



Agrociencia

ISSN: 1405-3195

agrocien@colpos.mx

Colegio de Postgraduados

México

Villa-Ruano, Nemesio; Pacheco-Hernández, Yesenia; Lozoya-Gloria, Edmundo; Rubio-Rosas, Efraín;
Ruiz-González, Nancy; Martínez-Orea, Yuriana; Cruz-Duran, Ramiro; Ramirez-Garcia, S. Alberto;
Ramón-Canúl, L. Guadalupe

LIPOPHILIC CONSTITUENTS AND SOME BIOLOGICAL ACTIVITIES OF HEXANIC EXTRACTS
FROM *Zaluzania montagnifolia*, (SCH. BIP.) SCH. BIP. (ASTERACEAE)

Agrociencia, vol. 47, núm. 4, 2013, pp. 335-346

Colegio de Postgraduados

Texcoco, México

Available in: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30226975003>

- How to cite
- Complete issue
- More information about this article
- Journal's homepage in redalyc.org

redalyc.org

Scientific Information System

Network of Scientific Journals from Latin America, the Caribbean, Spain and Portugal

Non-profit academic project, developed under the open access initiative

LIPOPHILIC CONSTITUENTS AND SOME BIOLOGICAL ACTIVITIES OF HEXANIC EXTRACTS FROM *Zaluzania montagnifolia*, (SCH. BIP.) SCH. BIP. (ASTERACEAE)

CONSTITUYENTES LIPOFÍLICOS Y ALGUNAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICOS DE *Zaluzania montagnifolia* (SCH. BIP.) SCH. BIP. (ASTERACEAE)

Nemesio Villa-Ruano^{1*}, Yesenia Pacheco-Hernández², Edmundo Lozoya-Gloria³, Efraín Rubio-Rosas⁴, Nancy Ruiz-González⁴,
Yuriana Martínez-Orea⁵, Ramiro Cruz-Duran⁵, S. Alberto Ramirez-Garcia¹, L. Guadalupe Ramón-Canú¹

¹Universidad de la Sierra Sur. Guillermo Rojas Mijangos s/n. Ciudad Universitaria. 70805, Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, México (necho82@yahoo.com.mx). ²Instituto Tecnológico de Sonora. 5 de Febrero 818 Sur. Colonia Centro. 8500, Ciudad Obregón, Sonora, México. ³Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Unidad Irapuato. Km 9.6 Libramiento Norte. Carretera Irapuato-León. 36000, Irapuato México. ⁴Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Ciudad Universitaria Avenida San Claudio y 22 sur. 72570, Puebla, México. ⁵Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria. México DF. Avenida Universidad 3000. 04510, Delegación Coyoacán, México, D.F.

ABSTRACT

Zaluzania montagnifolia, an antidiabetic and abortive shrub 1 to 3 m high, grows actively in xeric scrublands in some states of México. Zuluzanins and some flavonoids are the foremost constituents of the polar extracts in this species; however, there is no available information about the lipophilic compounds from non-polar extracts. The objective of this study was to describe the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) profile of hexanic preparations, exclusively with dissolve lipophilic molecules, in order to sustain the empirical uses and the new biological activities reported in this study for the plant. These preparations were obtained from flowers, leaves and roots of *Z. montagnifolia* which were collected in Oaxaca, México, in October 2011. In addition to the chemical study, antibacterial, allelopathic and antioxidant properties of the hexanic extracts were determined. The chemical profile revealed two majoritarian *ent*-kaurane diterpenes. According to the relative endogenous levels, grandiflorenic acid (35.5 %) and *ent*-kaurenoic acid (28.3 %) were the most abundant natural molecules in aerial and underground structures of the plant, and more than 50 different volatile organic compounds (VOC's) were identified according to their mass spectra and retention index. Antibacterial tests were carried out by the broth microdilution method in combination with hexanic extracts and conventional antibiotics as reference standards. The analysis of results reveal potent inhibitory on

RESUMEN

Zaluzania montagnifolia, un arbusto antidiabético y abortivo de 1 a 3 m de altura, crece activamente en matorrales xerófilo en algunos estados de México. Las zuluzaninas y algunos flavonoides son los constituyentes principales de los extractos polares en esta especie; sin embargo, no existe información disponible sobre los compuestos lipofílicos en los extractos no polares. El objetivo de este estudio fue describir el perfil lípofílico por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) de extractos hexánicos, exclusivamente con moléculas lipofílicas, para sustentar usos empíricos y nuevas actividades biológicas reportadas en este estudio para la planta. Las preparaciones se obtuvieron de flores, hojas y raíces de *Z. montagnifolia* recolectadas en Oaxaca, México, en octubre del 2011. Además del estudio químico, se determinaron las propiedades antibacteriales, alelopáticas y antioxidantes de los extractos hexánicos. El perfil químico reveló dos diterpenos del *ent*-kaureno mayoritarios. De acuerdo con los niveles endógenos relativos, el ácido grandiflorénico (35.5 %) y el *ent*-kaurenoico (28.3 %) fueron las moléculas naturales más abundantes en las estructuras aéreas y subterráneas, y se identificaron más de 50 compuestos orgánicos volátiles (VOCs) con base en su espectro de masas y su índice de retención. Pruebas antibacteriales se realizaron con el método de microdilución en caldo en combinación con extractos hexánicos y antibióticos convencionales como estándares de referencia. El análisis de los resultados revelan potencial inhibitorio para *Escherichia coli* TOP10 F⁺ (MIC= 49.2 µg mL⁻¹) y cepas de DH5α (MIC= 32.4 µg

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: October, 2012. Approved: March, 2013.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 47: 335-346. 2013.

Escherichia coli TOP10 F⁺ (MIC=49.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and DH5 α (MIC= 32.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) strains as well as for *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 (MIC=30.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) strain. Allelopathic properties were determined using the lettuce seed system, showing that the root extracts had a significant effect ($p \leq 0.01$). An acceptable antioxidant activity of leaf and flower extracts (IC₅₀=158.3-253.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was found by using 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl radical (DPPH). The latter biological activities are strongly related to VOC's and *ent*-kaurene derivatives which play an essential role as antibacterial and allelopathic agents.

Keywords: *Zaluzania montagnifolia*, grandiflorenic acid, *ent*-kaurenoic acid, VOC's, biological activities.

