



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

Aislamiento y caracterización del
Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo
a partir de las partes aéreas de
Hofmeisteria schaffneri (A. Gray) King & Robinson
(Asteraceae).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

PAOLA ARIADNA LOZANO RIVERA



MÉXICO, D. F.



2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

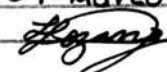
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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 NO SALE
DE LA BIBLIOTECA.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Lozano Rivera
Paola Ariadna
FECHA: 09-Marzo-04
FIRMA: 

Jurado asignado:

Presidente: Dra. Yolanda Caballero Arroyo

Vocal: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Secretario: Dra. Rachel Mata Essayag

1er. suplente: Dr. Andrés Navarrete Castro

2do. Suplente: M. en C. Blanca Estela Rivero Cruz

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 124, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

Asesor:


Dra. Rachel Mata Essayag.

Supervisor Técnico:

Iliana Morales B.
M. en C. Iliana Morales Barrientos.

Sustentante:


Paola Ariadna Lozano Rivera.

AGRADECIMIENTOS.

La presente investigación se realizó con el apoyo económico del proyecto "Bioactive Agents From Dryland Biodiversity of Latin America", financiado por el NIH (National Institute of Health) de los Estados Unidos de Norteamérica. Así mismo, este proyecto proporcionó una beca para la realización del presente trabajo de tesis.

Al Instituto de Química de la UNAM, y al personal técnico de la USAI (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación) por el registro de los espectros utilizados en el estudio que aquí se presenta. En particular agradezco a Georgina Duarte, Oscar Yáñez y Marisela Gutiérrez.

A las M. en C. Laura Acevedo Arteaga e Isabel Rivero Cruz por el apoyo técnico brindado a lo largo de este trabajo.

A la M. en C. Iliana Morales Barrientos, por la supervisión técnica, enseñanzas y paciencia durante la realización de este estudio.

A mis compañeros del laboratorio 124 por la ayuda laboral proporcionada.

A la Dra. Rachel Mata Essayag, por su dedicación a este trabajo, por el tiempo brindado y por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

DEDICATORIAS.

A Dios, por la vida en este espacio y tiempo.

A mis padres, Delfino y Rosario, por amarme como soy, y quienes sin escatimar en esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida en formarme y educarme, nunca podré pagarles ni aún con las riquezas más grandes del mundo.

A mis hermanos Ricardo y Diana, porque aunque cada vez se haga más grande la distancia, siempre los querré.

A mis abuelitos Trini, Cele, Adrián y Esther, los quiero mucho.

A mis tíos Ricardo, Roberto y Ma. del Carmen, porque su influencia me motivó a llegar hasta donde estoy.

A mis tías Ma. del Pilar Rivera y Esther Lozano, por consentirme y ser en su momento, mis otras mamás.

A mis amigos: Jay Georgina Estela, Ana Isabel, Gabriela, Evelyn, Lorena, Mariana, Sandra, Laura, Manuel Jaime, Miguel Ángel, Arturo de Jesús, Ángel, Selene, Marco, Rafael, Carlos, Pablo, Cristhian, Luis, por los excelentes momentos, y los malos también, me han ayudado a conocerme mejor...sigo aprendiendo de ustedes.

A ti Víctor, por tu amor puro y sincero, por ser el regalo de Dios para mí, gracias por existir.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 124: Iliana, Laura, Araceli, Isabel, Blanca, Martha, Francisco, Verónica, Isolda, Mario, Sandra, Toño, Sergio, Javier, los chicos del servicio: Nancy, Judith, Marcelino, Daniel, me la pasé muy bien, gracias.

A mis profesores, desde que empezó mi vida escolar hasta la Universidad, y a los que dejaron huella por su presencia, enseñanzas y consejos.

A toda esa gente que me apoyó en momentos difíciles, todos están en mi corazón.

ÍNDICE

| | Página |
|--|---------------|
| Lista de Figuras | III |
| Lista de Cuadros y Tablas | III |
| Lista de Esquemas | IV |
| Lista de Abreviaturas | V |
| Apéndice de Espectros | VII |
| | |
| 1. ANTECEDENTES. | 1 |
| 1.1 Antecedentes de la especie <i>Hofmeisteria schaffneri</i> . | 1 |
| 1.2 Fitotoxinas de origen vegetal. | 3 |
| | |
| 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS. | 9 |
| | |
| 3. PARTE EXPERIMENTAL | 12 |
| 3.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES. | 12 |
| 3.1.1 Análisis Cromatográficos. | 12 |
| 3.1.2 Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas. | 12 |
| 3.2 MATERIAL VEGETAL. | 13 |
| 3.3 ENSAYOS BIOLÓGICOS. | 13 |
| 3.3.1 Determinación del potencial fitotóxico del extracto activo, de las fracciones primarias y del metabolito aislado mediante el método de la caja de Petri. | 13 |
| 3.3.2 Determinación del efecto fitotóxico de la Fracción F4-4 mediante un método bioautográfico. | 14 |

ÍNDICE (continuación)

| | Página |
|--|---------------|
| 3.4 ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE <i>Hofmeisteria schaffneri</i> . | 14 |
| 3.4.1 Preparación del extracto. | 14 |
| 3.4.2 Fraccionamiento primario del extracto de <i>H. schaffneri</i> . | 15 |
| 3.4.3 Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa F4. | 18 |
| 3.4.4 Obtención del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 19 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. | 23 |
| 4.1 Selección de la especie <i>Hofmeisteria schaffneri</i> como un candidato idóneo para la obtención de principios activos. | 23 |
| 4.2 Fraccionamiento primario y evaluación de la fototoxicidad de las fracciones primarias. | 23 |
| 4.3 Aislamiento del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 25 |
| 4.4 Caracterización del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 25 |
| 4.5 Determinación del potencial fitotóxico del metabolito aislado. | 32 |
| 5. RESUMEN Y CONCLUSIONES. | 33 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA. | 34 |
| APÉNDICE DE ESPECTROS. | 39 |

Lista de Figuras.

| Figura | | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Ejemplar de herbario de la especie <i>Hofmeisteria schaffneri</i> . | 2 |
| 2 | Compuestos aislados en el estudio preliminar de <i>H. schaffneri</i> . | 2 |
| 3 | Compuestos de origen vegetal con actividad fitotóxica. | 4 |
| 4 | Compuestos de origen microbiano con actividad fitotóxica | 5 |

Lista de Cuadros y Tablas.

| Tabla | | |
|--------------|--|----------|
| 1 | Ejemplos selectos de compuestos naturales que afectan fotosíntesis y respiración mitocondrial. | 6 |

| Cuadro | | |
|---------------|--|-----------|
| 1 | Fraccionamiento primario de las partes aéreas de la especie <i>Hofmeisteria schaffneri</i> , mediante cromatografía en columna abierta. | 17 |
| 2 | Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa F4 de la especie <i>H. schaffneri</i> , mediante cromatografía en columna abierta | 18 |
| 3 | Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria activa F4-4 de la especie <i>H. schaffneri</i> , mediante cromatografía en columna abierta. | 20 |
| 4 | Fraccionamiento cuaternario de la fracción terciaria activa F4-4-8 de la especie <i>H. schaffneri</i> , mediante cromatografía en columna abierta. | 21 |
| 5 | Actividad fitotóxica contra <i>Amaranthus hypochondriacus</i> del extracto íntegro y fracciones primarias de <i>H. schaffneri</i> . | 24 |
| 6 | Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 26 |

Lista de Cuadros y Tablas (continuación).

| Cuadro | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 7 | Datos de RMN del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 28 |
| 8 | Correlaciones del espectro NOESY del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 29 |
| 9 | Correlaciones más relevantes del espectro HMBC del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 30 |

Lista de Esquemas.

| Esquema | | Página |
|----------------|--|---------------|
| 1 | Obtención del extracto activo de <i>Hofmeisteria schaffneri</i> . | 15 |
| 2 | Fraccionamiento primario del extracto activo de <i>H. schaffneri</i> . | 16 |
| 3 | Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa F4 | 19 |
| 4 | Aislamiento y purificación del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 22 |
| 5 | Correlaciones más relevantes del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo en el espectro NOESY. | 29 |
| 6 | Correlaciones más relevantes del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo en el espectro HMBC. | 30 |
| 7 | Patrón de fragmentación del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 31 |

Lista de Abreviaturas.

| Abreviatura | Significado |
|---------------------------------|---|
| ABS | Absorbancia |
| 2, 4-D | Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético |
| cm | Centímetros |
| CDCl ₃ | Cloroformo Deuterado |
| IC ₅₀ | Concentración inhibitoria media |
| J | Constante de acoplamiento |
| CCF | Cromatografía en capa fina |
| δ | Desplazamiento Químico |
| CH ₂ Cl ₂ | Diclorometano |
| d | Doblete |
| dd | Doble de dobles |
| dddd | Doble de doble de doble de dobles |
| EM/IE | Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico |
| °C | Grados centígrados |
| g | Gramo |
| HETCOR | Heteronuclear Correlation |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Bond Correlation |
| Hz | Hertz |
| hex | Hexano |
| M ⁺ | Ion molecular |
| IR | Infrarrojo |
| Int. rel. | Intensidad relativa |
| Kg | Kilogramos |
| L | Litro |
| ν _{máx} | Máxima longitud de onda |
| MeOH | Metanol |

Lista de Abreviaturas (continuación).

| Abreviatura | Significado |
|----------------------|--|
| μg | Microgramos |
| mg | Miligramo |
| mL | Mililitros |
| mm | Milímetros |
| m | Multiplete |
| nm | Nanómetros |
| NOESY | Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy |
| ppm | Partes por millón |
| % | Por ciento |
| m/z | Relación masa-carga |
| RMN- ¹³ C | Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 |
| RMN- ¹ H | Resonancia Magnética Nuclear Protónica |
| s | Singulete |
| s _a | Singulete ancho |
| TMS | Tetrametilsilano |
| uma | Unidades de Masa Atómica |
| UV | Ultravioleta |

Apéndice de Espectros.

| Espectro | | Página |
|-----------------|---|---------------|
| 1 | Espectro UV del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 40 |
| 2 | Espectro en el IR del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 41 |
| 3 | Espectro de Masas del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 42 |
| 4 | Espectro de RMN- ¹ H del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 43 |
| 5 | Espectro de RMN- ¹³ C del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 44 |
| 6 | Espectro HETCOR del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 45 |
| 7 | Espectro NOESY del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 46 |
| 8 | Espectro NOESY (ampliación) del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 47 |
| 9 | Espectro HMBC del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo. | 48 |

1. ANTECEDENTES.

1.1 Antecedentes de la especie *Hofmeisteria schaffneri* (A. Gray) King & Robinson (Asteraceae).

El género *Hofmeisteria*, perteneciente a la tribu Eupatorieae de la familia Asteraceae comprende 11 especies: *H. crassifolia*, *H. dissecta*, *H. fasciculata*, *H. filifolia*, *H. gentryi*, *H. laphamioides*, *H. pluriseta*, *H. schaffneri*, *H. sinaloenses*, *H. standleyi*, *H. urenifolia*. En particular, la especie *Hofmeisteria schaffneri* (A. Gray) King & Robinson se distribuye en los estados de Jalisco y San Luis Potosí, donde se conoce popularmente como ámbar.

H. schaffneri es un arbusto que habita en ambientes húmedos y calidos, crece en las grietas de las rocas, en filtraciones y salientes húmedas, y la mayoría de las veces en las orillas de los arroyos, florece entre los meses de febrero y abril.

En la medicina popular de México, la planta se utiliza para el tratamiento de heridas y la infusión de sus hojas sola, o acompañada con toronjiles, se emplea como agua de uso contra padecimientos del tracto gastrointestinal como vómito, diarrea y dolor de estómago.

Un estudio preliminar de esta planta permitió el aislamiento y la caracterización del β -sitosterol, el β -caroteno y la euparina (Figura 2). Éstos dos últimos inhibieron el crecimiento de las bacterias Gram negativas *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. De manera adicional, el β -caroteno inhibió el crecimiento de *Bacillus subtilis* (Gurrola, 2003).



Figura 1. Ejemplar de herbario de la especie *Hofmeisteria schaffneri*.

