

Esta página está disponible en los siguientes idiomas:



Abstract Licencia Creative Commons

**Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0
Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)**

Este es un resumen legible por humanos de (y no un sustituto) de la licencia .

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

Adaptar — remezclar, transformar y construir a partir del material

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .



CompartirIgual — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, debe distribuir su contribución bajo la misma licencia del original.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable .

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad o derechos morales pueden limitar la forma en que utilizan el material.



**TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**ESTRATEGIAS EN PRODUCTOS NATURALES DE LA
FAMILIA
ASTERACEAE: AISLAMIENTO, TRANSFORMACIONES
SINTÉTICAS Y SÍNTESIS TOTAL DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS.**

Lic. Ezequiel Alberto Falchi

Córdoba, 2014

BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUIMICAS

natura .. ^{A-1}

ingreso .. 584.55

.. ^F

libros .. 12424

.. ..

.. Donación del A

.. ..

.. ..

.. ..

.. ..

.. 7/7/2014

			
--	--	--	--

El presente trabajo de tesis doctoral fue realizado en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba y en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV - CONICET-UNC).

DIRECTORA DE TESIS

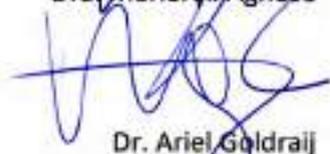


Dra. Virginia E. Sosa

MIEMBROS DE LA COMISIÓN DE TESIS



Dra. Mariel A. Agnese



Dr. Ariel Goldraj



Dr. Roberto A. Rossi

EVALUADOR EXTERNO



Dr. José Roberto Saad

Antes de que el lector comience con esta sección, quiero aclarar que si he omitido a alguna persona, institución, entidad, etc. en esta larga lista es solamente debido a cuestiones de mala memoria y pido disculpas por ello. Por otro lado, el orden de aparición no posee significancia alguna.

A FONCyT y CONICET por las becas de posgrado. A FONCyY y SeCyT por financiar nuestros proyectos.

A la Universidad Nacional de Córdoba, y a la Facultad de Ciencias Químicas, por educarme y formarme en investigación y hacerme descubrir una hermosa vocación como es la docencia.

A Mariel, Ariel y Roberto... mi comisión de tesis. Por su tiempo y dedicación, por seguir paso a paso este proceso lleno de aciertos y desatinos. Por sus sugerencias, las cuales desde cada punto de vista enriquecieron este humilde trabajo.

A Roberto Saad, por aceptar y asumir el compromiso de ser el evaluador externo.

A todo el grupo de productos naturales, el cual se transformó en una especie de familia muy particular:

A Virginia E. Sosa, mi directora, por brindarme la oportunidad de realizar investigación en esta gran familia.

A "la Adri" por los consejos experimentales y a "la Vivi" por la ayuda espectroscópica. Al "Doc" Oberti y a Raúl por dirigir y asesorar el trabajo paralelo titulado "Como sobrevivir en el grupo de Productos Naturales".

A mis compañeros, por la complicidad, y tanto tiempo compartido: A Manu, por los conciertos ligeros de música popular; A Silvia, por sus detallados relatos; A Carina, "la más grossa", por todas las sugerencias; Fátima, por su empeño en aprender Cordobés; A Gaby por su cálida compañía; A Ana, "que es piola"; A Guada por los ensayos y tantas risas; A "la tia" Mila; A Gloria... y a todos los que han pasado por el grupo: Flor, Lucio, Sole, Cabeza, Pio...gracias por hacer el día a día más placentero. A Claudio K, por tantas columnas compartidas.

A los "amigos de la zanja" por zanjar tantos asuntos.

A los auxiliares de orgánica, por el apoyo en situaciones tan peculiares.

A los chicos de la planta baja, por las discusiones, sugerencias, meriendas, almuerzos y todos los momentos compartidos.

A Ariel y Agustín, dos grandes pilares en los que pude apoyarme siempre que lo necesité.

A los amigos de siempre, sin nombrar a ninguno en particular, es sin duda, lo mejor que me logrado en este tiempo.

A mi familia, soporte fundamental en mi vida, que a lo largo de todos estos años he atormentado con esta disciplina:

A mi padre: por sus enseñanzas y formación que hicieron la base de lo que soy hoy y de quien heredé la virtud de renegar con las cosas.

A mi madre "la Cristina", por su apoyo y amor incondicional, por alentarme, aconsejarme y tirar siempre para adelante.

A Luciana, mi compañera, por su comprensión y tolerancia, por su compañía y por haberme dado la alegría más grande que he tenido en la vida.

A los clones: Facundo, por alimentar mi mente con su infinita imaginación y ensañarme cosas día a día. A Franco, por su sonrisa matutina, la cual alegra cada día de mi vida.

Amisomila

ABREVIATURAS Y FÓRMULAS

δ	Desplazamiento químico
μg	Microgramo
$[\text{M}]^+$	Ión Molecular
AcOEt	Acetato de Etilo
AMCPB	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico
Ac ₂ O	Anhidrido Acético
AlCl ₃	Tricloruro de Aluminio
an.	Ancho
Anh.	Anhidro
BHI	Agar Cerebro Corazón
<i>c</i>	Cuatriplete
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en placa delgada
CLV	Cromatografía líquida a presión reducida
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CHCl ₃	Cloroformo
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CLV	Cromatografía en Fase Líquida al Vacío
cm	centímetro
et al.	y otros
COSY	Correlation spectroscopy
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doble doblete

<i>ddd</i>	Doble doble dolete
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectro de Masas
Equiv.	Equivalentes
EtOH	Etanol
H ₂ O	Agua
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy
h	Horas
HgCl ₂	Cloruro de mercurio (II)
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
Hex	Hexano
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
%I	Porcentaje de inhibición
<i>J</i>	Constante de acoplamiento escalar
km	Kilómetro
LiAlH ₄	Hidruro de Litio Aluminio
LC ₅₀	Concentración requerida para matar el 50% de la población
LS	Lactona sesquiterpénica

% M	Porcentaje de mortandad
<i>m</i>	Multiplete
m	Metro
msnm	Metros sobre el nivel del mar
m/z	Relación masa carga
max.	Máximo
MeOH	Metanol
min	Minutos
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
Na ₂ SO ₄ anh.	Sulfato de sodio anhidro
NaBH ₄	Boro hidruro de sodio
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
<i>p</i> -MeC ₆ H ₄ SO ₂ Cl	Cloruro de <i>p</i> -toluensulfonilo
<i>p</i> -MeC ₆ H ₄ SO ₃ H	Ácido <i>p</i> -Toluensulfónico
<i>p</i>	<i>para</i>
Pb(AcO) ₂	Acetato de plomo
PN	Productos Naturales
ppm	Partes por millón
REA	Relaciones estructura actividad
<i>rf</i>	Relación de frentes
RMN	Resonancia magnética nuclear
<i>s</i>	Singlete

t

Triplete

THF

Tetrahidrofurano

TMS

Tetrametilsilano

var.

Variedad

Resumen

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se abarcaron distintos aspectos en el estudio de Productos Naturales. Se trabajó con especies de la familia Asteraceae, la cual es de gran importancia en distintos aspectos tanto alimenticio, como farmacéutico, industrial, etc. Se realizaron búsquedas de actividad por medio de distintos métodos a fin de obtener metabolitos secundarios bioactivos.

Por un lado, por medio del fraccionamiento biodirigido del extracto etanólico de la especie *Senecio ceratophyllus*, se obtuvo e identificó un terpeno de núcleo novedoso. Este compuesto presentó potencial actividad citotóxica cuando se realizó el ensayo frente a *Artemia salina*.

Se realizó el estudio fitoquímico de *S. pampeanus* por medio de dos metodologías diferentes: Partición y tratamiento con $Pb(AcO)_2$, de esta última, se obtuvo un diglicérido.

También se realizó la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana en especies del género *Eupatorium*. Se utilizaron cepas de microorganismos de interés alimentario y clínico. De *E. arnottianum*, por un lado, se obtuvo el metabolito cumarina cuya actividad antimicrobiana se encuentra reportada y, por otro lado, un flavonoide en apreciables cantidades.

Los antecedentes bibliográficos sobre la baja actividad antimicrobiana de *E. inulaefolium*, junto al perfil espectroscópico de su extracto de CH_2Cl_2 , hicieron al material un *target* interesante para realizar la técnica de diversificación por medio de reacción con hidracina. Así, se obtuvo en grandes cantidades el *ent*-norlabdano Austroeupatol, el cual fue objetivo para transformaciones semisintéticas. La baja reactividad de este compuesto llevó a realizar estudios conformacionales del mismo, que permitieron justificar este comportamiento.

En otro aspecto, se realizó la síntesis total de análogos de bisabolenos de *Lagascea mollis* que fueron aislados previamente en nuestro grupo y presentaron interesante actividad alelopática. En este caso, se lograron obtener 9 derivados simplificados sintéticos, a través de los cuales se pudieron establecer relaciones estructura actividad.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Investigación en Productos Naturales	3
1.2 Estrategias para la producción de compuestos bioactivos relacionados a los Productos Naturales	5
1.2.a Química combinatoria.....	5
1.2.b Semisíntesis.....	5
1.2.c Diversificación de extractos.....	6
1.2.d Biotransformaciones.....	6
1.3 Actividad Biológica	6
1.3.a Actividad citotóxica: Mortalidad en <i>Artemia salina</i>	7
1.3.b Actividad alelopática: Inhibición del crecimiento radicular.....	8
1.3.c Actividad antimicrobiana.....	9
2. Objetivos	11
3. La familia Asteraceae	15
3.1 Consideraciones Botánicas	17
3.2 Bioactividad de las especies de la familia	20
3.2.a Actividad citotóxica.....	20
3.2.b Actividad antimicrobiana.....	24
3.2.c Actividad alelopática.....	28
3.3 Fitoquímica	31
3.3.a Sesquiterpenos.....	31
3.3.b Lactonas sesquiterpénicas.....	33
3.3.c Triterpenos.....	34
3.3.d Acetilenos.....	35
3.3.e Flavonoides.....	35
3.3.f Cumarinas, cromanos y compuestos aromáticos relacionados.....	36
3.3.g Alcaloides.....	37
4. Resultados y discusión obtenidos a partir de las especies Vegetales	39
4.1 <i>Eupatorium arnottianum</i>	41
4.1.1 Descripción botánica.....	41

4.1.2 Distribución y Hábitat	42
4.1.3 Antecedentes de <i>E. arnottianum</i>	42
4.1.4 Parte experimental.....	45
4.1.4.a Material vegetal.....	45
4.1.4.b Extracción y Fraccionamiento.....	45
4.1.5 Resultados obtenidos de <i>E. arnottianum</i>	46
4.2 <i>Eupatorium inulifolium</i>.....	52
4.2.1 Descripción botánica.....	52
4.2.2 Distribución y Hábitat.....	53
4.2.3 Antecedentes de <i>E. inulifolium</i>	53
4.2.4 Parte experimental.....	55
4.2.4.a Material Vegetal.....	55
4.2.4.b Extracción y fraccionamiento.....	55
4.2.4.c Diversificación del sub-extracto.....	55
4.2.5 Discusión y Resultados Obtenidos de <i>E. inulifolium</i>	56
4.2.6 Obtención de derivados de Austroeupatol.....	62
4.2.7 Experimental.....	63
4.2.7.1 General.....	63
4.2.7.2 Modificaciones sobre el doble enlace C8-C17.....	64
4.2.7.2.a Isomerización.....	64
4.2.7.2.b Halogenación (Bromación)	64
4.2.7.2.c Epoxidación.....	64
4.2.7.2.d Hidrogenación.....	65
4.2.7.3 Modificación sobre el grupo furanoilo.....	65
4.2.7.4 Modificaciones sobre los grupos hidroxilo.....	65
4.2.7.4.1 Formación de acetales.....	65
4.2.7.4.1.a Isopropiliden derivados.....	65
4.2.7.4.1.b Benziliden derivados.....	66
4.2.7.4.2 Esterificaciones.....	66
4.2.8 Resultados y Discusión.....	67
4.2.8.1 Modificaciones sobre el doble enlace.....	67
4.2.8.1.a Isomerización.....	67
4.2.8.1.b Halogenación (Bromación).....	69
4.2.8.1.c Epoxidación.....	69
4.2.8.1.d Hidrogenación.....	70
4.2.8.2 Modificación sobre el grupo furanoilo.....	70
4.2.8.3 Modificaciones sobre los grupos hidroxilo.....	71
4.2.8.3.a Formación de acetales.....	71
4.2.8.3.b Esterificaciones.....	72
4.2.9 Consideraciones estructurales de Austroeupatol.....	84

4.3 <i>Senecio ceratophylloides</i>	85
4.3.1 Descripción botánica.....	85
4.3.2 Distribución y Hábitat.....	86
4.3.3 Antecedentes de <i>S. ceratophylloides</i>	86
4.3.4 Parte experimental	88
4.3.4.a Material vegetal.....	88
4.3.4.b Extracción y Fraccionamiento biodirigido.....	88
4.3.5 Discusión y Resultados obtenidos de <i>Senecio ceratophyllus</i>	90
4.3.6 Diversificación del Extracto de Hexano.....	96
4.3.6.a Parte experimental.....	96
4.3.7 Discusión y Resultados obtenidos.....	96
4.4 <i>Senecio pampeanus</i>	98
4.4.1 Descripción botánica.....	98
4.4.2 Distribución y Hábitat.....	98
4.4.3 Antecedentes de <i>S. pampeanus</i>	98
4.4.4 Parte experimental	99
4.4.4.1 Material vegetal.....	99
4.4.4.2 Extracción y Fraccionamiento... ..	99
4.4.4.2.a Extracción.....	99
4.4.4.2.b Partición.....	99
4.4.4.3 Resultados obtenidos a partir del proceso de partición.....	100
4.4.4.4 Purificación con acetato de plomo (II).....	101
4.4.4.5 Resultados Obtenidos a partir de la Purificación con acetato de plomo (II).....	101
<u>5. Síntesis de análogos de Bisabolenos con actividad alelopática aislados de <i>Lagascea mollis</i></u>	103
5.1 Introducción	105
5.2 Parte Experimental	106
5.2.1 General.....	106
5.2.2 Síntesis de ácido- β -(4-metilbenzoil)-propanoico.....	106
5.2.3 Síntesis de ácido- γ -(4-metilbenzoil)-butanoico.....	106
5.2.4 Síntesis de ácido- γ -(4-metilfenil)-butanoico	106
5.2.5 Síntesis de ácido- δ -(4-metilfenil)-pentanoico.....	107
5.2.6 Síntesis de ácido- γ -hidroxi- γ -(4-metilfenil)-butanoico.....	107
5.2.7 Síntesis de ácido- δ -hidroxi- δ -(4-metilfenil)-pentanoico.....	107
5.2.8 Síntesis de 1,5-di-p-tolil-pentan-1,5-diol.....	107
5.2.9 Síntesis de 1-hidroxi-1-(4-metilfenil)-pentan-5-ol.....	108

5.3 Resultados y discusión	108
5.3.1 ácido- β -(4-metilbenzoil)-propanoico.....	108
5.3.2 ácido- γ -(4-metilbenzoil)-butanoico.....	109
5.3.4 Ácido- γ -(4-metilfenil)-butanoico.....	111
5.3.5 Ácido- δ -(4-metilfenil)-pentanoico.....	112
5.3.6 Ácido- γ -hidroxi- γ -(4-metilfenil)-butanoico.....	113
5.3.7 Ácido- δ -hidroxi- δ -(4-metilfenil)-pentanoico.....	116
5.3.8 1,5-di-p-tolil-pentan-1,5-diol.....	117
5.3.9 1-hidroxi-1-(4-metilfenil)-pentan-5-ol.....	118
<u>6. Materiales y métodos</u>	123
6.1 Procesamiento del material vegetal	125
6.2 Solventes y Reactivos	125
6.3 Instrumental	125
6.3.a Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	125
6.3.b Espectroscopia Infrarroja (IR).....	125
6.3.c Espectrometría de masas.....	126
6.4 Técnicas cromatográficas	126
6.4.a Cromatografía líquida al vacío (CLV) o cromatografía al vacío.....	126
6.4.b Cromatografía en columna (CC) en fase normal.....	126
6.4.c Cromatografía de exclusión molecular (CEM).....	126
6.4.d Cromatografía en capa delgada (CCD) en fase normal.....	126
6.5 Ensayos de actividad biológica	127
6.5.a Actividad citotóxica: Mortalidad en <i>Artemia salina</i>	127
6.5.b Actividad alelopática: Inhibición del crecimiento radicular.....	128
6.5.b Actividad antimicrobiana.....	128
<u>7. Conclusiones</u>	131
<u>8. Referencias</u>	137

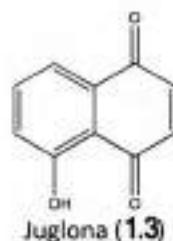
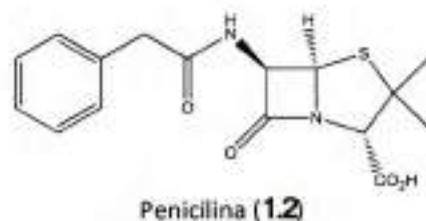
1. Introducción



1.INTRODUCCIÓN

1.1. Investigación en productos naturales

A lo largo de los siglos los seres humanos han dependido de la naturaleza para satisfacer sus necesidades básicas (Cragg & Newman, 2013). La naturaleza los ha proveído de comida, medicamentos, abrigo, refugio, medios de transporte, fertilizantes, sabores, fragancias, entre otras cosas (Newman *et al.*, 2000). Es por esto que la humanidad ha dependido tanto de la flora como de la fauna que la rodea para curar sus enfermedades (Ortholand & Ganesan, 2004). Así, el hombre se ha basado en la observación de fenómenos en su entorno, a fin de comprenderlos, poder imitarlos y en algunos casos, hasta mejorarlos. Por ejemplo, a mediados del siglo XVIII la producción de cerveza utilizando *Myrica gale* fue discontinuada, debido a que la gente se ponía agresiva. Este efecto fue atribuido al compuesto conocido como Cineol (1.1) (Tulp & Bohlin, 2004). El inesperado descubrimiento de la Penicilina (1.2) por Fleming en 1928, dio lugar a la llamada "Edad de oro de los Antibióticos" (Newman *et al.*, 2000). Así también, observaciones sobre la muerte de plantas cerca de nogales (*Jugland regia* y *J. nigra*) dieron las primeras ideas de actividad alelopática. Hoy se sabe que el nogal produce hidroquinona, que es oxidada a juglona (1.3), compuesto responsable del fenómeno observado (Vyvyan, 2002).

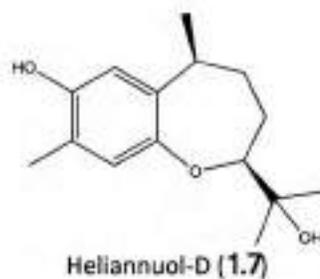
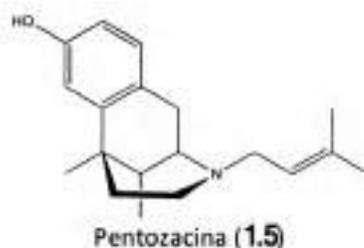


Históricamente, las plantas fueron la fuente más importante de productos naturales (PN). Los progresos más grandes en investigación se dieron en las líneas de la etnofarmacología y la toxicología. Hoy en día, es sabido que hay diversas fuentes de productos naturales las cuales pueden ser explotadas. Fleming dio el primer paso a la

segunda fuente de PN más investigada, los hongos. Otra fuente que se encuentra en auge es la obtención de PN marinos (Tulp & Bohlin, 2004; Haefner, 2003). Pero el estudio de los productos naturales también presenta serios inconvenientes (Harvey, 2008; Kingston, 2010):

- La baja disponibilidad de estos productos, ya que se aíslan en cantidades muy pequeñas, mediante métodos cromatográficos a veces dificultosos.
- Presentan estructuras generalmente complejas, con numerosos estereocentros.
- Los costos de recolección, dificultades en el acceso y variabilidad del material.

Algunos metabolitos secundarios bioactivos tienen gran valor como drogas o agentes terapéuticos. Es frecuente que se deje de lado su aislamiento y sirvan como modelo para la síntesis total de nuevas drogas. Por ejemplo: meperidina (**1.4**), pentozacina (**1.5**) y propoxifeno (**1.6**) son analgésicos completamente sintéticos, para los cuales la morfina y la codeína sirvieron de modelo (Balandrin *et al.*, 1985); la síntesis de heliannuol-D (**1.7**), dio origen a una nueva serie de agentes alelopáticos (Zhang *et al.*, 2013).



Así, la síntesis total de productos naturales tiene importantes razones que la hacen un área de interés (Nicolaou & Sorensen, 1996):

- Presenta un desafío para el químico orgánico, que debe sintetizar una sustancia con una nueva arquitectura.
- Origina una posibilidad para desarrollar un nuevo método sintético.
- Ofrece una oportunidad para hacer contribuciones a la biología, no sólo proveyendo la molécula en consideración, si no ofreciendo otros tipos de moléculas similares (análogos)
- Es necesaria para desarrollar procesos a larga escala, cuando la escasez de producto natural lo requiere.

1.2 Estrategias para la producción de compuestos bioactivos relacionados a los Productos Naturales

1.2.a. Química combinatoria

El objetivo básico de la química combinatoria consiste en la producción de grandes colecciones (biblioteca) de compuestos con una amplia diversidad estructural, a través de síntesis rápida o simulación por computación. Las colecciones obtenidas son sometidas posteriormente a ensayos biológicos, constituyendo así una fuente alternativa de compuestos líderes (Lee & Breitenbucher, 2003). Es posible encontrar muchos ejemplos en las décadas del '80 y '90 de "quimiotecas" que contienen cientos de miles de nuevos compuestos químicos (Ganesan, 2004). Las mismas, basadas principalmente en péptidos, nucleósidos o carbohidratos, tenían poco éxito y baja especificidad en los ensayos biológicos (Paterson & Anderson, 2005). Estos resultados fueron atribuidos a la carencia de complejidad asociada con los PN bioactivos, tales como elementos estereogénicos, sustituyentes heterocíclicos o estructuras policíclicas (Lee & Schneider, 2001).

1.2.b. Semisíntesis

La preparación de **análogos no naturales** a partir de metabolitos secundarios puede modificar las propiedades de un fármaco, tales como bioactividad, farmacocinética, solubilidad, etc. Recientemente surgió el concepto de "**síntesis orientada a la diversidad**" (Burke & Schreiber, 2004; Liu *et al.*, 2006) inspirado en la diversidad de metabolitos que se originan en la naturaleza a partir de un mismo precursor común. Así, a partir de un sustrato y dependiendo de las condiciones de reacción utilizadas, se puede llegar a quimiotecas con diversidad de unidades básicas, diversidad de esqueleto o diversidad estereoquímica. Otra estrategia que permite el acceso a análogos de PN es la "**síntesis total derivada**". En este caso, se usan los productos intermedios en una síntesis total de un producto natural para obtener análogos que no son fácilmente asequibles mediante la correspondiente ruta biosintética. En la bibliografía científica podemos encontrar diversos ejemplos de quimiotecas (Knepper *et al.*, 2012; Nicolaou *et al.*, 2000).

1.2.c. Diversificación de extractos

Recientemente se ha demostrado que es posible generar actividad biológica a partir de un extracto natural inactivo por medio de la diversificación química de sus componentes (López *et al.*, 2007; Ramallo *et al.*, 2011). El proceso se enfoca hacia la transformación de funciones químicas comunes en productos naturales en grupos funcionales raramente producidos por el metabolismo secundario. De esta manera, la maquinaria biosintética natural puede complementarse para producir un amplio rango de compuestos semisintéticos en una sola etapa. Estos extractos transformados químicamente pueden constituir una fuente alternativa de compuestos para alimentar el proceso de descubrimiento de moléculas nuevas con actividades biológicas interesantes. Se encuentran reportadas distintas reacciones químicas usadas como estrategias, en las que se incluyen reacciones con hidracina (López *et al.*, 2007), bromaciones (Méndez *et al.*, 2011) y sulfonilaciones (Salazar *et al.*, 2009; 2011).

1.2.d. Biotransformaciones

Las transformaciones biológicas o biotransformaciones se presentan como un muy buen complemento de las reacciones de transformación química a la hora de diversificar estructuras de compuestos de interés (Faber, 2011). La ventaja fundamental de estos procesos es que se realizan generalmente en condiciones quimio-, regio- y estereocontroladas, pudiendo en algunos casos, superar a similares métodos empleados en el área de síntesis. Las biotransformaciones son métodos muy ventajosos en caso de establecerse sistemas biocatalíticos de manejo sencillo y resultan una alternativa racional desde el punto de vista ecológico al momento de planificar un proceso en particular. Si bien se produce una elevada cantidad de biomasa, este tipo de residuos es totalmente degradable, minimizando así el uso de reactivos químicos de difícil o nula degradación. Así como la síntesis o la simulación por computadora son utilizadas para generar quimiotecas, se pueden obtener colecciones de compuestos utilizando biotransformaciones (Zhang *et al.*, 2006).

1.3 Actividad Biológica

La identificación de moléculas bioactivas derivadas de biomasas complejas requiere de una cuidadosa selección y ejecución de bioensayos relevantes en el largo proceso de descubrir potenciales drogas líderes y actividades diana (Strömstedt *et al.*, 2014). Los compuestos naturales están involucrados directa o indirectamente en procesos vitales, la probabilidad de que cada uno de ellos posea actividad biológica es treinta veces mayor que la de que una sustancia sintética exhiba ese tipo de actividad. Por ello, se diseñan ensayos simples de laboratorio como paso inicial para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos.

1.3.a Actividad citotóxica: Mortalidad en *Artemia salina*

El Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos utiliza los términos citotóxico, antitumoral y anticancerígeno para describir la actividad de un determinado producto. Así, un agente citotóxico es aquél que es tóxico para las células tumorales *in vitro*. Si esta actividad se mantiene al hacer un experimento *in vivo*, se dice que el producto tiene actividad antitumoral (Trease & Evans, 1996).

El género *Artemia*, comúnmente llamado camarón de salmuera (Figura 1.1) (Castro et al., 2006) es un invertebrado perteneciente a la fauna acuática salina y a los ecosistemas marinos. Está ubicado en el filum Artrópoda, clase Crustaceae. El ciclo de vida comienza con la eclosión de los quistes, los cuales son metabólicamente inactivos. Cuando los quistes son colocados en agua salada, son rehidratados y es allí cuando comienza su desarrollo (Pelka et al., 2000).

Artemia es usado en distintas áreas científicas como ecología, fisiología, ecotoxicología, acuicultura y genética (Nunes et al., 2006). Es uno de los ejemplos más conocidos de organismos adaptados al laboratorio. Así, es utilizado en bioensayos para determinar toxicidad utilizando como parámetro la concentración letal 50 (LC₅₀), la cual ha servido para determinar ciertas toxinas de plantas (Ramachandran et al., 2011). Este tipo de ensayo *in vitro* ha sido exitoso como estudio preliminar de agentes citotóxicos y anticancerígenos (Olowa & Nuñez, 2013). Farmacológicamente hablando, se ha encontrado buena relación entre el ensayo de mortalidad contra *Artemia* y distintos tipos de líneas celulares de cáncer (Ramachandran et al., 2011), como ciertas líneas tumorales de cáncer de seno (Maldonado Muete et al., 1993) y carcinoma nasofaríngeo humano entre otros (McLaughlin et al., 1998; Meyer et al., 1982). Por otro lado, también es usado como indicador de compuestos con actividad pesticida (Ramachandran et al., 2011; Tatli et al., 2008).



Figura 1.1: Ejemplar adulto de *Artemia* (nauplio) (Sorgeloos, et al. 1986)

1.3.b Actividad alelopática: Inhibición del crecimiento radicular

El término aleopatía fue definido como la interacción química entre plantas o entre microbios y plantas mayores. Esto incluye tanto influencias estimuladoras como también influencias inhibitorias. En una definición más actual, es el efecto directo o indirecto, perjudicial o beneficioso de una planta dadora, sobre otra aceptora debido a la producción de compuestos químicos que son liberados al entorno (Chon & Nelson, 2010). La liberación de estos compuestos, llamados aleloquímicos, por plantas puede ser por exudación de la raíz, descomposición, volatilización o lixiviación (Figura 1.2). La aleopatía puede influenciar tanto la germinación como el crecimiento, la supervivencia y la reproducción de los organismos (Ghebrehiwot *et al.*, 2013).



Figura 1.2: Modos de liberación de aleloquímicos y factores que influyen en su actividad (Kobayashi, 2004).

Varios metabolitos secundarios producidos por las plantas o microorganismos son considerados aleloquímicos y juegan un papel importante en las interacciones entre comunidades. Por ejemplo, en los agroecosistemas, los aleloquímicos pueden tener efectos nocivos en el crecimiento de los próximos cultivos en el cambio de estación. Así también, las malezas pueden producir efectos alelopáticos contra los campos de cultivo (Li *et al.*, 2010).

Un término estrechamente relacionado es la Fitotoxicidad, que se define como el grado en el cual un compuesto químico es tóxico para una planta. La actividad fitotóxica puede ser determinada mediante ensayos de laboratorio o en un ambiente no natural (Reigosa *et al.*, 2013). El bioensayo de toxicidad con semillas de *Lactuca sativa* es una prueba estática de toxicidad aguda en la que se evalúan los efectos de extractos o compuestos puros en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas en los primeros días de crecimiento. Como puntos

finales de la evaluación de la actividad se determina la inhibición de germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocótilo (Kitou & Yoshida, 1998).

Por otro lado, el uso indiscriminado de herbicidas sintéticos genera malezas más resistentes, incrementando el impacto ambiental y en la salud humana (Vyvyan, 2002). Es por esto que la investigación en esta área juega un rol muy importante en el control de malezas (Chon *et al.*, 2003; Gliessman, 1983).

1.3.c Actividad antimicrobiana

Las enfermedades transmisibles, particularmente las que involucran el tracto gastrointestinal y respiratorio son un serio problema a nivel mundial (Mutai, *et al.* 2009). En los últimos años se ha observado un rápido incremento de microorganismos resistentes a los antibióticos clásicos, lo que ha provocado, por un lado la reaparición de muchas enfermedades, como la tuberculosis, el cólera, las neumonías y endocarditis por enterococos y, por otro lado, la aparición de nuevas enfermedades transmisibles. Hay que tener en cuenta que las bacterias poseen poblaciones infinitamente mutables, capaces de diseminar el carácter de resistencia, en donde plásmidos, transposones e integrones pueden proveer a una bacteria de elementos que codifiquen resistencia a antimicrobianos procedentes de las más variadas especies y géneros bacterianos. Así, además del papel fundamental que desempeñan los factores ecológicos en la aparición de nuevos microorganismos, las características genéticas de los patógenos explican, con sólidas bases biológicas, el resurgimiento de las enfermedades transmisibles. Por ello se sugiere que la aparición y difusión de patógenos humanos resistentes es un problema ambiental que constituye una amenaza para la salud mundial. Ante estos problemas, cabe deducir la estricta necesidad de nuevos fármacos con carácter antimicrobiano que, o bien mejoren los que están en uso, por tratamiento de factores de resistencias o que presenten nuevos modos de acción (Coates *et al.*, 2002). Por otra parte las drogas corrientes que están en uso muestran efectos secundarios (Mutai *et al.*, 2009), por lo que también es necesario encontrar nuevos principios activos que minimicen los mismos.

2. Objetivos



2. Objetivos

2.1 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de tesis está orientado a la búsqueda de compuestos, biológicamente útiles en terapéutica y/o en agroquímica. Para conseguir este objetivos se diseñaron varias estrategias con la finalidad de obtener compuestos bioactivos de origen natural, semisintético o sintético.

2.2 Los objetivos específicos planteados son los siguientes:

2.2.1 Fraccionamiento biodirigido de extractos de especies vegetales de fácil asequibilidad de la familia Asteraceae.

2.2.2 Modificación química de los extractos que resultaran inactivos y posterior fraccionamiento biodirigido.

2.2.3 Transformaciones químicas de los metabolitos aislados.

2.2.4 Síntesis total de análogos simplificados de compuestos naturales bioactivos.

2.2.5 Caracterización de los compuestos obtenidos.

2.2.6 Estudio de la actividad biológica de los compuestos.

2.2.6.a Potencial actividad citotóxica frente a *Artemia salina*.

2.2.6.b Actividad antimicrobiana frente a microorganismos de interés alimentario y clínico.

2.2.6.c Actividad alelopática frente a especies modelo.

3. La familia Asteraceae



3. LA FAMILIA ASTERACEAE

3.1 Consideraciones botánicas

La Familia Asteraceae o Compositae es una de las más fáciles de reconocer (<http://herbarium.usu.edu/taxa/asteraceae.htm>). Las margaritas, crisantemos, dalias, girasoles, el diente de león, son representantes de esta gran familia. Basta observar, no con mucho detenimiento, las inflorescencias (conjunto de flores) (figura 3.1) de cualquiera de las plantas antes mencionadas para advertir que tienen en común una característica: las inflorescencias de este grupo que le dieron el nombre a la familia: Compositae, el término latín que significa Compuestas. Sus flores están agrupadas en capítulos, o sea insertas sobre un receptáculo común y protegidas por un involucre formado por brácteas especializadas, denominadas filiaris (Pacciaroni, 1997). El capítulo puede ser homogámico (conteniendo flores de igual morfología, perfectas: estaminadas o pistiladas) o heterógámico (conteniendo flores de distinta morfología: flores periféricas pistiladas o estériles y flores centrales, perfectas o hermafroditas) (figura 3.2). El fruto por lo general es un aquenio.



Figura 3.1: Izquierda: Capítulo homogámico de *Taraxacum officinale* (diente de león). Derecha: Capítulo Heterógámico de *Bellis perennis* (margarita)

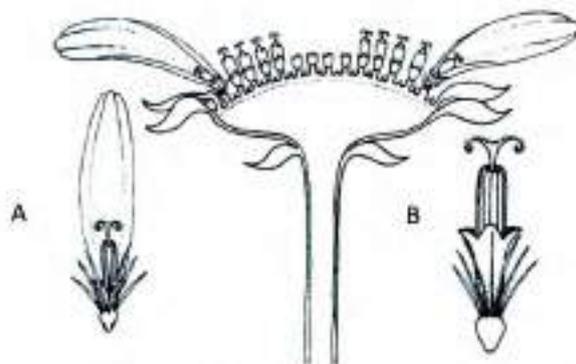


Figura 3.2: Capitulo heterógamo. A: Flor del margen. B: Flor del disco.

La familia Asteraceae comprende más de 1700 géneros, entre 24.000 y 30.000 especies clasificadas en 17 tribus y 3 subfamilias distribuidas por el mundo, lo que la convierte en una de las familias más grandes del reino vegetal (Alvarenga *et al.*, 2001; Zdero & Bohlmann, 1990). Representan la familia vegetal más numerosa en la República Argentina donde se encuentran todas las tribus que la componen, con excepción de Inuleae. La familia cuenta con 227 géneros y cerca de 1400 especies en el país. En la provincia de Córdoba se encuentran 12 de las 17 tribus, siendo las más representativas Astereae (24%), Eupatorieae (14%), Heliantheae (13%) y Gnaphalieae (13%), con aproximadamente 220 especies nativas, 50 especies endémicas y 45 especies adventicias (Katinas *et al.*, 2007). La **figura 3.3** muestra la distribución de tribus en la provincia de Córdoba.

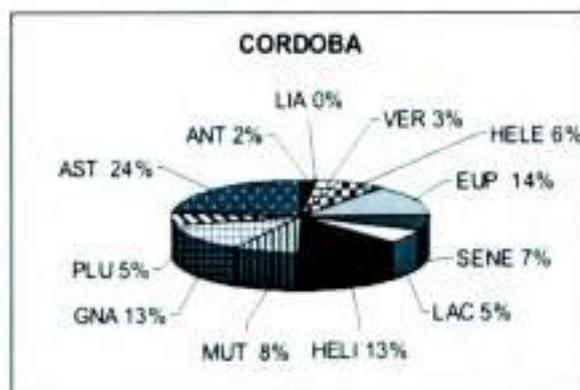


Figura 3.3: Porcentaje de distribución de las tribus de Asteraceae en la provincia de Córdoba. ANT=Anthemideae; ARC= Arctoteae; AST=Astereae; BAR=Barnadesieae; CAL=Calenduleae; CAR=Cardueae; EUP=Eupatorieae; GNA=Gnaphalieae; HELE=Helenieae; HELI=Heliantheae; LAC=Lactuceae; LIA=Liabeae; MUT=Mutisieae; PLU=Plucheae; SEN=Senecioneae; VER=Vernonieae.

En Argentina los usos que se ha dado a los taxones que componen esta familia son tan diversos como la cantidad de especies que existen. Desde el punto de vista estrictamente económico, unas 40 especies tienen importancia directa en alimentación humana (hortalizas y "semillas" oleaginosas) e indirectamente por productos obtenidos por la industria. Otras especies silvestres tienen potencial nutricional, muchas son de interés tecnológico u ornamental y centenares rinden metabolitos secundarios de uso farmacéutico o industrial o aportan néctar y polen para la producción apícola, forraje para la producción ganadera, etc. Muchas especies de la familia Asteraceae son pioneras u oportunistas y gran número resultan malezas de cultivos y/o tóxicas para el ganado. Además, numerosas plantas tienen un rol destacado en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas (Del Vitto & Petenatti, 2009).

Los géneros *Aster*, *Carpesium*, *Eupatorium*, *Inula*, *Saussurea*, *Taraxacum*, *Xanthium*, son fuentes de varias medicinas a nivel mundial (Wu et al., 2006). En medicina tradicional se han realizado y se realizan preparaciones por sus propiedades antibióticas, antifúngicas, antihelmíticas, antiplasmódicas, expectorantes, sedativas, diuréticas, espasmolíticas, homeostáticas, inmunoestimulantes y antiinflamatorias (Kadereit & Jeffrey, 2007). Desde la antigua Grecia cerca del año 800 a.c. hay registros sobre el uso de esta familia por el hombre (Petrovska, 2012): la hierba "Helenio" (*Inula helenium*), que recibe su nombre por Helena de Troya, era usada como tónico aromático y condimento. También existe registro de uso del género *Artemisia*; su nombre proviene del griego "artemis", que significa saludable.

En nuestro país ejemplos como la infusión de "manzanilla" (*Matriacara recutita* L.) por su propiedad terapéutica como hepático; la decocción de "carqueja" (*Baccharis articulata* L.) por sus propiedades digestivas, colagogas y antidiarreicas, o la infusión de Palo Santo (*Dasyphyllum diacanthoides* L.) por sus propiedades antiespasmódicas (Campos-Navarro & Scarpa, 2013) son muy conocidos popularmente. Muchas especies se encuentran codificadas en la Farmacopea Argentina lo que las convierte en Drogas Oficiales.

Algunas especies tienen significancia negativa, por ejemplo el polen de *Parthenium hysterophorus* (escoba amarga) y de *Ambrosia artemisiifolia* son causantes de alergias en humanos (Wedner et al., 1989; Zicari et al., 2013). Por otro lado, es conocido que muchas especies del género *Senecio* contienen alcaloides pirrolizidínicos con elevada actividad hepatotóxica (Giordano & Pestchanker, 1984; Pestchanker et al., 1985).

3.2 Bioactividad

3.2.a Actividad citotóxica

En la familia Asteraceae se encuentran antecedentes de actividad citotóxica de distintos tipos de extractos. Por ejemplo, extractos etanólicos de *Arctium lappa*, *Artemisia absinthium*, *Calendula officinalis*, *Centaurea cyanus*, *Tanacetum vulgare* y *Tragopogon pratensis* contra líneas celulares de leucemia J-45.01 (Wegiera *et al.*, 2012). El extracto de n-hexano de *Senecio stibianus* presenta actividad contra carcinoma de próstata LNCaP y melanoma C32 de piel (Tundis *et al.*, 2009). El extracto de CH_2Cl_2 de *Vernonia scorpioides* presenta actividad contra el tumor de Ehrlich en ratas (Pagno *et al.*, 2006). También hay descriptos estudios preliminares sobre la actividad antiproliferativa y citotóxica de infusiones de *Solidago microglossa* (Bagatini *et al.*, 2009). Particularmente en la Argentina, extractos de especies de *Eupatorium* usadas en medicina popular muestran actividad citotóxica *in vitro* (Fernández *et al.*, 2002)

La actividad de los extractos es debida a la presencia de compuestos con fuerte actividad citotóxica. Entre ellos se puede citar a las lactonas sesquiterpénicas (LS), las cuales son marcadores taxonómicos de la familia Asteraceae (Da Costa *et al.*, 2005). Se ha demostrado que para que este tipo de compuestos tengan la mayor actividad citotóxica, deben presentar en su estructura un doble enlace en posición α al grupo carbonilo (deben ser α - β -insaturados) y si éste es exocíclico, son aún más activos (Picman, 1986; Rodríguez *et al.*, 1976) (Figura 3.4). Esto hace que puedan tener actividad citotóxica, independientemente del esqueleto que lo contenga. Así, podemos encontrar LS activas con esqueleto germacranólido, guaianólido, pseudoguaianólido, eudesmanólido o bakkenólido (Rodríguez *et al.*, 1976). Douglanina (3.1) y Tamirina (3.2) son ejemplos de lactonas sesquiterpénicas aisladas del género *Tanacetum* (Ulubelen *et al.*, 2012) mientras que Eupanilínida K (3.3) y Eupanilínida L (3.4) fueron aisladas de *Eupatorium sp.* (Huo *et al.*, 2006).

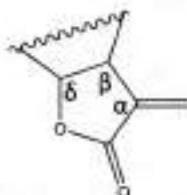
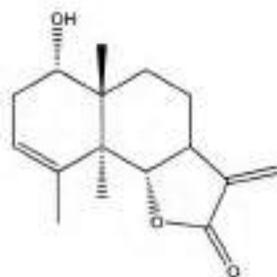
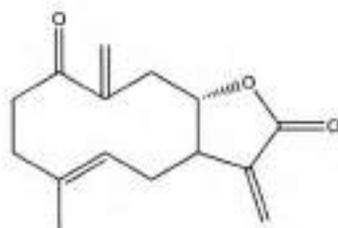


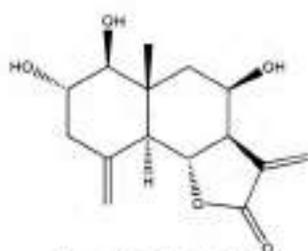
Figura 3.4: Disposición del anillo de γ -lactona para mayor actividad citotóxica.



