

00573
5

UNAM
POSGRADO



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS QUIMICAS

ACTIVIDAD FITOTOXICA DE LACTONAS
AISLADAS DE PARTHENIUM HYSTEROPHORUS Y
P. BIPINNATIFIDUM Y SUS DERIVADOS SEMI
SINTETICOS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(O R G A N I C A)
P R E S E N T A :
ADJACI UCHOA FERNANDES



CIUDAD DE MEXICO, D. F.

JULIO 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado

Presidente	Dr. Alfonso Romo de Vivar
Vocal	Dr. Eugenio Bratoeff Tittf
Secretario	Dr. Mariano Martínez Vázquez
Primer Suplente	Dr. Rogelio Pereda Miranda
Segundo Suplente	Dr. Enrique Angeles Anguiano

Sustentante:

Q. Adjaci Uchoa Fernades

Asesor:

Dr. José Serafín Calderón Pardo

Agradecimientos.

Agradezco a las instituciones que otorgaron el apoyo financiero para la realización de la presente tesis de investigación:

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DEGP) por una beca para cursar la maestría en Química Orgánica.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGPA) UNAM por una beca para el desarrollo de esta investigación (Proyecto PAPIIT IN 215799).

Al Sistema Nacional de Investigadores por una beca de Ayudante de investigador Nivel III.

Al Dr. Alfonso Romo de Vivar por proporcionar el compuesto de referencia zaluzanina C.

ÍNDICE

Abreviaciones	v
Resumen	vi
1 - INTRODUCCIÓN	1
2 - OBJETIVOS	4
2.1 Objetivos General	5
2.2 Objetivos Específicos	5
3. JUSTIFICACIÓN	6
4 - ANTECEDENTES	8
4.1 Herbicidas de origen naturales (Aleloquímicos)	9
4.2 Género <i>Parthenium</i>	11
4.3 <i>Parthenium hysterophorus</i>	12
4.4 <i>Parthenium bipinnatifidum</i>	13
4.5 Lactonas Sesquiterpénicas	14
4.5.1 Biogénesis de las Lactonas Sesquiterpénicas	14
4.6 Pseudogauyanólidas	18
4.7 Actividad Biológica de Lactonas sesquitérpenicas	18
4.8 Mecanismo de acción	22
5 -PARTE EXPERIMENTAL	23
5.1 Material vegetal.	24
5.2 Preparación de los extractos orgánicos	24
5.3. Análisis cromatográfico de los extractos	24
5.4 Elucidación estructural de los compuestos activos	25
5.5 Pruebas de actividad biológica	27
5.5.1 Prueba de germinación de semillas y desarrollo de plántulas	27
5.5.2 Determinación del peso seco	27
5.5.3 Respiración de las semillas	28
5.6 Reacciones químicas	28
5.6.1 Reducción	28

5.6.2 Acetilación	28
5.7 Análisis Estadístico	29
5.8 Materiales y reactivos	29
5.9 Aparatos	30
5.10 Modelado molecular	30
5.11 Propiedades físicas y espectroscópicas	31
6 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1 Estudio biodirigido	44
6.1.1 Estudio de la Actividad Inhibitoria de los Extractos	44
6.1.2 <i>Parthenium hysterophorus</i>	49
6.1.2.1 Extracto de CH ₂ Cl ₂ de <i>Parthenium hysterophorus</i>	43
6.1.2.2 Efecto inhibitorio de los grupos E y F. del extracto de CH ₂ Cl ₂ de <i>P. hysterophorus</i>	50
6.1.2.3 Fraccionamiento secundario de los grupos E y F	53
6.1.2.4 Actividad inhibitoria de partenina	53
6.1.2.5 Extracto metanólico	55
6.1.3 <i>Parthenium bipinnatifidum</i>	56
6.1.3.1 Fraccionamiento primario del extracto de CH ₂ Cl ₂ de <i>P. bipinnatifidum</i>	56
6.1.3.2 Actividad inhibitoria de los grupos de fracciones del extracto de CH ₂ Cl ₂ de <i>P. bipinnatifidum</i>	56
6.1.3.3 Fraccionamiento secundario de los grupos G2, H2, I2 y J2	61
6.1.3.4 Actividad inhibitoria de ambrosina e histerina	61
6.1.3.5 Actividad de los subgrupos	65
6.1.3.6 Extracto Metanólico	66
6.1.4 Actividad de las Lactonas sesquiterpenicas en <i>T. vulgare</i> (Trigo)	67
6.2 Determinación Estructural	70
6.2.1 Determinación estructural de las lactonas aisladas	70
6.2.2 Actividad biológica de las lactonas aisladas	71
6.2.3 Transformaciones químicas de los compuestos aislados	72
6.2.3.1 Derivados de Partenina	72

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

6.2.3.1.1 Hidrogenación de la partenina con Pd/C	73
6.2.3.1.2 Reducción de la partenina con NaBH ₄ .	73
6.2.3.1.3 Acetilación de 6	74
6.2.3.2 Derivados de ambrosina	75
6.2.3.2.1 Hidrogenación de ambrosina con Pd/C	76
6.2.3.2 Reducción de ambrosina con NaBH ₄	76
6.2.3.2.3 Acetilación de 10	77
6.2.3.3 Derivados de Histerina	77
6.2.3.3.1 Acetilación de histerina	78
6.2.3.3.2 Reducción de histerina con NaBH ₄	78
6.2.3.3.3 Acetilación de 13	78
6.2.4 Conformación de las lactonas aisladas	79
6.3 Actividad alelopática de la pseudoguayanólidas, zaluzanina C y 2,4-D	81
6.3.1 Actividad inhibitoria o reguladora de los derivados, zaluzanina C y 2,4-D	83
6.3.2 Peso seco	89
6.3.3 Respiración de las semillas durante la germinación	92
6.2.4 Funcionalidad y actividad	93
7 CONCLUSIONES	95
8 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
9 APÉNDICE	104
Espectro 1, RMN ¹ H de partenina (1)-	105
Espectro 2, RMN ¹ H de partenina (ampliado)	106
Espectro 3, ¹³ C de partenina	107
Espectro 4, DEPT de partenina	108
Espectro 5, HETCOR de partenina	109
Espectro 6, HETCOR de partenina (ampliado)	110
Espectro 7, COSY de partenina	111
Espectro 8, RMN ¹ H de histerina (3)	112
Espectro 9, ¹³ C de histerina (3)	113
Espectro 10, DEPT de histerina (3)	114

Espectro 11, HETCOR de histerina (3)	115
Espectro 12, HETCOR de histerina (3) (ampliado)	116
Espectro 13, RMN ^1H del Compuesto (6)	117
Espectro 14, RMN ^1H del Compuesto (7)	118
Espectro 15, RMN ^1H del Compuesto (8)	129
Espectro 16, RMN ^1H del Compuesto (10)	120
Espectro 17, RMN ^1H del Compuesto (11)	121
Espectro 18, RMN ^1H del Compuesto (13)	122
Espectro 19, RMN ^1H del Compuesto (14)	123

Abreviaturas

- δ : desplazamiento químico
2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético
COSY: correlation spectroscopy
DEPT: distortionless enhancement by polarization transfer
DHZ: dehidrozaluzanina C
Dicot: dicotiledóneas
GI₅₀: 50% de inhibición de la germinación
HETCOR: heteronuclear chemical shift correlation
IC₅₀: Concentración que inhibe 50%
LSQs: lactonas sesquiterpénicas
MHz: mega Hertz
Mono: monocotiledóneas
RI₅₀: 50% de inhibición en el desarrollo de la raíz
RMN¹³C: Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
RMN¹H: Resonancia Magnética Nuclear de protones
T. pratense: *Trifolium pratense*
T. vulgare: *Triticum vulgare*
TI₅₀: 50% de inhibición en el desarrollo del tallo
s: singulete
d: doblete
c: cuarteto
q: quinteto
m: multiplete
dd: doble de doble
dt: doble de triplete
td: triple de doblete
tc: triple de cuarteto
J: constante de acoplamiento en Hz

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Abreviaturas

- δ : desplazamiento químico
2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético
COSY: correlation spectroscopy
DEPT: distortionless enhancement by polarization transfer
DHZ: dehidrozaluzanina C
Dicot: dicotiledóneas
GI₅₀: 50% de inhibición de la germinación
HETCOR: heteronuclear chemical shift correlation
IC₅₀: Concentración que inhibe 50%
LSQs: lactonas sesquiterpénicas
MHz: mega Hertz
Mono: monocotiledóneas
RI₅₀: 50% de inhibición en el desarrollo de la raíz
RMN¹³C: Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
RMN¹H: Resonancia Magnética Nuclear de protones
T. pratense: *Trifolium pratense*
T. vulgare: *Triticum vulgare*
TI₅₀: 50% de inhibición en el desarrollo del tallo
s: singulete
d: doblete
c: cuarteto
q: quinteto
m: multiplete
dd: doble de doble
dt: doble de triplete
td: triple de doblete
tc: triple de cuarteto
J: constante de acoplamiento en Hz

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

P. hysterophorus y *P. bipinnatifidum* son malezas abundantes en el noreste y parte central de México, con el objeto de aislar los posibles compuestos responsables del fenómeno alelopático que presentan en el campo, se realizó un estudio biodirigido mediante la germinación de semillas y el desarrollo de *Lolium multiflorum*, *Triticum vulgare* (monocotiledóneas) *Lactuca sativa*, *Trifolium pratense* y *Physalis ixocarpa* (dicotiledóneas). Los resultados mostraron que los extractos de CH₂Cl₂ de ambas plantas resultaron más activos que los de metanol, sugiriendo que los compuestos activos se encuentran en estos extractos. Además se encontró que los extractos de *P. bipinnatifidum*, presentaron una actividad superior a los de *P. hysterophorus*.

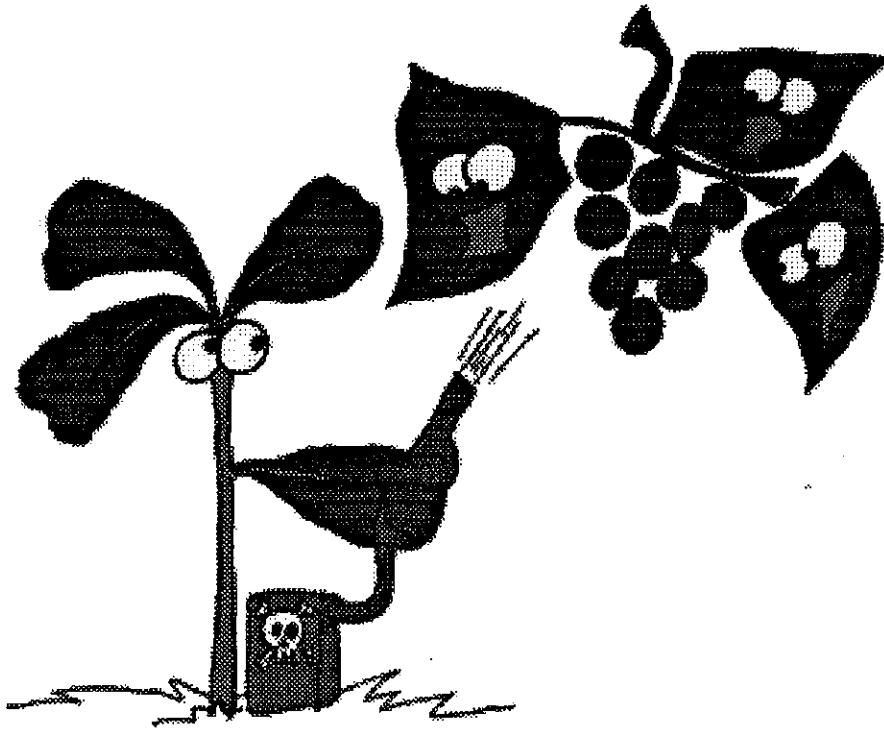
El fraccionamiento biodirigido de los extractos de CH₂Cl₂ de *P. hysterophorus* y de *P. bipinnatifidum* permitió el aislamiento de los principios activos, identificados como partenina para el primero y para el segundo, ambrosina e histerina. El potencial inhibitorio de las tres lactonas sesquiterpénicas (LSQ), del grupo de las pseudoguaianolidas en las semillas y plantas de prueba, demostró el siguiente orden de actividad: ambrosina > partenina >> histerina, el cual coincidió con la polaridad que mostraron estos compuestos en cromatografía en capa fina de sílica gel.

Con las tres lactonas aisladas se llevaron a cabo reacciones químicas para modificar sus estructuras, obteniéndose 11 derivados de los cuales cinco son nuevos. Estas transformaciones químicas permitieron modificar la polaridad, conformación y la relación lipofilicidad/hidrofilicidad de las moléculas, propiedades ligadas a la actividad alelopática de las lactonas. Al mismo tiempo, esta serie de transformaciones permitiría, determinar la importancia de la ciclopentenona en la actividad inhibitoria o reguladora presentada por las lactonas sesquiterpénicas aisladas. En total se evaluaron en los ensayos de germinación y desarrollo de plántulas, 14 lactonas: partenina, ambrosina, histerina, isocoronopilina, isopartenina, 1 α ,4 β -dihidroxi-pseudoguaya- 2,11(13)-dien-6 β -12-olida, 1 α ,4 β -dihidroxi-pseudoguaya-2-en-6 β -12-olida, 1 α -hidroxi-4 β -acetoxi-pseudoguaya-2,11(13)-dien-6 β -12-olida, isodamsina, 4 β -hidroxi-pseudoguaya-2-en-13 α ,6 β -12-olida, 4 β -acetoxi-pseudoguaya-2-en-13 α ,6 β -12-olida, acetato de histerina, 4 β ,14-dihidroxi-pseudoguaya-13 α ,6 β -12-olida,

4 β ,14-diacetoxi-pseudoguaya-13 α ,6 β -12-olida. Se utilizaron como muestras control la zaluzanina C (guayanólida), única lactona conocida que inhibe la evolución de oxígeno y que actúa como inhibidor del transporte electrónico⁵⁸ y el herbicida comercial 2,4-D. Los resultados mostraron que el grupo ciclopentenona juega un papel importante en la actividad fitotóxica y que el metileno exocíclico conjugado con la lactona es importante pero no necesario para la actividad alelopática mostrada por las lactonas ensayadas.

La partenina presentó una inhibición en la germinación de *L. sativa* del 50% (GI₅₀) a una concentración de 46 μ M, mientras que la ambrosina presentó la misma inhibición a la concentración 17 μ M, pero aproximadamente 5 y 14 veces superior a la zaluzanina C, compuesto que se usó como referencia interna, cuyo valor publicado GI₅₀ para *L. sativa* fue de 245 μ M. Estos valores también superan por más de 100 veces la actividad de algunas germacranólidas cuya actividad se ha descrito. La ambrosina presenta un efecto dual, ya que a 40 μ M exhibió un potente efecto regulador, estimulando el crecimiento en un 464% para raíz y un 566% para el hipocótilo de *T. vulgare* valores que no han mostrado otras lactonas sesquiterpénicas. A esta misma concentración, inhibe en forma parcial o total la germinación de las otras semillas dicotiledóneas. Por su gran actividad y su alta selectividad, la ambrosina puede representar un buen candidato para usarse como un modelo que permita el desarrollo de nuevos herbicidas de origen vegetal o semisintéticos.

Introducción



1 - INTRODUCCIÓN

La agricultura moderna utiliza pesticidas sintéticos para controlar malezas y otras plagas y de esta manera aumentar la producción en las cosechas. Los herbicidas sintéticos generalmente cumplen con este fin, pero al mismo tiempo causan un impacto negativo al medio ambiente y en la salud humana. La incorporación de herbicidas de origen botánico (compuestos alelopáticos) dentro de la agricultura puede reducir estos riesgos, ya que por ser biodegradables causan menos contaminación.^{1,2}

La alelopatía es un término creado por Molisch en 1937, y deriva de las palabras griegas alleton (mutuo) y pathos (perjuicio, desventaja). A pesar de la precisión de su etimología, el término se ha aplicado de distinta manera. Para Rice, 1984 el término incluye los efectos directos o indirectos, dañinos o benéficos de la interacción entre plantas a través de la producción de compuestos químicos, los cuales son liberados al medio ambiente a través de cualquier tejido vivo o muerto. Whittaker en 1971, propuso que el término involucrara todas las interacciones químicas provocadas por sustancias de origen vegetal con otras plantas u otros seres vivos³. Este concepto, por ser más general, parece más adecuado.

Existe una gran cantidad de trabajos publicados en la literatura química que informan de metabolitos secundarios aislados de plantas con actividad herbicida, probablemente estos metabolitos secundarios tengan una función de protección, contra otras plantas. También es probable que una misma sustancia desempeñe varias funciones, dependiendo de la concentración en que se encuentre dentro de la planta. Por otro lado, un compuesto que es tóxico para una especie puede ser inocuo para otra.

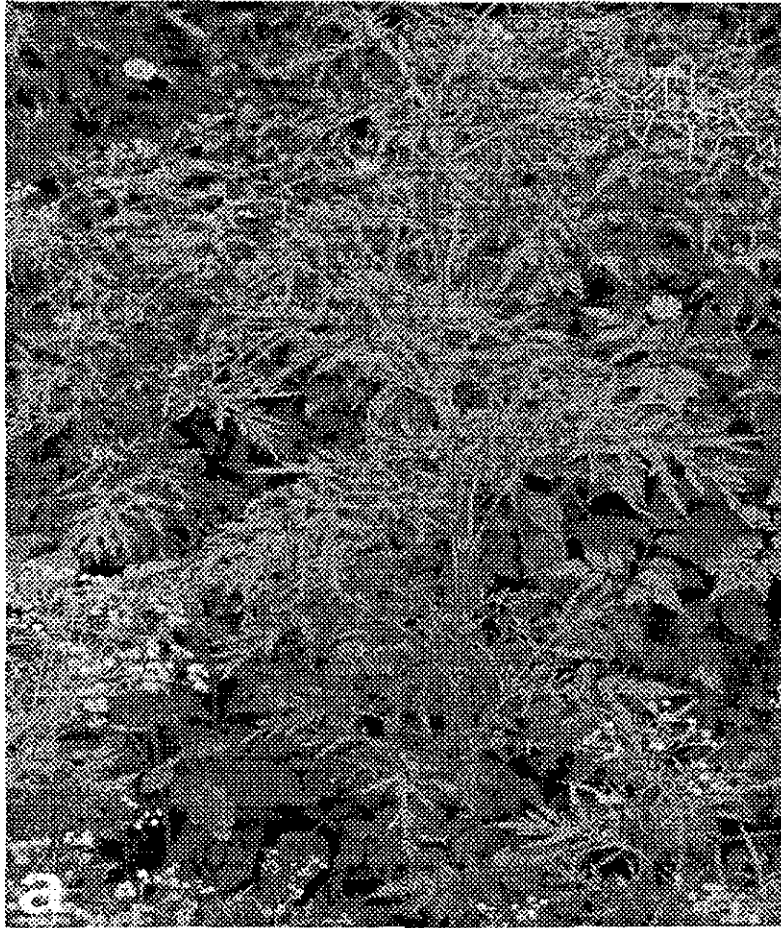
Se sabe que las plantas producen diversas sustancias con efectos alelopáticos como consecuencia de una verdadera guerra química entre los individuos, en que cada uno pelea por su integridad y territorio. Las plantas no pueden escapar del ataque de sus enemigos, por lo que utilizan tales métodos de supervivencia con mayor intensidad que los demás seres vivos. También es probable que esta estrategia química sea utilizada por las plantas para defenderse de sus depredadores.

La alelopatía también ejerce un papel importante en la protección de las plantas contra las plagas de insectos. Así los llamados compuestos aleloquímicos que sintetizan

varias especies, pueden ser tóxicos para sus depredadores naturales como los insectos o actuar contra bacterias, hongos o virus, siendo la forma más común de exhalar estos alelopáticos a través de las flores, hojas, raíces o por lixiviación.

La búsqueda de nuevos herbicidas, basado en aleloquímicos de origen natural, a dado lugar a numerosas investigaciones y al descubrimiento de un gran número de compuestos con actividad alelopática⁴. Los aleloquímicos de origen natural han sido usados como modelos para el desarrollo de herbicidas sintéticos ya que los primeros son biodegradables, altamente selectivos y sus mecanismos de acción tienden a ser diferentes a los mostrados por los herbicidas sintéticos.⁵ Existe una gran diversidad de estructuras que presentan actividad alelopática, un grupo poco estudiado son las lactonas sesquiterpénicas, las cuales presentan una gran actividad alelopática. Se han publicado dos estudios por el grupo de Macías involucrando lactonas del tipo de las germacranólidas⁶ y de las guianólidas⁷.

Objetivos



2 - OBJETIVOS

2.1 Objetivos General

Aislar los compuestos alelopáticos de dos especies de *Parthenium*, mediante un estudio biodirigido, evaluar la actividad alelopática de estos compuestos y sus derivados y correlacionar las estructuras con la actividad ensayada.

2.2 Objetivos Específicos

1 - Obtener los extractos MeOH y CH₂Cl₂ de *Parthenium hysterophorus* y *Parthenium bipinnatifidum*.

2 - Evaluar la actividad inhibitoria de los extracto de *P. hysterophorus* y *P. bipinnatifidum* en la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de monocotiledóneas y dicotiledóneas.

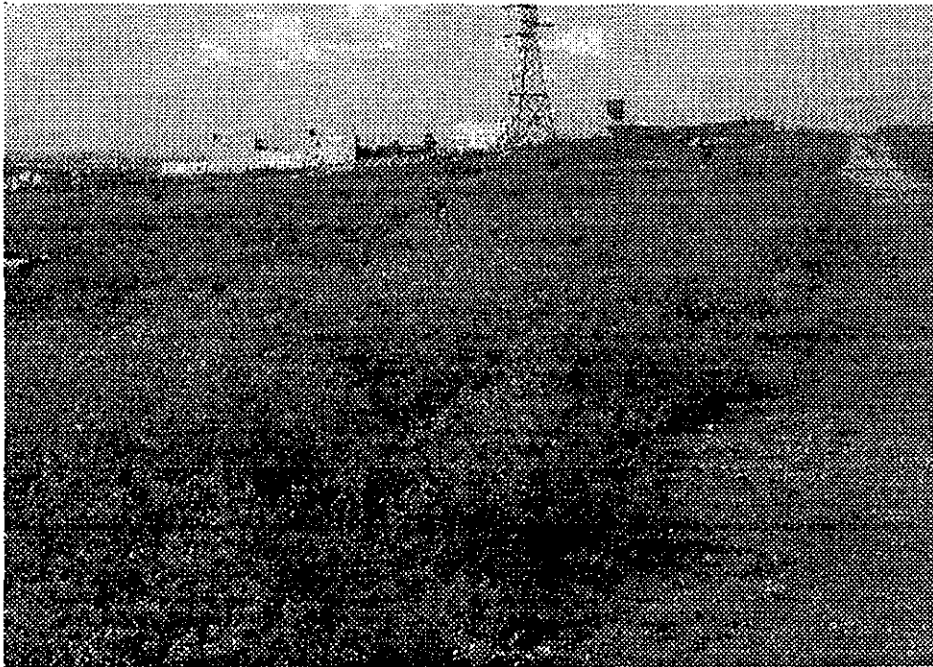
3 - Aislar e identificar los compuestos de *P. hysterophorus* y *P. bipinnatifidum* responsables de los efectos alelopáticos.

4 - Modificar químicamente los compuestos aislados con el objeto de establecer una correlación entre las estructuras y la actividad ensayada.

5 - Determinar el potencial inhibitorio o regulador de las lactonas aisladas y sus derivados en la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de mono y dicotiledóneas.

6- Comparar las actividades inhibitorias de las lactonas y sus derivados con respecto a la lactona zaluzanina C y el herbicida comercial 2.4-D.

Justificación 3



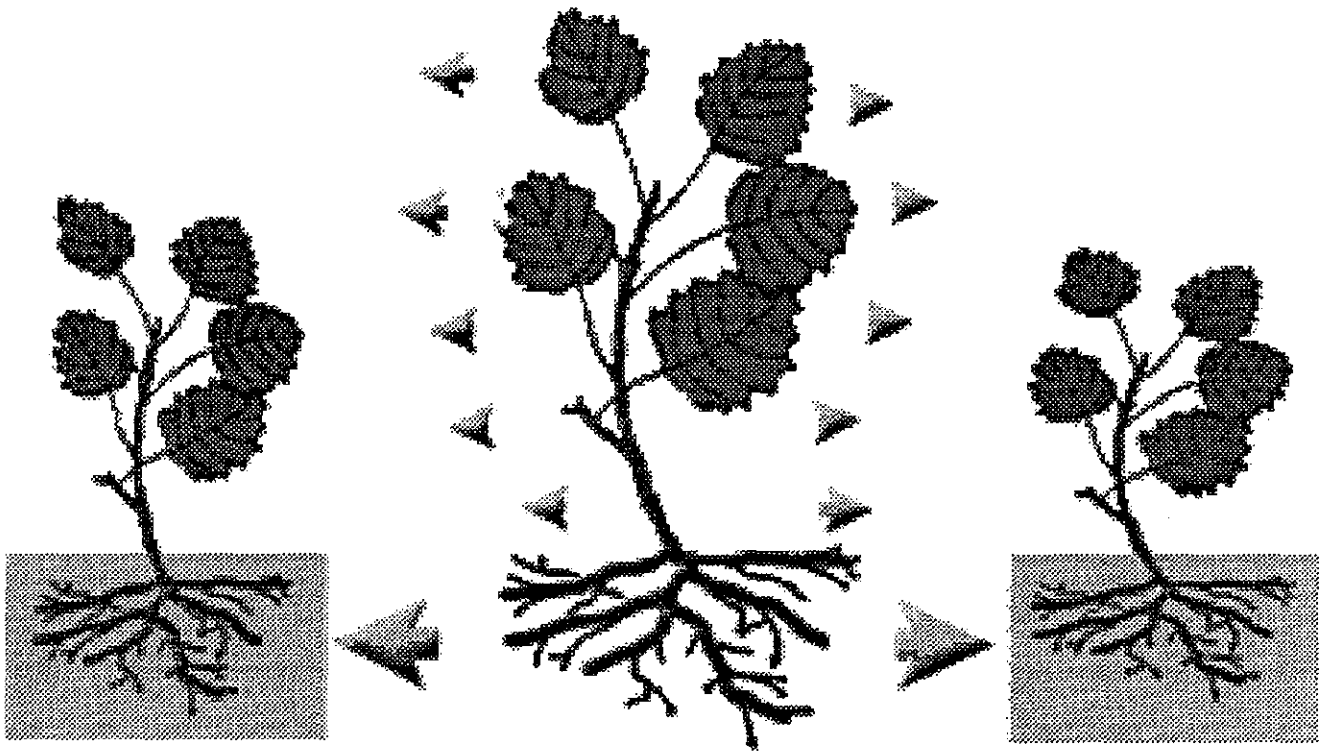
3. JUSTIFICACIÓN

En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio para correlacionar la estructura de tres pseudoguyanólidas naturales (partenina, ambrosina e histerina) y once derivados (semisintéticos) con la actividad inhibitoria y reguladora de la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de tres dico y 2 monocotiledonéas. Así como determinar la importancia relativa de la presencia del grupo metileno exocíclico en pseudoguyanólidas, la conformación molecular y la relación lipofilicidad-hidrofilicidad en la actividad alelopática de estas lactonas. Este trabajo se justifica puesto que no se han descrito estudios para este tipo de lactonas.

Partenina es la pseudoguyanólida más estudiada,^{8, 9, 10, 11, 12, 13} pero los estudios realizados con esta lactona se han llevado a cabo en la germinación de otras semillas de malezas y no se determinaron los GI_{50} para esas semillas. Tampoco se ha estudiado la partenina en el desarrollo de plántulas, estudio necesario para conocer las características postemergentes de esta lactona.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Antecedentes 4



4 - ANTECEDENTES

4.1 Herbicidas de origen naturales (Aleloquímicos)

El uso potencial de fitotoxinas naturales (aleloquímicos) para desarrollar nuevos herbicidas en el control de malezas, se ha incrementado con el conocimiento de sus modos de acción. Los herbicidas de origen vegetal pueden ser de gran interés para la industria agroquímica, puesto que estos productos poseen mecanismos de acción diferente de los sintéticos.⁵

Existen también ejemplos, donde los herbicidas orgánicos de origen natural, han sido usados como modelos de herbicidas sintéticos. La ciperina aislada por Weber y Gloer¹⁴ del hongo *Preussia fleischhakei* resultó una fitotoxina muy potente. Esta fitotoxina fue estudiada por el grupo de Harrington¹⁵ y condujo al descubrimiento de herbicida sintético acifluorfen (fig. 1)

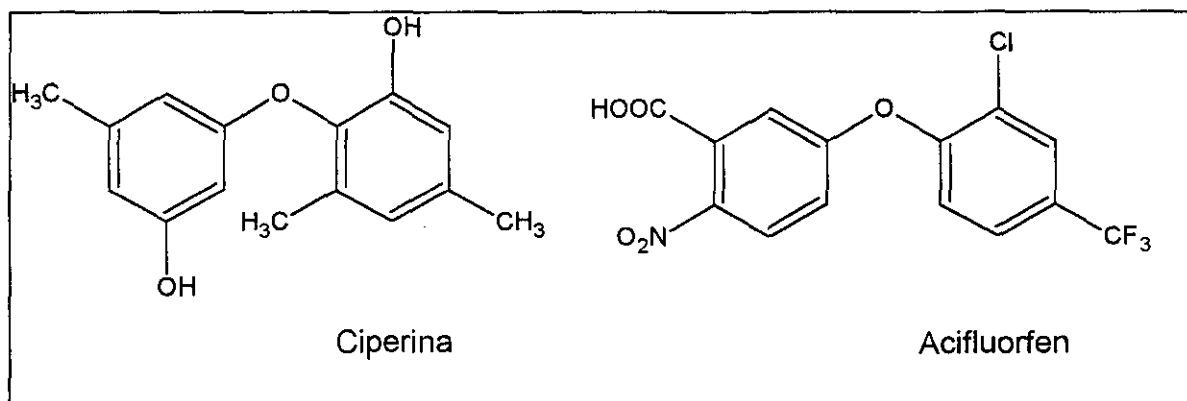


Fig. 1. Estructura del producto natural fitotóxico de origen natural ciperina y del herbicida sintético acifluorfen

De forma análoga los compuestos naturales con actividad fitotóxica, cantataridina, 1,4-cineol y leptospermona, fueron los modelos para obtener los herbicidas sintéticos endotal, cinmetilina y sulcotriona⁵. La figura 2 muestra las estructuras de estos productos naturales fitotóxicos y de los herbicidas sintéticos que fueron obtenidos a partir de los naturales.

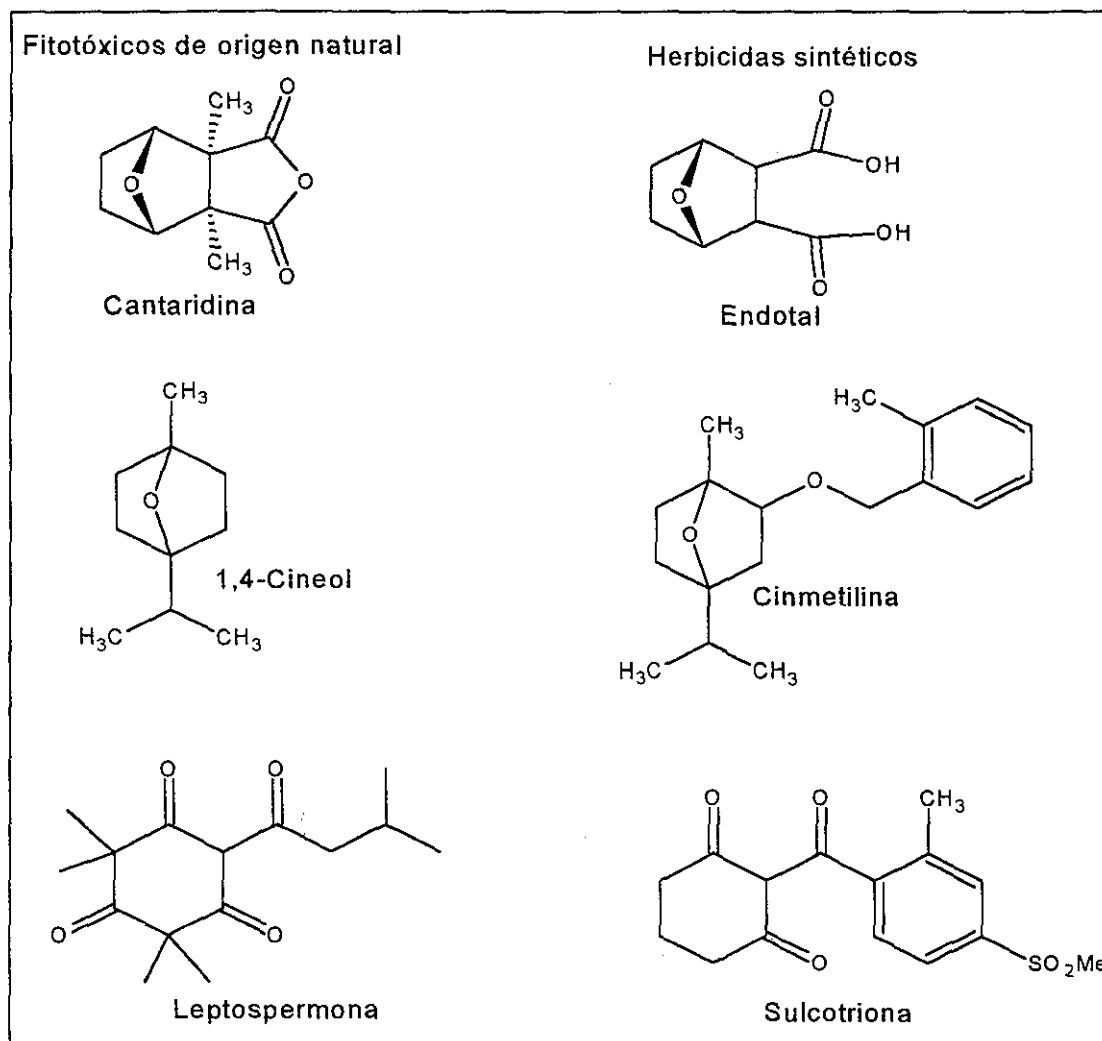


Fig. 2. Ejemplos de estructuras de compuestos naturales fitotóxicos y herbicidas sintéticos

4.2 Género *Parthenium*

El nombre *Parthenium* fue originado con base en dos especies, *P. hysterophorus* de Jamaica y *P. integrifolium* de Virginia. La siguiente especie descrita fue el *P. bipinnatifidum* que crece en partes altas de México¹⁶, es un especie muy cercana al *P. hysterophorus* y ha sido considerada erróneamente como *P. hysterophorus* durante mucho tiempo.¹⁶

Todas las especies de *Parthenium* están parcialmente cubiertas con tricomas, característica general del grupo, éste género presenta gran uniformidad en cuanto a sus flores pero se caracteriza por una gran diferencia en lo que respecta a su tamaño y forma de vida, por lo que se ha dividido en cuatro secciones que son: *Partheniachaeta*, *Argyrochaeta*, *Partheniastrum* y *Bolophytum*¹⁷.

1- Sección *Partheniachaeta*: presenta troncos leñosos, incluye a las siguientes especies: *P. argentatum*, *P. incanum*, *P. schottii*, *P. fruticosum*, *P. lozanium*, *P. tomentosum* y *P. Cineraceum*.

2- Sección *Argyrochaeta*: también se caracterizan por sus troncos herbáceos y suaves, generalmente persisten solamente por una única temporada (anuales). Sin embargo si las plantas son podadas regularmente, las raíces siguen produciendo nuevos retoños hasta por tres años.¹⁶ Esta sección está formada por las siguientes especies: *P. densipilum*, *P. confertum*, *P. bipinnatifidum*, *P. hysterophorus* y *P. glomeratum*.

3- Sección *Partheniastrum*: esta sección presenta raíces secundarias muy alargadas, con estructuras en forma de tubos, está formada por las especies *P. hispidum* y *P. integrifolium*.

4- Sección *Bolophytum*: Esta sección presenta tallos compactos también se caracteriza por no presentar ni una marca externa evidente que separe los tallos de las raíces, las raíces se expanden dando origen a nuevas plantas. En algunos casos llegan a estar muy

cercanas a los progenitores, manteniendo una vida enlazada por varios años. Esta sección esta compuesta por dos especies: *P. ligulatum* y *P. alpinum*.

4.3 *Parthenium hysterophorus*.

P. hysterophorus (amargosa) es una hierba endémica del entorno del Golfo de México (México y Estados Unidos), muy común en el noreste de México, que pertenece a la familia de las Asteraceae, habiendo sido introducida de forma accidental en regiones de climas similares a su territorio de origen. Tales como la India, Australia, China, partes de África y otros lugares¹⁸, como se ilustra en el mapa. (Fig. 3)

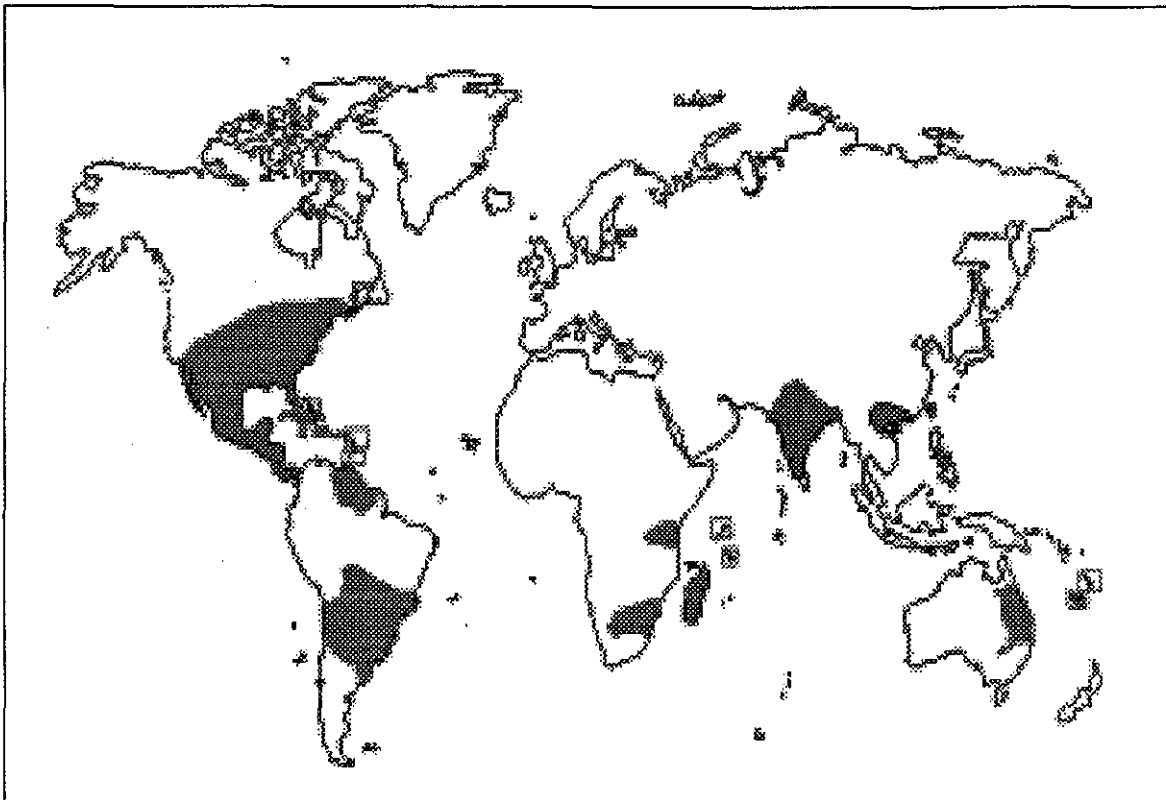


Fig. 3. Mapa de la distribución de *Parthenium hysterophorus*

El *P. hysterophorus* es una maleza que puede alcanzar hasta 2 metros de altura, su tamaño más común en México es de 30 a 50 cm¹⁹, y en Australia de 50 a 150 cm. Se

reproduce a través de semillas en la estación de lluvias y las semillas pueden permanecer en el suelo hasta 20 años. Florece de 6 a 8 semanas ¹⁸

El *P. hysterophorus* es considerado una maleza que causa muchos daños a los campesinos y a sus plantaciones, siendo de gran interés el control de tal maleza. Artículos publicados por diferentes grupos de la India, China, Australia, México, Argentina, informan de los daños causados por el *P. hysterophorus* y sus metabolitos, tales como dermatitis por contacto produciendo una reacción de hipersensibilidad en la piel, conduciendo a casos clínicos de difícil control²⁰, también es, causante de sinusitis, renitis, alergia, bronquitis y eczemas en humanos.²¹ Es una planta con gran resistencia al ataque de insectos.²² Recientemente se ha publicado un estudio sobre la actividad antibacteriana y la inhibición de la peroxidación de lípidos no enzimáticos (in vitro) del extracto crudo de *P. hysterophorus*.²³

El principio amargo de *Parthenium hysterophorus* es atribuido a la partenina, cuya estructura ya ha sido establecida.²⁴ Existen estudios preliminares de partenina y extractos de *P. hysterophorus*, donde mostraron tener actividad inhibitoria del crecimiento de *Phaseolus vulgaris*,²⁵ *Eleusine coracana*²⁶ y otras semillas.^{8,9,10,11,12,13} Hasta ahora no existen informes sobre la acción de extractos y compuestos de estas plantas sobre otras semillas, como *Lolium multiflorum*, *Physalis ixocarpa*, *Trifolium pratense*, *Lactuca sativa* y *Triticum vulgare*.

4.4 *Parthenium bipinnatifidum*.

Es una planta anual, erecta ascendente, hasta 50cm de alto, tallo comúnmente ramificado, estriado, hispido; hojas de 2 a 25 cm de largo, bi a tripinnadamente dividida en segmentos oblongos u ovados, por lo general obtusos o redondeados en el ápice, hispidos o escábridos en ambas caras, con los pelos más largos sobre las nervaduras, cabezuelas en cimas más o menos apretadas, a veces casi sésiles; involucre anchamente campanulado, de 3 a 4 mm de largo, sus brácteas exteriores cinco, ovadas, pubescentes en el ápice, persistentes, las brácteas interiores cinco, suborbiculares, glabras, cayendo con los aquenios; receptáculo hemisférico, páleas de 2 a 2.5 mm de largo, ensanchadas y pubescentes en el ápice, las exteriores volviéndose corchosas, cuculadas; flores liguladas

con las láminas diminutas, de menos de 1 mm de largo, emarginadas en el ápice, aquenio oblanceolado a obovado, de 2 a 2.5 mm de largo, negruzco, glabro o pubérulo, vilano de 2 escamas petaloides de poco menos de 1 mm de largo; flores del disco ± 80 , sus corolas de ± 2 mm de largo, casi filiformes, glabras. Ampliamente distribuida y frecuente en las partes bajas del valle de México a una altitud de 2250 m. Maleza ruderal y arvense, a veces penetrando en otras comunidades secundarias. Conocida de Chihuahua y Nuevo León a Veracruz, Puebla y Guerrero. Esta planta se menciona del Valle de México como *P. hysterothorus* L., especie afín de la que no siempre es fácil de distinguir²⁷.

