



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Actividad alelopática de lactonas sesquiterpénicas aisladas de
"Tanacetum parthenium".**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

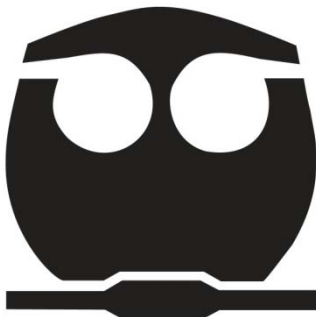
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

Luis Carlos Linares Jiménez.

MÉXICO, D.F.

AÑO 2011





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

- PRESIDENTE:** Profesor: José S. Calderón Pardo.
- VOCAL:** Profesor: Martha Yolanda González Quezada.
- SECRETARIO:** Profesor: Simon Hernández Ortega.
- 1er. SUPLENTE:** Profesor: Lino Joel Reyes Trejo.
- 2º SUPLENTE:** Profesor: María del Pilar Cañizares Macías.

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE QUÍMICA LAB. 7-C /
FACULTAD DE QUÍMICA EDIFICIO B LAB 307**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José S. Calderón Pardo.

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Luz del Carmen Castellanos Román.

SUSTENTANTE:

Luis Carlos Linares Jiménez.

Agradecimientos:**A mi familia:**

Por toda la ayuda y el apoyo que siempre me brindaron para poder alcanzar mi meta y poder realizarme como persona.

Thalía:

Sabes flaca que eres muy importante en mi vida y el terminar este ciclo en mi vida se debe en gran parte a ti, gracias por todo tu apoyo, paciencia y cariño.

Maestra Luz del Carmen:

Por ayudarme, aconsejarme, darme permiso de invadir su laboratorio, pero sobre todo por brindarme su amistad y apoyo.

Doctor Calderón:

Por permitirme trabajar con usted, apoyarme con sus conocimientos y darme todas las facilidades para poder concluir mi carrera profesional.

Amigos de la facultad:

A los 4 fantásticos (Kevin, Davo, Fer y Magnum), Ady, Ana, Rene, Miguel, los futboleros (Adolfo, Essau, Netza, Carlos, Cuau, Jessy, César) gracias por hacerme alegres tantos momentos, por convertirse en mi segunda familia, mis otros hermanos.

Amigos:

A los que han estado un poco más de tiempo saben quienes son pero no está de más nombrarlos Nacho, Paris, Rod, Tepo, Pana, Mariana, Andrea, Mónica, Mareli, Cecy, Areli y los que faltan gracias por seguir siendo mis amigos durante tanto tiempo.

Celia:

Por ayudarme haciendo más ameno mi trabajo, alimentarme y por las buenas charlas.

Facultad de Química:

Por formarme como persona y como profesionista dándome las herramientas necesarias para triunfar en la vida.

Pharmachem:

Por apoyarme financieramente en este proyecto.

Dedicatorias

Mamá:

Sabes que todo esto es gracias a tí, sin tu apoyo nada de esto estaría sucediendo así que también es un logro tuyo gracias por todo.

Tita:

Te lo había prometido y espero estés orgullosa, te sigo queriendo mucho igual que siempre.

Hermanos:

Carina y Joel son una gran motivación; los quiero mucho.

Papá:

Casi siempre molestabas, pero también muchas veces tenías razón e hiciste que cambiara el curso cuando fue necesario.

Índice.

	Pág.
Introducción.	6
Objetivo.	8
Justificación e hipótesis.	8
Antecedentes.	10
Parte Experimental.	17
Materiales y métodos.	18
Ensayo biológico.	20
Resultados.	21
Discusión de resultados.	53
Conclusiones.	56
Bibliografía	57
Anexos.	60

Introducción:

Desde los tiempos más remotos el hombre ha venido utilizando las plantas como un medio de supervivencia, aprovechando diversos vegetales con fines curativos mediante minuciosa observación y experimentación. Por lo tanto la química orgánica a través de los productos naturales de origen vegetal, busca nuevos compuestos que puedan tener propiedades biológicas importantes (1).

En la actualidad resulta de gran importancia investigar y encontrar las variantes, que permitan el desarrollo de una agricultura rentable y no contaminante del medio ambiente. Por otra parte, el uso de productos químicos en la agricultura aumenta notablemente los rendimientos y la rentabilidad de los cultivos, pero la utilización constante de éstos, puede alterar el medio biológico produciendo graves daños en los diversos ecosistemas; además el uso de productos químicos puede crear resistencia en los insectos hacia los insecticidas, sin por ello restar importancia a la destrucción de parásitos, predadores naturales y polinizadores, entre otros tantos integrantes del ecosistema, que han visto alterado su ciclo de vida a causa de estos productos.

Es por eso que el uso de prácticas sostenibles como: La reducción de productos químicos, rotaciones y asociaciones benéficas entre otras, son las mejores variantes para garantizar una buena producción, manteniendo a salvo el futuro de nuestro planeta. Las plantas en conjunto, producen más de 100 000 sustancias de bajo peso molecular conocidas también como metabolitos secundarios. Estos son, normalmente no esenciales para el proceso metabólico básico de la planta. Entre ellos se encuentran terpenos, lignanos, alcaloides, azúcares, esteroides, ácidos grasos, etc. (2). Un grupo estudiado son las lactonas sesquiterpénicas, las cuales han mostrado gran actividad alelopática (3).

El término alelopatía proviene de las palabras griegas allelon (mutuo) y pathos (perjuicio o desventaja); fue utilizado por primera vez por Molisch (1937) para referirse a los efectos perjudiciales o benéficos que son, ya sea directa o indirectamente el resultado de la acción de compuestos químicos que son liberados por una planta y ejercen su acción en otra (4). 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 herbicidas sintéticos (5).

Las plantas superiores sintetizan un gran número de compuestos fenólicos; terpénicos, así como, alcaloides, cumarinas y quinolonas que inhiben el desarrollo de las plantas; estos compuestos se liberan al medio ambiente por el follaje o por

residuos de las plantas productoras, actuando sobre especies vecinas; estos se conocen como “inhibidores alelopáticos”, presentes en diversas malezas muy competitivas y en algunas líneas de cultivos; por lo que el desarrollo de herbicidas de origen natural puede abrir oportunidades a la industria agroquímica mexicana, como los herbicidas comerciales basados en productos naturales: compuestos órganofosforados, tricetonas, aleloquímicos selectivos, benzoquinonas, cumarinas, flavonoides, terpenoides y strigolactonas.

Los productos sintéticos destinados a controlar plagas y enfermedades en los vegetales, han tenido un efecto muy marcado en el incremento de la producción agrícola. Sin embargo el uso continuo e indiscriminado de estas sustancias, no sólo ha causado enfermedades (6) y muertes por envenenamiento a corto y largo plazo, sino también ha afectado al medio ambiente, acumulándose en los distintos eslabones de la cadena alimenticia, en el agua y el suelo (7). Sin lugar a dudas los insecticidas naturales a partir de extractos vegetales, constituyen una muy interesante alternativa de control de insectos, además de que sólo se han evaluado muy pocas plantas en relación a la fuente natural que ofrece el planeta, por lo que las perspectivas futuras en cuanto a investigación, son aún mayores.

En el presente trabajo se describe el estudio fitoquímico de las hojas, las flores y la actividad alelopática que presentan los metabolitos secundarios aislados de la planta *Tanacetum parthenium*.

La planta *Tanacetum parthenium* invade los terrenos baldíos en donde crece. Debido a este efecto de alelopatía observado en la planta se aislaron dos lactonas sesquiterpénicas (santamarina y reynosina), que por trabajos reportados anteriormente, se sabe que la planta las contiene en una alta concentración, posteriormente se le realizaron pruebas biológicas para determinar si eran éstas moléculas las que presentaban la actividad alelopática.

Se realizaron dos ensayos uno con la planta colectada y almacenada desde el 2006 y otro ensayo con plantas recién colectadas en el mes de abril del presente año, con el fin de analizar si había una variación entre la concentración de las lactonas sesquiterpénicas en la planta almacenada y en la planta recién colectada.

Se utilizaron las hojas y flores de la planta *Tanacetum parthenium*, se les realizaron dos maceraciones con disolventes de diferente polaridad el primero fue hexano para separar las moléculas menos polares de la planta y el segundo fue con diclorometano.

Se contaba con un control de estas dos lactonas por medio de estos controles se compararon los dos extractos para determinar cual de los dos contenía una mayor concentración de las lactonas sesquiterpénicas .Al extracto de diclorometano se le

realizó una cromatografía por gravedad pues se observó que había una concentración mayor de estas lactonas.

Se purificaron las dos lactonas y se les practicaron ensayos biológicos a ambas con dos semillas monocotiledóneas; pasto y trigo, también con dos semillas dicotiledóneas; amaranto y lechuga, con el fin de determinar si había una diferencia entre el efecto en las semillas monocotiledóneas y el efecto en las semillas dicotiledóneas.

El ensayo biológico se realizó colocando 25 semillas en una caja Petri y midiendo el número de semillas germinadas, la elongación del tallo y de la raíz para determinar de esta manera si las lactonas presentaban actividad alelopática. Los resultados fueron positivos ambas lactonas presentaban actividad alelopática siendo más potente el efecto de la santamarina.



Imagen 1: “*Tanacetum parthenium*”.

Objetivo general.

Aislar e identificar los metabolitos secundarios de la especie vegetal "*Tanacetum parthenium*" Schultz-Bip, de las hojas y flores, mediante un estudio biodirigido. Determinar la actividad alelopática de los compuestos aislados, en la germinación y en el desarrollo de la radícula y plántula de las semillas: "*Lactuca sativa*" (lechuga), "*Triticum vulgare*" (trigo)," *Lolium multiflorum*" (pasto) y "*Amaranthus hypocondriacus*" (amaranto)

Objetivos:

Separar y purificar los metabolitos secundarios mediante cromatografía en columna y en capa fina.

Determinar la estructura de los metabolitos secundarios aislados mediante análisis espectroscópicos y espectrométricos.

Determinar la actividad alelopática mediante ensayos a los compuestos aislados en semillas de lechuga, pasto, trigo y amaranto.

Justificación.

Los herbicidas naturales presentan ventajas sobre los sintéticos, puesto que son biodegradables, no contaminan el ambiente, no dañan el ecosistema, son herbicidas selectivos y no muestran toxicidad sobre mamíferos. Debido a estas ventajas el estudio de plantas mexicanas dirigido a la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad herbicida está justificado.

Hipótesis.

La planta "*Tanacetum parthenium*" muestra un efecto alelopático muy fuerte sobre otras plantas. En donde crece, invade los terrenos baldíos principalmente se ha notado éste efecto de la zona sur del Distrito Federal. Debido a este efecto observado la planta puede contener metabolitos secundarios que presenten propiedades inhibitorias de la germinación de otras semillas.

Antecedentes.

La planta "*Tanacetum parthenium*" conocida comúnmente como "Santa María" es nativa del suroeste de Europa, de las montañas de los Balcanes, y fue traída a América originalmente como planta de adorno. Ahora crece en Norte, Centro y Sudamérica, Europa, Norte de África, China, Japón y Australia. (8)

Sinonimias.

"*Tanacetum parthenium*" (L.) Schultz-Bip., "*Matricaria parthenium*" L.

Nombres comunes

Altamisa, Santa María, chapote, matasano, hierba de Altamira, manzanillón.

Características botánicas.

Es una planta herbácea perenne, muy aromática, pubescente en sus tallos más jóvenes, hojas e involucros, tallos más o menos ramificados, erectos, hojas bipinnatifidas, de contorno elíptico, hasta de 8 cm de largo, pecioladas.

Sus cabezuelas por lo general son numerosas en panículas corimbiformes, sobre pedúnculos hasta de 8 cm de largo. Tiene involucro subhemisférico, con aproximadamente 50 brácteas, las exteriores lineales y las interiores oblongas, hasta de 4 mm de largo. El receptáculo es converso o semiesférico. Tiene de 10 a 21 flores liguladas (si son cultivadas pueden ser más), sus corolas son blancas, las láminas oblongas de 2.5 a 8 mm de largo, sus corolas amarillas son de \pm 1.5 mm de largo.

Están provistos de 5 a 10 costillas. Vilano en forma de corona diminuta. Los diferentes tipos de Santa María crecen entre 15 y 60 cm de alto, en tierras pobres a lo largo de los caminos y campos abandonados. Florece de julio a octubre; los tallos son duros y redondos, en la parte superior tienen muchas flores individuales sobre tallo pequeños que consisten en muchas hojas blancas pequeñas; la corteza es algo dura y pequeña, con muchas fibras fuertes. La esencia de toda la planta es muy fuerte y el sabor es algo amargo.

Uso medicinal.

Se usan generalmente las hojas y flores de la planta con fines medicinales. El aceite esencial obtenido de las hojas y flores secas, contiene un principio activo tóxico denominado tuyona, además de sustancias amargas, taninos glucósidos y vitaminas. El aceite esencial es vermífugo (para tratar parasitosis intestinales). La misma indicación tiene la infusión, preparada a partir de una cucharada de planta seca en medio litro de agua, consumiéndose tres tazas al día. En dosis excesivas

esta planta es tóxica produciendo mareos, vómitos, convulsiones y dolor abdominal.



Imagen 2: “*Tanacetum parthenium*”.

Alelopatía.

La Sociedad de alelopatía internacional en 1996, definió a la alelopatía como cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por las plantas, microorganismos, virus y hongos que influyan en el crecimiento y desarrollo de sistemas agrícolas y biológicos.

Los síntomas de la alelopatía se manifiestan de la siguiente manera: afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas que son expuestas a aleloquímicos. Los efectos reales son visibles en: un porcentaje de la germinación inhibida o retrasada, semillas necrosadas, raíz y tallo reducido, necrosis en las extremidades de las raíces, pérdida de pelos radiculares, reducción de la acumulación de peso seco, y una capacidad reproductiva reducida, entre otros daños (9).

El fenómeno puede manifestar sus efectos a través de la inhibición o estimulación de los procesos de crecimiento de las plantas vecinas, evitando la acción de insectos y animales comedores de hojas, los efectos dañinos de hongos, bacterias, virus y hasta la inhibición de la propia germinación de la semilla.

También se plantea que en los tejidos vegetales hay ciertas sustancias que constituyen un sistema de defensa. Estas sustancias llamadas aleloquímicos, son compuestos moleculares que actúan como señales o como mensajeros de disuasión produciendo efectos repulsivos, antialimentarios, tóxicos, alteradores de la fisiología y comportamiento sexual o poblacional de insectos.

La utilización de compuestos alelopáticos como una herramienta de manejo en las plantas, puede ser uno de los usos más prácticos aplicables de la alelopatía en los agro ecosistemas.

Otra aplicación importante de la alelopatía, es el control orgánico de insectos y plagas con el uso de algunos cultivos alelopáticos. La alelopatía puede generarse y actuar por exudación de compuestos provenientes de raíces vivas, frutos o por infiltración de compuestos químicos provenientes de la descomposición de los vegetales.

La alelopatía, parece ser un importante componente de la capacidad de interferencia de las plantas en ecosistema natural. La alelopatía puede contribuir a la distribución de las especies, las cuales en circunstancias específicas podían limitar severamente la comunidad de plantas.

No todas las sustancias liberadas por las plantas son inhibidoras, por el contrario, algunas manifiestan efectos estimulantes, ciertos metabolitos pueden provocar reacciones de estímulo o de inhibición dependiendo de su concentración. Por ello cualquier clasificación de los productos tóxicos como las plantas que la generan resultaría arbitraria; así la toxicidad no sólo depende de la sustancia en sí sino que también de la concentración de las mismas en el sitio de acción y de la especie sobre la cual se ejerce.

La actividad alelopática depende de diversos factores, como:

1. Sensibilidad de la especie receptora.
2. Liberación de la toxina al medio.
3. Actividad e interacciones bióticas y abióticas que ocurren en el suelo con la toxina (microorganismos, temperatura, pH, etc.).

Para que se produzcan efectos ya sea de carácter positivo o negativo, directos o indirectos, la concentración de las sustancias aleloquímicas es de gran importancia. Las actividades biológicas en plantas receptoras de aleloquímicos son conocidas por ser una respuesta dependiente de la concentración de entrada. La respuesta es de estimulación o atracción, con bajas concentraciones de aleloquímicos y de inhibición o rechazo al incrementarse.

No obstante para que todo fenómeno alelopático, de cualquier naturaleza, ejerza su efecto como tal, debe cumplir las siguientes condiciones:

1. Que exista en el suelo suficiente cantidad o concentración del compuesto alelopático.
2. Que el aleloquímico entre en contacto directo o interactúe de alguna forma con una planta susceptible.

El efecto alelopático de las plantas se manifiesta de diferentes maneras; por ejemplo en diversos organelos y procesos celulares como:

- Mitocondrias.
- Cloroplastos.
- Meristemos primarios.
- Membrana.
- Cinética enzimática.
- Síntesis de proteínas o estructura cromosómica.

Estos mecanismos de acción directa fueron resumidos, bajo las siguientes categorías:

1. Efectos en la elongación de las células y ultra estructura del extremo radical, incluyendo la inhibición de la división celular.
2. Efectos en la inducción de hormonas de crecimiento.
3. Inhibición de la síntesis de proteínas y cambios en el metabolismo de lípidos y ácidos orgánicos.
4. Inhibición y/o estimulación de enzimas específicas.
5. Efectos en la permeabilidad de la membrana.
6. Efectos en la apertura estomatal y en la fotosíntesis.
7. Efectos en la respiración.
8. Efectos sobre la absorción mineral.
9. Extraordinario atascamiento de los elementos del xilema y de la transmisión de agua por el tallo.
10. Efectos sobre la disponibilidad de fósforo y potasio en el suelo.

Limitaciones en el estudio de los mecanismos de acción.

Debido a la diversidad de naturalezas químicas de los diferentes agentes alelopáticos, no existe un mecanismo de acción único que explique la manera en que éstos afectan a la planta receptora. Existen varios inconvenientes para lograr

comprender el mecanismo de acción de un compuesto aleloquímico determinado: En condiciones naturales las cantidades en que se encuentran disponibles muchas de estas sustancias son inferiores a las que encuentran actividad en bioensayos en el laboratorio. Esto se debe a que frecuentemente existen interacciones sinérgicas y aditivas, lo cual dificulta determinar la actuación de cada compuesto.

Esa presencia mínima de sustancias también dificulta su recuperación para ser utilizados en estudios de efectos fisiológicos y a nivel subcelular. Estudiando un agente alelopático en particular, muchas veces es difícil diferenciar efectos secundarios de la causa primaria de acción. La importancia del estudio de cómo actúan estas sustancias es evidente, si se tiene en cuenta que son sólo doce los sitios moleculares de acción conocidos de los herbicidas que actualmente se utilizan en la agricultura.

La literatura brinda información sobre los mecanismos de acción de agentes alelopáticos pero, por lo antes señalado, falta todavía más claridad respecto a cómo afectan el crecimiento de las plantas receptoras. Los mecanismos de acción más estudiados ahora son los compuesto fenólicos. Es una aproximación interesante seguir la trayectoria de estas sustancias a través de la planta mediante moléculas de las mismas marcadas con C¹⁴. Esto permite entender a qué partes son transportados predominantemente y en qué tejidos es factible que ejerzan su acción. (10)

Naturaleza de las sustancias alelopáticas.

Las sustancias químicas que presentan actividad alelopática son llamados aleloquímicos. Estos pueden ser clasificados como metabolitos secundarios de las plantas, los cuales son generalmente agrupados por su composición (alcaloides, fenoles, flavonoides, terpenoides, glucosinolatos) y no juegan ningún papel en el metabolismo primario, proceso esencial para la supervivencia de la planta y son producidos como consecuencia de los caminos del metabolismo primario, e incluyen cientos de componentes moleculares de bajo peso. Decenas de miles de sustancias secundarias son conocidas hoy, sin embargo solo un número limitado se ha demostrado su actividad como aleloquímico.

Los inhibidores naturales fueron revisados por Kefeli y en general los fenólicos estimulan a la enzima indolacético oxidasa descomponiendo a la hormona fundamental ácido indolacético (AIA) o auxina. En tanto los terpénicos, interfieren con las enzimas respiratorias con el grupo SH como se ha comprobado con la juglona. Se ha tenido especial interés en los inhibidores terpénicos lactónicos

como: la eugarzadona y la partenina ya que estos inhibidores deprimen la respiración, siendo el efecto mayor en el frijol que en el trigo (11).

Lactonas sesquiterpénicas.

Las lactonas sesquiterpénicas son constituyentes característicos de la familia *Compositae*, aunque se han encontrado en otras plantas de familias como *Magnoliaceae*, *Umbelliferae* y *Lauraceae* (12). Sin embargo, el mayor número de lactonas que se han descrito en la literatura se aislaron de las plantas pertenecientes a la familia *Asteraceae*. El número de lactonas conocidas en el año de 1994 eran alrededor de 4000 y aproximadamente 5000 en el 2001 (13). Las concentraciones de lactonas sesquiterpénicas pueden variar entre el 0.01 y el 8 % del peso seco, y se les encuentra generalmente en hojas y flores. Se les puede encontrar en forma libre principalmente, y raramente en forma glicosídica (12).

Biogénesis de las lactonas sesquiterpénicas.

Las lactonas sesquiterpénicas poseen un esqueleto fundamental con 15 átomos de carbono, que derivan de la unión de 3 fragmentos de isopreno (2-metil-1,3-butadieno), cabeza, cola y algunos productos de transposición (1). Se originan a partir del pirofosfato-trans-farnesilo como los demás sesquiterpenos naturales.