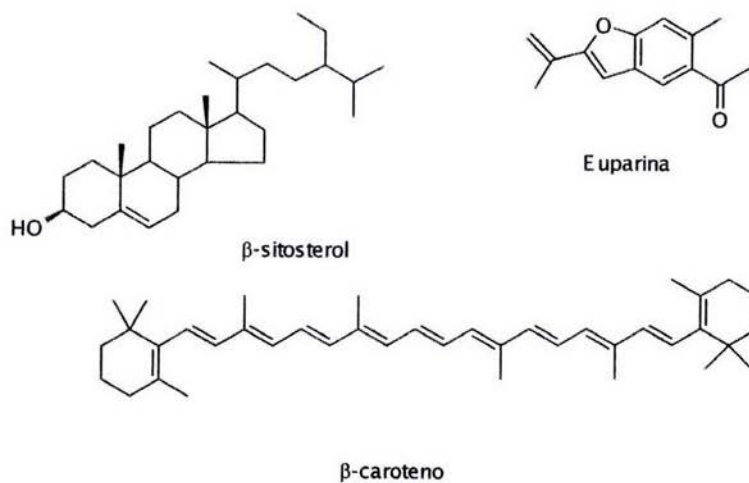


Figura 2. Compuestos aislados de *H. schaffneri* (Gurrola, 2003)

1.2 Fitotoxinas de origen vegetal.

Las fitotoxinas de origen natural, constituyen prototipos estructurales para diseño y síntesis de herbicidas con mayor potencia y eficacia que los compuestos de uso comercial, además poseen la característica de ser biodegradables.

En la literatura contemporánea de los productos naturales bioactivos, se han descrito numerosos compuestos que han generado un gran interés debido a sus propiedades fitotóxicas, a la variedad estructural que presentan y a los mecanismos de acción novedosos mediante los cuales ejercen su efecto fitotóxico. En este sentido, cabe mencionar que las fitotoxinas naturales pueden ejercer su efecto a través de uno o más mecanismos de acción fitotóxica.

Entre los compuesto de origen vegetal que son dignos de mencionarse por sus notables propiedades fitotóxicas se encuentra el cineol, la artemisina, la tricolorina A, el ácido p-hidroxibenzoico, la juglona, la sorgoleona y la leptospermona. Algunos de éstos productos han servido de prototipos para el desarrollo de nuevos herbicidas verdes a través de modificaciones químicas sencillas. Así, el ácido p-hidroxibenzoico es el prototipo estructural de dos de los herbicidas y biorreguladores de mayor éxito en la agricultura, las auxinas dicamba y el picloram (Grossmann, 2000). De modo similar, el herbicida comercial cinmetilino se obtuvo a partir del monoterpenoide 1,8-cineol (Figura 3).

Los productos naturales de origen microbiano también han generado un gran interés debido a sus propiedades fitotóxicas, y entre los más importantes se encuentran la fosfinitrixina y el bialafos. Este fue el primer producto comercial de origen microbiano, aislado originalmente de diferentes cepas de *Streptomyces*. Se usa principalmente para combatir malezas que afectan los cultivos de arroz, trigo y frijol (Tachibana y Kaneko, 1986) (Figura 4).

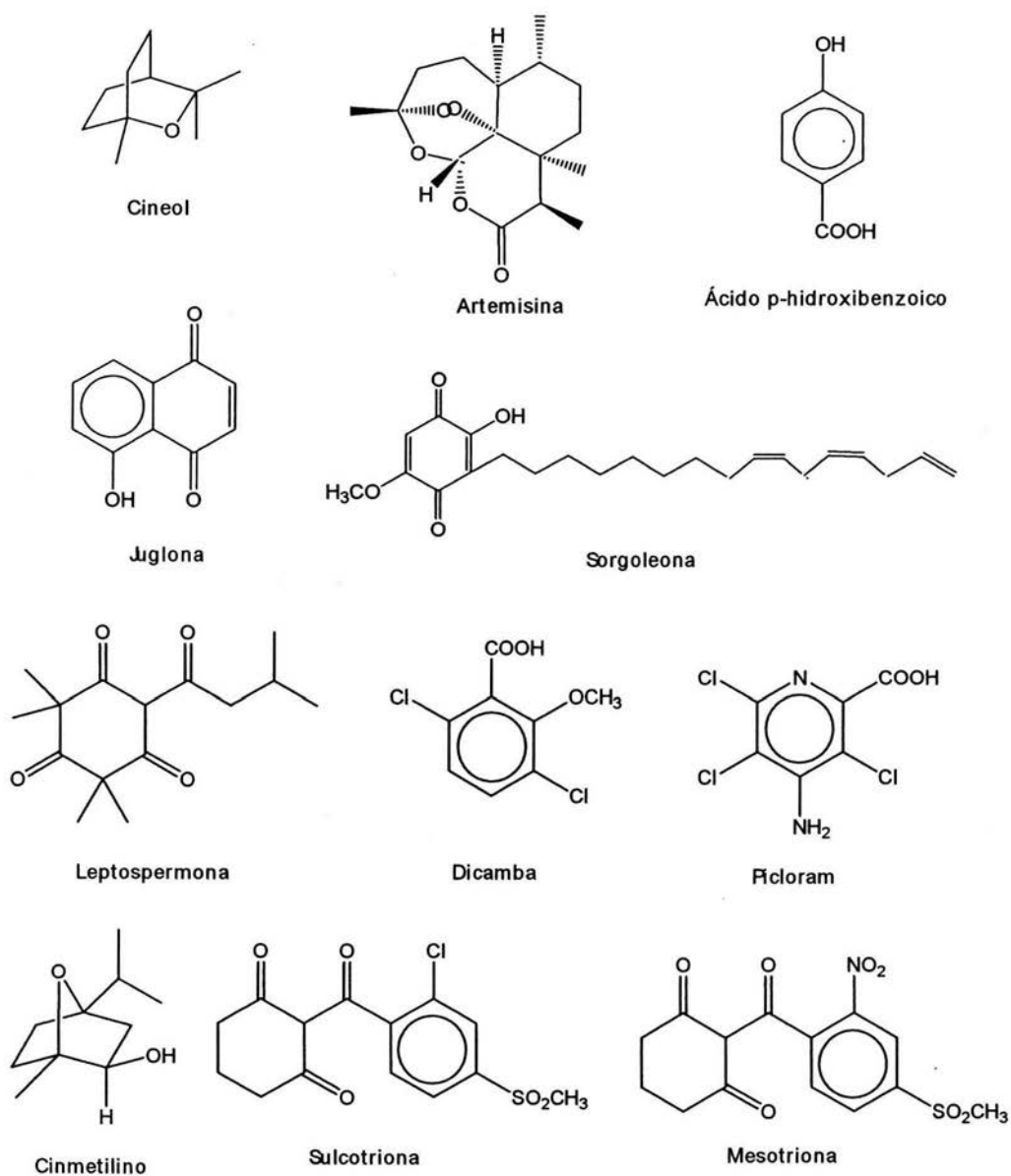


Figura 3. Compuestos de origen vegetal con actividad fitotóxica.

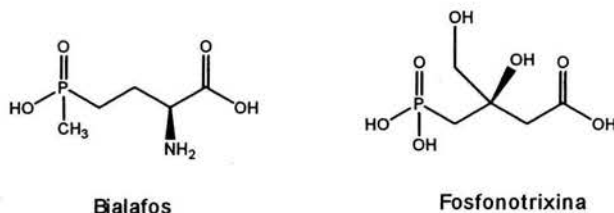


Figura 4. Compuestos de origen microbiano con actividad fitotóxica.

Muchos herbicidas interfieren con la organización estructural celular al modificar la biosíntesis de lípidos, de celulosa o al alterar la membrana y organelos celulares (Duke y Lyndon, 1993; Abbas *et al.*, 1997; Macías *et al.*, 2001) mientras que otros interfieren en el crecimiento y la reproducción celular como resultado de la modificación de la síntesis de ácidos nucleicos y el metabolismo del nitrógeno (Duke y Lyndon, 1993). Sin embargo, la mayoría de las fitotoxinas naturales estudiadas, al igual que los herbicidas sintéticos, interfieren con el abasto de energía de células vegetales al afectar los procesos metabólicos de la respiración mitocondrial, del transporte de electrones fotosintético (Lotina *et al.*, 1998) o de la biosíntesis de carotenoides y clorofila ((Duke y Lyndon, 1993; Cutler y Cutler 1999). Posiblemente esta tendencia se debe a que la fotosíntesis y la respiración celular constituyen los blancos de acción mejor estudiados.

Está bien documentado que la fotosíntesis es un proceso metabólico esencial para el crecimiento autotrófico de las plantas y es exclusivo en los vegetales, por lo tanto, constituye un blanco de acción altamente específico. Cabe mencionar que la mayoría de las fitotoxinas naturales o sintéticas que afectan la fotosíntesis ejercen su efecto a través de la inhibición del transporte de electrones fotosintético en el lado reductor del fotosistema II (Bowes *et al.*, 1980; Linscott, 1981; Percival y Baker, 1991).

Entre los compuestos de origen natural que ejercen su efecto fitotóxico a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial que han recibido mayor atención se encuentran productos de tipo quinonas, flavonoides, compuestos aromáticos simples y cumarinas. Es importante mencionar que la respiración mitocondrial representa la principal fuente de energía en forma de ATP en las semillas durante la etapa de inhibición (Bewley & Black, 1994). Por lo tanto, es de esperarse que cualquier alteración de este proceso puede interferir con la germinación de las semillas y como consecuencia con el desarrollo vegetal anormal que puede conducir a la muerte de las plantas por deficiencia de ATP. Cabe mencionar que la mayoría de los compuestos que afectan la respiración, ejercen su efecto al desacoplar la cadena transportadora de electrones, de la fosforilación oxidativa. En la Tabla 1 se resumen algunos ejemplos de compuestos naturales que afecta la fotosíntesis y respiración mitocondrial.

Tabla 1. Ejemplos selectos de compuestos naturales que afectan la fotosíntesis y la respiración mitocondrial.

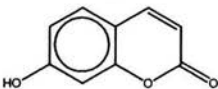
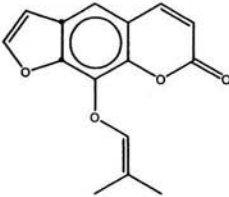
| Categoría | Ejemplo | Mecanismos en el que interfieren | Referencia |
|---------------|---|----------------------------------|-----------------------------|
| Quinonas | Juglona | Respiración mitocondrial | Reitveld, 1983 |
| Benzoquinonas | Sorgoleona | Fotosíntesis | Nimbal <i>et al.</i> , 1996 |
| Cumarinas | Umbeliferona | Respiración mitocondrial | Moreland y Noritzky, 1987. |
| |  Imperatonina | Fotosíntesis | Mata <i>et al.</i> , 1998 |
| |  | | |

Tabla 1. Ejemplos selectos de compuestos naturales que afectan fotosíntesis y respiración mitocondrial (continuación).