Rodríguez y colaboradores²⁸ mencionan que de esta planta se aislaron las siguientes lactonas sesquiterpénicas: damsina, bipinnatina, ambrosina, neoambrosina, histerina y acetato de histerina. En estudios previos fueron aislados flavonoides.^{29,30}

4.5 Lactonas Sesquiterpénicas

Las lactonas sesquiterpénicas (LSQs) son metabolitos secundarios aislados de plantas que poseen a menudo un sabor amargo, están presentes en diversas familias de plantas que presentan actividad biológica, como las *Acanthaceae*, *Magnoliaceae*, *Apiaceae*, *Euphorbiaceae*, *Lauraceae*, *Maginoleacea*, *Menispermaceae*, *Rutaceae*, *Winteraceae* y *Hepaticidae*.²¹ Sin embargo, el mayor número de lactonas publicadas son aisladas de plantas pertenecientes a la familia *Asteraceae*. El número de lactonas conocidas en el año de 1994 eran alrededor de 4000³¹ y aproximadamente 5000 estructuras en el 2001.³²

4.5.1 Biogénesis de las Lactonas Sesquiterpénicas

Las lactonas sesquiterpénicas poseen un esqueleto fundamental con 15 átomos de carbono, que teóricamente deriva de la unión de tres fragmentos de isopreno (2-metil, 1-3 butadieno). Las lactonas pueden ser clasificadas en grupos de acuerdo con su esqueleto básico. Los grupos más numerosos son: germacranólidas, guayanólidas, eudesmanólidas y pseudoguayanólidas.^{28, 33}

Los germacranólidas son considerados lactonas de primer paso biogénico y se supone que sean las precursoras de la demás. Se forman por ciclización enzimática seguida de oxidación enzimática del trans-trans pirofosfato de farnesilo³⁴. Las germacranólidas pueden ciclizarse, usualmente en los enlaces trans C₄-C₅ y C₁-C₁₀ del anillo de 10 miembros, el sustituyente en C₇ presenta la configuración β. La ciclización en C₅-C₁₀, conduce a las eudesmanólidas y la ciclización en C₅-C₁ conduce a los guayanólidas que por reordenamiento del metilo de C₄ a C₅, pueden ser convertidas en pseudoguayanólidas.³³

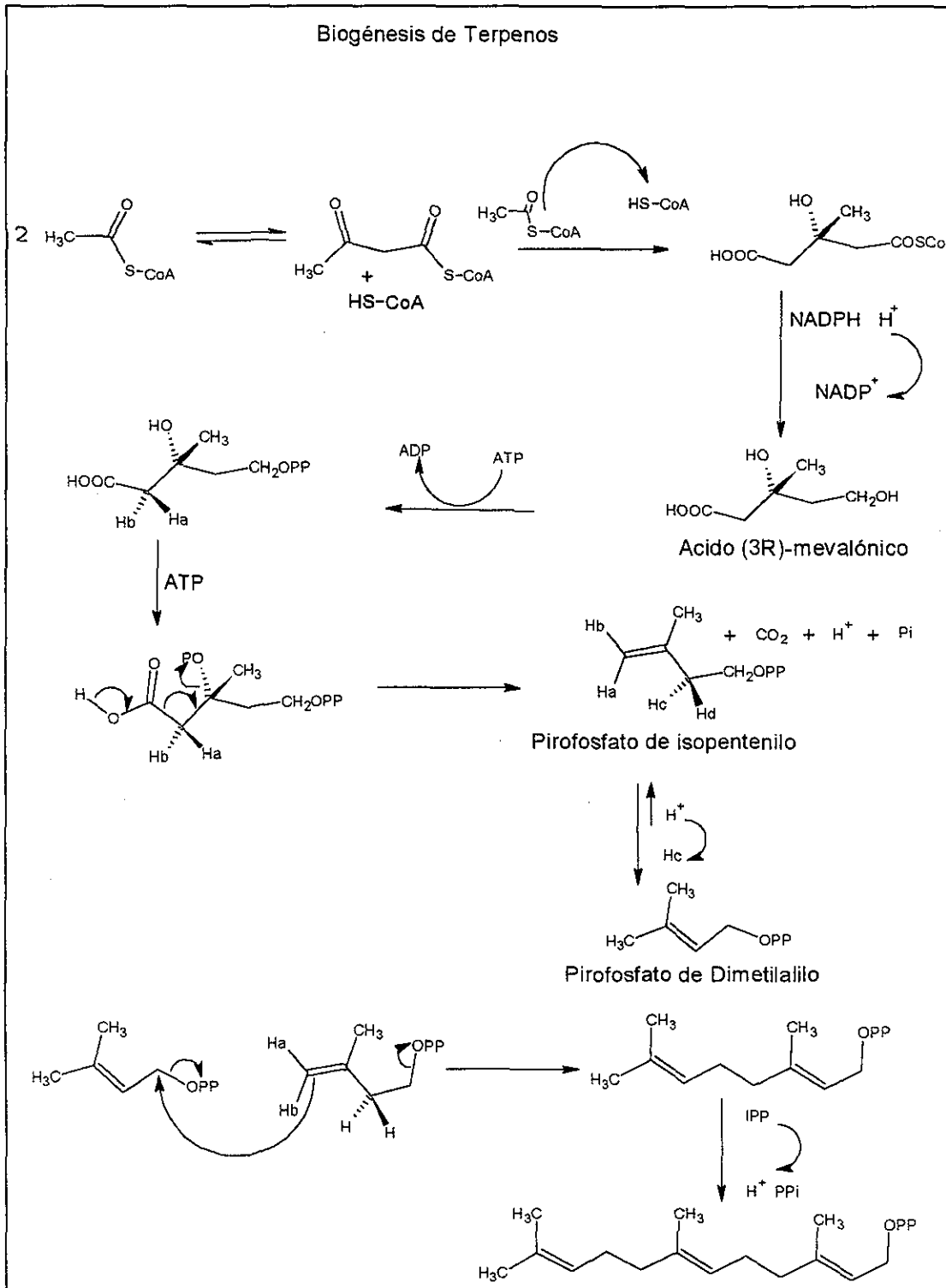


Fig. 4. Ruta Biogénica de los sesquiterpenos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

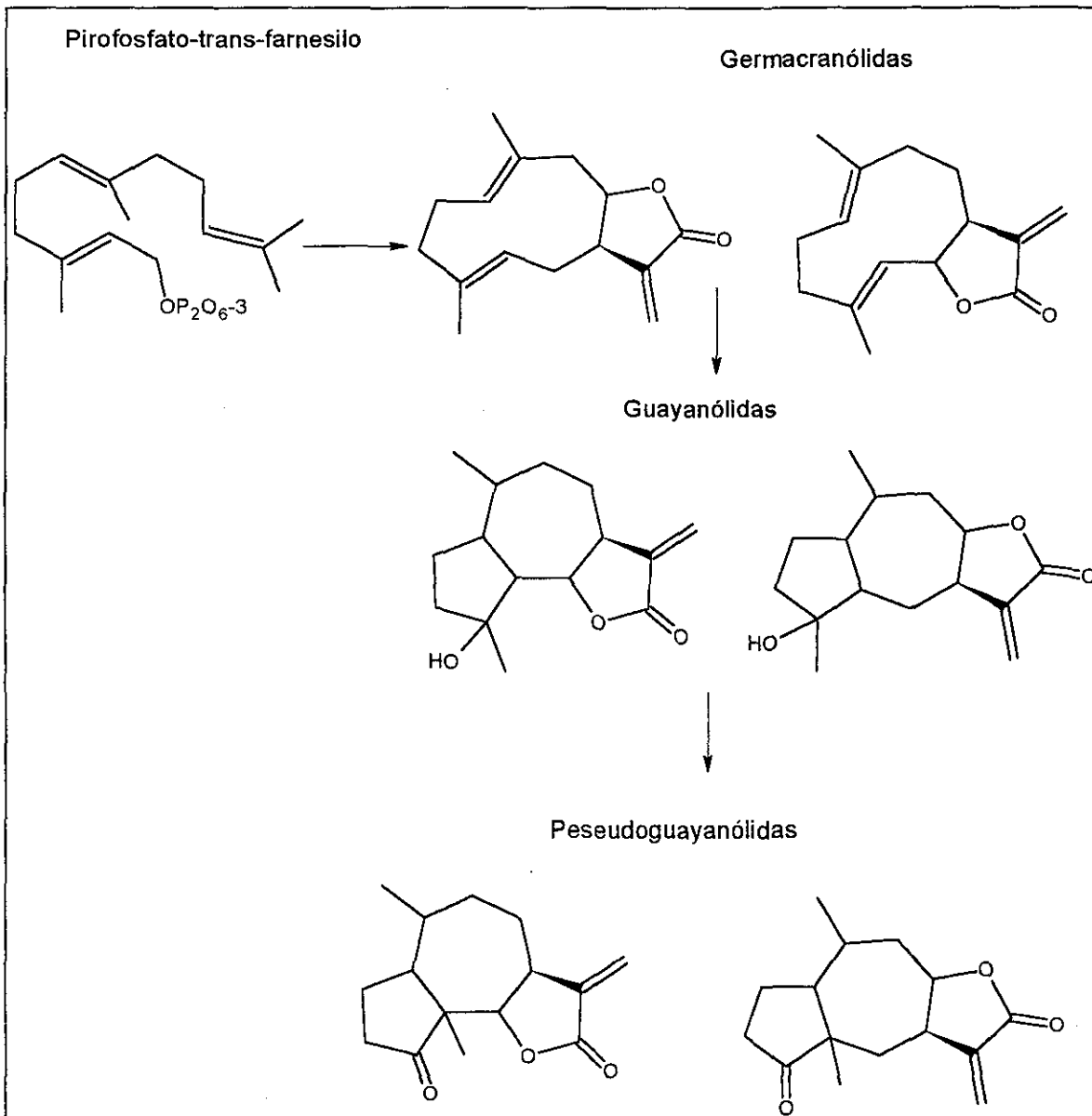


Fig. 5. Ruta biogénica de las pseudoguanólidas

4.6 Pseudoguayanólidas

Las pseudoguayanólidas son el tipo de lactonas sesquiterpénicas, que se caracteriza por poseer un esqueleto anormal de guayano, resultante de la migración del grupo metilo en C-4 al C-5.^{35,36 37}

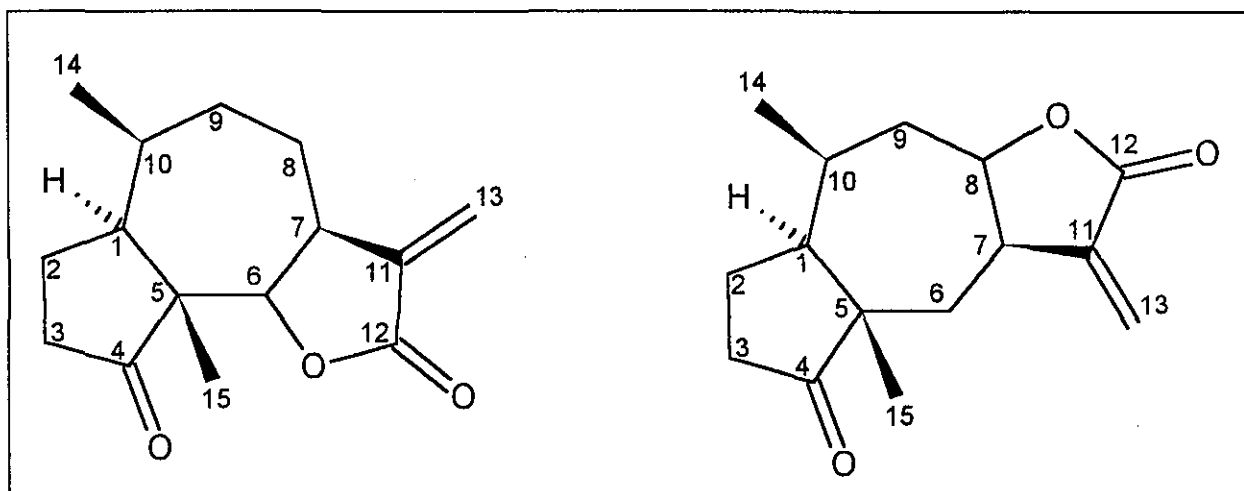


Fig. 6. Estructuras básicas de las pseudoguayanólidas.

Las pseudoguayanólidas pueden estar lactonizadas en C₆ o en C₈, y la mayoría, poseen una estereoquímica cis. El cierre entre los anillos de 5 y 7 generalmente es trans, solamente unas pocas lactonas estudiadas tienen la estereoquímica cis. Las reacciones más comunes de las pseudoguayanólidas son: la deshidrogenación produciendo azulenos, deshidratación, oxidación con perácidos tipo Bayer-Villiger produciendo lactonas, reordenamiento, reacciones fotoquímicas y formación de nor-pseudoguayanólidas.³³

4.7 Actividad Biológica de Lactonas sesquiterpénicas

17 lactonas sesquiterpénicas del grupo de la guayanólidas fueron evaluadas en plantas mono y dicotiledóneas utilizando el herbicida comercial "Logran" como referencia interna, los resultados mostraron una actividad comparable a la referencia (Logran), por lo cual estas lactonas son propuestas como modelos de herbicidas naturales. El estudio concluye que el grupo lactona es necesario para la actividad, pero no necesariamente tiene que ser insaturado y que un segundo sistema carbonílico insaturado aumenta la actividad

inhibitoria. Además la lipofiliidad y la estereoquímica de los sitios de anclaje son factores que afectan la actividad.⁷ La figura 7 muestra dos de las guayanólidas con actividad inhibitoria en germinación y desarrollo de semillas, que no presentan el metileno exocíclico.

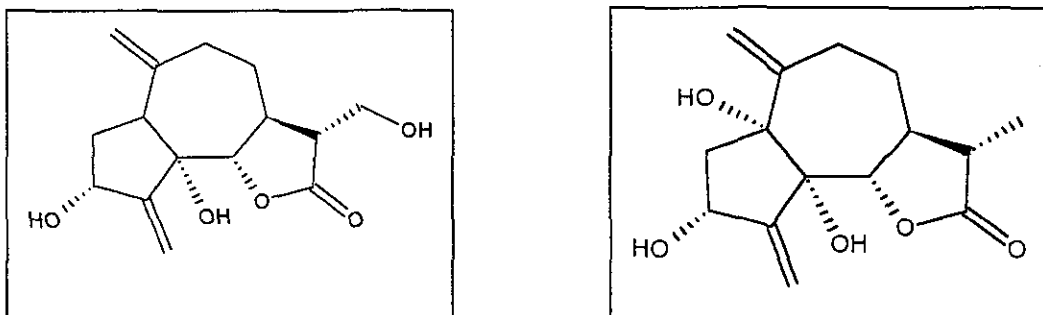


Fig. 7 Ejemplos de guayanólidas que contienen un grupo lactona saturado y que presentan actividad alelopática en semillas mono y decotiledóneas.

La lactona dehidrozaluzanina C (DHZ), figura 8, fue evaluada en 4 especies de monocots y 5 dicots, a concentraciones de 1000 μM a 0.01 μM . La DHZ resultó ser más activa que el herbicida comercial logran usado como referencia a concentraciones 1000 μM , por lo cual es considerada uno de los reguladores del crecimiento de plantas más potente de origen botánico³⁸.

La DHZ inhibe el crecimiento de la raíz de lechuga, mostrando una IC_{50} a 500 μM . DHZ es mas activa que el herbicida comercial acifluoren a una concentración 50 μM , también causa rompimiento de la membrana plasmática en discos de cotiledón de pepino el mecanismo de acción mediante el cual actúa esta lactona involucra la formación de mono y diaductos con biomoléculas conteniendo un grupo sulfidrilo, como la glutatona³⁹.

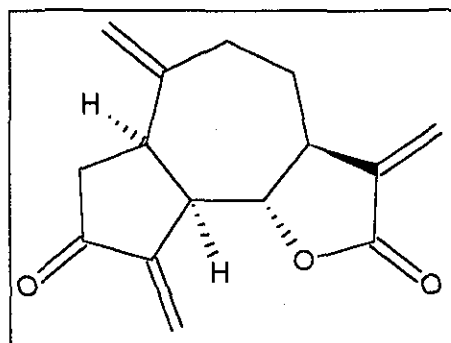


Fig. 8. Estructura de dehidrozaluzanina C

Un estudio para evaluar el efecto de las trans-trans germacranólidas, costunólida, partenólida, 1-10 epoxicostunólida, 1-10 epoxi partenólida y sus respectivos 11-13 dihidroderivados, en el crecimiento y germinación de varias especies de plantas mono y dicotiledóneas, fue llevado a cabo utilizando como referencia el herbicida "logran". Las lactonas estudiadas resultaron ser selectivas en el crecimiento de la raíz de las especies monocotiledóneas.⁶ Este estudio también concluye que la lactona no tiene que ser necesariamente insaturada para mostrar actividad.

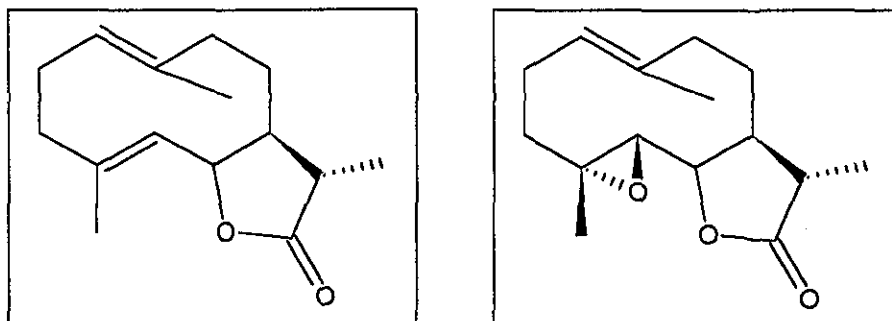


Fig. 9. Trans, trans-germacranólidas con el metileno exocíclico saturado y que presentan actividad inhibitoria y reguladora de la germinación de semillas y desarrollo de plántulas.

Tagitinina A, Tagitinina C y 17 derivados de ellas, obtenidos mediante reacciones químicas, fueron evaluados en tres importantes verduras: Rábano, pepino y cebolla en concentraciones de 1000 μ M. Tagitinina A mostró ser más activa que Tagitinina C en la inhibición de la germinación y el crecimiento de la especie estudiadas.⁴⁰

Seis lactonas sesquiterpénicas aisladas del girasol fueron probadas en semillas de *Orobancha cumana*. La partenólida y la 3,5 dihidroxi-dehidrocostuslactona, incrementaron de manera específica y significativa la germinación de estas semillas.⁴¹

Las lactonas sesquiterpénicas, burrodina, confertiflorina, desacetilconfertiflorina, dihidropartenina, partenina y 7-hidroxi-3-desoxizaluzanina C, fueron probadas en la germinación de semillas (16 dicotiledonas y 9 monocotiledonas) a concentraciones de 1,10, 100 μ M.⁴² Las lactonas ovatifolina, deacetil-ovatifolina 1-10, epoxi-ovatifolina, 11-13 dihidro-ovatifolina y 8-acetoxi-ovatifolina, inhibieron la germinación de varias especies de semillas mono y dicotiledóneas.³²

La lactona dehidrocostus-lactona mostró actividad fitoreguladora, induciendo la formación de raíces en cortes de hipocotilos de *Phaseolus aureus*.⁴³ De la planta *Helianthus annuus*, se aisló la germacranólida annuithrina que inhibió el crecimiento de cortes de coleoptilo de avena.⁴⁴

La artemisinina, es una lactona sesquiterpénica que posee una fuerte actividad antimalárica y contiene un grupo endoperóxido. Esta lactona y varios derivados fueron probados en semillas de *Lactuca sativa*, *Lolium multiflorum* y *Arabidopsis thaliana*. Los compuestos fueron más activos contra *Lolium* que contra *Lactuca* o *Arabidopsis*. Artemisinina inhibió el crecimiento de *Lemna minor* en un 50% a una concentración 5µM. El grupo funcional endoperóxido es necesario para la actividad, puesto que la artemisinina fue más activa que sus derivados sin el grupo endoperóxido.^{45,46.}

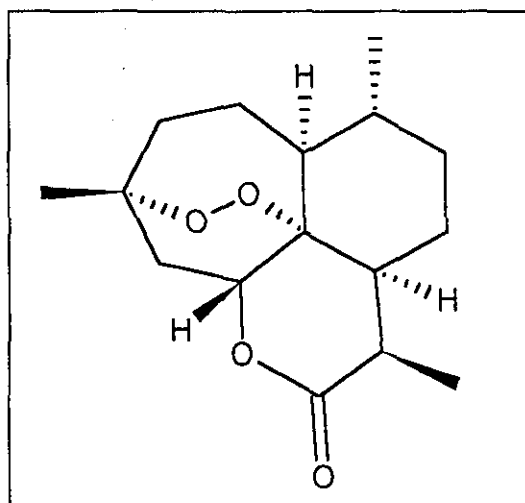


Fig. 10. Estructura de Artemisinina

Las LSQs presentan otras actividades como son: genotóxica⁴⁷, antiinflamatoria,^{48, 49} antitumoral,⁵⁰ antiúlceras,⁵¹ insecticida,⁵² antialimentaria,⁵³ antimalárica,⁵⁴ citotóxica,^{55,56} Inhibidores de la fotosíntesis y la reacción de Hill^{57, 58}. También se han publicado artículos de revisión de la actividad biológica de LSQs.^{21, 31, 34}

4.8 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción establecido para la citotoxicidad de las lactonas sesquiterpénicas involucra al grupo funcional $O=C-C=CH_2$ (α -metileno de la γ -lactona), otros grupos funcionales de menor influencia son la ciclopentenona α,β -insaturada así como grupos éster y cetona que intervienen en la actividad de estos compuestos. La forma por la cual se postula la acción inhibitoria es a través de una adición de Michael entre el grupo funcional $O=C-C=CH_2$ y un nucleófilo biológico, en especial el grupo sulfidrilo de las enzimas.^{39,59}

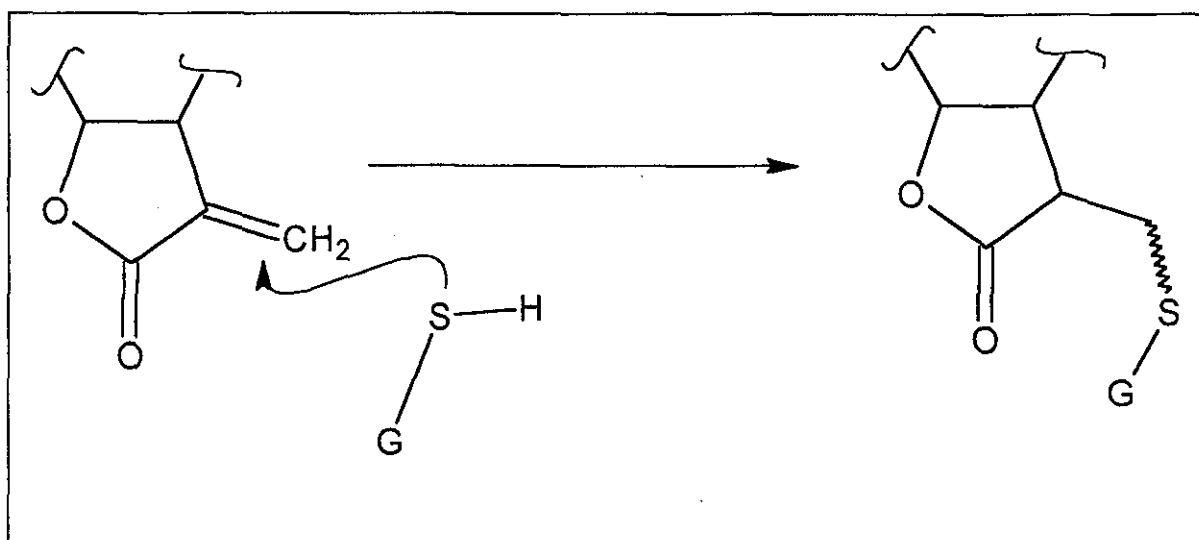
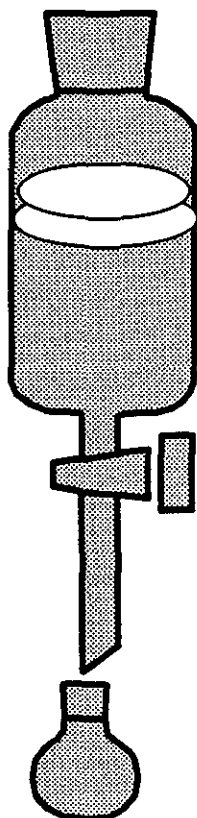


Fig. 11. Ataque de un nucleófilo biológico al metileno exocíclico de una lactona sesquiterpénica.

El mecanismo de acción para explicar la actividad inhibitoria en la germinación de semillas se ha explicado en base a la presencia del grupo α -metileno exocíclico de la γ -lactona. Recientemente estudios publicados por Macias^{6,7} explican que la actividad de las lactonas sesquiterpénicas no se debe exclusivamente a la presencia del metileno exocíclico sino que también son importantes otros factores como son la conformación molecular, el impedimento estérico del sitio de acción y la relación lipofilicidad-hidrofiliidad.

Parte Experimental 5

Parte Experimental 5



5 -PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material vegetal.

El presente estudio se realizó con las partes aéreas: tallos, hojas y flores secas de *Parthenium hysterophorus* (6340g) y *Parthenium bipinnatifidum* (5900g).

Parthenium hysterophorus fue recolectado en Oaxtepec Estado de Morelos en diciembre de 1997 y *P. bipinnatifidum* se recolectó en octubre de 1998, en los alrededores de Ciudad Universitaria México D.F.

Las plantas fueron identificadas por el Dr. O. Tellez, del Instituto de Biología de la UNAM. Muestras de estas plantas fueron depositadas en el Herbario del Instituto de Biología de la UNAM.

5.2 Preparación de los extractos orgánicos.

Los extractos de *P. hysterophorus* y *P. bipinnatifidum* fueron obtenidos utilizando como disolventes diclorometano y metanol por separado. Se realizó la extracción tres veces por un período de tres días con 15 L de disolvente. Los disolventes se filtraron y se evaporaron a presión reducida en un rota vapor, dejando como residuos los correspondientes extractos.

5.3. Análisis cromatográfico de los extractos.

Los extractos fueron absorbidos en gel de sílice 35/70 en proporción 1:1 (extracto: gel de sílice) y fueron colocados, en una columna empacada con sílica 70/230. Posteriormente se realizó el fraccionamiento en columna abierta, recolectándose fracciones de 500mL. El proceso de elusión se efectuó con mezclas de hexano-acetato de etilo, en polaridad creciente, diclorometano-metanol y finalmente metanol. El cuadro 1 muestra las cantidades y proporciones utilizadas en la cromatografía.

Cuadro 1: Pesos de los extractos fraccionados			
Planta	Extracto	Peso del extracto en gramos	Peso de gel de sílica en gramos
<i>Parthenium</i>	Diclorometano	170	2040
<i>bipinnatifidum</i>	Metanólico	120	1440
<i>Parthenium</i>	Diclorometano	100	1200
<i>hysterophorus</i>	Metanólico	100	1200

Los grupos obtenidos del fraccionamiento de los extractos de diclorometano de *P. hysterophorus* y *P. bipinnatifidum* que presentaron actividad inhibitoria de la germinación de las semillas y desarrollo de plántulas monocotiledóneas y dicotiledóneas⁶⁰, fueron sometidas a fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta y posteriormente purificadas por cromatografía en placa fina, obteniendo los subgrupos y los compuestos activos.²⁹

El compuesto de referencia zaluzanina C fue proporcionado por el Prof. Romo de Vivar (Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.).

5.4 Elucidación estructural de los compuestos activos.

Los compuestos activos conocidos se identificaron por comparación con los datos espectroscópicos publicados en la literatura y los nuevos mediante las siguientes técnicas espectroscópicas: IR-TF, RMN-¹H, RMN-¹³C y espectrometría de masas por impacto electrónico.

La figura 12 ilustra esquemáticamente el estudio biodirigido por lo cual fue posible aislar los compuestos activos.

Extracción y estudio biodirigido

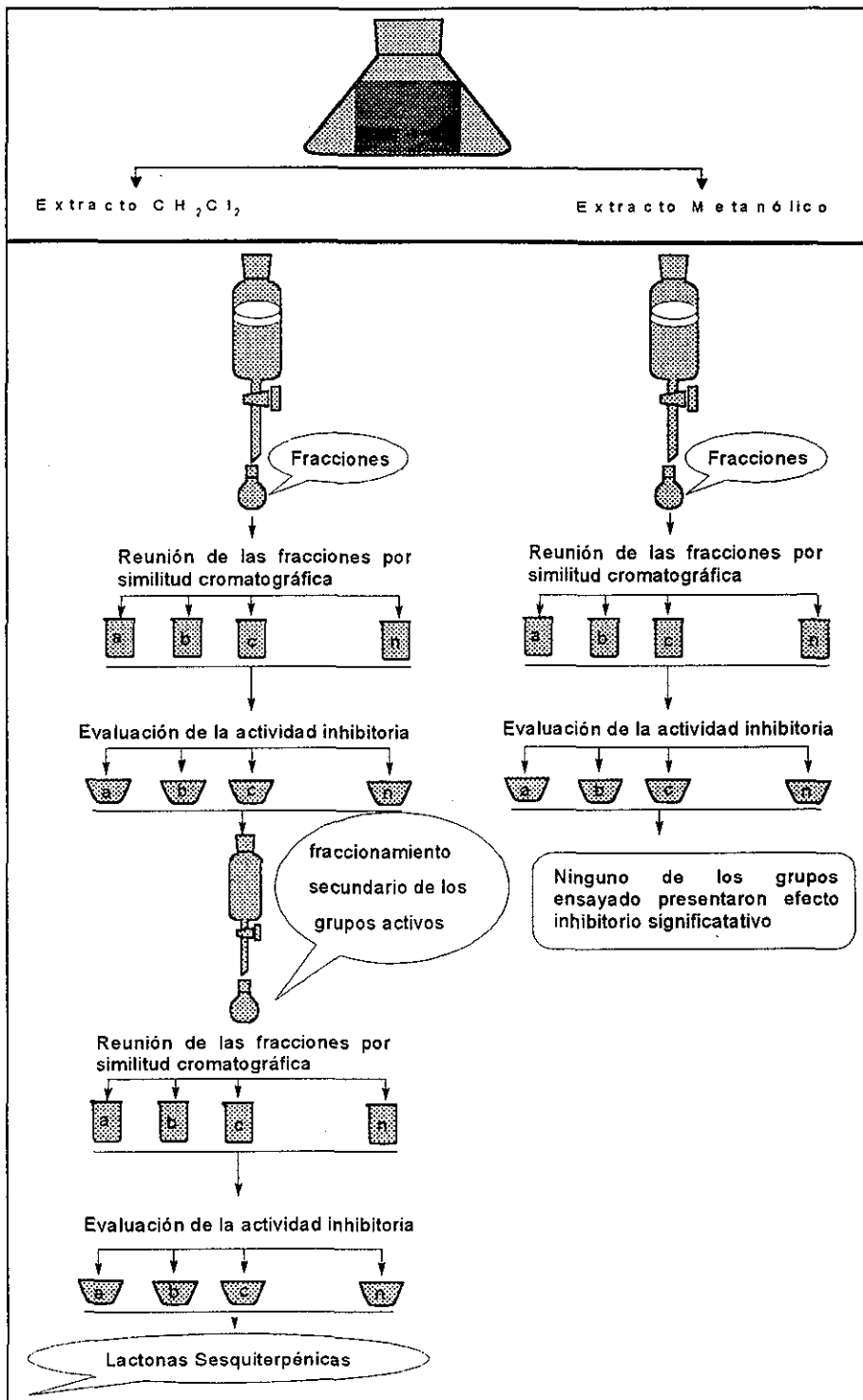


Fig. 12. Diagrama de flujo del procedimiento biodirigido y aislamiento de los metabolitos secundarios responsables de la actividad alelopática de *P. hysterothorus* y *P. bipinnatifidum*.

5.5 Pruebas de actividad biológica.

5.5.1 Prueba de germinación de semillas y desarrollo de plántulas.

Se determinaron los efectos de los extractos, fracciones y compuestos aislados de las fracciones activas, así como los compuestos obtenidos por reacciones químicas, en la germinación de semillas y desarrollo de las plantas: *Physalis ixocarpa*, *Lactuca sativa*, *Trifolium pratense*, *Lolium multiflorum* y *Triticum vulgare*. Todas las semillas fueron compradas a la empresa Semillas "COBO" S. A. de C.V. México D. F., México. Los ensayos fueron realizados por triplicado, utilizando cajas Petri con papel filtro previamente esterilizado en autoclave y humedecido con 5mL de solución acuosa, el compuesto fue disuelto en CH₂Cl₂, de pureza analítica, y adicionado sobre el papel filtro de la caja Petri, permitiendo la evaporación del disolvente por aproximadamente 2 horas, entonces fueron adicionadas las semillas y 5ml de agua.

Para la determinación de la actividad inhibitoria se utilizaron concentraciones entre 0 y 1000ppm para los extractos y fracciones, y de 0 a 1000μM para los compuestos puros. En los ensayos se usaron cajas Petri conteniendo 25 semillas en cada una de ellas, con excepción de las semillas de *T. vulgare* (trigo) que por ser de mayor tamaño se usaron solamente 15. Las cajas fueron selladas con parafilm, y se determinó la germinación a las 24, 48 y 72 horas. La elongación se midió después de 120 horas y los resultados (germinación y elongación) fueron trazados en gráficas tomando el control como 0% de concentración, 100% de germinación y 100% de elongación. Los valores de IC₅₀ (50% de inhibición) tanto en germinación, como en el crecimiento de raíz y tallo, fueron determinados por interpolación⁶⁰, utilizando el programa Origin 4.1.

5.5.2 Determinación del peso seco.

Posterior a la determinación del tamaño de la radícula y el tallo, fue eliminada la parte que cubre los cotiledones y posteriormente las plántulas fueron secadas en una estufa a 60°C, su peso fue determinado en una balanza semianalítica para la determinación del % de biomasa sintetizada.⁶⁰

5.5.3 Respiración de las semillas

La respiración de la semillas se midió con un polarógrafo tipo Clark midiendo la evolución del oxígeno (captación) durante el proceso de la germinación (se uso un oxímetro YSI modelo 5300). La captación del oxígeno, en presencia de las diferentes concentraciones de los compuestos probados, se determinó a los 5 y 10 minutos, durante todo el proceso las semillas contenidas en las celdas permanecieron en ausencia de luz y a 20°C de temperatura para retardar el proceso germinativo.⁶¹

5.6 Reacciones químicas.

5.6.1 Reducción.

Una típica reacción de reducción consistió en disolver el compuesto (partenina, ambrosina o histerina) en metanol y colocarlo en un matraz con agitación magnética a 0°C de temperatura. Posteriormente se adicionó una solución metanólica de NaBH₄. La reacción fue monitoreada por cromatografía en capa fina. Al término de la reacción se adicionó una solución de HCl al 10% y se extrajo tres veces con acetato de etilo, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida, usando un rotavapor. El residuo se purificó por cromatografía en capa fina usando cromatoplasmas preparativas de gel de sílice 60 F₂₅₄ de 1mm de espesor, eluidas con: hexano-acetato de etilo (2:3) para ambrosina y (3:7) para histerina y partenina. Obteniendo los siguientes productos de reducción; 1 α ,4 β -dihidroxi-pseudoguaya-2,11(13)-dien-6 β , 12-olida; 1 α ,4 β -dihidroxi-pseudoguaya-2-en-13 α ,6 β ,12-olida; 4 β -dihidroxi-pseudoguaya-2-en-13 α ,6 β -12-olida; 4 β ,14-dihidroxi-pseudoguyan-13 α ,6 β -12-olida.

5.6.2 Acetilación

Las lactonas, 1 α ,4 β -dihidroxi-pseudoguaya-2,11(13)-dien-6 β ,12-olida (30mg); 4 β -hidroxi-pseudoguaya-2-en-13 α ,6 β ,12-olida (25 mg); histerina (35 mg) y 4 β ,14-dihidroxi-pseudoguaya-13 α ,6 β ,12-olida (30 mg), fueron disueltas cada una de ellas en 0.5 mL de

piridina, adicionando en cada caso 0.5mL de anhídrido acético, dejando la reacción a temperatura ambiente y con agitación magnética por 30 min. Al finalizar la reacción los reactivos fueron eliminados al alto vacío con una bomba mecánica. El residuo se purificó por cromatografía en capa fina usando cromatoplasmas preparativas de gel de sílice 60 F₂₅₄ de 1mm de espesor desarrollando las cromatoplasmas con una mezcla de hexano-acetato de etilo (1:1) para histerina y 4β,14-dihidroxi-pseudoguaya-13α,6β,12-olida. Para la 4β-hidroxi-pseudoguaya-2-en-13α,6β,12-olida y 1α,4β-dihidroxi-pseudoguaya-2,11(13)-dien-6β, 12-olida, se usó una proporción 3:2.

Todos los derivados obtenidos por reducción y acetilación se identificaron mediante sus espectros de infrarrojo, resonancia magnética nuclear a 300MHz y espectrometría de masas, utilizando el método de impacto electrónico.

5.7 Análisis Estadístico.

Los datos mostrados en las gráficas de germinación de semillas y desarrollo de plántulas así como la tabla de IC₅₀, fueron obtenidos por media aritmética de ensayos en triplicado. El valor de cada ensayo fue obtenido por la media aritmética de las 25 semillas contenidas en cada ensayo. El promedio obtenido fue trazado en función de la concentración de los extractos, fracciones y compuestos utilizados en los respectivos ensayos. Los valores obtenidos fueron sometidos a una desviación estándar de 5%. Los valores de GI₅₀, TI₅₀ y RI₅₀ fueron obtenidos de las gráficas por interpolación. Este trabajo fue realizado en una computadora Compaq modelo 5203 usando el programa microsoft Origin 4.1

5.8 Materiales y reactivos.

Todos los reactivos utilizados fueron de pureza analítica. y/o calidad cromatográfica. Ácido 2,4-diclorofenoxi acético (2,4-D), ácido acético glacial, metanol, (CH₃)₄Si, CH₂Cl₂, CHCl₃, KCl, MgCl₂, CDCl₃, acetona-D₆, ácido, NaBH₄, piridina, y anhídrido acético. Cromatoplasmas de capa fina de gel de sílice GF₂₅₄ analíticas, gel de sílice

60, (70-230, 60A°) para cromatografía en columna. Los disolventes; *n*-hexano, diclorometano y metanol fueron adquiridos comercialmente y destilados en el laboratorio.

5.9 Aparatos.

Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros RMN¹H y RMN¹³C fueron obtenidos a 300 MHz, y 75 MHz respectivamente, en un equipo Varian VXR-300S el desplazamiento químico en ppm fue tomado en relación al (CH₃)₄Si, usado como referencia interna. Se utilizaron como disolventes CDCl₃ y acetona-D₆.

Infrarrojo

Los espectros de IR se obtuvieron en solución de CHCl₃ y en pastilla de KBr, en un espectrofotómetro Perkin Elmer 283-B y en un aparato FT-IR Nicolet Magna 750.

Punto de Fusión

Los puntos de fusión fueron obtenidos en un aparato marca Fischer-Johns y no fueron corregidos.

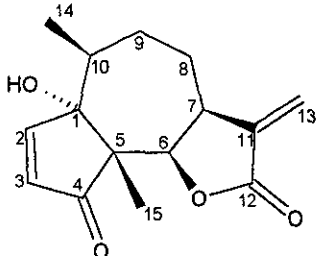
Evolución de oxígeno

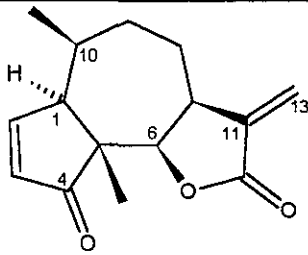
La evolución de oxígeno (captación) fue determinado con un electrodo tipo Clark conectado a un oxímetro YSI Modelo 5300.

5.10 Modelado molecular

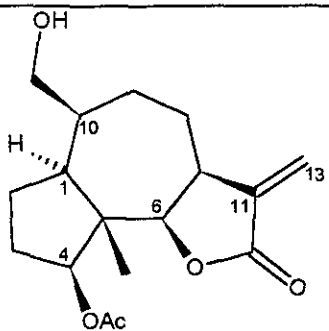
Las estructuras tridimensionales, fueron obtenidas por minimización de la energía conformacional, utilizando el programa de mecánica molecular MM2 y posteriormente el método abinitio AM1, ambos del MOPAC, ChemOffice versión 5.0. Las cuales convergieron dentro del criterio establecido (gradiente de 0.01).

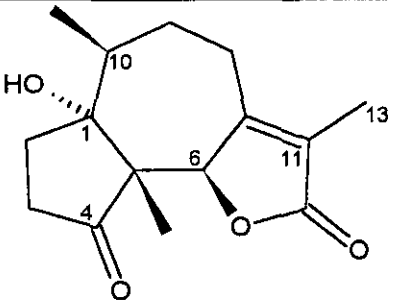
5.11 Propiedades físicas y espectroscópicas.