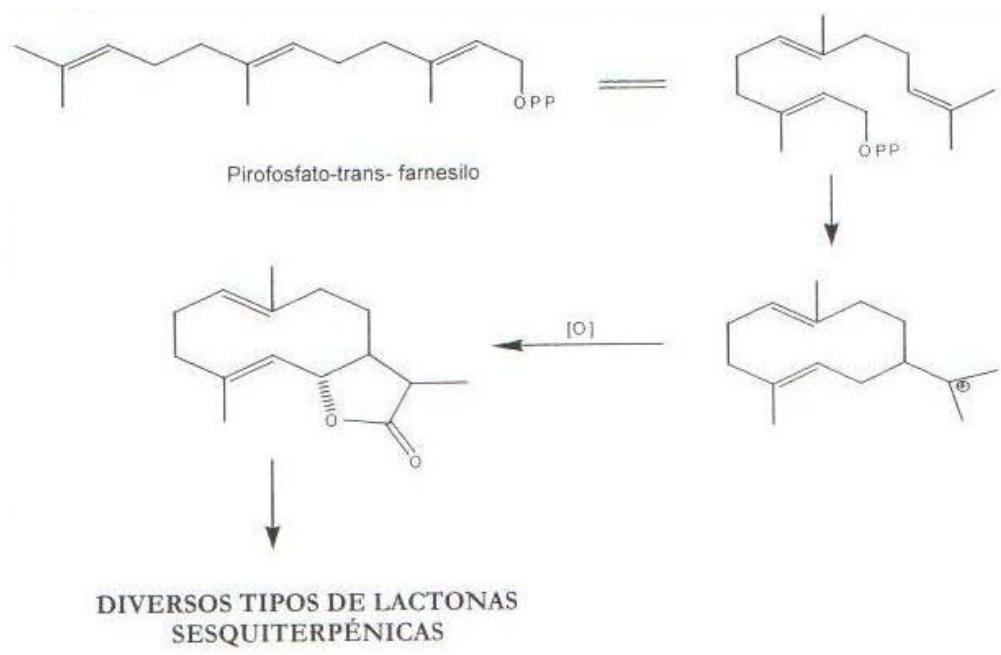


Fig. 1: Biogénesis de las lactonas sesquiterpénicas

La lactonización del precursor sesquiterpenoide, parece producirse por un mecanismo de oxidación de un grupo metilo hasta carboxilo, la oxidación de un carbono adyacente y finalmente la deshidratación entre los grupos carboxilo e hidroxilo formados (12).

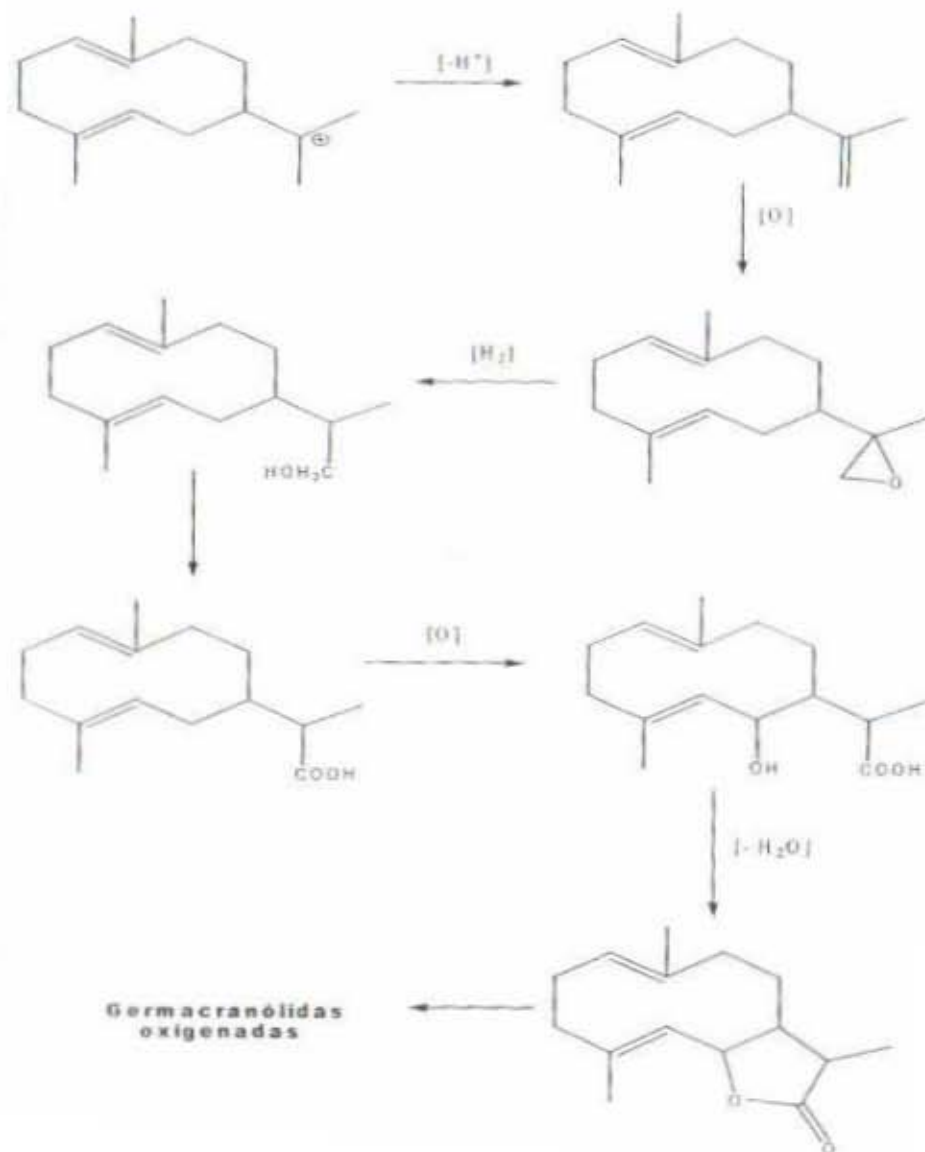
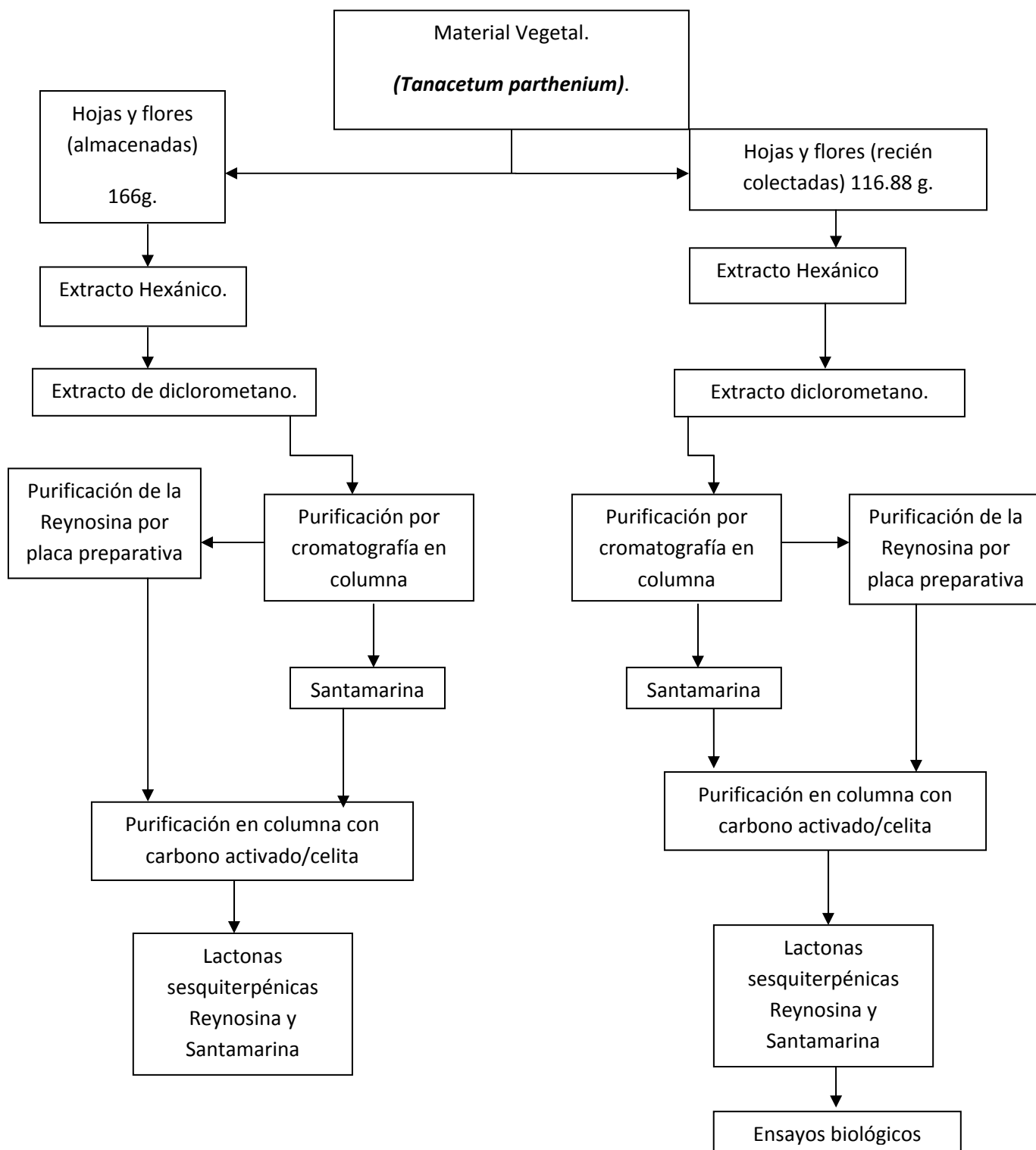


Fig. 2: Biogénesis del anillo lactónico de sesquiterpenlactonas.

Parte experimental.



Esquema 1: Diagrama de flujo del trabajo experimental partiendo de la planta *Tanacetum parthenium*.

Aparatos, Materiales y Disolventes.

Las cromatografías en columna por gravedad (CCG) se realizaron en una columna de 90 cm de largo y 4 cm de diámetro empacada con sílica gel 60 (230/400 mesh) en una proporción de 1:30. Las CCG se realizaron absorbiendo el extracto vegetal en sílica gel (35/70), en una proporción 1:3 para el punto de aplicación. Las cromatografías en capa fina (CCF) se realizaron con cromatofolios de sílica gel G UV254 de 0.25 mm de la marca Machery-Nagel para realizar el seguimiento de las columnas y comprobar la pureza de los metabolitos aislados. La purificación y aislamiento de los metabolitos secundarios se realizó mediante cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) en placas de vidrio de 20 X20 cm., sílica gel 60-F254 de 0.25 y 1.0 mm. Los métodos de revelado fueron: luz ultravioleta proveniente de una lámpara portátil modelo MODER-UVLS-26 (254-365 nm) y como reactivo cromogénico se utilizó una solución de sulfato cérico.

Los espectros infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro con transformada de Fourier modelo Tensor 27 marca Bruker, en solución de cloroformo (CHCl_3). Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMNH^1), fueron obtenidos a 300 MHz utilizando un espectrofotómetro analítico modelo eclipse 300 MHz, marca JEOL. Usando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3) y como referencia interna tetrametil silano (TMS).

Metodología.

Hojas y Flores almacenadas.

La planta Santa María fue colectada en la zona Sur de la Cd. de México el 22/abril/2006. Se pesaron 166 g de hojas y flores secas y se le realizaron maceraciones con disolventes de diferente polaridad a temperatura ambiente. La primera maceración se realizó con 1.85 litros de hexano para obtener 1.44g de extracto, la segunda maceración se realizó con 1.24 litros de diclorometano obteniendo 9.0 g de extracto.

Cromatografía del extracto de diclorometano.

Los 9 g. del extracto de diclorometano se absorbieron en 27 g de sílica-gel 35/70 para el punto de aplicación, colocándose en una columna empacada con 270 g. de sílica-gel 230/400. La columna se eluyó a presión normal en una combinación 1:1 de hexano:acetato de etilo.

Fracción	Compuesto	Cantidad
11 y 12	Santamarina	0.7245 g
13 a 17	Mezcla Santamarina/ Reynosina	1.23 g

Tabla 1: Rendimientos de las lactonas Santamarina y Reynoldsina de las hojas y flores almacenadas.

Hojas y flores recién colectadas.

La planta Santa María fue colectada en la zona Sur de la Cd. de México el 18/abril/2011. Se pesaron 117 g de hojas y flores secas y se le realizaron maceraciones con disolventes de diferente polaridad a temperatura ambiente. La primera maceración se realizó con 1.5 litros de hexano para obtener 1.28g de extracto, la segunda maceración se realizó con 1.5 litros de diclorometano obteniendo 7.3 g de extracto.

Cromatografía del extracto de diclorometano.

Los 7.3 g. del extracto de diclorometano se absorbieron en 22 g de sílica-gel 35/70 para el punto de aplicación, colocándose en una columna empacada con 220 g. de sílica-gel 230/400. La columna se eluyó a presión normal en una combinación 1:1 de hexano:acetato de etilo.

Fracción	Compuesto	Cantidad
8 y 9	Santamarina	0.933 g
10 a 18	Mezcla Santamarina/ Reynosina	1.522 g

Tabla 2. Rendimientos de las lactonas Santamarina y Reynoldsina de las hojas y flores nuevas.

De la fracción 17 que tenía una mayor concentración de Reynoldsina se realizó una purificación posterior por cromatografía en capa fina preparativa (CCFP), se obtuvieron 100 mg de Reynoldsina que fueron utilizados para realizar los ensayos biológicos.

Las estructuras de las lactonas sesquiterpénicas son:

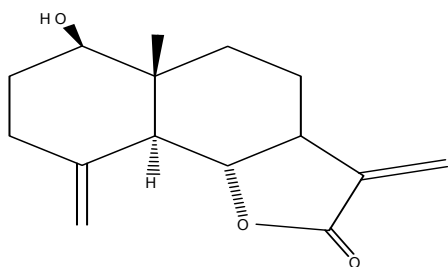


Fig. 3: Reynoldsina.

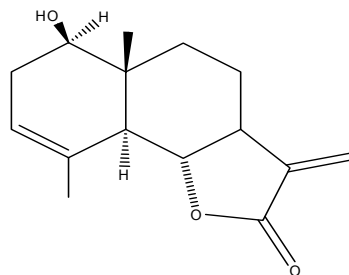


Fig. 4: Santamarina.

Ensayo biológico.

La determinación de la actividad herbicida de las moléculas aisladas, fue evaluada con uno de los ensayos biológicos más empleados para el estudio de los aleloquímicos, el cual comprendió la evaluación de la germinación de las semillas y la elongación de raíz y del tallo. Las semillas que se probaron fueron dos monocotiledóneas; "*Triticum vulgare*" (trigo) y "*Lolium multiflorum*" (pasto) y dos semillas dicotiledóneas; "*Amaranthus hypocondriacus*" (amaranto) y "*Lactuca sativa*" (lechuga). Se probaron estas semillas para determinar si los compuestos afectaban de diferente manera a semillas monocotiledóneas o dicotiledóneas.

Metodología.

El experimento consistía en agregar 25 semillas de cada especie, previamente lavadas con hipoclorito de sodio al 1%, en una caja Petri de 9 cm de diámetro con papel filtro esterilizado de la marca Whatman #2. Después, dependiendo la semilla se le agregaba un volumen de la solución prueba, que para trigo y pasto fue de 10 ml y 7 ml para lechuga y amaranto, las cajas se dejaban incubar a 25 °C, en oscuridad, durante 5 días, para las semillas de pasto, trigo y lechuga mientras que para amaranto dado que su proceso de germinación es más rápido comparado con las otras semillas, se dejaba incubando 3 días, todo esto por triplicado.

Posteriormente se medían el número de semillas germinadas, tamaño de radícula y plántula, así como el peso fresco de cada caja.

Las soluciones prueba eran de 1000 µM, 800 µM, 600 µM y 400 µM para las semillas de trigo, lechuga y pasto para las semillas de amaranto las concentraciones fueron de 400 µM, 300 µM, 200 µM y 100 µM. Se preparaban de la siguiente manera: se disuelve la lactona en un volumen de acetona adecuado para tener una concentración final de 0.5% de acetona/agua y posteriormente se realizaban diluciones de esta solución stock, para obtener las otras concentraciones, también se realizaba una solución control una concentración de 0.5% de acetona/agua para despreciar el efecto que ejerce la acetona sobre las semillas que se utilizaron en este trabajo experimental.

Desarrollo de raíz y plántula.

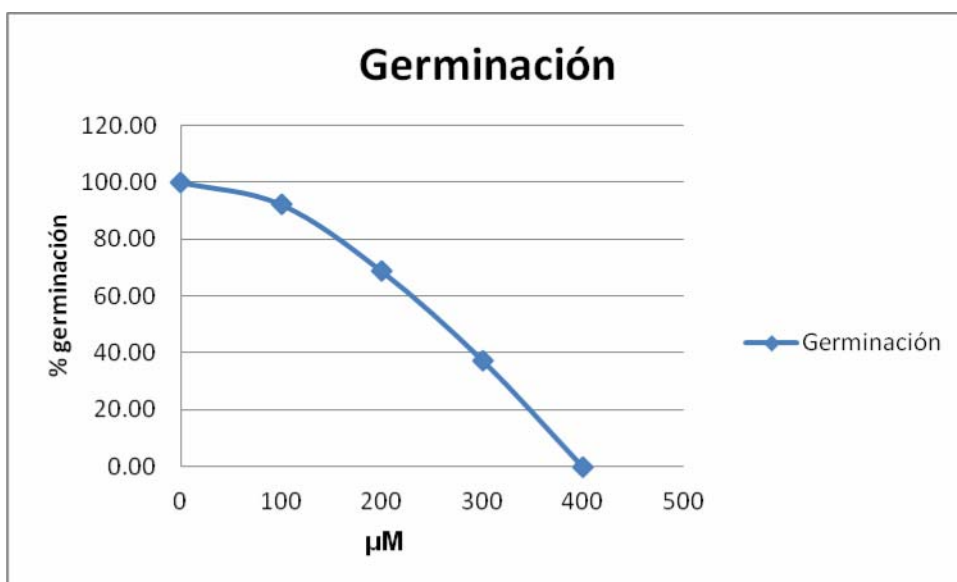
En los estudios que se realizaron se evaluaron los siguientes parámetros crecimiento de raíz y plántula; estos parámetros son aceptados como medidas indirectas para evaluar la actividad alelopática o herbicida del compuesto obtenido. Los resultados obtenidos son los promedios de los ensayos efectuados por triplicado. Los valores reportados se dan en % de inhibición con respecto al control.

Resultados.

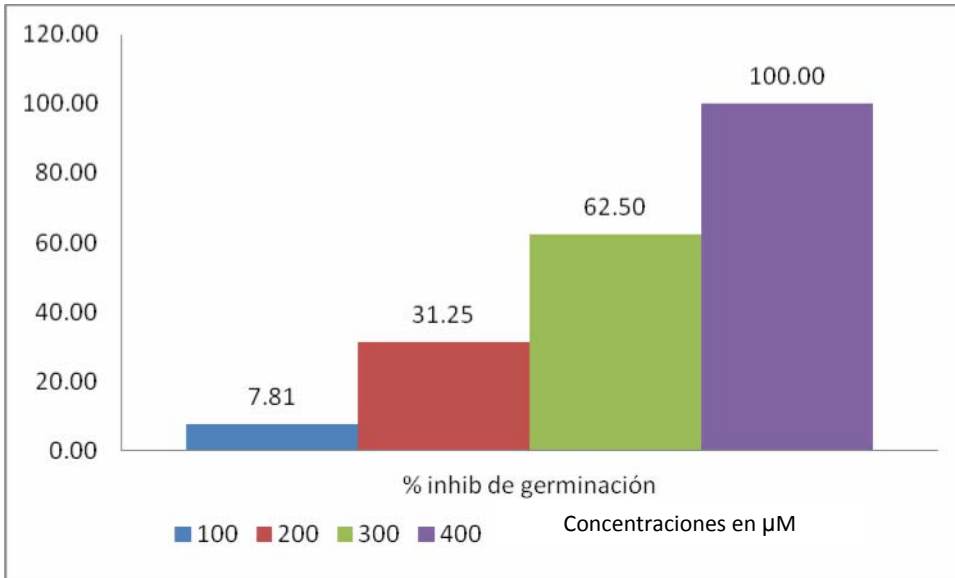
Semillas de amaranto (*Amaranthus hypocondriacus*) tratadas con Santamarina

[μM]	%Germinación	Raíz (cm)	Tallo(cm.)	Peso H (g.)	% inhib de germinación	%inhib. Raíz	%inhib. Tallo
0	100.00	3.52	1.26	0.36			
100	92.19	2.48	0.94	0.28	7.81	29.51	25.78
200	68.75	1.39	0.51	0.13	31.25	60.59	59.71
300	37.50	0.90	0.32	0.03	62.50	74.57	74.60
400	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00	100.00

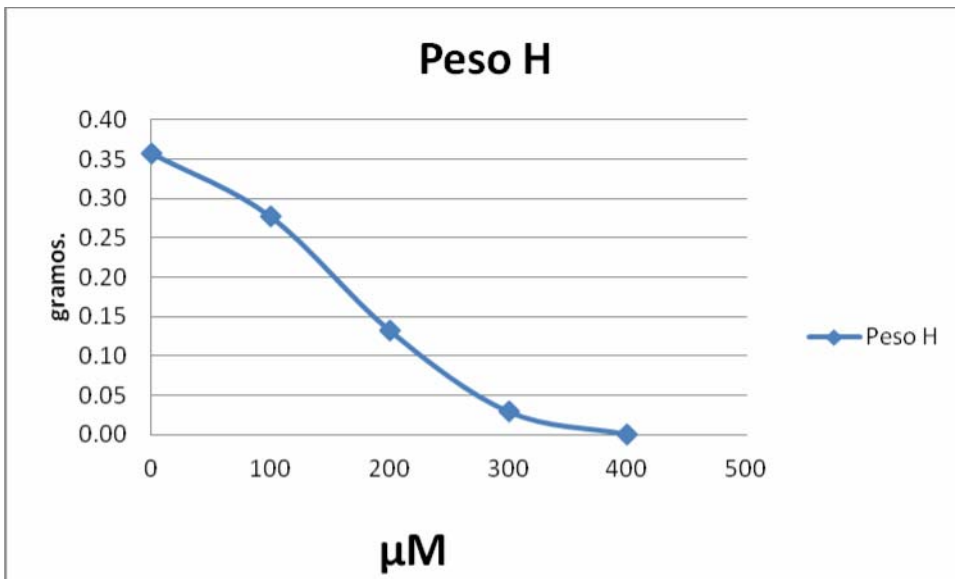
Tabla3: Resultados del amaranto tratado con la lactona sesquiterpénica Santamarina.