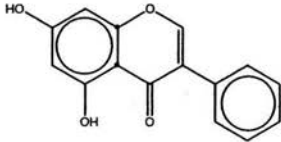
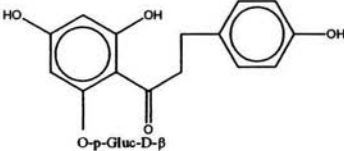
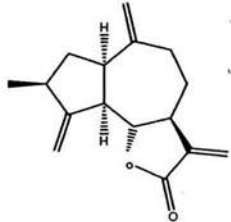
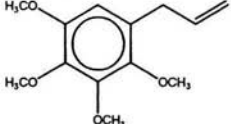
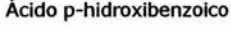
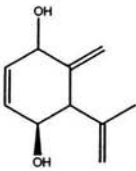
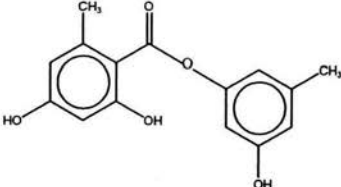
| Categoría | Ejemplo | Mecanismos en el que interfieren | Referencia |
|-------------------------------|--|----------------------------------|-----------------------------|
| Flavonoides | 5,7-dihidroxiisoflavona  | Respiración mitocondrial | Stenlid, 1970 |
| Lactonas sesquiterpénicas | Floridzina  O-p-Gluc-D-β | Fotosíntesis | Mc Carty, 1980 |
| Lactonas sesquiterpénicas | Zaluzanina  | Fotosíntesis | Lotina-Hennsen et al., 1992 |
| Fenilpropanoides | 1,2,3,4-tetrametoxi 5-(2-propenil)benceno  | Fotosíntesis | Jiménez et al., 1998 |
| Compuestos aromáticos simples | Ácido p-hidroxi benzoico  | Respiración mitocondrial | Tissut et al., 1980 |

Tabla 1. Ejemplos selectos de compuestos naturales que afectan fotosíntesis y respiración mitocondrial (continuación).

| Categoría | Ejemplo | Mecanismos en el que interfieren | Referencia |
|----------------------|--|----------------------------------|------------------------------|
| Benzofuranos | Euparina | Fotosíntesis | Lotina-Hennsen, 1998 |
| Resinas glicosídicas | Tricolorina | Fotosíntesis | Pereda-Miranda, 1993 |
| Monoterpenoides | Piquerol | Fotosíntesis | Mendoza <i>et al.</i> , 1994 |
| |  | | |
| Dépsidos | Lecanorina | Fotosíntesis | Rojas <i>et al.</i> , 2000 |
| |  | | |

A través de la información presentada se aprecia la gran potencialidad que la naturaleza nos brinda para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas que satisfagan las necesidades actuales de la agricultura. Sin embargo, aun y cuando el campo de los agroquímicos naturales se encuentra en pleno auge, éstos representan todavía una alternativa insuficiente para reemplazar a los herbicidas sintéticos debido a la poca demanda de los agricultores. En este sentido, es indispensable continuar con las investigaciones de carácter interdisciplinario que diversos grupos alrededor del mundo realizan en esta área y fomentar el empleo de estos agentes de tal manera que se conviertan en una alternativa real en los sistemas integrales para el control de las malezas.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

Las plantas nocivas representan uno de los mayores problemas a los que se enfrentan los agricultores a nivel mundial. Actualmente, se han identificado alrededor de 7000 especies de malezas, 250 de las cuales ocasionan los daños más severos a los cultivos de importancia económica. (Vyvyan, 2002). Estas malezas interfieren en el proceso productivo de cultivos, lo cual da como resultado una disminución del rendimiento de éstos. Para evitar pérdidas, los agricultores emplean un gran número de agentes herbicidas.

La mayoría de los herbicidas de uso comercial son de naturaleza sintética, y las ganancias por su comercialización representan aproximadamente el 70% de ventas totales por concepto de agroquímicos en los países desarrollados. A pesar de que estos agentes controlan malezas, reducen los costos derivados de la limpia de terrenos e incrementan los rendimientos de las cosechas; su uso excesivo provoca daños ambientales severos debido a sus altos índices de persistencia, y daños a animales y el hombre, esto último como resultado de su poca selectividad. También ocasionan la aparición de malezas resistentes a los tratamientos (Cramer, 2000). Por ejemplo, la especie *Echinochloa crus-galli*, que daña cultivos de arroz, ha desarrollado resistencia al dicofob y al propanil. Así mismo, varias especies de *Amaranthus* que provocan daños a los cultivos de trigo, maíz, sorgo y caña de azúcar han desarrollado resistencia a las triazinas atrazina y azimacina. Otros herbicidas que han inducido resistencia son el dorosulfuron, el paraquat, el metildicofop, el 2,4-D, el amitrol, el metador, el trialato, el bromoxinil, el glifosato y el dorotoluron (Heap, 1997).

Entre los herbicidas sintéticos que causan daños agudos o crónicos tanto a animales como al hombre, se encuentran el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el linuron, el dicamba y la atrazina, algunos de los cuales inclusive presentan propiedades carcinogénicas importantes (Barnard *et al.*, 1997).

Con base en las consideraciones anteriores, se han desarrollado alrededor del mundo programas dirigidos a encontrar estrategias alternativas que protejan los cultivos de interés económico, para así garantizar la obtención de productos biodegradables con mayor especificidad en su acción y menos tóxicos para el hombre y animales. Entre las alternativas tenemos la rotación de cultivos, eliminación manual de la maleza, manipulación genética, empleo de bioherbicidas y la búsqueda de fitotoxinas de origen natural a través del diseño biorracional (Cremlyn, 1991; Abell *et al.*, 1993; Cutler & Cutler, 1999; Vyvyan, 2002; inter alia).

Por las razones expuestas, la búsqueda de agentes fitotóxicos de origen natural se encuentra plenamente justificada, y en este sentido, la gran diversidad vegetal de México ofrece una fuente invaluable de productos biodinámicos que podrían constituir la base de nuevos herbicidas. De este modo, en la Facultad de Química de la UNAM, se ha desarrollado un programa interdisciplinario destinado a explorar el potencial fitotóxico de especies selectas de la flora mexicana con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos herbicidas verdes. En este programa, la preselección de las materias primas se lleva a cabo con base en los criterios convencionales: etnomédico, ecológico y quimiotaxonómico. Una vez preseleccionadas, las materias primas son sometidas a pruebas biológicas de selección, que consisten en la determinación del efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de los vegetales mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación, el crecimiento radicular y la producción de biomasa en las diversas especies de prueba. Posteriormente, se procede a la obtención de los principios activos a partir de aquellas especies que demuestren una actividad fitotóxica significativa, para lo cual los extractos se someten a un fraccionamiento biodirigido, generalmente se utiliza un método bioautográfico para monitorear la actividad fitotóxica.

Una vez que se identifican los compuestos separados de las fracciones activas, se evalúan para determinar su potencial fitotóxico.

En el marco de este proyecto, la especie *Hofmeisteria schaffneri* (A. Gray) King & Robinson (Asteraceae) fue seleccionada inicialmente como una fuente potencial de productos fitotóxicos con base en el criterio etnomédico (Cutler & Cutler, 1999).

Por lo tanto, el objetivo primordial de este proyecto consiste en determinar el potencial fitotóxico de la especie *Hofmeisteria schaffneri* con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes herbicidas biodegradables y de menor toxicidad.

Para el cumplimiento del objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- i. Determinar el potencial fitotóxico del extracto íntegro y de las fracciones primarias de *H. schaffneri* mediante la aplicación del método de la caja de Petri.
- ii. Separar al menos una de las fitotoxinas mediante la realización de un estudio biodirigido aplicando técnicas cromatográficas y homogenizar los métodos bioautográficos para monitorear actividad.
- iii. Caracterizar los compuestos aislados mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- iv. Determinar el potencial fitotóxico de los metabolitos aislados mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*).

3. PARTE EXPERIMENTAL.

3.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES.

3.1.1 Análisis cromatográficos.

En los análisis de cromatografía en capa fina tipo analítico (CCF) se utilizaron placas de aluminio de distintas dimensiones recubiertas con una capa de gel de sílice de 0.25 mm de espesor (silica Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck). Los análisis cromatográficos en columna abierta se realizaron en columnas de vidrio empacadas con gel de sílice (silica gel 60 Merck, tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm, malla de 70-230 μ), empleando varios sistemas de elución. La visualización de las placas se realizó con una lámpara de luz UV (onda corta, 254 nm; onda larga, 356 nm) y sulfato cérico como agente cromógeno; para el desarrollo de color, las placas cromatográficas se calentaron en una parrilla eléctrica con una temperatura aproximada de 30 °C.

3.1.2 Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros en el infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599-B, utilizando la técnica de pastilla de KBr o película. Los análisis de espectrometría de masas por impacto electrónico (EM-IE) se realizaron en un espectrómetro de masas HP 5890.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-¹H) y de Carbono-13 (RMN-¹³C), se registraron en un aparato Varian VXR-300S, el cual se operó a una frecuencia de 300 MHz para protón y 75 MHz para carbono-13. Los desplazamientos químicos se asignaron en ppm referidos a Tetrametilsilano (TMS) que se utilizó como referencia interna. Los espectros se registraron en CDCl₃.

Los análisis de IR, RMN y masas, se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. Los espectros NOESY y HMBC fueron registrados en el Instituto de Química de la UNAM.

3.2 MATERIAL VEGETAL.

Las partes aéreas de la especie *Hofmeisteria schaffneri* se recolectaron en San Luis Potosí en noviembre de 2002. En el Herbario Nacional (MEXU) se depositó un ejemplar de referencia [Voucher: R. Bye & E. Linares 31018]. La recolección e identificación fue realizada por el Dr. Robert Bye, del Instituto de Biología, UNAM. El material vegetal fue desecado a temperatura ambiente y fragmentado en un molino Wiley modelo 4.

3.3 ENSAYOS BIOLÓGICOS.

3.3.1 Determinación del potencial fitotóxico del extracto activo, de las fracciones primarias y del metabolito aislado mediante el método de la caja de Petri.

La determinación del potencial fitotóxico del extracto, de las fracciones primarias y del compuesto aislado se realizó por medio de la evaluación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) utilizando el método de la caja de Petri (Anaya *et al.*, 1990; 1995). El bioensayo se realizó en cajas de Petri de 10 cm de diámetro. Las muestras fueron disueltas en diclorometano y mezclas de diclorometano-metanol; se prepararon diluciones a una concentración final de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Tres mililitros de cada una de las disoluciones con las concentraciones apropiadas se adicionó sobre un disco de papel filtro (Whatman #1) en cajas de Petri, el disolvente se evaporó por medio de una corriente de aire.

Una vez evaporado el disolvente, se adicionaron tres mililitros de agua destilada sobre el papel filtro y se colocaron 20 semillas de *A. hypochondriacus* en cada caja. Como control positivo se utilizó un herbicida comercial el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), a una concentración de 5 µg/mL. Como blanco se empleó agua y una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (1:1).

3.3.2 Determinación del efecto fitotóxico de la fracción F4-4 mediante un método bioautográfico.

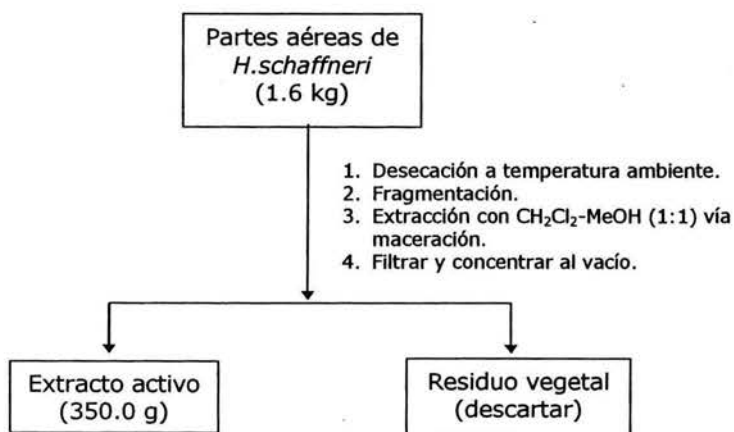
Para monitorear la actividad fitotóxica a lo largo del estudio fitoquímico se empleó la técnica cualitativa de bioautografía (Anaya *et al.*, 1990; 1995) Para ello se emplearon placas de vidrio de 20.0 x 2.5 cm recubiertas de gel de sílice. En cada placa se aplicaron 10 µg de la fracción a evaluar; posteriormente cada placa se eluyó en un sistema previamente seleccionado, empleando los métodos convencionales de cromatografía en capa fina. Finalizada la elución, se evaporó el disolvente de las cromatoplasmas y se cubrieron con 15 mL de una suspensión de agar bacteriológico (Bioxon) al 1%. Una vez solidificado el agar, se colocaron las semillas de prueba hasta cubrir completa y homogéneamente la superficie. Las placas se incubaron en una atmósfera húmeda a 28 °C durante 24 h. Transcurrido el periodo de incubación, se observaron las zonas de inhibición de la germinación y crecimiento radicular de las semillas de amaranto. Como control positivo se empleó el 2,4-D y como blanco agua.

3.4 ESTUDIO FITOQUIMICO DE LA ESPECIE *Hofmeisteria schaffneri*.

3.4.1 Preparación del extracto.

El material vegetal seco (1.6 Kg) se extrajo mediante un proceso de maceración con 45 L de una mezcla CH₂Cl₂-MeOH (1:1), el extracto resultante se filtró y concentró al vacío obteniendo así 350.0 g de extracto crudo.

Posteriormente, se determinó la actividad fitotóxica del extracto íntegro mediante la técnica de la caja de Petri. En el Esquema 1 se resume el proceso de extracción.