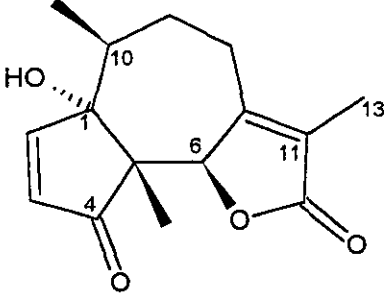
		Partenina (I). $C_{15}H_{18}O_4$ Pf: 163-164°C PM: 262	
N° C o H	δ (ppm) de 1H	δ (ppm) de ^{13}C	IR _{película} (cm^{-1})
1		84.6(s)	3429 (OH asociado)
2	7.50 (d, J=6.0Hz)	162.5(d)	2962 y 2924 (C-H)
3	6.20 (d, J=6.0 Hz)	132.1(d)	1760 (C=O γ -lactona)
4		210.1(s)	1721(C=O ciclopentenona).
5		59.2(s)	1273 (C-O-C)
6	5.00 (d, J=8.1 Hz)	78.5(d)	1660 (C=C)
7	3.50 (m)	44.24(d)	981 (H ₂ C=C-C=O)
8 ^a	1.85 (m)	28.4(t)	
8b	2.20 (m)		
9 ^a	2.25(m)	29.8(t)	
9	1.70(m)		
10	2.37(m)	40.8(d)	
11		140.4(s)	
12		170.5(s)	
13 ^a	6.28 (d, J=2.7 Hz)	121.6(t)	
13b	5.60 (d, J=2.1 Hz)		
14	1.14 (d, J=7.5 Hz)	17.4(q)	
15	1.3 (s)	18.3(q)	

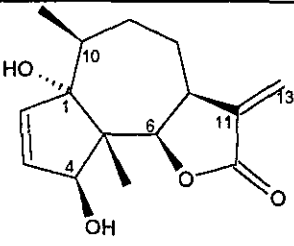
		<p>Ambrosina (2) $C_{15}H_{18}O_3$ Pf: 145-147°C PM: 246</p>
N° C o H	δ (ppm) de 1H	IR _{película} (cm ⁻¹)
1	2.98 (1H, m)	2937 y 2875 (C-H)
2	7.47 (1H, dd, J= 6.0 y 1.8Hz)	1766 (C=O de γ -lactona) :
3	6.17 (1H, dd, J=6.0 y 3.0Hz)	1712 (C=O ciclopentenona)
4		1660 (C=C)
5		980 (CH ₂ =C=O)
6	4.66 (1H, d, J=8.7Hz)	
7	3.44 (1H, m)	
13a	6.31 (d, J=3.6Hz)	
13b	5.5(d, J=3.3Hz)	
14	1.06 (d, J=7.2)	
15	1.21 (s)	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

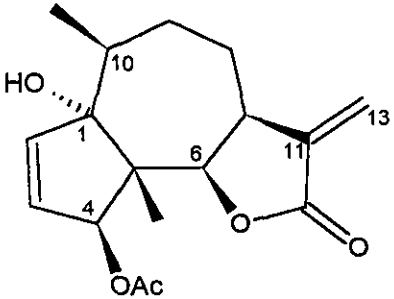
		Histerina (3) $C_{17}H_{24}O_5$ Pf: 167-168°C PM: 308	
N° C o H	δ (ppm) de 1H	δ (ppm) de ^{13}C	IR _{película} (cm^{-1})
1		47.1(d)	3628 (OH libre) 2947 y 2882 (C-H) 1761 (C=O de γ -lactona) 1732 (C=O.de acetato) 1254 (C-O ester) 1045 y 1020 (C-O, alcohol) 993 ($H_2C=C-C=O$)
2		27.0 (t)	
3		27.0 (t)	
4	5.13 (t, J=9.0 Hz)	80.7(d)	
5		50.3(s)	
6	4.48 (d, J=9.3 Hz)	88.5(d)	
7	3.34 (m)	43.2 (d)	
8		23.6	
9		23.6	
10		42.5	
11		140.2 (s)	
12		170.9 (s)	
13a	6.18 (d, J=3.6 Hz)	119.4 (t)	
13b	5.46 (d, J=3.3Hz)		
14a	3.76 (dd, J=10.5, 10 Hz)	59.9(t)	
14b	3.92 (dd, J=10.5, 3.5 Hz)		
15	0.85 (s)	10.3(q)	
(C=O, acetato)		169.9 (s)	
(CH ₃ ,acetato)	2.10 (s)	21.4(q)	

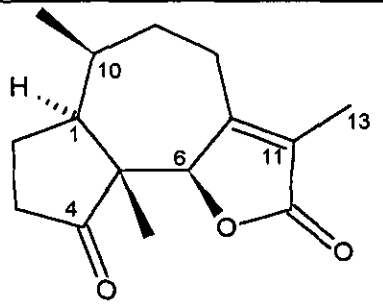
		<p>Isocoronopilina (4) $C_{15}H_{20}O_4$ PM: 264</p>
N° C o H	δ (ppm) de 1H	IR en KBr (cm^{-1})
6	5.39 (s)	3595 (OH libre)
13	1.82 (s)	2984, 2938 y 2969(C-H)
14	1.11 (d, J=7.3 Hz)	1750 C=O (de γ -lactona)
15	0.84 (s)	1740 (C=O ciclopentanona) 1669 cm^{-1} (C=C)

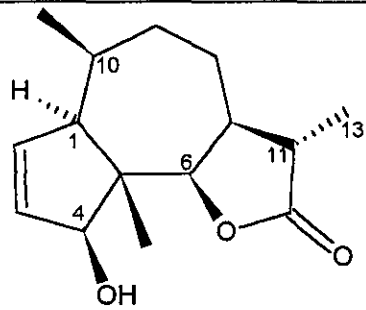
			<p>Isopartenina (5) $C_{15}H_{18}O_4$ PM: 262</p>
N° C o H	δ (ppm) de 1H	IR en KBr(cm^{-1})	
2	7.65 (d, J=5.9 Hz)	3595 (O-H libre) 2985, 2939 y 2869 (C-H) 1750 (C=O de γ -lactona) 1725 (C=O de ciclopentenona) 1669 (C=C)	
3	6.16 (d, J=5.9 Hz)		
6	5.46 (s)		
13	1.85 (s)		
14	1.08 (d, J=7.3 Hz)		
15	0.98 (s)		

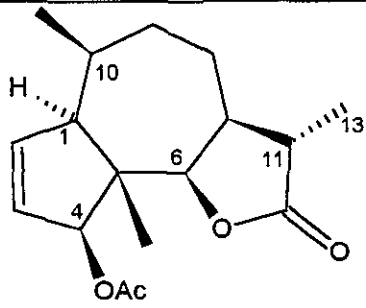
		<p>1α,4β-dihidroxi-pseudoguaya-2,11(13)-dien-6β,12-olida (6) $C_{15}H_{20}O_4$ PM: 264</p>	
N $^{\circ}$ C o H	δ (ppm) de 1H	δ (ppm) de ^{13}C	IR en KBr(cm^{-1})
2	5.99 (dd, J=5.8, 1.4 Hz)		3695 y 3604 (OH- libre)
3	5.95 (dd, J=5.8, 2.2 Hz)		2966, 2935 y 2875 (C-H)
4	5.16 (dd, J=2.2, 1.4 Hz)		1754 (C=O de γ -lactona)
6	5.39 (d, J=9.4 Hz)		1062y 1024 (C-O)
7	3.44 (m)		
13a	6.26 (d, J=3.6 Hz)		
13b	5.56 (d, J=3.3 Hz)		
14	1.08 (d, J=8.0 Hz)		
15	0.95 (s)		

		<p>1α,4β-dihidroxi-pseudoguaya-2-en-13α,6β,12-olida(7). $C_{15}H_{22}O_4$ PM: 266</p>
N $^{\circ}$ C o H	δ (ppm) de 1H	IR en KBr(cm^{-1})
2	5.98 (s)	3693 y 3602 (OH, libre) 2929y 2874 (C-H) 1762 (C=O, γ - lactona)
3	5.98 (s)	
4	5.14 (sa)	
6	5.30 (d, J=9.2 Hz)	
7	2.48 (m)	
11	3.66 (qd, J=9.5, 3.5 Hz)	
13	1.27 (d, J=6.7 Hz)	
14	1.10 (d, J=7.6 Hz)	
15	1.05 (s)	

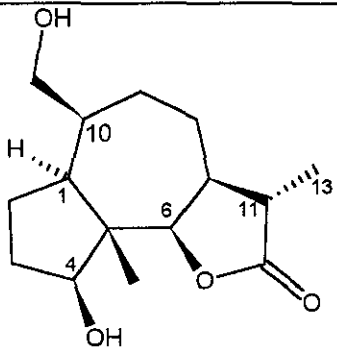
		<p>1α-hidroxi, 4β-acetoxi-pseudoguaya-2, 11(13)-dien-6β, 12-olida (8) C₁₇H₂₄O₅ PM: 308</p>	
N ^o C o H	δ (ppm) de ¹ H	δ (ppm) de ¹³ C	IR-CHCl ₃ (cm ⁻¹)
2	6.02 (dd, J=6.0, 2.5 Hz)		2966, 2935 y 2875 (C-H) 1754 (C=O de γ -lactona) 1737 (C=O de acetato) 1062 y 1024 (C-O)
3	5.92 (dd, J=6.0, 1.4 Hz)		
4	6.14 (t, J=2.2 Hz)		
6	5.29 (d, J=9.0 Hz)		
7	3.5 (m)		
13a	6.23 (d, J=3.6 Hz)		
13b	5.51 (d, J=3.0 Hz)		
14	1.09 (d, J=7.7 Hz)		
15	1.02 (s)		
4-acetato	2.14 (s)		

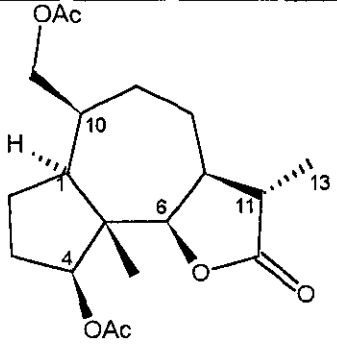
		<p>Isodamsina (9). $C_{15}H_{20}O_3$ PM: 248</p>
N° C o H	δ (ppm) de 1H	IR en KBr(cm^{-1})
6	4.62 (brs)	2978, 2929 y 2879(C-H) 1750 (C=O γ - lactona y ciclopentenona) 1673 (C=C)
13	1.84 (s)	
14	1.02 (d, J=6.9 Hz)	
15	0.85 (s)	

		<p>4β-dihidroxi-pseudoguaya-2-en-13α,6β-12-olida (10). $C_{15}H_{22}O_3$ PM: 250</p>
N° C o H	δ (ppm)	IR en KBr (cm^{-1})
1	2.34 (m)	3598 (OH libre) 2975,2934 y 2877 (C-H) 1770 (C=O γ - lactona)
2	5.69 (m)	
3	5.73 (m)	
4	4.72 (m)	
6	4.65 (d, J=9.1 Hz)	
13	1.25 (d, J=6.6 Hz)	
14	1.04 (d, J=7.4 Hz)	
15	1.05 (s)	

		<p>4β-acetoxi-pseudoguaya-2, en-13α, 6β-12-olida (11) C₁₇H₂₄O₄ PM: 292</p>
N° C o H	δ (ppm)	IR en KBr (cm ⁻¹)
1	2.6 (m)	2962, 2930, 2875 (C-H) 1761(C=O γ- lactona) 1731 (C=O acetato)
2	5.7-5.6 (m)	
3	5.7-5.6 (m)	
4	5.68 (brs)	
6	4.61 (d, J=8.5 Hz)	
11	2.4 (m)	
13	1.21 (d, J=6.6 Hz)	
14	1.05 (d, J=7.4 Hz)	
15	1.09 (s)	
4-acetato	2.09 (s)	

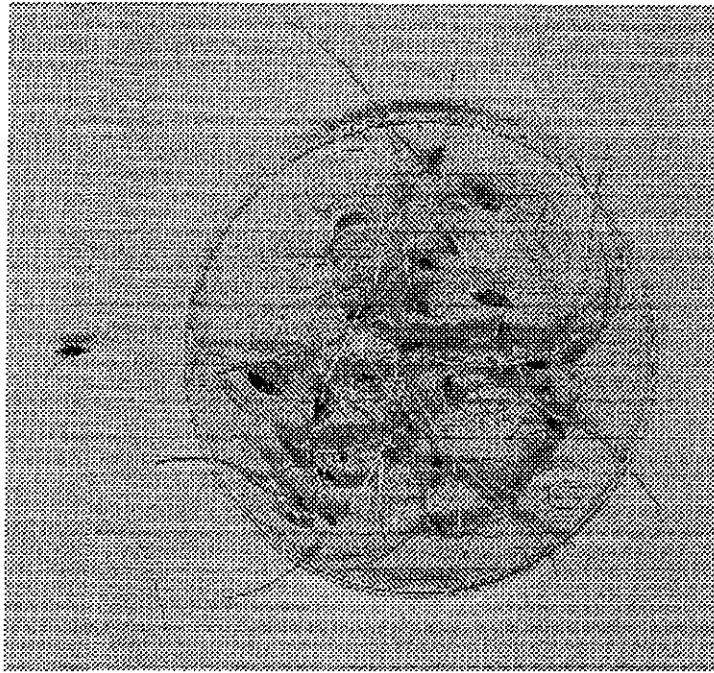
		<p>Acetato de histerina (12)</p> <p>$C_{19}H_{26}O_6$</p> <p>PM: 350</p> <p>Pf. 113-115°C</p>
N° C o H	δ (ppm)	IR en KBr (cm^{-1})
4	5.13 (t, J=8.8 Hz)	2975 y 2883 (C-H) 1750 (C=O para γ -lactona) 1739 (C=O, de acetato) 1673 (C=C)
6	4.56 (d, J=9.4 Hz)	
7	3.46 (m)	
13a	6.03 (d, J=3.6 Hz)	
13b	5.54 (d, J=3.3 Hz)	
14a	4.25 (dd, J=11.3, 10.5 Hz)	
14b	4.35 (dd, J=11.3, 3.0 Hz)	
15	0.85 (s)	
4-acetato	1.99 (s)	
14-acetato	2.04 (s)	

		<p>4β,14-dihidroxi-pseudoguaya-13α,6β-12-olida (13)</p> <p>C₁₅H₂₄O₄</p> <p>PM: 268</p>
N° C o H	δ (ppm) de ¹ H	
4	4.2 (t, J=9.0 Hz)	
6	4.33 (d, J=9.4 Hz)	
13	1.23 (d, J=6.9 Hz)	
14a	3.93 (dd, J=10.5, 3.6 Hz)	
14b	3.80 (t, J=10.5 Hz)	
15	0.85 (s)	

		<p>4β,14-diacetoxi-pseudoguaiian-13α,6β-12-olida (14)</p> <p>C₁₉H₂₈O₆</p> <p>PM: 352</p>
N° C o H	δ (ppm) de ¹ H	IR en KBr (cm ⁻¹)
4	5.03 (t, J=7.2 Hz)	2932 C-H:
6	4.48 (d, J=7.2 Hz)	1762 (C=O γ-lactona)
13	1.21 (d, J= 6.9 Hz)	1732 (C=O, acetato)
14a	4.11 (dd, J=11.0, 10.12 Hz)	1190 (C-O, lactona)
14b	4.39 (d, J=11 Hz)	1032 (C-O, acetato)
15	0.99 (s)	
4-acetato	2.02 (s)	
14-acetato	2.08 (s)	

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Resultados y Discusión 6



6 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Estudio biodirigido.

6.1.1 Estudio de la Actividad Inhibitoria de los Extractos.

Los tallos, hojas y flores de las plantas *Parthenium hysterophorus* y *Parthenium bipinnatifidum* fueron sometidas a extracción con disolventes orgánicos, obteniendo los extractos correspondientes mostrados en el cuadro 2.

Peso de la planta	Tipo de Extracto	Peso en gramos
<i>P. hysterophorus</i> 6430 g	CH ₂ Cl ₂	455
	MeOH	590
<i>P. bipinnatifidum</i> 5900 g	CH ₂ Cl ₂	420
	MeOH	560

En el desarrollo del estudio biodirigido, se determinó la actividad inhibitoria de estos extractos en la germinación de semillas así como en el desarrollo de plántulas de las siguientes semillas monocotiledóneas: *Lolium multiflorum* y dicotiledóneas: *Lactuca sativa*, *Physalis ixocarpa* y *Trifolium pratense*. La actividad fue evaluada usando concentraciones de 1, 10, 50, 100, 500 y 1000 ppm, según el procedimiento descrito en la sección 5.5.1. Los resultados fueron trazados en la gráfica de la fig.13, donde se muestran los efectos inhibitorios de estos extractos en la germinación. Las figs. 14 y 15 muestran el efecto inhibitorio en el desarrollo de tallo (hipocotilo y coleoptilo) y de la raíz de estas plántulas.

Germinación

Analizando las gráficas de la fig. 13 se observa que los extractos de diclorometano de ambas especies estudiadas resultaron más activos que los de metanol en la inhibición de la germinación de las cuatro semillas probadas. También se observa que ambos extractos de *P. bipinnatifidum* (CH_2Cl_2 y MeOH) fueron más activos que los de *P. hysterothorus*. Las semillas *L. sativa* y *L. multiflorum* fueron las más inhibidas por todos los extractos.

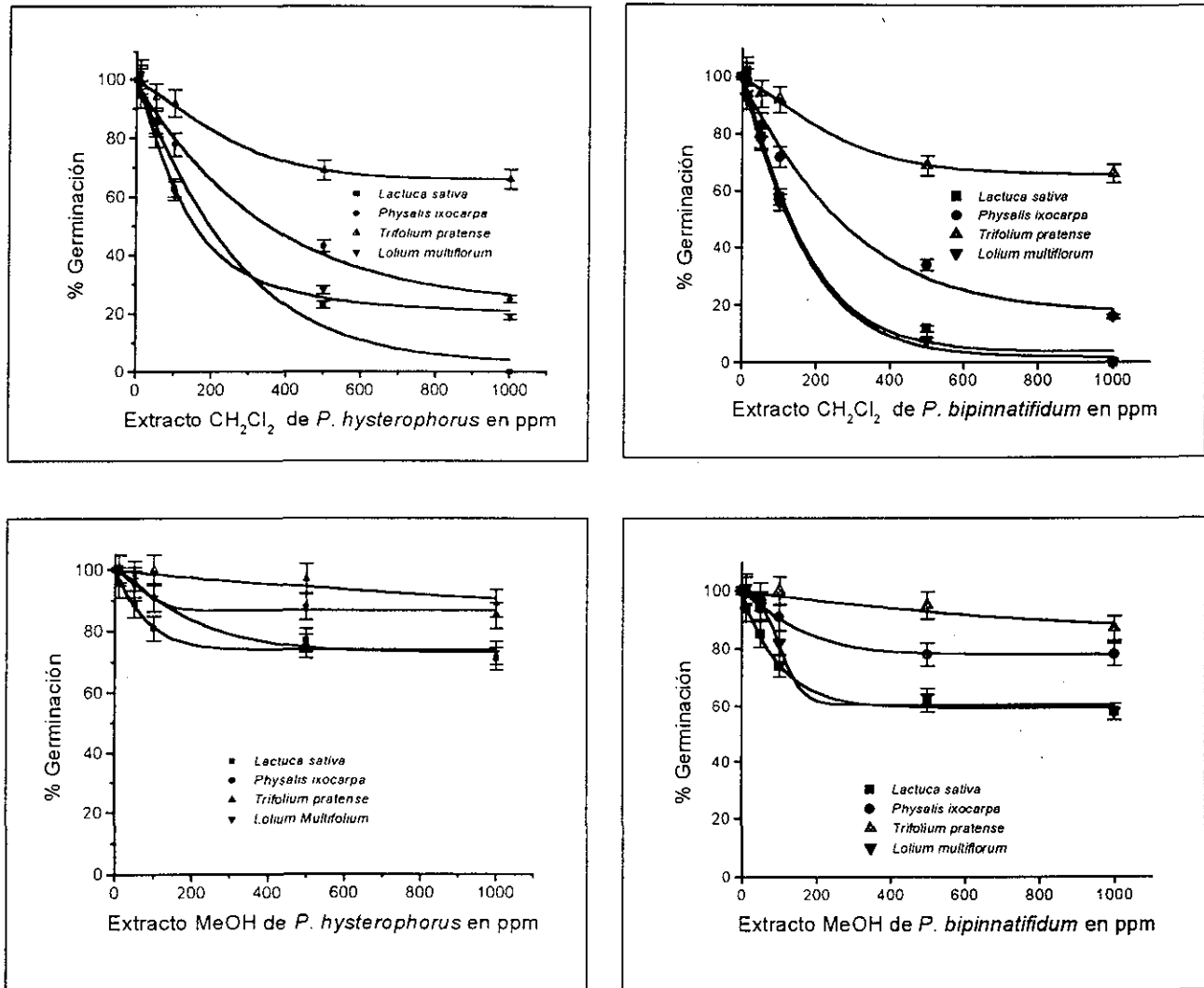


Fig. 13. Efecto inhibitorio de los extractos de *P. hysterothorus* y *P. bipinnatifidum* en la germinación.

Elongación de tallo y raíz

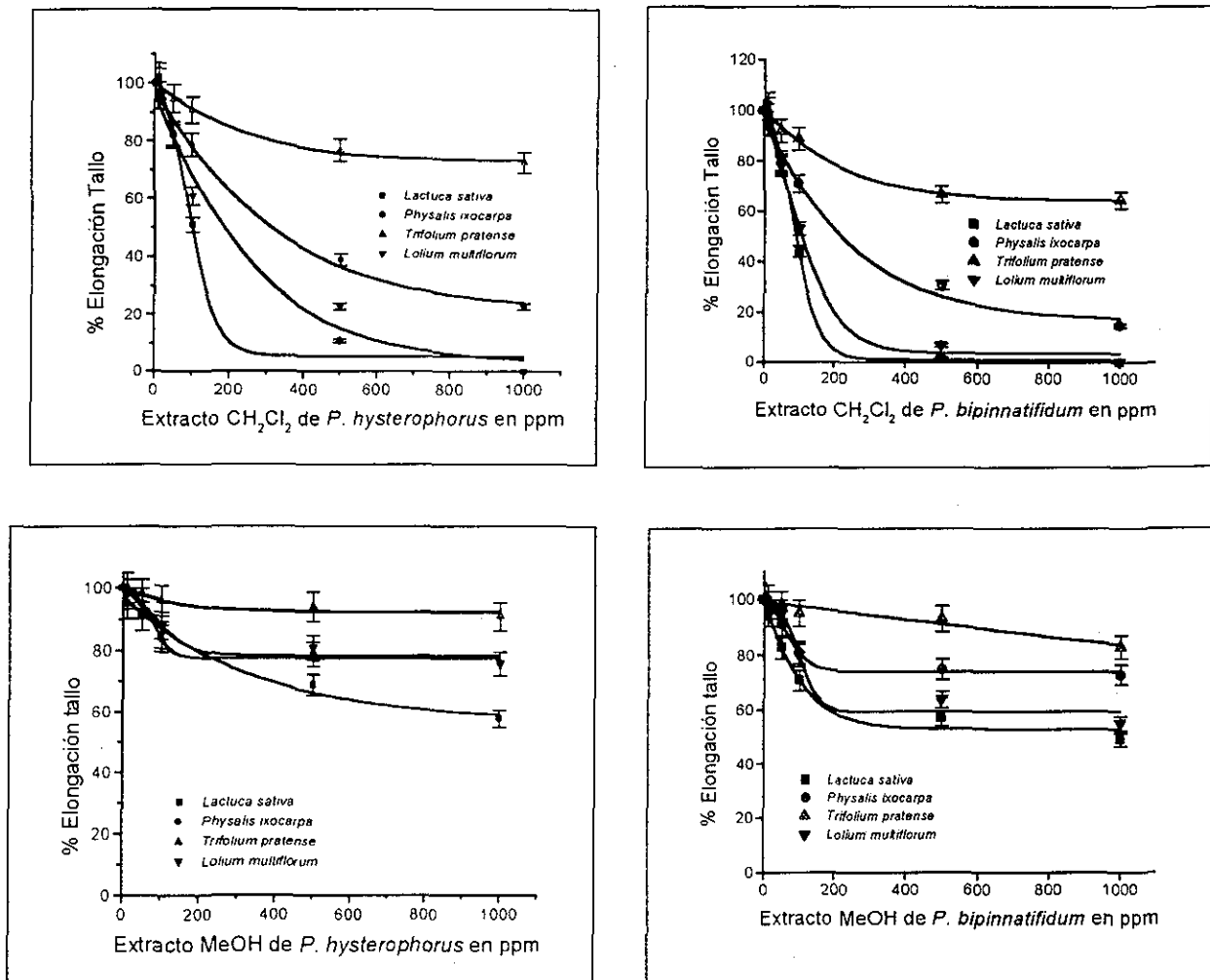


Fig. 14. Efecto inhibitorio de los extractos de *P. hysterophorus* y *P. bipinnatifidum* en la elongación de tallo.

Los efectos inhibitorios en la elongación de tallo (fig. 14) y de raíz (fig. 15) fueron al igual que los encontrados en la germinación (fig. 13) mayores para los extractos de *P. bipinnatifidum* que para los de *P. hysterophorus*. El efecto inhibitorio presentado por el extracto de diclorometano fue más potente que el mostrado por el extracto metanólico en ambas especies de *Parthenium*. Las semillas *L. sativa* y *L. multiflorum* fueron las más inhibidas.

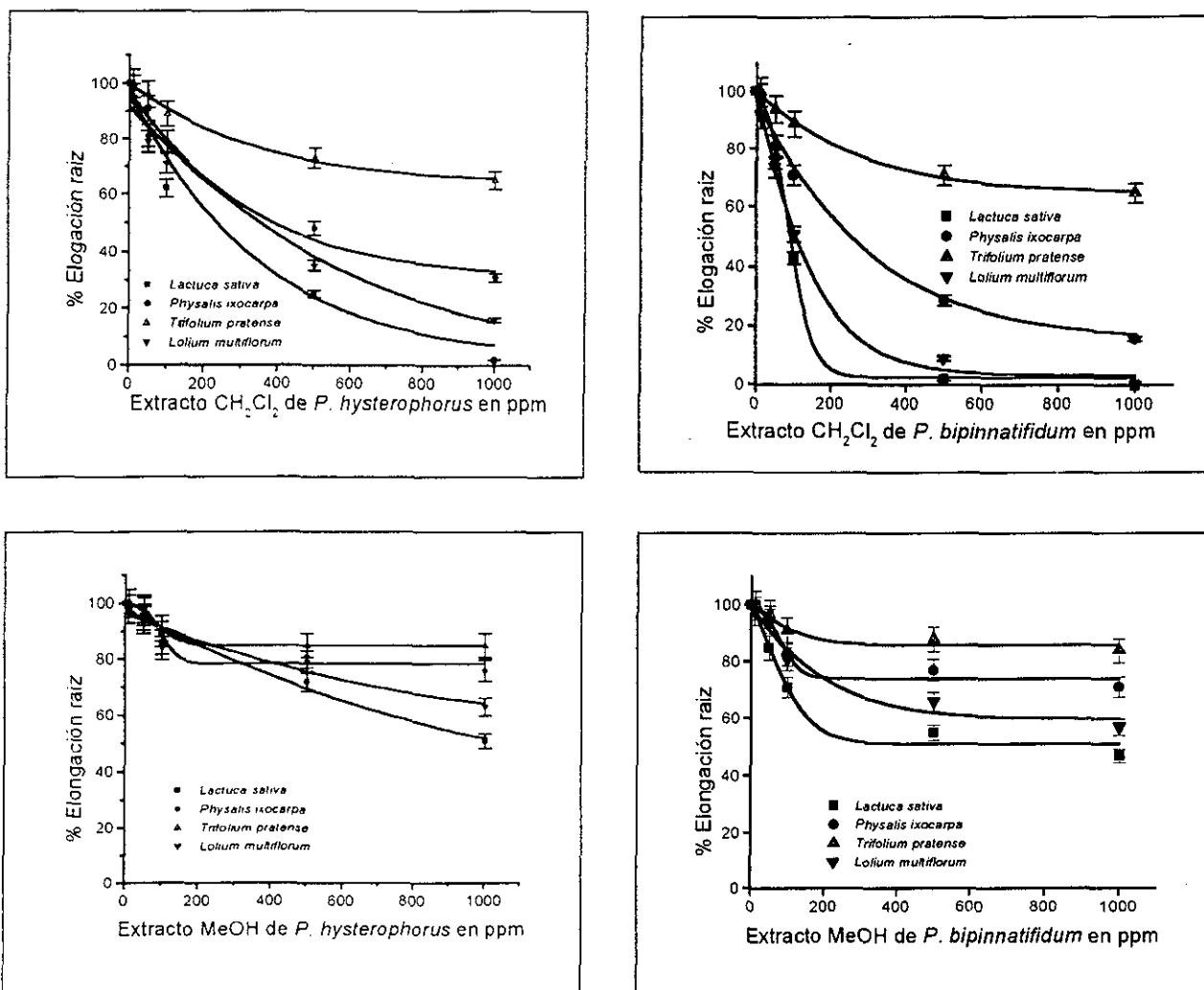


Fig. 15. Efecto inhibitorio del extractos de *P. hysterophorus* y *P. bipinnatifidum* en elongación de raíz.

Determinación de la concentración media inhibitoria (IC_{50}).

El cuadro 3 ilustra las IC_{50} de los extractos de *P. hysterophorus* y de *P. bipinnatifidum*. Los extractos de CH_2Cl_2 de ambos *Parthenium* son muy prometedores, dado su alto grado de inhibición mostrado por los bajos valores de IC_{50} .

El análisis de los resultados para GI_{50} , TI_{50} y RI_{50} del cuadro 3 confirmaron que los extractos de CH_2Cl_2 de ambos *Parthenium* fueron los más activos ya que presentaron valores de IC_{50} para tres de las cuatro semillas probadas. La semilla más sensible fue la de

L. sativa (lechuga) (dicotiledónea) ya que fue inhibida por ambos extractos de diclorometano. El extracto que mostró el efecto inhibitorio mas potente en *L. sativa* fue el de CH₂Cl₂ de *P. bipinnatifidum*, puesto que mostró valores de 121, 87, y 49 ppm para GI₅₀, TI₅₀ y RI₅₀ respectivamente.

Extracto	<i>Lactuca sativa</i>			<i>Physalis ixocarpa</i>			<i>Lolium multifolium</i>			<i>Trifolium pratense</i>		
	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀
<i>P. hysterothorus</i> CH ₂ Cl ₂	198	95	274	341	321	381	150	182	373	-	-	-
<i>P. hysterothorus</i> MeOH	-	-	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. bipinnatifidum</i> CH ₂ Cl ₂	121	87	49	232	210	242	119	115	107	-	-	-
<i>P. bipinnatifidum</i> MeOH	-	488	377	-	-	-	-	-	-	-	-	-

GI₅₀: 50% de inhibición de la germinación

TI₅₀: 50% de inhibición en el desarrollo del tallo

RI₅₀: 50% de inhibición en el desarrollo de la raíz

De las semillas dicotiledóneas ensayadas, la menos inhibida fue *T. pratense*, puesto que no pudieron obtenerse los respectivos IC₅₀ para esta semilla a las concentraciones usadas en este bioensayo (1 a 1000ppm). Los extractos metanólicos resultaron poco activos, siendo el de *P. bipinnatifidum* más activo que el de *P. hysterothorus*. Se observa en todos los casos que la actividad inhibitoria de los extractos de *P. bipinnatifidum*, fue superior a la mostrada por los de *P. hysterothorus*, puesto que los valores para IC₅₀ fueron menores para los primeros.

En este trabajo se procedió al fraccionamiento de los cuatro extractos, puesto que la actividad de los extractos de metanol aunque menor que la presentada por los extractos de diclorometano fue considerada significativa, puesto que presentaron efectos inhibitorios superiores al 20%.

6.1.2 *Parthenium hysterophorus*.6.1.2.1 Extracto de CH₂Cl₂ de *Parthenium hysterophorus*.

Se fraccionaron 100 gramos del extracto de CH₂Cl₂ de *P. hysterophorus* en una columna empacada con gel de sílice como se describió en la sección 5.3. Obteniendo 13 grupos como se muestra en el cuadro 4 a continuación:

Cuadro: 4 Fraccionamiento del extracto de CH ₂ Cl ₂ de <i>P. hysterophorus</i>			
Eluyente en %	Fraciones agrupadas	Grupo	Peso en gramos
Hexano 100	1-5	A	0.98
Hexano-acetato de etilo 90-10	6-20	B	1.78
Hexano-acetato de etilo 80-20	21-33	C	1.12
Hexano-acetato de etilo 70-30	34-45	D	3.07
Hexano-acetato de etilo 60-40	46-60	E	9.25
Hexano-acetato de etilo 50-50	61-74	F	11.02
Hexano-acetato de etilo 40-60	75-83	G	13.45
Hexano-acetato de etilo 30-70	84-98	H	9.52
Hexano-acetato de etilo 20-80	99-110	I	6.26
Hexano-acetato de etilo 10-90	111-120	J	5.53
Acetato de etilo 100	121-128	L	5.31
Acetato de etilo-cloruro de metileno 50-50	129-135	M	3.20
Metanol 100	136-140	N	1.15

Todos los grupos fueron ensayados y los únicos que presentaron una actividad significativa fueron los grupos E y F.

6.1.2.2 Efecto inhibitorio de los grupos E y F. del extracto de CH₂Cl₂ de *P. hysterophorus*

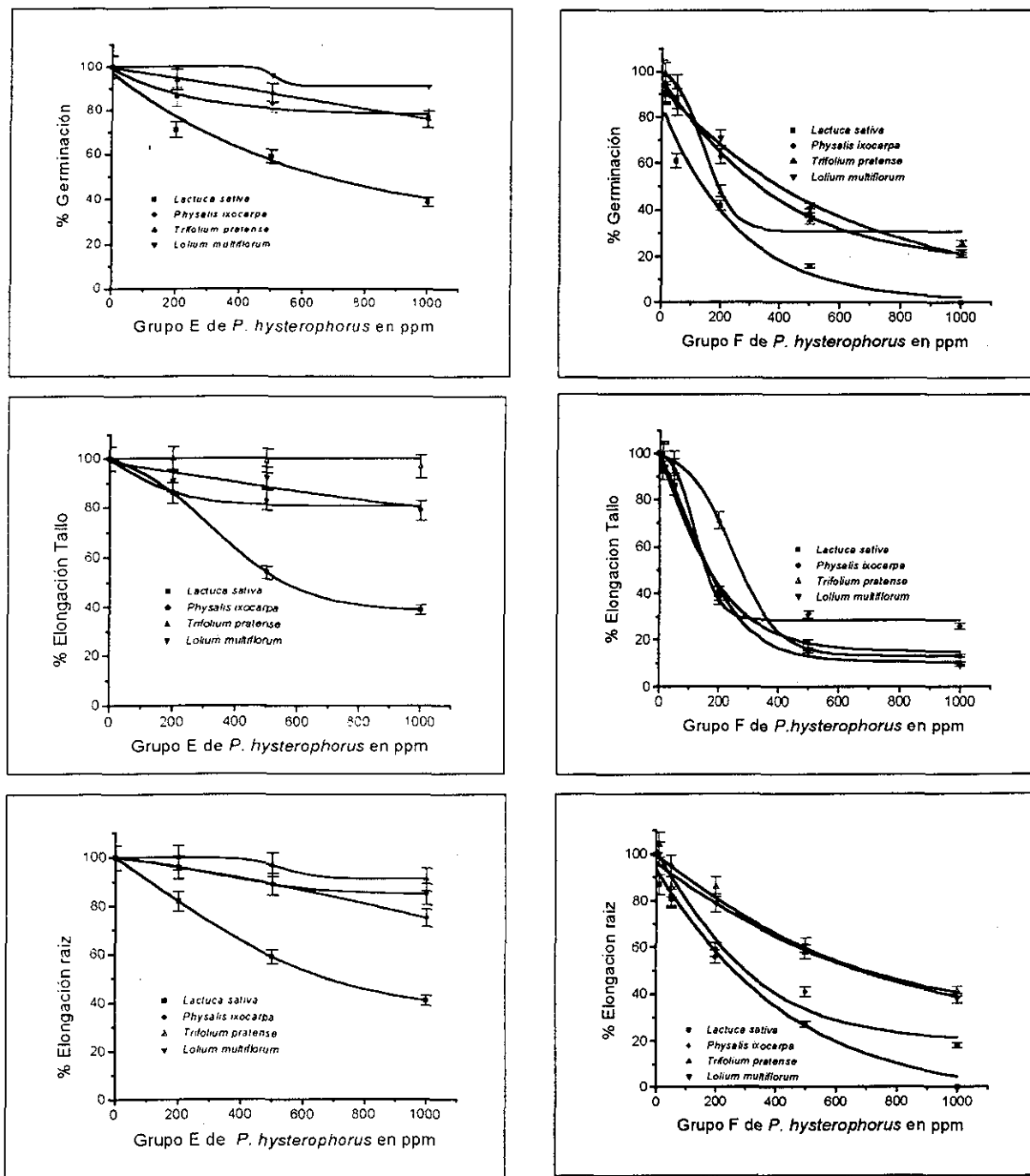


Fig. 16. Efecto inhibitorio de los grupos E y F del extracto en cloruro de metileno de *P. hysterophorus* en la germinación de semillas y elongación de tallo y de raíz.

Los grupos E y F del fraccionamiento anterior fueron los que mostraron los efectos inhibitorios más significativos en la germinación de las semillas y elongación de tallo y raíz en las plántulas de pruebas. El grupo E, aunque de menor actividad, presentó un efecto inhibitorio selectivo, puesto que mostró una fuerte inhibición sobre *L. sativa* como podemos observar en la fig. 16

Germinación

El efecto inhibitorio de los grupos E y F en la germinación se puede observar en la parte superior de la fig. 16, mostrando en el grupo F un efecto inhibitorio superior al del grupo E.

Elongación de tallo y raíz

La actividad inhibitoria presentada por los grupos E y F en la elongación de tallo y raíz resultó similar a la presentada en la germinación, siendo el grupo F más activo que el grupo E. También se observa en el grupo E un fuerte efecto inhibitorio selectivo sobre *L. sativa*, tanto en tallo como en raíz.

Determinación del IC₅₀

Los valores de IC₅₀ mostrados en el cuadro 5 confirman el potencial inhibitorio de los grupos E y F, siendo el grupo F el que presenta todos los valores de IC₅₀ para las cuatro semillas ensayadas, mientras que el grupo E inhibe en forma significativa, solamente a la semilla *L. sativa*. Semilla que se manifestó como la más sensible a los ensayos dentro de los criterios establecidos. Estos datos nos condujeron a realizar el fraccionamiento de estos dos grupos, con el fin de aislar los compuestos responsables de la actividad inhibitoria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Grupo	<i>Lactuca sativa</i>			<i>Physalis ixocarpa</i>			<i>Lolium multifolium</i>			<i>Trifolium pratense</i>		
	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀
E	649	522	640	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	134	160	262	333	146	301	413	162	667	194	270	672

GI₅₀: 50% de inhibición de la germinación

TI₅₀: 50% de inhibición en el desarrollo del tallo

RI₅₀: 50% de inhibición en el desarrollo de la raíz

Analizando los resultados del cuadro 5, el grupo E resultó menos activo que el extracto de CH₂Cl₂ de *P. hysterophorus* (cuadro 3), en cambio la fracción F, mostró una actividad similar al extracto anteriormente mencionado. El efecto comparable entre el extracto de CH₂Cl₂ y la fracción F se puede justificar por un efecto sinérgico entre los componentes del extracto.

6.1.2.3 Fraccionamiento secundario de los grupos E y F

Del fraccionamiento secundario de los grupos E y F se aisló únicamente partenina como el compuesto activo. La partenina se encontró en mayores cantidades en el grupo F, donde se aisló 2.31g lo que representa 20.96% del peso de este grupo (cuadro 4), y en menores cantidades en el grupo E, 0.62g equivalente al 6.70% del peso de este grupo (cuadro 4). Estos datos sugieren que la partenina es la responsable de la actividad en los dos grupos (E y F) La partenina fue purificada por recristalización de hexano-acetato de etilo, obteniendo 2.93 gramos, correspondiendo al 2.93% del peso total del extracto fraccionado.

6.1.2.4 Actividad inhibitoria de partenina

La partenina fue ensayada en las cuatro semillas de prueba; produciendo un efecto inhibitorio análogo y al extracto de CH₂Cl₂, lo que confirma que la partenina es el principio activo de este extracto.

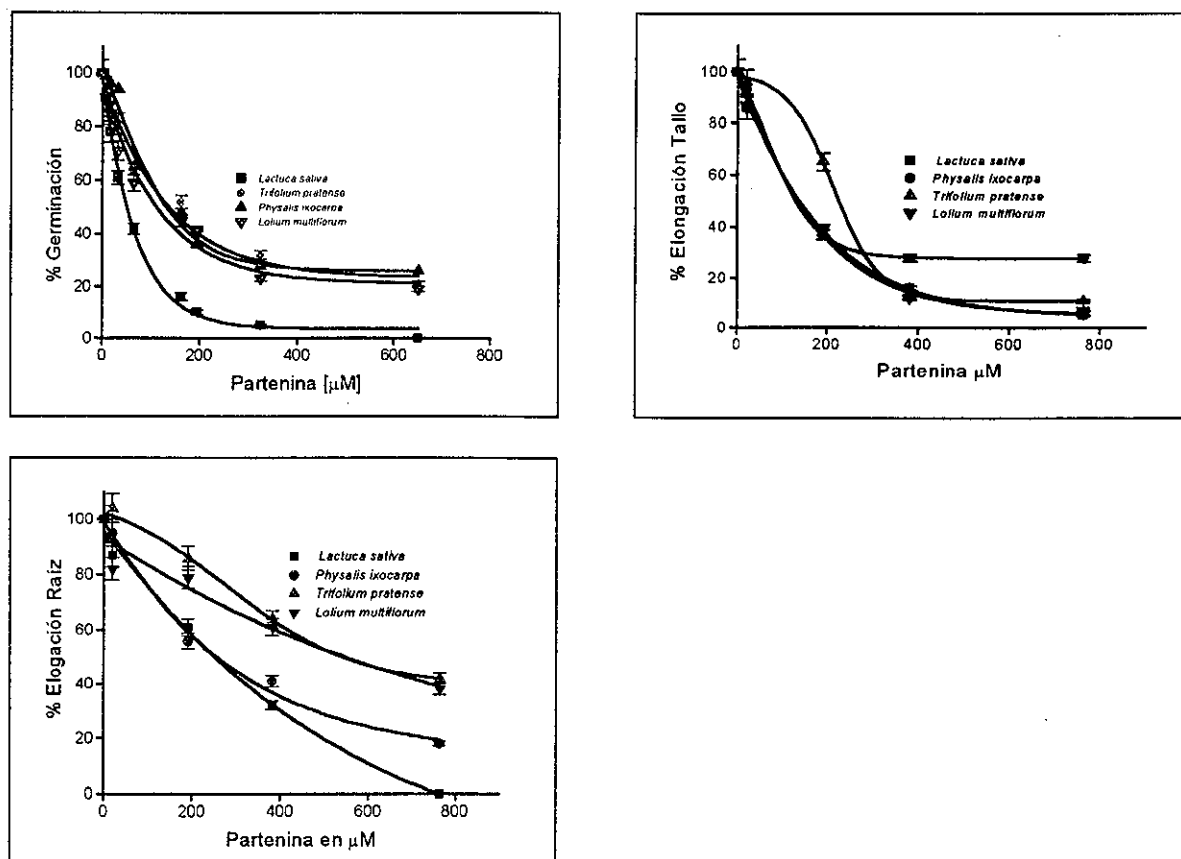


Fig. 17. Actividad inhibitoria de partenina en germinación y elongación de tallo y raíz.