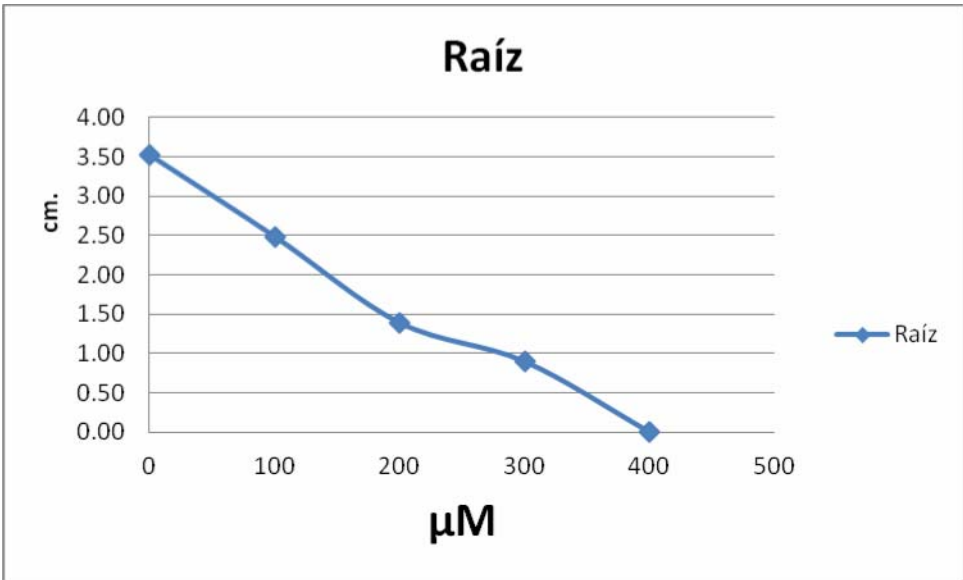
Gráfica 1: Efecto de la Santamarina en la germinación del amaranto en función de la concentración.



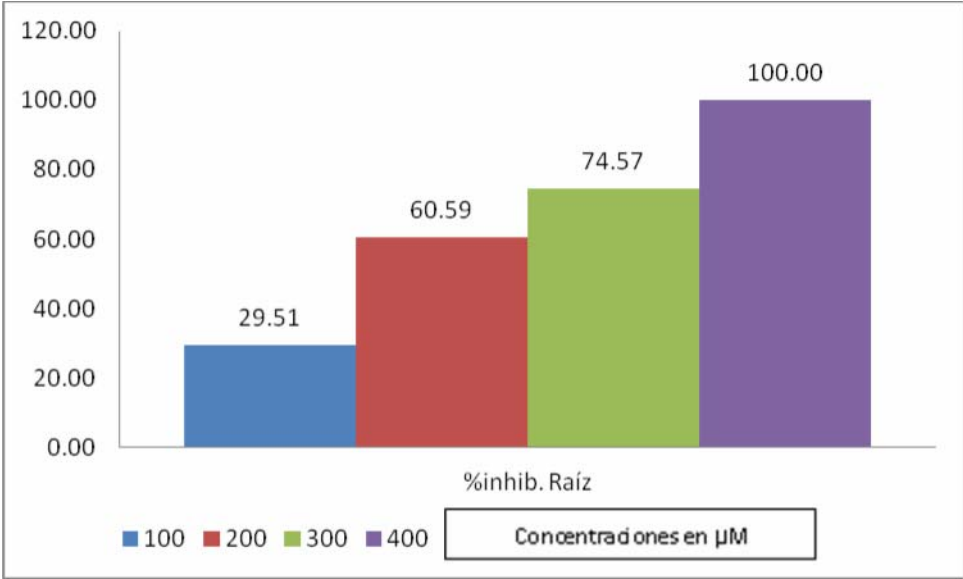
Gráfica 2: Efecto de la Santamarina en la germinación del amaranto comparada con el control en función de la concentración.



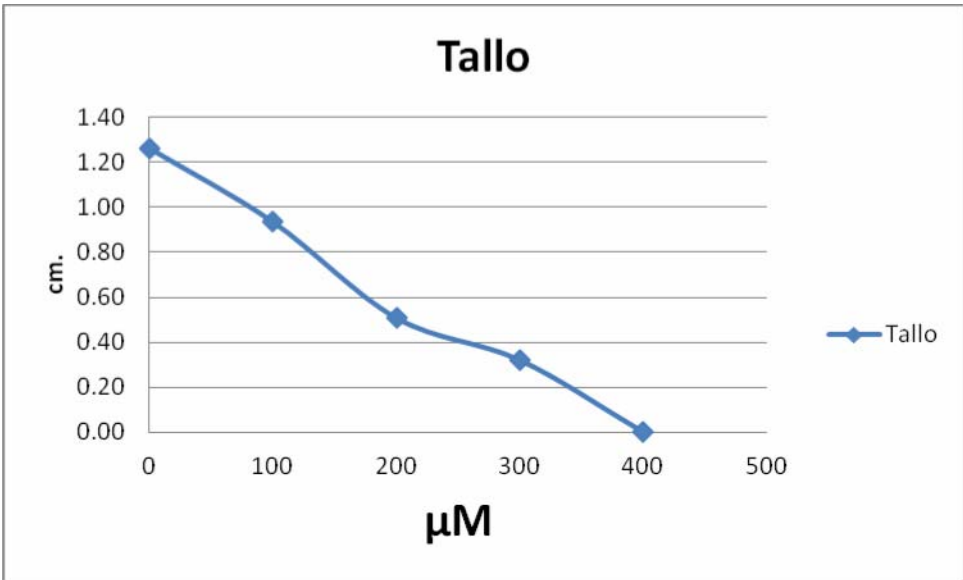
Gráfica 3: Efecto de la Santamarina en el peso húmedo del amaranto en función de la concentración.



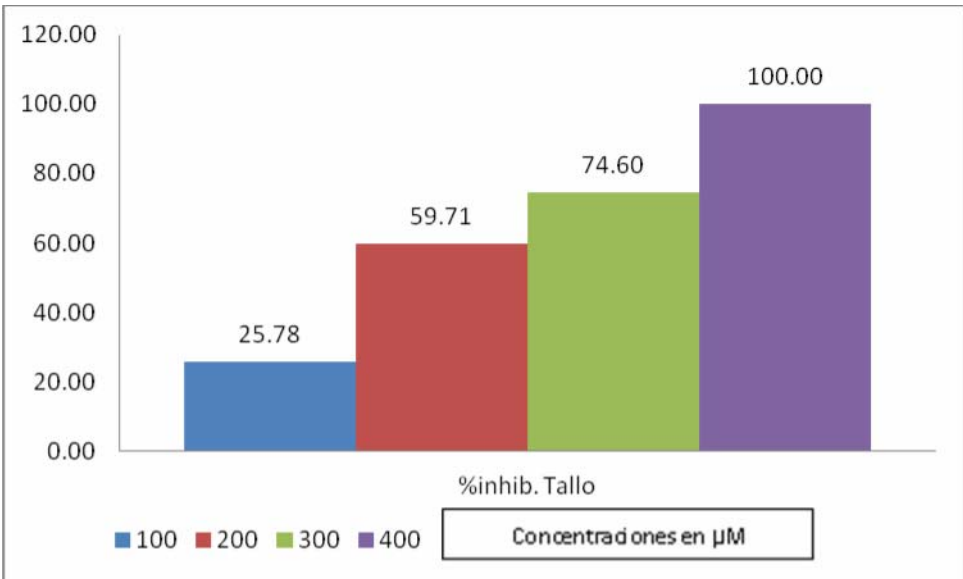
Gráfica 4: Efecto de la Santamarina en la elongación de la raíz del amaranto en función de la concentración.



Gráfica 5: Efecto de la Santamarina en la inhibición de la elongación de la raíz del amaranto en función de la concentración.



Gráfica 6: Efecto de la Santamarina en la elongación de la plántula del amaranto en función de la concentración.

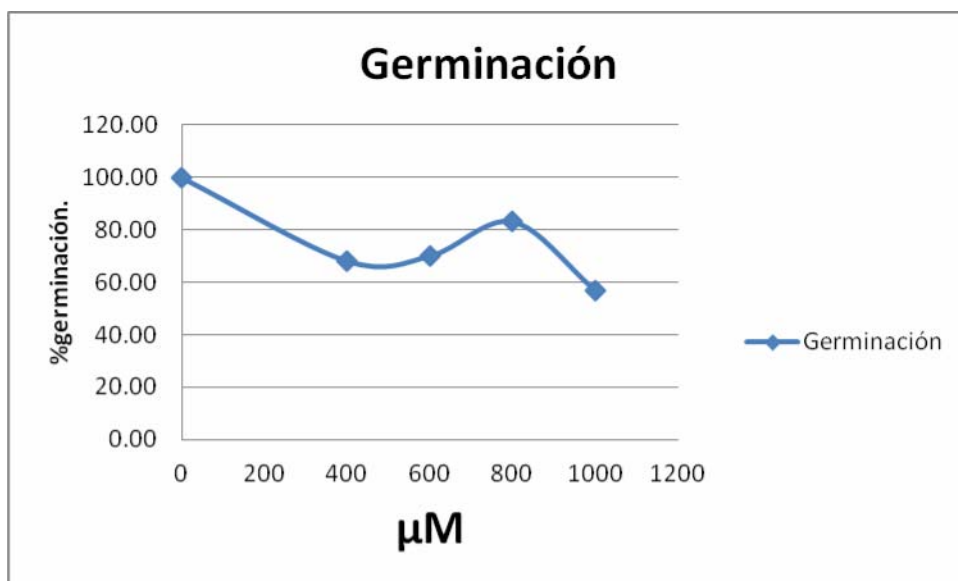


Gráfica 7: Efecto de la Santamarina en la inhibición de la elongación de la plántula del amaranto en función de la concentración.

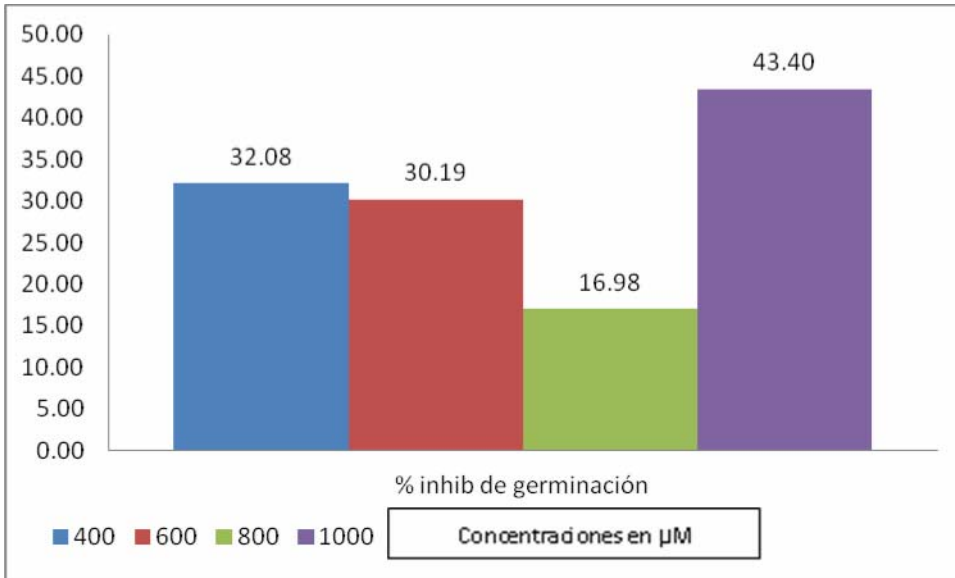
Lechuga (*Lactuca sativa*).

[μ M]	%Germinación	Raíz (cm.)	Tallo (cm.)	Peso H (g)	% inhib de germinación	%inhib. Raíz	%inhib. Tallo
0	100.00	3.92	2.38	0.70			
400	67.92	4.05	2.44	0.48	32.08	-3.28	-2.59
600	69.81	4.21	2.24	0.47	30.19	-7.36	6.09
800	83.02	3.04	1.72	0.47	16.98	22.48	27.90
1000	56.60	3.03	1.87	0.32	43.40	22.62	21.43

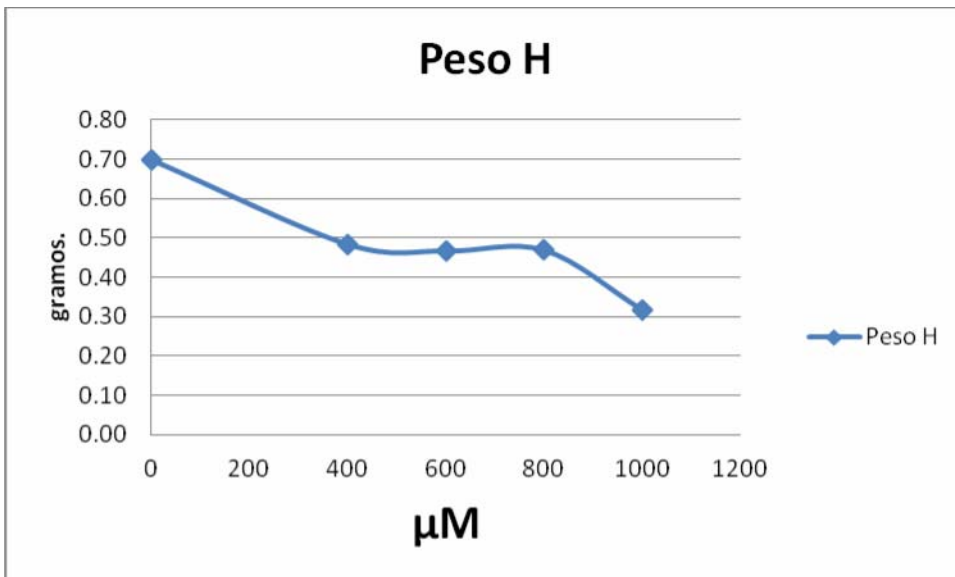
Tabla 4: Resultados de la lechuga tratada con la lactona sesquiterpénica Santamarina.



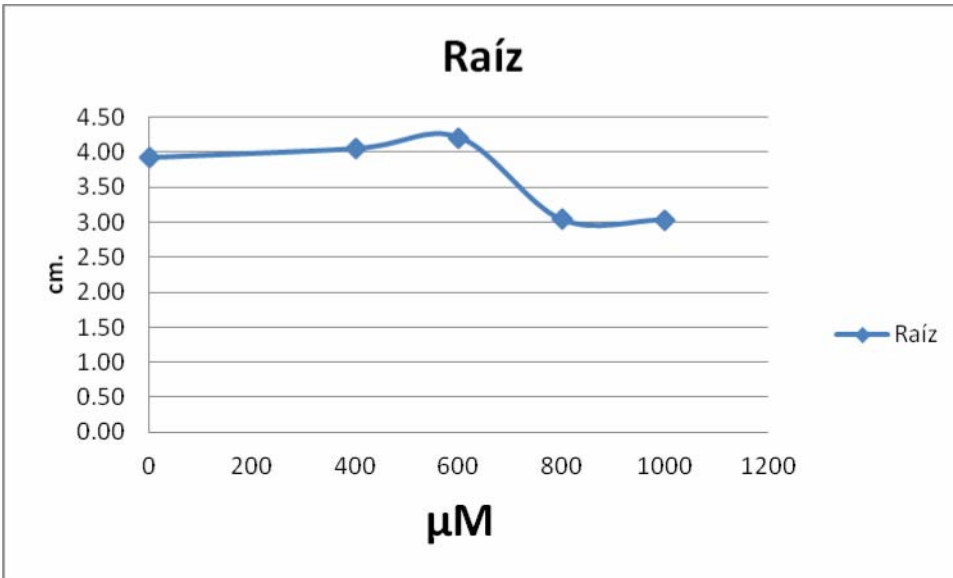
Gráfica 8: Efecto de la Santamarina en la germinación de la lechuga en función de la concentración.



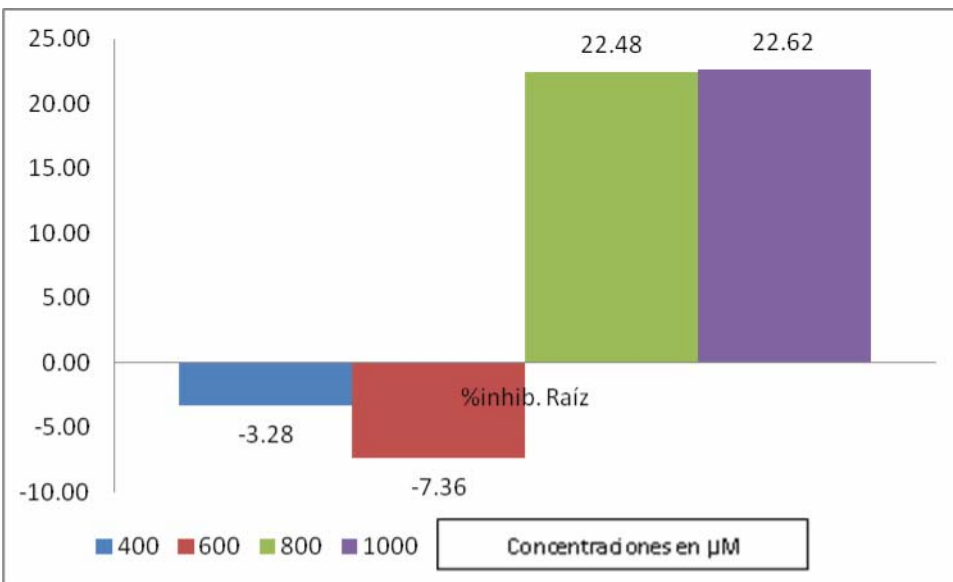
Gráfica 9: Efecto de la Santamarina en la germinación de la lechuga comparada con el control en función de la concentración.



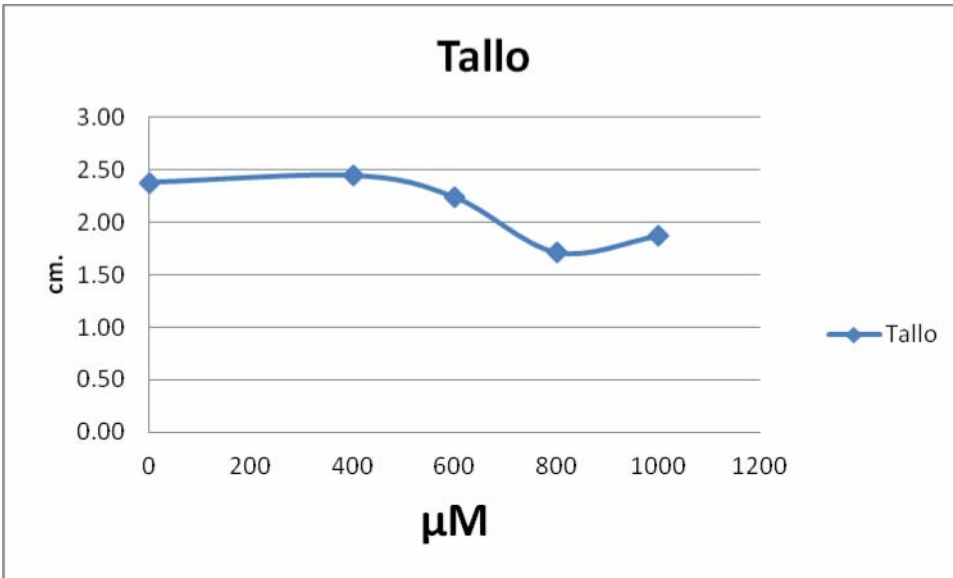
Gráfica 10: Efecto de la Santamarina en el peso húmedo de la lechuga en función de la concentración.



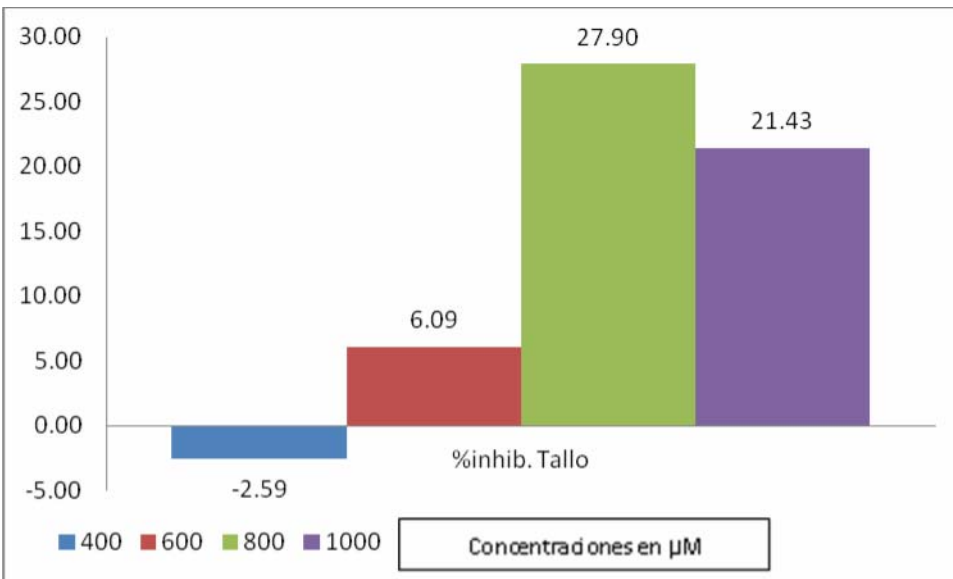
Gráfica 11: Efecto de la Santamarina en la elongación de la raíz de la lechuga en función de la concentración.



