



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Aislamiento, elucidación estructural y evaluación biológica de
elemenólidas de *Zinnia peruviana*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

ULISES GONZÁLEZ MARTÍNEZ



MÉXICO, CD. MX.

AÑO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DR. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA

VOCAL: DRA. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO

SECRETARIO: M. EN C. EMMA MALDONADO JIMÉNEZ

1er. SUPLENTE: DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR

2º. SUPLENTE: M. EN C. MANUEL EDUARDO RANGEL GRIMALDO

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio 2-7, Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Emma Maldonado Jiménez

SUSTENTANTE:

Ulises González Martínez

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación integral brindada a través del personal académico de la Facultad de Química.

A los amigos que hice durante mi estancia en la Facultad con quienes tuve la fortuna de convivir.

Al Comité de Becas del Instituto de Química de la UNAM, por la beca otorgada durante la realización de mi tesis de licenciatura.

A la M. en C. Emma Maldonado por asesorarme tanto en la parte experimental como en el desarrollo de este trabajo. Por brindar su tiempo y por compartir sus conocimientos que contribuyeron a mi formación profesional.

Al Dr. Guillermo Ávila y a la M. en C. Ana María García por la realización de los ensayos de actividad antibacteriana.

Al personal técnico del Instituto de Química de la UNAM: Dr. Rubén Gaviño, M. en C. Héctor Ríos, M. en C. Elizabeth Huerta y Dra. Isabel Chávez del laboratorio de resonancia magnética nuclear; QFB Rocío Patiño del laboratorio de espectroscopia y polarimetría; IQ Luis Velasco, Dr. Javier Pérez y Dra. Carmen García del laboratorio de espectrometría de masas; M. en C. Carmen Márquez del laboratorio de cromatografía.

A los miembros del jurado, por el tiempo dedicado a la revisión del manuscrito, así como por sus acertadas observaciones que contribuyeron a mejorar este trabajo.

A cada uno de los integrantes de mi familia por depositar su confianza en mí y apoyarme para concluir esta etapa de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	II
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE ESPECTROS	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Familia Asteraceae.....	3
2.2. Género <i>Zinnia</i>	3
2.3. <i>Zinnia peruviana</i>	4
2.4. Química del género <i>Zinnia</i>	6
2.5. Lactonas sesquiterpénicas.....	15
2.6. Biosíntesis de lactonas sesquiterpénicas.....	16
2.6.1. Biosíntesis de eleménólidas.....	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. OBJETIVOS	23
4.1. Objetivo general.....	23
4.2. Objetivos particulares.....	23
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	24
5.1. Material y equipo.....	24
5.2. Material vegetal.....	24
5.3. Extracción del material vegetal.....	24
5.4. Aislamiento y purificación de los compuestos.....	25
5.5. Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.....	28
5.6. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.....	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
6.1. Elucidación estructural de los compuestos aislados.....	30
6.2. Actividad antibacteriana.....	39
7. RESUMEN	42
8. CONCLUSIONES	42
9. BIBLIOGRAFÍA	43
10. ANEXO-ESPECTROSCOPIA	49

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<i>s a</i>	Señal ancha
α -OH <i>i</i> Bu	Alfa-hidroxiisobutanoil
Ac ₂ O	Anhídrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
Ang	Angeloil
<i>c</i>	Cuarteto
CC	Cromatografía en columna
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CCF	Cromatografía en capa fina
CBM	Concentración bactericida media
CMI	Concentración mínima inhibitoria
COSY	Espectroscopia de correlación homonuclear (Correlated spectroscopy)
δ	Desplazamiento químico
<i>D</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doble de doble
DEPT	Aumento sin distorsión de la transferencia de polarización (Distortionless enhancement of polarization transfer)
EM-DART	Espectrometría de masas por análisis directo en tiempo real (Direct analysis in real time)
EMAR-ESI	Espectrometría de masas de alta resolución por ionización por electrospray (Electrospray ionization)
FPP	Pirofosfato de farnesilo
Hz	Hertz
HMBC	Correlación heteronuclear de enlaces múltiples (² <i>J</i> C-H, ³ <i>J</i> C-H) (Heteronuclear multiple bond coherence)
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple (¹ <i>J</i> C-H) (Heteronuclear simple quantum coherence)
<i>i</i> Bu	Isobutanoil
IR	Espectroscopia de infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento

<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
Meacr	Metacriloil
Mebu	2-Metilbutanoil
MeOH	Metanol
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NOESY	Espectroscopia de efecto nuclear Overhauser (Nuclear Overhauser effect spectroscopy)
OAc	Acetato
ppm	Partes por millón
p.f.	Punto de fusión
R _f	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
<i>s</i>	Singulete
<i>t</i>	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
Tigl	Tigloil
UFC	Unidades formadoras de colonias

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Ejemplos de productos naturales empleados como fármacos.....	1
2. Estructura base de los cinco tipos de lactonas sesquiterpénicas aisladas del género <i>Zinnia</i>	4
3. Imágenes de <i>Zinnia peruviana</i>	5
4. Lactonas sesquiterpénicas aisladas de <i>Z. acerosa</i> , <i>Z. pauciflora</i> (sinónimo de <i>Z. peruviana</i>) y <i>Z. haageana</i>	7
5. Elemenólidas de <i>Z. peruviana</i> y <i>Z. acerosa</i>	8
6. Elemenólidas de <i>Z. verticillata</i> y <i>Z. tenuiflora</i> (ambas consideradas sinónimos de <i>Z. peruviana</i>).....	9
7. Elemenólidas de una población de <i>Z. peruviana</i> de Honduras.....	9
8. δ -Elemenólidas aisladas de <i>Z. juniperifolia</i> y <i>Z. grandiflora</i>	10
9. Estructura de la zinaflorina IV aislada de una población de <i>Z. peruviana</i> de la Ciudad de México y estructuras revisadas de elemenólidas de <i>Zinnia</i>	11
10. Estructura de la zinaflorina V, aislada de una población de <i>Z. peruviana</i> de Oaxaca..	11
11. δ -Elemenólidas aisladas de <i>Z. juniperifolia</i> y <i>Z. grandiflora</i> , y productos de acetilación de γ -elemenólidas	12
12. Elemenólidas aisladas de <i>Z. flavicoma</i>	13
13. δ -Elemenólida aislada de <i>Z. citrea</i>	14
14. δ -Elemenólidas aisladas de <i>Z. grandiflora</i>	14
15. Ejemplos de lactonas sesquiterpénicas con actividad biológica	15
16. Ruta biosintética propuesta para la formación de (+)-costunólida y (+)-inunólida.....	17
17. Modelos de ciclación de distintos germacranos y formación de una elemenólida por transposición de Cope.....	18
18. Relaciones biogenéticas de las lactonas sesquiterpénicas derivadas de germacránolidas.....	19
19. Conformaciones del germacrano A en la transposición de Cope y su relación con la configuración de los β -elemenos formados.....	20
20. Conversión de linderalactona a isolinderalactona por transposición de Cope.....	21
21. Transposiciones retro-Cope del hediciariol.....	21

22. Diagrama del procedimiento experimental para la obtención de los metabolitos secundarios de <i>Z. peruviana</i>	27
23. Estructuras de los compuestos aislados de <i>Z. peruviana</i>	29
24. Estructuras del β -sitosterol y estigmasterol.....	30
25. Algunas correlaciones observadas en los experimentos COSY, HMBC y NOESY para el compuesto 3.....	32
26. Estructuras del compuesto 4 y de la zinaflorina IV, y estructuras revisadas de los compuestos 4* y 4a*	33
27. Estructura de la zinaflorina II.....	33
28. Estructura de la zinaflorina IV*	34
29. Estructura de la onopordina.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
1. Datos espectroscópicos de RMN ^1H de las elemenólidas 3, 6, 7 y 9 (CDCl_3).....	35
2. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C de las elemenólidas 3, 6, 7 y 9 (CDCl_3).....	36
3. Datos espectroscópicos de RMN ^1H de la onopordina (DMSO-d_6).....	38
4. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C de la onopordina (DMSO-d_6).....	38
5. Resultados cualitativos de la actividad antibacteriana de los compuestos 3, 4/5, 6, 7 y 9 mediante el método de difusión en agar Kirby-Baüer.....	40
6. Resultados cuantitativos de la actividad antibacteriana de los compuestos 3, 6, 7 y 9 mediante la técnica de dilución en caldo.....	40

ÍNDICE DE ESPECTROS

	Página
1. RMN ¹ H de la mezcla de β-sitosterol (1) y estigmasterol (2) (300 MHz, CDCl ₃).....	50
2. IR de la zinaflorina VI (3) (CHCl ₃ , 2 ^a derivada).....	51
3. RMN ¹ H de la zinaflorina VI (3) (500 MHz, CDCl ₃).....	52
4. RMN ¹³ C de la zinaflorina VI (3) (125 MHz, CDCl ₃).....	53
5. HSQC de la zinaflorina VI (3).....	54
6. HMBC de la zinaflorina VI (3).....	55
7. COSY de la zinaflorina VI (3).....	56
8. NOESY de la zinaflorina VI (3).....	57
9. RMN ¹ H de la mezcla de elemenólidas (4 y 5) (300 MHz, CDCl ₃).....	58
10. RMN ¹³ C de la mezcla de elemenólidas (4 y 5) (75 MHz, CDCl ₃ + CD ₃ OD).....	59
11. RMN ¹ H de la zinaflorina II (6) (300 MHz, CDCl ₃).....	60
12. RMN ¹³ C de la zinaflorina II (6) (75 MHz, CDCl ₃).....	61
13. IR de la zinaflorina IV* (7) (CHCl ₃).....	62
14. RMN ¹ H de la zinaflorina IV* (7) (300 MHz, CDCl ₃).....	63
15. RMN ¹³ C de la zinaflorina IV* (7) (75 MHz, CDCl ₃).....	64
16. HSQC de la zinaflorina IV* (7).....	65
17. HMBC de la zinaflorina IV* (7).....	66
18. COSY de la zinaflorina IV* (7).....	67
19. NOESY de la zinaflorina IV* (7).....	68
20. RMN ¹ H de la onopordina (8) (400 MHz, DMSO-d ₆).....	69
21. RMN ¹³ C de la onopordina (8) (100 MHz, DMSO-d ₆).....	70
22. HSQC de la onopordina (8).....	71
23. RMN ¹ H de la juniperina (9) (500 MHz, CDCl ₃).....	72
24. RMN ¹³ C de la juniperina (9) (125 MHz, CDCl ₃).....	73

1. INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que tienen una importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos, defensa contra herbívoros y microorganismos, protección de la radiación ultravioleta y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de semillas.^{1,2} Estos metabolitos secundarios son producidos por ciertos grupos taxonómicos restringidos filogenéticamente, por lo que a menudo ciertas clases de compuestos sólo son producidos por miembros de una familia o de un género. Estos compuestos han sido la base de los primeros tratamientos medicinales desde el principio de la historia humana y este tipo de medicina todavía se practica extensamente hoy en día como parte de la llamada medicina tradicional. Muchos de estos compuestos han probado su eficacia en el tratamiento de ciertos padecimientos, por lo que un gran número de ellos se han tomado como base para desarrollar nuevos fármacos.³ Algunos ejemplos de moléculas activas provenientes de plantas que se utilizan como fármacos hoy en día son el analgésico morfina, aislado de *Papaver somniferum*, la efedrina de *Ephedra sinica*, que es un broncodilatador, el agente antipalúdico artemisinina aislado de *Artemisia annua*⁴ (Figura 1) y el aceite esencial de *Cordia verbenacea* que es la base de un nuevo fitomedicamento llamado Acheflan[®] (analgésico y antiinflamatorio), cuyos efectos se atribuyen a los sesquiterpenos α -humuleno y *trans*-cariofileno.⁵

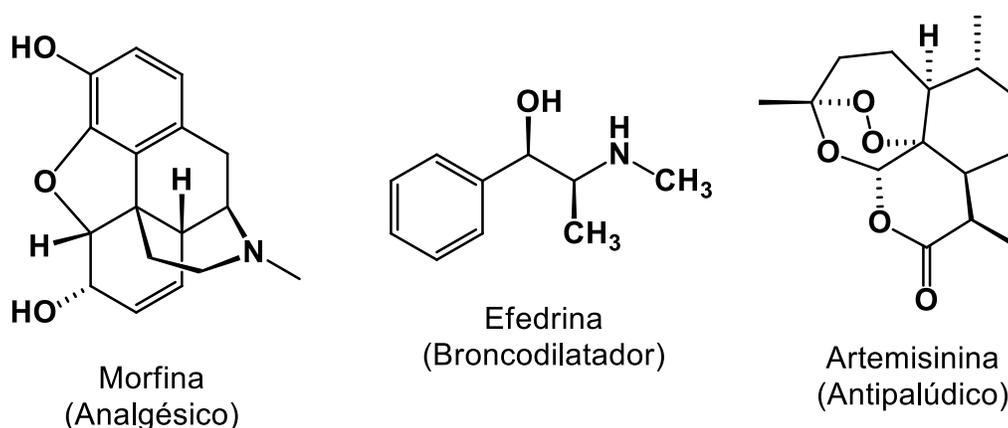


Figura 1. Ejemplos de productos naturales empleados como fármacos.

En el año 2013, existían 100 productos naturales o derivados de éstos, que estaban siendo evaluados en ensayos clínicos para su comercialización como fármacos, de éstos, 23 estaban en fase III y 8 en proceso de registro.⁶ Estas cifras indican claramente que los productos naturales representan una importante contribución a la farmacología moderna, y es probable que en los próximos años los fármacos basados en productos naturales continúen aumentando en el mercado.

Por otra parte, México cuenta con una de las floras más ricas, variadas y complejas del planeta.⁷ Es un país que combina la quinta flora vascular más rica del mundo y el sexto lugar con respecto a endemismos de plantas.⁸ Además, cuenta con un enorme acervo de conocimientos etnobotánicos para tratar diferentes padecimientos, hecho que se manifiesta en las numerosas especies que son consideradas medicinales y empleadas para dichos efectos. Entre las plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana son comunes las pertenecientes a la familia Asteraceae, uno de cuyos géneros es *Zinnia*. Este género está formado por 22 especies, entre las que existen varias que se consideran medicinales.

En este contexto, con el objeto de ampliar los conocimientos sobre el género *Zinnia* a través del estudio de sus especies, se realizó el análisis químico de una población de *Zinnia peruviana* proveniente del estado de Guanajuato. Adicionalmente, se presentan los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos aislados.

2. ANTECEDENTES

2.1. Familia Asteraceae

La familia Asteraceae, es una de las más diversas del grupo de las plantas con flores (angiospermas); cuenta con más de 23,000 especies agrupadas en alrededor de 1620 géneros y distribuidas en casi todo el mundo, principalmente en Centroamérica y en el sur de Norteamérica (México).^{9, 10} Son plantas herbáceas, anuales o perennes, más raramente arbustos o árboles, se caracterizan por tener flores dispuestas en una inflorescencia compuesta denominada capítulo la cual se halla rodeada de una o más filas de brácteas. Esta característica explica el antiguo nombre de esta familia, Compositae, en el que se hace referencia a la estructura floral típica, que corresponde a un órgano que asemeja una flor pero que, en realidad se compone de decenas de flores pequeñas.¹⁰ Los miembros de esta familia tienen uso ornamental (margaritas, crisantemos, dalias, zinnias, entre otras), alimenticio⁹ (girasol, cártamo, lechuga, alcachofa, etc.) y medicinal (*Arnica montana* L., analgésica y antiinflamatoria; *Artemisia absinthum* L., colerético; *Calendula officinalis* L., afecciones de la piel; *Cynara scolymus* L., padecimientos hepáticos; *Echinacea angustifolia* DC., inmunoestimulante; *Tussilago farfara* L., expectorante).¹⁰

2.2. Género *Zinnia*

El género *Zinnia* L. (tribu Heliantheae, familia Asteraceae) está compuesto por hierbas o arbustos anuales o perennes, distribuidos en Norteamérica, principalmente en México, con una sola especie (*Z. peruviana*) que crece desde Arizona hasta Perú.¹¹ Torres dividió a *Zinnia* en dos subgéneros, *Diplothrix* y *Zinnia*.¹² El primero está compuesto por seis especies (*Z. acerosa*, *Z. anomala*, *Z. citrea*, *Z. grandiflora*, *Z. juniperifolia* y *Z. oligantha*). El segundo subgénero está dividido en dos secciones, *Zinnia* con tres especies (*Z. elegans*, *Z. haageana* y *Z. peruviana*) y *Mendezia* con ocho especies (*Z. angustifolia*, *Z. bicolor*, *Z. greggii*, *Z. leucoglossa*, *Z. littoralis*, *Z. maritima*, *Z. purpusii* y *Z. tenella*). Posteriormente, las cinco especies del género *Tragoceras* fueron incluidas como una tercera sección del subgénero *Zinnia*,¹³ la sección *Tragoceras* (*Z. zinnioides*, *Z. schiedeana*, *Z. americana*, *Z. flavicoma* y *Z. venusta*). Sólo a tres de estas 22 especies se les atribuyen propiedades terapéuticas y son usadas en la medicina tradicional.¹¹ Por otra parte, algunas especies de

Zinnia tienen un alto valor económico porque han sido adaptadas al cultivo y son muy cotizadas como plantas ornamentales.¹⁴

Desde el punto de vista fitoquímico las especies de *Zinnia* estudiadas hasta ahora muestran una composición química que se caracteriza por la presencia de lactonas sesquiterpénicas. Estos compuestos son terpenos de quince átomos de carbono (sesquiterpenos) que tienen en su estructura un anillo lactónico, al cual se le atribuyen las diversas actividades biológicas que presentan estos metabolitos. Las lactonas aisladas de *Zinnia* son principalmente elemenólidas, aunque con menor frecuencia se han aislado guayanólidas, germacranólidas, eudesmanólidas y eremofilanólidas (Figura 2).¹¹

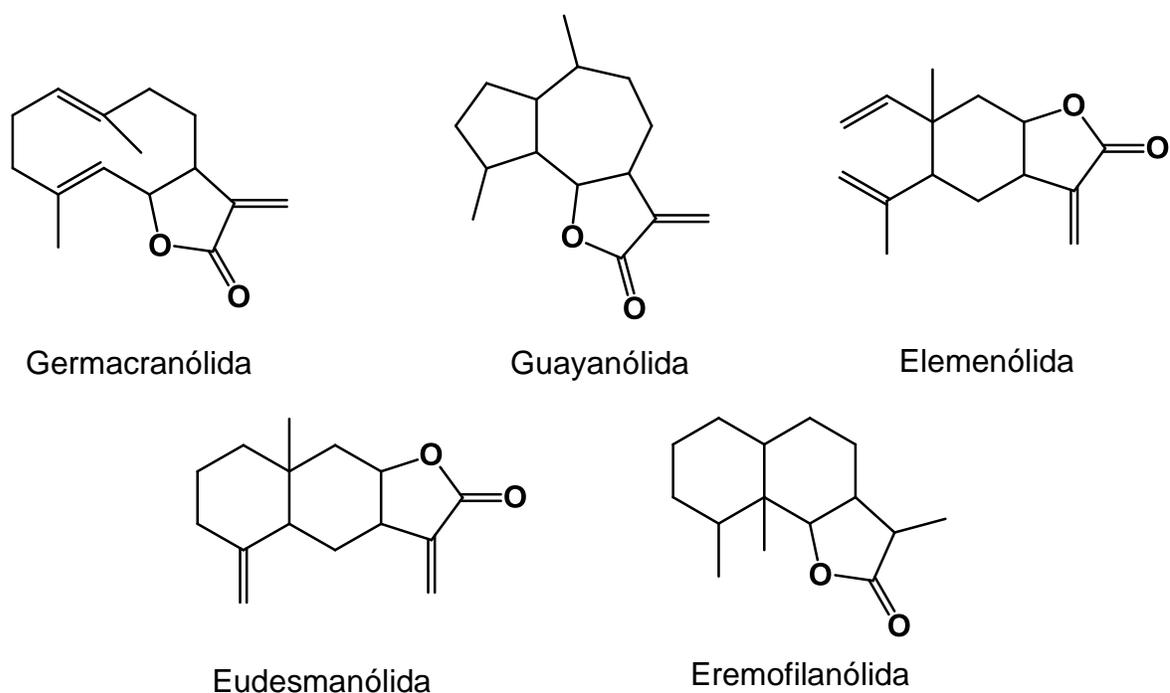


Figura 2. Estructura base de los cinco tipos de lactonas sesquiterpénicas aisladas del género *Zinnia*.

2.3. *Zinnia peruviana*

Zinnia peruviana L. (Figura 3), también conocida con los sinónimos de *Z. multiflora*, *Z. pauciflora*, *Z. tenuiflora*, *Z. verticillata*, entre otros, es una planta anual herbácea de hasta 90 cm de altura.¹² Crece por lo regular a la orilla de los caminos durante la época de lluvias.

En México, es un componente común de la vegetación ruderal y de pastizales. Crece en sitios con una altitud de hasta 2500 m y se distribuye en los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Ciudad de México, Coahuila, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas.¹⁵

En algunos estados de la República Mexicana, *Z. peruviana* es conocida con el nombre común de “mal de ojo” y tiene diversos usos en la medicina tradicional. En Nayarit, el té preparado con tallos y hojas se utiliza en el tratamiento de la diarrea y del dolor de estómago. En la región cuicateca de Santos Reyes Papalo, situada al norte de Santiago Huaucilla, Oaxaca, se utiliza para aliviar el dolor de estómago, para combatir la disentería y para baños después del parto. Los pobladores de Santiago Huaucilla, Oaxaca, la conocen como “gallito” y usan la decocción de las partes aéreas para aliviar el dolor y la inflamación producida por golpes.¹⁶



Figura 3. Imágenes de *Zinnia peruviana*.

En cuanto a estudios farmacológicos, se han evaluado las actividades antinociceptiva y antiinflamatoria de los extractos de hexano, acetato de etilo, metanol y acuoso de las partes aéreas de *Z. peruviana*. Los ensayos en que se evaluaron estas actividades fueron el de estiramiento abdominal (prueba de writhing) y en la prueba de la formalina. Los extractos

de hexano y acetato de etilo presentaron actividad moderada siendo más activo el extracto de acetato de etilo.¹⁶

Se ha descrito que las fracciones eluidas con hexano/AcOEt 7:3 y 6:4 de la CC del extracto de acetona de las partes aéreas de *Z. peruviana* muestran actividad antibacteriana contra bacterias patógenas gram-positivas (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*) y gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*), con actividad más pronunciada contra gram-positivas.¹⁷

También, se describió que el extracto de diclorometano de las partes aéreas y raíces de *Z. peruviana* muestra un potente efecto citotóxico en las líneas celulares de cáncer: UACC62 (melanoma), MCF7 (cáncer de mama) y TK10 (adenocarcinoma renal).¹⁸

2.4. Química del género *Zinnia*

La composición química de *Zinnia* se caracteriza por la presencia de lactonas sesquiterpénicas de tipo elemenólida y guayanólida. De forma menos frecuente, se han aislado y caracterizado germacranólidas, eudesmanólidas y eremofilanólidas.¹¹ Se ha documentado el estudio químico de nueve especies de *Zinnia*, de las cuales siete contienen elemenólidas.

En las primeras investigaciones químicas del género *Zinnia* se analizaron dos colectas de la especie *Zinnia acerosa* (DC.) A. Gray. De la primera colecta se aislaron las guayanólidas zaluzanina C (**1**) y D (**2**) (descritas previamente para algunas especies de *Zaluzania*). De la segunda colecta sólo se aislaron las elemenólidas zinarosina (**3**) y dihidrozinarosina (**4**).¹⁹ La estereoquímica de estos compuestos se estableció mediante el análisis de las constantes de acoplamiento observadas en los espectros de RMN ¹H.

La segunda especie en ser analizada fue *Zinnia pauciflora* L., la cual se considera sinónimo de *Zinnia peruviana* (L.). Del primer estudio químico de esta especie, se aislaron tres elemenólidas denominadas zinaflorinas I, II y III (**5-7**), cuya configuración fue asignada considerando los valores de las constantes de acoplamiento en el espectro de RMN ¹H y asumiendo una orientación alfa de H-5 y H-7, y beta de C-14.²⁰

El análisis fitoquímico de *Zinnia haageana* Regel²¹ condujo al aislamiento de la germacranólida haageanólida (**8**).

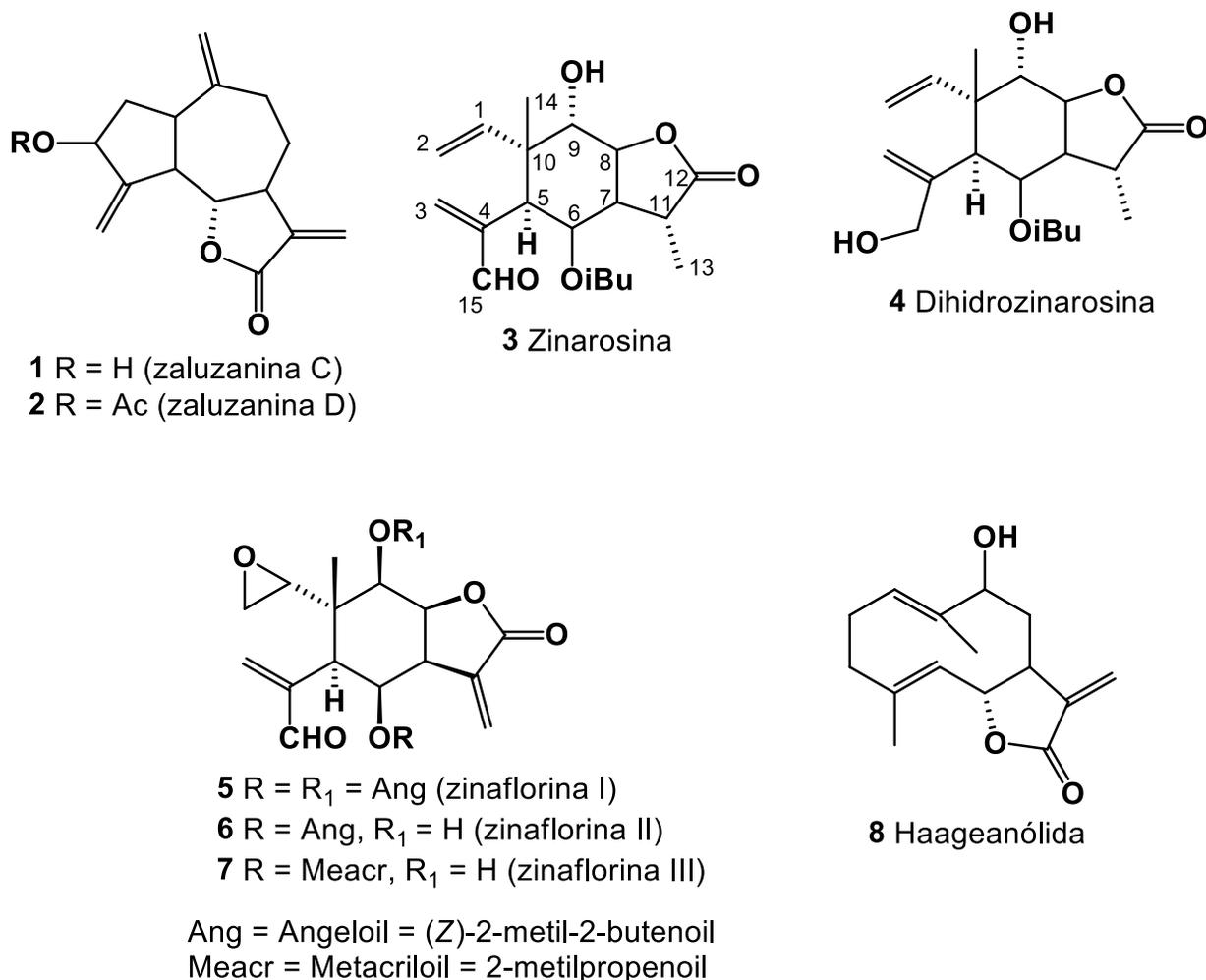


Figura 4. Lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Z. acerosa*, *Z. pauciflora* (sinónimo de *Z. peruviana*) y *Z. haageana*.

En 1979, se publicó el estudio químico de *Zinnia multiflora* L., *Zinnia peruviana* (L.) L. y *Zinnia acerosa* (DC.) A. Gray.²² Las tres especies contienen guayanólidas. De *Z. multiflora* se aislaron las mezclas de elemenólidas **9-12** (~4:3:1:1) y **15-18** (~4:3:1:1); de *Z. peruviana* se aislaron las mezclas de elemenólidas **9-12** (~5:4:1:1) y **12-15** (~4:5:1:1); de *Z. acerosa* se aislaron las elemenólidas **20-24**. El valor de la $J_{7,13} > 3$ Hz de las elemenólidas se tomó como base para proponer una fusión *trans* de la lactona y el valor de la $J_{8,9} = 2.5$ Hz para proponer una orientación beta de H-9. Debido a que las zinaflorinas II y III estaban entre los compuestos aislados, la configuración que se asignó originalmente a las zinaflorinas I-III se

corrigió a **19**, **15** y **16**, respectivamente. Los compuestos **13** y **14** se obtuvieron al acetilar la mezcla **9-12**. Sus constantes de acoplamiento fueron diferentes de las de **9-12** y **15-19**, lo que se atribuyó a cambios conformacionales.

