

00524
152

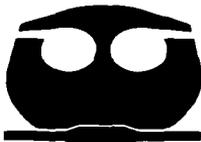


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
PIRANOCROMONA NOVEDOSA DE LA ESPECIE
Prionosciadium watsoni Coulter & Rose
(Umbelliferae)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A
MARÍA DEL PILAR RIVERA ÁLVAREZ



MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2003

A



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.

PAGINACION DISCONTINUA

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Yolanda Caballero Arroyo
Vocal	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Secretario	Dra. Rachel Mata Essayag
1 ^{er} Suplente	M. en C. Blanca Estela Rivero Cruz
2 ^o Suplente	M. en C. Laura Alicia Acevedo Arteaga

Sitio de realización de la tesis:

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

Asesor:



Dra. Rachel Mata Essayag

Supervisor técnico:



M. en C. Laura Alicia Acevedo Arteaga

Sustentante:



María del Pilar Rivera Álvarez

*A mis padres,
por darme la libertad de decidir.*

A mis hermanas.

*A Andrés,
por apoyarme siempre.*



AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM, a través del proyecto IN 200902, por el apoyo financiero otorgado para la realización del trabajo experimental.

Al Dr. Hamed Abbas, investigador de Crop Genetics and Production Research Unit, USDA/ARS, Stoneville, Mississippi, Estados Unidos, por la realización de los ensayos de actividad fitotóxica sobre *Lemna pausicostata*.

A la Dra. Martha Macías, por su dirección durante la realización de los experimentos de electroforesis y los ensayos enzimáticos.

A la Q.F.B. Marisela Gutiérrez, por el registro de los espectros de UV e IR y las rotaciones ópticas; a la Q. Georgina Duarte, por el registro de los espectros de masas; a la Q.F.B. Rosa Isela del Villar y al M. en C. Oscar Yáñez, por el registro de los espectros de RMN utilizados en el presente estudio; todos ellos personal de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM.

A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus comentarios y observaciones que mejoraron la versión final del presente trabajo.

A la M. en C. Laura Acevedo por la supervisión técnica durante el desarrollo del presente trabajo, pero principalmente por el apoyo moral y amistad brindados.

A la M. en C. Isabel Rivero, por su asesoría técnica en algunas etapas del presente trabajo.

Especialmente a la Dra. Rachel Mata Essayag por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su confianza al asignarme el presente proyecto y por su excelente dirección; pero sobre todo por haber contribuido a mi formación académica y por ser un ejemplo de profesionalismo y superación. Gracias.

Finalmente, expreso mi más profundo agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de su comunidad, y particularmente a la Facultad de Química por permitirme acceder a la mejor educación en Química del país.

F

CONTENIDO

	Página
Lista de Abreviaturas.....	vi
Lista de Cuadros.....	ix
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Esquemas.....	xiii
I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	1
II. ANTECEDENTES.....	6
2.1 Antecedentes de la especie <i>Prionosciadium watsoni</i> Coulter & Rose (Umbelliferae).....	6
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	14
3.1 Ensayos biológicos.....	14
3.1.1 Determinación de la actividad fitotóxica sobre <i>Lemna pausicostata</i> ...	14
3.1.2 Evaluación cuantitativa del potencial fitotóxico de los compuestos puros sobre la germinación y el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i>	15
3.1.3 Evaluación de la interacción de los compuestos aislados con calmodulina de cerebro de bovino.....	16

3.1.4	Determinación del efecto del (+)-5-metoxihamaudol sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del adenosín monofosfato cíclico (AMPC) dependiente de calmodulina.....	16
3.1.4.1	Determinación de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del adenosín monofosfato cíclico (AMPC) en presencia de diferentes concentraciones de calmodulina.....	18
3.1.4.2	Obtención de la curva estándar de fosfato inorgánico.....	18
3.1.4.3	Determinación del efecto del (+)-5-metoxihamaudol (16) sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPC en presencia de calmodulina.....	19
3.1.4.4	Determinación del efecto del (+)-5-metoxihamaudol (16) sobre la actividad basal de la enzima fosfodiesterasa del AMPC.....	19
3.2	Procedimientos experimentales generales.....	20
3.2.1	Análisis cromatográficos.....	20
3.2.2	Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales y sus derivados.....	21
3.3	Estudio químico del extracto activo obtenido de las partes aéreas de <i>Prionosciadium watsoni</i>	22
3.3.1	Material vegetal.....	22
3.3.2	Obtención del extracto activo de las partes aéreas de <i>Prionosciadium watsoni</i>	23
3.3.3	Fraccionamiento primario del extracto activo de <i>Prionosciadium watsoni</i>	23
3.3.4	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa F3.....	25

3.3.4.1	Obtención de los compuestos β -sitosterol (13), (9 <i>R</i>)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (9) y jatamansina (10) a partir de la fracción secundaria activa F3-2.....	26
3.3.4.2	Obtención de los compuestos (+)-lomatina (14), seravshanina (8) e isopterixina (15) a partir de la fracción secundaria activa F3-4.....	29
3.3.5	Obtención del compuesto (+)-5-metoxihamaudol (16) y del β -D-glucositosterol (17) a partir de la fracción primaria F7.....	31
3.3.6	Preparación de isopterixina (15).....	34
3.3.7	Preparación del (+)-5-metoxihamaudol (16).....	34
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.1	Aislamiento de los compuestos (9 <i>R</i>)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (9) y jatamansina (10), β -sitosterol (13), (+)-lomatina (14), seravshanina (8) e isopterixina (15) a partir de la fracción primaria activa F3; y del (+)-5-metoxihamaudol (16) y β -D-glucositosterol (17) a partir de la fracción primaria F7.....	36
4.2	Caracterización de los compuestos aislados.....	42
4.2.1	Caracterización de la (9 <i>R</i>)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (9), jatamansina (10), seravshanina (8), β -sitosterol (13) y β -D-glucositosterol (17).....	42
4.2.2	Caracterización de (+)-lomatina (14) e isopterixina (15).....	42
4.2.3	Caracterización del (+)-5-metoxihamaudol (16).....	49

	Página
4.3 Determinación del potencial fitotóxico de los metabolitos aislados.....	60
4.3.1 Determinación del potencial fitotóxico de los metabolitos aislados sobre la arvense acuática <i>Lemna pausicostata</i>	60
4.3.2 Determinación del potencial fitotóxico de los metabolitos aislados sobre las arvenses <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i>	61
4.3.3 Interacción de los compuestos puros con la proteína calmodulina.....	63
4.3.4 Determinación del efecto del (+)-5-metoxihamaudol (16) sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) dependiente de calmodulina.....	64
4.3.4.1 Determinación de la concentración óptima de calmodulina necesaria para la activación de la enzima fosfodiesterasa del AMPC.....	66
4.3.4.2 Efecto del (+)-5-metoxihamaudol (16) sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPC en ausencia de calmodulina.....	68
4.3.4.3 Efecto del (+)-5-metoxihamaudol (16) sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPC en presencia de calmodulina.....	68
 V. RESUMEN Y CONCLUSIONES	 71
 VI. BIBLIOGRAFÍA	 73

APÉNDICE	79
Espectro 1. Espectro de RMN- ¹ H de la mezcla 2:3 de los compuestos (9 <i>R</i>)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo [1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (9) y jatamansina (10).....	80
Espectro 2. Espectro de masas (IE) de seravshanina (8).....	81
Espectro 3. Espectro de RMN- ¹ H de seravshanina (8).....	82
Espectro 4. Espectro de RMN- ¹³ C de seravshanina (8).....	83
Espectro 5. Espectro en el IR de (+)-lomatina (14).....	84
Espectro 6. Espectro en el UV de (+)-lomatina (14).....	85
Espectro 7. Espectro de masas (IE) de (+)-lomatina (14).....	86
Espectro 8. Espectro de RMN- ¹ H de (+)-lomatina (14).....	87
Espectro 9. Espectro de RMN modalidad ¹ H- ¹ H-COSY de (+)-lomatina (14).....	88
Espectro 10. Espectro de RMN modalidad NOESY de (+)-lomatina (14)...	89
Espectro 11. Espectro de RMN- ¹³ C de (+)-lomatina (14).....	90
Espectro 12. Espectro de RMN modalidad HETCOR de (+)-lomatina (14).....	91
Espectro 13. Espectro en el IR de isopterixina (15).....	92
Espectro 14. Espectro en el UV de isopterixina (15).....	93
Espectro 15. Espectro de masas (IE) de isopterixina (15).....	94
Espectro 16. Espectro de RMN- ¹ H de isopterixina (15).....	95
Espectro 17. Espectro de RMN modalidad ¹ H- ¹ H-COSY de isopterixina (15).....	96
Espectro 18. Espectro de RMN- ¹³ C de isopterixina (15).....	97
Espectro 19. Espectro de RMN modalidad HETCOR de isopterixina (15)...	98
Espectro 20. Espectro de RMN- ¹ H del (+)-5-metoxihamaudol (16) registrado en CDCl ₃	99

LISTA DE ABREVIATURAS

%	por ciento
$[\alpha]_D^{20}$	rotación óptica
°C	grados centígrados
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AcOEt	acetato de etilo
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
APS	persulfato de amonio
ATP	trifosfato de adenosina
c	cuarteto
Ca ²⁺	ion calcio
CaCl ₂	cloruro de calcio
CaM	calmodulina
cc	cuarteto cuarteteado
CD ₃ OD	metanol deuterado
CDCl ₃	cloroformo deuterado
CeSO ₄	sulfato cérico
CG-EM	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
CH ₃ CN	acetonitrilo
CHCl ₃	cloroformo
CI ₅₀	concentración inhibitoria media
CLAE	cromatografía de líquidos de alta eficiencia
cm	centímetro
COSY	correlated spectroscopy
δ	desplazamiento químico
d	doblete
dc	doble de cuartetos
dd	doble de dobletes

DEPT	distortionless enhancement polarization transfer
DMSO	dimetilsulfóxido
EM	espectrometría de masas
eV	electrón volts
FeSO ₄	sulfato ferroso
g	gramo
h	hora
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
HCl	ácido clorhídrico
HETCOR	heteronuclear correlation
Hex	hexano
HPO ₄ ²⁻	ion fosfato
Hz	hertz
IE	impacto electrónico
Int. Rel.	intensidad relativa
<i>i</i> PrOH	isopropanol
IR	infrarrojo
<i>J</i>	constante de acoplamiento
Kg	kilogramo
KOH	hidróxido de potasio
λ	longitud de onda
L	litro
m	multiplete
<i>m/z</i>	relación masa/carga
M ⁺	ion molecular
MeOH	metanol
μ g	microgramos
mg	miligramo
MHz	megahertz
μ L	microlitros
mL	mililitro
mm	milimetro

μM	micromolar
mM	milimolar
μmho	micro Siemens
Na_2SO_4	sulfato de sodio
NAD	dinucleótido de nicotinamida
NaHCO_3	bicarbonato de sodio
nm	nanometro
nM	nanomolar
v_{max}	frecuencia máxima
NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy
p.f.	punto de fusión
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
ppm	partes por millón
q	quinteto
RMN	resonancia magnética nuclear
RMN- ^{13}C	resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN- ^1H	resonancia magnética nuclear protónica
s	singulete
SDS	dodecilsulfato de sodio
t	triplete
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamina
TMS	tetrametilsilano
UV	ultravioleta

LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1.	Fitotoxicidad del extracto y de las fracciones primarias en <i>Lemna pausicostata</i>	4
Cuadro 2.	Distribución del género <i>Prionosciadium</i> en México.....	6
Cuadro 3.	Piranocumarinas de <i>Prionosciadium watsoni</i>	9
Cuadro 4.	Piranocromonas de <i>Prionosciadium watsoni</i>	12
Cuadro 5.	Composición de los geles de acrilamida y de las disoluciones empleadas para llevar a cabo la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE al 12%).....	17
Cuadro 6.	Sistemas de elución empleados para los análisis cromatográficos en capa fina.....	20
Cuadro 7.	Agente cromógeno utilizado para los análisis cromatográficos en capa fina.....	21
Cuadro 8.	Fraccionamiento primario del extracto activo de <i>P. watsoni</i>	24
Cuadro 9.	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa F3.....	25
Cuadro 10.	Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria activa F3-2.....	27
Cuadro 11.	Fraccionamiento cuaternario de la fracción terciaria activa F3-2-2.	28
Cuadro 12.	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F7.....	32
Cuadro 13.	Actividad fitotóxica sobre <i>L. pausicostata</i> de las fracciones secundarias obtenidas a partir de la fracción primaria activa F3....	36
Cuadro 14.	Actividad fitotóxica sobre <i>L. pausicostata</i> de las fracciones terciarias obtenidas a partir de la fracción secundaria activa F3-2.	37
Cuadro 15.	Metabolitos aislados a partir de las fracciones primarias F3 y F7...	39
Cuadro 16.	Constantes físicas de (+)-lomatina (14).....	43
Cuadro 17.	Constantes espectroscópicas (IR y UV) y espectrométricas (EM-IE m/z) de (+)-lomatina (14).....	43
Cuadro 18.	Datos de RMN de (+)-lomatina (14).....	45
Cuadro 19.	Constantes físicas de isopterixina (15).....	46

Cuadro 20.	Constantes espectroscópicas (IR y UV) y espectrométricas (EM-IE m/z) de isopterixina (15).....	46
Cuadro 21.	Datos de RMN de isopterixina (15).....	48
Cuadro 22.	Constantes físicas del (+)-5-metoxihamaudol (16).....	50
Cuadro 23.	Constantes espectroscópicas (IR y UV) y espectrométricas (EM-IE m/z) del (+)-5-metoxihamaudol (16).....	50
Cuadro 24.	Datos de RMN del (+)-5-metoxihamaudol (16).....	54
Cuadro 25.	Actividad fitotóxica de la mezcla de los compuestos 9 y 10 sobre <i>L. pausicostata</i>	60
Cuadro 26.	Actividad fitotóxica de los compuestos 9 , 10 y 15 sobre <i>L. pausicostata</i>	61
Cuadro 27.	Actividad fitotóxica de los compuestos aislados sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i>	62

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Prionosciadium watsoni</i> Coulter & Rose (Umbelliferae).....	8
Figura 2. Cromatograma de la fracción secundaria activa F3-4.....	30
Figura 3. Cromatograma de la fracción terciaria F3-4-3.....	31
Figura 4. Cromatograma de la fracción secundaria F7-4p.....	33
Figura 5. (a) Cromatograma de gases de la fracción F3-2-2-IV, (b) Espectro de masas (IE) del compuesto 9 , (c) Espectro de masas (IE) del compuesto 10	38
Figura 6. Cromatograma de gases de la fracción terciaria F3-4-3.....	39
Figura 7. Correlaciones encontradas en el espectro ¹ H- ¹ H-COSY de (+)-lomatina (14).....	44
Figura 8. Correlaciones encontradas en el espectro NOESY de (+)-lomatina (14).....	44
Figura 9. Correlaciones encontradas en el espectro ¹ H- ¹ H-COSY de isopterixina (15).....	49
Figura 10. Semisíntesis del compuesto 15 por acetilación de (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-10- hidroxi-9-(2-metil-but-(2 <i>Z</i>)-enoiloxi)-8,8-dimetil-9,10-dihidro- 2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (2).....	49
Figura 11. Espectro en el IR del (+)-5-metoxihamaudol (16).....	51
Figura 12. Espectro en el UV del (+)-5-metoxihamaudol (16).....	51
Figura 13. Espectro de masas (IE) del (+)-5-metoxihamaudol (16).....	52
Figura 14. Estructura del hamaudol (18).....	52
Figura 15. Espectro de RMN- ¹ H del (+)-5-metoxihamaudol (16).....	55
Figura 16. Espectro de RMN- ¹³ C del (+)-5-metoxihamaudol (16).....	56
Figura 17. Espectro de RMN modalidad HETCOR del (+)-5-metoxihamaudol (16).....	57
Figura 18. Espectro de RMN modalidad FLOCK del (+)-5-metoxihamaudol (16).....	58

Figura 19.	Correlaciones observadas en el espectro de RMN modalidad FLOCK del (+)-5-metoxihamaudol (16).....	59
Figura 20.	Obtención del (+)-5-metoxihamaudol (16) por hidrólisis alcalina de los compuestos 11 y 12	59
Figura 21.	Gel de electroforesis SDS-PAGE de la calmodulina de cerebro de bovino después del tratamiento de los compuestos aislados. A, CaM en H ₂ O y Ca ²⁺ ; B, clorpromazina; C, 14 ; D, 15 ; E, 16 ; F, CaM en DMSO.....	64
Figura 22.	Reacciones bioquímicas involucradas en la determinación de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc.....	66
Figura 23.	Curva patrón de fosfatos inorgánicos.....	67
Figura 24.	Actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de varias concentraciones de calmodulina de cerebro de bovino.....	67
Figura 25.	Efecto de la clorpromazina sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en ausencia (●) y en presencia de calmodulina de cerebro de bovino(■).....	69
Figura 26.	Efecto del (+)-5-metoxihamaudol (16) sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en ausencia (●) y en presencia (▲) de calmodulina de cerebro de bovino.....	69

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1. Obtención del extracto activo de <i>P. watsoni</i>	23
Esquema 2. Fraccionamiento primario del extracto activo de <i>P. watsoni</i>	24
Esquema 3. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa F3.....	26
Esquema 4. Aislamiento y purificación de los compuestos 9, 10 y 13	29
Esquema 5. Aislamiento y purificación de los compuestos 16 y 17 a partir de la fracción primaria F7.....	33

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

Las plantas nocivas representan uno de los mayores problemas que enfrentan los agricultores a nivel mundial. A la fecha, se han identificado alrededor de 7000 especies de malezas, de las cuales cerca de 250 son las que ocasionan los daños más graves a la agricultura (Vyvyan, 2002). Estas especies interfieren en el proceso productivo ocasionando una dramática disminución en el rendimiento de los cultivos, por lo que los agricultores se han visto en la necesidad de aplicar un gran número de agentes herbicidas.

Los herbicidas, en su mayoría sintéticos, representan aproximadamente el 70% de las ventas totales de agroquímicos en los países desarrollados. A pesar de que estos agentes controlan las malezas, incrementan los rendimientos de las cosechas y reducen los costos derivados de las labores de limpia de los terrenos; su uso indiscriminado ocasiona daños ambientales severos debido a sus altos índices de persistencia, además de resultar tóxicos para los animales y el hombre como consecuencia de su poca selectividad. Por otro lado, estos agentes han ocasionado la aparición de numerosas malezas resistentes a los tratamientos (Cramer, 2000).

Lo anterior ha provocado que alrededor del mundo se desarrollen programas conducentes a encontrar estrategias alternas para proteger a los cultivos de interés económico. Algunas alternativas incluyen la rotación de cultivos, la eliminación manual y mecánica de las plantas no deseadas, la manipulación genética, el empleo de bioherbicidas y la búsqueda de fitotoxinas de origen natural a través del diseño biorracional (Cremllyn, 1991; Abell *et al.*, 1993; Cutler & Cutler, 1999; Vyvyan, 2002; *inter alia*), para de esta manera garantizar la obtención de productos biodegradables más específicos en su acción y en lo posible menos tóxicos para el hombre y los animales.

Las fitotoxinas de origen natural además de ser biodegradables, pueden constituir prototipos estructurales para el diseño y la síntesis de productos novedosos de mayor potencia y eficacia que los compuestos modelo y los productos de uso comercial. De manera adicional, el descubrimiento de nuevos compuestos naturales con estructuras

novedosas puede conducir al descubrimiento de nuevos blancos de acción a nivel molecular (Duke, 1993; Duke & Abbas, 1995; Hedin *et al.*, 1997; Cutler & Cutler, 1999; Macías *et al.*, 2000b; Evidente & Mota, 2001; Vyvyan, 2002; *inter alia*). Por las razones expuestas, la búsqueda de agentes fitotóxicos de origen natural se encuentra justificada.

En México, la gran diversidad vegetal constituye una fuente potencial de productos biodinámicos. Es por ello que, en la Facultad de Química de la UNAM, se ha desarrollado un programa interdisciplinario destinado a explorar el potencial fitotóxico de especies selectas de la flora mexicana con la finalidad de contribuir al desarrollo de herbicidas verdes. El programa emplea la estrategia metodológica que se resume a continuación:

En primer lugar, se realiza la preselección de las materias primas. En caso de ser materias primas vegetales, la selección inicial se lleva a cabo con base en los criterios convencionales: el etnomédico, el ecológico y el quimiotaixonómico (Espinosa-García & Delgado, 1998; Harborne, 1998; Cutler, 1999; Vyvyan, 2002).

Las materias primas preseleccionadas son sometidas a pruebas biológicas de selección, que consisten en la determinación del efecto fitotóxico de los extractos orgánicos derivados de las materias primas mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación, el crecimiento radicular y la producción de biomasa en las diversas especies de prueba (Mata *et al.*, 1996; Ueno *et al.*, 1997; Miyakado *et al.*, 1997; Van-Puyvelde *et al.*, 1999; Macías *et al.*, 2000a; *inter alia*).

En general, los extractos que demuestren respuestas positivas en los ensayos de fitoinhibición, se consideran candidatos apropiados para la realización de otras pruebas biológicas dirigidas a un blanco de acción específico en la fisiología o el metabolismo vegetal. Aquellos extractos que presenten buena actividad en los ensayos secundarios se consideran idóneos para la realización de estudios químicos biodirigidos con la finalidad de aislar los principios fitotóxicos. Estos estudios implican la obtención de los extractos vegetales a gran escala y su posterior estudio químico, utilizando a lo largo de todo el proceso los mismos ensayos biológicos de selección, con la finalidad de monitorear la actividad fitotóxica. Los compuestos naturales activos puros se identifican mediante la

aplicación de métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos. Posteriormente, se someten a pruebas de tipo pre y post-emergente sobre especies vegetales, tanto cultivables como nocivas. Por último, se realizan estudios conducentes a determinar el mecanismo de acción de las fitotoxinas aisladas (Mata *et al.*, 1996; Ueno *et al.*, 1997; Abell *et al.*, 1993; Cutler & Cutler, 1999; Macías *et al.*, 2000a; Dayan *et al.*, 2000; *inter alia*).

En este contexto, la especie *Prionosciadium watsoni* Coulter & Rose (Umbelliferae) fue preseleccionada con base en los criterios etnomédico y quimiotaxonómico, como una fuente de herbicidas verdes. Posteriormente se comprobó que un extracto CH₂Cl₂-MeOH (1:1) de la planta era fitotóxico contra las arvenses *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli* y *Lemna paucicostata*. En esa ocasión se inició el estudio fitoquímico biodirigido del extracto activo. De las fracciones activas estudiadas se logró el aislamiento y caracterización de varias fitotoxinas (Valencia *et al.*, 2002).

Dado que la investigación fitoquímica de *P. watsoni* fue parcial, es importante continuar con el estudio de la especie, no sólo para contribuir al conocimiento del contenido metabólico de la misma, sino también para completar el estudio de las fracciones bioactivas detectadas inicialmente.

En el estudio conducido por Valencia *et al.* (2002), no se investigó la fracción activa F3, misma que presentó el mayor efecto inhibitorio del crecimiento de la planta acuática *L. paucicostata*. Esta fracción inhibió de manera significativa tanto el crecimiento como el contenido de clorofila de la especie de prueba (**Cuadro 1**).

De manera adicional, la fracción F7, contenía un cromóforo mayoritario de color amarillo (al revelar con sulfato cérico), visible al eluir las cromatoplasmas del extracto original y de esta fracción en diferentes sistemas de elución. Por lo tanto, se consideró que el aislamiento y caracterización de este producto contribuiría a la determinación de compuestos marcadores de ésta especie medicinal.

Cuadro 1. Fitotoxicidad del extracto y de las fracciones primarias en *Lemna paucicostata*.^a

Tratamiento	Concentración (µg/mL)	Incremento en la conductividad (µmho/cm)	Inhibición del crecimiento (%)	Reducción de clorofila (%)
Extracto	25	-57.00 ± 14.80	3.01 ± 2.90	0.00 ± 12.70
	50	91.50 ± 39.90	7.79 ± 3.80	0.00 ± 0.00
	100	262.50 ± 12.10	100.00 ± 0.00	36.74 ± 11.70
	200	262.50 ± 24.70	100.00 ± 0.00	91.51 ± 6.50
F1	10	49.80 ± 35.40	17.00 ± 0.70	21.90 ± 4.40
	200	174.30 ± 9.20	73.90 ± 1.40	93.10 ± 4.70
	500	349.30 ± 47.40	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	1000	412.80 ± 21.10	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
F2	10	0.00 ± 55.10	8.70 ± 0.70	4.00 ± 8.70
	200	66.80 ± 5.70	30.40 ± 0.00	28.40 ± 30.40
	500	91.80 ± 8.50	52.20 ± 0.70	31.40 ± 52.20
	1000	157.30 ± 21.90	52.20 ± 2.10	66.20 ± 52.20
F3	10	85.30 ± 3.50	17.40 ± 0.70	31.10 ± 17.40
	200	334.30 ± 17.70	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	500	354.80 ± 29.70	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	1000	398.30 ± 13.40	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
F4	10	44.80 ± 45.30	9.00 ± 0.00	29.90 ± 9.00
	200	304.30 ± 9.20	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	500	361.80 ± 2.80	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	1000	403.30 ± 13.40	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
F5	10	0.00 ± 11.30	9.50 ± 0.70	6.90 ± 9.50
	200	3.50 ± 0.70	23.52 ± 13.80	69.60 ± 3.50
	500	100.00 ± 0.00	58.81 ± 8.30	100.00 ± 0.00
	1000	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
F6	10	0.00 ± 14.10	8.50 ± 0.70	4.80 ± 22.90
	200	67.30 ± 14.80	8.00 ± 0.00	30.70 ± 5.70
	500	97.30 ± 13.40	6.50 ± 0.70	73.70 ± 36.40
	1000	169.80 ± 2.80	4.00 ± 0.00	64.90 ± 4.60
F7	10	40.80 ± 22.60	9.00 ± 0.70	5.50 ± 17.30
	200	120.30 ± 19.90	7.50 ± 0.70	35.70 ± 13.00
	500	102.80 ± 14.10	5.50 ± 8.30	32.60 ± 21.70
	1000	202.80 ± 14.10	6.00 ± 0.00	60.10 ± 7.40
F8	10	50.30 ± 21.90	7.50 ± 0.70	22.40 ± 7.50
	200	108.80 ± 8.50	7.00 ± 0.00	28.10 ± 7.00
	500	86.50 ± 14.10	7.50 ± 0.70	33.20 ± 7.50
	1000	127.80 ± 0.00	6.00 ± 1.40	56.90 ± 6.00

^a Los resultados son las medias de tres repeticiones ± desviación estándar. Mostraron significativamente (prueba t-Student despareada) mayor fitotoxicidad que el control (medio de cultivo: incremento en la conductividad, 0.00 ± 9.40 µmho/cm; inhibición del crecimiento, 0.00 ± 1.00 %; reducción de clorofila, 0.00 ± 18.10 %).

La detección de compuestos marcadores es de importancia en estudios relativos al control de calidad de especies medicinales, ya que permite proponer pruebas de identidad apropiadas.

Por los motivos expuestos, el presente trabajo de tesis tiene como objetivo principal completar el estudio químico y biológico de la especie *P. watsoni*, iniciado por Valencia *et al.* (2002), mediante el análisis de una fracción activa y otra inactiva; de tal forma de contribuir al conocimiento de la flora medicinal de México, así como al desarrollo de nuevos agroquímicos biodegradables y de menor toxicidad.

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

- i. Realizar el fraccionamiento de dos de las fracciones primarias (F3 y F7) del extracto integro de las partes aéreas de *Prinosciadium watsoni*, que restaban por estudiar. En el caso de la fracción activa (F3), el fraccionamiento se hará biodirigido utilizando como ensayo de monitoreo la actividad fitotóxica contra *Lemna pausicostata*.
- ii. Separar los principios de interés mediante la aplicación de técnicas cromatográficas.
- iii. Caracterizar los compuestos aislados mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- iv. Determinar el potencial fitotóxico de los metabolitos aislados mediante la evaluación de sus efectos sobre *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli* y *Lemna pausicostata*.
- v. Comprobar si los metabolitos fitotóxicos aislados interaccionan con la proteína calmodulina, la cual constituye un posible blanco de acción de las fitotoxinas previamente aisladas de esta especie.

II. ANTECEDENTES.

2.1 Antecedentes de la especie *Prionosciadium watsoni* Coulter & Rose (Umbelliferae).

El género *Prionosciadium*, perteneciente a la familia Umbelliferae (Hegnauer, 1978), esta compuesto por 30 especies de las cuales alrededor de 25 crecen en las montañas de México y Guatemala distribuyéndose generalmente en los bosques cuya vegetación se compone principalmente de arboles de pino, roble y matorral. En el **Cuadro 2** se resumen las especies registradas para el territorio mexicano y su distribución ^{42, 50}.

Cuadro 2. Distribución del género *Prionosciadium* en México.

Especie	Distribución
<i>Prionosciadium acuminatum</i> J. M. Coulter & Rose	Jalisco.
<i>Prionosciadium bellii</i> Mathias & Constance	Michoacán.
<i>Prionosciadium cuneatum</i> J. M. Coulter & Rose	Jalisco, Michoacán y Nayarit.
<i>Prionosciadium diversifolium</i> J. M. Coulter & Rose	Guerrero y Chiapas.
<i>Prionosciadium durangense</i> J. M. Coulter & Rose	Durango.
<i>Prionosciadium filifolium</i> J. M. Coulter & Rose	Jalisco y Durango.
<i>Prionosciadium humile</i> Rose	Nuevo León.
<i>Prionosciadium lilacinum</i> Mathias & Constance	Jalisco
<i>Prionosciadium linearifolium</i> (S. Watson) J. M. Coulter & Rose	Querétaro, Guanajuato, Puebla y Jalisco.

Cuadro 2. Distribución del género *Prinosciadium* en México (continuación).

Especie	Distribución
<i>Prinosciadium macrophyllum</i> J. M. Coulter & Rose	Jalisco y Durango.
<i>Prinosciadium madreense</i> S. Watson	Chihuahua, Guerrero, Jalisco, y Sonora.
<i>Prinosciadium megacarpum</i> J. M. Coulter & Rose	Oaxaca y Michoacán.
<i>Prinosciadium moschatum</i> Rose	Puebla.
<i>Prinosciadium nelsonii</i> J. M. Coulter & Rose	Chiapas, Morelos Puebla y Guerrero.
<i>Prinosciadium palmeri</i> Rose	San Luis Potosí.
<i>Prinosciadium palustre</i> Rose	Morelos.
<i>Prinosciadium pringlei</i> S. Watson	Chihuahua.
<i>Prinosciadium serratum</i> J. M. Coulter & Rose	Jalisco y Nayarit.
<i>Prinosciadium simplex</i> Mathias & Constance	Tamaulipas
<i>Prinosciadium thapsoides</i> Mathias	Estado de México, Nayarit, Veracruz, Guanajuato, Michoacán, Hidalgo, Distrito Federal, Jalisco, Sonora, Chihuahua, Durango, Querétaro, Morelos, Oaxaca y Puebla.
<i>Prinosciadium townsendii</i> Rose	Chihuahua y Nayarit.
<i>Prinosciadium turneri</i> Constance & Affolter	Colima.
<i>Prinosciadium watsoni</i> Coulter & Rose	Durango, Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Querétaro, Tamaulipas, Jalisco, Oaxaca, Hidalgo y San Luis Potosí.

Prinosciadium watsoni Coulter & Rose ex S. Watson se encuentra en bosques de pino y roble desde Chihuahua y Tamaulipas hasta Jalisco e Hidalgo. Los individuos

pertenecientes a esta especie son arbustos erectos que pueden alcanzar más de 2 m de altura, sus tallos son huecos y sus hojas son grandes y lobuladas; las flores generalmente de color verde-amarillo se encuentran en umbelas, y los frutos oblongo-elípticos, comprimidos y con 5 costillas, son de sabor acre y aromático (**Figura 1**).

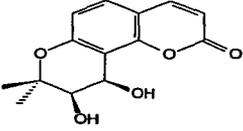


Figura 1. *Prionosciadium watsoni* Coulter & Rose (Umbelliferae).

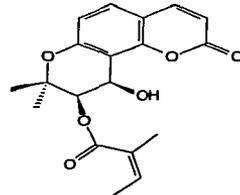
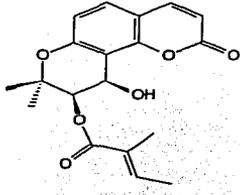
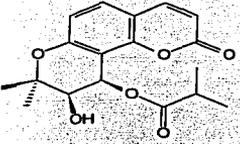
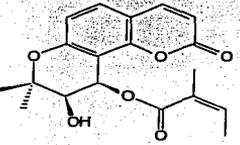
Prinosciadium watsoni es una especie medicinal conocida comúnmente con el nombre de "flor de ocotillo", "acocotillo", "hierba del oso" (Martínez, 1979), "ococote" o "njéo xempi". En Durango las raíces de *ococote* o *flor de ocotillo* se emplean para elaborar un té útil para aliviar el dolor intestinal y los frutos se usan en una infusión para el tratamiento de la diabetes (Bye, 2000). Un ungüento popular para aliviar las fiebres a finales del siglo XIX en San Luis Potosí, consistía de las de flores y raíces pulverizadas de *acocotillo* que eran mezcladas con "rosa de castilla" (*Rosa*) y "contrayerba" (*Pedimelum*) en sebo y aplicada en el estómago (Bye, 2000). Una infusión de los frutos de *hierba del oso* se usa para el tratamiento de las fiebres en Chihuahua y Coahuila (Bye, 2000). En Tamaulipas, el fruto de *flor de ocotillo* se tuesta y pulveriza con sebo para aplicarse tópicamente para tratamiento de la enfermedad cultural llamada "mal de ojo" o "mal de ojo pasado" (Argueta, 1994).

De las 30 especies que conforman al género *Prinosciadium*, únicamente *P. watsoni* ha sido estudiada desde el punto de vista químico. La investigación permitió el aislamiento y caracterización de 12 metabolitos secundarios (Valencia *et al.*, 2002), incluyendo diez piranocumarinas angulares (**Cuadro 3**) y dos piranocromonas (**Cuadro 4**).

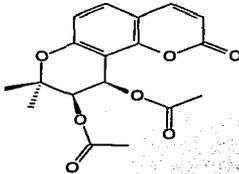
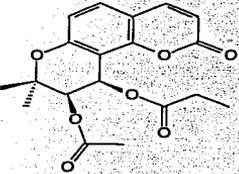
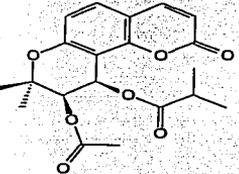
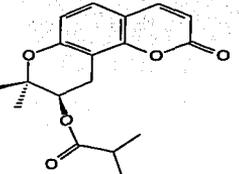
Cuadro 3. Piranocumarinas de *Prinosciadium watsoni*.

Estructura	Compuesto	Referencia
 <p style="text-align: center;">(1)</p>	(+)- <i>cis</i> -kellactona	Valencia <i>et al.</i> , 2002

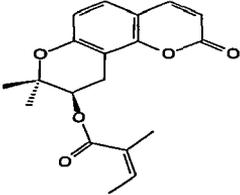
Cuadro 3. Piranocumarinas de *Prionosciadium watsoni* (continuación).

Estructura	Compuesto	Referencia
 <p style="text-align: center;">(2)</p>	<p style="text-align: center;">(9<i>R</i>,10<i>R</i>)-10-hidroxi-9-(2-metil-but-(2<i>Z</i>)-enoiloxi)-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2<i>H</i>,8<i>H</i>-benzo[1,2-<i>b</i>:3,4-<i>b'</i>]dipiran-2-ona</p>	<p style="text-align: center;">Valencia <i>et al.</i>, 2002</p>
 <p style="text-align: center;">(3)</p>	<p style="text-align: center;">(9<i>R</i>,10<i>R</i>)-10-hidroxi-9-(2-metil-but-(2<i>E</i>)-enoiloxi)-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2<i>H</i>,8<i>H</i>-benzo[1,2-<i>b</i>:3,4-<i>b'</i>]dipiran-2-ona</p>	<p style="text-align: center;">Valencia <i>et al.</i>, 2002</p>
 <p style="text-align: center;">(4)</p>	<p style="text-align: center;">(9<i>R</i>,10<i>R</i>)-9-hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2<i>H</i>,8<i>H</i>-benzo[1,2-<i>b</i>:3,4-<i>b'</i>]dipiran-2-ona</p>	<p style="text-align: center;">Valencia <i>et al.</i>, 2002</p>
 <p style="text-align: center;">(5)</p>	<p style="text-align: center;">quianhucumarina A</p>	<p style="text-align: center;">Valencia <i>et al.</i>, 2002</p>

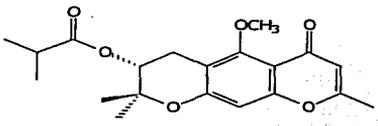
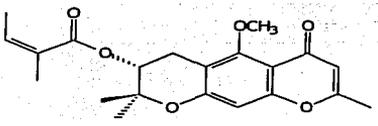
Cuadro 3. Piranocumarinas de *Prinosciadium watsoni* (continuación).

Estructura	Compuesto	Referencia
 <p>(6)</p>	quianhucumarina D	Valencia <i>et al.</i> , 2002
 <p>(7)</p>	(9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona	Valencia <i>et al.</i> , 2002
 <p>(8)</p>	seravshanina	Valencia <i>et al.</i> , 2002
 <p>(9)</p>	(9 <i>R</i>)-9-isobutirolloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona	Valencia <i>et al.</i> , 2002

Cuadro 3. Piranocumarinas de *Prionosciadium watsoni* (continuación).

Estructura	Compuesto	Referencia
 <p>(10)</p>	jatamansina	Valencia <i>et al.</i> , 2002

Cuadro 4. Piranocromonas de *Prionosciadium watsoni*.

Estructura	Compuesto	Referencia
 <p>(11)</p>	(3 <i>R</i>)-isobutiroiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2H,6H-benzo[1,2-b:5,4-b']dipirano	Valencia <i>et al.</i> , 2002
 <p>(12)</p>	(3 <i>R</i>)-2-metil-but-(2 <i>Z</i>)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2H,6H-benzo[1,2-b:5,4-b']dipirano	Valencia <i>et al.</i> , 2002

De los compuestos mencionados, **9** y **10** presentaron propiedades fitotóxicas significativas sobre la maleza acuática *Lemna pausicostata*. Asimismo, los metabolitos **11** y **12** inhibieron la germinación y el crecimiento radicular de las malezas *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*. Valencia y colaboradores (2002), encontraron que los compuestos **1-12** retardan la movilidad electroforética de la proteína calmodulina,

lo que sugiere, *a priori*, que esta importante proteína podría constituir un blanco de acción de estas fitotoxinas.

Por otro lado, los compuestos **11** y **12** se caracterizaron como inhibidores del proceso de respiración mitocondrial; en tanto que **9** y **11** se caracterizaron como inhibidores del proceso de la fotosíntesis (Valencia, 2002).

Cabe señalar que durante la realización del estudio de Valencia *et al.* (2002), no se completo el análisis de las fracciones fitotóxicas obtenidas a partir del extracto activo.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Ensayos biológicos.

3.1.1 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 del extracto y fracciones en medio Hunter (Becerril et al., 1992) (3 mL) de fuerza mediana se adicionaron a 10 colonias de *L. pausicostata* de 3 hojas cada una, contenidas en una caja Petri. A continuación las placas se incubaron durante 72 horas en una cámara de crecimiento. Al cabo de este tiempo se procedió a medir la inhibición del crecimiento de las plantas, la pérdida de electrolitos y la reducción del contenido de clorofila. 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 del experimento. La reducción en el contenido de clorofila para cada tratamiento se determinó con base en el peso fresco de las plantas. Para ello, las colonias de *L. pausicostata* se removieron del medio de cultivo, se secaron sobre toallas de papel y se pesaron. Enseguida, se colocaron en tubos de ensayo que contenían 5 mL de DMSO y se mantuvieron en la oscuridad durante toda la noche. Al día siguiente, la clorofila total (a y b) se determinó por espectroscopía UV de acuerdo al método de Hiscox e Israelstam (1979). Por último, la inhibición del crecimiento se determinó por diferencia en el peso fresco de las plantas, midiéndose al inicio y al final del experimento.

Estos estudios se realizaron en Crop Genetics & Production Research Unit, USDA/ARS, Stoneville, Mississippi, Estados Unidos.

3.1.2 Evaluación cuantitativa del potencial fitotóxico de los compuestos puros sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*.

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los compuestos puros se realizó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* L. (Amaranthaceae) y *Echinochloa crus-galli* (Beauv) L. (Graminae), utilizando el método en caja de Petri previamente descrito por Anaya y colaboradores (1990 y 1995). Las semillas de *Echinochloa crus-galli* fueron adquiridas en el Valley Seed Service de Fresno, California, Estados Unidos, y las de *Amaranthus hypochondriacus* en el Mercado de semillas de Xochimilco, México.

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 6 cm de diámetro que contenían un disco de papel filtro (Whatman No. 1). Cada una de las muestras a evaluar se disolvió en CH₂Cl₂ y se prepararon disoluciones a una concentración de 10, 50, 100 y 250 µg/mL. Posteriormente, 1.0 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 60 semillas (20 por caja) de *A. hypochondriacus* y 45 semillas (15 por caja) de *E. crus-galli*, humedeciendo el papel filtro con 1.0 mL de agua destilada.

Las cajas Petri se incubaron en la oscuridad a 28°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 48 horas para las semillas de *E. crus-galli*. Paralelamente se evaluaron controles positivos y negativos. Como control positivo se utilizó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, Sigma) y como control negativo CH₂Cl₂. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA, $p \leq 0.5$). Los valores de la concentración inhibitoria media se determinaron mediante el programa de análisis de probabilidad Finney (Mata *et al.*, 1996).

3.1.3 Evaluación de la interacción de los compuestos aislados con calmodulina de cerebro de bovino.

La posible interacción de los compuestos de prueba con calmodulina de cerebro de bovino se determinó mediante una electroforesis desnaturante SDS-PAGE sobre geles de poliacrilamida al 15% (Macías *et al.*, 2000b).

El procedimiento consistió en preparar muestras con 10 μg del compuesto de prueba (10 μL de una disolución de 1 mg/mL en DMSO), 2 μg de calmodulina de cerebro de bovino (SIGMA) y 3 μL de CaCl_2 1 mM. La mezcla anterior se llevó a un volumen final de 30 μL con agua desionizada. Posteriormente la mezcla se incubó durante 90 minutos a 30°C. Al término de la incubación las muestras fueron sometidas a ebullición durante 5 minutos para facilitar la interacción de los compuestos con la proteína calmodulina de prueba. A continuación, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y finalmente, se les adicionaron 10 μL de buffer de carga (Liao *et al.*, 1996). Enseguida, se llevó a cabo una electroforesis vertical descendente en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE al 12%) para determinar si la calmodulina tratada experimentaba algún cambio en la movilidad electroforética. Cada determinación se realizó por triplicado y se uso clorpromazina como control positivo (Marmé & Dieter, 1983; Leung *et al.*, 1988).

En el **Cuadro 5** se indica la composición de los geles y disoluciones empleadas.

3.1.4 Determinación del efecto del (+)-5-metoxihamaudol sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del adenosín monofosfato cíclico (AMPC) dependiente de calmodulina.

La actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina se determinó utilizando el método experimental descrito por Sharma y Wang (1979, 1986). De acuerdo con este método la actividad de la enzima correlaciona con la cantidad de fosfato inorgánico producido durante la reacción de hidrólisis del AMPc en presencia de la enzima 5'-nucleotidasa. En los siguientes puntos se describe la parte experimental.

Cuadro 5. Composición de los geles de acrilamida y de las disoluciones empleadas para llevar a cabo la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE al 12%)

Geles y/o disoluciones	Reactivos	Cantidad utilizada
Gel sellador	Acrilamida-Bis-acrilamida 30:08	1 mL
	TEMED 100%	2 μ L
	APS 10%	10 μ L
Gel separador	Acrilamida-Bis-acrilamida 30:08	3.7 mL
	TRIS 3 M pH 8.8	1.17 mL
	Agua	4.26 mL
	TEMED 100%	10 μ L
	APS 10%	10 μ L
	SDS 10%	92 μ L
Gel apilador	Acrilamida-Bis-acrilamida 30:08	625 μ L
	TRIS-HCl 1 M pH 6.8	625 μ L
	SDS 10%	50 μ L
	Agua	3.67 mL
	TEMED 100%	3.5 μ L
	APS 10%	35 μ L
Disolución de corrida (pH 8.3)	Trizma	6.0 g
	Glicina	28.5 g
	SDS	2.0 g
	Agua	2.0 L
Buffer de carga	TRIS-HCl 1 M pH 6.8	0.6 mL
	Glicerol 50%	5.0 mL
	SDS 10%	2.0 mL
	2-mercaptoetanol	0.5 mL
	Azul de bromofenol	10.0 mL
	Agua	0.9 mL
Disolución de tinción	Metanol 50%	200 mL
	Acido acético 0.5%	25 mL
	Azul de Coomassie	0.2 g

3.1.4.1 Determinación de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del adenosín monofosfato cíclico (AMPC) en presencia de diferentes concentraciones de calmodulina.

Los ensayos se realizaron adicionando a una disolución de 0.015 unidades de fosfodiesterasa del AMPC dependiente de calmodulina aislada de cerebro de bovino (Sigma), diferentes concentraciones de calmodulina de cerebro de bovino (Sigma) ($2.5 \times 10^3 \mu\text{g}$ a $0.5 \mu\text{g}$), $15 \mu\text{L}$ de una disolución de 5'-nucleotidasa de veneno de *Crotalus atrox* de 0.3 unidades (Sigma) preparada en un buffer constituido por Tris-HCl 10 mM y acetato de magnesio 0.5 mM a pH 7.0, y $800 \mu\text{L}$ de un buffer de reacción constituido por Tris-HCl 45 mM, acetato de magnesio 5.6 mM, imidazol 45 mM y CaCl_2 2.5 mM, a pH 7. La mezcla anterior se incubó durante 30 minutos a 30°C . Transcurrido este tiempo se adicionaron $100 \mu\text{L}$ de AMPC 10.8 mM a cada una de las muestras y la mezcla resultante se incubó nuevamente a 30°C durante 30 minutos. Al término de este segundo periodo de incubación se adicionaron a cada muestra $100 \mu\text{L}$ de ácido tricloroacético al 55% para detener la reacción.

La cuantificación del fosfato generado en la reacción se llevó a cabo utilizando un método espectrofotocolorimétrico (Sumner, 1944), de acuerdo al procedimiento siguiente: A una alícuota de $500 \mu\text{L}$ de la mezcla de reacción se le adicionaron $800 \mu\text{L}$ de heptamolibdato de amonio al 6.6% en H_2SO_4 3.75 N y $200 \mu\text{L}$ de FeSO_4 al 10%. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se determinó la densidad óptica de cada una de ellas a 660 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en una curva estándar de fosfato monobásico de potasio para determinar la concentración de fosfato obtenido en cada tratamiento (**Figura 22**).

3.1.4.2 Obtención de la curva estándar de fosfato inorgánico.

La curva estándar se construyó a partir de una disolución 50mM de fosfato monobásico de potasio (Sigma) tomando las alícuotas necesarias para obtener 14 concentraciones diferentes en un intervalo de 50 a 700 nm. A cada alícuota se añadieron

800 μL de FeSO_4 al 10% y agua desionizada hasta obtener un volumen final de 1500 μL . La densidad óptica de las muestras se determinó a 660 nm utilizando un espectrofotómetro Cintra 5.

3.1.4.3 Determinación del efecto del (+)-5-metoxihamaudol (16) sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de calmodulina.

Para evaluar el efecto del compuesto **16** sobre la actividad enzimática de la fosfodiesterasa en presencia de la proteína calmodulina se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones del compuesto de prueba (0 a 100 μM) y se incubaron con una concentración saturante de calmodulina de cerebro de bovino (0.2 μg), de acuerdo con el procedimiento antes descrito. El compuesto a evaluar se adicionó después de incubar durante tres minutos la mezcla de reacción que contenía 0.015 unidades de fosfodiesterasa de cerebro de bovino, 0.2 μg de calmodulina de cerebro de bovino, 0.3 unidades de 5'-nucleotidasa de veneno de *Crotalus atrox* y 800 μL del buffer de reacción. Cada ensayo se realizó por triplicado y como control positivo se utilizó clorpromazina.

3.1.4.4 Determinación del efecto del (+)-5-metoxihamaudol (16) sobre la actividad basal de la enzima fosfodiesterasa del AMPc.

La evaluación del efecto del compuesto de prueba sobre la actividad enzimática de la fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita en el inciso 3.1.4.3, con la excepción de que no se adicionó calmodulina a la mezcla de reacción.

3.2 Procedimientos experimentales generales.

3.2.1 Análisis cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en columna abierta se efectuaron empleando columnas de vidrio de diferentes capacidades empacadas con gel de sílice (sílica gel G-60 Merck, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 70-230) como adsorbente. El proceso de elución se llevó a cabo con gradientes de Hex:AcOEt:MeOH o CH_2Cl_2 :MeOH, y se monitoreo por cromatografía en capa fina.

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron en placas de aluminio recubiertas con gel de sílice de 0.25 mm de espesor (sílica gel 60 F₂₅₄ Merck) o con placas de vidrio recubiertas con gel de sílice de 1 mm de espesor (sílica gel 60 F₂₅₄ Merck), en su modalidad analítica y preparativa respectivamente. Se emplearon diversos sistemas de elución (**Cuadro 6**) y sulfato cérico como agente cromógeno para el revelado (**Cuadro 7**), previa visualización de las placas con luz UV (onda corta, 254 nm; onda larga, 365 nm).

Cuadro 6. Sistemas de elución empleados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Sistema de elución	Composición	Proporción
1	Hexano	100%
2	Hex:AcOEt	Diversas
3	AcOEt	100%
4	AcOEt:MeOH	Diversas
5	CH_2Cl_2	100%
6	CH_2Cl_2 :MeOH	Diversas
7	MeOH	100%

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se llevó a cabo en un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA) equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (Waters 996) colocado a 190-350 nm, y/o con un detector UV Dual (Waters 2487). Se emplearon columnas de gel

de sílice de fase normal (modalidad analítica: μ -porasil™ 125 Å 10 μ m, 3.9 × 300 mm; modalidad preparativa: μ -porasil™ 125 Å 10 μ m, 19 × 300 mm) o de fase reversa (modalidad analítica: Prep Nova-Pak® HR 60 Å 6 μ m, 3.9 × 300 mm; modalidad preparativa: Prep Nova-Pak® HR 60 Å 6 μ m, 19 × 300 mm). El volumen de inyección de las muestras fue de 50 μ L a una concentración de 6 μ g/ μ L para las columnas analíticas, y de 60 μ g/ μ L para las columnas preparativas. El control del equipo, la adquisición de los datos, el procesamiento y el manejo de la información cromatográfica se llevó a cabo a través del programa Millenium 32, Versión 3.05.01 (Waters).

Cuadro 7. Agente cromógeno utilizado para los análisis cromatográficos en capa fina.

Reactivo	Composición	Referencia
Sulfato cérico*	12.0 g de CeSO ₄ 22.2 mL de H ₂ SO ₄ conc. 350.0 g de hielo picado	Stahl, 1969 Lowery et al, 1993

*Para el desarrollo del color fue necesario calentar las cromatoplaquetas en una parrilla de calentamiento a 110°C aproximadamente por 2 minutos.

Los análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), se realizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890 serie II acoplado a un espectrómetro de masas modelo JEOL SX-102A. Se inyectaron 0.2 μ L de cada una de las muestras de prueba en una columna capilar HP-5MS (5% metil fenil silicona) empleando helio como gas acarreador a una presión manométrica de 0.6 Kg/cm² y con flujo de 2 mL/min. La temperatura del inyector se mantuvo en 260°C, la temperatura inicial de la columna fue de 150°C y se programó para alcanzar una temperatura de 260°C con un calentamiento gradual de 10°C/min.

3.2.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales y sus derivados.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros en el infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro FT IR Perkin-Elmer modelo 1605, en pastilla de KBr o película. Los espectros en el ultravioleta (UV) se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo Lambda 2, en solución de MeOH. Las rotaciones ópticas se tomaron en un polarímetro JASCO DIP-360.

Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas modelo JEOL SX-102A, a una energía de ionización de 70 eV. Cada uno de los espectros se registró con un barrido de 33 a 630 unidades de masa/carga (m/z) por segundo.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ^1H) y de carbono 13 (RMN- ^{13}C), incluyendo los experimentos bidimensionales de COSY, NOESY, HETCOR y FLOCK; se obtuvieron en un espectrómetro Varian Unity INOVA, el cual se operó a una frecuencia de 300 MHz (RMN- ^1H) o 75 MHz (RMN- ^{13}C). Los espectros se registraron en CDCl_3 ó CD_3OD , y los desplazamientos químicos se asignaron en unidades δ (ppm), referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los análisis arriba indicados se efectuaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

3.3 Estudio químico del extracto activo obtenido a partir de las partes aéreas de *Prinosciadium watsoni*.

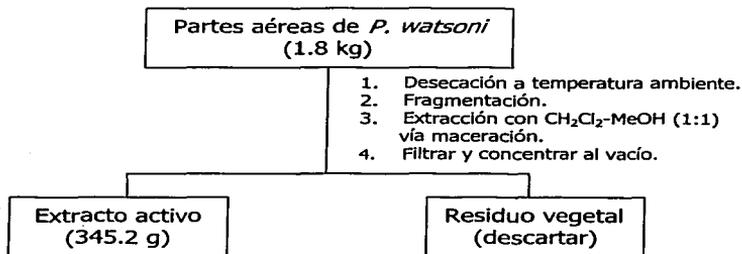
3.3.1 Material vegetal.

Las partes aéreas de *Prinosciadium watsoni* Coulter & Rose se colectaron el 12 de Febrero de 1999, en San Luis Potosí, México (Sierra Alvarez, Municipio Villa de Zaragoza); y fueron identificadas por el Dr. Robert Bye del Instituto de Biología, UNAM. Un ejemplar de referencia se conserva en la Colección Etnobotánica del Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM (Voucher R. Bye *et al.* 26911).

3.3.2 Obtención del extracto activo de las partes aéreas de *Prinosciadium watsoni*.

Las partes aéreas de *P. watsoni* se desecaron a temperatura ambiente. Una vez seco, la fragmentación del material vegetal se realizó en un molino Willey Modelo 4. El material vegetal seco y molido (1.8 kg) fue sometido a un proceso de maceración exhaustiva a temperatura ambiente con una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) (7 L).

El extracto obtenido se filtró y el disolvente se eliminó por evaporación. El peso del extracto seco fue de 345.2 g. En el **Esquema 1** se resume el proceso de extracción empleado.



Esquema 1. Obtención del extracto activo de *P. watsoni*.

3.3.3 Fraccionamiento primario del extracto activo de *Prinosciadium watsoni*.

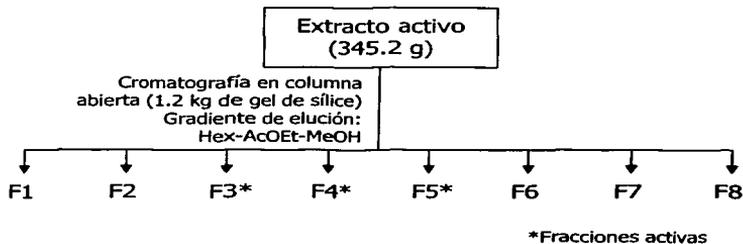
El fraccionamiento primario del extracto se realizó por medio una cromatografía en columna abierta usando gel de sílice como adsorbente (1.2 kg). Para eluir la columna se utilizó un gradiente de Hexano-AcOEt-MeOH, con lo que se obtuvieron un total de 49 fracciones de 1 L cada una (**Cuadro 8**) que se reunieron en ocho fracciones primarias por la similitud mostrada en cromatografía en capa fina. Este proceso se resume en el **Esquema 2**.

Cuadro 8. Fraccionamiento primario del extracto activo de *P. watsoni*.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones combinadas	Clave de la fracción	Peso (g)
Hexano	100%	1-4	F1	-
Hexano-AcOEt	90:10	5-9	F2	60.14
Hexano-AcOEt	80:20	10-16	F3*	52.3
Hexano-AcOEt	70:30	17-23	F4*	144.37
Hexano-AcOEt	50:50	24-40	F5*	12.77
AcOEt	100%	41-43	F6	-
AcOEt-MeOH	90:10	44-46	F7	5.7954
AcOEt-MeOH	50:50	47-49	F8	-

*Fracciones fitotóxicas en *Lemna pausicostata*.

Es importante mencionar que los procesos enunciados en los puntos 3.3.1 a 3.3.3 son los que se realizaron durante el anterior estudio de *Prionosciadium watsoni* (Valencia *et al.*, 2002). Los puntos que se mencionarán de aquí en adelante corresponden al estudio de las fracciones que quedaron sin investigar (F3* y F7) en el trabajo de Valencia y colaboradores (2002).

**Esquema 2.** Fraccionamiento primario del extracto activo de *P. watsoni*.

3.3.4 Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa F3.

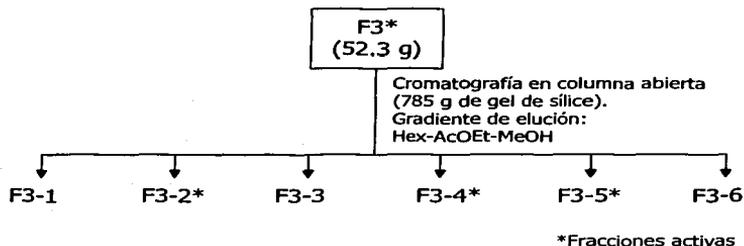
La fracción primaria F3* (52.3 g) se sometió a un fraccionamiento secundario (**Esquema 3**) por cromatografía en columna abierta usando 785 g de gel de sílice y un gradiente de elución de Hexano-AcOEt-MeOH. Se colectaron un total de 129 fracciones de 250 mL que se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica en seis fracciones secundarias como se indica en el **Cuadro 9**.

El ensayo de fitotoxicidad sobre *Lemna paucicostata* indicó que las fracciones con mayor actividad fitotóxica eran las fracciones F3-2 (23.4395 g), F3-4 (0.9776 g) y F3-5 (0.6284 g).

Cuadro 9. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa F3.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones colectadas	Fracciones combinadas	Clave de la fracción	Peso (g)
Hexano	100%	1-13	1-24	F3-1	9.0364
Hex-AcOEt	90:10	14-25	25-41	F3-2*	23.4395
Hex-AcOEt	80:20	26-37	42-56	F3-3	17.4389
Hex-AcOEt	70:30	38-49	57-70	F3-4*	0.9776
Hex-AcOEt	60:40	50-61	71-108	F3-5*	0.6284
Hex-AcOEt	50:50	62-73	109-129	F3-6	1.1672
Hex-AcOEt	40:60	74-85	—	—	—
Hex-AcOEt	20:80	86-97	—	—	—
AcOEt	100%	98-109	—	—	—
AcOEt-MeOH	50:50	110-127	—	—	—
MeOH	100%	128-129	—	—	—

*Fracciones fitotóxicas en *Lemna paucicostata*.



Esquema 3. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa F3.

3.3.4.1 Obtención de los compuestos β -sitosterol (13), (9R)-9-isobutiroliloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (9) y jatamansina (10) a partir de la fracción secundaria activa F3-2.

La fracción secundaria activa F3-2 (23.4395 g) se sometió a un fraccionamiento por cromatografía en columna abierta usando 235 g de gel de sílice y un gradiente de elución de Hex-AcOEt-MeOH. Se colectaron 152 fracciones de 100 mL, las cuales se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica en nueve fracciones terciarias, como se indica en el **Cuadro 10**.

El ensayo de fitotoxicidad sobre *L. pausicostata* permitió determinar que la actividad fitotóxica se concentraba en la fracción terciaria F3-2-2 (13.6434 g). Esta fracción se sometió a otro fraccionamiento por cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (409.3 g) con un gradiente de elución Hex-AcOEt-MeOH. Se colectaron 325 fracciones de 100 mL, las cuales se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica en nueve fracciones cuaternarias (**Cuadro 11**).

Cuadro 10. Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria activa F3-2.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones colectadas	Fracciones combinadas	Clave de la fracción	Peso (g)
Hexano	100%	1-10	1-29	F3-2-1	0.6539
Hex-AcOEt	95:5	11-20	30-43	F3-2-2*	13.6434
Hex-AcOEt	90:10	21-31	44-49	F3-2-3	1.6185
Hex-AcOEt	85:15	31-40	50-52	F3-2-4	0.1571
Hex-AcOEt	80:20	41-85	53-73	F3-2-5	1.4551
Hex-AcOEt	75:25	86-95	74-90	F3-2-6	0.7269
Hex-AcOEt	70:30	96-105	91-101	F3-2-7	0.6489
Hex-AcOEt	60:40	106-115	102-113	F3-2-8	0.9342
Hex-AcOEt	50:50	116-125	114-152	F3-2-9	2.3414
Hex-AcOEt	25:75	126-135	-	-	-
AcOEt	100%	136-145	-	-	-
AcOEt-MeOH	50:50	146-152	-	-	-

*Fracción fitotóxica sobre *Lemna pausicostata*.

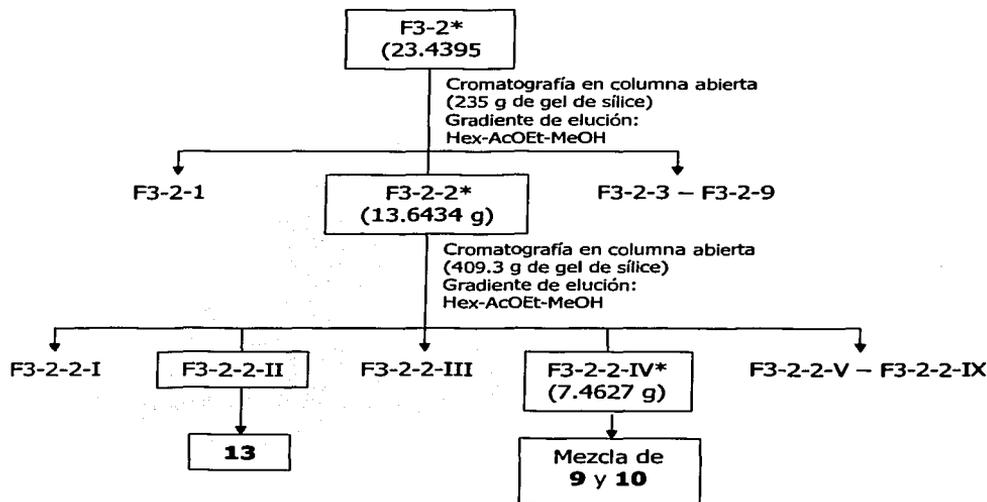
De la fracción F3-2-2-II precipitaron 133.3 mg de unos cristales blancos correspondientes a β -sitosterol (**13**), idéntico en todos sus aspectos a una muestra auténtica.

El análisis de la fracción F3-2-2-IV por CG-EM y RMN-¹H reveló que se trataba de una mezcla (aproximadamente en una relación 2:3) de los compuestos **9** y **10**. El **Esquema 4** resume el aislamiento y purificación de los compuestos **9**, **10** y **13**.

Cuadro 11. Fraccionamiento cuaternario de la fracción terciaria activa F3-2-2.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones colectadas	Fracciones combinadas	Clave de la fracción	Peso (g)
Hexano	100%	1-18	1-148	F3-2-2-I	0.1586
Hex-AcOEt	99:1	19-39	149-174	F3-2-2-II	0.4427
Hex-AcOEt	98:2	40-56	175-183	F3-2-2-III	1.1844
Hex-AcOEt	97:3	57-72	184-216	F3-2-2-IV*	7.4627
Hex-AcOEt	96:4	73-90	217-256	F3-2-2-V	1.7422
Hex-AcOEt	95:5	91-107	257-299	F3-2-2-VI	0.4008
Hex-AcOEt	94:6	108-115	300-307	F3-2-2-VII	0.4707
Hex-AcOEt	93:7	116-123	308-318	F3-2-2-VIII	0.6703
Hex-AcOEt	92:8	124-131	319-325	F3-2-2-IX	0.6323
Hex-AcOEt	91:9	132-261	—	—	—
Hex-AcOEt	90:10	262-276	—	—	—
Hex-AcOEt	89:11	277-285	—	—	—
Hex-AcOEt	85:15	286-299	—	—	—
Hex-AcOEt	80:20	300-307	—	—	—
Hex-AcOEt	50:50	308-313	—	—	—
AcOEt	100%	314-319	—	—	—
AcOEt-MeOH	50:50	320-325	—	—	—

*Fracción fitotóxica sobre *Lemna paucicostata*.



*Fracciones activas

Esquema 4. Aislamiento y purificación de los compuestos **9**, **10** y **13**.

3.3.4.2 Obtención de los compuestos (+)-lomatina (**14**), seravshanina (**8**) e isopterixina (**15**) a partir de la fracción secundaria activa **F3-4**

El fraccionamiento y purificación de la fracción secundaria **F3-4** se llevó a cabo por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) usando una columna preparativa de gel de sílice fase normal, una fase móvil constituida por Hex-*i*PrOH-MeOH 90:5:5 con un flujo de 8.3 mL/min; la detección se realizó a una $\lambda = 220$ nm. Este proceso permitió la obtención del compuesto **14** (12.7 mg). El tiempo de retención de dicho compuesto fue de 20.43 min (**Figura 2**).

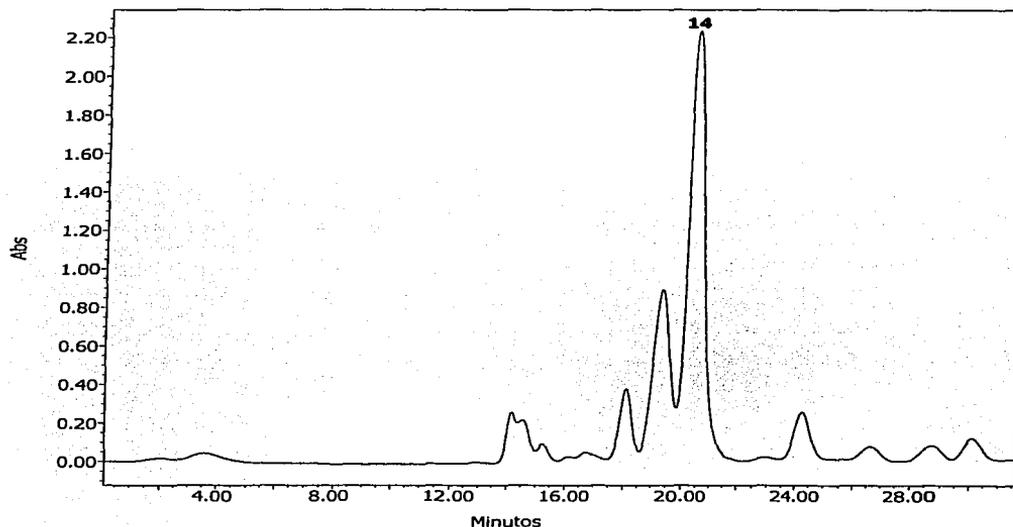


Figura 2. Cromatograma de la fracción secundaria activa F3-4.

El análisis por cromatografía de gases del pico con tiempo de retención de 19.33 min, reveló que se trataba de una mezcla de tres compuestos, por lo que esta fracción, F3-4-3, se purificó por CLAE usando una columna de gel de sílice fase reversa analítica, una fase móvil constituida por $\text{CH}_3\text{CN-MeOH}$ 90:10 con un flujo de 0.35 mL/min; la detección se realizó a una $\lambda = 207$ nm. Este proceso permitió la obtención de los compuestos **8** (4 mg) y **15** (3 mg) con un tiempo de retención de 6.36 min y 6.81 min, respectivamente (**Figura 3**).

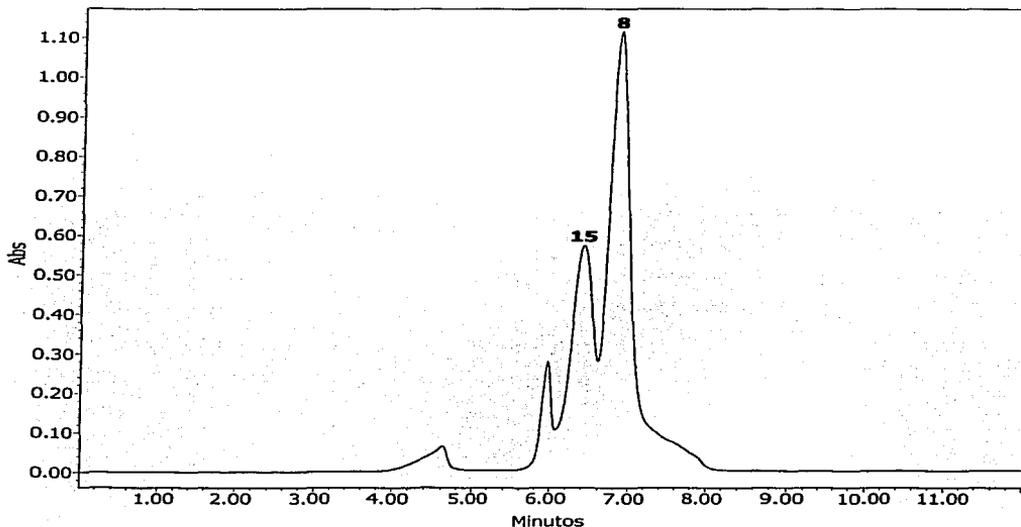


Figura 3. Cromatograma de la fracción terciaria F3-4-3.

3.3.5 Obtención del compuesto (+)-5-metoxihamaudol (**16**) y del β -D-glucositosterol (**17**) a partir de la fracción primaria F7.

La fracción primaria F7 (5.8572 g) se sometió a un fraccionamiento por cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (100 g). Se utilizó un gradiente de elución de CH_2Cl_2 -MeOH y se colectaron un total de 137 fracciones de 40 mL, las cuales se reunieron según su similitud cromatográfica en 10 fracciones secundarias (**Cuadro 12**).

Parte de la fracción F7-4 (50 mg) se cromatografió en capa fina preparativa con un sistema de elución de CH_2Cl_2 -MeOH 95:5 y cada placa se eluyó 3 veces. Posteriormente se purificó el compuesto **16** por CLAE usando una columna preparativa de gel de sílice fase reversa, una fase móvil constituida por CH_3CN -MeOH 60:40 con un flujo de 8.3 mL/min; la

detección se realizó a una $\lambda = 216$ nm. Este proceso permitió la obtención de 30 mg de **16** con un tiempo de retención de 5.86 min (**Figura 4**).

Cuadro 12. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F7.

Sistema de elución	Proporción	Fraciones colectadas	Fraciones combinadas	Clave de la fracción	Peso (g)
CH ₂ Cl ₂	100%	1-35	1-19	F7-1	0.0376
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	99:1	36-42	20-49	F7-2	0.0858
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	98:2	43-50	50	F7-3	0.1016
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	97:3	51-75	51-58	F7-4	0.6299
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	96:4	76-79	59-66	F7-5	0.0699
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	95:5	80-83	67-78	F7-6	0.0484
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	94:6	84-87	79-88	F7-7	0.3947
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	93:7	88-91	89-95	F7-8	0.4634
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	92:8	92-95	96-110	F7-9	0.7753
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	91:9	96-99	111-137	F7-10	1.2645
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	90:10	100-103	—	—	—
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	88:12	104-111	—	—	—
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	80:20	112-121	—	—	—
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	70:30	122-126	—	—	—
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	50:50	127-131	—	—	—
MeOH	100%	132-137	—	—	—

A partir de la fracción F7-8 precipitó un sólido blanco (131.3 g) que se separó por filtración. Dicho sólido correspondió al compuesto **17**, idéntico en todos sus aspectos a una muestra auténtica de β -D-glucositosterol. El **Esquema 5** resume el aislamiento y purificación de los compuestos **16** y **17**.

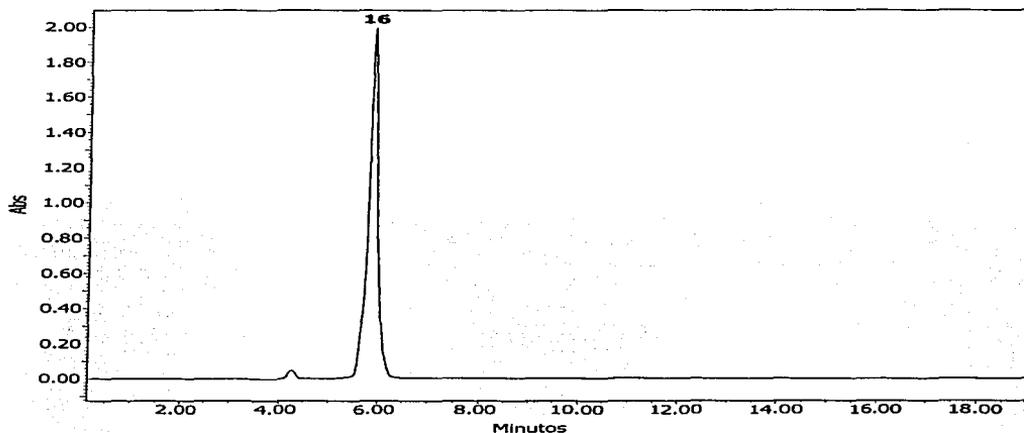
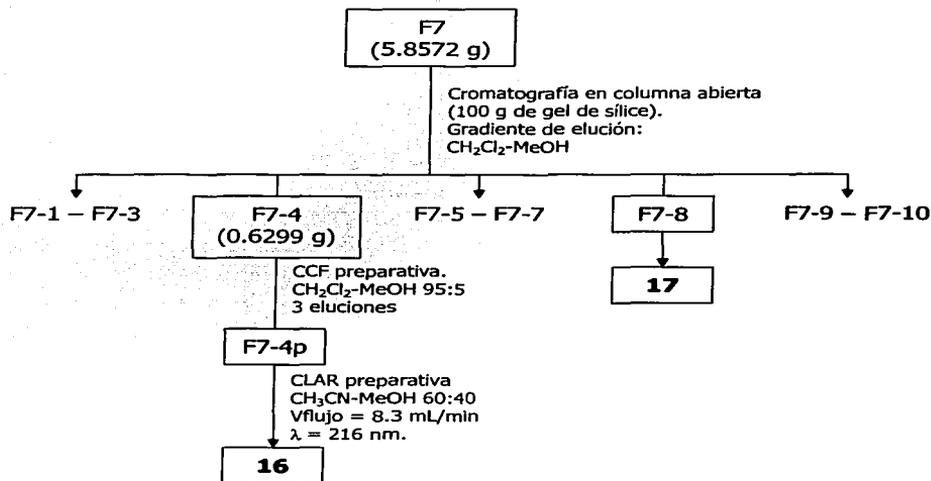


Figura 4. Cromatograma de la fracción secundaria F7-4p.



Esquema 5. Aislamiento y purificación de los compuestos **16** y **17** a partir de la fracción primaria F7.

3.3.6 Preparación de isopterixina (15).

A una solución de 20 mg del compuesto **2** en 1 mL de piridina, se adicionó 1 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 24 horas; al término de ese tiempo se adicionó agua destilada y se extrajo con CH_2Cl_2 . La fase orgánica resultante se lavó con HCl 1 N, posteriormente con una solución de NaHCO_3 al 10% y finalmente con agua. Por último la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. El producto acetilado se purificó por cromatografía en capa fina preparativa (Hex-AcOEt 6:4) obteniéndose 13 mg del compuesto **15**. El producto **15** se obtuvo como un sólido blanco de punto de fusión 134°-135°C, $[\alpha]_D^{20}$ -39 (conc. 1 mg/mL EtOH), idéntico en todos los aspectos al producto natural.

3.3.7 Preparación del (+)-5-metoxihamaudol (16).

A una solución de **11** (5 mg) ó de **12** (10 mg) en 2 mL de MeOH se adicionaron 2 mL de KOH metanólico 1 N. La mezcla se calentó a reflujo por 3.5 horas. Cada mezcla de reacción se diluyó con agua destilada, se concentró al vacío para remover el disolvente orgánico, se acidificó con H_2SO_4 2 N (2 mL) y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica resultante se lavó sucesivamente con una solución acuosa al 10% de NaHCO_3 y agua, y por último, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. En cada caso el producto resultante se purificó por cromatografía en capa fina preparativa (Hex-AcOEt 1:1) para generar 2 mg de **16** a partir de **11** y 5 mg a partir de **12**. El producto **16** se obtuvo como un sólido cristalino de punto de fusión de 137–138 °C; $[\alpha]_D^{20}$ + 560 (conc. 1 mg/mL CHCl_3), idéntico en todos los aspectos al producto natural.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La especie *Prionosciadium watsoni* Coulter & Rose (Umbelliferae) fue seleccionada con base en los criterios etnomédico y quimiotaxonómico como una fuente de principios biodinámicos. El estudio de esta especie, iniciado por Valencia *et al.* (2002), condujo a la obtención de varios compuestos con actividad fitotóxica sobre el crecimiento de las arvenses *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli* y *Lemna pausicostata*.

De tal manera que el presente trabajo de tesis complementa el estudio de las fracciones activas detectadas inicialmente en la investigación de Valencia *et al.* (2002), y además incluye el estudio de una fracción inactiva en la cual se detectó cromatográficamente un compuesto mayoritario. Este compuesto se observaba como un cromóforo amarillo al visualizar las placas con CeSO_4 . El producto se aisló finalmente mediante una combinación de métodos cromatográficos y representa un nuevo producto natural.

El estudio biodirigido de la fracción primaria activa F3 se realizó empleando como ensayo de monitoreo la determinación de la actividad fitotóxica sobre *Lemna pausicostata* (inciso 3.1.1, Parte Experimental).

Los compuestos aislados también se evaluaron para determinar su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de las arvenses *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*.

De manera adicional, se investigó la interacción potencial de los compuestos aislados con la proteína reguladora calmodulina (CaM), ya que se ha observado que esta proteína constituye un importante blanco de acción de otras fitotoxinas (Lee *et al.*, 1995).

4.1 Aislamiento de los compuestos (9R)-9-isobutiroliloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (9) y jatamansina (10), β -sitosterol (13), (+)-lomatina (14), seravshanina (8) e isopterixina (15) a partir de la fracción primaria activa F3; y del (+)-5-metoxihamaudol (16) y β -D-glucositosterol (17) a partir de la fracción primaria F7.

El fraccionamiento secundario biodirigido de la fracción primaria activa F3 mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice permitió la obtención de seis fracciones secundarias, de las cuales F3-2, F3-4 y F3-5 resultaron fitotóxicas contra *Lemna pausicostata* (**Cuadro 13**).

Cuadro 13. Actividad fitotóxica sobre *L. pausicostata* de las fracciones secundarias obtenidas a partir de la fracción primaria activa F3.

Tratamiento	Actividad fitotóxica ($\mu\text{g/mL}$) ^a
F3-1	>1000
F3-2*	500
F3-3	>1000
F3-4*	62
F3-5*	62
F3-6	1000

* Fracciones activas. ^a Concentración en la cual se observó claramente el blanqueamiento de los tejidos de las plantas.

El fraccionamiento terciario de la fracción secundaria activa F3-2, a través de una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice, permitió la obtención de nueve fracciones secundarias. El ensayo biológico de monitoreo indicó que la actividad fitotóxica se concentraba en la fracción terciaria F3-2-2 (**Cuadro 14**).

El fraccionamiento cuaternario de la fracción activa F3-2-2 por cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice, condujo a la obtención de nueve fracciones cuaternarias. A partir de la fracción F3-2-2-II cristalizó el β -sitosterol (**13**). El análisis de la fracción mayoritaria F3-2-2-IV por CG/EM (**Figura 5**) indicó que se trataba de una mezcla

constituida por los compuestos **9** y **10**, previamente aislados por Valencia y colaboradores (2002) de la fracción F4.

Cuadro 14. Actividad fitotóxica sobre *L. pausicostata* de las fracciones terciarias obtenidas a partir de la fracción secundaria activa F3-2.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	18	36	75	150	300	600
Tratamiento	Reducción de clorofila (%)					
F3-2-1	0	0	0	0	5	100
F3-2-2*	5	5	25	25	25	50
F3-2-3	0	0	5	5	25	100
F3-2-4	0	0	0	5	5	50
F3-2-5	0	0	0	0	5	50
F3-2-6	0	0	0	0	5	25
F3-2-7	0	0	0	0	5	50
F3-2-8	0	0	0	0	0	25
F3-2-9	0	0	0	0	5	50

*Fracción fitotóxica contra *L. pausicostata*.

El fraccionamiento y purificación de la fracción secundaria activa F3-4 por CLAE (gel de sílice fase normal) permitió la obtención del compuesto (+)-lomatina (**14**) y de una mezcla (F3-4-3) constituida por tres compuestos, de acuerdo al análisis por cromatografía de gases (**Figura 6**). A partir de esta mezcla se lograron separar por CLAE (gel de sílice fase reversa) la seravshanina (**8**) e isopterixina (**15**).

Por último, el fraccionamiento por cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción primaria F7, permitió la obtención de 10 fracciones secundarias. La fracción F7-4 contenía al compuesto mayoritario **16** (cromóforo amarillo), el cual se separó por cromatografía en capa fina preparativa y se purificó por CLAE (gel de sílice fase reversa). De la fracción F7-8 precipitó de manera espontánea el β -D-glucositosterol (**17**).

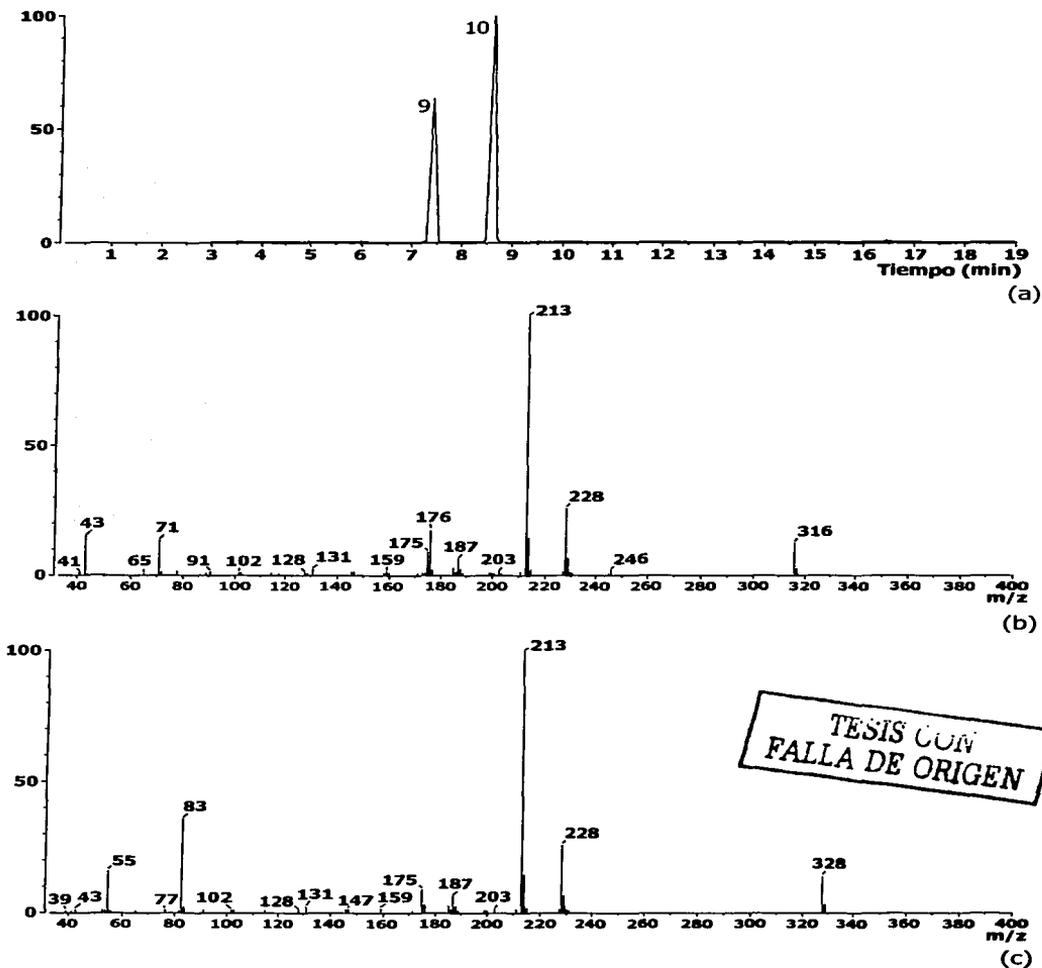


Figura 5. (a) Cromatograma de gases de la fracción F3-2-2-IV, (b) Espectro de masas (IE) del compuesto **9**, (c) Espectro de masas (IE) del compuesto **10**.

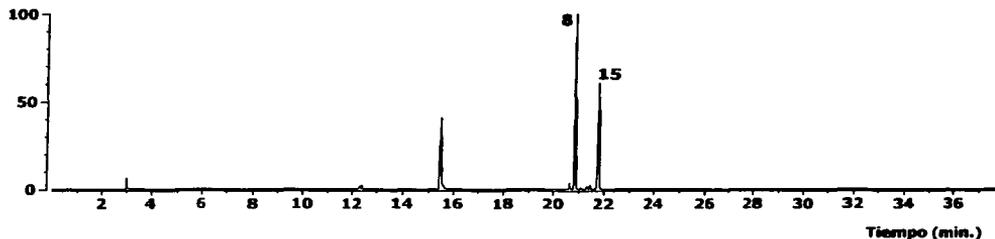
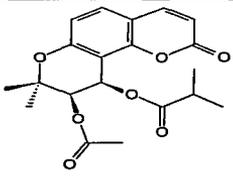


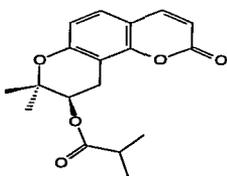
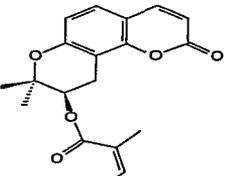
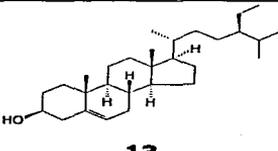
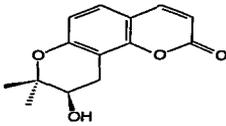
Figura 6. Cromatograma de gases de la fracción terciaria F3-4-3.

En el **Cuadro 15** se indican las estructuras de los productos naturales aislados en el presente estudio, su rendimiento (en base al peso del material vegetal seco) y la fracción cromatográfica de la cual se obtuvieron. Los compuestos **14** y **15** son productos novedosos de la especie *P. watsoni*, en tanto que el compuesto **16** constituye un nuevo producto natural.

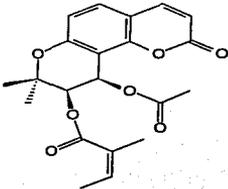
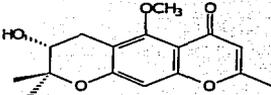
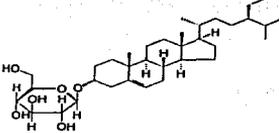
Cuadro 15. Metabolitos aislados a partir de las fracciones primarias F3 y F7.

Metabolito	Rendimiento (%)	Fracción de origen	Referencia
 <p style="text-align: center;">8</p>	2.22×10^{-4}	F3-4-3	Swager & Cardellina II, 1985.

Cuadro 15. Metabolitos aislados a partir de las fracciones primarias F3 y F7
(continuación).

Metabolito	Rendimiento (%)	Fracción de origen	Referencia
<p>Mezcla de</p>  <p>9</p>  <p>10</p>	0.41	F3-2-2-IV	<p>Valencia <i>et al.</i>, 2002;</p> <p>Shanbhag <i>et al.</i>, 1964.</p>
 <p>13</p>	7.41×10^{-3}	F3-2-2-II	<p>Anderson <i>et al.</i>, 1926;</p> <p>Bernstein, 1937.</p>
 <p>14</p>	7.06×10^{-4}	F3-4	<p>Nielsen, <i>et al.</i>, 1971;</p> <p>Shanbhag <i>et al.</i>, 1964;</p> <p>Bolhman & Franke, 1971.</p>

Cuadro 15. Metabolitos aislados a partir de las fracciones primarias F3 y F7
(continuación).

Metabolito	Rendimiento (%)	Fracción de origen	Referencia
 <p style="text-align: center;">15</p>	1.67×10^{-4}	F3-4-3	Nielsen & Soine, 1967.
 <p style="text-align: center;">16</p>	2.45×10^{-2}	F7-4	-
 <p style="text-align: center;">17</p>	7.29×10^{-3}	F7-8	Dictionary of Natural Products, 1994.

4.2 Caracterización de los compuestos aislados.

4.2.1 Caracterización de (9R)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (9), jatamansina (10), seravshanina (8), β -sitosterol (13) y β -D-glucositosterol (17).

La caracterización de los compuestos **9** y **10** se realizó por comparación con muestras auténticas obtenidas a partir de la fracción primaria activa F4 por Valencia *et al.* (2002). El patrón de fragmentación de estos compuestos en el espectro de masas modalidad impacto electrónico (**Figura 5**), resultó ser idéntico al de los compuestos previamente aislados. De manera adicional, los espectros de RMN de una mezcla 2:3 de los productos **9** y **10** obtenidos previamente, resultaron idénticos a los generados en el presente estudio (**Espectro 1, Apéndice**).

La seravshanina (**8**) (**Espectros 2, 3 y 4, Apéndice**) se caracterizó por comparación de sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas, con aquellas de muestras auténticas (Valencia *et al.*, 2002) y las reportadas en la literatura (Swager y Cardellina II, 1985).

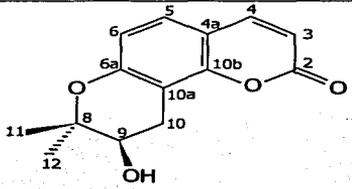
El β -sitosterol (**13**) y el β -D-glucositosterol (**17**) se caracterización por comparación con muestras auténticas.

4.2.2 Caracterización de (+)-lomatina (14) e isopterixina (15).

Los compuestos **14** y **15** constituyen productos novedosos de la especie *P. watsoni*. El análisis detallado de los espectros de RMN (**Cuadros 18 y 21**) permitió establecer que los productos naturales pertenecen al grupo de las piranocumarinas angulares (Valencia *et al.*, 2002). Las evidencias más importantes que permitieron proponer las estructuras de los productos se resumen a continuación. En primer lugar se analizarán las evidencias del compuesto **14** y enseguida las del **15**.

El compuesto (+)-lomatina (**14**) se obtuvo como un sólido cristalino color amarillo claro. Sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas se indican en los Cuadros 16 y 17.

Cuadro 16. Constantes físicas de (+)-lomatina (**14**).

Metabolito	 <p style="text-align: center;">14</p>
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₄ O ₄
Peso molecular	246
Punto de fusión	181-183 °C
[α]_D²⁰ (c 1 mg/mL, CH₂Cl₂)	+130

Cuadro 17. Constantes espectroscópicas (IR y UV) y espectrométricas (EM-IE *m/z*) de (+)-lomatina (**14**)

IR ν_{\max} . (pastilla) (Espectro 5, Apéndice)	3494, 2984, 2878, 1699, 1492, 1192.
UV (MeOH) λ_{\max} . (nm) (Espectro 6, Apéndice)	326.40
EM-IE <i>m/z</i> (int. rel.) (Espectro 7, Apéndice)	246 [M ⁺](60), 213 (15), 188 (12), 176 (100), 175 (77), 147 (9), 131 (7), 91 (8), 71 (11), 43 (12).

El espectro de RMN-¹H (**Cuadro 18; Espectro 8, Apéndice**) del producto **14** presentó las siguientes características:

- a) En δ_H 6.24 (H-3) y δ_H 7.63 (H-4) se observan dos dobletes ($J = 9.3$ Hz), señales diagnósticas de los protones de la porción α -pirona de una cumarina.
- b) En la región de los protones aromáticos se aprecian dos dobletes ($J = 8.7$ Hz) en δ_H 7.25 y 6.79 asignables a H-5 y H-6, respectivamente.
- c) En δ_H 1.36 y 1.42 se observan dos singuletes, integrando cada uno para tres hidrógenos, atribuibles a los metilos angulares sobre el anillo pirano de una piranocumarina.
- d) Por último, las señales restantes del anillo pirano (H-9, H-10 y H-10') se observan como un sistema ABX, las cuales correlacionan en el espectro 1H - 1H -COSY (**Figura 7**).

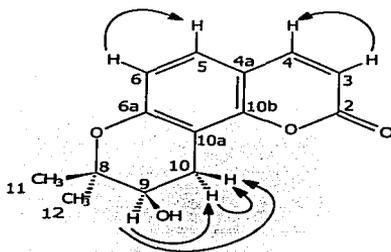


Figura 7. Correlaciones encontradas en el espectro 1H - 1H -COSY de (+)-lomatina (**14**).

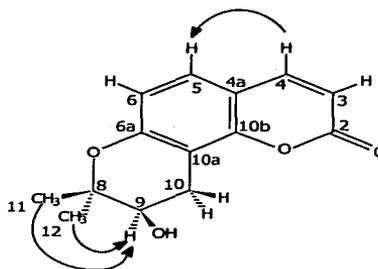


Figura 8. Correlaciones encontradas en el espectro NOESY de (+)-lomatina (**14**).

En el espectro de RMN- ^{13}C (**Cuadro 18; Espectro 11, Apéndice**) se observó una señal base de oxígeno, asignable al metino de la función carbinólica en δ_c 68.5 (C-9). Las restantes señales se asignaron como se indica en el **Cuadro 18**, por comparación con modelos apropiados (Valencia *et al.*, 2002).

La información proporcionada por los espectros de RMN (**Cuadro 18**), IR, espectrometría de masas, así como el valor positivo de rotación óptica (**Cuadro 16**) permitieron identificar al producto **14** como (+)-lomatina. Esta cumarina ha sido obtenida previamente a partir de otras fuentes naturales (Nielsen *et al.*, 1971; Shanbhag *et al.*, 1964; Bolhmann y Franke, 1971). Sin embargo, este estudio constituye la primera descripción en *Prinosciadium watsoni*.

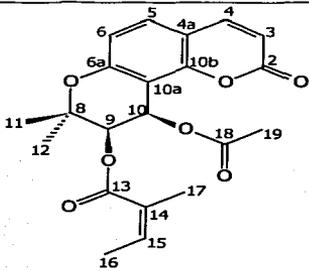
Cuadro 18. Datos de RMN de (+)-lomatina (**14**).*

Posición	δ_H	multiplicidad	J (Hz)	δ_C^a
2	—	—	—	161.3
3	6.24	d	9.3	112.5
4	7.63	d	9.3	143.9
4a	—	—	—	112.2
5	7.25	d	8.7	126.7
6	6.79	d	8.7	114.3
6a	—	—	—	153.6
8	—	—	—	70.7
9	3.92	dd	4.95	68.5
10	3.15	dd	4.8, 17.7	24.6
10'	2.98	dd	5.4, 17.7	—
10a	—	—	—	107.4
10b	—	—	—	156.4
11	1.36	s	—	22.1
12	1.42	s	—	25.8
OH-9	—	—	—	—

*Espectro registrado en $CDCl_3$. ^aAsignados por DEPT y HETCOR.

El compuesto **15** se obtuvo como un sólido de color blanco. Sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas se indican en los **Cuadros 19 y 20**.

Cuadro 19. Constantes físicas de isopterixina (**15**).

Metabolito	 <p style="text-align: center;">15</p>
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₂₂ O ₇
Peso molecular	386
Punto de fusión	134-135 °C
[α]_D²⁰ (c 1 mg/mL, EtOH)	-39

Cuadro 20. Constantes espectroscópicas (IR y UV) y espectrométricas (EM-IE *m/z*) de isopterixina (**15**).

IR ν_{\max} . (película) (Espectro 13, Apéndice)	2982, 1747, 1607, 1233
UV (MeOH) λ_{\max} . (nm) (Espectro 14, Apéndice)	322.58
EM-IE <i>m/z</i> (int. rel.) (Espectro 15, Apéndice)	386 [M ⁺] (2), 326 (20), 311 (61), 287 (79), 261 (23), 245 (100), 229 (81), 213 (12), 189 (12), 175 (14), 83 (72), 55 (18), 43 (8).

Los espectros de RMN del producto **15** (**Cuadro 21; Espectros 16 y 18, Apéndice**) presentaron también señales diagnósticas para una piranocumarina angular.

Los espectros fueron muy similares a los de la (+)-*cis*-kellactona (**1**) aislada por Valencia y colaboradores (2002). Las principales diferencias entre los espectros del producto **15** y los de la (+)-*cis*-kellactona (**1**) fueron las siguientes:

- i) Las señales para H-9 y H-10 se encuentran desplazadas a campos más bajos en **15** [δ_{H} 5.41 (H-9) y δ_{H} 6.60 (H-10)] debido a que los hidroxilos se encuentran esterificados en este caso. El valor de J_{9-10} de 4.8 Hz, fue consistente con la disposición *cis* de grupos carbinoles.
- ii) Además de las señales antes indicadas, se observan las señales asociadas con la presencia de un residuo derivado del ácido acético [δ_{H} 2.11 (H-19); δ_{C} 169.8 (C-18), δ_{C} 20.6 (C-19)] y otro derivado del ácido angélico [δ_{H} 6.14 (H-15), δ_{H} 1.96 (H-16), δ_{H} 1.87 (H-17); δ_{C} 166.4 (C-13), δ_{C} 126.9 (C-14), δ_{C} 139.8 (C-15), δ_{C} 15.8 (C16), δ_{C} 20.5 (C-17)].

Para determinar la ubicación de los residuos angeloil y acetil en el núcleo de la (+)-*cis*-kellactona se utilizó un método químico. Al tratar el compuesto (9*R*,10*R*)-10-hidroxi-9-(2-metil-but-(2*Z*)-enoiloxi)-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (**2**) aislado por Valencia *et al.* (2002) en el estudio anterior, con anhídrido acético y piridina (**Figura 10**), se obtuvo un producto idéntico en todos sus aspectos al producto natural **15**. Esta reacción evidenció entonces, que el grupo acetoxi se encontraba en C-10 y el angeloiloxi en C-9, y que por lo tanto el compuesto **15** se trataba de la isopterixina.

El producto **15** ya ha sido aislado ha partir de otras fuentes naturales (Nielsen & Soine, 1967); sin embargo, al igual que el compuesto **14**, este estudio constituye la primera descripción de su presencia en *Prinosciadium watsoni*.

Cuadro 21. Datos de RMN de isopterixina (15).*

Posición	δ_H	multiplicidad	J (Hz)	δ_C^a
2	—	—	—	159.9
3	6.24	d	9.3	113.2
4	7.60	d	9.6	143.3
4a	—	—	—	112.5
5	7.35	d	8.4	129.1
6	6.80	d	8.4	114.3
6a	—	—	—	156.7
8	—	—	—	78.0
9	5.41	d	4.8	69.7
10	6.60	d	4.8	61.0
10a	—	—	—	107.0
10b	—	—	—	153.9
11	1.48	s	—	22.9
12	1.44	s	—	24.9
13	—	—	—	166.4
14	—	—	—	126.9
15	6.14	cc	1.5, 7.2	139.8
16	1.96	dc	1.5, 7.2	15.8
17	1.87	q	1.5	20.5
18	—	—	—	169.8
19	2.11	s	—	20.6

*Espectro registrado en $CDCl_3$. ^aAsignados por DEPT y HETCOR.

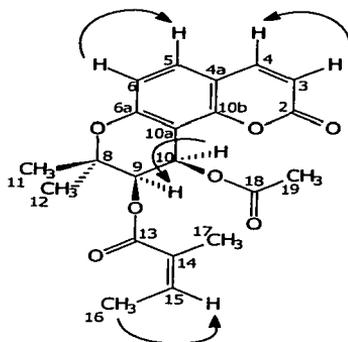


Figura 9. Correlaciones encontradas en el espectro ^1H - ^1H -COSY de isopterixina (**15**).

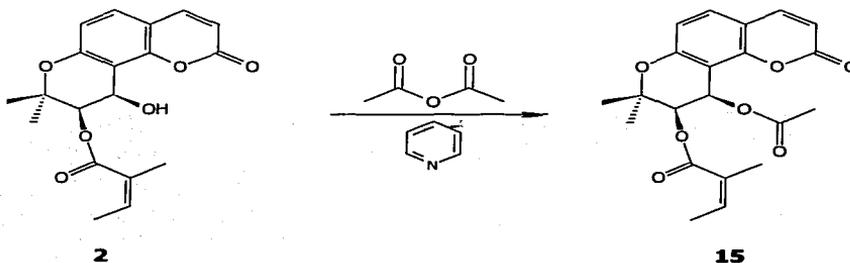


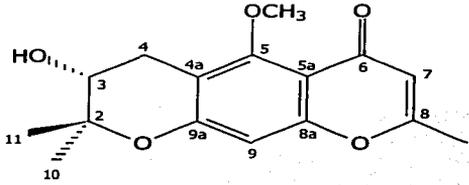
Figura 10. Semisíntesis del compuesto **15** por acetilación de (9*R*,10*R*)-10-hidroxi-9-(2-metil-but-(2*Z*)-enoiloxi)-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (**2**).

4.2.3 Caracterización del (+)-5-metoxihamaudol (**16**).

En los **Cuadros 22** y **23** se indican las constantes físicas, espectroscópicas (UV e IR) y espectrométricas (EM-IE m/z) del compuesto **16**.

