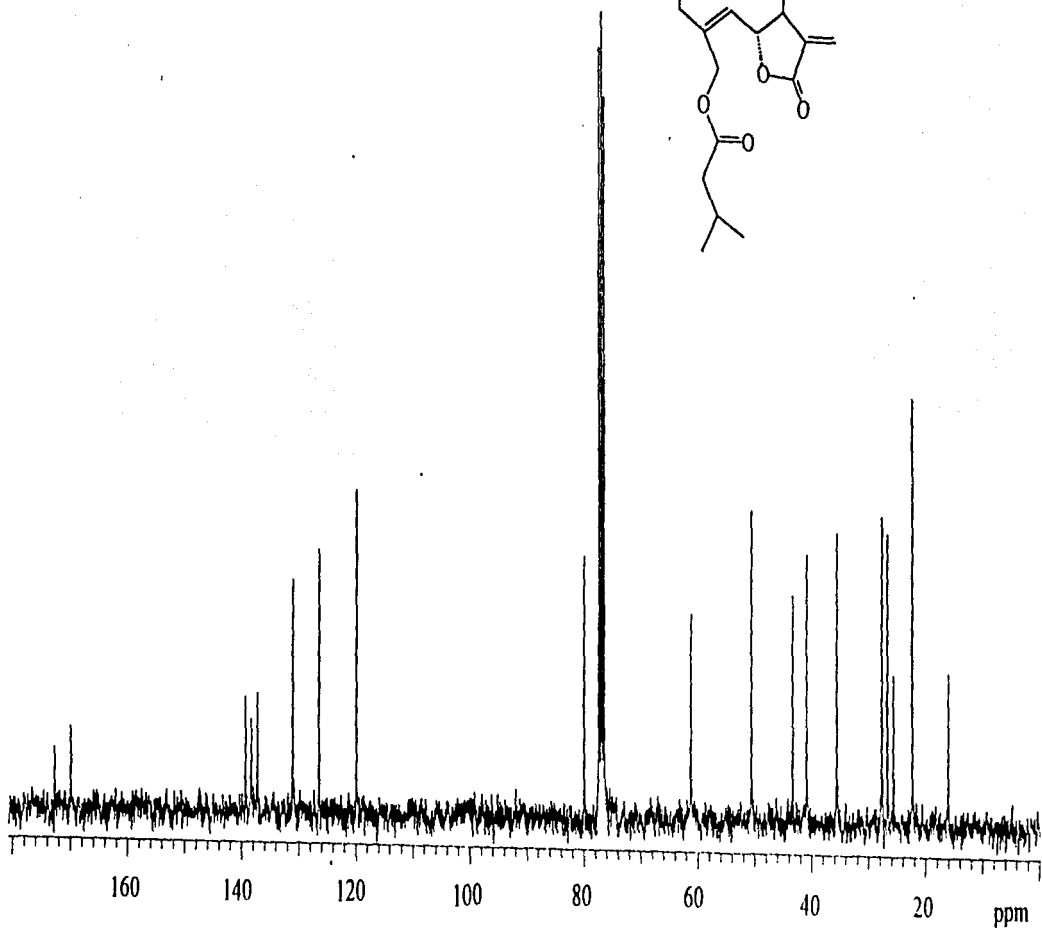
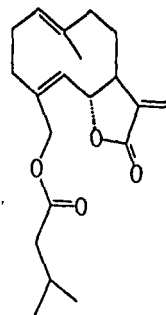


**Espectro 11.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la 15-isovaleriloxi costunólida (55)

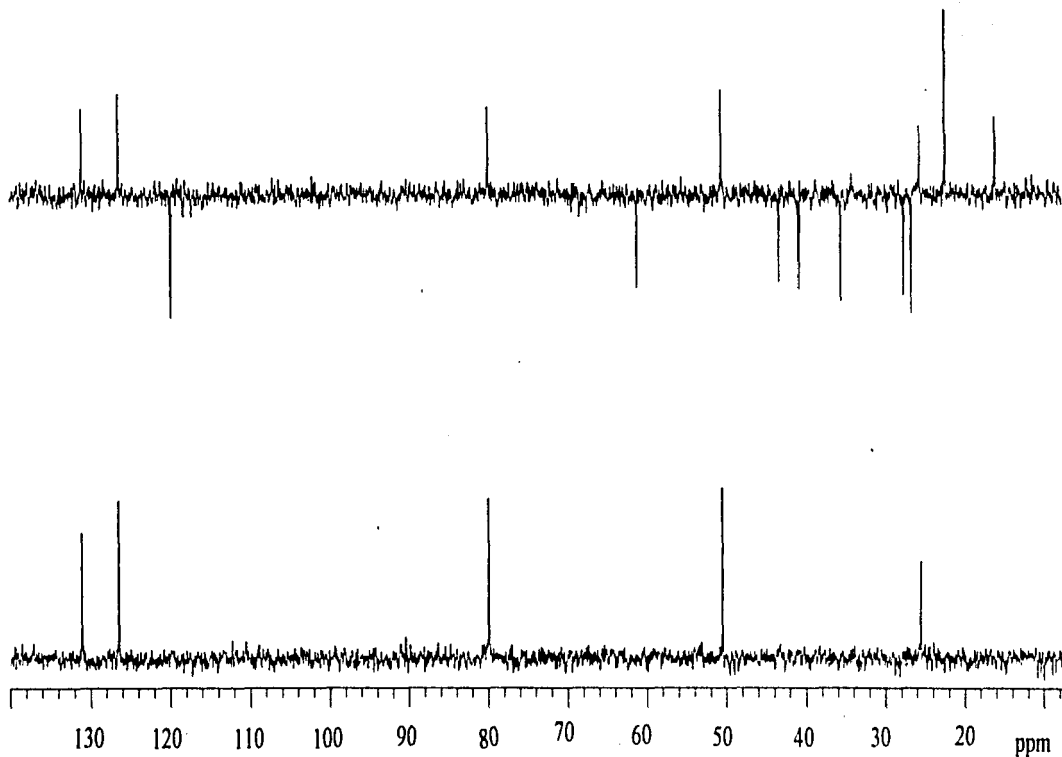
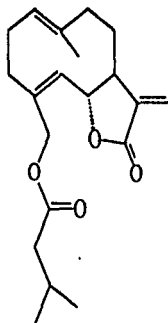


Espectro 11a. Espectro COSY de la 15-isovaleriloxi costunólida (55)

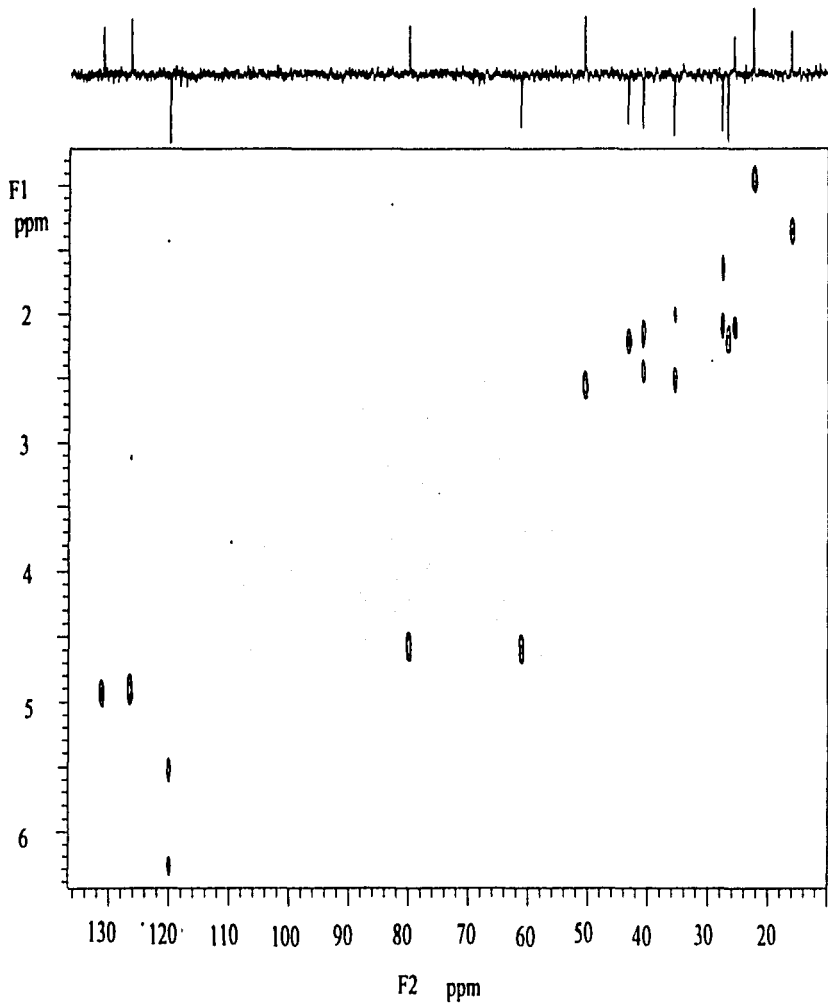




**Espectro 12.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la 15-isovaleriloxi costunólida (55)



**Espectro 12a.** Espectro DEPT de la 15-isovaleriloxi costunólida (55)



**Espectro 12b.** Espectro HETCOR de la 15-isovaleriloxi costunólida (55)

#### 4.2.4 Caracterización de la 15-isobutiriloxi costunólida (**56**) obtenida de la fracción activa I.

La 15-isobutiriloxi costunólida se obtuvo por cristalización a partir de la fracción activa I y presentó un punto de fusión de 108-109 °C. Las constantes físicas y espectroscópicas del producto se resumen en la Tabla 4.

La fórmula molecular del compuesto **56** se estableció por espectrometría de masas (Espectro 14) como  $C_{19}H_{27}O_4$ , la cual permite siete insaturaciones.

El espectro de IR (Espectro 13) presentó las absorciones características de una  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada ( $1759$  y  $1666\text{ cm}^{-1}$ ) y de una función éster ( $1724$  y  $1289\text{ cm}^{-1}$ ).

El análisis detallado de los espectros de RMN y masas permitió establecer que el producto **56** era muy similar al de la lactona **55**. Al igual que el producto **55**, este compuesto era un derivado de la 15-hidroxi costunólida. Sin embargo, en este caso el hidroxilo se encontraba esterificado por un residuo de ácido isobutírico en lugar de ácido isovalérico, como en el caso del producto **55**.

Las principales diferencias observadas en los espectros de RMN de los productos **55** y **56** se resumen a continuación:

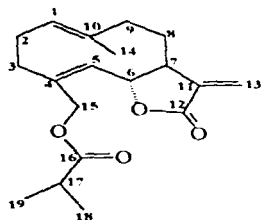
1. El ión molecular del producto **56** se observó en una relación  $m/z$  de 318 una; es decir catorce unidades de masas menos que el producto **55**.
2. El espectro de RMN- $^{13}C$  (Espectro 16) resultó prácticamente idéntico, difiriendo en la ausencia de una señal para el metileno presente en la unidad isovaleriloxi, y en el desplazamiento químico de la señal asignable a los metilos de esta unidad, la cual se desplazó diamagnéticamente a  $\delta_c$  18.3

3. El espectro de de RMN-<sup>1</sup>H (Espectro 15) también fué muy similar al del compuesto 55, difiriendo de nueva cuenta en el desplazamiento químico de la señal de los metilos del residuo ácido. En este caso la señal (d,  $J= 6.9$  Hz) se encontró desplazada paramagnéticamente en  $\delta_{H}$  1.18.

Las señales asignadas individualmente en RMN-<sup>13</sup>C y RMN-<sup>1</sup>H correlacionaron en el espectro bidimensional heteronuclear HETCOR (Espectro16b), mismo que permitió completar las asignaciones de los núcleos restantes. Cabe resaltar que este trabajo constituye la primera descripción del espectro de RMN-<sup>13</sup>C para este compuesto.

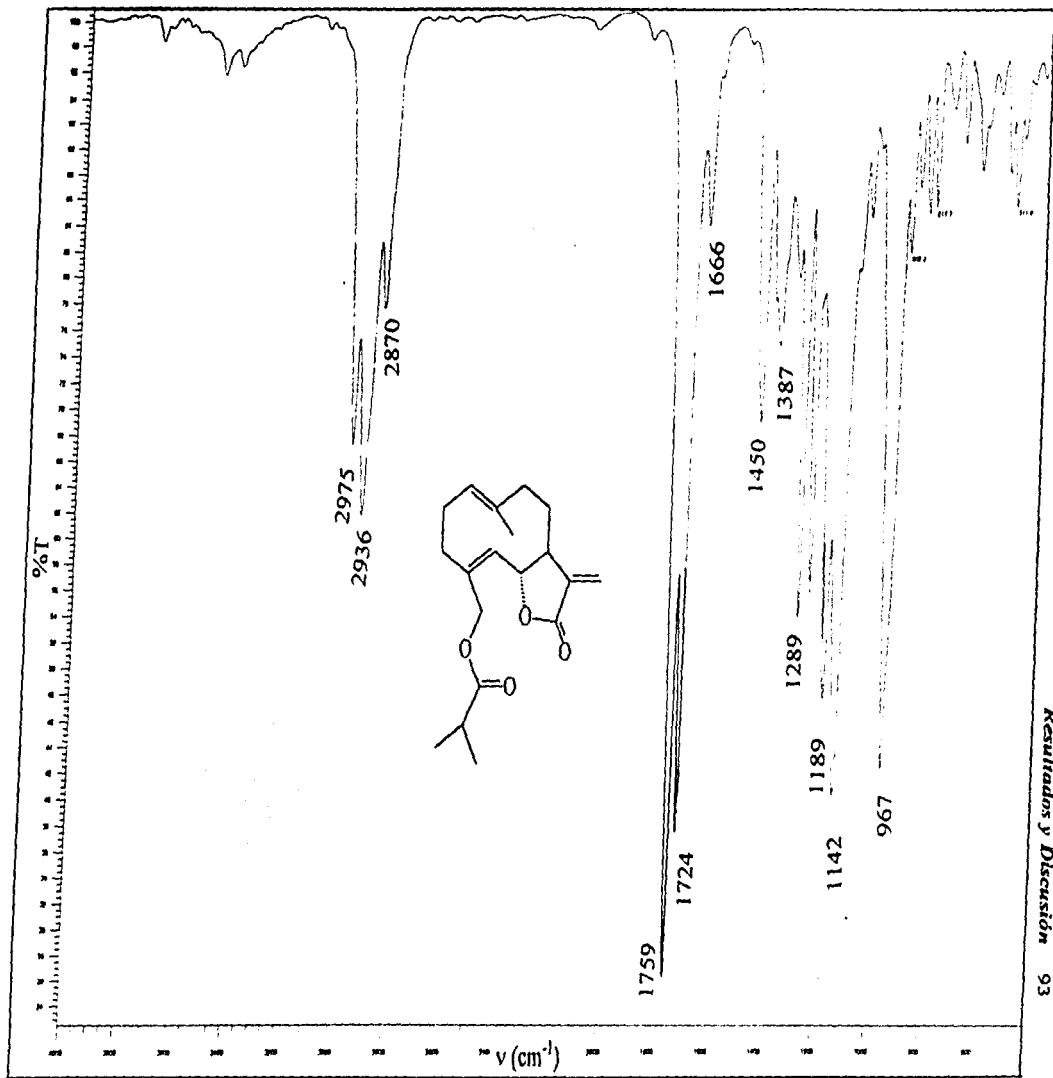
Con base en el análisis anterior, la estructura del metabolito 56 se estableció como la 15-isobutiriloxi costunólida. Los parámetros espectroscópicos (IR y RMN-<sup>1</sup>H) y características físicas coincidieron con los publicados previamente para este producto (Bohlmann *et al.*, 1980), el cual ya ha sido obtenido de otras fuentes naturales.