INTRODUCTION

The *Zaluzania* genus is one of the most recurrent *Asteraceae* groups in Mexican traditional medicine due to its anti-tumoral, antidiabetic and abortive properties (Andrade-Cetto and Heinrich, 2005). *Zaluzania montagnifolia*, *Z. augusta* (limpia tuna), *Z. triloba*, *Z. grayana*, and *Z. robinsonii* contain guaianolide sesquiterpene lactones called zaluzanins (from A to E and their dehydro forms), which are the main constituents of such species. These compounds show trypanocidal, fungistatic and smooth relaxant properties (Uchiyama *et al.*, 2002; Krishna-Kumari *et al.*, 2003), as well as effective agents in the P-388 lymphocytic leukemia test system (Jolad *et al.*, 1974). The tea of roots from *Z. montagnifolia* is orally administered to treat diabetes and to induce abortion, but there is not any chemical approach that sustains the effectiveness of their empirical uses. The ecological roles of the main secondary metabolites from the *Zaluzania* genus are still unknown, but Juárez-Flores *et al.* (2010) suggest that the aerial tissues contain insecticidal compounds. Some VOC'S or semi-volatile organic compounds could probably be related to these activities because of its tested insecticidal properties (Pavela, 2005). Morphologically, *Z. montagnifolia* differs from the other members of the genus due to its upper leaves being conspicuously crenate-dentate. Therefore, the aim of this study was to elucidate the content of the main VOC's and lipophilic molecules dissolved in the hexanic extracts from *Z. montagnifolia* in order to find compounds putatively involved in its empirical uses, as well as its possible antibacterial, allelopathic and antioxidant activities.

mL^{-1}), y para la cepa *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 (MIC=30.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Las propiedades alelopáticas se determinaron con el sistema de semilla de lechuga, mostrando que los extractos de raíz tuvieron un efecto significativo ($p \leq 0.01$). La actividad antioxidante fue aceptable para los extractos de hoja y flor (IC₅₀=158.3-253.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), usando el radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH). Las últimas actividades biológicas están muy relacionadas con los VOCs y los derivados de *ent*-kaureno, los cuales tienen una función esencial como agentes antibacterianos y alelopáticos.

Palabras clave: *Zaluzania montagnifolia*, ácido grandiflorénico, ácido *ent*-kaurenoico, VOCs, actividades biológicas.

INTRODUCCIÓN

El género *Zaluzania* es uno de los grupos *Asteraceae* más recurrentes en la medicina tradicional mexicana por sus propiedades anti-tumorales, anti-diabéticas y abortivas (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). *Zaluzania montagnifolia*, *Z. augusta* (limpia tuna), *Z. triloba*, *Z. grayana*, y *Z. robinsonii* contienen lactonas sesquiterpénicas de tipo guaianólido llamadas zaluzaninas (de A a E y sus formas dehidro) y son los constituyentes principales de dichas especies. Estos compuestos muestran propiedades tripanocidas, fungistáticas y propiedades relajantes suaves (Uchiyama *et al.*, 2002; Krishna-Kumari *et al.*, 2003); también son agentes efectivos en el sistema de pruebas de leucemia linfocítica P-388 (Jolad *et al.*, 1974). La infusión de raíces de *Z. montagnifolia* se administra oralmente para tratar la diabetes e inducir el aborto, pero no hay un enfoque químico que apoye la efectividad de sus usos empíricos. Las funciones ecológicas de los metabolitos secundarios principales del género *Zaluzania* todavía se desconocen, pero Juárez-Flores *et al.* (2010) sugieren que los tejidos aéreos contienen compuestos insecticidas. Algunos VOCs o semi-volátiles podrían probablemente relacionarse con estas actividades debido a sus propiedades insecticidas probadas (Pavela, 2005). Morfológicamente, *Z. montagnifolia* difiere de otros miembros del género debido a que sus hojas superiores son notablemente crenadas-dentadas. Por tanto, el objetivo de este estudio fue elucidar el contenido de los VOCs principales y las moléculas lipofílicas disueltas en los extractos hexánicos de *Z. montagnifolia* para encontrar compuestos involucrados putativamente en sus usos empíricos, así como sus posibles actividades antibacterianas, alelopáticas y antioxidantes.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and extraction

Zaluzania montagnifolia was collected in Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, 16° 20.63' N, 0.96° 34.85' O at 1580 masl, in October 2011. The identity of the plant was corroborated by comparing it with voucher 130910 from the FCME-herbarium at UNAM-México. Dried samples (40 g each) of flowers, leaves and axonomorfoous roots were extracted with 100 mL of *n*-hexanes for 10 d at 4 °C. Hexanic extracts were filtered using Ahlstrom grade 642 filter paper, concentrated using a rotary evaporator Buchi R-200 (Germany) to 10 mL and finally reduced to 1 mL under a N₂ stream. Heptadecanoic acid was used as the internal standard for extraction.

GC-MS analysis

Four μ L of the hexanic extracts were injected into a Varian CP3800 gas chromatograph equipped with a Factor Four Column VF-5ms (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m ID, covered with 5:95 phenyl-dimethylpolysiloxane as stationary phase) coupled to a Varian quadrupole mass spectrometer 320MS model. The carrier gas was He at 1 mL min⁻¹ flow rate. Injector temperature was maintained at 200 °C. The oven temperature program was 150 °C for 3 min and finally ramped up to 250 °C for 20 min. The GC-MS run software was programmed to identify a *m/z* range of 30-600. Obtained peaks were carefully analyzed according to their mass spectra using the MS data Review and AMDIS 2.64, and subsequently compared to the NIST Search 2.0, Wiley Registry 8th edition, Pherobase, Flavornet, mass spectral data bases from FiehnLib as well as to the retention indexes reported in the literature. The retention index was calculated by running a standard mix of *n*-alkanes of C₈-C₂₀ and C₂₁-C₄₀ from Sigma-Aldrich Co., under identical conditions. After determining the presence of *ent*-kauranes diterpenes in *Z. montagnifolia* preparations, these molecules were semi-purified by thin layer chromatography (TLC) using a mix of hexane:ethyl acetate (90:10 v/v) according to reference standards isolated from *Montanoa tomentosa* which were characterized by GC-MS at 70 eV as described by Villa-Ruano *et al.* (2009). The mass spectra of silylated *ent*-kauranes from *Z. montagnifolia* were obtained with N, O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane (BSTFA+1%TMCS, Sigma-Aldrich Co.) as a derivatizing agent and compared with those obtained from *M. tomentosa* under the same run conditions described above. Relative abundance was calculated from total ion chromatogram (TIC) data.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y extracción

Zaluzania montagnifolia se recolectó en Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, 16° 20.63' N, 0.96° 34.85' O a 1580 msnm, en octubre del 2011. La identidad de la planta se corroboró al compararla con la recolecta 130910 del Herbario FCME en UNAM-México. Muestras secas (40 g cada una) de flores, hojas y raíces axonomorfas se extrajeron con 100 mL de *n*-hexanos por 10 d a 4 °C. Los extractos hexánicos se filtraron usando papel filtro Ahlstrom grado 642, se concentraron usando un evaporador rotativo Buchi R-200 (Alemania) hasta 10 mL y finalmente se redujeron a 1 mL bajo un flujo de N₂. El ácido heptadecanoico se usó como estándar interno para la extracción.