Gráfica 12: Efecto de la Santamarina en la elongación de la raíz comparada con el control en función de la concentración.



Gráfica 13: Efecto de la Santamarina en la elongación de la plántula en función de la concentración.

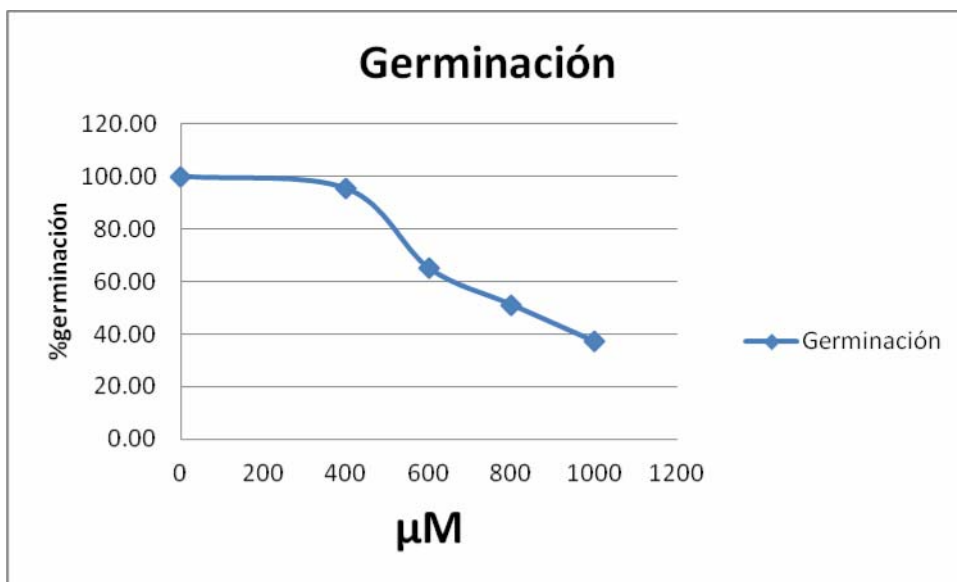


Gráfica 14: Efecto de la Santamarina en la inhibición de la elongación de la plántula de la lechuga en función de la concentración.

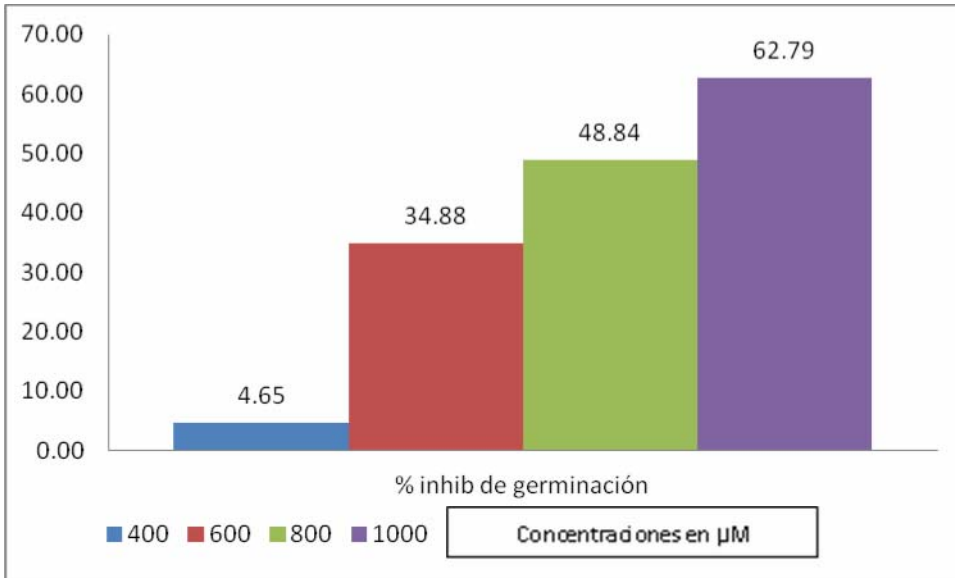
Pasto (*Lolium multiflorum*).

[μM]	%Germinación	Raíz (cm.)	Tallo (cm.)	Peso H (g.)	% inhib de germinación	%inhib. Raíz	%inhib. Tallo
0	100.00	3.43	2.97	0.72			
400	95.35	1.30	1.50	0.33	4.65	62.10	49.59
600	65.12	0.73	0.84	0.22	34.88	78.84	71.82
800	51.16	0.23	1.07	0.21	48.84	93.24	64.03
1000	37.21	0.26	0.78	0.11	62.79	92.35	73.74

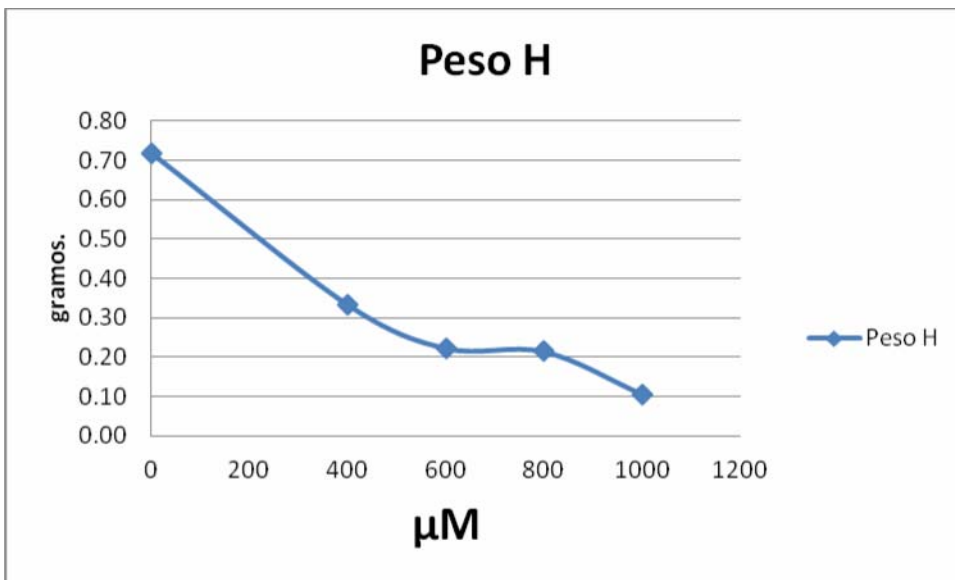
Tabla 5: Resultados del pasto tratado con la lactona sesquiterpénica Santamarina.



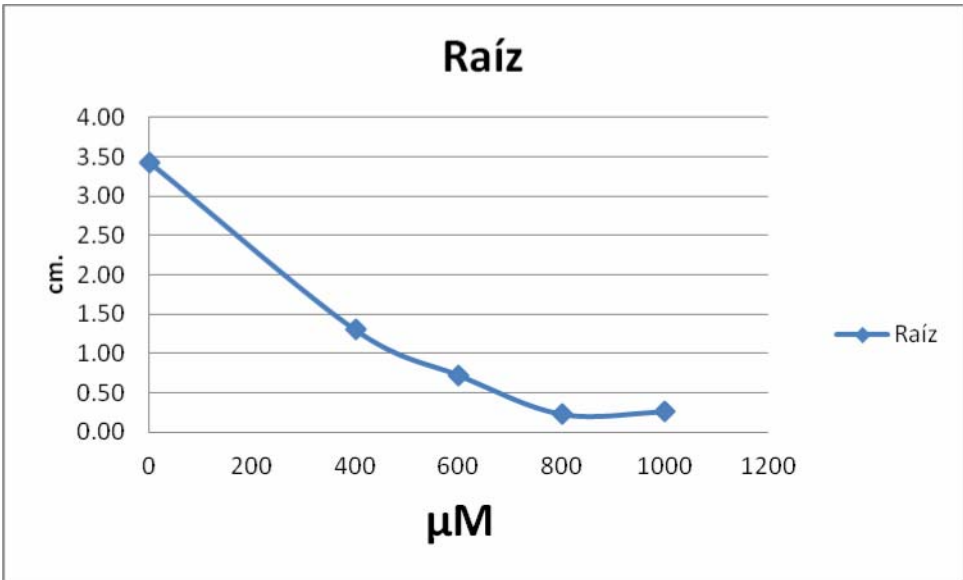
Gráfica 15: Efecto de la Santamarina en la germinación del pasto en función de la concentración.



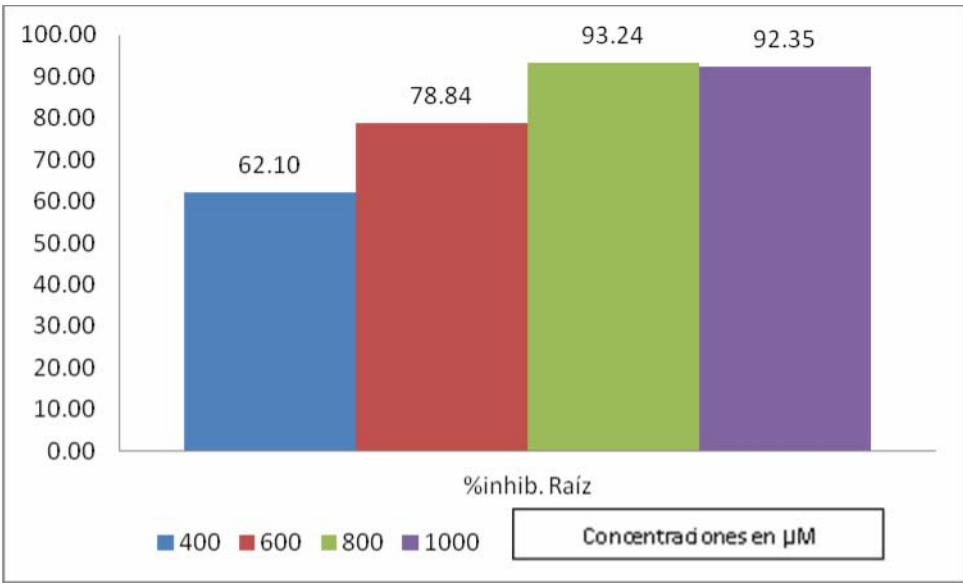
Gráfica 16: Efecto de la Santamarina en la germinación del pasto comparado con el control en función de la concentración.



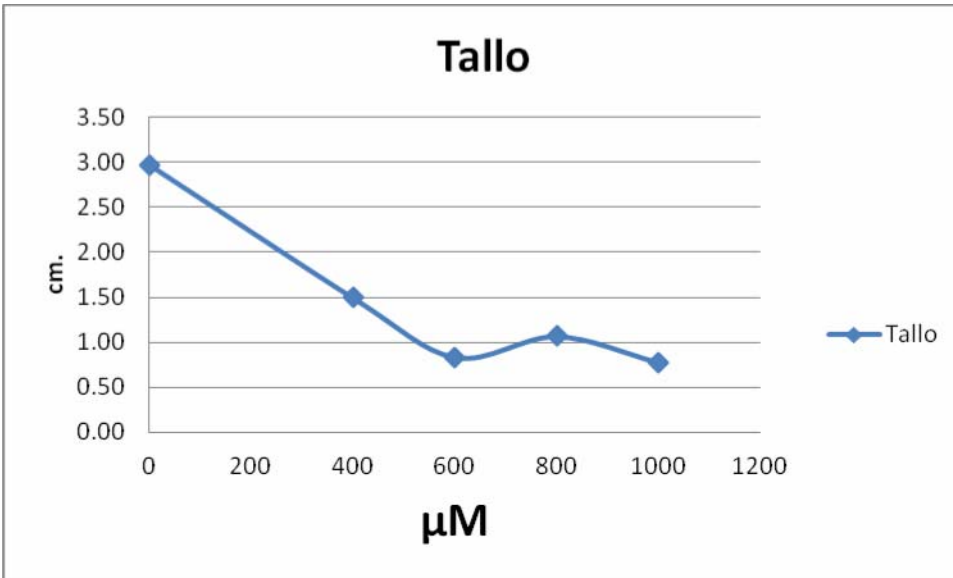
Gráfica 17: Efecto de la Santamarina en el peso húmedo del pasto en función de la concentración.



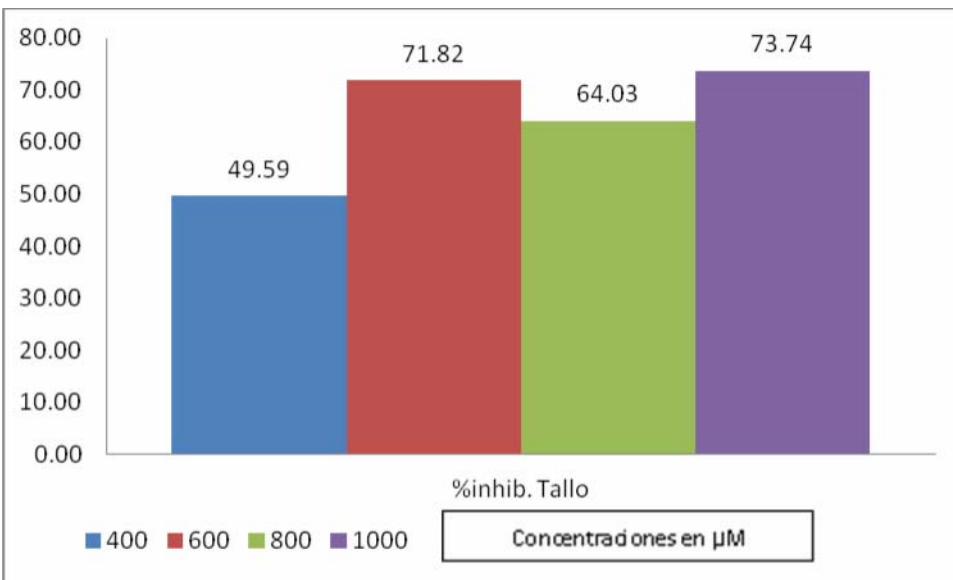
Gráfica 18: Efecto de la Santamarina en la elongación de la raíz del pasto en función de la concentración.



Gráfica 19: Efecto de la Santamarina en la inhibición de la elongación de la raíz del pasto en función de la concentración.



Gráfica 20: Efecto de la santamarina en la elongación de la plántula del pasto en función de la concentración.

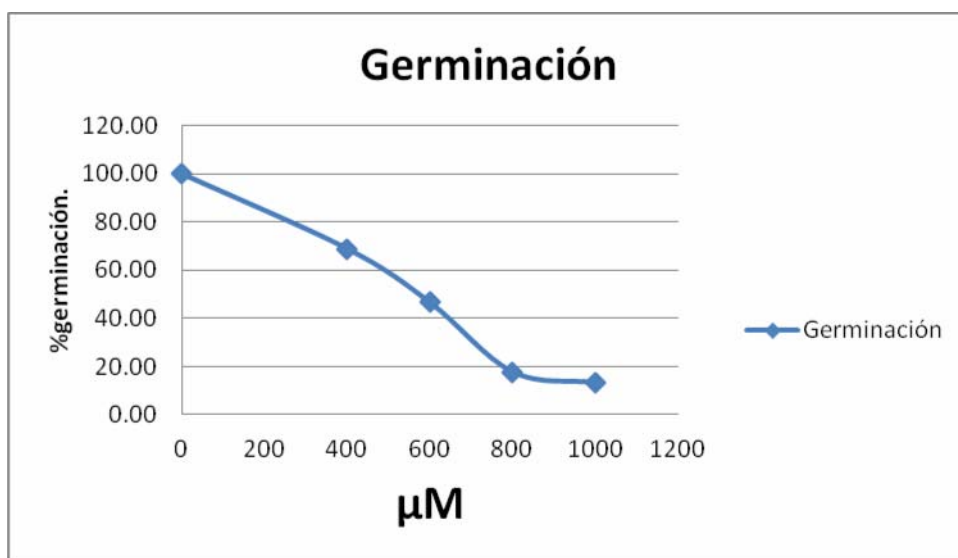


Gráfica 21: Efecto de la Santamarina en la inhibición de la elongación de la plántula del pasto en función de la concentración.

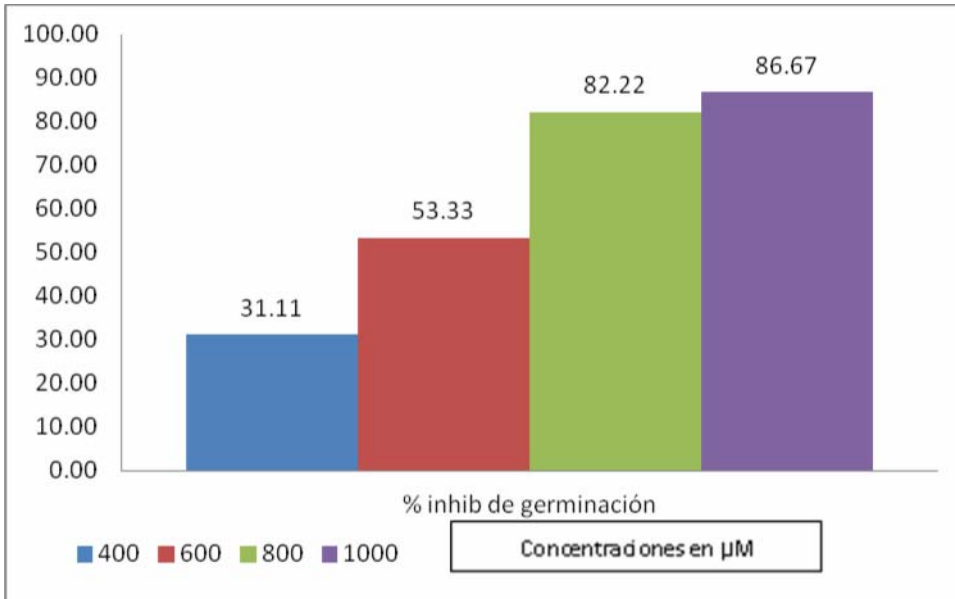
Trigo (*Triticum vulgare*).

[μM]	%Germinación	Raíz (cm.)	Tallo](cm.)	Peso H (g)	% inhib de germinación	%inhib. Raíz	%inhib. Tallo
0	100.00	9.36	5.18	6.34			
400	68.89	4.52	3.98	4.00	31.11	51.70	23.15
600	46.67	2.84	2.89	2.07	53.33	69.60	44.19
800	17.78	2.28	1.89	0.81	82.22	75.69	63.54
1000	13.33	1.85	1.37	0.67	86.67	80.23	73.60

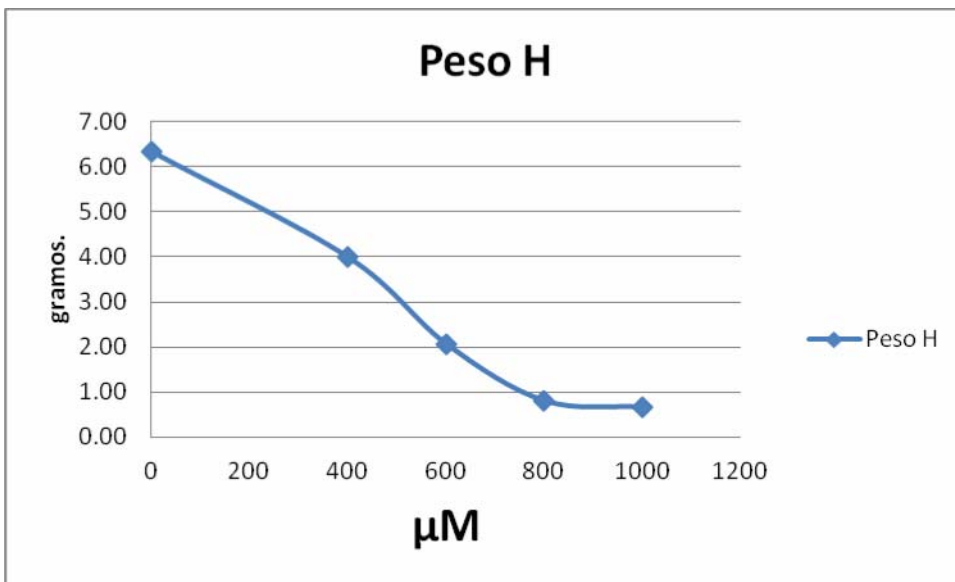
Tabla 6: Resultados del trigo tratado con la lactona sesquiterpénica Santamarina.



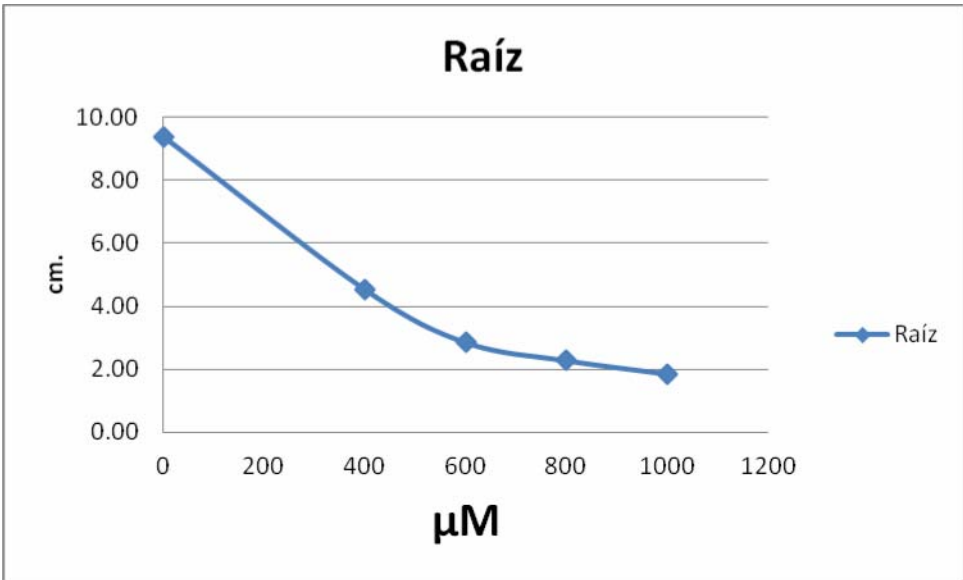
Gráfica 22: Efecto de la santamarina en la germinación del trigo en función de la concentración.