Germinación

La partenina inhibió de una manera significativa la germinación de las cuatro semillas probadas (fig. 17). La semilla más fuertemente inhibida por partenina fue *L. sativa*, puesto que el valor encontrado para GI_{50} fue de $46 \mu\text{M}$, lo más bajo. La actividad inhibitoria de partenina en la germinación de semillas de amaranto, lechuga, zanahoria, jitomate y *Sida spinosa*, fue obtenida a 3 concentraciones (1, 10 y $100 \mu\text{M}$) por Fischer y colaboradores⁴², pero estos autores no determinaron la GI_{50} para las semillas ensayadas. El presente estudio se realizó con un mayor número de concentraciones (8) y un intervalo mayor (1 a $1000 \mu\text{M}$), permitiendo encontrar el 100% de inhibición de la germinación para

L. sativa que se alcanzó a 600 μ M, para la demás semillas se observa un efecto inhibitorio menor.

Elongación de tallo y raíz

El efecto inhibitorio de la partenina en la elongación del tallo y raíz de *L. sativa*, mostrado en la fig. 17, fue menor que el presentado en la germinación, indicando que la partenina presenta una acción, más acentuada preemergente que posemergente. Los valores de TI₅₀ y RI₅₀ (cuadro 6) para esta semilla fueron de 132 μ M y 248 μ M respectivamente. La inhibición del desarrollo de las plántulas de las otras semillas siguió la misma tendencia ya mostrada en el estudio biodirigido, observando un efecto inhibitorio mayor en la elongación del tallo que en la raíz. El efecto inhibitorio en la raíz, mostrado por partenina fue selectivo, puesto que *L. multiflorum* y *T. pratense* presentaron valores de RI₅₀ mucho mayores que los mostrados por *P. ixocarpa* y *L. sativa*.

Determinación del IC₅₀

Cuadro 6: Determinación de IC ₅₀ en μ M para el compuesto aislado de <i>P. hysterothorus</i>												
Compuesto	<i>Lactuca sativa</i>			<i>Physalis ixocarpa</i>			<i>Lolium multiflorum</i>			<i>Trifolium pratense</i>		
	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀
Partenina	46	132	248	126	131	250	106	133	543	128	221	540

GI₅₀: 50% de inhibición de la germinación

TI₅₀: 50% de inhibición en el desarrollo del tallo

RI₅₀: 50% de inhibición en el desarrollo de la raíz

Los valores de IC₅₀ encontrados para partenina, principal metabolito *P. hysterothorus*⁶², confirman los datos ya publicados de que esta lactona es un potente inhibidor de la germinación de semillas, y justifica la actividad alelopática de esta maleza, que puede inhibir la germinación de otras semillas competidoras exudando partenina al suelo a través los tricomas⁸ y de la raíz.^{26,63}

6.1.2.5 Extracto metanólico

El extracto metanólico, que presentó una actividad menor que el de CH_2Cl_2 , fue fraccionado por cromatografía en columna de gel de sílice obteniendo 155 fracciones de 500ml, las cuales fueron reunidas en 9 grupos de polaridad distintas como se ilustra en el cuadro 7.

Cuadro 7 Fraccionamiento primario del extracto MeOH de <i>P. hysterophorus</i>			
Eluyente en %	Fracciones agrupadas	Grupo	Peso en gramos
Hexano-acetato de etilo 90-10 y 80-20	1-26	B1	0.98
Hexano-acetato de etilo 70-30	27-43	C1	1.78
Hexano-acetato de etilo 60-40	44-65	D1	3.12
Hexano-acetato de etilo 50-50	66-80	E1	4.07
Hexano-acetato de etilo 40-60	81-106	G1	6.25
Hexano-acetato de etilo 30-70	107-120	H1	5.02
Hexano-acetato de etilo 20-80, 10-90	121-132	I 1	3.45
Acetato de etilo-cloruro de metileno 50-50	133-145	M1	2.12
Metanol 100%	146-155	N1	1.26

Se llevó a cabo el bioensayo en la germinación y desarrollo de plántulas (tallo y raíz) de los 9 grupos, con el objeto de determinar su acción inhibitoria en las cuatro semillas de prueba. Ninguno de los 9 grupos ensayados presentó un efecto inhibitorio significativo, por lo cual no se pudo aislar el(los) compuesto(s) responsable(s) de la baja actividad inhibitoria del extracto de MeOH.

6.1.3 *Parthenium bipinnatifidum*

6.1.3.1 Fraccionamiento primario del extracto de CH₂Cl₂ de *P. bipinnatifidum*

El extracto de CH₂Cl₂ fue fraccionado por cromatografía en columna de gel de sílice, obteniendo 964 fracciones de 500 mL, y reunidos en 16 grupos según su polaridad. El cuadro 8 resume las fracciones agrupadas.

Eluyente en %	Fracciones agrupadas	Grupo	Peso en gramos
Hexano100	1-58	A2	2,25
Hexano100	59-178	B2	2.05
Hexano-acetato de etilo 95-5	179-294	C2	0.45
Hexano-acetato de etilo 95-5	295-327	D2	4.16
Hexano-acetato de etilo 90-10	328-364	E2	5.18
Hexano-acetato de etilo 85-15	366-440	F2	11.60
Hexano-acetato de etilo 85-15 y 80-20	441-499	G2	4.62
Hexano-acetato de etilo 70-30 y 60-40	500-618	H2	12.36
Hexano-acetato de etilo 50-50	619-693	I2	5.26
Hexano-acetato de etilo 50-50 y 45-55	694-732	J2	5.53
Hexano-acetato de etilo 40-60	733-791	L2	4.98
Hexano-acetato de etilo 35-65	792-880	M2	3.20
Hexano-acetato de etilo 30-70	881-922	N2	1.15
Hexano-acetato de etilo 20-80 y 0-100	923-943	O2	0.93
Diclorometano-metanol 50-50	944-953	P2	8.61
Metanol	954-964	R2	0.31

6.1.3.2 Actividad inhibitoria de los grupos de fracciones del extracto de CH₂Cl₂ de *P. bipinnatifidum*.

Todos los grupos de fracciones fueron evaluados, en el bioensayo de germinación de las semillas y desarrollo de las cuatro plántulas utilizadas en este trabajo. De los 16 grupos, solamente cuatro presentaron efecto inhibitorio significativo. Los grupos de fracciones más activos fueron aquellos eluidos con mezclas de hexano-acetato de etilo con porcentajes de 85-15 a 45-55% (G2, H2, I2 y J2). El efecto inhibitorio de estos cuatro grupos en la germinación, elongación de tallo y raíz se muestran en las fig. 18, 19 y 20.

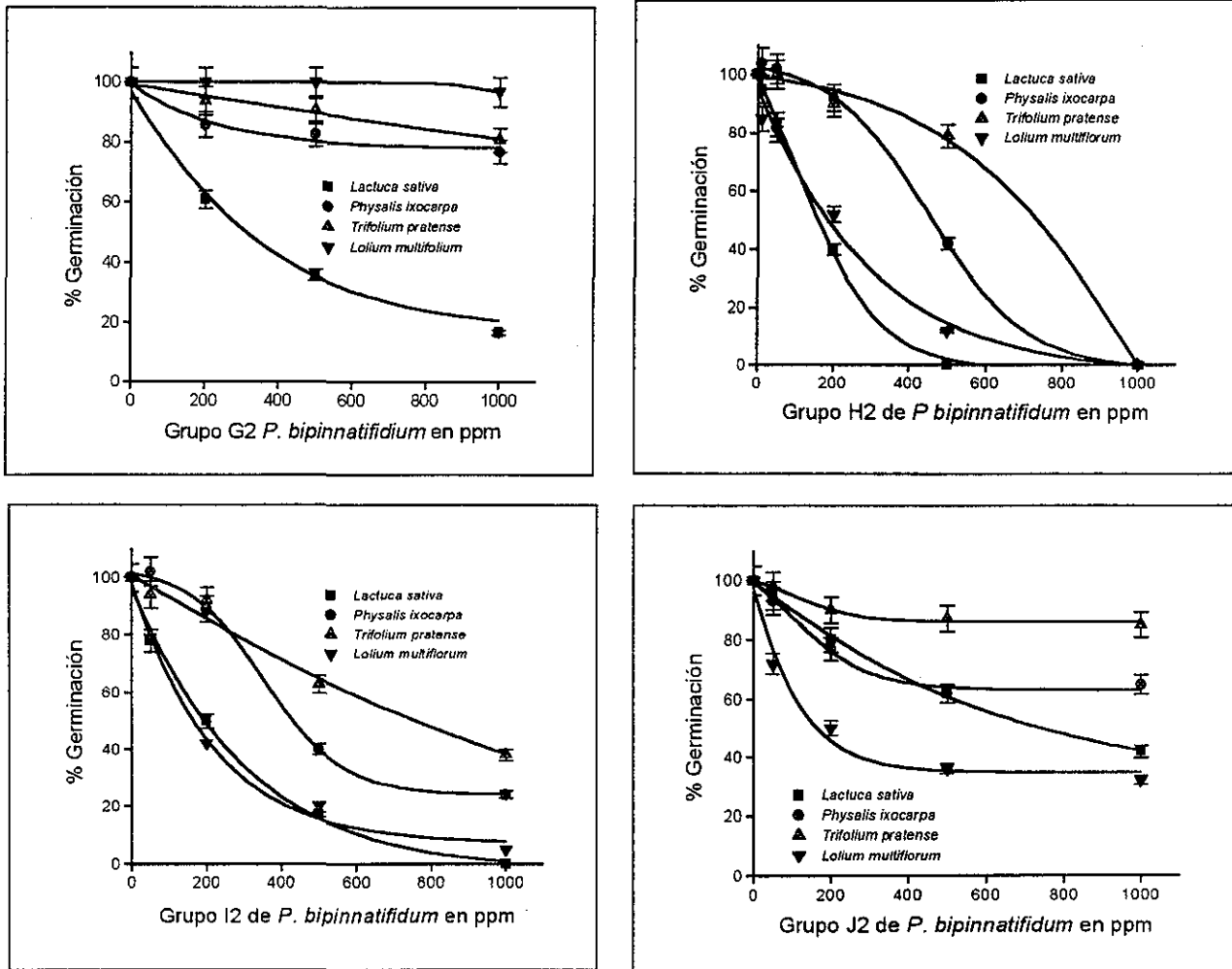


Fig. 18. Efecto inhibitorio de los grupos G2, H2, I2 y J2 en la germinación.

Germinación

El análisis de las gráficas de la fig. 18 nos indica que los cuatro grupos mostraron una actividad inhibitoria significativa en la germinación de las cuatro semillas probadas, mostrando los grupos H2 y I2, un efecto inhibitorio mayor que los grupos G2 y J2. El grupo H2 fue el que presentó el efecto más potente, ya que inhibió en forma total todas las semillas de prueba. La semilla más afectada por el grupo H2 fue *L. sativa*.

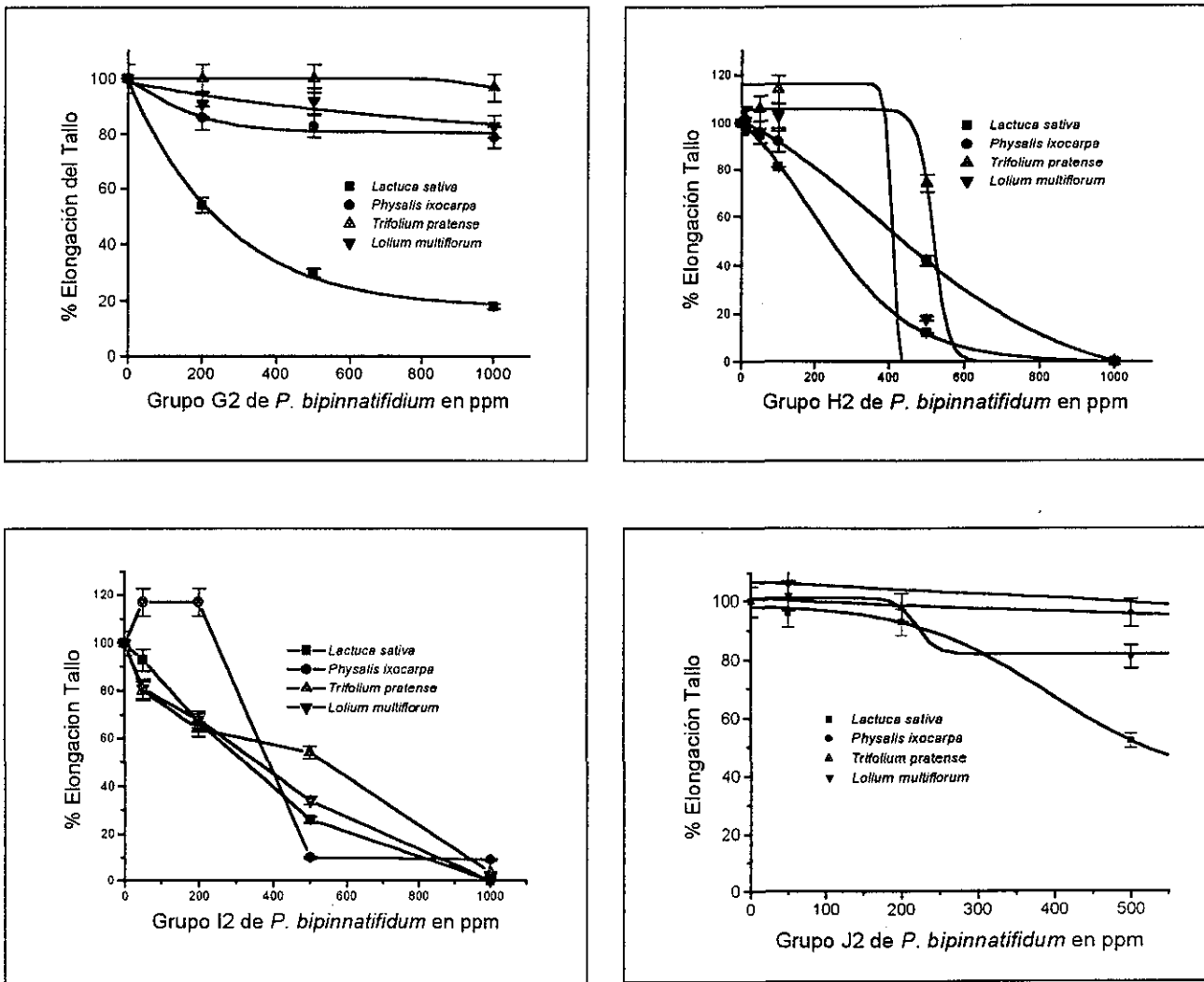


Fig. 19. Efecto inhibitorio de los grupos G2, H2, I2 y J2 en la elongación de tallo.

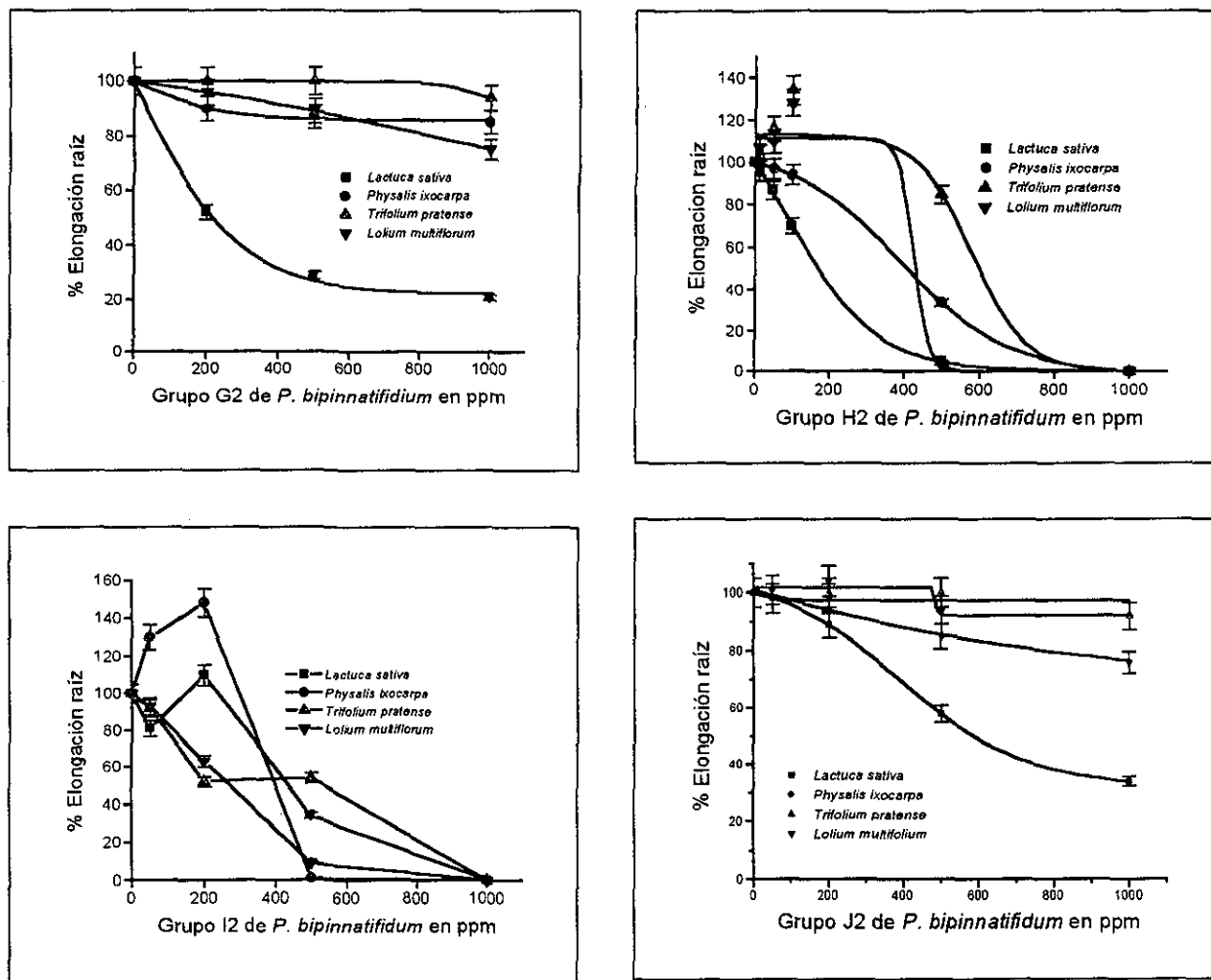


Fig. 20. Efecto inhibitorio de los grupos G2, H2, I2 y J2 en la elongación de raíz.

Desarrollo de las plántulas (tallo y raíz)

Las figs. 19 y 20 ilustran la actividad inhibitoria de los grupos G2 H2 I2 y J2 en la elongación de tallo y raíz de las cuatro plántulas ensayadas, tanto raíz como tallo fueron inhibidos, indicando que los probables compuestos responsables de la inhibición mostrada por el extracto de CH_2Cl_2 , se encuentran en estos grupos. Las curvas de inhibición siguen la tendencia original del extracto. Los grupos H2 y I2 fueron los más activos, tanto en la elongación del tallo, como en la raíz, inhibiendo totalmente el tallo y la raíz de todas las

plántulas. La única excepción es el grupo I2 que muestra un efecto estimulante muy pronunciado para *Physalis ixocarpa* entre 50 y 200 ppm.

Determinación del IC₅₀

El cuadro 9 ilustra las IC₅₀ de los grupos G2, H2, I2 y J2

Grupos	<i>Lactuca sativa</i>			<i>Physalis ixocarpa</i>			<i>Lolium multiflorum</i>			<i>Trifolium pratense</i>		
	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀
G2	304	228	207	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2	162	238	174	464	429	405	190	409	428	731	516	600
I2	199	312	442	413	380	411	161	359	278	728	539	548
J2	158	531	577	-	-	-	158	-	-	-	-	-

GI₅₀: 50% de inhibición de la germinación

TI₅₀: 50% de inhibición en el desarrollo del tallo

RI₅₀: 50% de inhibición en el desarrollo de la raíz

Los grupos H2 e I2 resultaron los más activos, obteniendo los GI₅₀, TI₅₀ y RI₅₀ para todas las semillas ensayadas. Los efectos más acentuados se encontraron en *L. sativa* y *L. multiflorum*. Los grupos G2 y J2 fueron los que presentaron una actividad poco significativa. El grupo G2 solamente inhibió la semilla *L. sativa* obteniendo los valores de GI₅₀, TI₅₀ y RI₅₀, mientras que el grupo J2 inhibió en forma significativa la germinación y el desarrollo de tallo y raíz de *L. sativa* y la germinación de *L. multiflorum* (GI₅₀ = 158) Aunque las actividades de estos grupos (G2 y J2) fueron relativamente bajas, también fueron sometidos al fraccionamiento secundario, con el propósito de aislar los posibles compuestos responsables de la acción alelopática de *P. bipinnatifidum*.

Al comparar los valores de IC₅₀ de las fracciones más activas con los valores de IC₅₀ del extracto CH₂Cl₂ de *P. bipinnatifidum* se observa que el extracto presentó una actividad superior a la mostrada por las fracciones. Este hecho se puede justificar por un efecto sinérgico entre los componentes del extracto, siendo este efecto más acentuado en *P. bipinnatifidum*, que en *P. hysterothorus*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.1.3.3 Fraccionamiento secundario de los grupos G2, H2, I2 y J2

Continuando con el estudio biodirigido se procedió al fraccionamiento de los cuatro grupos activos obtenidos del fraccionamiento del extracto de diclorometano de *P. bipinnatifidum*.

Grupo primario	Fracciones secundarias de 250ml	Subgrupos	Compuestos aislados
G2	60	4 grupos Ga, Gb, Gc y Gd	-
H2	70	4 grupos Ha, Hb, Hc y Hd	Ambrosina
I2	63	3 grupos Ia, Ib y Ic	Ambrosina e histerina
J2	60	3 grupos Ja, Jb y Jc	histerina

El fraccionamiento secundario, realizado por columna abierta de gel de sílice y posteriormente por cromatografía en placa fina, permitió el aislamiento de dos compuestos los cuales fueron purificados por cristalización. La elucidación estructural de estos compuestos se llevó a cabo mediante técnicas espectroscópicas y puntos de fusión. Los compuestos fueron identificados como ambrosina e histerina de acuerdo con sus datos físicos y espectroscópicos comparados con datos publicados en la literatura.^{24,64} Las lactonas sesquiterpénicas ambrosina e histerina aisladas mediante el estudio biodirigido se probaron en las cuatro semillas en la germinación y desarrollo de plántulas. Los subgrupos mencionados en el cuadro 10, también fueron ensayados pero ninguno presentó actividad significativa.

6.1.3.4 Actividad inhibitoria de ambrosina e histerina

Los resultados de la actividad inhibitoria de ambrosina e histerina en las cuatro semillas de prueba se presentan en las gráficas de la fig. 21.

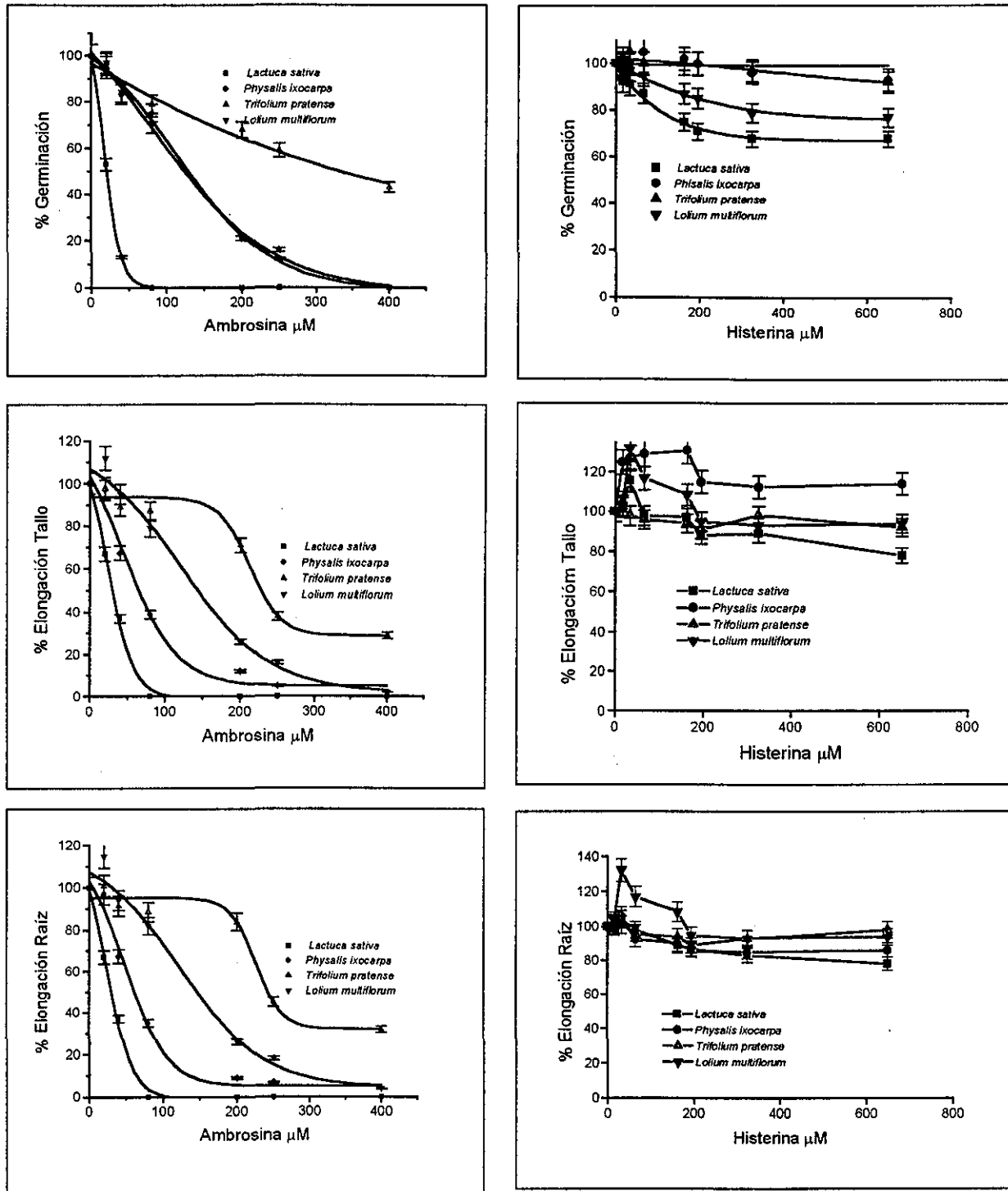


Fig. 21. Efecto inhibitorio de ambrosina e histerina aisladas de *P. bipinnatifidum* en la germinación y desarrollo de raíz y tallo.

Germinación

La ambrosina muestra una fuerte actividad inhibitoria en la germinación de todas las semillas de prueba, siendo su actividad más potente sobre *L. sativa*, puesto que inhibe totalmente la germinación de esta semilla a 80 μ M. Ésta concentración es mucho menor que la exhibida por la dehidrozaluzanina C, guayanólida más activa del grupo de lactonas ensayadas por Macías, la cual alcanzó solamente un 80% de inhibición a 1000 μ M.⁷ La histerina en cambio presenta una baja actividad, alcanzando solamente un 30% de inhibición arriba de 600 μ M, para las semillas de *L. sativa* y *L. mutiflorum*.

Elongación de tallo y raíz

La ambrosina presenta un efecto inhibitorio en el desarrollo de tallo y raíz muy superior al mostrado por la histerina. El efecto inhibitorio de la ambrosina en *L. sativa* puede ser observado en la fig. 22 la cual exhibe el efecto inhibitorio en la plántula.

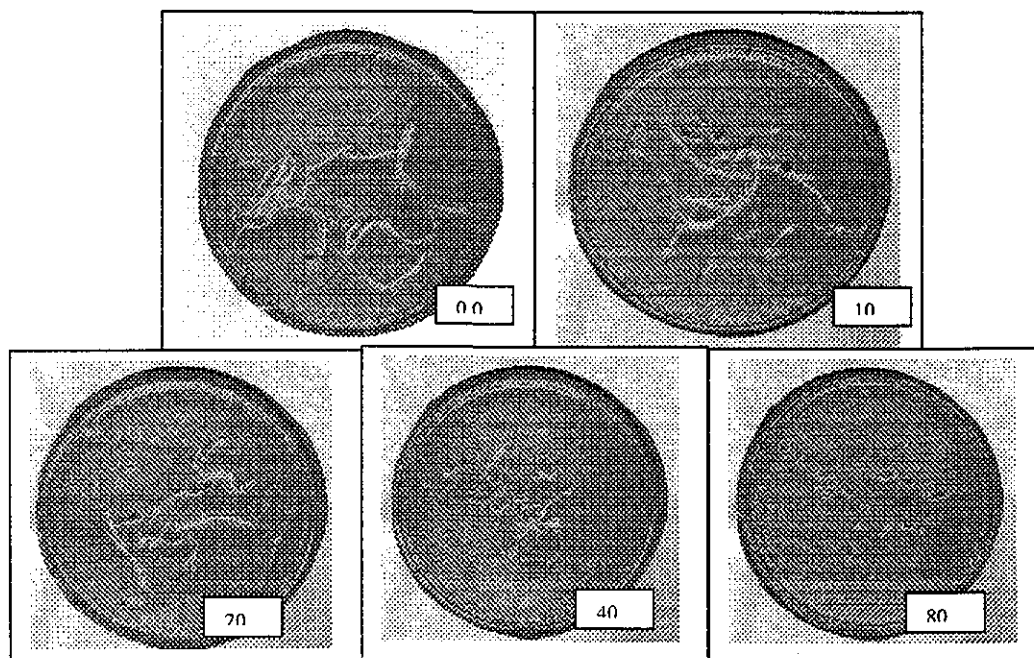


Fig. 22. Efecto inhibitorio de ambrosina en plántulas de *L. sativa* después de 6 días de incubación. La concentración esta expresada en μ M.

También, se observa que a bajas concentraciones la ambrosina estimula ligeramente el crecimiento de la raíz y el tallo de *L. multiflorum*. Aunque la histerina no presenta un efecto inhibitorio significativo en la mayoría de las semillas de prueba, presentó un efecto estimulante en el desarrollo del tallo y raíz de *L. multiflorum* y *P. ixocarpa*, promoviendo un 130% de elongación del tallo y raíz, a una concentración de 30 μM . Esta actividad estimulante no la presentó la partenina en ninguna de las semillas probadas (fig. 17) mientras que Fischer y colaboradores⁴² publicaron un ligero estímulo de la germinación en otras semillas. Ambrosina inhibe totalmente la elongación de raíz y tallo de *L. sativa* a concentraciones de 80 μM . Estos resultados sugieren que ambrosina presenta efectos inhibitorios pre-emergentes y postemergentes, siendo más acentuado su efecto pre-emergente.

Determinación del IC₅₀.

La ambrosina resultó ser el compuesto más activo, aislado de *P. bipinnatifidum*. El cuadro 11 ilustra las IC₅₀ para ambrosina e histerina.

Cuadro 11 Determinación de IC ₅₀ en μM para los compuestos aislados de <i>P. hysterophorus</i>												
Compuesto	<i>Lactuca sativa</i>			<i>Physalis ixocarpa</i>			<i>Lolium multiflorum</i>			<i>Trifolium pratense</i>		
	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀
Ambrosina	17	29	31	126	66	60	59	143	94	400	124	239
Histerina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

GI₅₀: 50% de inhibición de la germinación

TI₅₀: 50% de inhibición en el desarrollo del tallo

RI₅₀: 50% de inhibición en el desarrollo de la raíz

El análisis de los índices del 50% de inhibición, en germinación y desarrollo de tallo y raíz, ilustrados en el cuadro 11, nos permitió establecer que la ambrosina inhibió las cuatro semillas de prueba, en el siguiente orden: *L. sativa* > *L. multiflorum* > *P. ixocarpa* > *T. pratense*. En cambio la histerina mostró un efecto inhibitorio pequeño y no alcanza el GI₅₀ dentro de los criterios establecidos (intervalo de 0 a 1000 μM) en ninguna de las semillas de prueba. La actividad mostrada por la histerina en la germinación, inclusive fue menor que la mostrada por los grupos I2 y J2, grupos de donde fue aislada. Para convertir

la concentración en ppm a μM se usó la siguiente equivalencia (1 ppm = $3.25\mu\text{M}$ para histerina). Analizando el grupo I2 (Fig. 18) éste mostró una GI_{50} para *L. sativa* de 199 ppm, equivalente 646 μM , por otro lado el grupo J2, mostró un valor de GI_{50} para *L. multiflorum* de 158 ppm, equivalente a 513 μM . Considerando los valores de GI_{50} mostrados por los grupos I2 y J2, no podemos atribuir la actividad de estos grupos a la presencia de histerina, puesto que como se mencionó anteriormente ésta no logró alcanzar el GI_{50} a 1000 μM . La actividad del grupo I2 por lo tanto se puede justificar por la presencia de ambrosina, mientras que el grupo J2 puede justificarse por la presencia de otros compuestos activos en pequeñas cantidades, los cuales no se pudieron aislar. Por lo tanto, inferimos que la ambrosina es el compuesto que más contribuye a la actividad alelopática de *P. bipinnatifidum* y que la participación de la histerina no contribuye de manera significativa a esta actividad. Aunque la histerina puede presentar un efecto sinérgico. Del grupo G2, no se logró aislar ningún compuesto y su actividad puede ser atribuida a otros compuestos activos que se encuentran en pequeñas cantidades.

6.1.3.5 Actividad de los subgrupos

Los 14 subgrupos mencionados en el cuadro 10 fueron probados, pero no mostraron ninguna actividad significativa. Por lo tanto la actividad mostrada por el extracto de CH_2Cl_2 , se debe a la presencia de ambrosina.

6.1.3.6 Extracto Metanólico

El extracto metanólico se fraccionó en 238 fracciones, estas fueron agrupadas en 13 grupos de polaridad distintas como se ilustra el cuadro 12

Eluyente en %	Fracciones agrupadas	Grupo	Peso en gramos
Hexano	1-10	A3	0.70
Hexano-acetato de etilo 90-10	11-28	B3	1.58
Hexano-acetato de etilo 80-20	29-46	C3	3.62
Hexano-acetato de etilo 70-30	47-61	D3	4.57
Hexano-acetato de etilo 60-40	62-80	E3	5.85
Hexano-acetato de etilo 50-50	81-105	F3	6.09
Hexano-acetato de etilo 40-60	106-139	G3	3.75
Hexano-acetato de etilo 30-70	140-173	H3	2.98
Hexano-acetato de etilo 20-80	174-191	I3	2.26
Hexano-acetato de etilo 10-90	192-208	J3	1.72
Acetato de etilo 100	209-218	L3	1.25
Acetato de etilo-cloruro de metileno 50-50	219-227	M3	1.30
Metanol 100	228-238	N3	2.03

El fraccionamiento del extracto de MeOH permitió la obtención de 13 grupos de polaridad distintas y una mezcla de β -sitosterol y estigmasterol. Todos los grupos y la mezclas de compuestos fueron ensayados, con el objetivo de determinar su acción inhibitoria en la germinación semillas y el desarrollo de las cuatro plántulas de prueba. Entre los 13 grupos ensayados, ninguno presentó efecto inhibitorio significativo, por lo cual no se continuó con el estudio biodirigido.

6.1.4 Actividad de las Lactonas sesquiterpénicas en *T. vulgare* (Trigo)

Se probaron las 3 lactonas en la germinación de las semillas, desarrollo de las plántulas (tallo y raíz) de trigo (*T. vulgare*). Los resultados obtenidos se muestran en la fig. 23. Se escogió la semilla de trigo por ser monocotiledónea, ya que solamente se había probado la de *L. multiflorum*, y esta semilla había mostrado, frente a bajas concentraciones de ambrosina, un estímulo de 110% en su desarrollo (fig 20).

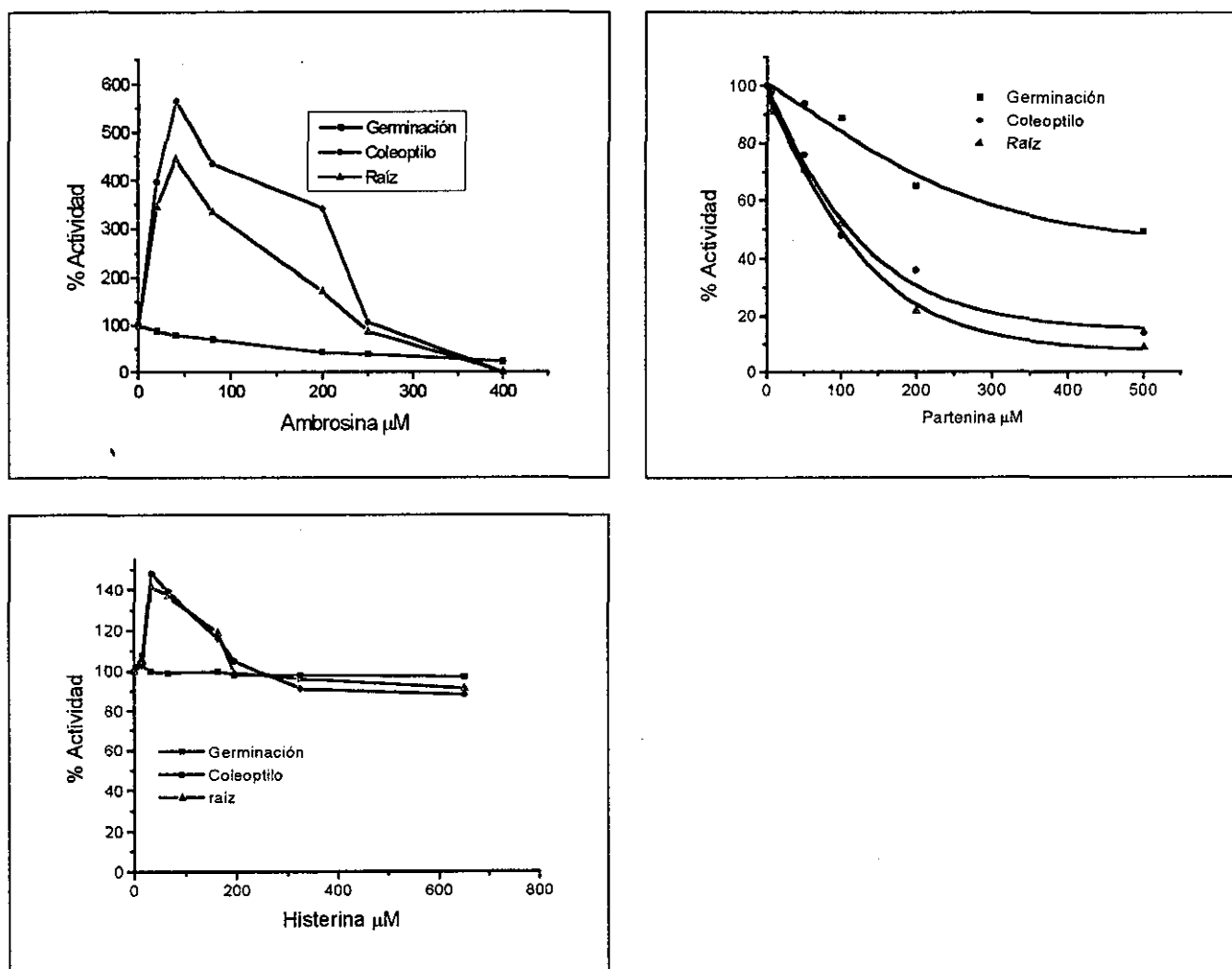


Fig. 23. Actividad de ambrosina, histerina y partenina en germinación y desarrollo de *T. vulgare*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Germinación

La ambrosina y la partenina inhibieron la germinación del trigo en forma significativa, mientras que la histerina fué totalmente inactiva. La ambrosina fue la más activa con una GI_{50} a la concentración de $156\mu M$, seguida de la partenina con una GI_{50} a $500\mu M$.

Desarrollo de raíz y tallo (coleóptilo)

Ambrosina e histerina, a bajas concentraciones, actúan como reguladores de crecimiento, estimulado el coleóptilo y la raíz de *T. vulgare*, siendo la estimulación de la ambrosina muy superior a la de la histerina. El efecto puede ser observado en las fotos de las plántulas presentadas en la fig. 24.

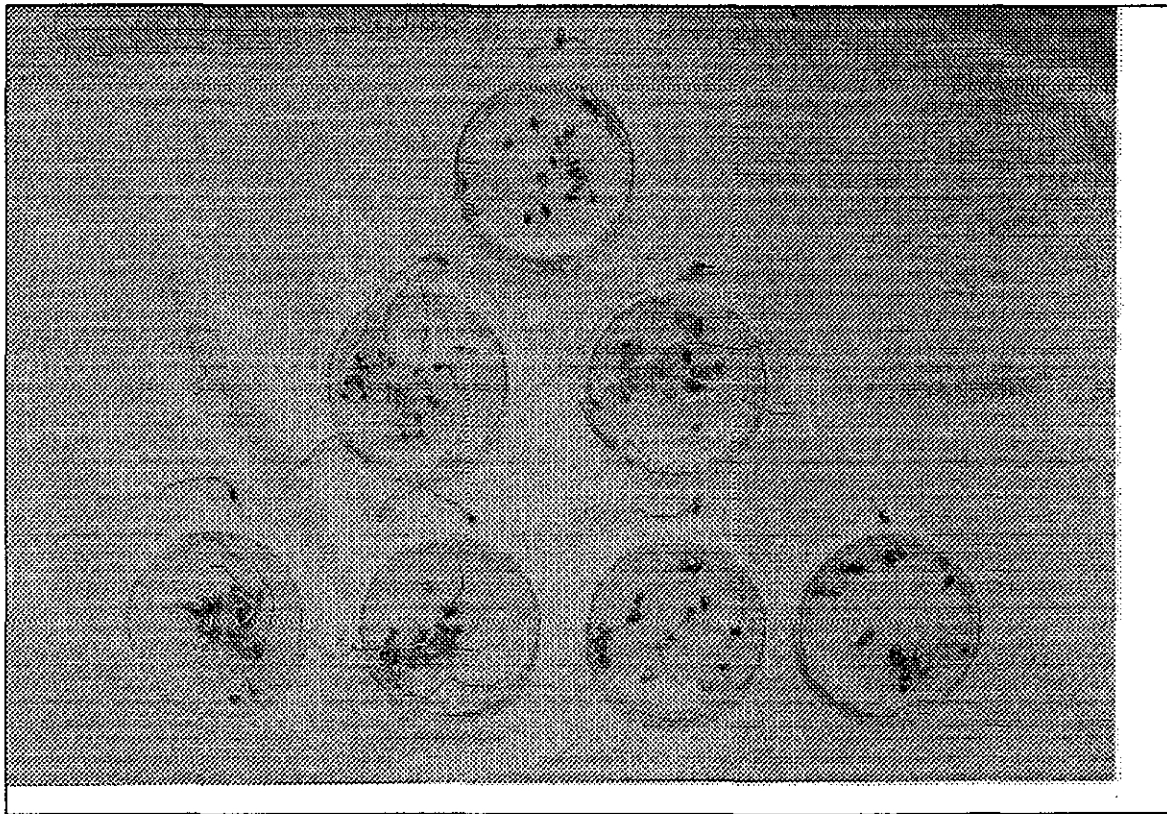


Fig.24. Efecto dosis dual de ambrosina μM en el desarrollo de *T. vulgare* (trigo) después de 6 días de incubación.