Análisis GC-MS

Cuatro μ L de los extractos hexánicos se inyectaron en un cromatógrafo de gases Varian CP3800 equipado con una Columna VF-5ms Factor Cuatro (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m ID, cubierta con 5:95 fenil-dimetilpolisiloxano como fase estacionaria) y acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar (Varian modelo 320MS). El gas transportador fue He con flujo de 1 mL min⁻¹. La temperatura del inyector se mantuvo a 200 °C. El programa de temperatura del horno fue 150 °C por 3 min y finalmente se elevó a 250 °C por 20 min. El software de corrida del GC-MS se programó para identificar un rango *m/z* de 30-600. Los picos se analizaron cuidadosamente con base en sus espectros de masas, usando los datos de MS Review y AMDIS 2.64 y después se compararon con las bases de espectros NIST Search 2.0, Wiley Registry 8^{va} edición, Pherobase, Flavornet, y bases espectrales de FiehnLib, así como con los índices de retención reportados en la literatura. El índice de retención se calculó al correr una mezcla estándar de *n*-alcanos de C₈-C₂₀ y C₂₁-C₄₀ de Sigma-Aldrich Co., en condiciones idénticas. Después de determinar la presencia de diterpenoides *ent*-kaureno en preparaciones de *Z. montagnifolia*, estas moléculas fueron semi-purificadas por cromatografía de capa delgada (TLC), usando una mezcla de hexano:acetato de etilo (90:10 v/v) de acuerdo a los estándares de referencia aislados de *Montanoa tomentosa*, caracterizados por GC-MS a 70 eV como lo describen Villa -Ruano *et al.* (2009). El espectro de masas del *ent*-kaureno silanizados de *Z. montagnifolia* se obtuvo con N,O-Bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida con 1% trimetilclorosilano (BSTFA+1%TMCS, Sigma-Aldrich Co.) como agente derivatizante y se comparó con los obtenidos de *M. tomentosa* en las mismas condiciones de corrida ya descritas. La abundancia relativa se calculó con datos del cromatograma de iones totales (TIC).

Antibacterial activity

This activity was determined by the broth microdilution method in combination with hexanic extracts and conventional antibiotics as reference standards. Besides, the minimal inhibitory concentration (MIC) for each extract was calculated (Villa-Ruano *et al.*, 2012).

Allelopathic activity

This activity was determined by using the *Lactuca sativa* (cv. Great Lakes) system according to Villa-Ruano *et al.* (2012). An analysis of variance (ANOVA) was performed from dose-response data (curves of 0-300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) obtained from the assayed hexanic extracts and semi-purified *ent*-kauranes. Besides a Tukey test ($p \leq 0.01$) was performed using Statistica 6.0 (StatSoft, Inc. 2001).

Antioxidant activity

This activity was determined according to Shafaghat *et al.* (2011), using butylated hydroxytoluene (BHT) instead of vitamin C as a reference standard, and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was obtained from Sigma-Aldrich Co. Dose-response curves (0-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were performed in quintuplicated to obtain the respective half maximal inhibitory concentration (IC_{50}). BHT was used because of its hydrophobic properties.

RESULTS AND DISCUSSION**GC-MS profile**

Analysis of hexanic extracts revealed 59 compounds (Table 1), including sesquiterpenes, aliphatic hydrocarbons, fatty acids and diterpenes. The most abundant sesquiterpenes in aerial parts were α -humulene (14.5 %), (-)- α -panasinsene (8.4%), β -bisabolene (7.94 %), humulene epoxide II (6.7 %) and germacrene D (5.9 %), while *trans*- α -bergamotene (6.51 %), α -cadinene (5.57 %), and italicene (5.32 %) were the most plentiful in roots. Sesquiterpene lactone tomentosin (0.87 %) was exclusively detected in leaves but not in the flowers, whereas *n*-dodecanal (3.9 %), squalene (3.43 %) and nonacosane (2.6 %) were the most abundant aliphatic hydrocarbons. A low percentage of cuticle-associated hydrocarbons such as pentadecene (1.2 %), octadecene (0.4 %), 1,12-tridecadiene (0.60 %), and

Actividad antibacteriana

Esta actividad se determinó con el método de microdilución en caldo, en combinación con extractos hexánicos y antibióticos convencionales como estándares de referencia. Además, se calculó la concentración mínima inhibitoria (MIC) para cada extracto (Villa-Ruano *et al.*, 2012).

Actividad alelopática

Esta actividad se determinó con el sistema de *Lactuca sativa* (cv. Great Lakes) de acuerdo con Villa-Ruano *et al.* (2012). El análisis de varianza (ANDEVA) se efectuó con datos de curvas de dosis-respuesta (0-300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) obtenidos de las pruebas de extractos hexánicos y derivados del *ent*-kaureno semi-purificados. Además se realizó una prueba de Tukey ($p \leq 0.01$) usando el programa Statistica 6.0 (StatSoft, Inc. 2001).

Actividad antioxidante

Esta actividad se determinó de acuerdo con Shafaghat *et al.* (2011), utilizando butil hidroxitolueno (BHT) en lugar de vitamina C como estándar de referencia, y 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) se obtuvo de Sigma-Aldrich Co. Las curvas dosis-respuesta (0-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) se realizaron por quintuplicado para obtener la concentración inhibitoria máxima al 50 % (IC_{50}) respectiva. El BHT se usó debido a sus propiedades hidrofóbicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN**Perfil GC-MS**

El análisis de los extractos hexánicos reveló 59 compuestos (Cuadro 1), incluyendo sesquiterpenos, hidrocarburos alifáticos, ácidos grasos y diterpenoides. Los sesquiterpenos más abundantes en las partes aéreas fueron α -humuleno (14.5 %), (-)- α -panasinseno (8.4 %), β -bisaboleno (7.94 %), humuleno epóxido II (6.7 %) y germacreno D (5.9 %), mientras que los más abundantes en raíces fueron *trans*- α -bergamoteno (6.51 %), α -cadineno (5.57 %), e italiceno (5.32 %). La lactona sesquiterpénica tomentosina (0.87 %) se detectó exclusivamente en hojas pero no en las flores, mientras que *n*-dodecanal (3.9 %), escualeno (3.43 %) y nonacosano (2.6 %) fueron los hidrocarburos alifáticos más abundantes. También se observó un bajo porcentaje de hidrocarburos asociados con la cutícula como pentadeceno (1.2 %),

Table 1. Volatile and semi-volatile compounds from *Zaluzania montagnifolia* obtained by GC-MS.
Cuadro 1. Compuestos volátiles y semi-volátiles de *Zaluzania montagnifolia* obtenidos por GC-MS.