Tabla 4. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la 15-isobutiriloxi costunólida (56).

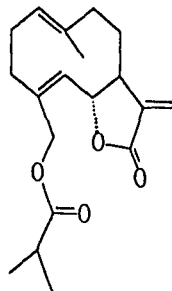
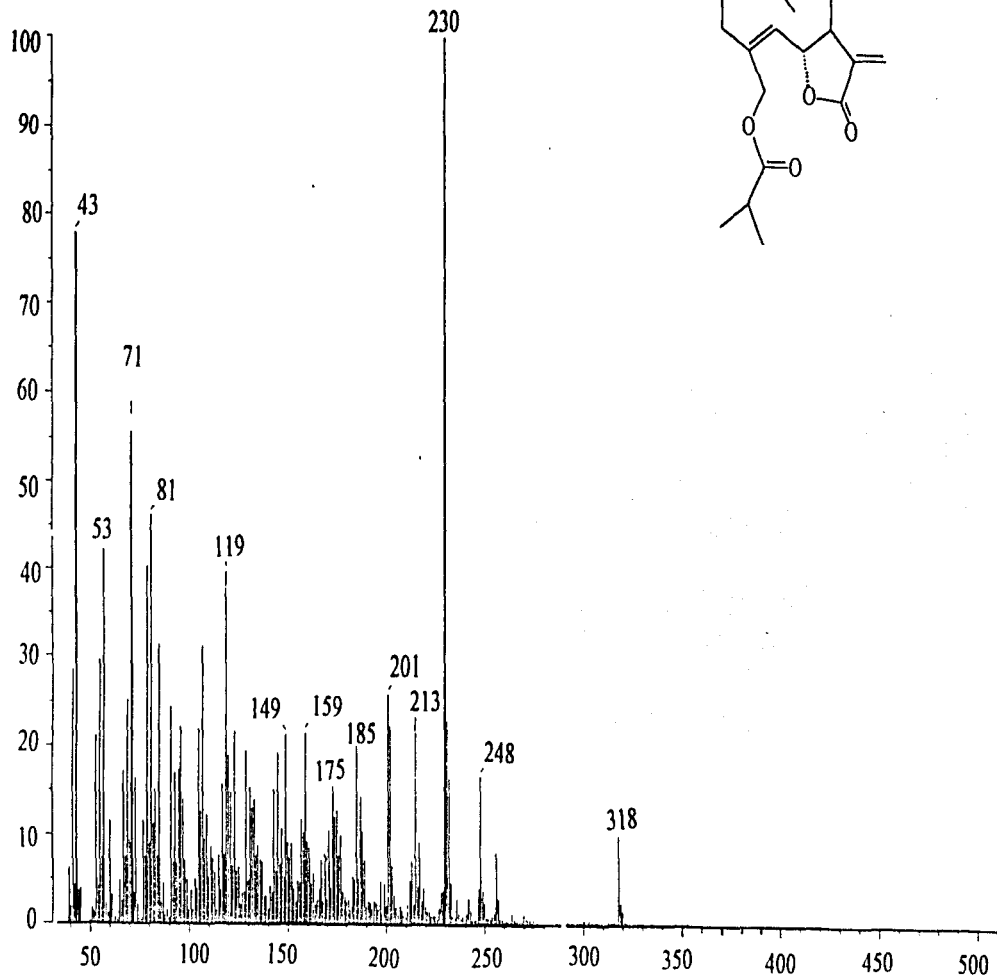


IR, $\nu_{\text{max}}$ (KBr) $\text{cm}^{-1}$ (Espectro 13)	2975, 2936, 2870, 1759, 1724, 1666 1450, 1387, 1289, 1248, 1189, 1142 y 967.
EMIE, $m/z$ (int rel) (Espectro 14)	318 [ $\text{M}^+$ (10.0)], 248 (16.6), 230 (100.0), 213 (24.0), 201 (26.0), 185 (20.6), 175 (15.5), 159 (22.0), 149 (22.0), 119 (40.0), 81 (46.0), 71 (56.0), 53 (42.3) y 43 (78.0).
RMN- $^1\text{H}$ $\delta$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) * (Espectro 15)	6.23 (d, $J=3.6$ , H-13a), 5.56 (d, $J=3.3$ , H-13b), 4.92 (m, H-1 y H-5), 4.61 (m, H-15 y H-6), 2.54 (m, H-7, H-17, H-9a y H-3a), 2.11 (m, H-2, H-8a, H-3b y H- 9b), 1.68 (m, H-8b), 1.39 (s, H-14), 1.18 (d, $J=6.9$ , H-18 y H-19)
RMN- $^{13}\text{C}$ $\delta$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) * (Espectro 16)	176.0 (C-16), 169.3 (C-12), 138.9 (C- 4), 137.8 (C-11), 136.6 (C-10), 130.3 (C-5), 125.9 (C-1), 119.3 (C-13), 79.4 (C-6), 60.8 (C-15), 49.9 (C-7), 40.2 (C- 9), 34.8 (C-3), 33.3 (C-17), 27.1 (C-8), 26.1 (C-2), 18.3 (C-18 y C-19) y 15.43 (C-14).

\* Las constantes de acoplamiento ( J ) expresadas en Hz se indican en el paréntesis.

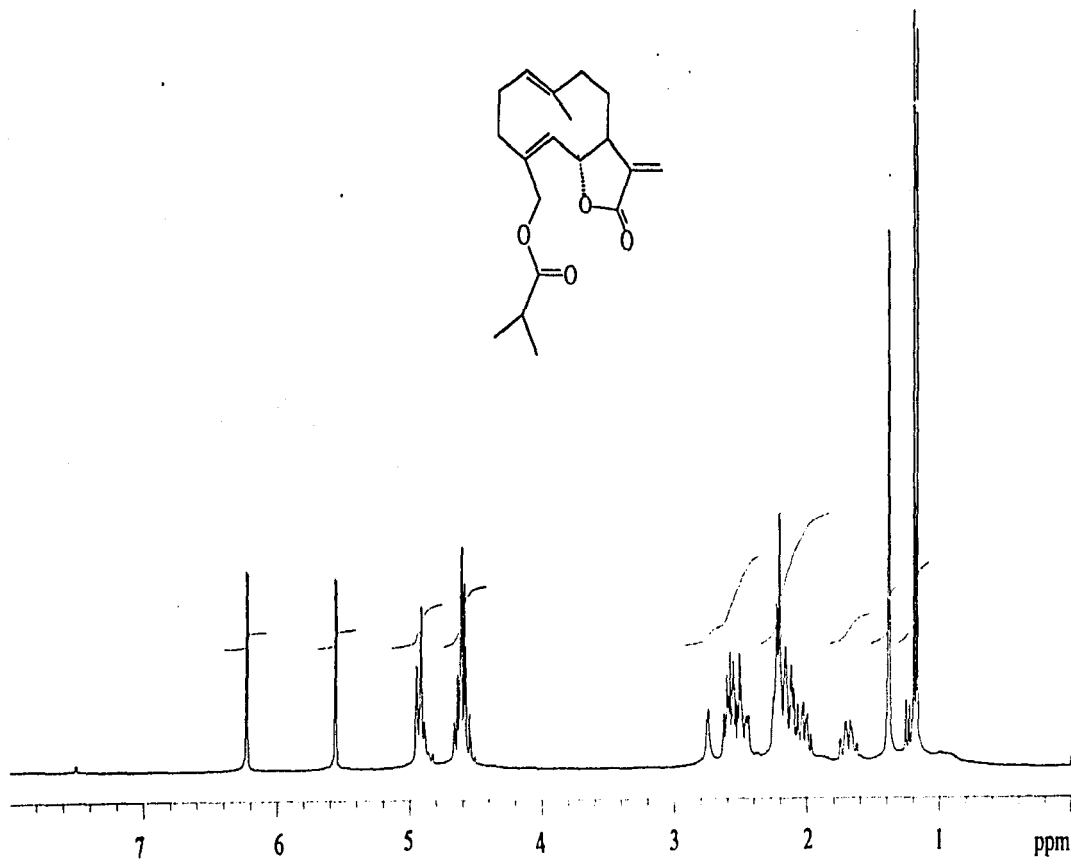


**Espectro 13.** Espectro de IR de la 15-isobutiriloxi costunólida (56)



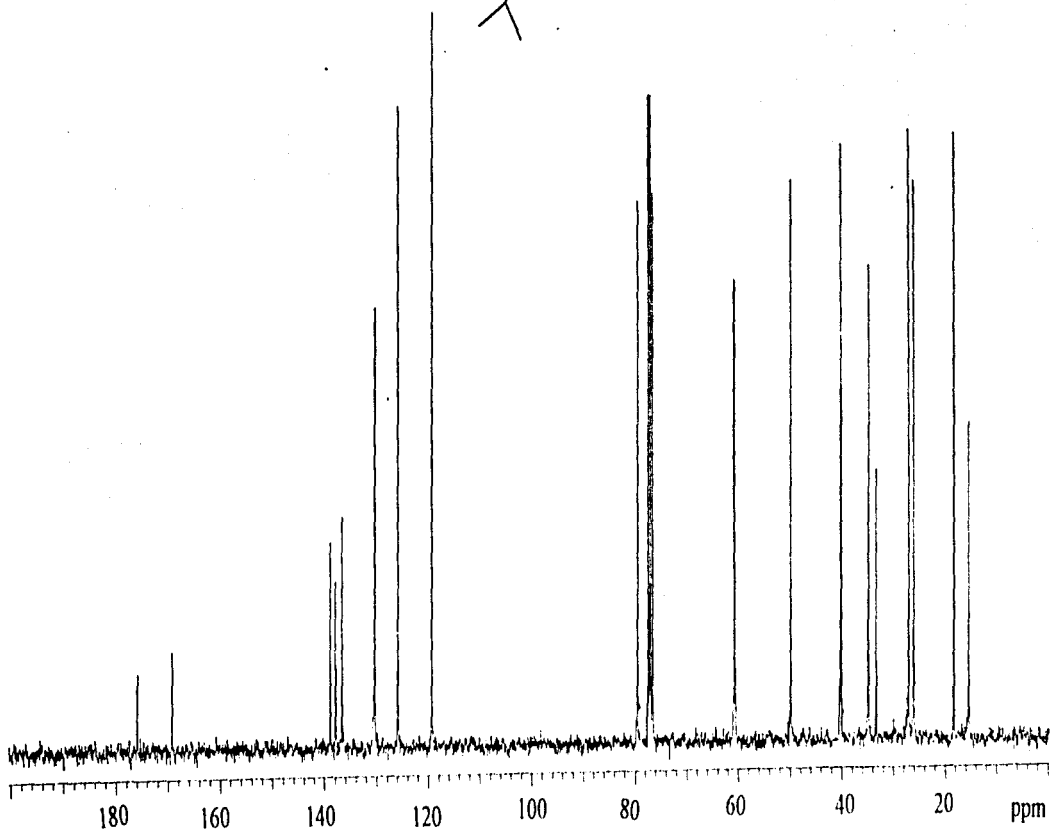
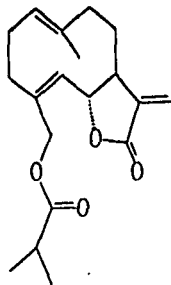
Espectro 14. EMIE de la 15-isobutiriloxi costunólida (56)

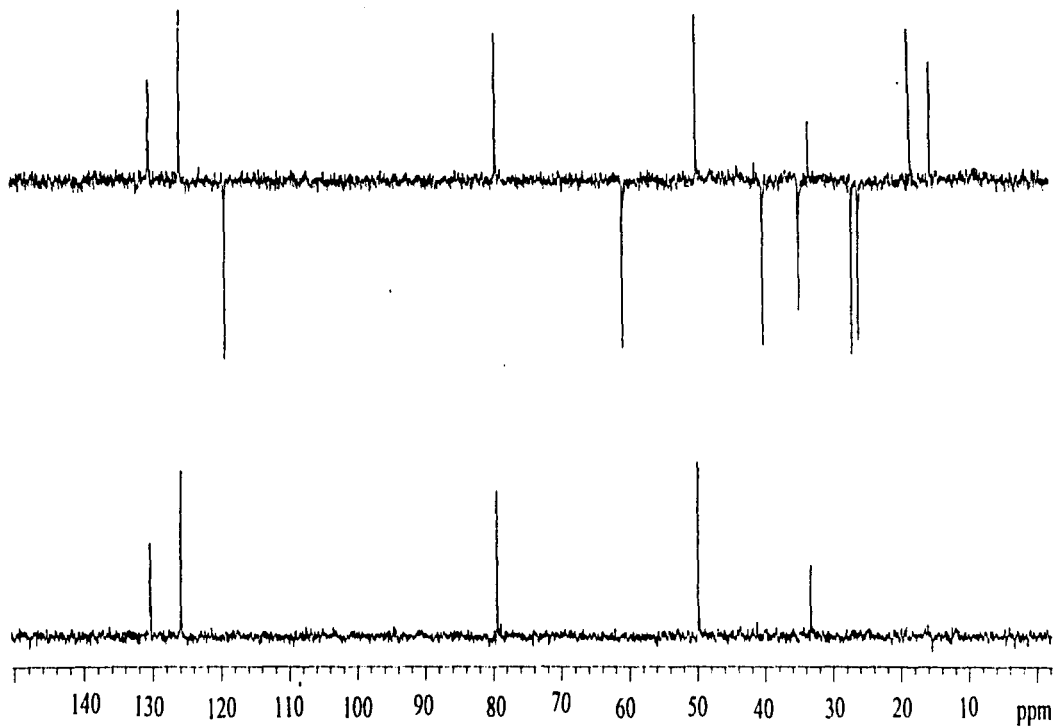
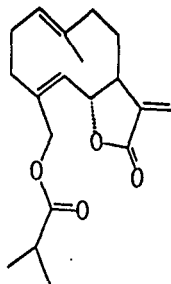