La estimulación en ambrosina, ocurre entre 0 a 250 μM presentando su mayor efecto estimulante a 40 μM , promoviendo el crecimiento del coleóptilo en 566% y de la raíz en 464%. A concentraciones superiores la ambrosina presenta un efecto inhibitorio, con una TI_{50} a 330 μM , para el coleóptilo y una RI_{50} a 305 μM para la raíz. Esto muestra que la actuación de ambrosina en monocotiledónea sigue un modelo dual, estimulando a bajas concentraciones e inhibiendo a altas. La histerina estimula el crecimiento de raíz y coleóptilo a concentraciones de 0 a 230 μM , presentando su mayor efecto estimulante, a 30 μM , promoviendo en un 148% el crecimiento para el coleóptilo y un 140% para la raíz, en cambio no mostró ningún efecto a concentraciones superiores a 230 μM , por consiguiente la histerina actúa como un regulador del crecimiento a bajas concentraciones en *T. vulgare*.

La partenina en cambio presentó un fuerte efecto inhibitorio, con una TI_{50} a 109 μM para el coleóptilo y una RI_{50} a 95 μM para la raíz de *T. vulgare*.

Estos resultados muestran que las lactonas de *P. bipinnatifidum* actúan como reguladores en semillas monocotiledóneas a bajas concentraciones. Este efecto se detectó en *L. multiflorum* y fue comprobado en *T. vulgare*. Puesto que ambrosina estimuló el desarrollo de la semilla monocotiledónea *T. vulgare*, en el intervalo de 0 a 250 μM , y que a las mismas concentraciones todas la dicotiledóneas ensayadas fueron inhibidas por la misma lactona, muestra que ambrosina es una lactona altamente selectiva y un buen candidato como modelo para estudios de herbicidas selectivos.

6.2 Determinación Estructural

6.2.1 Determinación estructural de las lactonas aisladas.

Partenina es una lactona sesquiterpénica perteneciente al grupo de las pseudoguayanólidas, es el metabolito secundario mayoritario de *P. hysterophorus*²⁴ fue aislada e identificada por Herz y colaboradores.⁶² En este trabajo la partenina fue aislada del extracto de diclorometano de *P. hysterophorus* por cromatografía en columna y purificada por cristalización de hexano-acetato de etilo, obteniéndose como cristales incoloros, con un p.f. 163-164°C, fue identificada por comparación de sus datos espectroscópicos con los publicados en la literatura.^{65, 66} La asignación de los datos publicados de RMN ¹³C, de la partenina presentaron diferencias en los carbonos C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₄ y C₁₅ (Tabla 1).

carbono	Presente estudio	Stethi et al 1987	Balza et al 1988	Chhabra et. al 1999
1	84.6	83.4	83.8	84.3
2	162.5	162.8	163.4	163.8
3	132.1	130.8	130.9	131.4
4	210.1	209.8	210.7	211.1
5	59.2	58.2	58.6	59.0
6	78.5	78.5	78.7	79.1
7	44.24	43.8	43.7	40.5
8	28.4	27.6	29.4	29.8
9	29.8	29.2	27.9	28.4
10	40.8	39.8	40.0	44.2
11	140.4	140.1	140.1	140.5
12	170.5	170.4	170.8	171.2
13	121.6	120.2	121.3	121.9
14	17.4	16.7	16.8	18.3
15	18.3	17.4	17.9	17.4

La asignación de los carbonos C₇, C₁₄ y C₁₅ se llevó a cabo mediante el análisis de las correlaciones C-H en el espectro HETCOR. Para la asignación de los carbonos C₈, C₉, C₁₀ se determinó primero el desplazamiento de los protones H₈, H₉ y H₁₀ en el espectro COSY y después los desplazamientos de los carbonos mediante las correlaciones C-H en el espectro HETCOR. De esta manera, se asignaron todos los carbonos de la partenina sin

ambigüedad, coincidiendo con los datos publicados por Stethi et al⁶⁷. Es interesante mencionar que los trabajos de Balza y colaboradores⁶⁸, y de Chhabra y colaboradores⁶⁶ aunque más recientes, la asignación de los carbonos fue incorrecta. La asignación total de los carbonos de la partenina se determinó utilizando las técnicas de DEPT, HETCOR y COSY.

La ambrosina, es una lactona sesquiterpénica que pertenece al grupo de las pseudoguayanólidas, aislada mas frecuentemente del genero *Ambrosia*⁶⁹, también fue aislada de *Parthenium bipinnatifidum*.²⁸ La ambrosina fue aislada en este estudio del extracto de diclorometano de *P. bipinnatifidum* por cromatografía en columna de gel de sílice y purificada por cristalización con hexano-acetato de etilo. La ambrosina se identificó por comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas con las publicadas en la literatura.²⁴

La histerina fue aislada por primera vez por Romo de Vivar en 1965 de *P. bipinnatifidum*, incorrectamente identificado como *P. hysterothorus*⁶⁴, en este estudio se aisló del extracto de diclorometano de *P. bipinnatifidum* por cromatografía en columna de gel de sílice y se identificó por comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas con las publicadas en la literatura.^{64,70} También fue determinado el espectro de RMN-¹³C de histerina el cual no ha sido publicado. La asignación de los desplazamientos de los carbonos se llevó a cabo mediante las técnicas de DEPT, HETCOR y COSY que permitió asignar de forma inequívoca todos los carbonos.

6.2.2 Actividad biológica de las lactonas aisladas.

La partenina exhibe diferentes actividades biológicas: anticancerígena^{50,71}, antiinflamatoria⁴⁹ antibacteriana⁷² antiamebocida⁷³, antimalárica.⁷⁴ e inhibe el crecimiento de hongos⁷⁵. Es tóxica y presenta dermatitis por contacto en humanos y animales.²⁰ La fuerte actividad reguladora que presenta la partenina en la germinación y desarrollo de malezas, tanto terrestres como acuáticas, ha sido motivo de numerosos estudios.^{8,9,10,11,12,13} Aunque la partenina ha sido ensayada en la germinación de *L. sativa* por Fischer y colaboradores⁴² en este estudio no se determinó la GI₅₀ y tampoco se estudió el desarrollo de la plántula. Para la histerina solamente se ha publicado su actividad antiinflamatoria⁴⁹.

6.2.3 Transformaciones químicas de los compuestos aislados.

El objeto de modificar las lactonas aisladas mediante reacciones químicas fue poder determinar la importancia relativa de los grupos ciclopentenona y metileno exocíclico, considerados responsables de la actividad inhibitoria de las lactonas sesquiterpénicas. También se busco cambiar la relación hidrofiliicidad/lipofiliicidad formando los correspondientes acetatos, mediante la acetilación de los grupos hidroxilos.

6.2.3.1 Derivados de Partenina.

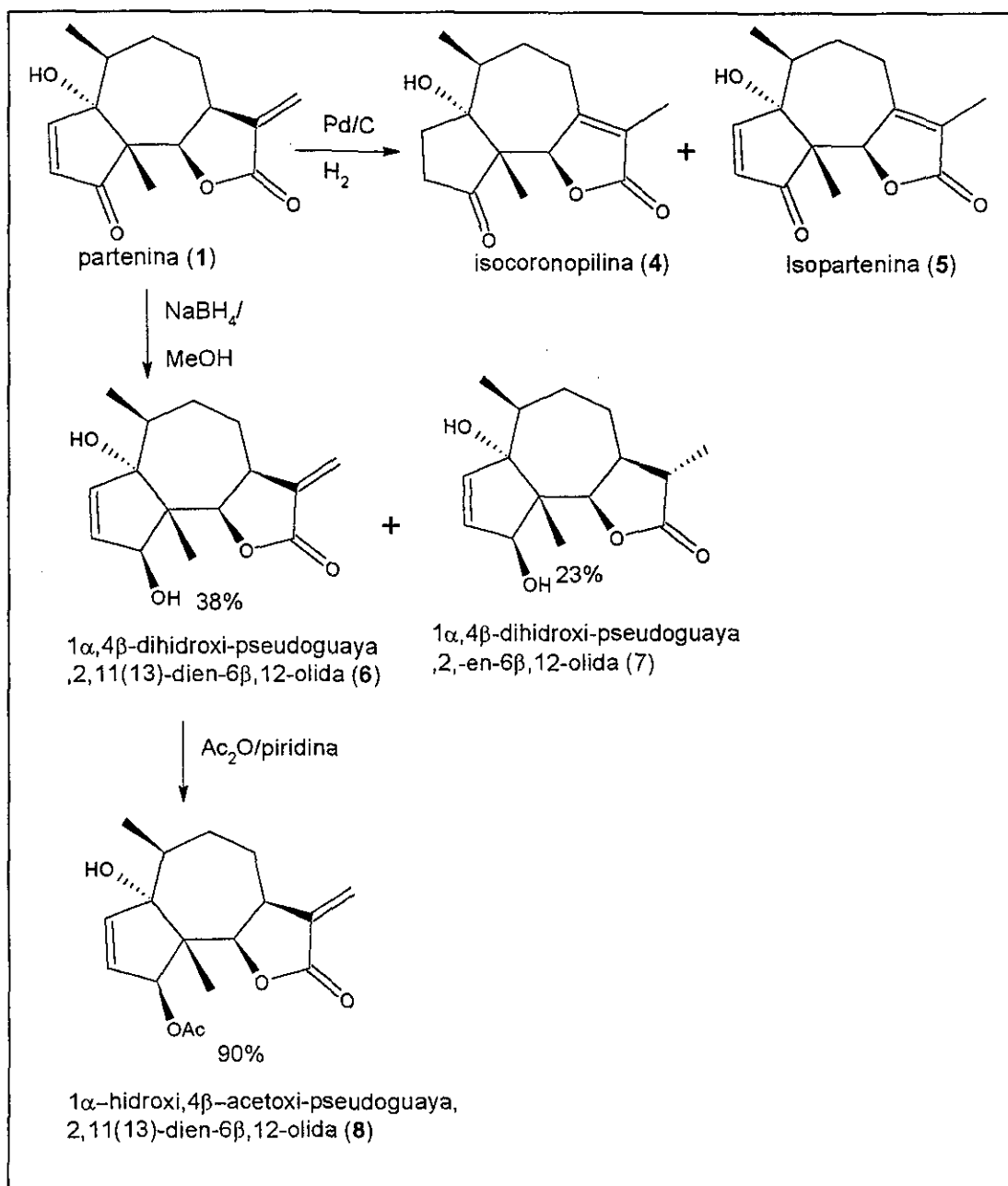


Fig. 25. Estructuras químicas de la partenina y sus derivados

6.2.3.1.1 Hidrogenación de la partenina con Pd/C.

La partenina (1) (80mg) fue hidrogenada catalíticamente con Pd/C en atmósfera de hidrógeno, produciendo una mezcla de isocoronopilina (4)(23mg) e isopartenina (5)(35mg). El compuesto 4, mostró una banda en el IR a 1740 cm^{-1} , característico de una ciclopentanona, indicando que se hidrogenó el doble enlace C_2, C_3 de la partenina, además el IR no muestra la señal a 1721 cm^{-1} de ciclopentenona. El espectro de RMN^1H , confirmó lo anterior puesto que no se observaron las señales de los protones vinílicos del anillo de cinco miembros de la partenina. El espectro de RMN^1H del compuesto 4 exhibió una señal simple en $\delta=1.82\text{ ppm}$, característica de un metilo vinílico, indicando que el metileno exocíclico se isomerizó a la posición 7-11, puesto que desaparecen la señal múltiple asignada a H_7 , y las señales para el metileno exocíclico conjugado con la lactona. Los datos de IR y de RMN^1H del compuesto 4 correspondieron a los publicados para isocoronopilina.^{76,77}

El compuesto 5 mostró una banda en 1750 cm^{-1} , asignada a una lactona que en la partenina, aparecía en 1760 cm^{-1} revelando una isomerización del metileno exocíclico de la lactona, esto se confirmó en el espectro de RMN^1H de 5, puesto que exhibió una señal simple en $\delta=1,85\text{ ppm}$, característico de un metilo vinílico, además la señal para H_6 se desplazó a campo bajo apareciendo como una señal simple en $\delta=5.46\text{ ppm}$. Los datos espectroscópicos de IR y RMN^1H de 5 fueron idénticos a lo publicados para la isopartenina.⁷⁶

6.2.3.1.2 Reducción de la partenina con NaBH_4 .

La reducción de partenina con NaBH_4 , produjo dos compuestos, la $1\alpha,4\beta$ -dihidroxipseudoguaya-2(3),11(13)-dien- $6\beta,12$ -olida (6) y la $1\alpha,4\beta$ -dihidrox-pseudoguaya-2(3)-en- $6\beta,12$ -olida (7).

El compuesto 6 fue un compuesto nuevo, presentó bandas en el IR en 3695 y 3604 cm^{-1} (OH, libre), 1754 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ de la γ -lactona) El espectro de RMN^1H , mostró señales características para un doble enlace di-substituído en $\delta=5.99$ y $\delta=5.95\text{ ppm}$ con constantes

de acoplamiento 5.8, 2.2 y 1.4 Hz. El valor de $J=5.8$ Hz sugiere que el doble enlace se encuentra en un anillo de 5 miembros y para un protón alílico base de un hidróxilo secundario en $\delta=5.16$ ppm como una señal doble de doble, como el espectro de IR no mostró la banda en 1721 cm^{-1} de una ciclopentenona, el compuesto **6** es el producto de reducción del carbonilo en C-4 de la partenina. produciendo el grupo hidróxilo secundario, la estereoquímica probable para este grupo, es β , considerando que el ataque del borohidruro, se llevó a cabo por el lado menos impedido de la molécula. El desplazamiento a campo bajo de la base de la lactona en **6** ($\delta=5.39$) se puede explicar por cambios conformacionales en la molécula, puesto que la reducción del grupo carbonilo, cambió la planaridad del anillo de cinco miembros.

El compuesto **7** es nuevo, su espectro de IR, tampoco mostró la banda en 1721 cm^{-1} característica de una carbonilo de ciclopentenona, indicando la reducción del carbonilo en C₄ de la partenina. El espectro de RMN¹H (ver experimental) mostró señales para un doble enlace di-substituído en $\delta=5.98$ ppm como un singulete asignado para los protones H₂ y H₃, un singulete ancho en $\delta=5.14$ ppm, atribuído a H₄ base del hidróxilo secundario, cuya estereoquímica probable sea β , considerando que su desplazamiento químico fue casi idéntico al del compuesto **6**. El espectro de RMN¹H, también exhibió una señal en $\delta=1.27$ ppm (d, $J = 6.7$ Hz) asignado al metilo secundario (H₁₃), confirmando la reducción del metileno exocíclico. La estereoquímica del grupo metilo en C₁₁ se estableció como α , comparando el desplazamiento químico de **7** con los isómeros α y β de la dihidrocoronipilina⁷⁶ y con la hymenolina⁶⁸ de estructura bien establecida y que posee un metilo en C₁₃ con estereoquímica α , el desplazamiento publicado para este metilo (1.29 ppm) fue casi idéntico al del compuesto **7**. De esta manera quedó establecida la estereoquímica α para el producto de reducción **7**.

6.2.3.1.3 Acetilación de 6.

El compuesto **6** fue acetilado con anhídrido acético en piridina a temperatura ambiente, obteniendo el correspondiente derivado acetilado **8**. Su espectro de IR mostró una nueva banda en 1737 cm^{-1} indicando la formación de un grupo acetato. El espectro de RMN¹H confirmó la presencia de grupo acetato (señal simple a $\delta=2.14$ ppm), además se

observa el desplazamiento de la señal en $\delta=5.16$ ppm (H-4) del compuesto **6** a $\delta=6.14$ ppm en el derivado acetilado **8**. Todos los datos anteriores están de acuerdo con la estructura propuesta para este nuevo derivado.

6.2.3.2 Derivados de ambrosina

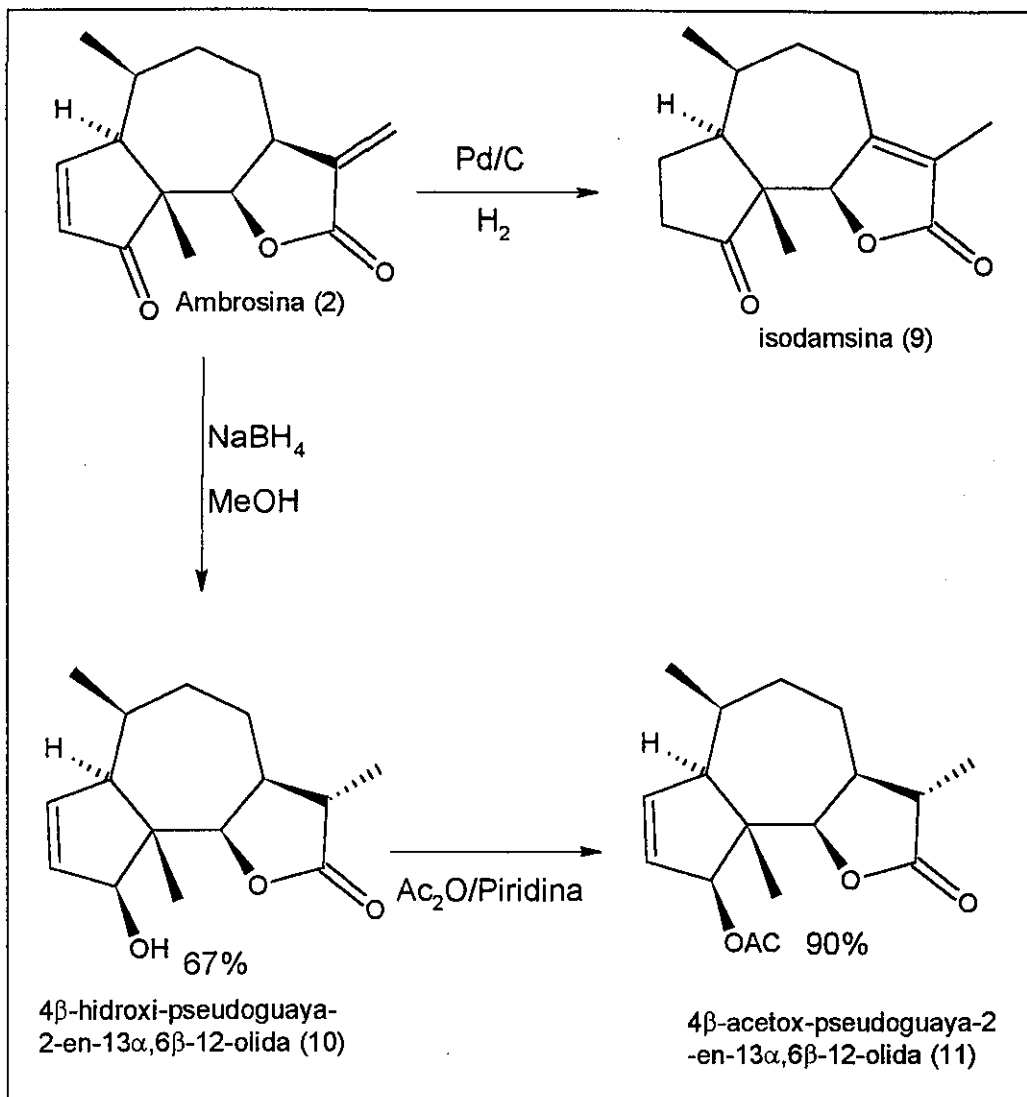


Fig. 26: Estructuras químicas de ambrosina y sus derivados

6.2.3.2.1 Hidrogenación de ambrosina con Pd/C

La ambrosina (**2**) fue hidrogenada con Pd/C produciendo la isodamsina (dihidroisoambrosina) (**9**). La espectroscopia del compuesto **9** fue muy similar al del compuesto **2**, pero no mostró la banda en 980 cm^{-1} característica del metileno exocíclico, sugiriendo la isomerización de éste. El espectro de RMN^1H confirmó la suposición anterior, puesto que no aparecen las señales para el metileno exocíclico, pero se observa una señal simple en $\delta=1.84\text{ ppm}$ atribuida a un metilo vinílico (H_{13}), además la señal para la base de la lactona ahora aparece como una señal simple en $\delta=4.62\text{ ppm}$, debido a la ausencia de H_7 . El doble enlace C_2 , C_3 también se hidrogenó puesto que la señales características para los protones vinílicos no se observaron en el espectro de RMN^1H de **9**. Los datos de IR y RMN^1H fueron idénticos a los reportados para la isodamsina.⁷⁸

6.2.3.2 Reducción de ambrosina con NaBH_4 .

Ambrosina **2** (50 mg) fue reducida con una solución de NaBH_4 , dando el nuevo producto **10** con un rendimiento de 67 %. El compuesto **10** mostró en el IR una banda en 3598 cm^{-1} , pero no exhibió la banda para la ciclopentenona en 1721 cm^{-1} , sugiriendo la reducción del carbonilo a un grupo hidróxilo. Su espectro de RMN^1H mostró señales para un doble enlace disustituido en $\delta=5.69$ y $\delta=5.73\text{ ppm}$, estas señales fueron asignadas a H_2 y H_3 , también se observó una señal doble en $\delta=1.25\text{ ppm}$ ($J=6.6\text{ Hz}$) atribuida a un metilo secundario (H_{13}), confirmando la reducción del metileno exocíclico. La estereoquímica del metilo en C_{11} se estableció como α , puesto que su desplazamiento químico (1.25 ppm) es muy similar al publicado para el epímero α de la dihidrocoronopilina (1.28 ppm)⁷⁶ Por último la señal para (H_4) base del hidróxilo secundario aparece como una señal múltiple en $\delta=4.72\text{ ppm}$, la estereoquímica probable para este grupo es β , considerando que el ataque del borohidruro, se lleva a cabo por el lado menos impedido de la molécula. Todos los datos de IR y RMN^1H (ver experimental) soportan la estructura **10**.

6.2.3.2.3 Acetilación de 10.

El compuesto 10 se acetiló con anhídrido acético en piridina, dando el acetato 11, con un rendimiento de 90%. El compuesto 11 (4 β -acetoxi-pseudoguaya-2-en-13 α ,6 β -12-olida) mostró en el IR una banda en 1731 cm^{-1} para el grupo C=O de un grupo acetato. En el espectro de RMN¹H, se observa el desplazamiento del protón H₄, de $\delta=4.72\text{ ppm}$ en el compuesto 10 a $\delta=5.68\text{ ppm}$ en el compuesto 11 confirmando la acetilación del grupo hidroxilo secundario. Todos los datos anteriores confirman la obtención del acetato 11.

6.2.3.3 Derivados de Histerina.

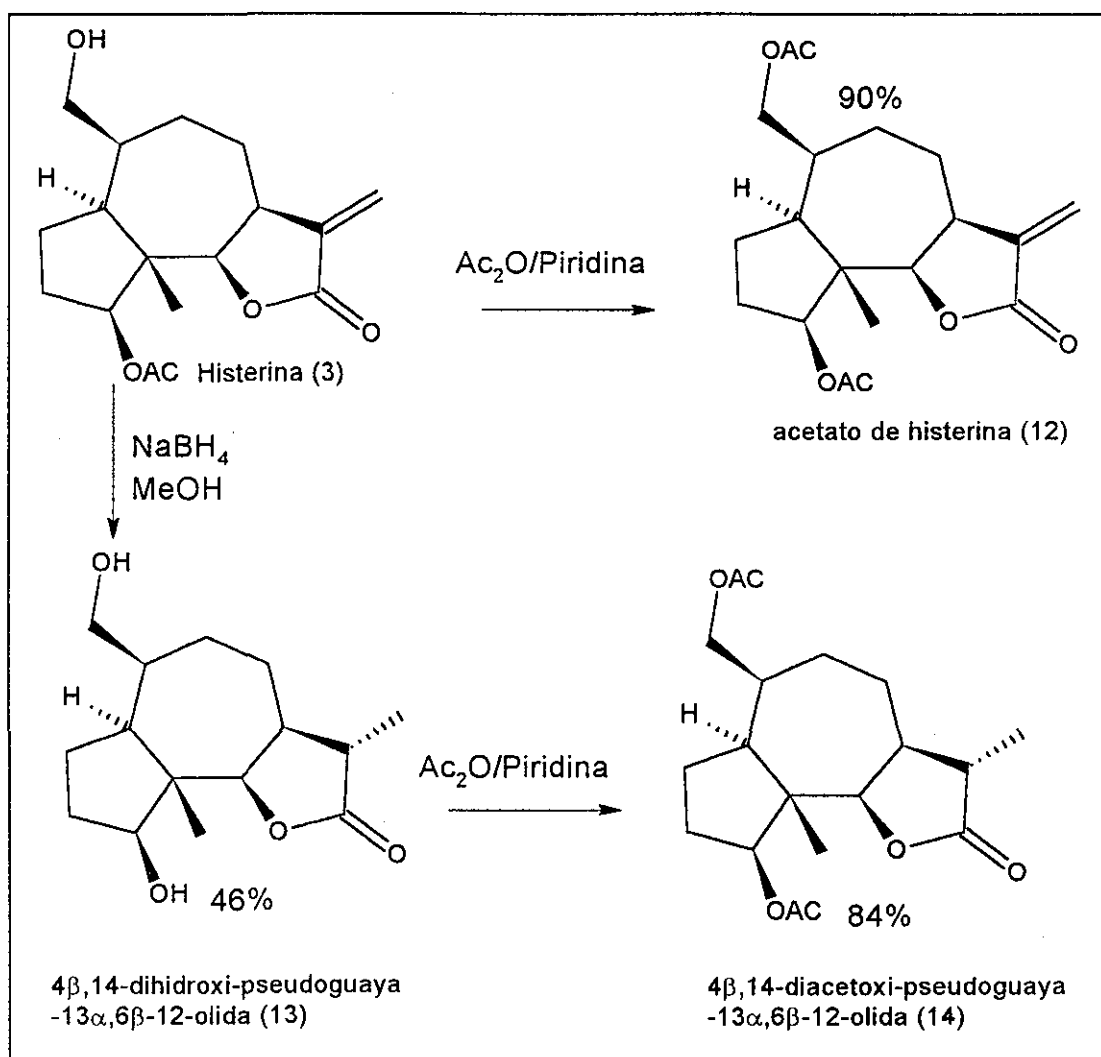


Fig. 27: Estructuras químicas de histerina y sus derivados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2.3.3.1 Acetilación de histerina.

La histerina **3** fue acetilada con anhídrido acético y piridina dando el correspondiente acetato **12** con un p.f. 113-115° (literatura 115-117°)⁶⁴ con rendimiento del 84 %. Los datos de IR y RMN¹H (ver experimental) soportaron la estructura **12** para el acetato de histerina.

6.2.3.3.2 Reducción de histerina con NaBH₄.

La histerina fue reducida con NaBH₄, produciendo el nuevo derivado **13** con un rendimiento de 46%. El espectro RMN¹H de **13** (4β,14-dihidroxi-pseudoguaya-6β,12-olida) no mostró las señales características del metileno exocíclico, pero presentó una señal doble en δ=1.23 ppm, atribuida al metilo secundario (H₁₃), la estereoquímica de este metilo se determinó como α, puesto que la reducción del metileno exocíclico con borohidruro, produce el metilo termodinámicamente más estable α^{65,64,76} La señal triple en δ=4.20 ppm se asignó al protón base de un hidróxilo secundario, formado por la reducción del grupo acetato en C₄. La ausencia de la señal simple en 2.09 ppm en el espectro de RMN¹H de **13**, característica del metilo de un acetato, confirmó la reducción del acetato en el C₄.

6.2.3.3.3 Acetilación de 13.

El producto de reducción **13**, fue acetilado con anhídrido acético en piridina, produciendo la 4β,14-diacetoxi-pseudoguaya-6β,12-olida (**14**), con un rendimiento de 84%. El espectro de IR mostró una banda en 1731 cm⁻¹ para C=O de grupos acetato y no se observó la banda para grupos hidróxilo, indicando que estos se acetilaron. El espectro de RMN¹H, confirmó la presencia de dos grupos acetato, al observar dos señales simples en δ=2.05 y δ=2.08 ppm, atribuidas a los metilos de los grupos acetato en las posiciones 4 y 14. Todos los datos de IR y RMN¹H (ver experimental) están de acuerdo con la estructura del compuesto **14** el cual es nuevo.

6.2.4 Conformación de las lactonas aisladas.

Las estructuras conformacionales de las lactonas aisladas (fig.28) fueron obtenidas mediante cálculos teóricos, estas estructuras permiten deducir la estereoquímica del centro quiral formado en el carbono C₄. La conformación de partenina muestra un impedimento en la cara β de la molécula causado por el metilo en C₅ el cual puede ser más fuerte que el causado por el hidróxilo en el C₁ promoviendo el ataque del borohidruro por el lado α menos impedido, dando lugar a la formación del hidróxilo β.

Esta suposición se confirmó al comparar nuestros resultados con los publicados por Das y colaboradores⁶⁵ los cuales llevaron a cabo la reducción de partenina con NaBH₄ obteniendo un hidróxilo en C₄ con estereoquímica β.

Analizando la conformación de la ambrosina se puede observar claramente que la cara α es la menos impedida ya que no contiene el grupo hidróxilo en el C₁, mientras que la cara β esta impedida por el grupo metilo en C₅. Por lo tanto el borohidruro atacará por la cara α formando el hidróxilo β en C₄.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

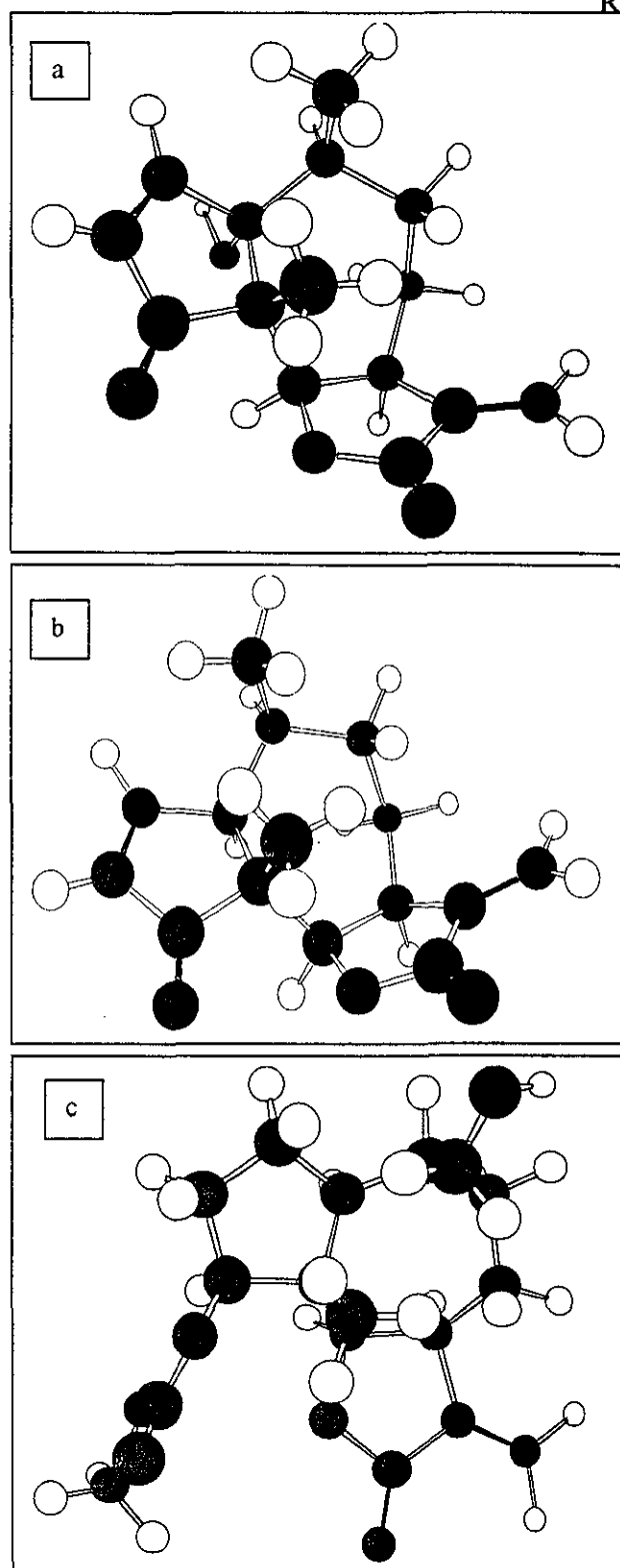


Fig. 28. Estructuras tridimensionales de las 3 lactonas aisladas a) partenina b) ambrosina c) histerina.

6.3 Actividad alelopática de la pseudoguayanólidas, zaluzanina C y 2,4-D.

Los estudios de la actividad alelopática fueron realizados con partenina, histerina, ambrosina y once derivados obtenidos, por transformaciones químicas. Se utilizaron como referencias la lactona zaluzanina C y el herbicida comercial 2,4-D. Las estructuras de los compuestos estudiados están representados en la fig. 29.

Las semillas utilizadas en este estudio fueron 3 dicotiledóneas, *L. sativa*, *P. ixocarpa* y *T. pratense* y dos monocotiledóneas, *L. multiflorum* y *T. vulgare*. Además de los ensayos de germinación de semillas y desarrollo de raíz y tallo, también se realizaron las mediciones de peso seco y respiración de semillas. Los resultados obtenidos, son comparados con los resultados presentados por la zaluzanina C, lactona sesquiterpénica y por los mostrados por el herbicida comercial 2,4-D.

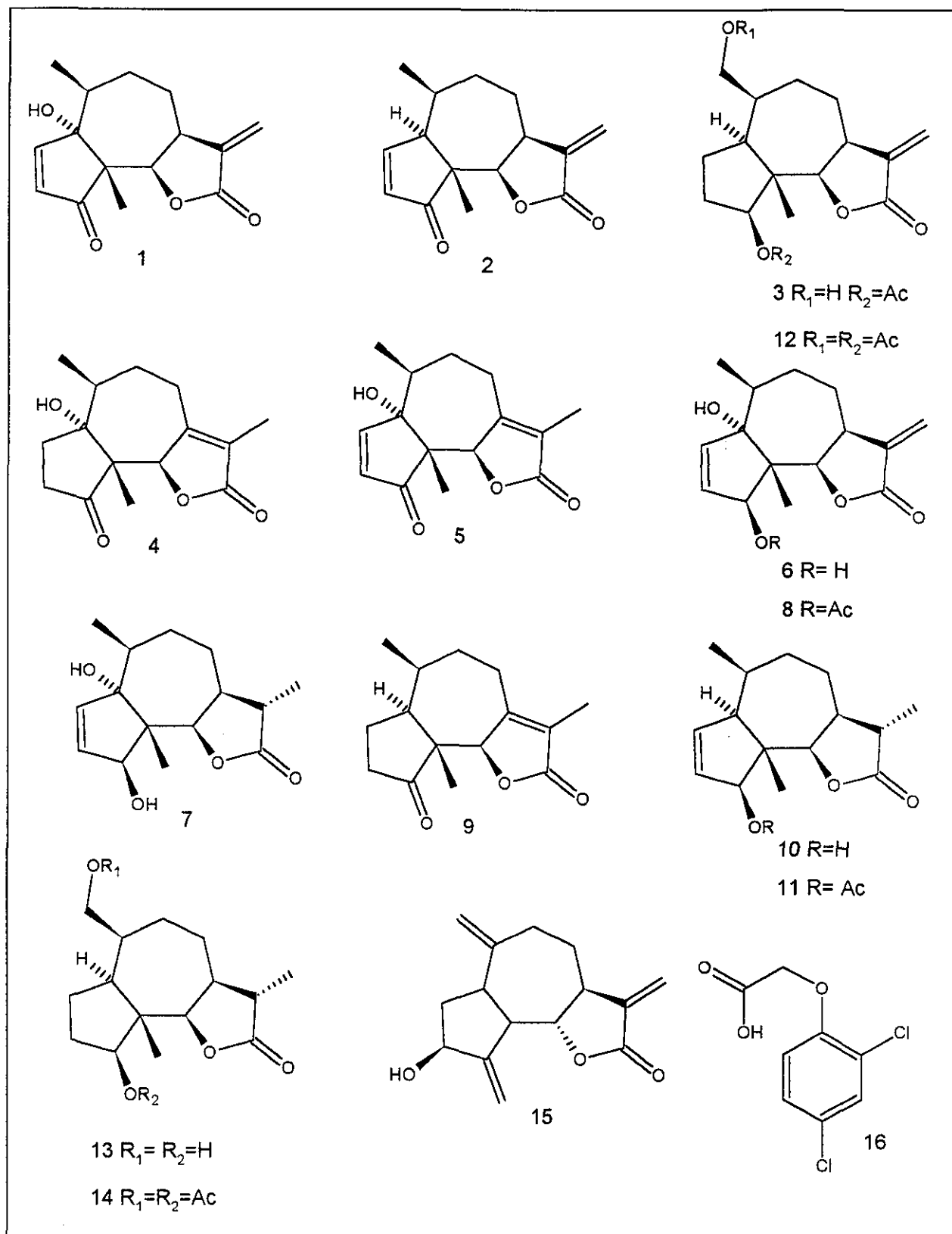


Fig. 29. Estructuras químicas de los compuestos ensayados en los estudios de estructura actividad.

6.3.1 Actividad inhibitoria o reguladora de los derivados, zaluzanina C y 2,4-D.

La mayoría de los derivados presentaron actividades muy pequeñas o nulas. Las actividades en germinación y desarrollo de raíz y tallo, se muestran en las gráficas de las fig.30, 31 y 32.

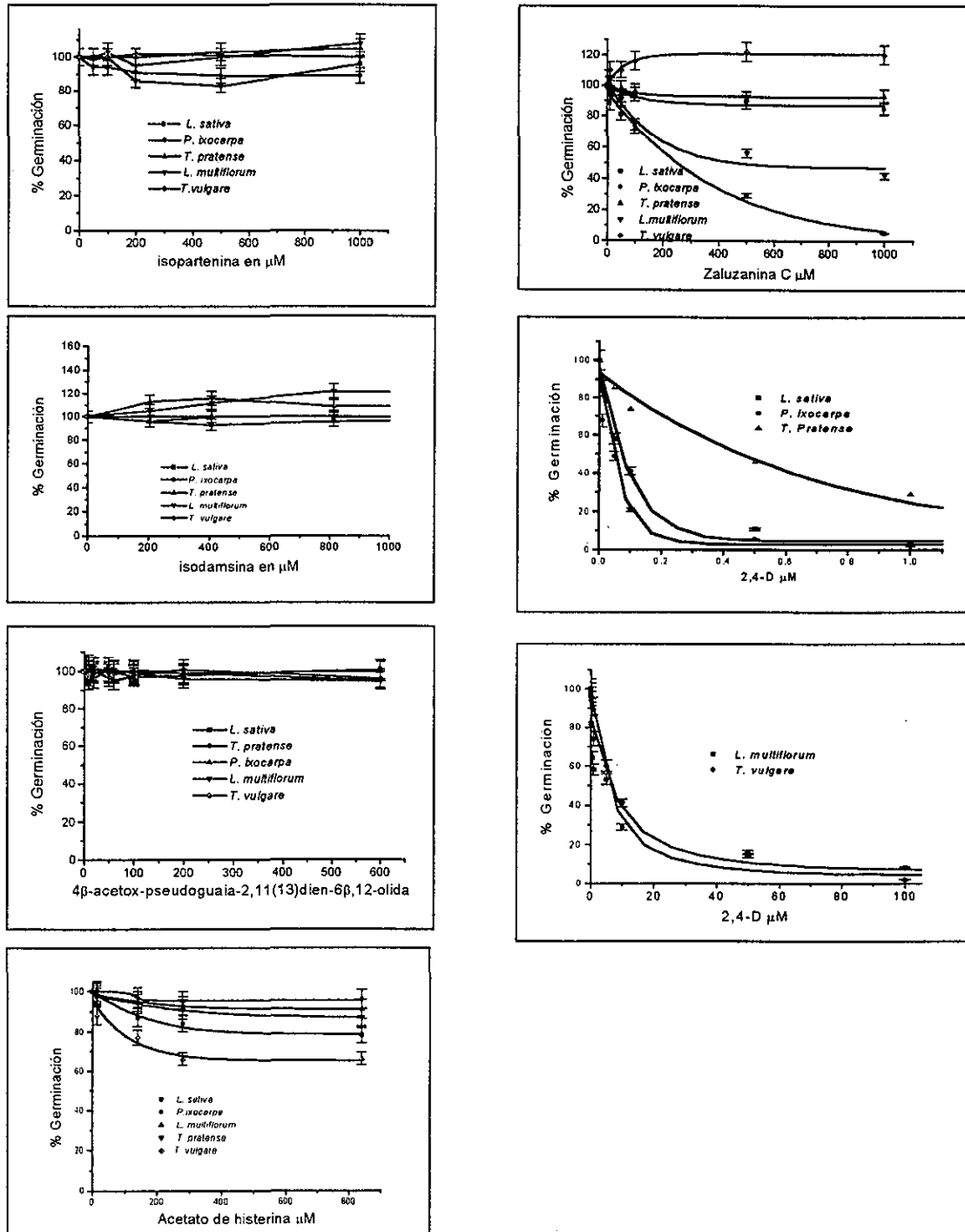


Fig. 30. Actividad inhibitoria en la germinación de los derivados, zaluzanina C y 2,4-D.

Germinación

La mayoría de los derivados presentaron bajos ó nulos efectos en la germinación. El derivado que presentó el efecto más significativo fue el acetato de histerina, el cual mostró una inhibición moderada para *L. sativa* y *T. vulgare*. Pero para ninguna de ellas se alcanzó el IC₅₀ a las concentraciones probadas. En cambio la zaluzanina C, presentó una inhibición del 95% para *L. sativa* a 1000µM, y para *L. multiflorum* una inhibición del 60% a la misma concentración, y efectos inhibitorios menores para *T. pratense* y *P. ixocarpa*, mientras que para *T. vulgare* el efecto fue ligeramente estimulado.

El 2,4-D, herbicida comercial, fue el que presentó el efecto inhibitorio más potente de todos los compuestos ensayados. Su efecto fue más pronunciado en dicotiledóneas, puesto que inhibió totalmente a las semillas de *L. Sativa* y *P. ixocarpa* a una concentración 5µM y para *T. pratense* a 10µM. Las monocotiledóneas mostraron ser mas resistentes, ya que *T. vulgare* fue totalmente inhibida a una concentración 100µM y *L. multiflorum* a 500µM.

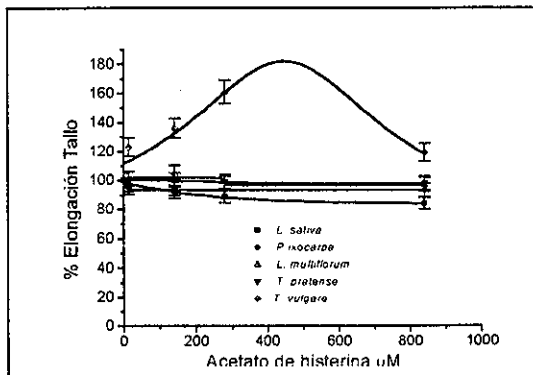
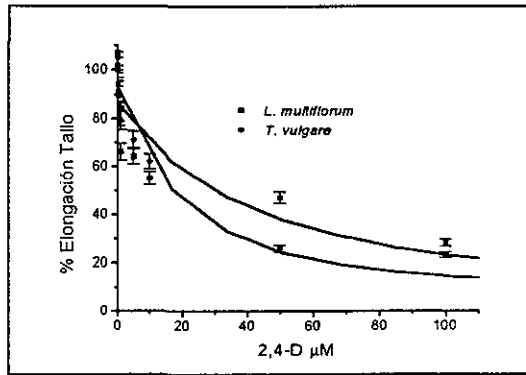
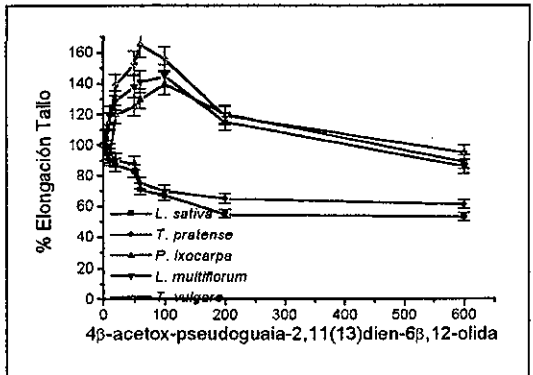
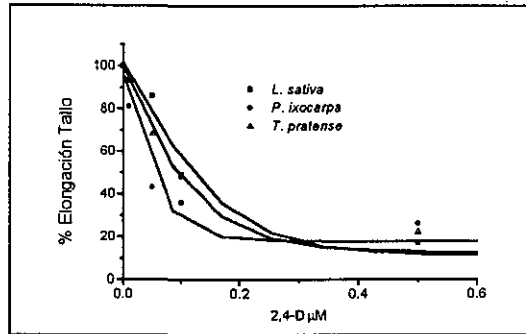
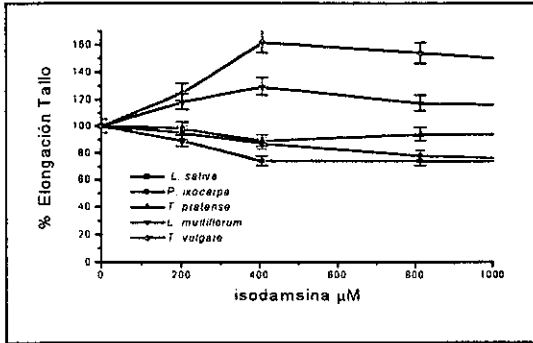
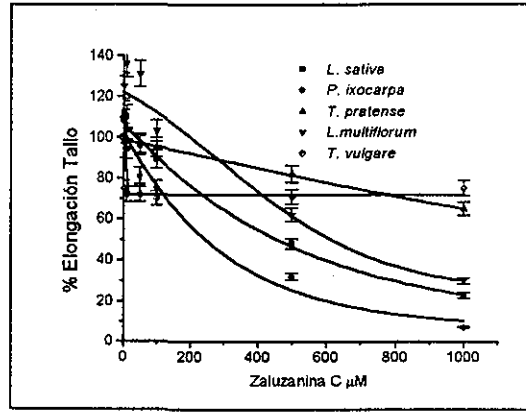
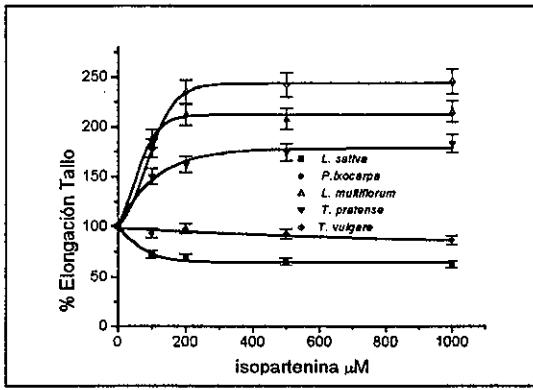


Fig. 31. Actividad inhibitoria en la elongación de tallo de los derivados, zaluzanina C y 2,4-D.

Elongación de tallo

El efecto inhibitorio de los derivados en el desarrollo de tallo fue poco significativo, en cambio presentaron efectos estimulantes en algunas de la semillas probadas. Isopartenina fue la que presentó el mayor efecto estimulante, siendo las semillas estimuladas *T. vulgare*, *L. multiflorum* y *T. pratense*. *T. vulgare*, fue la mas estimulada presentando un 234% de estimulación para coleóptilo a 200 μ M. La isodamsina también presentó un efecto dual en el intervalo de 0-800 μ M estimulando el crecimiento de *L. multiflorum* y *T. vulgare* ambas monocotiledóneas, el *T. vulgare* alcanza el máximo de estimulación a 400 μ M con un 153% para tallo.

El acetato de histerina, presentó actividad estimuladora solamente para el coleóptilo de *T. vulgare*, presentando un efecto estimulante del 180% a 450 μ M, el efecto sobre el tallo de las demás semillas fue de magnitud muy pequeña. El compuesto **8**, (1 α -hidroxi-4 β -acetoxi-pseudoguaya-2,11(13)-dien-6 β ,12-olida), también estimuló las semillas, *P. ixocarpa*, *T. vulgare* y *L. multiflorum* en los intervalos de 0 a 200 μ M. *T. vulgare* fue el mas estimulado alcanzando un 162% a concentraciones de 100 μ M para coleóptilo, y para *L. multiflorum*, presentó un 150% de estimulación para coleóptilo a la misma concentración. *P. ixocarpa* presenta casi el mismo valor que *L. multiflorum*.

La zaluzanina C presentó una inhibición para el hipocotilo de *P. ixocarpa* del 88%, para *L. sativa* del 70% y para *T. pratense* del 30%, a la concentración 1000 μ M. Para el coleóptilo se encontró una inhibición de 62% para *L. multiflorum* y de 26% para *T. vulgare* a la misma concentración.

El 2,4-D resultó el compuesto más activo, su actividad inhibitoria fue mucho mayor en dicotiledóneas puesto que inhibió totalmente el hipocotilo de *L. sativa*, *P. ixocarpa* y *T. pratense* a concentraciones de 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M respectivamente. Las semillas monocotiledóneas fueron más resistentes al 2,4-D, ya que el 100% de inhibición para el coleóptilo de *L. multiflorum* y *T. vulgare* se alcanzó a las concentraciones de 1000 μ M y 100 μ M respectivamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

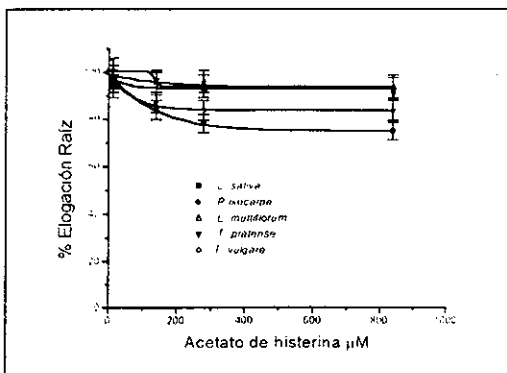
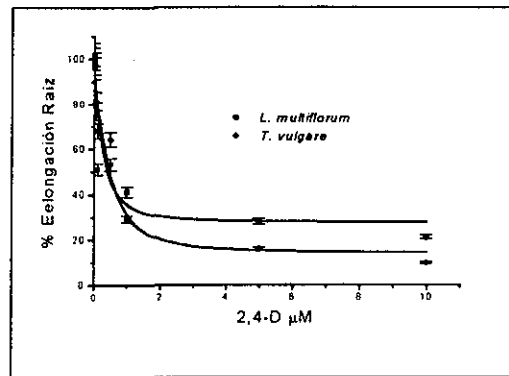
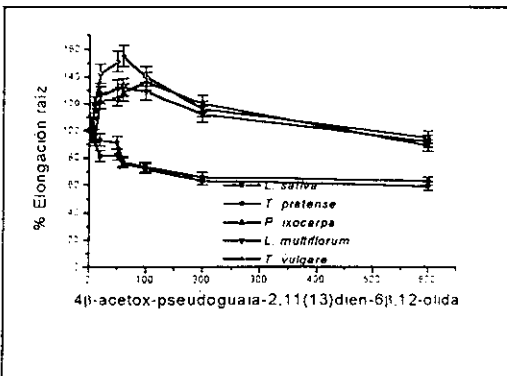
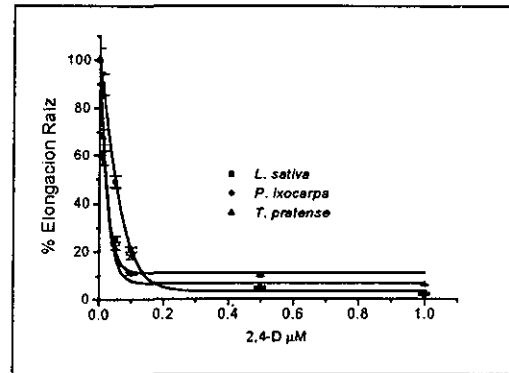
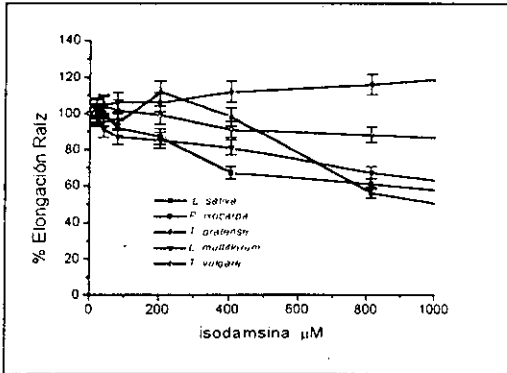
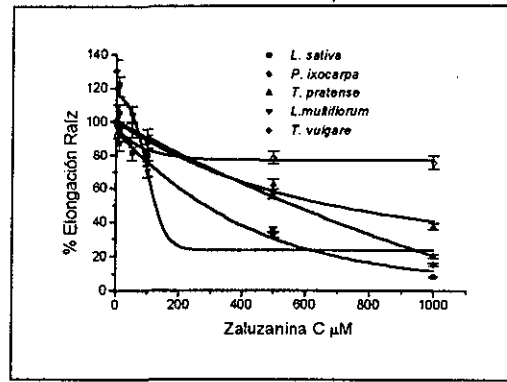
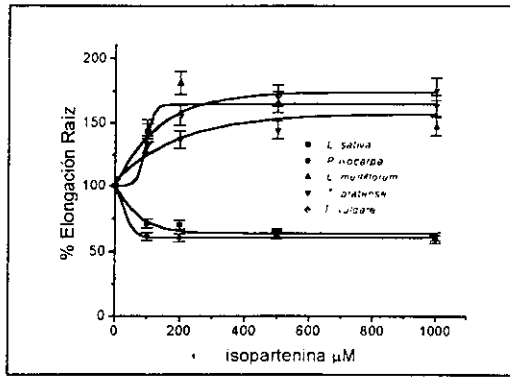


Fig. 32. Actividad inhibitoria en la elongación de raíces de los derivados, zaluzanina C y 2,4-D.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Elongación de raíz.

El desarrollo de raíz de las plántulas, en función de los derivados y las referencias zaluzanina C y 2,4-D se muestran en la fig. 32. Isopartenina muestra un fuerte efecto estimulador en las raíces de *T. vulgare*, *L. multiflorum* y *T. pratense*, siendo el efecto más fuerte en *T. vulgare*, el cual fue estimulado en un 175% a la concentración 500µM y que permaneció constante hasta 1000µM, seguido de un 160% para *L. multiflorum* a 200µM. En cambio mostró un efecto inhibitorio en las raíces de *L. sativa* y *P. ixocarpa*.

Isodamsina también presentó un efecto dual en el intervalo de 0-800µM, presentando efectos estimuladores menores que isopartenina pero inhibitorios mayores que ésta en el mismo intervalo.

El acetato de histerina, apenas presentó efectos inhibitorios en las cinco semillas de prueba, aunque estos fueron relativamente pequeños.

El compuesto **8** (1α-hidroxi-4β-acetoxi-pseudoguaia-2,11(13)-dien-6β,12-olida) mostró una actividad similar a la de isopartenina, estimulando la raíz de tres de las cinco semillas (*T. vulgare*, *L. multiflorum* y *P. ixocarpa*) e inhibiendo las otras dos (*L. sativa* y *T. pratense*).

La zaluzanina C presentó solamente efectos inhibitorios en las cinco raíces de las plántulas de prueba, inhibiendo en un 92% la raíz de *L. sativa*, 80% la de *L. multiflorum*, 76% la de *P. ixocarpa*, 64% la de *T. pratense*, y 25% la de *T. vulgare* a la concentración 1000µM.

El herbicida 2,4-D también presentó un fuerte efecto inhibitorio en la raíz, mayor que el presentado para el tallo. La raíz de *T. pratense* fue la menos sensible, ya que se necesitó una concentración de 500µM para alcanzar un 100% de inhibición.

Tanto en la germinación como en el desarrollo de raíz y tallo, se observó que la partenina y la ambrosina (pseudoguayanólidas) presentaron efectos inhibitorios ó estimuladores superiores a los de sus derivados, mientras que el acetato de histerina resultó ser ligeramente más activa que la histerina. Por otra parte la partenina y ambrosina, mostraron actividades inhibitorias entre 5 a 10 veces superior a las presentadas por la zaluzanina C (guayanólida), lactona con actividad inhibitoria similar a la del herbicida comercial Logran y que ha sido propuesta como modelo de herbicida natural.^{7,58}

Determinación del IC₅₀

Compuesto	<i>Lactuca sativa</i>			<i>Physalis ixocarpa</i>			<i>Lolium multiflorum</i>			<i>Trifolium pratense</i>			<i>Triticum vulgare</i>		
	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀	GI ₅₀	TI ₅₀	RI ₅₀
Zaluzanina C	245	450	274	-	230	555	440	612	426	-		646	-	-	-
2,4-D	0.07	0.12	0.50	0.05	0.06	0.01	6.8	31	0.39	0.45	0.09	0.01	6.7	16.5	0.50

GI₅₀: 50% de inhibición de la germinación

TI₅₀: 50% de inhibición en el desarrollo del tallo

RI₅₀: 50% de inhibición en el desarrollo de la raíz

Las pseudoguaynólidas partenina y ambrosina resultaron de 5 a 10 veces más activas que la zaluzanina C. (guayanólida), puesto que los datos de IC₅₀ (GI₅₀, TI₅₀ y RI₅₀) obtenidos para partenina (cuadro 6) y ambrosina (cuadro 11), mostraron valores menores que los obtenidos para zaluzanin C (cuadro 13).

Cuando se compara la actividad de las pseudoguaynólidas partenina y ambrosina con la actividad del 2,4-D (cuadro 13), se observa una actividad inhibitoria superior por parte del herbicida sintético.

6.3.2 Peso seco

Las medidas de peso seco se determinaron en los extractos de CH₂Cl₂ de *P. bipinnatifidum* y de *P. hysterophorus*, las lactonas aisladas, sus derivados más activos y las referencias zaluzanina C y el herbicida comercial 2,4-D. Las gráficas de peso seco se muestran en la fig. 33.

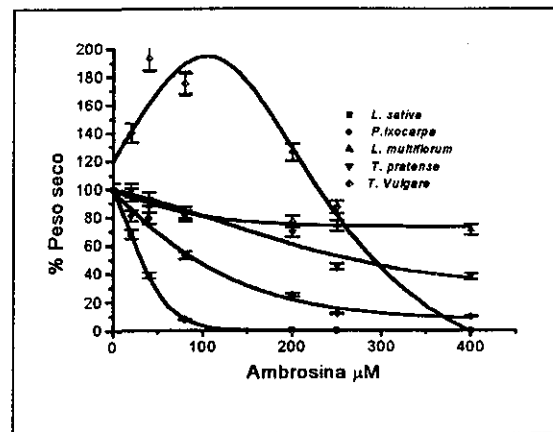
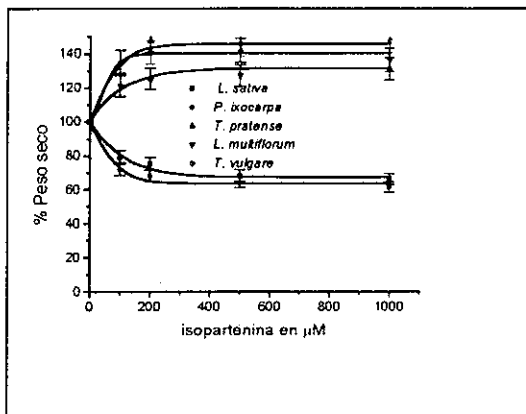
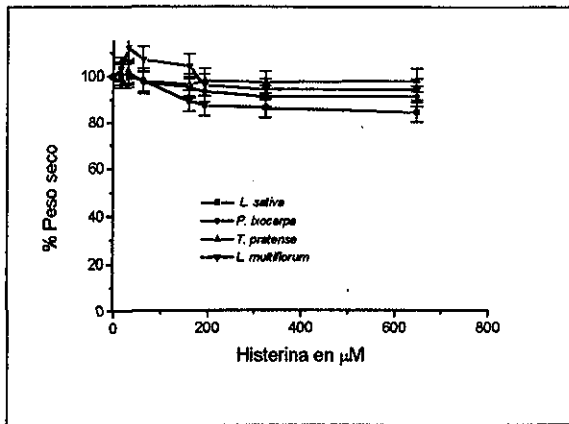
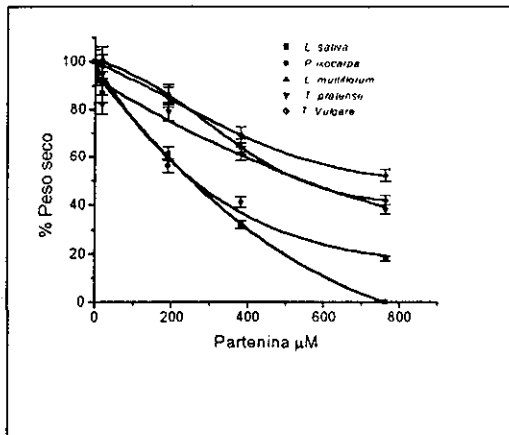
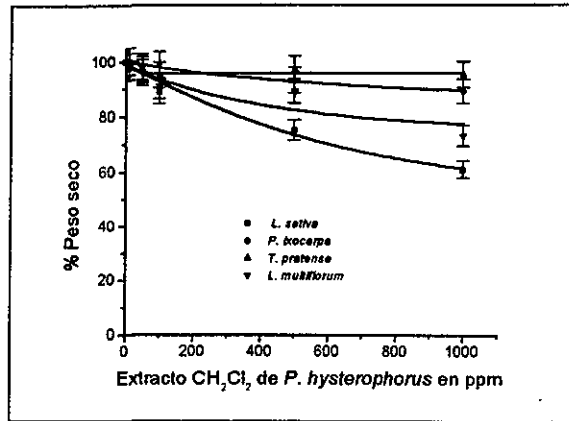
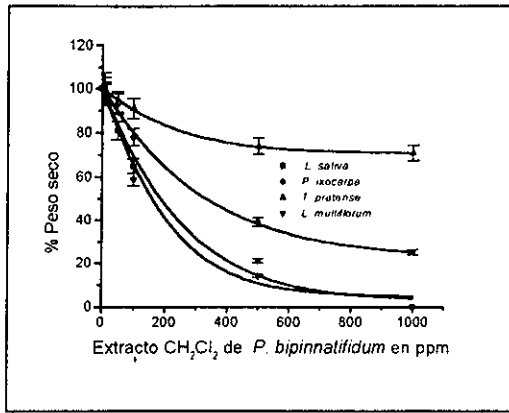


Fig. 33. Biomasa sintetizada frente a la actividad alelopática

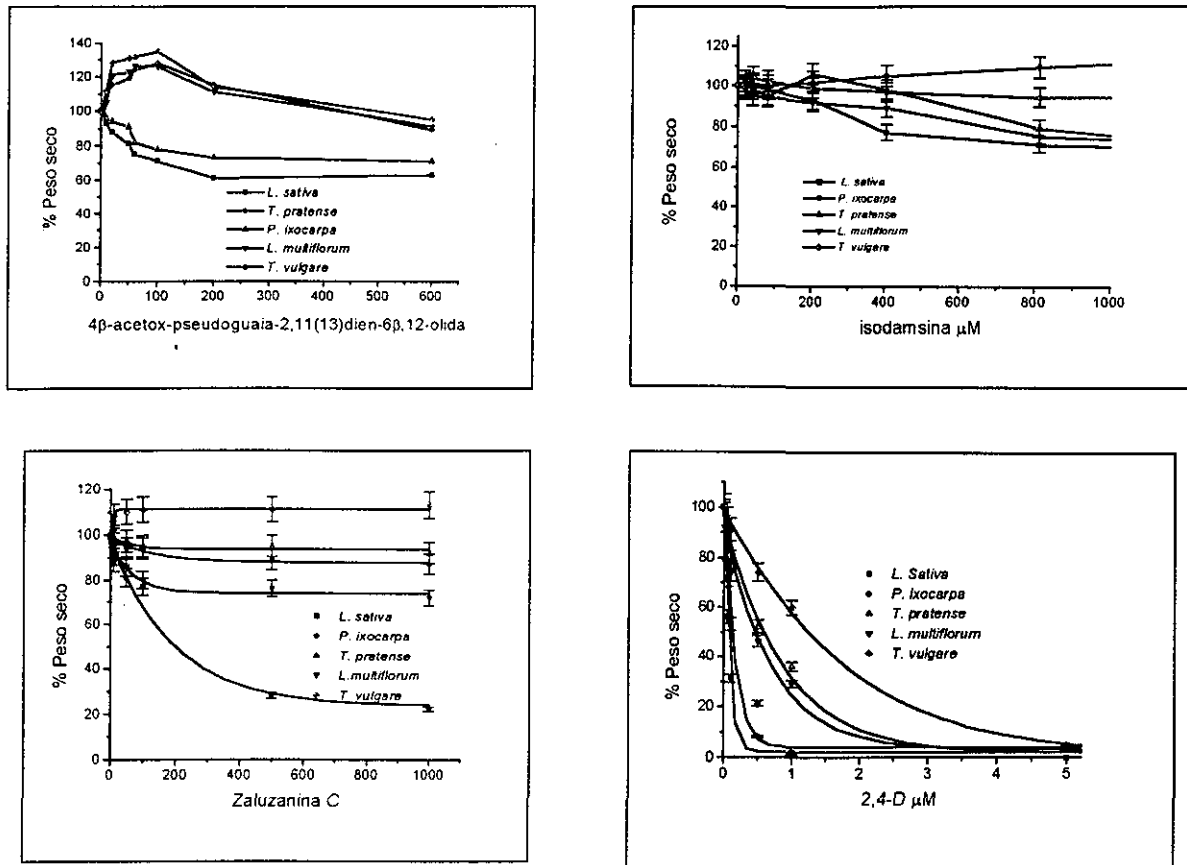


Fig. 33. Biomasa sintetizada frente a la actividad alelopática (continuación)

Las gráficas de peso seco muestran la cantidad de biomasa sintetizada durante el desarrollo de la plántula y que es proporcional a las dimensiones de las raíces y tallos y dependiente de la concentración del compuesto probado. Los resultados confirmaron la actividad estimulante que presentaron la isopartenina, ambrosina y 4β-acetoxi-pseudoguaya-2, en-13α,6β-12-olida en la elongación de tallo y raíz.

6.3.3 Respiración de las semillas durante la germinación

Se llevó a cabo la medición de la respiración (captación de oxígeno) de las cinco semillas de prueba con las lactonas más activas (ambrosina e histerina).

La respiración de las semillas dicotiledóneas disminuye a medida que aumenta la concentración de los compuestos esto fue observado tanto para la ambrosina como para la partenina, siendo el efecto mas fuerte para la ambrosina. Mientras que las monocotiledóneas presentan un efecto dual para la ambrosina, ya que a dosis bajas aumenta la captación de oxígeno y a dosis altas disminuye. El efecto es más pronunciado en *T. vulgare* en el intervalo de 0-35 μM y mucho menor en *L. multiflorum* en el intervalo de 0-20 μM , a concentraciones superiores a 35 μM la respiración de todas la semillas es inhibida. La respiración en cambio es inhibida en grado menor por la partenina.

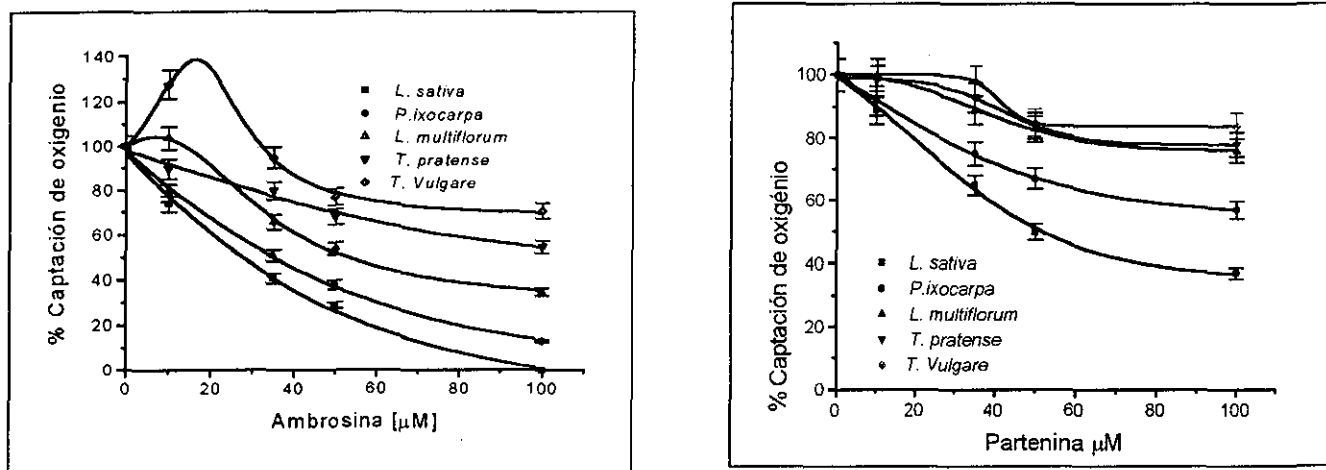


Fig. 34. Captación de O₂ por la respiración celular de las semillas, a las 72 horas para la ambrosina y la partenina.

Estos resultados sugieren que la ambrosina y la partenina pueden estar actuando como inhibidores de la respiración mitocondrial.

L. sativa y *P. ixocarpa*, fueron las semillas más afectadas en la respiración, tanto por la ambrosina, como por la partenina. Siendo las menos afectadas *L. multiflorum* y *T. vulgare* que como ya se había observado fueron las semillas que mostraron la mayor resistencia. En conclusión los resultados indican que la ambrosina y la partenina (pseudoguayanólidas) son más potentes y selectivas hacia la dicotiledóneas que hacia la monocotiledóneas.

6.3 4 Funcionalidad y actividad

Los resultados de este trabajo mostraron diferentes efectos: inhibitorio, estimulador y efectos dual, dependiendo de la concentración, indicando que los mecanismos de acción podrían ser diferentes, tanto para la germinación, como para el crecimiento.⁷⁹ La ambrosina y la partenina fueron las lactonas con más fuerte actividad inhibitoria, siendo la ambrosina más activa que la partenina. Estas lactonas contienen un metileno exocíclico conjugado y confirma los hallazgos obtenidos por el grupo de Marles y colaboradores,³¹ el cual postuló que la actividad citotóxica mostrada por las lactonas se debe a la presencia del metileno exocíclico el cual sufre adiciones tipo Michael.⁸⁰

La isopartenina y la isodamsina contienen un doble enlace endocíclico (C₇-C₁₁) su actividad es moderada en la germinación, en cambio presentan un efecto estimulador significativo en la elongación de tallo y raíz. La actividad estimulante superior de la isopartenina con respecto a la isodamsina se puede explicar por la presencia de un grupo cetona α,β no saturado en la primera y ausente en la última. Estos resultados indican que las lactonas sesquiterpénicas presentan otros mecanismos de acción, además de la adición de un nucleófilo biológico al metileno exocíclico, por lo cual es necesario llevar a cabo más estudios para conocer estos mecanismos.

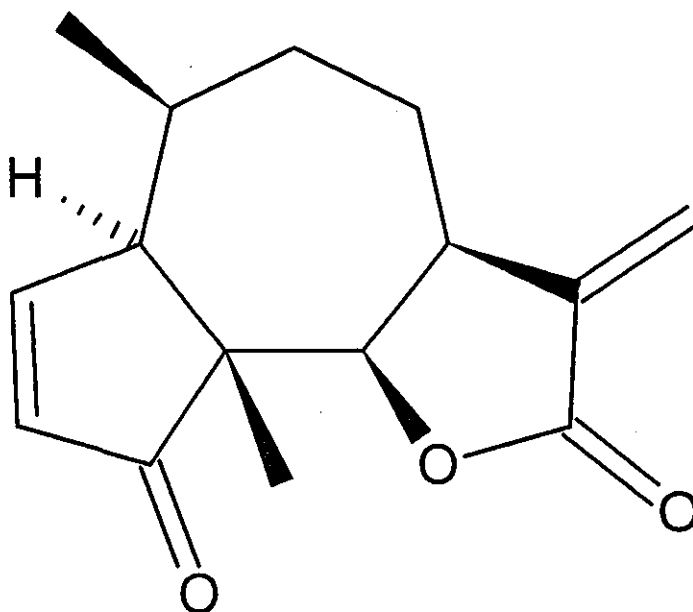
Considerando que la ambrosina y la partenina son 10 veces más activas que los demás compuestos ensayados, sugiere que la cetona α,β no saturada y el metileno exocíclico conjugado con la lactona, juegan un papel muy importante en la actividad de estos compuestos, y que la isomerización del metileno exocíclico a endocíclico cambia la actividad, puesto que la isopartenina y la isodamsina presentaron efectos estimulantes, lo cual no se observó en la partenina.

La ambrosina y la partenina tienen estructuras muy similares, pero sus actividades son diferentes puesto que la ambrosina es más activa que la partenina. La actividad mayor de la ambrosina puede deberse a dos factores; a) la mayor lipofilia de la ambrosina con respecto a la partenina (grupo hidróxilo terciario) y b) el impedimento estérico del hidróxilo terciario de la partenina para que pueda llevarse a cabo una adición tipo Michael en la cetona α,β no saturada.

La histerina así como los compuestos dihidroxilados, más polares y por lo tanto menos lipofílicos, presentaron solamente una actividad moderada. La presencia del metilo en C₅ también juega un papel muy importante en la actividad puesto que la partenina y la ambrosina (pseudoguayanólidas) son de 5 a 14 veces más activas que la zaluzanina C (guayanólida), así como a las demás guaianólidas⁶ tomadas como modelo de herbicidas naturales y más de 100 veces superior a las germacranólidas.⁷ La semilla más sensible a las lactonas activas probadas fue *L. sativa*, en cambio *T. Pratense* fue la más resistente.

La mayoría de los compuestos activos presentaron un efecto dual en el desarrollo de las monocotiledóneas *T. vulgare* (cultivo) y *L. multiflorum* (pasto), siendo más fuertemente activada la primera. La ambrosina fue la lactona que presentó el más fuerte efecto estimulador a una concentración 40 µM, estimulando el crecimiento del tallo de *T. vulgare* en un 566% y de la raíz en un 464%.

Conclusiones 7



7 CONCLUSIONES

El estudio biodirigido llevado a cabo en *P. hysterophorus* y *P. bipinnatifidum* mostró que la actividad alelopática que presentan estas malezas en el campo es atribuida a las lactonas sesquiterpénicas partenina (*P. hysterophorus*) y ambrosina (*P. bipinnatifidum*) que son exudadas en el campo a través de sus tricomas y raíces.

Los resultados del estudio estructura actividad mostraron que la ambrosina fue la lactona más activa, seguida por la partenina y que la histerina mostró un efecto estimulador moderado. La actividad alelopática de la ambrosina y la partenina fue también superior a la actividad mostrada por las guayanólidas y las germacranólidas publicadas por Macías.^{6,7}

Se sintetizaron 11 derivados de los cuales 7 son nuevos. La mayoría no mostró una actividad inhibitoria significativa en la germinación, en cambio mostraron un efecto estimulante en el crecimiento de tallo y raíz, lo que indicó que están actuando a nivel postemergente.

La histerina, el acetato de histerina y la 1 α -hidroxi-4 β -acetoxi-pseudoguaya-2,11(13)-dien-6 β ,12-olida (**8**) son lactonas con metileno exocíclico pero mostraron actividad inhibitoria moderada. Estos resultados indicaron que el metileno exocíclico conjugado con la lactona es un requisito importante pero no necesario para la actividad alelopática mostrada por estas lactonas. Una conclusión similar fue publicada por el grupo de Macías, el cual encontró que lactonas que no contienen metileno exocíclico del tipo de las guayanólidas⁷ y germacranólidas,⁶ mostraron actividad alelopática.

De las pseudoguayanólidas estudiadas la ambrosina es la más recomendada para ser usada como modelo para desarrollo de nuevos herbicidas, dado que presenta una gran selectividad a bajas concentraciones (0 a 250 μ M) estimulando el desarrollo de monocotiledóneas (*T. vulgare* y *L. multiflorum*) e inhibiendo a las mismas concentraciones todas las dicotiledóneas ensayadas.

8 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Putnam, A.R. & Duke W. P. Allelopathy in agroecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, (1978) **16**,431-51,.
- ² Putnam, A.R. & Thompson, A. C. The chemistry of allelopathy, biochemical interactions among plants. Washington. *American Chemical Society*, (1985). P 1-8
- ³ Almeida, F. S. A Alelopatia e as plantas, *Fundação Instituto Agrônômico do Paraná – Londrina* (1988).
- ⁴ Vyvyan J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals, *Tetrahedron* (2002) **58** 1631-1646.
- ⁵ Dayan F: E.; Romagni, J. G. And Duke S. O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *Juornal of Chemmical Ecology* (2000) **26**, 2079-2094
- ⁶ Macias F.A., Galindo J.C., Castellano D., and Velasco R. Sesquiterpene lactones with potential use as natural herbicide models (I): *trans,trans*-Germacranolides. *J. Agric. Food Chem.* (1999) **47**, 4407-4414.
- ⁷ Macias, A.F., Galindo J. C. G., Castellano D. And Velasco R. F.; Sesquiterpene Lactones with Potential Use as Natural Herbicide Models. 2. Guaianolides, *J. Agric. Food Chem.* (2000) **48**, 5288-5296.
- ⁸ Kanchan, S. D.; Jayachandra A. Allelopathic effects of *Parthenium hysterophorus* L. Part IV: Identification of inhibitors. *Plant and Soil.* (1980) **55**, 67-75
- ⁹ Pandey, D. K. Phytotoxicity of Sesquiterpene Lactone Parthenin on Aquatic Weeds. *J. Chem. Ecol.* (1996) **22**, 151-160.
- ¹⁰ Batish D. R., Singh H.P., Kohli R.K., Saxena D.B. and Kaur S. Allelopathic effects of parthenin against two weedy species, *Avena fatua* and *Bidens pilosa* *Environmental and Experimental Botany* (2002) **47**, 149–155
- ¹¹ Batish, D. R.; Kohli, R. K.; Saxena, D. B. and Singh, H. P. Growth regulatory response of parthenin and its derivatives *Plant Growth Regulation* (1997) **21**, 189-194
- ¹² Batish, D.R., Kohli, R.K., Singh, H.P., Saxena, D.B., Studies on herbicidal activity of parthenin, a constituent of *Parthenium hysterophorus* towards billgoat weed (*Ageratum conyzoides*). *Curr. Sci.* (1997) **73**, 369–371.

- ¹³ Khosla, S.N., Sobti, S.N., Parthenin promising root inhibitor from *Parthenium hysterophorus* L. *Pesticides* (1981) **15**, 8–11.
- ¹⁴ Weber, H. A.; Gloer, J. B. Interference competition among natural fungal competitors: an antifungal metabolite from the coprophilous fungus *Preussia fleischhakeri*. *J. Nat. Prod.* (1988) **51**, 879
- ¹⁵ Harrington, P. M.; Singh, B. K.; Szamosi I. T. and Birk J. H. Synthesis and herbicidal activity of cyperin. *J. Agric. Food Chem.* (1995), **43**, 804-898
- ¹⁶ Rollins R. C. The Guayule Rubber Plant and its Relatives. Contributions from the Gray Herbarium of *Harvard University Cambridge*. 1950, **CLXXII**, 3-72.
- ¹⁷ Matsubara C. S. Triterpenos Tetracíclicos de *Parthenium fruticosum*, Tesis provisional FQ-UNAM 1976
- ¹⁸ Magda Kuiken, *Parthenium* (*Parthenium hysterophorus*) is one of the worst weeds for agriculture, the environment and human health in Queensland, Australia. It is native to <http://www.cpitt.uq.edu.au/parthenium/parthenium.html> More Results From: www.cpitt.uq.edu.au
- ¹⁹ Oscar Sánchez S. Flora del Valle de México. *Instituto Politecnico Nacional*, México (1969) p 436-439
- ²⁰ Bose S.K.; Pentoxifylline in the treatment of *Parthenium* dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. (1996) **7**, 284-295
- ²¹ Robles M; Aregullin, West J. And Rodriguez E.; Recent Studies on the Zoopharmacognosy; Pharmacology And Neurotoxicology of Sesquiterpene Lactones (Review) *Planta med.* (1995) **61**, 199.
- ²² Haque K. E., Roy P. K. and Dutta C. P.; Phytochemical Investigation of *Parthenium hysterophorus* Lin. An Irritating but Promising Weed. *J. Indian Chem. Soc.*(1994) **92**
- ²³ Ramos A., Rivero R. Victoria M.C., Visozo, Piloto and A. Garcías, Assessment of Mutagenicity in *Parthenium hysterophorus* L.; *Journal of Ethnopharmacology* (2001) **25**, 77
- ²⁴ Herz, W., Watanabe, H., Miyazaki N. and Kishida Y. The structure of parthenin and ambrosin *J. Am. Chem. Soc.* (1962) **84**, 2601-2610.
- ²⁵ Garcidueñas, M. J., Domínguez X. A., Fernández J. and Alanís G. New Growth Inhibitors from *Parthenium hysterophorus*. *Rev. Latinoamer. Quím.* **3**, 52-53

- ²⁶ Kanchan. S. D. Growth Inhibitors from *Parthenium hysterophorus* Linn. *Curr. Sci.* (1975) **44**, 358-359
- ²⁷ Rzedowski J. Y Rzedowski G. C. Flora Fanerogámica del Valle de México Vol II dicotiledoneae. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Primera edición, Instituto de Ecología México, *I. P. N. México* D.F. **1985**
- ²⁸ Rodriguez E., Yoshioka H. and Mabry T. J.; The sesquiterpene Lactone Chemistry of The Genus *Parthenium* (Compositae). *Phytochemistry* (1971) **10**, 1145-1154
- ²⁹ Mears J. A. The flavonoids of *Parthenium* L. *J. Nat. Prod.* (1980) **43**, 708-716.
- ³⁰ Mears J. A., Flavonoid diversity and geographic endemism in *Parthenium*. *Biochemical Systematics & Ecology.* (1980) **8:4**, 361-370.
- ³¹ Marles R.J., Pazos-Sanou L., Compadre C.M., Pezzuto J.M., Blosyk E., and Arnason J.T. Sesquiterpene lactones revisited: recent developments in the assessment of biological activities and structure relationships. *Rec. Adv. Phytochem.* (1995) **29**, 333-356.
- ³² Céspedes C. L., Hoeneisen, M. Bittner, M., Becerra J. and Silva M.. Comparative study of ovatifolin antioxidant and growth inhibition activities. *J. Agric. food Chem.* (2001) **49**, 4243-4251
- ³³ Fischer N. H. Wiley R. A. and Perry L. D.; Sesquiterpene Lactones from melampodium (Compositae, Heliantheae) Structural and Biosynthetic Considerations, *Rev. Latinoamer. Quím* (1976) **7**, 87
- ³⁴ Rodriguez, E. Towers, G. H. N. and Mitchell J. C.; Biological Activities of Sesquiterpene Lactones, *Phytochemistry* (1976) **15**, 1573-1580
- ³⁵ The Biogenesis and Chemistry of Sesquiterpene Lactones. Fischer N.H.; Olivier E. J. And Fischer H. D. Department of Chemistry Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana **1979**.
- ³⁶ Sesquiterpene Lactones, Chemistry, NMR and Plant Distribution. Herosuke Yoshioka, Tom J. Mabry and Barbara N. Timmermann. University of Tokyo Press **1973**.
- ³⁷ Romo J. and Romo de Vivar A. The pseudoguaianolides, en *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Editor L.Zechmeister. Springer-Verlag (1967) Vol 25 , 91-130

- ³⁸Macias F.A., Galindo J.C.G, Molinillo J.M.G, and Castellano D. Dehydrozaluzeanin C: a potent plant growth regulator with potential use as a natural herbicide template. *Phytochemistry* (2000) **54**, 165-171.
- ³⁹ Galindo J. C. G., Hernández A., Dayan E. F., Tellez M. R. Macias F. A., Paul R. N. and Duke O. S.; Dehydrozaluzeanin C, a Natural Sesquiterpenolide, Cause Rapid Plasma Membrane Leakage. *Phytochemistry* (1999) **52**, 805-813
- ⁴⁰ Baruah N.C., Sarma J.C., Barua N.C., Sarma S., and Sharma R.P. Germination and growth inhibitory sesquiterpene lactones and flavone from *Tithonia diversifolia*. *Phytochemistry* (1994) **36**, 29-36.
- ⁴¹ Perez-Luque P. A., Galindo J.G., Macias F.A., and Jorin J. Sunflower sesquiterpene lactone models induce *Orobanche cumana* seed germination. *Phytochemistry* (2000) **53**, 45-50.
- ⁴²Fischer N.H., Weidenhamer J.D., and Bradow J.M. Inhibition and promotion of germination by several sesquiterpenes. *J. Chem. Ecol.* (1989) **15**, 1785-1793.
- ⁴³ Kalsi P.S., Vij V.K., Singh O.S., and Wadia M. S. Terpenoid lactones as plant growth regulators. *Phytochemistry* (1977) **16**, 784-786.
- ⁴⁴ Spring O., Albert K., and Grandmann W. Annuithrin A, a new biologically active germacranolide from *Helianthus annuus*. *Phytochemistry* (1981) **21**, 1883-1885.
- ⁴⁵ Chen P. K. and Leather G. R.; Plant growth regulatory activities of artemisinin and its related compounds. *J. Chem. Ecol.* (1990) **16**, 1867
- ⁴⁶ Dayan F. E., Hernandez A., Allen N. S., Moraes R. R., Vroman A. J., Avery M. A. and Duke S. O.; Comparative Phytotoxicity of artemisinin and several sesquiterpene analogues. *Phytochemistry* (1999) **50**, 607-614.
- ⁴⁷ Alarcon, M.; Wiegert, G.; Duk, S.; Garcias, M. A. Genotoxic effects of ovatifolin acetate, a sesquiterpene lactone isolated from *Podanthus ovatifolius* Lag. (Compositae). *Rev. Int. Contam. Ambiental.* (1992) **8**, 73
- ⁴⁸ Céspedes C.L., Ramirez-Apan T., Uchoa A., Calderon J., Hoeneisen M. and Silva M. Antiinflammatory activity of ovatifolin. *Rev. Latinoam. Quim.* (2000) **28**, 127-132.
- ⁴⁹ Recio, M. C.; Giner, R. M.; Uriburu, L.; Mañez, S.; Cerda, M.; De la fuente, J. R.; Rios, J. L. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. *Life Sci.* (2000) **66**, 2509-2518

- ⁵⁰ Kupchan S. M., Eakin M.A. and Thomas A. M. Tumor inhibitors. 69 Structure-Cytotoxicity Relationships among the sesquiterpene Lactones. *J. Med. Chem.* (1971) **14**, 1147-1152.
- ⁵¹ Giordano, O. S. Gerreiro E. Pestchanker, M.J. Guzman, J. Pastor, D. Guardia, the gastric cytotoxiprotective effect of several sesquiterpene lactones. *J. Nat. Prod.* (1990) **53**, 803-809
- ⁵² Maymó A.C., Cervera A., Garcera M.D., and Martinez R. Sesquiterpene-related compounds as endocrine disrupter in *Oncopeltus fasciatus*, and potential reduced glutathione synthesis modifiers. *The Science of the Total Environment* (1999) **233**, 163-166
- ⁵³ Passreiter C.M., and Isman M.B. Antifeedant bioactivity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* and their antagonism by γ -aminobutyric acid. *Biochem. Syst. Ecol.* (1997) **25**, 371-377.
- ⁵⁴ Francois, G.; Passreiter, C. M.; Vowerdengag, H. J.; Van Looveren, M. Antiplasmodial activities and cytotoxic effects of aqueous extracts and sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata*. *Planta Med.* (1995) **62**, 126
- ⁵⁵ Beekman, A. C.; Woerdengag, H.J.; Uden, W. V.; Pras, N.; Konings, A. W. T.; Wilkstroem, H. V.; Schimidt, T. J. Structure-Cytotoxicity relationships of some helenanolide type sesquiterpene lactones. *J. Nat. Prod.* (1997) **60**, 252-257
- ⁵⁶ Beekman, A. C., A. C. Barentsen, A. R. W. Woerdenbag, H. J. Uden, W. van. Pras, N. Konings, A. W. T. El-Feraly, F. S. Galal, A. M. Wikstrom, H. V Stereochemistry-dependent cytotoxicity of some artemisinin derivatives. *J. Nat. Prod.* (1997) **60**, 325-330.
- ⁵⁷ Dayan, F.; Rromagni, J.; Tellez, M.; Rimand, A.; Duke, S. O. Managing weeds with natural products. *Pestic. Outlook*, (1999) **110**, 1185-188
- ⁵⁸ Lotina-Hennsen, B., Bernal-Morales, E.; Romo de Vivar, A., Perez-Castorena, L., Castro, A., Aguilar-Martinez, M. Inhibition of oxygen evolution by zaluzanin C. *J. Chem. Ecol.* (1992) **18**, 1891-1901.
- ⁵⁹ Galindo J. C. G., Luque A. P., Jorrín J. and Macias F. A. SAR Studies of sesquiterpene Lactones as Orobanche Cumana Seed Germination Stimulants, *J. Agric. Food Chem.* (2002) **50**, 1911-1917.

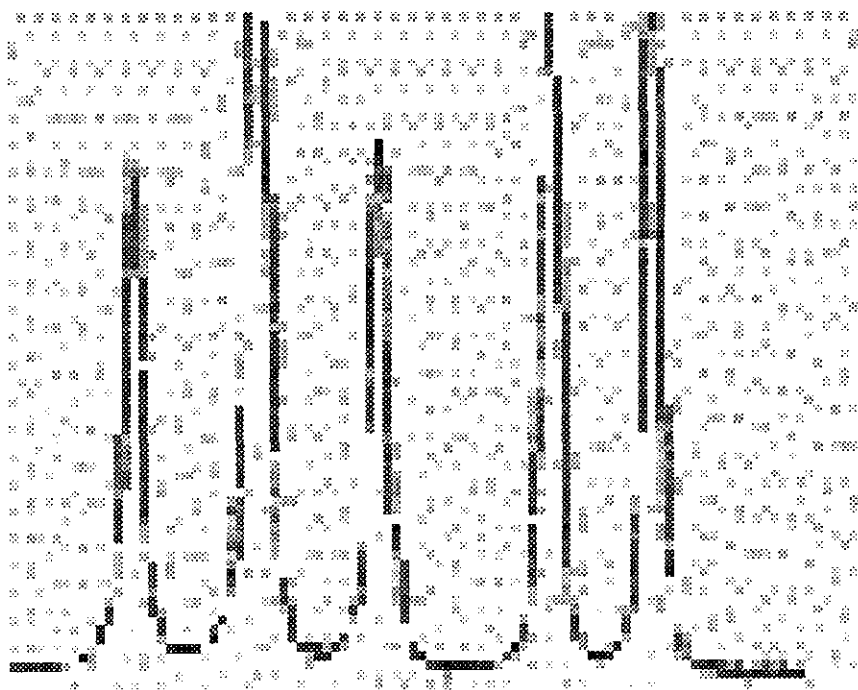
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- ⁶⁰ Céspedes C.L., Achnine L., Alarcón J., Becerra J., and Lotina-Hennsen B. Photosynthetic inhibitory activity of dihydro- β -agarofurans sesquiterpene from *Maytenus disticha* and *Maytenus boaria* (Celastraceae). *Z. Naturforsch.* (2000) 55631-637.
- ⁶¹ Céspedes C.L., Calderón J.S., Salazar J.R., King-Diaz B., and Lotina-Hennsen B. Allelopathic Activity of Photogedunins from *Cedrela ciliolata*. (Meliaceae). *Bol. Soc. Chil. Quim.* (1999) 44, 173-183.
- ⁶² Herz, W., Watanabe, H., Parthenin a new guaianolide. *J. Amer. Chem. Soc.* (1959) 81, 6088-6089
- ⁶³ Sukhada, D. K. Jayachandra Effect of *Parthenium hysterophorus* on nitrogren-fixing and Nitrifying bacteria. *Canadian Journal of Botany.* (1981) 59, 199-202.
- ⁶⁴ Romo de Vivar A., Bratoeff E. A. And T. Ríos, Structure of Hysterin, a new Sesquiterpene Lactone. *J. Org. Chem.* (1966) 31, 673-677.
- ⁶⁵ Das, B., Venkataiah, B., and Kashinatham. A., Chemical and Biochemical Modifications of Parthenin. *Tetrahedron* (1999) 55, 6585-6594)
- ⁶⁶ Chhabra, B. R., Kohli, J. C.; and Dhillon R. S. Three Ambrosanolides from *Parthenium hysterophorus*. *Phytochemistry* (1999) 52, 1331-1334.
- ⁶⁷ Sethi, V. K., Koul, S. K., Taneja, S. C. And Dhar K. L. Minor Sesquiterpenes of Flowers of *Parthenium hysterophorus*, *Phytochemistry* (1987) 26, 3359-3361.
- ⁶⁸ Balzar, F. and Towers, G. H. N. Structural Analysis of Sesquiterpene Lactones from *Hymenoclea Salsola*, *Phytochemistry* (1988) 27, 1421-1424
- ⁶⁹ Herz, W., Gage D., and Kumar N. Damsinic Acid and Ambrosanolides from Vegetative *Ambrosia hispida*, *Phytochemistry* (1981) 20,1601- 1604
- ⁷⁰ Fuente, J. R. de la. Novara, L. Alarcon, S. R. Diaz, O. J. Uriburu, M. L. Sosa, V. E Chemotaxonomy of *Parthenium: P. hysterophorus-P. glomeratum*. *Phytochemistry.* (1997) 45, 185-1188.
- ⁷¹ Mew, D. Balza, F. Towers, G. H. N. Levy, J. G Anti-tumour effects of the sesquiterpene lactone parthenin from *Parthenium hysterophorus*. *Planta Medica.* (1982) 45, 23-27
- ⁷² Pickman, A. K.; Towers, G. H. N. *Biochem. Syst. Ecol.*, (1983) 11, 321
- ⁷³ Sharma, G. L. Bhutani, K. K Plant based antiamebic drugs; Part II. Amoebicidal activity of parthenin isolated from *Parthenium hysterophorus*. *Planta Medica.* (1988) 54, 120-122.

- ⁷⁴ Hopper, M.; Kirby, G. C.; Kulkarni, M. M. ; Kulkarni S. N.; Nagasampagi, Bb. A.; Neill O. M.J.; Philipson, J. D.; Rojatkar, S. R. Warhurs, D. C. *Eur. J. Med. Chem.*, (1990) **25**, 717
- ⁷⁵ Patil, T. M. Hedge, B. A Isolation and purification of a sesquiterpene lactone from the leaves of *Parthenium hysterophorus* L. - its allelopathic and cytotoxic effects. *Current Science*. (1988) **57**, 1178-1181
- ⁷⁶ Rüesch, H. and Mabry, T. J. The Isolation and Structure of Tetraneurin-A, A New Pseudoguaianolide from *Parthenium alpinum* Var. *tetraneuris* (Compositae). *Tetrahedron* (1969) **25**, 805-811
- ⁷⁷ Venkataiah, B. Kashinatham, A. Das, B Investigations on *Parthenium hysterophorus* L. and chemical and biochemical modifications of allelochemical. *Allelopathy Journal*. (1999) **6**, 57-62.
- ⁷⁸ Salam N. A. A.; Mahmoud Z. F.; Ziesche J. And Jakupovic J. Sesquiterpene Lactona from *Ambrosia Maritima* (Damississa) *Phytochemistry* (1984) **23**, 2851-2853.
- ⁷⁹ Einhellig F. A. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In R. A. Putnam and Ch-Sh. Tang (eds.). *The Science of Allelopathy*. John Wiley & Sons, New York. 1986 pag. 171-188.
- ⁸⁰ Nichola J. L., McGown T., Nduka J., Hadfield A. J. And Pritchard G. R. Cytotoxic Michael-Type Amine of Adducts of α -Methylene Lactones Alantolactone and Isoalantolactone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2001) **11**, 429-431.

Apéndice

Apéndice



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

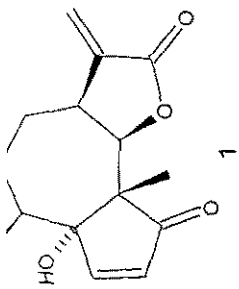
PARTENI
Dr. J. Calderon-Adjaci
30-X-01
AAH

Solvent: cdcl3
Temp. 27.0 C / 300.1 K
UNITY-300 "rnmag"

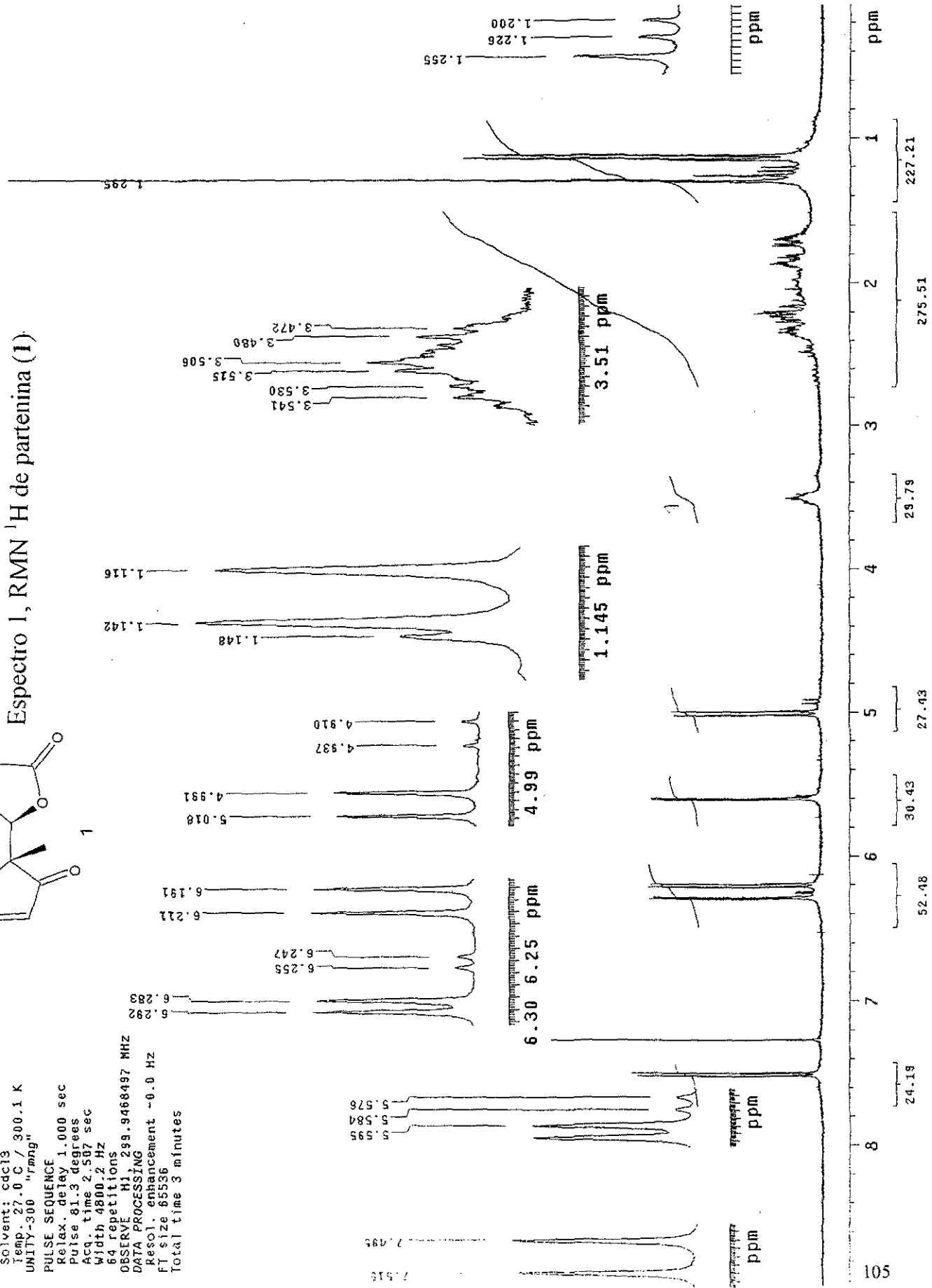
PULSE SEQUENCE

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 81.3 degrees
Acq. time 2.587 sec
Width 4800.2 Hz
64 repetitions

OBSERVE: H1, 299.9468497 MHz
DATA PROCESSING
Resol. enhancement -0.0 Hz
FT size 65536
Total time 3 minutes



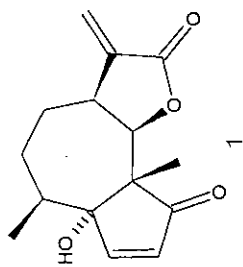
Espectro 1, RMN ¹H de partenina (1)



Espectro 2, RMN ¹H de partenina (ampliado)

7.26948

7.26948
7.26948
7.26948



6.27715

6.18510

6.16948

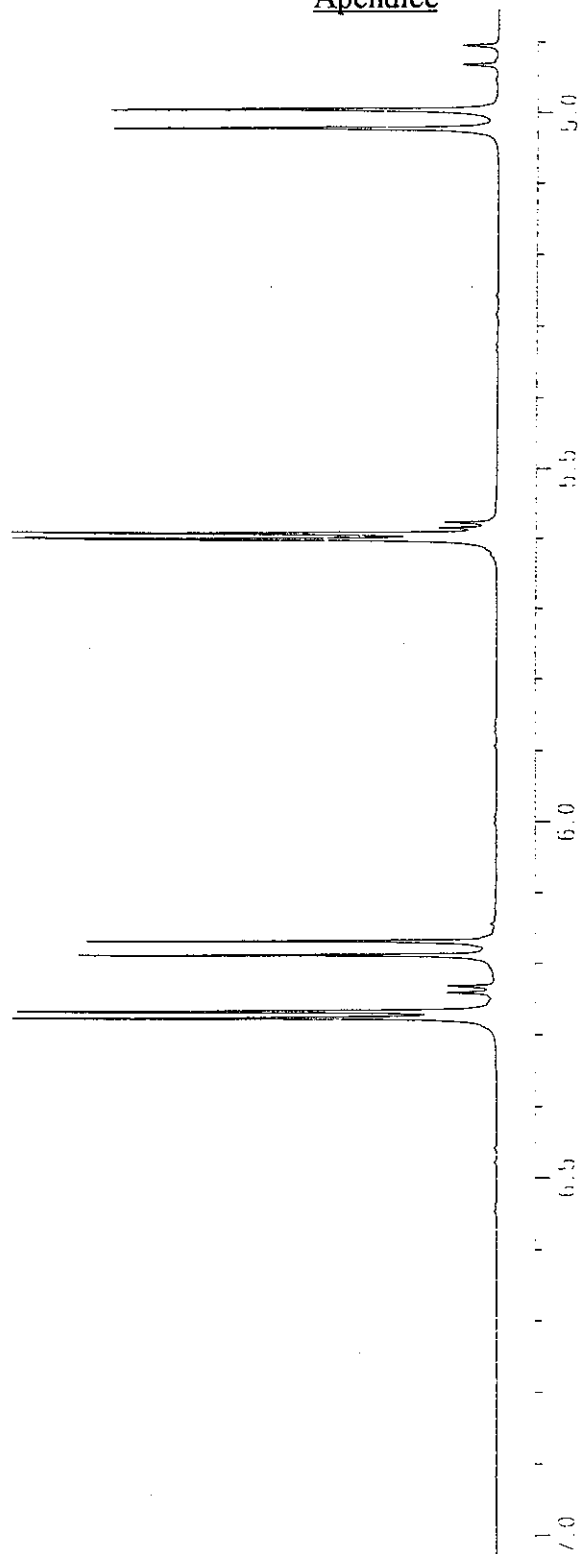
5.60344

5.59339

5.02764

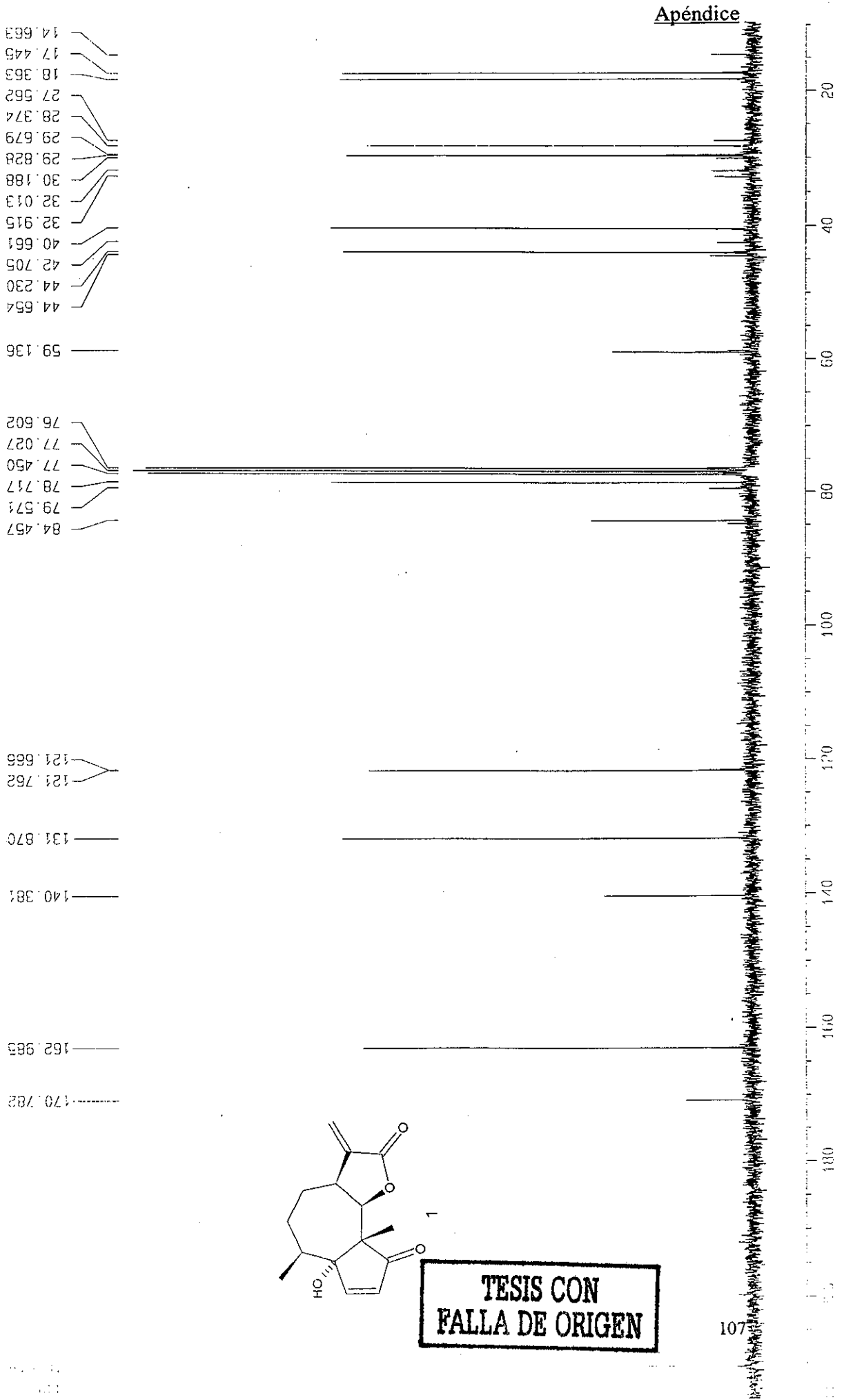
4.99816

Apéndice



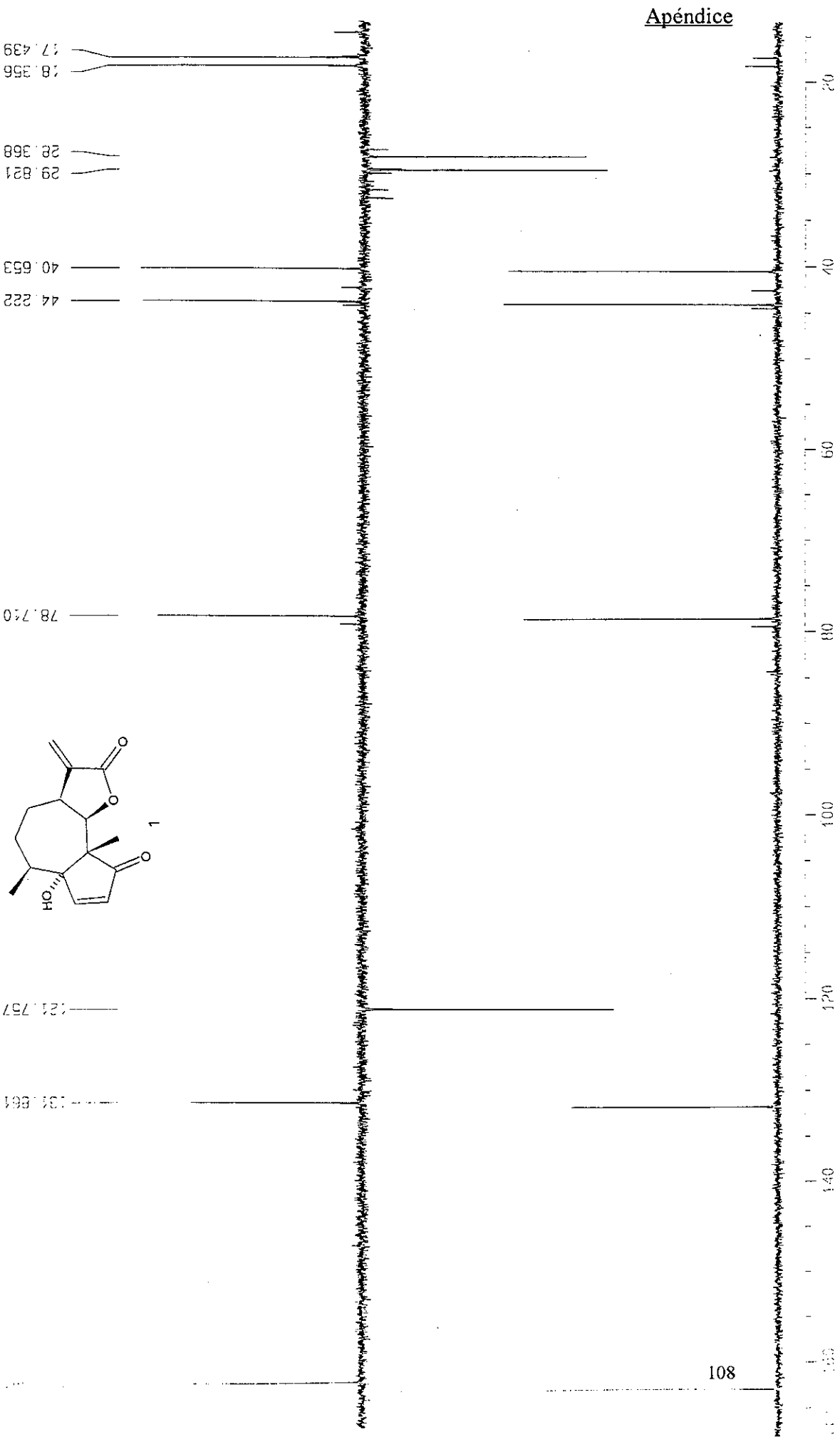
Espectro 3, ¹³C de partenina

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO QUÍMICO DE MÉXICO
LABORATORIO DE QUÍMICA ORGÁNICA
MÉXICO, D.F.

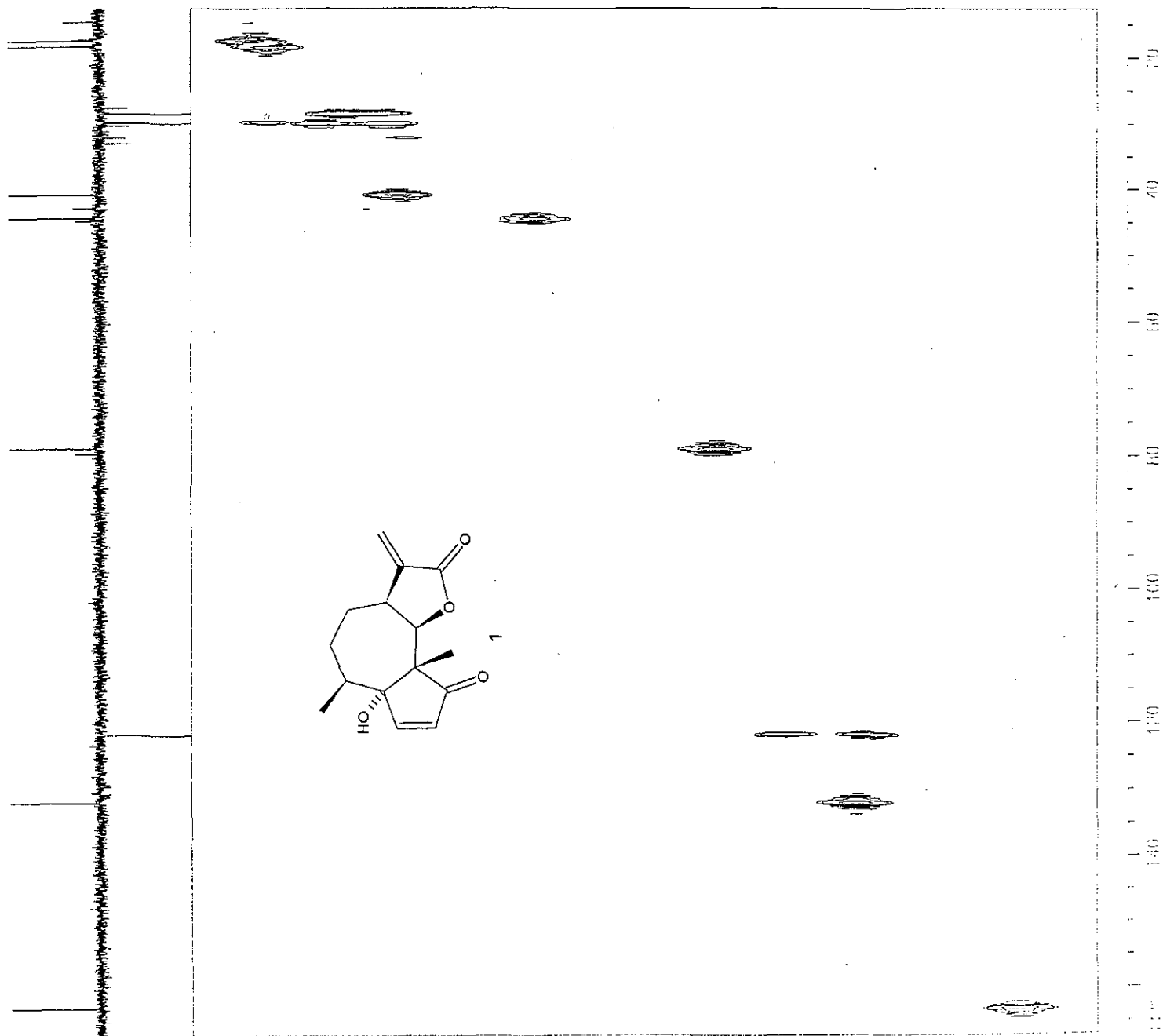


TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Espectro 4, DEPT de partenina

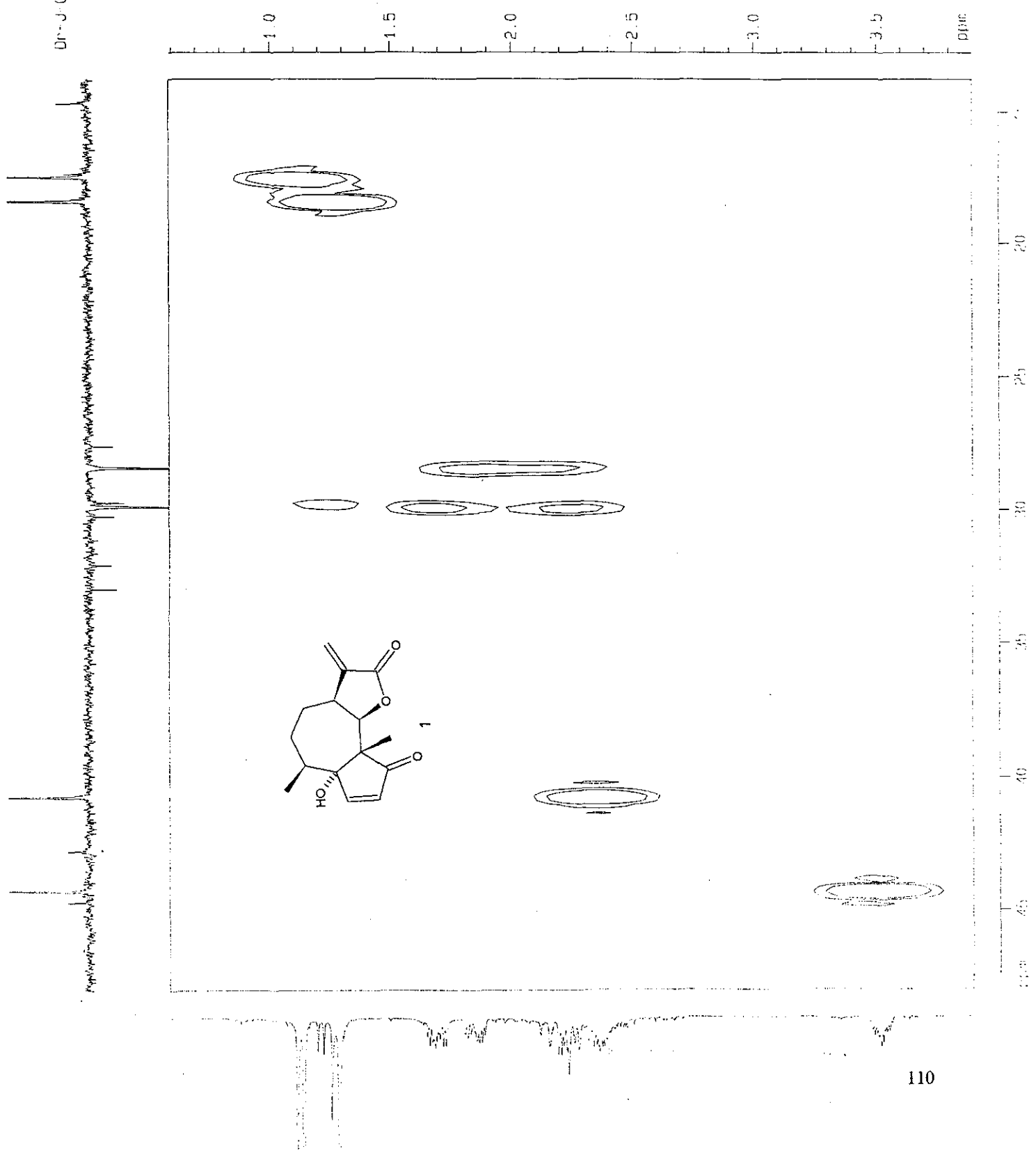


Dr. J-Calderon PARTN; hr
Experimento: III ICOT



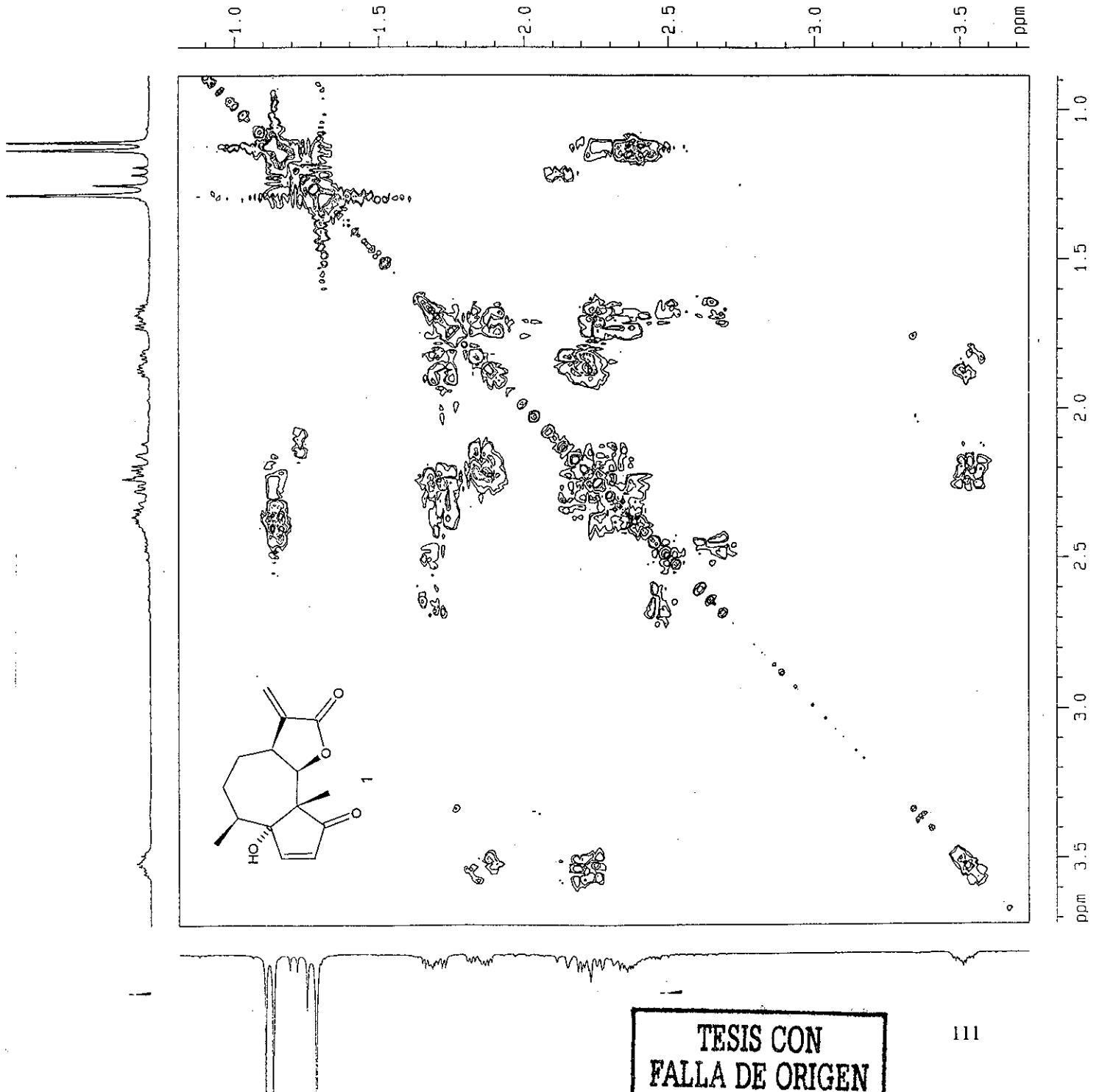
ЭСПЕЦИО, ПЕЛЛОК ДЕ ПАТЕННА (ампуло)

Dr. J. Calderon PAZINI hr
Experimento: HETCOR



Espectro 7, COSY de partenina

Dr--J-Calderon PARTN1 hf
Experimento: COSY



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

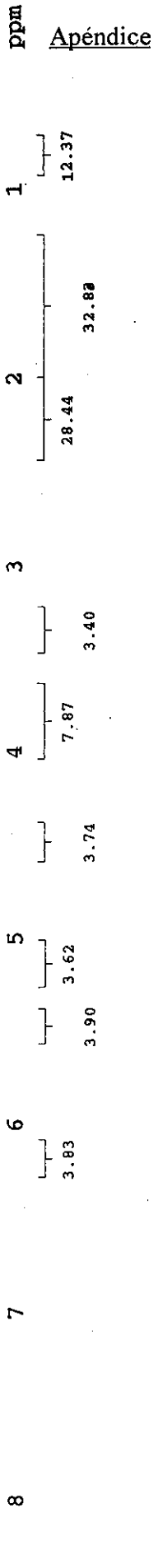
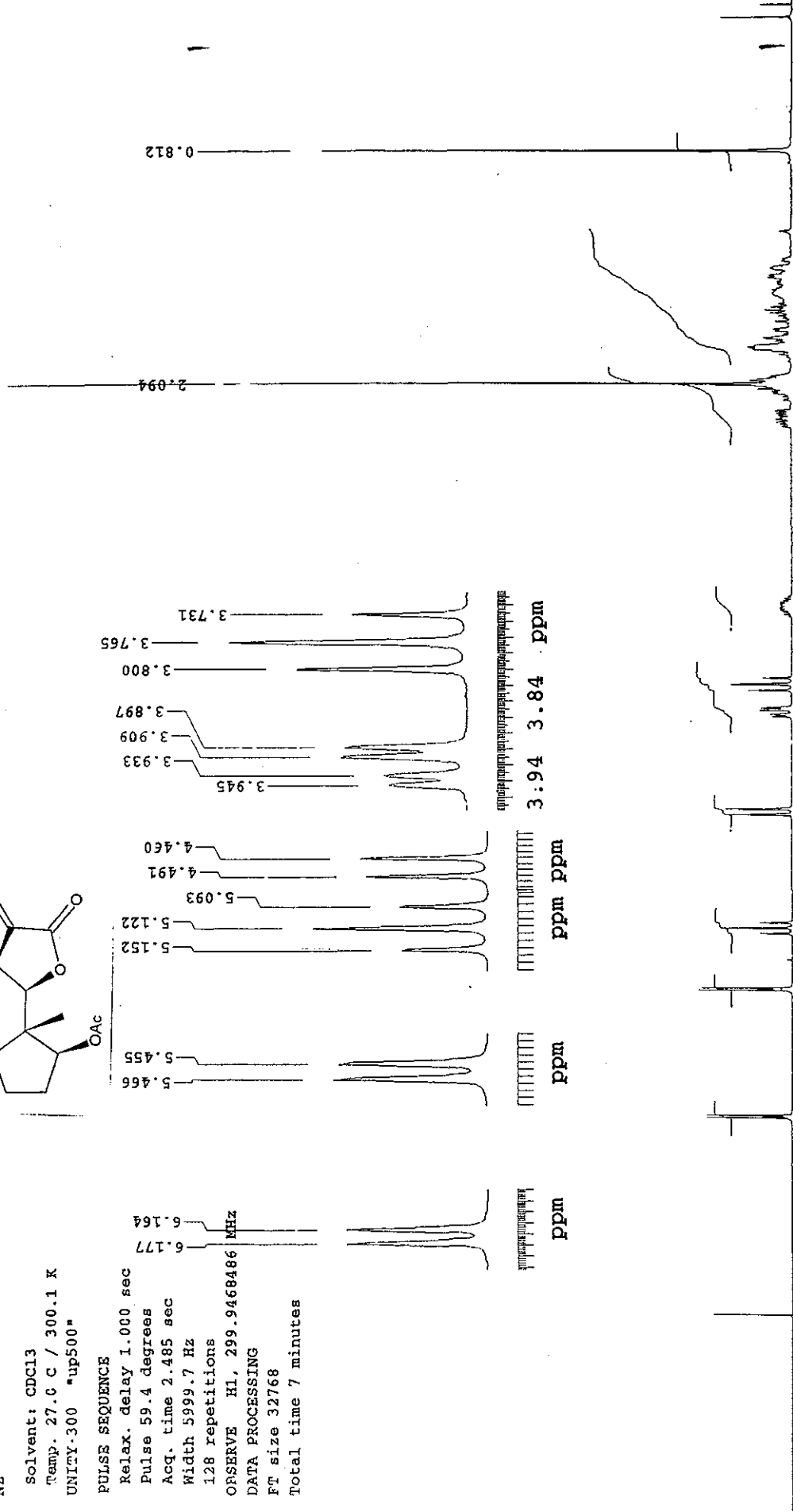
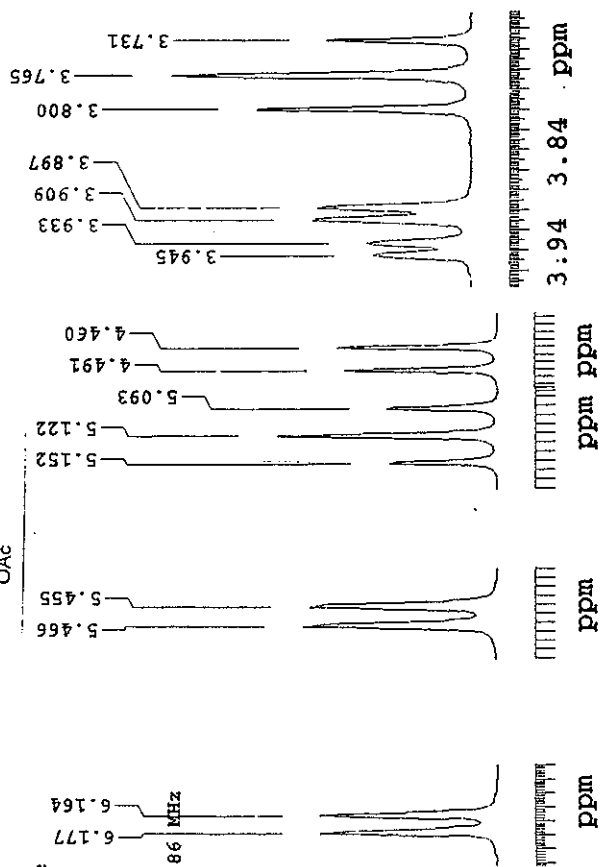
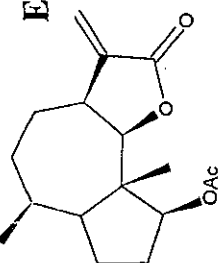
Espectro 8, RMN ¹H de histerina (3)