Retention index	Compound	Peak area (%)		
		Flowers	Leaves	Roots
1401	Copaene		4.7	
1403	Italicene	1.44		5.32
1409	<i>n</i> -dodecanal		3.9	1.24
1410	α -gurjunene	1.26		
1434	trans- α -bergamotene	0.96		6.51
1447	α -humulene	5.2	14.5	0.19
1454	(E)- β -farnesene			0.27
1481	Germacrene D	1.62	5.9	
1487	β -selinene			0.96
1495	Bicyclogermacrene	0.49	0.9	
1498	α -muurolene			0.54
1505	δ -selinene			0.66
1509	β -bisabolene	7.08	7.94	
1512	β -curcumene			1.8
1518	(-)- α -panasinsene	2.04	8.4	0.02
1537	α -cadinene	0.66	1.1	5.57
1551	Elemol	3.54	0.32	
1567	Globulol	0.42	0.07	
1575	Germacrene D-4-ol	0.8	0.28	
1588	Linalylisobutyrate	1.38		
1598	β -Cariophyllene			0.97
1602	γ -Eudesmol	0.9	0.7	
1609	Humulene epoxide II	1.2	6.7	0.87
1619	Eudesmol	0.19	0.19	
1629	1-epi-cubenol	0.29	0.4	0.11
1635	Alloaromadendrene epoxide	0.36	0.88	0.29
1646	α -muurolol	0.45		0.73
1656	neo-intermedeol		0.1	
1671	Trans-calamenen-10-ol	1.96	2	
1675	Methyl-epi-jasmonate	0.24	0.08	
1676	Tau-Cadinol			2.5
1682	α -bisabolol	1.62	0.3	
1718	14-Hydroxy- α -humulene	1.08	0.82	
1728	(Z)- <i>n</i> -heptadec-8-ene		0.09	
1737	iso-Caryophyllene	0.3	0.15	
1746	6S-7R-bisabolone	1.2	0.25	
1752	Guaia-1(10),11-dien-9-one		0.35	
1781	Pentadecene	1.2	0.4	
1805	Octadecene	0.40	0.24	0.39
1821	(E,E)-2,4-decadienal			0.12
1835	1,12-tridecadiene	0.6	0.41	
1848	Hexahydrofarnesyl acetone	0.76	0.1	
1892	Nonadecene	0.1	0.23	
1924	Methyl-hexadecanoate	0.6	0.13	0.23
1942	Cyclohexadecanolide	0.12	0.11	0.54
1967	Hexadecanoic acid	0.9	0.1	
1956	<i>ent</i> -kaurene	0.66	0.16	
2073	Epimanol	4.14	1.18	
2114	Phytol		1.12	

Continúa...

Continued Table 1.

Retention index	Compound	Peak area (%)		
		Flowers	Leaves	Roots
2354 2303 [†]	Grandiflorenic acid	18.63	11.56	35.5
2459 2376 [†]	<i>ent</i> -kaurenoic acid	15.02	10.87	28.3
2637	Tetracosanal		0.24	
2705	Tetracosanol		1.63	
2736	Tetracosanoic acid		0.29	
2816	Squalene	2.48	3.43	0.9
2908	Nonacosane	2.6	0.16	
	Total	87.55	97.15	94.53

[†]Retention index of silylated *ent*-kaurane diterpenes eluted in a Factor Four VF-5ms. Blank spaces indicate that the compound was not detected under those GC-MS conditions ♦ Índice de retención de diterpenos *ent*-kaureno silanizados eluidos en una VF-5ms Factor Cuatro. Los espacios en blanco indican que el compuesto no se detectó bajo esas condiciones de GC-MS.

(*Z*)-*n*-heptadec-8-ene (0.09 %) was also observed. Hexadecanoic acid (0.9 %) and the essential linoleic acid (2.7 %) were detected in aerial parts but not in roots. The gibberellin precursor *ent*-kaurene was exclusively detected in aerial parts of the plant. In all the studied organs, especially in roots, *ent*-kaurane derivatives such as grandiflorenic acid (GF) [kaura-9 (11), 16-dien-18-oic acid] and *ent*-kaurenoic acid (KA) [kaur-16-en-18-oic acid] were the most prevalent.

Grandiflorenic acid possesses uterotonic properties in animal species (Villa-Ruano *et al.*, 2009) and KA is a powerful hypoglycemic agent in rat models (Bresciani *et al.*, 2004). According to these studies, GF could be related to abortive properties due its stability and chemical integrity in aqueous infusions studies supported by high performance liquid chromatography (HPLC), GC-MS and nuclear magnetic resonance (NMR) (Enríquez *et al.*, 1996). Besides, these authors point out that KA exhibits the identical stability of GF and its presence and high abundance suggest its involvement in the antidiabetic effects according to *in vivo* tests performed by Bresciani *et al.* (2004). Therefore, the root teas from *Z. montagnifolia* could probably be influenced by both diterpenes to perform their effects. Zaluzanins have an *in vitro* effect on smooth muscle contraction (Calesteren *et al.*, 2008), but there is no evidence of its detection in aqueous preparations.

In addition to these findings, epimanol (Labda-8(20),14-dien-13-ol, (13S)-; 4.14 %) was detected in aerial parts of *Z. montagnifolia*. Epimanol and

octadeceno (0.4 %), 1,12-tridecadieno (0.60 %), y (*Z*)-*n*-heptadec-8-eno (0.09 %). El ácido hexadecanoico (0.9 %) y el ácido linoleico (2.7 %) se detectaron en partes aéreas pero no en raíces. El precursor de giberelinas *ent*-kaureno se detectó exclusivamente en partes aéreas de la planta. En todos los órganos estudiados, especialmente en raíces, los derivados del *ent*-kaureno como el ácido grandiflorénico (GF) [ácido kaura-9 (11), 16-dien-18-oico] y el ácido *ent*-kaurenoico (KA) [ácido kaur-16-en-18-oico] fueron los más predominantes.