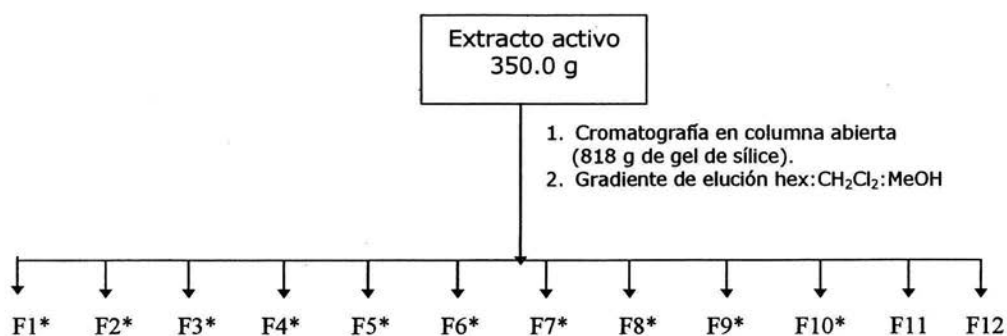


Esquema 1. Obtención del extracto activo de *H. schaffneri*.

3.4.2 Fraccionamiento primario del extracto de *Hofmeisteria schaffneri*.

El extracto íntegro (350.0 g) se sometió a una separación vía cromatografía en columna abierta, empleando una columna de vidrio empacada con gel de sílice 818 g y como eluyentes mezclas de hexano-CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂-MeOH, obteniéndose un total de 12 fracciones primarias. (Cuadro 1). Este proceso se resume en el Esquema 2.

Cabe mencionar que los procesos de extracción y fraccionamiento primario se realizaron durante el estudio de Gurrola (2003).



* Fracciones activas

Esquema 2. Fraccionamiento primario del extracto activo de *H. schaffneri*.

Los procedimientos fitoquímicos que se mencionarán de aquí en adelante corresponden al estudio de las fracciones primarias y fraccionamientos secundarios realizados a lo largo de este trabajo.

Cuadro 1. Fraccionamiento primario del extracto de las partes aéreas de la especie *Hofmeisteria schaffneri* mediante cromatografía en columna abierta.

| Fracciones | Sistema de elución | Proporción (%) | Fracciones reunidas | Clave | Peso (g) |
|------------|---------------------------------------|----------------|---------------------|-------|----------|
| 1-48 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 50:50 | 1-7 | F1* | 0.6132 |
| 49-65 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 40:60 | 8-14 | F2* | 5.1754 |
| 66-111 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 30:70 | 15-29 | F3* | 4.5764 |
| 112-120 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 20:80 | 30-67 | F4* | 16.6700 |
| 121-131 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 10:90 | 68-149 | F5* | 13.5091 |
| 132-145 | CH ₂ Cl ₂ | 100 | 150-173 | F6* | 12.0780 |
| 146-159 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 99:1 | 174-192 | F7* | 2.1029 |
| 160-186 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 98:2 | 193-203 | F8* | 2.2852 |
| 187-198 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 97:3 | 204-243 | F9* | 23.0178 |
| 199-214 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 96:4 | 244-253 | F10* | 13.5010 |
| 215-229 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 95:5 | 254-259 | F11 | 7.2900 |
| 230-244 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 90:10 | 260-272 | F12 | 18.3330 |
| 245-250 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 80:20 | | | |
| 251-261 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 70:30 | | | |
| 262-266 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 60:40 | | | |
| 267-272 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 50:50 | | | |

*Fracciones fitotóxicas activas contra *A. hypochondriacus*.

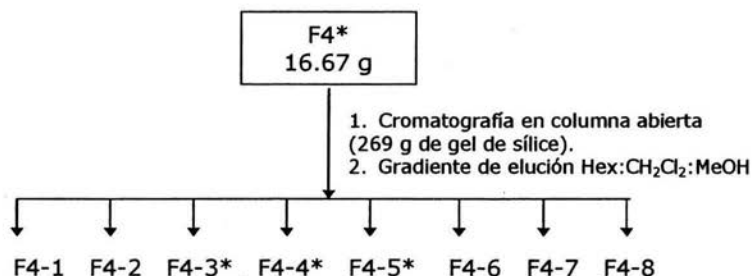
3.4.3 Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa F4.

La fracción primaria F4* (16.67 g) se sometió a un fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta, empleando una columna de vidrio empacada con gel de sílice (269 g) y un gradiente de elución de hexano-CH₂Cl₂-MeOH, obteniéndose las ocho fracciones secundarias indicadas en el Cuadro 2. El ensayo bioautográfico indicó que en las fracciones F4-3, F4-4 y F4-5 se concentraba la mayor actividad fitotóxica.

Cuadro 2. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa F4 de la especie *Hofmeisteria schaffneri*, mediante cromatografía en columna abierta.

| Fracciones | Sistema de elución | Proporción (%) | Fracciones reunidas | Clave | Peso (g) |
|------------|---------------------------------------|----------------|---------------------|-------|---------------------|
| 1-8 | Hex | 100 | 1-27 | F4-1 | 9.9 E ⁻³ |
| 9-12 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 90:10 | 28 | F4-2 | 0.0309 |
| 13-17 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 80:20 | 29-34 | F4-3* | 1.8364 |
| 18-23 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 70:30 | 35-52 | F4-4* | 2.600 |
| 24-27 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 60:40 | 53-84 | F4-5* | 1.9927 |
| 28-40 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 50:50 | 85-93 | F4-6 | 0.0249 |
| 41-51 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 40:60 | 94-98 | F4-7 | 1.1386 |
| 52-61 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 30:70 | 99-102 | F4-8 | 0.0197 |
| 62-69 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 20:80 | | | |
| 70-75 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 10:90 | | | |
| 76-86 | CH ₂ Cl ₂ | 100 | | | |
| 87-93 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 99:1 | | | |
| 94-98 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 90:10 | | | |
| 99-102 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 50:50 | | | |

*Fracciones fitotóxicas contra *A. hypochondriacus*.



* Fracciones activas.

Esquema 3. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa F4.

3.4.4 Obtención del acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo.

La fracción secundaria activa F4-4 (2.60 g) se sometió a un fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta, empleando una columna de vidrio empacada con gel de sílice (80 g), y un gradiente de elución de hexano-CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂-MeOH. Como resultado de este proceso se obtuvieron 11 fracciones terciarias (Cuadro 3).

El ensayo de fitotoxicidad permitió determinar que la actividad fitotóxica se concentraba en la fracción terciaria F4-4-8 (342.0 mg). Esta fracción se sometió a otro fraccionamiento vía cromatografía en columna abierta, empleándose una columna de vidrio empacada con gel de sílice (10.2 g), y como eluyentes mezclas de hexano-CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂-MeOH, obteniéndole en total

142 fracciones de 7.5 mL cada una. Las fracciones que presentaron perfiles cromatográficos similares se combinaron para así obtener 10 fracciones cuaternarias. (Cuadro 4).

Cuadro 3. Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria activa F4-4 de la especie *Hofmeisteria schaffneri*, mediante cromatografía en columna abierta.

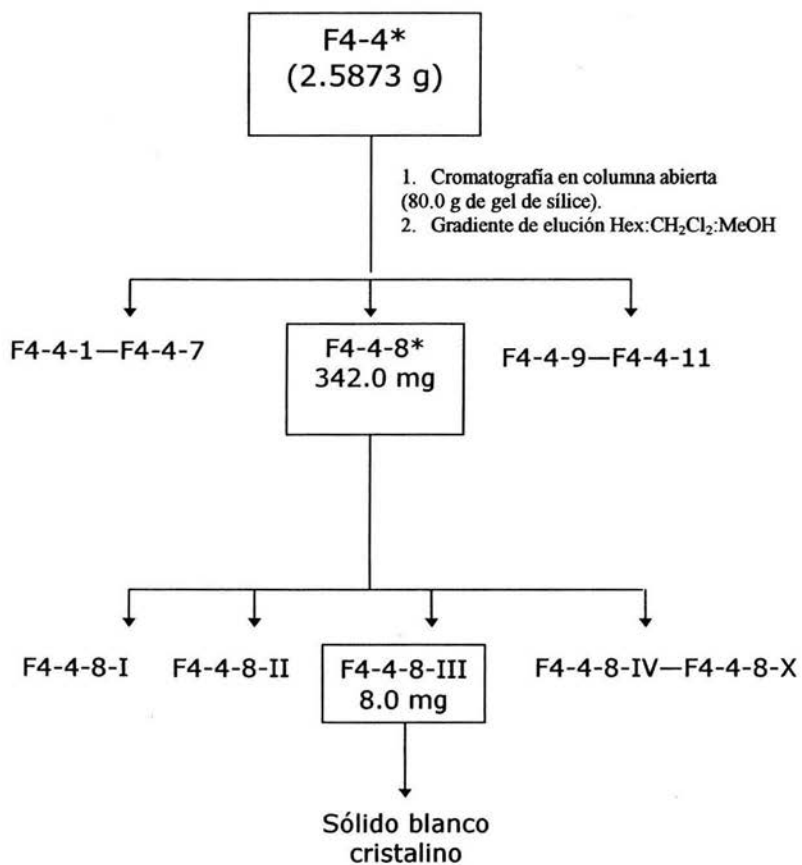
| Fracciones | Sistema de elución | Proporción (%) | Fracciones reunidas | Clave | Peso (mg) |
|------------|---------------------------------------|----------------|---------------------|---------|-----------|
| 1-9 | Hex | 100 | 1-20 | F4-4-1 | 3.1 |
| 10-20 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 75:25 | 21-23 | F4-4-2 | 2.0 |
| 21-77 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 50:50 | 24-32 | F4-4-3 | 14.2 |
| 78-96 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 40:60 | 33-39 | F4-4-4 | 3.8 |
| 97-124 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 30:70 | 40-94 | F4-4-5 | 158.0 |
| 125-152 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 20:80 | 95-107 | F4-4-6 | 110.2 |
| 153-165 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 10:90 | 108-125 | F4-4-7 | 95.3 |
| 166-198 | CH ₂ Cl ₂ | 100 | 126-194 | F4-4-8* | 342.0 |
| 199-230 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 99:1 | 195-234 | F4-4-9 | 632.9 |
| 231-244 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 98:2 | 235-240 | F4-4-10 | 67.9 |
| 245-254 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 97:3 | 241-308 | F4-4-11 | 154.0 |
| 255-265 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 96:4 | | | |
| 266-276 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 90:10 | | | |
| 277-285 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 85:15 | | | |
| 286-292 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 70:30 | | | |
| 293-300 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 50:50 | | | |
| 301-307 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 25:75 | | | |
| 308 | MeOH | 100 | | | |

*Fracción fitotóxica contra *A. hypochondriacus*.

Cuadro 4. Fraccionamiento cuaternario de la fracción terciaria F4-4-8 de la especie *Hofmeisteria schaffneri*, mediante cromatografía en columna abierta.

| Fracciones | Sistema de elución | Proporción (%) | Fracciones reunidas | Clave | Peso (mg) |
|------------|---------------------------------------|----------------|---------------------|-------------|-----------|
| 1-8 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 70:30 | 1-17 | F4-4-8-I | 4.3 |
| 9-13 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 60:40 | 18-32 | F4-4-8-II | 11.0 |
| 14-17 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 50:50 | 33-37 | F4-4-8-III* | 8.0 |
| 18-22 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 40:60 | 38-43 | F4-4-8-IV | 14.7 |
| 23-27 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 30:70 | 44-62 | F4-4-8-V | 37.1 |
| 28-32 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 20:80 | 63-88 | F4-4-8-VI | 8.6 |
| 33-110 | Hex:CH ₂ Cl ₂ | 10:90 | 89-118 | F4-4-8-VII | 9.7 |
| 111-122 | CH ₂ Cl ₂ | 100 | 119-134 | F4-4-8-VIII | 4.3 |
| 123-134 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 98:2 | 135-137 | F4-4-8-IX | 110.0 |
| 135-138 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 96:4 | 138-142 | F4-4-8-X | 19.6 |
| 139-142 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH | 90:10 | | | |

De la fracción F4-4-8-III cristalizó espontáneamente un sólido cristalino blanco, soluble en CH₂Cl₂, el cual se lavó sucesivamente con hexano para así generar 8.0 mg de acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo con un punto de fusión de 87 °C. El proceso global se resume en el Esquema 4.