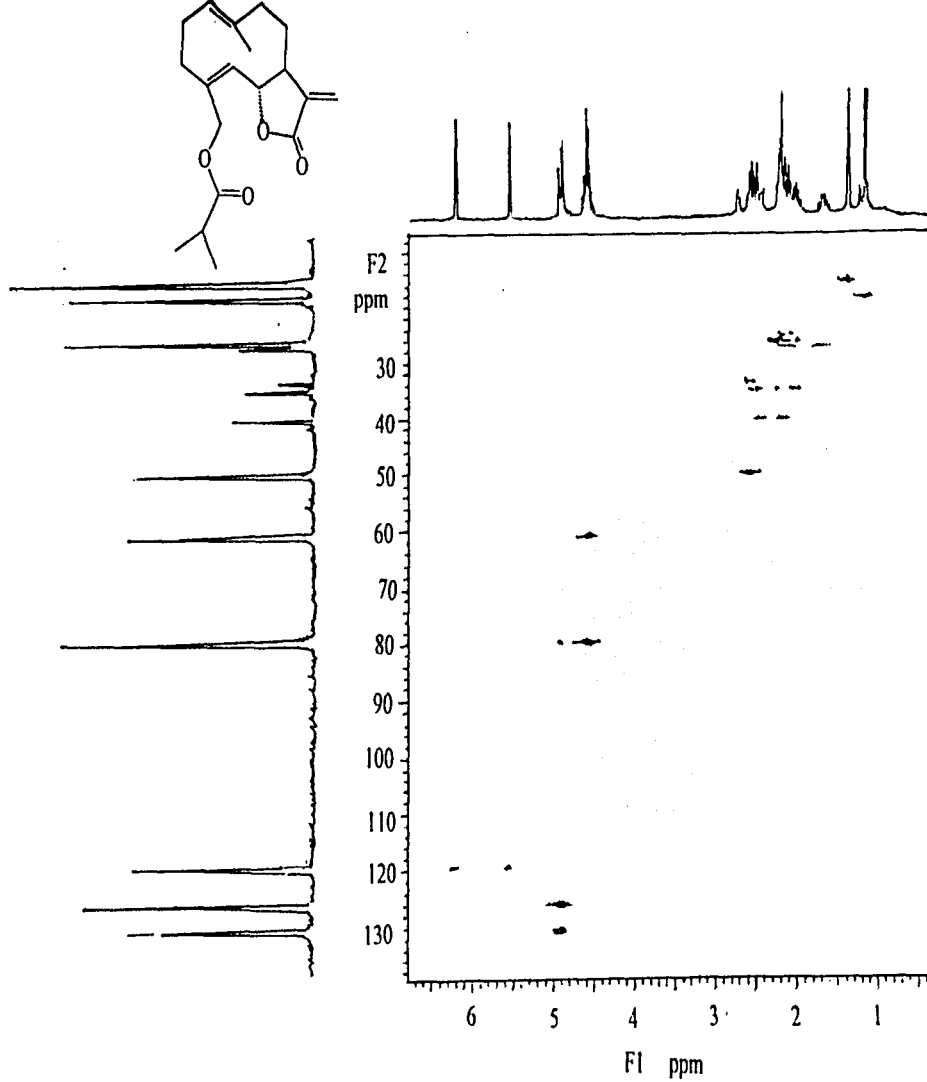
**Espectro 15.** Espectro de  $\text{RMN-}^1\text{H}$  de la 15-isobutiriloxi costunólida (56)



Espectro 16. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de la 15-isobutiniloxi costunólida (56)



**Espectro 16a.** Espectro DEPT de la 15-isobutiriloxi costunólida (56)



**Espectro 16b.** Espectro HETCOR de la 15-isobutiriloxi costunólida (56)

#### 4.2.5. Caracterización de la 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregn-16-en-20-ona (57) obtenida de la fracción J.

La 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregn-16-en-20-ona (57) cristalizó de forma espontánea de la fracción activa J, y se obtuvo como un sólido cristalino de color blanco con un punto de fusión de 192-193 °C. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de este producto se resumen en la Tabla 5.

El espectro en el IR (Espectro 17) presentó señales características para grupos hidroxilo (3507 y 1056 cm<sup>-1</sup>) y cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada (1685 y 1610 cm<sup>-1</sup>).

Este producto, por tratamiento con anhídrido acético y piridina, generó el derivado monoacetilado 57a.

La fórmula molecular del compuesto 57 se estableció por espectrometría de masas (Espectro 18) como C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>, la cual permite seis grados de insaturación.

El análisis detallado de los espectros de RMN del producto 57 permitieron establecer que el producto era un esteroide tipo pregnano que contenía una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada (Tereda *et al.*, 1978; Duddeck *et al.*, 1986; Dawe y Wright, 1987; Kirk *et al.*, 1990).

El espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Espectro 20) presentó señales para veintiún carbonos; y el análisis del espectro de RMN-<sup>13</sup>C en su modalidad DEPT (Espectro 20a), indicó claramente que las mismas correspondían a tres metilos, ocho metilenos, seis metinos y cuatro carbonos cuaternarios. De acuerdo con el desplazamiento químico, uno de los carbonos cuaternarios ( $\delta_c$  209) correspondía al carbonilo de la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada; previamente evidenciada en el espectro IR. La presencia de esta unidad estructural satisface dos de las insaturaciones requeridas en la fórmula molecular. El

segundo de los carbonos cuaternarios correspondió a un carbono olefinico ( $\delta_c$  140.8); por último los dos restantes eran de tipo alifático y son atribuibles a los carbonos C-10 ( $\delta_c$  36.5) y C-13 ( $\delta_c$  44.0 ) del núcleo base.

Las señales correspondientes a los metinos observados en  $\delta_c$  71.7 y  $\delta_c$  121.4 permitieron evidenciar la existencia de una función carbinólica y de una doble ligadura conjugada y trisustituída en la molécula respectivamente. La señal del oximetino mostró una clara correlación con el multiplete en  $\delta_H$  3.53 en el espectro HETCOR (Espectro 20b). Estas señales en conjunto con la información del espectro IR y la formación de un derivado monoacetilado confirmaron la presencia de un carbinol secundario en la molécula.

Así mismo, el metino vinílico mostró una correlación en el espectro HETCOR (Espectro 20b) con el multiplete en  $\delta_H$  5.35 (H-16), mismo que integraba para un hidrógeno vinílico. Estas últimas absorciones y el carbono cuaternario en  $\delta_c$  140.8 antes mencionado confirmaron la existencia de una doble ligadura conjugada y trisustituída.

En la zona de absorción de los metilos se observaron tres señales ( $\delta_c$  31.5, 19.4 y 13.2). La señal en  $\delta_c$  31.5 correlacionó con el singulete en  $\delta_H$  2.12 en el espectro HETCOR. El desplazamiento químico observado para este metilo en el espectro de RMN- $^1H$  era congruente con la presencia de una cetona terminal o un grupo acetato. La ausencia de carbonilo para acetato en el espectro de RMN- $^{13}C$  apoyaba la primera propuesta.

La información proporcionada por los espectros de RMN en relación a los **grupos funcionales** presentes en la molécula (carbinol, cetona conjugada) **permitieron** proponer que el producto natural era de naturaleza tetracíclica.

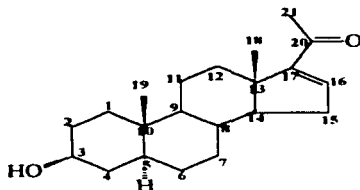
Por otro lado, el número de metilenos y metilos unidos a carbonos cuaternarios sugirieron que el núcleo tetracíclico correspondía al de un esteroide; más específicamente a un pregnano, considerando el número de átomos de carbono presente en la molécula.

Que la función cetona se encontraba en la posición C-20, era evidente por la presencia del metilo terminal en  $\delta_{11}$  2.12 en el espectro de RMN- $^1\text{H}$ . Al ser la cetona de naturaleza conjugada, la doble ligadura trisustituída debía ubicarse entonces entre los carbonos C-16 y C-17. Por último, el hidroxilo se ubicó en C-3, con base en consideraciones biogenéticas. Posteriormente, la hipótesis se confirmó al observar que el H-3 correlacionaba con los multipletes (asignados previamente por su correlación en el espectro HETCOR) que contenían a H-2 y H-4 ( $\delta_{11}$  2.07-1.97 y 1.71-1.43) en el espectro COSY (Espectro 19a). Finalmente, la estereoquímica del hidroxilo se estableció como  $\beta$ , en función del ancho medio ( $\omega_{1/2}=15.9$  Hz) de la señal en  $\delta_{11}$  3.53. El valor encontrado es característico para un hidrógeno  $\alpha$  orientado en C-3 (Tereda *et al.*, 1978; Kirk *et al.*, 1990).

Con base a las evidencias presentadas, el compuesto se caracterizó como la  $3\beta$ -hidroxi- $5\alpha$ -pregn-16-en-20-ona (57), la cual se ha obtenido de otras fuentes naturales, entre las que se encuentran: *Lycopersicon pimpinellifolium* (Schreiber y Aurich, 1966) y *Solanum verbascifolium* L (Doepke *et al.*, 1976).

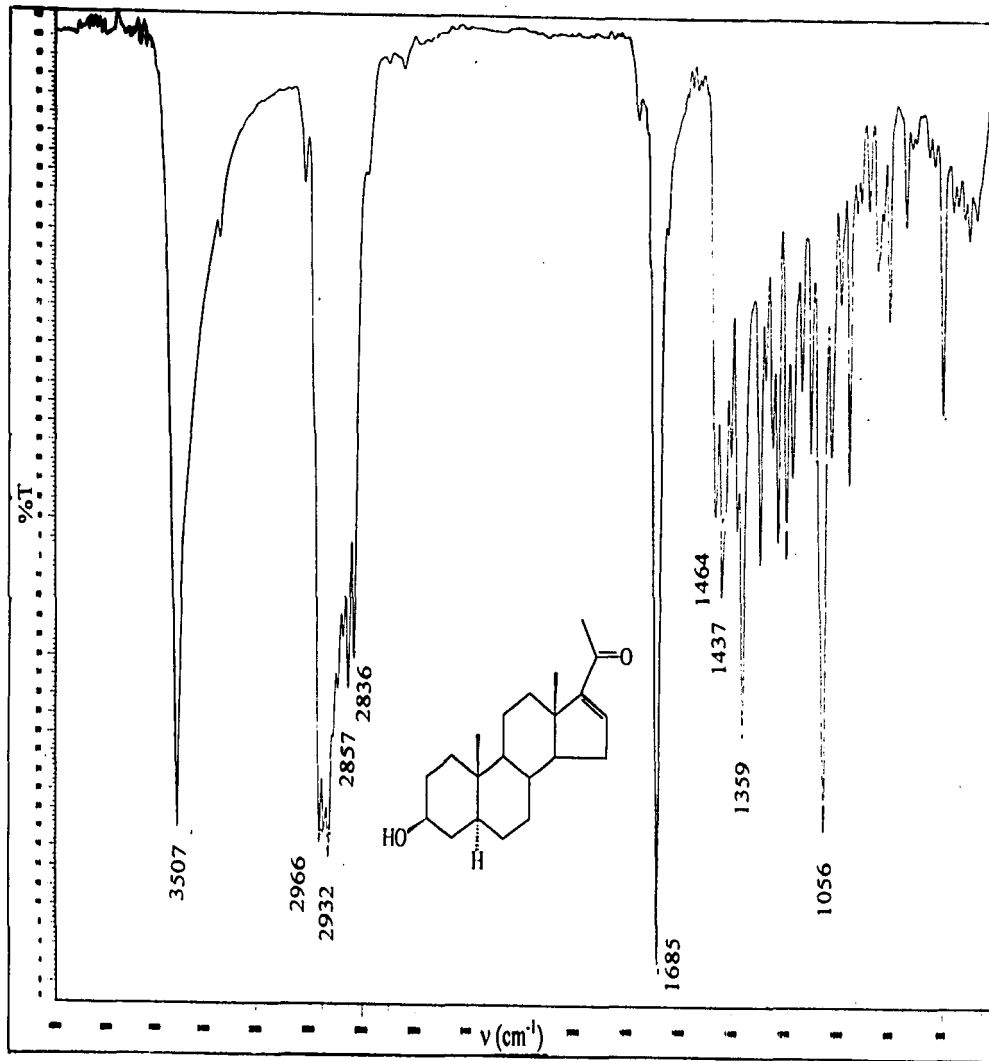


Tabla 5. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la 3β-hidroxi-5α-pregn-16-en-20-ona (57).

