



DE

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA

MÉXICO

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

**COMPUESTOS FITOTÓXICOS DE LA ESPECIE MEDICINAL *HOFMEISTERIA
SCHAFFNERI* (A. GRAY) R. M. KING & H. ROBINSON (ASTERACEAE).**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. ARACELI PÉREZ VÁSQUEZ



TUTOR: Dra. Rachel Mata Essayag

AÑO: 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Alfredo Ortega Hernández.
Primer vocal	Dr. Leovigildo Quijano.
Segundo vocal	Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas.
Tercer vocal	Dr. Andrés Navarrete Castro.
Secretario	Dr. Gustavo Ávila Zárraga.
Primer suplente	Dr. Fernando Calzada Bermejo.
Segundo suplente	Dra. Martha Lidia Macías Rubalcava.

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:

Laboratorio 124, Departamento de Farmacia, Conjunto E.
Facultad de Química.
Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECMIENTOS.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través del proyecto CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) 45814-Q.

Agradezco al CONACyT y DGEP (Dirección general de estudios de posgrado) por las becas otorgadas para la realización de mis estudios de doctorado.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Fernando Calzada Bermejo, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, gracias por todas las valiosas sugerencias y críticas a lo largo de mi formación doctoral.

Al Dr. Adelfo Reyes de la Facultad de Estudios Superiores, Unidad Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México (FES-ZARAGOZA-UNAM), por su valiosa asesoría en la síntesis de la hofmeisterina.

A los Drs. Robert Bye y Edelmira Linares por proporcionar el material vegetal para el presente proyecto.

Al M. C. Santiago Capella Vizcaíno, por el apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio 101 del departamento de Analítica de la Facultad de Química, UNAM, para la realización de los perfiles de los aceites esenciales.

A las M. en C. Isabel Rivero y Laura Acevedo por su gran apoyo técnico a lo largo del desarrollo del presente proyecto de investigación.

A los miembros de mi jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones.

Al personal Técnico de la USAI por el registro de los espectros de masas, IR, UV y RMN.

Quiero agradecer profundamente a mi tutora, La Dra. Rachel Mata Essayag, creadora de este proyecto, y a la que sin menoscabo y comprometida con el quehacer científico, estuvo siempre al pie del cañón, crítica ante todos mis múltiples errores, pendiente de todos mis avances y logros.

A mi madre Ana María y mis hermanos, Ana, Blanca, Rosa y Antonio...
Gracias por todo.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. ANTECEDENTES	1
1.1 EMPLEO DE HERBICIDAS PARA EL CONTROL DE LAS MALEZAS EN LAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS MODERNAS: VENTAJAS, DESVENTAJAS Y PERSPECTIVAS.	1
1.2 EL REINO VEGETAL COMO UNA FUENTE POTENCIAL DE HERBICIDAS.	7
1.3 LA CALMODULINA COMO UN BLANCO DE ACCIÓN POTENCIAL DE COMPUESTOS FITOTÓXICOS DE ORIGEN VEGETAL.	10
1.4 ANTECEDENTES DE LA ESPECIE VEGETAL <i>HOFMEISTERIA SCHAFFNERI</i> .	21
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	23
III HIPÓTESIS DE TRABAJO	26
IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL	27
4.1 MATERIAL VEGETAL.	27
4.2 PROCEDIMIENTOS GENERALES.	28
4.2.1 <i>Análisis cromatográficos.</i>	28
4.2.2 <i>Determinación de constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas.</i>	28
4.3 ENSAYOS BIOLÓGICOS.	29
4.3.1 <i>Determinación cuantitativa del potencial fitotóxico.</i>	29
4.3.2. <i>Determinación cualitativa del efecto fitotóxico.</i>	29
4.3.3 <i>Determinación de la actividad sobre la Fosfodiesterasa del AMPc (PDE1) dependiente de CaM para las fitotoxinas 76 y 77.</i>	31
4.4 ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ORGÁNICO LOTE I OBTENIDO A PARTIR DE LAS PARTES AÉREAS SECAS DE <i>H. SCHAFFNERI</i> .	31
4.4.1 <i>Preparación del extracto orgánico.</i>	30
4.4.2 <i>Fraccionamiento preliminar del extracto orgánico total.</i>	30
4.4.3 <i>Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa F4.</i>	31
4.4.4 <i>Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria activa F4-4.</i>	31
4.4.5 <i>Fraccionamiento cuaternario de la fracción terciaria activa F-4-8: Aislamiento del acetato de 2´-(2´´-hidroxi-4´´-metilfenil)-2´-oxo-etilo (76).</i>	33
4.4.6 <i>Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria activa F4-5: Aislamiento del 3´,4´,4a´,9a´-tetrahidro-6´,7´-dimetil-espiro[benzofuran-3(2H),2´-pirano[2,3-b] benzofuran]-2, 4a´-diol (77) y timol (105).</i>	34
4.5 ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ORGÁNICO LOTE II OBTENIDO A PARTIR DE LAS PARTES AÉREAS SECAS DE <i>H. SCHAFFNERI</i> .	35
4.5.1 <i>Preparación del extracto orgánico.</i>	35

4.5.2 Fraccionamiento preliminar del extracto orgánico total.	35
4.5.3 Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F3: Aislamiento del (2Z)-2-metil-2-butenolato de 2-hidroxi-4-metilfenilo (79) y del timol (105).	35
4.5.4 Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F4: Aislamiento del ácido angélico.	37
4.5.5 Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F4-14: Aislamiento del 1,4-bis-[(2-hidroxi-4-metil)-fenil]-buten-1,4-diona (78).	38
4.5.6 Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F-16: Aislamiento del 1,4-bis-[(2-hidroxi-4-metil)-fenil]-buten-1,4-diona (78).	39
4.5.7 Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F4-17: Aislamiento del (2Z)-2-metil-2-butenolato de 2-hidroxi-2-(2-hidroxi-4-metilfenil)-(isopropenilo) propilo (80).	39
4.5.8 Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F4-19: Aislamiento del 3',4',4a',9a'-tetrahidro-6',7'-dimetil-espiro-[benzofuran-3(2H),2'-pirano-[2,3-b]-benzofuran]-2,4a'-diol (77).	40
4.6 ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ACUOSO OBTENIDO A PARTIR DE LAS PARTES AÉREAS SECAS DE <i>H. SCHAFFNERI</i> .	40
4.6.1 Preparación del extracto acuoso a partir de las partes aéreas secas de <i>H. schaffneri</i> .	40
4.6.2 Fraccionamiento preliminar del extracto acuoso.	40
4.6.3 Fraccionamiento secundario de la fracción primaria 1-D: aislamientos de los compuestos (2Z,2'Z)bis(2-metil-2-butenolato) de 2-hidroxi-2-(2-hidroxi-4-metilfenil)-1,3-propanoilo (84), (2Z)-2-metil-2-butenolato de 2,3-dihidroxi-2-(2-hidroxi-4-metilfenil)propilo (82), (2Z)-2-metil-2-butenolato de 2-[2-(hidroximetil)-2-oxirani]-5-metilfenilo (81), (2Z)-2-metil-2-butenolato de 2-[2-(acetoximetil)-2-oxirani]-5-metilfenilo (83).	41
4.7 ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>H. SCHAFFNERI</i> .	43
4.7.1 Preparación del aceite esencial de <i>H. schaffneri</i> .	43
4.7.2 Identificación de los componentes presentes en las esencias de <i>H. schaffneri</i> : cálculo de los índices de retención.	43
4.7.3 Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en su modalidad impacto electrónico.	44
4.7.4 Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en su modalidad ionización química.	45
4.8 SÍNTESIS DE LA HOFMEISTERINA (76).	46
4.8.1 Síntesis del acetato de <i>m</i> -cresilo (86).	46
4.8.2 Síntesis de 2-hidroxi-4-metilacetofenona (87).	46
4.8.3 Síntesis de 2-metoxi-4-metilacetofenona (88).	47
4.8.4 Síntesis de la 2-benziloxi-4-metilacetofenona (89).	47
4.8.5 Síntesis de 2-Metiloxi- ω -bromo-4-metilacetofenona (90).	48
4.8.6 Síntesis de 2-Benziloxi- ω -bromo-4-metilacetofenona (91).	48
4.8.7 Síntesis del acetato de 2'-(2''-metoxi-4''-metilfenil)-2'-oxoetilo (92).	49
4.8.8 Síntesis del acetato de 2'-(2''-benzoil-4''-metilfenil)-2'-oxoetilo (93).	50
4.8.9 Síntesis del acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo (76).	53

4.9 CÁLCULOS DE MODELADO MOLECULAR.	53
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
5.1 SELECCIÓN PRIMARIA DE LA ESPECIE VEGETAL <i>H. SCHAFFNERI</i> COMO UNA FUENTE POTENCIAL DE PRINCIPIOS FITOTÓXICOS.	55
5.2 AISLAMIENTO DE LOS PRINCIPIOS FITOTÓXICOS A PARTIR DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE <i>H. SCHAFFNERI</i> .	57
5.3 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE <i>H. SCHAFFNERI</i> .	58
5.3.1 <i>Elucidación estructural del Compuesto 76.</i>	61
5.3.2 <i>Elucidación estructural del compuesto 78.</i>	69
5.3.3 <i>Elucidación estructural de los compuestos 79 y 84.</i>	74
5.4 EVALUACIONES BIOLÓGICAS.	81
5.5 ACTIVIDAD FITÓTOXICA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES PREPARADOS A PARTIR DEL MATERIAL VEGETAL RECOLECTADO EN DISTINTAS ÉPOCAS DEL AÑO.	83
VI. CONCLUSIONES	93
VII PERSPECTIVAS	95
VIII BIBLIOGRAFÍA	96
IX APÉNDICE	109

LISTA DE TABLAS

Tabla		pp
1.	Principales malezas en cultivos mexicanos.	3
2.	Principales blancos de acción de los herbicidas de mayor uso.	5
3.	Distribución del género <i>Hofmeisteria</i> en México.	21
4.	Registros de recolección de los siete lotes de material vegetal (<i>H. schaffneri</i>) utilizados en esta investigación.	27
5.	Fraccionamiento primario del extracto orgánico Lote I de <i>H. schaffneri</i> .	32
6.	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F4 del extracto orgánico lote I de <i>H. schaffneri</i> .	33
7.	Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F4-4 del extracto orgánico lote I de <i>H. schaffneri</i> .	34
8.	Fracc. cuaternario de la fracción terciaria F4-4-8 del extracto orgánico lote I de <i>H. schaffneri</i> .	35
9.	Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F4-5 del extracto orgánico lote I de <i>H. schaffneri</i> .	36
10.	Fraccionamiento primario del extracto orgánico lote II de <i>H. schaffneri</i> .	37
11.	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F3 del extracto orgánico lote II de <i>H. schaffneri</i> .	38
12.	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F4 del extracto orgánico lote II de <i>H. schaffneri</i> .	39
13.	Fracc. terciario de la fracción secundaria F4-14 del extracto orgánico lote II de <i>H. schaffneri</i> .	40
14.	Fraccionamiento preliminar del extracto acuoso.	43
15.	Rendimiento de las esencias obtenidas por hidrodestilación.	45
16.	Concentraciones de inyección de los lotes de esencias de <i>H. schaffneri</i> .	45
17.	Efecto de los extractos y aceites esenciales obtenidos de <i>H. schaffneri</i> sobre la germinación y crecimiento radicular de la arvense <i>A. hypochondriacus</i> .	56
18.	Efecto de los extractos orgánicos y fracciones primarias sobre la germinación y crecimiento radicular (CI ₅₀ , µg/mL) de la arvense <i>A. hypochondriacus</i> .	57
19.	Metabolitos derivados del timol aislados de <i>H. schaffneri</i> .	58
20.	Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto 76 .	61
21.	Datos de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de la hofmeisterina (76)	64
22.	Condiciones de reacción probadas para la transposición de Fries.	65

23.	Condiciones de reacción ensayadas para la α -bromación para la formación del intermediario 91 .	66
24.	Rendimientos y puntos de fusión de los compuestos sintetizados.	67
25.	Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto 78 .	69
26.	Datos de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) y RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de la hofmeisterina II (78).	72
27.	Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto 79 .	74
28.	Datos de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) y RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de la hofmeisterina III (79).	76
29.	Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto 84 .	77
30.	Datos de RMN- ¹ H (500 MHz CDCl ₃) y RMN- ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de la hofmeisterina IV (84).	79
31.	Actividad fitotóxica (CI ₅₀ , M) del timol (105) y los derivados 76-83 aislados de <i>H. schaffneri</i> .	81
32.	Actividad sobre la PDE1 del AMPc dependiente de CaM de los compuestos 76 y 77 .	82
33.	Actividad fitotóxica (CI ₅₀ , M) de los compuestos sintetizados.	82
34.	Rendimientos obtenidos de las esencias <i>H. schaffneri</i> .	83
35.	Actividad fitotóxica de las esencias obtenidas de <i>H. schaffneri</i> sobre la arvense <i>A. hypochondriacus</i>	84
36.	Programa de temperatura para las dos columnas.	87
37.	Proporción de los componentes identificados en los cinco lotes del aceite esencial de <i>H. schaffneri</i> .	87
38.	Composición de los lotes de aceite esencial de <i>H. schaffneri</i> preparados a partir del material vegetal recolectado en diferentes épocas del año.	88

LISTA DE FIGURAS

Figura		pp
1.	<i>Hofmeisteria schaffneri</i> .	
2.	Distribución geográfica de <i>H. schaffneri</i> .	
3.	Fraccionamiento primario del extracto orgánico lote I obtenido a partir de las partes aéreas secas de <i>H. schaffneri</i> .	33
4.	Aislamiento de la hofmeisterina (76) a partir de la fracción primaria F4 del extracto orgánico lote I de <i>H. schaffneri</i> .	35
5.	Aislamiento del compuesto 77 y del timol (105) a partir de la fracción primaria F4 del extracto orgánico lote I de <i>H. schaffneri</i> .	36
6.	Aislamiento de la hofmeisterina III (79) y timol (105) a partir de la fracción primaria F3 del extracto orgánico lote II de <i>H. schaffneri</i> .	38
7.	Aislamiento de la hofmeisterina II (78) a partir de la fracción primaria F4 del extracto orgánico lote II de <i>H. schaffneri</i> .	40
8.	Aislamiento del compuesto 80 a partir de la fracción primaria F4 del extracto orgánico lote II de <i>H. schaffneri</i> .	41
9.	Obtención del extracto acuoso y fraccionamiento primario de las partes aéreas secas de <i>H. schaffneri</i> .	43
10.	Aislamiento de los compuestos 81-84 a partir de la fracción primaria 1-D del extracto acuoso de <i>H. schaffneri</i> .	44
11.	Confórmeros principales de mínima energía de la hofmeisterina II (78)	73
12.	Vista estereoscópica de la estructura de la hofmeisterina II (78) obtenida por rayos X.	73
13.	Confórmeros principales de mínima energía del compuesto 77 .	80
14.	Comparación de frecuencias calculas y experimentales de 77 y 78 .	80
15.	Cromatogramas típicos (TIC-FID) de los aceites esenciales del ambar (<i>H. schaffneri</i>) analizados con la columna capilar SPB-1 (no polar). Las intensidades relativa esta en función del total de picos detectados, incluido el disolvente.	89
16.	Ampliación 1:4 de los cromatogramas (TIC-FID) de los aceites esenciales del ambar (<i>H. schaffneri</i>) analizados con la columna capilar SPB-1 (no polar). Las intensidades relativas están en función del total de picos detectados, incluido el disolvente.	90

17. Ampliación 1:6 de los cromatogramas (TIC-FID) de los aceites esenciales de ámbar (*H. schaffneri*) analizados con la columna capilar SPB-1 (no polar). Las intensidades relativa esta en función del total de picos detectados, incluido el disolvente. Se amplía el área de los picos de los metabolitos mayoritarios. **91**

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema		pp
1.	Patrón de fragmentación de la hofmeisterina (76).	64
2.	Ruta de síntesis alterna para preparar el producto α -bromado a la cetona.	66
3.	Ruta de síntesis para la generación de la hofmeisterina (76) y su derivado metilado (92)	68
4.	Patrón de fragmentación de la hofmeisterina II (78).	70

LISTA DE ESPECTROS

Espectro		pp
1.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la hofmeisterina (76).	62
2.	Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de la hofmeisterina (76).	63
3.	Espectro HMBC de la hofmeisterina (76).	63
4.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la hofmeisterina II (78).	71
5.	Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz).de la hofmeisterina II (78).	71
6.	Espectro HMBC de la hofmeisterina II (78).	72
7.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la hofmeisterina III (79).	75
8.	Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de la hofmeisterina III (79).	75
9.	Ampliación del HMBCde la hofmeisterina III (79).	76
10.	Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de la hofmeisterina IV (84).	77
11.	Ampliación de la zona de los metilos de los residuos de angelato en el espectro de RMN- ¹ H de la hofmeisterina IV (84).	78
12.	Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de la hofmeisterina IV (84).	78
13.	Espectro HMBC de la hofmeisterina IV (84).	79
14.	Espectro de masas (MS-EI) de la hofmeisterina (76).	110

15.	Espectro de masas (MS-EI) de la hofmeisterina II (78).	111
16.	Espectro de masas (MS-EI) de la hofmeisterina II (79).	112
17.	Espectro en el infrarrojo del compuesto 76 .	113
18.	Espectro en el infrarrojo del compuesto 78 .	114
19.	Espectro en el infrarrojo del compuesto 79 .	115
20.	Espectro en el infrarrojo del compuesto 84 .	116
21.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 77 .	117
22.	Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) del compuesto 77 .	118
23.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 80 .	119
24.	Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) del compuesto 80 .	120
25.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 81 .	121
26.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 82 .	122
27.	Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) del compuesto 82 .	123
28.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 83 .	124
29.	Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) del compuesto 83 .	125

LISTA DE ABREVIATURAS

DBU	1, 8-Diazabiclo[5.4.0]-undec-7-eno
AcOEt	Acetato de etilo
atm	atmósfera
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
CaM	Calmodulina
ca	cercano a
J	Constante de acoplamiento
COSY	Correlación homonuclear
CG-EM	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
c	cuarteto
cc	Cuarteto de cuarteto
δ	Desplazamiento químico
CH₂Cl₂	Diclorometano
HPPD	Dioxigenasa del ácido hidroxifenilpiruvico
dd	Doble de doble
d	Doblete
eV	Electrón volts
K	grados Kelvin
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
lb/plg²	libras /pulgada ²
MHz	Megahertz
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
Pd/C	Paladio/Carbono
p.f	Punto de fusión
m/z	Relación masa-carga
RMN-¹³C	Resonancia magnetica nuclear de carbono 13
RMN-¹H	Resonancia magnetica nuclear protónica
sep	Septuplete
sa	Singulete ancho
DFT	Teoría de funcionales de la densidad
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano

RESUMEN

Como parte de un proyecto de investigación multidisciplinario conducente al descubrimiento de nuevos agentes herbicidas potenciales, el presente trabajo describe el potencial fitotóxico de los extractos (orgánico y acuoso) y compuestos puros, obtenidos a partir de las partes aéreas de *Hofmeisteria schaffneri* (A. Gray) R. M. King & H. Robinson (Asteraceae).

Los resultados de ensayos biológicos preliminares de selección permitieron determinar que la especie es una fuente de principios fitotóxicos. Este ensayo consistió en la determinación del efecto sobre la germinación y crecimiento radicular de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* utilizando el método de la caja de Petri.

El fraccionamiento biodirigido de dos extractos orgánicos y uno acuoso preparado a partir del material vegetal seco de *H. schaffneri* condujo al aislamiento de catorce metabolitos secundarios: el timol, ácido angélico, euparina, β -sitosterol, β -caroteno, y nueve derivados del timol, cuatro de los cuales resultaron ser nuevos derivados del timol: acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo (**76**), 1,4-bis-[(2-hidroxi-4-metil)-fenil]-buten-1,4-diona (**78**), (2Z)-2-metilbut-2-enoato de 2-isopropil-5-metilfenilo (**79**) y (2Z,2'Z)bis(2-metilbut-2-enoato) de 2-hidroxi-2-(2-hidroxi-4-metilfenil)propan-1,3-diilo (**84**), a los cuales se les dio el nombre trivial de hofmeisterina y hofmeisterinas II-IV, respectivamente. Todos los productos fueron caracterizados por métodos espectroscópicos y espectrométricos. El comportamiento conformacional también se estudió por modelado molecular usando la teoría de funcionales de la a un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP.

Con la finalidad de obtener cantidades adicionales de la hofmeisterina (**76**) para la realización de los ensayos biológicos, así como para comprobar su estructura molecular, se diseñó una síntesis basada en una transposición de Fries del acetato de *m*-cresilo. El rendimiento global de la reacción fue de 11.8 %.

En general, todos los compuestos evaluados inhibieron el crecimiento radicular de las arvenses de prueba de manera dependiente de la concentración. La hofmeisterina (**76**) y el compuesto **77** fueron significativamente los más activos, incluso las concentraciones inhibitorias medias fueron menores que las de la tricolorina A (CI_{50} = 36.1 μ M, para A.

hypochondriacus), compuesto utilizado como control positivo. El compuesto **78** mostró una actividad fitotóxica moderada y provocó un blanqueamiento de las plántulas de *A. hypochondriacus* a la concentración 33.5 μM . Asimismo, los compuestos **76** y **77** inhibieron las propiedades moduladoras de la CaM al inhibir la activación de la enzima PDE1 (IC_{50} = 4.39 y 4.22 μM , respectivamente).

El análisis por cromatografía de gases de los aceites esenciales fitotóxicos preparados a partir de cinco lotes de material vegetal recolectado en diferentes meses del año, permitió la identificación de 27 componentes, que representa más del 60 % de los constituyentes. Seis productos son derivados del timol, incluyendo la hofmeisterina III (**79**) que fue el componente mayoritario en todos los lotes. Otros constituyentes importantes fueron el cubebeno (**107**), cubenol (**117**) y el óxido de cariofileno (**115**). La actividad fitotóxica de los cinco lotes de esencias fue igualmente determinada con el ensayo de la caja de Petri utilizando semillas de *Amaranthus hypochondriacus*. La actividad fitotóxica de los aceites de los distintos lotes fue muy similar; las concentraciones inhibitorias media (CI_{50}) se encontraron en el rango de 28-93 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta actividad no fue muy diferente a la del extracto orgánico de la planta, sin embargo, todas las esencias fueron más activas que el control positivo.

Las principales diferencias en el contenido metabólico se ven moderadamente reflejadas en la actividad fitotóxica; el lote de marzo, que se caracterizó por tener el menor contenido de hofmeisterina III (**79**), pero el mayor de los sesquiterpenoides α -cubebeno y cubenol, fue el más activo.

ABSTRACT

As a part of a research program to search new natural phytotoxic agents from Mexican biodiversity useful for the development of new herbicides, the present work describes the phytotoxic properties of some extracts and compounds from *Hofmeisteria schaffneri* (A. Gray) R. M. King & H. Robinson (Asteraceae).

The species was selected as a source of phytotoxic agents by testing the effects of some extracts of the plants on germination and radicle growth of seedlings of *Amaranthus hypochondriacus* using the Petri dish bioassay.

Bioassay-guided fractionation of two phytotoxic extracts (a CH₂Cl₂-MeOH (1:1) and an aqueous) prepared from the aerial parts of *H. schaffneri* led to the isolation of four new thymol analogs (**76**, **78**, **79** and **84**), along with five known compounds, **77**, **80-83**. The new derivatives were characterized by spectroscopic methods as 1,4-bis(2'-hydroxy-4'-methylphenyl)butane-1,4-dione (**78**), 2-isopropyl-5-methylphenyl (2Z)-2-methylbut-2-enoate (**79**) and 2-hydroxy-2-(2-hydroxy-4-methylphenyl)propane-1,3-diyl (2Z,2'Z)bis(2-methylbut-2-enoate) (**84**). Their conformational behavior was also studied by molecular modeling using density functional theory calculations at B3LYP/DGDZVP level. The new compounds were designated with the trivial names of hofmeisterins II-IV, respectively.

A formal synthesis of hofmeisterin was described with a total yield of 11.8%. The synthesis was based on Fries rearrangement of *m*-cresil acetate.

Compounds **76-83** significantly inhibited radicle growth of seedlings of *Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crus-galli* in the Petri dish bioassay with IC₅₀'s ≤ 10⁻⁴M. The most active compounds were **76** and **77** which were more active than tricolorin A (IC₅₀ = 110 μM), used as positive control. Furthermore, the northymol analog **78** provoked significant bleaching of the seedlings of *A. hypochondriacus*. However, none of the isolates affected seedling growth or germination of *Medicago sativa*. The unusual phytotoxic thymol derivatives **76** and **77** also inhibited activation of PDE1 in the presence of CaM with IC₅₀ values of 4.4 and 4.2 μM, respectively. Their effect was comparable to chlorpromazine (IC₅₀ = 6.8 μM).

Essential oils from the aerial parts of the plant collected in different seasons during a year were extracted by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography coupled with flame ionization detector and ion trap mass spectrometry. Twenty seven compounds were characterized. The major compound was hofmeisterin III (**79**) accounting for, on average 29.42 %, followed by thymyl isovalerate (**114**, 16.76%). Other important components were α -cubebene (**107**), cubenol (**117**) and caryophyllene oxide (**115**). The yield and composition remained constant during the year.

The essential oils were tested for their phytotoxic activity using the Petri dish method. The essential oils tested were effective against *Amaranthus hypochondriacus* seedlings, the IC₅₀ ranged between 28 and 93 $\mu\text{g/mL}$, being the most active the oil from the plant collected in March, which contained the lowest amount of hofmeisterin III (**79**) but the highest amount of α -cubebene and cubenol.

I. ANTECEDENTES.

1.1 EMPLEO DE HERBICIDAS PARA EL CONTROL DE LAS MALEZAS EN LAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS MODERNAS: VENTAJAS, DESVENTAJAS Y PERSPECTIVAS.

La agricultura es una de las actividades más importantes desarrollada por los humanos y está encaminada a la producción de bienes y satisfactores alimenticios. La buena práctica de esta actividad es importante para la consecución de alimentos suficientes para una dieta equilibrada para una población que cada día va en aumento.

Se estima que dos terceras partes de la población mundial económicamente activa se dedican a la agricultura, representando así, una de las industrias más grandes del mundo y la base de la economía de diferentes países (Labrada, 2004). A lo largo de la historia, los agricultores han enfrentado numerosos problemas, alguno de los cuales se indican en los párrafos siguientes.

En primer lugar, el uso excesivo de los suelos para producir una mayor cantidad de alimentos para satisfacer las necesidades de la creciente población mundial y el excesivo pastoreo han provocado el desgaste de la tierra y a la postre, falta de agua, erosión de los suelos, destrucción de los ecosistemas, y finalmente la alteración de la vegetación natural. La explotación exagerada de los suelos ocurre principalmente en los países altamente industrializados donde se trabaja bajo sistemas intensivos de siembra.

Cuando no existen las condiciones deseables de temperatura, humedad y nutrientes para el desarrollo óptimo de los cultivos, la capacidad de crecimiento y reproducción de las plantas disminuye y aumenta la competencia entre especies, originando la propagación y persistencia de aquellas plantas que se adaptan mejor a las condiciones extremas. Estas últimas especies se conocen como malezas, arvenses o plantas dañinas; algunas son indeseables por los daños que ocasionan a los cultivos al competir por luz, nutrientes, agua y espacio; otras son hospederas de insectos y patógenos dañinos. La gran mayoría de las plantas dañinas están relacionadas con enfermedades causadas por virus y algunas son alelopáticas, llegando a representar un serio problema dentro del

agroecosistema (Weston y Duke, 2003; Singh, 2003). Una característica de la mayoría de las malezas es su capacidad para el ajuste fenotípico en los caracteres morfológicos y las respuestas fisiológicas bajo diferentes condiciones del medio. La consecuencia de esta plasticidad es evidente en la producción de semillas (Miner, *et al.*, 2005; Basu, *et al.*, 2004).

Algunas arvenses tienen uso culinario o medicinal. Por lo tanto, el concepto de maleza es relativo y antropocéntrico. Entonces, se consideran plantas dañinas aquellas que bajo ciertas circunstancias afectan el desarrollo de otros cultivos de interés económico (Vibrans, 2001; Espinosa-García, *et al.*, 2004).

Las malezas constituyen el segundo componente económico más importante del complejo total de plagas antecedido por los insectos y seguido por los ácaros, vertebrados, nematodos, y patógenos de plantas (Labrada, 2004). Se han identificado aproximadamente 7000 especies de malezas, lo que corresponde a un 10% de las especies vegetales alrededor de mundo; de este gran número, 250 especies han provocado una dramática disminución en los rendimientos de los cultivos de mayor importancia económica (Vyvyan, 2002).

El conocimiento del daño que ocasionan las arvenses proviene de las evaluaciones de pérdidas de cosechas agrícolas. De tal forma que se considera que las malezas ocasionan una pérdida del 10% de la producción agrícola lo cual se ve claramente reflejado en las estadísticas agroeconómicas; éstas últimas estiman que las pérdidas anuales en la agricultura en los países en desarrollo causadas por malezas es del orden de 125 millones de toneladas, cantidad suficiente para alimentar 250 millones de personas (Reporte FAO).

Las principales especies de malezas registradas en el mundo pertenecen a la familia Poaceae (Espinosa-García, *et al.*, 2004; Randall, 2002; Brundu, *et al.*, 2001). Cada país, por supuesto, tiene sus listas oficiales. En el caso de México, aunque no hay una lista oficial, los diversos reportes y publicaciones de investigadores especializados permiten inferir que las más importantes son las resumidas en la Tabla 1. Muchas de estas especies son también las más agresivas a nivel global. (Espinosa-García, *et al.*, 2004; Villaseñor y Espinosa-García, 2004; Villaseñor, 1989).

Tabla 1. Principales malezas encontradas en los cultivos de México^a.

ESPECIE	FAMILIA	ORIGEN	DISTRIBUCIÓN	IMPORTANCIA ECONÓMICA
MALEZAS DE HOJA ANGOSTA				
<i>Cyperus esculentus</i>	Cyperaceae	Europa	Mayor parte del territorio	Algodón, papa y maíz.
<i>Avena fatua</i> *	Poaceae	Europa	Norte del país, Oaxaca	Avena y trigo
<i>Cenchrus incertus</i> *	Poaceae	América	Norte del país.	Varios cultivos
<i>Cynodon dactylon</i> *	Poaceae	África	Mayor parte del territorio	Caña de azúcar, maíz
<i>Echinochloa crus-galli</i> *	Poaceae	Europa-Asia	Norte del país	Arroz, maíz, papa
<i>Sorghum alepense</i> *	Poaceae	Europa-Asia	Toda la republica	Varios cultivos
MALEZAS DE HOJA ANCHA				
<i>Amarantus hybridus</i> *	Amaranthaceae	Norteamérica	Mayor parte del territorio	Varios cultivos
<i>Helianthus annuus</i>	Asteraceae	Norteamérica	Norte del país, Oax. y Guerrero.	Varios cultivos
<i>Taraxacum officinale</i>	Asteraceae	Europa	Norte y centro del país	Varios cultivos
<i>Xanthium strumarium</i>	Asteraceae	México	Varios estados	Varios cultivos
<i>Convolvulus arvensis</i> *	Convolvulaceae	Europa	Varios estados	Varios cultivos
<i>Chenopodium album</i> *	Chenopodiaceae	Europa-Asia	Varios estados	Varios cultivos
<i>Salsola kali</i>	Chenopodiaceae	Rusia	Norte y centro del país	Varios cultivos
<i>Argemone echinata</i>	Papaveraceae	México	Norte del país	Ganado
<i>Argemone mexicana</i>	Papaveraceae	América	Norte y centro del país, Oaxaca	Caña de azúcar
<i>Rumex crispus</i>	Poligonaceae	Europa-Asia	Varios estados	Alfalfa, papa, cereales
<i>Datura quersifolia</i>	Solanaceae	México	Norte del país	Ganado
<i>Solanum rostratum</i>	Solanaceae	México	Varios estados	Algodón

^aAdaptado de: Villaseñor *et al.*, 1998.

* Especies más agresivas a nivel mundial.

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

1. Métodos preventivos, que incluyen los procedimientos de cuarentena para prevenir la entrada de una maleza exótica en el país o en un territorio particular.
2. Métodos físicos: arranque manual, escarda con azada, corte con machete u otra herramienta y labores de cultivo.

3. Métodos culturales: rotación de cultivos, preparación del terreno, uso de variedades competitivas, distancia de siembra o plantación, cultivos intercalados o policultivo, cobertura viva de cultivos, acolchado y manejo de agua.
4. Control químico a través del uso de herbicidas.
5. Control biológico a través del uso de enemigos naturales específicos para el control de especies de malezas.
6. Otros métodos no convencionales, como por ejemplo la solarización del suelo.

De los métodos anteriormente mencionados, los herbicidas han tenido un mayor impacto en las prácticas agrícolas, principalmente en la agricultura convencional ejercida en los países desarrollados en donde la necesidad de reducir costos y aumentar la producción han sido los objetivos prioritarios; en general el consumo de herbicidas, en comparación a otras formas de control de malezas, aumenta en respuesta a la necesidad de incrementar la producción de alimentos.

El empleo de herbicidas para el control de malezas ha estado presente a lo largo de la historia de la agricultura. Así por ejemplo, los griegos utilizaban compuestos inorgánicos, como el azufre y los chinos emplearon sales derivadas del arsénico a partir del siglo 16 (Devine, 2002). La gran mayoría de estos productos eran utilizados por serendipia y no mostraban una acción selectiva. A principio del siglo 20 se sintetizaron los primeros herbicidas potenciales; conforme avanzó el tiempo, el número y la complejidad de los mismos incrementaron. De esta forma nacieron los herbicidas “orgánicos” como el 2,4-dinitro-*o*-cresol. Pero no fue sino hasta el descubrimiento de los ácidos ariloxialcanoicos y su efecto sobre la regulación del crecimiento que los herbicidas empezaron a desarrollarse y comercializarse a gran escala; los más relevantes de estos herbicidas son el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) descubierto en 1945 y el ácido metaclorofenoxiacético (MCPA) en 1946 (Carson, 1967; Devine 2002). Estas moléculas de tipo auxina eran consideradas “no tóxicas” y efectivas a bajas dosis; además, su costo de producción era muy bajo. Hoy en día, el uso del MCPA, está prohibido y el del 2,4-D está restringido en varios países debido a que ha mostrado un buen grado de toxicidad en animales y humanos (WSSA).

En la actualidad existen alrededor de 200 herbicidas autorizados para su uso y los criterios para su clasificación son variados (Mallory-Smith y Retzinger, 2003; Böger, *et al.*,

2002; WSSA). Hay herbicidas selectivos que solo matan algún tipo de plantas y otros no selectivos que matan toda tipo de vegetación. Desde el punto de vista de su naturaleza química hay más de 20 familias de herbicidas. Los compuestos de tipo bipiridilos como el paraquat y el diquat (desarrollados por Singenta®) u organofosforados como el glifosato (desarrollado por Monsanto®) son los más utilizados. Así mismo, dependiendo del momento de la aplicación los herbicidas pueden ser post-emergentes o pre-emergentes (WSSA)

Otra clasificación de los herbicidas se basa en su modo de acción. A la fecha se tienen identificados aproximadamente 27 blancos de acción. Sin embargo, más del 50% de los herbicidas comerciales afectan solo tres blancos (Tabla 2), principalmente la fotosíntesis (Wakabayashi y Böger, 2004a; 2004b; Cole, *et al.*, 2000; Hess, 2000).

Tabla 2. Principales blancos de acción de los herbicidas de mayor uso

Blanco de acción	No. de herbicidas
Fotosistema II	59
Acetolactato sintasa	43
Protoporfirinogeno IX oxidasa	28 (-3)
Mimetisadores de Auxina	20
Acetil CoA carboxilasa	16
División celular	14
Fitoeno desaturasa	11
Hidroxifenilpiruvato dioxigenasa	3 (+3)
Fosforilación oxidativa	3
Biosíntesis de celulosa	2
Fotosistema I	2
Transporte de auxina	1
Enolpiruvatoshikimato sintasa	1
Dihidropteroato sintasa	1
Glutamino sintetasa	1
Licopeno sintetasa	1
Desconocido o no especificado	48
total	254

Tomada de: Cole, *et al.*, 2000. El número entre paréntesis indica una reclasificación.

En los años sesenta se iniciaron los estudios de toxicidad de los herbicidas de uso común y hasta la fecha se han documentando un gran número de efectos adversos provocado por el incremento en su uso. (Carson, 1967; Shaner, 2003 Alavanja, *et al.*, 2004; Abdollahi, *et al.*, 2004). Por ejemplo, estudios recientes demostraron que el Roundup®, forma comercial del glifosato, es muy letal para anfibios (Relyea, 2005a; 2005b); además, puede ocasionar el aborto en humanos (Benachour, *et al.*, 2007).

Por otra parte, no fue sino hasta la década de los 70 cuando se reportaron los primeros casos de malezas resistentes a los herbicidas. Con estos hallazgos se comenzaron a visualizar los problemas ocasionados por los herbicidas sintéticos. Actualmente, el número de malezas resistentes ha incrementado sensiblemente (Beckie, 2006; Tranel y Wright, 2002; Heap, 1997; Jasieniuk, *et al.*, 1996; Holt, *et al.*, 1993; Fuerst y Vaughn, 1990; Holt y Lebaron, 1990; *inter alia*). Entre otras muchas causas, este problema se origina por prácticas como el monocultivo, el uso continuado de un mismo tipo de herbicida o el uso combinado de herbicidas con el mismo blanco de acción (Rausher, 2001). Las sulfonilureas y las imidazolinonas, en particular, provocan la evolución rápida de malezas resistentes y se conocen hasta catorce especies que le son resistentes a las primeras. *Cassia obtusifolia*, una maleza agresiva de la soya y el maíz en el sudeste de los EE.UU., es resistente a los herbicidas con núcleo imidazolinona (Goldburg, 1992).

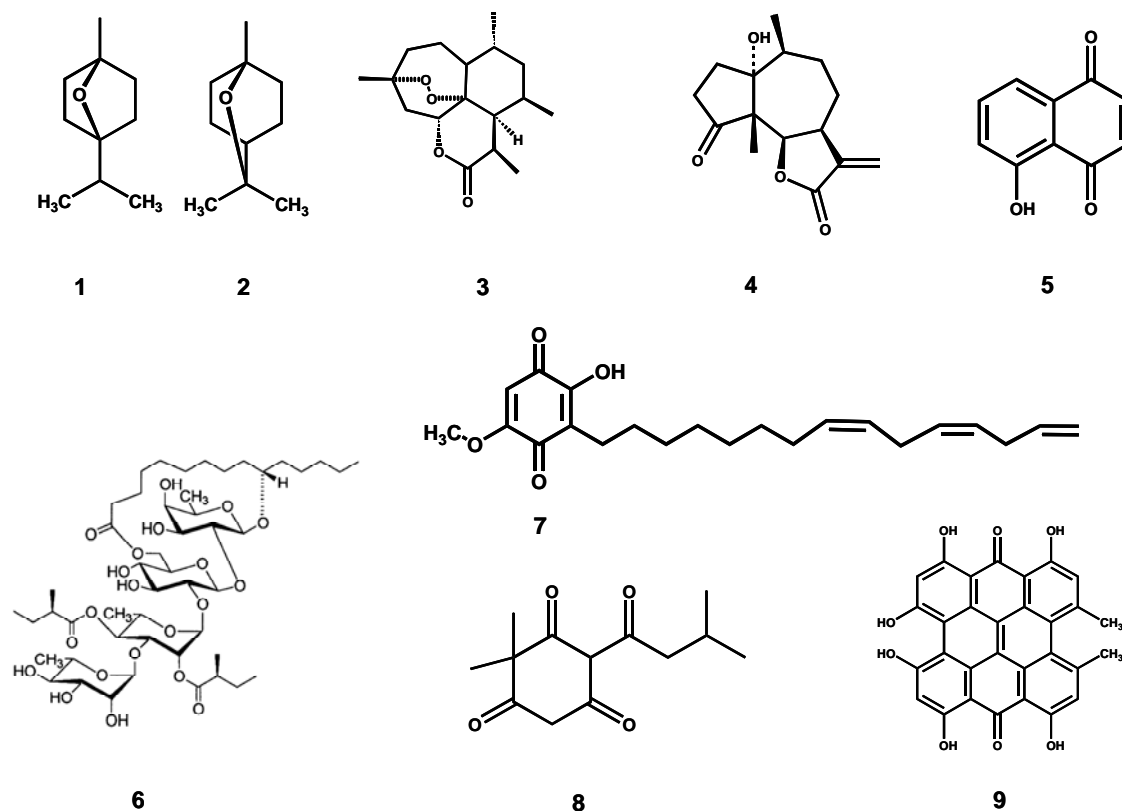
Con la finalidad disminuir el uso irracional de los herbicidas y prevenir problemas futuros de resistencia la FAO recomienda la aplicación de técnicas agrícolas que contribuyan a un manejo sustentable de los recursos agrícolas; estas técnicas forman parte del programa de *Manejo Integrado de Plagas (MIP)* promovido por esta misma organización (Yussefi, y Willer, 2002; Romero, 2004; Cobbe, 1998; Labrada y Parker, 1996).

Así mismo, diferentes grupos de investigación alrededor del mundo, tanto académicos como industriales, están promoviendo el uso de productos de origen natural (provenientes de vegetales o microorganismos) para combatir las plantas nocivas. Estos productos pueden utilizarse como herbicidas *per se*, o como “moléculas líderes” para el desarrollo de nuevas estructuras más potentes, con blancos de acción más específicos y en lo posible de menor toxicidad (Rimando y Duke, 2006; Clay, *et al.*, 2005; Duke, *et al.*, 2002; 2000; 1999; 1997; Dayan y Romagnoli, 2001; Dayan, *et al.*, 2000; 1999; Macías, *et al.*, 2000; Abell, 1996; *inter alia*).

1.2 EL REINO VEGETAL COMO UNA FUENTE POTENCIAL DE HERBICIDAS.

En la literatura científica especializada se han descrito numerosos compuestos de origen vegetal que han generado un gran interés debido a sus notables propiedades fitotóxicas. Estos compuestos son estructuralmente más complejos que los herbicidas sintéticos, por lo tanto pueden actuar específicamente como inhibidores de proteínas involucradas en los procesos de crecimiento y desarrollo vegetal, ya sea biomimetizando sustratos naturales ó intermediarios (Jeschke, *et al.*, 2006; Duke, *et al.*, 2002; Weir, *et al.*, 2004; Vyvyan, 2002; Dayan, *et al.*, 2000 *inter alia*). Entre los metabolitos vegetales que son dignos de mencionar por su potencia fitotóxica y/o mecanismo de acción novedoso se encuentran el 1,4-cineol (1) y su isómero el 1,8-cineol (2), la artemisinina (3), la partenina (4), la juglona (5), la tricolorina A (6), la sorgoleona (7), la leptospermona (8) y la hipericina (9). Todos estos compuestos se han aislados a partir de plantas medicinales, lo que sugiere que estas especies constituyen buenos puntos de partida para la obtención de agentes herbicidas (Cutler y Cutler, 1998).

El monoterpenoide 1,4-cineol (1) y el 1,8-cineol (2) que son los principales componentes del aceite esencial de varias especies del género *Eucalyptus* son potentes inhibidores de la asparagino sintetasa, enzima involucrada en la síntesis de asparagina y que juega un papel importante en la movilidad del nitrógeno en plantas (Vyvyan, 2002). También inhiben la división celular a nivel de la mitosis; en el caso del 1, 4 cineol (1), este metabolito actúa específicamente en la profase, a diferencia del 1,8 cineol, que actúa en todas las etapas de este proceso (Duke, 2003; Romagni, *et al.*, 2000). Así mismo, aunque los dos compuestos inhiben el crecimiento radicular y la germinación, el 1,4 cineol (1) tiene una potencia mayor y causa distorsiones morfológicas. La presencia del éter cíclico en las estructuras moleculares de ambos terpenoides es esencial para el efecto fitototóxico (Duke, *et al.*, 2000). A partir del 1,4-cineol se desarrolló la cinmetilina (Cinch®), un herbicida ampliamente comercializado en Europa.



La artemisinina (3), potente antimalárico aislado de las partes aéreas de *Artemisia annua* (Asteraceae), presenta también una excelente actividad fitotóxica (Weston y Duke, 2003; Bagchi, *et al.*, 1998; Lydon, 1997; Chen, *et al.*, 1990; Duke, *et al.*, 1987). En estudios sobre cultivos experimentales, esta lactona sesquiterpénica redujo significativamente (entre un 65 y 80 %) la aparición de arvenses, como *E. crus-galli*. El análisis posterior de los suelos confirmó la presencia de artemisinina hasta ocho semanas después de su incorporación; posteriormente se degradó totalmente (Delabays, *et al.*, 2001). Otra lactona sesquiterpénica, la partenina (4), aislada de la especie *Parthenium hysterophorus* (Asteraceae) inhibe igualmente el desarrollo de varias especies vegetales (Adkins y Sowerby, 1996; Dhawan, *et al.*, 1994); así, la lactona 4 afecta de manera importante el crecimiento de *Brassica campestris* una arvense muy agresiva para varios cultivos; sin embargo, no afecta el crecimiento del trigo (Batis, *et al.*, 1997; Pandey, 1993). Este comportamiento le confiere a la germacranólida un efecto selectivo sobre las dicotiledóneas.

La tricolorina A (6) es el principal agente alelopático de la especie vegetal *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae) la cual es utilizada en las prácticas agrícolas tradicionales de nuestro país como cultivo de cobertura. El glicolípido 6 (Anaya *et al.*, 1990; Pereda-Miranda, *et al.*, 1993). Así mismo, actúa a nivel de la fotosíntesis inhibiendo el transporte de electrones en el fotosistema II; la presencia de la macrolactona parece ser un requerimiento estructural para esta actividad ya que el ácido tricolórico es inactivo (Vyvyan, 2002 Achnine *et al.*, 1999; Pereda-Miranda, *et al.*, 1993). También actúa a nivel de la membrana plasmática, específicamente inhibiendo a la H⁺-ATPasa, una enzima clave en el transporte activo (Morsomme y Boutry, 2000; Calera, *et al.*, 1995).

La sorgoleona (7), compuesto mayoritario de las raíces de *Sorghum bicolor* (Poaceae), inhibe el transporte de electrones durante la fotosíntesis debido a que compite con la plastoquinona por su sitio de unión a la proteína D-1 del fotosistema II (PS-II) (Weir, *et al.*, 2004; Dayan, *et al.*, 1999; Gonzalez, *et al.*, 1997; Nimbal, *et al.*, 1996;). También se ha demostrado que puede desplazar a los herbicidas de tipo atrazina en este mismo sitio de acción. Por último, recientemente se comprobó que la sorgoleona (7) inhibe a la dioxigenasa del ácido hidroxifenilpirúvico (HPPD, por sus siglas en inglés) (Dayan, *et al.*, 2007), una enzima clave en la síntesis de pigmentos que participan en los procesos de respiración y fotosíntesis (Moran, 2005; Wu, *et al.*, 2002; Meazza, *et al.*, 2002; Lee, *et al.*, 1997).

La leptospermona (8), una tricetona natural aislada de diferentes especies de la familia Myrtaceae (*Leptospermum* spp y *Callistemon* spp, principalmente), provoca el blanqueamiento de las hojas ya que es un inhibidor de la HPPD. Actualmente esta enzima es un blanco molecular atractivo para el desarrollo de una nueva clase de herbicidas de tipo β-tricetona, como la sulcotriona y la mesotriona (Vyvyan, 2002; Dayan, *et al.*, 2007; Meazza, *et al.*, 2002).

1.3 LA CALMODULINA COMO UN BLANCO DE ACCIÓN POTENCIAL DE COMPUESTOS FITOTÓXICOS DE ORIGEN VEGETAL.

La calmodulina (CaM) es una proteína ubicua que se enlaza al calcio y regula muchos procesos celulares a través de su interacción con una gran variedad de proteínas blanco en plantas y animales. Esta proteína es de bajo peso molecular (16 a 18 kD) y está constituida por alrededor de 148 aminoácidos arreglados en dos dominios globulares que están conectados por una larga hélice flexible. Cada dominio globular contiene dos sitios funcionales que se unen al ión calcio. Al enlazarse al calcio la CaM expone dos superficies hidrofóbicas rodeadas por una carga negativa, una en cada dominio globular. Entonces el complejo Ca^{2+} -CaM puede enlazarse a sus enzimas blanco principalmente mediante interacciones hidrofóbicas con las largas cadenas de las enzimas blanco (Chin y Means, 2000; Bouché *et al.*, 2005).

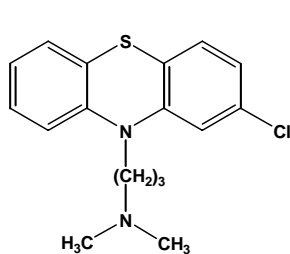
En plantas (trigo, papa, Arabidopsis y soya) se expresan un gran número de isoformas de la CaM (Lee, *et al.*, 2000; Bouché, *et al.*, 2005; Yamniuk y Vogel, 2005). Algunas de estas isoformas (SCaM-1 a SCaM-3) tienen un alto grado de homología (90%) con la CaM de mamíferos; otras como la SCaM-4 y SCaM-5 muestran solamente un 78% de identidad con la proteína animal.

La CaM y sus enzimas blanco constituyen una red compleja que participa en casi todos los procesos celulares, por lo tanto, la proteína es importante en la regulación de varios procesos fisiológicos en las plantas incluyendo los relacionados con el crecimiento y la defensa (Daye, *et al.*, 2001; Black, *et al.*, 2004; Kortvely y Gulya, 2004).