Esquema 4. Aislamiento y purificación del acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Selección de la especie *Hofmeisteria schaffneri* como un candidato idóneo para la obtención de principios activos.

La preselección de la especie *Hofmeisteria schaffneri* se realizó con base en el criterio etnomédico, el cual constituye uno de los criterios más importantes para seleccionar materias primas destinadas al descubrimiento de sustancias biológicamente activas (Miller & Gerau, 2000).

Posteriormente, durante la realización de los ensayos biológicos preliminares, realizados al inicio de esta investigación se estableció que el extracto crudo de esta especie posee propiedades fitotóxicas sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus*. El extracto inhibió de manera significativa el crecimiento de la arvense; la concentración inhibitoria media (IC₅₀) calculada fue de 52.2 µg/mL.

Considerando los resultados obtenidos en las evaluaciones biológicas preliminares, se decidió realizar el estudio fitoquímico biodirigido de *H. schaffneri* con la finalidad de comenzar el aislamiento de los principios fitotóxicos.

4.2 Fraccionamiento primario y evaluación de la fitotoxicidad de las fracciones primarias.

La preparación del extracto activo se realizó mediante un proceso de maceración utilizando como disolvente de extracción una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH 1:1. Posteriormente el extracto se sometió a un fraccionamiento primario mediante una cromatografía en columna sobre gel de sílice. Este proceso permitió la obtención de 12 fracciones primarias, de las cuales 10 fueron

fitotóxicas contra *Amaranthus hypochondriacus* de acuerdo al ensayo de la caja de Petri (Cuadro 5).

Cuadro 5. Actividad fitotóxica sobre *Amaranthus hypochondriacus* del extracto integro y fracciones primarias de *H. schaffneri*.

| Producto de la planta | IC ₅₀ (µg/mL) |
|-----------------------|--------------------------|
| Extracto | 52.54 |
| F1 | 113.05 |
| F2 | 75.81 |
| F3 | 63.09 |
| F4 | 52.78 |
| F5 | 45.39 |
| F6 | 47.21 |
| F7 | 154.88 |
| F8 | 100.51 |
| F8 | 258.80 |
| F10 | 589.52 |
| F11 | > 1000 |
| F12 | > 1000 |

Como se desprende de la información presentada en el Cuadro 5, las fracciones más activas fueron F4, F5 y F6.

4.3 Aislamiento del acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo.

El fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa F4 a través de una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice permitió la obtención de ocho fracciones secundarias. El ensayo de bioautografía indicó que la actividad fitotóxica se concentraba en las fracciones F4-3, F4-4, y F4-5.

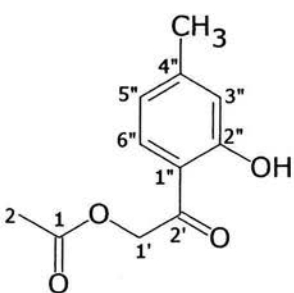
El fraccionamiento terciario de la fracción secundaria activa F4-4 por cromatografía en columna abierta condujo a la obtención de 11 fracciones terciarias. Después del ensayo bioautográfico, se observó que la actividad fitotóxica se concentraba en la fracción terciaria F4-4-8, por lo que a ésta se le sometió a un fraccionamiento cuaternario. A partir de la fracción F4-4-8-III cristalizó el acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo, el cual constituye un nuevo producto natural.

4.4 Caracterización del acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo.

El acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo se aisló como un sólido cristalino blanco con un punto de fusión de 87 °C.

Su fórmula molecular se estableció por espectrometría de masas como $C_{11}H_{12}O_4$, observándose el ion molecular en una relación m/z de 208. La fórmula molecular calculada permite un índice de deficiencia de hidrógeno de seis. El espectro en el IR presenta bandas de absorción asociadas con la presencia de un carbonilo de éster (1747 cm^{-1}), una cetona conjugada (1657 cm^{-1}), un hidroxilo de tipo fenólico (3300 y 1228 cm^{-1}) y un núcleo aromático (1570 , 1508 , 931 cm^{-1}).

Cuadro 6. Constantes físicas, espectroscópicas (IR, UV) y espectrométricas (EM/IE) del acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo.

| | |
|--|--|
| Metabolito |  <p>Acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo.</p> |
| Fórmula molecular | C ₁₁ H ₁₂ O ₄ |
| Peso Molecular | 208 |
| Punto de fusión | 87 °C |
| IR $\nu_{\text{máx}}$ (Película) | 3500, 2920, 2851, 1747, 1657, 1508, 1428, 1382, 1276, 1228, 1205, 1076, 998, 797, 754, 446. |
| EM-IE m/z (int. rel.) | 208 [M ⁺](33), 166 (48), 149 (18), 135 (100), 119 (6), 107 (21), 91 (3), 77 (21), 53 (5), 43 (15) |
| UV ($\lambda_{\text{máx}}$) | 328, 263 |

El análisis de los espectros de RMN permitió determinar la presencia de un anillo aromático trisustituído y corroboró la presencia de los grupos carbonilo (cetona y éster) e hidroxilo fenólico.

Las características más relevantes de los espectros se resumen a continuación:

- En δ_H 11.6 se aprecia un singulete que integra para un hidrógeno y que es característico de un grupo fenólico quelatado.
- Las señales en δ_H 7.49 (d, $J = 8.4$ Hz, H-6''), 6.83 (m, H-3'') y 6.73 (dddd, $J = 8.1, 1.5, -, 1.5$ Hz, H-5'') conforman un sistema ABX característico de un anillo aromático trisustituído. Todas las señales del sistema ABX correlacionan en el espectro HETCOR con las señales en δ_C 128 (C-6''), 121 (C-3'') y 119 (C-5''), respectivamente. De esta manera se realizó la asignación de los carbonos protonados en el anillo aromático.
- En el espectro de RMN- ^{13}C se visualizó la presencia de 5 carbonos no protonados en δ_C 196.4 (C-2'), 170.1 (C-1), 162.5 (C-2''), 149 (C-1'') y 115 (C-4''), estos son asignables a una cetona conjugada, a un carbonilo de éster, a un carbono aromático unido a oxígeno y a dos carbonos aromáticos cuaternarios, respectivamente.
- En δ_H 5.33 (H-1') se aprecia un singulete que integra para dos hidrógenos y es característico de un metileno unido a una función oxigenada y a un carbono sp_2 de un grupo ceto (Tori, *et. al*, 2001). Esta señal correlaciona en el espectro HETCOR con la absorción en δ_C 64.5. El desplazamiento químico de estas señales sugiere que la función oxigenada a la que se encuentra unido el metileno es un grupo acetoxi.
- En δ_H 2.36 se observa un singulete ancho correspondiente a un grupo metilo unido a un anillo aromático. Esta señal correlaciona en el espectro HETCOR con la señal en δ_C 22.
- En δ_H 2.24 se observa un singulete correspondiente al metilo de un grupo acetilo y que correlaciona en el espectro HETCOR con la señal en δ_C 20.

En el Cuadro 7 se ilustran los desplazamientos químicos (δ) correspondientes a los espectros de RMN Protónica y de Carbono-13.

Cuadro 7. Datos de RMN del acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo.

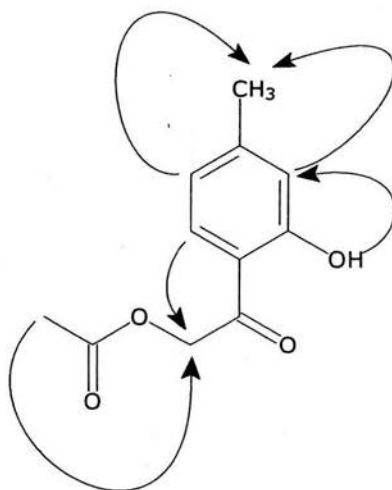
| Posición | δ_C (ppm) | δ_H (ppm) |
|-------------------------|------------------|-----------------------------|
| 2 | 20 | 2.24,s |
| ϕ -CH ₃ | 22 | 2.36,s _a |
| 1' | 64.5 | 5.33,s |
| 5" | 119 | 6.73,dddd (8.1, 1.5,-, 1.5) |
| 3" | 121 | 6.83,m |
| 6" | 128 | 7.49,d (8.4) |
| OH | - | 11.6 |
| 4" | 115 | - |
| 1" | 149 | - |
| 2" | 162.5 | - |
| 1 | 170.1 | - |
| 2' | 196.4 | - |

Espectro registrado en CDCl₃. Los valores entre paréntesis corresponden a las constantes de acoplamiento (*J*) en Hz.

Las correlaciones observadas en los espectros NOESY y HMBC permitieron ubicar los sustituyentes en el anillo aromático. En los Cuadros 8 y 9 y Esquemas 5 y 6 se resumen las correlaciones más relevantes.

Cuadro 8. Correlaciones del espectro NOESY del acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo.

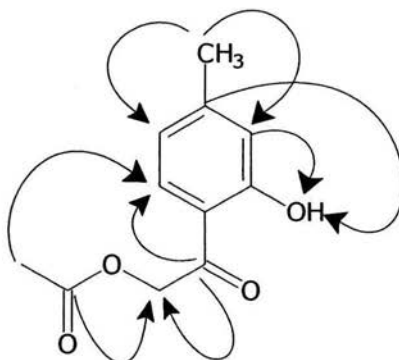
| Hidrógeno | δ_H | Correlaciones (H-H) |
|-------------------------|------------|---|
| H-2 | 2.24 | 5.33 (H-1') |
| ϕ -CH ₃ | 2.36 | 6.83 (H-3''), 6.73 (H-5'') |
| H-1' | 5.33 | 7.4(H-6''), 2.24(H-2) |
| H-5'' | 6.73 | 7.4(H-6''), 2.36(ϕ -CH ₃) |
| H-3'' | 6.83 | 11.6 (OH), 2.36(ϕ -CH ₃) |
| H-6'' | 7.49 | 6.83(H-3''), 5.33(H-1') |
| OH | 11.6 | 6.73(H-5''), 6.83(H-3'') |



Esquema 5. Correlaciones más relevantes del acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo observadas en el espectro NOESY.

Cuadro 9. Correlaciones más relevantes del espectro HMBC del acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo.

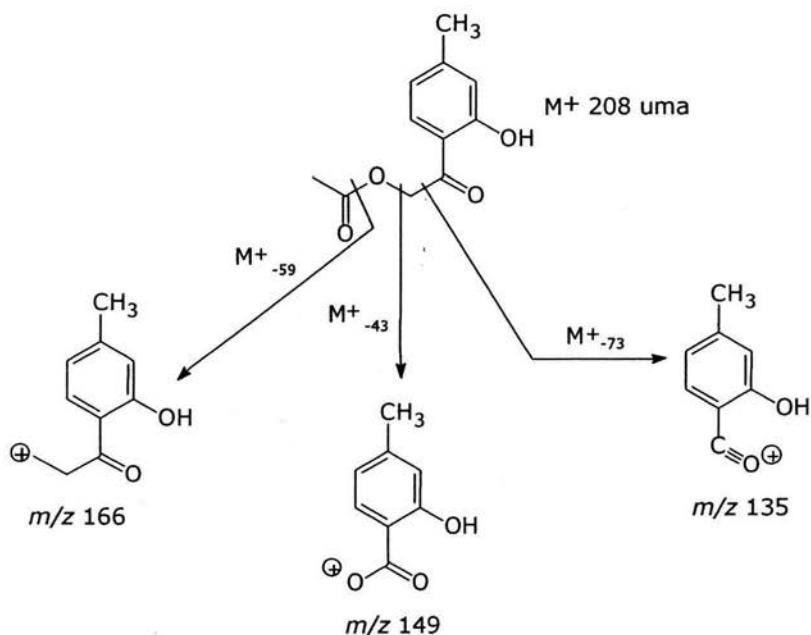
| Carbono | δ_c | Correlaciones (C-H) |
|-------------------------|------------|--|
| 2 | 20 | H- ϕ (2.36), H-3'' (6.83), H-5'' (6.73) |
| ϕ -CH ₃ | 22 | H-2 (2.24) |
| 1' | 64.5 | - |
| 5'' | 119 | CH ₃ - ϕ (2.36), H-5'' (6.73) |
| 3'' | 121 | CH ₃ - ϕ (2.36), OH (11.6), H-3'' (6.83) |
| 6'' | 128 | - |
| 4'' | 115 | H-5'' (6.73), H-3'' (6.83), OH (11.6) |
| 1'' | 149 | CH ₃ - ϕ (2.36), H-6'' (7.4) |
| 2'' | 162.5 | H-6'' (7.4), OH (11.6) |
| 1 | 170.1 | H-2 (2.24), H-1' (5.34) |
| 2' | 196.4 | H-6'' (7.4), H-1' (5.33) |



Esquema 6. Correlaciones más relevantes del acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo observadas en el espectro HMBC.