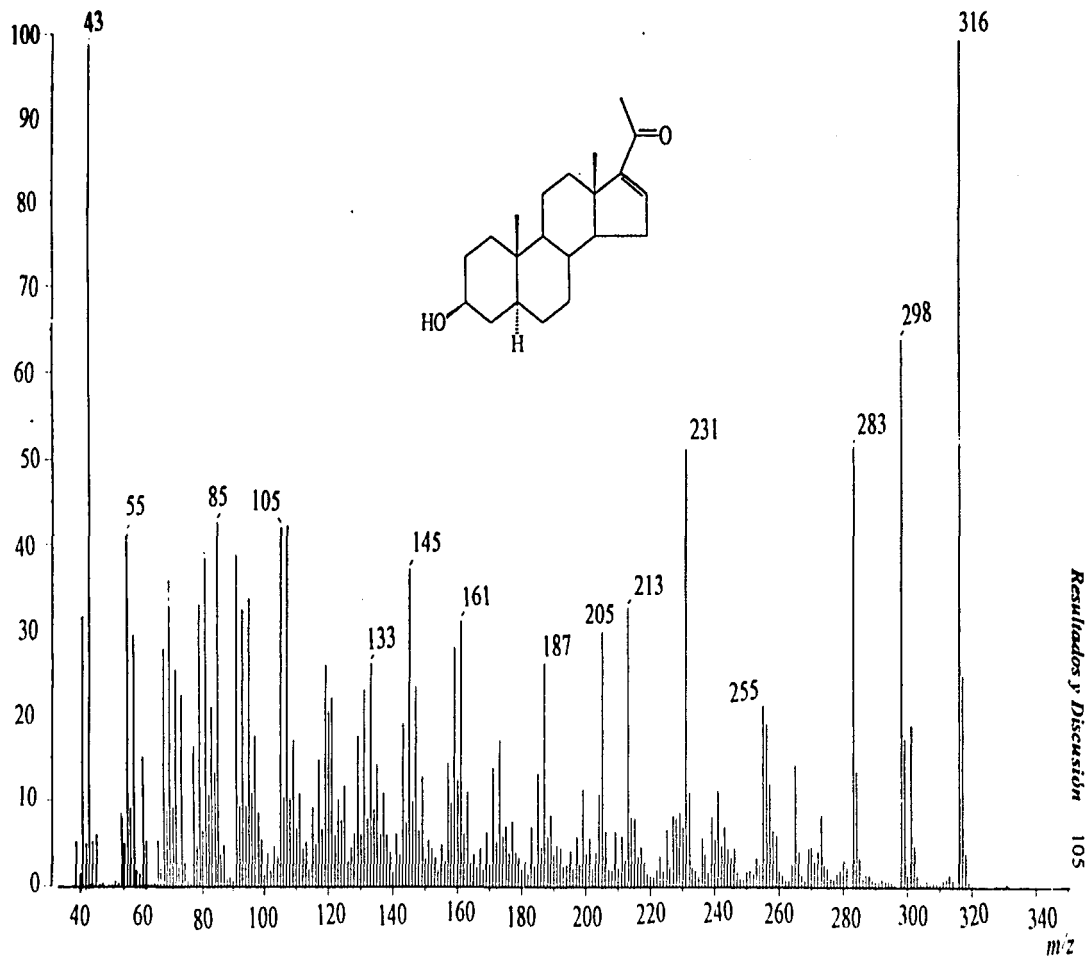


IR, $\nu_{\text{max}}$ (KBr) $\text{cm}^{-1}$ (Espectro 17)	3507, 2966, 2932, 2857, 2836, 1685, 1464, 1437, 1359 y 1056.
EMIE, $m/z$ (int rel) (Espectro 18)	316 [ $\text{M}^+$ (100.0)], 298 [ $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ (62.6)], 283 [ $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3$ (51.3)], 255 (20.6), 231 (50.6), 213 (32.6), 205 (30.0), 187 (26.0), 161 (30.6), 145 (36.6), 133 (26.0), 105 (42.0), 85 (42.6), 55 (40.6), 43 (98.6).
RMN- $^1\text{H}$ $\delta$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) * (Espectro 19)	5.35 (m, H-16), 3.53 (m, H-3), 2.53 (t, $J=9$ , H-14), 2.34-2.17 (m, H-12, H-7a, y H-8), 2.12 (s, H-21), 2.07-1.97 (m, H-4a y H-15a), 1.84 (m, H-1a), 1.71-1.43 (m, H-7b, H-6a, H-11, H-15b, H-2 y H-4b), 1.26-1.10 (m, H-6b, H-9, H-1b y H-5), 1.01 (s, H-19) y 0.64 (s, H-18).
RMN- $^{13}\text{C}$ $\delta$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) * (Espectro 20)	209.5 (C-20), 140.8 (C-17), 121.4 (C-16), 71.7 (C-3), 63.7 (C-14), 56.9 (C-9), 50.0 (C-5), 44.0 (C-13), 42.3 (C-12), 38.9 (C-4), 37.3 (C-1), 36.5 (C-10), 31.9 (C-8), 31.8 (C-2), 31.7 (C-15), 31.5 (C-21), 24.5 (C-6), 22.9 (C-7), 21.1 (C-11), 19.4 (C-19), 13.2 (C-18).

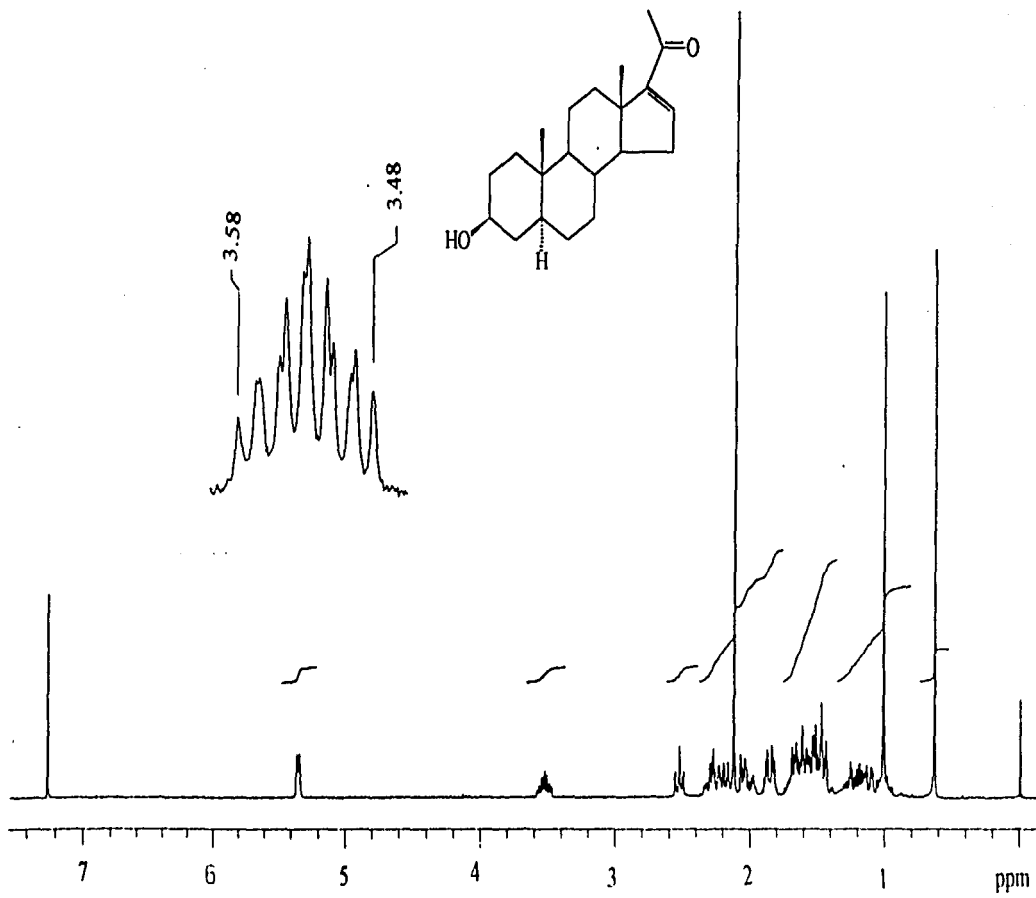
\* Las constantes de acoplamiento (J) expresadas en Hz se indican en el paréntesis.



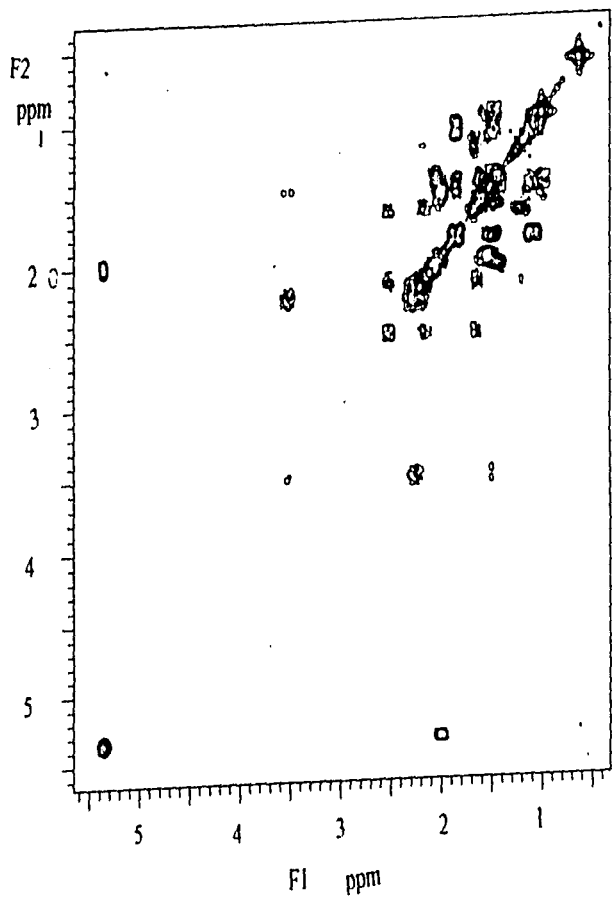
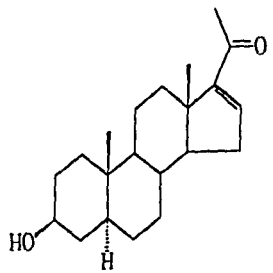
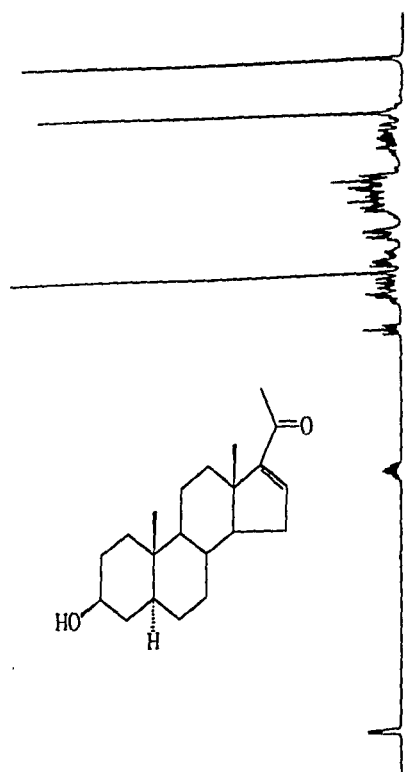
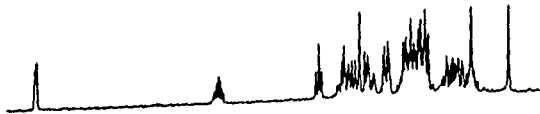
Spectro 17. Espectro de IR de la 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregn-16-en-20-ona (57)



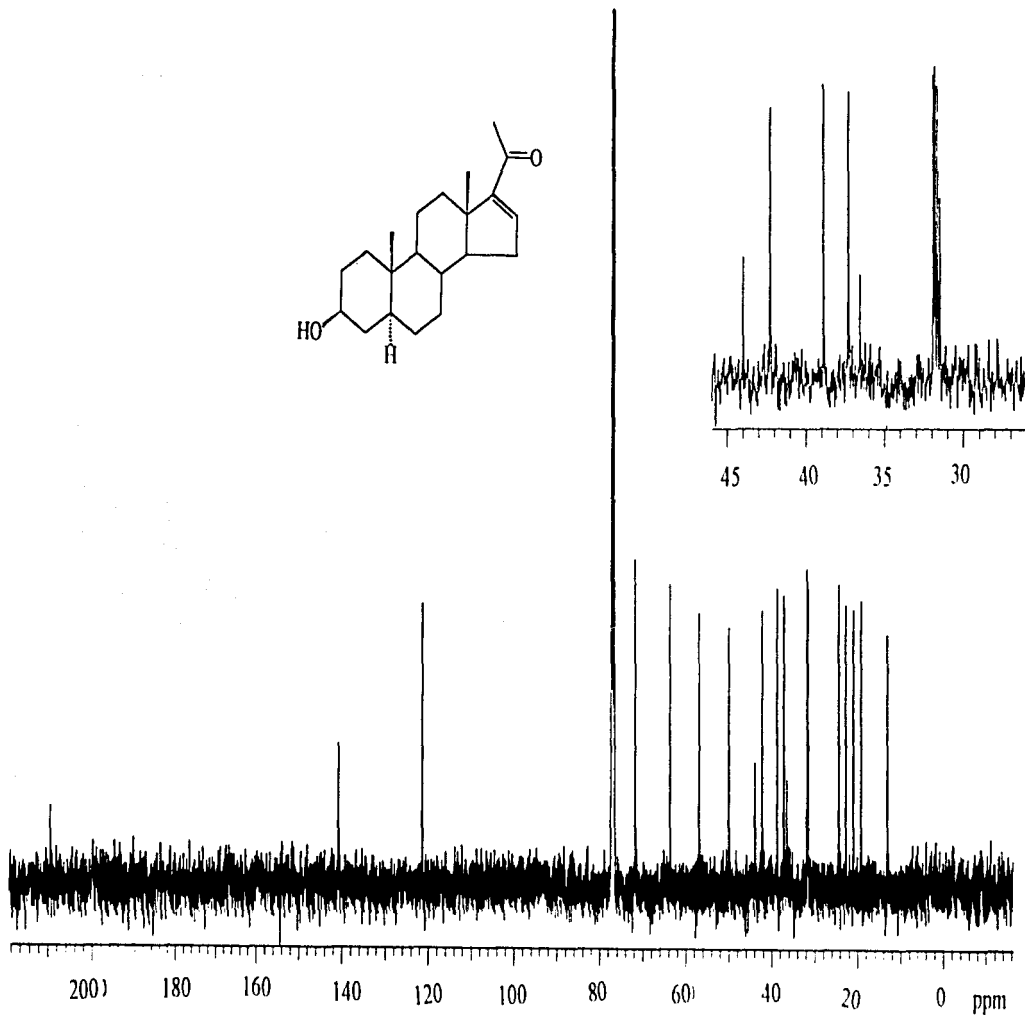
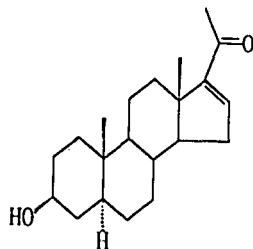
**Espectro 18.** EMIE de la 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregn-16-en-20-ona (57)



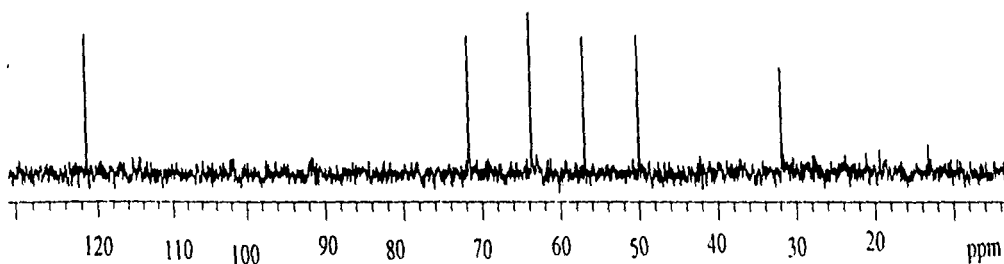
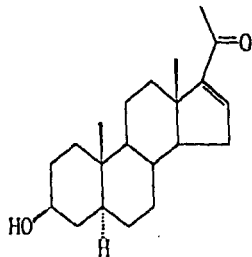
**Espectro 19.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de la 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregn-16-en-20-ona (57)



