

00502



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“METABOLITOS FITOTÓXICOS PRODUCIDOS POR
ALTERNARIA TAGETICA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS
(QUÍMICA ORGÁNICA)

P R E S E N T A

M. en C. MARIA MARCELA GAMBOA ANGULO

México, D.F.

285302
2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

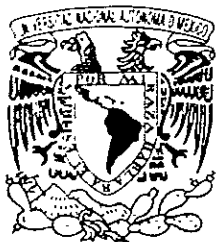
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTA TESIS FUE DESARROLLADA EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE
YUCATÁN, A.C. Y EN EL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO CON APOYO DEL
CONACyT (Beca doctoral y Proyecto 4871-E9406) y
PADEP-UNAM (Proyectos 5356 y 5370),
BAJO LA DIRECCIÓN DEL
Dr. LUIS MANUEL PEÑA RODRÍGUEZ .**

COORDINACIÓN DEL PROGRAMA
DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS QUÍMICAS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

BIÓL. FRANCISCO INCERA UGALDE

Jefe de la Unidad Administrativa del Posgrado.
Presente

Me es grato informarle que la alumna **MARÍA MARCELA GAMBOA ANGULO** presentará próximamente su examen para obtener el grado de Doctor correspondiente al Programa de Doctorado en Ciencias Químicas, adecuado al Reglamento General de Estudios de Posgrado, quien defenderá el proyecto de investigación titulado: "Metabolitos fitotóxicos producidos por *Alternaria tagetica*", ante el siguiente jurado:

Presidente	Dra. Martha Albores Velasco	Facultad de Química, UNAM
Primer vocal	Dr. Leovigildo Quijano	Instituto de Química, UNAM
Segundo vocal	Dra. Rachel Mata Essayag	Facultad de Química, UNAM
Tercer vocal	Dr. Mariano Martínez Vázquez	Instituto de Química, UNAM
Secretario	Dr. Rogelio Pereda Miranda	Facultad de Química, UNAM
Primer suplente	Dra. Yolanda Ríos	Centro de Investigaciones Químicas, UAEM
Segundo suplente	Dr. Carlos Cerda	CINVESTAV

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D. F., 8 de junio, 2000

DRA. NORAH BARBA BEHRENS.

Coordinadora del Programa de Maestría
y Doctorado en Ciencias Químicas

c.c.p.: Integrantes del Jurado
Departamento de Control Escolar
Interesado
Expediente

Dra. Noráh Barba Behrens.
Facultad de Química
Tel./Fax 5 50 91 96

A mis tres grandes amores:

Miguel,

Miguel Angel

y Alam Noel

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias a la invaluable ayuda de un gran ser humano:
mi tía Victoria

A mis hermanos y hermanas que en todo momento me brindaron su cariño y apoyo
durante la realización de esta tesis.

y a mi tía Rosario, cuya ayuda durante este último año fue esencial para la finalización de
este trabajo.

A todos y cada uno de mis compañeros y amigos del laboratorio L-1 del Instituto de
Química de la UNAM y de la Unidad de Biotecnología del CICY, por su ayuda y
amistad.

A los miembros de mi Comité Tutoral y del Jurado, por sus valiosos comentarios y
aportaciones en la integración de este trabajo.

A mis asesores, de quienes en el futuro intentaré ser su reflejo

Alumno: María Marcela Gamboa Angulo
Tesis Doctoral: "Metabolitos Fitotóxicos Producidos por *Alternaria tagetica*"
No. Cuenta: 96813094 No. Cuenta: 5961098 Plan: 582

RESUMEN

El hongo *Alternaria tagetica* Shome and Mustafee ha sido identificado como el agente causal del tizón temprano en plantas de cempazúchitl (*Tagetes erecta* L.). La enfermedad se caracteriza por la presencia de manchas necróticas en tallos, hojas y flores que pueden causar la muerte de la planta.

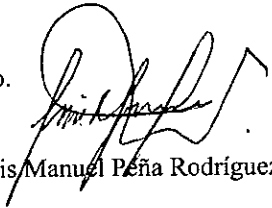
Al evaluar con el bioensayo de gota los filtrados de cultivo de *Alternaria tagetica* mantenidos en medio CET (ácido casamino enriquecido con infusión de hojas de cempazúchitl) bajo condiciones estacionarias, este presentó una fuerte actividad fitotóxica.

El fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico crudo obtenido por extracción de los filtrados de cultivo del hongo, resultó en la obtención de trece metabolitos en forma pura. Los metabolitos causantes de necrosis en las hojas de cempazúchitl fueron identificados como zinniol (15), éter metílico de 8-zinniol (22), acetato de 8-zinniol (23), tagetolona (41), tagetenolona (42), y tyrosol (43).

El resto de los metabolitos, todos ellos sin actividad fitotóxica, identificados como ácido *p*-hidroxibenzoico (17), *bis*-7-O-7"-8-O-8"-zinniol (20), *bis*-7-O-8"-8-O-7"-zinniol (21), acetato de 7-zinniol (24), éter (2-fenil)-etilico de 8-zinniol (25), 5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálico (26) y 6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftálico (27). Una revisión de la literatura permitió establecer que las estructuras de los metabolitos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 41 y 42, todos ellos estructuralmente relacionados con el zinniol, corresponden a nuevos productos naturales.

La estructura propuesta para los nuevos metabolitos 20, 21 y 22 fue confirmada mediante su preparación sintética en el laboratorio, utilizando zinniol como materia prima. Las modificaciones químicas de zinniol permitieron la obtención de una serie de derivados, los cuales fueron empleados en estudios de correlación estructura-actividad.

Vo. Bo.


Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez
Tutor

ABSTRACT

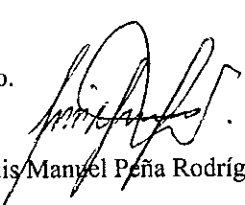
The fungus *Alternaria tagetica* Shome and Mustafee has been identified as the causal agent of early bright in marigold (*Tagetes erecta* L.) plants. The disease is characterized by the dark-brown necrotic spots on stems, leaves and flowers, which can coalesce and eventually led to plant death.

Leaf drop assay evaluation of *Alternaria tagetica* cultures, grown in CET medium under still conditions, showed a strong phytotoxic activity in the aqueous filtrate. Bioassay-guided fractionation of the organic crude extract obtained by extraction of the aqueous fungal filtrate resulted in the purification of thirteen metabolites. The metabolites responsible for causing necrotic spots on marigold leaves were identified as zinniol (15) and its natural derivatives: methyl-8-zinniol ether (22), 8-zinniol acetate (23), tagetolone (41), tagetenolone (42) and tyrosol (43).

The rest of the metabolites, all of them non-phytotoxic, were identified as *p*-hydroxybenzoic acid (17), *bis*-7-O-7''-8-O-8''-zinniol (20), *bis*-7-O-8''-8-O-7''-zinniol (21), 7-zinniol acetate (24), 2-(phenyl)-ethyl 8-zinniol ether (25), 5-(3',3'-dimethylallyloxy)-7-methoxy-6-methyl-phthalide (26) and 6-(3',3'-dimethylallyloxy)-4-methoxy-5-methyl-phthalide (27). After reviewing the literature it was established that the structures for metabolites 20, 21, 22, 23, 24, 25, 41 and 42, all structurally-related to zinniol, corresponded to new natural products.

The proposed structures for metabolites 20, 21 and 22 were confirmed by preparation in the laboratory, using zinniol as starting material. The chemical modifications of zinniol resulted in the obtention of a number of derivatives which were used in structure-activity correlation studies.

Vo. Bo.


Dr. Luis Mangel Peña Rodríguez
Tutor

CONTENIDO	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	14
OBJETIVOS	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
A. Metabolitos de la fracción hexánica	26
B. Metabolitos de la fracción de AcOEt	40
C. Derivados sintéticos de zinniol	43
PARTE EXPERIMENTAL	50
CONCLUSIONES	56
ESPECTROS	77
REFERENCIAS	163
PUBLICACIONES	

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1a. IR del zinniol (15)	77
1b. Espectro de masas del zinniol (15)	77
Espectro 2. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) del zinniol (15)	78
Espectro 3a. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) del zinniol (15)	79
3b. Experimento DEPT del zinniol (15)	79
Espectro 4. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del diacetato zinniol (15a)	80
Espectro 5a. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del diacetato de zinniol (15a)	81
5b. Experimento DEPT del diacetato de zinniol (15a)	81
Espectro 6a. IR de <i>bis</i> -7-O-7''-8-O-8''-zinniol (20)	82
6b. Espectro de masas del <i>bis</i> -7-O-7''-8-O-8''-zinniol (20)	82
Espectro 7. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) del <i>bis</i> -7-O-7''-8-O-8''-zinniol (20)	83
Espectro 8a. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) del <i>bis</i> -7-O-7''-8-O-8''-zinniol (20)	84
8b. Experimento DEPT del <i>bis</i> -7-O-7''-8-O-8''-zinniol (20)	84
Espectro 9. Experimento HMQC del <i>bis</i> -7-O-7''-8-O-8''-zinniol (20)	85
Espectro 10. Experimento HMBC del <i>bis</i> -7-O-7''-8-O-8''-zinniol (20)	86
Espectro 11a. IR del <i>bis</i> -7-O-8''-8-O-7''-zinniol (21)	87
11b. Espectro del masas de <i>bis</i> -7-O-8''-8-O-7''-zinniol (21)	87
Espectro 12. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) del <i>bis</i> -7-O-8''-8-O-7''-zinniol (21)	88
Espectro 13a. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) del <i>bis</i> -7-O-8''-8-O-7''-zinniol (21)	89
13b. Experimento DEPT del <i>bis</i> -7-O-8''-8-O-7''-zinniol (21)	89
Espectro 14. Experimento HMQC del <i>bis</i> -7-O-8''-8-O-7''-zinniol (21)	90
Espectro 15. Experimento HMBC del <i>bis</i> -7-O-8''-8-O-7''-zinniol (21)	91
Espectro 16a. IR del éter metílico de 8-zinniol (22)	92
16b. Espectro de masas del éter metílico de 8-zinniol (22)	92
Espectro 17. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) del éter metílico de 8-zinniol (22)	93
Espectro 18a. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) del éter metílico de 8-zinniol (22)	94
18b. Experimento DEPT del éter metílico de 8-zinniol (22)	94
Espectro 19. Experimento HMQC del éter metílico de 8-zinniol (22)	95
Espectro 20. Experimento HMBC del éter metílico de 8-zinniol (22)	96
Espectro 21a. IR del acetato de 8-zinniol (23)	97
21b. Espectro de masas del acetato de 8-zinniol (23)	97
Espectro 22. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del acetato de 8-zinniol (23)	98
Espectro 23. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) del acetato de 8-zinniol (23)	99
Espectro 24. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) acetato de 8-zinniol (23)	100
Espectro 25. Experimento HMBC del acetato de 8-zinniol (23)	101
Espectro 26a. IR del acetato de 7-zinniol (24)	102
26b. Espectro de masas del acetato de 7-zinniol (24)	102
Espectro 27. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del acetato de 7-zinniol (24)	103
Espectro 28a. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del acetato de 7-zinniol (24)	104
28b. Experimento DEPT del acetato de 7-zinniol (24)	104
Espectro 29. Experimento HMQC del acetato de 7-zinniol (24)	105
Espectro 30a. IR del éter (2-fenil)-etilico de 8-zinniol (25)	106
30b. Espectro de masas del éter (2-fenil)-etilico de 8-zinniol (25)	106
Espectro 31. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) del éter (2-fenil)-etilico de 8-zinniol (25)	107
Espectro 32. ¹ H- ¹ H-COSY del éter (2-fenil)-etilico de 8-zinniol (25)	108
Espectro 33a. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) del éter (2-fenil)-etilico de 8-zinniol (25)	109
33b. Experimento DEPT del éter (2-fenil)-etilico de 8-zinniol (25)	109
Espectro 34. Experimento HMQC del éter (2-fenil)-etilico de 8-zinniol (25)	110

Espectro 35. Experimento HMBC del éter (2-fenil)-etilico de 8-zinniol (25)	111
Espectro 36a. IR del 5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálico (26)	112
36b. Espectro de masas del 5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálico (26)	112
Espectro 37. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de 5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálico (26)	113
Espectro 38a. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del 5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálico (26)	114
38b. Experimento DEPT del 5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálico (26)	114
Espectro 39. Experimento HMQC del 5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálico (26)	115
Espectro 40a. IR del 6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftálico (27)	116
40b. Espectro de masas del 6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftálico (27)	116
Espectro 41. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del 6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftálico (27)	117
Espectro 42. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del 6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftálico (27)	118
Espectro 43. IR de tagetolona (41)	119
43b. Espectro de masas de tagetolona (41)	119
Espectro 44. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de tagetolona (41)	120
Espectro 45a. IR del diacetato de tagetolona(41a)	121
45b. Cromatograma de gases-masas del diacetato de tagetolona(41a)	121
Espectro 46. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) del diacetato de tagetolona (41a)	122
Espectro 47. ¹ H ¹ H-COSY del diacetato de tagetolona (41a)	123
Espectro 48a. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) del diacetato de tagetolona (41a)	124
48b. Experimento DEPT del diacetato de tagetolona (41a)	124
Espectro 49. Experimento HMQC del diacetato de tagetolona (41a)	125
Espectro 50. Experimento HMBC del diacetato de tagetolona (41a)	126
Espectro 51a. IR de tagetenolona (42)	127
51b. Espectro de masas de tagetenolona (42)	127
Espectro 52. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de tagetenolona (42)	128
Espectro 53. ¹ H ¹ H-COSY de tagetenolona (42)	129
Espectro 54. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) y experimento APT de tagetenolona (42)	130
Espectro 55. Experimento HMQC de tagetenolona (42)	131
Espectro 56. Experimento HMBC de tagetenolona (42)	132
Espectro 57a. IR de tyrosol (43)	133
57b. Espectro de masas de tyrosol (43)	133
Espectro 58. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de tyrosol (43)	134
Espectro 59a. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de tyrosol (43)	135
59b. Experimento DEPT de tyrosol (43)	135
Espectro 60. Experimento HMQC de tyrosol (43)	136
Espectro 61a. IR del diacetato de tyrosol (43a)	137
61b. Espectro de masas del diacetato de tyrosol (43a)	137
Espectro 62. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del diacetato de tyrosol (43a)	138
Espectro 63a. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del diacetato de tyrosol (43a)	139
63b. Experimento DEPT del diacetato de tyrosol (43a)	139
Espectro 64a. IR del ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (17)	140
64b. Espectro de masas del ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (17)	140
Espectro 65a. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (17)	141
65b. Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (17)	141
Espectro 66a. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del acetato del ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (17a)	142
66b. Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del acetato del ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (17a)	142
Espectro 67a. IR del anhídrido de zinniol (44)	143
67b. Espectro de masas del anhídrido de zinniol (44)	143
Espectro 68. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del anhídrido de zinniol (44)	144
Espectro 69a. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del anhídrido de zinniol (44)	145
69b. Experimento DEPT del anhídrido de zinniol (44)	145
Espectro 70a. IR del 7-éster metílico del 8-éter metílico de zinniol (45)	146
70b. Cromatograma de gases-masas del 7-éster metílico del 8-éter metílico de zinniol (45)	146
Espectro 71. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del 7-éster metílico del 8-éter metílico de zinniol (45)	147
Espectro 72a. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del 7-éster metílico del 8-éter metílico de zinniol (45)	148
72b. Experimento DEPT del 7-éster metílico del 8-éter metílico de zinniol (45)	148

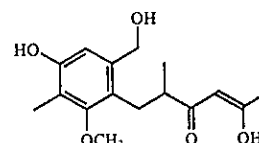
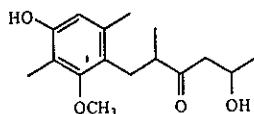
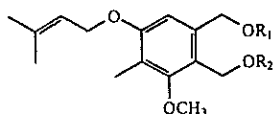
Espectro 73. HMQC del 7-éster metílico del 8-éter metílico de zinniol (45)	149
Espectro 74a. IR del 7-ácido del 8-éter metílico de zinniol (46)	150
74b. Cromatograma de gases-masas del 7-ácido del 8-éter metílico de zinniol (46)	150
Espectro 75. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del 7-ácido del 8-éter metílico de zinniol (46)	151
Espectro 76. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) del 7-ácido del 8-éter metílico de zinniol (46)	152
Espectro 77a. IR del 8-éster del 7-éter metílico de zinniol (47)	153
77b. Cromatograma de gases-masas del 8-éster del 7-éter metílico de zinniol (47)	153
Espectro 78. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del 8-éster del 7-éter metílico de zinniol (47)	154
Espectro 79a. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) del 8-éster del 7-éter metílico de zinniol (47)	155
79b. Experimento DEPT del 8-éster del 7-éter metílico de zinniol (47)	155
Espectro 80. Experimento HMQC del 8-éster del 7-éter metílico de zinniol (47)	156
Espectro 81a. IR del 8-ácido del 7-éter metílico de zinniol (48)	157
81b. Cromatograma de gases-masas del 8-ácido del 7-éter metílico de zinniol (48)	157
Espectro 82. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del 8-ácido del 7-éter metílico de zinniol (48)	158
Espectro 83. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) del 8-ácido del 7-éter metílico de zinniol (48)	159
Espectro 84a. IR del éter metílico de 7-zinniol (49)	160
84b. Cromatograma de gases del éter metílico de 7-zinniol (49)	160
Espectro 85. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del éter metílico de 7-zinniol (49)	161
Espectro 86a. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) del éter metílico de 7-zinniol (49)	162
86b. Experimento DEPT del éter metílico de 7-zinniol (49)	162

RESUMEN

El hongo *Alternaria tagetica* Shome and Mustafee ha sido identificado como el agente causal del tizón temprano en plantas de cempazúchitl (*Tagetes erecta* L.). La enfermedad se caracteriza por la presencia de manchas necróticas en tallos, hojas y flores que pueden causar la muerte de la planta.

Al evaluar con el bioensayo de gota los filtrados de cultivo de *Alternaria tagetica* mantenidos en medio CET (ácido casamino enriquecido con infusión de hojas de cempazúchitl) bajo condiciones estacionarias, este presentó una fuerte actividad fitotóxica.

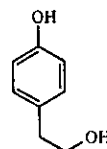
El fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico crudo obtenido por extracción de los filtrados de cultivo del hongo, resultó en la obtención de trece metabolitos en forma pura. Los metabolitos causantes de necrosis en las hojas de cempazúchitl fueron identificados como zinniol (15), éter metílico de 8-zinniol (22), acetato de 8-zinniol (23), tagetolona (41), tagetenolona (42), y tyrosol (43).



	R ₁	R ₂
15	H	H
22	H	CH ₃
23	H	Ac
24	Ac	H
25	H	-CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅

41

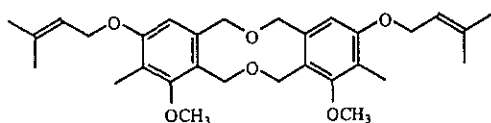
42



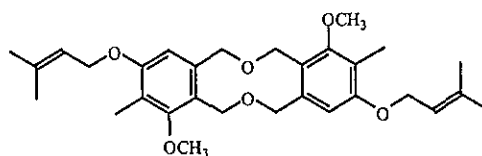
43

El resto de los metabolitos, todos ellos sin actividad fitotóxica, identificados como ácido *p*-hidroxibenzoico (17), *bis*-7-O-7''-8-O-8''-zinniol (20), *bis*-7-O-8''-8-O-7''-zinniol (21), acetato de 7-zinniol (24), éter (2-fenil)-etílico de 8-zinniol (25), 5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálico (26) y 6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftálico (27). Una revisión de la literatura permitió establecer que las estructuras de los metabolitos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 41 y 42, todos ellos estructuralmente relacionados con el zinniol, corresponden a nuevos productos naturales.

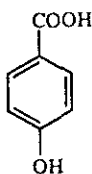
La estructura propuesta para los nuevos metabolitos 20, 21 y 22 fue confirmada mediante su preparación sintética en el laboratorio, utilizando zinniol como materia prima. Las modificaciones químicas de zinniol permitieron la obtención de una serie de derivados, los cuales fueron empleados en estudios de correlación estructura-actividad.



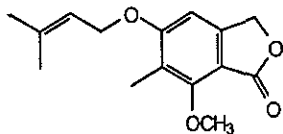
20



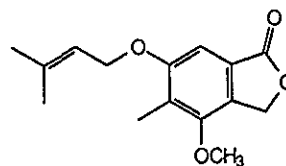
21



17



26



27

ABSTRACT

The fungus *Alternaria tagetica* Shome and Mustafee has been identified as the causal agent of early blight in marigold (*Tagetes erecta* L.) plants. The disease is characterized by the dark-brown necrotic spots on stems, leaves and flowers, which can coalesce and eventually led to plant death.

Leaf drop assay evaluation of *Alternaria tagetica* cultures, grown in CET medium under still conditions, showed a strong phytotoxic activity in the aqueous filtrate. Bioassay-guided fractionation of the organic crude extract obtained by extraction of the aqueous fungal filtrate resulted in the purification of thirteen metabolites. The metabolites responsible for causing necrotic spots on marigold leaves were identified as zinniol (15) and its natural derivatives: methyl-8-zinniol ether (22), 8-zinniol acetate (23), tagetolone (41), tagetenolone (42) and tyrosol (43).

The rest of the metabolites, all of them non-phytotoxic, were identified as *p*-hydroxybenzoic acid (17), *bis*-7-O-7''-8-O-8''-zinniol (20), *bis*-7-O-8''-8-O-7''-zinniol (21), 7-zinniol acetate (24), 2-(phenyl)-ethyl 8-zinniol ether (25), 5-(3',3'-dimethylallyloxy)-7-methoxy-6-methyl-phthalide (26) and 6-(3',3'-dimethylallyloxy)-4-methoxy-5-methyl-phthalide (27). After reviewing the literature it was established that the structures for metabolites 20, 21, 22, 23, 24, 25, 41 and 42, all structurally-related to zinniol, corresponded to new natural products.

The proposed structures for metabolites 20, 21 and 22 were confirmed by preparation in the laboratory, using zinniol as starting material. The chemical modifications of zinniol resulted in the obtention of a number of derivatives which were used in structure-activity correlation studies.

INTRODUCCION

El descubrimiento de las toxinas producidas por las bacterias *Clostridium tetani*, *C. botulinum* y *Corynebacterium diphtheridae* enfatizó la importancia de las sustancias elaboradas por un patógeno y su relación con el desarrollo de las enfermedades infecciosas.¹⁻³

La presencia de toxinas involucradas en las enfermedades vegetales causadas por microorganismos patogénicos también fue reconocida desde el siglo XIX.⁴ Sin embargo, el interés por el estudio de la acción de toxinas en plantas se inició a mediados del siglo XX, como consecuencia de las destrucciones masivas en los Estados Unidos de cultivos de avena y maíz causadas por infecciones de *Cochliobolus* (antes *Helminthosporium*) *victoriae* Meehan y Murphy y *C. maydis* Nisikado y Miyake, respectivamente; así como las epidemias en manzana y pera causadas por *Alternaria mali* Roberts y *A. kikuchiana* en Japón. En cada caso, los efectos destructivos de los patógenos fueron atribuidos a la acción de sus toxinas, demostrándose la existencia de una relación directa entre la producción de estos metabolitos por el microorganismo y su capacidad para infectar la planta;⁴⁻⁷ Estas epidemias proporcionaron entonces la justificación económica necesaria para que se iniciaran los primeros trabajos de investigación en toxinas y su papel en las enfermedades vegetales.

En patología vegetal, las sustancias descritas como toxinas son también denominadas fitotoxinas y éstas se definen generalmente como metabolitos de origen microbiano, los cuales son liberados como un factor de reconocimiento durante la germinación de las

esporas del patógeno en el sitio de infección. Las fitotoxinas se describen también como metabolitos secundarios de bajo peso molecular (< 2000), que pueden perturbar el crecimiento normal de plantas superiores.^{6,8}

Como resultado de los estudios realizados en el campo de las fitotoxinas, éstas han sido clasificadas en dos grupos con base a su selectividad y a su modo de acción: fitotoxinas hospedero selectivas (hospedero específicas, HSTs) y fitotoxinas hospedero no selectivas (hospedero no específicas, no-HSTs).⁵⁻⁸

Las HSTs se reconocen por ser tóxicas únicamente a los hospederos del patógeno que las produce y por inducir los síntomas de la infección natural aún en ausencia del microorganismo; las HSTs se consideran determinantes primarios de patogenicidad, es decir, son requeridas por el patógeno para colonizar la planta y causar daño. Por otra parte, las no-HSTs afectan a un rango diferente de plantas causando una variedad de síntomas; estos metabolitos no son esenciales para iniciar la infección pero contribuyen a la virulencia y se reconocen como determinantes secundarios de patogenicidad.⁶⁻⁸

Los primeros estudios realizados con fitotoxinas (tanto selectivas como no selectivas) por los investigadores, informan el empleo de filtrados de cultivo o fracciones semipurificadas. Posteriormente, como parte de un enfoque multidisciplinario, se reconoce la necesidad de aislar y caracterizar la estructura química de estos metabolitos y la importancia de su síntesis química para la confirmación de su estructura así como la obtención de derivados útiles como herramientas en estudios de estructura-actividad.

Debido al importante papel que juegan en el proceso de infección, las fitotoxinas hospedero selectivas han recibido la mayor atención.^{6, 8-9} En la actualidad se reconocen por lo menos diecisiete combinaciones hospedero-parásito de HSTs (Tabla 1). Sin embargo, el

conocimiento actual sobre fitotoxinas y su papel en el desarrollo de enfermedades se ha originado en su mayor parte de estudios realizados con patógenos saprofitos pertenecientes a hongos de los géneros *Alternaria* y *Cochliobolus* (*Bipolaris* en su etapa imperfecta).^{8, 10} La cepa patogénica de *Alternaria alternata* se ha desarrollado como un parásito altamente especializado con distintos patotipos a través de la elaboración de diferentes HSTs.

Las HSTs aisladas y caracterizadas (Tabla 1) presentan una amplia variedad de estructuras químicas (Figura 1) y, como la mayoría de los metabolitos secundarios, algunas existen como grupos de productos naturales donde cada miembro se produce en diferente cantidad.^{6, 8, 11-14}

Tabla 1. Fitotoxinas hospedero-selectivas (HSTs) caracterizadas a la fecha.

PATOGENO	HOSPEDERO	FITOTOXINA
<i>Alternaria alternata</i> p. Fresa	Fresa	AF I (1a), II (1b) y III (1c)
<i>A. alternata</i> f. sp. p. Lycopersici	Tomate	AAL T _A (2a-b) y T _B (2c-d)
<i>A. alternata</i>	Girasol	AS-1 (3)
<i>A. alternata</i>	<i>Centaurea maculosa</i>	Maculosina (4)
<i>A. citri</i> p. Limón	Limón	ACRL (5)
<i>A. citri</i> p. Tangerina	Tangerina	ACT I (6a) y II (6b) ACTG A (7a) y B (7b)
<i>A. kikuchiana</i>	Pera	AK I (8a) y II (8b)
<i>A. longipes</i>	Tabaco	AT
<i>A. mali</i>	Manzana	AM I (9a), II (9b) y III (9c)
<i>A. tenuissima</i>	Chicharo	ATC*
<i>Bipolaris sacchari</i>	Caña de azúcar	HS A, B y C
<i>Cochliobolus carbonum</i> r. 1	Maíz	HC I, II y III
<i>C. heterostrophus</i> r. T	Maíz	HM 1, 2, 3 y 1'
<i>C. victoriae</i>	Avena	HV
<i>Corynespora cassicola</i>	Tomate	CC
<i>Phyllosticta maydis</i>	Maíz	PM A, B, C y D
<i>Periconia circinata</i>	Sorgo	Peritoxina

*La estructura de la toxina ATC no es conocida.

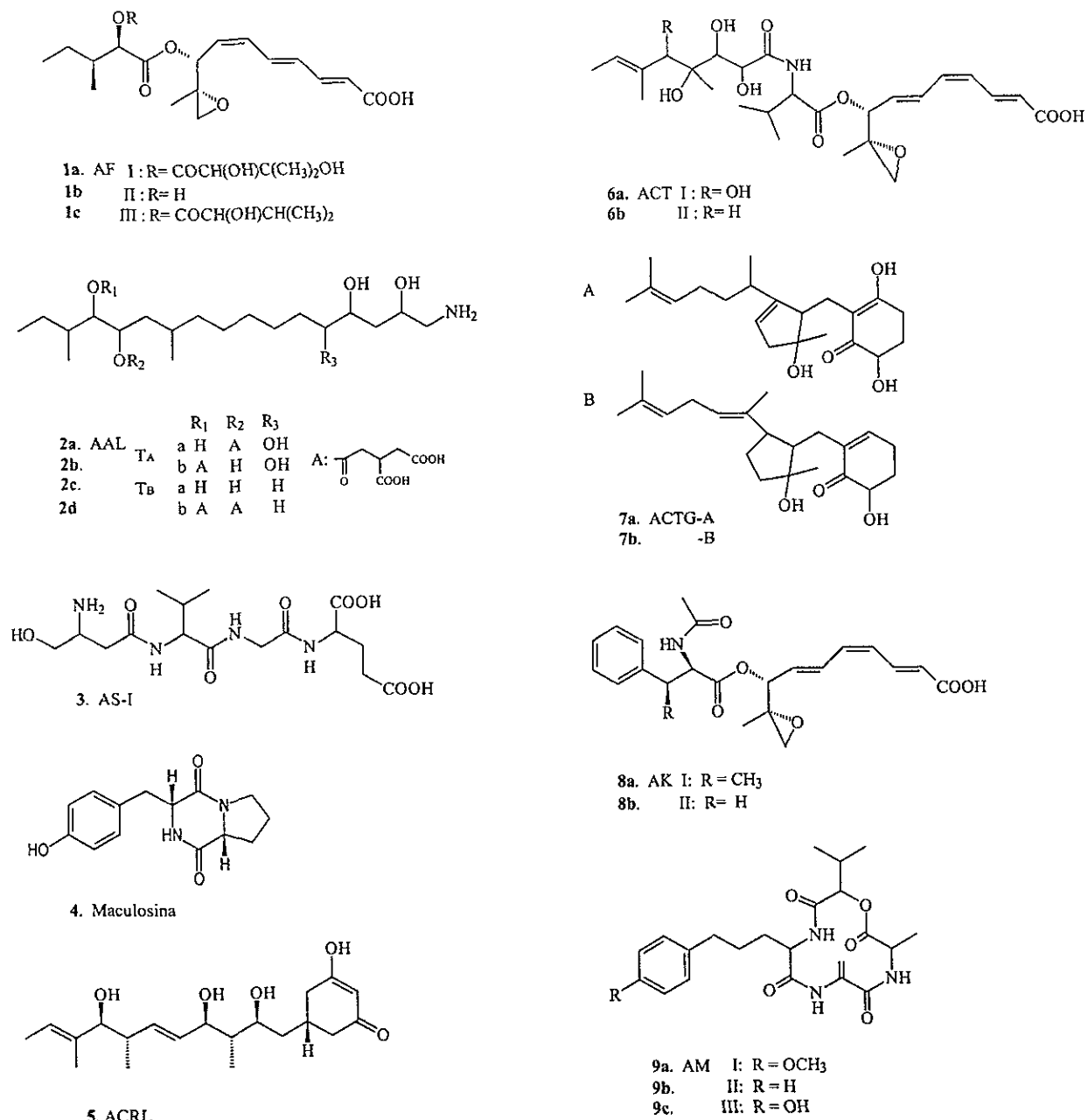


Figura 1. Estructuras de las HSTs producidas por el género *Alternaria*.

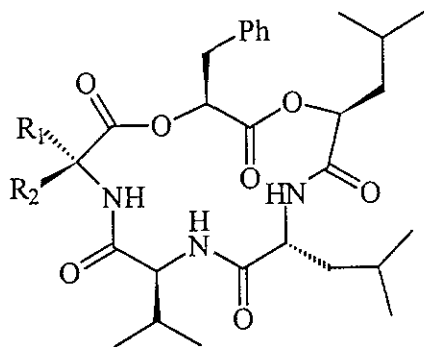
El primer grupo de HSTs cuyas estructuras fueron completamente elucidadas y comprobadas por síntesis química fue el grupo de las toxinas AM (I, II y III, **9a-c** respectivamente), identificadas como depsipéptidos cíclicos, constituidos de tres unidades de aminoácido y una de hidroxiaácido.¹⁵⁻¹⁷

Las toxinas AK I y II (**8a** y **b**) fueron aisladas a partir de caldos de cultivo de *A. kikuchiana*, hongo causante de la mancha negra en pera. Las estructuras de estas fitotoxinas fueron establecidas por métodos espectroscópicos, por difracción de rayos X y mediante su síntesis total. Los estudios demuestran que la fitotoxina AK I (**8a**) afecta cultivares de pera a una concentración menor de 10^{-9} M, mientras que la toxina AK II (**8b**), aun cuando mantiene su selectividad, muestra una actividad quince veces menor.^{7, 11, 18-19}

Es interesante mencionar que las toxinas AK (**8**), AF (**1**) y ACT (**6**), producidas por *A. kikuchiana*, *A. alternata* patotipo *fresa* y *A. citri* p. *tangerina*, respectivamente, aun cuando difieren en su toxicidad selectiva, todas presentan en su estructura el ácido 9,10-epoxi-*p*-metil decatrienoico como unidad química en común. Es interesante mencionar que la isomería de los dobles enlaces en las toxinas AF (**1**) es *2E*, *4E*, *6Z*, mientras que en las toxinas ACT y AK (**2** y **5**) la isomería es *2E*, *4Z*, *6E*; sin embargo, el rango de hospederos para los tres grupos es diferente.^{11, 20}

El fomálico (**10a**), un depsipéptido cíclico de 15 miembros formado de valina, leucina, dehidrotreonina y ácido 2-hidroxiisovalérico, es una fitotoxina altamente selectiva producida por *Phoma lingam*, agente causal de la mancha negra en plantas de canola (*Brassica napus* y *B. rapa*).²¹ La estructura y configuración de este metabolito ha sido confirmada por síntesis química.²² Al evaluar la fitotoxicidad hospedero-selectiva del fomálico y sus derivados (**10b-10d**), se estableció que la presencia e isomería del doble enlace es esencial para la selectividad. Mientras que el fomálico causa necrosis, clorosis y

lesiones rojas en hojas de canola, y no afecta la hojas de mostaza blanca (*Sinapis alba*) o café (*B. juncea*), su isómero Z (**10b**) no afecta a ninguna de estas plantas, en tanto que los dihidrofomálidos (*R* y *S*, **10c** y **d**, respectivamente) únicamente causan clorosis en las hojas de mostaza café.²³⁻²⁴



- 10a** $R_1, R_2 = (E)\text{-CH}_3\text{CH=}$
b $R_1, R_2 = (Z)\text{-CH}_3\text{CH=}$
c $R_1 = \text{CH}_3\text{CH}_2; R_2 = \text{H}$
d $R_1 = \text{H}; R_2 = \text{CH}_3\text{CH}_2$

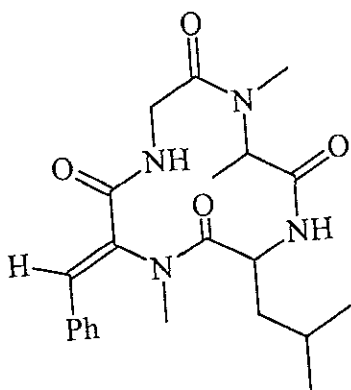
Hasta ahora se han informado mas de 200 fitotoxinas hospedero no selectivas. Al igual que las HSTs, las no-HSTs pertenecen a diversas familias químicas originadas por diferentes vías metabólicas y en este grupo se incluyen policétidos, péptidos cíclicos, terpenos, sacáridos y metabolitos de biogénesis incierta.⁸ En la tabla 2 se describen algunos ejemplos de no-HSTs producidas por hongos del género *Alternaria*.

Tabla 2. Fitotoxinas hospedero no selectivas (no-HSTs) informadas del género *Alternaria* durante 1990-1999.

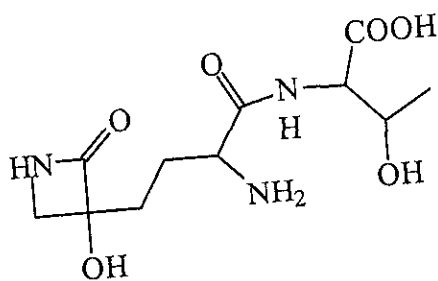
PATOGENO	HOSPEDERO	FITOTOXINA	REFERENCIA
<i>A. brassicicola</i>	<i>Brassica napus</i> L.	Brassicicena A-F	25
<i>A. cichorii</i>	Russian knapweed	Cichorina y zinnol	26
	Alfalfa (<i>Medicago hispida</i> Gaerth)	Cichorina, zinnol y zinndiol	26
<i>A. chrysanthemi</i>	<i>Chrysanthemum maximum</i>	Bis-radicinin	27
<i>A. porri</i>	Cebolla	Porritoxina	28
		Porritoxinol	29
<i>A. solani</i>	Papa y tomate	Homozinnol	30
		Solanopirona D	31
<i>A. zimmiae</i>	<i>Xanthium occidentale</i>	Brefeldina A y α , β -dehidro-curvularina	32

El conocimiento de los procesos involucrados durante la interacción planta-patógeno ha aumentado con el empleo de las fitotoxinas, llevando a un mejor entendimiento de las bases moleculares de resistencia y susceptibilidad a enfermedades en las plantas. Las fitotoxinas y sus derivados han sido herramientas útiles en fisiología y bioquímica vegetal para explicar los mecanismos de acción en los receptores de membranas en las bombas de iones, la fotosíntesis, la transpiración, la apertura estomatal, los canales de agua y la traslocación de nutrientes.³³⁻³⁴ Como ejemplo, se pueden mencionar los estudios realizados con tentoxina (11) un ciclotetrapéptido producido por *A. tenuis* Nees, que ocasiona clorosis en plántulas de diferentes especies, en los que se ha concluido que el primer sitio de acción de este metabolito es el CF₁ de la ATPasa del cloroplasto. Lo anterior ha permitido la utilización de esta fitotoxina en estudios bioquímicos y funcionales del cloroplasto.³⁵

Una de las principales aplicaciones de las fitotoxinas ha sido su utilización como marcadores en la rápida selección *in vitro* de genotipos resistentes a enfermedades.³⁶⁻⁴⁰ El primer sistema de selección *in vitro* estudiado fue tabaco, regenerándose plantas resistentes al patógeno a partir de protoplastos seleccionados usando metil sulfoxamina (MSO), un análogo de la tabtoxina (12).³⁶



11

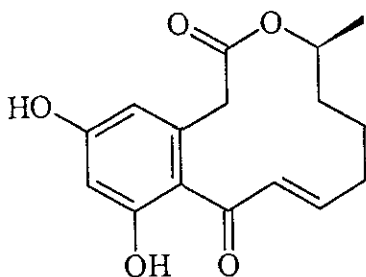


12

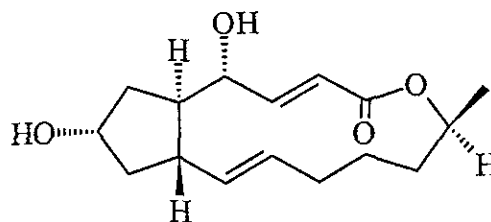
Las estrategias de control y fitomejoramiento desarrolladas recientemente por ingenieros genéticos y biólogos moleculares incluyen el uso de las HSTs para la inducción y detección de genes de resistencia a las enfermedades en plantas. Las plantas pueden ser resistentes a un patógeno en particular, si poseen o producen una o más enzimas específicas que metabolizan o detoxifican las HSTs producidas por el patógeno. Una vez identificados los genes responsables para la producción de las enzimas detoxificantes de HSTs, éstos podrían ser clonados y transferidos a plantas susceptibles.⁴¹⁻⁴³

La producción de metabolitos fitotóxicos en hongos patogénicos de hierbas nocivas para la agricultura también ha sido investigada.⁴⁴⁻⁴⁹ La importancia de este enfoque reside en el posible uso de las fitotoxinas obtenidas como nuevos bioherbicidas, biodegradables y con una mayor selectividad. Una de las plantas silvestres de mayor agresividad en las áreas de cultivo y pastizales de Norteamérica es *Centaurea maculosa*, reconocida como hospedero de un patotipo particular de *A. alternata*. Estudios realizados sobre este patógeno permitieron identificar a la maculosina (4) como el metabolito responsable de la necrosis y clorosis que el fitopatógeno ocasiona en las hojas de *C. maculosa*, y que a la postre ocasiona la muerte de la planta.¹⁴ Recientemente, se ha informado la preparación sintética de una serie de derivados sintéticos de maculosina, los cuales han mostrado resultados

promisarios como potenciales bioherbicidas en el control selectivo de *C. maculosa*.⁵⁰⁻⁵¹ Por otra parte, los conidios de *A. zinniae* han sido utilizados como un microherbicida contra *Xanthium occidentale* Bertol. y *X. italicum*, ambas consideradas malezas dañinas en cultivos australianos. Actualmente, se han identificado a la α,β -dehydrocurvularina (**13**) y a la brefeldina A (**14**) como dos de los metabolitos fitotóxicos producidos por cultivos de *A. zinniae*.³²



13



14

El éxito en una investigación sobre productos naturales bioactivos es altamente dependiente de la utilización de un bioensayo adecuado. El bioensayo se requiere para detectar inicialmente una actividad biológica en particular (e.g. fitotoxicidad) y para dirigir el proceso de purificación, así como para investigar el mecanismo de acción de los productos obtenidos. El bioensayo debe ser considerado en términos de su sensibilidad, su capacidad para cuantificar, la simplicidad para realizarlo y su reproducibilidad. En un principio, para la detección de las fitotoxinas se pueden utilizar bioensayos simples tales como el de gota, el de inmersión, el de fuga de electrolitos o el de inhibición de la germinación. Una vez conocida la acción de la fitotoxina a nivel celular, nuevos y más específicos bioensayos se pueden desarrollar; entre estos se encuentran el de muerte celular de protoplastos, basado en la viabilidad de las células hospederas después de adicionar la toxina, o los de inhibición de reacciones enzimáticas particulares.⁵²⁻⁵⁵ En el bioensayo de gota la muestra se deposita

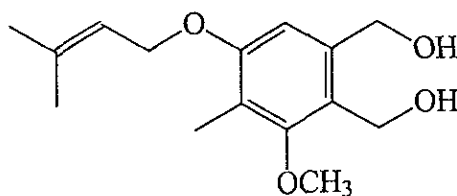
en la superficie foliar en forma acuosa (o adsorbida en gel de sílice y mezclada con agua), la toxicidad se manifiesta por la necrosis y/o clorosis observada en la zona de aplicación. En el bioensayo de inmersión, la parte basal de la hoja (o ramas) de la planta son sumergidas en la muestra acuosa y en este caso, la fitotoxicidad se detecta en forma de un marchitamiento y/o una necrosis general. Finalmente, el bioensayo de fuga de electrolitos está basado en el hecho de que algunas fitotoxinas afectan la permeabilidad de la membrana celular con la subsecuente pérdida de los electrólitos del citoplasma; esta fuga de electrolitos puede ser detectada por cambios en la conductividad del sobrenadante.⁵⁶

Una especie que no ha recibido suficiente atención en cuanto a su producción de fitotoxinas es *Alternaria tagetica* Shome and Mustafee. Este hongo ha sido identificado como el patógeno responsable del marchitamiento de tallo, hojas y flores de *Tagetes erecta* L. (xpuhuk, cempazúchitl o flor de muerto), un importante cultivo en México y E.U.A. para la producción de colorantes extraídos de las flores, utilizados en la industria alimenticia. En México se han informado pérdidas de hasta un 100% en la producción de flores como resultado de la infección de plantas de cempazúchitl por *A. tagetica*. Actualmente el control de esta infección se realiza con fungicidas, lo que incrementa los costos de producción del cultivo.⁵⁷⁻⁵⁹

La importancia económica de *T. erecta*, aunada a la fitopatogenicidad de *A. tagetica*, justifica la búsqueda de alternativas para el control de esta infección. La identificación de las fitotoxinas producidas por *A. tagetica* permitirá, además de evaluar su papel en el desarrollo de la enfermedad, su empleo como herramientas en la rápida selección de variantes genéticas de *T. erecta* resistentes al patógeno. Finalmente, la identificación de los metabolitos, tanto activos como no activos, producidos por *A. tagetica* contribuirá a enriquecer este campo de estudio y la quimiotaxonomía del género.

ANTECEDENTES

A la fecha el conocimiento sobre los metabolitos fitotóxicos producidos por *A. tagetica* es limitado. En un primer trabajo se describe la detección de actividad fitotóxica tanto en la fracción acuosa como en la orgánica, resultantes de la extracción del filtrado acuoso con cloroformo.⁶⁰ El principal componente fitotóxico en el extracto orgánico crudo se identificó como zinniol (15), una no-HSTs aislada de *A. zinniae*⁶¹ y comúnmente producida por patógenos del género *Alternaria*.⁶² En un segundo estudio se reporta también al zinniol como el metabolito mayoritario en cultivos de *A. tagetica*.⁶³ Sin embargo, la purificación biodirigida e identificación de la estructura química de los metabolitos responsables de la actividad fitotóxica detectada en cultivos de *A. tagetica*, es un estudio que no se ha realizado hasta ahora.

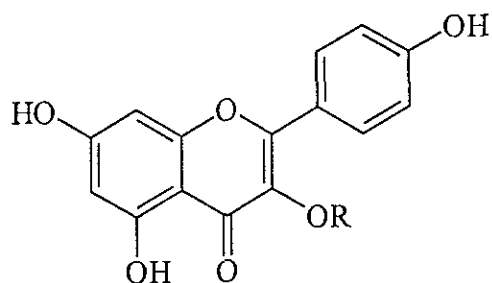


15

El jugo comercial V-8 es uno de los sustratos mas comúnmente utilizados para el cultivo de diferentes especies de hongos del género *Alternaria*, dada su disponibilidad y bajo costo, para los primeros cultivos de *A. tagetica* se utilizó una mezcla de jugo V-8 con infusión de *T. erecta* L. como medio de crecimiento (medio CZ8).^{5, 64} El filtrado acuoso y el

correspondiente extracto orgánico crudo de estos cultivos demostraron poseer actividad fitotóxica en el bioensayo de gota. Sin embargo, durante el proceso de purificación del extracto orgánico, la actividad necrótica desaparece sugiriendo un efecto de sinergismo entre los componentes, o la posibilidad de que los productos responsables de la actividad posean estructuras lábiles que se transforman durante el proceso de purificación, perdiendo su capacidad de inducir un daño fitotóxico.^{21, 65}

Sin embargo, al continuar con la purificación del extracto orgánico crudo se obtuvieron tres fracciones principales identificadas como una mezcla de ácidos grasos (ácido hexadecanoico y ácido Z-9-octadecenoico), una mezcla de esteroides (estigmasterol, γ -sitosterol y ergosterol) y el α -L-ramnósido de 3-O-kaempferilo (**16**), un flavonol conocido como afzelina. Mientras que las dos primeras fracciones se detectaron en el extracto del medio CZ8 sin inocular, sugiriendo su origen en la infusión de *T. erecta*, la presencia de **16** no fue detectada ni en el extracto del medio CZ8 sin inocular, ni en los extractos del jugo V-8 y de la infusión de *T. erecta* por separado. Dado que la producción de metabolitos del tipo flavonoide no es común en el metabolismo de hongos,⁶⁶⁻⁶⁷ hubo necesidad de establecer el origen real de afzelina. Para esto, los extractos orgánicos crudos del filtrado de cultivo, del medio CZ8 sin inocular, del jugo V8 y de la infusión de *T. erecta* fueron hidrolizados y sus productos de hidrólisis comparados por CCD y CLAR con un estándar de kaempferol. La aglicona de **16** (**16a**) fue detectado en los extractos orgánicos correspondientes al medio CZ8 sin inocular y a la infusión de *T. erecta*, pero no en el correspondiente jugo V-8. Estos resultados confirmaron el origen vegetal de afzelina y permitieron identificarlo como un producto de biotransformación del hongo.⁶⁸



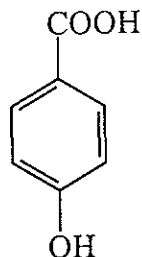
16 R= Ramnp

16a R= H

En general, los hongos pertenecientes al género *Alternaria* se cultivan en medios líquidos, en condiciones estacionarias. De esta forma se ha logrado que al cultivar un hongo en condiciones de laboratorio, éste produzca los metabolitos responsables de los síntomas de la enfermedad observados en el campo. Por otra parte, se ha informado que los filtrados de cultivo de diferentes especies de *Alternaria*, mantenidos en condiciones de agitación, no reproducen la patogenicidad del hongo.⁶⁹ Sin embargo, en uno de los trabajos reportados sobre *A. tagetica* se describe el cultivo del hongo en medio de Czapek Dox bajo condiciones de agitación; aun cuando el tiempo de incubación fue largo (21 días) el producto mayoritario se identificó como zinniol.⁶³

Con base en lo anterior, y con el objetivo de reducir el tiempo de incubación del hongo, se decidió explorar el comportamiento de *A. tagetica* al ser cultivado en medio líquido de ácido casamino enriquecido con infusión de *T. erecta* (CET) bajo condiciones de agitación. Los resultados obtenidos mostraron que aun cuando el tiempo de incubación se reduce de manera importante (7 días), el filtrado de cultivo y su respectivo extracto orgánico crudo, al

ser evaluados en el bioensayo de gota, manifestaron una completa falta de actividad fitotóxica contra *T. erecta*. Esto confirma los datos informados para otras especies del género *Alternaria*.



17

Para conocer la naturaleza de los metabolitos producidos por *A. tagetica* en condiciones de agitación, y como un aporte a la quimiotaxonomía del género, el extracto orgánico crudo fue sometido a un proceso de purificación que se inició con una partición con disolventes de polaridad ascendente, observándose la presencia de metabolitos únicamente en la fracción de mediana polaridad. El componente mayoritario fue purificado e identificado con base en sus datos espectroscópicos como el ácido *p*-hidroxibenzoico (17).

Debido a los resultados anteriores, se decidió establecer un medio de cultivo en el cual *A. tagetica* pudiera desarrollarse favorablemente, consumiendo la totalidad de los nutrientes y expresando una máxima fitotoxicidad en su extracto orgánico crudo. Para esto, se evaluó el crecimiento de *A. tagetica* en una serie de medios de cultivo definidos e indefinidos, cada uno con y sin infusión de *T. erecta* L. Cabe mencionar que la infusión de *T. erecta* L. se incluyó dado que se ha reportado que la adición de un extracto o infusión de la planta

hospedero al medio artificial favorece el crecimiento del hongo y estimula la producción de fitotoxinas.^{64, 69}

Los resultados mostrados en la Tabla 3 indican que *A. tagetica* produce una mayor cantidad de metabolitos fitotóxicos cuando se cultiva en medio CET. Aun cuando los extractos orgánicos crudos de los medios de Richards y CZ8 muestran actividad fitotóxica, sus rendimientos son significativamente menores a los obtenidos con los medios de ácido casamino enriquecido.

Tabla 3. Resultados del crecimiento de *A. tagetica* en diferentes medios líquidos de cultivo.

Medio de cultivo	Incubación (días)	Micelio (g)	Extracto Orgánico Crudo (mg)	Actividad Fitotóxica*
Richards	12	4.5	19.6	+
Richard's + MCT (RED)	12	4.5	41.0	-
Czapek-Dox	19	1.8	42.3	-
Czapek-Dox + MCT (CDT)	12	2.6	44.3	-
Acido Casamino enriquecido	19	4.8	198.3	+
Acido Casamino enriquecido + MCT (CET)	19	4.3	218.2	++
Jugo V-8	8	1.2	25.1	-
Jugo V-8 + MCT (CZ8)	6	1.1	21.2	+
PDB	12	1.8	14.1	-
PDB + MCT (PDT)	9	2.3	11.2	-
CMB	----	----	---	----
CMB + MCT (CMI)	9	0.7	19.2	-
Infusión de <i>T. erecta</i> (MCT)	8	0.05	5.1	-
MCT + azúcar (CTA)	9	0.55	9.4	-

* (++) : Actividad intensa
 (+) : Actividad moderada
 (-) : Ausencia de actividad

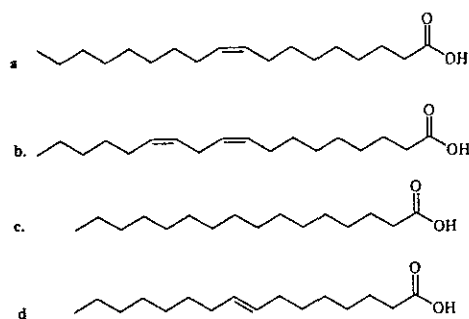
Al evaluar paralelamente el tiempo óptimo de crecimiento de *A. tagetica* en los medios CET y CZ8 a dos, cuatro y seis semanas de incubación, se detectaron marcadas diferencias

en la expresión de actividad. Mientras el extracto orgánico crudo de CET produce necrosis a las cuatro semanas, el correspondiente extracto del medio CZ8 manifestó clorosis a las dos semanas, pero esta actividad desaparece a las 4 semanas. Por lo tanto, estos resultados señalan la producción de diferentes clases de fitotoxinas en ambos medios. De manera similar se ha informado que fomalido (10a), una HSTs de *Phoma ligma* fue detectado en las primeras horas de germinación y crecimiento de la espora (24-60 h), pero después de 36 horas como máximo los cultivos solo producen fitotoxinas no selectivas.²¹

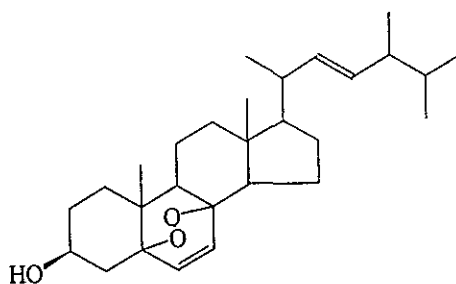
Los resultados indicaron el potencial de los medios CET y CZ8 para estudiar los metabolitos fitotóxicos producidos por el hongo. Sin embargo, los problemas encontrados al utilizar el medio indefinido CZ8 sugieren buscar alternativas para resolver el consumo total de los nutrientes por el hongo.

Durante el cultivo masivo de *A. tagetica* en medio CET se generaron cantidades considerables de micelio (12 g/L), cuyo extracto orgánico crudo careció de actividad fitotóxica. Sin embargo, los escasos reportes⁷⁰⁻⁷² existentes sobre metabolitos presentes en el micelio de las diferentes especies del género *Alternaria* llevaron a plantear su estudio con el objetivo de llevar a cabo una comparación cualitativa entre los componentes presentes en el extracto del micelio y los productos presentes en el extracto orgánico del filtrado, contribuyendo al mismo tiempo a la quimiotaenonomía de la especie. Los resultados obtenidos en trabajos precedentes describen el aislamiento de dos metabolitos presentes en la fracción de baja polaridad obtenida por partición del extracto crudo del micelio con hexano. El primer producto, de menor polaridad, se obtuvo como el componente mayoritario del extracto y se identificó como una mezcla de por lo menos seis

triacilglicéridos, en los cuales predominan los ácidos linoleico, oleico, palmítico y palmitoleico (**18a-d**, respectivamente).⁷³ Esta mezcla corresponde a un 9.71% del micelio liofilizado, rendimiento que puede considerarse alto si se compara con el informado para otras especies, pero bajo si se compara con el de hongos de interés industrial (40%). El segundo metabolito fue identificado como el endoperóxido de ergosterol (**19**), un artefacto del ergosterol comúnmente producido por diferentes especies de hongos.⁷³⁻⁷⁴



18



19

Descripción de *Alternaria tagetica* Shome and Mustafee⁷⁵

Alternaria tagetica es un hongo imperfecto perteneciente a la familia Dematiaceae del orden moniliales. Sus hifas son septadas, profusamente ramificadas, de color marrón claro a oscuro y de 3.7 a 5.5 μm de diámetro. Sus conidiofóros son erectos en grupos, sin ramificaciones, septados que llevan conidios solitarios o en cadenas. Los conidios son muriformes y los jóvenes típicamente poseen entre 3 a 9 septos transversos y 1 a 4 longitudinales, mientras que los conidios viejos presentan de 8 a 14 septos transversales y 3 a 6 longitudinales. El color de los conidios es marrón oscuro, con una longitud total de 43.4-384.4 μm , y 8.4-33.6 μm de ancho (Figura 2a). Los primeros síntomas de la enfermedad en las plantas aparecen de 6-7 semanas después de la infección y visualmente se observan como lesiones necróticas en hojas, tallos, flores y frutos. Las lesiones aparecen primero como pequeñas manchas circulares de color marrón oscuro y presentan un halo amarillento alrededor del área de necrosis, que pueden coalescer y matar al folíolo (Figura 2b). Las especies *T. erecta* y *T. patula* han sido identificados como los principales hospederos de *A. tagetica*.⁵⁸



Figura 2a. Vista microscópica de *Alternaria tagetica* Shome & Mustafee.



Figura 2b. Tizón temprano en cempazúchitl (*Tagetes erecta* L.).

OBJETIVOS

Objetivo General:

Llevar a cabo la detección, aislamiento e identificación de los metabolitos fitotóxicos producidos por *Alternaria tagetica* Shome and Mustafee.

Objetivos Específicos:

1. Emplear un bioensayo simple, rápido, confiable y reproducible que permita detectar actividad fitotóxica en los cultivos de *Alternaria tagetica* y utilizarlo como guía en los procesos de aislamiento y purificación.
2. Realizar el cultivo masivo del *A. tagetica* para obtener el extracto orgánico crudo.
3. Establecer un protocolo para aislar e identificar los metabolitos fitotóxicos a partir de los extractos crudos, utilizando para esto diferentes técnicas cromatográficas de separación.
4. Caracterizar químicamente las estructuras de los metabolitos fitotóxicos con asistencia de técnicas espectroscópicas y de correlación química.
5. Realizar estudios de estructura actividad de los metabolitos fitotóxicos obtenidos mediante la formación de derivados sencillos de los metabolitos fitotóxicos aislados, dependiendo de la disponibilidad del material, para ser evaluados en el bioensayo de gota.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio integraron el material de tres manuscritos: el primero de ellos publicado en el *Journal of Natural Products* (2000, 63, 1117-1120), el segundo se encuentra aceptado para su publicación en el *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Publicación 2) y el tercero ha sido enviado al *Tetrahedron* (Publicación 3). Los resultados que no fueron incluidos en los mencionados artículos se describen en detalle, los incluidos se referirán a las mismas.

El presente trabajo se inició formalmente con un cultivo masivo de *A. tagetica* en medio líquido CET bajo condiciones estacionarias y un período de incubación de 28 días,⁶⁴ obteniéndose un total de 264 L de filtrado de cultivo. El bioensayo de gota confirmó la presencia de actividad fitotóxica en el filtrado de cultivo y la ausencia de ésta en el extracto orgánico del micelio, por lo que el filtrado se extrajo exhaustivamente con acetato de etilo. La presencia de actividad fitotóxica tanto en el extracto orgánico crudo, como en la fase acuosa residual, indicaron la producción de dos grupos de metabolitos fitotóxicos (Tabla 4). La ausencia de actividad tanto en el medio CET sin inocular, así como en su correspondiente extracto orgánico crudo y fase acuosa residual, reafirmó que la actividad fitotóxica detectada es causada por la presencia de metabolitos fitotóxicos excretados por el hongo al medio de cultivo.

Tabla 4. Bioensayo de gota en hojas de cempazúchtil (*Tagetes erecta* L.)

	EM	FC	EC	FA
<i>A. tagetica</i>	Neg	+	+	+
Blanco	X	Neg	Neg	Neg
Control	Neg	Neg	Neg	Neg

EM: Extracto micelial FC: Filtrado de cultivo
EC: Extracto crudo FA: Fase acuosa residual
X: no posee EM

Con el fin de simplificar la composición del extracto orgánico crudo, éste fue suspendido en agua-metanol (9:1) y la suspensión acuosa resultante se sometió a particiones sucesivas con hexano, acetato de etilo y butanol, de esta forma se obtuvieron las correspondientes fracciones de media y alta polaridad, respectivamente, observándose actividad fitotóxica en las dos primeras fracciones, siendo la más activa la fracción hexánica.

Con base en estos resultados, el trabajo se continuó enfocado hacia el aislamiento e identificación de los metabolitos fitotóxicos presentes en las fracciones de baja y media polaridad producidos en los cultivos de *A. tagetica*.

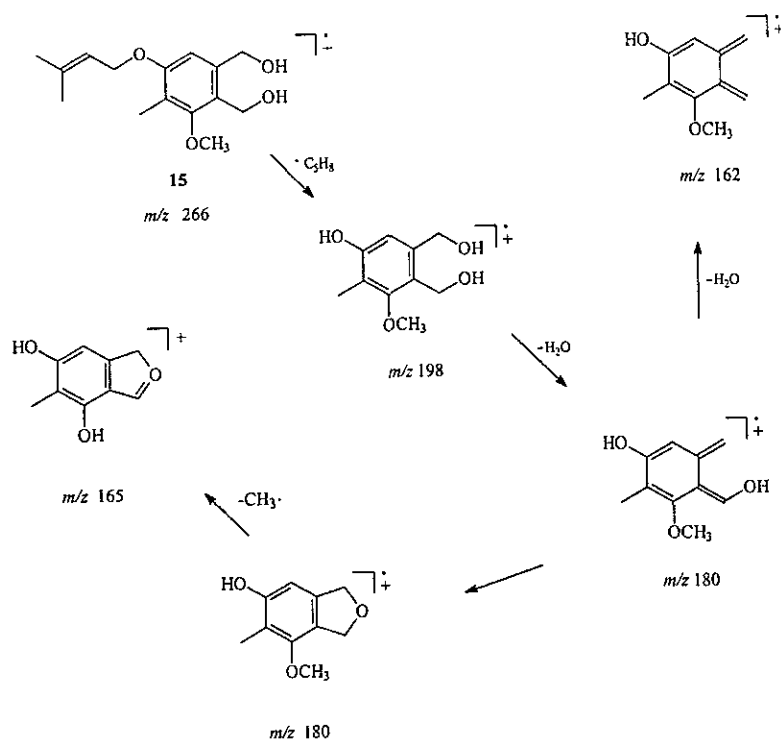
A. METABOLITOS DE LA FRACCIÓN HEXANICA

La fracción de baja polaridad fue purificada por cromatografía en columna líquida al vacío (CLV) obteniéndose un total de 13 subfracciones, cuatro de las cuales (6, 7, 10 y 11) presentaron actividad fitotóxica en el bioensayo de gota.

Caracterización de Zinniol (15)

La subfracción 11 mostró la mayor fitotoxicidad contra hojas de *T. erecta* y la presencia de un solo componente por cromatografía en capa delgada (CCD) y cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). El análisis de sus datos espectroscópicos (IR, EM, RMN ^1H , ^{13}C , DEPT y COSY ^1H - ^1H) y la comparación con los reportados en la literatura,^{26,28} permitieron identificar a la subfracción 11 como el 1,2-*bis*-(hidroximetil)-5-(3',3'-dimetilaliloxi)-3-metoxi-4-metilbenceno, conocido comúnmente como zinniol (15). En el espectro de masas de 15 (Espectro 1b) se puede observar el ión molecular en una m/z de 266 $[\text{M}]^+$ y el fragmento de m/z 198 $[\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8]^+$ originado por la pérdida de la cadena lateral dimetilaliloxi (Esquema 1), fragmentación característica de zinniol y sus derivados. Posteriormente, la pérdida de uno de los alcoholes bencílicos origina el fragmento correspondiente al pico base a m/z 180 $[\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3]^+$. El espectro en el IR de 15 (Espectro 1a) se observan las absorciones esperadas a 3363 cm^{-1} , características de grupos hidroxilo, a 1604 y 1452 cm^{-1} , debidas a las vibraciones longitudinales de dobles enlaces aromáticos, y una banda intensa a 1114 cm^{-1} atribuida al grupo metoxilo.⁷⁶

Esquema 1. Fragmentación de zinniol (15).

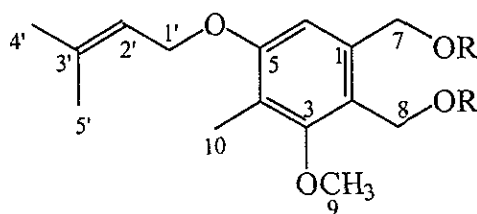


El espectro de RMN ^1H de **15** (Espectro 2) sugiere la existencia de un anillo aromático pentasustituido ya que solo muestra una señal simple en la región de los protones aromáticos (6.68 ppm). El desplazamiento químico de las señales simples asignadas a cuatro grupos metílicos (3.78, 2.16, 1.80 y 1.74 ppm) indican el enlace de los carbonos a un grupo fenólico, a un anillo aromático y los dos últimos a un grupo vinilo, respectivamente. El metino sp^2 de la cadena dimetilaliloxi aparece en la región de los protones vínilicos como una señal múltiple centrada en 5.49 ppm. En el experimento de correlación homonuclear de protón (COSY ^1H - ^1H) se observa una clara interacción del protón olefínico (5.49 ppm) con el metileno a 4.52 ppm y los grupos metilo a 1.80 y 1.74 ppm, lo que confirma la cadena dimetilaliloxi. La presencia de dos señales simples a 4.68 y 4.76 ppm, cada uno integrando para dos protones, en el espectro de RMN ^1H de **15**, y la preparación

del derivado acetilado **15a** que muestra el desplazamiento esperado de dos metilenos a campos bajos indican la presencia de dos metilenos oxigenados en su estructura como base de ésteres (5.14 y 5.22 ppm), la diferencia observada en el desplazamiento químico de los grupos metilenos (Δ 0.46 ppm) es característica para alcoholes primarios.⁷⁷ El análisis del espectro de RMN ¹³C de **15** (Espectro 3a), asistido por los datos de los experimentos DEPT (Espectro 5b), confirmó la presencia de 15 átomos de carbono: cuatro grupos metilos (9.2, 18.2, 25.8 y 61.9 ppm), tres oxometilenos (56.8, 64.7 y 65.3 ppm), dos metinos sp² (109.0 y 119.9 ppm) y seis carbonos cuaternarios sp² (120.0, 124.7, 137.6, 138.9, 157.7 y 158.2 ppm).⁷⁶

La identificación de **15** como zinniol fue confirmada al analizar las conectividades y correlaciones observadas en sus experimentos de HMQC y HMBC. Sin embargo, y aun cuando la mayoría de los desplazamientos químicos del compuesto aislado **15** coincidieron con los datos reportados en la literatura para el zinniol (Tabla 5),^{26, 28, 61} los desplazamientos químicos asignados para los carbonos C-2, C-4, C-1' y C-8 muestran diferencias con los descritos en la literatura. Sin embargo, el análisis detallado de los datos espectroscópicos de **15**, en conjunto con los obtenidos en los experimentos bidimensionales (DEPT, HMQC y HMBC) permitieron la correcta asignación de todos los protones y carbonos (Tabla 1 en publicación 1) de este metabolito. En el espectro de HMQC del zinniol (Figura 3) se observa claramente una correlación directa entre los protones del oxometileno a 4.52 ppm y el carbono a 65.3 ppm (C-1'); de la misma forma se observa que los protones metilénicos a 4.68 y 4.76 ppm se encuentran conectados directamente con los carbonos a 64.7 (C-7) y 56.8 (C-8) ppm, respectivamente. La ubicación inequívoca de los protones y carbonos correspondientes a los alcoholes bencílicos del zinniol fue posible dadas las interacciones a dos y tres enlaces (²J y ³J) observadas en el experimento de HMBC (Figura 4). Así, el protón aromático a 6.68 ppm muestra correlaciones (³J) con los carbonos situados a 124.7 (C-2), 120.0 (C-4) y 64.7 (C-7) ppm, indicando que la señal del carbono a 64.7 ppm

corresponde al oxometileno ubicado en posición C-1. Adicionalmente, las correlaciones 3J entre los protones metilénicos a 4.76 ppm con los carbonos localizados a 158.2 (C-3) y 138.9 (C-1) ppm permitieron asignar la señal a 56.8 ppm al oxometileno C-8, unido al carbono C-2 del anillo aromático (Tabla 6). Finalmente, el carbono a 65.3 ppm puede ser asignado al oximetileno C-1'.



15 R= H
15a R= Ac

Tabla 6. Comparación de los datos de RMN ^1H y ^{13}C de **15** con los reportados por Suemitsu²⁸ y Stierle²⁶ para zinniol.

No. C	δ	Gamboa <i>et al.</i> (CDCl_3 , 125 y 500 MHz)		Suemitsu, <i>et al.</i> (CDCl_3 , 50 y 200 MHz)		Stierle, <i>et al.</i> (CD_2OD , 75 y 300 MHz)	
		C	H	C	H	C	H
1		138.9		139.0		139.2	
2		124.7		124.7		119.8	
3		158.2		158.0		157.7	
4		120.0		119.8		124.6	
5		157.7		157.5		157.7	
6		109.0	6.68	109.0	6.66	109.2	6.69
7		64.7	4.68	64.3	4.69	65.6	4.69
8		56.8	4.76	65.3	4.61	63.9	4.67
9		61.9	3.78	61.8	3.72	61.9	3.72
10		9.2	2.16	9.2	2.14	9.2	2.14
1'		65.3	4.52	56.6	4.50	65.7	4.52
2'		119.9	5.49	119.9	5.46	120.1	5.47
3'		137.6		137.5		137.7	
4'		25.8	1.80	25.7	1.73	25.7	1.75
5'		18.2	1.74	18.2	1.73	18.2	1.69

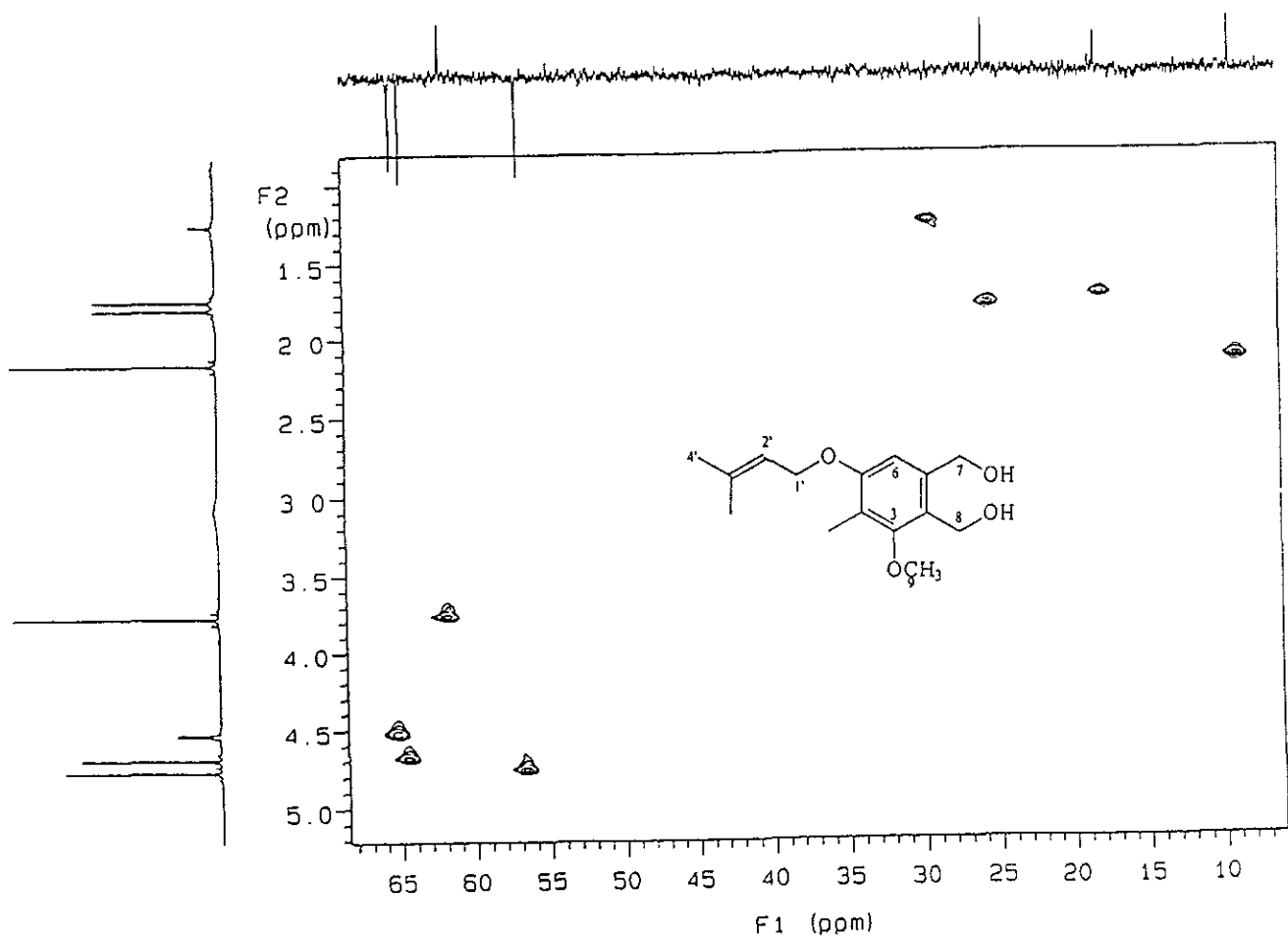


Figura 3. Fragmento del espectro de HMQC de zinniol (15).

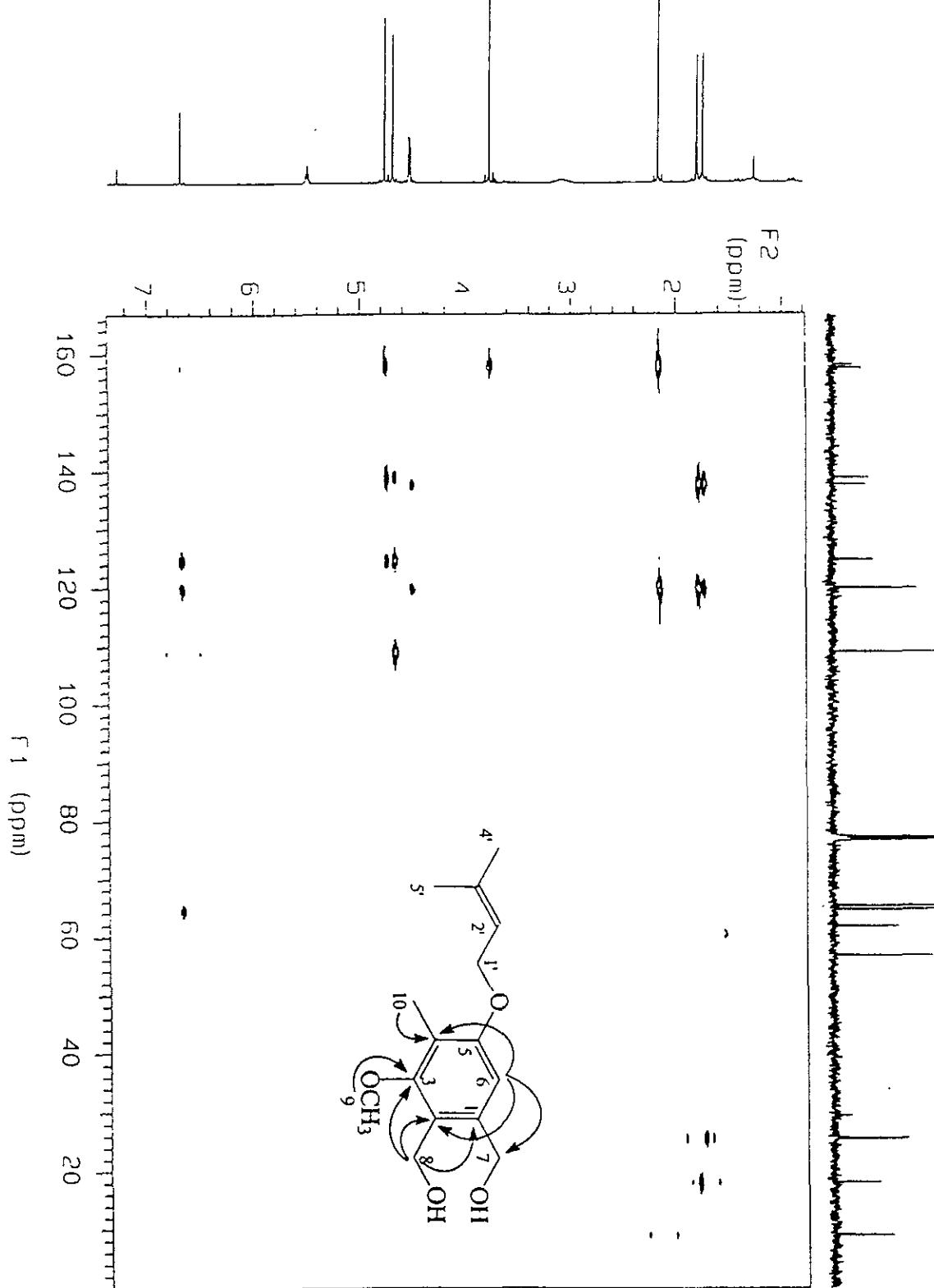


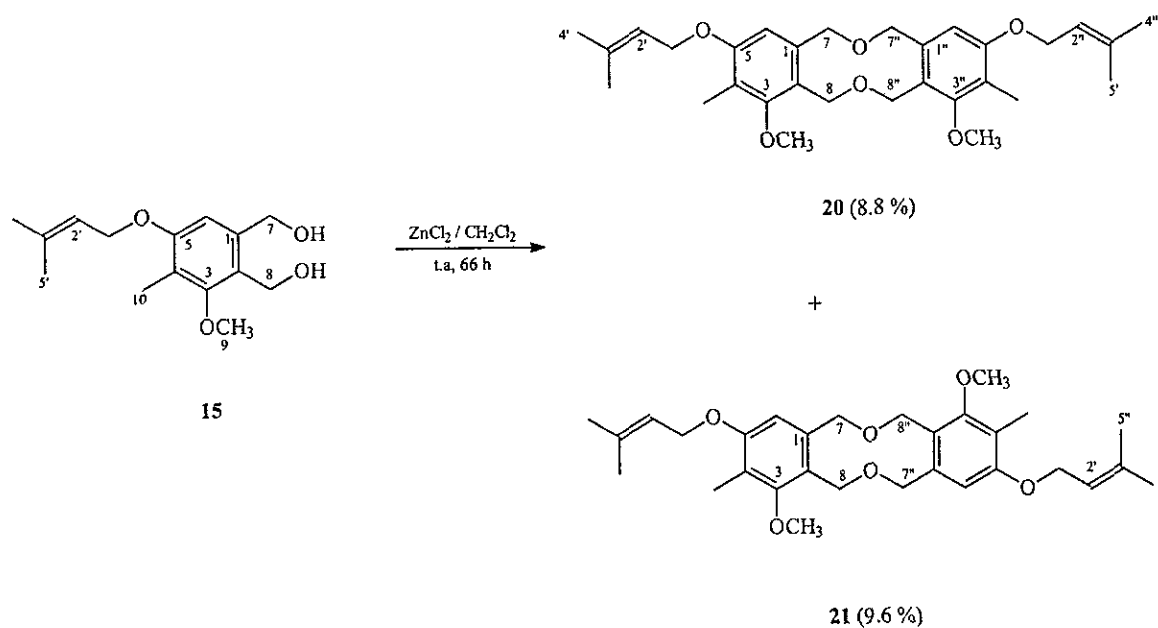
Figura 4. Fragmento del espectro de HMBC de zinniol (15).

Caracterización de los dímeros.

Un análisis por CCD de la subfracción fitotóxica 10 mostró la presencia de zinniol y otros dos metabolitos; los componentes de la mezcla fueron separados mediante purificaciones sucesivas por CC "flash" y CCD preparativa. Además de zinniol se obtuvieron dos metabolitos no fitotóxicos identificados como dímeros isoméricos del zinniol: *bis-7-O-7".8-O-8"-zinniol (20)* y *bis-7-O-8".8-O-7"-zinniol (21)*. La identificación de estos nuevos productos naturales producidos por *A. tagetica* (ver publicación No. 1) se apoyó en el análisis e interpretación de sus datos espectroscópicos (IR, EM, RMN ¹H, RMN ¹³C, DEPT, HMQC y HMBC, Espectros 6-15). Las estructuras propuestas para ambos dímeros fueron confirmados mediante su preparación en el laboratorio. El tratamiento del zinniol con un ácido de Lewis (Esquema 2) resultó en la formación de una mezcla de dos dímeros (20 y 21), que fueron purificados por CC "flash". El comportamiento en CLAR (Figura 5) y los datos espectroscópicos de cada uno de los dímeros resultaron idénticos a los correspondientes productos naturales.

Con el fin de establecer el origen natural de los nuevos metabolitos diméricos, la fracción hexánica, el extracto orgánico crudo y el filtrado de cultivo liofilizado fueron analizados por CLAR. Ambos dímeros fueron claramente detectados en la fracción hexánica, observados en menor concentración en el extracto orgánico crudo, y en tanto que en el liofilizado del filtrado de cultivo su presencia fue comprobada por co-cromatografía. Para eliminar la posible interferencia de otros productos presentes en el filtrado liofilizado, y con el fin de evitar la extracción directa del filtrado acuoso con acetato de etilo, el filtrado de cultivo fue tratado con resina DIAION HP-20.⁷⁸ Los metabolitos atrapados en la resina fueron recuperados mediante el lavado del material polimérico con metanol, acetona, acetato de etilo o hexano. Los cromatogramas de cada extracto, en particular el generado por el extracto hexánico, mostraron la presencia de ambos dímeros. Los resultados de estos

experimentos confirmaron la presencia de los dímeros **20** y **21** en el filtrado de cultivo antes de iniciar el proceso de extracción, lo que descarta su posible formación durante el proceso de purificación y confirma su origen natural.



Esquema 2. Reacción de condensación del zinniol (**15**).

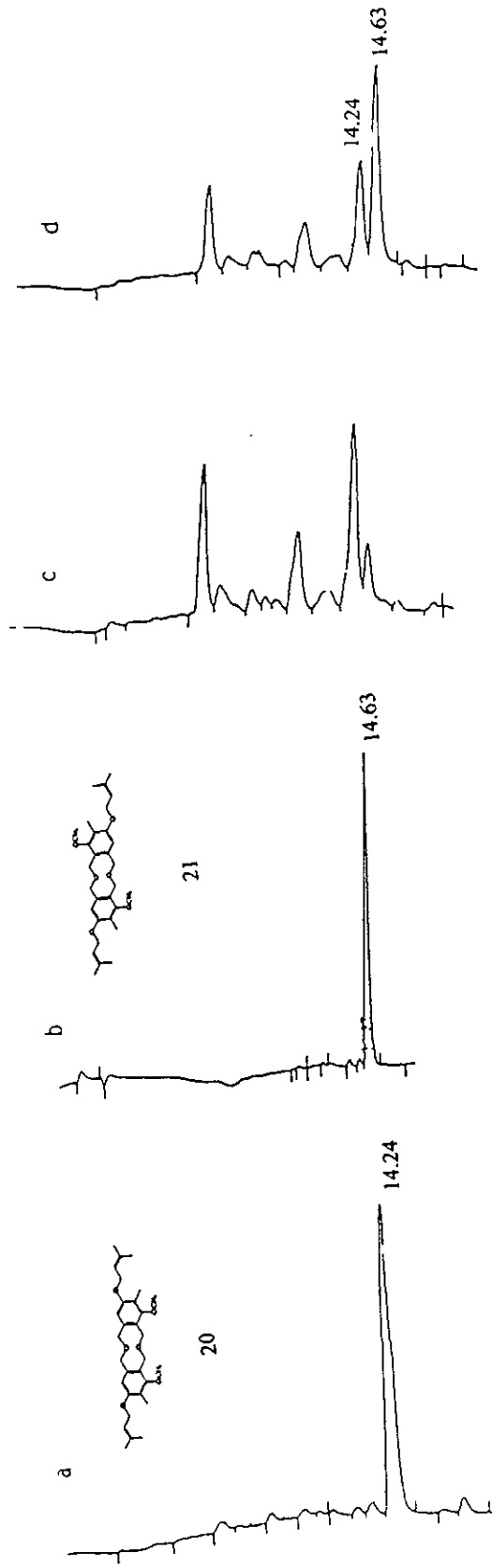
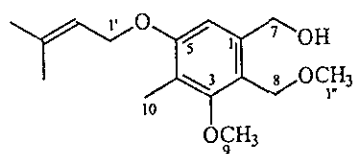


Figura 5. Cromatogramas de líquido de: a) dímmero **20** (14.24 min), b) dímmero **21** (14.63 min), c) producto crudo de reacción de dimerización de zinniol y d) co-cromatograma del dímmero **21** con el producto de reacción.

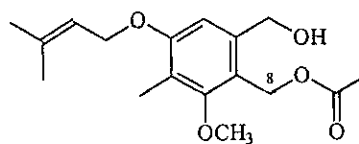
Caracterización de los derivados naturales de zinniol.

Las subfracciones fitotóxicas 6 y 7 fueron purificadas por CLAR preparativa resultando en la purificación de dos nuevos metabolitos fitotóxicos identificados como el éter metílico de 8-zinniol (**22**, Espectros 16-20) y el acetato de 8-zinniol (**23**, Espectros 21-25). Adicionalmente, se aislaron otros tres metabolitos inactivos, el acetato de 7-zinniol (**24**, Espectro 26-29) y el éter (2-fenil)-etílico de 8-zinniol (**25**, Espectros 30-35) y el 5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálico (**26**, Espectros 36-39). Mientras que el ftálico **26** ya ha sido reportado de *A. porri*, los derivados restantes se identificaron como nuevos productos naturales (ver publicación 3).

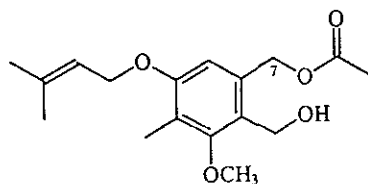
Finalmente, la purificación por CLAR preparativa de la subfracción 5, resultó en la obtención del 6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftálico (**27**, Espectros 40-42), un metabolito secundario previamente reportado como producido por los hongos *A. porri* y *A. Solani*.^{30, 79}



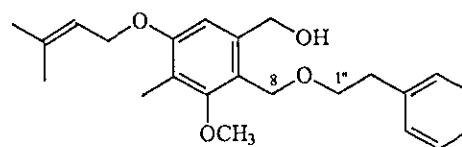
22



23



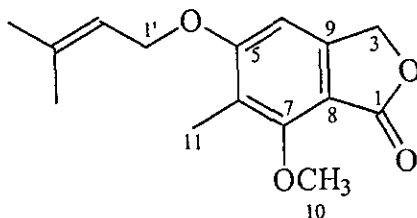
24



25

Caracterización del 5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálido (26).

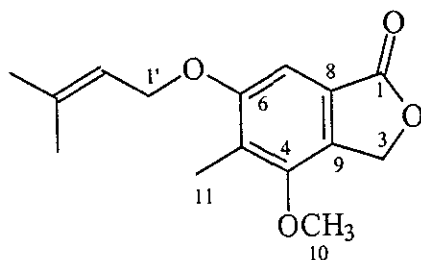
El metabolito **26** se obtuvo como un aceite y mostró un ion molecular de m/z 262 $[M]^+$ en su espectro de masas (Espectro 36b) y un fragmento pico base de m/z 194, característica de la pérdida de la cadena lateral de dimetilaliloxi. Por otra parte el espectro en el IR de **26** (Espectro 36a) mostró una banda intensa a 1752 cm^{-1} característica de δ -lactonas α,β -insaturadas, y la ausencia de absorciones en la región de los grupos oxhidrilo. Una señal a 169.0 ppm, en el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 38), cuyo desplazamiento es característico de carbonilo de éster cíclico confirmó la presencia de una lactona en la estructura de **26**. De manera adicional, en el espectro de RMN ^1H (Espectro 37) se observaron dos señales simples a 6.61 y 5.17 ppm. Mientras que la primera integra para un protón y fue asignada al protón aromático del anillo pentasustituido, la segunda que integra para dos protones, se asignó al oxometileno (H-3) de la δ -lactona. El resto de las señales coinciden con las observadas para zinniol. Un análisis de los datos espectroscópicos en conjunto y su comparación con los reportados en la literatura^{61, 80} permitieron confirmar la identidad de **26** como 5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálido.



26

Caracterización del 6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftálico (27)

El segundo ftálico mostró un espectro de masas (espectro 40b) y de IR (Espectro 40a) muy similares a los del ftálico **26**. El espectro de RMN ^1H del segundo ftálico (Espectro 40) mostró también las señales correspondientes a los protones del anillo aromático y del oxometileno de la δ -lactona a 7.09 y 5.49 ppm, respectivamente. El desplazamiento de la primera señal a campo más alto con respecto a las del ftálico **26**, permitió deducir que en este caso el grupo carbonilo de la lactona se encuentra en posición "peri" (C-8) con el protón aromático, y en consecuencia, el oxometileno se ubica en la posición C-9, resintiendo la cercanía del grupo metoxilo. El resto de las señales fueron muy similares a las del ftálico **26**, e idénticas a las reportadas en la literatura^{61,79} lo que permitió la identificación **27** como 6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftálico.