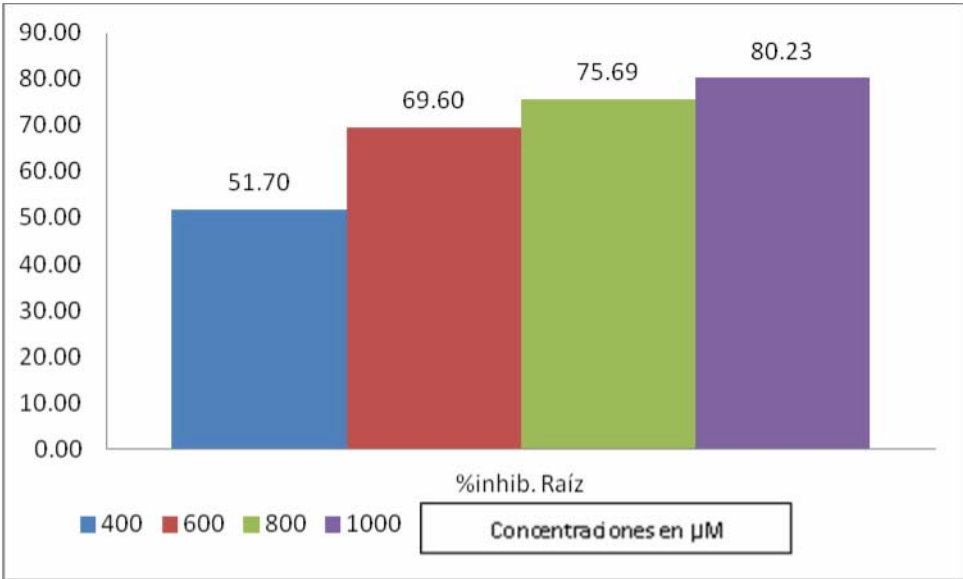
Gráfica 23: Efecto de la Santamarina en la inhibición de la germinación del trigo en función de la concentración.



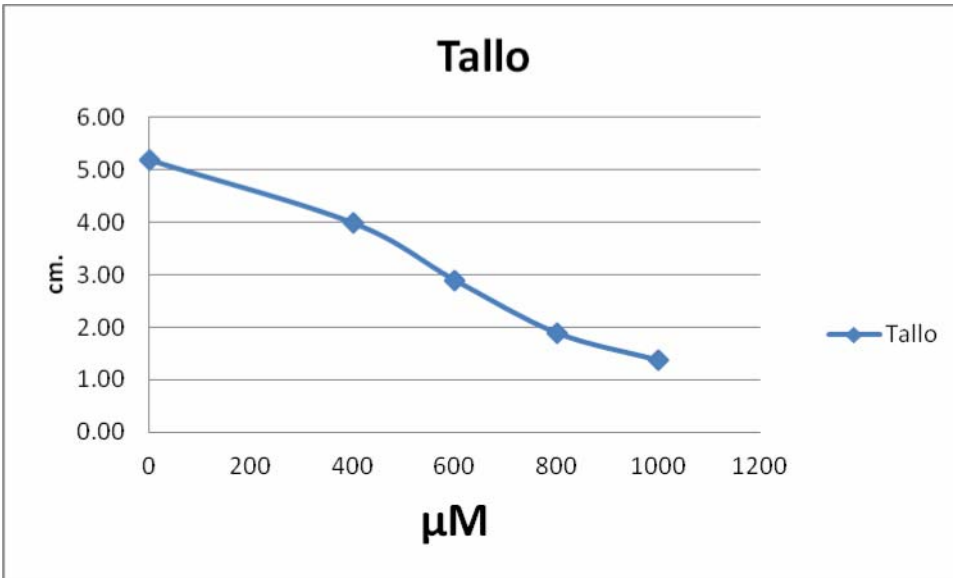
Gráfica 24: Efecto de la Santamarina en el peso húmedo del trigo en función de la concentración.



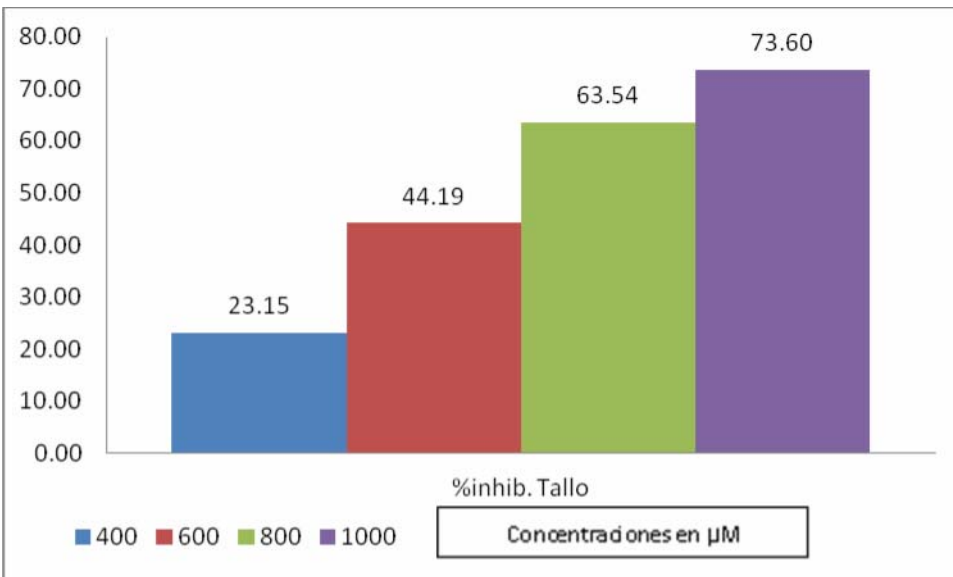
Gráfica 25: Efecto de la Santamarina en la elongación de la raíz del trigo en función de la concentración.



Gráfica 26: Efecto de la Santamarina en la inhibición de la elongación de la raíz del trigo en función de la concentración.



Gráfica 27: Efecto de la Santamarina en la elongación de la plántula del trigo en función de la concentración.

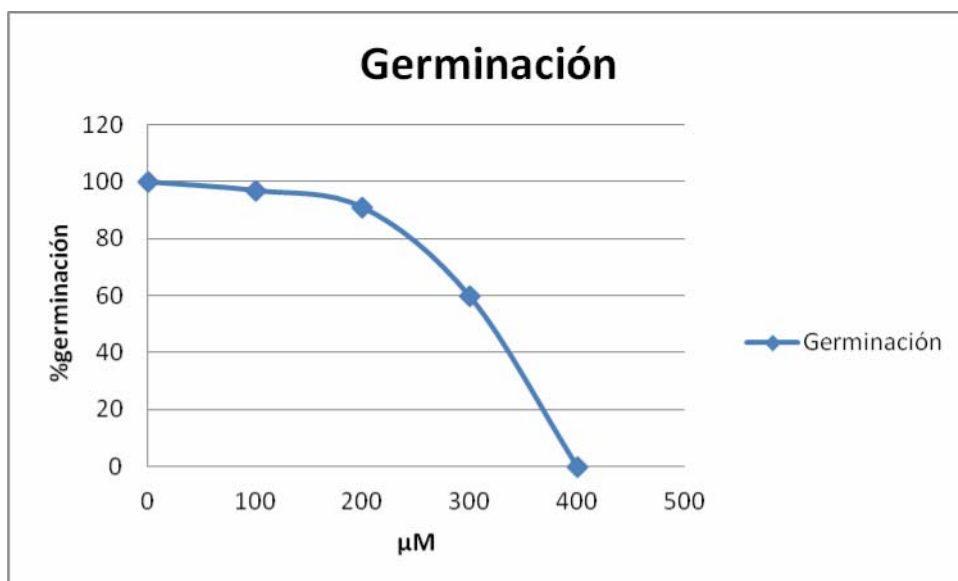


Gráfica 28: Efecto de la Santamarina en la inhibición de la elongación de la plántula del trigo en función de la concentración.

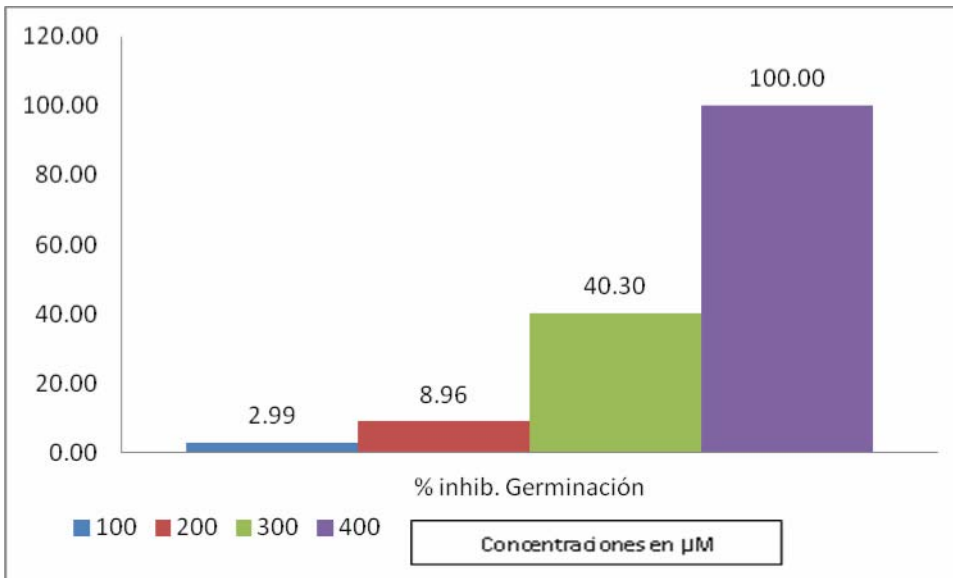
Semillas de amaranto (*Amaranthus hypocondriacus*) con Reynosina.

[μ M]	%Germinación	Raíz (cm.)	Tallo (cm.)	Peso H. (g.)	% inhib. Germinación	%inhib. Raíz	%inhib. Tallo
0	100	3.58	1.05	0.35			
100	97.01	3.02	1.02	0.32	2.99	15.52	2.72
200	91.04	1.49	0.72	0.19	8.96	58.29	31.36
300	59.70	0.85	0.42	0.08	40.30	76.26	59.90
400	0	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00	100.00

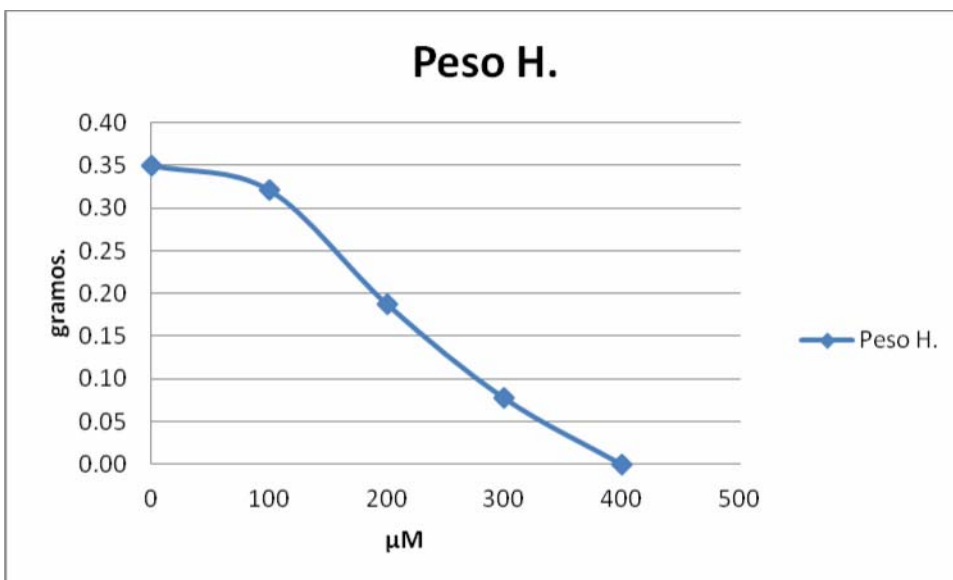
Tabla 7: Resultados del amaranto tratado con la lactona sesquiterpénica Reynosina.



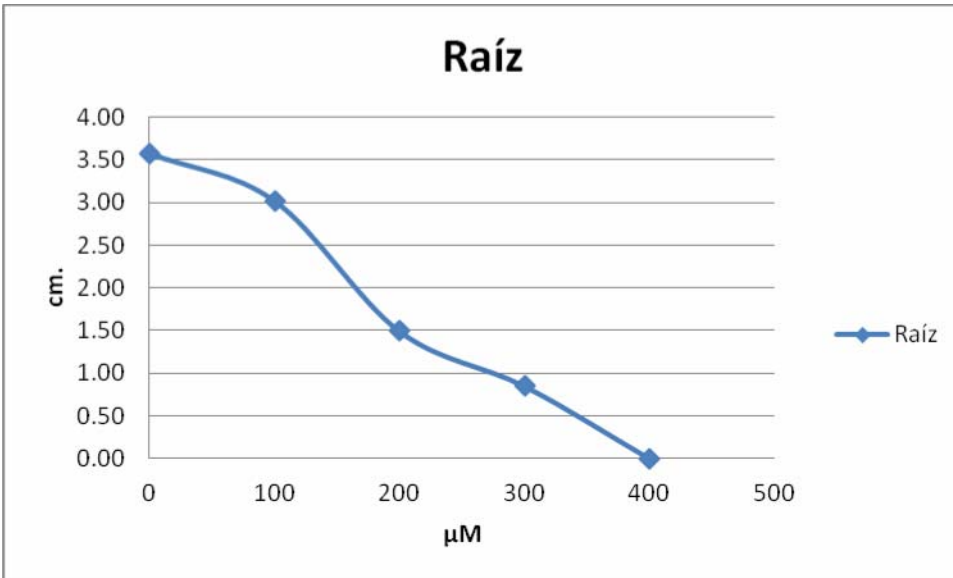
Gráfica 29: Efecto de la Reynosina en la germinación del amaranto en función de la concentración.



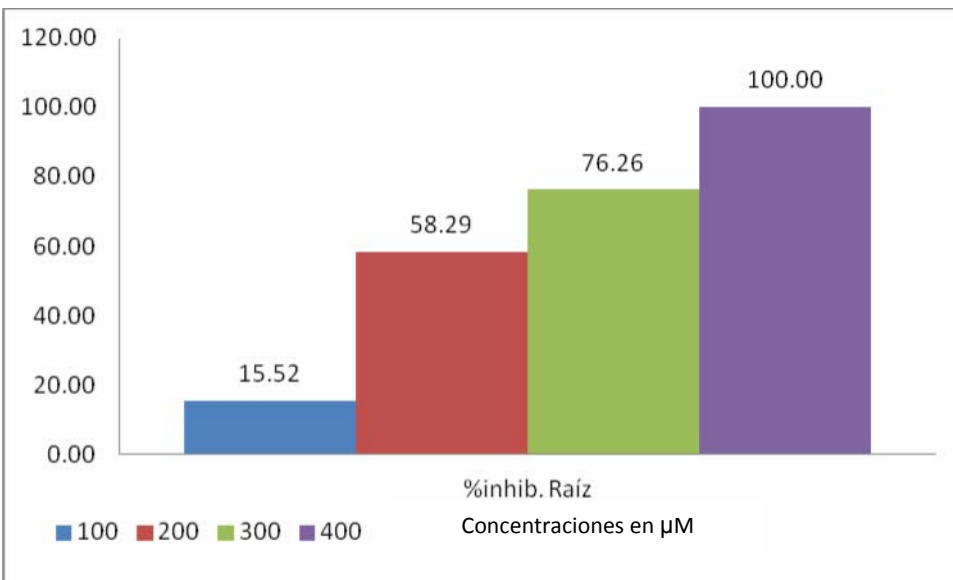
Gráfica 30: Efecto de la Reynosina en la inhibición de la germinación del amaranto en función de la concentración.



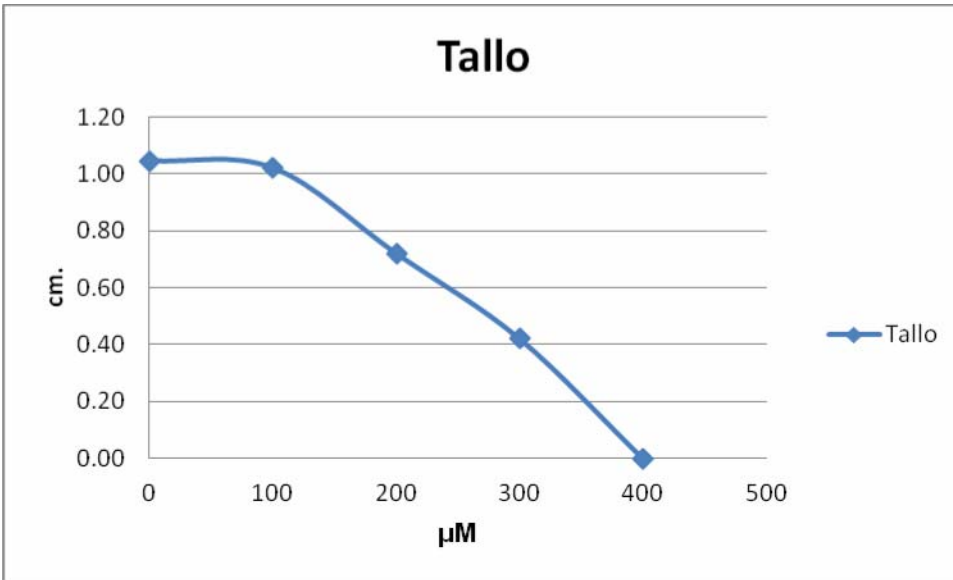
Gráfica 31: Efecto de la Reynosina en el peso húmedo del amaranto en función de la concentración



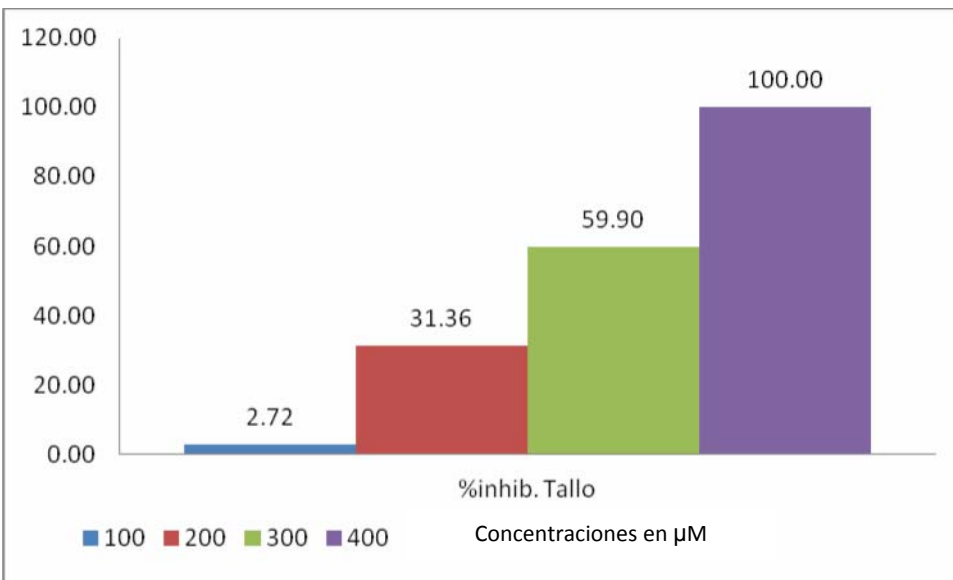
Gráfica 32: Efecto de la Reynosina en la elongación de la raíz del amaranto en función de la concentración.



Gráfica 33: Efecto de la Reynosina en la inhibición de la elongación de la raíz del amaranto en función de la concentración.



Gráfica 34: Efecto de la Reynosina en la elongación del tallo en amaranto en función de la concentración.

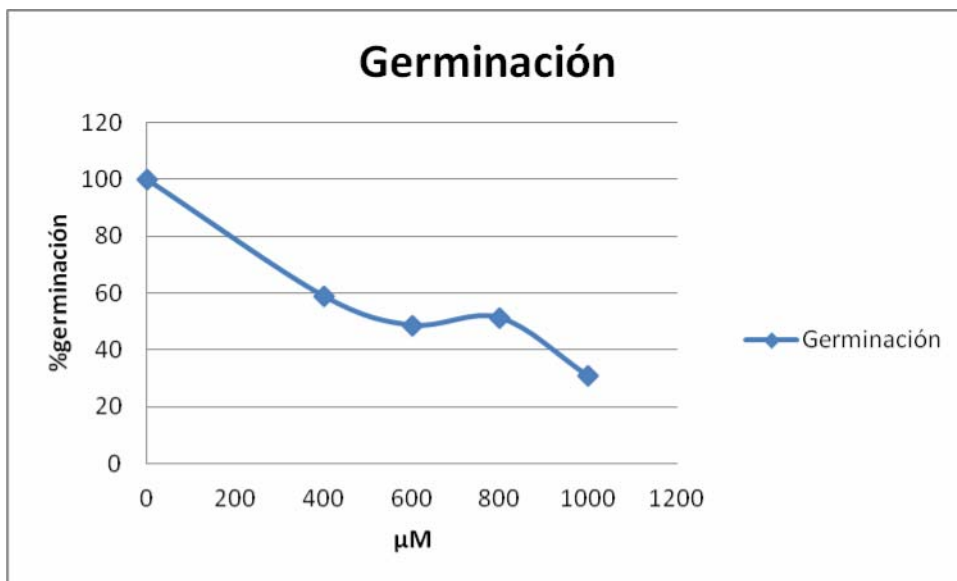


Gráfica 35: Efecto de la Reynosina en la inhibición de la elongación del tallo en amaranto en función de la concentración.

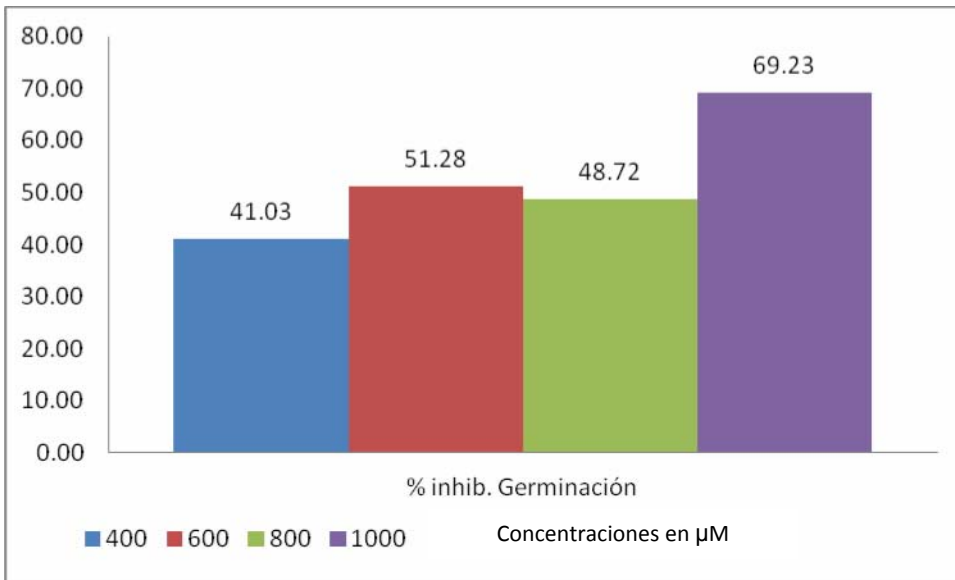
Semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) tratadas con Reynosina.

[μ M]	%Germinación	Raíz (cm.)	Tallo (cm)	Peso H. (g.)	% inhib. Germinación	%inhib. Raíz	%inhib. Tallo
0	100	3.84	2.66	0.57			
400	58.97	3.99	2.87	0.33	41.03	-3.79	-8.03
600	48.72	3.47	2.47	0.28	51.28	9.72	7.27
800	51.28	3.20	2.50	0.32	48.72	16.67	6.20
1000	30.77	2.73	1.78	0.15	69.23	28.98	33.27

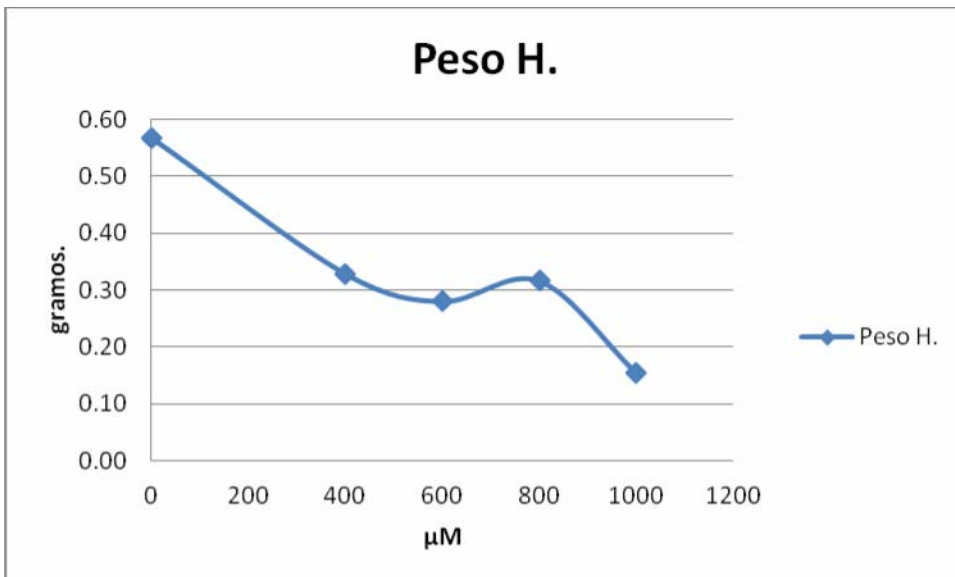
Tabla 8: Resultados de la lechuga tratada con la lactona sesquiterpénica Reynosina.



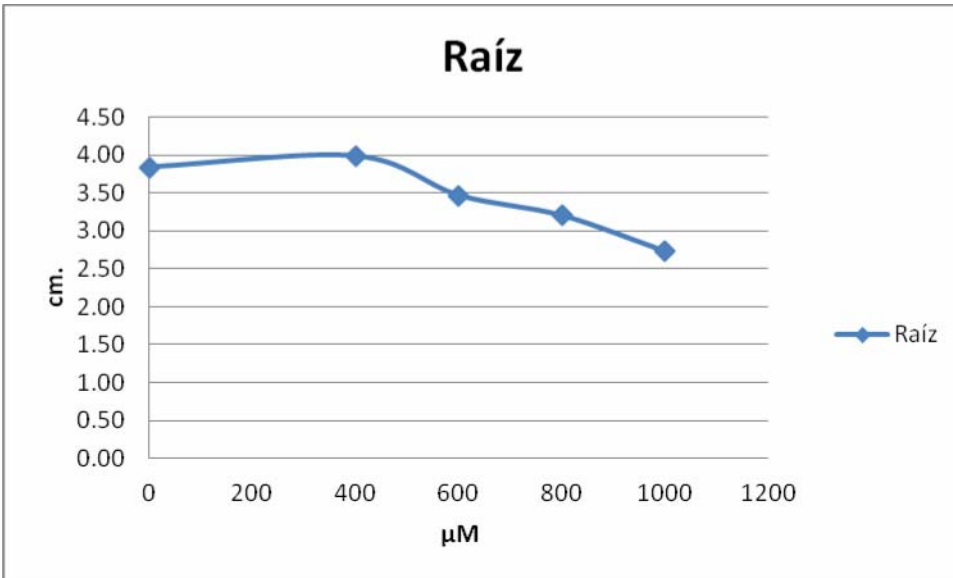
Gráfica 36: Efecto de la Reynosina en la germinación de la lechuga en función de la concentración.



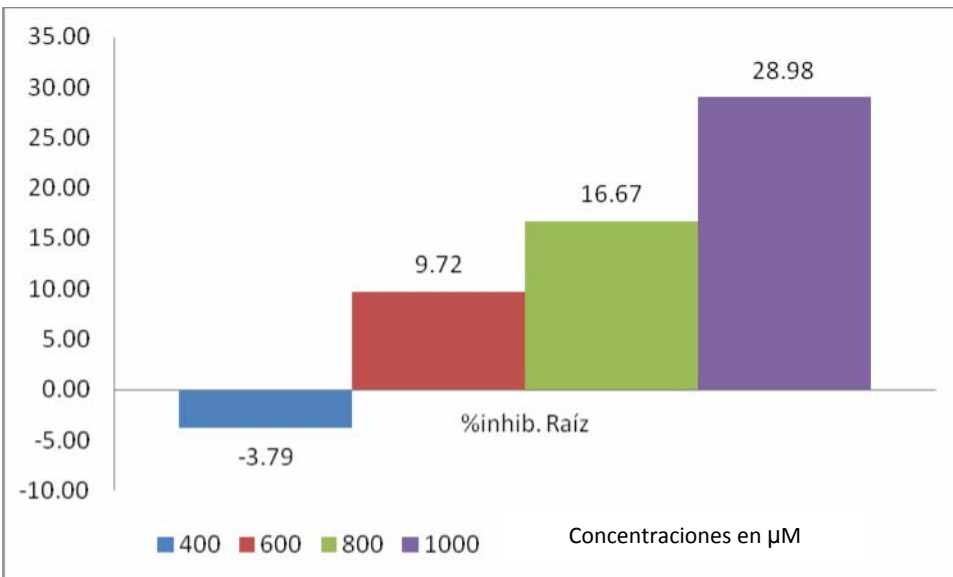
Gráfica 37: Efecto de la Reynosina en la inhibición de la germinación de la lechuga en función de la concentración.



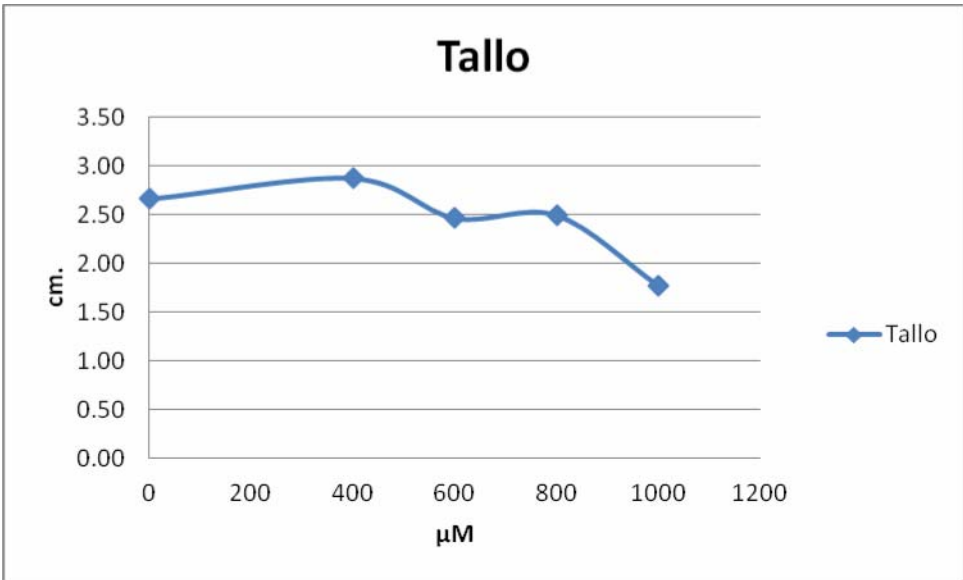
Gráfica 38: Efecto de la Reynosina en el peso húmedo de la lechuga en función de la concentración.



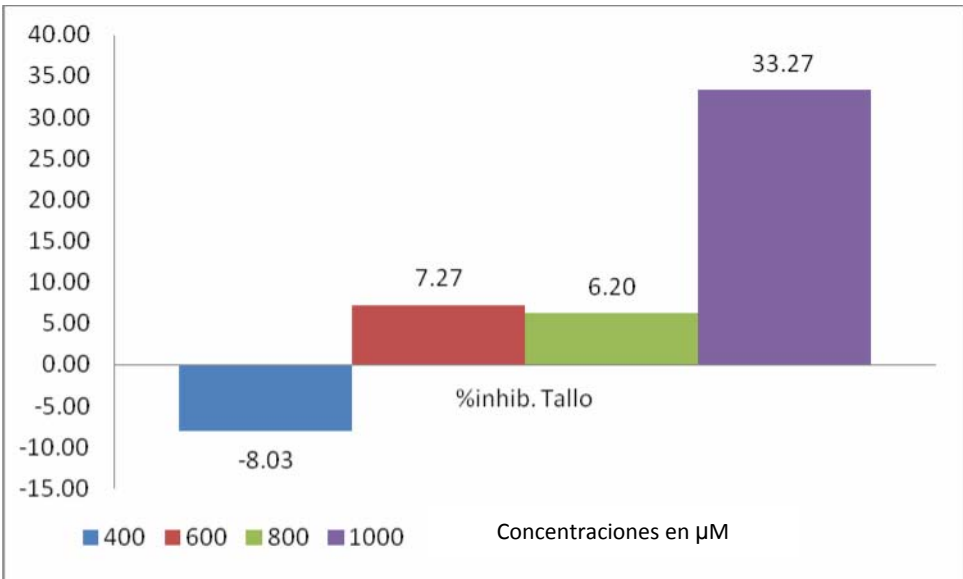
Gráfica 39: Efecto de la Reynosina en la elongación de la raíz en la lechuga en función de la concentración.



Gráfica 40: Efecto de la Reynosina en la inhibición de la elongación de la raíz de la lechuga en función de la concentración.



Gráfica 41: Efecto de la Reynosina en la elongación del tallo en la lechuga en función de la concentración.

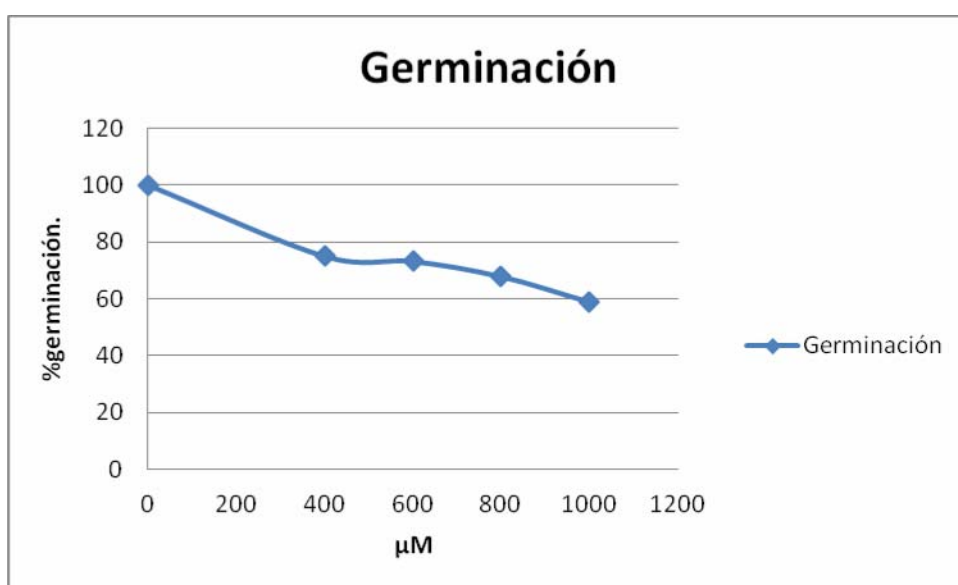


Gráfica 42: Efecto de la Reynosina en la inhibición de la elongación del tallo de la lechuga en función de la concentración.

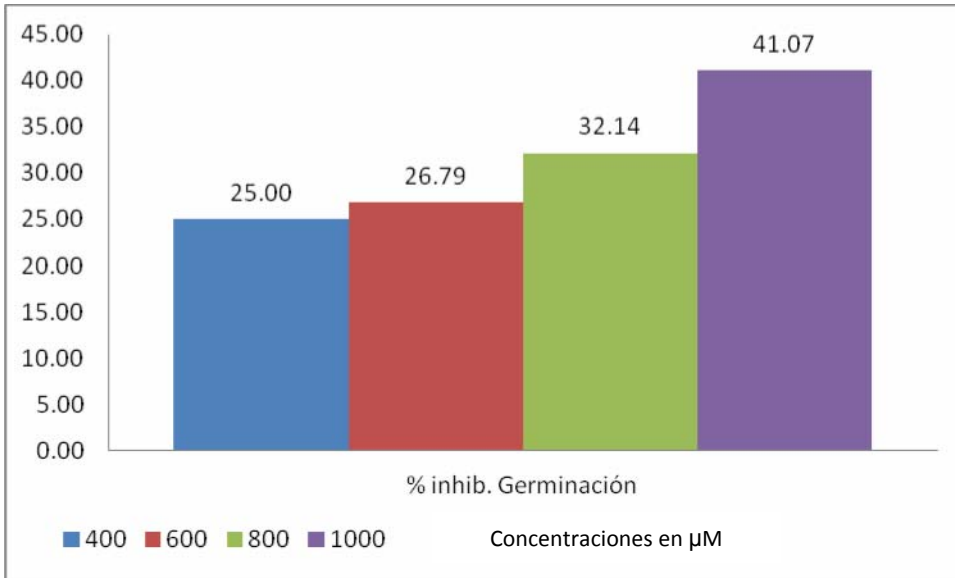
Semillas de pasto (*Lolium multiflorum*) tratadas con Reynosina.

[μM]	%Germinación	Raíz (cm.)	Tallo (cm)	Peso H.(g)	% inhib. Germinación	%inhib. Raíz	%inhib. Tallo
0	100	3.73	2.98	0.84			
400	75	1.77	2.18	0.46	25.00	52.44	26.98
600	73.21	0.88	2.11	0.51	26.79	76.43	29.06
800	67.86	0.47	1.41	0.41	32.14	87.46	52.51
1000	58.93	0.45	1.00	0.32	41.07	87.89	66.43

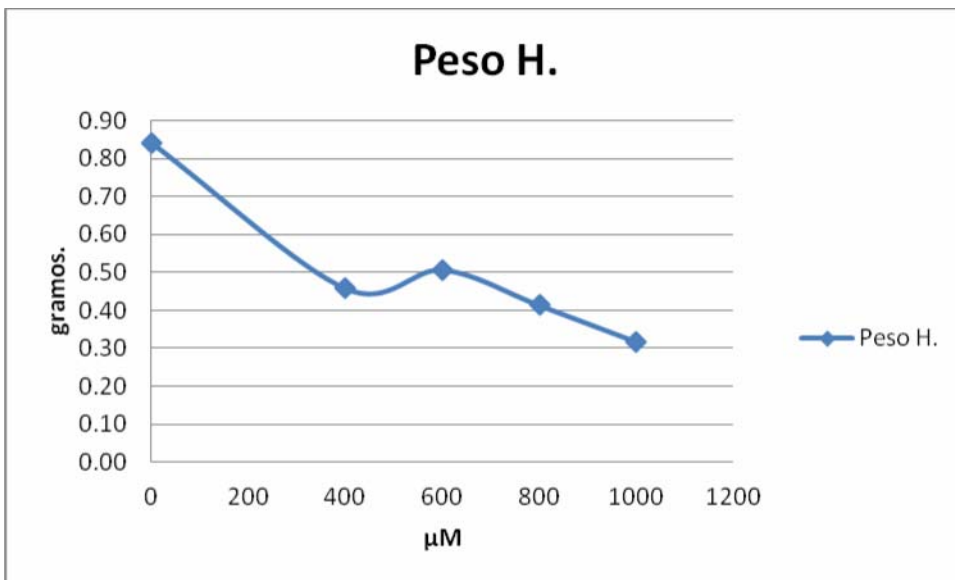
Tabla 9: Resultados del pasto tratado con la lactona sesquiterpénica Reynosina.



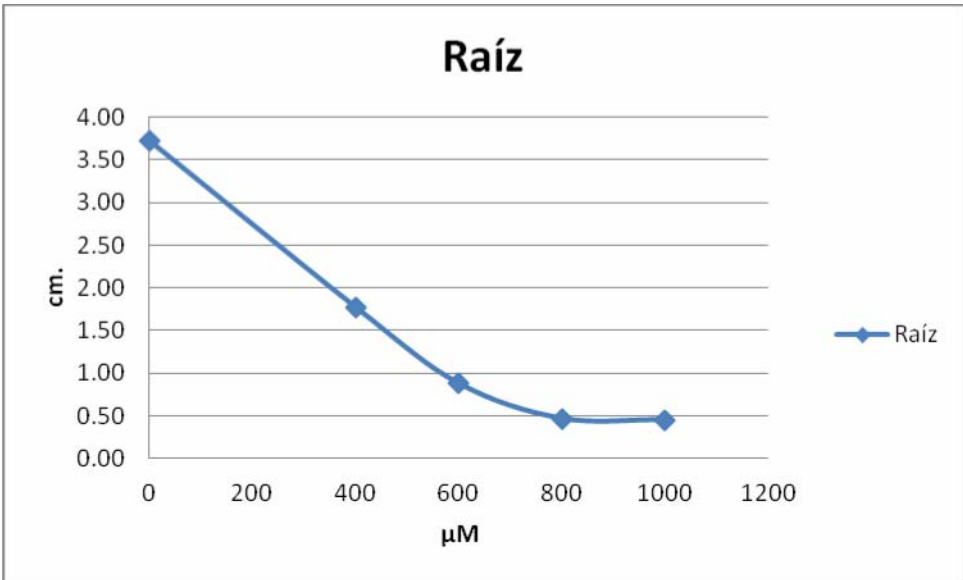
Grafica 43: Efecto de la Reynosina en la germinación del pasto en función de la concentración.



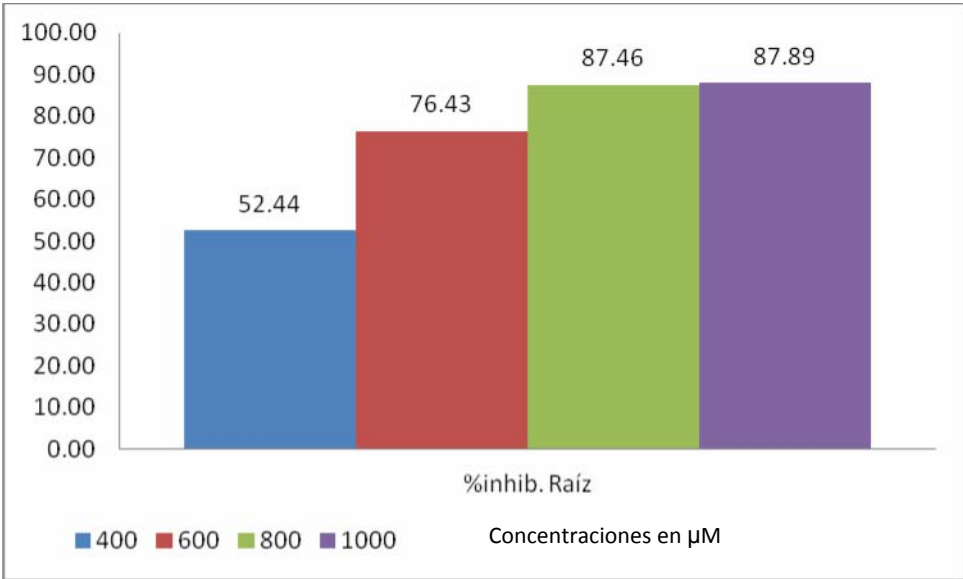
Gráfica 44: Efecto de la Reynosina en la inhibición de la germinación del pasto en función de la concentración.