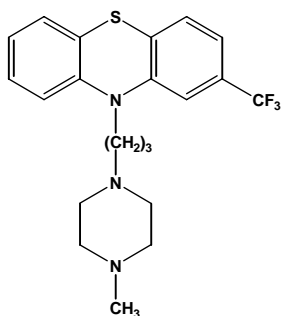
La CaM regula más de 50 enzimas y canales iónicos; estas proteínas incluyen varias cinasas (CaM cinasa II), fosfatasas (calcineurina y fosfodiesterasa), oxido nítrico sintasas, adenilato ciclasas (1 y 8), canales de calcio dependientes de voltaje, receptores de IP3 y un gran número de proteínas del citoesqueleto (Toutenhoofd y Strehler, 2000; Black, *et al.*, 2004; Bouché, *et al.*, 2005). Algunas de estas proteínas son exclusivas de plantas como por ejemplo las proteínas cinasas (CaMKs), la calcio ATPasa ACA9, de importancia particular para el desarrollo y fertilización normal de los tubos polínicos; la fosfatasa ser/thr PP7 y la proteína específica del polen NPG1, entre otras. Estas enzimas son importantes para el desarrollo de las plantas. Otras proteínas tienen homólogos en otros organismos pero son reguladas por la CaM únicamente en plantas. Ejemplos de estas enzimas son la glutamato

descarboxilasa y la NAD-cinasa. El resto son enzimas que tienen homólogos reguladas por CaM tanto en plantas como en otros organismos. Ejemplos de este último grupo son las ATPasas de la membrana plasmática, varias proteínas cinasas y la proteína kinesina (Bouché, *et al.*, 2005).

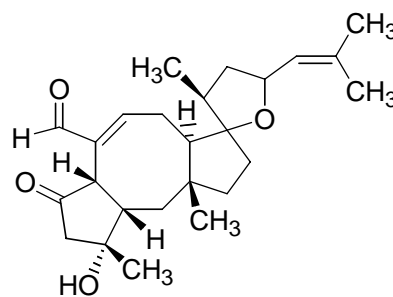
Muchos compuestos químicos interactúan con la CaM e inhiben sus propiedades moduladoras. Los inhibidores de la CaM más estudiados pertenecen a un grupo de tranquilizantes conocidos comúnmente como fenotiazinas. Entre los más importantes se encuentran la clorpromazina (**10**) y la trifluoroperazina (**11**). Otros inhibidores de la proteína son el calmidazolium y el compuesto W7 ampliamente utilizados como herramienta de investigación en los procesos en los que participa la CaM. Todos estos compuestos inhiben la activación de las enzimas dependientes de CaM.



10



11



12

Para detectar la interacción de la CaM con compuestos naturales y drogas se han utilizado diferentes métodos *in vitro* los cuales incluyen la cromatografía de afinidad (Molnar, *et al.*, 1995; Ovadi, 1989), la proteólisis limitada (Ovadi, 1989), la espectroscopia UV, el dicroísmo circular (Molnar, *et al.*, 1995; Harmat, *et al.*, 2000; Vertessy, *et al.*, 1998), la electroforesis en gel (Leung, *et al.*, 1985), la fluorescencia de energía de resonancia (Au, *et al.*, 2000; Molnar, *et al.*, 1995; Sharma, *et al.*, 2005), la resonancia magnética nuclear (Zhou, *et al.*, 1994; Craven, *et al.*, 1996), la difracción de rayos X (Vertessy, *et al.*, 1998; Harmat, *et al.*, 2000), la mutagénesis dirigida que sirve para identificar sitios de unión e inhibición en la CaM (Odom, *et al.*, 1997) y los ensayos enzimáticos funcionales utilizando enzimas

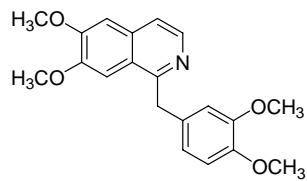
sensibles a la CaM (Orosz, *et al.*, 1988, 1990; Ovadi, 1989; Mólnar, *et al.*, 1995; Sharma, *et al.*, 1997). La enzima dependiente de CaM que más se ha utilizado para detectar antagonistas de la CaM es la fosfodiesterasa del AMP cíclico (PDE-1), aislada de cerebro o corazón de bovino. Esta enzima cataliza la hidrólisis de nucleótidos cíclicos a nucleótidos de monofosfato. La actividad de la PDE1 puede medirse mediante diversos procedimientos. Los dos más utilizados son el de radioinmuno-ensayo y el espectrofotométrico. En ambos métodos la actividad de la enzima se correlaciona con la cantidad de Pi generado por la hidrólisis del AMPc en presencia de una nucleotidasa (Ovadi, 1989; Sharma y Wang, 1979).

Muchos metabolitos secundarios aislados de microorganismos (actinomicetos, bacterias y hongos) y plantas inhiben a la CaM; estos metabolitos presentan una gran diversidad estructural y quizá el que mayor atención ha recibido es el sesterterpenoide ofiobolina A (**12**). El producto **12** es una fitotoxina muy potente aislada de varios hongos fitopatógenos de los géneros *Bipolaris* y *Drechslera*. Su actividad inhibitoria de la CaM se demostró inicialmente a través de ensayos funcionales enzimáticos, estudios de fluorescencia, electroforesis, mutagénesis dirigida y experimentos *in vivo* (Leung, *et al.*, 1984).

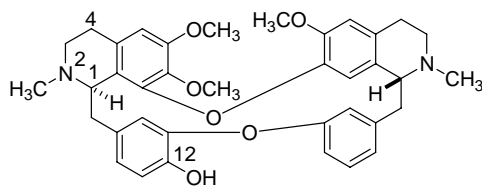
Los compuestos de origen vegetal que afectan las propiedades moduladoras de la CaM incluyen alcaloides, sesquiterpenoides; cumarinas, γ -pironas y xantinas, antraciclina, lignanos, ciclopéptidos; estilbenoides, así como flavonoides y otros compuestos fenólicos. A continuación se presenta una revisión detallada de los metabolitos vegetales más importantes que afectan las propiedades moduladoras de la CaM *in vitro*:

1.3.1 Alcaloides y péptidos. A la fecha los alcaloides antagonistas de la CaM pertenecen a la categoría de las isoquinolinas, de los indoles y péptidos.

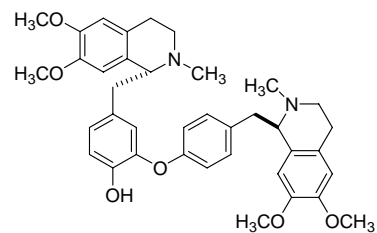
En el primer grupo los más estudiados son la bencilisoquinolina papaverina (**13**) presente en el opio, y las bisbencilisoquinolinas berbamina (**14**), dauricina (**15**) y daurisolina (**16**) obtenidas de *Menispermum dauricum* (Menispermaceae) y *Berberis portieri* (Menispermaceae). Todos estos compuestos son farmacológicamente activos e inhiben a la PDE1 y PDE10 dependientes de CaM (Boswell-Smith *et al.*, 2006; Siuciak, *et al.*, 2006; Ronca-Testoni, *et al.*, 1985; Hu, *et al.*, 1988).



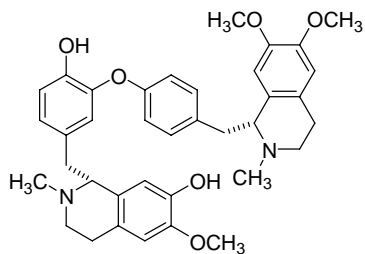
13



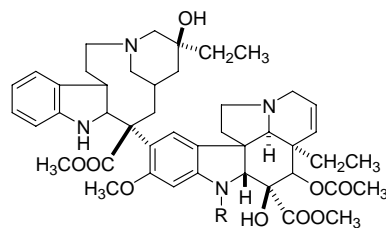
14



15

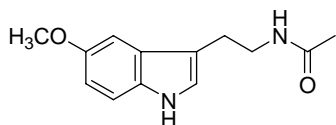


16

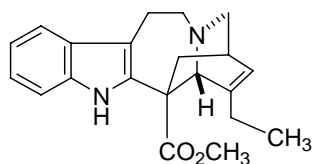


17 R=CH₃

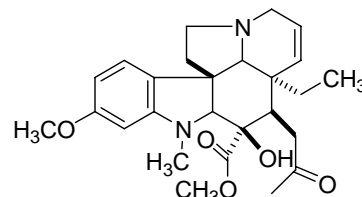
18 R=CHO



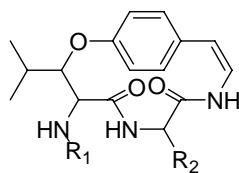
19



20



21

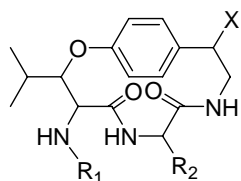


22 N(CH₃)₂Phe(S)-
23 N(CH₃)₂Phe(R)-
24 N(CH₃)Phe-
25 N(CH₃)₂Phe-
26 N(CH₃)₂Leu-
27 t-cinnamoyl-

R1

R2

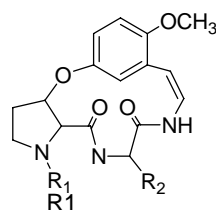
(CH₃)₂CHCH₂-
(CH₃)₂CHCH₂-
(CH₃)₂CHCH₂-
(CH₃)₂CHCH(OH)-
(CH₃)₂CHCH₂-
(CH₃)₂CHCH₂-
(CH₃)₂CHCH₂-



28 N(CH₃)₂Phe(S)-
29 N(CH₃)₂Phe(R)-
30 N(CH₃)Phe-

R2
(CH₃)₂CHCH₂-
(CH₃)₂CHCH₂-
(CH₃)₂CHCH₂-

X
H
OCH₃
OH



31 N(CH₃)₂Try-
32 NH(CH₃)Ala-Val-

R2
CH₃CH₂CH(CH₃)-
Benzyl-

En el caso de la papaverina (**13**), parte de sus efectos farmacológicos (relajación de la musculatura lisa) son debido a la inhibición de la PDE1 (Boswell-Smith *et al.*, 2006; Siuciak *et al.*, 2006).

Entre las bis-bencilisoquinolinas, el producto más activo es la berbamina (**14**) que inhibe la PDE1 con una $CI_{50} = 22 \mu M$, similar a la del control positivo trifluoropiperacina (Hu, *et al.*, 1988). Estudios de relación estructura química-actividad con la berbamina revelaron que el incremento en la lipofilia de la molécula provocaba un aumento en su actividad inhibidora de la CaM. Así por ejemplo, el análogo de la berbamina con un grupo *n*-propionilo en C-12 fue dos veces más potente que la molécula prototipo; del mismo modo, el derivado mono acetilado de la daurisolina fue más activo que el alcaloide original (Chen, *et al.*, 1990). Cabe mencionar que la naturaleza del nitrógeno (terciario *vs* cuaternario) de la porción terminal de la bisbencilisoquinolina no modifica la actividad anti-CaM de los alcaloides (Hu, *et al.*, 1988).

Los alcaloides indólicos antagonistas de la CaM se encuentran los indolmonoterpenoides vinblastina (**17**) y vincristina (**18**), dos agentes antitumorales de uso terapéutico, y la melatonina (**19**). Los dos primeros se unen a la CaM de manera dependiente de Ca^{2+} . La constante de disociación calculada ($3\mu M$) para el complejo CaM-vinblastina reveló que la afinidad del alcaloide por la CaM es similar a la que muestra por la tubulina (Molnar, *et al.*, 1995). Los monómeros catarantina (**20**) y vindolina (**21**), sin embargo no interaccionan con la proteína (Roufogalis, *et al.*, 1999). La melatonina (**19**), hormona que se encuentra en todos los organismos vivos, actúa como un antagonista de CaM induciendo cambios conformacionales en el complejo receptor de estrógeno α -CaM (ER α -CaM) impidiendo así su unión al DNA, y por lo tanto inhibiendo la transcripción ER α -dependiente. El efecto de la melatonina es específico dado que otras triptaminas no interactúan con la CaM (Del Río, *et al.*, 2004).

Los péptidos **22-32**, obtenidos a partir de las especies medicinales *Zizyphus vulgaris* var. *spinosa* y *Z. jujube* var. *inermis* (Rhamnaceae) y que son utilizadas en la medicina oriental para tratar el insomnio, inhiben varias enzimas dependientes de CaM (PDE1, Ca^{2+} -ATPasa y proteína cinasa II (PKII)). En general, estos alcaloides fueron más potentes como inhibidores de la CaM que la clorpromazina. La sanjoinina A (**22**), metabolito mayoritario de *Z. vulgaris*, se une a la CaM de manera dependiente de Ca^{2+} en una relación 1:2 (Han, *et al.*, 1993, 2005; Hwang, *et al.*, 2001). El efecto de los alcaloides sobre la Ca^{2+} -

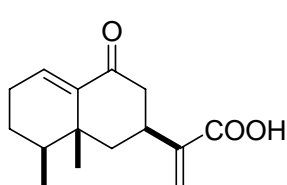
ATPasa podría estar relacionado con las propiedades sedantes de las plantas (Hwang, *et al.*, 2001).

1.3.2 Terpenoides. Entre los terpenoides que inhiben a la CaM se han descrito varios sesquiterpenoides y triterpenoides. Dos de los sesquiterpenoides, el ácido deshidroflourénsico (**33**) y flourensadiol (**34**) son los metabolitos fitotóxicos de la especie *Flourensia cernua* (Asteraceae). Estos sesquiterpenoides afectan la movilidad electroforética de la CaM (SDS-PAGE). Asimismo, inhiben a la PDE1 con valores de CI_{50} = 23.2 y 5.2 μ M, respectivamente (Mata *et al.*, 2003). El compuesto **34** fue más activo que la clorpromazina (CI_{50} = 10.2 μ M).

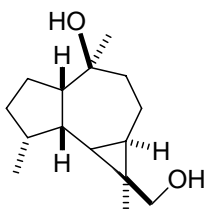
El sesquiterpenoide gosipol (**35**) se biosintetiza en las semillas del algodónero (*Gossypium spp.*, Malvaceae) e inhibe de manera no competitiva a la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de espermatozoides humanos (CI_{50} = 13 μ M) (Roufogalis, *et al.*, 1999). Así mismo, también inhibe a la Ser/Thr fosfatasa dependiente de Ca^{2+} -CaM, la cual es una enzima clave para muchos efectos mediados por la ciclosporina A (CsA) y el tacrolimus (FK506) (Baumgrass, *et al.*, 2001).

El ácido quinóvico (**36**) y su glucósido (**37**), aislados de *Mitragyna stipulosa* y otras especies de la familia Rubiaceae, inhibieron la actividad de la PDE1 con valores de CI_{50} = 0.166 y 0.374 mM, respectivamente (Fatima, *et al.*, 2002). En este caso, la cisteína fue utilizada como control positivo (CI_{50} = 0.748 mM).

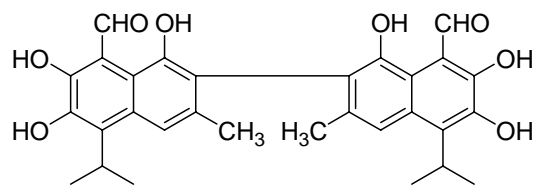
La jujubosida A (**38**), un triterpenoide aislado de la droga china conocida como sanzaoren, es un inhibidor no competitivo de la CaM y probablemente se enlaza a la CaM a través de interacciones hidrofóbicas (Zhou, *et al.*, 1994).



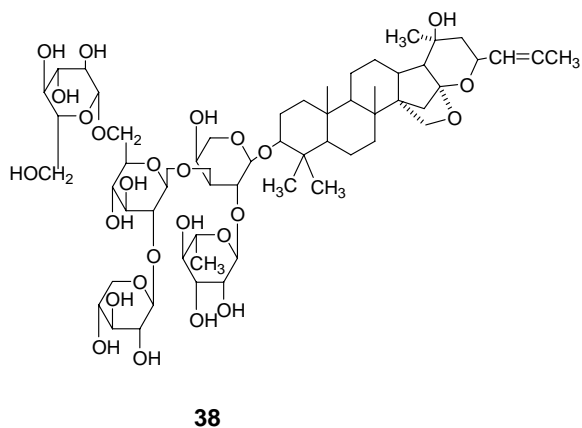
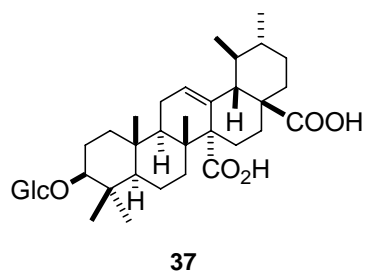
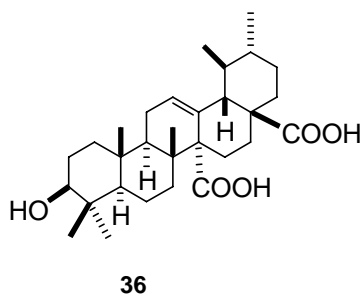
33



34

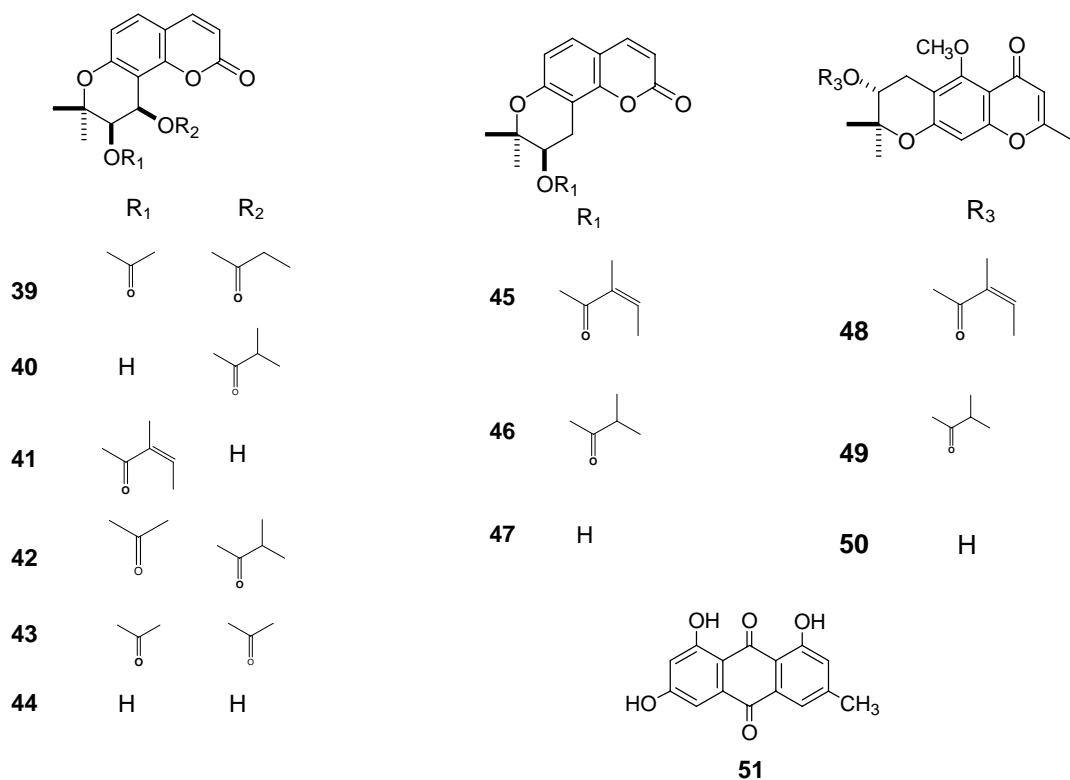


35

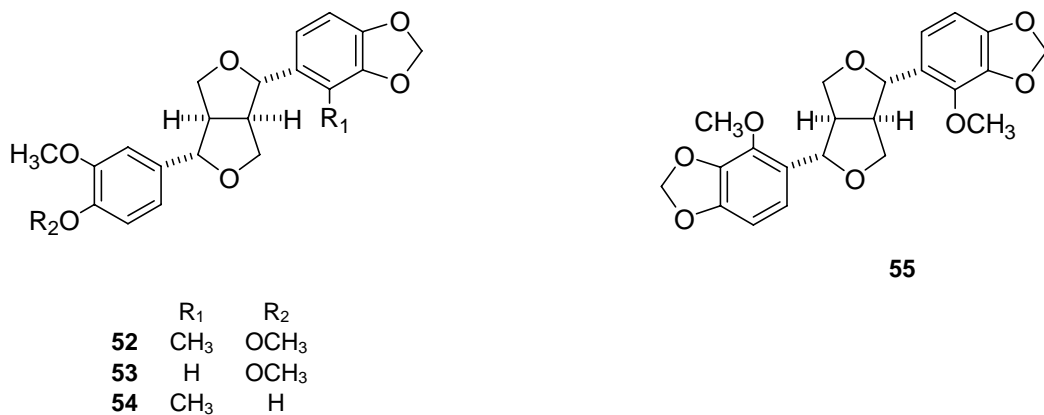


1.3.3 Piranocumarinas, γ -pironas y antraquinonas. De la especie *Prionosciadium watsoni* (Umbelliferae) fueron aislados nueve piranocumarinas (**39-47**) y tres γ -pironas (**48-50**), las cuales mostraron actividad fitotóxica contra *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli* y *Lemna paucicostata*. Estos productos modificaron la movilidad electroforética de la CaM de espinaca y cerebro de bovino (Valencia-Islas, *et al.*, 2002).

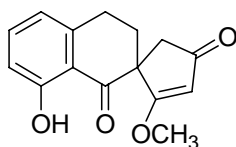
La emodina (**51**), una antraquinona que se encuentra en varias plantas y hongos afecta la movilidad electroforética de las calmodulinas de espinaca y cerebro de bovino (Macias, *et al.*, 2001).



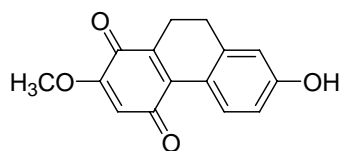
1.3.4 Lignanos. Los furofuranos **52-55** aislados de la especie *Leucophyllum ambiguum* (Scrophulariaceae), afectan la movilidad electroforética de la CaM. De manera adicional, la actividad de la enzima PDE1 dependiente de CaM fue inhibida en presencia de estos compuestos ($CI_{50} = 14.4, 26.4, 7.4, \text{ y } 5.6 \mu\text{M}$, respectivamente). La actividad inhibitoria de los compuestos **54** y **55** fue mayor que la de la clorpromazina ($CI_{50} = 10.2 \mu\text{M}$) (Rojas, *et al.*, 2003).



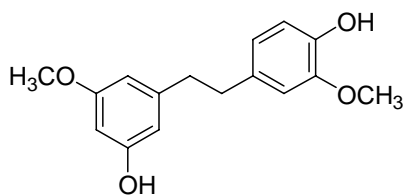
1.3.5 Estilbenoides. Los estilbenoides **56-63** aislados de las orquídeas mexicanas *Epidendrum rigidum*, *Scaphyglottis livida* y *Nidema boothii* son relajantes del músculo liso y potentes agentes fitotóxicos. Estas propiedades podrían estar relacionadas con las propiedades anti-CaM que presentaron estos compuestos. Todos ellos inhiben a la PDE1 sin afectar la actividad basal de esta enzima (Hernández-Romero, *et al.*, 2004; 2005). De estos compuestos, la nidemona (**56**) presenta una estructura poco común.



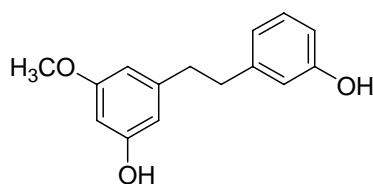
56



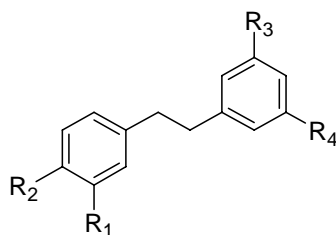
57



58



59



- 60:** R₁, R₃ = OH; R₂, R₄ = OCH₃
61: R₁ = H; R₂, R₃ = OH; R₄ = OCH₃
62: R₁, R₂ = H; R₃, R₄ = OH
63: R₁ = OH; R₂ = OCH₃; R₃, R₄ = H

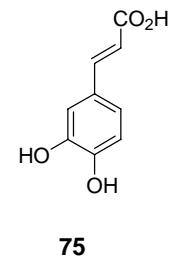
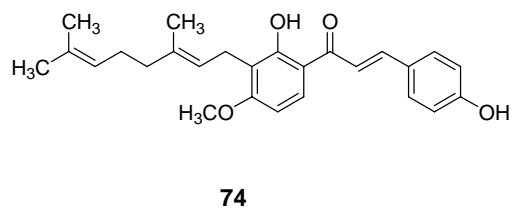
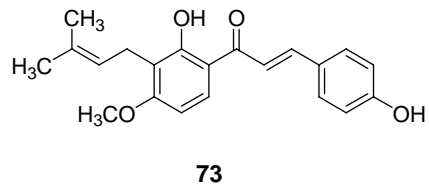
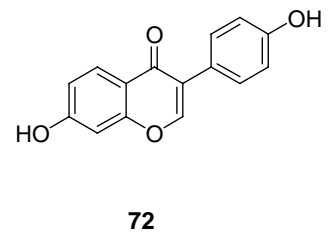
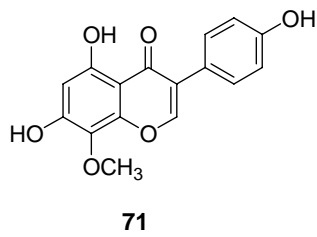
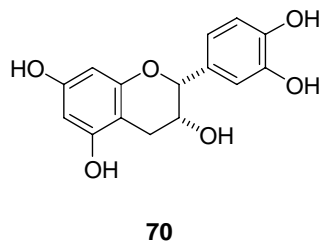
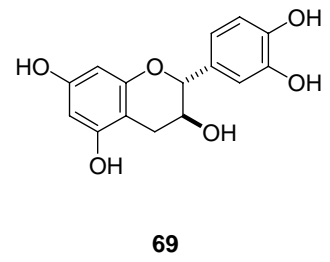
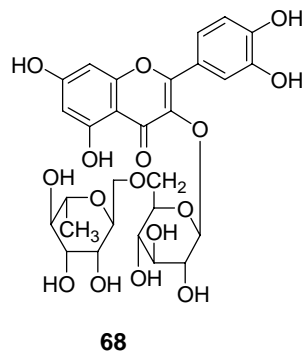
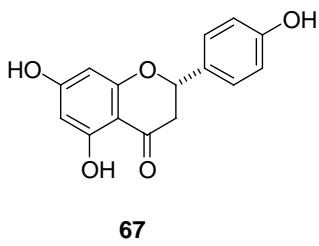
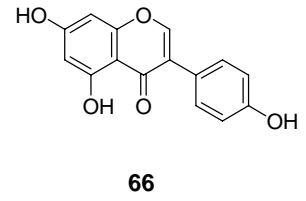
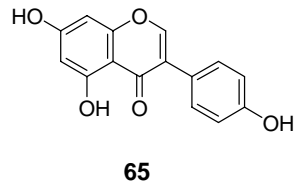
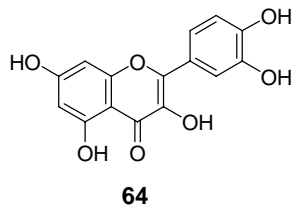
Cabe mencionar, que los compuestos **59** y **60**, inhibieron el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* con valores de CI₅₀ entre 0.1, 0.65, μ M, respectivamente. El 2,4-D fue utilizado como control positivo (CI₅₀ 0.19 μ M). La aplicación foliar de **59** a una concentración de 1 μ M a plantas jóvenes de amaranto (4 semanas) redujo considerablemente la elongación del tallo (69 %) y el peso de las plántulas (54 %).

1.3.6 Flavonoides y otros compuestos fenólicos. La quercetina (64) es uno de los flavonoides más comunes en plantas; este compuesto abate completamente la fluorescencia de la CaM inducida por la 1-N-fenilnaftilamina (NPN, por sus siglas en inglés) a una concentración de 50 μM . De manera adicional, las propiedades inhibitorias de la CaM de este flavonoides se confirmaron mediante experimentos de unión de la quercetina marcada isotópicamente con ^{14}C al complejo Ca^{2+} -CaM utilizando la técnica de Hummel y Dryer (Nishino, *et al.*, 1984).

Las isoflavonas genisteína (65) y biochanina (66) así como la naringenina (67), una flavanona y el C-glicósido de la rutina 68, inhiben la actividad de la PDE1 de cerebro de bovino de una manera dependiente de la concentración sin afectar apreciablemente la actividad basal de esta enzima; los valores de CI_{50} calculados para estos últimos cuatro compuestos fueron 220, 320, 529 y 317 μM respectivamente. El efecto fue comparado con la quercetina (64; CI_{50} 52.8 μM). Los flavan-3-oles catequina (69) y epicatequina (70) sin embargo, no fueron inhibidores específicos ya que inhibieron la actividad basal de la enzima.

Las chalconas antitumorales 4-hidroxiderrecina (73) y xantoangelol (74), aisladas de *Angelica keiskei* (Umbelliferae), igualmente interaccionan con el complejo Ca^{2+} -CaM a las concentraciones de 1 y 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. La interacción de estos últimos compuestos con la CaM se comprobó mediante experimentos de fluorescencia (Okuyama, *et al.*, 1991).

La naringenina (67) y el ácido caféico (75) inhiben significativamente la actividad de la PDE1 dependiente de CaM con valores de CI_{50} de 67 y 8 μM respectivamente, mientras que otro tipo de compuestos aromáticos como son los ácidos clorogénico, vainillínico, homovainillínico, ferúlico, gentísico, *trans*-cinámico, fenilacético y *o*-cumárico fueron inactivos presentado valores de CI_{50} mayores a 500 μM (Paliyath y Poovaiah, 1985). Por último, el policétido orselinato de metilo, aislado de *Flourensia cernua* y varias especies de hongos y líquenes, inhibe a la PDE1 con un valor de $\text{CI}_{50} = 8.1 \mu\text{M}$ (Mata, *et al.*, 2003).



Varios metabolitos aislados de microorganismos también inhiben a la proteína CaM. Estos últimos presentan una gran diversidad estructural, incluyendo péptidos tipo polimixina (Hegemann, *et al.*, 1991); terpenoides (Nakanishi, *et al.*, 1992; Ichimura, *et al.*, 1996); policétidos (Nakanishi, *et al.*, 1990b); alcaloides (Martínez-Luis, *et al.*, 2006; Kase, *et al.*, 1986; Nakanishi, *et al.*, 1986; Matsuda, *et al.*, 1988; *inter alia*) isoflavonas (Matsuda, 1988); naftoquinonas y antraquinonas (Matsuda, *et al.*, 1987, 1990; Yasuzawa, *et al.*, 1987; *inter alia*).

1.4 ANTECEDENTES DE LA ESPECIE VEGETAL *HOFMEISTERIA SCHAFFNERI*.

El género *Hofmeisteria*, pertenece a la tribu Eupatorieae, subfamilia Asteroideae, familia Asteraceae y está constituido por 8 especies, las cuales crecen principalmente en las regiones centro y norte de México (King, 1967). En la tabla 3 se resumen las especies registradas y su distribución.

Tabla 3. Distribución del género *Hofmeisteria* en México.

ESPECIE	DISTRIBUCIÓN
<i>Hofmeisteria crassifolia</i> S. Wats.	Sonora.
<i>Hofmeisteria dissecta</i> (Hook & Arn) R. M. King & H. Robinson	Colima, Guerrero, Jalisco, Edo. de México, Michoacán, Sinaloa.
<i>Hofmeisteria fasciculata</i> (Benth.)Walp in Walp	Baja California.
<i>Hofmeisteria filifolia</i> I. M. Johnston	Baja california.
<i>Hofmeisteria sinaloenses</i> H.S. Gentry	Sinaloa.
<i>Hofmeisteria standleyi</i> (Blake) R. M. King & H. Robinson	Jalisco, Nayarit, Sinaloa.
<i>Hofmeisteria schaffneri</i> (A. Gray) R. M. King & H. Robinson	Jalisco, San Luis Potosí
<i>Hofmeisteria urenifolia</i> (Hook & Arn) R. M. King & H. Robinson	Chiapas, Guerrero, Durango, Jalisco, Nayarit, Sinaloa.

Hofmeisteria schaffneri (A. Gray) R. M. King & H. Robinson (syn. *Fleischmannia schaffneri* A. Gray) es un arbusto de 25 a 35 cm de alto que habita en ambientes húmedos y cálidos, crece en las grietas de las rocas, en filtraciones y salientes húmedas y la mayoría de las veces en las orillas de los arroyos; se distribuye en los estados de Jalisco y San Luis Potosí y es cultivada en el estado de México, Distrito Federal y Michoacán. Florece entre los meses de febrero y abril (Figura 1 y 2).



Figura 1. Especie vegetal *Hofmeisteria schaffneri*.

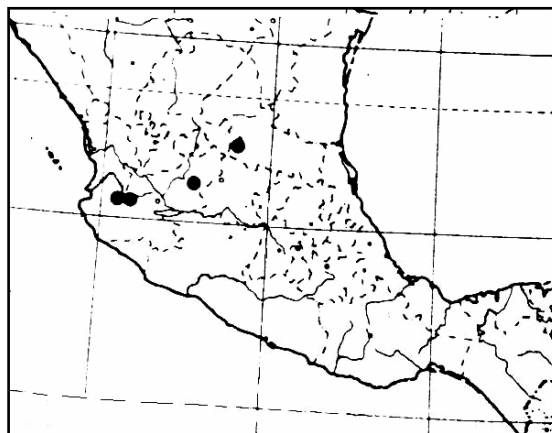


Figura 2. Distribución geográfica de *H. schaffneri* (Tomado de: King, 1967).

H. schaffneri se conoce comúnmente como “ámbar” en el Estado de México y como “manzanillo australiano” en Michoacán. En las prácticas médicas tradicionales de México la infusión de sus hojas, sola o acompañada con toronjiles, se emplea para tratar diversos malestares estomacales. Así mismo, la especie se utiliza bajo la forma de cataplasma para el tratamiento de heridas.

Ninguna de las especies pertenecientes al género *Hofmeisteria* ha sido objeto de estudios químicos previos. Sin embargo, numerosas investigaciones realizadas a otras especies pertenecientes a la familia Asteraceae han permitido el aislamiento y caracterización de diversos metabolitos secundarios, incluyendo a las lactonas sesquiterpénicas, que posiblemente sea el grupo más representativo de esta familia; acetilenos; flavonoides y cromenos (Wu et al., 2006; Krishna et al., 1999; 2005; Herz, 2004; 2003; Lam, 1998; Heinrich, et al., 1998). Por último, cabe mencionar que algunas especies de

la subfamilia Asteroideae pertenecientes a las tribus Eupatorie (Tori, *et al.*, 2001; Herz, 2001), Heliantheae, Inuleae (Stojakowska, *et al.*, 2004) y Tegeteae (Liang, *et al.*, 2007) biosintetizan análogos del timol, los cuales se encuentran restringidos a la familia Asteraceae.

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

Debido a los enormes problemas generados por el empleo indiscriminado de los herbicidas orgánicos, la necesidad de introducir nuevos herbicidas, menos tóxicos, biodegradables y con blancos de acción más específicos, ha generado un gran interés en la búsqueda de nuevos herbicidas de origen natural. En este sentido, el reino vegetal constituye una fuente valiosísima de principios fitotóxicos y por ende de moléculas modelos adecuadas para el desarrollo de nuevos herbicidas que ofrecen, entre otras la ventaja de ser biodegradables, disminuyendo así los riesgos de contaminación ambiental que provocan los herbicidas sintéticos.

Además los metabolitos secundarios se consideran un punto de partida importante para el descubrimiento de agentes herbicidas potenciales debido a que son el resultado de la coevolución de los organismos en respuesta a los estímulos del ambiente biótico y abiótico. De esta manera, una gran cantidad de compuestos secundarios biosintetizados por muchos organismos vegetales son parte de sus mecanismos de defensa contra otras plantas que le son dañinas (Rimando y Duke, 2006). En consecuencia las probabilidades de desarrollar nuevos herbicidas a partir de estas moléculas son altas.

La gran diversidad vegetal de México constituye un escenario ideal para el descubrimiento de productos biodinámicos que podrían constituir la base de nuevos herbicidas. Por lo tanto, en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se ha desarrollado un programa multidisciplinario destinado a explorar el potencial fitotóxico de especies selectas de la flora mexicana y así, contribuir al desarrollo de nuevos herbicidas verdes (Mata *et al.*, 1997, 2002, 2003b; Valencia-Islas *et al.*,

2002a, 2002b; Rivero-Cruz *et al.*, 2003, *inter alia*). En el marco de este programa, se determinó que la especie medicinal *Hofmeisteria schaffneri* (A. Gray) R.M. King & H. Robinson (Asteraceae) constituye una fuente potencial de principios fitotóxicos ya que el extracto íntegro de la especie inhibió significativamente el crecimiento radicular de varias arvenses. Entonces, el objetivo primordial del presente trabajo consiste en la obtención de nuevos principios fitotóxicos a partir de la especie *H. schaffneri* con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes herbicidas más eficaces, biodegradables y en lo posible de menor toxicidad y establecer si su modo de acción involucra la proteína calmodulina.

Para alcanzar el objetivo general planteado se consideraron adecuados los siguientes objetivos específicos:

- Establecer el potencial fitotóxico de extractos y el aceite esencial preparados a partir de la especie *Hofmeisteria schaffneri* utilizando el método de la caja de Petri.
- Realizar el estudio fitoquímico biodirigido de los extractos activos, aplicando las técnicas fitoquímicas convencionales, con la finalidad de obtener los principios fitotóxicos.
- Determinar la composición química (perfiles) de los aceites esenciales preparados a partir del material vegetal recolectado en diferentes épocas a lo largo de un año aplicado la técnica de cromatografía de gases y establecer en lo posible, si las diferencias en composición están relacionadas con variaciones en la actividad biológica.
- Determinar el efecto de los metabolitos secundarios aislados sobre el crecimiento radicular y germinación de dos arvenses (*Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*) y una planta de importancia agrícola, la alfalfa (*Medicago sativa*) utilizando también el método de la caja de Petri.
- Caracterizar la estructura molecular de los metabolitos secundarios activos aislados de *Hofmeisteria schaffneri* mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Determinar el efecto de los metabolitos fitotóxicos sobre la fosfodiesterasa I (PDE1) dependiente de calmodulina con la finalidad de establecer si estos afectan las propiedades moduladoras enzimáticas de la CaM.

- Realizar una síntesis eficiente de al menos uno de los metabolitos fitotóxicos minoritarios que se logren aislar durante el desarrollo del estudio.
- Contribuir al conocimiento de la biodiversidad vegetal de México, mediante la difusión de los resultados en publicaciones en revistas indizadas y de circulación internacional y la presentación de trabajos en distintos foros académicos.

III HIPÓTESIS DE TRABAJO

1.-El criterio quimiotaxonómico y etnomédico de preselección de materias primas para el descubrimiento de principios activos y los resultados de ensayos de fitotoxicidad apropiados constituyen indicadores idóneos para la detección de especies vegetales que proporcionen agentes fitotóxicos de utilidad para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas.

2.-Los productos del metabolismo secundario de *H. schaffneri*, pueden variar de acuerdo al ciclo estacional y en consecuencia las propiedades fitotóxicas potenciales de la planta.

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

Debido a los enormes problemas generados por el empleo indiscriminado de los herbicidas orgánicos, la necesidad de introducir nuevos herbicidas, menos tóxicos, biodegradables y con blancos de acción más específicos, ha generado un gran interés en la búsqueda de nuevos herbicidas de origen natural. En este sentido, el reino vegetal constituye una fuente valiosísima de principios fitotóxicos y por ende de moléculas modelos adecuadas para el desarrollo de nuevos herbicidas.

En general, los metabolitos secundarios se consideran un punto de partida importante para el descubrimiento de agentes herbicidas potenciales debido a que son el resultado de la coevolución de los organismos en respuesta a los estímulos del ambiente biótico y abiótico. De esta manera, una gran cantidad de compuestos secundarios biosintetizados por muchos organismos vegetales son parte de sus mecanismos de defensa contra otras plantas que le son dañinos. (Rimando y Duke, 2006).

Los productos naturales ofrecen la ventaja de ser biodegradables, disminuyendo los riesgos de contaminación ambiental que provocan los herbicidas sintéticos. Además, estos compuestos han contribuido a la identificación y esclarecimiento de nuevos modos de acción, a menudo más específicos. (Rimando y Duke 2006; Dayan, *et al.*, 1999).

La gran diversidad vegetal de México constituye un escenario ideal para el descubrimiento de productos biodinámicos que podrían constituir la base de nuevos herbicidas. Por lo tanto, en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se ha desarrollado un programa multidisciplinario destinado a explorar el potencial fitotóxico de especies selectas de la flora mexicana y así, contribuir al desarrollo de nuevos herbicidas verdes (Mata *et al.*, 1997, 2002, 2003b; Valencia-Islas *et al.*, 2002a, 2002b; Rivero-Cruz *et al.*, 2003, *inter alia*). En el marco de este programa, se determinó que la especie medicinal *Hofmeisteria schaffneri* (A. Gray) King & Robinson (Asteraceae) constituye una fuente potencial de principios fitotóxicos ya que el extracto íntegro de la especie inhibió significativamente el crecimiento radicular de varias arvenses. Entonces, el objetivo primordial del presente trabajo consiste en la obtención de nuevos principios fitotóxicos a partir de la especie *H. schaffneri* con la finalidad de contribuir al

desarrollo de nuevos agentes herbicidas más eficaces, biodegradables y en lo posible de menor toxicidad y establecer si su modo de acción involucra la proteína calmodulina.

Para alcanzar el objetivo general planteado se consideraron adecuados los siguientes objetivos específicos:

- Establecer el potencial fitotóxico de extractos y el aceite esencial preparados a partir de la especie *Hofmeisteria schaffneri* utilizando el método de la caja de Petri
- Realizar el estudio fitoquímico biodirigido de los extractos activos, aplicando las técnicas fitoquímicas convencionales, con la finalidad de obtener los principios fitotóxicos.
- Determinar la composición química (perfiles) de los aceites esenciales preparados a partir del material vegetal recolectado en diferentes épocas a lo largo de un año aplicado la técnica de cromatografía de gases y establecer en lo posible, si las diferencias en composición están relacionadas con variaciones en la actividad biológica.
- Determinar el efecto de los metabolitos secundarios aislados sobre el crecimiento radicular y germinación de dos arvenses (*Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*) y una planta de importancia agrícola, la alfalfa (*Medicago sativa*) utilizando también el método de la caja de Petri.
- Caracterizar la estructura molecular de los metabolitos secundarios activos aislados de *Hofmeisteria schaffneri* mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Determinar el efecto de los metabolitos fitotóxicos sobre la fosfodiesterasa I (PDA) dependiente de calmodulina con la finalidad de establecer si estos afectan las propiedades moduladoras enzimáticas de la CaM.
- Realizar una síntesis eficiente de al menos uno de los metabolitos fitotóxicos minoritarios que se logren aislar durante el desarrollo del estudio.
- Contribuir al conocimiento de la biodiversidad vegetal de México, mediante la difusión de los resultados en publicaciones en revistas indizadas y de circulación internacional y la presentación de trabajos en distintos foros académicos.

III. HIPÓTESIS DE TRABAJO

1.-El criterio quimiotaxonómico y etnomédico de preselección de materias primas para el descubrimiento de principios activos y los resultados de ensayos de fitotoxicidad apropiados constituyen indicadores idóneos para la detección de especies vegetales que proporcionen agentes fitotóxicos de utilidad para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas.

2.-Los productos del metabolismo secundario de *H. schaffneri*, pueden variar de acuerdo al ciclo estacional y en consecuencia las propiedades fitotóxicas potenciales de la planta.

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAL VEGETAL

Para la preparación de los diferentes extractos y esencias analizados en esta investigación, se utilizaron las partes aéreas de la especie vegetal *Hofmeisteria schaffneri* recolectada en diferentes épocas del año. Todos los lotes fueron proporcionados por el Dr. Robert Bye y la Dra. Edelmira Linares del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM (Tabla 4). Un ejemplar de referencia de cada uno de ellos se depositó en el Herbario Nacional (MEXU).

Tabla 4. Registros de recolección de los siete lotes de material vegetal (*H. schaffneri*) utilizados en esta investigación.

LOTE	FECHA DE RECOLECCIÓN	LOCALIDAD	VOUCHER
Extracto orgánico:			
Lote I	18 Noviembre 2002	San Luís Potosí	Bye & Linares 31018
Lote II	17 Febrero de 2005	Ozumba, Edo. Mex.	Bye 33848
Extracto acuoso	18 Enero 2006	Ozumba, Edo. Mex.	Bye & Linares 34585
Aceite esencial:			
Lote AEIII	2 Febrero 2006	Ozumba, Edo. Mex.	Bye & Linares 34609
Lote AEIV	1 Marzo 2006	Ozumba, Edo. Mex.	Bye & Linares 34631
Lote AEV	30 Agosto 2006	Ozumba, Edo. Mex.	E. Linares 1846
Lote AEVI	31 Octubre 2006	Ozumba, Edo. Mex.	E. Linares 1736
Lote AEVII	16 Enero 2007	Tepococulco Edo. Mex.	Bye & Linares 34962

En el caso de los dos extractos orgánicos y del acuoso, el material vegetal se sometió a un proceso de desecación a temperatura ambiente por ocho días; posteriormente se fraccionó en un molino Willey Modelo 4. Para la preparación de los aceites esenciales, se utilizó la planta fresca fragmentada en trozos pequeños.

4.2 PROCEDIMIENTOS GENERALES

4.2.1 Análisis cromatográficos. Los análisis cromatográficos en capa fina analítica (CCF) se efectuaron con placas de aluminio de distintas dimensiones recubiertas con una capa de gel de sílice de 0.25 mm de espesor (silica Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck), utilizando varios sistemas de elusión; como agentes cromógenos se utilizaron sulfato cérico amoniacal o cloruro férrico (2.5 g de FeCl₃ diluido con 50 mL de H₂O y ajustado a 100 mL con etanol). Adicionalmente, la visualización de las placas se realizó con una lámpara de luz UV (onda corta, 254 nm; onda larga, 356 nm). Los análisis cromatográficos en columna abierta se realizaron en columnas de vidrio empacadas con gel de sílice (sílica gel 60 Merck, tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm, malla de 70-230 μ) empleando varios sistemas de elusión, También se empleó sephadex LH20 (Pharmacia ®); en este caso la elusión se efectuó con MeOH. Para la purificación de algunos productos se utilizó la cromatografía en capa fina, en placas de vidrio recubiertas con gel de sílice (0.25 mm).

4.2.2 Determinación de constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas. Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fischer-Jonhs y no están corregidos. Los espectros en el infrarrojo se obtuvieron en pastilla de KBr o película en un espectrómetro Perkin Elmer 599. Los espectros en el ultravioleta se obtuvieron en un espectrómetro Lambda II UV en MeOH o CH₂Cl₂. La rotación óptica se midió en un polarímetro digital JASCO DIP 360 en MeOH o CH₂Cl₂. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-¹H) y de Carbono-13 (RMN-¹³C) así como los espectros de RMN bidimensionales homonucleares COSY (“Correlated Spectroscopy”) y NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) y heteronucleares HECTOR (Heteronuclear Correlation) y HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity) se registraron en los aparatos Varian Unity INOVA, el cual se operó a una frecuencia de 300 MHz para ¹H y 75 MHz para ¹³C; Varian unity INOVA el cual se operó a una frecuencia de 400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C y Bruker DMX500 el cual se operó a una frecuencia de 500 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C. Los espectros se registraron en CDCl₃ y solo en el caso del compuesto 77 se utilizó MeOD. Los desplazamientos químicos [δ (ppm)] se refieren al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas JEOL SX 102 utilizando como métodos de ionización, bombardeo rápido de átomos (MS-FAB) en modo positivo y como matriz alcohol nitrobencílico (NBA) y por impacto electrónico (MS-EI) acoplado a un cromatógrafo de gases a una energía de ionización de 70 eV. El análisis de difracción de rayos X para **78** se realizó en un aparato Broker Smart Apex CCD difractometer.

4.3 ENSAYOS BIOLOGICOS

4.3.1. Determinación cuantitativa del potencial fitotóxico. La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos, fracciones y compuestos puros se realizó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación y crecimiento radicular de semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), zacate pinto (*Echinochloa crus-galli*) y alfalfa (*Medicago sativa*) empleando el ensayo de la caja de Petri (Anaya, *et al.*, 1990; Valencia-Islas, *et al.*, 2002a). Todas las semillas fueron adquiridas en el mercado de Tulyehualco, Estado de México. El bioensayo se realizó por triplicado en cajas de Petri de 10 cm de diámetro cubiertas con discos de papel filtro (Whatman no. 1) y se hizo por triplicado. Los extractos, fracciones y compuestos puros se disolvieron en CH₂Cl₂, mezclas de CH₂Cl₂-MeOH o MeOH dependiendo de la solubilidad de los mismos y se prepararon diluciones para obtener concentraciones finales de 1000, 100 y 10 µg/mL para extractos y fracciones y de 500, 100 y 10 µg/mL para compuestos puros. 3 mL de cada una de las diluciones con las concentraciones apropiadas se adicionaron sobre el disco de papel filtro y posteriormente el disolvente se evaporó por medio de una corriente de aire. Una vez evaporado el disolvente, el papel filtro se humedeció con 3 mL de agua destilada y a continuación se colocaron 15 semillas ya sea de *A. hypochondriacus*, *E. crus-galli* o *M. sativa* en cada caja. Inmediatamente después las placas se incubaron a 28 °C durante 24, 48 y 72 horas respectivamente. Como control positivo se utilizó la tricolorina A a las concentraciones finales de 500, 100 y 10 ppm; como blanco se empleó agua destilada.

4.3.2. Determinación cualitativa del efecto fitotóxico. Para monitorear la actividad fitotóxica a lo largo de los estudios fitoquímicos en cada una de las fracciones en estudio, se utilizó el método bioautográfico (Anaya, *et al.*, 1990). Se utilizaron para esto, placas de

vidrio de 20.0 x 2.5 cm recubiertas de gel de sílice (silica Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck). En cada placa se aplicaron 10 µg de la fracción a evaluar. Posteriormente, cada placa se eluyó con la mezcla de disolventes que permitiera la mayor separación de los componentes de cada una de las fracciones evaluadas. Al cabo de la elusión, se evaporó el disolvente de las cromatoplasmas y una vez secas se cubrieron con 15 mL de una suspensión de agar bacteriológico (Bioxon) al 1%. Una vez solidificado el agar, se colocaron las semillas de amaranto hasta cubrir completa y homogéneamente la superficie. Las placas se incubaron en una atmósfera húmeda a 28 °C durante 24 h.

4.3.3 Determinación de la actividad sobre la Fosfodiesterasa del AMPc (PDE1) dependiente de CaM para las fitotoxinas 1 y 2.

Preparación del medio de reacción: 0.0015 unidades de PDE1 de cerebro de bovino, 0.83 µg de CaM de cerebro de bovino, 0.3 unidades de 5'-nucleotidasa de veneno de *Crotalus atrox* y 30 nM de ASB (albúmina sérica de bovino) se incubaron, durante 1 hora a 30 °C, en un vial que contenía exactamente 2.5 mL de solución amortiguadora.

Procedimiento: el ensayo se realizó en placas de 96 pozos (250 µL de capacidad). Para cada muestra se prepararon 9 diluciones seriadas, de forma tal de obtener concentraciones finales de 65, 50, 32, 20, 13, 7, 4, 2, 1 µM. A continuación, se transfirieron a los pozos de la placa 10 µL de las diluciones de prueba conteniendo las concentraciones antes indicadas y 40 µL de la mezcla de reacción previamente preparada y mantenida a una temperatura aproximada de 30 °C. Posteriormente, la placa se incubó a 30 °C durante 30 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación, se agregó a cada pozo 10 µL de AMPc 10.8 mM en intervalos de 10 segundos. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al término de este segundo periodo de incubación, se adicionó a cada pozo 190 µL de verde de malaquita para detener la reacción. La cantidad de fosfato generado durante la reacción de hidrólisis del AMPc se cuantificó espectrofotométricamente midiendo la densidad óptica de las muestras a 695 nm, en un espectrofotómetro marca BioRad modelo 660. La actividad de la enzima se calcula de manera indirecta al interpolar las densidades ópticas registradas en una curva estándar preparada con fosfato monobásico de potasio en un intervalo de 0.2 a 3 nmol. Para cada

muestra se realizaron seis réplicas independientes. Como control positivo se empleó clorpromazina.

4.4 ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ORGÁNICO LOTE I OBTENIDO A PARTIR DE LAS PARTES AÉREAS SECAS DE *H. SCHAFFNERI*

4.4.1. Preparación del extracto orgánico. El primer extracto orgánico total se preparó a partir del material vegetal seco y molido (1.6 Kg) por un proceso de maceración, utilizando una mezcla de MeOH-CH₂Cl₂ (1:1) como disolvente. Posteriormente, el extracto resultante se concentró bajo condiciones de presión reducida obteniéndose un total de 350 g de extracto vegetal crudo.

4.4.2 Fraccionamiento preliminar del extracto orgánico total. El extracto íntegro se sometió a una separación vía cromatografía en columna abierta empacada con 818 g de gel de sílice. Como eluyentes se emplearon mezclas de hexano-CH₂Cl₂ (5:5 → 0:10) y CH₂Cl₂-MeOH (10:0 → 5:5) y se recolectaron 272 fracciones de 1 L cada una, las cuales se analizaron por cromatografía en capa fina combinándose todas aquellas que resultaron cromatográficamente similares. Este proceso generó 12 fracciones primarias (Tabla 5). Cada una de las fracciones primarias resultantes se evaluó mediante el bioensayo de germinación y crecimiento radicular en caja de Petri, utilizando semillas de amaranto y siguiendo la metodología descrita en el inciso 4.3.1. De la fracción primaria **F2** precipitaron 49 mg de β-caroteno; de la fracción **F3** cristalizaron espontáneamente 456 mg de euparina y de la fracción primaria activa **F4** cristalizaron 147 mg de β-sitosterol. En la Figura 3 se resume el proceso de extracción y fraccionamiento primario del extracto orgánico obtenido de la especie *H. schaffneri*.

4.4.3 Fraccionamiento secundario de la fracción activa F4. La fracción primaria **F4** (16 g) se sometió a un fraccionamiento secundario vía una cromatografía en columna abierta utilizando 269 g sobre de gel de sílice. Los eluyentes empleados fueron mezclas de hexano-CH₂Cl₂ (10:0 → 0:10) y CH₂Cl₂-MeOH (10:0 → 0:10). Al finalizar este proceso se

obtuvieron ocho fracciones secundarias (Tabla 6). Cada una de las fracciones se analizó por el método bioatográfico (inciso 4.3.2).

4.4.4 Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria activa F4-4. La fracción secundaria **F4-4** (2.60 g) se sometió a un fraccionamiento terciario vía una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (80 g) empleando como eluyentes mezclas de hexano-CH₂Cl₂ (10:0 → 0:10) y CH₂Cl₂-MeOH (10:0 → 0:10). Este proceso generó 11 fracciones terciarias (Tabla 7). El método bioautográfico indicó que la fracción fitotóxica era **F4-4-8**.

Tabla 5. Fraccionamiento primario del extracto orgánico Lote I de *H. schaffneri*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
Hexano: CH ₂ Cl ₂	50:50	1-48	1-7	F1	0.61
Hexano: CH ₂ Cl ₂	40:60	49-65	8-14	F2*	5.18
Hexano: CH ₂ Cl ₂	30:70	66-111	15-29	F3*	4.58
Hexano: CH ₂ Cl ₂	20:80	112-120	30-67	F4*	16.7
Hexano: CH ₂ Cl ₂	10:90	121-131	68-149	F5*	13.51
CH ₂ Cl ₂	100	132-145	150-173	F6*	12.08
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	99:1	146-159	174-192	F7	2.10
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	98:2	160-186	193-203	F8	2.28
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	97:3	187-198	204-243	F9	23.02
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	96:4	199-214	244-253	F10	13.50
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	95:5	215-229	254-259	F11	7.29
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	90:10	230-244	260-272	F12	18.33
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	80:20	245-250			
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	70:30	251-261			
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	60:40	262-266			
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	50:50	267-272			

* Fracciones fitotóxicas contra *A. hypochondriacus*

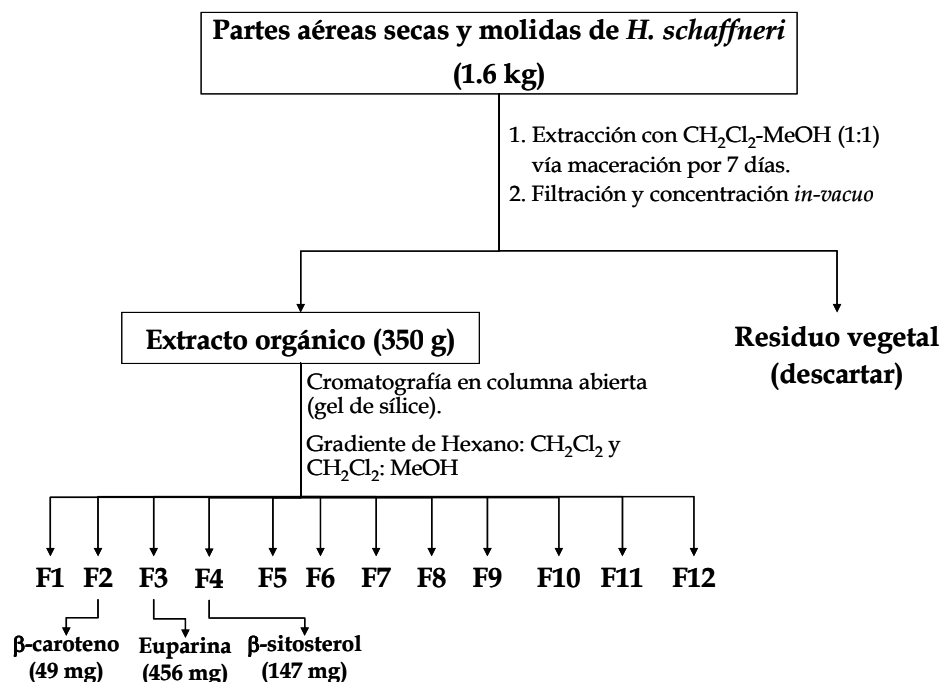


Figura 3. Fraccionamiento primario del extracto orgánico lote I obtenido a partir de las partes aéreas secas de *H. schaffneri*.

Tabla 6. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria **F4** del extracto orgánico lote I de *H. schaffneri*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
Hexano	100	1-8	1-27	F4-1	<0.01
Hexano: CH ₂ Cl ₂	90:10	9-12	28	F4-2	0.03
Hexano: CH ₂ Cl ₂	80:20	13-17	29-34	F4-3*	1.83
Hexano: CH ₂ Cl ₂	70:30	18-23	35-52	F4-4*	2.60
Hexano: CH ₂ Cl ₂	60:40	24-27	53-84	F4-5*	1.90
Hexano: CH ₂ Cl ₂	50:50	28-40	85-93	F4-6	0.02
Hexano: CH ₂ Cl ₂	40:60	41-51	94-98	F4-7	1.14
Hexano: CH ₂ Cl ₂	30:70	52-61	99-102	F4-8	0.02
Hexano: CH ₂ Cl ₂	20:80	62-69			
Hexano: CH ₂ Cl ₂	10:90	70-75			
CH ₂ Cl ₂	100	76-86			
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	99:1	87-93			
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	90:10	94-98			
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	50:50	99-102			

* Fracciones fitotóxicas contra *A. hypochondriacus*.

Tabla 7. Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria **F4-4** del extracto orgánico lote I de *H. schaffneri*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
Hexano	100	1-9	1-20	F4-4-1	3
Hexano: CH ₂ Cl ₂	75:25	10-20	21-23	F4-4-2	2
Hexano: CH ₂ Cl ₂	50:50	21-77	24-32	F4-4-3	14
Hexano: CH ₂ Cl ₂	40:60	78-96	33-39	F4-4-4	4
Hexano: CH ₂ Cl ₂	30:70	97-124	40-94	F4-4-5	158
Hexano: CH ₂ Cl ₂	20:80	125-152	95-107	F4-4-6	110
Hexano: CH ₂ Cl ₂	10:90	153-165	108-125	F4-4-7	95
CH ₂ Cl ₂	100	166-198	126-194	F4-4-8*	342
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	99:1	199-230	195-234	F4-4-9	632
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	98:2	231-244	235-240	F4-4-10	67
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	97:3	245-254	241-308	F4-4-11	154
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	96:4	255-265			
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	90:10	266-276			
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	85:15	277-285			
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	70:30	286-292			
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	50:50	293-300			
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	25:75	301-307			
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	100	308			

* Fracción fitotóxica contra *A. hypochondriacus*.

4.4.5 Fraccionamiento cuaternario de la fracción terciaria activa F-4-8: Aislamiento del acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo (76). La fracción terciaria **F4-4-8** (342 mg) se sometió a un fraccionamiento cuaternario vía cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (30 g) utilizando como mezcla de elusión hexano: CH₂Cl₂ en gradiente de polaridad (10:0 → 0:10) y CH₂Cl₂. Como resultado de este proceso se obtuvieron 10 fracciones cuaternarias (Tabla 8). De la fracción cuaternaria activa **F4-4-8-III** (10 mg) se obtuvieron 8 mg del acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo (76) como un sólido blanco. En la Figura 4 se resumen los procesos de obtención para este producto.

Tabla 8. Fracc. cuaternario de la fracción terciaria **F4-4-8** del extracto orgánico lote I de *H. schaffneri*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
Hexano: CH ₂ Cl ₂	70:30	1-8	1-17	F4-4-8-I	4
Hexano: CH ₂ Cl ₂	60:40	9-13	18-32	F4-4-8-II	11
Hexano: CH ₂ Cl ₂	50:50	14-17	33-37	F4-4-8-III*	10
Hexano: CH ₂ Cl ₂	40:60	18-22	38-43	F4-4-8-IV	14
Hexano: CH ₂ Cl ₂	30:70	23-27	44-62	F4-4-8-V	37
Hexano: CH ₂ Cl ₂	20:80	28-32	63-88	F4-4-8-VI	8.6
Hexano: CH ₂ Cl ₂	10:90	33-110	89-118	F4-4-8-VII	9
CH ₂ Cl ₂	100	111-122	119-134	F4-4-8-VIII	4
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	98:2	123-134	135-137	F4-4-8-IX	110
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	96:4	135-138	138-142	F4-4-8-X	19
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	90:10	139-142		* Fraccion fitotóxica contra <i>A. hypochondriacus</i> .	

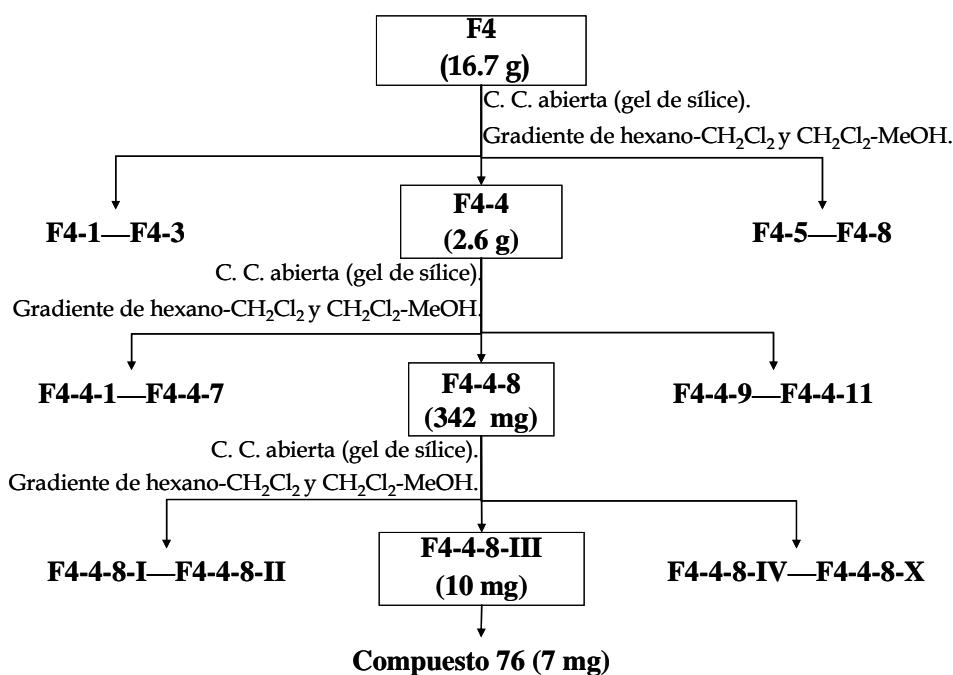


Figura 4. Aislamiento de la hofmeisterina (76) a partir de la fracción primaria **F4** del extracto orgánico lote I de *H. schaffneri*.

4.4.6 Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria activa F4-5: Aislamiento del 3',4',4a',9a'-tetrahidro-6',7'-dimetilespiro[benzofuran-3(2H),2'-pirano[2,3-b]benzofuran]-2,4a'-diol (77) y timol (105). La fracción secundaria activa **F4-5** (1.90 g) se

sometió a un fraccionamiento terciario en columna abierta sobre gel de sílice (50 g) usando como fase móvil mezclas de hexano-CH₂Cl₂ (10:0 → 0:10), lo que llevo a la obtención de ocho fracciones terciarias (Tabla 9). De la fracción terciaria **F4-5-II** (17 mg) precipitaron 9 mg de timol (**105**) y de la fracción terciaria activa **F4-5-VI** (714 mg) precipitaron 72 mg de 3',4',4a',9a'-tetrahidro-6',7'-dimetilespiro[benzofuran-3(2H),2'-pirano[2,3-b]benzofuran]-2,4a'-diol (**9**) como sólido blanco. La estrategia metodológica para la obtención de estos productos se resume en la figura 5.

Tabla 9. Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria **F4-5** del extracto orgánico lote I de *H. schaffneri*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
Hexano: CH ₂ Cl ₂	70:30	1-4	1-12	F4-5-I	27
Hexano: CH ₂ Cl ₂	1:1	5-11	13-18	F4-5-II	17
CH ₂ Cl ₂	100	12-106	19-20	F4-5-8-III	4
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	97:3	107-109	21-32	F4-5-IV	91
MeOH	100	110	33-49	F4-5-V	199
			50-105	F4-5-VI*	714
			106-109	F4-5-VII*	8
			110	F4-5-VIII	267

* Fraccion fitotóxica contra *A. hypochondriacus*.

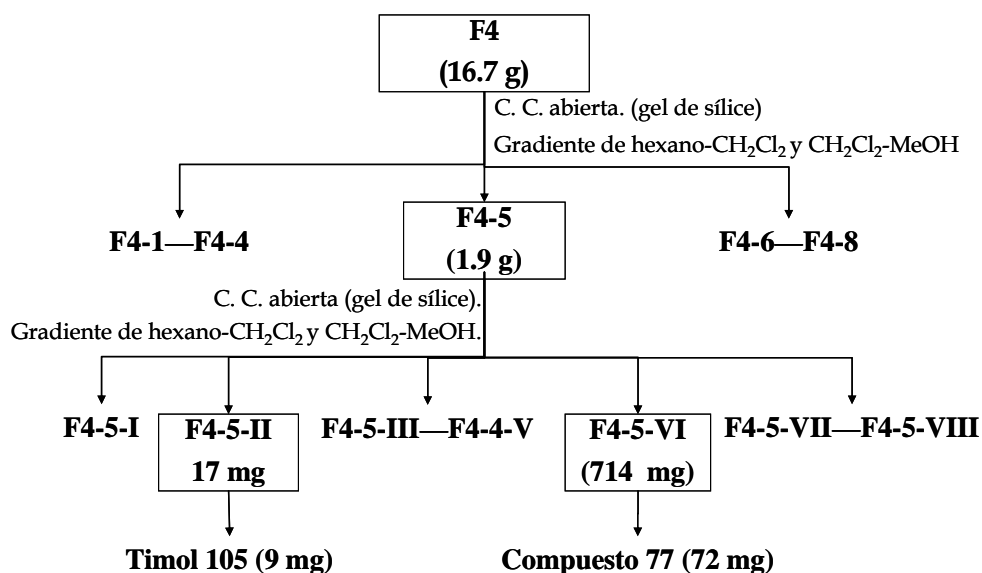


Figura 5. Aislamiento del compuesto **77** y del timol (**105**) a partir de la fracción primaria **F4** del extracto orgánico lote I de *H. schaffneri*.

4.5 ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ORGÁNICO LOTE II OBTENIDO A PARTIR DE LAS PARTES AÉREAS SECAS DE *H. SCHAFFNERI*

4.5.1 Preparación del extracto orgánico. La preparación del extracto orgánico lote II a partir de 1.5 kg de material vegetal seco y molido se realizó igualmente por maceración siguiendo la metodología descrita para la primera investigación (sección 4.4.1).

4.5.2 Fraccionamiento preliminar del extracto orgánico total. El fraccionamiento primario del extracto orgánico II (340 g) vía cromatografía en columna abierta, empacada con 600 g de gel de sílice generó 250 fracciones de 1 L cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina, combinándose todas aquellas que resultaron cromatográficamente similares. Este proceso condujo a la obtención de nueve fracciones primarias (Tabla 10). Como eluyentes se emplearon mezclas de hexano-CH₂Cl₂ (10:0 → 0:10) y CH₂Cl₂-MeOH (10:0 → 0:10). Cada una de las fracciones primarias resultantes se evaluó mediante el bioensayo de germinación y crecimiento radicular en caja de Petri siguiendo la metodología descrita en el inciso 4.3.1.

Tabla 10. Fraccionamiento primario del extracto orgánico lote II de *H. schaffneri*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
Hexano	100	1-45	1-55	F1	15.09
Hexano: CH ₂ Cl ₂	90:10	46-67	56-62	F2	7.32
Hexano: CH ₂ Cl ₂	80:20	68-85	63-77	F3*	4.21
Hexano: CH ₂ Cl ₂	60:40	86-94	78-91	F4*	13.43
Hexano: CH ₂ Cl ₂	20:80	95-119	92-123	F5	35.76
Hexano: CH ₂ Cl ₂	50:50	120-132	124-155	F6	51.98
Hexano: CH ₂ Cl ₂	30:70	133-142	156-185	F7	55.25
CH ₂ Cl ₂	100	143-168	186-213	F8	67.41
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	80:20	169-180	214-250	F9	59.07
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	70:30	191-223			
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	50:50	223-250			

* Fracciones fitotóxicas contra *A. hypochondriacus*.

4.5.3 Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F3: Aislamiento del (2Z)-2-metil-2-butenato de 2-hidroxi-4-metilfenilo (79) y del timol (105). La fracción primaria F3 (4.2 g) se sometió a una cromatografía en columna abierta empleando 90 g de gel de

sílice y una mezcla de elusión hexano:AcOEt en gradientes de polaridad (10:0 → 0:10). Este proceso condujo a la obtención de 12 fracciones secundarias (Tabla 11). De la fracción secundaria **F3-2** se identificó un producto mayoritario. Para separar el producto, la fracción se analizó por cromatografía en capa fina, modalidad preparativa (4 placas con aprox. 250 mg cada una), empleando una mezcla de hexano-AcOEt (9.5:0.5). Después de eluir las placas dos veces y procesarlas de manera habitual se obtuvieron 600 mg de un aceite color amarillo, que se caracterizó como el (2Z)-2-metil-2-butenato de 2-isopropil-5-metilfenilo (**79**). De la fracción secundaria **F3-12** precipitaron 16 mg de timol (**105**). En la figura 6 se resume la estrategia metodológica para la obtención de estos productos.

Tabla 11. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria **F3** del extracto orgánico lote II de *H. schaffneri*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
hexano	100	1-10	1-11	F3-1	0.08
Hexano: AcOEt	99:1	11-15	12-35	F3-2	1.11
Hexano: AcOEt	98:2	16-21	36-47	F3-3	0.45
Hexano: AcOEt	97::3	22-41	48-50	F3-4	0.43
Hexano: AcOEt	95:5	42-49	51-56	F3-5	0.12
Hexano: AcOEt	93:7	50-64	57-65	F3-6	0.16
Hexano: AcOEt	90:10	65-78	66-75	F3-7	0.31
Hexano: AcOEt	87:13	78-86	76-88	F3-8	0.08
Hexano: AcOEt	85:15	86-91	89-115	F3-9	0.41
Hexano: AcOEt	80:20	92-99	100-115	F3-10	0.2
Hexano: AcOEt	50:50	100-115	116-121	F3-11	0.52
Hexano: AcOEt	30:70	116-121	122-125	F3-12	0.21
AcOEt	100	121-125			

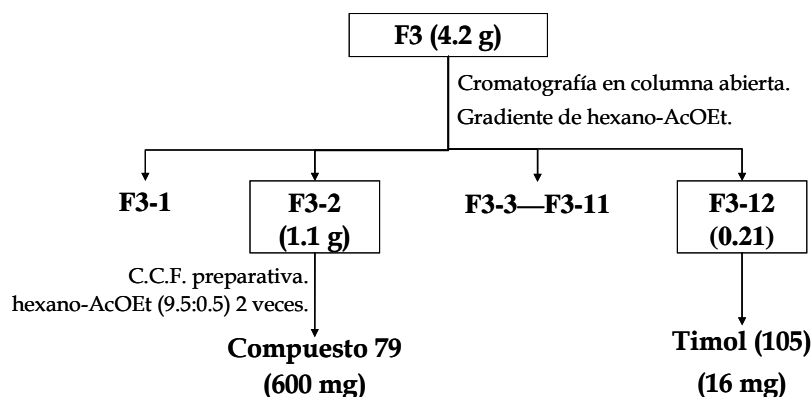


Figura 6. Aislamiento de la hofmeisterina III (**79**) y del timol (**105**) a partir de la fracción primaria **F3** del extracto orgánico lote II de *H. schaffneri*.

4.5.4 Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F4: Aislamiento del ácido angélico. La fracción primaria **F4** (13.43 g) se sometió a un fraccionamiento secundario vía una cromatografía en columna abierta utilizando 200 g de gel de sílice. Los eluyentes empleados fueron mezclas de hexano y AcOEt en gradientes de polaridad (10:0 → 0:10). Al finalizar este proceso (Tabla 12) se obtuvieron 25 fracciones secundarias (**F4-1—F4-25**). De la fracción secundaria **F4-5** precipitaron 19 mg de un sólido cristalino que se caracterizó como el ácido (2Z)-2-metil-2-butenóico, conocido comúnmente como ácido angélico (Joseph-Nathan, *et al.*, 1984).

Tabla 12. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria **F4** del extracto orgánico lote II de *H. schaffneri*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
Hexano	100	1-9	1-8	F4-1	0.12
Hexano: AcOEt	99:1	10-25	9-12	F4-2	0.14
Hexano: AcOEt	98:2	26-45	13-14	F4-3	0.23
Hexano: AcOEt	96:4	46-73	15-24	F4-4	0.25
Hexano: AcOEt	92:8	74-96	25-27	F4-5	0.56
Hexano: AcOEt	90:10	96-132	28-34	F4-6	0.47
Hexano: AcOEt	85:15	133-152	35-42	F4-7	0.26
Hexano: AcOEt	80:20	153-184	43-46	F4-8	0.14
Hexano: AcOEt	70:30	185-195	47	F4-9	0.15
Hexano: AcOEt	50:50	196-210	48-54	F4-10	0.43
			55	F4-11	0.08
			56-68	F4-12	0.58
			69-	F4-13	0.06
			70-92	F4-14	1.63
			93	F4-15	0.98
			94-110	F4-16	3.12
			111-122	F4-17	0.88
			123	F4-18	0.95
			124-129	F4-19	0.26
			130-137	F4-20	0.430
			138-142	F4-21	1.350
			143-150	F4-22	0.273
			151-158	F4-23	0.522
			159-166	F4-24	0.455
			167-210	F4-25	0.028

4.5.5 Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F4-14: Aislamiento del 1,4-bis-[(2-hidroxi-4-metil)-fenil]-buten-1,4-diona (78). La fracción secundaria F4-14 (1.63 g) se sometió a una cromatografía en columna abierta utilizando gel de sílice (125.7 g) y como eluyentes mezclas de hexano y AcOEt en gradientes de polaridad (10:0→0:10). Al finalizar este proceso se obtuvieron trece fracciones terciarias (Tabla 13). De la fracción terciaria F4-14-2 (15 mg) precipitaron 7 mg de 1,4-bis-[(2-hidroxi-4-metil)-fenil]-buten-1,4-diona (78). La estrategia metodológica para la obtención de este producto se resume en la Figura 7.

Tabla 13. Fracc. terciario de la fracción secundaria F4-14 del extracto orgánico lote II de *H. schaffneri*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
Hexano	100	1-20	1-3	F4-14-1	100
Hexano: AcOEt	99:1	21-43	4-10	F4-14-2	15
Hexano: AcOEt	98:2	44-54	11-24	F4-14-3	130
Hexano: AcOEt	96:4	55-58	25-27	F4-14-4	120
Hexano: AcOEt	92:8	59-65	28-43	F4-14-5	131
Hexano: AcOEt	90:10	66-79	44-54	F4-14-6	122
Hexano: AcOEt	88:12	80-92	55-62	F4-14-7	140
Hexano: AcOEt	85:15	93-106	63-66	F4-14-8	123
Hexano: AcOEt	80:20	107-122	67-78	F4-14-9	134
Hexano: AcOEt	75:15	123-127	79-106	F4-14-10	133
Hexano: AcOEt	70:20	128-139	107-122	F4-14-11	111
Hexano: AcOEt	65:35	140-151	123-153	F4-14-12	111
Hexano: AcOEt	50:50	152-159	154-170	F4-14-13	250
Hexano: AcOEt	35:75	160-165			
AcOEt	100	166-170			

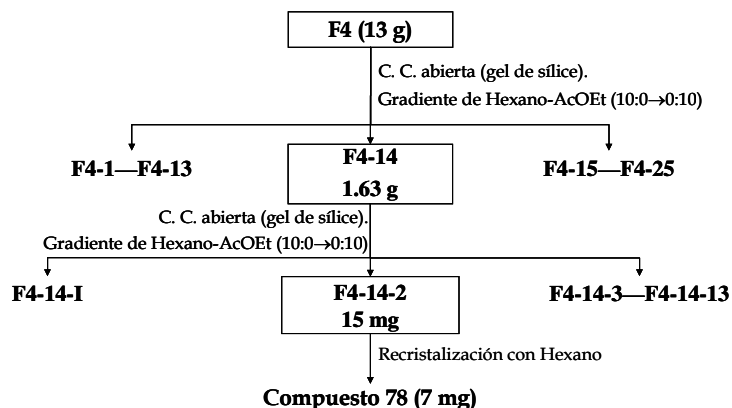


Figura 7. Aislamiento de la hofmeisterina II (78) a partir de la fracción primaria F4 del extracto orgánico lote II de *H. schaffneri*.

4.5.6 Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F4-16: Aislamiento del 1,4-bis-[(2-hidroxi-4-metil)-fenil]-buten-1,4-diona (78). El fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (110 g) de la fracción secundaria **F4-16** (3.12 g) empleando como eluyentes mezclas de hexano y AcOEt en gradientes de polaridad (10:0 → 0:10) dio como resultado quince fracciones terciarias (**F4-16-1 – F4-16-15**). De la fracción terciaria **F4-16-2** (300 mg) precipitaron espontáneamente 25 mg del compuesto **78**, que ya había sido aislado anteriormente.

4.5.7 Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F4-17: Aislamiento del (2Z)-2-metil-2-butenolato de 2-hidroxi-2-(2-hidroxi-4-metilfenil)-(isopropeniloxi) propilo (80). El fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción secundaria **F4-17** (885 mg) empleando como eluyentes mezclas de hexano y acetato de etilo en gradientes de polaridad (10:0 → 0:10), dio como resultado veintidós fracciones. De la fracción terciaria **F4-17-15** (92 mg) se identificó la presencia de un producto mayoritario. Para separar el producto, la fracción **F4-17-15** se analizó por cromatografía en capa fina, modalidad preparativa (3 placas con aprox. 30 mg cada una) empleando una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH 96:4. Después de eluir las placas dos veces y procesarlas de manera habitual se obtuvieron 79 mg de (2Z)-2-metilbut-2-enoato de 2-hidroxi-2-(2-hidroxi-4-metilfenil)-(isopropeniloxi)propilo (**80**) en forma de aceite. La estrategia metodológica para la obtención de este producto se resume en la figura 8.

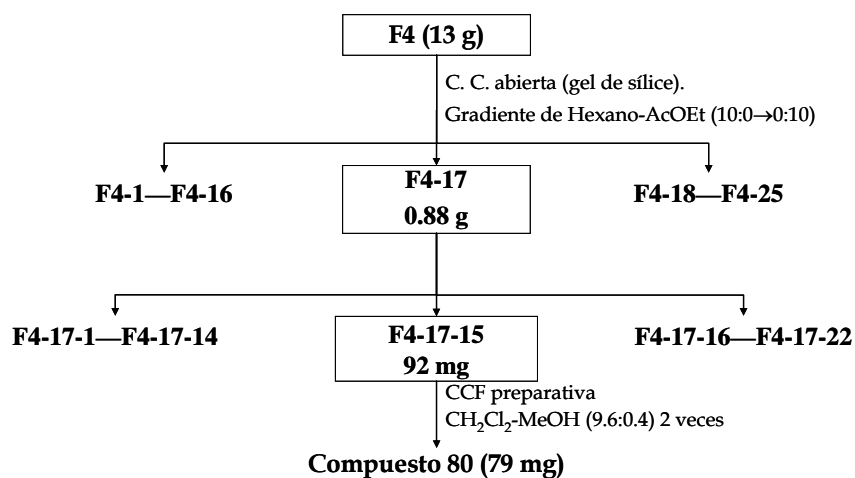


Figura 8. Aislamiento del compuesto **80** a partir de la fracción primaria **F4** del extracto orgánico lote II de *H. schaffneri*.

4.5.8 Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F4-19: Aislamiento del 3',4',4a',9a'-tetrahidro-6',7'-dimetil-espiro-[benzofuran-3(2H),2'-pirano-[2,3-b]benzofuran]-2,4a'-diol (77). La fracción secundaria **F4-19** (260 mg) se sometió a un fraccionamiento terciario por cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice utilizando como eluyentes mezclas de hexano-acetato de etilo (10:0 → 0:10). De la fracción terciaria **F4-19-17** (85 mg) precipitaron 22 mg de el 3',4',4a',9a'-tetrahidro-6',7'-dimetil-espiro-[benzofuran-3(2H),2'-pirano-[2,3-b]-benzofuran]-2,4a'-diol (77) compuesto aislado anteriormente durante la primera investigación de la especie (lote I, sección 5.4.1.3)

4.6 ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ACUOSO OBTENIDO A PARTIR DE LAS PARTES AÉREAS SECAS DE *H. SCHAFFNERI*

4.6.1 Preparación del extracto acuoso a partir de las partes aéreas secas de *H. schaffneri*. El extracto acuoso se preparó a partir del material vegetal seco (108 g) mediante un proceso de maceración utilizando 3 L de agua destilada a 70 °C por 30 minutos. Pasado este tiempo, el extracto acuoso se filtró inmediatamente por papel filtro (Whatman No. 1) para eliminar la mayor cantidad de residuos sólidos y posteriormente se fraccionó mediante particiones sucesivas con CH₂Cl₂ (3 L x 3). La fase orgánica resultante se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró al vacío para obtener finalmente 2.0 g de un residuo color ámbar (CI₅₀ = 126 ppm sobre *A. hypochondriacus*).

4.6.2 Fraccionamiento preliminar del extracto acuoso. El extracto acuoso se sometió a una cromatografía en columna abierta sobre sephadex LH-20 y se eluyó con MeOH, obteniéndose 18 fracciones de 20 mL cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina, combinándose todas aquellas que resultaron cromatográficamente similares obteniéndose finalmente siete fracciones primarias (Tabla 14). En la figura 9 se resume el proceso de obtención del extracto y el fraccionamiento primario.

Tabla 14. Fraccionamiento preliminar del extracto acuoso.

Fracciones combinadas	Clave	Peso (g)
1-6	1-A	0.04
7	1-B	0.05
8-9	1-C	0.76
10-12	1-D	0.47
13-14	1-E	0.09
15-16	1-F	0.06
17-18	1-G	0.03

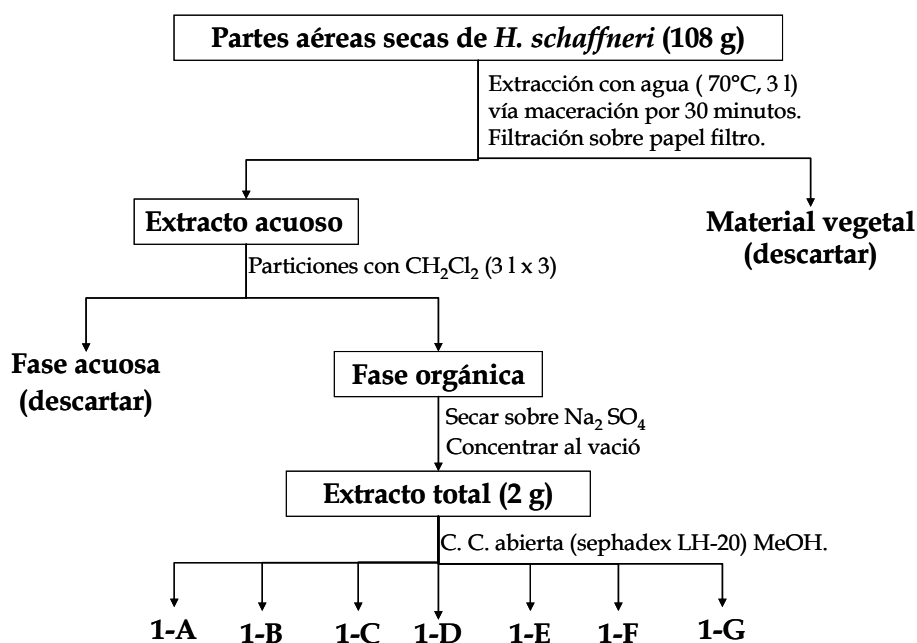


Figura 9. Obtención del extracto acuoso y fraccionamiento primario de las partes aéreas secas de *H. schaffneri*.

4.6.3 Fraccionamiento secundario de la fracción primaria 1-D: aislamientos de los compuestos (2Z,2'Z)bis(2-metil-2-butenato) de 2-hidroxi-2-(2-hidroxi-4-metilfenil)-1,3-propanoilo (84), (2Z)-2-metil-2-butenato de 2,3-dihidroxi-2-(2-hidroxi-4-metilfenil)propilo (82), (2Z)-2-metil-2-butenato de 2-[2-(hidroximetil)-2-oxiranil]-5-metilfenilo (81), (2Z)-2-metil-2-butenato de 2-[2-(acetoximetil)-2-oxiranil]-5-metilfenilo (83). La fracción 1-D (470 mg) se sometió a una cromatografía sobre sephadex LH-20 (MeOH) para obtener 21 fracciones terciarias (1-D-1 a 1-D-21). La fracción terciaria 1-D-10

(130 mg) se purificó por cromatografía en capa fina preparativa (CH_2Cl_2 :MeOH 9.6:0.4), para obtener 5 mg de (2Z,2'Z)bis(2-metil-2-butenato) de 2-hidroxi-2-(2-hidroxi-4-metilfenil)1,3 propanoilo (**84**), 15 mg de (2Z)-2-metil-2-butenato de 2-[2-(hidroximetil)oxiran-2-il]-5-metilfenilo (**81**), y 8 mg de (2Z)-2-metil-2-butenato de 2-[2-(acetoximetil)oxiran-2-il]-5-metilfenilo (**83**). Todos estos compuestos fueron obtenidos en forma de aceite. La fracción terciaria **1-D-16** (78 mg) también se purificó por cromatografía en capa fina preparativa (CH_2Cl_2 : MeOH 9.6:0.4) para obtener 15 mg del compuesto (2Z)-2-metil-2-butenato de 2,3-dihidroxi-2-(2-hidroxi-4-metilfenil)propilo (**82**) también en forma de aceite. En la figura 10 se resume el proceso de aislamiento de estos productos.

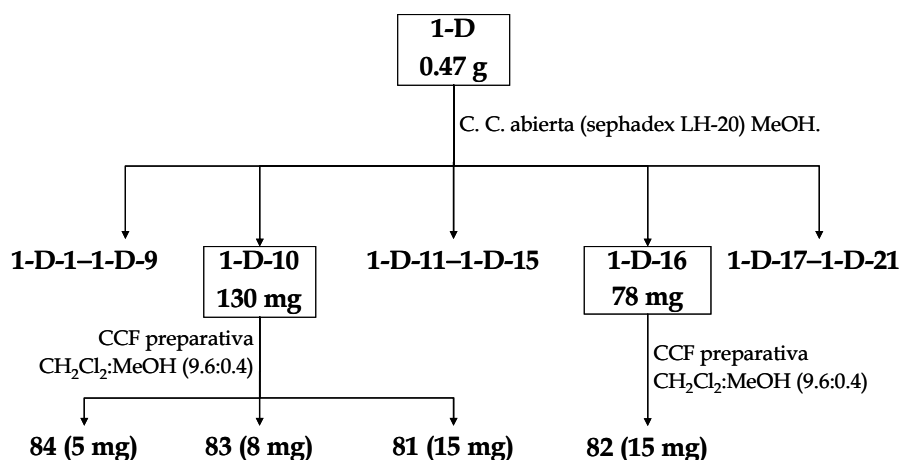


Figura 10. Aislamiento de los compuestos **81-84** a partir de la fracción primaria **1-D** del extracto acuoso de *H. schaffneri*.

4.7 ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *H. SCHAFFNERI*

4.7.1 Preparación del aceite esencial de *H. schaffneri*. La preparación de los cinco lotes de aceite esencial a partir de 500 g de material vegetal fresco de *H. schaffneri* se realizó mediante un proceso de hidrodestilación (3500 mL de H_2O ; por 4 h). Posteriormente a la obtención de cada uno de los hidrodestilados, se realizaron particiones con CH_2Cl_2 (3 x 500 mL). Al cabo de este proceso, el disolvente se eliminó por una destilación al vacío. Los volúmenes obtenidos de los cinco lotes se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Rendimiento de las esencias obtenidas por hidrodestilación.

LOTE	FECHA DE COLECTA	VOL. OBTENIDO
RM76AEIII	FEBRERO	450 mg
RM76AEIV	MARZO	435 mg
RM76AEV	AGOSTO	429 mg
RM76AEVI	OCTUBRE	460 mg
RM76AEVII	ENERO	470 mg

4.7.2 Identificación de los componentes presentes en las esencias de *H. schaffneri*: cálculo de los índices de retención. Para el análisis conducente a determinar los índices de retención de los componentes de las esencias se utilizó un Cromatógrafo de Gases (5890 Hewlett Packard) acoplado a un detector de ionización de flama con inyector split y se empleó helio como gas acarreador a flujo constante de 1 mL/min, (relación split 1/50). La temperatura del inyector y del detector fue de 280 °C. Se utilizaron dos tipos de columna capilar de sílice fundida, una no polar SPB 1 (polidimetilsiloxano) de 60 m de longitud x 250 mm de diámetro interno x 0.25 µm grosor de película (SUPELCO, USA) y otra polar SUPELCOWAX 10 (100% polietilenglicol) de 30 m de longitud x 250 mm de diámetro interno x 0.25 µm grosor de película. (SUPELCO PACK, USA). Se analizaron los cinco lotes de ámbar en diferentes disoluciones (tabla 16) utilizando como disolvente CH₂Cl₂. Se utilizó una mezcla de hidrocarburos lineales como estándares y se inyectó esta mezcla en las mismas condiciones cromatográficas a las que fueron analizados los diferentes lotes de esencias.

Tabla 16. Concentraciones de inyección de los lotes de esencias de *H. schaffneri*.

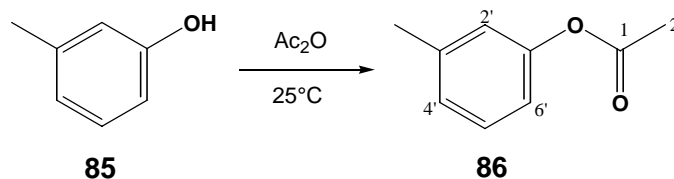
LOTE	MES DE COLECTA	Concentraciones	
		No polar	Polar
RM76AEIII	FEBRERO	6.3 mg / 2mL	10.4 mg / 2mL
RM76AEIV	MARZO	6.3 mg / 2mL	10.2 mg / 2mL
RM76AEV	AGOSTO	6.3 mg / 2mL	10.1 mg / 2mL
RM76AEVI	OCTUBRE	6.0 mg / 2mL	10.2 mg / 2mL
RM76AEVII	ENERO	6.0 mg / 2mL	10.1 mg / 2mL

4.7.3 Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en su modalidad impacto electrónico. Para la caracterización de los constituyentes presentes en las esencias a partir del análisis de los espectros de masas en su modalidad impacto electrónico se utilizó un cromatógrafo de Gases (6890N Agilent Technologies) acoplado a un detector selectivo de masas (5973 Agilent Technologies) con inyector split/splitless. Se utilizó una columna capilar de sílice fundida ZB-5 (5% difenil 95% polidimetilsiloxano) de 30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 μm de grosor de película. (Zebron Phenomenex, USA) y como disolvente CH_2Cl_2 . Se empleó He como gas acarreador a flujo constante de 1 mL/min. La temperatura del inyector fue de 260 °C modo “splitless” (1 min.). La temperatura de la línea de transferencia fue de 280 °C, la de la fuente de ionización de 230 °C y la del analizador (cuadrupolar) de 150 °C. Los análisis se realizaron por impacto electrónico a 70 eV, utilizando el modo de barrido total del espectro de 50 a 550 m/z para la identificación de iones para la caracterización. Para el análisis de los espectros de masas, se utilizó la biblioteca de espectros de masas del NIST (NIST Mass Spectral Search, ver. 2.0) en conjunto con datos de literatura.

4.7.4 Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en su modalidad ionización química. Se utilizó un cromatógrafo de Gases (5890 series II Hewlett Packard) utilizando una columna capilar de sílice fundida Ultra 2 (5%-fenil 95% metilsiloxano) de 25 m de longitud x 0.20 mm de diámetro interno x 0.33 μm de grosor de película (Agilent, USA) y como disolvente CH_2Cl_2 . Se empleó He como gas acarreador a flujo constante de 1 mL/min y metano (CH_4) como gas de ionización.

4.8 SÍNTESIS DE LA HOFMEISTERINA.

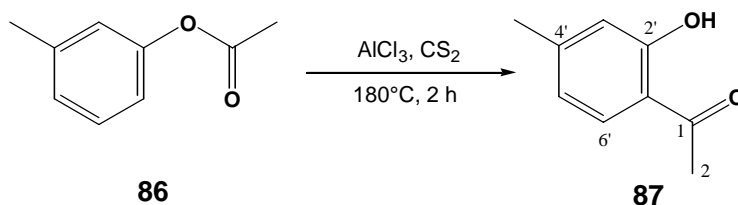
4.8.1. Síntesis del acetato de *m*-cresilo (86).



En un matraz bola de 50 mL provisto con un aparato de agitación magnética, se adicionaron 10 g (92.6 mmol) de *m*-cresol (**85**), 13.1 mL de anhídrido acético (138.6 mmol) y una gota de H₂SO₄ y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 4 hrs. Finalizado este tiempo, la mezcla resultante se trató con una solución de NaOH al 10% y se extrajo con CH₂Cl₂ (10 mL x 3). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentro *in vacuo* para generar el producto **86** (12.4 g, 90% de rendimiento) como un aceite cristalino.

Acetato de *m*-cresilo (86). IR ν_{\max} (película) 1747, 1508, 1277, 1229 cm⁻¹; RMN-1H (CDCl₃, 300 MHz) δ 2.28 (3H, s, 2-CH₃), 2.44 (3H, s, 3'-CH₃), 6.80 (1H, dd, $J = 8.0, 2.3$ Hz, H-6'), 6.81 (1H, sa, H-2'), 6.9 (1H, dd, $J = 8.1, 2.3$ Hz, H-4'), 7.12 (1H, dd, $J = 8.1, 7.7$ Hz, H-5'); EM-IE m/z 150 [M]⁺ (50), 135 (100), 107 (18), 77 (10), 43 (5).

4.8.2. Síntesis de 2-hidroxi-4-metilacetofenona (87).

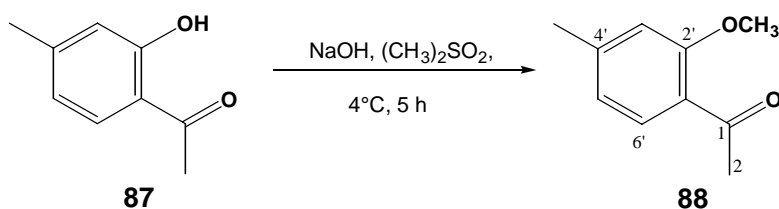


En un matraz bola de tres bocas de 50 mL provisto con un embudo de adición, un refrigerante conectado a una trampa de absorción de gases, un aparato de agitación magnética y una canasta de calentamiento, se pesó rápidamente 5 g (37.4 mmol) de AlCl₃ anhidro y se disolvieron en 10 mL de CS₂. Se adicionaron lentamente 5 g (33.4 mmol) de acetato de *m*-cresilo (**86**) disueltos en la mínima cantidad de CS₂. La mezcla se calentó a

reflujo por 90 minutos. Pasado este tiempo, se eliminó el disolvente y posteriormente la mezcla de reacción se llevó hasta 180 °C, manteniendo esta temperatura por tres horas. Al finalizar este tiempo, la resina resultante se dejó enfriar, se adicionaron 10 mL de HCl diluido (1:1) y después de 20 minutos, 50 mL de agua; se dejó en agitación por 4 horas y posteriormente se extrajo con CH₂Cl₂ (10 mL x 3). La fase orgánica resultante se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró *in vacuo*. La resina final fue purificada por cromatografía en columna sobre gel de sílice (80 g, hexano-AcOEt 9.6:0.4) para dar 3.76 g del compuesto **87** (75.2 % de rendimiento) como un aceite amarillo.

2-Hidroxi-4-metilacetofenona (87). UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 258 (4.12) 325 (3. 59) nm; IR ν_{\max} (película) 2925, 1637, 1507, 1367, 1247, 1225, 795 cm⁻¹; RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 2.34 (3H, s, 4'-CH₃), 2.59 (3H, s, 2-CH₃), 6.70 (1H, ddq, J = 8.1, 1.7, 0.6 Hz, H-5'), 6.77 (1H, sa, H-3'), 7.60 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-6'), 12.28 (1H, s, OH); RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 21.9 (4'-CH₃), 26.4 (2-CH₃), 117. 5 (C-5'), 118.3 (C-3'), 120.2 (C-4'), 130.6 (C- 6'), 148.1 (C-1'), 162.5 (C-2'), 203.8 (C-1); EM-IE- m/z 150 [M]⁺ (60), 135 (100), 107 (10), 105 (4), 77 (15), 63 (4), 43 (10).

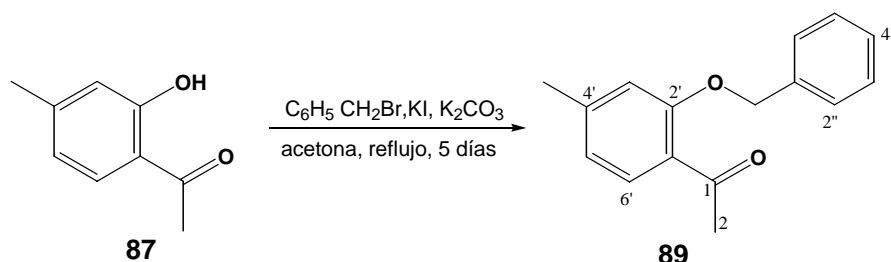
4.8.3. Síntesis de 2-metoxi-4-metilacetofenona (88).



En un matraz bola provisto de un aparato de agitación magnética y un baño de hielo se mezcló 1 g (6.6 mmol) de **87** con una solución de NaOH (0.28 g en 2,6 mL de agua) por 5 minutos. Posteriormente, se agregaron lentamente x 5 minutos 0.95 mL (9.9 mmol) de (CH₃)₂SO₄; manteniendo una agitación vigorosa. Finalizada la adición, la mezcla de reacción se mantuvo en agitación y temperatura ambiente por 5 hr. Pasado este tiempo se adicionó hielo, se filtró y lavo el precipitado con una solución de NaOH (10%). El sólido obtenido fue purificado por cromatografía en columna [50 g gel de sílice, hexano-AcOEt (9:1)] para dar 0.74 g del producto **88** como un sólido *vitreo* (68% de rendimiento).

2-metoxi-4-metilacetofenona, (88) UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 253 (4.07), 304 (3.71) nm; IR ν_{\max} (película) 2923, 1656, 1604, 1257, 1169, 1031, cm^{-1} ; RMN- ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 2.36 (3H, s, 4'- CH_3), 2.57 (3H, s, 2- CH_3), 3.87 (3H, s, - OCH_3), 6.74 (1H, da, H-3'), 6.79 (1H, dd, $J=8.1, 1.7$ Hz, H-5'), 7.65 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-6'); EM-IE m/z 164 [M] $^+$ (70), 149 (100), 134 (15), 119 (10), 106(27), 91 (53), 77 (26), 65 (12), 43 (8).

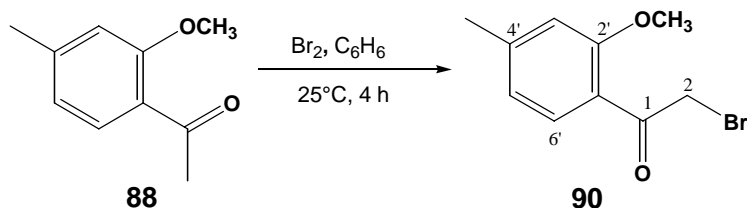
4.8.4. Síntesis de 2-benziloxi-4-metilacetofenona (89).



En un matraz bola de dos bocas de 150 mL provisto de un refrigerante, un embudo de adición, un aparato de agitación magnética y una canasta de calentamiento, se colocaron 2.5 g (16.65 mmol) de la hidroxiacetofenona **87**, 3.98 g (28.80 mmol) de K_2CO_3 y 0.398 g (5.527 mmol) de KI y se disolvieron en 100 mL de acetona anhidra. Posteriormente, se agregó 2.13 mL (18.0 mmol) de bromuro de bencilo. Terminada la adición, el matraz se puso bajo atmósfera de nitrógeno, se calentó a reflujo y se agitó vigorosamente por 5 días. El producto obtenido se filtró y lavó en repetidas ocasiones con acetona. Las aguas madres se concentraron y el crudo obtenido se separó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con una mezcla de elusión de hexano: AcOEt (9:1). De las fracciones más polares se obtuvieron 3.36 g (83.9 % de rendimiento) de un sólido vítreo blanco (**89**).

2-benziloxi-4-metilacetofenona (89). p.f 53°C ; UV (CH_2Cl_2) λ_{\max} (log ϵ) 252 (4.19), 301 (3.8), 305 (3.82) nm; IR ν_{\max} (KBr) 2947, 1660, 1604, 1408, 1254, 1170, 997, 698 cm^{-1} ; RMN- ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 2.37 (3H, s, 4'- CH_3), 2.57 (3H, s, 2- CH_3), 5.14 (2H, s, O- CH_2), 6.83 (1H, da, $J=7.8$ Hz, H-5'), 6.82 (1H, sa, H-3'), 7.47-7.40 (5H, m, H-2''- H-6''), 7.71 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-6'); RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 21.9 (4'- CH_3), 32.1 (C-2), 70.6 (O- CH_2), 113.5 (C-5'), 121.8 (C-3'), 125.9 (C-4'), 127.6, 128.2, 128.7 (C-2''-C-6''), 130.6 (C-6'), 136.3 (C-1''), 144.7 (C-1'), 158.3 (C-2'), 199.2 (-CO); EM-IE m/z 240 [M] $^+$ (95), 225 (27), 197(32), 195 (3), 162 (4), 135 (44), 119 (7), 91 (100), 77 (26), 65 (41), 43 (12).

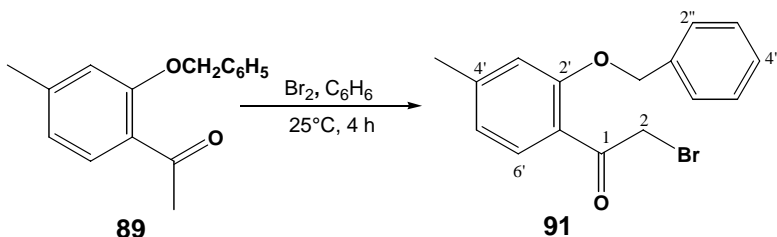
4.8.5. Síntesis de 2-Metiloxi- ω -bromo-4-metilacetofenona (90).



En un matraz bola de 50 mL provisto de una aparato de agitación magnética y un baño de hielo se colocaron 5 g (4.04 mmol) de la acetofenona **88** y se disolvieron en 10 mL de benceno anhidro y se agregaron gota a gota 0.15 mL de Br₂ (3.04 mmol) disueltos previamente en benceno. La mezcla se mantuvo en atmósfera de nitrógeno y agitación vigorosa por 4 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo la mezcla se concentró *in vacuo*. El sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice utilizando una mezcla de hexane-AcOEt (97:3) para obtener finalmente 0.31 g (36 % de rendimiento) del intermediario **90**.

2-Metiloxi- ω -bromo-4-metilacetofenona (90). IR (película) ν_{\max} 1675, 1600, 1500, 1200 cm⁻¹; RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 2.40 (3H, s, 4'-CH₃), 3.85 (3H, s, -OCH₃), 4.7 (2H, s, -CH₂Br), 6.86 (1H, m, H-3'), 6.87 (1H, da, $J = 7.2$ Hz, H-5'), 7.76 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6'); EM-FAB⁺ m/z 243, 245 [M+H]⁺ (20, 16).

4.8.6. Síntesis de 2-Benziloxi- ω -bromo-4-metilacetofenona (91).

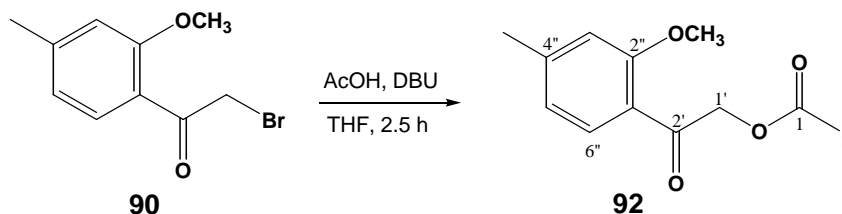


En un matraz bola de 50 mL provisto de una aparato de agitación magnética y un baño de hielo se colocaron 2 g (8.33 mmol) de la acetofenona (**89**) y se disolvieron en 15 mL de benceno anhidro. Posteriormente se agregaron gota a gota 0.427 mL (8.33 mmol) de Br₂ disueltos previamente en 10 mL de benceno. El matraz se puso bajo atmósfera de nitrógeno, se mantuvo en agitación y se calentó a 40 °C por cuatro horas. Pasado este tiempo, se concentró a sequedad y la mezcla obtenida se separó por cromatografía en

columna abierta sobre gel de sílice usando como eluyente una mezcla de hexano: AcOEt 97:3. De las primeras fracciones se obtuvieron 0.98 g (40% de rendimiento) un sólido blanco (**91**).

2-Benziloxi- α -bromo-4-metilacetofenona (91). p.f. 84 °C. IR (KBr) ν_{\max} 1676, 1601, 1494, 1418, 1267, 1180, 1119, 991 cm^{-1} ; RMN- ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 2.40 (3H, s, 4'- CH_3), 4.51 (2H, s, H-2), 5.17 (2H, s, Ar- CH_2O), 6.86 (1H, m, H-3'), 6.87 (1H, da, $J = 7.2$ Hz, H-1'), 7.45-7.39 (5H, m, H-2''-H-6''), 7.76 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6'); RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 22 (- CH_3), 37.6 (- CH_2Br), 70.9 (Ar CH_2O), 113.3 (C-5'), 122.3 (C-4'), 122.5 (C-3'), 127.8, 128.5, 128.8 (C-2''-C-6''), 131.8 (C-6'), 135.7 (C-1''), 146.0 (C-1'), 158.0 (C-2'), 193 (-CO); EM-FAB $^+$ m/z 319, 321 [M + H] $^+$ (10, 8), 239 (15), 149 (40), 91 (100), 69 (34), 43 (44).

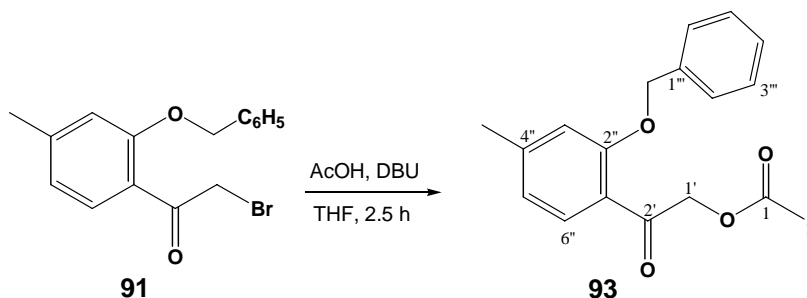
4.8.7. Síntesis del acetato de 2'-(2''-metoxi-4''-metilfenil)-2'-oxoetilo (**92**).



En un matraz bola de dos bocas de 50 mL provisto de un aparato de agitación magnética, se disolvieron 0.20 mL (4.3 mmol) de AcOH glacial en 7 mL de tetrahidrofurano anhidro (THF). Manteniendo la mezcla en agitación vigorosa, a continuación se agregaron 0.65 mL (4.3 mmol) de DBU (1, 8-diazabiclo[5.4.0]-undec-7-eno); la mezcla se mantuvo en atmósfera de nitrógeno y se dejó agitando a temperatura ambiente por un tiempo aproximado de tres minutos. Posteriormente, se agregaron, lentamente, 0.2 g (2.88 mmol) de la α -bromoacetofenona **90** disueltos previamente en 5 mL de THF. Finalizada la adición, la reacción se mantuvo por 2.5 horas a temperatura ambiente y después el disolvente se eliminó *in vacuo* para dar un crudo que se disolvió en CH_2Cl_2 ; y se realizaron extracciones con una solución de NaHCO_3 . La fase orgánica se concentró a sequedad y el producto obtenido se purificó por cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice, utilizando una mezcla de hexano: AcOEt (80:20). Finalmente se obtuvieron 0.48 g (76 % de rendimiento) del intermediario **92**, en forma de sólido vitreo.

Acetato de 2'-(2''-metoxi-4''-metilfenil)-2'-oxoetilo (92). IR (película) ν_{\max} 1735, 1678, 1605, 1404, 1236, 1172 cm^{-1} ; RMN- ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 2.21 (3H, s, H-2), 2.38 (3H, s, 4''-CH $_3$), 3.93 (3H, s, -OCH $_3$), 5.22 (2H, s, H-1'), 6.78 (1H, da, $J = 8.1$ Hz, H-5''), 6.85 (1H, da, $J = 1.2$ Hz, H-3''), 7.85 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6''); RMN- ^{13}C (CDCl_3 , MHz) δ 20 (C-2), 22 (Ar-CH $_3$), 55 (-OCH $_3$), 70 (C-1'), 112 (C-3''), 113 (C-4''), 122 (C-5''), 131 (C-6''), 146 (C-1''), 160 (C-2''), 171 (C-1), 192 (C-2'); EM-IE m/z 222 [M] $^+$ (15), 207 (19), 197 (2), 195 (1), 161(4), 135 (4), 134 (5).

4.8.8. Síntesis del acetato de 2'-(2''-benzoil-4''-metilfenil)-2'-oxoetilo (93).

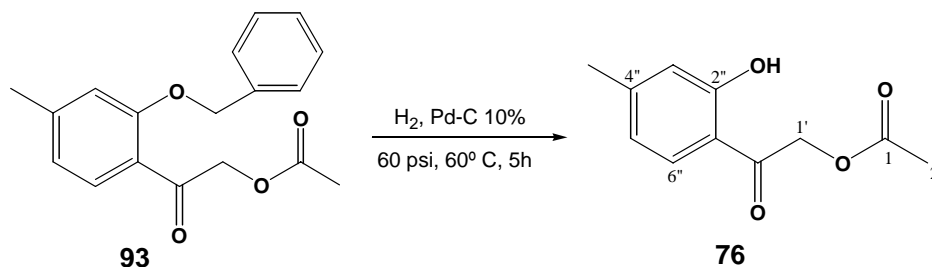


En un matraz bola de 50 mL provisto de un aparato de agitación magnética, se disolvieron 0.402 mL (7.031 mmol) de AcOH glacial en 10 mL de tetrahidrofurano anhidro (THF). A continuación se agregaron 1.05 mL (7.031 mmol) de DBU; la mezcla mantuvo en atmósfera de nitrógeno y se dejó agitando a temperatura ambiente por un tiempo aproximado de tres minutos. Posteriormente, se agregaron 1.5 g (4.68 mmol) de la α -bromoacetofenona **91** previamente disuelta en THF. Finalizada la adición, la mezcla se dejó en agitación por un tiempo aproximado de dos horas y media a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Pasado este tiempo la mezcla de reacción se concentró a sequedad y el precipitado obtenido se disolvió en CH_2Cl_2 para realizar dos extracciones con una solución de NaHCO_3 . La fase orgánica se concentró a sequedad y el sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice, utilizando una mezcla de hexano: AcOEt (80:20) y se obtuvieron finalmente 1.15 g el producto **93** como un sólido blanco cristalino (82.45 % de rendimiento).

Acetato de 2'-(2''-benzoil-4''-metilfenil)-2'-oxoetilo (93). p f. 73°C; UV (CH_2Cl_2) λ_{\max} (log ϵ) 253 (4.14), 308 (3.7) nm; IR (KBr) ν_{\max} 1735, 1678, 1605, 1404, 1236, 1172, 815 cm^{-1} ; RMN- ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 2.17 (3H, s, H-2), 2.39 (3H, s, Ar-CH $_3$), 5.15 (2H, s, CH $_2$),

5.16 (2H, s, CH₂), 6.86 (1H, da, *J* = 1.2 Hz, H-5''), 6.82 (1H, da, *J* = 7.8 Hz, H-3''), 7.47-7.26 (5H, m, H-2'''-H-6'''), 7.87 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-6''); RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 20.6 (-CH₃), 21.9 (-CH₃), 70.1 (CH₂), 70.87 (CH₂), 113.2 (C-5''), 122.2 (C-4''), 122.3 (C-3''), 127.9, 128.5, 128.9 (C-2'''-C-6'''), 131.2 (C-6''), 135.7 (C-1'''), 146.2 (C-1''), 158.8 (C-2''), 170.5 (C-1), 192.2 (C-2''); EM-IE *m/z* 298 [M]⁺ (2), 238 (30), 225 (92), 197 (2), 135 (4), 134 (5), 91 (100).

4.8.9 Preparación del acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxoetilo (76).



En un frasco de hidrogenación de 500 mL se suspendieron, bajo atmósfera de nitrógeno, 1.0 g de acetoxibencilacetofenona **93** (3.3 mmol) en 100 mL de AcOEt y 0.1 g del catalizador Pd/C (10%). El frasco se acopló al hidrogenador y se eliminó el aire presente en la botella mediante la administración de hidrógeno (30 lb/plg² x 3 veces) seguido de la expulsión por succión con vacío. Una vez instalado el frasco en el sistema de hidrogenación, la mezcla se cargó con hidrógeno (60 lb/plg²) y fue calentada a 60 °C por 5 horas. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se filtró al vacío sobre papel filtro y celita para eliminar el catalizador. Las aguas madres se concentraron *in vacuo* y la mezcla resultante se purificó por cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice utilizando hexano: AcOEt (80:20) como mezcla de elusión para dar 0.564 g (57 % de rendimiento) de la hofmeisterina (**76**).

Los datos espectroscópicos y espectrométricos fueron idénticos al producto natural.

4.9 CÁLCULOS DE MODELADO MOLECULAR.

La optimización de la geometría para los compuestos **79** y **80** se realizó utilizando cálculos de campo de fuerza MMFF94 implementados en el programa Spartan'04.

Primeramente, una búsqueda conformacional sistemática para los compuestos **79** y **80** se realizó con ayuda de modelos de Dreiding considerando el movimiento de los ángulos de torsión a *ca.* 60°, los valores de E_{MMFF} se utilizaron como criterio convergente. Posteriormente se llevo a cabo una búsqueda usando un protocolo Monte Carlo (Chang, *et al.*, 1989) obteniendo una selección de estructuras de mínima energía con valores relativos entre 0 a 3 kcal/mol las cuales fueron optimizadas por DFT a un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP usando el programa Gaussian 03W (Godbout, *et al.*, 1992). Los cálculos de las frecuencias en el infrarrojo se realizaron con el mismo nivel de teoría a 298 K y 1 atm.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente proyecto de investigación se desarrolló de acuerdo a la estrategia metodológica siguiente: En primer lugar se realizó la selección primaria de la especie *Hofmeisteria schaffneri* como una fuente potencial de principios fitotóxicos utilizando las estrategias convencionales. A continuación se realizó el aislamiento y la caracterización estructural de los productos puros aislados a partir de los distintos extractos obtenidos de *H. schaffneri*, así como la determinación de las propiedades fitotóxicas y anti-CaM de los productos obtenidos. Por último, se analizó la composición química de los aceites esenciales fitotóxicos preparados a partir de material vegetal recolectado en distintas épocas del año. En las siguientes secciones se presentaran y discutirán de manera detallada los resultados obtenidos en las distintas fases del trabajo.

5.1 SELECCIÓN PRIMARIA DE LA ESPECIE VEGETAL *H. SCHAFFNERI* COMO UNA FUENTE POTENCIAL DE PRINCIPIOS FITOTÓXICOS.

La selección primaria de la especie *H. schaffneri* como una fuente de agentes fitotóxicos se realizó considerando los criterios quimitaxonómico y etnomédico de selección de materias primas para el descubrimiento de agentes herbicidas potenciales (Cutler y Cutler, 1998).

El criterio quimiotaxonómico tiene su fundamento en el hecho de que en múltiples ocasiones se han aislado productos con importantes actividades biológicas de especies de la familia Asteraceae (Compositae). En esta familia en particular, el número de agentes fitotóxicos con una gran variedad estructural es relevante (Liu, *et al.*, 2006; Chon, *et al.*, 2003; Mata, *et al.*, 2002a; Kumbhar, 2001; Macias, *et al.*, 2000; Van Puyvelde, *et al.*, 1999; Mata, *et al.*, 1999; Bagchi; *et al.*, 1998; *inter alia*).

El criterio etnomédico se apoya en el hecho de que las plantas de amplio uso en las prácticas médicas tradicionales para el tratamiento de múltiples patologías constituyen una fuente invaluable de principios biodinámicos incluyendo aquellos con propiedades de interés agroquímico (Cutler y Cutler, 1998; Heinrich, 1998; Moerman, 1991; Valencia-islas, *et al.*, 2002;

Hernández-Romero, *et al.*, 2005). De tal forma que muchas especies medicinales, por ejemplo *Artemisia annua*, *Hypericum perforatum*, *Arnica montana*, biosintetizan productos con propiedades herbicidas potenciales.

Una vez seleccionada la especie vegetal, se realizaron las pruebas biológicas preliminares de fitotoxicidad para determinar el efecto sobre la germinación y crecimiento radicular de semillas de la arvense *Amaranthus hypochondriacus* utilizando la prueba de germinación y crecimiento radicular en caja de Petri (Anaya, *et al.*, 1990). Los ensayos se realizaron con dos extractos orgánicos, uno acuoso y cinco aceites esenciales preparados a partir de material vegetal recolectado en diferentes épocas del año. Los resultados de estas evaluaciones se resumen en la Tabla 17 y los mismos permitieron establecer el potencial fitotóxico de la planta. Como control positivo se utilizó un extracto clorofórmico de *Ipomoea tricolor*, planta medicinal ampliamente utilizada en la agricultura mexicana como cultivo de cobertura (Anaya, *et al.*, 1990). El extracto acuoso de *H. schaffneri* mostró una actividad similar al extracto de *Ipomoea*, en tanto que los extractos orgánicos y los aceites fueron aún más activos.

Tabla 17. Efecto de los extractos y aceites esenciales obtenidos de *H. schaffneri* sobre la germinación y crecimiento radicular de la arvense *A. hypochondriacus*.

Extracto	Cl ₅₀ (µg/mL)
Extracto orgánico Lote I	52.54
Extracto orgánico Lote II	59.09
Extracto acuoso	126.0
Aceite esencial III	89.37
Aceite esencial IV	28.38
Aceite esencial V	93.45
Aceite esencial VI	44.02
Aceite esencial VII	56.5
Extracto clorofórmico de <i>I. tricolor</i>	120.3

5.2 AISLAMIENTO DE LOS PRINCIPIOS FITOTÓXICOS A PARTIR DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE *H. SCHAFFNERI*.

Con la finalidad de obtener los productos fitotóxicos, los extractos activos (dos orgánicos y un acuoso) se fraccionaron de manera preliminar mediante una cromatografía preparativa, en columna sobre gel de sílice o sephadex. En el caso los extractos orgánicos, las fracciones primarias resultantes se evaluaron también para determinar su efecto sobre la germinación y crecimiento radicular de semillas de amaranto utilizando el método de la caja de Petri. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 18. Del extracto orgánico del Lote I, las fracciones más activas fueron **F-4** a **F-6** y del lote II las fracciones **F3** y **F4**. Posteriormente las fracciones primarias activas obtenidas en cantidades suficientes se sometieron a sucesivas separaciones cromatográficas, dirigiendo el estudio mediante un ensayo bioautográfico (Anaya, *et al.*, 1990). Estas separaciones finalmente conllevaron a la obtención de 14 metabolitos secundarios: el timol (**105**), ácido angélico, euparina, β -sitosterol, β -caroteno, y nueve derivados del timol (**76-84**) cuyas estructuras, y datos relacionados con su aislamiento se resumen en la Tabla 19.

Tabla 18. Efecto de los extractos orgánicos y fracciones primarias sobre la germinación y crecimiento radicular (CI_{50} , $\mu\text{g/mL}$) de la arvense *A. hypochondriacus*.

Fracción	Extractos orgánicos	
	I	II
Extracto	52.54	59.09
F1	113	134.3
F2	75.8* ^a	112.7
F3	63.1* ^a	75.7*
F4	52.7*	46.2*
F5	45.4*	149.0
F6	47.2*	150.2
F7	154.9	127.9
F8	100.5	498.4
F9	258.8	>1000
10	589.5	-
F11	>1000	-
F12	>1000	-

*Fracciones activas. ^aNo se estudiaron debido a lo escaso de las muestras.

5.3 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE *H. SCHAFFNERI*.

La determinación de las estructuras moleculares de los compuestos aislados se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y modelado molecular (Breitmaier, 2002; Mohan, 2000; Silverstein y Webster, 1998; Joseph-Nathan, *et al.*, 1984).

En el caso de los derivados del timol, el análisis detallado de las propiedades físicas y espectroscópicas de los compuestos **77**, y **80-83**, permitió constatar que sus estructuras ya habían sido reportadas anteriormente. Los nombres de estos productos y sus estructuras se indican en la Tabla 19.

Los compuestos **76**, **78**, **79** y **84** resultaron análogos naturales nuevos. En el caso del compuesto **78**, la estructura se confirmó inequívocamente mediante un análisis de Rayos X y para la estructura **76** por síntesis. A continuación se discutirá la elucidación estructural de estos cuatro compuestos.

Tabla 19. Metabolitos derivados del timol aislados de *H. schaffneri*.

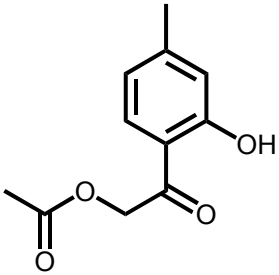
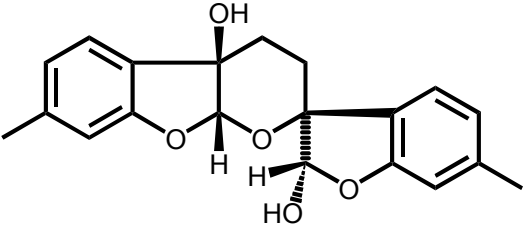
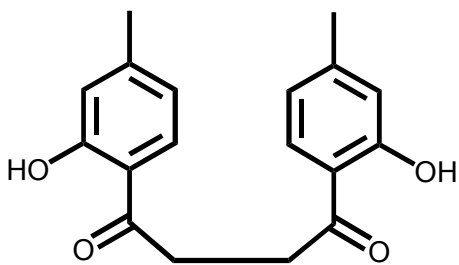
METABOLITO AISLADO	Extracto y fracción de origen	COMENTARIOS
 <p data-bbox="370 1444 570 1472">Hofmeisterina (76)</p>	<p data-bbox="850 1255 1036 1335">Extracto orgánico Lote I/F4 (7 mg)</p>	<p data-bbox="1084 1255 1474 1304">Estructura no reportada previamente en la literatura.</p>
	<p data-bbox="850 1583 1036 1663">Extracto orgánico Lote I/F4 (72 mg) Lote II/F4 (22 mg)</p>	<p data-bbox="1084 1556 1484 1692">Previamente aislado de las partes aéreas de <i>Arnica schalinensis</i> (Pasreiter, <i>et al.</i>, 1999). Este es el segundo reporte del aislamiento de este producto.</p>
<p data-bbox="180 1749 760 1797">1',4',4a',9a'-tetrahydro-6',7'-dimetil-espiro[benzofuran-3(2H),2'-pirano[2,3-b] benzofuran]-2, 4a'-diol (77)</p>		

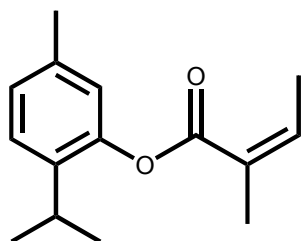
Tabla 19. (Cont.)



hofmeisterina II (78)

Extracto orgánico
Lote I/F4 (32 mg)

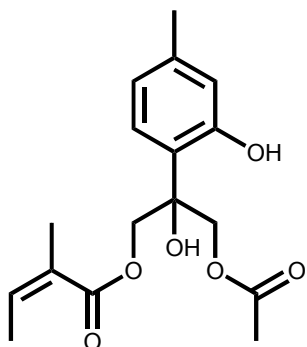
Estructura no reportada previamente
en la literatura como producto
natural.



hofmeisterina III (79)

Extracto orgánico
Lote II/F3
(600 mg)

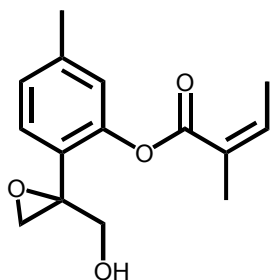
Estructura no reportada previamente
en la literatura.



(2Z)-2-metilbut-2-enoato de 2-hidroxi-2-(2-hidroxi-4-metilfenil)-
(isopropeniloxi) propilo (80)

Extracto orgánico
Lote II/F4
(79 mg)

Previamente aislado de las partes
aéreas de *Eupatorium fortunei*
(Tori, *et al.*, 2001).

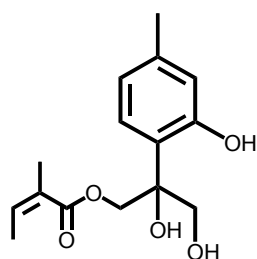


(2Z)-2-Metilbut-2-enoato de 2-[2-(Hidroximetil)oxiran-2-il]-5-
metilfenilo (81)

Extracto acuoso
D-10
(15 mg)
aceite

Previamente aislado de las partes
aéreas de *Eupatorium fortunei* (Tori,
et al., 2001).

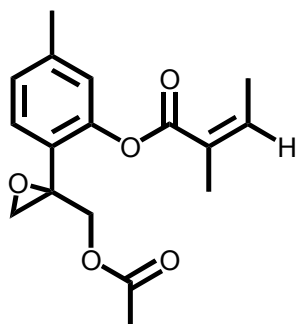
Tabla 19. (Cont.)



(2Z)-2-Metilbut-2-enoato de 2,3-dihidroxi-2-(2-hidroxi-4-metilfenil)propilo (**82**)

Extracto acuoso
D-16
(15 mg)
aceite

Previamente aislado de un extracto acuoso de las partes aéreas de *Eupatorium stoechadosmum*. (thi Diem Trang, *et al.*, 1993).



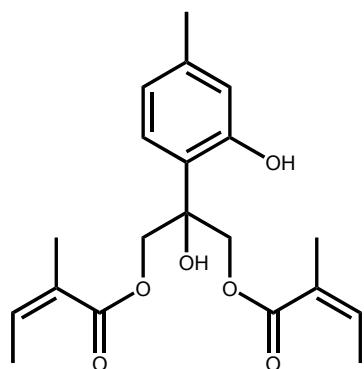
(2Z)-2-Metilbut-2-enoato de 2-[2-(Acetoximetil)oxiran-2-il]-5-metilfenilo (**83**)

Extracto acuoso
D-10
(8 mg)
aceite

Previamente aislado de las partes aéreas de un extracto acuoso de *Eupatorium stoechadosmum* (thi Diem Trang, *et al.*, 1993).

Doronicum hungaricum (raíces). (Bohlmann, *et al.*, 1980).

Eupatorium kiirunense, hojas, extracto con acetona (Ya-Ching, *et al.*, 2005).



hofmeisterina IV (**84**)

Extracto acuoso
D-10
5 mg

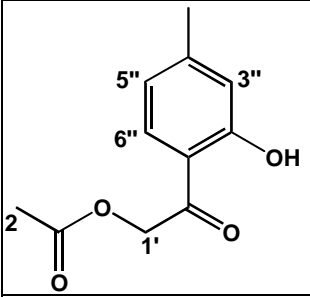
Estructura no reportada previamente en la literatura.

5.3.1 Elucidación estructural del Compuesto 76.

El compuesto **76**, se aisló como un sólido cristalino blanco soluble en diclorometano y metanol. La fórmula molecular del producto se estableció como $C_{11}H_{12}O_4$ con base en sus espectros de RMN (Espectro 1 y 2) y espectrometría de masas. En este último experimento el ión molecular se encuentra en una relación de m/z 208. El análisis integral de los espectros de RMN, IR y UV permitieron determinar su estructura como la del acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo (**76**) al cual se le dio el nombre trivial de hofmeisterina.

El espectro en el infrarrojo registrado en fase sólida presenta principalmente bandas de absorción asociadas a su carácter aromático (ν_{\max} 2930, 1570 cm^{-1}), a la presencia de un carbonilo de una cetona conjugada (1657 cm^{-1}) así como una banda de absorción débil característica para hidroxilo fenólico (3300 y 1228 cm^{-1}) (Tabla 20).

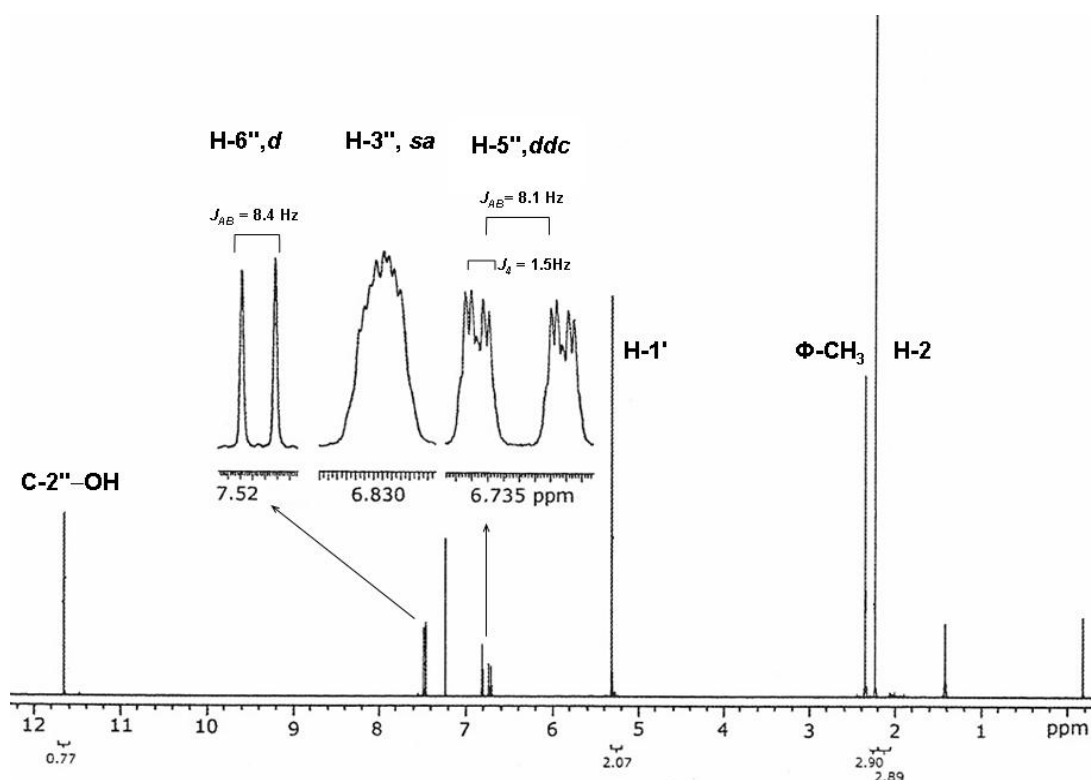
Tabla 20. Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto **76**.

	Nombre trivial: Hofmeisterina
	Nombre IUPAC: Acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo
Punto de fusión ($^{\circ}C$)	87 $^{\circ}C$
IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1}	3300, 2939, 1228, 1570, 1508, 931
UV λ_{\max} [nm] (log ϵ)	328 (3.78), 263 (3.30)
EM-IE m/z (int. rel.)	208 [M^+ (33)], 166 (48), 149 (18), 135 (100), 119 (6), 107 (21), 91 (3); 77 (21), 53(5), 43 (15).

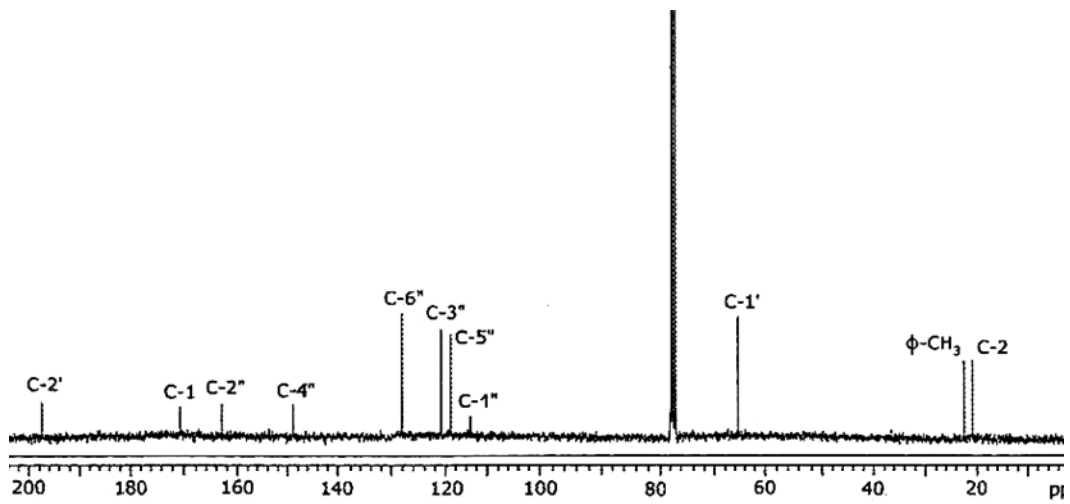
En δ_H 11.8 (C-2''-OH) se aprecia un singlete típico de un protón fenólico que forma un puente de hidrógeno con un grupo carbonilo. En la región aromática del espectro de RMN- 1H se aprecian las señales de un sistema ABX, característico del anillo aromático del timol y sus derivados, a δ_H 7.49 [H-6'' (d , $J = 8.4$ Hz)], δ_H 6.83 [H-3'' (sa)] y δ_H 6.73 [H-5'' (ddc , $J = 0.6, 1.5, 8.1$ Hz)]. Cada una de estas señales correlacionan en el espectro HETCOR con las encontradas en δ_C 128 (C-6''), 121 (C-3'') y 119 (C-5''), respectivamente. En δ_H 5.33 (H-1') se observa un singlete que

integra para dos protones asignables a un metileno unido a una función oxigenada y al grupo carbonilo conjugado detectado en el IR (Tori, *et al.*, 2001). Finalmente, en la región comprendida entre δ_H 2.4 y 2, se encuentran dos señales para grupos metilos en δ_H 2.36 y 2.24 asignables al metilo sobre anillo aromático y al de un grupo acetilo. Las señales correlacionan en el espectro HETCOR con aquellas en δ_C 22 y 20, respectivamente.

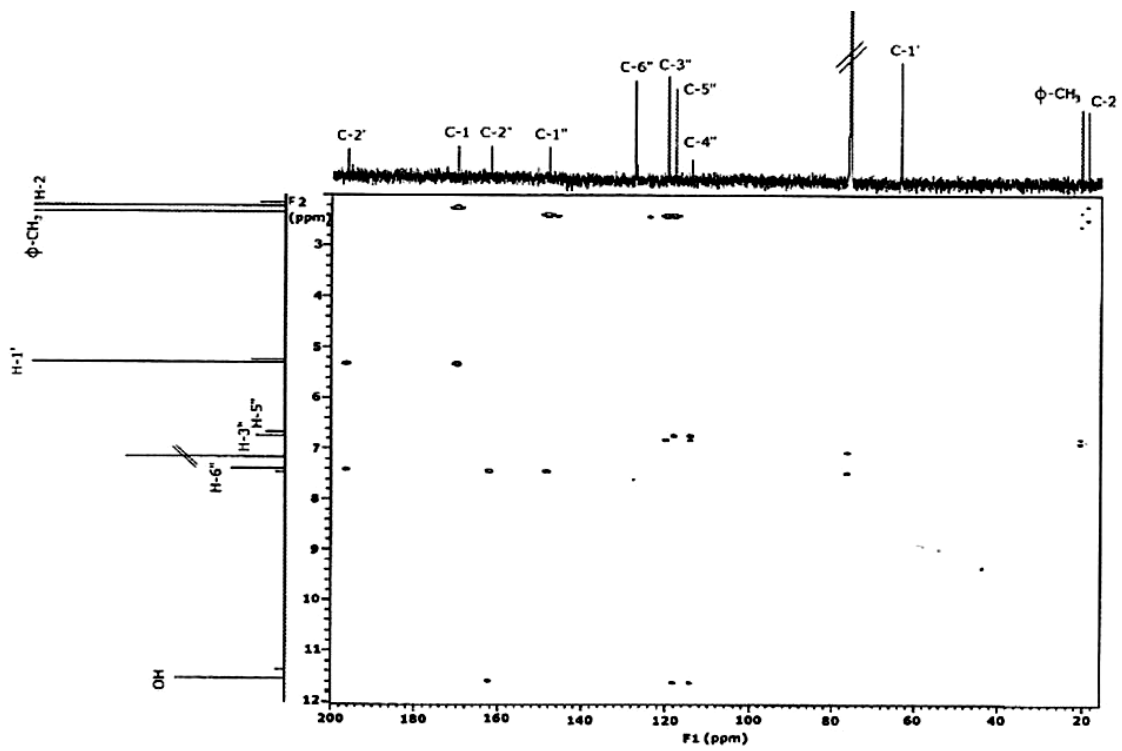
El espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 2) permitió identificar la presencia de 11 carbonos. A partir de las correlaciones HETCOR se pudo asignar directamente aquellos carbonos que se encuentran protonados. De esta manera se estableció la presencia de tres carbonos cuaternarios pertenecientes al anillo bencénico los cuales se asignaron a partir de las correlaciones observadas a larga distancia en el espectro HMBC (Espectro 3). Las correlaciones más importantes se muestran en la Tabla 21. Finalmente, Las señales a δ_C 196.4 (C-2') y 170.1 (C-1) se encuentran claramente asociadas a grupos carbonilos; la primera al carbonilo de la cetona y la segunda al carbonilo del residuo de ácido acético que se encuentra esterificando a un grupo hidroxilo.



Espectro 1. Espectro de RMN- 1H (300 MHz, $CDCl_3$) de la hofmeisterina (76).



Espectro 2. Espectro de RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de la hofmeisterina (76).

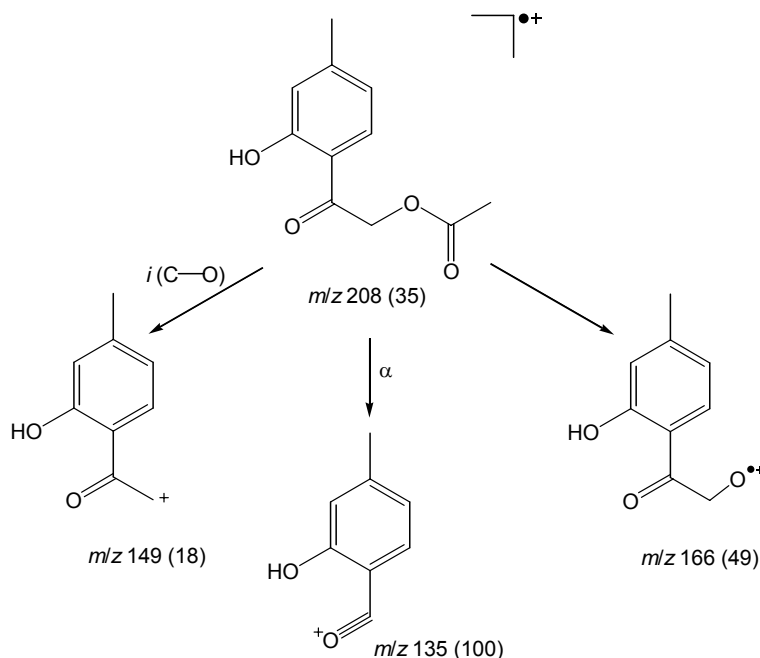


Espectro 3. Espectro HMBC de la hofmeisterina (76).

Tabla 21. Datos de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) y RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) de la hofmeisterina (**76**).

Posición	δ _C	δ _H (mult, J en Hz)	HMBC H→C
2	20	2.24 (s)	
CH ₃ -4"	22	2.36 (s)	3", 5"
1'	64	5.33 (s)	
3"	119	6.83 (sa)	-CH ₃ , 4", -OH, 5"
5"	121	6.73 (ddc, 8.1, 1.5, 0.6)	-CH ₃ , 3", 4"
6"	128	7.49 (d, 8.4)	2", 1", 2'
OH-2"	-	11.8 (s)	4", 2', 5"
4"	115	-	5", 3", -OH
1"	149	-	-CH ₃ , 6"
2"	162	-	6", -OH
1	170	-	2, 1'
2'	196	-	6", 1'

El patrón de fragmentación que se obtiene del espectro de masas esta en armonía con la presencia de la cetona y del éster acético, grupos que promueven fragmentaciones características (espectro 14, ver anexos). En este caso, el pico base (m/z 135) se genera por una ruptura homolítica inducida por el carbonilo de la cetona (McLafferty y Tureček, 1993). Así mismo, los fragmentos en m/z 166 y 149 se generan por una disociación heterolítica dirigida por el carbonilo y el oxígeno del ester, respectivamente (Esquema 1).



Esquema 1. Patrón de fragmentación de la hofmeisterina (**76**).

Con la finalidad de obtener cantidades adicionales de la hofmeisterina (76) para la realización de los ensayos biológicos, así como para comprobar su estructura molecular, se diseñó una síntesis, teniendo como estrategia principal una transposición de Fries del acetato de *m*-cresilo (86); este último se preparó a partir del *m*-cresol (85), anhídrido acético y H₂SO₄ (catalizador; dos gotas por cada equivalente de anhídrido acético) para generar el normonoterpenoide 87 que presenta el mismo esqueleto normentano que la hofmeisterina. Las condiciones para llevar a cabo la transposición de Fries están ampliamente documentadas en la literatura; éstas dan fé que la regioselectividad depende de la temperatura. Así, la formación del derivado en *orto* se favorece a temperaturas elevadas (≥ 100 °C); en cambio, a temperaturas bajas se favorece la formación del isómero *para* (Fieser y Fieser, 1944); por lo tanto, se realizaron varias pruebas a diferentes temperaturas mayores a 100 °C y a diferentes tiempos de reacción. Los mejores rendimientos se obtuvieron a 180 °C durante dos horas (Tabla 22).

Tabla 22. Condiciones de reacción probadas para la transposición de Fries.

Temperatura	Tiempo de reacción	Rendimiento* (%)
110	4 hr	56
145	4 hr	70
160	4 hr	78
180	4 hr	90
180	2 hr	91

* Promedio de varias repeticiones.

El siguiente paso en el diseño de la síntesis consistió en introducir el residuo de acetilo en la posición deseada. Para tener una quimioselectividad efectiva en la posición alfa a la cetona y generar el ester deseado fue necesario inicialmente proteger el grupo hidroxilo del fenol, lo cual se logró utilizando cloruro de bencilo en presencia de KI y K₂CO₃ para generar el intermediario alquil eter 89. Una vez protegido el fenol se realizó una bromación alfa a la cetona con este último intermediario. Existen en la literatura varias opciones para llevar a cabo reacciones de α -halogenación de cetonas, pero la más utilizada es la que se realiza con Br₂, Cl₂ o I₂ en presencia de cantidades catalíticas de un ácido (Smith y March, 2001). Inicialmente se ocupó Br₂ en ácido acético glacial, a diferentes temperaturas; luego se evaluó la opción de Br₂ en benceno, igualmente a diferentes temperaturas. Los mejores resultados, aunque en bajos rendimientos, se obtuvieron a 37°C utilizando únicamente Br₂ disuelto en Benceno o Br₂ en ácido acético glacial a

40°C. Finalmente, con la finalidad de incrementar los rendimientos se decidió utilizar N-bromosuccinimida como agente monohalogenante; sin embargo, no se logró este objetivo.

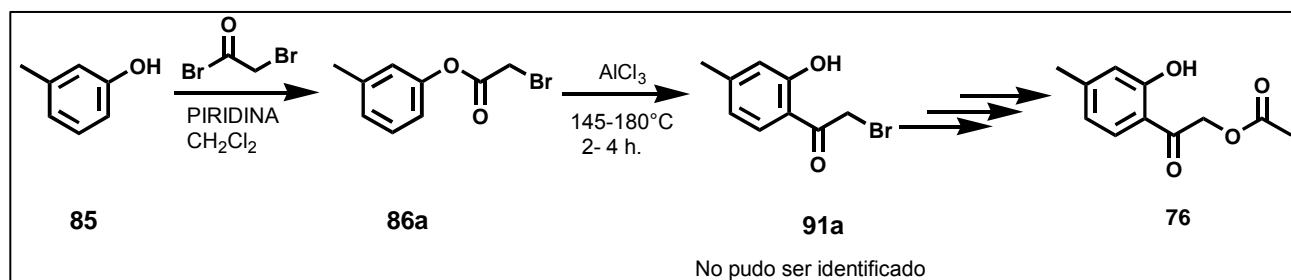
Después de todos los ensayos realizados (Tabla 23), la mejor opción fue Br₂ en benceno a temperatura ambiente; en estas condiciones fue más fácil controlar la formación del producto mono-bromado **91** con rendimientos aceptables.

Tabla 23. Condiciones de reacción ensayadas para la α-bromación para la formación del intermediario **91**

Condiciones de reacción	temperatura (°C)	Tiempo de reacción (hr)	Rendimiento* (%)
Br ₂ en benceno	4	5	no hubo transformación
Br ₂ en benceno	10	5	no hubo transformación
Br ₂ en benceno	15	5	10
Br ₂ en benceno	t.a	5	36
Br ₂ en benceno	37	3	28
Br ₂ y AcOH	t.a	3	≤ 10
Br ₂ y AcOH	40	3	28
NBS	t.a	5	no hubo transformación

* Promedio de varias repeticiones.

Cabe mencionar que inicialmente se intentó aplicar la estrategia que se resume en el Esquema 2. De igual forma la reacción se inició con **85**, que tratado con bromuro de bromoacetilo en presencia de piridina generó **86a** con un rendimiento moderado (63 %). Sin embargo, el punto crítico en esta propuesta fue la reacción de transposición de Fries para obtener **91a**. En todas las condiciones de temperatura y tiempos de reacciones ensayadas no fue posible obtener **91a**.



Esquema 2. Ruta de síntesis alternativa para preparar el producto α-bromado a la cetona.

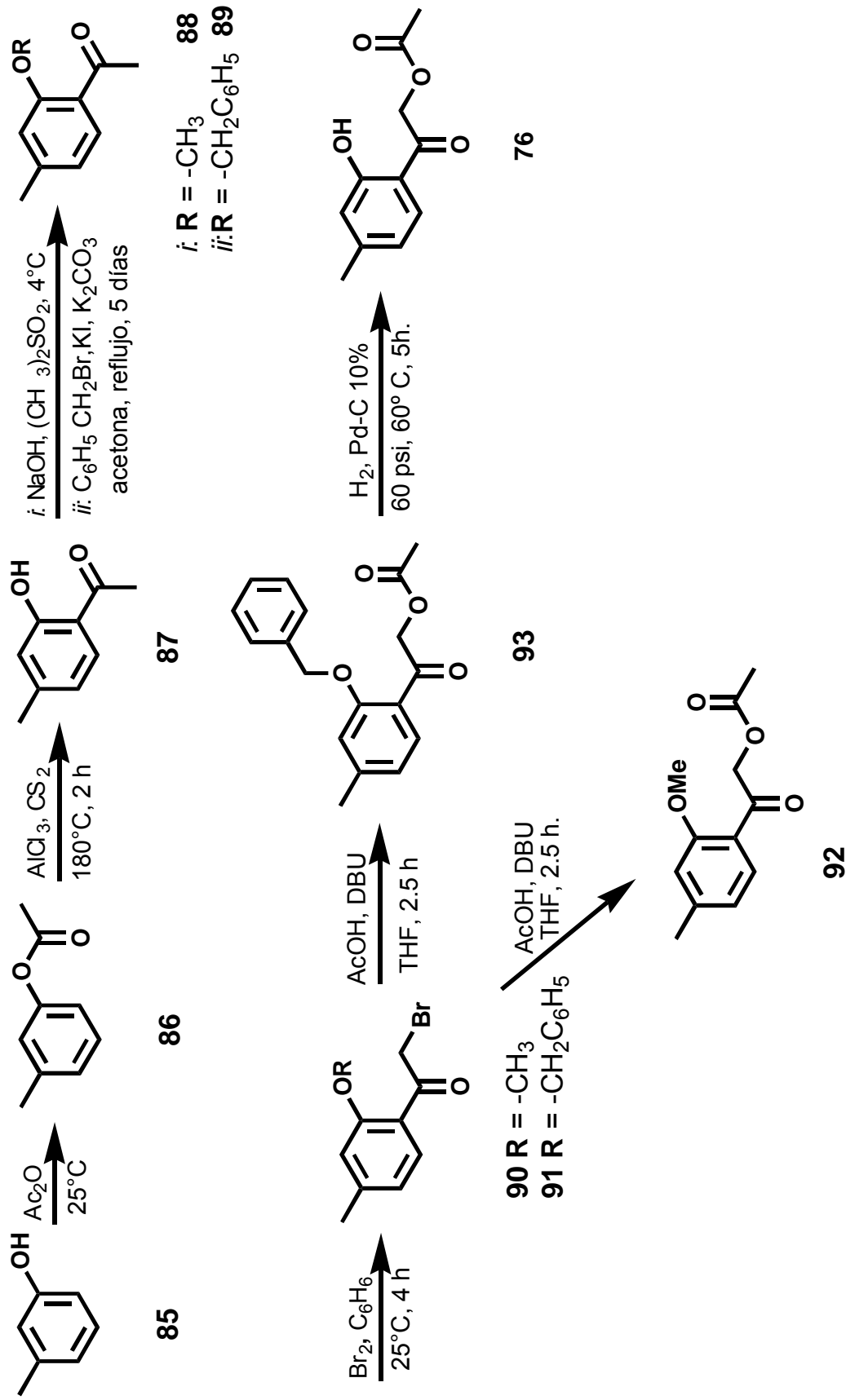
Una vez obtenido el intermediario **91** se llevó a cabo la reacción de esterificación en presencia de ácido acético. Los ácidos carboxílicos, entre otros muchos métodos, se esterifican, vía una sustitución nucleofílica por tratamiento con un halogenuro de alquilo en presencia de DBU; este último es un catalizador nucleofílico muy utilizado para esterificaciones ya que promueve la deshidrohalogenación con muy buenos resultados (Shieh, *et al.*, 2002; Smith y March, 2001; Conrad, *et al.*, 2000). La aplicación del procedimiento condujo a la formación del ester **93** con buenos rendimientos.

Finalmente la desprotección de **93** en condiciones de hidrogenación catalítica condujo a la obtención del producto natural **76** con un rendimiento (Tabla 24). De manera simultánea se preparó el derivado metilado **92** siguiendo la misma estrategia. En este caso la metilación se logró utilizando $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, como agente metilante e hidróxido de sodio como base para promover la formación del fenolato. La reacción se realizó a temperatura ambiente.

Tabla 24. Rendimientos y puntos de fusión de los compuestos sintetizados.

Compuesto	pf (°C)	Rendimiento (%)	t (h)
86	líquido	90	4
87	líquido	90	3
89	53	78	5 días
91	84	40	4
93	73	82.4	2.5
76	87	57	5
88	<40	68	5
90	-	36	4
92	<40	76	2.5

Cada uno de los intermediarios generados en la síntesis de la hofmeisterina se identificaron por sus datos espectroscópicos y espectrométricos (Breitmaier, 2002; Mohan, 2000; Silverstein y Webster, 1998; Joseph-Nathan, *et al.*, 1984). En el caso del producto **76** las propiedades espectroscópicas y físicas resultaron idénticas a las del producto natural (Esquema 3).

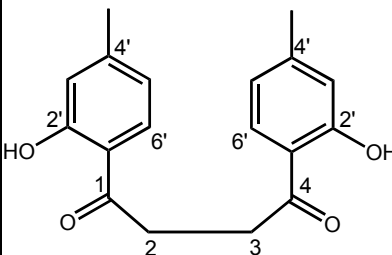


Esquema 3. Ruta de síntesis para la generación de la hofmeisterina (76) y su derivado metilado (92)

5.3.2 Elucidación estructural del compuesto (78).

El compuesto **78** se aisló como un sólido cristalino soluble en diclorometano. El espectro en el infrarrojo registrado en fase sólida presenta bandas de absorción asociadas a su carácter aromático (ν_{\max} 2930, 1570 cm^{-1}), a la presencia de un carbonilo conjugado (ν_{\max} 1632 cm^{-1}) y una banda de absorción débil característica para hidroxilo aromático (3417 cm^{-1}). En la Tabla 25 se resumen sus constantes físicas y espectroscópicas.

Tabla 25. Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto **78**.

	Nombre trivial: Hofmeisterina II
	Nombre IUPAC: 1,4-bis-[(2-hidroxi-4-metil)-fenil]-buten-1,4-diona.
Formula molecular	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_4$
Punto de fusión ($^{\circ}\text{C}$)	192-193
IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1}	3417, 2930, 1632, 1618, 1570, 1502.
UV λ_{\max} [nm] (log ϵ)	227 (4.48), 264 (4.58), 326 (4.08)
EM-IE- m/z (int. rel.):	298 [M] ⁺ (36), 280 (4), 163 (83), 135 (100), 107 (7), 77 (10).

Los espectros de RMN (Espectros 4 y 5) y masas resultaron muy similares a los registrados para la hofmeisterina (**76**). Sin embargo, la presencia de nuevas señales en el espectro de RMN- ^{13}C , la integración del espectro de RMN- ^1H para nueve protones, así como el valor del ión molecular en una relación de m/z 298 permitieron determinar que la estructura se trataba de un dímero simétrico con una fórmula molecular de $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_4$; así, el compuesto está conformado por dos unidades de 2'-hidroxi-4'-metilfenilmetilencetona. El análisis integral de los espectros de RMN, IR y UV permitieron determinar su estructura como 1,4-bis-[(2-hidroxi-4-metil)-fenil]-buten-1,4-diona, y se le dio el nombre trivial de hofmeisterina II (**78**).

Al igual que en la hofmeisterina (**76**), el espectro de RMN- ^1H presenta las siguientes señales diagnósticas:

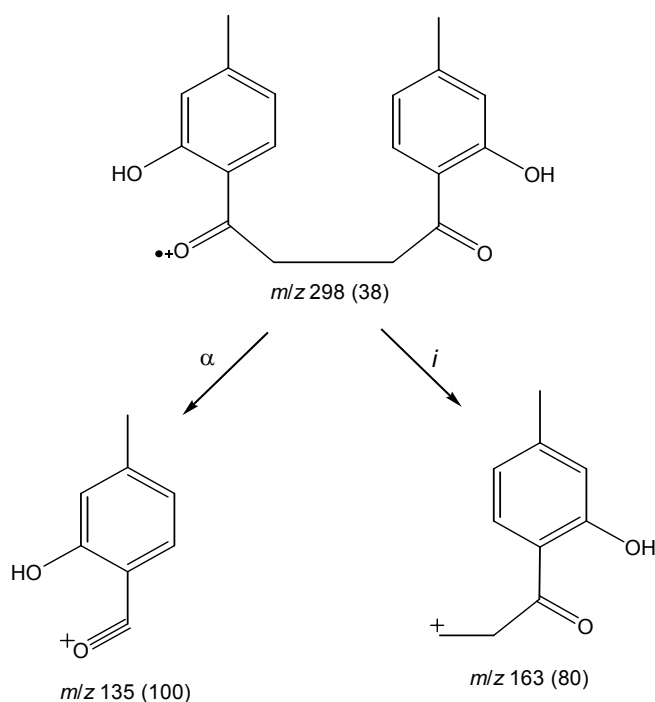
-Un sistema ABX asignable a tres metinos aromáticos en δ_H 7.76 (2H, *d*, $J= 8.1$ Hz, H-6'), 6.79 (2H, *m*, H-3') y 6.74 (2H, *ddc*, $J= 8.1, 1.5, 0.6$ Hz, H-5'), que correlacionan en el espectro HSQC con las señales en δ_C 118.5 (C-6'), 120.4 (C-3') y 117.1 (C-5').

-En δ_H 12.1 (C-2'–OH) se observa también la señal de un protón fenólico implicado en un puente de hidrogeno.

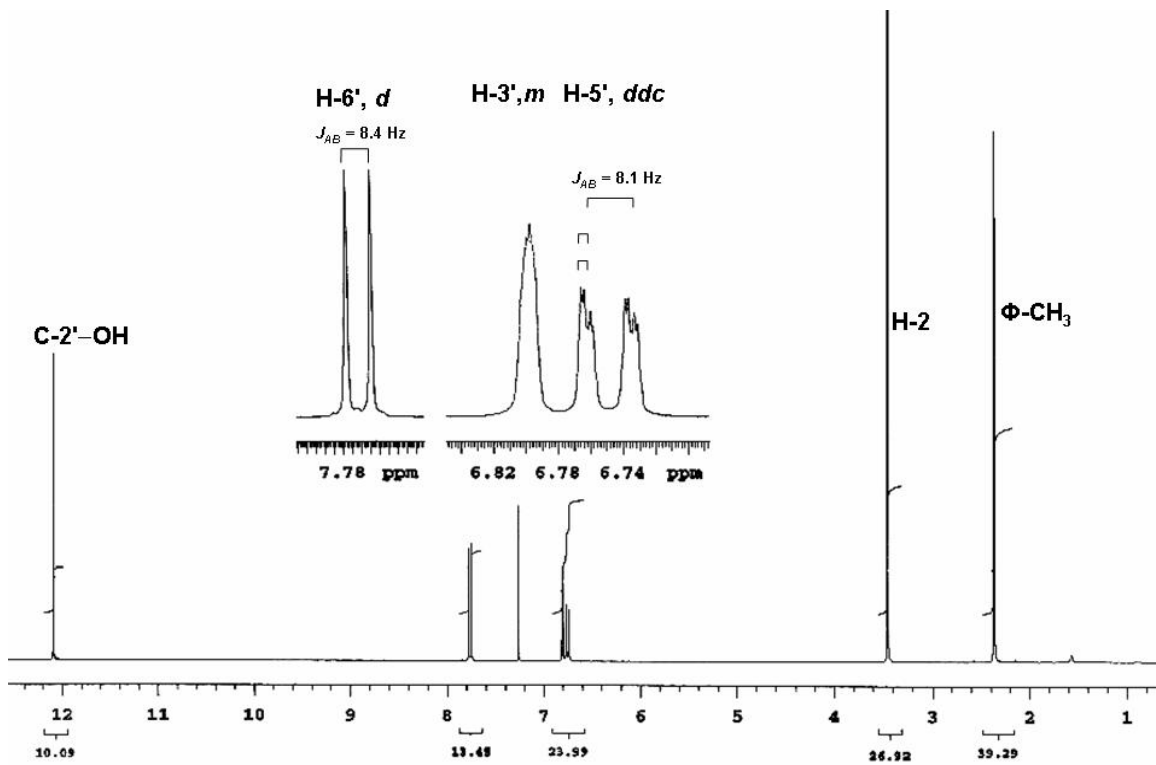
-Por último en δ_H 3.45 se observa un singulete atribuible a los dos grupos metilenos presentes en la molécula. En el espectro de RMN- ^{13}C la señal correspondiente aparece en δ_C 31.6.

La unión de las dos unidades de 2'-hidroxi-4'-metilfenilmetilencetona, así como el patrón de sustitución del anillo aromático se pudo confirmar mediante el análisis de las correlaciones a larga distancia observadas en los experimentos de correlación heteronuclear (HMBC) y homonuclear (NOESY), mismos que se resumen en la Tabla 26.

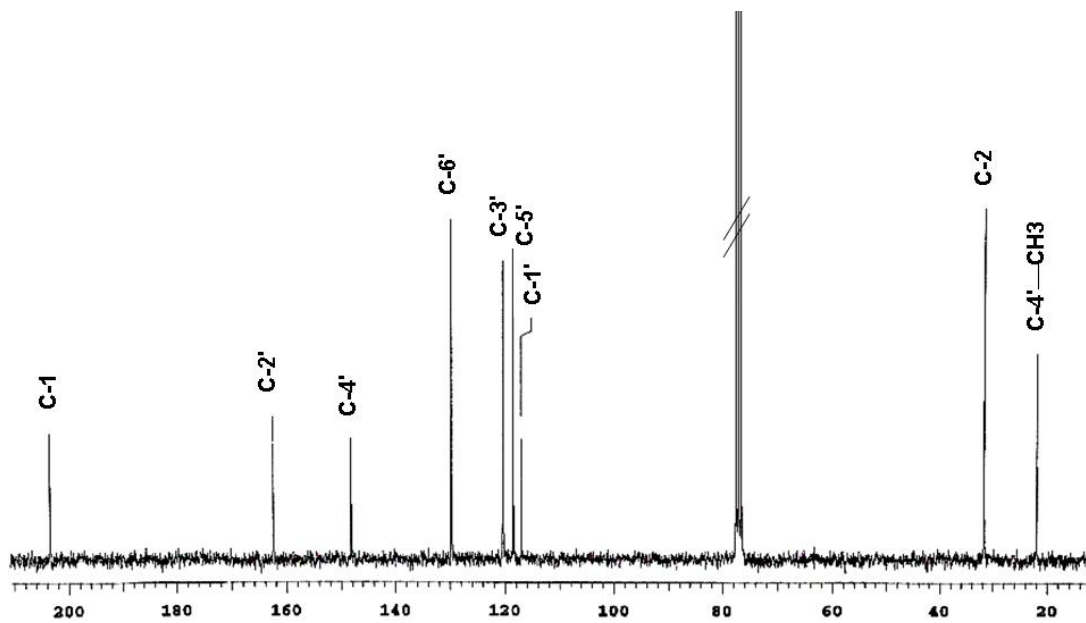
El espectro de masas de este producto resultó similar al de la hofmeisterina (espectro 15, ver anexos), encontrándose el pico base en una relación m/z de 135 (Esquema 4).



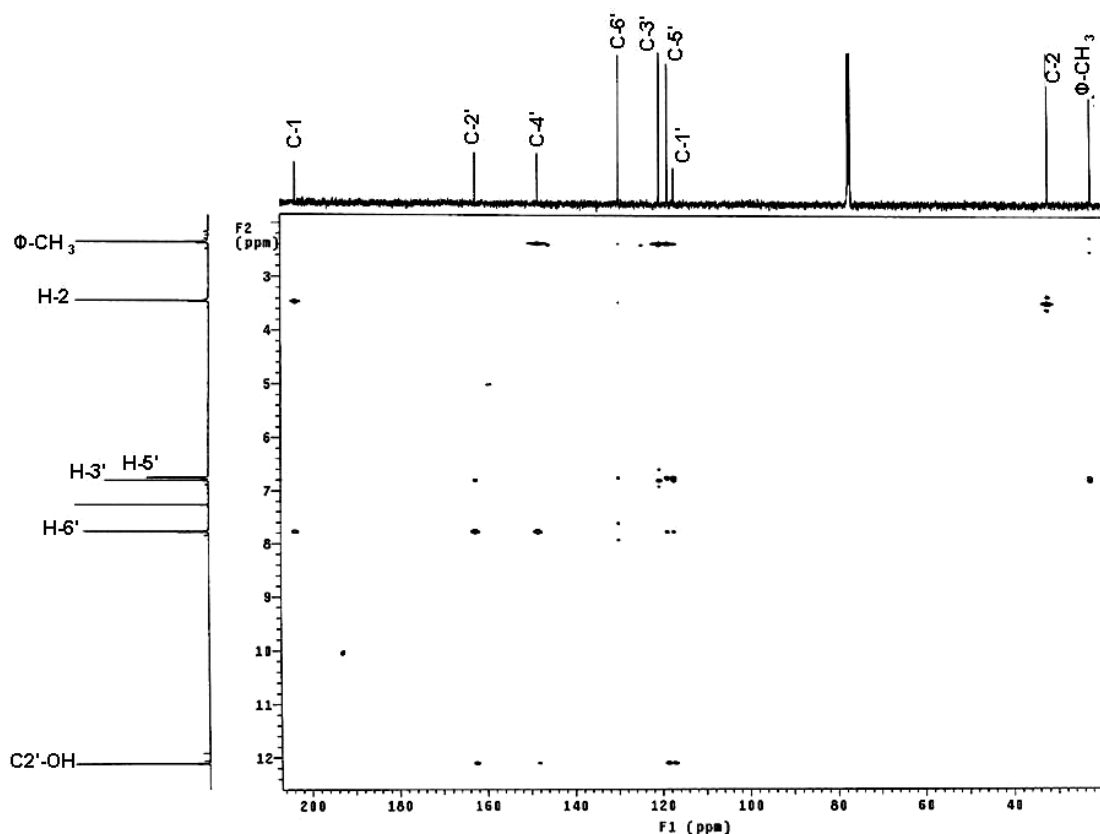
Esquema 4. Patrón de fragmentación de la hofmeisterina II (78).



Espectro 4. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) de la hofmeisterina II (78).



Espectro 5. Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) de la hofmeisterina II (78).



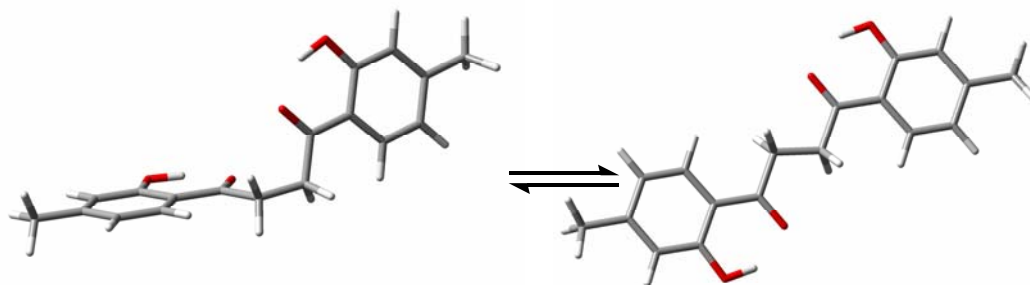
Espectro 6. Espectro HMBC de la hofmeisterina II (**78**).

Tabla 26. Datos de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) y RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) de la hofmeisterina II (**78**).

Posición	δ_C	δ_H (mult, J en Hz)	HMBC (H→C)
1	203.5	-	-
2	31.6	3.45 (s)	1, 2, 3
1'	117.1	-	-
2'	162.5	-	-
3'	120.4	6.79 (m)	2', 4', 4'-CH ₃
4'	148.2	-	-
5'	118.5	6.73 (ddc, 0.6, 1.5, 8.1)	4', 6', 4'-CH ₃
6'	129.7	7.75 (d, 8.1)	1, 1', 2', 4', 5'
4'-CH ₃	21.9	2.36 (s)	1', 3', 5'
2'-OH	-	12.09	2', 1'

Con la finalidad de analizar con mayor detalle la propuesta estructural de la hofmeisterina II (**78**), se realizó una búsqueda conformacional sistemática para este compuesto empleando el programa de modelado molecular Spartan[®]04. Los cálculos de modelado

molecular usando la teoría de funcionales de la densidad revelaron dos conformaciones principales de mínima energía (**78a** y **78b**) representadas en la Figura 11.



78a : $\rho_{\text{DFT}} = 35.52$

78b : $\rho_{\text{DFT}} = 30.14$

Figura 11. Conformeros principales de mínima energía de la hofmeisterina II (**78**).

Finalmente, la estructura de la hofmeisterina II (**78**) se confirmó de manera inequívoca a través de un análisis de difracción de rayos X. En este caso, la estructura cristalina muestra claramente la disposición *anti* del grupo 1,4-butanodiona (Figura 12), cuya conformación es muy similar a la de **78b**.

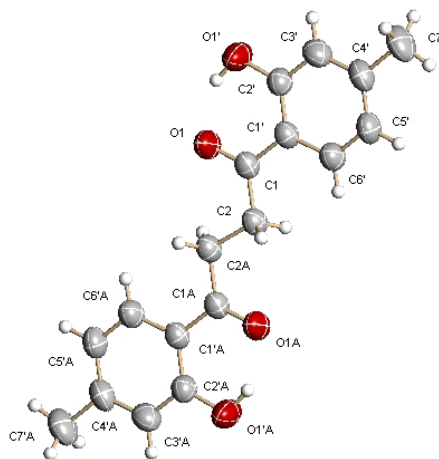


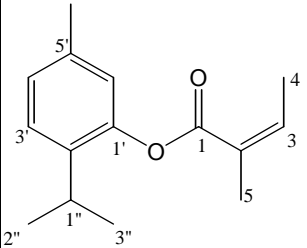
Figura 12. Vista estereoscópica de la estructura de la hofmeisterina II (**78**) obtenida por rayos X.

Cabe destacar que Passreiter, *et al.* (2002) obtuvo este compuesto como un subproducto de una degradación oxidativa con dicromato de potasio del compuesto **77**.

5.3.3 Elucidación estructural de los compuestos 79 y 84.

Los compuestos **79** y **84** se aislaron como aceites amarillos solubles en diclorometano; el producto **84** fue soluble también en metanol. Los espectros en el infrarrojo registrados en película presentan bandas de absorción asociadas a funciones olefínicas (ν_{\max} 2962, 1574 para **79** y 2954, 1577 cm^{-1} para **84**) y un grupo éster (1734 cm^{-1} y 1128 cm^{-1} para **79** y 1719 cm^{-1} y 1154 cm^{-1} para **84**). La fórmula molecular se estableció como $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$ para el compuesto **79** con base en los espectros de RMN (Espectros 7 y 8) y espectrometría de masas modalidad impacto electrónico; el ión molecular se observa en una relación de m/z 232. Para el compuesto **84**, la fórmula se estableció como $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_6$ igualmente con base en los espectros de RMN (Espectros 10 y 12) y espectrometría de masas pero en la modalidad de bombardeo rápido de átomos positivo (FAB⁺, por sus siglas en inglés); el ión cuasimolecular se observa en una relación de m/z 363.

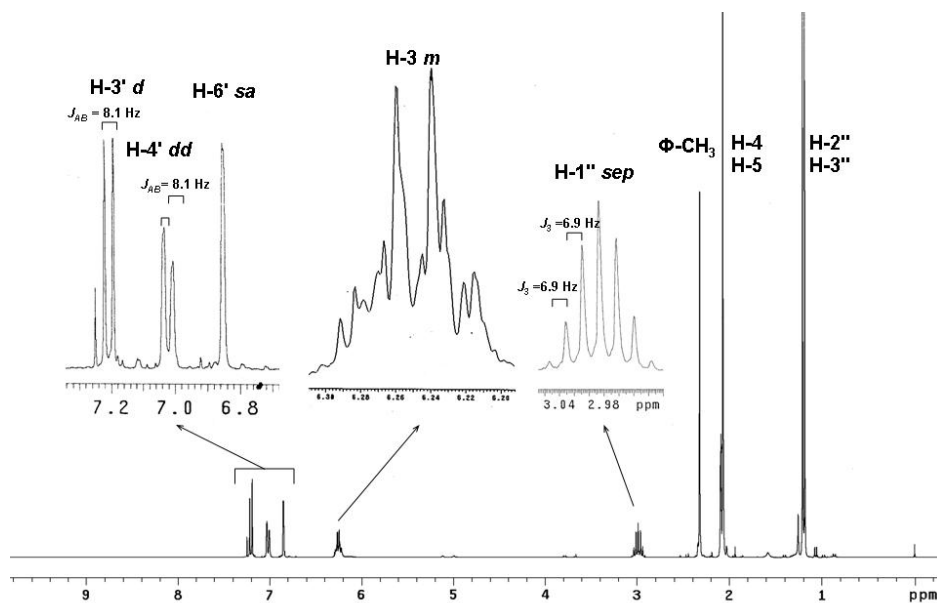
Tabla 27. Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto **79**.

	Nombre trivial: Hofmeisterina III
	Nombre IUPAC: (2Z)-2-metilbut-2-enoato de 2-isopropil-5-metilfenilo.
Formula molecular:	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$
IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1}	2962, 2870, 1734, 1224, 1128, 1036, 815
UV λ_{\max} [nm] (log ϵ)	230 (4.16)
EM-IE- m/z (int. rel.):	232 [M] ⁺ (9), 149 (10), 135 (12), 105 (5), 83 (100), 55 (30)

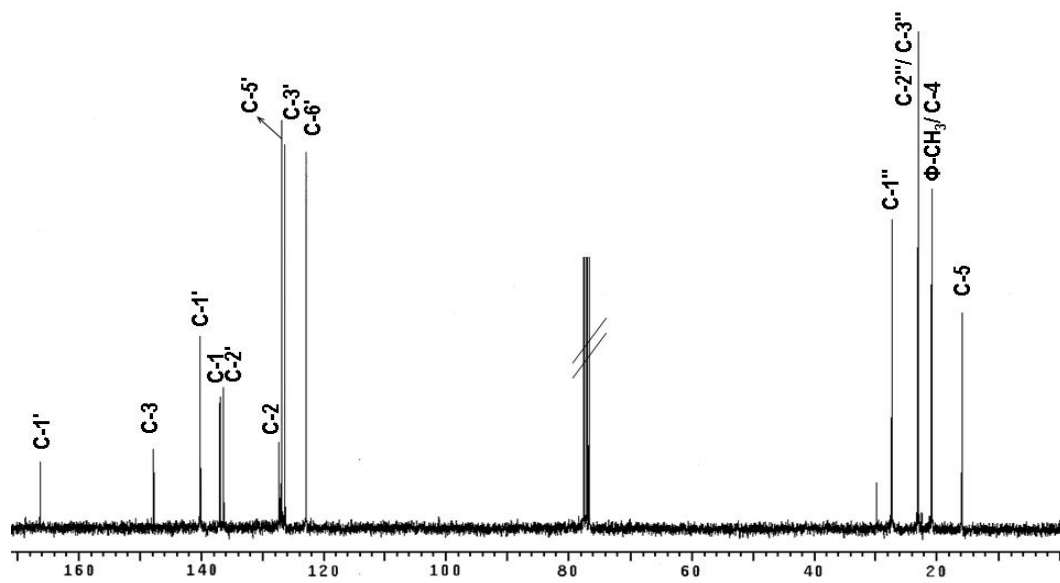
Los espectros de RMN de **79** y **84** permitieron evidenciar la presencia de residuos de angelato, así como señales para el sistema ABX característico de derivados del timol; en el caso del producto **79** estas señales se encuentran desplazadas paramagnéticamente en armonía con la presencia de un residuo de ácido angélico esterificando el grupo fenol. Las demás señales del núcleo mentano fueron similares a las del timol.

En el caso del producto **84**, el espectro de RMN-¹H además de las señales aromáticas, presentó señales para dos grupos metilenos unidos cada uno a una función angeloiloxi (Espectro 10).

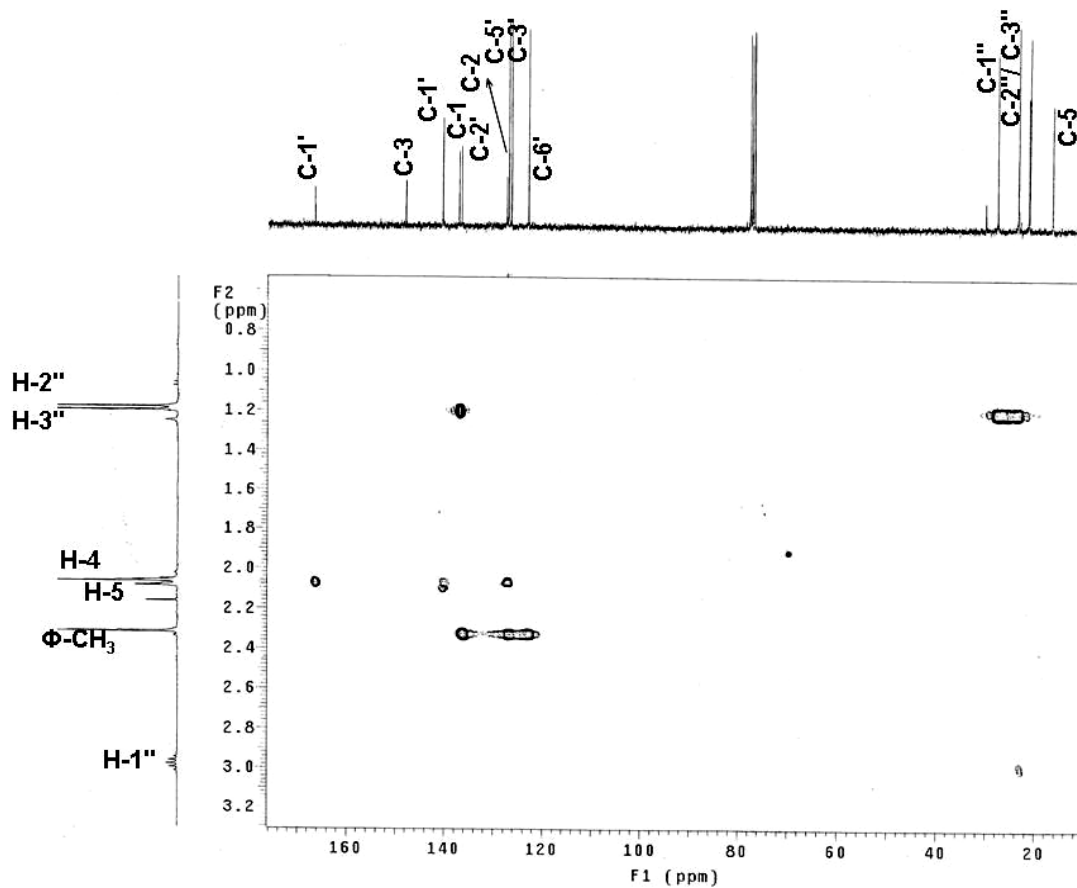
La estereoquímica de los residuos de angeliloxi para los dos compuestos fue corroborada mediante un experimento NOE (Tori, *et al.*, 2002) y mediante el análisis de los desplazamientos químicos de los dos metilos. De tal forma que en el producto **84**, por ejemplo, los desplazamientos del angelato en δ_H 1.85 (*c*, $J = 1.5$ MHz) y 1.93 (*dc*, $J = 7.3, 1.5$ MHz) son idénticos a los descritos por otros autores (Tori, *et al.*, 2002; Joseph-Nathan y Wesener, 1984) (Espectro 11).



Espectro 7. Espectro de RMN- 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) de la hofmeisterina III (**79**).



Espectro 8. Espectro de RMN- ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) de la hofmeisterina III (**79**).

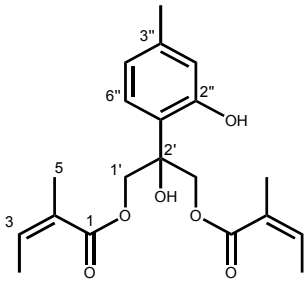


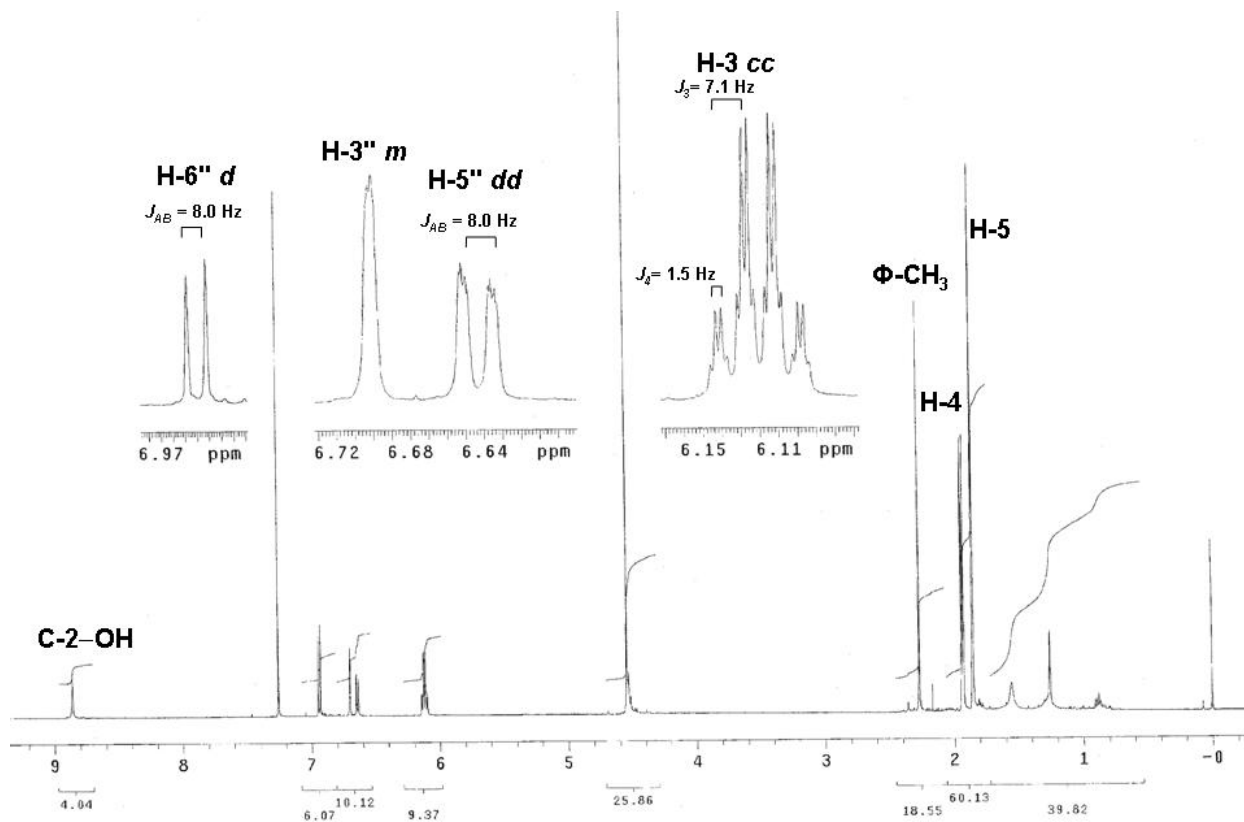
Espectro 9. Ampliación del HMBC de la hofmeisterina III (79).

Tabla 28. Datos de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) y RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) de la hofmeisterina III (79).

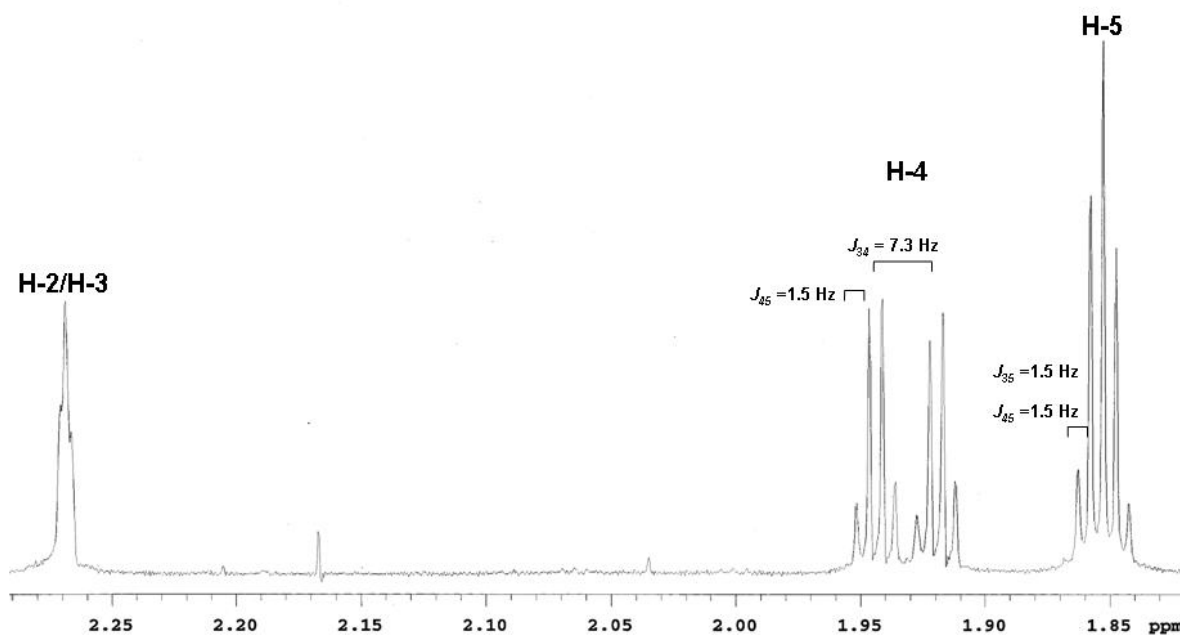
Posición	δ_c	δ_H (mult., J en Hz)	HMBC (H→C)
1	166.0	-	-
2	127.3	-	-
3	140.3	6.23 (m)	-
4	20.7	2.07 (sa)	3
5	15.9	2.09 (sa)	1, 3
1'	147.0	-	-
2'	136.5	-	-
3'	126.3	7.21 (d, 7.8)	1', 2', 4'
4'	126.9	7.01 (dd, 7.8)	5', CH ₃ -5'
5'	137.0	-	-
6'	122.9	6,85 (sa)	5'-CH ₃ ,
CH ₃ -5'	20.8	2.32 (s)	4', 5', 6'
1''	27.2	2.98 (sep, 6.9)	1', 3', 2'', 3''
2''	22.9	1.20 (sa)	3'
3''	22.9	1.18 (s)	2'

Tabla 29. Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto **84**.

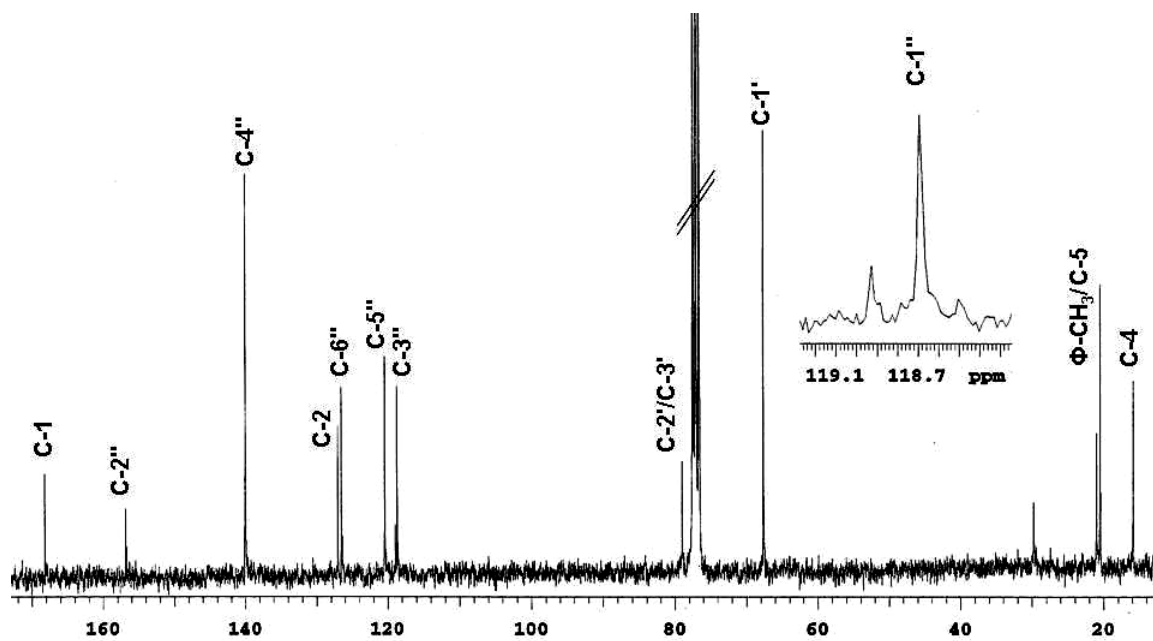
	Nombre trivial: Hofmeisterina IV.
	Nombre IUPAC: (2Z,2'Z)bis(2-metilbut-2-enoato) de 2-hidroxi-2-(2-hidroxi-4-metilfenil)propan-1,3-diilo.
Formula molecular: $C_{20}H_{26}O_6$	
IR ν_{max} (película) cm^{-1}	3349, 2924, 1719, 1230, 1154, 1045, 848.
UV λ_{max} [nm] (log ϵ)	269 (3.32).
EM-FAB ⁺ - m/z (int. rel.):	363 [M+H] ⁺ (3), 345 (17), 249 (15), 83 (100), 55 (73).



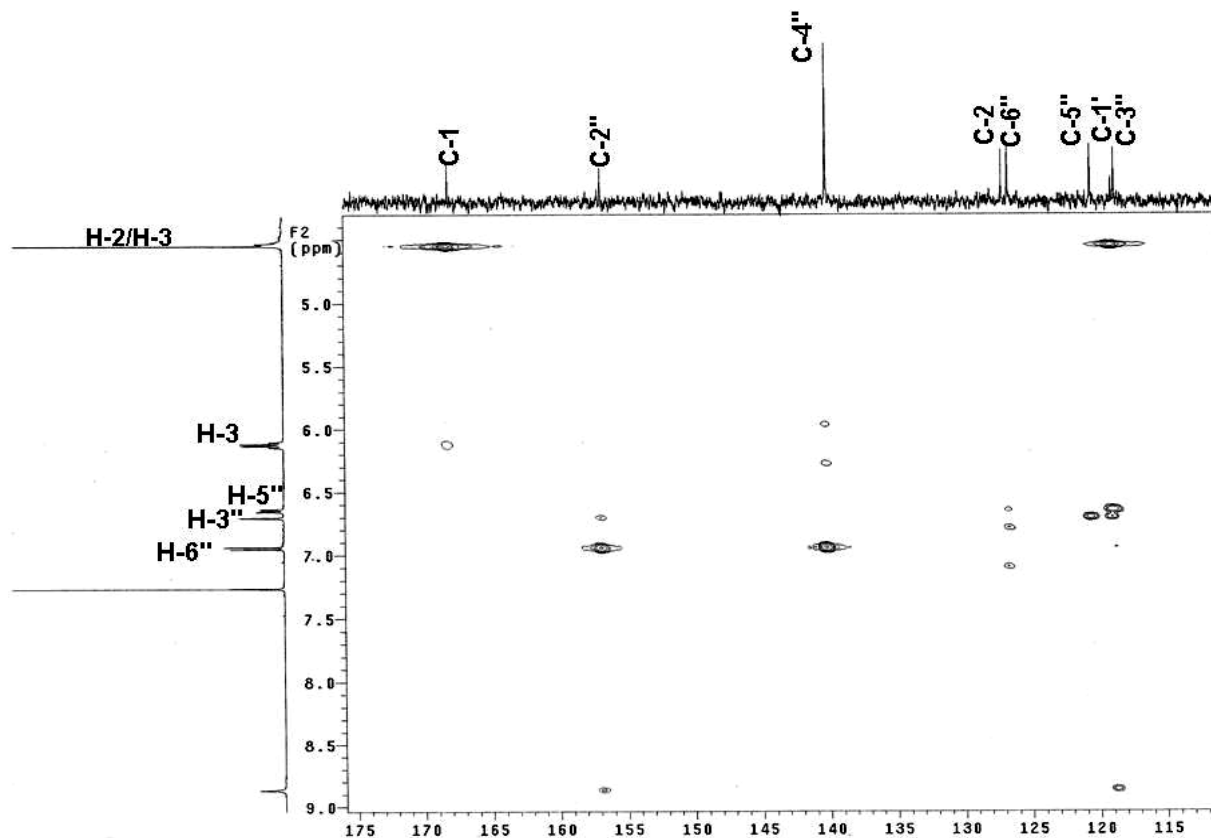
Espectro 10. Espectro de RMN-¹H de la hofmeisterina IV (**84**).



Espectro 11. Ampliación de la zona de los metilos de los residuos de angelato en el espectro de RMN-¹H de la hofmeisterina IV (84).



Espectro 12. Espectro de RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) de la hofmeisterina IV (84).

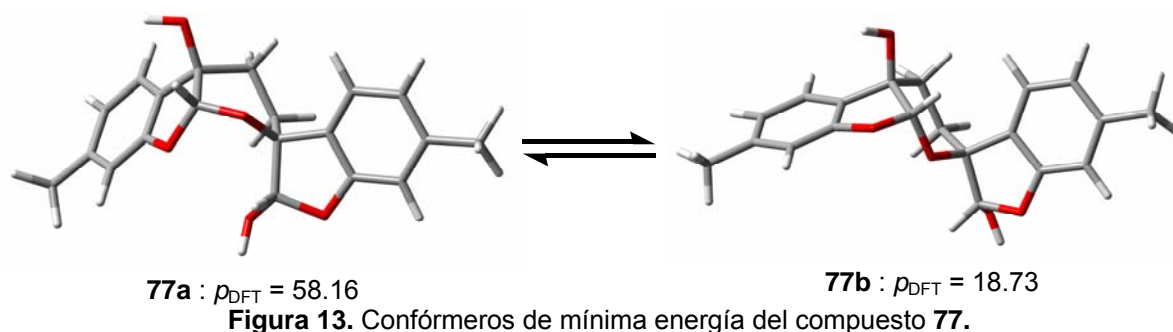


Espectro 13. Espectro HMBC de la hofmeisterina IV (**84**).

Tabla 30. Datos de RMN-¹H (500 MHz CDCl₃) y RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) de la hofmeisterina IV (**84**).

Posición	δ_c	δ_H (mult, <i>J</i> en Hz)	HMBC (H→C)
1	168.1	-	-
2	127.0	-	-
3	140.0	6.12 (cc, 7.1, 1.5)	2, 4
4	15.8	1.93 (dc, 7.1, 1.5)	3
2-CH ₃	20.5	1.85 (c, 1.5)	3
1'	67.6	4.55 (s)	6'
2'	78.9	-	-
1''	118.9	-	-
2''	156.8	-	-
3''	118.7	6.7 (m)	1', 3', 5'' 2''-OH
4''	140.1	-	-
5''	120.4	6.65 (ddc, 8, 1.5, 0.5)	-
6''	126.5	6.94 (d, 8.0)	5''
4''-CH ₃	20.9	2.26 (sa)	5'', 6''
2''-OH	-	-	-

Durante la realización del presente estudio fue posible realizar también el modelado molecular de la estructura **77**. El análisis conformacional de este producto, utilizando la misma estrategia que para la hofmeisterina II, reveló la existencia de dos conformémeros principales de mínima energía. La estructura **77a** adopta una conformación de bote, muy similar a la que obtuvo Pasreiter *et al.*, (2002) en el estado sólido (Figura 13). La estructura **77b** adopta una conformación de silla y es relevante mencionar que cuando se realizó la búsqueda por mecánica molecular, la cual solo toma en cuenta efectos estéricos, esta última resultó ser más favorable ($\Delta E_{\text{MMFF}} = 1.807$ kcal/mol), por lo que se presume que algunos efectos electrónicos pueden estar implicados en la estabilidad de **77a**.



Para validar el equilibrio conformacional que presentan en solución los compuestos **77** y **78**, se compararon las frecuencias en el infrarrojo experimentales y calculadas (Figura 14); la correlación gráfica de cada uno de las frecuencias (calculadas vs experimentales) resultó ser lineal, por lo que se considera que el modelo teórico utilizado (B3LYP/DGDZVP) fue exacto.

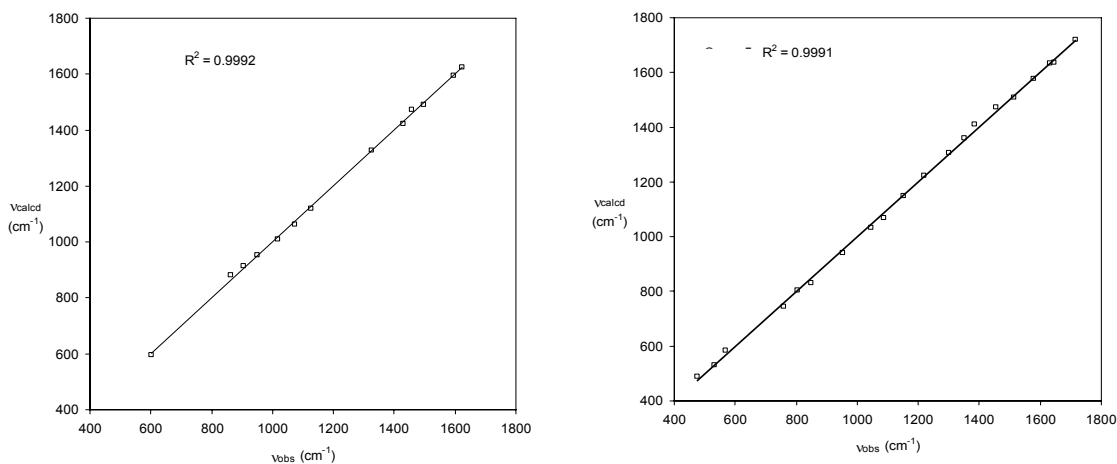


Figura 14. Comparación de frecuencias en el infrarrojo calculadas vs experimentales de **77** y **78**.

5.4 EVALUACIONES BIOLÓGICAS.

Todos los análogos del timol, excepto **84**, se ensayaron para determinar su efecto sobre la germinación y crecimiento radicular utilizando el método de la caja de Petri con la finalidad de establecer su fitotoxicidad. Las semillas de prueba utilizadas fueron las arvenses, *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli* y una de importancia agrícola, *Medicago sativa*. En estas evaluaciones se utilizó como control positivo el glicolípido tricolorina A (Tabla 31).

En general, todos los compuestos evaluados inhibieron el crecimiento radicular de las arvenses de prueba de manera dependiente de la concentración, no obstante, ningún compuesto presentó una fitotoxicidad contra *M. sativa*. La hofmeisterina (**76**) y el compuesto **77** fueron los más activos contra *A. hypochondriacus*, incluso las concentraciones inhibitorias medias fueron menores que las de la tricolorina A.

Tabla 31. Actividad fitotóxica (Cl₅₀, M) del timol (**105**) y los derivados **76-83** aislados de *H. shaffneri*.

Compuestos	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crus-galli</i>	<i>M. sativa</i>
	Crecimiento radicular Cl ₅₀ (M)		
76	3.5 x 10 ⁻⁶	5.67 x 10 ⁻³	>1 x 10 ⁻³
77	9.3 x 10 ⁻⁷	4.2 x 10 ⁻⁴	>1 x 10 ⁻³
78	4.16 x 10 ⁻⁴	8.6 x 10 ⁻⁵	>1 x 10 ⁻³
79	1.38 x 10 ⁻⁴	1.2 x 10 ⁻⁶	>1 x 10 ⁻³
80	7.4 x 10 ⁻⁴	21.0 x 10 ⁻⁴	8.21x. 10 ⁻³
81	12.7 x 10 ⁻⁴	ND ^c	ND ^c
82	9.1 x 10 ⁻⁴	5.2 x 10 ⁻⁴	>1 x 10 ⁻³
83	6.4 x 10 ⁻⁴	1.16 x 10 ⁻⁴	4.25 x 10 ⁻³
84	ND ^c	ND ^c	ND ^c
105	1.4 x 10 ⁻⁵	3.6 x 10 ⁻⁵	>1 x 10 ⁻³
Tricolorina A^a	3.6 x 10 ⁻⁵	3.61 x ⁻⁵	5.1 x 10 ⁻⁴

^aControl positivo; ^cNo se evaluó debido a la poca cantidad de muestra disponible (5 mg).

Aunque el compuesto **78** mostró una actividad fitotóxica moderada (en las arvenses de prueba), provocó un blanqueamiento de las plántulas de *A. hypochondriacus* a la concentración de 33.5 µM similar al que inducen los inhibidores de la enzima HPPD como los herbicidas de tipo β-tricetonas y *o*-hidroxiacetofenonas. Este último grupo de compuestos presentan un residuo estructural de naturaleza *o*-hidroxiacetofenona similar al presente en la hofmeisterina II (**78**). La HPPD tiene como sustrato un grupo α-cetoácido y muchos compuestos de tipo β-tricetonas y *o*-hidroxiacetofenonas compiten por el sitio de unión a esta enzima (Dayan, *et al.*,

2007; Meazza, *et al.*, 2002; Wu, *et al.*, 2002). Este mecanismo de acción podría ser un blanco de acción interesante para evaluar el efecto de la actividad fitotóxica de la hofmeisterina II (**78**).

Los metabolitos que resultaron más activos contra *A. hypochondriacus* (**76** y **77**), se seleccionaron para determinar su efecto sobre la PDE1 dependiente de CaM de acuerdo a la metodología descrita por Sharma y Wang (1979) y recientemente estandarizada en nuestro laboratorio (Rivero-Cruz, *et al.*, 2007). Para este ensayo se utilizó la clorpromazina como control positivo.

Los resultados del ensayo enzimático indicaron que los productos naturales **76** y **77** inhiben a la enzima de manera dependiente de la concentración y con una mayor potencia que la clorpromazina. Los resultados de este ensayo enzimático se presentan en la Tabla 32.

Tabla 32. Actividad sobre la PDE1 del AMPc dependiente de CaM de los compuestos **76** y **77**.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)
76	4.39 ± 0.46
77	4.22 ± 0.48
Clorpromazina ^a	6.81 ± 1.88

Los intermediarios generados durante la síntesis de la hofmeisterina (**76**) también se ensayaron como agentes fitotóxicos potenciales utilizando las mismas semillas de prueba, sin embargo los productos no fueron activos (Tabla 33).

Tabla 33. Actividad fitotóxica (CI₅₀, M) de los compuestos sintetizados.

Compuesto	<i>E. crus-galli</i>	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>M. sativa</i>
86	3.2 x 10 ⁻⁴	3.8 x 10 ⁻⁴	1.4 x 10 ⁻³
87	> 3 x 10 ⁻³	> 1.4 x 10 ⁻³	>1.4 x 10 ⁻³
88	2.9 x 10 ⁻³	7.5 x 10 ⁻⁴	> 1.4 x 10 ⁻³
89	> 3 x 10 ⁻³	> 1.4 x 10 ⁻³	> 1.4 x 10 ⁻³
90	> 3 x 10 ⁻³	> 1.4 x 10 ⁻³	> 1.4 x 10 ⁻³
91	> 3 x 10 ⁻³	> 1.4 x 10 ⁻³	> 1.4 x 10 ⁻³
92	> 3 x 10 ⁻³	> 1.4 x 10 ⁻³	> 1.4 x 10 ⁻³
93	> 3 x 10 ⁻³	> 1.4 x 10 ⁻³	> 1.4 x 10 ⁻³
76	3.5 x 10 ⁻⁶	5.67 x 10 ⁻³	>1 x 10 ⁻³
Tricolorina A^a	3.61 x 10 ⁻⁵	3.61 x 10 ⁻⁵	5.1 x 10 ⁻⁴

^aControl positivo.

5.5 ACTIVIDAD FITÓTOXICA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES PREPARADOS A PARTIR DEL MATERIAL VEGETAL RECOLECTADO EN DISTINTAS ÉPOCAS DEL AÑO.

Recientemente se ha intensificado el estudio de los aceites esenciales como agentes herbicidas para el control de las malezas en los denominados cultivos orgánicos (Bainard, *et al.*, 2006; Dayan, 2005; Shahi, 2003; Tworkosli, 2002, Belmont, 2001; *inter alia*). Esta tendencia obedece a que los aceites contienen constituyentes alelopáticos de regular tamaño, que además de inhibir la germinación de muchas semillas de malezas, se degradan con mayor facilidad que los productos naturales más complejos (Inderjit y Duke, 2003; Beuchat 2001; Dudai, *et al.* 1999, Tworkoski, 2001 Wilson, *et al.* 1997 Ismaiel y Pierson 1990 Putnam, 1983; *inter alia*). Asimismo, los aceites suelen ser poco tóxicos para los animales y el hombre y tienen propiedades antimicrobianas (Bakkali, *et al.*, 2007).

Antes de realizar experimentos para establecer el potencial herbicida de los aceites en los campos de cultivo, es necesario establecer su actividad fitotóxica en función de la época de recolección del material vegetal, ya que la composición de las esencias, y por ende su actividad biológica, varía con la época de recolección. Con este propósito se prepararon los aceites esenciales de *H. schaffneri* a partir de cinco lotes de planta fresca (500 g) recolectados en diferentes épocas a lo largo de un año. Las épocas de recolección correspondieron a las épocas de sequía y lluvia. Los aceites se obtuvieron por un proceso de hidrodestilación. Los rendimientos de los aceites esenciales utilizando este procedimiento se muestran en la Tabla 34 y de los mismos se desprende que no hay una variación significativa en los rendimientos.

Tabla 34. Rendimientos obtenidos de las esencias *H. schaffneri*.

LOTE	FECHA DE COLECTA	cantidad obtenida	rendimiento (%)
RM76AEIII	FEBRERO	450 mg	0.090
RM76AEIV	MARZO	435 mg	0.087
RM76AEV	AGOSTO	429 mg	0.085
RM76AEVI	OCTUBRE	460 mg	0.092
RM76AEVII	ENERO	470 mg	0.094

La actividad fitotóxica de los cinco lotes de esencias fue igualmente determinada con el ensayo de germinación y crecimiento radicular de la caja de Petri utilizando semillas de *Amaranthus hypochondriacus*. La actividad fitotóxica de los aceites de los distintos lotes fue muy similar; las concentraciones inhibitorias media (CI_{50}) se encontraron en un rango de 28-93 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El aceite del lote IV presento la mejor actividad fitotoxica (Tabla 35).

Tabla 35. Actividad fitotóxica de las esencias obtenidas de *H. schaffneri* sobre la arvense *A. hypochondriacus*

Extracto	CI_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Aceite esencial III	89.37
Aceite esencial IV	28.38
Aceite esencial V	93.45
Aceite esencial VI	44.02
Aceite esencial VII	56.5
Extracto de <i>I. tricolor</i>	120.3

La identificación de los constituyentes de los aceites esenciales se realizó utilizando la cromatografía de gases (CG), ya que es la herramienta de separación más adecuada para analizar compuestos volátiles, y por lo tanto la más utilizada para el análisis de los aceites esenciales de un modo confiable (Hudaib, *et al.*, 2002; Skoog, *et al.*, 2001).

Para el análisis por CG de esencias se utilizan métodos combinados que incluyen el cálculo de índices de retención en columnas con fases estacionarias de diferente polaridad y el análisis de los espectros de masas, en conjunto con el uso de compuestos estándares. (Zhu, *et al.*, 2007; Zhao, *et al.*, 2005; Tarján, *et al.*, 2002; Vernin, *et al.*, 1987; Shibamoto, 1987).

La identificación de los componentes presentes en los cinco lotes del aceite esencial de *H. schaffneri* se realizó en primera instancia por el cálculo de los índices de retención aplicando la metodología establecida por Kovats (1958), para lo cual se ocuparon dos columnas con fases estacionarias de diferente polaridad: una no polar constituida de 100% dimetilpolisiloxanos (SPB1, SUPELCO) y una polar de polietilenglicol (SUPELCOWAX 10) y se utilizó un equipo de CG adaptado a un detector de ionización de flama.

Para implementar el método de Kovats se utilizaron como estándares externos una mezcla de hidrocarburos constituida por una serie homologa de *n*-alcanos (mezclas de parafinas); el proceso de elución de la mezcla de hidrocarburos se realizó bajo las mismas condiciones cromatográficas que para los analitos (Rouessac, 2003; Shibamoto, 1987; Kovats 1958

inter alia). Las mezclas de parafinas son ampliamente utilizadas debido a que son no polares, químicamente inertes y solubles en muchas de las fases estacionarias utilizadas y por lo tanto los índices de retención de los *n*-alcanos (*I.K.*) son independientes del relleno de la columna, la temperatura u otras condiciones cromatográficas (Rouessac, 2003; Skoog, *et al.*, 2001; Kovats 1958). El cálculo de los índices de retención de Kovats para los *n*-alcanos normales pertenecientes a la mezcla de parafinas se realiza con la siguiente ecuación:

$$I.K. = 100n$$

IK = Índice de Kovats del hidrocarburo
n = número de carbonos del alcano.

Los índices de retención para aquellos analitos que no pertenezcan a la serie homóloga de *n*-alcanos, son dependientes de las variables de la columna y de las condiciones cromatográficas de tal forma que el cálculo dependerá de estos factores. Puesto que se trabajó con un programa de temperatura de tipo lineal (Tabla 36), ya que de esta forma se obtenía la mejor separación de los constituyentes (Figura 15), los índices de retención de los picos desconocidos (*I_x*) se calcularon utilizando la ecuación de Van Den Dool (Ettre, 2003; Harangi, 2003; Tarján, *et al.*, 2002; González y Nardillo, 1999; Van Den Dool y Kratz 1963), la cual es una ecuación modificada de la de Kovats; esta última es aplicada solamente cuando se trabaja en condiciones isotérmicas.

Ecuación de Van Den Dool:

$$I_x = 100 n + 100 [(t_x - t_n) / (t_{n+1} - t_n)]$$

Donde:

n: número de átomos de carbono del alcano más corto.

t_n: tiempo de retención del alcano más corto.

t_{n+1}: tiempo de retención del alcano más largo.

t_x: tiempo de retención del pico analizado.

Los índices de retención calculados de los picos obtenidos en los cromatogramas generados con las dos columnas se cotejaron con los reportados en bases de datos de índices de retención de sustancias de referencia medidos en diferentes columnas (Base de Datos de

Referencia Estándar del NIST Número 69, 2005) y con valores de literatura especializada (Paolini, *et al.*, 2005).

Simultáneamente al cálculo de los índices de retención, se obtuvieron los espectros de masas de los componentes de las esencias en las modalidades impacto electrónico e ionización química. Esta última se utilizó cuando los iones moleculares no se pudieron detectar por impacto electrónico. Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico se compararon con bases de datos de espectros de masas (Base de Datos de Referencia Estándar del NIST Número 69, 2005; NIST Mass Spectral Search, ver. 2.0, Adams, 1989) y de literatura (Paolini, *et al.*, 2007; 2005; Devies, 1990; Sandra y Bicchi, 1987; *inter alia*). Con estas herramientas se identificaron los iones fragmentos característicos de los componentes.

Adicionalmente, algunas estructuras fueron confirmadas por inyección de estándares y analizadas bajo las mismas condiciones cromatográficas, estos incluyen al timol (**105**), hofmeisterina III (**79**), α -terpineol (**100**), *p*-cimeno (**96**), y linalol (**97**).

Los perfiles químicos de los aceites analizados, la identidad de los mismos y los porcentajes obtenidos se resumen en la Tabla 38. La proporción de los componentes (%) fue calculada por normalización de área (Mc Nair y Miller, 1998) utilizando los picos de los cromatogramas obtenidos de la columna no polar (Figura 15), por lo que los componentes identificados se enlistan de acuerdo al orden de elución en esta columna. En total, se pudieron identificar 27 compuestos los cuales representan un porcentaje mayor al 60 % en los cinco lotes.

En general, los aceites esenciales se caracterizaron por tener un alto contenido de monoterpenoides con funciones oxigenadas, principalmente derivados del timol esterificados con diferentes ácidos grasos de bajo peso molecular (Tabla 37). Estos compuestos se encontraron en los cinco lotes estudiados con patrones sincronizados de variación. El constituyente mayoritario es siempre la hofmeisterina III (**79**), seguido del isovalerato de 8,9-dihidrotimilo (**114**). Básicamente la composición del aceite esencial varía en el contenido de sesquiterpenoides, principalmente en la cantidad de α -cubebeno (**107**), cubenol (**117**) y óxido de cariofileno (**115**). La colecta de marzo presentó la mayor proporción de los dos primeros metabolitos, en tanto que el **115** fue más abundante en el lote III (Febrero).

También se detectó la presencia, aunque en menores cantidades, del eupatoriocromeno **49**.

Tabla 36. Programa de temperatura para las dos columnas

Inyector	split (1/50)
Detector	ionización en flama
Temperatura inicial	60 °C.
Tiempo inicial	0 min
Velocidad de calentamiento:	2 °C/min hasta 230 °C manteniendo esta temperatura durante 35 min.
Volumen de inyección:	1 µl

Tabla 37. Proporción de los componentes identificados.

Componentes identificados	VII	III	IV	V	VI
	Enero	febrero	marzo	Agosto	Octubre
Monoterpenoides	55.4	46.3	54.8	58.7	48.9
hidrocarbonados	0.30	0,07	0.35	0.88	0.36
oxigenados	54.49	46.19	54.44	57.82	48.04
alcoholes	2.91	1.56	3.31	1.83	1.97
derivados del Timol	50.49	43.13	50.94	55.42	45.16
Hofmeisterina III (79)	30.8	22.3	31.0	34.3	28.7
Isovalerato de timilo (114)	17.4	18.6	16.0	18.4	13.4
Isobutirato de timilo (112)	1.99	1.06	1.42	2.37	2.53
Sesquiterpenoides	8.8	16.8	7.6	7.2	9.3
Cromeno (eupatoriocromeno, 119)	0.7	0.6	0.8	0.8	0.7

Tabla 38. Composición de los lotes de aceite esencial de *H. schaffneri* preparados a partir del material vegetal recolectado en diferentes épocas del año.

no.	COMPUESTO	IRa	IRp	ID	Lote						
					III Febrero	IV Marzo	V Agosto	VI Octubre	VII Enero		
94	α -terpineno	1009		IR EM-IE	0.08	0.07	0.08	0.22	0.09		
95	<i>m</i> -cimeno	1015		IR EM-IE	tr	tr	0.26	0.35	0.06		
96	<i>p</i> -cimeno	1017	1237	Es IR EM-IE EM-IC	0.22			0.31	0.21		
97	linalol	1081	1519	Es IR EM-IE	0.75	tr	1.27	0.55	0.39		
98	epóxido de α -pineno	1099		IR EM-IE	0.10				0.13		
99	hidrato de <i>cis</i> -pineno	1102		IR EM-IE	0.37	tr	tr	tr	0.57		
100	α -terpineol	1166	1654	Es IR EM-IE	0.73	0.10	1.25	0.79	0.9		
101	<i>cis</i> -piperitol	1184		IR EM-IE	0.11				0.2		
102	8,9-Deshidrotimol	1192		IR EM-IE	0.16	0.14	0.53	0.13	0.13		
103	timol metil eter	1212		IR EM-IE	0.15	1.11	2.06	0.24	0.36		
104	acetato de linalol	1237		IR EM-IE	0.45	1.11	0.52	0.46	0.16		
105	timol	1267	2159	Es IR EM-IE EM-IC	1.16	1.33	0.25	0.36	0.40		
106	acetato de α -terpinilo	1331		IR EM-IE	0.33	0.53	0.21	0.24	0.17		
107	α -cubebeno	1355		IR EM-IE EM-IC	0.77	6.22	1.76	0.95	0.73		
108	acetato de geranilo	1357		IR EM-IE	0.58				0.5		
109	β -cubebeno	1392		IR EM-IE	tr	0.22	0.30	0.32	0.68		
110	aromadendreno	1435		IR EM-IE	0.12	0.48	0.76	0.64	0.20		
111	aloomadendreno	1452		IR EM-IE	0.36	0.12	tr	0.27	0.45		
112	Isobutirato de timilo	1456		IR EM-IE EM-IC	1.99	1.06	1.42	2.37	2.53		
113	nerolidol E	1545		IR EM-IE	4.03	0.18	1.27	1.73	2.96		
114	Isovalerato de timilo	1548	1942	IR EM-IE EM-IC	17.4	18.6	16.0	18.4	13.4		
115	oxido de cariofileno	1574	1926	IR EM-IE EM-IC	7.4	0.3	2.0	3.0	6.3		
76	hofmeisterina III	1577	2036	Es IR EM-IE EM-IC	30.8	22.3	31.0	34.3	28.7		
116	1-10- <i>epi</i> -Cubanol	1610		IR EM-IE	0.5	0.5			0.6		
117	cubanol	1629		IR EM-IE EM-IC	tr	8.0	1.8	1.4	0.5		
118	γ -bisabolol	1667		IR EM-IE	tr	1.0	1.0	0.9	0.2		
119	Eupatoriocromeno	1726		IR EM-IE	0.7	0.6	0.8	0.8	0.7		
					Rendimiento	69.23	64.00	64.43	68.66	62.32	

IRa = Índice de retención columna no polar (SPB-1). IRp Columna polar (Supelcowax 10). tr = trazas (<0.05%). ID = Identificado por : EM-IE = espectrometría de masas impacto electrónico; EM-IC = ionización química. Es = estándar eluido.

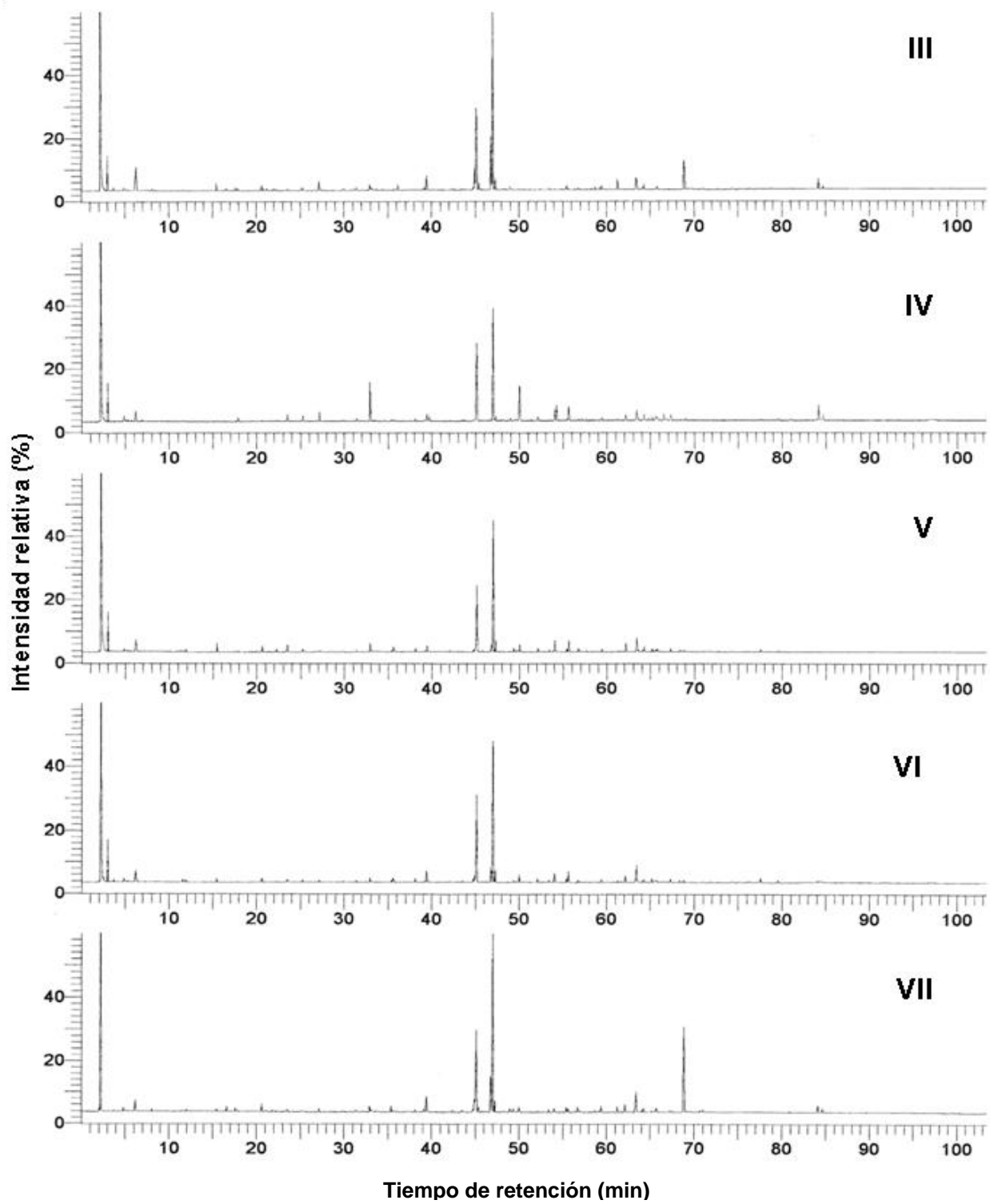
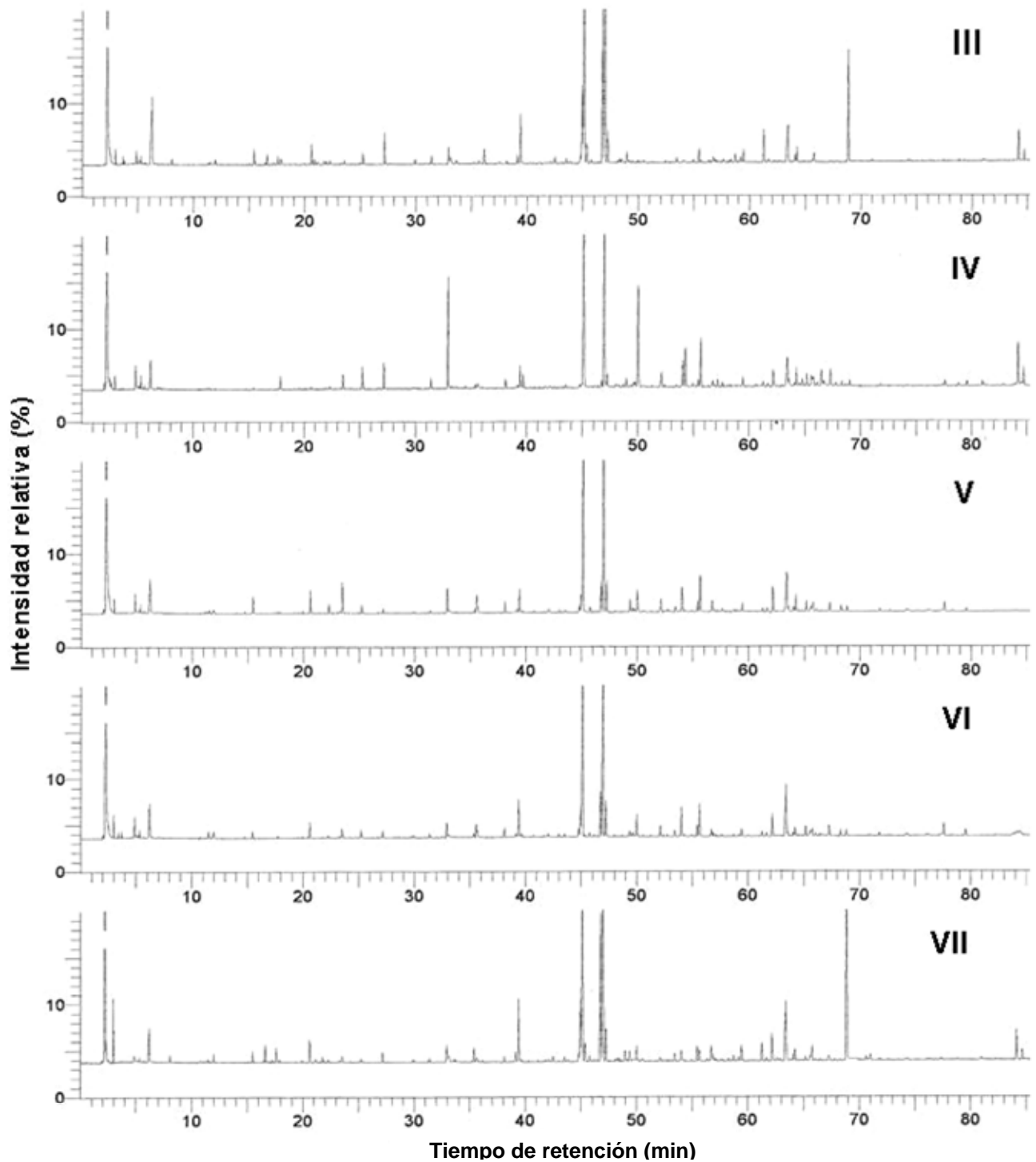


Figura 15. Cromatogramas típicos (TIC-FID) de los aceites esenciales de ambar (*H. schaffneri*) analizados con la columna capilar SPB-1 (no polar). Las intensidades relativas están en función del total de picos detectados, incluido el disolvente.



Figra 16. Ampliación 1:4 de los cromatogramas (TIC-FID) de los aceites esenciales del ambar (*H. schaffneri*) analizados con la columna capilar SPB-1 (no polar). Las intensidades relativas están en función del total de picos detectados, incluido el disolvente.

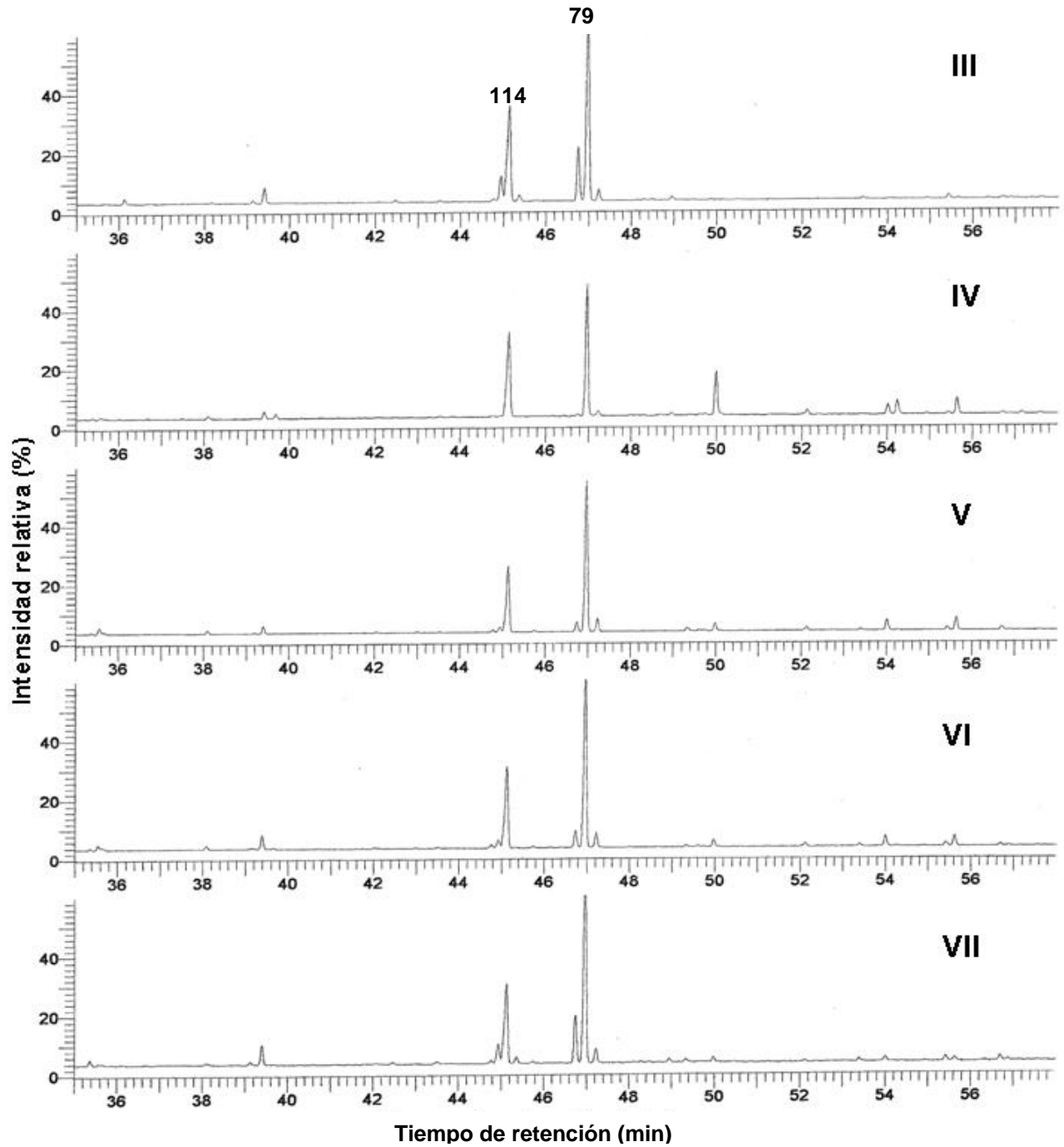


Figura 17. Ampliación 1:6 de los cromatogramas (TIC-FID) de los aceites esenciales de ámbar (*H. schaffneri*) analizados con la columna capilar SPB-1 (no polar). Las intensidades relativas están en función del total de picos detectados, incluido el disolvente. Se amplía el área de los picos de los metabolitos mayoritarios.

Las principales diferencias en el contenido metabólico se ven moderadamente reflejadas en la actividad fitotóxica; el lote de marzo, que se caracterizó por tener el menor contenido en hofmeisterina II, pero mayor en los sesquiterpenoides α -cubebeno y cubenol, fue el más activo. La mejor actividad del lote IV puede obedecer entonces a un mayor contenido de cadinanos. Esta hipótesis deberá confirmarse mediante las evidencias experimentales apropiadas.

Diferentes estudios relacionados con los componentes de aceites esenciales y los grupos funcionales presentes en los mismos, han permitido proponer que la actividad fitotóxica es mayor, conforme la cantidad de compuestos con funciones oxigenadas aumenta (Vaughn y Spencer, 1996; 1993; Fischer, 1986; Asplund, 1968). Por lo tanto, es factible que la variación en el contenido de compuestos de mayor polaridad presentes en el aceite y aún no caracterizados, pueda reflejar mejor las diferencias en actividad biológica.

VI. CONCLUSIONES

-El estudio químico biodirigido de las partes aéreas de *H.schaffneri* condujo a la obtención del timol (**105**), nueve derivados del timol, ácido angélico, β -caroteno, β -sitosterol y euparina. Los normonoterpenoides acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxo-etilo (**76**, hofmeisterina) y 1,4-bis-[(2-hidroxi-4-metil)-fenil]-buten-1,4-diona (**78**, hofmeisterina II), así como los ésteres de angelato (2Z)-2-Metil-2-butenato de 2-hidroxi-4-metilfenilo (**79**, hofmeisterina III,) y (2Z,2'Z)bis(2-metil-2-butenato) de 2-hidroxi-2-(2-hidroxi-4-metilfenil)propan-1,3-ilo (**84**, hofmeisterina IV) son nuevos productos naturales, los cuales se caracterizaron mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y modelado molecular. En el caso del producto **78** la estructura se confirmó inequívocamente mediante un análisis por difracción de rayos-X y en el caso del producto **76** por síntesis. La síntesis de este producto se realizó utilizando un diseño racional de tipo lineal que consistió de seis pasos. La estrategia principal de síntesis se basó en un rearrreglo de Fries del acetato de *m*-cresilo. El rendimiento global fue de 11.8%.

-El aislamiento de la hofmeisterina II (**78**) representa la primera descripción en la naturaleza de un bis-normonoterpenoide. La presencia de los productos **76** y **78** en *Hofmeisteria schaffneri* permite concluir que los nortimoles se encuentran restringidos, hasta la fecha, a especies de la tribu Eupatoriae, a la cual pertenece la especie estudiada.

-Los compuestos aislados en el presente estudio se pueden biosintetizar a partir del 2-[2-(hidroximetil)oxiran-2-il]-5-metilfenol. Este intermediario puede sufrir una degradación oxidativa para generar el compuesto 2-hidroxi-1-(2-hidroxi-4-metilfenil)etanona, posible precursor de **76**. La 2-hidroxi-1-(2-hidroxi-4-metilfenil)etanona también se puede dimerizar vía un acoplamiento fenólico para generar la hofmeisterina II (**78**). Alternativamente, **78** se puede formar a partir de **77** por una degradación oxidativa, posiblemente una versión *in vivo* de la reacción realizada por Passreiter *et al.* (2002). Por último, la apertura nucleofílica del epóxido del producto 2-[2-(hidroximetil)oxiran-2-il]-5-metilfenol podría favorecer la formación de los compuestos **80**, **81** and **84**.

-De todos los compuestos aislados, dos presentaron propiedades fitotóxicas significativas mayores a las de la tricolorina A: La hofmeisterina (**76**) y 1',4',4a',9a'-tetrahidro-6',7'-dimetil-

espiro[benzofuran-3(2H),2'-pirano[2,3-b]benzofuran]-2,4a'-diol (77). El efecto de estos productos fue selectivo contra las arvenses ya que no inhibieron la germinación o crecimiento radicular de *Medicago sativa*, una especie ampliamente usada en la agricultura orgánica en rotación de cultivos. Ambos productos inhibieron la PDE-1 dependiente de CaM y representan nuevos inhibidores del complejo CaM-PDE1 y prototipos estructurales para el desarrollo de agentes herbicidas novedosos. Estos resultados *per se* permitieron cumplir con el objetivo primordial del proyecto de tesis.

-El análisis por cromatografía de gases de los aceites esenciales preparados a partir de varios lotes de material vegetal recolectado en diferentes meses del año, permitió la identificación de 27 componentes, que representan más del 60 % de los constituyentes. Seis de los productos son derivados del timol, incluyendo la hofmeisterina III (76) que fue el componente mayoritario en todos los lotes.

-Aunque no fue posible establecer una clara correlación entre la actividad fitotóxica y la composición de los aceites, se encontró que la esencia de la colecta de marzo (Lote IV) presenta la mayor fitotoxicidad y el contenido más alto de cadinenos.

-Los efectos fitotóxicos sobre las arvenses *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli* de los extractos, aceites esenciales y algunos compuestos puros obtenidos de *H. schaffneri* permitieron corroborar las hipótesis de trabajo.

VII. PERSPECTIVAS

-Establecer los parámetros de inocuidad de los extractos y compuestos fitotóxicos de la especie *H. schaffneri*.

-Determinar el efecto pre o post emergente de los productos fitotóxicos y los aceites sobre distintas especies de plantas de interés agrícola.

-Explorar las propiedades medicinales de la especie vegetal.

-Completar el estudio conducente a establecer la composición química de la esencia de *H. schaffneri*.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- **Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., ezaie, A. (2004).** Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor* 10, RA141-147.
- **Abell, L. (1996)** Biochemical approaches to herbicide discovery: advances in enzyme target identification and inhibitor design. *Weed Science* 44, 734-742.
- **Adams, R.P. (1989).** Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass spectroscopy. Academic Press Inc. London.
- **Adams, R.P. (1995).** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, Allured, Carol Stream.
- **Achnine, L., Pereda-Miranda, R., glesias-Prieto, R., Moreno-Sanchez, R., Lotina-Hennsen, B., (1999).** Tricolorin A, a potent natural uncoupler and inhibitor of photosystem II acceptor side of spinach chloroplasts. *Physiology Plantarum* 106, 246-252.
- **Alavanja, M.C.R., Hoppin, J.A., Kamel, F. (2004).** Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annual Review of Public Health* 25, 155-97.
- **Anaya A.L., Calera M.R., Mata R., Pereda-Miranda R. (1990),** Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae), *Journal of Chemical Ecology* 7, 2145-2152.
- **Asplund, R.O. (1968).** Monoterpenes: relationship between structure and inhibition of germination. *Phytochemistry* 7, 1995-1997.
- **Au, T.K., Chick, W.S.H., Leung, P.C. (2000).** The biology of ophiobolins. *Life Science* 67, 733-742.
- **Babushok, V.I., Linstrom, P.J. (2004).** On the Relationship Between Kováts and Lee Retention Indices. *Chromatographia* 60, 725-728.
- **Bainard, L.D., Isman, M.B., Upadhyaya, M.K. (2006).** Phytotoxicity of clove oil and its primary constituent eugenol and the role of leaf epicuticular wax in the susceptibility to these essential oils. *Weed Science* 54, 833-837.
- **Bagchi, G.D., Jain, D.C., Kumar, S. (1998).** The phytotoxic effects of the artemisinin related compounds of *Artemisia annua*. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 20, 5-11.
- **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. Idaomar M. (2007).** Biological Effects of Essential Oils- A Review. *Food and Chemical Toxicology* 10.1016/j.fct.2007.09.106.
- **Barberi, P. (2004).** Métodos preventivos y culturales para el manejo de malezas. En Labrada, R. (ed). Manejo de malezas para países en desarrollo (Addendum I). Estudios FAO 120. Producción y protección ambiental. (Ed.) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma.
- **Basu, C., Halfhill, M.D., Mueller, T.C., Stewart Jr, C. N. (2004).** Weed genomics: new tools to understand weed biology. *TRENDS in Plant Science* 9, 391-398.
- **Baumgrass, R., Weiwad, M., Erdmann, F., Liu, J.O., Wunderlich, D., Grabley, S., Fischer, G.**

- (2001). Reversible inhibition of calcineurin by the polyphenolic aldehyde gossypol. *Journal of Biological Chemistry* 276, 47914-47921.
- **Beckie, H.J. (2006)**. Herbicide-resistant weeds: Management tactics and practices. *Weed Technology* 20, 793-814.
 - **Benachour, N., Sipahutar H., Moslemi S., Gasnier, C., Travert, C., Séralini G.E. (2007)** Time- and Dose-Dependent Effects of Roundup on Human Embryonic and Placental Cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 10.1007/s00244-006-0154-8.
 - **Black, D.J., Tran, Q-K., Persechini, A. (2004)**. Monitoring the total available CaM concentration in intact cells over the physiological range in free Ca²⁺. *Cell Calcium* 35, 415-425.
 - **Bohlmann, F., Dhar, A. K., Ahmed, M. (1980)**. Thymol derivatives from *Doronicum Hungaricum*. *Phytochemistry* 19, 1850-1851.
 - **Boswell-Smith, V., Spina, D., Page, C.P. (2006)**. Phosphodiesterase inhibitors. *British Journal of Pharmacology* 147, Suppl 1: S252-S257.
 - **Böger, P., Wakabayashi, K., Hirai, K. (2002)**. *Herbicide Classes in Development: Mode of Action, Targets, Genetic Engineering, Chemistry*. Springer-Verlag, Heidelberg.
 - **Bouché, N., Yellin, A., Snedden, W.A., Fromm, H., (2005)**. Plant-specific CaM-binding proteins. *Annual Review in Plant Biology* 56, 435-466.
 - **Breitmaier, E. (2002)**. Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: A Practical Guide. (3a. Ed.). Wiley. Chichester.
 - **Brundu, G., Brock, J., Camarda, I., Child, L., Wade, M. (eds.) (2001)**. Plant invasions: species ecology and ecosystem management. Ed. Backhuys Publishers, The Netherlands.
 - **Calera, M.R., Anaya A.L., and M. Gavilanes-Ruiz. (1995)**. Effect of phytotoxic resin glycoside on activity of H⁺-ATPase from plasma membrane. *Journal of Chemical Ecology* 21, 289-297.
 - **Canell, R.J.P. J. (1998)**. Natural Product Isolation. Humana Press. New Jersey. pp 471.
 - **Carson, R. (1967)**. *Silent Spring*. Ed. London Readers union H. Hamilton.
 - **Chang, G., Guida, W. C., Still, W. C., (1989)**. An internal-coordinate Monte Carlo method for searching conformational space. *Journal of American Chemical Society* 111, 4379-4386.
 - **Chen, P.K; Leather, G.R. (1990)**. Plant growth regulatory activities of artemisinin and its related compounds, *Journal of Chemical Ecology* 16, 1867-1876.
 - **Chen, S., Hu, Z., Hao, Z., Cai, H., Huang, W. (1990)**. Calmodulin antagonist-study on structure-activity relationship of bis-benzylisoquinoline compounds. *Shengwu Huaxue Zazhi* 6, 413-416.
 - **Chin, D., Means, A.R., (2000)**. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology* 10, 322-328.
 - **Chon, S-U., Kim, Y-M., Lee, J-C. (2003)**. Herbicidal potential and quantification of causative allelochemicals from several Compositae weeds. *Weed Research* 43, 444-450.
 - **Clay, D.V., Dixon, F.L., Willoughby, I. (2005)**. Natural products as herbicides for tree establishment. *Forestry* 78, 1-9.
 - **Coats, J.R., Tollefson, J.J. (1996)**. Biorational insecticides for the control of corn rootworm,. *Competitive Grant Report* 5, 92-55.
 - **Cobb, A.H. y Kirkwodd, R. C. (eds.). (2000)**. Herbicides and their mechanisms of action. Sheffield Academic Press: UK.
 - **Cobbe, R.V. (1998)**. Capacitación Participativa en el Manejo Integrado de Plagas (MIP) *Una*

propuesta para América Latina. Documento preparado para la FAO. Julio de 1998.

- **Cole, D., Pallett, K., Rodgers, M. (2000)**. Discovering New Modes of Action for Herbicides and the Impact of Genomics. *Pesticide Outlook*. 223-229.
- **Conrad II, P.G., Givens, R.S., Weber, J.F. W., Kandler, K. (2000)**. New Phototriggers: ¹Extending the -Hydroxyphenacyl π - π^* Absorption Range. *Organic Letters* 2, 1545-1547.
- **Craven, C.J., Whitehead, B., Jones, S.K.A., Thulin, E., Blackburn, G.M., Waltho, J.P. (1996)**. Complexes formed between calmodulin and the antagonists J-8 and TFP in solution. *Biochemistry* 35, 10287-10299.
- **Cutler, H. y Cutler, S. (1999)**. Agrochemicals and pharmaceuticals: the connection. En: Biologically active natural products. Agrochemicals. Cutler, H. Cutler, S. (eds). CRC Press. Boca Raton, Florida, pp1-14.
- **Dayan, F.E., Duke, S.O., Sauldubois A., Singh N., McCurdy C., Cantrell C. (2007)**. *p*-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is a herbicidal target site for β -triketones from *Leptospermum scoparium*, *Phytochemistry* 68, 2004-2014.
- **Dayan, F.E., Romagni, J.G. (2001)**. Lichens as a potential source of pesticides. *Pesticide Outlook*, 229-232.
- **Dayan, F.E., Romagni, J.G., Duke, S.O. (2000)**. Investigating the mode of Action of Natural phytotoxins. *Journal of Chemical Ecology* 26, 2079-2094.
- **Dayan, F., Romagni, J., Tellez, M., Rimando A., Duke, S. (1999)**. Managing Weeds With Natural Products. *Pesticide Outlook*, 185-1988.
- **Daye, S., Wenqiang, T., Ligeng, M., (2001)**. Extracellular calmodulin: A polypeptide signal in plants?. *Science in China, Series C: Life Science* 44, 449-460.
- **Del Rio, B., Pedrero, J.M.G., Martinez-Campa, C., Zuazua, P., Lazo, P.S., Ramos, S. (2004)**. Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor α via calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* 279, 38294-38302.
- **Devies N.W. (1990)**. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *Journal of chromatography* 503, 1-24.
- **Devine, M.D. (2002)**. Herbicides. En Encyclopedia of pest management.
- **thi Diem Trang, N.; Wanner M. J., Koomen, G., Dung, N., (1993)**. New acetophenone and thymol derivatives from *Eupatorium stoechadosmum*. *Planta Medica* 59, 480-481.
- **Dudai, N., Mayer, A.M., Poljakoff-Mayber, A., Putievsky, E., and Lerner, H.R., (1999)**. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *Journal of Chemical Ecology* 25 1079-1089.
- **Dudai, N., Ben-ami, Chaimovich, R. and Chaimovitch, D. (2004)** Essential oils as allelopathic agents: bioconversion of monoterpenes by germinating wheat seeds. *Act. Hort. (ISHS)* 629, 505-508.
- **Duke, S. O., Dayan, F. E., Hernandez, A., Duke, M. V., Abbas, H. K. (1997)** Natural products as leads for new herbicide modes of action. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference – Weeds*, pp 579-586.
- **Duke, S. O., Dayan, F. E., Romagni, J.G., Rimando, A.M. (1999)**. Natural products as source of herbicides: current status and future trends. *Weed Research* 40, 99-111.
- **Duke, S.O.; Dayan, F.E.; Rimando, A.M., (2000)**. En: Herbicides and Their Mechanisms of

- Action; Cobb, A.H., Kirwood, R.C. (eds.) Sheffield Academic Press: UK, pp 105-133.
- **Duke**, S.O., Dayan, F.E., Aliotta, G., Romagni, J.G. (2002). Chemicals from nature for weed management. *Weed Science* 50, 138-151.
 - **Duke**, S.O., Dayan, F.E., Baerson, S. R., Romagni, J.G., Agarwal, A., Oliva, A., (2003). Natural phytotoxins with potential for development in weed management strategies. En: Chemistry and crop protection. Voss, G. y Ramos, G. (eds.). Wiley VCH. Germany, pp 143-154.
 - **Duke**, S.O., **Oliva**, A. (2004). Mode of action of phytotoxic terpenoids. *Recent Advances in Allelopathy* 2, 201-216.
 - **Duke**, S.O. Dayan, F.E. Kagan, I.A., Baerson, S.R. (2005). New herbicide target sites from natural compounds. ACS Symposium Series 892 (New Discoveries in Agrochemicals), 151-160.
 - **Espinosa-García**, F.J., Villaseñor, J.L., Vibrans, H. (2004). Geographical Patterns in Native and Exotic Weeds of Mexico. *Weed Technology* 18, 1552-1558. **Dayan**, F. E., Romagni, J. G. and Duke, S. O. (2000). Investigation the mode of action of natural phytotoxins. *Journal of Chemical Ecology* 26, 2079-2094.
 - **Ettre**, L. S. (2003). Retention Index Expressions. *Chromatographia* 58, 491-494.
 - **Fatima**, N., Tapondjou, L.A., Lontsi, D., Sondengam B.L., Atta-Ur-Rahman, Choudhary M.I. (2002). Quinovic acid glycosides from *Mitragyna stipulosa* first examples of natural inhibitors of snake venom phosphodiesterase I. *Natural Products Letters* 16, 389-393.
 - **Fieser**, L.F., **Fieser**, M. (1944). Química orgánica. Ed. Atlante. Mexico D.F.
 - **Fischer**, N.H., (1986). The function of mono and sesquiterpenes as plant germination and growth regulators. En: Putnam, A.R. y Tang, C.S.(ed.). *The Science of Allelopathy*, Wiley, New York, pp. 203-218.
 - **Fischer**, N.H., (1991). Plant terpenoids as allelopathic agents. En: Harborne, J.B. y Tomas-Barberan, T.A. (ed.). *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*, Clarendon Press, Oxford, pp. 377-398.
 - **Fresco**, L.O. (2000). Scientific and ethical challenges in agriculture to meet human needs. *Food Nutrition and agriculture* (FAO) 27, 4-13.
 - **Fuerst**, E.P., **Vaughn**, K.C. (1990). Mechanism of Paraquat resistance. *Weed Technology* 4, 150-156.
 - **Godbout**, N., Salahub, D. R., Andzelm, J., Wimmer, E., (1992). Optimization of Gaussian-type basis sets for local spin density functional calculations. Part I. Boron through neon, optimization technique and validation. *Canadian Journal of Chemistry* 70, 560-571.
 - **Goldburg**, R.J. (1992). Environmental Concerns with the Development of Herbicide-Tolerant Plants. *Weed Technology* 6, 647-652.
 - **González**, F.R. y **Nardillo**, A.M. (1999). Retention index in temperature-programmed gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 842, 29-49.
 - **Han**, Y.N., Kim, G.-Y., Hwang, K.H., and Han, B.H. (1993). Binding of sanjoinine-A (frangulofoline) to calmodulin. *Archives in Pharmacal Reserach* 16, 289-294.
 - **Harmat**, V., Bocskei, Z., Naray-Szabo, G., Bata, I., Csutor, A.S., Hermecz, I., Aranyi, P., Szabo, B., Liliom, K., Vertessy, B.G., Ovadi. J. (2000). A new potent calmodulin antagonist with arylalkylamine structure: crystallographic, spectroscopic and functional studies. *Journal of Molecular Biology* 297, 747-755.
 - **Harangi** J. (2003). Retention index calculation without *n*-alkanes—the virtual carbon number.

Journal of Chromatography A, 993, 187–195.

- **Heap**, I.M. (1997). The occurrence of herbicide-resistant weeds world wide. *Pesticide Science* 51, 235-243.
- **Hegemann**, L., Van Rooijen, L.A.A., Traber, J., Schmidt, B.H. (1991). Polymyxin B is a selective and potent antagonist of calmodulin. *European Journal of Pharmacology* 207, 17-22.
- **Heinrich**, M., Robles, M., West, J.E., Ortiz de Montellano, B.R., Rodriguez E. (1998). Ethnopharmacology of Mexican asteraceae (Compositae), *Annual Review in Pharmacology and Toxicology* 38, 539–565.
- **Hess**, F. D. (2000). Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Science* 48, 160–170.
- **Hernandez-Romero**, Y., Acevedo L., Sánchez M.D., Shier W.T., Abbas H.K. Mata R. (2005). Phytotoxic activity of bibenzyl derivatives from the orchid *Epidendrum rigidum*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 6276-6280.
- **Hernández-Romero**, Y., Rojas, J-I., Castillo, R., Rojas, A., Mata, R. (2004). Spasmolytic effects, mode of action, and structure-activity relationships of stilbenoids from *Nidema boothii*. *Journal of Natural Products* 67, 160-167.
- **Herz**, W. (2004). Chemistry of the Critoniinae. *Biochemical Systematics and Ecology* 32, 1159-1185.
- **Herz**, W. (2001). Chemistry of the Eupatoriinae. *Biochemical Systematics and Ecology* 29, 1115-1137.
- **Herz**, W. (2003). Chemistry of the Oxylobinae. *Biochemical Systematics and Ecology* 31, 963-993.
- **Holt**, J.S., S.B. Powles y J.A.M. Holtum (1993). Mechanisms and Agronomic Aspects of Herbicide Resistance. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 44, 203-229.
- **Holt**, J.S. y **Lebaron**, H.M. (1990). Significance and distribution of herbicide resistance. *Weed Technology* 4, 141-149.
- **Hu**, Z., Chen, S., Hao, Z., Huang, W., Peng, S. (1988). Benzylisoquinoline compounds inhibit the ability of calmodulin to activate cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Cell Signal* 1, 181-185.
- **Hudaib**, M., Speroni, E., Di Pietra, A. M., Cavrini, V. (2002). GC/MS evaluation of thyme (*Thymus _ulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29, 691–700.
- **Hwang**, K.H., Han, Y.N., Han, B.H. (<). Inhibition of calmodulin-dependent calcium-ATPase and phosphodiesterase by various cyclopeptides and peptide alkaloids from the *Zizyphus* species. *Archives in Pharmacal Ressearch* 24, 202-206.
- **Ibrahim**, M.A., Kainulainen, P., Aflatuni, A., Tiilikkala, K., Holopainen, J.K. (2001). Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oil: With special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. *Agricultural and Food Science in Finland* 10, 243-259.
- **Ichimura**, M., Eiki, R., Osawa, K., Nakanishi, S., Kase, H. (1996). KS-505a, an isoform-selective inhibitor of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochemical Journal* 316, 311-316.
- **Inderjit**, **Duke**, S.O. (2003). Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta* 217, 529–539.
- **Ismail**, A.A., **Pierson**. M.D. (1990). Inhibition of germination, outgrowth, and vegetative growth of *Clostridium botulinum* 67B by spice oils. *Journal of Food Protection* 53, 755–758.
- **Jasieniuk**, M., Brule-Bable, A.L., Morrison, I.N. (1996). The evolution and genetics of herbicide

resistance in weeds. *Weed Science* 44, 176-193.

- **Jeschke, P., Lieb, F., Velten, R., Wiese, W-B. (2006).** Natural products and their role in the design of active ingredients for modern crop protection. En: Natural products for pest management. ACS symposium series 927. American Chemical Society, Washington. DC, pp 128-141.
- **Joseph-Nathan, P., Wesener, J. R.; Günther H. (1984).** A two-Dimensional NMR study of Angelic and Tiglic Acid. *Organic Magnetic Research* 22, 190-191.
- **Kase, H., Iwahashi, K., Matsuda, Y. (1986).** K-252a, a potent inhibitor of protein kinase C from microbial origin. *Journal of Antibiotics* 39, 1059-1065.
- **King, R. M. (1967).** Studies in the Eupatorieae (Compositae) IV. *Hofmeisteria. Rodora* 69, 352-371.
- **Kobaisy, M., Tellez, M.R., Dayan, F.E., (2005).** Mamonov, L.K., Mukanova, G.S., Sitpaeva, G.T., Gemejeva, N.G. Composition and phytotoxic activity of *Nepeta pannonica* L. essential oil. *Journal of Essential Oil Research* 17, 704-707.
- **Kortvely, E., Gulya, K. (2004).** CaM, and various ways to regulate its activity. *Life Science* 74, 1065-1070.
- **Kovats, E. (1958).** Gas chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen.I. Retentions indices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helvetica Chimical Acta* 41, 1915-1932.
- **Kovats, E.Sz. (1965).** Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. En: Giddings, J.C. Keller, R.A. (Ed.), *Advances in Chromatography* 1, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 229-247.
- **Krishna, V., Gupta, G. S. Singh, P. (1999),** Acetylenic derivatives from some Compositae plants. *Journal of the Indian Chemical Society* 76, 689-691.
- **Krishna, V., Sharma, V., Singh, P. (2005).** Structural studies on sesquiterpenoids and thiophenic acetylenes from some Asteraceae plants. *Journal of the Indian Chemical Society* 82, 214-218.
- **Kumbhar, P.P., Dewang, (2001),** Eco-friendly pest management using monoterpenoids. I. Antifungal efficacy of thymol derivatives. *Journal of Science and. Industry Research* 60, 645-648.
- **Labrada, R. (ed). (2004).** Manejo de malezas para países en desarrollo (Addendum I). Estudios FAO 120. Producción y protección ambiental. (Ed.) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, pp 5-9.
- **Labrada, R. y Parker, C. (1996)** El control de malezas en el contexto del manejo integrado de plagas. En: Manejo de malezas para países en desarrollo. Reporte FAO 120.
- **Lam, J. (1998).** Acetylenes in the genus *Dahlia*, Asteraceae. *Phytochemistry* 49, 513-519.
- **Lee, D.L., Prisbylla, M.P., Dagarin, T.H., Howard, D.P., Proven, S.E., Ellis, M.K. (1997).** The discovery and structural requirement of inhibitors of *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Weed Science* 45, 601- 609.
- **Lee, S. H., Johnson, D., Walsh, P. M., Van-Lierop, J. E., Sutherland, C., Xu, A., Sneadden, W. A., Kosika, D. K., Narayanan, N., Cho, M. J. (2000).** Differential regulation of Ca²⁺/ Calmodulin-dependent enzymes by plant calmodulin isoforms and free Ca²⁺ concentration. *Biochem. Journa* 350, 299-306.
- **Leung, P.C., Taylor, W.A., Wang, J.H., Tipton, C.L. (1984).** Ophiobolin A. A natural product inhibitor of calmodulin. *Journal of Bioical Chemistry* 259, 2742-2747.
- **Leung, P.C., Taylor, W.A., Wang, J.H., Tipton, C.L. (1985).** Role of CaM inhibition in the mode

of action of Ophiobolin A. *Plant Physiology* 77, 303-308.

- **Liang, H.**, Bao, F., Dong, X., Tan, R., Zhang, C., Lu, Q., Cheng, Y. (2007). Antibacterial thymol derivatives isolated from *Centipeda minima*. *Molecules* 12, 1606-1613.
- **Liu, C.H.**, Mishra, A.K., Tan, R.X. (2006). Repellent, insecticidal and phytotoxic activities of isoalantolactone from *Inula racemosa*. *Crop Protection* 25, 508-511.
- **Macías, F.A.**, Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G. Castellano, D. (2000). "Natural products as allelochemicals" 10. Dehydrozalanin C: a potent plant growth regulator with potential use as a natural herbicide template. *Phytochemistry* 54, 165-171.
- **Macias, F.A.**, Castellano, D., Molinillo J.M.G. (2000) Search for a Estándar Phytotoxic Bioassay for allelochemicals selection of estándar Target species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2512-2521.
- **Macías, M.**, Ulloa, M., Gamboa, A., Toscano, R.A., Mata, R. (2001). Phytotoxic naphthopyranone derivatives from the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *Phytochemistry* 58, 751-758.
- **Mallory-Smith, C.A.** y **Retzinger, E.J.** (2003). Revised Classification of Herbicides by Site of Action for Weed Resistance Management Strategies. *Weed Technology* 17, 605-619.
- **Martínez-Luis, S.**, Rodríguez, R., Acevedo, L., González, M.C., Lira-Rocha, A., Mata, R., (2006). Malbrancheamide, a new CaM inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Tetrahedron* 66, 1012-1016.
- **Martínez-Luis, S.**, Pérez-Vásquez, A., Mata, Rachel. (2007) Natural products with calmodulin inhibitor properties, *Phytochemistry* 68, 1882-1903.
- **Mata, R.**, Bye R., Linares E., Macias, M., Rivero-Cruz, I., Perez, O., Timmermann B.N. (2003). Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua* *Phytochemistry* 64, 285-91.
- **Mata, R.**, Rivero-Cruz J. F., Chavez, D. (2002a). Bioactive Secondary Metabolites from selected Mexican medicinal Plants: Recent progress. En *Bioactive Compounds from Natural Sources*. (Ed. C. Tringalli) Taylor & Francis. London. pp 129-15.
- **Mata, R.**, Rivero-Cruz, I., Rivero-Cruz, B., Bye, R., Timmermann, B.N. (2002b). Sesquiterpene lactones and phenylpropanoids from *Cosmos pringlei*. *Journal of natural products* 65, 1030-1032.
- **Mata, R.**, Rivero-Cruz, J. F., Rojas, A. (1999). Bioactive Compounds from Selected Mexican medicinal plants. Proceedings of the International joint symposium iocd-cyted. *Chemistry, Biological and Pharmacological properties of medicinal plants from the Americas*. (k. Hosttetman, Ed.). Plenum Pres. N. Y. pp 61-183.
- **Mata, R.**, Lotina Henssen, B., Pereda-Miranda, R. (1996). Natural Products from Mexican Plants as a source of Potential herbicides Agents. En *Secondary Metabolites from Mexican Plants: Chemistry and Biological Properties*. Ed. Research Signpost. Trivandarum. pp 59-68.
- **Mata, R.**, Gamboa, A., Macias, M., Santillán S., Ulloa, M., González, M. D. (2003a). Effect of selected phytotoxins from *Guanomyces polythrix* on the calmodulin-dependent activity of the enzymes cAMP phosphodiesterase and NAD-kinase. *J. Agric. Food Chem.* 51 (16), 4559-4562.
- **Mata, R.**, Bye, R., Linares, E., Macías, M., Rivero-Cruz, I., Pérez, O., and Timmermann, B. N. (2003b). Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*. 64 (1):285-291.
- **Matsuda, Y.**, Kase, H. (1987). KS-619-1, a new inhibitor of calcium and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Streptomyces californicus*. *J. Antibiot.* 40, 1104-1110.
- **Matsuda, Y.**, Asano, K., Kawamoto, I., Yasuzawa, T., Shirahata, K., Sano, H., Kase, H., 1988. K-251 compounds, inhibitors of Ca²⁺ and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Streptoverticillium album*. *Agricultural Biology Chemistry* 52, 3211-3213.

- **Matsuda**, Y., Nakanishi, S., Nagasawa, K., Kase, H., (1990). Inhibition by new anthraquinone compounds, K-259-2 and KS-619-1 of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochemi. Pharmacol.* 39, 841-849.
- **McLafferty**, F.W., **Tureček**, F. (1993). Interpretation of mass spectra. pp 64-65 y 225-258. Ed. University.
- **Mc Nair** H. M. y **Miller** J. M. (1998). Basic Gas Chromatography. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- **Meazza**, G., Scheffler, B. E., Tellez, M. R., Rimando, A. M., Romagni, J. G., Duke, S. O., Nanayakkara, D., Khanc, I. A., Abourashed, E. A., Dayan, F. E.. (2002) The inhibitory activity of natural products on plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Phytochemistry* 59, 281-288.
- **Miner**, B.G., Sultan, S.E., Morgan, S.G., Padilla, D.K., Relyea, R.A. (2005). Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution* 20
- **Moerman**, D.E. (1991). The medicinal flora of native North America: An analysis. *Journal of Ethnopharmacology* 31, 1-42.
- **Mohler**, C.L., (2001). Weed life history: identifying vulnerabilities. In Ecological Management of Agricultural Weeds. pp. 40-98. Liebman, M., Mohler, C.L., Stever, C.P., Eds., Cambridge University Press, Cambridge.
- **Mohan**, J. (2000). Organic Spectroscopy: Principles and Applications. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- **Molnar**, A., Liliom, K., Orosz, F., Vertessy, B.G., Ovadi, J. (1995). Anti-CaM potency of indole alkaloids in *in-vitro* systems. *European Journal of Pharmacology* 291, 73-82.
- **Montes**, B.R., Flores M.H.E. (2001). Combate de *Fusarium thapsinum* y *Claviceps africana* mediante semillas de sorgo tratadas con productos naturales. Sorghum seeds treated with natural products for the control of *Fusarium thapsinum* and *Claviceps africana*. *Manejo Integrado de Plagas* (CATIE) 61, 23-30.
- **Moran**, G.R. (2005) (4-Hydroxyphenyl) pyruvate Dioxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433, 117-28.
- **Morsomme**. F. y **Boutry**, M. (2000). The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and Regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465, 1-16.
- **Nakanishi**, S., Kuroda, K., Osawa, K., and Kase, H., (1990). Calmodulin antagonistic action of KS-504a, a novel metabolite of the fungus *Mollisia ventosa*. *Agricultural Biology Chemistry* 54, 2697-2702.
- **Nakanishi**, S., Osawa, K., Saito, Y., Kawamoto, I., Kuroda, K., Kase, H. (1992). KS-505a, a novel inhibitor of bovine brain Ca²⁺ and calmodulin-dependent cyclic-nucleotide phosphodiesterase from *Streptomyces argenteolus*. *Journal of Antibiotics* 45, 341-346.
- **Nishino**, H., Naitoh, E., Iwashima, A., Umezawa, K. (1984). Quercetin interacts with calmodulin, a calcium regulatory protein. *Experientia* 40, 184-185.
- **Odom**, A., Del Poeta, M., Perfect, J., Heitman, J. (1997). The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analog L-685, 818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 41, 156-161.
- **Okuyama**, T., Takata, M., Takayasu, J., Hasegawa, T., Tokuda, H., Nishino, A., Nishino, H. (1991). Anti-tumor promotion by principles obtained from *Angelica keiskei*. *Planta Medica* 57, 242-246.
- **Orosz**, F., Christova, T.V., Ovadi, J. (1988). Functional *in vitro* test of calmodulin antagonism:

- Effect of drugs on interaction between calmodulin and glycolytic enzymes. *Molecular Pharmacology* 33, 678- 682.
- **Orosz, F., Telegdi, M., Liliom, K., Solti, M., Korbonits, D., Ovadi, J. (1990).** Dissimilar mechanisms of action of anticalmodulin drugs: Quantitative analysis. *Molecular Pharmacology* 38, 910- 916.
 - **Ovadi, J. (1989).** Effects of drugs on calmodulin-mediated enzymatic actions. In: Jucker, E. (Ed.), *Progress in Drug Research*, Vol. 33. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 353-395.
 - **Paulini, J., Costa, J., Bernardini, A-F. (2005).** Analysis of the essential oil from aerial parts of *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionization spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1076, 170-178.
 - **Pasreiter, C.M., Wulluhn, G., Weber, H., Schleifer, K-J. (1999).** Dimeric thymol derivative from *Arnica sachalinensis*. *Tetrahedron* 55, 2997-3006.
 - **Pasreiter, C.M., Weber, H., Bläser, D., Boese, R. (2002).** Stereochemistry and oxidative degradation of a dimeric thymol derivative from *Arnica sachalinensis*. *Tetrahedron* 58, 279-282.
 - **Paliyath, G., Poovaiah, B.W. (1985).** Identification of naturally occurring calmodulin inhibitors in plants and their effects on calcium- and calmodulin-promoted protein phosphorylation. *Plant Cell Physiology* 26, 201-209.
 - **Pereda-Miranda, R. Mata, R., Anaya, A.L., Pezzuto, J.M., Wickramaratne, D.B.M., Kinghorn, A.D.(1993)** Structure and biological activities of tricolorin A, major phytogrowth-inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *Journal of Natural Products* 56, 571-582.
 - **Perez-Vasquez A., Reyes A., Linares E., Bye R. Mata R. (2005).** Phytotoxins from *Hofmeisteria schaffneri*: Isolation and synthesis of 2'-(2''-hydroxy-4''-methylphenyl)-2'-oxoethyl acetate, *Journal of Natural Product.*, 68, 959-962.
 - **Powers, L. E. (2001).** *Ecological Principles of Agriculture*. Albany, NY.
 - **Putnam, A. R. (1988).** Allelochemicals from plants as herbicides. *Weed Technology* 2, 510-518.
 - **Randall, R.P. (2002).** A global compendium of weeds. Ed. RG and FJ Richardson.
 - **Rausher, M.D. (2001).** Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* 411, 854-864.
 - **Relyea, R.A. (2005a)** The lethal impact of Roundup® on aquatic and terrestrial. amphibians. *Ecological Application* 15, 1118-1124.
 - **Relyea, R.A. (2005b)** The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Application* 15, 618-627.
 - **Reporte FAO. (1997).** Resistencia de malezas a herbicidas. Reunion regional. Jaboticabal, Unesp, Brasil. Division de Producción y Protección Vegetal. Organización de la alimentación y la agricultura de las Naciones Unidas, FAO. Roma.
 - **Rimando A. M., y Duke S.O. (eds.) (2006).** Natural Products for Pest Management. En *Natural Products for Pest Management*. (ACS Symposium series 927) Ed. American Chemical Society, Washintong, DC, 2-17.
 - **Rivero-Cruz, J. F., Macias, M., Cerda García-Rojas, C., Mata, R. (2003).** A new phytotoxic nonenolide from *Phoma herbarum*. *Journal of Natural product* 66, 511-514.
 - **Rivero-Cruz B, Rivero-Cruz I, Rodríguez-Sotres R, Mata R. (2007).** Effect of natural and synthetic benzyl benzoates on calmodulin. *Phytochemistry*. 68, 1147-55.
 - **Rojas, S., Acevedo, L., Macias, M., Toscano, R.A., Bye, R., Timmermann, B., Mata, R. (2003).**

- Calmodulin inhibitors from *Leucophyllum ambiguum*. *Journal of Natural Products* 66, 221-224.
- **Romagni, J.G,** Allen, S.N., Dayan, F.E. (2000). Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. *Journal of Chemical Ecology* 26, 303–313.
 - **Romero, F.** (2004). *Manejo integrado de plagas*. Las bases, los conceptos, su mercantilización. Universidad Autónoma de Chapingo. Colegio de posgraduados. Reporte del instituto de fitosanidad, Unidad Montecillos.
 - **Ronca-Testoni, S.,** Hrelia, S., Hakim, G., Rossi, C.A. (1985). Interaction of smooth muscle relaxant drugs with calmodulin and cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Experientia* 41, 75-76.
 - **Rosselli, S.,** Bruno, M., Simmonds, M.S.J., Senatore, F., Rigano, D., Formisano, C. (2007). Volatile constituents of *Scutellaria rubicunda* Hornem subsp. linnaeana (Caruel) Rech. (Lamiaceae) endemic in Sicily. *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 797-800.
 - **Rouessac, F., Rouessac, A.** (2003). *Análisis Químico. Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*. McGraw. Hill.
 - **Roufogalis, B.D.,** Li, Q., Tran, V.H., Kable, E.P.W., Duke, C.C., (1999). Investigation of plant-derived phenolic compounds as plasma membrane Ca²⁺-ATPase inhibitors with potential cardiovascular activity. *Drug Dev. Res.* 46, 235–249.
 - **Sandra, P., Bicchì, C.** (ed). (1987). *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*. Ed. Huethig Buch Verlag.
 - **Scrivanti, L.R.,** Zunino, M.P., Zygodlo J.A. (2003). *Tagetes minuta* and *Schinus areira* essential oils as allelopathic agents. *Biochemical Systematics and Ecology* 31, 563–572.
 - **Schomberg, G., Dielmann, G.** (1973). Identification by means of retention parameters, *Journal of Chromatographic Science* 11, 151–159.
 - **Setia, N.,** Batish, D.R., Singh, H.P. Kohli, R.K., (2007). Phytotoxicity of volatile oil from *Eucalyptus citriodora* against some weedy species *Journal of Environmental Biology* 28, 63-66.
 - **Shahi, S.K.** Patra, M. Shukla, A.C. Dikshit, A. (2003). Use of essential oil as botanical-pesticide against post harvest spoilage in *Malus pumilo* fruit. *BioControl* 48, 223-232.
 - **Shaner, D.L.** (2003) Herbicide safety relative to common targets in plants and mammals. *Pest Manag Sci* 60, 17–24.
 - **Sharma, R.K., Wang, J.H.** (1979). Preparation and assay of the Ca²⁺-dependent modulator protein. In: Greengard, P., Robinson, G.A. (Eds.), *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, Vol. 10. Raven Press, New York, pp 187-198.
 - **Sharma R.K., Wang, J.H.** Wu, Z. (1997). Mechanism of inhibition of calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase by dihydropyridine calcium antagonists. *Journal of Neurochemistry* 69, 845-850.
 - **Sharma, B.,** Deo, S.K., Bachas, L.G., Daunert, S. (2005). Competitive binding assay using fluorescence resonance energy transfer for the identification of calmodulin antagonists. *Bioconjugate Chemical* 16, 1257-1263.
 - **Shibamoto T.** (1987) Retention Indices in Essential Oil Analysis. En: *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*. Sandra P., Bicchì C. (ed). Ed. Huethig Buch Verlag. pp 259–270.
 - **Shieh, W-C.,** Dell, S., Repi, O. (2002). Nucleophilic Catalysis with 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) for the Esterification of Carboxylic Acids with Dimethyl Carbonate. *Journal of organic chemistry* 67, 2188-2199.

- **Silverstein, R. M., Webster, F. X. (1998).** *Spectrometric identification of organic compounds*. 6a Ed. New York. J. Wiley.
- **Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K. (2003).** Allelopathic interactions and allelochemicals: New possibilities for sustainable weed management. *Critical Review in Plant Sciences* 22, 239-311.
- **Skoog, D.A. (2001).** *Fundamentos de Química Analítica*. Thomson Paraninfo, S.A. Madrid.
- **Smith M.B., March, J. (2002).** *Advanced organic chemistry. Reactions, Mechanisms and structure*. 5a Ed. Wiley Interscience. New York.
- **Siuciak, J.A., Chapin, D.S., Harms, J.F., Lebel, L.A., McCarthy, S.A., Chambers, L., Shrikhande, A., Wong, S., Menniti, F.S., Schmidt, C.J. (2006).** Inhibition of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: A novel approach to the treatment of psychosis. *Neuropharmacology* 51, 386-396.
- **Tanaka, T., Abbas, H. K., and Duke, S.O. (1993).** Structure-dependent phytotoxicity of fumonisins and related compounds in a duckweed bioassay. *Phytochemistry* 33, 779-785.
- **Tarján, G., Bitter, I., Strasser, B., Szatmáry, M. (2002).** Data for the Gas-Liquid Chromatographic Analysis of Essential Oils. Determination of the composition of the Essential Oil of Marjoram. *Chromatographia* 56. suppl. S-155-S163.
- **Tori, M., Ohara, Y., Nakashima, K., Masakuzo S., (2001).** Thymol derivatives from *Eupatorium fortunei*. *Journal of Natural Products* 64, 1048-1051.
- **Toutenhoofd, S.L., Strehler, E.E., (2000).** The CaM multigene family as a unique case of genetic redundancy: multiple levels of regulation to provide spatial and temporal control of CaM pools?. *Cell Calcium* 28, 83-96.
- **Tranel, P.J., Wright, T.R. (2002).** Resistance of weeds to ALS- inhibiting herbicides: What have we learned? *Weed Science*. 50, 700-712.
- **Twirkoski, T. (2002).** Herbicide effects of essential oils. *Weed Science* 50, 425-431.
- **Valencia-Islas, N.A., Abbas H., Bye R., Toscano R.A. and Mata R. (2002a).** Phytotoxic compounds from *Prionosciadium watsoni*, *Journal of Natural Products* 65, 828-834.
- **Van den Dool, H., Kratz, P.D. (1963).** A generalization of the index system including linear temperature programmed partition chromatography. *Journal of Chromatography* 11, 463-471.
- **Van Puyvelde, L., Bosselaers, J., Stevens, C., De Kimpe, N., Van Gestel, J., Van Damme, P. (1999),** Phytotoxins from the Leaves of *Laggera decurrens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2116-2119.
- **Valencia-Islas, N.A., Paul R.N., Shier W.T., Mata R., Abbas H.K. (2002b).** Phytotoxicity and ultrastructural effects of gymnopusin from the orchid *Maxillaria densa* on duckweed (*Lemna paucicostata*) frond and root tissues, *Phytochemistry*, 6, 141-148.
- **Vaughn S.F., Spencer G.F. (1996).** Synthesis and herbicidal activity of modified monoterpenes structurally similar to cinmethylin. *Weed Scienci* 44, 7-11.
- **Vaughn, S.F. y Spencer, G.F. (1993).** Volatile monoterpenes as potential parent structures for new herbicides. *Weed Science* 41, 114-119.
- **Vertessy, B.G., Ramat, V., Böcskei, Z., Náray-Szabó, G., Orosz, F., Ovádi, J. (1998).** Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca²⁺-calmodulin: Crystallographic and spectroscopic studies. *Biochemistry* 37, 15300-15310.
- **Villaseñor, J.L Espinosa-García, L. F. (2004).** The alien flowering plants of Mexico. *Diversity and Distributions* 10, 113-123.

- **Vibrans, H. (2001).** Manejo de malezas en agroecosistemas tradicionales. Memoria, XXII Congreso Nacional de la Maleza, Colima, Col., 7-9 de noviembre de 2001, pp. 303-311.
- **Vyvyan, J. (2002).** Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals *Tetrahedron* 58, 1631-1646.
- **Wakabayashi, K., Böger, P. (2004a).** Phytotoxic sites of action for molecular design of modern herbicides (Part 1): The photosynthetic electron transport system. *Weed Biology and Management* 4, 8-18.
- **Wakabayashi, K., Böger, P. (2004b).** Phytotoxic sites of action for molecular design of modern herbicides (Part 2): Amino acid, lipid and cell wall biosynthesis, and other targets for future herbicides. *Weed Biology and Management* 4, 59-70.
- **Waller, G. R. (2003).** Introduction-Reality and Future of Allelopathy. En *Allelopathy: Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals*. Macías, F., Galindo, J. C. G., Molinillo, J. M. G., Cutler, H. G. (Eds.) CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 1-11.
- **Weir, T. L., Park, S. W., Vivanco, J. M. (2004).** Biochemical and Physiological Mechanisms mediated by Allelochemicals. *Curr. Op. Plant Biol.* 7, 472-479.
- **Weston, L.A., y Duke, S.O. (2003).** Weed and Crop Allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22, 367-389.
- **Wilson, C.L., Solar, J.M., El Ghaouth A. Wisniewski, M.E. (1997).** Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Diseases* 81, 204 - 210.
- **WSSA: <http://www.wssa.net/Weeds/Tools/Herbicides/HerbicideMovies.htm>.** Agosto 25, 2007.
- **Wu, Quan-Xiang, Shi, Yan-Ping, Jia, Zhong-Jian. (2006),** Eudesmane sesquiterpenoids from the Asteraceae family. *Natural Product Reports* 23, 699-734.
- **Yamniuk, A.P., Vogel, H.J. (2005).** Structural investigation into the differential target enzyme regulation displayed by plant CaM isoforms. *Biochemistry* 44, 3101-3111.
- **Yussefi, M. y Willer, H. (2002).** *Organic agriculture worldwide, 2002. Statistics and future prospects.* Bad Dürkheim, SÖL-Sonderausgabe 74, pp. 159
- **Zhao, C-X., Liang, Y-Z., Fang, H-Z., Li. X.-N., (2005)** Temperature-programmed retention indices for gas chromatography-mass spectroscopy analysis of plant essential oils. *Journal of Chromatography A* 109676-85.
- **Zhou, Y., Li, Y., Wang, Z., Ou, Y., Zhou, X. (1994).** ¹H NMR and spin-labeled EPR studies on the interaction of calmodulin with jujuboside A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 148-154.
- **Zhu, S., Lu, X., Qiu, Y., Pang, T., Kong, H. Wu, C., Xu. G. (2007).** Determination of retention indices in constant inlet pressure mode and conversion among different column temperature conditions in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1150, 28-36.
- **Zielinski, R. E. (1998).** Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annual Review of Plant Molecular Biology* 49, 697-725.

IX. APÉNDICE

PUBLICACIONES:

Araceli Pérez-Vásquez, Adelfo Reyes, Edelmira Linares, Robert Bye, Rachel Mata. (2005). Phytotoxins from *Hofmeisteria schaffneri*: Isolation and Synthesis of 2'-(2''-Hydroxy 4''-methylphenyl)-2'-oxoethyl Acetate. *Journal of Natural Products*, 68, 959-962.

Sergio Martínez-Luís, **Araceli Pérez-Vásquez**, Rachel Mata (2007). Natural products with calmodulin inhibitor properties. *Phytochemistry* 68, 1882-1903.

Araceli Pérez-Vásquez, Edelmira Linares, Robert Bye, Carlos Cerda-García-Rojas, Rachel Mata. (2008). Phytotoxic activity and conformational analysis of thymol analogs from *Hofmeisteria schaffneri*, Aceptado para su publicación en *Phytochemistry*.

Araceli Pérez-Vásquez, Edelmira Linares, Robert Bye, Santiago Capella, Rachel Mata. Chemical Composition and Phytotoxic activity of the Essential Oil of *Hofmeisteria schaffneri*, en preparación.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS:

Araceli Pérez, Iliana Morales, Paola Lozano, Robert Bye, Edelmira Linares, y Rachel Mata. "Fitotoxinas de *Hofmeisteria schaffneri* (A. Gray) King & Robinson (Asteraceae)". Primera Reunión Nacional de Química de Productos Naturales que se llevó a cabo en Mérida Yucatán los días 19 al 22 de mayo de 2004.

Araceli Pérez, Adelfo Reyes, Robert Bye, Edelmira Linares, y Rachel Mata. "Síntesis y actividad biológica de la fitotoxina Hofmeisterina (1)". Segunda Reunión Nacional de Química de Productos Naturales, que se llevó a cabo en Cocoyoc, Morelos los días 25 al 28 de Mayo de 2005.

Araceli Pérez-Vásquez, Robert Bye, Eelmira Linares, Adelfo Reyes y Rachel Mata. "Compuestos fitotóxicos derivados del timol de la especie *Hofmeisteria schaffneri*". Tercera Reunión Nacional de Química de Productos Naturales y Primera Reunión Nacional de Investigación en Productos Naturales, que se llevó a cabo en Querétaro, Querétaro, los días 16 al 19 de Mayo de 2006.

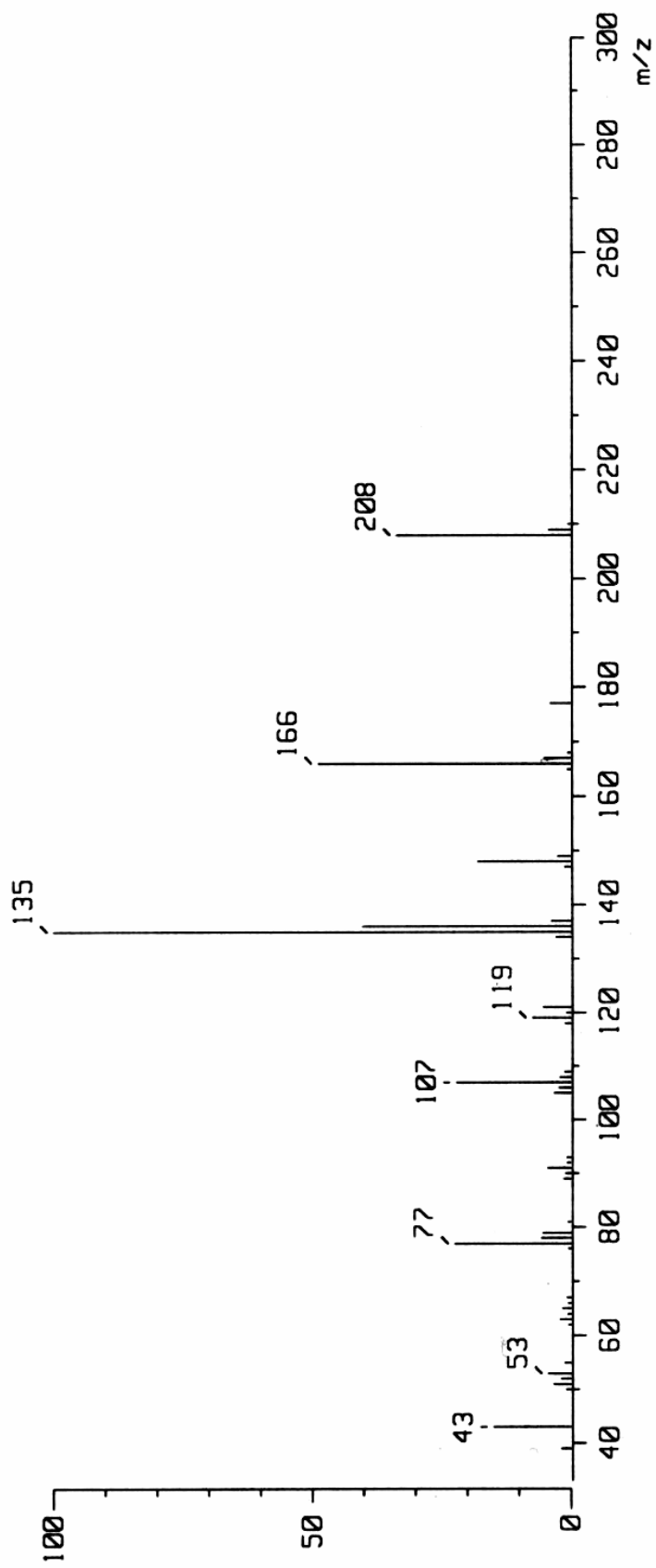
A. Pérez-Vásquez, R. Bye A. Reyes, and R. Mata. Thymol Derivatives from *Hofmeisteria schaffneri*, 47^a Reunión anual de la Sociedad Americana de Farmacognosia (47th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy) realizada en Arlington Virginia, USA los días 5 al 9 de Agosto del 2006. Abstract P-153.

Araceli Pérez-Vásquez, Edelmira Linares, Robert Bye, Santiago Capella, Rachel Mata. Chemical Composition of the Essential Oil of *Hofmeisteria schaffneri* (A. Gray) R.M. King & H. Robinson (Asteraceae). 48^a Reunión Nacional de la Sociedad Americana de Farmacognosia (48th Annual Meeting American Society of Pharmacognosy). Realizada en Portland, Maine. USA. Los días 14 a 18 de Julio de 2007. Abstract P-084S.

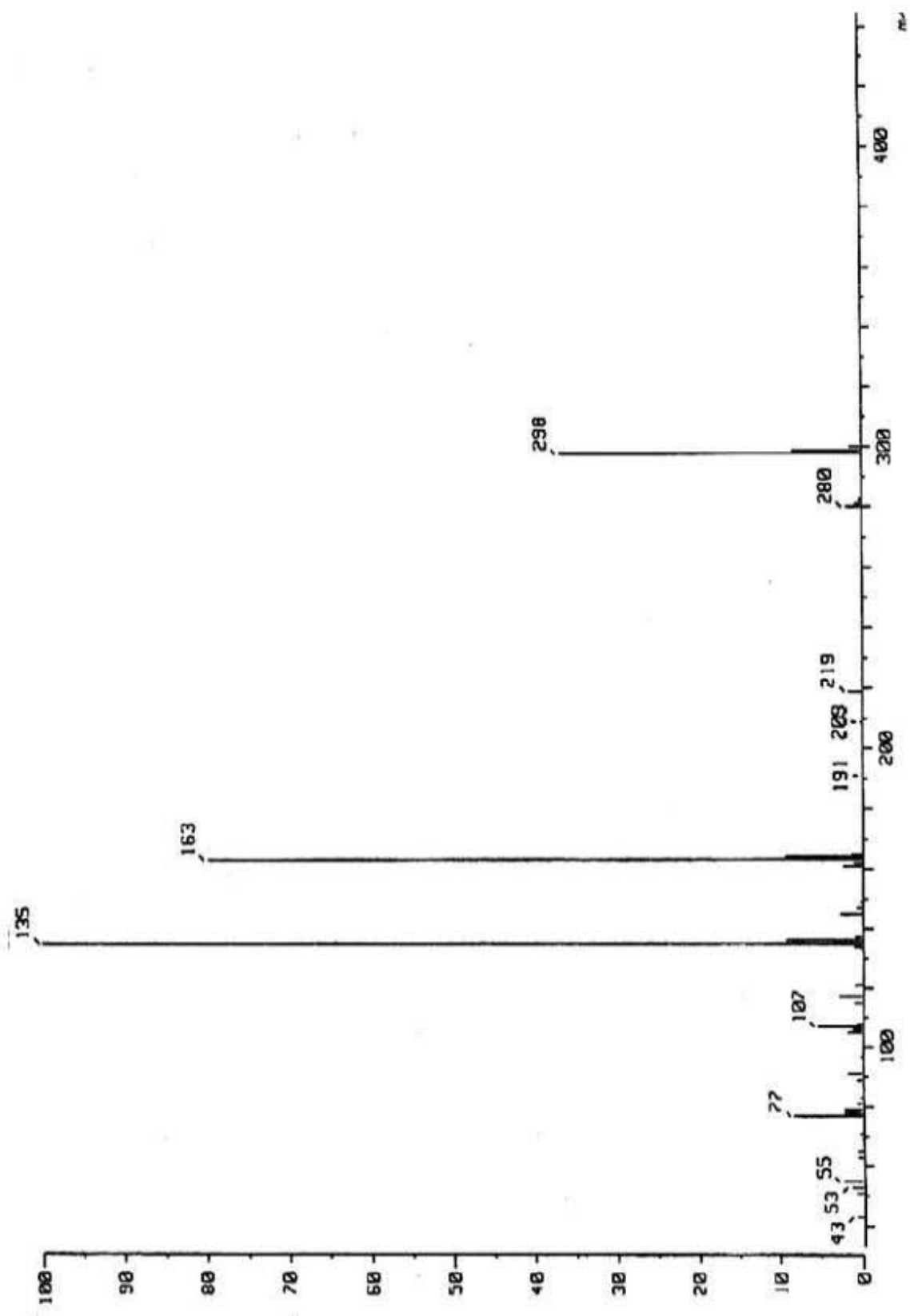
Araceli Pérez-Vásquez, Edelmira Linares, Robert Bye, Carlos Cerda-García-Rojas, Rachel Mata. Phytotoxic Activity And Conformational Analysis of Thymol Analogs from *Hofmeisteria schaffneri*. 48^a Reunión Nacional de la Sociedad Americana de Farmacognosia (48th Annual Meeting American Society of Pharmacognosy). Realizada en Portland, Maine. USA. Los días 14 a 18 de Julio de 2007. Abstract P-085S.

Araceli Pérez-Vásquez, Edelmira Linares, Robert Bye, Carlos Cerda-García-Rojas, Rachel Mata. Phytotoxic Activity And Conformational Analysis of Thymol Analogs from *Hofmeisteria schaffneri*. Reunión anual 2007 de la Sociedad Norteamericana de Fitoquímica (2007 Annual Meeting of Phytochemical Society of North America). Realizada en St. Louis Missouri, los días 21 al 25 de Julio del 2007. Abstract PHP-9.

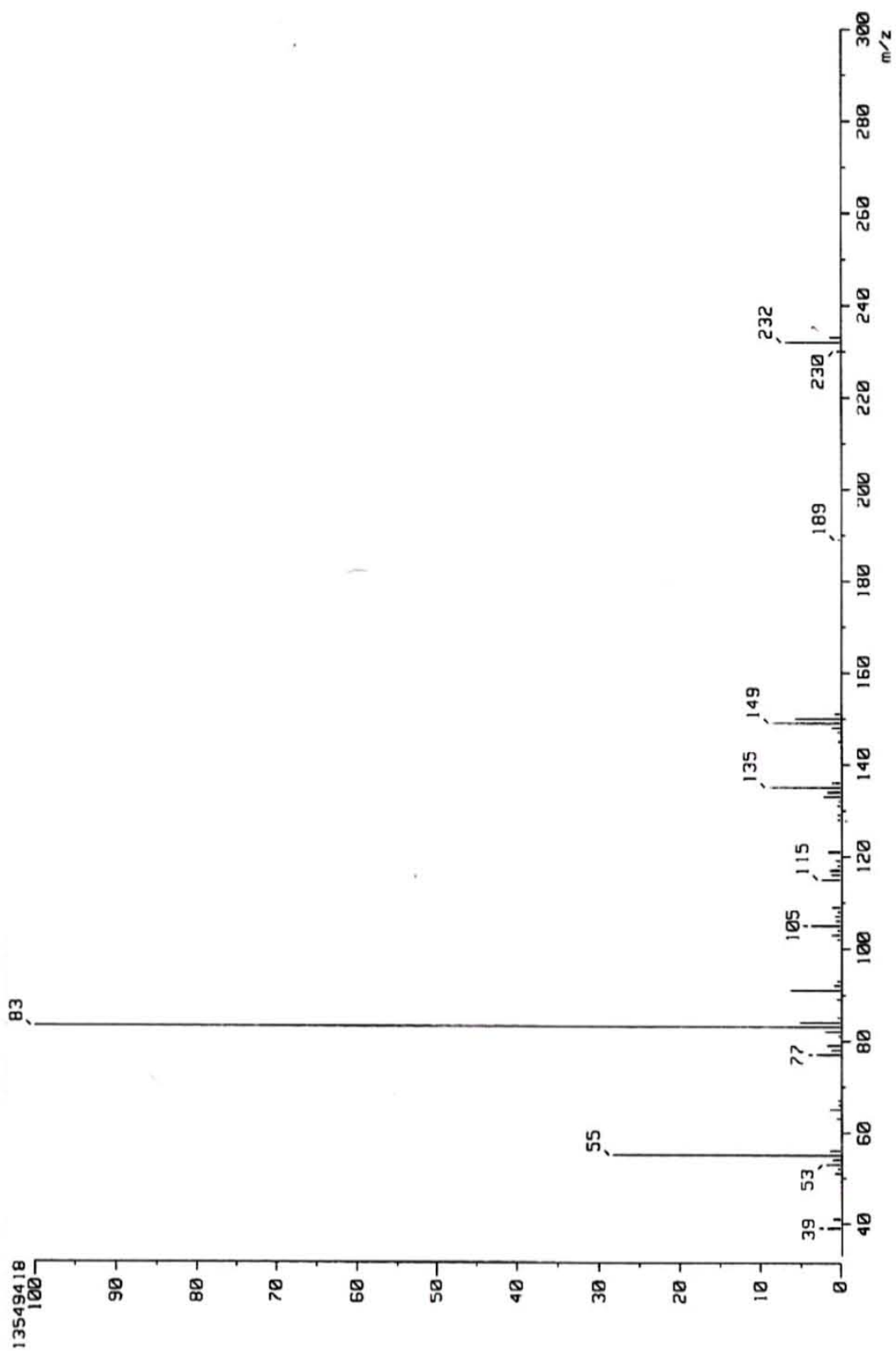
Araceli Pérez-Vásquez, Edelmira Linares, Robert Bye, Santiago Capella, Rachel Mata. Chemical Composition of the Essential Oil of *Hofmeisteria schaffneri* (A. Gray) R.M. King & H. Robinson (Asteraceae). Reunión anual 2007 de la Sociedad Norteamericana de Fitoquímica (2007 Annual Meeting of Phytochemical Society of North America). Realizada en St. Louis Missouri, los días 21 al 25 de Julio del 2007. Abstract PHP-10.



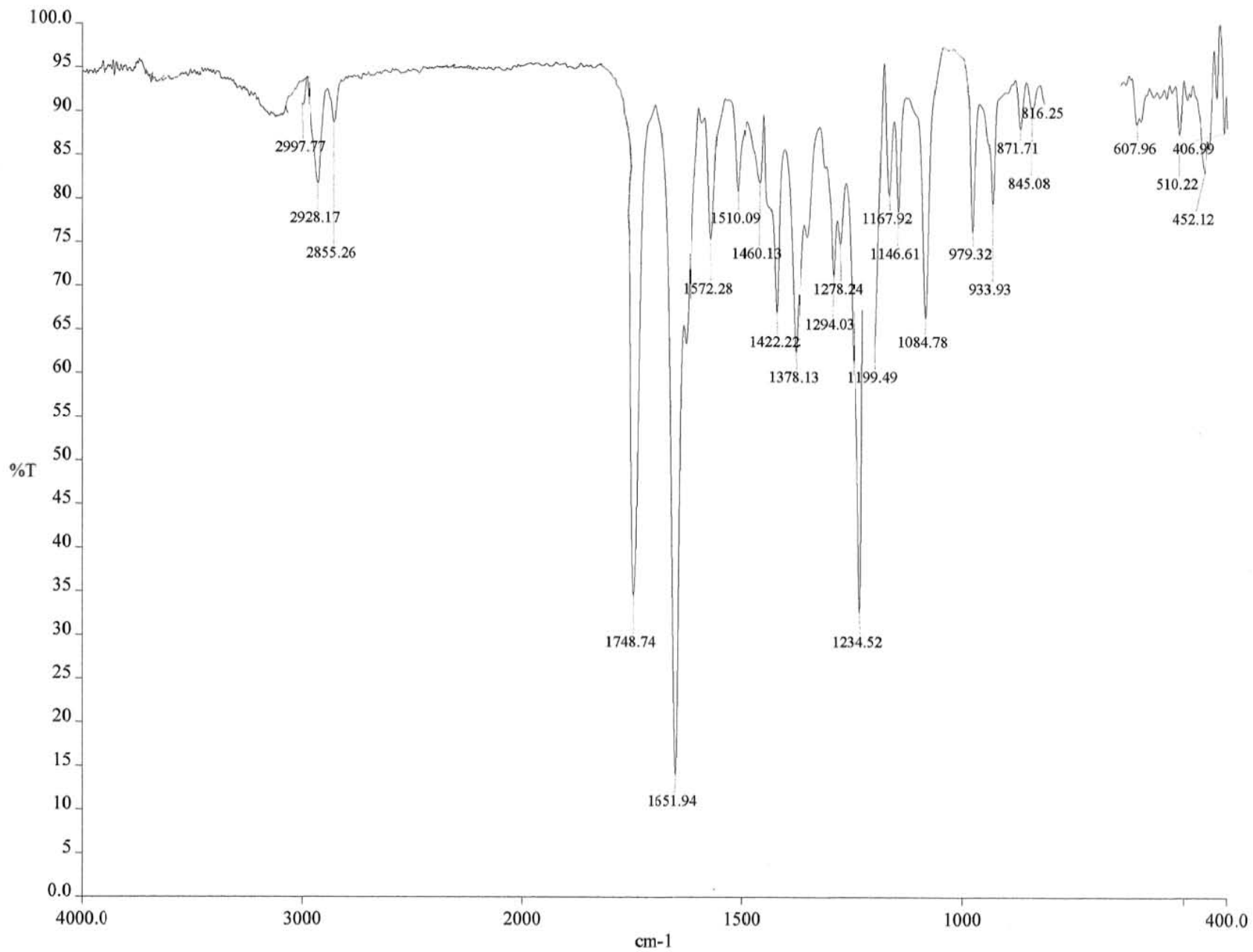
Espectro 14. Espectro de masas (MS-EI) de la hofmeisterina (76).



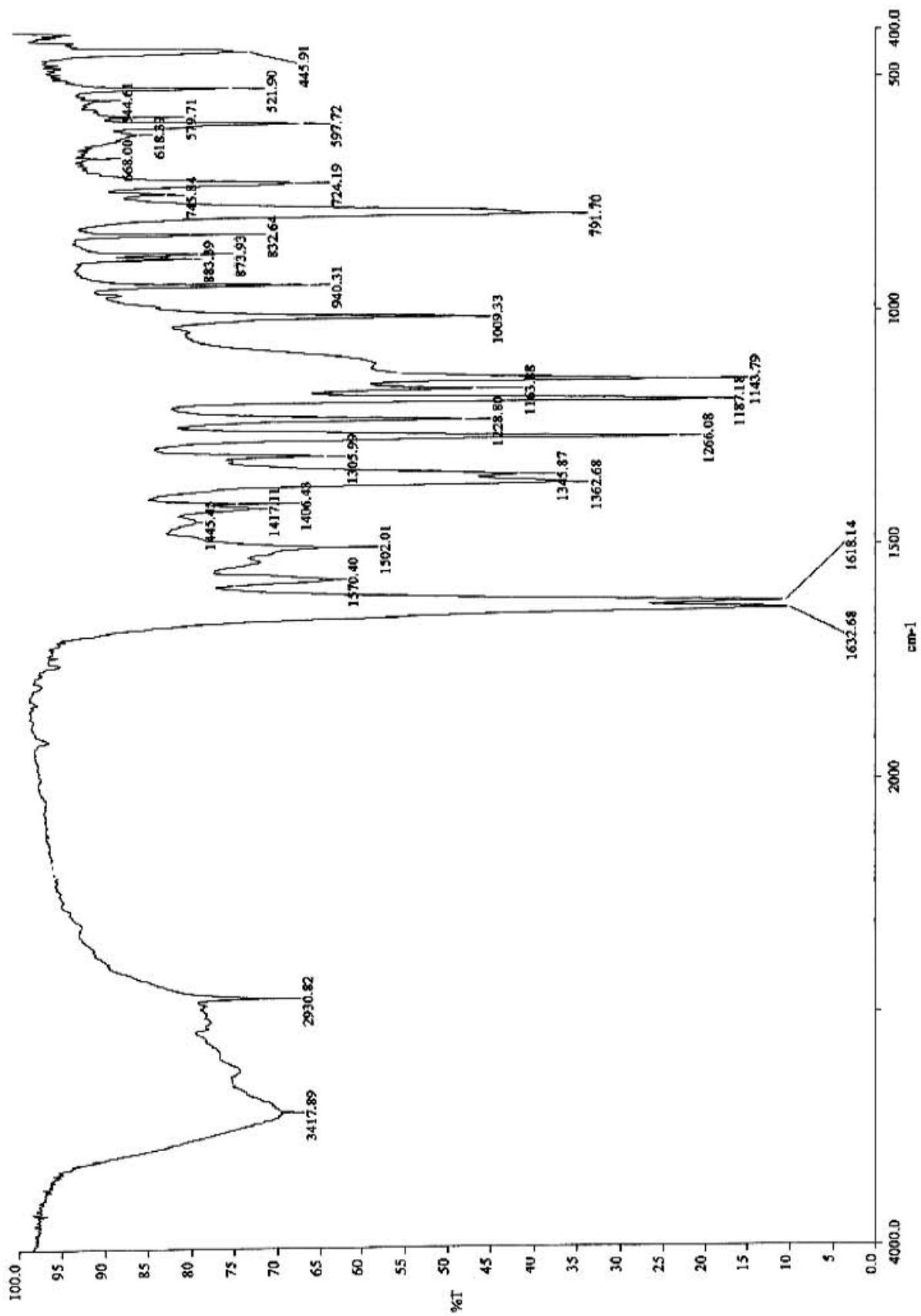
Espectro 15. Espectro de masas (MS-EI) de la hofmeisterina II (78).



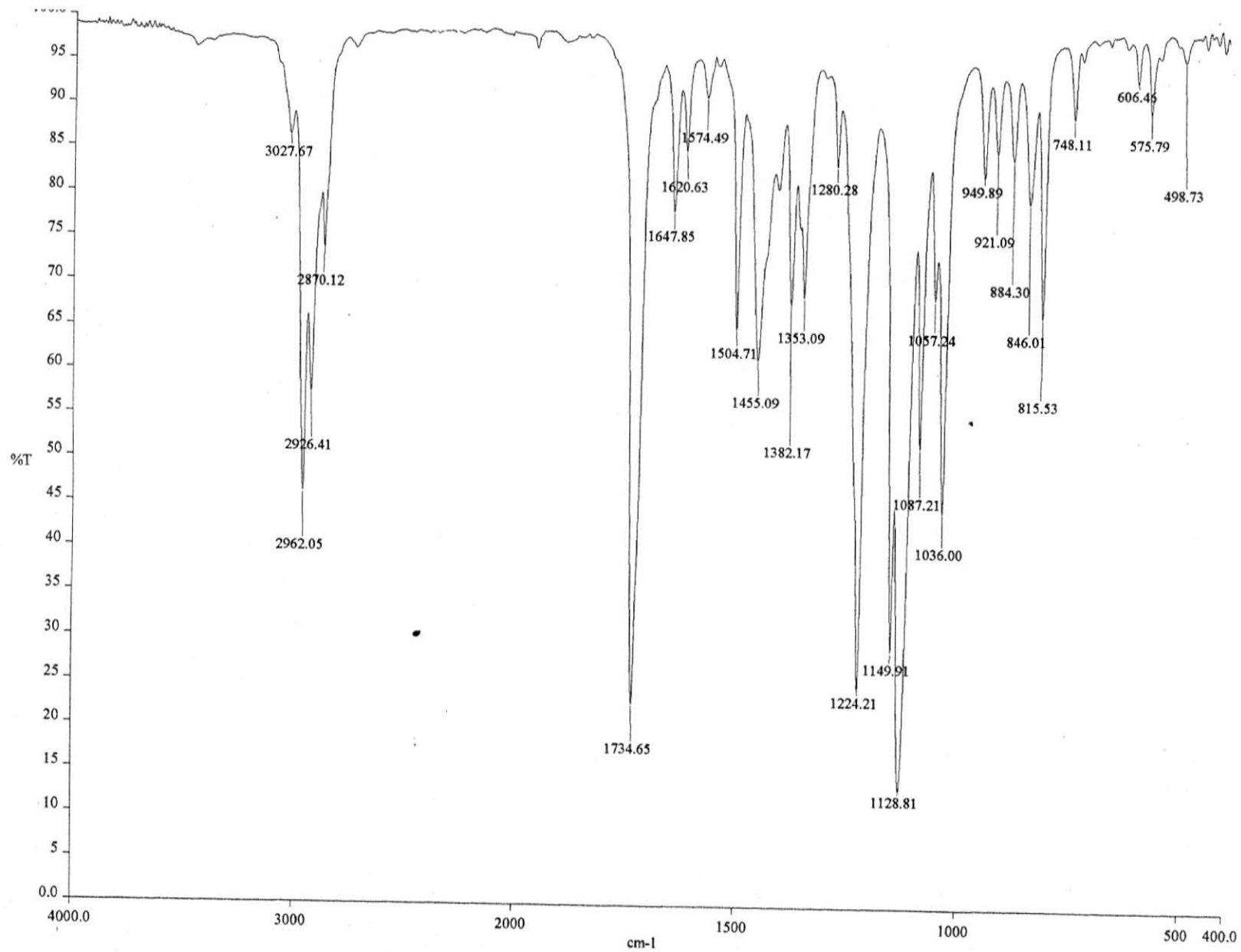
Espectro 16. Espectro de masas (MS-EI) de la hofmeisterina II (79).



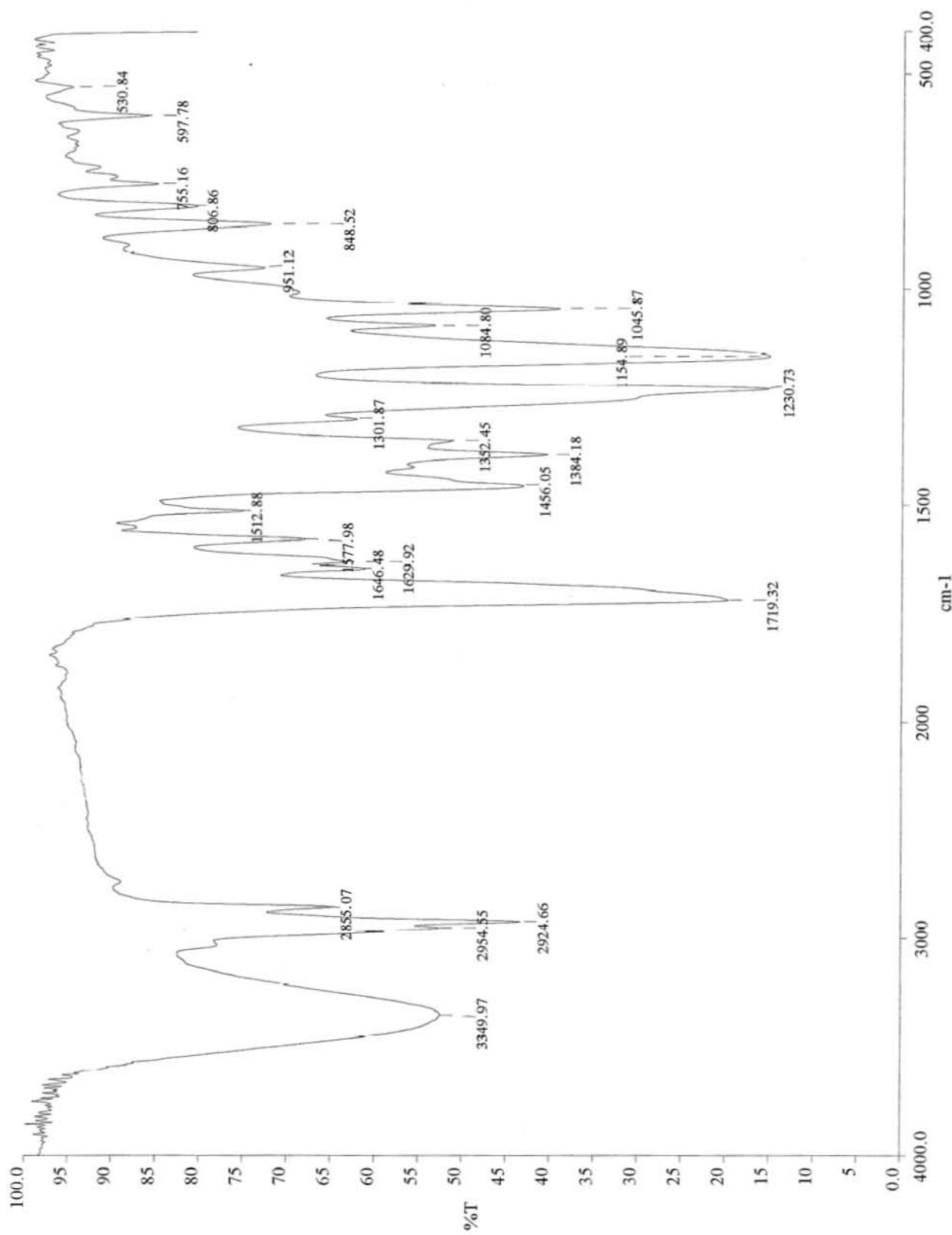
Espectro 17. Espectro en el infrarrojo del compuesto **76**.



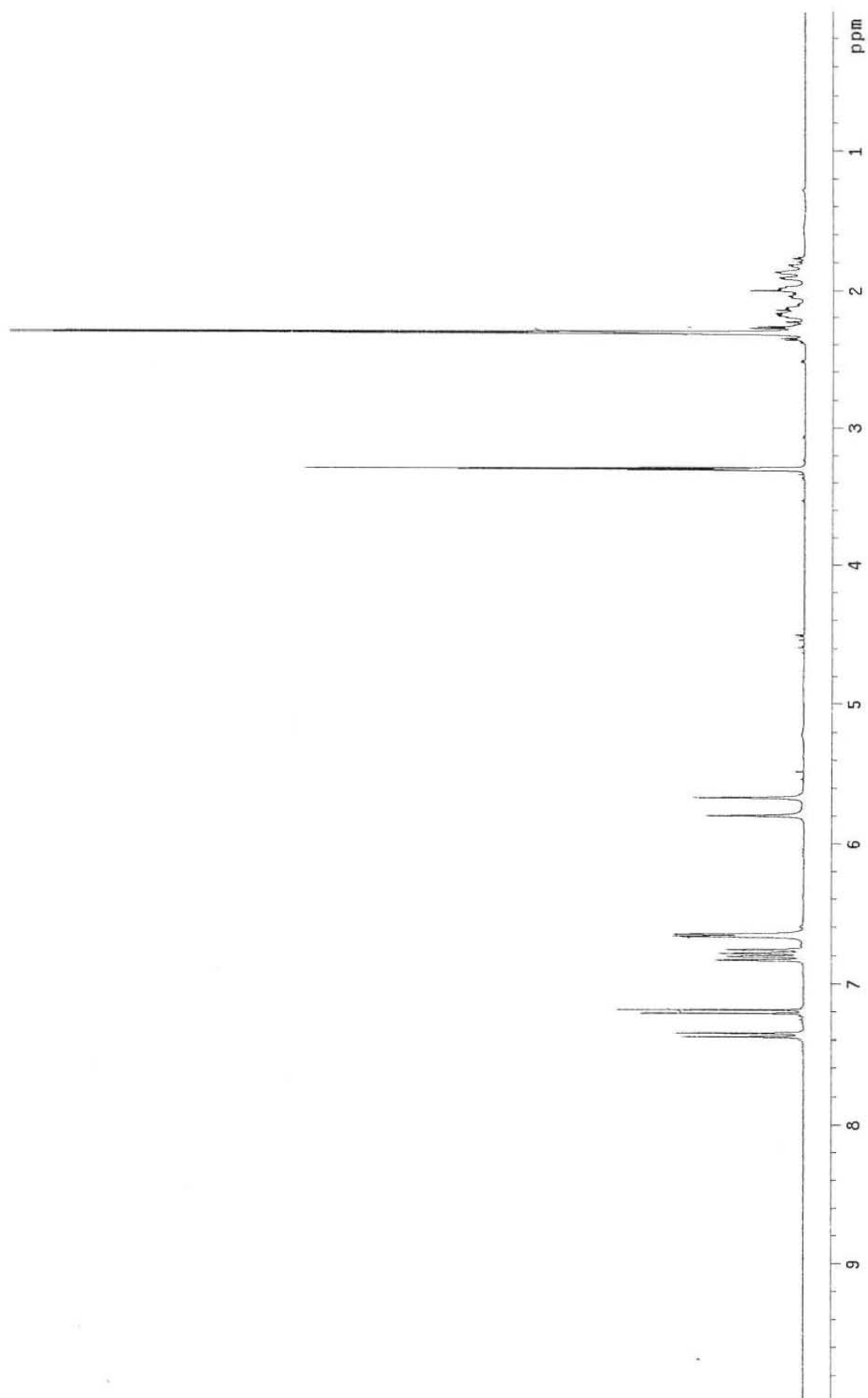
Espectro 18. Espectro en el infrarrojo del compuesto 78.



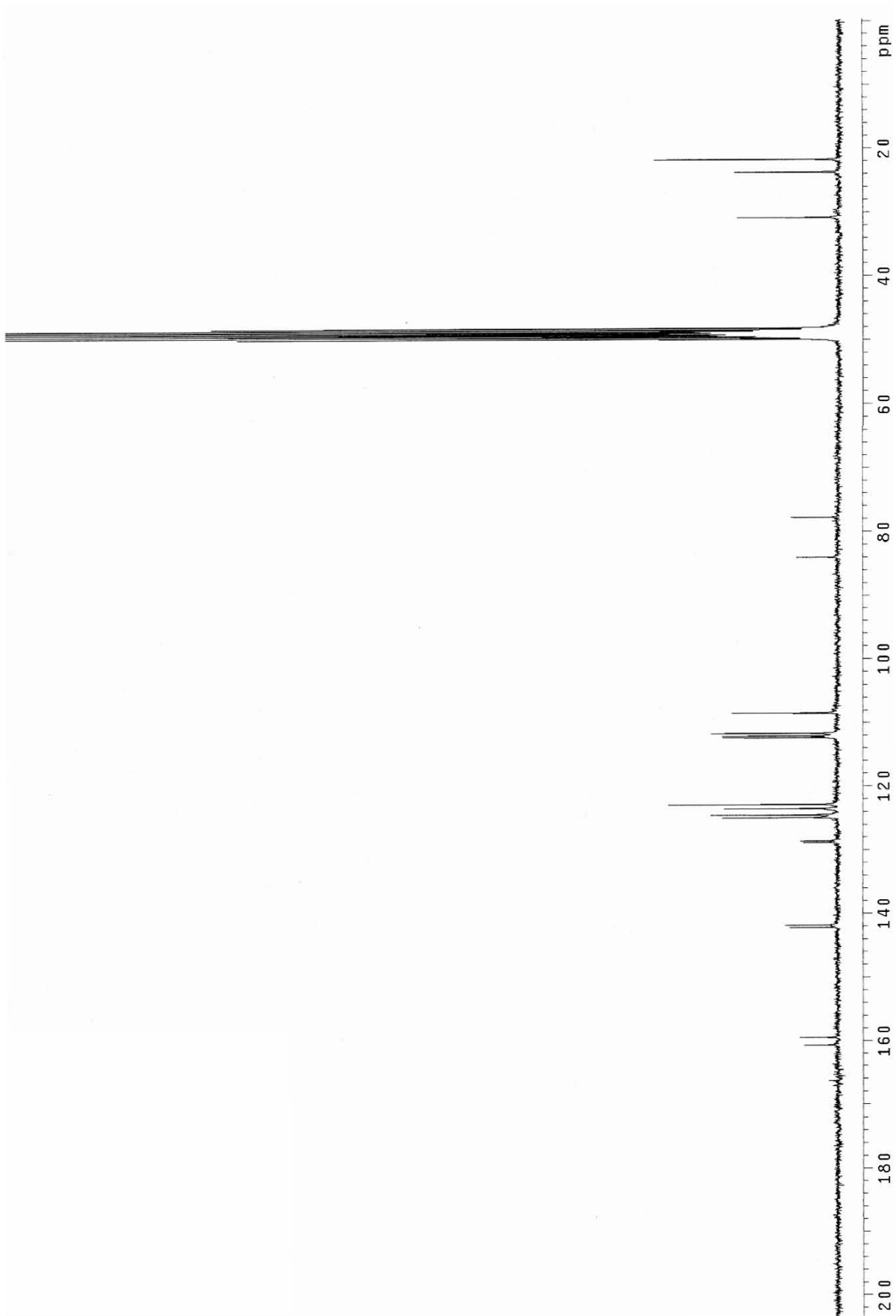
Espectro 19. Espectro en el infrarrojo del compuesto 79.



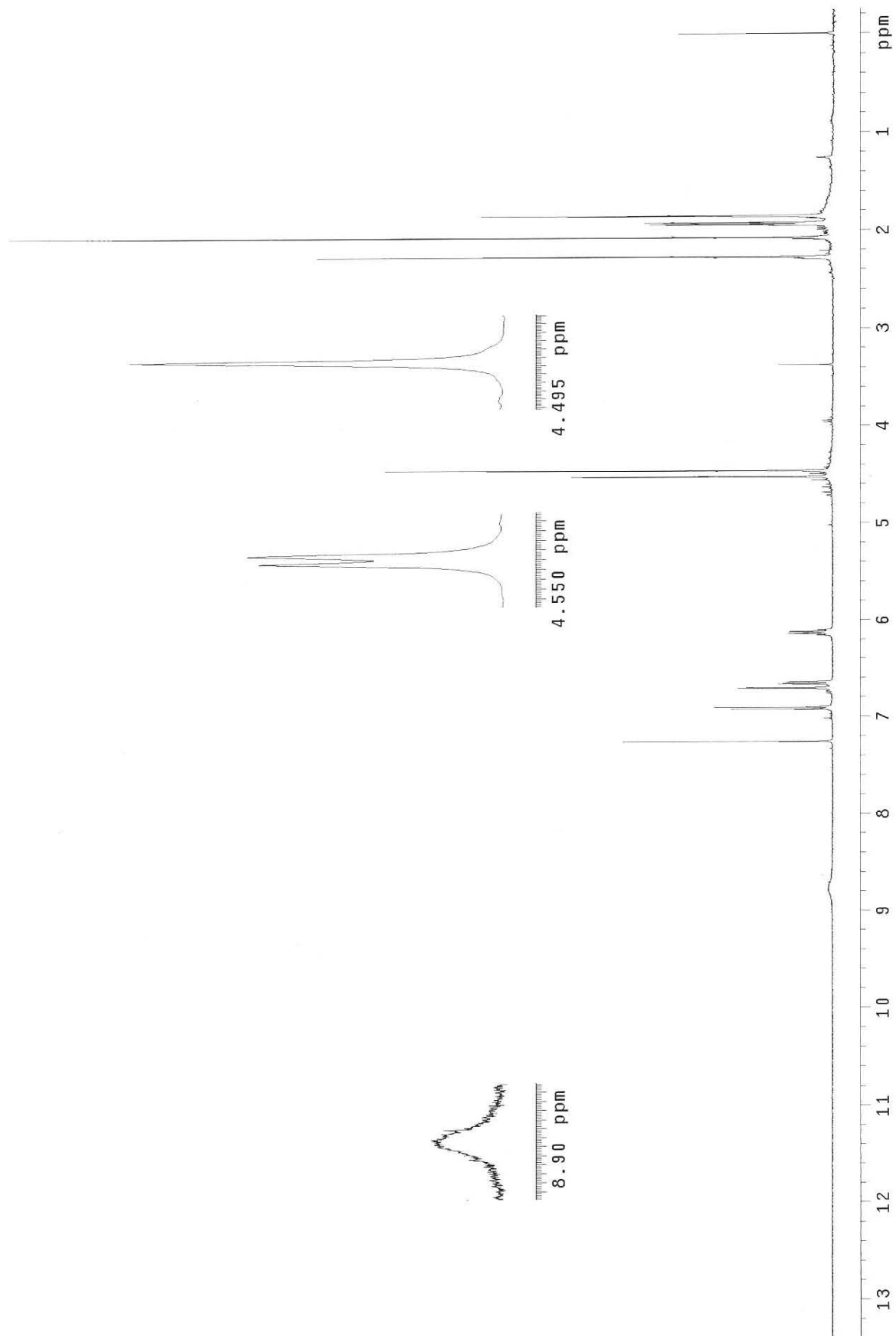
Espectro 20. Espectro en el infrarrojo del compuesto **84**.



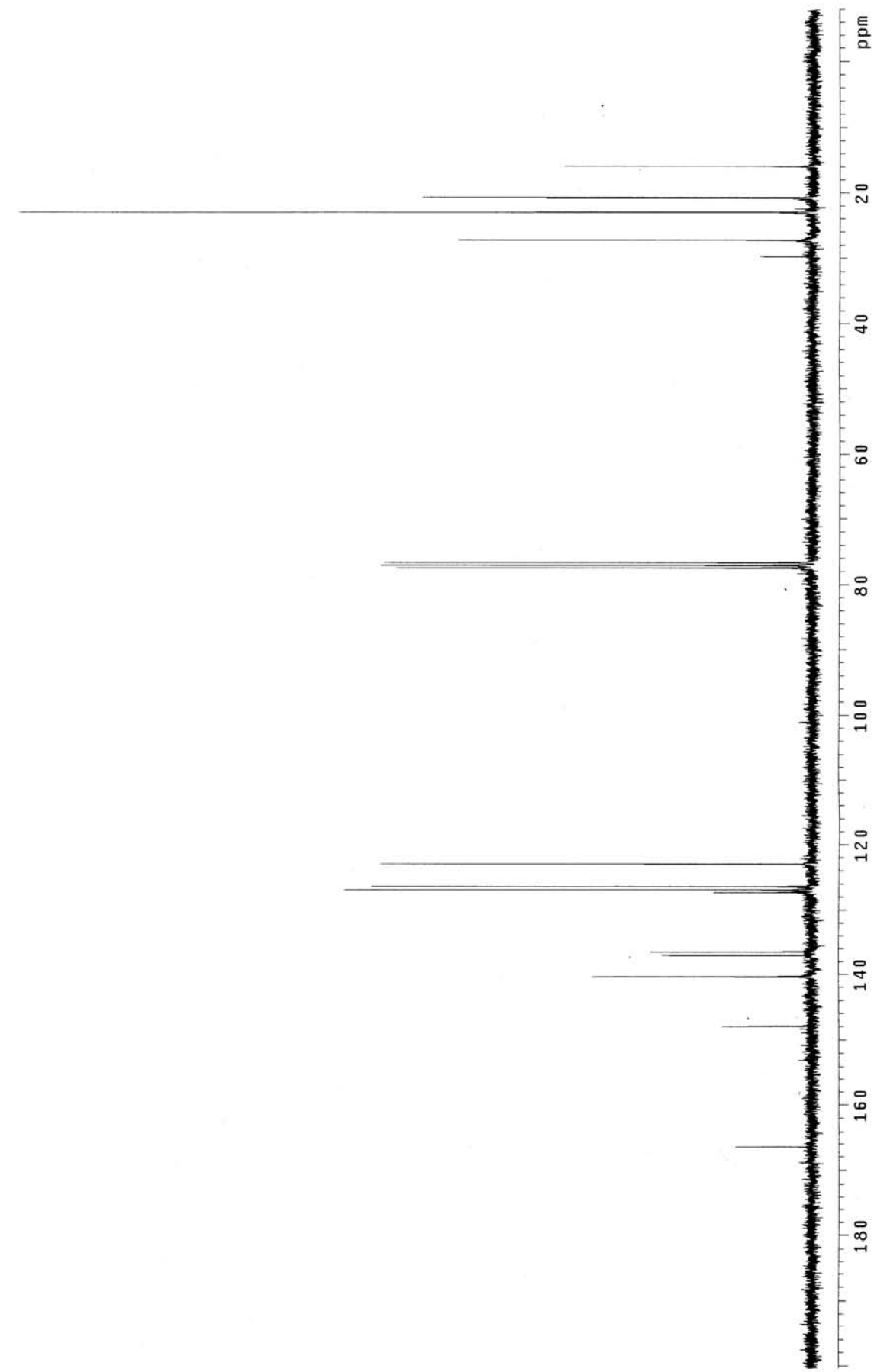
Espectro 21. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **77**.



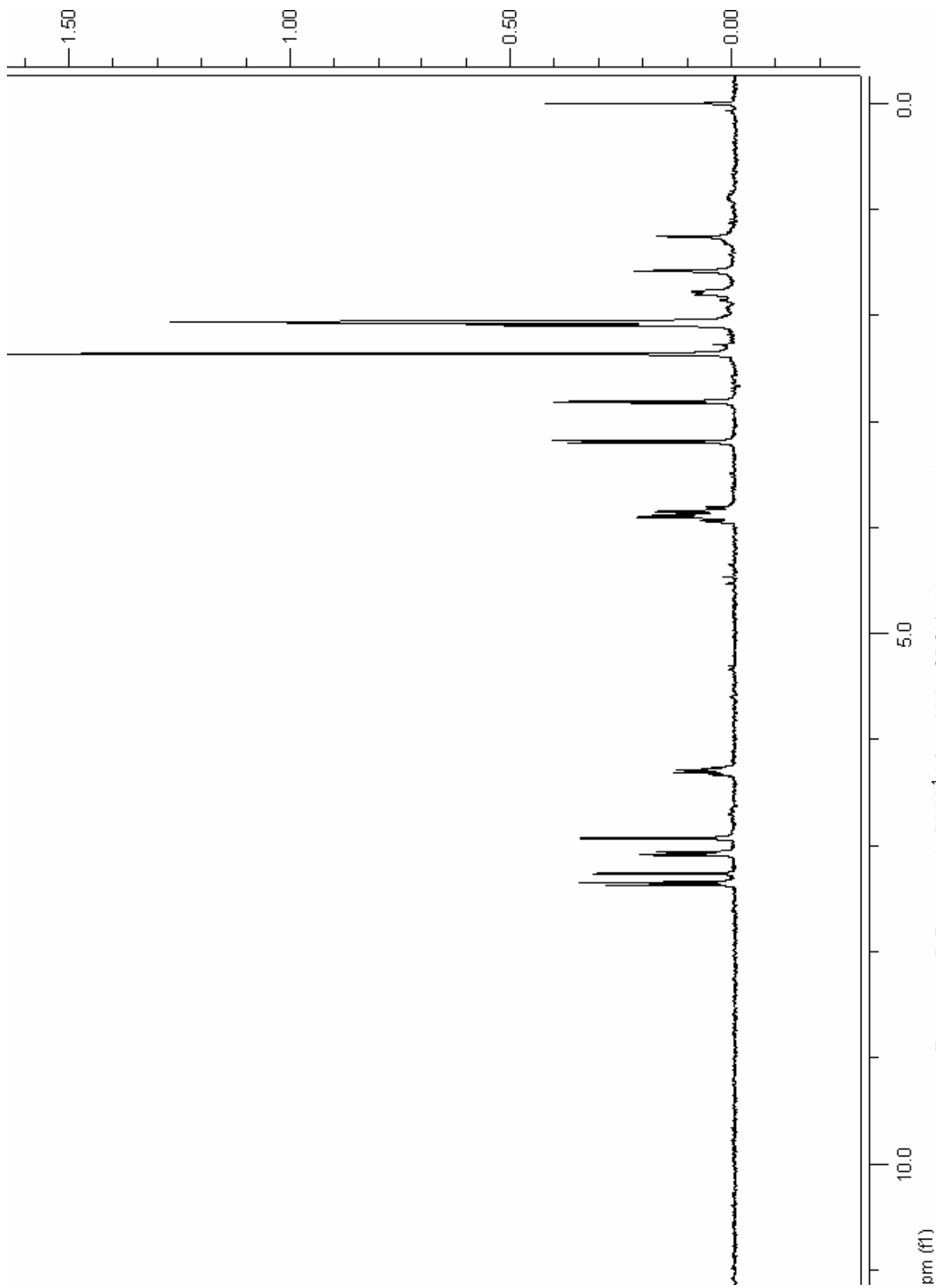
Espectro 22. Espectro de RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **77**.



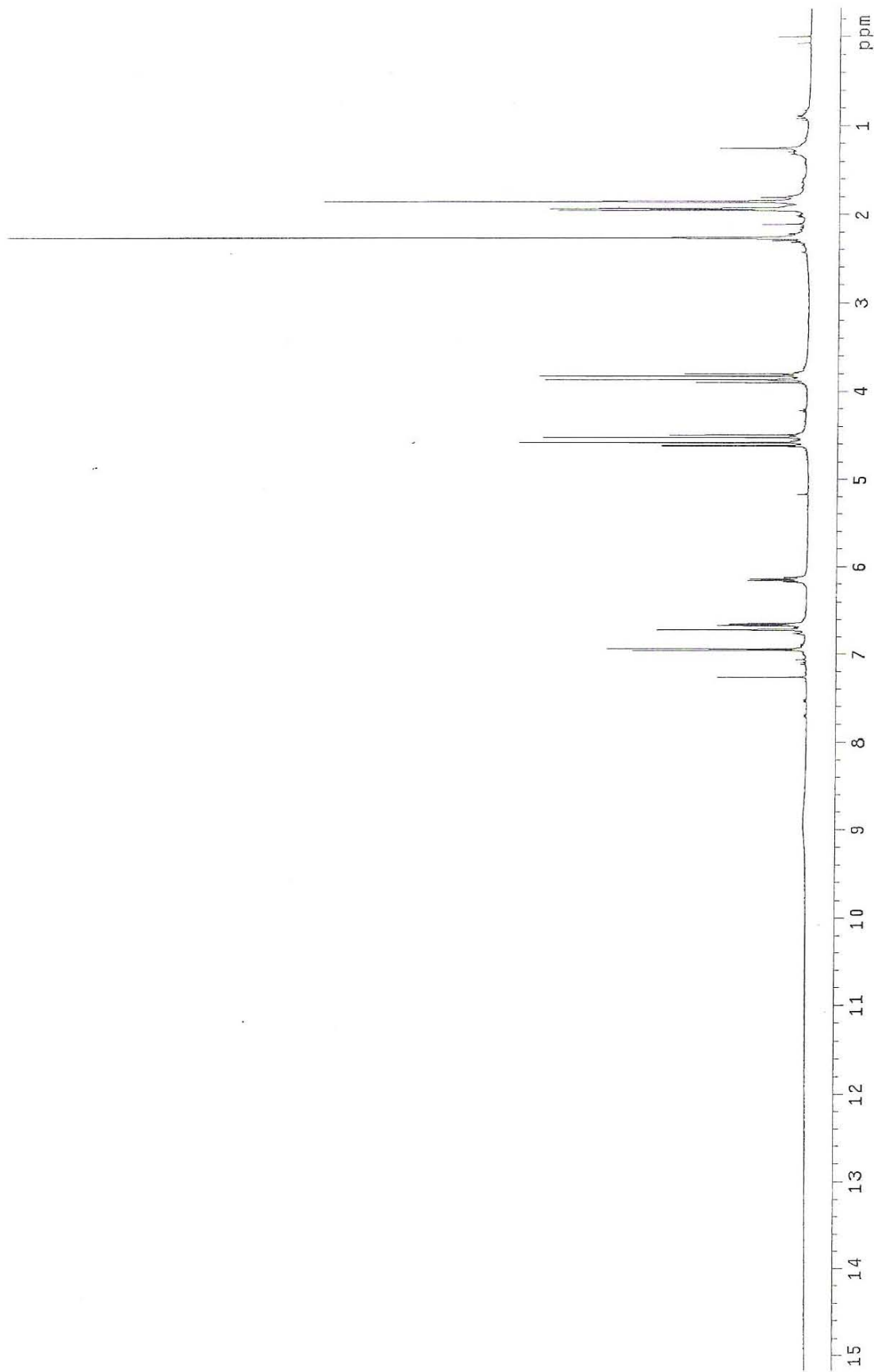
Espectro 23. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **80**.



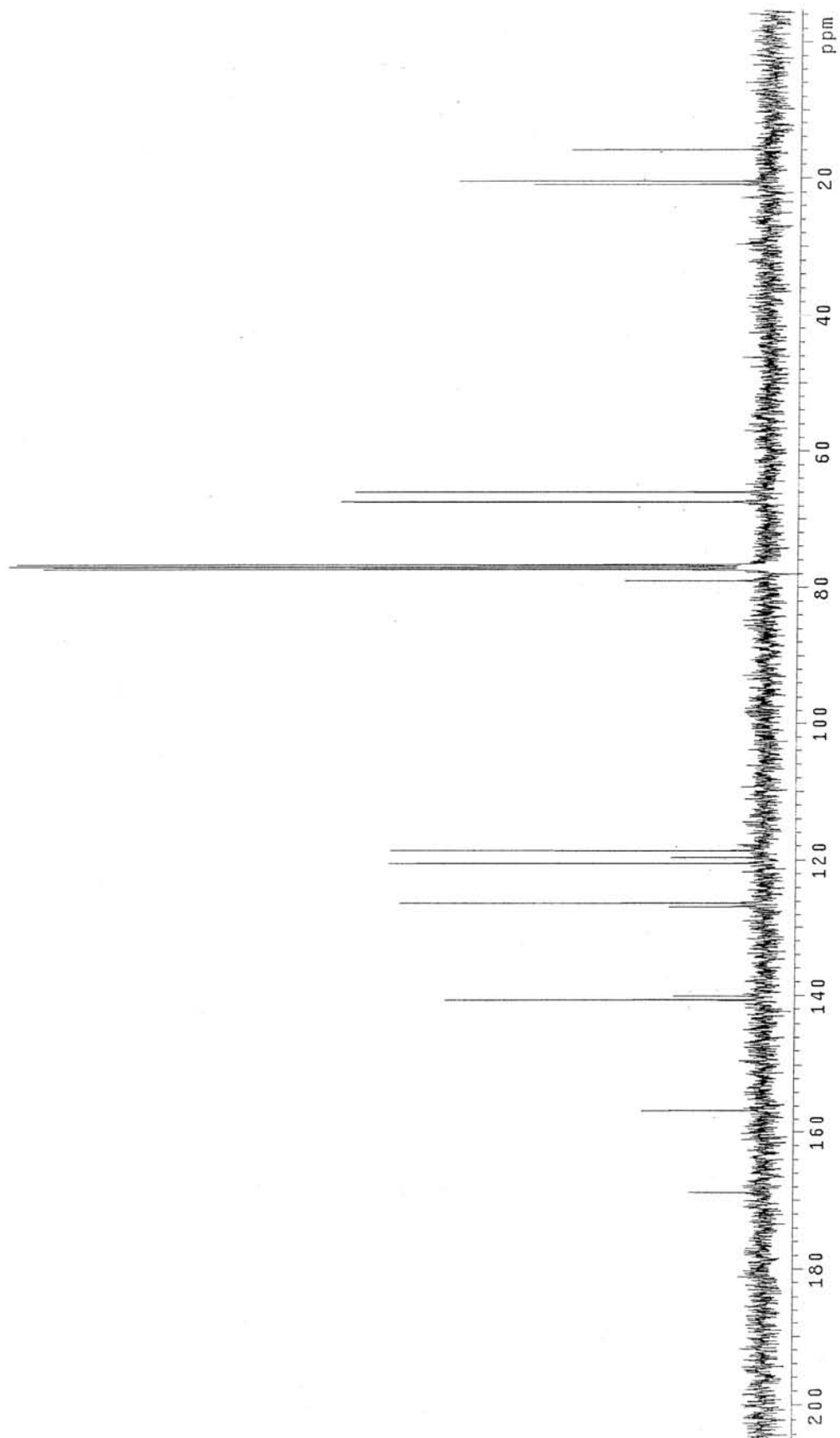
Espectro 24. Espectro de RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **80**.



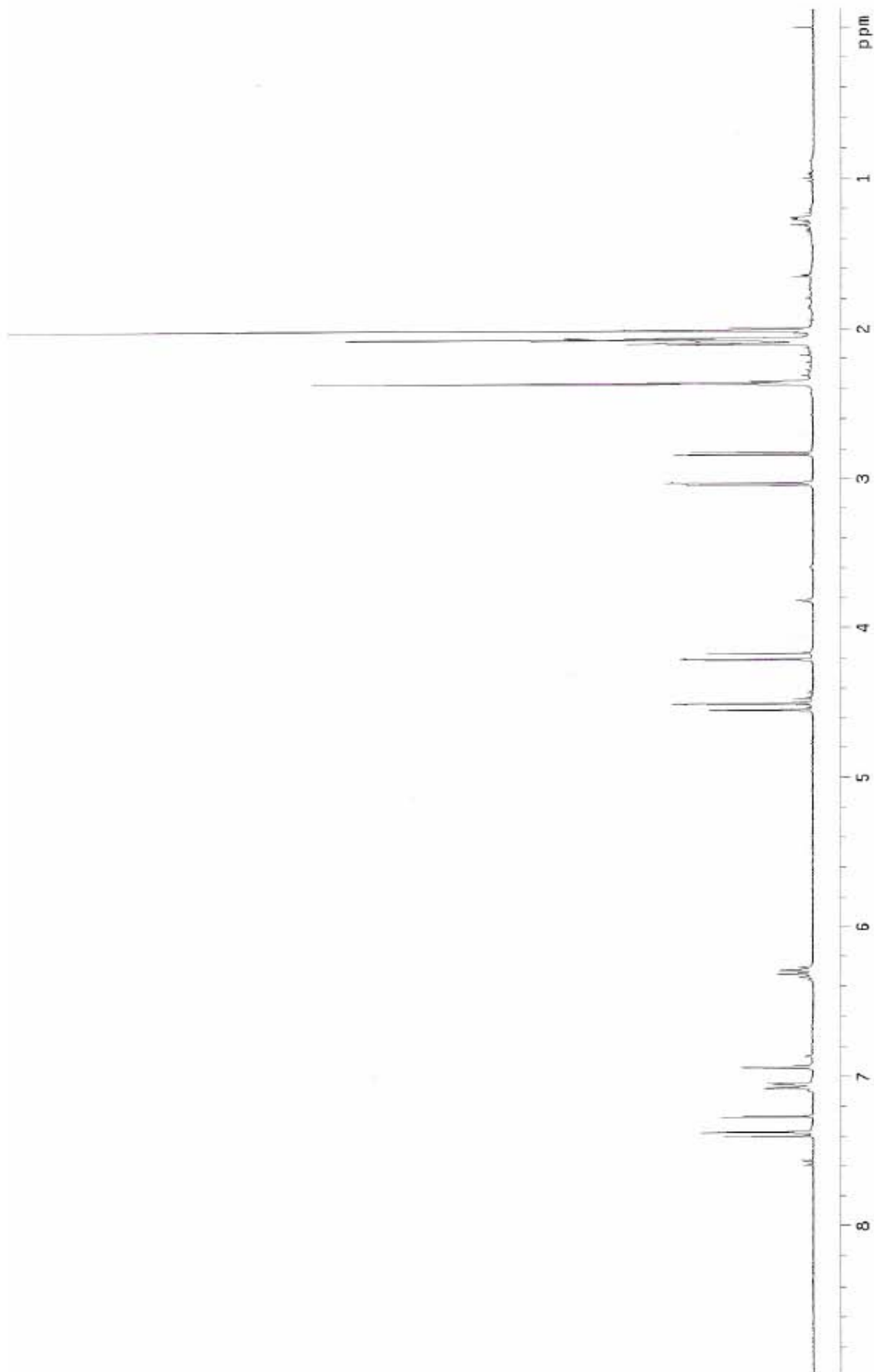
Espectro 25. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **81**.



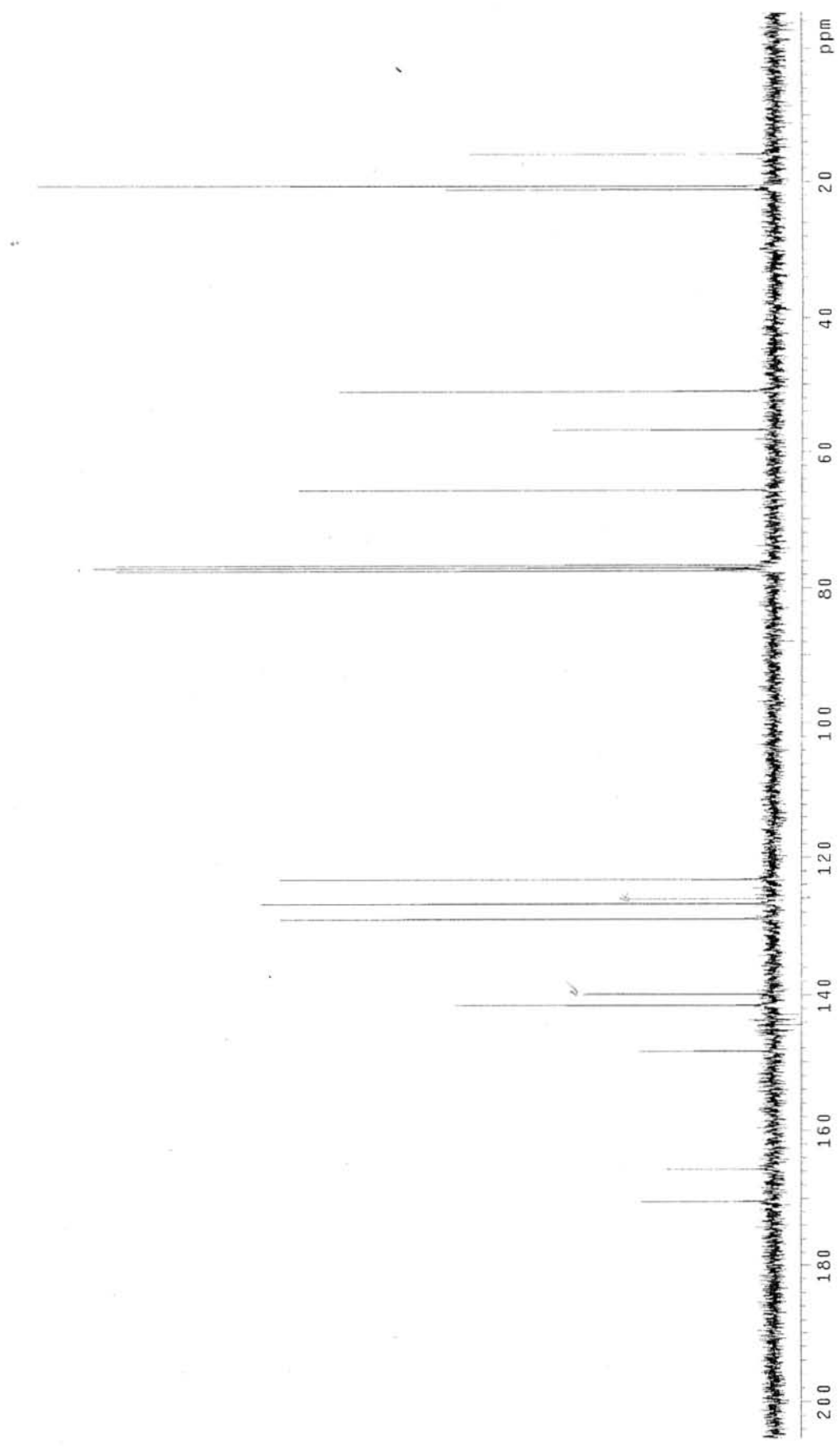
Espectro 26. Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **82**.



Espectro 27. Espectro de RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **82**.

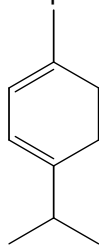


Espectro 28. Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **83**.

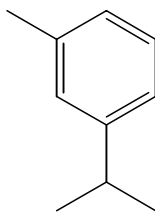


Espectro 29. Espectro de RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **83**.

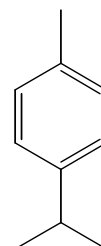
Tabla 35. Componentes identificados en los aceites esenciales.



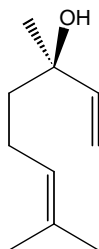
(94)



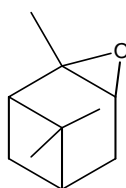
(95)



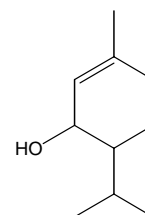
(96)



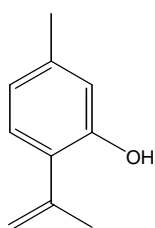
(97)



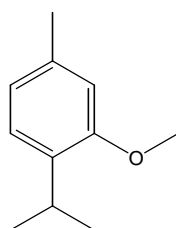
(98)



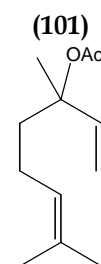
(101)



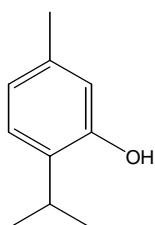
(102)



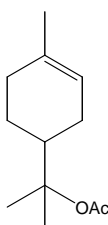
(103)



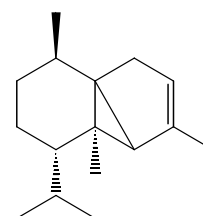
(104)



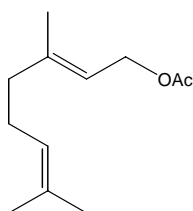
(105)



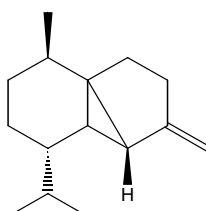
(106)



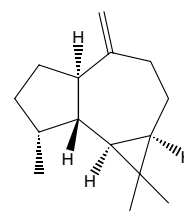
(107)



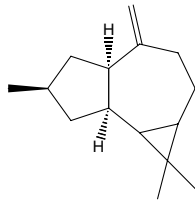
(108)



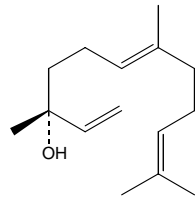
(109)



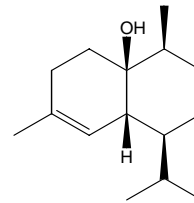
(110)



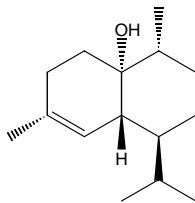
(111)



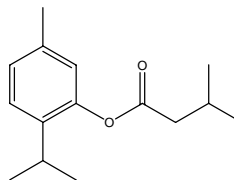
(113)



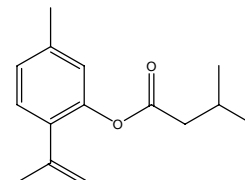
(116)



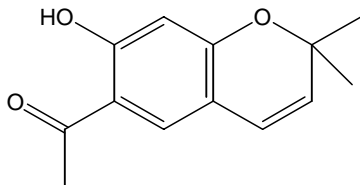
(116)



(114)



(112)



(119)