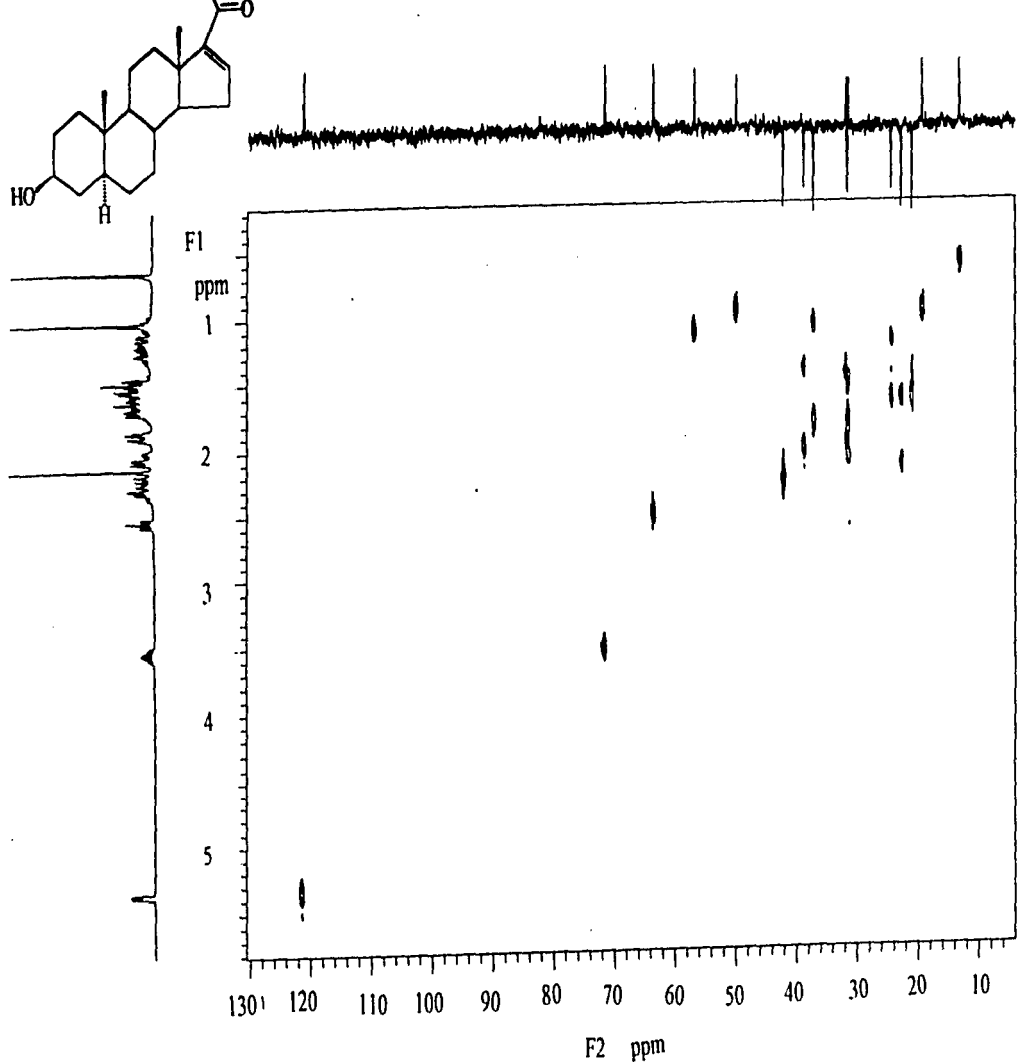
Espectro 19a. Espectro COSY de la 3β-hidroxi-5α-pregn-16-en-20-ona (57)



Espectro 20. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la 3β-hidroxi-5α-pregn-16-en-20-ona (57)

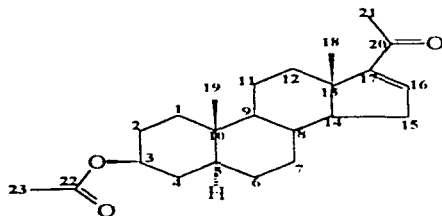


Espectro 20a. Espectro DEPT de la 3β-hidroxi-5α-pregn-16-en-20-ona (57)



Espectro 20b. Espectro HETCOR de la 3β-hidroxi-5α-pregn-16-en-20-ona (57)



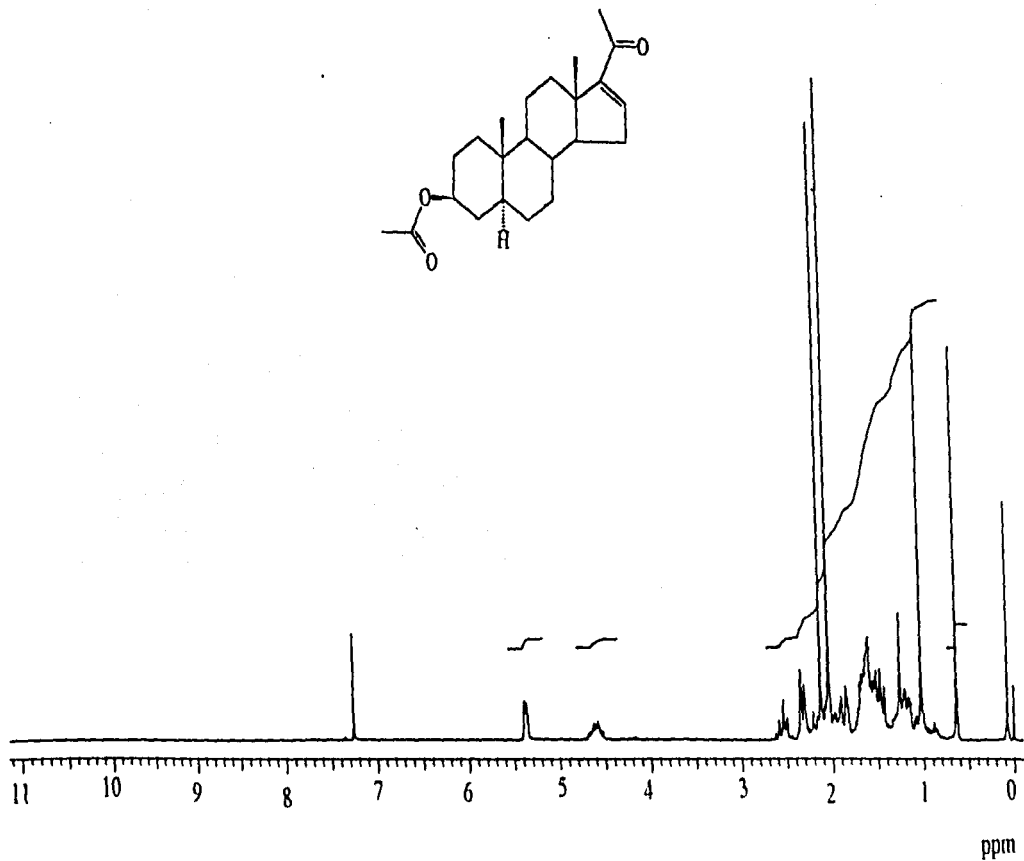
Tabla 6. Constantes espectroscópicas del 3 $\beta$ -acetoxi- pregn-16-en-20-ona (57a).

RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), ppm (Espectro 21)	5.38 (m, H-16), 4.61 (m, H-3), 2.54 (t, J=9, H-14), 2.13 (s, H-21), 2.04 (s, C-23), 1.02 (s, H-19) y 0.63 (s, H-18).
---	--

\* Las constantes de acoplamiento (J) expresadas en Hz se indican en el paréntesis.

#### 4.2.6 Caracterización del estigmasterol (58) obtenido de la fracción G.

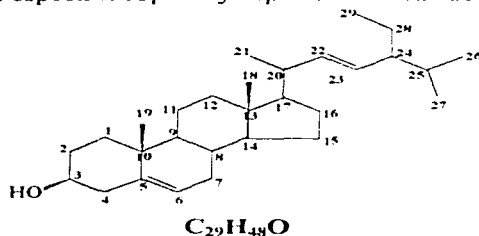
De la fracción primaria G se obtuvo un sólido cristalino de color blanco, con un punto de fusión de 143-145 °C, el cual fué caracterizado como estigmasterol (58) por comparación con una muestra auténtica. Cabe señalar que sus constantes espectroscópicas se encuentran en armonía con las descritas previamente en la literatura para este compuesto y se presentan en la Tabla 7.



Espectro 21. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del 3β-acetoxi-5α-pregn-16-en-20-ona (57a)

ppm

Tabla 7. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del estigmasterol (58).



IR, $\nu_{max}$ (KBr) $cm^{-1}$	3430, 2959, 2937, 2869, 1650, 1463, 1379, 1059 y 966.
EMIE, $m z$ (int rel)	412 [ $M^+$ (100.0)], 396 (42.6), 381 (22.6), 329 (31.3), 303 (34.0), 273 [ $M^+$ -cadena lateral (28.0)], 255 (47.3), 231 (21.3), 213 (36.0), 199 (15.3), 159 (37.3), 145 (41.3), 133 (35.3), 95 (46.0), 69 (61.3), 55 (73.3) y 43 (68.0).
RMN- $^1H$ $\delta$ (300 MHz, $CDCl_3$ ), *	5.35 (m, H-6), 5.16 (dd, $J=15.0$ , $J=8.4$ , H-22), 5.02 (dd, $J=15$ , $J=8.4$ , H-23), 3.52 (m, H-3), 1.02 (d, $J=6.9$ , H-21), 1.01 (s, H-19), 0.85 (d, $J=6.6$ , H-26), 0.83 (t, $J=6.3$ , H-29) 0.80 (d, $J=5.7$ , H-27) y 0.70 (s, H-18).
RMN- $^{13}C$ $\delta$ (75 MHz, $CDCl_3$ ) *	140.8 (C-5), 138.3 (C-22), 129.3 (C-23), 121.7 (C-6), 71.8 (C-3), 56.8 (C-14), 56.0 (C-17), 51.2 (C-24), 50.2 (C-9), 42.3 (C-4 y C-13), 40.5 (C-20), 39.8 (C-12), 37.3 (C-1), 36.5 (C-10), 31.9 (C-7, C-8 y C-25), 31.7 (C-2), 28.9 (C-16), 25.4 (C-28), 24.3 (C-15), 21.0 (C-11 y C-27), 19.8 (C-21), 19.4 (C-19), 19.0 (C-26), 12.2 (C-18) y 12.0 (C-29).

\* Las constantes de acoplamiento (J) expresadas en Hz se indican en el paréntesis.

### 4.3. Evaluaciones biológicas de los productos aislados.

El potencial fitotóxico de los productos naturales obtenidos en el transcurso del estudio biodirigido del extracto activo de *C. pringlei*, se determinó mediante la evaluación de la actividad inhibitoria de la germinación y del crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. Los compuestos evaluados incluyeron los siguientes: deshidrocoster lactona (**48**), costunólida (**20**), 15-isovaleriloxi costunólida (**55**) y la 15-isobutiriloxi costunólida (**56**). Cabe destacar que todos ellos se obtuvieron de fracciones fitotóxicas.

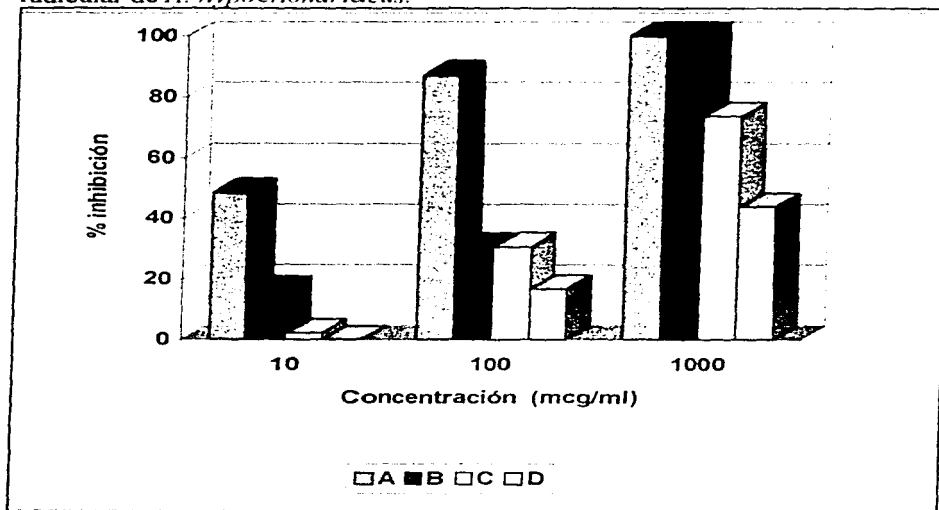
Los constituyentes que demostraron una actividad inhibitoria de la germinación incluyeron a la deshidrocoster lactona (**48**) y la costunólida (**20**). Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la germinación y se indican en el Cuadro 11. El compuesto más activo fue el **48**, el cual afecta la germinación de las dos especies de arvenses empleadas de manera dependiente de la concentración. La costunólida (**20**) afectó solamente a la especie *A. hypochondriacus*.

Las lactonas **55** y **56** no afectaron la germinación de las especies de prueba (datos no presentados). Estos resultados indican que la sustitución de un hidrógeno por un residuo alcanoiloxi en la posición 15 de la costunólida conlleva una disminución de la actividad fitoinhibidora.

El efecto sobre el crecimiento radicular se presenta en las Gráficas 3 y 4. Los resultados se encuentran expresados como porcentajes de inhibición radicular.

Cuadro 11. Efecto de la deshidrocostus lactona (48) y de la costunólida (20) sobre la germinación de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*.

TRATAMIENTO		% INHIBICIÓN DE GERMINACION	
Compuesto	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>
deshidrocostus lactona (48)	10	3.5	0
	100	38	30
	1000	100	100
costunólida (20)	10	0	0
	100	6.9	7.4
	1000	100	51.9

Gráfica 3. Efecto de los compuestos aislados de *C. pringlei* sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*.