Así, la información de los espectros unidimensionales de RMN y el análisis de los espectros NOESY y HMBC (Cuadro 8 y 9) permitieron establecer que la estructura del producto natural corresponde al acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo. Este compuesto no ha sido reportado previamente en la literatura.

El patrón de fragmentación observado en el espectro de masas permitió corroborar la estructura propuesta. El fragmento en m/z 135 constituye el pico base y se genera mediante una ruptura homolítica en el metileno α al carbonilo de la cetona a partir del ion molecular de 208 uma. El fragmento con relación m/z 166 se genera por una ruptura homolítica perdiendo el radical acilo. Finalmente, el fragmento con relación m/z 149 se genera perdiendo 59 uma mediante una ruptura homolítica inducida por el grupo éster.



Esquema 7. Patrón de fragmentación del acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo.

La estructura de este nuevo producto natural es poco común y biogénicamente podría generarse a partir del monoterpenoide timol; el monoterpenoide timol debe perder un átomo de carbono de la cadena isopropanoide y sufrir la oxidación de un metilo al alcohol primario; la acetilación de este grupo generaría el compuesto natural objeto de este estudio.

4.5 Determinación del potencial fitotóxico del metabolito aislado.

El acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo se evaluó para determinar su potencial fitotóxico sobre la germinación y el crecimiento radicular de la arvense *Amaranthus hypochondriacus*, mediante el ensayo de la caja de Petri. El metabolito aislado presentó una IC₅₀ de 72.57 ppm.

Considerando que la fracción terciaria F4-4-8 presentó una IC₅₀ de 37µg/mL, es probable que se encuentren presentes otros metabolitos activos y que el efecto detectado sea el resultado de una acción sinérgica. Alternativamente se puede especular que existen productos en el extracto con una mayor actividad que el acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo.

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

- Los resultados del presente trabajo demuestran que la selección de especies vegetales con base en el criterio etnomédico nos permite la obtención de productos naturales biodinámicos. Así, el estudio fitoquímico biodirigido de la especie *Hofmeisteria schaffneri* permitió el aislamiento y caracterización del acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo, un metabolito con propiedades fitotóxicas no reportado previamente en la literatura.
- El acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo inhibió de manera significativa la germinación y el crecimiento radicular en semillas de *Amaranthus hypochondriacus*.
- Aunque el metabolito aislado es activo, la IC₅₀ de la fracción terciaria de donde se obtuvo nos hace pensar que en ella existen metabolitos con una mayor actividad. Probablemente el efecto de la fracción se debe al efecto sinérgico del metabolito acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo y de otros metabolitos presentes en la fracción.
- La fitotoxina aislada constituye un prototipo estructural para diseño y síntesis de productos novedosos que podrían presentar mayor potencia y eficacia que los compuestos utilizados comercialmente.
- Este trabajo representa una aportación al conocimiento de la flora medicinal mexicana y al campo de los productos naturales con propiedades fitotóxicas.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Abell, L. M., Schloss, J. V. & Rendina, R. (1993). Target-site direct herbicide design. En: Pest control with enhanced environmental safety. Duke, S.; Menn, J.; Plimmer (Eds.). *ACS Symposium Series* **524**. Washington, D. C. 17-37.
- Anaya, A. L., Calera, M., Mata, R. & Pereda-Miranda, R. (1990). Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology* **16**, 2145-2152.
- Anaya, A. L., Hernández, B. E., Calera, M. R., Torres, A., Pelayo, H. & Fernández, E., A methodological model used in the search for allelopathic potential in some Mexican plants. En: *Methodology for Allelopathic Research*. Waller, G. R. & S. Narwal (Eds).
- Barnard, C., Daberkow, S., Padgitt, M., Smith, M. & Uri, N. (1997). Alternative measures of pesticide use. *The Science of the Total Environment* **203**, 229-244.
- Bewley, J. & Black, M. (1994). Seeds. Physiology of development and germination. Segunda Edición. Plenum Press, New York, 1-33, Pp 147-198.
- Bowes, J., Croft & A. R. Arzen, Redox reactions on the reducing side of photosystem II in chloroplasts with altered herbicide binding properties. *Ach. Bioch. Bioph.* **200**, 30-308.
- Cramer, H.M. (2000). Crop Protection. En: *Agrochemicals. Composition, Production, Toxicology Applications*. F. Müller (Ed.). Willey-VCH. Federal Republic of Germany, 288-317.

- Cremlyn, R.J. (1991). Agrochemicals preparation and mode of action. John Willey & Sons, Chichester, England, Pp 37-51, 217-270 y 341-360.
- Cutler, H. & Cutler, S. (1999). Agrochemicals and Pharmaceuticals: The Connection. En: *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals*. Cutler, H.; Cutler, S. (Eds.). CRC Press. Boca Raton, Florida, Pp 1-14.
- Duke, S. & Abbas, H. (1995). Natural Products with Potential Use as Herbicides. En: *Allelopathy Organisms, Process and Applications*. M. Inderjit, M. Dakshini Y. F. (Eds.). *ACS Symposium Series 582*. Washington, D. C. Pp 96-116 y 348-362.
- Duke, S. & Lyndon, J. (1993). Natural phytotoxins as herbicides. En: *Pest control with enhanced environmental safety*. Duke, S., Menn, J., Plimmer (Eds.). *ACS Symposium Series 524*, Washington, D. C. Pp 111-124.
- Espinosa-García, F. & Delgado, G., (1998). Relationship between Ecology of Plants Defense and the Prospection of Secondary Metabolites with Potential Medicinal or Agricultural Application. *Rev. Latinoamer. Quím.* **26** (1), 13-29.
- Gurrola, V., (2003). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. "Compuestos antibacterianos de las especies *Alvaradoa amorphoides* Liebm (Simaroubaceae) y *Hofmeisteria schaffneri* (A. Gray) King & Robinson (Asteraceae)".
- Harborne, J. (1998). Recent Advances in Chemical Ecology. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 509-523.
- Heap, I.M. (1997). The Occurrence of herbicide-resistance weeds worldwide. *Pesticide Science* **51**, 235-243.

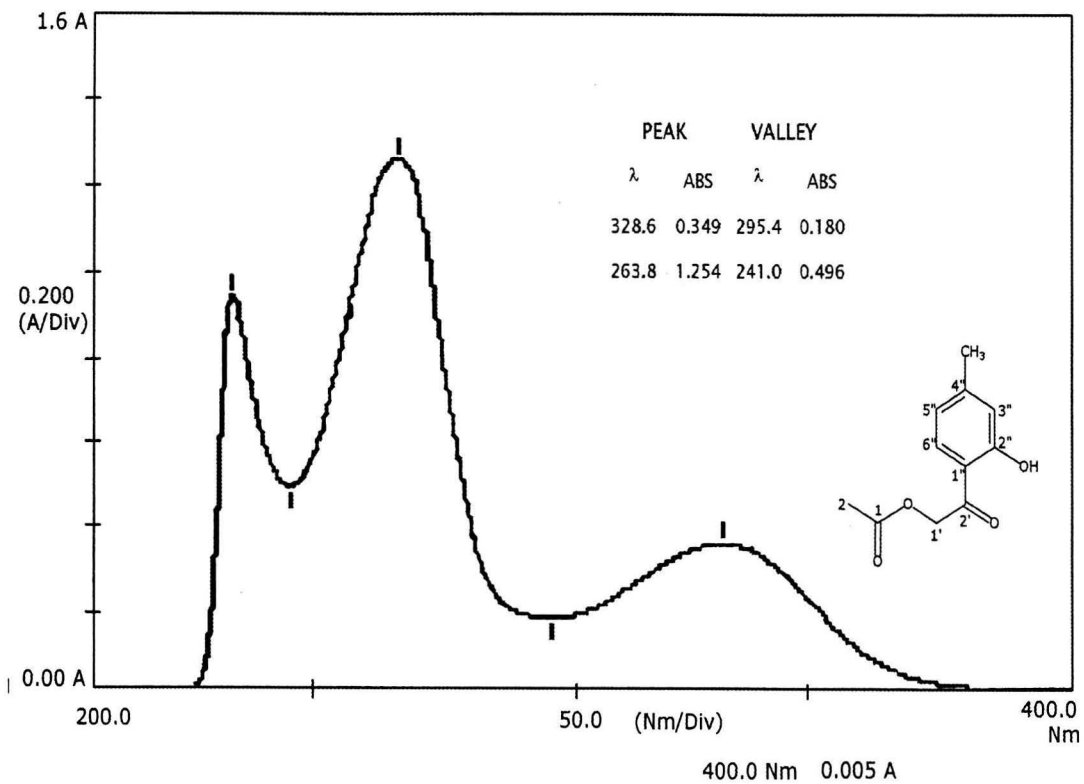
- Inoue, M., Nishimura, H., Li, H. & Mizutani, J. (1992). Allelochemicals of *Polygonum sachaliense* FR.SCHM (*Polygonaceae*). *J. of Chem Ecol.* **18**, 1833-1840.
- King, R. M., 1967. Studies in the Eupatorieae (Compositae) IV. *Hofmeisteria schaffneri*. *Rhodora* **69**:352-371.
- Linscott, D. L. (1981). The nature mode of action and toxicity of herbicides. En: Handbook of pest management in agriculture. Pimentel, D. (Ed.). Vol. III CRC Press., Pp 759-794.
- Lotina-Hennsen, B., Mata, R., Calderón, J., Céspedes-Acuña, C. & Jiménez Estrada, M. (1998). Secondary metabolites from mexican plants: target and mechanism of action on photosynthesis. *Recent Res. Devel. In Agricultural & Food Chem.* **2**, 731-749.
- Lotina-Hennsen, B., Bernal-Morales, E., Romo de Vivar, A., Pérez, A. L., Castro, A. & Aguilar, M., (1992). *J. Chem. Ecol.* **18**, 1891.
- Mata, R., Pereda-Miranda, R. & Lotina-Hennsen, B. (1996). En: Secondary Metabolites from Mexican Plants: Chemistry and Biological Properties. L. Rodríguez-Hahn. (Ed.) Research Signpost, Trivandrum. Pp 59-68.
- Mc Carty. R.E. (1980). Delineation of the mechanisms of ATP shynthesis in chloroplasts: Use of uncouplers, energy transfer inhibitors, and modifiers of coupling factor. *Methods in Enzymol.* **69**, 719-728.
- Mc Vaugh, R., 1984. Compositae, in W.R. Anderson (Ed.) Flora Novo-Galiciana, A Descriptive Account of the Vascular Plants of Western Mexico. Ann Arbor, MI: University of Michigan Herbarium. **12**:1-1157.[*Hofmeisteria*: Pp. 516-521].

- Miller, J. S. & Gerau, R. E. (2000). Therapeutic Potential and Plant-Derived Compounds: Realizing the Potential. En: *Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals S..J. Cutler & H. G. Cutler, (Eds). CRC Press; New York, Pp 25-38.*
- Miyakado, M., Watanabe, J. & Miyamoto, J.(1997). Natural Products as Leads in Estructural Modification Studies Yielding New Agrochemicals. En: *Phytochemicals for Pest Control. P. Hedin et al. (Eds.). ACS Symposium Series 658. Washington, D. C. Pp 168-182.*
- Moreland, D.E. & Novitzky W.P. (1987). Effects on phenolic acids, coumarins and flavonoids on isolated chloroplasts and mitochondria. En: *Allelochemicals: role in agriculture and forestry. Waller, G.R. (Ed.). ACS Symposium Series, Washington, D.C., Pp 246-261.*
- Nimbal, C.I., Pederson, J.F., Yerkes, C.N., Weston L.A. & Weller, S.C. (1996). *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1343-1347.
- Percival, M.P. & Baker, N.R. (1991). Herbicides and photosynthesis. En: *Herbicides. Baker, N.R. (Ed.). Elsevier Science Publishers. Pp 1-26.*
- Pereada-Miranda, R., Mata, R., Anaya. A.L., Wickramaratne, D.B., Mahinda, D.B., Pezzuto, J.M. & Kinghorn, A.D. (1993) *J. Nat. Prod.* **56**, 571-582.
- Reitvel, W.J. (1983). Allelopathic effects of juglona on germination and growth of several herbaceous and wood species. *J. Chem. Ecol.* **9**, 295-308.
- Rojas, I., Lotina-Henssen, B. & Mata. R. (2000). Effect of lichen metabolites on thylacoid electron transport and photophosforilation in isolated spinach chloroplasts. *J. Nat. Prod.* **63**, 1396-1399.

