



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**CARACTERIZACION ESTRUCTURAL, FITOTOXICIDAD Y PROPIEDADES  
INHIBITORIAS DE LA PROTEINA CALMODULINA DE  
ANALOGOS SINTETICOS DE LOS ESTILBENOIDES NATURALES  
BATATASINA III Y GIGANTOL**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. F. B. MARTHA ADRIANA LEYTE LUGO



TUTOR: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG  
AÑO: 2009



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.

## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Químicas de la UNAM, por permitir ampliar mi formación académica.

Agradezco especialmente a la *Dra. Rachel Mata* por la dedicación, paciencia y compromiso en el desarrollo de este trabajo así como el conocimiento compartido. Gracias.

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría.

Al Dr. Adelfo Reyes de la Facultad de Estudios Superiores, Unidad Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su valiosa asesoría en la síntesis de los productos.

Al Dr. Abbas, USDA-ARS Research Pathologist, Mississippi USA, por el procesamiento de las muestras para el desarrollo del presente trabajo.

Al personal técnico de la USAI (Facultad de Química) por el registro de los espectros de masas, IR, UV y RMN.

A los miembros del jurado designado por sus valiosos comentarios y observaciones durante la revisión de este trabajo.

A la Dra. Araceli Pérez y la M. en C. Isabel Rivero por el gran apoyo técnico brindado durante el desarrollo de este trabajo y por su valiosa amistad.

Al Dr. Mario Figueroa y al Dr. Martín González por su asesoría, apoyo y conocimientos compartidos para el desarrollo del trabajo experimental.

A todos mis compañeros del Laboratorio 124 del Conjunto E, Facultad de Química: Abraham, Fernando, Francisco, Guadalupe, José Alberto, Krutzkaya, Magda, Sol y Viridiana, por su apoyo, amistad y experiencias compartidas, pues mi estancia no hubiera sido lo mismo sin ustedes. De igual manera a mis compañeros Karina Mendoza y Francisco Juárez.

A Harry Alvarez por su apoyo, amor, comprensión y por el sinnúmero de experiencias compartidas y las que faltan.

## INDICE

|  | Página     |
|--|------------|
| <b>Lista de Cuadros</b>  | <b>I</b>   |
| <b>Lista de Esquemas</b>   | <b>II</b>  |
| <b>Lista de Figuras</b>  | <b>II</b>  |
| <b>Lista de Tablas</b>   | <b>III</b> |
| <b>Lista de Abreviaturas</b>   | <b>IV</b>  |
| <b>Resumen</b>   | <b>VII</b> |
| <br>   |            |
| <b>1. ANTECEDENTES</b>   |            |
| <br>   |            |
| <b>1.1</b> Generalidades de los estilbenoides de origen natural                | <b>1</b>   |
| <b>1.1.1</b> Síntesis de los análogos de la Batatasina III y el Gigantol       | <b>7</b>   |
| <b>1.2</b> Productos naturales vegetales como fuente de compuestos fitotóxicos | <b>9</b>   |
| <b>1.3</b> Calmodulina   | <b>16</b>  |
| <br>   |            |
| <b>2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>  |            |
| <br>   |            |
| <b>2.1</b> Hipótesis   | <b>21</b>  |
| <b>2.2</b> Objetivos generales   | <b>21</b>  |
| <b>2.3</b> Objetivos específicos   | <b>21</b>  |
| <br>   |            |
| <b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b>   |            |
| <br>   |            |
| <b>3.1</b> Procedimientos generales  | <b>23</b>  |
| <b>3.1.1</b> Síntesis de los análogos <b>54-65</b>                             | <b>23</b>  |
| <b>3.1.2</b> Síntesis del bibenciloxibenceno ( <b>66</b> )                     | <b>28</b>  |
| <b>3.1.3</b> Síntesis de los análogos <b>67-76</b>                             | <b>29</b>  |

|   |    |
|---|----|
| 3.1.4 Purificación de los análogos bibencilos   | 32 |
| 3.1.5 Determinación de las constantes físicas y<br>caracterización de los compuestos sintéticos: métodos<br>espectroscópicos y espectrométricos   | 34 |
| 3.2 Ensayos biológicos  | 34 |
| 3.2.1 Evaluación cuantitativa del potencial fitotóxico de los<br>análogos puros sobre la germinación y el crecimiento radicular<br>de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , <i>Echinochloa crus-galli</i> y<br><i>Medicago sativa</i> | 34 |
| 3.2.2 Determinación de la actividad fitotóxica sobre <i>Lemna<br/>pausicostata</i>  | 35 |
| 3.2.3 Efecto de los análogos bibencilos sobre la actividad de<br>la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina (PDE1)  | 36 |
| 3.2.4 Apagamiento de la fluorescencia de la CaM inducida por<br>los análogos 56, 60, 62, 64, 65, 67-76  | 37 |

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

|  |    |
|--|----|
| 4.1 Caracterización estructural de los análogos de los<br>bibencilos 54-65   | 40 |
| 4.1.1 RMN de los productos 56, 57, 59, 60 y 62-65  | 42 |
| 4.1.2 RMN de los productos 54, 55, 58 y 61   | 46 |
| 4.2 Caracterización estructural de los análogos de los<br>productos 67-76  | 49 |
| 4.2.1 RMN de los productos 67-69 y 74-76   | 51 |
| 4.2.2 RMN de los productos 70-73   | 54 |
| 4.3 Caracterización estructural del producto 66  | 57 |
| 4.4 Efecto de los compuestos sobre la germinación y crecimiento<br>radicular de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> ,<br><i>Echinochloa crus-galli</i> y <i>Medicago sativa</i> y sobre el crecimiento |    |

|   |           |
|---|-----------|
| de <i>Lemna pausicostata</i>  | 58        |
| 4.5 Efecto de los análogos sintéticos sobre la actividad moduladora de la calmodulina | 63        |
| <b>5. CONCLUSIONES</b>  | <b>71</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFIA</b>  | <b>73</b> |
| <b>ANEXOS</b>   | <b>81</b> |

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Cuadro 1.</b> Ejemplos selectos de bibencilos bioactivos aislados de diferentes especies.                                     | 3      |
| <b>Cuadro 2.</b> Resumen de los reactivos empleados para la obtención de los intermediarios y análogos sintéticos <b>48-60</b> . | 24     |
| <b>Cuadro 3.</b> Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN- <sup>1</sup> H de <b>56, 57, 59, 60 y 62-65</b> .  | 44     |
| <b>Cuadro 4.</b> Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN- <sup>13</sup> C de <b>56, 57, 59, 60 y 62-65</b> . | 45     |
| <b>Cuadro 5.</b> Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN- <sup>1</sup> H de <b>54, 55, 58 y 61</b> .         | 47     |
| <b>Cuadro 6.</b> Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN- <sup>13</sup> C de <b>54, 55, 58 y 61</b> .        | 48     |
| <b>Cuadro 7.</b> Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN- <sup>1</sup> H de <b>67-69 y 74-76</b> .           | 52     |
| <b>Cuadro 8.</b> Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN- <sup>13</sup> C de <b>67-69 y 74-76</b> .          | 53     |
| <b>Cuadro 9.</b> Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN- <sup>1</sup> H de <b>70-73</b> .                   | 55     |
| <b>Cuadro 10.</b> Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN- <sup>13</sup> C de <b>70-73</b> .                 | 56     |
| <b>Cuadro 11.</b> Constantes espectroscópicas y espectrométricas del benciloxibenceno ( <b>66</b> ).                             | 57     |
| <b>Cuadro 12.</b> Efecto de los análogos sintéticos sobre la actividad de la PDE1.   | 64     |

**LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS**

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Esquema 1.</b> Preparación del iluso de fósforo.  | 7      |
| <b>Esquema 2.</b> Síntesis del gigantol ( <b>5</b> ) mediante la reacción de Wittig.   | 8      |
| <b>Esquema 3.</b> Esquema de la síntesis del compuesto benciloxibenceno ( <b>66</b> ).   | 28     |
| <b>Esquema 4.</b> Análogos sintéticos con un número mayor y menor de carbonos de carbonos que une a los dos anillos aromáticos.  | 29     |
| <b>Esquema 5.</b> Esquema general de la síntesis de difenilmetanos ( <b>68-69</b> ).   | 30     |
| <b>Esquema 6.</b> Esquema general de la síntesis de los homobibencilos y chalconas ( <b>70-76</b> ).   | 31     |
| <b>Esquema 7.</b> Esquema general de la síntesis de los compuestos <b>1</b> y <b>5</b> (batatasina III y gigantol) y de sus análogos <b>54-66</b> .  | 38     |
| <b>Figura 1.</b> Tipos más comunes de estilbenoides.   | 1      |
| <b>Figura 2.</b> Compuestos de origen sintético que son empleados como herbicidas.   | 10     |
| <b>Figura 3.</b> Estructura tridimensional de la calmodulina CaM con calcio.   | 17     |
| <b>Figura 4.</b> Fármacos y metabolitos secundarios que inhiben la actividad de la CaM.  | 19     |
| <b>Figura 5.</b> Fragmentos derivados de la ruptura bencílica del bibencilo <b>56</b> .  | 41     |
| <b>Figura 6.</b> Fragmentos resultantes de la ruptura en los homobibencilos.   | 50     |
| <b>Figura 7.</b> Hidrólisis enzimática del AMPc.   | 63     |
| <b>Figura 8.</b> Propiedades inhibitorias de análogos sintéticos sobre la proteína CaM.  | 65     |
| <b>Figura 9.</b> Titulación por fluorescencia de <i>hCaM</i> con los compuestos <b>5(a)</b> , <b>60(b)</b> , <b>71(c)</b> , <b>72(d)</b> y <b>73(e)</b> (gráfica izquierda). Cambio absoluto de la emisión de la fluorescencia a 470 nm ( $\Delta\Delta I F$ ) versus la relación inhibidor/proteína <sup>3</sup> (gráfica derecha). | 68     |

|   | Página |
|---|--------|
| <b>Tabla 1.</b> Fitotoxicidad <i>in vitro</i> de la batatasina III (1), el gigantol (5) y algunos análogos sintéticos sobre cultivos de <i>Lemna pausicostata</i> a las 72 horas. | 6      |
| <b>Tabla 2.</b> Principales malezas encontradas en los cultivos de México.  | 11     |
| <b>Tabla 3.</b> Ejemplos selectos de compuesto naturales con actividad fitotóxica aislados de diferentes especies vegetales.  | 13     |
| <b>Tabla 4.</b> Características físicas y método de purificación empleado.  | 32     |
| <b>Tabla 5.</b> Constantes espectroscópicas (UV e IR) y espectrométricas (EM-IE m/z) de los bibencilos 54-65.   | 41     |
| <b>Tabla 6.</b> Constantes espectroscópicas (UV e IR) y espectrométricas (EM-IE m/z) de los difenilmetanos 67-69, chalconas 70-73 y homobibencilos 74-76.                         | 50     |
| <b>Tabla 7.</b> Efecto de los productos 55, 56, 68, 69, 75 y 76 sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crus-galli</i> .                              | 58     |
| <b>Tabla 8.</b> Efecto de los bibencilos 55, 56, 61 y 65 sobre el crecimiento y pérdida de electrolitos de <i>L. pausicostata</i> .   | 60     |
| <b>Tabla 9.</b> Efecto de los homobibencilos 75 y 76 sobre el crecimiento y pérdida de electrolitos de <i>L. pausicostata</i> .   | 61     |
| <b>Tabla 10.</b> Efecto de las chalconas 70, 72 y 76 sobre el crecimiento y pérdida de electrolitos de <i>L. pausicostata</i> .   | 62     |
| <b>Tabla 11.</b> Valores de $k_d$ de los análogos 56, 60, 62, 68, 71-73, 75 y 76 y trifluoperazina* determinadas en el ensayo fluorométrico.                                      | 66     |

**LISTA DE ABREVIATURAS**

| <b>Abreviatura</b>              | <b>Significado</b>                                    |
|---------------------------------|---|
| AcOEt                           | Acetato de Etilo                                      |
| AMPc                            | Adenosín Monofosfato cíclico                          |
| CaM                             | Calmodulina   |
| Ca <sup>2+</sup>                | Calcio  |
| CDCl <sub>3</sub>               | Cloroformo deuterado                                  |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | Diclorometano   |
| cm                              | Centímetros   |
| CPZ                             | Clorpromazina   |
| °C                              | Grados Celsius  |
| δ                               | Desplazamiento químico                                |
| d                               | Doblete   |
| dd                              | Doble de dobles                                       |
| D <sub>2</sub> O                | Agua deuterada  |
| DMSO                            | Dimetilsulfóxido                                      |
| EtOH                            | Etanol  |
| EM-IE                           | Espectroscopia de Masas modalidad Impacto Electrónico |
| eV                              | Electron Volts  |
| g                               | Gramo   |
| µg                              | Microgramos   |
| HCl                             | Ácido Clorhídrico                                     |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>  | Ácido Fosfórico                                       |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  | Ácido Sulfúrico                                       |
| Hz                              | Hertz   |
| IC <sub>50</sub>                | Concentración media inhibitoria                       |
| IP <sub>3</sub>                 | 1,4,5-trifosfato de inositol                          |
| IR                              | Infrarrojo  |
| <i>J</i>                        | Constante de acoplamiento                             |

|              |  |
|--------------|--|
| $K_2CO_3$    | Carbonato de Potasio                       |
| KBr          | Bromuro de Potasio                         |
| $K_d$        | Constante de disociación                   |
| KI           | Yoduro de Potasio                          |
| L            | Litro                                      |
| $\mu L$      | Microlitro                                 |
| m            | Multiplete                                 |
| MeOH         | Metanol                                    |
| mg           | Miligramos                                 |
| MHz          | Megahertz                                  |
| mL           | Mililitro                                  |
| mm           | Milímetros                                 |
| mM           | Milimolar                                  |
| $\mu M$      | Micromolar                                 |
| $m/z$        | Relación masa-carga                        |
| N            | Normalidad                                 |
| NaH          | Hidruro de Sodio                           |
| NaOH         | Hidroxido de Sodio                         |
| $Na_2CO_3$   | Carbonato de Sodio                         |
| $Na_2SO_4$   | Sulfato de Sodio                           |
| nm           | Nanómetros                                 |
| PDE1         | Fosfodiesterasa de AMPc                    |
| ppm          | Partes por millón                          |
| RMN          | Resonancia Magnetiza Nuclear               |
| RMN $^1H$    | Resonancia Magnetiza Nuclear Protónica     |
| RMN $^{13}C$ | Resonancia Magnetiza Nuclear de Carbono 13 |
| %            | Porcentaje                                 |
| $P_T$        | Proteína total                             |
| S            | Singulete                                  |
| $t$          | Triplete                                   |

|      |                          |
|------|--------------------------|
| THF  | Tetrahidrofurano         |
| u.a. | Unidades arbitrarias     |
| uma  | Unidades de Masa Atómica |
| UV   | Ultravioleta             |

---

**RESUMEN**

El presente trabajo forma parte de un estudio sistemático para descubrir productos fitotóxicos de utilidad para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas e inhibidores de la calmodulina (CaM) potencialmente útiles para el desarrollo de nuevos fármacos. Para su desarrollo se sintetizaron 23 análogos (**54-76**) de los bibencilos batatasina III (**1**) y gigantol (**5**). Tras el estudio de varias orquídeas mexicanas se comprobó que estos productos son inhibidores naturales de la CaM y agentes herbicidas potenciales.

De los 23 análogos sintetizados, doce son bibencilos (**54-65**), tres difenilmetanos (**67-69**), cuatro chalconas (**70-73**) y tres homobibencilos (**74-76**). El diseño de los productos no fue racional, y para su síntesis se utilizó la reacción de Wittig. Los homobibencilos se prepararon por hidrogenación catalítica de la correspondiente chalcona, la cual fue sintetizada por catálisis básica. Una vez sintetizados se purificaron y caracterizaron mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.

Para evaluar el potencial fitotóxico se utilizaron ensayos simples como la determinación del crecimiento radicular y germinación de distintas semillas de prueba incluyendo *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli* y *Medicago sativa* utilizando el método de la caja de Petri. De manera adicional, se determinó el efecto de los compuestos de prueba sobre el crecimiento de la planta acuática *Lemna paucicostata*.

El estudio permitió detectar productos más activos que las moléculas prototipo. Los productos más activos incluyeron a los bibencilos **55** y **56** y la chalcona **70**. Los bibencilos presentan como común denominador sustituyentes oxigenados en la posición *para* en uno de los anillos y en posición *meta* en el segundo anillo. También se descubrió un difenilmetano con un efecto selectivo sobre amaranto. En el grupo de las chalconas, aunque la **70** fue la más activa, tres más presentaron un efecto fitotóxico importante.

Para detectar los inhibidores de la CaM se utilizó un ensayo enzimático funcional utilizando la enzima PDE1 como monitora y un método basado en la fluorescencia de energía de resonancia. El análisis de los productos **54-76** sobre el complejo PDE1-CaM indicó varios productos activos con valores de IC<sub>50</sub> comprendidos entre 9.38 y 36.33 µM.

Los más activos fueron **56**, **60** y **67** cuyo efecto fue mayor o comparable al de la clorpromazina, un inhibidor de la CaM empleado como control positivo. Además, el bibencilo **56** presentó una mayor actividad inhibitoria que las moléculas prototipo, batatasina III (**1**) y gigantol (**5**).

Los bibencilos **60** ( $IC_{50} = 0.571 \pm 0.0170 \mu M$ ) y **62** ( $IC_{50} = 0.022 \pm 0.000 \mu M$ ), las chalconas **71** ( $IC_{50} = 0.155 \pm 0.059 \mu M$ ), **72** ( $IC_{50} = 0.682 \pm 0.059 \mu M$ ) y **73** ( $IC_{50} = 0.369 \pm 0.042 \mu M$ ), así como el homobibencilos **76** ( $IC_{50} = 4.402 \pm 0.443 \mu M$ ) provocan un apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la CaM de manera dependiente de la concentración por lo tanto su efecto es directo sobre la CaM. Los bibencilos **64** y **65** y el difenilmetano **67**, fueron activos en el ensayo funcional, afectando al complejo CaM-PDE1 o directamente a la PDE1. En el caso del homobibencilo **74**, se observó un importante aumento de la fluorescencia, resultado que permite suponer que **74** interacciona con la CaM por un sitio distinto al de los inhibidores clásicos como la clorpromazina.

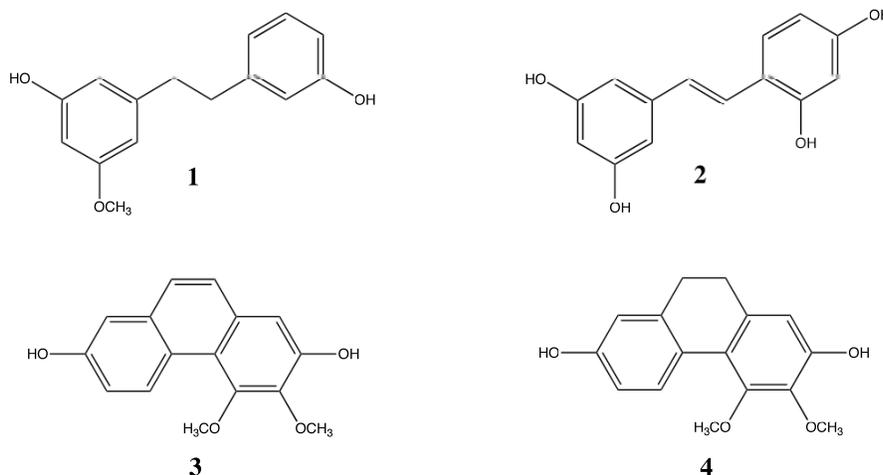
Las actividades de los bibencilos resultaron mucho mejores que las correspondientes a los análogos homobibencilos y difenilmetanos. Por lo tanto, al incrementar o disminuir el número de metilenos de dos a tres, o de dos a uno, disminuye la actividad fitotóxica o anti-CaM. Las implicaciones moleculares de esta diferencia de actividad se desconocen aún. En general, los compuestos más activos fueron aquellos que presentan sustituyentes metoxilos y/o hidroxilos en ambos anillos aromáticos. En uno de los anillos el sustituyente se encuentra en la posición *para*, en tanto que en el segundo en posición *meta*, con excepción del producto **70**, que presenta una actividad fitotóxica importante.

Los resultados obtenidos demostraron que no hay ninguna correlación entre la actividad fitotóxica de los bibencilos y su actividad como inhibidores de la CaM por lo que el mecanismo de la acción fitotóxica de estos compuestos debe involucrar otros blancos de acción a nivel molecular, como la maquinaria fotosintética, por indicar algún ejemplo.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Generalidades de los bibencilos de origen natural

Los bibencilos son estilbenoides, es decir metabolitos secundarios de tipo C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> de biogénesis mixta; la unidad C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub> se genera a partir de un derivado del ácido cinámico, y el otro anillo aromático a partir de tres unidades de malonil-CoA. Los estilbenoides más comunes incluyen además de los **bibencilos** como la batatasina III (**1**) (Estrada *et al.*, 1999) a los **estilbenos** como el oxiresveratrol (**2**) (Likhitwitayawuid *et al.*, 2006), los **fenantrenos** como el nudol (**3**) (Valencia, 2002) y los **9, 10-dihidrofenantrenos** como la eriantridina (**4**) (Valencia, 2002) (Figura 1).



**Figura 1.** Tipos más comunes de estilbenoides.

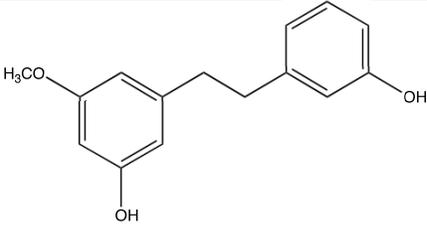
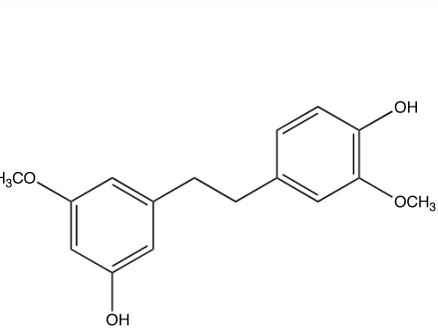
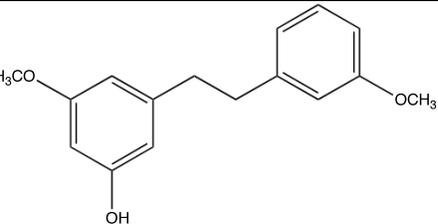
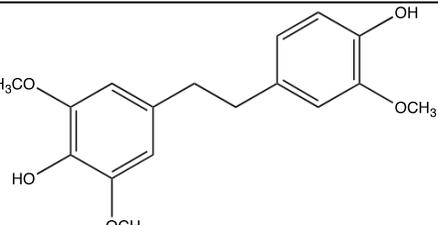
Los bibencilos se encuentran principalmente en especies de orquídeas y briofitas, aunque también se han descrito en familias como las moráceas, canabináceas y poligonáceas, dioscoráceas y fabáceas, por tan solo mencionar las más importantes (Gorham, 1995). Los bibencilos son quizás los estilbenoides más abundantes.

En la literatura científica se ha descrito que los bibencilos poseen varias propiedades biológicas. Las más importantes son como relajantes de la musculatura lisa (Estrada *et al.*, 1999, 2000), antisépticos (Takagi *et al.*, 1983), antimutagénicos (Miyazawa *et al.*, 1997, 1999), antiinflamatorios (Shimizu *et al.*, 1998) y fitotóxicos (Hernández-Romero *et al.*, 2005). Algunos ejemplos de bibencilos biodinámicos se presentan en el Cuadro 1. Por otro lado, los fenantrenos y los 9,10-dihidrofenantrenos poseen propiedades espasmolíticas (Sachdev y Kulshreshtha, 1986, Estrada *et al.*, 1999a), antifúngicas (Baxter, 1994), fitotóxicas (Valencia-Islas *et al.*, 2002) y antitumorales (Lee *et al.*, 1995, Gorham, 1995).

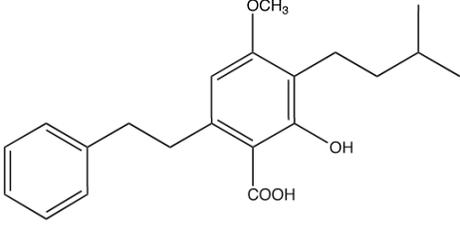
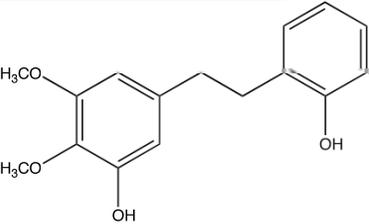
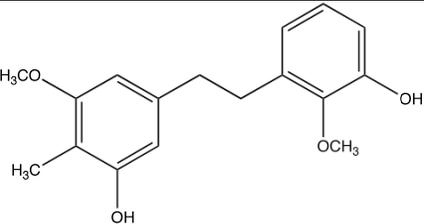
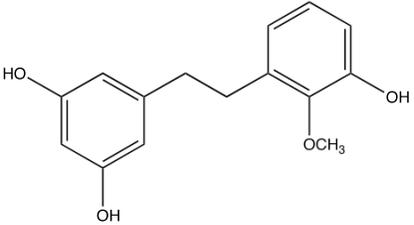
De las propiedades descritas para estos estilbenoides quizás las estudiadas con mayor detalle son la espasmolítica y la fitotóxica. Así, la batatasina, el gigantol y una serie de análogos sintéticos provocaron la relajación de la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo; el efecto fue dependiente de la concentración. Las concentraciones inhibitorias media oscilaron entre 0.14 y 2.36  $\mu\text{M}$  (Estrada *et al.*, 1999; Hernández-Romero *et al.*, 2004). De acuerdo a una serie de experimentos funcionales el efecto relajante del gigantol, además de involucrar la vía nitrérgica, podría estar relacionado con la proteína calmodulina (CaM) ya que tanto el gigantol como la batatasina se comportan como agonistas de la clorpromazina (Hernández-Romero *et al.*, 2004).

Con respecto a las propiedades fitotóxicas, en otro estudio se determinó el efecto fitotóxico de los productos naturales gigantol y batatasina III y varios análogos sintéticos, mediante la evaluación de sus efectos sobre la integridad celular (perdida de electrolitos al medio de cultivo) y la inhibición del crecimiento de la arvense acuática *Lemna pausicostata*. Los resultados se resumen en la Tabla 1 y de los mismos se desprende que los productos **15** y **18** presentaron los mejores efectos como inhibidores del crecimiento vegetal.

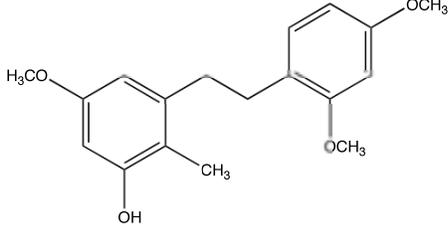
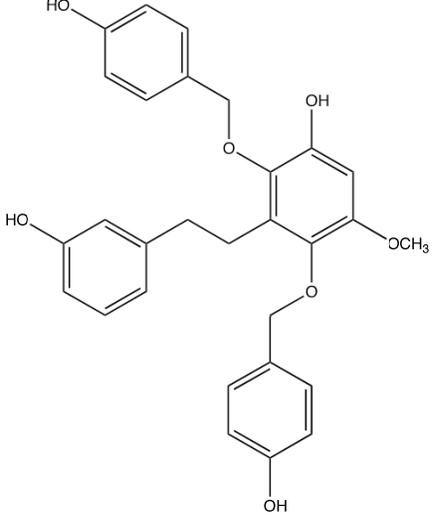
**Cuadro 1.** Ejemplos selectos de bibencilos bioactivos aislados de diferentes especies.

| <b>Fuente natural<br/>Selecta</b>   | <b>Compuesto</b>   | <b>Actividad Biológica</b>   |
|---|--|--|
| <p><i>Nidema boothii</i><br/>Orchidaceae</p>                                |  <p>Batatasina III (1)</p>             | <p>Espasmolítico<br/>(Hernández-Romero <i>et al.</i>, 2004)</p>  |
| <p><i>Catasetum barbatum</i><br/><i>Lusia volucris</i><br/>Orchideaceae</p> |  <p>Gigantol (5)</p>                  | <p>Antiinflamatorio<br/>(Shimizu <i>et al.</i>, 1988)<br/>Antimutagénico<br/>(Miyazawa <i>et al.</i>, 1997)<br/>Inhibidor de la<br/>agregación plaquetaria<br/>(Fan <i>et al.</i>, 2001)<br/>Espasmolítico<br/>(Estrada <i>et al.</i>, 1999)</p> |
| <p><i>Coelogyne ovalis</i><br/>Orchidaceae</p>                              |  <p>3'-O-Metilbatatasina III (6)</p> | <p>Antibacterial contra<br/><i>Streptococcus mutans</i> y<br/><i>Staphylococcus aureus</i><br/>(Yamaki <i>et al.</i>, 1989)</p>  |
| <p><i>Dendrobium nobile</i><br/>Orchidaceae</p>                             |  <p>Aloifol II (7)</p>               | <p>Inhibidor de la<br/>agregación plaquetaria<br/>(Kong <i>et al.</i>, 2003)<br/>Antimutagénico<br/>(Miyazawa <i>et al.</i>, 1999)</p>   |

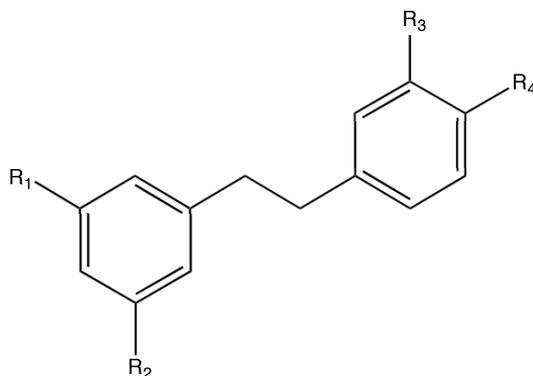
**Cuadro 1.** Ejemplos selectos de bibencilos bioactivos aislados de diferentes especies (continuación)

| Fuente natural<br>Selecta                          | Compuesto  | Actividad Biológica   |
|--|--|---|
| <p><i>Amorpha fruticosa</i><br/>Fabaceae</p>       |  <p>Amorfrutina A (<b>8</b>)</p>   | <p>Antibacterial contra<br/><i>Mycobacterium<br/>smegmatis</i> y<br/><i>Staphylococcus aureu</i><br/>(Mitscher <i>et al.</i>, 1981)</p> |
| <p><i>Empetrum nigrum</i><br/>Empetraceae</p>      |  <p>1-(2-Hidroxifenil)-2-(3-hidroxi-<br/>4,5-dimetoxifenil)-etano (<b>9</b>)</p> | <p>Inhibe la germinación<br/>de <i>Scots pine</i> (aspen)<br/>(Jarevång <i>et al.</i>, 1997)</p>  |
| <p><i>Stemona cf. Pierrei</i><br/>Stemonaceae</p>  |  <p>Estilbostemina G (<b>10</b>)</p>   | <p>Antifúngico contra<br/><i>Cladosporium<br/>herbarum</i><br/>(Kostecki <i>et al.</i>, 2004)</p>                                       |
| <p><i>Dioscorea opposita</i><br/>Dioscoreaceae</p> |  <p>3,3',5-Trihidroxi-2'-<br/>metoxibibencilo (<b>11</b>)</p>                  | <p>Inhibidor de COX-2<br/>(Hye <i>et al.</i>, 2009)</p>   |

**Cuadro 1.** Ejemplos selectos de compuesto bioactivos aislados de diferentes especies (continuación).

| <b>Fuente natural Selecta</b>                  | <b>Compuesto</b>   | <b>Actividad Biológica</b>   |
|--|--|--|
| <p><i>Stemona tuberosa</i><br/>Stemonaceae</p> |  <p>Estilbostemina U (<b>12</b>)</p>   | <p>Antibacterial contra<br/><i>Bacillus pumilus</i><br/>(Li-Gen <i>et al.</i>, 2007)</p>   |
| <p><i>Bletilla striata</i><br/>Orchidaceae</p> |  <p>3,3'-Dihidroxi-5-metoxi-2,6-bis-<br/>(<i>p</i>-hidroxibencil) bibencilo (<b>13</b>)</p> | <p>Antibacterial contra<br/><i>Bacillus subtilis</i>, <i>B.</i><br/><i>Cereus</i>, <i>Nocardia</i><br/><i>gardneri</i> y <i>S. Aureus</i><br/>(Takagi <i>et al.</i>, 1983)</p> |

**Tabla 1.** Fitotoxicidad *in vitro* de la batatasina III (**1**), el gigantol (**5**) y algunos análogos sintéticos sobre cultivos de *Lemna paucicostata* a las 72 horas.



| Compuestos | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>   | R <sub>3</sub>   | R <sub>4</sub>   | IC <sub>50</sub> (μM)      |                            |
|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------------|----------------------------|
|            |                  |                  |                  |                  | Liberación de electrolitos | Inhibición del crecimiento |
| <b>14</b>  | OCH <sub>3</sub> | OH               | OCH <sub>3</sub> | OH               | 166                        | 180                        |
| <b>15</b>  | OCH <sub>3</sub> | OH               | OH               | H                | 145                        | 159                        |
| <b>16</b>  | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | OH               | 116                        | 89.9                       |
| <b>17</b>  | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | 148                        | 117                        |
| <b>18</b>  | OCH <sub>3</sub> | OH               | H                | OH               | 144                        | 169                        |
| <b>19</b>  | OCH <sub>3</sub> | OH               | OCH <sub>3</sub> | H                | 89.9                       | 94.7                       |
| <b>20</b>  | H                | OH               | OH               | H                | 725                        | 985                        |
| <b>21</b>  | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H                | >1000                      | >1000                      |
| <b>22</b>  | H                | OH               | OH               | OH               | >1000                      | >1000                      |

\*Los resultados son el promedio de tres repeticiones  $\pm$  1 desviación estándar. Los compuestos exhibieron una fitotoxicidad significativamente mayor ( $P < 0.005$ , prueba t-student no pareada) que el control (medio de cultivo; incremento de la conductividad,  $0.00 \pm 15.7 \mu\text{mho/cm}$ ; inhibición del crecimiento,  $0.00 \pm 4.3\%$ ).

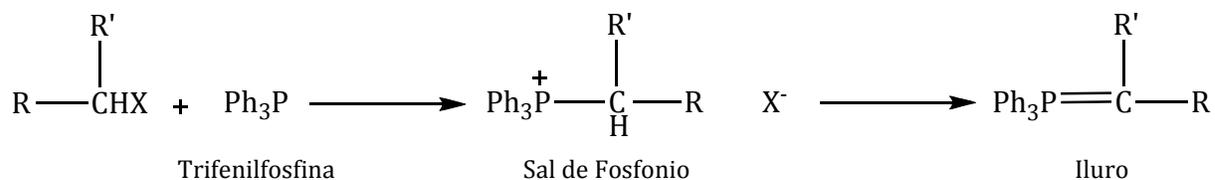
Los bibencilos en general provocaron una inhibición del crecimiento de la planta acuática de manera dependiente de la concentración y aunque fue difícil establecer una relación estructura actividad contundente, los análogos sintéticos **3**, **5** sustituidos con grupos metoxilos e hidroxilos en el anillo A (**14-19**) y al menos un sustituyente

oxigenado en la posición C-3 del anillo B presentaron una fitotoxicidad significativa (Hernández-Romero *et al.*, 2005).

### 1.1.2 Síntesis de los análogos de la Batatasina III y el Gigantol

Usualmente los bibencilos se sintetizan mediante la aplicación de la reacción de Wittig. Desde su descubrimiento a principios de los años 50's (Wittig y Schollkopf, 1954), esta reacción se usa ampliamente por su fácil desarrollo experimental y buenos rendimientos (Jiann-Jyh *et al.*, 1999).

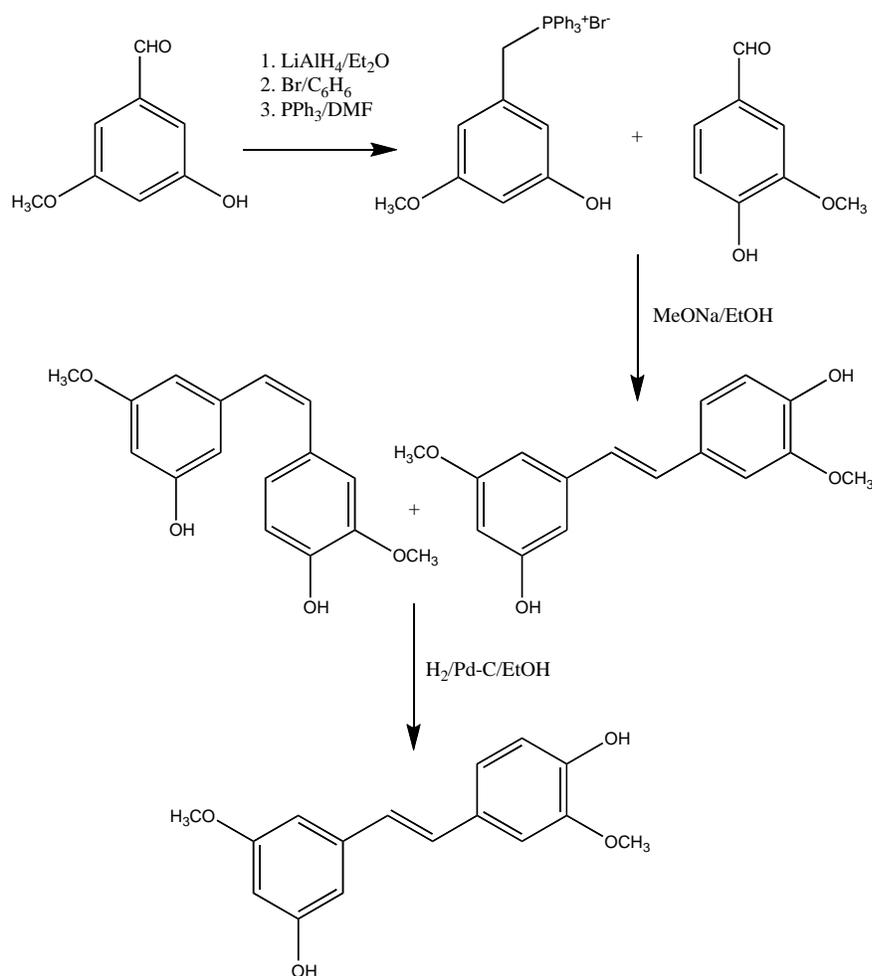
En la reacción de Wittig, un iluro de fósforo (reactivo de Wittig) se une a una cetona o un aldehído para producir un intermediario bipolar llamado betaína; esta última usualmente no se aísla si no que se descompone para producir un alqueno y un óxido de trifenilfosfina. El resultado neto es el reemplazo del oxígeno del carbono por el fragmento orgánico que esencialmente estaba unido al fósforo. Los iluros de fósforo necesarios para la reacción de Wittig se producen fácilmente por una reacción tipo S<sub>N</sub>2 de halogenuros de alquilo con trifenilfosfina, R<sub>3</sub>P (Crombie y Jamieson, 1982) (Esquema 1).



**Esquema 1.** Preparación del iluro de fósforo

Para la obtención de compuestos bibencilicos mediante la reacción de Wittig, inicialmente se condensa un iluro de bencil trifenilfosfonio con un derivado del aldehído benzoico apropiado en presencia de una base fuerte. La mezcla de estilbenos resultantes (isómeros Z y E) se somete a una reacción de hidrogenación catalítica. Los grupos hidroxilos fenólicos pueden ser protegidos durante la reacción mediante la formación de

éteres o ésteres (Crombie y Jamieson, 1980; Reinmann, 1971). Posteriormente, la reacción de desprotección (hidrogenólisis) de los grupos hidroxilo se realiza durante el proceso de hidrogenación catalítica que conlleva a la formación de los bibencilos a partir de la mezcla de estilbenos. A manera de ejemplo, en el Esquema 2, se presenta la síntesis aplicada a la obtención del gigantol (5).



**Esquema 2.** Síntesis del gigantol (5) mediante la reacción de Wittig.

## 1.2. Productos naturales vegetales como fuente de compuestos fitotóxicos

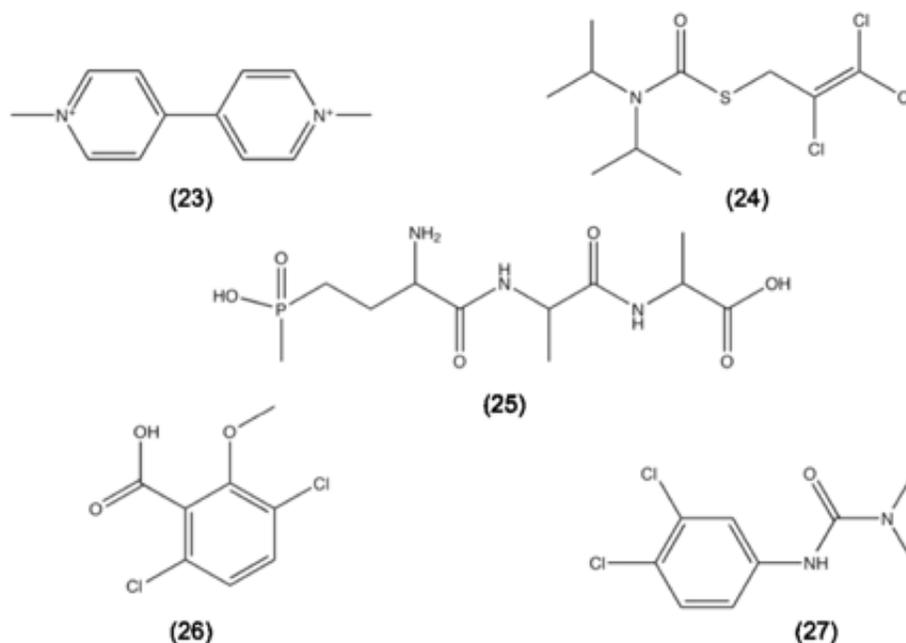
La agricultura actualmente enfrenta una serie de problemas que han aumentado con el paso del tiempo. El uso de los suelos para producir una mayor cantidad de alimentos para satisfacer las necesidades de la creciente población mundial, y el excesivo pastoreo han provocado el desgaste de la tierra y a la postre, falta de agua, erosión de suelos, destrucción de los ecosistemas y alteración de la vegetación natural.

El problema de la explotación exagerada de los suelos provoca la falta de condiciones adecuadas de temperatura, humedad y nutrientes para el desarrollo óptimo de los cultivos. Por lo tanto, la capacidad de crecimiento y reproducción de las plantas disminuye y aumenta la competencia entre especies. Aquellas plantas que se adaptan mejor a las condiciones extremas como es el caso de las malezas o arvenses persisten y se propagan. Las malezas son indeseables por los daños que ocasionan a los cultivos al competir por luz, nutrientes, agua y espacio, o por ser hospederas de insectos y patógenos dañinos. Como algunas arvenses tienen uso culinario o medicinal, sólo se consideran malezas aquellas que bajo ciertas circunstancias afectan el desarrollo de otros cultivos de interés económico (Vibrans, 2001; Espinosa-García *et al.*, 2004).

Para el control de las malezas se han utilizado diversas estrategias las cuales se incluyen en el reporte “Manejo de Malezas en los Países en Vías de Desarrollo” emitido por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) (Labrada, 1997). Las más importantes son:

1. Métodos preventivos para prevenir la entrada de una maleza en un territorio en particular.
2. Métodos físicos como el arranque manual, escarda con azada, corte con machete u otra herramienta y labores de cultivo.
3. Métodos culturales incluyendo la rotación de cultivos, preparación del terreno, distancia de siembra o plantación, cultivos intercalados, acolchado y manejo de aguas.

4. Control químico a través del uso de herbicidas.
5. Control biológico a través del uso de enemigos naturales específicos para el control de especies de malezas.
6. Otros métodos no convencionales como la solarización del suelo.



**Figura 2.** Compuestos de origen sintético que son empleados como herbicidas.

De los métodos antes mencionados, los herbicidas han tenido un mayor impacto en las prácticas agrícolas, principalmente en la agricultura convencional ejercida en los países desarrollados en donde la necesidad de reducir costos y aumentar la producción han sido los objetivos principales. De tal manera que en épocas recientes se han descubierto y comercializado alrededor de 270 herbicidas, la mayoría de estos de origen sintético (Figura 2) como el paraquat (23), el triallato (24), el bialafos (25), el dicamba (26) y el diuron (27). Sin embargo, durante los años 80's el control químico de malezas empezó a perder interés debido al aumento en los costos de cultivo y a los riesgos ambientales y de salud asociados al uso de dichos herbicidas. El costo para erradicar las malezas aumenta considerablemente cada año debido a las complicaciones cada vez mayores para su control (Kohli *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2003); la aparición de biotipos

resistentes a los herbicidas comunes es una de las más importantes. La resistencia se genera en primera instancia por la aplicación recurrente de herbicidas eficaces con un mecanismo de acción idéntico.

**Tabla 2.** Principales malezas encontradas en los cultivos de México.

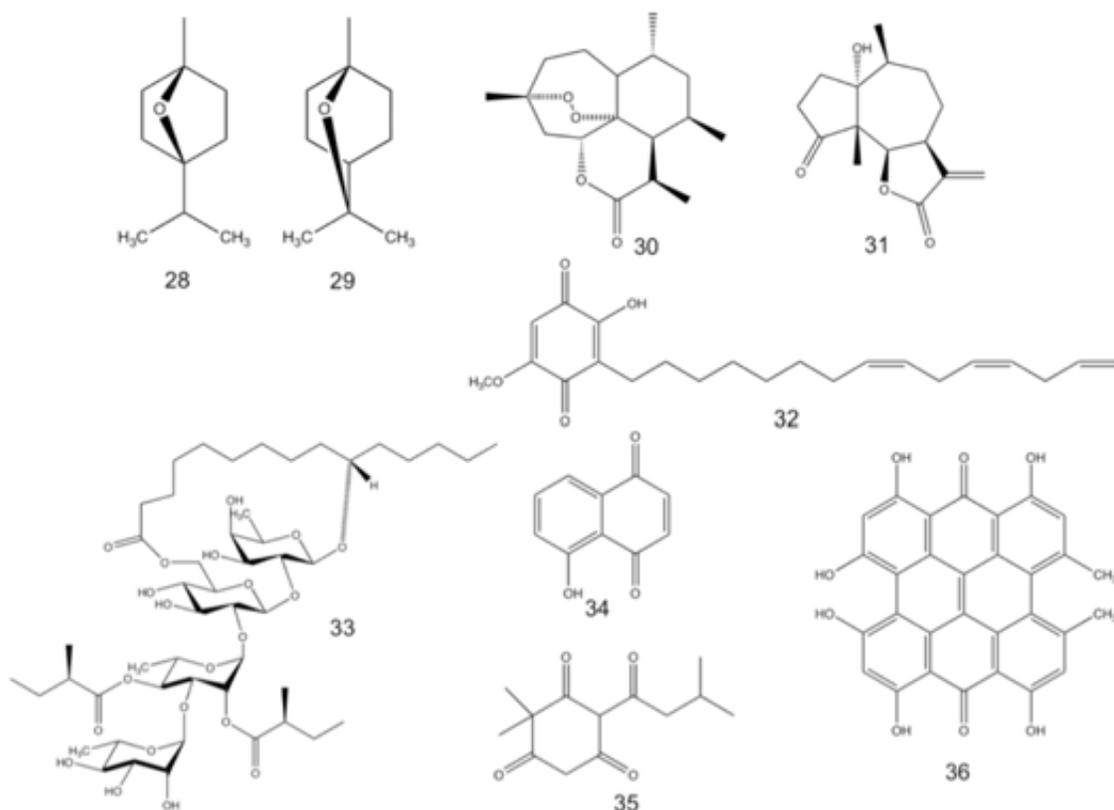
| Especie                         | Familia        | Origen       | Distribución                    | Importancia Económica   |
|---------------------------------|----------------|--------------|---------------------------------|-------------------------|
| <b>Malezas de hoja angosta</b>  |                |              |                                 |                         |
| <i>Cyperus esculentus</i>       | Cyperaceae     | Europa       | Mayor parte del territorio      | Algodón, papa y maíz    |
| <i>Avena fatua</i> *            | Poaceae        | Europa       | Norte del país, Oaxaca          | Avena y trigo           |
| <i>Cenchrus incertus</i> *      | Poaceae        | América      | Norte del país                  | Varios cultivos         |
| <i>Cynodon dactylon</i> *       | Poaceae        | África       | Mayor parte del territorio      | Caña de azúcar, maíz    |
| <i>Echinochloa crus-galli</i> * | Poaceae        | Europa-Asia  | Norte del país                  | Arroz, maíz, papa       |
| <i>Sorghum alepense</i> *       | Poaceae        | Europa-Asia  | Toda la República               | Varios cultivos         |
| <b>Malezas de hoja ancha</b>    |                |              |                                 |                         |
| <i>Amaranthus hybridus</i> *    | Amaranthaceae  | Norteamérica | Mayor parte del territorio      | Varios cultivos         |
| <i>Helianthus annuus</i>        | Asteraceae     | Norteamérica | Norte del país, Oaxaca          | Varios cultivos         |
| <i>Taraxacum officinale</i>     | Asteraceae     | Europa       | Norte y Centro del país         | Varios cultivos         |
| <i>Xanthium strumarium</i>      | Asteraceae     | México       | Varios estados                  | Varios cultivos         |
| <i>Convolvulus arvensis</i> *   | Convolvulaceae | Europa       | Varios estados                  | Varios cultivos         |
| <i>Chenopodium album</i> *      | Chenopodiaceae | Europa-Asia  | Varios estados                  | Varios cultivos         |
| <i>Salsola kali</i>             | Chenopodiaceae | Rusia        | Norte y Centro del país         | Varios cultivos         |
| <i>Argemone echinata</i>        | Papaveraceae   | México       | Norte del país                  | Ganado                  |
| <i>Argemone mexicana</i>        | Papaveraceae   | América      | Norte y Centro del país, Oaxaca | Caña de azúcar          |
| <i>Rumex crispus</i>            | Poligonaceae   | Europa-Asia  | Varios estados                  | Alfalfa, papa, cereales |
| <i>Datura quersifolia</i>       | Solanaceae     | México       | Norte del país                  | Ganado                  |
| <i>Solanum rostratum</i>        | Solanaceae     | México       | Varios estados                  | Algodón                 |

\*Especies más agresivas del mundo.

A la fecha se han identificado 324 biotipos de malezas resistentes pertenecientes a 183 especies vegetales (Heap, 2009). Las principales especies de malezas registradas en el mundo pertenecen a la familia Poaceae (Espinosa-García *et al.*, 2004; Randall, 2002). Sin embargo, cada país tiene sus listas oficiales. En el caso de México, aunque no hay una lista oficial, los diversos reportes y publicaciones de investigación permiten inferir que las más importantes son las que se mencionan en la Tabla 2. Muchas de las

cuales son agresivas a nivel internacional (Espinosa-García *et al.*, 2004; Villaseñor y Espinosa-García, 2004).

Los herbicidas sintéticos también han ocasionado graves problemas ambientales ya que sus índices de bioacumulación son grandes y son tóxicos para el hombre y animales.

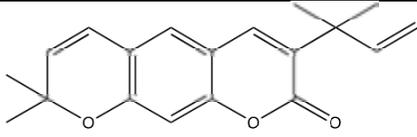
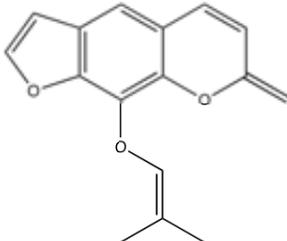


Las plantas biosintetizan y acumulan una gran cantidad de metabolitos secundarios que le sirven como defensa contra el ataque de insectos, microorganismos y plantas nocivas. Así, muchas de estas sustancias tienen un papel importante en las interacciones alelopáticas de tipo planta-planta, planta-microorganismo y planta-insecto en los distintos ecosistemas. Dichas interacciones regulan la densidad y distribución de plantas, insectos y microorganismos. Por lo tanto, no es de sorprender que el reino vegetal constituya una fuente potencial invaluable de agentes herbicidas, ya que numerosos compuestos de origen vegetal presentan actividad fitotóxica. Estos

compuestos pueden actuar específicamente como inhibidores de proteínas involucradas en los procesos de crecimiento y desarrollo vegetal, ya sea biomimetizando sustratos naturales ó intermediarios (Jeschke *et al.*, 2006; Duke *et al.*, 2002; Weir *et al.*, 2004; Vyvyan, 2002; Dayan *et al.*, 2000) (Tabla 3).

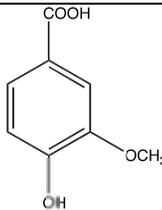
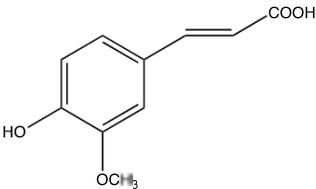
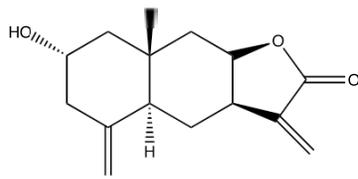
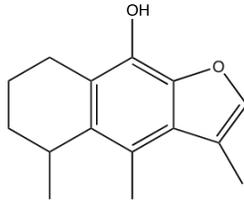
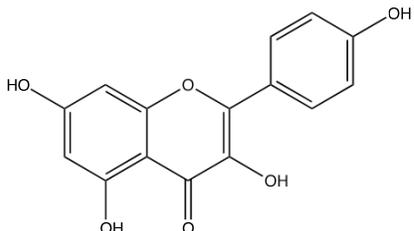
Entre los metabolitos vegetales que son importantes por su potencia fitotóxica y/o mecanismo de acción novedoso se encuentran: el 1,4-cineol (**28**) y su isómero 1,8-cineol (**29**), la artemisinina (**30**), la partenina (**31**), la sorgoleona (**32**), la tricolorina A (**33**), la juglona (**34**), la leptospermona (**35**) y la hipericina (**36**). Todos estos compuestos se han aislado a partir de plantas medicinales, lo que significa que estas especies constituyen puntos de partida para la obtención de agentes herbicidas (Cutler y Cutler, 1998). A partir de los productos **28**, **29** y **35** se han desarrollado derivados de uso comercial.

**Tabla 3.** Ejemplos selectos de compuesto naturales con actividad fitotóxica aislados de diferentes especies vegetales.

| Metabolito  | Blanco de Acción                                      | Referencia                  |
|---|---|-----------------------------|
| <br>3-(1',1'-Dimetilalil)-xantiletina<br><b>(37)</b> | Fotosíntesis: IRH y DF                                | Macías <i>et al.</i> , 2000 |
| <br>Imperatorina <b>(38)</b>                         | Fotosíntesis: DF;<br>estimulante de la ATPasa;<br>IRH | Mata <i>et al.</i> , 1998   |

IRH = Inhibición de la Reacción de Hill      DF = Desacoplamiento de la Fotofosforilación  
DFO = Desacoplamiento de la Fosforilación Oxidativa.

**Tabla 3.** Ejemplos selectos de compuesto naturales con actividad fitotóxica aislados de diferentes especies vegetales (continuación).

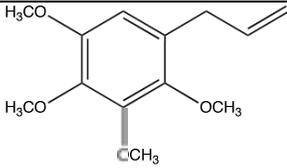
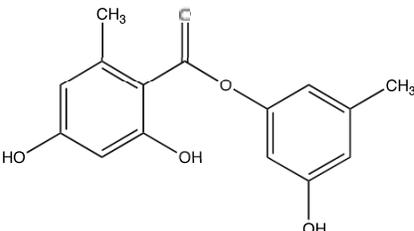
| Metabolito  | Blanco de Acción   | Referencia                               |
|---|--|--|
|  <p>Ácido vainílico (39)</p> | Respiración Mitocondrial:<br>DFO                                     | Duke, 1993                               |
|  <p>Ácido ferúlico (40)</p>  | Respiración Mitocondrial:<br>DFO                                     | Moreland y Novitzky,<br>1987             |
|  <p>Ivalina (41)</p>        | Fotosíntesis: IRH  | Lotina-Hennsen <i>et al.</i> ,<br>1998   |
|  <p>Cacalol (42)</p>       | Fotosíntesis: IRH  | Aguilar-Martínez <i>et al.</i> ,<br>1996 |
|  <p>Canferol (43)</p>      | Inhibe el Citocromo C de la<br>cadena de transporte de<br>electrones | Valencia-Islas, 2000                     |

IRH = Inhibición de la Reacción de Hill

DF = Desacoplamiento de la Fotofosforilación

DFO = Desacoplamiento de la Fosforilación Oxidativa.

**Tabla 3.** Ejemplos selectos de compuesto naturales con actividad fitotóxica aislados de diferentes especies vegetales (continuación).

| Metabolito   | Blanco de Acción   | Referencia                   |
|--|--|------------------------------|
|  <p>1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benzeno (<b>44</b>)</p> | Fotosíntesis: IRH  | Jiménez <i>et al.</i> , 1998 |
|  <p>Lecanorina (<b>45</b>)</p>                                | Fotosíntesis: IRH del complejo enzimático que fotolisa el agua | Rojas <i>et al.</i> , 2000   |

IRH = Inhibición de la Reacción de Hill

DF = Desacoplamiento de la Fotofosforilación

DFO = Desacoplamiento de la Fosforilación Oxidativa.

El monoterpenoide 1,4-cineol (**28**) y el 1,8-cineol (**29**), principales componentes del aceite esencial de varias especies del género *Eucalyptus*, son potentes inhibidores de la asparagino sintetasa, enzima involucrada en la síntesis de asparagina y que juega un papel importante en la movilidad del nitrógeno en plantas (Vyvyan, 2002). También inhiben la división celular en la etapa de la mitosis; en el caso de **28**, el efecto es durante la profase, y en el caso del 1,8-cineol (**29**) durante todas las etapas de este proceso (Duke 2003; Romagni *et al.*, 2000). Asimismo, aunque los dos compuestos inhiben el crecimiento radicular y la germinación, el 1,4-cineol (**28**) tiene una potencia mayor y causa distorsiones morfológicas. La presencia del éter cíclico en las estructuras moleculares de ambos terpenoides es esencial para el efecto fitototóxico (Duke *et al.*, 2000). A partir del 1,4-cineol se desarrolló la cinmetilina (Cinch®), un herbicida ampliamente comercializado en Europa.

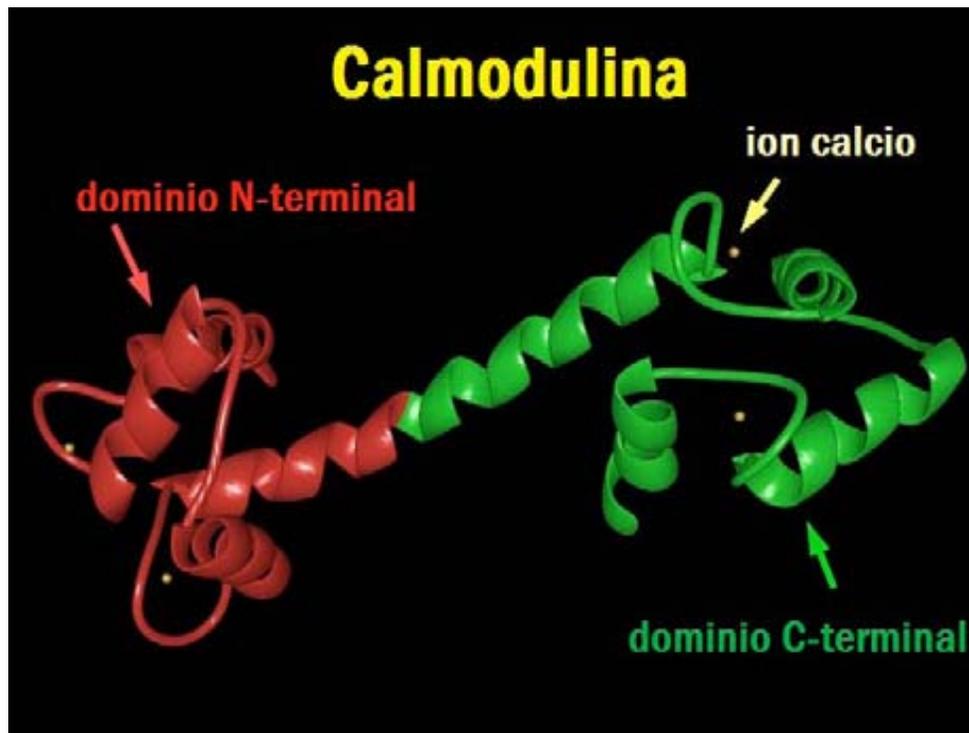
La leptospermona (35), tricetona de diferentes especies de la familia Myrtaceae, es un inhibidor de la dioxigenasa del ácido hidroxifenilpirúvico, una enzima de primordial importancia en la biosíntesis de pigmentos y que participa en los procesos de respiración y fotosíntesis (Moran 2005; Wu *et al.*, 2002; Meazza *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1997). Actualmente esta enzima es un blanco molecular atractivo para el desarrollo de una nueva clase de herbicidas de tipo  $\beta$ -tricetona, como la sulcotriona y la mesotriona (Vyvyan 2002; Dayan *et al.*, 2007; Meazza *et al.*, 2002).

Así como los ejemplos señalados, los bibencilos de las orquídeas podrían, tras modificaciones estructurales, generar productos más efectivos.

### 1.3 Calmodulina

La calmodulina (CaM) es una proteína pequeña modulada por  $\text{Ca}^{2+}$  de 148 aminoácidos, arreglados en dos dominios globulares ( $\alpha$ -hélices) conectadas por una larga hélice flexible (Figura 3). Cada dominio globular contiene dos sitios funcionales que se unen al ión calcio. Al enlazarse el calcio a la CaM expone dos superficies hidrofóbicas rodeadas por una carga negativa, una en cada dominio globular. Entonces el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM puede enlazarse a sus enzimas blanco principalmente mediante interacciones hidrofóbicas con las largas cadenas de las enzima blanco (Chin y Means, 2000; Bouché *et al.*, 2005). La CaM se considera el primer transductor de señales en células eucariontes y es un regulador de eventos celulares por interacción con grupos heterogéneos de proteínas blanco en células tanto animales como vegetales. Cabe mencionar que la secuencia de aminoácidos en la CaM está conservada tanto en animales como en plantas.

La CaM y sus enzimas blanco constituyen una red compleja que participa en casi todos los proceso celulares: regulación del metabolismo, citoesqueleto, transporte de iones, proliferación celular, división celular, transcripción, metabolismo de fosfolípidos, fosforilación y desfosforilación, entre otros. Por lo tanto, esta proteína juega un papel muy importante en la regulación de varios procesos fisiológicos en las plantas, incluyendo los relacionados con el crecimiento y la defensa (Black *et al.*, 2004; Kortvely y Gulya, 2004).



**Figura 3.** Estructura tridimensional de la calmodulina CaM con calcio.

La mayoría de los sitios de unión de la CaM hasta ahora conocidos, están constituidos de una secuencia de 12 a 30 aminoácidos contiguos que de manera característica contiene una carga positiva. El tipo de interacciones que contribuyen principalmente a la estabilidad del complejo CaM-enzima blanco son de tipo electrostáticas. Las primeras estructuras resueltas en tres dimensiones de los complejos CaM-enzima blanco sugieren que ambos dominios globulares de la CaM se enrollan alrededor de la enzima, formando así una estructura globular (Chin y Means, 2000; Bouché *et al.*, 2005).

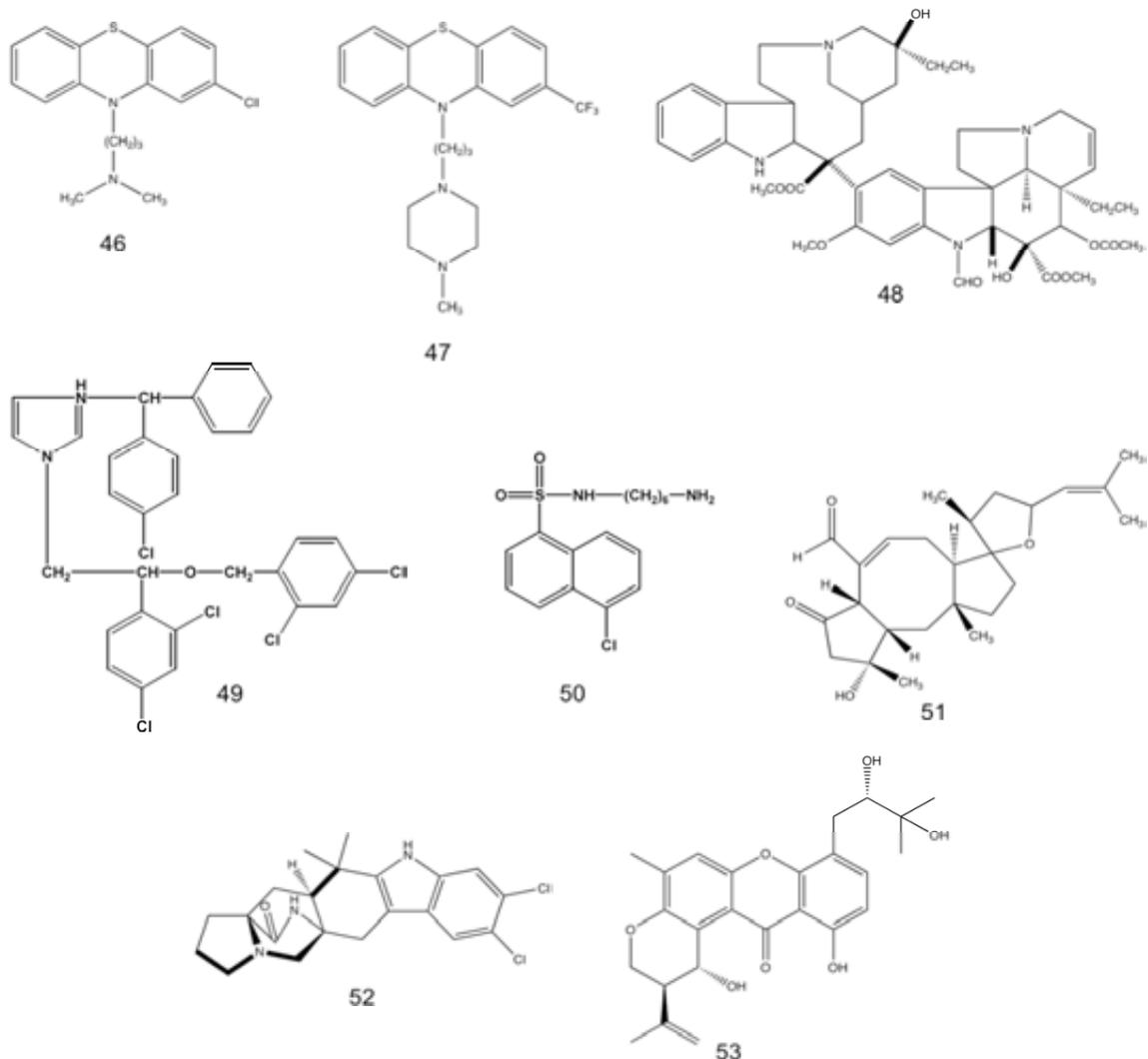
Más de 100 proteínas son reguladas por la CaM en plantas y vertebrados. Esas proteínas incluyen varias enzimas cinasas (CaM cinasa II), proteínas fosfatasas, fosfodiesterasas, las adenilato ciclasas 1 y 8, la oxido nítrico sintasa, y varios canales iónicos y receptores como rianodina e IP3, por mencionar algunos ejemplos. Ciertas enzimas blanco de la CaM se encuentran solo en plantas y entre ellas se pueden citar la

---

Ca<sup>2+</sup>-ATPasa (ACA9), de importancia particular en el crecimiento normal del tubo de polen y en la fertilización y la proteína específica del polen NPG1, importante para el desarrollo de la planta (Chin y Means, 2000; Black *et al.*, 2004; Bouché *et al.*, 2005; Martínez-Luis *et al.*, 2007). Por lo anterior, podemos decir que la calmodulina es un receptor multifuncional que regula muchas funciones fisiológicas importantes (Daye *et al.*, 2001).

Muchos compuestos, naturales y sintéticos tanto fármacos como pesticidas, interaccionan con la CaM e inhiben sus propiedades moduladoras. Estos productos pueden ejercer su efecto a través de su unión directa a la proteína o al complejo Ca<sup>2+</sup>-CaM-enzima. Muchos de los productos que se unen a la proteína han contribuido al conocimiento de sus funciones, regulación y características estructurales, así mismo han permitido el descubrimiento de nuevos blancos enzimáticos e isoformas, y su papel en la regulación del crecimiento de las plantas y su defensa (Bouché *et al.*, 2005), la contracción y relajación del músculo liso (Somlyo y Somlyo, 2003), el aprendizaje y la memoria (Horikawa *et al.*, 2005), la inflamación (Horikawa *et al.*, 2005), y la ansiedad fisiológica (Du *et al.*, 2004), por mencionar algunos.

Entre los fármacos más importantes que inhiben a la CaM se encuentran los antipsicóticos derivados de la fenotiazina [clorpromazina (46) y trifluoperazina (47)] y la vincristina(48), alcaloide anticancerígeno del cataranto (*Catharanthus roseus*). El calmidazolium (49) y el compuesto W7 (50) son otros inhibidores de la proteína ampliamente utilizados como herramientas de investigación en procesos en los que participa la CaM. Dentro de los productos fitotóxicos más importantes que inhiben la CaM se encuentran la ofiobolina A (51) (sesterpenoide aislado de hongos del género *Bipolaris*), la malbranqueamida (52) (alcaloide biosintetizado por el hongo *Malbranchea aurantiaca*) y el hidrato de tajixantona (53) (xantona prenilada del hongo *Emericella sp.*), por mencionar algunos ejemplos (Figura 4) (Martínez-Luis *et al.*, 2007; Figueroa *et al.*, 2008; González-Andrade *et al.*, 2009). Recientemente se publicó una revisión detallada de inhibidores de la CaM de origen natural (Martínez-Luis *et al.*, 2007).



**Figura 4.** Fármacos y metabolitos secundarios que inhiben la actividad de la CaM.

Los inhibidores de la CaM pueden ser detectados por varios métodos, la mayoría de ellos *in vitro*. Estos métodos incluyen cromatografía de afinidad (Molnar *et al.*, 1995; Ovadi, 1989), proteólisis limitada (Ovadi, 1989), espectroscopia UV, dicroísmo circular (Molnar *et al.*, 1995; Harmat *et al.*, 2000; Vertessy *et al.*, 1998), electroforesis en gel (Leung *et al.*, 1985), resonancia magnética nuclear (Zhou *et al.*, 1994; Craven *et al.*, 1996), difracción de rayos X (Vertessy *et al.*, 1998; Harmat *et al.*, 2000), mutagénesis dirigida que sirve para identificar sitios de unión e inhibición en la CaM (Odom *et al.*, 1997), ensayos enzimáticos funcionales utilizando enzimas sensibles a la CaM (Ovadi,

1989, Molnar *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1997) y tecnologías basadas en la fluorescencia de energía de resonancia (Au *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2005).

Los ensayos mas ampliamente usados son los que miden la inhibición de la actividad enzimática de una enzima modulada por CaM (ensayos funcionales enzimáticos), como por ejemplo la fosfodiesterasa del AMPc (PDE1). La PDE1 cataliza la hidrólisis de nucleótidos cíclicos a nucleótidos monofosfato (Leung *et al.*, 1984; Sharma, 1997). La actividad de la PDE1 se puede correlacionar con la cantidad de AMPc liberado durante la reacción enzimática usando un radioinmunoensayo. Alternativamente, la cantidad de fosfato inorgánico (Pi) liberado por la hidrólisis del AMPc en presencia de CaM y una nucleotidasa se puede cuantificar por métodos espectrofotométricos o radiométricos (Sharma y Wang, 1979). Sin embargo, la transferencia de energía con fluorescencia esta captando un mayor interés debido a que es altamente especifico, selectivo, de bajo costo y por que el tiempo de reacción es rápido, aunque muchas veces la preparación de los elementos de detección puede ser muy laboriosa (Allen *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2005; Gangopadhyay *et al.*, 2004; Douglass *et al.*, 2002). Uno de los procedimientos mas ampliamente usados involucra la unión covalente a la calmodulina de un fluoroforo estratégicamente localizado mediante el método de mutagénesis dirigida. Con tal molécula de prueba, es posible correlacionar un cambio conformacional por la unión del ligando, con el cambio en las propiedades de emisión de la proteína marcada (González-Andrade *et al.*, 2009).

## 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis

Las hipótesis en que se sustenta el presente trabajo son las siguientes:

a) Con base en la similitud estructural, los análogos sintéticos de la batatasina III (**1**) y gigantol (**5**) pueden presentar un efecto fitotóxico contra las arvenses *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli*, *Medicago sativa* y *Lemna pausicostata*.

b) El mecanismo de acción a nivel molecular del efecto fitotóxico de la batatasina III (**1**) y el gigantol (**5**) así como de sus análogos sintéticos podría involucrar a la proteína moduladora calmodulina ya que estos compuestos modifican la movilidad electroforética de la CaM.

### 2.2 Objetivos generales

Evaluar el potencial fitotóxico e inhibidor de la proteína CaM de una serie de análogos sintéticos de la batatasina III (**1**) y el gigantol (**5**) con la finalidad de encontrar compuestos con una actividad mejor a la de las moléculas prototipo y así contribuir al desarrollo de nuevos agentes herbicidas y medicinales potenciales.

### 2.3 Objetivos específicos

Para el cumplimiento de los objetivos generales propuestos, se plantearon los siguientes objetivos específicos.

2.3.1 Sintetizar, purificar y caracterizar por métodos espectroscópicos y espectrométricos una serie de bibencilos análogos de la batatasina III (**1**) y el gigantol (**5**) diseñados de manera no racional aplicando la reacción de Wittig.

2.3.2 Purificar y caracterizar por métodos espectroscópicos y espectrométricos tres series de análogos sintéticos de la batatasina III (**1**) y el gigantol (**5**) diseñados de manera no racional y que incluyen, tres difenilmetanos, cinco homobibencilos y cuatro chalconas.

2.3.3 Determinar el potencial fitotóxico de los análogos sintéticos mediante la evaluación del efecto fitotóxico sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli* *Echinochloa crus-galli* y *Medicago sativa*.

2.3.4 Determinar el potencial fitotóxico de los análogos sintéticos sobre la reducción del crecimiento y la pérdida de electrolitos de *Lemna pausicostata*.

2.3.5 Evaluar el efecto de la batatasina III (**1**), gigantol (**5**) y análogos sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc (PDE1) *in vitro* en presencia de CaM de humano. Esta actividad permitirá conocer si los bibencilos modifican la actividad reguladora enzimática de la proteína CaM.

2.3.6 Determinar si los compuestos que inhiben la actividad de la PDE1 actúan directamente sobre la CaM o sobre el complejo CaM-PDE1 mediante la aplicación de experimentos de apagamiento de fluorescencia de la proteína.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Procedimientos generales

##### 3.1.1 Síntesis de los análogos 54-65

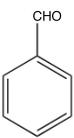
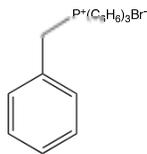
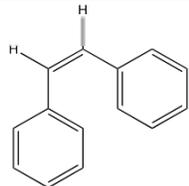
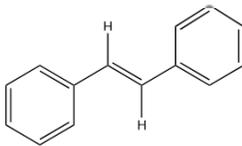
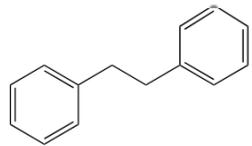
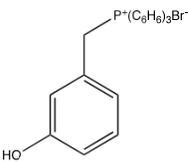
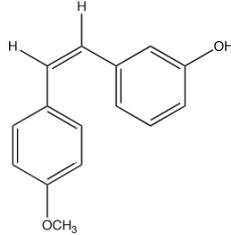
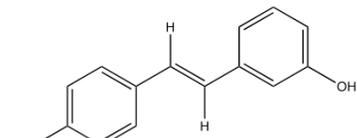
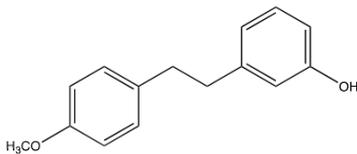
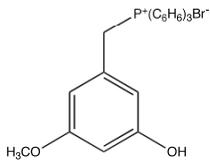
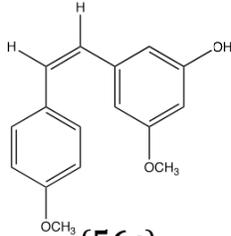
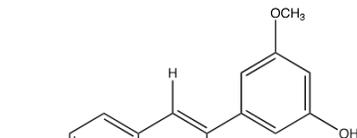
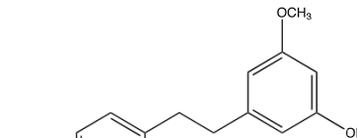
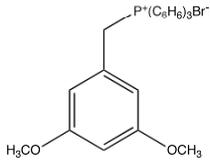
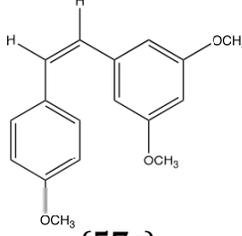
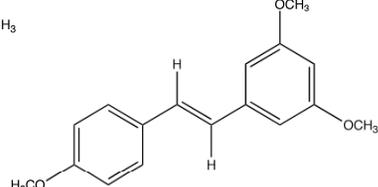
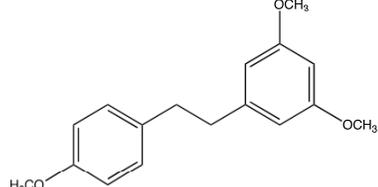
La síntesis de los análogos **54-65** se realizó utilizando la reacción de Wittig. Las estructuras de los productos finales e intermediarios sintetizados se muestran a detalle en el Cuadro 2.

La síntesis en general de los análogos se realizó de la siguiente manera: en un matraz bola de 150 mL con tres bocas equipado con agitación magnética, termómetro, septum y embudo de adición bajo una atmósfera de N<sub>2</sub>, se colocó una determinada cantidad del aldehído correspondiente en 15 mL de THF anhidro y NaH al 10% en aceite y se adicionó a dicha mezcla de reacción la sal de Wittig. La mezcla de reacción se dejó en agitación por 2.5 horas a temperatura ambiente.

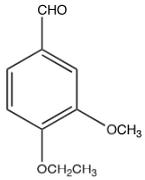
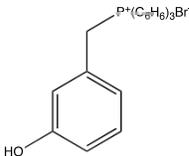
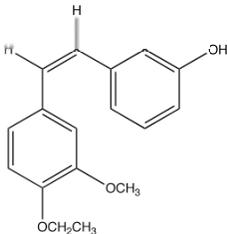
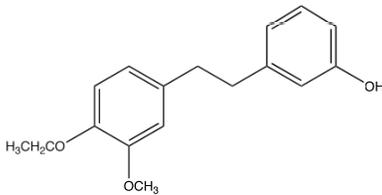
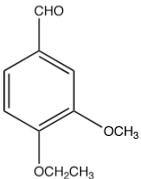
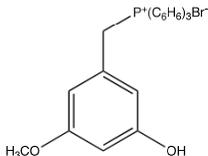
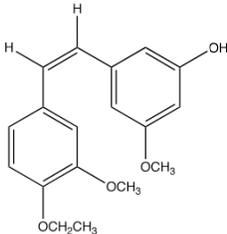
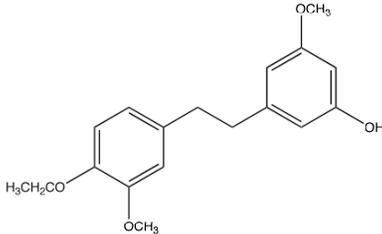
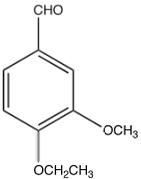
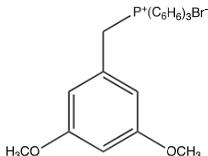
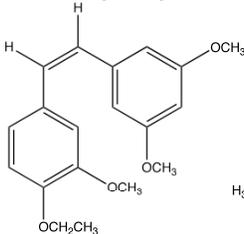
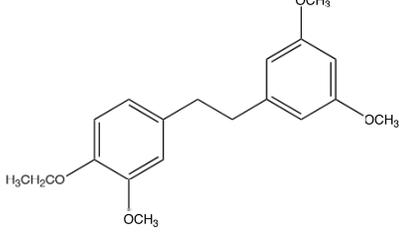
A la mezcla de reacción se le adicionó 4.5 mL de HCl al 5%, se concentró casi a sequedad en un rotaevaporador y el residuo se lavó con 20 mL de salmuera y se extrajo con 2 x 15 mL de AcOEt. Las fases orgánicas se juntaron, se lavaron con 10 mL de agua y se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y nuevamente se concentró en el rotaevaporador.

Para retirar las impurezas de la reacción, se purificó por medio de columna cromatográfica utilizando un medio de elución adecuado para cada compuesto. En un frasco para hidrogenación se disolvió la mezcla de estilbenos obtenida en 25 mL de AcOEt, a continuación se adicionaron 27 mg de Pd/C al 10% como catalizador y se hidrogenó la mezcla por 3 horas a 59 psi de presión y 49 °C de temperatura. Al cabo de este tiempo a la mezcla se adicionaron 25 mg más de catalizador y se hidrogenó por 3 horas más a la misma presión y a 55 °C de temperatura. Posteriormente, la mezcla se filtró para eliminar el catalizador y se concentró en el rotaevaporador. Finalmente cada uno de los compuestos fue purificado por métodos convencionales, como se indica más adelante.

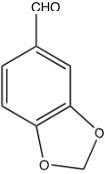
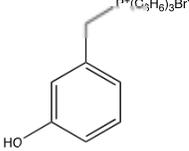
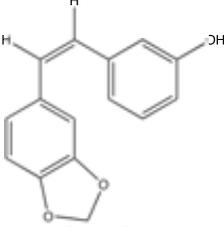
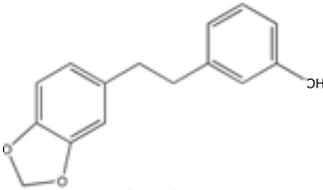
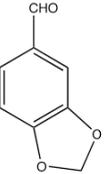
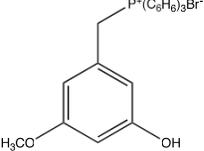
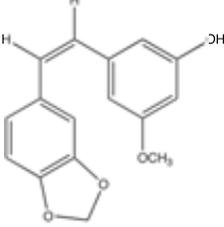
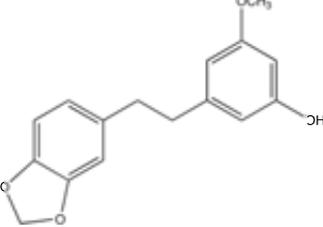
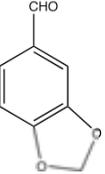
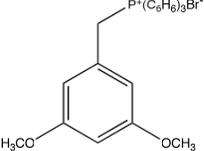
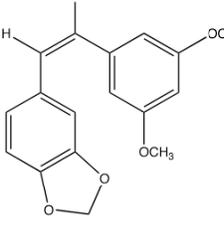
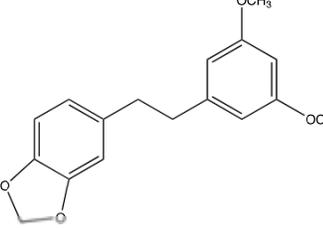
**Cuadro 2.** Resumen de los reactivos empleados para la obtención de los intermediarios y análogos sintéticos 54-65.

| ALDEHÍDO  | SAL DE FOSFONIO   | ESTILBENOS   |   | BIBENCILOS   |
|---|---|--|---|--|
| <br><b>(54a)</b>   | <br><b>(54b)</b>   | <br><b>(54c)</b>   | <br><b>(54d)</b>   | <br><b>(54)</b>   |
| <br><b>(55a)</b>   | <br><b>(55b)</b>   | <br><b>(55c)</b>   | <br><b>(55d)</b>   | <br><b>(55)</b>   |
| <br><b>(56a)</b>  | <br><b>(56b)</b>  | <br><b>(56c)</b>  | <br><b>(56c)</b>  | <br><b>(56)</b>  |
| <br><b>(57a)</b> | <br><b>(57b)</b> | <br><b>(57c)</b> | <br><b>(57d)</b> | <br><b>(57)</b> |

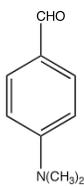
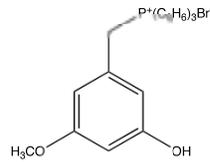
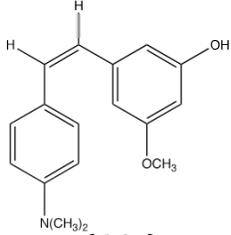
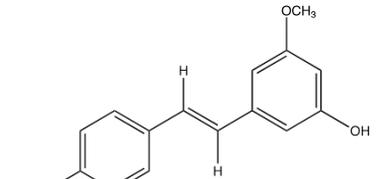
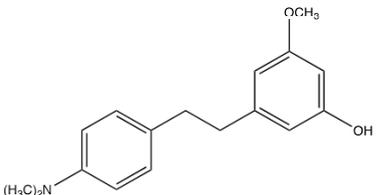
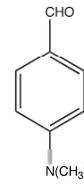
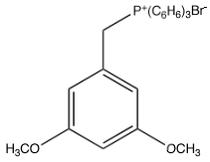
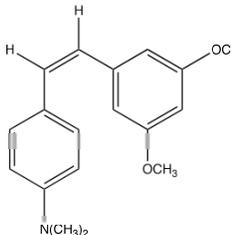
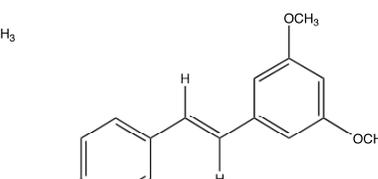
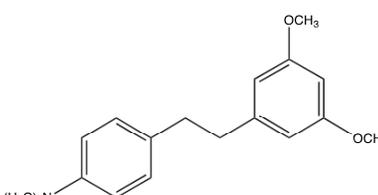
**Cuadro 2.** Resumen de los reactivos empleados para la obtención de los intermediarios y análogos sintéticos **54-65** (continuación).

| ALDEHÍDO  | SAL DE FOSFONIO  | ESTILBENOS  | BIBENCIOLOS   |
|---|--|---|---|
|  <p><b>(58a)</b></p>   |  <p><b>(58b)</b></p>  |  <p><b>(58c)</b></p>  |  <p><b>(58)</b></p>  |
|  <p><b>(59a)</b></p>   |  <p><b>(59b)</b></p>  |  <p><b>(59c)</b></p>  |  <p><b>(59)</b></p>  |
|  <p><b>(60a)</b></p> |  <p><b>(60b)</b></p> |  <p><b>(60c)</b></p> |  <p><b>(60)</b></p> |

**Cuadro 2.** Resumen de los reactivos empleados para la obtención de los intermediarios y análogos sintéticos **54-65** (continuación).

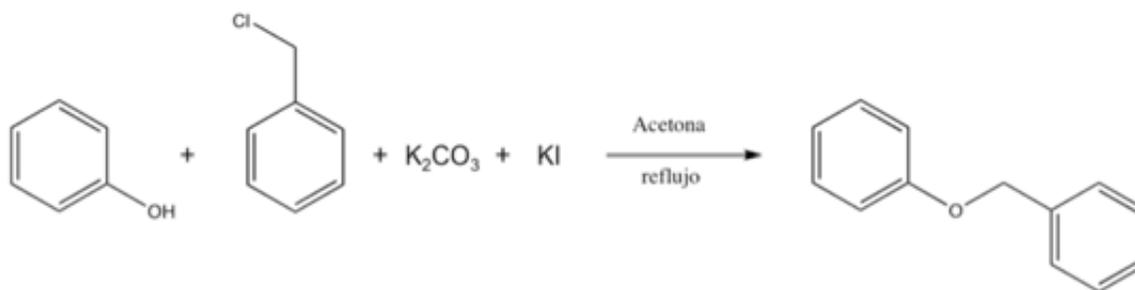
| ALDEHÍDO   | SAL DE FOSFONIO  | ESTILBENOS  | BIBENCILOS  |
|--|--|---|---|
|  <p><b>(61a)</b></p>  |  <p><b>(61b)</b></p>  |  <p><b>(61c)</b></p>  |  <p><b>(61)</b></p>  |
|  <p><b>(62a)</b></p>  |  <p><b>(62b)</b></p>  |  <p><b>(62c)</b></p>  |  <p><b>(62)</b></p>  |
|  <p><b>(63a)</b></p> |  <p><b>(63b)</b></p> |  <p><b>(63c)</b></p> |  <p><b>(63)</b></p> |

**Cuadro 2.** Resumen de los reactivos empleados para la obtención de los intermediarios y análogos sintéticos **54-65** (continuación).

| ALDEHÍDO  | SAL DE FOSFONIO   | ESTILBENOS   |   | BIBENCILOS   |
|---|---|--|---|--|
|  <p><b>(64a)</b></p> |  <p><b>(64b)</b></p> |  <p><b>(64c)</b></p> |  <p><b>(64d)</b></p> |  <p><b>(64)</b></p> |
|  <p><b>(65a)</b></p> |  <p><b>(65b)</b></p> |  <p><b>(65c)</b></p> |  <p><b>(65c)</b></p> |  <p><b>(65)</b></p> |

### 3.1.2 Síntesis del benciloxibenceno (66).

El producto **66** se sintetizó de acuerdo a la reacción que se indica en el Esquema 3.

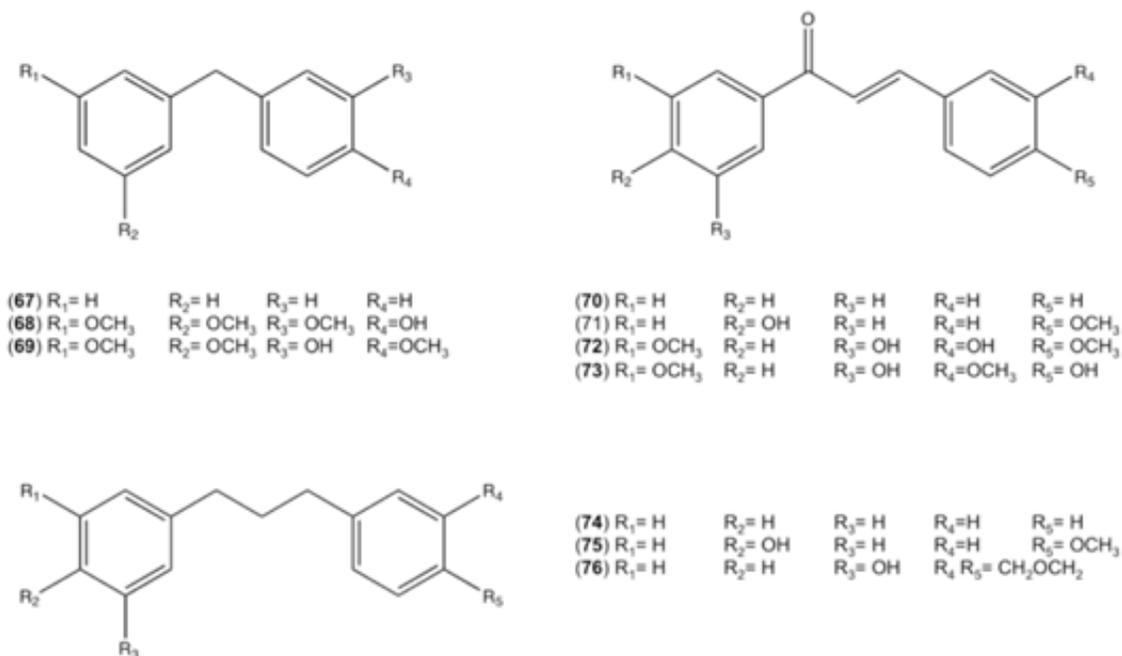


**Esquema 3.** Esquema de la síntesis del compuesto benciloxibenceno (**66**).

El procedimiento se llevo a cabo como se describe a continuación: en un matraz bola de 150 mL con tres bocas equipado con agitación magnética, termómetro, septum, embudo de adición y una trampa anhidra, se disolvieron 5 g (0.053mol) de fenol, 6.8 g (0.049 mol) de  $K_2CO_3$  y cantidades catalíticas de KI en 150 mL de acetona. Posteriormente se adicionó a la mezcla de reacción 3.77 mL de cloruro de bencilo gota a gota y se agitó vigorosamente. Una vez que se termino la adición de cloruro de bencilo, se retiró el embudo de adición y se colocó sobre el matraz de reacción un condensador de agua. La mezcla se mantuvo a reflujo durante 21 horas. Al cabo de ese tiempo, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se extrajo con AcOEt 3 x 15 mL. Las fases orgánicas se juntaron, se lavaron con 20 mL de salmuera, se secaron con  $Na_2SO_4$  anhidro, y el filtrado se concentro *in vacuo*. El producto obtenido fue el benciloxibenceno que finalmente fue purificado por cromatografía en columna abierta.

### 3.1.3 Síntesis de los análogos 67-76

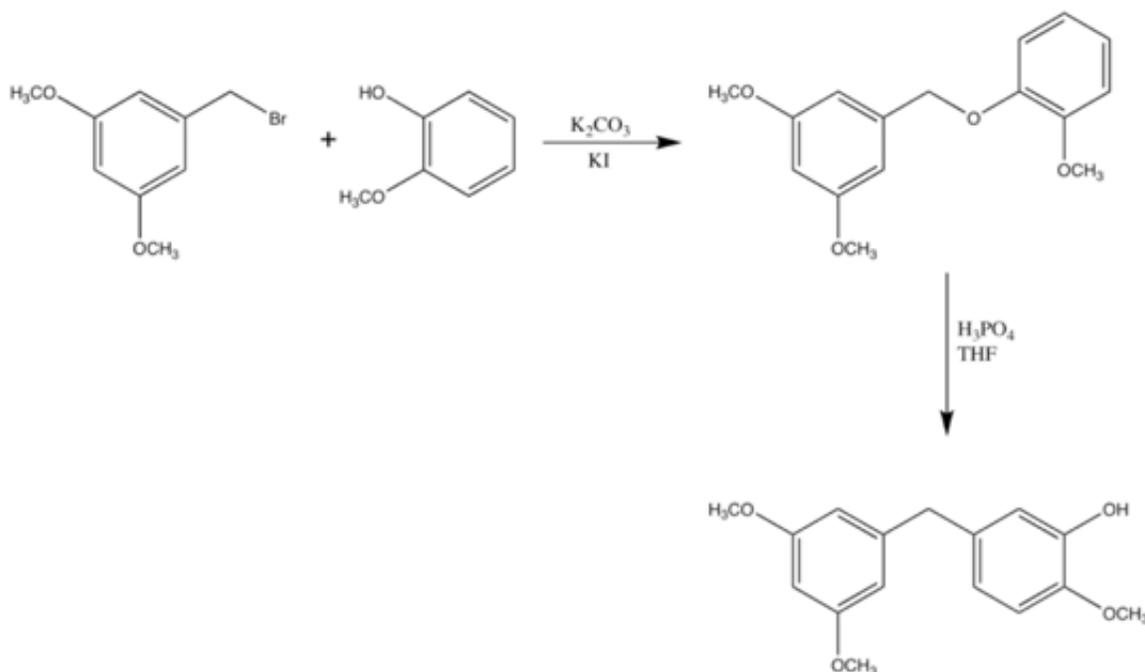
El resto de los compuestos se sintetizaron por medio de otros métodos, con el objetivo de obtener análogos con un número menor y mayor de carbonos en la cadena que une los dos anillos aromáticos (Esquema 4). Estos análogos fueron sintetizados por el Dr. Adelfo Reyes Ramírez de la FES Zaragoza, UNAM y solo fueron purificados y caracterizados en nuestro laboratorio. Sin embargo, para que el trabajo se presente de forma integral se indicará de manera breve el proceso experimental de síntesis de estos productos.



**Esquema 4.** Análogos sintéticos con un número mayor y menor de carbonos de carbonos que une a los dos anillos aromáticos.

La síntesis para obtener los difenilmetanos **67-69** (Esquema 5) se realizó de la siguiente forma: 0.04 moles de bromuro de 3,5-dimetoxibencilo y 5 g de guayacol se disolvieron en 65 mL de acetona; a la solución resultante se adicionó 5.51 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se calentó a reflujo por 7.5 horas. Al cabo de este tiempo se adicionó a la mezcla 1.02 g de KI y se calentó a reflujo 2.5 hora más. Al finalizar el segundo periodo de reflujo, se adicionó

a la mezcla 30 ml de agua y se concentro al vacío hasta eliminar la acetona. Posteriormente, la mezcla se extrajo con AcOEt (2 x 15 mL). Las fases orgánicas se combinaron y se trataron con 20 mL de una solución de NaOH 1N durante cinco minutos. Una vez separadas las fases, la orgánica se lavó con 15 mL de agua y se seco con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtro y se concentro al vacío. El guayacol remanente se elimino a través de una cromatografía en columna de gel de sílice de la mezcla de reacción resultante usando hexano-AcOEt (9:1) como eluyente.

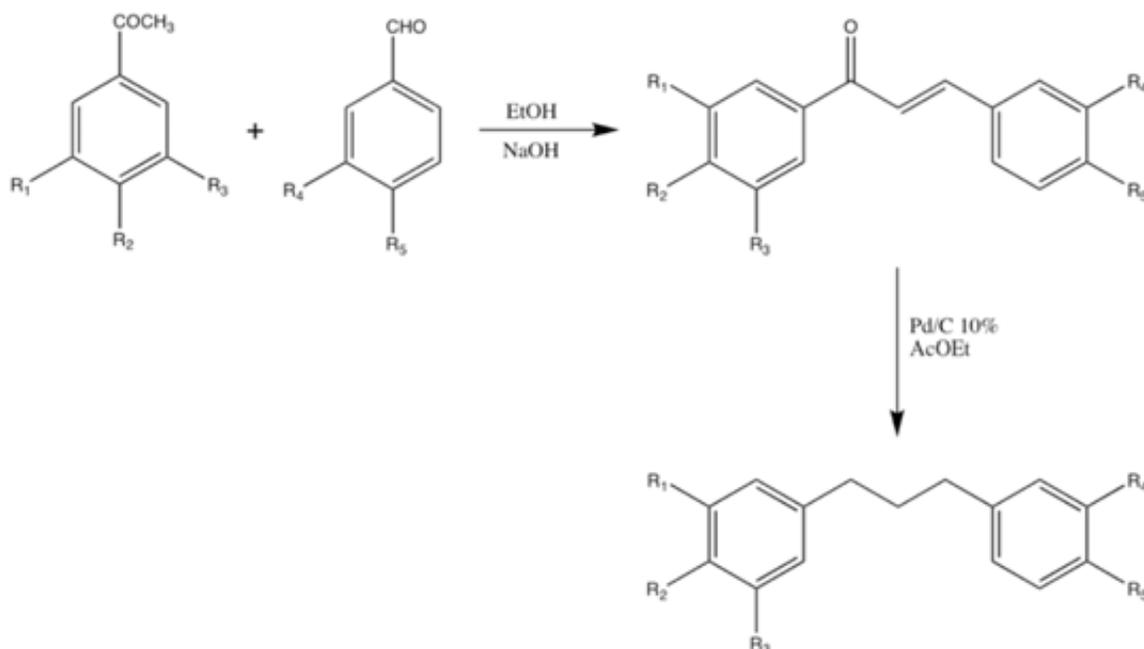


**Esquema 5.** Esquema general de la síntesis de difenilmetanos (**68-69**).

El producto obtenido, 1.5 g se disolvió en 18 mL de tolueno y a la solución resultante se adicionaron 1.7 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; la mezcla se calentó a reflujo por 6.5 horas. La solución obtenida se neutralizó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y después se extrajo sucesivamente con 15 mL de agua y AcOEt (2 x 15 mL). Las fases orgánicas se combinaron y lavaron con 10 mL de agua. Por último, la fase orgánica combinada se secó con NaSO<sub>4</sub> anhidro, se filtro y se concentro en un rotaevaporador al vacío.

Los homobibencilos **74-76** se prepararon por hidrogenación catalítica de la correspondiente chalcona, la cual fue sintetizada por catálisis básica. Así de esta manera se obtuvieron los dos últimos subgrupos de análogos (Esquema 6).

De manera general, el procedimiento para la obtención de ambos subgrupos fue el siguiente: el benzaldehído (0.1 mol) y la acetofenona (0.1 mol) correspondientes fueron disueltos en 200 mL etanol caliente; posteriormente se adicionaron lentamente 2 mL de una solución acuosa de NaOH 1N; la mezcla de reacción se dejó en agitación por 1.5 horas a temperatura ambiente. Durante este tiempo las chalconas **70-73** cristalizaron del medio de reacción y se separó por filtración.



**Esquema 6.** Esquema general de la síntesis de los homobibencilos y chalconas (**70-76**).

Para obtener los homobibencilos **74-76**, las chalconas **70-73** se disolvieron en 25 mL de AcOEt; a la mezcla se adicionaron 27 mg de Pd/C al 10% como catalizador; la reacción de hidrogenación transcurrió durante 3 horas a 59 psi de presión y 49 °C de temperatura. Al cabo de este tiempo, se adicionaron 25 mg más de Pd/C y la reacción se continuó durante tres horas más a la misma presión y a una temperatura de 55 °C.

Finalmente, la mezcla se filtró para eliminar el catalizador y se concentró al vacío en un rotaevaporador.

### 3.1.4 Purificación de los análogos bibencilos.

Para 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 (sílica gel 60 F<sub>254</sub> Merck). La visualización de las placas se realizó con una lámpara de luz UV (onda corta 254 nm; onda larga 356 nm) y como agente cromógeno se utilizó una solución reactiva a base de sulfato cérico (sulfato cérico amoniacal en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

La purificación de los compuestos se llevó a cabo mediante las técnicas cromatográficas de columna abierta o en capa fina utilizando gel de sílice como fase estacionaria (sílica gel 60 o F<sub>254</sub> Merck, respectivamente) y diversas mezclas de disolventes como fase móvil. Para la elección del método se consideró la cantidad de compuesto. Los análisis se realizaron de acuerdo a las técnicas convencionales. La técnica utilizada para la purificación y las características físicas de cada compuesto se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Características físicas y método de purificación empleado.

| Compuesto | Método de Purificación           | Rendimiento (%) | Características Físicas    | Punto de Fusión (°C) |
|-----------|----------------------------------|-----------------|----------------------------|----------------------|
| (54)      |                                  |                 | Sólido cristalino blanco   |                      |
| (55)      | Cromatografía en Columna Abierta | 68.4            | Líquido viscoso amarillo   |                      |
| (56)      | Cromatografía en Columna Abierta | 82.6            | Líquido viscoso ámbar      |                      |
| (57)      | Cromatografía en Columna Abierta | 57.4            | Líquido viscoso ámbar      |                      |
| (58)      |                                  |                 | Sólido cristalino amarillo | 54                   |

**Tabla 4.** Características físicas y método de purificación empleado (continuación).

| <b>Compuesto</b> | <b>Método de Purificación</b>    | <b>Rendimiento (%)</b> | <b>Características Físicas</b>                          | <b>Punto de Fusión (°C)</b> |
|------------------|----------------------------------|------------------------|---|-----------------------------|
| (59)             | Cromatografía en Columna Abierta | 60.4                   | Líquido viscoso ámbar                                   |                             |
| (60)             | Cromatografía en Capa Fina       | 51.8                   | Sólido cristalino amarillo                              | 82                          |
| (61)             | Cromatografía en Capa Fina       | 40.5                   | Sólido cristalino amarillo                              | 85                          |
| (62)             | Cromatografía en Capa Fina       | 47.1                   | Sólido cristalino amarillo                              | 115                         |
| (63)             |                                  |                        | Sólido cristalino en forma de agujas blanco translucido | 85                          |
| (64)             |                                  |                        | Sólidos amorfo amarillo                                 | 146                         |
| (65)             |                                  |                        | Sólido amorfo blanco                                    | 41                          |
| (66)             | Cromatografía en Columna Abierta | 85                     | Sólido amorfo blanco                                    |                             |
| (67)             | Cromatografía en Columna Abierta | 76.6                   | Líquido incoloro olor dulce                             |                             |
| (68)             |                                  |                        | Sólido amorfo amarillo                                  | 80                          |
| (69)             |                                  |                        | Líquido viscoso amarillo                                |                             |
| (70)             | Cromatografía en Capa Fina       | 49.1                   | Líquido amarillo  |                             |
| (71)             |                                  |                        | Sólido amorfo amarillo                                  | 190                         |
| (72)             | Cromatografía en Capa Fina       | 54.3                   | Sólido amorfo amarillo                                  | 161                         |
| (73)             | Cromatografía en Columna Abierta | 76.9                   | Sólido amorfo amarillo                                  | 162                         |
| (74)             | Cromatografía en Capa Fina       | 88.5                   | Líquido incoloro olor picante                           |                             |
| (75)             | Cromatografía en Capa Fina       | 61.1                   | Sólido amorfo amarillo                                  | 48                          |
| (76)             |                                  |                        | Sólido amorfo amarillo                                  | 84                          |

### **3.1.5 Determinación de las constantes físicas y caracterización de los compuestos sintéticos: métodos espectroscópicos y espectrométricos**

Los puntos de fusión se midieron con un aparato Fisher-Johns y se reportan sin corregir. Los espectros en el IR se obtuvieron en pastilla de KBr o película y se midieron en un espectrómetro Perkin-Elmer FT 1650. Los espectros al UV se registraron utilizando un espectrómetro Lambda II UV en MeOH.

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  (400 y 300 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) se obtuvieron en un espectrómetro Varian UNITY PLUS 500 utilizando  $\text{CDCl}_3$  ó  $\text{DMSO}_d_6$  como disolvente y TMS como referencia interna. Los espectros de masas por impacto electrónico se obtuvieron utilizando un espectrómetro JEOL SX 102 mediante inyección directa con una energía de ionización de 70 eV.

## **3.2 Ensayos biológicos**

### **3.2.1 Evaluación cuantitativa del potencial fitotóxico de los análogos puros sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli* y *Medicago sativa***

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los análogos sintéticos se realizó mediante el bioensayo de germinación y crecimiento radicular de las semillas *Amaranthus hypochondriacus* L. (Amaranthaceae), *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. (Poaceae) y *Medicago sativa* L. (Fabaceae), utilizando el método en caja de Petri previamente descrito por Anaya y colaboradores (1990 y 1995).

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro que contenían un disco de papel filtro del mismo diámetro (Whatman No 1). Cada una de los análogos a evaluar se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  o en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1). Se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones: 10, 50, 100 y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Posteriormente, 3 mL de las disoluciones se vertieron en las cajas de Petri y se permitió la evaporación del disolvente mediante una corriente de aire. A continuación, se inició la

germinación de 15 semillas de cada una de las especies de prueba, humedeciendo el papel filtro con 3 mL de agua destilada.

Las cajas de Petri se incubaron en la oscuridad a 29 °C y la actividad fitotóxica se registró midiendo la longitud de las radículas y contando el número de semillas germinadas después de 24 horas para el caso de *A. hypochondriacus* y 72 horas para el caso de *E. crus-galli* y *M. sativa*. Paralelamente se evaluaron controles positivo y blanco. Como control positivo se utilizó la Tricolorina A (Pereda-Miranda *et al.*, 1993). Como blancos se utilizaron CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y agua. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos se expresaron como concentraciones inhibitorias medias (CI<sub>50</sub>), las cuales fueron calculadas por regresión lineal a partir de los porcentajes del crecimiento radicular. Además los resultados fueron analizados mediante la prueba estadística ANOVA ( $P \leq 0.5$ )

### **3.2.2 Determinación de la actividad fitotóxica sobre *Lemna pausicostata*.**

Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Tanaka y colaboradores (1993). Para ello, disoluciones en DMSO de los compuestos a evaluar, a concentraciones de 31, 62, 125, 250, 500 y 1000 µM, en 3 mL de medio Hunter de fuerza mediana (Becerril, *et al.*, 1992) se adicionaron a 10 colonias de *L. pausicostata* cada una contenidas en los pozos de placas de Elisa. Posteriormente, las placas se incubaron durante 72 horas en una cámara de crecimiento. El control fue tratado con DMSO. Al cabo del tiempo establecido, se procedió a medir la inhibición del crecimiento de las plantas y la pérdida de electrolitos, los resultados fueron expresados en términos del tratamiento menos el valor del control. La pérdida celular de electrolitos se determinó por el incremento en la conductividad eléctrica del medio de cultivo y se midió empleando un conductímetro, al inicio y al final de cada experimento.

### 3.2.3 Efecto de los análogos bibencilos sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina (PDE1).

La actividad de la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina (PDE1) en presencia de calmodulina (CaM) se determinó a través de la cuantificación de la cantidad de fosfato producido, como resultado de la reacción de hidrólisis de AMPc de acuerdo al procedimiento descrito por Sharma y Wang (1979) y con modificaciones de Rivero Cruz *et al.* (2007) y Figueroa *et al.* (2009).

El ensayo se inició mediante la preparación de la mezcla de reacción [0.015 unidades de fosfodiesterasa de cerebro de bovino (PDE1, Sigma), 0.08 µg de calmodulina (CaM Humana), 0.063 unidades de 5'-nucleotidasa de veneno de *Crotalus atrox* (Sigma) y 10 µM de la proteína albúmina sérica bovina (ASB, Boehringer Mannheim), en 1 mL de buffer TRIS-HCl constituido por TRIS-HCl 45 mM, acetato de magnesio 5.6 mM, imidazol 45 mM y CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, a pH de 7]. Una vez preparada se incubó durante 30 min a 30 °C. En una placa de ELISA de 96 pozos (cada uno con una capacidad de 250 µL) se adicionaron 10 µL del compuesto a evaluar [disuelto en una mezcla binaria de acetonitrilo-agua (1:1)] para obtener concentraciones finales de 0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 13, 20, 32, 50 y 60 µM y 40 µL de la mezcla de reacción. La placa se incubó durante 30 min a 30 °C. Al término de este período de incubación, se adicionó cada 10 segundos, a temperatura ambiente y durante 15 minutos a cada pozo 10 µL de AMP cíclico 10.8 mM. Por último, se adicionó a cada pozo 190 µL de una solución de verde de malaquita y molibdato de amonio, con el fin de estimar el contenido de fósforo inorgánico espectrofotocolorimétricamente. Como control positivo se utilizó a la clorpromazina, un inhibidor de la CaM. Cada muestra se ensayo por sextuplicado.

Los valores de absorbancia obtenidos fueron interpolados a una curva estándar de fosfato monobásico de potasio (Sigma); que fue preparada tomando las alícuotas necesarias para obtener once concentraciones diferentes en un intervalo de 0.1 a 3 nM. La absorbancia de las muestras se determinó a 700 nm utilizando un lector de placa ELISA, marca BIO-RAD modelo 680.

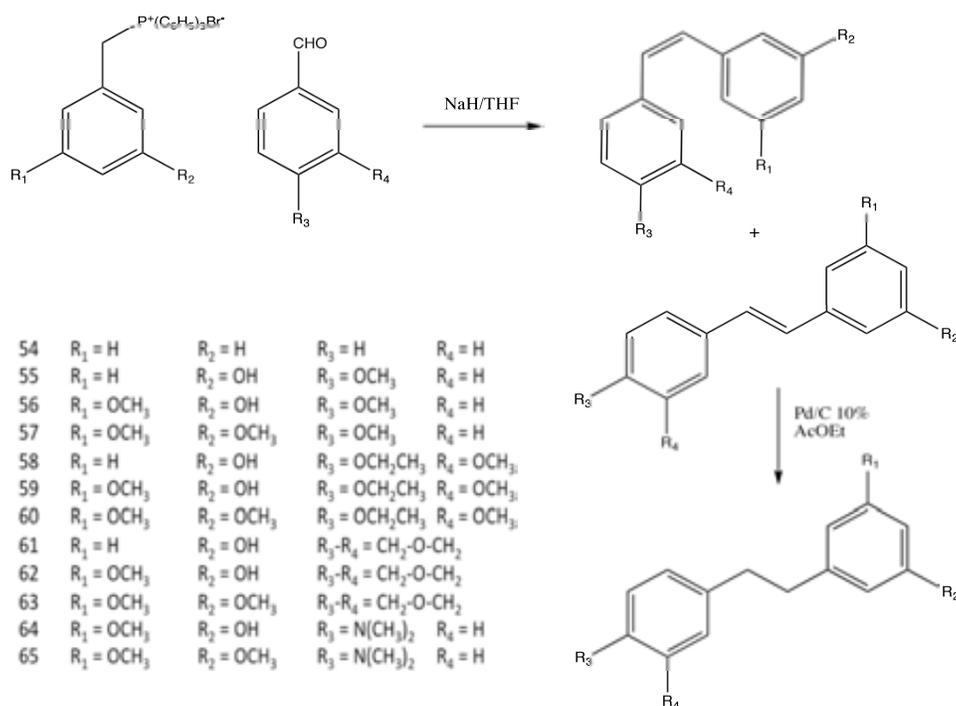
### 3.2.4 Apagamiento de la fluorescencia de la CaM inducida por los análogos 56, 60, 62, 64, 65, 67-76.

El efecto de los productos **56, 60, 62, 64, 65, 67-76** sobre la actividad de la calmodulina (CaM) se determinó también mediante un método espectrofluorométrico de acuerdo al procedimiento descrito por González-Andrade y colaboradores (2009).

Para efectuar este ensayo se utilizó una CaM humana recombinante marcada con un agente fluoróforo (*hCaM M124C-mBBr*) diseñada en la Facultad de Medicina, UNAM (González-Andrade *et al.*, 2009). El apagamiento de la fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro ISS-PC1 (ISS, Champaign, IL, USA). En todos los casos se midió la fluorescencia emitida por la proteína en presencia de los compuestos de prueba a una temperatura de 37 °C. La proteína *hCaM M124C-mBBr* (5µM) se incubó en un buffer de fosfatos (100 mM de fosfatos [pH 5.1] y 10 mM de CaCl<sub>2</sub>) con los distintos tratamientos (10-810 µM). El espectro de emisión de fluorescencia fue adquirido con ranuras de excitación y emisión de 0.5 y 2 nm, respectivamente. La longitud de onda de excitación fue de 381 nm, mientras que la longitud de onda de emisión para las medidas fue de 400 a 550 nm. El grado fraccional de saturación de *hCaM M124C-mBBr* con el ligando (*y*) fue calculado por los cambios en la fluorescencia ocasionados por la unión del ligando. Todos los datos fueron analizados usando el programa Origin 7.0.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los productos **54-66** se sintetizaron con el objetivo de continuar con la búsqueda de compuestos con mejores propiedades fitotóxicas e inhibidoras de la proteína calmodulina (CaM) que los bibencilos prototipo batatasina III (**1**) y gigantol (**5**). Los análogos sintetizados incluyeron moléculas con esqueletos bibencilo, difenilmetano, homobibencilo y chalcona. En el primer caso se pretendía evidenciar el efecto de la posición y naturaleza de los sustituyentes en los anillos A y B en las propiedades biológicas antes señaladas; en los otros casos se analizaría el efecto del tamaño y naturaleza de la cadena que une los dos fenilos. El diseño de los productos no fue racional y el criterio primordial para su síntesis fue la disponibilidad de las materias primas necesarias para su preparación.



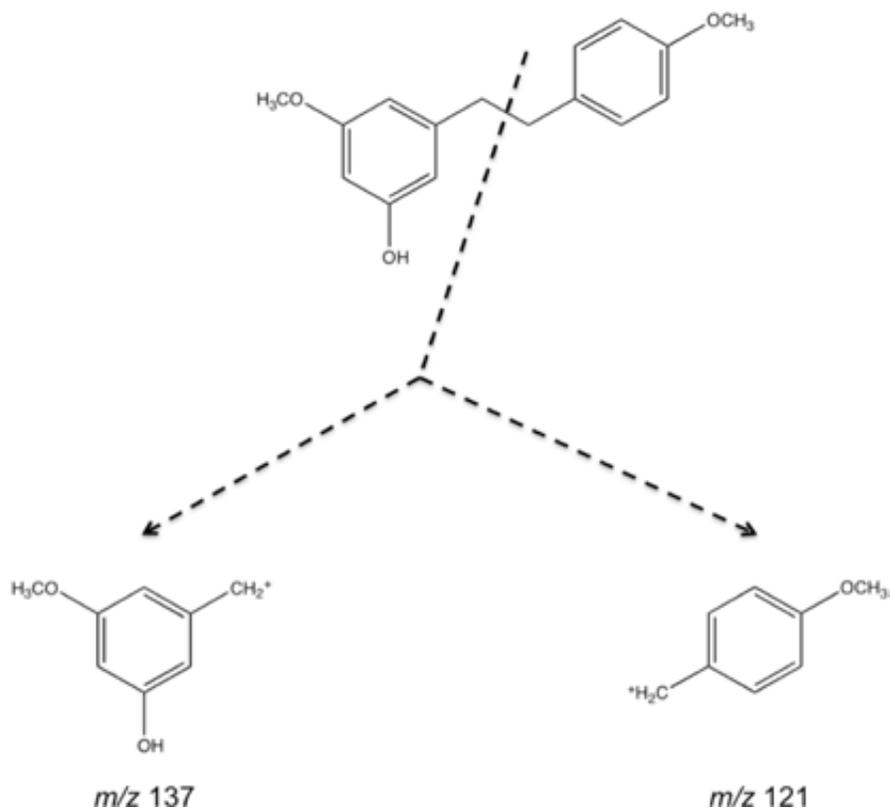
**Esquema 7.** Esquema general de la síntesis de los compuestos **1** y **5** (batatasina III y gigantol) y de sus análogos **54-66**.

Para la síntesis del primer grupo de análogos (**54-66**) se utilizó la reacción de Wittig, altamente valorado para la preparación de bibencilos (Esquema 7) (Wittig y Schollkopf, 1954). Los compuestos sintéticos difieren de las moléculas tipo en la posición de los sustituyentes en los anillos aromáticos (caso de los productos **54-63**) o en su naturaleza como en el caso de los compuestos **64** y **65** que contienen nitrógeno. Aunque las estructuras se incluyeron en la parte experimental, se indican en el esquema 7 de nueva cuenta para facilitar la discusión de los resultados. De este primer grupo, los bibencilos **58-61** y **63-65** son entidades químicas novedosas, en tanto que **55** y **62** se aislaron de las especies *Plagiochila standleyi* (Rycroft y Cole, 2001) y *Dendrobium sp.* (Majumder y Guha, 1999), respectivamente. Así mismo, los compuestos **54-57** fueron sintetizados previamente (Hastings, *et al.*, 2008, Orsini, *et al.*, 2004).

Los difenilmetanos, homobibencilos y chalconas fueron preparados por el Dr. Adelfo Reyes Ramírez de la FES Zaragoza, UNAM. En los primeros, los dos fenilos están unidos por un solo metileno, en tanto que los segundos por tres metilenos. Por último, las chalconas presentan un puente de tres carbonos que incluye al carbonilo conjugado de este tipo de productos. Del conjunto de los difenilmetanos, los compuestos **68** y **69** son novedosos, mientras que el compuesto **67** ya fue sintetizado en 2003 (Dong-Sun y Wha-Seung, 2003). Dentro del subgrupo de los homobibencilos, el compuesto **74** ya ha sido reportado (Chandrasekhar *et al.*, 2002), sin embargo, los compuestos **75** y **76**, son novedosos. Por último, dentro de las chalconas todos los compuestos (**69**, **71-73**) son inéditos con excepción del **70** aceptado como producto natural (Nunes *et al.*, 2000; Schlangen *et al.*, 2009).

#### 4.1 Caracterización estructural de los análogos de los bibencilos 54-65

De manera general los compuestos sintéticos se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Las fórmulas moleculares se determinaron mediante espectrometría de masas y los espectros presentaron los fragmentos de las rupturas bencílicas diagnosticas de este tipo de producto (Figura 5). Como común denominador los productos **56**, **59**, **62** y **64** presentaron uno de los fragmentos resultantes de esta ruptura en una  $m/z$  de 137 uma; los compuestos **57**, **60**, **63** y **65** en una  $m/z$  de 151 uma; en tanto que los productos **55**, **58** y **61** en una  $m/z$  de 107 uma. Por último el bibencilo **54** que carece de sustituyentes presenta el único fragmento de la ruptura bencílica en una  $m/z$  de 91 uma. En todos los casos los iones moleculares presentes en los espectros se observaron en una  $m/z$  par, con la excepción de los productos **64** y **65** que contienen un nitrógeno y por lo tanto sus iones moleculares son impares (Tabla 5). Los espectros en el UV e IR presentan bandas asociadas a su carácter aromático ( $\lambda_{\text{máx}} \sim 276$  nm;  $\nu_{\text{max}} \sim 3000$  y  $\sim 1600$   $\text{cm}^{-1}$ ); en el caso de los productos **56**, **59** y **62** se aprecian, además bandas características para grupos hidroxilos fenólicos ( $\nu_{\text{max}} \sim 3200$   $\text{cm}^{-1}$ ); por último, los bibencilos **64** y **65** presentan bandas congruentes con la presencia de una amina terciaria ( $\nu_{\text{max}} \sim 3200$   $\text{cm}^{-1}$ ). El núcleo bibencilo así como la disposición de los sustituyentes se confirmaron mediante RMN. En los siguientes incisos se discutirán las principales características de los espectros.



**Figura 5.** Fragmentos derivados de la ruptura bencílica del bibencilo **56**.

**Tabla 5.** Constantes espectroscópicas (UV e IR) y espectrométricas (EM-IE  $m/z$ ) de los bibencilos **54-65**.

| Análogos  | UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm | IR $\nu_{\max}$ (KBr) $\text{cm}^{-1}$ | EM-IE $m/z$   |
|-----------|-------------------------------|--|---|
| <b>54</b> | 258<br>210                    | 3299, 2917, 1598,<br>1450, 697         | 182 [ $M^+$ (44)], 91 (100),<br>77 (5), 65 (27)                     |
| <b>55</b> | 275<br>225                    | 3452, 2935, 1598,<br>1452, 1236, 1017  | 228 [ $M^+$ (100)], 165<br>(13), 152 (8.5)                          |
| <b>56</b> | 276<br>208                    | 3401, 2933, 1597,<br>1453, 1244, 1148  | 258 [ $M^+$ (65)], 137 (10),<br>121 (100), 77 (13)                  |
| <b>57</b> | 277<br>208                    | 2998, 2935, 1596,<br>1463, 1246, 1153  | 272 [ $M^+$ (24)], 151<br>(6.5), 121 (100), 91<br>(14.5), 77 (20.5) |
| <b>58</b> | 279<br>207                    | 3536, 2944, 1590,<br>1516, 1362, 1229  | 272 [ $M^+$ (37)], 165<br>(96.5), 137 (100), 107<br>(15), 77 (10)   |

**Tabla 5.** Constantes espectroscópicas (UV e IR) y espectrométricas (EM-IE m/z) de los bibencilos **54-65** (continuación).

| Análogos  | UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm | IR $\nu_{\max}$ (KBr) $\text{cm}^{-1}$ | EM-IE m/z  |
|-----------|-------------------------------|--|--|
| <b>59</b> | 280<br>208                    | 3451, 2935, 1600,<br>1456, 1145        | 302 [M <sup>+</sup> (37.7)], 165 (89.5), 137 (100), 122 (19), 94 (31.6), 77 (30.5) |
| <b>60</b> | 279<br>208                    | 3072, 2935, 1598,<br>1469, 1136        | 316 [M <sup>+</sup> (36)], 165 (100), 137 (70), 122 (6), 77 (3)                    |
| <b>61</b> | 281<br>209                    | 3367, 2858, 1483,<br>1244, 1041        | 242 [M <sup>+</sup> (64.5)], 135 (100), 105 (8.5), 77 (22.5)                       |
| <b>62</b> | 281<br>212                    | 3306, 2927, 1592,<br>1484, 1243        | 272 [M <sup>+</sup> (44)], 135 (100)   |
| <b>63</b> | 281<br>208                    | 3429, 2928, 1592,<br>1484, 1311, 1159  | 286 [M <sup>+</sup> (2)], 135 (100), 91 (3), 77 (19), 65 (6), 51 (14)              |
| <b>64</b> | 253<br>208                    | 3081, 2933, 1599,<br>1454, 1149        | 271 [M <sup>+</sup> (27.5)], 134 (100), 118 (6.5)                                  |
| <b>65</b> | 254<br>207                    | 3430, 2927 1596, 1522,<br>1346, 1159   | 285 [M <sup>+</sup> (69)], 134 (100), 118 (21)                                     |

#### 4.1.1 RMN de los productos **56, 57, 59, 60 y 62-65**

En los cuadros 3 y 4 se incluyen los datos de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de los análogos **56, 57, 59, 60 y 62-65**. Las características más importantes observadas en sus espectros de RMN se resumen a continuación:

-En la región alifática de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H, los ocho productos presentan un singlete ancho, que integra para cuatro hidrógenos, alrededor de  $\delta_{\text{H}}$  2.8 atribuible a los dos metilenos del bibencilo. En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C la señal correspondiente se observa en  $\sim\delta_{\text{C}}$  36-38.

-En la región aromática del espectro de RMN-<sup>1</sup>H de los bibencilos **56, 57, 59, 60 y 62-65**, las señales de los hidrógenos del anillo A forman un sistema AB<sub>2</sub> característico de un benceno trisustituido con los hidrógenos *meta*-relacionados. Las señales se observan

como dobles de dobles con valores de constante de acoplamiento ( $J$ ) de 1 a 3 Hz y sus desplazamientos químicos en el intervalo de  $\sim\delta_H$  6.2-6.6. En los compuestos **56**, **57**, **64** y **65**, los hidrógenos del anillo B forman un sistema AA'BB' típico de un anillo aromático *p*-disustituido y las principales diferencias entre sus espectros fueron los desplazamientos químicos de la porción BB' que en el caso de **64** y **65** están desplazados diamagnéticamente con respecto a los de los productos **56** y **57** en los que los hidrógenos se encuentran *orto* a los carbonos aromáticos que soportan una función metoxilo. Sin embargo, en los productos **59**, **60**, **62** y **63** los tres hidrógenos del anillo B constituyen un sistema A<sub>2</sub>B típico de un anillo 1, 3,4 trisustituido.

-Los espectros de RMN-<sup>13</sup>C de los ocho productos presentaron señales para doce carbonos aromáticos entre  $\delta_C$  97 y 161. Los desplazamientos químicos de las señales entre  $\delta_C$  146 y 161 son característicos de los carbonos aromáticos unidos a las distintas funciones oxigenadas presentes en cada molécula. Así en todos los casos los espectros contienen una o más señales atribuibles a grupos metoxilos y/o hidroxilos unidos a carbonos aromáticos ( $\delta_H/\delta_C \sim 3.8/55$  y  $\delta_H \sim 5.0$  que desaparece con D<sub>2</sub>O, respectivamente). En el caso de los productos **62** y **63**, se observan además las señales típicas del metileno de un grupo metilendioxi ( $\delta_H/\delta_C \sim 5.9/99$ ). Por último, los productos **59** y **60** contienen las absorciones diagnosticas de un grupo etoxilo ( $\delta_H/\delta_C \sim 4.0$ , m;  $\sim 1.45$  (t,  $J = 7$  Hz)/64; 15).

-En la región  $\sim\delta_C$  36-38 en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se aprecian señales para los dos grupos metilenos de los bibencilo.

**Cuadro 3.** Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de **56, 57, 59, 60 y 62-65.**

| Posición                             | 56                      | 57                | 59                    | 60                    | 62                | 63                | 64                | 65                |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                      | $\delta_H$ (m, J en Hz) |                   |                       |                       |                   |                   |                   |                   |
| 2                                    | 6.32<br>(dd, 2.4)       | 6.33<br>(dd, 2.1) | 6.41<br>(dd, 3.0)     | 6.34<br>(dd, 2.4)     | 6.63<br>(dd, 1.8) | 6.33<br>(dd, 2.0) | 6.32<br>(dd, 1.8) | 6.64<br>(dd, 2.1) |
| 4                                    | 6.16 (dd)               | 6.31<br>(dd, 2.1) | 6.25<br>(dd, 1.8)     | 6.31<br>(dd, 2.0)     | 6.32 (dd)         | 6.31<br>(dd, 2.0) | 6.20<br>(dd, 1.8) | 6.28<br>(dd, 2.1) |
| 6                                    | 6.25<br>(dd, 2.4)       | 6.33<br>(dd, 2.1) | 6.32<br>(dd, 3.0)     | 6.34<br>(dd, 2.4)     | 6.60<br>(dd, 1.8) | 6.33<br>(dd, 2.0) | 6.26<br>(dd, 2.1) | 6.64<br>(dd, 2.1) |
| 7                                    | 2.82 (m)                | 2.84 (m)          | 2.82 (m)              | 2.84 (m)              | 2.79 (m)          | 2.82 (s)          | 2.77 (s)          | 2.29 (s)          |
| 2'                                   | 7.09<br>(d, 8.8)        | 7.10<br>(d, 8.7)  | 6.67<br>(dd, 2.1)     | 6.69<br>(dd, 2.0)     | 6.65<br>(d, 1.8)  | 6.64<br>(d, 1.6)  | 7.09<br>(d, 8.4)  | 7.12<br>(d, 8.4)  |
| 3'                                   | 6.83<br>(d, 8.4)        | 6.82<br>(d, 8.7)  | 6.79<br>(d, 8.1)      | 6.79<br>(d, 8.0)      | 6.72<br>(d, 7.8)  | 6.73<br>(d, 8.0)  | 6.82<br>(d, 8.4)  | 6.73<br>(d, 8.1)  |
| 5'                                   | 6.83<br>(d, 8.4)        | 6.82<br>(d, 8.7)  |                       |                       |                   |                   | 6.82<br>(d, 8.4)  | 6.73<br>(d, 8.1)  |
| 6'                                   | 7.09<br>(d, 8.8)        | 7.10<br>(d, 8.7)  | 6.71<br>(d, 2.1)      | 6.72 (d, 2.0)         | 6.67<br>(d, 1.5)  | 6.65<br>(d, 1.6)  | 7.09<br>(d, 8.4)  | 7.12<br>(d, 8.4)  |
| 7'                                   | 2.82 (s)                | 2.84 (s)          | 2.82 (s)              | 2.84 (s)              | 2.79 (s)          | 2.82 (s)          | 2.77 (s)          | 2.29 (s)          |
| 8'                                   |                         |                   |                       |                       | 5.92 (s)          | 5.92 (s)          |                   |                   |
| OCH <sub>3</sub> -3                  | 3.79 (s)                | 3.76 (s)          | 3.83 (s)              | 3.76 (s)              | 3.75 (s)          | 3.77 (s)          | 3.75 (s)          | 3.76 (s)          |
| OH-5                                 | 5.07 (s)                |                   | 5.00 (s)              |                       | 5.02 (s)          |                   |                   |                   |
| OCH <sub>3</sub> -5                  |                         | 3.76 (s)          |                       | 3.76 (s)              |                   | 3.77 (s)          |                   | 3.76 (s)          |
| OCH <sub>3</sub> -4'                 | 3.79 (s)                | 3.76 (s)          |                       |                       |                   |                   |                   |                   |
| OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> -4' |                         |                   | 4.07 (m)/<br>1.45 (t) | 4.07 (m)/<br>1.45 (t) |                   |                   |                   |                   |
| OCH <sub>3</sub> -5'                 |                         |                   | 3.83 (s)              | 3.83 (s)              |                   |                   |                   |                   |
| N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>     |                         |                   |                       |                       |                   |                   | 2.93 (s)          | 2.98 (s)          |

<sup>a</sup> Espectros registrados en CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H, 400 y 300 MHz);  $\delta$  en ppm

**Cuadro 4.** Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN-<sup>13</sup>C de **56, 57, 59, 60 y 62-65.**

| Posición                             | 56         | 57    | 59            | 60            | 62    | 63    | 64    | 65    |
|--------------------------------------|------------|-------|---------------|---------------|-------|-------|-------|-------|
|                                      | $\delta_c$ |       |               |               |       |       |       |       |
| 1                                    | 144.8      | 144.2 | 144.8         | 144.2         | 144.4 | 144.0 | 144.6 | 145.1 |
| 2                                    | 107.0      | 106.5 | 107.1         | 106.5         | 106.8 | 106.5 | 106.6 | 106.5 |
| 3                                    | 161.1      | 160.7 | 161.2         | 160.7         | 160.9 | 160.7 | 160.8 | 161.5 |
| 4                                    | 99.2       | 97.9  | 99.3          | 97.8          | 100.7 | 97.9  | 98.9  | 97.6  |
| 5                                    | 158.1      | 160.7 | 156.8         | 160.7         | 156.5 | 160.7 | 156.8 | 161.5 |
| 6                                    | 108.2      | 106.5 | 108.2         | 106.5         | 107.9 | 106.5 | 107.9 | 106.5 |
| 7                                    | 38.4       | 38.4  | 38.4          | 38.4          | 38.2  | 38.5  | 38.1  | 38.0  |
| 1'                                   | 133.9      | 133.8 | 134.6         | 134.3         | 135.5 | 135.5 | 131.9 | 131.6 |
| 2'                                   | 129.5      | 129.3 | 120.6         | 120.2         | 121.2 | 121.2 | 129.1 | 128.6 |
| 3'                                   | 113.9      | 113.7 | 113.3         | 112.7         | 108.1 | 108.1 | 114.2 | 112.8 |
| 4'                                   | 156.8      | 157.8 | 146.8         | 146.4         | 145.7 | 145.6 | 148.3 | 148.3 |
| 5'                                   | 113.9      | 113.7 | 149.4         | 149.0         | 147.5 | 147.5 | 144.2 | 112.8 |
| 6'                                   | 129.5      | 129.3 | 112.6         | 112.7         | 108.9 | 108.9 | 129.1 | 128.6 |
| 7'                                   | 36.8       | 36.7  | 37.4          | 37.3          | 37.2  | 37.4  | 36.6  | 37.4  |
| 8'                                   |            |       |               |               | 99.0  | 100.7 |       |       |
| OCH <sub>3</sub> -3                  | 55.5       | 55.2  | 56.2          | 55.2          | 55.2  | 55.2  | 55.2  | 55.8  |
| OCH <sub>3</sub> -5                  |            | 55.2  |               | 55.2          |       | 55.2  | 55.2  | 55.8  |
| OCH <sub>3</sub> -4'                 | 55.5       | 55.2  |               |               |       |       |       |       |
| OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> -4' |            |       | 64.7/<br>15.1 | 64.3/<br>14.8 |       |       |       |       |
| OCH <sub>3</sub> -5'                 |            |       | 55.5          | 55.8          |       |       |       |       |
| N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>     |            |       |               |               |       |       | 41.6  | 41.3  |

<sup>a</sup> Espectros registrados en CDCl<sub>3</sub> (<sup>13</sup>C 100 MHz);  $\delta$  en ppm

#### 4.1.2 RMN de los productos 54, 55, 58 y 61

En los cuadros 5 y 6 se presentan los datos de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de los análogos **54**, **55**, **58** y **61**. Las características más importantes observadas en los espectros de RMN se resumen a continuación:

-Al igual que en el caso de los compuestos **54**, **55**, **58** y **61**, en  $\delta_H/\delta_C \sim 38/2.8$  se aprecian las señales características de los dos metilenos de la estructura base.

-En la región aromática del espectro de RMN-<sup>1</sup>H de los compuestos **55**, **58** y **61**, las señales de los hidrógenos del anillo A forman un sistema ABCX característico de un benceno *meta* disustituido. Las señales se observan como dobles de dobles con distintos valores de constante de acoplamiento y sus desplazamientos químicos en el intervalo de  $\sim\delta_H$  6.6-7.4. En el compuesto **55**, los hidrógenos del anillo B forman un sistema AA'BB' típico de un anillo aromático *p*-disustituido, en tanto que para los productos **58** y **61**, los tres hidrógenos del anillo B constituyen un sistema A<sub>2</sub>B típico de un anillo 1, 3,4 trisustituido.

-El compuesto **54** muestra en su espectro de RMN-<sup>1</sup>H en el intervalo  $\delta_H$  7.20-7.27 señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos de dos anillos bencénicos monosustituidos, mismos que forman un sistema AB<sub>2</sub>X<sub>2</sub>. Estas señales correlacionaron en el espectro HSQC con las de <sup>13</sup>C ubicadas en el rango  $\delta_C$  125-128.

-Los espectros de RMN-<sup>13</sup>C de los productos **55**, **58** y **61** presentaron señales para doce carbonos aromáticos entre  $\delta_C$  108 y 160. Además, contienen una o más señales atribuibles a grupos metoxilos y/o hidroxilos unidos a carbonos aromáticos ( $\delta_H/\delta_C \sim 3.7/55$  y  $\delta_H \sim 5.0$ , respectivamente). En el caso del producto **58** se observan las señales de un grupo etoxilo ( $\delta_H/\delta_C \sim 4.0$ , m;  $\sim 1.45$  (t, J= 7 Hz)/64; 15). Por último, los espectros del producto **61** muestran las señales diagnósticas del metileno del anillo metilendioxi ( $\delta_H/\delta_C \sim 6.0/100$ ).

**Cuadro 5.** Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de **54**, **55**, **58** y **61**.

| Posición                             | $\delta_H$ (m, J en Hz) |                   |                   |                   |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                      | <b>54</b>               | <b>55</b>         | <b>58</b>         | <b>61</b>         |
| 2                                    | 7.20<br>(d, 7.5)        | 6.67<br>(dd, 3.6) | 6.79<br>(dd, 8.1) | 6.74<br>(dd, 8.4) |
| 3                                    | 7.27<br>(dd, 8.2)       | 7.14 (t)          | 7.14 (t)          | 7.42 (t)          |
| 4                                    | 7.18<br>(t)             | 6.65<br>(dd, 4.2) | 6.69<br>(dd, 2.1) | 6.66<br>(dd, 5.6) |
| 5                                    | 7.27<br>(dd, 8.2)       |                   |                   |                   |
| 6                                    | 7.20(d, 7.5)            | 6.75 (t)          | 7.03 (t)          | 7.14 (t)          |
| 7                                    | 2.92 (s)                | 2.84 (s)          | 2.84 (s)          | 2.82 (s)          |
| 2'                                   | 7.20<br>(d, 7.5)        | 7.09<br>(d, 8.7)  | 6.66<br>(dd, 9.0) | 6.61<br>(dd, 7.2) |
| 3'                                   | 7.27<br>(dd, 8.2)       | 6.82<br>(d, 8.7)  | 6.75<br>(d, 8.0)  | 6.72<br>(d, 8.0)  |
| 4'                                   | 7.18(t)                 |                   |                   |                   |
| 5'                                   | 7.27<br>(dd, 8.2)       | 6.82<br>(d, 8.7)  |                   |                   |
| 6'                                   | 7.20<br>(d, 7.5)        | 7.09<br>(d, 8.7)  | 6.69<br>(dd, 2.1) | 6.66<br>(dd, 5.6) |
| 7'                                   | 2.92 (s)                | 2.84 (s)          | 2.84 (s)          | 2.82 (s)          |
| 8'                                   |                         |                   |                   | 6.07 (s)          |
| OH-5                                 |                         |                   | 4.82 (s)          | 5.03              |
| OCH <sub>3</sub> -4'                 |                         | 3.79 (s)          |                   |                   |
| OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> -4' |                         |                   | 4.07 (m)/1.45 (t) |                   |
| OCH <sub>3</sub> -5'                 |                         |                   | 3.84 (s)          |                   |

<sup>a</sup> Espectros registrados en CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H, 400 y 300 MHz);  $\delta$  en ppm

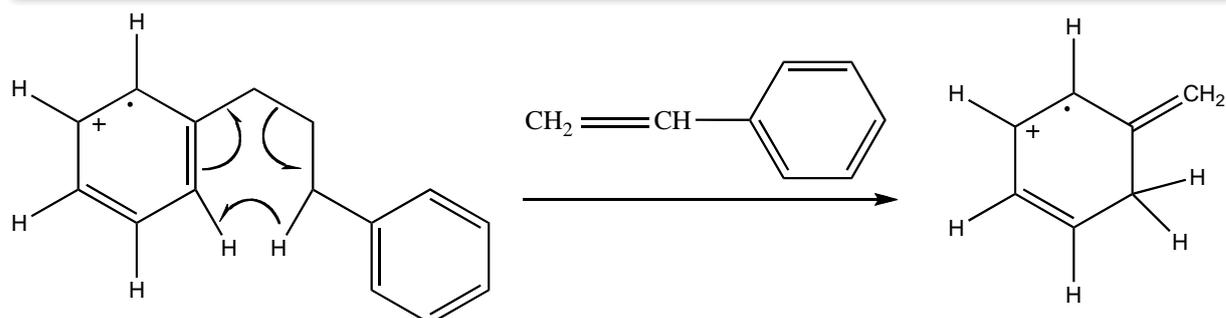
**Cuadro 6.** Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN-<sup>13</sup>C de **54, 55, 58 y 61**.

| Posición                             | 54         | 55    | 58         | 61    |
|--------------------------------------|------------|-------|------------|-------|
|                                      | $\delta_c$ |       |            |       |
| 1                                    | 141.8      | 143.8 | 143.7      | 143.5 |
| 2                                    | 128.3      | 120.9 | 120.2      | 120.9 |
| 3                                    | 128.4      | 129.4 | 129.4      | 129.5 |
| 4                                    | 125.9      | 112.7 | 112.8      | 112.8 |
| 5                                    | 128.4      | 155.5 | 155.5      | 155.5 |
| 6                                    | 128.3      | 115.4 | 115.4      | 115.3 |
| 7                                    | 37.9       | 37.9  | 37.9       | 37.9  |
| 1'                                   | 141.7      | 133.8 | 134.3      | 135.5 |
| 2'                                   | 128.3      | 129.3 | 120.9      | 121.2 |
| 3'                                   | 128.4      | 113.7 | 115.4      | 108.1 |
| 4'                                   | 125.9      | 157.8 | 146.4      | 145.6 |
| 5'                                   | 128.4      | 113.7 | 148.9      | 147.5 |
| 6'                                   | 128.3      | 129.3 | 112.0      | 108.9 |
| 7'                                   | 37.9       | 36.7  | 37.3       | 37.4  |
| 8'                                   |            |       |            | 100.7 |
| OCH <sub>3</sub> -4'                 |            | 55.2  |            |       |
| OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> -4' |            |       | 64.3/14.84 |       |
| OCH <sub>3</sub> -5'                 |            |       | 55.8       |       |

<sup>a</sup> Espectros registrados en CDCl<sub>3</sub> (<sup>13</sup>C 100 MHz);  $\delta$  en ppm

## 4.2 Caracterización estructural de los análogos de los productos 67-76

Los compuestos del tipo difenilmetanos, homobibencilos y chalconas sintéticos se caracterizaron también mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Las fórmulas moleculares se determinaron mediante espectrometría de masas. Como común denominador los productos **67-69** y **74-76** presentaron picos resultantes de una ruptura bencílica. Para el difenilmetano **67**, el fragmento correspondiente se aprecia en una  $m/z$  91 uma; también se aprecia un pico prominente en una  $m/z$  de 167(M-1) debido a una ruptura bencílica. El homobibencilo **74** presenta dos fragmentos resultantes de esta ruptura, uno en  $m/z$  91 uma y el otro en 105 uma; el pico base, sin embargo se aprecia en una  $m/z$  de 92 debido a la migración de hidrógeno con eliminación de una molécula neutra (Figura 6). En los compuestos **68** y **69** el pico correspondiente a la ruptura bencílica se observa en una  $m/z$  de 151 uma; en **75** y **76** en una  $m/z$  de 107 uma; y, en los productos **71-73** en una  $m/z$  de 177 uma. En todos los casos los iones moleculares presentes en los espectros se observaron en una  $m/z$  par. Los espectros en el UV e IR (Tabla 6) presentan bandas asociadas a su carácter aromático ( $\lambda_{\text{máx}} \sim 276$  nm;  $\nu_{\text{max}} \sim 3000$  y  $\sim 1600$   $\text{cm}^{-1}$ ); en el caso de los productos **68, 69, 71-73, 75 Y 76** se aprecian, además bandas características para grupos hidroxilos fenólicos ( $\nu_{\text{max}} \sim 3200$   $\text{cm}^{-1}$ ); por último, los productos **70-73** presentan bandas congruentes con la presencia de un grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado ( $\nu_{\text{max}} \sim 1680$   $\text{cm}^{-1}$ ). Los núcleos base de los análogos de los bibencilos de tipo difenilmetanos, homobibencilos y chalconas así como la disposición de los sustituyentes se confirmaron mediante RMN. En los siguientes incisos se discutirán las principales características de los espectros.



**Figura 6.** Fragmentos resultantes de la ruptura en los homobibencilos.

**Tabla 6.** Constantes espectroscópicas (UV e IR) y espectrométricas (EM-IE  $m/z$ ) de los difenilmetanos **67-69**, chalconas **70-73** y homobibencilos **74-76**.

| Análogos  | UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm | IR $\nu_{\max}$ (KBr) $\text{cm}^{-1}$         | EM-IE $m/z$   |
|-----------|-------------------------------|--|---|
| <b>67</b> | 258<br>223                    | 3027, 2842, 1599,<br>1494, 1451, 735, 697      | 168 [ $M^+$ (94.5)], 167<br>(13), 115 (25.05), 91<br>(63.7)               |
| <b>68</b> | 273<br>226                    | 3406, 2957, 1590,<br>1468, 1208, 1159          | 274 [ $M^+$ (100)], 151<br>(72.5), 115 (41)                               |
| <b>69</b> | 280<br>219                    | 3437, 2935, 1594,<br>1511, 1460, 1152          | 274 [ $M^+$ (29)], 151<br>(100), 115 (20.5)                               |
| <b>70</b> | 308<br>204                    | 3059, 1663, 1605,<br>1336, 1215, 747           | 208 [ $M^+$ (69)], 207<br>(100), 131 (19), 105<br>(10), 103 (11), 77 (14) |
| <b>71</b> | 344<br>236                    | 3123, 2839, 1645,<br>1563, 1429, 1166          | 254 [ $M^+$ (100)], 239<br>(21), 161 (18), 121<br>(20)                    |
| <b>72</b> | 356<br>207                    | 3476, 3263, 2840,<br>1646, 1562, 1266          | 300 [ $M^+$ (100)], 285<br>(34), 177 (35), 142<br>(41)                    |
| <b>73</b> | 360<br>207                    | 3407, 2943, 1648,<br>1565, 1428, 1149          | 300 [ $M^+$ (100)], 177<br>(28), 145 (23)                                 |
| <b>74</b> | 258<br>219                    | 3026, 2934, 1603,<br>1495, 1453, 744, 698      | 196 [ $M^+$ (48.8)], 105<br>(56.7), 104 (100), 77<br>(30.06), 65 (40.02)  |
| <b>75</b> | 277<br>226                    | 3418, 2941, 1608,<br>1512, 1353, 1216          | 242 [ $M^+$ (71)], 135<br>(18), 121 (100), 107<br>(24)                    |
| <b>76</b> | 281<br>209                    | 3477, 3368, 2918,<br>1586, 1500, 1483,<br>1244 | 256 [ $M^+$ (60)], 149<br>(100), 119 (16)                                 |

#### 4.2.1 RMN de los productos 67-69 y 74-76

En los cuadros 7 y 8 se incluyen los datos de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de los productos **67-69** y **74-76**. Las características más importantes observadas en sus espectros de RMN se resumen a continuación:

-En la región alifática de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H, los compuestos **68** y **69** presentan alrededor de  $\delta_H$  3.9 un singlete, que integra para los dos hidrógenos del metileno del núcleo difenilmetano. Para los productos **74-76** se observan dos multipletes en  $\delta_H$  ~1.8 y ~3.2, que integran para cuatro y dos hidrógenos, respectivamente y que son atribuibles a los tres metilenos del núcleo homobibencilo. En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C las señales correspondientes se observan en el intervalo entre  $\delta_C$  33 y 40.

-En la región aromática del espectro de RMN-<sup>1</sup>H de los compuestos **68** y **69**, las señales de los hidrógenos del anillo A forman un sistema AB<sub>2</sub> característico de un benceno simétricamente trisustituido y los hidrógenos del anillo B forman un sistema A<sub>2</sub>B típico de un anillo 1, 3,4 trisustituido similar a los descritos para los bibencilos **57** y **60**. En el caso de **75** las señales de los hidrógenos tanto del anillo A como del B forman un sistema AA'BB' típico de un anillo aromático *p*-sustituido como los descritos para el anillo B los bibencilos **55-58**, **64** y **65**. En el espectro del compuesto **76** se aprecia un sistema ABCX característico de un benceno *m*-disustituido similar a la de los productos **55**, **58** y **61**. También presenta un sistema AB<sub>2</sub> como el del producto **61**. Por último, los compuestos **67** y **74** son simétricos y los hidrógenos de cada anillo forman un sistema AB<sub>2</sub>X<sub>2</sub> característico de un benceno monosustituido.

-Los espectros de RMN-<sup>13</sup>C de todos estos productos presentaron señales para doce carbonos aromáticos que se observaron entre  $\delta_C$  97 y 161 y se asignaron con base en sus desplazamientos químicos y el análisis del espectro HSQC. Con la excepción de los productos **74** y **75**, todos los espectros contienen una o más señales atribuibles a grupos metoxilos y/o hidroxilos unidos a carbonos aromáticos ( $\delta_H / \delta_C$  ~3.7/55 y  $\delta_H$  ~4.4, esta última señal desaparece al tratar la muestra con D<sub>2</sub>O desaparece) y en el caso de **76** se observa un singlete atribuible al metilendioxi ( $\delta_H / \delta_C$  ~5.9/100).

**Cuadro 7.** Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de **67-69** y **74-76**.

| Posición             | 67                      | 68                | 69                | 74                | 75               | 76               |
|----------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
|                      | $\delta_H$ (m, J en Hz) |                   |                   |                   |                  |                  |
| 2                    | 7.23 (d, 7.2)           | 6.36 (dd, 2.2)    | 6.34 (dd, 2.0)    | 7.22 (d, 7.4)     | 7.02 (d, 8.8)    | 6.75 (d, 7.6)    |
| 3                    | 7.33<br>(dd, 8.4)       |                   |                   | 7.29<br>(dd, 8.7) | 6.74<br>(d, 8.8) | 7.14 (t)         |
| 4                    | 7.26 (t)                | 6.31 (dd, 2.4)    | 6.31 (dd, 2.8)    | 7.18 (t)          |                  | 6.66(d, 8.0)     |
| 5                    | 7.33<br>(dd, 8.4)       |                   |                   | 7.29<br>(dd, 8.7) | 6.74<br>(d, 8.8) |                  |
| 6                    | 7.23<br>(d, 7.2)        | 6.36<br>(dd, 2.2) | 6.34<br>(dd, 2.0) | 7.22<br>(d, 7.4)  | 7.02<br>(d, 8.8) | 7.26 (s)         |
| 7                    | 3.98 (s)                | 3.95 (s)          | 3.86 (s)          | 2.63 (t)          | 2.55 (t)         | 2.82 (t)         |
| 8                    |                         |                   |                   | 1.98 (m)          | 1.86 (t)         | 1.26 (t)         |
| 2'                   | 7.23 (d, 7.2)           | 6.93 (d, 3.6)     | 6.83 (d, 4.0)     | 7.22 (d, 7.4)     | 7.08 (d, 8.8)    | 6.66 (d, 2.0)    |
| 3'                   | 7.33 (dd, 8.4)          |                   |                   | 7.29 (dd, 8.7)    | 6.83 (d, 8.8)    |                  |
| 4'                   | 7.26 (t)                |                   |                   | 7.18 (t)          |                  |                  |
| 5'                   | 7.33<br>(dd, 8.4)       | 6.84<br>(d, 8.0)  | 6.70<br>(d, 8.0)  | 7.29<br>(dd, 8.7) | 6.83<br>(d, 8.8) | 6.72<br>(d, 8.0) |
| 6'                   | 7.23 (d, 7.2)           | 6.66 (d, 7.6)     | 6.67 (d, 8.2)     | 7.22 (d, 7.4)     | 7.08 (d, 8.8)    | 6.61 (d, 8.0)    |
| 7'                   |                         |                   |                   | 2.63 (t)          | 2.55 (t)         | 2.82 (t)         |
| 8'                   |                         |                   |                   |                   |                  | 5.92 (t)         |
| OCH <sub>3</sub> -3  |                         | 3.75 (s)          | 3.75 (s)          |                   |                  |                  |
| OCH <sub>3</sub> -5  |                         | 3.75 (s)          | 3.75 (s)          |                   |                  |                  |
| OH-3'                |                         |                   | 5.53 (s)          |                   |                  |                  |
| OH-4                 |                         |                   |                   |                   | 4.41 (s)         |                  |
| OH-4'                |                         | 5.52 (s)          |                   |                   |                  |                  |
| OH-5                 |                         |                   |                   |                   |                  | 4.62 (s)         |
| OCH <sub>3</sub> -3' |                         | 3.75 (s)          |                   |                   |                  |                  |
| OCH <sub>3</sub> -4' |                         |                   | 3.75 (s)          |                   | 3.78 (s)         |                  |

<sup>a</sup> Espectros registrados en CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H, 400 y 300 MHz);  $\delta$  en ppm

**Cuadro 8.** Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN-<sup>13</sup>C de **67-69 y 74-76**.

| Posición             | 67         | 68    | 69    | 74    | 75    | 76    |
|----------------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                      | $\delta_c$ |       |       |       |       |       |
| 1                    | 141.1      | 142.9 | 143.8 | 142.3 | 134.4 | 143.6 |
| 2                    | 128.4      | 107.0 | 106.9 | 128.3 | 129.4 | 120.9 |
| 3                    | 128.9      | 160.8 | 160.8 | 128.4 | 115.1 | 129.5 |
| 4                    | 126.0      | 97.9  | 97.8  | 125.7 | 153.5 | 112.8 |
| 5                    | 128.9      | 160.8 | 160.9 | 128.4 | 115.1 | 155.4 |
| 6                    | 128.4      | 107.0 | 106.9 | 128.3 | 129.4 | 115.3 |
| 7                    | 41.9       | 35.7  | 41.5  | 35.4  | 34.8  | 37.9  |
| 8                    |            |       |       | 32.4  | 33.4  | 37.4  |
| 1'                   | 141.1      | 133.5 | 133.9 | 142.3 | 134.5 | 135.5 |
| 2'                   | 128.4      | 113.9 | 115.1 | 128.3 | 129.3 | 112.8 |
| 3'                   | 128.9      | 148.9 | 145.4 | 128.4 | 113.7 | 147.5 |
| 4'                   | 126.0      | 145.4 | 145.4 | 125.7 | 157.5 | 145.6 |
| 5'                   | 128.9      | 122.4 | 114.2 | 128.4 | 113.7 | 108.1 |
| 6'                   | 128.4      | 124.9 | 121.6 | 128.3 | 129.3 | 121.1 |
| 7'                   |            |       |       | 35.4  | 34.8  | 37.9  |
| 8'                   |            |       |       |       |       | 100.7 |
| OCH <sub>3</sub> -3  |            | 55.2  | 55.3  |       |       |       |
| OCH <sub>3</sub> -5  |            | 55.2  | 55.3  |       |       |       |
| OCH <sub>3</sub> -3' |            | 61.3  |       |       |       |       |
| OCH <sub>3</sub> -4' |            |       | 55.9  |       | 55.3  |       |

<sup>a</sup> Espectros registrados en CDCl<sub>3</sub> (<sup>13</sup>C 100 MHz);  $\delta$  en ppm

#### 4.2.2 RMN de los productos 70-73

En el Cuadro 9 y 10 se incluyen los datos de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de los productos **70-73**. Los espectros de estos productos presentaron el perfil típico de una chalcona. Así, en los espectros de RMN-<sup>13</sup>C de los tres compuestos, también se puede observar una señal  $\sim\delta_c$  190 ppm correspondiente al carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado de estos compuestos. En la región  $\delta_c \sim 118$  y  $\sim 140$  se aprecian señales para los dos metinos olefínicos de las chalconas; estas dos señales correlacionan con las absorciones de dos hidrógenos vinílicos en  $\delta_H \sim 7.4$  y  $7.8$ ; las señales aparecen como dobletes con una constante de acoplamiento ( $J$ ) de  $\sim 15.6$  Hz, sugiriendo la disposición *trans* de estos hidrógenos.

-Las señales de los hidrógenos y carbonos aromáticos del producto **71** fueron prácticamente iguales al del homobibencilo **75**. En el caso de los productos **72** y **73**, estas señales fueron casi idénticas a la de los productos **68** y **69**, respectivamente. Por último, las señales aromáticas de la chalcona **70** fueron similares a las del producto **64**, sin embargo los desplazamiento químicos de los hidrógenos se aprecian a campos más bajos debido a la conjugación extendida.

-Como en los casos anteriores se observaron en los espectros las señales correspondientes a las distintas funciones oxigenadas presentes en cada molécula. Así en los productos **71-73** los espectros contienen una o más señales atribuibles a grupos metoxilos y/o hidroxilos unidos a carbonos aromáticos ( $\delta_H / \delta_C \sim 3.8/55$  y  $\delta_H \sim 4.8$ , esta última señal desaparece al tratar la muestra con D<sub>2</sub>O).

**Cuadro 9.** Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de **70-73**.

| Posición             | 70                      | 71                | 72                | 73                |
|----------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                      | $\delta_H$ (m, J en Hz) |                   |                   |                   |
| 2                    | 7.82<br>(d, 7.5)        | 8.03<br>(dd, 8.7) | 7.04<br>(dd, 2.0) | 7.06<br>(dd, 1.6) |
| 3                    | 7.64 (dd, 8.2)          | 7.45 (dd, 7.8)    |                   |                   |
| 4                    | 7.73 (t)                |                   | 6.60 (dd, 2.4)    | 6.60 (dd, 2.0)    |
| 5                    | 7.64 (dd, 8.2)          | 7.45 (dd, 7.8)    |                   |                   |
| 6                    | 7.82<br>(d, 7.5)        | 8.03<br>(dd, 8.7) | 7.03<br>(dd, 2.0) | 7.04<br>(dd, 1.6) |
| 8                    | 7.59 (d, 15.4)          | 7.81 (d, 15.9)    | 7.41 (d, 15.6)    | 7.46 (d, 15.6)    |
| 2'                   | 7.60<br>(d, 7.5)        | 7.63<br>(dd, 8.7) | 7.21<br>(d, 2.0)  | 7.33<br>(d, 2.0)  |
| 3'                   | 7.40 (dd, 8.0)          | 7.47 (dd, 8.7)    |                   |                   |
| 4'                   | 7.33 (t)                | 7.47<br>(dd, 8.7) | 6.98<br>(d, 8.4)  | 6.85<br>(d, 8.0)  |
| 5'                   | 7.40 (dd, 8.0)          |                   |                   |                   |
| 6'                   | 7.60<br>(d, 7.5)        | 7.63<br>(dd, 8.7) | 7.18<br>(dd, 8.0) | 7.22<br>(dd, 8.4) |
| 7'                   | 8.01 (d, 15.4)          | 8.06 (d, 15.9)    | 7.66 (d, 15.6)    | 7.71 (d, 15.6)    |
| OCH <sub>3</sub> -3  |                         |                   | 3.91 (s)          | 3.93 (s)          |
| OH-5                 |                         | 4.89 (s)          |                   |                   |
| OCH <sub>3</sub> -4' |                         | 3.89 (s)          | 3.82 (s)          | 3.83 (s)          |

<sup>a</sup> Espectros registrados en CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H, 400 y 300 MHz);  $\delta$  en ppm

**Cuadro 10.** Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN-<sup>13</sup>C de 70-73.

| Posición             | 70         | 71    | 72    | 73    |
|----------------------|------------|-------|-------|-------|
|                      | $\delta_c$ |       |       |       |
| 1                    | 138.5      | 130.7 | 140.2 | 140.3 |
| 2                    | 128.9      | 131.0 | 104.6 | 104.7 |
| 3                    | 129.2      | 115.4 | 161.2 | 161.1 |
| 4                    | 130.8      | 161.6 | 105.5 | 105.4 |
| 5                    | 129.2      | 115.4 | 158.7 | 158.6 |
| 6                    | 128.9      | 131.0 | 107.6 | 107.6 |
| 7                    | 190.8      | 188.9 | 191.0 | 191.2 |
| 8                    | 122.5      | 119.5 | 119.4 | 118.8 |
| 1'                   | 133.0      | 127.7 | 127.9 | 126.8 |
| 2'                   | 128.9      | 130.1 | 113.7 | 110.8 |
| 3'                   | 128.9      | 114.4 | 146.6 | 149.7 |
| 4'                   | 128.8      | 159.7 | 150.8 | 148.0 |
| 5'                   | 128.9      | 114.4 | 111.1 | 115.2 |
| 6'                   | 128.9      | 130.1 | 122.1 | 123.5 |
| 7'                   | 145.1      | 144.1 | 140.7 | 145.9 |
| OCH <sub>3</sub> -3  |            |       | 54.5  | 54.5  |
| OCH <sub>3</sub> -3' |            |       |       | 55.1  |
| OCH <sub>3</sub> -4' |            | 55.4  | 54.9  |       |

<sup>a</sup> Espectros registrados en CDCl<sub>3</sub> (<sup>13</sup>C 100 MHz);  $\delta$  en ppm

### 4.3 Caracterización estructural del producto 66

La fórmula molecular del compuesto **66** se determinó mediante espectrometría de masas. Los espectros de UV e IR presentaron bandas asociadas a su carácter aromático ( $\lambda_{\text{máx}} \sim 276 \text{ nm}$ ;  $\nu_{\text{máx}} \sim 3000$  y  $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente). El cuadro 11 resume las constantes espectroscópicas y espectrométricas del producto **66**. Las características más importantes observadas en sus espectros de RMN  $^{-1}\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  se resumen a continuación:

-En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  se observa un singulete en  $\delta_{\text{H}}$  5.0 que integra para dos hidrógenos atribuibles al metileno del núcleo benciloxibenceno. En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  la señal de este metileno se encuentra  $\sim \delta_{\text{C}}$  69.

-En la región aromática del espectro de RMN  $^{-1}$ , las señales de los hidrógenos para ambos anillos forman un sistema  $\text{AB}_2\text{X}_2$  característico de un benceno monosustituido. En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  se observan señales para los 12 carbonos aromáticos presentes en la molécula entre  $\delta_{\text{C}}$  114 y 129.

**Cuadro 11.** Constantes espectroscópicas y espectrométricas del benciloxibenceno (**66**).

| EM-IE $m/z$          | 184 [ $\text{M}^+$ (41)], 91 (100)  |
|----------------------|---|
| RMN- $^1\text{H}$    | 7.47 (d, H-2' y H-6', $J = 7.2 \text{ Hz}$ ), 7.41 (t, H-4'), 7.38 (dd, H-3' y H-5', $J = 8.0 \text{ Hz}$ ), 7.34 (dd, H-3 y H-5, $J = 8.2 \text{ Hz}$ ), 7.01 (t, H-4), 6.99 (d, H-2 y H-6, $J = 8.0 \text{ Hz}$ ), 5.02 (s, H-7') |
| RMN- $^{13}\text{C}$ | 158.7 (C-1), 137.0 (C-1'), 129.4 (C-3 y C-5), 128.5 (C-3' y C-5'), 127.9 (C-4'), 127.4 (C-2' y C-6'), 120.9 (C-4), 114.8 (C-2 y C-6), 69.8 (C-7')   |

#### 4.4 Efecto de los compuestos sobre la germinación y crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli* y *Medicago sativa* y sobre el crecimiento de *Lemna pausicostata*

Se evaluó la actividad fitotóxica de los análogos mediante la determinación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli* y *Medicago sativa*, especies selectas de arvenses monocotiledóneas y dicotiledóneas. En la Tabla 7 se indican los resultados y sólo se incluyen aquellos de los compuestos con un efecto significativo.

De los compuestos ensayados, **55**, **56** y **70** fueron los más activos ya que inhibieron de manera importante el crecimiento radicular de las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*. Sin embargo, el compuesto **69** mostró una actividad selectiva sobre *A. hypochondriacus*. Ninguno de los compuestos afectó la germinación o crecimiento radicular de *M. sativa*. Es importante mencionar que el efecto de **69** y **70** fue comparable al del control positivo, tricolorina.

**Tabla 7.** Efecto de los productos **55**, **56**, **68-70**, **75** y **76** sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*.

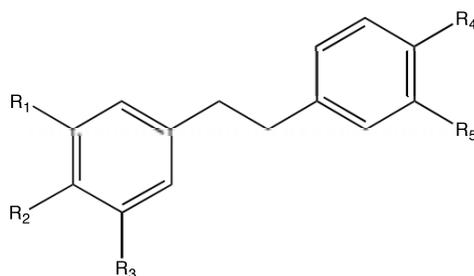
| Compuesto    | IC <sub>50</sub>          |          | IC <sub>50</sub>     |          |
|--------------|---------------------------|----------|----------------------|----------|
|              | <i>A. hypochondriacus</i> |          | <i>E. crus-galli</i> |          |
|              | (µg/mL)                   | moles/L  | (µg/mL)              | moles/L  |
| Tricolorina* | 21                        | 2.08E-05 | 17                   | 1.68E-05 |
| <b>55</b>    | 39                        | 1.72E-04 | 55                   | 2.41E-04 |
| <b>56</b>    | 29                        | 1.14E-04 | 71                   | 2.74E-04 |
| <b>68</b>    | 85                        | 3.46E-04 | 289                  | 1.05E-03 |
| <b>69</b>    | 18                        | 7.29E-05 | >1000                |          |
| <b>70</b>    | 15                        | 7.28E-05 | 114                  | 5.49E-04 |
| <b>75</b>    | 89                        | 3.70E-04 | 287                  | 1.18E-03 |
| <b>76</b>    | 116                       | 4.54E-04 | >1000                |          |

\* Control positivo.

En el caso de *L. pausicostata*, solo algunos de los productos mostraron actividad fitotóxica significativa a concentraciones entre 80 y 242 µg/mL. De nueva cuenta se indican en esta apartado los que mostraron una actividad importante. Los

productos más activos fueron los bibencilos **55** y **56** (Tabla 8), seguidos del homobibencilo **76** (Tabla 9) y la chalcona **70** (Tabla 10). Estos análogos causaron inhibición del crecimiento y pérdida de electrolitos de la célula de manera dependiente de la concentración.

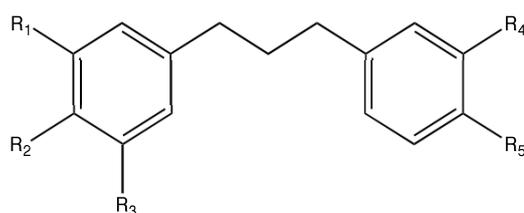
Analizando los resultados globales es evidente que los compuestos más activos de las tres series homologas (difenilmetanos, bibencilos y homobibencilos) son aquellos que presentan sustituyentes en ambos anillos aromáticos. En uno de los anillos el sustituyente debe ser *para*, en tanto que en el segundo debe estar *meta* orientado con respecto al metileno. Los sustituyentes en cuestión son metoxilos y/o hidroxilos. Las moléculas sin sustituyentes no presentan actividad fitotóxica en contra de las arvenses de prueba. El largo de la cadena entre los dos anillos aromáticos parece no afectar de manera importante la actividad fitotóxica. En el caso de las chalconas la presencia de sustituyentes oxigenados no es requisito importante para la actividad ya que el producto **80** que carece de sustituyentes en los anillos aromáticos fue uno de los mas fitotóxicos.



**Tabla 8.** Efecto de los bibencilos **55**, **56**, **61** y **65** sobre el crecimiento y pérdida de electrolitos de *L. pausicostata*.

| Compuesto | R <sub>1</sub>                   | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>   | R <sub>4</sub>                   | R <sub>5</sub>   | Incremento de la Conductividad |         | Inhibición del crecimiento |
|-----------|----------------------------------|----------------|------------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------|---------|----------------------------|
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | Conc (μM)                      | μmho cm | IC <sub>50</sub> (μM)      |
| <b>55</b> | OCH <sub>3</sub>                 | H              | OH               | H                                | H                | 31                             | 14      | 46                         |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 62                             | 49      |                            |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 125                            | 124     |                            |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 250                            | 144     |                            |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 500                            | 149     |                            |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 1000                           | 149     |                            |
| <b>56</b> | OCH <sub>3</sub>                 | H              | OCH <sub>3</sub> | H                                | OH               | 31                             | 24      | 87                         |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 62                             | 66      |                            |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 125                            | 101     |                            |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 250                            | 229     |                            |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 500                            | 159     |                            |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 1000                           | 151     |                            |
| <b>61</b> | H                                | OH             | H                | CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> |                  | 31                             | 90      | 85                         |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 62                             | 60      |                            |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 125                            | 135     |                            |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 250                            | 175     |                            |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 500                            | 175     |                            |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 1000                           | 145     |                            |
| <b>65</b> | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | H              | OCH <sub>3</sub> | H                                | OCH <sub>3</sub> | 31                             | 10      | 149                        |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 62                             | 35      |                            |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 125                            | 65      |                            |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 250                            | 130     |                            |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 500                            | 135     |                            |
|           |                                  |                |                  |                                  |                  | 1000                           | 120     |                            |

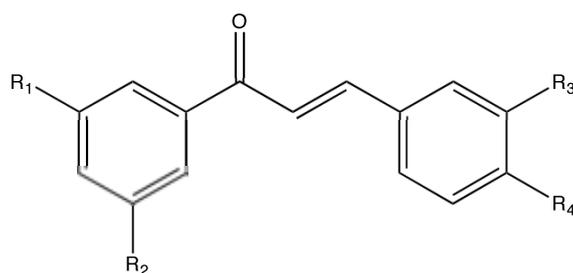
Los resultados son el promedio de dos replicas ± la desviación estándar. Las IC<sub>50</sub> del gigantol y la batatasina III, prototipos de las moléculas sintéticas, fueron 180 y 159 μM respectivamente.



**Tabla 9.** Efecto de los homobibencilos **75** y **76** sobre el crecimiento y pérdida de electrolitos de *L. pausicostata*.

| Compuesto | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub>                   | R <sub>5</sub>   | Incremento de la Conductividad |         | Inhibición del crecimiento<br>IC <sub>50</sub> (μM) |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------|---------|---|
|           |                |                |                |                                  |                  | Conc (μM)                      | μmho cm |   |
| <b>75</b> | H              | OH             | H              | H                                | OCH <sub>3</sub> | 31                             | 65      | 108   |
|           |                |                |                |                                  |                  | 62                             | 45      |   |
|           |                |                |                |                                  |                  | 125                            | 100     |   |
|           |                |                |                |                                  |                  | 250                            | 150     |   |
|           |                |                |                |                                  |                  | 500                            | 115     |   |
|           |                |                |                |                                  |                  | 1000                           | 140     |   |
| <b>76</b> | H              | H              | OH             | CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> |                  | 31                             | 69      | 94  |
|           |                |                |                |                                  |                  | 62                             | 36      |   |
|           |                |                |                |                                  |                  | 125                            | 151     |   |
|           |                |                |                |                                  |                  | 250                            | 219     |   |
|           |                |                |                |                                  |                  | 500                            | 196     |   |
|           |                |                |                |                                  |                  | 1000                           | 216     |   |

Los resultados son el promedio de dos replicas ± la desviación estándar. Las IC<sub>50</sub> del gigantol y la batatasina III, prototipos de las moléculas sintéticas, fueron 180 y 159 μM respectivamente.



**Tabla 10.** Efecto de las chalconas **70**, **72** y **76** sobre el crecimiento y pérdida de electrolitos de *L. pausicostata*.

| Compuesto | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>   | R <sub>4</sub>   | Incremento de la Conductividad |         | Inhibición del crecimiento |
|-----------|------------------|----------------|------------------|------------------|--------------------------------|---------|----------------------------|
|           |                  |                |                  |                  | Conc (μM)                      | μmho cm | IC <sub>50</sub> (μM)      |
| <b>70</b> | H                | H              | H                | H                | 31                             | 35      | 80                         |
|           |                  |                |                  |                  | 62                             | 55      |                            |
|           |                  |                |                  |                  | 125                            | 108     |                            |
|           |                  |                |                  |                  | 250                            | 180     |                            |
|           |                  |                |                  |                  | 500                            | 155     |                            |
|           |                  |                |                  |                  | 1000                           | 185     |                            |
| <b>72</b> | OCH <sub>3</sub> | OH             | OH               | OCH <sub>3</sub> | 31                             | 0       | 242                        |
|           |                  |                |                  |                  | 62                             | 0       |                            |
|           |                  |                |                  |                  | 125                            | 15      |                            |
|           |                  |                |                  |                  | 250                            | 135     |                            |
|           |                  |                |                  |                  | 500                            | 130     |                            |
|           |                  |                |                  |                  | 1000                           | 1115    |                            |
| <b>76</b> | OCH <sub>3</sub> | OH             | OCH <sub>3</sub> | OH               | 31                             | 55      | 172                        |
|           |                  |                |                  |                  | 62                             | 35      |                            |
|           |                  |                |                  |                  | 125                            | 55      |                            |
|           |                  |                |                  |                  | 250                            | 100     |                            |
|           |                  |                |                  |                  | 500                            | 135     |                            |
|           |                  |                |                  |                  | 1000                           | 135     |                            |

Los resultados son el promedio de dos replicas ± la desviación estándar. Las IC<sub>50</sub> del gigantol y la batatasina III, prototipos de las moléculas sintéticas, fueron 180 y 159 μM respectivamente.

#### 4.5 Efecto de los análogos sintéticos sobre la actividad moduladora de la calmodulina

Con base en investigaciones previas acerca del efecto de bibencilos sintéticos se examino el efecto de los productos **54-76** sobre la actividad moduladora de la CaM utilizando primero un método enzimático funcional en el que la PDE1 fue la enzima monitora. El método es espectrofotocolorimétrico y se basa en la cuantificación del fósforo inorgánico generado a partir de la hidrólisis de AMPc por la acción de la PDE1 en presencia de una 5'-nucleotidasa (Figura 7). La cantidad de fósforo cuantificado correlaciona directamente con la actividad de la PDE1 dependiente de CaM.

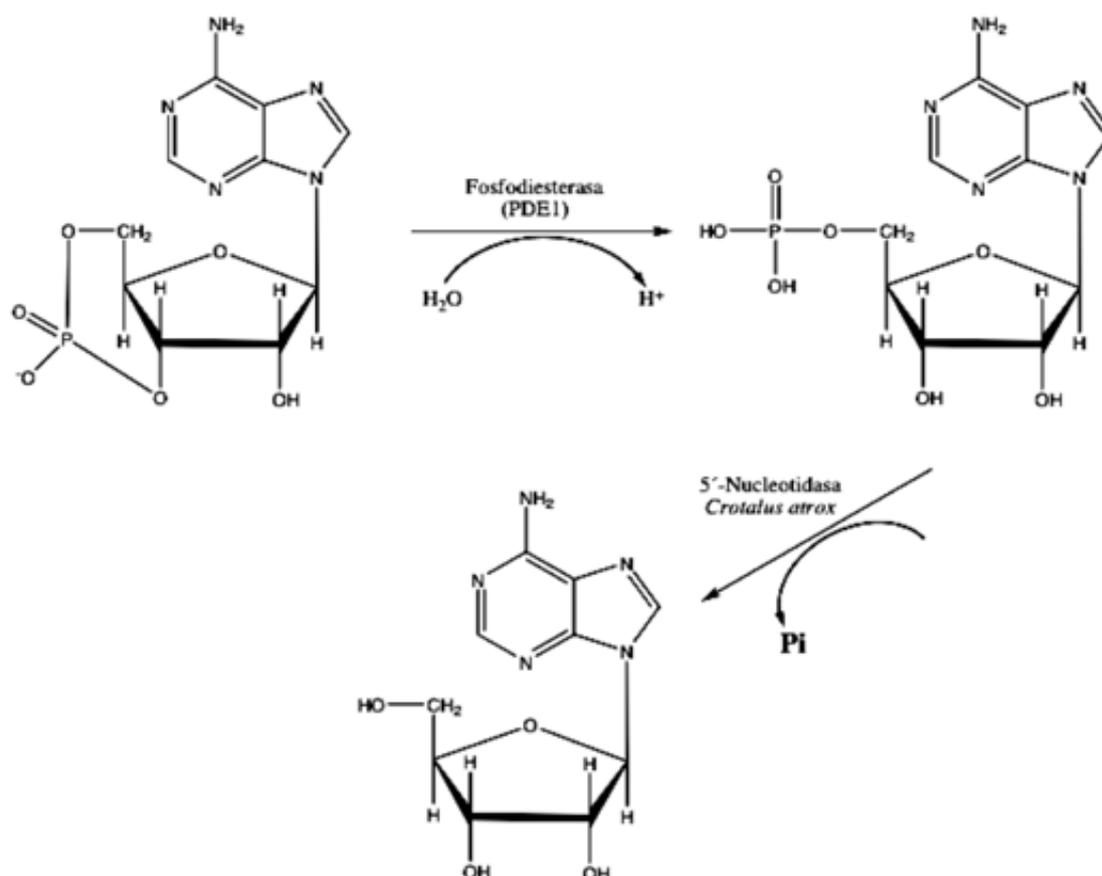


Figura 7. Hidrólisis enzimática del AMPc.

Los resultados de la determinaciones muestran que algunos de los compuestos inhibieron la actividad del complejo PDE1-CaM con valores de IC<sub>50</sub> comprendidos

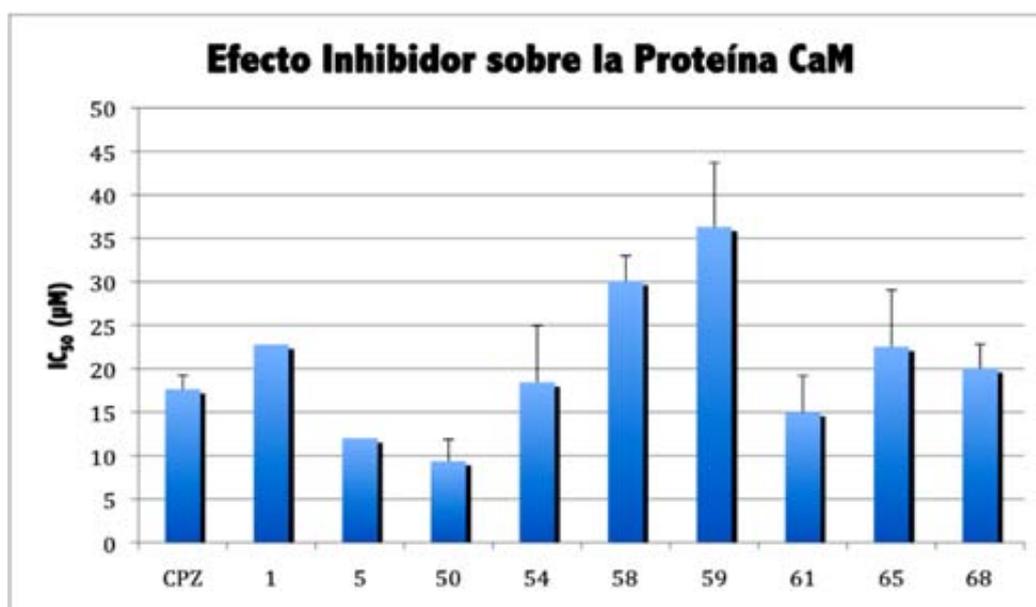
entre 9.38 y 36.33  $\mu\text{M}$ , en el Cuadro 12 se muestran los compuestos con mayor actividad en contra del complejo PDE1-CaM.

**Cuadro 12.** Efecto de los análogos sintéticos sobre la actividad de la PDE1.

| Compuesto      | IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) |
|----------------|------------------------------------|
| Clorpromazina* | 17.66                              |
| <b>1</b>       | 22.80                              |
| <b>5</b>       | 12.01                              |
| <b>56</b>      | 9.38                               |
| <b>60</b>      | 18.44                              |
| <b>64</b>      | 30.10                              |
| <b>65</b>      | 36.33                              |
| <b>67</b>      | 15.02                              |
| <b>71</b>      | 22.53                              |
| <b>74</b>      | 20.07                              |

\* Control positivo.

Cabe mencionar, que el efecto de los compuesto **56**, **60** y **67** fue menor o comparable al de la clorpromazina (Figura 8), un inhibidor de la CaM empleado como control positivo. Además, es importante resaltar que el bibencilo **56** presentó una mayor actividad inhibitoria que las moléculas prototipo, batatasina III (**1**) y gigantol (**5**)



**Figura 8.** Propiedades inhibitorias de análogos sintéticos sobre la proteína CaM.

Para determinar si el efecto de los productos activos se debe a su interacción con el complejo CaM-PDE1 o directamente con la CaM se realizó también un ensayo de apagamiento de la fluorescencia de la CaM marcada con un fluoróforo en un residuo de cisteína en la posición 124, de acuerdo a la metodología descrita por González-Andrade y colaboradores (2009). Los resultados obtenidos de esta evaluación se ilustran en la Tabla 11 y Figura 9. Como se desprende de esta información solo los bibencilos **60** y **62**, las chalconas **71**, **72** y **73**, así como el homobibencilo **76** provocan un apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la CaM de manera dependiente de la concentración, por lo tanto interaccionan directamente con la proteína. Los valores de  $K_d$  (Tabla 11) para estos compuestos son:  $0.571 \pm 0.0170$ ,  $0.022 \pm 0.000$ ,  $0.155 \pm 0.059$ ,  $0.682 \pm 0.059$ ,  $0.361 \pm 0.042$ , y  $4.402 \pm 0.443$   $\mu\text{M}$ , respectivamente, mientras que para la CPZ fue igual a  $0.3423 \pm 0.0324$   $\mu\text{M}$ . De tal forma que de los productos más activos en el ensayo funcional, sólo el bibencilo **62** y la chalcona **71** interaccionan directamente con la CaM. Asimismo, estos resultados indican también que tres de los productos (**72**, **73** y **76**) que presentaron un efecto moderado sobre el complejo CaM-PDE1 interaccionan directamente con la CaM. Por lo tanto, los productos bibencilos **64** y **65** y el difenilmetano **67**, muy activos en el ensayo funcional, afectan al complejo CaM-PDE1 o directamente a la PDE1, más que a la CaM. En caso del homobibencilo **74**, se observó un importante aumento de la fluorescencia, a pesar de que afectó de manera importante el complejo CaM-PDE1;

este resultado permite suponer que **74** interacciona con la CaM por un sitio distinto al sitio activo de la CaM para la activación de la enzima fosfodiesterasa, provocando también un cambio conformacional importante de la CaM y por lo tanto de su efecto activador de la PDE1.

Cabe mencionar que los compuestos **60**, **62**, y **75** precipitaron durante el ensayo por lo que sus resultados no son concluyentes.

**Tabla 11.** Valores de  $k_d$  de los análogos **56**, **60**, **62**, **68**, **71-73**, **75** y **76** y clorpromazina\* determinadas en el ensayo fluorométrico.

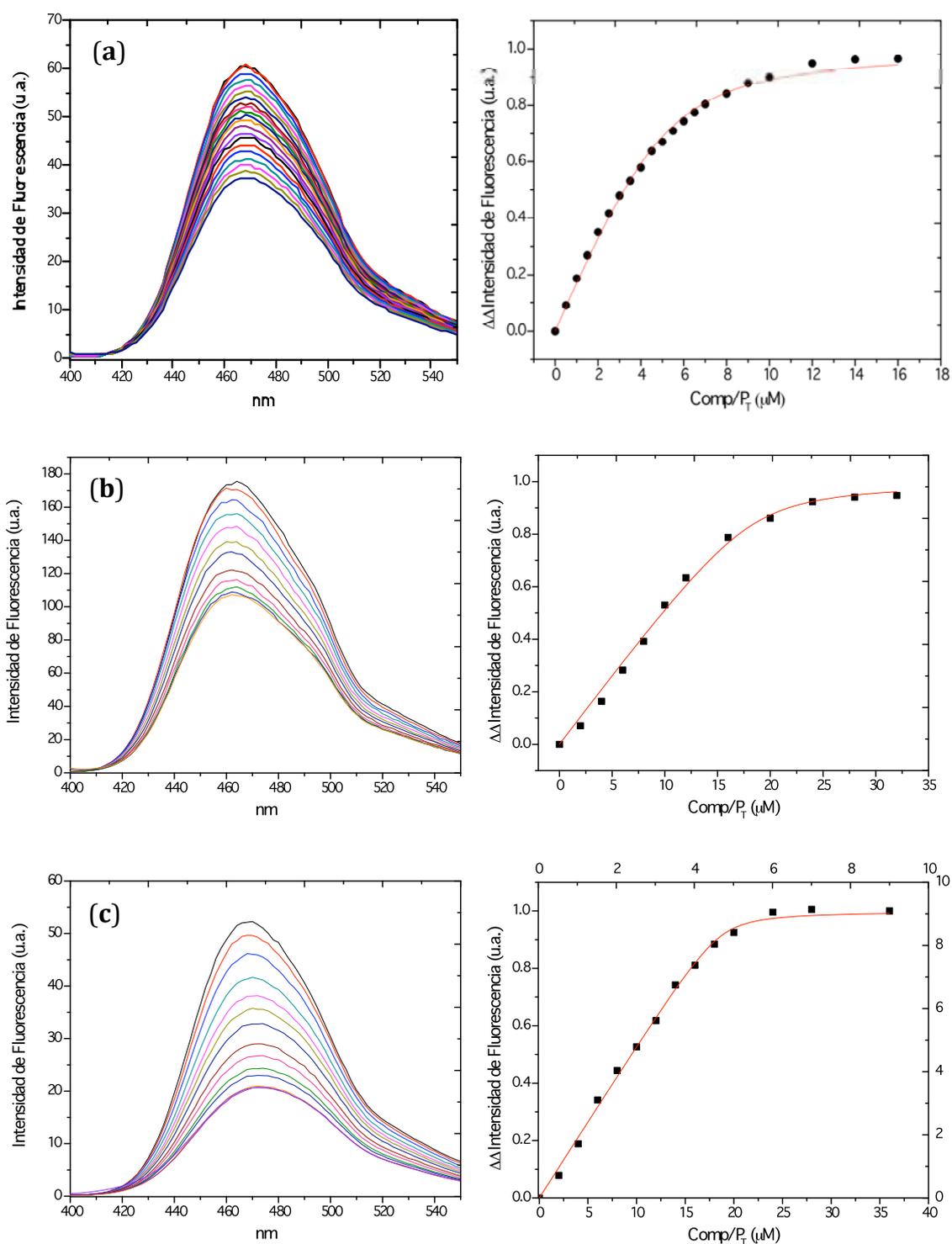
| Compuesto  | <i>h</i> CaM M124C-mBBr |              |
|------------|-------------------------|--------------|
|            | $k_d$ ( $\mu$ M)        |              |
| <b>CPZ</b> | 0.3423                  | $\pm$ 0.0324 |
| <b>5</b>   | 9.925                   | $\pm$ 1.017  |
| <b>56</b>  | 10.562                  | $\pm$ 2.618  |
| <b>60</b>  | 0.571                   | $\pm$ 0.170  |
| <b>62</b>  | 0.022                   | $\pm$ 0.000  |
| <b>68</b>  | 10.080                  | $\pm$ 1.332  |
| <b>71</b>  | 0.155                   | $\pm$ 0.059  |
| <b>72</b>  | 0.682                   | $\pm$ 0.059  |
| <b>73</b>  | 0.369                   | $\pm$ 0.042  |
| <b>75</b>  | 2.268                   | $\pm$ 0.241  |
| <b>76</b>  | 4.402                   | $\pm$ 0.443  |

\*Control positivo

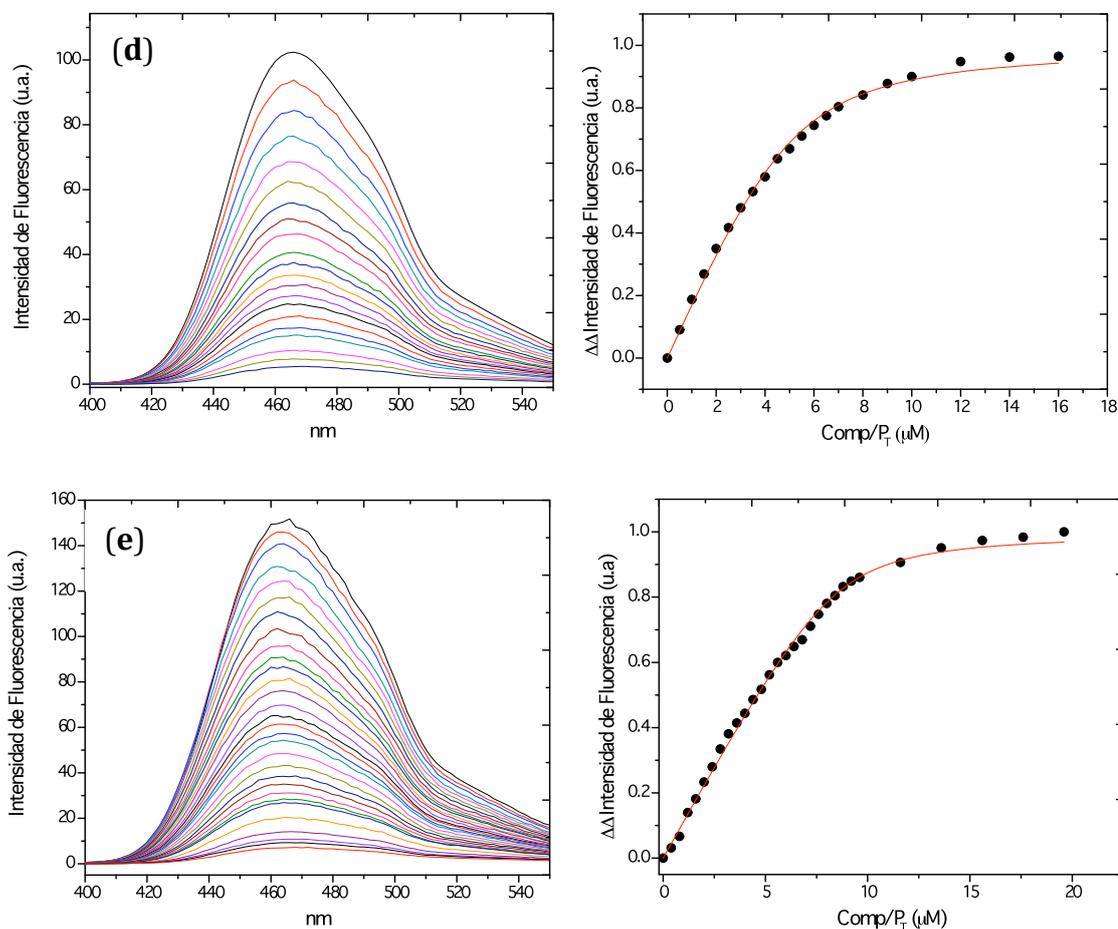
Debido a que la CaM juega un papel muy importante en la regulación de varios procesos fisiológicos en las plantas, incluyendo los relacionados con el crecimiento y la defensa se postuló que podría existir una correlación entre el potencial fitotóxico de los bibencilos y sus propiedades inhibitoras de la CaM. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que no existe correlación alguna entre las dos actividades.

En general los bibencilos fueron los más activos en los ensayos de *L. pausicosta* y fluorescencia; también afectaron la actividad del complejo CaM-PDE1; en tanto que las chalconas afectaron el crecimiento radicular, al complejo CaM-PDE1 y a la CaM. El compuesto que presentó un mejor efecto anti-CaM fue la chalcona **71**, sin embargo este compuesto no demostró efecto fitotóxico alguno.

En el experimento enzimático el mejor efecto fue del bibencilo **56** que presentó un efecto fitotóxico importante contra *L. pausicostata* y *A. hypochondriacus*, en cambio el bibencilo **55**, que afectó también el crecimiento de *Lemna* no inhibió el complejo CaM-PDE1 ni presentó efecto anti-CaM en el ensayo de fluorescencia. Finalmente los bibencilos, **60** y **62** presentaron un notable efecto anti-CaM sin afectar el crecimiento vegetal. En general los bibencilos biodinámicos encontrados en el presente trabajo son aquellos que presentan sustituyentes en ambos anillos aromáticos. En uno de los anillos el sustituyente debe ser *para*, en tanto que en el segundo debe estar *meta* orientado con respecto al metileno. Los sustituyentes en cuestión son metoxilos y/o hidroxilos. Cabe mencionar, que en general las actividades de los bibencilos resultaron mucho mejor que las correspondientes a los análogos homobibencilos y difenilmetanos. Por lo tanto, al incrementar o disminuir el número de metilenos de dos a tres, o de dos a uno, disminuye la actividad fitotóxica o anti-CaM. Respecto a esto último, la longitud de la cadena influye en la actividad de las moléculas, ya que el tamaño y forma del sustrato es importante para que ajuste en el sitio activo de su enzima, dicha complementariedad es esencial en el establecimiento de las interacciones electrostáticas y estéricas, en acuerdo con los modelos de la “llave-cerradura” y “encaje inducido” (Kortagere *et al.*, 2009). Además de que la presencia de aminoácidos en el sitio activo determina la forma de éste y por lo tanto qué tipo de moléculas pueden interactuar (Graham, 1995).



**Figura 9.** Titulación por fluorescencia de hCaM con los compuestos 5(a), 60(b), 71(c), 72(d) y 73(e) (gráfica izquierda). Cambio absoluto de la emisión de la fluorescencia a 470 nm ( $\Delta\Delta IF$ ) versus la relación inhibidor/proteína3 (gráfica derecha).



**Figura 9.** Titulación por fluorescencia de *hCaM* con los compuestos **5(a)**, **60(b)**, **71(c)**, **72(d)** y **73(e)** (gráfica izquierda). Cambio absoluto de la emisión de la fluorescencia a 470 nm ( $\Delta\Delta IF$ ) versus la relación inhibidor/proteína3 (gráfica derecha).

Por último, las chalconas fueron activas en el ensayo de crecimiento vegetal. Así el producto **70** fue el mejor inhibidor del crecimiento vegetal pero no presento efecto anti-CaM o inhibidor del complejo CaM-PDE1. Por otro lado, el producto **71**, inhibió la actividad de la PDE1 y apagó la fluorescencia de la CaM sin afectar el crecimiento vegetal. La presencia de sustituyentes oxigenados en los dos anillos aromáticos de **71** le confiere a la molécula una mejor actividad anti-CaM. Es probable que el mejor efecto de las chalconas se deba a que estos compuestos pueden reaccionar con las proteínas a través de reacciones de alquilación, lo cual podría resultar en efectos no específicos y citotóxicos. Los resultados del apagamiento de la fluorescencia coinciden con los resultados ya obtenidos en investigaciones previas,

respecto a la actividad anti-CaM de dos chalconas, ya que la 4-hidroxiderricina y el xantoangelol, productos naturales aislados de *Angelica keiskei* (Umbelliferae) a concentraciones de 1 y 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente apagaron la fluorescencia intrínseca de la proteína (Okuyama *et al.*, 1991). Dicho reporte y los resultados obtenidos en el presente estudio son los únicos descritos para este grupo de flavonoides; en el grupo de las chalconas sólo se habían reportado propiedades citotóxicas (Shu-Zhen *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009), antiparasitarias (Montes-Ávila *et al.*, 2009) y antitumorales (Romagnoli *et al.*, 2009).

## 5. CONCLUSIONES

5.1 El estudio del potencial fitotóxico de una serie de análogos de los bibencilos batatasina III (**1**) y gigantol (**5**) que incluyeron los bibencilos **48-59**, los difenilmetanos **61-63**, las chalconas **64-67** y los homobibencilos **68-70**, utilizando ensayos de crecimiento radicular de semillas y de la planta acuática *Lemna pausicostata*, permitió detectar productos más activos que las moléculas prototipo. Los productos más activos incluyeron a los bibencilos **49** y **50** y la chalcona **64**. Los bibencilos presentan como común denominador sustituyentes oxigenados en la posición *para* en uno de los anillos y en posición *meta* en el segundo anillo. También se descubrió un difenilmetano con un efecto selectivo sobre *A. hypochondriacus*. Es factible que el mecanismo de acción a nivel molecular mediante el cual este último producto ejerce su efecto sea distinto al de los bibencilos. En el grupo de las chalconas, aunque la **64** fue la más activa, tres más presentaron un efecto fitotóxico importante. La chalcona **65**, sin embargo no fue fitotóxica. De todas, esta última contiene un sustituyente oxigenado en posición *para* en cada uno de los anillos aromáticos. Las implicaciones moleculares de esta diferencia de actividad se desconocen aún.

5.2 Se detectaron productos con un efecto inhibidor del complejo CaM-PDE1 y de la proteína CaM. Los bibencilos más activos fueron superiores a las moléculas prototipos en todas estas actividades que incluyeron a los productos **50**, **54**, **56**, **58** y **59**. Los primeros inhibieron al complejo y apagaron la fluorescencia intrínseca de la CaM por lo tanto constituyen inhibidores de la proteína. En este caso, los productos más activos como inhibidores de la CaM son más hidrofóbicos ya que no poseen grupos fenólicos libres. Los otros productos afectaron al complejo CaM-PDE1. La chalcona con un efecto anti-CaM más importante fue la **65**, sin embargo el producto afectó también al complejo CaM-PDE1. Aparentemente la presencia de un sustituyente oxigenado en posición *para* en cada uno de los anillos aromáticos permite al producto una mejor interacción con

el sitio activo de la CaM e inhibir así sus propiedades moduladoras sobre la enzima PDE1. De estos resultados resulta evidente que la mejor actividad anti-CaM se obtiene con los compuestos de tipo bibencilo y que el incremento o acortamiento del largo de la cadena de metilenos disminuye la actividad. Estos resultados constituyen un aporte al conocimiento de las propiedades anti-CaM de los bibencilos y chalconas.

5.3 Los resultados obtenidos demostraron que no hay ninguna correlación entre la actividad fitotóxica de los análogos bibencilos y la actividad como inhibidores de la CaM por lo que el mecanismo de acción debe involucrar otros blancos de acción a nivel molecular, como la maquinaria fotosintética, por indicar algún ejemplo.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Adkins, S.W., Sowerby, M.S. 1996. Allelopathic potential of the weed, *Parthenium hysterophorus* L., in Australia. *Plant Protection Quarterly*, **11**, 20-23.

Anaya, A. L., Calera, M. R., Mata, R., Pereda-Miranda, R. 1990. Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology*, **7**, 2145-2152.

Aguilar-Martínez, M., Jiménez-Estrada, M., Macias-Ruvalcaba, N. A., Lotina-Hennsen, B. 1996. Electrochemical properties of the herbicide cacalol and its derivatives on protic and aprotic solvents by using cyclic voltammetry. Correlation with Hill's Reaction Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 290-295.

Au, T. K., Chick, W. S. H., Leung, P. C. 2000. The biology of ophiobolins. *Life Science*, **67**, 733-742.

Bagchi, G. D., Jain, D. C., Kumar, S. 1998. The phytotoxic effects of the artemisinin related compounds of *Artemisia annua*. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science*, **20**, 5-11.

Baxter, H., Harbone, J. B. 1994. Stilbenoids. *Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants*. Taylor and Francis, Washington, D.C. pp. 509-518.

Becerril J. M., M. V. Duke, U. B. Nandihalli, H. Matsumoto, S. O. Duke, 1992. Light control of porphyrin accumulation in acifluorfen-methyl-treated *Lemna pausicostata*. *Physiological Plant*, **86**, 6-16.

Black, D. J., Tran, Q-K., Persechini, A. 2004. Monitoring the total available CaM concentration in intact cells over the physiological range in free Ca<sup>2+</sup>. *Cell Calcium*, **35**, 415-425.

Bouché, N., Yellin, S., Snedden, W. A., Fromm, H. 2005. Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annual Review of Plant Biology*, **56**, 435-466.

Chin, D., Means, A. R. 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology*, **10**, 322-328.

Craven, C. J., Whitehead, B., Jones, S. K. A., Thulin, E., Blackburn, G. M., Waltho, J. P. 1996. Complexes formed between calmodulin and the antagonists J-8 and TFP in solution. *Biochemistry*, **35**, 10287-10299.

Crombie, L., Jamieson, S. 1982. Dihydrostilbenes of *Cannabis*, síntesis of canniprene. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, **1**, 1263-1270.

- Cutler, H., Cutler, S. 1998. Agrochemicals and pharmaceuticals: the connection. En: Biologically active natural products. Agrochemicals. Cutler, H., Cutler, S. (eds). CRC Press. Boca Raton, Florida, pp. 1-14.
- Dayan, F. E., Romagni, J. G., Duke, S. O. 2000. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *Journal of Chemical Ecology*, **26**, 2079-2094.
- Daye, S., Wenqiang, T., Ligeng, M. 2001. Extracellular calmodulin: a polypeptide signal in plants?. *Science in China Series C: Life Sciences*, **44**, 449-460.
- Du, J., Szabo, S. T., Gray, N. A. Manji, H. K. 2004. Focus on CaMKII: a molecular switch in the pathophysiology and treatment of mood and anxiety disorders. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, **7**, 243-248.
- Duke, S. O., Kenyon, W. 1993. En Target assays for herbicides and related phytotoxic compounds. Börger, P. and Sandmann, G. (eds.) *CRC Press*: **61**.
- Duke, S. O. Dayan, F. E., Aliotta, G., Romagni, J. G. 2003. Chemicals from nature for weed management. *Weed Science*, **50**, 138-151.
- Gorham, J. 1995. The biochemistry of the stilbenoids. Chapman & Hall: London, pp. 128-133.
- González-Andrade, M., Figueroa, M., Rodríguez-Sotres, R., Mata, R., Sosa-Peinado, A. 2009. An alternative assay to Discovery potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore labeled-CaM protein. *Analytical Biochemistry*, **387**, 64-70
- Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. **April, 2009**. Available [www.weedscience.com](http://www.weedscience.com)
- Hernández-Romero, Y. Tesis Doctoral, 2004: Efecto espasmolítico, síntesis de análogos y mecanismo de acción de los estilbenoides de *Nidema boothii* (Lindley) Schltr. (Orchidaceae). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hernández-Romero, Y., Rojas, J., Castillo, R., Rojas, A., Mata, R., 2004. Spasmolytic effects, mode of action, and structure-activity relationships of stilbenoids from *Nidema boothii*. *Journal of Natural Products*, **67**, 160-167.
- Hernández-Romero, Y., Acevedo, L., Sánchez, M., Shier, W., Abbas, H., Mata, R. 2005. Phytotoxic activity of bibenzyl derivatives from the orchid *Epidendrum rigidum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 6276-6280.
- Espinosa-García, F. J., Villaseñor, J. L., Vibrans, H. 2004. Geographical patterns in native and exotic weeds of Mexico. *Weed Technology*, **18**, 1552-1558: Dayan, F. E., Romagni, J. G.,

- Duke, S. O. 2000. Investigation the mode of action of natural phytotoxins. *Journal of Chemical Ecology*, **26**, 2079-2094.
- Estrada, S., Rojas, A., Mathison, Y., Israel, A., Mata, R. 1999. Nitric oxide/cGMP mediates the spasmolytic action of 3,4'-dihydroxy-5,5'-dimethoxybibenzyl from *Scaphyglottis livida*. *Planta Medica*, **65**, 109-114.
- Estrada, S., Toscano, R. A., Mata, R. 1999. New phenantrene derivates from *Maxillaria densa*. *Journal of Natural Products*, **62**, 1175-1178.
- Estrada, S., Tesis Doctoral, 2002: Estilbenoides espasmolíticos de *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schltr (Orchidaceae) y *Maxillaria densa* Lindley (Orchidaceae). Efecto del 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo sobre el sistema óxido nítrico/GMP cíclico. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fan, Ch., Wang, W., Wang, Y., Qin, G., Zhao, W. 2001. Chemical constituents from *Dendrobium densiflorum*. *Phytochemistry*, **57**, 1255-1258.
- Figuroa, M., González, M. Rodríguez-Sotres, R., Sosa-Peinado, A., González-Andrade, M., Cerda-García-Rojas, C., Mata, R. 2008. Calmodulin inhibitors from the fungus *Emericella* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, in press.
- Graham L. P. 1995. An Introduction to Medicinal Chemistry. *Department of Chemistry, Paisley University*. OXFORD UNIVERSITY PRESS.
- Harmat, V., Bocskei, Z., Naray-zabo, G., Bata, I., Csutor, A. S., Hermecz, I., Aranyi, P., Szabo, B., Liliom, K., Vertessy, B. G., Ovadi, J. 2000. A new potente calmodulin antafonist with arylalkylamine structure: crystallographic, spectroscopic and functional Studies. *Journal of Molecular Biology*, **297**, 747-755.
- Horikawa, N., Suzuki, T., Uchiumi, T., Minamimura, T., Tsukada, K., Takaguchi, N., Sakai, H. 2005. Cyclic AMP-dependent Cl<sup>-</sup> secretion induced by thromboxane A<sub>2</sub> in isolated human colon. *Journal of Physiology*, **562**, 885-897.
- Jarevång, T., Nilsson, M., Wallstedt, A., Odham, G., Sterner, O. 1997. A bibenzyl from *Empetrum nigrum*. *Phytochemistry*, **48**, 893-896.
- Jeschke, P., Lieb, F., Velten, R., Wiese, W-B. 2006. Natural products and their role in the designo f active ingredients for modern crop protection. En: Natural products for pest Management. ACS simposium series 927. *American Chemical Society*, Washington, D.C., pp. 128-141.
- Jiann\_Jyh, H., Ruey-Linh, L., Ruey-Lone, S., Jing-Jer, J. 1999. Study of the Wittig reaction of benzultriphenylphosphonium SALT and benzaldehyde via ylide-mediated phase-transfer

catálisis substituent and solvents effects. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **142**, 125-139.

Jiménez, A., Mata, R., Lotina-Hennsen, B., Anaya, A. 1998. Interference of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene with photosynthetic electron transport. *Z. Naturforsch*, **53c**, 55-59.

Kohli, R. K., Batish, D. R., Singh, H. P. 2006. Weeds and their management: Rational and approaches. En: Singh, H. P., Batish, D. R., Kohli, R. K. (eds), Handbook of sustainable weed Management. *Food Products Press*, Binghamton, NY, 1-19.

Kong, J. M., Ngoh-Khang, G., Lian-Sai, C., Tet-Fatt, C. 2003. Recent advances in traditional plant drugs and orchid. *Acta Pharmacologica Sinica*, **24**, 7-21.

Kortagere, S., Krasowski, M. D., Ekins, S. 2009. The importance of discerning shape in molecular pharmacology. *Cell Press*, **30** (3), 138-147.

Kortvely, E., Gulya, K. 2004. CaM, and various ways to regulate its activity. *Life Science*, **74**, 1065-1070.

Kostecki, K., Engelmeier, D., Pacher, T., Hofer, O., Vajrodaya, S., Greger, H., 2004. Dihydrophenanthrenes and other antifungal stilbenoids from *Stemona* cf. *Pierrei*. *Phytochemistry*, **65**, 99-106.

Labrada, R., Parker, C. 1997. El control de malezas en el contexto del manejo integrado de plagas. En: Manejo de malezas para países en desarrollo. Reporte FAO 120.

Lee, Y. H., Park, J. D., Baek, N. I., Kim, S. I., Ahn, B. Z. 1995. In vitro and in vivo antitumoral phenanthrenes from the aerial parts of *Dendrobium nobile*. *Planta Medica*, **61**, 178-180.

Leung, P. C., Taylor, W. A., Wang, J. H., Tipton, C. L. 1984. Ophiobolin A. A natural product inhibitor of calmodulin. *Journal of Biological Chemistry*, **259**, 2742-2747.

Li-Gen, L., Xin-Zhou, Y., Chun-Ping, T., Chang-Qiang, K., Ji-Bao, Z., Yang, Y. 2007. Antibacterial stilbenoids from the roots of *Stemona tuberisa*. *Phytochemistry*, **69**, 457-463.

Likhitwitayawuid, K., Sornsute, A., Sritularak, B., Ploypradith, P. 2006. Chemical transformation of oxyresveratrol (*trans*-2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) into a potente tyrosinase inhibitor and a Sorong cytotoxic agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **16**, 5650-5653.

Lotina-Hennsen, B., Mata, R., Calderón, J., Cxéspedes-Acuña, C., Jiménez-Estrada, M. 1998. Secondary metabolites from mexican plants: target and mechanism of action on photosynthesis. *Recent Res. Devel. In Agricultural and Food Chemistry*, **2**, 731-749.

Macías, F. A., Castellano, D., Molinillo, J. M. 2000. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals selection of standard target species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 2512-2521.

Martínez-Andrade, M., Figueroa, M., Rodríguez-Sotres, R., Mata, R., Sosa-Peinado, A. 2009. An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein. *Analytical Biochemistry*, **387**, 64-70.

Martínez-Luis, S., Pérez-Vásquez, A., Mata, R. 2007. Natural products with calmodulin inhibitor properties. *Phytochemistry*, **68**, 1882-1903.

Mata, R., Macias, M., Rojas, I., Lotina-Hennsen, B., Toscano, R., Anaya, A. 1998. Phytotoxic compounds from *Esenbeckia yaxhoob*. *Phytochemistry*, **49**, 1086-1095.

Meazza, G., Scheffler, B. E., Tellez, M. R., Rimando, A. M., Romagni, J. G., Duke, S. O., Nanayakkara, D., Khanc, I. A., Abourashed, E. A., Dayan, F. E. 2002. The inhibitory activity of natural products on plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Phytochemistry*, **59**, 281-288.

Min. Y, Kee, Y., Young-Won, Ch., Ju, P., Jinwoong, P. 2009. Phenolic compounds with radical scavenging and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitory activities from *Dioscorea opposita*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. In press

Mitscher, L., Park, Y., Al-Shamma, A., Hudson, B., Haas, T. 1981. Amorfrutin A and B, bibenzyl antimicrobial agents from *Amorpha fruticosa*. *Phytochemistry*, **20**, 781-785.

Miyazawa, M., Shimamura, H., Nakamura, S., Kameoka, H. 1997. Antimutagenic activity of gigantol from *Dendrobium nobile*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 2849-2853.

Miyazawa, M., Shimamura, H., Nakamura, S., Sugiura, W., Kosaka, H., Kameoka, H. 1999. Moscatilin from *Dendrobium nobile*, a naturally occurring bibenzyl compound with potential antimutagenic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 2163-2167.

Molnar, A.m Liliom, K., Orosz, F., Vertessy, B. G., Ovadi, J. 1995. Anti-CaM potency of indole alkaloids in *in-vitro* Systems. *European Journal of Pharmacology*, **291**, 73-82.

Montes, B. R., Flores, M. H. E. 2001. Conbate de Furarium thapsium y Claviceps africana mediante semillas de sorgo tratadas con productos naturales. Sorghum seeds treats

with natural products for the control of *Fusarium thapsinum* and *Claviceps africana*. *Manejo Integrado de Plagas* (CATIE) **61**, 23-30.

Moran, G. R. 2005. (4-Hydroxyphenyl) pyruvate Dioxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **433**, 117-128.

Moreland, D. E., Novitzky, W. P. 1987. Effects of phenolic acids, coumarins and flavonoids on isolated chloroplasts and mitochondria. En: *Allelochemicals: Role in agriculture and forestry*. Waller g. r. (Editor). *ACS Symposium Series*, Washington. D. C., 246-261.

Okuyama, T., Takata, M., Takayasu, J., Hasegawa, T., Tokuda, H., Nishino, A., Nishino, H. 1991. Anti-tumor promotion by principles obtained from *Angelica keiskei*. *Planta Medica*, **57**, 242-246.

Ovadi, J. 1989. Effects of drugs on calmodulin-mediated enzymatic actions. In: Jucker, E. (Ed.), *Progress in Drugs Research*, **33**, Birkhauser Verlag, Basel, 353-395.

Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A. L., Pezzuto, J. M., Wickramaratne, D. B., Kinghorn, A. D. 1993. Structure and biological activities of tricolorin A, major phyto-growth-inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *Journal Natural Products*, **56**, 571-582.

Randall, R. P. 2002. A global compendium of weeds. Ed. RG and FJ Richardson.

Reinmann, E. 1971 Natural stilbenes II. Synthesis of polyhydroxystilbenes. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **750**, 109-127.

Rivero-Cruz, B., Rivero-Cruz, I., Rodríguez-Sotres, R., Mata, R. 2007. Effect of natural and synthetic benzyl benzootes on calmodulin. *Phytochemistry*, **68**, 1147-1155.

Rojas, I. S., Lotina-Hennsen, B., Mata, R. 2000. Effect of lichen metabolites on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated Spinach chloroplasts. *Journal of Natural Products*, **63**, 1396-1399.

Romagni, J. G., Duke, S. O., Dayan, F. E. 2000. Inhibition of Plant Asparagine Synthetase by Monoterpene Cineoles. *Plant Physiology*, **123**, 725-732.

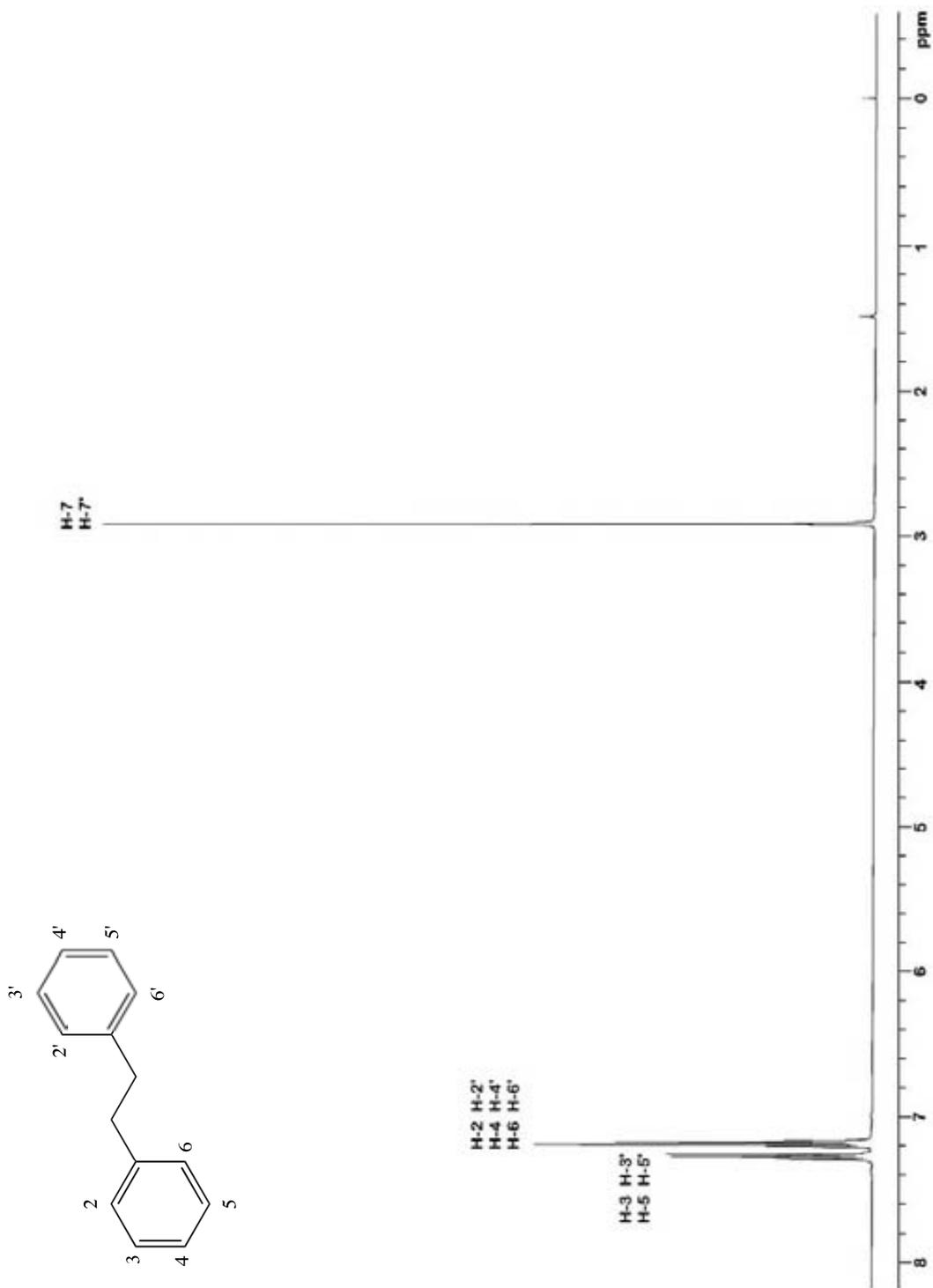
Rycroft, D.S. and Cole, W.J. 2001. Hydroquinone derivatives and monoterpenoids from the Neotropical liverwort *Plagiochila rutilans*. *Phytochemistry*, **57** (3). 479-488. ISSN 0031-9422

Sachdev, K., Kulshreshthe, K. 1986. Phenolic constituents of *Coelogyne ovalis*. *Phytochemistry*. **25**, 499-502.

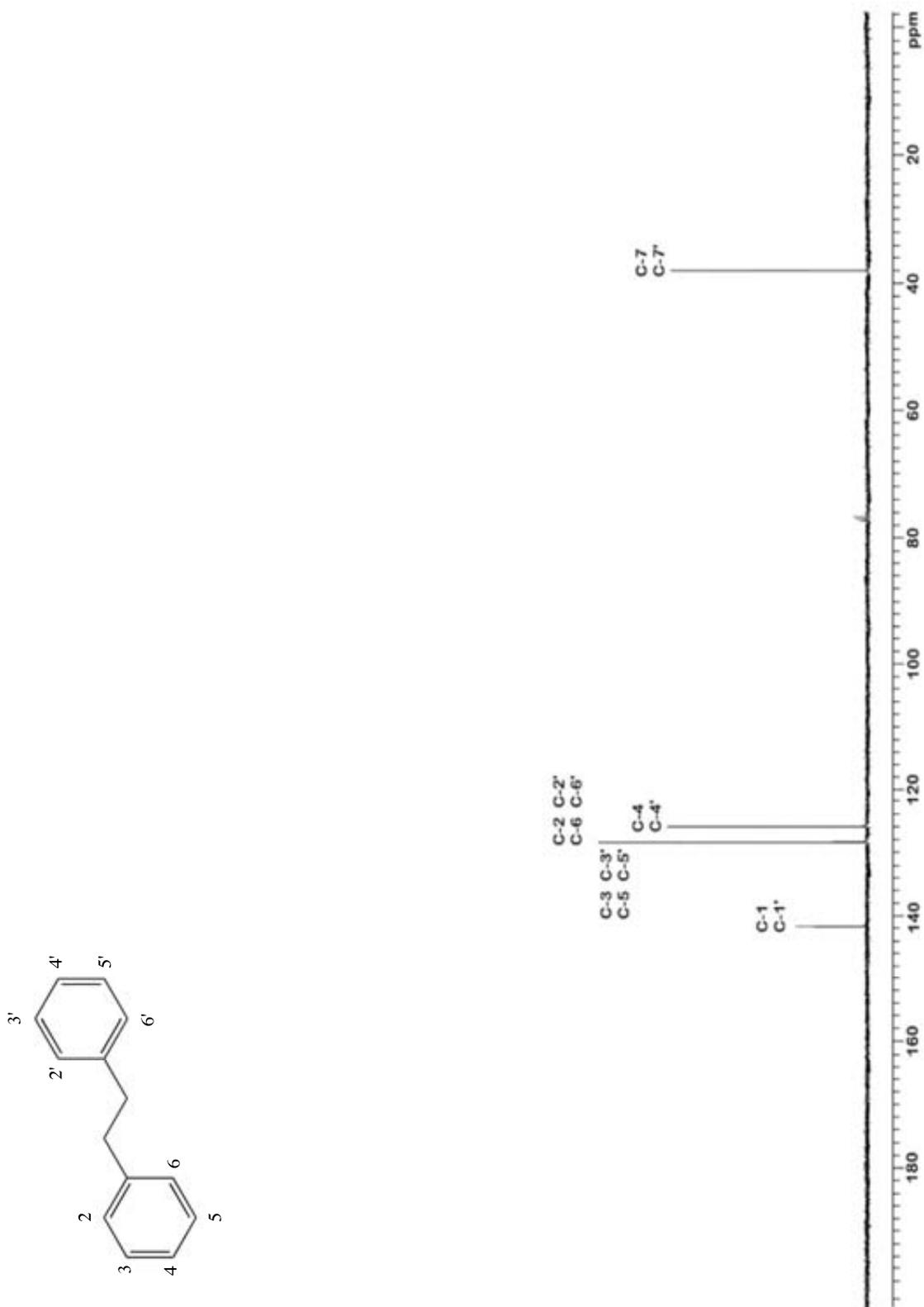
- Sharma, R. K., Wang, J. H. 1979. Preparation and assay of the Ca<sup>2+</sup> dependent modulator protein. En: Greengard, P., Robinson, G. A. (eds). *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, **10**, Raven Press, NY, pp. 187-198.
- Sharma, R. K., Wang, J. H., Wu, Z. 1997. Mechanisms of inhibition of calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase by dihydropyridine calcium antagonists. *Journal of Neurochemistry*, **69**, 845-850.
- Shimizu, M., Shogawa, H., Hayashi, T., Arisawa, M., Suzuki, S., Yoshizaki, M., Morita, N., Ferro, E., Basualdo, I., Berganza, L. H. 1988. Anti-inflammatory constituents of tropical applied crude drugs III. Constituents nad anti-inflammatory effects of paraguayan crude drug "Tamandá cuná" (*Catasetum barbatum* Lindley). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **36**, 4447-4452.
- Singh, H.P., Batish, D. R., Kohli, R. K. 2003. Allelopathic interactions and allelochemicals: New posibilitéis for sustainable weed Management. *Critical Review in Plant Science*, **22**, 239-311.
- Somlyo, A. P., Somlyo, A. V. 2003. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiological Reviews*, **83**, 1325-1358.
- Tanaka, T., Abbas, H. K., Duke, S. O. 1993. Structure-dependent phytotoxicity of fumonisins and related compounds in a duckweed bioassay. *Phytochemistry*, **33**, 779-785.
- Takagi, S., Yamaki, M., Inoue, K. 1983. Antimicrobial agents from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **22**, 1011-1015.
- Yamaki, M., Bai, L., Inoue, K., Takagi, S. 1989. Biphenanthrenes from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **28**, 3503-3505.
- Valencia-Islas, N. A. Tesis Doctoral, 2000. Fitotoxinas de *Prionosciadium watsoni* (Umbelliferae) y *Maxilaria densa* (Orchidaceae). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Valencia-Islas, N., Paul, R. N., Shier, W. T., Mata, R., Abbas, H. 2002. Phytotoxicity and ultrastructural effects of gymnopusin from the orchid *Maxillaria densa* on duckweed fronda and roods tissue. *Phytochemistry*, **61**, 141-148.
- Vibrans, H., 2001. Manejo de malezas en agroecosistemas tradicionales. Memoria, XXII Congreso Nacional de la Maleza, Colima, Col., 7-9 de noviembre de 2001, pp. 303-311.

- Villaseñor, J. L., Espinosa-García, L. F. 2004. The alien flowering plants of Mexico. *Diversity and Distributions*, **10**, 113-123.
- Vertessy, B. G., Ramat, V., Bocskei, Z., Náray-Szabó, G., Orosz, F., Ovádi, J. 1998. Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca<sup>2+</sup>-calmodulin: Crystallographic and spectroscopic Studies. *Biochemistry*, **37**, 15300-15310.
- Vyvyan, J. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*, **58**, 1631-1646.
- Weir, T. L., Park, S. W., Vivanco, J. M. 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*. **7**, 472-479.
- Weston, L. A., Duke, S. O. 2003. Weed and crop allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **22**, 367-389.
- Wittig, G., Scholkopf, U. 1954. *Chem. Ver.*, **87**, 1318.
- Zhang, L., Lu, Y. T. 2003. Calmodulin-binding proteína in plants. *Trends in Plant Science*, **8**, 123-127.
- Zhou, Y., Li, Y., Wang, Z., Ou, Y., Zhou, X. 1994. <sup>1</sup>H NMR and spin-labeled EPR studies on the interaction of calmodulin with jujuboside A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **202**, 148-154.

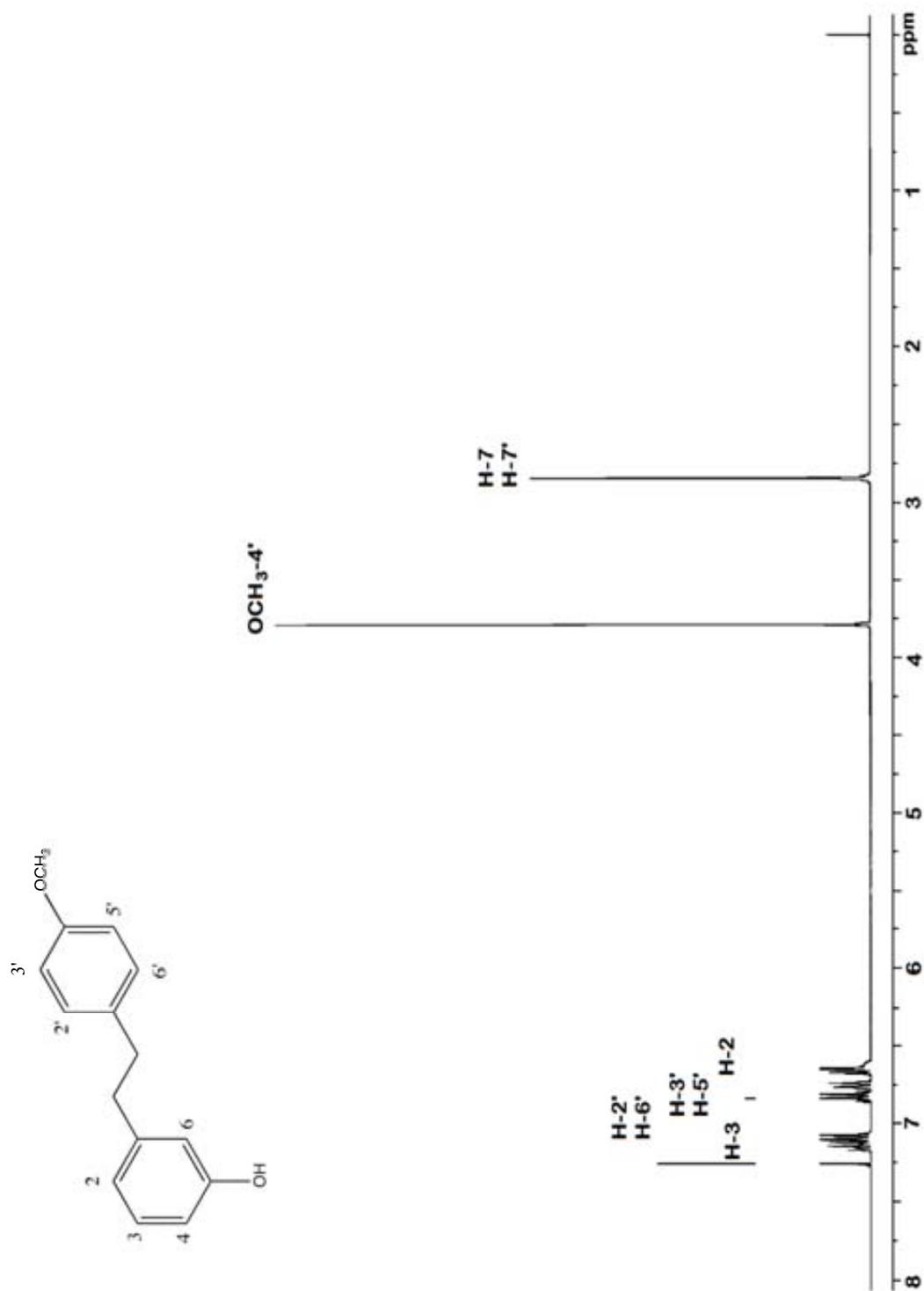
# *Anexo*



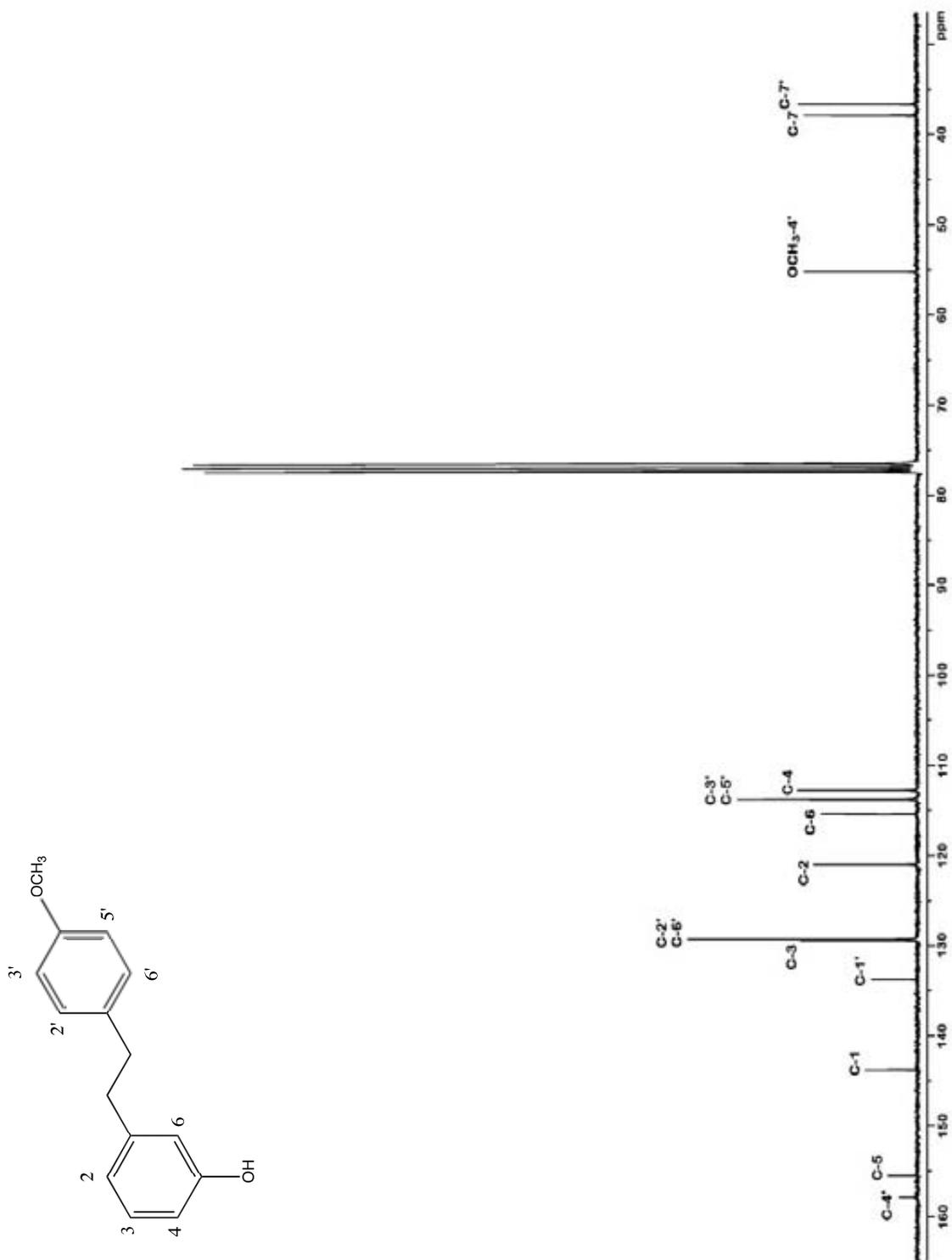
**Espectro 1.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del bibencilo (54)



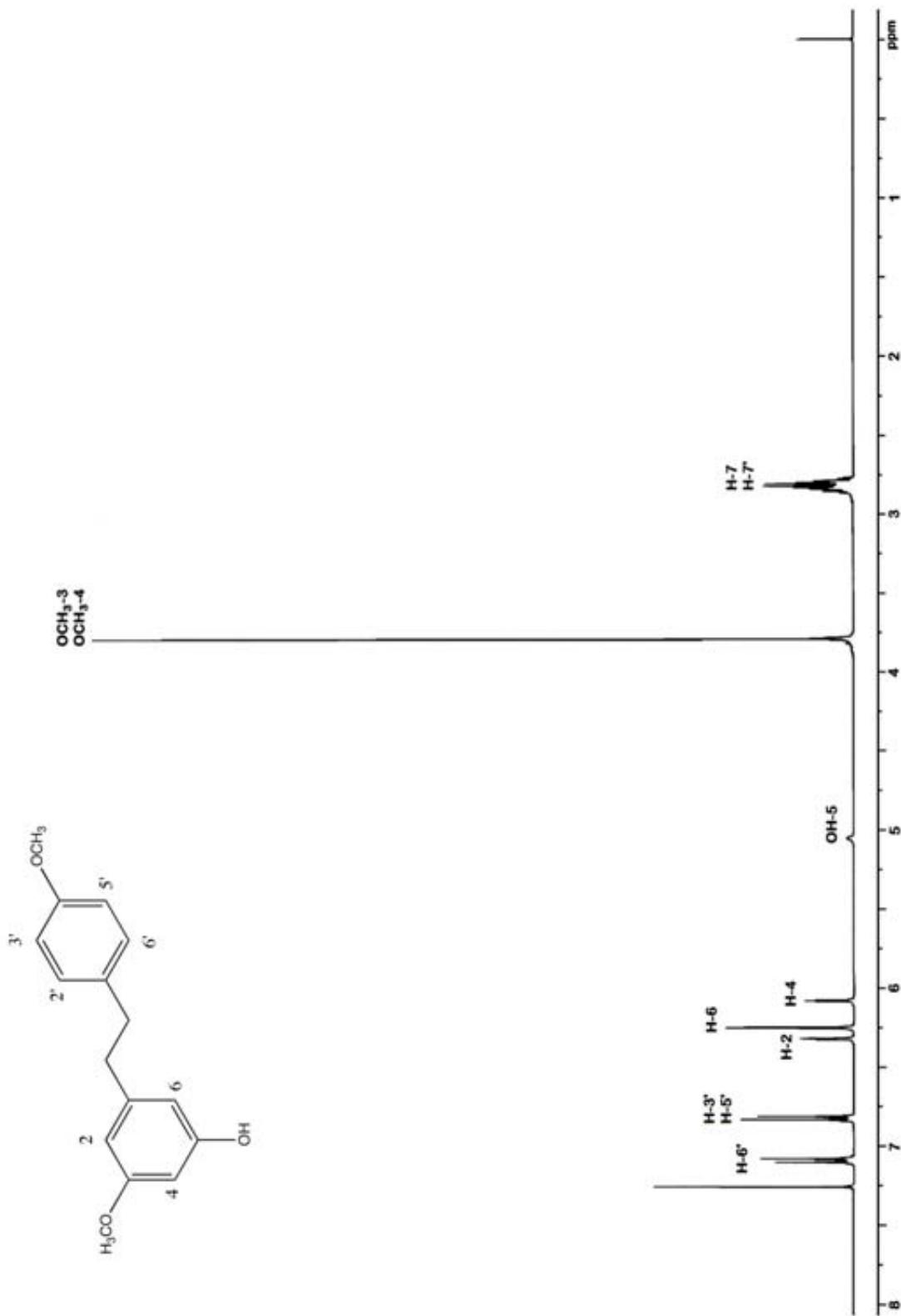
**Espectro 2.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del bibencilo (54)



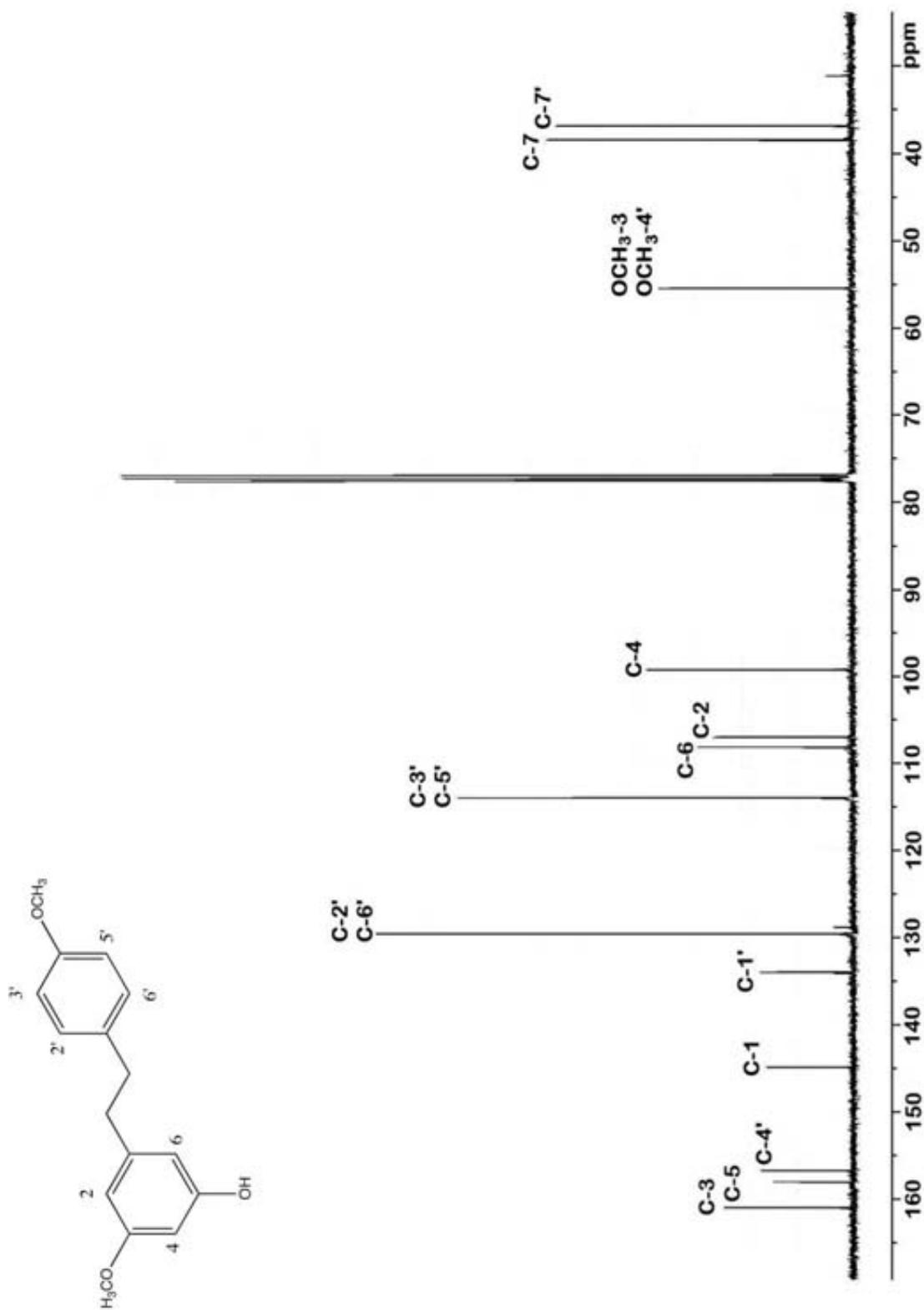
**Espectro 3.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 3'-hidroxi-4-metoxibibencilo (55)



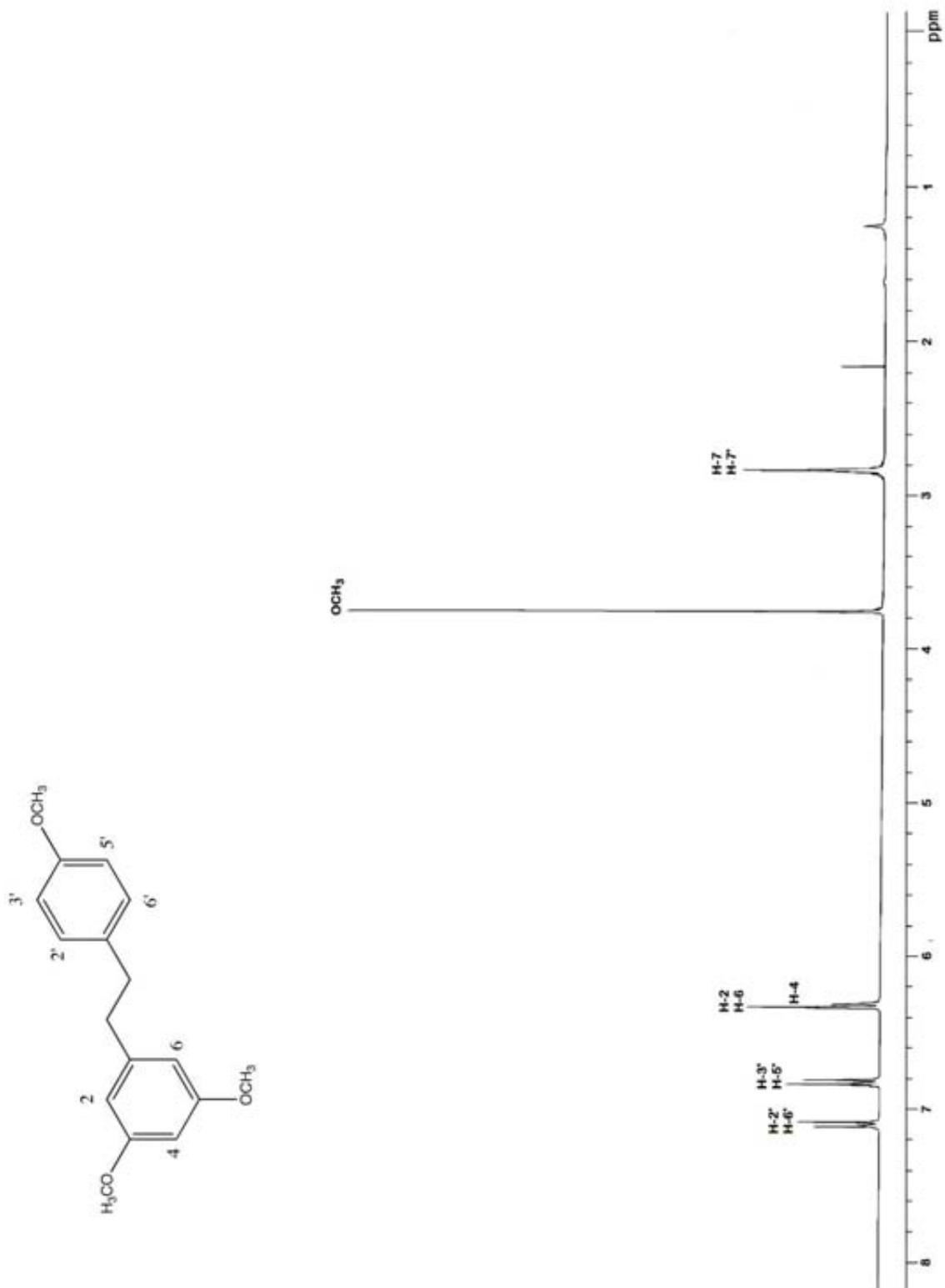
**Espectro 4.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3'-hidroxi-4-metoxibencilo (55)



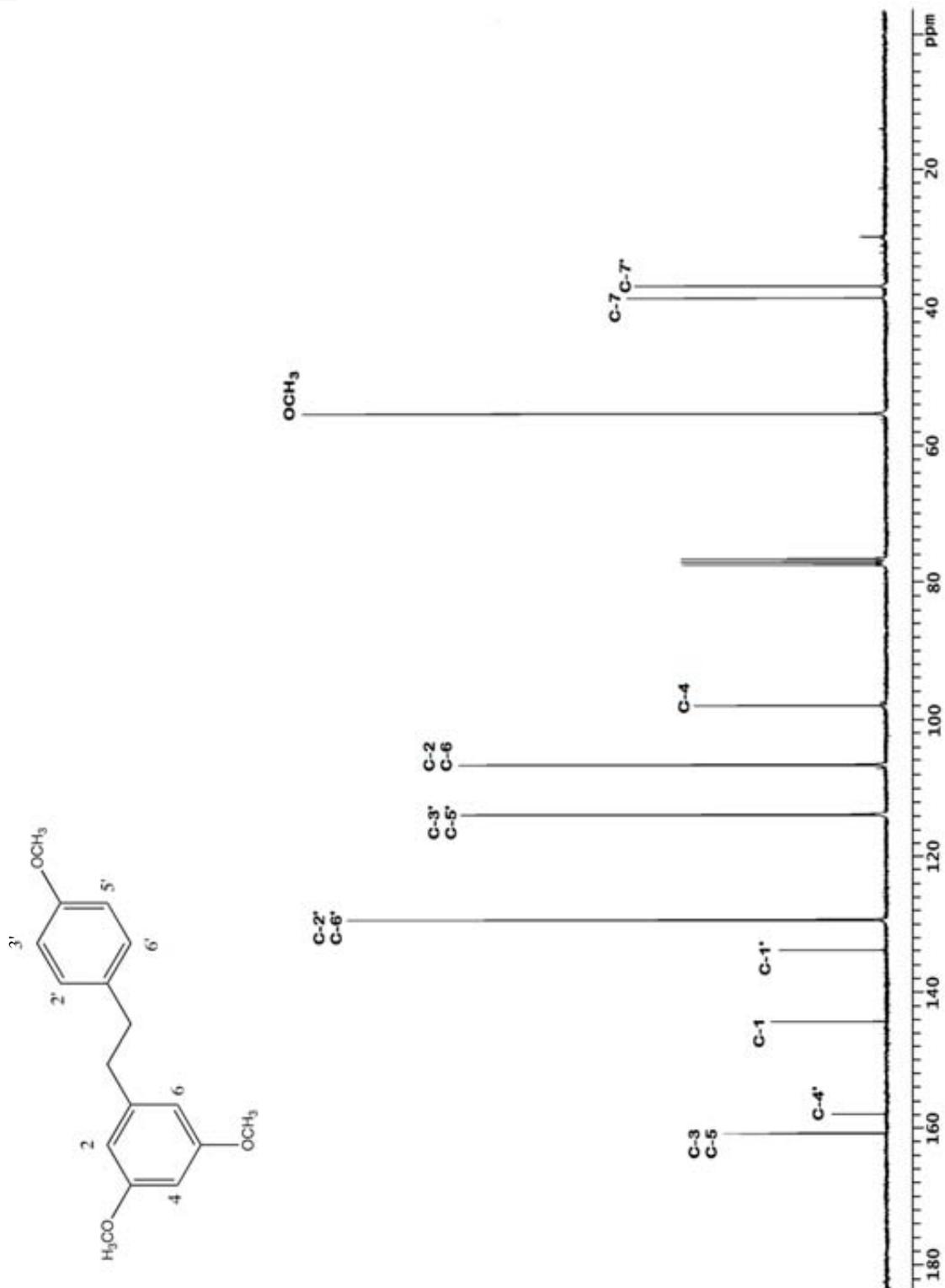
**Espectro 5.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 3',4-dimetoxi-5'-hidroxibibencilo (56)



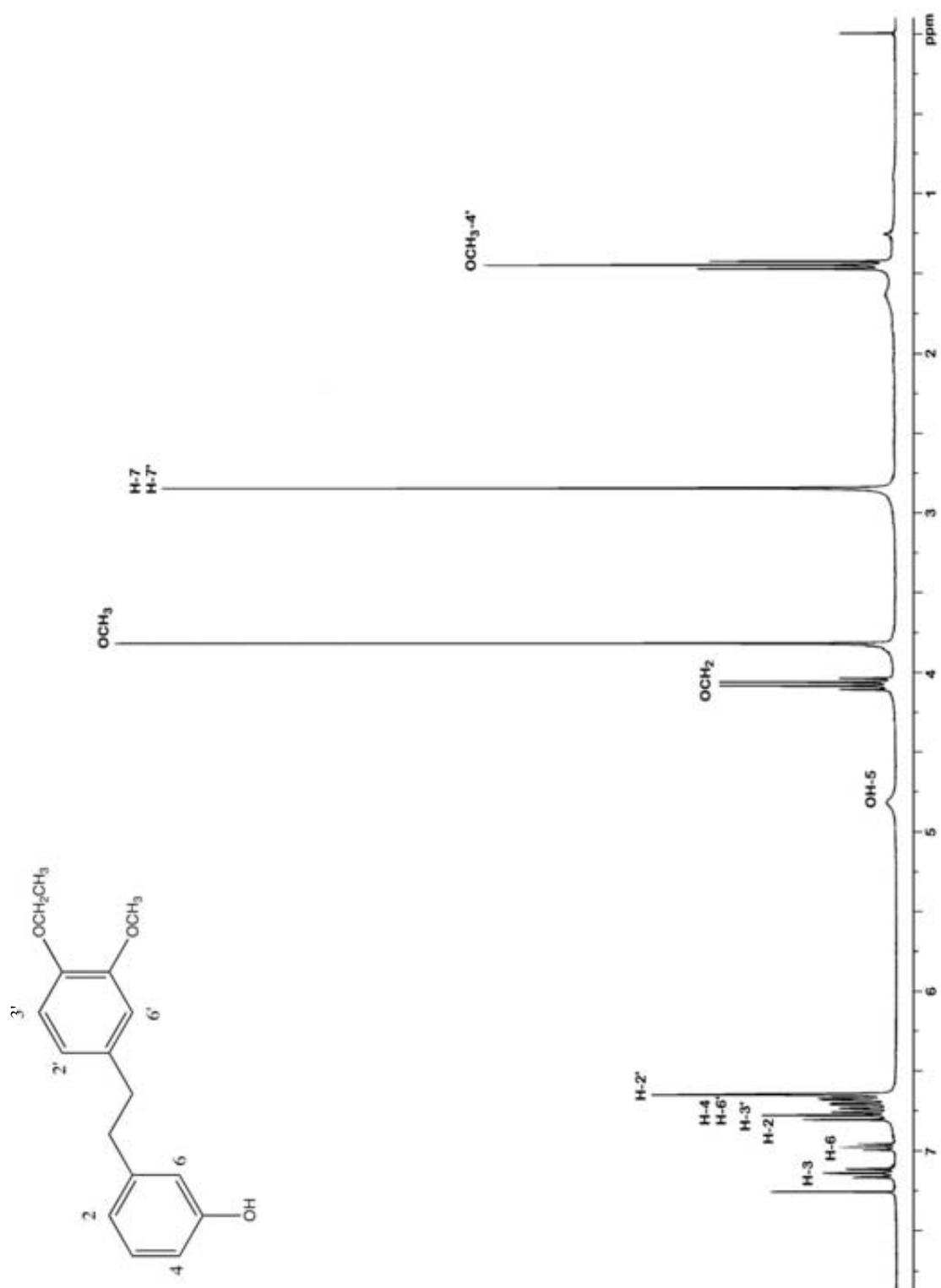
**Espetro 6.** Espetro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3',4-dimetoxi-5'-hidroxibibencilo (56)



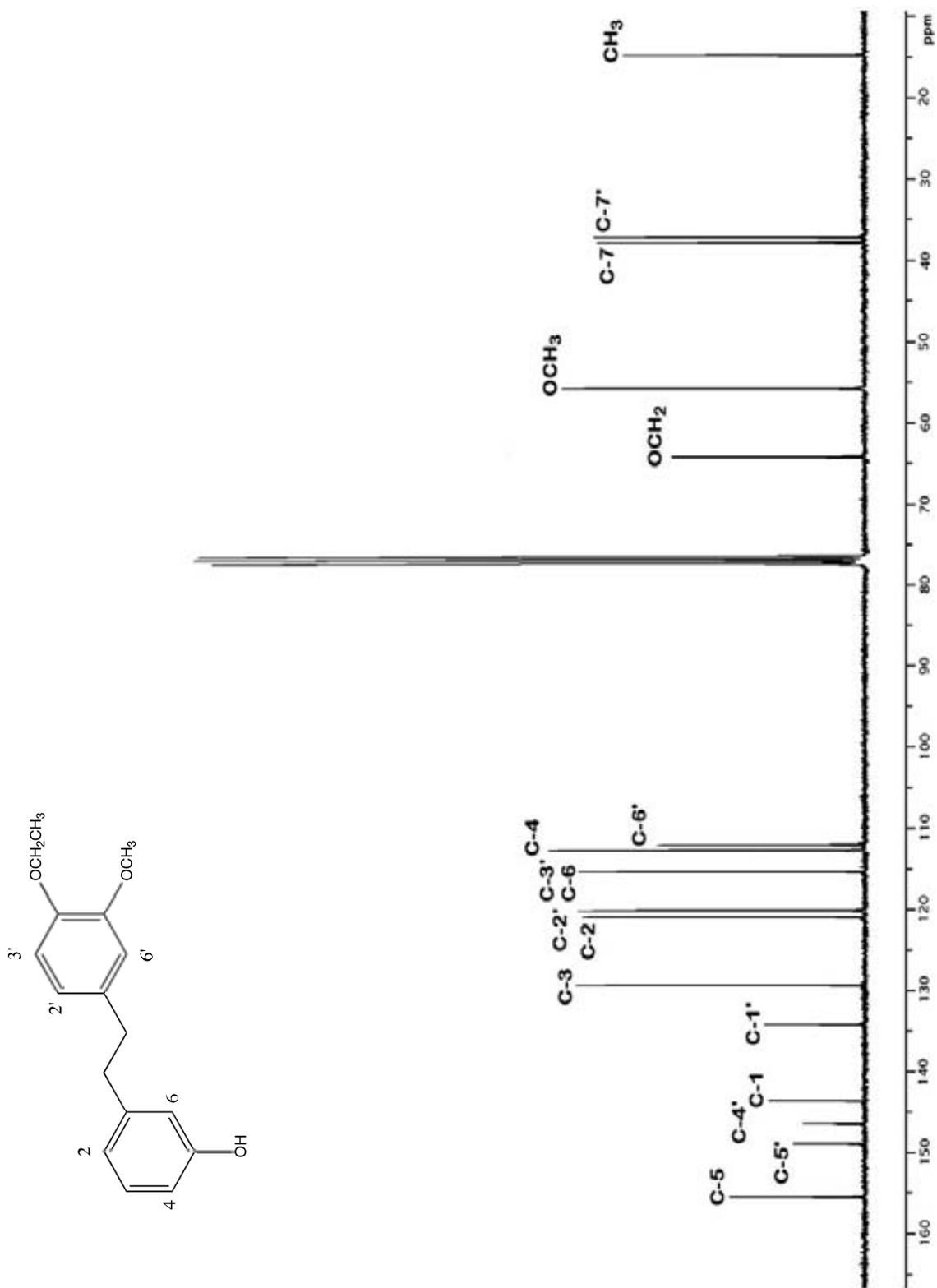
**Espectro 7.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 3',4, 5'-trimetoxibencilo (57)



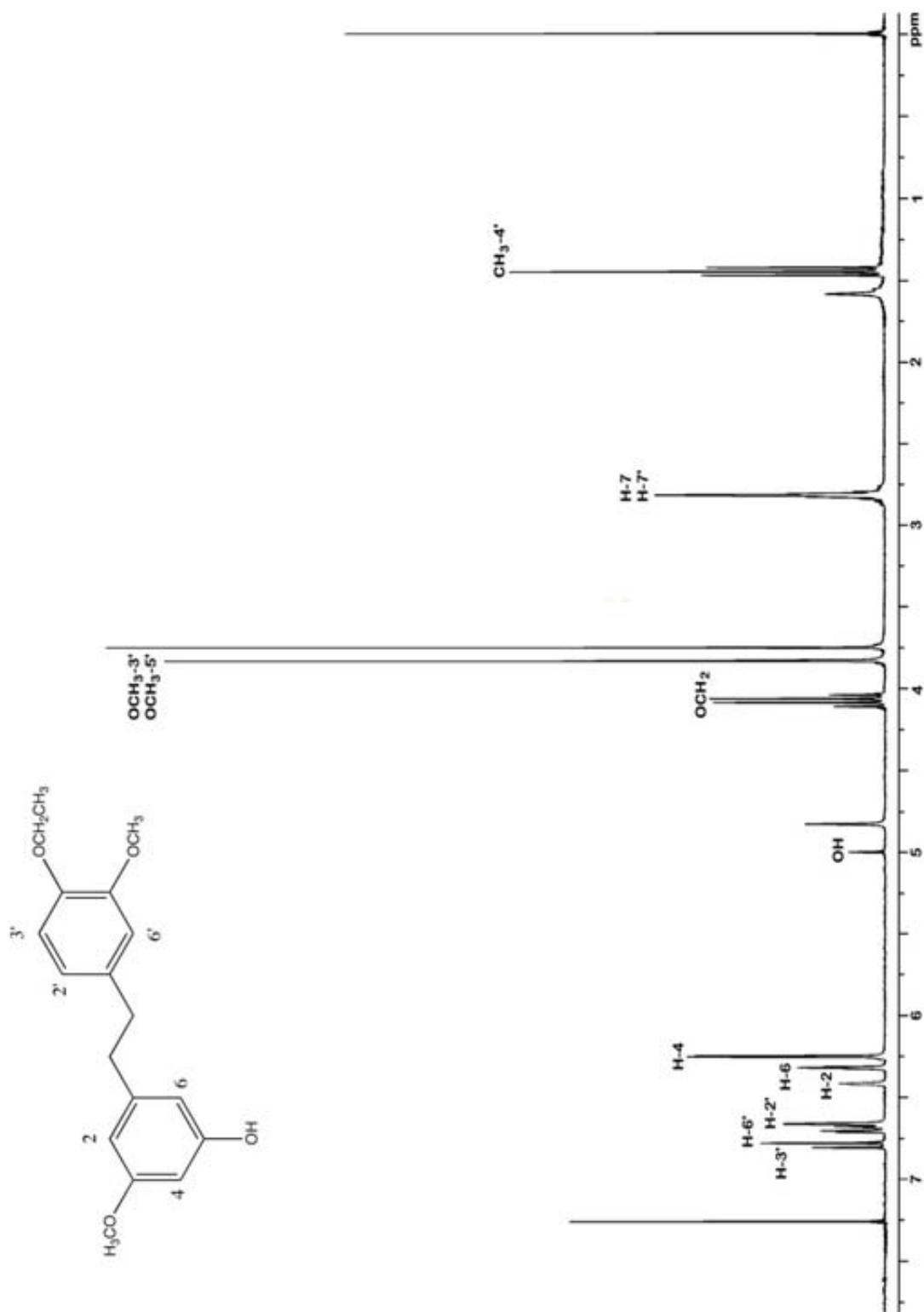
**Espectro 8.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3',4',5'-trimetoxibibencilo (57)



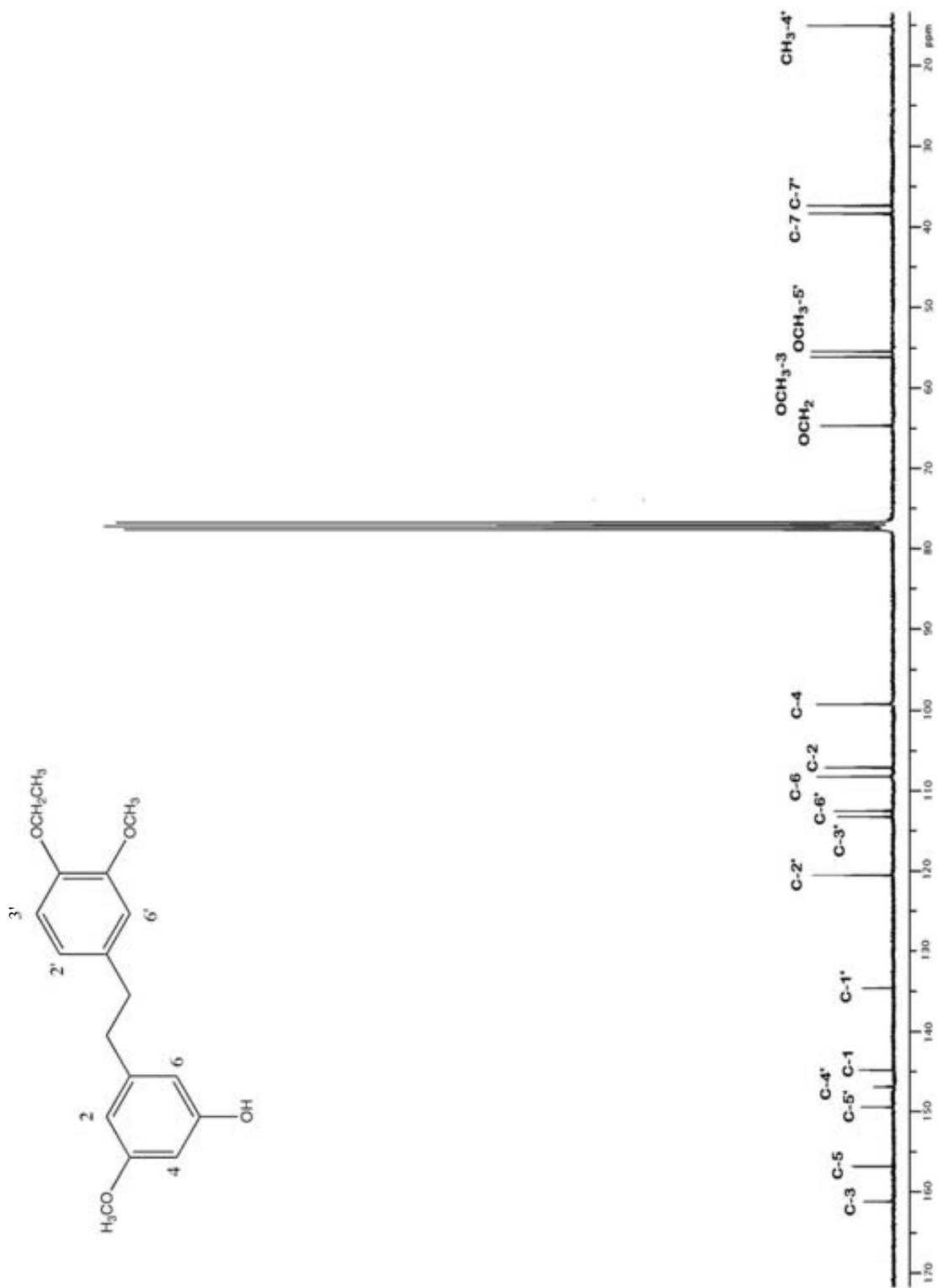
**Espectro 9.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del 4'-etoxi-3-hidroxi-3'-metoxibencilo (58)



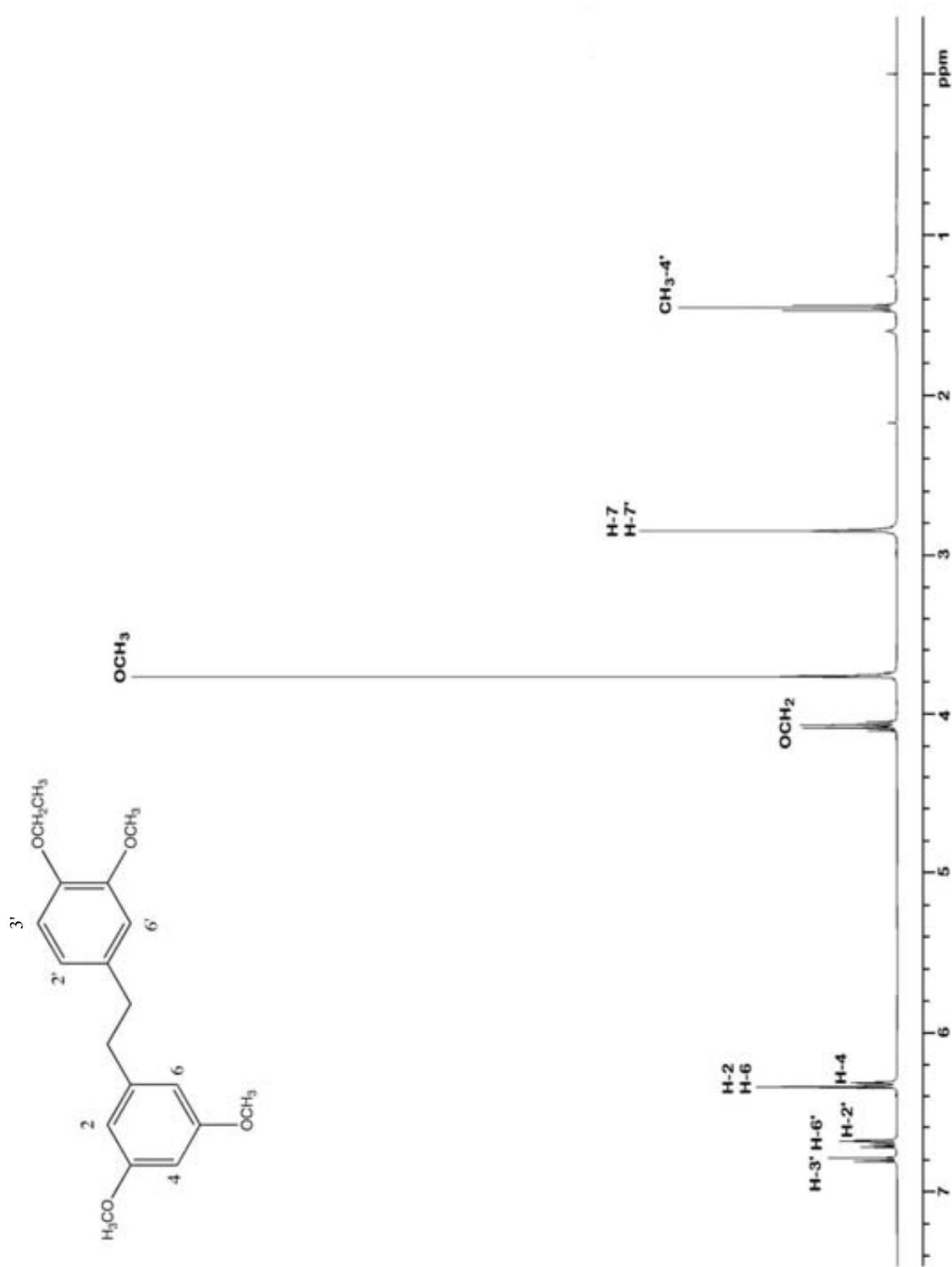
**Espectro 10.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 4'-etoxi-3-hidroxi-3'-metoxibibencilo (58)



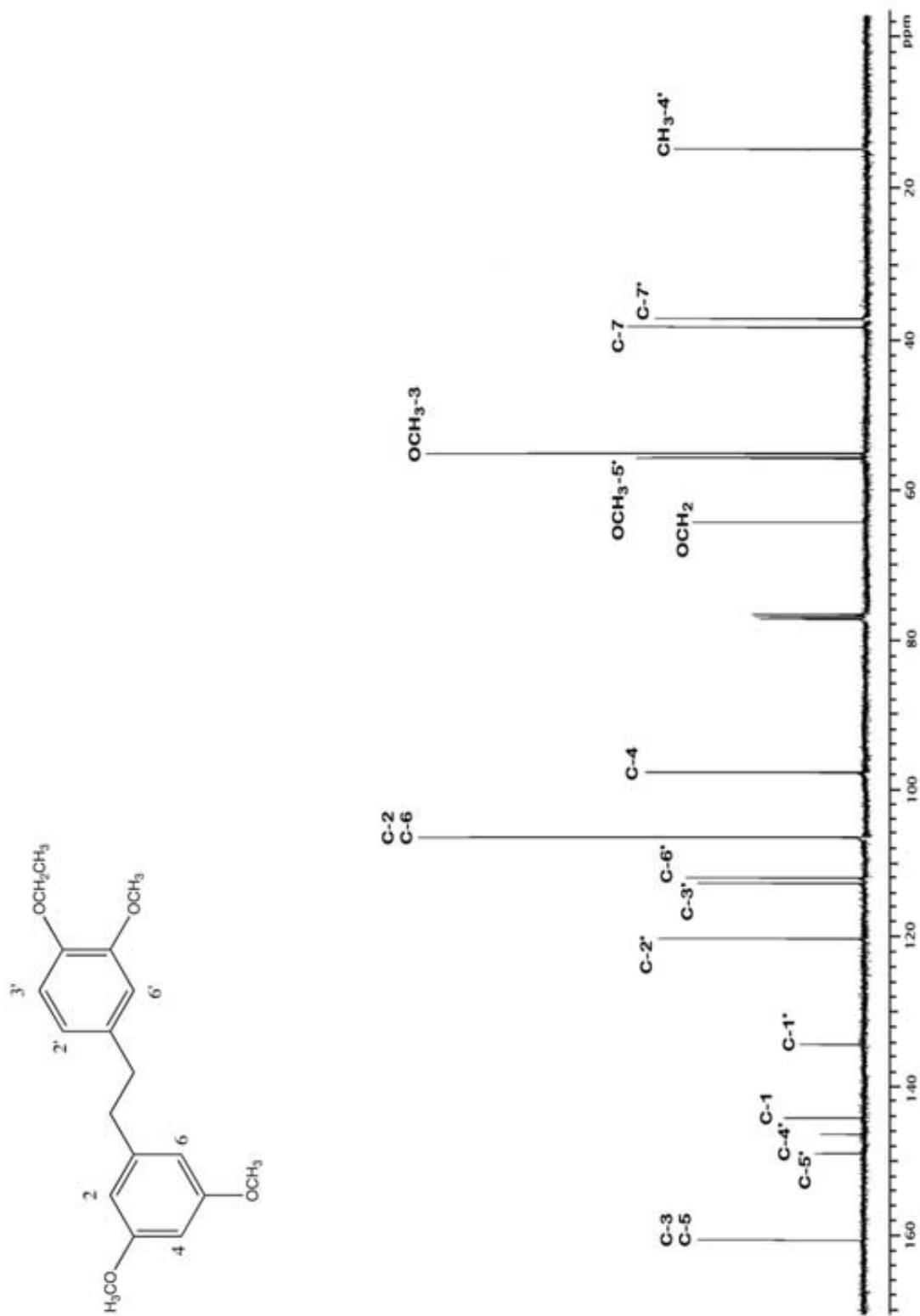
**Espectro 11.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 3', 5-dimetoxi-4'-etoxi-3-hidroxibibencilo (59)



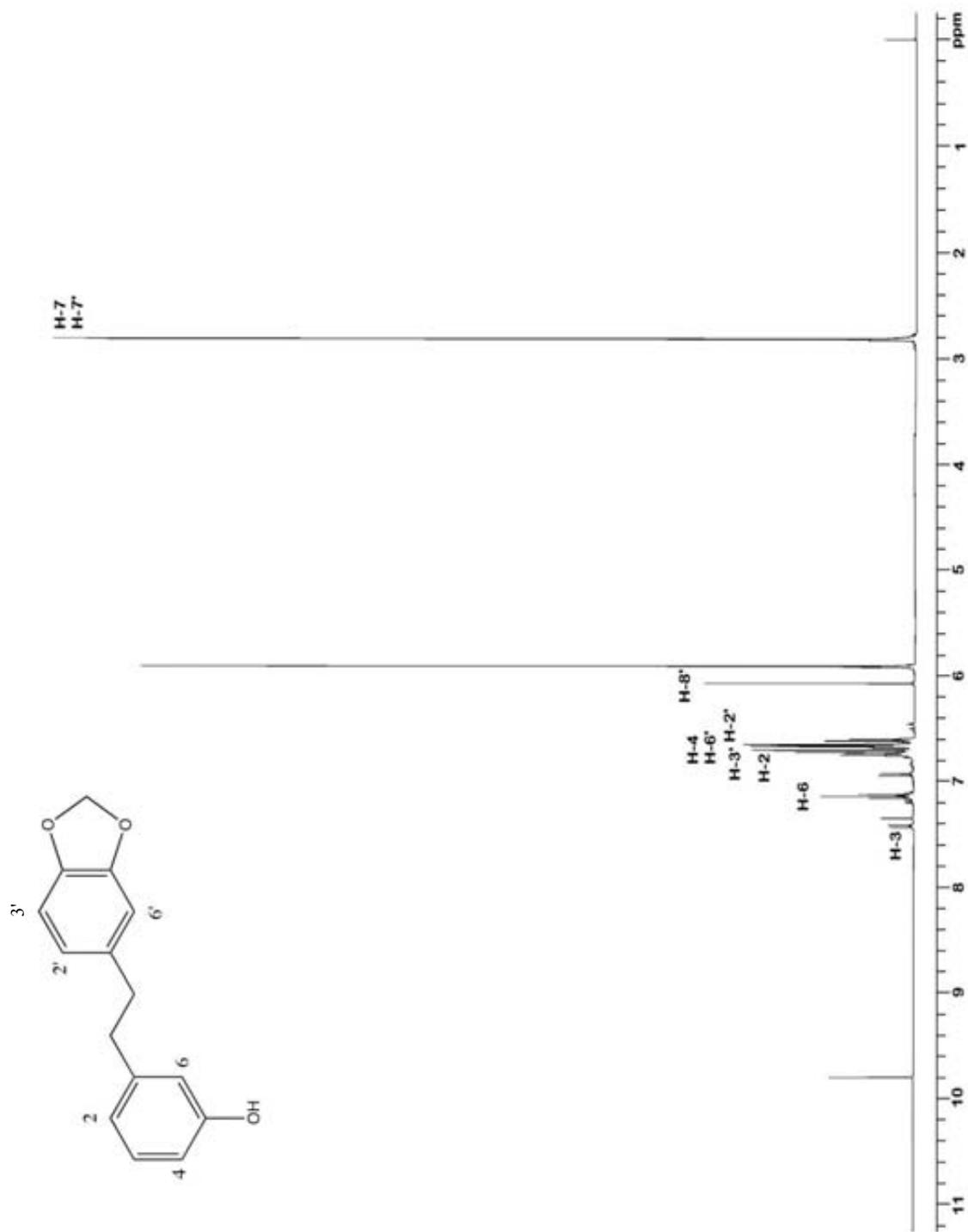
**Espectro 12.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3', 5-dimetoxi-4'-etoxi-3-hidroxibencilo (59)



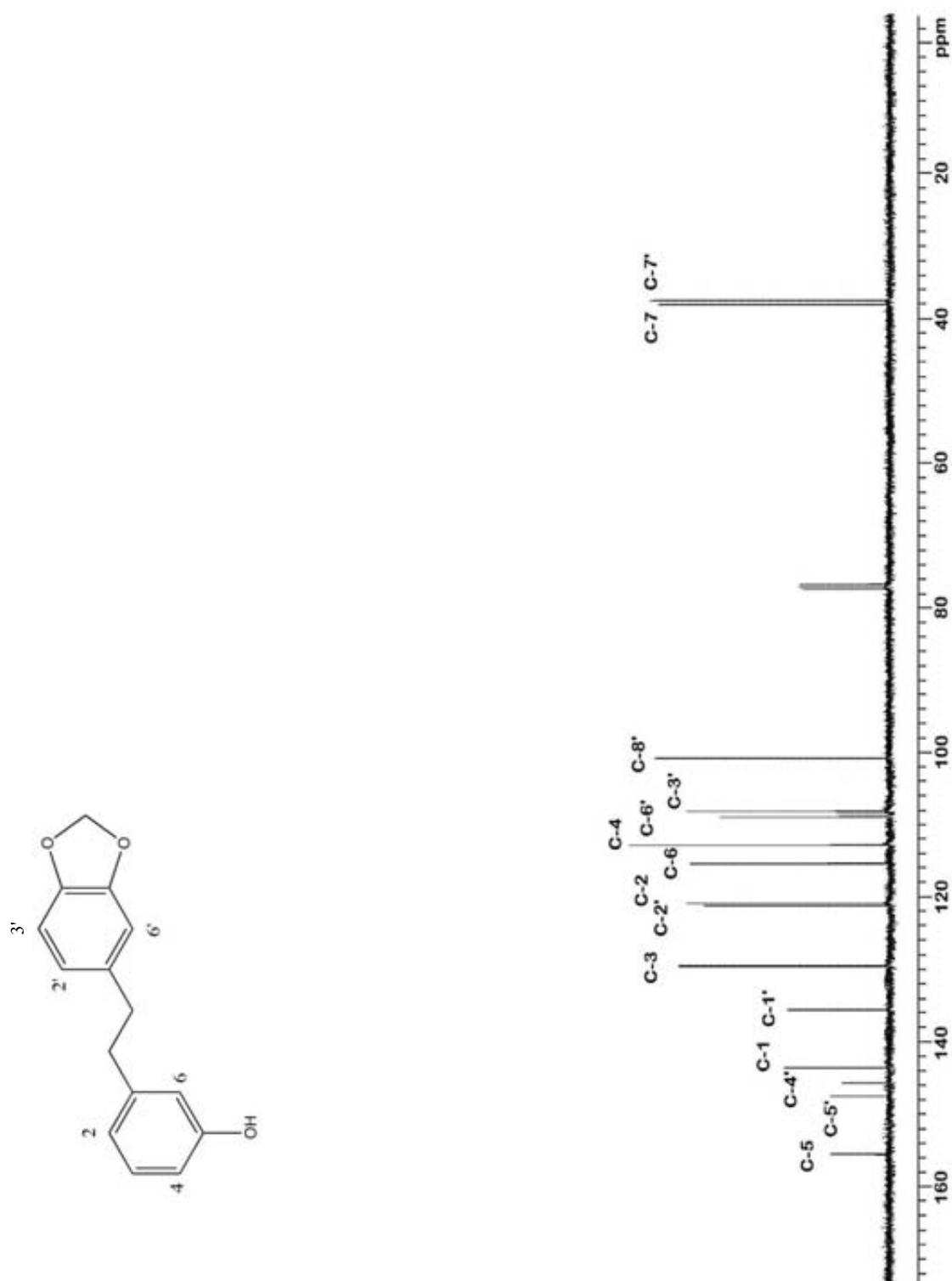
**Espectro 13.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 4'-etoxi-3,3',5-trimetoxibibenclo (60)



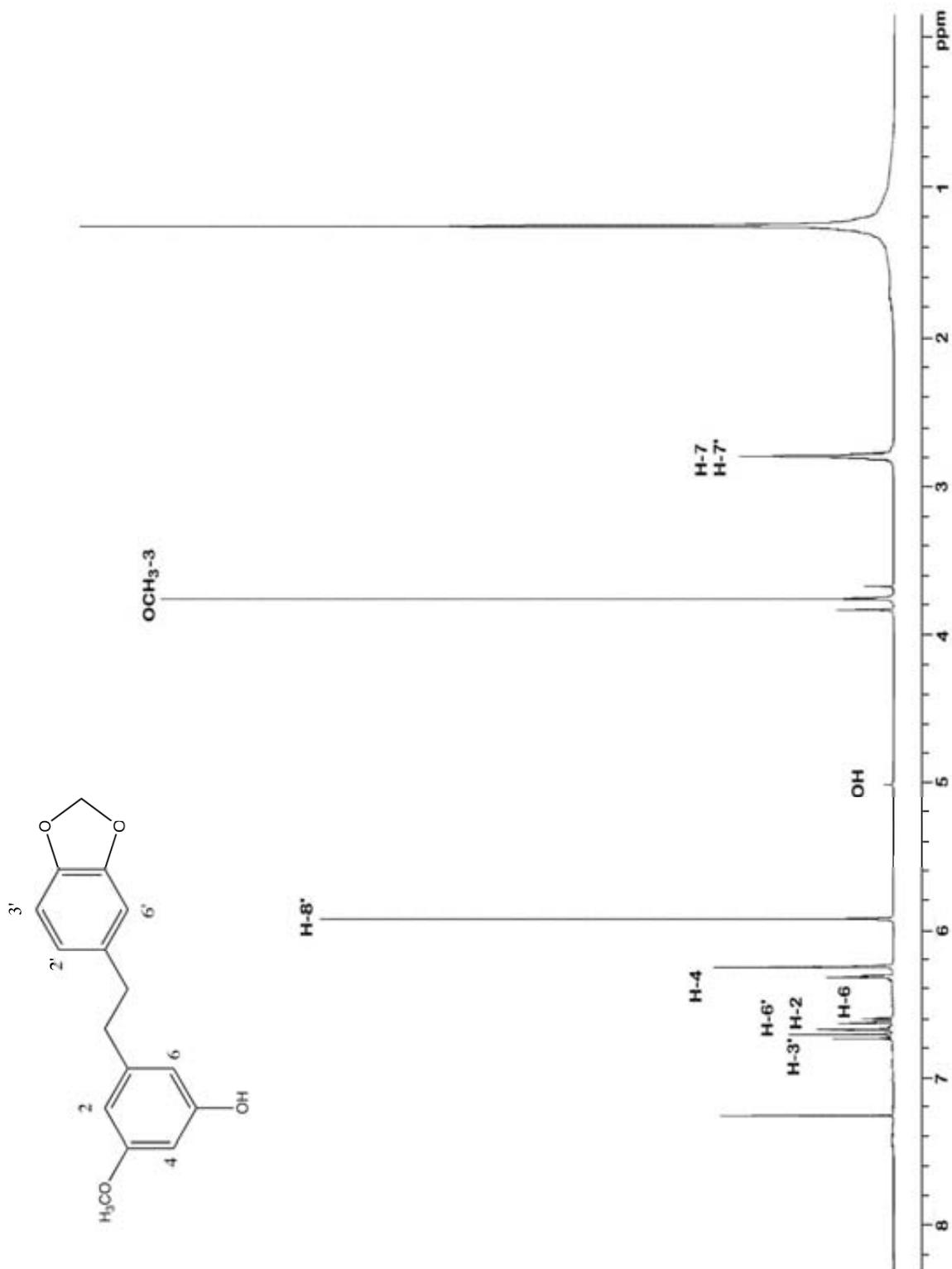
**Espectro 14.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 4'-etoxi-3,3',5-trimetoxibencilo (60)



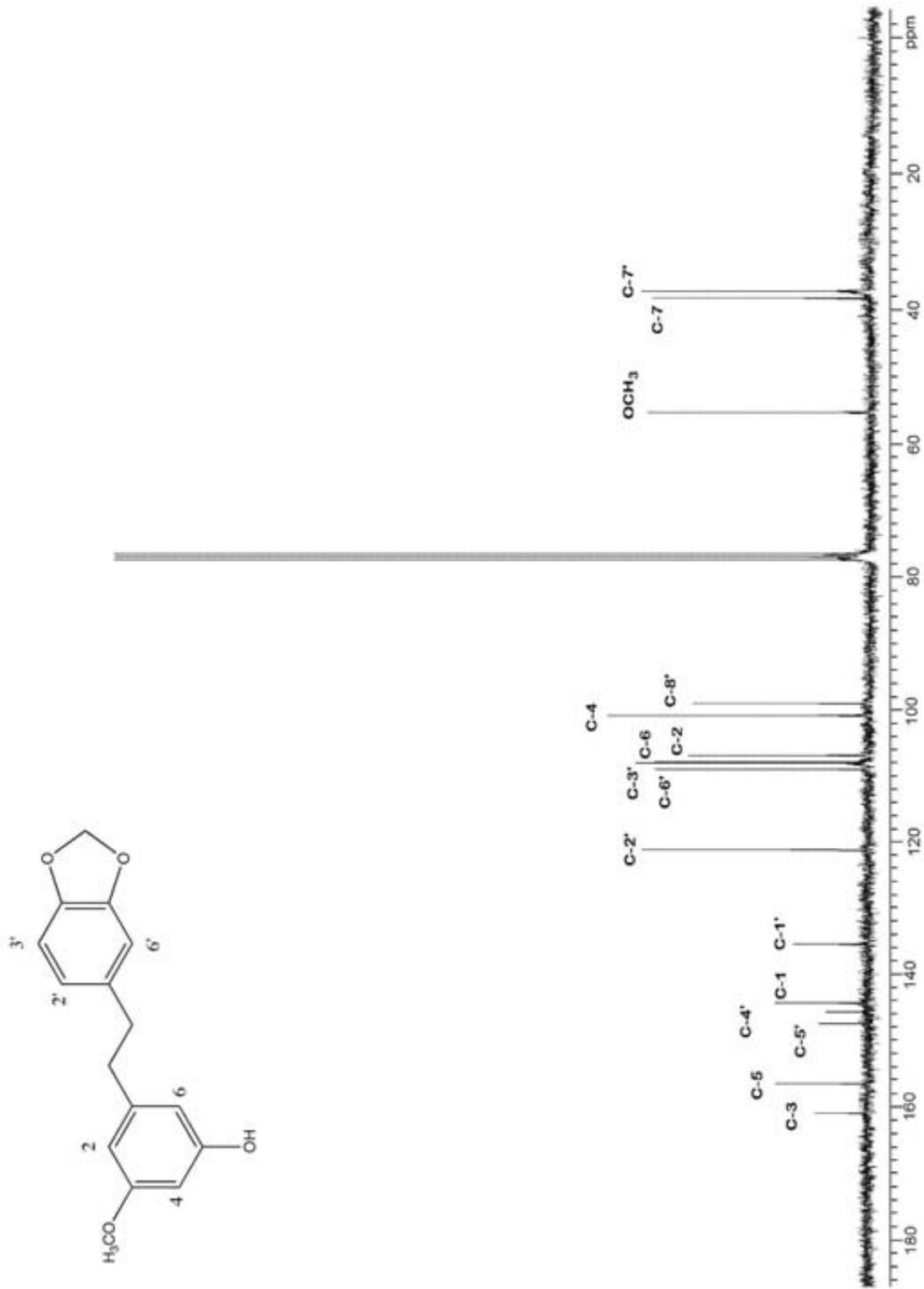
**Espectro 15.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 3', 4'-dioximetilen-3-hidroxi bibencilo (61)



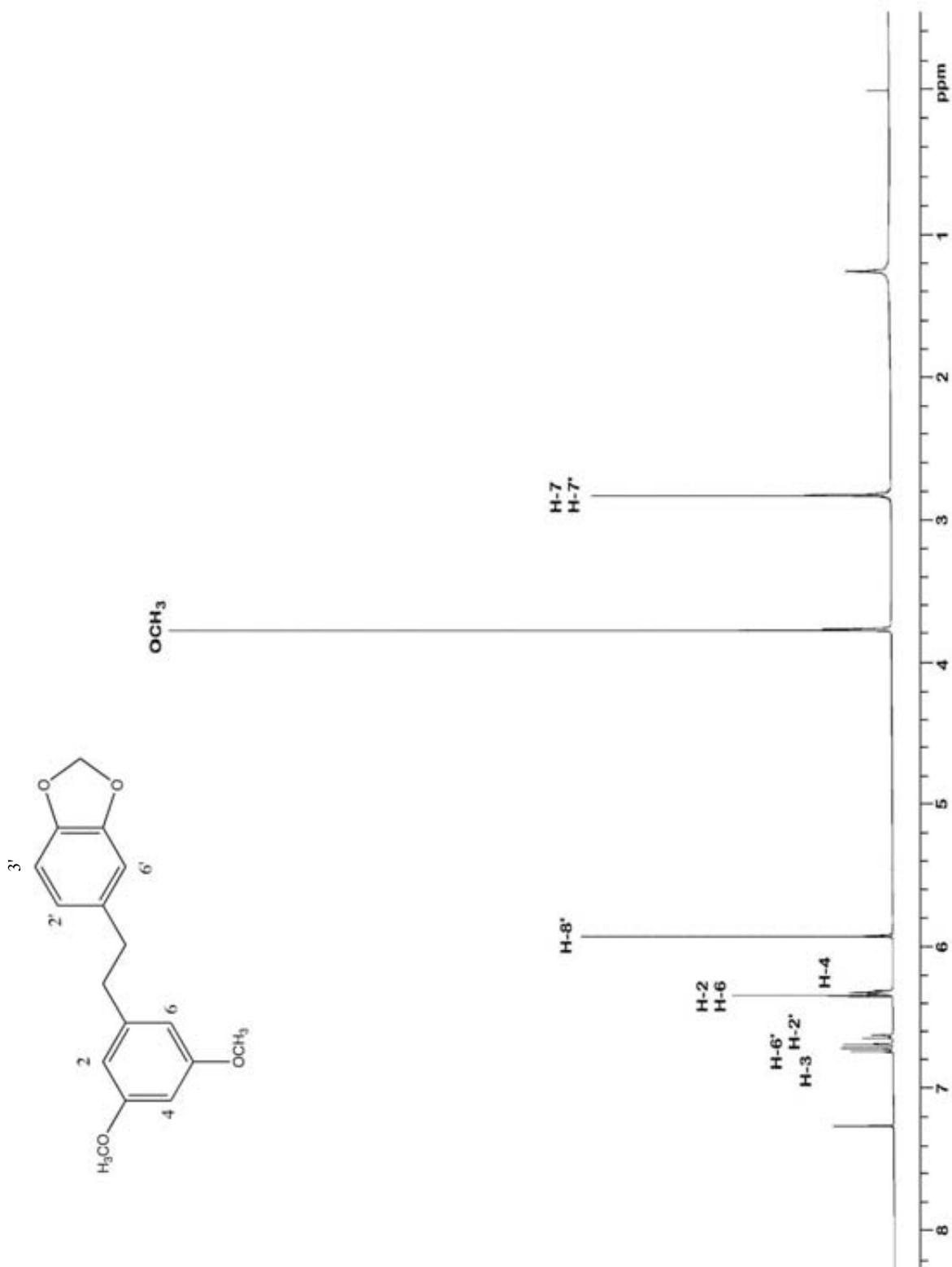
**Espectro 16.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3', 4'-dioximetil-3-hidroxi bibencilo (61)



**Espectro 17.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 3',4'-dioximetilen-3-hidroxi-5-metoxibibencilo (62)

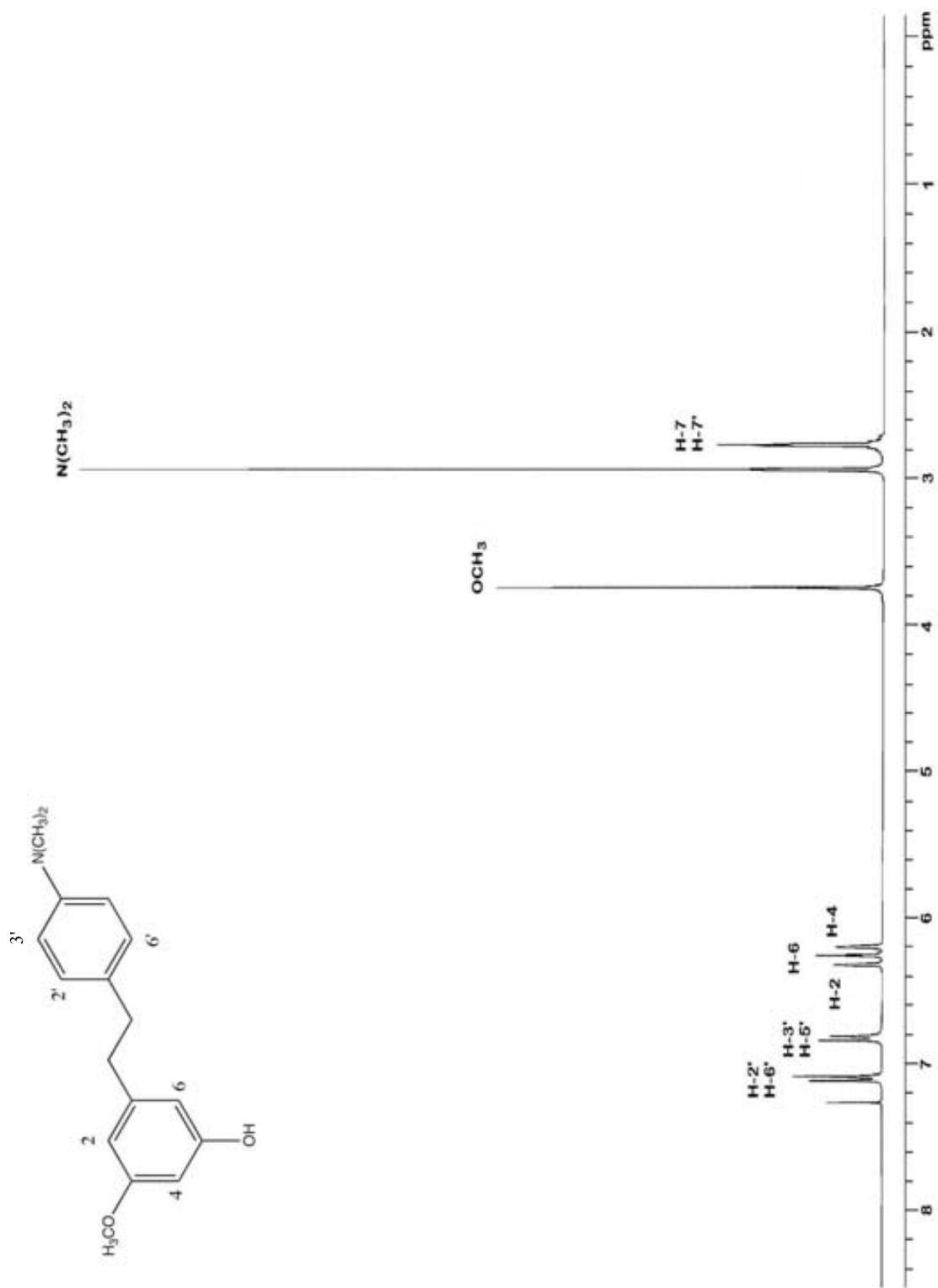


**Espectro 18.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3',4'-dioximetilen-3-hidroxi-5-metoxibencilo (62)

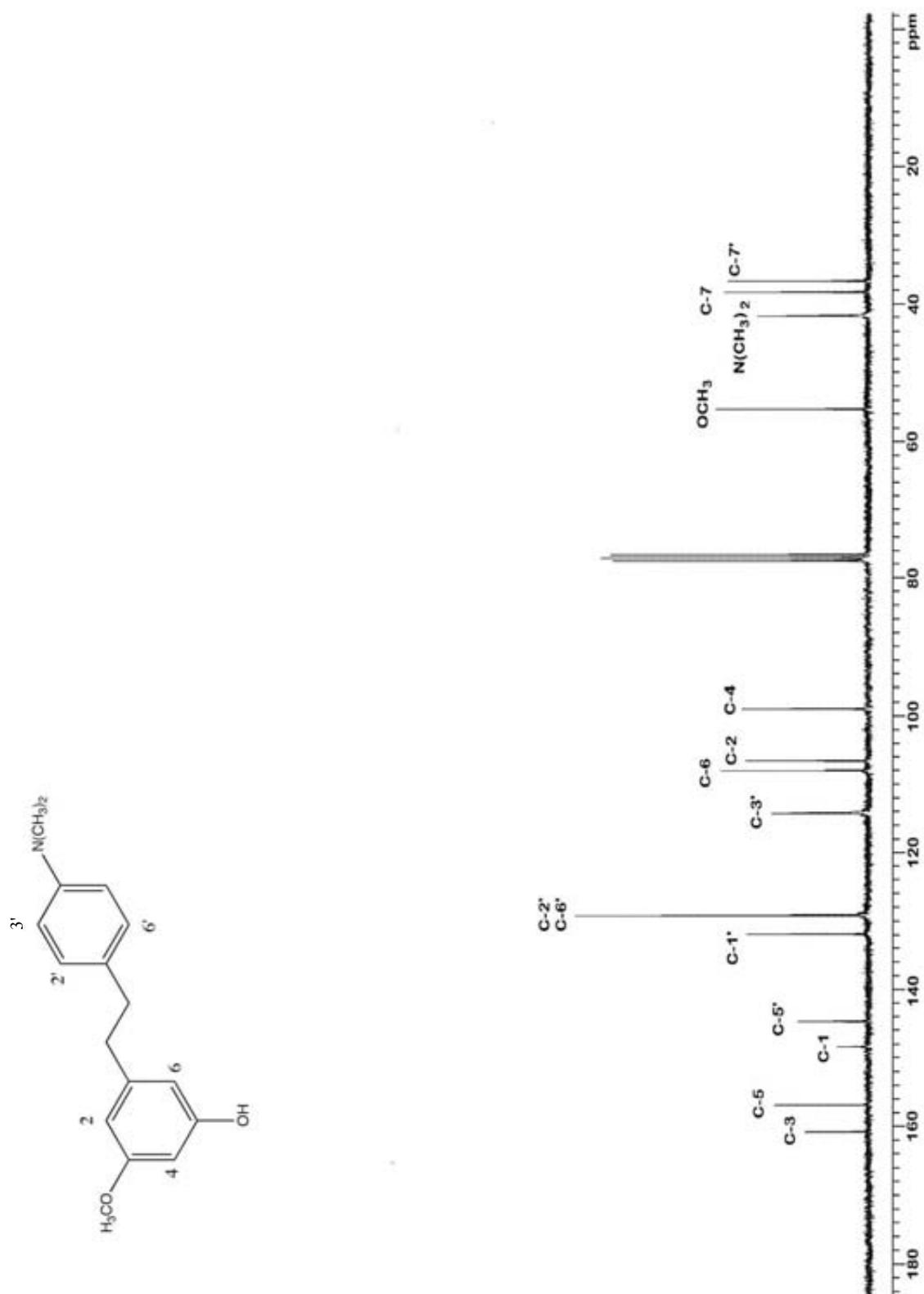


**Espectro 19.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 3,5-dimetoxi-3',4'-dioximetilbibencilo (63)

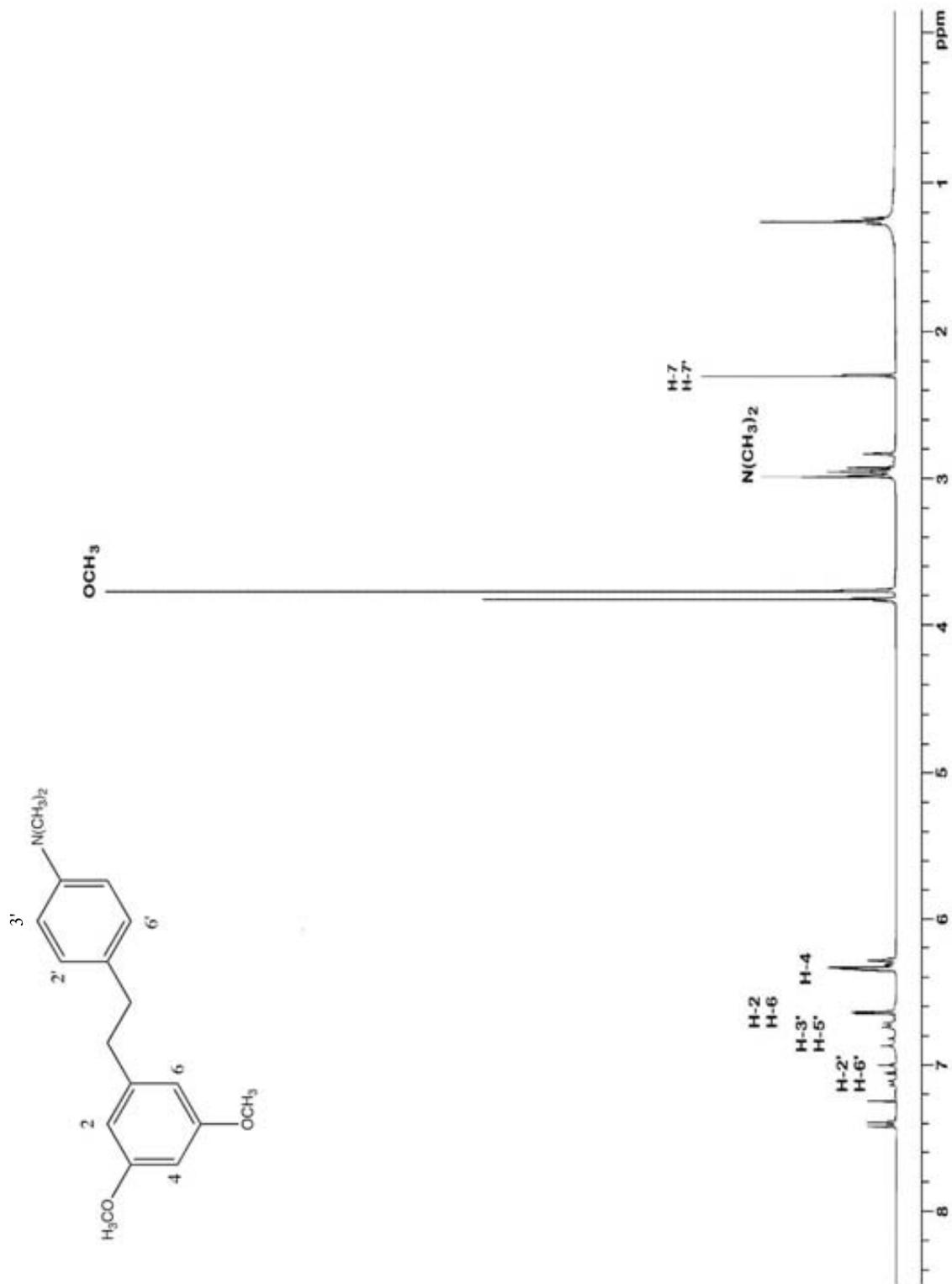




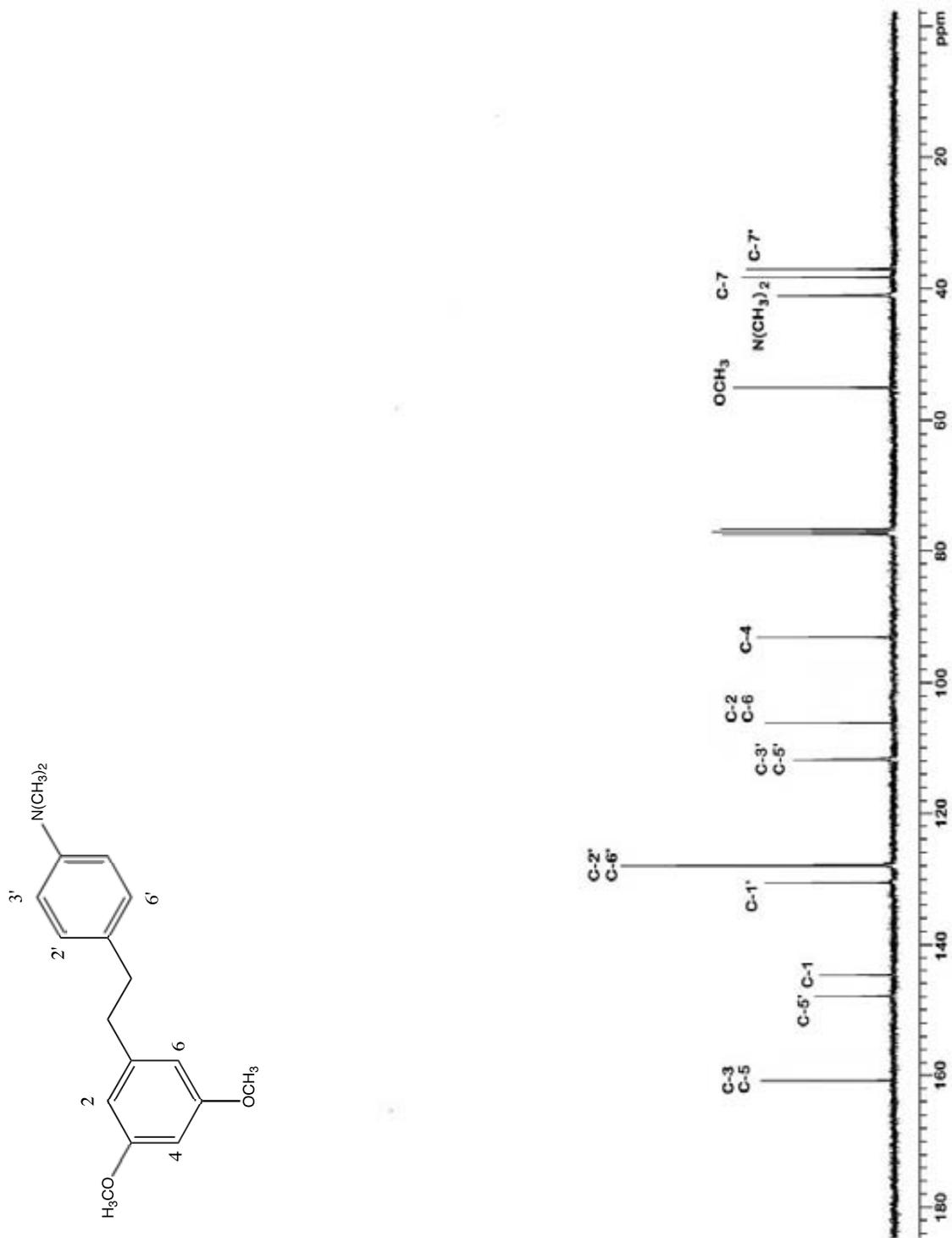
**Espectro 21.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 4'-dimetilamino-3-hidroxi-5-metoxibipencilo (64)



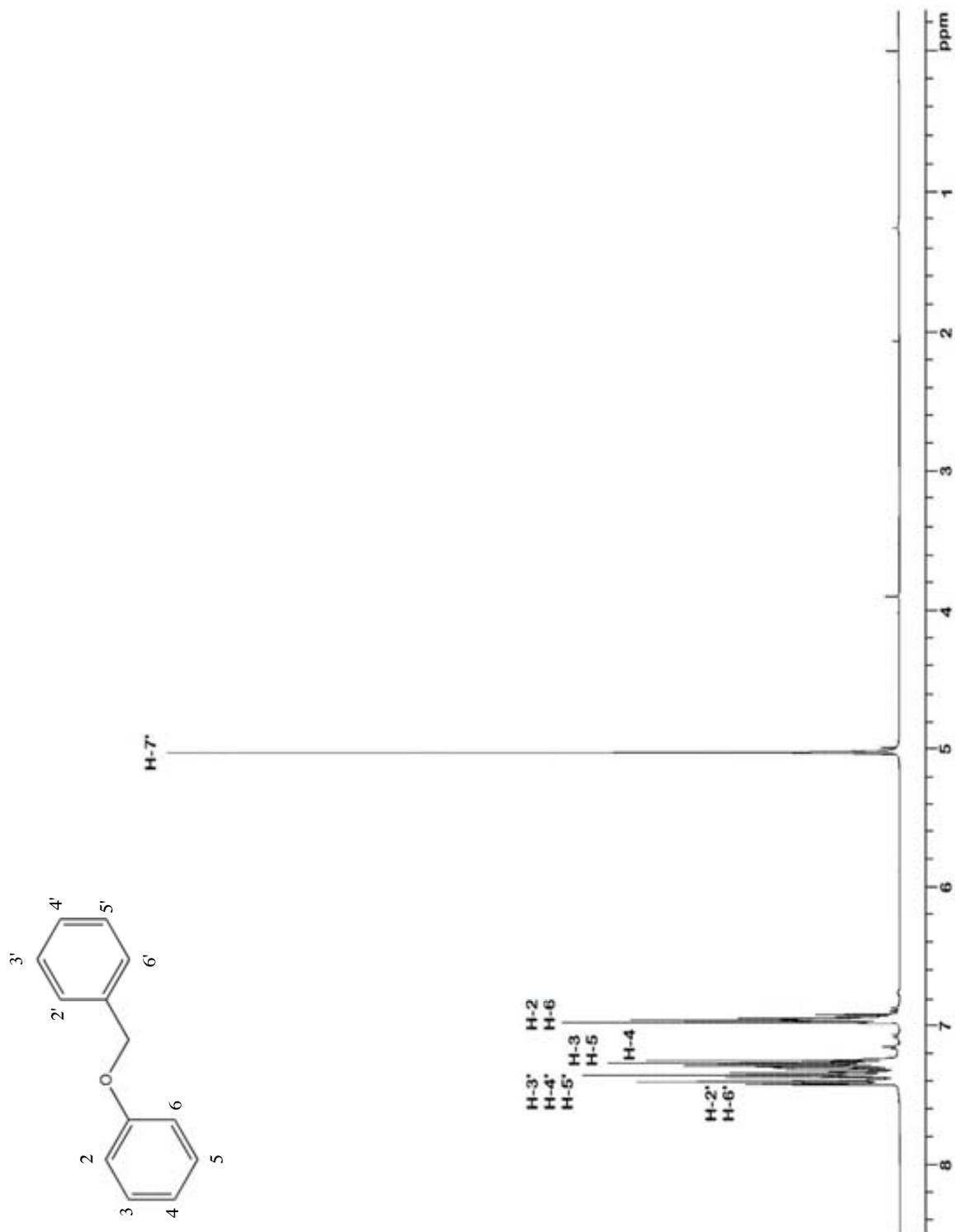
**Espectro 22.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 4'-dimetilamino-3-hidroxi-5-metoxibencilo (64)



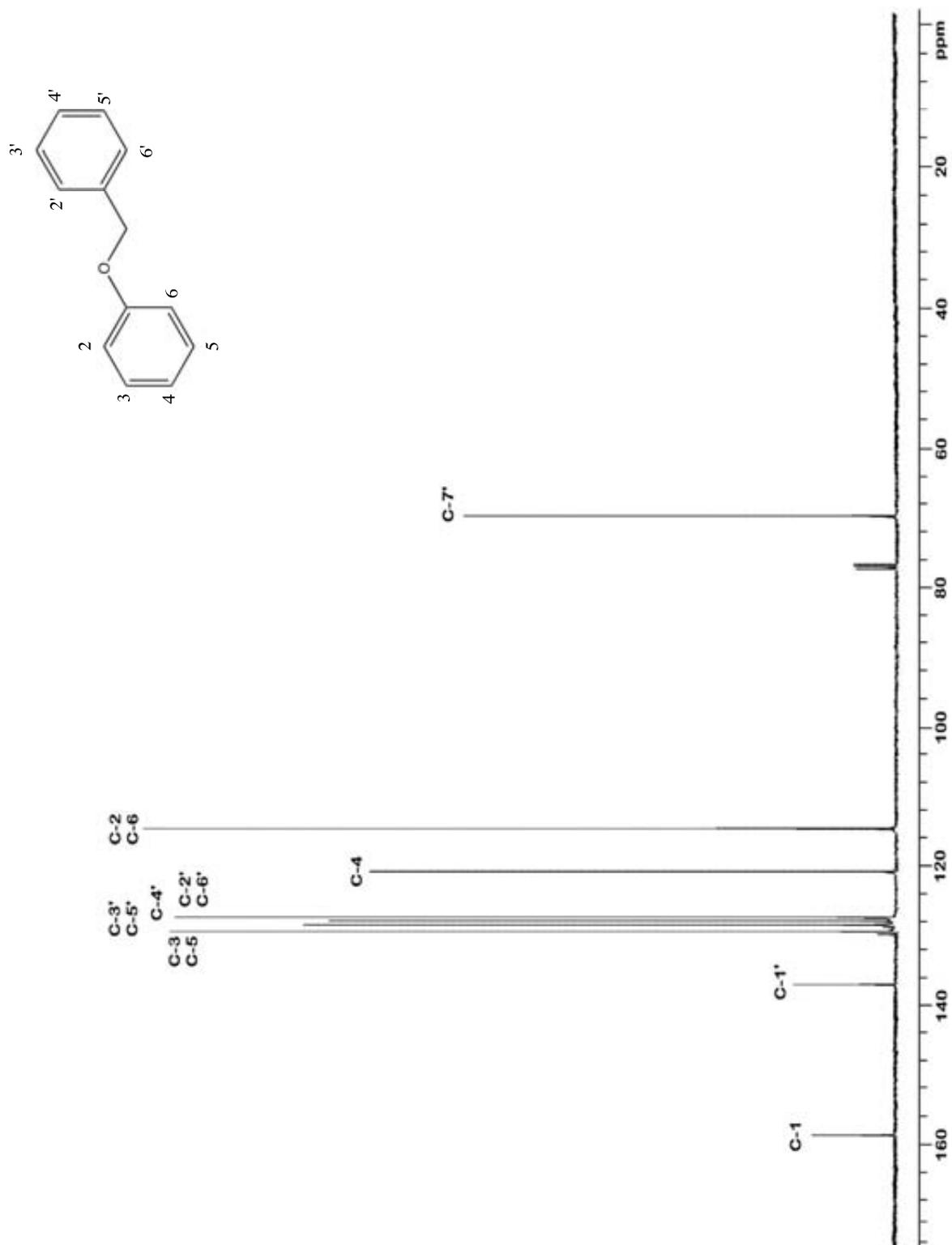
**Espectro 23.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 4'-dimetilamino-3,5-dimetoxibipencilo (65)



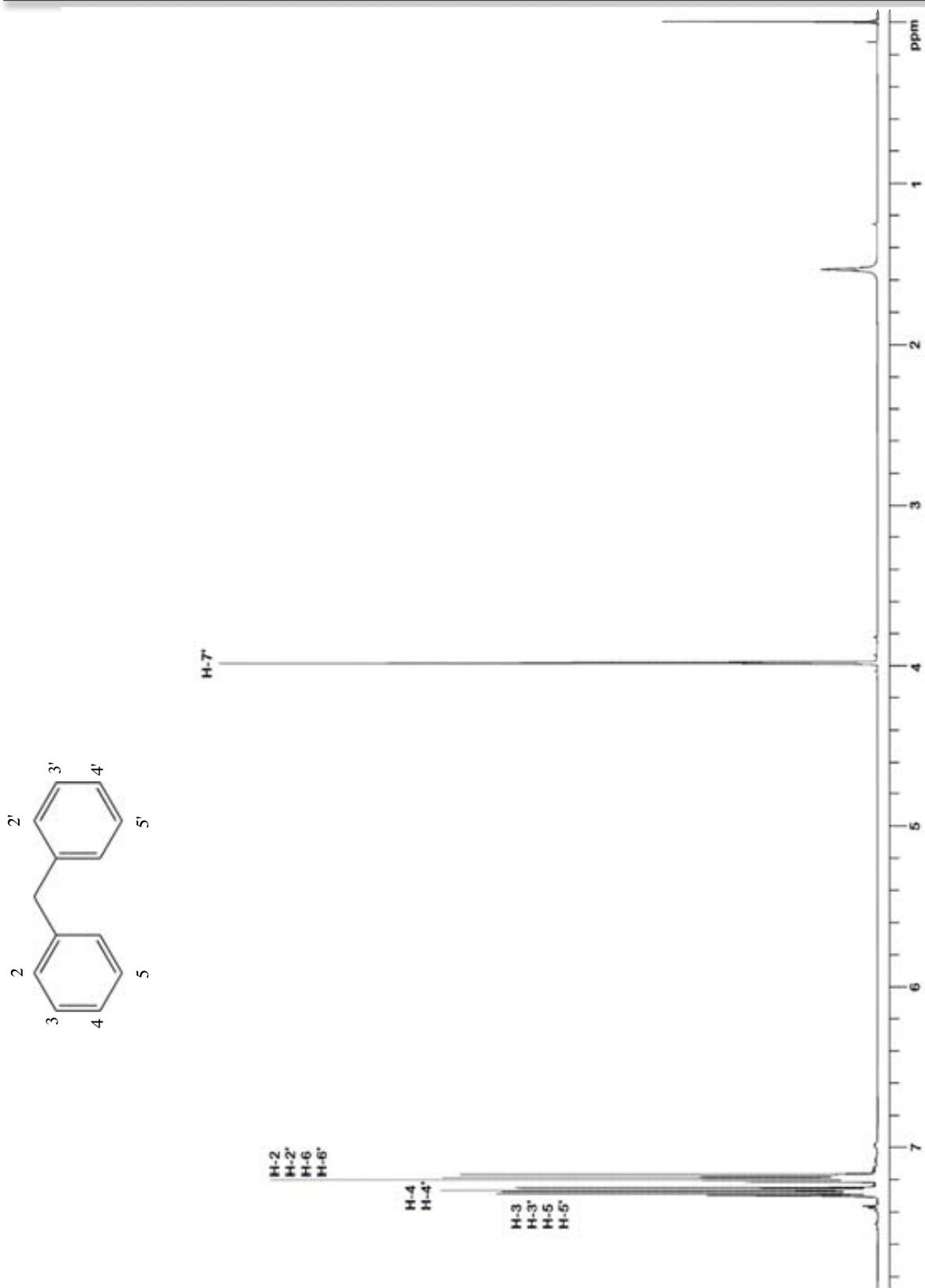
**Espectro 24.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 4'-dimetilamino-3,5-dimetoxibencilo (65)



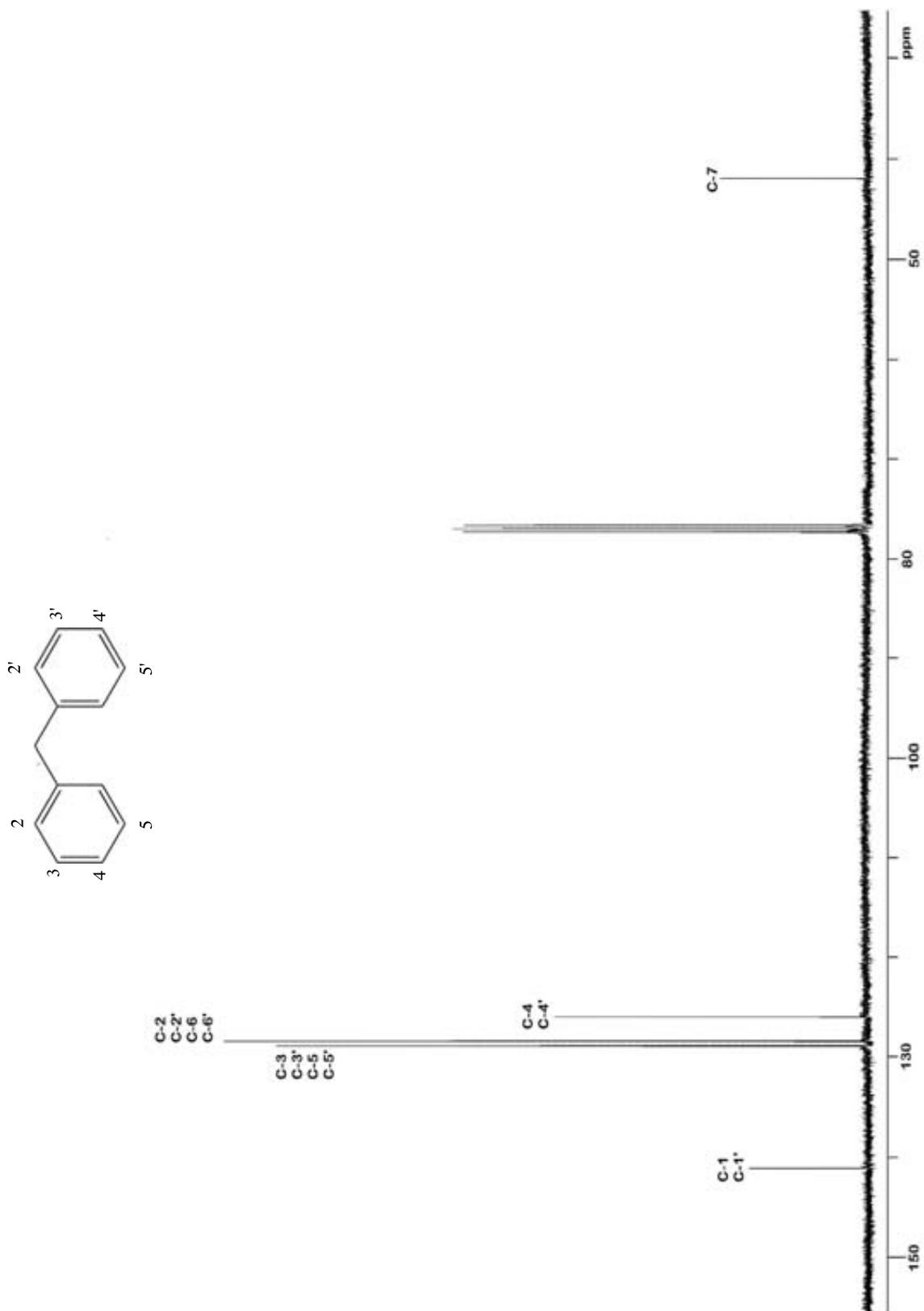
**Espectro 25.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del benciloxibenceno (66)



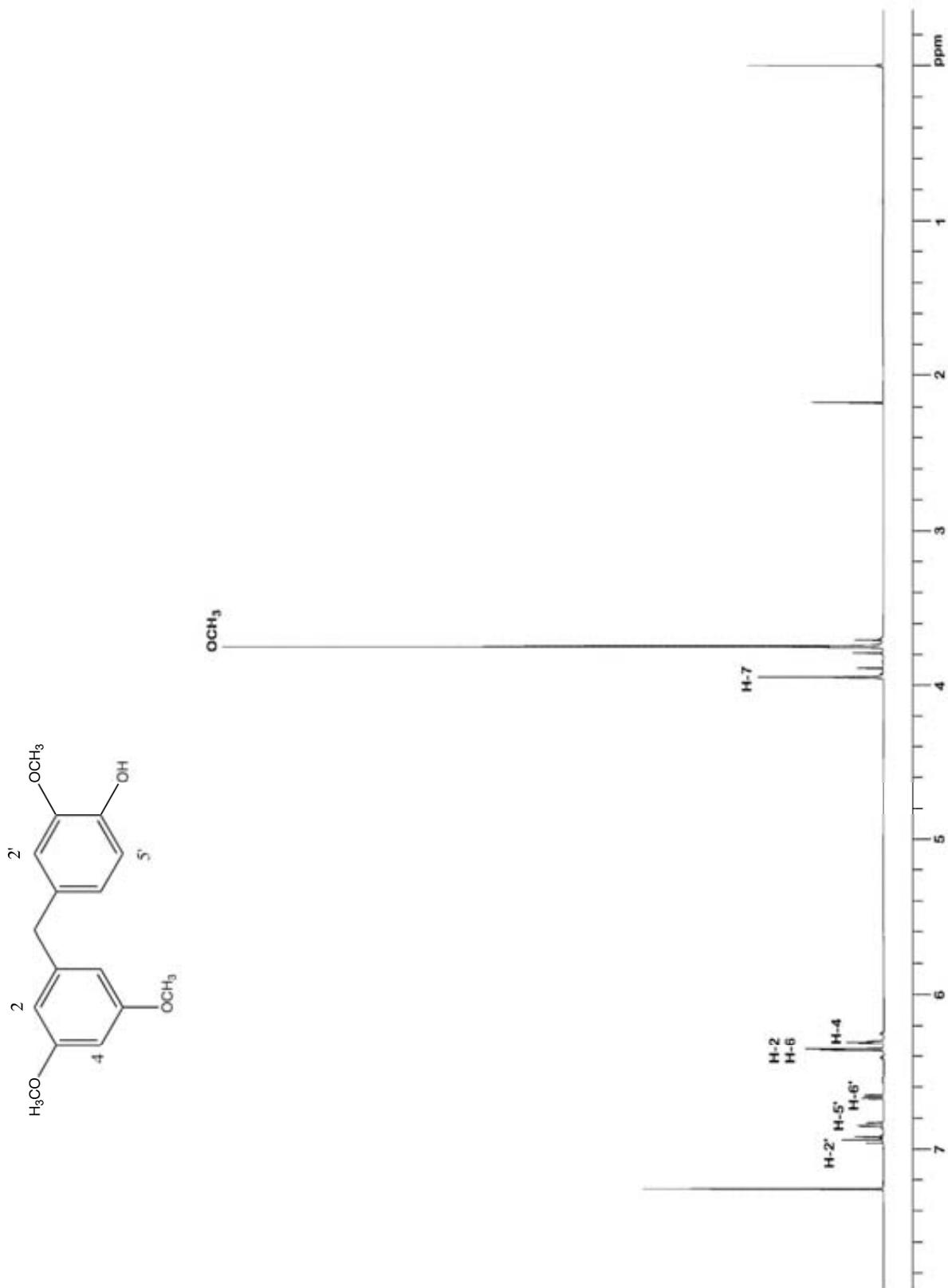
**Espectro 26.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del benciloxibenceno (66)



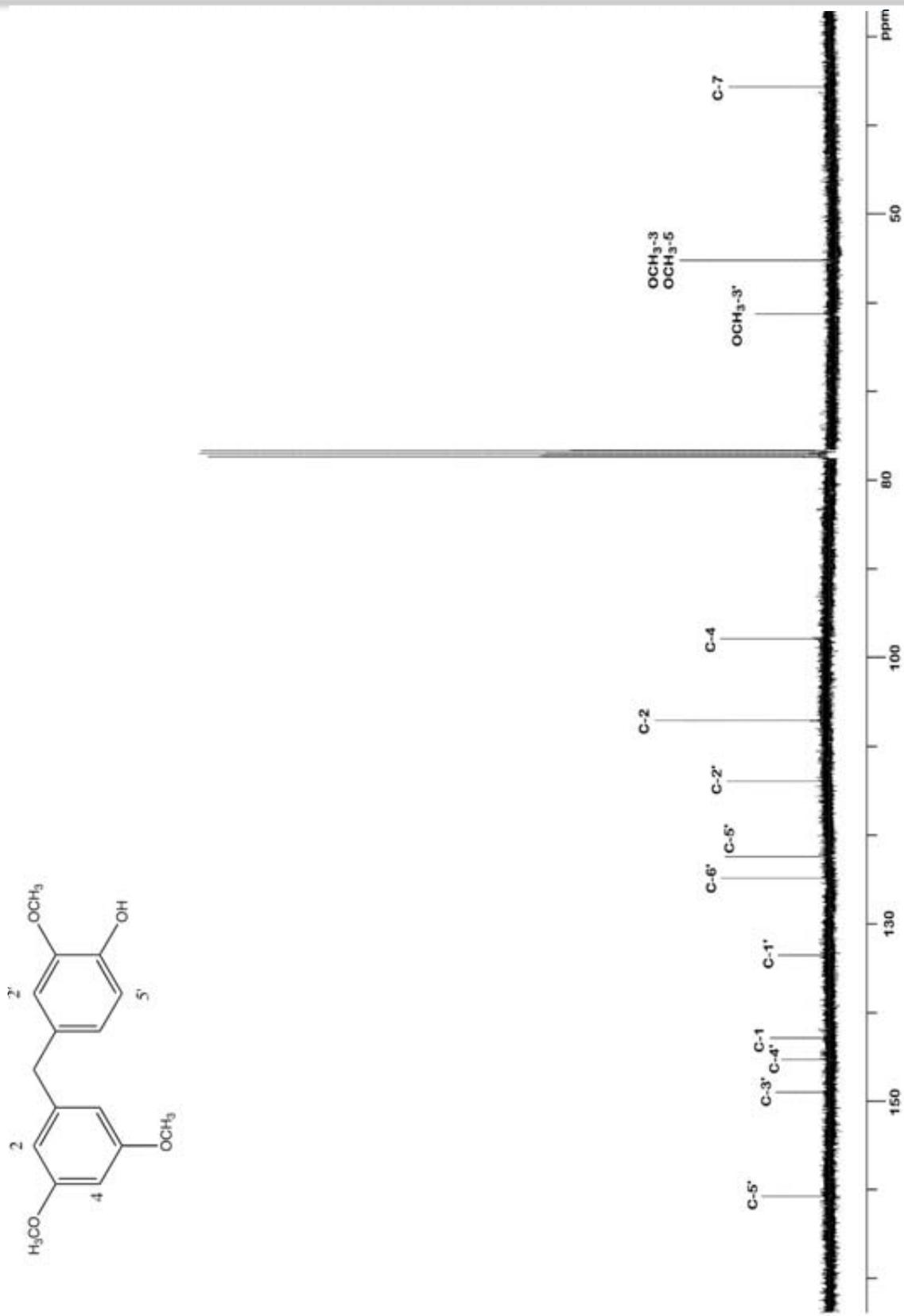
**Espectro 27.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del difenilmetano (67)



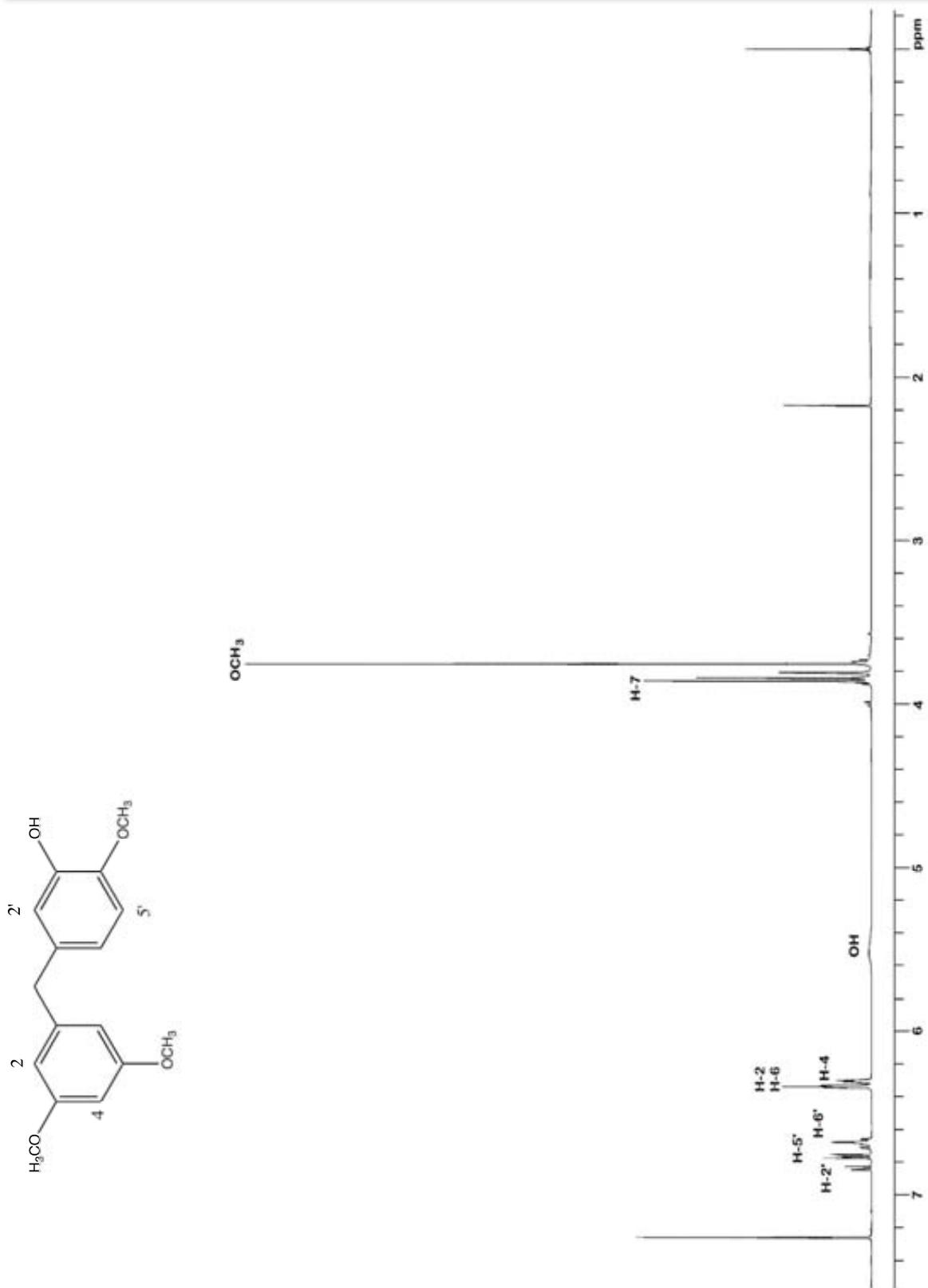
**Espectro 28.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del difenilmetano (67)



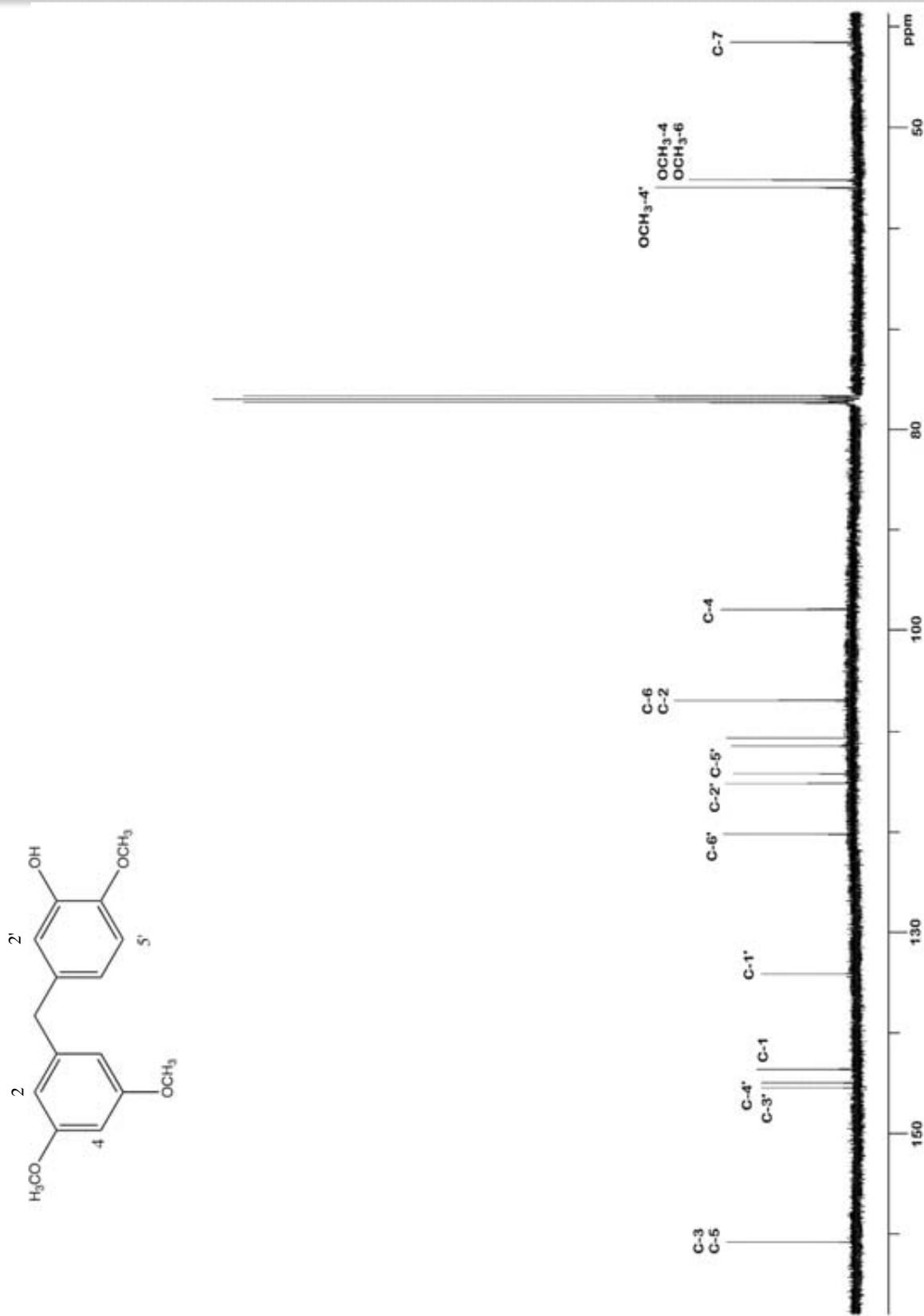
**Espectro 29.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 4-(3,5-dimetoxibencil)-2-metoxifenol (68)



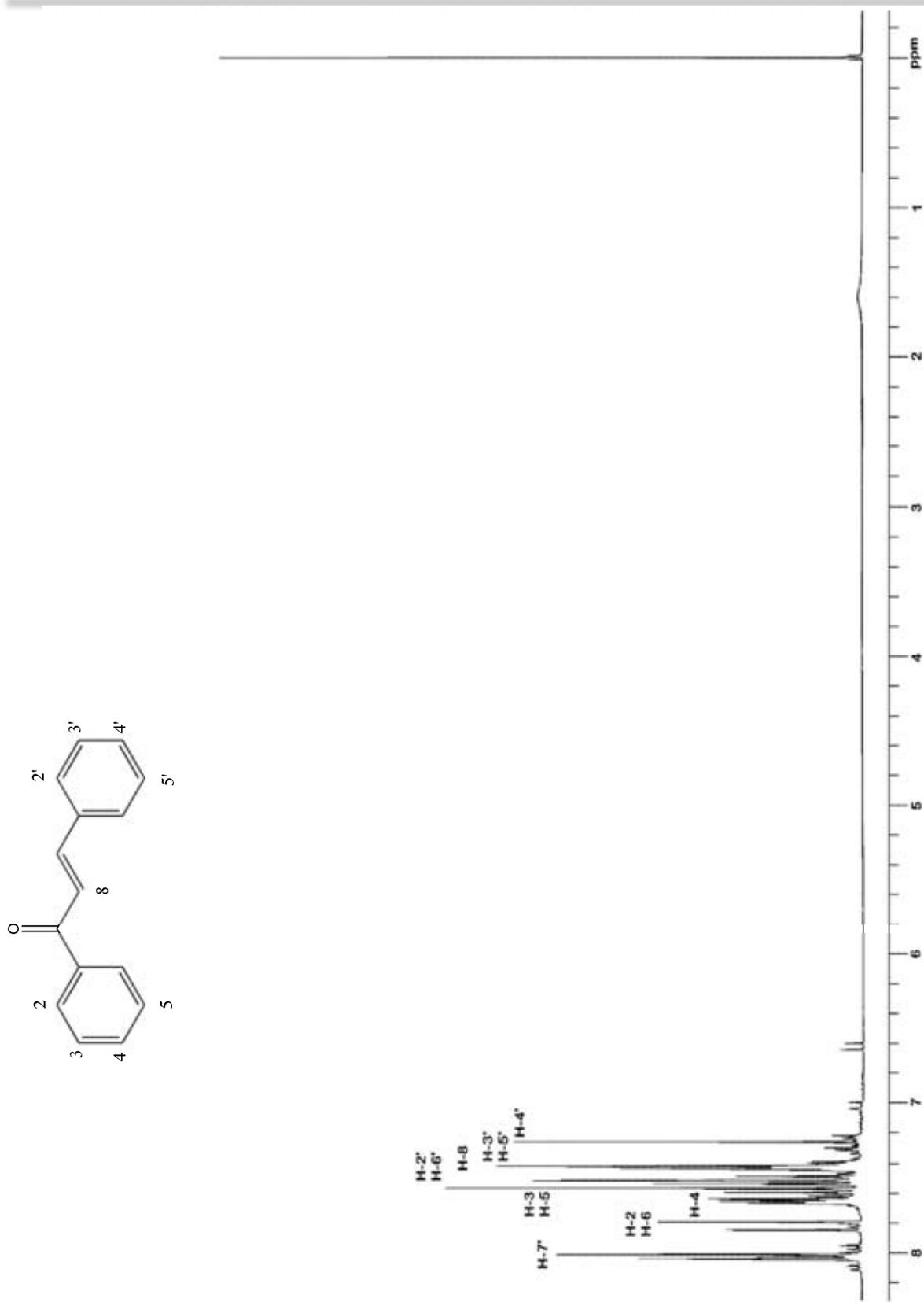
**Espectro 30.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 4-(3,5-dimetoxibencil)-2-metoxifenol (68)



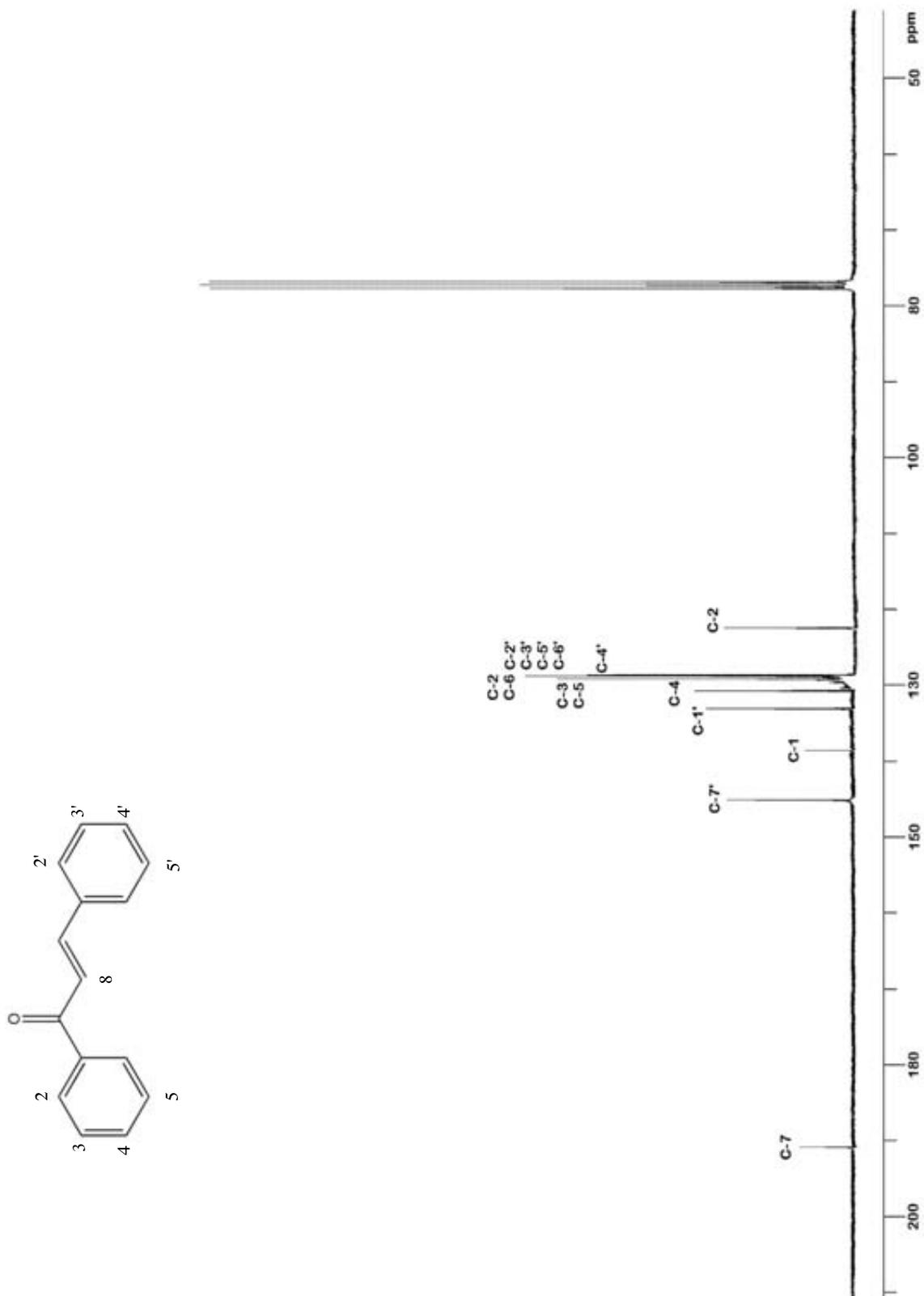
**Espectro 31.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 5-(3,5-dimetoxibencil)-2-metoxifenol (**69**)



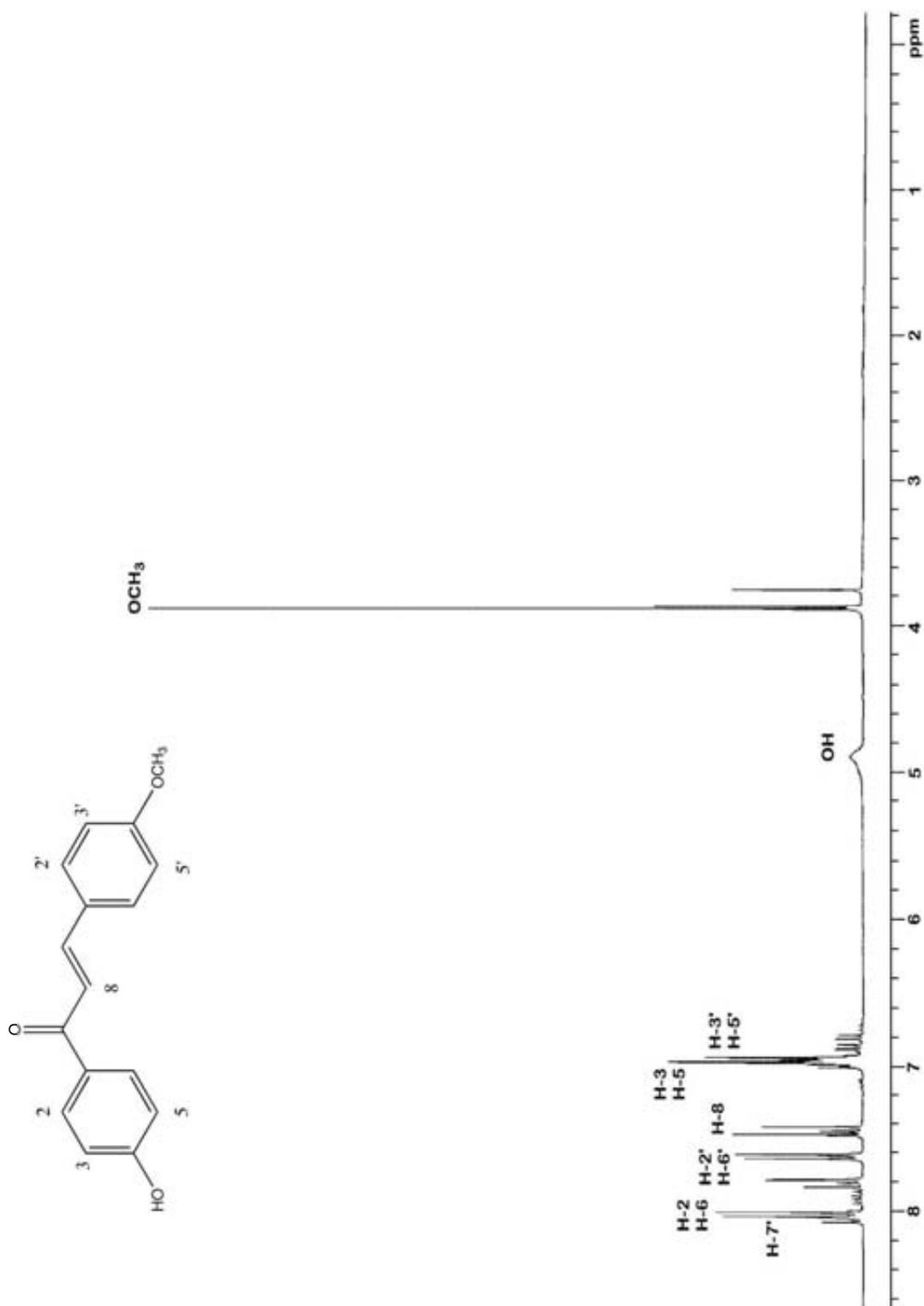
**Espectro 32.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 5-(3,5-dimetoxibencil)-2-metoxifenol (69)



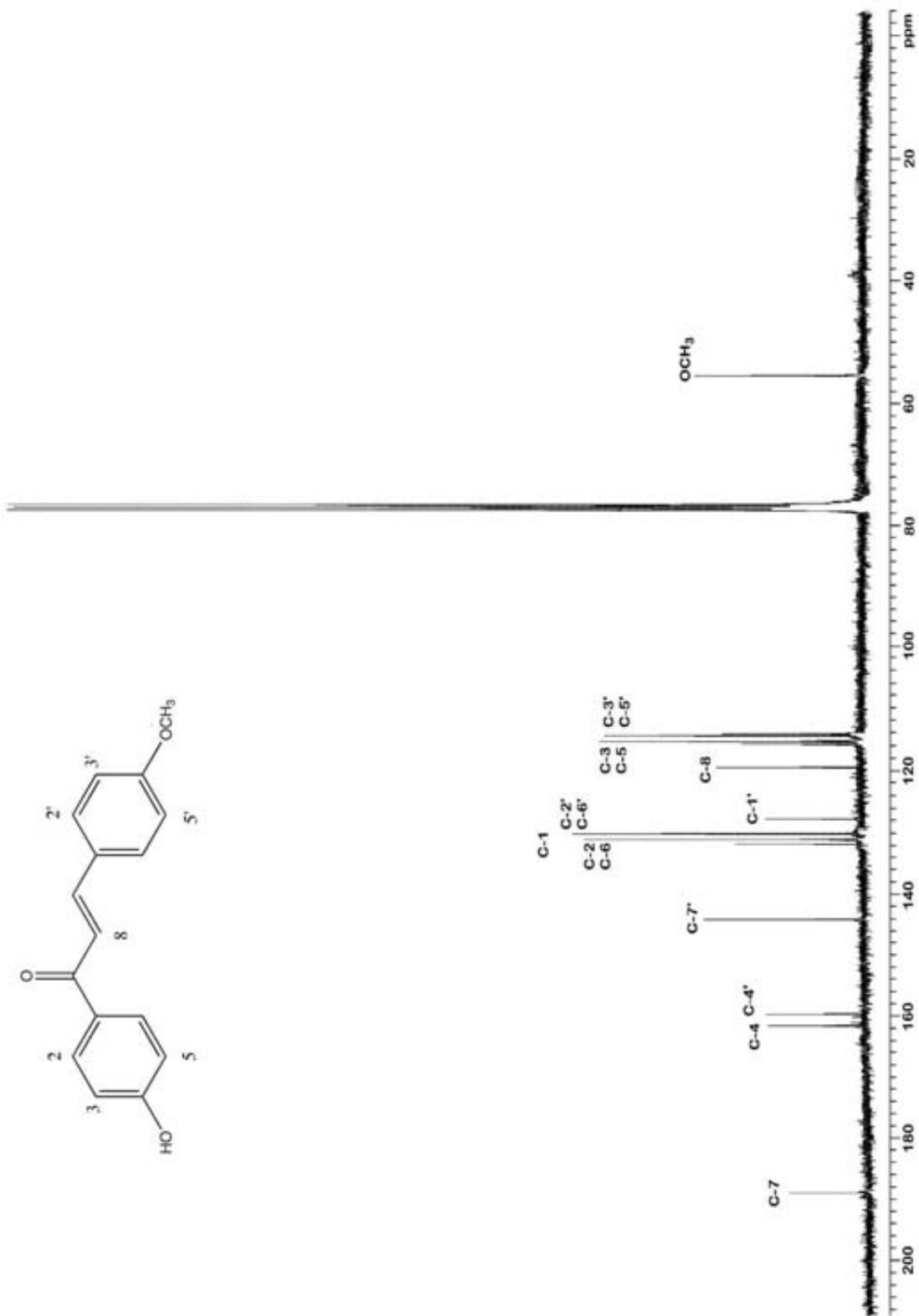
**Espectro 33.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de la chalcona (70)



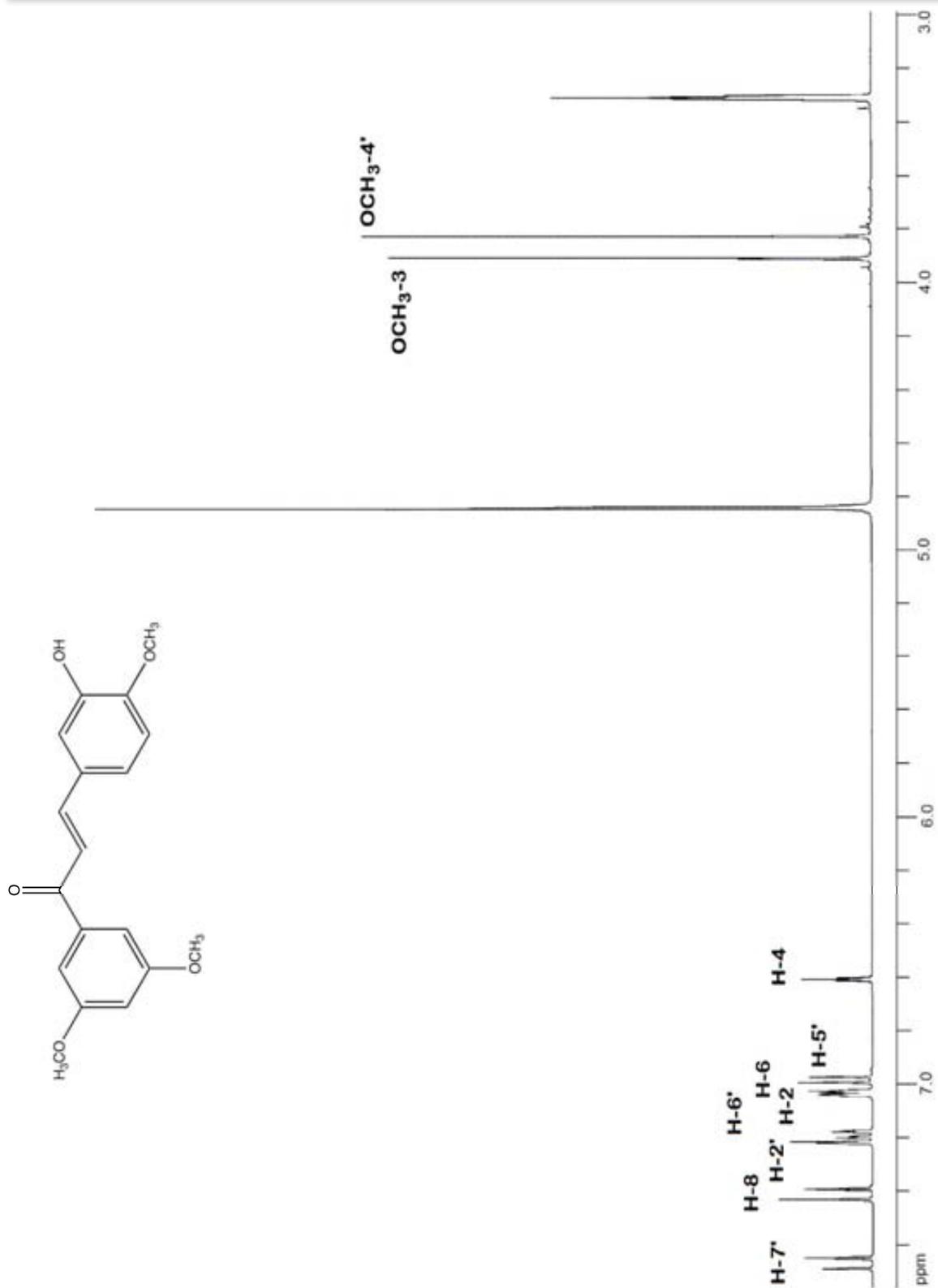
**Espectro 34.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la chalcona (70)



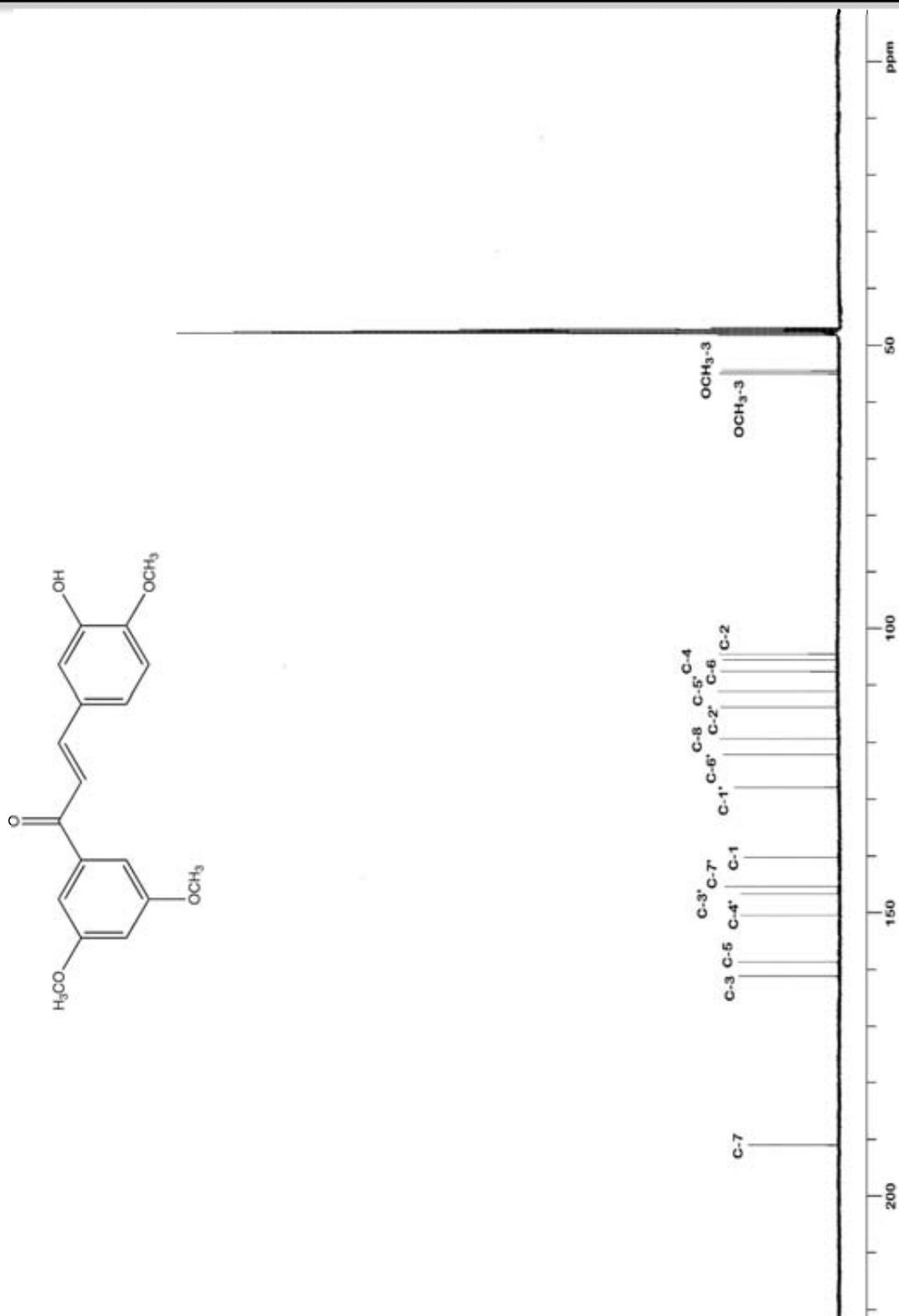
**Espectro 35.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del (*E*)-1-(4-hidroxi fenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (71)



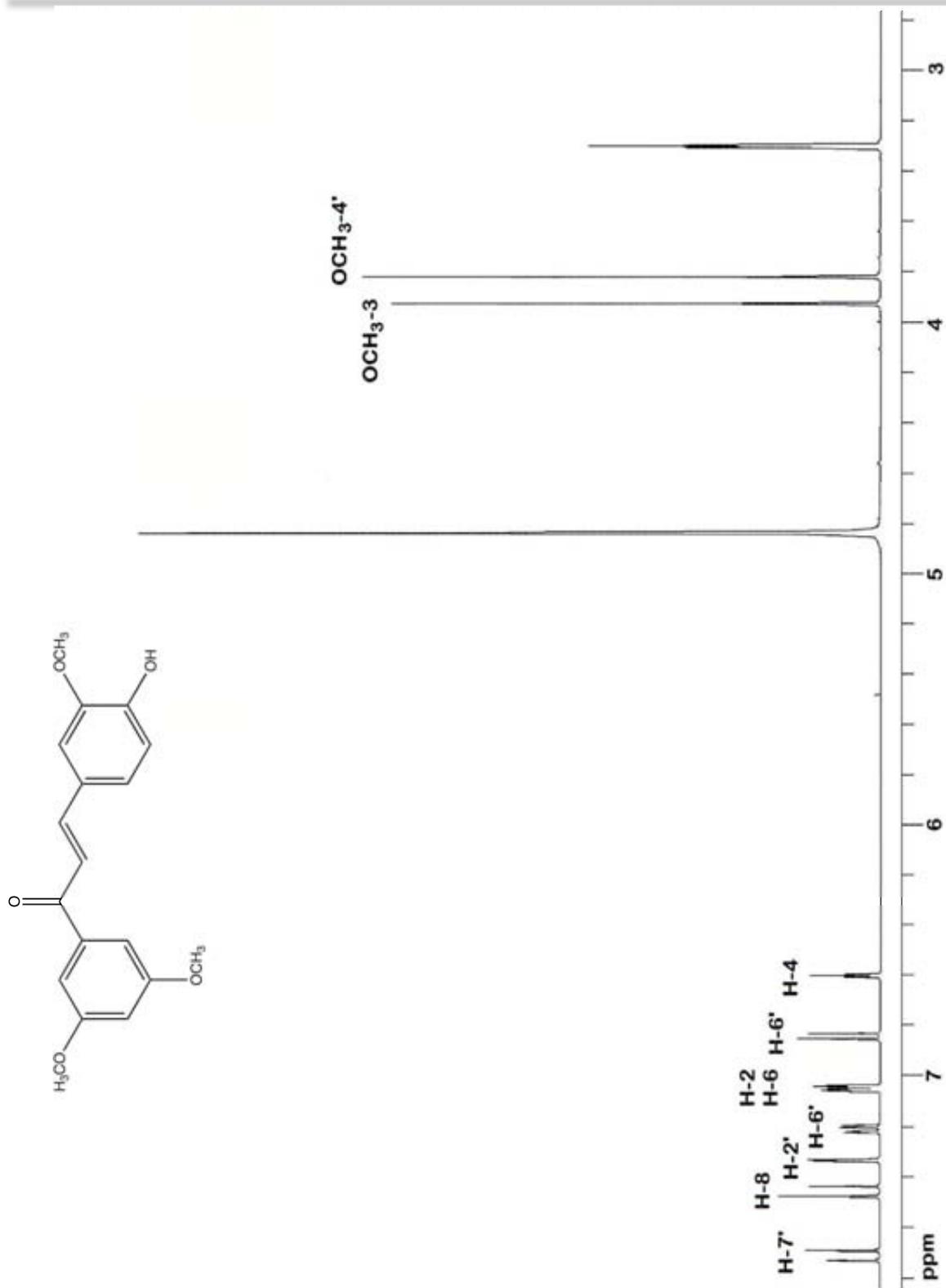
**Espectro 36.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del (*E*)-1-(4-hidroxi fenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (71)



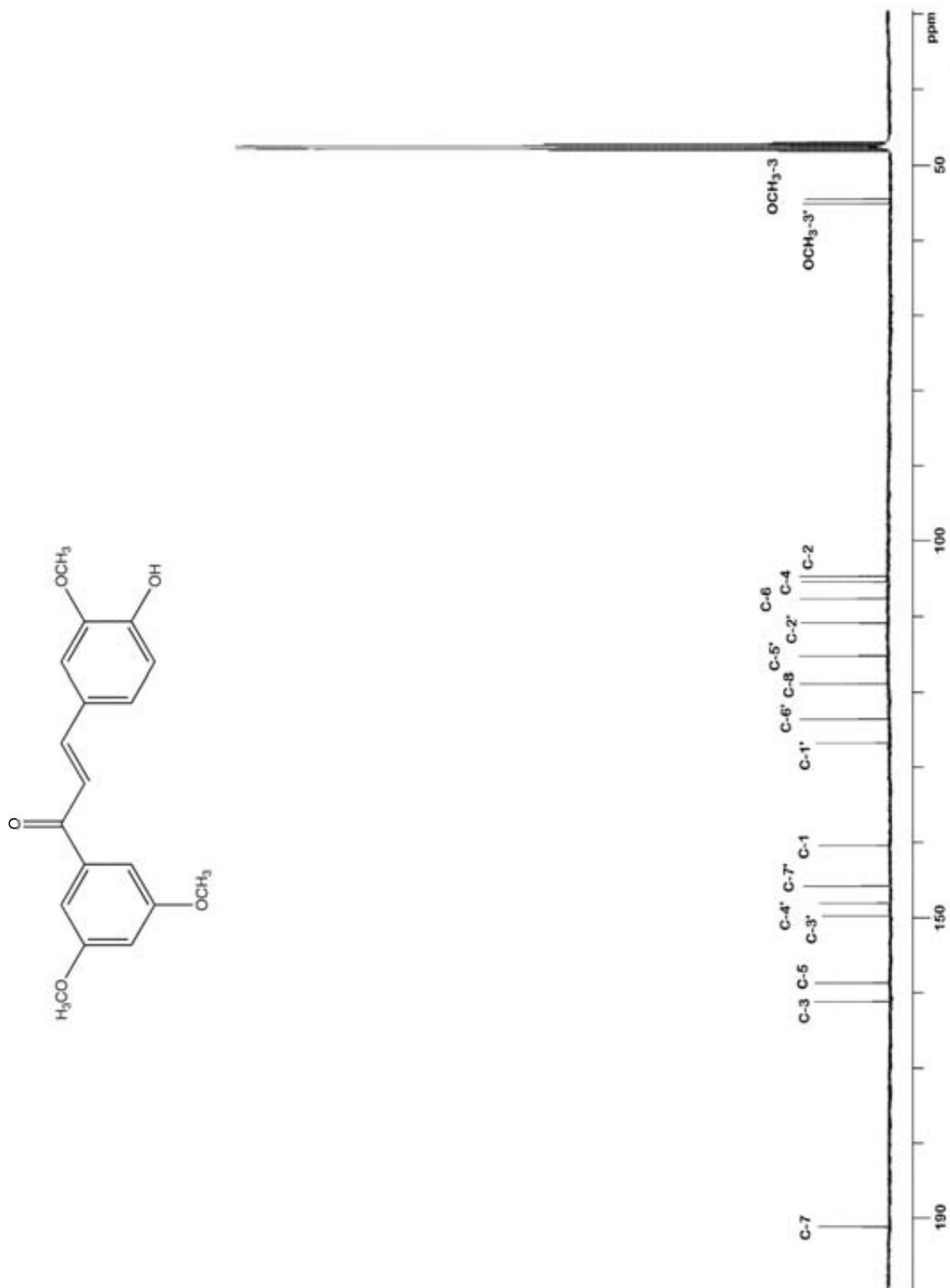
**Espectro 37.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del (*E*)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-1-(3-hidroxi-5-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (72)



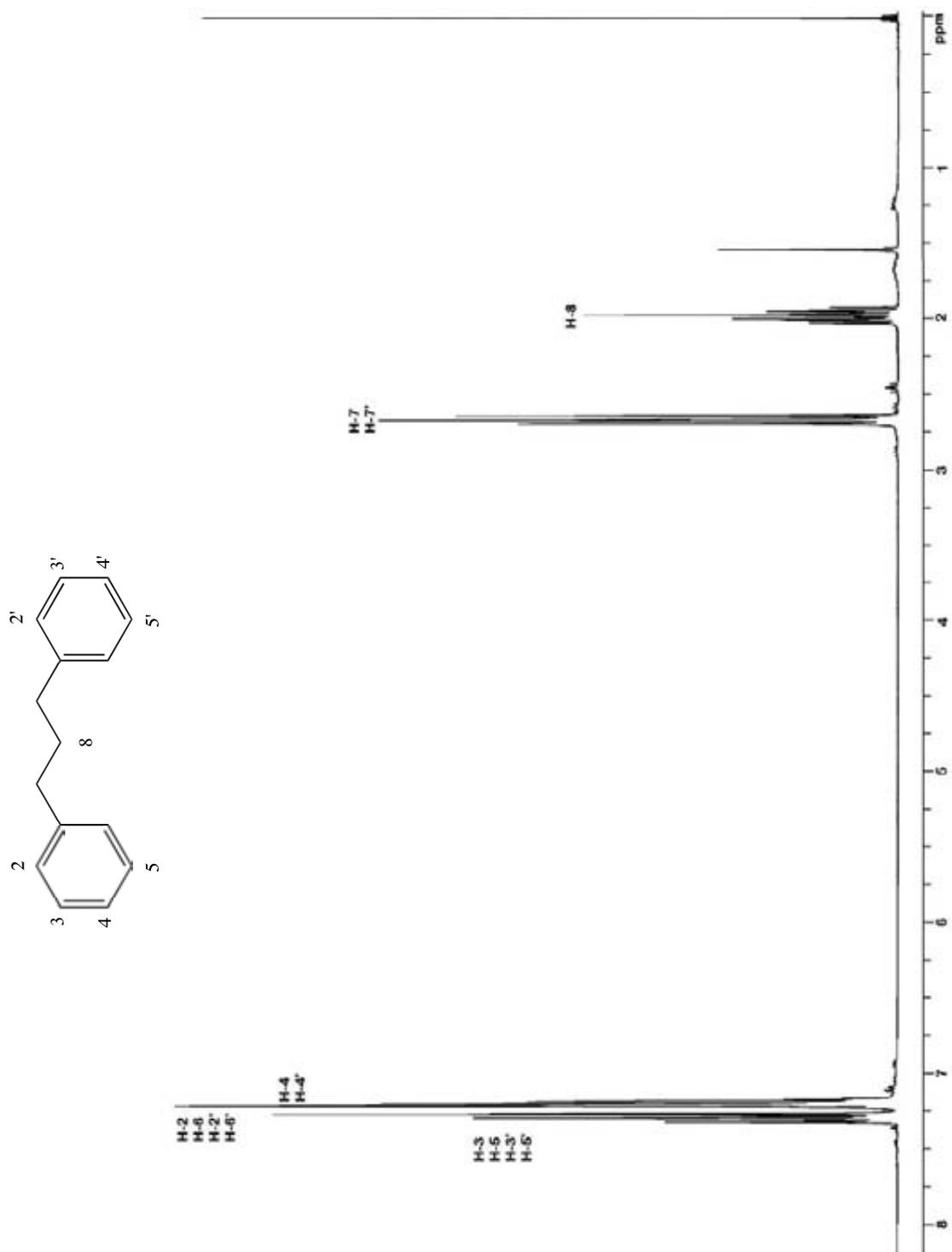
**Espectro 38.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del (*E*)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-1-(3-hidroxi-5-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (72)



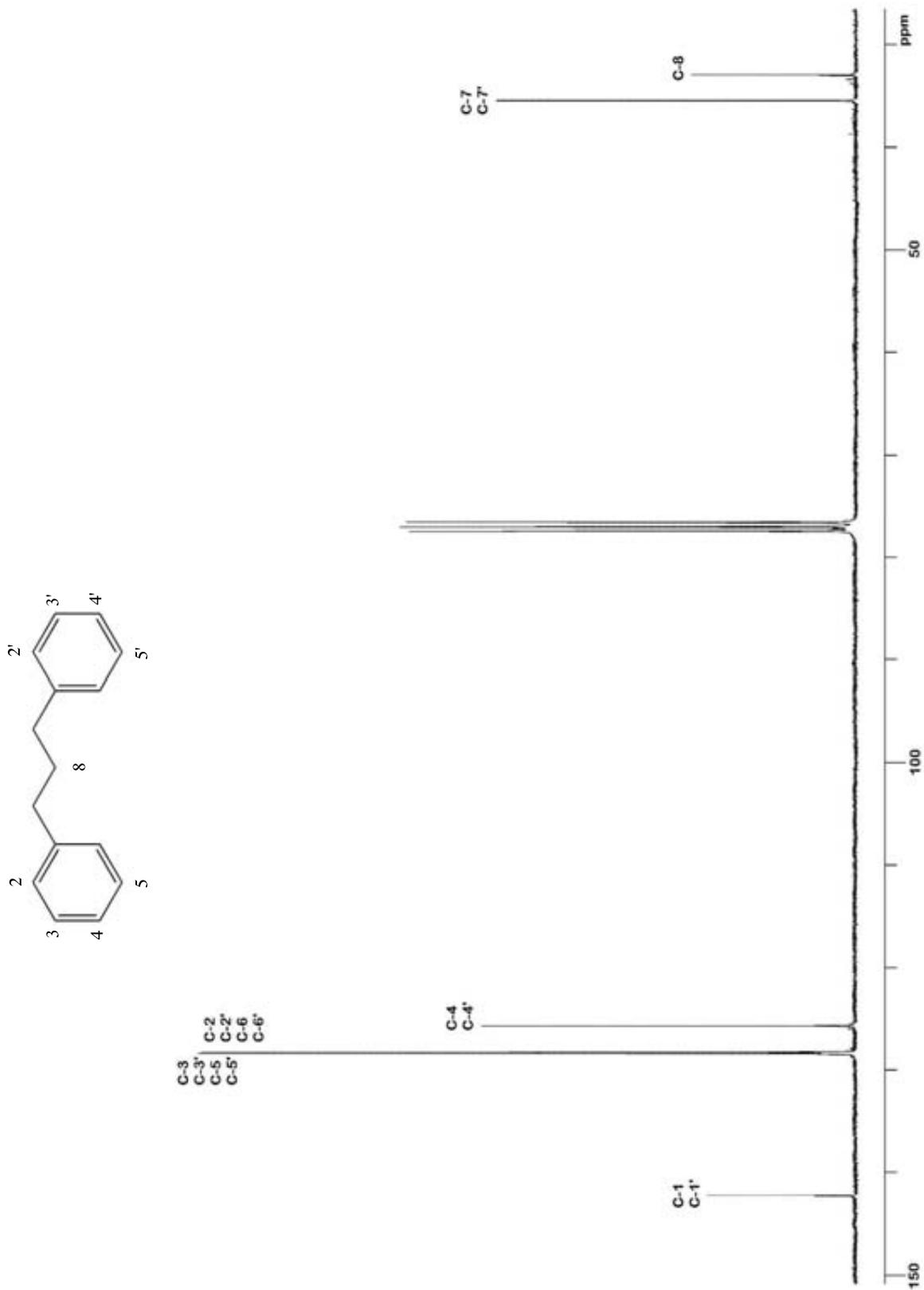
**Espectro 39.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-(3-hidroxi-5-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (73)



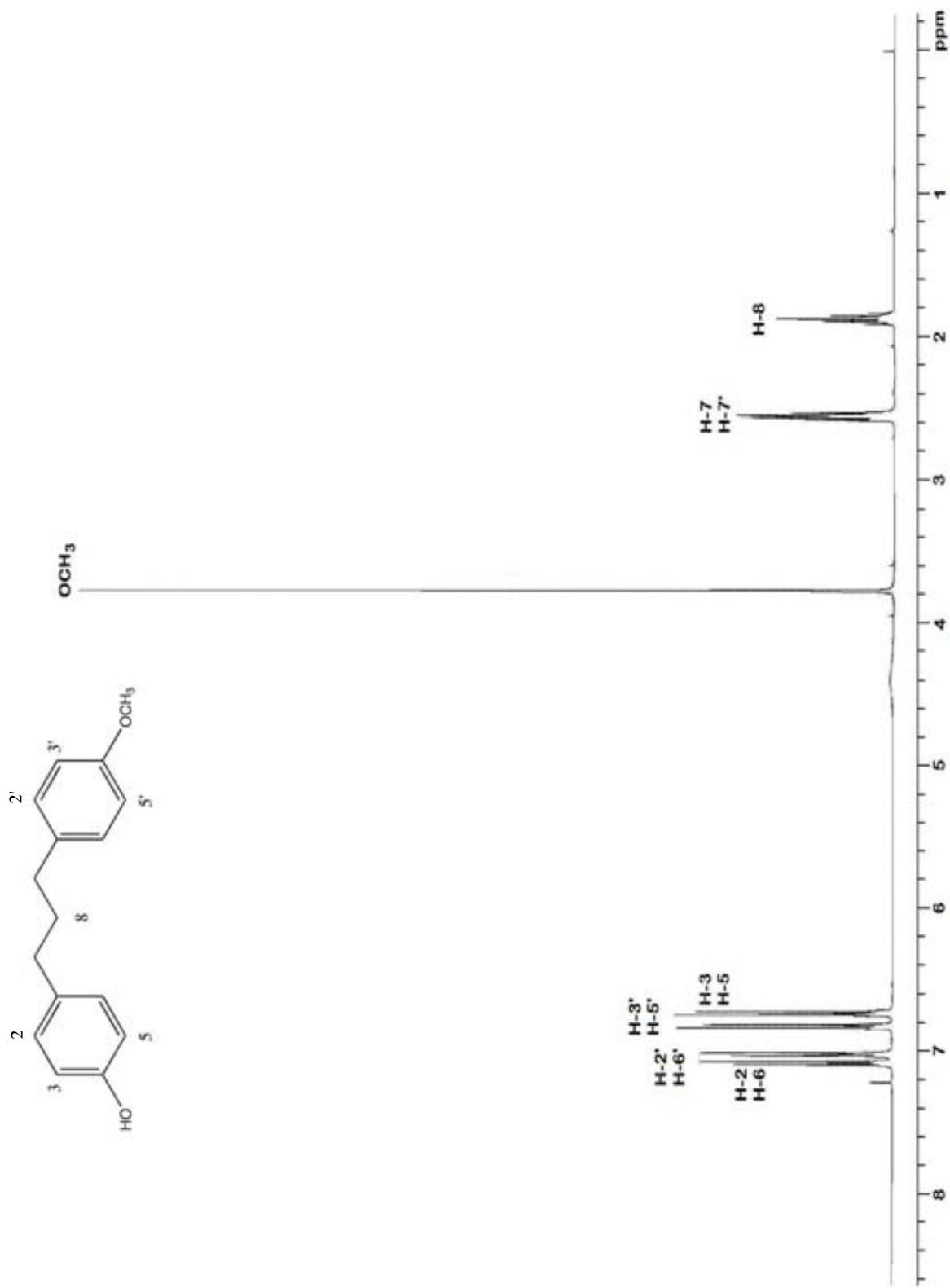
**Espectro 40.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-(3-hidroxi-5-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (73)



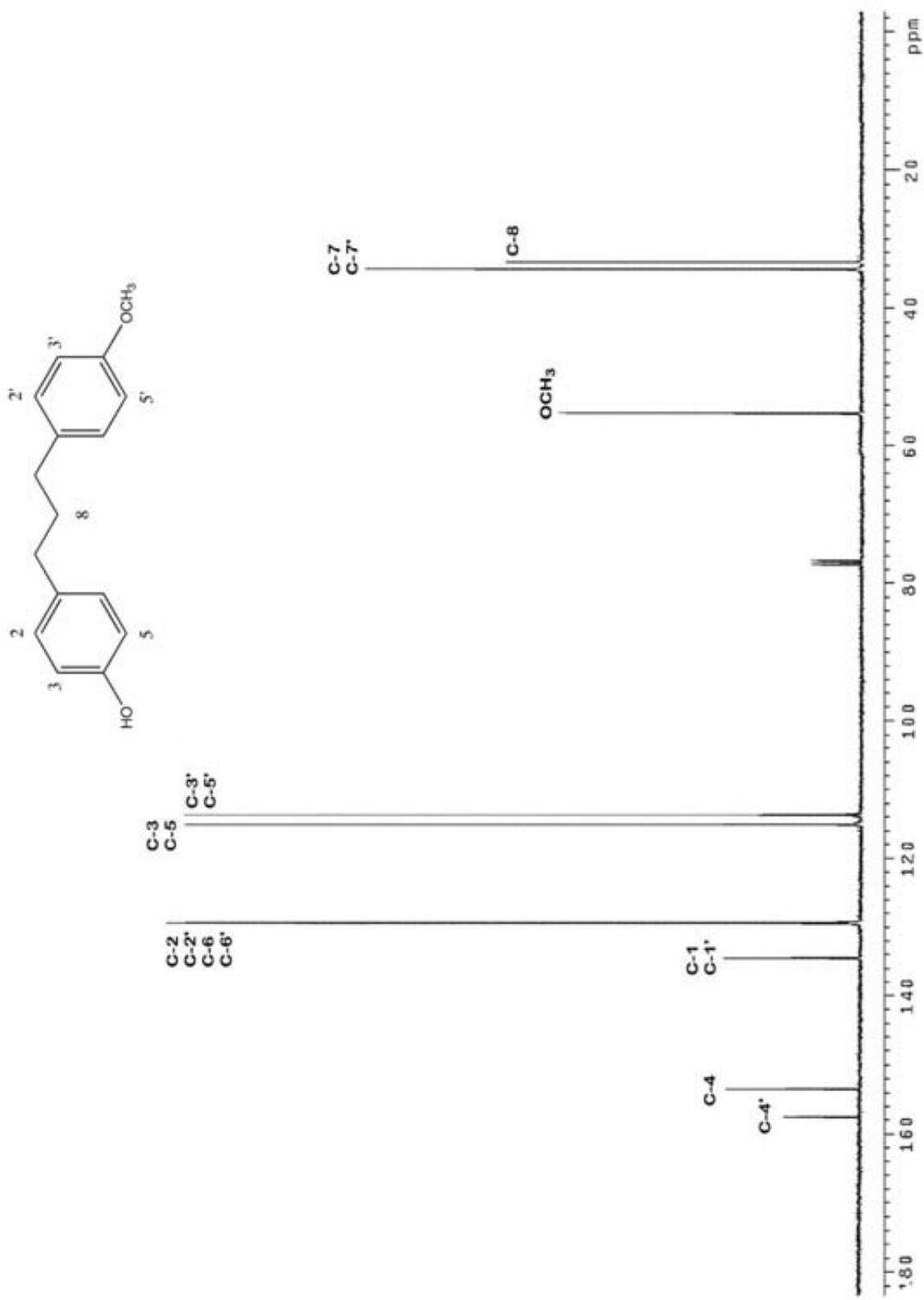
**Espectro 41.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 1,3-difenilpropano (74)



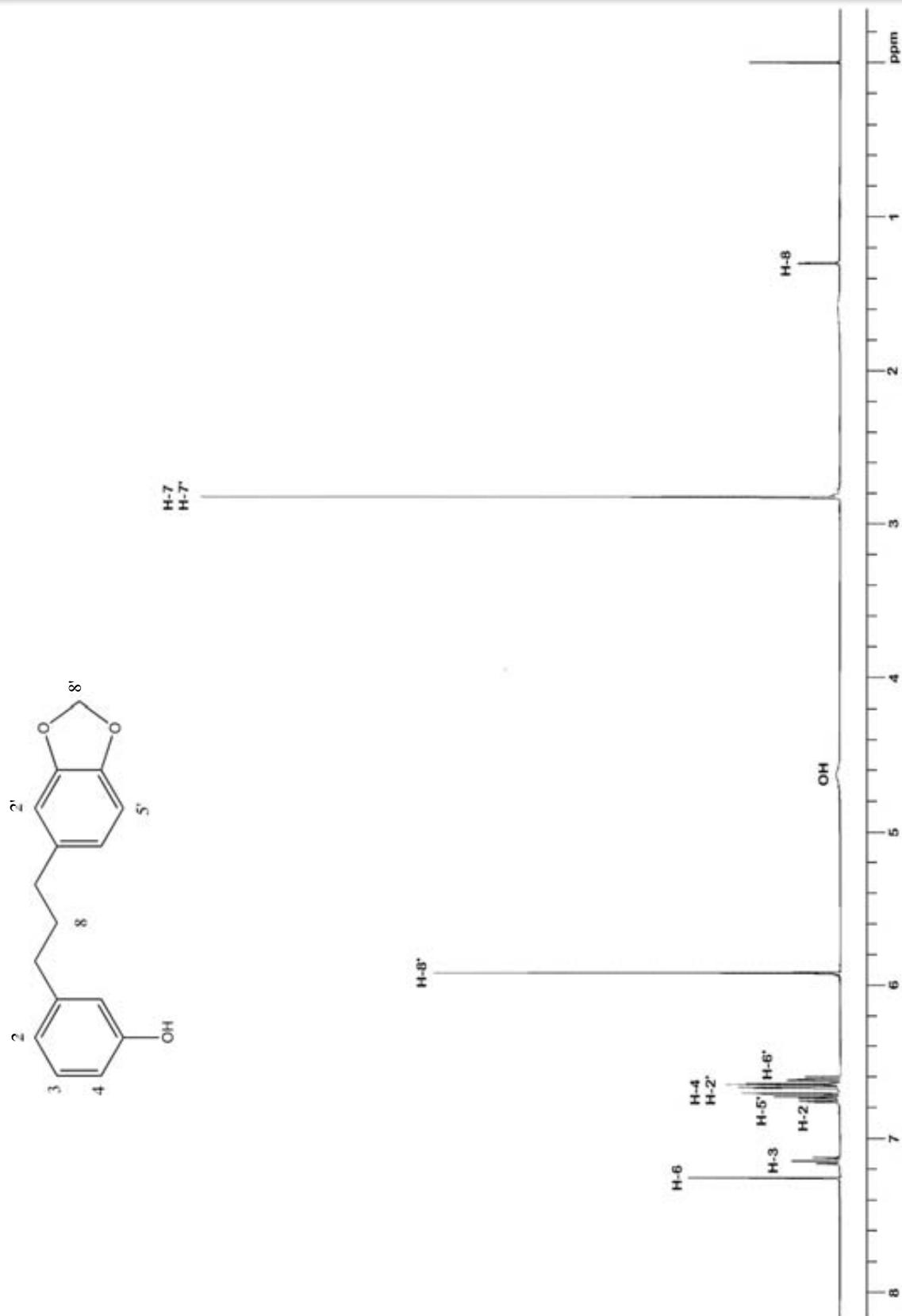
**Espectro 42.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 1,3-difenilpropano (74)



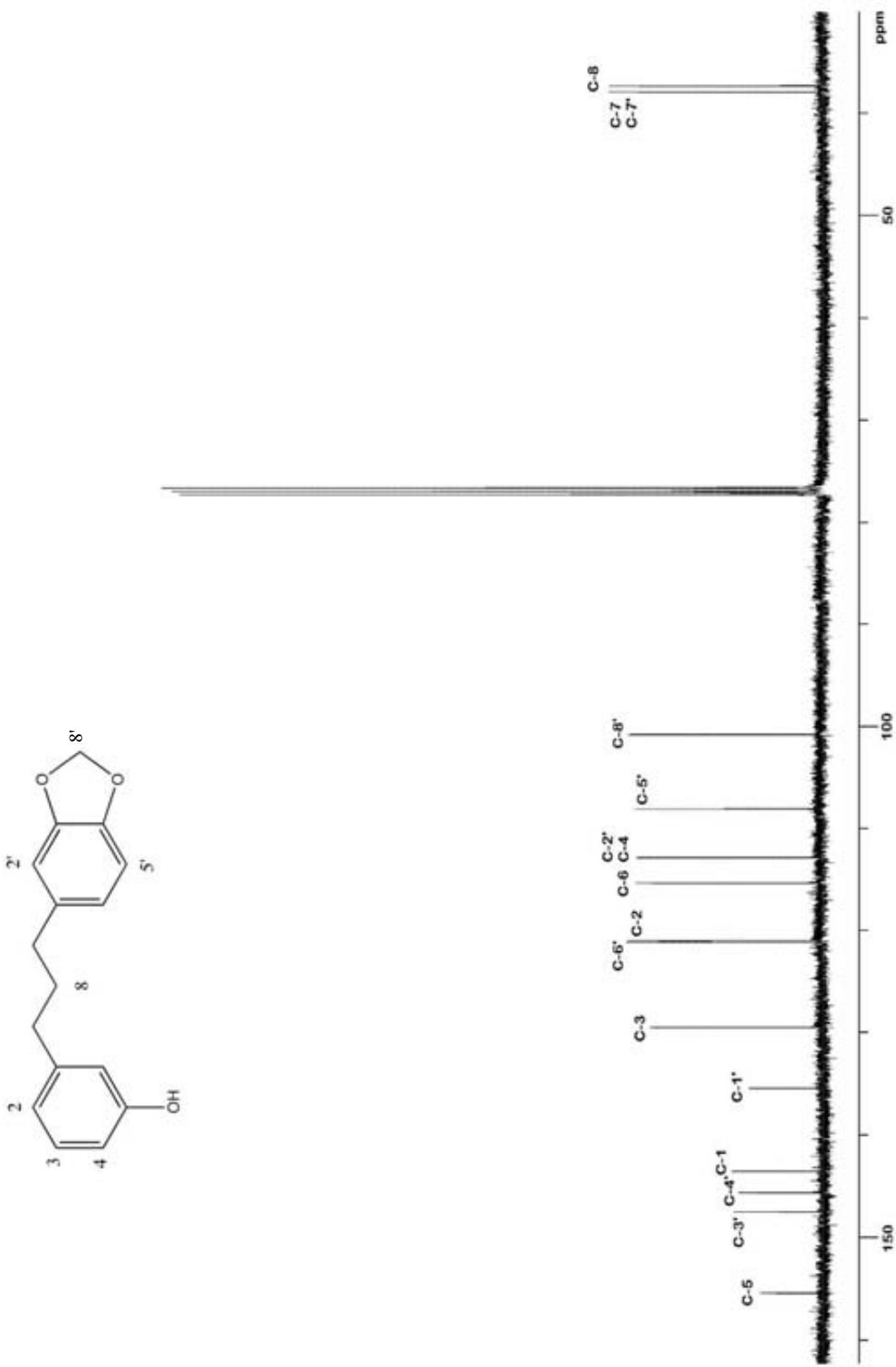
**Espectro 43.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 4-(3-(4-metoxifenil)propil)fenol (75)



**Espectro 44.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 4-(3-(4-metoxifenil)propil)fenol (75)



**Espectro 45.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del 3-(3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)propil) fenol (76)



**Espectro 46.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del 3-(3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)propil) fenol (76)