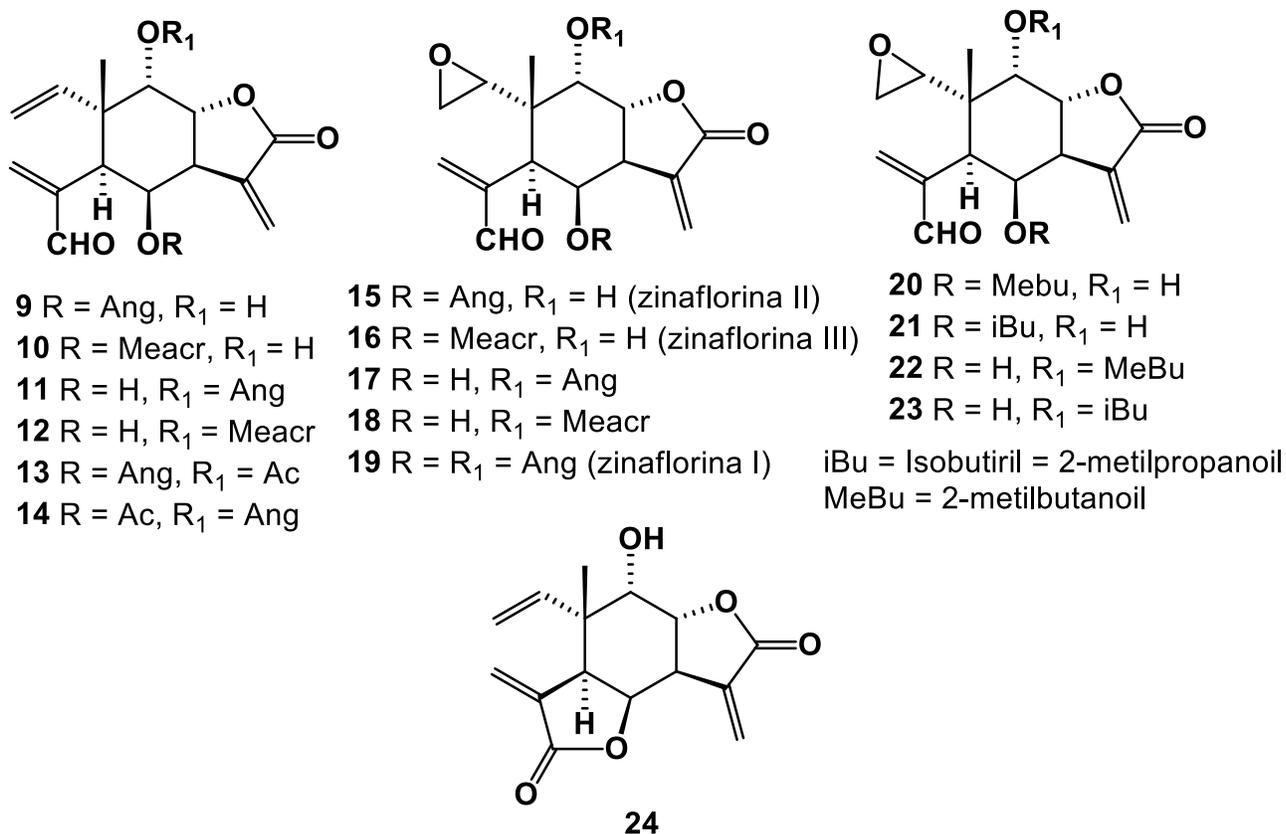


Figura 5. Elemenólidas de *Z. peruviana* y *Z. acerosa*.²²

Posteriormente, se estudió la composición química de seis especies de *Zinnia*: *Zinnia angustifolia*, *Zinnia elegans*, *Zinnia haageana*, *Zinnia linearis*, *Zinnia tenuiflora* y *Zinnia verticillata*.²³ De acuerdo con Torres, *Z. linearis* es sinónimo de *Z. angustifolia*, mientras que *Z. tenuiflora* y *Z. verticillata* son sinónimos de *Z. peruviana*.¹² El análisis químico de *Z. angustifolia*, *Z. linearis* y *Z. haageana* demostró que su composición es similar y constituida por germacranólidas, guayanólidas, eudesmanólidas y eremofilanólidas. No se encontraron elemenólidas en estas especies. Las especies *Z. elegans*, *Z. verticillata* y *Z. tenuiflora* contienen las elemenólidas **9-12**, las epoxielemenólidas **15-18** y guayanólidas. Además, *Z. verticillata* y *Z. tenuiflora* contienen los diésteres **25-29**, a los que se asignó una fusión *cis* del anillo lactónico y una orientación alfa de H-9 con base en los valores de $J_{7,8}$ y $J_{8,9}$, ambos de 4 Hz.

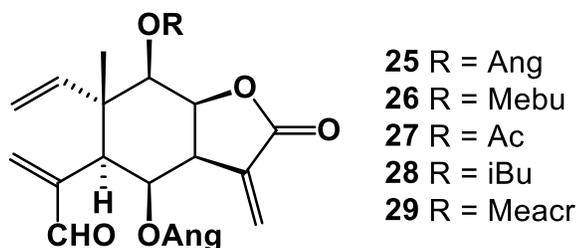
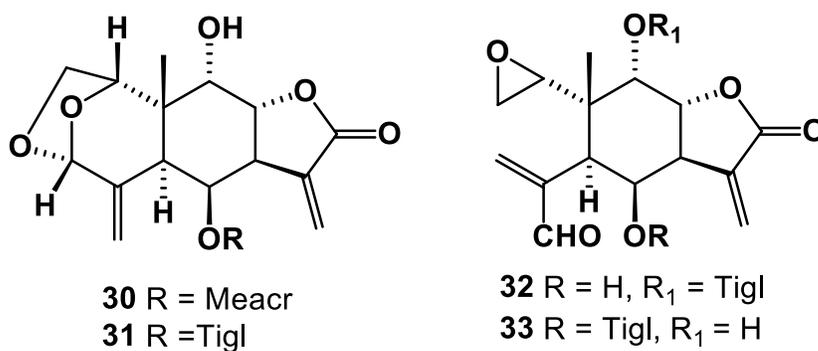


Figura 6. Elemenólidas de *Z. verticillata* y *Z. tenuiflora* (ambas consideradas sinónimos de *Z. peruviana*).

La investigación de una población de *Z. peruviana* proveniente de Honduras²⁴ resultó en el aislamiento de una mezcla de acetales de elemenólidas (**30** y **31**) en una proporción 4:1 y de otra mezcla que contenía a la zinaflorina III (**16**) y al compuesto **32** o la mezcla de **18** y **33**. Los datos espectroscópicos y constantes de acoplamiento, principalmente la $J_{7,13}$, fueron la base para proponer la configuración que se muestran en la Figura 7 y sugerir que es la que corresponde a las zinaflorinas.



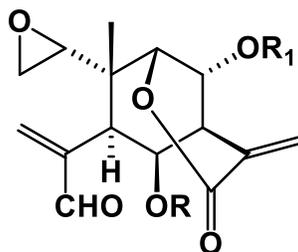
Tigl = Tigloil = (*E*)-2-metil-2-butanoil

Figura 7. Elemenólidas de una población de *Z. peruviana* de Honduras.

El análisis químico de *Zinnia juniperifolia* (DC.) A. Gray²⁵ resultó en el aislamiento de la primera δ -elemenólida a la que se llamó juniperina (**34**). La configuración del compuesto (excepto en C-1) se dedujo a partir de la magnitud de las constantes de acoplamiento ($J_{5,6} = 3$ Hz; $J_{6,7} = 4$ Hz; $J_{7,8} = 3.5$ Hz; $J_{8,9} = 2.2$ Hz), asumiendo una orientación alfa para H-5 y H-7 y beta para C-14.

De *Zinnia grandiflora* Nutt.,²⁶ también se aisló una δ -elemenólida, su estructura no fue elucidada satisfactoriamente, ya que no se logró determinar la posición de los ésteres, por lo que la estructura probable puede ser **35** ó **36**. Este compuesto sólo difiere de **34** por la

naturaleza de uno de los ésteres en C-6 o C-8. La configuración asignada fue la misma que la juniperina.



34 R = α -OH*i*Bu, R₁ = Ang (juniperina)

35 R = α -OH*i*Bu, R₁ = Ac

36 R = Ac, R₁ = α -OH*i*Bu

Figura 8. δ -Elemenólidas aisladas de *Z. juniperifolia* y *Z. grandiflora*.

El estudio químico de una población de *Z. peruviana* colectada en la Ciudad de México²⁷ permitió aislar una nueva elemenólida, denominada zinaflorina IV (**37**), la cual únicamente difiere de los acetales **30** y **31** (Figura 7) por el éster en C-6 que en **37** es un angelato (Figura 9). Sin embargo, con base en el análisis de los ángulos diedros y de las constantes de acoplamiento observadas en el espectro de RMN se propuso una fusión *cis* de la lactona como la asignada originalmente a las zinaflorinas I-III,²⁰ a pesar de la $J_{7,13} > 3$ Hz. Para aclarar esta controversia se llevó a cabo el análisis de difracción de rayos-X de la zinaflorina IV, el cual confirmó la fusión *cis* de la lactona y, sorprendentemente, reveló que en esta elemenólida H-5 es beta y C-14 alfa. Con base en lo anterior, la estructura de la zinaflorina IV fue propuesta como **37**, también se corrigieron las estructuras de los compuestos **30** y **31**, proponiendo las estructuras **38** y **39**, respectivamente.

Las zinaflorinas I-III fueron aisladas nuevamente de esta misma población y se corrigieron sus estructuras con base en la comparación de sus datos espectroscópicos con los de **37**, dando lugar a las estructuras corregidas **48**, **44** y **45**.²⁷ Las estructuras de las elemenólidas **9-12** y las epoxielemenólidas **20-23**, **15-19** y **32-33** (Figuras 5 y 7) fueron revisadas y las estructuras corregidas corresponden a **40-43** y **44-54**.¹¹

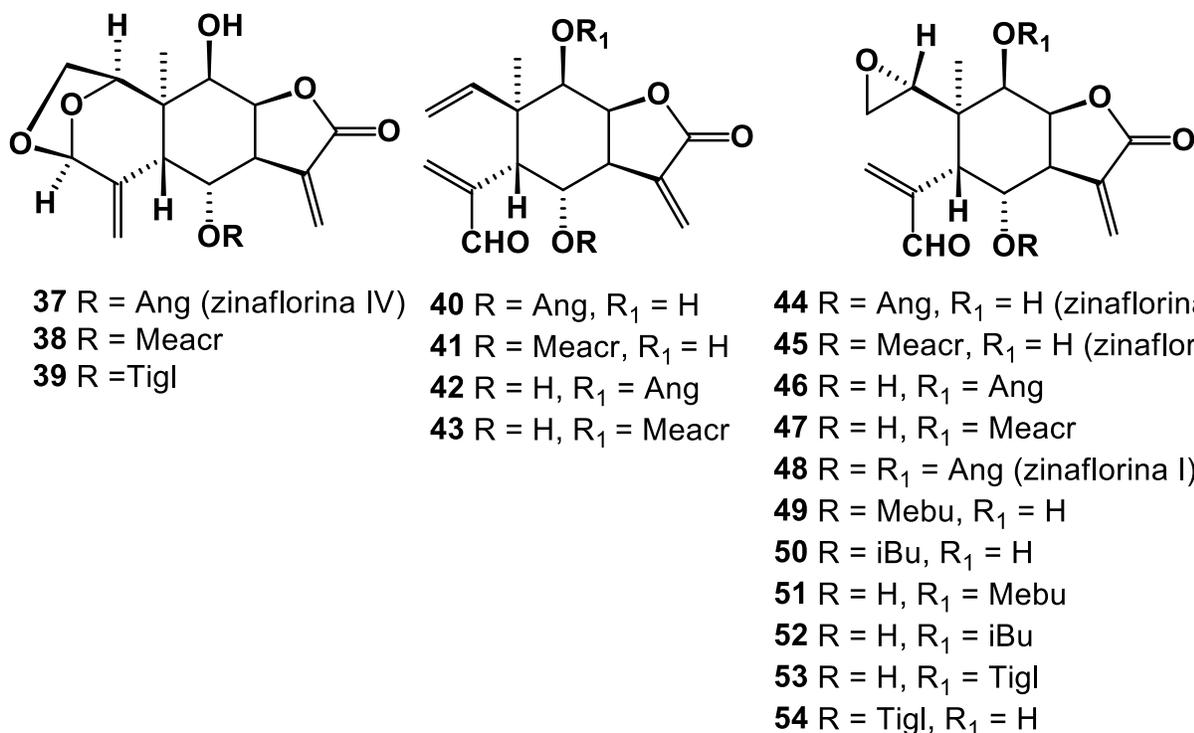


Figura 9. Estructura de la zinaflorina IV aislada de una población de *Z. peruviana* de la Ciudad de México y estructuras revisadas de elemenólidas de *Zinnia*.

El análisis químico de una población de *Z. peruviana* proveniente del estado de Oaxaca²⁷ permitió aislar una nueva elemenólida llamada zinaflorina V (**55**). Este compuesto también pertenece a la serie H-5 β , C-14 α . Se propuso el nombre de zinnólidas para elemenólidas que pertenezcan a esta serie. También se identificaron los compuestos **37**, **44** y **48**.

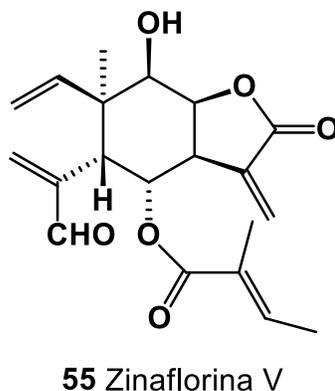


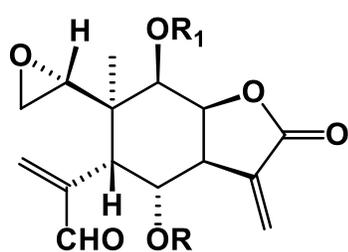
Figura 10. Estructura de la zinaflorina V, aislada de una población de *Z. peruviana* de Oaxaca.

Posteriormente, se publicó el análisis de los productos de acetilación de varias 9 β -hidroxieleman-8 β ,12-ólidas, entre ellas las zinaflorinas II-IV (**44**, **45** y **37**).²⁸ En el artículo se describe que al acetilar la zinaflorina II (Ac₂O/piridina, T.A., 12 h) que tiene un sólo grupo

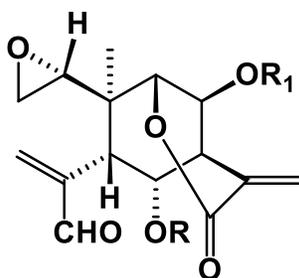
hidroxilo, se obtienen dos productos; el minoritario se identificó como el producto esperado, 9-O-acetilzinaflorina II (**56**), mientras que el mayoritario no presentó la banda de γ -lactona ($\sim 1775\text{ cm}^{-1}$) en el espectro IR, pero sí una banda en 1735 cm^{-1} , atribuida a una δ -lactona y al acetato. Su espectro de RMN ^1H resultó prácticamente igual (sin considerar los ésteres) al de la δ -lactona, juniperina, por lo que fue necesario revisar la estructura de esta última. Para ello se llevó a cabo el estudio de difracción de rayos-X que mostró que la juniperina también pertenece a la serie de las H-5 β , C-14 α elemenólidas y su estructura se determinó como **59**. En consecuencia, la estructura del acetato mayoritario es **57**, esta δ -lactona se obtiene como único producto cuando la acetilación de zinaflorina II (**44**) se efectúa con calentamiento (Ac_2O /piridina, 4 h).²⁸

También, se demostró la formación de la δ -lactona **61** como producto de acetilación de la zinaflorina IV (**37**). Con base en lo anterior y en el análisis de los datos espectroscópicos reportados para los productos de acetilación de las γ -lactonas **40** y **45**,²⁸ se propuso que sus estructuras corresponden a las δ -lactonas **62** y **58**, respectivamente.

En el mismo artículo se ha descrito el aislamiento del compuesto **64** de una población de *Z. acerosa* de San Luis Potosí,²⁸ cuya acetilación produjo los acetatos **63** y **65** en una proporción 2:1. Las transposiciones anteriores pueden explicarse con la existencia de un equilibrio entre γ -elemenólidas y δ -elemenólidas, siendo favorecidas estas últimas con el aumento de la temperatura.



56 R = Ang, R₁ = Ac

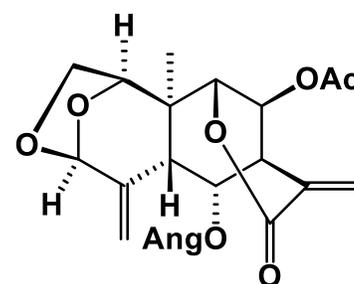


57 R = Ang, R₁ = Ac

58 R = Meacr, R₁ = Ac

59 R = α -OH*i*Bu, R₁ = Ang (juniperina)

60 R = α -OH*i*Bu, R₁ = Ac



61

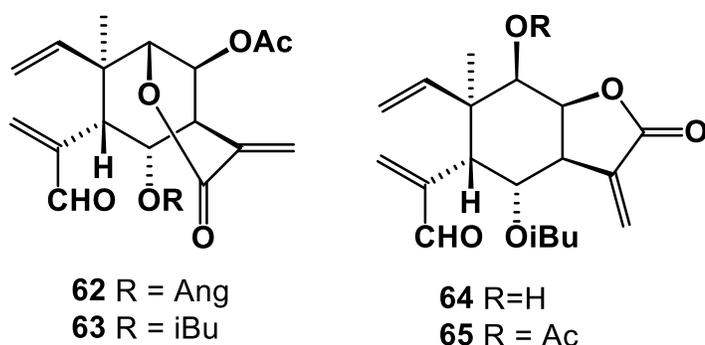


Figura 11. δ -Elemenólidas aisladas de *Z. juniperifolia* (**59**) y *Z. grandiflora* (**60**), y productos de acetilación de γ -elemenólidas.

El género *Tragoceras* (tribu *Zinninae*) fue incluido como una nueva sección de *Zinnia*, por lo que debe presentar una composición química similar a la de otras especies de *Zinnia*. Lo anterior se corroboró con el análisis de *Zinnia flavicoma* (DC.) Olorode & Torres, mediante el cual se aislaron ocho nuevas elemenólidas, las zinaflavinas A-H (**66-73**).²⁹ La estructura y configuración de los compuestos se propusieron con base en sus datos espectroscópicos y se confirmaron mediante el análisis de difracción de rayos-X de la zinaflavina F.

Una diferencia notable entre las zinaflavinas A-F y G-H es la magnitud de las constantes de acoplamiento de H-6. En las zinaflavinas G y H los valores de $J_{5,6} = 12$ Hz y $J_{6,7} = 9$ Hz establecen una relación *trans* de H-6 con los protones vecinos H-5 y H-7; si se asume que H-7 es alfa, entonces H-6 es beta, H-5 debe tener una orientación alfa y C-14 es beta. Lo mencionado anteriormente indica que estos dos compuestos pertenecen a la serie H-5 α , C-14 β . *Z. flavicoma* es la primera especie en la que se reporta que ambas series de elemenólidas coexisten (H-5 β , C-14 α y H-5 α , C-14 β).

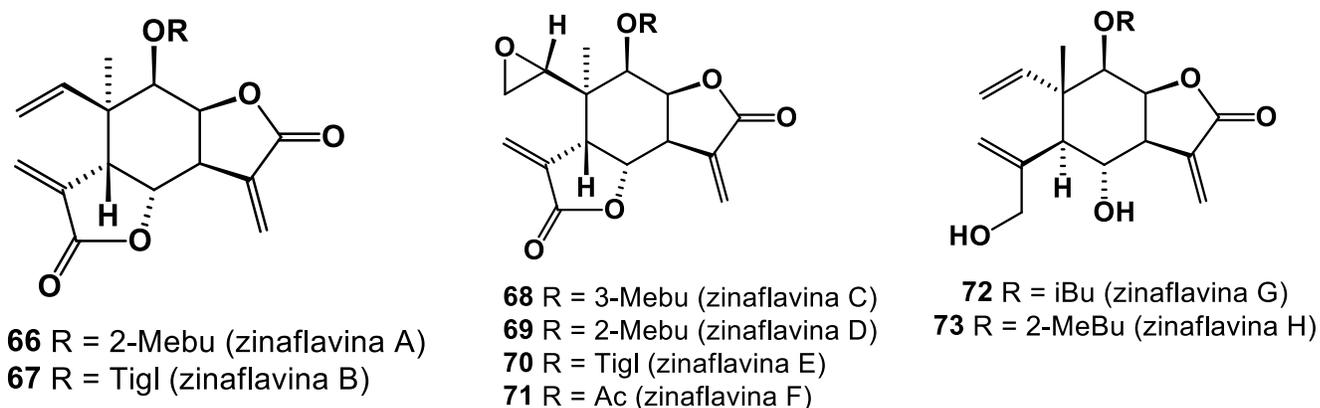
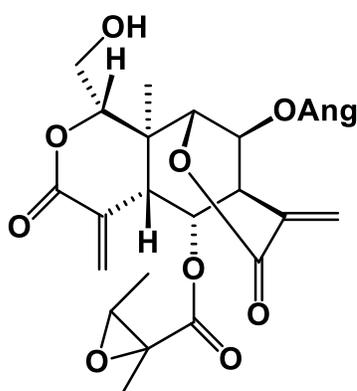


Figura 12. Elemenólidas aisladas de *Z. flavicoma*.

La última publicación sobre *Z. peruviana*, corresponde al estudio químico de una población colectada en el estado de Jalisco.³⁰ En ella se da a conocer el aislamiento de una nueva elemenólida (**33**) nombrada equívocamente zinaflorina IV, ya que este nombre había sido asignado con anterioridad al compuesto **37**. Además, esta elemenólida (**33**) ya había sido descrita como constituyente de una mezcla de elemenólidas aisladas de otra población de *Z. peruviana*.²⁴

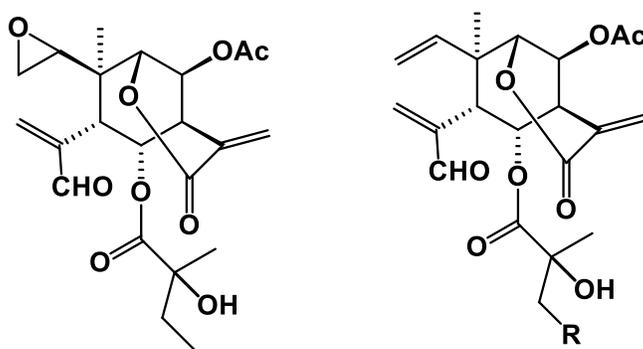
La especie *Zinnia citrea* Torres contiene una δ -elemenólida conocida como zinacitrina (**74**).³¹ Su estructura fue elucidada mediante la interpretación de sus datos espectroscópicos y confirmada por comparación con los valores de las constantes de acoplamiento de la juniperina.



74 Zinacitrina

Figura 13. δ -Elemenólida aislada de *Z. citrea*.

El último artículo sobre el género *Zinnia* corresponde a una población de *Z. grandiflora* de Arizona.³² Este estudio se llevó a cabo con el propósito de aislar compuestos con actividad citotóxica y condujo al aislamiento de la δ -lactona **60** y de tres nuevas δ -elemenólidas, denominadas zinagrandinólidas A, B y C (**75-77**).



75 Zinagrandinólida A

76 R = Me (Zinagrandinólida B)

77 R = H (Zinagrandinólida C)

Figura 14. δ -Elemenólidas aisladas de *Z. grandiflora*.

2.5. Lactonas sesquiterpénicas

Las lactonas sesquiterpénicas son un grupo amplio y diverso de metabolitos secundarios del grupo de los terpenos. Actualmente se conocen alrededor de 5000, aisladas principalmente de la familia Asteraceae (antes Compositae).³³ Estos compuestos han recibido un considerable interés debido a la amplia gama de actividades biológicas que presentan, principalmente analgésica, antiinflamatoria, citotóxica, hipoglucemiante, antiviral, antiparasitaria, antifúngica y antimicrobiana (Figura 15).^{9, 34}

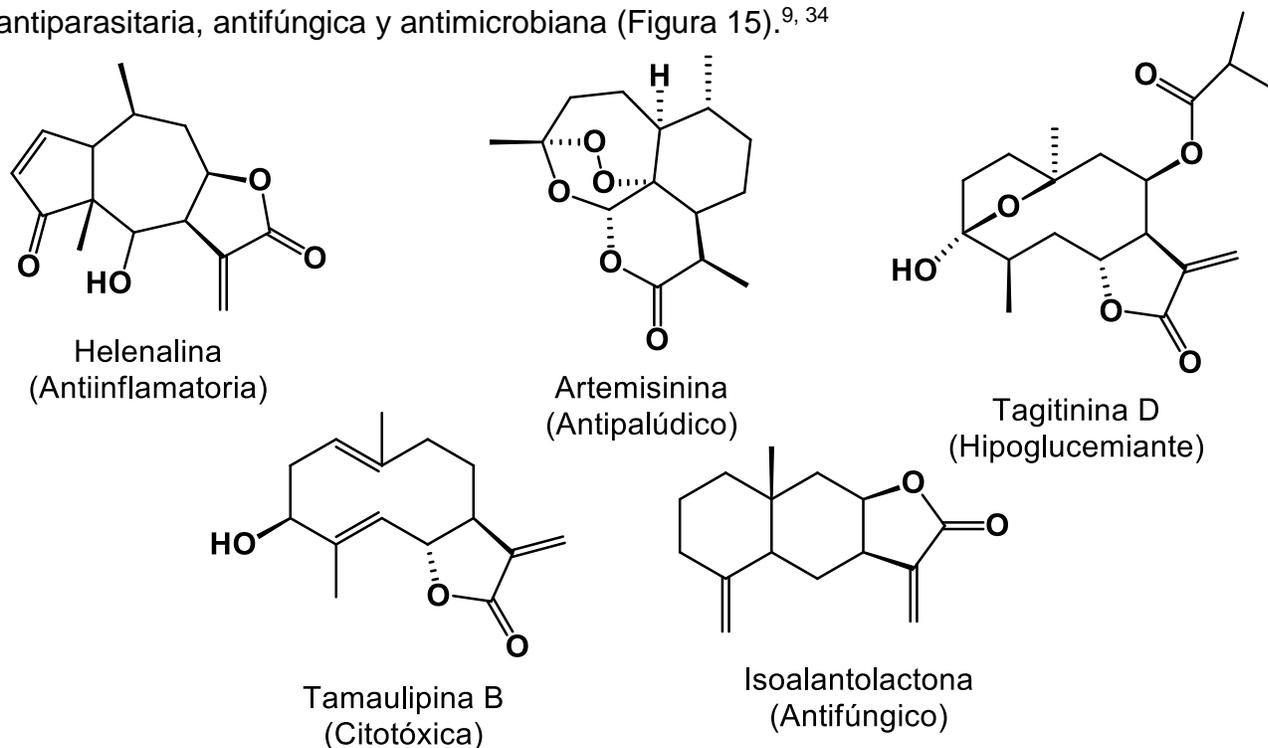


Figura 15. Ejemplos de lactonas sesquiterpénicas con actividad biológica.³⁴

Estos metabolitos secundarios se clasifican en más de 100 tipos con base en su estructura; sin embargo, sólo siete de estos tipos (germacranólidas, eudesmanólidas, elemenólidas eremofilanólidas, guayanólidas, xantánolidas y pseudoguayanólidas) constituyen el 87% de las lactonas sesquiterpénicas conocidas.³⁵ La funcionalidad que da nombre a las lactonas sesquiterpénicas es un anillo γ - o δ -lactónico, generalmente α,β -insaturado, al cual se le atribuyen los principales efectos biológicos (principalmente la actividad citotóxica) que presentan estos compuestos. Otros grupos frecuentemente presentes en las lactonas sesquiterpénicas son dobles enlaces, hidroxilos, ésteres o epóxidos.³⁶

Se ha propuesto que la bioactividad de las lactonas sesquiterpénicas es mediada por alquilación de nucleófilos a través de carbonilos α,β -, o $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturados, tales como: α -

metilén- γ -lactonas o ciclopentanonas α,β -insaturadas. Estos grupos funcionales reaccionan con nucleófilos, especialmente con los grupos sulfhidrilo de aminoácidos azufrados como la cisteína (presentes en un gran número de proteínas funcionales y enzimas), a través de reacciones de adición tipo Michael,³⁴ lo que provoca la inhibición o disminución de actividad de la biomolécula debida a la formación de enlaces covalentes.³⁷