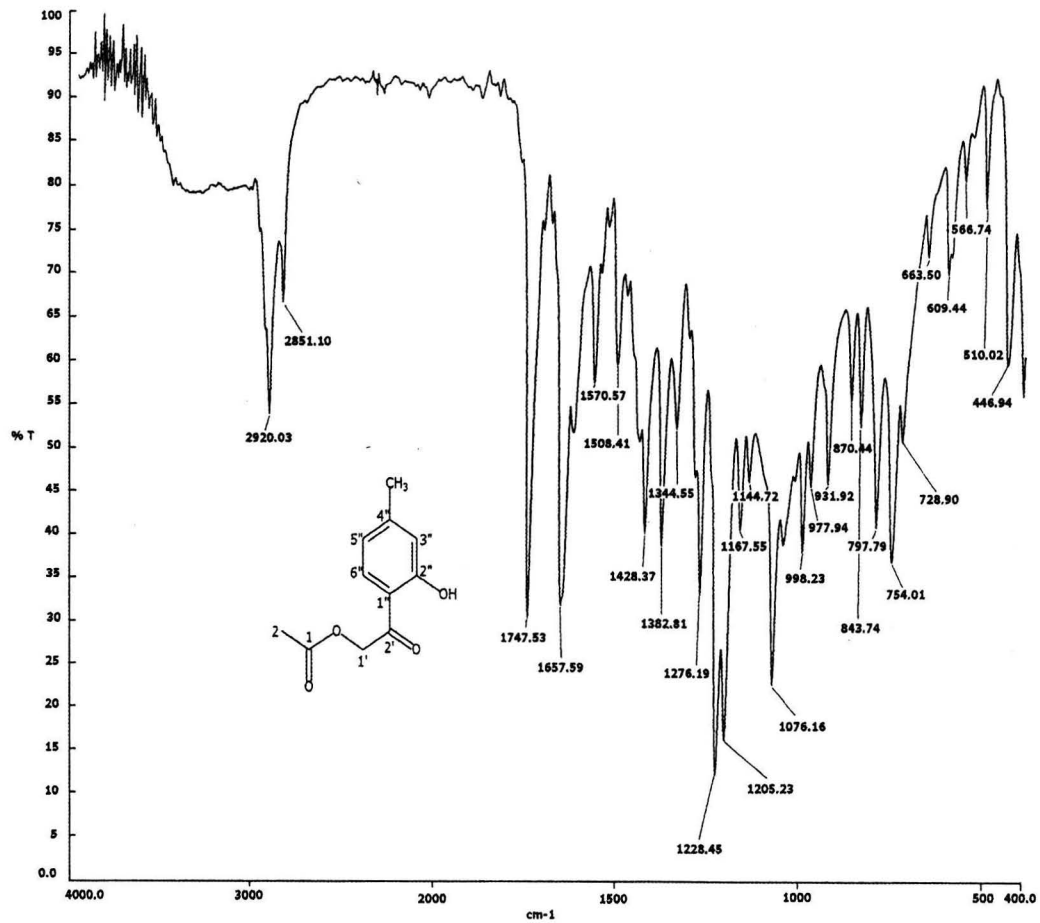
- Tachibana, K., Watanabe, T., Sekizawa, Y., & Takematsu, T. (1986). *J. Pestic. Sci.* **11**, 27.
- Tissut, M., Chevallier, D. & Douce, R. (1980). Effet de différents polyphenols sur les mitochondries et les chloroplastes isolés. *Phytochem.* **19**, 495-500.
- Tori, M., Ohara, Y., Nakashima, K. & Sono, M., (2001), Thymol Derivates from *Eupatorium fortunei*, *J. Nat. Prod.* **64**, 1048-1051.
- Ueno, T., Miyagawa, H., Yamaguchi, H., Okada, M. & Irie, H. (1997). A New Applications for Phytochemicals Pest Control Agents. En: *Phytochemicals for Pest Control*. P. Hedin *et al.* (Eds.). *ACS Symposium Series* **658**. Washington, D. C.
- Vyvyan, J. (2002). Allelochemicals as Leads for New Herbicides and Agrochemicals. *Tetrahedron* **58**, 1631-1646.

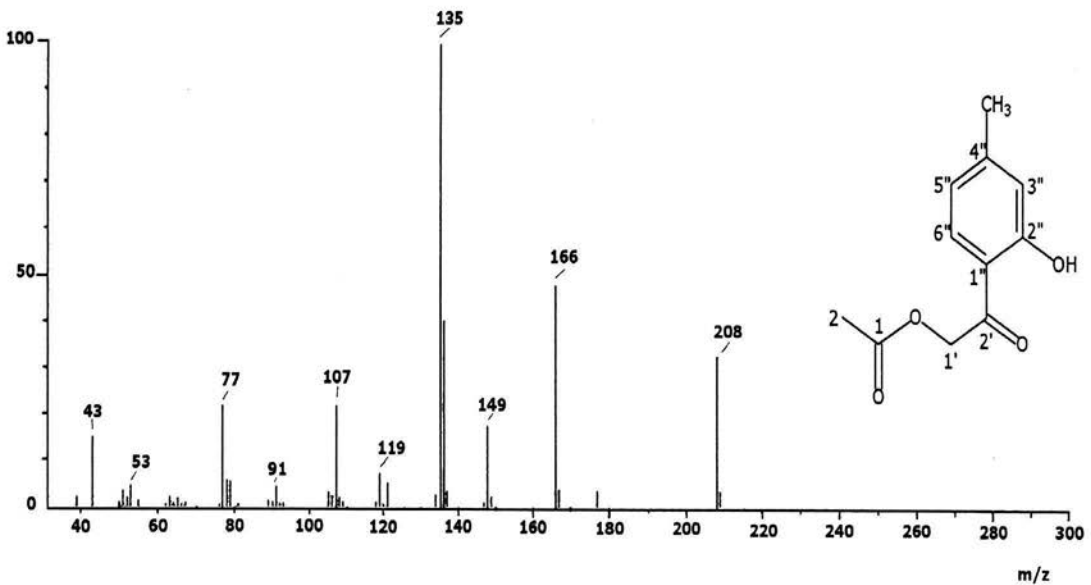
**APÉNDICE
DE
ESPECTROS.**

Espectro 1. Espectro UV del Acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo.

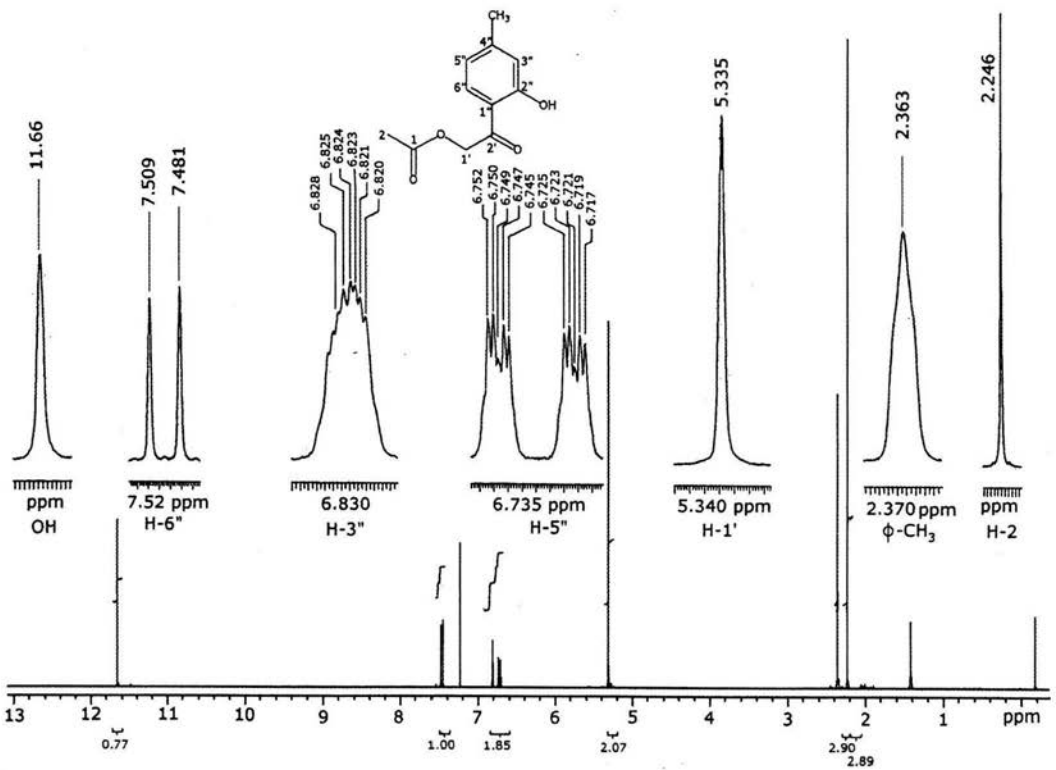


Espectro 2. Espectro en el IR del Acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo.