El ácido grandiflorénico posee propiedades uterótónicas en especies animales (Villa-Ruano *et al.*, 2009) y el KA es un agente hipoglucémico poderoso en modelos de ratas (Bresciani *et al.*, 2004). De acuerdo con estos estudios, GF podría estar relacionado con propiedades abortivas debido a su estabilidad e integridad química en estudios en infusiones acuosas apoyadas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), GC-MS y resonancia magnética nuclear (NMR) (Enríquez *et al.*, 1996). Además, estos autores señalan que el KA exhibe una estabilidad idéntica a la del GF y su presencia y alta abundancia sugieren su participación en los efectos antidiabéticos, de acuerdo con las pruebas *in vivo* realizadas por Bresciani *et al.* (2004). Por tanto, las infusiones de raíces de *Z. montagnifolia* probablemente podrían estar influidos por ambos diterpenoides para realizar sus efectos. Las zaluzaninas tienen un efecto *in vivo* sobre la contracción del músculo liso (Calesteren *et al.*, 2008), pero no hay evidencia de su detección en preparaciones acuosas.

related labdanes are usually present in oleoresins of many plants and associated with insecticidal and larvicidal effects (Chinou, 2005; Demetzos and Dimas 2007). Plant essential oils with high amounts of α -humulene, coapaene and germacrene D as well as other VOC's also found in *Z. montagnifolia* extracts, show insecticidal properties (Murugesan *et al.*, 2012). Further experiments are required to show the involvement of hexanic extracts and its molecules in the insecticidal properties reported by Juárez-Flores *et al.* (2010). The presence of labdane and *ent*-kaurane diterpenoids was shown in other *Asteraceae* such as *Stevia* spp (Hernández *et al.*, 1998). Results of the present study show that *Z. montagnifolia* roots are the best source to obtain both majoritarian *ent*-kaurane diterpenes.

Antibacterial activity

The inhibitory effect of hexanic extracts on the growth of *E. scherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens* strains was shown. The low MIC values of leaf and root extracts (Table 2) revealed their antibacterial properties and suggested that those extracts contain natural compounds involved in the observed effect. MIC value refers to the lowest concentration of an antimicrobial agent that will inhibit the visible growth of a microorganism after incubation; this value is inversely proportional to the effectiveness of a particular substance. The detection and abundance of both KA and GF by GC-MS was the first approach that suggested their possible role in antibacterial activity. Antibacterial properties of KA and GF were shown in *E. coli* and other gram-negative bacteria, especially for the first diterpene (Bremner and Meyer, 2000). The inhibitory effect of the *ent*-kaurane mix on the assayed bacterial species suggests that the latter compounds are involved in this biological activity. However, there is no discarding the possible synergism with other cytotoxic VOC's such as α -humulene and germacrene D (Vijayakumar *et al.*, 2012) in aerial parts where the endogenous levels of *ent*-kauranes are relatively lower than in the roots. *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 is one of the most virulent strains of the respective genus, the MIC=30.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ reveals that root extracts are the most effective against this bacteria and could be employed in the biological control of crown gall disease. Interestingly, these data predict that plants

Además de estos hallazgos, se detectó epimanol (Labda-8(20),14-dien-13-ol, (13S)-; 4.14 %) en las partes aéreas de *Z. montagnifolia*. Epimanol y labdanos relacionados están presentes usualmente en oleoresinas de muchas plantas y están asociados con efectos insecticidas y larvicidas (Chinou, 2005; Demetzos y Dimas 2007). Los aceites esenciales vegetales con altas cantidades de α -humuleno, coapaeno y germacrene D, y otros VOCs también detectados en extractos de *Z. montagnifolia*, muestran propiedades insecticidas (Murugesan *et al.*, 2012). Más experimentos son necesarios para mostrar la participación de extractos hexánicos y sus moléculas en las propiedades insecticidas reportadas por Juárez-Flores *et al.* (2010). La presencia de labdanos y diterpenoides derivados del *ent*-kaureno se mostraron en otras *Asteraceae* como *Stevia* spp. (Hernández *et al.*, 1998). Los resultados del presente estudio muestran que las raíces de *Z. montagnifolia* son la mejor fuente para obtener ambos diterpenos *ent*-kaureno mayoritarios.

Actividad antibacteriana

El efecto inhibitorio de los extractos hexánicos se mostró en el crecimiento de cepas de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*. Los valores MIC bajos de los extractos de hojas y raíces (Cuadro 2) revelaron sus propiedades antibacterianas y sugieren que esos extractos contienen compuestos naturales involucrados en el efecto observado. El valor MIC se refiere a la concentración más baja de un agente antimicrobiano que inhibirá el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación; este valor es inversamente proporcional a la efectividad de una sustancia particular. La detección y la abundancia de KA y GF por GC-MS fue el primer acercamiento que sugirió su posible función en la actividad antibacteriana. Las propiedades antibacterianas de KA y GF se mostraron en *E. coli* y otras bacterias gram-negativas, especialmente para el primer diterpene (Bremner y Meyer, 2000). El efecto inhibitorio de la mezcla de derivados del *ent*-kaureno en las especies bacterianas estudiadas sugiere que estos últimos compuestos están involucrados en esta actividad biológica. Sin embargo, no se descarta el posible synergismo con otros VOCs citotóxicos como el α -humuleno y el germacrene D (Vijayakumar *et al.*, 2012) en partes aéreas donde los niveles endógenos de *ent*-kaureno son relativamente menores que en las raíces. *Agrobacterium*

Table 2. Antibacterial effect of hexanic extracts and the mix of *ent*-kauranes from *Zaluzania montagnifolia*.**Cuadro 2. Efecto antibacteriano de extractos hexánicos y la mezcla de los derivados del *ent*-kaureno a partir de *Zaluzania montagnifolia*.**

Microorganism	Hexanic Extracts	<i>ent</i> -kaurane mix [†]	Reference standards	(DMSO effect)
	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ampicillin ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	OD ₆₀₀
<i>E. coli</i> TOP 10	98.1 (F)	32.2	11.3	0.82±0.05
	76.2 (L)			
	49.2 (R)			
<i>E. coli</i> DH α 5	84.3 (F)	21.3	8.2	0.81±0.05
	39.3 (L)			
	32.4 (R)			
			Cefatoxime ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	OD ₆₀₀
<i>A. tumefaciens</i> LBA 4404	114.7 (F)	19.4	6.0	0.9±0.05
	78.2 (L)			
	30.4 (R)			

[†]Mix of GF and KA. F, flowers; L, leaves; R, roots ♦ Mezcla de GF y KA. F, flores; L, hojas; R, raíces.

[§] MIC: minimal inhibitory concentration ♦ MIC: concentración mínima iInhibitoria.

with high endogenous levels of both *ent*-kaurane diterpenes could be hardly transformed genetically by *A. tumefaciens*.