La relación entre la estructura química y la bioactividad de las lactonas sesquiterpénicas se ha estudiado en las actividades citotóxica,³⁸ analgésica³⁹, antiinflamatoria⁴⁰ y antimicrobiana.⁴¹ Se ha postulado que el grupo exometileno de la lactona es esencial para la actividad antiinflamatoria y citotóxica porque modificaciones estructurales a este grupo, tales como saturación o adición, resultan en una disminución de la actividad. También, se ha observado que los grupos alquilantes adicionales de tipo $O=C-C=CH_2$ aumentan en gran medida la citotoxicidad.³⁵ Otras características estructurales también contribuyen a la bioactividad, por ejemplo, la lipofilidad del compuesto, la geometría molecular y el entorno químico de los grupos sulfhídrico de la diana molecular.⁴²

2.6. Biosíntesis de lactonas sesquiterpénicas

Las lactonas sesquiterpénicas se forman por la vía del ácido mevalónico en el retículo endoplásmico de las células de las plantas.³⁴ Estos compuestos derivan del pirofosfato de farnesilo (FPP), el cual está formado por tres unidades C_5 (pirofosfato de isopentenilo y pirofosfato de dimetilalilo). Biogenéticamente, la (+)-germacrano A sintasa cataliza la ciclación del FPP y forma el catión germacrilo que da lugar al (+)-germacrano A. Posteriormente, el C-13 de la cadena lateral del germacrano se oxida para formar el ácido germatrienoico que puede oxidarse en C-6 o C-8 y así generar las lactonas sesquiterpénicas (+)-costunólida o (+)-inunólida (Figura 16). Lo anterior se ha confirmado en estudios de biosíntesis de (+)-costunólida en raíces de *Cichorium intybus* L. (achicoria).^{43, 44}

La formación del anillo lactónico implica la oxidación del metilo vinílico (C-13) del (+)-germacrano A a ácido carboxílico. Este paso comienza con la hidroxilación de (+)-germacrano A a germacratrien-12-ol por la enzima (+)-germacrano A hidroxilasa. Esta enzima del citocromo P450 es dependiente de NADPH. El germacratrien-12-ol es oxidado posteriormente a ácido germacratrien-12-oico a través de germacratrien-12-al por deshidrogenasas dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.⁴⁵

La conversión del ácido germacatrien-12-oico en (+)-costunólida se cataliza por la (+)-costunólida sintasa. Esta enzima también pertenece al citocromo P450, ya que depende de NADPH. La biosíntesis de (+)-costunólida en presencia de $^{18}\text{O}_2$ da como resultado la incorporación de un átomo de ^{18}O . Esto apoya el concepto de que el anillo lactónico se forma a través de una hidroxilación en la posición C-6 del ácido germacatrien-12-oico, después de lo cual el grupo hidroxilo ataca al grupo carboxilo en C-12. No está claro si la formación final del anillo de la lactona está mediada por la (+)-costunólida sintasa o si se produce espontáneamente sin intervención de la enzima. La hidroxilación en la posición C-8, generaría un intermediario de las lactonas sesquiterpénicas cuyo anillo lactónico está cerrado hacia C-8 como la (+)-inunólida.⁴⁶

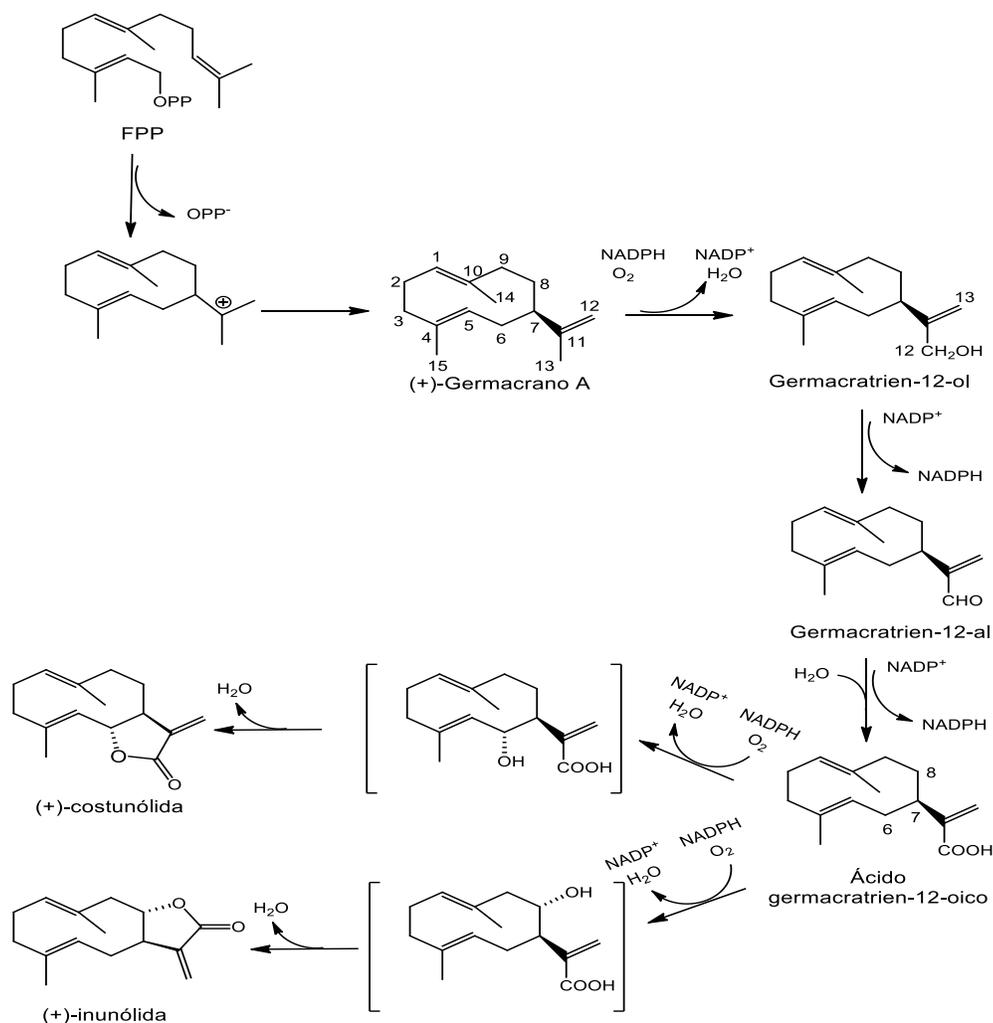


Figura 16. Ruta biosintética propuesta para la formación de (+)-costunólida y (+)-inunólida.⁴⁵

Se han realizado estudios en los que se demuestra que las eudesmanólidas se forman a partir de germacranólidas y 1,10-epoxigermacranólidas, mientras que las guayanólidas se forman a partir de 4,5-epoxigermacranólidas (Figura 17). Esto implica que la 4,5-epoxicostunólida (partenólida) conduciría a guayanólidas, mientras que la 1,10-epoxicostunólida llevaría a eudesmanólidas.⁴⁷ Las germacranólidas también producen eudesmanólidas a través de ciclación promovida por protonación y elemenólidas por transposición de Cope.^{45,46}

Finalmente, existen otras lactonas sesquiterpénicas que tienen como precursor común a las germacranólidas, tal como se muestra en la Figura 18.

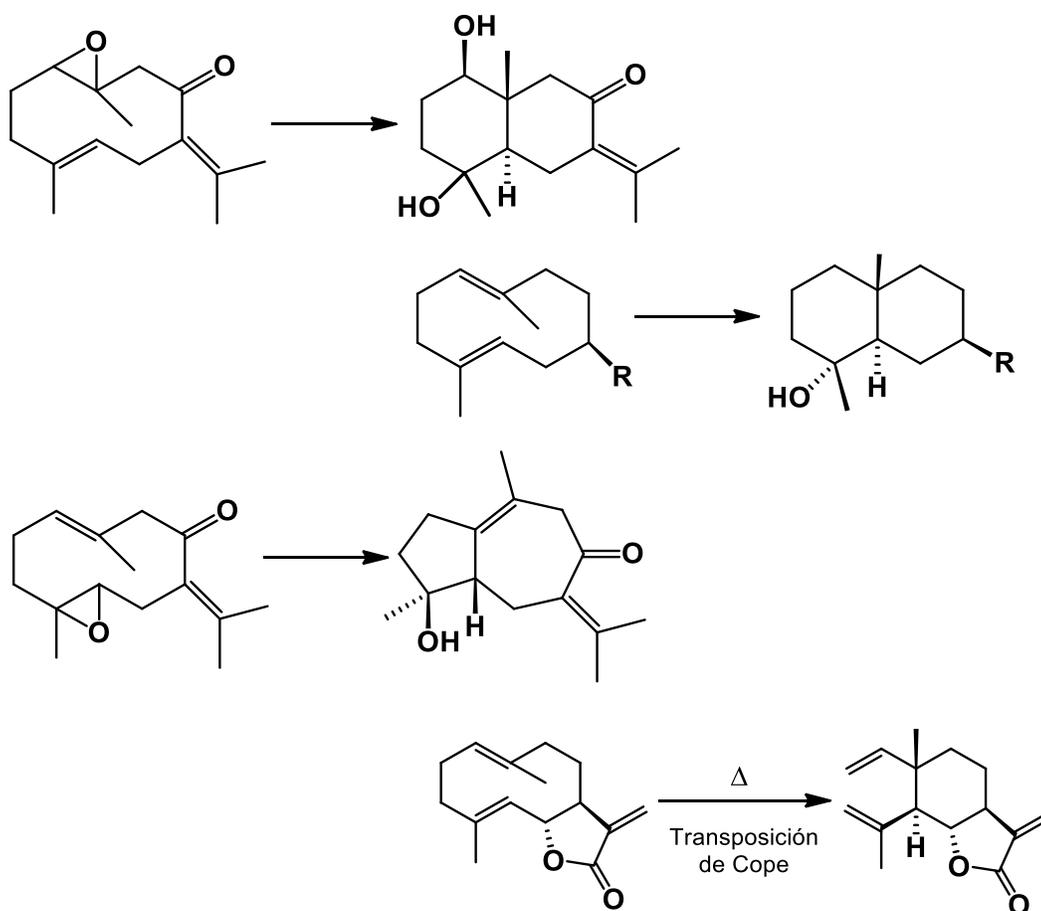


Figura 17. Modelos de ciclación de distintos germacranos y formación de una elemenólida por transposición de Cope.⁴⁶

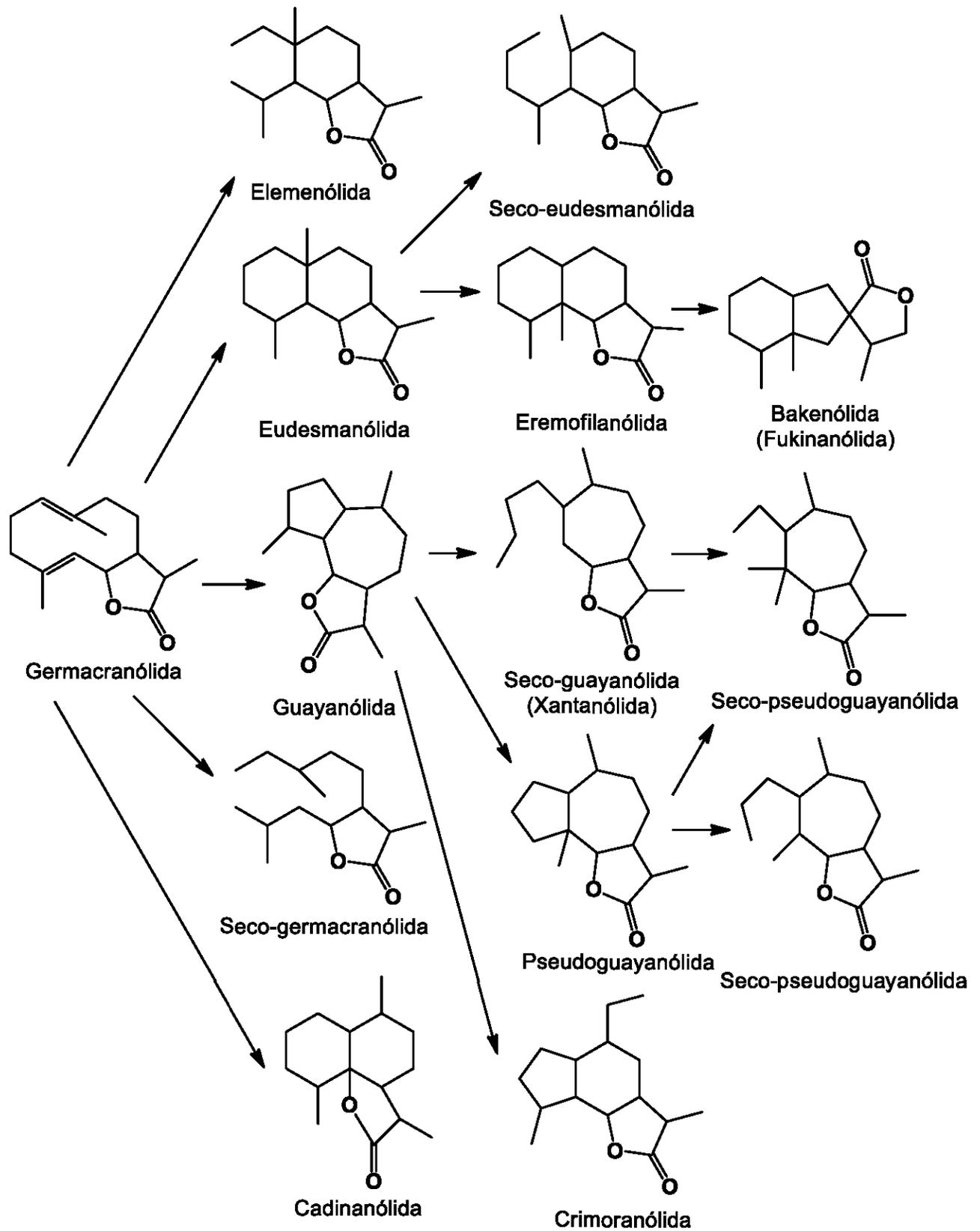


Figura 18. Relaciones biogenéticas de las lactonas sesquiterpénicas derivadas de germacranólidas.⁴⁷

2.6.1. Biosíntesis de elemenólidas

La biosíntesis de elemenólidas involucra transposiciones de Cope de germacranólidas a través de procesos espontáneos o mediados por enzimas (posiblemente elemano sintasas).⁴⁷ La transposición de Cope es una reacción sigmatrópica [3,3] estereoespecífica, que procede a través de un estado de transición en forma de silla.⁴³ Dado que los germacranos prefieren la conformación silla-silla, esta reacción procede fácilmente, sin embargo, es un proceso reversible y el equilibrio entre 1,5-ciclododecadieno y 1,2-divinilciclohexano depende de la naturaleza y la configuración de los sustituyentes. Los germacranos tienen cuatro posibles isómeros geométricos: (*E,E*), (*Z,E*), (*E,Z*) y (*Z,Z*). Los (*E,E*)-germacranos son los más comunes en la naturaleza, son moléculas relativamente flexibles, pero en caso de tener un sustituyente voluminoso en C-7, predomina el conformero con el sustituyente ecuatorial,⁴⁸ como en el caso del germacrano A (Figura 19) que adopta la conformación **a** para generar el *trans*-1,2-divinilciclohexano **1a** (β -elemeno), mientras que el compuesto **1b** con H-5 β y C-14 α no se forma⁴³ (Figura 19).

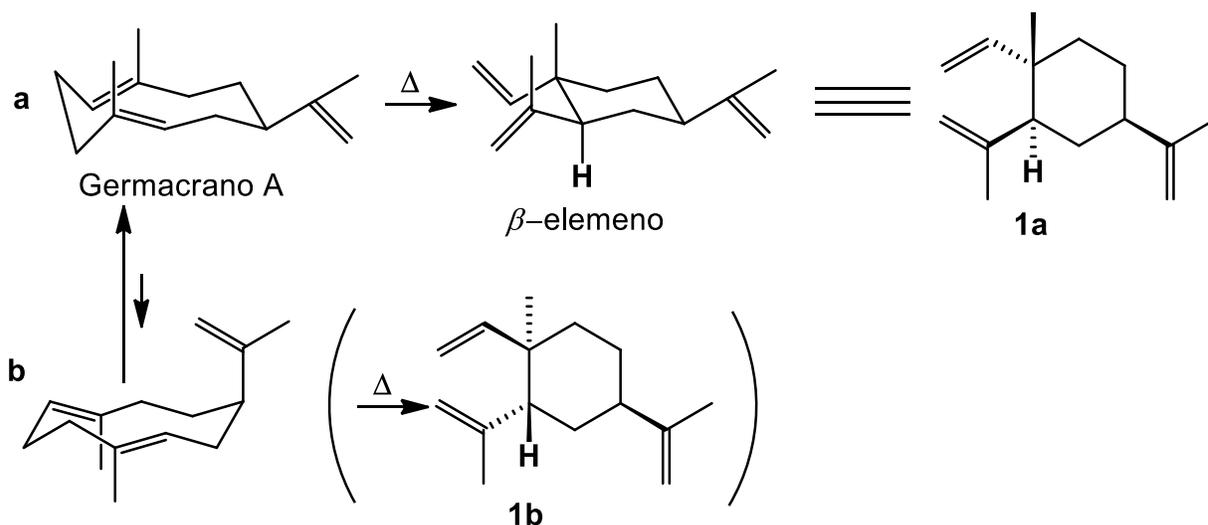


Figura 19. Conformaciones del germacrano A en la transposición de Cope y su relación con la configuración de los β -elemenos formados.⁴³

No obstante, existen ejemplos en los que la reacción de Cope de un (*E,E*)-germacrano puede producir un H-5 β ,C-14 α -divinilciclohexano, como la lenta transformación de linderalactona a isolinderalactona a temperatura ambiente (Figura 20), que podría sugerir que los germacradienos oxidados en C-14 y/o C-15 pueden transponerse a temperaturas bajas en comparación con los germacradienos no oxidados⁴⁷ Lo que también sugiere que

en las plantas la transposición de Cope es espontánea y las reacciones oxidativas posteriores son controladas por enzimas.

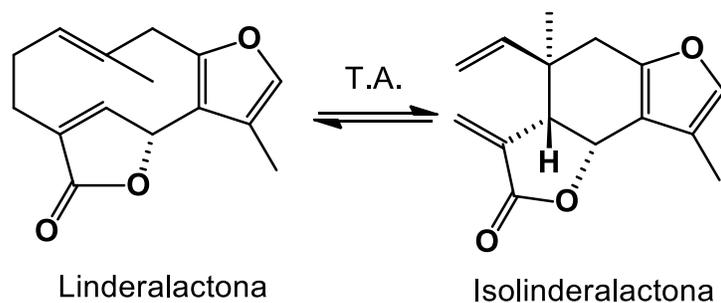


Figura 20. Conversión de linderalactona a isolinderalactona por transposición de Cope.

Otro ejemplo, son las transposiciones del hedicariol y sus isómeros geométricos que demuestran que la configuración H-5 β , C-14 α (la mayoría de las elemenólidas del género *Zinnia* presentan esta configuración¹¹) se forma únicamente del isómero (E,E),⁴⁹ tal como se observa en la Figura 21 que involucra transposiciones retro-Cope, en la que uno de los productos es un elemol con configuración H-5 β , C-14 α .

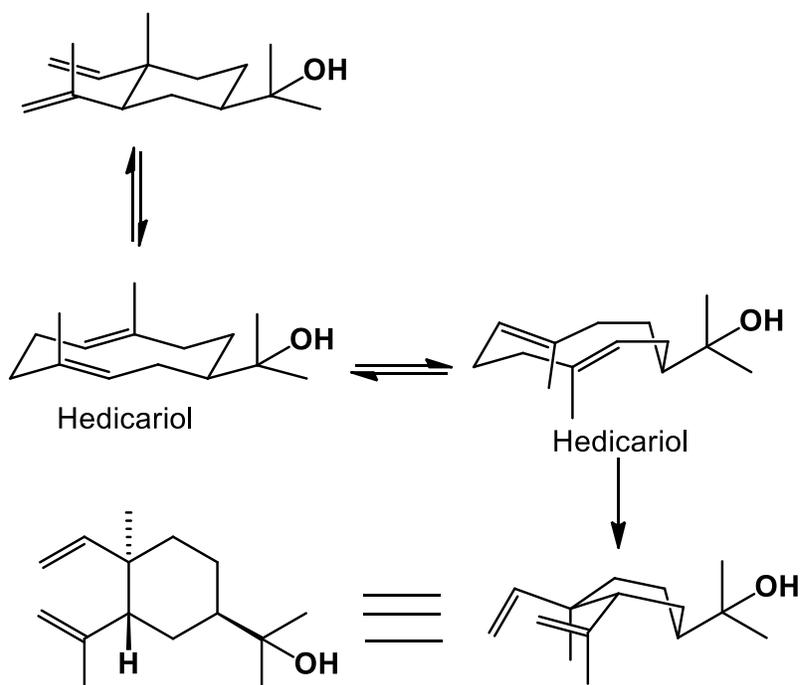


Figura 21. Transposiciones retro-Cope del hedicariol.⁴⁹

3. JUSTIFICACIÓN

El estudio químico de plantas constituye una herramienta útil en la búsqueda de compuestos bioactivos presentes en la naturaleza. Las actividades requeridas para descubrir estos compuestos están asociadas con técnicas de separación, purificación y elucidación estructural, así como con ensayos de actividad biológica. El criterio etnomédico ha servido para seleccionar plantas que resulten de interés con base en el uso que se les ha dado. Tal es el caso de *Zinnia peruviana*, que se utiliza en algunos estados de la República Mexicana para tratar infecciones gastrointestinales y también como analgésico y antiinflamatorio, además está reportado que los extractos orgánicos de esta planta tienen actividad antiinflamatoria, antinociceptiva, citotóxica y antibacteriana. Dentro de este contexto, el análisis químico de una población de *Zinnia peruviana* proveniente del estado de Guanajuato contribuirá a ampliar el conocimiento de la química de esta especie. Además, dado que en la literatura no existen datos de la actividad biológica de los compuestos que se han aislado de esta especie, se evaluará la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios que se aislen de *Z. peruviana*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Generar conocimiento relacionado con la química del género *Zinnia*, a través del estudio químico de una población de *Zinnia peruviana* proveniente del estado de Guanajuato, así como aportar conocimientos científicos acerca de la actividad antibacteriana de sus metabolitos secundarios.

4.2. Objetivos particulares

- Aislar el mayor número posible de metabolitos secundarios presentes en la fracción de acetato de etilo proveniente del extracto de acetona y metanol.
- Determinar la estructura de los compuestos aislados mediante la interpretación de sus datos espectroscópicos.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos obtenidos.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1. Material y equipo

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fischer-Johns y no están corregidos. Las cromatografías en columna (CC) se realizaron con sílica gel 60 (Macherey-Nagel G/UV₂₅₄) como fase estacionaria. Las cromatografías en capa fina (CCF) se realizaron sobre cromatoplasas Macherey-Nagel Sil G/UV₂₅₄ de 0.25 mm de espesor. Las cromatografías en placa preparativa se realizaron sobre placas Sil G/UV₂₅₄ de 1.0 mm y 2.0 mm de espesor. Se utilizó una lámpara de luz ultravioleta Spectroline CX-20 a 254 y 366 nm para visualizar las cromatoplasas. Como revelador se empleó una disolución de sulfato cérico al 3% en ácido sulfúrico 2 N.

Los espectros de RMN se obtuvieron en espectrómetros Bruker Avance Digital (¹H a 300 MHz; ¹³C a 75 MHz), Bruker Avance III (¹H a 400 MHz; ¹³C a 100 MHz) y en un Varian Inova 500 (¹H a 500 MHz; ¹³C a 125 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm con respecto a tetrametilsilano (TMS) que se usó como referencia interna. Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27. La rotación óptica se determinó en un polarímetro Perkin Elmer 343. Los espectros de masas (MS-DART) se obtuvieron en un equipo JEOL AccuTOF JMS-T100LC y los de alta resolución, por la técnica de ionización por electrospray (EMAR-ESI) en un equipo Agilent 6200 series TOF/6500.

5.2. Material vegetal

El material vegetal se recolectó en Valle de Santiago, Gto., el 20 de Julio de 2016 y fue identificado como *Zinnia peruviana* (L.) L. por el Dr. José Luis Villaseñor. Una muestra de la planta se depositó en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM (MEXU-1443211).

5.3. Extracción del material vegetal

Las partes aéreas y raíces de las plantas se dejaron secar a la sombra, ya secas se molieron en un molino de cuchillas. El material vegetal molido (381.21 g) se extrajo con acetona y después con metanol mediante percolación. Los extractos se reunieron (54.73 g) y se

sometieron a partición entre MeOH/H₂O (9:1) y acetato de etilo. Se obtuvieron 34.49 g de la fracción acuosa y 17.47 g de la fracción de AcOEt.

5.4. Aislamiento y purificación de los compuestos

El extracto de AcOEt se fraccionó (fracciones de 500 mL) por medio de CC, usando un sistema de elución hexano/AcOEt; se empezó a eluir con hexano y se aumentó gradualmente la polaridad del sistema hasta 100% de AcOEt. El orden y la relación de disolventes en las distintas fracciones fueron los siguientes: A1-A17 (1:0); A18-A33 (19:1); A34-A61 (9:1); A62-A68 (4:1); A69-A97 (7:3); A98-A102 (3:2); A103-A117 (1:1); A118-A126 (3:7); A127 (0:1); A128 (acetona) y A129 (MeOH). El progreso de la CC se monitoreó mediante CCF y con base en ello se reunieron aquellas fracciones que evidenciaron tener una composición similar. Las fracciones se reunieron de la siguiente forma: A1-A17, A18-A25, A26-A41, A42-A60, A61-A68, A69-A74, A75-A81, A82-A84, A85-A103, A104-A126, A127, A128 y A129.

Mediante CC de las fracciones A26-A41 (1.5335 g) se obtuvieron las fracciones B1-B20 y B21-B34, que fueron eluidas con hexano/AcOEt 96:4 y 93:7, respectivamente. Las fracciones B17-B24 se cristalizaron de etanol y se obtuvieron 184.5 mg (0.048% respecto al material vegetal seco) de la mezcla de los compuestos **1** y **2**.

Las fracciones A69-A74 (1.8727 g) se sometieron a CC, eluida con hexano/acetona, 17:3→7:3. Se obtuvieron las fracciones C1-C79. Las fracciones C4-C20 (825.7 mg) se sometieron a CC. La columna se eluyó con hexano/acetona 88:12→73:27, se obtuvieron las fracciones D1-D31. La fracción D8 se decoloró con carbón activado y se cristalizó de AcOEt/hexano para obtener 44.5 mg (0.012% respecto al material vegetal seco) del compuesto **3**. Las fracciones D11-D20 se decoloraron con carbón activado y se sometieron a cromatografía en placa preparativa (eluida con benceno/AcOEt 3:1), de la que se obtuvieron 13.5 mg (0.004% respecto al material vegetal seco) de la mezcla de los compuestos **4** y **5**, mediante cristalización de AcOEt/hexano. Las fracciones C38-C50 (174.7 mg) se sometieron a CC, eluida con hexano/AcOEt 3:1, de la que se obtuvieron las fracciones E1-E21. De la fracción E8 se obtuvieron 17.0 mg (0.004% respecto al material vegetal seco) del compuesto **6**, mediante cristalización de AcOEt/hexano.

Las fracciones A75-A81 se purificaron mediante sucesivas cristalizaciones de AcOEt/hexano y se aislaron 303.6 mg (0.080% respecto al material vegetal seco) del compuesto **7**.

Las fracciones A85-A103 (1.5274 g) se cometieron a CC, eluida con hexano/AcOEt, 7:3 →1:1. Se obtuvieron las fracciones F1-F51. Las fracciones F12-F34 se cristalizaron de AcOEt/hexano y se obtuvieron 5.2 mg (0.001% respecto al material vegetal seco) del compuesto **8**.

Adicionalmente, 300 mg de la elemenólida juniperina (**9**) se purificaron por medio de CC eluida con hexano/acetona 3:1. Se obtuvieron las fracciones G1-G15. De la fracción G7 se obtuvieron 51.2 mg de juniperina por cristalización de acetona/hexano.

β -sitosterol (1) y estigmasterol (2): Cristales incoloros; p.f. 136-138°C (EtOH); RMN ¹H (CDCl₃): ver espectro 1.

Zinaflorina VI (3): Cristales incoloros; p.f. 138-140°C (AcOEt/hexano); [α]_D²⁰ +140.0 (c. 0.24, CHCl₃); IR (CHCl₃): $\nu_{\text{máx}}$ 3598, 1774, 1710 (1714, 1698 2ª derivada), 1648, 961 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃): ver Tabla 1; RMN ¹³C (CDCl₃): ver Tabla 2; EMAR-ESI: *m/z* 483.1990 [M+Na]⁺ (calculada para C₂₅H₃₂O₈Na, 483.1995).

Mezcla de los compuestos 4 y 5: Cristales incoloros; p.f. 284-285 °C (AcOEt/hexano); RMN ¹H (CDCl₃): ver espectro 9; RMN ¹³C (CDCl₃ + CD₃OD): ver espectro 10; EM-DART: *m/z* 377 [M+H]⁺.

Zinaflorina II (6): Cristales incoloros; p.f. 187-189°C (AcOEt/hexano); IR (CHCl₃): $\nu_{\text{máx}}$ 3611, 1772, 1720, 960 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃): ver Tabla 1; RMN ¹³C (CDCl₃): ver Tabla 2.