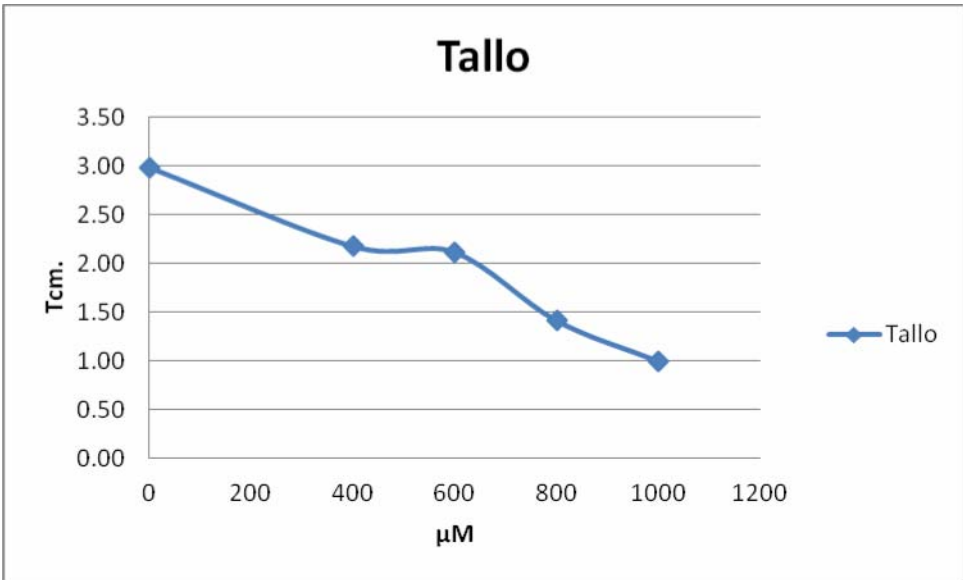
Gráfica 45: Efecto de la Reynosina en el peso húmedo del pasto en función de la concentración.



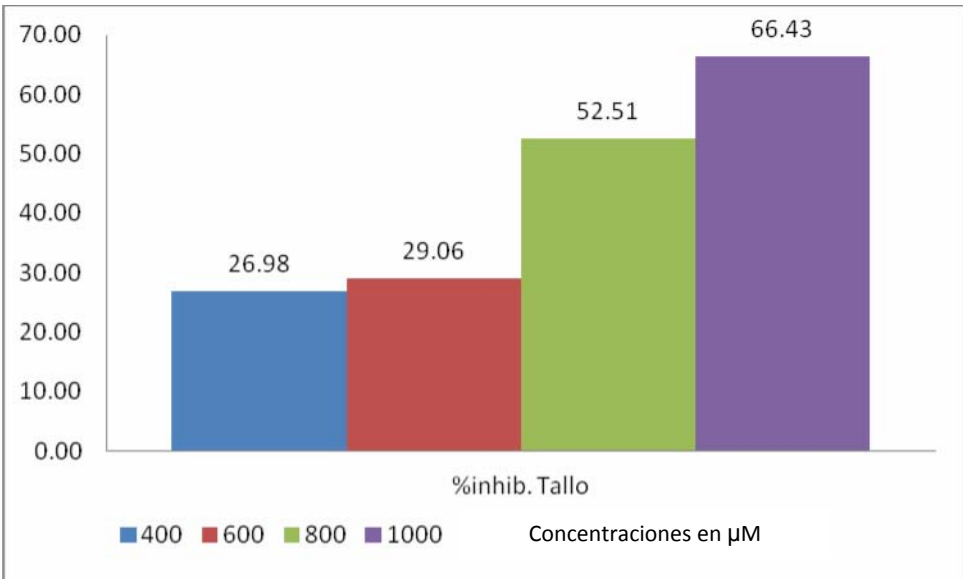
Gráfica 46: Efecto de la Reynosina en la elongación de la raíz del pasto en función de la concentración.



Gráfica 47: Efecto de la Reynosina en la inhibición de la elongación de la raíz del pasto en función de la concentración.



Gráfica 48: Efecto de la Reynosina en la elongación del tallo en pasto en función de la concentración.

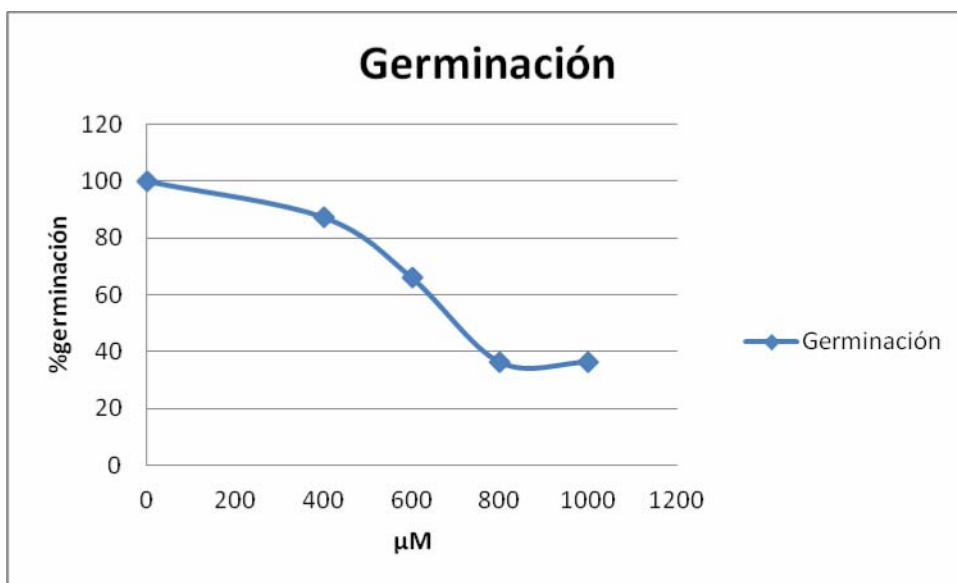


Gráfica 49: Efecto de la Reynosina en la inhibición de la elongación del tallo del pasto en función de la concentración.

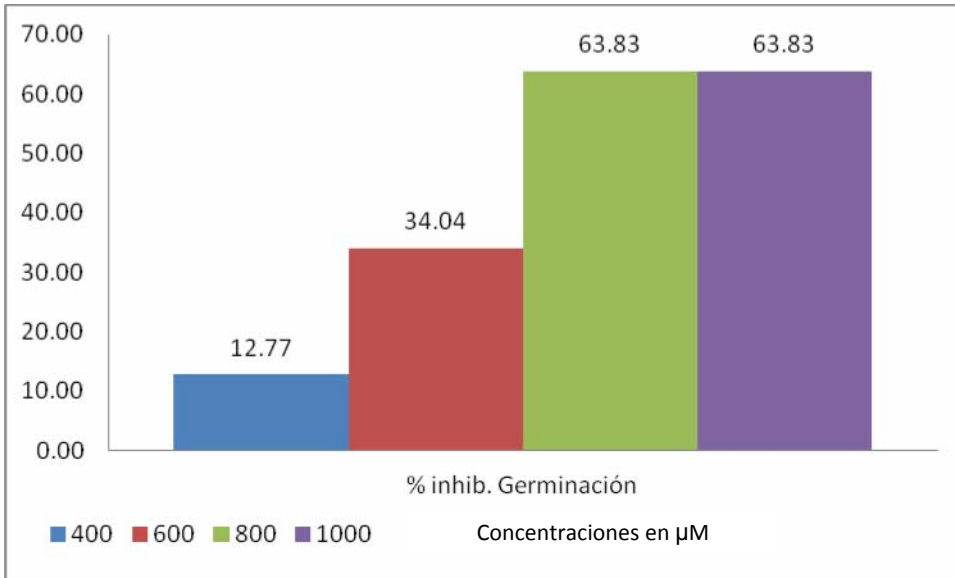
Semillas de trigo (*Triticum vulgare*) tratadas con Reynosina.

[]	Germinación	Raíz (cm)	Tallo (cm)	Peso H. (g)	% inhib. Germinación	%inhib. Raíz	%inhib. Tallo
0	100	9.26	5.06	7.30			
400	87.23	5.07	4.42	5.41	12.77	45.24	12.61
600	65.96	3.23	3.14	3.78	34.04	65.16	37.89
800	36.17	2.08	2.34	1.50	63.83	77.50	53.84
1000	36.17	2.04	2.00	1.85	63.83	77.96	60.47

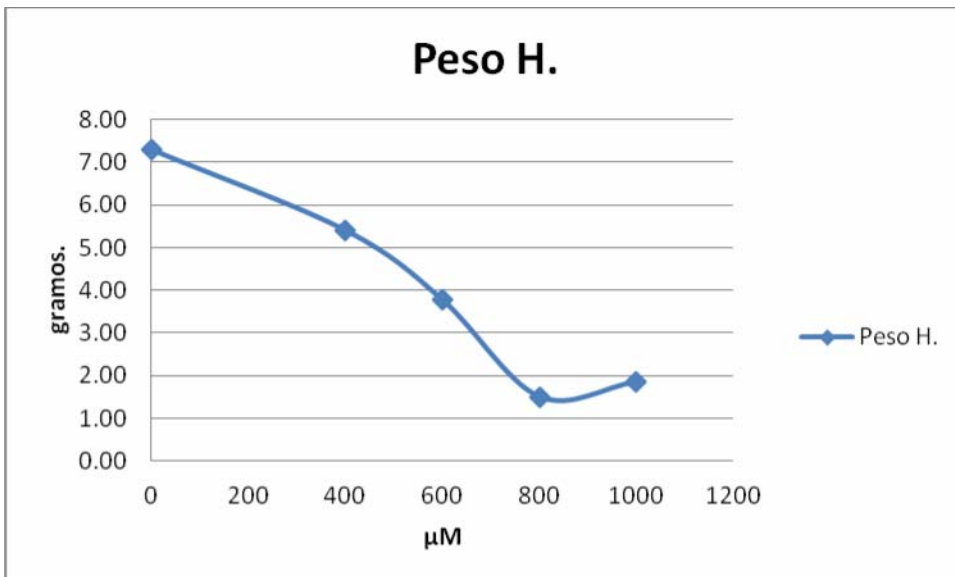
Tabla 10: Resultados del trigo tratado con la lactona sesquiterpénica Reynosina.



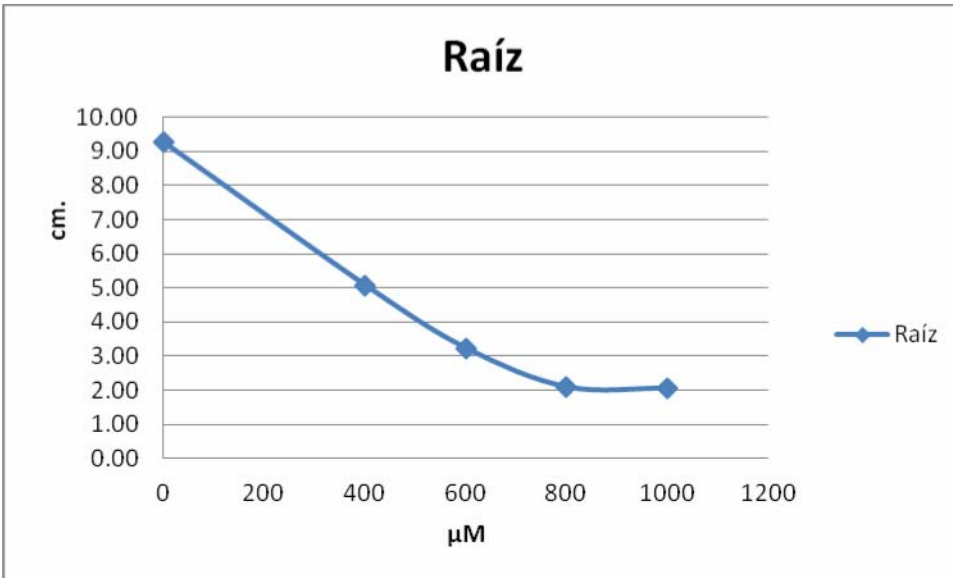
Gráfica 50: Efecto de la Reynosina en la germinación del trigo en función de la concentración.



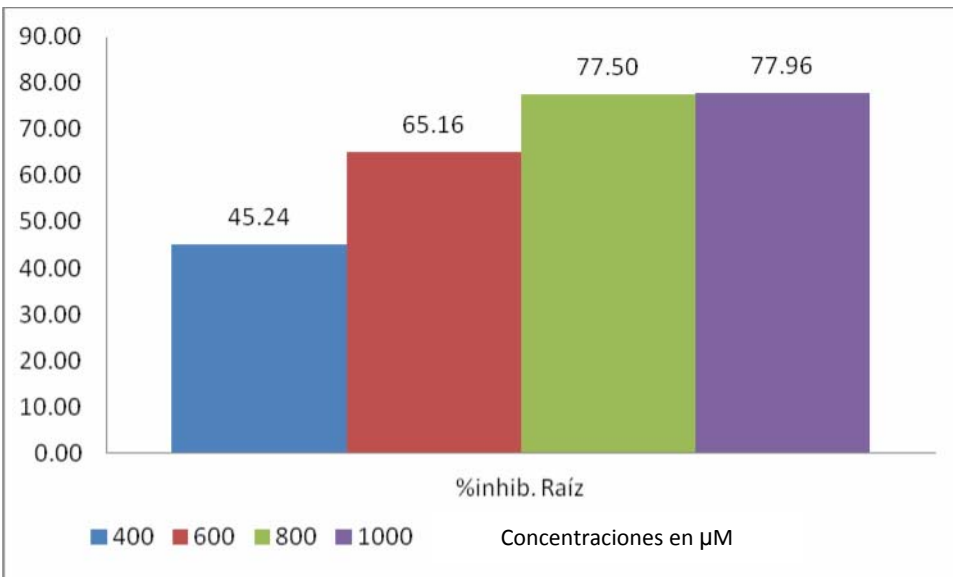
Gráfica 51: Efecto de la Reynosina en la inhibición de la germinación del trigo en función de la concentración.



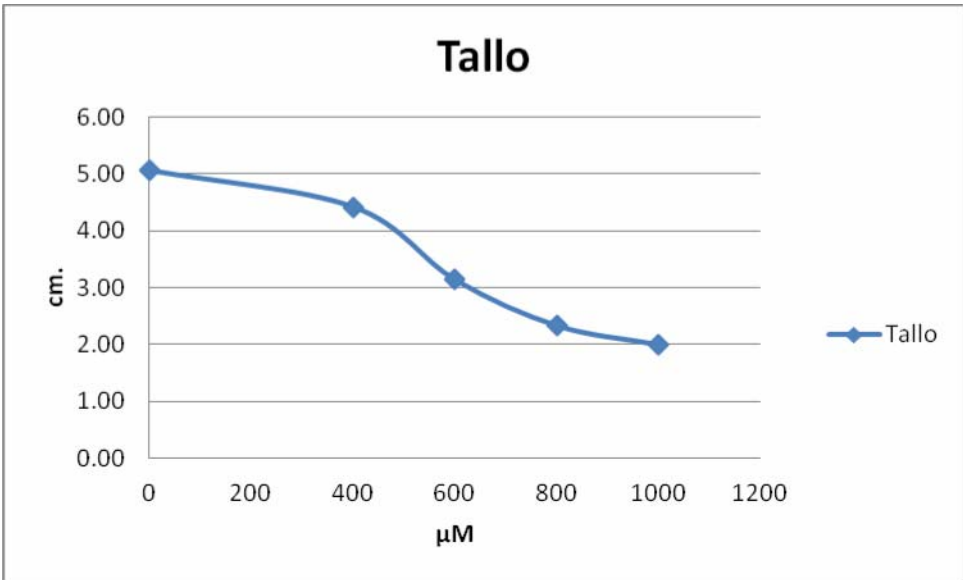
Gráfica 52: Efecto de la Reynosina en el peso húmedo del trigo en función de la concentración.



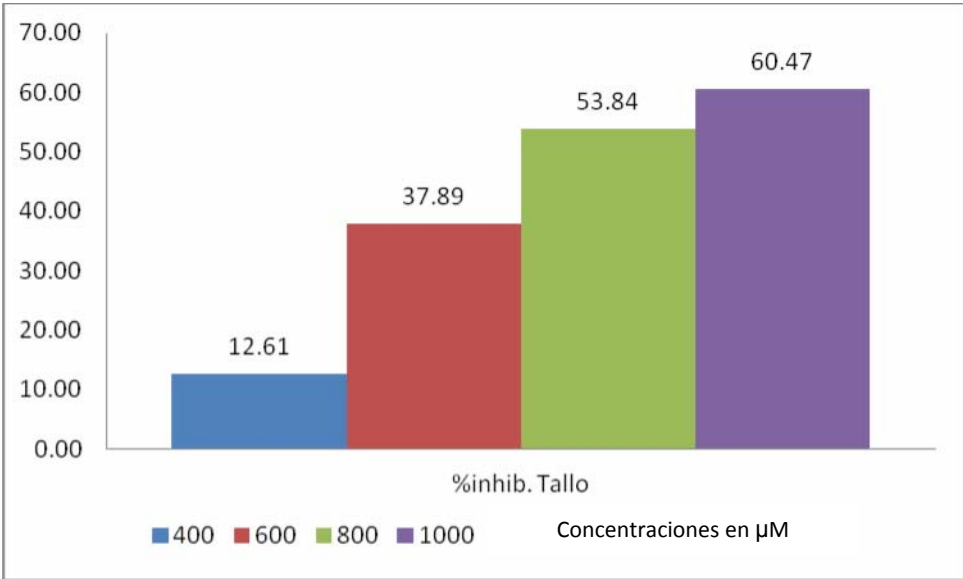
Gráfica 53: Efecto de la Reynosina en la elongación de la raíz del trigo en función de la concentración.



Gráfica 54: Efecto de la Reynosina en la inhibición de la elongación de la raíz del trigo en función de la concentración.



Gráfica 55: Efecto de la Reynosina en la elongación del tallo en trigo en función de la concentración.



Gráfica 56: Efecto de la Reynosina en la inhibición de la elongación del tallo del trigo en función de la concentración.

Discusión de resultados.

En las semillas de amaranto se notó una actividad inhibitoria muy pronunciada de la Santamarina y de la Reynosina, por lo que se decidió trabajar a concentraciones más bajas con respecto a las otras semillas. La semilla de amaranto es muy sensible al efecto alelopático de las dos lactonas, siendo mayor el efecto inhibitorio de la Santamarina que de la Reynosina. Con ambos compuestos a una concentración de 400 μM se alcanza el 100% de inhibición en germinación, pero a una concentración de 300 μM los porcentajes de inhibición son más elevados en la lactona sesquiterpénica Santamarina.

En las semillas de lechuga las dos lactonas en las concentraciones de 400 μM , se observó un crecimiento de la raíz y el tallo pero una inhibición de la germinación. A la concentración más alta que era de 1000 μM , la Reynosina mostró un máximo de inhibición de 69% en la germinación de las semillas de lechuga, mientras que las semillas tratadas con Santamarina mostraron un 43% de inhibición. Para lechuga la Reynosina mostró una mayor inhibición que la Santamarina. El efecto de estas lactonas en la inhibición del tallo y raíz, fue mayor, ya que a la concentración de 1000 μM la Santamarina presentó una inhibición de 92% para raíz y 73% para tallo, mientras que la Reynosina a la misma concentración, mostró una inhibición de 87% para raíz y 66% para tallo. Estos resultados confirman que la lactona Santamarina es más activa que la Reynosina.

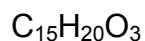
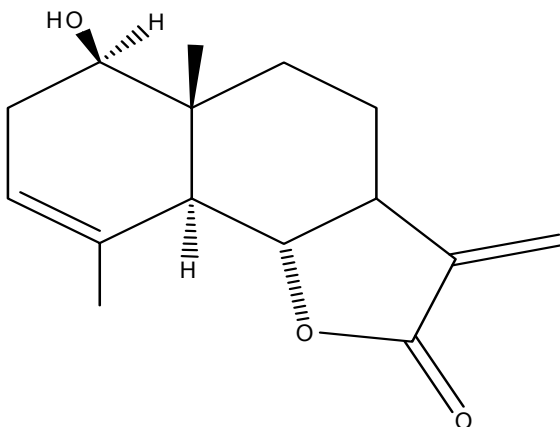
En las semillas de pasto se observó un efecto de inhibición de la germinación siendo mayor el efecto en las semillas tratadas con Santamarina que las tratadas con Reynosina. El efecto inhibitorio sobre las semillas de pasto fue menor al mostrado en las semillas de amaranto y trigo, indicando que estas semillas son más sensibles que las de pasto.

Por último en las semillas de trigo se observó también una mayor actividad inhibitoria de la germinación de la Santamarina, puesto que a la concentración de 1000 μM las semillas tratadas con Santamarina presentaron una inhibición de la germinación del 86% mientras que en las semillas tratadas con Reynosina hubo una inhibición de la germinación del 63%. Las dos lactonas presentaron un efecto inhibitorio en el crecimiento de la raíz y del tallo.

Tipo de semillas	Semillas	Santamarina			Reynosina		
		Germinación	Raíz	Tallo	Germinación	Raíz	Tallo
Monocotiledóneas	Pasto.	62.79%	92.35%	73.74%	41.04%	87.89%	66.43%
	Trigo.	86.67%	80.23%	73.60%	63.83%	77.96%	60.47%
Dicotiledóneas	Lechuga.	43.40%	22.62%	21.43%	69.23%	28.98%	33.27%
	Amaranto.	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabla 11: Los resultados del bioensayo están expresados en % de inhibición.

Santamarina.



PM= 248 g/mol.

Sólido blanco cristalino

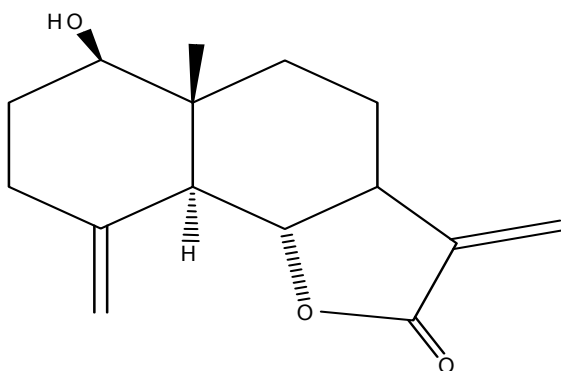
Punto de fusión=130-132 °C

1β-Hidroxi-santa-3,11(13)-dien-5,12-olido C

IR (CHCl₃) γ_{max}, cm⁻¹: 3500 (hidroxilo), 3006 (enlace C-H), 1765 (carbonilo de γ-lactona en anillo de 5 miembros).

RMN ¹H (CDCl₃), (300 Mhz), 6.05 ppm (1H, dJ= 3.2 Hz, H-13); 5.38ppm (1H, dJ=2.9 Hz, H-13); 5.32 ppm (1H, s, a, H-3); 3.92 (1H, t, J= 11.1 Hz, H-6); 3.65 (1H, d,dJ =6.5, 9.8Hz H-1); 1.81 ppm (3 H, s, a, H-15); 2.47 ppm (1H, m, H-7); 0.85 ppm (3H, s, H-14).

Reynosina.



$C_{15}H_{20}O_3$

PM= 248 g/mol.

Sólido blanco cristalino

Punto de fusión=142-143 °C

1 β -Hidroxi-4(15),11(13)-eudesmadien-12,6 α -olido

IR ($CHCl_3$) γ_{max} , cm^{-1} : 3678, 3611, 3498 (hidroxilo), 3031(enlace CH), 1766 (carbonilo de γ -lactona en anillo de 5 miembros).

RMN 1H ($CDCl_3$), (300 MHz), 6.08 ppm (1H, dJ=3.2 Hz, H-13); 5.42 ppm (1HdJ=2.9 Hz, H-13'); 4.99 ppm (1H, s, a H-15); 4.86 ppm (1H, s, a, H-15'); 4.03 ppm (1H, t, J= 11.1 Hz, H-6); 3.53 ppm (1H, d, d, J=4.7, 11.4 Hz, H-1); 2.55 ppm (1H, m, H-7); 0.82 ppm (3H, s, H-14).

Conclusiones.

- ❖ Se lograron aislar y purificar las lactonas sesquiterpénicas Santamarina y Reynosina de la planta *Tanacetum parthenium*.
- ❖ Las dos lactonas sesquiterpénicas presentan actividad alelopática en todas las semillas que se utilizaron en el experimento.
- ❖ En amaranto las dos lactonas muestran buena actividad de inhibición de germinación, raíz y tallo, siendo mayor el efecto de la Santamarina que el de la Reynosina.
- ❖ La lechuga fue la semilla que mostró una resistencia al efecto de las dos lactonas, aunque igual mostró inhibición de germinación, raíz y tallo, pero el efecto era muy pequeño. Podemos decir que la lechuga, fue la semilla más resistente a los efectos alelopáticos de las lactonas sesquiterpénicas.
- ❖ El pasto no presentó un gran efecto de inhibición en la germinación, pero si presentó una gran actividad de inhibición en la raíz y el tallo. La lactona que presentó mayor efecto en esta semilla fue la Santamarina.
- ❖ En trigo hubo efecto de inhibición tanto en germinación como en raíz y tallo, siendo la Santamarina la lactona sesquiterpénica que tuvo mayor actividad alelopática.
- ❖ Por los resultados podemos decir que las semillas monocotiledóneas (pasto y trigo), presentan un mayor efecto de inhibición que las semillas dicotiledóneas (amaranto y lechuga); ya que la lechuga fue resistente a los efectos de las lactonas sesquiterpénicas, mientras que las semillas monocotiledóneas no.
- ❖ Ambas lactonas sesquiterpénicas tienen actividad alelopática, siendo la Santamarina la que presentó mayor actividad en las semillas de amaranto, pasto y trigo, mientras que para la lechuga la Reynosina fue la que presentó mayor actividad inhibitoria en la germinación.

Bibliografía.

- 1.- Romo de Vivar A. Productos naturales de la flora mexicana. Edit Limusa México (1985).
- 2.- Dixon R. Nature, 2001 , 411, 843.
- 3.-Macías F. A., Galindo J. C., Castellano D., and Velasco R.F.; Sesquiterpene Lactones with Potencial use as Natural herbicide Models. 2. Guaianolides, J. Agric Food Chem. (2000) 48, 5288-5296.
- 4.-http://www.angelfire.com/ia2/ingenieriagricola/alelopatia.htm#_1._Concepto_y_1
- 5.- Dyan F. E., Romagni, J. G., And Duke S. O. Investigation the mode action of natural phytotoxins. Journal of chemical Ecology (2000) 26, 2079-2094.
- 6.- Waterhouse D., Carman W.J., Schottenfeld D., Gridley G., MacLean S. Cancer. (1996) 77, 763-770.
- 7.- Bourguet D., Genissel A., Raymond M., J. Econ. Entomol. (2000) 93, 1588-1595.
- 8 .- Hewlett, M. J. Begley. M. J., Groenewegen, A., Heptinstall, S., Knigth D. W., May J., Salan U. And Toplis D. (1996) J. Chem. Soc., Perkin Trans 1, 1979-1986.
- 9.- Fisher, N. H. In the science of Allelopathy; Putnam, A. R., Tang, C. S., eds.; Wiley: New York, 1986; Pag. 203-218.
- 10.- www.manualdelombricultura.com/glosario/pal/203.html
- 11.- Rojas Garcidueñas Manuel, Gámez González Hilda Herbicidas de origen natural Abril- Junio 2002 Ciencia UANL vol. V No 2 160-164.
- 12.- <http://docencia.udea.edu.co/~farmacogfit/Sesquiterpenlactonas/>
- 13.- 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 assenssment of biological activities and structure relationships. Rec. Adv. Phytochem. (1995) 29, 333-356.
- 14.- J Azcon- Bieto, M. Talón Fundamentos de fisiología vegetal 2° edición Mc Graw Hill 2008 España.
- 15.- Salisbury Frank B. y Ross Thomson Cleon W. Fisiología de las plantas Vol. 3 Editores España.

- 16.- Morrison y Boyd; Química orgánica; Pag. 859 Quinta edición, Ed. Pearson educacion.
- 17.- Batish, D.R.; Singh, H.P.; Kohli, R.K.; Saxena, D.B.; Kaur, S. 2002: Allelopathic effects of parthenin against two weedy species, *Avena fatua* and *Bidens pilosa*. *Environ. Exp. Bot.* 47: 149-155.
- 18.- Galindo Juan C.G., De Luque Alejandro P., Jorrín Jesus and Macías Francisco A.; SAR Studies of Sesquiterpene Lactones as *Orobanche cumana* Seed; Germination Stimulants *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 1911-1917.
- 19.- Lallana María del C., Elizalde José H., Billard Cristina E., Lallana Víctor H.; Germination bioassay of *Lactuca sativa* (L.): to determine water quality in irrigation dams. *Rev. FCA UNCuyo. Tomo XL. N° 1. Año 2008.* 29-38.
- 20.- Hidalgo José Celis, Sandoval Estrada Marco, Briones Luengo Mario; BIOENSAYOS DE FITOTOXICIDAD DE RESIDUOS ORGÁNICOS EN LECHUGA Y BALLICA ANUAL REALIZADOS EN UN SUELO ALFISOL DEGRADADO; *J. Soil Sc. Plant Nutr.* 7 (3) 2007 (51-60)
- 21.- Mansaray, M. *Chem.* 2000, 677-678.
- 22.- Macías Francisco A., Juan C. G. Galindo, Diego Castellano, and Raú I F. Velasco; Sesquiterpene Lactones with Potential Use as Natural Herbicide Models (I): trans,trans-Germacranolides; *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 4407-4414
- 23.-Ottaway, P. B. *Chem.* 2001 42-44.
- 24.- Macias, F.A.; Molinillo, J.M.G.; Galindo, J.C.G.; Varela, R.M.; Simonet, A.M.; Castellano, D. 2001: The use of allelopathic studies in the search for natural herbicides. *J. Crop. Prod.* 4: 237-255.
- 25.- Seyhan Ege; Química orgánica Estructura y Reactividad: Pag. 658, 659, Ed Reverté, S.A.
- 26.- T. W. Gram. Solomons; Química orgánica Pag. 947-949, Ed Limusa Wiley, Segunda edición.
- 27.- D. R. Batish, H.P. Singh, D.B. Saxena and R.K. Kohli; Weed suppressing ability of Parthenin-a sesquiterpene lactone from *Parthenium Hysterophorus* ; *New Zealand Plant Protection Society* (2002) 218-221
- 28.- Ji Young Choi , MinKyun Na, In Hyun Hwang, Seung Ho Lee, Eun Young Bae, Bo Yeon Kim and Jong Seog Ahn; Isolation of Betulinic Acid, its Methyl Ester and

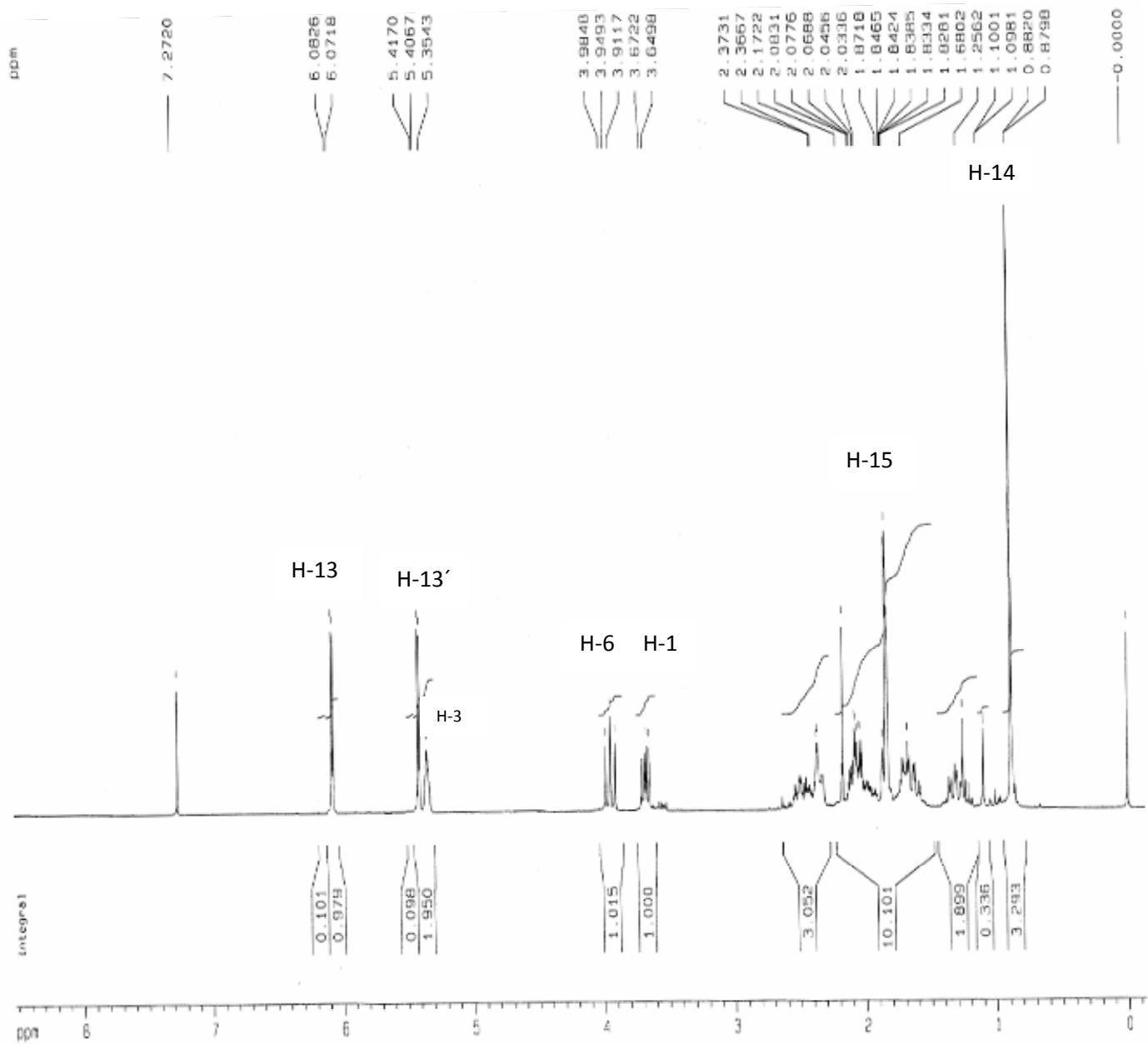
Guaiane Sesquiterpenoids with Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitory Activity from the Roots of *Saussurea lappa* C.B.Clarke; *Molecules* 2009, 14, 266-272.

29.-Simone de Marino, Nicola Borbone, Franco Zollo, Angela Lanaro, Paola Di Meglio, María Iorizzi; New sesquiterpene lactones from *Laurus nobilis* Leaves as inhibitors of Nitric Oxide Production; *Planta Med* 2005; 71: 706-710.

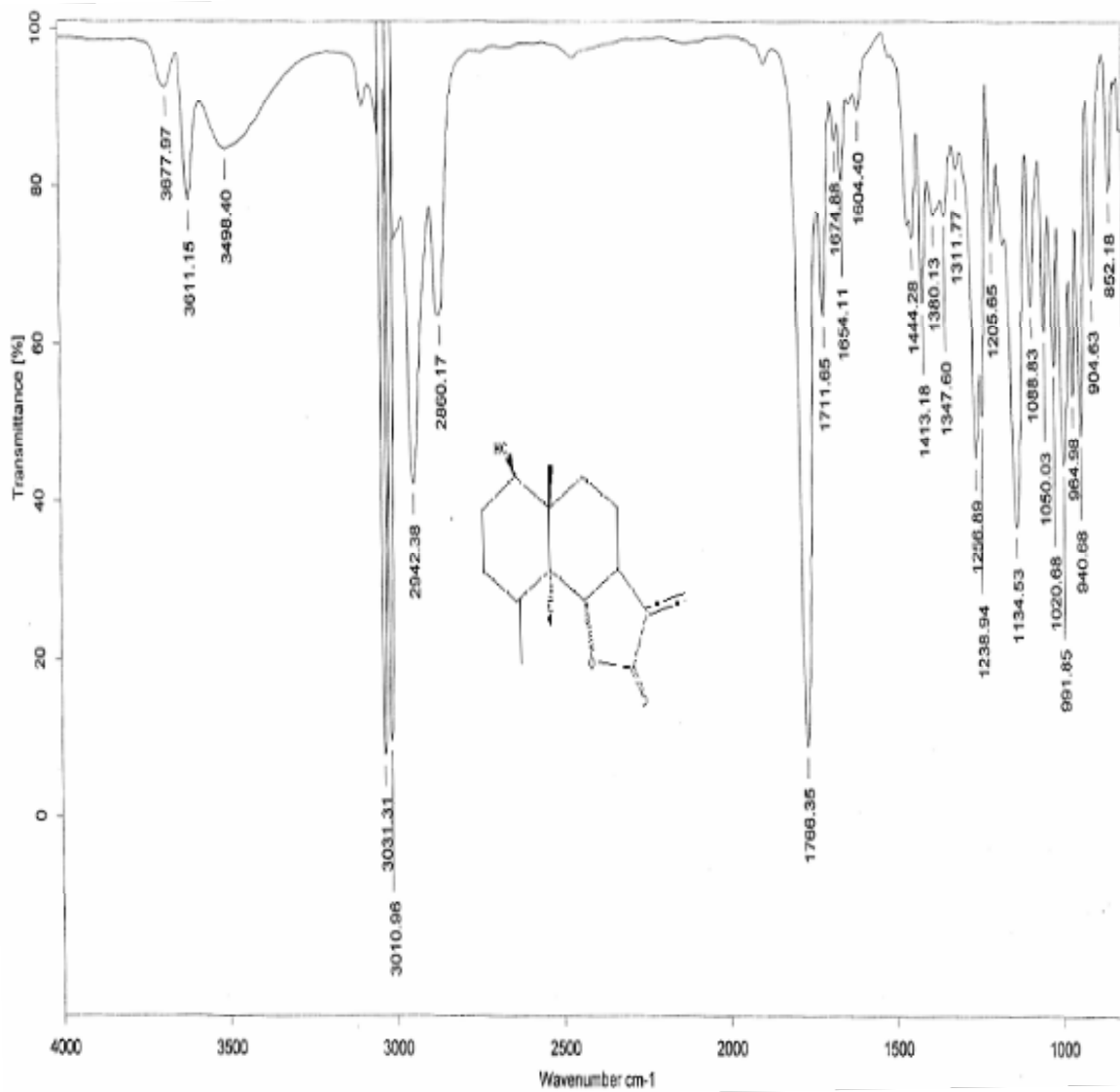
Anexo.



Espectro 1: Infrarrojo de la Santamarina.

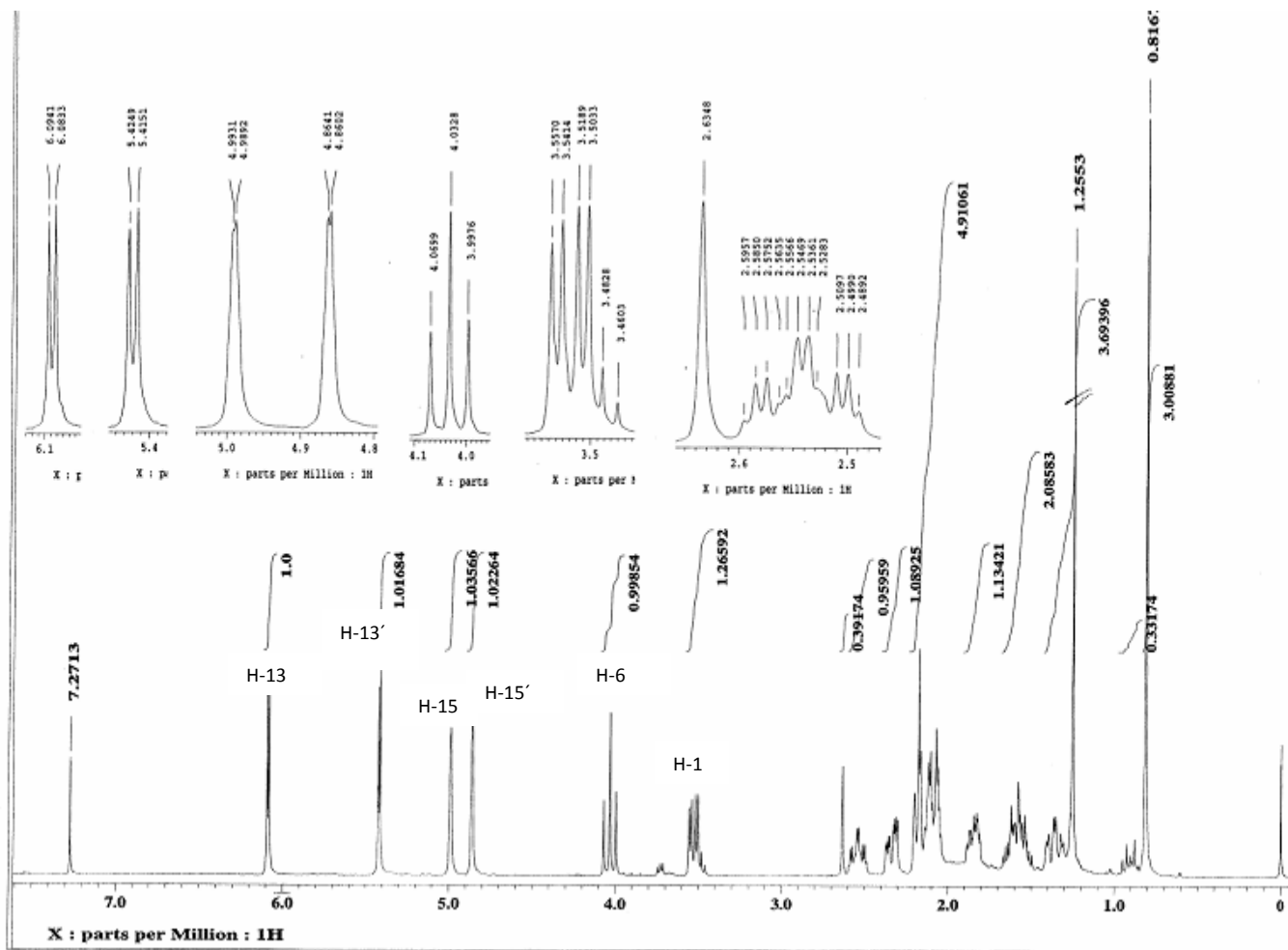


Espectro 2: RMN ^1H (CDCl_3 300 MHz) Santamarina.



Espectro 3: IR de la Reynosina.

H-14



Espectro 4: RMN ¹H (CDCl₃ 300 MHz) Reynosina.