Allelopathic activity

Table 3 shows the data about the allelopathic activity of the hexanic extracts from the three organs studied. The results of an ANOVA coupled to a Tukey test reveal significant differences between the assayed concentrations in the germination frequency of *L. sativa* seeds ($p \leq 0.01$). According to these data, leaf and root extracts were the most effective causing 91-95 % inhibition at 100-150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ whereas the maximum concentration by flower extracts (300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) only resulted in 64 % inhibition. Allelopathic properties of leaf extracts were more significant than those of the roots as shown by the concentration of 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, observing 89.6 % and 52.8 % inhibition by leaf and root extracts. Considering that *ent*-kaurane diterpenes were the most abundant compounds in both organs and showed allelopathic properties at the concentrations here reported, the specific effectiveness of leaf extracts suggests that other compounds increase that effect. Some abundant VOC's in this organ such as β -bisabolene and

tumefaciens LBA 4404 es una de las cepas más virulentas de su género, el valor MIC=30.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ revela que los extractos de raíces son los más efectivos contra esta bacteria y podrían emplearse en el control biológico de la enfermedad corona de agallas. Interesantemente, estos datos predicen que las plantas con altos niveles endógenos de ambos diterpenos *ent*-kaureno difícilmente podrían ser transformados genéticamente por *A. tumefaciens*.

Actividad alelopática

El Cuadro 3 muestra los datos sobre la actividad alelopática de los extractos hexánicos de los tres órganos estudiados. Los resultados de un ANDEVA junto con una prueba de Tukey revelan diferencias significativas entre las concentraciones estudiadas sobre la frecuencia de germinación de semillas de *L. sativa* ($p \leq 0.01$). De acuerdo con estos datos, los extractos de hojas y raíces fueron los más efectivos, causando 91-95 % de inhibición a 100-150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que la concentración máxima en extractos de flores (300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sólo causó inhibición de 64 %. Las propiedades alelopáticas de extractos de hojas fueron más significativas que las de raíces, como lo muestra la concentración de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, donde se observó 89.6 % y 52.8 % de inhibición por extractos de

Table 3. Allelopathic activity of hexanic extracts and the mix of *ent*-kauranes from *Zaluzania montagnifolia* on the germination frequency (% \pm standard deviation) of *Lactuca sativa* seeds (cv. Great Lakes).**Cuadro 3. Actividad alelopática de extractos hexánicos y la mezcla de *ent*-kaureno de *Zaluzania montagnifolia* en la frecuencia de germinación (% \pm desviación estándar) de semillas de *Lactuca sativa* (cv. Great Lakes).**

$\mu\text{g mL}^{-1}$	Flowers	Leaves	Roots	<i>ent</i> -kaurane mix
300	9.0 \pm 2.23 a [†]	2.4 \pm 1.51 ab	1.2 \pm 1.64 a	0 \pm 0 a
250	13.4 \pm 4.33 bc	3.8 \pm 1.30 b	10.0 \pm 2.82 b	0 \pm 0 a
200	15.4 \pm 2.70 bc	2.6 \pm 1.51 ab	11.8 \pm 1.78 bc	1.4 \pm 1.14 a
150	15.6 \pm 2.60 bc	8.0 \pm 1.58 c	9.0 \pm 1.87 b	1.4 \pm 1.14 a
100	23.6 \pm 0.89 c	15.8 \pm 3.03 cd	22.4 \pm 1.14 c	4 \pm 1.58 b
80	18.4 \pm 9.23 cd	14.8 \pm 3.70 cd	22.0 \pm 1.58 c	5 \pm 2.549 b
50	23.2 \pm 1.48 d	22.0 \pm 1 d	23.4 \pm 1.14 c	7.8 \pm 1.78 bc
20	22.8 \pm 1.78 d	23.8 \pm 1.30 d	22.4 \pm 1.67 c	13.8 \pm 2.58 cd
10	24.0 \pm 1.73 d	22.6 \pm 2.07 d	24.4 \pm 0.89 c	16.2 \pm 2.77 cd
0	23.0 \pm 1.22 d	22.8 \pm 1.92 d	24.0 \pm 1.22 c	23.2 \pm 1.78 e

[†]Means with a different letter are statistically different ($p \leq 0.01$). The germination frequency data are the means from 25 seeds, $n=125$ ♦ Medias con distintas letras son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.01$). Los datos de frecuencia de germinación son las medias de 25 semillas, $n=125$.

trans- α -bergamotene could probably be involved in the allelopathic properties according to Bradow (1985). Related physiological effects could be expected due the similarities in chemical structure between *ent*-kauranes and gibberellins. Vieira *et al.* (2005) report a stimulation of seed germination and shoot elongation of *L. sativa* (cv. Grand Rapids) by KA and GF as well as by some of its derivatives. According to these studies, concentrations of 0.1 mM, 10 μM and 0.1 μM of KA and GF promoted the shoot growth of *L. sativa* seeds. In the present study, the highest concentration of mixed *ent*-kauranes was 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (~ 1 mM) and the lowest 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (~ 30 μM , or ~ 0.03 mM) and these concentrations inhibited seed germination. Contrary to other studies where micromolar concentrations stimulated the germination of *L. sativa* (cv. Great Lakes) the lower one in this essay (~ 30 μM) had no effect on promoting the same process. This effect could be due to the variety of *L. sativa* seed assayed (cv. Great Lakes) or to the mix itself. Allelopathic properties of crude extracts and semi-purified *ent*-kaurane diterpenes from *Z. montagnifolia* have been shown for *L. sativa* seeds (cv. Great Lakes) but further experiments are required to determine their effects in the growth inhibition of seeds from weeds.

hojas y raíces. Considerando que los diterpenoides *ent*-kaureno fueron los compuestos más abundantes en ambos órganos y mostraron propiedades alelopáticas en las concentraciones aquí reportadas, la efectividad específica de los extractos de hojas sugiere que otros compuestos aumentan ese efecto. Algunos VOCs abundantes en este órgano, como α -bisaboleno y trans- β -bergamoteno probablemente podrían estar involucrados en las propiedades alelopáticas, de acuerdo con Bradow (1985). Efectos fisiológicos relacionados entre *ent*-kaureno y giberelinas podrían esperarse debido a similitudes en su estructura química. Vieira *et al.* (2005) reportan una estimulación de germinación de semillas y elongación de brotes de *L. sativa* (cv. Grand Rapids) por KA y GF, así como por algunos de sus derivados. De acuerdo con estos estudios, las concentraciones 0.1 mM, 10 μM y 0.1 μM de KA y GF promovieron el crecimiento de brotes de semillas de *L. sativa*. En el presente estudio, la concentración más alta de la mezcla de *ent*-kaurenos fue 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (~ 1 mM) y la más baja 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (~ 30 μM , o ~ 0.03 mM) y estas concentraciones inhibieron la germinación de semillas. Contrario a otros estudios donde concentraciones micromolares estimularon la germinación de *L. sativa* (cv. Great Lakes), la concentración mas baja en este estudio (~ 30 μM) no tuvo efecto en promover el mismo proceso. Este

Antioxidant activity

The results of antioxidant activity of hexanic extracts by the DPPH radical scavenging method are shown in Table 4. According to the obtained IC_{50} , leaf extracts were the most effective followed by those of flowers and roots. Despite IC_{50} values being significantly lower than those of BHT, this molecule must be considered as a pure substance, whereas the hexanic extracts consist of diverse molecules that are surely diluted. Due to this fact and considering that other plant preparations with high levels of flavonoids showed similar antioxidant MIC values (García-Mateos *et al.*, 2012) than those of this study, the antioxidant properties of hexanic extracts from *Z. montagnifolia* are acceptable. According to the chemical profile, the observed effect could be related to some volatiles such as β -bisabolene and germacrene D, since essential oils with high endogenous levels of both sesquiterpenes show the same behavior according to Ricci *et al.* (2005) and Shafaghat (2011). Flavonoids and related phenolic compounds derived from Shikimate pathway are usually associated with antioxidant activities, despite its quick degradation by moderate temperatures (>40 °C) and its susceptibility to light is known (Deng *et al.*, 2011).

The presence of thermostable lipophilic compounds with antioxidant properties, represent an alternative that plants probably use to avoid oxidative stress and to regulate the physiology under high temperatures. Besides, antioxidant agents from lipophilic preparations could regulate glycemia by affecting the enzymes involved in glucose and lipid metabolism (Chung *et al.*, 2010). The discovery of

efecto podría deberse a la variedad de semilla de *L. sativa* (cv. Great Lakes) empleada o la misma mezcla. Las propiedades alelopáticas de los extractos crudos y semi-purificados de los diterpenos *ent*-kaureno de *Z. montagnifolia* se han mostrado para semillas de *L. sativa* (cv. Great Lakes), pero se requieren más experimentos para determinar sus efectos en la inhibición de crecimiento de semillas de malezas.

Actividad antioxidante

Los resultados de actividad antioxidante de los extractos hexánicos por el método de secuestro de radicales DPPH se muestran en el Cuadro 4. De acuerdo al IC_{50} obtenido, los extractos de hojas fueron los más efectivos, seguidos por los de flores y de raíces. Aunque los valores de IC_{50} son significativamente menores que los de BHT, esta molécula debe considerarse una sustancia pura, mientras que los extractos hexánicos consisten de diversas moléculas que seguramente están diluidas. Debido a esto y considerando que otras preparaciones vegetales con niveles altos de flavonoides mostraron valores IC_{50} antioxidantes similares (García-Mateos *et al.*, 2012) a los de este estudio, las propiedades antioxidantes de extractos hexánicos de *Z. montagnifolia* son aceptables. De acuerdo con el perfil químico, el efecto observado podría estar relacionado a algunos volátiles como β -bisaboleno y germacrene D, ya que los aceites esenciales con niveles endógenos altos de ambos sesquiterpenos muestran el mismo comportamiento según Ricci *et al.* (2005) y Shafaghat (2011). Los flavonoides y compuestos fenólicos relacionados derivados de la ruta del Shikimate usualmente están asociados con actividades antioxidantes, aunque su rápida degradación por temperaturas moderadas (> 40 °C) y su susceptibilidad a la luz son conocidas (Deng *et al.*, 2011).

La presencia de compuestos lipofílicos termoestables con propiedades antioxidantes representa una alternativa que las plantas probablemente usan para controlar el estrés oxidativo y regular la fisiología ante altas temperaturas. Además, agentes antioxidantes obtenidos de preparaciones lipofílicas podrían regular la glicemia al afectar las enzimas involucradas en el metabolismo de glucosa y lípidos (Chung *et al.*, 2010). El descubrimiento de extractos antioxidantes novedosos y el aislamiento de sus moléculas bioactivas abren la posibilidad de realizar más experimentos

Table 4. Antioxidant activity of hexanic extracts from *Zaluzania montagnifolia* against DPPH.

Cuadro 4. Actividad antioxidante de extractos hexánicos de *Zaluzania montagnifolia* contra el DPPH.

Hexanic extract	$^{\dagger}IC_{50}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Flowers	253.5
Leaves	158.3
Roots	445.1
BHT (reference standard)	24.6

$^{\dagger}IC_{50}$ refers to the half maximum inhibitory concentration for those extracts ♦ IC_{50} se refiere a la concentración inhibitoria máxima al 50 % para esos extractos.

novel antioxidant extracts and the isolation of their bioactive molecules, open the possibility to perform further experiments in animal models based on its capability to avoid oxidative stress and its relationship with cancer, premature ageing and neurodegenerative diseases (Timsina *et al.*, 2012).

CONCLUSIONS

The first extensive list of the lipophilic compounds from *Zaluzania montagnifolia* is shown in order to reveal the unknown chemistry of this plant. The accurate identification, high abundance of KA (hypoglycemic diterpene) and GF (uterotonic diterpene) could suggest in a coherent way, that the effects of the root teas as antidiabetic and abortive agents is probably influenced by those diterpenes. There was no chemical evidence that supports these properties in certain natural products from this plant until now. Based on literature, it is suggest that some of the main VOC's of *Zaluzania montagnifolia* could be involved in the antioxidant properties of the hexanic extracts. Results of this study suggest that *ent*-kaurane mixes from this plant possesses antibacterial and allelopathic properties. This is the first study showing the presence of *ent*-kaurane diterpenes in a member of the *Zaluzania* genus.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Craig A. Hilts for reviewing the manuscript, as well as Horacio Duque Bautista, Guilbaldo Gabriel Zurita Vásquez and Martha Guadalupe Betancourt Jiménez (from Cinvestav-Irapuato) for their technical support. We specially thank the financial hold from Programa Intergral de Fortalecimiento Institucional (PIFI).