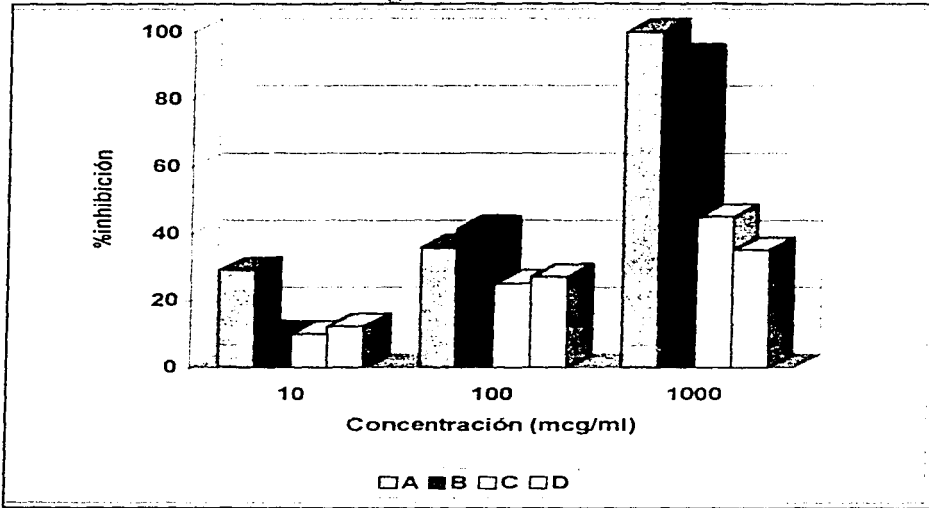
A: deshidrocostus lactona (48)

B: costunólida (20)

C: 15-isovaleriloxi costunólida (55)

D: 15-isobutiriloxi costunólida (56)

Gráfica 4. Efecto de los compuestos aislados de *C. pringlei* sobre el crecimiento radicular de *E. crusgalli*.



A: deshidrocostos lactona (48)  
 B: costunólida (20)

C: 15-isovaleriloxi costunólida (55)  
 D: 15-isobutiriloxi costunólida (56)

Los constituyentes más activos sobre las dos especies evaluadas fueron las lactonas **48** y **20**, mismas que afectaron en mayor grado el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*. El producto **48** fué el más potente, con una  $CI_{50}$  de  $10.84 \mu\text{g/ml}$ ; mientras que la costunólida (**20**) mostró una  $CI_{50}$  de  $101.32 \mu\text{g/ml}$  en esta misma especie.

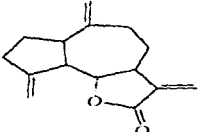
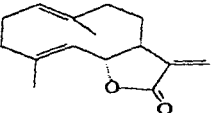
Los compuestos **55** y **56** inhibieron en menor grado el crecimiento radicular de las dos especies de prueba. La especie *A. hypochondriacus* fue más sensible a los tratamientos ya que a la concentración de 1000 µg/ml el compuesto **55** inhibió su crecimiento radicular en un 73.5%. La  $CI_{50}$  calculada fue de 294.02 µg/ml. Esta actividad fue mayor a la que manifestó el compuesto **56**, pues este inhibió el crecimiento radicular sólo en un 43.8% a la misma concentración.

Con la finalidad de explorar de forma más detallada el potencial herbicida de las lactonas sesquiterpénicas con mayor actividad fitoinhibidora (deshidrocostus lactona [**48**] y costunólida [**20**]) se determinó su efecto sobre la fotofosforilación o síntesis de ATP en cloroplastos aislados de hojas de espinaca. En el Cuadro 12 y en la Gráfica 5 se muestran los resultados de esta determinación.

De acuerdo con los resultados ilustrados en la Gráfica 5, las dos lactonas inhiben la síntesis de ATP. La inhibición inducida por los dos compuestos fue dependiente de la concentración. La deshidrocostus lactona (**48**) inhibe la fotofosforilación en un 84% a una concentración de 200 µM, mientras que la costunólida (**20**) inhibe este proceso en un 51% a la misma concentración. Los valores de  $CI_{50}$  obtenidos (concentración que inhibe el 50% de la síntesis de ATP) se muestran en el Cuadro 12, en donde se observa que la deshidrocostus lactona (**48**) es el inhibidor más potente de la fotofosforilación.

Es importante mencionar que los compuestos que inhiben la síntesis de ATP lo pueden hacer por mecanismos de desacoplamiento, inhibiendo la transducción de energía o bien, inhibiendo la reacción de Hill. Para determinar el mecanismo específico de la actividad demostrada por los compuestos **48** y **20**, actualmente se continúan realizando los bioensayos pertinentes.

Cuadro 12. Efecto de la deshidrocostus lactona (**48**) y de la costunólida (**20**) sobre la síntesis de ATP.

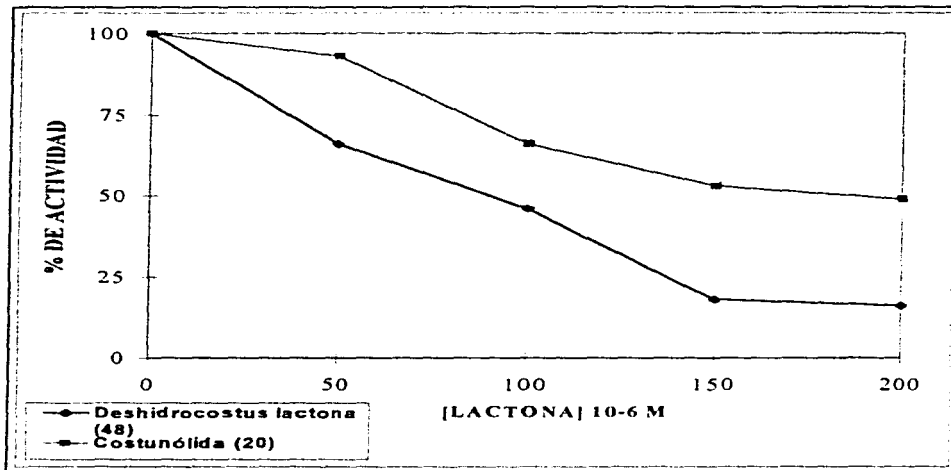
LACTONA SESQUITERPENICA	CONCENTRACION ( $\mu\text{M}$ )	SÍNTESIS DE ATP (% DE ACTIVIDAD)	CI50 ( $\mu\text{M}$ )
 Deshidrocostus lactona ( <b>48</b> )	0	100	87.1
	50	66	
	100	46	
	150	18	
	200	16	
 Costunólida ( <b>20</b> )	0	100	182.0
	50	93	
	100	66	
	150	53	
	200	49	

Teniendo como antecedente que el extracto afectó la producción de biomasa de *A. hypochondriacus*, y de que el producto **48** demostró la mayor actividad fitoinhibidora del crecimiento radicular de las especies arvenses de prueba, se evaluó su efecto sobre el crecimiento de las plántulas de las mismas especies vegetales (*A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*). La deshidrocostus lactona (**48**)



se evaluó a tres concentraciones (1000, 100 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) en plántulas de 7 semanas de crecimiento en el caso de *E. crusgalli* y de 3 semanas para el caso de *A. hypochondriacus*. En el Cuadro 13 se resumen los resultados obtenidos.

Gráfica 5. Efecto de la concentración de las lactonas **48** y **20** en la síntesis de ATP.



El análisis de los resultados indica que, la deshidrocostus lactona (**48**), no afectó la producción de biomasa de ninguna de las especies de prueba, ya que

los distintos tratamientos del producto no ocasionaron una pérdida significativa de peso, con respecto a los controles blanco (agua y disolvente).

Cuadro 13. Efecto de la deshidrocosterona lactona (48) sobre la producción de biomasa en plántulas de *A. hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*.

ESPECIE VEGETAL	PRODUCCION DE BIOMASA [mg/plántula] $\pm$ d. s.					
	CONTROL		DESHIDROCOSTUS LACTONA ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	(-)	(+)	10	100	1000	
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	24.1 $\pm$ 4.6	3.49 $\pm$ 1.5 *	22.7 $\pm$ 5.44	25.5 $\pm$ 5.65	23.64 $\pm$ 4.51	<b>PESO HUMEDO</b>
	3.58 $\pm$ 0.74	1.65 $\pm$ 0.47 *	3.04 $\pm$ 0.71	3.56 $\pm$ 0.81	3.4 $\pm$ 0.65	<b>PESO SECO</b>
<i>Echinochloa crus-galli</i>	924.8 $\pm$ 138.3	485.8 $\pm$ 175.6 *	1233.4 $\pm$ 317.2	1088 $\pm$ 219.6	1061.2 $\pm$ 335.9	<b>PESO HUMEDO</b>
	167.8 $\pm$ 30.3	90.9 $\pm$ 26.0 *	216.8 $\pm$ 54.0	190.8 $\pm$ 43.7	189.6 $\pm$ 51.3	<b>PESO SECO</b>

Control (-): H<sub>2</sub>O y Tween 80 [0.1ml/L]

Control (+): Paraquat [10<sup>-2</sup> M]

\*Significativamente diferentes al control (-) a P=0.05

Con base en lo anterior, puede decirse que la deshidrocosterona lactona (48) no afecta el crecimiento de las plántulas de *A. hypochondriacus* ni de *E. crus-galli*. Tampoco se observaron cambios en la apariencia de las plántulas, como

ocurría con el extracto, por lo que habría que suponer que la actividad de este se debe a algún otro componente del mismo.

Con estos resultados se confirma que un efecto alelopático a nivel radicular no necesariamente implica un efecto a nivel del desarrollo y elongación de la plántula (Macías *et al.*, 1992). La actividad inhibidora de la germinación y crecimiento radicular demostrada por el compuesto **48** sugiere que se considere como un buen candidato para el desarrollo de nuevos herbicidas. (Macías, 1995).

El estudio fitoquímico de la fracción activa E, condujo al aislamiento de los compuestos **59**, **60** y cantidades adicionales del **48**. No se determinó la actividad fitotóxica de estos, debido a que se comprobó, mediante el método bioautográfico, que la actividad de la fracción E sobre *A. hypochondriacus* se debía a la presencia de la deshidrocostus lactona (**48**).

Por otra parte, se realizó la evaluación de la actividad tóxica contra *A. salina* de los productos **48**, **20**, **55** y **56** con el objetivo de predecir otras actividades biológicas en los compuestos aislados, pues se ha demostrado que este bioensayo muestra una cierta correlación con la actividad citotóxica, antihelmíntica o antipalúdica, entre otras (Anderson *et al.*, 1991). Cabe mencionar que, de los productos evaluados, sólo el **55** no procedía de fracciones activas para el crustáceo; en congruencia, el producto **55** no demostró actividad significativa; mientras que los productos **48**, **20** y **56** si presentaron actividad, tal como lo indican los valores de concentración letal media obtenidos ( $CL_{50}$ ) de 50, 110.1 y 79.8  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

La presencia simultánea de la deshidrocostus lactona (**48**) y la costunólida (**20**) se reportó por primera vez en la especie *Saussurea lappa* (Rao *et al.*, 1958),

[con un rendimiento del 35 % para la deshidrocoster lactona (48) y del 15% para la costunólida (20) ], de tal forma que ha sido considerada como su principal fuente vegetal.

En estudios previos se ha demostrado el efecto alelopático de la deshidrocoster lactona (48) y de la costunólida (20) sobre otras especies vegetales (Sección Antecedentes). Sin embargo, este trabajo constituye la primera descripción del efecto de las mismas sobre la síntesis de ATP.

Se ha encontrado que la costunólida (20) promueve la germinación del sorgo, pepino y zanahoria, pero inhibe la del trigo, centeno bállico y *Amaranthus palmeri* a concentraciones entre 50 y 100  $\mu\text{M}$  (Fischer y Quijano, 1985). Además promueve la formación de raíces en *Phaseolus aureus* a concentraciones de 15-20 ppm (Kalsi *et al.*, 1983) y provoca una estimulación del 40-65% de la germinación de *Striga asiatica* en concentraciones entre  $10^{-5}$  y  $10^{-9}$  M (Fischer *et al.*, 1990).

La deshidrocoster lactona (48) promueve la formación de las raíces de *Phaseolus aureus* a 25 ppm (Kalsi *et al.*, 1977); en *Lactuca sativa* inhibe la germinación en un 17% a la concentración de  $10^{-4}$  M, sin embargo, a concentraciones de  $10^{-6}$  -  $10^{-7}$  M promueve la elongación radicular en un 30% (Macías *et al.*, 1992). Por último, este compuesto promueve la formación de raíces en *Vigna radiata* a 20 ppm (Talwar *et al.*, 1992). También en las raíces de esta especie se ha comprobado que, tanto la lactona 48 como la 20 inducen un incremento de la actividad de la nitrato reductasa (Talwar *et al.*, 1989).

Kalsi y colaboradores (1977, 1979, 1981, 1983 y 1984) han realizado estudios en los que relacionan los cambios en la actividad de formación de raíces en *Phaseolus sp.* en función de cambios estructurales de estas lactonas. Más

recientemente Macías y colaboradores (1992) realizaron un estudio sobre el potencial alelopático de varias lactonas sesquiterpénicas sobre *L. sativa*, en el que incluyeron a la deshidrocostus lactona (48) y otras germacranólidas.

Además de las actividades alelopáticas, se han reportado otras actividades biológicas que muestran en común las lactonas 48 y 20, entre las que se encuentran: efecto antimutagénico (Kuroda *et al.*, 1987), inhibición de la función "asesina" de los linfocitos T citotóxicos (Taniguchi *et al.*, 1995) y actividad antiulcerante (Yoshikawa *et al.*, 1993; Yamahara *et al.*, 1985). Esta última toma particular importancia para el presente trabajo, ya que la presencia en altas concentraciones del producto 48 en *C. pringlei* justifica el uso en las prácticas medicinales de los indios tarahumaras para tratamiento de la úlcera gástrica.

Adicionalmente, para la costunólida (10) se han descrito las siguientes actividades biológicas: citotóxica y antitumoral (Ogura *et al.*, 1978; Wang *et al.*, 1983), alergénica (provoca dermatitis alérgica de contacto) (Stampf *et al.*, 1978; Benezra y Epstein, 1986; Ducombs *et al.*, 1990) y nematocida (es activa contra el tremátodo *Schistosoma mansoni* que provoca schistosomiasis en humanos) (Harborne y Baxter, 1993). Recientemente, también se describió su acción inhibidora de la producción de óxido nítrico sobre macrófagos activados, lo que indica que podría ser un fuerte agente inmunosupresor (Park *et al.*, 1996).

En lo que respecta a los productos **55** y **56**, no se han encontrado estudios alelopáticos, por lo que este constituye el primero.

Por otro lado, el producto **57** ha demostrado anteriormente actividad anestésica y ha sido patentado por los laboratorios Glaxo (Glaxo, 1972).