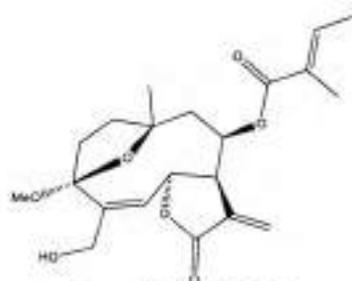
Douglanina (3.1)



Tamirina (3.2)

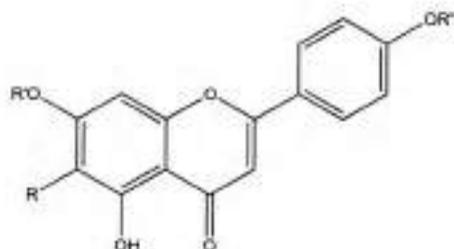


Eupanilinda K (3.3)

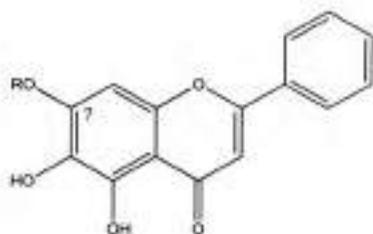


Eupanilinda L (3.4)

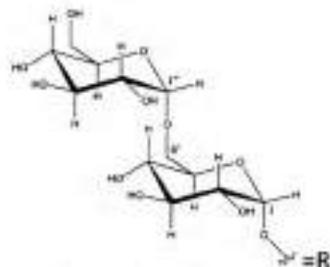
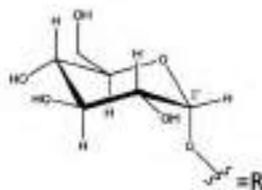
Otro constituyente común en la familia Asteraceae son los flavonoides. Se encuentran reportes de actividad citotóxica de Hispidulina (3.5), Apigenina (3.6) aisladas de *Centaurea spp.* (Seelinger *et al.*, 2008; Ulubelen *et al.*, 2012), los O-7 glucósidos del flavonoide Baicalina (3.7) extraídos de *Enhydra sp.* (Sannigrahi *et al.*, 2010), Nepetina (3.8) aislado de *Eupatorium sp.* (Militao *et al.*, 2004) y el flavonol glicosidado, Rutina (3.9) de *Senecio sp.*



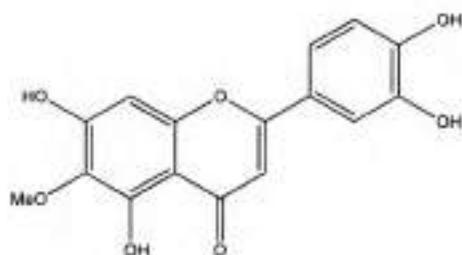
Hispidulina (3.5) R=OMe; R'=R''=H



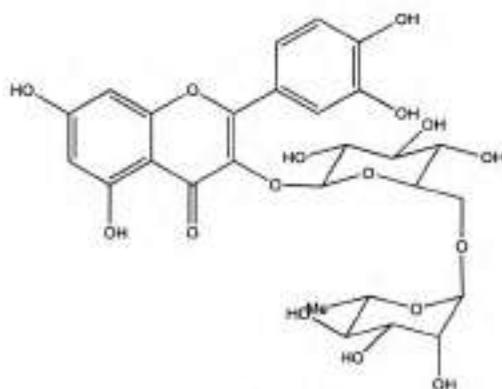
Apigenina (3.6) R=R'=R''=H



Baicalina-7-O-glucosidos (3.7)

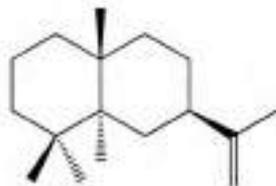


Nepetina (3.8)



Rutina (3.9)

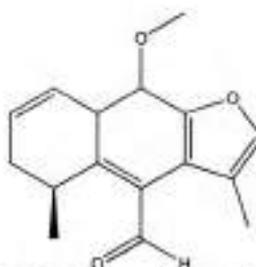
También existen reportes de terpenos sin el anillo de lactona que presentan actividad, como por ejemplo el sesquiterpeno de esqueleto eudesmano (+)-intermedeol (3.10) (Park *et al.*, 2000), el diterpeno acíclico spiciformisina b (3.11) (Lee *et al.*, 2002) ambos aislados de *Ligularia fischeri* y el sesquiterpeno eremofilano (3.12) obtenido de *Senecio sp.* (Gelbaum *et al.*, 1982).



(+)-intermedeol (3.10)

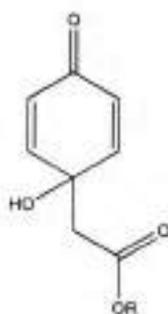


Spiciformicina b (3.11)

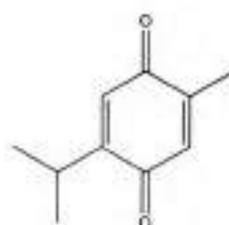


14-oxo-1,2-dehydrocacalol metil ester (3.12)

Los quinoles Jacaranona etil éster y jacaranona metil éster (3.13) aislados de *Senecio sp.* (Gelbaum *et al.*, 1982; Loizzo *et al.*, 2007) y timoquinona (3.14) aislado de *Eupatorium sp.* (Schneider-Stock *et al.*, 2014) poseen actividad citotóxica.

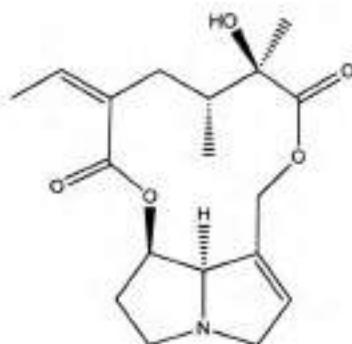


R=Et ó Me
Derivados de Jacaranona (3.13)



Timoquinona (3.14)

En este punto cabe aclarar que el género *Senecio* se caracteriza por la presencia de alcaloides pirrolizidínicos (APs). Estos APs son farmacológicamente activos destacándose los APs que presentan una insaturación en la base necina, por ser potentes hepatotóxicos para los mamíferos (Yang *et al.*, 2011). Esta reportada la actividad citotóxica de extractos conteniendo retrorsina (3.15) como compuesto mayoritario (McGaw *et al.*, 2007).

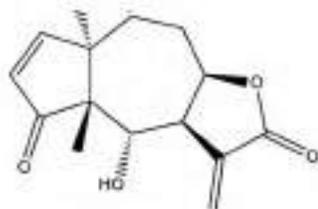


Retrorsina (3.15)

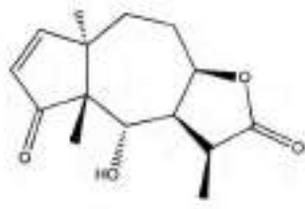
3.2.b Actividad antimicrobiana

Existen reportes de extractos de especies de Asteraceae con esta actividad. Por ejemplo el género *Baccharis*, muy abundante en nuestro país. La infusión y decocción de las hojas de *B. incarum* es usada tradicionalmente como antiséptico. La infusión y el extracto metanólico muestran actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* (Zampini *et al.*, 2009a), también está reportado que el extracto etanólico (tintura) de especies del género *Parastrephia* presentan actividad contra los mismos microorganismos (D'Almeida *et al.*, 2012). Tanto tinturas como decocciones de *Baccharis boliviensis*, *Chuquiraga atacamensis* y *Chiliotrichiopsis keidelii* presentan actividad contra cepas de *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *E. faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus* (Zampini *et al.*, 2009b). Está reportada la actividad del extracto de AcOEt de *Senecio leucanthemifolius* contra *S. aureus* (Tundis *et al.*, 2007). El extracto diclorometano de *Senecio desiderabilis* presenta elevada actividad frente a *Cryptococcus neoformans* (Deuschle *et al.*, 2009). El extracto etanólico de *Eupatorium bunifolium*, una especie usada como medicinal en la provincia de Córdoba (Goleniowski *et al.*, 2006) presenta actividad antimicrobiana *in vitro* (Zanon *et al.*, 1999).

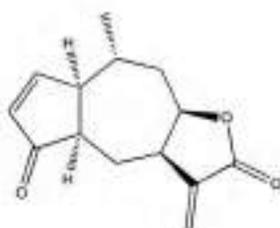
Existen distintos informes sobre la actividad antibacteriana los constituyentes químicos comunes de Asteraceae. Muchas LSs muestran actividad antibacteriana, antifúngica y antihelmintica (Rodríguez *et al.*, 1976). Compuestos derivados de Helenalina (3.16), como Plenolina (3.17) y Mexicanina (3.18) aislados de *Gaillardia megapota mica* (Fortuna *et al.*, 2011; Kuo-Hsiung *et al.*, 1977) y Vermeerina (3.19), aislada de *Hymenoxys robusta* (Lozano *et al.*, 2012) muestran fuerte actividad contra *S. aureus* independientemente de la conformación del anillo de lactona.



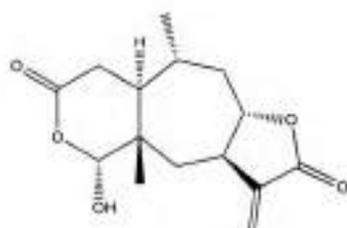
Helenalina (3.16)



Plenolina (3.17)

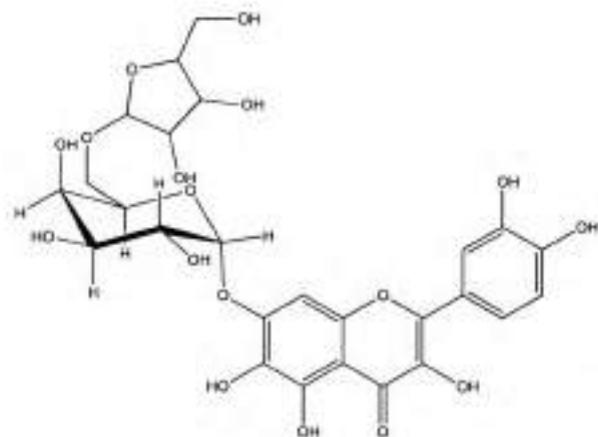


Mexicanina (3.18)

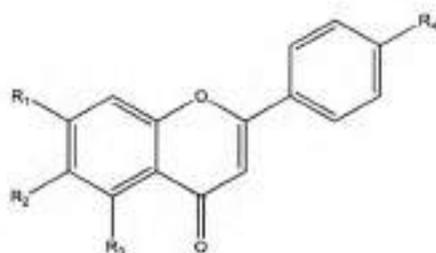


Vermeerina (3.19)

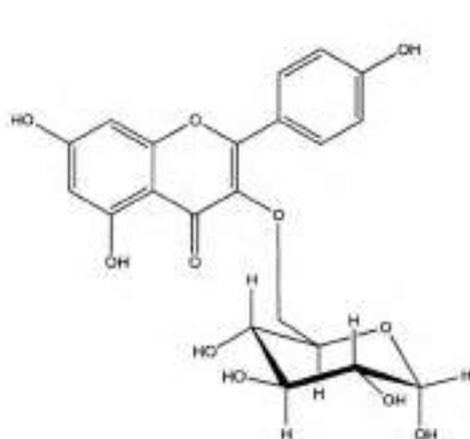
Los flavonoides son conocidos por su capacidad antimicrobial (Cushnie & Lamb, 2005). Flavonoides aislados de *Tagetes minuta* poseen elevada actividad contra microorganismos patógenos. Particularmente Quercetagetina-7-O-arabinosilglucósido (3.20) muestra elevada actividad contra *Bacillus subtilis* y *S. aureus* (Tereschuk *et al.*, 2004; Tereschuk *et al.*, 1997). Existen reportes de otros flavonoides glicosidados en la posición 7 obtenidos de especies de Asteraceae que presentan actividad antimicrobiana (Lima *et al.*, 2009). Los Flavonoides aislados de *Eupatorium clematideum* Griseb., Apigenina (4',5,7-trihidroxi flavona) (3.6), Genkwanina (4',5-dihidroxi-7-metoxiflavona) (3.21), 7,4'-dimetilapigenina (5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona) (3.22), trimetilapigenina (4',5,7-trimetoxiflavona) (3.23), Cirsimaritina (4',5,-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona) (3.24) y tetrametilescutellareina (4',5,6,7-tetrametoxiflavona) (3.25), son moduladores de la resistencia a drogas en *S. aureus* (Maia *et al.*, 2011). Los derivados glicosidados de Kaempferol (3.26) y de Quercetina (3.27) aislados de *Senecio scandens* también poseen actividad antimicrobial (Mendiondo *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013).



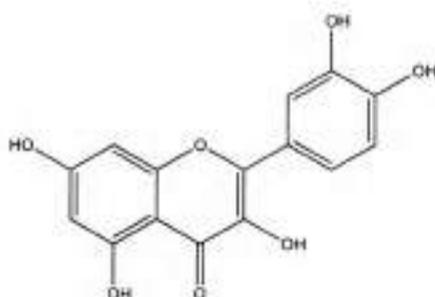
Quercetagenin-7-O-arabinosil-glucosido (3.20)



- (3.21): $R_1 = \text{OMe}$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = R_4 = \text{OH}$
 (3.22): $R_1 = R_4 = \text{OMe}$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OH}$
 (3.23): $R_1 = R_3 = R_4 = \text{OMe}$; $R_2 = \text{H}$
 (3.24): $R_1 = R_2 = \text{OMe}$; $R_3 = R_4 = \text{OH}$
 (3.25): $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{OMe}$

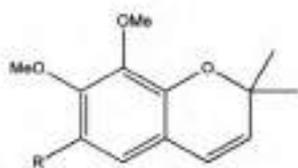


Kaempferol-3-O-glucósido (3.26)



Quercetina (3.27)

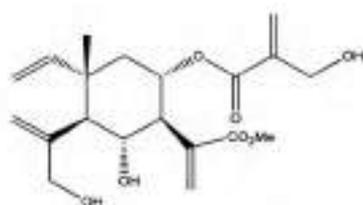
También presentan actividad contra *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* los cromanos aislados de *Eupatorium sp.* (3.28) (Ragasa *et al.*, 1998). Otro tipo de compuesto, como por ejemplo los sesquiterpenoides de esqueleto elemano, aislados de *Centaurea spp.* como Elenacarmanina (3.29) poseen actividad selectiva sobre bacterias Gram + (Bruno *et al.*, 2013). Existen informes de diterpenos de esqueleto labdano estructuralmente emparentados con labda-7,13E-dien-2 β ,15-diol (3.30) aislados de *Baccharis spp.*, *Relhania spp.* y *Ophryosporus sp.* que presentan actividad contra *S. aureus* (Feresin *et al.*, 2003). Así también, otros 20 terpenoides comunes en la familia Asteraceae fueron evaluados frente a distintos microorganismos. Sólo el triterpeno Taraxasterol (3.31), presentó actividad contra *S. aureus* (Villarreal *et al.*, 1994).



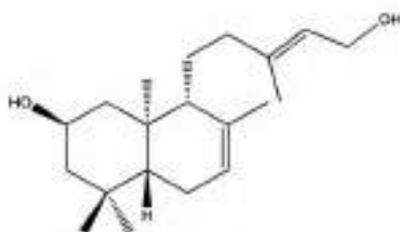
R=OH

R=CH(OH)CH₃

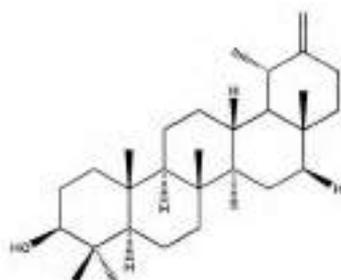
Cromanos (3.28)



Elemacarmanina (3.29)

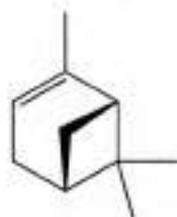


Labda-7,13E-dien-2β,15-diol (3.30)

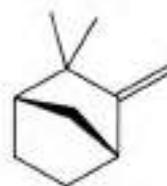


Taraxasterol (3.31)

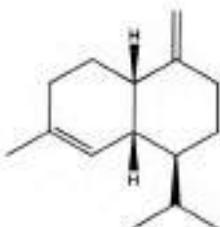
En los aceites esenciales de distintas Asteraceae también se han identificado compuestos con probable actividad antimicrobiana. El aceite obtenido de *Baccharis salicifolia* presenta como principales constituyentes α -pineno (3.32) y canfeno (3.33) y tiene elevada actividad contra *S.aureus* y *L. monocytogenes* (Carrizo Flores *et al.*, 2009). El aceite obtenido de raíces de *Eupatorium adenophorum* presenta como componentes mayoritarios E,E- cosmeno y γ -Muuroleno (3.34) y presenta mayor actividad que el antibiótico Streptomina contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Ahluwalia *et al.*, 2013). El principal constituyente del aceite de *Artemisia echegarayi* es la 3-thujanona (3.35) presentando, el aceite obtenido, elevada actividad contra *Bacillus cereus*, entre otros patógenos de interés alimentario (Laciar *et al.*, 2009) .



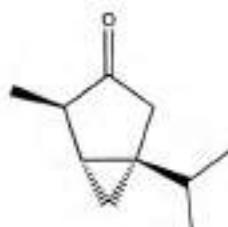
α -pineno (3.33)



Canfeno (3.34)



γ -Muuroleno (3.35)



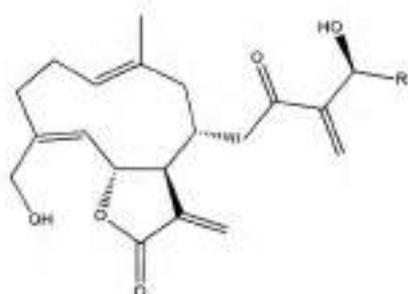
3-thujanona (3.36)

3.2.c Actividad alelopática

La familia Asteraceae o Compositae contiene sustancias biológicamente activas que son alelopáticas para las malezas (Chon *et al.*, 2003). Extractos acuosos de *Bidens frondosa*, *Breea segetum*, *Chrysanthemum indicum*, *Cirsium japonicum*, *Eclipta prostrata*, *Lactuca sativa*, *Xanthium occidentale*, y *Youngia sonchifolia* muestran efectos sobre el crecimiento radicular de *Medicago sativa* (Alfalfa) (Chon & Nelson, 2010). Extractos etanólicos de las Asteraceae *Angelphytum aspilioides*, *Baccharis salicifolia* y *Eupatorium hookerianum* muestran 100% de inhibición en la germinación (IG) de Avena sativa (Monocotiledonea), mientras que *Achyrocline tomentosa*, *A. aspilioides* y *B. salicifolia* muestran 100% de IG sobre *Raphanus sativus* (Dicotiledónea). En cambio, los extractos de *Senecio madagascariensis* y *S. vira-vira* poseen muy baja actividad IG (Palacios *et al.*, 2010). El extracto etanólico de *Eupatorium buniifolium* presenta elevada IG (>78%) sobre *R. sativus*. *Flourensia oolepis* muestra 100% IG sobre *A. sativa* y *R. sativus*, sin presentar selectividad. *Gaillardia megapotanica*, *Grindelia pulchella* y *Heterothalamus alienus* tienen moderada IG sobre *A. sativa*. *Liabum candidum*, *Thelesperma megapotamicum*, *Trichocline reptans* y *Zexmenia bupthalmiflora* tienen elevada IG sobre *R. sativus* (Palacios *et al.*, 2007). Está reportada la actividad allelopática del extracto acuoso y del tejido en descomposición de *Senecio jacobaea* contra *Lolium perenne* (Césped Ingles), *Trifolium spp.* y *M. sativa* (Ahmed & Wardle, 1994). Los extractos de Hex (Hexano) y CH_2Cl_2 de *S. volckmannii* poseen actividad fitotóxica, mostrando una elevada IG (Pacciaroni *et al.*, 2003). También está descripta la actividad fitotóxica selectiva del extracto etanólico de *Lagascea mollis* el cual presenta inhibición del crecimiento radicular en *Sorgum halepense* (Alarcón *et al.*, 2007).

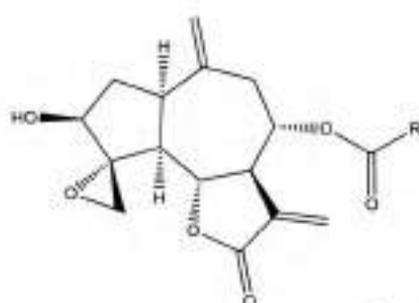
Existen publicaciones acerca de diferentes LSs con distintos esqueletos que poseen actividad reguladora del crecimiento en plantas (Rodríguez *et al.*, 1976). Por ejemplo las LSs de esqueleto germacranolidos, Cnicina (3.37) y Onopordopicrina (3.38) aisladas de *Centaurea spp.* inhiben drásticamente el crecimiento de *L. sativa* (Bruno *et al.*, 2013; Sesto Cabral *et al.*, 2008). Por otro lado las LSs con esqueleto guaionolido,

Repina (3.39) y Acroptilina (3.40) producen elongación de la raíz de *L. sativa* a bajas concentraciones (Bruno *et al.*, 2013).



Cnicina (3.37): $R = \text{CH}_2\text{OH}$

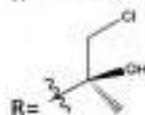
Onopordopicrina (3.38): $R = \text{H}$



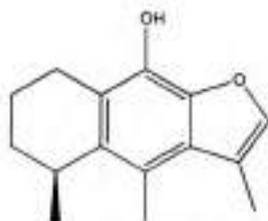
Repina (3.39):



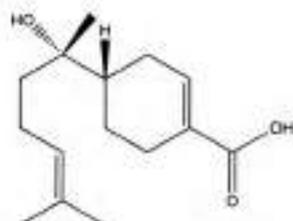
Acroptilina (3.40):



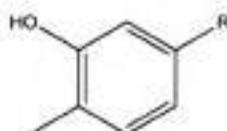
Sesquiterpenos tipo Cacalol (3.41) aislados de *Psacalum decompositum* presentan actividad tanto contra especies dicotiledóneas como monocotiledóneas, pero la actividad se hace selectiva hacia las especies monocotiledóneas cuando el compuesto es O-acetilado. (Anaya *et al.*, 1996). El bisaboleno (-)-Acido hamanasico A (3.42), de *Flourensia campestris* presenta IG sobre *L. sativa* (dicotiledónea) (Silva *et al.*, 2012), mientras que los bisabolenos 12-hydroxy-13-en-xanthorrhizol (3.43) y 11-en-13-hydroxy-xanthorrhizol (3.44) de *L. mollis* presentan actividad fitotóxica contra *S. halepense* (monocotiledónea) (Alarcón *et al.*, 2007).



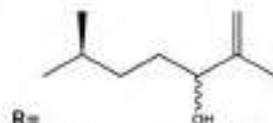
Cacalol (3.41)



(-)-Acido hamanasico A (3.42)



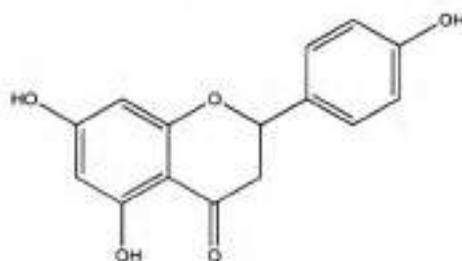
12-hydroxy-13-en-xanthorrhizol (3.43)



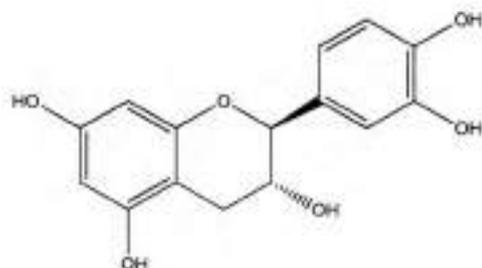
11-en-13-hydroxy-xanthorrhizol (3.44)



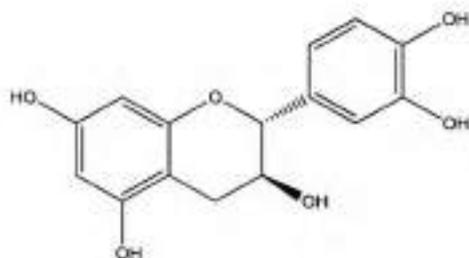
También se ha informado acerca de flavonoides aislados de *Baccharis spp.* como Apigenina (3.6), Quercetina (3.27) y Naringenina (3.45) los cuales muestran elevada inhibición de germinación, respiración y crecimiento radicular en especies de dicotiledóneas (Céspedes *et al.*, 2006). La mezcla de estereoisómeros (\pm)-Catequina (3.46) aislada de *Centaurea maculosa* presenta actividad inhibitoria de algunas especies vegetales *in vitro* y actúa como autoinhibidor en la misma especie (Actividad autotóxica) (Chon & Nelson, 2010; Li *et al.*, 2010).



Naringenina (3.45)



(-)-Catequina



(+)-Catequina (3.46)

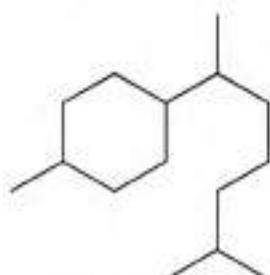
3.3 Fitoquímica

Así como la familia Asteraceae es una de las familias del reino vegetal que más cantidad de especies presenta (Alvarenga *et al.*, 2001), también produce una amplia diversidad de metabolitos secundarios. Hay reportes de estudios químicos de unas 5000 especies y cerca de 7000 constituyentes aislados e identificados, esto hace que sea la familia vegetal que ha sido más investigada desde este punto de vista (Demetzos & Dimas, 2001; Zdero & Bohlmann, 1990). Compuestos como monoterpenos, sesquiterpenos, lactonas sesquiterpénicas, diterpenos, triterpenos, poliacetilenos, flavonoides, cumarinas, benzofuranos, acetofenonas y fenilpropanoides son metabolitos secundarios típicos en la familia (Alvarenga *et al.*, 2001). Otros metabolitos, como por ejemplo los alcaloides, están menos distribuidos en la familia (Langel *et al.*, 2010; Zdero & Bohlmann, 1990).

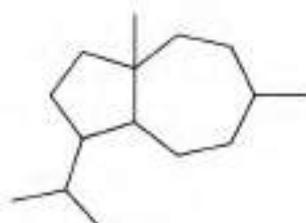
3.3.a Sesquiterpenos

Los sesquiterpenos son terpenoides de C_{15} formados por 3 unidades de isopreno. Una búsqueda bibliográfica extensiva muestra que se han identificado 287 sesquiterpenos diferentes de 218 especies pertenecientes a unos 19 géneros en la familia Asteraceae (Bruno *et al.*, 2013). Dentro de este tipo de compuestos se ha informado sobre la presencia de esqueletos tipo bisabolenos (Aguilar *et al.*, 1993; Ahmed *et al.*, 1999; Alarcón *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2012; Hirota *et al.*, 2012; Moradi-Afrapoli *et al.*, 2013; Piornedo *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012; Tagliatalata-Scafati *et al.*, 2012; Trifunović *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2012), carotanos (Kong *et al.*, 2007; Tagliatalata-Scafati *et al.*, 2012; Tiansheng *et al.*, 1993), cadinanos (Ahmad & Misra, 1994; Coballase-Urrutia *et al.*, 2010, 2011; Loayza *et al.*, 1995; Misra *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 2012; Stipanovic *et al.*, 2006; Urzúa, 2004), oplopanos (Arciniegas *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012; Nagano *et al.*, 2012), cariofilanos (Apel *et al.*, 2006; Sánchez-

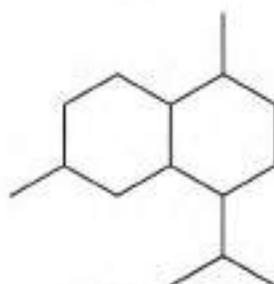
Muñoz *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2009; Znini *et al.*, 2013), germacranos (Appendino *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2013; Kisiel *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2012; Sosa *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2012), elemanos (Bruno *et al.*, 2013; Formisano *et al.*, 2012; Jenett-Siems *et al.*, 2003; Marco *et al.*, 2005) eusdesmanos (Ding *et al.*, 2010; Formisano *et al.*, 2012; Habibi *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Shin *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2012a; Xu *et al.*, 2012b; Zan *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012), eremofilanos y bakkanos (Fragoso-Serrano *et al.*, 2012; Hanai *et al.*, 2012; Nagano *et al.*, 2012; Saito *et al.*, 2012), guaianos (He *et al.*, 2012; Saifudin *et al.*, 2012; Tagliatela-Scafati *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012) y aromadendranos (Alarcón *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010) (figura 3.4).



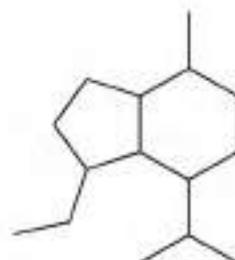
Bisaboleno



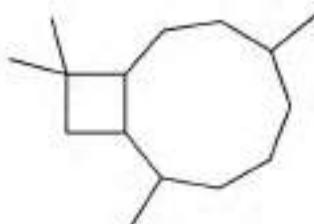
Carotano



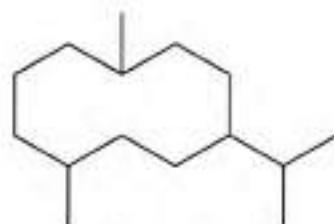
Cadinano



Oplopanos



Cariofilano



Germacrano

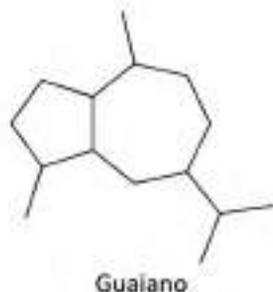
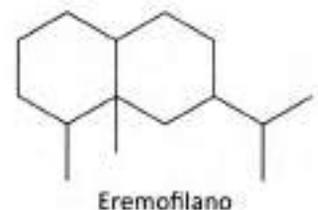
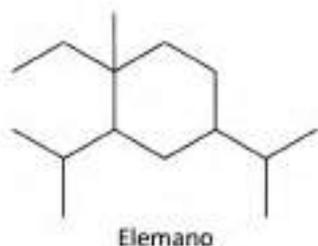


Figura 3.4: Esqueletos de sesquiterpenos aislados de Asteraceae.

3.3.b Lactonas sesquiterpénicas

Un caso particular de sesquiterpenos son las lactonas sesquiterpénicas que incluyen esqueletos de C_{15} . Más de 4000 estructuras de LSs con alrededor de 30 esqueletos diferentes han sido reportadas en distintas tribus de Asteraceae (Da Costa *et al.*, 2005). Las LSs pueden estar presentes en grandes cantidades en flores, en tricomas, en polen y frutos (aquenios), aunque en bajas cantidades en raíces (Picman, 1986). Biogenéticamente derivan del E,E-farnesilpirofosfato, seguido de una ciclización y una subsecuente modificación oxidativa. El grupo Germacranólido (la terminación "olido" se refiere al grupo lactona) es el más importante y, salvo algunas excepciones, todas las LSs derivan de transformaciones de éste (Barquera-Lozada & Cuevas, 2008; Rodríguez *et al.*, 1976) (Figura 3.5).

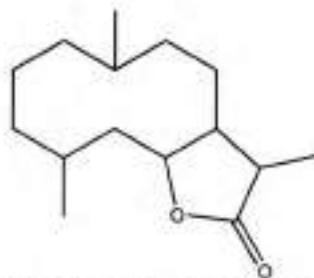
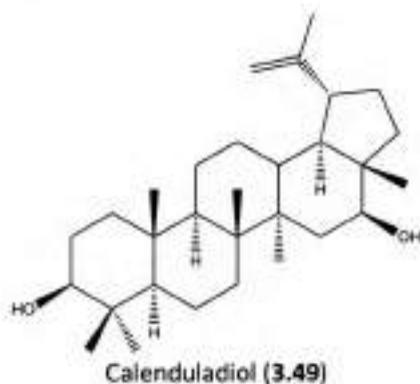
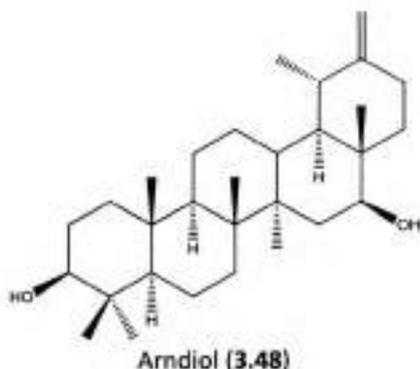
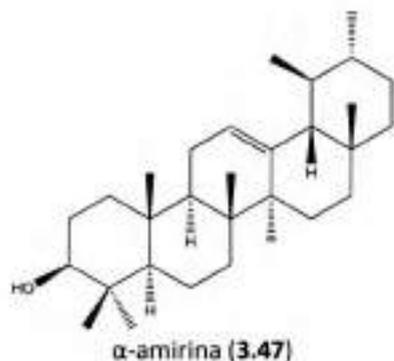


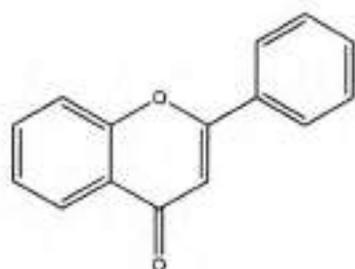
Figura 3.5: Estructura tipo germacranolido.

3.3.c Triterpenos

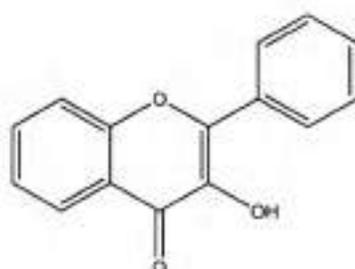
Triterpenos del tipo oleanano (α -amirina) (3.47), ursano (arndiol) (3.48), o lupanos (calenduladiol) (3.49) son típicos constituyentes de la familia Asteraceae. Pueden encontrarse esterificados con ácido acético, en distintas fracciones, en órganos reproductivos de la planta o en latex (Csupor-Löffler, 2012). En muchos géneros se encuentran glicosilados formando saponinas (Debnath *et al.*, 2010)



2004; Wang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2008) y los del tipo quercetina (3.27) (Céspedes *et al.*, 2006; Clavin *et al.*, 2000; 2007; Csupor-Löffler, 2012; Cushnie & Lamb, 2005; Herz, 2001; Li *et al.*, 2010; Mendiando *et al.*, 2011; Seelinger *et al.*, 2008; Tereschuk *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2011; Zampini *et al.*, 2009; Zampini *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008)



Flavona

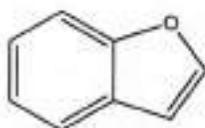


Flavonol

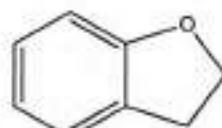
Figura 3.6: Tipos de Flavonoides comunes en Asteraceae.

3.3.f Cumarinas, cromanos y compuestos aromáticos relacionados

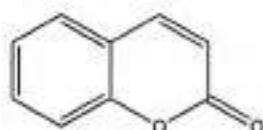
Las cumarinas (1,2-benzopiranos) están ampliamente distribuidas en muchas familias de plantas (Petrufová-Poracká *et al.*, 2013). En la familia Asteraceae se encuentran distintos tipos de derivados de benzofuranos (Céspedes *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 1995), dihidrobenzofuranos (Herz, 2001; 2004), cumarinas (Chon & Nelson, 2010; Chon *et al.*, 2003; D'Almeida *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2010; Zdero & Bohlmann, 1990), cromenos (Alarcón *et al.*, 2007; Ragasa *et al.*, 1998; Zdero & Bohlmann, 1990) y cromanonas (Herz, 2004) (Figura 3.7).



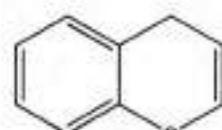
Benzofuranos



Dihidrobenzofuranos



Cumarinas



Cromenos

Figura 3.7: Ejemplos de compuestos aromáticos aislados de Asteraceae.

3.3.g Alcaloides

En muchas familias, los aminoácidos son precursores de alcaloides. En la familia Asteraceae, sólo el aminoácido ornitina es usado para los APs, que están restringidos a la tribu Senecionae (Zdero & Bohlmann, 1990), aunque también están presentes en la tribu Eupatorieae (Langel *et al.*, 2010). Los APs están formados por una base necina y ácido necico (Figura 3.8).

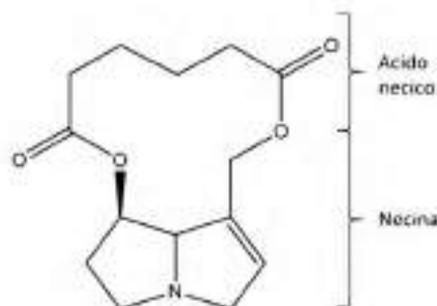


Figura 3.8: Alcaloide pirrolizidinico.

A pesar de que son los más comunes en la familia, especialmente en la tribu Senecionae, también existen reportes de alcaloides sesquiterpénicos (Wu *et al.*, 2006), indólicos (Shoeb *et al.*, 2006) y piridínicos (Maatooq & Hoffmann, 2002).

4. Resultados y discusión obtenidos a partir de las especies vegetales



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN OBTENIDOS A PARTIR DE ESPECIES VEGETALES

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos a partir de cuatro especies vegetales de la familia Asteraceae: *Eupatorium arnottianum* Griseb, *E. inulaefolium* Kunth, *Senecio ceratophylloides* Griseb y *S. pampeanus* Cabrera. Para cada taxón se hace una breve introducción botánica para ubicar al lector en contexto.

4.1 *Eupatorium arnottianum*

4.1.1 Descripción Botánica(<http://www.floraargentina.edu.ar/>)

E. arnottianum Griseb. (sin. *Chromolaena arnottiana* Griseb.) (Figura 4.1 A) es una hierba de 1-1,5 m de altura, poco ramificada. Hojas cortamente pecioladas, lanceoladas, atenuadas en el ápice y cuneiformes en la base y en el ápice, cortamente aserradas, estrigosopubescentes en ambas caras, de 4-8 x 0,8-1,5 cm. Capítulos numerosos dispuestos en cimas corimbiformes (figura 4.1 B) densas, pedúnculos pubescentes. Involucro cilíndrico de 6-7 x 2 mm. Filarios fácilmente caedizos, en 5-6 series, imbricados, gradualmente más cortos, redondeados o subtruncados en el ápice, de color castaño. Receptáculo plano. Flores 8-20, violáceas. Aquenios glabros o laxamente pilosos.



Figura 4.1 A: Ejemplar en floración de *E. arnottianum*. B: Capítulos de *E. arnottianum*.

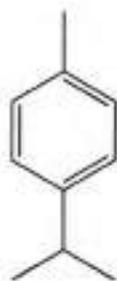
4.1.2 Distribución y Hábitat

Especie del Sur de Bolivia, centro y noroeste de la República Argentina ocupando las provincias de Jujuy, Salta, Catamarca, Tucumán, Santa Fe, Santiago de Estero, Corrientes, La Rioja, Córdoba, Entre Ríos y San Luis entre los 100 y 3000 msnm (Metros sobre el nivel del mar) (Zuloaga & Morrone, 1999).

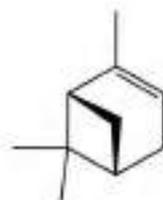
4.1.3 Antecedentes de *E. arnottianum*

Las hojas frescas de *E. arnottianum* son utilizadas en medicina popular contra el asma, bronquitis, resfrios, en emplastos para fracturas óseas y dislocaciones y contra dolores estomacales (Clavin *et al.*, 2002). La infusión de esta especie presenta actividad antiinflamatoria (Clavin *et al.*, 2000), mientras que el extracto de CH_2Cl_2 presenta elevada actividad inmunomoduladora (Fernández *et al.*, 2002). Por otro lado, el extracto de MeOH presenta muy baja actividad antifúngica (Muschiatti *et al.*, 2005).

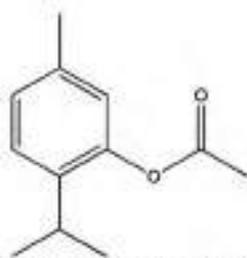
En lo que respecta a antecedentes fitoquímicos de la especie, se encuentra reportado el análisis del aceite esencial obtenido por hidrodestilación el cual contiene p-Cimeno (4.1), α -Pino (4.2), Acetato de timol (4.3) y β -Cariofileno (4.4) (Zygodlo *et al.*, 1995).



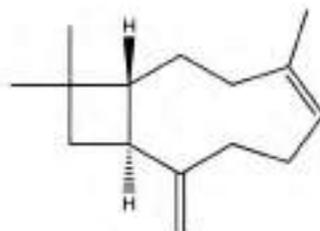
p-Cimeno (4.1)



α -Pino (4.2)

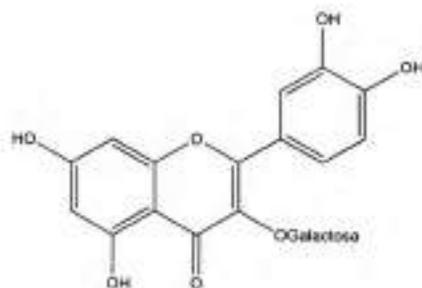
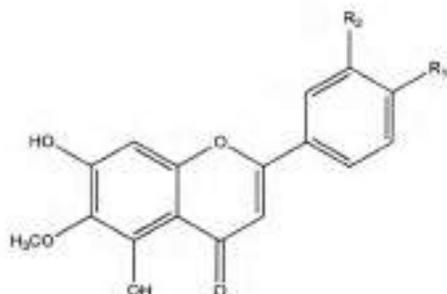


acetato de timol (4.3)



β -Cariofileno (4.4)

También se encuentran reportes de flavonoides aislados de *E. arnotianum* con actividad antiinflamatoria como Nepetina (4.5), Jaceosidina (4.6), Hispidulina (4.7), Eupatilina (4.8), Hiperósido (4.9) y Eriodictiol (4.10) (Clavin *et al.*, 2007) además de otros derivados de la vía del ácido Shikímico (4.11; 4.12; 4.13) (Gutierrez *et al.*, 1995).



Hiperósido (4.9)

Nepetina (4.5)

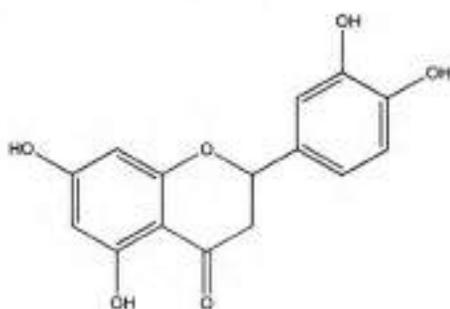
Jaceosidina (4.6)

Hispidulina (4.7)

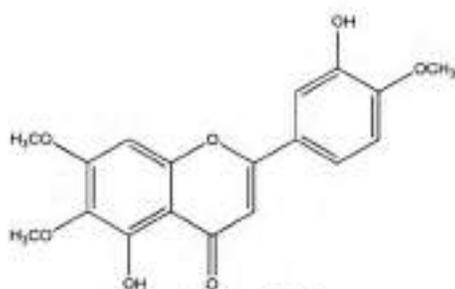
Eupatilina (4.8)

R₁
OH
OH
OH
OCH₃

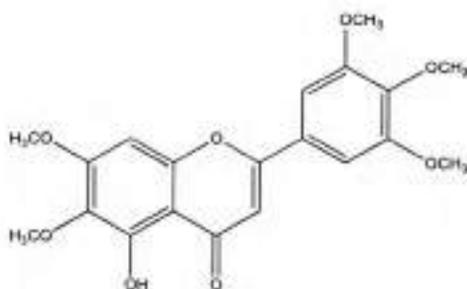
R₂
OH
OCH₃
H
OCH₃



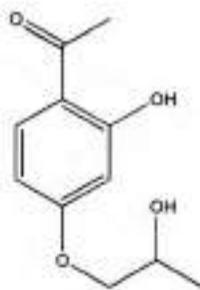
Eriodictiol (4.10)



Eupatorina (4.11)

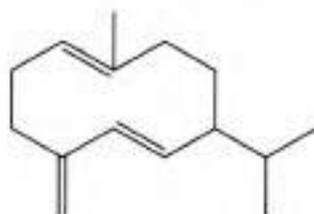


5-hidroxi-6,7,3',4',5',-pentametoxiflavona (4.12)

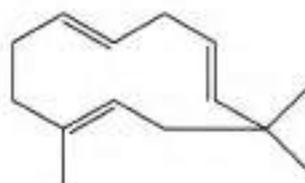


2-hidroxi-4-(2'-hidroxipropil)-acetofenona (4.13)

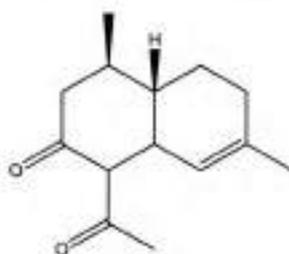
Además de los flavonoides, los mono y sesquiterpenos, aislados del aceite esencial, también se ha reportado la presencia de Cadinenos (4.14; 4.15; 4.16), furanocadinenos (4.17), terpenos de cadena abierta (4.18) y triterpenos comunes en la familia Asteraceae (4.19) (Bohlmann et al., 1979; Espitia de Perez, 1994) .



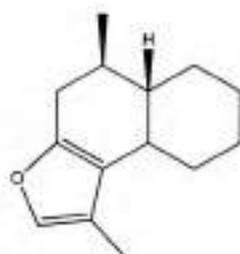
Germacreno (4.14)



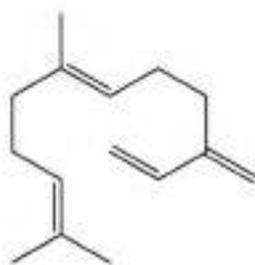
α -humuleno (4.15)



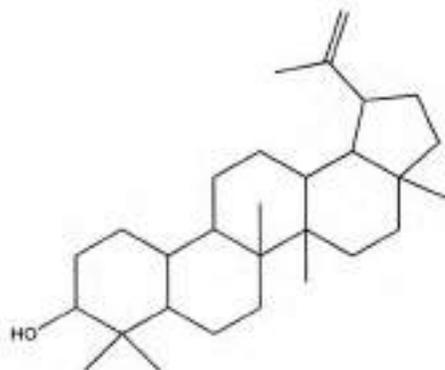
Chromoarnottin (4.16)



Dihidroisochomolaeina (4.17)



β -farneseno (4.18)



Lupeol (4.19)

4.1.4 Parte experimental

4.1.4.a Material vegetal

El material vegetal (figura 4.1) fue recolectado en el mes de marzo de 2011, encontrándose la especie en estado de floración. El lugar de recolección fue La Calera, departamento Colón, Córdoba, Republica Argentina. La especie fue identificada por el Dr. L. Ariza Espinar. FCEF y N - UNC.