27

Zinniol es un metabolito procedente de la condensación de cuatro unidades de acetato y una de isopreno. A la fecha se han reportado varios metabolitos naturales con estructuras químicas derivadas del zinniol (Figura 6). Las principales diferencias entre zinniol y los nuevos metabolitos se encuentran principalmente en el grado de oxidación y condensación de los alcoholes bencílicos dando lugar a lactonas, lactamas y a la modificación o ausencia de la cadena lateral de isopreno. Por otra parte, esta es la primera ocasión que se detectan

de manera natural derivados que conservan la unidad íntegra de zinniol, tal es el caso de los derivados etereos **22** y **25** y los monoacetatos **23** y **24**.

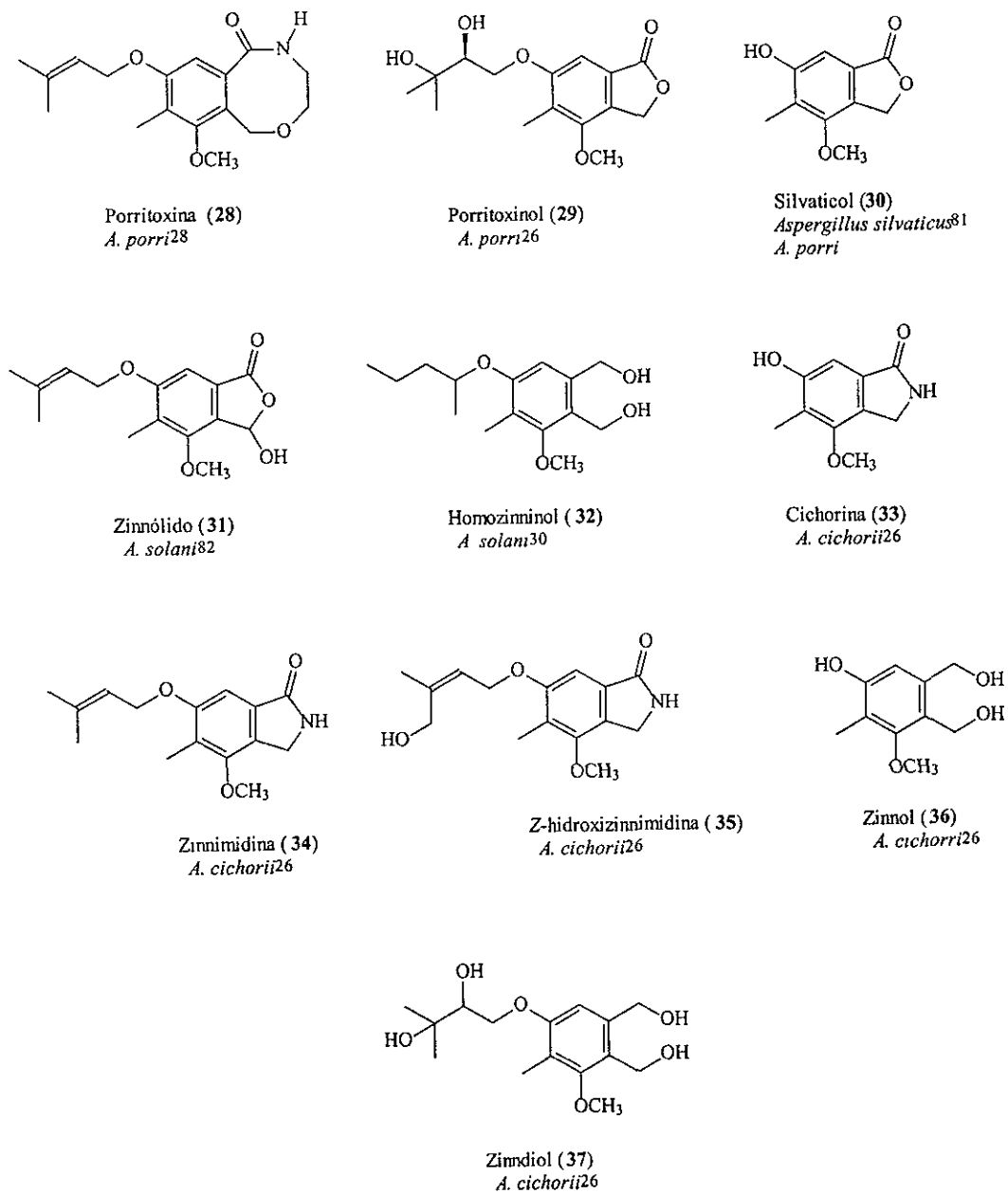
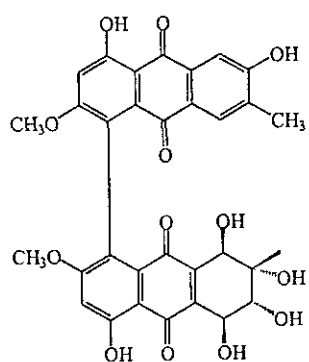
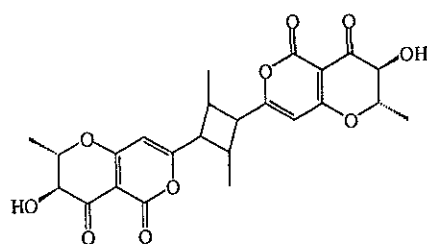


Figura 6. Metabolitos estructuralmente relacionados con zinniol.

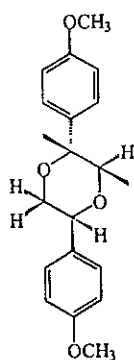
Los nuevos metabolitos **20** y **21** aislados en el presente estudio corresponden a dimerizaciones de dos unidades de zinniol, vía dos enlaces etereos. Las dimerizaciones entre los metabolitos aislados del género *Alternaria* es poco usual, en este caso tenemos a los alterporioles (**38**)⁸³⁻⁸⁴ y *bis*-radicinol (**39**),²⁷ todos ellos unidos mediante enlaces C-C. La dimerización mediante eterificación ha sido reportada en lignanos como en **40**, aislado de *Illicium verum*.⁸⁵



38



39



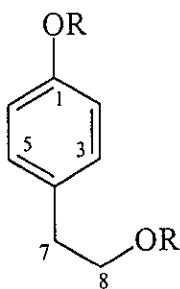
40

B. METABOLITOS DE LA FRACCIÓN DE ACETATO DE ETILO

El extracto fitotóxico de polaridad media se fraccionó por CLV obteniéndose las subfracciones A-M. La purificación biodirigida de las subfracciones fitotóxicas D, E, F y G condujo al aislamiento e identificación de tagetolona (**41**, Espectros 43-50), tagetenolona (**42**, Espectros 51-56), tyrosol (**43**, Espectros 57-63) y ácido *p*-hidroxibenzoico (**17**, Espectros 64-66), respectivamente (ver publicación No. 2).

Caracterización de Tyrosol (**43**)

La subfracción fitotóxica F (área necrótica: 1.07 mm²) mostró un solo componente por CCD. El ión molecular del metabolito se observa en una *m/z* de 138 en el espectro de masas (Espectro 57b) y en el espectro UV se aprecian bandas de absorción a 254 y 365 nm. La razón de esta absorción se confirmó en su espectro de RMN ¹H (Espectro 58) donde se observan señales pertenecientes a un sistema A₂B₂ (7.03 y 6.72 ppm) en la región de los protones aromáticos. Dos señales triples que resuenan a 2.68 y 3.65 ppm en el mismo espectro, cada una de ellas integrando para dos protones, confirmaron la existencia de dos metilenos, uno alílico y otro base de alcohol primario. El derivado diacetilado de **43** (**43a**, Espectros 61-63) confirmó la presencia de dos grupos oxhidrilo en su estructura, siendo uno de ellos primario y otro de naturaleza fenólica de acuerdo al desplazamiento de los correspondientes grupos metilo de acetato (2.03 y 2.28 ppm, respectivamente). El espectro de RMN ¹³C de **43** (Espectro 59) mostró las 8 señales esperadas, seis de ellas [151.0, 131.0, 130.6 (x2) y 115.9 (x2) ppm] debidas a los carbonos aromáticos y dos (39.5 y 64.2 ppm) correspondientes a los carbonos de dos grupos metileno. Estos datos coinciden con los reportados en la literatura para tyrosol⁸⁶⁻⁸⁷ un metabolito que ha sido aislado e identificado de fuentes vegetales y fúngicas, y que ha demostrado poseer actividad antialimentaria y fitotóxica, respectivamente.⁸⁸⁻⁹⁰

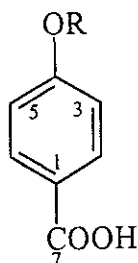


43 R= H
43a R= Ac

Caracterización del Ácido *p*-hidroxibenzoico (17)

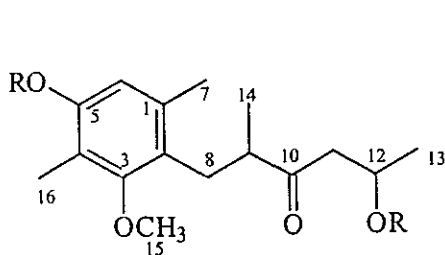
El ácido *p*-hidroxibenzoico fue aislado a partir de la fracción de acetato de etilo del extracto orgánico de los cultivos en condiciones estacionarias y como componente mayoritario del extracto crudo de los cultivos en agitación de *A. tagetica*. En su espectro de masas (Espectro 64b) aparece el ion molecular a m/z 138, el cual pierde un grupo oxhidrilo para generar el fragmento a m/z 121 como pico base, seguido de la pérdida del grupo carboxilo, detectada por la presencia del fragmento a m/z 93 $[M^+ - COOH]^+$. En el espectro de RMN 1H de 17 (Espectro 65a) aparece el protón del grupo carboxilo como una banda ancha a 9.0 ppm, en tanto que los protones del anillo aromático *para* sustituido aparecen como un par de dobletes en 7.91 y 6.92 ($J= 9$ Hz, 2H cada una). En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 65b) se pudieron contar las señales de siete carbonos, tres de ellos correspondientes a los carbonos del grupo carboxílico, al carbono sp^2 base del carboxilo y al carbono sp^2 oxigenado (167.4, 162.5 y 122.6 ppm) y dos restantes [115.9 (x2) y 132.9 (x2) ppm] pertenecientes a los carbonos aromáticos C-3, C-5 y C-2 y C-6, respectivamente. Con estos datos se confirmó el sistema del ácido *para* sustituido de 17 y los datos espectroscópicos coincidieron con los reportados en la literatura.⁹¹⁻⁹²

El ácido *p*-hidroxibenzoico es un metabolito procedente de la vía del ácido siquímico, que ha sido comúnmente aislado de plantas y hongos. Sin embargo, a la fecha sólo ha sido reportado como parte de un pigmento obtenido del micelio de una cepa de *Alternaria* sp. que infecta los granos de trigo.⁹³

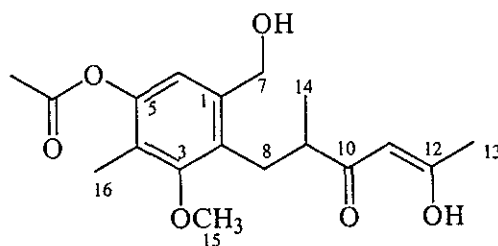


17 R= H
17a R= Ac

Los dos metabolitos restantes, tagetolona (41) y tagetenolona (42) se identificaron como nuevos productos naturales estructuralmente relacionados con zinniol. Estos metabolitos poseen una cadena lateral con un patrón alternado de oxigenación, lo que sugiere que proceden de la condensación de seis unidades de acetato (ver figura 2 en publicación no. 2).



41 R= H
41a R= Ac

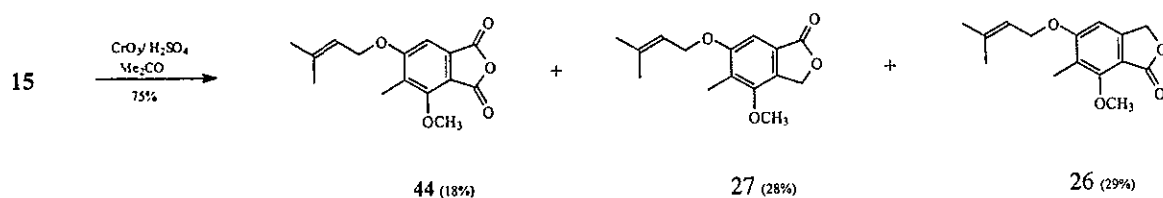


42

C. DERIVADOS SINTETICOS DE ZINNIOL

El éter metílico de 8-zinniol es un metabolito fitotóxico donde uno de los alcoholes bencílicos de zinniol se encuentra metilado; la ubicación del metilo en la posición C-8 se basó en el estudio de sus datos espectroscópicos. Con el fin de confirmar esta asignación e investigar la actividad fitotóxica del producto natural y su isómero sintético se planteó la síntesis del éter metílico de 8-zinniol y su isómero correspondiente, utilizando zinniol como materia prima (Publicación 3).

Como paso inicial del proceso de síntesis se llevó a cabo la oxidación de zinniol, utilizando el reactivo de Jones de acuerdo a la metodología descrita en la literatura.⁶¹ De esta reacción se obtuvieron los ftálidos **26** y **27** y un tercer producto de menor polaridad, identificado como el anhídrido de zinniol (**44**) de acuerdo al análisis de sus datos espectroscópicos (**44**, Espectros 67-69, Esquema 3).



Esquema 3. Oxidación de zinniol (**15**).

La formación de ftálidos a partir de 1,4 dioles es una reacción que se origina cuando el aldehído, producto de la oxidación parcial de uno de los alcoholes, se condensa para formar un hemiacetal y éste posteriormente se oxida para dar lugar al ftálido.⁹⁴ Cuando las condiciones de oxidación son lo suficientemente fuertes, los alcoholes primarios pueden ser oxidados hasta los ácidos carboxílicos correspondientes, los cuales al condensarse dan lugar al anhídrido.⁹⁵ Lo anterior explica la formación del anhídrido de zinniol como resultado de la reacción. El anhídrido de zinniol fue reportado recientemente como producto del tratamiento del diácido de zinniol con DCC en THF y condiciones neutras.⁹⁶ Este es el primer reporte de la obtención del anhídrido de zinniol como subproducto de la reacción de oxidación de zinniol.

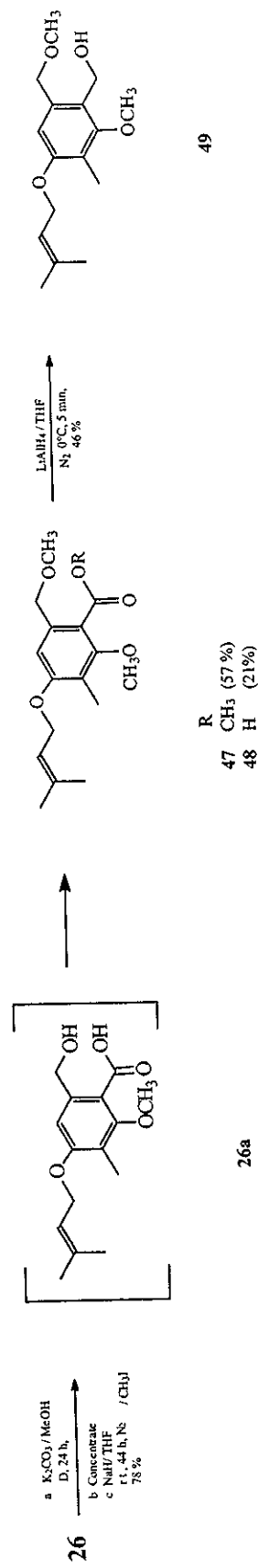
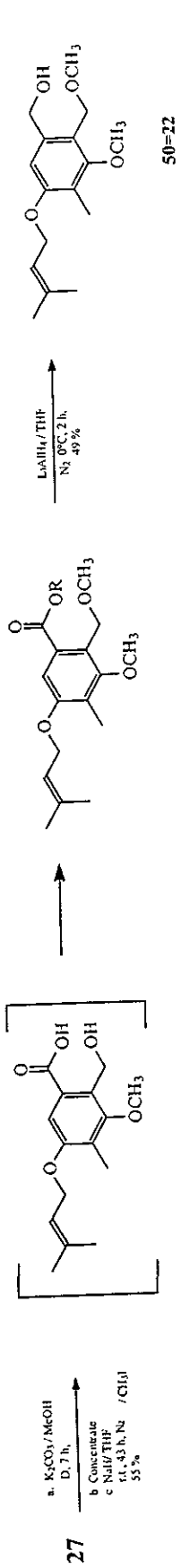
Como siguiente paso en el esquema sintético (Esquema 4), se estudió la apertura de las δ -lactonas **26** y **27** por medio de la hidrólisis alcalina con K_2CO_3 en metanol.⁹⁷⁻⁹⁸ Los primeros intentos con el ftálido **27** resultaron infructuosos; aun cuando por CCD se observaba el consumo total de la materia prima, el hidroxiácido resultante volvía a la lactona original durante la recuperación del producto crudo de la reacción. Para evitar la relactonización del hidroxiácido se decidió llevar a cabo la reacción de metilación sin aislar el producto de hidrólisis. Esto se logró eliminando el metanol a presión reducida y llevando a cabo la metilación con hidruro de sodio y yoduro de metilo.⁹⁹ Después de 43 h de reacción se obtuvieron los productos **45** y **46** con un rendimiento de 42 y 13 %, respectivamente. El producto menos polar se identificó como el 7-éster metílico del 8-éter metílico de zinniol (**45**) de acuerdo a la presencia en su espectro de RMN 1H (Espectro 71) de tres señales simples a 3.38, 3.75 y 3.89 ppm asignadas a grupos metoxilos pertenecientes al éter, al grupo unido al anillo aromático y al del éster, respectivamente. El espectro de IR del segundo producto (Espectro 74a) mostró una banda ancha característica de ácidos a $3400-2600\text{ cm}^{-1}$ y la correspondiente banda a 1720 cm^{-1} asignada al carbonilo de ácido.⁷⁶ La presencia del grupo carboxilo en la estructura de **46** se confirmó por las señales a 168.9

ppm en su espectro de RMN ^{13}C , en tanto que las señales a 58.0 y 62.0 ppm se asignaron a los grupos metilo del éter bencílico del grupo metoxilo unido al anillo aromático. Con los datos anteriores **46** se identificó como el 7-ácido del 8-éter metílico de zinniol.

La misma secuencia de reacciones fue aplicada al ftálico **26** (Esquema 4), observándose en este caso que la hidrólisis requirió de un mayor tiempo para lograr la conversión total de la materia prima. Los productos de la reacción, de acuerdo al análisis de sus datos espectroscópicos, se identificaron como el 8-ácido del 7-éter-metílico de zinniol (**48**) y su correspondiente derivado esterificado (**47**) con un rendimiento del 21 % y 57 %, respectivamente.

Los derivados esterificados **45** y **47** fueron tratados con LiAlH_4 en THF anhidro,^{95,100} (Esquema 4) obteniéndose los correspondientes éteres metílicos de zinniol (**49** y **50**). Ambos productos isoméricos fueron analizados por CLAR comparando su comportamiento con el del producto natural **22**; de esta forma la estructura se confirmó como el éter metílico de 8-zinniol (Figura 7). Los datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C de **22** y **49** mostraron una gran similitud, observándose diferencias significativas únicamente en los valores de desplazamiento químico observados para los carbonos C-1, C-2, C-7 y C-8, los cuales aparecen a 135.3, 126.1, 74.4 y 56.9 ppm en el espectro de **49** (Espectro 86), y a 140.3, 121.2, 64.5 y 66.5 ppm en el de su isómero **22**.

Esquema 4. Obtención de los éteres metílicos de zinniol (49 y 50).



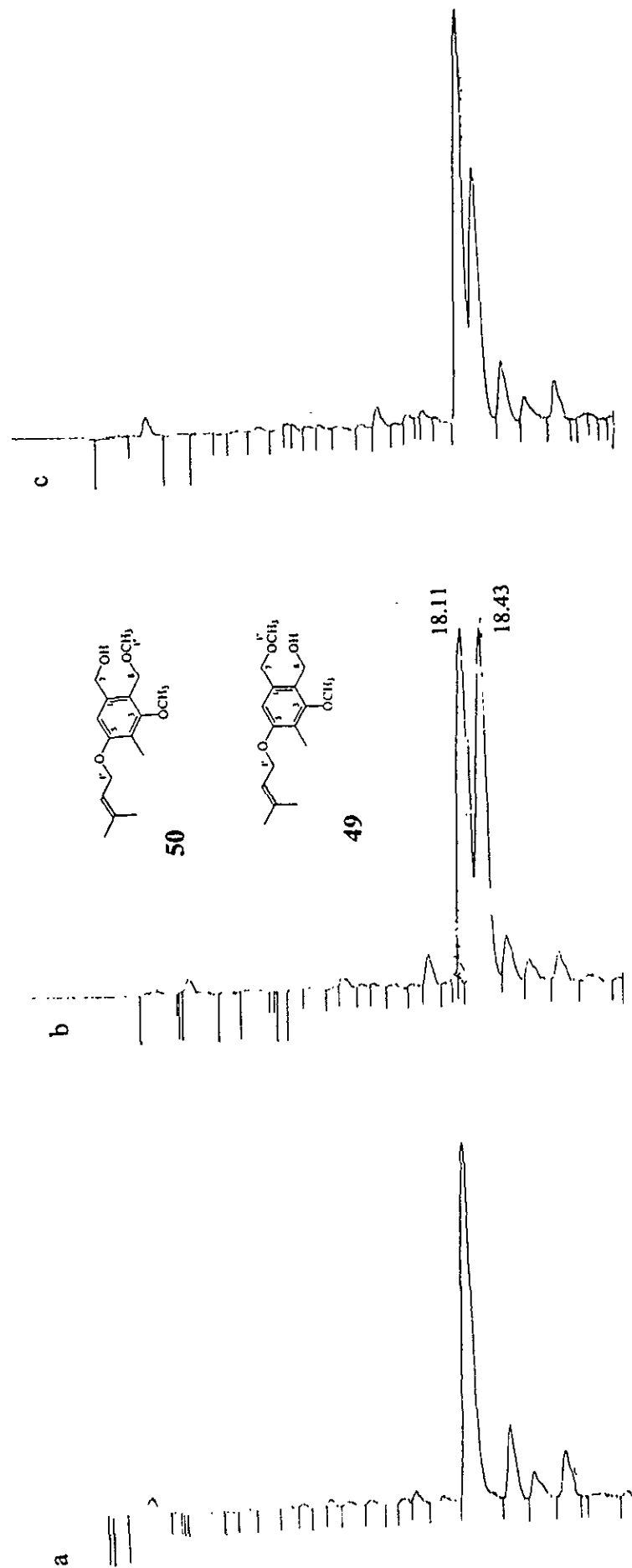
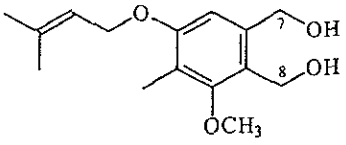
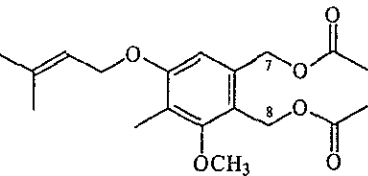
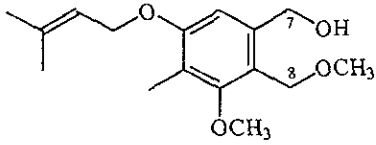
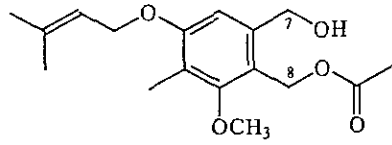
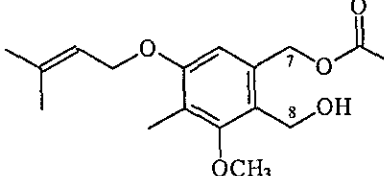
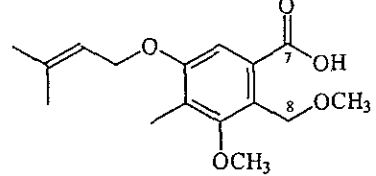


Figura 7. Cromatogramas de líquidos de: a) éter metílico de 8-zinniol natural (22, 18.11 min), b) co-cromatograma de la mezcla de éteres metílicos de zinniol 49 y 50 (18.11 min) y c) co-cromatograma de 22 con la mezcla de éteres sintéticos (49 y 50).

Tanto los éteres metílicos de zinniol como los diferentes derivados obtenidos durante el proceso de síntesis fueron evaluados en cuanto a su actividad fitotóxica utilizando el bioensayo de gota contra *T. erecta* L. (Tabla 7). Ambos éteres isoméricos mostraron una capacidad similar para producir necrosis, sin embargo, la actividad fitotóxica expresada fue menor que la del zinniol utilizado como control positivo en el bioensayo. Por otra parte el diacetato de zinniol (**15a**), anhídrido de zinniol (**44**) y los ftálicos **26** y **27** no mostraron ninguna actividad, aun cuando se evaluaron a mayores concentraciones. Estos resultados, coinciden con reportes anteriores, en los que se establece la importancia de los alcoholes bencílicos para la expresión de fitotoxicidad.¹⁰¹ Sin embargo, **24** y **25** no siguen este patrón de actividad, pues aun cuando en ambos productos uno de los alcoholes bencílicos ha sido sustituido, ninguno de los dos muestra actividad fitotóxica hacia *T. erecta* L. Por otra parte, los resultados del bioensayo mostraron una actividad fitotóxica significativa de los derivados **46** y **48**, observándose que la intensidad de la actividad del derivado **46** (área necrótica: 0.49 mm²) resultó ser similar a la manifestada por zinniol (área necrótica: 0.62 mm²). Es interesante mencionar también que la fitotoxicidad del metabolito es mayor cuando el grupo carboxilo se localiza en posición C-7, y que ambos metabolitos pierden su capacidad para expresar actividad al ser esterificados (e.g. **45** y **47**, Tabla 6). Con base en los resultados anteriores se puede concluir que los alcoholes bencílicos de zinniol son importantes para la manifestación de la actividad fitotóxica de la molécula, pero no son indispensables; y que el grado de oxidación y sustitución de estos grupos es también de importancia.

Tabla 7. Actividad fitotóxica de los derivados de zinniol.

METABOLITO	Área necrótica mm ²		METABOLITO
 <p style="text-align: center;">15</p>	0.62	NA	 <p style="text-align: center;">15a</p>
 <p style="text-align: center;">22</p>			0.12
 <p style="text-align: center;">23</p>	0.1	NA	 <p style="text-align: center;">24</p>
 <p style="text-align: center;">46</p>			0.49

(NA) inactivo

PARTE EXPERIMENTAL

La cepa certificada de *Alternaria tagetica* Shome and Mustafee (ATCC 58771) utilizada para este trabajo fue adquirida de la American Type Culture Collection.

Para el bioensayo de gota y la preparación de infusiones se emplearon hojas de *Tagetes erecta* clona C16M9P31, cultivadas en los viveros del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados a 15 libras de presión y 121°C durante 15 minutos, utilizando un autoclave horizontal (Industrias Man Play, 0.25 m³ de capacidad). El trabajo microbiológico fue realizado en condiciones asépticas, utilizando una campana de flujo laminar vertical marca VECO.

El medio líquido de ácido casamino enriquecido con infusión de *Tagetes erecta* (CET) fue preparado en el laboratorio de acuerdo a la siguiente formulación: 1 g de fosfato monobásico de potasio (P.Q. Monterrey), 0.5 g de sulfato de magnesio heptahidratado (P. Q. Monterrey), 6 g de caseína hidrolizada (Merck), 100 g de azúcar comercial (marca ZUZ), 1 mg de sulfato ferroso heptahidratado (Baker), 0.15 mg de sulfato cuproso pentahidratado (Baker), 1 mg de sulfato de zinc heptahidratado (Baker), 0.1 mg de molibdato de sodio dihidratado (Merck), aforado a un litro con infusión de *T. erecta* ajustando el pH a 4.9 con HCl 2N.

Infusión de *T. erecta*: 20 g de hojas sanas y limpias de la planta se calientan en agua (ca. 500 mL) a ebullición durante 20 minutos. La infusión se deja enfriar, se filtra y afora a un litro.

Para los procesos de extracción y purificación se utilizaron disolventes grado industrial destilados en el laboratorio; los disolventes y reactivos utilizados en las reacciones fueron grado reactivo analítico obtenidos de diferentes proveedores.

Para cromatografía en capa delgada analítica (CCD) se utilizaron placas cromatográficas con soporte de aluminio impregnadas con gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck, 0.2 mm de espesor). Las purificaciones en CCD preparativa fueron realizadas en placas cromatográficas de vidrio impregnadas con gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck, 0.25 mm de espesor, 20 x 20 cm). Todos los metabolitos separados por CCD se observaron primero bajo luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y larga (350 nm). Para la visualización final de los cromatogramas las placas se sumergieron en una solución de ácido fosfomolibdico y/o sulfato cérico, seguido de un calentamiento suave. Las columnas cromatográficas al vacío (CLV),¹⁰²⁻¹⁰³ “flash”¹⁰⁴ y por gravedad fueron empacadas con gel de sílice 60 F₂₅₄, de 200-400 y 70-230 mallas, respectivamente (Aldrich o Merck).

Los espectros en ultravioleta (UV) se determinaron en un espectrofotómetro DU-65 Beckman UV/VIS, en tanto que los de infrarojo (IR) fueron obtenidos en un espectrofotómetro FT-IR Nicolet Magna 750 o en un FT-IR Protege 460.

Para los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se utilizaron espectrómetros Varian Unity-300, Bruker 400 y Varian Unity Plus-500 a 300, 400 y/o 500 MHz para RMN ¹H y a 75, 100 y/o 125 MHz para RMN ¹³C, usando diferentes disolventes deuterados y

tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los experimentos bidimensionales (DEPT, HMQC y HMBC) fueron obtenidos en un equipo Varian Unity Plus-500.

Los espectros de masas (EM) se realizaron en un equipo JEOL-JMS-AX505HA a 70 eV y en un JEOL JMS-SX102A para los de baja y alta resolución, respectivamente.

Los análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) se llevaron a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890 acoplado a un detector másico Hewlett-Packard modelo 5971A. Las condiciones de trabajo fueron: 0.5 μ L de muestra en solución al 1%, columna Ultra 1 (Hewlett-Packard, cross-linked methyl silicone gum, 25 m x 0.32 mm, 0.52 μ m espesor de la película) con un flujo de 1 mL/min, temperatura de inyección de 300 °C, temperatura del detector de 290°C y programas de temperatura: **método a)** $T_1 = 180^\circ \text{C}$, $T_2 = 290^\circ \text{C}$; **método b)** $T_1 = 70^\circ \text{C}$, $T_2 = 290^\circ \text{C}$, gradiente= 10°C/min.

Para los análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) se emplearon dos equipos: 1) cromatógrafo Milton Roy CM-4000 acoplado a un detector Milton Roy SM-4000 UV, un integrador Milton Roy CS-4100, y una columna Hypersil ODS C_{18} (Alltech, 5 μ , 4.6 mm x 250 mm); 2) cromatógrafo Waters Delta prep 4000 (Millipore Corp.) con un detector de arreglo de diodos Waters 996 para las evaluaciones a nivel analítico utilizando una columna Microporasil de fase normal (Waters, 10 μ , 3.9 mm x 300 mm),. La adquisición, procesamiento y manejo de los datos fueron controlados por el programa Millennium 2000 (Waters). Las condiciones de análisis fueron las siguientes: **método a)**

un gradiente de elución de agua-acetonitrilo [90:10 a 10:90 (6 min.)], flujo de 1 mL/min, a una longitud de onda de 254 nm; **método b)** ídem método a, con un gradiente de elución agua-acetonitrilo [90:10 a 20:80 (12 min)], y un flujo de 1.5 mL/min, a una λ de 220 nm; **método c)** ídem método a, con un gradiente de elución agua-acetonitrilo [90:10 a 90:10 (15 min)], y un flujo de 1.0 mL/min a una λ de 254 nm; **método d)** hexano-acetato de etilo [85:15] como eluyente, con un flujo de 1.0 mL/min a una λ de 260 nm; **método e)** ídem método d utilizando cloroformo-acetato de etilo [90:10] como eluyente. Para las purificaciones a nivel semipreparativo se utilizó una columna Microporasil de fase normal (Waters, 19.5 x 300 mm), con los flujos indicados en cada caso, usando un detector Waters 486 para las separaciones semipreparativas a una λ de 260 nm.

Cultivo y Mantenimiento de *Alternaria tagetica*

La cepa del hongo fue transferida a tubos inclinados conteniendo jugo V8-agar (5/2 %), e incubados por 15 días a 26°C, bajo 16/8 horas de luz/oscuridad. Estos tubos designados como “cultivos padre”, se mantuvieron a 4°C en la oscuridad.

Para preparar el inóculo utilizado en el cultivo del hongo en medio líquido, una parte del cultivo de *A. tagetica* se transfirió de un tubo inclinado a cajas Petri (10 cm diam.) conteniendo jugo V8-agar (5/2 %) y las cajas se incubaron a 26°C, con fotoperíodo de 16/8 horas de luz/oscuridad durante 15 días. Después de este tiempo, a cada caja se le adicionaron 5 mL de agua destilada estéril y la superficie del cultivo se raspó suavemente con un pincel. La suspensión de esporas resultante (1 mL) fue utilizada para inocular un

litro de medio líquido CET contenido en matraces de fondo plano. Los cultivos en medio líquido se incubaron en condiciones estacionarias por 28 días, a 26°C, bajo luz natural.

Procedimiento de extracción de los metabolitos (Esquema 5)

Al finalizar el período de cultivo del hongo, el micelio fue separado de la fase líquida (264 L) por filtración a través de dos capas de gasa y dos capas de papel toalla. Una parte del micelio del hongo fue secado al aire, molido y extraído con acetato de etilo en un aparato Soxhlet por 2 horas, el resto se guardó a -20°C. El filtrado acuoso se extrajo con acetato de etilo (x 3, 1:1, v:v) y la fase orgánica resultante, después de ser concentrada a presión reducida fue secada con sulfato de sodio anhidro (Aldrich), filtrada a través de papel filtro Whatman no. 1 y llevada a sequedad total obteniéndose el extracto orgánico crudo (77 g, ca. 0.29 g/L). El filtrado de cultivo, antes y después de ser extraído con acetato de etilo, así como los extractos orgánicos crudos del filtrado y del micelio, fueron evaluados en el bioensayo de gota.

El extracto orgánico fitotóxico (65 g) de *A. tagetica* fue resuspendido en una mezcla de agua-metanol (9:1, ca. 100 mL de solución/300 mg de extracto). La suspensión acuosa fue extraída sucesivamente con hexano (x 3, 2:1, 1:1, 1:1,v:v) y acetato de etilo (x 3, 2:1, 1:1, 1:1, v:v). Las correspondientes fases orgánicas fueron secadas con sulfato de sodio anhidro, filtradas a través de papel filtro Whatman no. 1 y concentradas bajo presión reducida. De esta manera se obtuvieron los correspondientes extractos de baja (13 g) y media (51 g) polaridad.

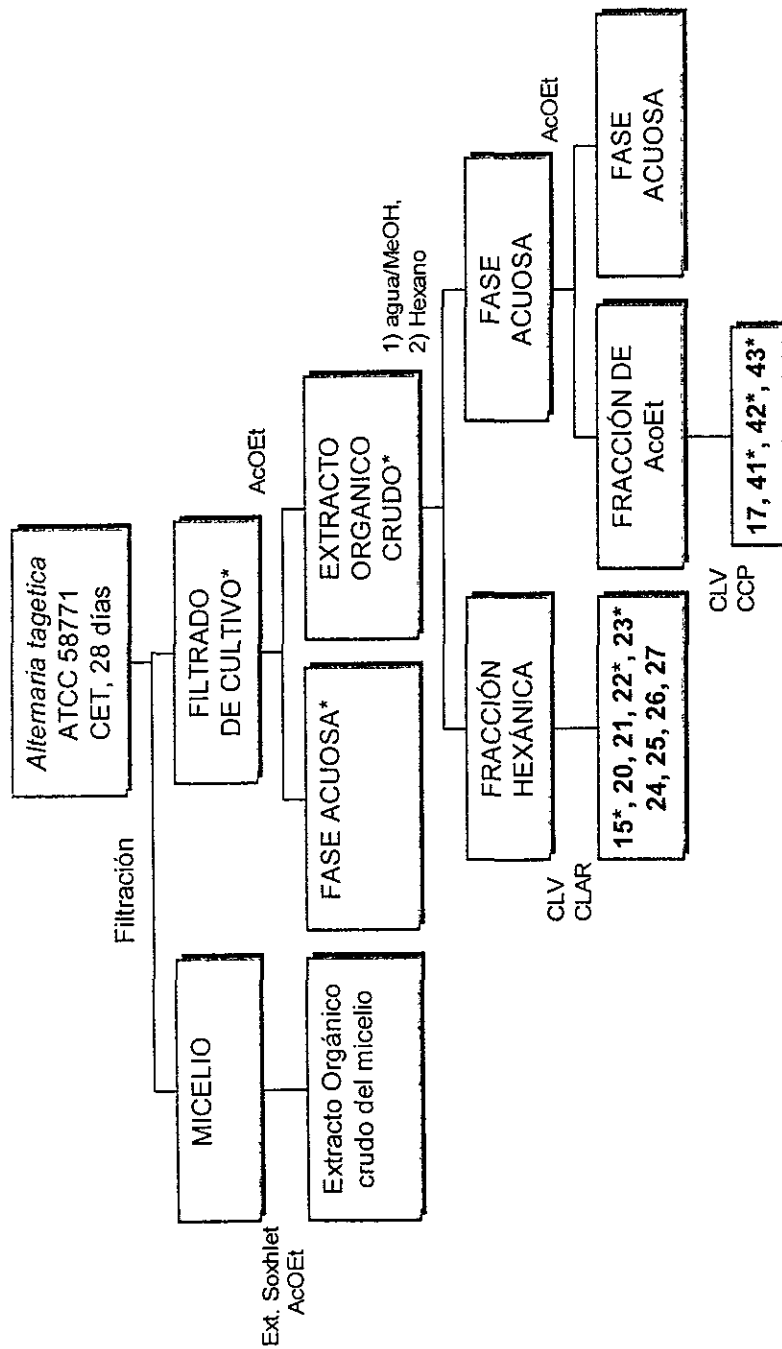
Purificación del Extracto Hexánico (Esquema 5).

El extracto de baja polaridad, activo en el bioensayo de gota, fue fraccionado por cromatografía líquida al vacío (CLV) usando una mezcla de hexano-acetona con gradiente de polaridad ascendente como eluyente. De esta purificación se obtuvieron 13 subfracciones principales, cuatro de ellas (7, 9, 10 y 11) poseedoras de actividad fitotóxica. Una purificación adicional por CC "Flash" con diclorometano-acetona-metanol [95:3:2] de la subfracción 11 resultó en el aislamiento de zinniol (**15**, 5 mg/L).

Zinniol (15, espectros 1-3): aceite amarillo; R_f 0.22 (diclorometano-acetona-metanol [95:3:2]); t_R 11.02 min (CLAR, método a), 10.99 min (CLAR, método b); t_R 10.09 min (CG, método a) y t_R 23.41 min (CG, método b); IR (película) ν_{max} 3363 (OH), 2932, 1604 (C=C), 1452 (C=C), 1114 (C-O-C) cm^{-1} ; EM m/z (int. rel.) 266 $[M]^+$ (8), 255 $[M^+-18]$ (2), 198 $[M^+-C_5H_8]$ (96), 180 (100), 165 (41), 69 $[C_5H_8 + H]^+$ (59); RMN 1H y ^{13}C ver Tabla 1, estructura **1** en publicación no.1.

Diacetato de zinniol (15a, espectros 4-5): una mezcla de **15** (12 mg, mmol), anhídrido acético (0.5 mL) y piridina (0.25 mL) fue mantenida en agitación una noche a temperatura ambiente. El producto de la reacción fue recuperado de la manera usual y purificado por CCD preparativa eluyendo dos veces con hexano-acetato de etilo [8:2], obteniéndose el derivado diacetilado **15a** (10.7 mg) como un sólido blanco amorfo de R_f 0.35 (hexano-acetato de etilo [8:2]); RMN 1H y ^{13}C ver Tabla 1 y 2, estructura **1a** en publicación no. 3.

Esquema 5. Extracción de los metabolitos de *Alternaria tagetica* Shome and Mustafae.



*Fitotóxico

Dímeros de zinniol

La subfracción fitotóxica 10 fue purificada por cromatografía en columna “flash” utilizando una mezcla de diclorometano-acetona-metanol [95:3:2] como disolvente de elución. De este procedimiento se obtuvo *bis-7-O-7''-8-O-8''-zinniol* (**20**, 0.157 mg/L) en forma pura, además de varias fracciones con diferentes componentes. La purificación por CCD preparativa de una de estas últimas fracciones eluyendo dos veces con diclorometano-acetona [95:5], resultó en la obtención de *bis-7-O-8''-8-O-7''-zinniol* (**21**, 0.2 mg/L) como un solo componente.

bis-7-O-7''-8-O-8'' zinniol (**20**, espectros 6-10): sólido blanco; R_f 0.44 (diclorometano-acetona-metanol [95:3:2]); t_R 14.24 min (CLAR, método a), 24.2 min (CLAR, método b); t_R 9.69 min (CG, método a), 23.38 min (CG, método b); IR (CHCl₃) ν_{max} 3000 (Ar-H), 2940, 1610 (C-sp²), 1120 (C-O-C) cm⁻¹; EM m/z (int. rel.) 496 [M]⁺ (14), 428 [M⁺-C₅H₈]⁺ (10), 360 (6), 342 (24), 248 (14), 181 (100), 164 (55), 69 [C₅H₈+H]⁺ (52); RMN ¹H y ¹³C ver Tabla 1, estructura 3 en publicación no. 1.

bis-7-O-8''-8-O-7'' zinniol (**21**, espectros 11-15): sólido blanco; R_f 0.33 (diclorometano-acetona-metanol [95:3:2]); t_R 14.63 min (CLAR, método a) y 24.49 (CLAR, método b); t_R 9.69 min (CG, método a) y t_R 23.38 min (CG, método b); IR (película) ν_{max} 3000, (Ar-H), 2940, 1610 (C-sp²), 1120 (C-O-C) cm⁻¹; HR-EM m/z 496.2790 (calcd. para C₃₀H₄₀O₆, 496.2825); EM m/z (int. rel.) 496 [M]⁺ (1.0), 428 [M⁺-C₅H₈]⁺ (3), 410 (5), 360 (5), 342

(12), 249 (10), 181 (100), 164 (12), 69 [C₅H₈+H]⁺ (22); RMN ¹H y ¹³C ver Tabla 1, estructura **2** en publicación no. 1.

Preparación de 20 y 21.¹⁰⁵ A una solución de **15** (23 mg, 0.086 mmol) en diclorometano (10 mL) se le adicionaron 42 mg de cloruro de zinc hidratado (Aldrich) y la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente. Después de 66 horas la mezcla de reacción se diluyó con agua y la suspensión resultante se extrajo con diclorometano. El disolvente orgánico fue eliminado a presión reducida y el producto crudo de reacción purificado por cromatografía en columna “flash”, usando mezclas de diclorometano-acetona [97.5:2.5 y 95:5], como eluyentes para producir **20** (0.5 mg) y **21** (2.5 mg) en forma pura.

La subfracción 6 obtenida de la purificación de la fracción hexánica se purificó por CLAR preparativa usando hexano-acetato de etilo [85:15], con un flujo de 18 mL/min, como eluyente. Purificaciones sucesivas de la subfracción 6 por CLAR preparativa, utilizando mezclas de hexano-acetato de etilo [85:15], con flujos de 18 y 15 mL/min, como eluyente, resultaron en el aislamiento del éter (2-fenil-) etílico de 8-zinniol (**25**, 0.21 mg/L) y del 5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálico (**26**, 0.17 mg/L).

Eter 2-(fenil)-etílico de 8-zinniol (25, espectros 30-35): aceite incoloro; *R_f* 0.55 (C₆H₆-acetona [95:5]); *t_R* 14.5 min (CLAR, método d); IR (película) ν_{\max} 3445 (OH), 3020 (Ar-H), 1605 (C-sp²), 1214 (C-O), 1148 (C-O-C) cm⁻¹; EM *m/z* (int. rel.) 370 [M]⁺ (8), 302 [M⁺-C₅H₈]⁺ (8), 284 [M⁺-C₅H₈-H₂O]⁺ (8), 180 (100), 105 [C₅H₈+H]⁺ (22), 69 [C₅H₉]⁺ (18); RMN ¹H y ¹³C ver Tabla 1 y 2, estructura **4** en publicación no. 3.

5-(3',3'-Dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálico (26, espectros 36-39): aceite incoloro (metabolito natural); R_f 0.1 (cloroformo), 0.32 (hexano-acetato de etilo [8:2]); t_R 13.3 min (CLAR, método d); IR (película) ν_{max} 3026 (Ar-H), 2933, 1752 (lactona α , β inst.), 1608 (C=C), 1216 (C-O) cm^{-1} ; EM m/z (int. rel.) 262 $[\text{M}]^+$ (15), 194 $[\text{M}^+-\text{C}_5\text{H}_8]^+$ (90), 180 (25), 165 (32), 148 (32), 69 $[\text{C}_5\text{H}_9]^+$ (18); RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) 6.61 (s, 1H, H-7), 5.48 (m, 1H, H-2'), 5.17 (s, 2H, H-3), 4.59 (d, 2H, $J=6.4$ Hz, H-1'), 4.04 (s, 3H, H-10), 2.15 (s, 3H, H-11), 1.81 (s, 3H, H-4') 1.75 (s, 3H, H-5') ppm; RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) 169.0 (C-1), 163.6 (C-9), 157.8 (C-6), 148.1 (C-9), 138.6 (C-3'), 120.7 (C-7), 118.9 (C-2'), 109.5 (C-4), 99.4 (C-5), 68.7 (C-3), 65.8 (C-1'), 62.1 (C-10), 25.8 (C-4'), 18.3 (C-5'), 8.7 (C-11) ppm.

6-(3',3'-Dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftálico (27, espectros 40-42): la subfracción 5 obtenida de la purificación de la fracción hexánica se purificó por CLAR preparativa usando hexano-acetato de etilo [85:15], con un flujo de 18 mL/min, como eluyente. El 6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftálico (27) se obtuvo en forma pura (0.28 mg/L) como un sólido blanco; R_f 0.24 (cloroformo), 0.39 (hexano-acetato de etilo [8:2]); t_R 9.47 min (CLAR, método d); IR (película) ν_{max} 3017 (Ar-H), 2923, 1764 (lactona α , β inst.), 1220 (C-O) cm^{-1} ; EM m/z (int. rel.) 262 $[\text{M}]^+$ (10), 194 $[\text{M}^+-\text{C}_5\text{H}_8]^+$ (100), 165 (52), 149 (12), 69 $[\text{C}_5\text{H}_9]^+$ (75); RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) 7.09 (s, 1H, H-7), 5.49 (s, 2H, H-3), 5.48 (m, 1H, H-2'), 4.57 (d, 2H, $J=6.6$ Hz, H-1'), 3.89 (s, 3H, H-10), 2.21 (s, 3H, H-11), 2.08 (s, 3H, H-4') 2.05 (s, 3H, H-5') ppm; RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) 171.2 (C-1), 159.9

(C-6), 152.2 (C-4), 138.2 (C-3'), 128.1 (C-8), 125.8 (C-9), 119.2 (C-2'), 102.0 (C-7), 68.2 (C-3), 65.8 (C-1'), 59.3 (C-10), 25.8 (C-4'), 18.3 (C-5'), 9.7 (C-11) ppm.

Éter metílico de 8-zinniol (22, espectros 16-20): la purificación de la subfracción 7 por CLAR utilizando hexano-acetato de etilo [85:15] como eluyente, con un flujo de 15 mL/min, resultó en la obtención del éter metílico de 8-zinniol (**22**, 0.28 mg/L) como un sólido blanco; R_f 0.3 (hexano-acetona [8:2]); t_R 18.11 min (CLAR, método c), 18.27 min (CLAR, método e); t_R 8.23 min (CGmétodo a); IR (película) ν_{max} 3433 (OH), 1604 (C-sp²), 1214 (C-O), 1114 (C-O-C) cm⁻¹; EM m/z (int. rel.) 280 [M]⁺ (8), 212 [M⁺-C₅H₈]⁺ (36), 194 [M⁺-C₅H₈-H₂O]⁺ (10), 180 (100), 69 [C₅H₈+H]⁺ (25); RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 1 y 2, estructura **5** en publicación no. 3.

Monoacetatos isoméricos de zinniol. La subfracción 9 fue purificada por CLAR utilizando cloroformo-acetato de etilo [90:10] como mezcla eluyente, obteniéndose los monoacetatos isoméricos **23** y **24** (0.04 y 0.19 mg/L, respectivamente).

Acetato de 8-zinniol (23, espectros 21-25): aceite amarillo; R_f 0.27 (diclorometano-acetato de etilo [9:1]); t_R 14.9 min (CLAR, método e); IR (película) ν_{max} 3435 (OH), 1739 (C=O), 1604 (C-sp²), 1232 (C-O), 1115 (C-O-C) cm⁻¹; EM m/z (int. rel.) 308 [M]⁺ (7), 240 [M⁺-C₅H₈]⁺ (12), 222 [M⁺-C₅H₈-H₂O]⁺ (5), 180 (100), 162 [180-H₂O]⁺ (32), 69 [C₅H₈+H]⁺ (42); RMN ¹H y ¹³C: ver tabla 1 y 2, estructura **6** en publicación no. 3.

Acetato de 7-zinniol (24, espectros 26-29): aceite amarillo; R_f 0.25 (diclorometano-acetato de etilo [9:1]); t_R 17.2 min (CLAR, método e); IR (película) ν_{max} 3435 (OH), 1739

(C=O), 1604 (C-sp²), 1232 (C-O), 1115 (C-O-C) cm⁻¹; EM *m/z* (int. rel.) 308 [M]⁺ (7), 240 [M⁺-C₅H₈]⁺ (15), 222 [M⁺-C₅H₈- H₂O]⁺ (5), 180 (100), 162 [180-H₂O]⁺ (11), 69 [C₅H₈+H]⁺ (26). RMN ¹H y ¹³C: ver tabla 1 y 2, estructura 7 en publicación no. 3.

Purificación de la Fracción Acetato de etilo (Esquema 3).

La fracción fitotóxica de mediana polaridad (51 g) fue purificada por CLV, usando mezclas de hexano-acetato de etilo-acetona en gradiente de polaridad ascendente, como eluyente. De esta purificación se obtuvieron las subfracciones A-M, observándose actividad fitotóxica en el bioensayo de gota en las subfracciones D, E, F y G.

Tagetolona (41, espectros 43-44): la subfracción D (2.14 g) fue purificada sucesivamente por CLV eluyendo con mezclas de diclorometano-acetona con gradiente de polaridad ascendente, y CCD preparativa, eluida dos veces con diclorometano-acetona-ácido acético [95:5:1], para producir la fitotoxina tagetolona (**41**, 1.7 mg/L) como un aceite marrón; *R_f* 0.48 (diclorometano-acetona-ácido acético [95:5:1], x 2), 0.2 (hexano-acetato de etilo 8:2, x 2); *t_R* 13.02 min (CG, método a); IR (CHCl₃) *v*_{max} 3602 (OH, libre), 3400 (OH, asociado), 2972, 2935 (C-H), 1699 (C=O), 1257 (C-O), 1089 (C-O-C) cm⁻¹; EM *m/z* (int. rel.) 280 [M]⁺ (30), 262 [M⁺-H₂O] (10), 236 [M⁺-C₂H₄O]⁺ (38), 193 (10), 165 [M⁺-C₆H₁₁O₂]⁺ (100), 152 (15), 135 (90), 107 (8), 91(10), 45 (10); RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) 6.42 (1H, s, H-6), 4.18 (1H, m, H-12), 3.67 (3H, s, H-15), 2.83 (2H, m, H-8a, H-9), 2.64 (1H, dd, *J*= 18,

2.7 Hz, H-8b), 2.41 (1H, dd, $J = 18, 8.7$ Hz, H-11b), 2.20 (3H, s, H-7), 2.14 (3H, s, H-16), 1.16 (3H, d, $J = 6$ Hz, H-13), 1.04 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-14) ppm.

Diacetato de Tagetolona (41a, espectros 45-50): una mezcla de **41** (19.5 mg), anhídrido acético (0.5 mL) y piridina (0.2 mL) fue mantenida en agitación durante una noche a temperatura ambiente. El producto de la reacción fue recuperado de la manera usual y purificado por CCD preparativa eluyendo dos veces con hexano-acetato de etilo [8:2]. El derivado diacetilado **41a** (14 mg) presentó un R_f de 0.5 (hexano-acetato de etilo [8:2], x 2); t_R 15.01 min (CG, método a); IR (CHCl_3) ν_{max} 3032 (Ar-H), 2982, 2931 (C-H), 1741 (COOR), 1234 (C-O), 1079 (C-O-C) cm^{-1} ; EM m/z (rel. int.) 364 $[\text{M}]^+$ (10), 322 $[\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$ (10), 304 $[\text{M}^+ - \text{AcOH}]^+$ (20), 286 (30), 262 $[\text{M}^+ - \text{AcOH} - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$ (25), 245 $[\text{M}^+ - 2 \text{AcOH} + \text{H}]^+$ (25), 193 (17), 166 (100); RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) 6.64 (1H, s, H-6), 5.26 (1H, m, H-12), 3.69 (3H, s, H-15), 2.88 (2H, m, H-8a, H-9), 2.79 (1H, dd, $J = 18.5, 7$ Hz, H-11a), 2.59 (1H, dd, $J = 15.5, 10$ Hz, H-8b), 2.42 (1H, dd, $J = 16.5, 6$ Hz, H-11b), 2.30 (3H, s, $\text{C}_{12}\text{-CH}_3$), 2.25 (3H, s, H-7), 2.07 (3H, s, H-16), 1.98 (3H, s, $\text{C}_5\text{-CH}_3$), 1.20 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-13), 1.04 (3H, d, $J = 7$ Hz, H-14) ppm; RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) 211.3 (C=O), 170.2 ($\text{C}_5\text{-COOR}$), 169.2 (C-12-COOR), 158.0 (C-3), 148.3 (C-5), 135.7 (C-1), 129.2 (C-2), 121.2 (C-4), 119.5 (C-6), 67.2 (C-12), 60.3 (C-15), 47.6 (C-11), 46.6 (C-9), 29.7 (C-8), 21.2 ($\text{C}_5\text{-CH}_3$), 20.8 ($\text{C}_{12}\text{-CH}_3$), 19.9 (C-7, C-13), 15.9 (C-14), 9.7 (C-16) ppm.

Tagetenolona (42, espectros 51-56). Purificaciones sucesivas por CLV (diclorometano-acetona en polaridad ascendente) y CC "flash" (hexano-acetona-metanol [75:20:5]) de la subfracción G (3.61 g) resultó en la obtención del metabolito fitotóxico **42** (1.17 mg/mL),

en forma de un aceite marrón; R_f de 0.47 (hexano-acetona-metanol [60:35:5]), 0.57 (diclorometano-acetato de etilo-metanol [80:18:2]); t_R 13.02 min (CG, método a); UV (metanol) λ_{\max} (log ϵ) 297 (3.2), 266 (3.2), 233 (3.3) nm; IR (CHCl₃) ν_{\max} 3600 (OH, libre), 3359 (OH, asociado), 2965, 2933 (C-H), 1610 (C=C), 1593 (HO-C=C-C=O), 1103 (C-O-C), 1012 (C-O) cm⁻¹; HR-EM m/z 294.1383 (calcd. Para C₁₆H₂₂O₅, 294.1467); EM m/z (rel. int.) 294 [M]⁺ (12), 276 [M⁺-H₂O] (18), 259 [M⁺-2 H₂O + H]⁺ (22), 240 (8), 207 (17), 192 (30), 181 [M⁺-C₆H₉O₂]⁺ (100), 165 (23), 151 (22), 136 (12), 91(8), 64 (12); RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) 6.68 (1H, s, H-6), 5.44 (1H, m, H-11), 4.65 (1H, d, J = 12.5 Hz, H-7), 4.54 (1H, d, J = 12.5 Hz, H-7), 3.69 (3H, s, H-15), 2.92 (2H, dd, J = 13.3, 6.3 Hz, H-8a), 2.8 (1H, q, J =7 Hz, H-9), 2.67 (1H, dd, J = 13.2, 7.2 Hz, H-8b), 2.16 (3H, s, H-16), 2.00 (3H, s, H-13), 1.12 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-14), 1.04 (3H, d, J = 7 Hz, H-14) ppm; RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) 199.4 (C=O), 190.8 (C-12), 158.7 (C-3), 154.0 (C-5), 138.0 (C-1), 122.6 (C-2), 117.5 (C-4), 111.4 (C-6), 99.5 (C-11), 63.0 (C-7), 60.5 (C-15), 43.6 (C-9), 30.4 (C-8), 24.8 (C-13), 17.8 (C-14), 9.4 (C-16) ppm.

Tyrosol (43, espectros 57-60). Purificación de la subfracción E (2.41 g) mediante CC “flash” sucesivas usando hexano-acetona-metanol [75:23:2], diclorometano-metanol [97:3] y hexano-acetato de etilo-acetona [60:38:2], resultó en la obtención de tyrosol (43, 1.13 mg/L) como un aceite marrón; R_f de 0.37 (diclorometano-acetona-metanol [75:23:2]); t_R 12.45 min (CG, método b); IR (CHCl₃) ν_{\max} 3600 (OH libre), 3388 (OH asociado), 2970, 2937 (C-H), 1613 (C-sp²), 1381 y 1045 (C-O) cm⁻¹; EM m/z (int. rel.) 138 [M]⁺ (12), 107 [M⁺-CH₃O]⁺ (100), 77 (16), 31 (42); RMN ¹H (acetona-d₆, 300 MHz) 7.03 (2H, dd, J = 8.7, 2.1, H-2, H-6), 6.72 (2H, dd, J = 8.7, 2.1 Hz, H-3, H-5), 3.65 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-8),

2.68 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-7) ppm; RMN ^{13}C (acetona d_6 , 75 MHz) 151 (C-1), 131 (C-4), 130.6 (C-2, C-6), 115.9 (C-5, C-3), 64.2 (C-8), 39.5 (C-7) ppm.

Diacetato de tyrosol (43a, espectros 36-38): una mezcla de **43** (33.3 mg), anhídrido acético (2 mL) y piridina (1 mL) fue mantenida en agitación una noche a temperatura ambiente. El producto de la reacción fue recuperado de la manera usual y purificado por una columna cromatográfica empacada con gel de sílice y eluida con hexano-acetato de etilo-acetona [90:8:2] obteniendo el derivado diacetilado **43a** (17.7 mg). Aceite café; R_f de 0.36 (hexano-acetato de etilo-acetona [80:18:2]); IR (CHCl_3) ν_{max} 2960, 1736 (COOR), 1510 (C-sp 2), 1371 y 1210 (C-O) cm^{-1} ; EM m/z (int. rel.) 222 [M^+] (5), 180 [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{CO}$] (8), 138 [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{CO} (\times 2)$] (18), 120 [$180 - \text{CH}_3\text{O}$] (100), 43 (65); RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) 7.22 (2H, dd, $J = 8.4, 2.1$, H-2, H-6), 7.02 (2H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, H-3, H-5), 4.27 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-8), 2.93 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-7), 2.28 (3H, s, CH_3COOR), 2.03 (3H, s, CH_3COOR) ppm; RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) 171.0, 169.5 (CH_3COOR), 149.0 (C-1), 135.0 (C-4), 130.2 (C-2, C-6), 121.9 (C-5, C-3), 64.2 (C-8), 34.5 (C-7), 21.0 (2 CH_3COOR) ppm.

Ácido *p*-hidroxibenzoico (17, espectro 64-65). Una purificación por CC “flash” (hexano-acetato de etilo-metanol 75:20:5) de la subfracción F (2.39 g) condujo a la obtención del ácido-*p*-hidroxibenzoico (**17**, 0.54 mg/L) como un sólido blanco; R_f 0.22 (diclorometano-acetona-metanol [75:23:2]); IR (película) ν_{max} 3392 (OH), 2923, 1675 (COO), 1598 (C-sp 2), 1250 y 1170 (C-O) cm^{-1} ; EM m/z (int. rel.) 138 [M^+] (90), 121 [$\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$] (100), 93 [$\text{M}^+ - \text{COOH}$] (16), 69 (17), 43 (13); RMN ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) 9.0 (1H, sa, H-7),

7.91 (2H, d, $J = 9$ Hz, H-3, H-5), 6.92 (2H, d, $J = 9$ Hz, H-2, H-6) ppm; RMN ^{13}C (acetona d_6 , 75 MHz) 167.4 (C-7), 162.5 (C-4), 132.9 (C-2, C-6), 122.6 (C-1), 115.9 (C-3, C-5) ppm.

Acetato del ácido *p*-hidroxibenzoico (17a, espectros 66a y b). Una mezcla de 17 (25.9 mg), anhídrido acético (1.0 mL) y piridina (0.3. mL) fue mantenida en agitación una noche a temperatura ambiente. El producto de la reacción fue recuperado de la manera usual y purificado por CCD preparativa eluyendo seis veces con hexano-acetona [8:2] obteniendo el derivado acetilado 17a (2.3 mg). RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), 9.0 (1H, s, H-7), 8.14 (2H, d, $J = 9$ Hz, H-3, H-5), 7.21 (2H, d, $J = 9$ Hz, H-2, H-6), 2.10 (6H, CH_3COOR) ppm; RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) 170.3 (C-7), 154.9 (C-4), 131.9 (C-2, C-6), 122.6 (C-1), 121.7 (C-3, C-5), 21.17 (2 CH_3COOR) ppm.

Obtención de derivados sintéticos de zinniol (15)

Oxidación de zinniol (15).⁶¹ Una solución de 15 (616.8 mg, 2.31 mmol) en acetona (485 mL) conteniendo un exceso de ácido crómico en solución fue mantenida a temperatura ambiente con agitación constante durante cinco minutos. Enseguida la mezcla de la reacción se diluyó con agua y el producto crudo de oxidación fue recuperado por extracción de la fase acuosa con éter etílico (x 3, 2:1, 1:1, 1:1, v:v). La fase orgánica fue lavada sucesivamente con agua y una solución saturada de cloruro de sodio, secada con sulfato de sodio anhidro y filtrada a través de una cama de gel de sílice. El disolvente fue eliminado *in vacuo*, obteniéndose un producto que por CCD mostró tres componentes. Una

purificación por CLAR preparativa (método d) del producto crudo de oxidación produce **44** (117.9 mg, 18%), **26** (176.7 mg, 29%) y **27** (168.2 mg, 28%) en forma pura.

Anhídrido de zinniol (44, espectro 67-69): sólido blanco amorfo; R_f 0. 0.52 (CHCl₃); t_R 4.4 min (CLAR, método d); IR (película) ν_{max} 2939 (C-H), 1838 (anh.), 1772 (anh.), 1614 (sp²-C), 1214 (C-O), 1114 (C-O-C) cm⁻¹; EM m/z (rel. int.) 276 [M]⁺ (3), 208 [M⁺-C₅H₈]⁺ (5), 164 [M⁺C₅H₈-CO₂]⁺ (8), 69 [C₃H₉]⁺ (100); RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 7.15 (1H, s, H-6), 5.47 (1H, ddd, $J = 6.6, 6.6, 1.5$ Hz, H-2'), 4.68 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, H-1'), 4.16 (2H, s, H-9), 2.21 (3H, s, H-10), 1.82 (3H, d, $J = 0.9$ Hz, H-4'), 1.75 (3H, s, H-5') ppm; RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) 163.5 (C-8), 164.5 (C-7), 160.9 (C-3), 157.9 (C-5), 139.6 (C-1), 131.9 (C-3'), 118.2 (C-2'), 112.1 (C-4), 103.1 (C-6), 66.4 (C-1'), 62.3 (C-9), 25.8 (C-4'), 18.3 (C-5'), 9.6 (C-10) ppm.

5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálico: sólido blanco; R_f , t_R en CLAR, IR, EM, RMN ¹H y RMN ¹³C idénticos al producto natural **26**.

6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftálico: sólido blanco; R_f , t_R en CLAR IR, EM, RMN ¹H y RMN ¹³C idénticos al producto natural **27**.

Hidrólisis y metilación del 6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftálico (27, espectro 64-66).⁹⁷⁻⁹⁹ Una mezcla de **27** (25 mg, 0.095 mmol), metanol (10 mL, Aldrich) y un exceso de carbonato de potasio (Merck), fue calentada a reflujo con agitación constante, hasta observar el consumo total de la materia prima (7 h). El disolvente fue removido a presión

reducida y el residuo resultante fue primero secado al alto vacío y después bajo atmósfera de nitrógeno, combinado con 4 mL de tetrahidrofurano anhidro (4 mL, Aldrich); la mezcla resultante se hizo reaccionar con 180 mg de hidruro de sodio (80% en aceite mineral, 6 mmol, Aldrich) previamente lavado con tetrahidrofurano anhidro. La suspensión se dejó agitar a temperatura ambiente por media hora, enseguida se adicionaron 300 μ L de yoduro de metilo (4.82 mmol, Baker). Una vez consumida la materia prima (43 horas), el exceso de reactivo fue eliminado mediante la adición de una solución saturada de cloruro de amonio y agua. La suspensión acuosa resultante fue extraída con acetato de etilo (x 3, 2:1, 1:1, 1:1, v:v) y la fase orgánica fue lavada con agua hasta pH neutro y con solución saturada de NaCl, para posteriormente ser secada con sulfato de sodio anhidro y filtrada a través de papel filtro Whatman no. 1. El disolvente fue eliminado a presión reducida obteniéndose el producto crudo de la reacción **45** (12.2 mg, 42%). La fase acuosa residual fue neutralizada con ácido sulfúrico (2N) y extraída con acetato de etilo (x 3, 2:1, 1:1, 1:1, v:v). La fase orgánica resultante fue lavada con agua hasta pH neutro y con solución saturada de NaCl, secada con sulfato de sodio anhidro y filtrada a través de una cama de gel de sílice empacada en una microcolumna, eluyendo con hexano-acetona [8:2], obteniendo **46** (3.7 mg, 13%) en forma pura.

3-Metoxi-4-metil-5-(3',3'-dimetilaliloxi)-2-metoximetilbenzoato de metilo (45, espectro 70-73): aceite amarillo; R_f (0.49 en hexano-acetona [8:2]); t_R 8.88 min (CG, método a); IR (CHCl_3) ν_{max} 3015 (Ar-H), 1730 (C=O), 1607 ($\text{sp}^2\text{-C}$), 1118 (C-O-C) cm^{-1} ; EM m/z (int. rel.): 225 [$\text{M}^+\text{-C}_5\text{H}_8\text{-CH}_3$] $^+$ (9), 193 [$\text{M}^+\text{-C}_5\text{H}_8\text{-H}_2\text{O}$] $^+$ (100), 179 (3), 69

$[\text{C}_5\text{H}_9]^+$ (71); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) 7.14 (1H, s, H-6), 5.47 (1H, ddd, $J = 6.6, 6.6, 1.2$ Hz, H-2'), 4.71 (1H, s, H-8), 4.54 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, H-1'), 3.9 (3H, s, H-1''), 3.76 (3H, s, H-9), 3.39 (3H, s, H-2''), 2.19 (3H, s, H-10), 1.79 (3H, s, H-4'), 1.75 (3H, s, H-5') ppm; RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) 168.1 (C-7), 158.8 (C-3), 157.3 (C-5), 137.9 (C-3'), 129.8 (C-1), 124.6 (C-2), 124.2 (C-4), 119.6 (C-2'), 109.3 (C-6), 65.7 (C-8), 65.4 (C-1'), 61.9 (C-9), 58.2 (C-2''), 52.1 (C-1''), 25.8 (C-4'), 18.3 (C-5'), 9.5 (C-10) ppm.

Ácido 3-metoxi-4-metil-5-(3',3'-dimetilaliloxi)-2-metoximetilbenzoico (46, espectro 74-76): sólido blanco; R_f 0.14 (hexano-acetona [8:2]); t_R 10.54 min (CG, método a); IR (CHCl_3) ν_{max} 3400-2600 (COOH), 3008 (Ar-H), 1716 (C=O), 1603 ($\text{sp}^2\text{-C}$), 1114 (C-O-C) cm^{-1} ; EM m/z (int. rel.): 226 $[\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8]^+$ (10), 212 $[\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8 - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ (18), 193 $[\text{212} - \text{H}_2\text{O}]^+$ (100), 165 (11), 69 $[\text{C}_5\text{H}_9]^+$ (61); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) 7.23 (1H, s, H-6), 5.47 (1H, ddd, $J = 6.6, 6.6, 1.2$ Hz, H-2'), 4.71 (2H, s, H-8), 4.58 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, H-1'), 3.74 (3H, s, H-9), 3.49 (3H, s, H-1''), 2.21 (3H, s, H-10), 1.80 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, H-4'), 1.75 (3H, s, H-5') ppm; RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) 168.9 (C-7), 158.3 (C-3), 158.1 (C-5), 138.2 (C-3'), 131.3 (C-1), 125.1 (C-2), 121.1 (C-4), 119.4 (C-2'), 110.7 (C-6), 66.1 (C-7), 65.3 (C-1'), 62.0 (C-9), 58.0 (C-1''), 25.8 (C-4'), 18.3 (C-5'), 9.7 (C-10).

Hidrólisis y metilación del 5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálico (26, espectro 64-66). Una solución de **26** (21 mg, 0.08 mmol) en metanol (10 mL) se calentó a reflujo con agitación constante en presencia de un exceso de carbonato de potasio. Una vez

consumida la materia prima (24 h) el disolvente fue eliminado *in vacuo* y la mezcla resultante secada al alto vacío. El producto de la hidrólisis fue sometido a las condiciones de metilación similares a las descritas para **27**, con tetrahidrofurano anhidro (4 mL), hidruro de sodio (208 mg, 6.93 mmol, 80% in mineral oil) y yoduro de metilo (200 μ L, 3.2 mmol). Después de 44 horas de reacción se observó por CCD el consumo de la materia prima; el producto crudo de reacción se purificó por CC, usando con hexano-acetona [8:2] como eluyentes para recuperar **47** (14.1 mg, 57%) y **48** (5 mg, 21%) en forma pura.

2-Metoxi-3-metil-4-(3',3'-dimetilaliloxi)-6-metoximetil benzoato de metilo (47, espectro 64-66): aceite amarillo pálido; R_f 0.44 (hexano-acetona [8:2]); t_R 8.75 min (CG, método a); IR (CHCl_3) ν_{max} 3010 (Ar-H), 1727 (C=O), 1602 ($\text{sp}^2\text{-C}$), 1114 (C-O-C) cm^{-1} ; EM m/z (int. rel.): 308 $[\text{M}]^+$ (1), 240 $[\text{M}^+-\text{C}_5\text{H}_8]^+$ (61), 208 $[\text{240-CH}_3\text{O-H}]^+$ (100), 193 $[\text{208-CH}_3]^+$ (66). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): 6.71 (1H, s, H-6), 5.47 (1H, ddd, $J = 6.5, 6.5, 1.5$ Hz, H-2'), 4.54 (2H, d, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 4.46 (1H, s, H-7), 3.89 (3H, s, H-2''), 3.76 (3H, s, H-9), 3.56 (3H, s, H-1''), 2.14 (3H, s, H-10), 1.79 (3H, s, H-4'), 1.74 (3H, s, H-5') ppm; RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): 168.4 (C-8), 159.1 (C-3), 157.0 (C-5), 137.8 (C-3'), 135.6 (C-1), 119.7 (C-2'), 119.6 (C-4), 119.1 (C-2), 106.8 (C-6), 72.4 (C-7), 65.4 (C-1'), 61.9 (C-9), 58.3 (C-1''), 52.0 (C-2''), 25.8 (C-4'), 18.3 (C-5'), 9.0 (C-10) ppm.

Ácido 2-metoxi-3-metil-4-(3',3'-dimetilaliloxi)-6-metoximetil benzoico (48, espectro 81-83): sólido blanco; R_f 0.12 (hexano-acetona [8:2]); t_R 9.68 min (CG, método a); IR (CHCl_3) ν_{max} 3400-2600 (COOH), 3008 (Ar-H), 1720 (C=O), 1603 ($\text{sp}^2\text{-C}$), 1381, 1106

(C-O-C) cm^{-1} ; EM m/z (int. rel.): 226 [$\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8$] $^+$ (13), 193 [$212 - \text{H}_2\text{O}$] $^+$ (100), 179 (11), 165 (12), 69 [C_5H_9] $^+$ (23); RMN ^1H y (300 MHz, CDCl_3) 7.07 (1H, s, H-6), 5.47 (1H, ddd, $J = 6.6, 6.6, 1.5$ Hz, H-2'), 4.81 (1H, s, H-7), 4.62 (2H, d, $J = 6$ Hz, H-1'), 3.86 (3H, s, H-9), 3.48 (3H, s, H-1''), 2.17 (3H, s, H-10), 1.80 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, H-4'), 1.77 (3H, s, H-5') ppm; RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) 166.0 (C-8), 161.0 (C-3), 158.3 (C-5), 142.1 (C-1), 138.3 (C-3'), 119.3 (C-4 and C-2'), 118.5 (C-2) 107.0 (C-6), 72.9 (C-7), 65.5 (C-1'), 62.5 (C-9), 58.6 (C-1''), 25.8 (C-4'), 18.3 (C-5'), 9.0 (C-10) ppm.

Reducción del 2-metoxi-3-metil-4-(3',3'-dimetilaliloxi)-6-metoximetil benzoato de metilo. Una suspensión de hidruro de litio y aluminio (26 mg, 0.68 mmol) en tetrahydrofurano anhidro (5 mL) colocada en un baño de hielo fue desoxigenada burbujeando con nitrógeno durante 15 minutos. Enseguida se adicionó, gota a gota y bajo atmósfera de nitrógeno, una solución de **47** (10 mg, 0.32 mmol) en tetrahydrofurano anhidro. Después de cinco minutos se observó por CCD el consumo total de la materia prima y el exceso de reactivo fue eliminado mediante adiciones sucesivas de tetrahydrofurano-agua [9:1] hasta obtener un precipitado blanco. La fase líquida fue recuperada por filtración a través de papel filtro Whatman no. 1 y extraída con acetato de etilo (3x, 2:1, 1.1, 1:1). La fase orgánica resultante fue lavada con agua, solución saturada de NaCl, secada con sulfato de sodio anhidro y concentrada a presión reducida. El producto crudo de reacción fue purificado utilizando por una microcolumna empacada con gel de sílice, y una mezcla hexano-acetato de etilo [85:15] como eluyente. De esta forma se obtuvo el éter metílico de 7-zinniol (**49**, 4.1 mg, 46 %).

49 (espectro 64-66). Aceite amarillo pálido; R_f 0.3 (hexano-acetona [8:2]); t_R 8.21 min (CG, método a); t_R 18.43 min (CLAR, método c); IR (CHCl_3) ν_{max} 3468 (OH), 3009 (Ar-H), 1606 ($\text{sp}^2\text{-C}$), 1116 (C-O-C) cm^{-1} ; EM m/z (int. rel.) 212 [$\text{M}^+\text{-C}_5\text{H}_8$] $^+$ (2), 194 [$\text{M}^+\text{-C}_5\text{H}_8\text{-H}_2\text{O}$] $^-$ (5), 180 (100), 163 (30), 69 [C_5H_9] $^+$ (100); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) 6.64 (1H, s, H-6), 5.49 (1H, ddd, $J = 6.6, 6.6, 1.2$ Hz, H-2'), 4.67 (2H, s, H-8), 4.52 (2H, d, $J = 6$ Hz, H-1'), 4.52 (2H, s, H-7), 3.81 (3H, s, H-9), 3.43 (3H, s, H-1''), 2.18 (3H, s, H-10), 1.79 (3H, d, $J = 0.9$ Hz, H-4'), 1.74 (3H, s, H-5'); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) 158.4 (C-3), 157.3 (C-5), 137.5 (C-3'), 135.3 (C-1), 126.1 (C-2), 120.5 (C-4), 120.0 (C-2'), 109.4 (C-6), 74.4 (C-7), 65.4 (C-1'), 61.9 (C-9), 56.9 (C-8), 25.8 (C-4'), 18.2 (C-5'), 9.2 (C-10) ppm.

Reducción de 3-metoxi-4-metil-5-(3',3'-dimetilaliloxi)-2-metoximetil benzoato de metilo (45). Una solución de **45** (4 mg, 0.013 mmol) en tetrahidrofurano anh. (3 mL) fue sometida a condiciones de reducción con hidruro de litio y aluminio (12.4 mg, 0.32 mmol) durante dos horas, de manera similar a la descrita para **47**, obteniéndose el éter metílico de 8-zinniol (**50**, 1.9 mg, 49%) en forma pura.

Bioensayo de gota

La actividad fitotóxica de los filtrados de cultivo, de los extractos orgánico crudos y de las fracciones obtenidas fue detectada utilizando el bioensayo de gota en hojas de cempazúchitl (*T. erecta* L.). Para llevar a cabo el bioensayo, las hojas frescas y sanas fueron limpiadas y secadas con servitoallas; posteriormente se ocasionaron leves lesiones en el envés foliar, removiendo la cutícula suavemente con un pincel. Las hojas tratadas fueron colocadas en cajas Petri de 10 cm de diámetro conteniendo dos capas de papel filtro humedecidas con 5 mL de agua destilada. Sobre

cada lesión se aplicaron 20 μL de agua destilada y sobre cada gota se adicionó la muestra adsorbida en gel de sílice. La muestra se preparó disolviéndola al 4% en un disolvente orgánico y adsorbiendo 5 μL (0.2 mg/aplicación) o 2.5 μL (0.1 mg/aplicación) de esta solución en gel de sílice sobre soporte de vidrio (5 x 5 x 0.5 mm). Una vez evaporado el disolvente, la gel de sílice impregnada se adicionó a la gota de agua previamente aplicada sobre la lesión foliar, manteniendo las cajas de Petri a 25-26 °C con luz natural. Como controles negativos se utilizaron gel de sílice impregnada con el disolvente utilizado y el vehículo de aplicación (agua). Las evaluaciones se hicieron por triplicado (dos lesiones por hoja) y se observaron cada 24 horas durante tres días. El daño (necrosis y/o clorosis) se cuantificó con un digitalizador de imágenes, reportándose como área de lesión en mm^2 .

Durante el establecimiento del bioensayo se utilizaron como controles negativos, el filtrado, extracto orgánico crudo y la fase acuosa residual del blanco (medio de cultivo sin inocular); como control positivo se utilizó zinniol y el extracto orgánico crudo obtenido de las esporas del hongo (incubadas en agua por 24 h y el agua extraída con acetato de etilo).

CONCLUSIONES

El bioensayo de gota establecido con las hojas de *Tagetes erecta* L. permitió detectar de una manera rápida y confiable la actividad fitotóxica en los caldos de cultivo de *Alternaria tagetica* y el aislamiento biodirigido de algunos de los componentes responsables de esta actividad. La fitotoxicidad manifestada por los metabolitos contenidos tanto en el extracto orgánico crudo, como en la fase acuosa residual, permitió determinar la presencia de metabolitos de naturaleza hidrofóbica e hidrofílica producidos por *A. tagetica*.

El estudio de la fracción fitotóxica hidrofóbica de *A. tagetica* guió al aislamiento e identificación de un total de trece metabolitos a partir de las fracciones de baja y mediana polaridad: zinniol (15), ácido *p*-hidroxibenzoico (17), *bis*-7-*O*-7''-8-*O*-8''-zinniol (20), *bis*-7-*O*-8''-8-*O*-7''-zinniol (21), éter metílico de 8-zinniol (22), acetato de 8-zinniol (23), acetato de 7-zinniol (24), éter (2-fenil)-etílico de 8-zinniol (25), 5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálico (26), 6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftálico (27) tagetolona (41) tagetenolona (42) y tyrosol (43).

Los metabolitos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 41 y 42 correspondieron a productos naturales nuevos, de los cuales el éter metílico de 8-zinniol (22), el acetato de 8-zinniol (23), tagetolona (41) y tagetenolona (42) demostraron poseer actividad fitotóxica al ser evaluadas en el bioensayo de gota contra *T. erecta* L. Adicionalmente, tyrosol (43) es descrita por

primera vez como una fitotoxina producida por *A. tagetica*, con una intensidad de actividad similar a la ocasionada por zinniol (15).

Los metabolitos fitotóxicos y no fitotóxicos purificados e identificados de *A. tagetica* contribuyen a enriquecer el conocimiento químico de los productos naturales producidos por hongos del género *Alternaria*, y a enriquecer la familia química de los metabolitos derivados del zinniol.

La mayoría de los metabolitos aislados se encuentran estructuralmente relacionados con zinniol (15), conservando como rasgo característico el anillo aromático con el mismo patrón de sustitución. El aislamiento de los derivados monoeterificados y monoacetilados de zinniol (22-25), correspondió al primer informe de la presencia de derivados naturales de zinniol conservando la unidad íntegra de ésta molécula. Por otra parte, la estructura de tagetolona (41) y tagetenolona (42) describen por primera vez metabolitos con una cadena alquílica en lugar de uno de los alcoholes bencílicos y sin la cadena lateral de isopreno de zinniol.

La presencia de tyrosol (43) y ácido-*p*-hidroxibenzoico (17) sugieren que *A. tagetica* también produce metabolitos por la vía del ácido siquímico, los cuales no son comunes en las especies del género *Alternaria*.

Los resultados obtenidos de los experimentos bidimensionales HMQC y HMBC de zinniol (15) proporcionaron la evidencia que permitió asignar correctamente los datos

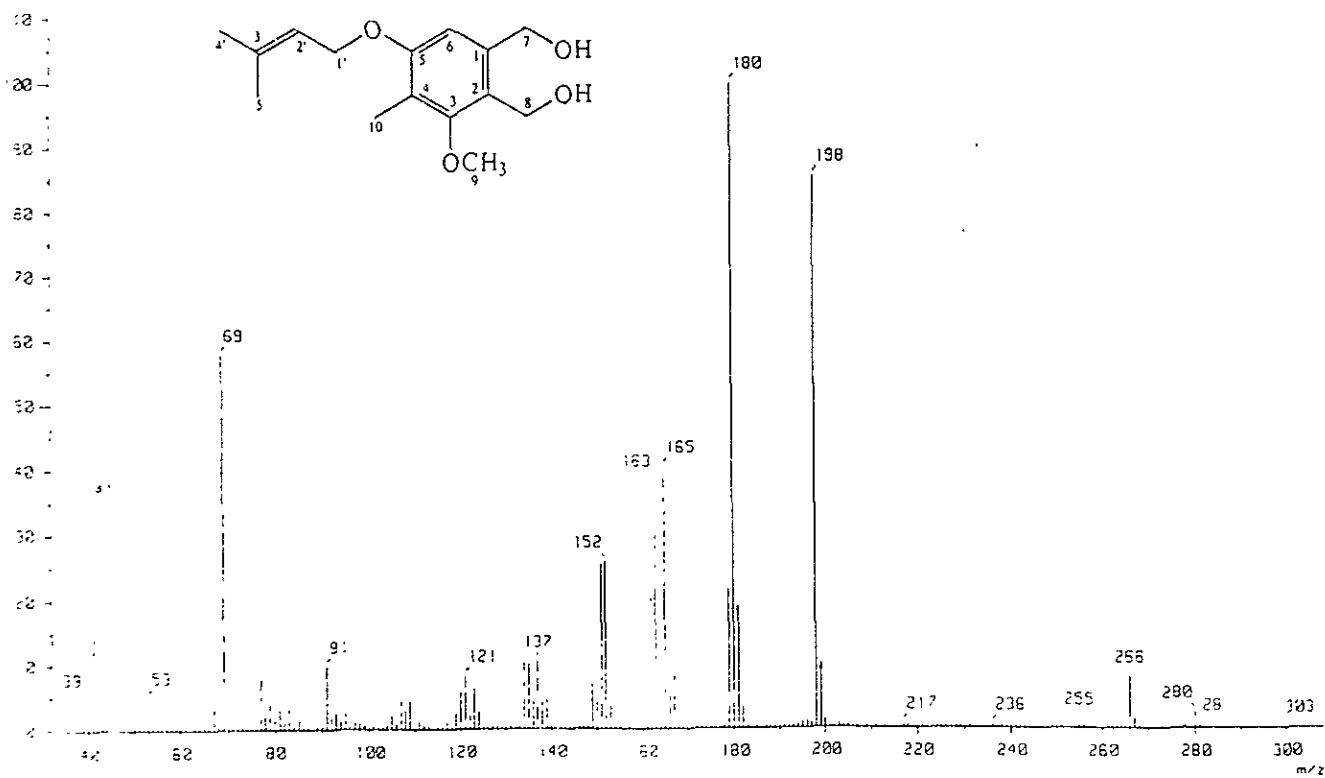
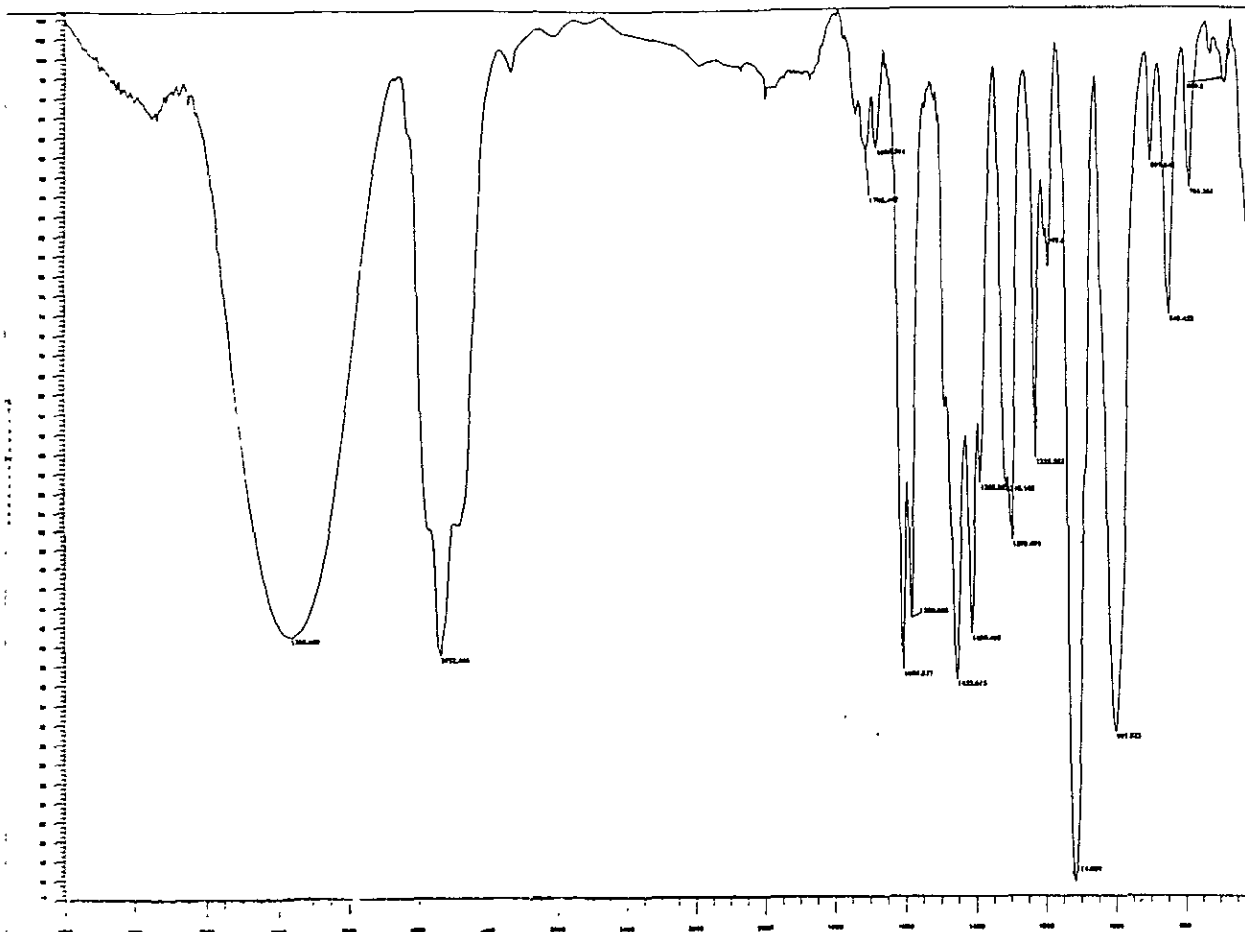
espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C de zinniol (**15**) para corregir los informados previamente en la literatura.

La identificación de los metabolitos diméricos **20** y **21** en los cultivos de *A. tagetica* enriquecen el limitado número de este tipo de productos naturales aislados de hongos del género *Alternaria*, representando el primer ejemplo de dímeros formados a través de enlaces etereos del género. La estructura de ambos dímeros **20** y **21** fue corroborada mediante su preparación química, utilizando zinniol como materia prima.