LITERATURE CITED

- Andrade-Cetto, A., and M. Heinrich. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 99: 325–348.
- Bradow, J. M. 1985. Germination regulation by *Amaranthus palmeri* and *Ambrosia artemisiifolia*. In: Thompson, C. (ed). *The Chemistry of Allelopathy*. Vol 268. ACS Symposium Series. USA. pp: 285-299.
- Bremner, P. D., and J. J. Meyer. 2000. Prenylbutyrylphloroglucinol and kaurenoic acid: two antibacterial compounds from *Helichrysum kraussii*. *South Afr. J. Bot.* 66: 115-117.
- Bresciani, L. F. V, R. A. Yunes, C. Bürguer, L. E. De Oliveira, K. L. Bof, and V. Cechinel-Filho. 2004. Seasonal variation of

en modelos animales con base en su capacidad para evitar el estrés oxidativo y su relación con cáncer, envejecimiento prematuro y enfermedades neurodegenerativas (Timsina *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

La primera lista extensa de los compuestos lipofílicos de *Zaluzania montagnifolia* se presenta para mostrar la química desconocida de esta planta. La identificación precisa y alta abundancia de KA (diterpeno hipoglucémico) y del GF (diterpeno uterotónico) podría sugerir, de manera coherente, que los efectos de infusiones de raíz como agentes antidiabéticos y abortivos están probablemente influidos por esos diterpenos. Hasta ahora no había evidencia química que apoyara estas propiedades en ciertos productos naturales. Con base en la literatura se sugiere que algunos de los principales VOCs de *Zaluzania montagnifolia* podrían estar involucrados en las propiedades antioxidantes de los extractos hexánicos. Los resultados de este estudio sugieren que las mezclas de derivados del *ent*-kaureno de esta planta poseen propiedades antibacterianas y alelopáticas. Este es el primer estudio que muestra la presencia de diterpenos derivados *ent*-kaureno en un miembro del género *Zaluzania*.

—Fin de la versión en Español—

---*---

- kaurenoic acid, a hypoglycemic diterpene present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). *Z. Naturforsch.* 59c: 229-232.
- Calesteren, M. R. V., C. K. Jankowski, R. Reyes-Chilpa, M. Jiménez-Estrada, M. Campos G., A. Zarazua-Lozada, M. Oropeza, and D. Lesage. 2008. X-ray and high-resolution 1H and 13C NMR of smooth muscle relaxant sesquiterpene lactones. *Can. J. Chem.* 86: 1077-1084.
- Chinou, I. 2005. Lanbdanes of natural origin-biological activities (1981-2004). *Curr. Med. Chem.* 12: 1295-1317.
- Chung, M. J., S. Y. Cho, M. J. Bhuiyan, K. H. Kim, and S. J. Lee. 2010. Anti-diabetic effects of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil on glucose- and lipid-regulating enzymes in type 2 diabetic mice. *Br. J. Nutr.* 104: 180-188.
- Demetzos, C., and K. S. Dimas. 2007. Labdane-type diterpenes: Chemistry and biological activity. In: Atta-ur Rahman (ed). *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol.25. Elsevier. London UK. pp: 235-292.
- Deng, S., B. J. West, and C. J. Jensen. 2011. Thermal degradation of flavonol glycosides in noni leaves during roasting. *Adv. J. Food Sci. Technol.* 3: 155-159.

- Enríquez, R. G., E. Miranda, B. Ortiz, I. León, G. Magos, A. Peña, W. F. Reynolds, and D. Gnecco. 1996. The unambiguous detection of kaurenic derivatives in aqueous infusions of *Montanoa tomentosa* by GC-MS and 2D-NMR spectroscopy: an answer to contradictory reports. *Planta Med.* 62: 569-571.
- García-Mateos, R., L. Aguilar-Santelisis, M. Soto-Hernández, R. Nieto-Angel, and G. Kite. 2012. Total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in the flowers of *Crataegus* spp. from México. *Agrociencia* 46:651-662.
- Hernandez, L. R., C.A. Catalán N., and P. Joseph-Nathan. 1998. The chemistry of the genus *Stevia* (*Asteraceae*). *Rev. Acad. Colomb. Cien.* 22: 229-279.
- Jolad, S. D., R. M. Wiedhopf, and J. R. Cole. 1974. Tumor-inhibitory agent from *Zaluzania robinsonii* (*Compositae*). *J. Pharm. Sci.* 63: 1321-1322.
- Juárez-Flores, B. I., Y. Jasso-Pineda, J. Aguirre-Rivera, y I. Jasso-Pineda. 2010. Efecto de polvos de asteráceas sobre el gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais* motsch). *Polibotánica* 30: 123-135.
- Krishna-Kumari, G. N., S. Masilamani, M. Ganesh, S. Aravind, and S. Sridhar. 2003. Zaluzanin D: a fungistatic sesquiterpene from *Vernonia arborea*. *Fitoterapia* 74: 479-482.
- Murugesan, S., C. Rajeshkannan, D. Suresh Babu, R. Sumathi, and P. Manivachakam. 2012. Identification of insecticidal properties in common weed *Lantana camara* Linn by Gas Chromatography and Mass Spectrum (GC-MS-MS). *Adv. Appl. Sci. Res.* 3: 2754-2759.
- Pavela, R. 2005. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia* 76: 691-696.
- Ricci, D., D. Fraternali, L. Giampieri, A. Bucchini, F. Epifano, G. Burini, and M. Curini. 2005. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (*Lamiaceae*). *J. Ethnopharmacol.* 98: 195-200.
- Shafaghat, A. 2011. Chemical constituents, antimicrobial and antioxidant activity of the hexane extract from root and seed of *Levisticum persicum* Freyn and Bornm. *J. Med. Plant Res.* 5: 5127-5131.
- Timsina, B., M. Shukla, and V. K. Nadumane. 2012. A review of few essential oils and their anticancer property. *J. Nat. Pharm.* 3: 1-8.
- Uchiyama, N., K. Matsunga, F. Kiuchi, G. Honda, A. Tsubouchi, J. Nakajima-Shimada, and T. Aoki. 2002. Trypanocidal terpenoids from *Laurus nobilis* L. *Chem. Pharm. Bull.* 50: 1514-1516.
- Vieira, H. S., J. A. Takahashi, L. P. Pimenta S., and M. A. D. Boaventura. 2005. Effects of kaurane diterpene derivatives on germination and growth of *Lactuca sativa* seedlings. *Z. Naturforsch.* 60c: 72-78.
- Vijayakumar, A., V. Duraipandiyan, B. Jeyaraj, P. Agastian, M. K. Raj, and S. Ignacimuthu. 2012. Phytochemical analysis and *in vitro* antimicrobial activity of *Illicium griffithii* Hook. f. and Thoms extracts. *Asian Pac. J. Trop. Dis* 2: 190-199.
- Villa-Ruano, N., M. G. Betancourt-Jiménez, and E. Lozoya-Gloria. 2009. Biosynthesis of uterotonic diterpenes from *Montanoa tomentosa* (zoapatle). *J. Plant Physiol.* 166: 1961-1967.
- Villa-Ruano, N., Y. Pacheco-Hernández, E. Rubio-Rosas, N. Ruiz-González, R. Cruz-Duran, E. Lozoya-Gloria, G. Zurita-Vásquez, and J. Franco-Monsreal. 2012. Alkaloid profile, antibacterial and allelopathic activities of *Lupinus jaimehintoniana*, BL Turner. (*Fabaceae*). *Arch. Biol. Sci.* 64: 1065-1071.