4.1.4.b Extracción y Fraccionamiento

Las partes aéreas de *E. arnottianum* se dejaron secar durante 10 días en ambiente adecuadamente ventilado. Luego fueron finamente molidas obteniéndose 721,64 g de material vegetal pulverizado. El material vegetal fue exhaustivamente extraído mediante lixiviación con CH_2Cl_2 a temperatura ambiente. El solvente fue evaporado en su totalidad, a presión reducida, recuperándose 38,24 g de extracto (5,3% extraído). El residuo del material vegetal fue sometido a reflujo suave en CH_2Cl_2 para lograr un mayor rendimiento obteniéndose 2,21 g adicionales de extracto, obteniéndose una masa final de 40,45 g. El extracto total fue redissuelto en 500 mL de EtOH a 40°C y se le adicionaron 500 mL de solución de $\text{Pb}(\text{AcO})_2/\text{H}_2\text{O}$ 4%. La mezcla se dejó decantar a temperatura ambiente durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se procedió a filtrar el precipitado formado y se evaporó el EtOH a presión reducida. A la mezcla obtenida se la particionó con CH_2Cl_2 (200 mL x 3), lavándose esta última fase con H_2O para eliminar las trazas de $\text{Pb}(\text{AcO})_2$. La fase orgánica fue secada sobre Na_2SO_4 y el solvente fue evaporado a presión reducida obteniéndose 6,63 g de un extracto purificado.

Esquema 4.1: Tratamiento de *E. arnottianum*



Al extracto final obtenido se le realizó un fraccionamiento mediante CC usando silica gel G-60 como fase estacionaria y se eluyó con mezclas de solventes de polaridad creciente de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (49:1 a 0:100) en volúmenes de 400 mL. Las fracciones así obtenidas fueron denominadas como *Earn*. A partir de la fracción *Earn 8* se obtuvieron 340,3 mg de precipitado blanco en forma de cristales. De la fracción *Earn 40* se obtuvieron 189,9 mg de cristales de coloración amarilla.

4.1.5 Resultados obtenidos de *E. arnottianum*

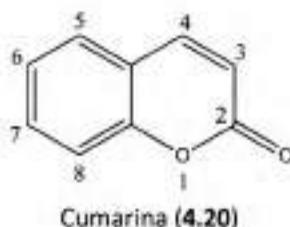
Al extracto final obtenido se le realizaron ensayos de actividad antimicrobiana frente a cepas de: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus hirae*, *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli*, mediante el método de Difusión en Disco. La mayor actividad se observó frente a las bacterias Gram +, particularmente contra *B. cereus* con una CMI = 2,19 mg/mL. La **Tabla 4.1** resume el diámetro de los halos de inhibición obtenidos a distintas concentraciones frente a distintas cepas de *B. cereus*.

Tabla 4.1: Ensayos de Inhibición bacteriana de *E. arnottianum* del extracto purificado.

Cepas	<i>E. arnottianum</i> Griseb Halos de inhibición			
	18,70 mg/mL	13,20 mg/mL	6,60 mg/mL	2,19 mg/mL
<i>B. cereus</i> MBC1	0,7	0,7	0,6	0,1
<i>B. cereus</i> MBC3	0,7	0,7	0,55	-
<i>B. cereus</i> MBC5	0,8	0,8	0,6	0,35
<i>B. cereus</i> MBC7	0,9	0,9	0,75	0,4
<i>B. cereus</i> C1	0,65	0,8	0,7	0,4

El experimento se realizó mediante la técnica de difusión en disco. Los halos de inhibición están expresados en mm.

El fraccionamiento del extracto mediante CC permitió obtener 40 fracciones de las cuales *Earn 8* y *Earn 40* precipitaron en forma de cristales, con alto rendimiento. El precipitado de la fracción *Earn 8* fue identificado inequívocamente como Cumarina (4.20) mediante metodologías de RMN (Tabla 4.2). En el espectro de ¹H-RMN (figura 4.2) se observa un grupo de señales a campos bajos, entre 6,40 y 7,50 ppm. Los dobletes a 7,73 y 6,42 ppm (*J* = 9,3 Hz, 1 H cada una) son debidos a los hidrógenos vinílicos sobre C3-C4. El resto de las señales, en la región de los protones aromáticos se encuentran solapadas y su adjudicación se logró a través del experimento de HSQC (figura 4.3, Tabla 4.2). En la tabla 4.2 se muestran las asignaciones de ¹³C y ¹H.



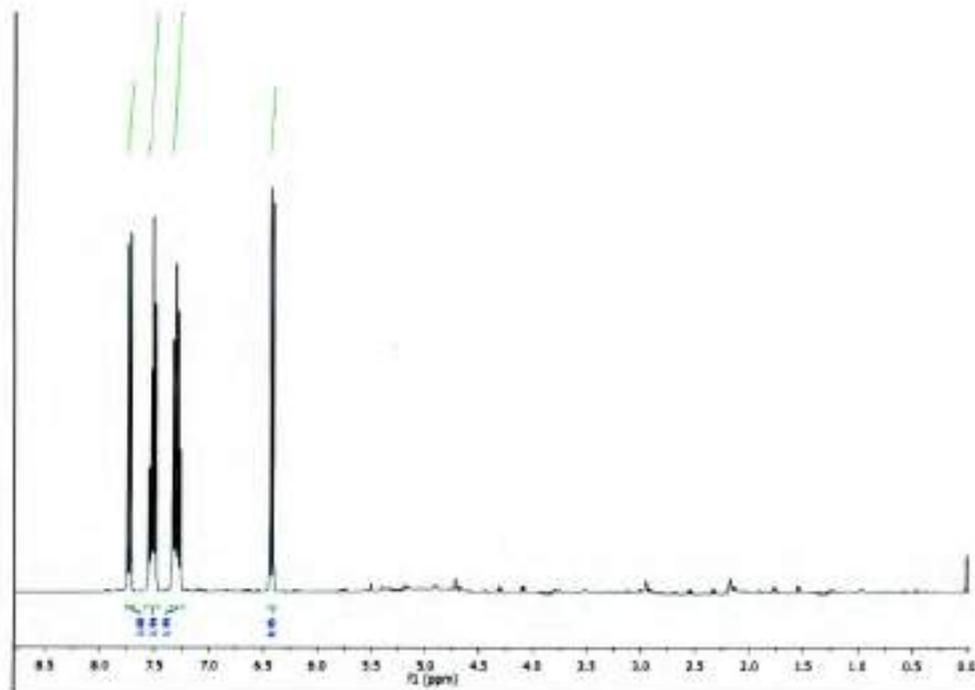


Figura 4.2: Espectro de ^1H -RMN de Cumarina (4.20).

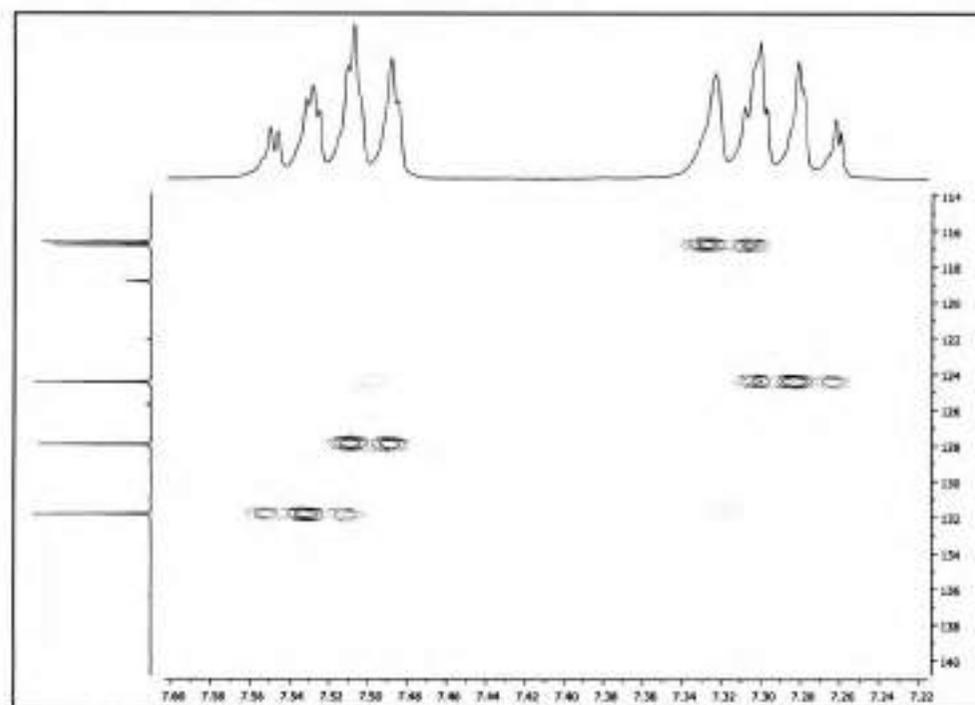


Figura 4.3: Ampliación del espectro HSQC de Cumarina.

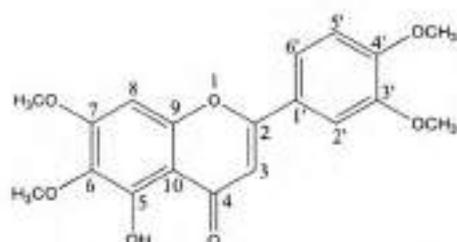
Tabla 4.2: Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C de Cumarina.

	^{13}C	^1H
2	160,6	
3	116,6	6,42 <i>d</i> (9,3)
4	143,5	7,73 <i>d</i> (9,3)
5	127,9	7,50 <i>dd</i> (8,2; 1,4)
6	124,4	7,28 <i>td</i> (8,2; 1,5)
7	131,8	7,53 <i>td</i> (8,0; 0,5)
8	116,8	7,31 <i>dd</i> (8,0; 0,5)
9	118,8	
10	154,1	

En Cl_2CD , TMS como estándar interno. δ en ppm, constantes de acoplamiento en Hz entre paréntesis.

Debido a que la actividad antimicrobiana de esta familia de compuestos está reportada y que particularmente Cumarina (**4.20**) presenta baja actividad antimicrobiana contra cepas de *B. cereus* (CMI>1000ppm) (Souza *et al.*, 2005), no se realizó el ensayo frente a este microorganismo.

El otro compuesto precipitado a partir de la fracción, *E. am 40*, (como se describió) fue identificado como 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona (**4.21**). La elucidación estructural del compuesto fue realizada mediante metodologías de RMN en una y dos dimensiones. En el espectro de ^1H -RMN (figura 4.4, tabla 4.3) se puede observar una señal a 12,72 ppm, característica de un átomo de H formando un enlace de puente hidrogeno como los presentes en las 5-hidroxi flavonas. La asignación de las señales del anillo A fue completada mediante comparación con bibliografía (Biekofsky, *et al.* 1991).



5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona (**4.21**)

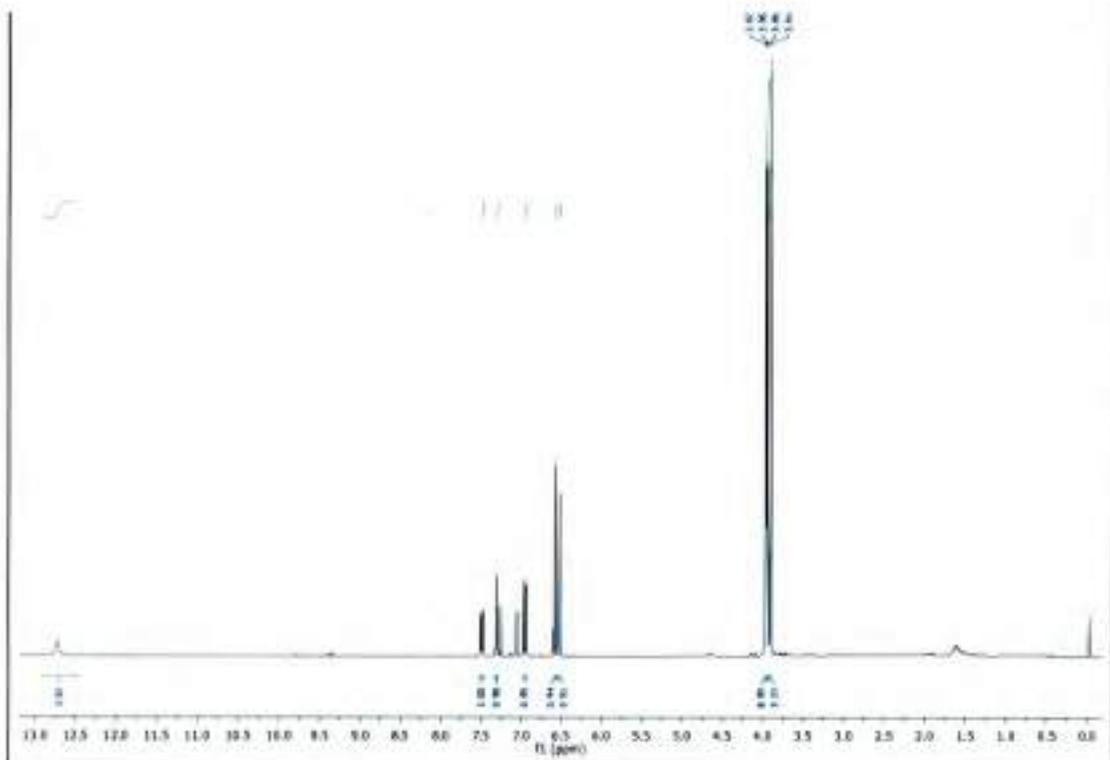


Figura 4.4: Espectro de ^1H -RMN de 5-hidroxi-3',4', 6,7-tetrametoxiflavona.

El espectro de correlación ^{13}C - ^1H a largo alcance (HMBC) muestra una fuerte señal entre las señales de los grupos OMe en las posiciones 6,7,3' y 5' lo cual fue decisivo para la asignación de las mismas, además de la señal del ^1H en posición 8. La figura 4.5 muestra las correlaciones de HMBC. En la tabla 4.3 se indican las asignaciones para las señales de ^{13}C y ^1H .

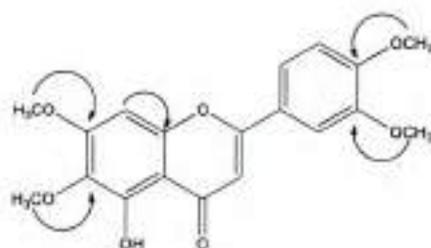


Figura 4.5: Correlaciones ^{13}C - ^1H HMBC.

Se determinó la actividad antimicrobiana de 5-hidroxi-3',4', 6,7-tetrametoxiflavona frente a cepas de *B. cereus* a distintas concentraciones (figura 4.6). A concentraciones de 18,7; 9,3; y 1,8 mg/mL, se observaron halos de inhibición de 2,0 mm, 0,5 mm y 0,0 mm, respectivamente. Como control se ensayó la actividad de antibióticos en una concentración de 0,5 mg/mL para cada uno obteniéndose los siguientes valores de halos de inhibición: Ciprofloxacina 17 mm, Azitromicina 13 mm, Oxofloxacina 20 mm y Cloramfenicol 9 mm.

Tabla 4.3: Asignaciones de las señales de 5-hidroxi-3',4', 6,7-tetrametoxiflavona.

	¹³ C	¹ H
2	163,9	
3	104,4	6,58;s;1H
4	182,6	
5	153,1	
6	132,6	
7	158,7	
8	90,6	6,52;s;1H
9	153,2	
10	106,9	
1'	123,7	
2'	108,6	7,31;d;(2,04);1H
3'	149,3	
4'	152,3	
5'	111,1	6,95;d;(8,56);1H
6'	120,0	7,49;dd;(2,04;8,56);1H
5-OH		12,72;s;1H
6-OMe	60,85	3,91;s;3H
7-OMe	56,3	3,95;s;3H
3'-OMe	56,1	3,97;s;3H
4'-OMe	56,1	3,95;s;3H

En Cl₃CD, TMS como estándar interno. δ en ppm, constantes de acoplamiento en Hz entre paréntesis.



Figura 4.6: Ensayo de actividad de 5-hidroxi-3',4', 6,7-tetrametoxiflavona contra Cepas de *B.cereus*. 1) 18,7 mg/mL; 2) 9,3 mg/mL; 3) 1,800 mg/mL.

El análisis de los valores obtenidos indica que el flavonoide presenta baja actividad frente al microorganismo ensayado.

4.2 *Eupatorium inulifolium*

4.2.1 Descripción botánica: (<http://www.floraargentina.edu.ar/>)

Eupatorium inulifolium Kunth. [Sin. *Autroeupatorium inulifolium* (Kunth) K. et R.]: Es un arbusto de 1-2 m de altura, con tallos densamente pubescentes (**figura 4.7.a**). Hojas pecioladas, ovado-rómbicas, atenuadas en la parte superior y redondeadas o cuneiformes en la base, decurrentes a lo largo del peciolo, aserradas, densamente pubescentes, de 7-13 x 2-5 cm. Capitulos numerosos dispuestos en cimas corimbiformes densas (**figura 4.7.b**). Involucro acampanado, de 5-6 x 4-5 mm. Filarios en 2-3 series, los externos más cortos, oblongolanceolados, ligeramente pubérulos. Receptáculo plano, glabro. Flores 10-15, blancas y fragantes. Aquenios negros con glándulas sésiles.

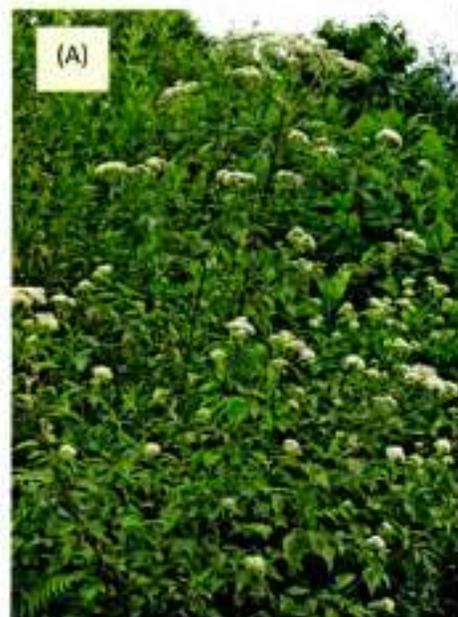


Figura 4.7.A: Ejemplar en floración de *E. inulifolium*. B: Capítulos de *E. inulifolium*.

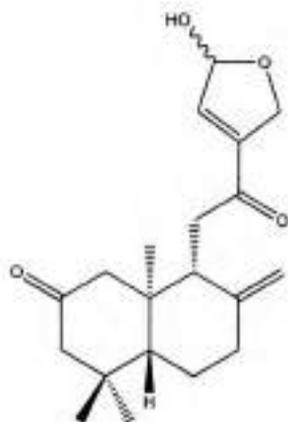
4.2.2 Distribución y Hábitat

En la República Argentina crece en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Corrientes, Córdoba, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, y Tucumán, a una elevación entre 0 y 2000 msnm (Zuloaga & Morrone, 1999).

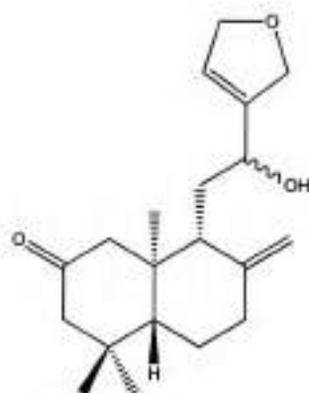
4.2.3 Antecedentes de *E. inulifolium*

La especie *E. inulifolium* es conocida como "sanalotodo" o "yerba de María" en el noreste de Argentina. Es utilizada en medicina popular para el lavado de llagas como de otras afecciones cutáneas (Ferraro *et al.*, 1977). En lo que respecta a la actividad antimicrobiana, está reportado que el extracto no es activo frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Aspergillus niger* (Anesini & Perez, 1993).

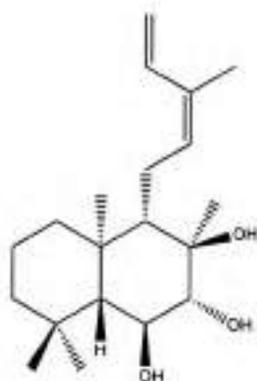
Reportes fitoquímicos previos de esta especie, recolectada en distintas regiones sudamericanas, informan la presencia de diterpenos tales como labdanos (4.22, 4.23, 4.24) (Bohlmann & Zdero, 1977), nor-labdanos (4.25, 4.26) (Bohlmann *et al.*, 1984; Oberti *et al.*, 1984), Kauranos (4.27, 4.28) (Bohlmann *et al.*, 1984). También se encuentra reportada la presencia de dos compuestos derivados de la vía del ácido shikímico: un flavonol, Quercetagenina-3,6,3'-tri-metiléter (4.29), (Herz, 2001) y un derivado de la cumarina (4.30) (Bohlmann *et al.*, 1984).



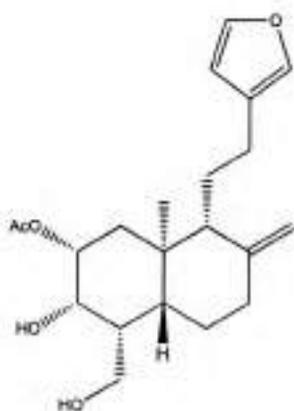
15, 16 - Dihydroaustrofolin-15-ol
(4.22)



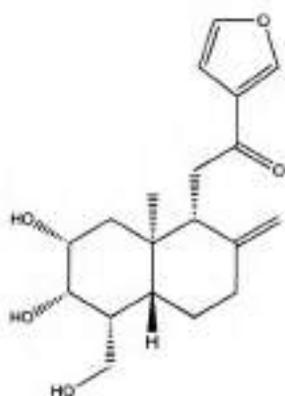
12-Desoxo-austrofolin-12-ol
(4.23)



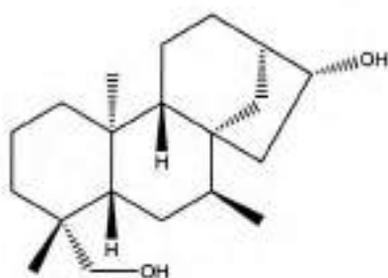
Austroinulina (4.24)



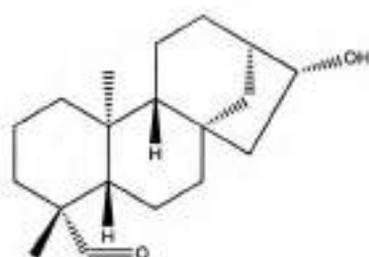
12-desoxo-austroeupeatorion (4.25)



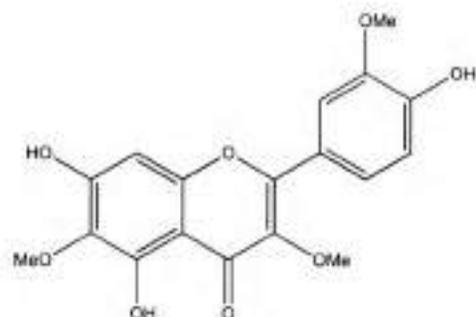
2-desacetyl-austroeupeatorion (4.26)



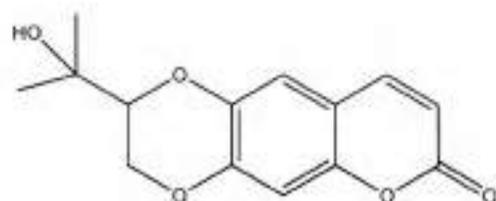
Kauran-17,19-diol (4.27)



Ent-Kaurenal (4.28)



Quercetagenin 3,6,3' trimetil éter (4.29)



Derivado de Cumarina (4.30)

4.2.4 Parte experimental

4.2.4.a Material vegetal

El material vegetal (Figura 4.7) fue recolectado en el mes de marzo de 2011, encontrándose la especie en estado de floración. El lugar de recolección fue La Calera, departamento Colón, Córdoba, República Argentina. La especie fue identificada por el Dr. L. Ariza Espinar. FCEF y N - UNC.

4.2.4.b Extracción y Fraccionamiento

Las partes aéreas de *E. inulifolium* se dejaron secar durante 10 días en ambiente adecuadamente ventilado. Luego fueron finamente molidas obteniéndose 908,70 g de material vegetal pulverizado. El material vegetal fue exhaustivamente extraído mediante lixiviación con CH_2Cl_2 a temperatura ambiente. El solvente fue evaporado en su totalidad, a presión reducida, obteniéndose 88,44 g de extracto (9,7% extraído). El extracto total fue redissuelto en 900 mL de EtOH a 40°C y se le adicionaron 900 mL de solución de $\text{Pb}(\text{AcO})_2$ / H_2O 4%. La mezcla fue colocada a temperatura ambiente durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se procedió a filtrar el precipitado formado, y se evaporó el EtOH a presión reducida. A la mezcla obtenida se la particionó con CH_2Cl_2 (400 mL x 3), lavándose esta última fase con H_2O para eliminar las trazas de $\text{Pb}(\text{AcO})_2$. La fase orgánica fue secada sobre Na_2SO_4 y el solvente fue evaporado a presión reducida obteniéndose 20,46 g de un sub-extracto purificado.

4.2.4.c Diversificación del sub-extracto

Se tomó una muestra de 10 g del sub-extracto obtenido como se describió en el apartado anterior, la cual fue resuspendida en 500 mL de EtOH; 4,84 mL de N_2H_4 fueron adicionados gota a gota. La mezcla se sometió a reflujo durante 7h

con agitación magnética. El crudo de reacción fue redissuelto en CH_2Cl_2 (250 mL) y se lavó con H_2O (3x100mL). El solvente orgánico (secado sobre Na_2SO_4 anh.) fue evaporado a sequedad bajo presión reducida, obteniéndose 4,08 g de extracto diversificado.

4.2.5 Discusión y Resultados obtenidos de *E. inulifolium*

Como ya se mencionó anteriormente, está reportado que el extracto de *E. inulifolium* no posee actividad antimicrobiana contra las cepas de interés (Anesini & Perez, 1993). El espectro de IR muestra una zona alrededor de 1750 cm^{-1} donde se observan varias señales que podrían adjudicarse a grupos carbonilos. Por otro lado, en el espectro de ^{13}C -RMN, se observan señales que indican la presencia del mencionado grupo funcional. Estas observaciones experimentales llevaron a suponer que el extracto puede ser modificado químicamente por reacción con N_2H_4 . Transcurrido el tiempo de reacción, se procedió a realizar los espectros correspondientes a fin de verificar si había evidencias de cambio químico. La **figura 4.8** muestra los espectros de IR del extracto antes y después de la diversificación.

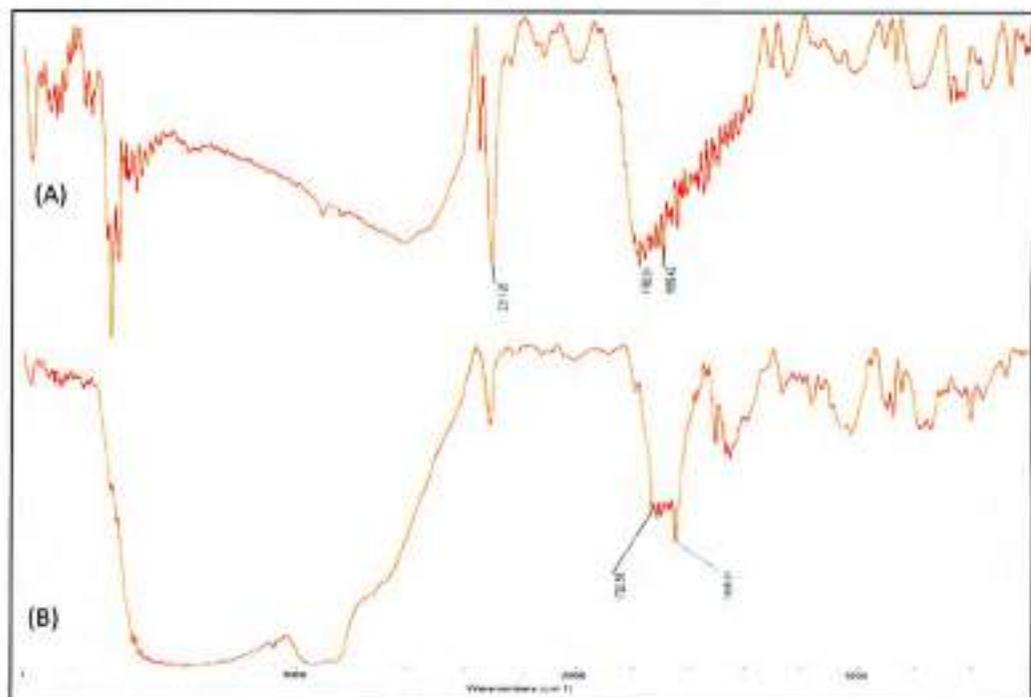


Figura 4.8: Espectros de IR de *E. inulifolium*. A: Extracto inalterado. B: Extracto diversificado.

Comparando ambos espectros de la **figura 4.8** se puede observar, en general, un cambio notable entre ambos espectros de IR. Particularmente en la zona de

señales atribuibles a grupos carbonilo hay una notable disminución en la intensidad de las señales en la región de 1780 cm^{-1} .

Otra evidencia que corrobora lo observado por IR, fueron los espectros de ^{13}C -RMN realizados antes y después de la diversificación (Figura 4.9). En el espectro perteneciente al extracto original se ve un número mayor de señales de átomos de carbono que en el extracto diversificado. Particularmente se observa que en la región característica de los grupos carbonilo (ca $180\text{-}210\text{ ppm}$) desaparecen por completo todas las señales. Por otro lado, también se observan evidencias de cambio químico en las señales del espectro de ^1H -RMN (Figura 4.10)

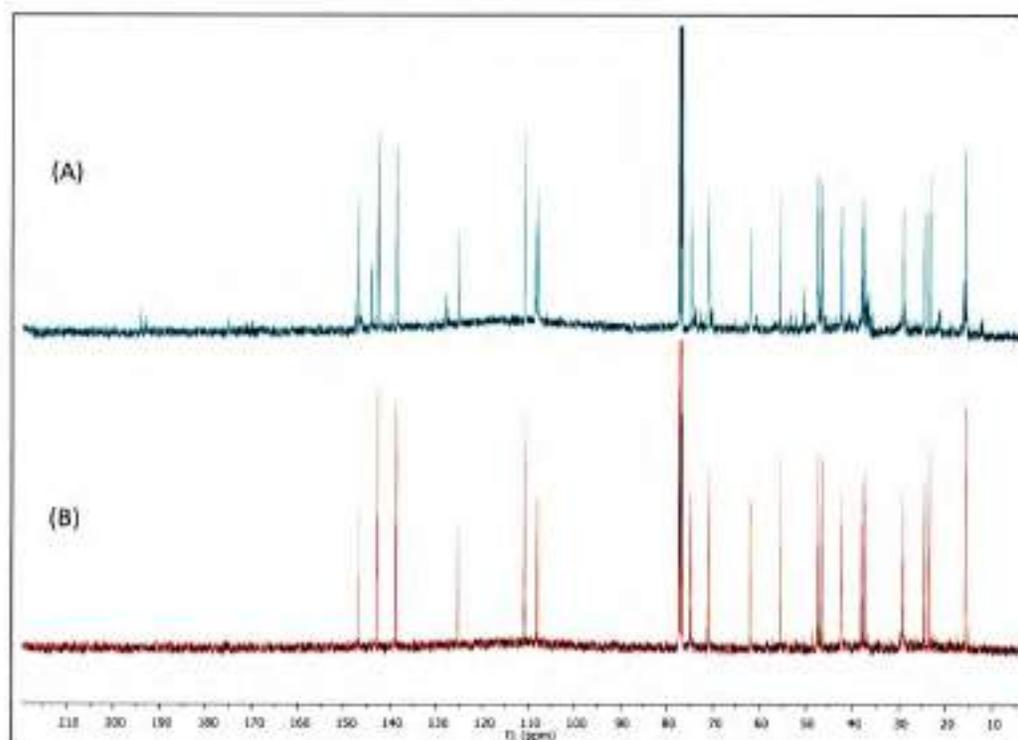


Figura 4.9: Espectro de ^{13}C -RMN de los extractos de *E. inulifolium*. A: Extracto inalterado. B: Extracto diversificado.

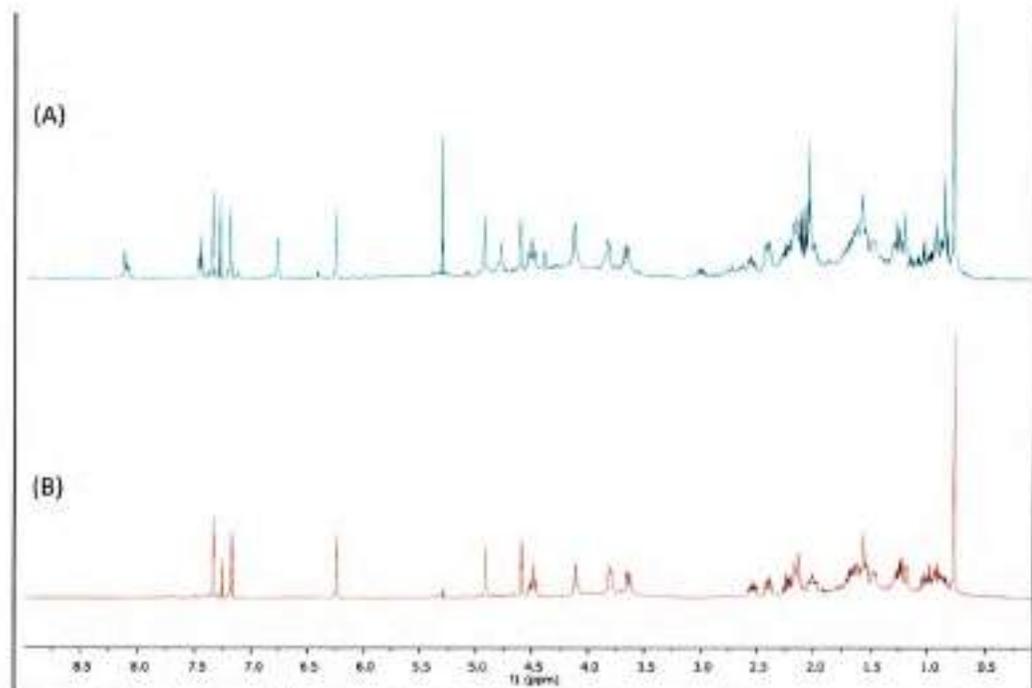


Figura 4.10: Espectro de $^1\text{H-RMN}$ de los extractos de *E. inulifolium*. A: Extracto inalterado. B: Extracto diversificado.

Se determinó la actividad biológica del extracto frente a cepas de *B. cereus*, y *S. aureus* (Figura 4.11) a una concentración de 15,9 mg/mL produciendo halos de inhibición de 2mm. En comparación con antimicrobianos comerciales tales como Ciprofloxacina, Azitromicina, Oxofloxacina y Cloramfenicol, se observó una actividad muy baja.



B. cereus M2 7-06



B. cereus M2 9-06



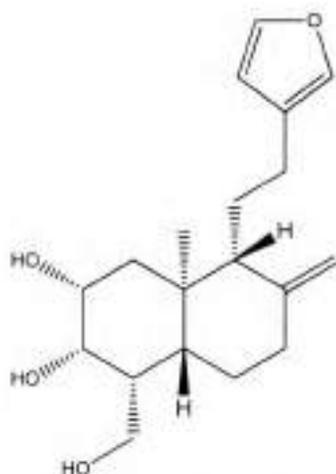
S. aureus M3 7-06



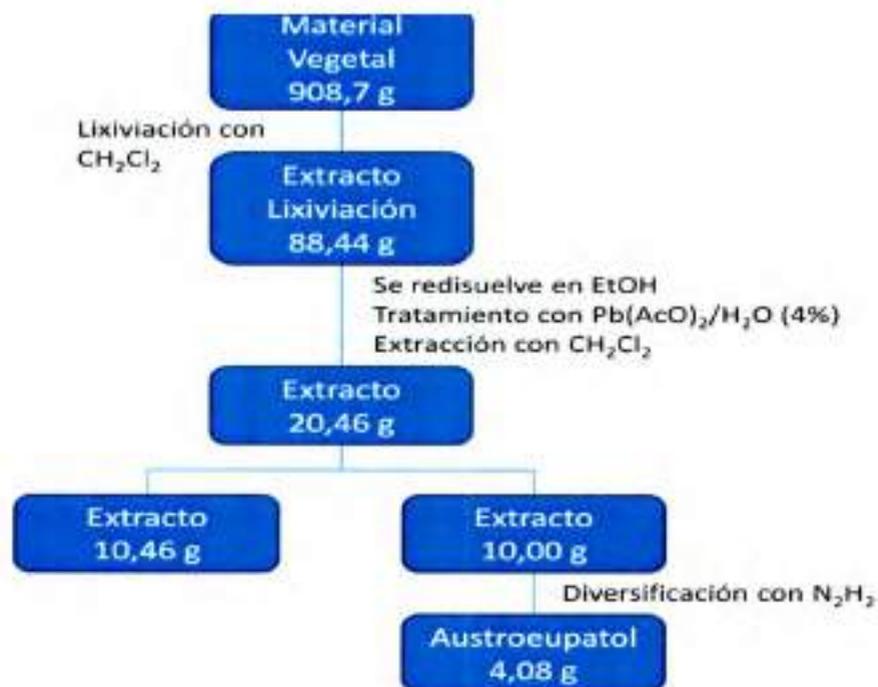
S. aureus M3 9-06

Figura 4.11: Actividad antimicrobiana del extracto diversificado de *E. inulifolium* frente a cepas de *B. cereus* y *S. aureus*. El disco 3 corresponde al extracto diversificado de *E. inulifolium*.

A partir del extracto diversificado de *E. inulifolium* se aisló e identificó inequívocamente, mediante distintas metodologías espectroscópicas, Austroepatol (4.31), un compuesto ya reportado en esta especie colectada en los Andes venezolanos (Triana *et al.*, 1995). Cabe destacar que este compuesto es el único presente en el extracto. El Esquema 4.2 muestra el método de obtención para el compuesto en cuestión.



Austroepatol (4.31)



Esquema 4.2: Método de obtención de Austroepatol (4.31).

El compuesto tiene una fórmula empírica $C_{19}H_{28}O_4$ deducida a partir del espectro de masa y de ^{13}C -RMN. En el espectro de ^{13}C -RMN (Figura 4.9, B) se puede observar la presencia de 19 señales, lo cual corroboró que se trataba de un norditerpeno. La presencia del grupo 3-furanoilo fue deducida a partir de 3 señales características en el espectro de 1H -RMN: 6,24 ppm (H-14), 7,33 ppm (H-15) y 7,17 ppm (H-16) (Figura 4.10, B). El doble enlace exocíclico muestra 2 señales características en el espectro de 1H -RMN a 4,91 ppm y 4,59 ppm, fue también corroborado mediante experimentos de HSQC. La estereoquímica del anillo de decalina fue asignada mediante comparación con los datos publicados por otros autores (Oberti *et al.*, 1984; Triana *et al.*, 1995). Las asignaciones de las señales de RMN se muestran en la Tabla 4.4.

El elevado rendimiento de Austroepatol (4.31) en el extracto diversificado puede ser debido, entre otros factores, a una reducción de Wolf-Kishner (Smith, 2010). En este tipo de reducción un compuesto carbonílico reacciona con hidracina, en presencia de base para dar el alcano correspondiente. Particularmente el 2-desacetil-austroepatorion (4.26) (Oberti *et al.*, 1984) puede reducirse para dar como producto Austroepatol (4.31) (Esquema 4.3). Cabe acotar que 2-desacetil-austroepatorion (4.26) fue encontrado como uno de los componentes principales de la especie colectada en terrenos de la Ciudad

Universitaria, Córdoba (Oberti *et al.*, 1984). Analizando los espectros de ^1H -RMN de los extractos de *E. inulifolium*, antes y después de la reacción con hidracina, claramente se observa que las señales a campos bajos atribuibles a los H-14, H-15 y H-16 ($\delta=6,76$ ppm; 7.45 ppm y 8.11 ppm, respectivamente) del anillo furánico desapantallados por la presencia del grupo carbonilo en C-12, han desaparecido y sólo se observan las señales de H-14, H-15 y H-16 del anillo furánico de Austroepatul (4.31). Esto permitiría proponer que el extracto de la especie recolectada en la localidad de La Calera, Córdoba, contiene como componentes mayoritarios una mezcla de 2-desacetil-austroepatorion (4.26) y de Austroepatul (4.31). Por ende, la reacción del extracto con hidracina convirtió al primero en el segundo.

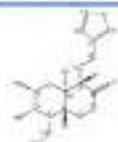
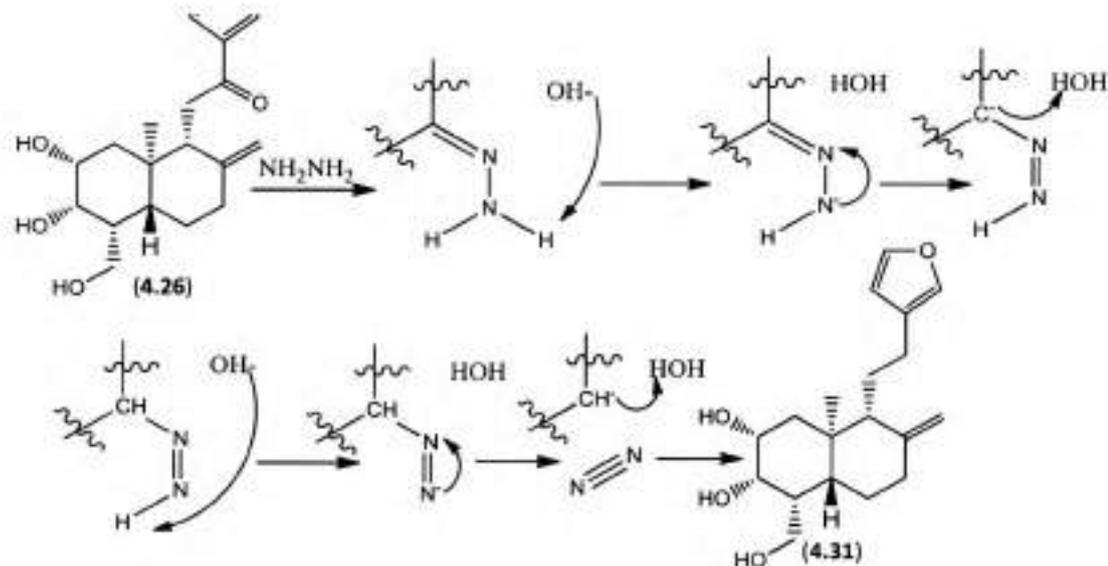


Tabla 4.4: Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C de austroepatul (4.31).
 δ (ppm)

	^1H	^{13}C
1 α	2,15 dd ($J=14,6-2,9$ Hz)	42,4
1 β	1,20 dd ($J=14,6-2,9$ Hz)	
2	4,13 bd ($J=2,9$ Hz)	71,1
3	3,8 bdd ($J=5,8-3,6$ Hz)	74,8
4	2,14 m	46,6
5	1,56 m	47,5
6 α	1,61 m	29,2
6 β	1,46 m	
7 α	2,44 ddd ($J=13,0-3,5-2,1$ Hz)	38,1
7 β	2,01 td ($J=13,0-5,5$ Hz)	
8		146,9
9	1,55 m	55,5
10		37,5
11a	1,75 m	24,5
11b	1,55 m	
12a	2,54 m	23,4
12b	2,24 m	
13		125,3
14	6,24 d ($J=0,9$ Hz)	110,9
15	7,33 dd ($J=1,4$ Hz)	142,7
16	7,17 br	138,7
17a	4,91 br	108,5
17b	4,59 br	
19a	4,49 dd ($J=10,0-10,0$ Hz)	62,1
19b	3,64 dd ($J=10,0-2,1$ Hz)	
20	0,77 s	15,7

En Cl_2CD , TMS como estándar interno. δ en ppm, constantes de acoplamiento en Hz entre paréntesis.

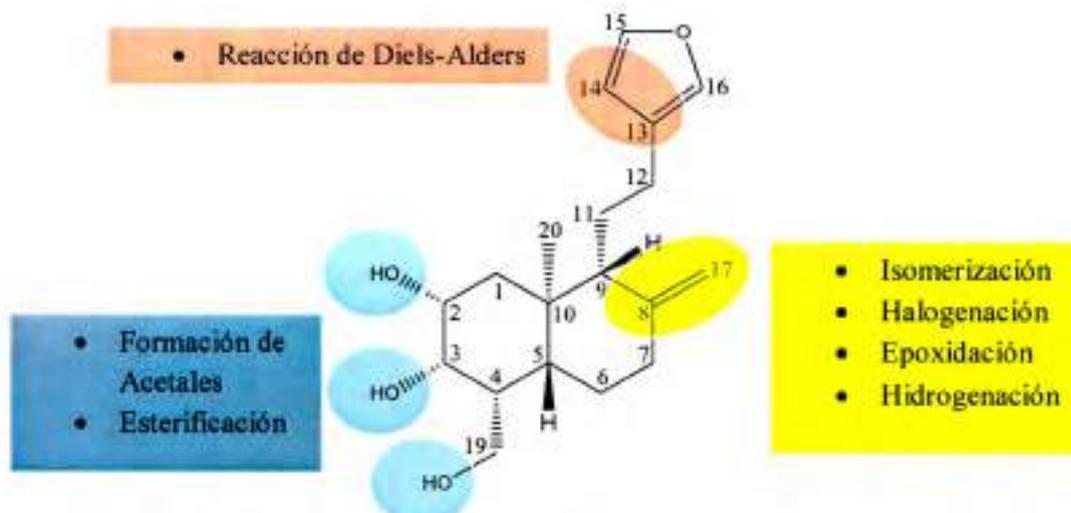


Esquema 4.3: Mecanismo de reducción del 2-desacetil-austroepatorion (4.26) para formar Austroepatol (4.31).

4.2.6 Obtención de derivados de Austroepatol

Austroepatol (4.31) contiene diversos grupos funcionales susceptibles de ser modificados químicamente, produciendo cambios estructurales que podrían conducir a una modificación de la actividad antimicrobiana.

Como objetivo se plantearon transformaciones químicas sobre los siguientes grupos funcionales: En hidroxilo primario 19-OH y en los hidroxilos secundarios 2-OH y 3-OH, formación de acetales y esterificación. Sobre el grupo furano de la cadena lateral, reacciones de Diels-Alder. Además, el doble enlace exocíclico (C8-C17) puede ser susceptible de isomerizar, hidrogenar, halogenar y epoxidar (Esquema 4.4).



Esquema 4.4: Grupos funcionales de Austroepatol (4.31) con las modificaciones químicas planteadas.

4.2.7 Experimental

4.2.7.1 General

Todas las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera de N_2 , salvo que se indique lo contrario. La evolución de todas las reacciones se monitorearon mediante CCD (Cromatografía en capa delgada) usando como fase estacionaria sílica gel y como fase móvil $CH_2Cl_2/AcOEt$ en proporción 1:1, salvo que se indique lo contrario. Las CC (Cromatografía en columna) fueron realizadas usando sílica gel G-60 como fase estacionaria.

Se evaluó la actividad biológica de los derivados obtenidos mediante la técnica de difusión en disco, con 24 cepas de microorganismos:

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1- <i>Listeria monocytogenes</i> 60-364/03 | 13- <i>S. typhimurium</i> CUB 29/08 |
| 2- <i>L. monocytogenes</i> 01-155 | 14- <i>S. enteritidis</i> CUB 77/20 |
| 3- <i>L. monocytogenes</i> 00/220 | 15- <i>S. typhimurium</i> CUB 08/28 |
| 4- <i>L. monocytogenes</i> 99/320 | 16- <i>S. gallinarum</i> CUB 954 |
| 5- <i>L. monocytogenes</i> 00/110 | 17- <i>Bacillus cereus</i> 3 |
| 6- <i>L. monocytogenes</i> 01/31 | 18- <i>B. cereus</i> 4 |
| 7- <i>L. monocytogenes</i> 01/01 | 19- <i>B. cereus</i> 2 |
| 8- <i>L. monocytogenes</i> 99/287 | 20- <i>B. cereus</i> 7 |
| 9- <i>Echerichia coli</i> | 21- <i>B. cereus</i> 5 |
| 10- <i>Staphylococcus aureus</i> M3 | 22- <i>B. cereus</i> 6 |
| 11- <i>Salmonella enteritidis</i> CUB 22/10 | 23- <i>B. cereus</i> Mori2 |
| 12- <i>S. gallinarum</i> 69/12 | 24- <i>B. cereus</i> c4 |

4.2.7.2 Modificaciones sobre el doble enlace C8-C17

4.2.7.2.a Isomerización (Vogel, et al. 1996)

A 78,0 mg (2,43 mmol) de Austroepatol (**4.31**) disueltos en 5 mL de tolueno seco se le añadieron 15,6 mg (0,09 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico y se llevó a reflujo durante 3 h con agitación magnética. Se eliminó el solvente de reacción y se particionó en CH₂Cl₂/ H₂O. Se obtuvieron 3,4 mg de un aceite de tonalidad dorada.

4.2.7.2.b Halogenación (Bromación)

Método A (Tietze & Eicher, 1989): A 43,0 mg (0,134 mmol) de Austroepatol (**4.31**) disueltos en 5 mL de CHCl₃ enfriados en baño de hielo y sal, se le añadieron 7 µL de Br₂ manteniendo la mezcla de reacción con agitación durante 1 h. Luego se añadieron 5 mL de H₂O y se extrajo con 5 mL de CH₂Cl₂. Se lavó con solución saturada de NaHCO₃ y se secó sobre MgSO₄ anhidro. Se obtuvieron 10,3 mg de un sólido oscuro. El análisis del espectro de RMN indicó la descomposición del sustrato.

Método B (Dominguez, 1973): A una solución de 45,6 mg (0,142 mmol) del sustrato en 3 mL de CCl₄ en agitación se le añadieron 100 µL de una solución al 35% de Br₂ en CCl₄. Luego se añadieron 5 mL de H₂O y se extrajo con 5 mL de CH₂Cl₂. Se lavó con solución saturada de NaHCO₃ y se secó sobre MgSO₄ anhidro. Se recuperaron 20,5 mg sustrato sin reaccionar.

4.2.7.2.c Epoxidación

Método A (Tietze & Eicher, 1989): A 2 mL de una solución de 60,2 mg (0,188 mmol) de Austroepatol en CHCl₃ seco se le añadieron 51,2 mg (0,296 mmol) de AMCPB bajo atmósfera de N₂ agitando hasta conseguir la disolución completa. Luego se dejó toda la noche a temperatura ambiente, al abrigo de la luz. Se agregó solución de NaHCO₃ al 10% y se particionó con CHCl₃. Se secó la fase orgánica con Na₂CO₃ anhidro. Se obtuvo 40,3 mg de un aceite dorado identificado como el sustrato sin reaccionar.

Método B (Gutierrez Nicolas, 2010): A 50,0 mg (0,156 mmol) de sustrato disueltos en 3 mL de CHCl₃ seco se le añadieron 40,4 mg (0,234 mmol) de MCPBA. Luego se añadieron 57,6 mg (0,685 mmol) de NaHCO₃ y se agitó la mezcla a reflujo durante 3 h. Se agregó solución de NaHCO₃ al 10% y se particionó con CHCl₃. Se secó la fase orgánica con Na₂CO₃ anhidro. Se recuperó el sustrato sin reaccionar.

Método C (Gutierrez Nicolas, 2010): A 53,3 mg (0,166 mmol) de sustrato disueltos en 5 mL de MeOH se le adicionaron 50,8 μ L (0,498 mmol) de H₂O₂ (31% , δ = 1,11 g/mL) y 83 μ L (0,083 mmol) de solución 1 M de NaOH. Se agitó la mezcla durante toda la noche. Pasado el tiempo de reacción se agregaron otros 50,8 μ L (0,498 mmol) de H₂O₂ y se llevó la mezcla a reflujo durante 2 h. Se recuperaron 51,8 mg de sustrato sin reaccionar.

4.2.7.2.d Hidrogenación (Tietze & Eicher, 1989)

17,6 mg (0,055 mmol) de Austroeupatol (**4.31**) se disolvieron en 4 mL de THF seco y se adicionaron cantidades catalíticas de Pd/C al 10%. El sistema fue secado bajo corriente de N₂. Se conectó al balón de reacción un globo lleno con H₂ y el sistema se cerró bajo esta atmósfera. Se dejó reaccionar durante 48 h. No se observaron cambios en el producto de partida

4.2.7.3 Modificación sobre el Grupo furanoilo

Reacción de Diels-Alders (Carreño *et al.*, 1996)

43,3 mg (0,135 mmol) del sustrato se disolvieron en 500 μ L de CH₂Cl₂ seco y se añadieron 39 mg (0,405 mmol) de anhídrido maleico, manteniendo agitación magnética constante hasta obtener una mezcla homogénea. La agitación se mantuvo a lo largo de 5 días a temperatura ambiente, añadiendo porciones de solvente a fin de mantener el volumen. No se observaron cambios en el perfil cromatográfico del sustrato.

4.2.7.4 Modificaciones sobre los grupos hidroxilo

4.2.7.4.1 Formación de acetales

4.2.7.4.1.a Isopropiliden derivados

Método A (De Wilde *et al.*, 1987; Vogel *et al.*, 1996): A 55,3 mg (0,172 mmol) de Austroeupatol (**4.31**) se le adicionaron 303,2 mg (2,22 mmol) de ZnCl₂ y 1,5 mL de Acetona, en un balón previamente evacuado. La mezcla se agitó manteniendo la temperatura a 20°C hasta completar la disolución; entonces se dejó con agitación a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla de reacción se colocó sobre 1,5 mL de solución saturada de K₂CO₃ y luego fueron añadidos 2,0 mL de éter etílico. El sólido resultante se filtró, realizando lavados con una mezcla de éter etílico /acetona 1:1. El filtrado resultante se evaporó a presión

reducida, quedando 12,5 mg de un aceite el que fue identificado como el sustrato.

Método B (Karamé *et al.*, 2011): En un balón seco, se agregaron 43,9 mg (0,137 mmol) de sustrato. Se le adicionaron 3,0 mg (0,011 mmol) de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 1,0 mL de acetona. La mezcla se agitó durante toda la noche. Transcurrido este tiempo de reacción, el solvente fue evaporado a sequedad y la mezcla se separó por CC sobre sílica gel usando como mezcla de elución Hexano/AcOEt 4:1. No se observaron cambios estructurales en el sustrato.

Método C (Dauben *et al.*, 1954; Halabi, 2000; Tietze & Eicher, 1989) : Se colocaron 50,0 mg (0,156 mmol) de Austroepatol, en un balón previamente evacuado. Se añadieron 29,8 mg (0,173 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico y 4 mL de acetona anhidra. La mezcla se agitó durante 22 h a 56°C. El crudo de reacción se llevó a sequedad y se retomó con CH_2Cl_2 (5 mL), lavándose con H_2O (3x5 mL). Se obtuvieron 29,1 mg de un aceite que fue identificado como el sustrato sin modificar.

4.2.7.4.1.b Benziliden derivados (Holder & Fraser-Reid, 1973; Vogel *et al.*, 1996)

A 59,2 mg (0,185 mmol) de Austroepatol (**4.31**) se le añadieron 31,2 mg (0,098 mmol) de ZnCl_2 y 80 μL de benzaldehído. Se agitó hasta disolución (10 h) y luego se dejó reaccionar con agitación durante 18 h a temperatura ambiente. Se añadió hielo a la mezcla de reacción y se extrajo exhaustivamente con éter etílico. Se obtuvo un aceite de color amarillo que fue purificado mediante CC usando como fase móvil CH_2Cl_2 . Se obtuvo el sustrato sin ningún tipo de modificación.

4.2.7.4.2 Esterificaciones

Síntesis de 19-benzoil-austroepatol (Tietze & Eicher, 1989): En un balón previamente evacuado se colocaron 44,6 mg (0,139 mmol) de Austroepatol (**4.31**) en 500 μL de piridina anhidra y se añadieron 19,0 μL de cloruro de benzoilo. La mezcla se mantuvo con agitación magnética a 50°C durante 3 h. A continuación se eliminó el solvente a presión reducida y se purificó el residuo (143,6 mg) mediante CC, usando como solvente de corrida una mezcla CH_2Cl_2 / AcOEt 7:3. Se obtuvieron 9,2 mg (0,022 mmol) del producto esperado (15,6%) .

Síntesis de 19-octanoil-austroepatol: 39,4 mg (0,123 mmol) de sustrato se colocaron en 500 mL de piridina anhidra y se añadieron 25 μL de Cloruro de Octanoilo, procediendo de la misma manera detallada anteriormente. Se obtuvieron 0,9 mg de producto (1,63%).

Síntesis del derivado acetilado: A 40 mg (0,125 mmol) de Austro eupatol se le adicionaron 7,26 μL de piridina anhidra y 226,8 μL de anhídrido acético. La mezcla se llevó a reflujo durante 1,5 h. Transcurrido este tiempo se añadió 1,0 mL de solución al 2% de HCl y se extrajo exhaustivamente con éter etílico. La fase orgánica fue secada sobre MgSO_4 anhidro y el solvente fue eliminado por evaporación a presión reducida. Se obtuvieron 18,6 mg de una mezcla de isómeros acetilados.

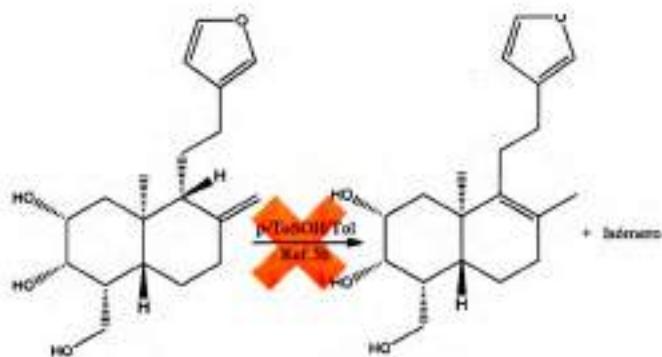
Síntesis de 19-*p*-toluensulfonyl-austro eupatol (Kabalka *et al.*, 1986): A una solución de 40 mg (0,125 mmol) de Austro eupatol (**4.31**) en 2,0 mL de CHCl_3 anhidro, se le añadieron 50 μL de piridina anhidra y se sometió a agitación magnética en un baño de hielo. Luego fueron adicionados 30 mg de *p*- $\text{MeC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{Cl}$ (cloruro de *p*-toluensulfonyl) en 3 porciones. La mezcla se dejó a temperatura ambiente con agitación durante 20 h hasta la desaparición completa del sustrato. El solvente fue removido mediante evaporación a presión reducida y el residuo fue purificado mediante CC usando como fase móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 7:3. Se obtuvieron 28,6 mg de un aceite que fue identificado como el epímero de C-2 de Austro eupatol (**4.31**) (71,4%).

4.2.8 Resultados y discusión

4.2.8.1 Modificaciones sobre el doble enlace

4.2.8.1.a Isomerización

Con el objetivo de isomerizar el doble enlace exocíclico C8-C17 a fin de obtener el doble enlace en la posición más estable C8-C9, se hizo reaccionar el sustrato Austro eupatol (**4.31**) con *p*- $\text{MeC}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$ (ácido *p*-toluensulfónico), en tolueno como solvente a reflujo durante 3 h (Vogel *et al.*, 1996). Esta reacción no condujo al compuesto deseado y tampoco se obtuvo el compuesto de partida. En el espectro de ^1H -RMN del producto obtenido (figura 4.12) se observan dos singletes anchos a δ 4,91 y 4,59 ppm indicando la presencia del doble enlace exocíclico. El compuesto mayoritario fue identificado como un estereoisómero (epímero) de la posición C-2. No fue posible identificar el compuesto minoritario debido al bajo rendimiento del mismo.



Esquema 4.5: Esquema de reacción de Austroeupatol (4.31) con $p\text{-MeC}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$ en tolueno.

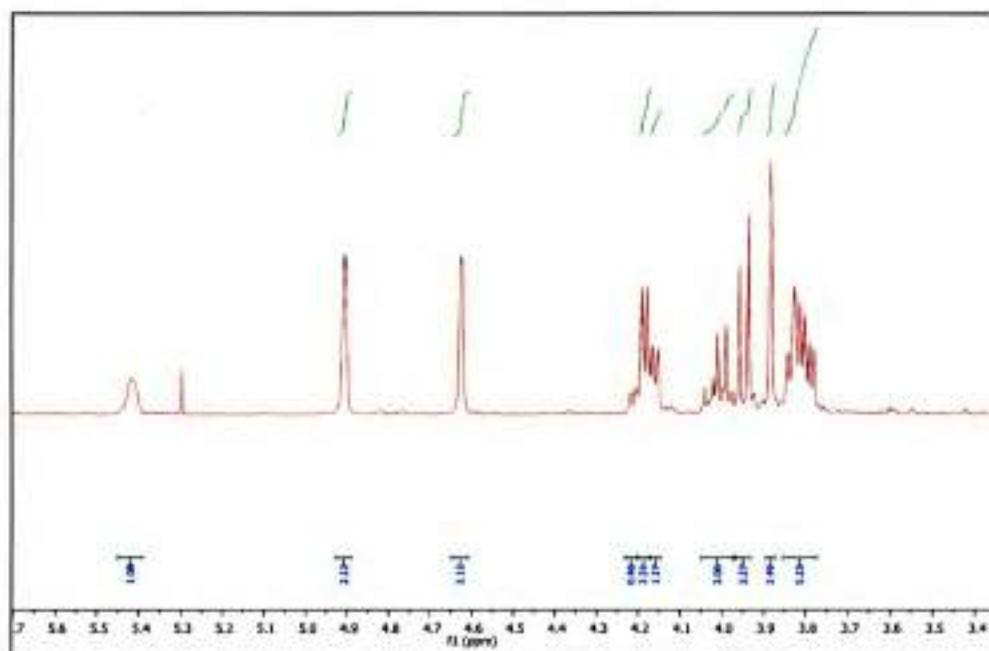
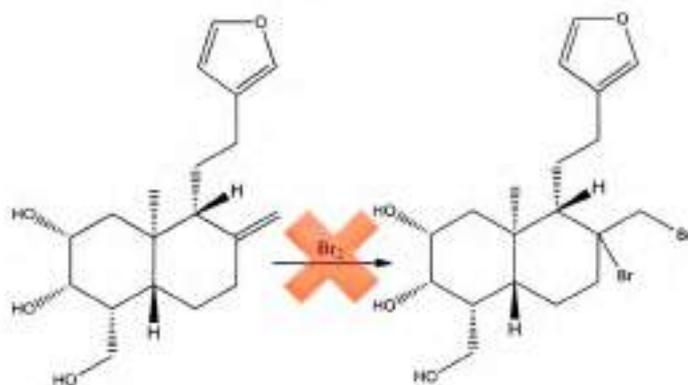


Figura 4.12: región del espectro de ^1H -RMN entre δ 5.7 y 3.3 ppm del producto de isomerización.

4.2.8.1.b Halogenación (Bromación)

Se ensayaron dos métodos diferentes de halogenación con la finalidad de obtener derivados halogenados del diterpeno. El primer método que se llevó a cabo fue el agregado de Br_2 sobre una solución clorofórmica del sustrato a baja temperatura (Tietze & Eicher, 1989). Se observó que el sustrato se descomponía, adquiriendo una coloración negra.

En el segundo método se agregó una solución de Br_2 al 35% en CCl_4 a una solución clorofórmica del sustrato. No se observan cambios en los espectros de ^1H -RMN cuando se compararon los del compuesto de partida con el del crudo de reacción (Ver discusión de la reactividad en la sección 4.2.9).



Esquema 4.6: Reacción de bromación del doble enlace.

4.2.8.1.c Epoxidación

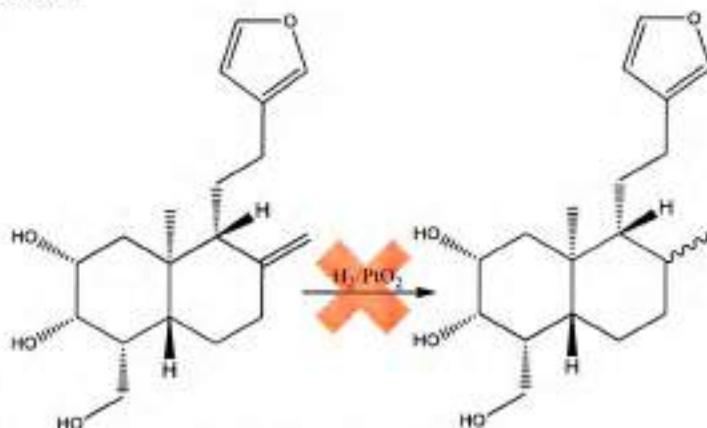
Para realizar la semisíntesis del oxirano derivado se ensayaron 3 métodos diferentes. Se hizo reaccionar el sustrato en presencia de 1 equivalente de AMCPB (Ácido *m*-cloroperbenzoico) en CHCl_3 a temperatura ambiente durante 12 h (Tietze & Eicher, 1989). Por otro lado, se colocaron 1,5 equivalentes de MCPBA en CHCl_3 , en este caso con el agregado de una base débil como NaHCO_3 . Por último se ensayó la reacción de epoxidación con H_2O_2 en MeOH y en presencia de NaOH (Gutierrez Nicolás, 2010). En todos los casos, se recuperó el sustrato sin reaccionar.



Esquema 4.7: Reacción de formación del epóxido por tres métodos diferentes.

4.2.8.1.d Hidrogenación

A fin de realizar la hidrogenación del doble enlace se procedió a colocar el compuesto disuelto en THF en atmósfera de H_2 gaseoso en presencia de PtO_2 como catalizador (Tietze & Eicher, 1989). Se agitó durante 48 h, no registrándose ningún cambio tanto en los perfiles espectroscópicos, como en los cromatográficos.



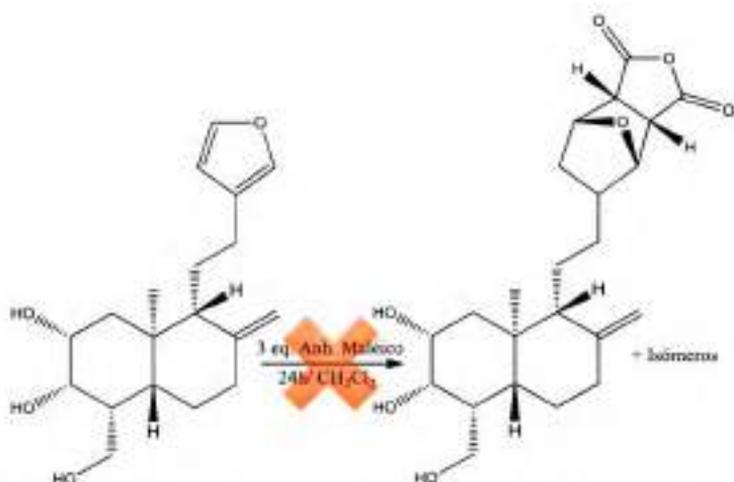
Esquema 4.8: Hidrogenación catalítica del doble enlace.

4.2.8.2 Modificación sobre el Grupo furanillo

Reacción de Diels-Alders

Con el objetivo de obtener el aducto correspondiente a la cicloadición al dieno furano, se procedió a disolver el compuesto en CH_2Cl_2 y se añadieron 3 eq. de anhídrido maléico (dienófilo) y se colocó a reflujo por 24 h (Carreño et al.,

1996). Se recuperó el sustrato sin reaccionar lo cual fue deducido a partir del espectro de $^1\text{H-RMN}$ donde se pueden observar las señales características del grupo 3-furanoilo a δ 6,24 ppm (H-14), 7,33 ppm (H-15) y 7,17 ppm (H-16).

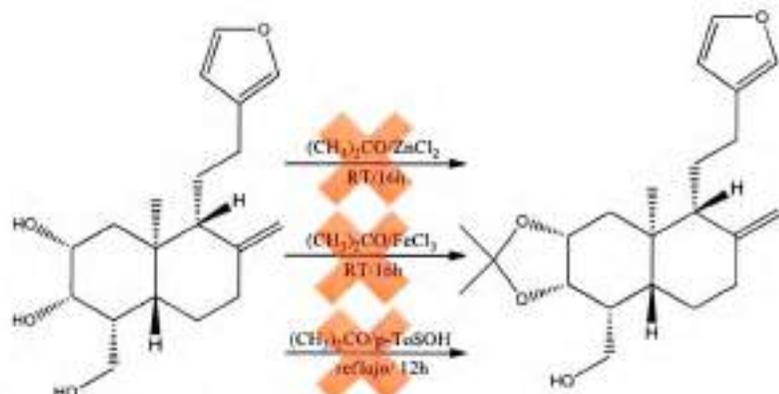


Esquema 4.9: Cicloadición entre Austroepatol y Anhídrido maléico.

4.2.8.3 Modificaciones sobre los grupos hidroxilo

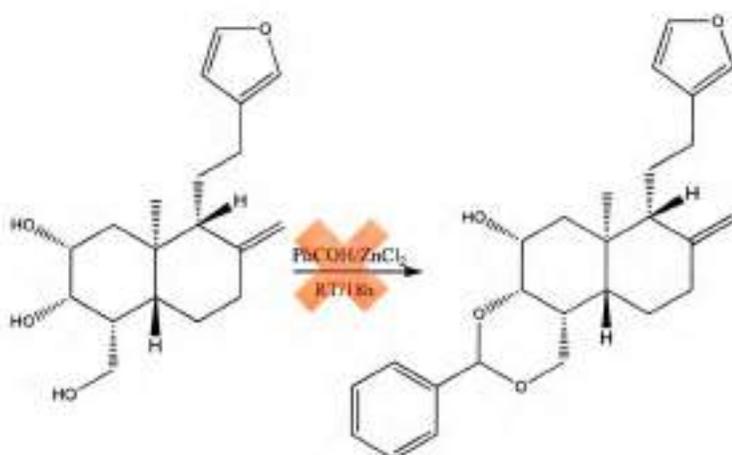
4.2.8.3.a Formación de acetales

Otro de los objetivos fue la obtención de compuestos conteniendo el anillo 1,3 dioxolano, por lo cual se planteó la formación de acetales con 2 reactivos distintos: acetona y benzaldehído para formar el isopropilidén y el benzilidén derivado, respectivamente. Para formar el isopropilidén derivado, se disolvió el diterpeno (**4.31**) en acetona y se ensayaron como catalizadores 2 ácidos de Lewis: ZnCl_2 (De Wilde *et al.*, 1987) y FeCl_3 (Vogel *et al.*, 1996), ambos durante 16h. También se usó como catalizador $p\text{-MeC}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$, a reflujo 12 h (Halabi, 2000).



Esquema 4.10: Síntesis del isopropiliden-derivado.

Para la obtención del benziliden derivado (Holder & Fraser-Reid, 1973), se disolvió el sustrato en benzaldehído y se agitó durante 18h a temperatura ambiente, en presencia de $ZnCl_2$ como catalizador (Vogel *et al.*, 1996). En ninguno de los métodos ensayados se obtuvo el producto esperado, recuperándose siempre el sustrato sin reaccionar.

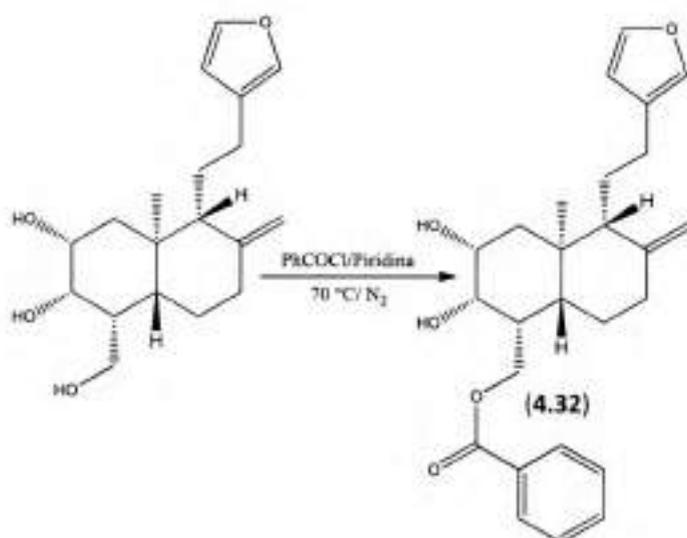


Esquema 4.11: Síntesis del benziliden-derivado.

4.2.8.3.b Esterificaciones

Se probaron distintos tipos de reactivos para intentar esterificar los grupos hidroxilo presentes en el diterpeno. En la primera experiencia el sustrato se hizo reaccionar con cloruro de benzoilo ($PhCOCl$) en piridina a $70^\circ C$ (Tietze & Eicher,

1989) a fin de obtener el éster benzoico de Austroeuropatol. En el espectro de ^1H -RMN (Figura 4.13) puede observarse que las señales correspondientes a H-2 y H-3 no sufrieron un cambio significativo de corrimiento químico, en cambio, las señales de H-19a y H-19b, aparecen a campos más bajos, a δ 5,03 y 4,53 ppm respectivamente. Esto indica que los átomos H están más desapantallados, sugiriendo que se produjo una modificación en la estructura del compuesto de partida. El espectro de correlación ^{13}C - ^1H HMBC (Figura 4.14) muestra una señal correspondiente a un fuerte acoplamiento entre H-19 y el grupo carbonilo a δ 167,1 ppm del éster benzoilo. El espectro de correlación ^{13}C - ^1H HSQC y el espectro de masas confirman una fórmula empírica de $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_5$. En la Tabla 4.5 se muestran las asignaciones de ^1H -RMN del benzoil derivado (4.32). Cabe acotar que el rendimiento de esta reacción fue muy bajo (15,6%).



Esquema 4.12: Síntesis de 19-Benzoil-Austroeuropatol (4.32).

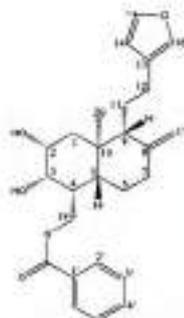


Tabla 4.5: Espectros de RMN ^1H y ^{13}C de 19-benzoyl-austroepatol (4.32).

δ (ppm)		
	^1H	^{13}C
1 α	2,19 dd ($J=3,0-14,0$ Hz)	42,1
1 β	1,24 dd ($J=3,0-14,0$ Hz)	
2	4,16 dd ($J=3,0-6,3$ Hz)	70,5
3	3,85 dd ($J=3,0-6,3$ Hz)	73,3
4	2,24 m	45,9
5	1,62 m	47,3
6 α	1,91 dd ($J=4,3-13,2$ Hz)	29,1
6 β	1,61 m	
7 α	2,47 m	37,9
7 β	2,06 m	
8		146,8
9	1,6 m	55,6
10		37,7
11a	1,71 m	24,3
11b	1,61 m	
12a	2,25 m	23,4
12b	2,57 m	
13		125,3
14	6,26 s an.	110,9
15	7,35 d an. ($J=1,5$ Hz)	142,8
16	7,19 s an.	138,8
17a	4,96 s an.	108,1
17b	4,64 s an.	
19a	5,03 dd ($J=5,4-11,8$ Hz)	63,4
19b	4,53 dd ($J=4,3-11,8$ Hz)	
20	0,95 s	15,7
CO OBz		167,1
1'		130,0
2'	8,01 dd ($J=1,3-8,5$ Hz)	129,5
3'	7,49 dd an. ($J=8,0$ Hz)	128,5
4'	7,56 dd an. ($J=1,3-8,0$ Hz)	133,1

En Cl_2CD , TMS como estándar interno. δ en ppm, constantes de acoplamiento en Hz entre paréntesis.

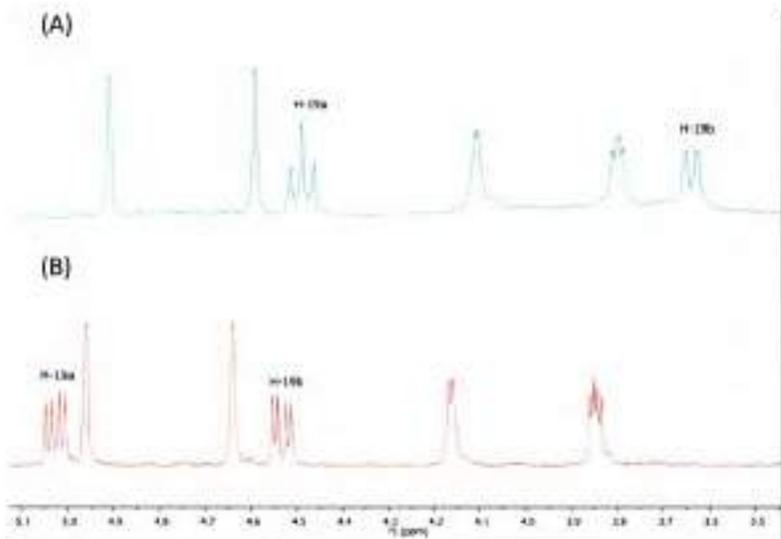


Figura 4.13: Ampliación de espectros de ¹H-RMN, solo se muestra la región relevante de δ 3,5 a 5,1 ppm. A: Austro eupatol. B: 19-benzoyl-austro eupatol.

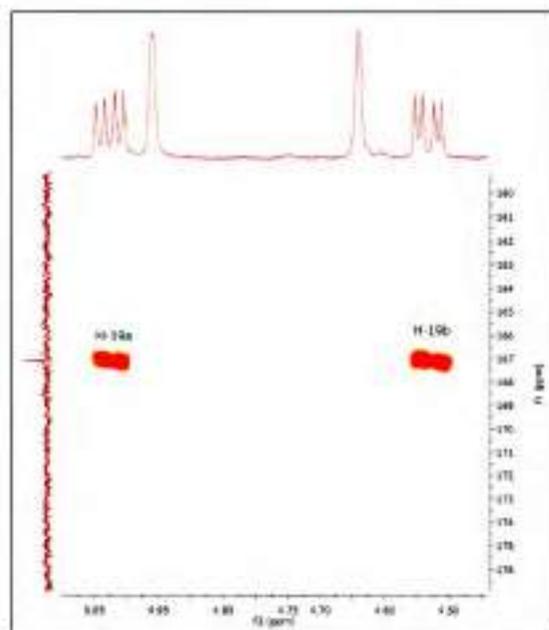
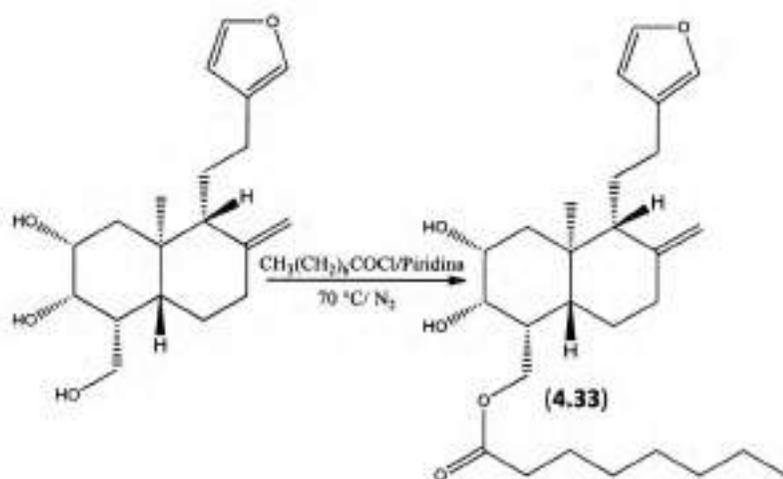


Figura 4.14: Ampliación del espectro de correlación C-H HMBC de 19-benzoyl-austro eupatol.

Se evaluó la posible actividad antimicrobiana del derivado obtenido frente a 24 cepas de microorganismos. El mismo no mostró actividad apreciable frente a ninguna de las cepas empleadas.

A los fines de generar el octanoil-éster derivado de austro eupatol (**4.31**) se colocó el diterpeno en presencia de cloruro de octanoilo empleando las mismas

condiciones que en la experiencia anterior. El espectro de ^1H -RMN del producto de reacción muestra que las señales correspondientes a H-2 y H-3 permanecen sin cambio considerable en su corrimiento químico, mientras que las señales de H-19a (δ 4,49 ppm) y H-19b (δ 3,64 ppm) ahora aparecen a δ 4,72 y 4,25 ppm respectivamente (**Figura 7**), lo cual indica que se esterificó el oxidrilo primario de la posición C-19 al igual que en la reacción anterior con cloruro de benzoilo. El espectro de masas muestra un ion molecular de $m/z= 446,30$, lo que correlaciona con una fórmula empírica de $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_5$. El rendimiento de la reacción fue muy bajo (<2%) para realizar una caracterización completa del sustrato y las pruebas biológicas correspondientes.



Esquema 4.13: Síntesis de 19-octanoyl-austroepatol (**4.33**).

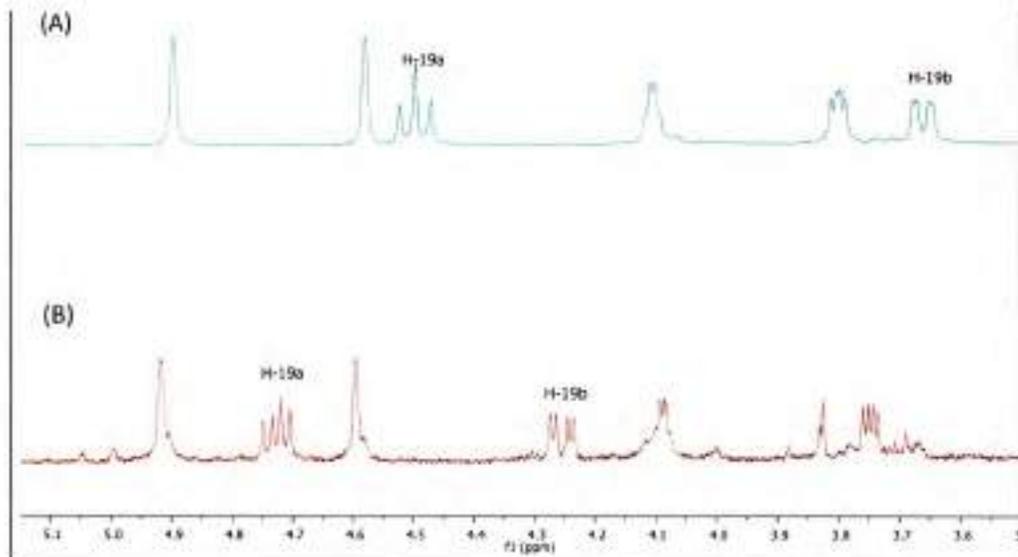
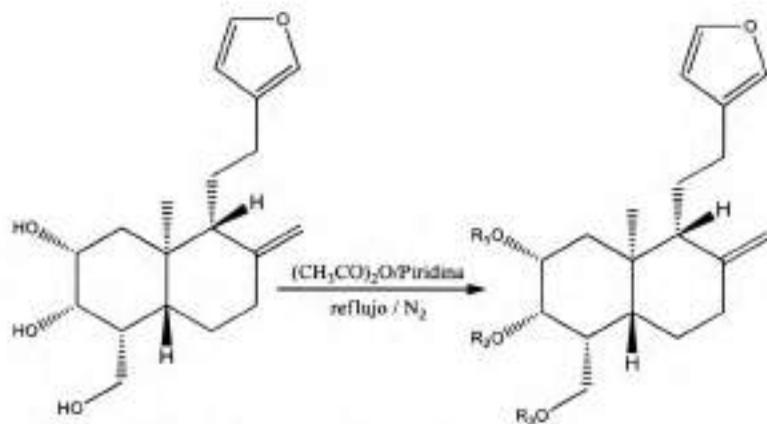


Figura 4.15: A: espectro de ¹H-RMN de Austroeuropatol. B: espectro de ¹H-RMN de 19-octanoyl-austroeuropatol. (4.33) Región: 3,5 a 5,2 ppm.

La tercera reacción de esterificación se llevó a cabo empleando anhídrido acético como agente de acilación. El procedimiento se realizó colocando el diterpeno en presencia de anhídrido acético en piridina a reflujo durante 1 h (Tietze & Eicher, 1989). Los espectros de ¹H-RMN permitieron identificar una mezcla de compuestos parcialmente acetilados. Particularmente el espectro de ¹³C-RMN muestra varias señales pertenecientes a distintos grupos carbonilo de éster acetato con corrimientos químicos alrededor de δ 170,6 y 170,1 ppm. En el espectro de ¹H-RMN se puede observar que desaparecieron completamente las señales de los H-2, H-3 y H-19 (Figura 4.16) pertenecientes al sustrato. Los múltiples intentos para separar la mezcla de derivados acetilados no dieron resultado positivo, probablemente esto sea debido a las similitudes en los *rf* pudiendo tratarse de derivados diacetilados.

La mezcla fue evaluada para determinar si poseía actividad biológica pero fue inactiva frente a las 24 cepas de microorganismos ensayadas.



Esquema 4.14: Síntesis de los derivados acetilados.

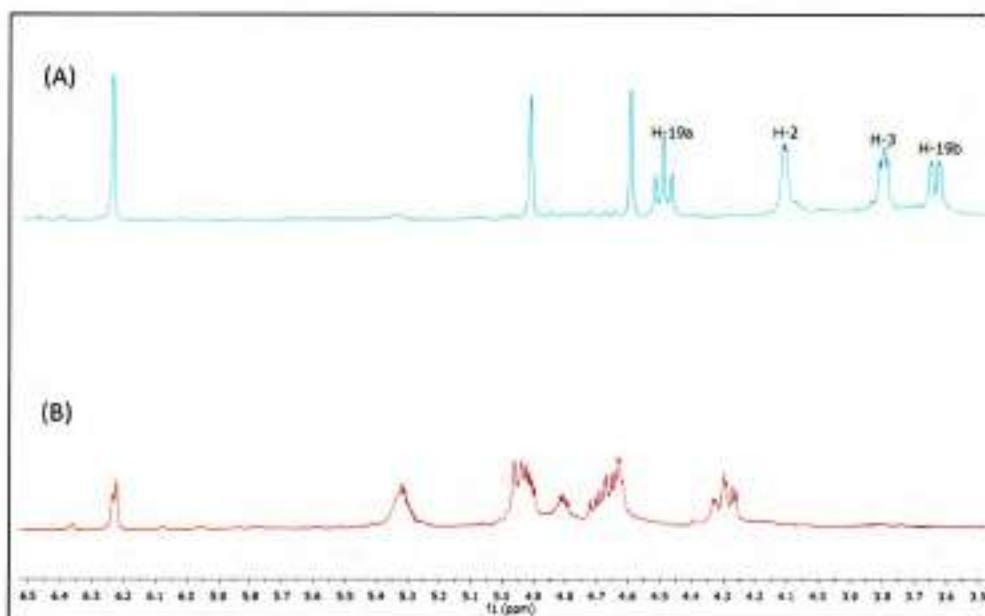
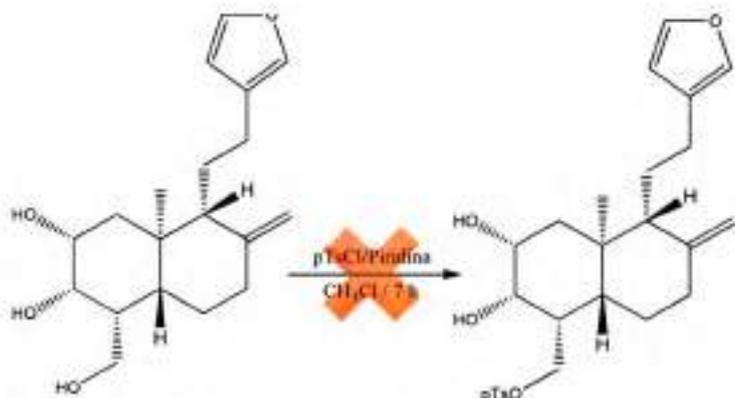


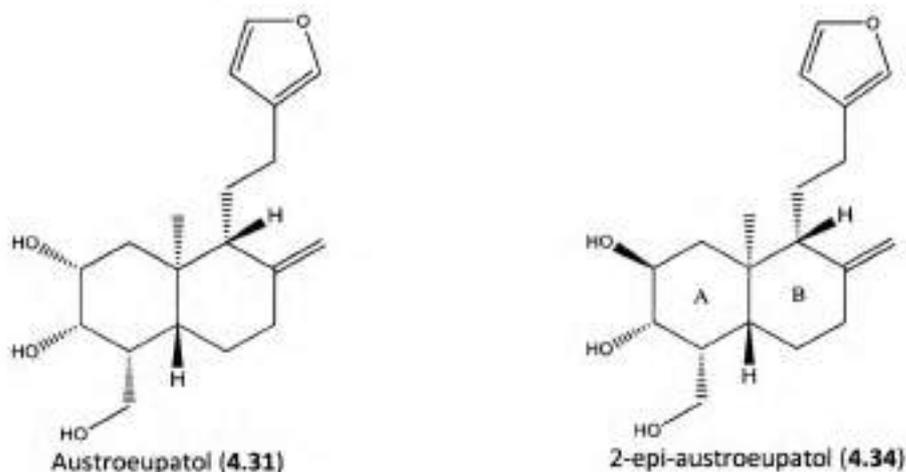
Figura 4.16: A: espectro de ^1H -RMN de Austroepatol. B: espectro de ^1H -RMN de la mezcla de derivados acetilados. Se muestra la región desde 3,5 a 6,5 ppm.

Se intentó convertir el hidroxilo primario de C-19 en un grupo más sensible de sufrir modificaciones convirtiéndolo en el éster del $p\text{-MeC}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$ (Ácido p -toluensulfónico). La reacción se realizó empleando $p\text{-MeC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{Cl}$ (Cloruro de p -toluensulfonilo) en piridina (Kabalka *et al.*, 1986).



Esquema 4.15: Síntesis de 19-sulfonyl-austroeuropatol.

De la purificación del crudo de reacción se aisló un producto mayoritario, el cual no era el producto esperado. El mismo presentó un r_f de 0,45 en CCD distinto al del sustrato que se determinó a 0,22, en la mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 1:1. Los espectros de masas y el espectro de ^{13}C -RMN permiten deducir una fórmula empírica de $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_4$, coincidente con la fórmula del Austroeuropatol (4.31) lo cual indica que no ocurrió la reacción esperada. Mediante estudios de RMN se pudo identificar al producto obtenido como el epímero de C-2 (4.34) de Austroeuropatol (4.31).



El análisis del espectro de ^1H -RMN (Figura 4.17) indica que especialmente las señales de pertenecientes a H-2 y H-3 sufrieron un leve desplazamiento hacia campos más altos, y un notable cambio en las constantes de acoplamiento. Por otro lado, las señales de C-2, C-3, C-4 y C-5 en el espectro de ^{13}C -RMN (δ 71,1,

74,8, 46,6 y 47,5 ppm) (Figura 4.18) se desplazaron a campos más bajos (a δ 81,4, 80,2, 48,4 y 49,7 ppm). Ambos hechos, el valor de las constantes de acoplamiento de hidrógeno y el corrimiento químico de los átomos de carbono del anillo A indican un cambio en la conformación del anillo.

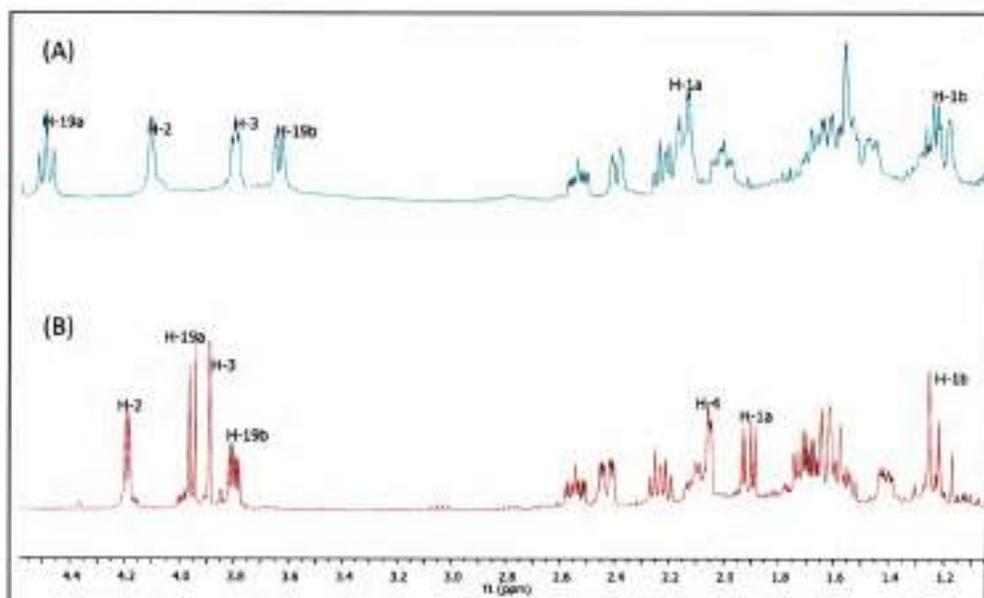


Figura 4.17: Ampliación de los espectros de ^2H -RMN. A: Austroepatol. B: epímero C-2 de Austroepatol.

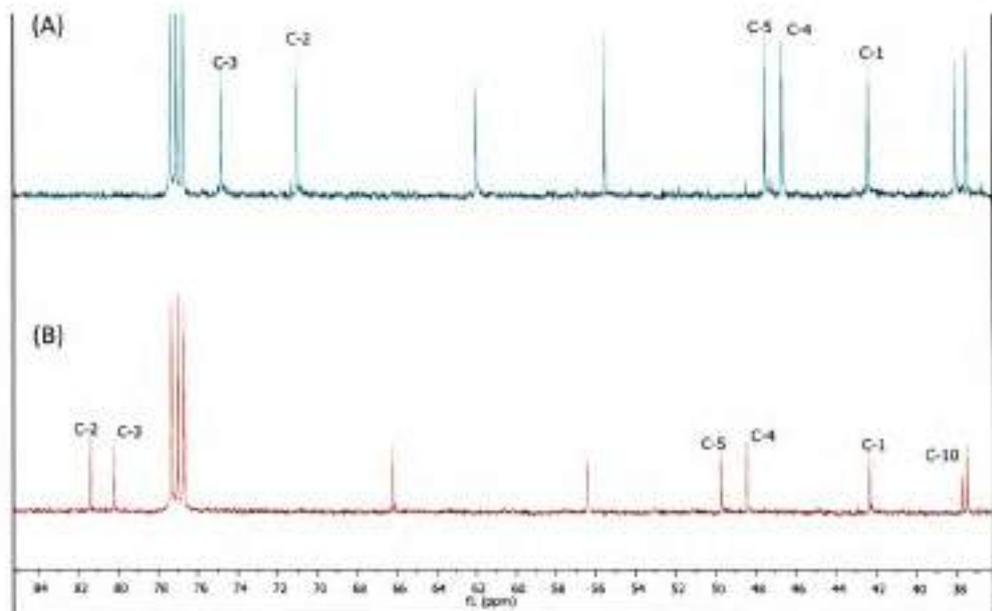


Figura 4.18: Ampliación de los espectros de ¹³C-RMN. Parte superior: Austroeuropatol. Parte inferior: epímero C-2 de Austroeuropatol.

Los valores bajos de las constantes de acoplamiento vecinales $J_{1,2} = 5,2$ Hz y $J_{3,4} = 1,2$ Hz, indican claramente la ausencia de H en posición trans-diaxial, además del valor no observable de acoplamiento entre H-2 y H-1 β (confirmado mediante experimentos de correlación H-H COSY) sugieren que H-1 β , H-2 y H-3 se encuentran todos en posiciones ecuatoriales y que el anillo A ha adquirido una conformación en forma de pseudo-bote. El espectro de correlación H-H NOESY muestra acoplamiento espacial entre H-2, H-3, H-4, pero no muestra correlación entre H-2 y H-5, lo cual confirma la configuración relativa sobre C-2. La **Figura 4.19** muestra un modelo del epímero propuesto, minimizado mediante método semiempírico AM-1. La **Tabla 4.6** resume las asignaciones de RMN para el 2-epi-austroeuropatol (**4.34**).

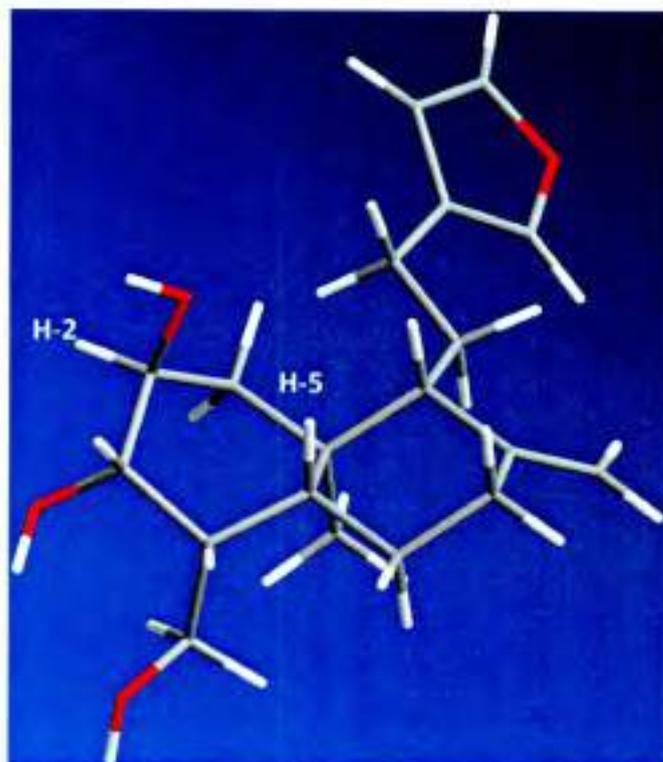
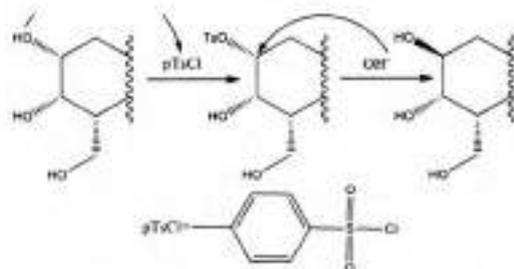


Figura 4.19: Modelo de 2-epi-ustroeuropatol (4.34). La optimización de la energía se realizó mediante método semiempírico AM-1.

La inversión en la configuración de C-2 de Austroeuropatol (4.31) en la reacción de esterificación con cloruro de *p*-toluensulfonilo pudo haber sido causada por la hidrólisis del éster formado, mediante un mecanismo de SN2. En una primera etapa se formaría el éster, mediante el correspondiente ataque del OH-2 al S del cloruro de ácido (Esquema 4.16). El éster formado es altamente reactivo frente a ataques nucleofílicos (Ding *et al.*, 2011). La presencia de agua en el sistema posiblemente haya generado iones OH, los cuales actuaron como nucleófilos.



Esquema 4.16: Posible mecanismo de isomerización de Austroepatulol (4.31).

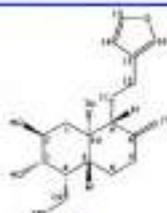


Tabla 4.6: Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C de 2-epi-austroepatulol (4.34).
 δ (ppm)

	^1H	^{13}C
1 α	1,91 dd ($J=13,8-5,2$ Hz)	42,3
1 β	1,22 d ($J=13,8$ Hz)	
2	4,19 d ($J=5,2$ Hz)	81,4
3	3,89 d ($J=1,2$ Hz)	80,2
4	2,05 m	48,4
5	1,6 m	49,7
6 α	1,76 m	28,7
6 β	1,41 m	
7 α	2,43 ddd ($J=13,6-4,4-1,8$ Hz)	37,5
7 β	2,09 dd an. ($J=13,6-5,7$ Hz)	
8		147,2
9	1,63 m	56,4
10		37,7
11a	1,68 m	25,3
11b	1,56 m	
12a	2,54 m	
12b	2,23 m	
13		125,3
14	6,24 dd ($J=1,6-0,7$ Hz)	110,8
15	7,35 d an. ($J=1,6$ Hz)	142,7
16	7,19 s an.	138,7
17a	4,91 d ($J=1,5$ Hz)	108,6
17b	4,63 d ($J=1,5$ Hz)	
19a	3,95 d ($J=8,5$ Hz)	66,2
19b	3,80 dd ($J=8,5-4,4$ Hz)	
20	0,92 s	16,5

En Cl_2CD , TMS como estándar interno. δ en ppm, constantes de acoplamiento en Hz entre paréntesis.

4.2.9 Consideraciones estructurales de Austroepatol (4.31)

La baja reactividad encontrada en los grupos funcionales del diterpeno puede ser explicada por medio de interacciones no covalentes entre ellos. Por un lado, sobre el anillo A es probable la formación de puentes hidrógeno entre los grupos hidroxilo. Se encuentra reportada la formación de puentes de H entre oxidrilos en anillos de 6 miembros tanto primarios como secundarios (Angyal & Christofides, 1996; Ghosh & Gilbert, 1971; Jeffrey, 1973) y cómo ello afecta la reactividad de los mismos frente a ésterificaciones (Kurahashi *et al.*, 1999).

Mediante la optimización de la geometría por método Semiempírico AM-1 se obtuvo una conformación en la cual se puede ver que el OH-3 y el O-19 (Figura 4.20) se encuentran comprometidos en una unión tipo puente hidrógeno, formando una conformación de silla. Esta conformación deja libre el oxidrilo de C-2, lo que explica que la configuración de C-2 sea la que resultó invertida en la reacción de esterificación con *p*-MeC₆H₄SO₃H. Por otro lado, la formación de puentes hidrógeno en una molécula que posee tres grupos oxidrilo, también explica la baja solubilidad en solventes polares.

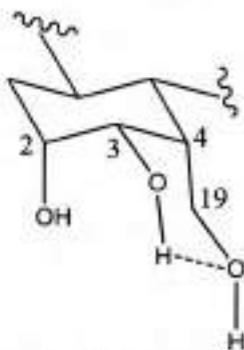


Figura 4.20: Probable conformación del anillo A de austroepatol (4.31)

Así también, el mismo modelo obtenido, puede explicar la baja reactividad del doble enlace si se lo considera comprometido en uniones no covalentes con el sustituyente furanilo de la cadena lateral. Se encuentra reportado que este tipo de interacciones no sólo controla la conformación molecular, sino también el coeficiente de difusión y las propiedades electroquímicas de las moléculas (Arendorf, 2011; Roura-Pérez *et al.*, 2007). La Figura 4.21 muestra el modelo molecular propuesto para Austroepatol (4.31). Este modelo también estaría soportado por el acoplamiento espacial observado en el espectro NOESY entre H-14 y los hidrógenos del grupo metilo angular en C-10.

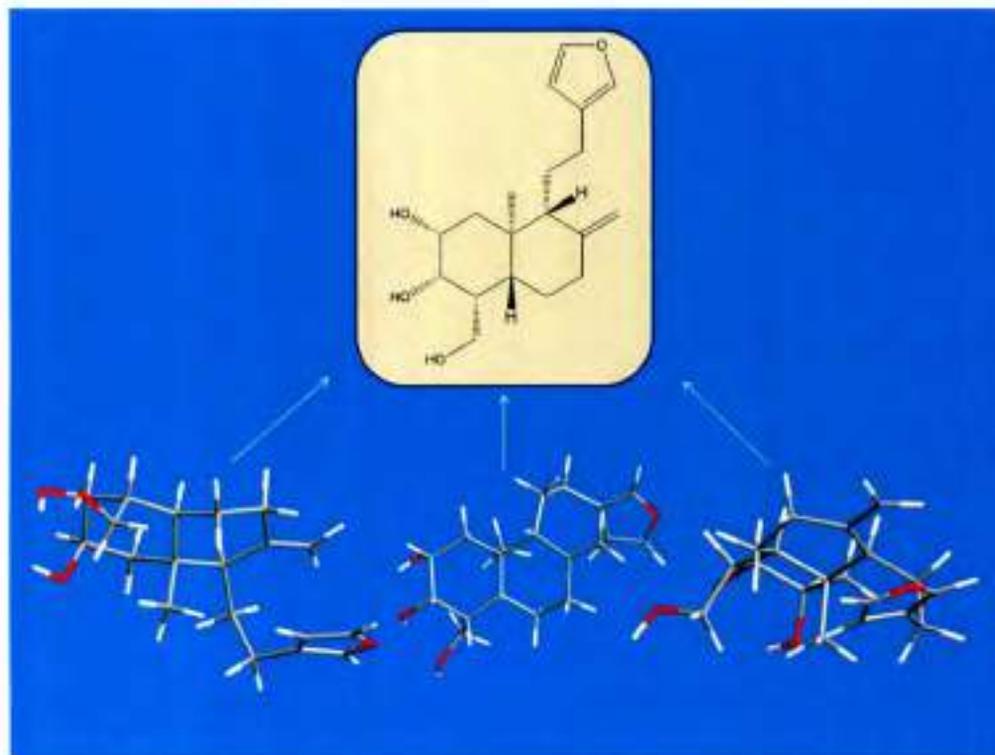


Figura 4.21: Modelo obtenido mediante optimización de la geometría por método AM-1 de Austroepatol (4.31).

4.3 *Senecio ceratophylloides*

4.3.1 Descripción Botánica: (<http://www.floraargentina.edu.ar/>)

S. ceratophylloides Griseb. (Sin. *S. ceratophyllus* Don ex Hook. & Arn.) (Figura 4.22.A) es una hierba perenne, tomentosa o lanuginosa, formando matas de 1 m de diámetro y de 0,15 a 0,30 m de alto. Tallos ascendentes densamente hojosos. Hojas oblanceoladas, trifidas, con 2-4 dientes gruesos a cada lado en la parte superior y largamente atenuados en la base, de 30-50 por 3-8 mm. Capitulos radiados, solitarios en el ápice de las ramas, largamente pedunculados. Involucro acampanado 12-15 por 12-16 mm; Brácteas del cálculo, pocas, lineares, más cortas que el involucro. Filarios 20-24, lineares, agudos en el ápice, lanosos al dorso. Flores muy numerosas, amarillas, isomorfas. Aquenios densamente papilosos-pubescentes (Figura 4.22.B).

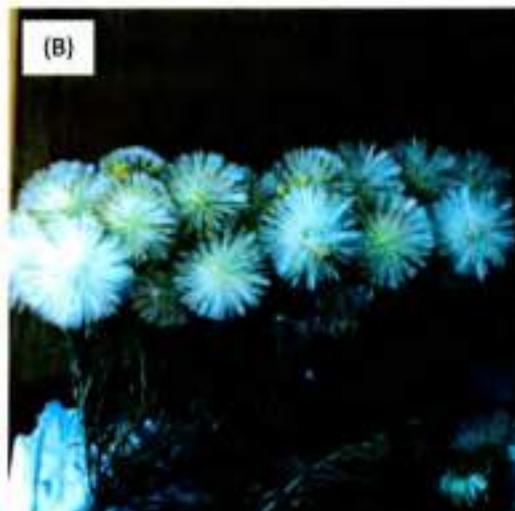


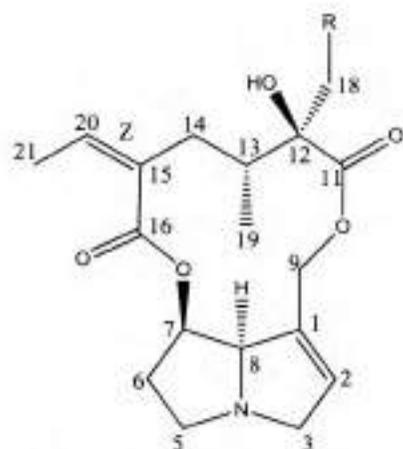
Figura 4.22: A: Ejemplar en floración de *S.ceratophylloides*. B: Ejemplar de *S.ceratophylloides* con sus aquenios

4.3.2 Distribución y Hábitat:

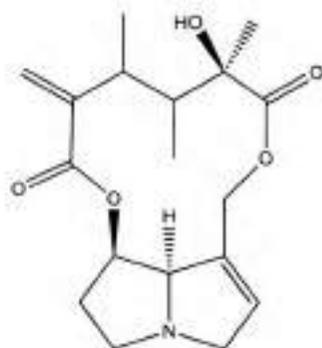
Especie del Sur de Brasil, Uruguay y centro de la Republica Argentina ocupando las provincias de Buenos Aires, Córdoba, La Pampa, Rio Negro y San Luis, entre 0 y 500 msnm (Zuloaga & Morrone, 1999).

4.3.3 Antecedentes de *S. ceratophylloides*:

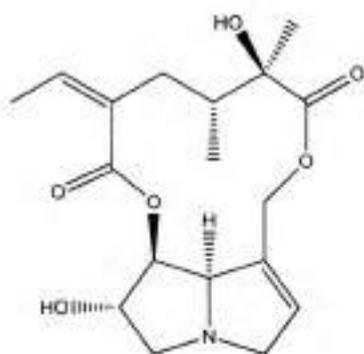
Reportes previos de esta especie informa acerca de la presencia de alcaloides pirrolizidínicos en las raíces: senecionina (4.35), retrorcina (4.36), usuramina (4.37), senecivervina (4.38) y uspallatina (4.39). (Giordano & Pestchanker, 1984; Pestchanker *et al.*, 1985; Trigo *et al.*, 2003)



Senecionina, Z, R=H (4.35)
 Retrocina, E, R=OH (4.36)
 Usuramina, E, R=OH (4.37)

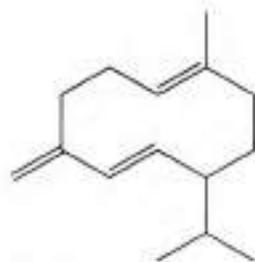


Senecivervina (4.38)

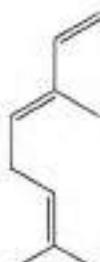


Uspllatina (4.39)

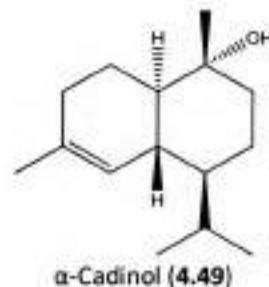
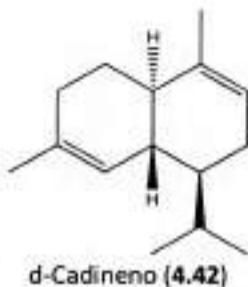
Por otro lado, del análisis del aceite esencial obtenido de las flores se reportaron los mono y sesquiterpenos siguientes: *trans*- β -ocimeno (4.40), germacreno D (4.41), d-cadineno (4.42) y α -cadinol (4.49) (Francescato & Santos da Silva, 2006)



Trans- β -Ocimeno (4.40)



Germacreno D (4.41)



4.3.4 Parte experimental

4.3.4.a Material vegetal

El material vegetal (Figura 4.22) fue recolectado en el mes de noviembre de 2008, encontrándose la especie en estado de floración. El lugar de recolección fue el predio del Instituto Técnico Renault, Av. Renault 2520. Córdoba capital, Republica Argentina. La especie fue identificada por el Dr. L. Ariza Espinar, FCEFN-UNC.

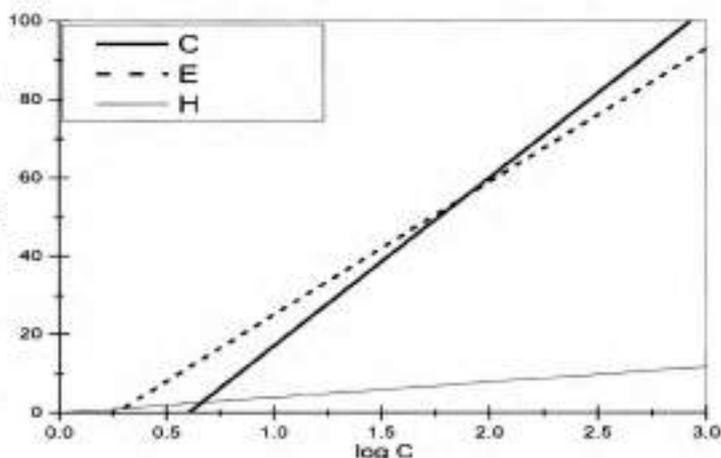
4.3.4.b Extracción y Fraccionamiento biodirigido

Las partes aéreas de *S. ceratophylloides* se dejaron secar durante 10 días en ambiente adecuadamente ventilado. Luego fueron finamente molidas obteniéndose 2,5 kg de material vegetal pulverizado. El material vegetal fue exhaustivamente extraído mediante lixiviación con EtOH a temperatura ambiente. El solvente fue evaporado en su totalidad, a presión reducida, obteniéndose un rendimiento en la extracción del 6,4% (160,67g). El residuo fue redisoluto en una mezcla MeOH/H₂O 4:1 (500 mL) y particionado con solventes en orden creciente de polaridad de la siguiente manera: Primero se extrajo con Hex (4x200mL), se evaporó el MeOH de la fase MeOH/H₂O y se particionó con CH₂Cl₂ (2x200mL). Por último se extrajo con AcOEt (2x100mL). Todos las fases orgánicas fueron secadas sobre Na₂SO₄ anhidro y llevadas a sequedad evaporando el solvente a presión reducida, obteniéndose así los extractos correspondientes: Extracto de hexano (H) (32%), Extracto de CH₂Cl₂ (C) (12%), Extracto de AcOEt (E) (5%) y el extracto acuoso (51%).

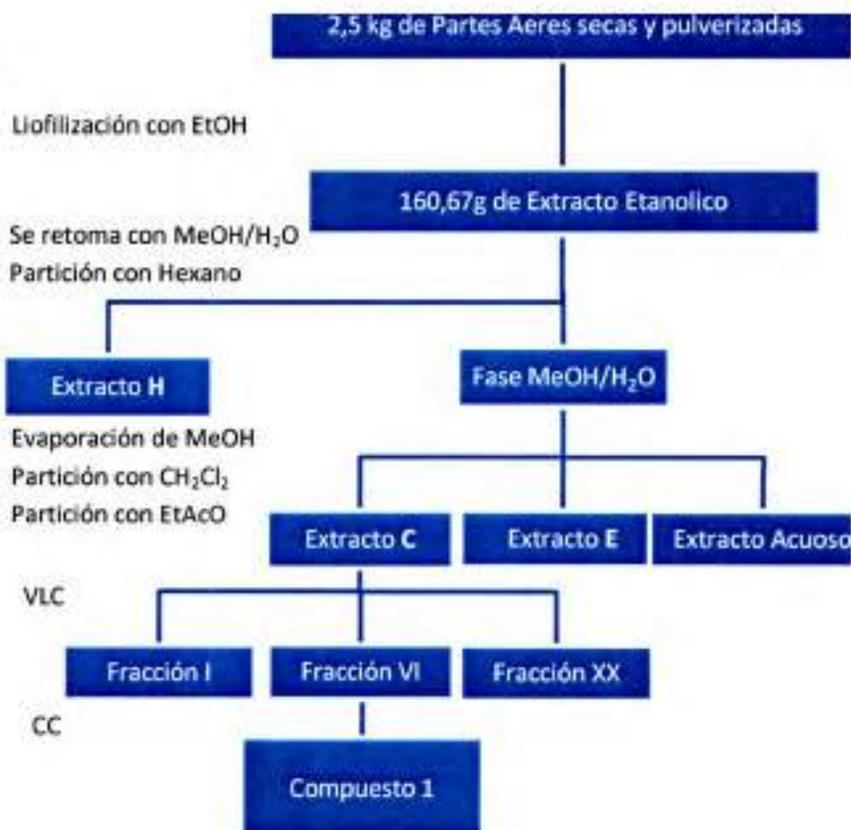
Se evaluó la actividad de cada extracto frente a *Artemia sp.* En el Gráfico 4.1 se muestran las curvas obtenidas en cada caso. Las LD₅₀ para cada extracto fueron: H >> 1000ppm; C = 54,24ppm; E = 51,67ppm. El extracto C demostró poseer actividad similar a la de A, pero su masa fue mayor, por lo cual fue sometido a fraccionamiento biodirigido por medio de CLV (Cromatografía líquida

a presión reducida) usando silica gel G-60 como fase estacionaria y eluyendo con mezclas de solventes de polaridad creciente; en primer lugar con Hex/CH₂Cl₂ (4:1 a 0:1 y luego con CH₂Cl₂/AcOEt (9:1 a 1:4) en volúmenes de 200mL. Se obtuvieron 20 fracciones (I a XX), entre las cuales IV (320mg) resultó ser la más activa (LD₅₀ = 72,44 ppm). Esta última fracción (IV), por poseer mayor actividad fue sometida a un nuevo fraccionamiento, pero en este caso por medio de CC usando la misma fase estacionaria y mezclas de CH₂Cl₂/AcOEt de polaridad creciente. Este procedimiento llevó al aislamiento de un compuesto oleoso levemente coloreado. Este compuesto fue identificado, mediante el empleo de distintas metodologías espectroscópicas, como el nor-sesquiterpeno **4.40** cuya actividad frente a *Artemia sp.* fue determinada con un valor de LD₅₀ = 48,36 ppm.

Grafico 4.1: Curvas obtenidas por el método de cuadrados mínimos para las actividades de los distintos extractos de *S. ceratophyllus* sobre *Artemia sp.* CH₂Cl₂: %M=43,58 logC-26,92, r²=0,963. EtAcO: %M=34,32logC-8,80, r²=0.968. Hex:

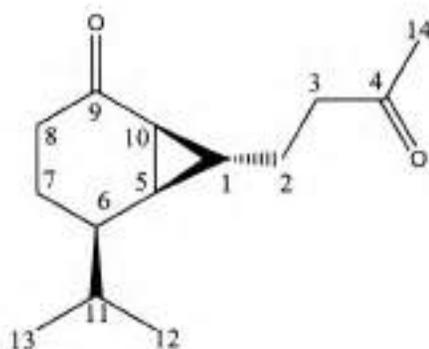


Esquema 4.17: Diagrama de extracción y fraccionamiento de *S. ceratophyllodes*.



4.3.5 Discusión y Resultados obtenidos de *Senecio ceratophyllus*

El fraccionamiento biodirigido del extracto de *S. ceratophylloides*, como se describió en el apartado anterior, llevó al aislamiento y elucidación estructural de un nor-sesquiterpeno (4.40) el cual resultó de estructura novedosa y con una probable actividad citotóxica ($LD_{50} = 48,36$ ppm).



(4.40)

El espectro de masas de **4.40** mostró la presencia del ion cuasi-molecular ($C_{14}H_{22}O_2+H$) $[M+H]^+$ a $m/z=223$. Un pico importante fue el producido por la pérdida del radical isopropilo a partir del ión cuasi-molecular (C_3H_7) $[M+H]^+-43$ a $m/z = 180$, seguido de la ruptura alfa al grupo carbonilo en posición 4 con la pérdida del correspondiente radical (C_2H_3O) $[M+H]^+ - 86$ a $m/z=137$. El espectro de IR muestra dos señales características de grupos carbonilo a 1716 y 1685 cm^{-1} .

En el espectro de ^{13}C -RMN (Figura 4.22) pueden observarse 14 señales de las cuales se destacan las correspondientes a los dos grupos carbonilo en posición C-4 y C-9 a $\delta = 208,8\text{ppm}$ y $\delta = 214,3\text{ppm}$, respectivamente.

El análisis de los espectros de correlación 1H - ^{13}C (HSQC) y del espectro de 1H -RMN permitió establecer la siguiente fórmula condensada: $C_{14}H_{22}O_2$; a partir de la cual se dedujo que el compuesto presenta 4 insaturaciones. El espectro de 1H -RMN (Figura 4.23) muestra sólo señales de 1H unidos a C sp³, lo que llevó a suponer que, junto con los dos átomos de C sp² de los grupos carbonilo, el compuesto presenta 2 ciclos. Esta situación da cuenta de las cuatro insaturaciones deducidas a partir de la fórmula molecular. En el espectro de 1H -RMN (Tabla 4.7) se observa un multiplete a campo alto, a $\delta = 0,71\text{ ppm}$ el cual correlaciona con su ^{13}C correspondiente a campo bajo, $\delta=46,3\text{ ppm}$, corrimientos típicos de un anillo tensionado como lo es el ciclopropano. La señal asignada a H-1 correlaciona con la de H-10 (1H; $\delta = 1,87\text{ ppm}$; dd ; $J = 5,1$ y $9,5\text{ Hz}$) puede observarse como un dd ensanchado, debido al acoplamiento a largo alcance tipo "W" (Figura 4.24) con H-6 y además, comparte la constante de acoplamiento de $9,5\text{ Hz}$ con H-5 (1H; $\delta = 1,05\text{ ppm}$; ddd $J = 2,9; 3,9; 9,5\text{ Hz}$). El valor de la constante de acoplamiento entre $J_{1-10} = 5,1\text{ Hz}$ está de acuerdo a las informadas para compuestos del tipo-carabrano reportados previamente (Matsuda *et al.*, 2001a).

En la **Figura 4.25** se muestran las correlaciones establecidas en los espectros ^1H - ^{13}C HMBC y ^1H - ^1H COSY.

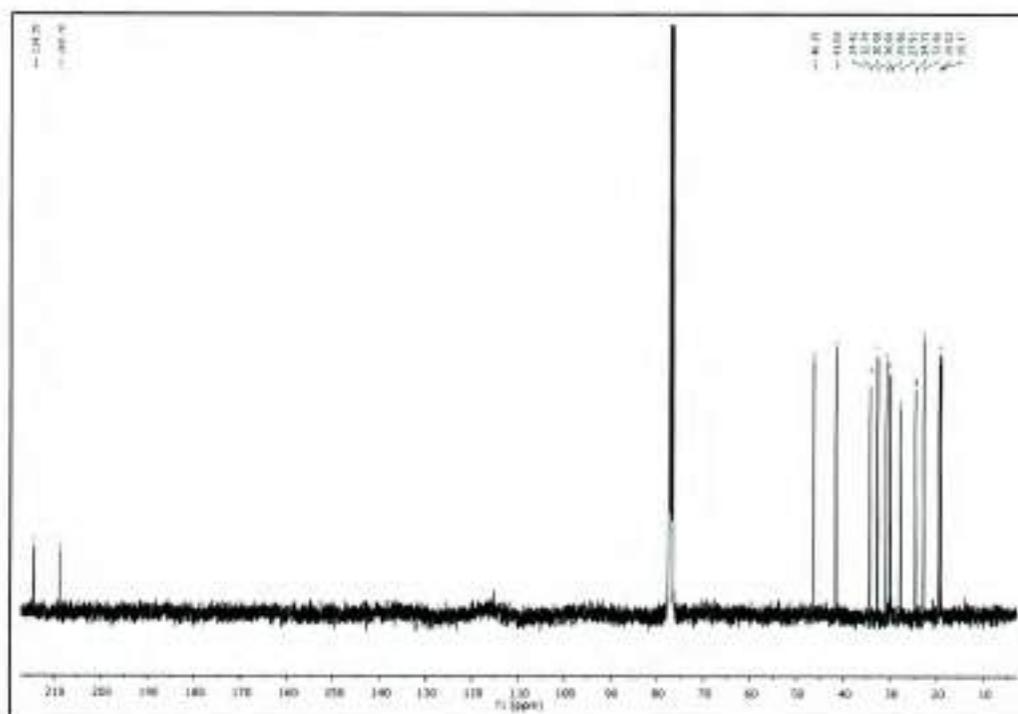


Figura 4.22: espectro de ^{13}C -RMN de 4.40.

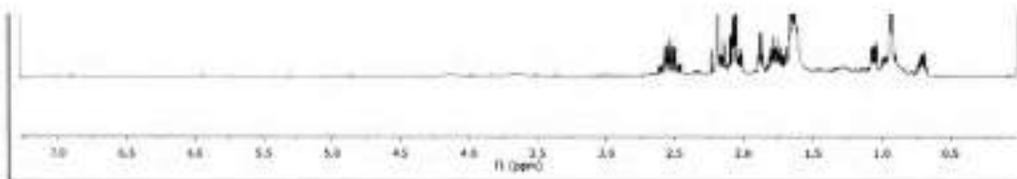


Figura 4.23: Espectro de ^1H -RMN de 4.40.

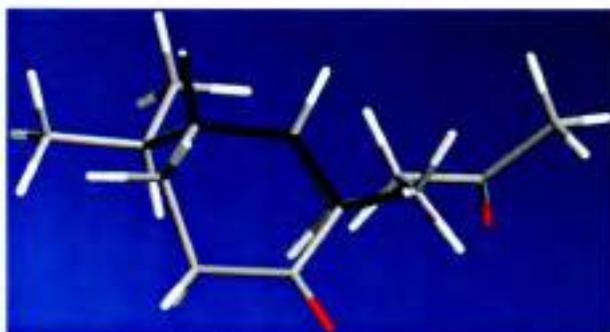


Figura 4.24: modelo molecular de 4.40 en donde se observa la posición relativa de H-10 y H-6.

La Tabla 4.7 resume las asignaciones de RMN ^{13}C y ^1H para el nor-carabranone 4.40.

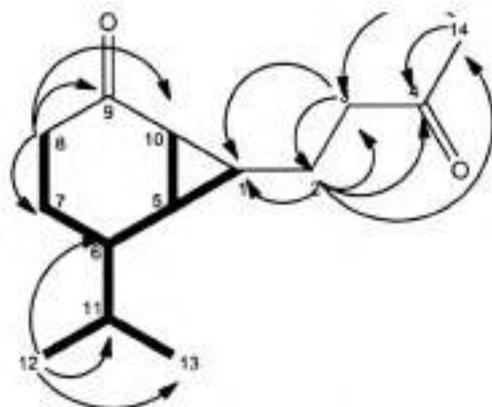


Figura 4.25: → Correlaciones ^{13}C - ^1H HMBC — Correlaciones ^1H - ^1H COSY.

Tabla 4.7: Espectros de RMN ^1H y de ^{13}C 4.40.

	δ	
	^1H	^{13}C
1	0,71 m 1H	46,3
2	1,81-1,62 m 2H	24,8
3	2,53 m 2H	41,7
4		208,8
5	1,06 ddd 1H (2,9;3,9;9,5)	29,9
6	1,65 m 1H	34,4
7	2,19-2,01 m 2H	22,9
8	2,03-2,17 m 2H	32,8
9		214,3
10	1,87 dd 1H (5,1; 9,5)	27,9
11	1,80 m 1H	31,0
12	0,93 d 6H (7,0)	19,2
13	0,93 d 6H (7,0)	19,5
14	2,19 s 3H	30,0

En Cl_2CD , TMS como estándar interno. δ en ppm, constantes de acoplamiento en Hz entre paréntesis.

Estructuralmente este compuesto se encuentra emparentado con compuestos de núcleo Carabrano Figura 4.26.

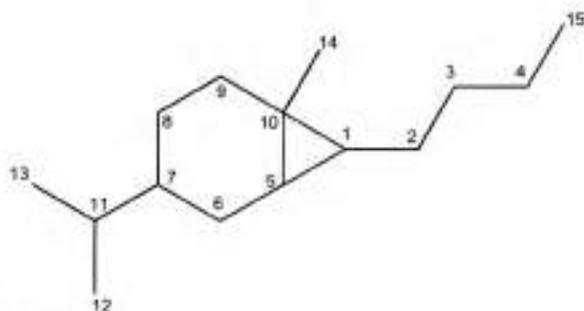
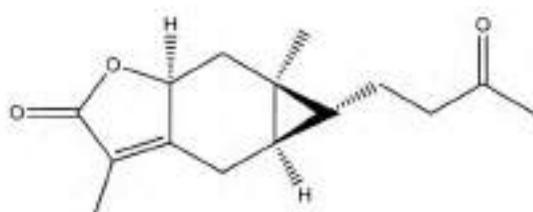
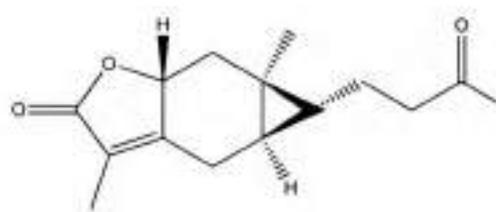


Figura 4.26: Núcleo Carabrano

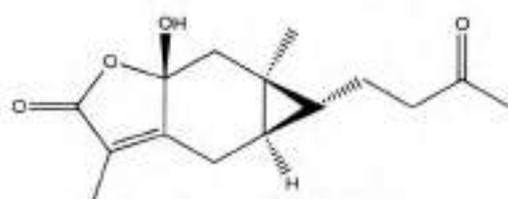
El núcleo carabrano ha sido descrito especialmente en la familia de las Zingiberáceas, más específicamente en el género *Curcuma*, a partir del cual fueron aislados la mayoría de los metabolitos de este tipo (4.41 a 4.47) (Matsuda *et al.*, 2001a; 2001b). Por otro lado, reportes recientes informaron la presencia de dos estereoisómeros (4.48 *R*; 4.49 *S*) en *Vladimiria souliei*, una especie perteneciente a la familia Asteraceae (Xu *et al.*, 2009).



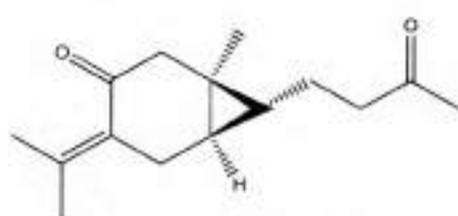
Curcumenolactona A (4.41)



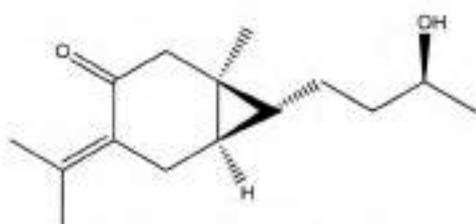
Curcumenolactona B (4.42)



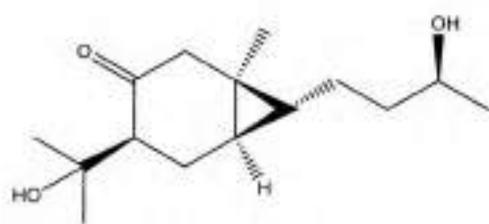
Curcumenolactona C (4.43)



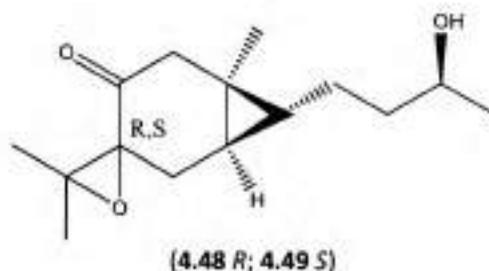
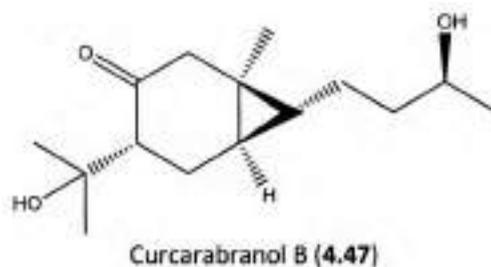
Curcumenona (4.44)



45-Dihidrocurcumenona (4.45)



Curcarabranol A (4.46)



4.3.6 Diversificación del Extracto de Hexano

4.3.6.a Parte experimental

5 g del extracto H (obtenido como se describió en el Esquema 4.17) que presentó menor actividad frente a *Artemia sp* ($LD_{50} \gg 1000 \text{ ppm}$) fue suspendida en 250 mL de EtOH y se adicionaron 2,42 mL de N_2H_2 gota a gota. La mezcla se calentó a reflujo durante 7h y con agitación magnética. El crudo de reacción fue redisoluto en CH_2Cl_2 (250 mL) y sometido a partición con H_2O (3x100mL). Fue necesario el agregado de solución saturada de NaCl para romper la emulsión formada. El CH_2Cl_2 fue evaporado bajo presión reducida a sequedad, obteniéndose 3,12g de extracto diversificado (Extracto HD).

4.3.6 Discusión y Resultados obtenidos

Los espectros de IR del Extracto H (extracto sin diversificar) y el Extracto HD (extracto diversificado) (Figura 4.27), muestran un cambio en el perfil de las señales en la zona correspondiente a los grupos carbonilo, desde 1800 cm^{-1} a 1600 cm^{-1} . También pueden observarse en los espectros de ^{13}C -RMN un cambio en la señal a $\delta = 176,7 \text{ ppm}$ (Figura 4.28). Por otro lado, la cromatografía en capa delgada del Extracto HD produjo una coloración naranja, al ser revelada con reactivo de Dragendorff, lo cual es indicativo de la presencia de N en los compuestos.

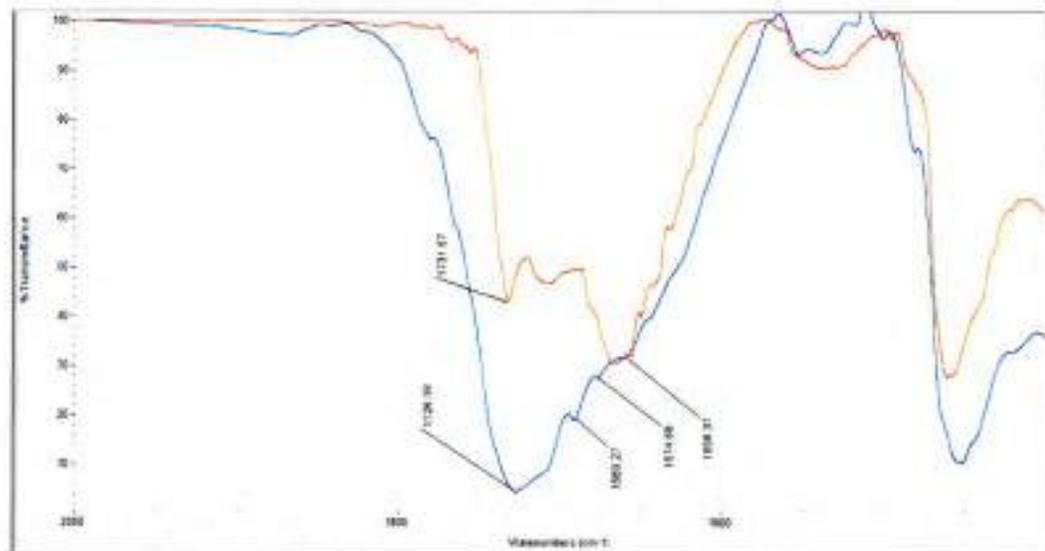


Figura 4.27: Espectro de IR mostrando la zona de las señales de grupo carbonilo. En azul se muestra el Extracto H. En rojo se muestra el Extracto HD.

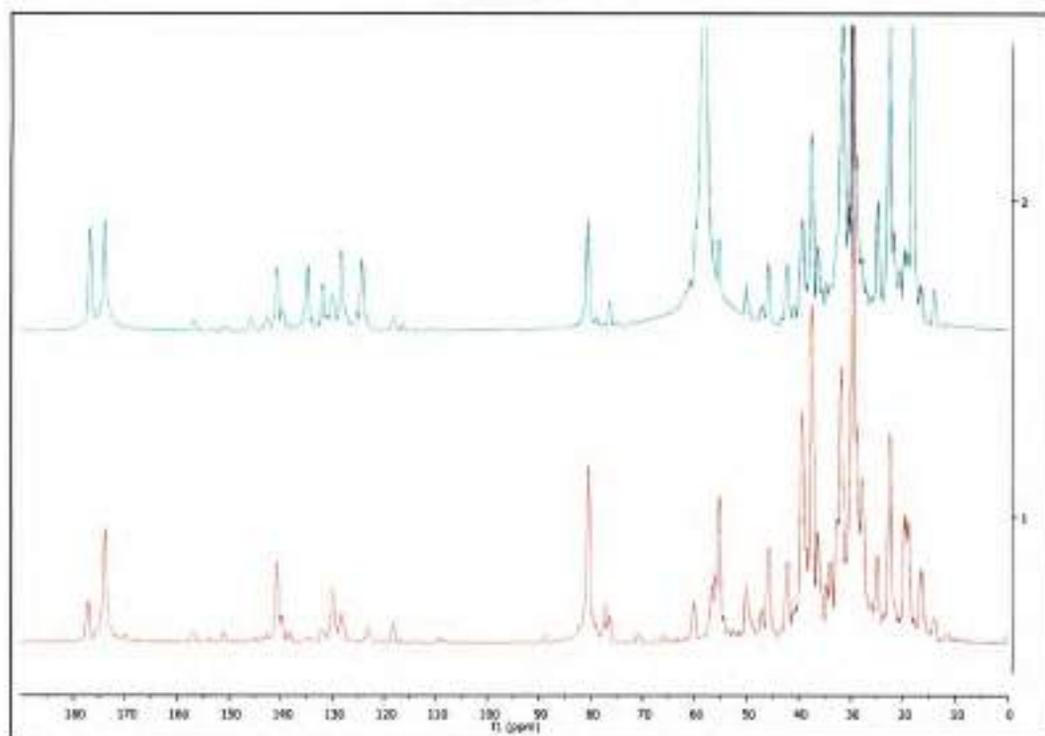


Figura 4.28: Espectro de ¹³C-RMN. En azul se muestra el Extracto H. En rojo el Extracto HD.

Habiendo evidencia de cambio en la composición química del extracto, se evaluó la actividad biológica frente a *Artemia sp.* del Extracto HD, pero se observó que la misma no cambió significativamente ($LD_{50} \gg 1000ppm$) por lo cual no se realizó un fraccionamiento biodirigido del Extracto HD.

4.4 *Senecio pampeanus*

4.4.1 Descripción Botánica (<http://www.floraargentina.edu.ar/>)

S. pampeanus Cabrera (Figura 4.29) es una hierba perenne, glabra, de 0,40-1,40 m de altura. Tallo ramificado en la parte superior, hojoso hasta la inflorescencia. Hojas pinnatisectas, con raquis linear de 60-140 x 1-1,5 mm y 7-9 pares de segmentos también lineares, enteros o con 1-2 lóbulos a cada lado, de 18-35 x 0,8-1 mm. Capítulos radiados (Figura 4.29.b), muy numerosos, dispuestos en densas cimas corimbiformes en los ápices de las ramas. Involucro acampanado, ca. 7 x 5-6 mm, muy brevemente calculado. Filarios 20, lineares, agudos y penicilados en el ápice, glabros en el dorso. Flores amarillas, dimorfas, las marginales 11-13, liguladas; las del disco numerosas. Aquenios glanduloso-pubescentes.

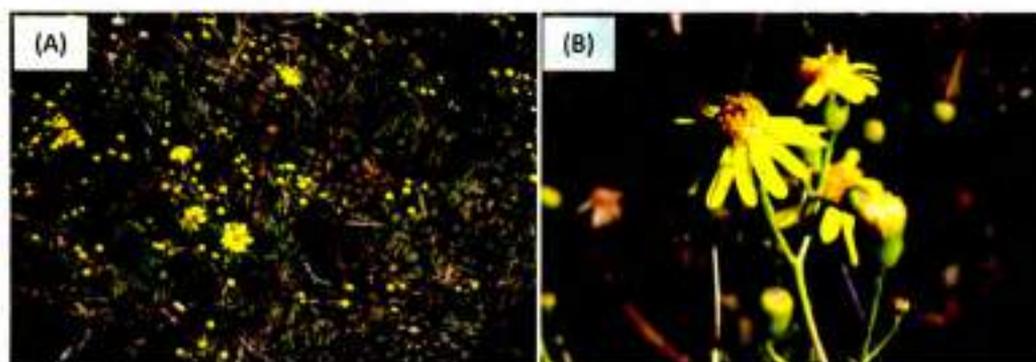


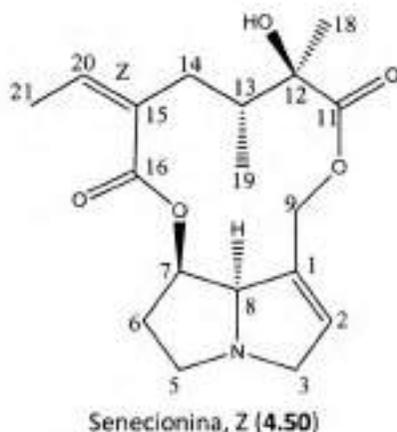
Figura 4.29: A: Ejemplar en floración de *S.pampeanus*. B: Ejemplar de *S.pampeanus* con sus capítulos.

4.4.2 Distribución y hábitat

Especie del Norte y Centro de la República Argentina ocupando las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, La Pampa, Mendoza, Río Negro, Santa Fe y San Luis, entre 0 y 3500 msnm (Zuloaga & Morrone, 1999).

4.4.3 Antecedentes de *S. pampeanus*

El único reporte fitoquímico de la especie (Waseem *et al.*, 1994) informa el aislamiento e identificación del alcaloide Pirrolizidinico Senecionina (4.50).



4.4.4 Parte experimental

4.4.4.1 Material vegetal

El material vegetal fue recolectado en el mes de diciembre de 2008, encontrándose la especie en estado de floración. El lugar de recolección fue la localidad de Río Ceballos, Departamento Colón, Prov. De Córdoba, República Argentina. La especie fue identificada por el Dr. L. Ariza Espinar, FCEPyN-UNC.

4.4.4.2 Extracción y Fraccionamiento

4.4.4.2.a Extracción

Las partes aéreas de *S. pampeanus* se dejaron secar durante 10 días en ambiente adecuadamente ventilado. Luego fueron finamente molidas obteniéndose 1,2 kg de material vegetal pulverizado. El material vegetal fue exhaustivamente extraído mediante lixiviación con EtOH a temperatura ambiente. El solvente fue evaporado en su totalidad, a presión reducida, obteniéndose un rendimiento en la extracción del 7,4% (90,37 g).

4.4.4.2.b Partición

El residuo fue redisolto en una mezcla MeOH/H₂O 4:1 (400 mL) y particionado con solventes en orden creciente de polaridad de la siguiente manera: Primero se extrajo con Hex (4x150mL), se evaporó el MeOH de la fase MeOH/H₂O y se residuo acuoso se extrajo con CH₂Cl₂ (2x150mL) y luego con AcOEt (2x100mL). Todos las fases orgánicas fueron secadas sobre Na₂SO₄ anhidro y llevadas a sequedad evaporando el solvente a presión reducida, obteniéndose así los extractos correspondientes: Extracto de hexano (H) (30%),

Extracto de CH_2Cl_2 (C) (11%), Extracto de AcOEt (E) (4,5%) y el extracto acuoso (Esquema 4.18).

4.4.4.3 Resultados obtenidos a partir del proceso de partición

Se realizó CCD de todos los extractos obtenidos mediante la metodología de partición, como se describió más arriba, como método de prueba para su posterior fraccionamiento. Al revelar con óleum los ensayos realizados con los distintos solventes empleados, se observaba una intensa coloración negra en la línea de siembra (Figura 4.30). Esta coloración se atribuyó a la presencia de grasas en los extractos, razón por la cual, se planteó otra metodología de purificación del extracto inicial.



Figura 4.30: CCD de los extractos de *S. pampeanus*. a: extracto inicial. b: extracto H. c: extracto C. d: extracto E. Solvente de corrida: Hex/ AcOEt 1:1. Adsorbente: Silica gel G-60.



Esquema 4.18: Diagrama de fraccionamiento de *S. pampeanus*.

4.4.4.4 Purificación con $Pb(AcO)_2$

Una muestra de 1g del extracto etanólico de *Senecio pampeanus* fue redisuelta en 40mL de EtOH a 40°C y se adicionaron 40mL de solución de $Pb(AcO)_2/H_2O$ 4%. La mezcla fue colocada a temperatura ambiente durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se procedió a filtrar el precipitado formado y se evaporó el EtOH a presión reducida. A la mezcla obtenida se la particionó con CH_2Cl_2 , lavándose esta última fase con H_2O para eliminar las trazas de $Pb(AcO)_2$. La fase orgánica fue secada sobre Na_2SO_4 y el solvente fue evaporado a presión reducida obteniéndose 169,1 mg de un nuevo extracto. El mismo obtenido fue fraccionado mediante CC usando sílica gel G-60 como fase estacionaria y mezclas de $CH_2Cl_2/MeOH$ de polaridad creciente (1:0 a 97:3).

4.4.4.5 Resultados Obtenidos a partir de la purificación con $Pb(AcO)_2$

Por este método de fraccionamiento se obtuvo un extracto inicial de 169,1mg el cual mostraba por medio de CCD la presencia de 4 componentes. Luego de la CC (Silica gel G-60, fase móvil: mezcla de polaridad creciente Hex/

AcOEt 1:1 a 1:4) se obtuvieron 4 fracciones siendo la mayoritaria **Sp 7** (40mg). El espectro de ^1H -RMN (Figura 4.31) reveló la presencia de un diglicérido, el cual no presenta interés para este trabajo.

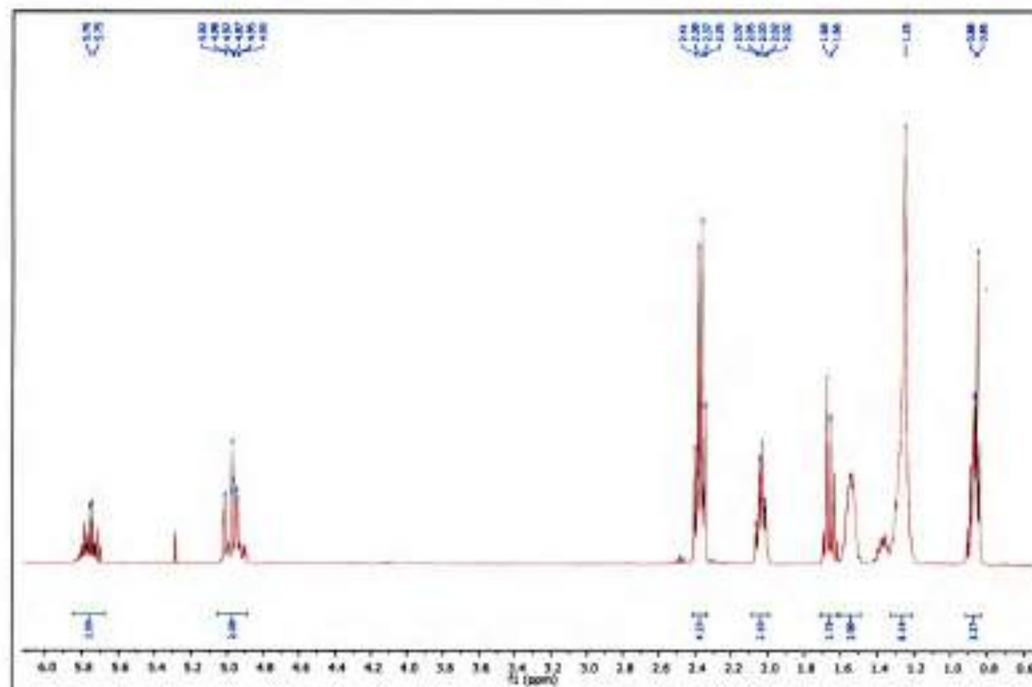


Figura 4.31: Espectro de ^1H -RMN de la fracción **Sp 7** en Cl_3CD , TMS como estándar interno.

5. Síntesis de análogos de Bisabolenos con actividad alelopática aislados de *Lagascea mollis* Cav.



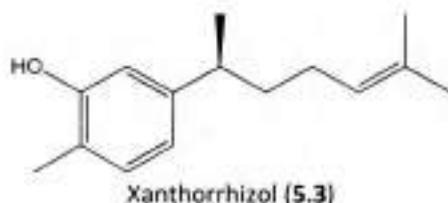
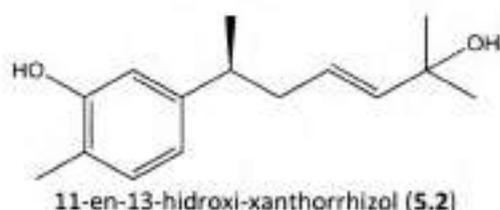
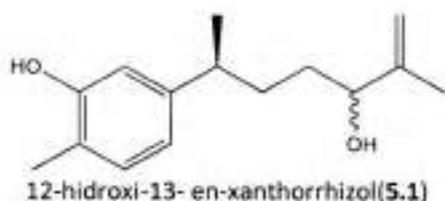
5. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE BISABOLENOS CON ACTIVIDAD ALELOPÁTICA

AISLADOS DE *Lagascea Mollis Cav.*

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de la síntesis total de análogos de bisabolenos bioactivos y la evaluación de su actividad alelopática.

5.1 Introducción

Un estudio de la química y de la actividad biológica de *Lagascea mollis Cav.* (Asteraceae) llevado a cabo en nuestro grupo de investigación permitió el aislamiento de seis compuestos conocidos: patuletina-7-O-glucósido, 12-hidroxi-13- en-xanthorrhizol (5.1), 11-en-13-hidroxi-xanthorrhizol (5.2), xanthorrhizol (5.3), 12,13-epoxi- xanthorrhizol y 1- α -angeloiloxicarotol (Alarcón *et al.*, 2007). En este estudio se informó acerca de la actividad inhibitoria de germinación y de crecimiento radicular en especies monocotiledóneas y dicotiledóneas de los bisabolenos 5.1, 5.2 y 5.3. Estos dos últimos (xanthorrhizol (5.2) y 12,13-epoxi- xanthorrhizol (5.3)) mostraron notable actividad biológica frente a *Sorghum halepensis*, monocotiledónea empleada como semilla modelo. En estudios previos se había determinado que los mismos también poseían actividad selectiva frente a semillas de *Avena sativa* y *Lactuca sativa* (Alarcón, 2002).



Teniendo en cuenta estos antecedentes anteriormente expresados, se planteó como objetivo la síntesis completa de análogos simplificados de los bisabolenos aislados que fueran activos frente a la germinación y/o al crecimiento radicular de las especies tomadas como modelo. Por otro lado, fue de interés realizar dicha síntesis planteando reacciones simples y partiendo de reactivos de fácil asequibilidad con el fin de obtener

una serie de compuestos estructuralmente emparentados. Por esta razón se propuso que el tolueno podría ser uno de los productos de partida que, mediante una reacción de Friedel Craft con el anhídrido adecuado podía, conducir a compuestos simples y de estructura relacionada con los bisabolenos bioactivos.

5.2 Parte Experimental

5.2.1 General

Todas las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera de N_2 , salvo se indique lo contrario. El $AlCl_3$ fue pesado bajo la misma atmósfera, por ser un sólido fuertemente higroscópico. La evolución de todas las reacciones se monitorearon mediante CCD usando como fase estacionaria sílica gel.

Se evaluó la actividad alelopática de los compuestos usando como especies modelo de monocotiledónea *Avena sativa* y de dicotiledónea *Lactuca sativa*. Se tomó como parámetro la inhibición del crecimiento radicular (%) a 3 concentraciones diferentes: 150 ppm, 75 ppm y 15 ppm.

5.2.2 Síntesis de ácido- β -(4-metilbenzoil)-propanoico (5.6) (Tietze & Eicher, 1989)

Se colocaron a reaccionar en un balón previamente evacuado 3,63 mL (34,2mmol) de tolueno seco (5.4), 733,1 mg (7,5 mmol) de $AlCl_3$ y 502,0 mg (4,4 mmol) de anhídrido succínico (5.5) con agitación magnética. Luego de 3,5 h, se adicionaron aproximadamente 15 mL de hielo y se llevó a pH ácido con solución de HCl. Se extrajo con dos porciones de 6 y 2 mL de CH_2Cl_2 . Se reunieron las porciones, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y, luego de filtrar, la solución extractiva se redujo hasta aproximadamente una quinta parte de su volumen. Esta solución se trató con benceno y se dejó reposar durante aproximadamente 3 h, lo cual llevó a la obtención de un polvo fino color verdoso. Se purificó mediante CC obteniéndose 552,3 mg (65,3%) de 5.6 como cristales incoloros en forma de escamas.

5.2.3 Síntesis de ácido- γ -(4-metilbenzoil)-butanoico (5.8) (Tietze & Eicher, 1989)

Se colocaron a reaccionar en un balón previamente evacuado 3,82 mL (36,0mmol) de tolueno seco (5.4), 1,0 g (7,5 mmol) de $AlCl_3$ y 764,5 mg (4,4 mmol) de anhídrido glutárico (5.7) con agitación magnética. Se procedió de la misma manera que en el punto anterior, obteniéndose 773,6 mg (85%) del producto 5.8.

5.2.4 Síntesis de ácido- γ -(4-metilfenil)-butanoico (5.9) (Tietze & Eicher, 1989)

Se colocaron en un balón y se sometieron a agitación magnética, 296,17 mg de Zn (4,53 mmol); HgCl_2 , 250,9 mg (0,924 mmol); $\text{HCl}_{(\text{conc.})}$ (4 gotas); H_2O (10 gotas) durante 5 minutos, hasta la formación de la amalgama. Luego se adicionaron en el siguiente orden: H_2O ; $\text{HCl}_{(\text{conc.})}$ (5 gotas); tolueno (5 mL) y ácido- β -(4-metilfenil)-propanoico (5.6) (135 mg, 0,702 mmol). La mezcla de reacción se llevó a reflujo durante 30 h, con el agregado de $\text{HCl}_{(\text{conc.})}$ (2 gotas) cada 6 h. Finalizado el tiempo de reacción, se extrajo con éter etílico y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Se obtuvieron 97,7 mg (78%) de 5.9 en forma de cristales blancos amorfos.

5.2.5 Síntesis de ácido- δ -(4-metilfenil)-pentanoico (5.10) (Tietze & Eicher, 1989)

En iguales condiciones y en el mismo orden de reactivos descripto anteriormente se colocaron 141,87 mg de Zn (2,17 mmol); 12,08 mg de HgCl_2 (0,044 mmol); $\text{HCl}_{(\text{conc.})}$ (2 gotas); H_2O (20 gotas). Obtenida la amalgama, se adicionó H_2O ; $\text{HCl}_{(\text{conc.})}$ (10 gotas); tolueno (3 mL); ácido- γ -(4-metilbenziloil)-butanoico (5.8) (40,0 mg, 0,193 mmol). Se obtuvieron 27,7 mg (74%) de 5.10 en forma de cristales.

5.2.6 Síntesis de ácido- γ -hidroxi- γ -(4-metilfenil)-butanoico (5.11) (Tietze & Eicher, 1989)

Se solubilizaron 84,2 mg (0,438 mmol) del compuesto de partida (5.6) en 5 mL de una solución $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 95:5 al 0,01 % en NaOH . Se colocó la solución en baño de hielo (0°C) y se le adicionaron en porciones 82,8 mg (2,19 mmol) de NaBH_4 . Se colocó con agitación durante dos días a temperatura ambiente. Luego se acidificó con 2 mL de HCl (6N) y se procedió a extraer con 3 porciones de 3 mL de CH_2Cl_2 cada una. Luego de reunir y secar los extractos con Na_2SO_4 anhidro, se concentró a presión reducida observándose un aceite que fue cristalizando al alcanzar la temperatura ambiente. Se obtuvieron 65,8 mg de cristales de 5.11 (77,4%).

5.2.7 Síntesis de ácido- δ -hidroxi- δ -(4-metilfenil)-pentanoico (5.12) (Tietze & Eicher, 1989)

En las mismas condiciones anteriores (descriptas en el punto 5.2.6) se colocaron 38,77 mg (0,188 mmol) del compuesto de partida (5.8), con 50 mg (1,32 mmol) de NaBH_4 , obteniéndose 32,7 mg de 5.12 en forma de cristales (83,5%).

5.2.8 Síntesis de 1,5-di-*p*-tolil-pentan-1,5-diol (5.14)

En las mismas condiciones anteriores (descriptas en el punto 5.2.6) se colocaron 40,00 mg (0,142 mmol) del compuesto 1,5-di-*p*-tolil-pentan-1,5-diona (5.13), con

54,62 mg (1,44 mmol) de NaBH_4 , obteniéndose 23,02 mg de **5.14** en forma de cristales (57,0%).

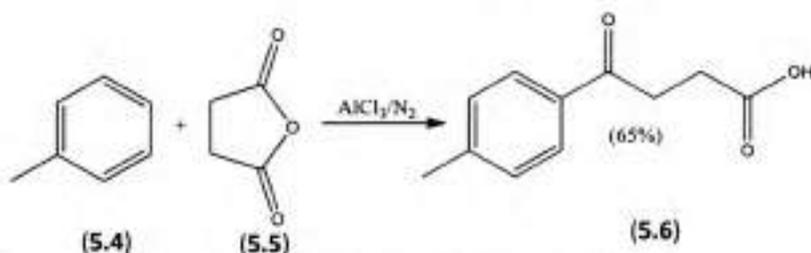
5.2.9 Síntesis de 1-hidroxi-1-(4-metilfenil)-pentan-5-ol (**5.15**) (Dwivedi et al., 2013)

126,0 mg (0,611 mmol) de ácido- γ -(4-metilbenzoil)-butanoico (**5.8**) disueltos en 5 mL de THF seco, se adicionaron sobre una suspensión de 34,8 mg (0,918 mmol) de LiAlH_4 en 5 mL del mismo solvente con agitación magnética, sobre baño de hielo. Luego de 1h, se adicionaron 15 mL de AcOEt y 15 mL de agua. La fase acuosa fue extraída con AcOEt (3x15 mL) y secada con Na_2SO_4 anhidro. El producto de la reacción se purificó mediante CC obteniéndose 92,9 mg (78%) de un aceite de tonalidad dorada identificado como el diol **5.15**.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 ácido- β -(4-metilbenzoil)-propanoico (**5.6**)

Con el objetivo de realizar la primera serie de análogos se realizó la síntesis del ácido- β -(4-metilbenzoil)-propanoico por medio de una reacción de acilación de Friedel-Crafts, a partir de anhídrido succínico (**5.5**) y tolueno (**5.4**) como se indica en el Esquema 5.1. Se obtuvo un 65% de rendimiento en la reacción. Se analizó el producto de la reacción (**5.6**) mediante espectroscopia de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.



Esquema 5.1: Síntesis de ácido- β -(4-metilbenzoil)-propanoico (**5.6**).

La actividad del cetoácido **5.6** fue evaluada frente a *L. sativa* y *A. sativa* (Figura 5.2). Se puede observar que a baja concentración tiene un efecto inhibitor (37,6%) del crecimiento radicular sobre *A. sativa* (monocotiledónea) y un leve efecto estimulante (-6,8%) sobre *L. sativa*. Esto podría interpretarse como un comportamiento selectivo entre ambas semillas a bajas concentraciones, ca. 15 ppm. Por otro lado, a 75 ppm el efecto se invierte y es estimulante para ambas semillas a 150 ppm.

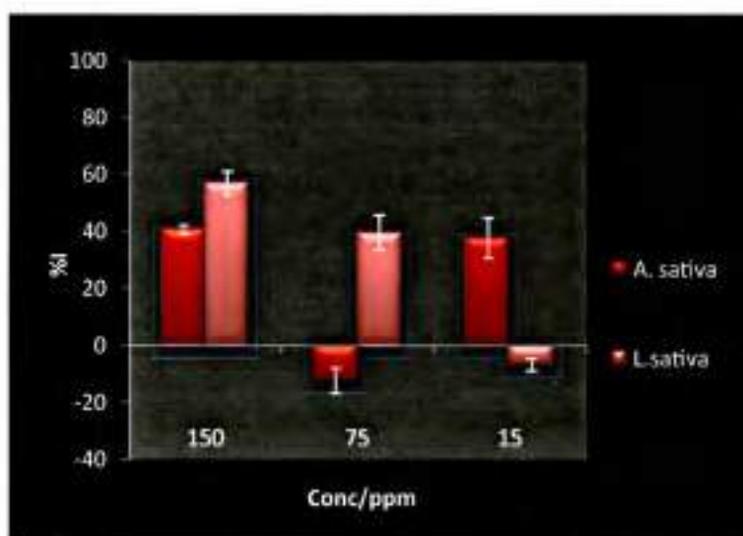
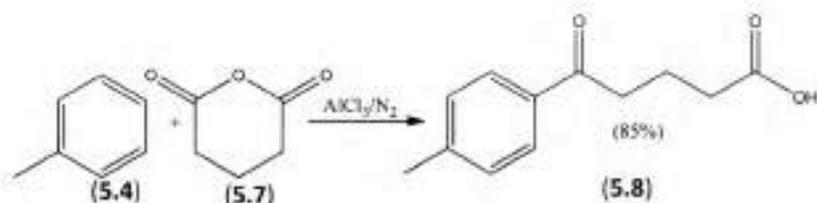


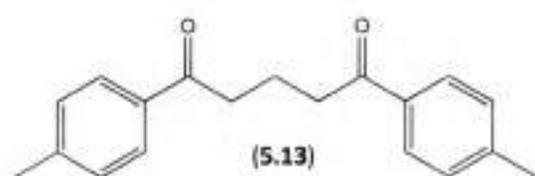
Figura 5.1: Efecto sobre el crecimiento radicular del ácido- β -(4-metilbenzoil)-propanoico (5.5) sobre *Avena sativa* y *Lactuca sativa*.

5.3.2 ácido- γ -(4-metilbenzoil)-butanoico (5.8)

El precursor de la segunda serie de análogos (con un átomo de carbono adicional), ácido- γ -(4-metilbenzoil)-butanoico (5.8) se sintetizó a partir de anhídrido glutárico (5.7) y tolueno (5.4), como se indica en el Esquema 5.2. Se obtuvo un 56% de rendimiento del producto esperado. Se analizó el producto mediante espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$. De este proceso se aisló un subproducto de reacción, el compuesto 1,5-di-*p*-tolil-pentan-1,5-diona (5.13). El mismo fue identificado mediante distintas metodologías espectroscópicas. Una posible causa de formación de este subproducto podría deberse a la presencia de un exceso del catalizador (AlCl_3) en el medio de reacción.



Esquema 5.2: Síntesis de ácido- γ -(4-metilbenzoil)-butanoico (5.8).



La actividad de los compuestos sintetizados fue evaluada, cada uno por separado (Figura 5.4) y en mezcla (Figura 5.5). En lo que respecta a la actividad del ácido- γ -(4-metilbenzoi)-butanoico (5.8) se puede ver un efecto estimulante sobre la monocotiledónea a 15 ppm (-20,5%) y una inhibición del 17,6% sobre la radícula de la dicotiledónea. Este efecto fue siempre estimulador sobre la dicotiledónea mientras que el efecto inhibitor sobre *L. sativa* incrementó gradualmente con el aumento de la concentración. Por otro lado, la actividad de 1,5-di-*p*-toluil-pentan-1,5-diona (5.13) presentó efectos erráticos siendo estimulante no selectivo a 150 ppm y 15 ppm; y selectivo a 75 ppm, aunque con baja actividad (12,6% de inhibición sobre *A. sativa* y -15,6% sobre *L. sativa*).

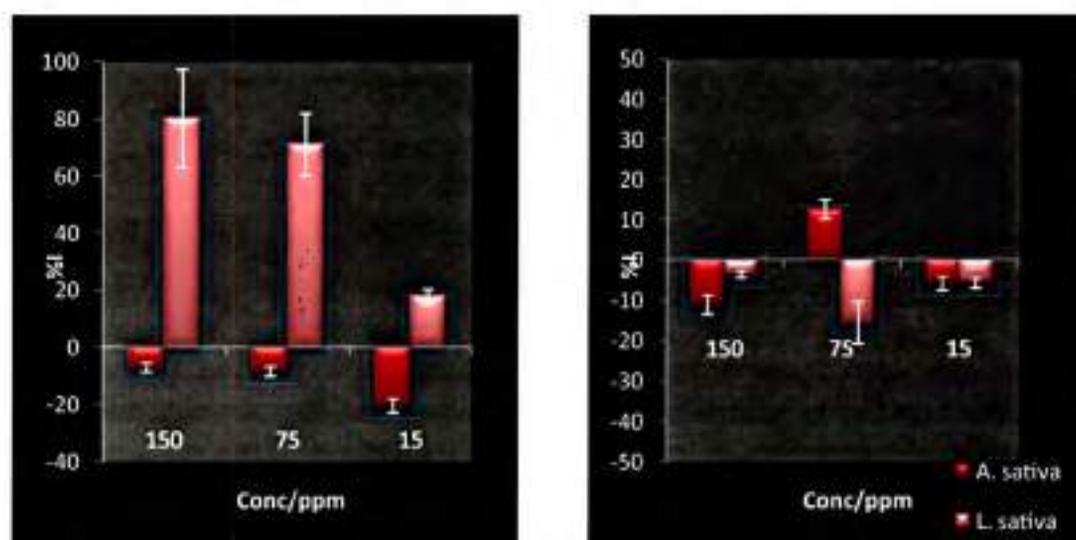


Figura 5.4: Efectos sobre el crecimiento radicular sobre *A. sativa* y *L. sativa*, Izq.: ácido- γ -(4-metilbenzoi)-butanoico (5.8). Der.: 1,5-di-*p*-toluil-pentan-1,5-diona (5.13).

En cuanto a la actividad de la mezcla de los dos compuestos (5.8:5.13, aproximadamente 75:25; Figura 5.5), se puede observar efectos inversos sobre Avena a 15 ppm (-36,1%), el cual es más intenso que el observado para 5.13. A 75 ppm la mezcla estimula la elongación radicular en ambas especies. A 150 ppm se observa nuevamente el efecto inverso sobre ambas especies teniendo un efecto inhibitorio

(38,1%) sobre *L. sativa* y muy baja estimulación sobre *A. sativa* cuando se compara con los productos por separado.

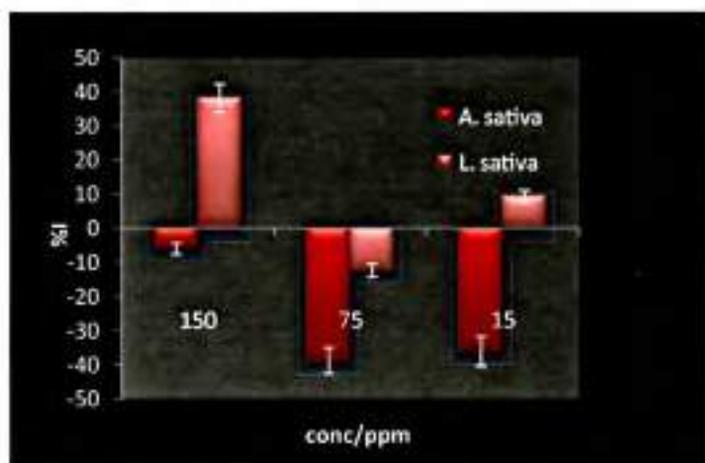
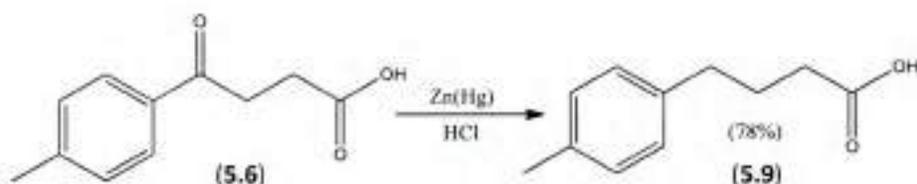


Figura 5.5: Actividad sobre el crecimiento radicular de la mezcla de reacción 5.8:5.13 (75:25).

5.3.4 Ácido- γ -(4-metilfenil)-butanoico (5.9)

Se realizó la reducción completa del grupo carbonilo del resto benzoilo mediante una reacción de Clemmensen como lo muestra el Esquema 5.4 obteniéndose 5.9 con un rendimiento del 78%. Se analizó el producto mediante espectroscopia de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.



Esquema 5.4: Síntesis de ácido- γ -(4-metilfenil)-butanoico (5.9).

En la figura 5.6 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de la actividad del ácido- γ -(4-metilfenil)-butanoico (5.9). A una concentración de 15 ppm el efecto no es selectivo, mostrando estimulación tanto para la especie monocotiledónea (-25,6 %) como para la dicotiledónea, si bien para esta última es poco significativo, -3,0 %. A 75 ppm se puede decir que el efecto es selectivo pero con muy baja actividad inhibitoria para la dicotiledónea (5,9%) y estimula la monocotiledónea también en un valor bajo, -10,5%. Un cambio total se ve a la mayor concentración ensayada, la selectividad se pierde inhibiendo ambas especies.

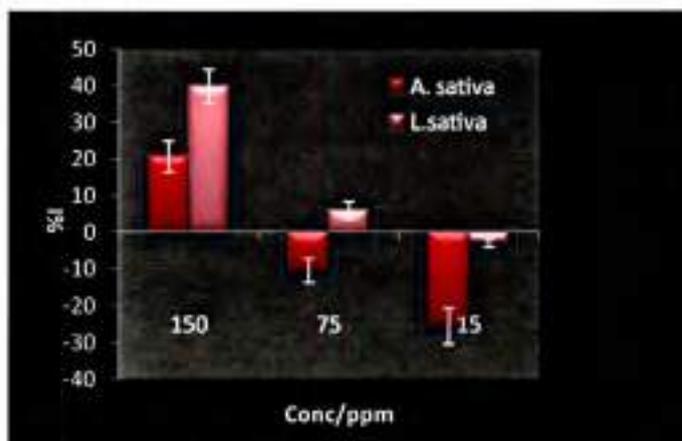
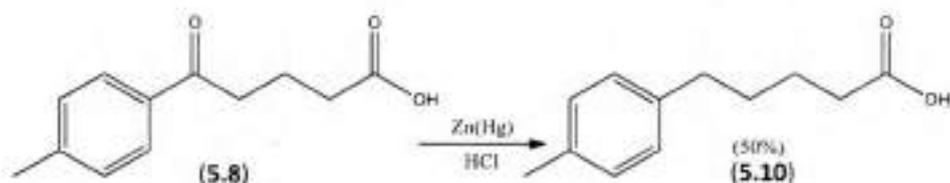


Figura 5.6: Actividad alelopática del ácido- γ -(4-metilfenil)-butanoico (5.9).

5.3.5 Ácido- δ -(4-metilfenil)-pentanoico (5.10)

De la misma manera que para el cetoácido 5.6, se realizó la reducción total del grupo carbonilo adyacente al anillo aromático del derivado 5.8, utilizando amalgama de Zn(Hg) como lo indica el Esquema 5.5. El rendimiento de la reacción fue del 50%. Se analizó el producto mediante espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$.



Esquema 5.5: Síntesis del Ácido- δ -(4-metilfenil)-pentanoico (5.10).

Los ensayos de bioactividad del producto obtenido se muestran en la Figura 5.7.

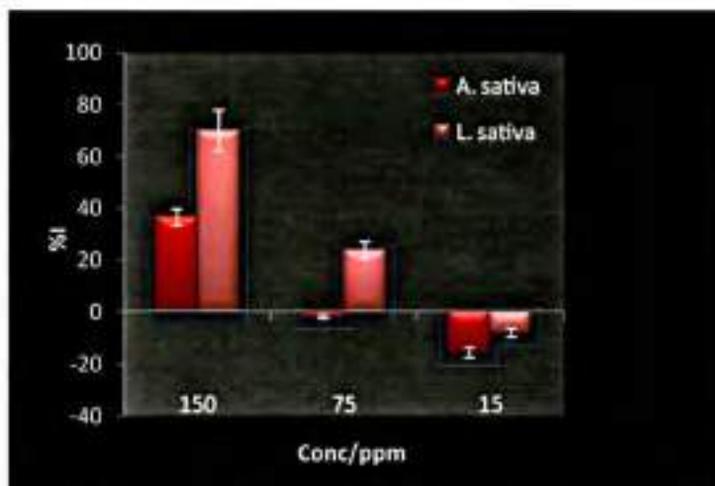
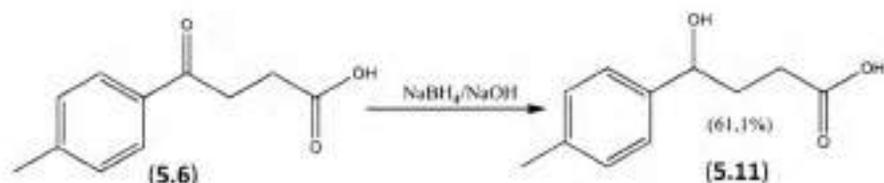


Figura 5.7: Actividad alelopática del Ácido- δ -(4-metilfenil)-pentanoico (5.10)

Como se observa en el Gráfico, a la mayor (150 ppm) y a la menor (15 ppm) concentración empleadas, el efecto es del mismo signo sobre ambas especies, pero en el primer caso inhibitorio y en el segundo estimulante en muy pequeña proporción. A 75 ppm los efectos tanto estimulante como inhibitorio sobre las radículas fueron poco significativos.

5.3.6 Ácido- γ -hidroxi- γ -(4-metilfenil)-butanoico (5.11)

Otra reacción llevada a cabo fue la reducción suave del grupo carbonilo vecino al anillo aromático usando NaBH_4 como agente reductor con el objetivo de convertirlo en hidroxilo, como se muestra en el Esquema 5.6. El espectro de $^1\text{H-RMN}$ (Figura 5.8) muestra la señal de H-4 (H carbinólico) a δ 5,47 ppm como un doblete. Los H ubicados en C-3 producen dos señales asignadas a hidrógenos diastereotópicos, a δ 2,63 y 2,17 ppm. Esta situación llevó a concluir que el compuesto se cicla espontáneamente, formando la γ -lactona 5.16, Esquema 5.7.



Esquema 5.6: Síntesis de Ácido- γ -hidroxi- γ -(4-metilfenil)-butanoico (5.11)

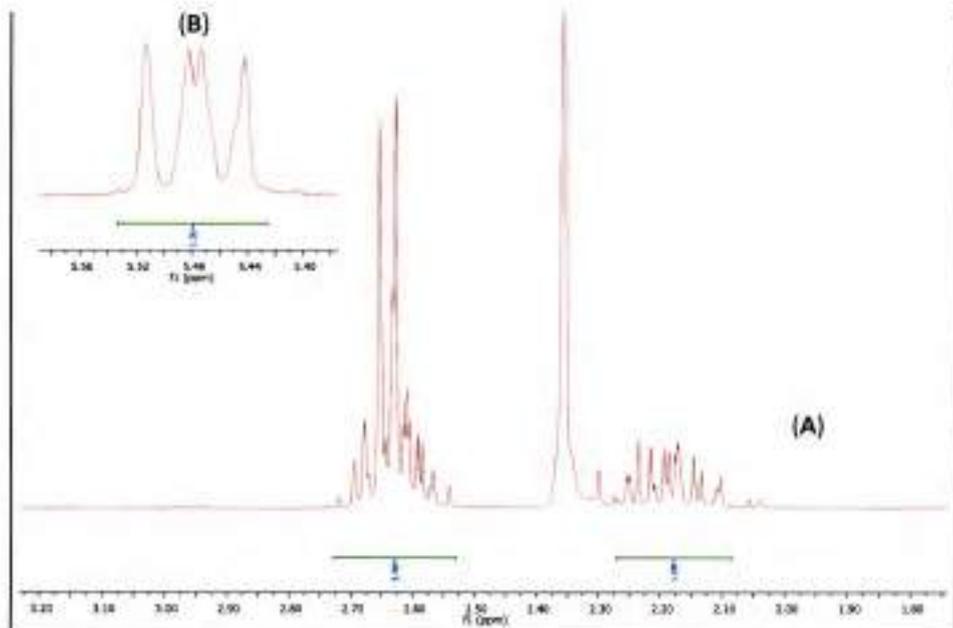
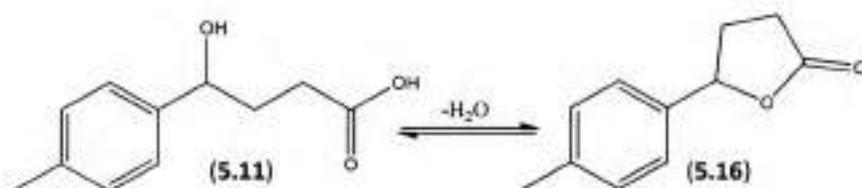


Figura 5.8: A: Ampliación del espectro de ^1H -RMN (desde δ 1.75 a 3.20 ppm) del producto de reacción del Esquema 5.6, a δ 2.63 y 2.17 ppm se observan los H en el C-3. B: el H-4 (δ 5.47 ppm) se observa como un dd.



Esquema 5.7: Ciclación del hidroxiaácido 5.11 para producir la γ -lactona 5.16.