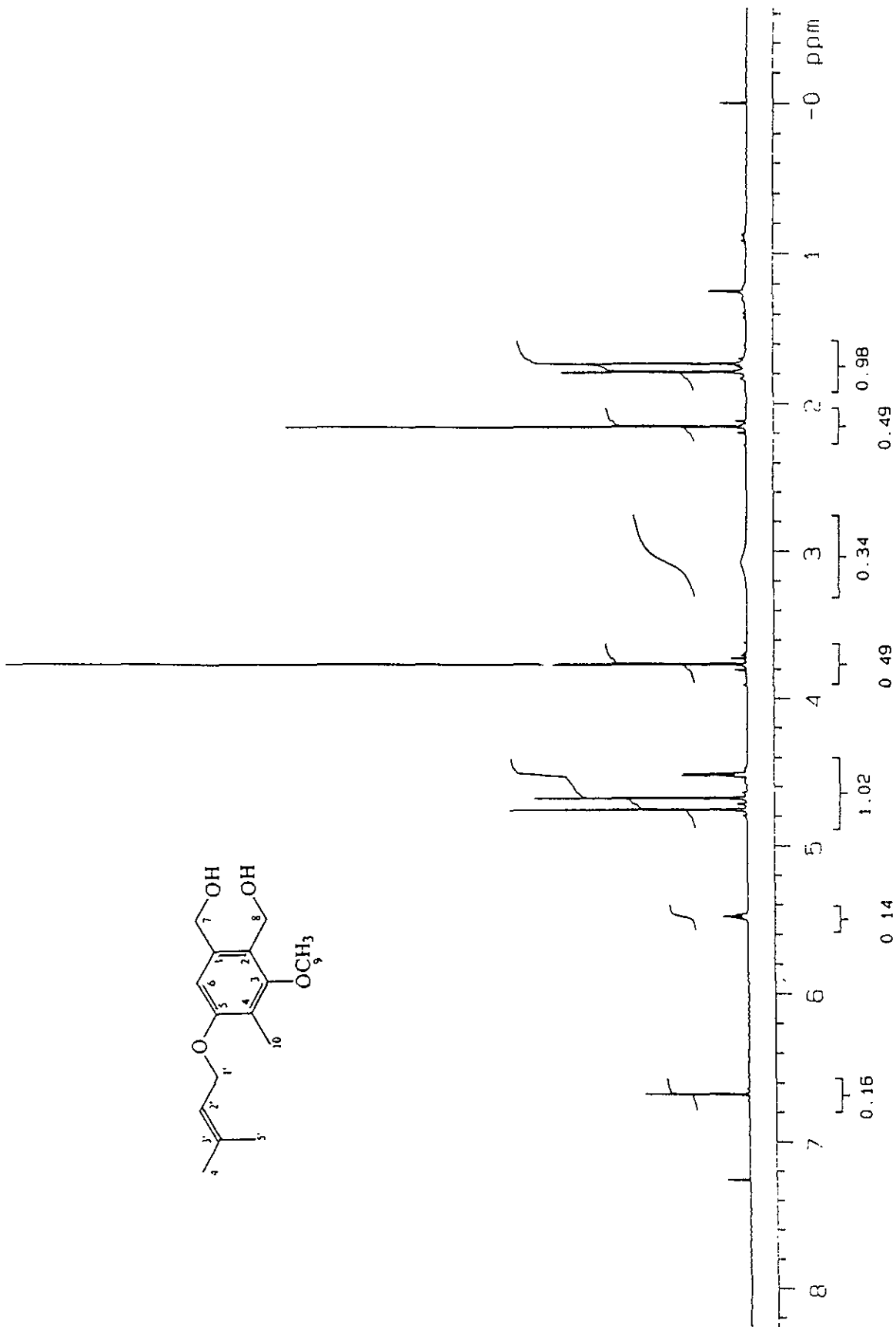
Se diseñó un esquema sintético para la obtención del éter metílico de 8-zinniol (**22**) y su isómero el éter metílico de 7-zinniol (**49**), a partir de zinniol como materia prima, confirmando finalmente la estructura propuesta para el metabolito natural. La oxidación de zinniol con el reactivo de Jones, conduce a la obtención de los dos ftálicos isoméricos de zinniol (**26** y **27**) y al anhídrido de zinniol (**44**), siendo este último informado por primera vez como un subproducto de esta reacción. Como paso clave para la síntesis de los éteres isoméricos **49** y **50** (**22**) se identificó la necesidad de metilar *in situ* el producto de la hidrólisis de las correspondientes δ -lactonas **26** y **27**.

Durante el trabajo de síntesis se prepararon cinco nuevos compuestos: 3-metoxi-4-metil-5-(3',3'-dimetilaliloxi)-2-metoximetil benzoato de metilo (**45**), ácido 3-metoxi-4-metil-5-(3',3'-dimetilaliloxi)-2-metoximetilbenzoico (**46**), 2-metoxi-3-metil-4-(3',3'-dimetilaliloxi)-6-metoximetil benzoato de metilo (**47**), ácido 2-metoxi-3-metil-4-(3',3'-dimetilaliloxi)-6-metoximetilbenzoico (**48**) y éter metílico de 7-zinniol (**49**).

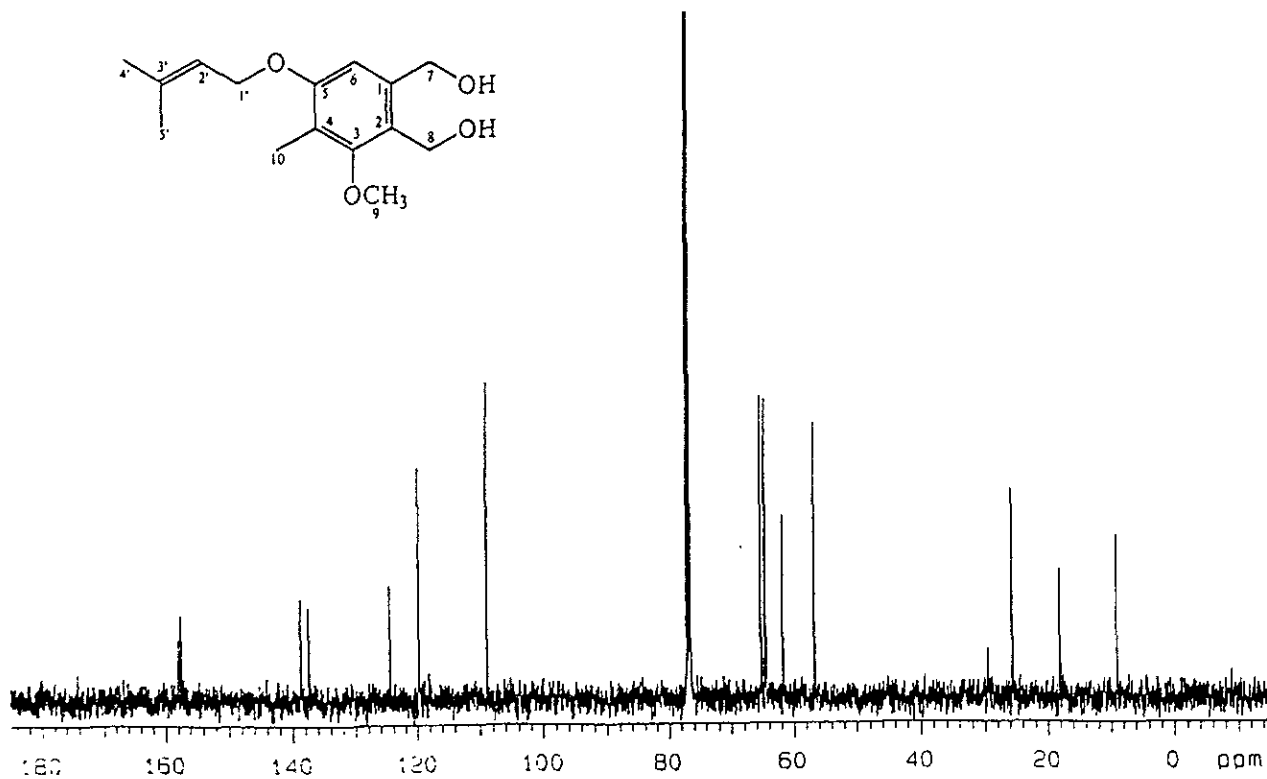
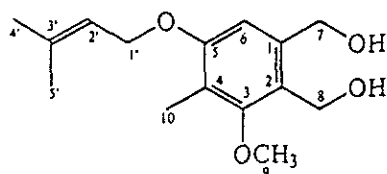
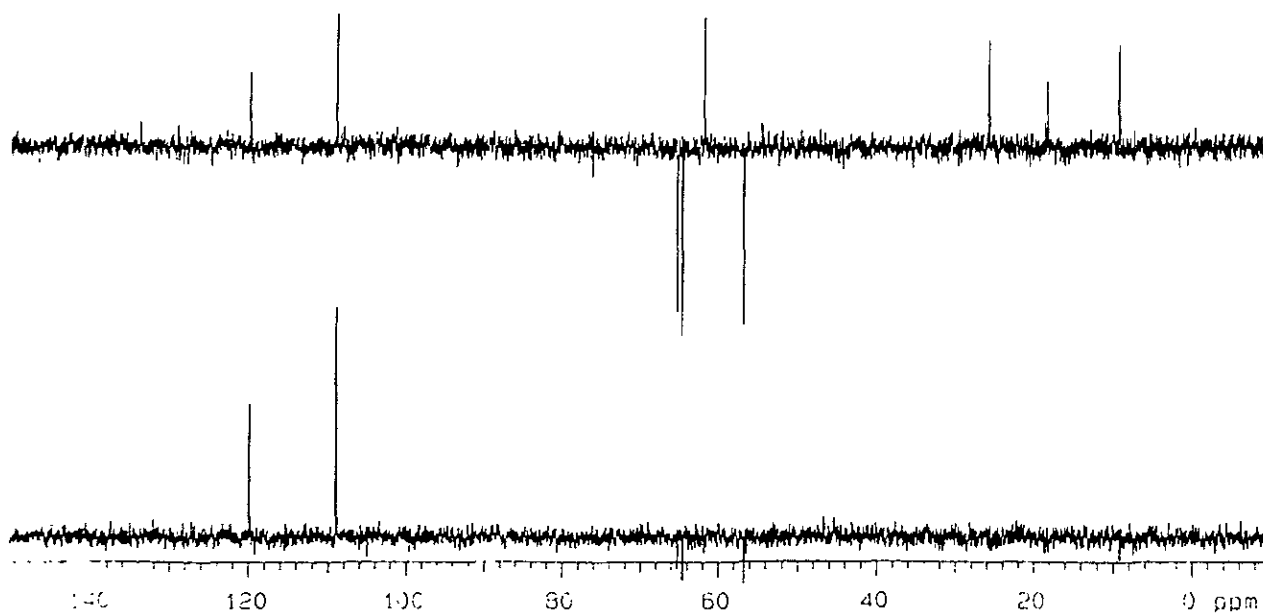
Los derivados sintéticos **46**, **48**, **49** y **50** manifestaron actividad fitotóxica en el bioensayo de gota, en menor intensidad con respecto al ocasionado por zinniol, con excepción de **46**, cuya actividad fue similar. La actividad fitotóxica detectada, tanto en los derivados sintéticos como en los productos naturales obtenidos de zinniol, sugieren que existen varios factores que controlan la actividad en éstas moléculas, incluyendo el tipo, grado de oxidación y posición de los grupos funcionales.



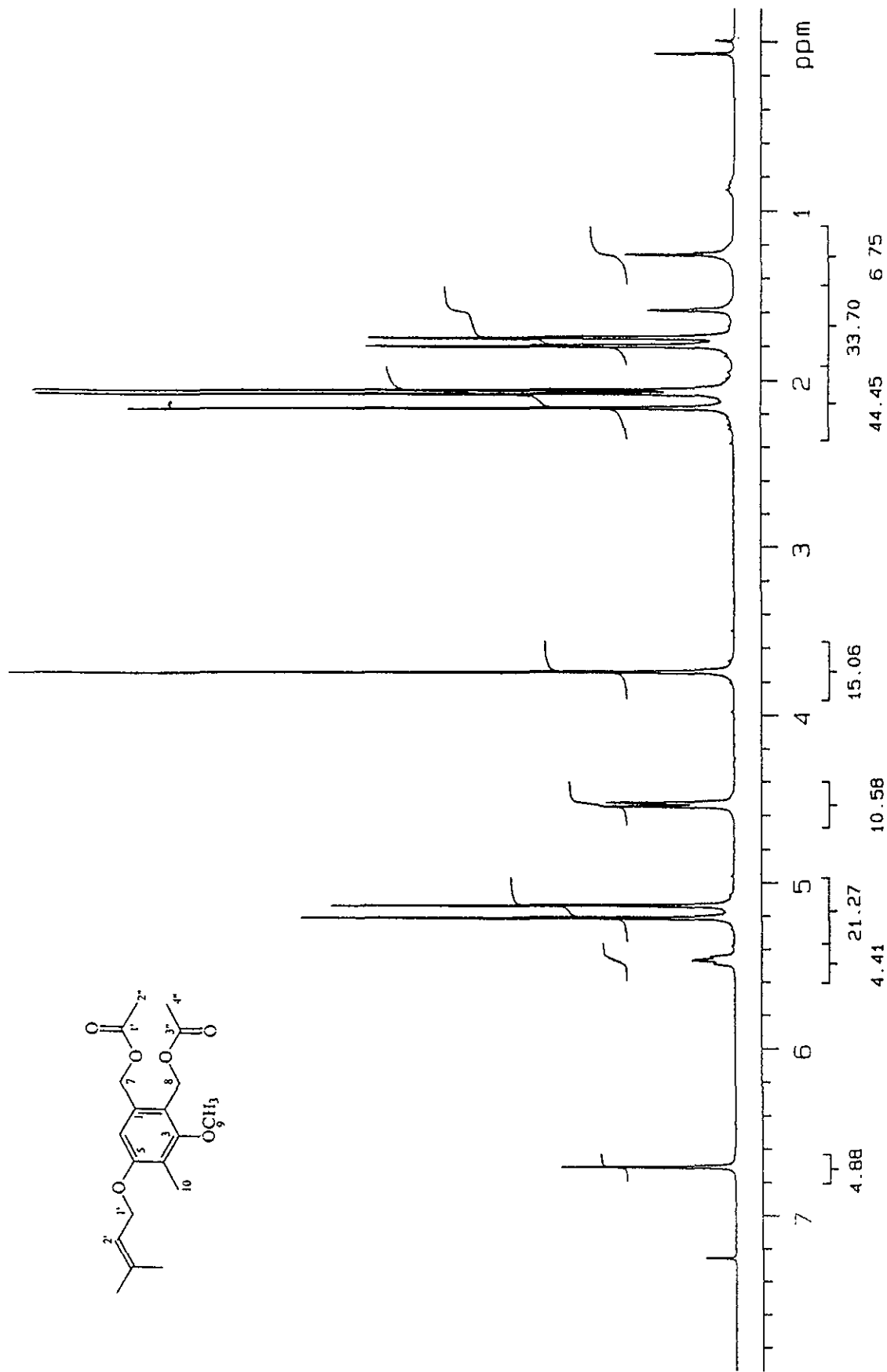
Espectro 1a. IR y 1b. Espectro de masas del zinniol (15)



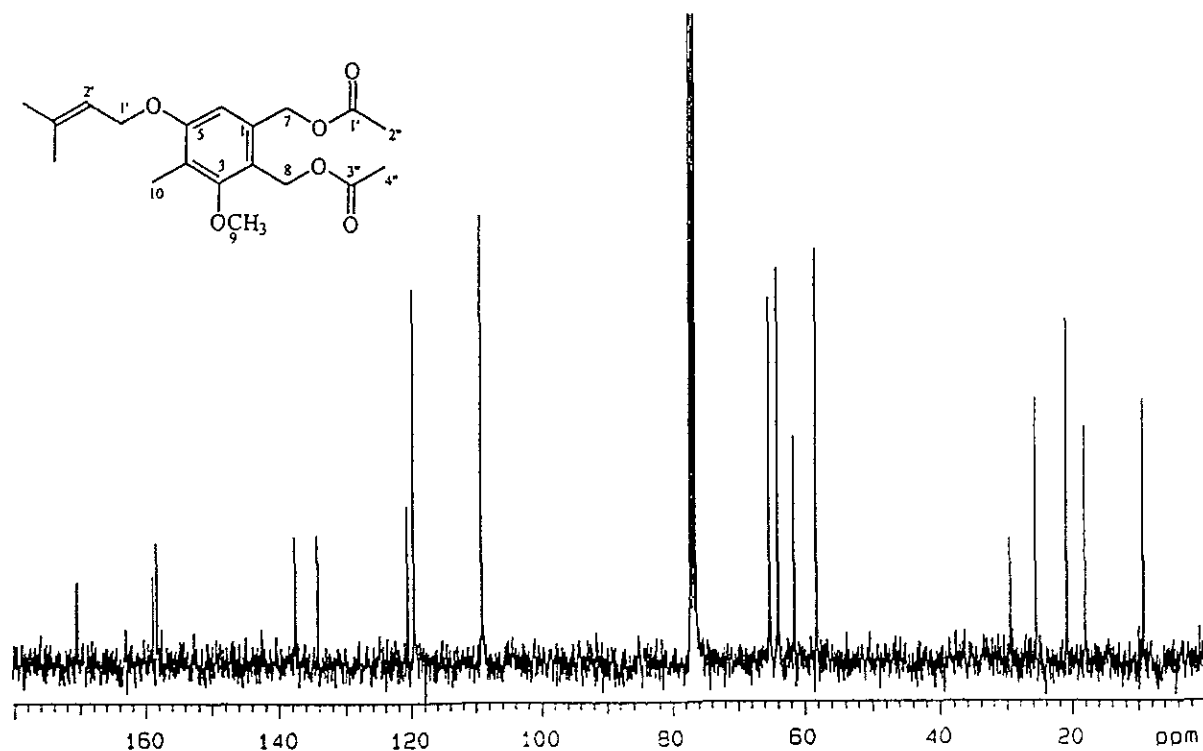
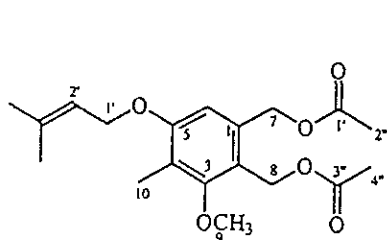
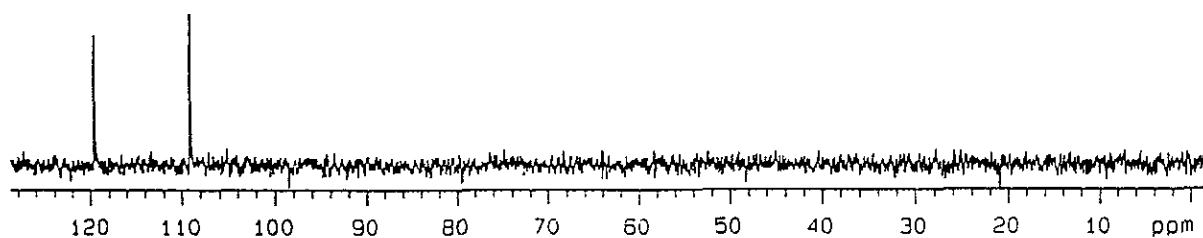
Espectro 2. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) del zinniol (15)



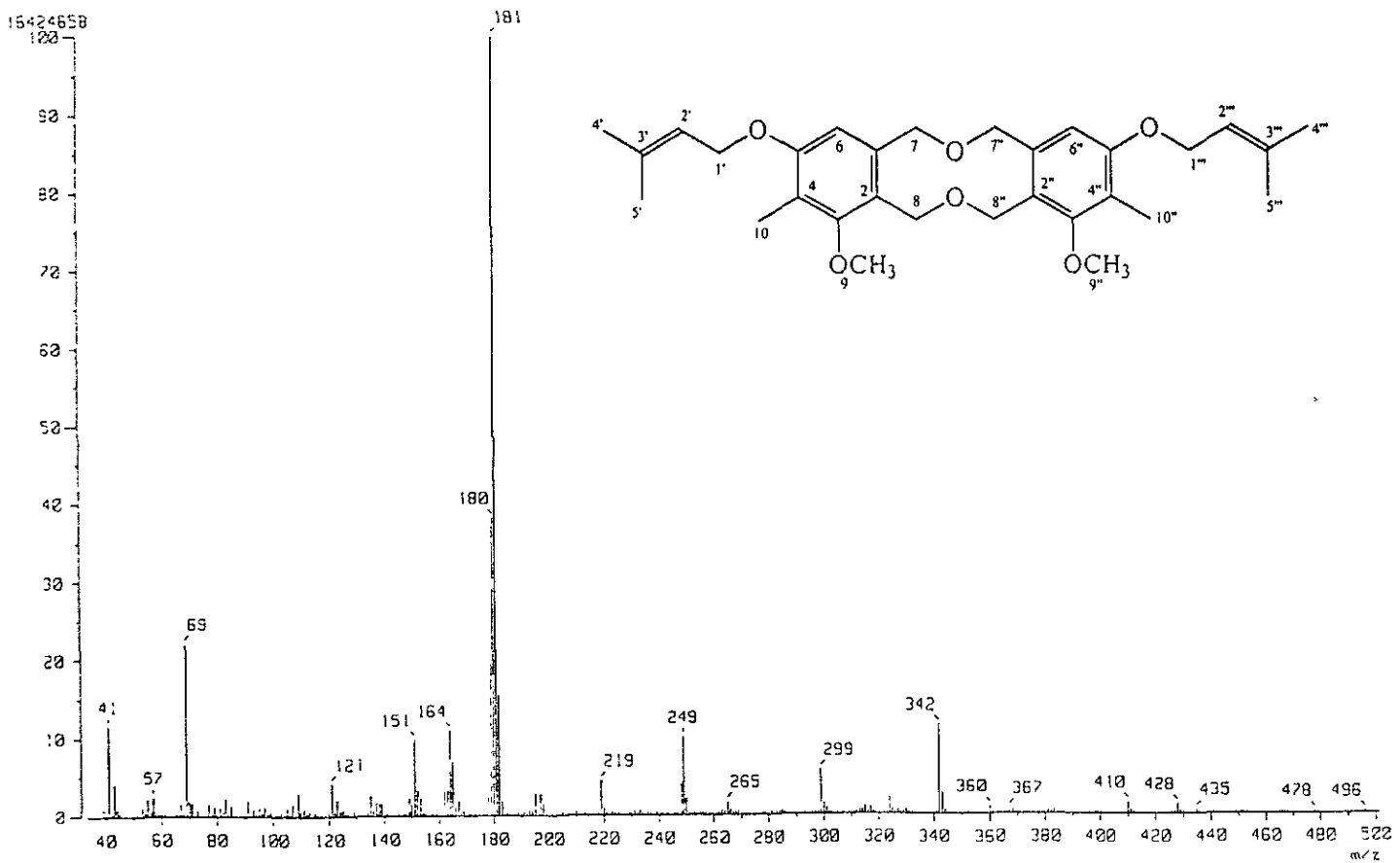
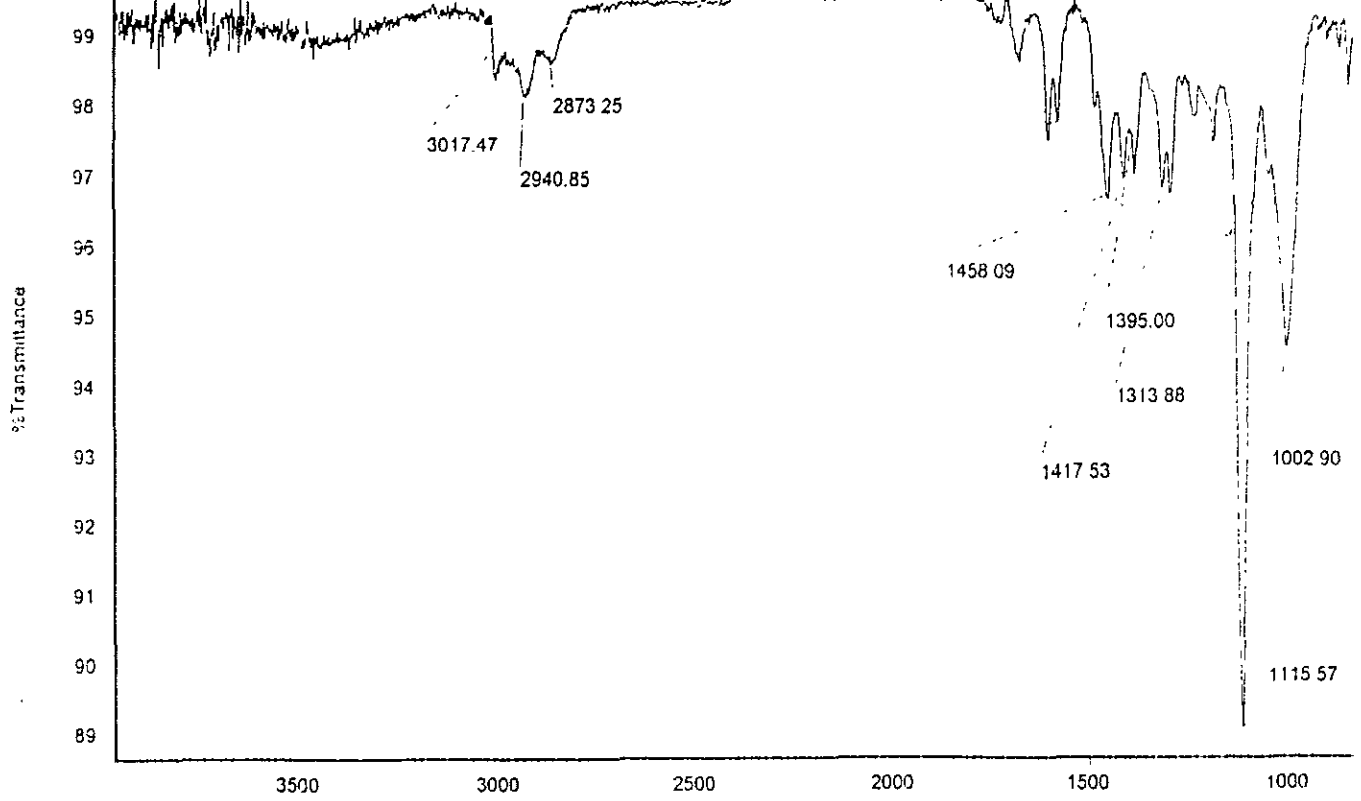
Espectro 3a. RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz), 3b. Experimento DEPT del zinniol (15)



Espectro 4. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) del diacetato zinniol (15a).

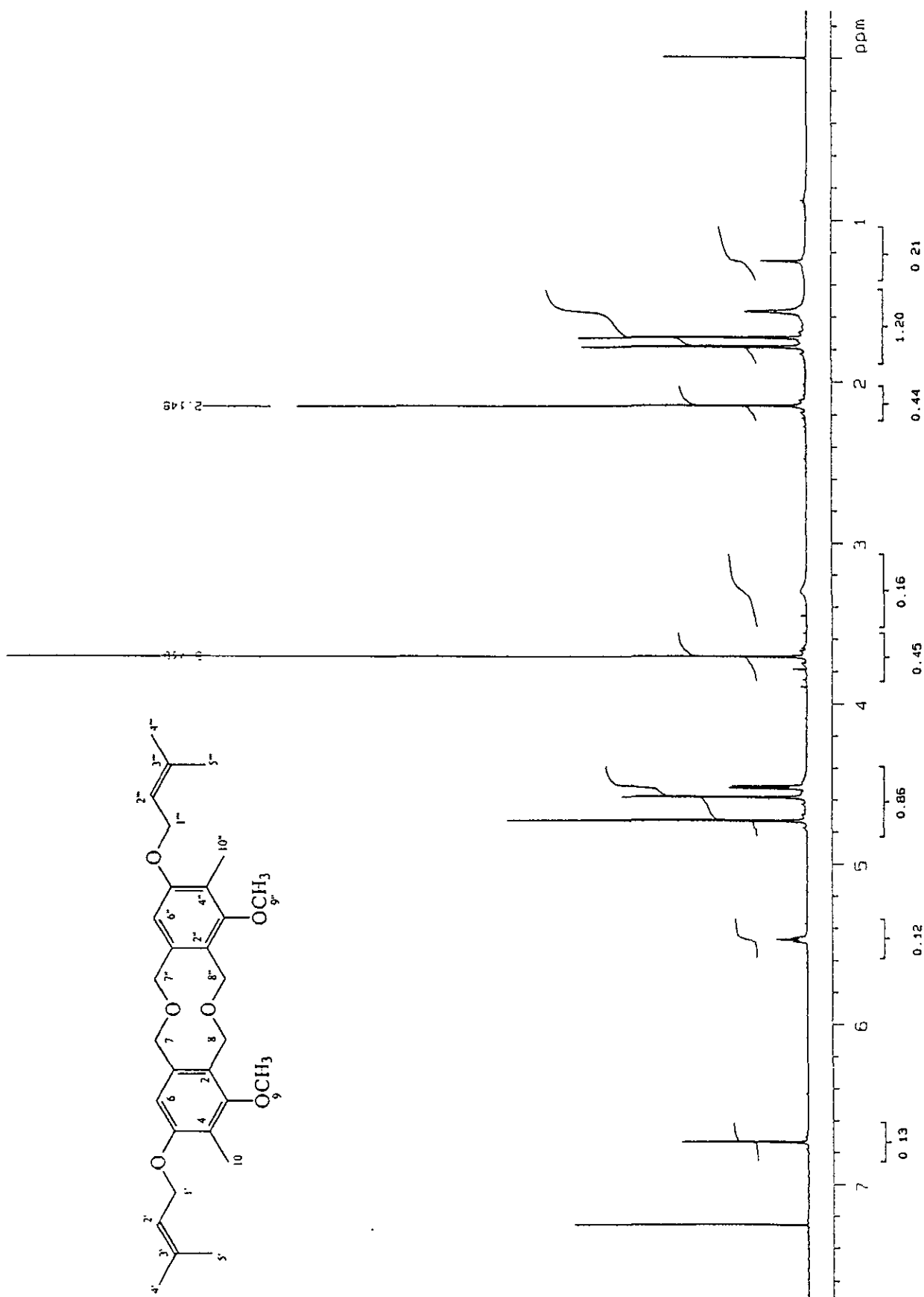


Espectro 5a. RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) del diacetato de zinniol (15a)
 5b. Experimento DEPT del diacetato de zinniol (15a).

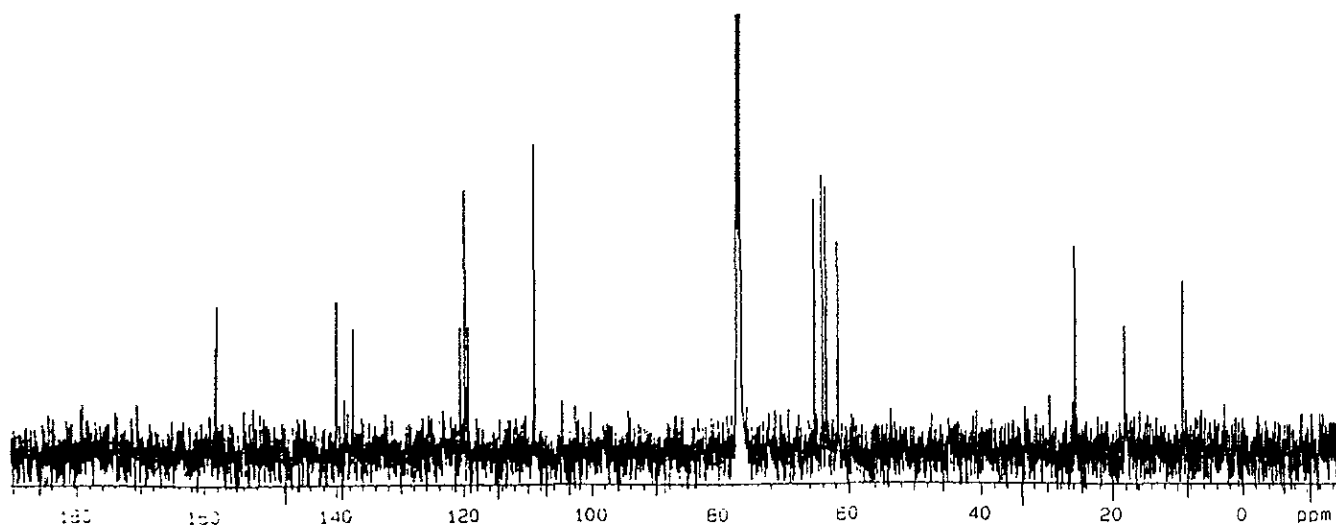
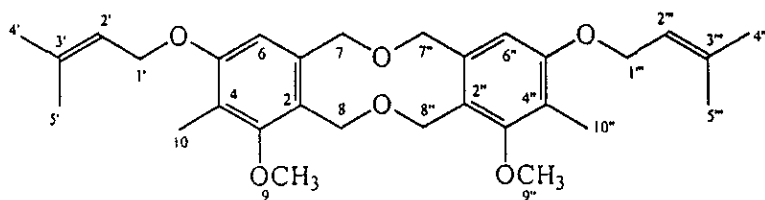
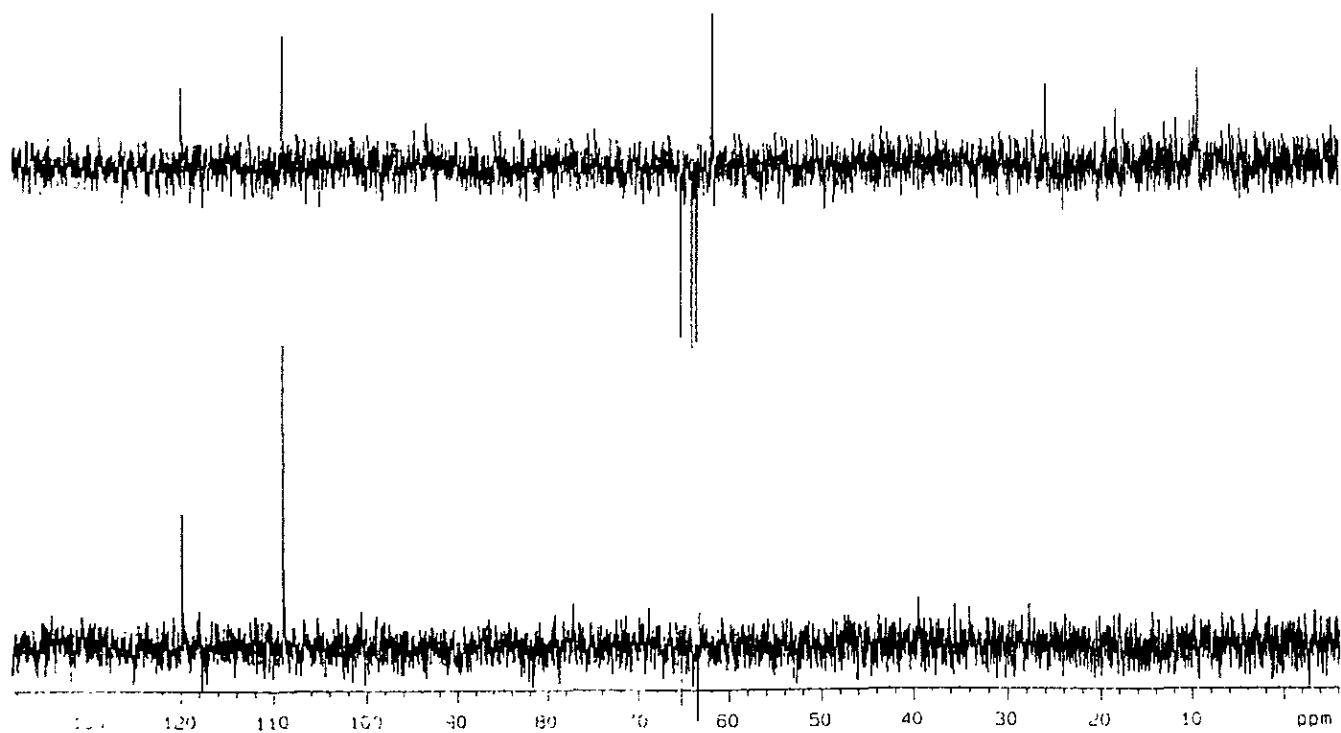


Espectro 6a. IR de *bis-7-O-7''-8-O-8''-zinniol (20)*

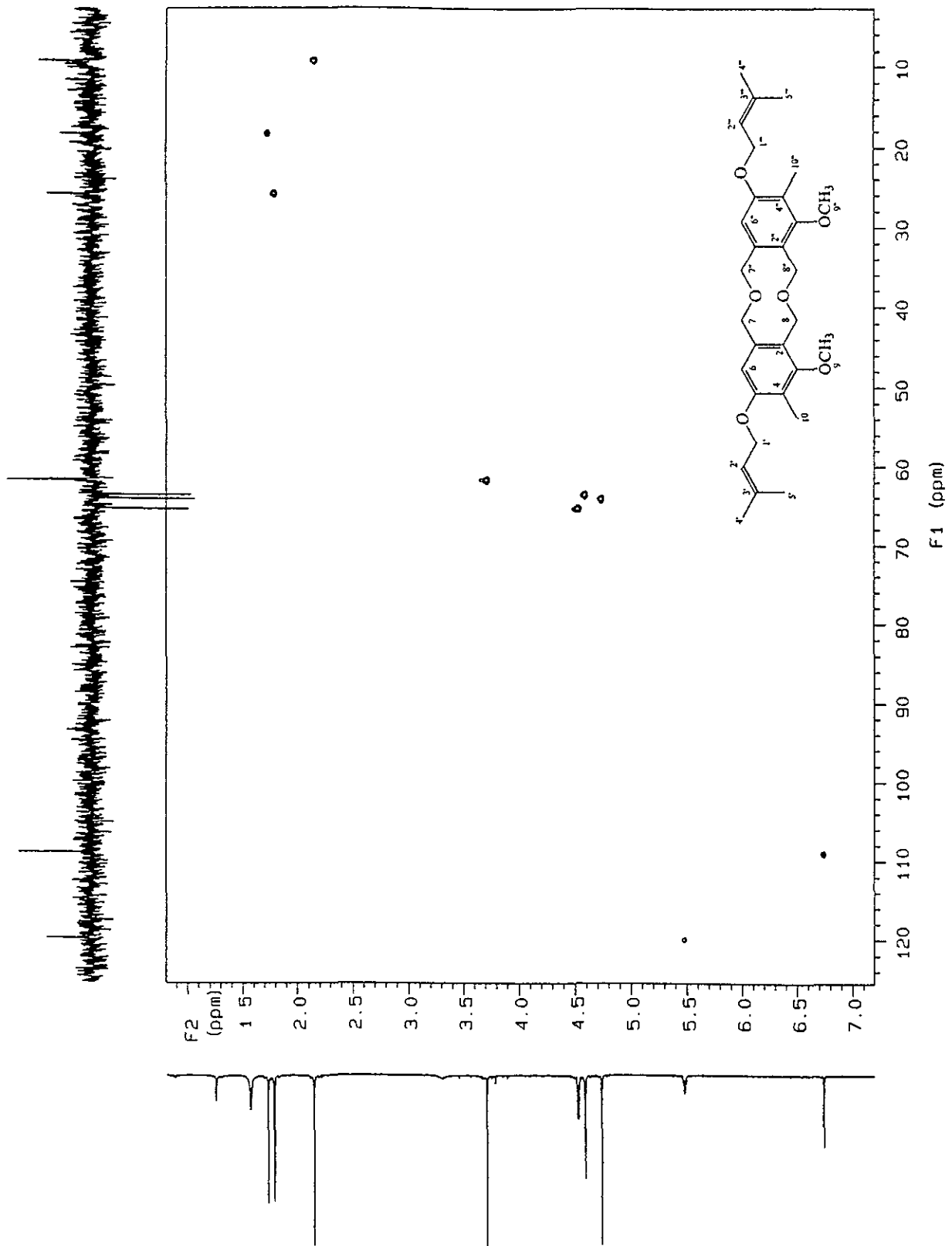
6b. Espectro de masas de *bis-7-O-7''-8-O-8''-zinniol (20)*.



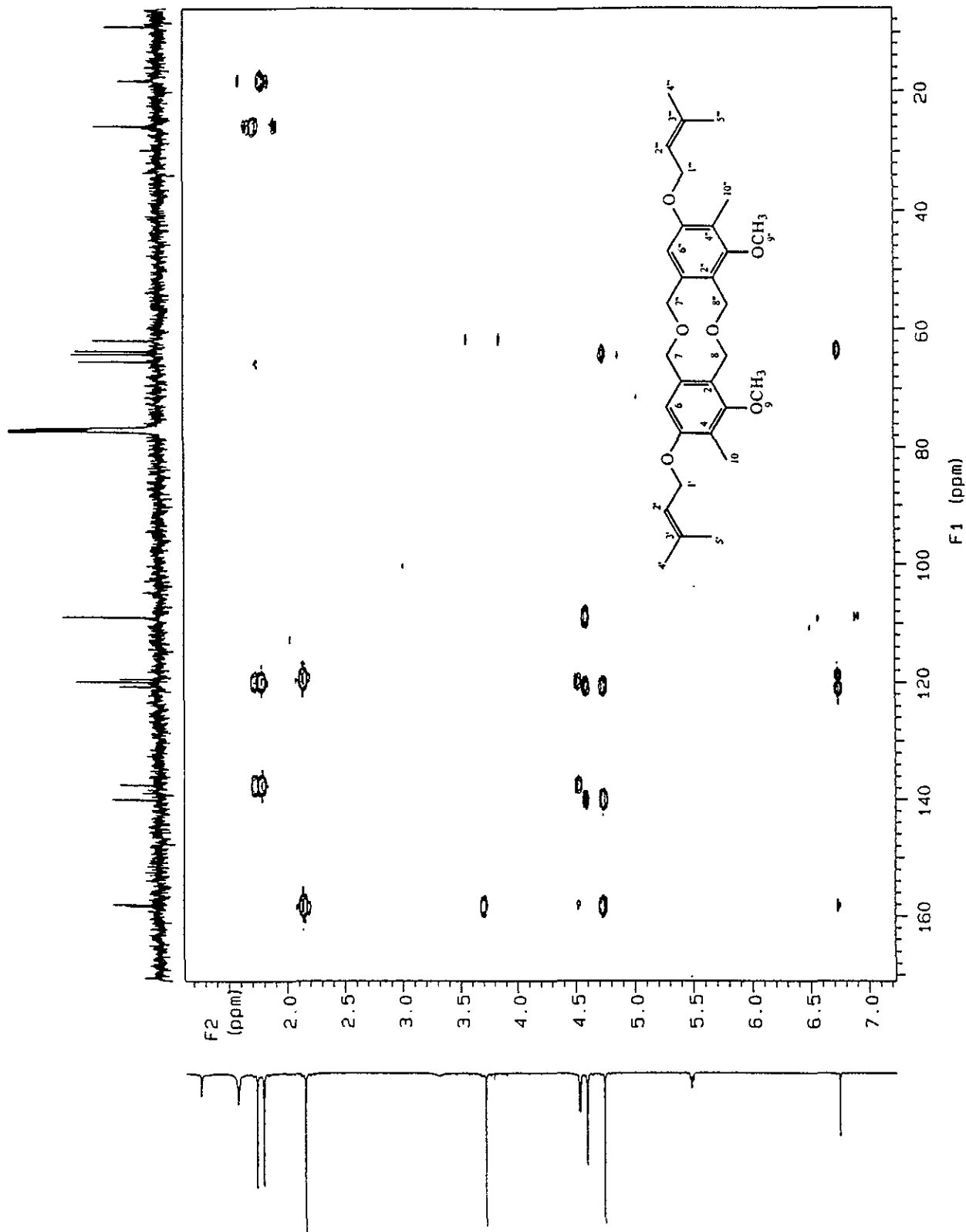
Espectro 7. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de bis-7-O-7''-8-O-8''-zinniol (20).



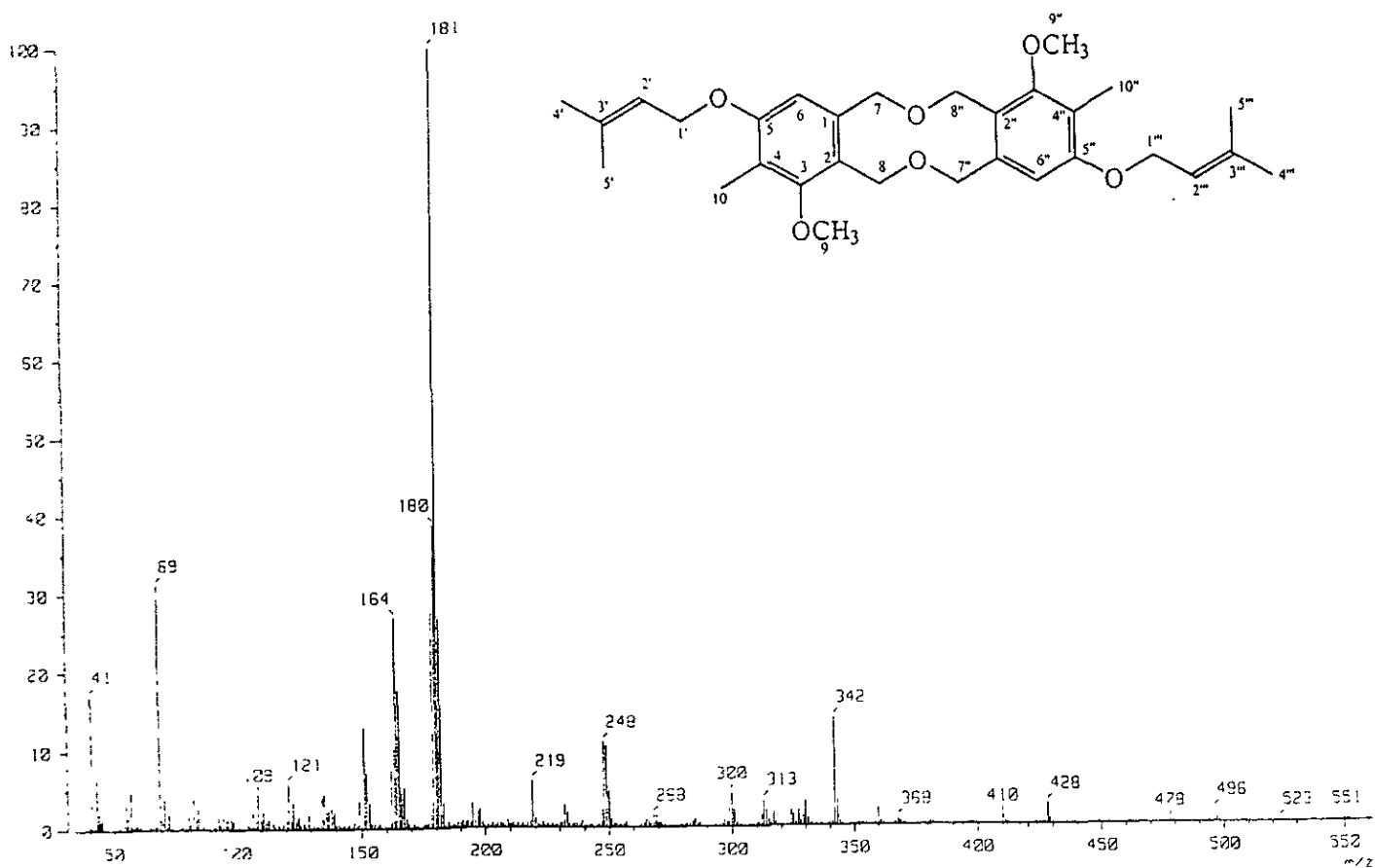
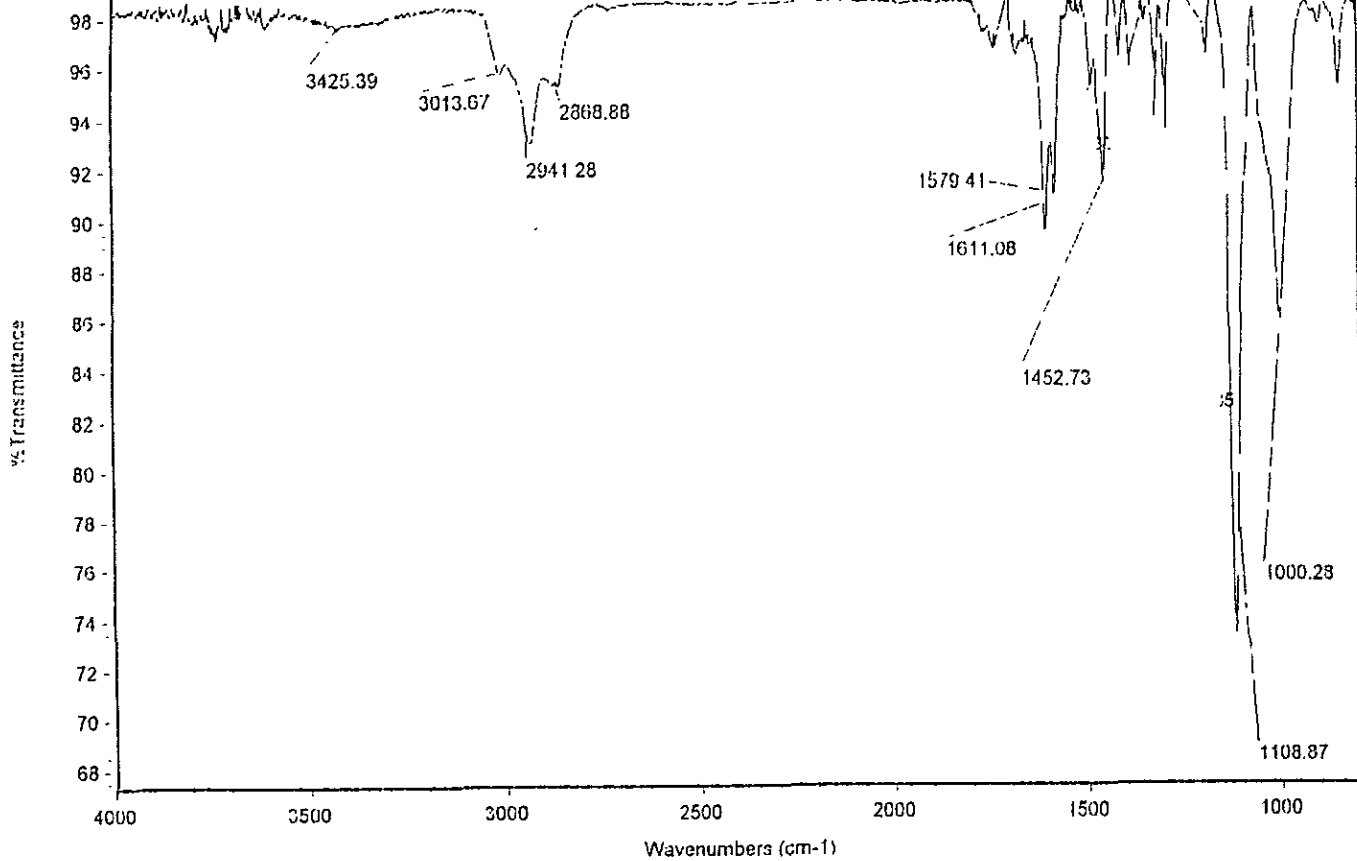
Espectro 8a. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) *bis-7-O-7''-8-O-8''-zinniol* (20).
8b. Experimento DEPT de *bis-7-O-7''-8-O-8''-zinniol* (20).



Espectro 9. Experimento HMQC de bis-7-O-7''-8-O-8''-zinniol (20).

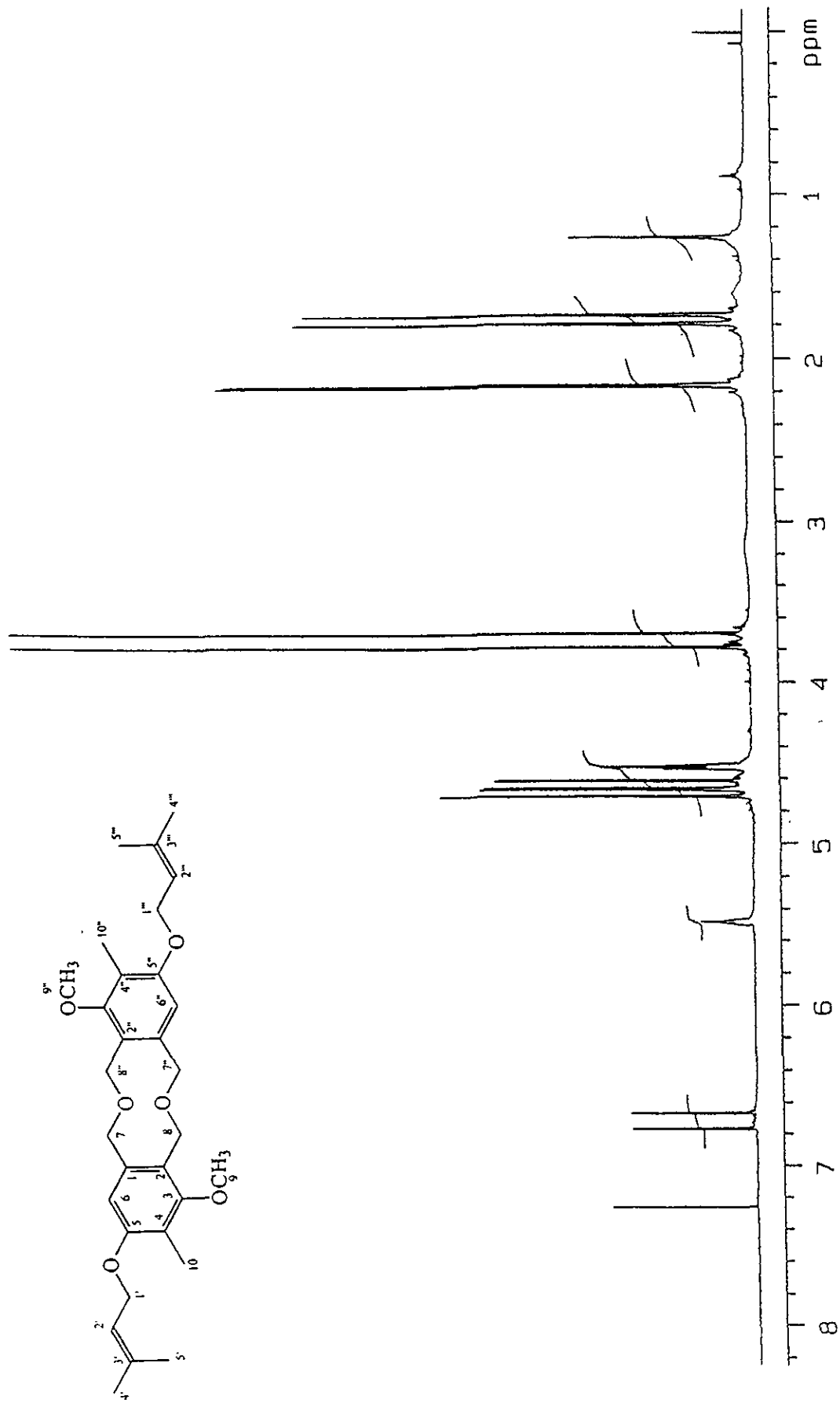


Espectro 10. Experimento HMBC de bis-7-O-7''-8-O-8''-zinniol (20).

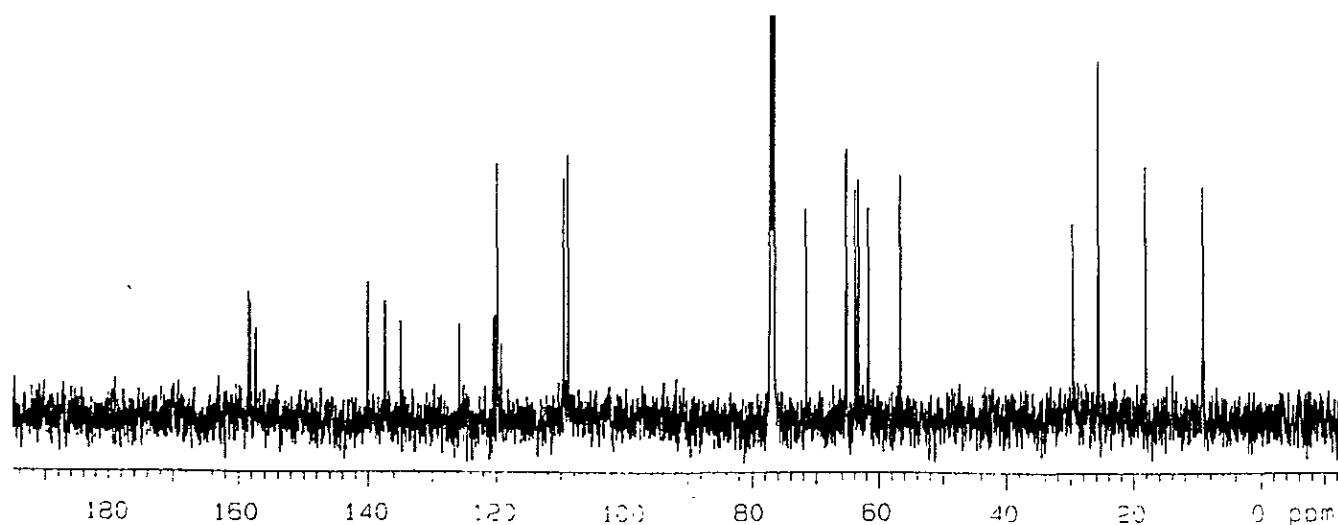
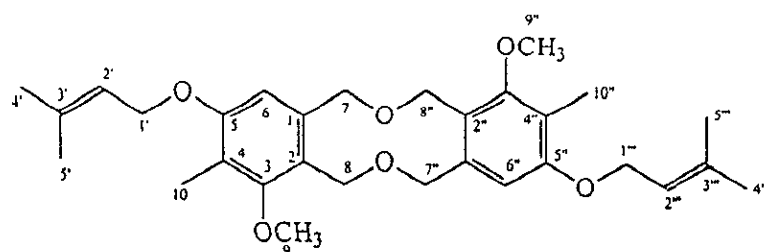
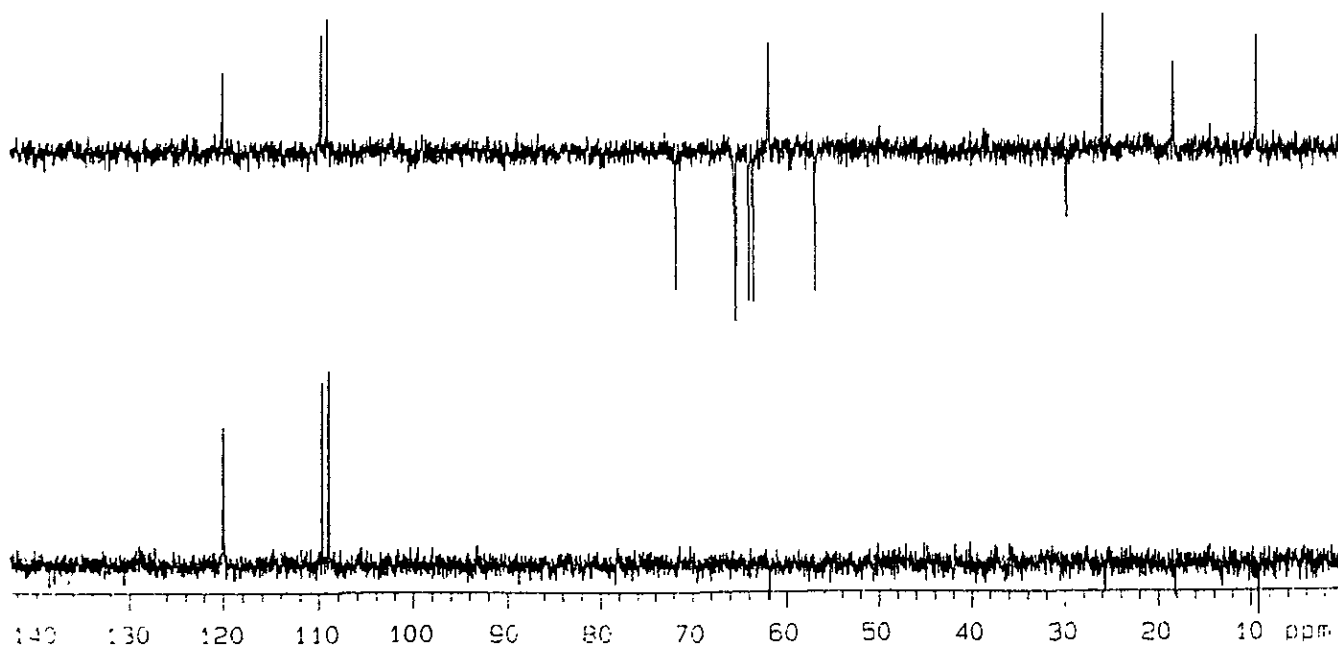


Espectro 11a. IR de *bis-7-O-8''-8-O-7''-zinniol (21)*.

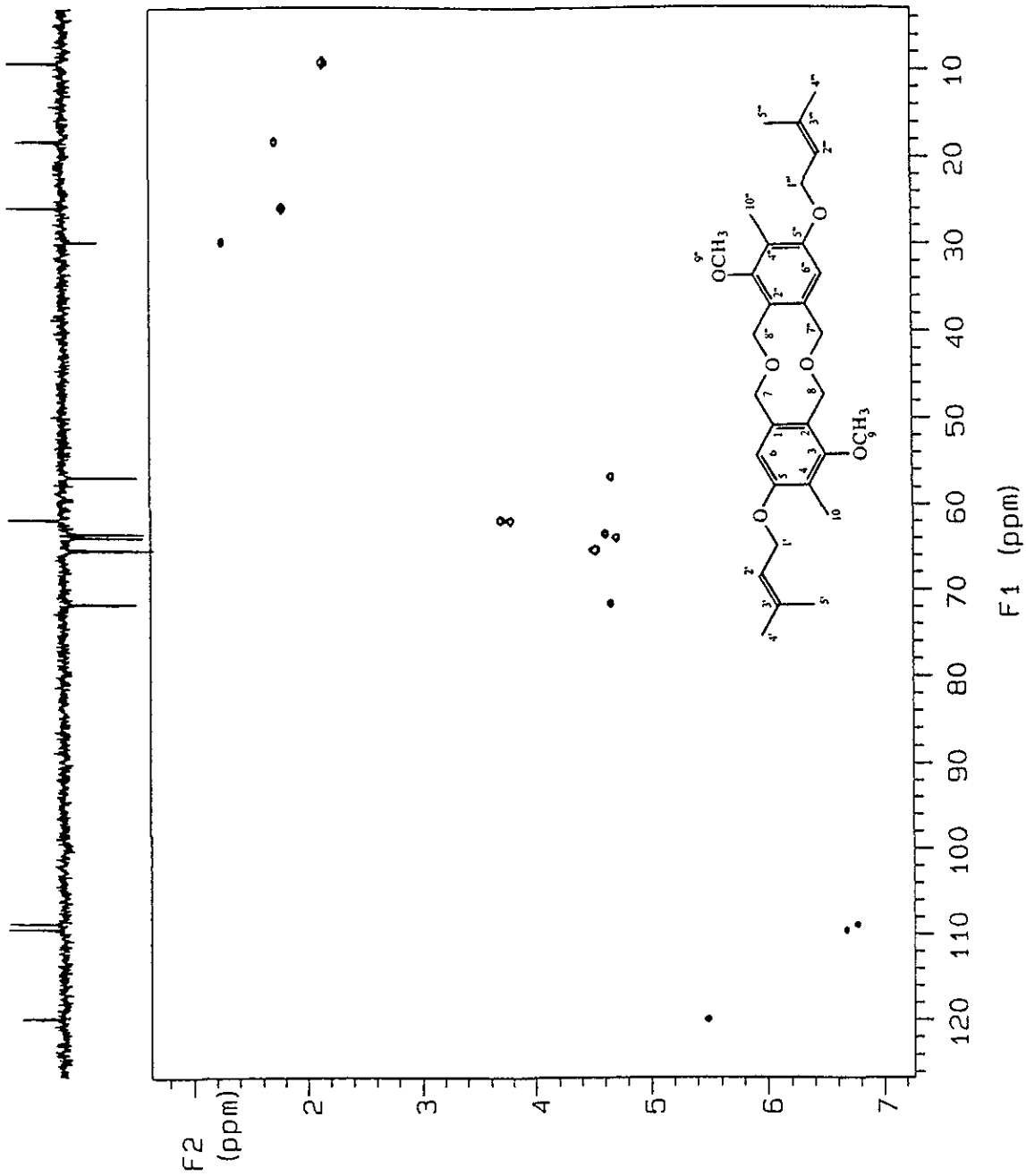
11b. Espectro de masas de *bis-7-O-8''-8-O-7''-zinniol (21)*.



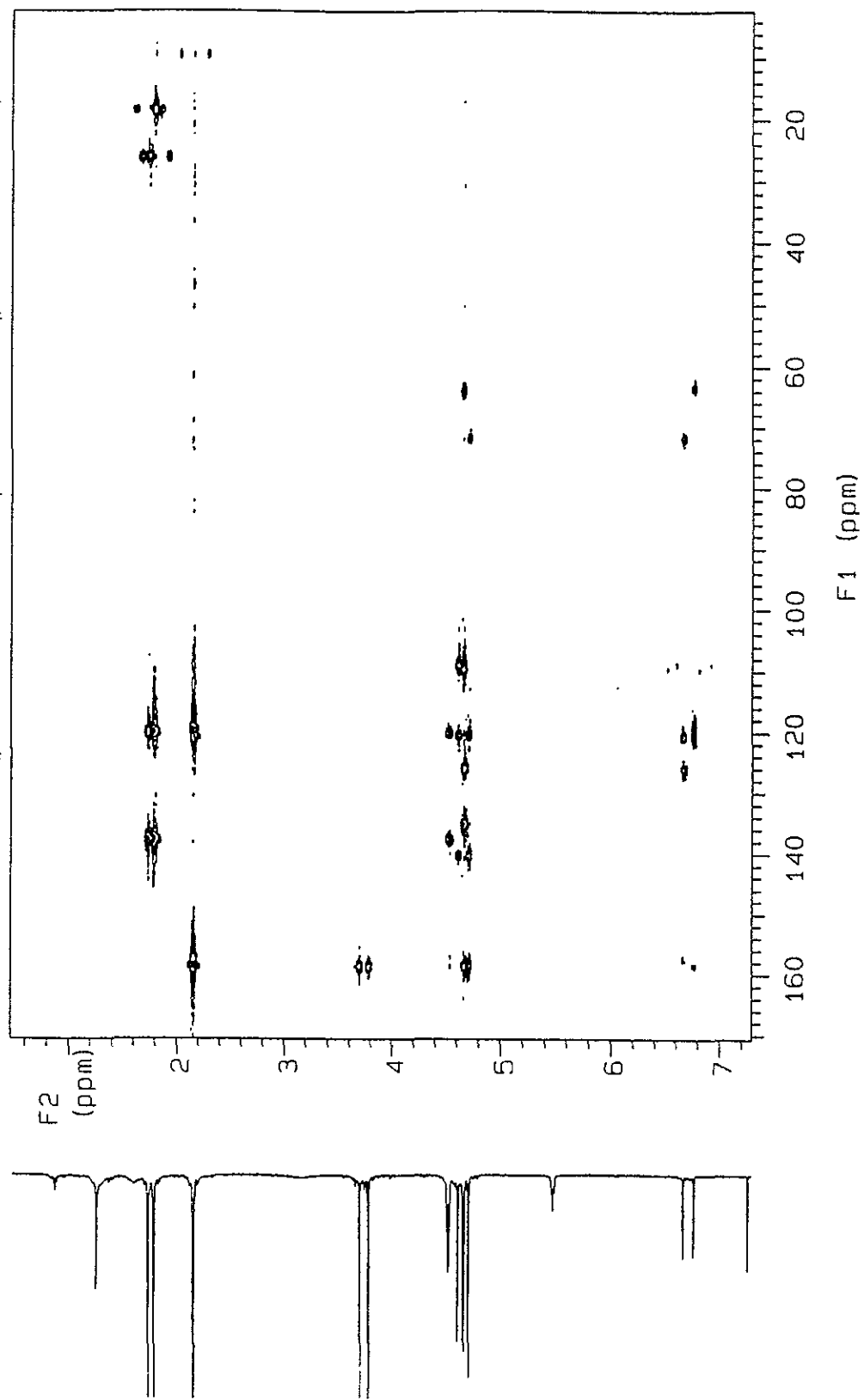
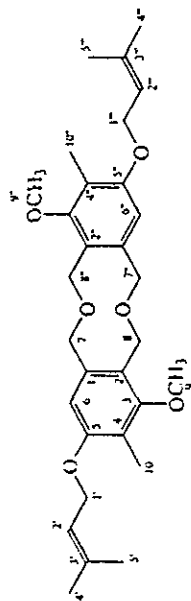
Espectro 12. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de bis-7-O-8''-8-O-7''-zinniol (21).



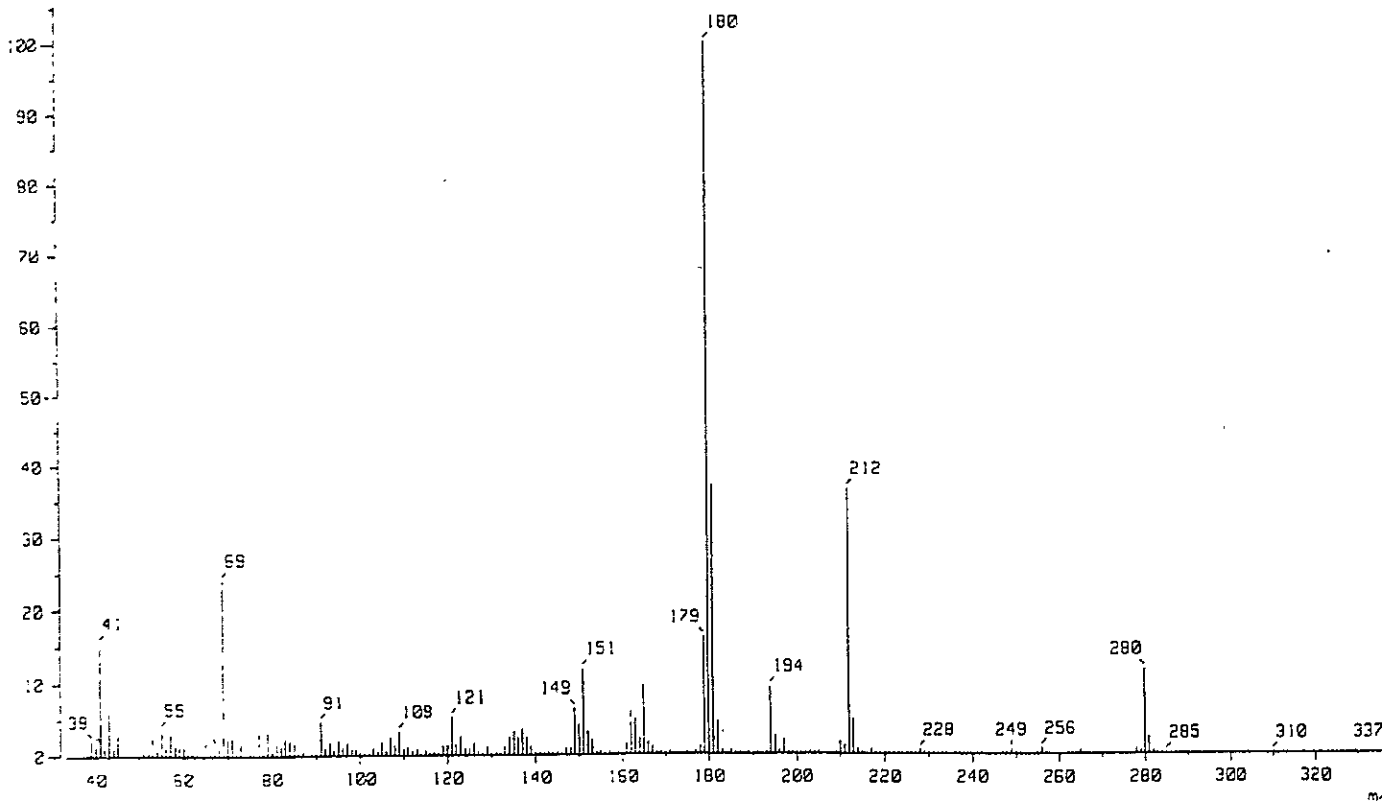
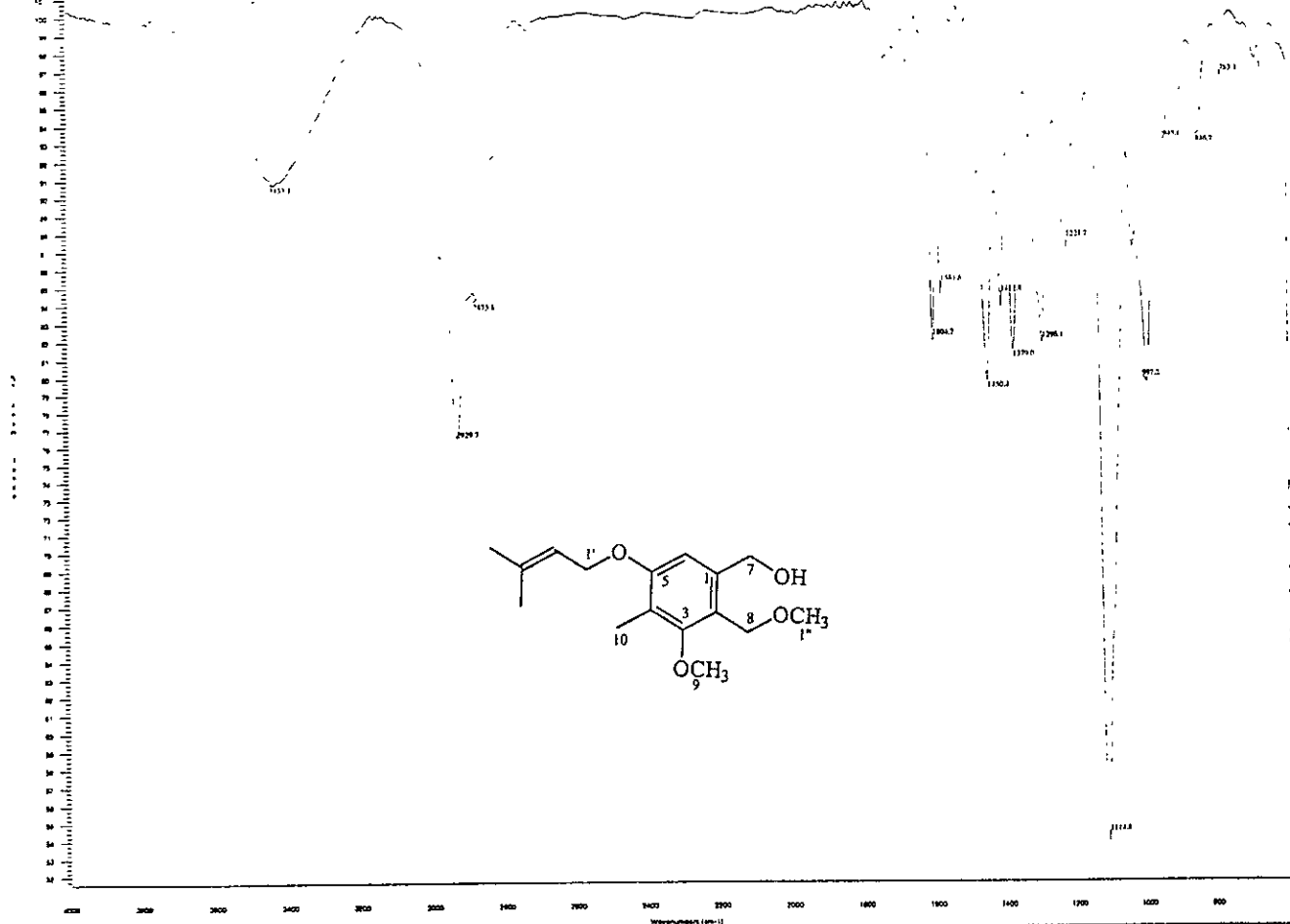
Espectro 13a. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de *bis-7-O-8''-8-O-7''-zinniol* (21).
13b. Experimento DEPT de *bis-7-O-8''-8-O-7''-zinniol* (21).



Espectro 14. Experimento HMQC de bis-7-O-8''-8-O-7'''-zinniol (21).

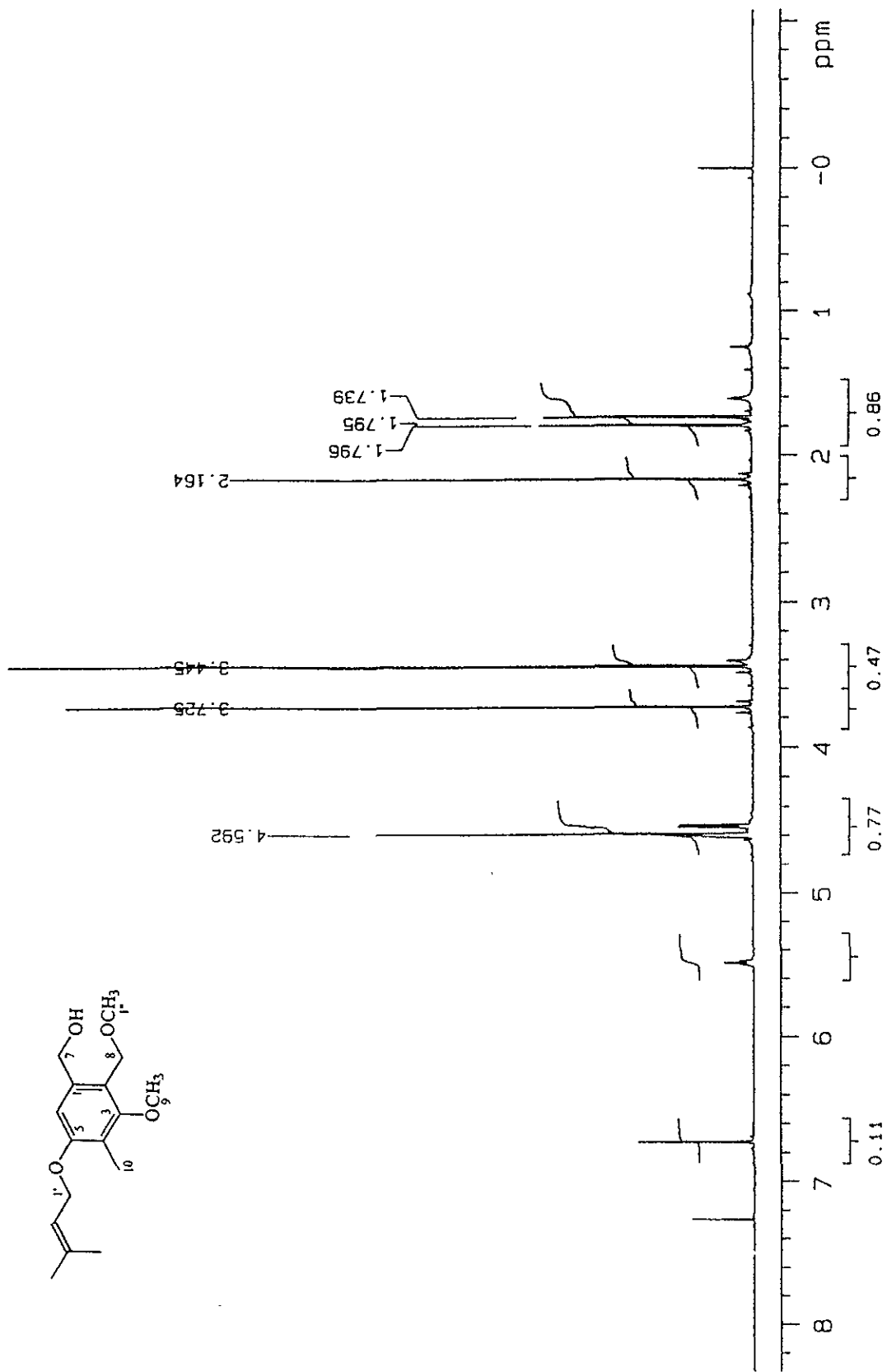


Espectro 15. Experimento HMBC de bis-7-O-8'-8-O-7''-zinniol (21).

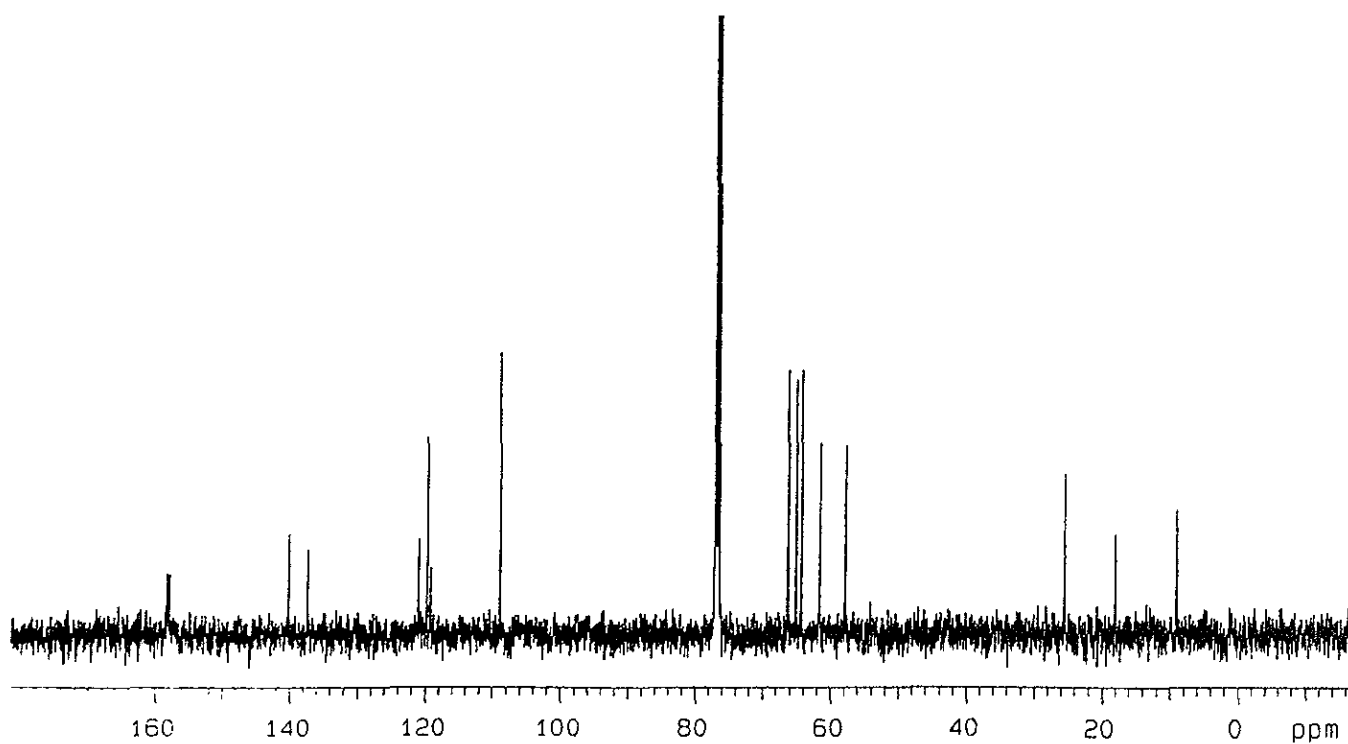


Espectro 16a. IR del éter metílico de 8-zinniol (22).

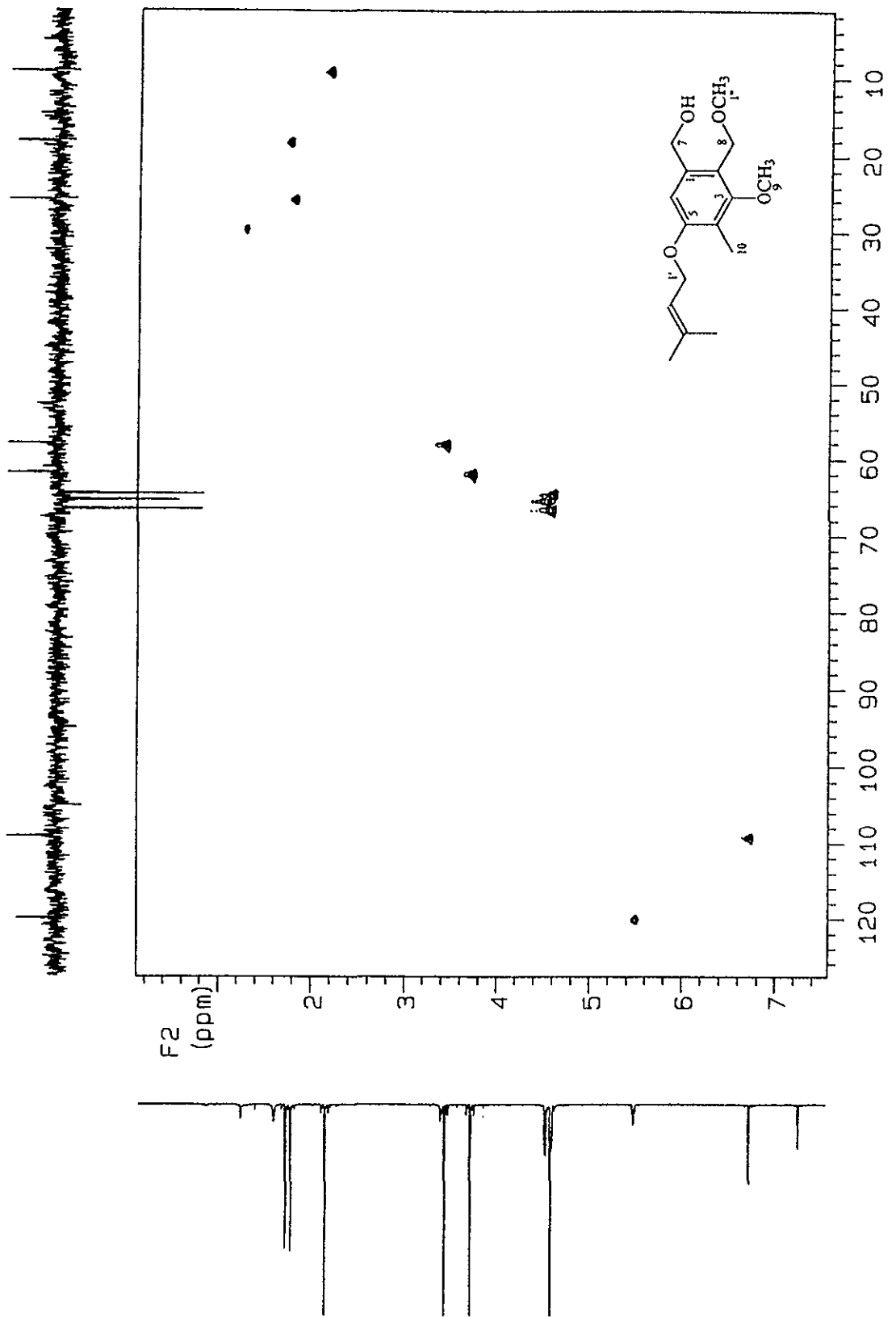
16b. Espectro de masas del éter metílico de 8-zinniol (22).



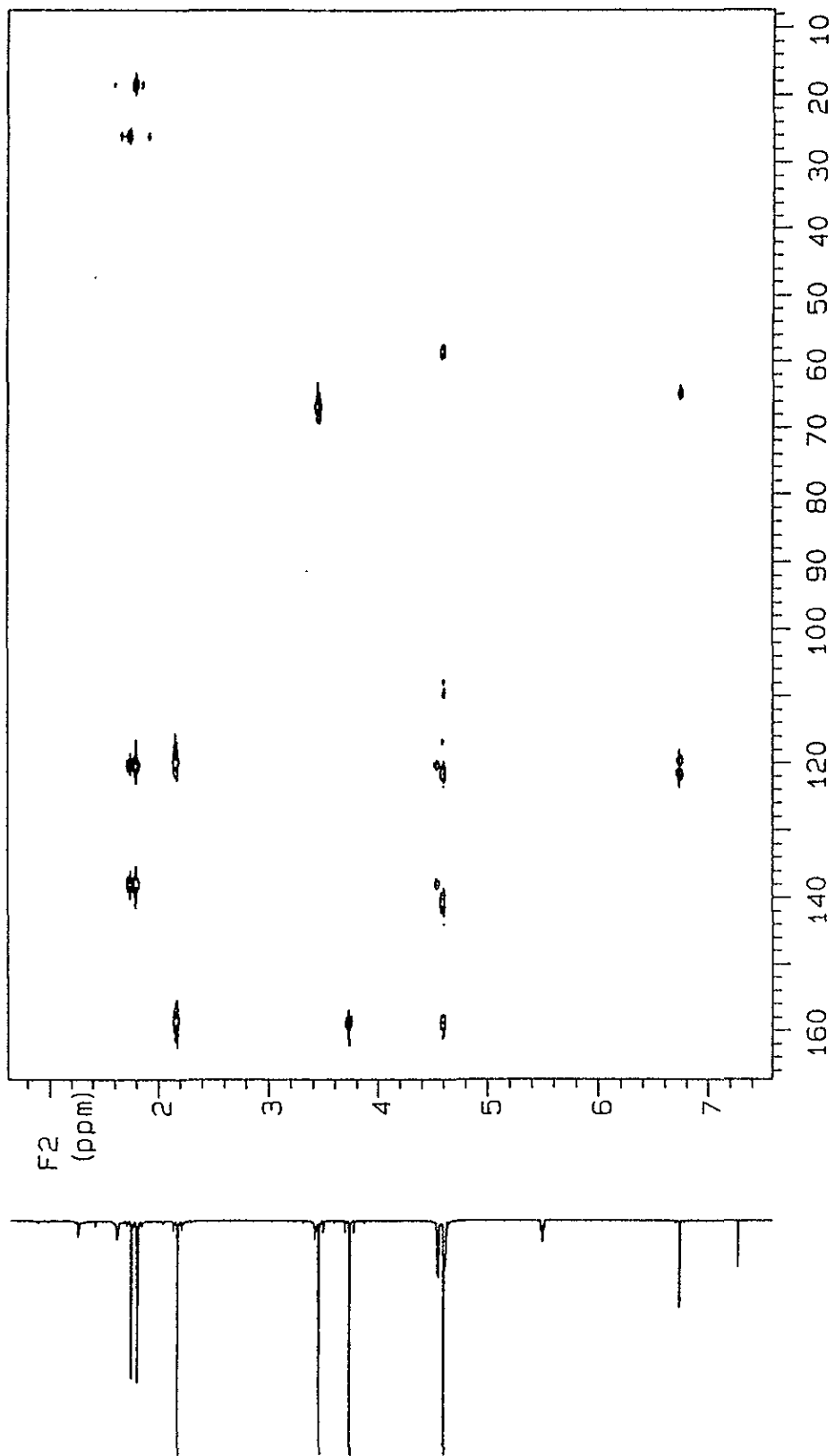
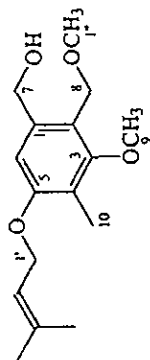
Espectro 17. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) del éter metílico de 8-zinniol (22).



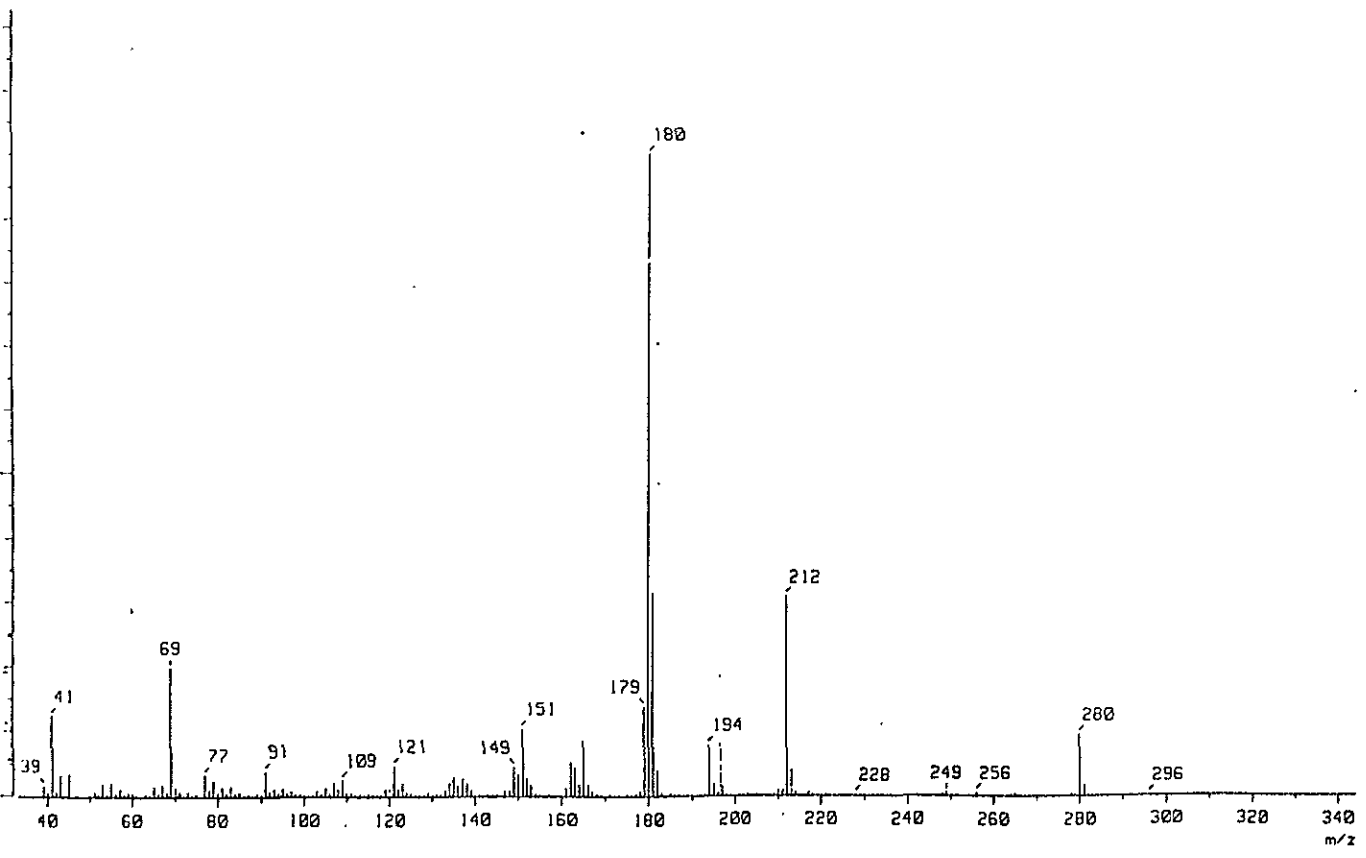
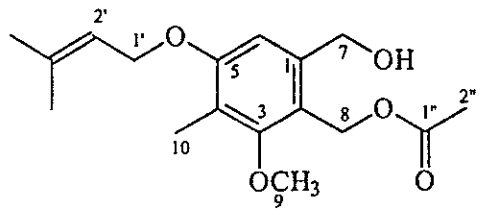
Espectro 18a. RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) del éter metílico de 8-zinniol (22).
18b. Experimento DEPT del éter metílico de 8-zinniol (22).



Espectro 19. Experimento HMQC del éter metílico de 8-zinniol (22).

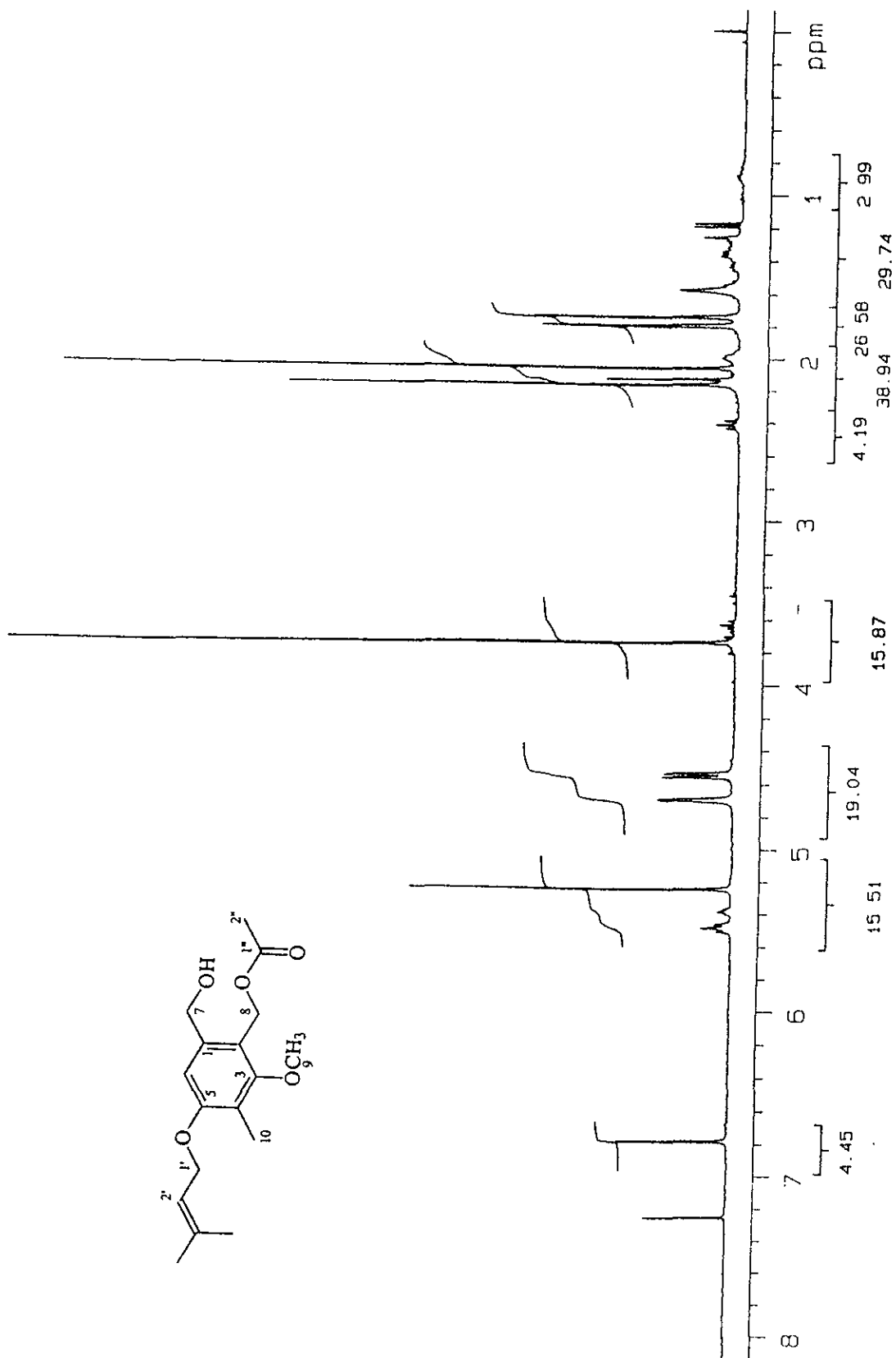


Espectro 20. Experimento HMBC del éter metílico de 8-zinniol (22).

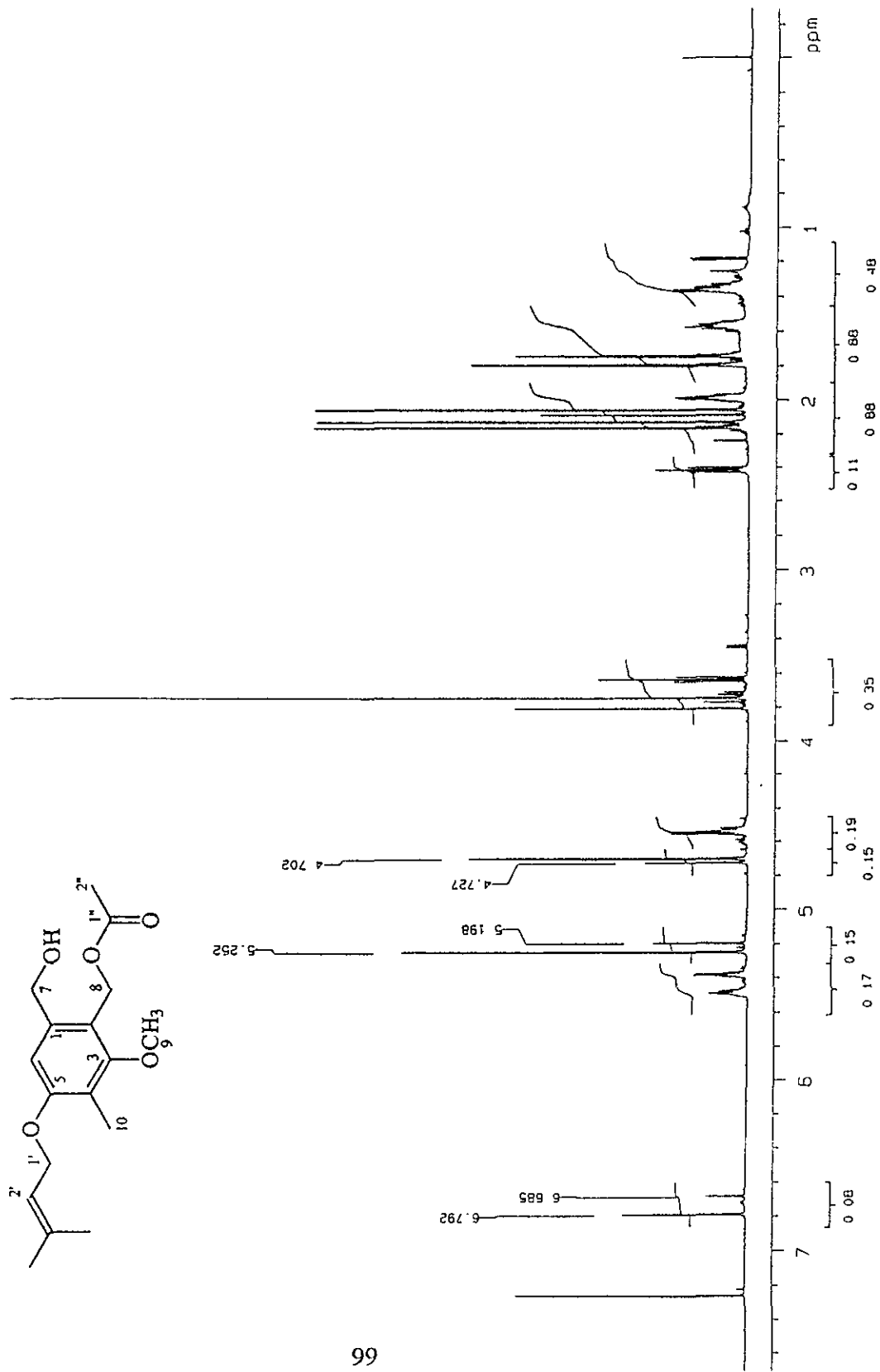


Espectro 21a. IR del acetato de 8-zinniol (23).

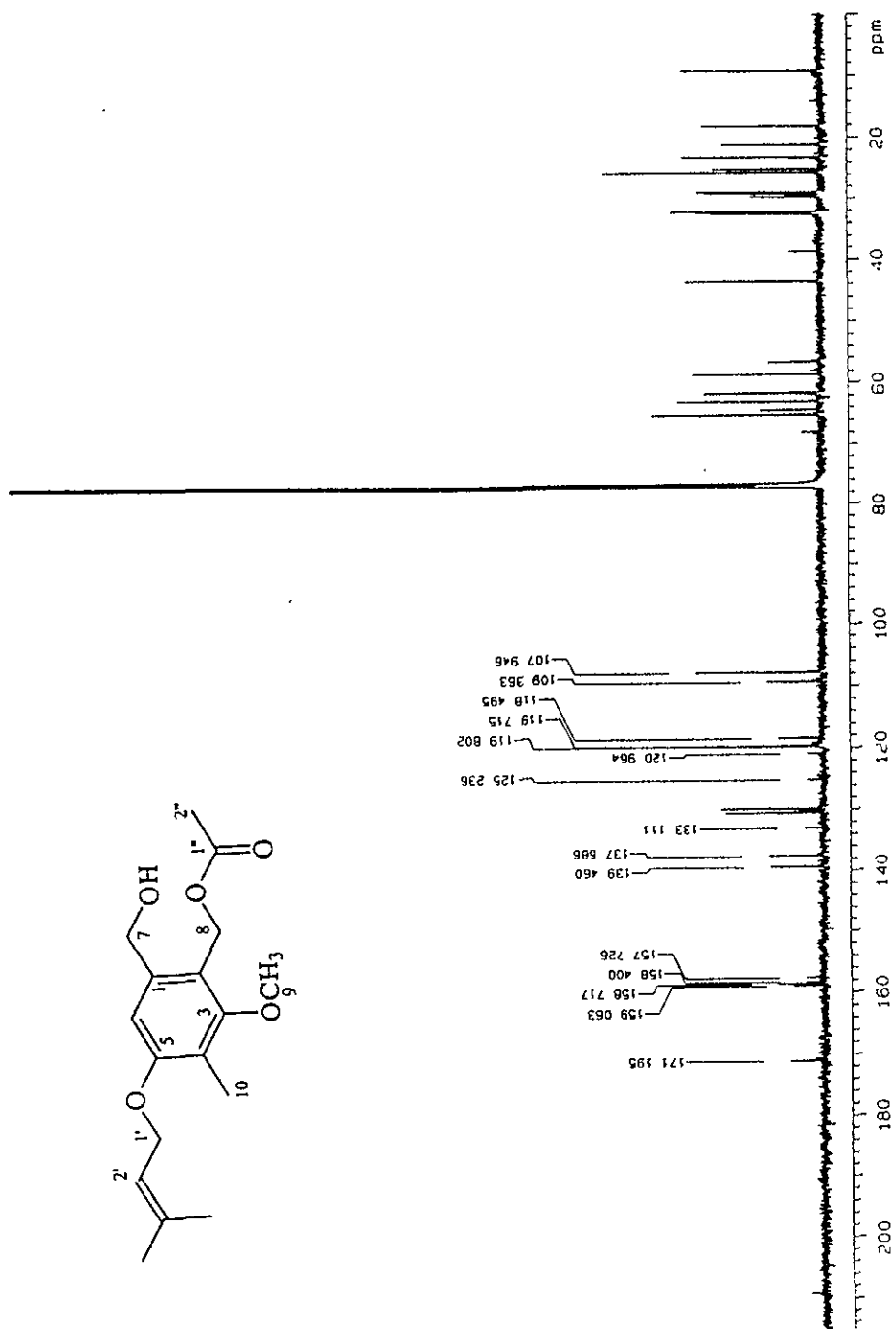
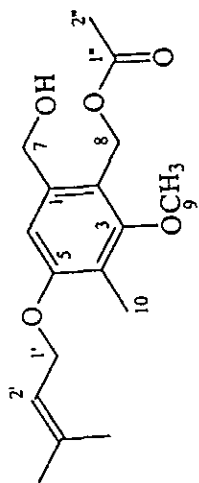
21b. Espectro de masas del acetato de 8-zinniol (23).



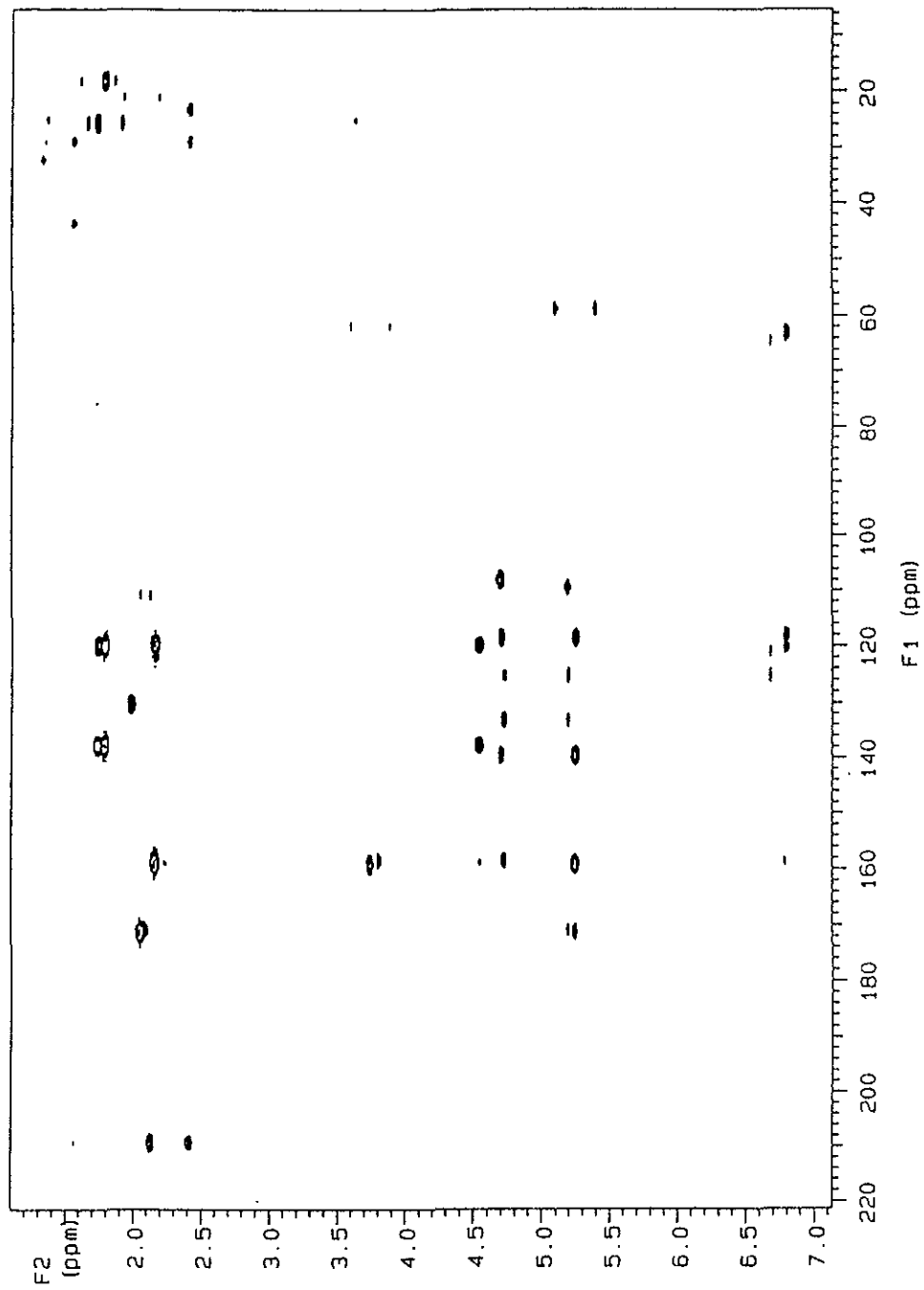
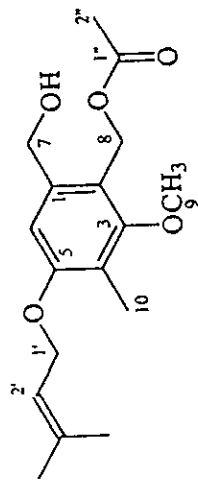
Espectro 22. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) del acetato de 8-zinniol (23).



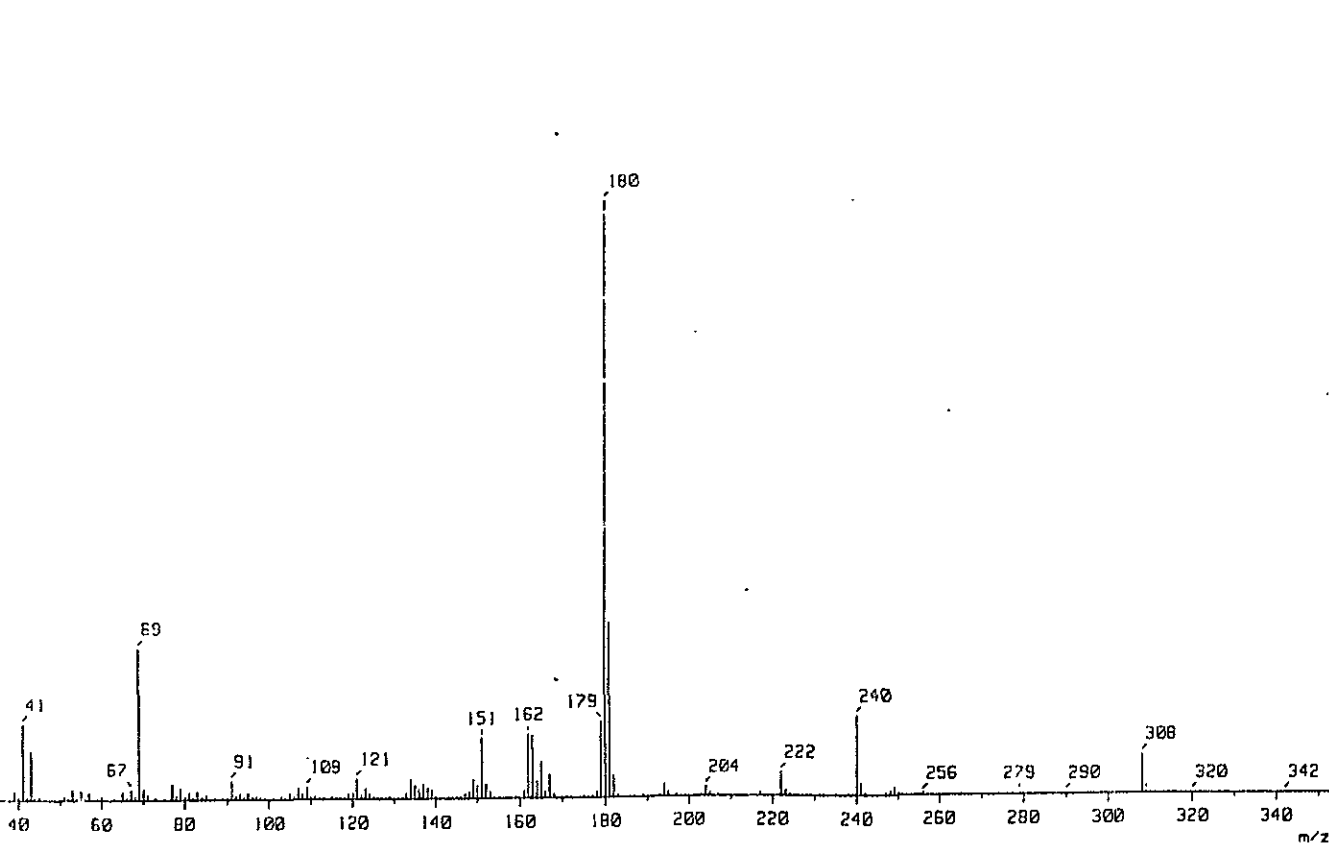
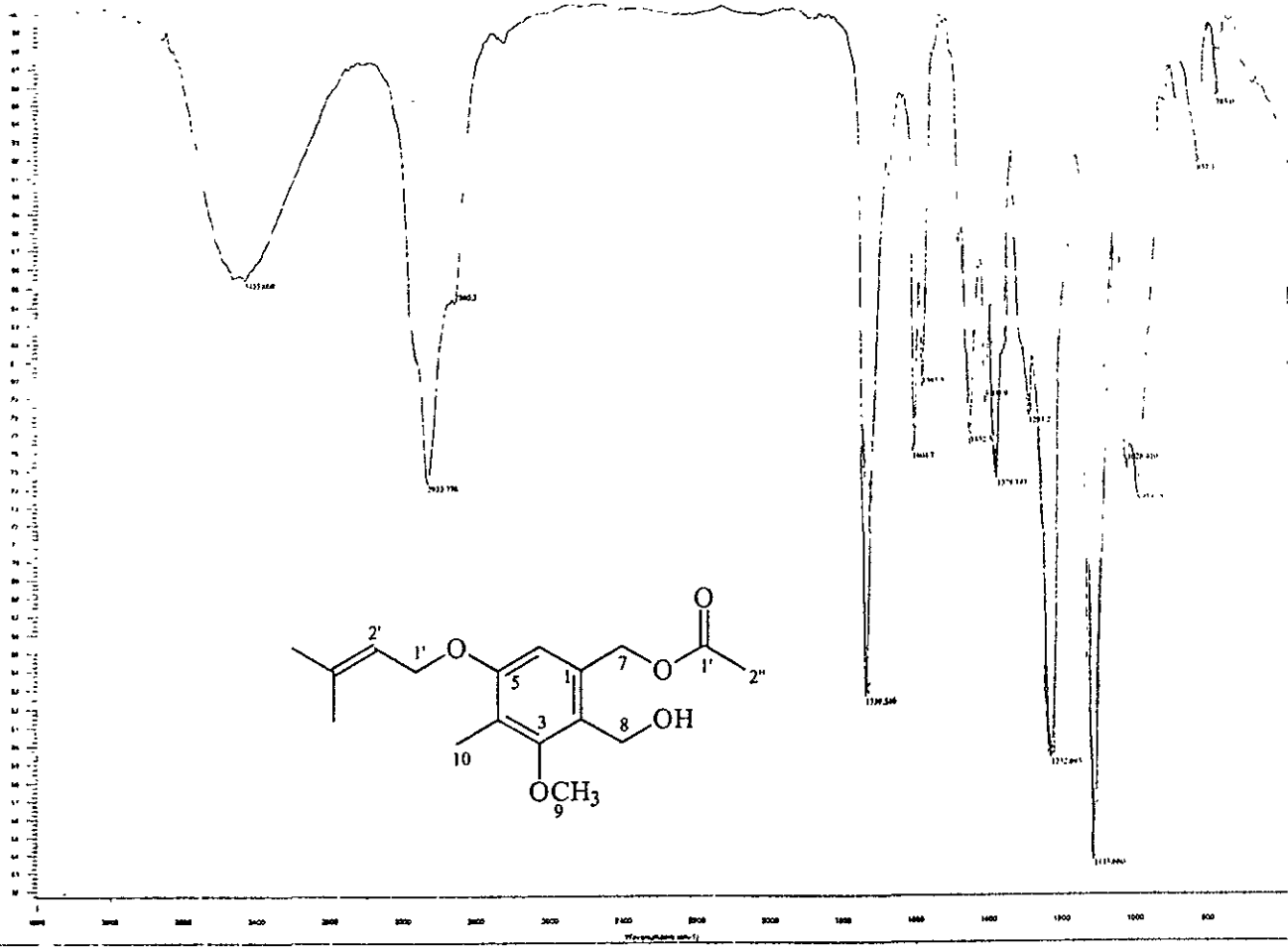
Espectro 23. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) del acetato de 8-zinniol (23).



Espectro 24. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) del acetato de 8-zinniol (23).

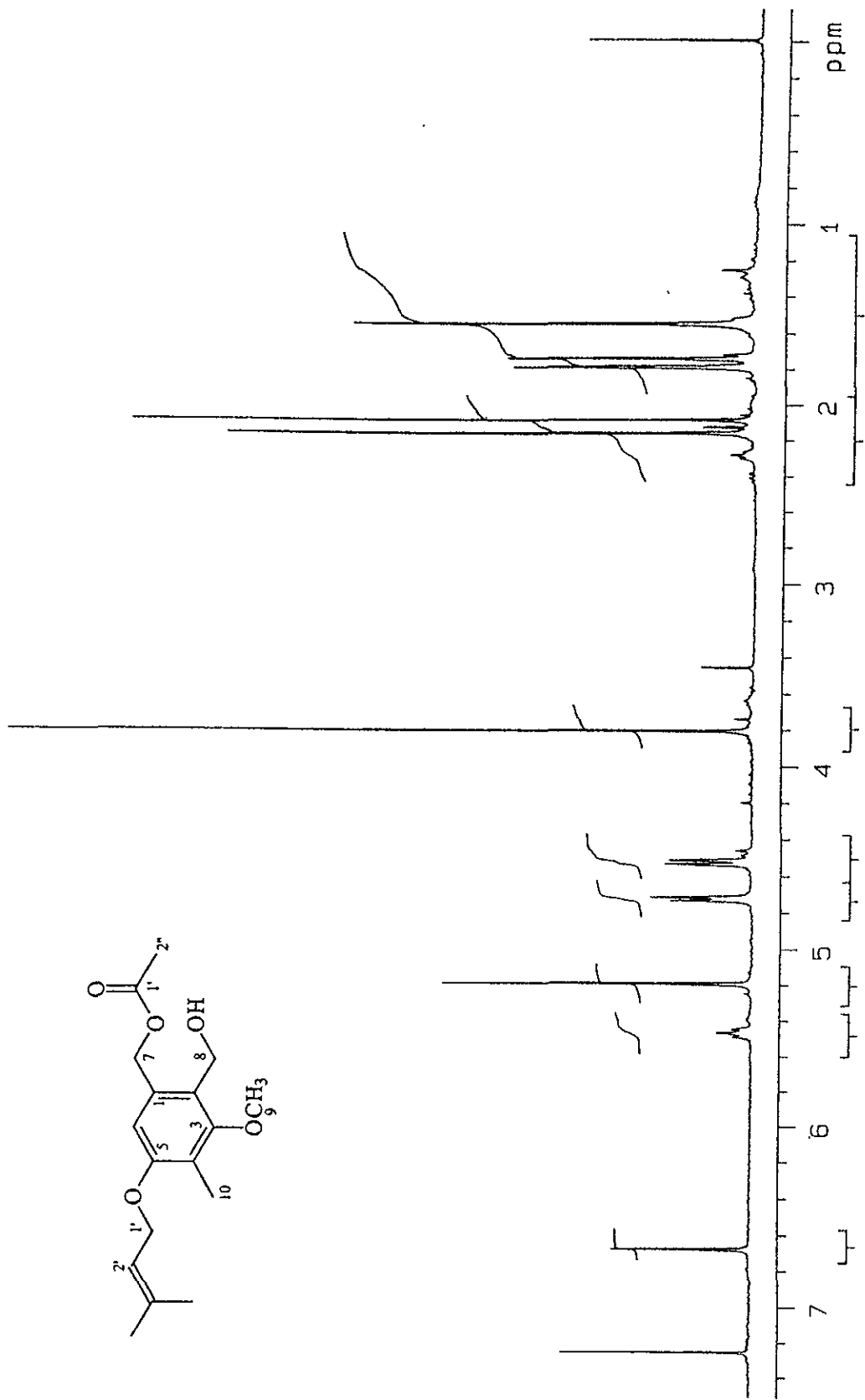


Espectro 25. Experimento HMBC del acetato de 8-zinniol (23).

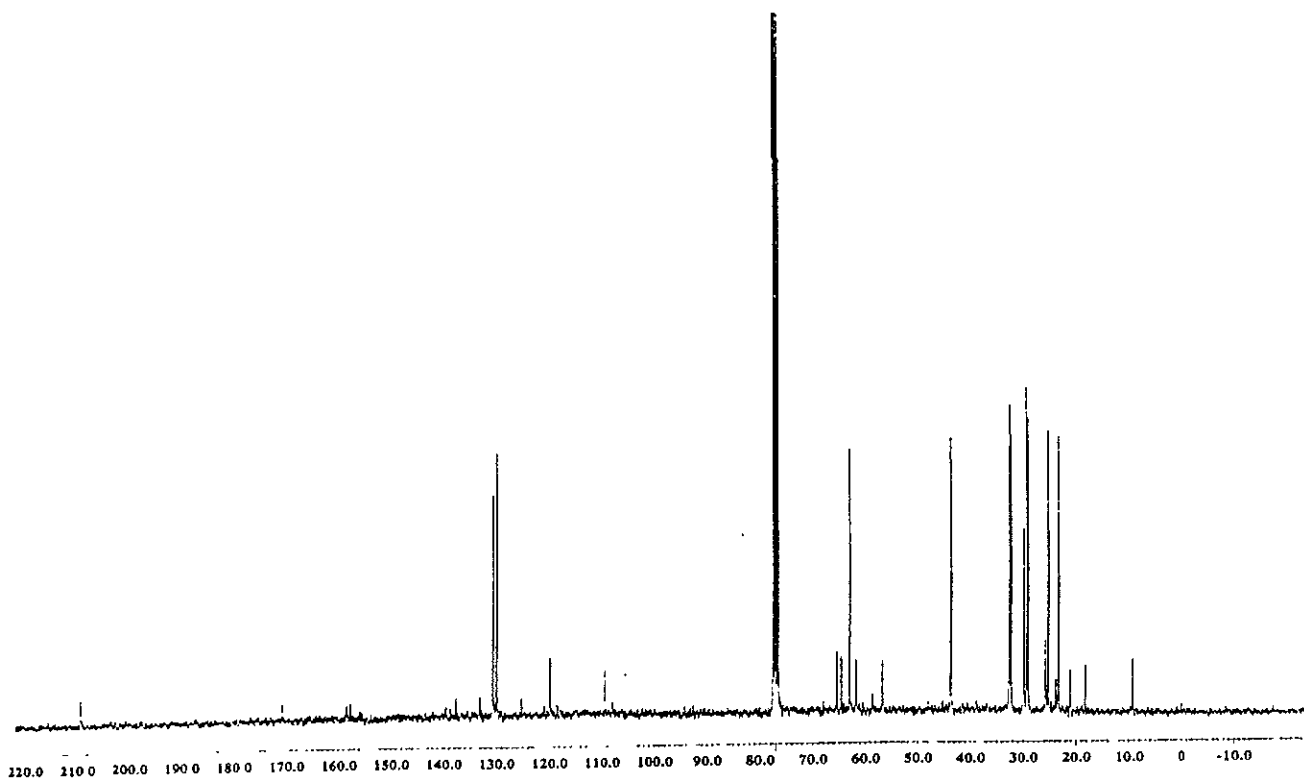
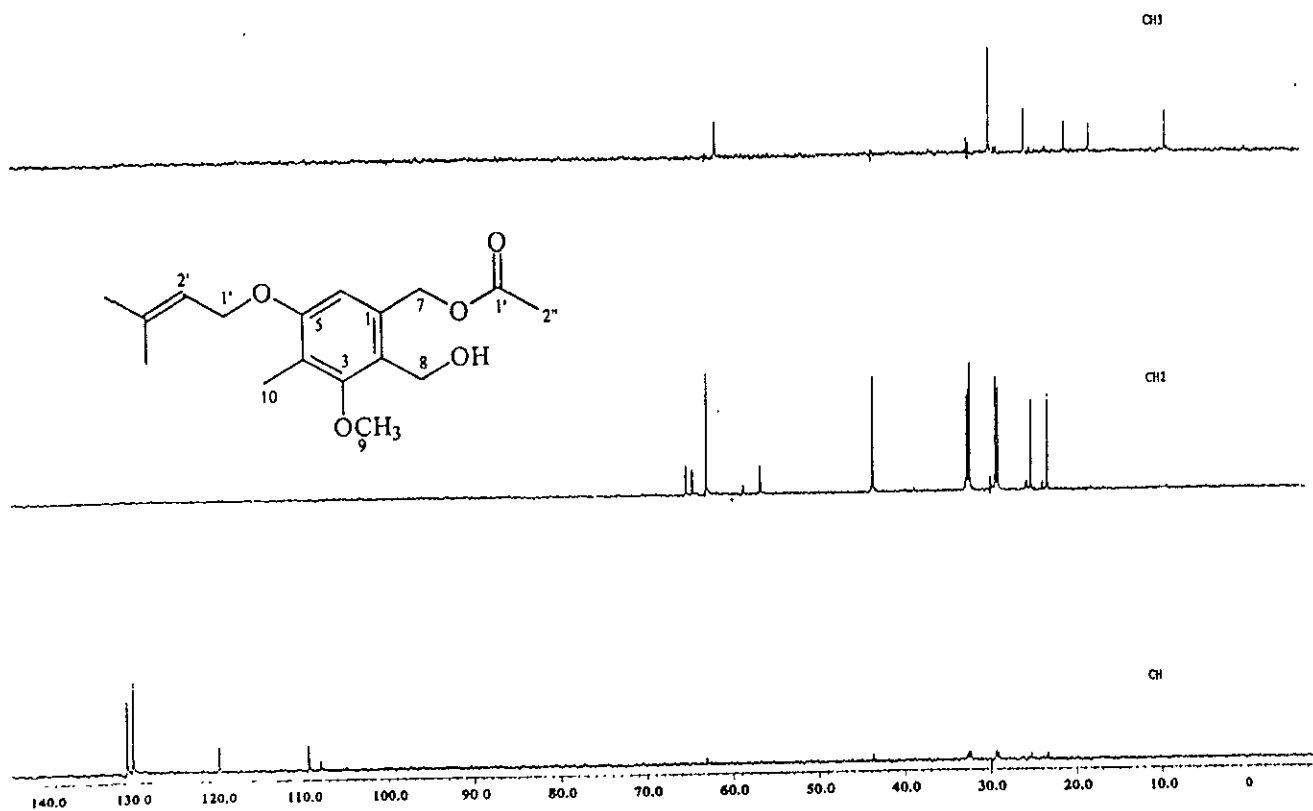


Espectro 26a. IR del acetato de 7-zinniol (24).

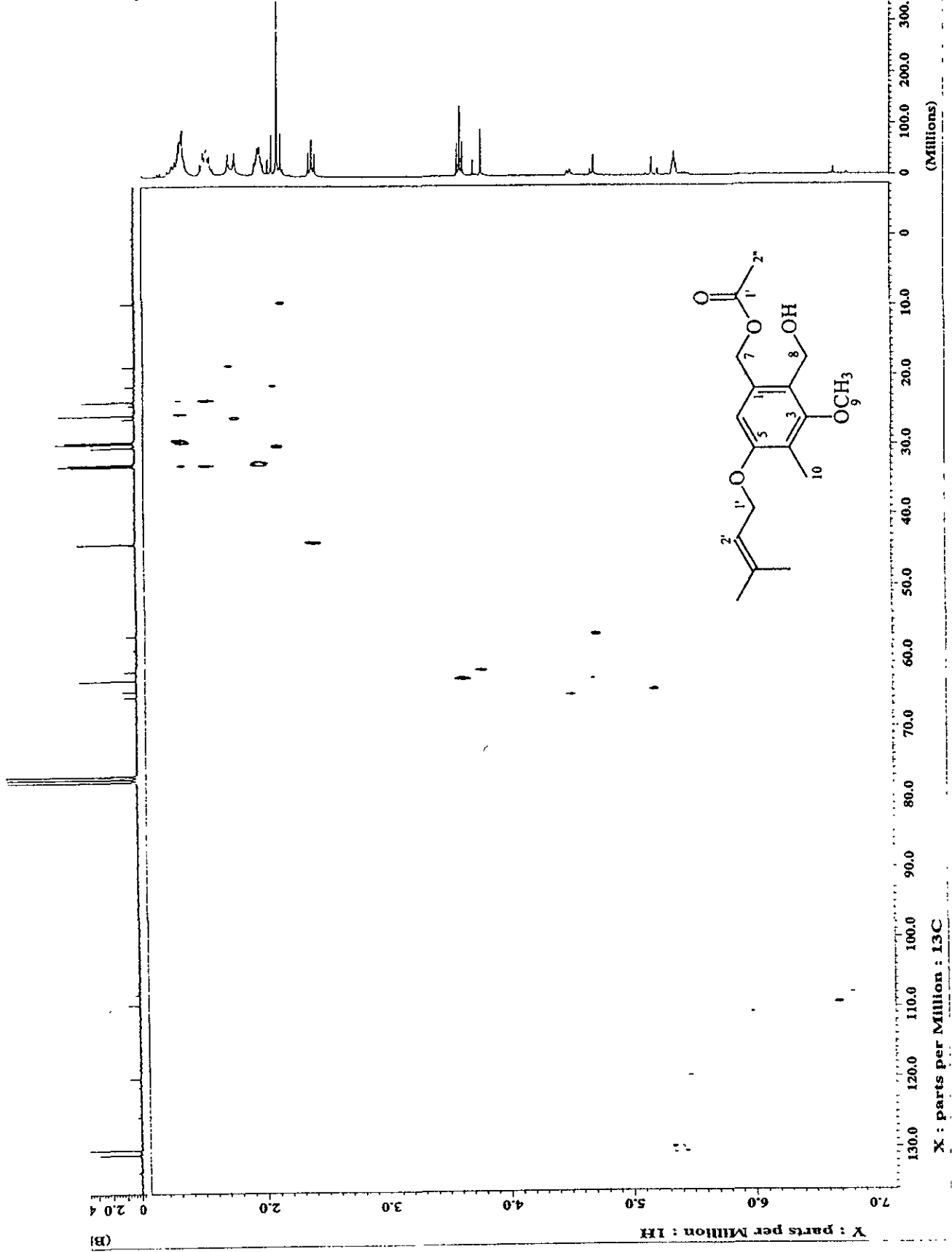
26b. Espectro de masas del acetato de 7-zinniol (24).



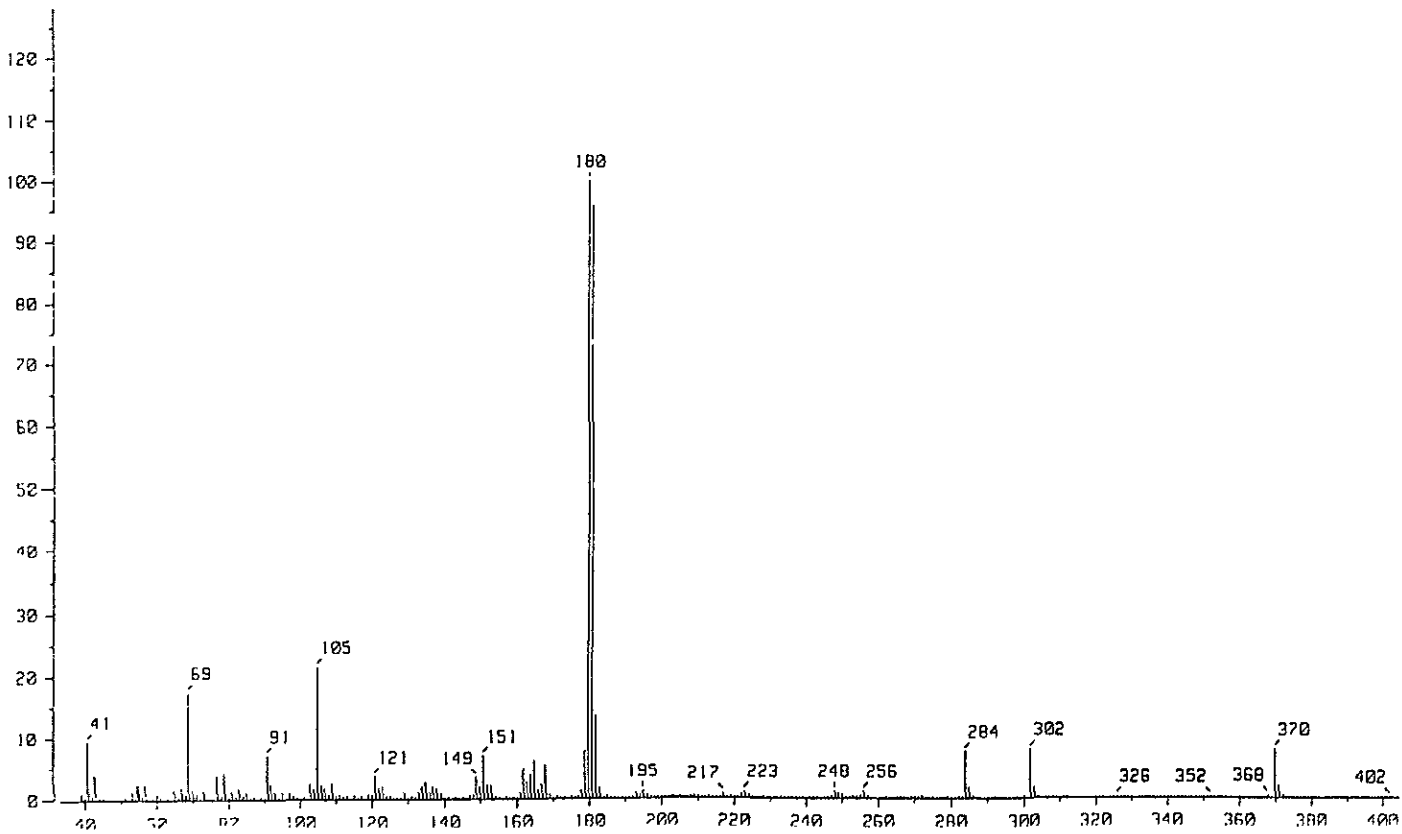
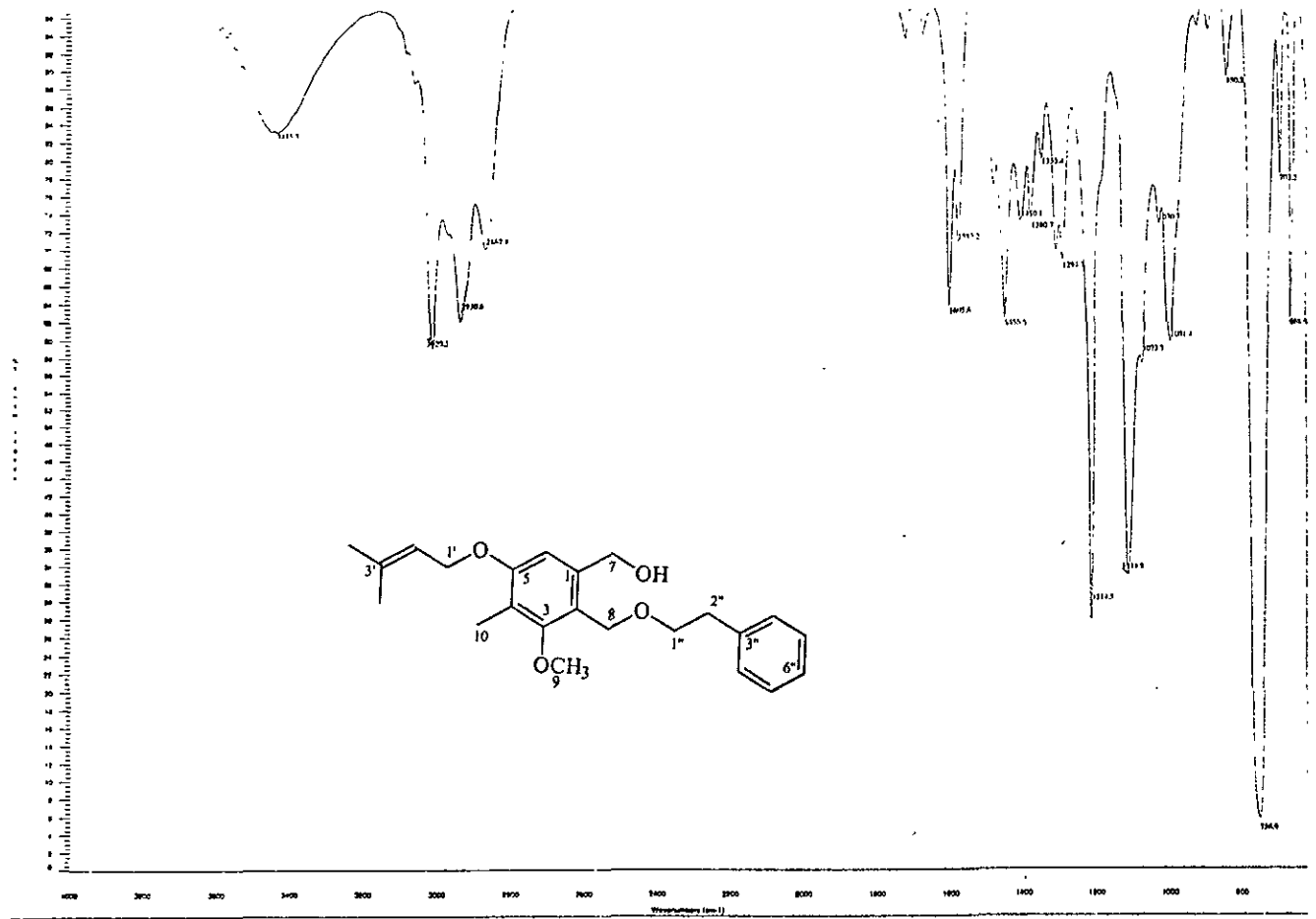
Espectro 27. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del acetato de 7-zinniol (24).



Espectro 28a. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) del acetato de 7-zinniol (24).
 28b. Experimento DEPT del acetato de 7-zinniol (24).

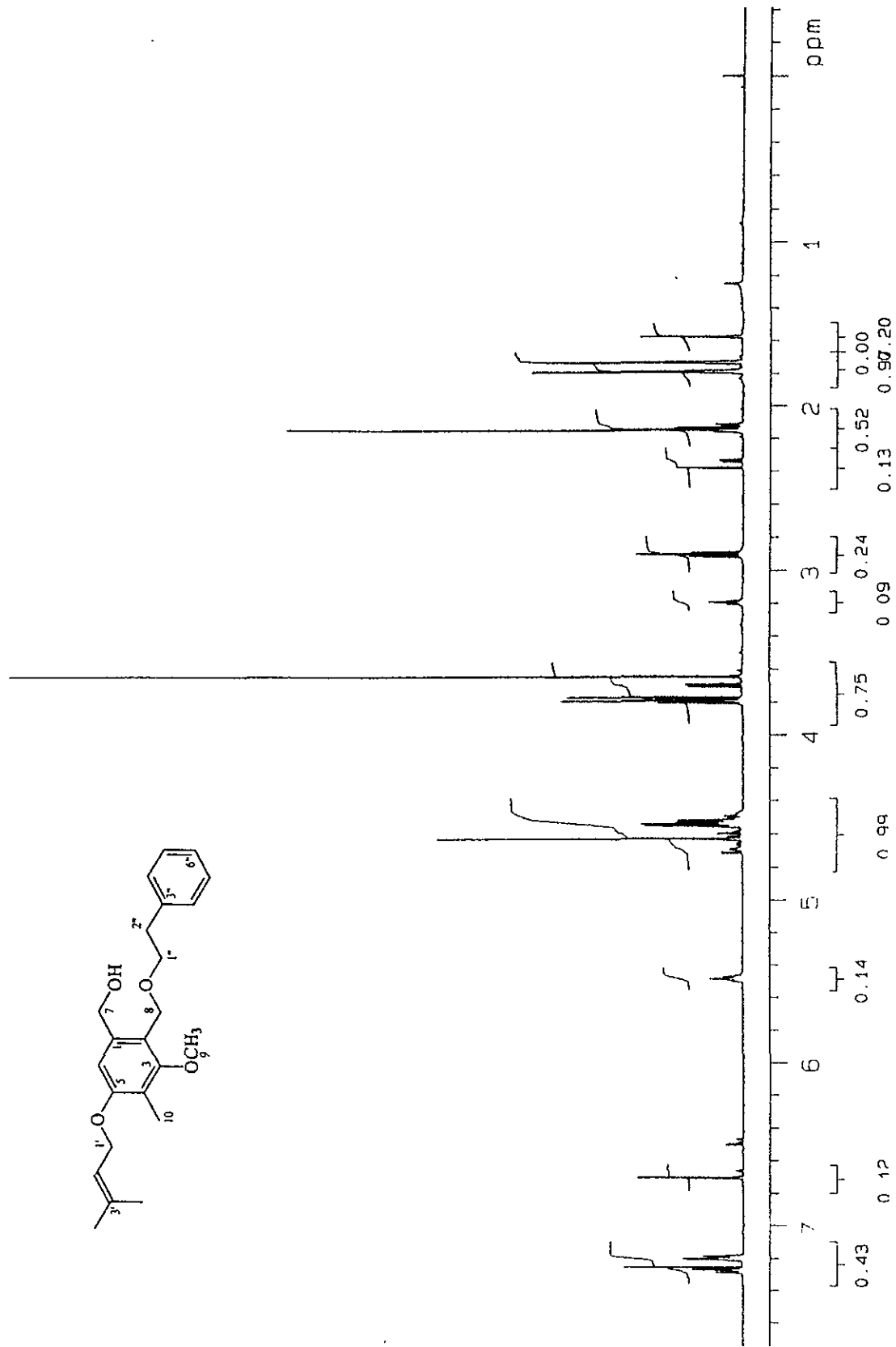
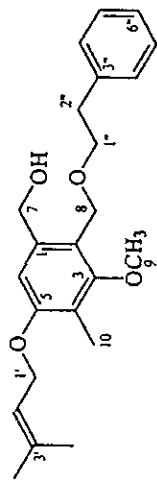


Espectro 29. Experimento HMQC del acetato de 7-zinniol (24).

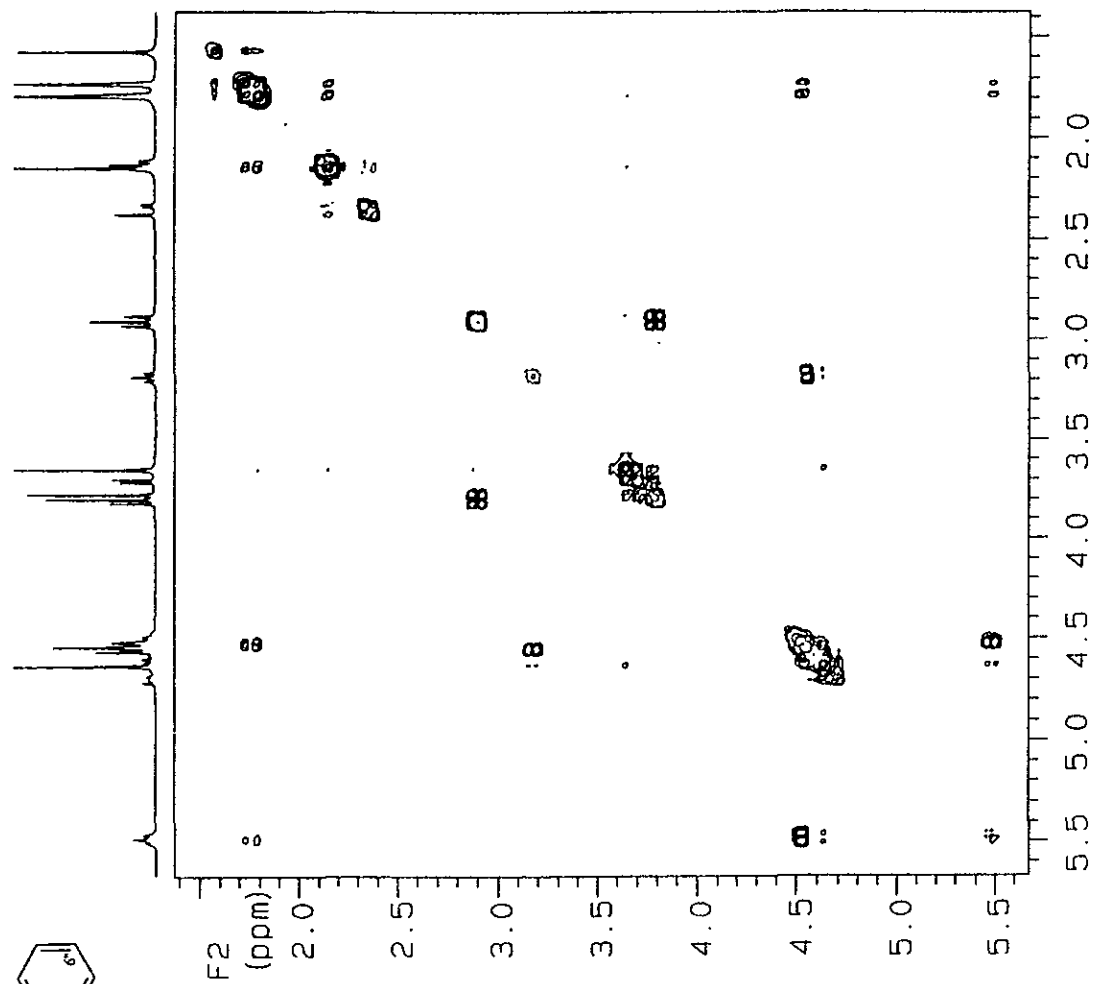
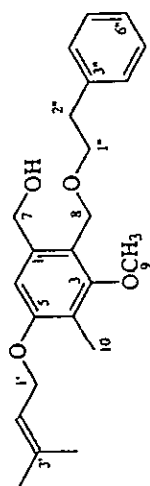


Espectro 30a. IR del éter (2-fenil)-etílico de 8-zinniol (25).

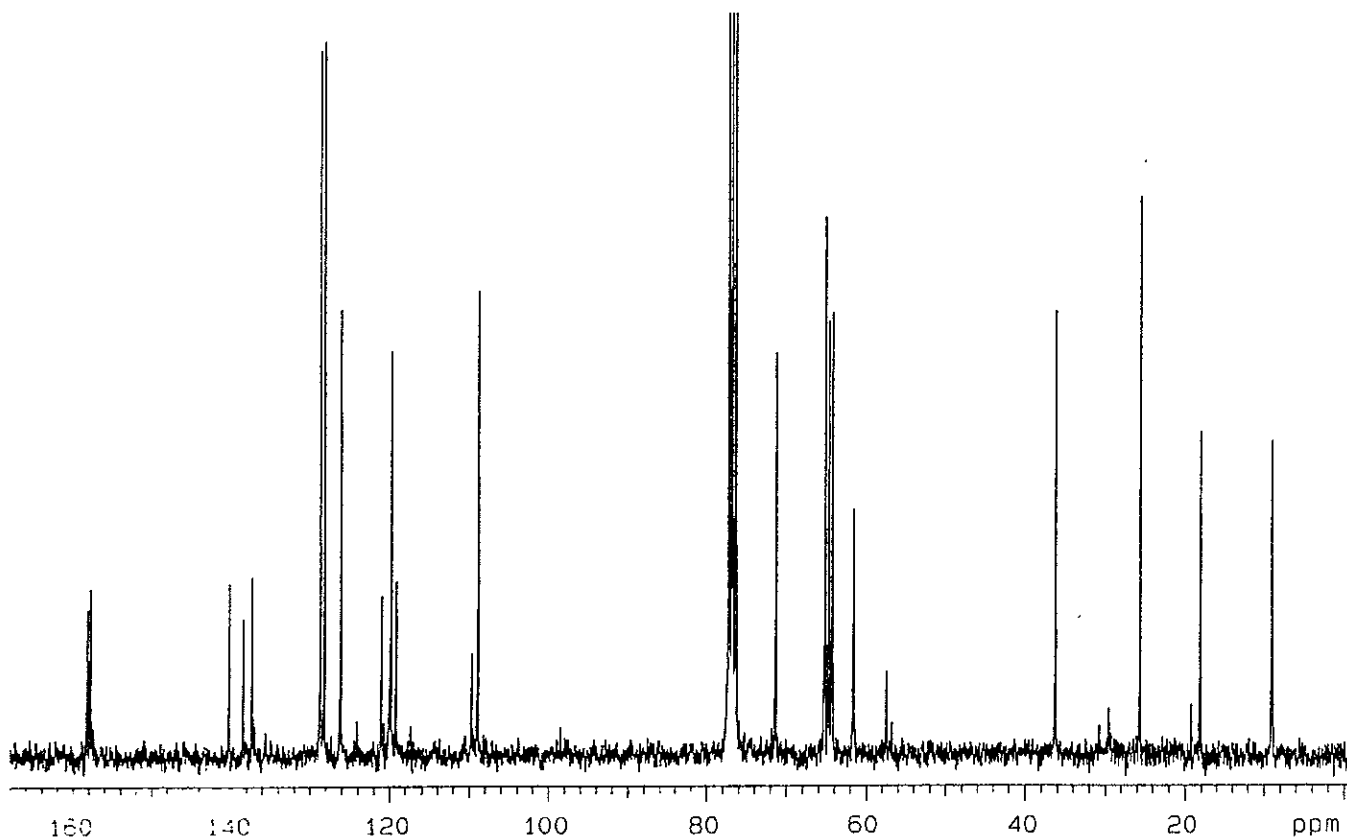
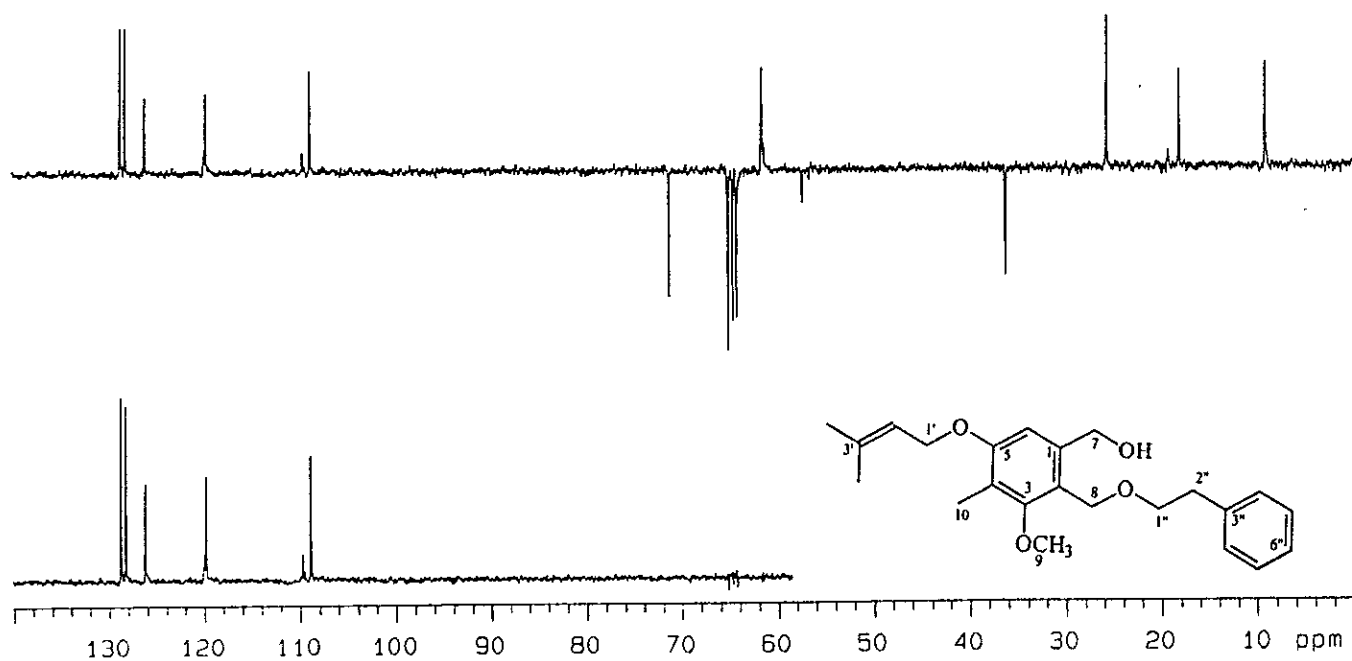
30b. Espectro de masas del éter (2-fenil)-etílico de 8-zinniol (25).



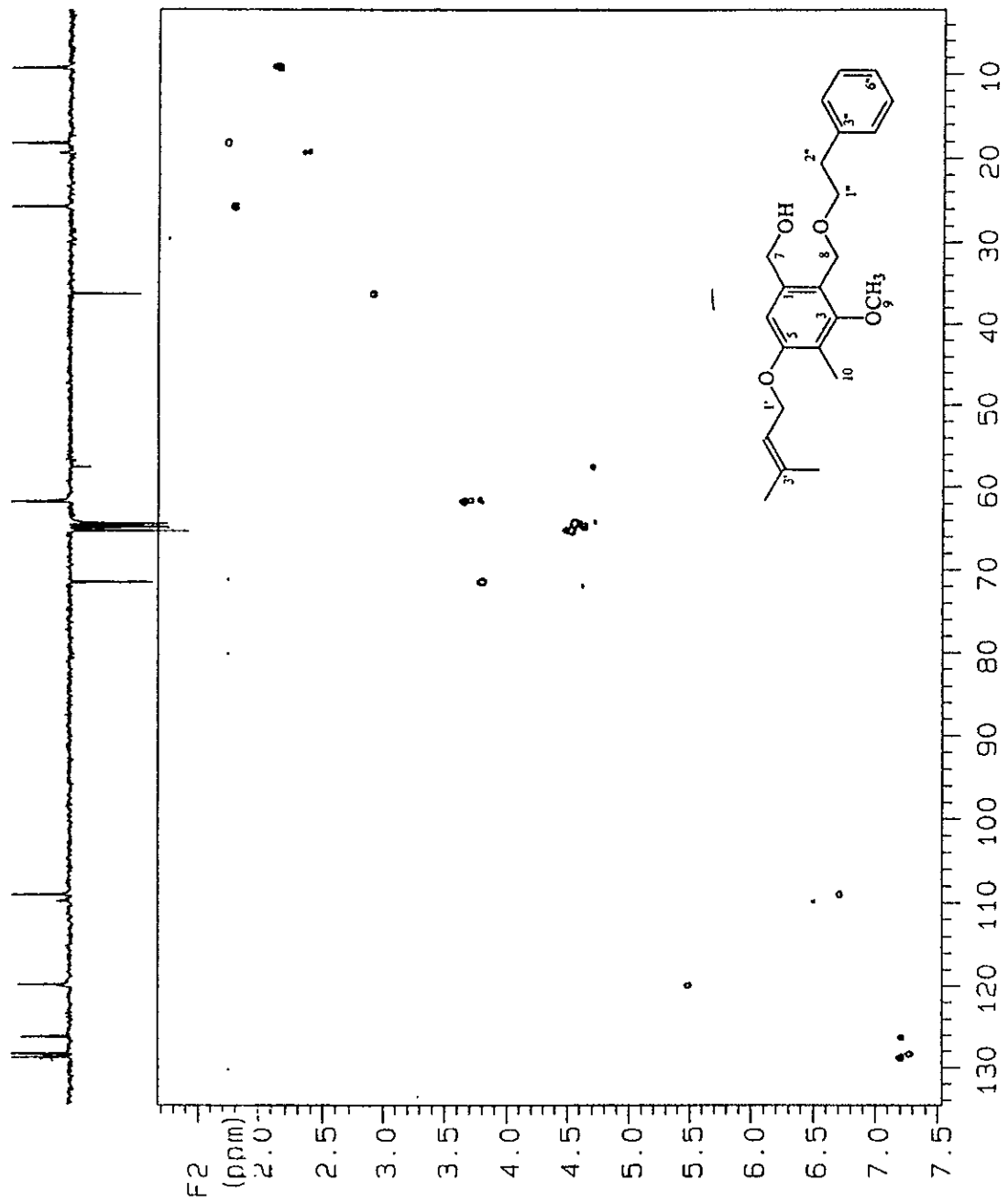
Espectro 31. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) del éter (2-fenil)-etílico de 8-zinniol (25).



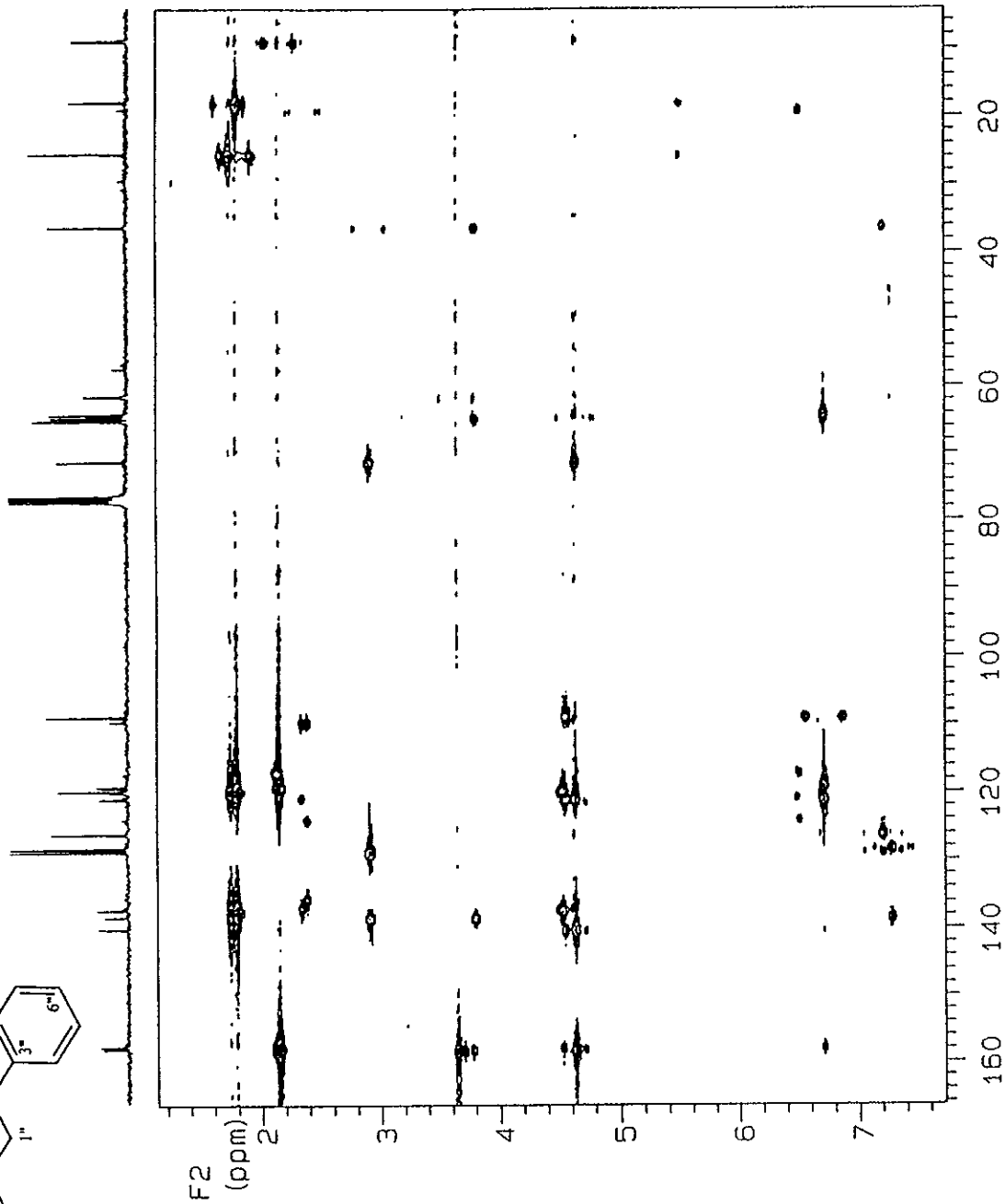
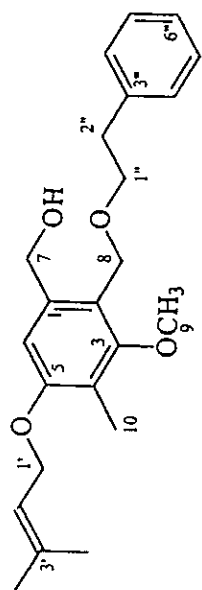
Espectro 32. ¹H-¹H-COSY del éter (2-fenil)-etílico de 8-zinniol (25).



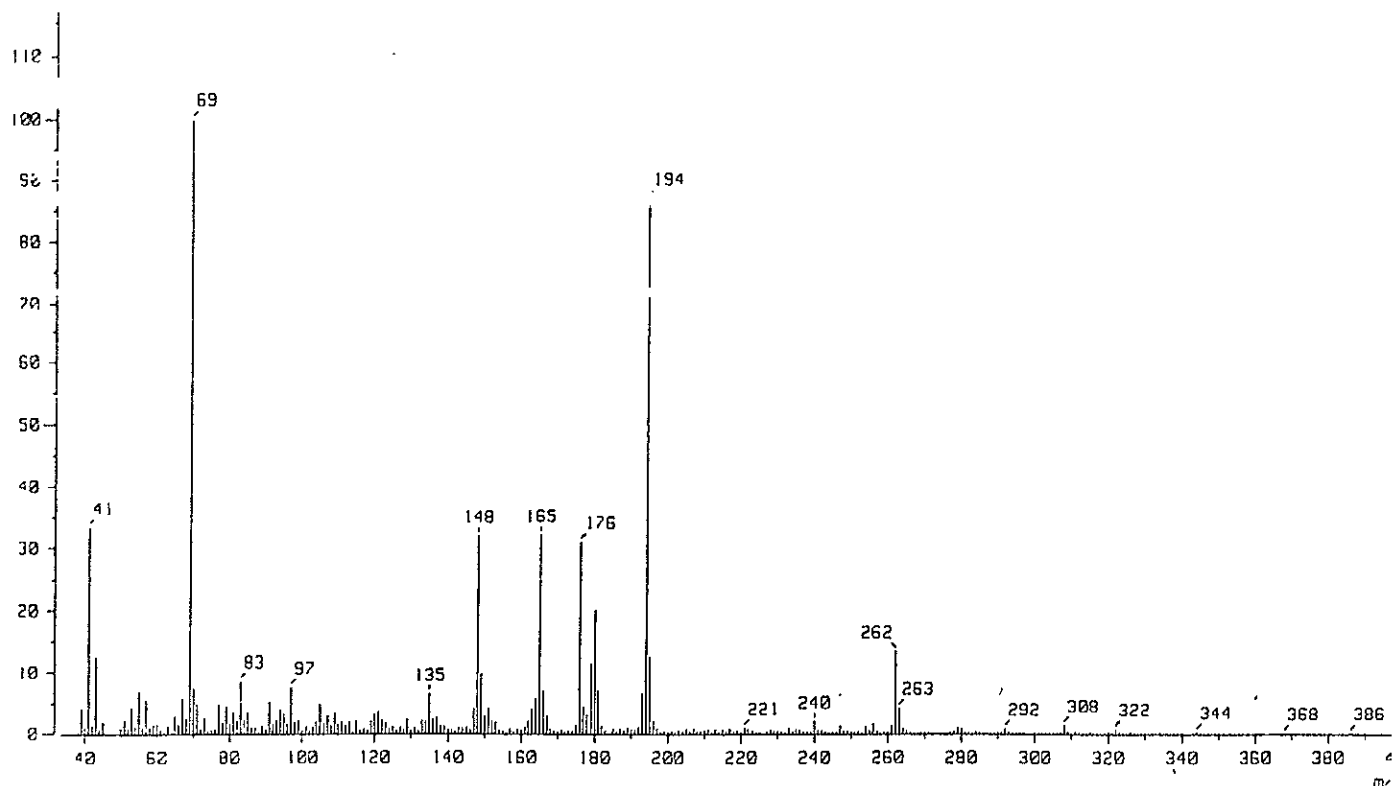
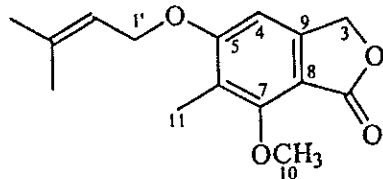
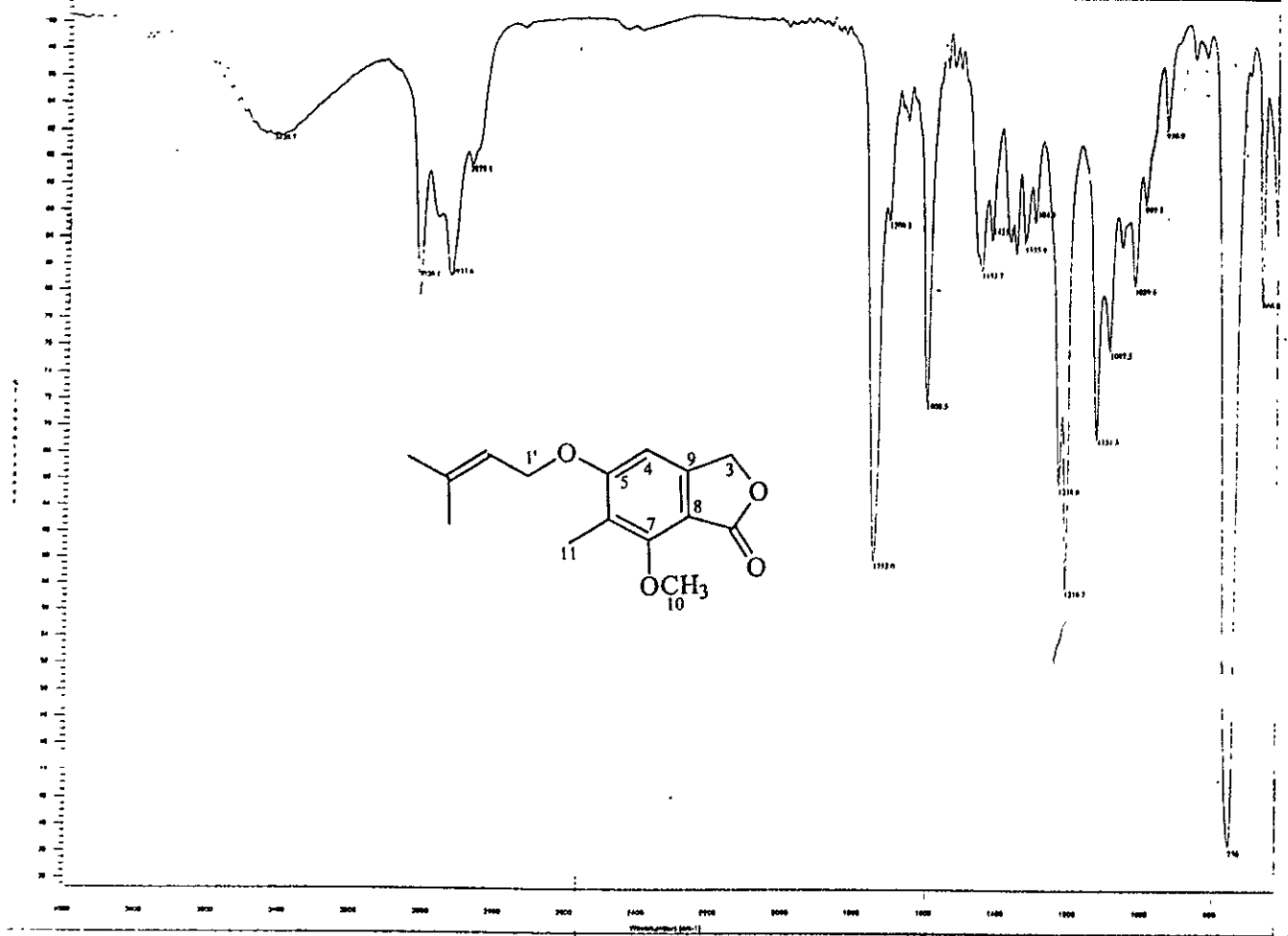
Espectro 33a. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) del éter (2-fenil)-etílico de 8-zinniol (**25**).
33b. Experimento DEPT del éter (2-fenil)-etílico de 8-zinniol (**25**).



Espectro 34. Experimento HMQC del éter (2-fenil)-etilico de 8-zinniol (25).



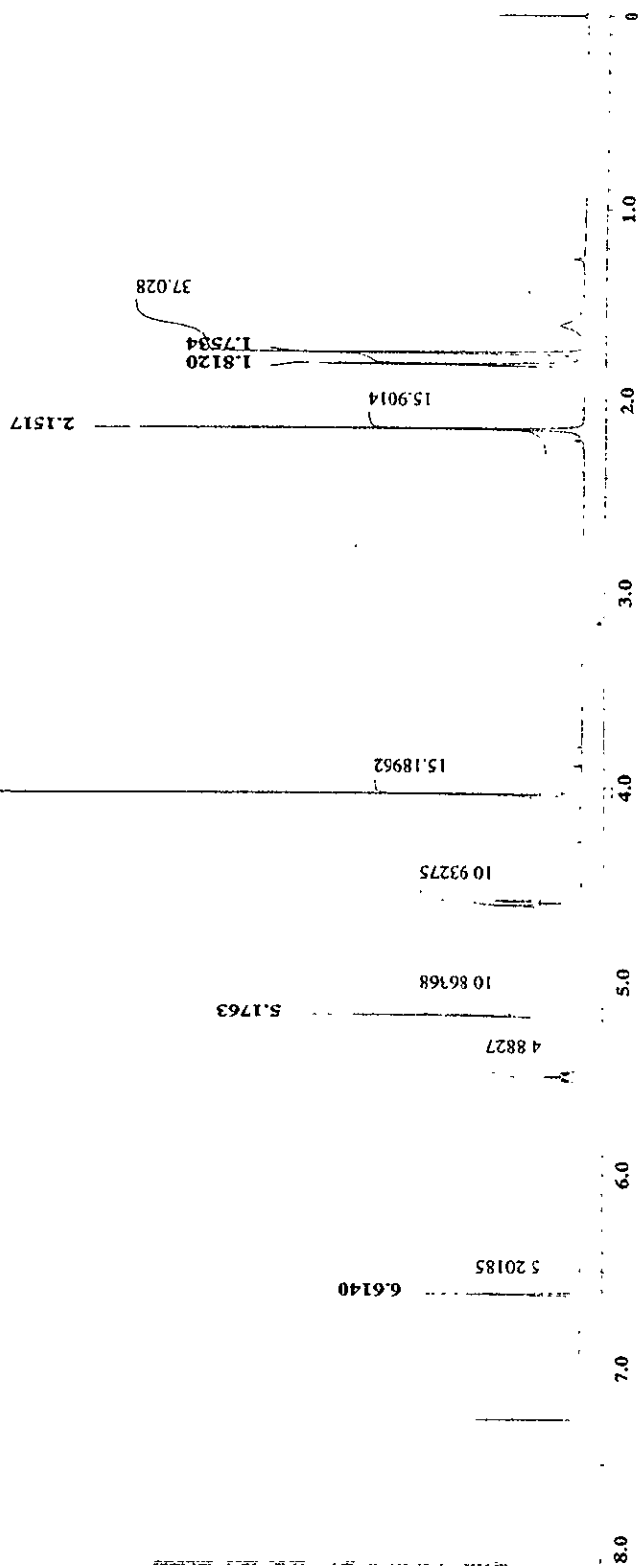
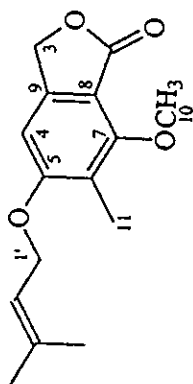
Espectro 35. Experimento HMBC del éter (2-fenil)-etílico de 8-zinniol (25).



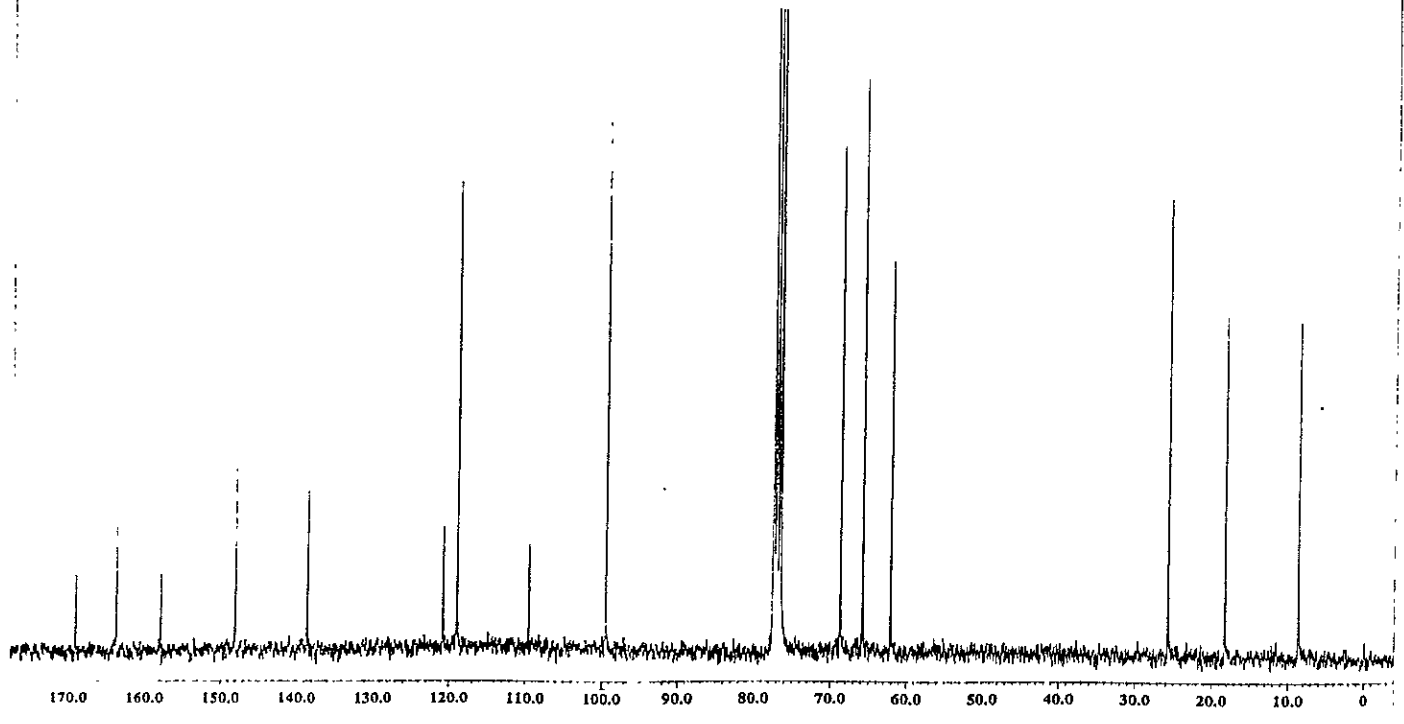
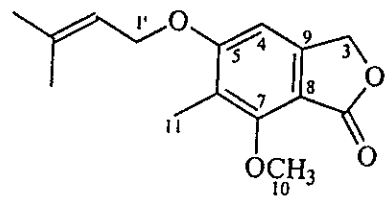
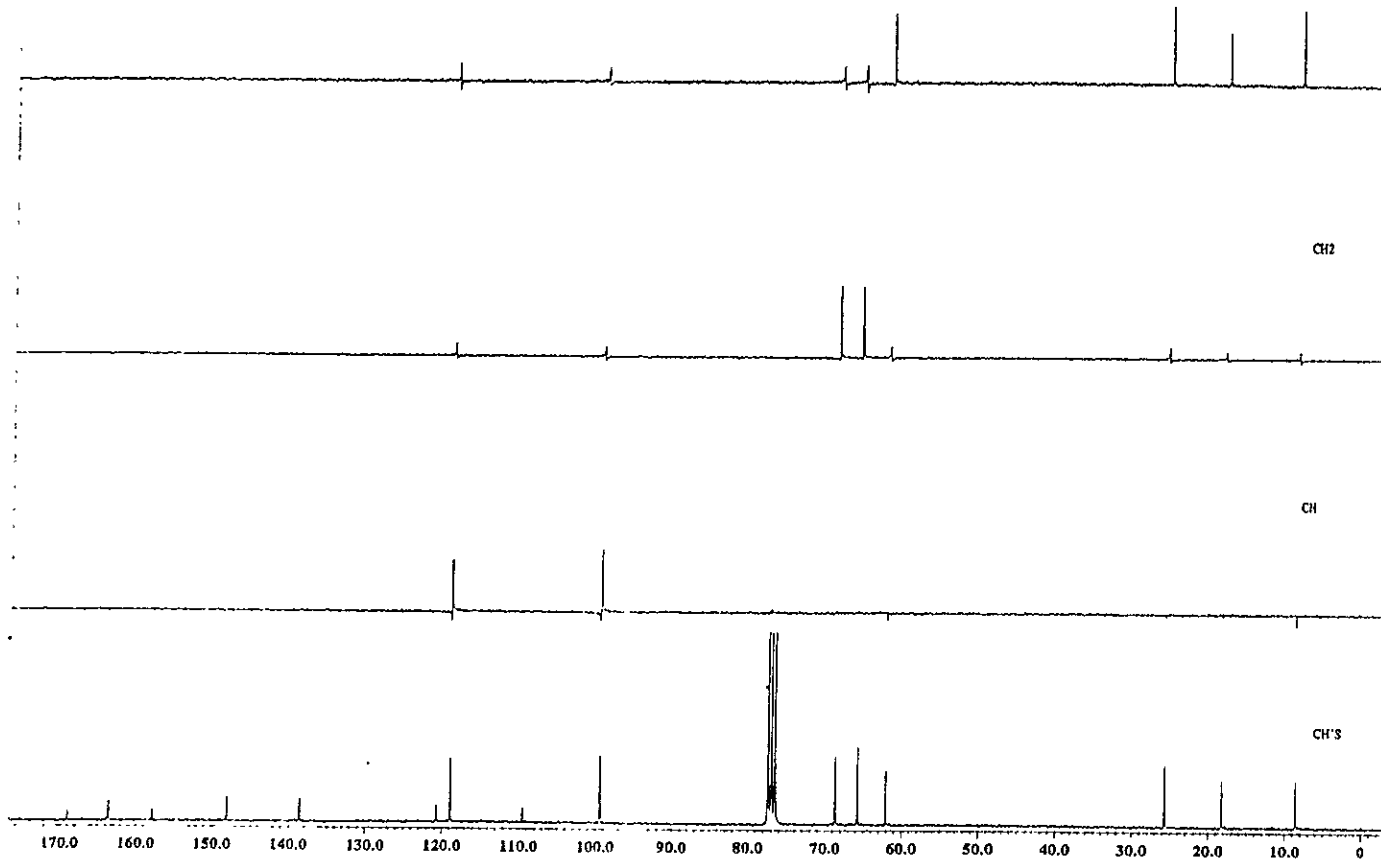
Espectro 36a. IR del 5-(3,3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálico (26).

36b. Espectro de masas del 5-(3,3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftálico (26).

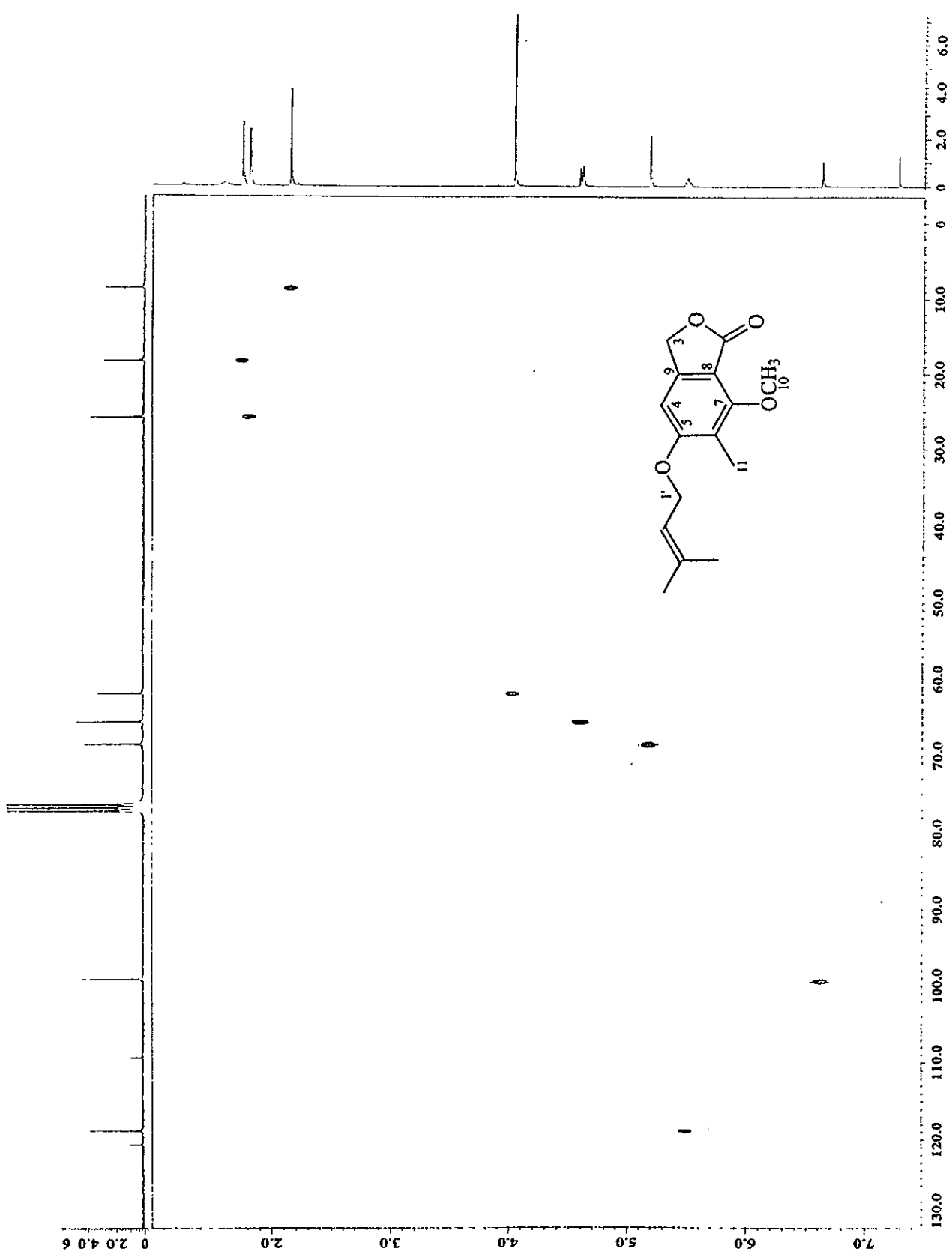
4.0353



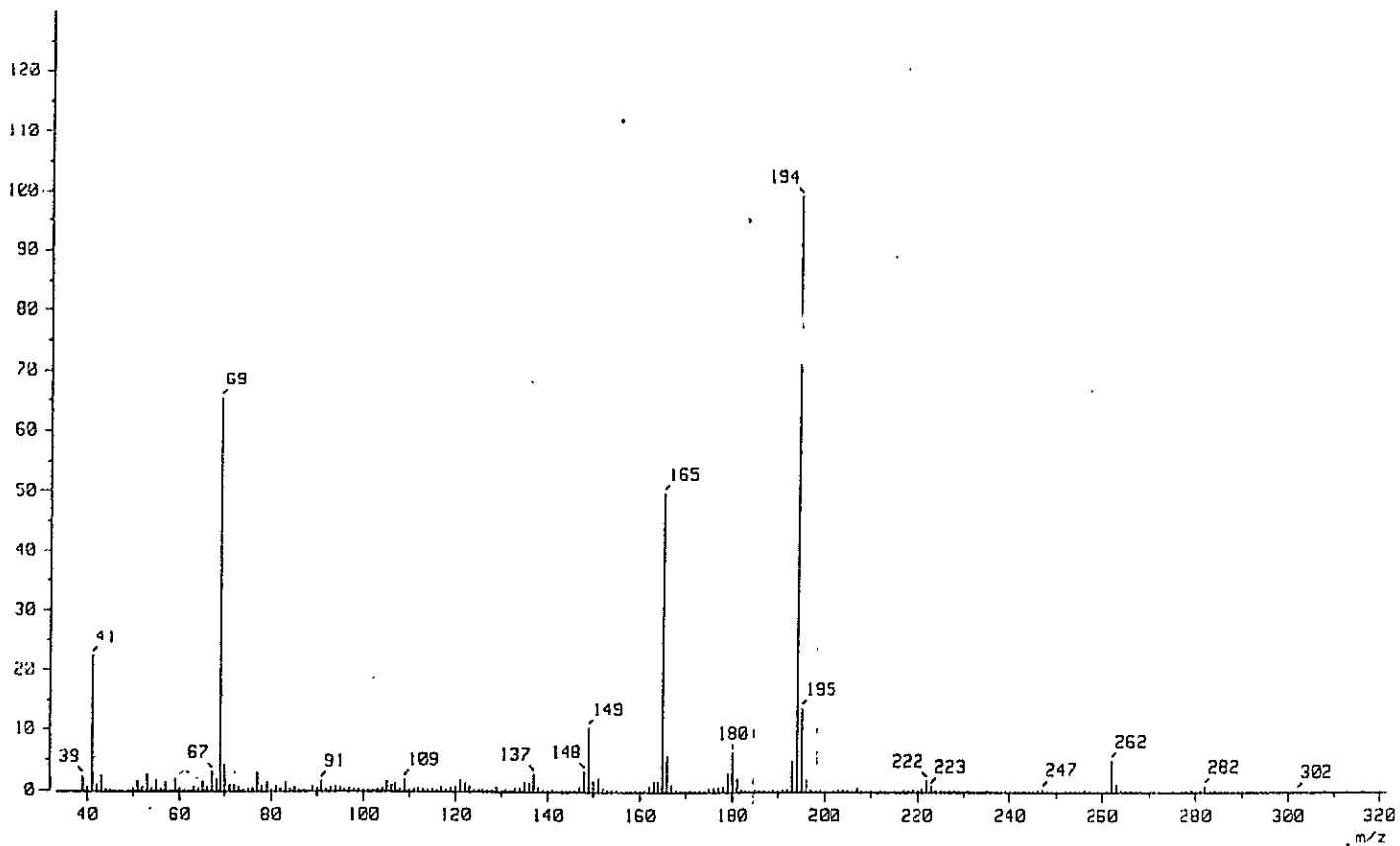
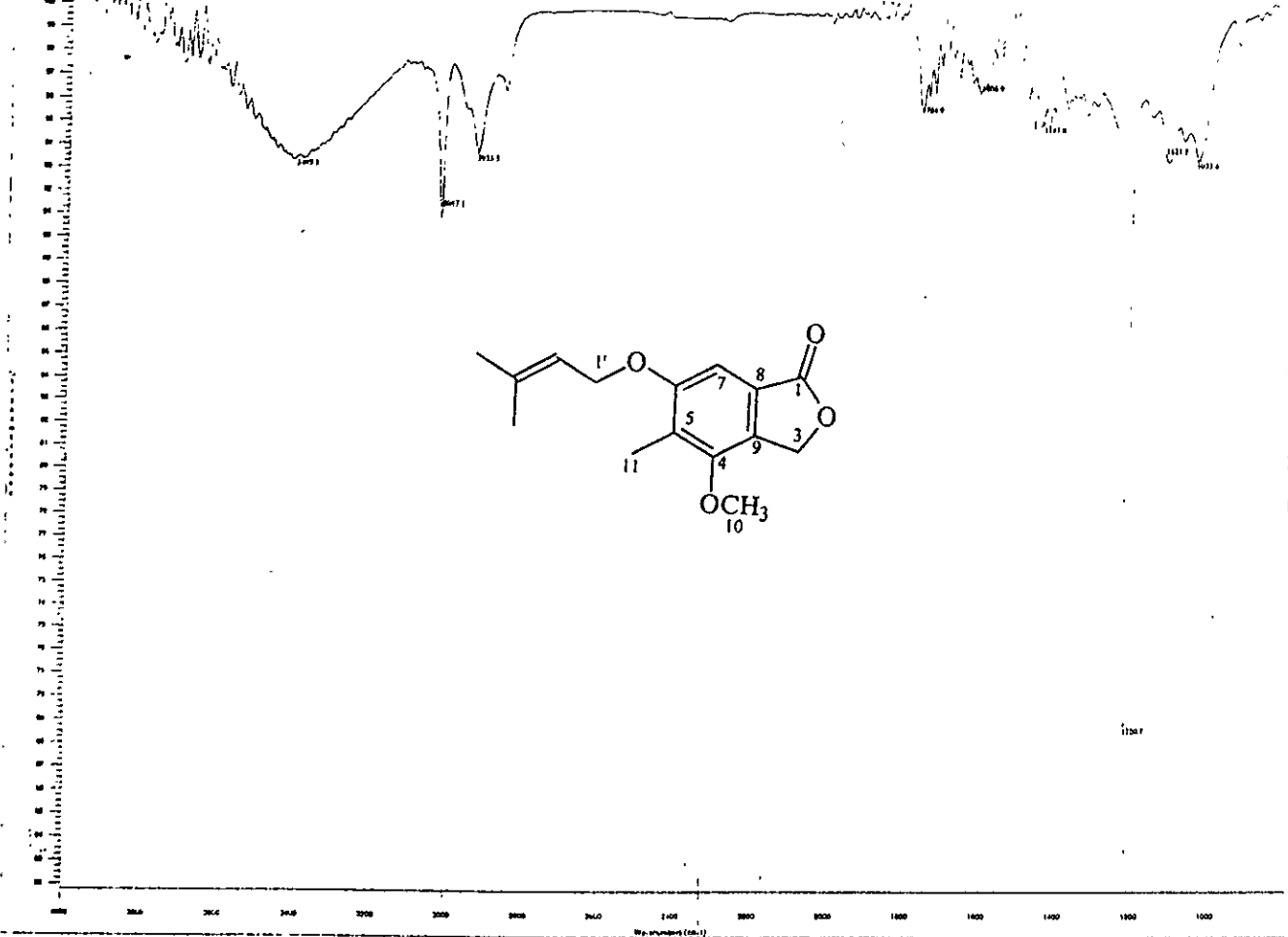
Espectro 37. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del 5-(3,3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftárido (26).



Espectro 38a. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) del 5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftárido (26).
38b. Experimento DEPT del 5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-ftárido (26).

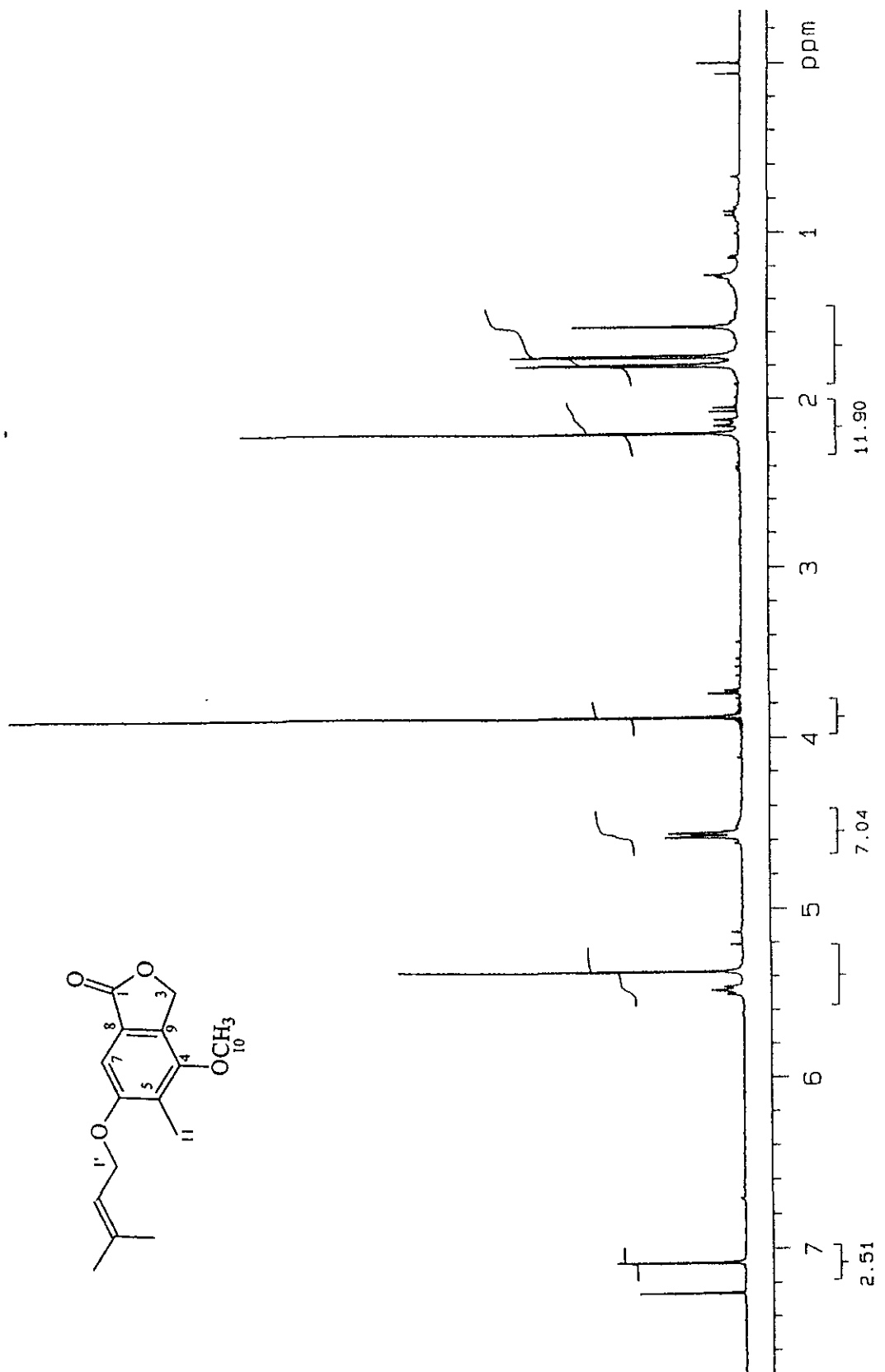


Espectro 39. Experimento HMQC del 5-(3,3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metil-falido (26).

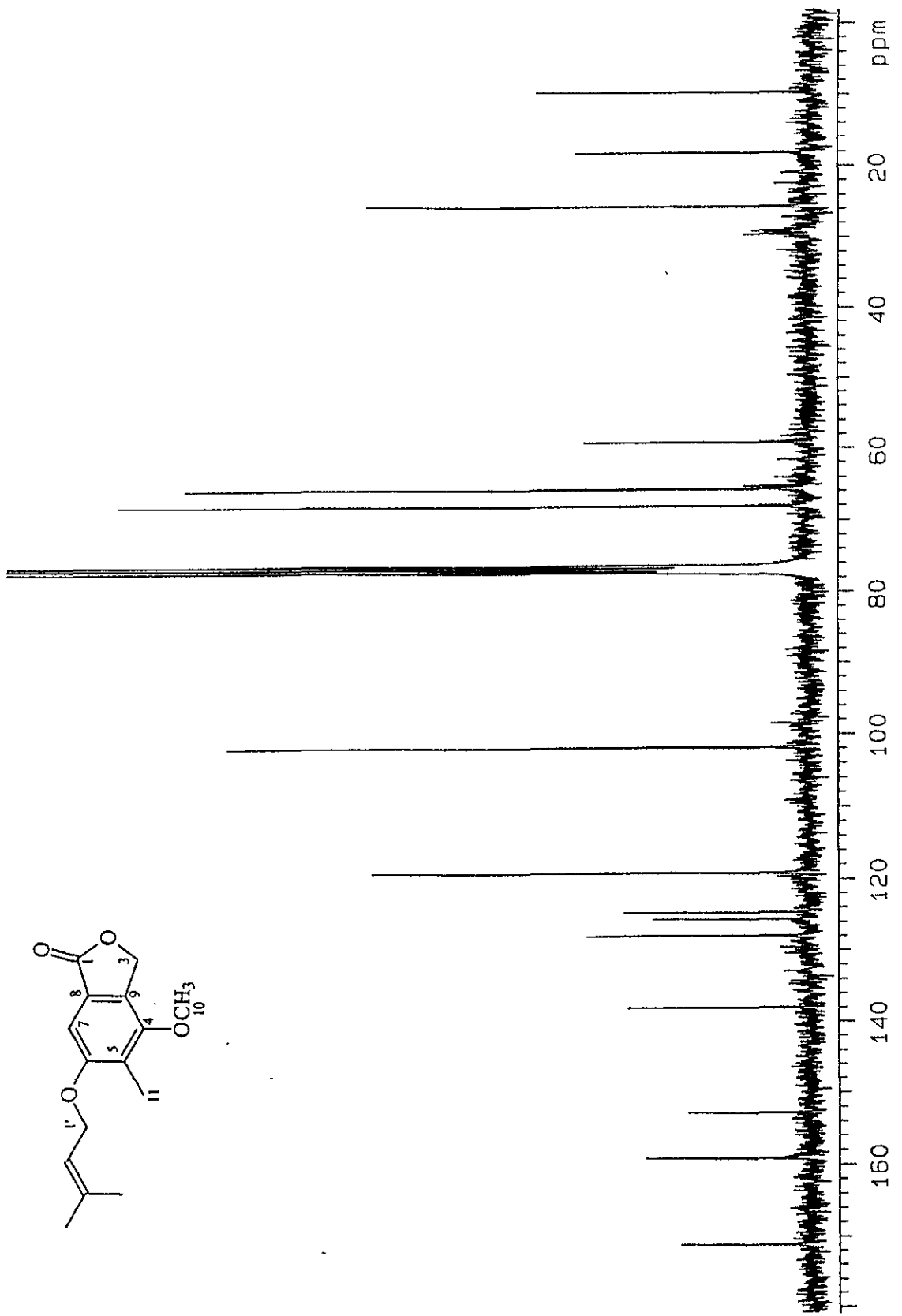


Espectro 40a. IR del 6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftálico (27).

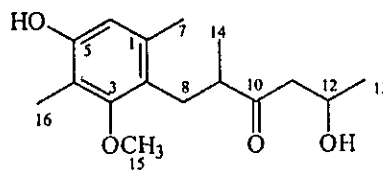
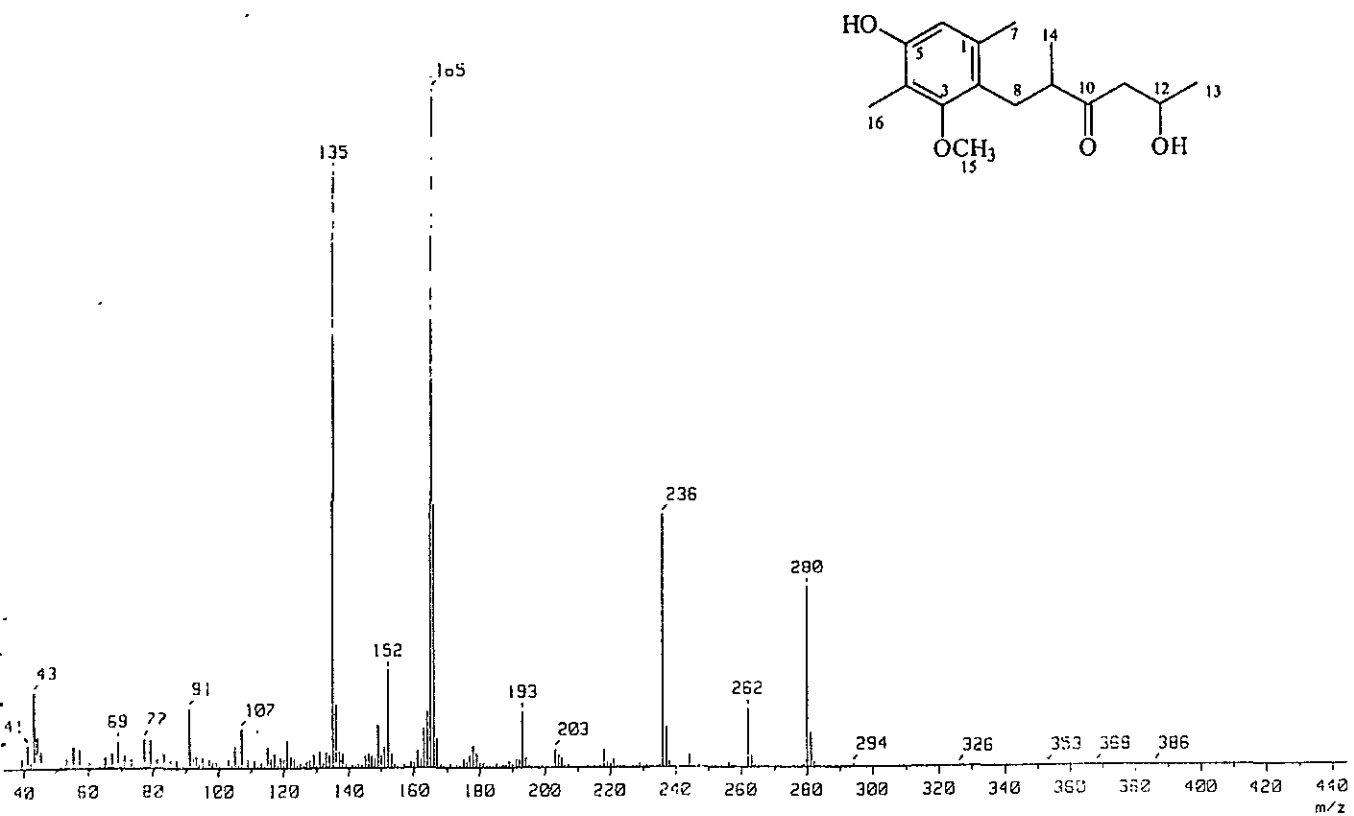
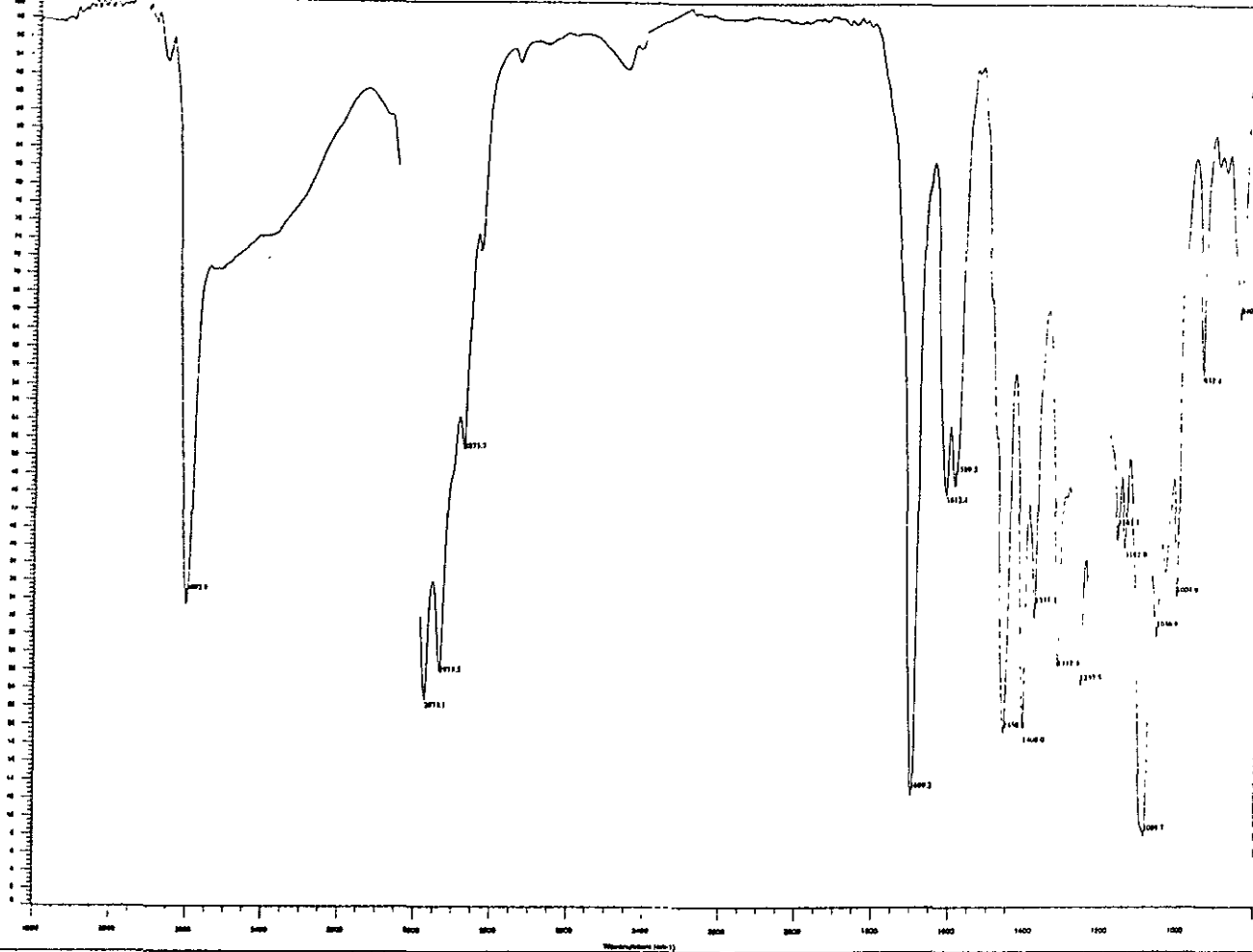
40b. Espectro de masas del 6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftálico (27).



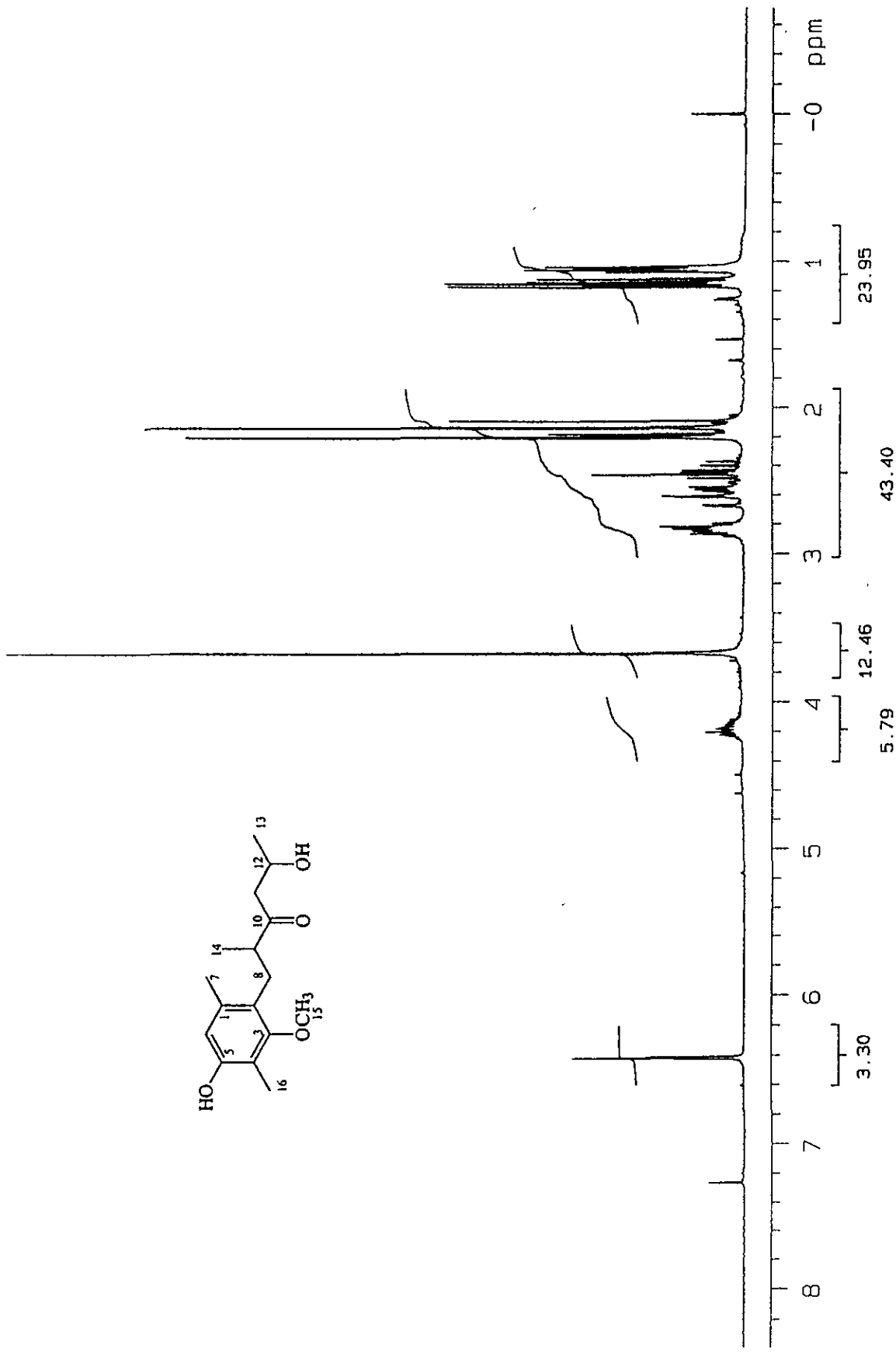
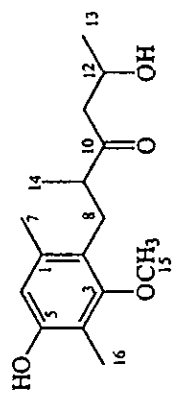
Espectro 41. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) del 6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftárido (27).



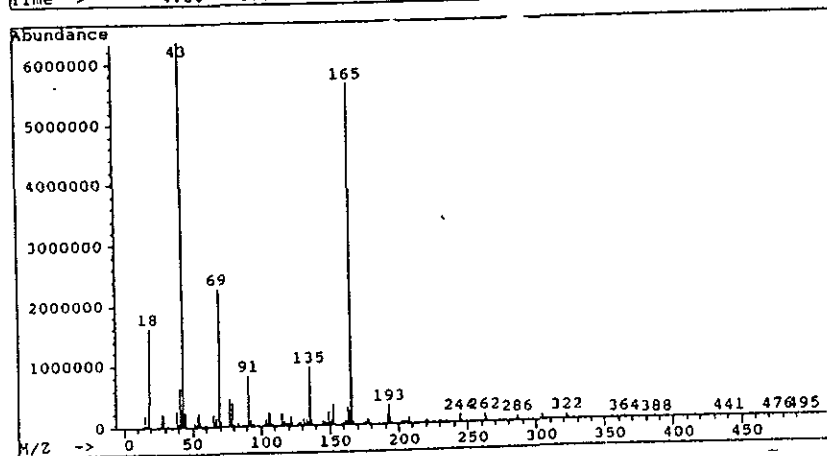
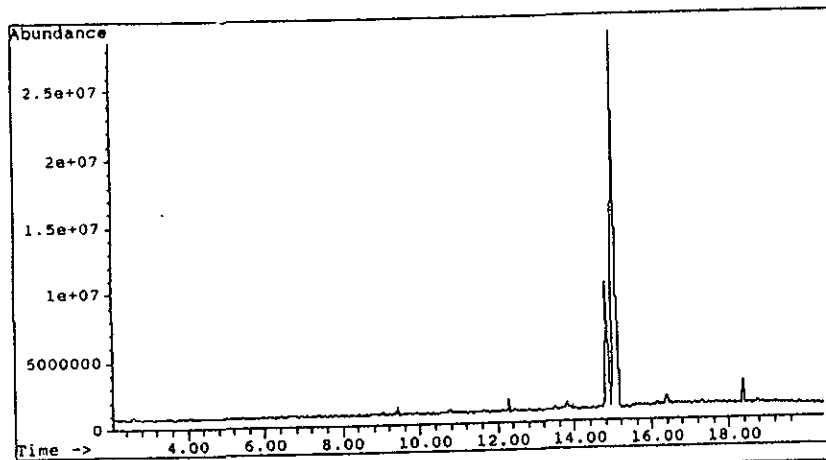
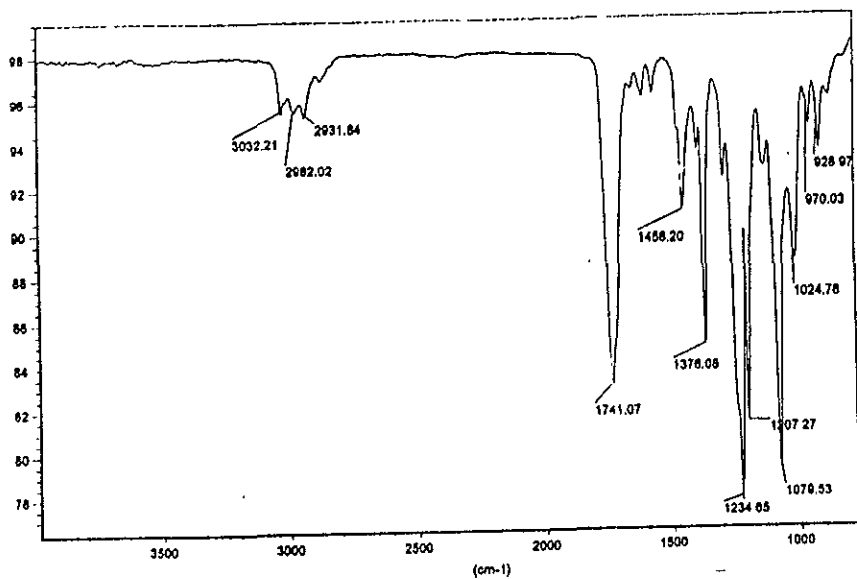
Espectro 42. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) del 6-(3,3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metil-ftárido (27).



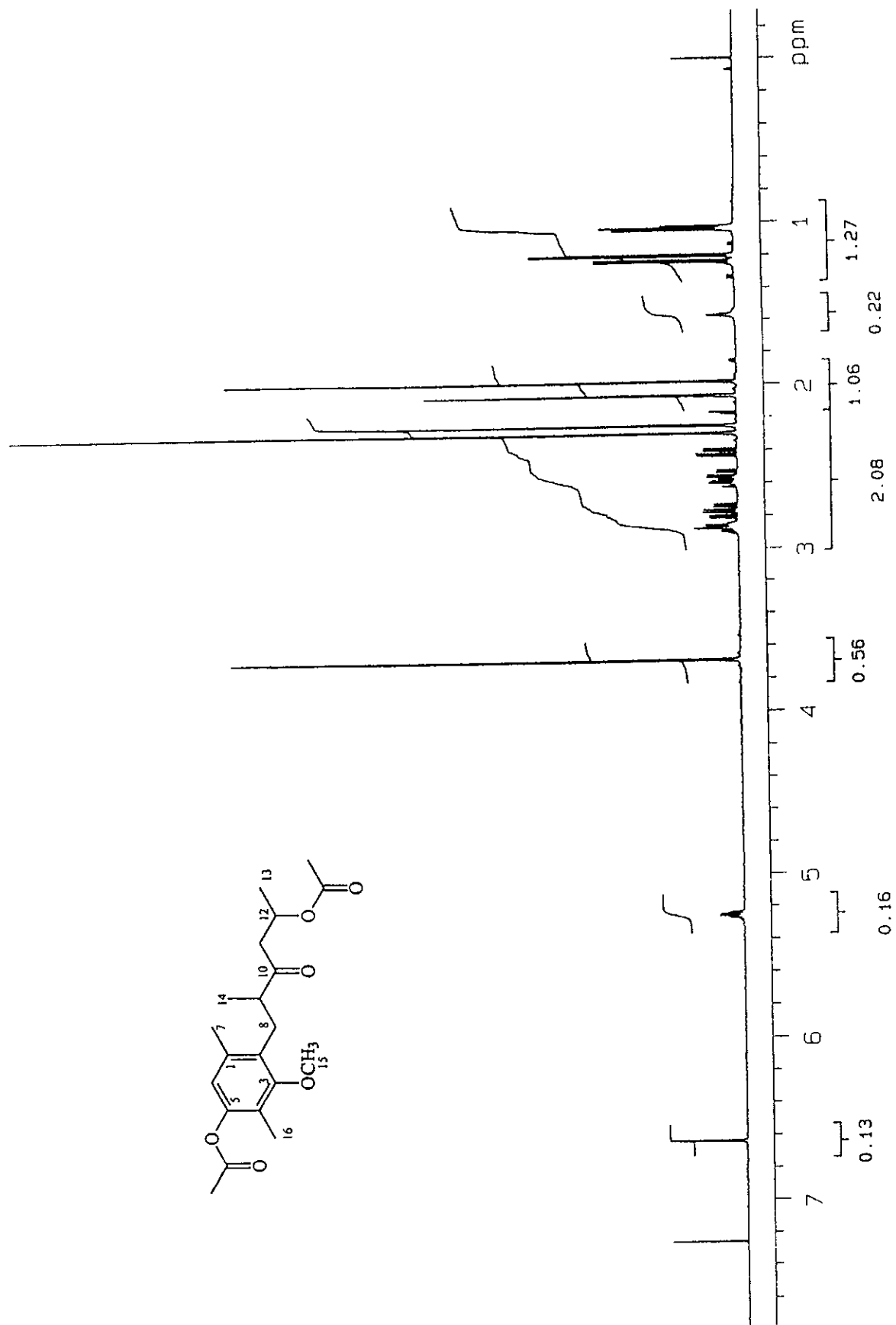
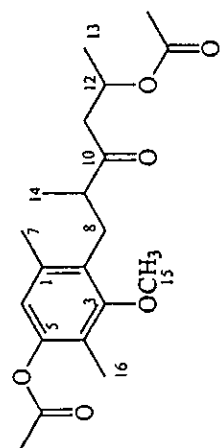
Espectro 43. IR de tagetolona (41). 43b. Espectro de masas de tagetolona (41)



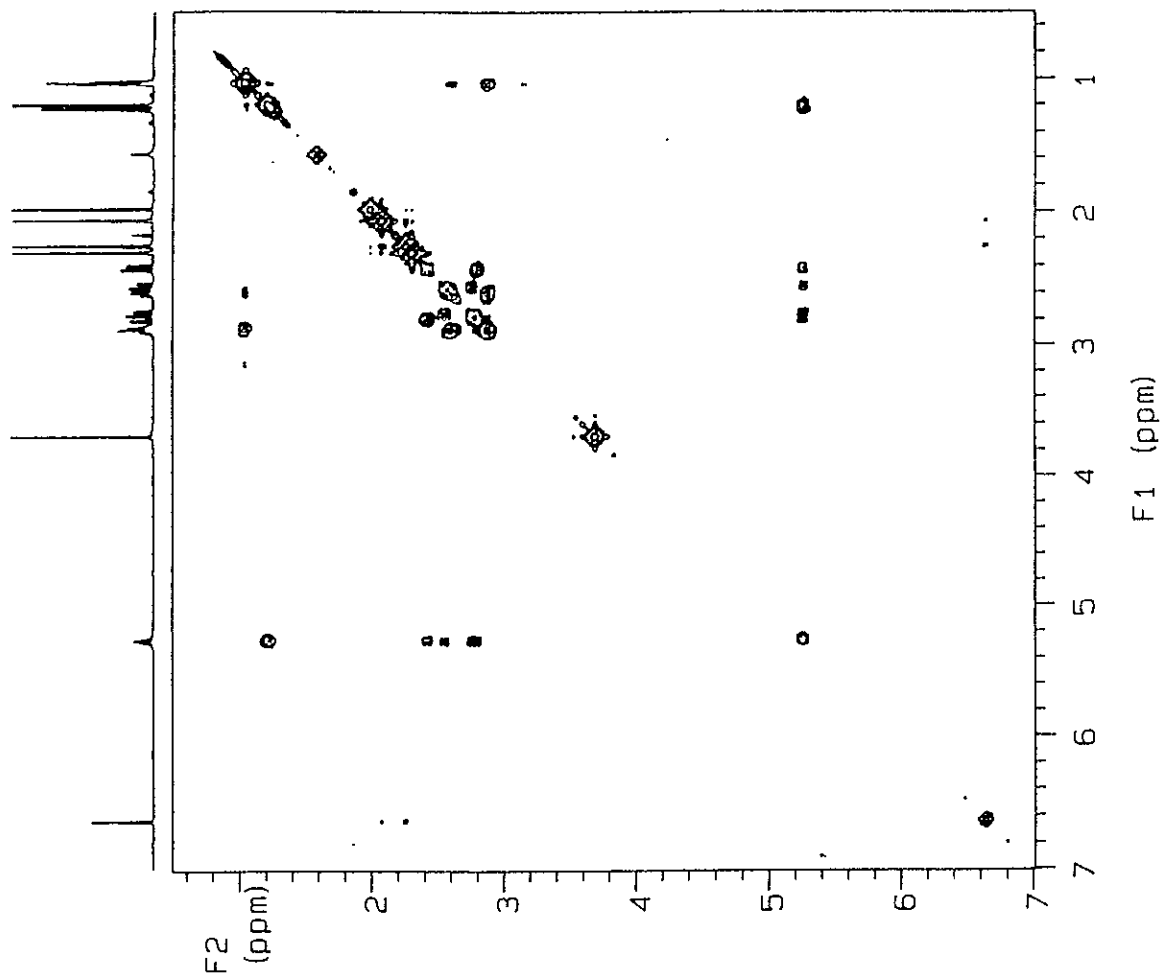
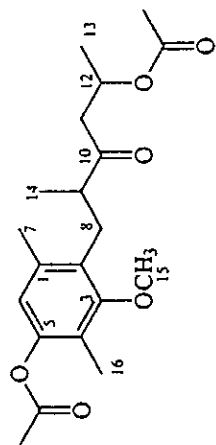
Espectro 44. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de tagetolona (41).



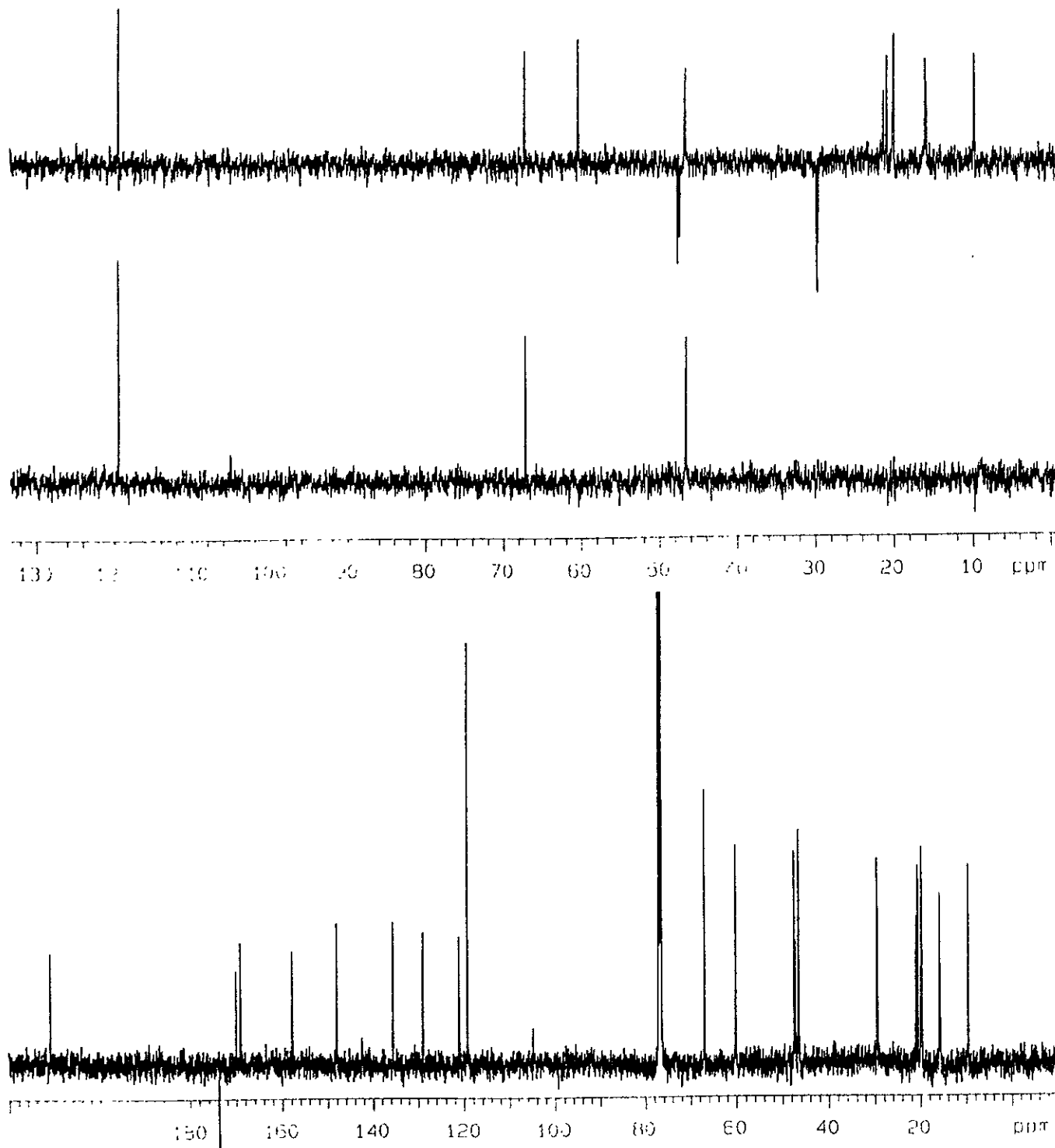
Espectro 45a. IR del diacetato de tagetolona (41a).
45b. Cromatograma de gases-masas de tagetolona (41a)



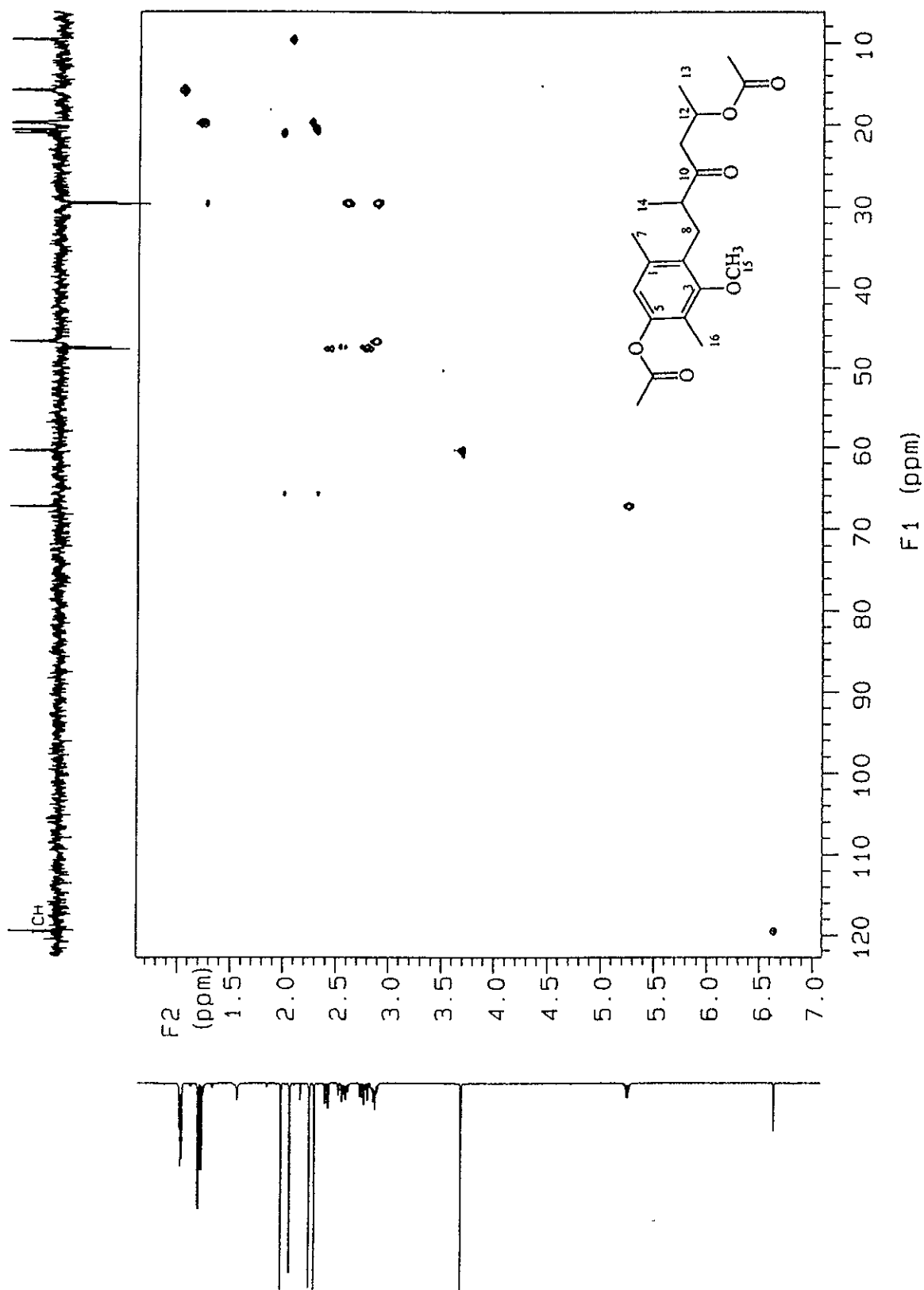
Espectro 46. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) del diacetato de tagetolona (41a).



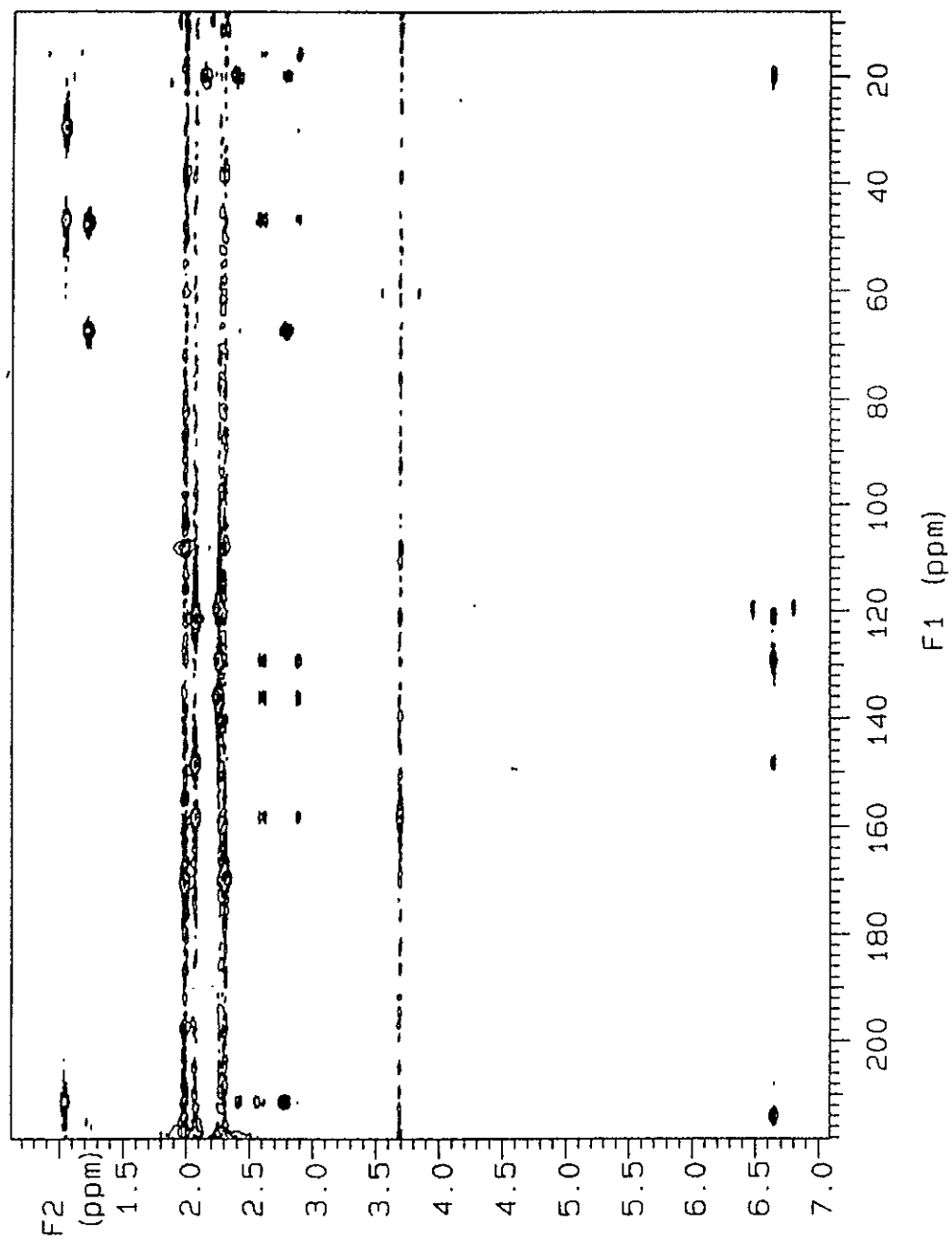
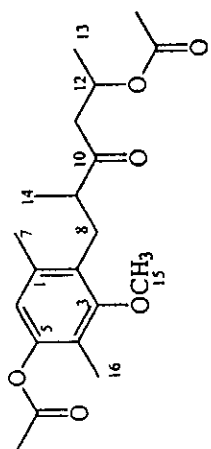
Espectro 47. ¹H¹H-COSY del diacetato de tagetolona (41a).



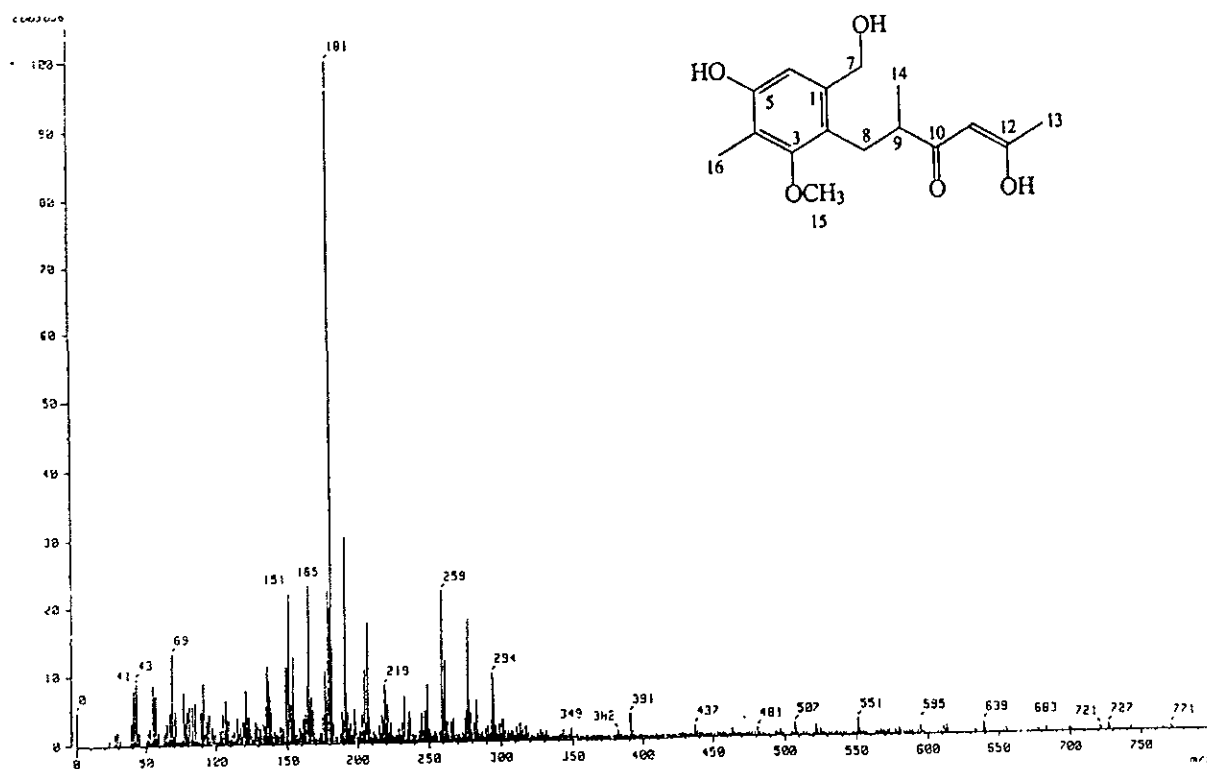
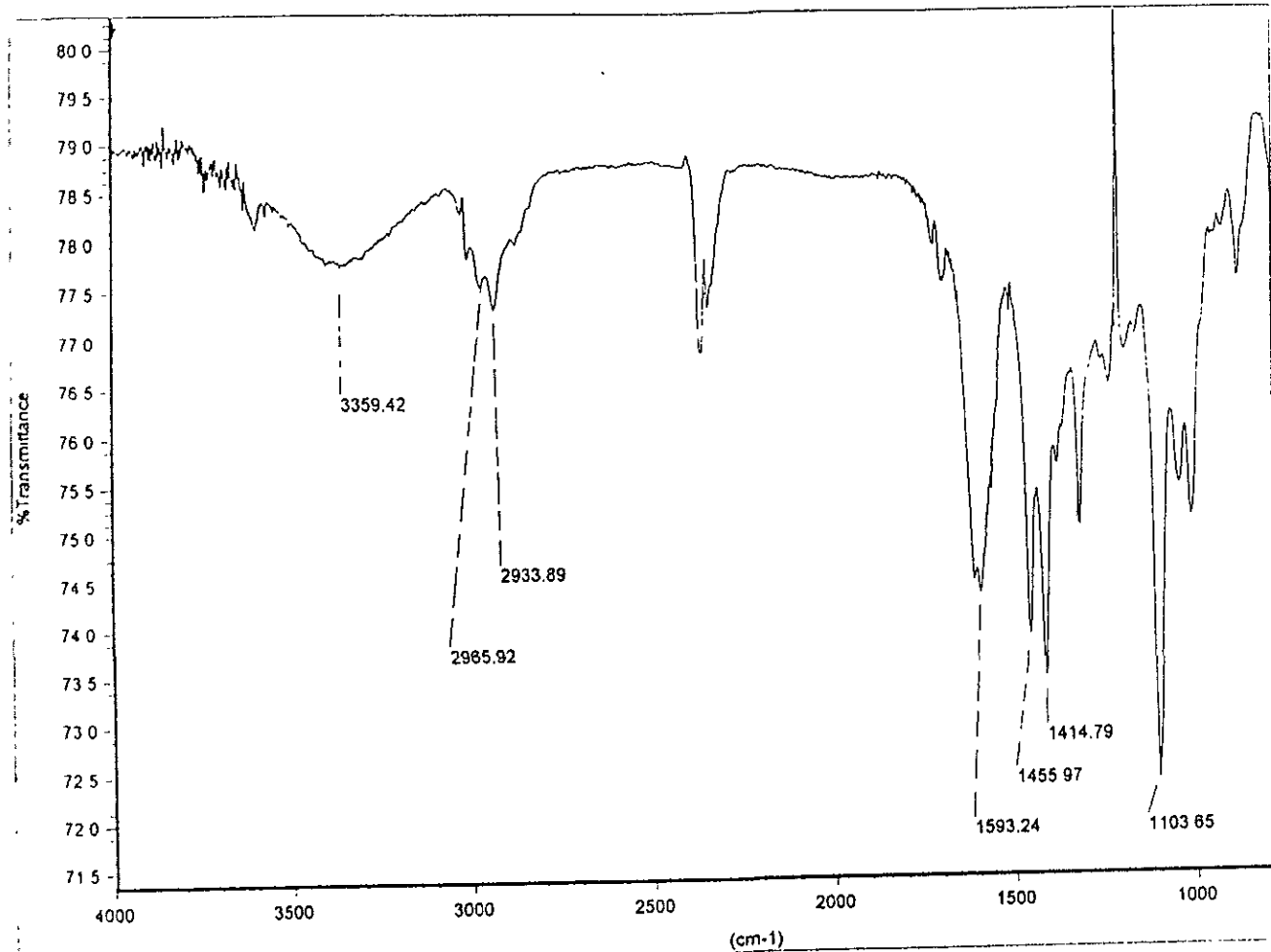
Espectro 48a. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) del diacetato de tagetolona (41a).
48b. Experimento DEPT del diacetato de tagetolona (41a).



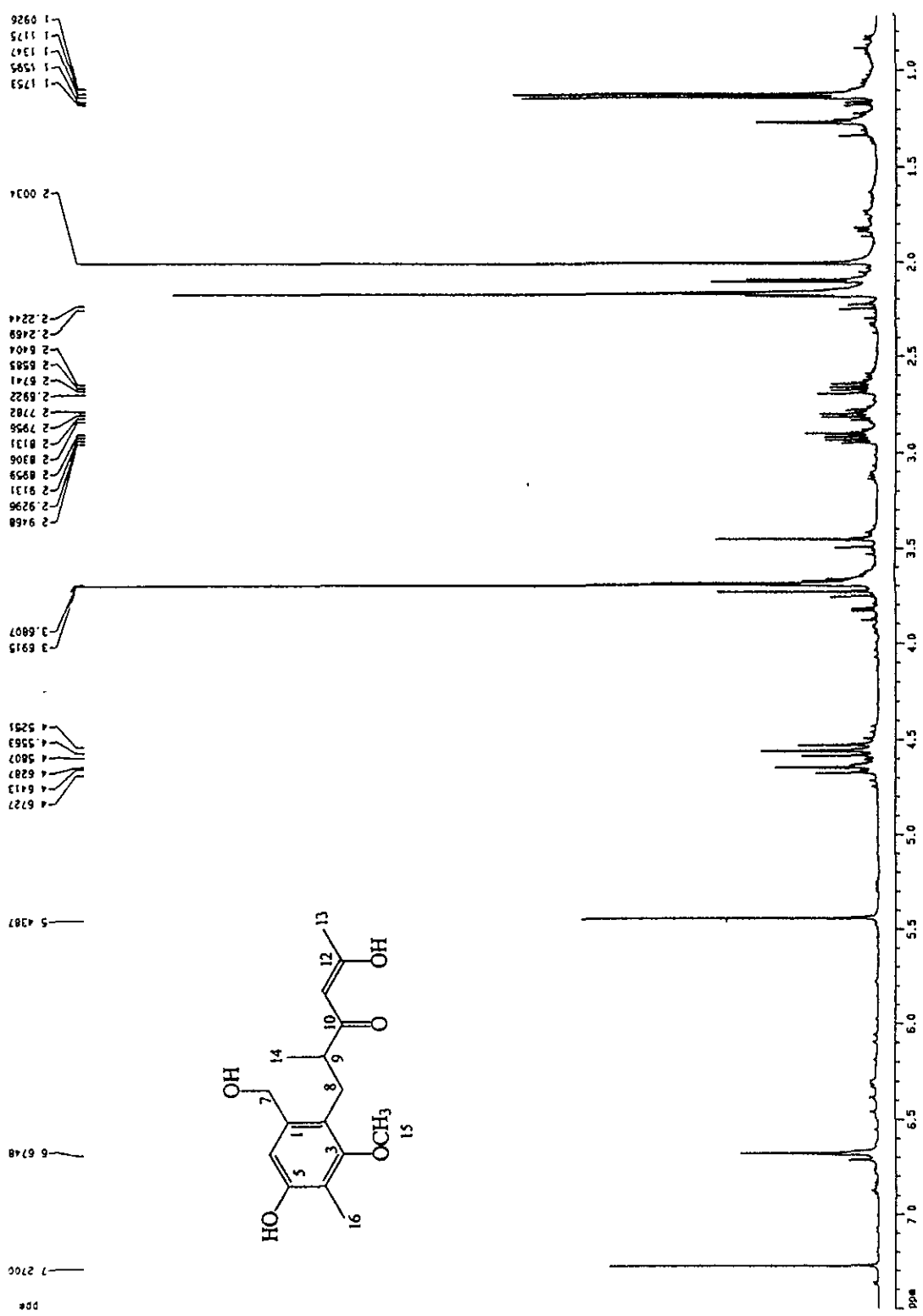
Espectro 49. Experimento HMQC del diacetato de tagetolona (41a).



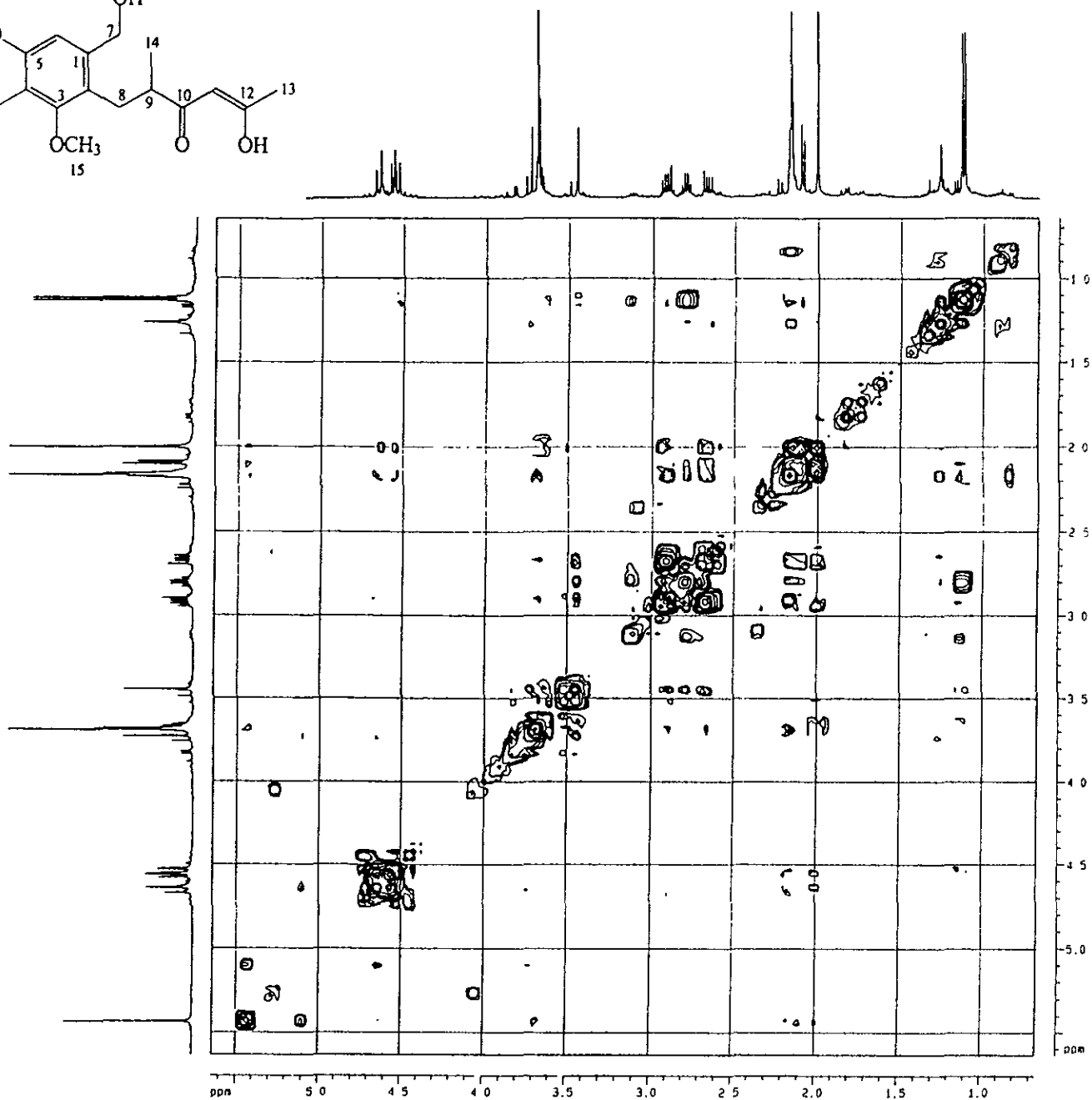
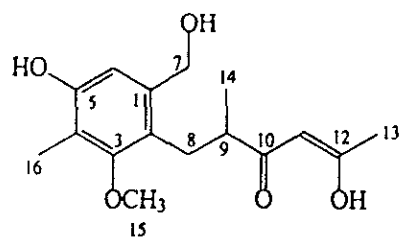
Espectro 50. Experimento HMBC del diacetato de tagetolona (41a).



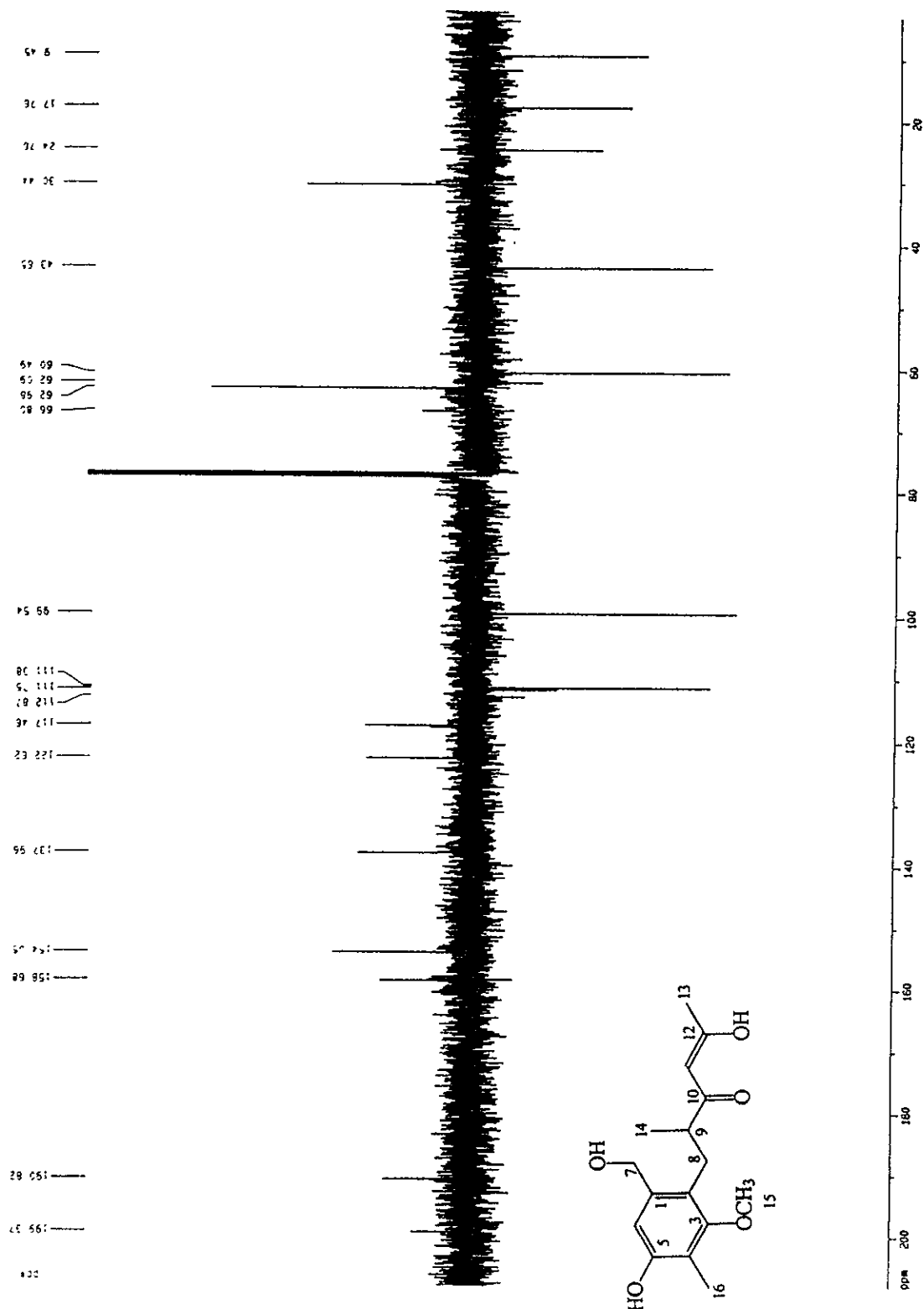
Espectro 51a. IR de tagetoenolona (42), 51b. Espectro de masas de tagetoenolona (42).



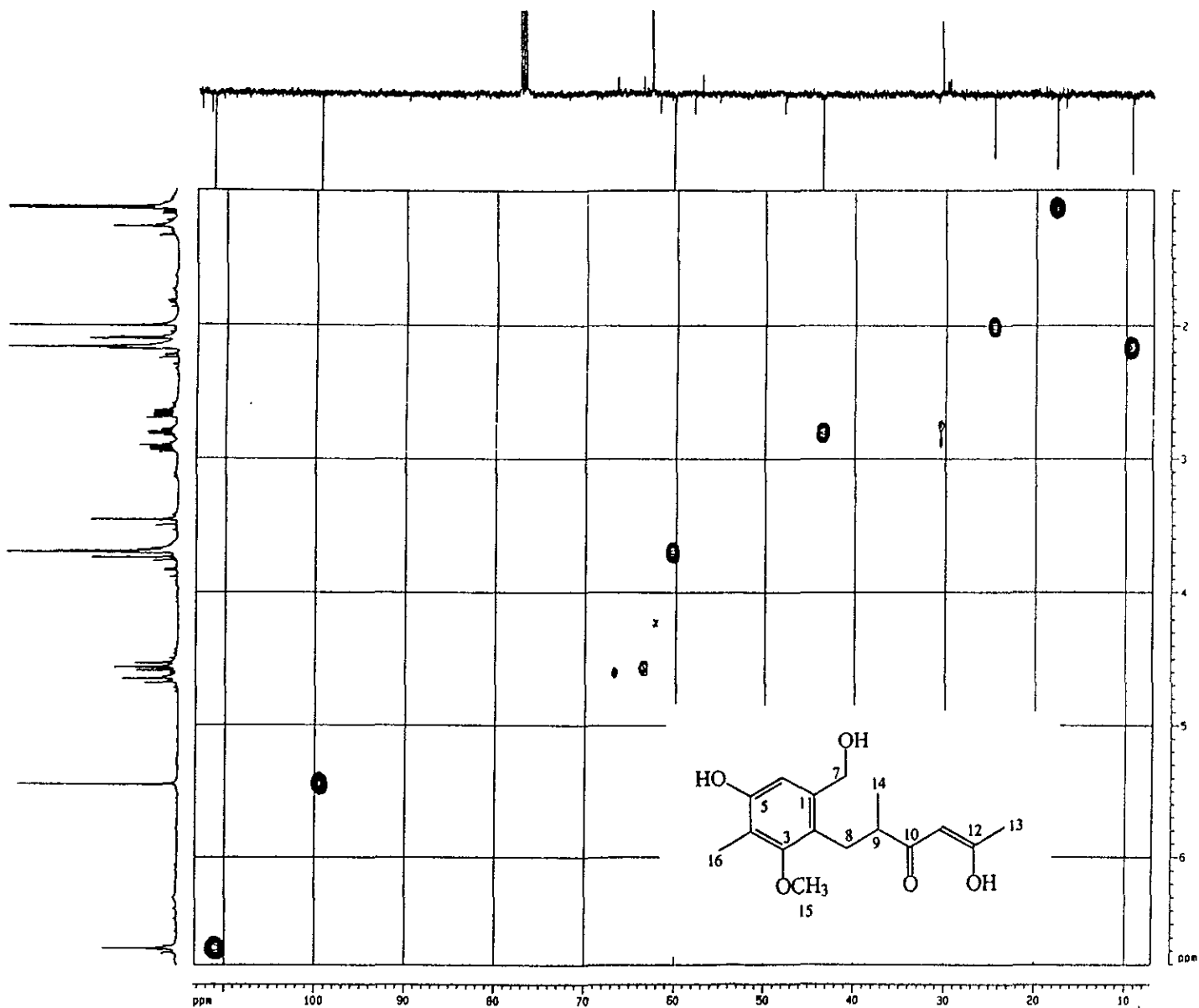
Espectro 52. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de tagetenolona (42)



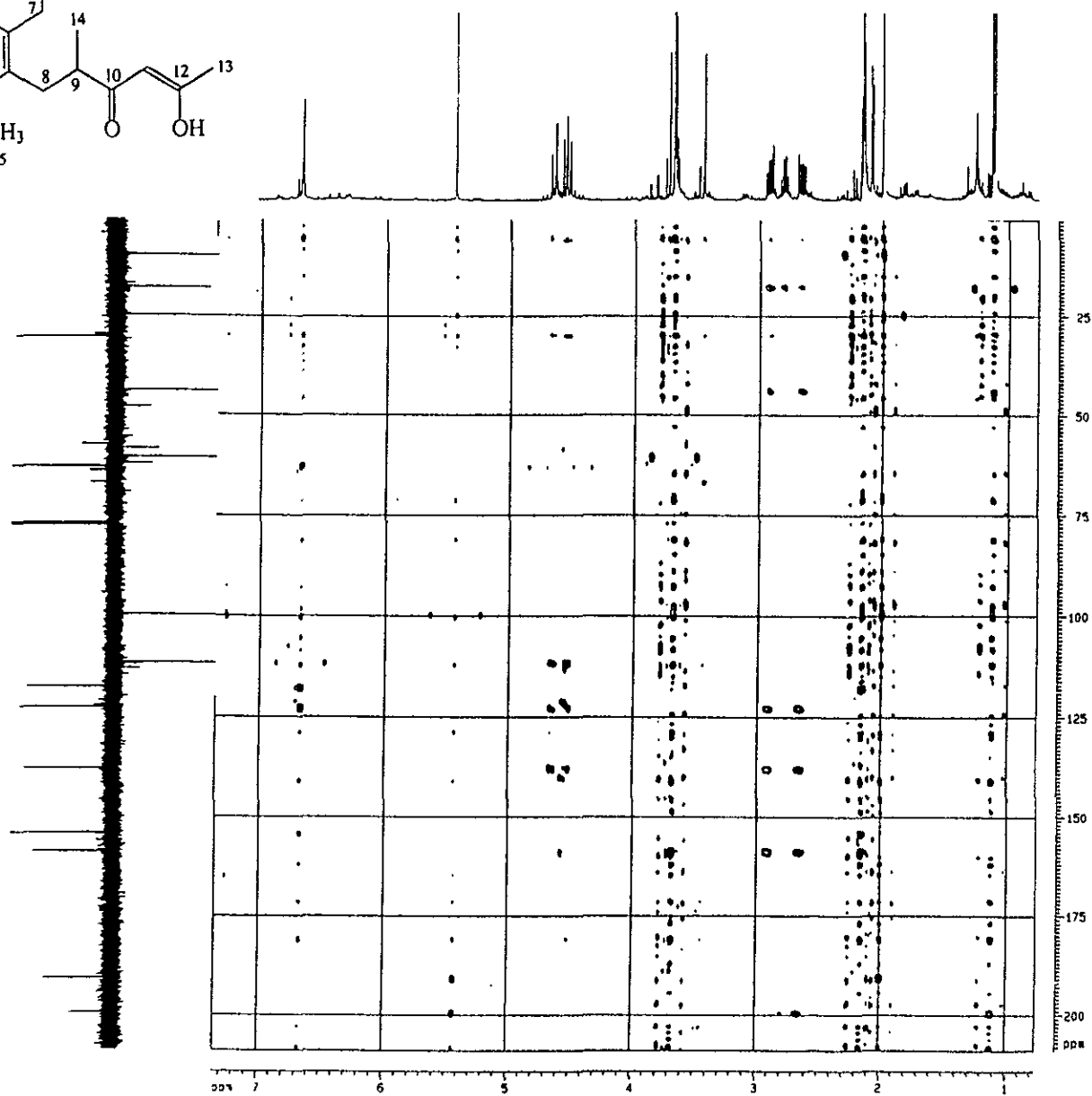
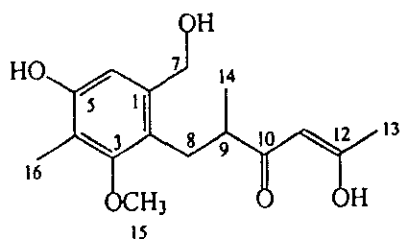
Espectro 53. $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY de tagetenolona (42)



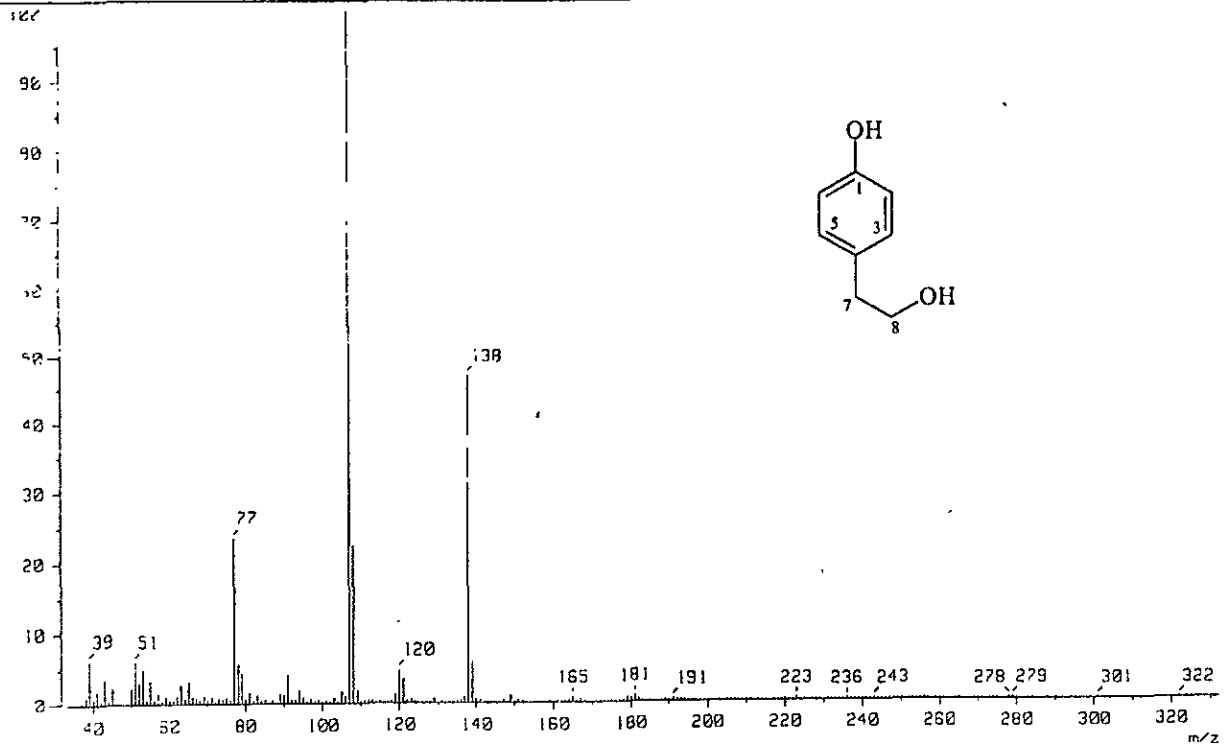
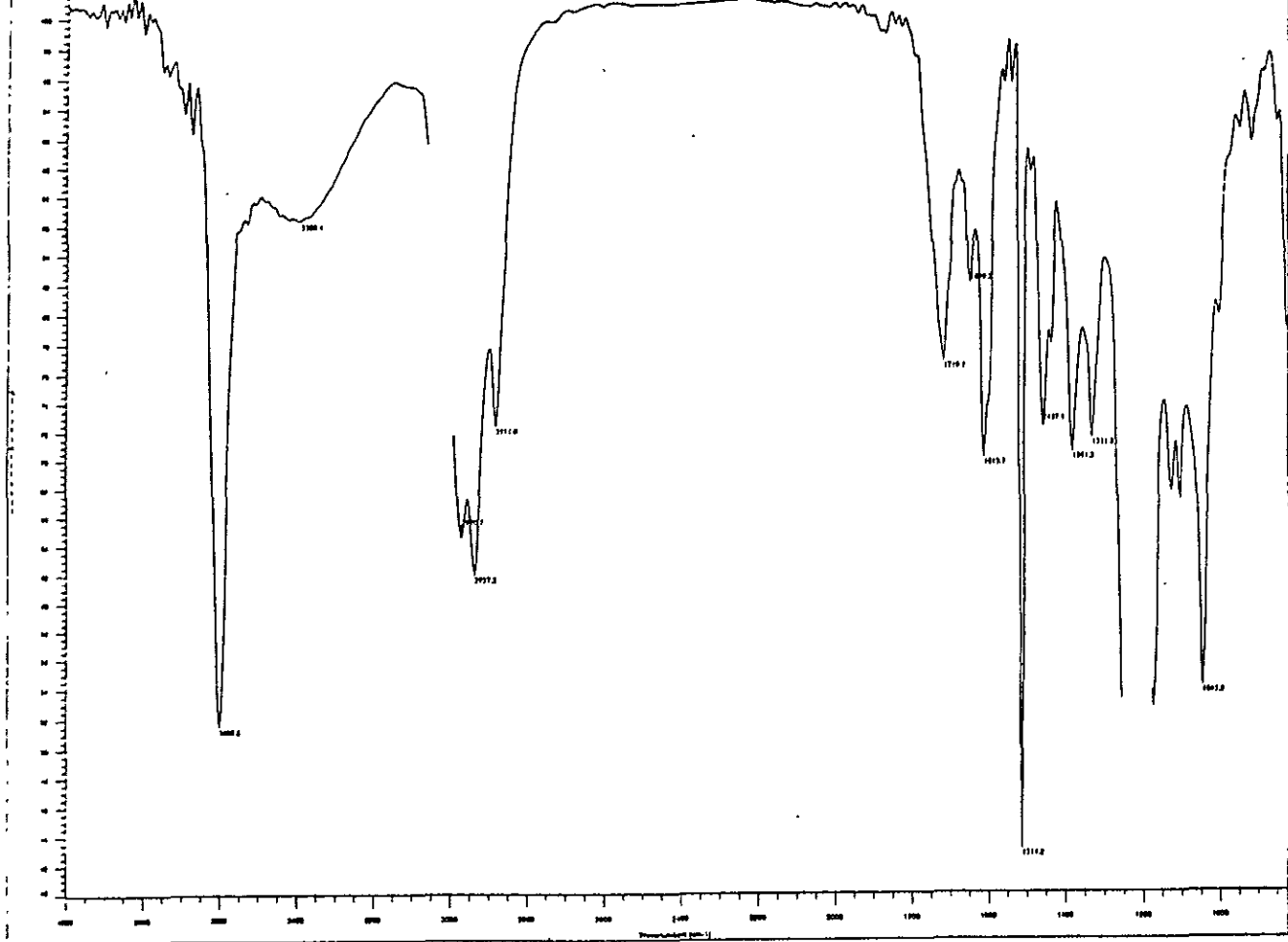
Espectro 54. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) y experimento APT de tagetenolona (42)



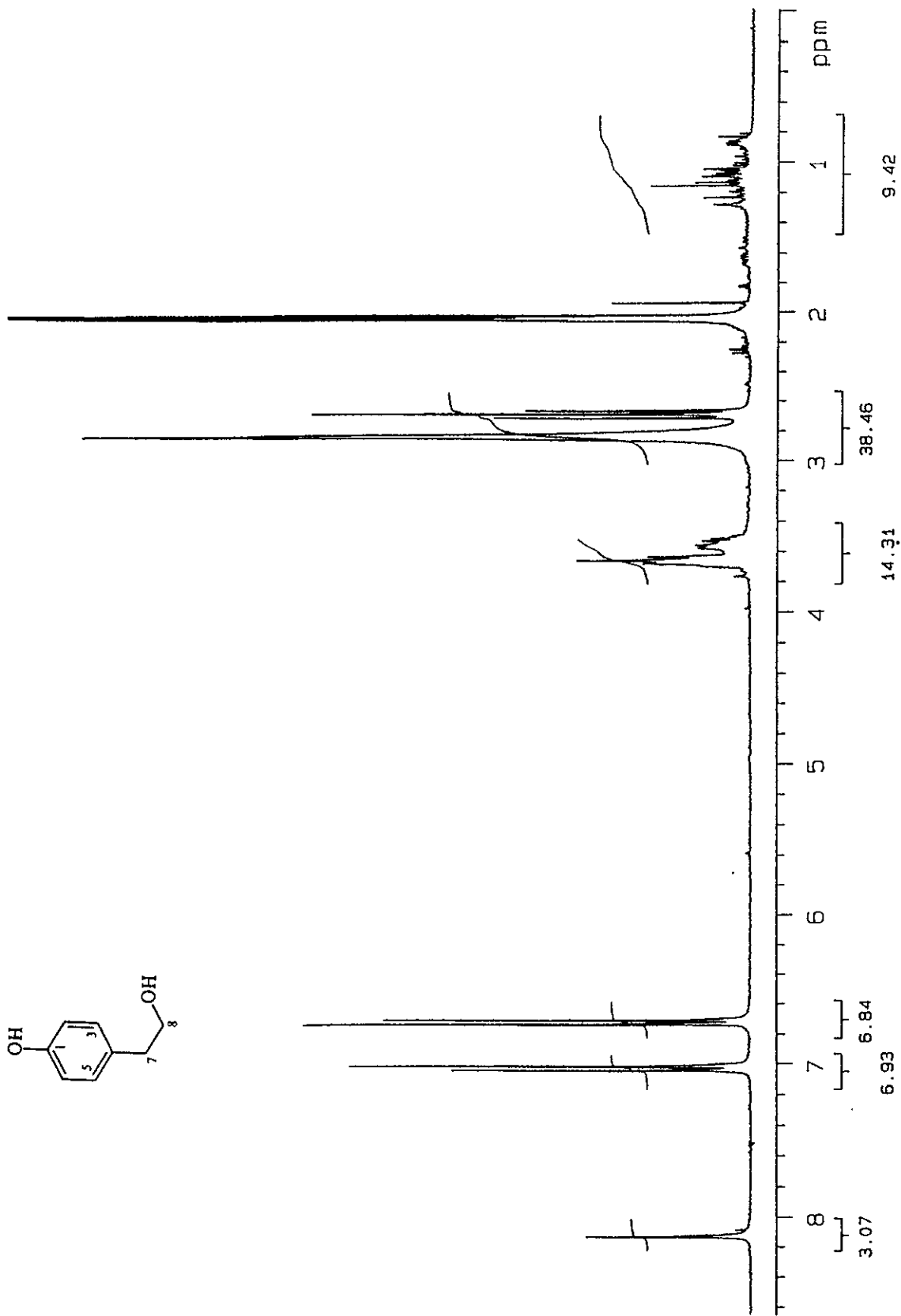
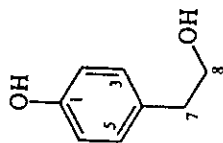
Espectro 55. Experimento HMQC de tagetenolona (42)



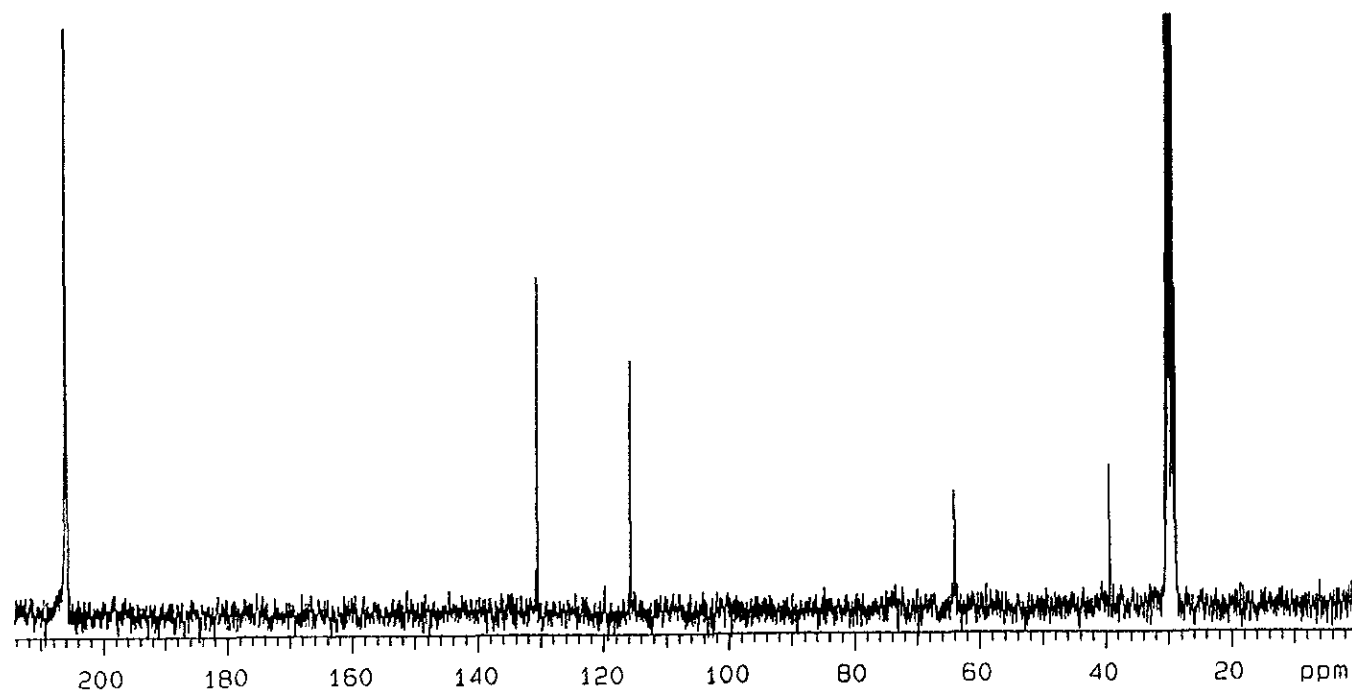
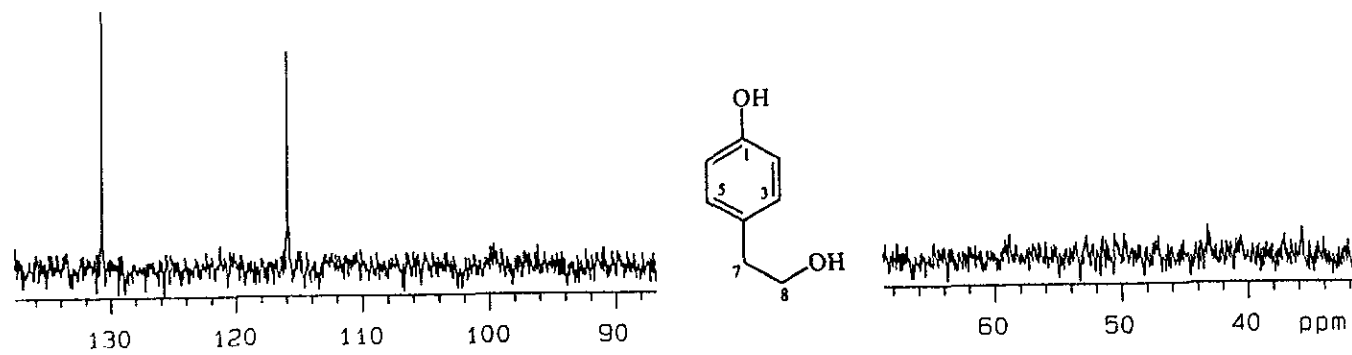
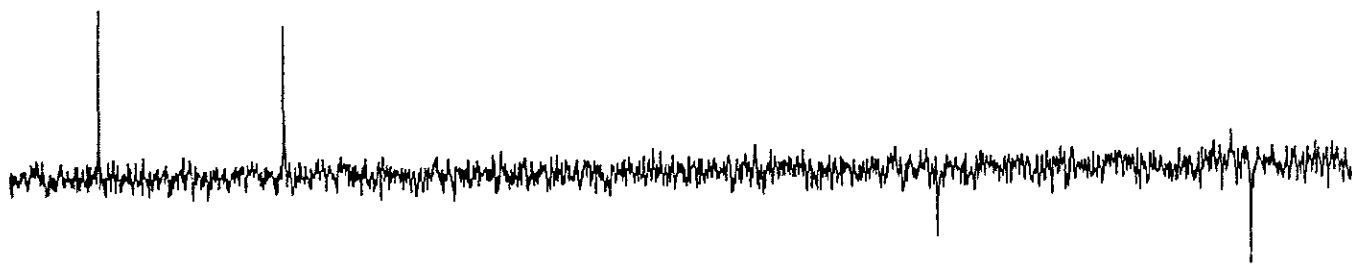
Espetro 56. Experimento HMBC de tagetenolona (42)



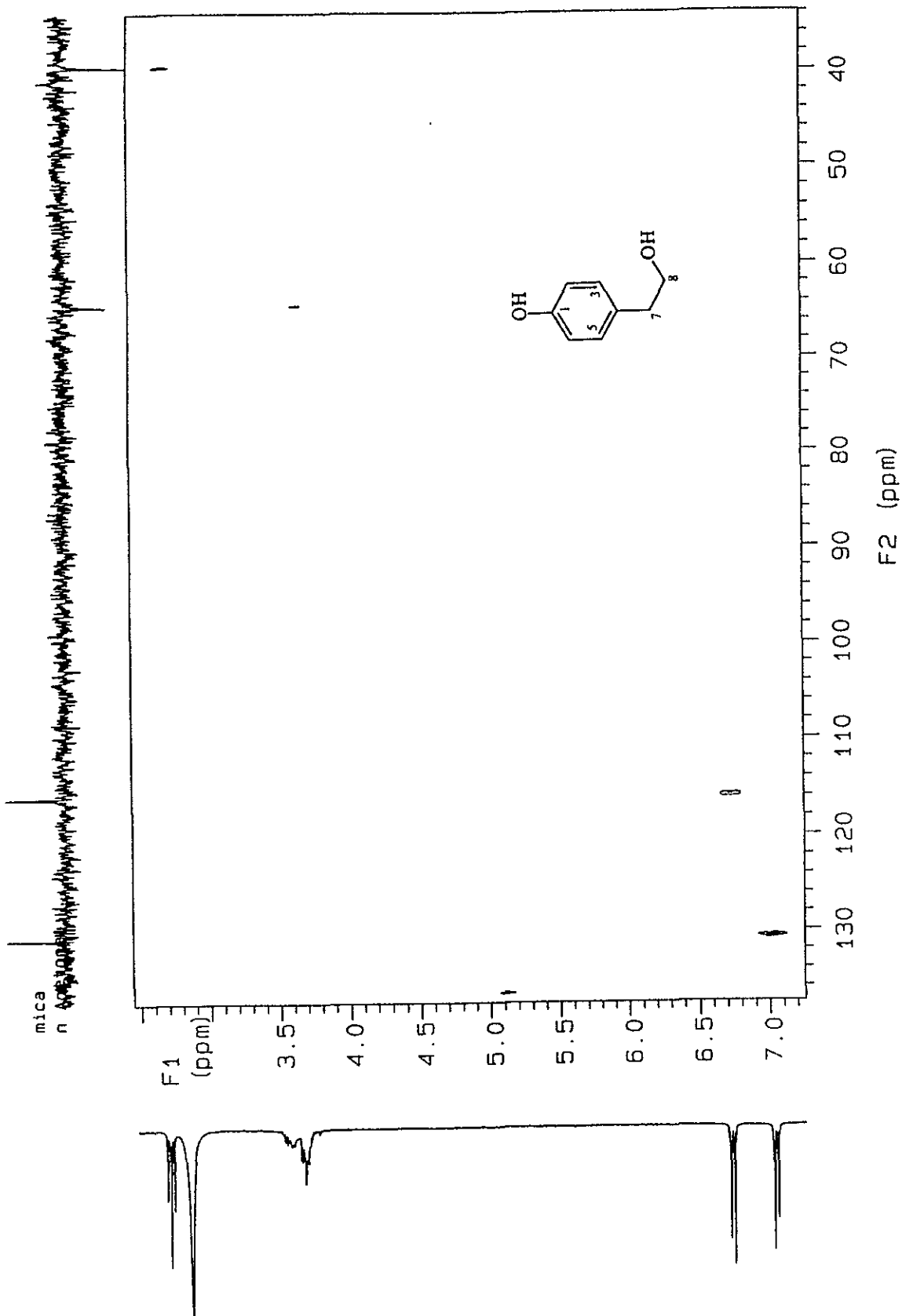
Espectro 57a. IR de tyrosol (43), 57b. Espectro de masas de tyrosol (43).



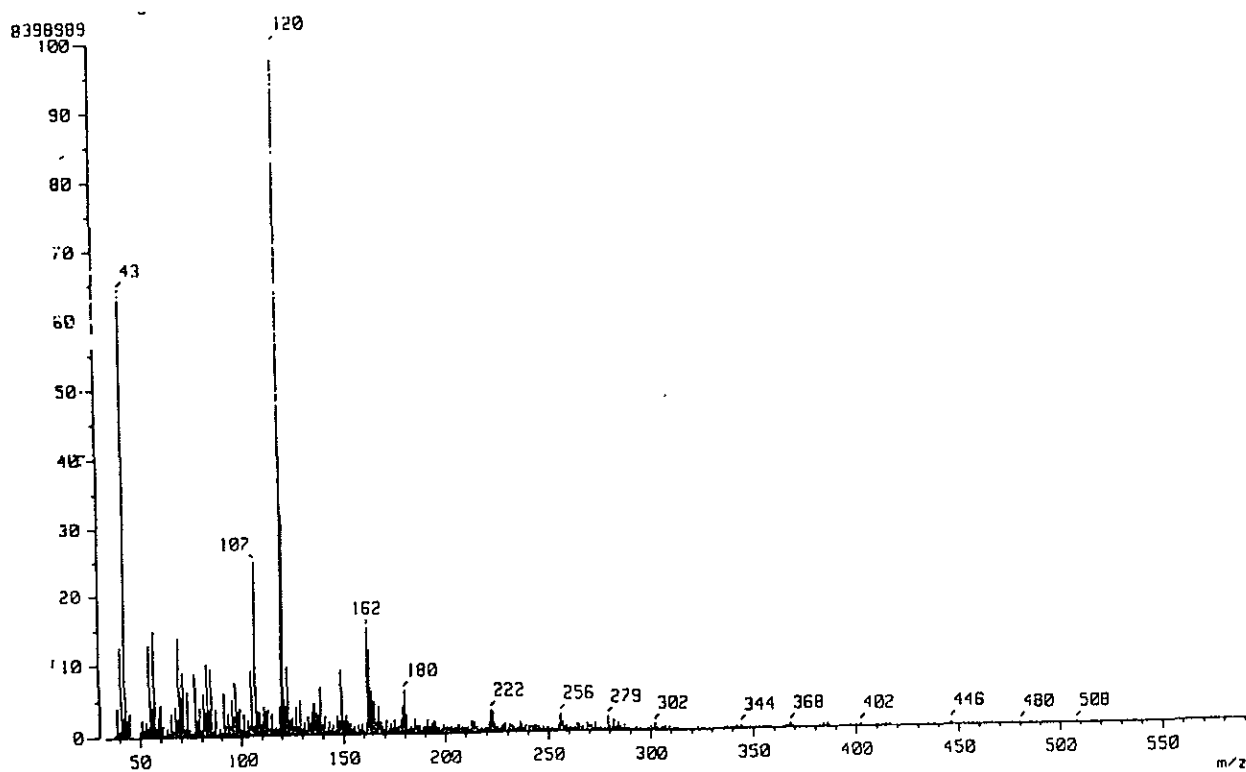
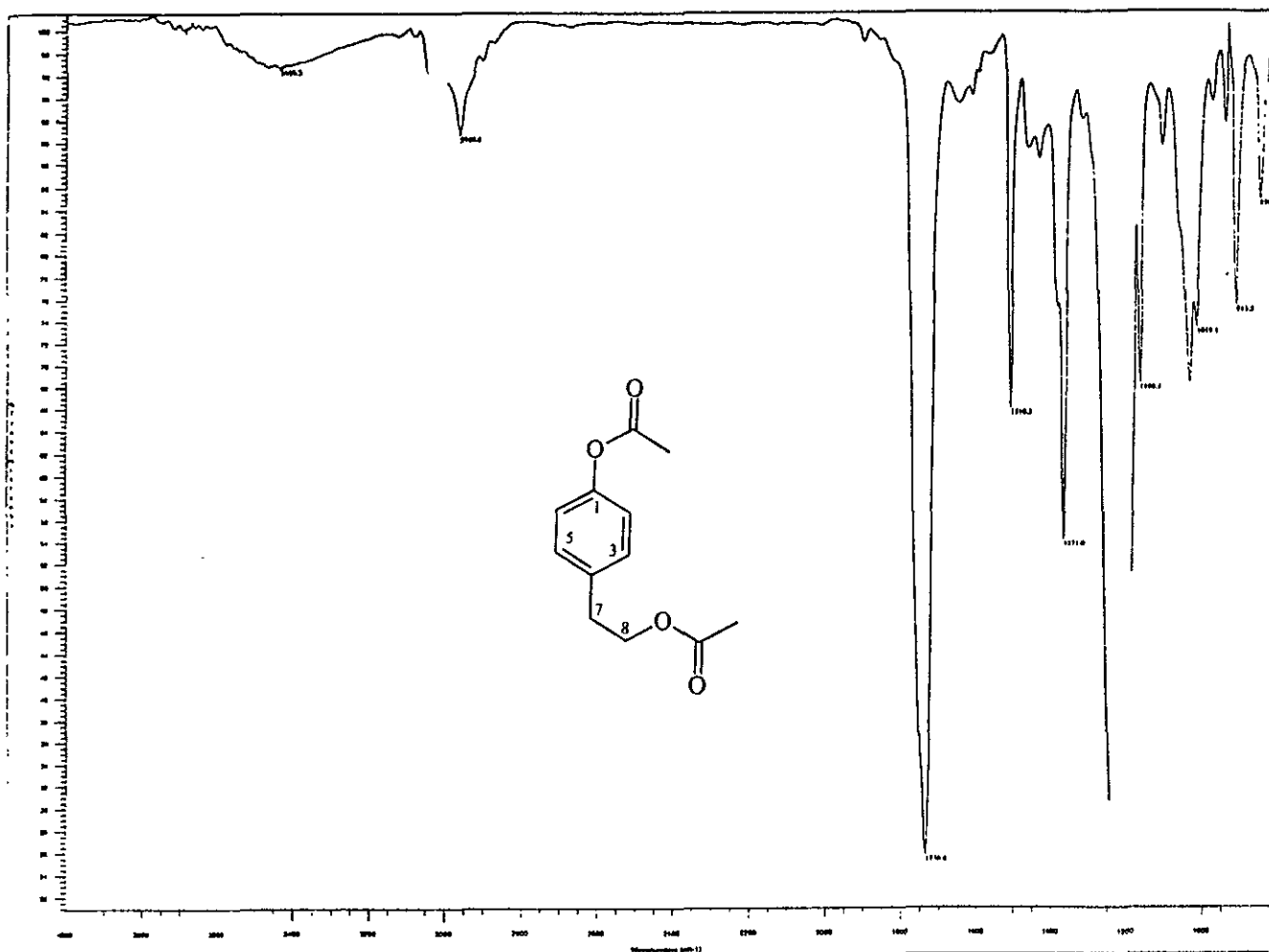
Espectro 58. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de tyrosol (43).



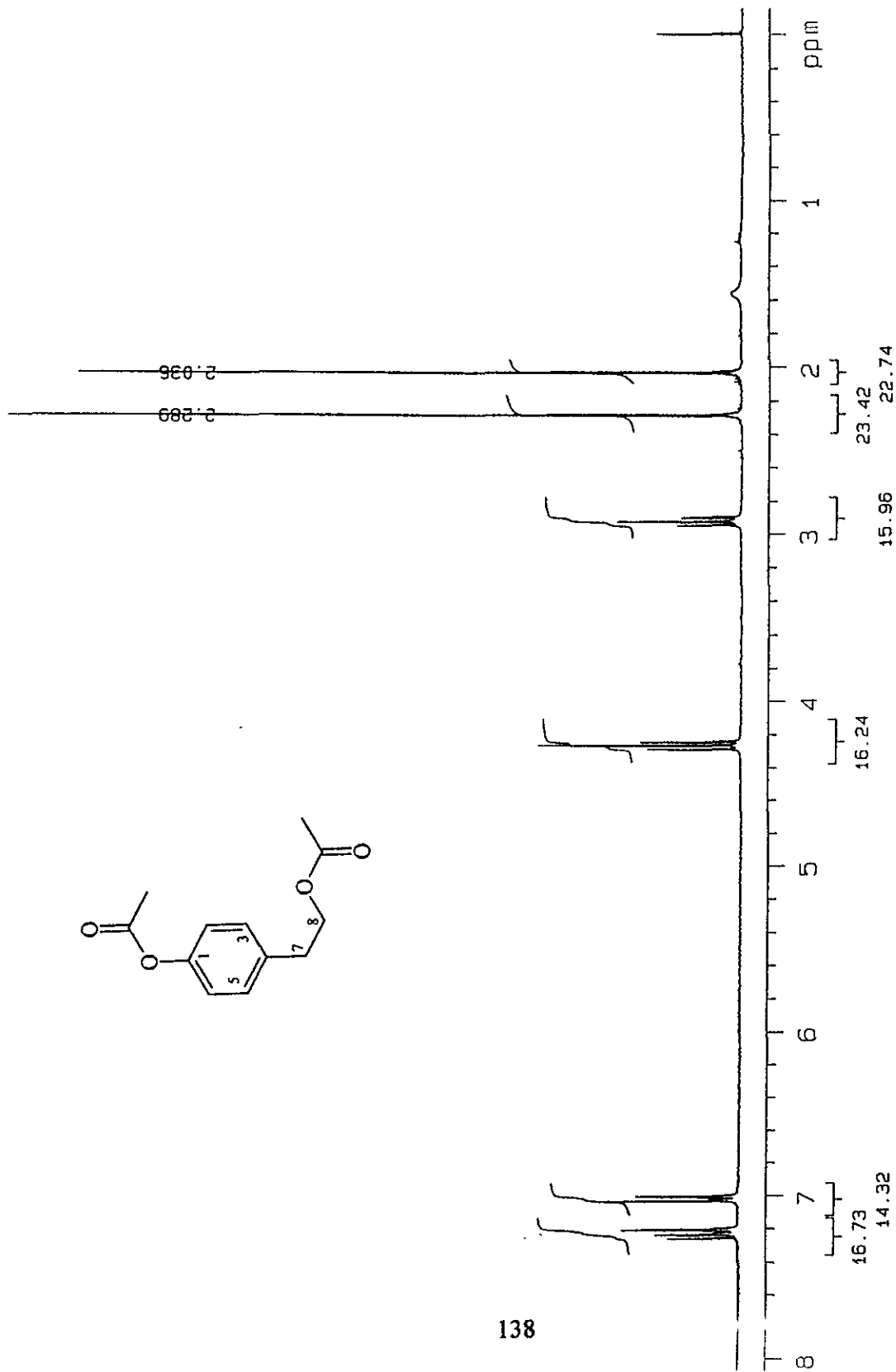
Espectro 59a. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de tyrosol (43), **59b.** Experimento DEPT de tyrosol (43).



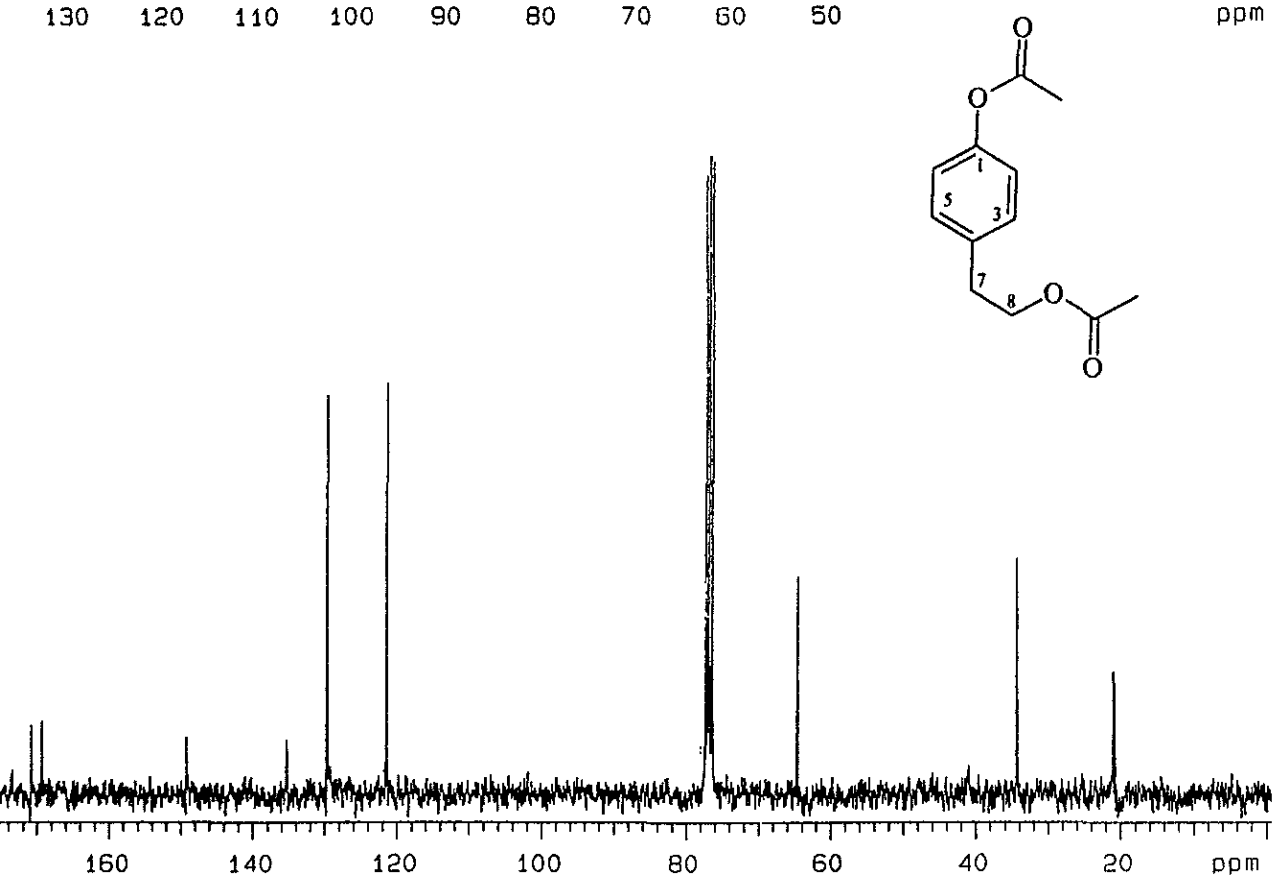
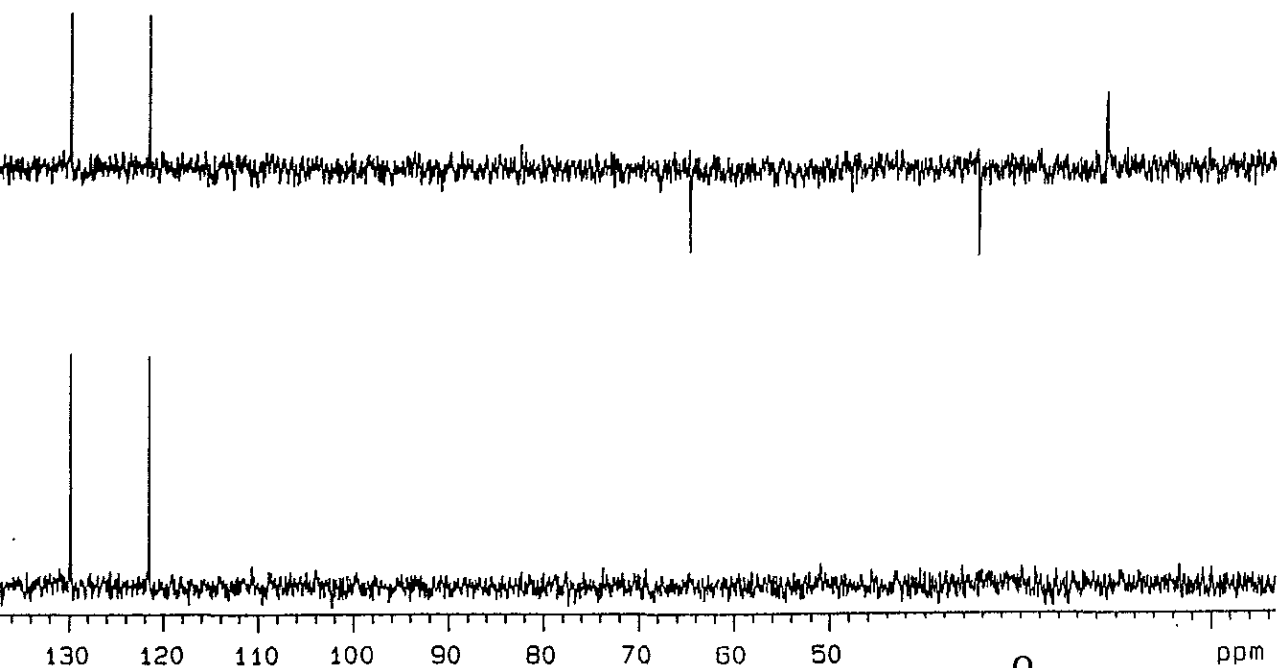
Espectro 60. Experimento HMQC de tyrosol (43).



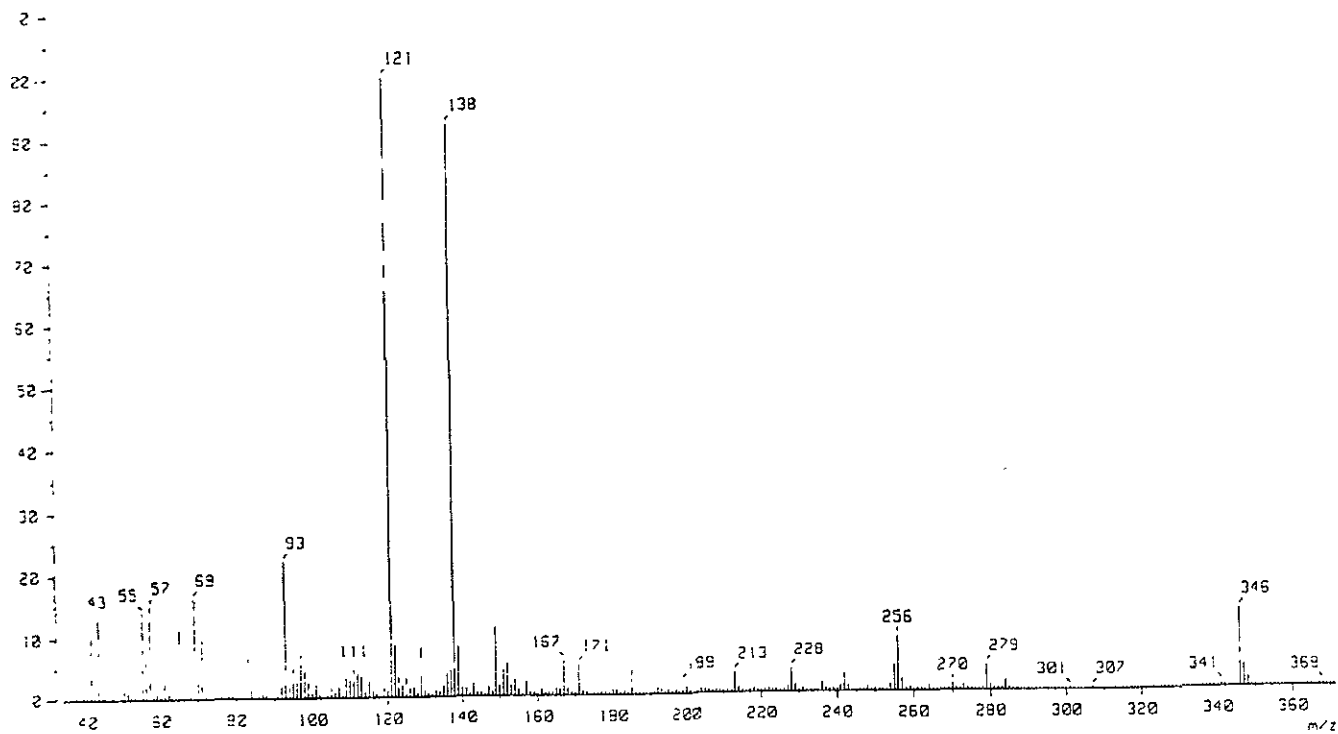
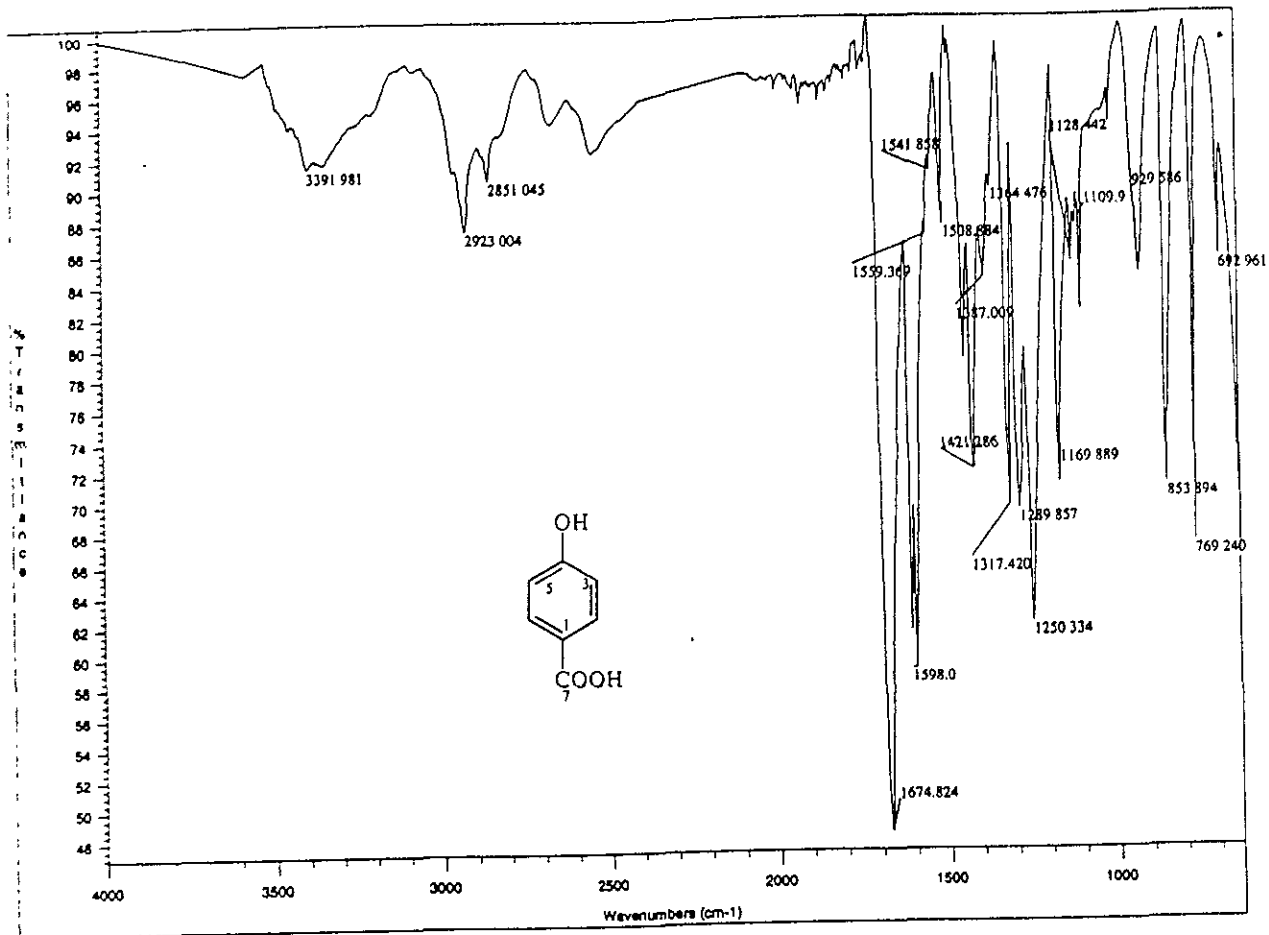
Espectro 61a. IR del diacetato de tyrosol (43a), 61b. Espectro de masas del diacetato de tyrosol (43a).
137



Espectro 62. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del diacetato de tyrosol (43a).

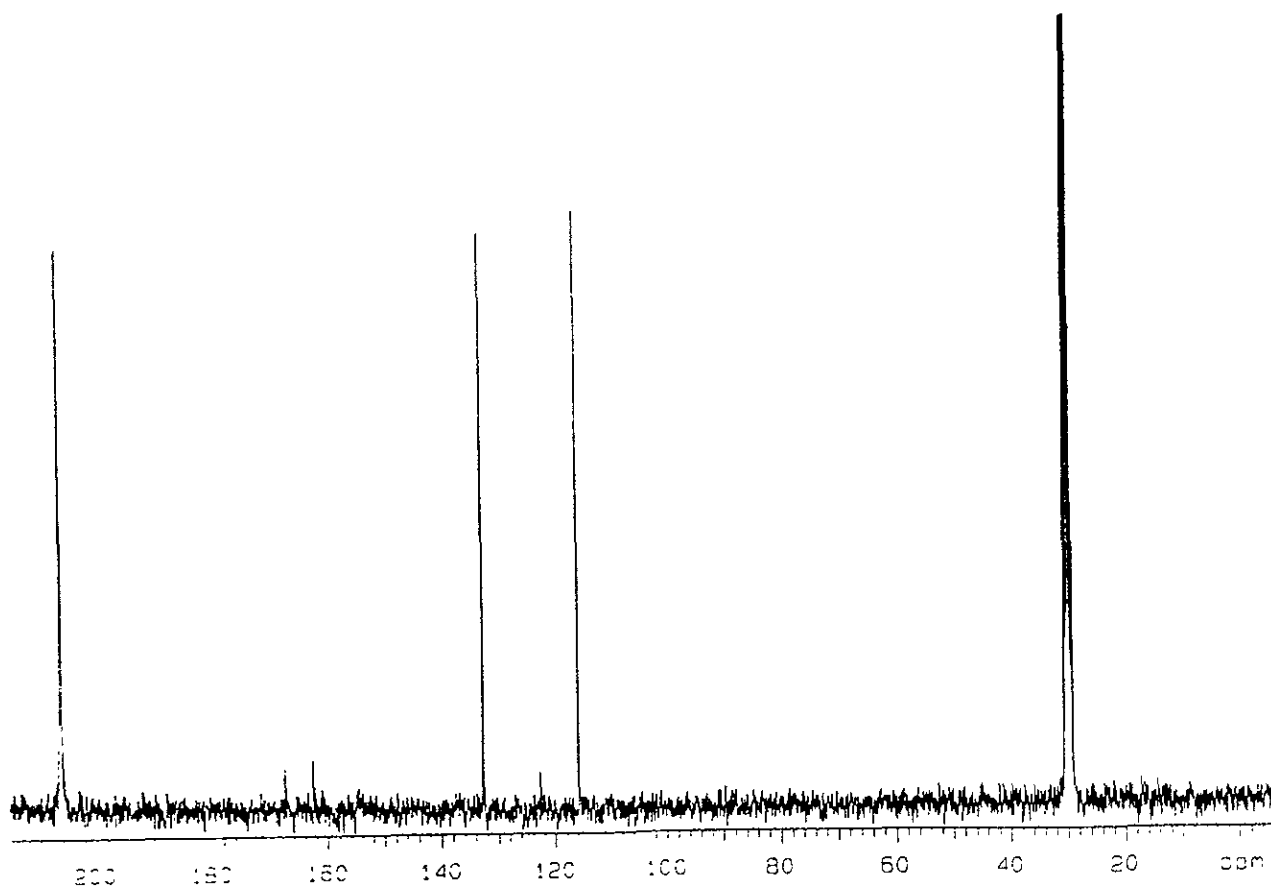
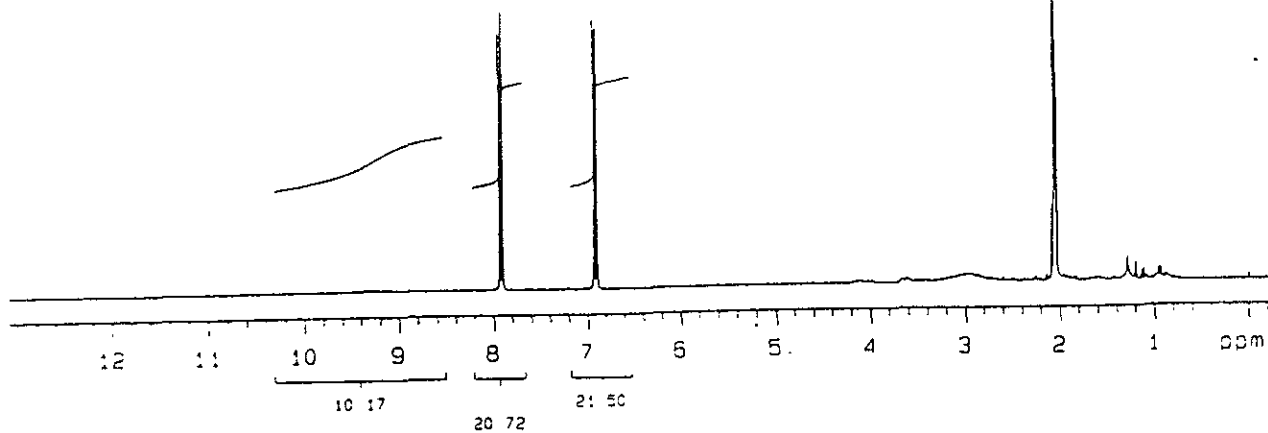
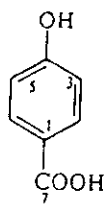


Espetro 63a. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) del diacetato de tyrosol (43a).
63b. Experimento DEPT del diacetato de tyrosol (43a).

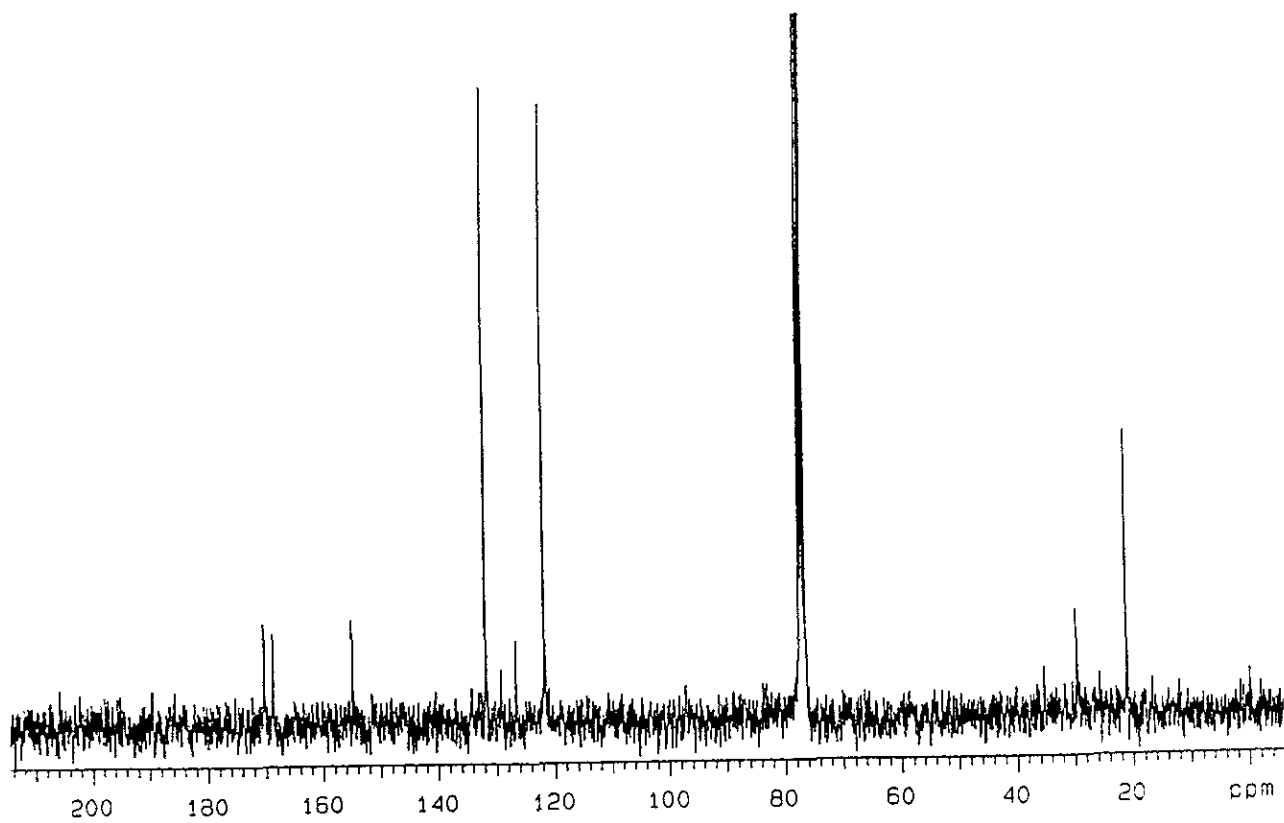
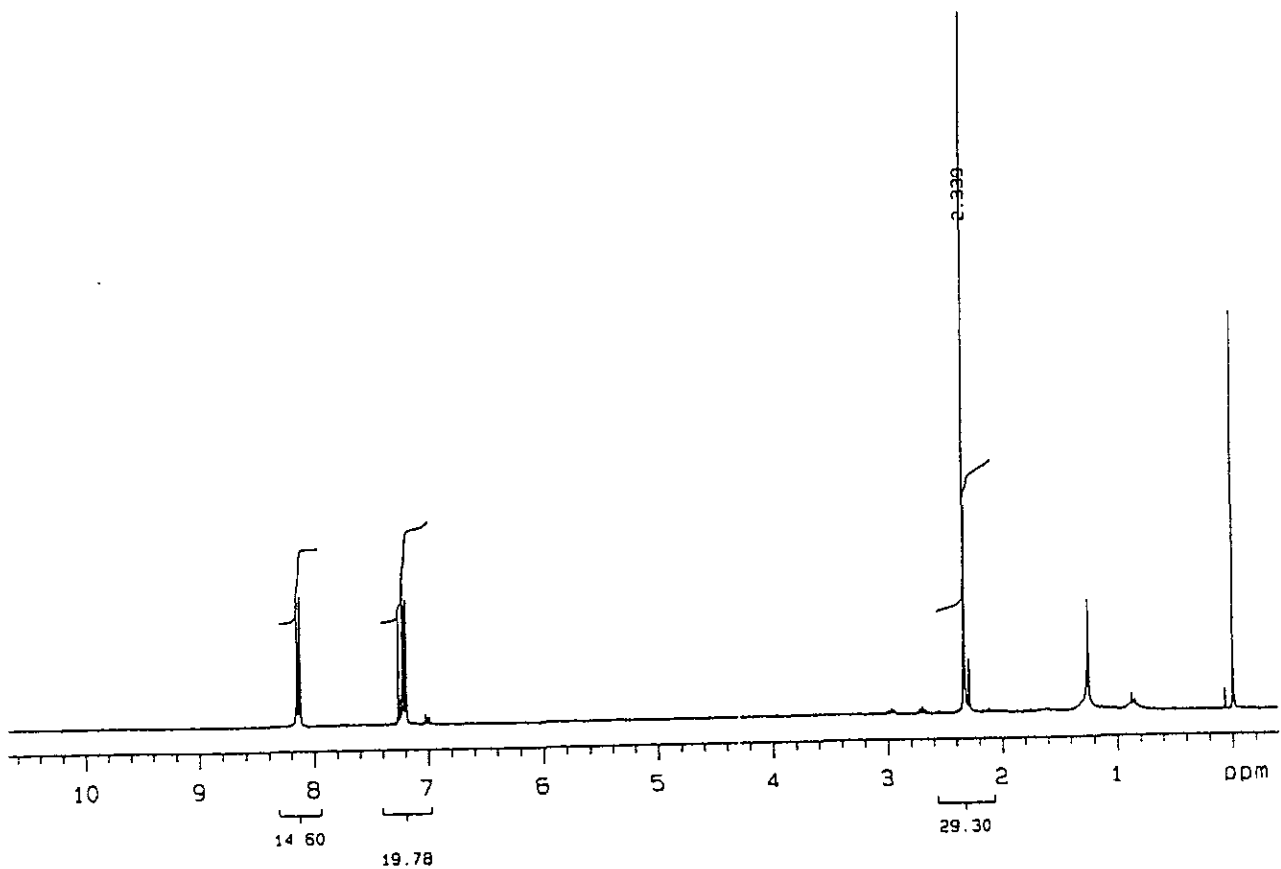


Espectro 64a. IR del ácido *p*-hidroxibenzoico (17).

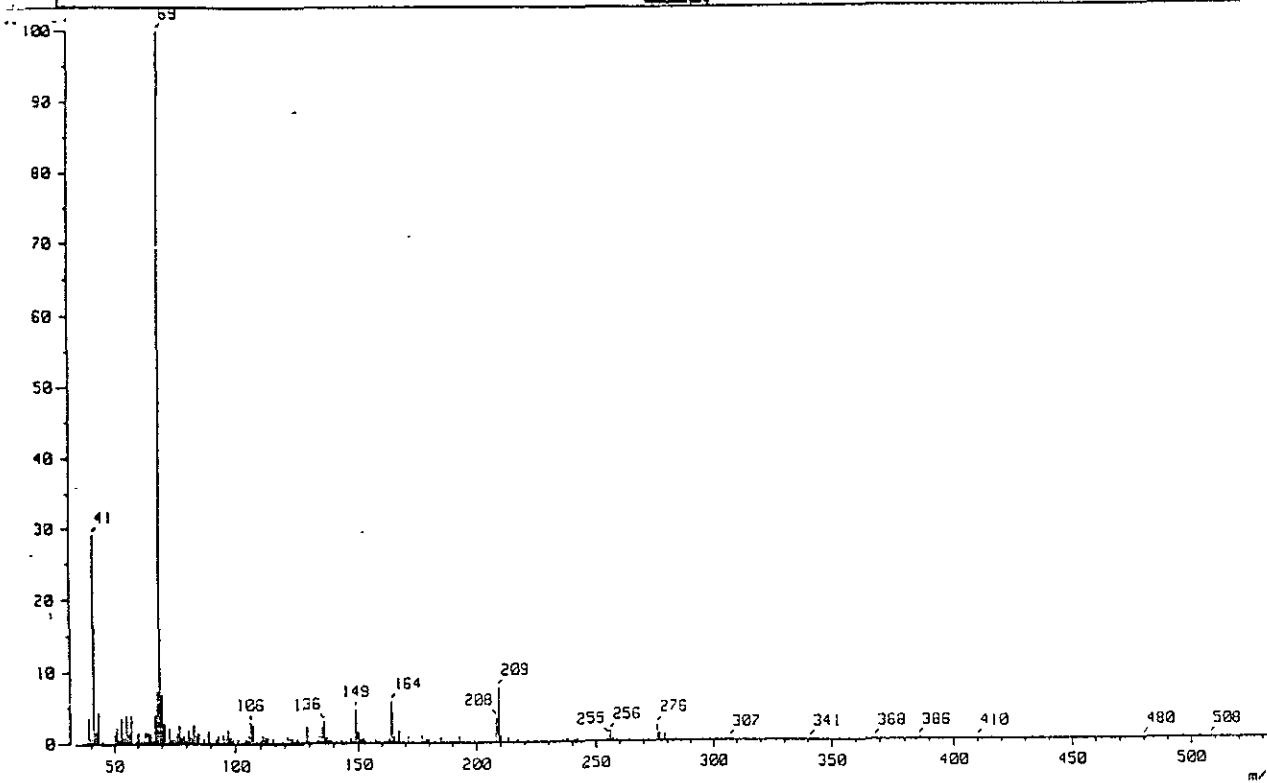
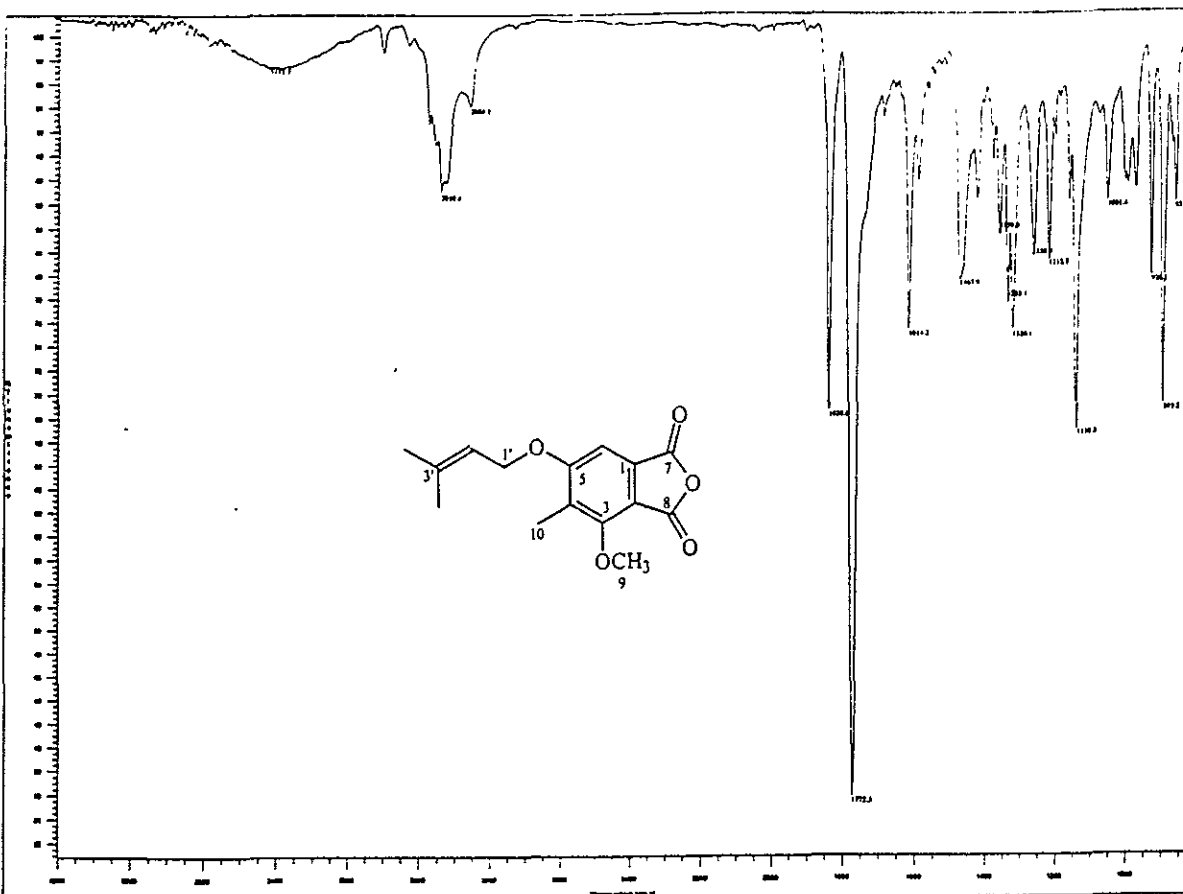
64b. Espectro de masas del ácido *p*-hidroxibenzoico (17).



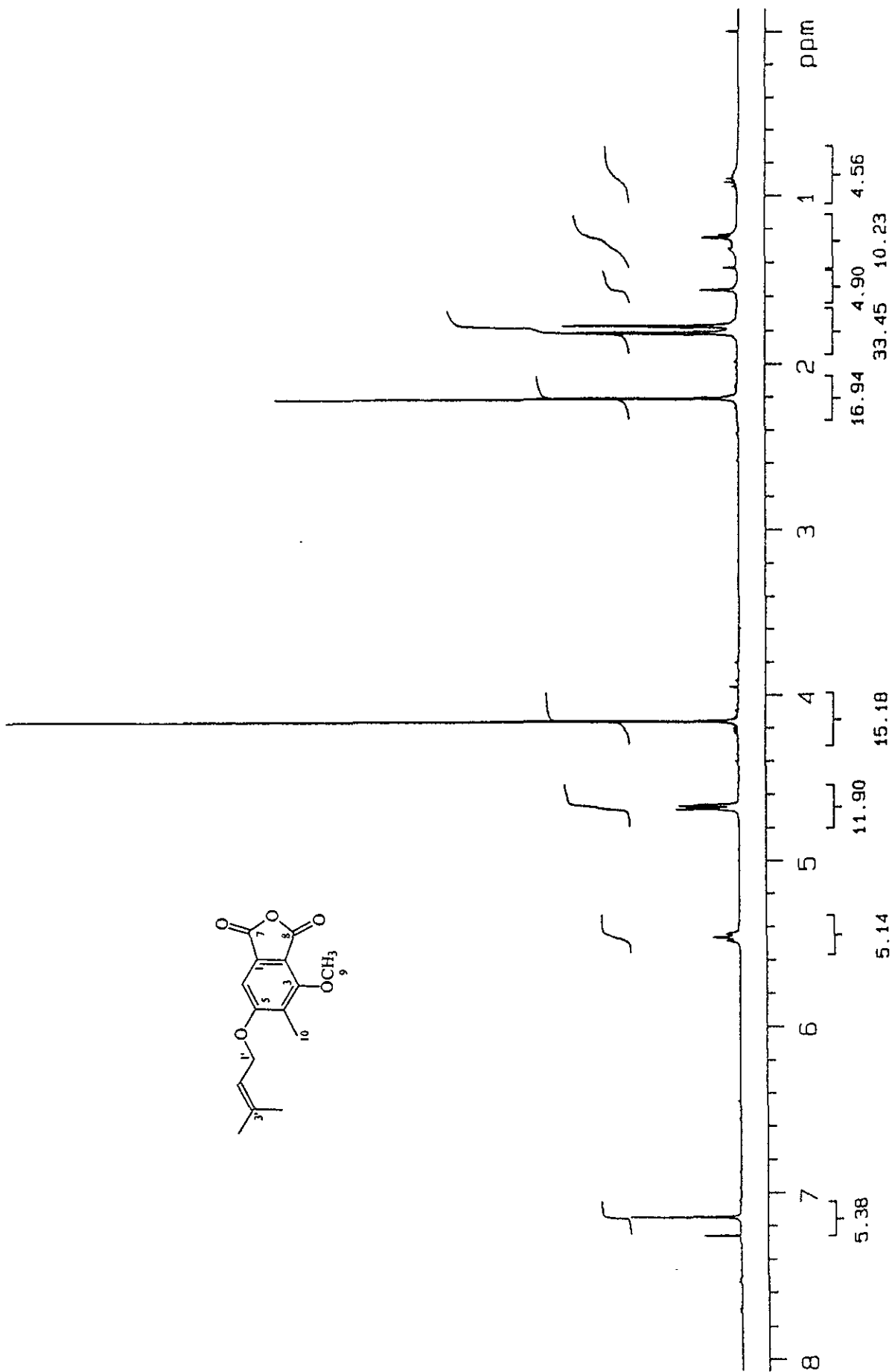
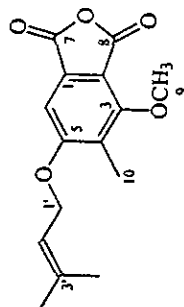
Espectro 65a. RMN ^1H (CDCl₃, 300 MHz) del ácido *p*-hidroxibenzoico (17).
65b. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz) del ácido *p*-hidroxibenzoico (17)



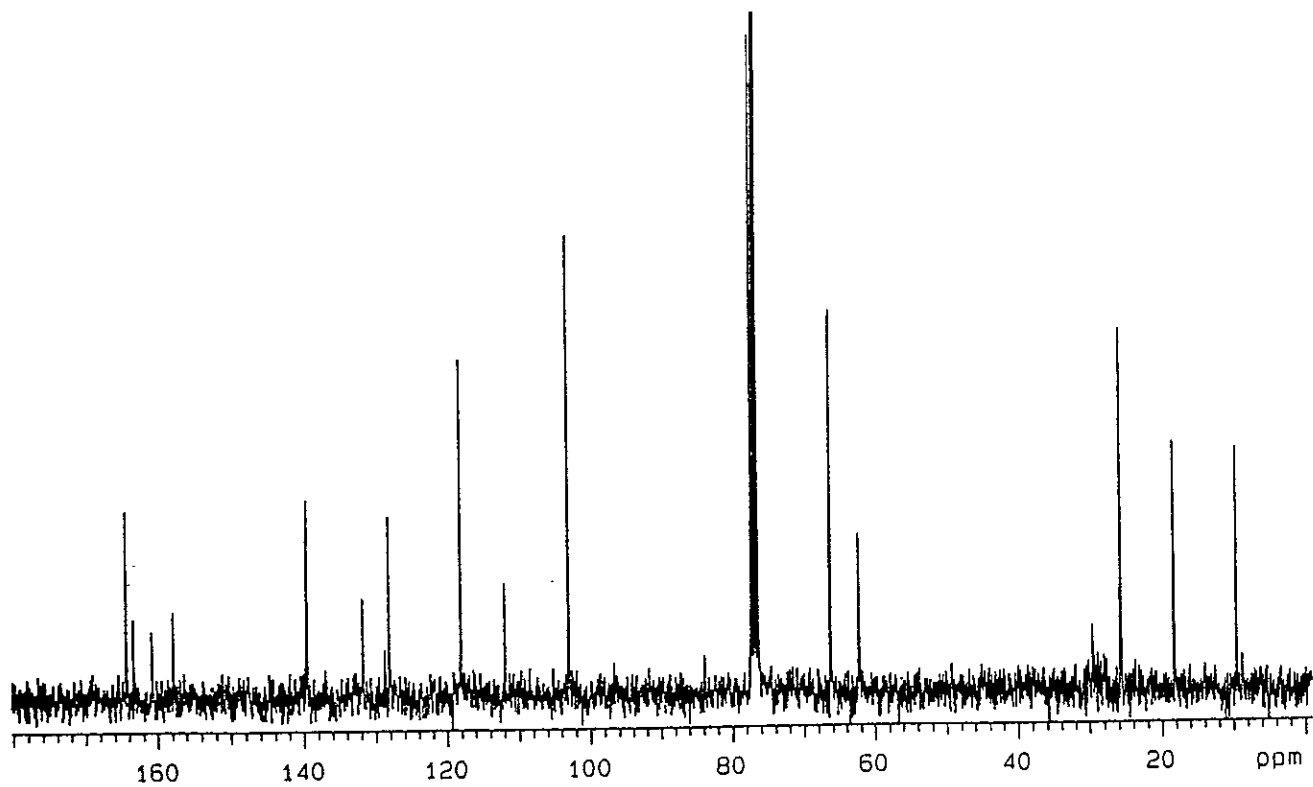
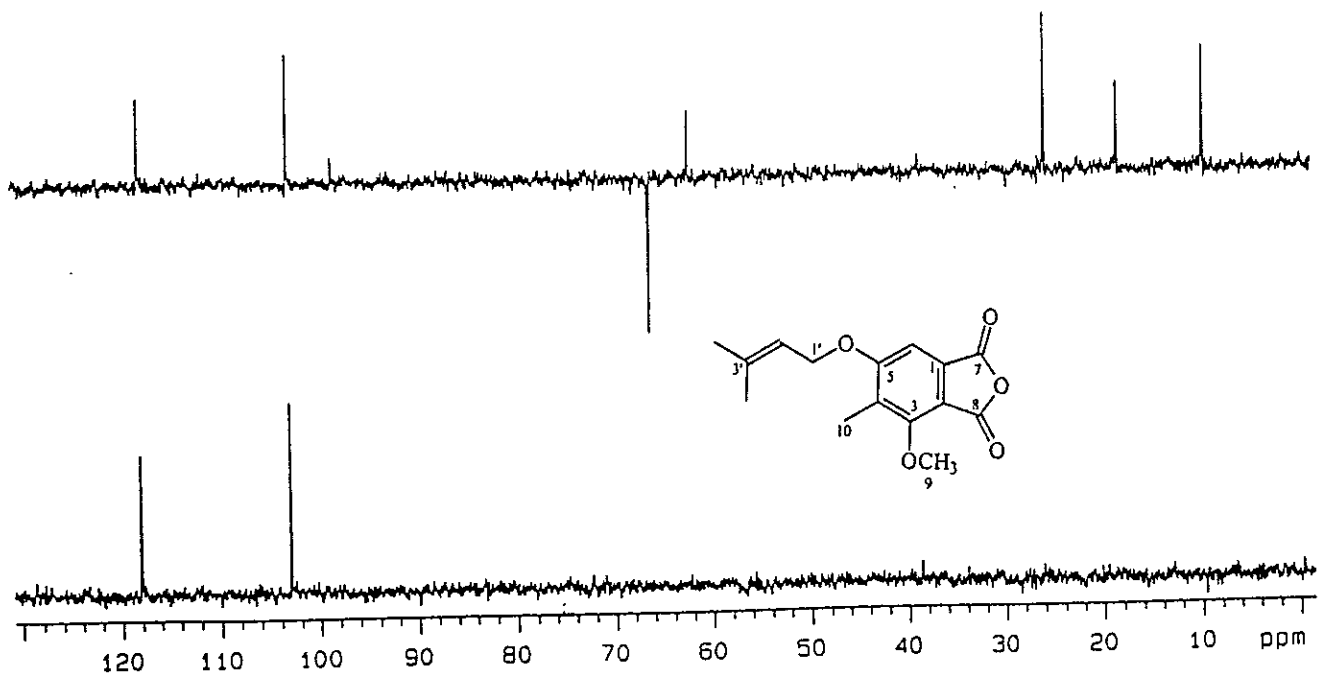
Espectro 66a. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) del acetato del ácido *p*-hidroxibenzoico (17a)
 66b. Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) del acetato del ácido *p*-hidroxibenzoico (17a)



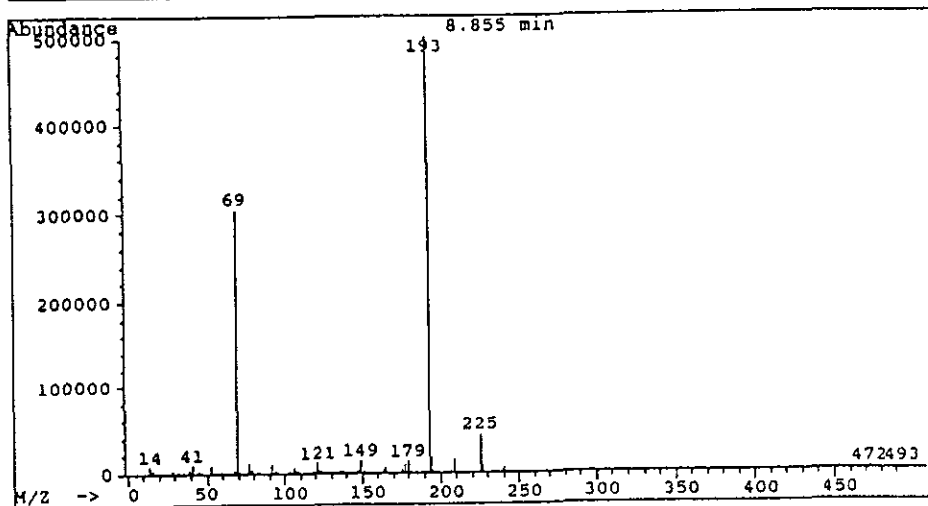
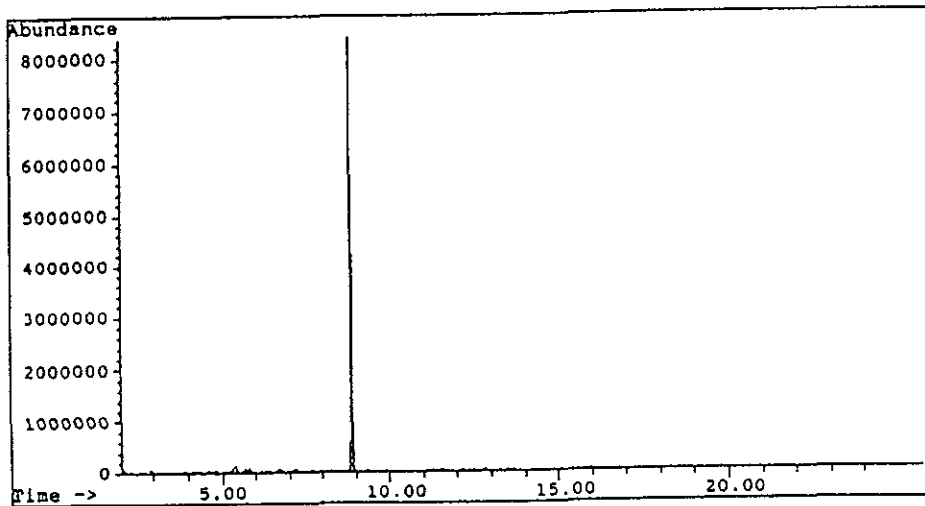
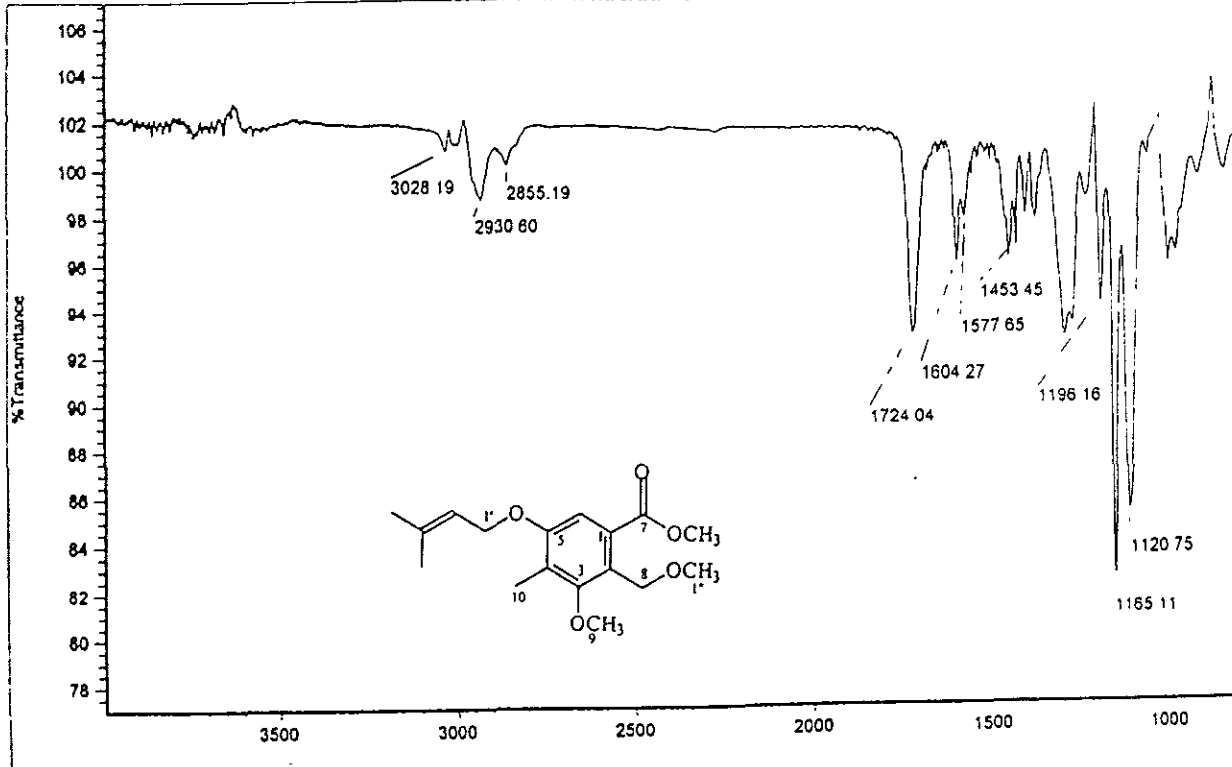
Espectro 67a. IR del anhídrido de zinniol (44), 67b. Espectro de masas del anhídrido de zinniol (44).



Espectro 68. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) del anhídrido de zinniol (44).

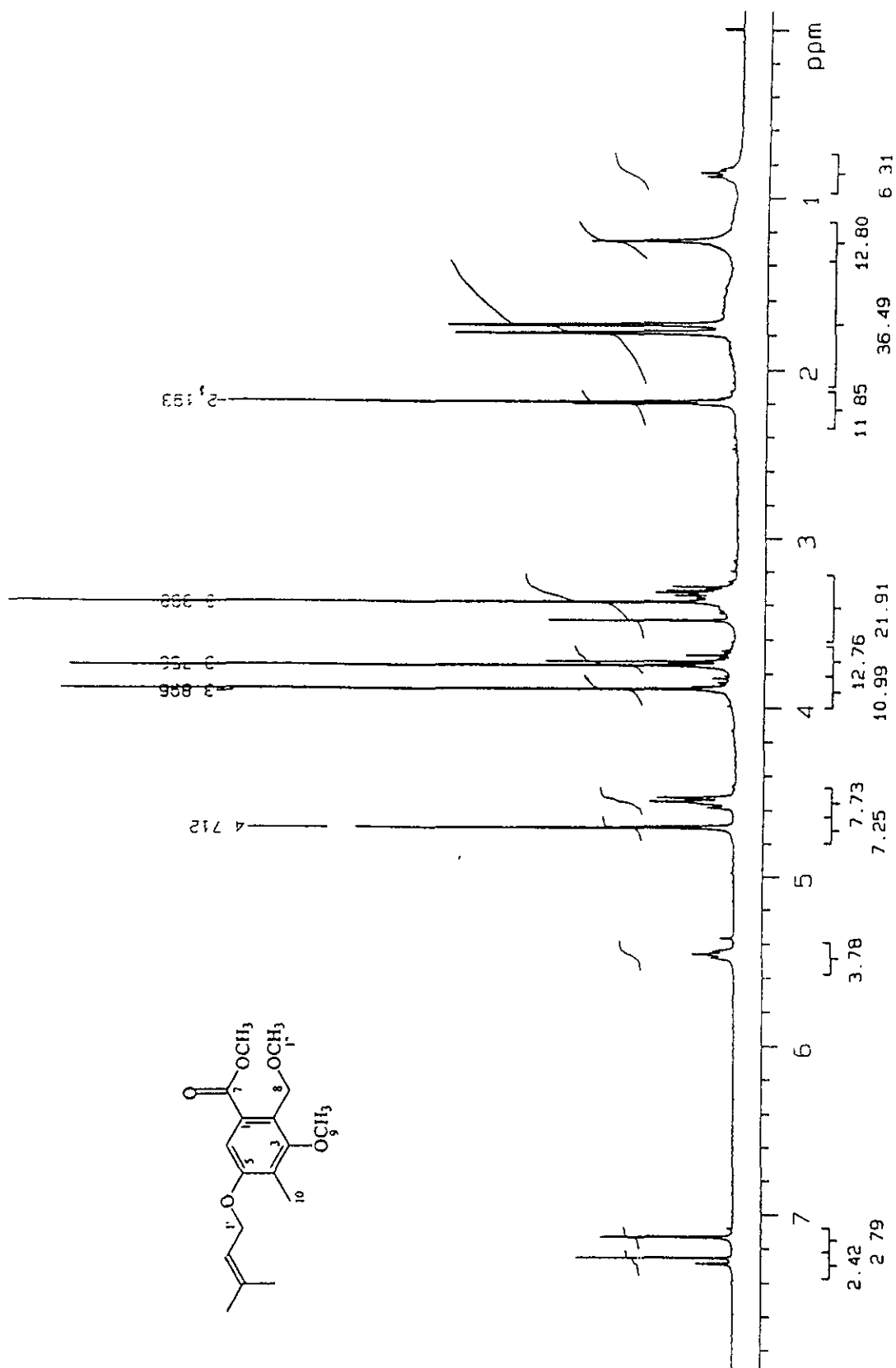


Espectro 69a. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) del anhídrido de zinniol (44).
 69b. Experimento DEPT del anhídrido de zinniol (44).

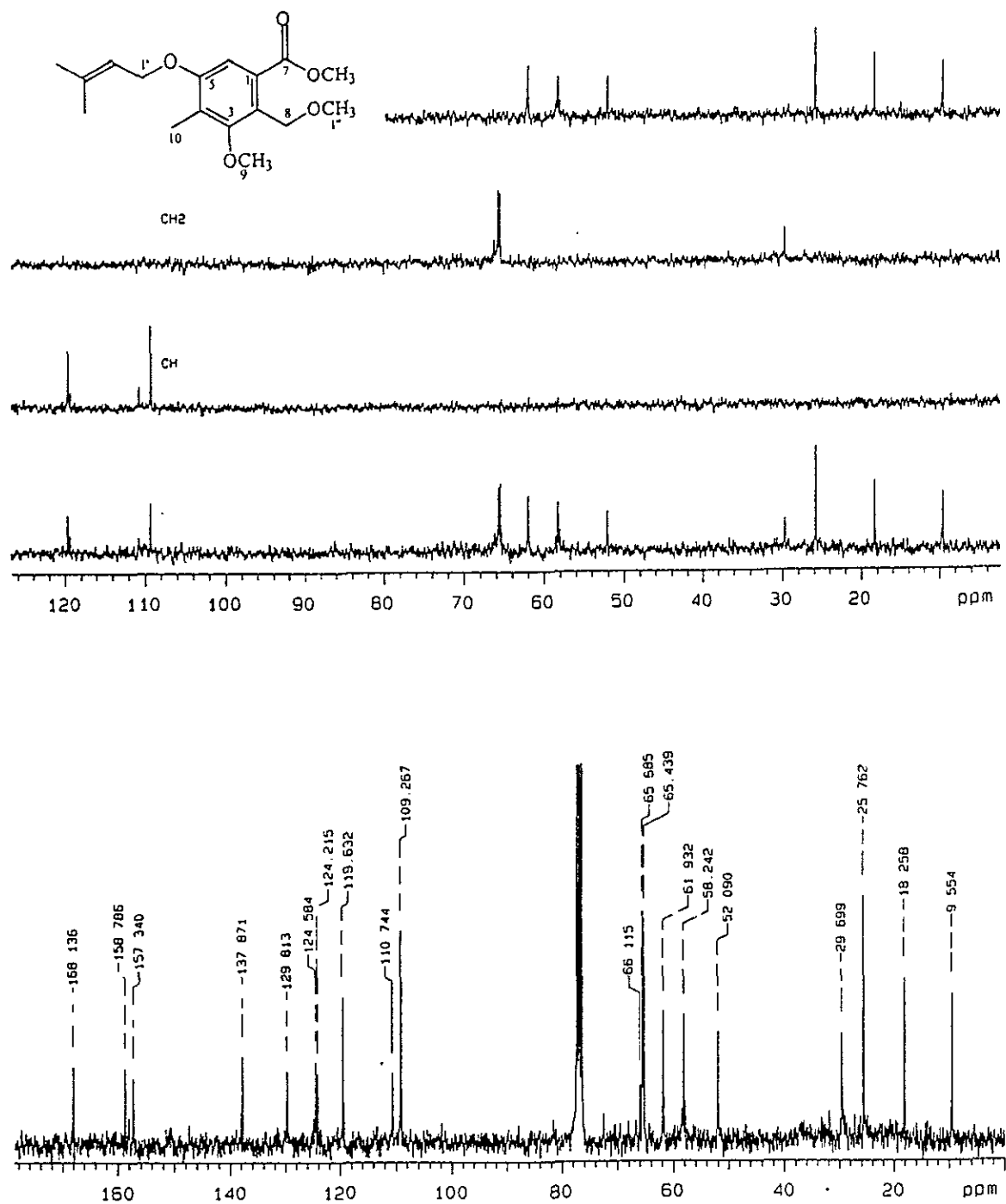


Espectro 70a. IR del 7-éster metílico del 8-éter metílico de zinniol (45).

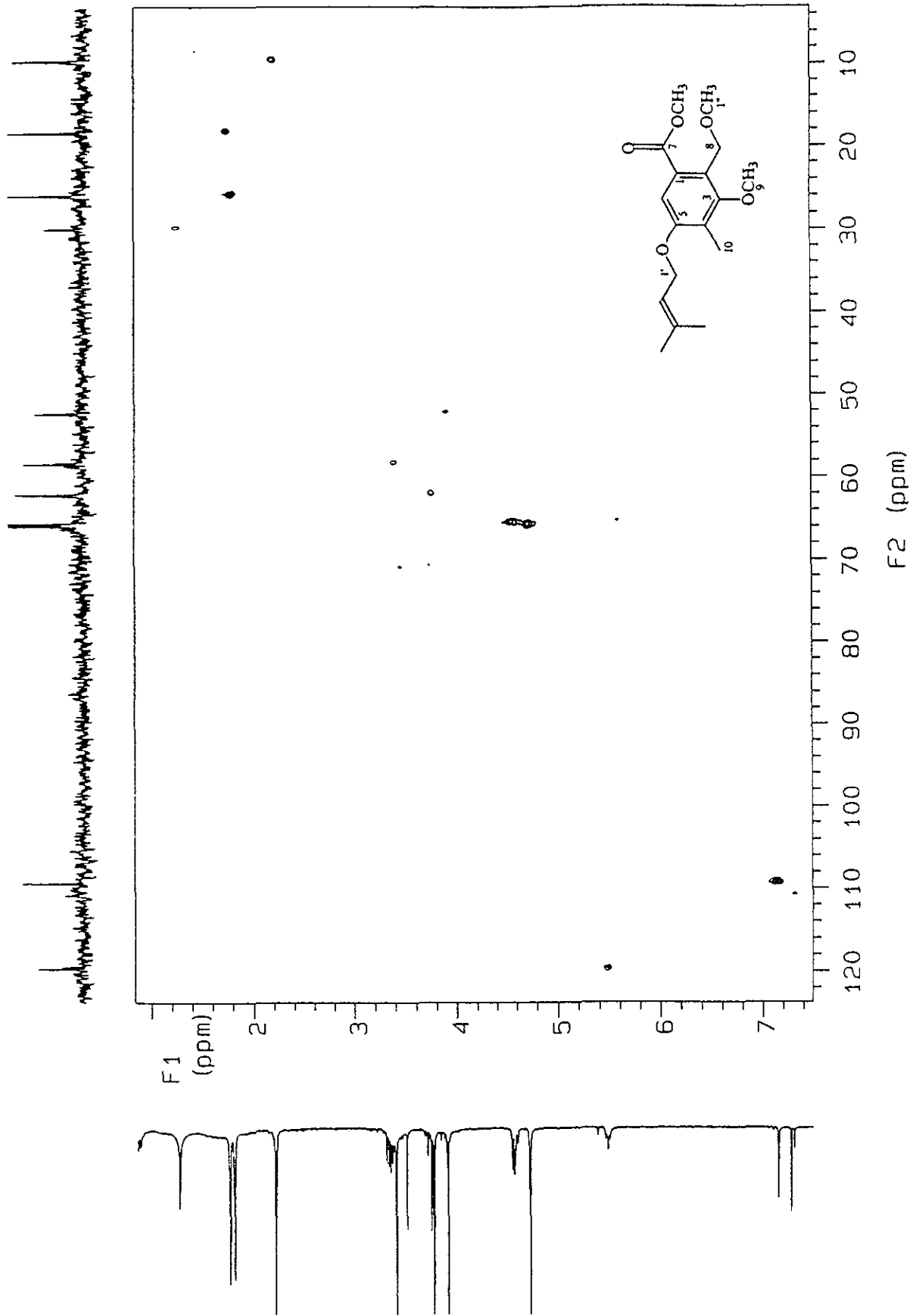
70b. Cromatograma de gases-masas del 7-éster metílico del 8-éter metílico de zinniol (45).



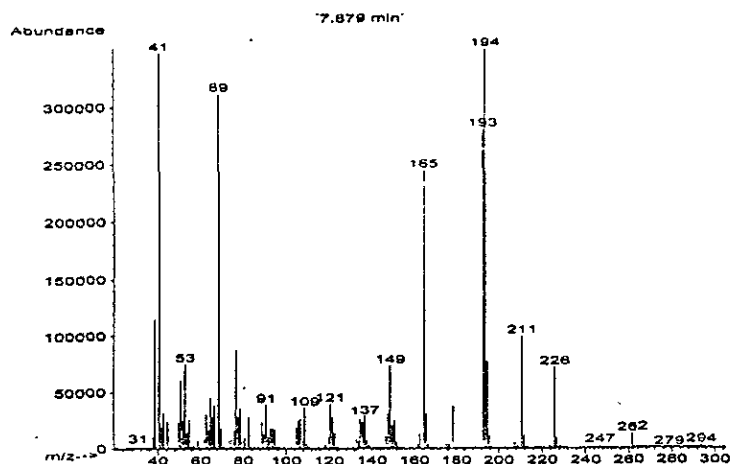
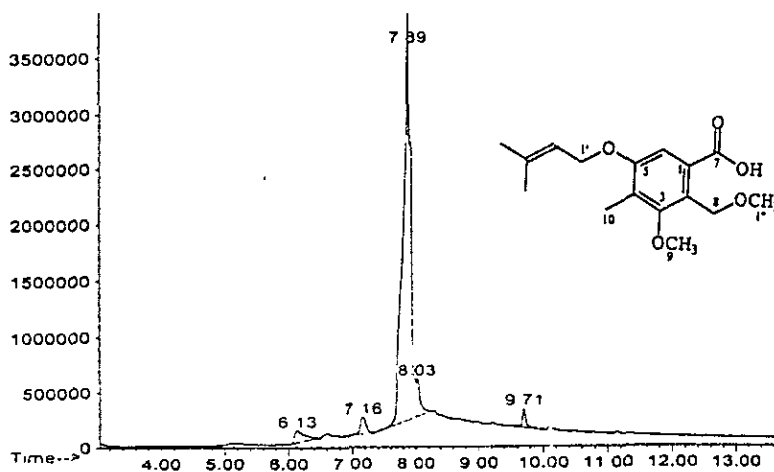
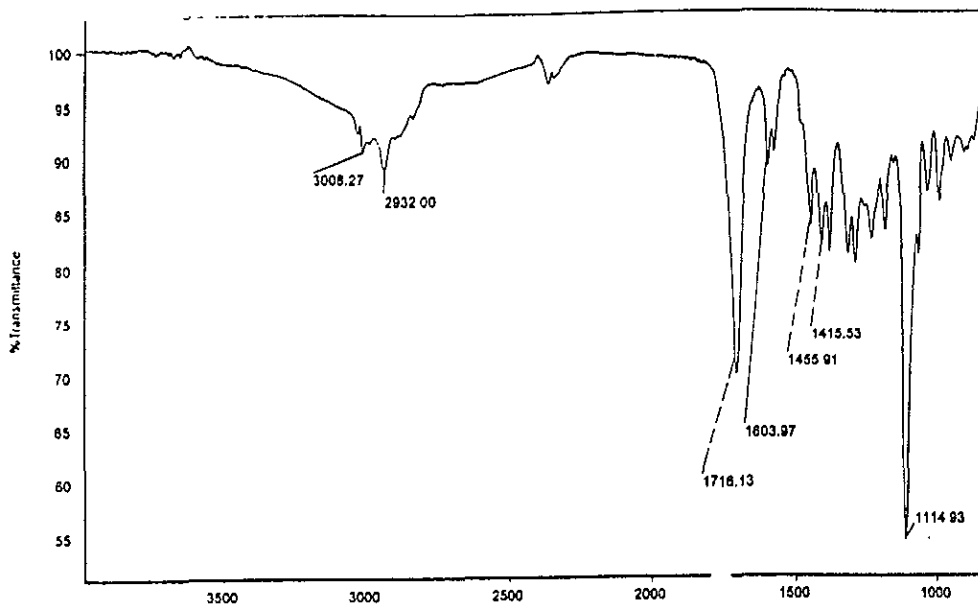
Espectro 71. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) del 7-éter metílico del 8-éter metílico de zinniol (45)



Espectro 72a. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) del 7-éster metílico del 8-éter metílico de zinniol (45).
72b. Experimento DEPT del 7-éster metílico del 8-éter metílico de zinniol (45).

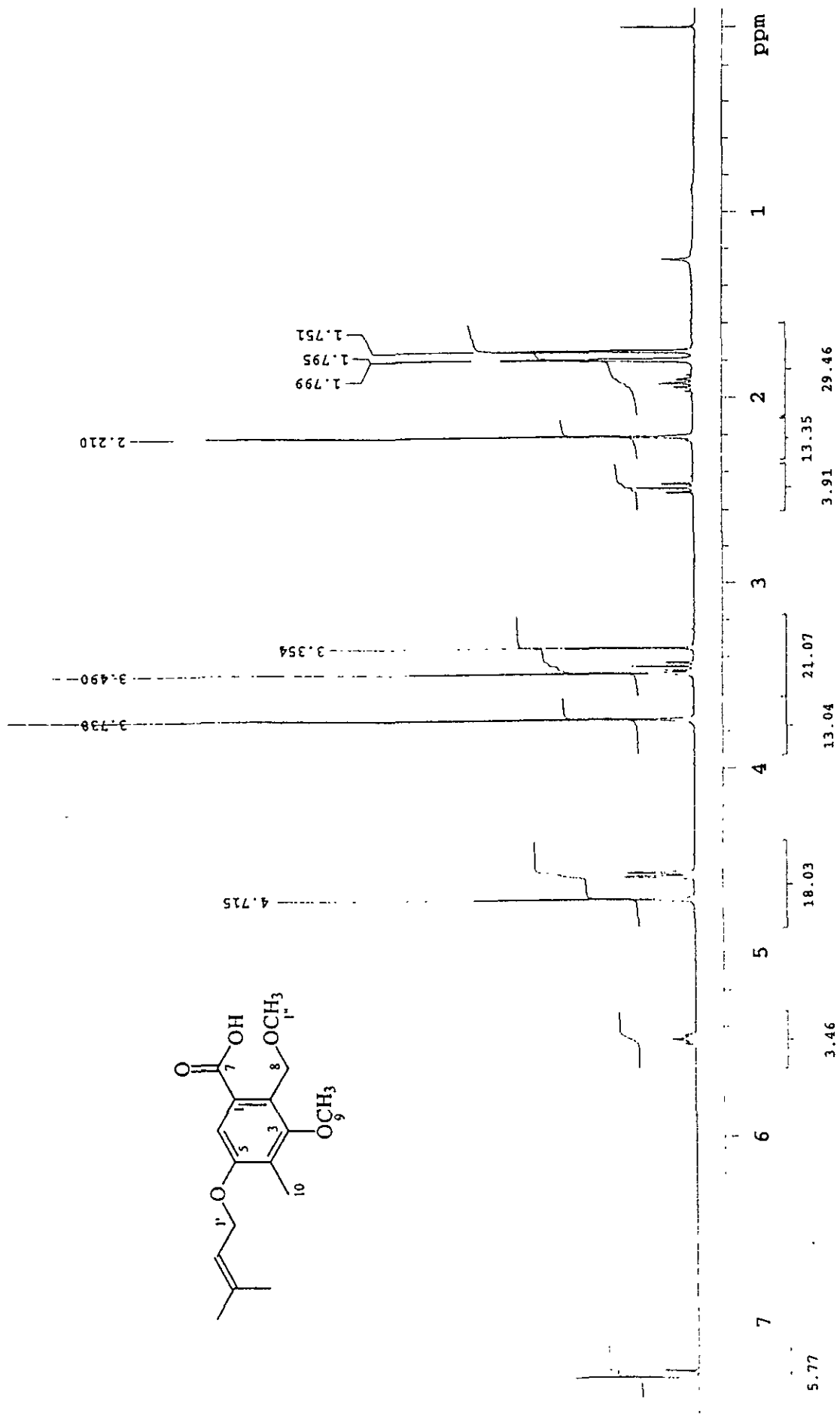


Espectro 73. HMQC del 7-éster metílico del 8-éter metílico de zinniol (45).

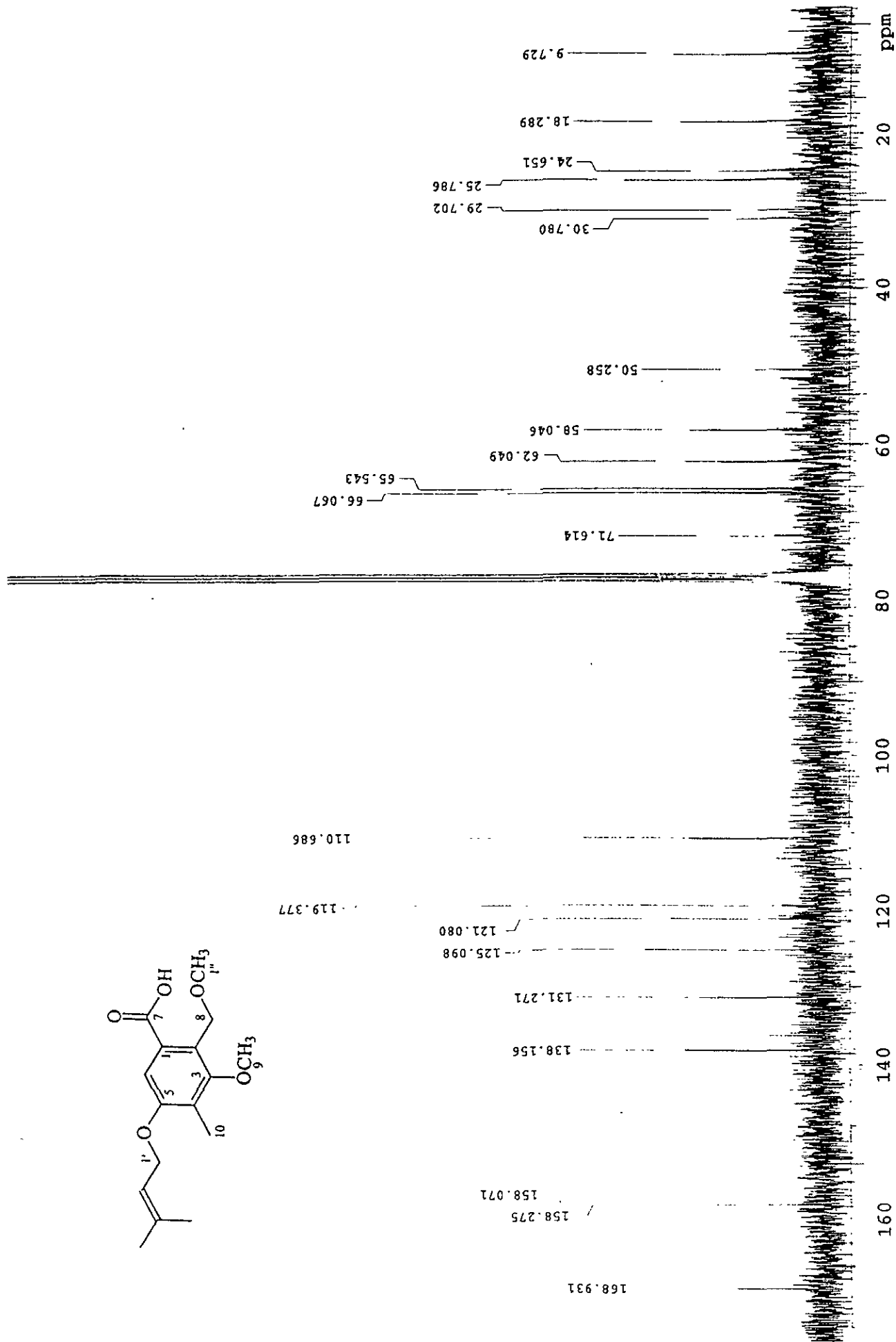


Espectro 74a. IR del 7-ácido del 8-éter metílico de zinniol (46).

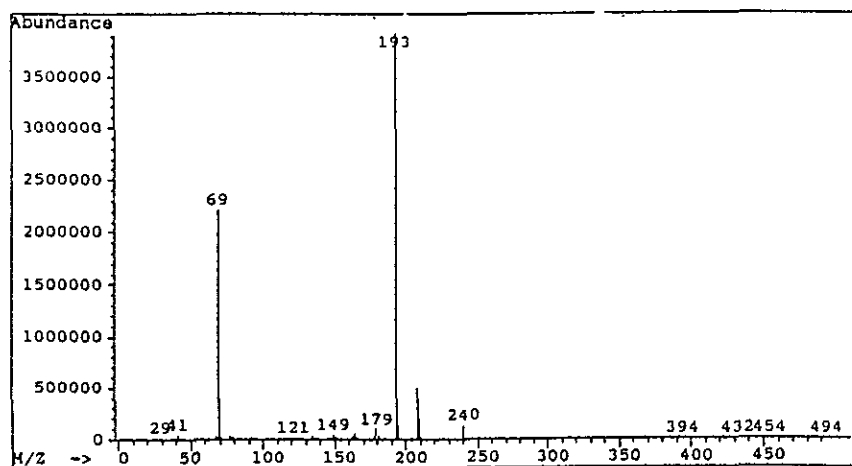
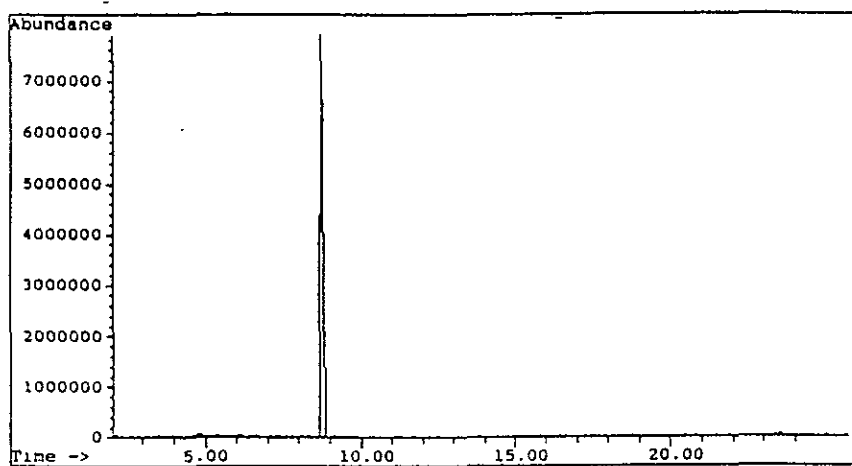
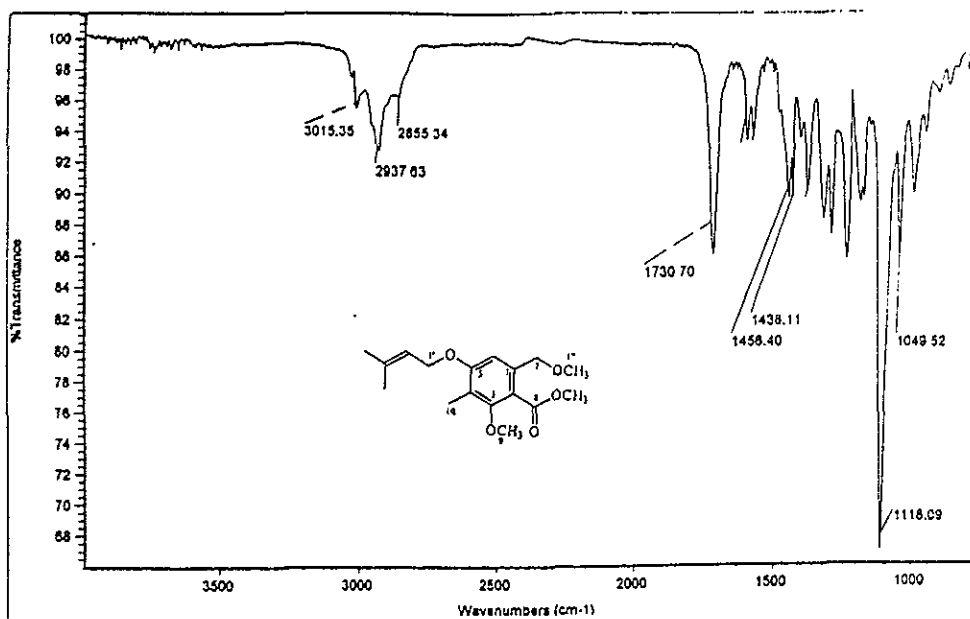
74b. Cromatograma de gases-masas del 7-ácido del 8-éter metílico de zinniol (46).



Espectro 75. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) del 7-ácido del 8-éter metílico de zinniol (46)

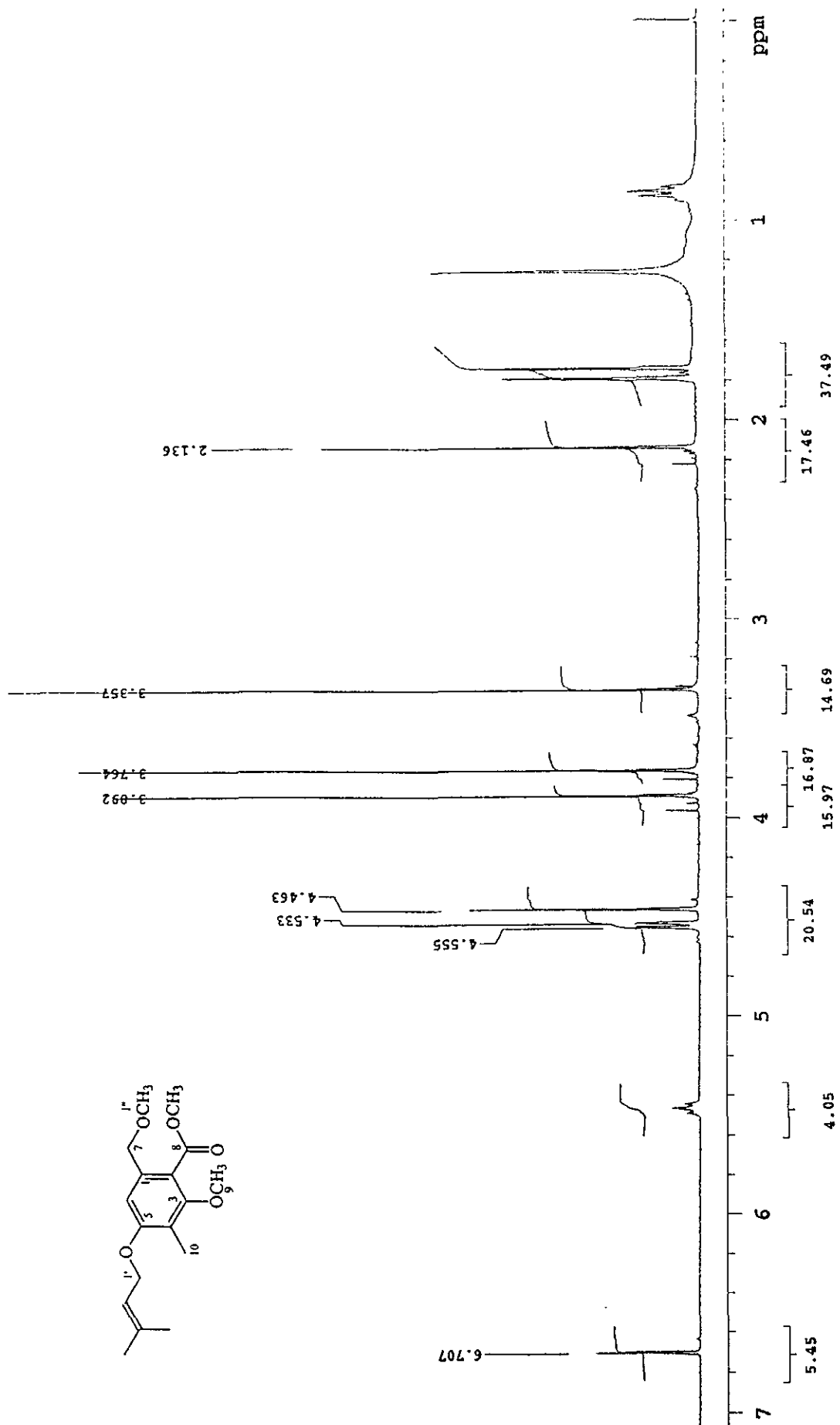


Espectro 76. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) del 7-ácido del 8-éter metílico de zinniol (46).

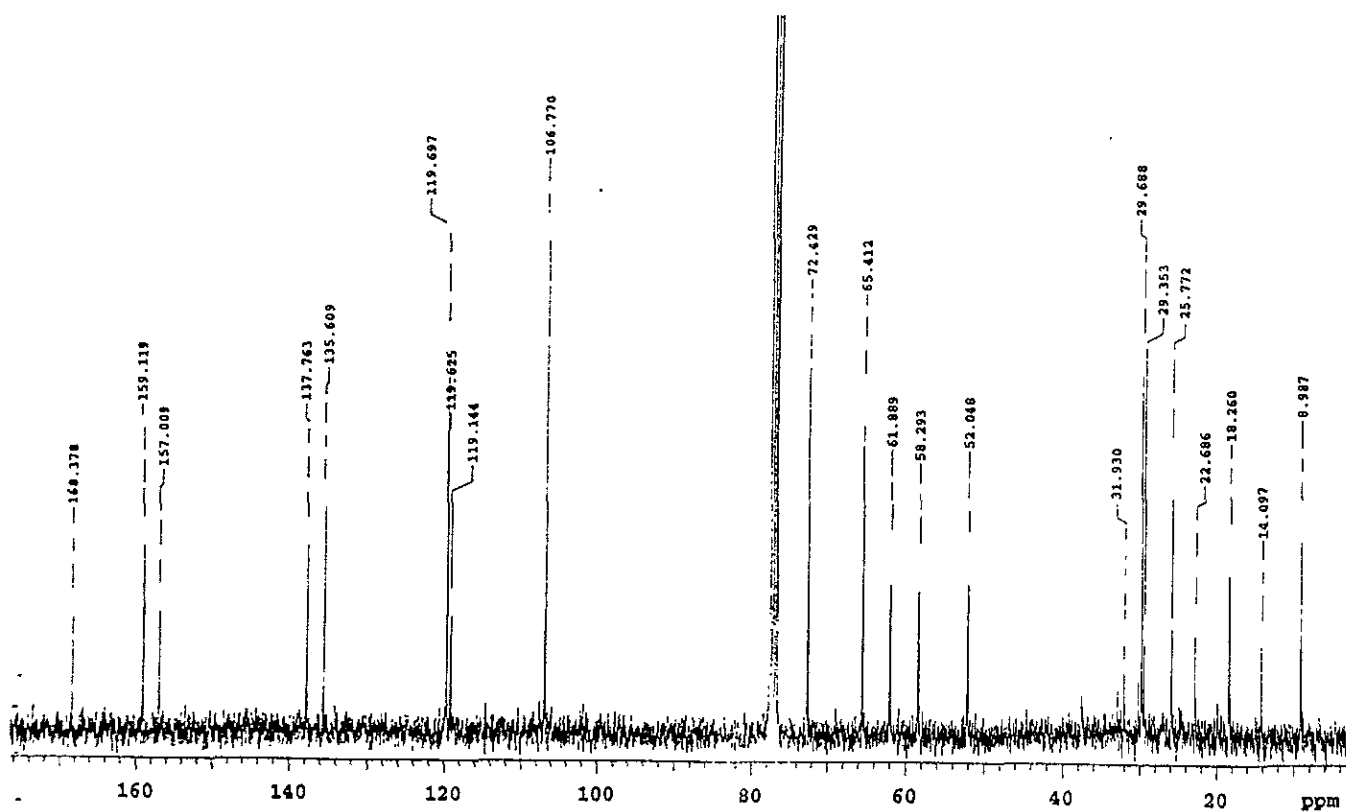
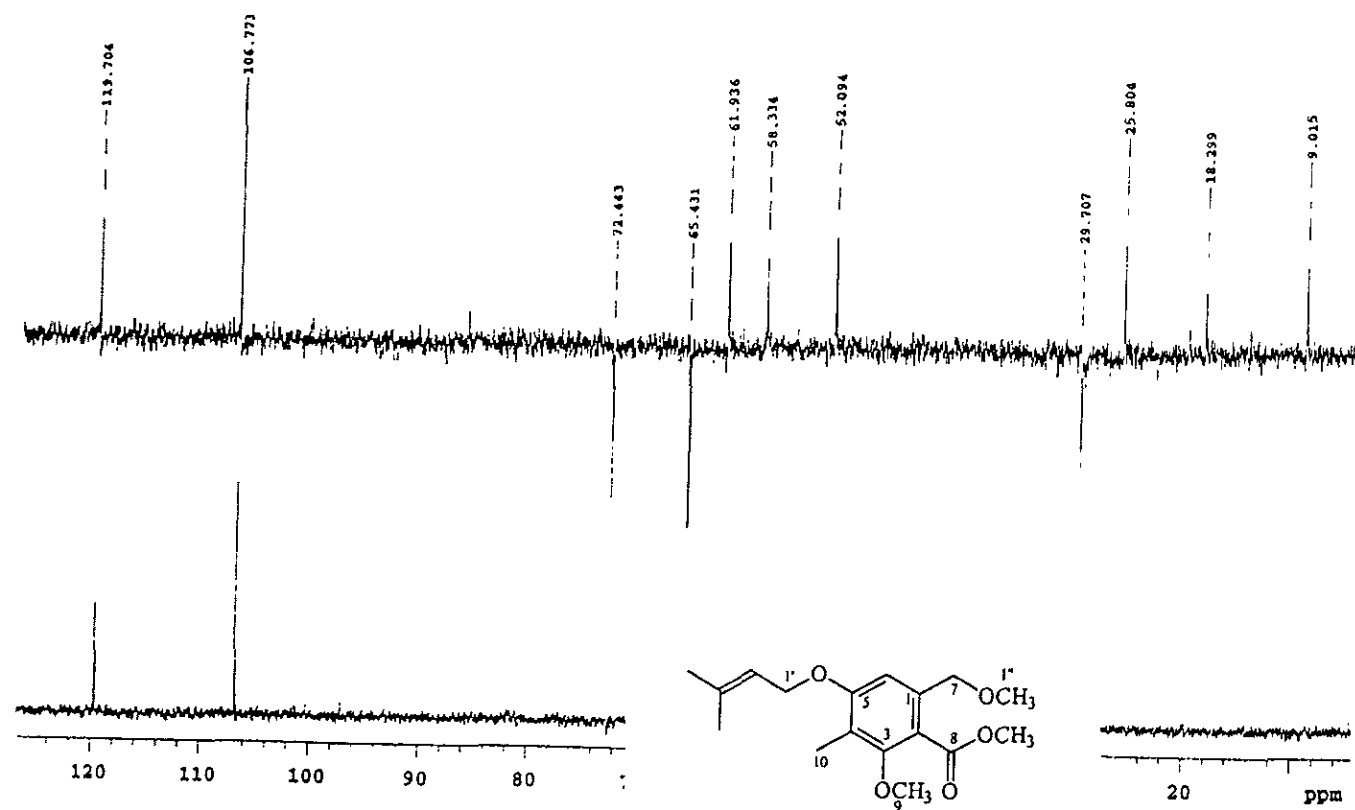


Espectro 77a. IR del 8-éster del 7-éter metílico de zinniol (47).

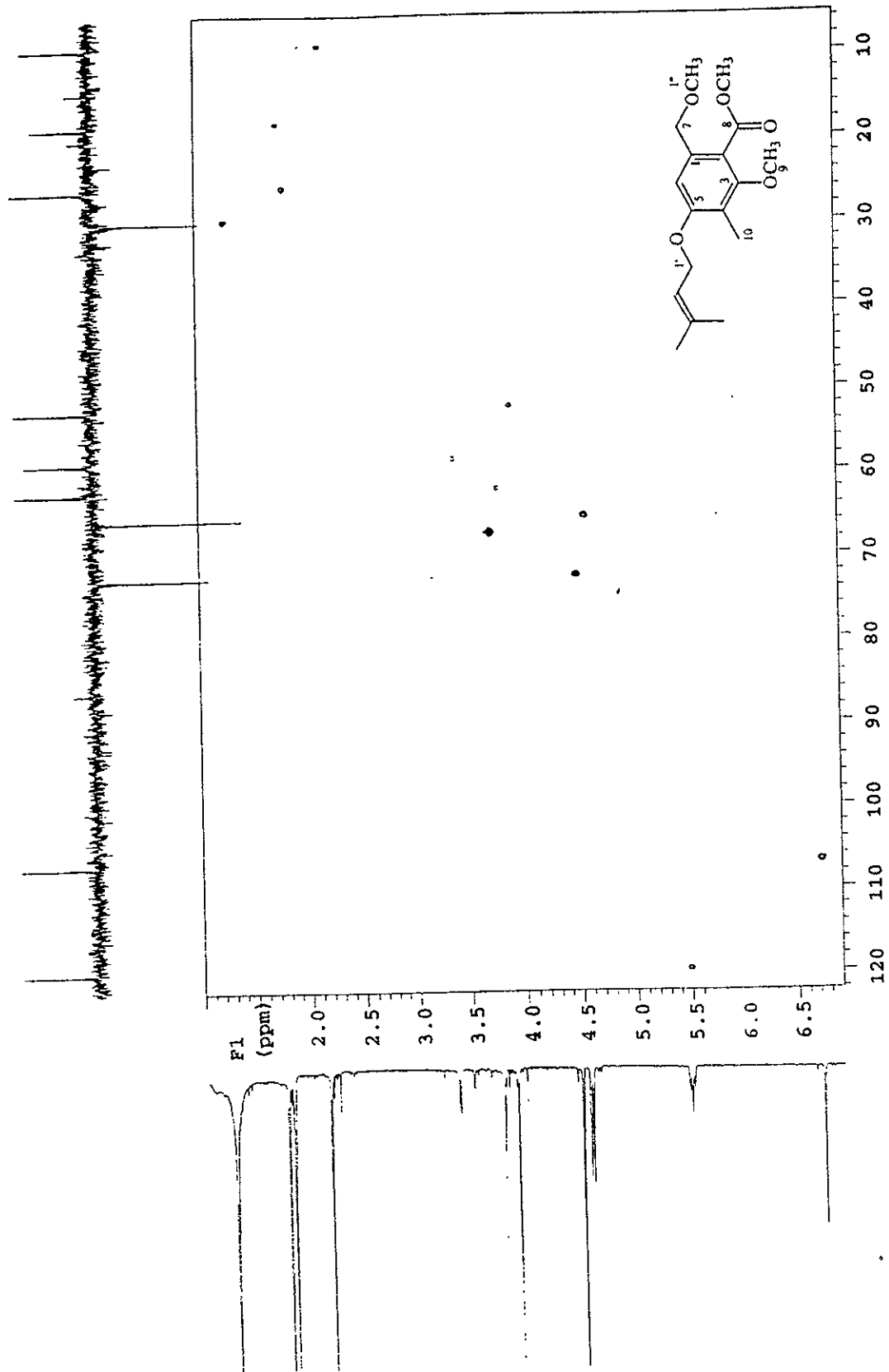
77b. Cromatograma de gases-masas del 8-éster del 7-éter metílico de zinniol (47).



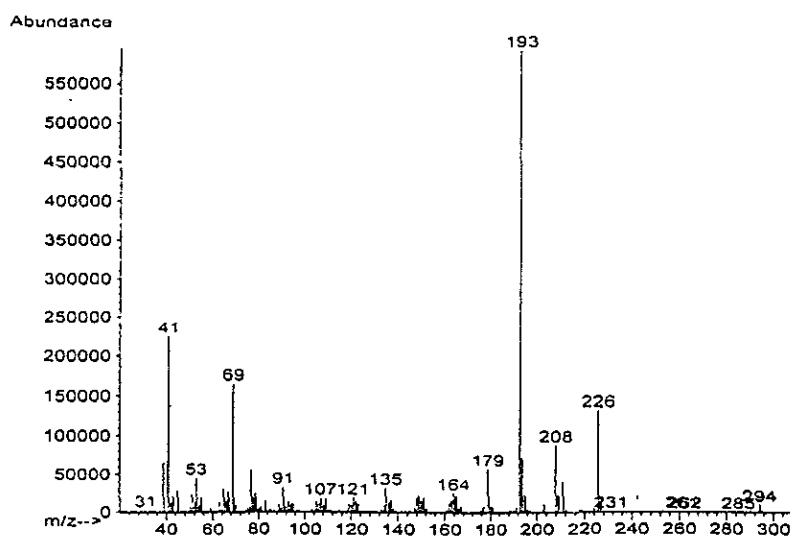
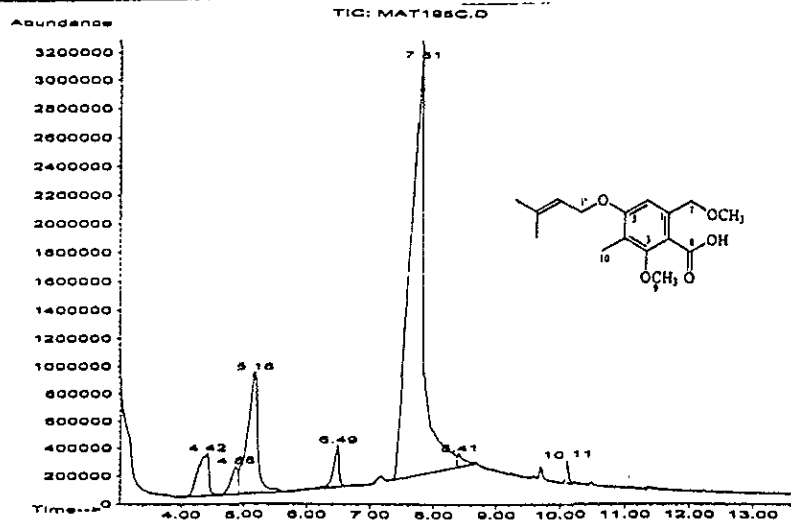
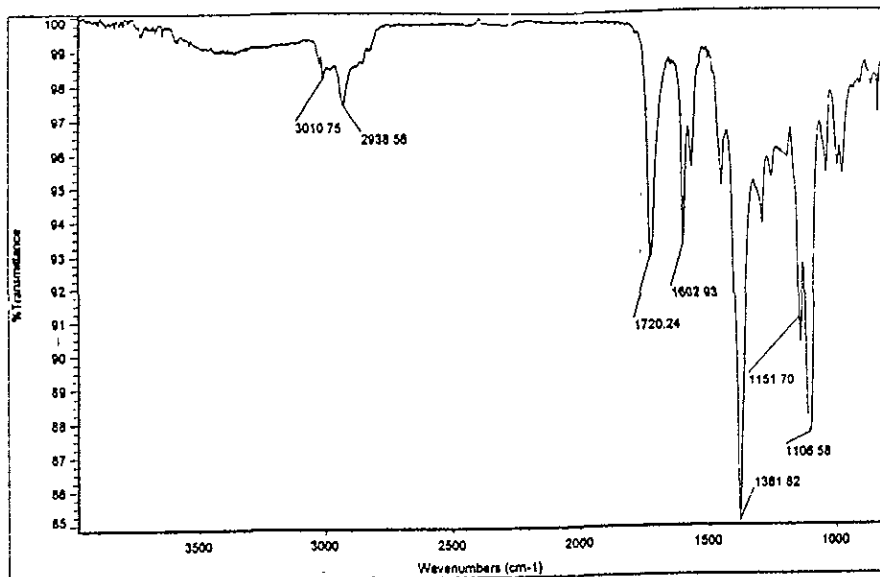
Espectro 78. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) del 8-éster del 7-éter metílico de zinniol (47).



Espectro 79a. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) del 8-éster del 7-éter metílico de zinniol (47).
79b. Experimento DEPT del 8-éster del 7-éter metílico de zinniol (47).

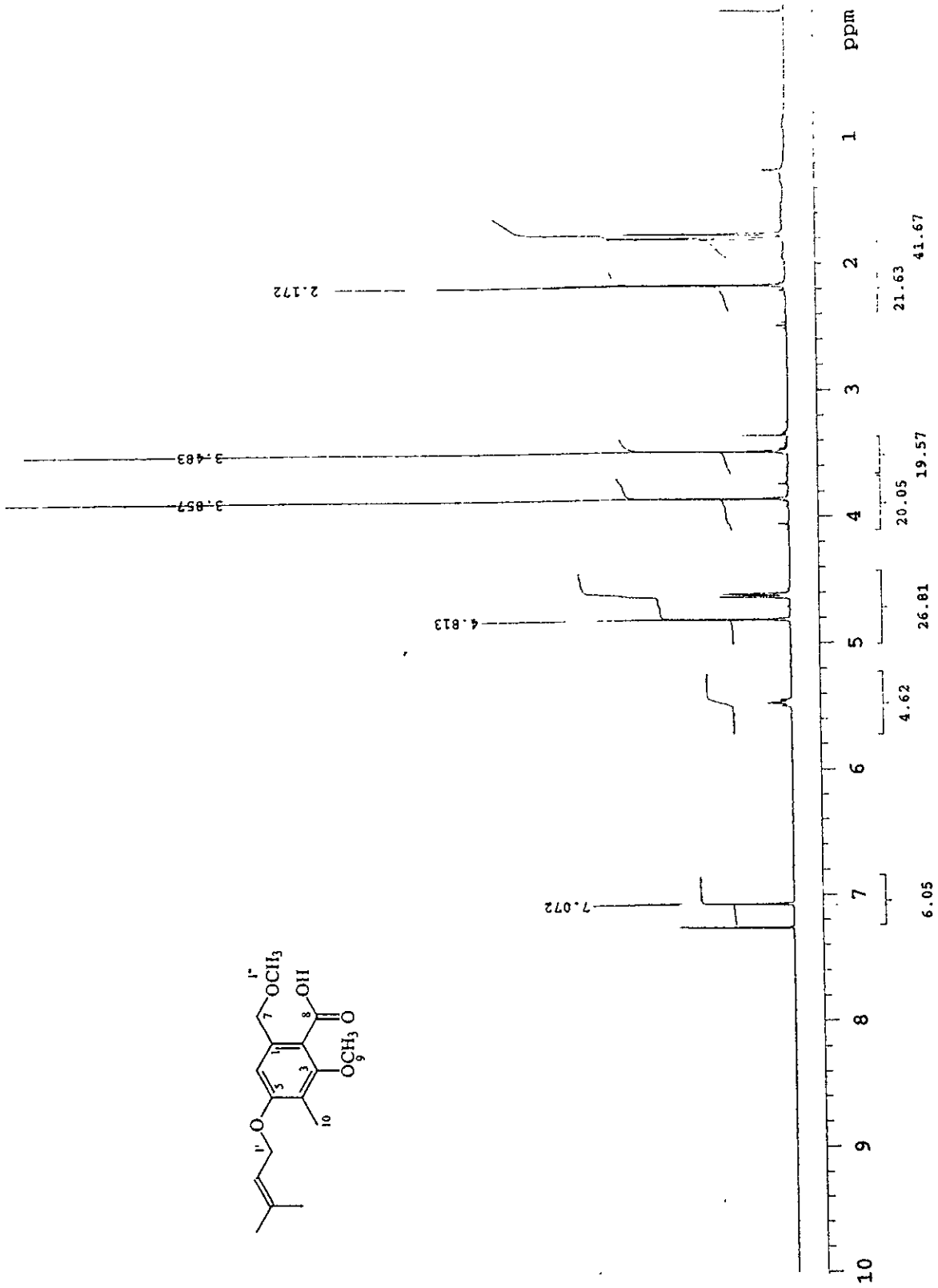


Espectro 80. Experimento HMQC del 8-éster metílico de zinniol (47).

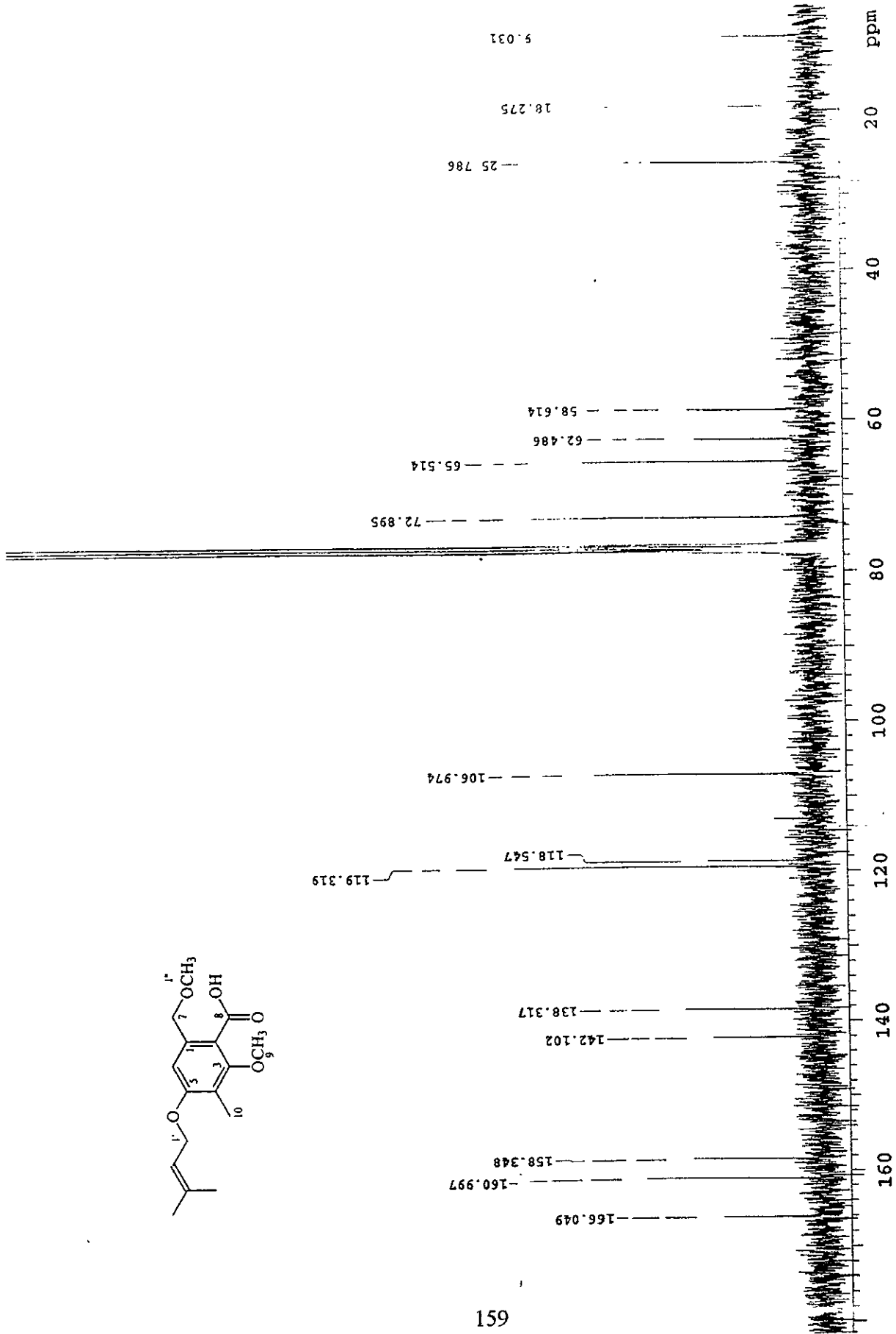
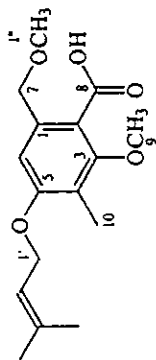


Espectro 81a. IR del 8-ácido del 7-éter metílico de zinniol (48).

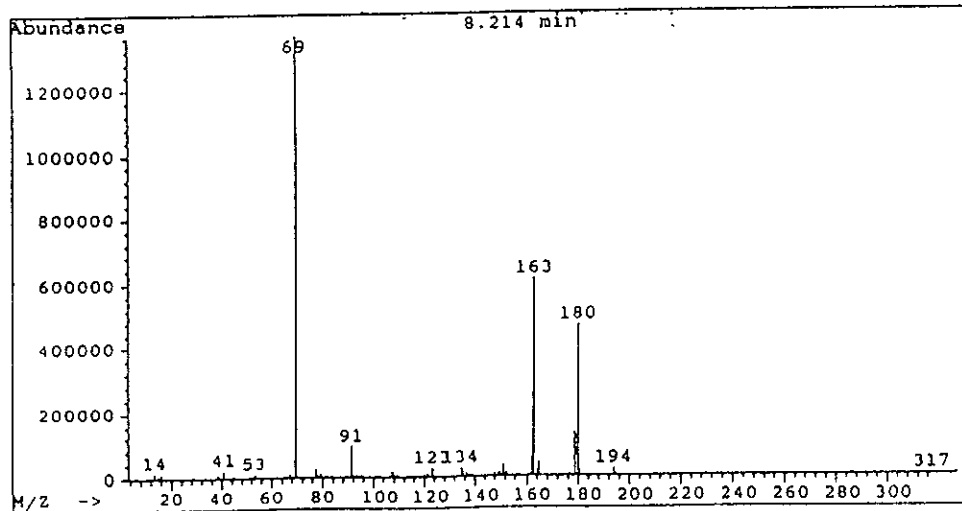
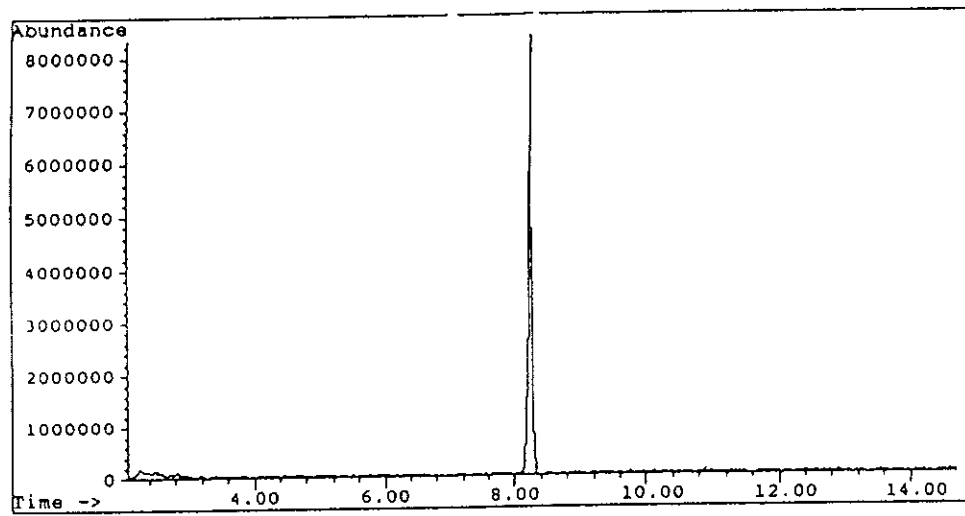
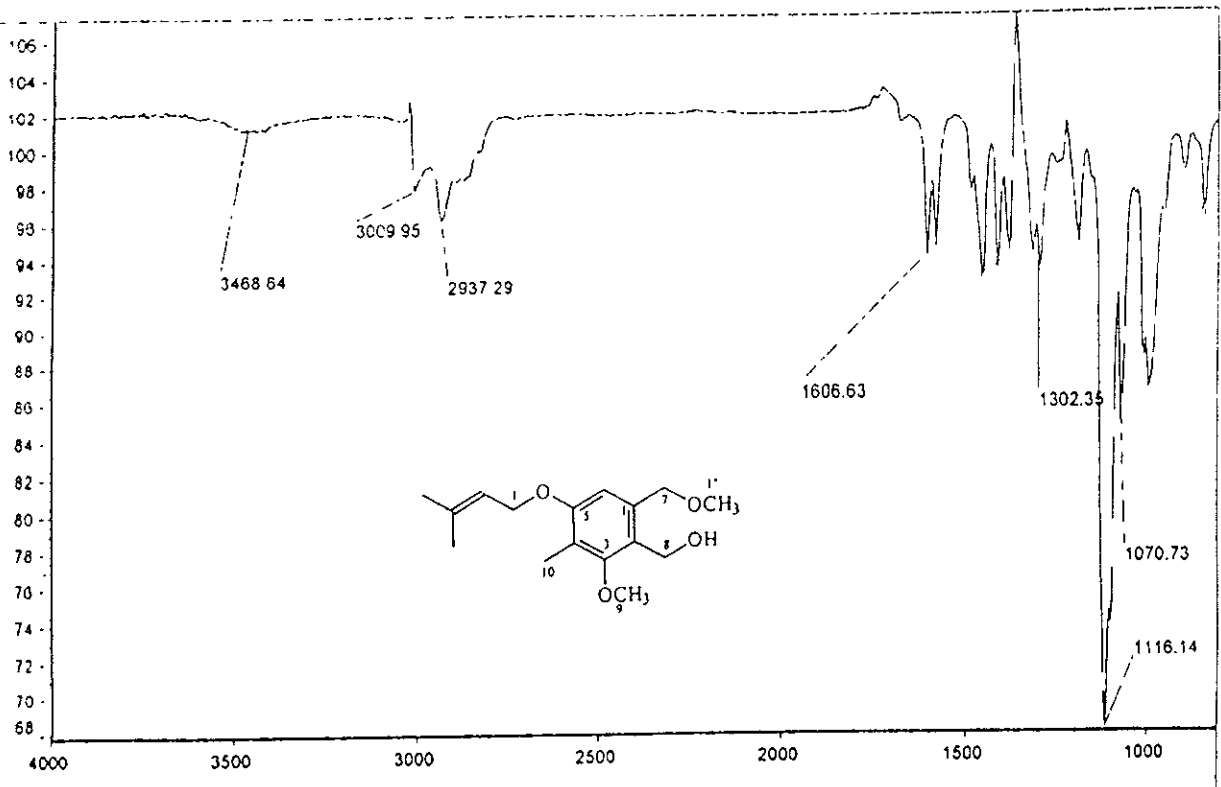
81b. Cromatograma de gases-masas del 8-ácido del 7-éter metílico de zinniol (48).



Espectro 82. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) del 8-ácido del 7-éter metílico de zinniol (48).

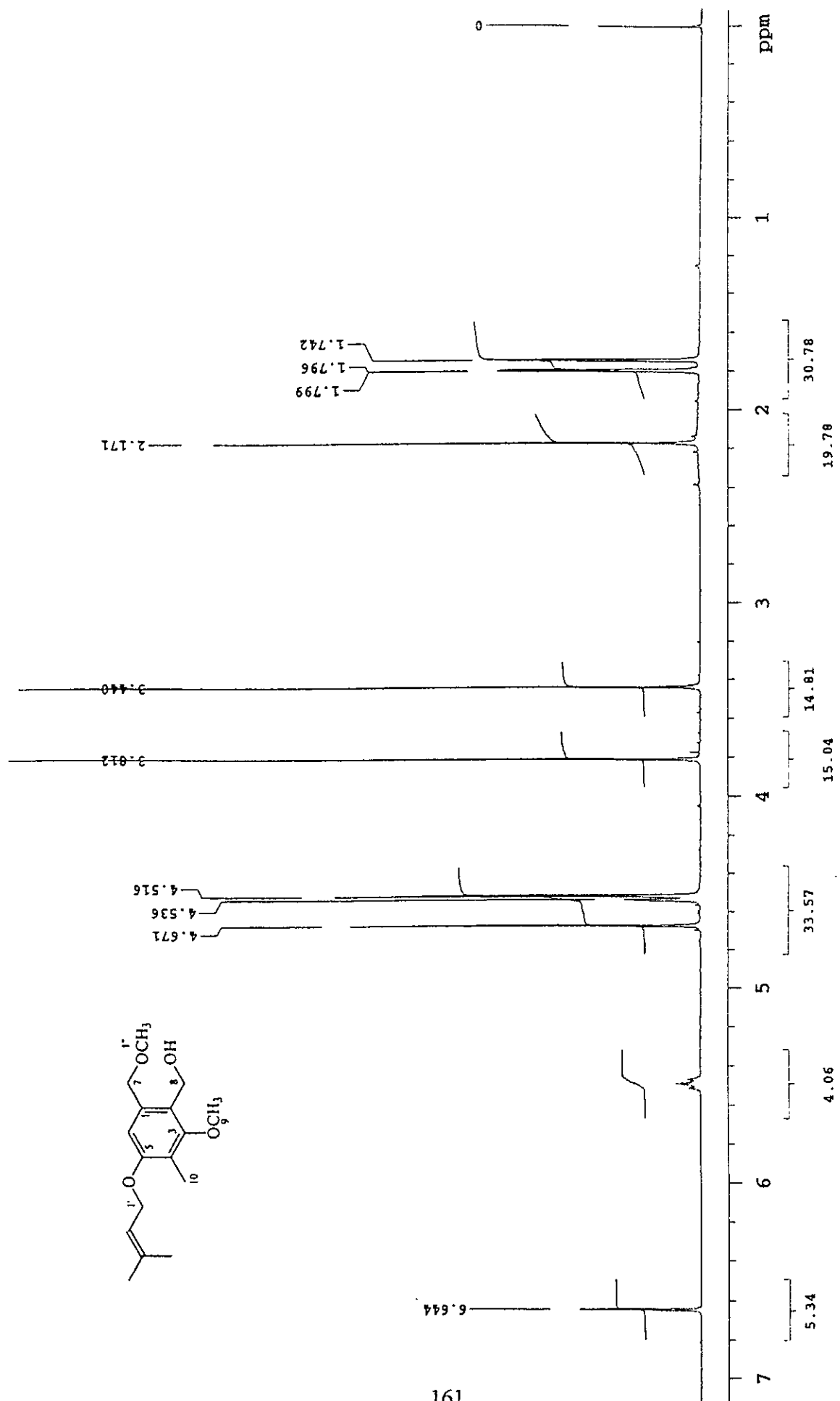


Espectro 83. RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) del 8-ácido del 7-éter metílico de zinniol (48).

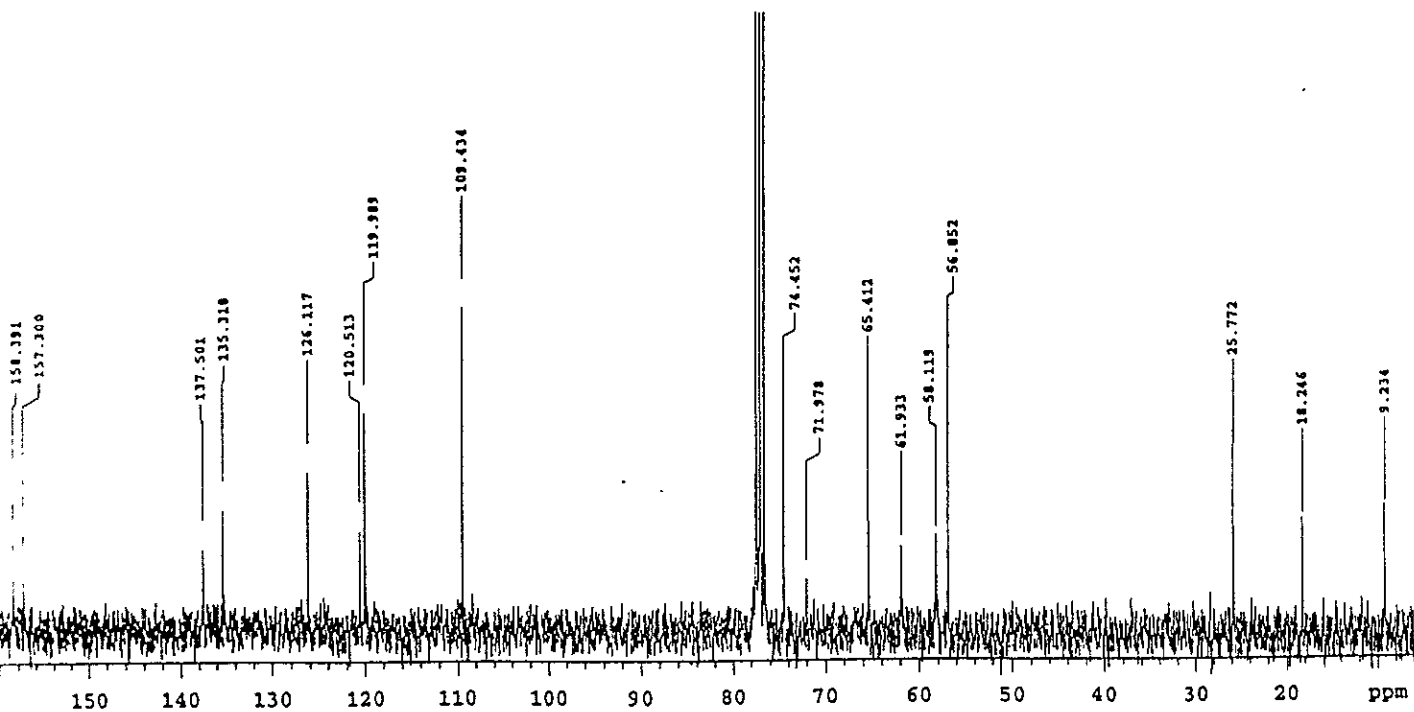
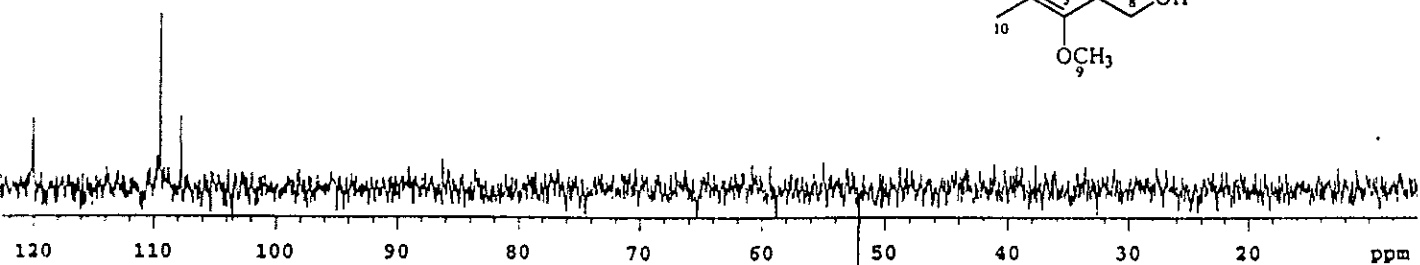
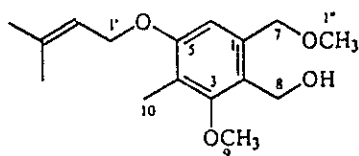
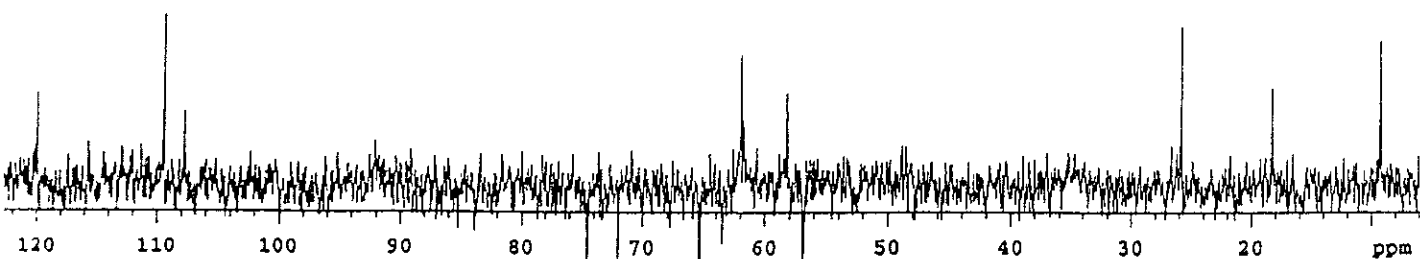


Espectro 84a. IR del éter metílico de 7-zinniol (49)

84b. Cromatograma de gases del éter metílico de 7-zinniol (49)



Espectro 85. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) del éter metílico de 7-zinniol (49).



Espectro 86a. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) del éter metílico de 7-zinniol (49)
 86b. Experimento DEPT del éter metílico de 7-zinniol (49)

REFERENCIAS

1. Herrera, T.; Ulloa, M. *El reino de los hongos. Micología básica y aplicada*; Fondo de Cultura Económica: México, 1990; pp. 375-377.
2. Sherf, A.; Macnab, A. *Vegetables diseases and their control*; John Wiley: New York, 1986; pp. 1-2.
3. Pelczar, M. J.; Reid, R. D.; Chan, E. C. S. *Microbiología*; Mc Graw-Hill: México, 1990; pp. 247, 251, 268.
4. Graniti, A. Phytotoxins and their involvement in plant diseases. *Experientia* **1991**, *47*, 751-764.
5. Rotem, J. *The genus Alternaria. Biology, epidemiology, and pathogenicity*. APS Press: St. Paul, Minnesota, 1994; pp 77, 95-100.
6. Scheffer, R. P.; Briggs, S. P. *In Toxins in Plant diseases. Introduction: a perspective of toxin studies in Plant Pathology*; Durbin, R. D. Ed.; Academic Press: New York, 1981; pp 1-17.
7. Otani, H.; Kohmoto, K.; Kodama, M. *Alternaria* Toxins and their effects on host plants. *Can. J. Bot.* **1995**, *S453-S458*.
8. Walton, J. D. Host-selective toxins: agents of compatibility. *The Plant Cell* **1996**, *8*, 1723-1733.
9. Daly, J. M. *In Toxins in Plant disease: fungal host-specific*; Durbin, R. D. Ed. Academic Press: New York, 1981; pp. 295-383.
10. Jones, M. J; Dunkle, L. D. Analysis of *Cochliobolus carbonum* races by PCR amplification with arbitrary and gene-specific primers. *Phytopathology* **1993**, *83*, 366-369.
11. Kohmoto, K.; Otani, H. Host recognition by toxigenic plant pathogens. *Experientia* **1991**, *47*, 755-764.
12. Walton, J. D.; Panaccione, D. G. Host-selective toxins: Perspectives and Progress. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1993**, *31*, 275-303.
13. Liakopoulou-Kyriakides, M.; Lagopodi, A. L.; Thanassouloupoulos, C. C.; Stavropoulos, G. S.; Magafa, V. Isolation and synthesis of a host-selective toxin produced by *Alternaria alternata*. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 37-40.
14. Stierle, A. C.; Cardellina II, J. H.; Strobel, G. A. Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 8008-8013.
15. Kono, Y.; Knoche, H. W.; Daly, J. M. *Toxins in Plant disease: Structure: fungal host-specific*; Durbin, R. D. Ed. Academic Press: New York, 1981; pp. 221-257.
16. Okuno, T.; Ishita, Y.; Nakayama, S.; Sawai, K.; Fujita, T.; Sawamura, K. Isolation of a host-specific toxin produced by *Alternaria mali* Roberts, *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **1974**, *40*, 375-376.
17. Ueno, T.; Nakashima, T.; Hayashi, Y.; Fukami, H. Structures of AM-toxin I and II, host-specific phytotoxic metabolites produced by *Alternaria mali*. *Agric. Biol. Chem.* **1975**, *39*, 1115-1122.

18. Nakashima, T.; Ueno, T.; Hayashi, Y.; Fumaki, H. Structure elucidation of AK-toxins, host-specific metabolites produced by *Alternaria kikuchiana* Tanaka. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 43, 4469-4472.
19. Irie, H.; Igarashi, J.; Matsumoto, K.; Yanagawa, Y.; Nakashima, T.; Ueno, T.; Fumaki, H. An approach to a synthesis of the host-specific toxins AK-toxin I and II, starting from vitamin C as a chiral material. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33, 1313-1315.
20. Nakatsuka, S. I.; Feng, B. N.; Goto, T.; Tsuge, T.; Nishimura, S. Biosynthetic origin of (8*R*,9*S*)-9,10-epoxy-8-hydroxy-9-methyl-deca-(2*E*,4*Z*,6*E*)-trienoic acid, a precursor of AK-toxins produced by *Alternaria alternata*. *Phytochemistry* **1990**, 29, 1529-1531.
21. Pedras, M. S. C.; Taylor J. N.; Nakashima, T. T. A novel chemical signal from the "Blackleg" fungus: beyond phytotoxins and phytoalexins. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 4778-4780.
22. Ward, D. E.; Vazquez, A.; Pedras, M. S. C. Understanding host-selective phytotoxicity: synthesis and biological discrimination of phomalide and its (*Z*)-isomer. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 8008-8009.
23. Ward, D. E.; Vazquez, A.; Pedras, M. S. C. Probing host-selective phytotoxicity: synthesis and biological activity of phomalide, isophomalide, and dihydrophomalide. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 1657-1666.
24. Panigrahi, S. In *Handbook Plant. Fungal Toxicants: Alternaria toxins*; D'Mello, J. P. F. Ed: , 1997; pp. 319-337.
25. MacKinnon, S. L.; Keifer, P.; Ayer, W. A. Components from the phytotoxic extract of *Alternaria brassicicola*, a black spot pathogen of canola. *Phytochemistry* **1999**, 51, 215-221.
26. Stierle, A.; Hershenshorn, J.; Strobel, G. Zinniol-related phytotoxins from *Alternaria cichorii*. *Phytochemistry* **1993**, 32, 1145-1149.
27. Canning, A. M.; Hook, I.; Sheridan, H. Bisradicinin: a novel dimer elicited in cultures of *Alternaria chrysanthemi*. *J. Nat. Prod.* **1992**, 55, 487-490.
28. Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Horiuchi, M.; Kitaguchi A.; Odamura, K. Porritoxin, a phytotoxin of *Alternaria porri*. *Phytochemistry* **1992**, 31, 2325-2326.
29. Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Morikawa, Y.; Ideguchi, I.; Uno, H. Porritoxinol, a phytotoxin of *Alternaria porri*. *Phytochemistry* **1994**, 35, 603-605.
30. Gamboa-Angulo, M. M.; Alejos-González, F.; Peña-Rodríguez, L. M. Homozinniol, new phytotoxic metabolite from *Alternaria solani*. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 282-285.
31. Oikawa, H.; Yokota, T.; Sakano, C.; Susuki, Y.; Naya, A.; Ichihara, A. Solanopyrones, phytotoxins produced by *Alternaria solani*: biosynthesis and isolation of minor components. *Biosc. Biotech. Biochem.* **1998**, 62, 2016-2022.
32. Vurro, M.; Evidente, A.; Andolfi, A.; Zonno, M. C.; Giordano, F.; Motta, A. Brefeldin A and α,β -dehydrocurvularin, two phytotoxins from *Alternaria zinniae*, a biocontrol agent of *Xanthium accidentale*. *Plant Science* **1998**, 138, 67-79.
33. Ballio, A. Non-host-selective fungal phytotoxins: Biochemical aspects of their mode of action. *Experientia* **1991**, 47, 783-790.

34. Haraguchi, H.; Abo, T.; Fukuda, A.; Okamura, N.; Yagi, A. Mode of phytotoxic action of altersolanols. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 989-992.
35. Heiser, I.; Oßwald, W.; Elsner, F. E. The formation of reactive oxygen species by fungal and bacterial phytotoxins. *Plant Physiol. Biochem.* **1998**, *36*, 703-713.
36. Buiatti, M.; Ingram, D. S. Phytotoxins as tools in breeding and selection of disease-resistant plants. *Experientia* **1991**, *47*, 811-819.
37. Cornelissen, B. J. C.; Melchers, L. S. Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. *Plant. Physiol.* **1993**, *101*, 709-712.
38. Pedras, M. S. C.; Zaharia, I. L.; Gai, Y.; Smith, K. C.; Ward, D. E. Metabolism and the host-selective toxins dextruxin B and homodextruxin B: probing a plant disease resistance trait. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1655-1658.
39. Arcioni, S.; Pezzoti, M.; Damiani, F. *In vitro* selection of alfalfa plants resistant to *Fusarium oxysporum* f. medicagines. *Theor. Appl. Genet.* **1987**, *74*, 700-705.
40. Rines, H. K.; Luke, H.H. Selection and generation of toxin insensitive plants from tissue cultures of oats (*Avena sativa*) susceptible to *Helminthosporium victoriae*. *Theor. Appl. Genet.* **1985**, *71*, 16-21.
41. Ling, D. H.; Vidhyaseharan, P.; Borromeo, E. S.; Zapata, F. J.; Mew, T. W. *Theor. Appl. Genet.* **1985**, *71*, 133-135.
42. Pedras, M. S. C.; Okanga, F. I. Strategies of cruciferous pathogenic fungi: detoxification of the phytoalexin cyclobrassinin by mimicry. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1196-1202.
43. Pedras, M. S. C.; Khan, A. Q. Biotransformation of the *Brassica* phytoalexin brassicanal A by the blackleg fungus. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3403-3407.
44. Templeton, G. E. Biological herbicides: discovery, development, deployment. *Weed Sci.* **1982**, *30*, 430-433.
45. TeBeest, D. O.; Templeton, G. E. Mycoherbicides: progress in the biological control of weeds. *Plant Disease* **1985**, *69*, 6-10.
46. Strobel G.; Kenfield, D.; Bunkers, G.; Sugawara, F.; Clardy, J. Phytotoxins as potential herbicides. *Experientia* **1991**, *47*, 819-829.
47. Kamanna, B. C.; Ponnappa, K. M. Prospects for the use of phytotoxic metabolite of *Alternaria eichhorniae* to control aquatic weeds (Abstr). *Crop Research (hisar)* **1996**, *12*, 11-14.
48. Molleyres, L. P. Natural products in agricultura. *Rev. Latinoamer. Quim.* **1995**, *24*, 233-248.
49. Muller-Schwer, H.; Scheepas, P. C.; Greaves, M. P. Biological control of weeds in European crops: recent achievements and future work (Abstr.). *Weed Research* **2000**, *40*, 83-98.
50. Park, S. H.; Stierle, A.; Strobel, G. A. Metabolism of maculosin, a host-specific phytotoxin produced by *Alternaria alternata* on spotted knapweed (*Centaurea maculosa*). *Phytochemistry* **1994**, *35*, 101-106.
51. Bobylev, M. M.; Bobyleva, L. I.; Strobel, G. A. Synthesis and bioactivity of analogs of maculosin, a host-specific phytotoxin produced by *Alternaria alternata* on spotted knapweed (*Centaurea maculosa*). *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3960-3964.

52. Yoder, O. C. In *Toxins in Plant disease: Assay*; Durbin, R. D. Ed. Academic Press: New York, 1981; pp 46-78.
53. Walton, D.; Earle, E. D. In *genetics of plants: cell culture and somatic cell*; Academic press: New York, 1984, pp. 602.
54. Pena-Rodríguez, L. M.; Armingeon, N. A.; Chilton, W. S. Toxins from weed pathogens, I. Phytotoxins from a *Bipolaris* pathogen of Johnson grass. *J. Nat. Prod.* **1988**, 51, 821-828.
55. Kwon, C. Y.; Rasmussen, J. B.; Franci, L. J.; Meinhardt, S. W. A quantitative bioassay for necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis* based on electrolyte leakage. *Phytopathology* **1996**, 86, 1360-1363.
56. Templeton, G. E. In *Microbial Toxins VIII Fungal toxin.*; Kadis, S.; Ciegler, A.; Ajl, S. J. Eds; Academic Press: New York, 1972, 169-192.
57. Cotty, P. J.; Mishagi, I. J.; Hine, R. B. Phytotoxin production by *Alternaria tagetica*. *Phytopathology* **1982**, 72, 942-945.
58. Hotchkiss, E.S.; Baxter, L. W. Pathogenicity of *Alternaria tagetica* on *Tagetes*. *Plant Dis.* **1983**, 67, 1288-1290.
59. García Aguirre, A.; Oviedo Zárate, A.; Ramírez Ramírez, R.; Vázquez Gómez, A. *Cultivo de la flor de Cempazúchitl*; Laboratorios Bioquímex S. A. de C.V; México, 1992; p 7.
60. Cotty, P. J.; Mishagi, I. J.; Hine, R. B. Production of zinniol by *Alternaria tagetica* and its phytotoxic effect on *Tagetes erecta*. *Phytopathology* **1983**, 73, 1326-1328.
61. Starratt, A. N. Zinniol: a major metabolite of *Alternaria zinniae*. *Can. J. Chem.* **1968**, 46, 767-770.
62. Cotty, P. J.; Mishagi, I. J. Zinniol production by *Alternaria* species. *Phytopathology* **1984**, 74, 785-788.
63. Robeson, D. J. Zinniol induces chlorophyll retention in Barley leaves: the selective action of a non host-specific phytotoxin. *Phytochemistry* **1984**, 23, 1597-1599.
64. Granja Pérez, P. Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por *Alternaria tagetica* Shome & Mustafee y optimización de las condiciones de cultivo del hongo. Tesis de Lic. Universidad Autónoma de Yucatán, México, 1997.
65. Matern, U.; Strobel G.; Shepard, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 4935-4939.
66. Harbone, J. B.; Mabry, T. J.; Mabry, H. In *The flavonoids*; Chapman and Hall: London, 1975, pp. 1106-1117.
67. Krohn, K.; Bahramsari, R.; Florke, U.; Ludewig, K.; Kliche-Spory, C.; Michel, A.; Aust, H.; Draeger, S.; Schulz, B.; Antus, S. Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. *Phytochemistry* **1997**, 45, 313-320.
68. Granja-Pérez, P.; Gamboa-Angulo, M. M.; Peña-Rodríguez, L. M. Identification of kaempferol-3-O- α -rhamnside as a biotransformation product of *Alternaria tagetica*. *Rev. Soc. Quim. Méx.* **1999**, 43, 188-191.
69. Shaw, P. D. In *Toxins in Plant disease: production and isolation*; Durbin, R. D. Ed. Academic Press: New York, 1981; pp 26-27.

70. Ali, N. A. A.; Jansen, R.; Pilgrim, H.; Liberra, K.; Lindequist, U. Hispolon, a yellow pigment from *Inonotus hispidus*. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 927-929
71. Bradburn, N.; Coker, R. D.; Blunden, G.; Turner, C. H.; Crabb, T. A. 5'-Epialetuene and neoaltenuene, dibenzo- α -pyrones from *Alternaria alternata* cultured on rice. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 665-669.
72. Lourenco, A.; Lobo, A.; Rodríguez, B. Jimeno, M. Ceramides from the fungus *Phellinus pinus*. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 135-140.
73. Arana López, G. Aislamiento de dos metabolitos e identificación del endoperóxido de ergosterol en el micelio de *Alternaria tagetica*. Tesis de Lic. Universidad Autónoma de Yucatán, México, 2000.
74. Tsantrizos, Y.; Ogilvie, K. K. Phytotoxic metabolites of *Phomopsis convolvulus*, a host-specific pathogen of field blindweed. *Can. J. Bot.* **1992**, *70*, 2276-2284.
75. Shome, S. K.; Mustafee, T. P. *Alternaria tagetica* sp. Nov. Causing blight of marigold (*Tagetis* sp.). *Curr. Sci.* **1966**, *35*, 370-371.
76. Silverstein, R. M.; Webster, F. X. In *Spectrometric Identification of Organic Compound*, 6th Ed.; John Wiley, New York, 1997.
77. Jackman, L. M.; Sternhell, S. In *Applications of nuclear magnetic resonance spectroscopy in Organic Chemistry*; second, Ed: Pergamon Press, 1969.
78. Ayer, W. A.; Jimenez, L. D. Phomalone, an antifungal metabolite of *Phoma etheridgei*. *Can. J. Bot.* **1994**, *72*, 2326-2332.
79. Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Horiuchi, M.; Morikawa, Y. Isolation and Identification of 6-(3'-3'-Dimethylallyloxy)-4-methoxy-5-methylphthalide from *Alternaria porri*. *Biosc. Biotech. Biochem.* **1992**, *56*, 986.
80. Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Morikawa, Y.; Nagamoto, S. Zinnimidine and 5-(3'-3'-Dimethylallyloxy)-7-methoxy-6-methylphthalide from *Alternaria porri*. *Phytochemistry*, **1995**, *38*, 495-497.
81. Fujita, M.; Yamada, M.; Nakajima, S.; Kawai, K.; Nagai, M. O-Methylation effect on the carbon-13 nuclear magnetic resonance signals of *ortho*-disubstituted phenols and its application to structure determination of new phthalides from *Aspergillus silvaticus*. *Chem. Pharm. Bull* **1984**, *32*, 2622-2627.
82. Ichihara, A.; Tazaki, H.; Sakamura, S. The structure of zinnolide, a new phytotoxin from *Alternaria solani*. *Agric. Bio. Chem.*, **1985**, *49*, 2811-2812.
83. Okamura, N.; Haraguchi, H.; Hashimoto, K.; Yagi, A. Altersolanol-related antimicrobial compounds from a strain of *Alternaria solani*. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1005-1009.
84. Suemitsu, R.; Horiuchi, M.; Kubota, M.; Okamatsu, T. Production of alterporriols, altersolanols and macrosporin by *Alternaria porri* and *A. solani*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1509-1511.
85. Sy, L.; Brown, G. D. Novel phenylpropanoids and lignans from *Illicium verum*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 987-992.

86. Ayer, W. A.; Browne, L. M.; Feng, M. C.; Orszanska, H.; Saeedi-Ghomi, H. The chemistry of the blue stain fungi. Part 1. Some metabolites of *Ceratocystis* species associated with mountain pine beetle infected lodgepole pine. *Can. J. Chem.* **1986**, *64*, 904-909.
87. Capasso, R.; Cristinzio, G.; Evidente, A.; Scognamiglio, F. Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 4125-4128.
88. Claydon, N.; Grove, J.F.; Pople, M. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 937-943.
89. Venkatasubbaiah, P.; Chilton, W. S. Phytotoxins of *Botryosphaeria obtusa*. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1628-1630.
90. Turner, W. B.; Aldridge, D. C. *Fungal Metabolites II*. Academic Press Inc.; London, 1983, pp. 8-11, 67-69.
91. Pouchert, C. J. *The Aldrich Library of Infrared Spectra*. Edition III; Aldrich Chemical Company, Inc.: U.S.A., 1981; 621.
92. Pouchert, C. J. *The Aldrich Library of NMR Spectra*. Edition II, Vol. 2; Aldrich Chemical Company, Inc.: U.S.A., 1983; 195.
93. Pridham, J. B.; Woodhead, S. The biosynthesis of melanin in *Alternaria*. *Phytochemistry*, **1977**, *16*, 903-906.
94. Tombari, D. G.; Moglioni, A. G.; Moltrasio-Iglesias, G.Y. Preparation of 2(2'-hydroximethyl-6'-methyl)-phenyletahnol. *Org. Prep. Proc. Inter. The New J. Org. Synt.* **1995**, *27*, 671-673.
95. Carey, F. A.; Sundberg, R. J. *Advanced Organic Chemistry. Part B: Reactions and Synthesis*; Plenum Press, 3er ed.: New York, 1990, pp. 219-270.
96. Hariprakash, H. K.; Subba Rao, G. S. R. Synthesis based on cyclohexadienes: Part 6-total synthesis of some naturally occurring phthalides from *Alternaria* species. *Indian J. Chem.* **1998**, *37B*, 851-856.
97. Ríos, M. Y. Aproximaciones sintéticas y correlaciones químicas de cicloductos diméricos derivados del Z-ligustilido. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, 1996.
98. Skeeane, R. W.; Goel, O. P. Convenient synthesis of 1,3-dihydro-1-oxo-4-isobenzofuranocarboxylic acid, 1,3-dihidro-3-oxo-4-isobenzofuranocarboxylic acid, and the homologous acetic acids. *Synthesis* **1990**, 628-630.
99. Van Maarschalkerwaart, D. A. H.; Willar, N. P., Pandit, U. K. Synthesis of carbohydrate containing crown ethers and their application as catalysts in asymmetric Michel additions. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 8825-8840.
100. Brison, B. J.; England, R.; Reza, K.; Sainsbury, M. Monofunctional chiral Crowns. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1103-1114.
101. Barash, I.; Mor, H.; Netzer, D.; Kashman, Y. Production of zinniol by *Alternaria dauci* and its phytotoxic effect on carrot. *Physiol. Plant Path.* **1981**, 7-19.
102. Pelletier, W. S.; Chokshi, H. P.; Desai, H.K. Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. *J. Nat. prod.* **1986**, *49*, 892-900.

103. Coll, P. C.; Bowden, B. F. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *J. Nat. prod.* **1986**, 49, 934-936.
104. Still, C.; Kahn, M.; Mitra, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* **1978**, 2923-2925.
105. Kim, S.; Chung, K. N.; Yang, S. Direct synthesis of ethers via zinc chloride mediated etherification of alcohols in dichloroethane. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 3917-3919.

Novel Dimeric Metabolites from *Alternaria tagetica*

M. Marcela Gamboa-Angulo,[†] Fátima Alejos-González,[†] Fabiola Escalante-Erosa,[†] Karolina García-Sosa,[†] Guillermo Delgado-Lamas,[†] and Luis M. Peña-Rodríguez^{*†}

Grupo de Química Orgánica, Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Apdo. Postal 87 Cordemex 97310, Mérida, Yucatán, México, and Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México D.F.

Received August 27, 1999

Two novel polyketides, *bis*-7-*O*-8''-8-*O*-7''- and *bis*-7-*O*-7''-8-*O*-8''-zinniol (2 and 3, respectively) were isolated from the organic crude extract of culture filtrates from *Alternaria tagetica*. Both structures were determined on the basis of their spectroscopic data (IR, MS, ¹H NMR, ¹³C NMR, and 2D NMR experiments) and confirmed by chemical synthesis. Zinniol (1) was isolated as a major component, and its ¹³C NMR data was correctly assigned after careful analysis of data from its 2D NMR experiments (HMOC and HMBC).

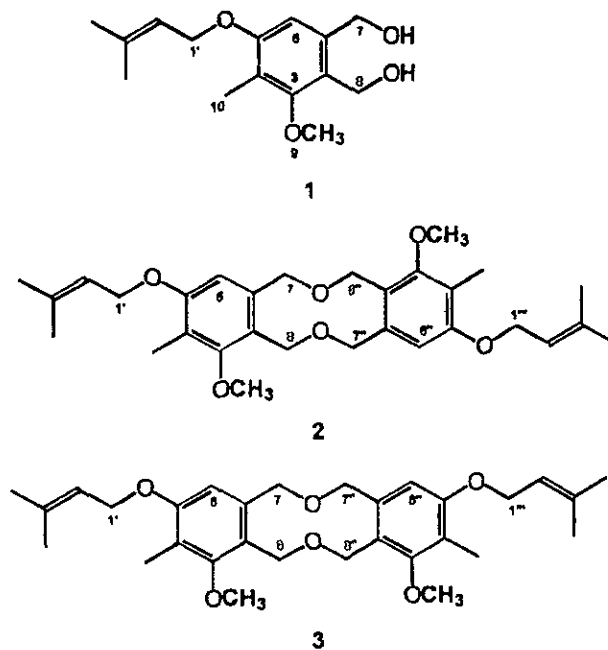
Among fungi, the *Alternaria* genus is known for the high pathogenicity of some of its members, including *A. mali*, *A. kikuchiana*, and *A. solani*, which infect apple, pear, and potato plants, respectively.¹ It has long been recognized that these and other phytopathogenic fungi produce phytotoxic metabolites that play a significant role during the infection process; these phytotoxins have been classified as host specific and non-host specific toxins (HSTs and non-HSTs, respectively), depending on whether they are considered to be essential or not for pathogenicity.² One of the most important applications of phytotoxins, both HSTs and non-HSTs, is their use as selection agents for the development of disease-resistant plant lines.^{1–3}

One *Alternaria* species that has not received much attention for its production of phytotoxic metabolites is *A. tagetica*, the causal agent of early blight in marigold (*Tagetes erecta*), an important economic crop in Mexico for the industrial production of xanthophyll pigments that are extracted from its flowers.¹ It has been reported that, under favorable conditions, *A. tagetica* can severely infect marigold plants causing losses of up to 100% in flower yields.^{4–5} Previous studies carried out on *A. tagetica* reported zinniol, a non-HST frequently isolated from *Alternaria* species,⁶ as one of the phytotoxic components present in the organic crude extract.⁷

As part of a study directed toward the detection, isolation, and identification of the phytotoxic metabolites produced by *A. tagetica* cultured in liquid medium, we report herein the purification and identification of two novel dimeric metabolites, *bis*-7-*O*-8''-8-*O*-7''- and *bis*-7-*O*-7''-8-*O*-8''-zinniol (2 and 3, respectively) and the correct assignment of the ¹³C NMR data for zinniol (1).

Results and Discussion

An initial solvent partitioning of the phytotoxic organic crude extract (necrotic area: 0.3 mm²) from cultures of *A. tagetica* yielded three crude fractions of increasing polarity. Testing of the fractions in the leaf-spot assay⁸ showed that the low polarity (hexane) fraction possessed the strongest phytotoxic activity (necrotic area: 0.41 mm²). A bioassay-guided purification of the low polarity fraction⁹ resulted in the isolation of a single phytotoxic (necrotic area: 0.7



mm²) metabolite identified as zinniol (1) by comparing its spectroscopic data with those reported in the literature.^{10–12} A careful analysis of both ¹H and ¹³C NMR data of 1, together with those from DEPT, HMOC, and HMBC experiments, allowed for the correct assignment of all carbons and protons of zinniol (Table 1). The three oxomethylene groups in 1 were easily detected from DEPT and HMOC analyses; a doublet at δ 4.52 showed a direct correlation with the carbon at 65.3 ppm, while two singlets at δ 4.68 and 4.76 were shown to be connected with carbons at 64.7 and 56.8 ppm, respectively. In the HMBC of 1, the long-range correlation (³*J*) observed between the aromatic proton (δ 6.68) and the carbons resonating at 124.7, 120.0, and 64.7 ppm, together with the ³*J* interactions observed between the methylene protons at δ 4.76 and the carbons at 158.2, 138.9, and 124.7 ppm, allowed the unequivocal assignment of the signal at 64.7 ppm to C-7 and that at 56.8 ppm to C-8. In view of these results, the remaining oxygen-bearing carbon at 65.3 ppm must correspond to the C-1' methylene. Similarly a ³*J* interaction between the C-7 oxomethylene protons (δ 4.68) and the carbon at 124.7 ppm,

* To whom correspondence should be addressed. Tel.: +52-9-981-3923. Fax: +52-9-981-39-00. E-mail: lmanuel@cicy.mx
[†] Grupo de Química Orgánica.
[‡] Instituto de Química.

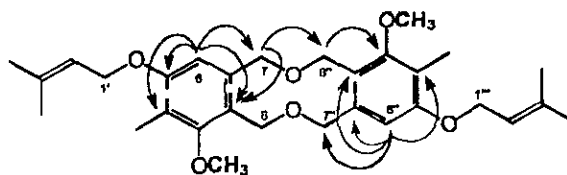
Table 1. ^{13}C and ^1H NMR (CDCl_3) Data for Compounds 1–3^{a,b}

position	1		2		3	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	138.9 s		135.1 s		140.1 s	
2	124.7 s		125.8 s		120.7 s	
3	158.2 s		158.5 s		158.4 s	
4	120.0 s		120.3 s		119.1 s	
5	157.7 s		157.5 s		158.2 s	
6	109.0 d 6.68 br s		109.6 d 6.67 br s		109.0 d 6.74 br s	
7	64.7 t 4.68 s		71.6 t 4.66 s		63.6 t 4.59 s	
8	56.8 t 1.76 s		56.8 t 1.67 s		64.1 t 4.73 s	
9	61.9 q 3.78 s		61.8 q 3.79 s		61.7 q 3.71 s	
10	9.2 q 2.16 s		9.2 q 2.15 s		9.2 q 2.15 s	
1'	65.3 t 4.52 br d (6.5)		65.4 t 4.52 br d (6.6)		65.3 t 4.52 br d (6.6)	
2'	119.9 d 5.49 m (6.5, 1.5)		119.9 d 5.48 m (6.6, 1.5)		119.9 d 5.48 m (6.6, 1.5)	
3'	137.6 s		137.5 s		137.6 s	
4'	25.8 q 1.8 s		25.7 q 1.79 s		25.8 q 1.78 s	
5'	18.2 q 1.74 s		18.2 q 1.75 s		18.2 q 1.73 s	
1''			140.2 s		140.1 s	
2''			120.6 s		120.7 s	
3''			158.5 s		158.4 s	
4''			119.1 s		119.4 s	
5''			158.3 s		158.2 s	
6''			108.9 d 6.76 br s		109.0 d 6.74 br s	
7''			63.1 t 4.61 s		63.6 t 4.59 s	
8''			63.9 t 4.71 s		64.1 t 4.73 s	
9''			61.8 q 3.7 s		61.7 q 3.71 s	
10''			9.2 q 2.15 s		9.2 q 2.15 s	
1'''			65.4 t 4.52 br d (6.6)		65.3 t 4.52 br d (6.6)	
2'''			119.9 d 5.48 m (6.6, 1.5)		119.9 d 5.48 m (6.6, 1.5)	
3'''			137.5 s		137.6 s	
4'''			25.7 q 1.79 s		25.8 q 1.78 s	
5'''			18.2 q 1.75 s		18.2 q 1.73 s	

^a Assignments were established by DEPT, HMQC, and HMBC spectra. ^b J values (in Hz) in parentheses.

together with a 2J interaction between the methyl group protons at 2.16 ppm and the carbon at 120.0 ppm, allowed for the correct assignment of the latter signal to C-4 and that at 124.7 ppm to C-2. These assignments, particularly that of the C-8 methylene in the ^{13}C NMR spectrum, differ from those previously reported for zinniol. The chemical shift values for C-8 and C-1' were originally reported at 65.3 and 56.6 ppm,¹¹ an assignment that can now be reversed on the basis of the results shown here. In a second report on the isolation of zinniol, chemical shift values were assigned by comparison with a model compound and shift calculations.¹² In this report, C-8 is assigned to the signal at 63.9 ppm; however, there was no signal reported with a chemical shift of 56–57 ppm. Because the identity of zinniol was reportedly confirmed by direct comparison with an authentic sample, it is difficult to explain the significant difference observed for the C-8 assignment and the absence of the signal at 56–57 ppm in the work described by these authors.

During the isolation of 1, a second, less polar and non-phytotoxic, metabolite was obtained in pure form. Both the IR and ^1H NMR spectra of the new metabolite showed significant similarities with those of 1, suggesting a related structure. The ^1H NMR of the new metabolite showed signals having chemical shifts almost identical to those of 1; however, while individual signals for the protons in the dimethylallyloxy chain were observed [δ 5.48 (H-2'), 4.52 (H-1'), 1.79 (Me-C-3') and 1.75 (Me-C-3')], the rest of them appeared duplicated (Table 1). The spectrum showed the presence of two aromatic protons at δ 6.67 and 6.76, two methoxy groups at δ 3.79 and 3.70, and two methyl groups at δ 2.16 and 2.15, in addition to four singlets at δ 4.71, 4.67, 4.66, and 4.61 corresponding to the same number of oxygen-bearing methylene groups. The presence of two

**Figure 1.** Selected HMBC correlations (H–C) observed for 2

aromatic rings in the structure of the new metabolite was confirmed by the 12 sp^2 carbon signals (10 quaternary and two tertiary) observed in the aromatic region of its ^{13}C NMR spectrum. These data, together with the molecular ion peak at m/z 496 ($\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_6$) observed in the EIMS of the new metabolite and the absence of hydroxyl group bands in its IR spectrum, suggested a dimeric structure in which two zinniol units are connected via ether linkages. A detailed analysis of the HMQC and HMBC experiments performed on the new metabolite allowed for the assignment of all the signals observed in the ^1H and ^{13}C NMR spectra and permitted the establishment of the linkage positions between the two units of zinniol. HMQC data showed that the methylene protons at δ 4.61, 4.66, 4.67, and 4.71 correlated with carbons at δ 63.4, 71.6, 56.8, and 63.9, respectively. Similarly, the aromatic protons at δ 6.67 and 6.76 were shown to be bonded to their corresponding sp^2 carbons at δ 109.6 and 108.9. In the HMBC of the new metabolite (Figure 1), the aromatic proton at δ 6.67 (H-6) showed long-range couplings with C-5 (157.5 ppm), C-4 (120.3 ppm), and C-2 (125.8 ppm), while the one at 6.76 (H-6'') showed similar correlations with C-7'' (63.4 ppm), C-5'' (158.3 ppm), C-4'' (119.4 ppm), and C-2'' (120.6 ppm). Finally, the long-range interaction through oxygen between the methylene protons at δ 4.66 (H-7) and the C-8'' signal at δ 63.9 ppm provided the evidence required to assign a C-7-O-C-8''/C-8-O-C-7'' ether linkage between the two zinniol units and to identify the new metabolite as *bis*-7-O-7''-8-O-8''-zinniol (2).

The EIMS of a third, non-phytotoxic, purified metabolite showed a parent ion peak (m/z 496) identical with that of 2, suggesting an isomeric structure for the two metabolites. Although a molecular weight of 496 corresponds to a molecular formula of $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_6$, both the ^1H and ^{13}C NMR spectra of the third metabolite showed signals corresponding to only 20 protons and 15 carbons, all with chemical shift values very similar to those of 1 (Table 1). These data suggested that the third metabolite was also a dimer, having two zinniol units bonded through two ether linkages, where the presence of one set of signals in both the ^1H and ^{13}C NMR spectra can be explained by a high symmetry in the molecule. The third metabolite was thus identified as *bis*-7-O-7''-8-O-8''-zinniol (3).

To confirm the structure of both metabolites, 1 was treated under Lewis acid (ZnCl_2)¹³ conditions. Both dimers (2 and 3) were formed, and, after purification, their spectroscopic data and their TLC and HPLC behavior proved to be identical to those observed for the natural products.

To rule out the possibility of 2 and 3 being artifacts formed as a result of the extraction and purification process, a careful HPLC analysis of all extracts and purified fractions was carried out. Both dimers were detected in both the original organic crude extract and the low polarity fraction obtained after the solvent partition procedure. Although 2 and 3 could not be detected in the lyophilized culture filtrate due to interference by other components, their presence was clearly observed in the organic extracts obtained after treatment of the filtrate with DIAION HP-

20 resin. These experiments provided enough evidence to establish the natural origin of the two novel metabolites.

Several metabolites structurally related to zinniol have been reported from *A. porri*,^{11,14-17} *A. solani*,^{18,19} and *A. cichorii*.¹² These include structures in which the primary alcohol groups have been oxidized and condensed into a lactone (e.g., 6-[3',3'-dimethylallyloxy]-4-methoxy-5-methylphthalide and zinnolide) or a lactam ring (e.g., zinnimidine and porritoxine), and others in which the isoprene side chain has been modified (e.g., homozinnol and zinnol) or lost (e.g., zinnol). Reports on the production of dimeric metabolites by *Alternaria* species are limited, with the best known example being the C-C linked alterporriolides.²⁰ However, 2 and 3 represent the first examples of zinnol dimers linked through an ether bond, similar to that reported in the literature for lignans from *Illicium verum*.²¹ Finally, the non-phytotoxic activity of 2 and 3 is in agreement with the existing reports that the hydroxymethyl groups are essential for the expression of biological activity.¹⁹

Experimental Section

General Experimental Procedures. IR spectra were measured on a FT-IR Nicolet Magna 750 or on a FT-IR Protege 460. EIMS were recorded at 70 eV on a JEOL-JMS-AX505HA mass spectrometer. GC analyses were performed on a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph under the following conditions: 0.5 μ L of sample; Ultra 1 column (Hewlett-Packard, cross-linked methyl silicone gum, 25 m long, 0.32 mm i.d., 0.52 μ m fill thickness); flow rate = 1 mL/min; temperature programs: (a) $T_1 = 180^\circ\text{C}$, $T_2 = 290^\circ\text{C}$; (b) $T_1 = 70^\circ\text{C}$, $T_2 = 290^\circ\text{C}$, gradient = $10^\circ\text{C}/\text{min}$. HPLC analyses were carried out using a Milton Roy CM-4000 series chromatograph equipped with a Milton Roy SM-4000 UV detector and a Milton Roy CS-4100 integrator. Conditions for HPLC analyses were as follows: Hypersil ODS C₁₈ column (Alltech, 5 micron, i.d. = 4.6 mm, length = 250 mm); gradient elution using MeCN (A) and H₂O (B) [Method a. A/B 10:90 to 90:10 (6 min.)], flow rate = 1 mL/min, UV detector set at 254 nm; and Method b: A/B 10:90 to 80:20 (12 min), flow rate = 1.5 mL/min, UV set at 220 nm]. NMR spectra were recorded on Varian Unity-300 and -500 spectrometers, at 300 and/or 500 MHz for ¹H and 75 or 125 MHz for ¹³C, using CDCl₃ as solvent and tetramethylsilane (TMS) as internal standard. Two-dimensional NMR experiments (DEPT, HMQC, and HMBC) were obtained on a Varian Unity-500 instrument. Industrial-grade solvents were glass-distilled in the laboratory prior to use. Flash column and vacuum liquid chromatography (VLC) purifications were carried out using Si gel (200–400 mesh and TLC grade, respectively) from Aldrich Chemical Co. Preparative TLC purifications were performed on E. M. Merck glass-coated Si gel plates (GF254, 20 × 20 mm, 0.25 mm thickness).

Fungal Material. The strain of *A. tagetica* Shome and Mustafee (ATCC 58771) was maintained on V-8 juice agar (V8A) slant tubes, kept in the dark at 4 °C. The tubes were used to inoculate V8A-containing Petri dishes, on which the fungus was allowed to grow for 15 days at 26 °C, under 16/8 h of light/darkness conditions. A spore suspension (1 mL), prepared by adding 5 mL of sterile distilled water to a Petri dish, was used to inoculate 1 L of a liquid culture medium consisting of casamino acid enriched with marigold infusion (20 g of leaves/L of medium), and the fungus was cultured under stationary conditions for 28 days at 26 °C, under natural light (diurnal cycle).

Extraction and Isolation. The mycelial mat was separated from the culture filtrate by filtration through two

layers of cheesecloth. The aqueous filtrate was extracted with EtOAc (× 3, 1:1, v:v) and the resulting organic layer concentrated under reduced pressure to yield the organic crude extract (ca. 0.29 g/L). A suspension of the organic crude extract (ca. 29 g) in H₂O/MeOH 9:1 (ca. 100 mL of solution/300 mg of extract) was successively partitioned between hexane (× 3, 1:1, v:v) and EtOAc (× 3, 1:1, v:v), yielding the corresponding low (5.2 g) and medium (16.0 g) polarity fractions, respectively. VLC purification of the low polarity fraction, using a stepwise gradient elution (hexane/acetone, 98:2–100%, 13 fractions) yielded 1 (fractions 11–12, 500 mg) as yellow oil. Fraction 10 (662 mg) was further purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/acetone/MeOH, 95:3:2) to produce several fractions, one of which contained 2 (15.7 mg) in pure form. Pure 3 (20 mg) was obtained by preparative TLC (CH₂Cl₂/acetone, 95:5, × 3) purification.

Phytotoxicity Evaluation. Aqueous filtrates, before and after extraction, together with the corresponding organic and mycelium extracts, as well as crude and purified fractions, were tested for phytotoxic activity using the leaf-spot assay⁸ on marigold leaves (0.2 mg/application).

Zinniol (1): yellow oil; R_f 0.22 (CH₂Cl₂/acetone/MeOH, 95:3:2); t_R (HPLC, Method a) 11.02 min; t_R (GC, method a) 10.09 min; t_R (GC, method b) 23.41 min; identified by comparison of spectroscopic data with those reported in the literature.^{8,9} For the corrected assignments of the ¹³C NMR data, see Table 1.

bis-7-O-8''-8-O-7'' Zinniol (2): white solid; R_f 0.33 (CH₂Cl₂/acetone/MeOH, 95:3:2); t_R (HPLC, method a) 14.63 min; t_R (GC, method a) 9.69 min; t_R (GC, method b) 23.38 min; IR (film) ν_{max} 3000, 2940, 1610, and 1120 cm⁻¹; HREIMS m/z 496.2790 (calcd for C₃₀H₄₀O₆, 496.2825); LREIMS (70 eV) m/z 496 (M⁺, 1.0), 428 (M⁺ - 68, 3), 410 (5), 360 (5), 342 (12), 249 (10), 181 (100), 164 (12), 69 (22); ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1.

bis-7-O-7''-8-O-8'' Zinniol (3): white solid; R_f 0.44 (CH₂Cl₂/acetone/MeOH, 95:3:2); t_R (HPLC, method a) 14.24 min; t_R (GC, method a) 9.69 min; t_R (GC, method b) 23.38 min; IR (CHCl₃) ν_{max} 3000, 2940, 1610 and 1120 cm⁻¹; EIMS (70 eV) m/z 496 (M⁺, 14), 428 (M⁺ - 68, 10), 360 (6), 342 (24), 248 (14), 181 (100), 164 (55), 69 (52); ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1.

Preparation of 2 and 3. Hydrated ZnCl₂ (42 mg, Aldrich Chemical Co.) was added to a solution of 1 (23 mg, 0.086 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 66 h, quenched with water, and extracted with CH₂Cl₂. The organic solvent was evaporated and the resulting crude reaction product purified by flash column chromatography, using stepwise elution with CH₂Cl₂/acetone (97.5:2.5 and 95:5), to produce 2 (2.5 mg) and 3 (0.5 mg) in pure form.

Acknowledgment. We thank Isabel Chávez, Hector Ríos, Beatriz Quiroz, Rocío Patiño, Luis Velasco-Ibarra, and Javier Pérez-Flores (Instituto de Química, UNAM) for recording the NMR, IR, and MS spectra and Ileana Borges-Argáez (CICY) for her assistance in the initial microbiological work. Financial support for the project, through grants from PADEP-UNAM (Nos. 5356 and 5370) and CONACyT (4871-E9406), is also greatly appreciated. M.M.G.A. wishes to thank CONACyT for a graduate student fellowship.

References and Notes

- Templeton, G. E. In *Microbial Toxins VIII. Fungal Toxins*; Kadis, S., Ciegler, A., Ajl, S. J., Eds.; Academic: New York, 1972; Chapter 7, pp 169–192.
- Scheffer, R. P.; Briggs, S. P. In *Toxins In Plant Disease*; Durbin, R. D., Ed.; Academic: New York, 1981; Chapter 2, pp 1–17.

- (3) Macko, V. In *Toxins and Plant Pathogenesis*. Daly, J. M., Deverall, B. J. Eds.; Academic: New York 1983, p 11-74.
- (4) Garcia Aguirre, A.; Oviedo Zarate, A.; Ramirez Ramirez, R.; Vazquez Gomez, A. *Cultivo de la flor de Cempazucitl*. Laboratorios Bioquimex S. A. de C. V., Mexico 1992, p 7.
- (5) Hotchkiss, E. S.; Baxter, L. W. *Plant Dis* 1983, 67, 1288-1290.
- (6) Cotty P. J., Mishagi, I. J. *Phytopathology* 1984, 71, 785-788.
- (7) Cotty P. J., Mishagi, I. J.; Hine, R. B. *Phytopathology* 1983, 73, 1326-1328.
- (8) Pena-Rodriguez, L. M.; Armington, N. A.; Chilton, W. S. *J. Nat. Prod.* 1988, 51, 821-828.
- (9) Weaker activity was detected in other purified fractions, as well as in the medium polarity fraction (ethyl acetate). Isolation of the metabolites responsible for the activity observed is currently in progress; their structures will be published elsewhere.
- (10) Starratt, A. N. *Can. J. Chem.* 1968, 46, 767-770.
- (11) Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Horiuchi, M.; Kitagawa, A.; Odamura, K. *Phytochemistry* 1992, 31, 2325-2326.
- (12) Suerle, A.; Hershenhorn, J.; Strobel, G. *Phytochemistry* 1993, 32, 1145-1149.
- (13) Kim, S.; Chung, K. N.; Yang, S. *J. Org. Chem.* 1987, 52, 3917-3919.
- (14) Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Horiuchi, M.; Morikawa, Y. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1992, 56, 986.
- (15) Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Horiuchi, M.; Morikawa, Y.; Sakaki, Y.; Matsumoto, Y. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1993, 57, 334-335.
- (16) Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Morikawa, Y.; Ideguchi, I.; Uno, H. *Phytochemistry* 1994, 35, 603-605.
- (17) Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Morikawa, Y.; Nagamoto, S. *Phytochemistry* 1995, 38, 495-497.
- (18) Ichihara, A.; Tazaki, H.; Sakamura, S. *Agric. Bio. Chem.* 1985, 49, 2811-2812.
- (19) Gamboa-Angulo, M. M.; Alejos-González, F.; Peña-Rodriguez, L. M. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 282-285.
- (20) Suemitsu, R.; Horiuchi, K.; Kubota, M.; Okamoto, T. *Phytochemistry* 1990, 29, 1509-1511.
- (21) Sy, L.; Brown, C. D. *J. Nat. Prod.* 1998, 61, 987-992.

NP990422Q

**TAGETOLONE AND TAGETENOLONE, TWO PHYTOTOXIC POLYKETIDES
FROM *ALTERNARIA TAGETICA*¹**

M. Marcela Gamboa-Angulo[†], Karlina García-Sosa[†], Fátima Alejos-González[†], Fabiola Escalante-Erosa[†], Guillermo Delgado-Lamas[‡] and Luis M. Peña-Rodríguez^{†*}

[†]Grupo de Química Orgánica, Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná, Mérida, Yucatán, México 97200 and [‡]Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México D.F.

Running Head: Phytotoxins from *Alternaria*.

* Author to whom correspondance should be addressed. Tel.: +52-99-81-3923;
Fax: +52-99-81-39-00; e-mail: lmanuel@cicy.mx

ABSTRACT

Two new phytotoxic polyketides, tagetolone (1) and tagetenolone (2), in addition to tyrosol (3) and *p*-hydroxybenzoic acid (4), have been isolated from the organic crude extract of culture filtrates from *Alternaria tagetica*. Complete characterization of all structures was carried out following a careful analysis of their spectroscopic data (IR, MS, ¹H and ¹³C NMR and 2D NMR experiments).

Keywords: *Alternaria tagetica*; *Tagetes erecta*; *marigold*; *tagetolone*; *tagetenolone*; *tyrosol*; *p-hydroxybenzoic acid*.

INTRODUCTION

The fungal pathogen *Alternaria tagetica* severely infects marigold (*Tagetes erecta* L.) plants, causing necrotic spots on leaves, stems and petals and, in some cases, plant death (Hotchkiss and Baxter, 1983).

As part of our search for the bioactive metabolites produced by *A. tagetica*, we have previously reported the isolation and identification of the non-host specific toxin zinniol and two new dimeric non-phytotoxic metabolites, *bis-7-O-7".8-O-8"* and *bis-7-O-8".8-O-7"-zinniol* (Gamboa-Angulo *et al.*, 2000). While these metabolites were obtained from a low polarity (hexane) fraction resulting from a solvent partition of the original crude extract, testing the medium polarity fraction (ethyl acetate) in the leaf spot assay produced necrotic damage which gave a clear indication of the presence of a second group of phytotoxic metabolites biosynthesized by *A. tagetica*. We report here the bioassay-guided purification of the medium polarity fraction and the identification of the phytotoxic metabolites tagetolone (1), tagetenolone (2) and tyrosol (3), in addition to a fourth, non-phytotoxic, metabolite identified as *p*-hydroxybenzoic acid (4).

MATERIALS AND METHODS

UV-spectra were determined in a DU-65 Beckman UV/VIS spectrophotometer using MeOH as solvent. IR spectra were measured using a FT-IR Nicolet Magna 750 or a FT-IR Protege 460. HR and LREIMS were recorded at 70 eV on a JEOL-JMS-SX102A mass spectrometer. GC-MS analyses were performed on a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph coupled to a Hewlett-Packard 5971A mass selective detector. Conditions for GC analyses were as follows: 0.5 μ L of sample, Ultra 1 column (Hewlett-Packard, cross-linked methyl silicone gum, 25 m long, 0.32 mm i.d., 0.52 μ m fill thickness), flow rate = 1 mL/min, temperature programs: a) $T_1 = 150$ °C, $T_2 = 290$ °C, b) $T_1 = 70$ °C, $T_2 = 290$ °C, gradient = 10 °C/min. NMR spectra were recorded on Varian Unity-300, Bruker AMX-400 and Varian Unity Plus-500 spectrometers, at 300, 400 and/or 500 MHz for ^1H and 75, 100 or 125 MHz for ^{13}C , using CDCl_3 or $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) as solvents and tetramethylsilane (TMS; Aldrich) as internal standard. Industrial-grade solvents were glass-distilled in the laboratory prior to use. Flash column (flash CC) and vacuum liquid chromatography (VLC) purifications were carried out using silica gel (200-400 mesh and TLC grade, respectively) from Aldrich Chemical Co. Preparative TLC purifications were performed on Macherey-Nagel silica gel (Germany) aluminofolium (GF₂₅₄, 20 x 20 mm, 0.20 mm thickness) and/or E.M. Merck (Darmstadt, Germany) glass-coated silica gel plates (GF₂₅₄, 20 x 20 mm, 0.25 mm thickness).

Cultures of the fungus were maintained, grown (160 L), harvested, extracted and the organic crude extract partitioned, as described previously (Gamboa-Angulo, *et al.*, 2000). All fractions were tested for phytotoxic activity using the leaf-spot assay on marigold leaves, following a procedure described previously (Peña-Rodríguez, *et al.*, 1988).

The phytotoxic medium polarity (ethyl acetate) fraction (35 g) was purified by VLC using a stepwise gradient elution with hexane/ethyl acetate/acetone mixtures, which resulted in fractions A to M. Leaf-spot assay evaluation of all fractions indicated that phytotoxic activity was located in fractions D, E, F and G.

Isolation of Tagetolone (1). Successive VLC (dichloromethane/acetone mixtures in stepwise elution), and preparative TLC (dichloromethane/acetone/acetic acid 95:5:1, 2x) bioassay-guided purifications of fraction D (2.14 g) led to the obtention of **1** (1.7 mg/L) in pure form. TLC: R_f 0.48 dichloromethane/acetone/acetic acid 95:5:1 (2x); 0.2 hexane/ethyl acetate 8:2 (2x); GC: R_t 13.02 min (a conditions); IR (CHCl₃): 3602 (OH, free), 3400 (OH, bonded), 2972, 2935 (C-H), 1699 (C=O), 1257 (C-O), 1089 (C-O-C) cm⁻¹; LREIMS m/z (rel. int. %): 280 [M]⁺ (30), 262 [M⁺-H₂O] (10), 236 [M⁺-C₂H₄O]⁺ (38), 193 (10), 165 [M⁺-C₆H₁₁O₂]⁺ (100), 152 (15), 135 (90), 107 (8), 91(10), 45 (10); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 6.42 (1H, s, H-6), 4.18 (1H, m, H-12), 3.67 (3H, s, H-15), 2.83 (2H, m, H-8a, H-9), 2.64 (1H, dd, J = 18, 2.7 Hz, H-8b), 2.41 (1H, dd, J = 18, 8.7 Hz, H-11b), 2.20 (3H, s, H-7), 2.14 (3H, s, H-16), 1.16 (3H, d, J = 6 Hz, H-13), 1.04 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-14) ppm.

Tagetolone diacetate (1a). A mixture of **1** (19.5 mg), acetic anhydride (0.5 mL) and pyridine (0.2 mL) was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was worked up in the usual manner to produce the crude acetylated product which, after preparative TLC (hexane/ethyl acetate 8:2, 2x) purification, yielded **1a** (14 mg) in pure form. TLC: R_f 0.5 hexane/ethyl acetate 8:2 (2x); GC: R_t 15.01 min (a conditions). IR (CHCl₃) 3032 (Ar-H), 2982, 2931 (C-H), 1741 (COOR), 1234 (C-O), 1079 (C-O-C) cm⁻¹;

1 HREIMS m/z 364.1883 (calcd for $C_{20}H_{28}O_6$, 364.1886); LREIMS, m/z (rel. int. %) 364
2 $[M]^-$ (10), 322 $[M^+ - C_2H_2O]^+$ (10), 304 $[M^+ - AcOH]^+$ (20), 286 (30), 262 $[M^+ - AcOH -$
3 $C_2H_2O]^+$ (25), 245 $[M^+ - 2 AcOH + H]^+$ (25), 193 (17), 166 (100); 1H NMR (500 MHz,
4 $CDCl_3$) 6.64 (1H, s, H-6), 5.26 (1H, m, H-12), 3.69 (3H, s, H-15), 2.88 (2H, m, H-8a, H-9),
5 2.79 (1H, dd, $J = 18.5, 7$ Hz, H-11a), 2.59 (1H, dd, $J = 15.5, 10$ Hz, H-8b), 2.42 (1H, dd, $J =$
6 16.5, 6 Hz, H-11b), 2.30 (3H, s, $C_{12}-CH_3$), 2.25 (3H, s, H-7), 2.07 (3H, s, H-16), 1.98 (3H,
7 s, C_5-CH_3), 1.20 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-13), 1.04 (3H, d, $J = 7$ Hz, H-14) ppm; ^{13}C NMR
8 ($CDCl_3$, 125 MHz) 211.3 (C=O), 170.2 (C_5-COOR), 169.2 (C-12-COOR), 158.0 (C-3),
9 148.3 (C-5), 135.7 (C-1), 129.2 (C-2), 121.2 (C-4), 119.5 (C-6), 67.2 (C-12), 60.3 (C-15),
10 47.6 (C-11), 46.6 (C-9), 29.7 (C-8), 21.2 (C_5-CH_3), 20.8 ($C_{12}-CH_3$), 19.9 (C-7, C-13), 15.9
11 (C-14), 9.7 (C-16) ppm.

12
13
14 **Isolation of Tagetenolone (2).** Successive VLC (gradient elution,
15 dichloromethane/acetone) and flash CC (1 cm diameter, hexane/acetone/methanol 75:20:5)
16 purifications of fraction G (3.61 g) afforded **2** (1.17 mg/L) as a single metabolite. TLC: R_f
17 0.47 hexane/acetone/methanol 60:35:5, 0.57 dichloromethane/ethyl acetate/methanol
18 80:18:2; GC: R_t 13.02 min (a conditions); UV (methanol) λ_{max} (log ϵ): 297 (3.2), 266 (3.2),
19 233 (3.3) nm; IR ($CHCl_3$): 3600 (OH, free), 3359 (OH, bonded), 2965, 2933 (C-H), 1610
20 (C=C), 1593 (HO-C=C-C=O), 1103 (C-O-C), 1012 (C-O) cm^{-1} ; HREIMS m/z 294.1383
21 (calcd for $C_{16}H_{22}O_5$, 294.1467); LREIMS m/z (rel. Int. %) 294 $[M]^+$ (12), 276 $[M^+ - H_2O]$
22 (18), 259 $[M^+ - 2 H_2O + H]^+$ (22), 240 (8), 207 (17), 192 (30), 181 $[M^+ - C_6H_9O_2]^+$ (100),
23 165 (23), 151 (22), 136 (12), 91(8), 64 (12); 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) 6.68 (1H, s, H-6),
24 5.44 (1H, m, H-11), 4.65 (1H, d, $J = 12.5$ Hz, H-7), 4.54 (1H, d, $J = 12.5$ Hz, H-7), 3.69 (3H,

s, H-15), 2.92 (2H, dd, $J=13.3, 6.3$ Hz, H-8a), 2.8 (1H, q, $J=7$ Hz, H-9), 2.67 (1H, dd, $J=13.2, 7.2$ Hz, H-8b), 2.16 (3H, s, H-16), 2.00 (3H, s, H-13), 1.12 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-14), 1.04 (3H, d, $J=7$ Hz, H-14) ppm; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) 199.4 (C=O), 190.8 (C-12), 158.7 (C-3), 154.0 (C-5), 138.0 (C-1), 122.6 (C-2), 117.5 (C-4), 111.4 (C-6), 99.5 (C-11), 63.0 (C-7), 60.5 (C-15), 43.6 (C-9), 30.4 (C-8), 24.8 (C-13), 17.8 (C-14), 9.4 (C-16) ppm.

Isolation of Tyrosol (3). Successive flash CC purifications (5, 3 and 2 cm diameter, using hexane/acetone/methanol 75:23:2, dichloromethane/methanol 97:3, and hexane/ethyl acetate/acetone 60:38:2, respectively) of fraction E (2.41 g) yielded **3** (4-hydroxyphenylethanol, 1.13 mg/L) as a single component. TLC: R_f 0.37 dichloromethane/acetone/methanol, 75:23:2; GC: R_t 12.45 min (b conditions); IR, EIMS, ^1H and ^{13}C NMR data were in agreement with those reported in the literature (Ayer, *et al.*, 1985; Capasso, *et al.*, 1992).

Isolation of *p*-hydroxybenzoic acid (4). Fraction F (2.39 g) was purified by flash CC (2 cm diameter, hexane/ethyl acetate/ethanol 75:20:5) to produce *p*-hydroxybenzoic acid (**4**, 0.54 mg/L) as a white solid. TLC: R_f 0.22 dichloromethane/acetone/methanol 75:23:2. Spectroscopic data were in agreement with those reported in the literature (Pouchert, 1981; Pouchert, 1983).

RESULTS AND DISCUSSION

Bioassay-guided purification of the medium polarity (ethyl acetate) fraction, resulting from the partition of the phytotoxic organic crude extract of *A. tagetica*, led to the isolation of metabolites **1-4**. The least polar and phytotoxic (necrotic area: 0.22 mm², 0:05

mg/application) metabolite **1** was obtained as a yellow oil after successive VLC and preparative TLC purifications. The IR spectrum of **1** showed the presence of a characteristic ketone carbonyl band at 1699 cm^{-1} , in addition to typical absorption bands for hydroxyl groups (free and hydrogen-bonded at 3602 and 3400 cm^{-1} , respectively), aromatic double bonds (1612 and 1589 , and 1458 cm^{-1}) and ether groups (1089 cm^{-1}). The EIMS spectra of **1** showed a molecular ion peak at m/z 280, which suggested a molecular formula of $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4$ and indicated five unsaturation sites in the structure of **1**. The ^1H NMR spectrum of **1** displayed some striking similarities with that of zinniol; a one proton singlet at 6.41 ppm and two three-proton singlets at 3.67 and 2.14 ppm confirmed the presence of the pentasubstituted aromatic ring, a methoxyl and methyl groups as substituents. However, the ^1H NMR spectrum of **1** did not show the typical signals for the dimethylallyloxy chain or the benzylic methylene groups presents in the structure of zinniol. Instead, an additional three-proton singlet at 2.2 ppm in the ^1H NMR spectra of **1** indicated that a third substituent in the aromatic ring was a second methyl group. An aromatic ring and a ketone carbonyl group accounted for the five unsaturations sites implied from the molecular formula of **1**.

Treatment of **1** under acetylating conditions produced **1a** whose ^1H NMR spectrum showed two new three-proton singlets at 1.98 and 2.30 ppm. While the lower field value of the latter signal is characteristic of the methyl group of an acetylated phenolic hydroxyl group, the chemical shift of the former suggested an acetylated secondary alcohol. Presence of a secondary alcohol in the structure of **1** was confirmed by the downfield shift (to 5.26 ppm),

experienced by a carbinol proton multiplet signal at 4.18 ppm in the ^1H NMR of **1**. The EIMS spectrum of **1a** showed a molecular ion peak at m/z 364 and significant fragments at m/z 322 and 262 due to the loss of a $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ and a $[\text{AcOH} + \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]$ unit, respectively; thus confirming the presence of two acetylated hydroxyl groups in its structure. These data supported a phenolic hydroxyl group as the fourth substituent in the aromatic ring of **1**.

The ^{13}C NMR data of **1a** showed the expected signals for all 20 carbons of the structure. They were identified as seven methyl groups (two acetyl, one aryl methyl ether, two on sp^2 -carbons and two on sp^3 -carbons), two methylene groups, three methine groups (two sp^3 -carbons and one aromatic carbon), and eight carbons not bonded to hydrogen (five aromatic, two ester carbonyls and one ketone carbonyl). Complete characterization of **1** could be achieved by a detailed analysis of the data from ^1H - ^1H COSY, ^{13}C NMR, DEPT, HMQC and HMBC experiments of **1a** (Table 1). The ^1H - ^1H -COSY showed the presence of two isolated spin systems; in one the oxygenated methine (m, 5.26 ppm) showed a correlation to both the methyl group at 1.2 ppm (d, $J=6.5$ Hz) and the methylene protons at 2.79 and 2.42 ppm (dd, $J=18.5, 7$ and $16.5, 6$ Hz, respectively), and in the other a correlation between protons at 2.59 and 2.88 ppm (dd, $J=15.5, 10$ Hz and m, respectively) was observed together with that of the 2.88 ppm proton with the methyl group at 1.04 (d, 7 Hz) ppm. On the basis of these results, the isolated systems could be identified as $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$ and $\text{-CH}_2\text{-CH-(CH}_3\text{)-}$.

Long-range correlations (2J), observed in the HMBC experiment of **1a**, between the methylene protons at 2.79 and 2.42 ppm and the carbons at 211.3 (C-10) and 67.2 ppm (C-11) indicated that the $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-CH}_2$ fragment was linked to the carbonyl carbon.

Similarly, the 2J correlations shown between a methylene proton at 2.59 ppm and carbons at 129.2 (C-2) and 46.6 (C-9) ppm, together with 3J correlations between the carbonyl carbon (211.3, C-10) and two aromatic carbons at 158 (C-3) and 135.7 (C-1) ppm suggested that the $-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)-$ fragment was the bridge between the ketone and the aromatic ring. This allowed the identification of a 2-methyl-5-acetoxy-3-hexanone side chain as the fifth substituent in the aromatic ring. The alkyl chain justifies the presence a base peak fragment at m/z 165 [$\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2$] in the EIMS spectra of both **1** and **1a**, which can be explained by the partial loss of the side chain from the molecular ion.

That the arrangement of the substituents in the aromatic ring of **1** (Figure 1) was similar to that of zinniol, was again confirmed by the long-range correlations observed between the aromatic proton (6.64 ppm) and both the methyl group carbon at 19.9 ppm (C-7) and the oxygen bearing carbon at 148.3 ppm (C-5). With the methyl and methoxyl groups occupying positions as in zinniol (C-4 and C-3, respectively), the alkyl residue must occupy the remaining C-1' position. On this basis, **1** can be identified as 5-hydroxy-1-[4'-hydroxy-2'-methoxy-3',6'-dimethyl-phenyl]-2-methyl-hexan-3-one to which we have given the trivial name tagetolone.

Phytotoxin **2** produced a necrotic area (0.92 mm²) when tested (0.1 mg/application) on marigold leaves. Its IR spectrum showed absorptions for hydroxyl, phenyl and ether groups (3359, 3010 and 1104 cm⁻¹, respectively) but no carbonyl bands. The EIMS spectrum of **2** showed a molecular ion peak at m/z 294 [M^+] which was confirmed by a positive FAB experiment. This suggested a molecular formula of $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_5$, indicating six unsaturation sites.

The ^1H NMR and ^{13}C NMR data of **2**, together with the results from 2D-NMR experiments (^1H - ^1H COSY, DEPT, HMQC and HMBC) showed that **2** was structurally related to **1**. The ^1H NMR spectrum of **2** showed the presence of an aromatic proton at 6.68 ppm, a methoxyl group at 3.69 ppm and three methyl groups at 2.16, 2.00 and 1.12 ppm, in addition to proton signals at 2.92, 2.67 and 2.80 ppm, corresponding to a $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$ fragment. These data strongly suggested that **2** had a similarly substituted aromatic nucleus as **1**.

The main structural differences between **2** and **1** were given by the nature of the substituents at C-1 and C-2. The low field region of the ^1H NMR spectrum of **2** showed a one proton singlet at 5.44 ppm and two doublets (4.65 and 4.54 ppm, $J=12.5$ Hz, 1H ea) of an AB quartet spin system. These signals were assigned to one vinylic proton and an oxygenated methylene, respectively. The presence of a primary alcohol in the structure of **2** was confirmed by the signal at 63 ppm in its ^{13}C NMR.

The C-1 location of the primary alcohol in the structure of **2** was determined by the long-range correlations observed in the HMBC experiment between the oxygenated methylene protons and the carbon signals at 138, 122.6, and 111.4 ppm (C-1, C-2 and C-6, respectively).

The ^{13}C NMR spectrum of **2** showed the expected 16 carbon signals, including two quaternary carbons at 199.4 and 190.8 ppm suggesting the presence of two ketone carbonyl groups. Although the possibility of a β -diketone was suggested by the UV spectrum of **2**

(266 and 297 nm), its IR spectrum did not show an absorption in the carbonyl region. However, the absorption band at 1593 cm^{-1} indicated the presence of a 1,3-keto-enol system; β -diketones and their enol forms exist as tautomers, where the latter predominates and presents an intense absorption at $1640\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$ in the IR (Silverstein, *et al.*, 1997).

Additional evidence to support the existence of a 1,3-keto-enol system in the structure of **2**, was given by the long-range correlations observed in its HMBC experiment; the vinylic proton at 5.44 ppm showed 2J interactions with the quaternary carbon signals at 199.4 (C-10) and 190.8 (C-12) ppm. The 2J interaction between the methyl group protons at 2 ppm and the C-12 carbon at 190.8 ppm, and a comparison of the side chain data of **2** with that of **1**, allowed for its identification and attachment to the C-2 position. On the basis of this data **2** can be described as 5-hydroxy-1-(4'-hydroxy-6'-hydroxymethyl-2'-methoxy-3'-methylphenyl)-2-methyl-hex-4-en-3-one, a new metabolite to which we have given the trivial name tagetenolone.

A third, highly phytotoxic metabolite (necrosis: 1.07 mm^2 at $0.1\text{ mg/application}$) was obtained (1.13 mg/L) as a dark brown oil and identified as tyrosol (**3**) by comparing its spectroscopic data (IR, MS, ^1H and ^{13}C NMR) with those reported in the literature (Ayer, *et al.*, 1985; Capasso, *et al.*, 1992). Tyrosol is a primary metabolite with phytotoxic and antifeeding activities, commonly encountered in fungal cultures (Claydon, *et al.*, 1985; Venkatasubbaiah and Chilton, 1990; Turner, 1983). A fourth, non-phytotoxic, metabolite, isolated in a yield of 0.54 mg/L , was identified as *p*-hydroxybenzoic acid (**4**) by means of spectroscopic data (IR, EIMS, ^1H and ^{13}C NMR; Pouchert, 1981; 1983).

Although a number of metabolites structurally-related to zinniol have been reported, only a few lack the dimethylallyloxy side chain; these include zinnol, cichorine (Sterlie, *et al.*, 1993), silvaticol, *O*-methylsilvaticol, nidulol (Fujita, *et al.*, 1984; Suemitsu, *et al.*, 1993) and several orsellinic acid derivatives (Turner, 1983). To date, metabolites structurally-related to zinniol without one or both of the oxygenated benzylic methylenes, or where one of the oxygenated methylenes is substituted by an alkyl side chain, have not been reported. Still, it is interesting to point out that ascolitoxin, a phytotoxin produced by *Ascochyta pisi* (Evidente *et al.*, 1993), shows a very similar substitution pattern of the aromatic ring as that of zinniol, including a benzyl-aldehyde and an oxoalkyl side chain as substituents. Similarly, the 1,3-keto-enol system present in the side chain of **2** can also be found in the chemical structure of host specific phytotoxins belonging to the ACRL and ACTG group (Gardner, *et al.*, 1985; Kono, *et al.*, 1985, 1986), in alternaric acid and its derivatives (Tabuhi and Ichihara, 1994), in hispolon, a yellow pigment identified from the mycelium of *Inonotus hispidus* (Ali, *et al.*, 1996); and in some diarylheptanoids isolated from plants of the *Alpinia* genus (Dong, *et al.*, 1998; Yang, *et al.*, 1999).

Biosynthetic studies carried out on zinniol (Stoessl, *et al.*, 1983) established its tetraketide origin, with the initial acetate unit located at the hydroxymethyl group C-7. Taking into account the structural similarity of **1** and **2** with zinniol, and the oxygenated sequence of the side chain at C-2, it can be argued that both **1** and **2** also have a poliketide origin, and that they are constituted by six acetate unit as proposed in Figure 2. The presence of **3** and **4**, both metabolites from the shikimic acid pathway, suggest that *A. tagetica* has the capacity to use this route for the production of phytotoxic metabolites. Therefore, it is possible that some secondary metabolites from the shikimate pathway might be reported from *A.*

tagetica in the future.

The bioassay-guided isolation and identification of metabolites **1-4** as natural products produced by *Alternaria tagetica* is reported. Tagetolone and tagetenolone (**1**, **2**) proved to be two new phytotoxins structurally-related to zinniol. This is the first report of zinniol derivatives without the dimethylallyloxy side chain and having an alkyl side chain instead of an oxygenated benzylic methylene. Even though there are reports of 1,3-keto-enol systems in some metabolites produced by several *Alternaria* species (Gardner, *et al.*, 1985; Kono, *et al.*, 1986; Tabuchi and Ichihara, 1994), the identification of **1** and **2** is the first report of an open chain 1,3-ketol and 1,3-keto-enol systems, respectively. Finally, even though **3** was significantly more phytotoxic than **1** and **2**, its activity was weaker in comparison with that of zinniol (5.8 mm², 0.1 mg/application).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Isabel Chávez, Beatriz Quiroz, Héctor Ríos, Rocío Patiño, Luis Velasco-Ibarra and Javier Pérez-Flores (Instituto de Química, UNAM) and Dr. Peter Waterman (University of Strathclyde, Glasgow) for recording NMR, IR and MS spectra and Mirbella Cáceres-Farfán (CICY) for technical assistance.

LITERATURE CITED

¹ This work represents part of the Ph. D. Thesis that will be submitted to the Graduate School of Chemistry, UNAM, by M.M.G.A.

Ali, N.A.A.; Jansen, R.; Pilgrim, H.; Liberra, K.; Lindequist, U. Hispolon, a yellow pigment from *Inonotus hispidus*. *Phytochemistry* **1996**, 41, 927-929.

Ayer, W.A.; Browne, L.M.; Feng, M.; Orszanska, H.; Saeedi-Ghomi, H. The chemistry of the blue stain fungi. Part 1. Some metabolites of *Ceratocystis* species associated with mountain pine beetle infected lodgepole pine. *Can. J. Chem.* **1986**, 64, 904-909.

Capasso, R.; Cristinzio, G.; Evidente, A.; Scognamiglio, F. Isolation, Spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters. *Phytochemistry* **1992**, 31, 4125-4128.

Claydon, N.; Grove, J.F.; Pople, M. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. *Phytochemistry* **1985**, 24, 937-943.

Dong, H.; Chen, S.X.; Xu, H.X.; Kadota, S.; Namba, T. A new antiplatelet diarylheptanoid from *Alpinia blepharocalyx*. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 142-144.

Evidente, A.; Capasso, R.; Vurro, M.; Bottalico, A. Ascosalitoxin, a phytotoxic trisubstituted salicylic aldehyde from *Ascochyta pisi*. *Phytochemistry*, **1993**, 34, 995-998.

Fujita, M.; Yamada, M.; Nakajima, S.; Kawai, K.I.; Nagai, M. *O*-Methylation effect on the carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance signals of *ortho*-disubstituted phenols and its

application to structure determination of new phthalides from *Aspergillus silvaticus*. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, 32, 2622-2627.

Gamboa-Angulo, M.M.; Alejos-González, F.; Escalante-Erosa, F.; García-Sosa, K.; Delgado-Lamas, G.; Peña-Rodríguez, L.M. Novel dimeric metabolites from *Alternaria tagetica*. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1117-1120.

Gardner, J.M.; Kono, Y.; Tatum, J.H.; Susuki, Y.; Takeuchi, S. Structure of the major component of ACRL-toxins, host-specific pathotoxic compounds produced by *Alternaria citri*. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, 49, 1235-1238.

Hotchkiss, E.S.; Baxter, L. W. Pathogenicity of *Alternaria tagetica* on *Tagetes*. *Plant Dis.* **1983**, 67, 1288-1290.

Kono, Y.; Gardner, J.M.; Takeuchi, S. Structure of the host-selective toxins produced by a pathotype of *Alternaria citri* causing brown spot disease of mandarins. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, 50, 801-804.

Pena-Rodríguez, L.M.; Armingeon N.A.; Chilton, W.S. Toxins from weed pathogens, I. Phytotoxins from a *Bipolaris* pathogen of Johnson grass. *J. Nat. Prod.* **1988**, 51, 821-824.

Pouchert, C.J. *The Aldrich Library of Infrared Spectra*. Edition III; Aldrich Chemical Company, Inc.: U.S.A., 1981; 621.

Pouchert, C.J. *The Aldrich Library of NMR Spectra*. Edition II, Vol. 2; Aldrich Chemical Company, Inc.: U.S.A., 1983; 195.

Silverstein, R.M.; Webster, F.X.; Morrill, T.C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*; John Wiley, New York, 1997; pp. 93-94.

Stierle, A.; Hershenhorn, J.; Strobel, G. Zinniol-related phytotoxins from *Alternaria cichorii*. *Phytochemistry*, **1993**, 32, 1145-1149.

Stoessel, A.; Unwin, C.H.; Stothers, J.B. On the biosynthesis of some polyketide metabolites in *Alternaria solani*: ^{13}C and ^2H nmr studies. *Can. J. Chem.* **1983**, 61, 372, 377.

Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Horiuchi, M.; Morikawa, Y.; Sakaki, Y.; Matsumoto, Y. Structure of porriolide, a new metabolite from *Alternaria porri*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1993**, 57, 334- 335.

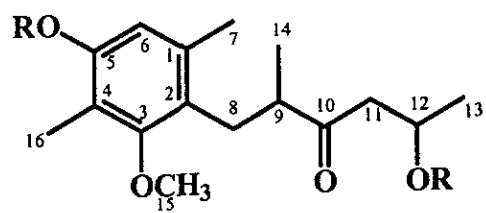
Tabuchi, H.; Ichihara, A. Structures and stereochemistries of new compounds related to alternaric acid. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1994**, 125-133.

Turner, W. B.; Aldridge, D.C. *Fungal Metabolites II*. Academic Press Inc., London, 1983, pp. 8-11, 67-69.

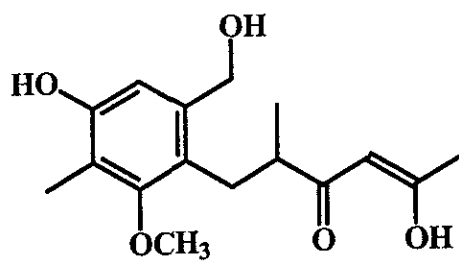
Venkatasubbaiah, P.; Chilton, W.S. Phytotoxins of *Botryosphaeria obtusa*. *J. Nat. Prod.* **1990**, 53, 1628-1630.

Yang, Y.; Kinoshita, K.; Koyama, K.; Takahashi, K.; Tai, T.; Nunoura, Y.; Watanabe, K. Two novel anti-emetic principles of *Alpinia katsumadai*. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 1672-1674.

1 Financial support for the project, through grants from PADEP-UNAM (Nos. 5356 and
2 5370) and CONACYT (4871-E9406), is also greatly appreciated. M.M.G.A. wishes to
3 thank CONACYT for a graduate student fellowship.
4
5



1 R = H
1a R = AcO



2

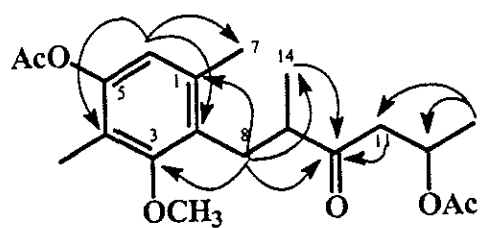


Figure 1. Selected HMBC correlations (H-C) observed for **1a**.

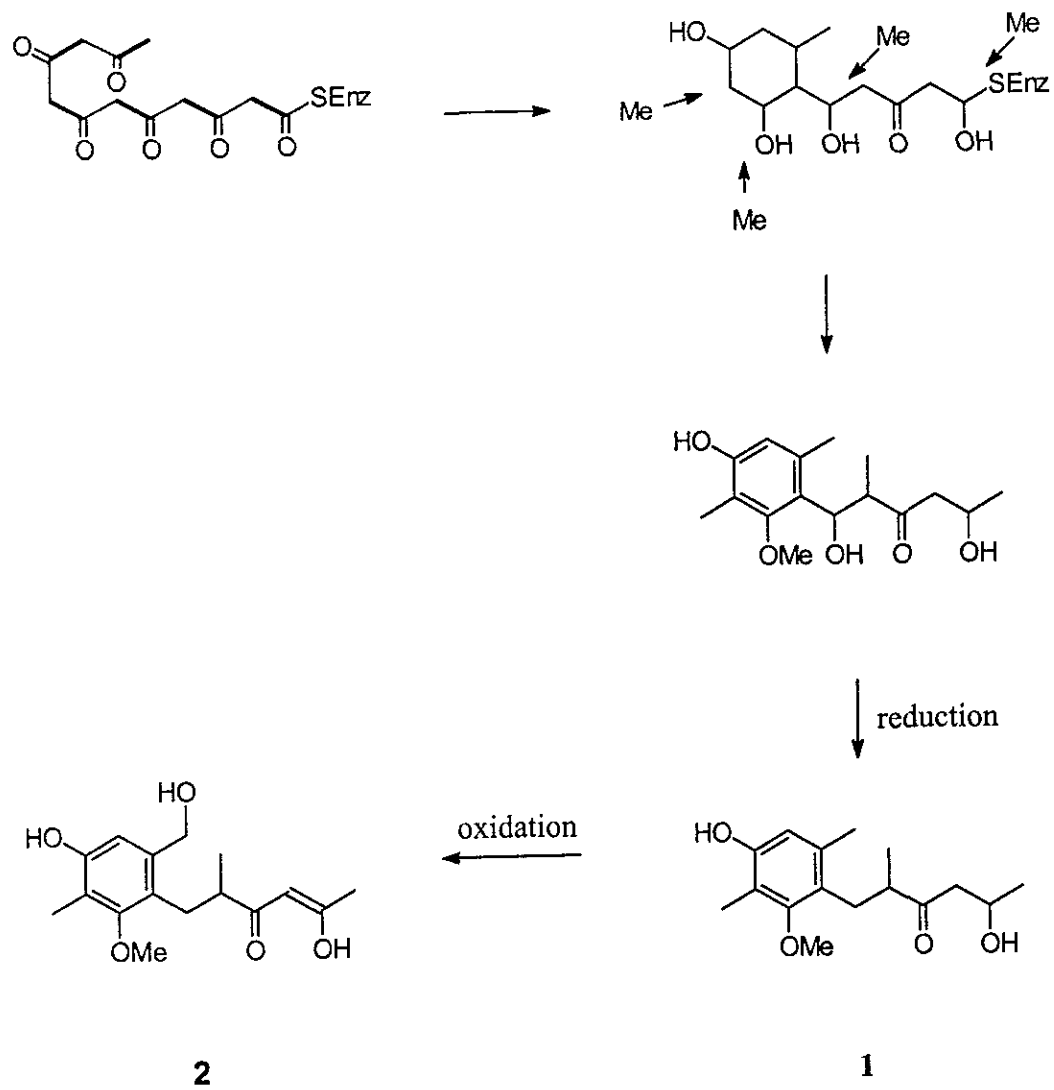


Figure 2. Possible biosynthetic origin of **1** and **2**.

Natural Zinniol Derivatives from *Alternaria tagetica*. Isolation, Synthesis and Structure-Activity Correlation¹

M. Marcela Gamboa-Angulo[†], Fabiola Escalante-Erosa[†], Karlina García-Sosa[†], Fátima Alejos-González[†], Guillermo Delgado-Lamas[†] and Luis M. Peña-Rodríguez^{†*}

[†]Grupo de Química Orgánica del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Apartado Postal 87 Cordemex, 97310, Mérida, Yucatán, México.

^{†*}Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México D.F.

Abstract. Two novel phytotoxins, 8-zinniol methyl ether (**5**) and 8-zinniol acetate (**6**) in addition to 6-(3',3'-dimethylallyloxy)-4-methoxy-5-methyl-phthalide (**2**), 5-(3',3'-dimethylallyloxy)-7-methoxy-6-methyl-phthalide (**3**) and the novel metabolites 8-zinniol 2-(phenyl)-ethyl ether (**4**) and 7-zinniol acetate (**7**), have been identified as natural zinniol derivatives from the organic crude extract of *Alternaria tagetica* culture filtrates. Using zinniol as the starting material, phytotoxin **5** was synthesized together a number of synthetic intermediates (**8-13**). Both, natural and synthetic zinniol-derivatives were evaluated in the leaf-spot bioassay against marigolds leaves (*Tagetes erecta*).

Key Words: *Alternaria tagetica*, *Tagetes erecta*, marigold, phytotoxin, zinniol, zinniol-derivatives, leaf-spot bioassay.

Introduction

Zinniol (**1**) is a phytotoxic tetraketide first isolated from *A. zinniae*² and later detected in culture filtrates from *Phoma macdonaldii*³, *A. dauci*⁴, *A. solani*, *A. porri*, *A. carthami*, *A. macrospora*⁵, *A. cichorii*⁶ and *A. tagetica*.⁷ The total synthesis of zinniol has been reported following two different routes: one using a disulphonic acid as the starting material⁸ and another using a sequence of Diels-Alder and Alder-Rickert reactions with DMAD structure.⁹ This has confirmed both its structure and phytotoxic activity.

We have previously reported the isolation of **1** as the major phytotoxic component in the organic crude extract from culture filtrates of *A. tagetica*.¹⁰ We wish to describe here a number of metabolites structurally related to zinniol, including the isomeric phthalides **2** and **3**, 8-zinniol 2-(phenyl)-ethyl ether (**4**), 8-zinniol methyl ether (**5**), 8-zinniol acetate (**6**) and 7-zinniol acetate (**7**), in addition to the synthesis of phytotoxin **5** by chemical transformation of zinniol and the biological evaluation of a number of the intermediate derivatives (**8-13**) generated during the synthetic process.

Results and Discussion

Bioassay-guided VLC and preparative HPLC purifications of the phytotoxic organic crude extract from *A. tagetica* resulted in the purification and identification of six metabolites (**2-7**), two of them (**5**, **6**) phytotoxic.

The isomeric phthalides 6-(3',3'-dimethylallyloxy)-4-methoxy-5-methyl-phthalide (**2**) and 5-(3',3'-dimethylallyloxy)-7-methoxy-6-methyl-phthalide (**3**) were identified by comparing their spectroscopic data with those reported in the literature,¹¹⁻¹² and by direct comparison with authentic samples. The phthalide **2** has been reported previously from *A. porri*¹¹ and *A. solani*¹³, while **3** has only been reported from *A. porri*.¹² Both isomers were first reported as the main products resulting from the oxidation of zinniol.²

The remaining metabolites (4-7) were obtained in pure form after preparative HPLC purifications of various fractions. Their IR, LR-EIMS and ^1H NMR spectra showed close similarities between them and with zinniol.^{2,10} These similarities included a single aromatic proton, that confirmed the presence of a pentasubstituted aromatic ring; two methyl groups, one attached to the aromatic ring and the other as part of an aryl methyl ether; and the signals corresponding to the dimethylallyloxy side chain. The presence of the characteristic base peak fragment at m/z 180 in the MS spectra of metabolites 4-7, and their being of a lower polarity on TLC when compared to 1, suggested that these derivatives had, one or both of the benzylic alcohols substituted. The nature and location of the substituents on each metabolite was established following a careful analysis of their MS, ^1H NMR (Table 1) and ^{13}C NMR (Table 2) data, in addition to the results from HMQC and HMBC experiments.

The LR-EIMS spectrum of 4 showed a molecular ion peak at m/z 370 which corresponded to a difference of 104 units with respect to that of zinniol. Additionally, the ^1H NMR spectrum of 4 showed five additional protons in the aromatic region which appeared as the multiple signal (centered at δ 7.23) typical of a monosubstituted aromatic ring; the spectrum also showed two doublets of doublets at δ 3.80 and 2.90 assigned to the protons of two methylene groups, one of which (δ 3.80) showed the typical chemical shift for a methylene bearing oxygen. The presence of a second aromatic ring in the structure of 4 was confirmed by twelve sp^2 carbons signals in its ^{13}C NMR spectrum (six methine and six quaternary, Table 1), while the two new methylene carbon signals appeared at δ 71.4 and 36.4. This data was consistent for the presence of an oxygenated 2-(phenyl)-ethyl fragment in the structure of 4, and this fragment can readily explain the 104 units molecular weight difference with zinniol.

In order to establish the correct location of the 2-(phenyl)-ethyl fragment in the structure of 4, it was necessary to first establish the correct assignment of the various methylene groups in its structure. The HMQC experiment of 4 showed a direct correlation between the methylene protons at δ 4.63, 4.55, 3.80 and 2.90 and the carbon signals at δ 64.8, 64.4, 71.4 and 36.4, respectively. A long-range interaction observed in the HMBC experiment of 4, between the aromatic proton at δ 6.71 and the carbon signal at δ 64.4, allowed for the latter being assigned to C-7 and the carbon signal at δ 64.8 to C-8. Similarly, long-range interactions between the methylene protons at δ 4.63 (H-8) and the carbon signals at δ 140.3 (C-1), 121.1 (C-2), 158.3 (C-3) and, through oxygen, with δ 71.4 (C-1''), indicated that the 2-(phenyl)-ethyl-residue was located on C-8 via an ether linkage. This was supported by the observed interactions between the methylene protons at δ 3.80 with the carbon signals at δ 36.4 (C-2''), 138.6 (C-3'') and, through

oxygen, with δ 64.8 (C-8). On the basis of this data, the new metabolite **4** was identified as 8-zinniol 2-(phenyl)-ethylether.

Phytotoxic metabolite **5** (Table 3) was obtained as single component on TLC. A parent ion peak at m/z 280 in its LR-EIMS suggested a zinniol structure with an additional methylene. A three proton singlet at δ 3.44 in its ^1H NMR, together with a carbon signal at δ 58.0 in its ^{13}C NMR, confirmed the presence of an additional methoxyl group in the structure of **5**. While the chemical shift for C-7 (δ 64.5), in the ^{13}C RMN of **5** was very similar to that of zinniol (δ 64.7) the corresponding C-8 signal in the spectrum of **5** appeared at a lower field (δ 66.5) than that of zinniol (δ 56.8), suggesting that the new methoxyl group was located at the C-8 position in the structure of **5**. This was confirmed by the long-range, through oxygen, group 3J interaction observed in the HMBC of **5** between the methyl group protons at δ 3.44 and the carbon signal at δ 66.5 (C-8). Phytotoxic metabolite **5** was thus identified as 8-zinniol methyl ether.

The IR spectra of metabolites **6** and **7** were identical, both presenting an intense absorption at 1739 cm^{-1} characteristic for an ester carbonyl group. As expected, their LR-EIMS spectra also showed the same parent ion peak at m/z 308, where the difference of 42 units suggested an acetylated zinniol structure. This was supported by a fragment at m/z 240 $[\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8]^+$, originating from the loss of the dimethylallyloxy chain side, which after losing an AcOH molecule produced the characteristic base peak fragment at m/z 180. Further support for an acetylated zinniol structure came from the three proton methyl singlets at δ 2.16 in the ^1H NMR spectra of **6** and **7**, and carbon signals at δ 171.1 and 170.9 in the ^{13}C RMN spectra. This suggested that metabolites **6** and **7** were isomeric monoacetylated derivatives of **1**. While the HMQC experiment of metabolite **6** showed a direct correlation between the methylene protons at δ 5.25 and 4.70 with the carbon signals at δ 58.7 and 63.1; the HMQC experiment of **7** showed a direct correlation between the protons at δ 5.20 and 4.73 with the carbon signals at δ 64.6 and 56.8. A comparison of the chemical shift for both benzylic methylenes in the ^{13}C NMR spectra of **6** and **7** with those previously described for **1**, **4** and **5** (Tabla 2), made it possible to identify **6** as 8-zinniol acetate and **7** as the isomeric 7-zinniol acetate. This assignment was further supported by the long-range interactions observed in the HMBC experiment of **6** between the methylene protons at δ 4.70 and the aromatic carbon at δ 108.0 (C-6), and between the methylene protons at δ 5.25 with carbon signals at δ 118.5 (C-2), 158.7 (C-3) and with the carbonyl carbon at δ 171.1 (carbonyl acetate). In order to rule out the possibility of **6** and **7** being formed during the isolation process, zinniol (**1**) was subjected to the same processes involved in working up the culture filtrate of *A. tagetica*, resulting in the obtention of only starting material. Additionally,

the natural metabolite **5** (Scheme 2). Similarly, reduction of **11** afforded 7-zinniol methyl ether (**13**) as the main component. ^1H and ^{13}C NMR data for the isomeric methyl ether **13** was very similar to those of **5**; significant differences were only observed in their ^{13}C NMR spectra where the chemical shift values of C-1, C-2, C-7 and C-8 in **13** are δ 135.3, 126.1, 74.4 and 56.9, respectively and δ 140.3, 121.2, 64.5 and 66.5, in **5**.

The phytotoxic activity of all products (**1-13**), both natural and synthetic, was evaluated in the leaf-spot assay (Table 3). While zinniol (**1**) caused the strongest necrotic lesions on marigold leaves, neither its diacetylated derivative (**1a**), nor the isomeric phthalides **2** and **3** or zinniol anhydride (**8**) showed significant activity. As expected, a lower phytotoxic activity was detected in the monosubstituted derivatives **5** and **13**, thus confirming previous reports that both benzylic alcohols in zinniol are essential for the expression of phytotoxic activity.⁴ However, the latter statement was seriously challenged when the monosubstituted derivatives **4** and **7** did not show the ability to cause damage to marigold leaves, and both carboxylated methylether derivatives **10** and **12** showed significant phytotoxic activity. This activity was readily lost upon esterification to produce **9** and **11**. These results indicate that there might be a number of factors controlling the expression of phytotoxic activity in these molecules, including the type, size and position of the various functional groups.

Conclusions

In summary, we have reported herein the isolation and identification of six metabolites from the culture filtrates of *A. tagetica*. All metabolites were structurally related to zinniol, and four of them identified as new natural products (**4-7**), while five new compounds (**9-13**) were prepared. Five of all the products tested, both natural and synthetic derivatives (**5, 6, 10, 12, 13**), showed phytotoxic activity against marigold leaves. All natural and synthetic phytotoxic derivatives were less phytotoxic than zinniol (**1**) with the exception of the acid derivative **10** which showed a similar activity (Table 3). The synthetic preparation of 8-zinniol methyl ether (**5**) and its isomer 7-zinniol methyl ether (**13**), using zinniol as starting material, confirmed the structure for the new natural product **5**.

Experimental

General Experimental Procedures. IR, LR-EIMS, ^1H , ^{13}C and 2D-NMR instrumentation and experimental procedures have been described previously.¹⁰ GC-EIMS analyses were carried out using a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph coupled to a Hewlett-Packard 5971A mass selective detector. Conditions for GC analyses were as follows: 0.5 μL of 0.1% sample; Ultra 1 column (Hewlett-Packard, cross-linked methyl silicone gum, 25 m long, 0.32 mm i.d., 0.52 μm fill thickness); flow rate = 1 mL/min; temperature program; $T_1 = 180^\circ\text{C}$, $T_2 = 290^\circ\text{C}$, gradient = $10^\circ\text{C}/\text{min}$, detector temperature 300°C .

HPLC analyses. Instrumentation: a) Waters Delta prep 4000 preparative chromatography system (Millipore Corp.) equipped with a Waters 486 UV detector for semipreparative separations and a Waters 996 Photodiode Array Detector for analytical studies. Control of the equipment, data acquisition, processing and management of chromatographic information were performed by the Millennium 2000 software program (Waters). Conditions for HPLC analyses were: Microporasil normal phase column (Waters, 10 μm , 3.9 x 300 mm); using hexane-EtOAc [85:15] (method a) or CHCl_3 -EtOAc [90:10] (method b), flow rate = 1.0 mL/min and UV detector set at 260 nm. b) Milton Roy CM-4000 series chromatograph equipped with a Milton Roy SM-4000 UV detector and a Milton Roy CS-4100 integrator. Conditions for HPLC analyses were: Hypersil ODS C_{18} column (Alltech, 5 μm , 4.6 x 250 mm); gradient elution using $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ [10:90 to 90:10 (15 min)] (method c); flow rate = 1.0 mL/min and UV detector set at 254 nm.

Isolation and Purifications of metabolites 1-6.

Details of the microbiological work, leaf-spot assay and fractionation of the organic crude extract by solvent partition and VLC purification (13 fractions) have been described already.¹⁰ HPLC separations were carried out using a preparative column (300 x 19.5 mm) packed with the same microporasil normal phase as that used for analytical studies. After VLC of the organic crude extract, purification of fraction 5 by HPLC (method a, flow = 18 mL/min) yielded metabolite 2 in pure form (0.73 mg/L). Fraction 6, after successive HPLC purifications (method a, flow of 18 and 15 mL/min) produced pure 3 (0.21 mg/L) and 4 (0.17 mg/L). A similar purifications of fraction 7 (method a, flow of 15 mL/min) resulted in the obtention of 5 (0.28 mg/L) as a single component. Finally, purification of phytotoxic fraction 9 using the same column but method b and a flow of 16 mL/min, yielded 6 (0.40 mg/L) and 7 (0.19 mg/L).

6-(3',3'-Dimethylallyloxy)-4-methoxy-5-methyl-phthalide (2). White amorphous powder; R_f 0.24 (CHCl_3) and 0.39 (Hexane-EtOAc 8:2); HPLC: R_t 9.47 min (method a); IR, LR-EIMS, ^1H and ^{13}C NMR spectra were identical to those reported in the literature.^{1, 10, 12}

5-(3',3'-Dimethylallyloxy)-7-methoxy-6-methyl-phthalide (3). colorless oil; R_f 0.1 (CHCl_3) and 0.32 (Hexane-EtOAc 8:2); HPLC: R_t 13.3 min (method a); IR, LR-EIMS, ^1H and ^{13}C NMR spectra were identical to those reported in the literature.^{1, 11}

8-Zinniol-2-(phenyl)-ethyl ether (4). Colorless oil; R_f 0.55 (C_6H_6 -acetone 95:5); HPLC: R_t 14.5 min (method a); IR (film): 3445 (OH), 3020 (Ar-H), 1605 ($\text{sp}^2\text{-C}$), 1214 (C-O), 1148 (C-O-C) cm^{-1} ; LR-EIMS m/z (rel. int.): 370 $[\text{M}]^+$ (8), 302 $[\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8]^+$ (8), 284 $[\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8 - \text{H}_2\text{O}]^+$ (8), 180 (100), 105 $[\text{C}_5\text{H}_8 + \text{H}]^+$ (22), 69 $[\text{C}_5\text{H}_9]^+$ (18); ^1H NMR data see Table 1; ^{13}C NMR data see Table 2.

8-Zinniol methyl ether (5). White amorphous powder; R_f 0.3 (hexane-acetone 8:2); HPLC: R_t 19.1 min (method a), 18.27 min (method b); GC: R_t 8.23 min; IR (film): 3433 (OH), 1604 ($\text{sp}^2\text{-C}$), 1214 (C-O), 1114 (C-O-C) cm^{-1} ; LR-EIMS m/z (rel. int.): 280 $[\text{M}]^+$ (8), 212 $[\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8]^+$ (36), 194 $[\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8 - \text{H}_2\text{O}]^+$ (10), 180 (100), 69 $[\text{C}_5\text{H}_8 + \text{H}]^+$ (25); ^1H NMR data see Table 1; ^{13}C RMN data see Table 2.

8-Zinniol acetate (6). Yellow oil; R_f 0.27 (CH_2Cl_2 -EtOAc 9:1); HPLC: R_t 14.9 min (method b); IR (film): 3435 (OH), 1739 (C=O), 1604 ($\text{sp}^2\text{-C}$), 1232 (C-O), 1115 (C-O-C) cm^{-1} ; LR-EIMS m/z (rel. int.): 308 $[\text{M}]^+$ (7), 240 $[\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8]^+$ (12), 222 $[\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8 - \text{H}_2\text{O}]^+$ (5), 180 (100), 162 $[\text{180-H}_2\text{O}]^+$ (32), 69 $[\text{C}_5\text{H}_8 + \text{H}]^+$ (42); ^1H NMR data see Table 1; ^{13}C NMR data see Table 2.

7-Zinniol acetate (7). Pale yellow oil; R_f 0.25 (CH_2Cl_2 -EtOAc 9:1); HPLC: R_t 17.2 min (method b); IR (film): 3435 (OH), 1739 (C=O), 1604 ($\text{sp}^2\text{-C}$), 1232 (C-O), 1115 (C-O-C) cm^{-1} ; LR-EIMS m/z (rel. int.): 308 $[\text{M}]^+$ (7), 240 $[\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8]^+$ (15), 222 $[\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8 - \text{H}_2\text{O}]^+$ (5), 180 (100), 162 $[\text{180-H}_2\text{O}]^+$ (11), 162 $[\text{180-H}_2\text{O}]^+$ (11), 69 $[\text{C}_5\text{H}_8 + \text{H}]^+$ (26); ^1H NMR data see Table 1; ^{13}C NMR data see Table 2.

Oxidation of zinniol (1). A solution of 1 (616.8 mg, 2.31 mmol) in acetone (485 mL) was stirred with an excess of a stock chromic acid solution at room temperature for 5 min (Starratt, 1968). After diluting with

water, the oxidation crude product was obtained by ethylether extraction of the aqueous suspension, followed by a normal work up of the organic layer. This produced a mixture of three products which was filtered through a silica gel bed and separated by preparative HPLC (method a) to yield **2** (168.2 mg, 28%), **3** (176.7 mg, 29%) and **8** (117.9 mg, 18%), in pure form.

Zinniol anhydride (8): White amorphous powder; R_f 0.52 (CHCl_3); HPLC: R_t 4.4 min (method a); IR (film): 2939 (C-H), 1838 (anh. C=O), 1772 (anh. C=O), 1614 ($\text{sp}^2\text{-C}$), 1214 (C-O), 1114 (C-O-C) cm^{-1} ; LR-EIMS m/z (rel. int.): 276 $[\text{M}]^+$ (3), 208 $[\text{M}^+\text{-C}_5\text{H}_8]^+$ (5), 164 $[\text{M}^+\text{-C}_5\text{H}_8\text{-CO}_2]^+$ (8), 69 $[\text{C}_5\text{H}_9]^+$ (100); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.15 (1H, s, H-6), 5.47 (1H, ddd, $J = 6.6, 6.6, 1.5$ Hz, H-2'), 4.68 (2H, br d, $J = 6.6$ Hz, H-1'), 4.16 (2H, s, H-9), 2.21 (3H, s, H-10), 1.82 (3H, br d, $J = 0.9$ Hz, H-4'), 1.75 (3H, s, H-5'); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 163.5 (C-8), 164.5 (C-7), 160.9 (C-3), 157.9 (C-5), 139.6 (C-1), 131.9 (C-3'), 118.2 (C-2'), 112.1 (C-4), 103.1 (C-6), 66.4 (C-1'), 62.3 (C-9), 25.8 (C-4'), 18.3 (C-5'), 9.6 (C-10).

Hydrolysis and methylation of 6-(3',3'-dimethylallyloxy)-4-methoxy-5-methyl-phthalide.¹⁸⁻¹⁹ A mixture of **2** (25 mg, 0.095 mmol), MeOH (10 mL, Aldrich), and an excess of K_2CO_3 (Merck), was heated under reflux for 7 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue eliminated under high vacuum. The residue was combined with 4 mL of dry THF (Aldrich) under a nitrogen atmosphere and then a suspension of 180 mg of NaH (80% in mineral oil, 6 mmol, Aldrich), previously washed with dry THF, was added. The suspension was stirred at room temperature for 30 min and 300 μL of CH_3I (4.82 mmol, Baker) were added slowly. The mixture was left to stand at room temperature until no starting material could be detected by TLC (43 h). The reaction mixture was quenched with saturated NH_4Cl solution, diluted with water and extracted with EtOAc (3x, 2:1, 1:1, 1:1). The organic layer was washed with water to neutralization and then with brine followed by treatment with Na_2SO_4 and filtration. The solvent was finally removed under reduced pressure to produce **9** (12.2 mg, 42%). The remaining aqueous layer was neutralized with H_2SO_4 (2N) and extracted with EtOAc (3x, 2:1, 1:1, 1:1). The organic layer was washed with water and brine, dried, concentrated and filtered through a silica gel microcolumn (hexane-acetone 8:2) to yield **10** (3.7 mg, 13%).

Methyl-3-methoxyl-4-methyl-5-(3',3'-dimethylallyloxy)-2-methoxymethyl benzoate (9): Yellow oil; R_f 0.49 (hexane-acetone 8:2); GC: R_t 8.88 min; IR (CHCl_3): 3015 (Ar-H), 1730 (C=O), 1607 ($\text{sp}^2\text{-C}$),

1118 (C-O-C) cm^{-1} ; LR-EIMS m/z (rel. int.): 225 [$\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8 - \text{CH}_3$] $^+$ (9), 193 [$\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8 - \text{H}_2\text{O}$] $^+$ (100), 179 (3), 69 [C_5H_9] $^+$ (71); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.14 (1H, s, H-6), 5.47 (1H, ddd, $J = 6.6, 6.6, 1.2$ Hz, H-2'), 4.71 (1H, s, H-8), 4.54 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, H-1'), 3.9 (3H, s, H-1''), 3.76 (3H, s, H-9), 3.39 (3H, s, H-2''), 2.19 (3H, s, H-10), 1.79 (3H, s, H-4'), 1.75 (3H, s, H-5'); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 168.1 (C-7), 158.8 (C-3), 157.3 (C-5), 137.9 (C-3'), 129.8 (C-1), 124.6 (C-2), 124.2 (C-4), 119.6 (C-2'), 109.3 (C-6), 65.7 (C-8), 65.4 (C-1'), 61.9 (C-9), 58.2 (C-2''), 52.1 (C-1''), 25.8 (C-4'), 18.3 (C-5'), 9.5 (C-10).

3-Methoxyl-4-methyl-5-(3',3'-dimethylallyloxy)-2-methoxymethyl benzoic acid (10): White solid; R_f 0.14 (hexane-acetone 8:2); GC: R_t 10.54 min; IR (CHCl_3): 3400-2600 (COOH), 3008 (Ar-H), 1716 (C=O), 1603 ($\text{sp}^2\text{-C}$), 1114 (C-O-C) cm^{-1} ; LR-EIMS m/z (rel. int.): 226 [$\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8$] $^+$ (10), 212 [$\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8 - \text{H}_2\text{O} + \text{H}$] $^+$ (18), 193 [212- H_2O] $^+$ (100), 165 (11), 69 [C_5H_9] $^+$ (61); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.23 (1H, s, H-6), 5.47 (1H, ddd, $J = 6.6, 6.6, 1.2$ Hz, H-2'), 4.71 (2H, s, H-8), 4.58 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, H-1'), 3.74 (3H, s, H-9), 3.49 (3H, s, H-1''), 2.21 (3H, s, H-10), 1.80 (3H, br d, $J = 1.2$ Hz, H-4'), 1.75 (3H, s, H-5'); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 168.9 (C-7), 158.3 (C-3), 158.1 (C-5), 138.2 (C-3'), 131.3 (C-1), 125.1 (C-2), 121.1 (C-4), 119.4 (C-2'), 110.7 (C-6), 66.1 (C-7), 65.3 (C-1'), 62.0 (C-9), 58.0 (C-1''), 25.8 (C-4'), 18.3 (C-5'), 9.7 (C-10).

Hydrolysis and methylation of 5-(3',3'-dimethylallyloxy)-7-methoxy-6-methyl-phthalide (3): A solution of **3** (21 mg, 0.08 mmol) in MeOH (10 mL) was heated under reflux with an excess of K_2CO_3 for 24 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the resulting material was combined with dry THF (4 mL) and a suspension of NaH (208 mg, 6.93 mmol, 80% in mineral oil). The mixture was stirred at room temperature for 30 min and then CH_3I (200 μL , 3.2 mmol) was added dropwise. Once no more starting material could be detected by TLC (44 h), the reaction mixture was quenched with a saturated NH_4Cl solution, diluted with water and extracted with EtOAc (3x, 2:1, 1:1, 1:1). The organic layer was washed with water and brine, dried (Na_2SO_4) and filtered. The solvent was removed under reduced pressure to produce **11** (14.1 mg, 57%). The residual aqueous layer was neutralized with H_2SO_4 (2N) and extracted with EtOAc (3x, 2:1, 1:1, 1:1). The organic layer was washed with water and brine, dried, and concentrated to yield **12** (5 mg, 21%).

Methyl-2-methoxyl-3-methyl-4-(3',3'-dimethylallyloxy)-6-methoxymethyl benzoate (11): Pale yellow oil; R_f 0.44 (hexane-acetone 8:2); GC: R_t 8.75 min; IR (CHCl₃): 3010 (Ar-H), 1727 (C=O), 1602 (sp²-C), 1114 (C-O-C) cm⁻¹; LR-EIMS m/z (rel. Int.): 308 [M]⁺ (1), 240 [M⁺-C₅H₈]⁺ (61), 208 [240-CH₃O-H]⁺ (100), 193 [208-CH₃]⁺ (66); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.71 (1H, s, H-6), 5.47 (1H, ddd, J = 6.5, 6.5, 1.5 Hz, H-2'), 4.54 (2H, d, J = 6.5 Hz, H-1'), 4.46 (1H, br s, H-7), 3.89 (3H, s, H-2''), 3.76 (3H, s, H-9), 3.56 (3H, s, H-1''), 2.14 (3H, s, H-10), 1.79 (3H, s, H-4'), 1.74 (3H, s, H-5'); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 168.4 (C-8), 159.1 (C-3), 157.0 (C-5), 137.8 (C-3'), 135.6 (C-1), 119.7 (C-2'), 119.6 (C-4), 119.1 (C-2), 106.8 (C-6), 72.4 (C-7), 65.4 (C-1'), 61.9 (C-9), 58.3 (C-1''), 52.0 (C-2''), 25.8 (C-4'), 18.3 (C-5'), 9.0 (C-10).

2-Methoxyl-3-methyl-4-(3',3'-dimethylallyloxy)-6-methoxymethylbenzoic acid (12): White solid; R_f 0.12 (hexane-acetone 8:2); GC: R_t 9.68 min; IR (CHCl₃): 3400-2600 (COOH), 3008 (Ar-H), 1715 (C=O), 1603 (sp²-C), 1114 (C-O-C) cm⁻¹; LR-EIMS m/z (rel. int.): 226 [M⁺-C₅H₈]⁺ (13), 193 [212-H₂O]⁺ (100), 179 (11), 165 (12), 69 [C₅H₉]⁺ (23); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.07 (1H, s, H-6), 5.47 (1H, ddd, J = 6.6, 6.6, 1.5 Hz, H-2'), 4.81 (1H, s, H-7), 4.62 (2H, d, J = 6 Hz, H-1'), 3.86 (3H, s, H-9), 3.48 (3H, s, H-1''), 2.17 (3H, s, H-10), 1.80 (3H, br d, J = 1.2 Hz, H-4'), 1.77 (3H, s, H-5'); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 166.0 (C-8), 161.0 (C-3), 158.3 (C-5), 142.1 (C-1), 138.3 (C-3'), 119.3 (C-4 and C-2'), 118.5 (C-2) 107.0 (C-6), 72.9 (C-7), 65.5 (C-1'), 62.5 (C-9), 58.6 (C-1''), 25.8 (C-4'), 18.3 (C-5'), 9.0 (C-10).

7-Zinniol methyl ether (13). A suspension of LiAlH₄ (26 mg, 0.68 mmol) in dry THF (5 mL), under a N₂ atmosphere and in an ice bath was stirred while a solution of **11** (10 mg, 0.32 mmol) in THF was added dropwise. After 5 min, the excess reagent was eliminated by successive additions of THF-water [9:1] until a white precipitate appeared. The reaction mixture was filtered and the filtrate was extracted with ethyl acetate (3x, 2:1, 1:1, 1:1). The organic layer was washed with water and brine, dried and evaporated to afford the crude reduction product, which was filtered through silica gel (hexane-acetone) to produce **13** (4.1 mg, 46 %) in pure form. R_f 0.3 (hexane-acetone 8:2); GC: R_t 8.21 min; HPLC: R_t 19.09 min (method c); IR (CHCl₃): 3468 (OH), 3009 (Ar-H), 1606 (sp²-C), 1116 (C-O-C) cm⁻¹; LR-EIMS m/z (rel. int.): 212 [M⁺-C₅H₈]⁺ (2), 194 [M⁺-C₅H₁₁-H₂O]⁺ (5), 180 (100), 163 (30), 69 [C₅H₉]⁺ (100); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.64 (1H, s, H-6), 5.49 (1H, ddd, J = 6.6, 6.6, 1.2 Hz, H-2'), 4.67 (2H, s, H-8), 4.52 (2H, d, J = 6 Hz, H-1'), 4.52 (2H, s, H-7), 3.81 (3H, s, H-9), 3.43 (3H, s, H-1''), 2.18 (3H, s, H-10), 1.79 (3H, br d, J = 0.9 Hz, H-4'), 1.74 (3H, s, H-5'); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 158.4 (C-3), 157.3 (C-5), 137.5 (C-3'), 135.3 (C-1), 126.1 (C-2), 120.5 (C-4), 120.0 (C-2'), 109.4 (C-6), 74.4 (C-7), 65.4 (C-1'), 61.9 (C-9), 56.9

(C-8), 25.8 (C-4'), 18.2 (C-5'), 9.2 (C-10).

8-Zinniol methyl ether (5). A solution of **9** (4 mg, 0.013 mmol) in anhydrous THF (3 mL) was treated with LiAlH₄ (12.4 mg, 0.32 mmol) for 2 h as described above, to give **5** (1.9 mg, 49%).

Phytotoxicity evaluation. Natural and synthetic metabolites were tested for phytotoxic activity using the leaf-spot assay²⁰ on marigol leaves (0.1 mg/ application).

Acknowledgments

We thank Isabel Chávez, Hector Ríos, Beatriz Quiroz, Rocío Patiño, Luis Velasco-Ibarra and Javier Pérez-Flores (Instituto de Química, UNAM) for recording the NMR, IR and MS spectra; Mariel Avila-Martínez (CICY), María Yolanda Ríos, Moustapha Bah and Rogelio Pereda-Miranda (UNAM) for technical assistance. Financial support for the project, through grants from PADEP-UNAM (Nos. 5356 and 5370) and CONACyT (4871-E9406), is also greatly appreciated. M.M.G.A. wishes to thank CONACyT for a graduate student fellowship.

References

1. This work represents part of the Ph. D. Thesis that will be submitted to the Graduate School of Chemistry, UNAM, by M.M.G.A.
2. Starratt, A.N. *Can. J. Chem.* **1968**, 46, 767-770.
3. Sugawara, F.; Strobel, G. *Plant. Sci.* **1986**, 43, 19-23.
4. Barasch, I.; Mor, H.; Netzer, D.; Kashman, Y. *Physiol. Plant Path.* **1981**, 19, 7-16.
5. Cotty, P.J.; Mishagi, I. *Phytopathology*, **1984**, 74, 785-788.
6. Stierle, A.; Hershenhorn, J.; Strobel, G. *Phytochemistry*, **1993**, 32, 1145-1149.
7. Cotty, P.J.; Mishagi, I.; Hine, R. *Phytopathology*, **1983**, 73, 1326-1328.
8. Martin, J. A.; Vogel, E. *Tetrahedron* **1980**, 36, 791-794.
9. Hariprakash, H. K.; Subba Rao, G. S. R. *Indian J. Chem.* **1998**, 37B, 851-856.
10. Gamboa-Angulo, M. M.; Alejos-González, F.; Escalante-Erosa, F.; García-Sosa, K.; Delgado-Lamas, G.; Peña-Rodríguez, L.M. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1117-1120.
11. Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Horiuchi, M.; Morikawa Y. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1992**, 56, 986.

12. Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Morikawa, Y.; Nagamoto, S. *Phytochemistry*, **1995**, 38, 495-497.
13. Gamboa-Angulo, M.M.; Alejos-González, F.; Peña-Rodríguez, L.M. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 282-285.
14. Fujita, M.; Yamada, M.; Nakajima, S.; Kawai, K.; Nagai, M. *Chem. Pharm. Bull* **1984**, 32, 2622-2627.
15. Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Morikawa, Y.; Ideguchi, I.; Uno, H. *Phytochemistry* **1994**, 35, 603-605.
16. Ichihara, A.; Tazaki, H.; Sakamura, S. *Agric. Bio. Chem.* **1985**, 49, 2811-2812.
17. Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Horiuchi, M.; Morikawa, Y.; Sakaki, Y.; Matsumoto, Y. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1993**, 57, 334-335.
18. Rios, M. Y. Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, 1997.
19. Van Maarschalkerwaard, A.H.; Willard, N.P.; Pandit, U. K. *Tetrahedron*, **1992**, 48, 8825-8840.
20. Pena-Rodríguez, L.M.; Armingeon, N.A.; Chilton, W.S. *J. Nat. Prod.*, **1988**, 51, 821-828.

Table 1. ¹H NMR Data (δ, m, J= Hz) for metabolites I, Ia, 4-7 in CDCl₃ at 500 MHz.

Proton	I	Ia*	4	5	6	7*
6	6.68, br.s	6.72, s	6.71, s	6.73, s	6.79, s	6.68, s
7	4.68, s	5.14, s	4.55, d, 6.5	4.6, br.s	4.7, s	5.2, s
8	4.76, s	5.22, s	4.63, s	4.59, s	5.25, s	4.73, ABq
9	3.78, s	3.74, s	3.65, s	3.72, s	3.74, s	3.81, s
10	2.16, s	2.17, s	2.15, s	2.16, s	2.16, s	2.17, s
1'	4.52, br.d, 6.5	4.54, br.d, 6.6	4.53, br.d, 6.5	4.54, d, 6.5	4.55, d, 6.6	4.53, d, 6.42
2'	5.49, ddd, 6.5, 6.5, 1.5	5.47, ddd, 6.6, 6.6, 1.5	5.48, ddd, 6.5, 6.5, 1.5	5.55, ddd, 6.5, 6.5, 1.5	5.49, ddd, 6.6, 6.6, 1.5	5.47, ddd, 6.3, 6.3, 1.5
3'						
4'	1.8, s	1.8, s	1.79, d, 1	1.79, s	1.78, s	1.79, d, 0.9
5'	1.74, s	1.75, s	1.73, d, 1	1.74, s	1.74, s	1.75, s
1''		2.07, s	3.8, dd, 7, 7.5	3.44, s	2.05, s	2.1, s
2''		2.05, s	2.9, dd, 7, 7			
Ar-			7.18-7.29, m			

*300 MHz

Table 2. ¹³C NMR data for metabolites 1, 1a 4-7 in CDCl₃ at 125 MHz.

No. C	1	1a ^a	4	5	6	7 ^a
1	138.9	137.7	140.3	140.3	139.5	139.5
2	124.7	120.7	121.1	121.2	118.5	125.3
3	158.2	159.1	158.3	158.4	159.1	157.8
4	120.0	119.7	119.3	119.4	119.7	121.0
5	157.7	158.4	158.0	158.1	158.7	157.8
6	109.0	109.3	109.0	109.1	108.0	109.4
7	64.7	64.1	64.4	64.5	63.1	64.6
8	56.8	58.4	64.8	66.5	58.7	56.8
9	61.9	61.7	61.7	61.8	61.7	61.8
10	9.2	9.3	9.2	9.2	9.3	9.3
1'	65.3	65.3	65.3	65.3	65.4	65.4
2'	119.9	119.7	120.0	119.9	119.8	119.8
3'	137.6	134.4	137.5	137.5	137.7	137.7
4'	25.8	25.7	25.8	25.8	25.8	25.8
5'	18.2	18.2	18.2	18.2	18.3	18.2
1''		170.9	71.4	58.0	171.1	170.9
2''		21.0	36.4		21.2	21.2
		170.6	138.6 ^b			
		21.0	128.9 ^b (2)			
			128.4 ^b (2)			
			126.3 ^b			

^a 75 MHz

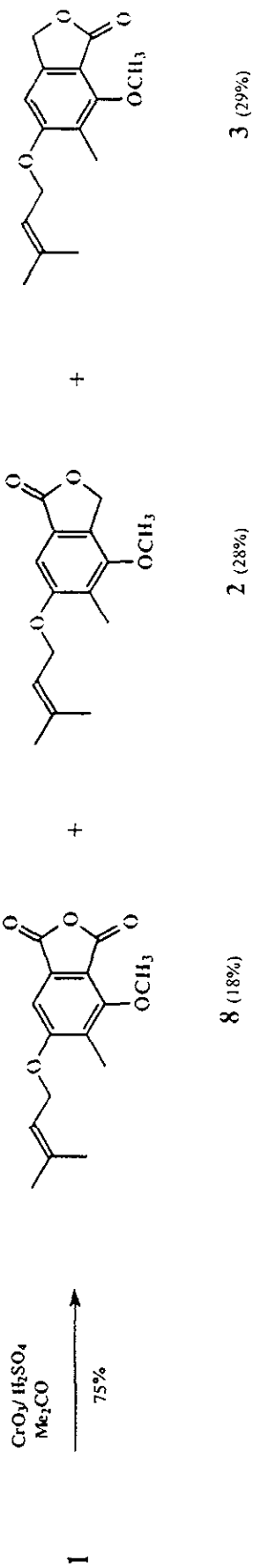
^b Ar- carbons

Table 3. Leaf-spot assay on marigold leaves of the metabolites **1-13** (0.1 mg/application)

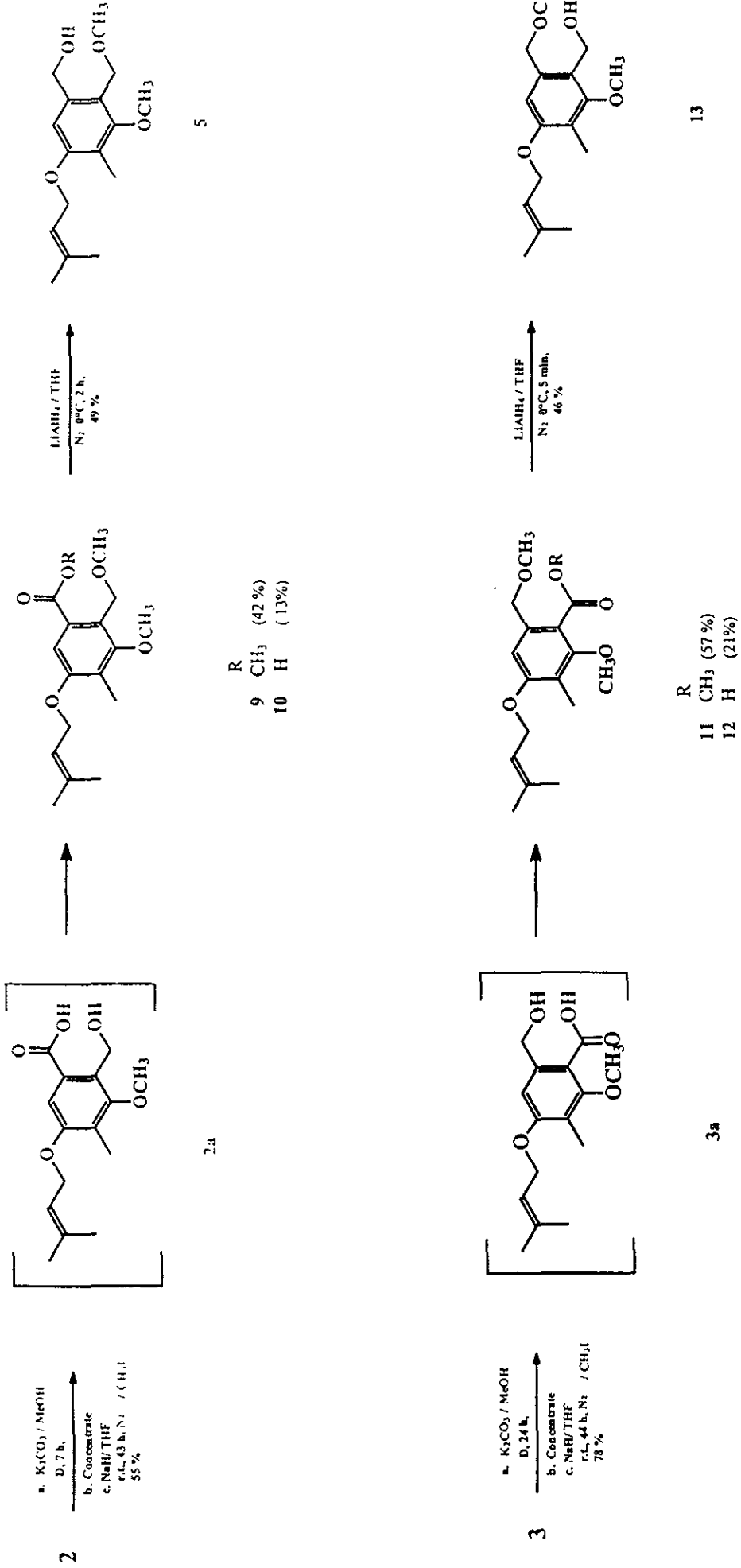
Metabolite	1	1a	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Necrotic Area (mm ²)	0.62	-	-	-	-	0.12	0.1	-	-	-	0.49	-	0.16	0.13

(-) not active

Scheme 1



Scheme 2



2

2a

5

3

3a

13