Dr. Jose Calderon
Hys
NZ

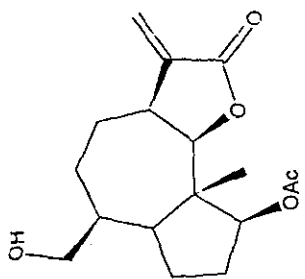
Solvent: CDCl₃
Temp. 27.0 C / 300.1 K
UNITY-300 *up500*

PULSE SEQUENCE

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 59.4 degrees
Acq. time 2.485 sec
Width 5999.7 Hz
128 repetitions
OBSERVE H1, 299.9468486 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 7 minutes



Espectro 9, ¹³C de histerina (3)

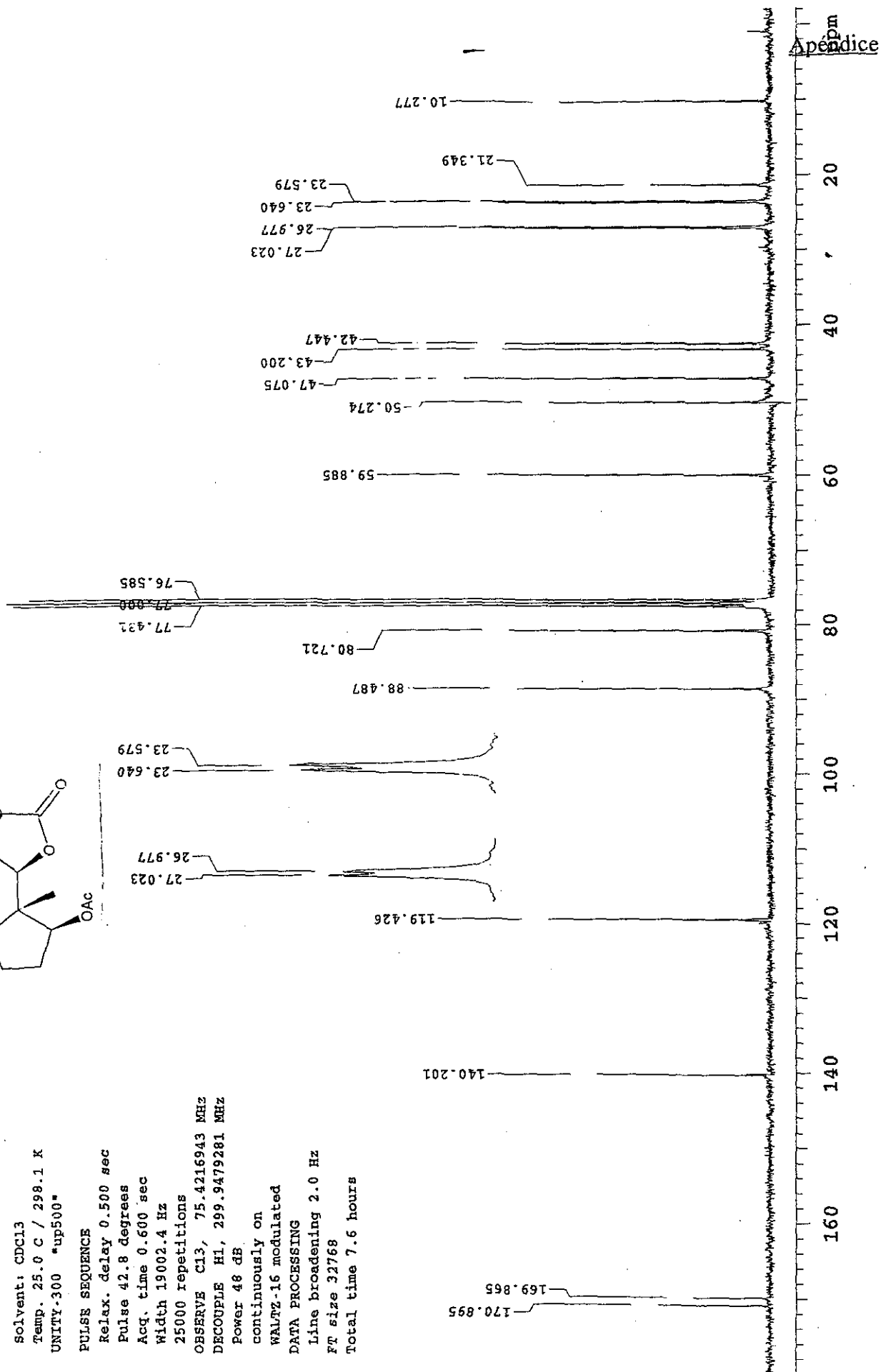


Dr. Jose Calderon
Hys
NZ

Solvent: CDCl₃
Temp. 25.0 C / 298.1 K
UNITY-300 *up500*

PULSE SEQUENCE

Relax. delay 0.500 sec
Pulse 42.8 degrees
Acq. time 0.600 sec
Width 19002.4 Hz
25000 repetitions
OBSERVE C13, 75.4216943 MHz
DECOUPLE H1, 299.9479281 MHz
Power 48 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 2.0 Hz
Ft size 32768
Total time 7.6 hours



Dr. Jose Calderon
Hys
NZ

Espectro 10, DEPT de histerina (3)

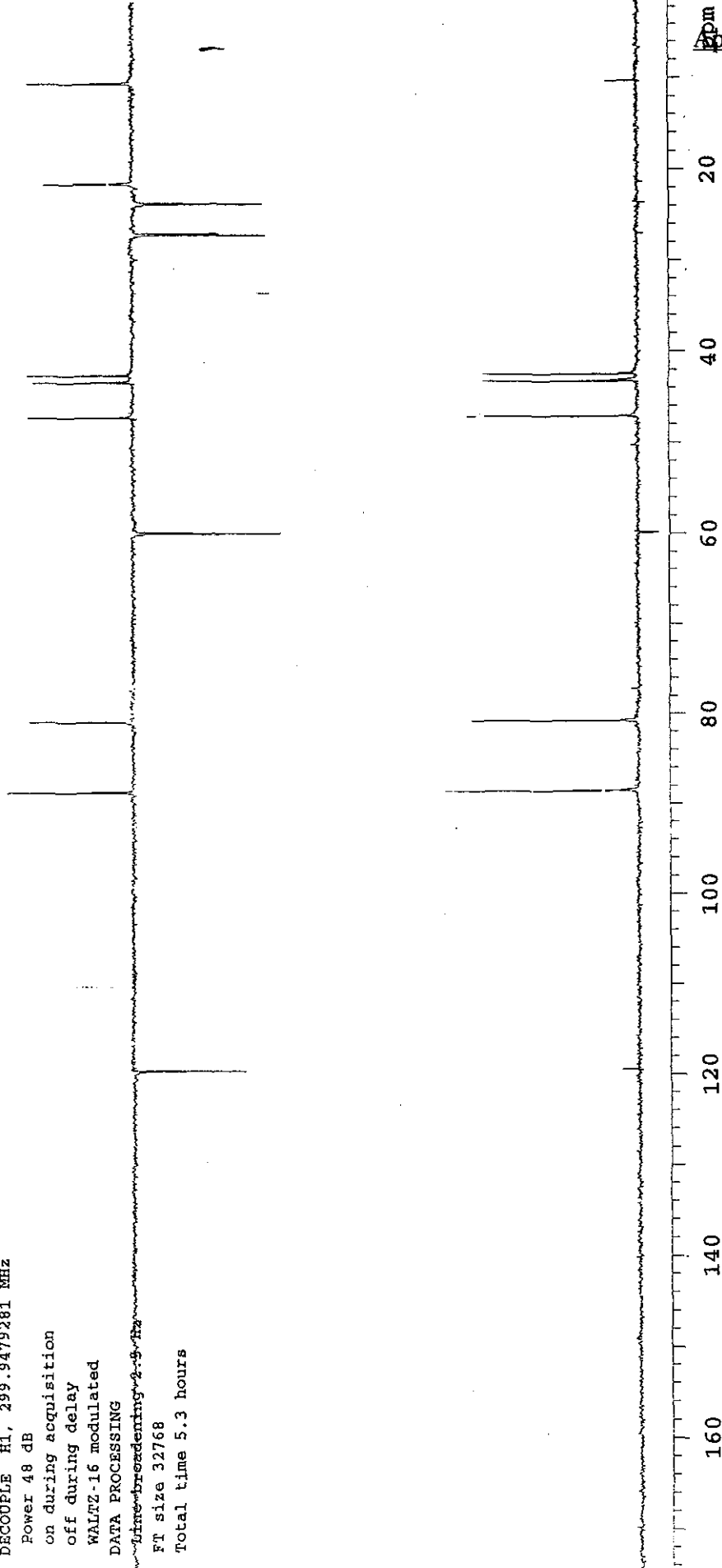
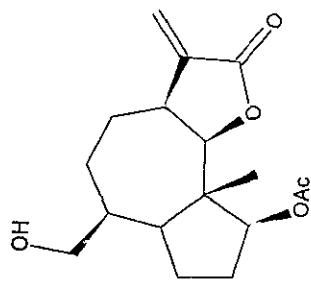
Solvent: CDCl3
Temp. 27.0 C / 300.1 K
UNITY-300 "up500"

PULSE SEQUENCE: dept
Relax. delay 2.000 sec
Pulse 129.8 degrees
Acq. time 0.399 sec
Width 19002.4 Hz
4000 repetitions

OBSERVE C13, 75.4216942 MHz
DECOUPLE H1, 299.9479281 MHz

Power 48 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING

Time-broadening 2.9 Hz
Ft size 32768
Total time 5.3 hours



ppm

20

40

60

80

100

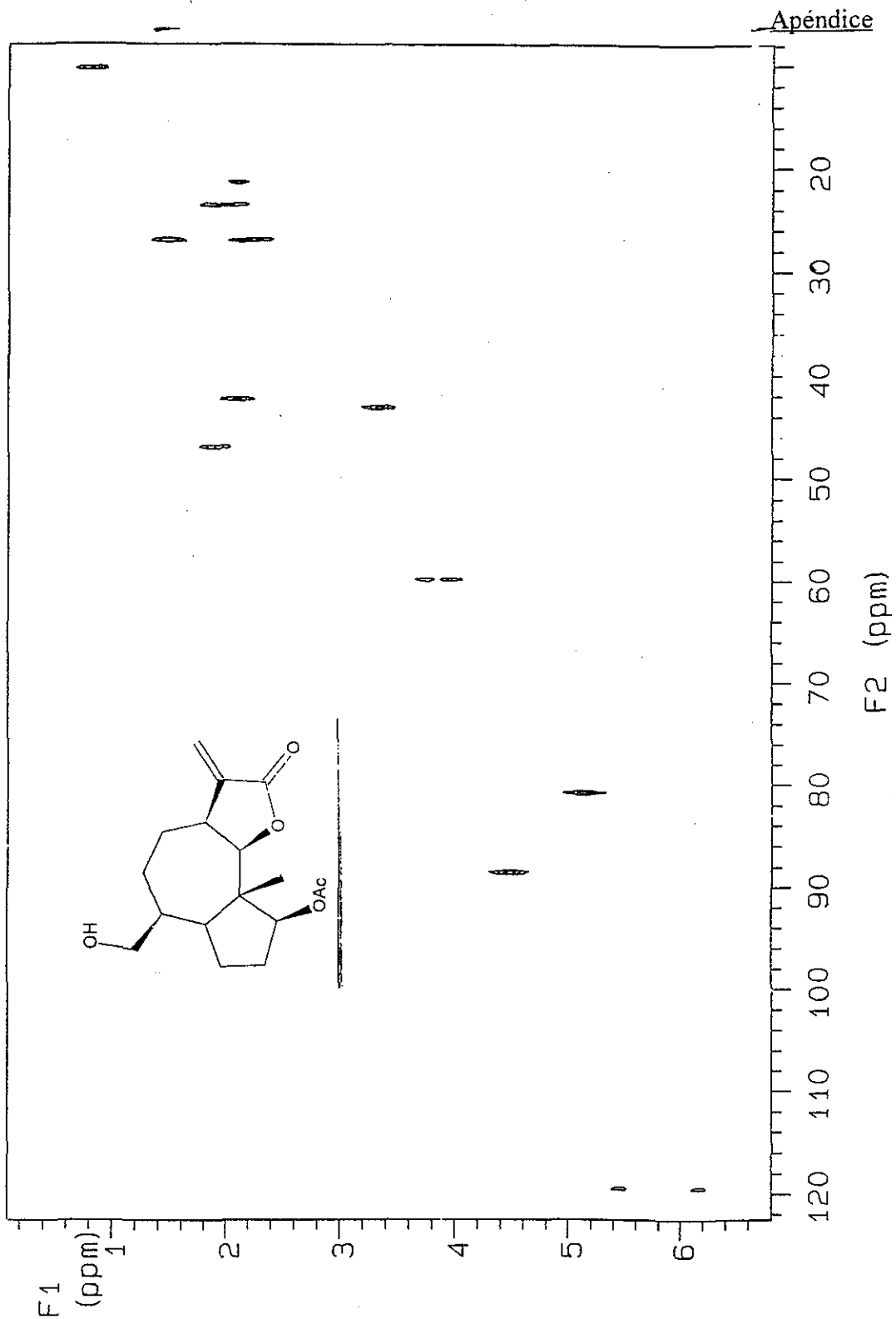
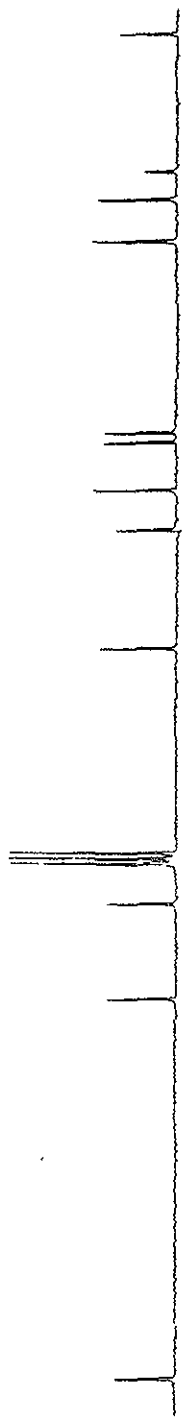
120

140

160

Espectro 11, HETCOR de histerina (3)

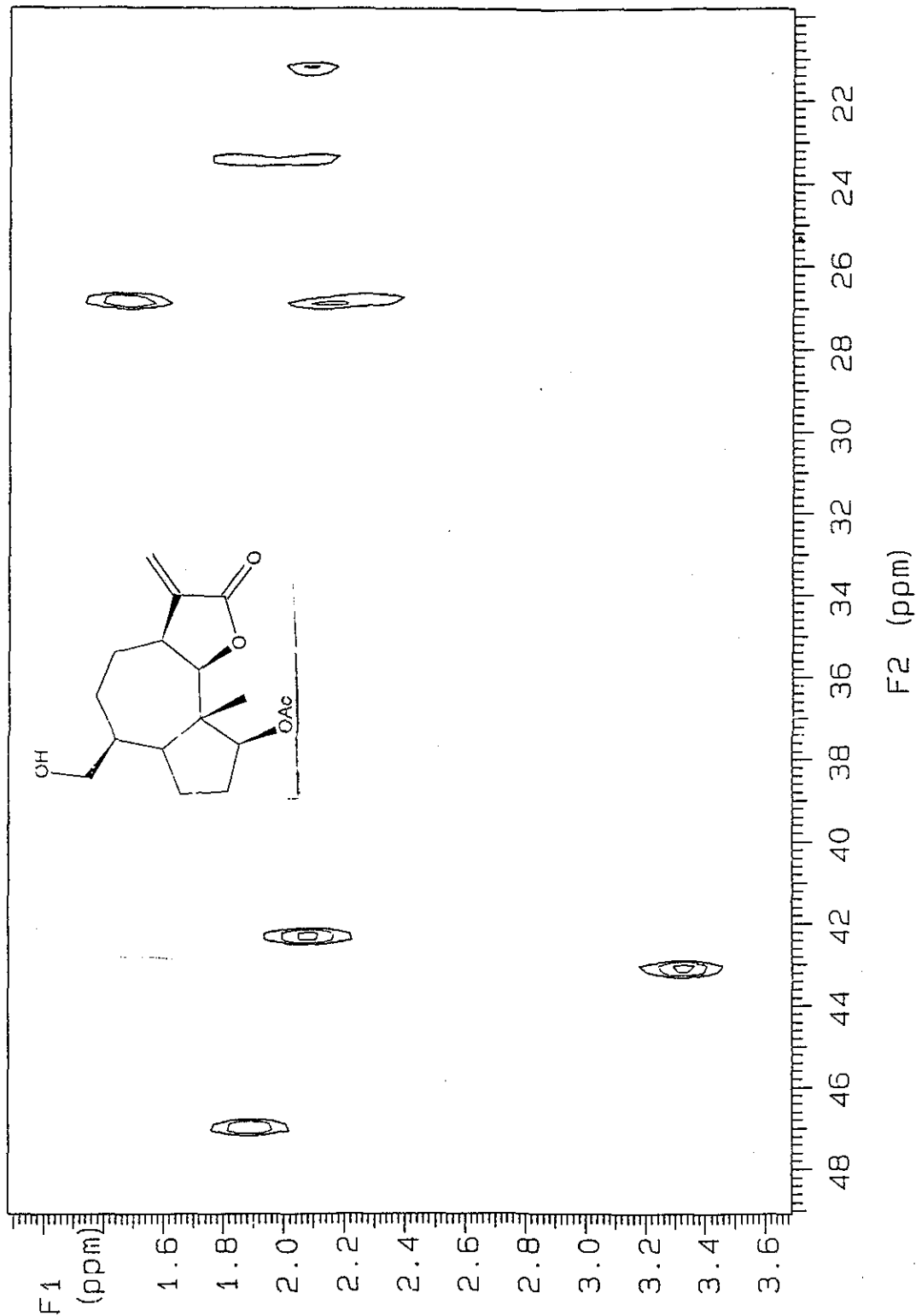
Dr. Jose Calderon
Hys
Hetcor
NZ



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

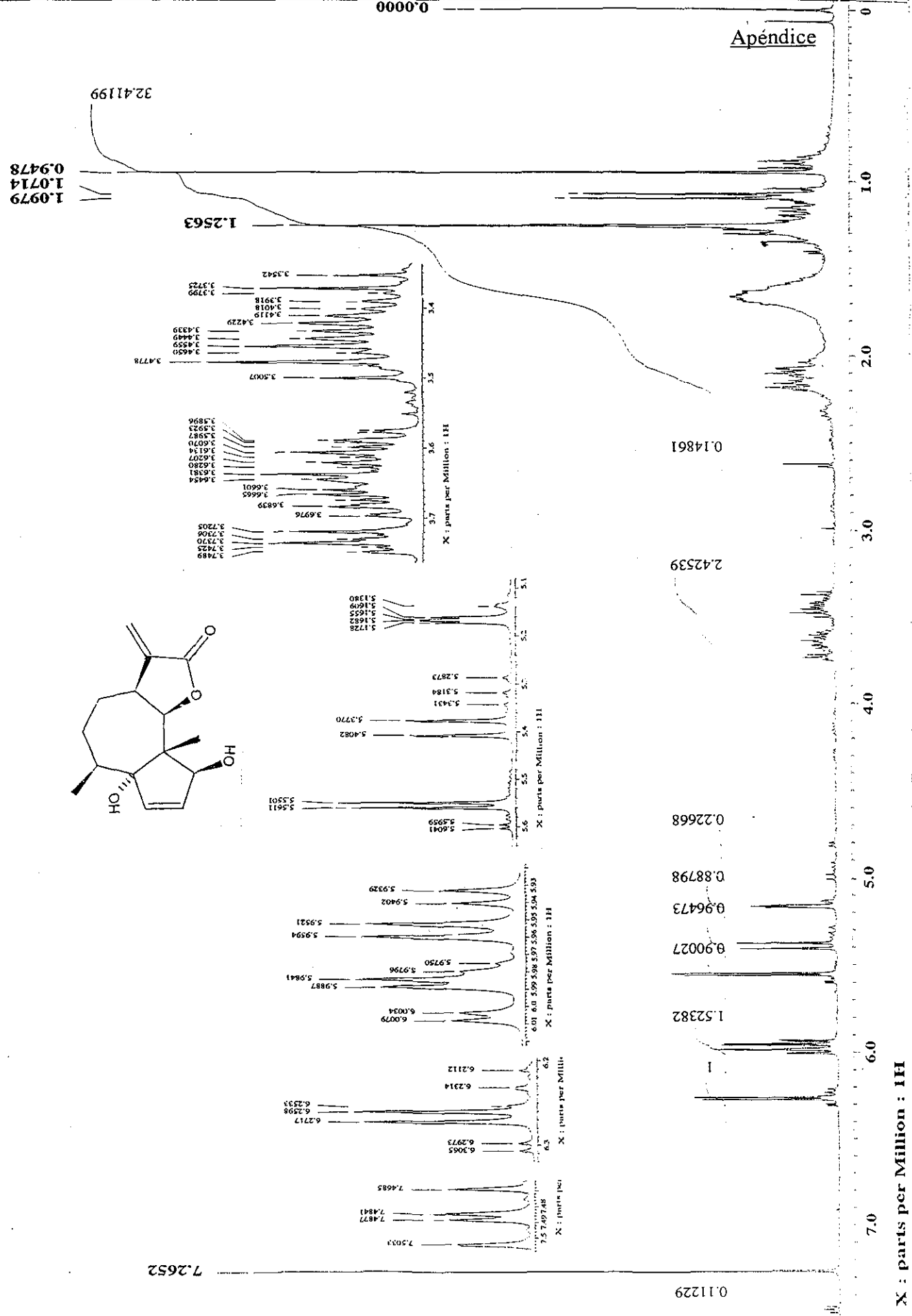
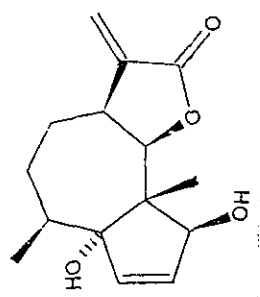
Espectro 12, HETCOR de histerina (3) (ampliado)

Dr. Jose Calderon
HYS
Hetcor
NZ



Lic. Jose Calderon
 A. Uchón
 PARTRED2 300 MHz
 CDCl₃
 JEOL ECLIPSE 300 JEOL
 EHS

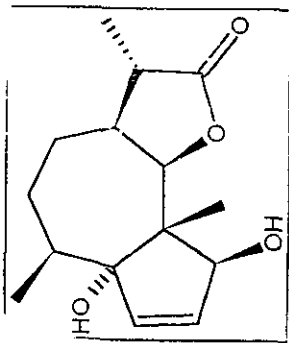
Espectro 13, RMN ¹H del Compuesto (6)



Apéndice

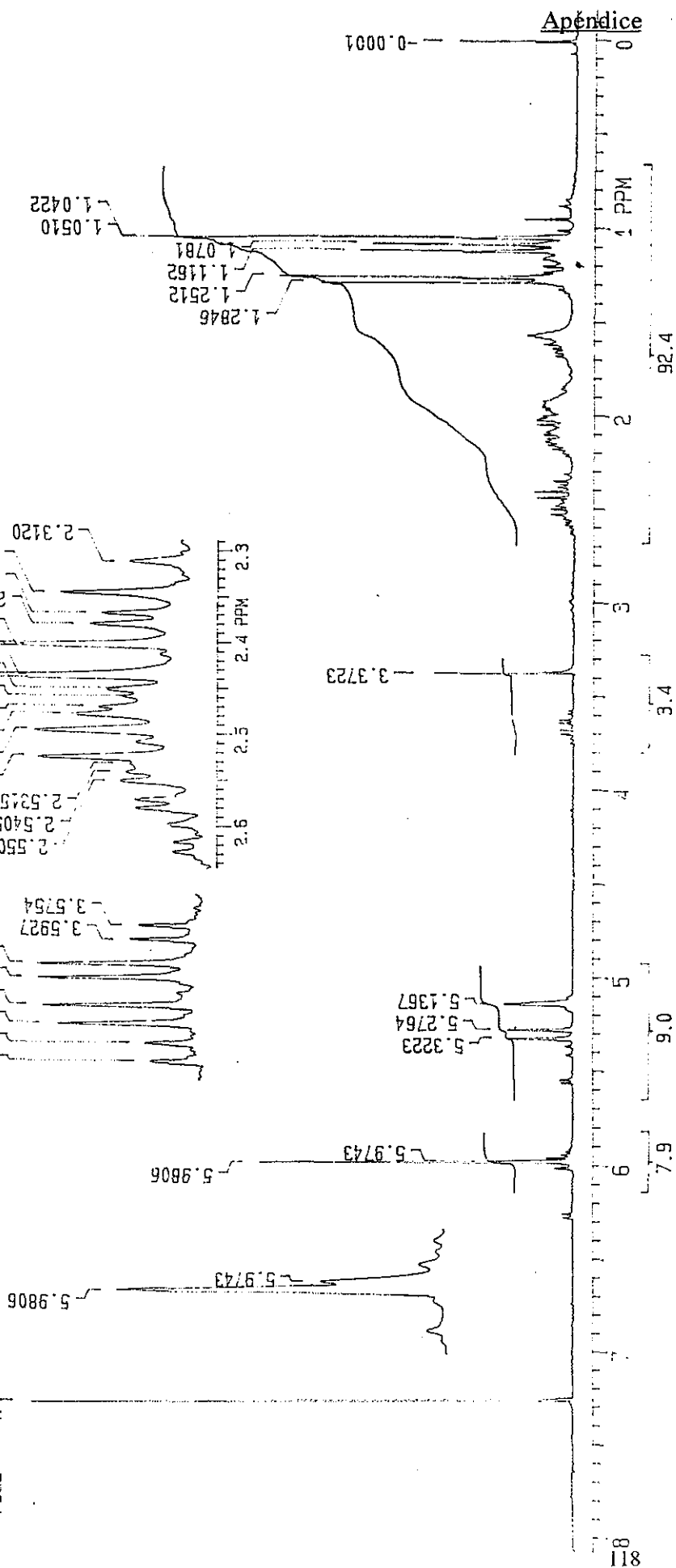
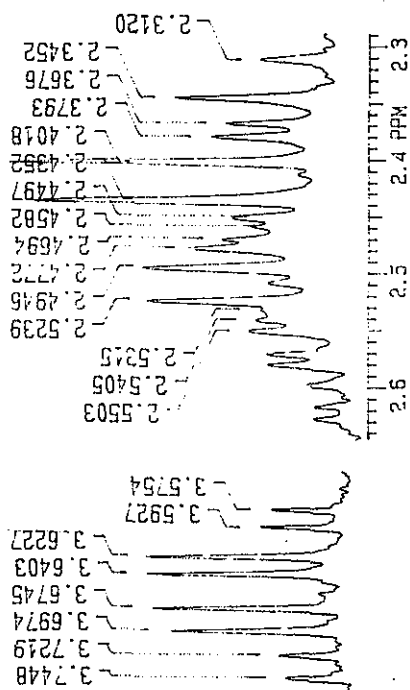
X : parts per Million : 1H

Espectro 14, RMN ¹H del Compuesto (7)



DR. J. CALDERON
A. UCHDA
PARSED 200 MHZ
EPS

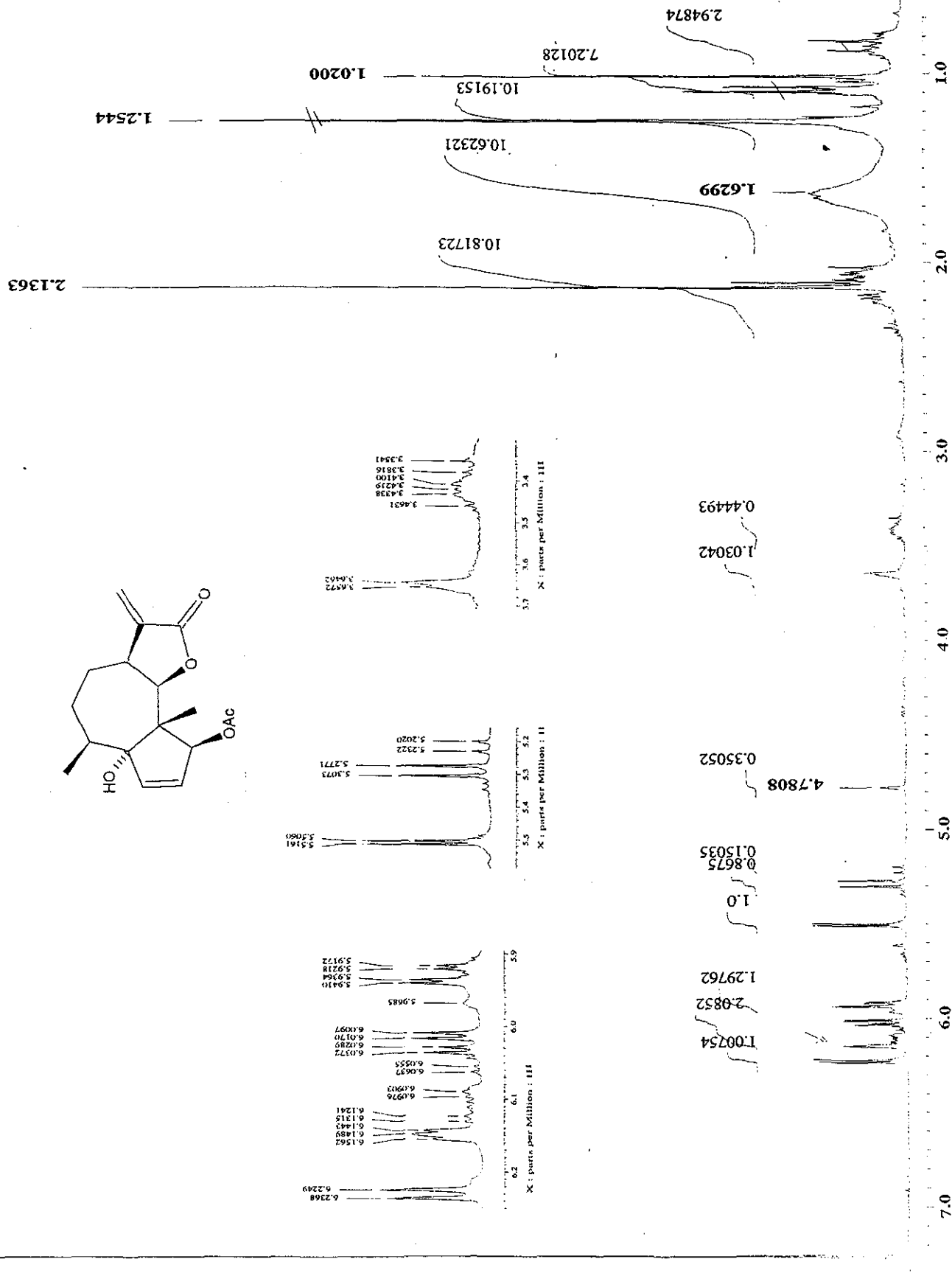
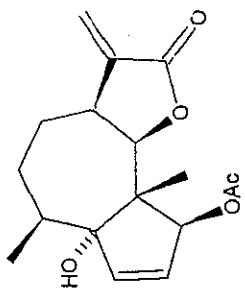
EXP3 PULS: SEQUENCE: S2PUL
DATE 01-08-00
SOLVENT: CDCL3
FILE H



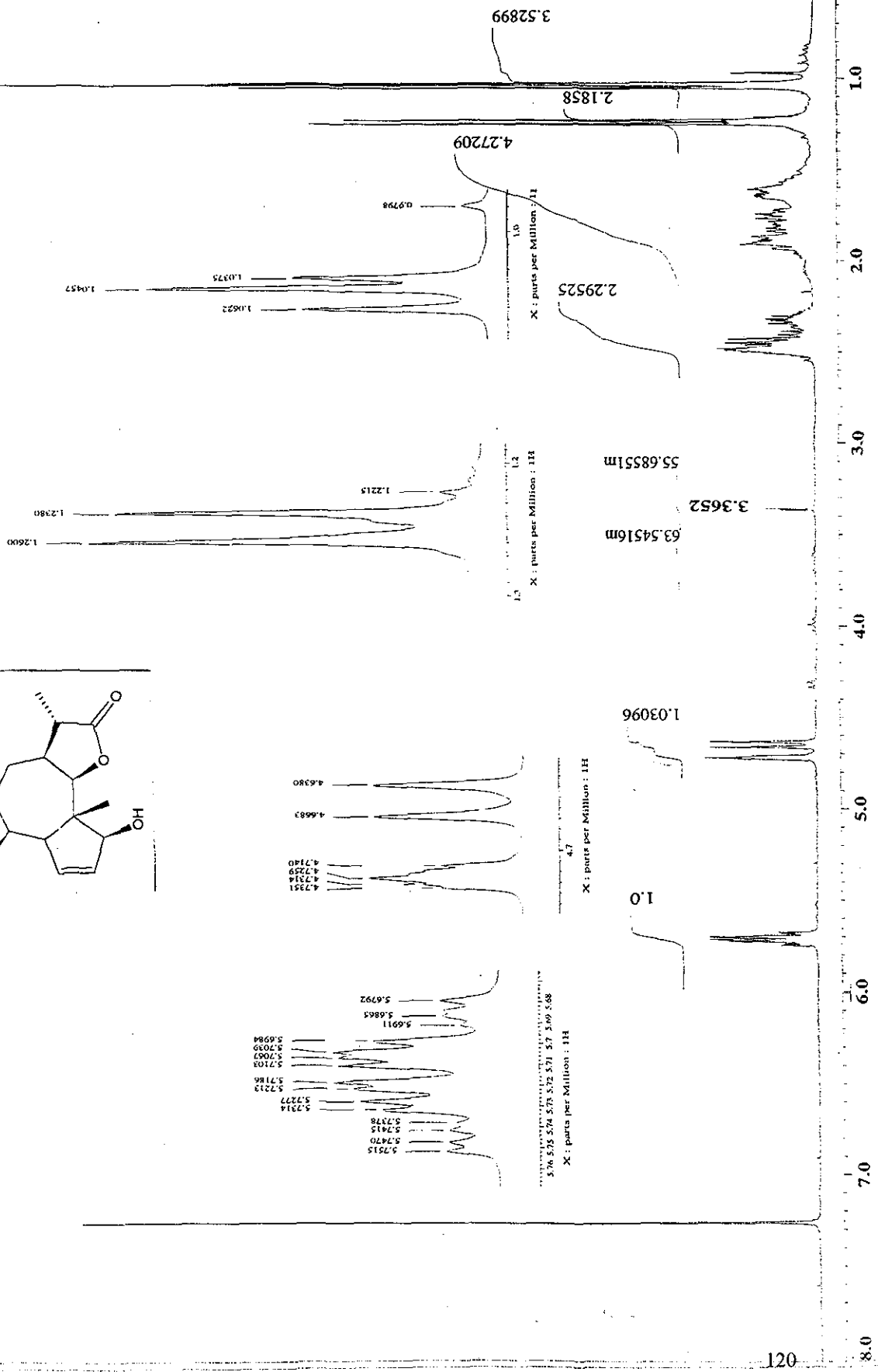
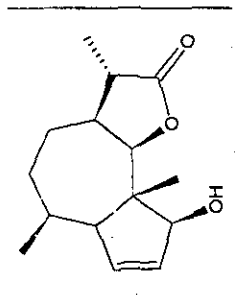
Apéndice

Espectro 15, RMN ¹H del Compuesto (8)

Dr. Jose Calderon
 PAR RED ACT 3B
 300 Mhz/ CDCl₃
 (eclipse 300 jeol)
 sdp



Espectro 16, RMN ¹H del Compuesto (10)



Dr. Jose Calderon

A.

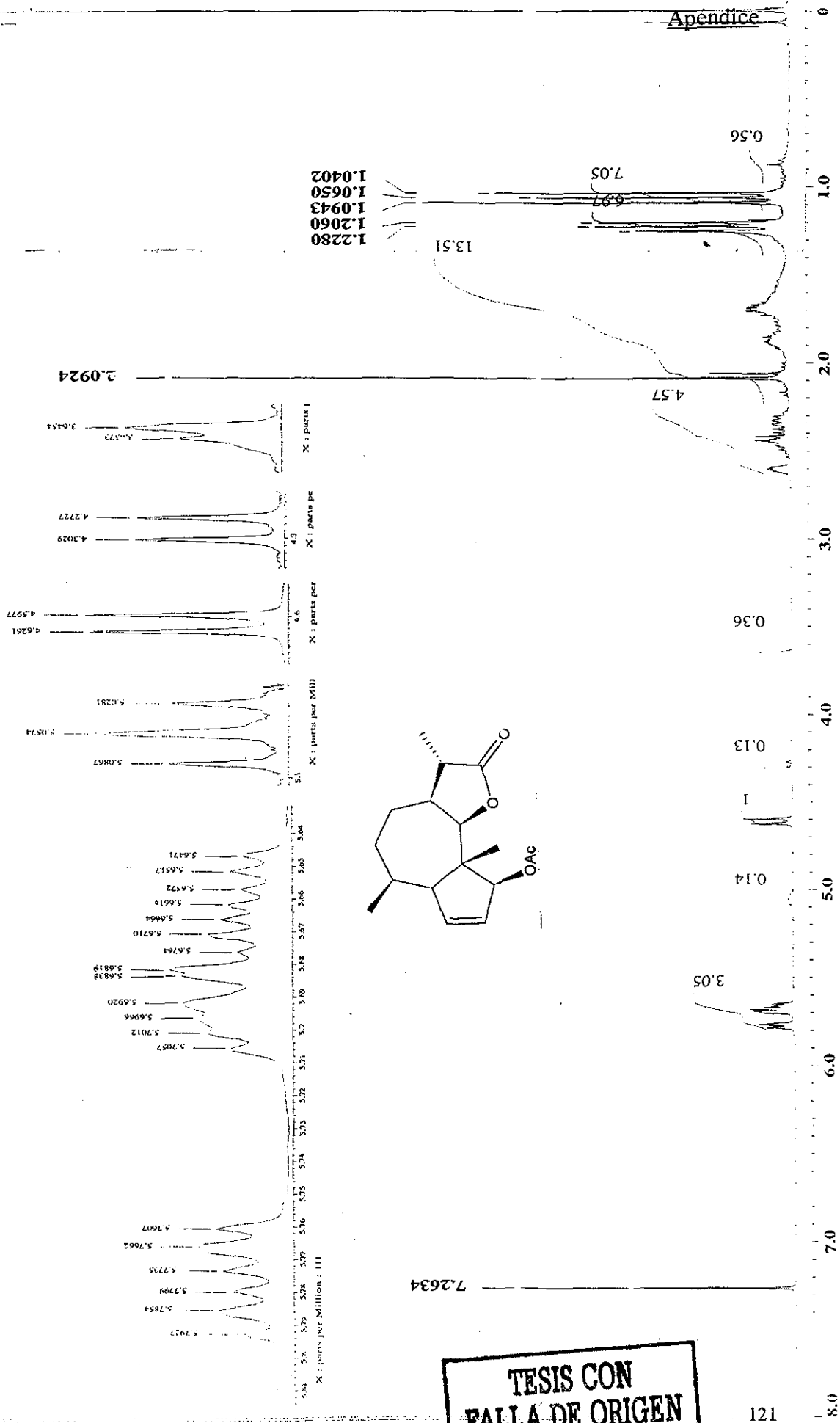
AMBRREDACT3B 300 MHz

CDCl₃

Eclipse 300 Jeol

HHS

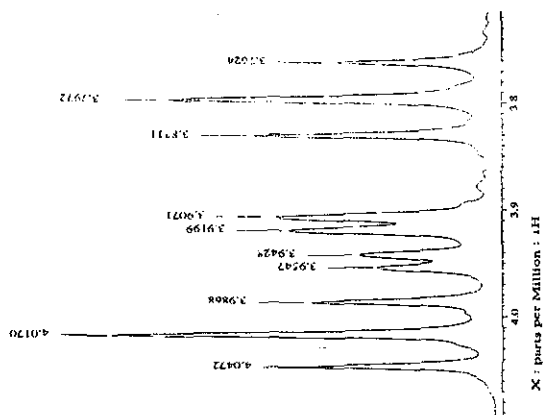
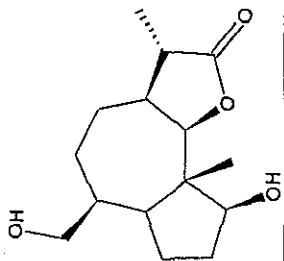
Espectro 17, RMN ¹H del Compuesto (11)



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Espectro 18, RMN ¹H del Compuesto (13)

Dr. J-Calderon HYSRED hr
 Solvent: CDCL₃
 300 MHz
 Proton



0.8697

21.87872
 1.2406
 1.2177

3.83803

3.39537
 3.7624
 3.7972
 3.8311
 3.9868
 4.0170
 4.0472
 4.3164
 4.3476

Apéndice

X : parts per Million : 1H

Espectro 19, RMN ¹H del Compuesto (14)

Hys Red Act Sup
 Dr. J. Calderón-A Wchoa
 19-VI-01
 AAH
 Solvent: cde13
 Temp: 27.0 C / 300.1 K
 UNITY-300 "rnmng"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 87.1 degrees
 Acq. time 2.500 sec
 Width 4890.2 Hz
 128 repetitions
 OBSERVE H1 299.9468508 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 7 minutes