Con la finalidad de obtener el producto de la reacción planteada en el Esquema 5.7, esto es el γ -hidroxiaácido, se realizó una reacción de hidrólisis en medio básico con resultados negativos, ya que el compuesto vuelve a ciclarse espontáneamente. La **Figura 5.9** muestra el espectro de ^1H -RMN donde se observan los 2 compuestos, pero que no se lograron separar, obteniendo siempre la lactona 5.16. A un desplazamiento de δ 5.47 ppm puede observarse la señal del H-4 como un doblete correspondiente al compuesto ciclado, mientras que a δ 4.72 ppm se observa la señal de H-4 del compuesto en su forma cíclica. Luego de un tiempo, la señal a δ 4.72 desaparece observándose solamente la correspondiente al cierre de la lactona.

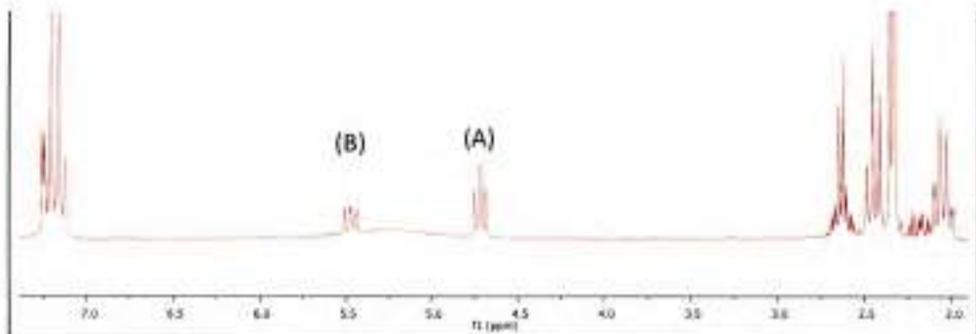


Figura 5.9: Ampliación del espectro de ^1H -RMN desde δ 2.0 hasta 8 ppm donde puede observarse la presencia las señales (A) del hidroxilácido **5.11** y (B) la γ -lactona **5.16**.

Por lo tanto, sólo se pudo evaluar la actividad alelopática del compuesto **5.16** mostrando muy baja selectividad a la concentración más baja ensayada (15 ppm). A esta concentración el efecto fue levemente inhibitorio (6,3%) sobre la especie dicotiledónea (*L. sativa*) y estimulante (-3,1%) sobre la especie monocotiledónea (*A. sativa*). A mayores concentraciones se observa una pérdida de la selectividad, mostrando un efecto estimulante sobre ambas especies, pero siguiendo la tendencia estimulante de crecimiento para *A. sativa*.

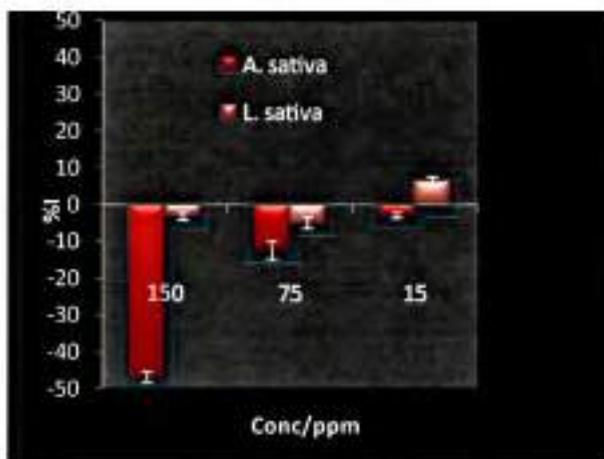
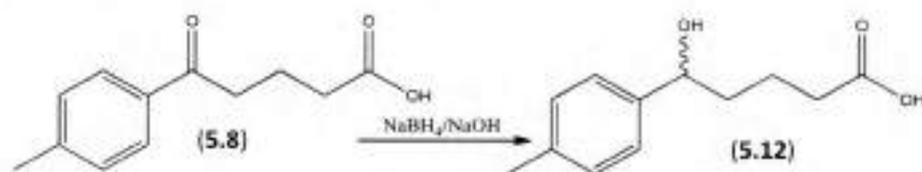


Figura 5.10: Ensayos de actividad alelopática del compuesto 5.16.

5.3.7 Ácido- δ -hidroxi- δ -(4-metilfenil)-pentanoico (5.12)

Con el objetivo de obtener el homólogo monohidroxilado de 5.11, esto es con un átomo de carbono adicional, se procedió a reducir el ácido- γ -(4-metilbenzoi)-butanoico (5.8) con $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$ (Esquema 5.8).



Esquema 5.8: Síntesis de Ácido- δ -hidroxi- δ -(4-metilfenil)-pentanoico (5.12).

El porcentaje de inhibición del crecimiento radicular para el δ hidroxiácido obtenido se muestra en la Figura 5.11. A 15 ppm se observa una baja inhibición (12,3%) de la especie monocotiledónea y una leve estimulación (-2,9%) de la especie dicotiledónea. A 75 ppm se ve una inversión de la selectividad, pero con baja actividad. A 150 ppm se pierde la selectividad, inhibiendo a las dos especies estudiadas. Siempre con efectos poco significativos.

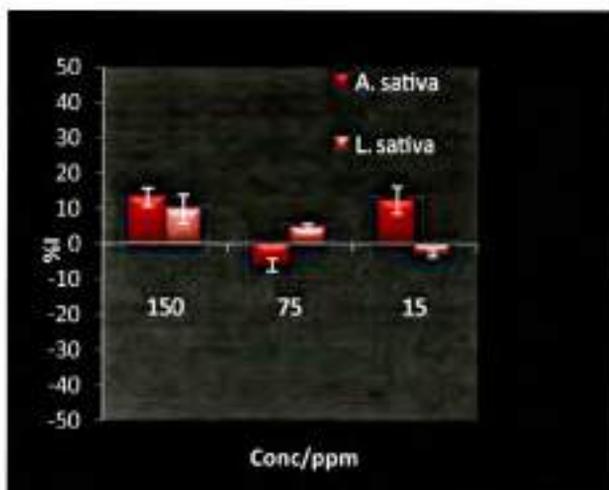


Figura 5.11: Actividad alelopática del ácido- δ -hidroxi- δ -(4-metilfenil)-pentanoico (5.12).

5.3.8 1,5-di-*p*-tolil-pentan-1,5-diol (5.14)

Se realizó la reducción parcial del subproducto de reacción de la síntesis de ácido- γ -(4-metilbenzoil)-butanoico, la 1,5-di-*p*-tolil-pentan-1,5-diona (5.13). Para lograr la reducción se colocó la dicetona en presencia de NaBH_4 en medio básico, como lo indica el Esquema 5.9.



Esquema 5.9: Síntesis de 1,5-di-*p*-tolil-pentan-1,5-diol (5.14).

El compuesto presentó baja actividad en general. A las concentraciones más bajas ensayadas (15 ppm y 75 ppm) se observa que el compuesto carece de selectividad, presentando un efecto estimulante en ambas especies. A 150 ppm, se observa inhibición (5,1%) sobre la *A. sativa*, y estimulación (-3,3%) sobre *L. sativa*.

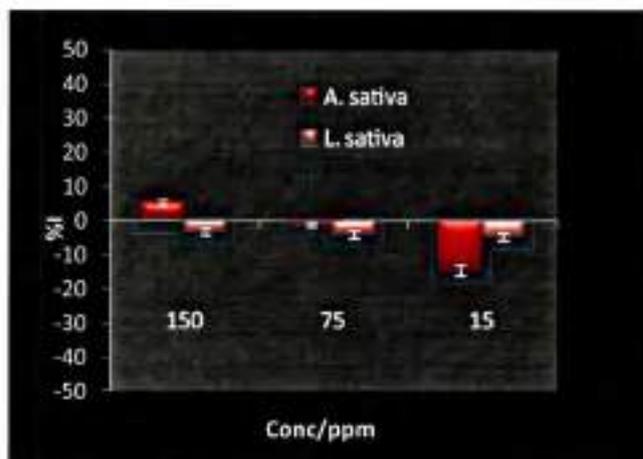
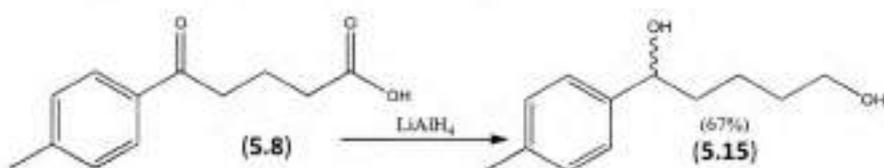


Figura 5.12: Actividad alelopática de 1,5-di-*p*-tolil-pentan-1,5-diol.

5.3.9 1-hidroxi-1-(4-metilfenil)-pentan-5-ol (5.15)

A partir 5.8 se obtuvo el diol 5.15, para lo cual se realizó la reducción con LiAlH_4 . El rendimiento de la reacción fue de 67% (Esquema 5.10). Se analizó el producto mediante espectroscopia de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.



Esquema 5.10: Síntesis de 1-hidroxi-1-(4-metilfenil)-pentan-5-ol (5.15)

El producto obtenido presentó efecto estimulante (-23,6% para *A. sativa* y -6,9% para *L. sativa*) para ambas especies a 15 ppm. A 75 ppm se aparece un leve efecto inhibitor en la especie monocotiledónea y disminuye el efecto estimulante sobre la especie dicotiledónea. A 150 ppm se observa un efecto inhibitor (11,1%) sobre la especie monocotiledónea, manteniéndose el efecto estimulante sobre *L. sativa*, el cual es notable a 15 ppm.

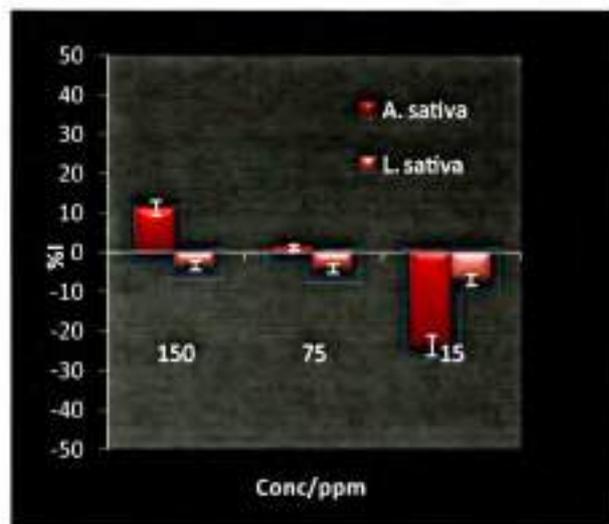
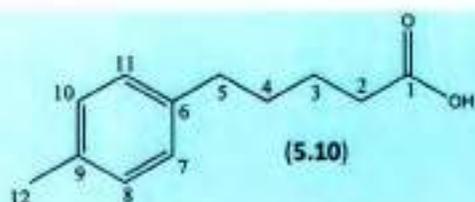


Figura 5.13: actividad alelopática de 1-hidroxi-1-(4-metilfenil)-pentan-5-ol (5.15).

Tabla 5.1 Asignaciones de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN

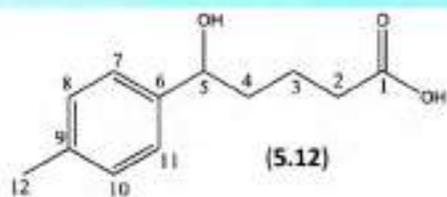
<p>(5.6)</p>	<p>^1H-RMN: H-2: 2,83 t (2H, $J=6,52$); H-3: 2,31 t (2H, $J=6,52$); H-6/H-10: 7,90 d (2H, $J=8,03$); H-7/H-9: 7,28 d (2H, $J=8,03$); H-11: 2,43 s (3H)</p> <p>^{13}C-RMN: C-2: 228,01; C-3: 33,07; C-5: 133,94; C-6/C-10: 128,18; C-7/C-9: 129,33; C-8: $\delta=144,18$; C-11: $\delta=21,56$.</p>
<p>(5.8)</p>	<p>^1H-RMN: H-2: 2,50 t (2H, $J=6,94$); H-4: 3,05 t (2H, $J=7,3\text{Hz}$); H-3: 2,08 c (2H, $J=7,3; 6,94$); H-7/H-11: 7,26 d (2H, $J=8,0$); H-8/H-10: 7,34 d (2H, $J=8,0$); H-12: 2,41 s (3H).</p> <p>^{13}C-RMN: C-1: 178,55; C-2: 33,01; C-3: 19,13; C-4: 37,19; C-5: 205,43; C-6: 134,35; C-7/C-11: 128,15; C-8/C-10: 129,28; C-9: 143,89; C-12: 21,58.</p>
<p>(5.9)</p>	<p>^1H-RMN: H-2: 2,36 ppm t (2H, $J=7,7$); H-3: 1,94 ppm, tt (2H, $J=7,3; 7,7$); H-4: 2,63 t (2H, $J=7,3$); H-6/H-10/H-7/H-9: 7,08 ppm m (4H); H-11: 2,31 s (3H)</p> <p>^{13}C-RMN: C-1: 178,79; C-2: 33,15; C-3:</p>

26,30; C-4: 34,55; C-5:138,07; C-6/C-10: 128,34; C-7/C-9: 129,09 ; C-8: 135,48; C-11: 20,96.



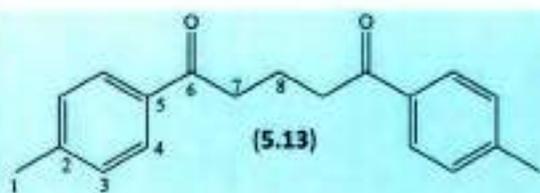
¹H-RMN: H-2: 2,49 t (2H, J=7,15); H-3: 2,31 t (2H, J=7,15); H-4: 2,07 t (2H, J=6,9); H-5: 3,04 t (2H, J=6,92); H-7/H-11: 7,25 d (2H, J=8,03); H-8/H10: 7,86 d (2H, J=8,03); H-12: 2,40 s (3H).

¹³C-RMN: C-1: 178,8 ; C-2: 33,2 ; C-3: 29,7 ; C-4: 30,3 ; C-5: 35,0 ; C-6: 134,3 ; C-7: 129,3 ; C-8: 128,17 ; C-9: 143,9 ; C-12: 21,6.



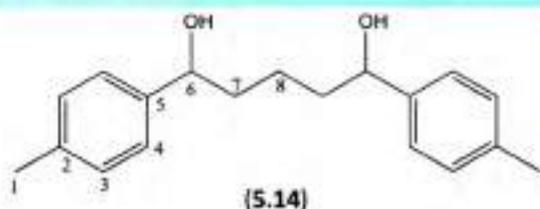
¹H-RMN: H-2: 2,45 t (2H, J=7,08); H-3: 1,98 m (2H); H-4: 1,76 m (2H); H-5: 4,65 m (1H); H-11/H-7: 7,15 d (2H, J=8,12); H-10/H8: 7,23 d (2 H, J=8,12) ; H-12: 2,33 s (3H).

¹³C-RMN: C-1: 178,3 ppm; C2: 33,59 ppm; C-3: 21,2 ppm ; C-4: 38,0 ppm; C-5: 74,1 ppm; C-6: 141,3 ppm; C-11/C-7: 129,2 ppm; C-10/C-8: 125,8 ppm; C-9: 137,4 ppm; C-12: 21,1 ppm.



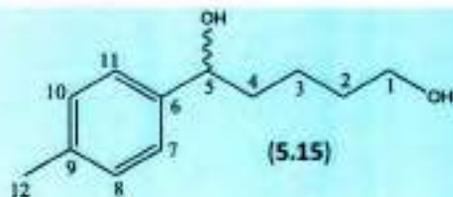
¹H-RMN: H-1: 2,40 s (6H); H-3: 7,26 d (4H, J=8,0); H-4: 7,88 d (4H, J=8,0); H-7: 3,05 t (4H, J=7,2) ; H-8: 2,08 q (2H, J=6,0).

¹³C-RMN: C-1: 21,6 ; C-2: 143,9 ; C-3: 130,8 ; C-4: 129,9 ; C-5: 134,3 ; C-6: 198,9 ; C-7: 40,0 ; C-8: 19,0.



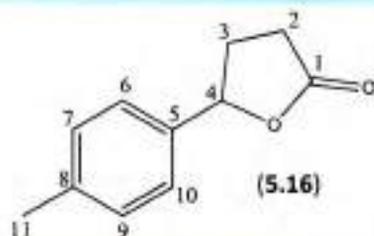
¹H-RMN: H-1: 2,32 s (3H); H-3: 7,19 d (2H, J=8,04); H-4: 7,12 ppm d (2H, J=8,04) ; H-6: 4,59 t (1H, J=6,4); los metilenos (H-6, 7 y 8) aparecen como multipletes entre 2 a 1 ppm.

¹³C-RMN: C-1: δ=21,0 ppm; C-2: δ=137,1 ppm; C-3: δ=125,8 ppm; C-4: δ=129,0 ppm; C-5: δ=141,8 ppm; C-6: δ=74,2 ppm; C-7: δ=38,8 ppm; C-8: δ=22,2 ppm .



$^1\text{H-RMN}$: H-1: 3,65 t (2H, $J=6,19$); los metilenos H-4/H-3/H-2 aparecen como multipletes entre 1,46 ppm y 1,28 ppm ; H-5: 4,67 t (1H, $J=6,62$); H7/H-8/H-10/H-11: 7,18 m (4H) ; H-12: 2,43 s (3H).

$^{13}\text{C-RMN}$: C-1: 62,6; C-2: 32,2; C-3: 23,3; C-4: 37,2; C-5: 72,9; C-6: 141,4; C-7/C-11: 128,8; C-8/C-10: 125,4; C-9: 137,0; C-12: 21,0.



$^1\text{H-RMN}$: H-3a/ H-2: 2,63 m (3H); H-3b: 2,17 m (1H); H-4: 5,48 dd (1H, $J=8,41$; 5,84); H-7/H-6/H-9/H-10: 7,35 m (4H); H-11: 2,35 s (3H)

$^{13}\text{C-RMN}$: C-1: 176,1 ; C-2: 28,9 ; C-3: 30,9 ; C-4: 81,3 ; C-5: 138,3 ; C-6: 129,4 ; C-7: 125,3 ; C-8: 137,2 ; C-11: 21,1

En CDCl_3 , TMS como estándar interno. δ en ppm, constantes de acoplamiento en Hz entre paréntesis.

6. Materiales y métodos



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Procesamiento del material vegetal

Recolección de las muestras vegetales

En todos los casos las especies se recolectaron entre los meses de diciembre y marzo (temporada de verano), debido a que las especies se encuentran en estado de floración o fructificación y está demostrado que en dichas etapas la concentración de metabolitos secundarios es mayor. Las muestras vegetales fueron identificadas por el Dr. Luis Ariza Espinar, Profesor Emérito, FCEFN-UNC.

6.2 Solventes y Reactivos

Todas las reacciones con reactivos sensibles se realizaron bajo atmósfera inerte (nitrógeno seco o argón) y con disolventes secos (por eliminación de agua según la metodología habitual). El CH_2Cl_2 fue secado sobre hidruro de calcio, mientras que el THF fue secado sobre sodio metálico y destilado utilizando como indicador de humedad la benzofenona.

Todos los solventes empleados para los procesos de extracción y purificación fueron destilados antes de ser utilizados.

6.3 Instrumental

6.3.a Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear fueron tomados a temperatura ambiente (25°C) en un equipo Bruker Avance II AV-400 (400,13 MHz para ^1H y 100,03 MHz para ^{13}C). Se empleó cloroformo deuterado (CDCl_3 , 99,8%-Sigma Aldrich) como solvente. Los desplazamientos químicos (δ) se describen en ppm y están referenciados respecto a la señal del TMS. Las constantes de acoplamiento (J) en los espectros de ^1H -RMN se expresan en Hertz (Hz). Las asignaciones de las señales de protón y de carbono se llevaron a cabo mediante el análisis de los experimentos de correlación homo y heteronucleares COSY, HSQC, HMBC y NOESY.

6.3.b Espectroscopia Infrarroja (IR)

Los espectros se realizaron en espectrofotómetros Bruker IFS 55-FTIR y Nicolet 5-SXC-FTIR. Los compuestos se disolvieron en cloroformo grado espectroscópico en todos los casos y se aplicaron en forma de película sobre una pastilla de cloruro de sodio o cloruro de plata de 0,2 mm de espesor. Los valores de frecuencia (ν) se expresan en cm^{-1} .

6.3.c Espectrometría de Masas

Los espectros de masas de baja resolución se llevaron a cabo en espectrómetros Hewlett-Packard modelo 5995, VG Micromass ZAB-2F, LCT premier XE Micromass.

6.4 Técnicas cromatográficas

Para purificar los metabolitos se empleó una combinación de métodos cromatográficos.

6.4.a Cromatografía líquida al vacío (CLV) o cromatografía al vacío

Se utilizó Silica Gel 60 Merck 0,063-0,2 mm (70-230 mesh) como fase estacionaria y para realizar las pastillas de siembra.

6.4.b Cromatografía en columna (CC) en fase normal

En este caso se empleó Silica Gel 60 G (70-230 mesh ASTM; 0,063-0,200 mm de diámetro de partícula ó 230-400 mesh ASTM; 0,040-0,063 mm), Merck. Se empleó la metodología de columna seca. La muestra a separar se aplicó como cabeza, adsorbida en sílica (pastilla de siembra).

6.4.c Cromatografía de exclusión molecular (CEM)

En este tipo de cromatografías se utilizó Sephadex LH-20 como fase estacionaria marca -Sigma que requiere una previa estabilización del polímero en una suspensión con MeOH (4,1 mL/g) durante, al menos, 12 h. A continuación se vierte en la columna y se deja reposar 1 hora. Los sistemas que normalmente son utilizados para estabilizar y luego eluir la columna son Hex-CH₂Cl₂-MeOH (2:1:1) y MeOH. La muestra a cromatografiar se disolvió en el sistema de elución a una concentración no superior al 5% del volumen muerto de la columna. Las columnas fueron reutilizadas tras lavarse con MeOH y estabilizadas nuevamente con el eluyente a utilizar.

6.4.d Cromatografía en capa delgada (CCD) en fase normal

Se utilizaron con fines analíticos para hacer el seguimiento de las CLV, CC, CR, reacciones y con fines preparativos. En todos los casos se utilizaron cromatofolios con base de aluminio o vidrio (20x20 cm) de sílica gel 60 G (Merck) o Sil G-100 (Macherey-Nagel) de 0,25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia de 254 nm (F₂₅₄). La detección de los productos en las placas se realizó por fluorescencia, empleando una lámpara ultravioleta a una longitud de onda de 254 o 360 nm, o bien, pulverizando

con vainillina (disolución de vainillina y H₂SO₄ en una concentración de 1 mg/ 100mL) y óleum (disolución de H₂SO₄:EtOH 1:4) y con posterior calentamiento a 120 °C.

6.5 Ensayos de actividad biológica

6.5.a Actividad citotóxica: Mortalidad en *Artemia salina*

Los quistes de *Artemia* fueron obtenidos en acuarios comerciales. Se utilizó la marca "Vita Fish" y *Artemia* de producción propia.

Se realizaron los ensayos de mortandad utilizando el método descrito por McLaughlin y col., 1998. Para lograr la eclosión de los quistes (huevos) de *Artemia* (Figura 6.1.A), se colocaron en agua salina (NaCl 3,8% p/v) con abundante aireación y luz durante aproximadamente 30 h en un lixiviador como se muestra en la Figura 6.1.B. Luego se cubrió la parte inferior del lixiviador y se colocó una luz de mayor intensidad en la parte superior con el objetivo de atraer a los nauplios hacia la superficie para poder separarlos ya que, como las plantas, poseen fototropismo positivo (Olowa & Nuñez, 2013).

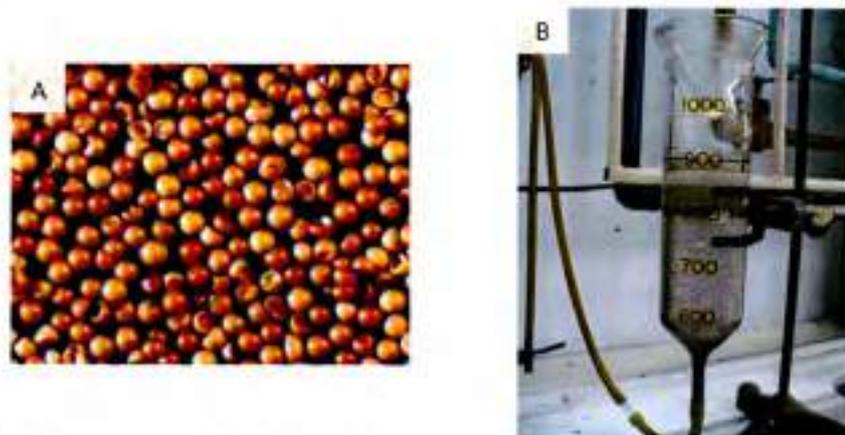


Figura 6.1: A: Quistes (huevos) de *Artemia*. B: Equipo de Lixiviación, con aireación.

Se ensayaron 3 concentraciones distintas de los extractos: 1000 ppm, 100 ppm y 10 ppm en agua salina al 5% de DMSO; todos los experimentos se realizaron por triplicado. Para ello, se colocaron en cada "well" 10 a 15 nauplios por pocillo en 100 µL del agua salina donde eclosionaron junto a 100 µL de cada una de las soluciones durante 24 h.

El porcentaje de mortandad (%M) en cada uno de los pocillos se calculó por medio de la Ecuación 6.1 y luego se calculó el valor medio.

$$\%M = \frac{M_{exp} - M_{cont}}{n^{\circ} \text{ nauplios}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 6.1}$$

Donde:

%M de nauplios por pocillo. *Mexp*: nauplios muertos en presencia del extracto. *Mcont*: nauplios muertos en el control. *n°nauplios*: número total de nauplios.

A fin de obtener la LC_{50} se graficó el log de la concentración utilizada (log C) vs. %M para obtener la ecuación de una recta, que muestre el %M en función de la concentración (**Ecuación 6.2**).

$$\%M = a \cdot \log C + b \quad \text{Ecuación 6.2}$$

Expresión general para la ecuación de la recta obtenida.

6.5.b Actividad alelopática: Inhibición del crecimiento radicular

Con el objetivo obtener compuestos que muestren cierta selectividad en especies mono- y dicotiledóneas se utilizaron semillas de *Avena sativa* y *Lactuca sativa* como modelo para cada tipo. Se utilizó el método descrito por Alarcón y colaboradores (2007) para evaluar la inhibición de crecimiento radicular. Las soluciones fueron preparadas usando EtOH como solvente. Se ensayaron 3 concentraciones: 150 ppm, 75 ppm y 15 ppm empleando EtOH como control. El bioensayo se llevó a cabo en cápsulas de Petri de vidrio (90 mm de diámetro). En el fondo de cada cápsula se colocó papel de filtro Whatman N°1 y 5 mL de cada solución a ensayar dejando evaporar el solvente en estufa a 40°C. Luego de la adición de 5 mL de agua destilada se colocaron 15 semillas de *A. sativa* y 20 semillas *L. sativa*, según correspondiera, y se incubó a $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ durante 7 días en ausencia de luz. Cada ensayo se realizó por triplicado. El efecto de los compuestos se evaluó midiendo la longitud de la raíz. El largo de la raíz para cada concentración fue medido, promediado y comparado con el control. La **Ecuación 6.3** fue utilizada para evaluar la inhibición del crecimiento radicular (%I). El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo por medio del análisis de la varianza, con el "software" adecuado.

$$\%I = \left(1 - \frac{X_t}{X_c}\right) \times 100\% \quad \text{Ecuación 6.3}$$

Donde: %I = porcentaje de inhibición del crecimiento radicular. X_t : Promedio de las longitudes a determinada concentración. X_c : Promedio de las longitudes en el control.

6.5.c Actividad antimicrobiana

Los ensayos antimicrobianos fueron realizados por la Brom. María Guadalupe Reyes en el Instituto de Investigaciones para la Industria Química (INIQUI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de Salta.

Microorganismos indicadores y condiciones de cultivo

Las cepas Gram (+) y Gram (-) utilizadas como indicadores de la actividad antibacteriana se muestran en la Tabla 6.1. Las cepas fueron incubadas en el medio de cultivo BHI (Agar Cerebro Corazón) a 37°C por 24 h, sin una atmósfera especial. Todas las cepas indicadoras fueron conservadas a -20°C en medio BHI con glicerol (10% v/v).

Tabla 1: Cepas indicadoras.

1- <i>Listeria monocytogenes</i> 60-364/03	13- <i>S. typhimurium</i> CUB 29/08
2- <i>L. monocytogenes</i> 01-155	14- <i>S. enteritidis</i> CUB 77/20
3- <i>L. monocytogenes</i> 00/220	15- <i>S. typhimurium</i> CUB 08/28
4- <i>L. monocytogenes</i> 99/320	16- <i>S. gallinarum</i> CUB 954
5- <i>L. monocytogenes</i> 00/110	17- <i>Bacillus cereus</i> 3
6- <i>L. monocytogenes</i> 01/31	18- <i>B. cereus</i> 4
7- <i>L. monocytogenes</i> 01/01	19- <i>B. cereus</i> 2
8- <i>L. monocytogenes</i> 99/287	20- <i>B. cereus</i> 7
9- <i>Escherichia coli</i>	21- <i>B. cereus</i> 5
10- <i>Staphylococcus aureus</i> M3	22- <i>B. cereus</i> 6
11- <i>Salmonella enteritidis</i> CUB 22/10	23- <i>B. cereus</i> Moriz
12- <i>S. gallinarum</i> 69/12	24- <i>B. cereus</i> c4

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de cada compuesto, una alícuota de 10 µL de una solución en EtOH fue depositada sobre discos de papel de filtro Whatman N°1 de 5 mm de diámetro y luego éstos colocados sobre el césped de la cepa indicadora. Dicho césped se obtuvo sembrando 100 µL de un cultivo de 24 h de cada cepa indicadora en 10 mL de medio BHI agarizado (1,5% p/v de agar). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h para las diferentes cepas de *Listeria*, *Staphylococcus*, *B. cereus*, *E. coli* y *Salmonella*. Luego de transcurrido el tiempo de incubación, éstas fueron examinadas para determinar presencia o no de halos de inhibición. La actividad antibacteriana de las cepas de *Bacillus* se determinó midiendo el diámetro del halo de inhibición (mm) frente a las cepas indicadoras.

7. Conclusiones

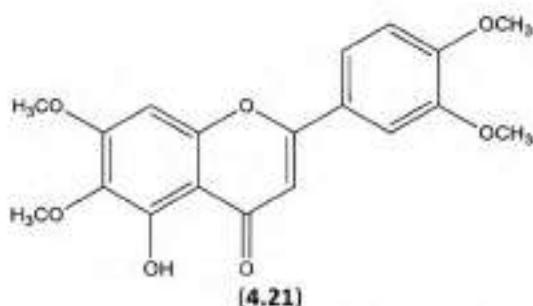
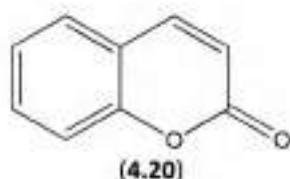


7. Conclusiones

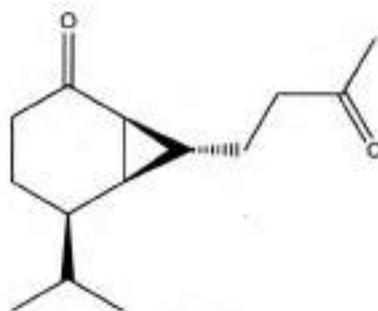
La investigación en productos naturales es una ciencia demandante, que requiere un profundo conocimiento de muchos aspectos de la química, como son la química orgánica, la química analítica y la química biológica, sólo por mencionar algunos de ellos. Este proceso incluye también estudios complementarios de los métodos de separación, de la espectroscopia, la biosíntesis, la síntesis y la farmacología, como así también de biología y taxonomía vegetal.

En el desarrollo de este trabajo de tesis se consiguieron distintos resultados a través de diversas metodologías, los que permitieron delinear las siguientes conclusiones:

- En el marco de la búsqueda de compuestos antimicrobianos de especies de la familia Asteraceae, se obtuvieron dos metabolitos, con buen rendimiento relativo, a partir de *Eupatorium arnottianum* Griseb. [sin. *Chromolaena arnottiana* (Griseb.) R. M. King & H. Rob] los que fueron identificados como cumarina (4.20) y 5-hidroxi-3',4', 6,7-tetrametoxiflavona (4.21).

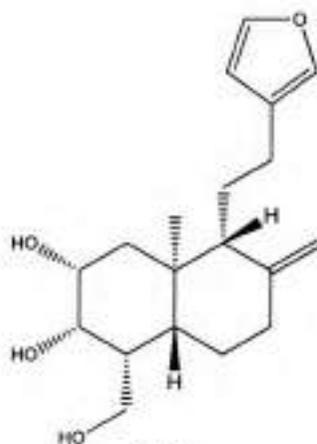


- Si bien en esta especie, se había informado la presencia de 5-hidroxi-3',4', 6,7-tetrametoxiflavona (4.21), no está reportada su actividad antimicrobiana frente a cepas de *B. cereus*, que resultó ser muy baja.
- Mediante el estudio biodirigido de *Senecio ceratophylloides* Griseb. se llegó al aislamiento del nor-sesquiterpeno (4.40), de esqueleto carabrano modificado (figura 4.26). Este núcleo resultó novedoso y poco común en la familia Asteraceae. El compuesto 4.40, además, posee potencial actividad citotóxica preliminar frente a *Artemia salina*.



(4.40)

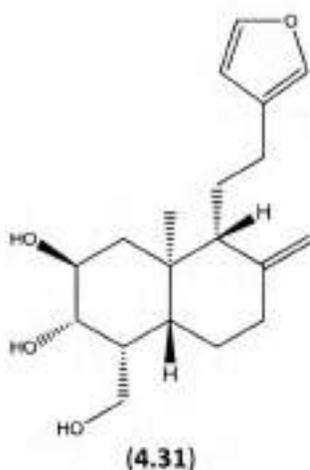
- La diversificación del extracto de hexano de *S. ceratophyllus* no presentó cambios en la bioactividad estudiada.
- El estudio de *Senecio pampeanus* resultó dificultoso por la elevada cantidad de grasas en los extractos. Solamente al tratar el extracto etanólico con solución de $Pb(AcO)_2$ una técnica para eliminar este tipo de impurezas, se logró aislar un glicérido sin interés para este estudio.
- En lo que respecta a *Austroeupatorium inulaefolium* (H.B.K.) K et R. (sin. *E. inulaefolium* H.B.K.), la diversificación del extracto con hidracina permitió la obtención del *ent*-norlabdano austroeupatol (4.31) con muy buen rendimiento.



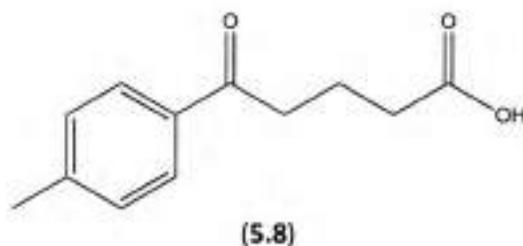
(4.31)

- La bioactividad de austroeupatol (4.31) frente a todas las cepas de microorganismos del metabolito ensayadas resultó ser extremadamente baja.
- El buen rendimiento obtenido del *ent*-norlabdano 4.31 lo hizo promisorio para la preparación de derivados semisintéticos, lo cual llevó a los siguientes resultados:
- Casi todos los intentos de modificar químicamente el *ent*-norlabdano dieron resultado negativo; solo frente al $p\text{-MeC}_8\text{H}_4\text{SO}_2\text{Cl}$ se obtuvo un epímero en C-2 (4.34).

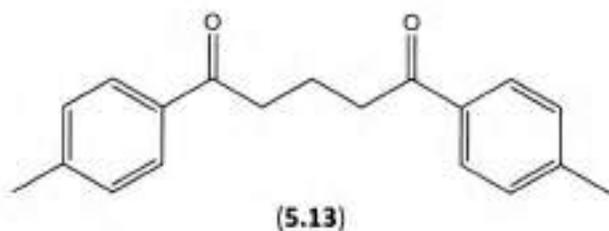
Se propone que esta reacción tuvo lugar por mecanismo SN₂, en el cual, luego de la esterificación en el C-2 se produce la hidrólisis del éster con su respectiva inversión de configuración.



- La inercia del ent-norlabdano (**4.31**) frente a casi todas las reacciones realizadas y la baja solubilidad en solventes polares, a pesar de poseer tres grupos hidroxilo en la molécula, llevó a hacer consideraciones estructurales y cálculos mediante métodos semiempíricos, proponiendo un modelo que explicaría los resultados obtenidos.
- Una tercera estrategia planteada fue la síntesis de los análogos de los bisabolenos bioactivos aislados de *Lagascea mollis* Cav. a través de reacciones simples y de reactivos de fácil asequibilidad. Esto permitió obtener 9 análogos simplificados alguno de ellos presentaron actividad alelopática.
- De los análogos simplificados, el ácido-γ-(4-metilbenzoi)-butanoico (**5.8**) resultó el de mayor interés, dado que mostró gran selectividad en las especies modelo utilizadas. El compuesto actuó inhibiendo a la dicotiledónea *Lactuca sativa* y estimulando a la monocotiledónea *Avena sativa* a todas las concentraciones estudiadas.



- Además, en la síntesis de **5.8** se produjo un subproducto, el compuesto **5.13**. Ambos muestran un efecto que podría interpretarse como sinergista (estimulante) cuando es evaluada su actividad en mezcla.



8. Referencias bibliográficas



- Aguilar, M. I., Delgado, G., Bye, R., & Linares, E. (1993). Bisabolenes, polycyclic diterpenoids and other constituents from the roots of *Lostephane heterophylla*. *Phytochemistry*, 33(5), 1161–1163.
- Ahluwalia, V., Sisodia, R., Walia, S., Sati, O. P., Kumar, J., & Kundu, A. (2013). Chemical analysis of essential oils of *Eupatorium adenophorum* and their antimicrobial, antioxidant and phytotoxic properties. *Journal of Pest Science* 86 (3), 571-577 .
- Ahmad, A., & Misra, L. N. (1994). Terpenoids from *Artemisia annua* and constituents of its essential oil. *Phytochemistry*, 37(1), 183–186.
- Ahmed, A. A., & Abou Elela, M. A. (1999). Highly oxygenated bisabolenes and an acetylene from *Matricaria aurea*. *Phytochemistry*, 51(4), 551–554.
- Ahmed, M., & Wardle, D. A. (1994). Allelopathic potential of vegetative and flowering ragwort (*Senecio jacobaea* L.) plants against associated pasture species. *Plant and Soil*, 164(1), 61–68.
- Alarcón, R. (2002). *Valor Quimiotaxonómico y Bioactividad de los Compuestos de Lagascea mollis y Stachycephalum argentinum, tribu Heliantheae, Asteraceae. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba.*
- Alarcón, R., Ocampos, S., Pacciaroni, A., Colloca, C., & Sosa, V. (2009). Constituents of *Gutierrezia mandonii* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(5), 683–685.
- Alarcón, S. R., Ocampos, L. S., Flores Galleguillo, L. V., Pacciaroni, A., & Sosa, V. E. (2007). Phytochemistry and phytotoxic activity of *Lagascea mollis* (asteraceae). *The Journal of Argentine Chemical Society*, 95(1), 25–31.
- Alvarenga, S. A., Ferreira, M. J., Emerenciano, V., & Cabrol-Bass, D. (2001). Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: characterization of tribes by principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 56(1), 27–37.
- Anaya, A. L., Hernández-Bautista, B. E., Torres-Barragán, A., León-Cantero, J., & Jiménez-Estrada, M. (1996). Phytotoxicity of cacalol and some derivatives obtained from the roots of *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob. & Brettell (Asteraceae), matarique or maturin. *Journal of Chemical Ecology*, 22(3), 393–403.
- Anesini, C., & Perez, C. (1993). Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 39(2), 119–28.

- Angyal, S. J., & Christofides, J. C. (1996). Intramolecular hydrogen bonds in monosaccharides in dimethyl sulfoxide solution. *Perkin Transactions 2*, (7), 1485–1491.
- Apel, M. A., Sobral, M., & Henriques, A. T. (2006). Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes nativas* da região sul do Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16 (3), 402-407.
- Appendino, G., Aviello, G., Ballero, M., Borrelli, F., Fattorusso, E., Petrucci, F., Santellia, F., & Tagliabatella-Scafati, O. (2005). Cytotoxic Germacrane Sesquiterpenes from the Aerial Parts of *Santolina insularis*. *Journal of Natural Products*, 68(6), 853–857.
- Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A. L., Maldonado, J., Avila, G., Villaseñor, J. L., & Romo de Vivar, A. (2008). Chemical constituents of *Roldana lineolata*. *Fitoterapia*, 79(1), 47–52.
- Arendorf, J. R. (2011). *A study of some non-covalent functional group pi interactions*. Thesis. University College London.
- Bagatini, M. D., Fachineto, M. J., Ferreira da Silva, A. C., & Tedesco, S. B. (2009). Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(2).
- Balandrin, M. F., Klocke, J. a, Wurtele, E. S., & Bollinger, W. H. (1985). Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4704), 1154–60.
- Barquera-Lozada, J. E., & Cuevas, G. (2008). Biogenesis of Sesquiterpene Lactones Pseudoguaianolides from Germacranolides: Theoretical Study on the Reaction Mechanism of Terminal Biogenesis of 8-Epiconfertifin. *The Journal of Organic Chemistry*, 74(2), 874–883.
- Biekofsky, R. R., Buschi, C. A., & Pomilio, A. B. (1991). Conformational analysis of 5,6,7-trisubstituted flavones: ¹³C NMR and molecular mechanics study. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 29(6), 569–575.
- Bohlmann, F., Schmeda-Hirschmann, G., & Jakupovic, J. (1984). Nor-ent-labdan Derivate aus *Austroepatorium inulaefolium*. *Planta Med*, 50(02), 199–200.
- Bohlmann, F., & Zdero, C. (1977). Weitere Inhaltsstoffe aus Vertretern der Eupatoriurn-Gruppe, 1041, 1034–1041.
- Bohlmann, F., Zdero, C., & Kings, R. M. (1979). Neue cadinen-derivate und andere aus *Chromolaena*-arten. *Phytochemistry*, 18, 1177–1179.

- Bohm, B., & Stuessy, T. (2001). *Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae)* (1st editio., pp. 68–69). Wolfsberg: Springer.
- Bruno, M., Bancheva, S., Rosselli, S., & Maggio, A. (2013). Sesquiterpenoids in subtribe Centaureinae (Cass.) Dumort (tribe Cardueae, Asteraceae): distribution, ¹³C NMR spectral data and biological properties. *Phytochemistry*, *95*, 19–93.
- Burke, M. D., & Schreiber, S. L. (2004). A planning strategy for diversity-oriented synthesis. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, *43*(1), 46–58.
- Campos-Navarro, R., & Scarpa, G. F. (2013). The cultural-bound disease “empacho” in Argentina. A comprehensive botanico-historical and ethnopharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, *148*(2), 349–60.
- Carreño, M. C., Cid, M. B., & Garcia Ruano, J. L. (1996). Diels-Alder reactions of [(S)R]- (1E,3E)-1-p-tolylsulfinyl-1,3-pentadiene: the unexpected evolution of maleic anhydride adducts. *Tetrahedron: Asymmetry*, *7*(7), 2151–2158.
- Carrizo Flores, R., Ponzi, M., Ardanaz, C., Tonn, C., & Donadel, O. (2009). Chemical composition of essential oil of *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pavon) Pers. and antibacterial activity. *Journal of the Chilean Chemical Society*, *54*, 475–476.
- Castro, M. J., Monroy, D. M. C., Castro, M. G., Castro, B. T., & De Lara, A. R. (2006). Los estudios morfológicos y de aislamiento reproductivo, como herramientas para determinar características fenotípicas en poblaciones del género *Artemia* en México. *Contacto5*, *59*(1), 49–53.
- Céspedes, C. L., Marín, J. C., Domínguez, M., Avila, J. G., & Serrato, B. (2006). Plant growth inhibitory activities by secondary metabolites isolated from Latin American flora. *Lead Molecules from Natural Products Discovery and New Trends* (Vol. Volume 2, pp. 373–410). Elsevier.
- Cheng, X., Zhang, S., Wang, C., Ren, J., Qin, J., Tang, X., Sheen, Y., Yan, S., Jin, H., & Zhang, W. (2013). Bioactive eudesmane and germacrane derivatives from *Inula wissmanniana* Hand.-Mazz. *Phytochemistry*, *96*(0), 214–222.
- Chon, S., Kim, Y., & Lee, J. (2003). Herbicidal potential and quantification of causative allelochemicals from several Compositae weeds. *Weed Research*, *43*(6), 444–450.
- Chon, S., & Nelson, C. (2010). Allelopathy in Compositae plants . A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *30*, 349–358.
- Christensent, L. P., & Lam, J. (1991). Acetylenes and related compounds in Asteraceae. *Phytochemistry*, *30*(8), 2453–2476.