Zinaflorina IV* (7): Cristales incoloros; p.f. 192-193°C (AcOEt/hexano); [α]_D²⁰ +115.0 (c. 0.22, EtOH); IR (CHCl₃): $\nu_{\text{máx}}$ 3613, 1773, 1700, 1649, 881 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃): ver Tabla 1; RMN ¹³C (CDCl₃): ver Tabla 2; EM-DART: *m/z* (rel. int.) 377 [M+H]⁺ (100), 359 [M+H-H₂O]⁺ (46), 277 [M-H-TigOH]⁺ (59), 259 [277-H₂O]⁺ (39).

Onopordina (8): Sólido amarillo; p.f. 233-235°C (AcOEt/hexano); RMN ¹H (DMSO-d₆): ver Tabla 3; RMN ¹³C (DMSO-d₆): ver Tabla 4; EM-DART: *m/z* 317 [M+H]⁺.

Juniperina (9): Cristales incoloros; p.f. 134-135°C (acetona/hexano); RMN ¹H (CDCl₃): ver Tabla 1; RMN ¹³C (CDCl₃): ver Tabla 2.

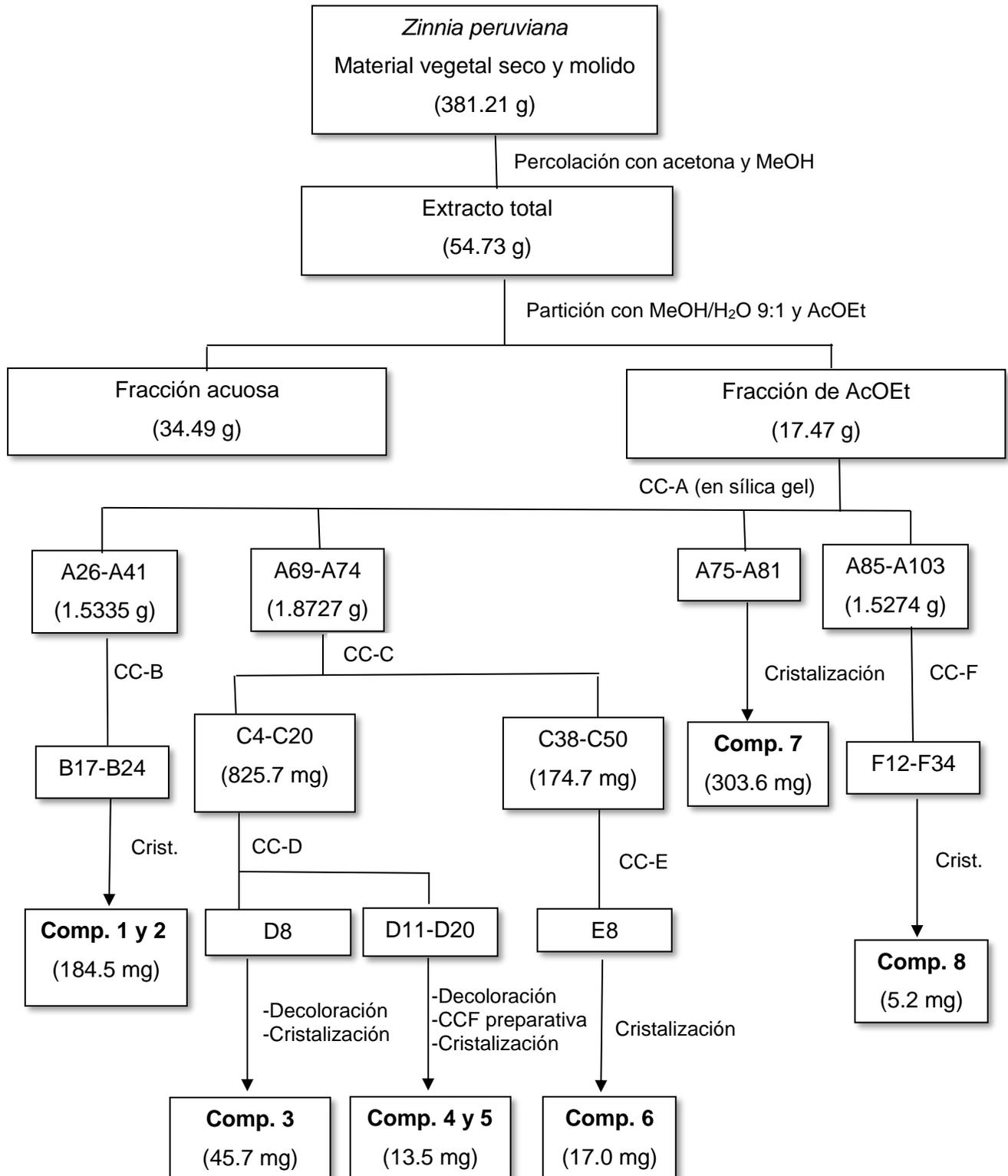


Figura 22. Diagrama del procedimiento experimental para la obtención de los metabolitos secundarios de *Zinnia peruviana*.

5.5. Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana

Las cepas bacterianas utilizadas en los bioensayos fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (donadas por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán).

La actividad antibacteriana de los compuestos se evaluó mediante el método de difusión en agar de Kirby-Baüer.⁵⁰ Los inóculos bacterianos se prepararon en 10 mL de caldo Mueller-Hinton (Bioxon®) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Los inóculos se ajustaron con solución salina estéril hasta obtener la turbidez del estándar No. 5 de McFarland (10^8 UFC/mL). Sobre la superficie de placas con agar Mueller-Hinton se sembraron los inóculos bacterianos, posteriormente, se colocaron por triplicado discos de papel filtro (Whatman No. 5) de 5 mm de diámetro, impregnados con 277 µg del compuesto a evaluar. Como control positivo, se utilizaron discos con 30 µg de cloranfenicol y como control negativo se utilizaron discos con 10 µL del disolvente empleado (DMSO). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Los halos de inhibición se midieron y se reportaron en mm. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

5.6. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos que inhibieron el crecimiento de las bacterias ensayadas se determinó mediante la técnica de dilución en caldo.⁵⁰ Las cepas bacterianas se sembraron en caldo Mueller-Hinton y se incubaron a 37 °C durante 24 h. La serie de microtubos con las diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar, disueltos en DMSO, se prepararon a partir de una solución patrón de la que se tomaron las alícuotas correspondientes y se agregaron en caldo Mueller-Hinton. Las concentraciones finales fueron de 0.035 a 1.120 mg/mL. Como control negativo se empleó el disolvente DMSO. Cada tubo se inoculó con 10 µL de la suspensión bacteriana cuya concentración se ajustó a 4×10^6 UFC/mL, posteriormente se incubaron durante 24 h a 37 °C. La CMI se consideró como la menor concentración del compuesto que inhibió visiblemente el crecimiento de la bacteria ensayada. Para determinar la concentración bactericida media (CBM), se sembraron 100 µL de los tubos que no mostraron crecimiento en placas de agar Mueller-Hinton. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C. Se consideró que la CBM corresponde a las placas sembradas en donde no se observó crecimiento bacteriano.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio químico de una población de *Zinnia peruviana*, procedente del estado de Guanajuato, dio como resultado el aislamiento de una mezcla de dos esteroides, cinco lactonas sesquiterpénicas y una flavona (Figura 23). Una de las lactonas es un nuevo producto natural. La elucidación estructural de estos compuestos, junto con los resultados de la evaluación de su actividad antibacteriana se presentan en esta sección.

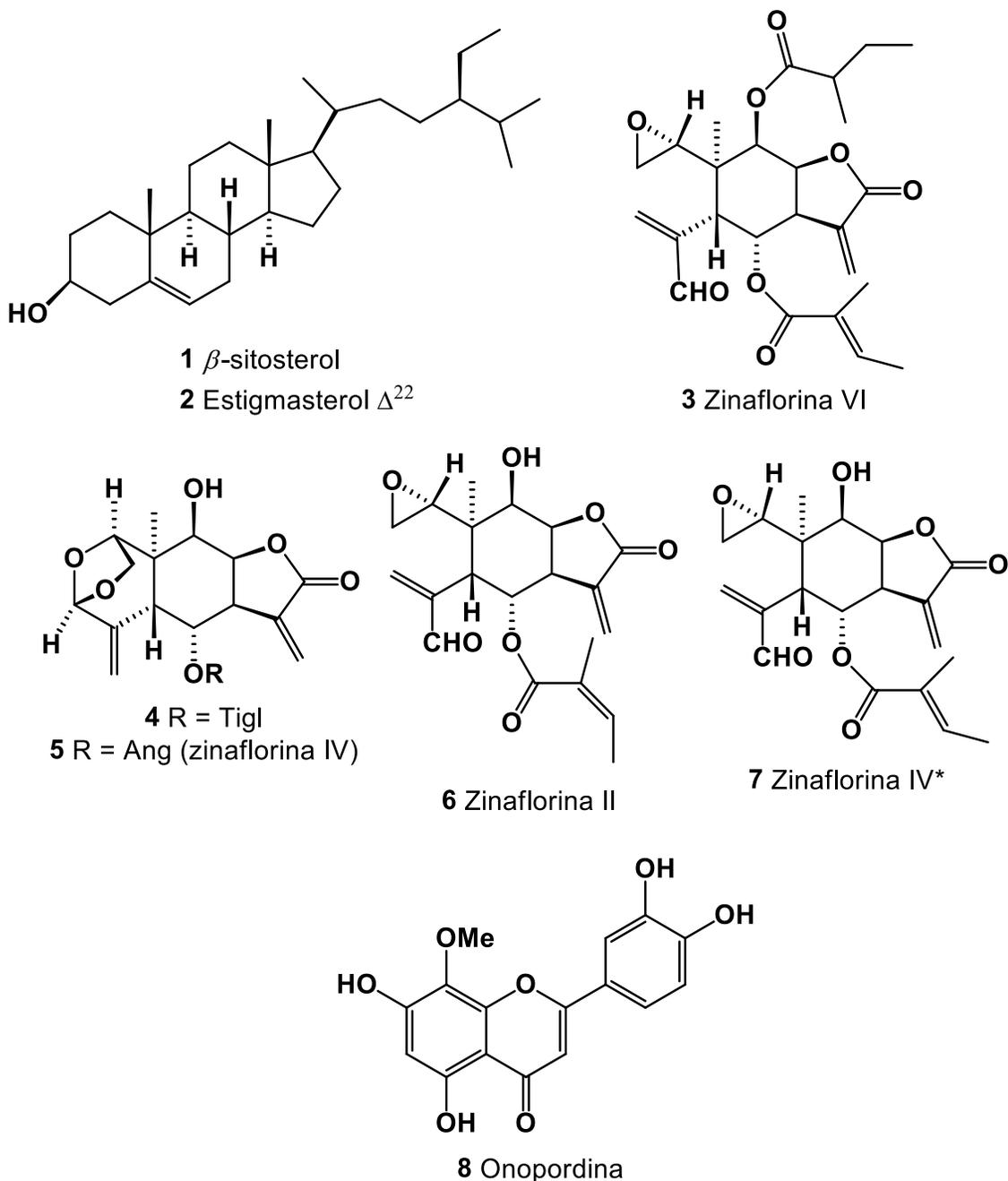


Figura 23. Estructuras de los compuestos aislados de *Z. peruviana*.

6.1. Elucidación estructural de los compuestos aislados

De las fracciones poco polares del extracto de acetona y metanol de *Z. peruviana*, se aisló una mezcla de β -sitosterol (**1**) y estigmasterol (**2**), los cuales se identificaron por comparación de su espectro de RMN ^1H y de su punto de fusión ($136\text{-}138^\circ\text{C}$) con los descritos en la literatura.⁵¹ En apoyo de lo anterior, la CCF comparativa con una muestra de la mezcla, obtenida previamente en el laboratorio, mostró los mismos factores de retención. El β -sitosterol y el estigmasterol son considerados de interés terapéutico ya que son capaces de inhibir la absorción del colesterol y actúan como agentes neutralizantes del veneno de ciertas serpientes,⁵²⁻⁵⁴ además el β -sitosterol presenta otras actividades biológicas, tales como: antiinflamatoria, moduladora del sistema inmune y citotóxica.⁵²

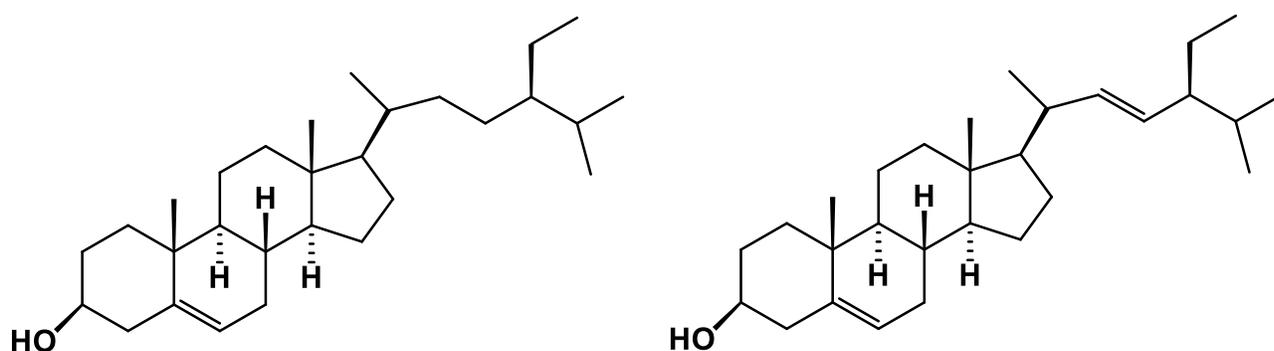


Figura 24. Estructuras del β -sitosterol (**1**) y estigmasterol (**2**).

El espectro de IR del compuesto **3** indica la presencia de una lactona de cinco miembros (1774 cm^{-1}) y dobles ligaduras (1648 cm^{-1}). Este espectro mostró una banda ancha en 1710 cm^{-1} cuya segunda derivada mostró bandas para éster conjugado (1714 cm^{-1}) y aldehído conjugado (1698 cm^{-1}). En su espectro de masas, EMAR-ESI, se observa el ion de m/z 483, que corresponde a la molécula cationizada $[\text{M}+\text{Na}]^+$, que es congruente con la fórmula molecular $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_8$. El espectro de RMN ^{13}C del compuesto **3** presenta veinticinco señales que corresponden a cinco metilos, cuatro metilenos, nueve metinos y siete carbonos no protonados (experimento DEPT). El espectro de RMN ^1H indica la presencia de los grupos tigloil y 2-metilbutanoil, para el primero se observa la señal característica de su protón vinílico en δ_{H} 6.89 y para el segundo las señales de los metilos $\text{CH}_3\text{-}5''$ en δ_{H} 1.18 (d , $J = 7.0\text{ Hz}$) y $\text{CH}_3\text{-}4''$ en δ_{H} 0.93 (t , $J = 7.5\text{ Hz}$), las del metileno $\text{CH}_2\text{-}3''$ en δ_{H} 1.75 y 1.53, y la del metino $\text{CH-}2''$ en δ_{H} 2.44. Los quince carbonos restantes deben pertenecer al esqueleto

de **3**, por lo que, con base en los antecedentes del género, se pensó que la estructura más probable era la de una lactona sesquiterpénica de tipo elemenólida.

Las señales en δ_H 9.42 s y δ_C 193.6 indicaron la presencia de un carbonilo de aldehído α,β -insaturado. El aldehído se situó en C-15 y el doble enlace entre C-3 y C-4, por las correlaciones en el espectro HMBC, del protón del aldehído con el carbono de un metino (δ_C 32.6, δ_H 3.59, CH-5) y con un carbono vinílico (δ_C 146.4, C-4). El espectro HMBC muestra también las correlaciones de H-5 con el carbono de un metileno vinílico terminal y beta al aldehído, CH₂-3 (δ_C 139.5, δ_H 6.57 y 6.21). Además, H-5 correlaciona a dos enlaces con el carbono cuaternario C-10 (δ_C 40.2) y con el carbono de un metino (δ_H 5.21, δ_C 72.9, CH-6); a tres enlaces con el carbono de un grupo metilo (δ_H 1.03 s, δ_C 14.8, CH₃-14) y con el de un metino (δ_H 2.90, δ_C 54.6, CH-1). Este último junto con un metileno (δ_H 2.48 *dd*, H-2a, δ_H 2.36 *dd*, H-2b; δ_C 43.6; CH-2) forman parte de un grupo epóxido terminal.

Por otra parte, las interacciones observadas en el experimento COSY (Figura 25) permitieron asignar las señales de H-5 (δ_H 3.59), H-6 (δ_H 5.21), H-7 (δ_H 3.46), H-8 (δ_H 4.97) y H-9 (δ_H 5.47), así como la de los protones vinílicos H-13a (δ_H 6.39) y H-13b (δ_H 5.81). Las correlaciones en el espectro HMBC de la señal de H-6 en la del carbonilo del tigolato (C-1') y H-9 en la del carbonilo del 2-metilbutanoato (C-1'') mostraron que el tigolato está unido a C-6 y el 2-metilbutanoato a C-9; mientras que la correlación de H-8 en el carbonilo de la γ -lactona, C-12 (δ_C 168.9) y con el carbono vinílico C-11 (δ_C 134.7) reveló que el cierre lactónico es a C-8 y que la γ -lactona es α,β -insaturada.

La estereoquímica del compuesto **3** se dedujo de las interacciones observadas en el experimento NOESY (Figura 25), considerando una orientación alfa del hidrógeno de C-7, el cual correlaciona con H-8, que a su vez interacciona con H-9 y con el CH₃-14, indicando que todos ellos tienen una orientación alfa. Por otra parte, las interacciones de H-5 con H-1 y H-6 revelaron una orientación beta de estos hidrógenos. Lo anterior condujo a determinar la estructura del compuesto **3** como se muestra en la Figura 25. Este compuesto es una nueva elemenólida a la que se denominó zinaflorina VI.

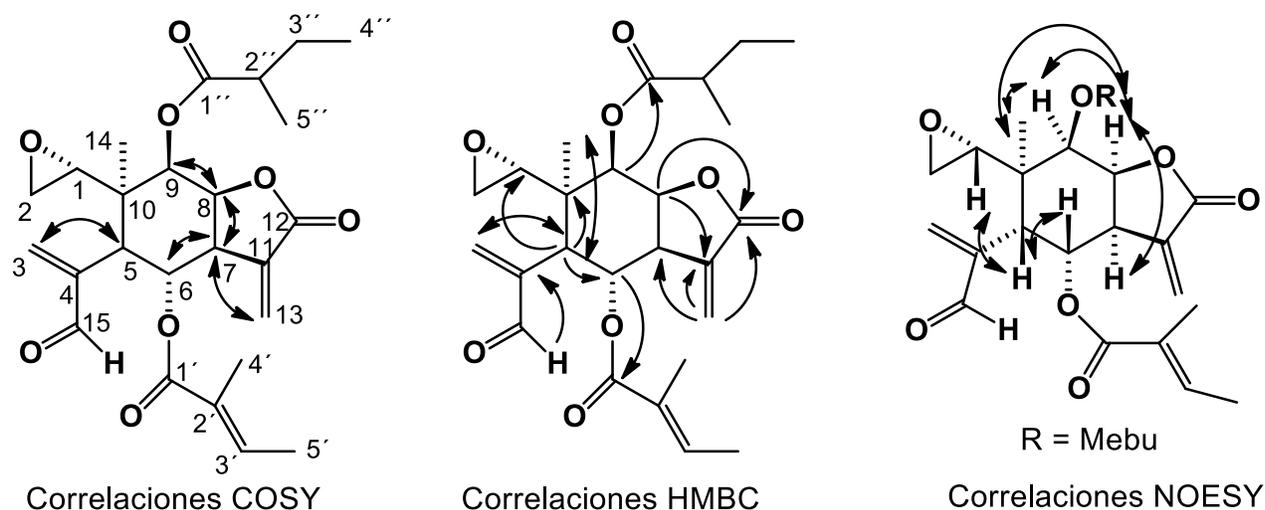


Figura 25. Algunas correlaciones observadas en los experimentos COSY, HMBC y NOESY para el compuesto **3**.

Se aisló una pequeña cantidad de la mezcla de los compuestos **4** y **5**. Esta mezcla presentó una mancha homogénea en CCF; sin embargo, sus espectros de RMN ^1H y ^{13}C revelaron que se trata de dos elemenólidas que sólo difieren en el grupo éster unido a C-6, que en **4** es un tiglato y en **5** un angelato. La identidad de estos compuestos se determinó mediante el análisis de los espectros de RMN que mostraron que ambas moléculas presentan al igual que el compuesto **3**, un éster en C-6 y una γ -lactona- α,β -insaturada cerrada hacia C-8. A diferencia de **3**, en los compuestos **4** y **5** la señal del protón H-9 se encuentra desplazada hacia campo alto (δ_{H} 3.99) porque pertenece a un protón base de alcohol, las señales de los protones H-1, H-2a y H-2b se encuentran desplazadas hacia campo bajo (δ_{H} 4.89, 4.11 y 3.71) y los desplazamientos de las señales del metino CH-15 (δ_{H} 5.49 s; δ_{C} 104.5) son características para un metino de acetal. Además, las señales de los protones vinílicos H3a y H3b (δ_{H} 5.06/5.05 y 4.61/4.59) aparecen desplazadas hacia campo alto respecto a las de **3**. De lo anterior, se dedujo que las estructuras de los compuestos **4** y **5** son las que se muestran en la Figura 26.

Al revisar la literatura se encontró que los compuestos **4** y **5** habían sido aislados previamente, el primero se obtuvo como componente de una mezcla de **4*** y **4a*** de una población de *Z. peruviana* recolectada en Honduras y se les asignó la configuración mostrada en la Figura 26.²⁴ El compuesto **5** se aisló de una población recolectada en la Ciudad de México y se le dio el nombre de zinaflorina IV. Su estructura se confirmó por

difracción de rayos-X.²⁷ La similitud de los datos de RMN de estos tres compuestos permitió corregir las estructuras **4*** y **4a*** que quedaron establecidas como **4** y **4a**.

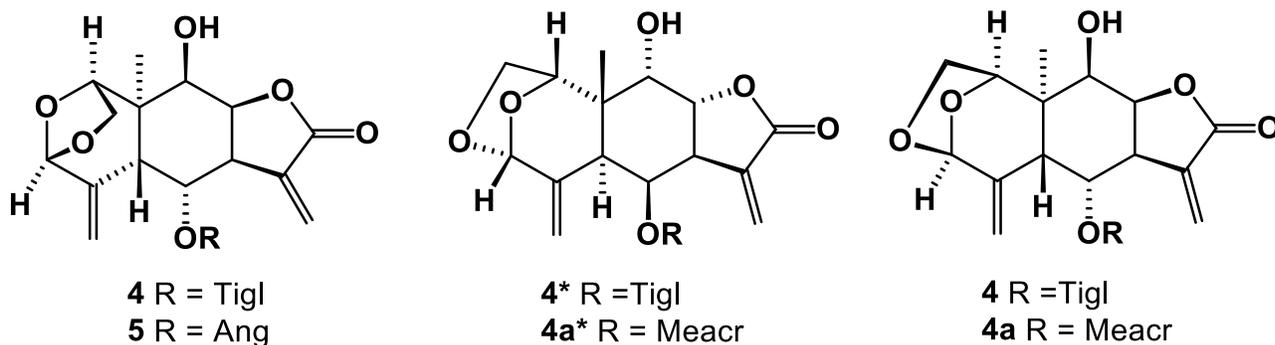


Figura 26. Estructuras del compuesto **4** y de la zinaflorina IV (**5**), y estructuras revisadas de los compuestos **4*** y **4a***.

El espectro de IR del compuesto **6** mostró bandas para grupo hidroxilo (3611 cm^{-1}), γ -lactona α,β -insaturada (1772 cm^{-1}), éster conjugado (1720 cm^{-1}), y dobles enlaces (960 cm^{-1}). En el espectro de RMN ^1H del compuesto **6**, con excepción de H-9, las señales que corresponden a los hidrógenos H-1 a H-15 son prácticamente iguales a las del compuesto **3**; lo mismo sucede con las señales de los carbonos C-1 a C-15 (ver Tablas 1 y 2). De hecho, la diferencia entre **3** y **6** reside en los sustituyentes unidos a C-9 y C-6, que para el caso del compuesto **6** el sustituyente unido a C-9 se identificó como un grupo hidroxilo por la señal ancha en δ_{H} 2.81 y el sustituyente en C-6 se identificó como angelato por la señal característica de su protón vinílico en δ_{H} 6.18. La correlación en el experimento HMBC, de la señal de H-6 en la del carbonilo del angelato (C-1') confirmó que este grupo está unido a C-6. Así, la estructura de este compuesto se determinó como la que se muestra en la figura 27. Este compuesto ya ha sido aislado anteriormente de otras poblaciones de *Z. peruviana* y se le dio el nombre de zinaflorina II.^{20, 27}

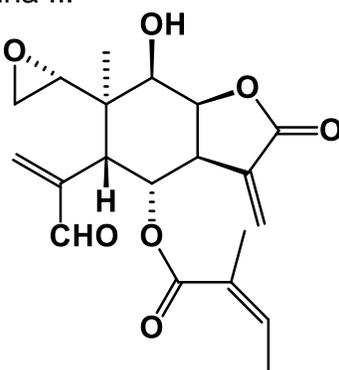


Figura 27. Estructura de la zinaflorina II (**6**).

El espectro de IR del compuesto **7** indica la presencia de un grupo hidroxilo (3434 cm^{-1}), lactona de cinco miembros (1773 cm^{-1}), aldehído conjugado (1700 cm^{-1}) y dobles ligaduras ($1649, 881\text{ cm}^{-1}$). En su espectro de masas se observa el ion de m/z 377, correspondiente a la molécula protonada $[M+H]^+$, que es congruente con la fórmula $C_{20}H_{24}O_7$. El espectro de RMN ^{13}C del compuesto **7** presenta veinte señales que corresponden a tres metilos, tres metilenos, ocho metinos y seis carbonos no protonados (experimento DEPT). La presencia de un tigolato en **7** se dedujo de la señal para un protón vinílico en δ_H 6.88 (H-3'), así como las de dos grupos metilo en δ_H 1.87 y 1.88 (H-4' y H-5'). Su presencia se confirmó por las señales en δ_C 166.8 (C-1'), 128.3 (C-2'), 138.7 (C-3'), 14.7 (C-4') y 12.2 (C-5'), en el espectro de RMN ^{13}C .

Los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento de los hidrógenos H-1 a H-15, fueron similares a las de los compuestos **3** (con excepción de la señal de H-9) y **6**, esto es, las señales de los hidrógenos del epóxido terminal forman un sistema ABX con señales en δ_H 3.11 (H-1), 2.64 (H-2a) y 2.60 (H-2b), la señal del hidrógeno del aldehído se observó como singulete en δ_H 9.48 y las de los protones del metileno conjugado con el aldehído en δ_H 6.62 (H-3a) y 6.24 (H-3b). La señal en δ_H 4.06 que pertenece a H-9, a diferencia del compuesto **3**, está desplazada hacia campo alto debido a que pertenece a un protón base de alcohol.

Las constantes de acoplamiento de las señales de H-5 a H-9 del compuesto **7** y las de los compuestos **3** y **6** son prácticamente iguales, lo que indica que estos compuestos presentan la misma configuración. Lo anterior condujo a determinar la estructura del compuesto **7** como se muestra en la Figura 28.

El compuesto **7** ya había sido descrito como constituyente de dos poblaciones de *Z. peruviana*, una recolectada en Honduras y la segunda en el estado de Jalisco, México.^{24, 30}

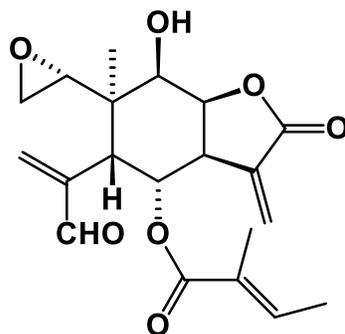


Figura 28. Estructura de la zinaflorina IV*

Tabla 1. Datos espectroscópicos de RMN ¹H de las elemenólidas **3**, **6**, **7** y **9** (CDCl₃, δ en ppm, *J* en Hz).