## V. CONCLUSIONES.

- En el presente estudio se demostró, mediante la evaluación de la actividad fitotóxica y de la toxicidad contra *A. salina* del extracto, que la especie *C. pringlei* constituye una fuente de principios bioactivos.
- El fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico, permitió el aislamiento de los siguientes compuestos: costunólida (**20**), deshidrocostus lactona (**48**), 15-isovaleriloxi costunólida (**55**), 15-isobutiriloxi costunólida (**56**), 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregn-16-en-20-ona (**57**) y estigmasterol (**58**). La caracterización de los productos naturales se realizó por métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- Las lactonas sesquiterpénicas **20** y **48** fueron los productos que demostraron un mayor efecto fitotóxico sobre crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y de *E. crusgalli*. La primera especie fue la más sensible a los tratamientos, encontrándose que el producto **48** provocó una inhibición del 50% del crecimiento radicular a una concentración de 10.84  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que el producto **20** a una concentración de 101.32  $\mu\text{g/ml}$ . Estos resultados han dejado la posibilidad de considerar a estos compuestos como candidatos a herbicidas pre-emergentes. Además la lactona **48** resultó ser el inhibidor más potente de la síntesis de ATP, inhibiéndola en un 50% a una concentración de 87.1  $\mu\text{M}$ . Esto constituye una base para continuar las evaluaciones que finalmente conlleven al conocimiento del mecanismo de acción de las lactonas fitotóxicas. Adicionalmente, estos productos

mostraron una actividad tóxica significativa contra *A. salina*, lo cual resultó consistente con la actividad citotóxica previamente descrita para estos compuestos. El producto **55** no demostró actividad contra *A. salina*, sin embargo provocó una moderada inhibición del crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* ( $CI_{50}=294 \mu\text{g/ml}$ ). La actividad fitotóxica del compuesto **56** fue todavía menor a la del **55**, sin embargo, demostró una actividad significativa contra *A. salina*. A las lactonas **20**, **48** (en mayor grado), **56** y **57** se les puede atribuir el efecto inhibitor del crecimiento radicular demostrado por el extracto íntegro.

- De los metabolitos aislados en el presentes estudio, sólo la costunólida (**20**) se había obtenido previamente del género *Cosmos* (Bohlmann *et al.*, 1964). Por otro lado la coexistencia de la dehidrocostus lactona y la costunólida ya ha sido previamente descrita en la especie *Saussurea lappa* (Rao *et al.*, 1958).
- La presente investigación fitoquímica constituye una contribución adicional para el conocimiento del contenido metabólico secundario del género *Cosmos* y de la flora medicinal mexicana.
- La presencia de la deshidrocostus lactona (**48**) y de la costunólida(**20**), con una demostrada actividad antiulcérica justifica el uso de la especie *C. pringlei* como un agente antiulcérico en las prácticas médicas de los indios tarahumaras.



## VI. PERSPECTIVAS.

- Completar el estudio fitoquímico de las fracciones de mayor polaridad, con la finalidad de completar el conocimiento sobre el contenido metabólico secundario de la especie *Cosmos pringlei*.
- Caracterizar los productos **59** y **60** empleando métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- Completar las evaluaciones de las actividades fotosintéticas necesarias para conocer el mecanismo de acción de los productos fitotóxicos.
- Evaluar el efecto fitotóxico de otros compuestos aislados sobre el desarrollo de plántulas de especies arvenses, con la finalidad de explorar posibles agentes herbicidas con acción postemergente.

## VII. BIBLIOGRAFIA

Acevedo, L. A. y Estrada, S.E. (1995). Estudio químico y biológico preliminar de *Conyza filaginoides* (D.C) Hieron. (Asteraceae). Tesis de licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Akihisa, T., Yasukawa, K., Oinuma, H., Kasahara, Y., Kimura, Y., Yamanouchi, S., Takido, M., Kumaki, K. y Tamura, T. (1996). Triterpene alcohols from the flowers of Compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*, **43** 1255-1260.

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.

Anderson, A. L., Goetz, C.M. y McLaughlin, J. L. (1991). A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis*, **2** 107-111.

Arlette, J. y Mitchell, J. C. (1981). *Contact Dermatitis*, **7** 129.

Arnold, E. (1992). Pesticides and the ecosystem . En "Pesticides Chemicals and Health" (Ed. Morgan, D. R), British Medical Association, pp 11-17.

Asakawa, Y., Toyota, M. y Takemoto, T. (1981). Two guaiane-type sesquiterpene lactones and their related sesquiterpene lactones from *Porella japonica*. *Phytochemistry*, **20** 257-261.

Asakawa, Y. (1984). Phytochemistry of Hepaticae, isolation of biologically active aromatic compounds and terpenoids. *Rev. Latinoamer. Quim.* **14** 109-114; *Chem. Abstr.* **101** 3891f.

Ayala, G. (1997). El mirasol, una de las especies con mayor potencial forrajero, alimenticio y medicinal. *Gaceta UNAM*, 16 de enero, pp.15-17.

Bate-Smith, E. C. (1980). Astringent tannins of *Cosmos bipinnatus*. *Phytochemistry*, **19** (5) 982.

Beekman, A.C., Woerdenbag, H. J., Van Uden, W., Pras, N., Konings, A.W.T., Wikström, H.V y Schmidt, T.J. (1997). Structure-cytotoxicity relationships of some helenanolide-type sesquiterpene lactones. *J.Nat. Prod.*, **60** 252-257.

Benezra, C. y Epstein, W. L. (1986). *Contact Dermatitis*, **15**, 223-230.

Benner, J. P. (1993). Pesticidal compounds from higher plants. *Pesticide Science*, **39**, 95-102.

Bohlmann, F., Bornowski, H. y Koehn, S. (1964). The polyynes of the genus *Cosmos*. *Ber.* **97** (9) 2583-2385.

Bohlmann, F., Kleine, K.M. y Bornowski, H. (1966). Polyacetylene compounds. XCI. Structure and synthesis of a C18-oxo acetate from *Cosmos sulphureus*. *Ber.* **99** (1) 142-147.

Bohlmann, F., Brindöpke, G. y Rastogi, R. C. (1978). A new type of germacranolide from *Vernonia* species. *Phytochemistry*, **17** 475-482.

Bohlmann, F., Zdero, C., King, R. M. y Robinson, H. (1980). New sesquiterpene lactones and other constituents from *Fitchia speciosa*. *Phytochemistry*, **19** 1141-1143.

Bohm, B. A. (1975). Chalcones, aurones and dihydrochalcones en "The Flavonoids". (Eds. Harborne, J. B., Mabry, T. J. y Mabry, H.), Chapman and Hall, London, pp. 442-504.

Bye, R. (1996). Comunicación personal.

Calera, M. R., Soto, F., Sánchez, P., Bye, R., Hernández-Bautista, B., Anaya, A. L., Lotina-Hennsen, B. y Mata, R. (1995). Biochemically active sesquiterpene lactones from *Ratibida mexicana*. *Phytochemistry*, **40**, 419-425.

Cassady, J. M. y Suffness, M. (1980). Cap.7 en "Medicinal Chemistry" (Eds. Cassady, J. M. y Douros, J. D.), Vol. **16**: Anticancer agents based on natural product models. Academic, London.

- Chabannes, B. y Pacheco, H. (1971). Biogenesis of plant pigments IV. Biogenesis of cosmoisine in *Cosmos bipinnatus* and the chemical conversion of prunine to cosmoisine. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **4** 1486-1491.
- Chen, P. K. y Leather, G. R. (1990). Plant growth regulatory activities of artemisinin and its related compounds. *J. Chem. Ecol.*, **16**, 1867-1876.
- Cox, P. A. y Balick, M. J. (1994). The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American*, June.
- Crabalona, L. (1948). The presence of a crystalline lactone in the essential oil of the root of *Saussurea lappa*. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **15** 357-358.
- Cremlyn, R. y Campbell, W. (1991). Pesticides. Preparation and mode of action. J. Wiley.
- Dalvi, R. R., Singh, B. y Salunkhe, D. K. (1971). *Chem. Biol. Interact.*, **3** 13.
- Dawe, R. D. y Wright, J. L. C. (1987). An improved route to pregna-5,20-dien-3 $\beta$ -ol: Carbon and proton nuclear magnetic resonance assignments for the aglycone and a number of related pregnene derivatives. *Can. J. Chem.*, **65**, 666-669.
- Del Amo, S. y Anaya, A. L. (1978). *J. Chem. Ecol.*, **4** 305.
- Dilley, R. A. (1972). Methods in Enzimology, **24**, (Ed. Anthony San Pietro), Academic Press, pp. 68.
- Doepke, W., Mola, Y. L., Hess, U. (1976). Alkaloid and steroid sapogenin content of *Solanum verbascifolium* L. *Pharmazie*, **31**(9), 656.
- Ducombs, G., Benezra, C., Talaga, P., Andersen, K. E., Burrows, D., Camarasa, J. G., Dooms-Goossens, A., Frosch, P. J., Lachapelle, J. M., Menne, T., Rycroft, R. J. G., White, I. R., Shaw, S. y Wilkinson, J. D. (1990). *Contact Dermatitis*, **22**, 249-252.
- Duddeck, H., Resenbaum, D., Hani, M., Elgamal, A. y Fayez, M. B. E. (1986). High-field  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of some corticosteroids and related compounds. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **24**, 999-1003.

- Duke, S.O., Vaughn, K. C., Croom, E. M. Jr. y Elsohly, H. N. (1987). Artemisinin, a constituent of annual wormwood (*Artemisia annua*), is a selective phytotoxin. *Weed Sci.*, **35** 499-505.
- Duke, S. O., (1988a). En "Herbicide. Chemistry, Degradation and Mode of Action". (Eds. Kearney, P.C., y Kaufman, D.D.). Marcel Dekker Inc., New York, pp.1-69.
- Duke, S. O., Paul, R. N. y Lee, S. M. (1988b). Terpenoids from the genus *Artemisia* as potential pesticides. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, **380** 318-334.
- Duke, S. O. (1991). Plant terpenoids as pesticides . En "Handbook of Natural Toxins". Vol.6-Toxicology of Plant and Fungal Compounds (Eds. Keeler, R. y Tu A.T.) Marcel Dekker, Inc., pp. 269-289.
- Duke, S. O. y Abbas, H. K. (1995). Natural products with potential use as herbicides. En "Allelopathy. Organisms, Processes and Applications". (Eds. Inderjit, K. M. M., Dakshini y Einhellig, F. A.). *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, **582**, pp. 349-359.
- Einhellig, F. A. y Leather, G. R. (1988). Potentials for exploiting allelopathy to enhance crop production. *J. Chem. Ecol.*, **14**, 1829-1844.
- Elakovich, S. D. (1988). Terpenoids as models for new agrochemicals. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, **380** 250- 261.
- Epstein, S.S., Andrea, J. y Jaffe, H., Noshi, S., Falk, H. y Mantel, N. (1967). Carcinogenicity of the herbicide maleic hydrazide. *Nature*, **215**, 1388-1390.
- Fischer, N. H., Olivier, E. J. y Fischer, H. D. (1979). The biogenesis and chemistry of sesquiterpene lactones. En "Progress in the Chemistry of Organic Natural Products". Springer, New York, Vol **38**, 47-390.
- Fischer, N. H. y Quijano, L. (1985). The Chemistry of Allelopathy. (Ed. Thompson, A.C.). American Chemical Society, Washington, D.C., pp 133-147.

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

Fischer, N. H., Williamson, G. B., Weidenhamer, J. D., Tarrisever, N., de la Peña, A., Jordan, E. D. y Richardson, D. R. (1989a). Allelopathic mechanisms in the Florida scrub community. *Phytochemical Ecology*, (9) 183-193.

Fischer, N. H., Weidenhamer, J. D., y Bradow, J. M. (1989b). Dihydroparthenolide and other sesquiterpene lactones stimulate witchweed germination. *Phytochemistry*, **28** 2315-2317.

Fischer, N. H., Weidenhamer, J. D., Riopel, J. L., Quijano, L y Menelaou, M. A. (1990). Stimulation of witchweed germination by sesquiterpene lactones: a structure-activity study. *Phytochemistry*, **29** (8) 2479-2483.

Fischer, N. H. (1991). Plant terpenoids as allelopathic agents. En "Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids" (Ed. Harborne, J. B. y Tomas-Barberan, F. A), Clarendon Press, Oxford. pp. 377-398.

Frear, D. E. H. (1948). "Chemistry of Insecticides, Fungicides and Herbicides", 2a edición, Edit. D. Van Nostrand Company, Inc., U. S. A., pp 1-7.

Fuzzati, N., Sutarjadi., Dyatmiko, W., Rahman, A., Hostettmann, K., (1995). Phenylpropane derivatives from root of *Cosmos caudatus*. *Phytochemistry*, **39** (2) 409-412.

Geissman, T. A. (1941). *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 2689.

Ghisalberti, E. (1993). Detection and isolation of bioactive natural products. En "Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination". (Eds. Colegate, S. y Molyneux, R.), CRC Press, U.S.A., pp. 10-49.

Glaxo Laboratories Ltd. (1972). Anesthetic pregnanes. *Fr.Demande* **2**, **113**, 919.

- González de la Parra, M., Anaya, A. L., Espinosa, F., Jiménez, F. y Castillo, R. (1981). Allelopathic potential of *Poqueria trinervia* (Compositae) and piquerols A and B. *J. Chem. Ecol.*, **7**, 509-515.
- Gören, N., Jakupovic, J. y Topal, S. (1990). *Phytochemistry*, **29** 1467.
- Grayson, B. T., Williams, K. S., Freehauf, P. A., Pease, R. R., Ziesel, W. T., Sereno, R. L. y Reinsfelder, R. E. (1987). The physical and chemical properties of the herbicide cinnethylin. *Pestic. Sci.*, **21**, 143-153.
- Gross, D. (1975). Growth regulating substances of plant origin. *Phytochemistry*, **14**, 2105.
- Hamburger, M., Hostettmann, K. (1991). Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, **30** (12) 3864-3874.
- Harborne, J. B. (1988). Introduction to Ecological Biochemistry, 3a. edición, Academic Press, pp. 277-299.
- Harborne, J. B. y Baxter, H. (1993). *Phytochemical Dictionary*. Taylor & Francis.
- Hausen, B. M. y Spring, O. (1989). *Contact dermatitis*, **20** 326.
- Hayashi, (1941). *Acta phytochim.*, Japan **12** 65.
- Herout, V. y Sorm, F. (1959). Isolation and structure of costunolide from *Artemisia balchanorum*. *Chem. & Ind.* (London), 1067-1068.
- Holm, L. G., Plucknett, D. L., Pancho J. V., Herberger, J. P. (1977). "The World's Worst Weeds". Edit. The University Press of Hawaii, Honolulu.
- Hostettmann, K. y Marston A. (1990). Bioactive constituents of plants used in Africal traditional medicine. *Studies in natural products chemistry*, **7** 405-437.
- Hostettmann, K. y Hamburger, M. (1993). Search for new lead compounds of natural origin. *Perspect. Med. Chem.*, 475-488.

- Inoue, M., Nishimura, Hai-Hang, I. y Mizutani, J. (1992). Allelochemicals of *Polygonum sachalinense* FR. SCHM (Polygonaceae). *Journal of Chemical Ecology*, **18** 1833-1840
- Jiménez, A., Pereda-Miranda, R., Bye, R., Linares, E. y Mata, R. (1993). Ratibinolide III, a sesquiterpene lactone glucoside from *Ratibida latipalearis*. *Phytochemistry*, **34** 1079-1082.
- Kalsi, P.S., Vij, V. K., Singh, O. S. y Wadia, M. S. (1977). Terpenoid lactones as plant growth regulators. *Phytochemistry*, **16** 784-786.
- Kalsi, P. S., Kaur, P. y Chabra, B. R. (1979). Plant growth activity of epoxides from dehydrocostus lactone. *Phytochemistry*, **18**, 1877-1878.
- Kalsi, P. S., Gupta, D., Dhillon, R. S., Arora, G. S., Talwar, K. K. y Wadia, M. S. (1981). Plant growth activity of guaianolides with C-4 oxygen-containing groups. *Phytochemistry*, **20** (7) 1539-1542.
- Kalsi, P.S., Sood, V. B., Masih, B., Gupta, D. y Talwar, K. K. (1983). Structure and plant growth activity relationship in terpenoid lactones. *Phytochemistry*, **22** 1387-1392.
- Kalsi, P. S., Kaur, G., Sharma, S. y Talwar, K. K. (1984). Dehydrocostuslactone and plant growth activity of derived guaianolides. *Phytochemistry*, **23** 2855-2861.
- Kalsi, P. S., Khurana, S. y Talwar, K. K. (1985). Chemistry of costunolide and biological activity of the derived lactones. *Phytochemistry*, **24** (1) 103-109.
- Kalsi, P. S., Goyal, R., Talwar, K.K. y Chhabra, B. R. (1989). Stereostructures of two biologically active sesquiterpene lactones from *Inula racemosa*. *Phytochemistry*, **28** 2093-2096.
- Kalsi, P. S., Kumar, S., Jawanda, G. S. y Chabra, B. R. (1995). Guainaolides from *Saussurea lappa*. *Phytochemistry*, **40** (6), 1713-1715.
- Kaneta, M., Hikichi, H., Endo, S. y Sugiyama, N. (1978). Identification of flavones in sixteen Compositae species. *Agric. Biol. Chem.*, **42** (2) 475-477.



- Kil, B. S. y Lee, S. Y. (1987). Allelopathic effects of *Chrysanthemum morifolium* on germination and growth of several herbaceous plants. *J. Chem. Ecol.* **13** (2) 299-308.
- Kinghorn, A. D. (1995). Novel strategies for plant-derived anticancer agents. *International Journal of Pharmacognosy*, **33** 48-58.
- Kirk, D. N., Toms, H. C., Douglas, C., White, K. A., Smith, K. E., Catif, S. y Hubbard, R. W. P. (1990). A survey of the high-field <sup>1</sup>H NMR spectra of the steroid hormones, their hydroxylated derivatives, and related compounds. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1567-1594.
- Klayman, D. L. (1985). Qinghaosu. (Artemisinin): An antimalarial drug from China. *Science*, **228**, 1049-1055.
- Kupchan, S. M., Eakin, M. A. y Thomas, A. M. (1971). Tumor Inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones. *Journal of Medicinal Chemistry*, **14** (12), 1147-1152.
- Kuroda, M., Yoshida, D. y Kodama, H. (1987). Bio-antimutagenic effects of sesquiterpene lactones from costus root oil. *Agric. Biol. Chem.*, **51** (2), 585-587.
- Kwon, Y. M., Woo, W. S., Woo, L. K. y Lee, M. J. (1973). *Han'guk Saenghwahakhoe Chi.*, **6**, 85.
- LeBaron, H. (1991). En "Herbicide Resistance in Weed and Crops".(Eds. Caseley, J. kC., Cussans, kG. W., Atkins, R. K). Butterworths-Heinemann, Oxford, U. K., pp.27-43.
- Lee, K. H., Ibuka, T., Wu, R. Y. y Geissman, T. A. (1977). Structure-Antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds. *Phytochemistry*, **16** 1177.
- Lotina-Hennsen, B., Roque-Reséndiz, J. L., Jiménez, M. y Aguilar, M. (1991). *Z. Naturforsch.*, **46c**, 777.
- Lowery, C. (1993). *Reagent Chemicals*. American Chemical Society specification, Editores. Washington, D. C., pp 90-91.

- Macías, F. A., Galindo, J. C. G. y Massanet, G. M. (1992). Potential allelopathic activity of several sesquiterpene lactone models. *Phytochemistry*, **31** (6) 1969-1977.
- Macías, F. A. (1995). Allelopathy in the search for natural herbicide models. En "Allelopathy. Organisms, Processes and Applications" (Eds. Inderjit, K. M. M., Dakshini y Einhellig, F. A.). ACS Symposium Series 582, pp. 311-329.
- Manno, M. (1991). Toxicology and risk assesment of pesticides. En "Chemistry, Agriculture and the Environment" (Ed. Richardson, M. L.). The Royal Society of Chemistry, pp. 466-479.
- Marston, A. y Hostettmann, K. (1985). Plant molluscicides. *Phytochemistry*, **24**, 639-652.
- Martínez, M. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México.
- Martínez, M. (1989). Las plantas medicinales de México. 6a. edición, Ediciones Bota, México D.F.
- Mathur, S. B., Hiremath, S. V., Kulkarni, G. H., Kelkar, G. R. y Bhattacharyya, S. C., Simonovic, D. M. y Rao, A. S. (1965). Terpenoids (LXX). Structure of dehidrocostus lactone. *Tetrahedron*, **21**, 3575.
- McCahon, C. B., Kelsey, R. H., Sheridan, R. P. y Shafizadeh. (1973). *Bull. Torrey Bot. Club*, **100**, 23.
- Mendoza, J. L., Jiménez, M. y Lotina-Hennsen, B. (1994). Piquerol A and diacetyl piquerol act as energy transfer inhibitors of photosynthesis. *Pesticides Science*, **40**, 37-40.
- Miyase, T., Ozaki, H. y Ueno, A. (1991). *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 937.
- Nakaoki, T., Morita, N. e Isetani, A. (1961). *J. Pharm. Soc. Japan*, **81** 558-1158.

Panero, J. L. y Villaseñor, J. L. (1996). Novelty in Asteraceae from southern Mexico. *Brittonia*, **48** 79-90.

Park, H.J., Jung W.T., Basnet, P., Kadota, S. y Namba, T. (1996). Syringin 4-O- $\beta$ -glucoside, a new phenylpropanoid glycoside, and costunolide, a nitric oxide synthase inhibitor, from the stem bark of *Magnolia sieboldii*. *J. Nat. Prod.*, **59** 1128-1130.

Paul, A., Bawdekar, A. S., Joshi, R. S., Kulkarni, G. H., Rao, A. S., Kelkar, G. R. y Bhattacharyya, S. C. (1960). *Perf. Ess. Oil Rec.*, **57** 115.

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

Peña-Valdivia, C.B., Rodríguez-Flores, L., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Lotina-Hennsen, B. (1991). Inhibition of photophosphorylation and electron transport by N,N-dimethylformamide. *Biophysical Chemical*, **41**, 169-174.

Picman, A. K. (1986a). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. System. Ecol.*, **14** 255-281.

Picman, A. K. (1986b). Aqueous solubility of isoalantolactone and its effect on germination and biomass production of redroot pigweed and late-flowering goosefoot. *Biochem. System. Ecol.*, **14** (4) 361-364.

Picman, A. K. (1988). Effect of Isoalantolactone on germination, biomass production and respiration of young seedlings. *Biochem. System. Ecol.*, **16** (2) 127-131.

Putnam, A. R. (1988). *Weed Tech.*, **2**, 510-518.

Rao, A.S., Kelkar, G.R. y Bhattacharyya. (1958). Costunolide, a new sesquiterpene lactone from costus root oil. *Chem. Ind.*, 1359-1360.

Rice, E. L. (1984). Allelopathy, 2a. ed. Academic Press, Orlando, Florida, pp. 422.

- Roberts, T. R. (1987). Herbicides and plant growth regulators. En "Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology".- Vol.6. (Eds. Hutson, D. H. y Roberts, T. R.) John Wiley & Sons., pp.1-56.
- Rodgers, B. P. (1993). Potential of biopesticides in agriculture. *Pesticide Science*, **39**, 117-129.
- Romauk, M., Herout, V. y Sorm, F. (1956). *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **21** 894.
- Saito, K. (1974). Distribution of flavonoids and related compounds in various parts of *Cosmos bipinnatus*. *Z. Pflanzenphysiol.*, **71** (4) 80-82.
- Saito, K. (1976). Flavone glycosides in the ray flowers of *Cosmos bipinnatus*. *Planta Med.* **30** (4) 349-355
- Saito, K. (1979). Quantitative variation of flavonoids and related compounds in *Cosmos bipinnatus*. *Acta Soc. Bot. Pol.* **48** (2) 317-325.
- Samata, Y., Inazu, K., Takahashi, K. (1977). Studies on the interspecific hybrid between *Cosmos sulphureus* and *Cosmos caudatus* with special reference to flower color and pigments. *Ikushugaku Zasshi*, **27** (3) 223-236.
- Sánchez, P. N. y Carrillo, D. F. (1993). Compuestos bioactivos de *Ratibida mexicana* (Wats) Sharp. (Asteraceae). Tesis de licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Schreiber, K. y Aurich, O. (1966). Isolierung von nebenalkaloiden und 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregn-16-en-20-on aus *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. *Phytochemistry*, **5**, 707.
- Seaman, F. C. (1982). Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *Bot. Rev.*, **48**, 121-595.
- Sequeira, L., Hemingway, R. J. y Kupchan, S. M. (1968). Vernolepin: a new, reversible plant growth inhibitor. *Science*, **161**, 789-790.

- Sherff, E. E. y Alexander, E. J. (1955). Compositae-Heliantheae-Coreopsidinae. En "North American Flora. Series II", Parte 2. The New York Botanical Garden, pp 1-149.
- Shimokoriyama, M. y Geissman, T. A. (1960). Anthochlor pigments. XIV. The pigments of *Viguiera multiflora* and *Baeria chrysostoma*. *J. Org. Chem.* **25**, 1956-1959.
- Shriner, R. L., Fuson, R. C. y Curtin, D. Y. (1980). Identificación sistemática de compuestos orgánicos. Limusa, México, D. F.
- Smith, G. M., Kester, K. M. y Fischer, N. H. (1983) *Biochem. Syst. Ecol.*, **11** 377.
- Stampf, J. L., Schlewer, G., Ducombs, G., Foussereau, J., Benezra, C. (1978). Allergic contact dermatitis due to sesquiterpene lactones. A comparative study of human and animal sensitivity to  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -butirolactone and derivatives. *Br. J. Dermatol.*, **99** (2), 163-169.
- Starman, T. W., Cerny, T. A., MacKenzie, A. J. (1995). Productivity and profitability of some field-grown specialty cut flowers. *Hortscience*, **30** 1217-1220.
- Stevens, K. L. (1984). "Isopentenoids in Plants" (Eds. Nes, W. D., Fuller, G y Tsai, L. S.) New York, pp.65-80.
- Swain, T. y Williams C. A. (1977). Heliantheae-chemical review en "The biology and chemistry of Compositae". (Eds. Heywood, V. H., Harborne, J. B. y Turner, B. L.), vol 2. Academic Press, London, pp. 539-574.
- Talwar, K. K., Sekhon, B. S. y Kalsi, P. S. (1989). Enhancement of nitrate reductase activity in mungbean (*Vigna radiata* L.) roots by terpenoid plant growth substances- a new report. *Natl. Acad. Sci. Lett. (India)*, **12** (6), 189-192.
- Talwar, K. K., Singh, I. P. y Kalsi, P. S. (1992). A sesquiterpenoid with plant growth regulatory activity from *Saussurea lappa*. *Phytochemistry*, **31** (1), 336-338.

Taniguchi, M., Kataoka, T., Suzuki, H., Uramoto, M., Ando, M., Arai, K., Magae, J., Nishimura, T., Otake, N. y Nagai, K. (1995). Costunolide and dehydrocostus lactone as inhibitors of killing function of cytotoxic T lymphocytes. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59** (11), 2064-2067.

Tanira, M. O. M., Bashir, A. K., Dib, R., Goodwin, C. S., Wasfi, I. A. y Banna, N. R. (1994). Antimicrobial and phytochemical screening of medicinal plants of the United Arab Emirates. *Journal of Ethnopharmacology*, **41**, 201-205.

Tereda, S., Hayashi, K. y Mitsunashi, H. (1978). On the structure of Stephanthraniline C. *Tetrahedron Letters*, (23), 1995-1998.

Toribio, F. P. y Geissman, T. A. (1969). Sesquiterpene lactones of *Hymenoclea monogyra*. *Phytochemistry*, **8** 313-314.

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

Vaughn, M. A. y Vaughn, K. C. (1988). *Weed Tech.*, **2**, 533-539.

Wang, Y. y Zhou, S. (1983). Structure-activity relations of sesquiterpenoid antitumor agents as determined by molecular orbital method. *Yaaxue Xuebao*, **18** (1), 25-32.

Watanabe, S., Kobayashi, A. y Yamashita, K. (1981). Growth and germination inhibitor in hog-weed. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2919-2920.

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

Worsham, A. D. (1989). Current and potential techniques using allelopathy as in aid in weed management. En "Phytochemical Ecology: Allelochemicals, mycotoxins and insects pheromones and allonones" (Eds. Chou, C. H. y Waller, G. R.). Institute of Bolany, Academia Sinica Monograph Series No. 9 Taipei ROC., 275-291.

Yamahara, J., Kobayashi, K., Miki, M., Kozuka, T., Sawanda T. y Fujimura, H. (1985). *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1285-1288.

Yoshikawa, M., Hatakeyama, S., Inoue, Y. y Yamahara, J. (1993).  
Saussureamines A, B, C, D and E, new anti-ulcer principles from chinese  
saussureae radix. *Chem. Pharm. Bull.*, **41** (1), 214-216.

Yoshioka, H., Mabry, T. J. y Timmermann, B. N. (1973). En "Sesquiterpene  
Lactones. Chemistry, NMR and Plant Distribution". University of Tokyo Press,  
pp. 333.