- Clavin, M., Anke, T., & Martino, V. (2002). Aislamiento e identificación de eupatilina y nepetina de un extracto citotóxico de *Eupatorium arnottianum*. I Congreso Latinoamericano de Fitoquímica, 8-10 de mayo, 2002, Buenos Aires, Argentina.
- Clavin, M., Gorzalczy, S., Macho, a, Muñoz, E., Ferraro, G., Acevedo, C., & Martino, V. (2007). Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(3), 585–9.
- Clavin, M. L., Gorzalczy, S., Miño, J., Kadarian, C., Martino, V., Ferraro, G., & Acevedo, C. (2000). Antinociceptive effect of some Argentine medicinal species of *Eupatorium*. *Phytotherapy Research* 14(4), 275–7.
- Coates, A., Hu, Y., Bax, R., & Page, C. (2002). The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 1(11), 895–910.
- Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Camacho-Carranza, R., Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta-Gertrudis, B., Medina-Campos, O. N., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2010). Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. *Toxicology*, 276(1), 41–48.
- Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta-Gertrudis, B., Edna García-Cruz, M., Ramírez-Morales, A., & Javier Espinosa-Aguirre, J. (2011). Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl4-induced toxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63(4), 363–370.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(6), 3670–95.
- Csupor-Löffler, B. (2012). *Activity-guided investigation of antiproliferative secondary metabolites of Asteraceae species*. Thesis. University of Szeged Faculty. Faculty of Pahrmary.
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26(5), 343–356.
- D'Almeida, R. E., Alberto, M. R., Quispe, C., Schmeda-Hirschmann, G., & Isla, M. I. (2012). Antimicrobial phenylpropanoids from the Argentinean highland plant *Parastrephia lucida* (Meyen) Cabrera. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(2), 407–14.
- Da Costa, F. B., Terfloth, L., & Gasteiger, J. (2005). Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: a study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics. *Phytochemistry*, 66(3), 345–53.

- Dauben, H. J., Löken, B., & Ringold, H. J. (1954). Preparation of Ethylenedioxy Derivatives of Ketosteroids by Exchange Dioxolanation. An Improved Synthesis of Testosterone from Δ^4 -Androstene-3,17-dione. *Journal of the American Chemical Society*, 76(5), 1359–
- De Wilde, H., De Clercq, P., Vandewalle, M., & Röper, H. (1987). L-(S)-erythrulose a novel precursor to L-2,3-O-isopropylidene-C3 chirons. *Tetrahedron Letters*, 28(40), 4757–4758.
- Debnath, S., Mohanta, B. C., Harigaya, Y., & Tripura, S. (2010). Naturally Occurring Triterpenoid Saponins. *Chemistry & biodiversity*, 7(10), 2327–2580.
- Del Vitto, L., & Petenatti, E. (2009). Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera parte. Sinopsis ecológica y plantas de interés industrial. *Multequina*, (18), 87–115.
- Demetzos, C., & Dimas, K. S. (2001). Labdane-type diterpenes: Chemistry and biological activity. In A.-R. B. T.-S. in N. P. Chemistry (Ed.), *Bioactive Natural Products (Part F)* (Vol. Volume 25, pp. 235–292). Elsevier.
- Deuschle, R. A. N., Camargo, T. de, Francescato, L. N., Alves, S. H., & Heinzmann, B. M. (2009). Actividad antimicrobiana de *Senecio desiderabilis* Vellozo (Asteraceae). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 25(3), 356–359.
- Ding, R., He, Y., Wang, X., Xu, J., Chen, Y., Feng, M., & Qi, C. (2011). Treatment of alcohols with tosyl chloride does not always lead to the formation of tosylates. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(7), 5665–73.
- Ding, Y., Liang, C., Yang, S.-Y., Kim, J.-H., Lee, Y.-M., & Kim, Y.-H. (2010). Iwayoside A, a New Diterpene Glycoside from *Artemisia iwayomagi* Kitamura that Enhances IL-2 Secretion. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31(8), 2422–2423.
- Domínguez, X. A. (1973). *Métodos de investigación en Fitoquímica*. Monterrey: Limusa S.A.
- Dwivedi, S. K. D., Samanta, K., Yadav, M., Jana, A. K., Singh, A. K., Chakravarti, B., & Panda, G. (2013). Amino acids derived benzoxazepines: Design, synthesis and antitumor activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(24), 6816–6821.
- Espitia de Perez, C. (1994). Química del genero *Chomolaena*. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 19(27), 141–145.
- Evans, W. C., & Trease, G. E. (1996). *Trease and Evans' pharmacognosy*. WB Saunders. Retrieved from <http://books.google.com.ar/books?id=HwhtAAAAMAAJ>

- Faber, K. (2011). *Biotransformations in organic chemistry* (6th ed.). Berlin: Springer.
- Feresin, G. E., Tapia, A., Gimenez, A., Ravelo, A. G., Zacchino, S., Sortino, M., & Schmeda-Hirschmann, G. (2003). Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(1), 73–80.
- Fernández, T., Cerdá Zolezzi, P., Risco, E., Martino, V., López, P., Clavin, M., & Alvarez, E. (2002). Immunomodulating properties of Argentine plants with ethnomedicinal use. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 9(6), 546–52.
- Ferraro, G. E., Martino, V. S., & Coussio, J. D. (1977). New flavonoids from *Eupatorium inulaefolium*. *Phytochemistry*, 16(10), 1618–1619.
- Formisano, C., Rigano, D., Russo, A., Cardile, V., Caggia, S., Apostolides Arnold, N., & Bruno, M. (2012). Phytochemical Profile and Apoptotic Activity of *Oenopardum cynarocephalum*. *Planta Med*, 78(EFirst), 1651–1660.
- Fortuna, A. M., Juárez, Z. N., Bach, H., Nematallah, A., Av-Gay, Y., Sánchez-Arreola, E., ... Hernández, L. R. (2011). Antimicrobial activities of sesquiterpene lactones and inositol derivatives from *Hymenoxys robusta*. *Phytochemistry*, 72(18), 2413–8.
- Fragoso-Serrano, M., Figueroa-González, G., Castro-Carranza, E., Hernández-Solis, F., Linares, E., Bye, R., & Pereda-Miranda, R. (2012). Profiling of Alkaloids and Eremophilanes in Miracle Tea (*Packeria candidissima* and *P. bellidifolia*) Products. *Journal of Natural Products*, 75(5), 890–895.
- Francescato, L. N., & Santos da Silva, G. N. (2006). Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Senecio ceratophylloides* Griseb. *Registros Da 58ª Reunião Anual Da Sociedade Brasileira Para O Progreso Da Ciencia*, Brasil.
- Ganesan, a. (2004). Natural products as a hunting ground for combinatorial chemistry. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(6), 584–90.
- Gelbaum, L. T., Zalkow, L. H., & Hamilton, D. (1982). Cytotoxic agent from *Senecio ananymus* wood. *Journal of Natural Products* 45(3), 370-372.
- Ghebrehiwot, H. M., Aremu, A. O., & Van Staden, J. (2013). Evaluation of the allelopathic potential of five South African mesic grassland species. *Plant Growth Regulation*, 72(2), 155–162.
- Ghosh, K. K., & Gilbert, R. D. (1971). Intramolecular Hydrogen Bonding in Dimethyl Sulfoxide Solutions of Glucose and Polyglucoses. *Textile Research Journal*, 41(4), 326–330.

- Giordano, O. S., & Pestchanker, M. J. (1984). Pirrolizidine Alkaloids from five Senecio species. *Journal of Natural Products*, (4), 722–723.
- Gliessman, S. R. (1983). Allelopathic interactions in crop-weed mixtures. *Journal of Chemical Ecology*, 9(8), 991–999.
- Goleniowski, M. E., Bongiovanni, G. a, Palacio, L., Nuñez, C. O., & Cantero, J. J. (2006). Medicinal plants from the "Sierra de Comechingones", Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3), 324–41.
- Gutierrez, A. N., Catalan, C. A. N., Diaz, J. G., & Herz, W. (1995). Sesquiterpene lactones, a labdane and other constituents of *Urolepis hecatantha* and *Chromolaena arnottiana*, 39(4), 795–800.
- Gutierrez Nicolas, F. (2010). *Tesis doctoral: Búsqueda de nuevos compuestos bioactivos de Celastraceae*. Tesis. Universidad de la Laguna, España.
- Habibi, Z., Kheyraadi, R., Ghasemi, S., Yousefi, M., & Ng, S. W. (2012). A new sesquiterpenoid from *Sclerorhachis platyrachis* (Boiss.) Podlech ex Rech.f. *Phytochemistry Letters*, 5(4), 705–707.
- Haefner, B. (2003). Drugs from the deep : marine natural products as a durg candidates. *Drug Discovery Today*, 8(12), 536–544.
- Halabi, A. (2000). *Síntesis de soportes polimericos a partir de macromoléculas con alto grado de organizacion*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Hanai, R., Yamada, H., Suzuki, Y., Nagano, H., Kawahara, T., Yu, J. J., & Kuroda, C. (2012). Chemical constituents of *Ligularia nelumbifolia* and *L. subspicata* hybrid collected in Shangrila County, Yunnan Province of China. *Natural Product Communications*, 7(12), 1565–1568.
- Harvey, A. L. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13(19–20), 894–901.
- He, F., Nugroho, A. E., Wong, C. P., Hirasawa, Y., Shiota, O., Morita, H., & Aisa, H. A. (2012). Rupestines F-M, New Guaipyridine Sesquiterpene Alkaloids from *Artemisia rupestris*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 60(2), 213–218.
- Hernández, D. M., Díaz-Ruiz, G., Rivero-Cruz, B. E., Bye, R. A., Aguilar, M. I., & Rivero-Cruz, J. F. (2012). Ent-trachyloban-19-oic acid isolated from *Lostephane heterophylla* as a promising antibacterial agent against *Streptococcus mutans* biofilms. *Fitoterapia*, 83(3), 527–531.

- Herrmann, F., Hamoud, R., Sporer, F., Tahrani, A., & Wink, M. (2011). Carlina Oxide – A Natural Polyacetylene from *Carlina acaulis* (Asteraceae) with Potent Antitrypanosomal and Antimicrobial Properties. *Planta Med*, 77(17), 1905–1911. doi:10.1055/s-0031-1279984
- Herz, W. (2001). Chemistry of the Eupatoriinae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(11), 1115–1137.
- Herz, W. (2004). Chemistry of the Critoniinae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(12), 1159–1185.
- Hirota, H., Horiguchi, Y., Kawai, S., Kuroda, C., Hanai, R., & Gong, X. (2012). Four new bisabolane-type sesquiterpenes from *Ligularia lankongensis*. *Natural Product Communications*, 7(4), 451–454.
- Holder, N. L., & Fraser-Reid, B. (1973). The Synthesis of Some Alkyl Hex-3-enopyranosiduloses. *Canadian Journal of Chemistry*, 51(20), 3357–3365.
- Huo, J., Yang, S.-P., Ding, J., & Yue, J.-M. (2006). Two New Cytotoxic Sesquiterpenoids from *Eupatorium lindleyanum* DC. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(4), 473–477.
- Jeffrey, G. A. (1973). Intramolecular Hydrogen Bonding in Carbohydrate Crystal-Structures. *Carbohydrate Research*, 28, 233–241.
- Jenett-Siems, K., Kraft, C., Siems, K., Jakupovic, J., Solis, P. N., Gupta, M. P., & Bienzle, U. (2003). Sipaucins A–C, sesquiterpenoids from *Siparuna pauciflora*. *Phytochemistry*, 63(4), 377–381. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00098-0
- Kabalka, G. W., Varma, M., Varma, R. S., Srivastava, P. C., & Knapp, F. F. (1986). The tosylation of alcohols. *The Journal of Organic Chemistry*, 51(12), 2386–2388.
- Kadereit, J., & Jeffrey, C. (2007). *The Families and Genera of Vascular Plants* (pp. 75–76). Springer.
- Karamé, I., Alamé, M., Kanj, A., Baydoun, G. N., Hazimeh, H., el Masri, M., & Christ, L. (2011). Mild and efficient protection of diol and carbonyls as cyclic acetals catalysed by iron (III) chloride. *Comptes Rendus Chimie*, 14(6), 525–529.
- Katinas, L., Gutiérrez, D., Grossi, M., & Crisci, J. (2007). Panorama de la familia Asteraceae (= Compositae) en la Introducción Breve historia taxonómica de la familia. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 42(1), 113–130.
- Kingston, D. G. I. (2010). Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. *Journal of Natural Products*, 74(3), 496–511.

- Kisiel, W., Dawid-Pa, R., Grabarczyk, H., & Nowak, G. (2003). Germacrane derivatives from *Santolina pinnata* subsp. neapolitana. *Zeitschrift für Naturforschung, C, Journal of Biosciences*, 58(11-12), 793–796.
- Kitou, M., & Yoshida, S. (1998). Alleopathic Effects of Extracts of Soil Amended with Some Plant Materials on Germination and Radicle Elongation of *Lettuce*. *Journal of Weed Science and Technology*, 43(1), 1–9.
- Knepper, K., Vanderheiden, S., & Bräse, S. (2012). Synthesis of diverse indole libraries on polystyrene resin – Scope and limitations of an organometallic reaction on solid supports. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 8, 1191–1199.
- Kobayashi, K. (2004). Factors Affecting Phytotoxic Activity of Allelochemicals in Soil. *Weed Biology and Management*, 4(1), 1–7.
- Kong, C.-H., Wang, P., & Xu, X.-H. (2007). Allelopathic interference of *Ambrosia trifida* with wheat (*Triticum aestivum*). *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 119(3–4), 416–420.
- Kuo-Hsiung, L., Ibuka, T., Rong-Yang, W., & Geissman, T. A. (1977). Structure-antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds. *Phytochemistry*, 16(8), 1177–1181.
- Kurahashi, T., Mizutani, T., & Yoshida, J. (1999). Effect of intramolecular hydrogen-bonding network on the relative reactivities of carbohydrate OH groups. *Perkin Transactions 1*, (4), 465–473.
- Laciar, A., Vaca Ruiz, M. L., Carrizo Flores, R., & Saad, J. R. (2009). Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia echegarayi* Hieron. (Asteraceae). *Revista Argentina de Microbiología* 41(4), 226-231.
- Langel, D., Ober, D., & Pelsler, P. B. (2010). The evolution of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis and diversity in the Senecioneae. *Phytochemistry Reviews*, 10(1), 3–74.
- Lee, A., & Breitenbucher, J. G. (2003). The impact of combinatorial chemistry on drug discovery. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 6 (4), 494-508.
- Lee, J., Lee, Y. M., Lee, B. W., Kim, J.-H., & Kim, J. S. (2012). Chemical Constituents from the Aerial Parts of *Aster koraiensis* with Protein Glycation and Aldose Reductase Inhibitory Activities. *Journal of Natural Products*, 75(2), 267–270.
- Lee, K.-T., Koo, S.-J., Jung, S.-H., Choi, J., Jung, H.-J., & Park, H.-J. (2002). Structure of three new terpenoids, spiciformisins a and b, and monocyclosqualene, isolated from the herbs *Ofligularia fischeri* var. spiciformis and cytotoxicity. *Archives of Pharmacal Research*, 25(6), 820–823.

- Lee, M. L., & Schneider, G. (2001). Scaffold architecture and pharmacophoric properties of natural products and trade drugs: application in the design of natural product-based combinatorial libraries. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 3(3), 284–9.
- Li, W., Huang, X., & Yang, X.-W. (2012). New sesquiterpenoids from the dried flower buds of *Tussilago farfara* and their inhibition on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells. *Fitoterapia*, 83(2), 318–322. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2011.11.011>
- Li, Z.-H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C.-D., & Jiang, D.-A. (2010). Phenolics and plant allelopathy. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(12), 8933–52.
- Lima, B., Agüero, M. B., Zygadlo, J., Tapia, A., Solis, C., Rojas de Arias, A., Schmeda-hirschmann, G. (2009). Antimicrobial activity of extracts, essential oil and metabolites obtained from *Tagetes mendocina*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 54(1), 68–72.
- Liu, G., Li, Y., & Nan, F. (2006). Diversity-Oriented Synthesis of Natural Product-Like Libraries. *Progress in Chemistry*, 18(06), 734–742.
- Liu, L., Wang, R., Yang, J., & Shi, Y. (2012). Five New Sesquiterpenoids from *Chrysanthemum indicum*. *Chinese Journal of Chemistry*, 30(6), 1255–1260.
- Loayza, I., Abujder, D., Aranda, R., Jakupovic, J., Collin, G., Deslauriers, H., & Jean, F. (1995). Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry*, 38(2), 381–389.
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Statti, G. A., & Menichini, F. (2007). Jacaranone: a cytotoxic constituent from *Senecio ambiguus* subsp. *ambiguus* (biv.) DC. against renal adenocarcinoma ACHN and prostate carcinoma LNCaP cells. *Archives of Pharmacal Research*, 30(6), 701–7.
- López, S. N., Ramallo, I. A., Sierra, M. G., Zacchino, S. A., & Furlan, R. (2007). Chemically engineered extracts as an alternative source of bioactive natural product-like compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(2), 441–4.
- Lozano, E., Barrera, P., Salinas, R., Vega, I., Nieto, M., Tonn, C., & Sosa, M. A. (2012). Sesquiterpene lactones and the diterpene 5-epi-icetexone affect the intracellular and extracellular stages of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology International*, 61(4), 628–633.
- Maatooq, G. T., & Hoffmann, J. J. (2002). Pyridine alkaloids from a *Parthenium* hybrid. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 57(3-4), 211–215.

- Maia, G., Falcão-Silva, V., Aquino, P., Araújo-Júnior, J., Tavares, J., da Silva & M., Barbosa-Filho, J. (2011). Flavonoids from *Praxelis clematidea* R.M. King and Robinson modulate bacterial drug resistance. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(6), 4828–35.
- Maldonado Muete, C., Palomino, E., & Reguero, M. T. (1993). Evaluación de cinco compuestos esteroidales en la línea celular MCF-7 y en larvas de *Artemia salina*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 42(21), 52–59.
- Marco, J. A., Sanz-Cervera, J. F., Yuste, A., Sancenón, F., & Carda, M. (2005). Sesquiterpenes from *Centaurea aspera*. *Phytochemistry*, 66(14), 1644–1650.
- Matsuda, H., Morikawa, T., Ninomiya, K., & Yoshikawa, M. (2001a). Absolute stereostructure of carabrane-type sesquiterpene and vasorelaxant-active sesquiterpenes from *Zedoariae Rhizoma*. *Tetrahedron*, 57(40), 8443–8453.
- Matsuda, H., Morikawa, T., Ninomiya, K., & Yoshikawa, M. (2001b). Hepatoprotective Constituents from *Zedoariae rhizoma*: Absolute Stereostructures of Three New Carabrane-type sesquiterpenes, curcumenolactones A, B and C. *Biorganic & Medicinal Chemistry*, 9(4), 909-916.
- McGaw, L. J., Steenkamp, V., & Eloff, J. N. (2007). Evaluation of *Athrixia bush* tea for cytotoxicity, antioxidant activity, caffeine content and presence of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(1), 16–22.
- McLachlan, D., & Lam, J. (1986). Structure-function relationships in the phototoxicity of acetylenes from the Asteraceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 14(1), 17–23.
- McLaughlin, J. L., Rogers, L. L., & Anderson, J. E. (1998). The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. *Drug Information Journal*, 32(2), 513–524.
- Méndez, L., Salazar, M. O., Ramallo, I. A., & Furlan, R. (2011). Brominated extracts as source of bioactive compounds. *ACS Combinatorial Science*, 13(2), 200–204.
- Mendiondo, M. E., Juárez, B. E., Zampini, C., Isla, M. I., & Ordoñez, R. (2011). Bioactivities of *Chuquiraga straminea* sandwich. *Natural Product Communications*, 6(7), 965–968.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituent. *Planta Medica*, 45(5), 31–4.

- Militao, G. C. G., Albuquerque, M. R. J. R., Pessoa, O. D. L., Pessoa, C., Moraes, M. E. A., de Moraes, M. O., & Costa-Lotufo, L. V. (2004). Cytotoxic activity of nepetin, a flavonoid from *Eupatorium ballotaefolium* HBK. *Die Pharmazie*, 59(12), 965–966.
- Misra, L. N., Ahmad, A., Thakur, R. S., & Jakupovic, J. (1993). Bisnor-cadinanes from *Artemisia annua* and definitive ¹³C NMR assignments of β-arteether. *Phytochemistry*, 33(6), 1461–1464.
- Moradi-Afrapoli, F., Ebrahimi, S. N., Smiesko, M., Raith, M., Zimmermann, S., Nadjafi, F., & Hamburger, M. (2013). Bisabololoxide derivatives from *Artemisia persica*, and determination of their absolute configurations by ECD. *Phytochemistry*, 85(0), 143–152.
- Muschietti, L., Derita, M., Sülsen, V., de Dios Muñoz, J., Ferraro, G., Zacchino, S., & Martino, V. (2005). In vitro antifungal assay of traditional Argentine medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(2), 233–8.
- Mutai, C., Bii, C., Vagias, C., Abatis, D., & Roussis, V. (2009). Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(1), 143–8.
- Nagano, H., Hanai, R., Yamada, H., Matsushima, M., Miura, Y., Hoya, T., & Kuroda, C. (2012). Chemical and Genetic Study of *Ligularia duciformis* and Related Species in Sichuan and Yunnan Provinces of China. *Chemistry & Biodiversity*, 9(4), 789–805.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery (Antiquity to late 1999). *Natural Product Reports*, 17(3), 215–234.
- Nicolaou, K. C., Pfefferkorn, J. A., Barluenga, S., Mitchell, H. J., Roecker, A. J., & Cao, G. Q. (2000). Natural Product-like Combinatorial Libraries Based on Privileged Structures. 3. The “Libraries from Libraries” Principle for Diversity Enhancement of Benzopyran Libraries. *Journal of the American Chemical Society*, 122(41), 9968–9976.
- Nicolaou, K. C., & Sorensen, E. (1996). *Classics in Total Synthesis: Targets, Strategies, Methods* (1 edition., p. 821). Wiley-VCH.
- Nunes, B. S., Carvalho, F. D., Guilhermino, L. M., & Van Stappen, G. (2006). Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 144(2), 453–62.
- Oberti, J. C., Sosa, V. E., Kulanthaivel, P., & Herz, W. (1984). Ent-norlabdane triols from *Austro eupatorium inulaefolium*. *Phytochemistry*, 23(9), 2003–2006.

- Olowa, L. F., & Nuñez, O. M. (2013). Brine Shrimp Lethality Assay of the Ethanolic Extracts of Three Selected Species of Medicinal Plants from Iligan City , Philippines. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(11), 74–77.
- Ortholand, J.-Y., & Ganesan, a. (2004). Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(3), 271–80.
- Pacciaroni, A. (1997). *Metabolitos secundarios del género Schkuhria con probables aplicaciones quimiataxonómicas*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba.
- Pacciaroni, A., Vaccarini, C., Falchi, E., & Sosa, V. E. (2003). Sesquiterpenos Fitotóxicos de *Senecio volckmannii*. *SINAQO XIV* (p. 75). Rosario, Argentina.
- Pagno, T., Blind, L. Z., Biavatti, M. W., & Kreuger, M. R. O. (2006). Cytotoxic activity of the dichloromethane fraction from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) against Ehrlich's tumor cells in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39(11), 1483–1491.
- Palacios, S. M., del Corral, S., Carpinella, M. C., & Ruiz, G. (2010). Screening for natural inhibitors of germination and seedling growth in native plants from Central Argentina. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 674–677.
- Palacios, S. M., Maggi, M. E., Bazán, C. M., Carpinella, M. C., Turco, M., Muñoz, A., & Valladares, G. R. (2007). Screening of Argentinian plants for pesticide activity. *Fitoterapia*, 78(7-8), 580–584.
- Park, H. J., Kwon, S. H., Yoo, K. O., Sohn, I. C., Lee, K. T., & Lee, H. K. (2000). Sesquiterpenes from the leaves of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis*. *Planta Medica*, 66(8), 783–4.
- Paterson, I., & Anderson, E. a. (2005). The renaissance of natural products as drug candidates. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5747), 451–3.
- Pelka, M., Danzl, C., Distler, W., & Petschelt, a. (2000). A new screening test for toxicity testing of dental materials. *Journal of Dentistry*, 28(5), 341–5.
- Pérez-Amador, M. C., Muñoz, V., Noyola, A., & García-Jiménez, F. (2006). Essential oil and phototoxic compounds in *Clibadium surinamense* L. and *Montanoa grandiflora* D.C. (Asteraceae). *Phyton (Buenos Aires)*, 75, 145–150.
- Pestchanker, M. J., Ascherl, M. S., & Giordano, O. S. (1985). Uspallatine, a pyrrolizidine alkaloid from *Senecio uspallatensis*. *Phytochemistry*, 24(7), 1622–1624.

- Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6(11), 1–5.
- Petrufová-Poracká, V., Repčák, M., Vilková, M., & Imrich, J. (2013). Coumarins of *Matricaria chamomilla* L.: Aglycones and glycosides. *Food Chemistry*, 141(1), 54–59.
- Picman, A. K. (1986). Biological Activities of Sesquiterpene Lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, 14(3), 255–281.
- Piornedo, R. dos R., de Souza, P., Stefanello, M. É. A., Strapasson, R. L. B., Zampronio, A. R., & Kassuya, C. A. L. (2011). Anti-inflammatory activity of extracts and 11,13-dihydrozaluzanin C from *Gochnatia polymorpha* ssp. floccosa trunk bark in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 1077–1084.
- Ragasa, C., Tepora, M., & Rideout, J. (1998). Antimicrobial chromenes from *Eupatorium toppingianum*. *Chemical Research Communications*, 7(1), 48–53.
- Ramachandran, S., Vamsikrishna, M., Gowthami, K. V., Heera, B., & Dhanaraju, M. D. (2011). Assessment of Cytotoxic Activity of *Agave cantala* Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Bioassay.pdf. *Asian Journal of Scientific Research*, 4(1), 90–94.
- Ramallo, I. A., Salazar, M. O., Mendez, L., & Furlan, R. (2011). Chemically Engineered Extracts: Bioactive Compounds. *Accounts of Chemical Research*, 44(4), 241–250.
- Reigosa, M., Gomes, A. S., Ferreira, A. G., & Borghetti, F. (2013). Allelopathic research in Brazil. *Acta Botanica Brasílica*, 27(4), 629–646.
- Rodriguez, E., Towers, G. H. N., & Mftcheu, J. C. (1976). Biological activities of sesquiterpenes lactones. *Phytochemistry*, 15(11), 1573–1580.
- Roura-Pérez, G., Quiróz, B., Aguilar-Martínez, M., Frontana, C., Solano, A., Gonzalez, I., & Cuevas, G. (2007). Remote position substituents as modulators of conformational and reactive properties of quinones. Relevance of the pi/pi intramolecular interaction. *The Journal of Organic Chemistry*, 72(6), 1883–94.
- Saifudin, A., Tanaka, K., Kadota, S., & Tezuka, Y. (2012). Chemical constituents of *Blumea balsamifera* of Indonesia and their protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity. *Natural Product Communications*, 7(7), 815–818.
- Saito, Y., Ichihara, M., Okamoto, Y., Gong, X., Kuroda, C., & Tori, M. (2012). Four new eremophilane-type alcohols from *Cremanthodium helianthus* collected in China. *Natural Product Communications*, 7(4), 423–426.

- Salazar, M. O., Micheloni, O., Escalante, A. M., & Furlan, R. L. E. (2011). Discovery of a β -glucosidase inhibitor from a chemically engineered extract prepared through sulfonylation. *Molecular Diversity*, 15(3), 713–9.
- Salazar, M. O., Ramallo, I. A., Micheloni, O., Sierra, M. G., & Furlan, R. (2009). Chemically engineered extracts: bioactivity alteration through sulfonylation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(17), 5067–70.
- Sánchez-Muñoz, B. A., Aguilar, M. I., King-Díaz, B., Rivero, J. F., & Lotina-Hennsen, B. (2012). The Sesquiterpenes β -Caryophyllene and Caryophyllene Oxide Isolated from *Senecio salignus* Act as Phyto-growth and Photosynthesis Inhibitors. *Molecules*, 17(2), 1437–1447.
- Sannigrahi, S., Mazumder, U. K., Mondal, A., Pal, D., Mishra, S. L., & Roy, S. (2010). Flavonoids of *Enhydra fluctuans* exhibit anticancer activity against Ehrlich's ascites carcinoma in mice. *Natural Product Communications*, 5(8), 1239–1242.
- Schneider-Stock, R., Fakhoury, I. H., Zaki, A. M., El-Baba, C. O., & Gali-Muhtasib, H. U. (2014). Thymoquinone: fifty years of success in the battle against cancer models. *Drug Discovery Today*, 19(1), 18–30.
- Seelinger, G., Merfort, I., Wölfle, U., & Schempp, C. M. (2008). Anti-carcinogenic Effects of the Flavonoid Luteolin. *Molecules*, 13, 2628–2651.
- Sesto Cabral, M. E., Fortuna, A. M., De Riscalca, E. C., Catalán, C. E., & Sigstad, E. (2008). Allelopathic activity of *Centaurea diffusa* and *Centaurea tweediei*: Effects of cnicin and onopordopicrin on seed germination, phytopathogenic bacteria and soil. *Allelopathy Journal*, 21, 183 – 191.
- Shi, W., Luo, S., & Li, S. (2012). Defensive Sesquiterpenoids from Leaves of *Eupatorium adenophorum*. *Chinese Journal of Chemistry*, 30(6), 1331–1334.
- Shin, H. J., Lee, S. Y., Kim, J. S., Lee, S., Choi, R. J., Chung, H. S. & Kang, S. S. (2012). Sesquiterpenes and Other Constituents from *Dendranthema zawadskii* var. *latilobum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 60(3), 306–314.
- Shoeb, M., MacManus, S. M., Jaspars, M., Trevidu, J., Nahar, L., Kong-Thoo-Lin, P., & Sarker, S. D. (2006). Montamine, a unique dimeric indole alkaloid, from the seeds of *Centaurea montana* (Asteraceae), and its in vitro cytotoxic activity against the CaCo2 colon cancer cells. *Tetrahedron*, 62(48), 11172–11177.
- Silva, C. de M. da, Bolzan, A. A., Mallmann, C. A., Pozzatti, P., Alves, S. H., & Heinzmann, B. M. (2010). Sesquiterpenoids of *Senecio bonariensis* Hook. & Arn., Asteraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20, 87-92.

- Silva, M. P., Piazza, L. a, López, D., López Rivilli, M. J., Turco, M. D., Cantero, J. J., & Scopel, A. L. (2012). Phytotoxic activity in *Flourensia campestris* and isolation of (-)-hamanasic acid A as its active principle compound. *Phytochemistry*, 77, 140–8.
- Smith, M. B. (2010). Organic synthesis. Chapter 4 - Reduction. In M. B. B. T.-O. S. (Third E. Smith (Ed.)), (pp. 347–490). Oxford: Academic Press.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Le, P., Tackaert, W., & Versichele, D. (1986). *Manual Para uso y cultivo de Artemia en acuicultura*. Universidad del Estado en Gent. Belgica.
- Sosa, S., Tubaro, A., Kastner, U., Glasl, S., Jurenitsch, J., & Della Loggia, R. (2001). Topical anti-inflammatory activity of a new germacrane derivative from *Achillea pannonica*. *Planta Medica*, 67(7), 654–658.
- Souza, S. M. De, Monache, F. D., & Sma, A. (2005). Antibacterial Activity of Coumarins. *Zeitschrift for Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 60(c), 693–700.
- Stipanovic, R. D., Puckhaber, L. S., Reibenspies, J. H., & Williams, H. J. (2006). The absolute configuration of (-)-3-hydroxy- α -calacorene. *Phytochemistry*, 67(13), 1304–1308.
- Strömstedt, A. a, Felth, J., & Bohlin, L. (2014). Bioassays in Natural Product Research - Strategies and Methods in the Search for Anti-inflammatory and Antimicrobial Activity. *Phytochemical Analysis : PCA*, 25(1), 13–28.
- Taglialatela-Scafati, O., Pollastro, F., Cicione, L., Chianese, G., Bellido, M. L., Munoz, E., & Appendino, G. (2012). STAT-3 Inhibitory Bisabolanes from *Carthamus glaucus*. *Journal of Natural Products*, 75(3), 453–458.
- Taglialatela-Scafati, O., Pollastro, F., Minassi, A., Chianese, G., De Petrocellis, L., Di Marzo, V., & Appendino, G. (2012). Sesquiterpenoids from Common Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.), an Invasive Biological Polluter. *European Journal of Organic Chemistry*, 2012(27), 5162–5170.
- Tatli, I. I., Erdogan, T. F., Kahraman, C., Kivcak, B., & Akdemir, Z. S. (2008). Brine Shrimp Lethality Bioassay of Some *Verbascum* Species Growing In Turkey. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2), 193–198.
- Tereschuk, M., Baigorí, M., Figueroa, L. C., & Abdala, L. (2004). Flavonoids From Argentine *Tagetes* (Asteraceae) With Antimicrobial Activity. In J. T. Spencer & A. Ragout de Spencer (Eds.), *Public Health Microbiology* (Vol. 268, pp. 317–330). Humana Press.
- Tereschuk, M. L., Riera, M. V, Castro, G. R., & Abdala, L. R. (1997). Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *Journal of Ethnopharmacology* 56 (3), 227–232.

- Tiansheng, L., Parodi, F. J., Vargas, D., Quijano, L., Mertoetomo, E. R., Hjortso, M. A., & Fischer, N. H. (1993). Sesquiterpenes and thiarubrines from *Ambrosia trifida* and its transformed roots. *Phytochemistry*, 33(1), 113–116.
- Tietze, L. F., & Eicher, T. (1989). *Reactions and Syntheses: In the Organic Chemistry Laboratory* (18a ed.). California: Wiley. Retrieved from <http://books.google.com.ar/books?id=3Lbga8F5-48C>
- Triana, J., Bahsas, A., Delgado, P., Jaimes, R., & Trejo, C. O. (1995). ent-Norlabdanes and Other Constituents of Four Venezuelan Species Previously Classified in the Genus *Eupatorium*. *Journal of Natural Products*, 58(5), 744–747.
- Trifunović, S., Vajs, V., Juranić, Z., Žižak, Ž., Tešević, V., Macura, S., & Milosavljević, S. (2006). Cytotoxic constituents of *Achillea clavennae* from Montenegro. *Phytochemistry*, 67(9), 887–893.
- Trigo, J. R., Leal, I. R., Matzenbacher, N. I., & Lewinsohn, T. M. (2003). Chemotaxonomic value of pyrrolizidine alkaloids in southern Brazil *Senecio* (Senecioneae: Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(9), 1011–1022.
- Tulp, M., & Bohlin, L. (2004). Unconventional natural sources for future drug discovery. *Drug Discovery Today*, 9(10), 450–8.
- Tundis, R., Loizzo, M. R., Bonesi, M., Menichini, F., Dodaro, D., Passalacqua, N. G., & Menichini, F. (2009). In vitro cytotoxic effects of *Senecio stabianus* Lacaite (Asteraceae) on human cancer cell lines. *Natural Product Research* 23 (18), 1707-1718.
- Tundis, R., Loizzo, M. R., Statti, G. a, Houghton, P. J., Miljkovic-Brake, a, & Menichini, F. (2007). In vitro hypoglycemic and antimicrobial activities of *Senecio leucanthemifolius* Poir. *Natural Product Research*, 21(5), 396–400.
- Ulubelen, A., Kolak, U., & Bo, M. (2012). Screening Some Plants for their Antiproliferative Compounds. *Records of Natural Products*, 3, 194–211.
- Urzúa, A. (2004). Mono- and sesquiterpenes in the trichome secreted exudates from *Pseudognaphalium cheiranthifolium*, *P. heterotrichium*, *P. vira vira* and *P. robustum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(2), 211–214.
- Villarreal, M. L., Alvarez, L., Alonso, D., Navarro, V., Garcia, P., & Delgado, G. (1994). Cytotoxic and antimicrobial screening of selected terpenoids from Asteraceae species. *Journal of Ethnopharmacology*, 42(1), 25–29.

- Vogel, A. I., Tatchell, A. R., Furnis, B. S., Hannaford, A. J., & Smith, P. W. G. (1996). *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry (5th Edition)*. Prentice Hall.
- Vyvyan, J. R. (2002). Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*, 58(599), 1631–1646.
- Wang, D., Huang, L., & Chen, S. (2013). *Senecio scandens* Buch.-Ham.: a review on its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and toxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(1), 1–23.
- Wang, J.-S., Zhou, J., & Kong, L.-Y. (2012). Three new germacrane-type sesquiterpene stereoisomers from the flowers of *Chrysanthemum indicum*. *Fitoterapia*, 83(8), 1675–1679.
- Waseem, A., Zaheer, A., Najamul-Hussain Kazmi, S., & Malik, A. (1994). Pyrrolizidine alkaloids content of the genus *Senecio*. *Journal of The Chemical Society Of Pakistan*, 16(1), 64–81.
- Wedner, H. J., Wilson, P., & Lewis, W. H. (1989). Allergic reactivity to *Parthenium hysterophorus* pollen: An ELISA study of 582 sera from the United States Gulf Coast. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 84(2), 263–271.
- Wegiera, M., Smolarz, H. D., Jedruch, M., Korczak, M., & KoproD, K. (2012). Cytotoxic effect of some medicinal plants from Asteraceae family on J-45.01 leukemic cell line—pilot study. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 69 (2), 263-268.
- Wu, Q.-X., Shi, Y.-P., & Jia, Z.-J. (2006). Eudesmane sesquiterpenoids from the Asteraceae family. *Natural Product Reports*, 23(5), 699–734.
- Wu, Y.-X., Chen, Y.-J., Liu, C.-M., & Gao, K. (2012). Four new sesquiterpenoids from *Ligularia cymbulifera*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 14(12), 1130–1136.
- Xu, J., Jin, D., Liu, C., Xie, C., Guo, Y., & Fang, L. (2012). Isolation, Characterization, and NO Inhibitory Activities of Sesquiterpenes from *Blumea balsamifera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 8051–8058.
- Xu, J., Zhang, P., Ma, Z., Guo, Y., Zhao, X., & Wei, K. (2009). Two carabrane-type sesquiterpenes from *Vladimiria souliei*. *Phytochemistry Letters*, 2(4), 204–206.
- Xu, J.-J., Huang, H.-Q., Zeng, G.-Z., & Tan, N.-H. (2012). Cytotoxic sesquiterpenes and lignans from *Saussurea deltoidea*. *Fitoterapia*, 83(6), 1125–1130.

- Yang, Y., Zhao, L., Wang, Y.-F., Chang, M.-L., Huo, C.-H., Gu, Y.-C., & Kiyota, H. (2011). Chemical and pharmacological research on plants from the genus *Senecio*. *Chemistry & Biodiversity*, 8(1), 13–72.
- Yao, C.-M., & Yang, X.-W. (2014). Bioactivity-guided isolation of polyacetylenes with inhibitory activity against NO production in LPS-activated RAW264.7 macrophages from the rhizomes of *Atractylodes macrocephala*. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(2), 791–799.
- Zampini, I. C., Isla, M., & Schmeda-Hirschmann, G. (2009a). Antimicrobial and antioxidant compounds from the infusion and methanolic extract of *Baccharis incarum* (Wedd.) Perkins. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 54(4), 477–481.
- Zampini, I. C., Cuello, S., Alberto, M. R., Ordoñez, R. M., D' Almeida, R., Solorzano, E., & Isla, M. I. (2009b). Antimicrobial activity of selected plant species from "the Argentine Puna" against sensitive and multi-resistant bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(3), 499–505.
- Zan, K., Chen, X.-Q., Chai, X.-Y., Wu, Q., Fu, Q., Zhou, S.-X., & Tu, P.-F. (2012). Two new cytotoxic eudesmane sesquiterpenoids from *Artemisia anomala*. *Phytochemistry Letters*, 5(2), 313–315.
- Zanon, S. M., Ceriatti, F. S., Rovera, M., Sabini, L. J., & Ramos, B. A. (1999). Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41(2), 59–62.
- Zdero, C., & Bohlmann, F. (1990). Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist. *Plant Systematics and Evolution*, 171(1-4), 1–14.
- Zhang, C., Weller, R. L., Thorson, J. S., & Rajske, S. R. (2006). Natural Product Diversification Using a Non-natural Cofactor Analogue of S-adenosyl-L-methionine. *Journal of American Chemical Society* 7(9), 2760–2761.
- Zhang, M.L., Wu, M., Zhang, J.J., Irwin, D., Gu, Y.C., & Shi, Q.W. (2008). Chemical constituents of plants from the genus *Eupatorium*. *Chemistry & Biodiversity*, 5(1), 40–55.
- Zhang, M.L., Zhang, J.J., Huo, C.H., Gu, Y.C., & Shi, Q.W. (2010). Chemical constituents of plants from the genus *Cacalia*. *Chemistry and Biodiversity*, 7(1), 105–115.
- Zhang, S.D., Qin, J.J., Jin, H.Z., Yin, Y.H., Li, H.L., Yang, X.W., & Zhang, W.D. (2012). Sesquiterpenoids from *Inula racemosa* Hook. f. Inhibit Nitric Oxide Production. *Planta Med*, 78(02), 166–171.

- Zhang, T., Huang, L.Z., Li, Y.Q., Xu, Y.M., & Du, Z.T. (2013). A facile synthesis of (±)-heliannuol-D. *Natural Product Communications*, 8(9), 1197–1200.
- Zhou, C.X., Zou, L., Zhao, Z.Z., Zhu, H., He, Q.J., Yang, B., & Gan, L.S. (2012). Terpenoids from *Cichorium intybus*. *Natural Product Communications*, 7(8), 971–972.
- Zhu, Y., Zhao, Y., Meng, X.-H., & Wu, W.-S. (2009). Chemical constituents from *Sinacalia tangutica*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(1), 59–62.
- Zicari, G., Soardo, V., Rivetti, D., Cerrato, E., & Russo, D. (2013). The weeding of *Ambrosia artemisiifolia* and sanitary risks. *Igiene E Sanità Pubblica*, 69(3), 341–347.
- Znini, M., Cristofari, G., Majidi, L., Paolini, J., Desjobert, J. M., & Costa, J. (2013). Essential oil composition and antifungal activity of *Pulicaria mauritanica* Coss., against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *LWT - Food Science and Technology*, 54(2), 564–569.
- Zuloaga, F., & Morrone, O. (1999). *Catálogo de las Plantas Vasculares de la Republica Argentina II*. Missouri Botanical Gardens. St. Louis.
- Zygadlo, J. A., Lamarque, A. L., Grosso, N. R., & Espinar, L. A. (1995). Analysis of the Essential Oil of the Leaves of *Eupatorium arnotianum* Griseb. *Journal of Essential Oil Research*, 7(6), 677–678.

Páginas Web visitadas

Flora de la Republica Argentina:

<http://www.floraargentina.edu.ar/detalleespecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=pampeanus&espcod=17623&genero=Senecio&autor=172&deDonde=0&let ra=Senecio>

<http://www.floraargentina.edu.ar/detalleespecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=ceratophylloides&espcod=17469&genero=Senecio&autor=54&deDonde=6>

<http://www.floraargentina.edu.ar/detalleespecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=arnottianum&espcod=16541&genero=Eupatorium&deDonde=6>

<http://www.floraargentina.edu.ar/detalleespecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=inulifolium&espcod=16571&genero=Eupatorium&autor=69&deDonde=6>

University Utah State:

<http://herbarium.usu.edu/taxa/asteraceae.htm>