Posición	δ _H			
	3 ^a	6 ^b	7 ^b	9 ^a
H-1	2.90 <i>s a</i>	3.08 <i>dd</i> (4.2, 2.7)	3.11 <i>dd</i> (4.2, 3.0)	3.10 <i>dd</i> (4.0)
H-2a	2.48 <i>t</i> (4.5)	2.62 <i>m</i>	2.64 <i>dd</i> (4.2, 4.2)	2.54 <i>t</i> (4.0)
H-2b	2.36 <i>dd</i> (4.5, 2.5)	2.60 <i>m</i>	2.60 <i>dd</i> (4.2, 3.0)	2.47 <i>dd</i> (4.0, 2.5)
H-3a	6.57 <i>s</i>	6.61 <i>s</i>	6.62 <i>s</i>	6.71 <i>s</i>
H-3b	6.21 <i>s</i>	6.23 <i>s</i>	6.24 <i>s</i>	6.26 <i>s</i>
H-5	3.59 <i>d</i> (3.5)	3.86 <i>d</i> (3.9)	3.88 <i>d</i> (4.2)	3.44 <i>d</i> (3.5)
H-6	5.21 <i>s a</i>	5.44 <i>dd</i> (3.9, 2.7)	5.43 <i>dd</i> (4.2, 2.7)	4.94 <i>dd</i> (3.5, 3.5)
H-7	3.46 <i>m</i>	3.43 <i>m</i>	3.42 <i>m</i>	3.37 <i>m</i>
H-8	4.97 <i>dd</i> (8.0, 4.0)	4.87 <i>dd</i> (8.1, 3.6)	4.90 <i>dd</i> (8.1, 3.9)	5.56 <i>dd</i> (3.5, 2.0)
H-9	5.47 <i>d</i> (4.0)	4.05 <i>s a</i>	4.06 <i>s a</i>	4.67 <i>dd</i> (3.5, 2.5)
H-13a	6.39 <i>d</i> (3.5)	6.31 <i>d</i> (3.3)	6.32 <i>d</i> (3.6)	6.79 <i>s</i>
H-13b	5.81 <i>d</i> (2.5)	5.73 <i>d</i> (3.0)	5.74 <i>d</i> (3.3)	5.86 <i>s</i>
H-14	1.03 <i>s</i>	1.02 <i>s</i>	1.05 <i>s</i>	1.17 <i>s</i>
H-15	9.42 <i>s</i>	9.45 <i>s</i>	9.48 <i>s</i>	9.38 <i>s</i>
OH	-	2.81 <i>s a</i>	2.87 <i>s a</i>	2.83 <i>s a</i>
6-OR	Tigl	Ang	Tigl	α-OHiBu
H-3'	6.89 <i>c a</i> (7.0)	6.18 <i>c a</i> (6.9)	6.88 <i>dc</i> (7.2, 1.5)	1.58 <i>s</i> 1.56 <i>s</i>
H-4'	1.87 <i>d</i> (7.0)	2.00 <i>d</i> (6.9)	1.87 <i>d a</i> (7.2)	-
H-5'	1.88 <i>s a</i>	1.92 <i>s a</i>	1.88 <i>s a</i>	-
9-OR	Mebu	-	-	Ang (8-OR)
H-2''	2.44 <i>c</i> (7.0)	-	-	-
H-3a''	1.75 <i>ddc</i> (7.5, 7.5, 7.0)	-	-	6.19 <i>cc</i> (7.0, 1.5)
H-3b''	1.53 <i>ddc</i> (7.5, 7.5, 7.0)	-	-	-
H-4''	0.93 <i>t</i> (7.5)	-	-	1.94 <i>dc</i> (7.0, 1.5)
H-5''	1.18 <i>d</i> (7.0)	-	-	1.84 <i>m</i>

^aLos espectros se determinaron a 500 MHz.

^bLos espectros se determinaron a 300 MHz.

Tabla 2. Datos espectroscópicos de RMN ¹³C de las eleménolidas **3**, **6**, **7** y **9** (CDCl₃, δ en ppm).

Posición	δ _c			
	3 ^a	6 ^b	7 ^b	9 ^a
C-1	54.6 CH	55.7 CH	55.6 CH	55.0 CH
C-2	43.6 CH ₂	44.3 CH ₂	44.3 CH ₂	44.0 CH ₂
C-3	139.5 CH ₂	139.2 CH ₂	139.4 CH ₂	139.0 CH ₂
C-4	146.4 C	146.5 C	146.4 C	145.4 C
C-5	32.6 CH	32.3 CH	32.0 CH	29.5 CH
C-6	72.9 CH	70.7 CH	71.4 CH	77.9 CH
C-7	43.2 CH	43.0 CH	43.0 CH	43.1 CH
C-8	73.7 CH	74.4 CH	74.4 CH	63.6 CH
C-9	72.1 CH	72.1 CH	72.1 CH	82.2 C
C-10	40.2 C	40.1 C	40.2 C	43.1 C
C-11	134.7 C	134.9 C	134.8 C	131.2 C
C-12	168.9 C	169.8 C	169.7 C	162.2 C
C-13	122.4 CH ₂	120.2 CH ₂	120.2 CH ₂	134.0 CH ₂
C-14	14.8 CH ₃	13.7 CH ₃	13.6 CH ₃	13.7 CH ₃
C-15	193.6 CH	193.8 CH	193.8 CH	192.8 CH
6-OR	Tigl	Ang	Tigl	α-OHiBu
C-1'	166.8 C	166.3 C	166.8 C	176.1 C
C-2'	128.1 C	126.3 C	128.3 C	72.3 C
C-3'	139.3 CH	141.4 CH	138.7 CH	27.6 CH ₃
C-4'	14.7 CH ₃	15.8 CH ₃	14.7 CH ₃	27.0 CH ₃
C-5'	12.2 CH ₃	20.7 CH ₃	12.2 CH ₃	-
9-OR	Mebu	-	-	Ang (8-OR)
C-1''	175.1 C	-	-	166.4 C
C-2''	41.1 CH	-	-	126.6 C
C-3''	24.4 CH ₂	-	-	141.0 CH
C-4''	11.5 CH ₃	-	-	15.9 CH ₃
C-5''	15.8 CH ₃	-	-	20.3 CH ₃

^aLos espectros se determinaron a 125 MHz.

^bLos espectros se determinaron a 75 MHz.

De las fracciones más polares, se aisló un flavonoide de tipo flavona (**8**), el cual con base en los datos espectroscópicos obtenidos por RMN se identificó como onopordina.

El espectro de masas (EM-DART) muestra el ion correspondiente a la molécula protonada, m/z 317 $[M+H]^+$, que es congruente con la fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_7$. El espectro de RMN ^{13}C (ver Tabla 4) muestra dieciséis señales que corresponden a un metilo, cinco metinos y diez carbonos no protonados. Estas señales son características de un flavonoide de tipo flavona,⁵⁵ ya que doce de ellas corresponden a dos anillos aromáticos, una a la del metilo de un grupo metoxilo y las tres restantes corresponden al anillo C, esto es, la señal en δ_c 181.8 pertenece al carbono C-4 de la cetona; las señales en δ_c 163.7 (C-2) y en δ_c 102.7 (CH-3) corresponden a los carbonos vinílicos C-2 y C-3, respectivamente. El experimento HSQC permitió localizar la señal de H-3 en δ_H 6.68.

En el espectro de RMN 1H (ver Tabla 3) se observa un sistema formado por tres señales asignadas al anillo B en δ_H 7.42 (*dd*, $J = 2.3, 8.3$ Hz), 7.44 (*d*, $J = 2.2$ Hz) y 6.90 (*d*, $J = 8.3$ Hz). Las constantes de acoplamiento indican que este anillo está sustituido en C-3' y C-4' y que la señal en δ_H 7.42 corresponde a H-6', ya que muestra una J_{orto} (8.3 Hz) con H-5' (δ_H 6.90) y una J_{meta} (2.3 Hz) con la señal en δ_H 7.44 que pertenece a H-2'. La señal en δ_H 12.63 es característica de un hidroxilo en C-5 que por formar un puente de hidrógeno con la cetona en C-4 está desplazada hacia campo bajo. El anillo A tiene un hidrógeno aromático cuya señal se observa en δ_H 6.27, el cual muestra correlación en el espectro HSQC con la señal de carbono que aparece en δ_c 98.9, este desplazamiento químico del carbono es característico de C-6 cuando en C-7 y C-5 existen grupos hidroxilo y C-8 está unido a oxígeno, por lo que este hidrógeno aromático se asignó a H-6. Finalmente, la señal simple en δ_H 3.84 pertenece a un grupo metoxilo, ya que integra para tres hidrógenos. La señal ubicada en δ_c 127.7 debe pertenecer al carbono que está unido al metoxilo por lo que se asignó a C-8 y la señal en δ_c 157.0, por estar desplazada hacia campo bajo, indica que este carbono está sustituido por un hidroxilo por lo que se asignó a C-7.

Así, se propuso la estructura que se muestra en la Figura 29. Este flavonoide, ya ha sido aislado de otras plantas pertenecientes a la familia Asteraceae y se le conoce como onopordina.⁵⁶⁻⁵⁸ Esta es la primera vez que se aísla como constituyente de *Z. peruviana*.

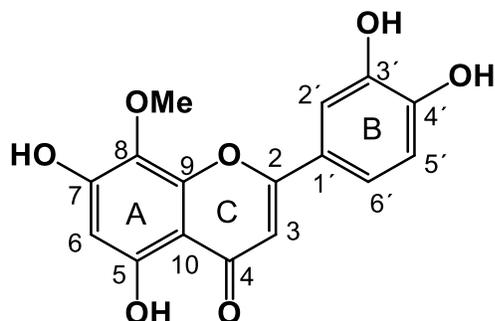


Figura 29. Estructura de la onopordina (8).

Tabla 3. Datos espectroscópicos de RMN ^1H de la onopordina (8) (DMSO- d_6 , δ en ppm, J en Hz)^a

Posición	δ_{H}
H-3	6.68 s
H-6	6.27 s
H-2'	7.44 d (2.2)
H-5'	6.90 d (8.3)
H-6'	7.42 dd (2.3, 8.3)
C ₆ -OCH ₃	3.84 s
C ₅ -OH	12.63 s

^aEl espectro se determinó a 400 MHz.

Tabla 4. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C de la onopordina (8) (DMSO- d_6 , δ en ppm)^b

Posición	δ_{C}
C-2	163.7 C
C-3	102.7 CH
C-4	181.8 C
C-5	156.2 C
C-6	98.9 CH
C-7	157.0 C
C-8	127.7 C
C-9	149.4 C
C-10	103.5 C
C-1'	121.6 C
C-2'	113.3 CH
C-3'	145.8 C
C-4'	149.8 C
C-5'	116.1 CH
C-6'	118.9 CH
C ₈ -OCH ₃	61.1 CH ₃

^bEl espectro se determinó a 100 MHz.

Con base en los antecedentes de que el principal uso medicinal de *Z. peruviana* es para tratar infecciones gastrointestinales¹⁶ y de la actividad antibacteriana de algunas fracciones del extracto de AcOEt,¹⁷ se decidió determinar si las eleménolidas **3-7** pudieran ser responsables de esta actividad. También, se decidió complementar el estudio incluyendo en él a la juniperina (**9**) una δ -eleménolida aislada de *Z. juniperifolia* en nuestro laboratorio.²⁵ Para ello se purificó el compuesto y se obtuvieron sus espectros de RMN para determinar que no hubiera sufrido alguna transformación durante su almacenamiento. Los datos de RMN ¹H y ¹³C se incluyen en las Tablas 1 y 2.

6.2. Actividad antibacteriana

En los últimos años se ha incrementado la incidencia de enfermedades infecciosas debido a que los microorganismos patógenos que las causan han desarrollado resistencia a la mayoría de los antibióticos conocidos. Este hecho es un problema de salud muy serio, ya que las enfermedades infecciosas son una de las principales causas de muerte en pacientes inmunosuprimidos, en los que un alto porcentaje de infecciones se debe a bacterias muy resistentes como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.⁵⁹ Esta situación ha incentivado la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antibacteriana que sean eficientes en el tratamiento de estas infecciones. En este contexto, se decidió evaluar la actividad antibacteriana de las γ -eleménolidas **3-7** y de la δ -eleménolida **9**, contra una bacteria gram-positiva (*S. aureus*) y una gram-negativa (*E. coli*), ambas de importancia clínica. Los resultados se muestran en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Resultados cualitativos de la actividad antibacteriana de los compuestos **3**, **4/5**, **6**, **7** y **9** mediante el método de difusión en agar Kirby-Baüer.

Compuesto ($\mu\text{g}/\text{disco}$)	Halo de inhibición (\bar{X} en mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
3 (277)	10.6	NA
Mezcla de 4 y 5 (277)	NA	NA
6 (277)	13.6	NA
7 (277)	14.0	NA
9 (277)	16.0	NA
Cloranfenicol (30)	23.6	22.5

NA: No presentó actividad

Tabla 6. Resultados cuantitativos de la actividad antibacteriana de los compuestos **3**, **6**, **7** y **9** mediante la técnica de dilución en caldo.

Compuesto	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	
	CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CBM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Zinaflorina VI (3)	280	>280
Zinaflorina II (6)	280	>280
Zinaflorina IV* (7)	280	>280
Juniperina (9)	<35	<35

Los resultados de la actividad antibacteriana que se presentan en las Tablas 5 y 6 muestran que estos compuestos son activos sólo contra bacterias gram-positivas, lo que concuerda con lo reportado en la literatura.⁴¹ Una posible explicación al hecho anterior es que las elemenólidas tienden a ser lipofílicas y, por lo tanto, pueden ser retenidas en el lipopolisacárido de la membrana externa de las bacterias gram-negativas, sin la posibilidad de afectar a la bacteria.⁶⁰

En cuanto a la relación estructura-actividad, se observa que el aldehído conjugado es esencial para que se presente la actividad, ya que la mezcla de **4** y **5** que carecen de este grupo no fue activa. La geometría del éster (*E/Z*) en C-6 no tiene efecto en la actividad, mientras que el hidroxilo en C-9 parece contribuir a la misma, como se deduce de la comparación de la actividad de los compuestos **6** y **7** contra **3**. El compuesto **9** fue el más activo, lo que podría indicar que el tipo de anillo lactónico y/o el cambio conformacional que produce en la molécula tienen una influencia importante en la actividad antibacteriana.

Este trabajo es el primero en el que se evalúa la actividad antibacteriana de γ y δ -elemenólidas aisladas de *Zinnia*. Los resultados permiten proponer que las elemenólidas son los compuestos activos en estas plantas.

7. RESUMEN

El estudio químico realizado a la fracción de acetato de etilo de las partes aéreas y raíces de una población de *Zinnia peruviana* L. del estado de Guanajuato, dio como resultado el aislamiento de cinco lactonas sesquiterpénicas de tipo elemenólida, una de ellas, la zinaflorina VI, nueva. Además, se aislaron dos fitosteroles (β -sitosterol y estigmasterol) y un flavonoide de tipo flavona (onopordina). Con excepción de la zinaflorina VI y la onopordina, los demás compuestos ya habían sido descritos como componentes de esta especie. Exceptuando a la mezcla de acetales, todas las elemenólidas evaluadas, mostraron actividad antibacteriana contra *S. aureus*; el compuesto más activo fue la δ -elemenólida juniperina.

8. CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió determinar que los principales metabolitos de la población de *Zinnia peruviana* analizada son lactonas sesquiterpénicas de tipo elemenólida y que estas lactonas, incluida la nueva elemenólida, zinaflorina VI (**3**), pertenecen a la serie H-5 β , C-14 α .

La composición química de esta población resultó semejante a la de las poblaciones de *Z. peruviana* analizadas anteriormente.

En los ensayos de actividad antibacteriana, resultaron activas las elemenólidas que poseen un aldehído α,β -insaturado (**3**, **6**, **7** y **9**); la mezcla de los acetales **4** y **5** que no poseen esa funcionalidad, no mostraron actividad. La mayor actividad de la juniperina (**9**), parece indicar que la δ -lactona contribuye de manera importante a la actividad.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H., Rocha-Sosa, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 355-363.
2. Verpoorte, R., Van der Heijden, R., Memelink, J. (2000). Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Res*, 9, 323–343.
3. Patwardhan, B., Mashelkar, R. A. (2009). Traditional medicine-inspired approaches to drug discovery: can Ayurveda show the way forward? *Drug Discov. Today*, 14, 804–811.
4. Gilani, A. H., Rahman, A. U. (2005). Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 43–49.
5. Dutra, R. C., Campos, M. M., Santos, A. R., Calixto, J. B. (2016). Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, 112, 4-29.
6. Butler, M., Robertson, A., Cooper, M. (2014). Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat Prod Rep*, 31, 1612-1661.
7. Villaseñor, J. L. (2004). Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 75, 105-135.
8. Llorente-Bousquets, J., Ocegueda S. (2008). Estado del conocimiento de la biota. En: *Capital Natural de México*, vol. 1: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, p.p. 283-322.
9. Bruno, M., Bancheva, S., Rosselli, S., Maggio, A. (2013). Sesquiterpenoids in subtribe Centaureinae (Cass.) Dumort (tribe Cardueae, Asteraceae): Distribution, ¹³C NMR spectral data and biological properties. *Phytochemistry*, 95, 19-93.
10. Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E. M. (2012). Families yielding important phytopharmaceuticals. In *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, Second Edition, Churchill Livingstone, England, p.p. 35-37.
11. Maldonado, E., Ortega, A. (1996). Elemenolides from *Zinnia*. In *Secondary metabolites from Mexican plants: Chemistry and biological properties*. Edited by Pandalai S.G. Research Signpost, Trivandaram, India, p.p. 31-44.
12. Torres, A. M. (1963). Taxonomy of *Zinnia*. *Brittonia*, 15, 1-25.

13. Torres, A. M. (1963). Revision of *Tragoceras* (Compositae). *Brittonia*, 15, 290-302.
14. Metcalf, H.N. and Sharma, J.N. (1971). Germ plasm resources of the genus *Zinnia* L. *Econ. Bot.* 25, 169-181.
15. CONABIO. Malezas de México. Página web <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/zinnia-peruviana/fichas/ficha.htm> (consultada Marzo 26, 2017).
16. Nambo, A. A. (2015). Etnobotánica de Santiago Huaucilla, Oaxaca y evaluación farmacológica de *Zinnia peruviana*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
17. Satorres, S. E., Chiaramello, A. I., Tonn, C. E., Laciari A. L. (2012). Antibacterial activity of organic extracts from *Zinnia peruviana* (L.) against gram-positive and gram-negative bacteria. *Emir. J. Food Agric.* 24, 344-347.
18. Fouche, G., Khorombi, E., Kolesnikova, N., Maharaj, M. V., Nthambeleni, R., Van der Merwe M. (2006). Investigation of South African plants for anticancer properties. *Pharmacologyonline* 3, 494-500.
19. Romo, J., Romo de Vivar, A., Ortega, A., Díaz, E., Cariño, M. A. (1971). Las estructuras de la zinarosina y de la dihidrozinarosina, componentes de la *Zinnia acerosa* DC. (Gray). *Rev. Latinoamericana Quím.* 2, 24-31.
20. Quijano, L., Ortega, A., Ríos, T., Romo de Vivar, A. (1975). Estructura de las zinaflorinas, nuevas lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Zinnia pauciflora* L. *Rev. Latinoamericana Quím.* 6, 94-101.
21. Kisiel, W. (1978). A new germacranolide from *Zinnia haageana*. *Phytochemistry.* 17, 1059-1060.
22. Bohlmann, F., Zdero, C., King, R. M., Harold, R. (1979). Neue elemanolide und guajanolide aus *Zinnia*-arten, *Phytochemistry.* 18, 1343-1348.
23. Bohlmann, F., Zdero, C., Ziesche, J., King, R. M., Robinson, H. (1981). Eudesmanolides, guaianolides, germacranolides and elemanolides from *Zinnia* species. *Phytochemistry.* 20, 1623-1630.
24. Herz, W., Govindan, S.V. (1981). Elemanolides from *Zinnia peruviana*. *Phytochemistry.* 20, 2229-2231.
25. Ortega, A., Maldonado, E. (1982). A sesquiterpene δ -lactone from *Zinnia juniperifolia*. *Phytochemistry.* 21, 785-786.

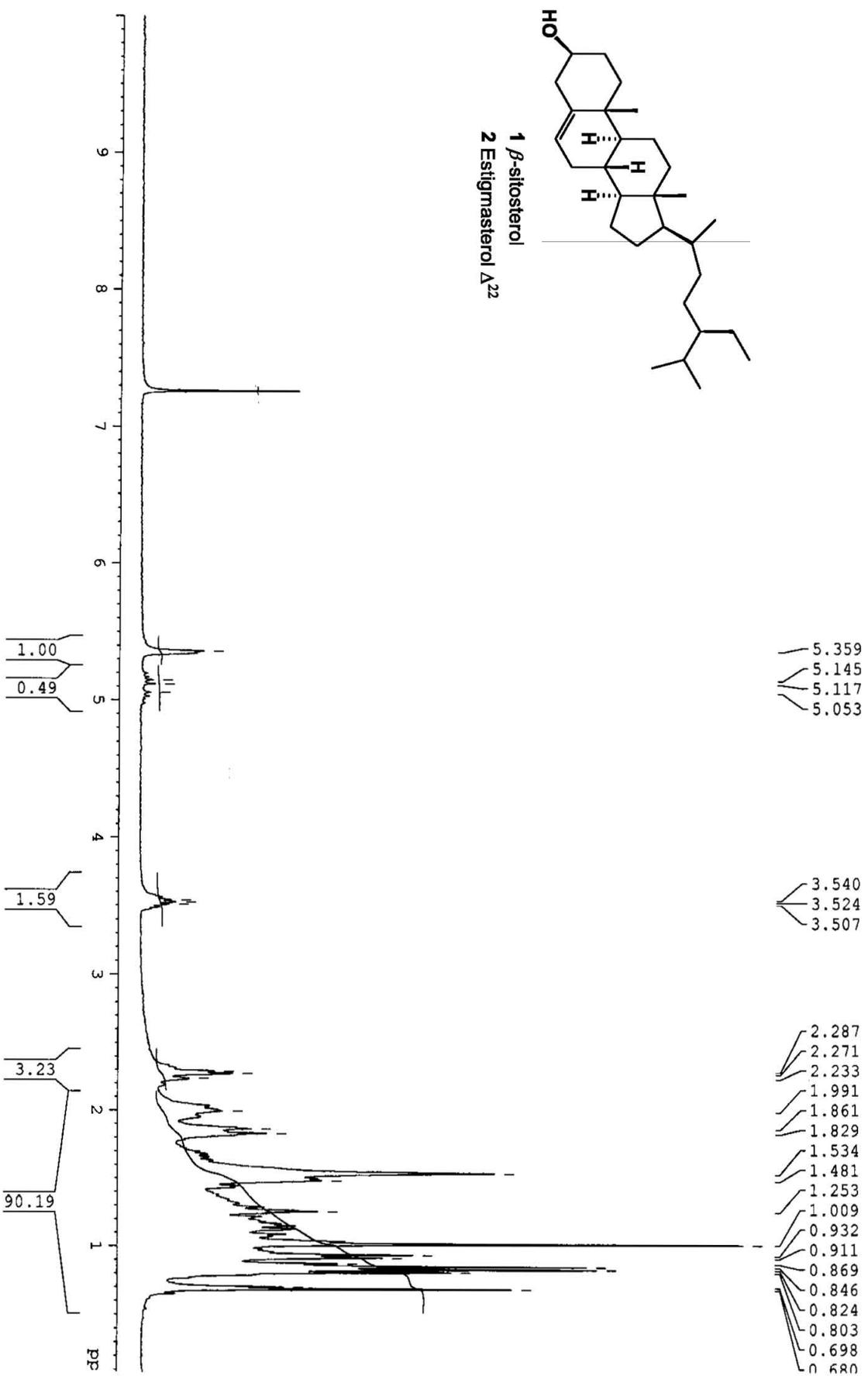
26. Herz, W., Govindan, S.V. (1982). An elemanolide from *Zinnia grandiflora*. *Phytochemistry*. 21, 787-788.
27. Ortega, A., Romo de Vivar, A., Toscano, R. A., Maldonado, E. (1983). New elemenolides from *Zinnia* species: structural revision of the zinnolides. *Chem. Letters*. 12, 1607-1610.
28. Maldonado, E., Soriano, M., Guerrero, C., Romo de Vivar, A., Ortega, A. (1985). The structures of 9-hidroxyzinnolides and their rearranged acetates, *Phytochemistry*. 24, 991-994.
29. Ortega, A., Maldonado, E. (1985). Elemanolides from *Zinnia flavicoma*. *Phytochemistry*. 24, 2635-2639.
30. Miranda, R., Angeles, E., Salmón, M. (1989). A tiglate analogue of zinaflorine II isolated from *Zinnia peruviana*. *J. Nat. Prod.* 52, 1128.
31. Ortega, A., Vázquez, A., Gaviño, R., Maldonado, E. (1995). An elemandiolide from *Zinnia citrea*. *Phytochemistry*. 39, 1479-1481.
32. Bharat, P. B., Steven, P. P., Gunatilaka, A. A. L. (2006). Zinagrandinolides A-C, Cytotoxic δ -Elemanolide-Type Sesquiterpene Lactones from *Zinnia grandiflora*. *J. Nat. Prod.* 69, 1820-1822.
33. Chadwick, M., Trewin, H., Gawthrop, F., Wagstaff, C. (2013). Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 12780-12805.
34. Chaturvedi, D., Dwivedi P. K. (2017). Recent Developments on the Antidiabetic Sesquiterpene Lactones and Their Semisynthetic Analogues. In *Discovery and Development of Antidiabetic Agents From Natural Products*. Elsevier, p.p. 185-207.
35. Schmidt, T. J. (2006). Structure-activity relationships of sesquiterpene lactones. In *Studies in Natural Products Chemistry*. Edited by Atta-ur-Rahman. Elsevier, Vol. 33, p.p. 309-392.
36. Hohmann, M., Longhi-Balbinot, D., Guazelli, C., Navarro S., Zarpelon, A., Casagrande, R., Arakawa, N., Verri, W. (2016). Sesquiterpene Lactones: Structural Diversity and Perspectives as Anti-Inflammatory Molecules. In *Studies in Natural Products Chemistry*. Edited by Atta-ur-Rahman. Elsevier, Vol. 49, p.p. 243-264.
37. Schmidt, T. J. (1997). Helenanolide-Type Sesquiterpene Lactones-III. Rates and Stereochemistry in the Reaction of Helenalin and Related Helenanolides with Sulfhydryl Containing Biomolecules. *Bioorg. Med. Chem.* 5, 645-653.