El compuesto **16** se aisló como un sólido cristalino de color amarillo claro, soluble en CH_2Cl_2 , CHCl_3 , AcOEt , MeOH y DMSO . Su fórmula molecular se estableció como $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_5$ por espectrometría de masas, observándose el ión molecular $[\text{M}^+]$ en una relación m/z 291. La fórmula calculada permite un índice de deficiencia de hidrógeno de ocho. El espectro en el IR presenta bandas de absorción asociadas con la presencia de un carbonilo α,β -insaturado ($\nu_{\text{max.}} \sim 1657 \text{ cm}^{-1}$) y de un grupo hidroxilo ($\nu_{\text{max.}} \sim 3380 \text{ cm}^{-1}$).

Cuadro 22. Constantes físicas del (+)-5-metoxihamaudol (**16**).

Metabolito	 <p style="text-align: center;">16</p>
Fórmula molecular	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_5$
Peso molecular	290
Punto de fusión	137-138 °C
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (c 1 mg/mL, CHCl_3)	+560

Cuadro 23. Constantes espectroscópicas (IR y UV) y espectrométricas (EM-IE m/z) del (+)-5-metoxihamaudol (**16**).

IR ν_{max} (cm^{-1}) (pastilla) (Figura 11)	3380, 3150, 2966, 2917, 2850, 1657, 1465, 1172.
UV (MeOH) λ_{max} (nm) (Figura 12)	214.57, 242.93, 290.65
EM-IE m/z (int. rel.) (Figura 13)	290 $[\text{M}^+]$ (100), 275 (6), 257 (10), 244 (5), 231 (65), 213 (65), 201 (24), 189 (16), 186 (15), 174 (5), 59 (21).

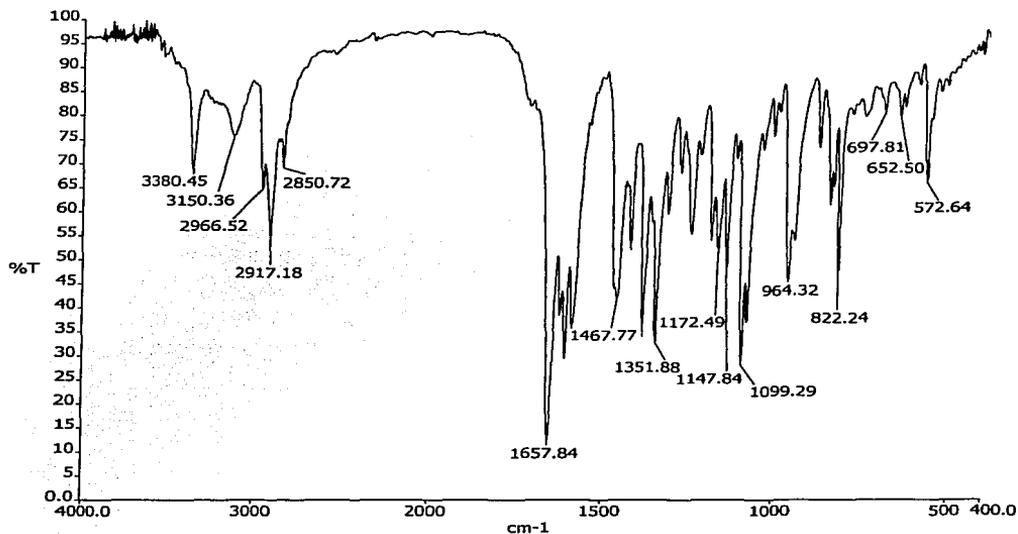


Figura 11. Espectro en el IR del (+)-5-metoxihamaudol (16).

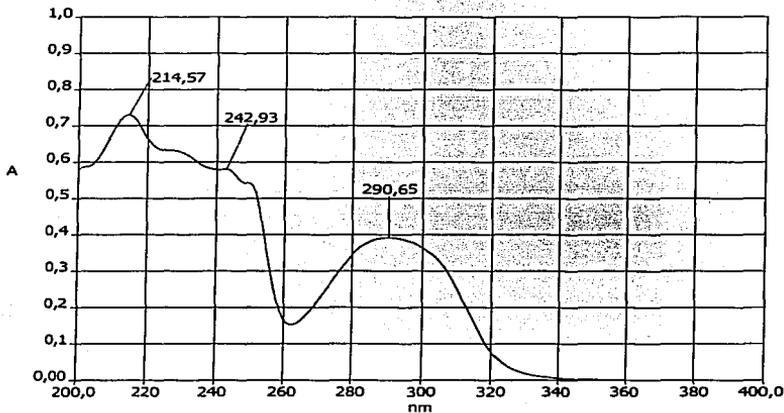


Figura 12. Espectro en el UV del (+)-5-metoxihamaudol (16).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

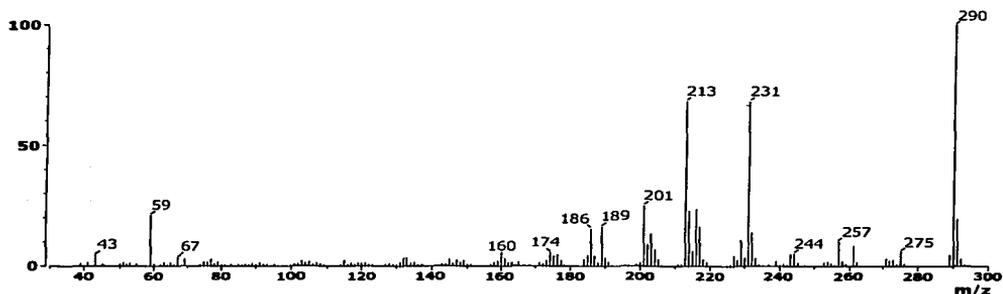


Figura 13. Espectro de masas (IE) del (+)-5-metoxihamaudol (**16**).

El análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear unidimensionales (RMN- ^1H y RMN- ^{13}C) y bidimensionales (HETCOR y FLOCK) indicaron que el compuesto **16** era una piranocromona relacionada con el hamaudol (**18**) (Nitta, 1965) y los productos **11** y **12** aislados por Valencia *et al.* (2002).

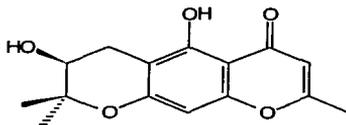


Figura 14. Estructura del hamaudol (**18**).

TESIS CON
FALLA A DE ORIGEN

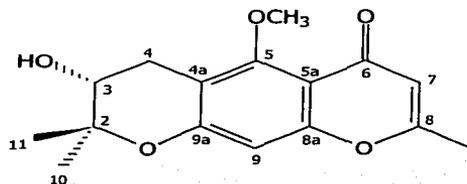
Las señales diagnósticas de los espectros de RMN (**Cuadro 24**) se resumen a continuación:

- a) En la región aromática del espectro de RMN- ^1H (**Figura 15**) se observa un singulete en δ_{H} 6.59 (H-9) asignable al único hidrógeno aromático de la molécula y que correlaciona con el metino en δ_{C} 94.5 en el espectro HETCOR (**Figura 17**).

- b) En δ_H 6.01 (c, $J = 0.9$ Hz, H-7) se aprecia una señal atribuible al hidrógeno α al grupo carbonilo, el cual correlaciona con el metino en δ_C 111.5 en el espectro HETCOR.
- c) En la región alifática del espectro de RMN- 1 H se observan dos singuletes, uno en δ_H 1.23 y el otro en δ_H 1.29. Estas señales son características de los metilos geminales ubicados sobre el anillo pirano del compuesto. Además, se observa un sistema ABX integrado por las señales de un hidrógeno geminal a una función oxigenada [δ_H 4.74 (dd, $J = 8.4$; H-3)] y del metileno del anillo pirano ($\delta_H \sim 3.32$, H-4). En el espectro HETCOR dichas señales correlacionan con un metino en δ_C 92.6 y el único metileno en δ_C 28.7, respectivamente. Cabe mencionar que el espectro se registró en CD $_3$ OD y la señal de este disolvente aparece en δ_H 3.3; por lo que las señales de los hidrógenos H-4 y H-4' no se observan claramente. Debido a esto, la asignación de las señales del sistema ABX se realizó en el espectro de RMN- 1 H registrado en CDCl $_3$ (**Espectro 20, Apéndice**), en donde se observa el hidrógeno H-3 en δ_H 4.81 (dd, $J = 9.3$), H-4 en δ_H 3.37 (dd, $J = 9.3, 16.2$) y H-4' en δ_H 3.50 (dd, $J = 9.3, 16.2$). Asimismo, la señal del hidroxilo en el espectro registrado en CDCl $_3$ aparece en δ_H 5.03.
- d) En δ_H/δ_C 3.91/61.0 se aprecia una señal característica para un grupo metoxilo unido a un anillo aromático.

Para ubicar los grupos metoxilo y metilo en el núcleo piranocromona, se analizó el espectro FLOCK (**Figura 18**) generado por el producto **16**, y las correlaciones más importantes se resumen en la **Figura 19**. Así la correlación entre C-5 y los hidrógenos del grupo metoxilo indican que este grupo funcional se encuentra sobre el carbono C-5. Por otro lado las correlaciones C-8/-CH $_3$ y C-7/-CH $_3$ corroboran la ubicación del metilo en C-8. Otras correlaciones observadas fueron C-2/H-10, H-11; C-3/H-10, H-11 y C-4a/H-4, H-4'.

Por analogía con los compuestos **11** y **12**, y con base en los desplazamientos químicos observados para C-3/H-3 y C-4a/H-4, H-4'; el grupo hidroxilo carbinólico se ubicó en C-3 y con una disposición α .

Cuadro 24. Datos de RMN del (+)-5-metoxihamaudol (**16**).^a

Posición	δ_H	Multiplicidad	J (Hz)	δ_C^*
2	—	—	—	72.2
3	4.74	dd	8.4	92.6
4	~3.32	m	—	28.7
4'	~3.32	m	—	—
4a	—	—	—	118.4
5	—	—	—	157.0
5a	—	—	—	111.9
6	—	—	—	179.7
7	6.01	c	0.9	111.5
8	—	—	—	167.0
8a	—	—	—	161.4
9	6.59	s	—	94.5
9a	—	—	—	166.5
10	1.29	s	—	25.3
11	1.23	s	—	25.4
OH-3	4.87	s	—	—
-OCH ₃	3.91	s	—	61.0
-CH ₃	2.32	d	0.9	19.7

^a Espectro registrado en CD₃OD. *Asignado por DEPT, HETCOR y FLOCK.

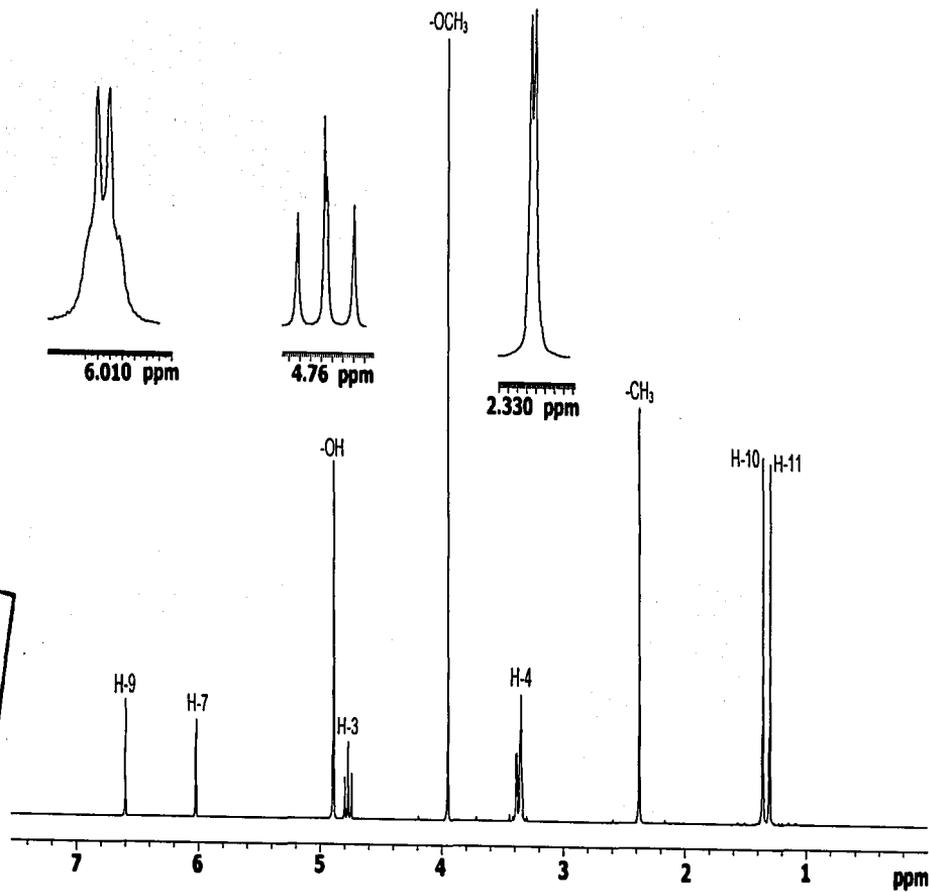


Figura 15. Espectro de RMN^1H del (+)-5-metoxihamaudol (16).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

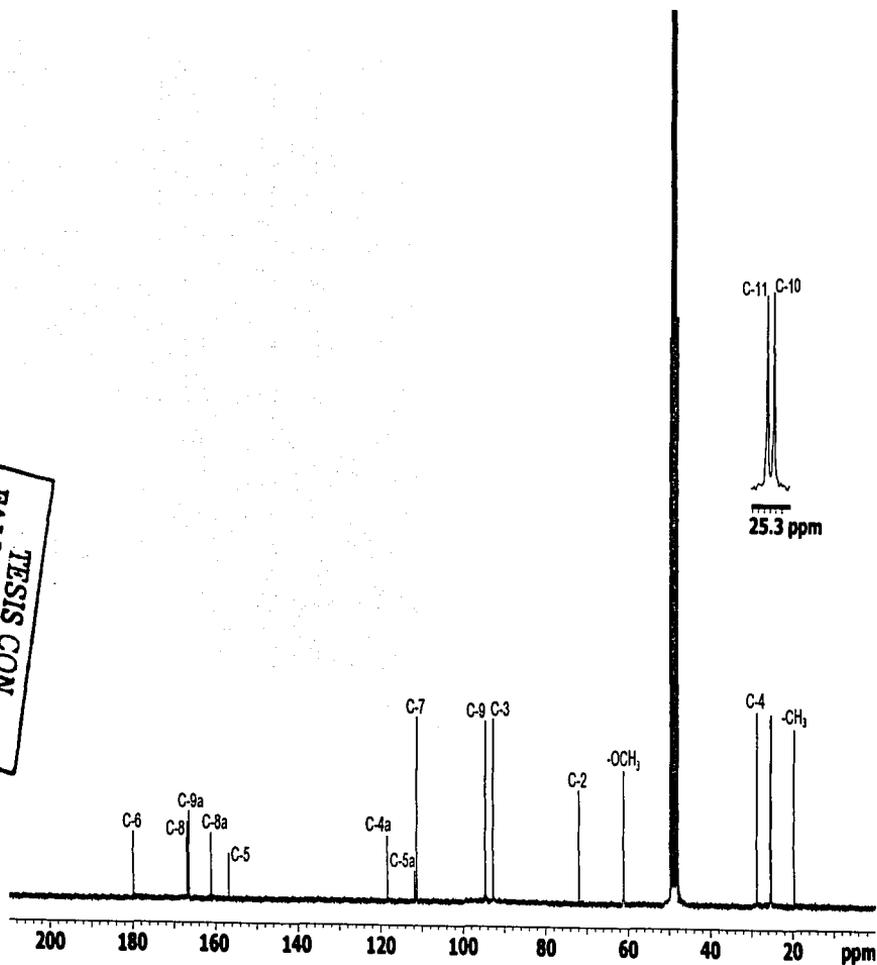


Figura 16. Espectro de RMN-¹³C del (+)-5-metoxihamaudol (16).

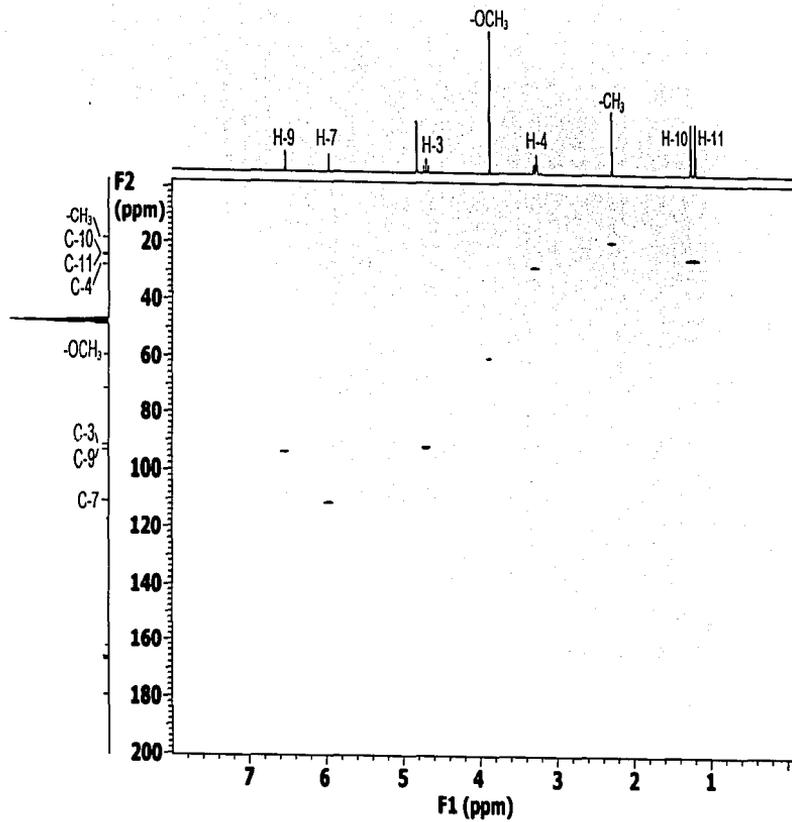


Figura 17. Espectro de RMN modalidad HETCOR del (+)-5-metoxihamaudol (16).

FALTA DE ORIGEN

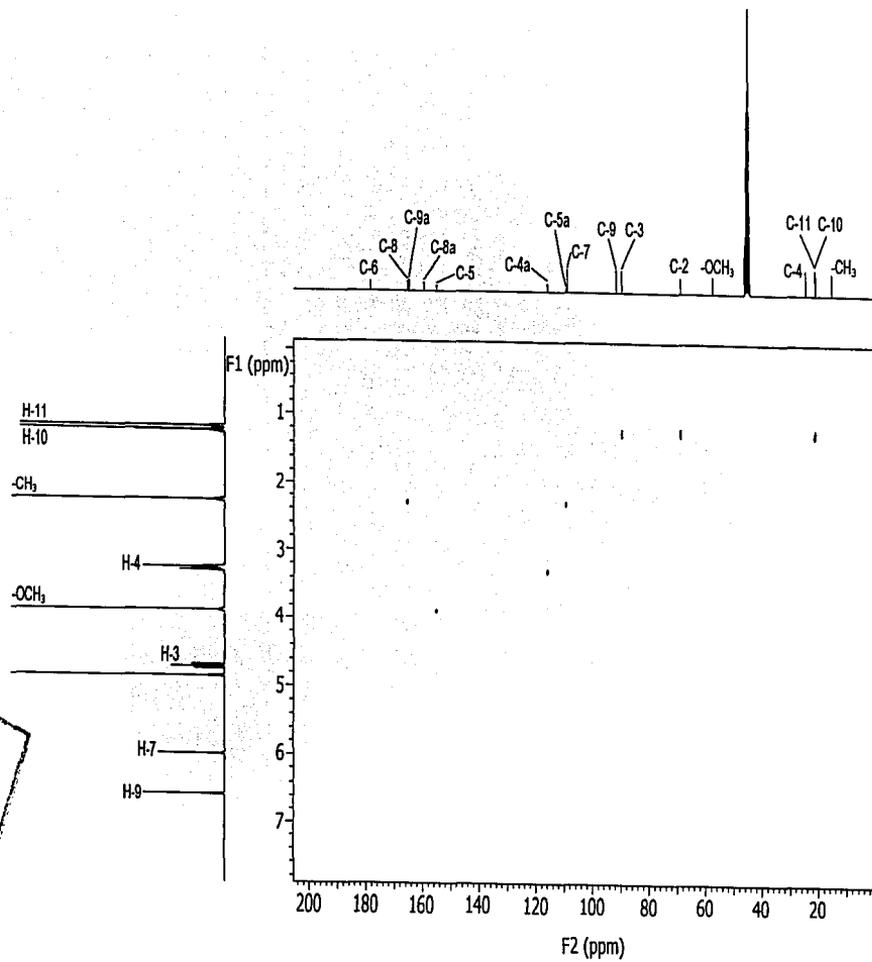


Figura 18. Espectro de RMN modalidad FLOCK del (+)-5-metoxihamaudol (**16**).

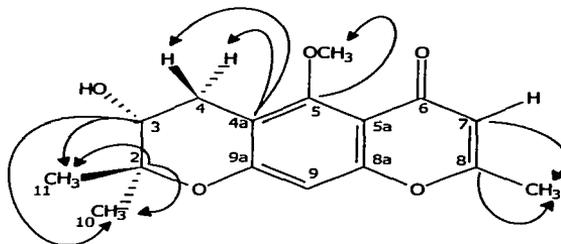


Figura 19. Correlaciones observadas en el espectro de RMN modalidad FLOCK del (+)-5-metoxihamaudol (**16**).

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto **16** resultaron ser idénticas a las del producto de hidrólisis alcalina de los compuestos **11** y **12** (**Figura 20**). La configuración absoluta del centro quiral C-3 en los compuestos **11** y **12** se determinó como *R*, aplicando la metodología avanzada de los ésteres de Mosher (Valencia *et al.*, 2002). Por lo tanto, la configuración absoluta de C-3 en **16** es también *R*.

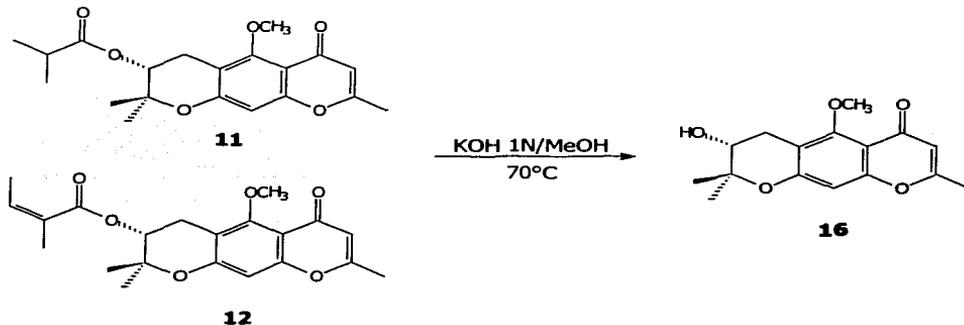


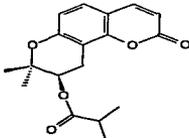
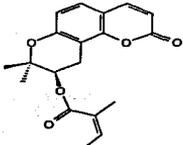
Figura 20. Obtención del (+)-5-metoxihamaudol (**16**) por hidrólisis alcalina de los compuestos **11** y **12**.

4.3 Determinación del potencial fitotóxico de los metabolitos aislados.

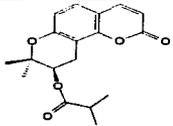
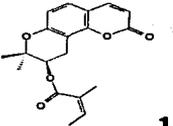
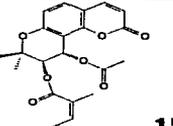
4.3.1 Determinación del potencial fitotóxico de los metabolitos aislados sobre la arvensa acuática *Lemna paucicostata*.

De los nuevos compuestos encontrados en la planta, la (+)-lomatina (**14**) y el (+)-5-metoxihamaudol (**16**) no presentaron actividad fitotóxica contra *Lemna paucicostata*. Por el contrario, la mezcla de los compuestos (9*R*)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (**9**) y jatamansina (**10**) presentó fitotoxicidad significativa contra la arvensa acuática de prueba (**Cuadro 25**). En el estudio realizado por Valencia y colaboradores (2002), se comprobó que estos compuestos individuales eran los únicos que afectaban el crecimiento de la planta (**Cuadro 26**). Sin embargo, al evaluar la isopterixina (**15**), obtenida a partir de la fracción F3 que era la más activa contra *L. paucicostata*, se encontró que también afectaba el crecimiento de la planta acuática (**Cuadro 26**) aunque en menor magnitud que los compuestos individuales **9** y **10**. Es evidente que la actividad fitotóxica de la fracción F3 se debe a un efecto sinérgico de las tres cumarinas, **9**, **10** y **15**.

Cuadro 25. Actividad fitotóxica de la mezcla de los compuestos **9** y **10** sobre *L. paucicostata*.

Tratamiento	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Reducción de clorofila (%)
 9	18	0
	36	25
 10	75	25
	150	50
	300	100
	600	100

Cuadro 26. Actividad fitotóxica de los compuestos **9**, **10** y **15** sobre *L. pausicostata*.^a

Tratamiento	Concentración		Incremento en la conductividad (μmho)	Inhibición del crecimiento (%)	Reducción de clorofila (%)
	($\mu\text{g/mL}$)	(μM)			
 9	8	25	124.20 \pm 21.1	19.59 \pm 8.3	20.00 \pm 16.8
	16	50	100.00 \pm 1.4	23.52 \pm 13.8	54.30 \pm 2.1
	32	100	86.00 \pm 2.1	58.81 \pm 8.3	84.92 \pm 4.0
	64	200	260.00 \pm 13.4	100.00 \pm 0.0	87.38 \pm 0.0
 10	4	12	-77.00 \pm 42.4	15.33 \pm 11.4	5.94 \pm 4.9
	8	25	-30.50 \pm 31.1	37.51 \pm 14.2	4.37 \pm 4.3
	16	50	59.50 \pm 7.1	47.59 \pm 5.7	12.82 \pm 10.8
	32	100	100.00 \pm 9.2	100.00 \pm 0.0	40.32 \pm 3.3
 15	48	125	367 \pm 114.3	41.9 \pm 18.6	41.9 \pm 41.9
	96	250	123.7 \pm 35.6	25.6 \pm 6.9	18.6 \pm 23.2

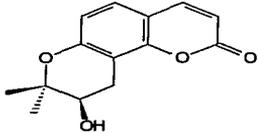
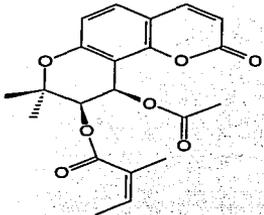
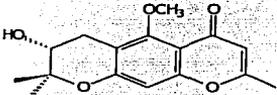
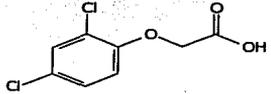
^aEstos resultados son el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. Mostraron diferencias significativas (prueba *t*-Student sin aparear): mayor fitotoxidad que el control (medio de cultivo; incremento en la conductividad, 0.00 \pm 26.2 $\mu\text{mho/cm}$; inhibición del crecimiento, 0.00 \pm 2.7 %; reducción de la clorofila, 0.00 \pm 4.2 %).

4.3.2 Determinación del potencial fitotóxico de los metabolitos aislados, sobre las arvenses *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*.

De manera adicional, los compuestos **14-16** se evaluaron para determinar su potencial fitotóxico sobre la germinación y el crecimiento radicular de las arvenses *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*.

Los tres compuestos evaluados inhibieron el crecimiento radicular de las semillas de prueba de un modo dependiente de la concentración. Sin embargo, los compuestos evaluados no inhibieron la germinación de las semillas a la máxima concentración evaluada (250 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados se muestran en el **Cuadro 27**.

Cuadro 27. Actividad fitotóxica de los compuestos aislados sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*.

Tratamiento	CI ₅₀ A. hypochondriacus		CI ₅₀ Echinochloa crus-galli	
	(μg/mL)	(moles/L)	(μg/mL)	(moles/L)
 <p>14</p>	111.2	3.83×10^{-4}	133.9	4.61×10^{-4}
 <p>15</p>	111.7	2.89×10^{-4}	172.8	4.47×10^{-4}
 <p>16</p>	84.67	3.44×10^{-4}	73.1	2.96×10^{-4}
 <p>2,4-D^a</p>	39.8	1.80×10^{-4}	>48.6	> 2.20×10^{-4}

^aControl positivo (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). Estos resultados son el promedio de tres repeticiones.

*Mostraron diferencias significativas en ANOVA.

De los tres compuestos evaluados, el (+)-5-metoxihamaudol (**16**) fue el que presentó mayor fitotoxicidad sobre las semillas de prueba; sin embargo su CI_{50} fue mayor a la del control positivo (**Cuadro 27**).

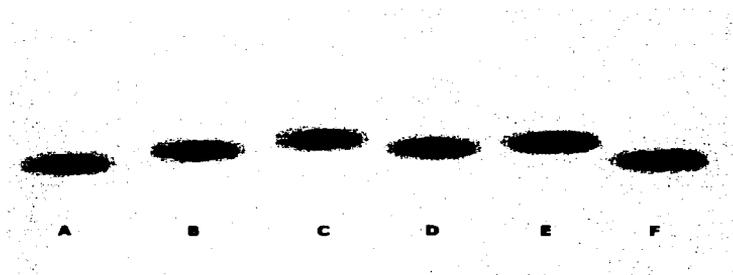
Es importante destacar que aunque el compuesto se aisló de una fracción inactiva, se decidió estudiarlo por su analogía estructural con los compuestos **11** y **12**. Los resultados indicaron que el producto puro **16** presenta una moderada actividad contra *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*. Es altamente probable que la fracción de origen (F7) fuese inactiva debido a la presencia de sustancias que antagonizaban el efecto del producto natural **16**.

4.3.3 Interacción de los compuestos puros con la proteína calmodulina.

La posible interacción de los nuevos compuestos aislados con la proteína calmodulina (cerebro de bovino) se estudió por medio de una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE al 12%). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado en presencia de $CaCl_2$ y clorpromazina como control positivo (Marmé & Dieter, 1983; Leung *et al.*, 1988).

En los eucariotes, la calmodulina (CaM) actúa como un receptor intracelular para el Ca^{2+} , modulando la respuesta enzimática a este ion. La proteína CaM tiene un papel muy importante en la transducción de señales en las plantas durante los procesos de germinación y crecimiento al modular la actividad de varias enzimas importantes tales como la NAD-cinasa, la glutamato descarboxilasa, la Ca^{2+} -ATPasa y la fosfodiesterasa del AMPc. Por lo tanto, CaM y/o las enzimas que modula podrían ser importantes blancos de acción para la acción de muchas fitotoxinas *in vivo* (Lee *et al.*, 1995). Es conveniente mencionar que la interacción de un compuesto con el complejo Ca^{2+} -CaM altera su conformación y cambia su movilidad electroforética (Leung *et al.*, 1985); sin embargo, esto no permite determinar si la interacción modifica las propiedades moduladoras enzimáticas de la CaM (Au *et al.*, 2000).

La interacción de los productos naturales **14-16** con la CaM en presencia de Ca^{2+} se ilustra en el electroforetograma de la **Figura 21**. En general, se aprecia que los tres compuestos retardan la movilidad electroforética de la CaM, lo cual indica que posiblemente estos compuestos interactúan con la CaM interfiriendo con los procesos que regula *in vivo*.



TESIS CON
PALA DE ORIGEN

Figura 21. Gel de electroforesis SDS-PAGE de la calmodulina de cerebro de bovino después del tratamiento de los compuestos aislados. A, CaM en H_2O y Ca^{2+} ; B, clorpromazina; C, **14**; D, **15**; E, **16**; F, CaM en DMSO.

4.3.4 Determinación del efecto del (+)-5-metoxihamaudol (**16**) sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) dependiente de calmodulina.

El experimento de electroforesis permitió determinar que los compuestos **14**, **15** y **16** interaccionan con la proteína calmodulina. Sin embargo, esto no permite establecer si la interacción de los compuestos con la CaM afecta sus propiedades reguladoras enzimáticas. Para determinar *in vitro* si el compuesto **16** afecta la habilidad de la calmodulina para interaccionar con sus proteínas blanco, se procedió a evaluar su efecto sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) dependiente de calmodulina, obtenida a partir de cerebro de bovino. Se seleccionó sólo este producto con la finalidad de comparar su efecto con aquel de los productos **11** y

12, los cuales afectaron el complejo CaM-fosfodiesterasa y estimularon la actividad basal de la enzima (Santillán, 2002).

La estrategia experimental utilizada para evaluar el efecto del compuesto **16** sobre la enzima fosfodiesterasa en presencia de calmodulina se realizó en tres etapas (Santillán, 2002):

- a) En primer lugar se determinó la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de diferentes concentraciones de calmodulina de cerero de bovino. Este experimento permitió determinar la concentración óptima de calmodulina requerida para la máxima activación de la enzima fosfodiesterasa del AMPc.
- b) A continuación se determinó el efecto del metabolito secundario **16** sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina.
- c) Por último se evaluó el efecto del metabolito **16** sobre la actividad enzimática de la fosfodiesterasa en presencia de calmodulina.

La actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc se determinó utilizando un método espectrofotocolorimétrico de acuerdo al procedimiento experimental descrito por Sharma y Wang (1979; 1986), en el cual se mide la actividad de la enzima mediante la cuantificación del fosfato inorgánico generado por la hidrólisis del 5'-monofosfato de adenosina en presencia de la enzima 5'-nucleotidasa de *Crotalus atrox* (Sigma). El 5'-monofosfato de adenosina se genera por la actividad enzimática de la fosfodiesterasa sobre el AMPc (**Figura 22**).

El fosfato liberado se determinó por un método colorimétrico bajo la forma de fosfomolibdato de amonio (Sumner *et al.*, 1944). Para cuantificar la cantidad de fosfato inorgánico (HPO_4^{-2}) generado se construyó la curva patrón que se observa en la **Figura 23** a partir de una disolución 50 mM de fosfato monobásico de potasio (Sigma).

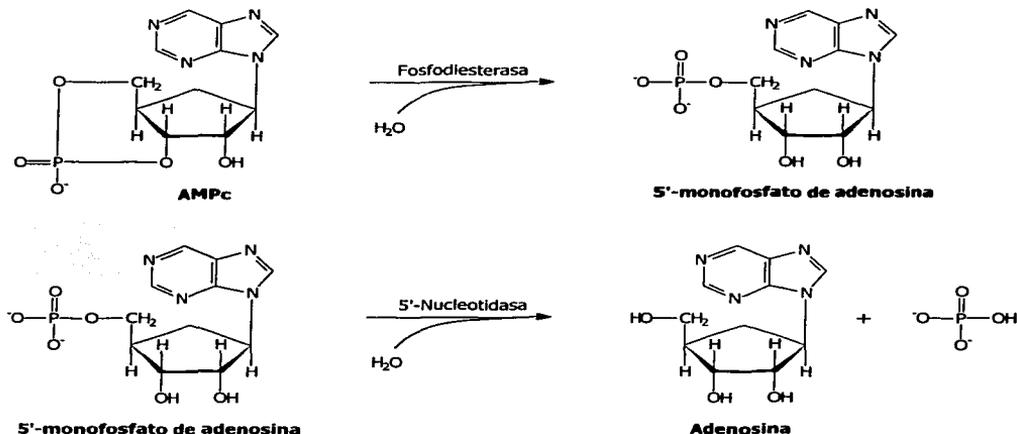


Figura 22. Reacciones bioquímicas involucradas en la determinación de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc.

La interpolación de los valores de absorbancia obtenidos en cada caso en la recta de la **Figura 23** permitió determinar cuantitativamente la concentración de fosfatos inorgánicos liberados durante la reacción de hidrólisis del 5'-monofosfato de adenosina y por ende la actividad de la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina en cada tratamiento (nM de fosfato inorgánico).

4.3.4.1 Determinación de la concentración óptima de calmodulina necesaria para la activación de la enzima fosfodiesterasa del AMPc.

En la **Figura 24** se ilustra la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina en presencia de diferentes concentraciones de calmodulina de cerebro de bovino.

La máxima activación de la enzima fosfodiesterasa del AMPc (223%) se obtuvo en presencia de 0.2 µg de la proteína calmodulina.

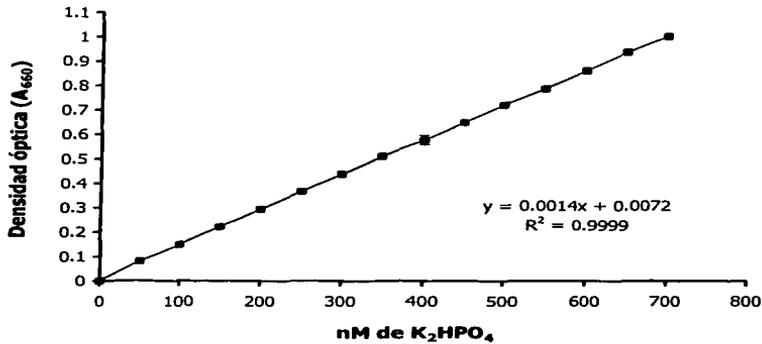


Figura 23. Curva patrón de fosfatos inorgánicos.

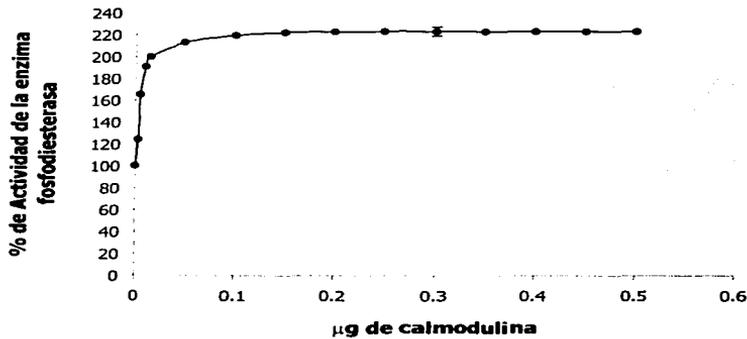


Figura 24. Actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de varias concentraciones de calmodulina de cerebro de bovino.

4.3.4.2 Efecto del (+)-5-metoxihamaudol (16) sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en ausencia de calmodulina.

Antes de proceder a determinar el efecto del compuesto **16** sobre la actividad de la fosfodiesterasa en presencia de calmodulina era necesario determinar si el compuesto modifica la actividad basal de la fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina, con la finalidad de descartar un efecto directo del compuesto sobre la enzima. De tal manera que se analizó el efecto de diferentes concentraciones de la clorpromazina (**Figura 25**) y del compuesto **16** (**Figura 26**) sobre la enzima blanco. Estas evaluaciones indicaron que ni el compuesto **16** ni el control positivo (clorpromazina), modificaron la actividad de la fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina de cerebro de bovino.

4.3.4.3 Efecto del (+)-5-metoxihamaudol (16) sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en presencia de calmodulina.

Una vez que se determinó que el compuesto **16** no modifica la actividad basal de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina, se evaluó el efecto sobre la actividad de la enzima en presencia de calmodulina, observándose que sí hay una inhibición del complejo CaM-fosfodiesterasa. El compuesto **16** presentó una CI_{50} de 20 μM (**Figura 25**), mayor a la de la clorpromazina, CI_{50} 10 μM (**Figura 26**). Estos datos confirman los resultados de la electroforesis desnaturalizante.

La interacción del (+)-5-metoxihamaudol (**16**) con la proteína reguladora calmodulina podría ser uno de los mecanismos de acción a través del cual el compuesto **16** ejerce su acción fitotóxica sobre el crecimiento radicular de las semillas *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*.

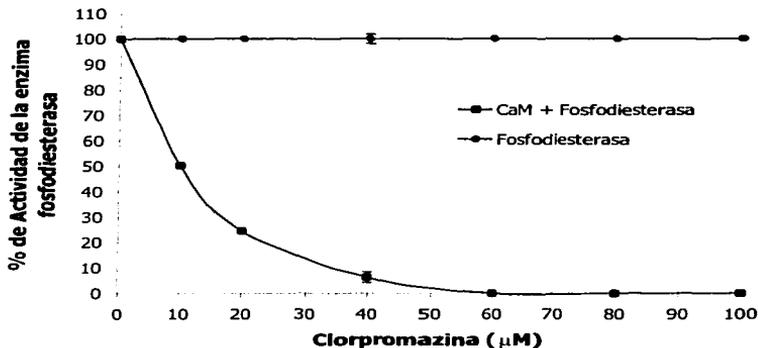


Figura 25. Efecto de la clorpromazina sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en ausencia (●) y en presencia de calmodulina de cerebro de bovino (■).

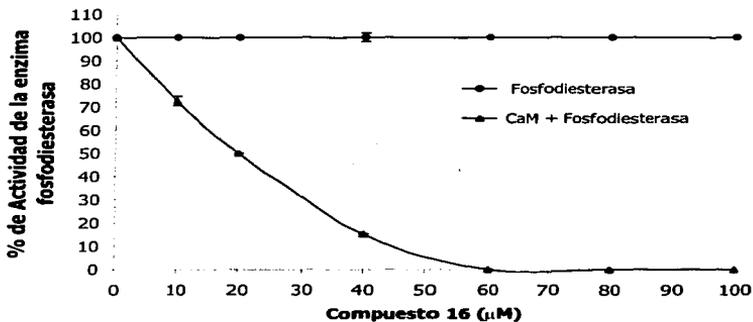


Figura 26. Efecto del (+)-5-metoxihamaudol (**16**) sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc en ausencia (●) y en presencia (▲) de calmodulina de cerebro de bovino.

Es importante mencionar que los compuestos **11** y **12** evaluados por Santillán (2002) aceleran la actividad de la fosfodiesterasa del AMPc en ausencia de calmodulina, aunque también inhiben su activación en presencia de esta proteína. Estos resultados indican que la presencia de un éster en C-3 conlleva a una interacción con la enzima blanco. También indican que los compuestos **11**, **12** y **16** modifican las propiedades moduladoras enzimáticas de la CaM.

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se completó el estudio de las fracciones primarias activas detectadas durante la investigación de Valencia y colaboradores (2002) de la especie *Prionosciadium watsoni* Coulter & Rose (Umbelliferae), y además se realizó el estudio de una fracción inactiva de interés.

El estudio químico biodirigido de la fracción primaria activa F3, permitió el aislamiento y caracterización de dos nuevos productos en la especie *Prionosciadium watsoni*, (+)-lomatina (**14**) e isopterixina (**15**). De manera adicional se obtuvieron los compuestos seravshanina (**8**), una mezcla de (9*R*)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (**9**) y jatamansina (**10**), previamente descritos en esta especie. La mezcla de **9** y **10** y la isopterixina (**15**) inhibieron de manera significativa el crecimiento de la arvense *Lemna pausicostata*, en consecuencia, estos productos naturales son los responsables de la actividad del extracto íntegro contra la planta acuática.

El estudio químico de la fracción primaria F7, permitió el aislamiento y caracterización de una piranocromona novedosa, el (+)-5-metoxihamaudol (**16**). Su caracterización se realizó por métodos espectroscópicos, espectrométricos y químicos. El compuesto **16** mostró fitotoxicidad moderada contra las arvenses *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*. Dada su concentración y facilidad de detección al revelar en placas del extracto íntegro con sulfato cérico, el producto **16** puede constituir un compuesto marcador de utilidad para las pruebas de identidad de la droga *P. watsoni*.

Se demostró que el compuesto novedoso **16** es un inhibidor de la proteína calmodulina *in vitro*, ya que el producto natural modifica la movilidad electroforética de la proteína y sus propiedades reguladoras enzimáticas al inhibir la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc de cerebro de bovino dependiente de CaM.

Este estudio constituye una contribución al conocimiento del contenido metabólico del género *Prinosciadium* y en particular de la especie *P. watsoni*. Asimismo representa una contribución al conocimiento de la flora medicinal mexicana.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Abell, L. M.; Schloss, J. V.; Rendina, R. (1993). Target-site direct herbicide design. En: Pest control with enhanced enviromental safety. Duke, S.; Menn, J.; Plimmer (eds.). *ACS Symposium Series* **524**. Washington, D. C. pp. 17-37.
2. Anaya, A. L.; Calera, M.; Mata, R.; Pereda-Miranda, R. (1990). Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *J. Chem. Ecol.*, **16**, 2145-2152.
3. Anaya, A. L.; Hernández, B. E.; Calera, M. R.; Torres, A.; Pelayo, H.; Fernández, E. (1995). A methodological model used in the search for allelopathic potential in some mexican plants. En: *Methodology for allelopathy research*. Waller, G. R. & Narwal, S. (eds.).
4. Anderson, R. J.; Shriner, R. L.; Burr, G. O. (1926). The phytosterols of wheat germ oil. *J. Am. Chem. Soc.* **48**, 2987-2996.
5. Argueta, V. A. (1994). *Atlas de la Medicina Tradicional Mexicana. Vol. III*. Instituto Nacional Indigenista. México. pp. 1533.
6. Au, T. K.; Chick, W. S.; Leung, P. C. (2000). The biology of ophiobolin A. *Life Sci.* **67**, 733-742.
7. Becerril, J.; Duke, M.; Ujjana, B.; Nadihalli, U.; Matsumoto, H.; Duke, S. (1992). Ligth control of porphyrin accumulation in acifluoren-methyl-treated *Lemna pausicostata*. *Phys. Plant.* **86**, 6-16.
8. Bernstein, S.; Wallis, E. S. (1937). The structure of β -sitosterol, and its preparation from stigmasterol. *J. Org. Chem.* **2**, 341-345.

9. Bolhman, F.; Franke, H. (1971). Synthese von racemischen lomatín, columbianetin, angenomalin und samidin. *Chem. Ber.* **104**, 3229-3233.
10. Bye, R. (2000). *Ethnobotanical notes of Dr. Edward Palmer from western USA and Mexico – 1861-1910. Data base, first approximation*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
11. Cramer, H. M. (2000). Crop protection. En: *Agrochemicals. Composition, production, toxicology applications*. F. Müller (ed.). Wiley-VCH. Federal Republic of Germany, 288-317.
12. Cremlýn, R. J. (1991). *Agrochemicals preparation and mode of action*. John Wiley & Sons, Chichester, England. pp. 37-51, 217-270 y 341-360.
13. Cutler, H.; Cutler, S. (1999). Agrochemicals and pharmaceuticals: The connection. En: *Biologically active natural products: Agrochemicals*. Cutler, H.; Cutler, S. (eds.). CRC Press. Boca Raton, Florida. pp. 1-14.
14. Dayan, F. E.; Romagni, J.; Duke, S. O. (2000). Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *J. Chem. Ecol.* **26**, 2079-2094.
15. *Dictionary of Natural Products. Vol. 5*. (1994). Editorial Chapman & Hall, 1st ed. Great Britain. pp. 5258-5259.
16. Duke, S. O. (1993). Naturally occurring chemical compounds as herbicides. *Weed Sci. Rev.* **5**, 17-44
17. Duke, S.; Abbas, H. (1995). Natural products with potential use as herbicides. En: *Allelopathy organisms, process and applications*. M. Inderjit; M. Dakshini. (eds.). *ACS Symposium Series* **582**. Washington, D. C. pp. 96-116 y 348-362.

18. Espinosa-García, F.; Delgado, G. (1998). Relationship between ecology of plants defense and the prospection of secondary metabolites with potential medicinal or agricultural application. *Rev. Latinoamer. Quím.* **26**(1), 13-29.
19. Evidente, A.; Mota, A. (2001). Phytotoxins froms fungi, phatogenic for agrarian, forestal and weeding plants. En: *Bioactive compounds from natural sources*. Tringalli (ed.). Taylor and Francis. England. 475-525.
20. Harborne, J. (1998). Recent advances in chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 509-523.
21. Hedin, P.; Hollingworth. (1997). New applications for phytochemical pest control agents. En: *Phytochemicals for pest control*. P. A. Hedin *et al.* (eds.). *ACS Symposium Series* **658**. Washington, D. C. pp. 1-12.
22. Hegnauer, R. (1978). Phytochemie und klassifikation der umbelliferen, eine Neubewertung im lichte der seit 1972 bekannt gewordenen phytochemischen tatsachen. En: "Actes de 2e Symposium International sur les Ombelliferes" (Perpignan, 1977). "Contributions pluridisciplinaires á la Systématique". Paru, 335-363.
23. Hiscox, J.; Israelstam, G. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissues without maceration. *Can. J. Bot.* **57**, 1332-1334.
24. Lee, S.; Kim, M.; Lee, W.; Heo, H.; Seo, H.; Yoon, J.; Hong, S.; Lee, J.; Bahk, I.; Hwang, M.; Cho, M. (1995). Identification of a novel divergent calmodulin isoform from soybean wich has a differential ability to activate calmodulin-dependent enzyms. *J. Biol. Chem.* **270**, 21806-21812.
25. Leung, P. C.; Graves, L. M.; Tripton, C. L. (1988). Characterization of the interaction of ophiobolin A and calmodulin. *International Journal of Biochemistry* **20**, 1351-1359.

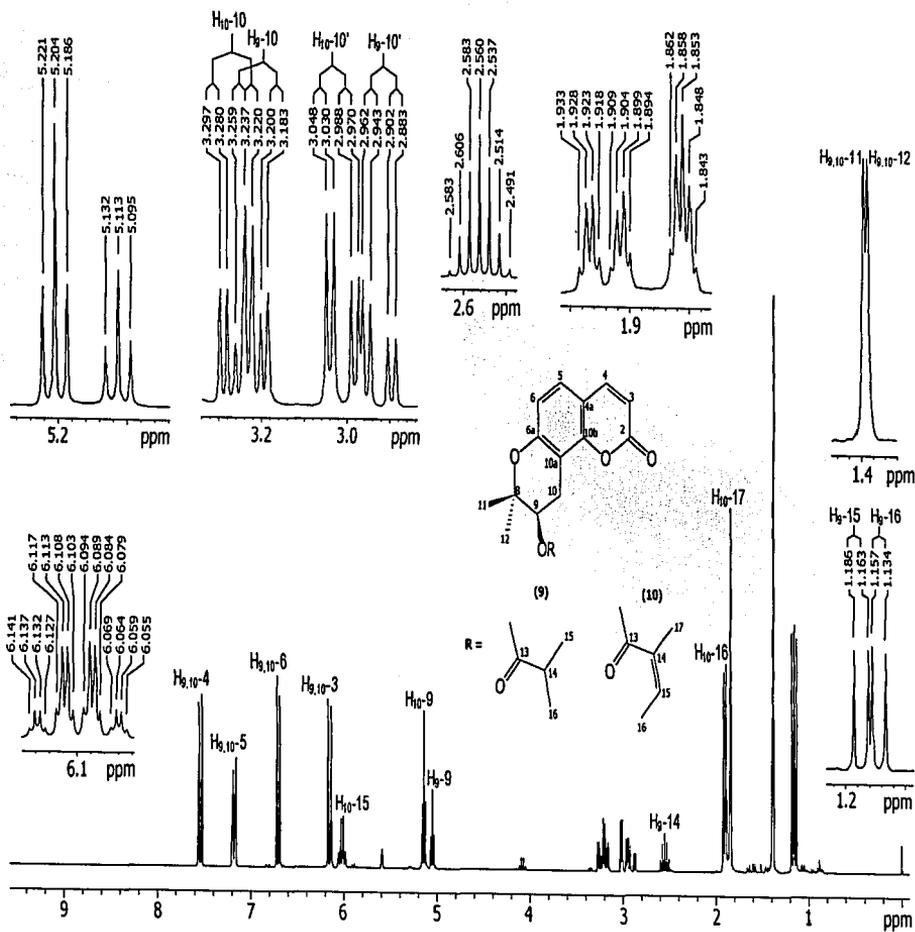
26. Leung, P. C.; Taylor, W. A.; Wang, J. H.; Tripton, C. L. (1985). Role of calmodulin inhibition in the mode of action of ophiobolin A. *Plant Physiol.* **77**, 303-308.
27. Liao, B.; Gawienowski, M. C.; Zielinski, R. E. (1996). Differential stimulation of NAD kinase and binding of peptide substrates by wild-type and mutant plant calmodulin isoforms. *Arch. Biochem. Biophys.* **327**, 53-60.
28. Lowery, C. (1993). Reagent chemicals. *American Chemical Society Specification*. Washington, D. C. pp. 90-91.
29. Macías, F.; Castellano, D.; Molinillo, J. (2000a). Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. *J. Agric. Food. Chem.* **48**, 2515-2521.
30. Macías, M.; Ulloa, M.; Gamboa, A.; Mata, R. (2000b). Phytotoxic compound from the new coprophilus fungus *Guanomyces polithrix*. *J. Nat. Prod.* **63**, 757-761.
31. Marme, D.; Dieter, P. (1983). *Role of Ca²⁺ and calmodulin in plants*. Academic Press, Inc. Cap. 7, 264-311.
32. Martínez, M. (1979). *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 430.
33. Mata, R.; Pereda-Miranda, R.; Lotina-Hennsen, B. (1996). En: *Secondary metabolites from mexican plants: Chemistry and biological properties*. L. Rodriguez-Hahn, Ed. Research Signpost, Trivandrum. pp. 59-68.
34. Miyakado, M.; Watanabe, J.; Miyamoto, J. (1997). Natural products as leads in estructural modification studies yielding new agrochemicals. En: *Phytochemicals for pest control*. P. Hedin *et al.* (eds.). *ACS Symposium Series* **658**. Washington, D. C. pp. 168-182.

35. Nielsen, B. E.; Soine, T. O. (1967). Coumarins of *Pteryxia terebinthina*. Structures of two new coumarins, isopteryxin and calipteryxin. *J. Pharm. Sci.* **56**, 184-187.
36. Nielsen, E.; Larsen, P.; Lemmich, J. (1971). Coumarins from *Seseli gummiferum* Pall. The structure of two new coumarins. *Acta Chem. Scand.* **25**, 529-533.
37. Nitta, A. (1965). Constituents of the roots of *Angelica japonica*. *Yakugaku Zasshi* **85**(1), 55-61.
38. Santillán-Hernández, S. (2002). Efecto de fitotoxinas selectas de origen fúngico y vegetal sobre la fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina. Metabolitos adicionales del hongo coprófilo *Guanomyces polythrix*. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.
39. Shanbhag, S.; Mesta, C.; Maheshwari, M.; Paknikar, S.; Bhattacharyya, S. (1964). Jatamansin, a new terpenic coumarin from *Nardostachys jatamansi*. *Tetrahedron* **20**, 2605-2615.
40. Sharma, R. K.; Wang, J. H. (1979). *Preparation and assay of the Ca²⁺ dependent modulator protein*. *Advances in cyclic nucleotide research, Vol 10*. Raven Press. New York. pp. 187-198.
41. Sharma, R. K.; Wang, J. H. (1986). Purification and characterization of bovine lung calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* **261**(30), 14160-14166.
42. Species and subspecific taxa of *Prionosciadium*. TROPICOS Nomenclatural Data Base. En: Missouri Botanical Garden [en línea]. [citado 2 Diciembre 2002]. Disponible en World Wide Web: <http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast>
43. Stahl, E. (1969). *Thin layer chromatography*. Academic Press, Inc. New York. pp. 478.

44. Sumner, J. B. (1944). Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science* **100**, 413-415.
45. Swager, T. M.; Cardellina II, J. H. (1985). Coumarins from *Musineon divaricatum*. *Phytochemistry* **24**, 805-813.
46. Tanaka, T.; Abbas, H.; Duke, S. (1993). Structure-dependent phytotoxicity of fumonisins and related compounds in a duckweed bioassay. *Phytochemistry* **33**, 779-785.
47. Ueno, T.; Miyagawa, H.; Yamaguchi, H.; Okada, M.; Irie, H. (1997). A new applications for phytochemical pest control agents. En: Phytochemicals for pest control. P. Hedin *et al.* (eds.). *ACS Symposium Series* **658**. Washington, D. C.
48. Valencia-Islas, N. (2002). Fitotoxinas de *Prionosciadium watsoni* (Umbelliferae) y *Maxilaria densa* (Orchidaceae). Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM.
49. Valencia-Islas, N.; Abbas, H.; Bye, R.; Toscano, R.; Mata, R. (2002). Phytotoxic compounds from *Prionosciadium watsoni*. *J. Nat. Prod.* **65**, 828-834.
50. Van-Puyvelde, L.; Bosselaers, J.; Stevens, C.; De Kimpe, N.; Van Gestel, J.; Van Damme, P. (1999). Phytotoxins from the leaves of *Laggera decurrens*. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2116-2119.
51. Vascular Plants Type Catalog. En: The New York Botanical Garden [en línea]. Actualizado 29 Abril 2002 [citado 10 octubre 2002]. Disponible en World Wide Web: <<http://www.nybg.org/bsci/hcol/vasc/Apiaceae.htm>>
52. Vyvyan, J. R. (2002). Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* **58**, 1631-1646.

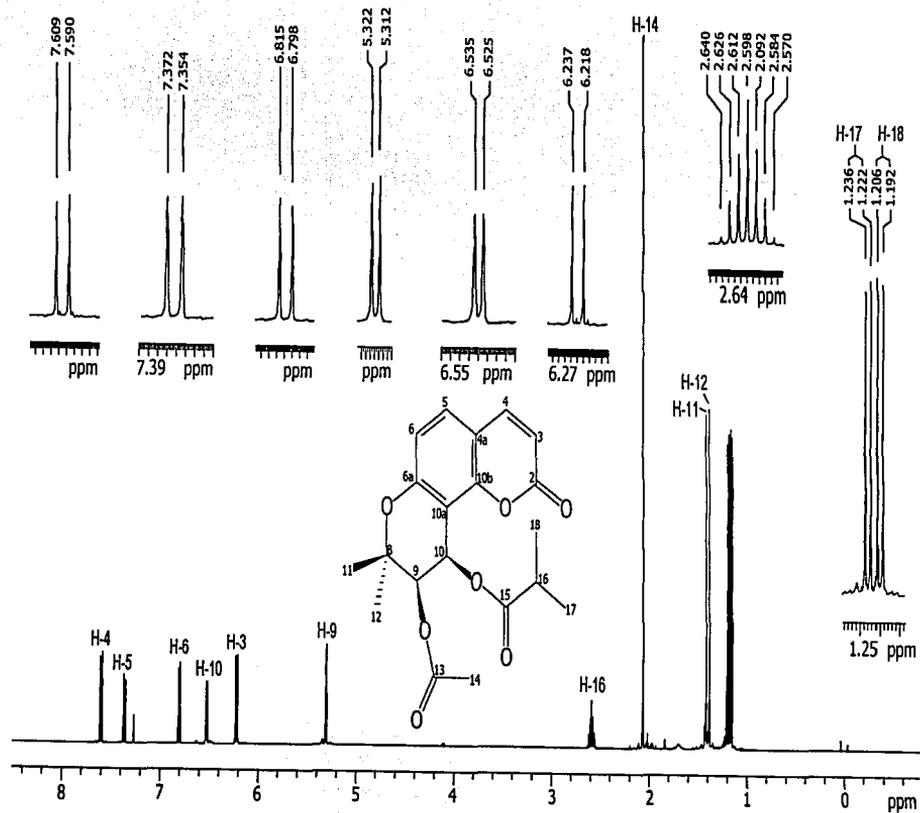
A P É N D I C E

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



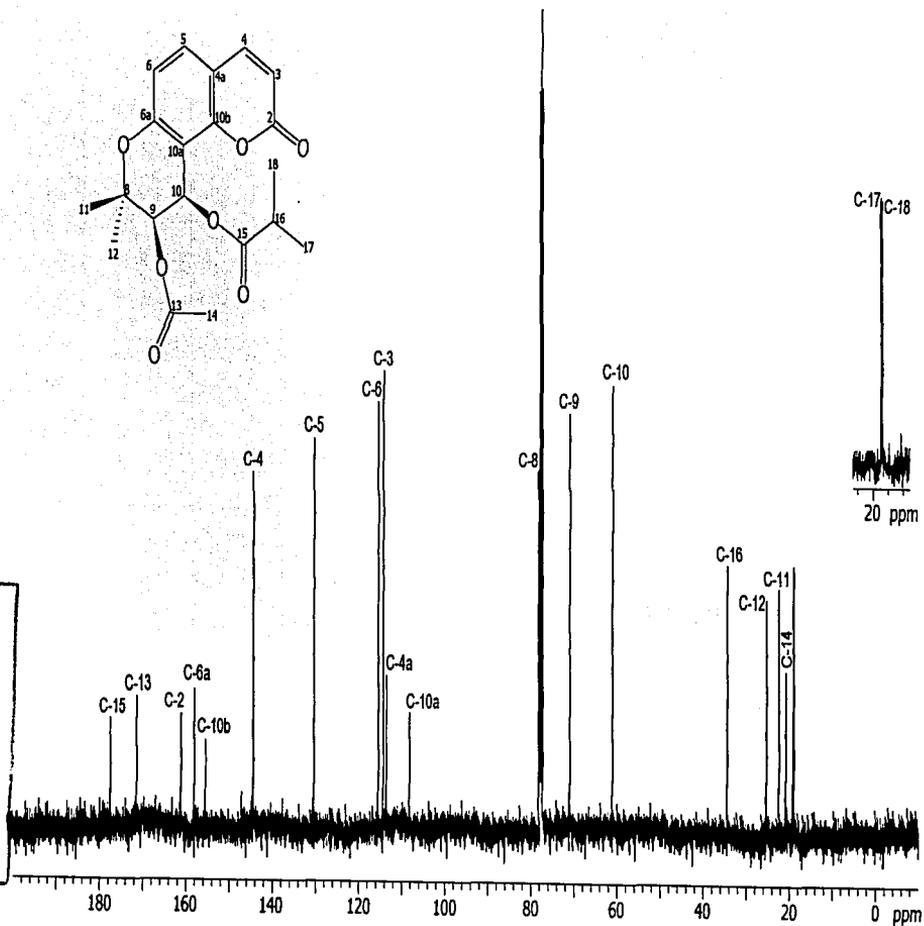
Espectro 1. Espectro de RMN- ^1H de la mezcla 2:3 de los compuestos (9*R*)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (9) y jatamansina (10)

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

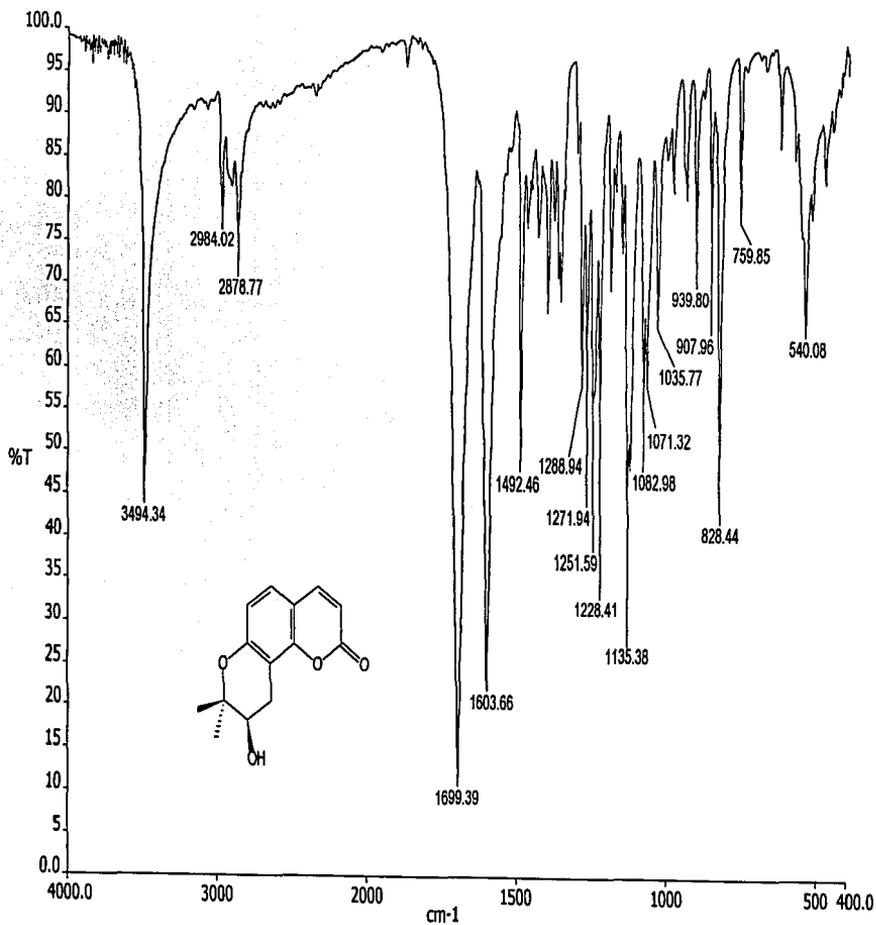


Espectro 3. Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ de seravshanina (8).

ACIDS COCA
 FALTA DE ORIGEN

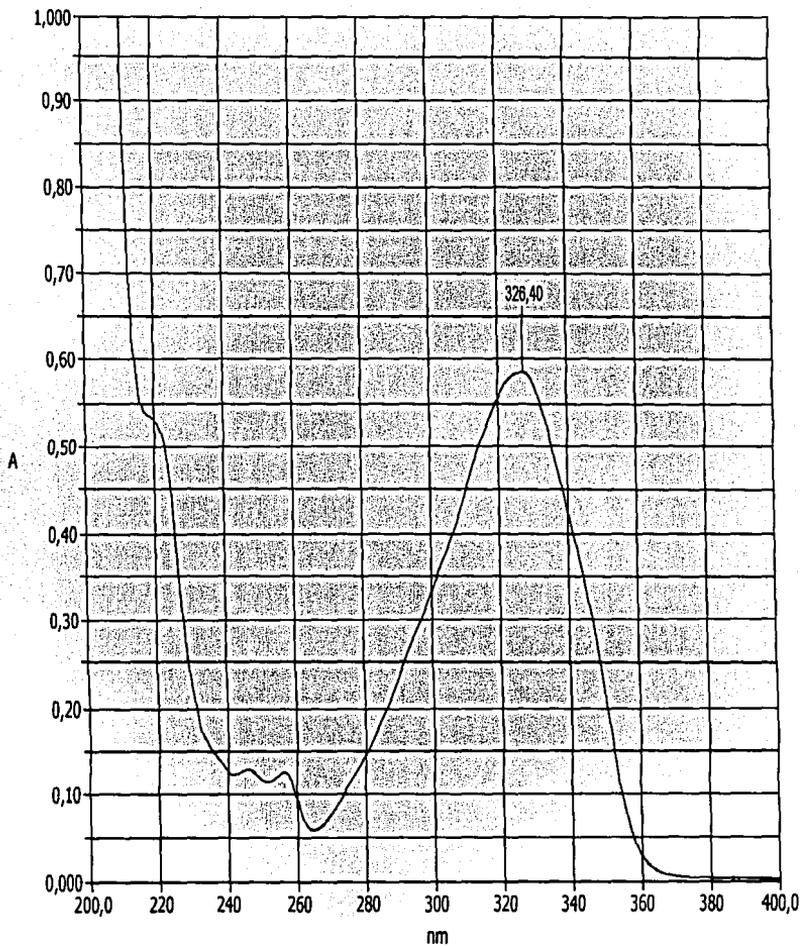


Spectro 4. Espectro de RMN- ^{13}C de seravshanina (8).



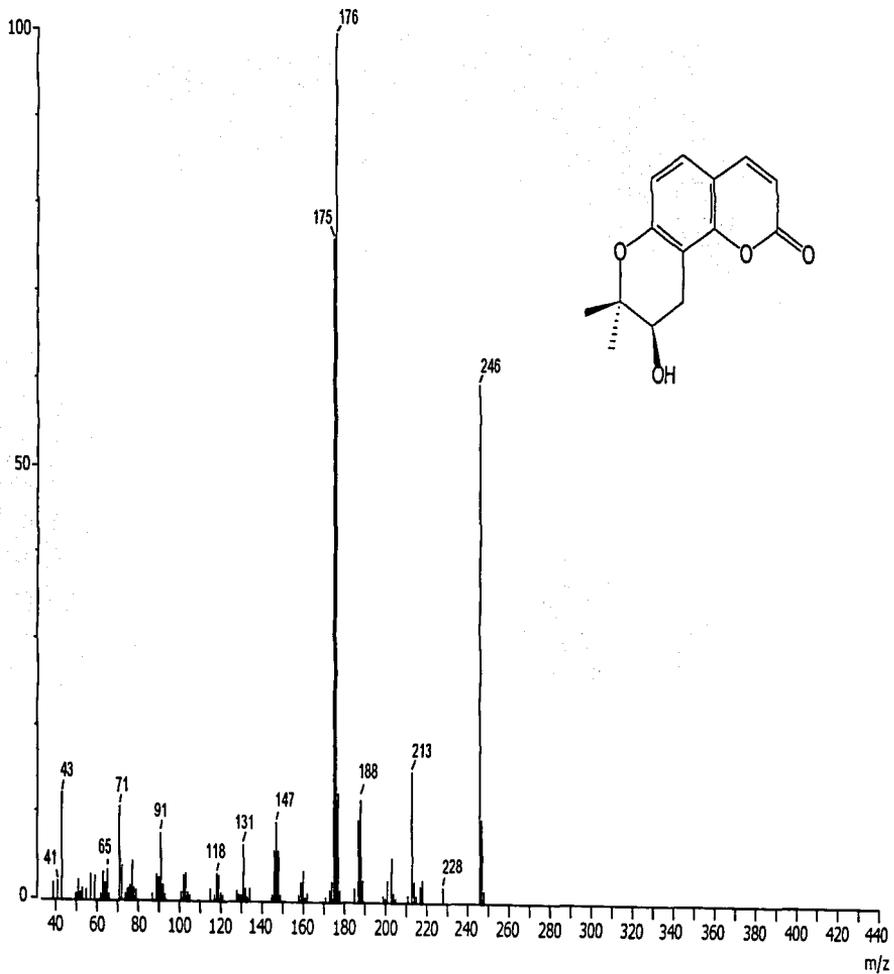
Espectro 5. Espectro en el IR de (+)-lomatina (**14**).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



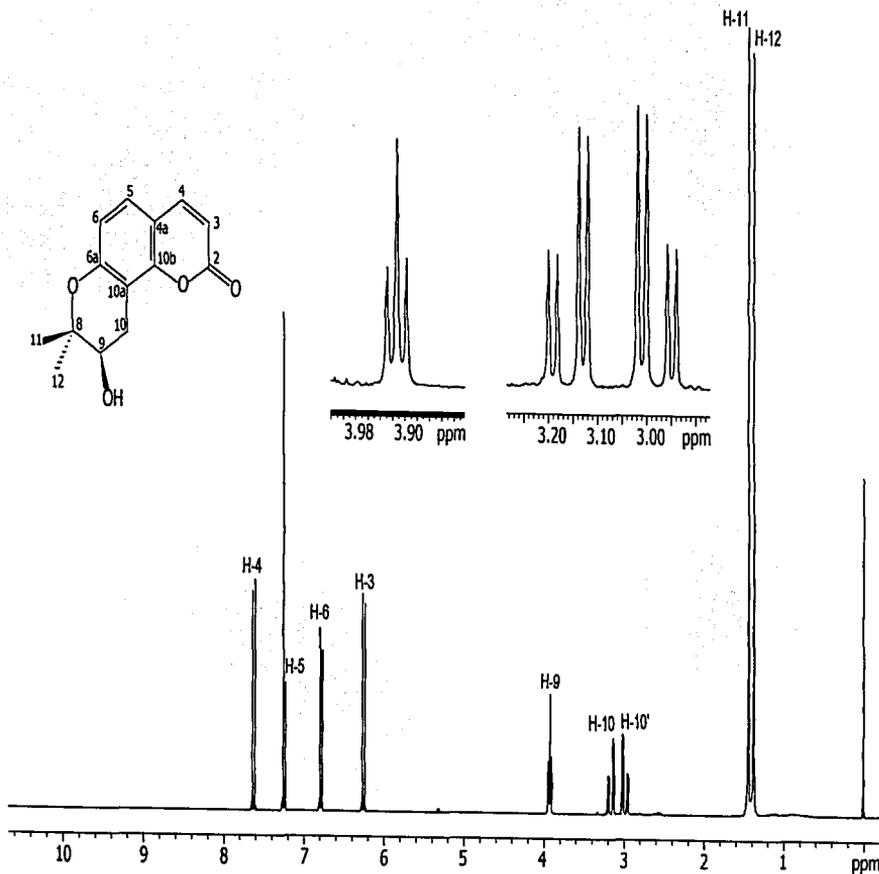
Espectro 6. Espectro en el UV de (+)-lomatina (14).

TESIS CON
PALA DE ORIGEN



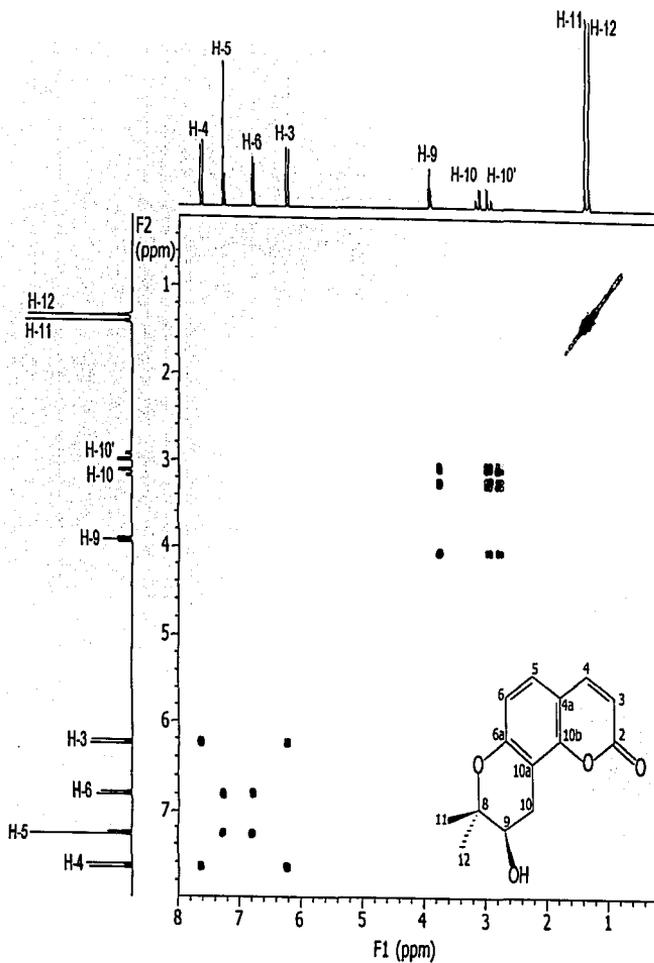
Espectro 7. Espectro de masas (IE) de (+)-lomatina (14)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



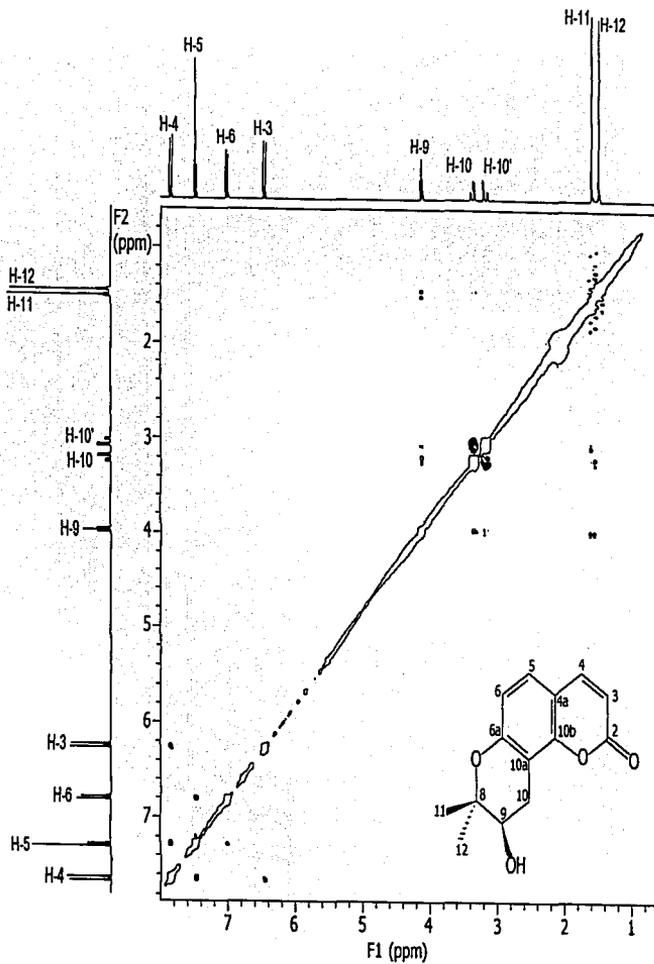
Espectro 8. Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ de (+)-lomatina (**14**).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

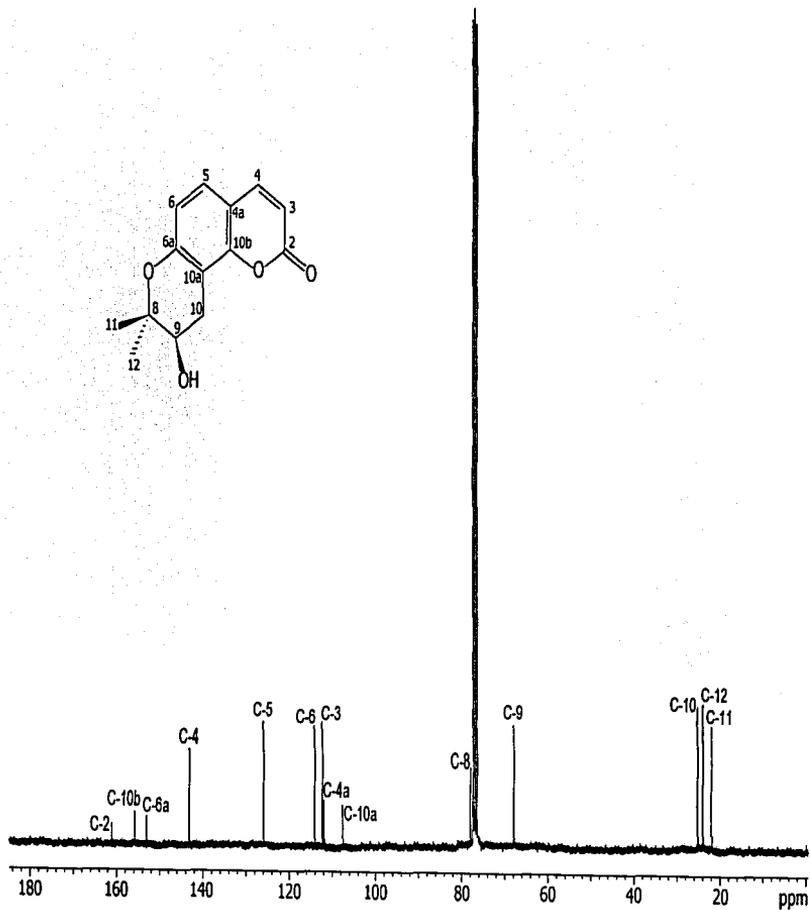
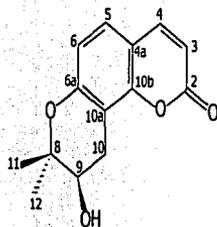


Espectro 9. Espectro de RMN modalidad ^1H - ^1H -COSY de (+)-lomatina (14).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



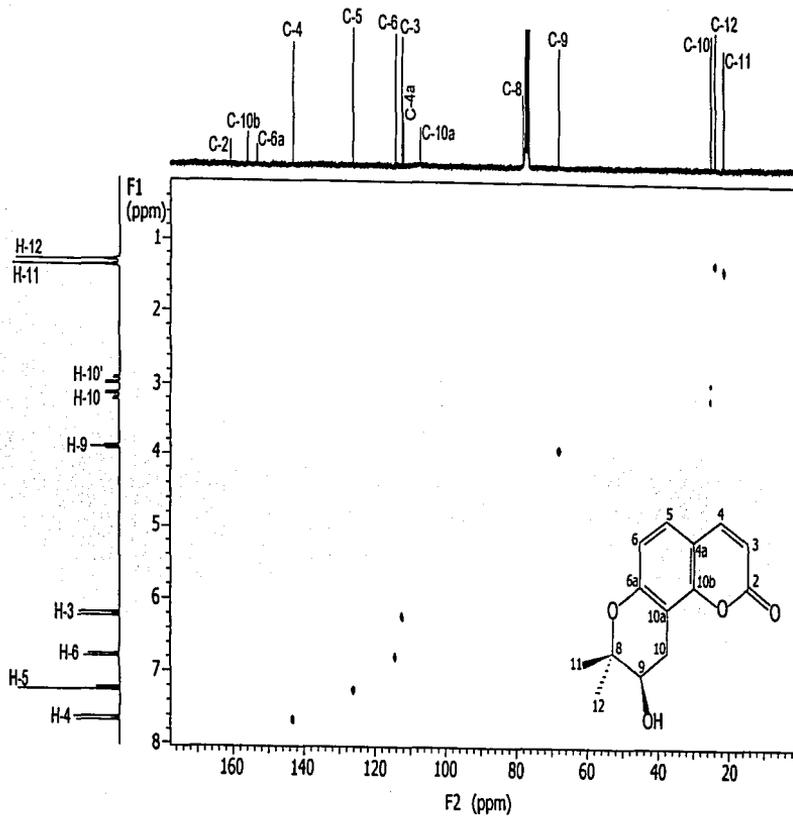
Espectro 10. Espectro de RMN modalidad NOESY de (+)-lomatina (14).



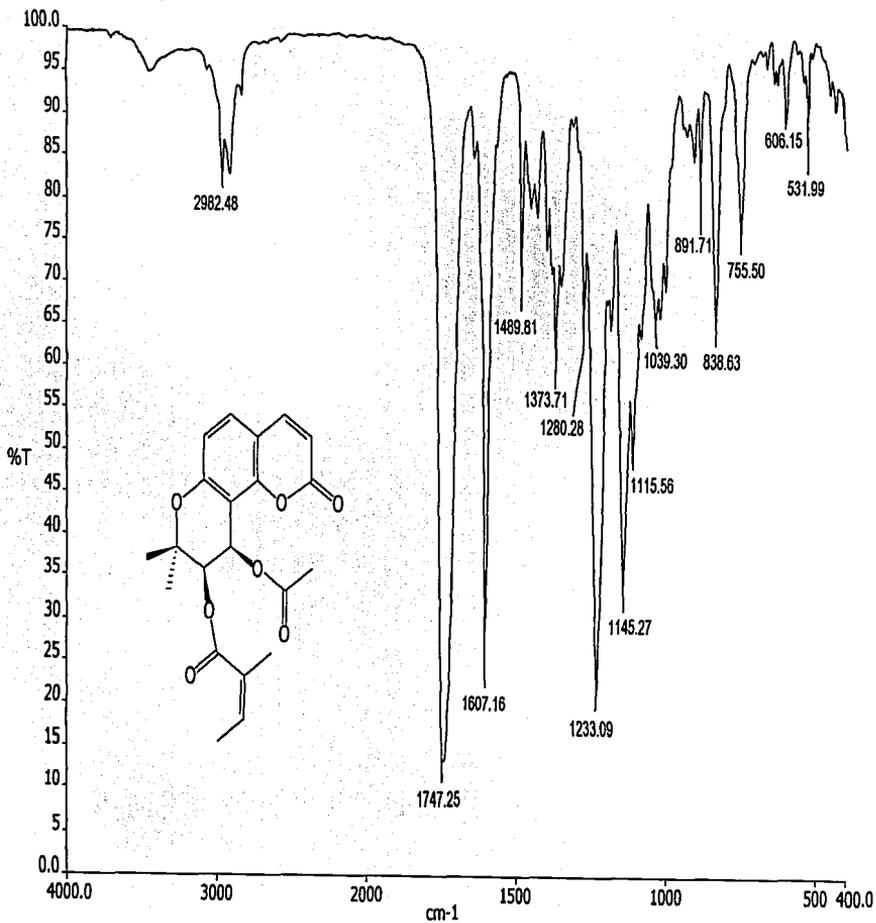
Espectro 11. Espectro de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ de (+)-lomatina (**14**).

FALTA DE ORIGEN

TESIS CON
FALTA DE CITEEN

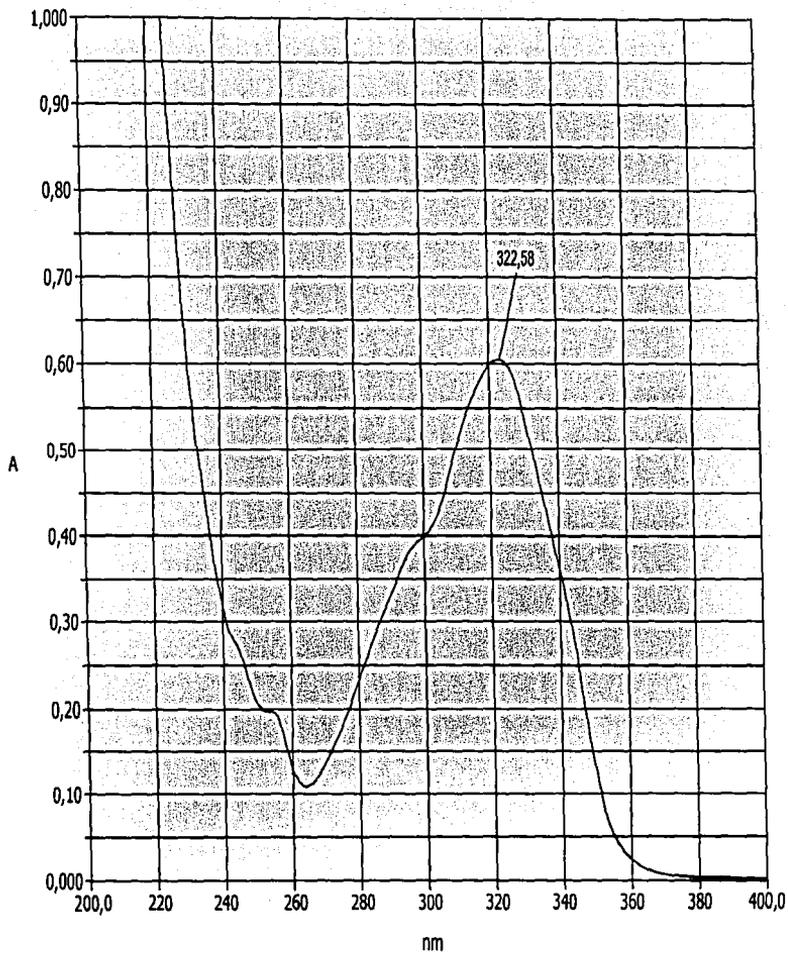


Espectro 12. Espectro de RMN modalidad HETCOR de (+)-lomatina (**14**).



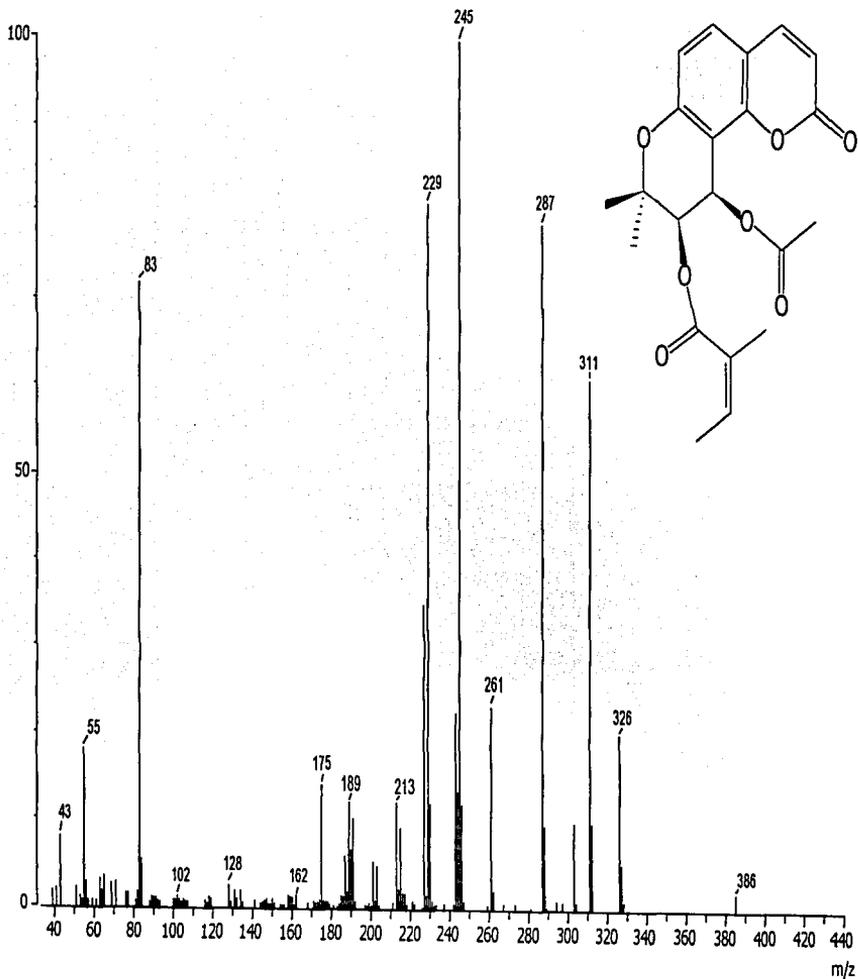
Espectro 13. Espectro en el IR de isopterin (15).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

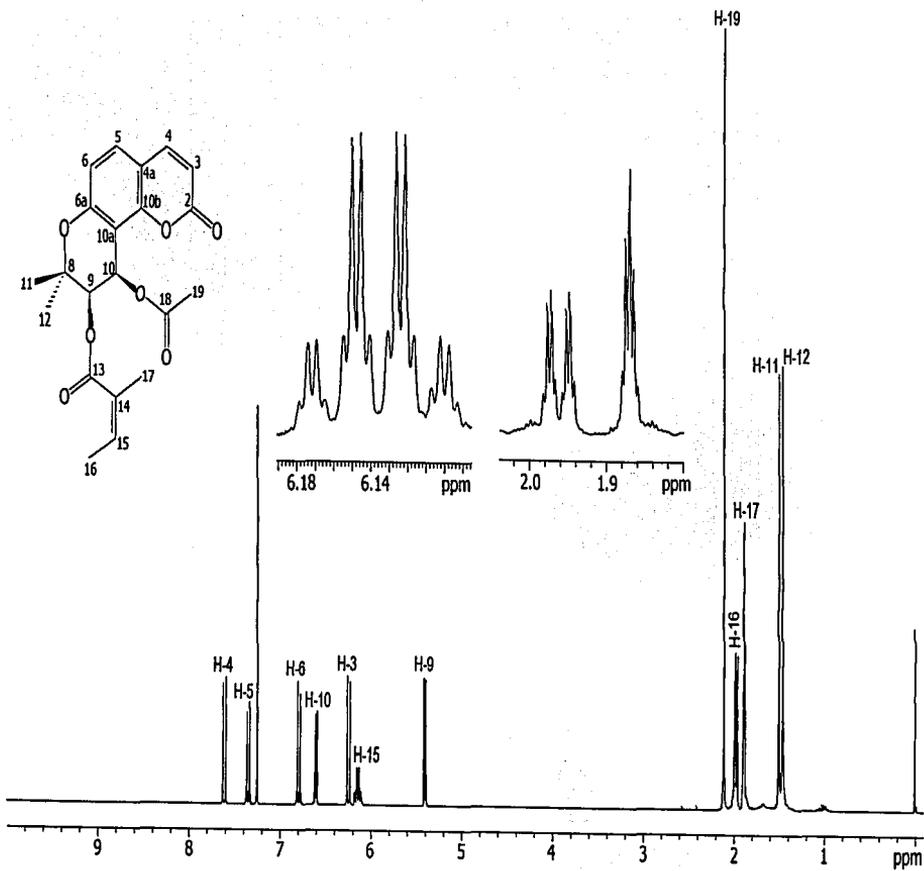


Espectro 14. Espectro en el UV de isopterixina (15).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

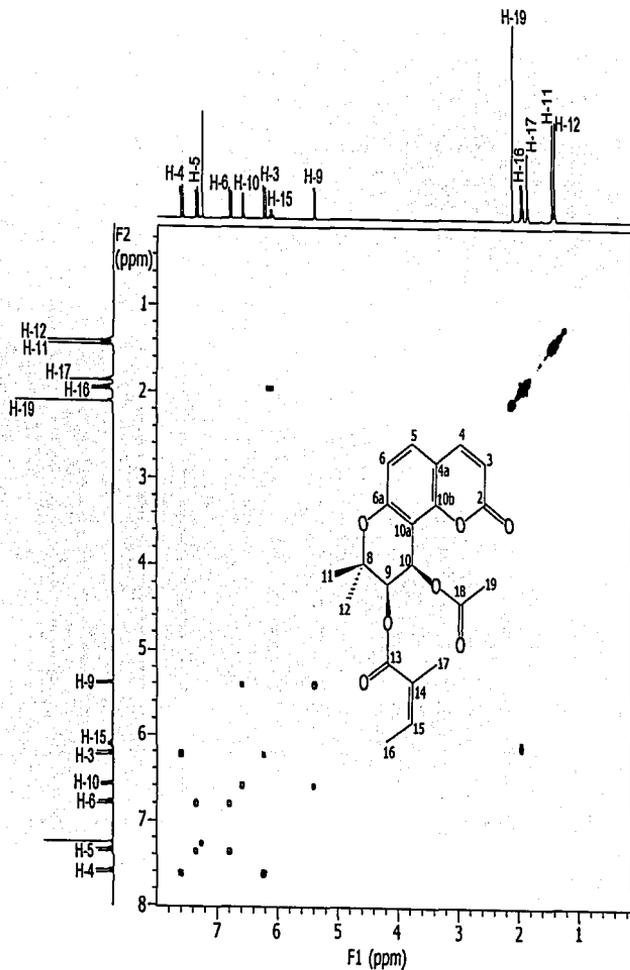


Espectro 15. Espectro de masas (IE) de isopterixina (15).

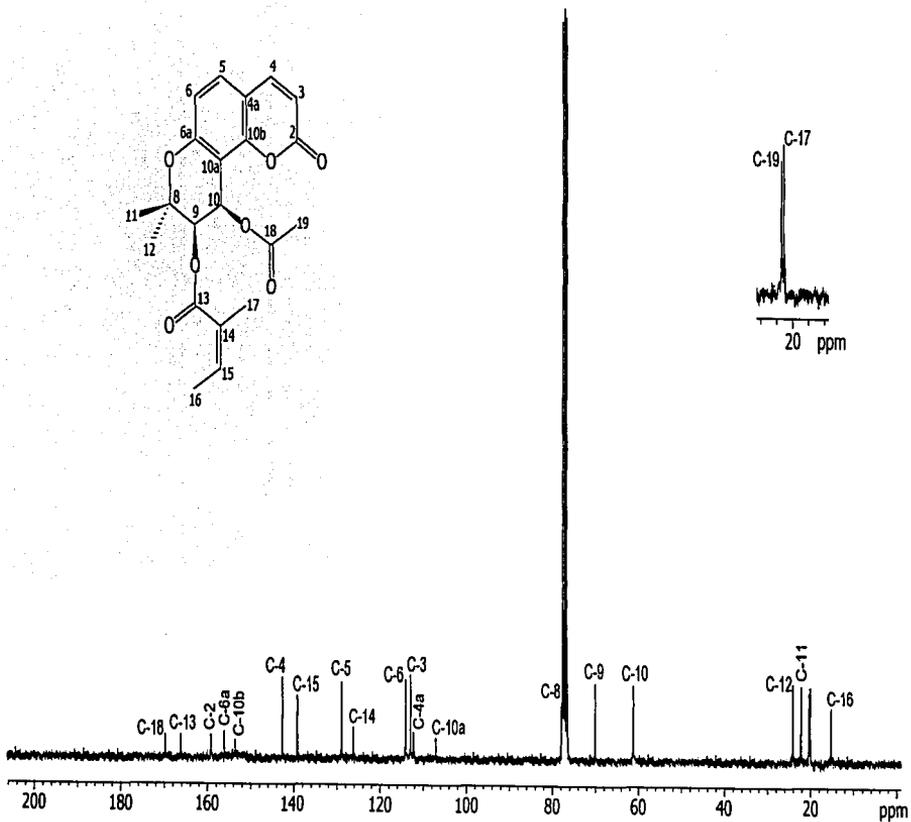
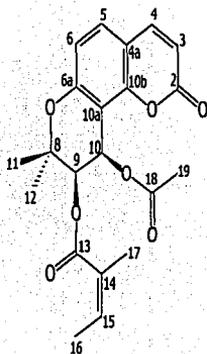


Espectro 16. Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ de isopterixina (15).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

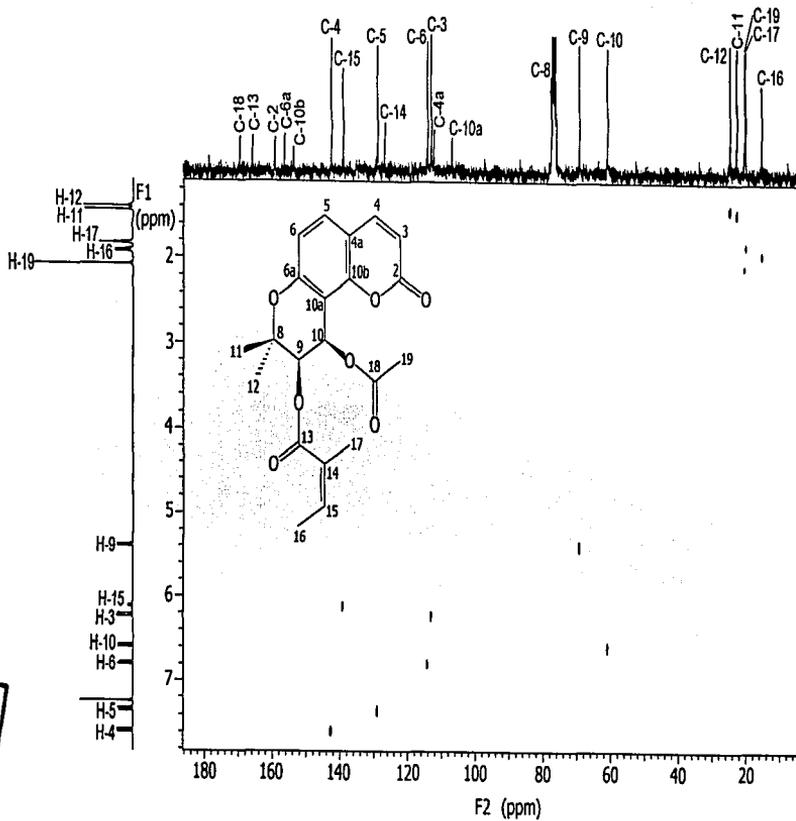


Espectro 17. Espectro de RMN modalidad ^1H - ^1H -COSY de isopterixina (15).



Espectro 18. Espectro de RMN- ^{13}C de isopterixina (15).

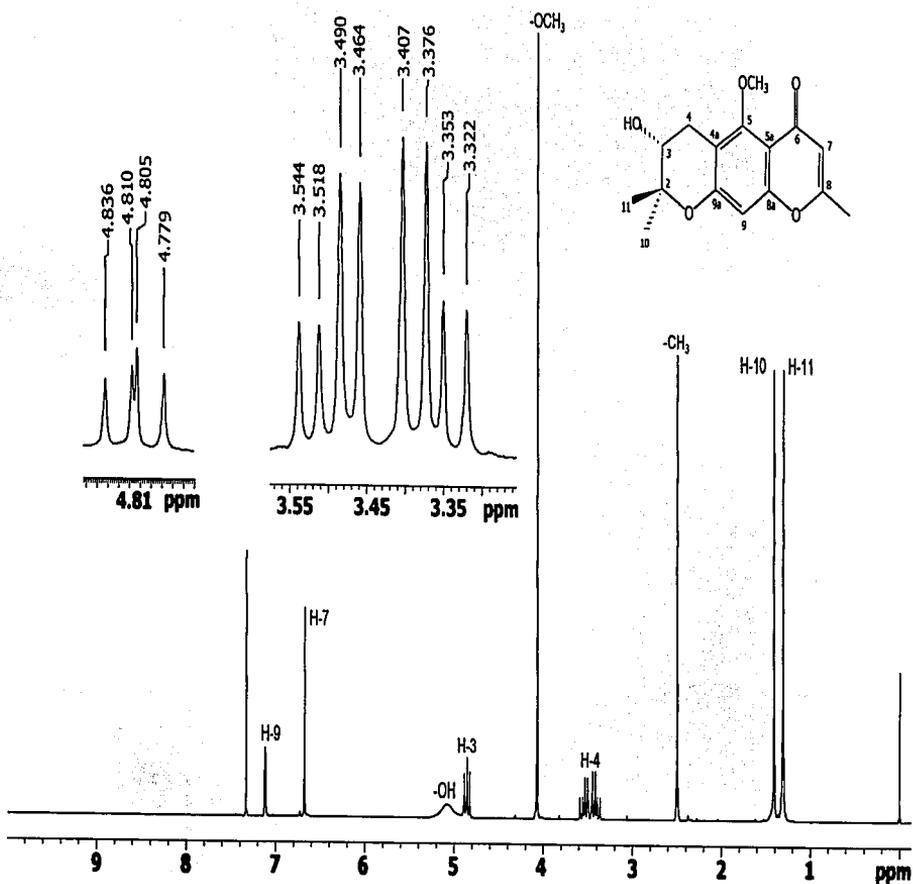
FALLA DE ORIGEN



Espectro 19. Espectro de RMN modalidad HETCOR de isopterixina (15).

TESIS CON
FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Espectro 20. Espectro de $\text{RMN}^1\text{-H}$ del (+)-5-metoxihamaudol (**16**) registrado en CDCl_3 .