

00570
6
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



**CONSTITUYENTES BIOACTIVOS DE Ratibida latipalearis Richards
Y EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POTENCIAL DE
VARIOS METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE PLANTAS MEXICANAS
USADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(FARMACIA - QUIMICA FARMACEUTICA)**

P R E S E N T A

María Alejandra Rojas Molina

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE ESPECTROS	iii
INTRODUCCION -----	1
CAPITULO 1. CONSTITUYENTES BIOACTIVOS DE <u>Ratibida latipalearis</u>	
1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS -----	5
2. GENERALIDADES ACERCA DE <u>Ratibida latipalearis</u> -----	9
3. MATERIALES Y METODOS	
3.1 Material vegetal -----	23
3.2 Evaluación de la toxicidad <u>in vitro</u> para <u>Artemia</u> <u>salina Gray</u> -----	24
3.3 Métodos de Extracción y Fraccionamiento biodirigido-	25
3.4 Separación de los constituyentes de las fracciones activas del extracto cloroformo metanólico -----	26
3.4.1 Obtención de la ratibinólida 1, <u>33</u> -----	28
3.4.2 Obtención del β sitbsterol, <u>34</u> -----	28
3.4.3 Obtención de la ratibinólida II <u>35</u> -----	28
3.5 Separacion de los constituyentes de las fracciones inactivas del extracto cloroformo metanólico -----	29
3.5.1 Obtención de la hispidulina, <u>36</u> -----	29
3.6 Caracterización de los compuestos aislados -----	29
3.6.1 Determinación de las constantes físicas y espec- troscópicas -----	29
3.6.2 Obtención del derivado acetilado de la hispidulina	30

4.0 RESULTADOS Y DISCUSION-----	31
4.1 Identificación de la ratibinólida I <u>33</u> -----	34
4.2 Identificación de la ratibinólida II <u>35</u> -----	41
4.3 Identificación de la hispidulina, <u>36</u> -----	51
4.4 Identificación del β sitosterol, <u>34</u> -----	54
4.5 Constantes físicas y espectroscópicas y espectros --	55
5.0 CONCLUSIONES -----	72

**CAPITULO 2. EVALUACION PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTI-
MICROBIANA POTENCIAL DE VARIOS METABOLITOS
SECUNDARIOS AISLADOS DE PLANTAS MEXICANAS
USADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL**

1.0 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION -----	75
2.0 OBJETIVOS -----	80
3.0 MATERIALES Y METODOS	
3.1 Sustancias objeto de la evaluación -----	90
3.2 Microorganismos de prueba -----	90
3.3 Preparación de la muestras a evaluar y de los tes- tigos -----	91
3.4 Preparación de los inóculos de los microorganismos de prueba -----	91
3.5 Siembra de los microorganismos -----	92
3.6 Aplicación de las muestras objeto de la evaluación en las placas de agar previamente inoculadas con los	

microorganismos de prueba -----	93
3.7 Evaluación de la actividad antimicrobiana -----	93
4.0 RESULTADOS -----	93
5.0 DISCUSION Y CONCLUSIONES -----	97
6.0 RECOMENDACIONES -----	102
APENDICE-----	103
BIBLIOGRAFIA-----	104

LISTA DE CUADROS

Página

CUADRO 1. Ejemplos de plantas medicinales empleadas por los indios tarahumaras -----	6
CUADRO 2. Especies del género <u>Ratibida</u> , sinonimias y distribución -----	11
CUADRO 3. Metabolitos secundarios descritos en <u>Ratibida columnifera</u> -----	13
CUADRO 4. Metabolitos secundarios descritos en <u>Ratibida peduncularis</u> -----	23
CUADRO 5. Resumen del fraccionamiento biodirigido vía cromatografía en columna del extracto cloroformo-metanólico de <u>R. latipalearis</u> -----	27
CUADRO 6. Toxicidad del extracto cloroformo-metanólico de <u>Ratibida latipalearis</u> para <u>A. salina</u> ----	31
CUADRO 7. Toxicidad de las fracciones activas obtenidas de la cromatografía en columna del extracto cloroformo-metanólico de <u>Ratibida latipalearis</u> -----	32
CUADRO 8. Constantes físicas y espectroscópicas de la ratibinólida I -----	56
CUADRO 9. Comparación de los desplazamientos químicos para H-6, H-7 y H-15 entre la 4,5-epoxi-dihidroarbusculina B y la ratibinólida II-----	48

CUADRO 10. Constantes físicas y espectroscópicas de la ratibinólida II -----	62
CUADRO 11. Constantes físicas y espectroscópicas de la hispidulina -----	67
CUADRO 12. Metabolitos evaluados para su determinación cualitativa como potenciales agentes antimicrobianos -----	81
CUADRO 13. Microorganismos de prueba empleados para la evaluación cualitativa como potenciales agentes antimicrobianos -----	90
CUADRO 14. Patrones de Mc Farland -----	92
CUADRO 15. Metabolitos activos contra bacterias en la determinación cualitativa preliminar -----	94
CUADRO 16. Metabolitos activos contra <u>Candida albicans</u> en la determinación cualitativa preliminar ---	96

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Distribución de las especies del género <u>Ratibida</u> -----	10
FIGURA 2. Metabolitos secundarios aislados de <u>Ratibida latipallearis</u> -----	33
FIGURA 3. Espectro de ¹ H RMN bidimensional 2D-COSY de la ratibidinólida I -----	37
FIGURA 4. Vista estereoscópica de la ratibidinólida I ---	39
FIGURA 5. Zona comprendida entre 0 y 7 ppm del espectro de ¹ H RMN bidimensional de la ratibidinólida II -----	43
FIGURA 6. Zona comprendida entre 1 y 4.5 ppm del espectro de ¹ H RMN bidimensional de la ratibidinólida II -----	45
FIGURA 7. Representación mediante proyecciones de Newman del efecto γ -gauche que ejerce el sustituyente en C-1 sobre C-9 en eudesmanólidas 1-hidroxiladas -----	47
FIGURA 8. Efecto paramagnético inducido por el reactivo de desplazamiento sobre H-6, H-7, H-14 y H-15 de la ratibidinólida II -----	50
FIGURA 9. Estructura visualizada mediante el modelo Drieding de la ratibidinólida II -----	50

FIGURA 10. Fragmentos más importantes del espectro de masas de la hispidulina -----	53
FIGURA 11. Descubrimiento de nuevos antibióticos entre 1952 y 1982 y sus fuentes naturales -----	76
FIGURA 12. Estructuras de los metabolitos secundarios evaluados en la determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana -----	84

LISTA DE ESPECTROS

	Página
ESPECTRO 1. Espectro de IR de la ratibinólida I -----	57
ESPECTRO 2. Espectro de ^1H RMN en CDCl_3 de la ratibinólida I -----	58
ESPECTRO 3. Espectro de ^{13}C RMN en CDCl_3 de la ratibinólida I -----	59
ESPECTRO 4. Espectro de APT ^{13}C RMN en CDCl_3 de la ratibinólida I -----	60
ESPECTRO 5. Espectro COSY ^1H RMN en CDCl_3 de la ratibinólida I -----	61
ESPECTRO 6. Espectro de IR de la ratibinólida II -----	63
ESPECTRO 7. Espectro de ^1H RMN en CDCl_3 de la ratibinólida II -----	64
ESPECTRO 8. Espectro de ^1H RMN en CDCl_3 con adi- ción de D_2O de la ratibinólida II. -----	64-A
ESPECTRO 9. Espectro de ^{13}C RMN en CDCl_3 de la ratibinólida II -----	65
ESPECTRO 10. Espectro de APT ^{13}C RMN en CDCl_3 de la ratibinólida II -----	66
ESPECTRO 11. Espectro de IR de la hispidulina -----	68
ESPECTRO 12. Espectro de UV de la hispidulina -----	69
ESPECTRO 13. Espectro de ^1H RMN en $\text{DMSO}-d_6$ de la hispidulina -----	70

ESPECTRO 14. Espectro de ^1H RMN en DMSO-d_6 del
derivado triacetilado de la hispi-
dulina -----

INTRODUCCION

En las últimas cinco décadas el desarrollo de nuevos medicamentos ha sido notable, principalmente en lo que se refiere a los antibióticos y productos de síntesis. En este sentido las sustancias naturales no solamente han contribuido de manera significativa, sino que también constituyen hasta la fecha, la base de los tratamientos médicos tradicionales en los países en vías de desarrollo (Anand, 1978). Se estima que más de la mitad de la población mundial, hace uso de remedios tradicionales, y si bien es cierto que la tendencia es mayor en los países subdesarrollados, en los países industrializados existe un interés creciente por el uso de plantas con fines curativos. Quizás el resurgimiento de la medicina verde en los países del primer mundo sea una consecuencia de la alta incidencia de enfermedades iatrogénicas ocasionadas por muchos medicamentos sintéticos y algunos antibióticos (Nityanand, 1985).

Las plantas y los otros recursos que emplean los usuarios de la medicina tradicional, constituyen fuentes potenciales valiosas para el hallazgo de nuevos principios activos. En la literatura, son numerosos los ejemplos que ilustran el importante papel que ha jugado el uso folklórico de varias plantas en el descubrimiento de compuestos bioactivos (Farnsworth y Bingel, 1977; Farkas, 1980; Farnsworth, 1980; Bingel, 1977; Galeffi, 1980; Fairbairn, 1980; Salemink, 1980;

inter alia).

En la actualidad, las estrategias básicas para la investigación de plantas medicinales incluyen métodos biodirigidos y convencionales (Powell y Smith, 1980; Geran et al., 1972; Douros y Sufness, 1978; Wall y Wani, 1977; Spjut, 1985; Ferrigni, et al., 1984).

En el caso de los primeros, se emplea un bioensayo conveniente para guiar el aislamiento de los constituyentes bioactivos, sin importar sus propiedades químicas o sus concentraciones relativas en los extractos. En contraste, los métodos tradicionales implican el aislamiento del mayor número posible de metabolitos secundarios para posteriormente investigar su actividad biológica. Las sustancias obtenidas de esta manera, pueden o no reflejar las propiedades curativas del extracto crudo, de tal forma que aunque estos estudios constituyen una contribución al conocimiento de las plantas medicinales, no siempre cumplen con el propósito de aislar compuestos con actividad biológica. Los estudios biodirigidos por el contrario, garantizan la obtención de compuestos bioactivos, muchos de los cuales resultan ser estructuralmente novedosos, contribuyendo no solamente al campo de la Química Farmacéutica, sino también a otras áreas más específicas del conocimiento de los Productos Naturales.

Aunque de manera general, es deseable que los ensayos biológicos empleados en la investigación biodirigida de plantas medicinales sean específicos para la actividad que se

les atribuye popularmente, en muchos casos, sobre todo en los países del tercer mundo, por múltiples factores ha sido difícil la implementación sistemática de los mismos. Entre las razones que dificultan la realización de estos ensayos, se encuentran la carencia de infraestructura adecuada, las deficientes políticas de investigación multidisciplinaria y hasta la falta de tradición en el estudio de las plantas con miras a la búsqueda de sustancias activas, por tan sólo mencionar algunas.

De manera afortunada, existen numerosas pruebas sencillas de fácil implementación y que permiten en algunos casos, detectar en forma preliminar actividades biológicas de mayor complejidad y en otros, actividades biológicas específicas. Algunos de estos bioensayos incluyen entre otros, la determinación de la toxicidad para el crustáceo Artemia salina (Meyer, et al., 1982), la inhibición de las agallas inducidas por Agrobacterium tumefaciens en la papa (Kahl, et al., 1982; Zaenen, et al., 1974; Chilton, et al., 1980; Ream, et al., 1982; inter alia), la inhibición del crecimiento de Lemna minor (Einhelig, et al., 1985; Zeringue, 1987), la inhibición del desarrollo de los huevecillos de erizo de mar (Cimino, et al., 1990), la determinación de citotoxicidad mediante bioautografía en agar (Burnes, et al., 1989), la evaluación de la actividad antimicrobiana y antifúngica (Mitscher, et al., 1972; Van den Berghe, et al., 1978; Ieven, et al., 1979; Dornberger y Lich, 1982; Mitscher, et al., 1984; Verpoorte,

et al., 1982; Von Beek, et al., 1984) y la reducción del desarrollo viral sobre placa (Abou Karam, et al., 1990).

Estos ensayos se han correlacionado de manera satisfactoria con actividades biológicas más complejas que en algunas ocasiones han permitido justificar el uso popular de muchas plantas. Como ejemplo reciente, se puede citar el aislamiento de varias acetogeninas antitumorales e insecticidas de algunas especies de la familia Annonaceae (Rupprecht, et al., 1990), empleando como bioensayo la determinación de la toxicidad para Artemia salina. Recientemente, este bioensayo condujo al aislamiento de la pinocembrina, como el único constituyente bioactivo del epazote de zorrillo (Teloxys graveolens). El efecto larvicida observado se correlacionó con un amplio espectro de actividad antihelmíntica en ensayos in vitro (Camacho, 1990).

Independientemente del tipo de ensayo utilizado (preliminar o específico) para conducir los estudios es evidente, según la vasta y diversa información existente en la literatura especializada, que la estrategia biodirigida ofrece los mejores resultados (Cimino, et al., 1989; Burnes, et al., 1989; Wang, et al., 1988; Hui, et al., 1989; inter alia).

CAPITULO 1

CONSTITUYENTES BIOACTIVOS DE Ratibida latipalearis Richards

1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

México es un país con una gran tradición en el empleo de plantas medicinales y en la actualidad gran parte de su población, principalmente la de bajos recursos económicos que no tiene acceso a servicios médicos adecuados, hace uso de ellas para la cura de un sinnúmero de enfermedades. Esta costumbre se encuentra especialmente difundida entre los grupos étnicos de nuestro país; de manera sobresaliente, los trahumaras de las sierras de Chihuahua hacen uso de aproximadamente 300 especies vegetales en sus prácticas medicinales. Las plantas más importantes usadas por estos indígenas se incluyen en el Cuadro 1 y entre ellas figura la "Chi'punuwa", Ratibida latipalearis Richards.

El objetivo fundamental de la presente sección de la tesis es realizar el estudio fitoquímico biodirigido de la planta medicinal Ratibida latipalearis Richards, sustentando esta investigación en las consideraciones siguientes. En primer lugar, las plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional constituyen fuentes potenciales valiosas de principios bioactivos. Por otra parte, las investigaciones químicas y farmacológicas relacionadas con la medicina

Cuadro 1. Ejemplos de plantas medicinales empleadas por los indios tarahumaras

PLANTA	NOMBRE TARAHUMARA	USOS MEDICINALES
<u>Teloxys graveolens</u>	Epazote, yerba del zorrillo	Dolores de cabeza, fiebre, desórdenes gastrointestinales.
<u>Taqetes lucida</u>	Yerbanis	Dolores de cabeza, catarro, congestiones.
<u>Hintonia latiflora</u>	Copalquín	Malaria y fiebre.
<u>Ligusticum porteri</u>	Chuchupate	Desórdenes gastrointestinales, dolores de cabeza, fiebre.
<u>Isotephane madrensis</u>	Cachana	Úlcera, reumatismo.
<u>Ratibida latipalearis</u>	Chi'punuwa	Heridas de la piel, inflamaciones y dolores de cabeza.
<u>Monarda austromontana</u>	Napá (orégano)	Desórdenes gastrointestinales, catarro.
<u>Pectis stenophylla</u>	Limoncillo	Dolores de cabeza, desórdenes urinarios.
<u>Caesalpinia platyloba</u>	Palo colorado	Enjuague bucal, dolores de los dientes.
<u>Psacalium decompositum</u>	Matarique	Dolores corporales, reumatismo, desórdenes gastrointestinales.

tradicional tarahumara son muy escasas, y por lo tanto la información disponible que permitiría su eventual adaptación a los programas de salud oficiales, con las ventajas que esto implicaría, es prácticamente inexistente.

Finalmente, es importante enfatizar que cualquier proyecto encaminado a la resolución de algún problema de salud pública nacional, bien sea mediante el hallazgo de nuevos principios activos a partir de materias primas nacionales o la investigación sistemática de las distintas floras regionales, está bien justificado.

Para el cumplimiento del objetivo fundamental del trabajo, se consideraron pertinentes los siguientes objetivos específicos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Recopilar la información botánica, etnobotánica, química y farmacológica de Ratibida latipalearis.
2. Efectuar las operaciones preliminares propias a la preparación de extractos vegetales.
3. Preparar el extracto vegetal de acuerdo a las técnicas fitoquímicas concencionales.

4. Efectuar el fraccionamiento biodirigido del extracto obtenido de R. latipalearis, empleando el ensayo de determinación de la toxicidad para Artemia salina.
5. Separar y purificar los constituyentes de las diferentes fracciones.
6. Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos los compuestos aislados.
7. Determinar la toxicidad para A. salina en las diferentes etapas del estudio biodirigido.
8. Contribuir al conocimiento de los elementos constitutivos de la flora medicinal mexicana.
9. Correlacionar en lo posible los resultados obtenidos con la información previamente descrita en la literatura en cuanto a la composición química de especies relacionadas y la actividad biológica de las sustancias aisladas.

2. GENERALIDADES ACERCA DE Ratibida latipalearis

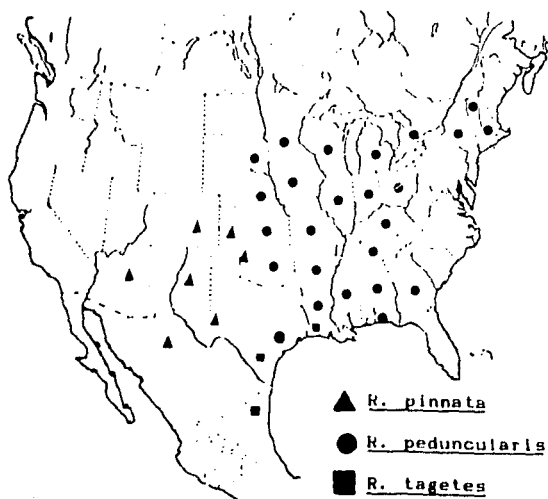
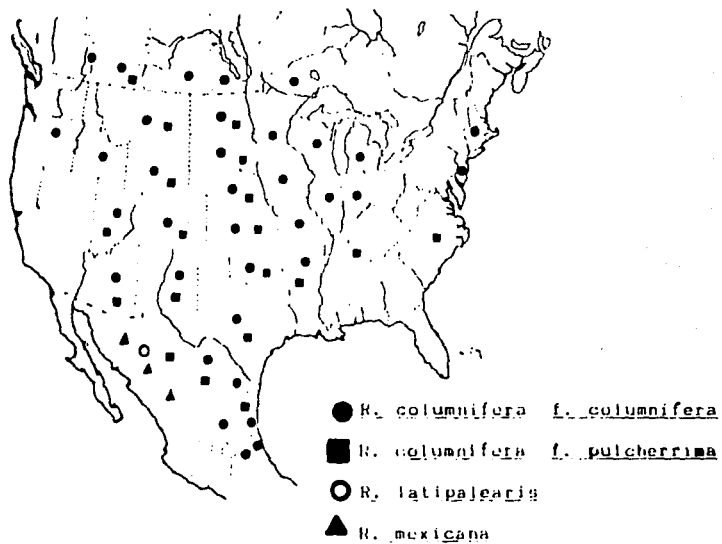
El género Ratibida Richards pertenece a la familia Asteraceae (tribu: Heliantheae) y desde el punto de vista filogenético se encuentra estrechamente relacionado con los géneros Echinacea y Rudbeckia. Comprende seis especies y una variedad, las cuales habitan en praderas, laderas montañosas, bosques de pinos y planicies del sur de Canada, Estados Unidos y norte de México (ver Figura 1). En el Cuadro 2 se indican las especies del género, sus sinonimias y distribución.

Las especies R. mexicana y R. latipalearis son las únicas que tienen uso medicinal. La primera se emplea para tratar dolores de cabeza, desórdenes gastrointestinales, resfriados e inflamaciones de la piel (Richards, 1969). La R. latipalearis para el tratamiento de heridas de la piel, inflamaciones y dolores de cabeza (Bye, 1989). Los indios Tarahumaras designan a esta última especie con el nombre de "Chi'punuwa".

La R. latipalearis es una hierba perenne, de tallo simple o ramificado que mide de 55 a 117 cm de altura, posee hojas alternas, espinosas y moteadas en ambas superficies, sus flores son amarillas y miden de 0.8 a 3.1 cm de largo. Esta especie es endémica del estado de Chihuahua en México (Richards, 1969).

Los estudios químicos del género son muy escasos y solamente las especies columnifera y peduncularis han sido investigadas. Dichos trabajos condujeron al aislamiento e

Figura 1. Distribucion de las especies del género Ratibida



Cuadro 2. Especies del genero Ratibida, sinonimias y distribución

NOMBRE CIENTIFICO	SINONIMIAS	DISTRIBUCION
<u>Ratibida mexicana</u> Watson	<u>Lepachys mexicana</u>	Sierra Madre Occidental, Chihuahua, Durango y So- nora.
<u>Ratibida pinnata</u> Vent.	<u>Lepachys pinnata</u> <u>Rudbeckia pinnata</u> <u>Obeliscaria pinnata</u> <u>Lepachys pinnatifida</u>	Centro y oeste de Esta- dos Unidos, sureste de - Canada.
<u>Ratibida peduncularis</u> Torr. y Gray.	<u>Lepachys peduncularis</u> <u>Lepachys serratum</u> <u>Ratibida picta</u>	Costas de Texas, E.E.U.U.
<u>Ratibida columnifera</u> Nutt	<u>Rudbeckia columnifera</u> <u>Rudbeckia columnaris</u> <u>Ratibida columnaris</u> <u>Lepachys columnaris</u>	Sureste de Canada, Esta- dos Unidos y norte de - México.
<u>Ratibida latipalearis</u> Richards	-----	Sierra Madre Occidental de Chihuahua.
<u>Ratibida taqetes</u> James	<u>Rudbeckia taqetes</u> <u>Rudbeckia globosa</u> <u>Lepachys columnaris</u>	Suroeste de Estados Uni- dos y Chihuahua.

identificación de veinticuatro lactonas sesquiterpénicas (1 - 24), dos flavonoides (25, 26), un fenil propanoide (27), dos sesquiterpenos simples (28, 29) y tres acetilenos (30 - 32) (ver Cuadros 3 y 4).

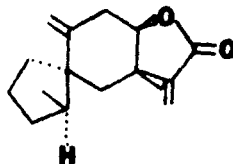
Cuadro 3. Metabolitos secundarios descritos en Ratibida columnifera

NOMBRE DEL COMPUESTO	ESTRUCTURA	REFERENCIA
----------------------	------------	------------

LACTONAS SESQUITERPENICAS

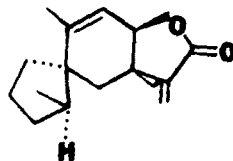
a) Ratibidanolidas

1 (4S,5S,7R,8R)-Ratibida-11(13)-dien-8,12-ólida.



Herz, et al.,
1985.

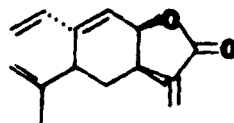
2 (4S,5S,7R,8R)-Ratibida-9,11(13)-dien-8,12-ólida.



Herz, et al.,
1985.

3 (5R,7R,8R,10S)-Elema-1,3,11(13)-trien-8,12-ólida.

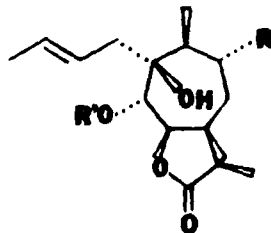
b) Elemanolida



Herz, et al.,
1985.

4, 5, 6, (1S,5S,6R,7S,10S,11R)-1-Hidroxi-2-oxo-5-(aciloxi)-xant-3-en-6,12-ólidas.

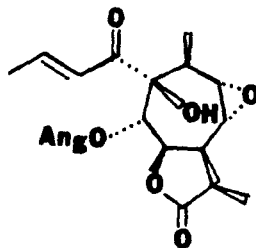
c) Xantanólidas



Herz, et al.,
1985.

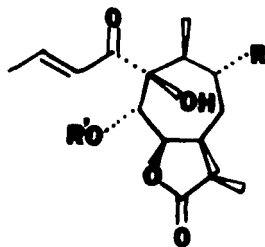
4	R=H	R'=Ang
5	R=H	R'=Tig
6	R=H	R'=iBut

7 (1S,5S,6R,7R,8R,9S,10S,11R)-8,9-Epoxi-1-hidroxi-2-oxo-5-angeloxi-xant-3-en-6,12-ólida.



Herz, et al.,
1985.

8, 9, (1S,5S,6R,7S,9R,10S,11R)
10, 11, -1,9-Dihidroxi-2-oxo-5-
 (aciloxi)-xant-3-en-6,12-
 ólidas.

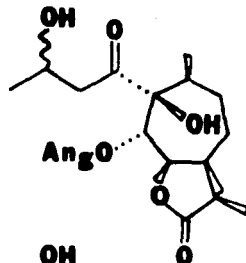


Herz, et al.,
 1985.

8 R=OH R'=Ang
9 R=OH R'=Tig

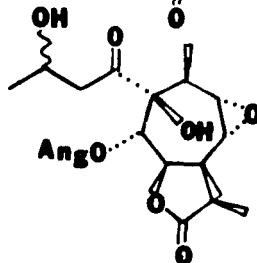
10 R=OH R'=iBut
11 R=OH R'=Ang

12 (1S,4R,5S,6R,7S,10S,11R)-1,4-
 Dihidroxi-2-oxo-5-angeloxixan-
 tan-6,12-ólida.



Herz, et al.,
 1985.

13, 14 (1S,4R,5S,6R,7R,8R,9S,10S,
 11R)-8,9-Epoxi-1-hidroxi-
 2-oxo-5-angeloxixantan-6,
 13-ólidas.

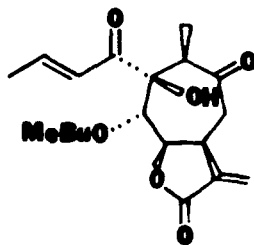


Herz, et al.,
 1985.

13 R=H

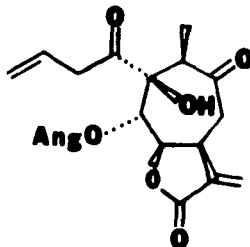
14 R=Et

- 15 5 α -O-[2-Metilbutirato]-9-oxo-
seco-ratiferólida.



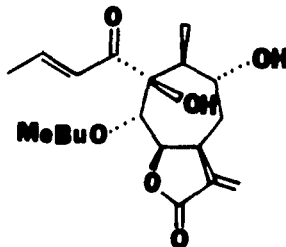
Ellmauerer,
et al., 1987.

- 16 5 α -O-Angelato-9-oxo-seco-
ratiferólida.



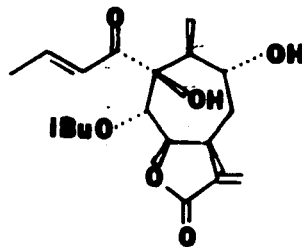
Ellmauerer,
et al., 1987.

- 17 5 α -O-2-[Metil-butirato]-9 α -
hidroxi-seco-ratiferólida.



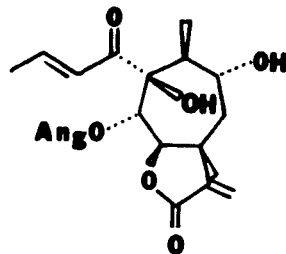
Ellmauerer,
et al., 1987.

18 5 α -O-Isobutirato-9 α -hidroxi-
-seco-ratiferdólida.



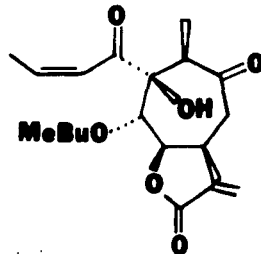
Ellmauerer,
et al., 1987.

19 5 α -O-Angelato-9 α -hidroxi-
-seco-ratiferdólida.



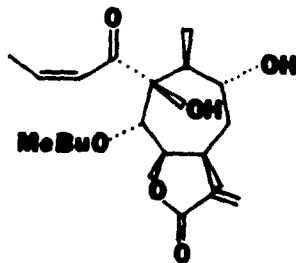
Ellmauerer,
et al., 1987.

20 5 α -O-[2-Metil-butirato]-
-9- β -seco-ratiferdólida.



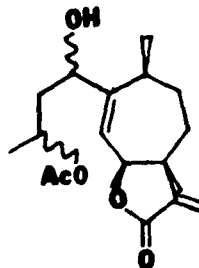
Ellmauerer,
et al., 1987.

- 21 5 α -O-[2-Metilbutirato]-9 α -hidroxi-3Z-seco-ratiferólida.



Ellmauerer,
et al., 1987.

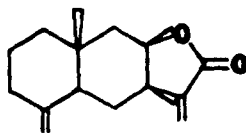
- 22 2-Hidroxi-4-acetoxi-xantan-1(5)-en-6 β -12-ólida.



Ellmauerer,
et al., 1987.

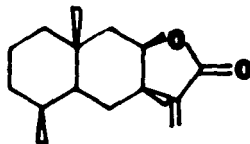
d) Eudesmanólidas

- 23 Eudesman-4(14),11(13)-dien 8 β -ólida.



Herz, et al.,
1985.

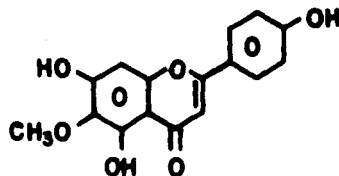
24 Eudesman-11(13)-en-8 β -12-
olida.



Ellmauerer,
et al., 1987.

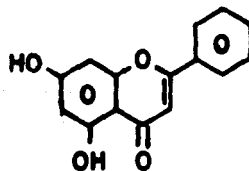
FLAVONOIDES

25 5,7,6-Trihidroxi-6-
metoxi-flavona.



Herz, et al.,
1985.

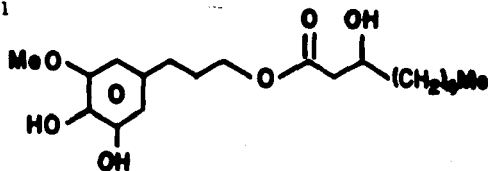
26 5,7-Dihidroxi-flavona



Ellmauerer,
et al., 1987.

FENILPROPANOIDES

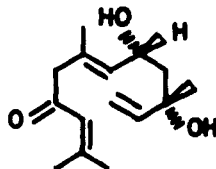
27 4-O-Desmetil-eschkurianol



Ellmauerer,
et al., 1987.

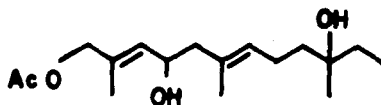
SESQUITERPENOS SIMPLES

28 (3S,5R)-5-Hidroxi-9-oxo-nerolidol.



Herz, et al.,
1985.

29 9-Hidroxi-12-acetoxi-nerolidol.



Ellmauerer,
et al., 1987.

ACETILENOS

- 30 2-(3-Buten-1-inil)-4-(1,3-pentadiinil)-tiofeno.

Herz, et al.,
1985.



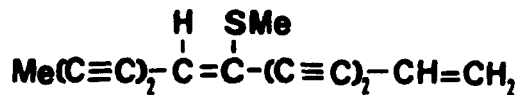
- 31 4'-(3-Buten-1-inil)-4-metil-2,2'-bitiofeno.

Herz, et al.,
1985.



- 32 7-Metiltio-1,7-tridecadien-3,5,9,11-tetraino.

Ellmayerer,
et al., 1987.



Cuadro 4. Metabolitos secundarios descritos en Ratibida peduncularis

NOMBRE DEL COMPUESTO	REFERENCIA
<p><u>11</u> (1S,5S,6R,7R,8R,9S,10S,11R)-8,9-Epoxi-1-hidroxi-2-oxo-5-angeloxi-xantan-3-en-6,12-ólida.</p>	<p>Herz, <u>et al.</u>, 1985.</p>
<p><u>17</u> 5α-O-[2-Metilbutirato]-9α-hidroxi-seco-ratiferólida.</p>	<p>Ellmauerer, <u>et al.</u>, 1987.</p>
<p><u>19</u> 5α-O-Angelato-9α-hidroxi-seco-ratiferólida.</p>	<p>Ellmauerer, <u>et al.</u>, 1987.</p>

PARTE EXPERIMENTAL

3.0 MATERIALES Y METODOS

3.1 Material vegetal

El material vegetal (planta completa), se colectó en el Municipio de Guachochic, Cusarase, Chihuahua, el 12 de noviembre de 1988. Una muestra de referencia (Voucher: Bye y Ramamoorthy 16656) se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional, Instituto de Biología UNAM.

La planta se secó a temperatura ambiente y se pulverizó en un molino de cuchillos Modelo Wyley No. 4.

3.2 Evaluación de la toxicidad in vitro para Artemia salina Gray

El bioensayo utilizado para dirigir el estudio fitoquímico de R. latipalparis, se efectuó de acuerdo con la siguiente metodología (Meyer, et al., 1982):

- Preparación de las muestras.

20 mg de compuesto puro, extracto o fracción, se disolvieron en 2 ml de un disolvente adecuado. De esta solución se transfirieron por separado a tres viales: 500µl, 50 µl y 5 µl para obtener disoluciones de 1000, 100 y 10 ppm respectivamente. Cada concentración se preparó por triplicado y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente o al

vacío.

- Incubación de los huevos de A. salina

Los huevos de A. salina se incubaron en un medio salino artificial durante un periodo de 48 horas. Posteriormente, los camarones fototrópicos fueron colectados con una pipeta Pasteur.

- Bioensayo

Se transfirieron diez crustaceos a cada uno de los viales que contenian las muestras a evaluar y 5 ml de un medio salino artificial. Los viales se mantuvieron con iluminación durante 24 horas y, transcurrido este tiempo, se contó el número de individuos sobrevivientes, para calcular el porcentaje de mortalidad y la LC_{50} , en el caso de compuestos puros.

3.3 Métodos de Extracción y Fraccionamiento Biodirigido

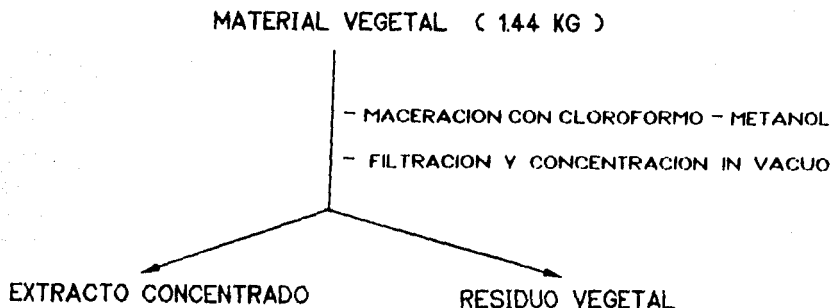
El material vegetal seco (1447 gramos) se extrajo con una mezcla de cloroformo-metanol (1:1) de acuerdo con el procedimiento señalado en el Esquema 1.

El extracto se evaluó biológicamente mediante el ensayo descrito en la sección anterior y se fraccionó preliminarmente mediante una cromatografía preparativa en columna, utilizando como adsorbente gel de sílice desactivada al 10% con agua destilada (1.25 Kg, sílica gel G 60 Merck 70-230 mallas); el proceso de elución se llevó a cabo con hexano, cloroformo, metanol y acetona en diferentes proporciones. Se recogieron un total de 307 fracciones de 500 ml c/u. Las fracciones fueron

analizadas por cromatografía en capa fina y se combinaron aquellas que resultaron similares. A cada una de las fracciones combinadas se les determinó la toxicidad para A. salina.

En el Cuadro 5 se resumen los sistemas de eluyentes empleados y las fracciones combinadas.

Esquema 1. Preparación del extracto orgánico de Ratibida latipalearis



3.4 Separación de los constituyentes de las fracciones activas del extracto cloroformo-metanólico

Las fracciones 48-64 y 93-125, obtenidas del fraccionamiento del extracto total, fueron recromatografiadas sobre gel de sílice. Las fracciones secundarias resultantes de este proceso también se evaluaron biológicamente.

Cuadro 5. Resumen del fraccionamiento biodirigido via cromatografia en columna del extracto cloroformo-metanólico de Ratibida latipalearis

ELUYENTE	PROPORCION	FRACCIONES COMBINADAS
Hexano		1-35
Hexano-cloroformo	8:2	36-47 48-64 65-78 79-81 82-92
Hexano-cloroformo	7:3	93-105
Hexano-cloroformo	5:5	106-125
Hexano-cloroformo	2.5:7.5	126-131
Hexano-cloroformo	1:9	132-165
Cloroformo		166-173
Cloroformo-metanol	9.5:0.5	174-205
Cloroformo-metanol	9:1	206-219
Cloroformo-metanol	8:2	220-259
Cloroformo-metanol	7:3	260-281
Cloroformo-metanol	6:4	282-286
Cloroformo-metanol	5:5	287-290
Acetona		291-307

3.4.1 Obtención de la ratibinólida I 33

Las fracciones 93-125 (5.5867 g) de la columna original (Cuadro 5) se recromatografiaron en una columna empacada con 168 g de gel de sílice (desactivada al 10%); la elución se realizó con distintas proporciones de hexano y acetona. De las fracciones secundarias activas 188-192, eluidas con hexano-acetona 95:5, se aisló un polvo cristalino, que fue recrystalizado repetidas veces con una mezcla de hexano-acetona (1:1), para originar finalmente 20 mg de unos cristales blancos con p.f.=142-144°C.

3.4.2 Obtención del β sitosterol 34

De las fracciones 120-130 de la columna descrita en la sección anterior, se obtuvieron 60 mg de unos cristales blancos de p.f.=140-142°C.

3.4.3 Obtención de la ratibinólida II 35

Las fracciones 48-64 (320 mg) de la columna original (Cuadro 5) fueron cromatografiadas en una columna empacada con gel de sílice (desactivada al 10%). La elución se efectuó con hexano y acetona en diferentes proporciones. De las fracciones secundarias 100-110 eluidas con cloroformo-acetona (9:1), se obtuvo un sólido cristalino blanco de p.f. 276-280°C.

3.5 Separación de los constituyentes de las fracciones inactivas del extracto total

3.5.1 Obtención de la hispidulina 36

Las fracciones primarias 166-173 (20.30 g) (Cuadro 5), fueron recromatografiadas en una columna empacada con 350 g de gel de sílice (desactivada al 10%), los eluyentes empleados fueron: hexano, cloroformo y metanol en varias proporciones. De las fracciones secundarias 248-258, eluidas con cloroformo-metanol 97:3, precipitó un polvo amarillo de p.f. 290-292 °C. La cantidad obtenida fue de 80 mg.

3.6 Caracterización de los compuestos aislados

3.6.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas

- a) Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Johnes y no están corregidos.
- b) Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 599 B.
- c) Los espectros de UV se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 599B.
- d) Los espectros de masas fueron obtenidos en un aparato Hitachi-Perkin-Elmer RMU-GD (Instituto de Química, UNAM).
- e) Los espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN se determinaron en

espectrofotómetros Varian EM 390 (Facultad de Química, UNAM) y Varian VXR-3005 (Instituto de Química, UNAM) utilizando como disolventes CDCl_3 y/o DMSO-d_6 y como referencia interna TMS.

f) El estudio de difracción de Rayos X se efectuó en un difractómetro Nicolet R3m (Instituto de Química, UNAM).

3.6.2 Obtención del derivado acetilado de la hispidulina 37

Se acetilaron 20 mg de la hispidulina usando 0.2 ml de piridina y 0.2 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 12 horas y, al cabo de este tiempo, el crudo de la reacción se procesó de acuerdo a la metodología convencional (Shriner, Fuson-Curtin, 1980). Como resultado se obtuvieron 11 mg del derivado acetilado 37 con p.f. 154-156°C.

4.0 RESULTADOS Y DISCUSION

Con la finalidad de obtener compuestos bioactivos de R. latipalearis, el extracto cloroformo-metanólico de la planta fue evaluado biológicamente mediante la determinación de la toxicidad para Artemia salina, de acuerdo a la metodología descrita por Meyer y colaboradores (Meyer, et al., 1982). Debido a que el extracto mostró una buena toxicidad para el crustáceo (ver Cuadro 6), se procedió a fraccionarlo de manera biodirigida mediante una cromatografía preparativa en columna sobre gel de sílice.

Cuadro 6. Toxicidad del extracto cloroformo metanólico de

Ratibida latipalearis para A. salina

CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)	1000	100	10
% DE MORTALIDAD	100	66.66	3.33
LC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	366.61		

El empleo del bioensayo para el monitoreo del efecto larvicida durante el fraccionamiento permitió la obtención de cuatro fracciones activas, las cuales fueron recromatografiadas para separar los compuestos activos. De las fracciones primarias 93-125 y 48-64, se aislaron dos lactonas sesquiterpénicas bioactivas, que fueron denominadas

ratibinólida I ($LC_{50}=62.74 \mu\text{g/ml}$) 33 y ratibinólida II ($LC_{50}=69.53 \mu\text{g/ml}$) 35. De la fracción 93-124 se aisló también el β -sistosterol 34.

Cuadro 7. Toxicidad de las fracciones activas obtenidas de la cromatografía en columna del extracto cloroformo-metanólico de *R. latipalmaris*

FRACCION CROMATOGRAFICA	LC_{50} ($\mu\text{g} / \text{ml}$)
48-64	137.12
93-125	65.00
126-131	200.85
132-161	77.32

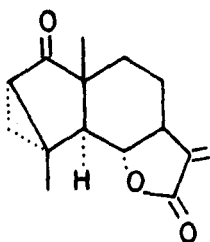
Finalmente, la recromatografía de la fracción primaria no activa 166-173 de la columna original (Cuadro 5), permitió el aislamiento de una flavona que fue identificada como la hispidulina 36.

Los rendimientos expresados en porcentaje sobre el peso de material vegetal seco y las estructuras de los compuestos obtenidos se indican en la Figura 2.

Figura 2. Metabolitos secundarios aislados de *Ratibida latipallearis*

RATIBINOLIDA I

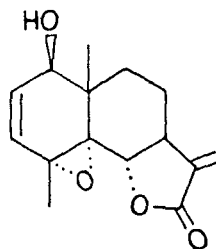
(0.0014 %)



BS LC₅₀=62.749 µg/ml

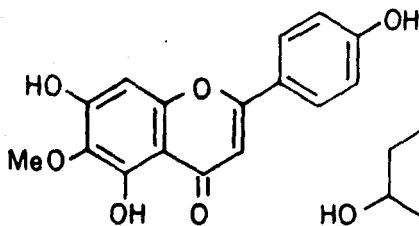
RATIBINOLIDA II

(0.0003 %)

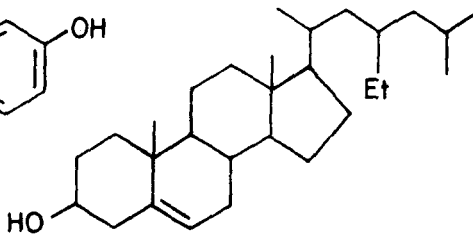


BS LC₅₀=69.53 µg/ml

HISPIDULINA



β-SITOSTEROL



4.1 Identificación de la ratibinólida I 33

El compuesto 33 se aisló al recromatografiar las fracciones activas 93-124 de la columna original (Cuadro 5). Su fórmula molecular se estableció mediante espectrometría de masas y análisis elemental como $C_{15}H_{16}O_3$, que permitió calcular un índice de insaturación de siete.

El espectro de IR (Espectro 1), mostró bandas de absorción para carbonilo de lactona (1770 cm^{-1}) y carbonilo de cetona (1730 cm^{-1}). Su espectro de ^1H RMN (Espectro 2) presentó resonancias que fueron asignadas de la siguiente manera:

- a) Los dobletes en δ 6.16 y 5.41 a los hidrógenos de un metileno exocíclico α al carbonilo de una γ -lactona.
- b) El doblete de dobletes en δ 4.20, al hidrógeno geminal de una función lactónica.
- c) Los dos singuletes en δ 1.27 y 1.46, que integraban cada uno para tres hidrógenos, a metilos unidos a carbonos cuaternarios.

El espectro de ^{13}C RMN (Espectro 3), confirmó la presencia de 15 carbonos en la molécula, dos de los cuales correspondían a los grupos carbonilos de una lactona [δ 170.42 (s)] y de una cetona [δ 212.22 (s)]. De acuerdo a la teoría del desplazamiento químico y al número de resonancias positivas y negativas observadas en el espectro de APT (Espectro 4), las trece señales restantes se asignaron a una doble ligadura disustituida (δ 138.07 y 117.22), dos carbonos

cuaternarios (δ 59.26 y 29.68), dos metilenos (δ 29.62 y 20.54), un carbono geminal al oxígeno etéreo de una lactona (δ 79.85), tres metinos (δ 55.04, 52.04 y 32.95) y dos metilos (δ 19.32 y 16.81). Estas observaciones y consideraciones de tipo quimiotaxonomico (Bohlamn, 1987; Herz, 1985) permitieron establecer que el producto natural era la cetona de una α -metilen- γ -lactona sesquiterpénica.

De las siete insaturaciones calculadas, tres se asignaron al anillo de la α -metilen- γ -lactona y una cuarta al grupo carbonilo de la cetona. La ausencia en los espectros de RMN de señales indicativas de otro tipo de insaturación permitió concluir que el núcleo base de la lactona correspondía al de un sistema triccíclico.

El análisis del espectro de ^1H RMN y su correlación bidimensional 2D-COSY (Espectro 6 y Figura 3), confirmó no sólo la naturaleza triccíclica del compuesto, sino también la disposición y la estereoquímica del anillo lactónico. Las conclusiones más relevantes que resultaron de esta interpretación espectroscópica se resumen a continuación:

- a) Los dos dobletes (δ 5.41 y 6.16) asignados a los hidrógenos del metileno exocíclico de la lactona (H-13 y H-13'), correlacionaban entre sí y con el multiplete a δ 2.35, el cual en consecuencia se asignó a H-7. El valor de la constante de acoplamiento entre los hidrógenos 13 y H-7 ($J=3\text{Hz}$) era consistente con una fusión trans de la lactona (Samek, 1970).
- b) El hidrógeno geminal de la lactona en δ 4.20 (dd, H-6)

interaccionaba con H-7 y con el doblete centrado a δ 1.72, asignable entonces a H-5. El patrón de acoplamiento observado entre H-5, H-6 y H-7 ($J_{5-7}=J_{5-6}=11.5$ Hz) indicó una relación trans diaxial entre estos tres protones, confirmándose la fusión trans de la lactona.

Debido a que H-5 solamente correlacionaba con H-6, era claro que el núcleo C-4 representaba uno de los centros cuaternarios de la molécula.

c) La señal correspondiente a H-7 correlacionaba también con el multiplete en δ 1.60 (ddd, $J_{8\alpha-9\alpha}=14$ Hz, $J_{8\beta-7}=11.5$ Hz, $J_{8\beta-9\alpha}=4$ Hz), el cual a su vez interaccionaba con las resonancias en δ 2.06 (d, $J_{8\alpha-9\alpha}=14$ Hz) y en δ 1.42 (m). Consecuentemente estas tres últimas señales se asignaron a H-8 β , H-8 α y H-9 α respectivamente. De manera adicional, H-9 α correlacionaba con el doblete ancho ($J_{9\alpha-9\beta}=14$ Hz en δ 1.67, señal que por lo tanto se atribuyó a H-9 β (ver Figura 3).

Las observaciones resumidas en los incisos a), b) y c), permitieron proponer la estructura parcial A.

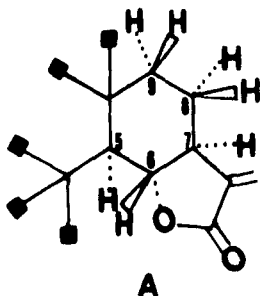
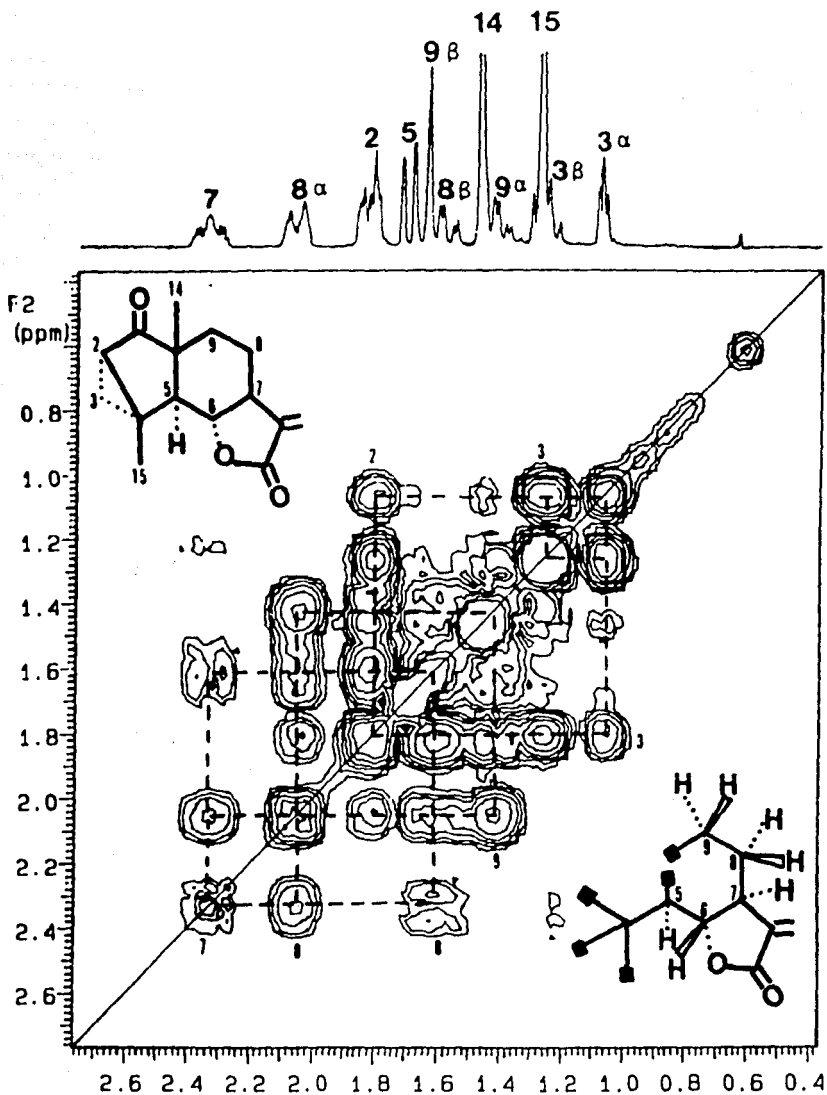
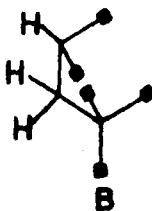


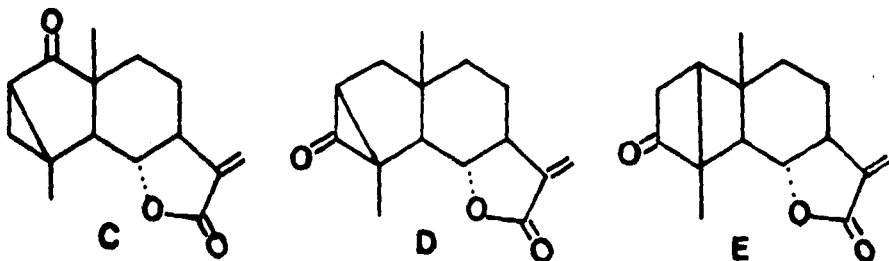
Figura 3. Espectro de ^1H RMN bidimensional 2D-COSY de la ratibinólida I



d) Finalmente, el doblete de dobletes a δ 1.08 se encontraba relacionado con los multipletes a δ 1.22-1.32 y 1.81. Es de hacer notar que este conjunto de señales conformaba un sistema ABX y la ausencia de interacciones adicionales, permitió establecer en la molécula la presencia de la unidad estructural B.



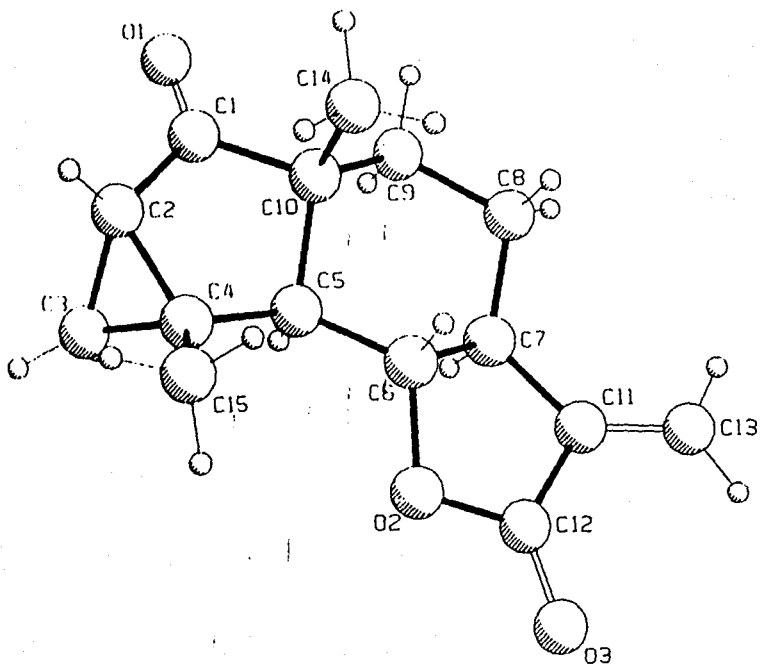
La integración de las estructuras parciales A y B, de los dos metilos unidos a carbonos cuaternarios y del grupo ceto, permitieron proponer para el producto natural las tres estructuras siguientes:



La frecuencia de absorción observada para el carbonilo de cetona en el espectro de IR permitió descartar en principio las estructuras D y E. Teóricamente una cetona en anillos de tres o cuatro miembros debe absorber a frecuencias mayores que las observadas para el compuesto 33 (Pretsch, *et al.*, 1980).

El estudio de difracción de Rayos X permitió confirmar de manera inequívoca que la propuesta C era la correcta y en la Figura 4 se muestra una vista estereoscópica de la ratibinólida I, una nueva lactona sesquiterpénica del tipo de las geigeranólidas (Bohlman, 1982).

Figura 4. Vista estereoscópica de la ratibinólida I



El compuesto consta de un sistema tetracíclico, en el cual, los anillos carbocíclicos de cinco y seis miembros y el correspondiente al de la α -metilen- γ -lactona, se encuentran aproximadamente coplanares, el anillo de ciclopropano, en cambio esta por debajo del plano formado por los otros tres. El ciclo de seis miembros adopta una conformación de silla con el grupo metilo 14 axial y los dos anillos de cinco miembros [C(1)-C(2)-C(4)-C(5)-C(10)] y [C(2)-C(6)-C(7)-C(11)-C(12)] presentan conformaciones de semisilla y " α -envelope"-semisilla respectivamente (Soriano, et al. 1989). En el Apéndice se resumen los parámetros posicionales correspondientes a la ratibinólida I. Las constantes físicas y espectroscópicas para este producto natural se incluyen en el Cuadro 8.

Cabe mencionar como hecho sobresaliente, el desplazamiento paramagnético presentado por los protones metilénicos del anillo de tres miembros ($\Delta\delta=3.32$ y $\Delta\delta=7.78$) (Bohlmann, 1982) el cual podría explicarse por un efecto anisotrópico ejercido por el carbonilo en la posición uno.

4.2 Identificación de la ratibinólida II 35

El componente bioactivo de menor polaridad aislado de Ratibida latigalearis corresponde a la fórmula molecular de $C_{15}H_{16}O_4$ (Espectrometría de masas). Se obtuvo como un sólido cristalino incoloro de p. f. = 276-280°C, soluble en cloroformo, acetato de etilo y acetona.

El espectro de IR (Espectro 6) del producto 35 presentó bandas características para hidroxilo (3500 cm^{-1}) y para una α -metileno- γ -lactona (1770 cm^{-1}). Al igual que en el caso del compuesto anterior, el espectro de ^1H RMN (Espectro 7) mostró las señales típicas del metileno exocíclico de una γ -lactona sesquiterpénica [δ 5.98 (d), 6.28 (d) y 4.36 (d)]. También se observaron resonancias para:

1) el hidrógeno geminal de una función carbinólica secundaria [δ 3.5 (dd)] y un grupo hidroxilo [δ 2.4 (d, $J=11.6\text{ Hz}$)]. Al registrar el espectro con D_2O (Espectro 8), la señal del primero se simplificaba a un doblete, lo cual indicaba su acoplamiento con el hidrógeno del oxhidrilo.

2) una doble ligadura adicional disustituida [δ 5.98 (d) y 6.28 (dd)].

3) dos metilos unidos a carbonos cuaternarios centrados en δ 1.76 (s) y 0.96 (s). El desplazamiento químico observado para el primero era congruente con su disposición sobre un centro cuaternario oxigenado.

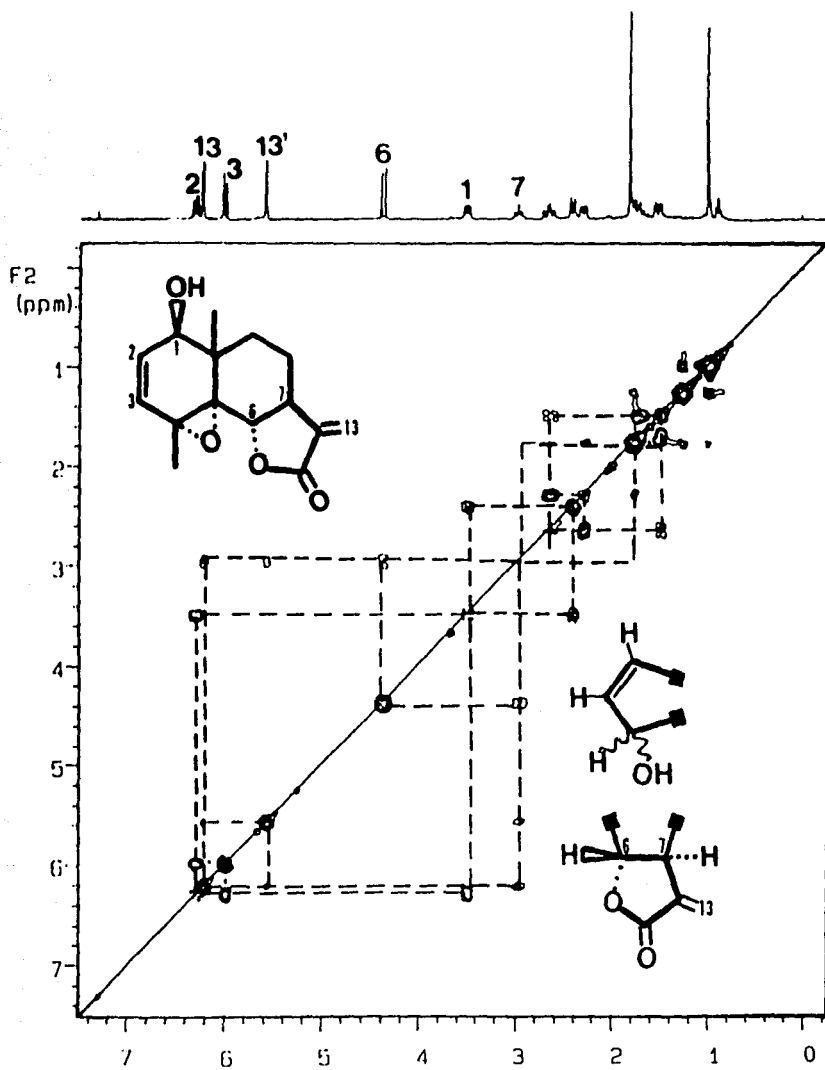
Los espectros de ^{13}C RMN (Espectros 9 y 10) confirmaron los grupos funcionales evidenciados por la resonancia

magnética nuclear protónica, indicando además la existencia en la molécula de un epóxido [δ 71.63 (s) y 61.99 (s), C-5 y C-4], un centro cuaternario sin sustituyentes oxigenados [δ 39.67 (s)], dos metilenos [δ 29.80 (t) y 22.03 (t)] y un metino [δ 45.87 (d)].

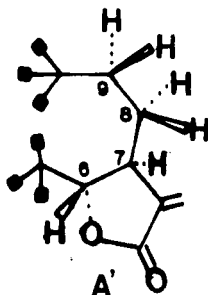
Los elementos estructurales presentados hasta este punto de la discusión satisfacían los requerimientos de la fórmula molecular en cuanto al número de carbonos, hidrogenos y oxigenos se refiere. En relación a las insaturaciones, faltaban por asignar dos de las siete permitidas, las cuales después del análisis espectroscópico previo, solamente podían pertenecer a un sistema bicíclico. El análisis del espectro de ^1H RMN bidimensional, permitió determinar que el mismo correspondía al de un eudesmano. Las correlaciones más importantes observadas en este espectro, así como sus implicaciones estructurales se resumen a continuación:

- a) Los dos dobletes a δ 6.2 y 5.56 atribuibles a H-13 y H-13', correlacionaban entre sí, y con la señal a δ 2.94, la cual entonces se asignó a H-7.
- b) El doblete correspondiente al hidrógeno geminal de la función lactónica en δ 4.36 (H-6), interaccionaba única y exclusivamente con H-7. La constante de acoplamiento observada ($J_{6-7}=11.6$ Hz), era consistente con una disposición trans-diaxial y por lo tanto con la fusión trans de la lactona (ver Figura 5).

Figura 5. Zona comprendida entre 0 y 7 ppm del espectro de ^1H
RMN bidimensional de la ratibinolida II

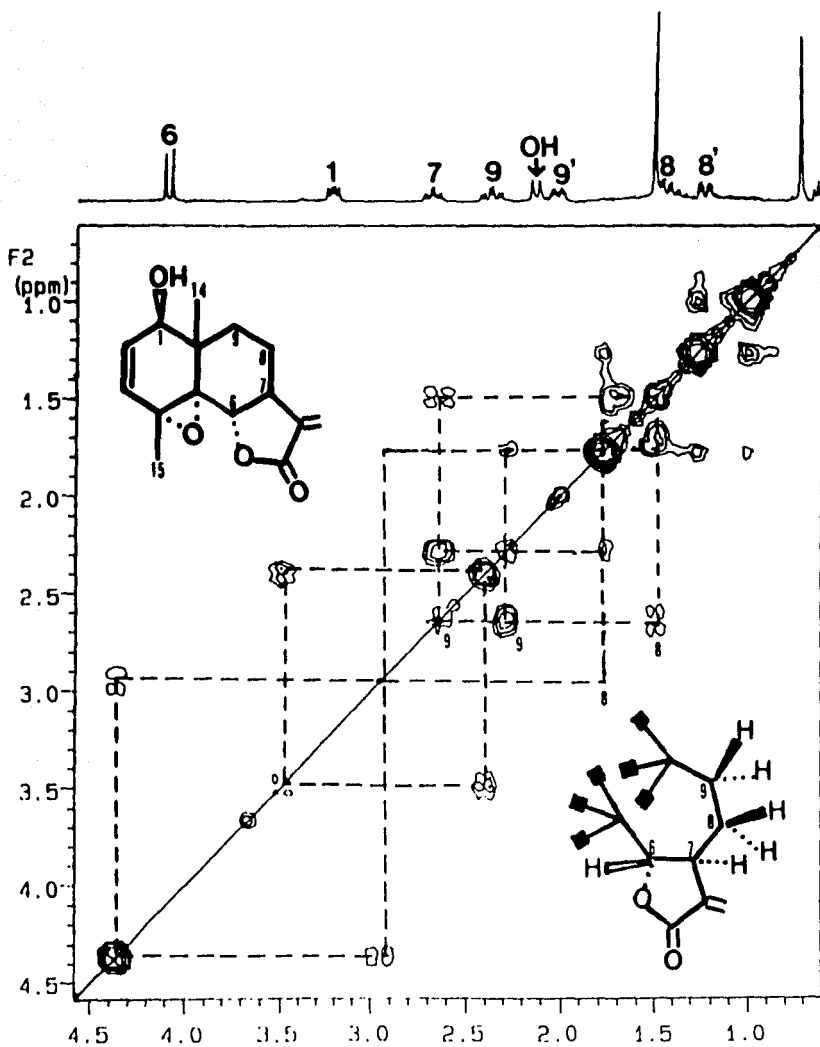


c) De manera adicional, H-7 correlacionaba con los multipletes en δ 1.7 y 1.5, los cuales fueron asignados a H-8 β y H-8 α respectivamente. Estos últimos hidrógenos a su vez se relacionaban entre sí y con los hidrógenos de un metileno vecinal [H-9 α a δ 2.28 y H-9 β a δ 2.64] (ver Figura 6). Las constantes de acoplamiento correspondientes a las interacciones especificadas en este punto se indican en el Cuadro 9. Con base a las conectividades mencionadas, se pudo proponer la estructura parcial A' que se muestra a continuación:



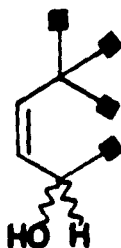
d) Los dos hidrógenos de la doble ligadura disustituida adicional [δ 5.98 (d, $J_{2-3}=8.7$ Hz, H-3) y δ 6.28 (dd, $J_{2-3}=8.7$ Hz, $J_{1-2}=5.8$ Hz, H-2)], correlacionaban entre sí y uno de ellos (H-2), además con el hidrógeno geminal de la función carbinólica secundaria a δ 3.48 (dd, $J_{1-2}=5.8$ Hz, $J_{OH-1}=11.6$ Hz, H-1) (ver Figura 5). La magnitud de la constante de acoplamiento observada para los hidrógenos vinílicos, indicó que la doble ligadura debía encontrarse en

Figura 6. Zona comprendida entre 1 y 4.5 ppm del espectro de ^1H RMN bidimensional de la ratibinólida II.

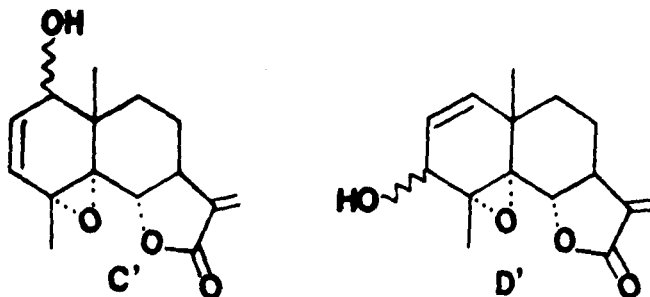


un anillo de seis miembros (Jackman, 1969). Finalmente, la señal en δ 3.48 mostraba una interacción con el hidrógeno del hidroxilo en δ 2.4 (d, $J_{OH-H} = 11.6\text{Hz}$).

Las correlaciones recién descritas permitieron proponer la siguiente secuencia parcial B'



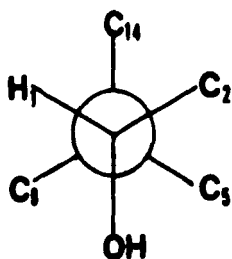
La integración de las estructuras parciales A' y B', el valor de la constante de acoplamiento observada entre los dos hidrógenos olefinicos de la fórmula parcial B' ($J=8.7\text{Hz}$) y el patron de acoplamiento observado para H-6, permitieron proponer las estructuras C' y D' para el producto natural.



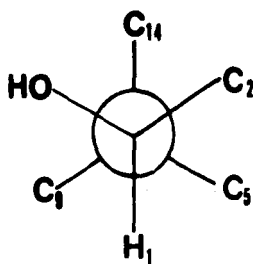
El desplazamiento diamagnético observado para C-9, atribuible al efecto γ -gauche ejercido por un sustituyente α ó β orientado en C-1 (ver Figura 7) (Mata R., *et al.*, 1983; Herz, *et al.*, 1983; Da Silva, *et al.*, 1981), permitió descartar la posibilidad D'. La falta de parámetros de ^{13}C RMN para modelos comparables que permitiesen correlacionar la magnitud del efecto y la estereoquímica del sustituyente en C-1, impidió establecer de manera inequívoca la orientación del sustituyente.

Figura 7. Representación mediante proyecciones de Newman del efecto γ -gauche que ejerce el sustituyente en C-1 sobre C-9.

HIDROXILO CON ORIENTACION α



HIDROXILO CON ORIENTACION β



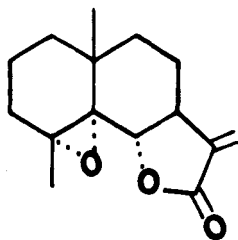
Con respecto a la estereoquímica del epóxido en C-4/C-5,

la similitud de los desplazamientos químicos de H-6 y H-7, con los correspondientes para la 4,5-epoxi-dihidroarbusculina B (Irvin, *et al.*, 1971), permitió inferir a priori que el epóxido se encontraba α -orientado. En el Cuadro 9, se ilustran comparativamente los desplazamientos químicos de la ratibinólida II y la 4,5-epoxi-dihidroarbusculina B.

Cuadro 9. Comparación de los desplazamientos químicos para H-6, H-7 y H-15 entre la 4,5-epoxi-dihidroarbusculina B y la ratibinólida II

4,5-epoxi-dihidroarbusculina B

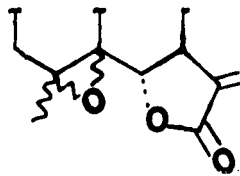
ratibinólida II



H-15 δ 1.56

H-7 δ 3

H-6 δ 4.35



H-15 δ 1.76

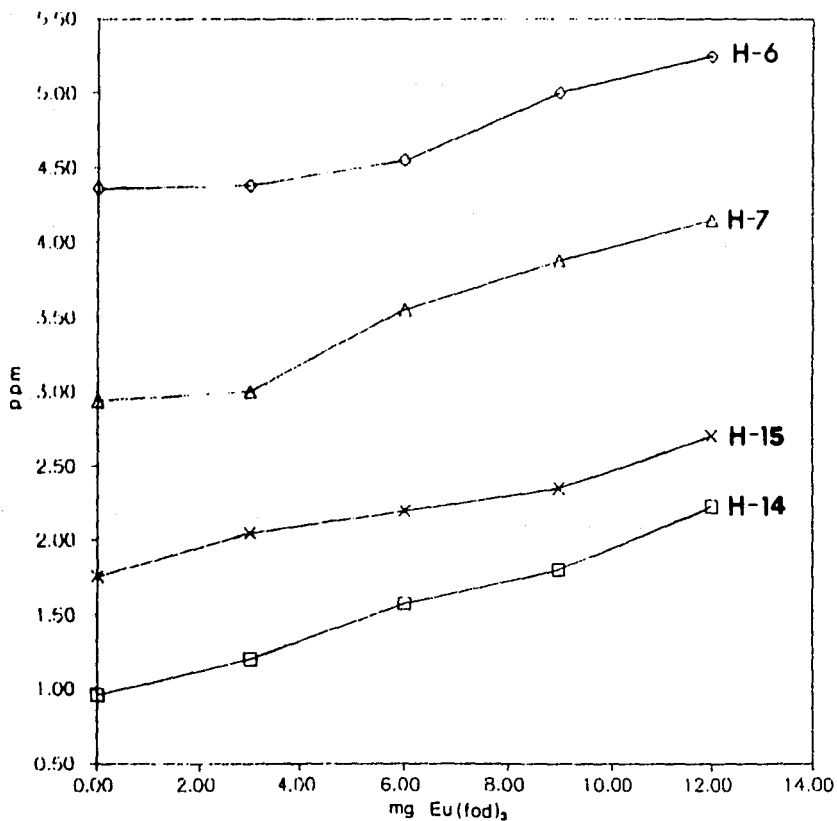
H-7 δ 2.94

H-6 δ 4.36

Con el objeto de confirmar la orientación del hidroxilo en C-1 y del epóxido en C-4/C-5, se registró el espectro de ^1H RMN con adición de un reactivo de desplazamiento de Europio.

Como se puede apreciar en la Figura 8, los hidrogenos más afectados en orden decreciente fueron H-14, H-7, H-6 y H-15.

Figura 8. Efecto paramagnético inducido por el reactivo de desplazamiento sobre H-6, H-7, H-14 y H-15 de la ratibinólida II.

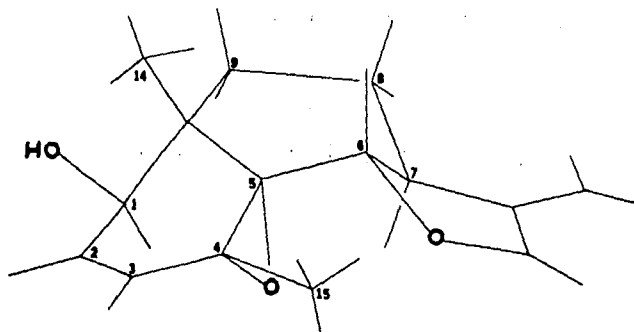


El desplazamiento paramagnético significativo observado para

H-7, era consistente con su proximidad espacial al epóxido, y en consecuencia con la orientación α de este último. En la estructura visualizada mediante el modelo Dreiding (Figura 9), se puede observar claramente la cercanía entre H-7 y el epóxido α -orientado.

Asimismo, el efecto sobre H-14 era congruente con la disposición β del hidroxilo en C-1. Finalmente cabe mencionar, que la desprotección observada tanto para H-15 como para H-6, se debe a la cercanía de los mismos al epóxido y al oxígeno etéreo de la lactona respectivamente.

Figura 9. Estructura visualizada mediante el modelo Drieding de la ratibínólida II.



Con base en las evidencias discutidas, se propone la estructura 35 para la ratibínólida II, una nueva eudesmanólida. Las constantes físicas y espectroscópicas del compuesto se incluyen en el Cuadro 10.

4.3 Identificación de la hispidulina 36

Al recromatografiar las fracciones no activas 166-173 de la columna original (Cuadro 5) se obtuvo el compuesto 36 como un polvo amarillo soluble en metanol.

El compuesto presentó un comportamiento cromatográfico en capa fina típico de un flavonoide. Su espectro de IR (Espectro 11) mostró bandas características de absorción para hidroxilo (3400 cm^{-1}), carbonilo de γ -pirona (1660 cm^{-1}) y aromaticidad (1615 , 1580 y 1500 cm^{-1}). Las bandas a 333 y 272 nm en el espectro de UV (Espectro 12) sugirieron que se trataba de una flavona (Markham, 1982).

El espectro de $^1\text{H RMN}$ (Espectro 13) mostró señales para:

- dos hidroxilos fenólicos a $\delta 10.49$ - 10.85 . El desplazamiento a campos muy bajos para uno de ellos, indicó que existía un grupo OH en la posición 5 (Markham, 1982).
- un sistema A_2B_2 típico de un anillo aromático para-sustituido [$\delta 6.95$ (d), $J_{ortho}=8.5\text{ Hz}$, H-3',5' y $\delta 7.95$ (d), $J_{ortho}=8.5\text{ Hz}$, H-2',6'], assignable al anillo C de una flavona 4'-oxigenada.
- el H-3 del núcleo de flavona en $\delta 6.61$ (s) y un hidrógeno de un anillo aromático pentasustituido a $\delta 6.8$ (s).
- un metoxilo aromático en $\delta 3.75$ (s).

La naturaleza trifenólica de la molécula, se confirmó químicamente mediante la obtención del derivado triacetilado. El espectro de $^1\text{H RMN}$ de éste (Espectro 114, mostraba tres señales para metilo de acetato, una de ellas ($\delta 2.5$),

consistente con la presencia de un grupo acetoxi en C-5. El desplazamiento paramagnético ($\Delta\delta = .92$ ppm observado para el hidrógeno aromático del anillo pentasustituido indicó su disposición orto y para a dos funciones fenólicas, en consecuencia este hidrógeno debía corresponder al H-8 de la flavona. Se observó también, un desplazamiento a campos bajos de una de las ramas del sistema A_2B_2 [δ 6.95 a δ 7.36, H-3',5'] perteneciente al anillo C para-sustituido, por lo que resultaba evidente que el sustituyente en C-4 era un hidroxilo.

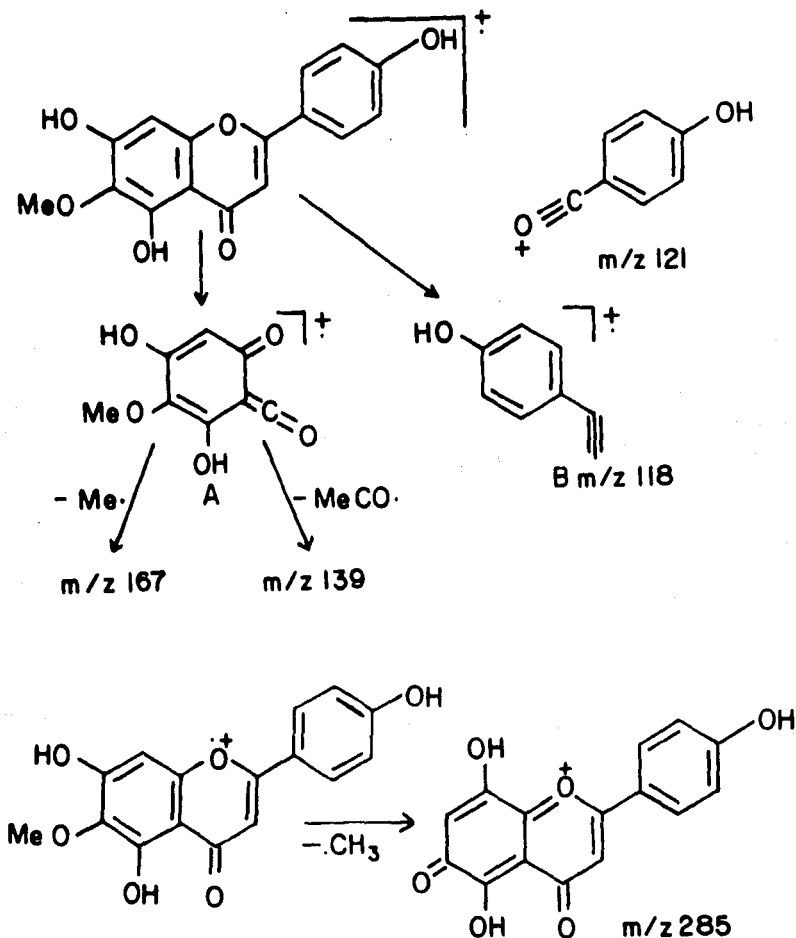
El espectro de masas presentó fragmentos de m/z 285 ($M^+ - 15$), 121, 118, 167 y 139, mediante los cuales fue posible determinar que el metoxilo se localizaba en la posición 6 del esqueleto base y confirmar que el sustituyente en C-4' era un hidroxilo (Kingston, 1971). En la Figura 10 se ilustran los fragmentos más importantes.

Finalmente, la presencia del tercer hidroxilo en posición 7, se confirmó cuando al registrar el espectro de UV en presencia de acetato de sodio, se observan los desplazamiento batocrómicos que eran de esperarse para las bandas I y II (Liu, 1981).

Con base en el análisis anterior, se identificó a la flavona como la 5,7,4'-trihidroxil-6-metoxi-flavona (hispidulina) (Herz, 1964), la cual ya había sido aislada previamente de R. columnifera (Herz, 1985). Las constantes físicas y espectroscópicas de la hispidulina se resumen en el

Cuadro 11 y resultaron idénticas a las descritas en la literatura (Liu, 1980).

Figura 10. Fragmentos más importantes del espectro de masas de la hispidulina.



4.4 Identificación del β -sitosterol 34

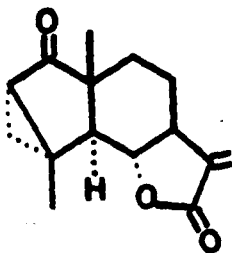
De las fracciones 93-124 de la columna original se aisló el β -sitosterol el cual se caracterizó por comparación con una muestra auténtica siguiendo la metodología convencional.

4.5 CONSTANTES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS

Y

ESPECTROS

Cuadro B. Constantes físicas y espectroscópicas de la ratibinólida I, 33.



F.M.

$C_{13}H_{18}O_3$

P.F.

142-144°C

KBr
IR $\nu_{cm^{-1}}$
max.

3040, 2925, 2850, 1770, 1730, 930

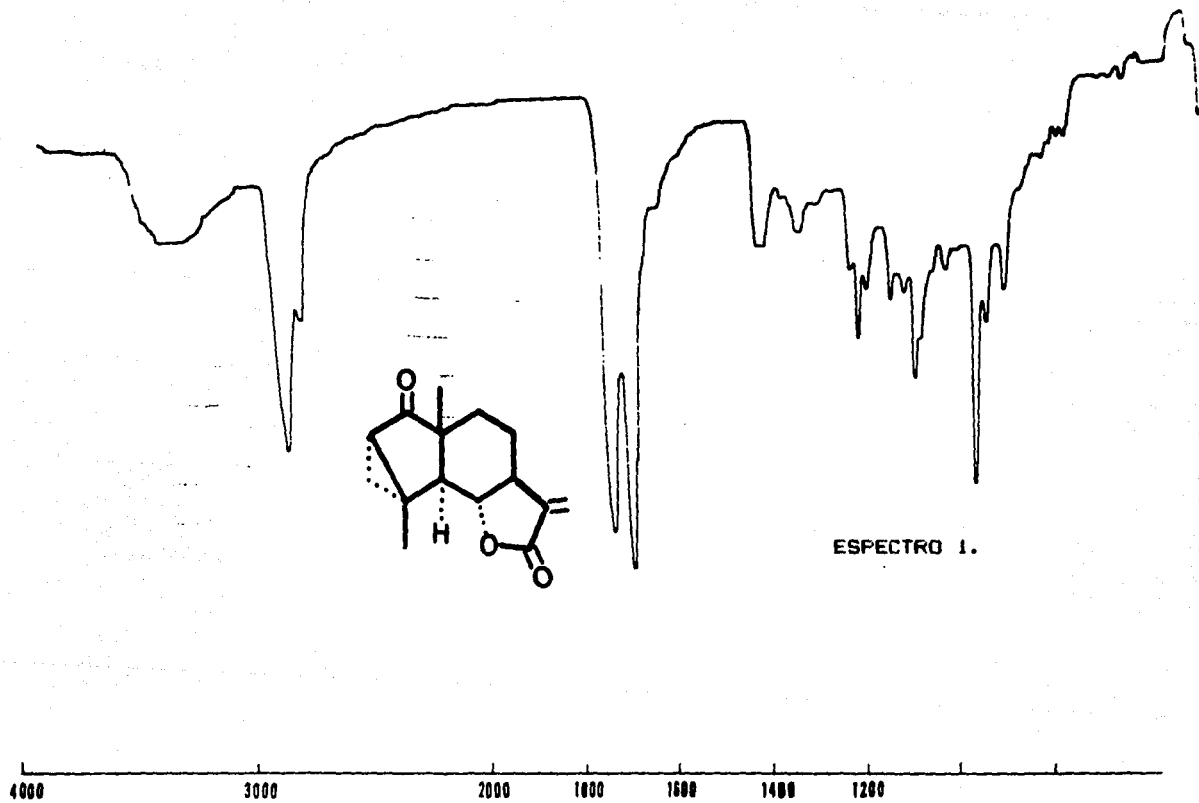
ESPECTRO 1.

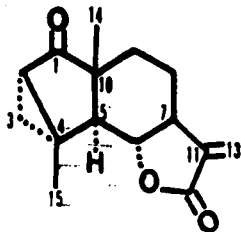
1H RMN ($CDCl_3$, δ):
300 MHz
ESPECTROS 2 y 5.

6.16 ($J_{7-13}=3Hz$, H-13'), 5.41 (d, $J_{7-13}=3Hz$, H-13), 4.20 (dd, $J_{5-6}=J_{6-7}=11.5Hz$, H-6), 2.35 (m, $J_{6-7}=11.5Hz$, $J_{7-8}=10Hz$, $J_{7-13}=3Hz$, H-7), 2.06 (br d, $J_{8-9}=14Hz$, H-8a), 1.8 (m, H-2), 1.72 (d, $J_{5-6}=11.5Hz$) 1.67 (d, $J_{9-10}=14Hz$, H-9b), 1.60 (ddd, $J_{9-10}=14Hz$, $J_{7-10}=11.5Hz$, $J_{10-11}=4Hz$, H-8b), 1.46* (s, H-14), 1.42 (m, H-9a), 1.27* (s, H-15), 1.22-1.32 (m, H-3b), 1.08 (dd, $J_{3a-3b}=J_{2-3a}=4Hz$, H-3a).

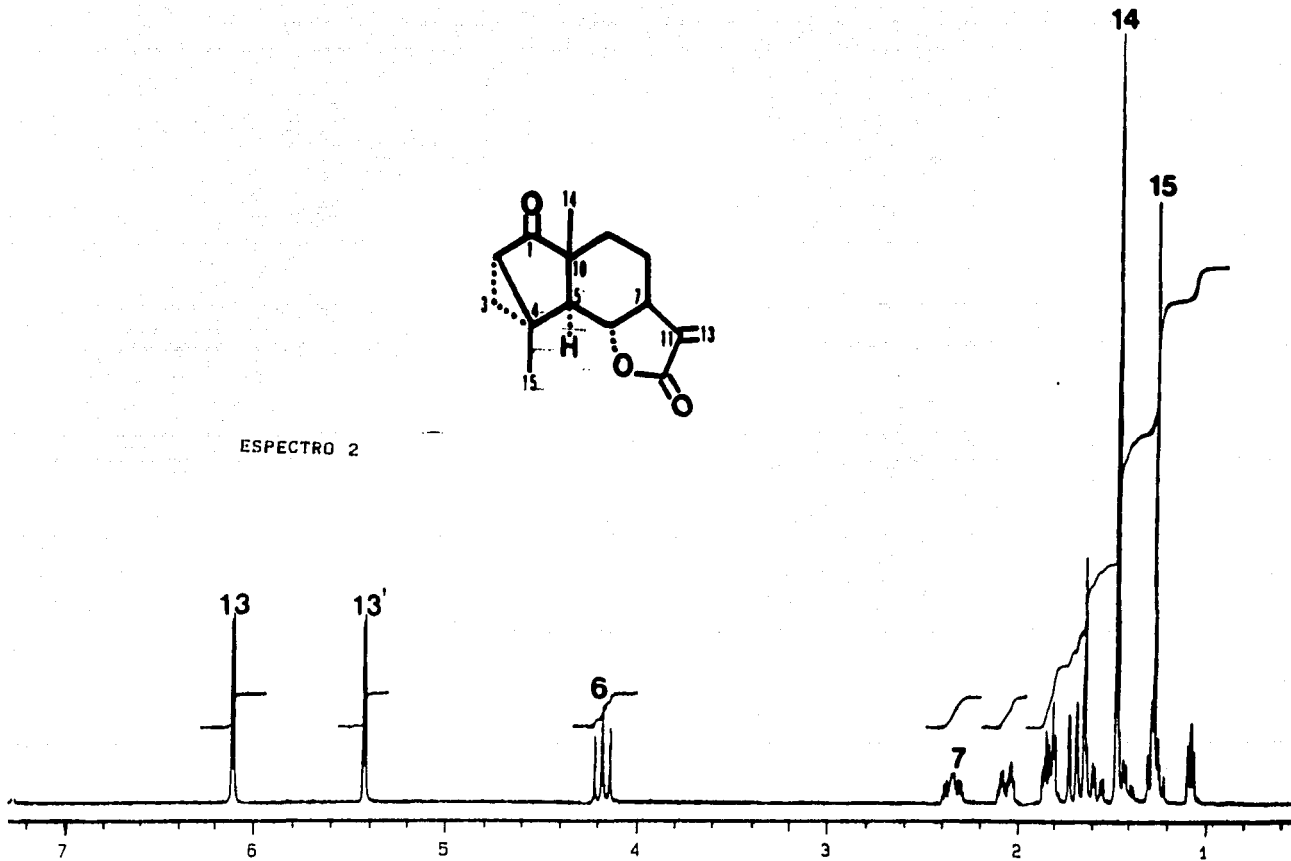
^{13}C RMN ($CDCl_3$, δ):
300 MHz
ESPECTROS 3 Y 4.

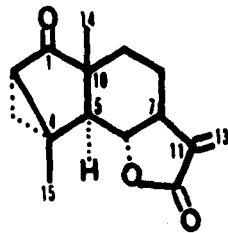
221.22 (s, C-1), 170.42 (s, C-12)
138.07 (s, C-11), 111.22 (t, C-13)
79.85 (d, C-6), 59.26 (s, C-10),
55.07 (d, C-5), 52.04 (d, C-7),
32.96 (d, C-2), 29.68* (t, C-3),
29.92* (t, C-9), 25.90 (s, C-4),
20.54 (t, C-8), 19.32 (c, C-14),
16.81 (c, C-15).





ESPECTRO 2





ESPECTRO 3.

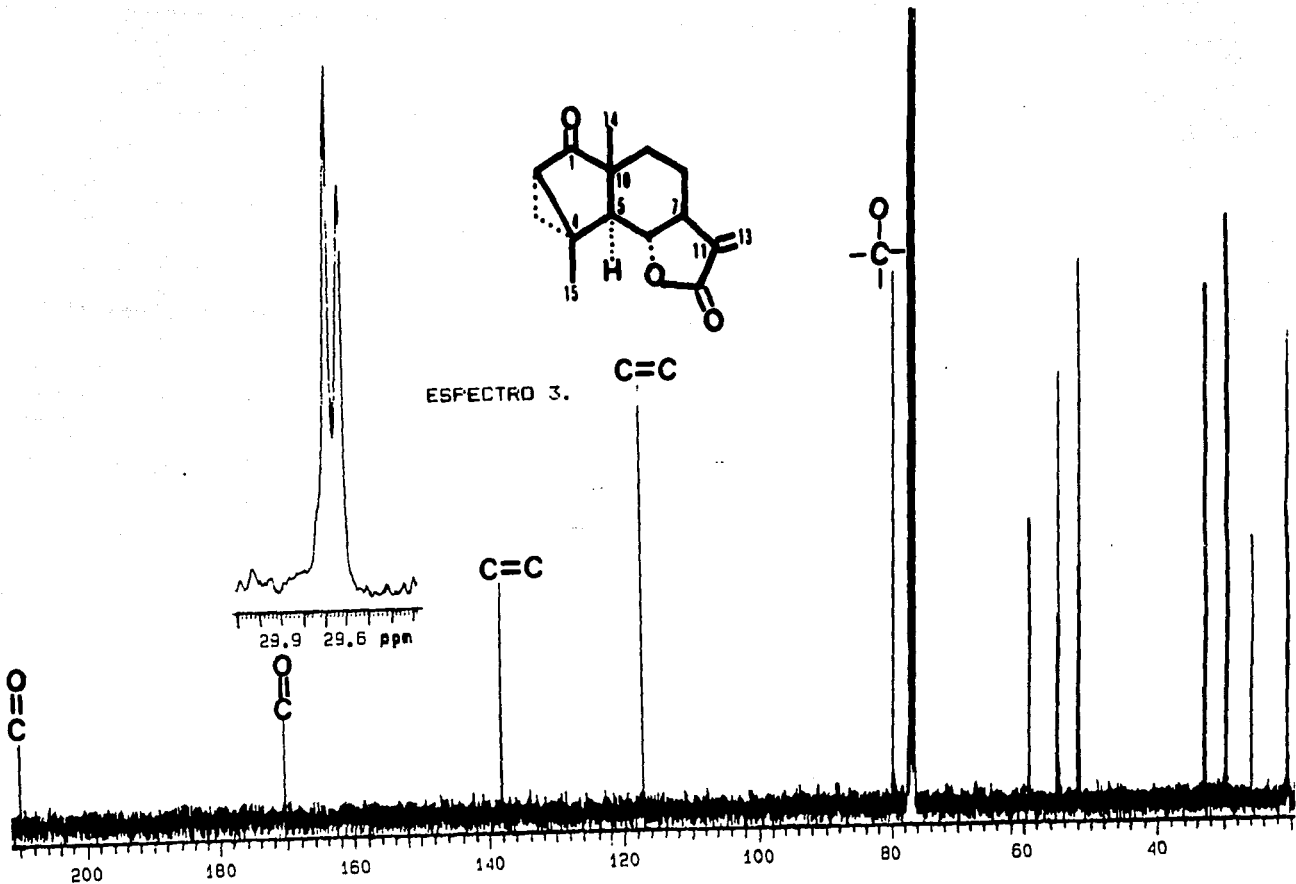
C=C

C=C

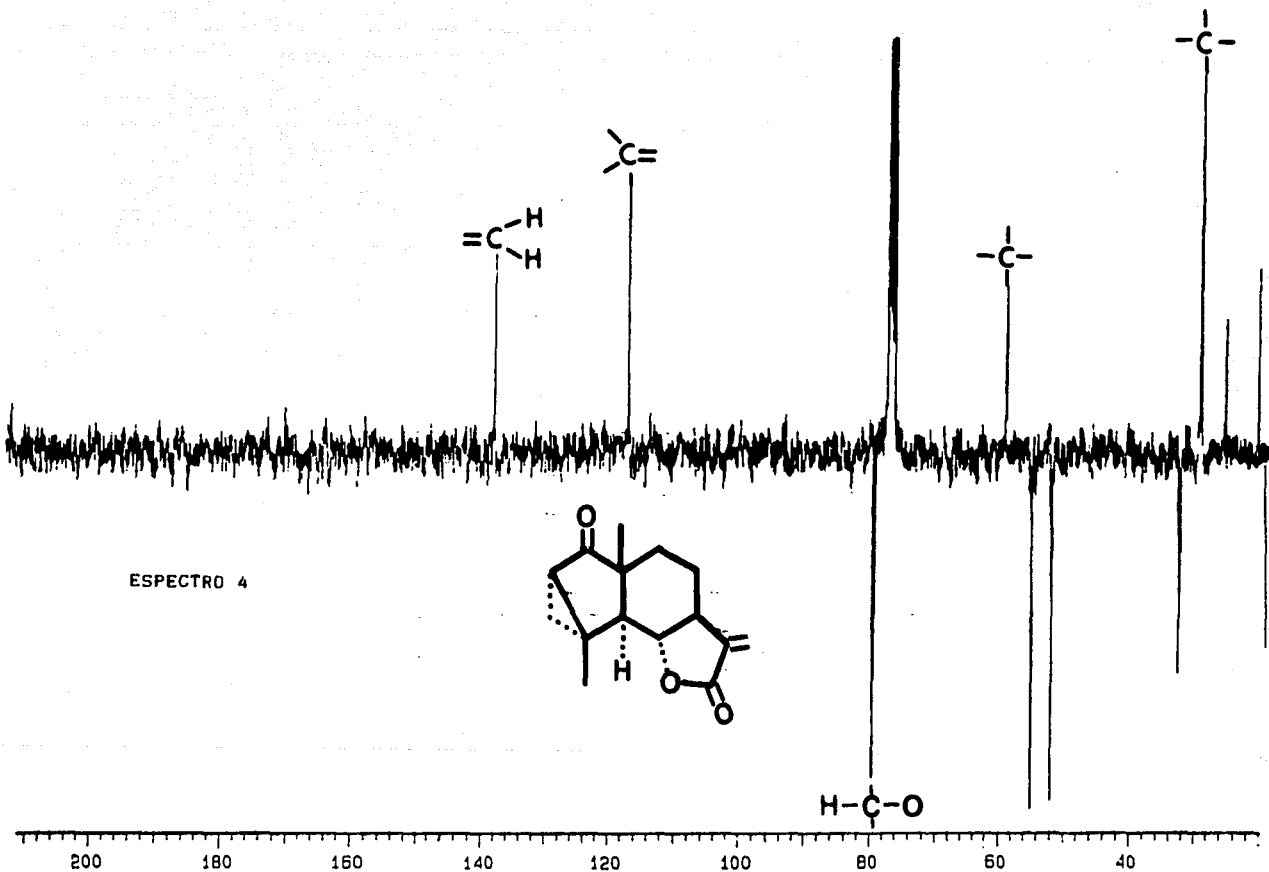
29.9 29.6 ppm

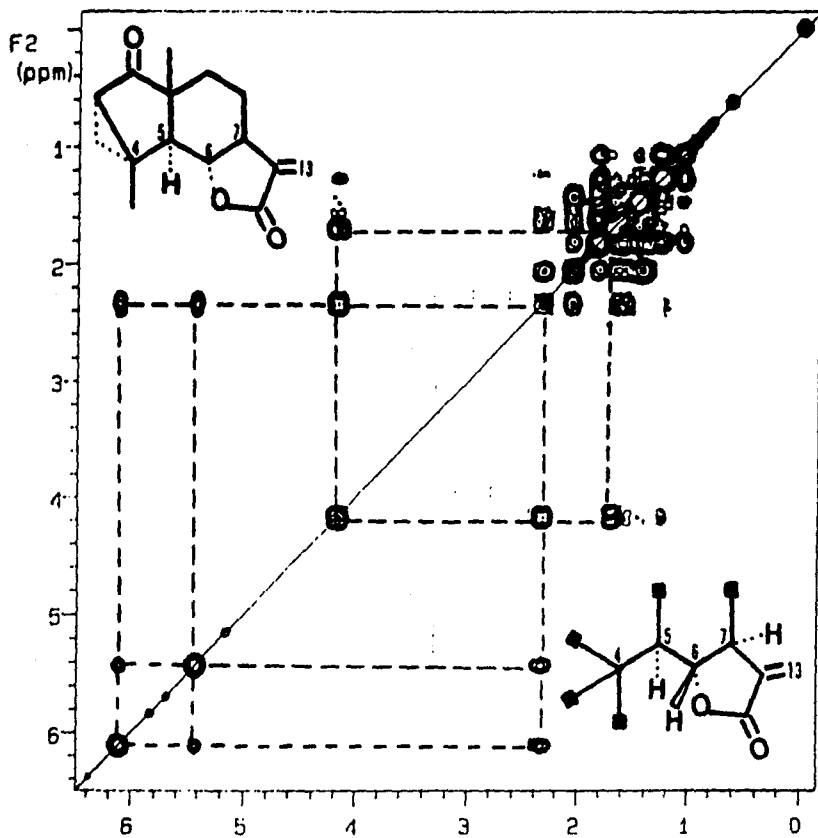
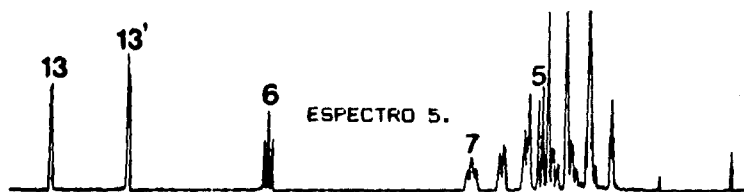
C=O

C=O

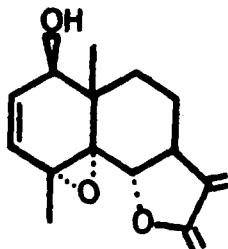


ESPECTRO 4





Cuadro 10. Constantes físicas y espectroscópicas de la ratibinólida II, 35



F.M.

$C_{15}H_{18}O_4$

P.F.

276-280°C

KBr
IR ν cm^{-1}
max.
ESPECTRO 6.

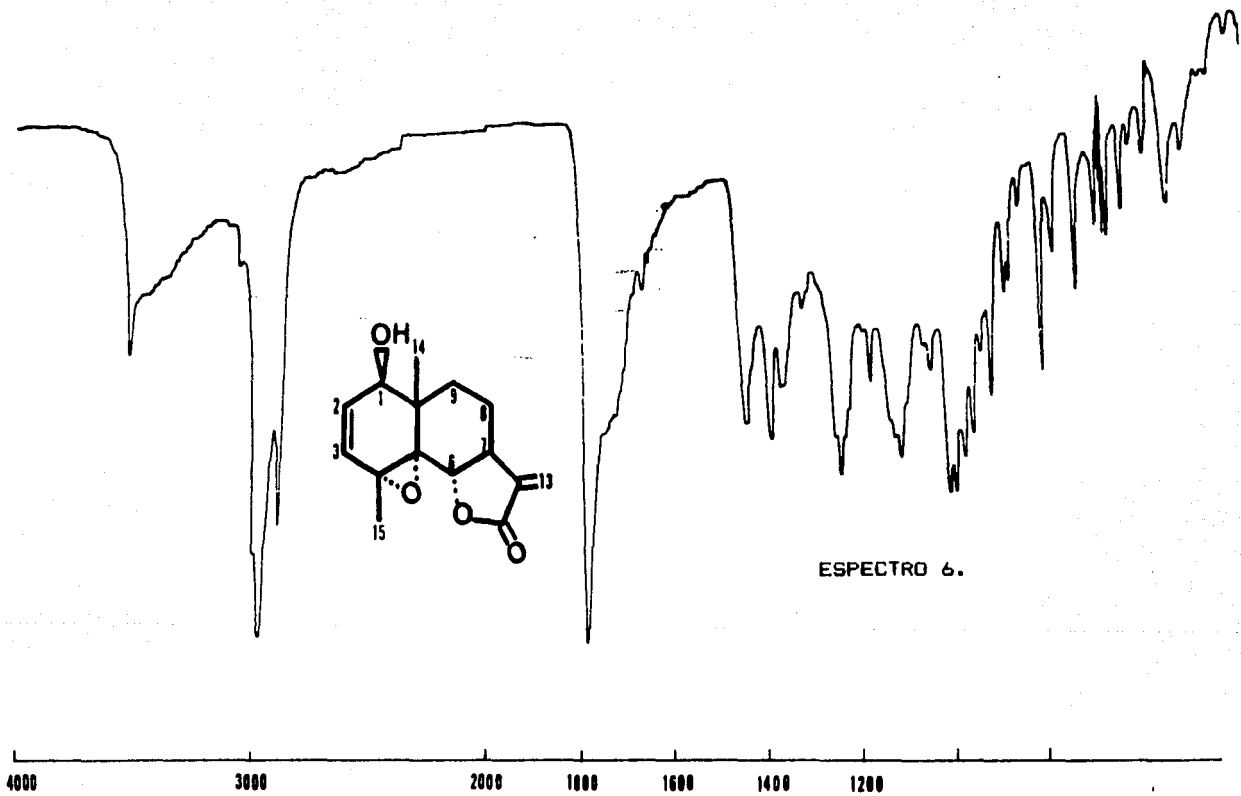
3500, 3040, 2925, 2850, 1770

1H RMN ($CDCl_3$, δ):
300 MHz
ESPECTRO 7

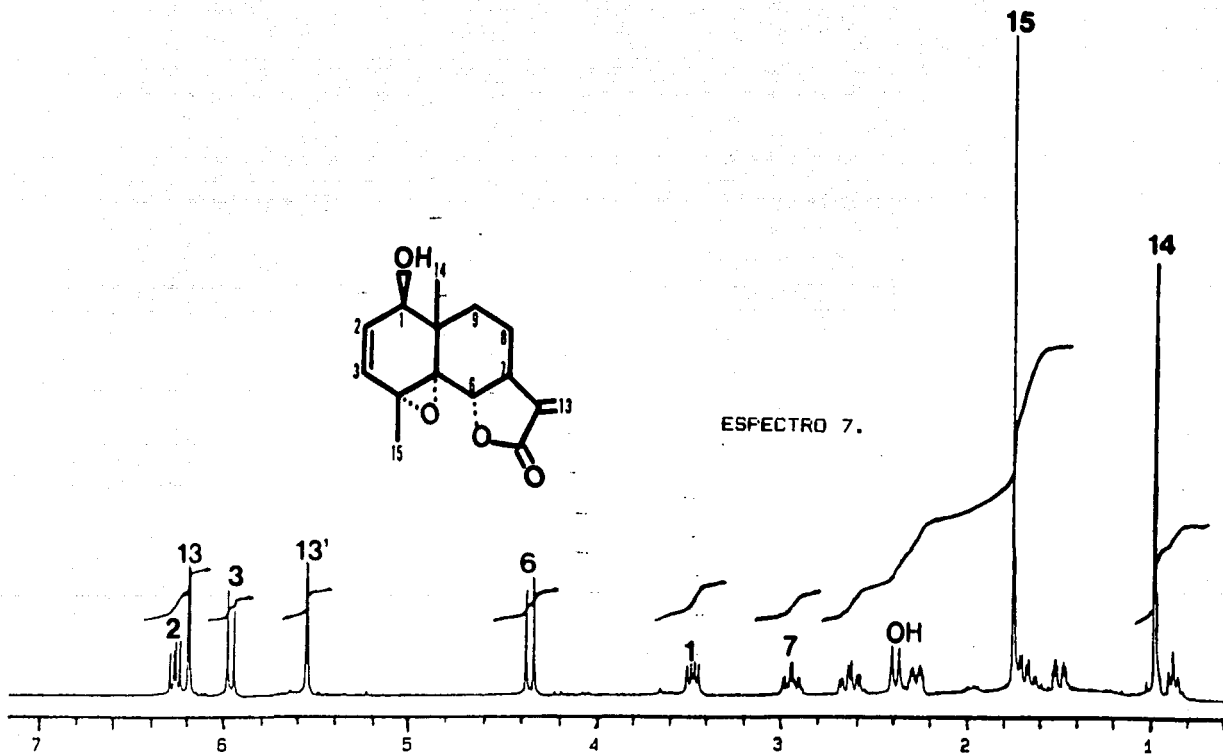
6.28 (dd, $J_{2-3}=8.7Hz$, $J_{1-2}=5.8Hz$, H-2), 6.2 (d, $J_{7-13}=4Hz$, H-13'), 5.98 (d, $J_{2-3}=8.7Hz$, H-3), 5.56 (d, $J_{7-13}=4Hz$, H-13), 4.36 (d, $J_{4-7}=11.6Hz$, H-6), 3.48 (dd, $J_{1-2}=5.8Hz$, $J_{6H-1}=11.6Hz$, H-1), 2.94 (ddd, $J_{4-7}=11.6Hz$, $J_{7-13}=4Hz$, H-7), 2.64 (m, $J_{9\alpha-9\beta}=14Hz$, H-9 β), 2.4 (d, $J_{6H-1}=11.6Hz$, OH), 2.28 (m, $J_{9\alpha-9\beta}=14Hz$, $J_{9\alpha-9\beta}=11.6Hz$, $J_{9\alpha-9\beta}=4Hz$, H-9 α), 1.7 (ddd, $J_{8\alpha-8\beta}=14Hz$, $J_{7-8\beta}=J_{8\alpha-9\alpha}=11.6Hz$, $J_{8\beta-9\beta}=4Hz$, H-8 β), 1.5 (m, $J_{8\alpha-8\beta}=14Hz$, H-8 α), 1.76 (s, H-15), .96 (s, H-14)

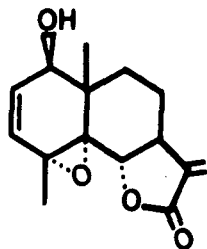
^{13}C RMN ($CDCl_3$, δ):
300 MHz
ESPECTROS 9 Y 10.

169.57 (s, C-12), 137.81 (s, C-11)
134.24* (d, C-2), 132.28* (d, C-3)
118.93 (t, C-13), 77.28 (d, C-6)
72.63 (d, C-1), 71.63 (s, C-4),
61.99 (s, C-5), 45.87 (d, C-7),
39.67 (s, C-10), 29.80 (t, C-9),
22.03 (t, C-8), 21.54 (c, C-15),
18.65 (c, C-14).



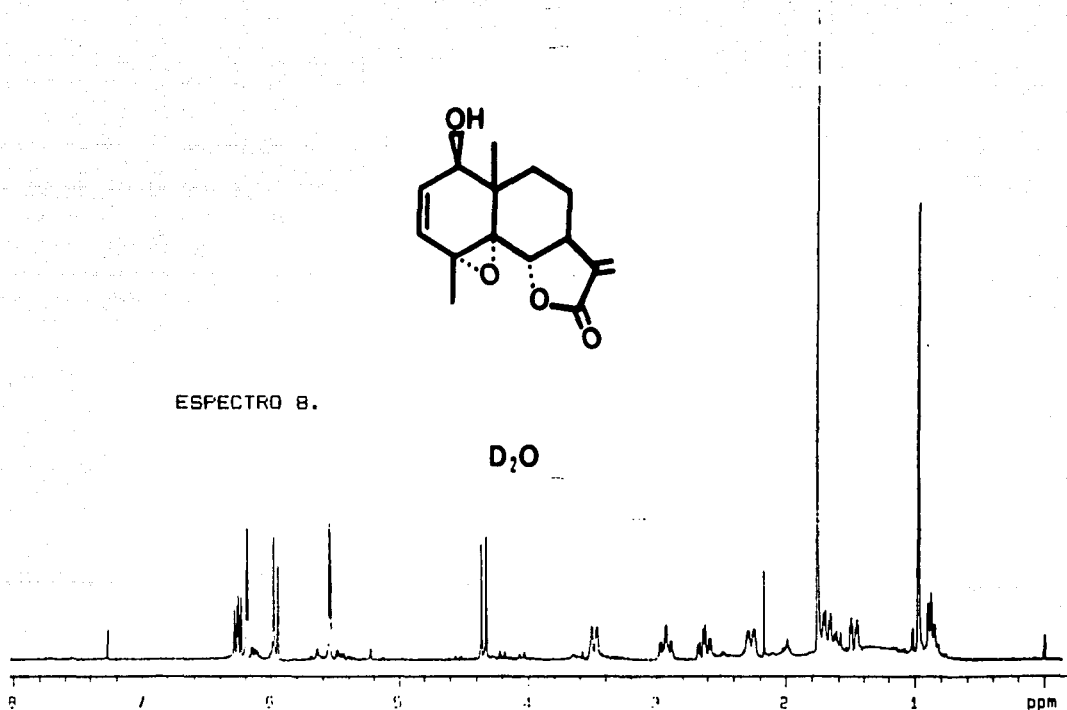
ESPECTRO 6.



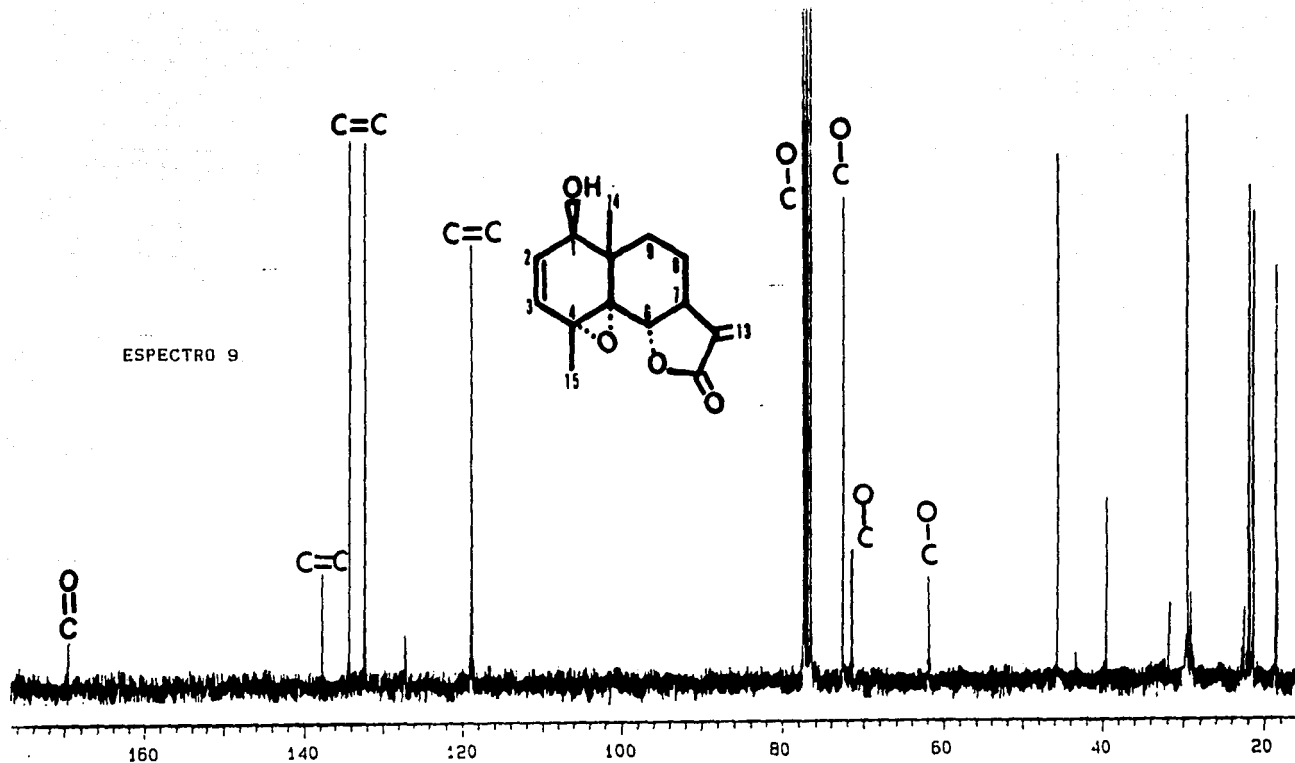


ESPECTRO 8.

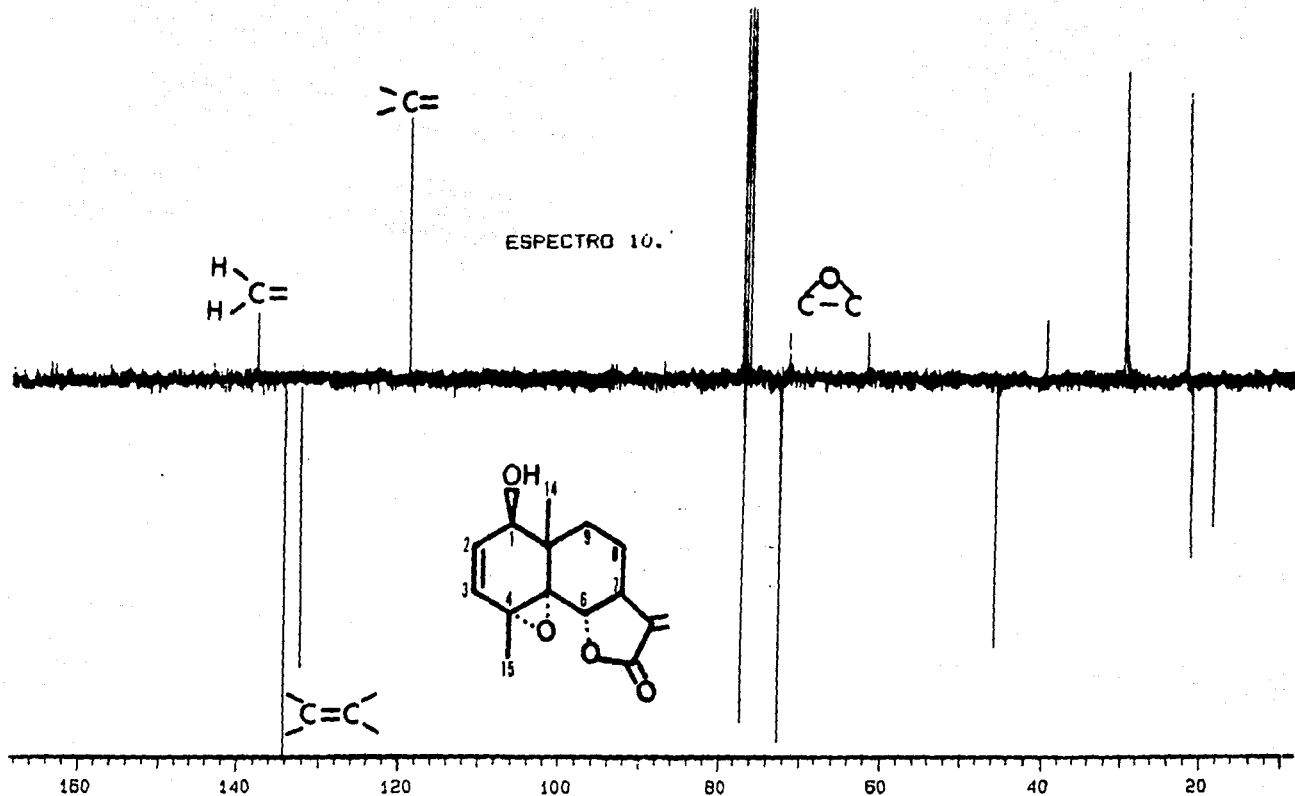
D₂O



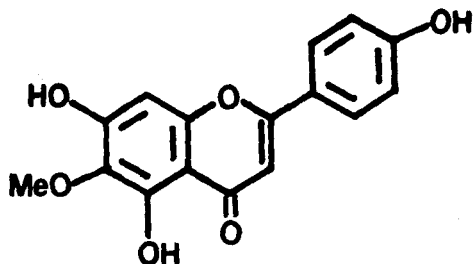
ESPECTRO 9



ESPECTRO 10.



Cuadro 11. Constantes físicas y espectroscópicas de la hispidulina, 36.



F.M.

$C_{16}H_{12}O_6$

P.F.

291-292°C

KBr
IR ν cm^{-1}
max
ESPECTRO 11.

3400, 1660, 1615, 1580, 1500

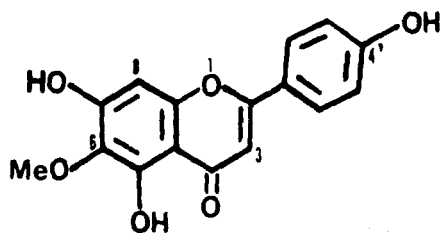
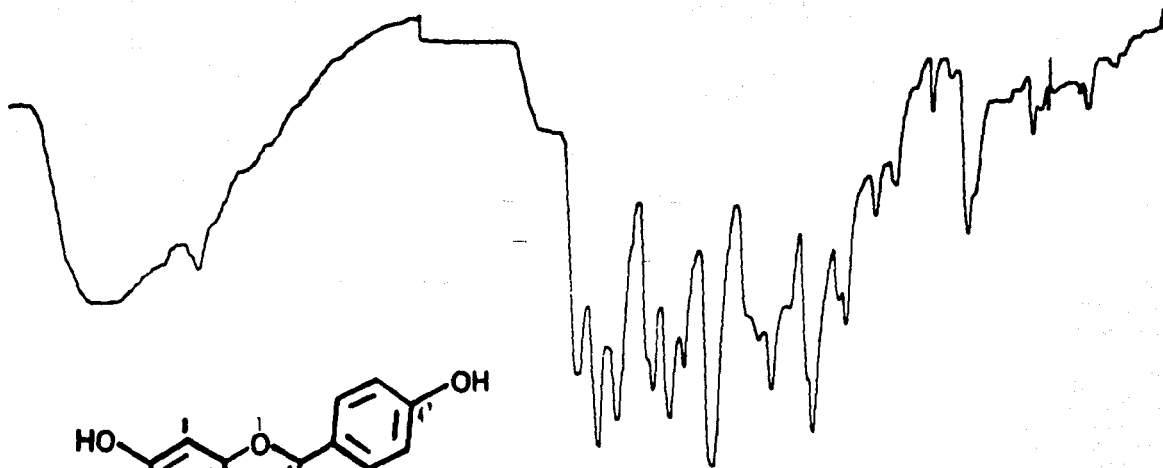
MeOH
UV λ nm
max
ESPECTRO 12.

272, 233

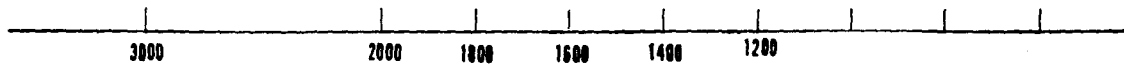
E.M.I.E. m/z (int.rel.) 300 (100) M^+ , 285 (50), 167 (15),
139 (25), 121, 118, 69.

1H RMN ($CDCl_3$, δ):
ESPECTRO 13

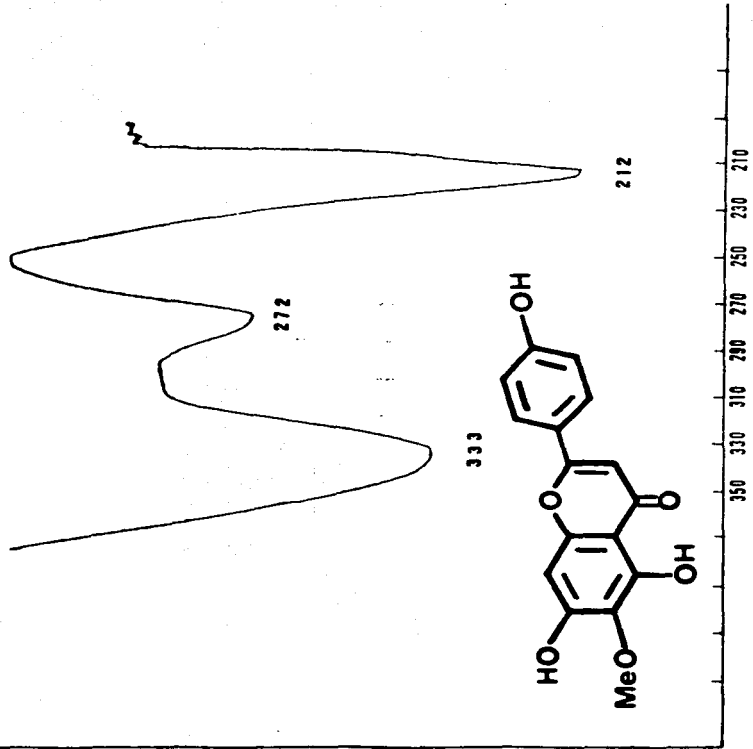
10.49-10.85 (OH), 7.95 (d, $J=8.5$ Hz,
H-2',6'), 6.95 (d, $J=11.5$ Hz,
H-3',H-5'), 6.79 (s, H-8), 6.61
(s, H-3), 3.75 (s, 6-OMe).

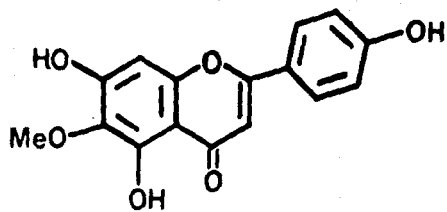


ESPECTRO 11.

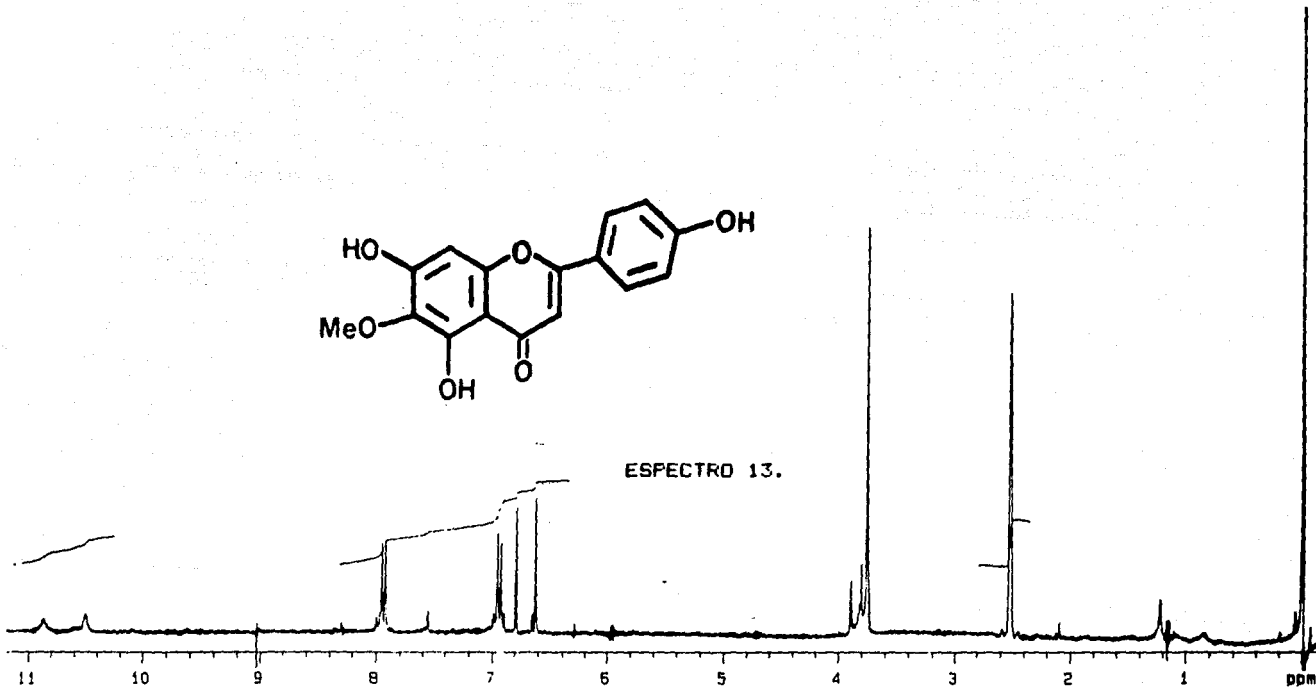


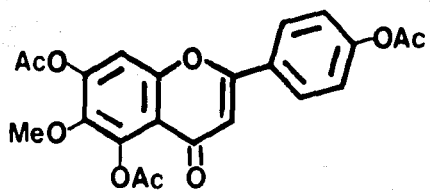
ESPECTRO 12.



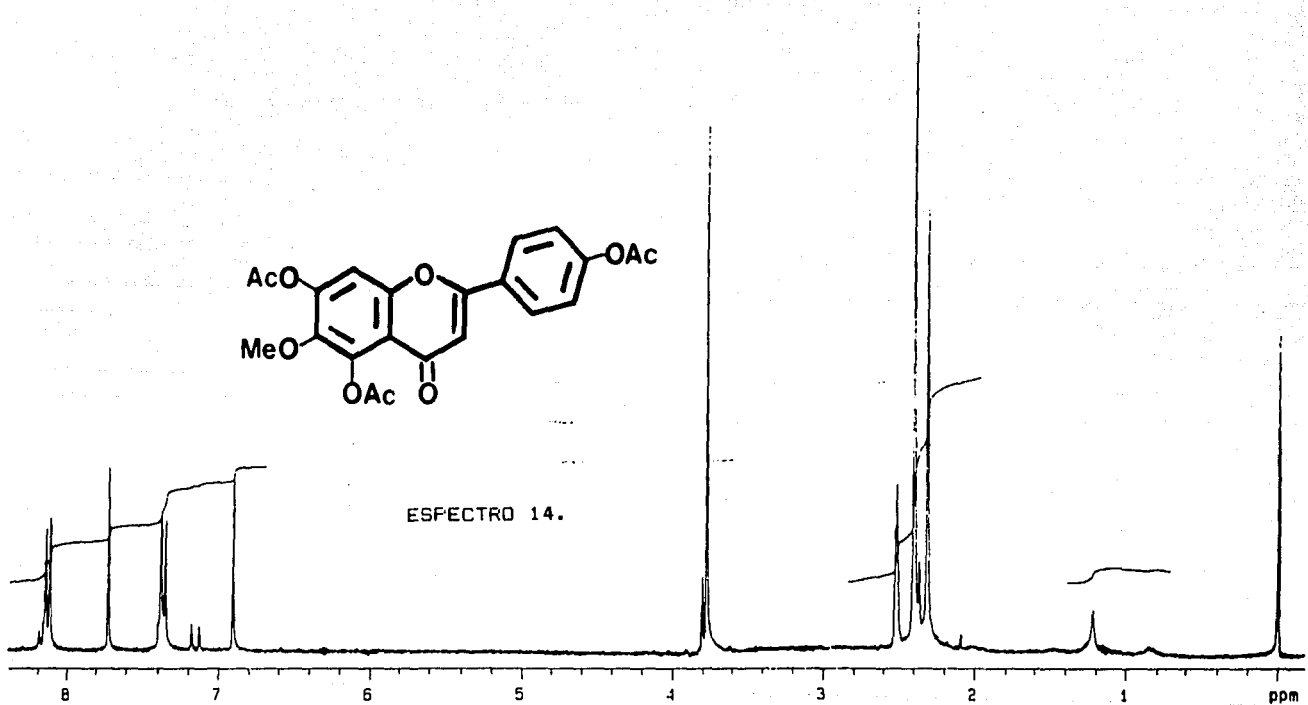


ESPECTRO 13.





ESPECTRO 14.



5.0 CONCLUSIONES

Las conclusiones que se derivan del presente Capitulo son las siguientes:

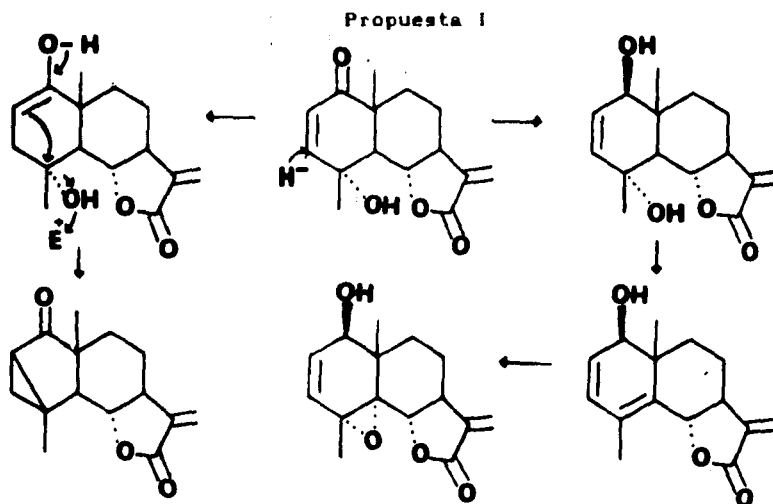
1.- El estudio fitoquímico biodirigido de Ratibida latipalearis Richards mediante la determinación de la toxicidad para Artemia salina, condujo al aislamiento e identificación de dos nuevas lactonas sesquiterpénicas denominadas genéricamente ratibinólida I ($LC_{50}=62.74 \mu\text{g/ml}$) y ratibinólida II ($LC_{50}=69.53 \mu\text{g/ml}$). En ambos casos, sus estructuras fueron caracterizadas por métodos espectroscópicos. La estructura de la ratibinólida I se confirmó mediante un estudio de difracción de Rayos X. Adicionalmente, se obtuvieron dos compuestos inactivos caracterizados como el β -sitosterol y la hispidulina (5,7,4'-trihidroxi-6-metoxi-flavona).

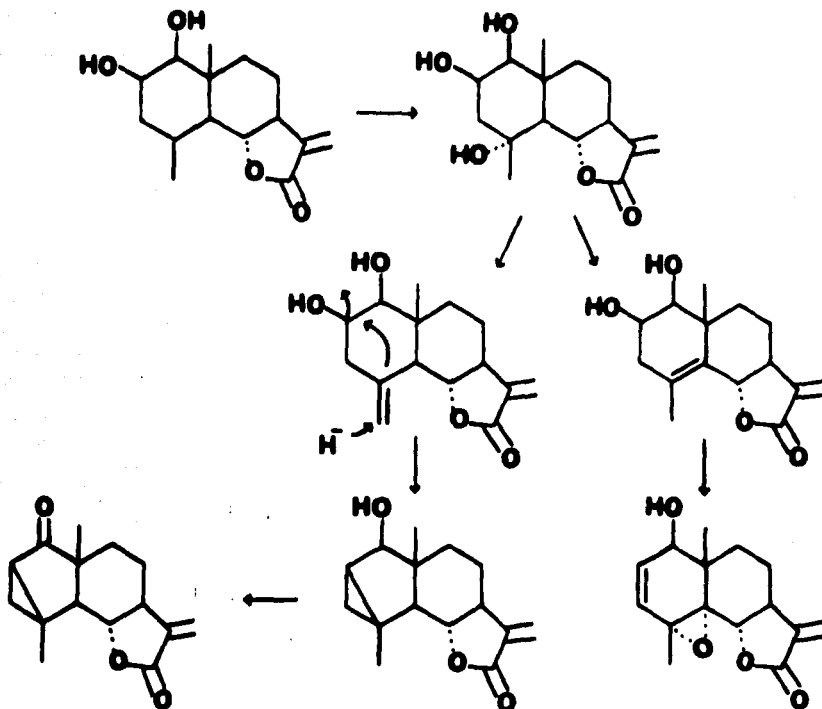
2.- La ratibinólida I representa la tercer lactona sesquiterpénica con núcleo de geigerano. El primer compuesto de este tipo, la brotenólida (Takeda, et al., 1980), fue obtenido de la hepática Frullania brotheri. Posteriormente, Bohlmann y col. aislaron la gerigeranólida de una especie del género Geigeria (Asteracea) (Bohlmann, et al., 1982), el cual no se encuentra relacionado con Ratibida. Este segundo grupo consideró al núcleo carbonado como novedoso y lo denominó de

manera genérica como geigerano; desconociendo indudablemente el trabajo previo del grupo de Takeda.

3.- A diferencia de los estudios previos, en la presente investigación no se aislaron lactonas sesquiterpénicas del tipo de las xantánólidas, que hasta la fecha parecían ser las lactonas características de este género (Herz, *et al.*, 1985; Ellmauerer, *et al.*, 1987).

4.- Desde el punto de vista biogenético, tal como lo propusiera Bohlmann (Bohlmann, *et al.*, 1982), es factible que la ratibinólida I se originara a partir de un intermediario de tipo eudesmano que presentara sustituyentes oxigenados en las posiciones 1 y 2. La coexistencia de la ratibinólida I y la ratibinólida II, permiten especular la existencia de un precursor común para ambos compuestos como se indica en la dos siguientes propuestas biogenéticas.





5.- En este trabajo queda demostrado una vez más, la utilidad de conducir el estudio fitoquímico de manera biodirigida, ya que se logró el aislamiento de sustancias bioactivas que se encontraban presentes en muy pequeñas cantidades, las cuales mediante un estudio convencional, posiblemente no habrían podido ser detectadas. Los niveles de toxicidad presentados por ambas lactonas sesquiterpénicas, sugieren la posibilidad de que las mismas posean actividades biológicas más complejas. En la actualidad se está reinvestigando la planta con la finalidad de obtener mayor cantidad de los compuestos y explorar así su actividad antitumoral potencial.

CAPITULO 2

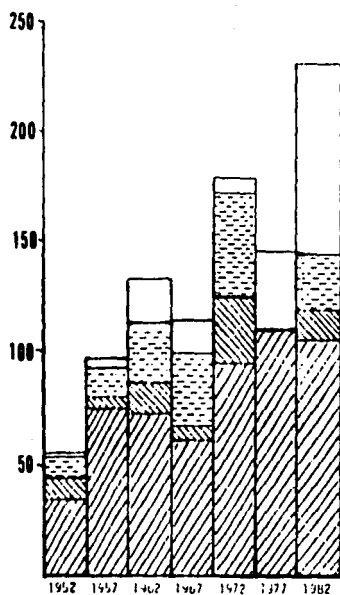
EVALUACION PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POTENCIAL DE VARIOS METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE PLANTAS MEXICANAS USADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL

1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

Desde épocas remotas el hombre ha usado extractos vegetales y productos derivados de los mismos para el tratamiento de numerosas enfermedades infecciosas. Durante mucho tiempo el empleo de esos agentes terapéuticos, otrora efectivos, y la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos de origen vegetal, se ha visto opacado debido a la gran revolución ocasionada por los antibióticos derivados de microorganismos o sus análogos sintéticos, y que data desde los primeros ensayos clínicos de la penicilina en 1921.

Sin embargo, desde la década pasada, ha resurgido notablemente el interés por los agentes antimicrobianos derivados de plantas, como lo demuestra la abundante literatura que se ha publicado en relación al tema durante ese periodo (ver Figura 11). El uso de técnicas microbiológicas modernas, ha permitido demostrar que los extractos de plantas superiores de diversos géneros y familias, poseen una actividad significativa en contra de numerosas bacterias y hongos patógenos.

Figura 11. Descubrimiento de nuevos antibióticos entre 1952 y 1982 y sus fuentes naturales



Otras fuentes



Derivados de hongos



Derivados de bacterias



Derivados de estreptomicetos



Los principios activos responsables de la actividad biológica, pertenecen a diversas categorías de metabolitos secundarios, tales como alcaloides, cumarinas, bifenílos, cromanos, dihidrofenantrenos, flavonoides, quinonas y saponinas (Mitscher, et al., 1987). Los espectros antimicrobianos de estos productos, son más reducidos que los de los antibióticos derivados de microorganismos, pero en general sus potencias son bastante buenas.

En este reciente interés por agentes antimicrobianos de origen vegetal, la medicina tradicional ha desempeñado un papel muy importante como criterio para la selección de plantas con principios potencialmente antimicrobianos. Un ejemplo representativo lo constituye un estudio sistemático de especies medicinales del género Erythrina (Leguminosae), de donde se han aislado gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Mitscher, et al., 1987).

En general, las investigaciones conducentes a la obtención de principios activos antimicrobianos, se han realizado mediante procedimientos biorientados y alternativamente mediante métodos fitoquímicos tradicionales seguidos de las evaluaciones biológicas correspondientes. En el primer caso, los resultados han sido mucho más satisfactorios. Independientemente de la estrategia empleada, los ensayos se realizan con una serie de microorganismos de prueba que incluyen bacterias Gram positivas (Bacillus subtilis y Staphylococcus aureus), Gram negativas (Escherichia

coli, Pseudomona aeruginosa, Salmonella gallinarum, Kleibsell
pneumoniae), levaduras (Candida albicans) y hongos. La
suceptibilidad de tales microorganismos al agente potencial
antimicrobiano se determina en dos fases: en la primera se
realiza un ensayo cualitativo primario que permite detectar la
presencia o ausencia de actividad. En la segunda, se
cunatifica la potencia relativa (Mitscher, et al., 1987).

Para realizar el ensayo primario, generalmente se utiliza
el método de difusión en placa de agar, en el cual las
muestras a probar (extractos, fracciones o compuestos puros),
se adicionan sobre perforaciones realizadas en una placa de
agar previamente inoculada con el microorganismo de prueba.
Después de un periodo de incubación apropiado, se examina la
placa en busca de zonas de inhibición del crecimiento
microbiano alrededor de las perforaciones (Clark, et al.,
1981).

En el ensayo secundario, a una serie de tubos que
contienen el medio de cultivo adecuado y el microorganismo de
prueba, se adicionan cantidades crecientes del compuesto
objeto de la evaluación. Después de la etapa de incubación, se
determina la cantidad más pequeña del agente requerida para
inhibir el desarrollo de microorganismo, a esta concentración
se le conoce con el nombre de Concentración Mínima Inhibitoria
(MIC) (Pelczar, 1982).

En el caso particular de México, existen varias plantas
que son utilizadas en la medicina tradicional para el

tratamiento de los más diversos padecimientos infecciosos y a la fecha son escasos, por no decir inexistentes, los estudios realizados para la búsqueda de agentes antimicrobianos. Entre esas plantas podemos mencionar la Hintonia latiflora, la Hippocratea excelsa, el Amphypterynium adstringens y la Dodonaea viscosa, por tan sólo mencionar algunas. Estas plantas además poseen otras propiedades medicinales.

Las plantas antes mencionadas han sido objeto de estudios fitoquímicos convencionales, los cuales han permitido el aislamiento y caracterización de numerosos metabolitos secundarios. Sin embargo a la fecha no se ha realizado la evaluación de los mismos como agentes potenciales antimicrobianos.

2. OBJETIVOS

Considerando lo antes expuesto, el objetivo fundamental de la presente sección de la tesis es determinar cualitativamente la actividad antimicrobiana potencial de 31 productos naturales obtenidos de plantas mexicanas usadas en la medicina tradicional. Veinticinco de estos productos se obtuvieron de especies con reputación folklórica como agentes antimicrobianos. Por lo que de encontrarse resultados satisfactorios, no solamente se podría validar el uso de las especies, sino que también se generarían posibilidades para el

descubrimiento de principios antimicrobianos a partir de recursos naturales nacionales.

Los compuestos objeto de la evaluación se resumen en el Cuadro 12, en donde además se especifican sus fuentes naturales, el uso popular que se les atribuye a las plantas y las referencias convenientes. En la Figura 12 se ilustran las estructuras correspondientes.

Cuadro 12. Metabolitos evaluados para su determinación cualitativa como potenciales agentes antimicrobianos

	COMPUESTO	FUENTE NATURAL	USO POPULAR DE LA PLANTA	REFERENCIAS
<u>37</u>	7,5,3,4'-Tetrahidroxi-4-fenilcumarina	<u>Hintonia latiflora</u>	Antipalúdica, antiséptica, hipoglucemiante, curar granos, febrífuga, tranquilizante, tratamiento de la bilis, úlcera gástrica.	Camacho, 1990.
<u>38</u>	3',4'-Dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina.	(Rubiácea)		
<u>39</u>	5-O-β-D-Glucopiranosil-7,3,4'-trihidroxi-4-fenilcumarina.			
<u>40</u>	5-O-(6"-Acetil-β-D-galactopiranosil)-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina.			
<u>41</u>	5-O-β-D-Glucopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina.			
<u>*42</u>	5-O-β-Galactopiranosil-3'-4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina.			
<u>43</u>	7-Metil-luteolina.			
<u>44</u>	3-O-β-D-Glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F.			

* Compuesto que resultó activo en un estudio previo

continuacion del Cuadro 12

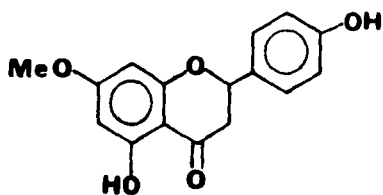
	COMPUESTO	FUENTE NATURAL	USO POPULAR DE LA FLANTA	REFERENCIAS
45	23, 24-dihidrocucurbitacina F.			Reguero, <i>et al.</i> , 1987.
46	25-Acetil-23-24-dihidrocucurbitacina F.			
47	7,4',5', Trihidroxi-4-fenil 5,2'-oxidocumarina.	<u>Exostema caribaeum</u>	Antipaludica	Garcia, 1987.
48	4',5'-Dihidroxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina.	(Rubiacea)		
49	2-β-D-Glucopiranosil-cucurbitacina B.	<u>Cigarrilla mexicana</u>	Emetica, antiambiana.	Mata, <i>et al.</i> , 1988. Castañeda, 1987.
50	2-β-D-Glucopiranosil-cucurbitacina F.	(Rubiacea)		
51	Cucurbitacina F-25-acetato.	<u>Exostema mexicanum</u>	Antimalárica, contra dengue.	Mata, <i>et al.</i> , 1990.
52	Cucurbitacina F.	(Rubiacea)		Albor, 1989.
53	Acido masticadienónico.	<u>Amphypterynqium adstringens</u>	Cicatrizante, calmante, antibiótico,	Calzada, 1989.
54	Acido isomasticadienónico.	(Julianiácea)	disolución de cálculos biliares,	
55	Acido 3-α-hidroxi-masticadienónico.		hipocolesterolemiante, antifebrifuga, anticancerígena y antiulcerosa.	
56	Acido anacárdico.			
57	Anacardaldehido.			

continuacion del Cuadro 12.

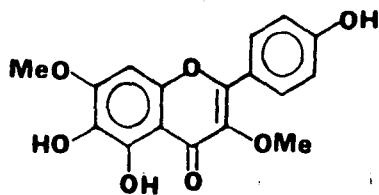
COMPUESTO	FUENTE NATURAL	USO POPULAR DE LA PLANTA	REFERENCIAS
<u>58</u> Canofilol.	<u>Hippocratea excelsa</u>	Afecciones de la piel, amenorrea, infecciones uterinas.	Calzada, 1989.
<u>59</u> Acido canofilico.	(Hippocrateacea)	padecimientos renales, úlceras.	
<u>60</u> Canofilal.			
<u>61</u> 5,4'-Dihidroxi-1-7-metoxi-flavanona.	<u>Dodonaea viscosa</u>	antibacteriana astringente, contra enfermedades venéreas, tratamiento de llagas.	Crisanto, 1990
<u>62</u> 5,6,4'-Trihidroxi-3,7-dimetoxi-flavona.	(Sapindácea)		
<u>63</u> Acido huatriwaico.			
<u>64</u> Pinocembrina.	<u>Teloxys graveolens</u>	Vermífugo, antihelmintico y antiséptico estomacal.	Camacho, 1990.
<u>65</u> Pinostrobina.	(Chenopodiácea)		
<u>66</u> Crisina.			
<u>67</u> Hispidulina	<u>Ratibida latipallearis</u>	Heridas de la piel, inflamaciones y dolores de cabeza.	Ver Capitulo 1
	(Asteracea)		

Figura 12. Estructuras de los metabolitos secundarios evaluados en la determinación preliminar de la actividad antimicrobiana

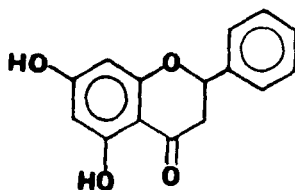
1. FLAVONOIDES



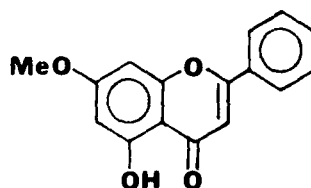
61



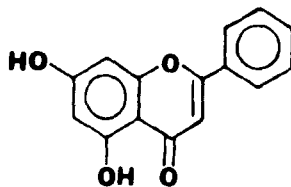
62



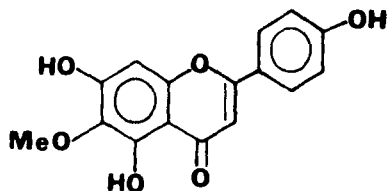
64



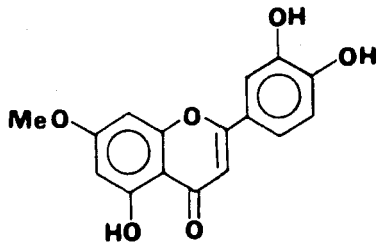
65



66

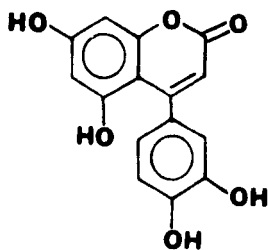


67

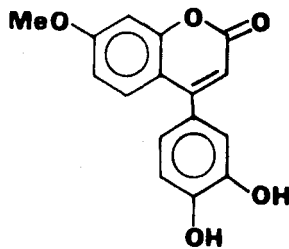


43

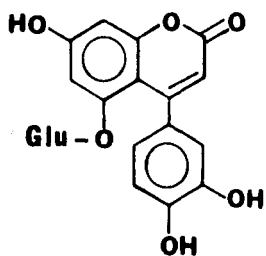
2. FENILCUMARINAS



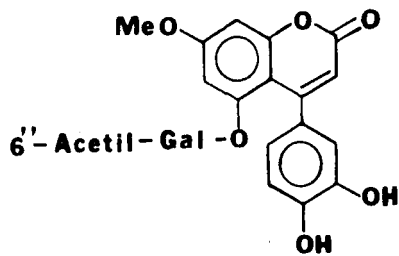
37



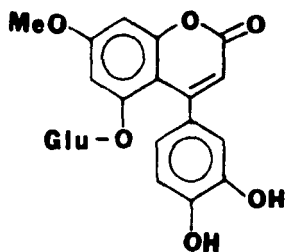
38



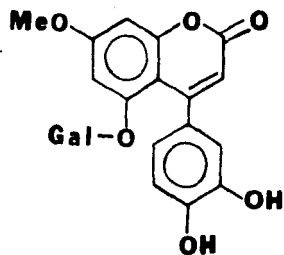
39



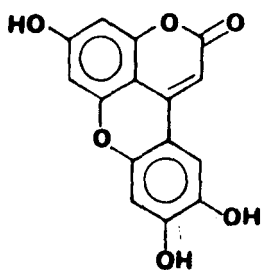
40



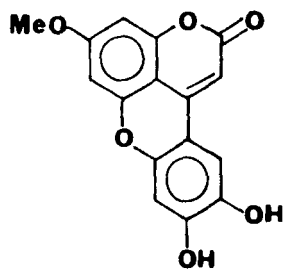
41



42



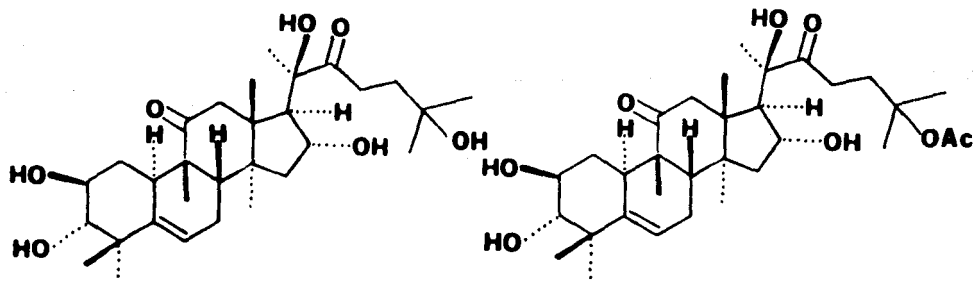
47



48

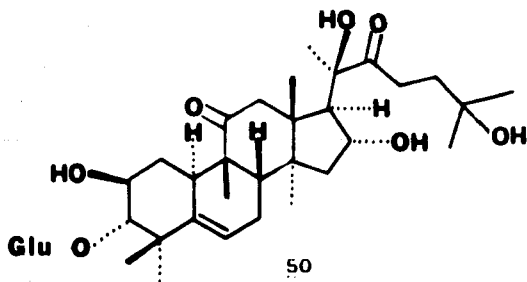
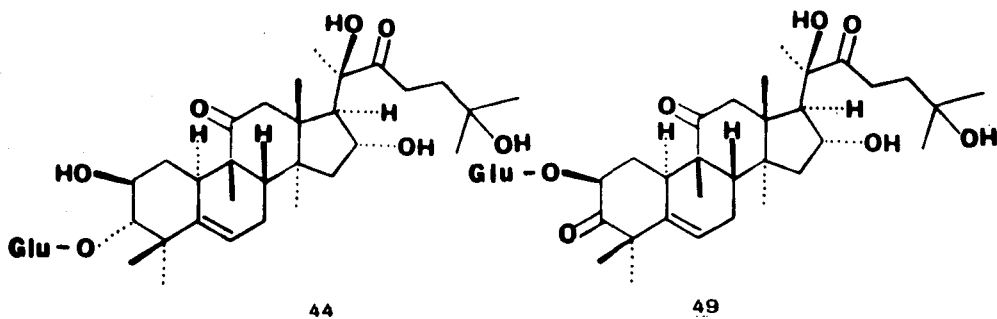
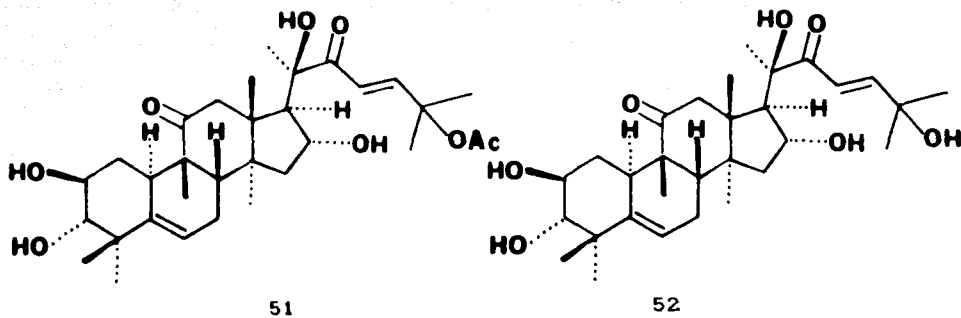
3. TRITERPENOS

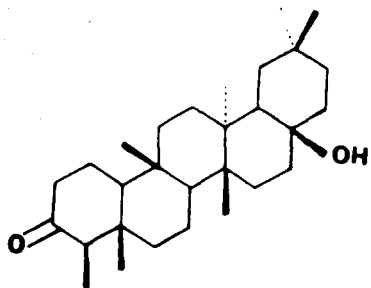
a) Cucurbitanos



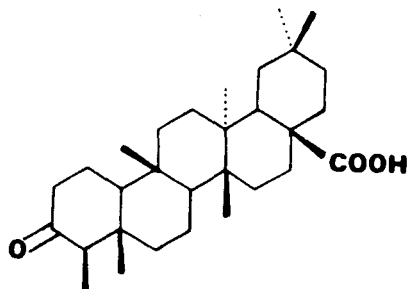
45

46

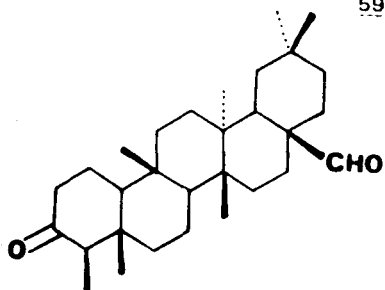


b) Friedelanos

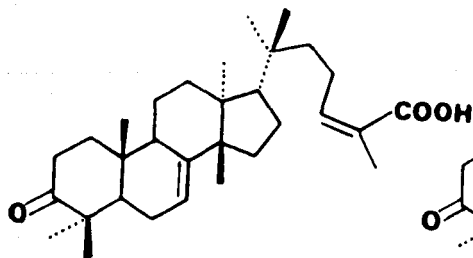
58



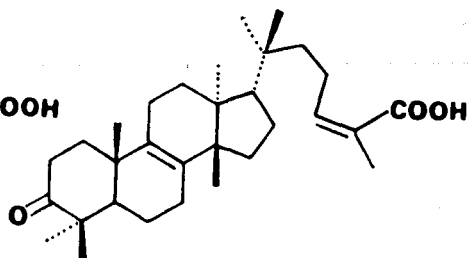
59



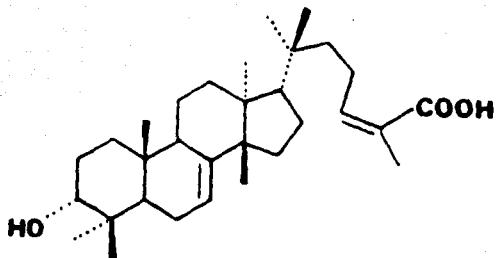
60

c) Tirucalanos

53

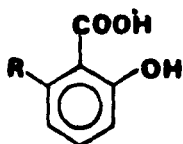


54



55

4. ALKYLFENOLES



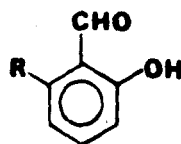
R:

 C_H
15 31

 C_H
17 35

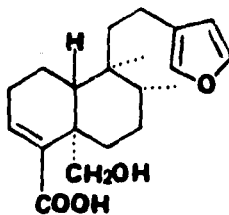
 C_H
19 39

56



57

5. DITERPENOS



63

3.0 MATERIALES Y METODOS

3.1 Sustancias objeto de la evaluación

Las sustancias objeto de la evaluación, fueron aisladas previamente en el Laboratorio 211 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM., de las especies vegetales señaladas en el Cuadro 10.

3.2 Microorganismos de prueba

Los microorganismos empleados para la evaluación incluyeron bacterias Gram positivas, Gram negativas y una levadura. En el Cuadro 13 se resumen los microorganismos de prueba, indicándose además las cepas correspondientes.

Cuadro 13. Microorganismos de prueba empleados en la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana.

GRAM + :	Staphylococcus aureus (ATCC 15006)
	Bacillus subtilis (ATCC 6633)
GRAM - :	Pseudomona aeruginosa (ATCC 14207)
	Escherichia coli (ATTC 25922)
LEVADURA :	Candida albicans (ATCC 10231)

3.3 Preparación de las muestras a evaluar y de los testigos

Debido a que los solventes orgánicos de uso más común en el laboratorio (CHCl_3 , CH_3OH , AcOEt , etc.) podían interferir con los resultados del ensayo, fue preciso emplear disolventes inocuos para los microorganismos de prueba, tales como mezclas de dimetil sulfóxido en agua (en proporciones no mayores de 50:50) o soluciones al 10% en agua de Tween 20 y Tween 80.

Una vez efectuadas las pruebas de solubilidad pertinentes, se prepararon las muestras objeto del ensayo (1 mg/ml) y los controles positivos [Estreptomicina (1 mg/ml) y Nistatina (3 mg/ml)].

3.4 Preparación de los inóculos de los microorganismos de prueba.

Las bacterias se pusieron a desarrollar en caldo nutritivo (Merck) y se incubaron durante un periodo de 24 horas a 37°C . La Candida albicans en cambio, se sembró en caldo-glucosa 2% Sabouraud (Merck) y se incubó por 48 horas a 28°C .

Una vez desarrollados los microorganismos, fue necesario estandarizar su número a una concentración determinada. Para ello se utilizó una técnica turbidimétrica empleando como base los patrones de turbidez de Mc Farland (Bailey, 1986). En todos los casos, se hizo una dilución del caldo nutritivo inculado en solución salina isotónica, hasta obtener una turbidez equivalente a la mitad del estándar # 1 de Mc

Farland, que contenía un número aproximado de 1.5×10^4 células por mililitro. En el Cuadro 14 se muestran los patrones de Mc Farland y el número de células por ml que corresponde a cada uno de ellos.

Cuadro 14. Patrones de Mc Farland

	NUMERO DE STANDARD					
	1	2	3	4	5	6
BaCl ₂ al 1% (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
H ₂ SO ₄ al 1% (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4
* aprox. de células (x 10 ⁴ /ml)	3	6	9	12	15	18

3.5 Siembra de los microorganismos por el método de vertido en placa

1 ml de las soluciones estandarizadas de microorganismos (aprox. 1.5×10^8 células) se colocó en cajas de Petri estériles. Posteriormente, se agregaron a cada caja, 20 ml de agar fundido a una temperatura aproximada de 45°C, homogeneizando mediante una agitación cuidadosa. El agar empleado para las bacterias fue el Agar #1 para antibióticos (Merck) y en el caso de la levadura se utilizó agar-glucosa 4% Sabouraud (Merck).

3.6 Aplicación de las muestras objeto de la evaluación en las placas de agar previamente inoculadas con los microorganismos de prueba

Transcurrido el tiempo necesario para la solidificación de las placas de agar, se realizaron tres horadaciones convenientemente distribuidas en cada placa, utilizando un horador cilíndrico de 10 mm de diámetro. Posteriormente se adicionaron a cada pozo 100 y 50 μ l de la solución de muestra y 100 μ l del control positivo. Las placas así preparadas se incubaron por 24 horas a 37°C en el caso de las bacterias y durante 48 horas a 28°C en el caso de la Candida albicans.

3.7 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Al cabo del tiempo de incubación, se evaluó la actividad antimicrobiana de los compuestos midiendo el diámetro de la zona clara de inhibición.

Las pruebas se realizaron por duplicado y todo el procedimiento se efectuó en una campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad.

4.0 RESULTADOS

En los Cuadros 15 y 16 se muestran los metabolitos secundarios que resultaron activos, los microorganismos sobre los cuales presentaron actividad y los correspondientes diámetros de los halos de inhibición.

Cuadro 15. Metabolitos activos contra bacterias en la determinación cualitativa preliminar

DIAMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICION (mm)				
COMPUESTO	Staphylococcus aureus	Bacillus subtilis	Pseudomona aeruginosa	Escherichia coli
Estreptomocina:				
100 µg	18	35	30	14
7,4,5'-trihidroxil-4-fenil-5-2'-oxido-cumarina <u>47</u> :				
100 µg	-	-	25	-
50 µg	-	-	22	-
Ducurbitacina F-25 acetato <u>51</u> :				
100 µg	-	-	30	-
50 µg	-	-	27	-
Acido huatriwaico <u>63</u> :				
100 µg	16	-	-	-
50 µg	14	-	-	-
Ac. anacárdicos <u>56</u> :				
100 µg	13	-	-	-
50 µg	12	-	-	-
Ac. 3α-hidroxi-mastiacadienónico <u>55</u> :				
100 µg	13	-	-	-
50 µg	12	-	-	-

continuación del Cuadro 15

COMPUESTO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
Canofilal 60:				
100 µg	-	-	30	-
50 µg	-	-	28	-
Pinocembrina 64:				
100 µg	18.5	14.5	-	-
50 µg	16	12.5	-	-
Crisina 66:				
100 µg	-	-	28	-
50 µg	-	-	24	-
Hispidulina 67:				
100 µg	16	15	-	-
50 µg	12.5	13	-	-

Cuadro 16. Metabolitos activos contra Candida albicans en la determinacion cualitativa preliminar

COMPUESTO	DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm)
Nistatina:	
100 ug	21
5-O-B-D-galactopiranosil-3',4'- dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina <u>42</u> :	
100 ug	19
50 ug	16
Crisina <u>66</u> :	
100 ug	20
50 ug	17
Finocembrina <u>64</u> :	
100 ug	20
50 ug	15

5. DISCUSION Y CONCLUSIONES

La evaluación cualitativa preliminar in vitro de los metabolitos secundarios aislados de las plantas que se indican en el Cuadro 12, se realizó mediante la técnica de difusión en agar. Este metodo es indudablemente el de mayor aplicación en los ensayos preliminares para la detección de agentes antimicrobianos (Mitscher, et al., 1984; Clarck, et al., 1981; Fuyvelde, et al., 1989; inter alia). La técnica antes mencionada ofrece la ventaja de ser rápida, sencilla y además requiere poca cantidad de muestra.

En lo que se refiere a los microorganismos de prueba empleados, cabe mencionar que su selección se hizo de acuerdo a criterios convencionales (Mitscher, et al., 1972). Con la excepción del Bacillus subtilis, todos los demás son huesoedes normales del hombre, aunque bajo ciertas condiciones pueden llegar a presentar patogenicidad (Felczar, 1982).

La mayor parte de los metabolitos ensayados en este estudio, provienen de plantas con reputación folklórica como agentes antimicrobianos y los seis restantes se eligieron con base a consideraciones de relación estructura química-actividad (Mitscher, et al., 1984) o dada su disponibilidad.

Como se puede observar en los Cuadros 15 y 16, los antibiogramas demostraron que de los 31 metabolitos estudiados, nueve resultaron activos; todos ellos pertenecen

a categorías estructurales para las que previamente se había descrito actividad antimicrobiana (Mitscher, et al., 1984; Mitcher, et al., 1987; Fuyvelde, et al., 1989; Clarck, et al., 1981; inter alia).

Los tres flavonoides activos (hispidulina 62, pinocembrina 64 y crisina 66, aunque pertenecen a grupos diferentes, presentan como característica comun un hidroxilo libre en la posición 7. Los escasos estudios de relación estructura química-actividad antimicrobiana que se han realizado (Mitscher, et al., 1987), han demostrado que el hidroxilo en C-7 es indispensable para la actividad antibiótica (independientemente de su núcleo estructural). En el caso particular de este estudio, la diferencia de actividades presentada por las flavanonas pinocembrina (5,7-dihidroxi-flavanona) y la pinostrobinina (5-hidroxi-7-metoxi-flavanona), que difieren unicamente en la sustitución en C-7, confirman una vez más la importancia que para la actividad tiene el grupo OH libre en la posición 7.

Cabe hacer notar que de todos los flavonoides la pinocembrina fue la que presentó el mayor espectro de actividad (ver Cuadros 15 y 16) y en el caso de las pruebas contra S. aureus y C. albicans el halo de inhibición encontrado fue comparable al de la estreptomycinina y la nistatina, respectivamente.

La flavona crisina (5,7-dihidroxi-flavona), mostró actividad sobre Pseudomona aeruginosa y Candida albicans, en

ambas ocasiones equivalente a los controles positivos. Finalmente, la hispidulina (5,7,4'-trihidroxi-6-metoxi-flavona) presentó un efecto moderado en contra de S. aureus y B. subtilis. La presencia de la hispidulina en Ratibida latipallearis (ver Capítulo 1) podría justificar el uso popular como agente antimicrobiano cutáneo que se le atribuye a la planta, sobre todo, si se considera que el S. aureus es un microorganismo oportunista que puede infectar heridas y producir abscesos menores en la piel (Walter, et al., 1980).

Dentro del grupo de los triterpenos se evaluaron siete cucurbitanos, tres friedelanos y tres tirucalanos (ver Figura 12). En lo que se refiere al primer grupo, la única sustancia activa fue la cucurbitacina F-25 acetato, la cual inhibió el desarrollo de Pseudomona aeruginosa con un halo similar al del antibiotico control. En este tipo de compuestos aparentemente la presencia del grupo acetato en la posición 25 y la doble ligadura entre C-23 y C-24, constituyen los requerimientos estructurales necesarios para la acción antibacteriana.

Con relación a los friedelanos, el ácido canofílico y el canofilol resultaron inactivos, en tanto que el canofilal exhibió un excelente efecto inhibitorio contra F. aeruginosa, bacteria gram negativa que afecta a menudo el tracto urinario ocasionando infecciones de la vejiga y el riñón (Walter, et al., 1980). Considerando lo antes mencionado, posiblemente la presencia de este aldehído triterpéncio en la Hippocratea excelsa, explique el uso popular de la planta en el

tratamiento de infecciones renales. Se podría especular que el grupo aldehído en la posición 28 es necesario para el efecto observado contra F. aeruginosa, ya que los otros dos friedelanos sólo diferían del canofilal en la naturaleza del sustituyente en C-28.

El grupo más numeroso de compuestos evaluados lo constituye el de las fenilcumarinas, sin embargo sólo se detectó actividad para la 7,4',5'-trihidroxí-4-fenil-5,2'-oxidocumarina 47 y , como era de esperarse, para el 5-o- β -D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxí-7-metoxí-4-fenilcumarina 42 (ver Cuadro 10). El efecto de la oxidocumarina fue específico sobre F. aeruginosa y en el caso del galactósido contra C. albicans. A este respecto resulta interesante comentar que aparentemente la presencia de la galactosa es indispensable para la actividad contra la levadura; ya que el glucósido y la aglicona correspondientes resultaron inactivos. En relación a la actividad que sobre F. aeruginosa ejerció la oxidocumarina, podría pensarse que la presencia del oxido y del hidroxilo libre en C-7 son requerimientos estructurales para el efecto observado; como se puede apreciar en la Figura 12 y Cuadro 15, ninguno de los compuestos que carecen del puente oxigenado son activos contra F. aeruginosa. Por otra parte, el compuesto relacionado 48, que sí presenta el oxido y tiene un grupo metoxi en posición 7, también resulto inactivo.

A fin de confirmar las especulaciones antes mencionadas, es necesario realizar un estudio más detallado y con un mayor

número de compuestos.

En lo referente a los restantes compuestos bioactivos (ac. huatriwaico 63 y las dos mezclas de alquilfenoles 56 y 57), el grado del efecto encontrado fue muy pobre, por lo que su sola presencia en Dodonaea viscosa y Amphypterynquium adstringens, no validaría las propiedades antimicrobianas que se le atribuyen a las mismas.

De la discusión anterior se desprende que los compuestos que ameritan ser estudiados en más detalles son: dinocembrina 64, crisina 66, hispidulina 67, cucurbitacina F-25 acetato 51, canofilal 60 y 7,4'5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina 47. Por esta razón los compuestos fueron enviados al Dr. Mitscher del Departamento de Química medicinal de la Universidad de Kansas, Lawrence, KS., E.E.U.U. para la determinación de sus concentraciones mínimas inhibitorias. Hasta la fecha sólo se tienen los resultados para la crisina, la cual mostró una concentración mínima inhibitoria para Candida albicans de 50 µg/ml. La magnitud de este efecto no es sorprendente entre flavonoides de origen vegetal y además es lo suficientemente notable, como para realizar estudios posteriores encaminados a la síntesis de análogos con mayor potencia. La actividad contra C. albicans es generalmente utilizada como un indicador preliminar para la determinación de actividad contra hongos patógenos y por lo tanto sería recomendable continuar con el estudio correspondiente.

6.0 RECOMENDACIONES

- 1.- Efectuar la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de los compuestos que resultaron activos en la evaluación cualitativa preliminar.
- 2.- Evaluar la actividad de la crisina contra hongos patógenos. Sintetizar análogos con miras a la obtención de compuestos más potentes.
- 3.- Dependiendo de los resultados obtenidos para las determinaciones cuantitativas de la actividad antimicrobiana de los compuestos, establecer las estrategias pertinentes para futuros estudios.

APENDICE

PARAMETROS POSICIONALES CORRESPONDIENTES A LA RATIBINOLIDA I

1.- Longitudes de enlace (Å).

01	C1	1.202	C5	C6	1.495
02	C12	1.353	C5	C10	1.562
02	C6	1.468	C6	C7	1.535
03	C12	1.201	C7	C11	1.482
C1	C2	1.506	C7	C8	1.519
C1	C10	1.526	C8	C9	1.526
C2	C3	1.500	C9	C10	1.527
C2	C4	1.518	C10	C14	1.553
C3	C4	1.488	C11	C13	1.320
C4	C15	1.497	C11	C12	1.490
C4	C5	1.539			

2.- Angulos (°)

C12	02	C6	107.7	C5	C6	C7	108.4
01	C1	C2	127.5	C11	C7	C8	124.2
01	C1	C10	125.6	C11	C7	C6	100.7
C2	C1	C10	106.8	C8	C7	C6	112.0
C3	C2	C1	120.3	C7	C8	C9	109.4
C3	C2	C4	59.1	C8	C9	C10	111.5
C1	C2	C4	108.3	C1	C10	C9	118.7
C4	C3	C2	61.1	C1	C10	C14	102.9
C3	C4	C15	121.8	C1	C10	C5	100.1
C3	C4	C2	59.9	C9	C10	C14	110.5
C3	C4	C5	112.2	C9	C10	C5	111.9
C15	C4	C2	122.9	C14	C10	C5	112.2
C15	C4	C5	120.6	C13	C11	C7	132.0
C2	C4	C5	103.8	C13	C11	C12	123.3
C6	C5	C4	124.1	C7	C11	C12	104.7
C6	C5	C10	106.5	03	C12	02	121.8
C4	C5	C10	105.3	03	C12	C11	128.6
02	C6	C5	116.9	02	C12	C11	109.6
01	C6	C7	102.5				

BIBLIOGRAFIA

- Abou-karam, J. Nat. Prod., 53, (1990).
- Albor, C.; Tesis de Maestria, Facultad de Quimica, UNAM. Mexico (1989).
- Anand, N.; Natural Products and Drug development, Krogsgaard-Larsen, S. Brogger, H. Kofod, Munksgaard, Copenhagen, pp. 78-139 (1985).
- Baerheim, A.; Planta Medica, 180 (1984).
- Barley; Diagnostic Microbiology, CV. Mosby Company. Saint Louis, pp. 175-200 (1974).
- Bohlman, F.; Zdero, C.; Ahmed M.; Phytochemistry, 21, 1679 (1982).
- Burnes; J. Nat. Prod., 52, 522 (1989).
- Bye, R.; Economic Botany, 40, 1031 (1986).
- Bye, R.; comunicacion personal, (1989).
- Calzada, B.F.; Tesis de Maestria, Facultad de Quimica, UNAM. Mexico (1989).
- Camacho, R.; Tesis de Maestria, Facultad de Quimica, UNAM. Mexico (1990).
- Castañeda, F.; Tesis Profesional, Facultad de Quimica, UNAM. Mexico (1988).
- Cimino; J. Nat. Prod., 53, 345 (1990).
- Clarck A.; El-Feraley; Li, W.; J. Pharm. Sci., 70, 951 (1981).
- Crisanto, D.; Tesis Profesional, Facultad de Quimica, UNAM. México (1990).
- Chilton, M.D.; Scientific American, 248, 254 (1983).
- Da Silva, A.; Garcia, M.; Baker, P.; Rabi, J.; Organic Magnetic Resonance, 16, 234 (1981).
- Dornberger, K.; Lich, H.; Pharmazie, 37, 271 (1982).
- Douros, J. y Suffness, M.; Cancer Chemoter. Pharmacol., 1, 91 (1978).

- Einhelling F.; J. Chem. Ecol., 11, 65 (1985).
- Ellmauerer, V.; Pathak, P.; Jakupovic, J.; Bohlmann, F.; Dominguez, X.; Phytochemistry, 159 (1987).
- Fairbairn, J.; J. of Ethnopharmacology, 2, 135 (1980).
- Farkas, L.; J. of Ethnopharmacology, 2, 145 (1980).
- Farnsworth, N.; J. of Ethnopharmacology, 2, 173 (1980).
- Farnsworth, N. W. y Bingel, A.S. En Wagner, H. y Wolff, P. ed. "New Natural Products and Plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity". Springer-Verlang, Berl Hidenberg, New York, pp. 1-23 (1987).
- Ferrigni, N.; McLaughlin, J.L.; Powell, R.G.; Smith, C.R.; J. Nat. Prod., 47, 347 (1984).
- Fuson, R.C.; Shriner, R.L.; Curtin, D. Identificación sistemática de compuestos orgánicos. LIMUSA, Mexico (1980).
- Garcia, M.R.; Tesis de Maestria, Facultad de Química UNAM. México (1987).
- Geran, R.I.; Freenber, N.H.; MacDonald, N.; Abbot, J.J.; Cancer Chemoter. Rep., 2, 1 (1972).
- Gill, M.; Bajaj, R.; Chang, C.J.; Nichols, D.E.; McLaughlin J. Nat. Prod., 50, 36 (1987).
- Herz, W., Kulanthaivel, F.; Goekden, V., J. Org. Chem., 50, 610 (1985).
- Herz, W.; Kulanthaivel, F.; Phytochemistry, 23, 715 (1983).
- Herz, W.; Sumi, Y.; J. Org. Chem., 29, 2438 (1964).
- Hui, Y.H.; Rupprecht, J.K.; Liu, Y.; Anderson, J.; Smith, D.E.; McLaughlin, J.L.; J. Nat. Prod., 52, 463 (1989).
- Ieven, M.; Van den Berghe, D.; Mertens, M; Planta Medica, 36, 311 (1979).
- Irvin; Phytochemistry, 10, 637 (1971).
- Jackman, L.M.; Sternhel, S.; Nuclear Magnetic Resonance in Organic Chemistry, Pergamon Press, Oxford, 1969.
- kahl, G.; Shell, J.S.; Molecular Biology of Plant Tumors, Academic Press, New York (E.E.U.U.) pp.155-544 (1982).

- Kingston, D.; Tetrahedron, 27, 2691 (1971).
- Lui, U; Mabry, T.; Phytochemistry, 20, 1289 (1981).
- Markham, K.R.; Mabry T.; Thomas, M.B.; Systematic Identification of flavonoids. Ed. Springer. Nueva York, (1982).
- Mata, R.; Albor, C.; Planta Medica, 56, 241 (1990).
- Mata, R.; Calzada, F.; Garcia, M.R.; Reguero, R.; J. Nat. Prod., 50, 866 (1987).
- Mata, R.; Castañeda, P.; Camacho, M.R.; J. Nat. Prod., 51, 836 (1988).
- Mata, R.; Delgado, D.; Romo de Vivar, A.; Phytochemistry, 23, 715 (1983).
- Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; McLaughlin, J.L.; Planta Medica, 45, 31 (1982).
- Mitscher, L.; Leu, O.; Bathala, M.; Wu, W.; Lloydia, 35, 157 (1972).
- Mitscher, L.; Drake, S.; Sitaraghav, R.; Gollaoud; J. Nat. Prod., 50, 1025 (1987).
- Mitscher, L.; Raghav, G.; Natural Products and Drug Development Ed. por F. Krogsgaard Larsen, S. Brogger Christensen y K. Kofod, Munksgaard, Copenhagen. pp. 193-212 (1984).
- Nityanand, S.; Natural Products and Drug development, Krogsgaard Larsen, S. Brogger, K. Kofod, Munksgaard, Copenhagen pp. 78-139 (1985).
- Pelczar, M; Reid, R.; Chan, E.; Microbiologia, Mc Graw Hill. Mexico, pp. 408-432 (1982).
- Powell, R.G.; Bajaj, R.; McLaughlin, L.L.; J. Nat. Prod., 50, 293 (1987).
- Powell, R.G.; Smith, C. R.; Recent Advances in Phytochemistry, 14, Plenum Press, N.Y. (E.E.U.U.), p.23 (1980).
- Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W.; Tablas para la identificación de compuestos orgánicos. Ed. Alhambra, México (1980).

- Fuyvelde, V.; De Kimpe, N.; Costa, J.; J. Nat. Prod., 52, 629 (1989).
- Reguero, M.T.; Mata, R.; Bye, R.; Linares, E.; Delgado, G.; J. Nat. Prod., 50, 315 (1987).
- Ream, L.W.; Science, 218, 254 (1982).
- Richards, L.; Rhodora, 70, 390 (1968).
- Salemi, C.; J. of Ethnopharmacology, 2, 135 (1980).
- Samek, Z.; Tetrahedron Letters, 671 (1970).
- Soriano, M.; Villena, R.; Mata, R.; Rojas, A.; Acta crystallographica, en prensa (1990).
- Spjut, R.W.; Economic Botany, 39, 266 (1985).
- Van den Berghe; Mertens M.; Planta Medica, 36, 311 (1979).
- Verpoorte, R.; Tjin, A.; van Doorne, H.; J. of Ethnopharmacology, 5, 221 (1982).
- Wall, M.E. y Wani, M.C.; Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 17, 117 (1977).
- Wang, Z.W.; Ma, W.W.; MacLaughlin, J.L.; Gupta, M.P.; J. Nat. Prod., 51, 382 (1988).
- Zaenen, I.; Wan Larekehe, V.; Tenchy, H.; Van Montagu, M.; Schell, J.; J. Mol. Biol., 86, 109 (1974).
- Zeringue, H.J.; Phytochemistry, 26, 975 (1987).