38. Kupchan, S. M., Eakin, M. A., Thomas, A. M. (1971). Structure-Cytotoxicity Relationships among the Sesquiterpene Lactones. *J. Med. Chem.* 14, 1147–1152.
39. Valério, D. A., Cunha, T. M., Arakawa, N. S., Lemos, H. P., Da Costa, F. B., Parada, C. A., Ferreira, S. H., Cunha, F. Q., Verri Jr, W. A. (2007). Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: Inhibition of cytokine production-dependent mechanism. *Eur. J. Pharmacol.* 562,155–163.
40. Hall, I. H., Lee, K. H., Starnes, C. O., Sumida, Y., Wu, R. Y., Waddell, T. G., Cochran, J. W., Gerhart, K. G. (1979). Anti-Inflammatory Activity of Sesquiterpene Lactones and Related Compounds. *J. Pharm. Sci.* 68, 537–541.
41. Lee, K. H., Ibuka, T., Wu, R. Y., Geissman, T. A. (1977). Structure-antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds. *Phytochemistry*, 16, 1177-1181.
42. Siedle, B., Garcia-Piñeres, A. J., Murillo, R., Schulte-Mönting, J., Castro, V., Rüngeler, P., Klaas, C. A., Da Costa, F. B., Kisiel, W., Merfort, I. (2004). Quantitative Structure-Activity Relationship of Sesquiterpene Lactones as Inhibitors of the Transcription Factor NF- κ B. *J. Med. Chem.* 47, 6042–6054.
43. De Kraker, J. W., Franssen, M., de Groot, A., König, W. A., Bouwmeester H. J. (1998). (+)-Germacrene A Biosynthesis. *Plant Physiol.* 117, 1381–1392.
44. De Kraker, J. W., Franssen, M. C. R., Dalm, M. C. F., de Groot, A., Bouwmeester H. J. (2001). Biosynthesis of Germacrene A Carboxylic Acid in Chicory Roots. Demonstration of a Cytochrome P450 (+)-Germacrene A Hydroxylase and NADP⁺-Dependent Sesquiterpenoid Dehydrogenase(s) Involved in Sesquiterpene Lactone Biosynthesis. *Plant Physiol.* 125, 1930-1940.
45. De Kraker, J. W., Franssen, M. C. R., Joerink, M., de Groot, A., Bouwmeester H. J. (2002). Biosynthesis of Costunolide, Dihydrocostunolide, and Leucodin. Demonstration of Cytochrome P450-Catalyzed Formation of the Lactone Ring Present in Sesquiterpene Lactones of Chicory. *Plant Physiol.* 129, 257-268.
46. Piet, D. P., Schrijvers, R., Franssen, M. C. R., de Groot, A. (1995). Biotransformation of germacrene epoxides by *Cichorium intybus* L. *Tetrahedron*, 51, 6303-6314.
47. Fischer, N. H., Olivier, E. J., Fischer, H. D. (1979). The biogenesis and chemistry of sesquiterpene lactones. In W. Herz, H. Grisebach, G.W. Kirby, eds, *Progress in the*

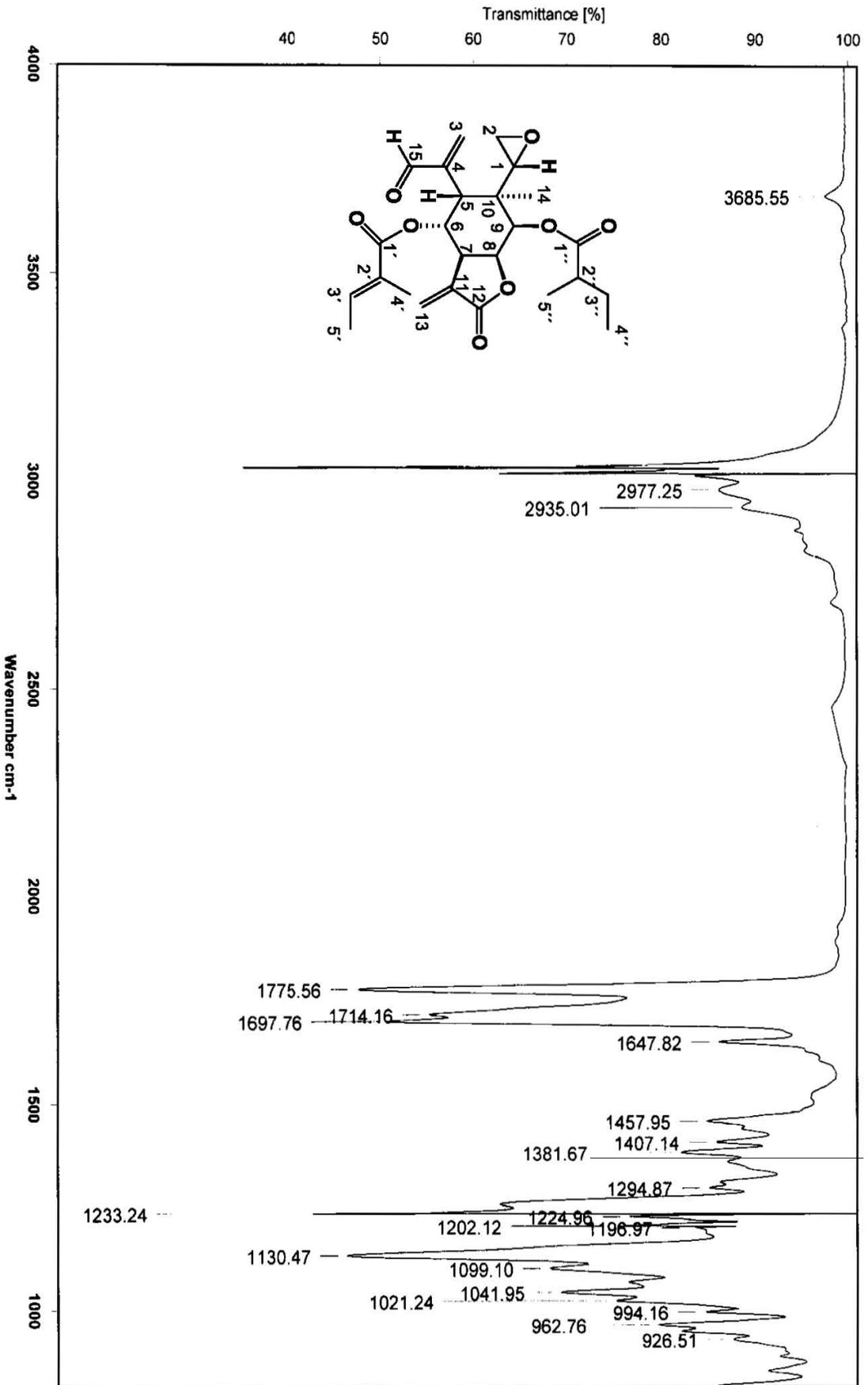
- Chemistry of Organic Natural Products*, Springer Verlag, Wien-New York, 38, p.p. 214-221.
48. Takeda, K. (1974). Stereospecific Cope rearrangement of the germacrene-type sesquiterpenes. *Tetrahedron*, 30, 1525–1534.
49. Kodama, M., Yokoo, S., Matsuki, Y., Itô, S. (1979). Synthesis of macrocyclic terpenoids by intramolecular cyclization V. Transannular reactions of hedycariol isomers. *Tetrahedron Letters*, 20, 1687-1690.
50. Van den Berghe, D. A., Vlietinck, A. J. (1991). Screening methods for antibacterial agents from higher plants. In *Methods in plant biochemistry*. Edited by Hostettmann, K. Academic Press, New York and London, Vol. 6, p.p. 165–168.
51. Zhang, X., Geoffroy, P., Miesh, M., Julien-David, D., Raul, F., Aoudé-Werner, D., Marchioni, E. (2005). Gram-scale chromatographic purification of β -sitosterol. Synthesis and characterization of β -sitosterol oxides. *Steroids*, 70, 886-895.
52. Saeidnia, S., Manayi, A., Gohari, A. R., Abdollani, M. (2014). The Story of Beta-sitosterol- A Review. *European Journal of Medicinal Plants*, 4, 590-609.
53. Batta, A. K., Xu, G., Honda, A., Miyazaki, T., Salen, G. (2006). Stigmasterol reduces plasma cholesterol levels and inhibits hepatic synthesis and intestinal absorption in the rat. *Metabolism*, 55, 292-299.
54. Gomes, A., Saha, A., Chattherjee, I., Chakravarty, A.K. (2007). Viper and cobra venom neutralization by β -sitosterol and stigmasterol isolated from the root extract of *Pluchea indica* Less. (Asteraceae). *Phytomedicine*, 14, 637-643.
55. Harborne, J. B., Mabry, T. J. (1982). Carbon-13 NMR Spectroscopy of Flavonoids. In *The Flavonoids. Advances in Research*. Springer US, p.p. 19-134.
56. Wollenweber, E., Dörr, M., Roitman, J. N., Schilling, E. (1995). External Flavonoids of Three Species of *Viguiera*, Section *Hypargyrea* (Asteraceae). *Z. Naturforsch*, 50c, 588-590.
57. García, B., Skaltsa, H., Navarro, F. I., Pedro, J. R., Lazari, D. (1996). Sesquiterpene lactones and elemene derivatives from *Onopordon myriacanthum*. *Phytochemistry*, 41, 1113-1117.
58. Lazari, D., Skaltsaa, H., Harvalaa, C. (1998). Flavonoids of *Onopordum sibthorpiatum* and *Onopordum laconicum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 26, 105-107.

59. Alós, J. I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 33, 692-699.
60. Cartagena, E., Montanaro, S., Bardón, A. (2008). Improvement of the antibacterial activity of sesquiterpene lactones. *Rev. Latinoamer. Quím.*, 36, 43-51.

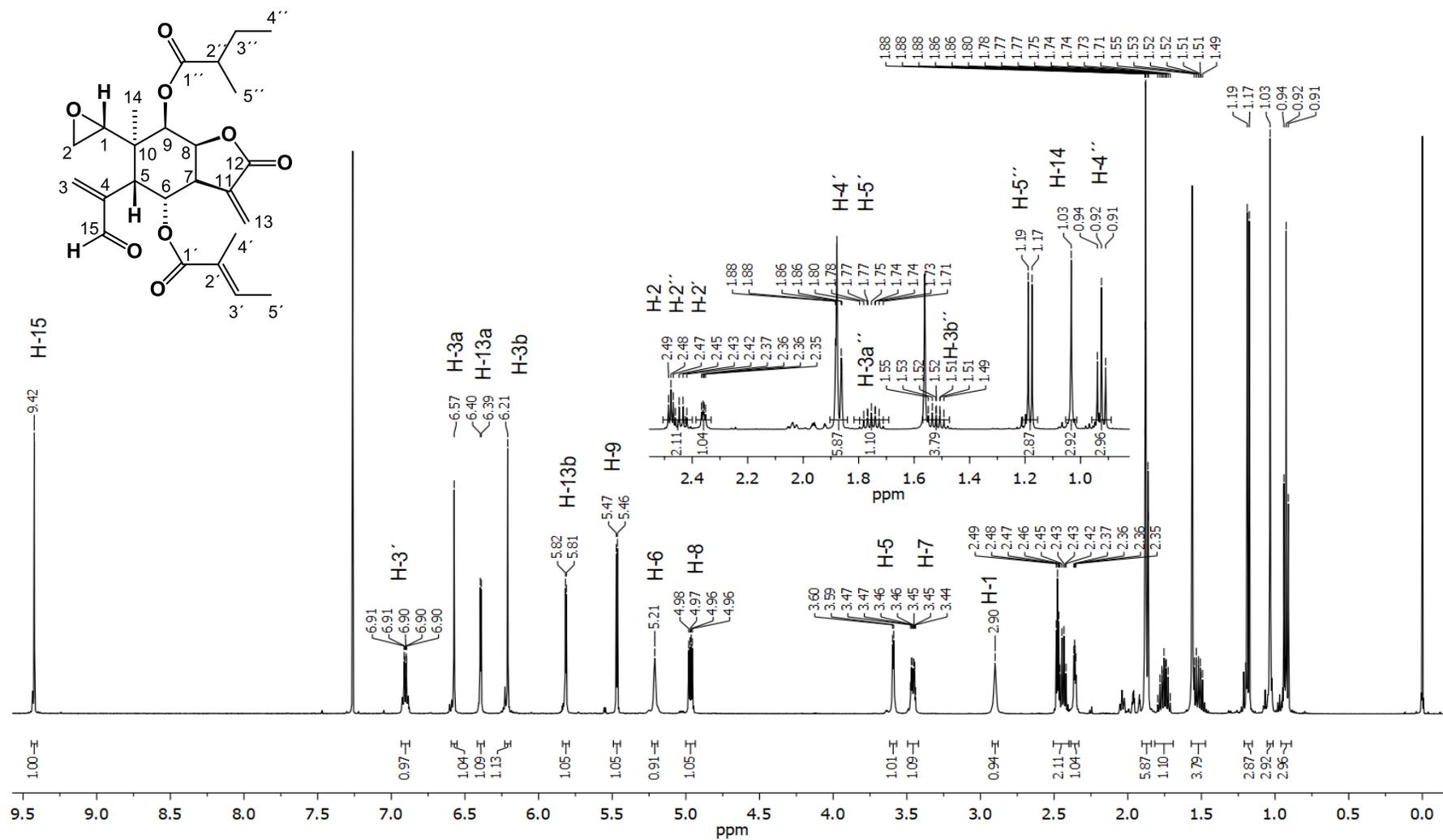
10. ANEXO-ESPECTROSCOPIA



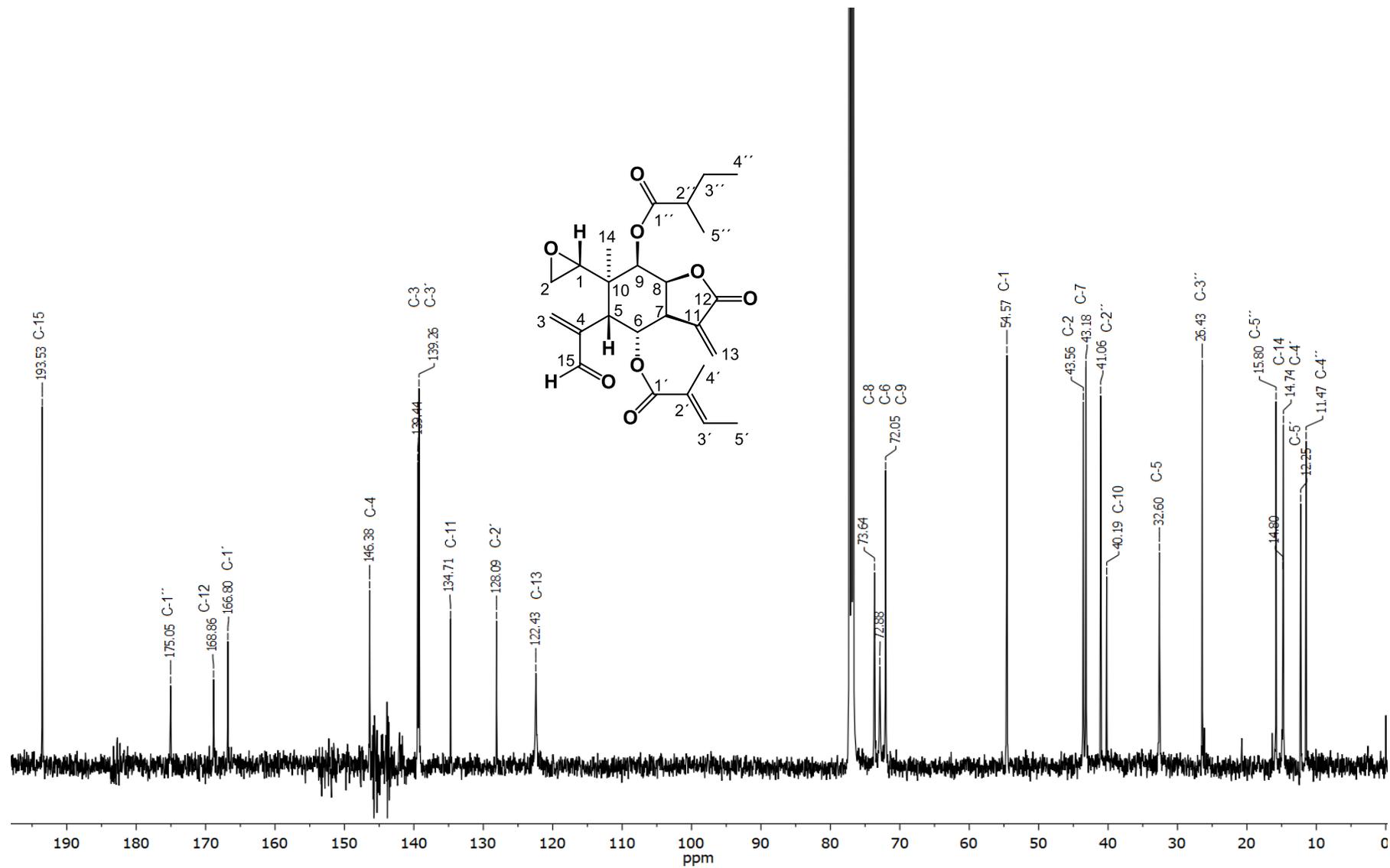
Espectro 1. RMN ^1H de la mezcla de β -sitosterol (1) y stigmasterol (2) (300 MHz, CDCl_3).



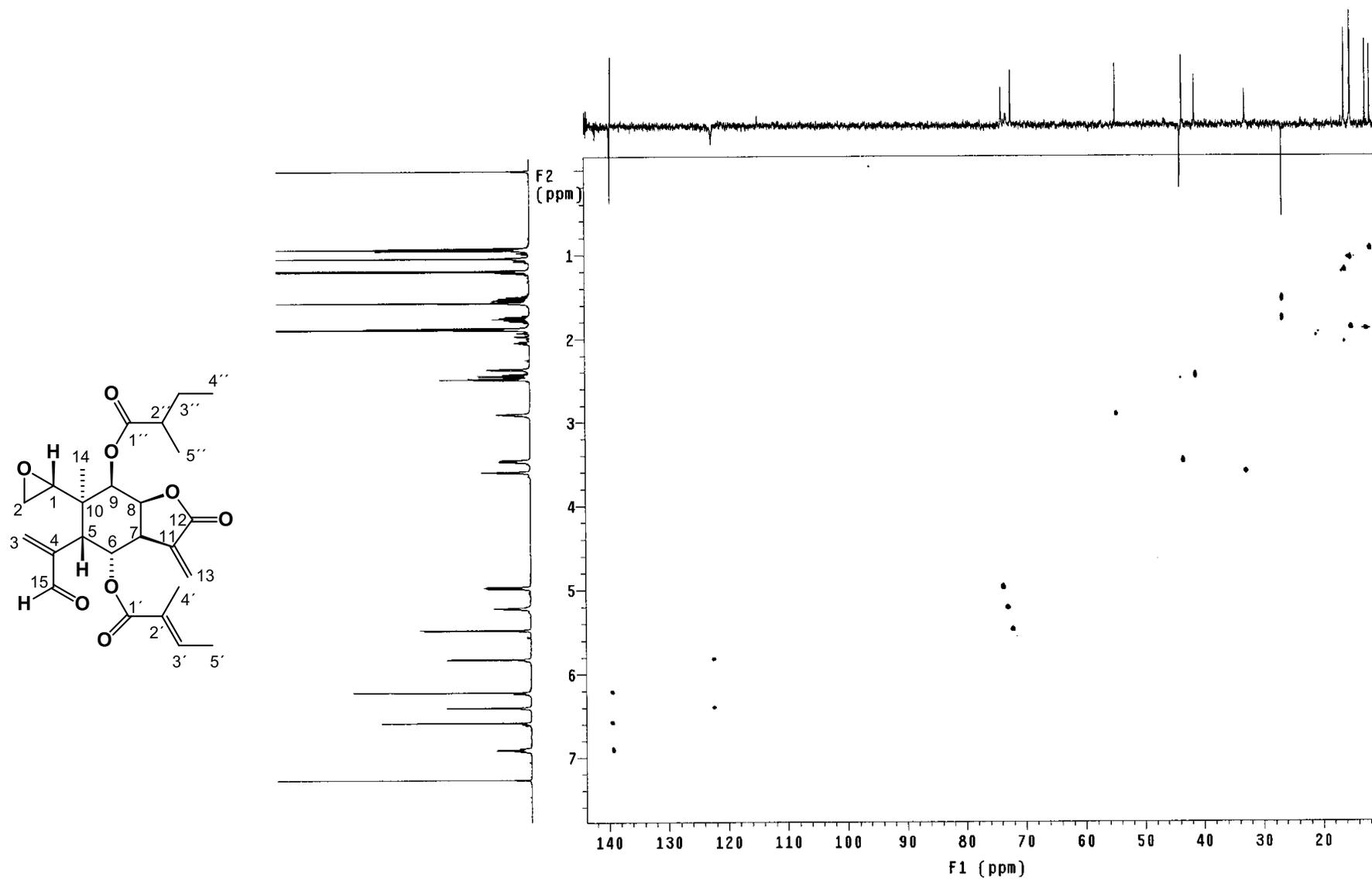
Espectro 2. IR de la zinaflorina VI (3) (CHCl₃, 2^a derivada).



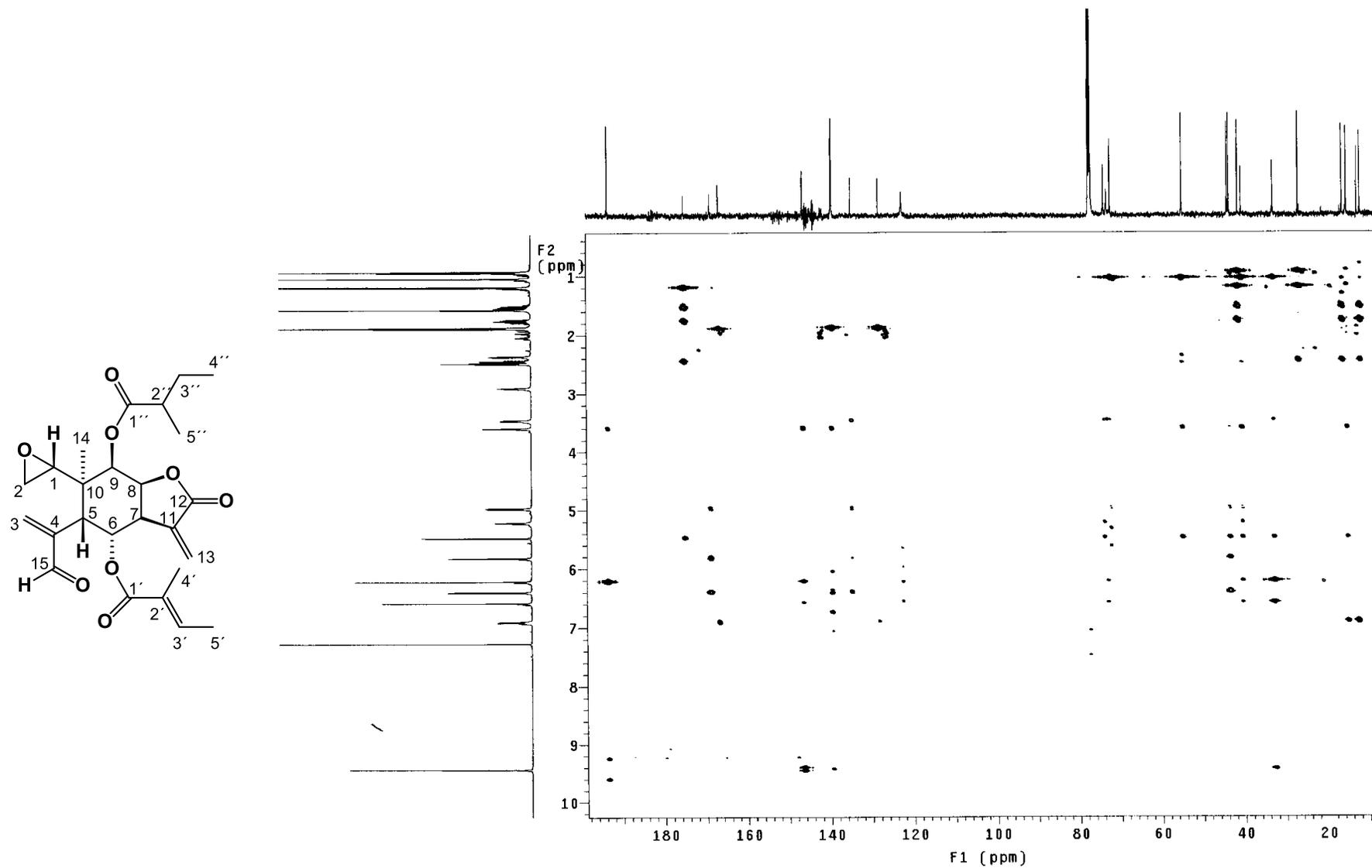
Espectro 3. RMN ¹H de la zinaflorina VI (**3**) (500 MHz, CDCl₃).



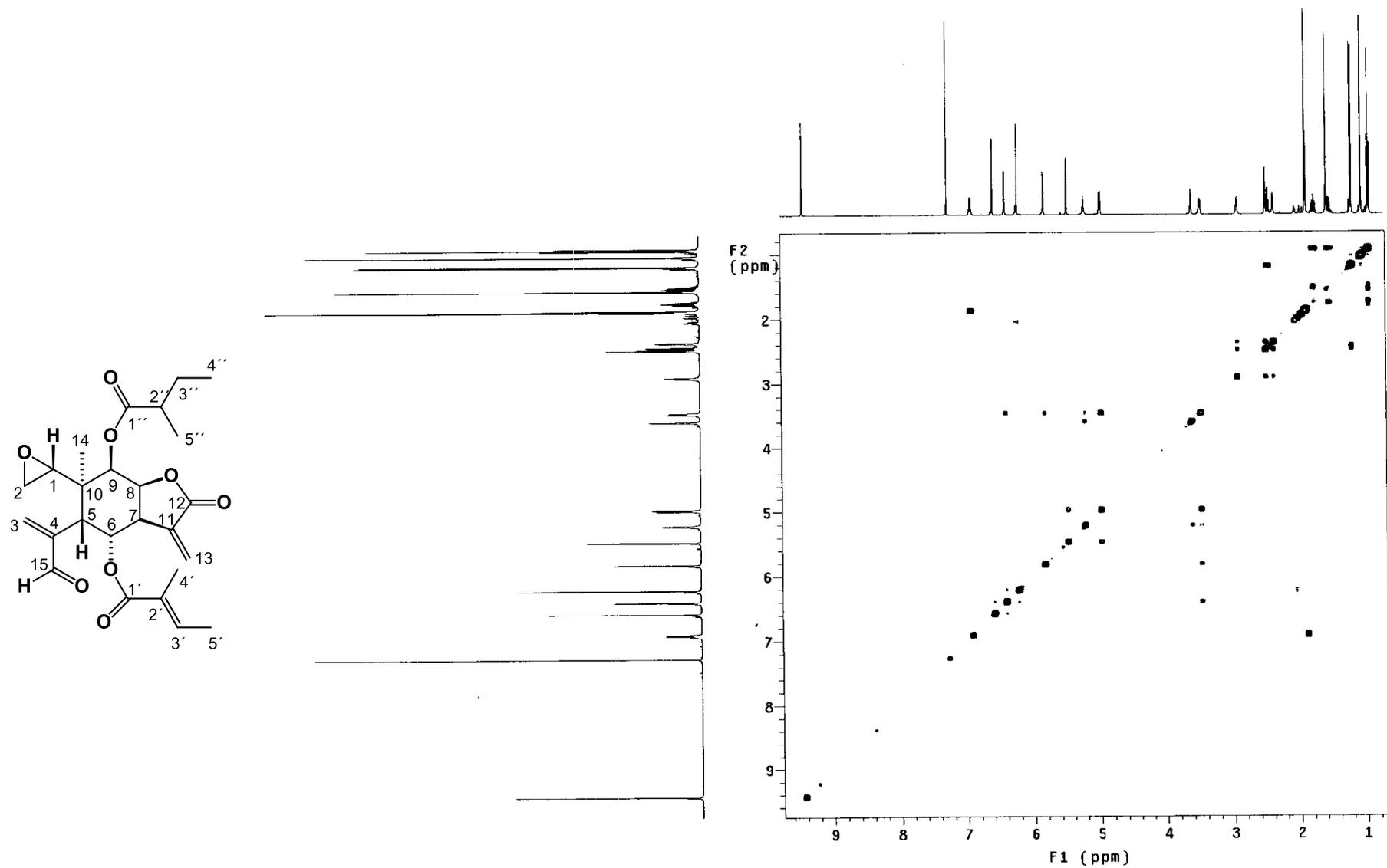
Espectro 4. RMN ^{13}C de la zinaflorina VI (**3**) (125 MHz, CDCl_3).



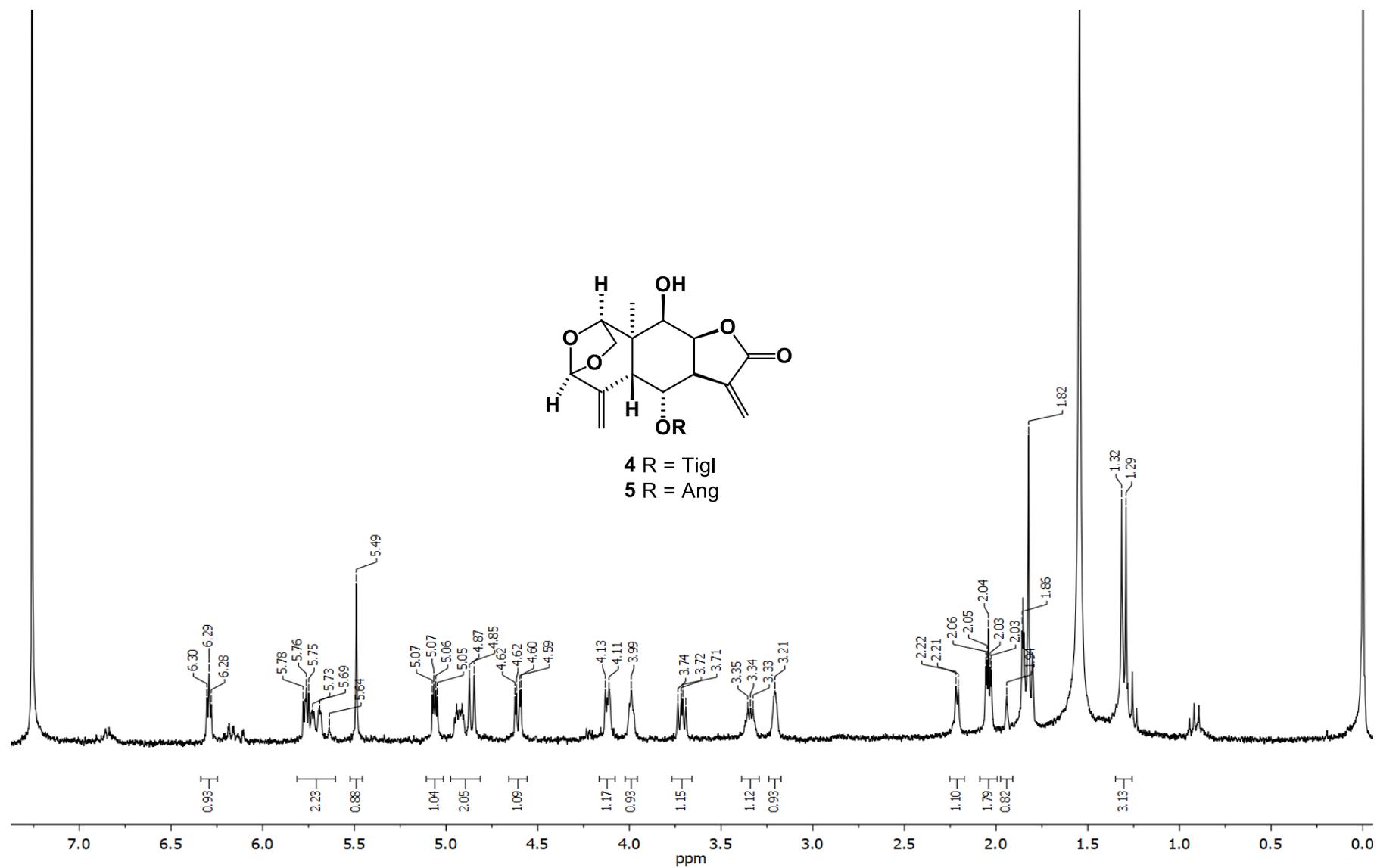
Espectro 5. HSQC de la zinaflorina VI (3).



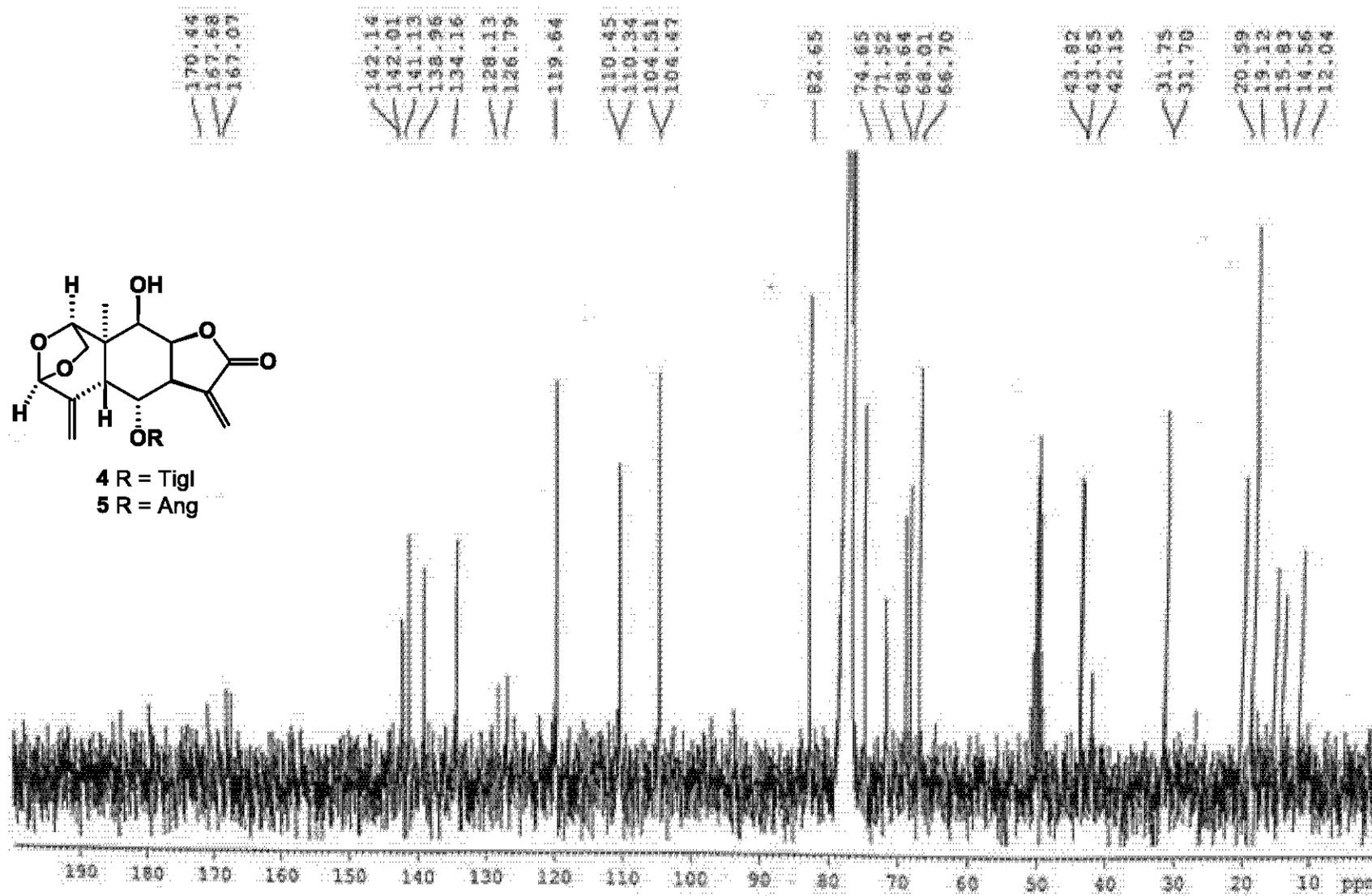
Espectro 6. HMBC de la zinaflorina VI (3).



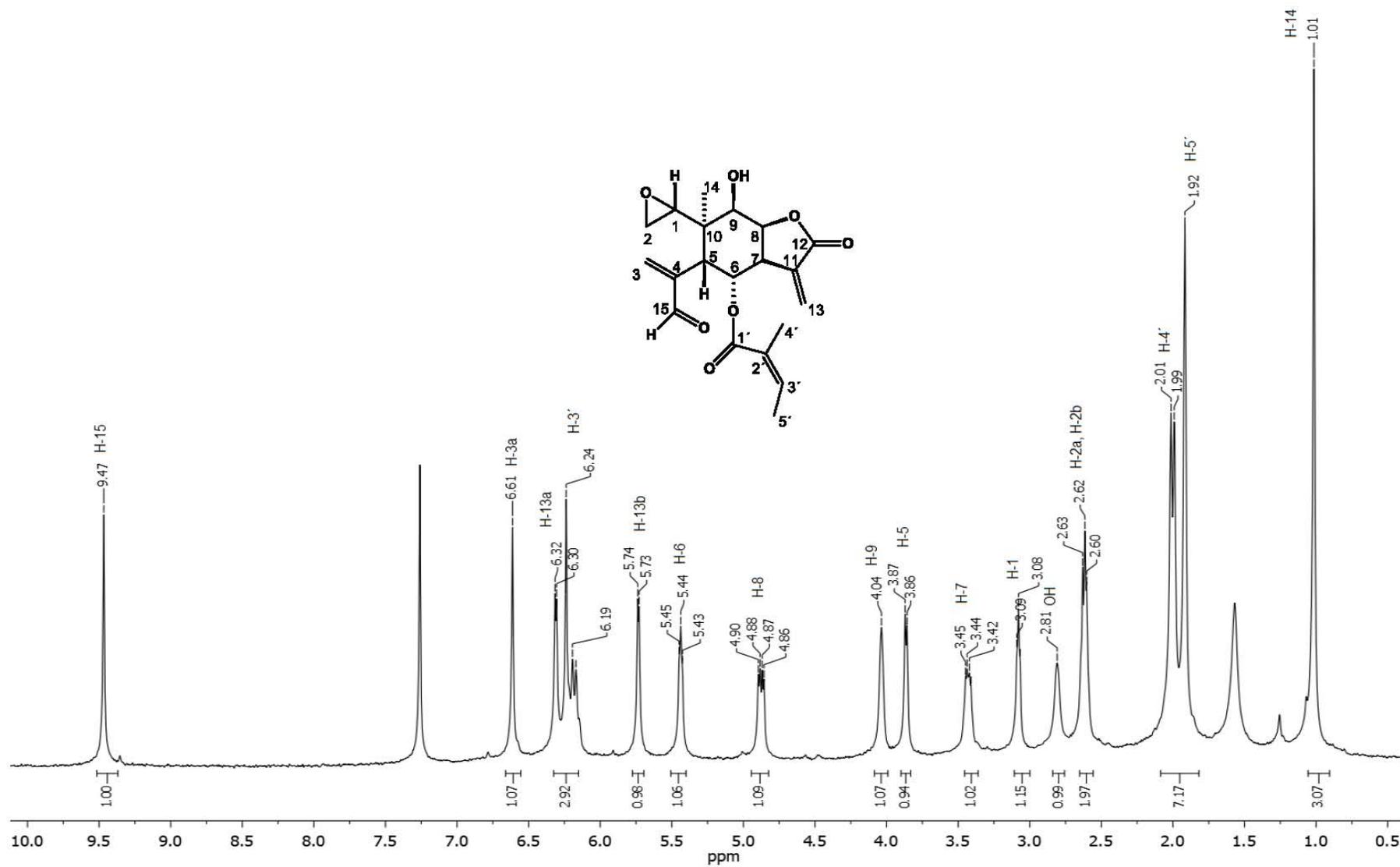
Espectro 7. COSY de la zinaflorina VI (3).



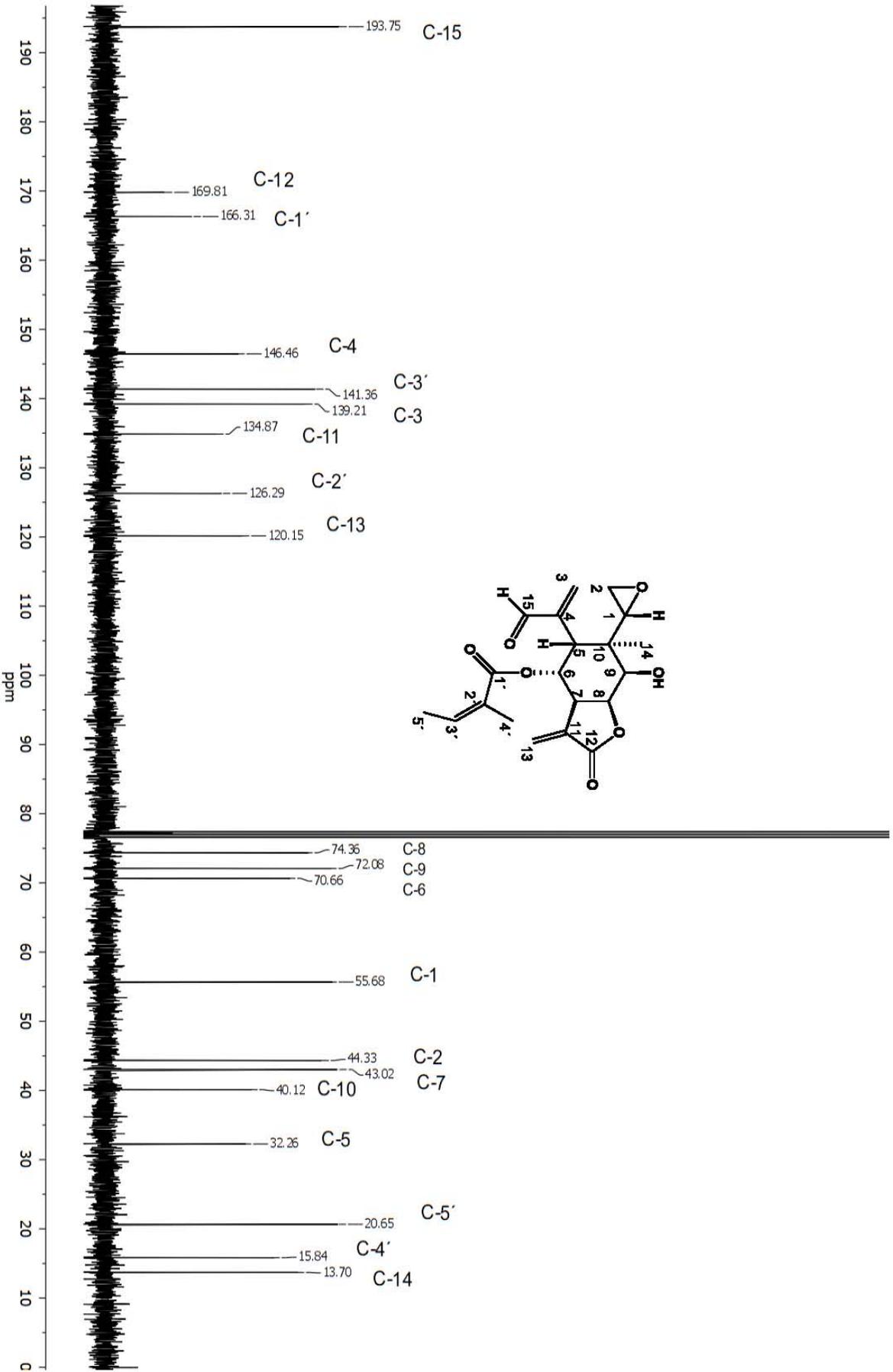
Espectro 9. RMN ^1H de la mezcla de elemolidas (4 y 5) (300 MHz, CDCl_3).



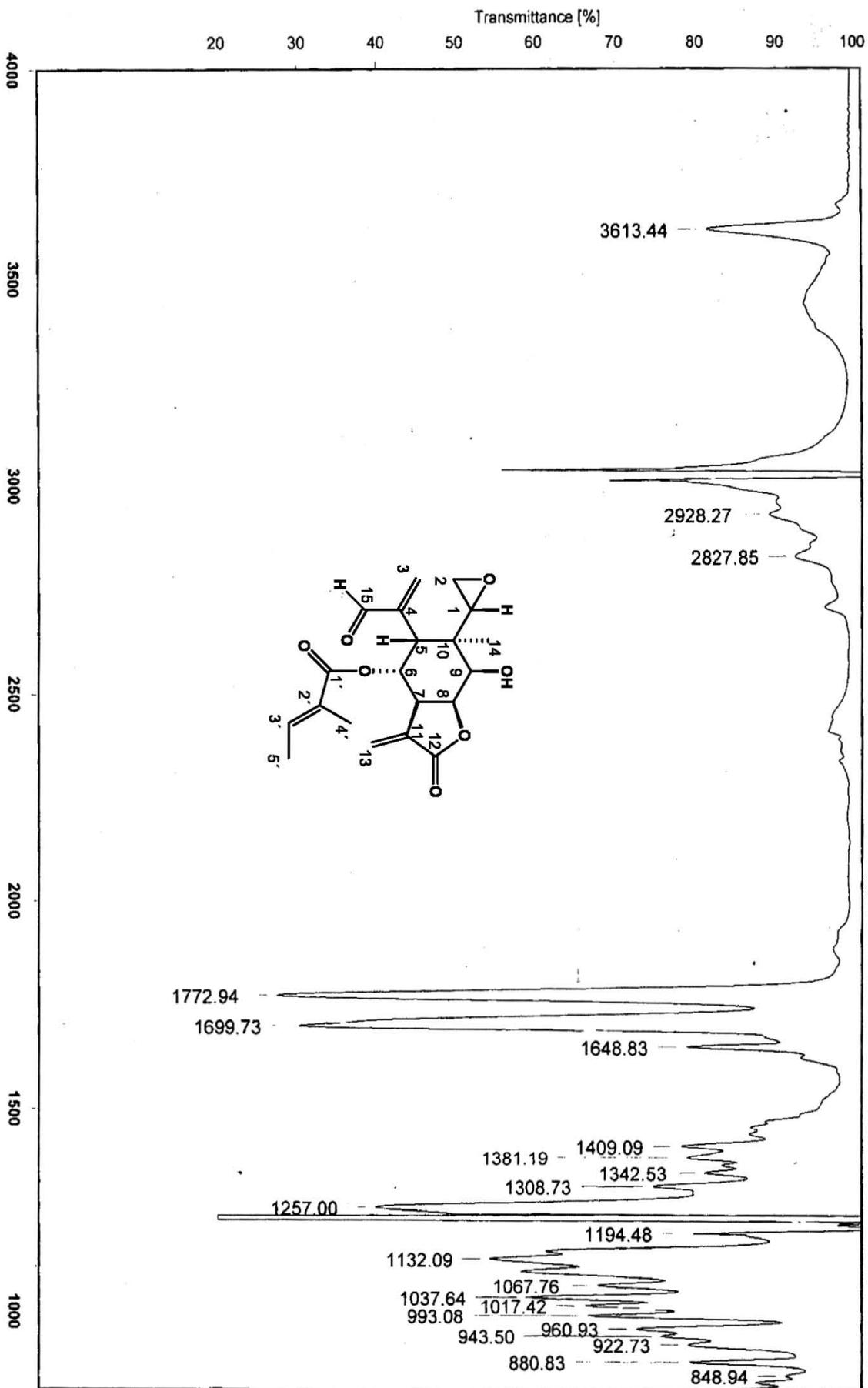
Espectro 10. RMN ^{13}C de la mezcla de elemenólidas (4 y 5) (75 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$).



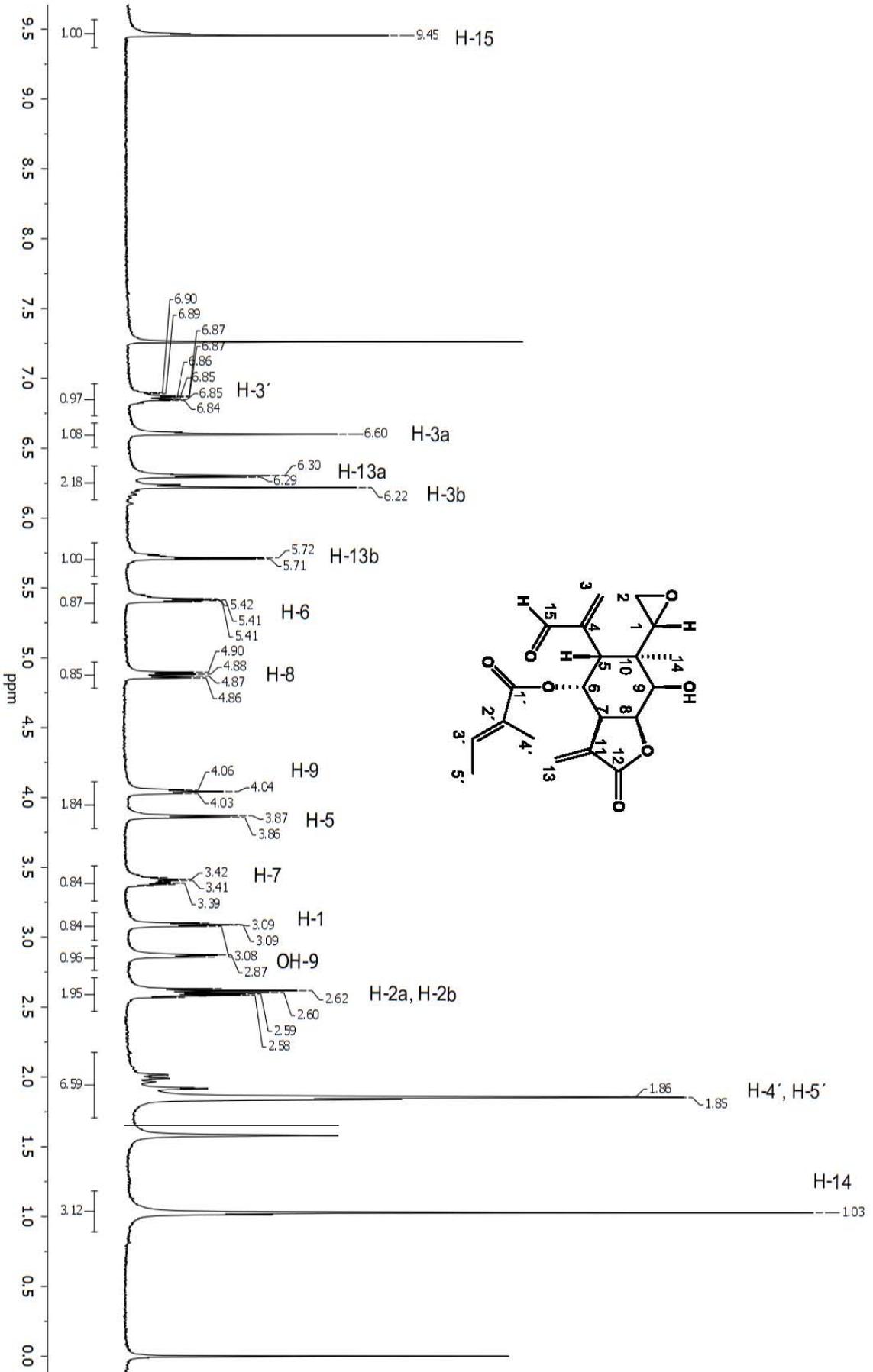
Espectro 11. RMN ¹H de la zinaflorina II (6) (300 MHz, CDCl₃).

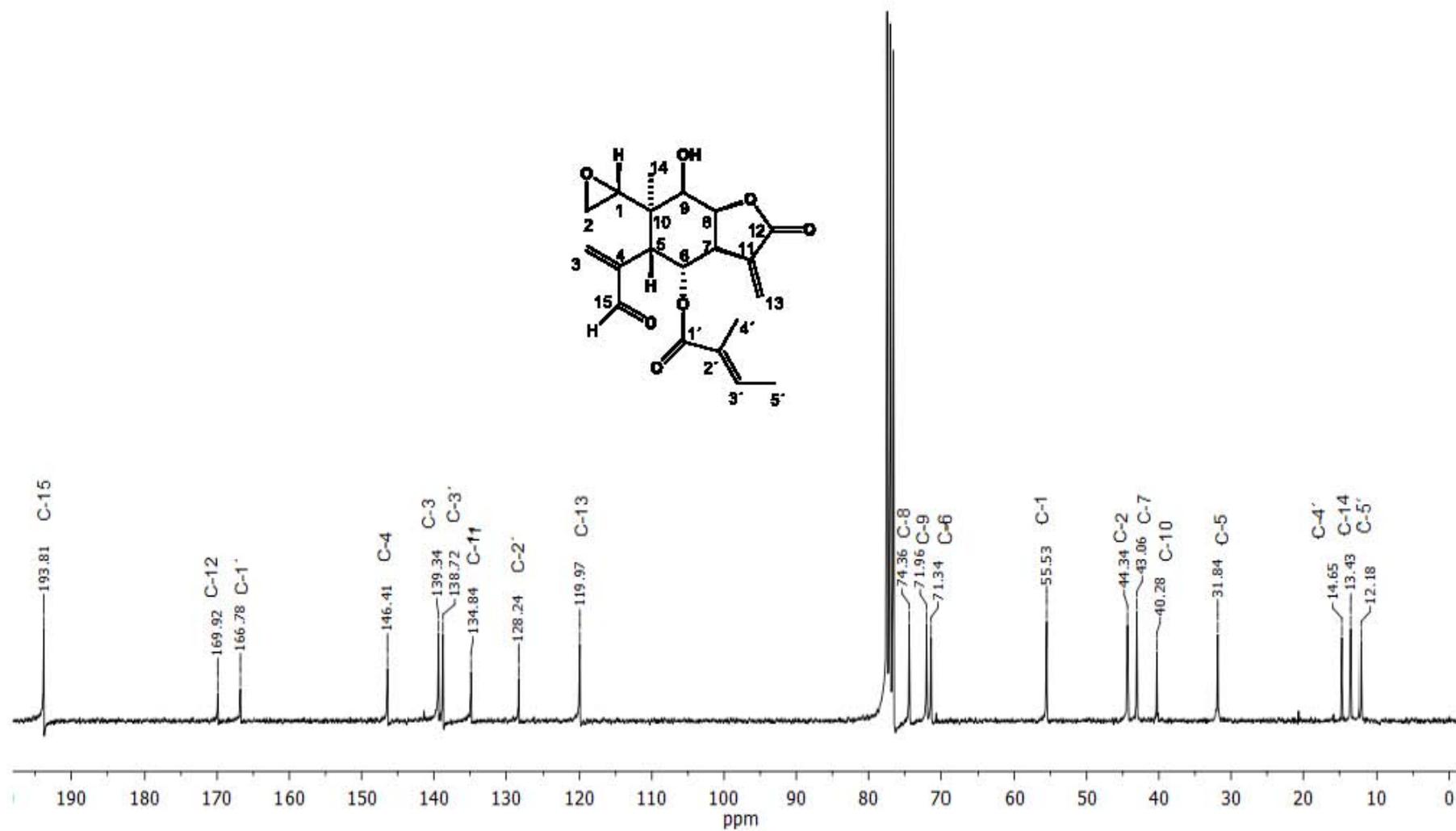


Espectro 12. RMN ¹³C de la zinaflorina II (6) (75 MHz, CDCl₃).

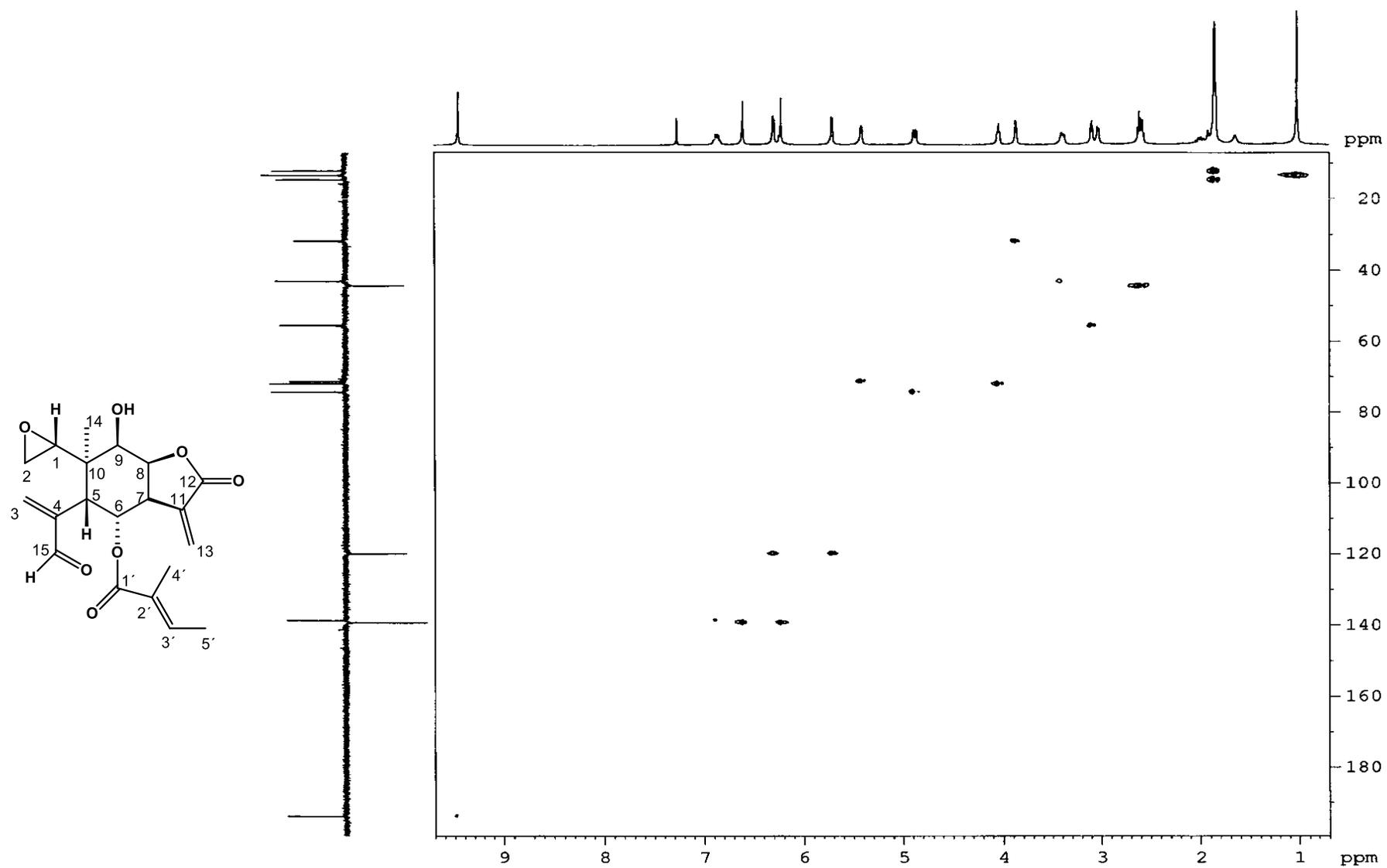


Espectro 13. IR de la zinaflorina IV* (7) (CHCl₃).

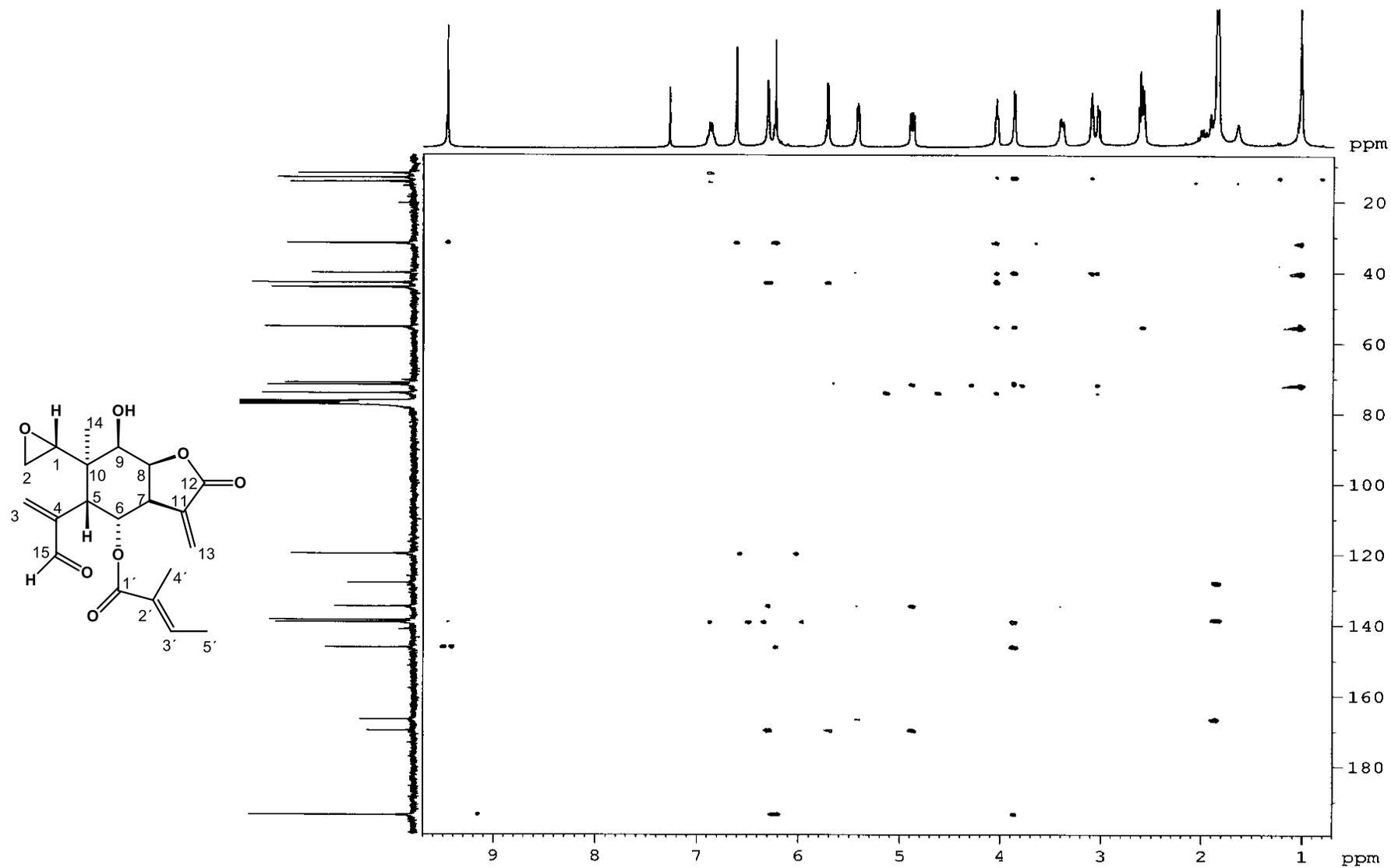




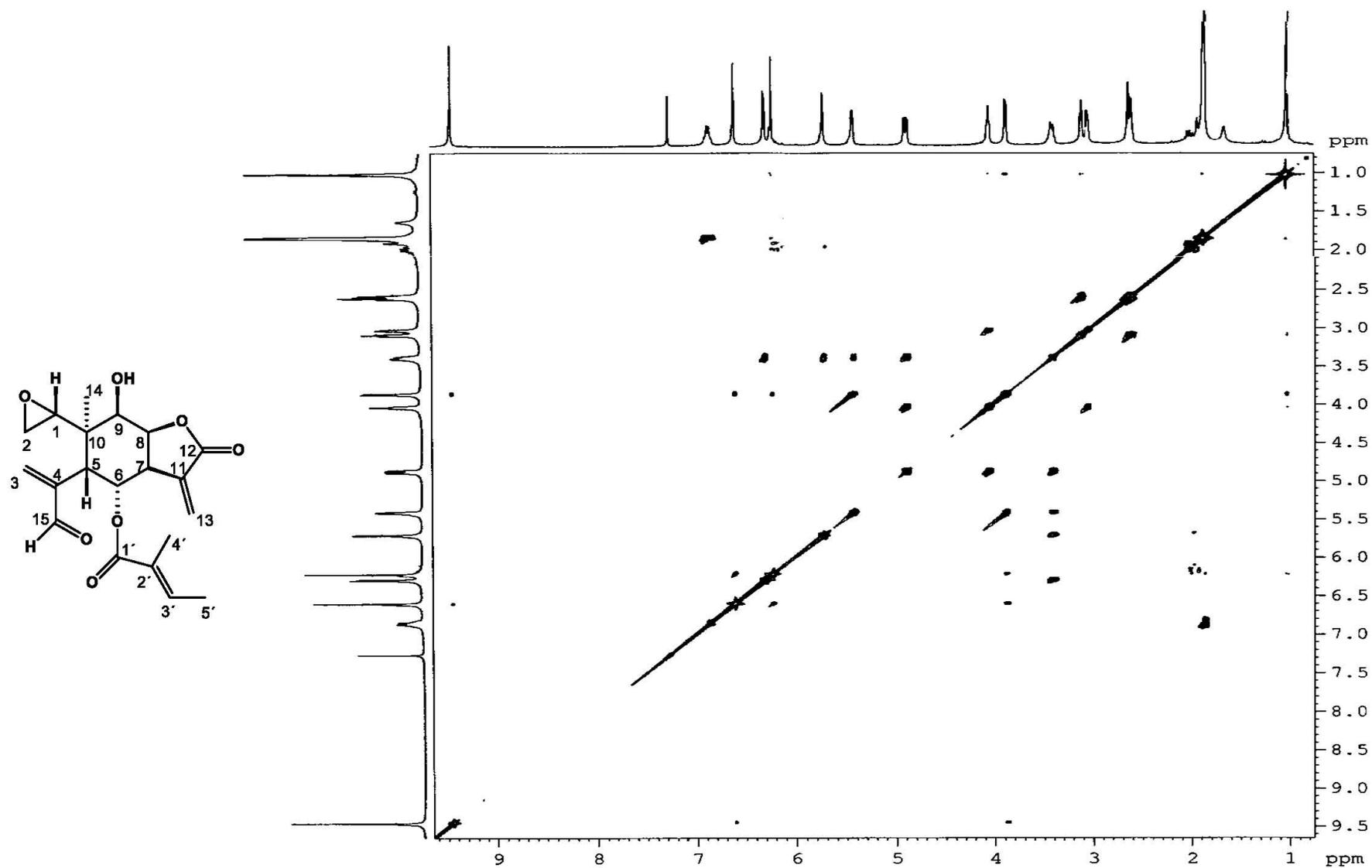
Espectro 15. RMN ^{13}C de la zinaflorina IV* (7) (75 MHz, CDCl_3).



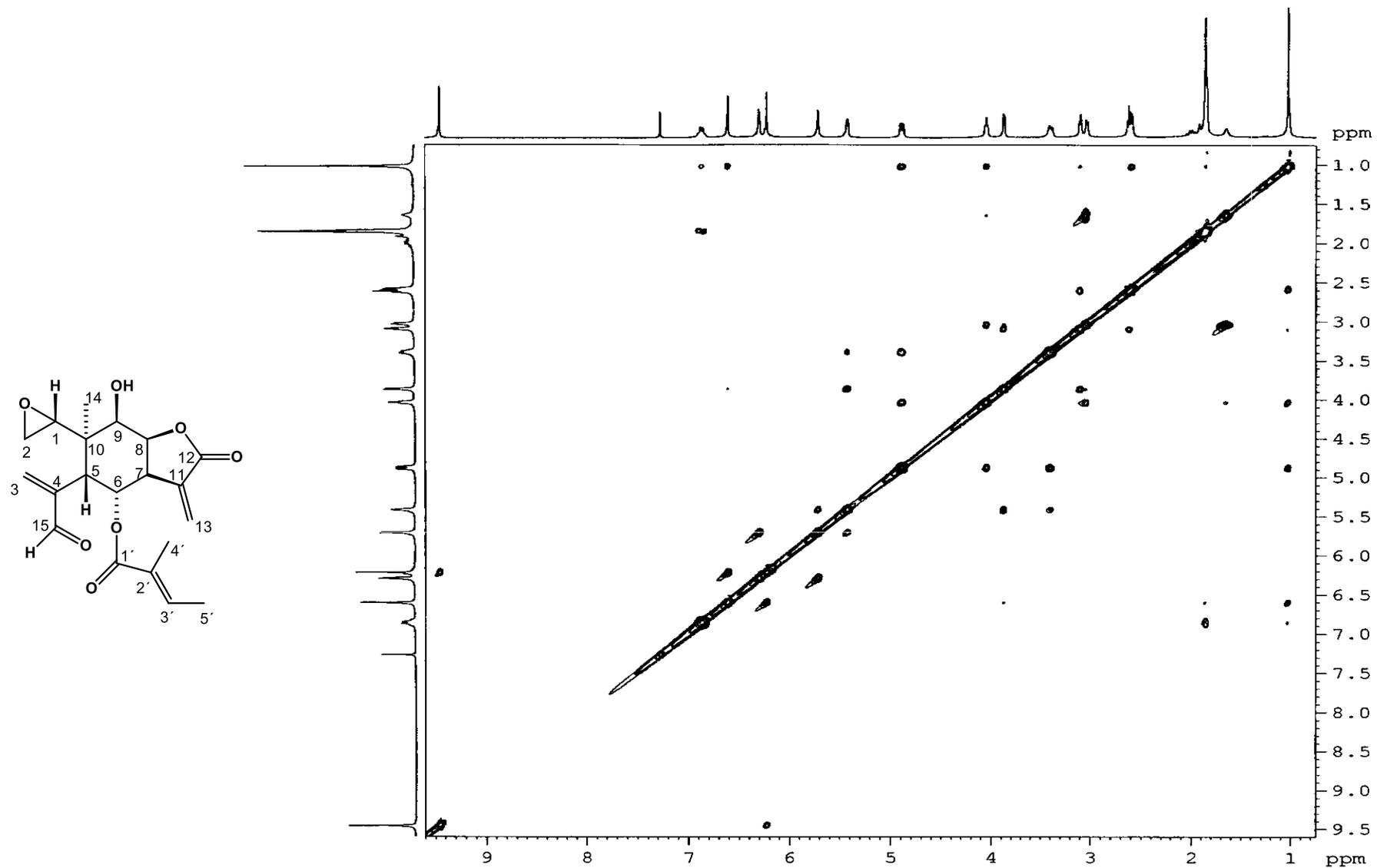
Espectro 16. HSQC de la zinaflorina IV* (7).



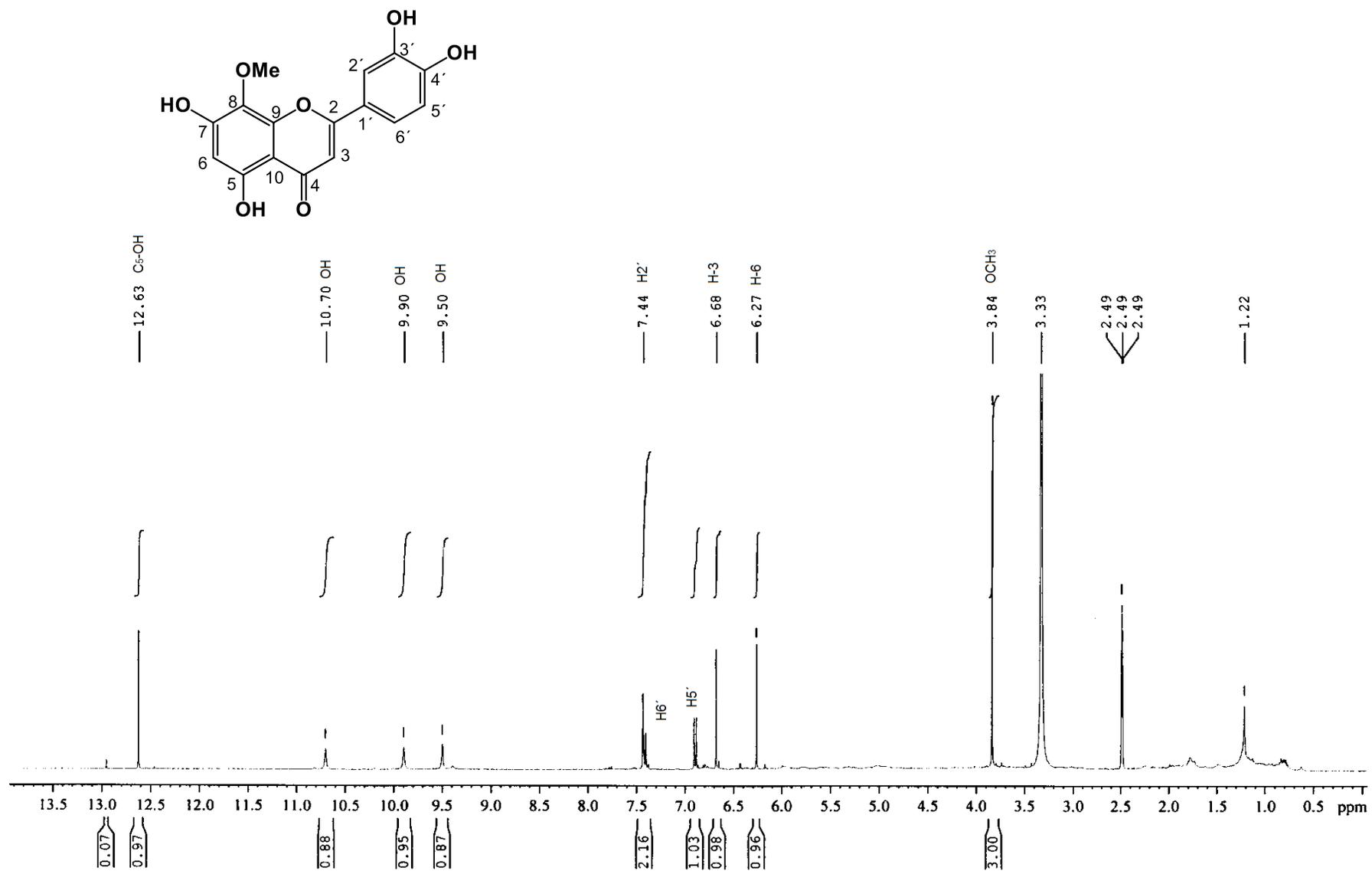
Espectro 17. HMBC de la zinaflorina IV* (7).



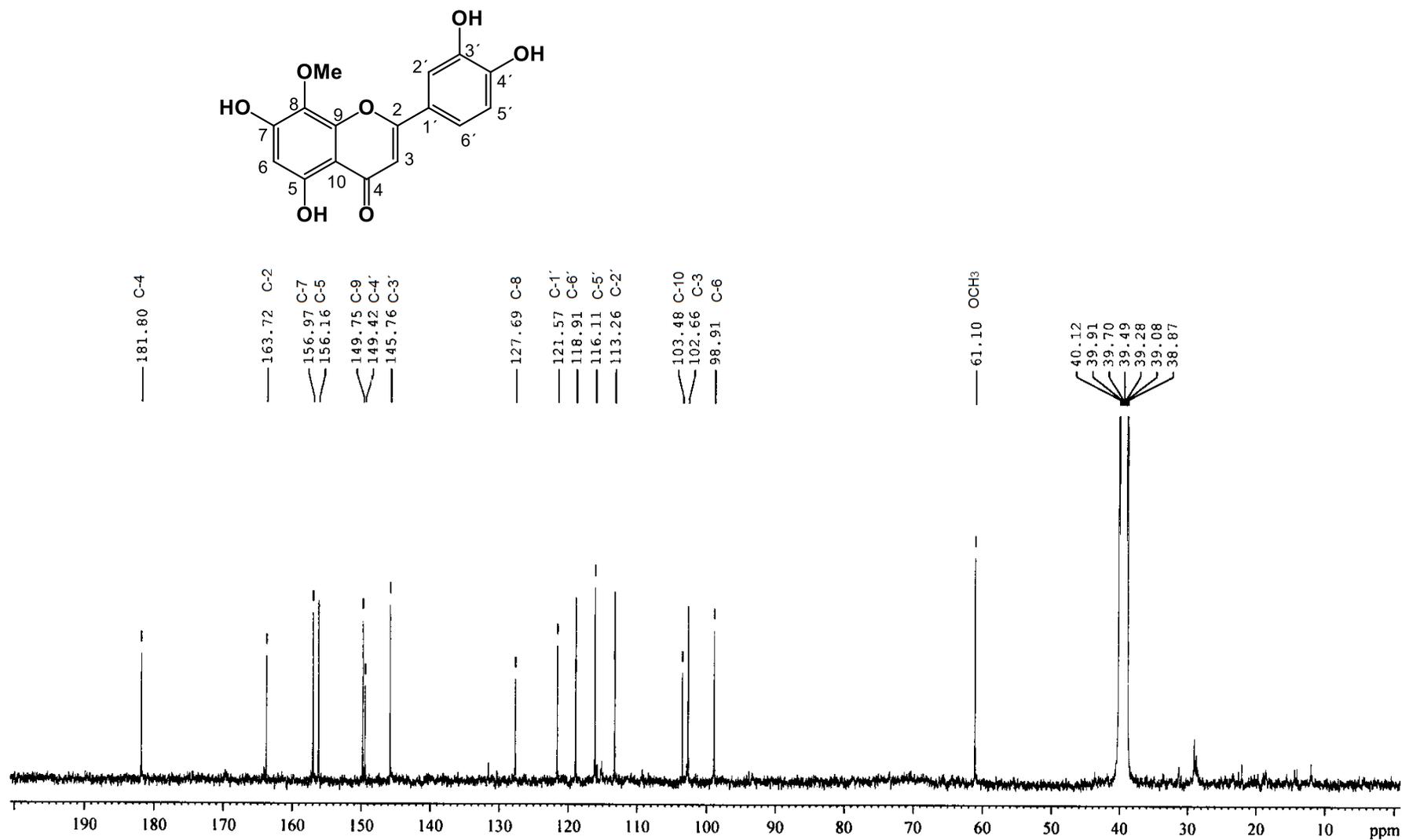
Espectro 18. COSY de la zinaflorina IV* (7).



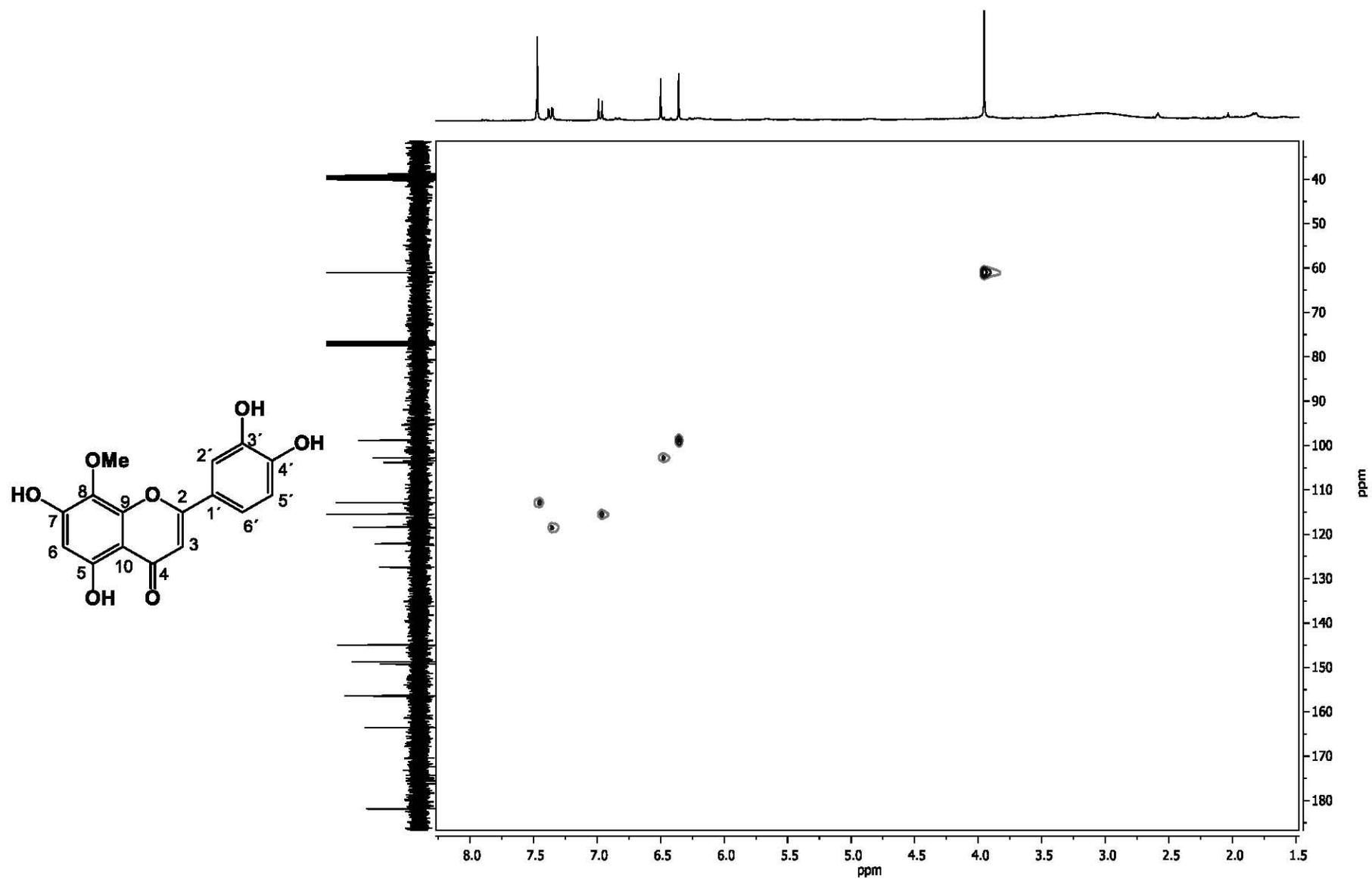
Espectro 19. NOESY de la zinaflorina IV* (7).



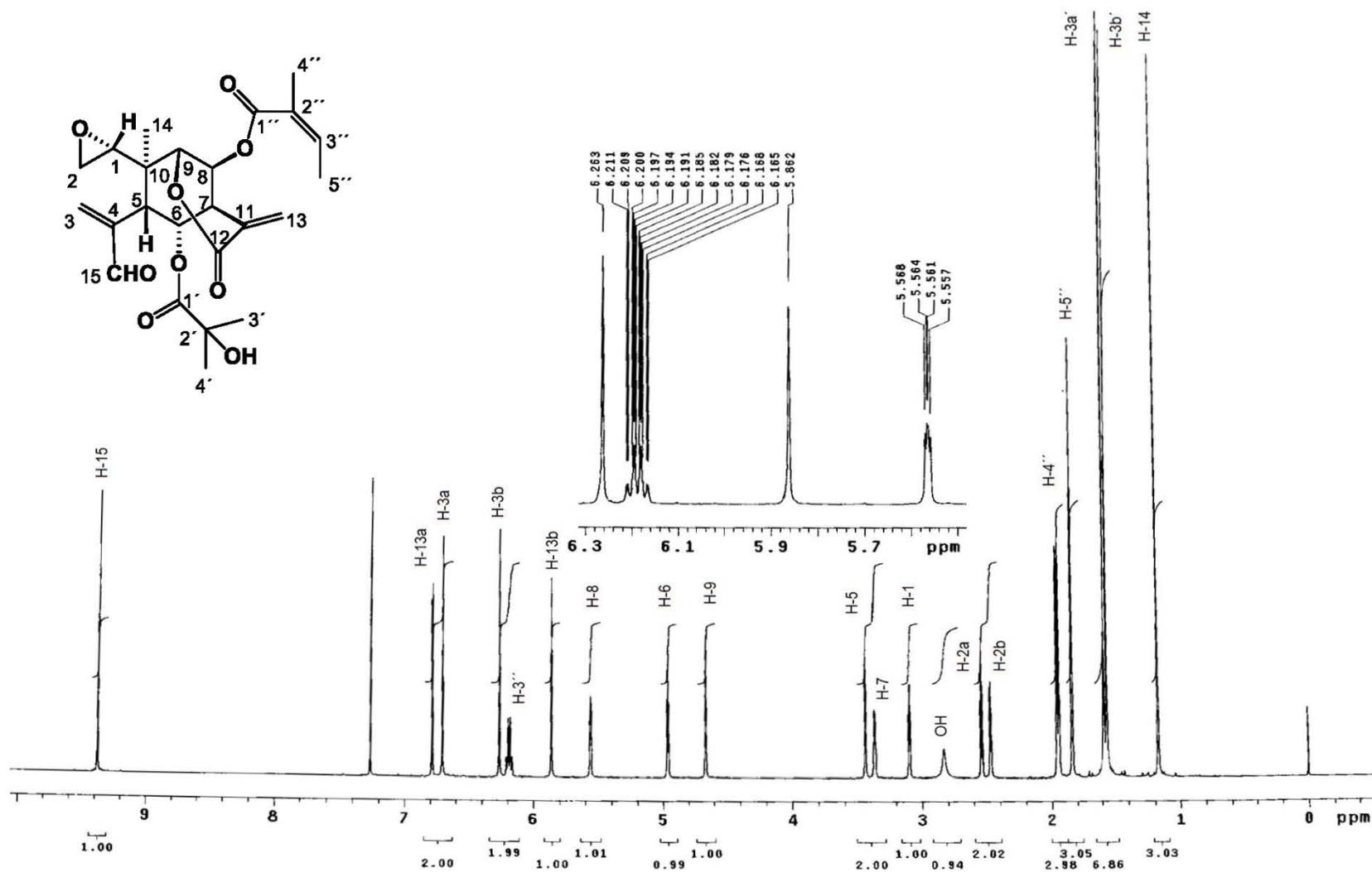
Espectro 20. RMN ^1H de la onopordina (**8**) (400 MHz, DMSO-d_6).



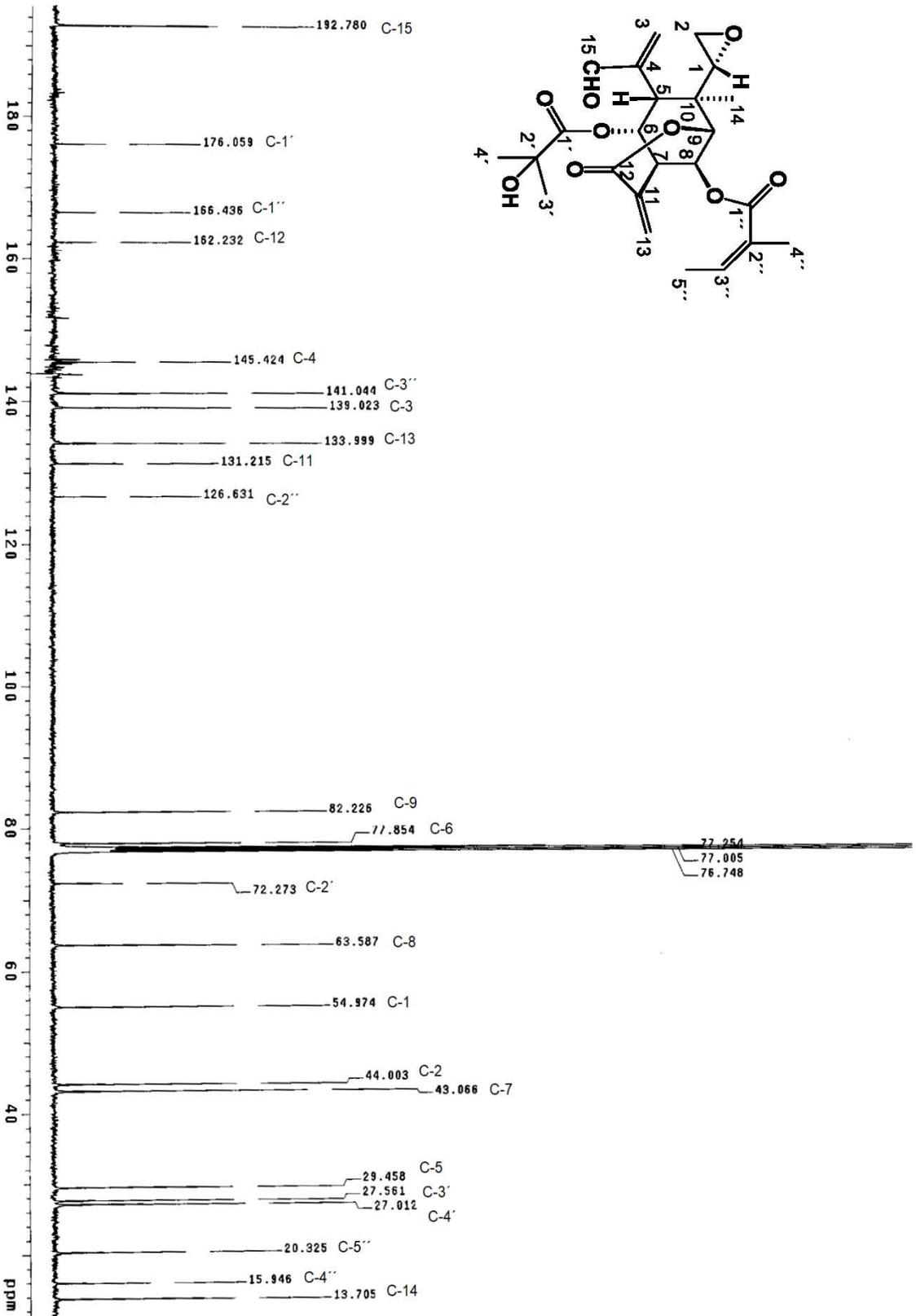
Espectro 21. RMN ¹³C de la onopordina (**8**) (100 MHz, DMSO-d₆).



Espectro 22. HSQC de la onopordina (8).



Espectro 23. RMN ¹H de la juniperina (9) (500 MHz, CDCl₃).



Espectro 24. RMN ¹³C de la juniperina (9) (125 MHz, CDCl₃).