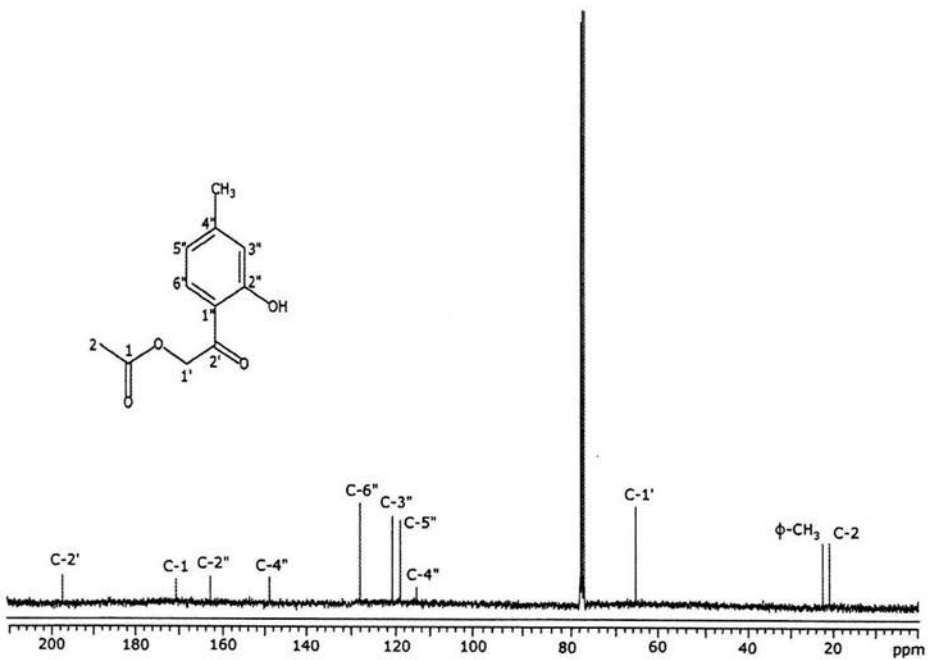




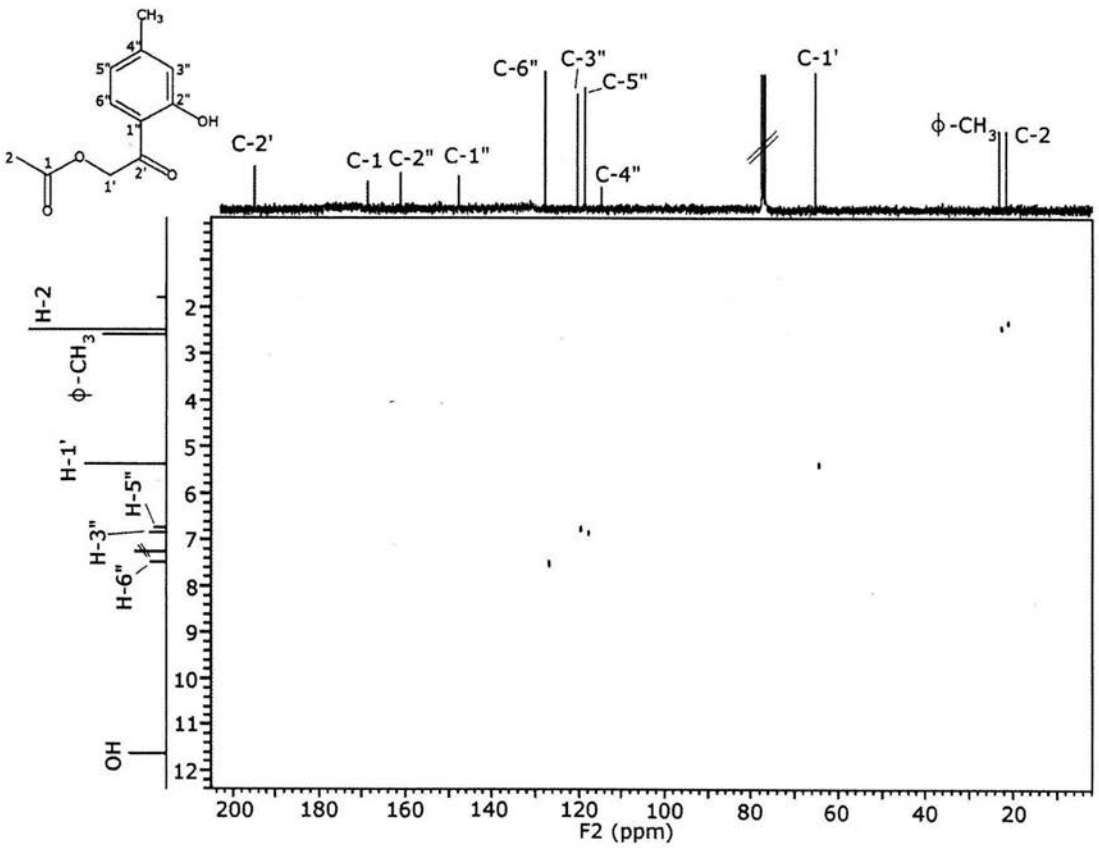
Espectro 3. Espectro de Masas del Acetato de 2'-(2'-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo.



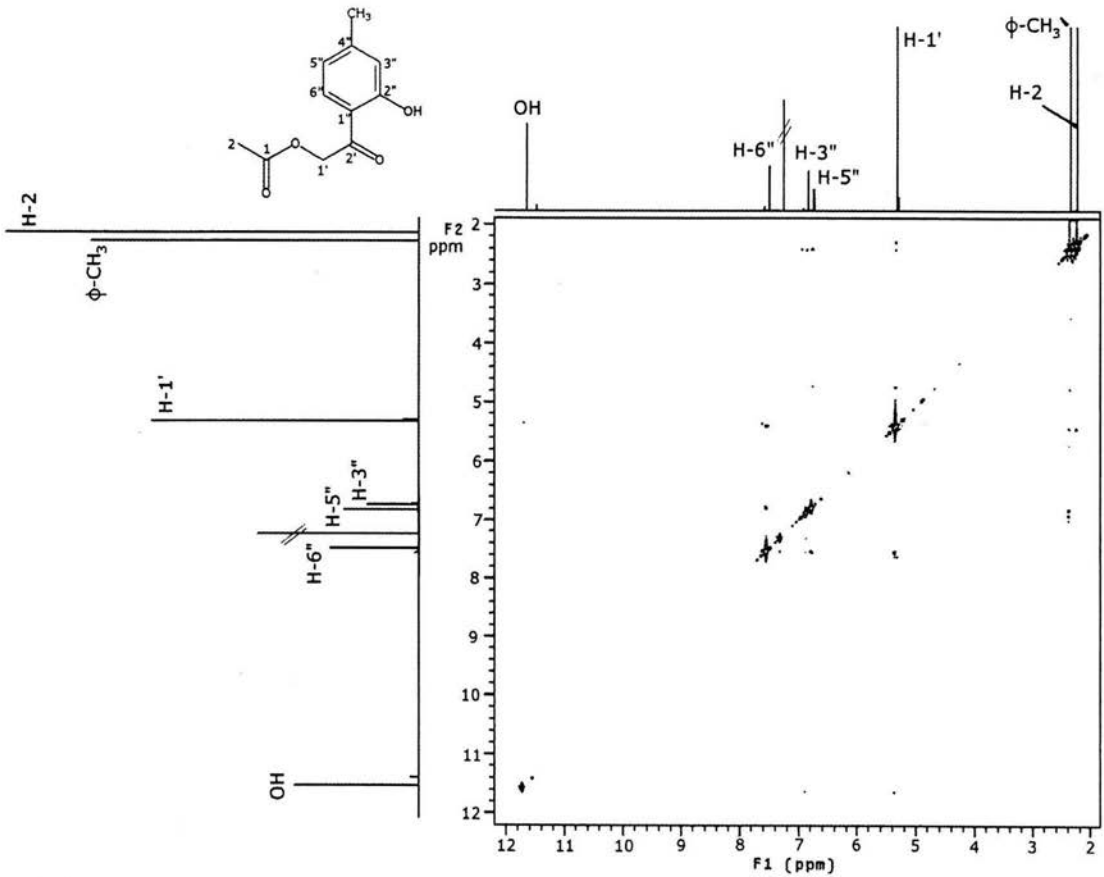
Espectro 4. Espectro de RMN-¹H del Acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxo-etilo.



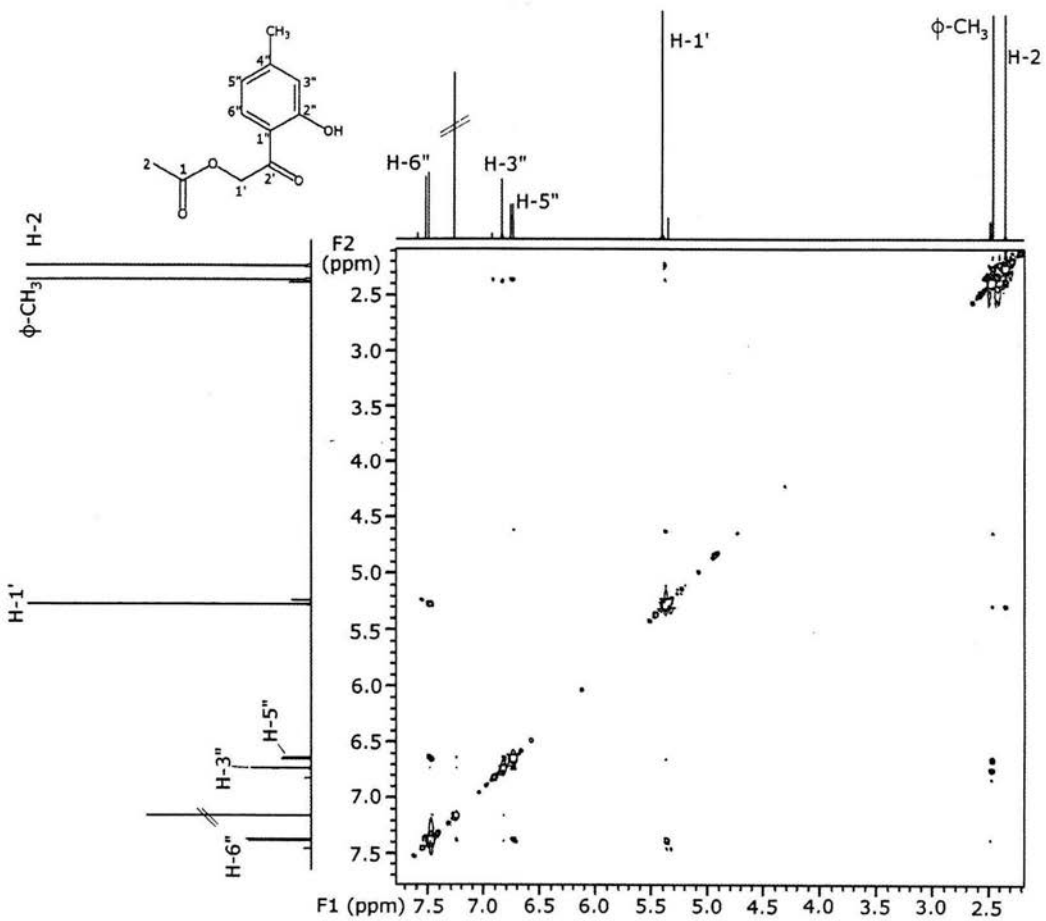
Espectro 5. Espectro de RMN- ^{13}C del Acetato de 2'-(2'-hidroxi-4'-metilfenil)-2'-oxo-etilo.



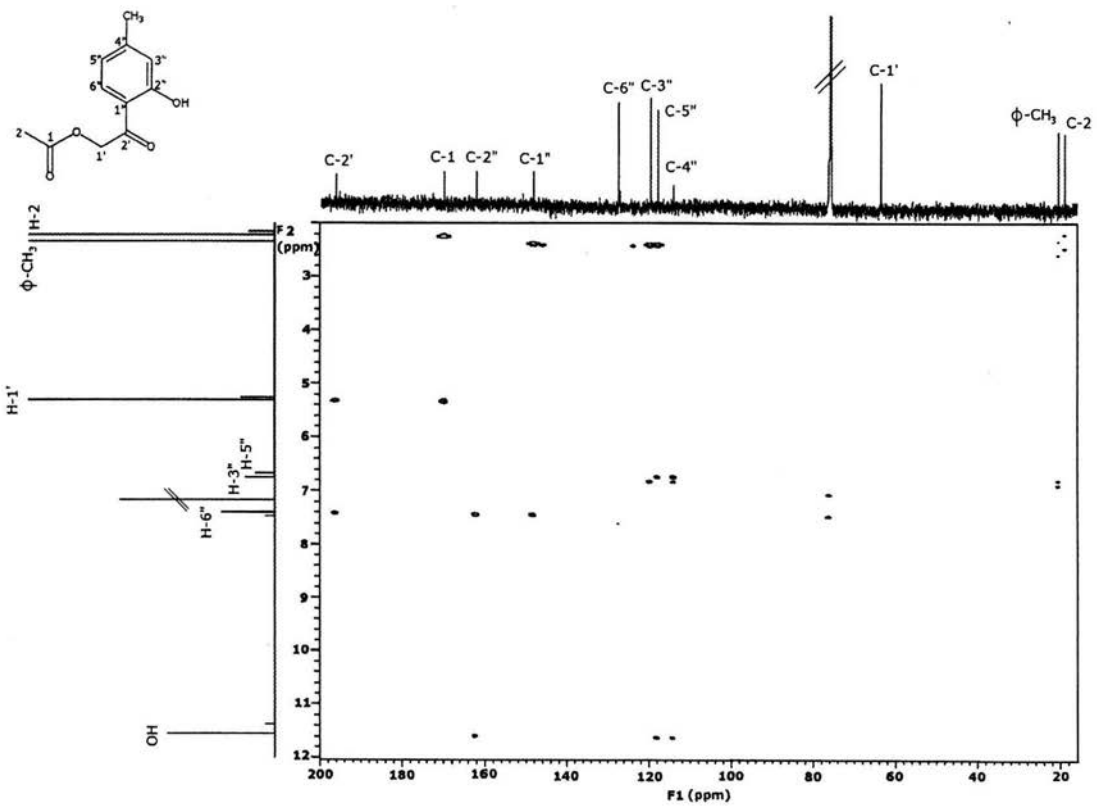
Espectro 6. Espectro HETCOR del Acetato de 2'-(2'-hidroxi-4'-metilfenil)-2'-oxo-etilo.



Espectro 7. Espectro NOESY del Acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo.



Espectro 8. Espectro NOESY (ampliación) del Acetato de 2-(2'-hidroxi-4'-metilfenil)-2'-oxo-etilo.



Espectro 9. Espectro HMBC del Acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo.