



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Obtención de compuestos de *Lantana achyranthifolia* y *Tournefortia densiflora* para su evaluación antifúngica en hongos fitopatógenos del chile (*Capsicum annum*)

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS: PRODUCTOS NATURALES Y ALIMENTOS

PRESENTA:

I.A. HÉCTOR CRUZ SANTIAGO

DIRECTORA:

DRA. BEATRIZ HERNÁNDEZ CARLOS

CODIRECTORA:

DRA. CLAUDIA VILLANUEVA CAÑONGO

H. CIUDAD DE HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA, MÉXICO, MAYO 2020

Esta Tesis de Maestría se realizó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través de la beca de manutención 868997/638968. El trabajo experimental se efectuó en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Agroindustrias y en el Laboratorio de Principios Bioactivos, que se encuentra incorporado al Edificio de Productos Naturales y Alimentos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, bajo la dirección de la Dra. Beatriz Hernández Carlos y la codirección de la Dra. Claudia Villanueva Cañongo. Concerniente al análisis conformacional, éste se llevó a cabo en el Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional–Zacatenco (CINVESTAV-IPN-Zacatenco), bajo la supervisión de la Dra. Angelina Flores Parra y del posdoctorante Dr. Osvaldo Tayde Villaseñor Granados.

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis se presentaron en la modalidad de cartel en el 4^{to} Congreso Internacional de Resonancia Magnética Nuclear Experimental, celebrado en Pachuca Hidalgo, en septiembre de 2018 por la Sociedad Mexicana de Resonancia Magnética Nuclear A. C.



AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis de Maestría ha sido posible gracias al apoyo directo e indirecto de diversas personas, por ello, expreso mis sinceros agradecimientos a:

Mis padres, Rómulo e Imelda que aunque no están aquí conmigo, desde la distancia nunca dejan de creer y confiar en mí, ya que gracias a su apoyo incondicional me permitieron llegar hasta este nivel de preparación profesional.

A mis hermanos y hermanas, los quiero mucho y agradezco todo lo que han hecho por mí; sin duda, pasamos por muchas situaciones difíciles, mismas que en su momento me hicieron flaquear, pero gracias a ustedes me fui dotando de más confianza cuando me faltaba.

A mi querido primo Leo, que más que mi primo lo considero un hermano, por compartir conmigo momentos de alegrías y de tristezas y porque aunque ahora se encuentre lejos siempre está disponible para mí.

A mi directora de Tesis, Dra. Beatriz Hernández Carlos por darme la oportunidad de introducirme hace ya cuatro años en un trabajo de investigación y por aceptarme bajo su dirección. Este primer trabajo en conjunto con su experiencia profesional y personal compartida, influyeron para que me inclinara por realizar la Maestría. Adicionalmente, agradezco enormemente el tiempo invertido en la dirección de esta tesis y por darme su total confianza y apoyo para planear e implementar cada una de las fases experimentales comprendidas en este trabajo.

A mi codirectora de Tesis, Dra. Claudia Villanueva Cañongo quien fue pieza clave para que me inclinara a cursar la Maestría en la UTM. Estoy sumamente agradecido por todo su apoyo, orientación y valiosos consejos compartidos los cuales influyeron en mi formación académica y personal. Asimismo, le agradezco por su tiempo y dedicación invertida en limpiar muchos de mis errores tanto en la parte experimental y en el escrito de la tesis y por sus valiosas aportaciones para el enriquecimiento del mismo.

A cada uno de los miembros de mi comité revisor de tesis, Dra. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza, Dra. Thalía Isolda Ramírez Reyes, Dra. Mayra Herrera Martínez y Dr. Raúl Salas Coronado; porque a través de sus observaciones y críticas constructivas, han ayudado a clarificar lo redactado en esta tesis.

A la Dra. Angelina Flores Parra del Departamento de Química del CINVESTAV-Zacatenco por permitirme realizar en su laboratorio los estudios teóricos de algunos compuestos y al Dr. Osvaldo Tayde Villaseñor por proporcionarme su apoyo y conocimiento básico en el análisis de los cálculos teóricos.

A la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez, por su valiosa ayuda en mis primeras cromatografías flash a partir de la cual obtuve mi primer compuesto puro y por el aprovisionamiento de ricas y exquisitas tazas de café.

A mi compañera Miriam Rojas Horizonte, por todo el trabajo compartido durante en el transcurso de estos casi tres años y sobre todo por brindarme tu ayuda en las diversas separaciones cromatográficas y la elucidación estructural. Muchas gracias por compartir conmigo las frías madrugadas del laboratorio y por estar siempre disponible para acompañarme a trabajar en algunos fines de semana; siempre recordaré los buenos momentos y las risas que compartimos en este lugar.

Al personal de la División de Posgrado, Carmen y Celes por todo su apoyo brindado en los trámites administrativos y porque aún en la distancia nunca recibí una negativa o excusa de su parte.

A mi gran amiga y maestra en ciencias, Mónica Morales Jiménez por tu apoyo sin condiciones y por todas tus muestras inmensas de cariño y por aprovisionarme de ciertos artículos y amistades; además, agradezco mucho tu tiempo y dedicación invertida en la revisión de mi protocolo de investigación. Sin duda alguna, eres un gran ejemplo de persona y una excelente amiga.

A mi amigo físico, Armando por acogerme en Zacatenco durante los primeros días de mi estancia en el CINVESTAV y por siempre estar dispuesto a echarme una mano.

A mi amiga ingeniero, Luz Isadora por estar siempre pendiente de mí. Es gratificante que aún en la distancia siempre tenga llamadas y mensajes tuyos, eres el claro ejemplo de amistades que perduran a través del tiempo.

A mi gran amigo chef Marco Antonio y a su maravillosa madre, por todas las atenciones y cariño que han tenido hacia mi persona desde la Licenciatura. Muchas gracias por los viajes, por la comida, por el hospedaje express y por darme la oportunidad de conocer a nuevos familiares y amigos.

A mis amigos Judith, Ofelia, Esther, Yarisleny, Marlitt, María del Pilar, Mónica Marcela, Yazmín, Rocío, Isaac y Jazel, por su apoyo, por su motivación, por todas sus muestras de cariño incondicional, por las amenas conversaciones, por estar siempre para todo y por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos que nunca voy a olvidar.

A mis amigos de la Coalición de Líderes Académicos Nocturnos (CLAN), Ángela, Margarita, Laura, Clemente y Barrita por todos los momentos compartidos en nuestra travesía por ENACTUS.

A Saret, María, Claudia y Ezequiel, mis mejores amigos que he tenido en el bachillerato por las infinitas risas y buenos momentos vividos durante el COBAO.

A mi querida profesora del COBAO, Lic. Roberta Aparicio Aguirre por darme la oportunidad de tener mi primer acercamiento con la Química y por empujarme a iniciar mi Licenciatura en la UTM; infinitas gracias por estar al pendiente de mi persona aún en la distancia y por su total apoyo, usted es el claro ejemplo de profesor que sabe tocar la mente y el corazón.

Finalmente, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la asistencia financiera brindada a esta investigación y a la Universidad Tecnológica de la Mixteca por brindarme una formación académica de calidad y por proveerme de las mejores instalaciones para llevar a cabo el trabajo experimental.

DEDICATORIAS

A mí increíble y fantástica madre, Imelda Santiago Merino que siempre creyó en mí y que a pesar de no haber estado de manera presencial conmigo, siempre me inculcó valores y me aconsejó. En ningún momento sentí tu ausencia ya que todo el tiempo has estado ahí para mí, brindándome en cada llamada y videollamada tus constantes e infinitas muestras de amor y animándome a alcanzar cada una de las etapas de mi formación profesional; madre no creo que seas consciente de todo lo que has hecho por mí y cada uno de mis hermanos. ¡Te amo a montones madre y me siento sumamente orgulloso de ser tu hijo!

A mí dedicado padre, Rómulo Cruz Martínez por todo el esfuerzo que has hecho por seguir apoyando mi formación académica, ya que sin tu soporte económico jamás hubiese podido llegar a este nivel de Maestría. ¡Padre, siempre tendrás todo mi respeto, admiración y cariño, ya que este triunfo alcanzado al día de hoy es gracias a ti!

A mis herman@s, Nahúm, Luis, Beny, Lourdes y Alicia que a pesar de la distancia estuvieron siempre a mi lado brindándome fuerzas y apoyándome para continuar con mis estudios. Ustedes han sido y seguirán haciendo el motor fundamental de la familia y les agradezco que siempre estén ahí para mí, tanto en los buenos y en malos momentos. Aunque me sientan frío, tengan por seguro que ¡Los quiero mucho herman@s!

A mis abuel@s, Emiliano, Emiliana, Honorio y Heliodora† por nunca dejar de impulsarme en mis metas, por consentirme de vez en cuando y por sus infinitas muestras de amor.

A mi querido tío, Maximino con quién puedo hablar de múltiples temas y por nunca dejar de creer en mí y en las capacidades que tengo como profesionista y ser humano. Me sonroja que siempre diga que le enorgullezco, considero que no es para tanto.

A mi cuñada, Yokibel por regalarme a un hermoso e inteligente sobrino y por las atenciones que tiene hacia mi persona.

A mis sobrin@s, Citlali, Yaduani Sarai, Elizabeth, Joshua Gael, Luis Freddy y Alexander por ser nuestras fuentes de alegrías y futuras matrículas de honor de la familia. ¡Ustedes me inspiran a dar la mejor versión de mí!

Por último y no por ello menos importante, a mi compañera ideal y amiga del alma, Miriam Rojas Horizonte por ser mi fuente de inspiración en estos últimos años y por formar parte esencial en mi vida. Contigo puedo discutir abiertamente sobre cualquier cosa, sin roce alguno y esto me ha permitido en los últimos años ser más consciente de que yo no siempre llevo la razón. Adicionalmente, ¡Adoro tus grandes muestras de compañerismo, cariño y tu inmenso amor!

RESUMEN

El uso indiscriminado de los fungicidas sintéticos empleados para el control biológico de hongos fitopatógenos asociados a la marchitez del chile tienen impactos negativos en el medio ambiente y la salud humana; por ello la apuesta hoy en día se centra en explorar otras estrategias para su manejo. Diversos informes científicos han demostrado que los extractos vegetales constituyen una importante alternativa para el control de plagas y enfermedades. Bajo este criterio, la presente investigación se enfocó en el estudio fitoquímico de los extractos metanólicos de la parte aérea de *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae) y la raíz de *Tournefortia densiflora* M. Martens & Galeotti (Boraginaceae). Se aislaron e identificaron los compuestos verbascósido (1), 8-epiloganina (2), un nuevo glicósido iridoide nombrado como glucurónido-8-epiloganina (3), carioptosido (4), ácido 8-epilogánico (5), pectolinaringenina 7-O- β -D- glucuronopiranosido (6, 11), 6-O-metilscutellarina (7), luteolina 7-glucurónido (8), glucurónidos de flavonas (9, 10), alantoína (12) y una mezcla de estigmasterol con β -sitosterol (13) para la evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica en especies de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, identificados como los principales promotores de la marchitez del chile. La metodología aplicada en este estudio involucró la obtención de los extractos crudos utilizando ultrasonido, posteriormente, el fraccionamiento y purificación de los metabolitos secundarios por cromatografía en columna flash, en columna de C₁₈ y cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). La asignación de los datos espectroscópicos se efectuó a partir del análisis de los espectros unidimensionales y bidimensionales de protón y carbono de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) obtenidos en el espectrómetro Bruker Ascend™ de 400 MHz. Los patrones de fragmentación de masa de baja resolución se obtuvieron por ionización electrónica (IE) a 70 eV y por ionización mediante electrospray (ESI), ambos registrados en modo positivo. La evaluación antifúngica, se llevó a cabo por el método de difusión en agar, midiendo el crecimiento radial del micelio con el programa ImageJ®; mientras que la inhibición de la esporulación se determinó a través del método de dilución en caldo. Los resultados obtenidos en estas pruebas biológicas mostraron que todos los tratamientos (extractos y fracciones) de *L. achyranthifolia* y *T. densiflora*, redujeron la producción de esporas de *F. oxysporum*. Referente a la inhibición del crecimiento micelial, se encontró que los extractos evaluados a 100 mg/mL presentaron efectos inhibitorios sobre *R. solani* con valores del 43.37 ± 9.48 y $78.26 \pm 12.81\%$. Sobre esta misma línea, se determinó que la mayoría de las fracciones no produjeron efectos inhibitorios significativos en ambas cepas fúngicas y que la acción de los extractos se debe en gran parte a un efecto sinérgico de los diversos tratamientos.

ÍNDICE

RESUMEN	ix
LISTADO DE ABREVIATURAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3. JUSTIFICACIÓN	4
3.1 Pertinencia	4
3.2 Relevancia	4
4. HIPÓTESIS	5
5. OBJETIVOS	5
5.1 Objetivo general	5
5.2 Objetivos específicos.....	5
6. LIMITACIONES DE LA TESIS	5
7. MARCO TEÓRICO	6
7.1. Aspectos relevantes del chile.....	6
7.2 Patógenos asociados a la secadera del chile	6
7.3 Manejo en el control de plagas	9
7.4. Antecedentes de las plantas de estudios	13
7.4.1 <i>Lantana achyranthifolia</i> Desf. (Verbenaceae)	13
7.4.2 <i>Tournefortia densiflora</i> M. Martens & Galeotti (Boraginaceae).....	19
7.5 Fundamentos de las técnicas a utilizar	25
7.5.1 Espectrometría de masa (MS).....	25
7.5.2 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	27
8. MATERIALES Y MÉTODOS	32
8.1 Materiales	32
8.2 Disolventes y reactivos	32
8.3 Equipos	34
8.4 Especies vegetales.....	35
8.5 Cepas biológicas.....	35
8.6 METODOLOGÍA	36
8.6.1 Obtención de extractos crudos: Extracción sólido-líquido	36

8.6.2 Aislamiento de compuestos de la parte aérea de <i>L. achyranthifolia</i>	37
8.6.2.1 Fraccionamiento del extracto metanólico	37
8.6.2.2 Remoción de azúcares del extracto metanólico suspendido en agua	37
8.6.2.3 Perfiles cromatográficos de separación	38
8.6.2.4 Cromatografía de la fracción de AcOEt.....	38
8.6.3 Tratamiento alternativo del extracto metanólico de <i>L. achyranthifolia</i>	40
8.6.3.1 Purificación cromatográfica de las fracciones FS3-FS4	40
8.6.3.2 Purificación cromatográfica de las fracciones FP2 y FP1	42
8.6.3.3 Purificación de la subfracción 11-14C18LA obtenida de FP2 del extracto metanólico de la parte aérea de <i>L. achyranthifolia</i>	43
8.6.4 Aislamiento de compuestos presentes en la raíz de <i>T. densiflora</i>	44
8.6.4.1 Cromatografía del extracto metanólico	44
8.6.4.2 Extracción de alcaloides de la raíz de <i>T. densiflora</i>	44
8.6.4.3 Aislamiento de compuesto minoritario en el extracto Metanólico.....	44
8.6.4.4 Reducción de alcaloides N-óxidos de la raíz de <i>T. densiflora</i>	45
8.6.5 Elucidación estructural de componentes bioactivos	46
8.6.6 Evaluación de la actividad antifúngica.....	46
8.6.6.1 Inhibición del crecimiento micelial.....	46
8.6.6.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	48
8.7 Análisis estadístico de los resultados	49
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
9.1 Fraccionamiento y cromatografía del extracto de <i>L. achyranthifolia</i>	50
9.2 Elucidación de verbáscosido de la parte aérea de <i>L. achyranthifolia</i>	52
9.3 Elucidación de 8-epiloganina de la parte aérea de <i>L. achyranthifolia</i>	58
9.4 Elucidación de glucurónido-8-epiloganina aislado de <i>L. achyranthifolia</i>	61
9.5 Elucidación de carioptosido aislado de <i>L. achyranthifolia</i>	65
9.6 Análisis conformacional de 8-epiloganina	68
9.7 Elucidación de ácido 8-epilogánico aislado de <i>L. achyranthifolia</i>	70
9.8 Purificación y caracterización estructural de la fracción FP1.....	77
9.9 Elucidación de pectolinaringenina 7-O-β-D-glucuronopiranosido	77
9.10 Elucidación de 6-O-metilscutellarina aislado de <i>L. achyranthifolia</i>	85
9.11 Elucidación de luteolina 7-glucurónido aislado de <i>L. achyranthifolia</i>	88

9.12 Purificación y caracterización espectroscópica de las subfracciones	94
11-14C18LA y 21-24C18LA.....	94
9.13 Fraccionamiento del extracto metanólico de <i>T. densiflora</i>	98
9.14 Aislamiento de alcaloides presentes en la raíz de <i>T. densiflora</i>	100
9.15 Elucidación de alantoina aislada de la raíz de <i>T. densiflora</i>	102
9.16 Elucidación de mezcla de esteroides aislados de la raíz de <i>T. densiflora</i>	105
9.18 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria	115
10. CONCLUSIONES	117
11. PERSPECTIVAS	119
12. REFERENCIAS	120
13. APÉNDICE	129

LISTADO DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AcOEt	Acetato de etilo
ANOVA	Análisis de varianza
C₅D₅N	Piridina deuterada
CCF	Cromatografía de capa fina
CD₃OD	Metanol deuterado
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CH₂Cl₂	Diclorometano
CHCl₃	Cloroformo
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
COSY	Espectroscopía de correlación (COSY por sus siglas en inglés)
DEPTQ	Mejora sin distorsiones por transferencia de polarización incluyendo la detección de núcleos cuaternarios (DEPTQ por sus siglas en inglés)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-<i>d</i>6	Dimetilsulfóxido deuterado
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
ESI	Ionización por electrospray (ESI por sus siglas en inglés)
h	Horas
ha	Hectárea
HCl	Ácido clorhídrico
HMBC	Conectividad heteronuclear a enlaces múltiples (HMBC por sus siglas en inglés)
HSQC	Coherencia heteronuclear cuántica simple (HSQC por siglas en inglés)
Hx	Hexano
<i>J</i>	Constante de acoplamiento expresado en hertz (Hz)
kJ	Kilojoule
L	Litro
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitro
MS	Espectrometría de masa
nm	Nanómetro
NOESY	Espectroscopia de mejoramiento nuclear de Overhauser (NOESY por sus siglas en inglés)
p/v	Relación peso-volumen
PDA	Agar papa dextrosa
RMN- ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN- ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
TOCSY	Espectroscopía de correlación total (TOCSY por sus siglas en inglés)
ton	Tonelada
v/v	Relación volumen-volumen
δ	Desplazamiento químico expresado en partes por millón (ppm)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de Chile fuertemente atacada por hongos fitopatógenos.....	7
Figura 2. Cultivos fúngicos de <i>R. solani</i> (A) y <i>F. oxysporum</i> (B).....	8
Figura 3. Metabolitos secundarios producidos en plantas.....	11
Figura 4. Monoterpenos con actividad fungicida.....	12
Figura 5. Parte aérea de <i>Lantana achyranthifolia</i> Desf. (Verbenaceae).....	13
Figura 6. Metabolitos secundarios aislados del género <i>Lantana</i>	14
Figura 7. Ácido 22 β -acetoxílico.....	15
Figura 8. Metabolitos secundarios aislados de <i>Lantana camara</i>	16
Figura 9. Metabolitos secundarios aislados de <i>Lantana</i> aff. <i>fucata</i> Lindl.....	17
Figura 10. Metabolitos secundarios aislados de <i>Lantana achyranthifolia</i>	18
Figura 11. Aceites esenciales aislados de <i>Lantana achyranthifolia</i>	19
Figura 12. Parte aérea de <i>Tournefortia densiflora</i> M. Martens & Galeotti (Boraginaceae).....	20
Figura 13. Compuestos polifenólicos aislados de <i>Tournefortia sarmentosa</i>	21
Figura 14. Flavonoides aislados de <i>Tournefortia bicolor</i>	23
Figura 15. Espectrómetro de masa con ionización por impacto electrónico.....	25
Figura 16. Espectro de masa del 2,4-dimetilpentano.....	27
Figura 17. Orientación de los espines nucleares ante un campo magnético externo.....	28
Figura 18. Desplazamientos químicos de RMN- ¹ H en compuestos orgánicos.....	29
Figura 19. Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C en compuestos orgánicos.....	29
Figura 20. Diagrama general del estudio fitoquímico de <i>L. achyranthifolia</i> y <i>T. densiflora</i>	33
Figura 21. Equipos utilizados en el desarrollo del trabajo de investigación.....	34
Figura 22. Secuencia de pasos involucrados en la obtención de extractos crudos.....	36
Figura 23. Extracción líquido-líquido de los extractos metanólicos.....	38
Figura 24. Sólido proveniente de la Fracción AcOEt de <i>L. achyranthifolia</i>	39
Figura 25. Fraccionamiento químico y purificación del extracto metanólico de <i>L. achyranthifolia</i>	41
Figura 26. Equipo CLAR equipado con detector de UV/Vis.....	43
Figura 27. Reducción de alcaloides N-óxidos presentes en la raíz de <i>T. densiflora</i>	45
Figura 28. Fraccionamiento de extractos vegetales para la evaluación antifúngica <i>in vitro</i>	47
Figura 29. Perfiles cromatográficos en CCF de <i>L. achyranthifolia</i>	50
Figura 30. Espectro de RMN- ¹ H de <i>L. achyranthifolia</i>	51
Figura 31. Espectro de RMN- ¹³ C del extracto MeOH de <i>L. achyranthifolia</i>	52
Figura 32. Purificación de PAFAcOEt en CF.....	53
Figura 33. Perfil cromatográfico de F5PA aislado de <i>L. achyranthifolia</i> en CF.....	53
Figura 34. Estructura química del verbáscosido aislado de <i>L. achyranthifolia</i>	54
Figura 35. Espectro de RMN- ¹ H de verbáscosido aislado de <i>L. achyranthifolia</i> en CD ₃ OD (400 MHz).....	55
Figura 36. Espectro de RMN- ¹³ C de verbáscosido aislado de <i>L. achyranthifolia</i> en CD ₃ OD (100 MHz).....	55
Figura 37. Espectro de RMN- ¹ H de 8-epiloganina aislado de <i>L. achyranthifolia</i> en CD ₃ OD (400 MHz).....	58
Figura 38. Espectro de RMN- ¹³ C de 8-epiloganina aislada de <i>L. achyranthifolia</i> en CD ₃ OD (100 MHz).....	59
Figura 39. Espectros de RMN- ¹ H de 8-epiloganina (trazo inferior) y compuesto 3 (trazo superior).....	62
Figura 40. Espectro DEPTQ del compuesto 3 aislado de <i>L. achyranthifolia</i> en CD ₃ OD (100 MHz).....	63
Figura 41. Espectros apilados de RMN- ¹ H de 8-epiloganina (trazo inferior) y carioptosido (trazo superior).....	65
Figura 42. Espectro DEPTQ del carioptosido aislado de <i>L. achyranthifolia</i> en CD ₃ OD (100 MHz).....	66
Figura 43. Confórmeros de mínima energía obtenidos con cálculos del método semiempírico PM3.....	68
Figura 44. Espectro RMN- ¹ H del compuesto 5 aislado de <i>L. achyranthifolia</i> en C ₅ D ₅ N (400 MHz).....	71
Figura 45. Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto 5 aislado de <i>L. achyranthifolia</i> en C ₅ D ₅ N (100 MHz).....	71
Figura 46. Espectro DEPTQ del compuesto 5 aislado de <i>L. achyranthifolia</i> en C ₅ D ₅ N (100 MHz).....	72
Figura 47. Espectro HSQC del compuesto 5 aislado de la parte aérea de <i>L. achyranthifolia</i> en C ₅ D ₅ N.....	73
Figura 48. Espectro HMBC del compuesto 5 aislado de la parte aérea de <i>L. achyranthifolia</i> en C ₅ D ₅ N.....	74
Figura 49. Espectro NOESY del compuesto 5 aislado de la parte aérea de <i>L. achyranthifolia</i> en C ₅ D ₅ N.....	75
Figura 50. CCF de fase reversa de las subfracciones de FP1 observadas en 254 y 365 nm.....	77

Figura 51. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 6 aislado de <i>L. achyranthifolia</i> en C ₅ D ₅ N (400 MHz).....	78
Figura 52. Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto 6 aislado de <i>L. achyranthifolia</i> en C ₅ D ₅ N (100 MHz)	79
Figura 53. Espectro DEPTQ del compuesto 6 aislado de la parte aérea de <i>L. achyranthifolia</i> en C ₅ D ₅ N	79
Figura 54. Espectro HSQC del compuesto 6 aislado de la parte aérea de <i>L. achyranthifolia</i> en C ₅ D ₅ N	80
Figura 55. Espectro HMBC del compuesto 6 aislado de la parte aérea de <i>L. achyranthifolia</i> en C ₅ D ₅ N	81
Figura 56. Espectro NOESY del compuesto 6 aislado de la parte aérea de <i>L. achyranthifolia</i> en C ₅ D ₅ N	82
Figura 57. Estructura tridimensional del compuesto 6 establecida a partir de NOESY.....	83
Figura 58. Espectro COSY del compuesto 6 aislado de la parte aérea de <i>L. achyranthifolia</i> en C ₅ D ₅ N	84
Figura 59. Espectros de RMN- ¹ H de Pectolinarigenina 7-O-β-D-glucuronopiranosido (trazo inferior) y 6-O-metilscutellarina (trazo superior)	86
Figura 60. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 8 aislado de <i>L. achyranthifolia</i> en DMSO-d ₆ (400 MHz)	88
Figura 61. Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto 8 aislado de <i>L. achyranthifolia</i> en DMSO-d ₆ (100 MHz)	89
Figura 62. Espectro DEPTQ del compuesto 8 aislado de <i>L. achyranthifolia</i> en DMSO-d ₆	89
Figura 63. Espectro HSQC del compuesto 8 aislado de <i>L. achyranthifolia</i> en DMSO-d ₆	90
Figura 64. Espectro HMBC del compuesto 8 aislado de <i>L. achyranthifolia</i> en DMSO-d ₆	91
Figura 65. Espectro NOESY del compuesto 8 aislado de <i>L. achyranthifolia</i> en DMSO-d ₆	92
Figura 66. CCF de fase reversa de subfracciones purificadas de FP2	94
Figura 67. Cromatogramas de la fracción 11-14C18LA proveniente de FP2 de <i>L. achyranthifolia</i>	95
Figura 68. Espectro de RMN- ¹ H de flavonas aisladas de <i>L. achyranthifolia</i> en DMSO-d ₆ (400 MHz)	96
Figura 69. Espectro DEPTQ de flavonas aisladas de la parte aérea de <i>L. achyranthifolia</i> en DMSO-d ₆	96
Figura 70. Espectro HMBC de flavona aislada de <i>L. achyranthifolia</i> en DMSO-d ₆	97
Figura 71. Espectros de RMN- ¹ H de <i>T. densiflora</i> en DMSO-d ₆ (400 MHz)	98
Figura 72. Espectro de RMN- ¹³ C de <i>T. densiflora</i> en DMSO-d ₆ (100 MHz)	99
Figura 73. Espectro de RMN- ¹ H de Fracción CHCl ₃ tratada con Zinc/HCl de la raíz de <i>T. densiflora</i>	100
Figura 74. Sección del espectro de RMN- ¹³ C de Fracción CHCl ₃ tratada con Zinc/HCl de <i>T. densiflora</i>	101
Figura 75. Espectro de RMN- ¹ H de alantoína aislada de la raíz de <i>T. densiflora</i> en DMSO-d ₆ (400 MHz)....	103
Figura 76. Espectro de RMN- ¹³ C de alantoína aislada de la raíz de <i>T. densiflora</i> en DMSO-d ₆ (100 MHz) ..	104
Figura 77. Espectro de masa de baja resolución de alantoína presente en la raíz de <i>T. densiflora</i>	105
Figura 78. Espectro RMN- ¹ H de la mezcla de esteroides de la raíz de <i>T. densiflora</i> en CDCl ₃ (400 MHz)	106
Figura 79. Sección ampliada del espectro de RMN- ¹ H de señales diagnósticas de esteroides.....	107
Figura 80. Espectro de RMN- ¹³ C de los esteroides presentes en raíz de <i>T. densiflora</i> en CDCl ₃ (100 MHz) ..	107
Figura 81. Efecto de los extractos metanólicos (%) de las partes aéreas de LA (EMLA) y raíces de TD (EMT), fracción polar y no polar de LA (F3C18LA, FNPOLA), fracción de alcaloides puros y en mezcla de TD (FATD, FAIMTD) en diferentes concentraciones contra <i>F. oxysporum</i>	110
Figura 82. Efecto de los extractos metanólicos (%) de las partes aéreas de LA (EMLA) y raíces de TD (EMT), fracción polar y no polar de LA (F3C18LA, FNPOLA), fracción de alcaloides puros y en mezcla de TD (FATD, FAIMTD) en diferentes concentraciones contra <i>R. solani</i>	111
Figura 83. CMI de los extractos metanólicos y fracciones de A) <i>T. densiflora</i> y B) <i>L. achyranthifolia</i> contra <i>F. oxysporum</i>	116

1. INTRODUCCIÓN

El chile es una de las principales hortalizas que se cultiva en el país (2.3 millones ton) y constituye uno de los alimentos representativos de la gastronomía mexicana. De acuerdo con los reportes de SAGARPA (2017), México está posicionado como líder mundial en la exportación de chiles y genera el 3.5% del producto interno bruto (PIB) del país.

Actualmente la demanda internacional del chile se ha incrementado, por consiguiente, la apertura de nuevos tratados de comercialización ha ocasionado que países como China, India y Países Bajos dominen una tercera parte del mercado mexicano, esto debido a sus costos de producción bajos. La demanda alta puede atribuirse al hecho de que la hortaliza también se utiliza como ingrediente en la fabricación de medicamentos, productos cosméticos y de aseo personal (SAGARPA, 2017).

Ante el incremento de la competencia se sugiere prestar atención al brote de las plagas a fin de elevar la calidad del fruto y la rentabilidad. Referente a este punto, de las plagas que atacan a los cultivos del chile, las enfermedades producidas por los hongos son las más importantes ya que pueden causar la pérdida total de la producción (SAGARPA, 2017).

La secadera o marchitez es una de las principales enfermedades que interfiere en la producción del chile, los agentes causales de la infección son *Phytophthora capsicini*, *Rhizoctonia sp.*, y *Fusarium sp.* (CESAVEG, 2012). En estudios de diagnóstico efectuados en los estados de Guanajuato, Aguascalientes, Zacatecas y Oaxaca, se encontró que la enfermedad se manifestó por síntomas asociados a la defoliación, enchinamiento del follaje, cambios de coloración, alteraciones de las estructuras reproductivas, pudrición de raíz y maduración precoz del fruto (Velásquez *et al.*, 2001, Vásquez *et al.*, 2009, Albañil *et al.*, 2015, Pérez *et al.*, 2017).

A fin de incrementar los rendimientos de las cosechas, los productores recurren principalmente a los fungicidas comerciales para reducir la incidencia de los hongos fitopatógenos; sin embargo, los ingredientes activos como los organofosforados, carbamatos, organoclorados, y piretroides deterioran la salud humana y el medio ambiente (González *et al.*, 2017., De León y Mier, 2010). También se ha evidenciado que el uso de plaguicidas sintéticos, provoca que los patógenos desarrollen ciertas resistencias adaptativas a las nuevas condiciones del entorno, por lo tanto es necesario investigar nuevas estrategias que puedan minimizar los efectos señalados (SAGARPA, 2010., De León y Mier, 2010).

En la actualidad el empleo de bioplaguicidas constituye una alternativa viable para reducir o eliminar el uso tóxico de los plaguicidas convencionales. Los bioplaguicidas son aquellos productos derivados de microorganismos, extractos vegetales y feromonas que se emplean en la agricultura para controlar las poblaciones de las plagas (De León y Mier, 2010).

El uso de extractos vegetales para el control de plagas es una práctica ancestral que ha recobrado gran importancia en el sector agrícola, ya que han demostrado tener actividad antifúngica *in vitro* contra fitopatógenos de interés como *Fusarium oxysporum f.sp. chrysanthemi*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans* y *Alternaria solani* (Bowers y Locke, 2000, Zapata *et al.*, 2003, Bernal *et al.*, 2005, Lira *et al.*, 2014). El potencial de los extractos vegetales como alternativa de uso a los fungicidas sintéticos es evidente; sin embargo, son pocos los estudios químicos que se centran en la caracterización de los compuestos bioactivos responsables de la actividad antifúngica, por lo anterior, este trabajo de investigación se enfoca en aislar e identificar a los compuestos bioactivos de los extractos metanólicos de la parte aérea de *L. achyranthifolia* y raíz de *T. densiflora* que previamente mostraron tener potencial antifúngico en ensayos *in vitro* (Lira-De León *et al.*, 2014).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La presencia individual o colectiva de los hongos fitopatógenos *P. capsici*, *R. solani* y *F. oxysporum* representa una de las principales limitantes de la producción y rentabilidad comercial del chile. Estos fitopatógenos pueden causar la pérdida total de los cultivos y se han identificado en diversos estados de la República Mexicana. El control químico de los patógenos está basado principalmente en el uso indiscriminado de agroquímicos del tipo carbamatos, organofosforados, organoclorados y piretroides, los cuales, al usarse en cantidades excesivas representan riesgos potenciales a la salud humana, a los ecosistemas y favorece el surgimiento de plagas más resistentes y agresivas (CESAVEG, 2012., SAGARPA, 2010).

En la actualidad las dependencias del gobierno han implementado diversas estrategias de políticas agropecuarias con la finalidad de impulsar los rendimientos de las cosechas para que sean asequibles por la población a precios fijos. Las estrategias aplicadas incluyen mejoras tecnológicas de la maquinaria agrícola y compra de semillas modificadas genéticamente tolerantes a sequías, al calor, a las plagas y a las enfermedades (SAGARPA, 2010).

La controversia actual entorno a las modificaciones genéticas y la apertura de mercados que demandan productos orgánicos, inducen al sector agrícola hacia la búsqueda de nuevos plaguicidas eficaces que ayuden a restaurar la rentabilidad y competitividad. Entre las alternativas disponibles para abatir las poblaciones de plagas se destaca el uso de bioplaguicidas a base de microorganismos y derivados botánicos, siendo este último más práctico ya que no requiere de condiciones específicas como los microorganismos (Celis *et al.*, 2009).

Con base en lo expuesto anteriormente, se pretende identificar y evaluar la actividad antifúngica de los compuestos bioactivos aislados del extracto metanólico de la parte aérea de *Lantana achyranthifolia* y de la raíz de *Tournefortia densiflora* como alternativa de uso a los fungicidas utilizados actualmente en los cultivos del chile.

3. JUSTIFICACIÓN

El uso indiscriminado y prolongado de los agroquímicos en el tratamiento de marchitez del chile ha generado cierta resistencia por parte de los hongos fitopatógenos, lo que obliga a incrementar las dosis de empleo, provocando severas afectaciones a las exportaciones, a la salud del hombre y al ambiente. Ante la actual situación agrícola, es necesario enfocar los esfuerzos hacia el mantenimiento y mejoramiento del estatus fitosanitario. En este sentido, Lira *et al.*, (2014) evidenció que los extractos metanólicos de la parte aérea de *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae) y raíz de *Tournefortia densiflora* M. Martens & Galeotti (Boraginaceae) tienen potencial de inhibir la esporulación y el crecimiento micelial de hongos del género *Fusarium*. Debido a que no se reportan los compuestos bioactivos responsables de la actividad antifúngica, en el presente trabajo de investigación se efectuará el fraccionamiento de dichos extractos vegetales a fin obtener compuestos puros para su evaluación antifúngica *in vitro*. Los resultados generados de esta investigación científica, permitirán validar el empleo de los extractos vegetales como bioplaguicidas alternativos al control biológico de hongos fitopatógenos.

3.1 Pertinencia

La investigación se acopla a los objetivos de la Planeación Agrícola Nacional 2017-2030, en la cual, se busca incrementar la rentabilidad del chile y promover la producción orgánica del mismo a través de la innovación de nuevos fertilizantes y productos para el combate de plagas y enfermedades (SAGARPA, 2017).

3.2 Relevancia

Este trabajo representa el primer estudio químico enfocado en el aislamiento y caracterización estructural de los metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de las partes aéreas de *L. achyranthifolia* y raíces de *T. densiflora*. Adicionalmente se informa la capacidad citotóxica de estos extractos y fracciones vegetales sobre las cepas fúngicas de *F. oxysporum* y *R. solani*, considerados agentes causales de la marchitez del chile.

4. HIPÓTESIS

Del aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios de los extractos metanólicos de la parte aérea de *L. achyranthifolia* y raíz de *T. densiflora*, se obtendrán compuestos con actividad antifúngica *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Aislar y elucidar compuestos de *L. achyranthifolia* y/o *T. densiflora*, y evaluar su actividad antifúngica *in vitro* en hongos fitopatógenos del Chile.

5.2 Objetivos específicos

1. Obtener fracciones a partir de los extractos metanólicos de parte aérea de *L. achyranthifolia* y/o de raíz de *T. densiflora*.
2. Purificar los compuestos de fracciones mediante técnicas cromatográficas.
3. Elucidar la estructura química de los compuestos por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y espectrometría de masa (MS) y de ser necesario efectuar análisis estructurales a detalle apoyándose en cálculos teóricos.
4. Evaluar la actividad antifúngica de los extractos, fracciones y/o compuestos puros.

6. LIMITACIONES DE LA TESIS

- La evaluación de la actividad antifúngica sólo se desarrolló a nivel de ensayos *in vitro*.

7. MARCO TEÓRICO

7.1. Aspectos relevantes del chile

El chile es una hortaliza distintiva de México, la cual se produce prácticamente en toda la República Mexicana. Oaxaca resalta por tener 25 de las 64 variedades existentes en el país; también destacan Guerrero, Puebla y Veracruz con 12, 10 y 9 variedades respectivamente (SNICS, 2017). Las divisas generadas por las exportaciones, hacen que el chile sea una de las hortalizas más cultivadas en México con 36,236 ha de superficie sembrada, 36,216 ha cosechadas y 1,097,483 ton obtenidas siendo los mayores productores Sinaloa, Zacatecas, San Luis Potosí, Chihuahua y Tamaulipas (SIAP, 2017).

El consumo de la hortaliza se da en estado maduro e inmaduro; sin embargo, la investigación realizada por Mendoza *et al.*, (2015) recomiendan el consumo en estado maduro debido a las mejores propiedades fisicoquímicas y antioxidantes. En este estadio se encontraron importantes cantidades de ácido ascórbico (149 mg/100 g de peso fresco), carotenoides (1,180 mg/100 g de peso fresco), polifenoles (349 mg de ácido gálico/100 g de peso fresco) y ácidos grasos funcionales (5% monoinsaturados y 39% poliinsaturados), los cuales tienen capacidad de aumentar la captura de radicales libres y reducir el estrés oxidativo de las células. De manera concreta, el ensayo *in vitro* del extracto acuoso mostró un 58% de inhibición de radicales de DPPH.

Las concentraciones de capsaicina presentes en el chile, dependen de una gama amplia de factores entre las cuales destacan: incidencias de plagas, calidad nutritiva del suelo, condiciones climáticas y calidad de la semilla (SIAP, 2010).

7.2 Patógenos asociados a la secadera del chile

Los patógenos que se presentan con frecuencia en los cultivos de chile incluyen virus, nematodos y hongos, siendo estos últimos los de mayor incidencia ya que generan devastadoras pérdidas económicas que van del 40 al 100%. La prevalencia de temperaturas moderadas (10 a 28 °C) y de humedad relativa

elevada, producen modificaciones en el potencial redox y pH del suelo que interfiere en la absorción de nutrientes y agua por parte de la planta, favoreciéndose con ello el desarrollo de los hongos. La presencia de dichos fitopatógenos provocan alteraciones hormonales, respiratorias y de crecimiento que inducen la maduración prematura de hojas y frutos, tal como se muestra en la Figura 1 (Cavallini, 1998).

En los estados de Guanajuato, Aguascalientes, Zacatecas y Oaxaca, la secadera o marchitez es una de las principales enfermedades que interfiere en la rentabilidad de la producción del chile. Los agentes causales de dicha enfermedad se asocian a la presencia individual o colectiva de *P. capsici*, *F. oxysporum*, *R. solani*, *Pythium sp.*, *Stemphylium sp.*, y *Alternaria sp.* (Velásquez *et al.*, 2001, Vásquez *et al.*, 2009, Albañil *et al.*, 2015, Pérez *et al.*, 2017). Aunque otros autores indican que los principales hongos son *P. capsici*, *Rhizoctonia sp.*, y *Fusarium sp.*; posteriormente el daño se intensifica por la presencia de otros fitopatógenos (CESAVEG, 2012).



Figura 1. Planta de chile fuertemente atacada por hongos fitopatógenos

Las características generales de los fitopatógenos de interés en este trabajo, se detallan a continuación:

Rhizoctonia solani: este hongo se caracteriza por infestar una amplia variedad de cultivos y emplea materia orgánica en descomposición para su sobrevivencia (Cavallini, 1998). Las condiciones que se requieren para su desarrollo involucran temperatura por debajo de 20 °C y humedad relativa moderada. Los síntomas característicos de este fitopatógeno son: lesiones necróticas en el cuello de la raíz y tallo, estrangulamiento, pudrición, desprendimiento de epidermis en raíces secundarias cercanas al cuello de la raíz y marchitez temporal en el transcurso del día. La intensificación de los síntomas se ve favorecida por la producción de enzimas extracelulares que al debilitar el tallo propician su contacto con el suelo (Pérez *et al.*, 2017, Vásquez *et al.*, 2009).

Del aislamiento en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) (Figura 2-A), se observan colonias finas de color café, hifas constrictadas en ángulo de 90 °C y formación de dos septos cercanos a la ramificación hifal (Albañil *et al.*, 2015).

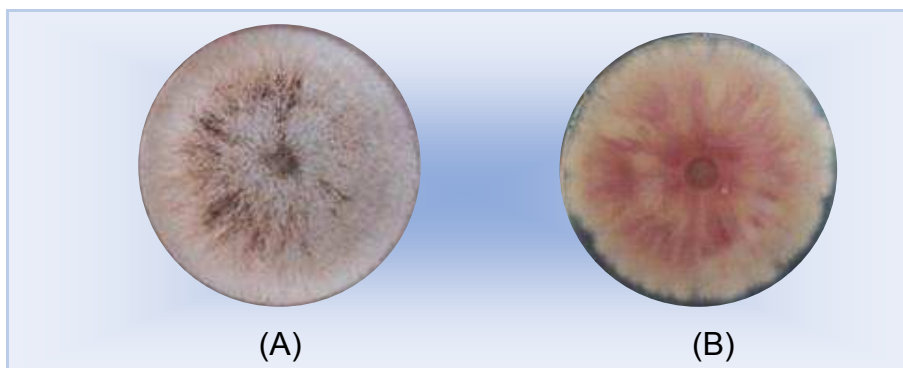


Figura 2. Cultivos fúngicos de *R. solani* (A) y *F. oxysporum* (B)

Fusarium oxysporum: la incidencia alta de esta especie en los cultivos del Chile genera una de las mayores pérdidas económicas (Velázquez *et al.*, 2001, Pérez *et al.*, 2017). El ingreso del fitopatógeno se favorece por las modificaciones morfológicas y bioquímicas que el nematodo agallador *N. aberrans* provoca en la raíz de las plantas del Chile (Godínez *et al.*, 2010).

La infección produce marchitamiento vascular (usualmente en el periodo de floración y/o fructificación) que se extiende por el xilema, lo cual repercute en el desarrollo óptimo de la planta y propicia la producción de frutos pequeños. La reproducción asexual de *F. oxysporum* a través de los conidios es un proceso que se lleva a cabo rápidamente, formando esporas de tipo microconidias (esporas unicelulares sin septas, de forma elipsoidal, cilíndrica, recta curva), macroconidias (esporas de pared delgada, fusiformes, largas, moderadamente curvadas de 3-5 septas transversales) y clamidosporas formadas por la condensación de células de las hifas o macroconidias que se caracterizan por su pared gruesa (Torres, 2000). El aislamiento del fitopatógeno en medio de cultivo PDA (Figura 2-B) se distingue por las aglomeraciones o esparcido de micelio blanco y por la pigmentación del cultivo que varía de color blanco a violeta, rojizo y fucsia (Albañil *et al.*, 2015).

7.3 Manejo en el control de plagas

La mayoría de las enfermedades que se desarrollan en los cultivos de Chile se deben en gran medida a que el productor no efectúa la preparación adecuada del terreno y ante la aparición de las plagas, el uso de plaguicidas son la principal opción para exterminar o controlar las poblaciones, lo cual se consigue bloqueando los procesos vitales o el proceso reproductivo de los patógenos (Planes, 2008). La problemática relacionada con el uso de los plaguicidas incide en que el productor desconoce qué tipo de microorganismos se encuentran en sus parcelas. Adicionalmente, la falta de conocimiento respecto a la toxicología de los productos químicos, hacen que en México se apliquen agroquímicos que han sido restringidos en otros países. En el mercado mexicano se encuentran autorizados 183 ingredientes activos, de los cuales 34.40% tienen una toxicidad aguda alta, 23.50% están asociados a cáncer, 19.13% son perturbadores endocrinos, 11.48% son tóxicos en el proceso de reproducción y el 1.00% tiene efectos mutagénicos. En cuanto a los productos altamente tóxicos sobresalen el metil paratión, clorpirifos etil, cipermetrina, malatión, permetrina, mancozeb, clorotalonil, glifosato,

atrazin, deltametrina y piretroides. De los 3,140 registros sanitarios vigentes, 1,978 están autorizados para ser usado como insecticidas, 474 como fungicidas, 474 como herbicidas, 126 como rodenticidas, 78 como fumigantes, 24 como acaricidas y 3 como miticida-ovicida-acaricida; la distribución detallada se muestra en el Cuadro 1 (González *et al.*, 2017).

A fin de contrarrestar los problemas sanitarios y ambientales generados por el uso de los plaguicidas convencionales, surge la utilización de los bioplaguicidas como una estrategia de control de plagas que es más amigable con el medio ambiente y tiene menor efecto toxicológico a la salud humana. Las definiciones para el término bioplaguicidas son diversas; sin embargo, una de las más aceptables se refiere a aquellos productos que están hechos a base microorganismos, extractos de plantas y feromonas, los cuales se emplean para la regulación de las poblaciones de plagas (De León y Mier, 2010).

Cuadro 1. Plaguicidas altamente peligrosos autorizados en México

Tipo de plaguicida	Número de registros	Porcentaje de registros
Acaricida	24	0.76
Acaricida, fungicida	2	0.06
Subtotal acaricida	26	0.83
Fungicida	465	14.81
Fungicida, bactericida	9	0.29
Subtotal fungicida	438	15.10
Herbicida	438	13.95
Herbicida, desecante	4	0.13
Subtotal herbicidas	442	14.26
Insecticida	1,413	45.00
Insecticida acaricida	490	15.61
Insecticida larvicida	23	0.73
Insecticida nematocida	61	1.94
Subtotal insecticidas	1,987	63.98
Fumigante	78	2.48
Miticida, ovicida, acaricida	3	0.10
Nematocida	4	0.13
Rodenticida	126	4.01
TOTAL	3,140	100.00

El uso de bioplaguicidas a partir de extractos vegetales se basa en la presencia de metabolitos secundarios de las plantas, los cuales se sintetizan como respuesta al estrés ambiental para hacer eficiente los procesos fotosintéticos, como mecanismos de defensa, medio de comunicación química y polinización. Las fitoalexinas como ácido clorogénico y capsidiol (Figura 3) son algunos ejemplos de metabolitos secundarios que producen las plantas en respuesta a una infección antimicrobiana o fúngica, dependiendo de la cantidad segregada pueden abatir parcial o completamente las poblaciones de fitopatógenos (Pegard *et al.*, 2005., Godínez *et al.*, 2010).

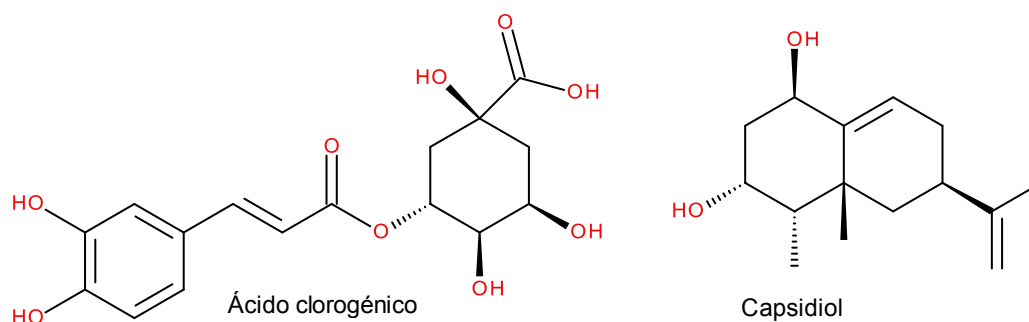


Figura 3. Metabolitos secundarios producidos en plantas

En plantas dañadas del género *Allium* se ha identificado la producción del disulfuro de dimetilo (DMDS) como respuesta para la protección de la planta. El mecanismo de acción del DMDS se efectúa por alteraciones en el sistema del citocromo oxidasa de las mitocondrias de los insectos (Dugravot *et al.*, 2004).

En los estudios de la actividad fungicida desarrollado por Vaillant *et al.*, (2009) se encontró que el timol, mentol y citronelal inhibieron el crecimiento de *Rhizoctonia solani* en un 100% a una concentración de 0.1 y 0.5% p/v. Los aceites esenciales alcanfor y 1,8-cineol también mostraron efectividad fungicida menor al 100%. Por otro lado, Becerra *et al.*, (2010) demostraron que los aceites esenciales de la planta *Haplopappus baylahuen* son inhibidores del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* en un 54% a una concentración del 1% p/v. Las estructuras químicas de los compuestos descritos se muestran en la Figura 4.

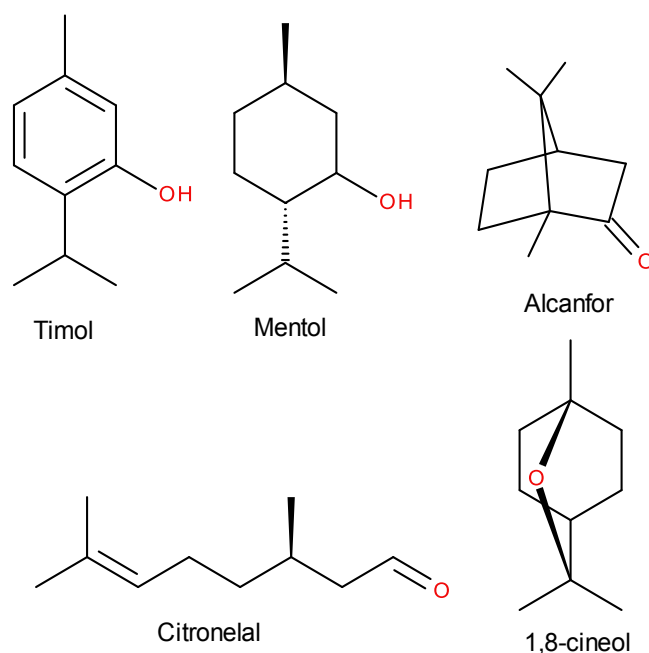


Figura 4. Monoterpenos con actividad fungicida

Otros extractos vegetales que han demostrados tener efectividad antifúngica *in vitro* contra agentes fitopatógenos se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Extractos vegetales con actividad antifúngica

Tipo de Extracto	Fitopatógeno	Referencia
Extracto acuoso de semillas de <i>Moringa</i>	<i>R. stolonifer</i> <i>Aspergillus flavus</i>	Donli y Dauda, 2003
Extractos acuoso y etanólico de <i>Cardón lefaria</i>	<i>R. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>P. infestans</i>	Zapata <i>et al.</i> , 2003
Extracto acuoso de semillas de <i>Lupinus spp.</i>	<i>A. solani</i> , <i>R. solani</i> y <i>F. oxysporum</i>	Bernal <i>et al.</i> , 2005
Extractos de chile con aceite esencial de mostaza, extractos de casia y extractos de clavo	<i>F. oxysporum f.sp. chrysanthemi</i>	Bowers y Locke, 2000
Extracto metanólico crudo de la parte aérea de <i>L. achyranthifolia</i> y raíz de <i>T. densiflora</i>	<i>F. solani</i> , <i>A. Alternata</i>	Lira <i>et al.</i> , 2014

7.4. Antecedentes de las plantas de estudios

7.4.1 *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae)

Lantana achyranthifolia Desf. (Figura 5) pertenece a la familia Verbenaceae, cuyos orígenes se sitúan en las regiones tropicales y subtropicales de América (Sousa y Costa, 2012). La clasificación taxonómica de *L. achyranthifolia* se muestra en el Cuadro 3. La planta se caracteriza por la presencia tallos finos ascendentes, frutos ovalados, hojas puntiagudas dentadas, flores agrupadas con transiciones de color que van de blancas, amarillas, naranjas y violetas; usualmente llegan a medir 2 m de altura. Usualmente crecen a orillas de las carreteras, en bosques caducifolios y hasta en perennifolios.

Cuadro 3. Información taxonómica de *L. achyranthifolia*

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Verbenaceae</i>
Género	<i>Lantana</i>
Especie	<i>Achyranthifolia</i>



Figura 5. Parte aérea de *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae)

Para el género *Lantana* se reporta la presencia de 160 metabolitos secundarios, entre los que destacan los monoterpenos, esteroides, glucósidos iridoide, derivados de ácido cafeico, flavonas y triterpenos; siendo estos dos últimos los más comunes (Hussain *et al.*, 2011). Algunos metabolitos secundarios de *Lantana* se muestran en la Figura 6.

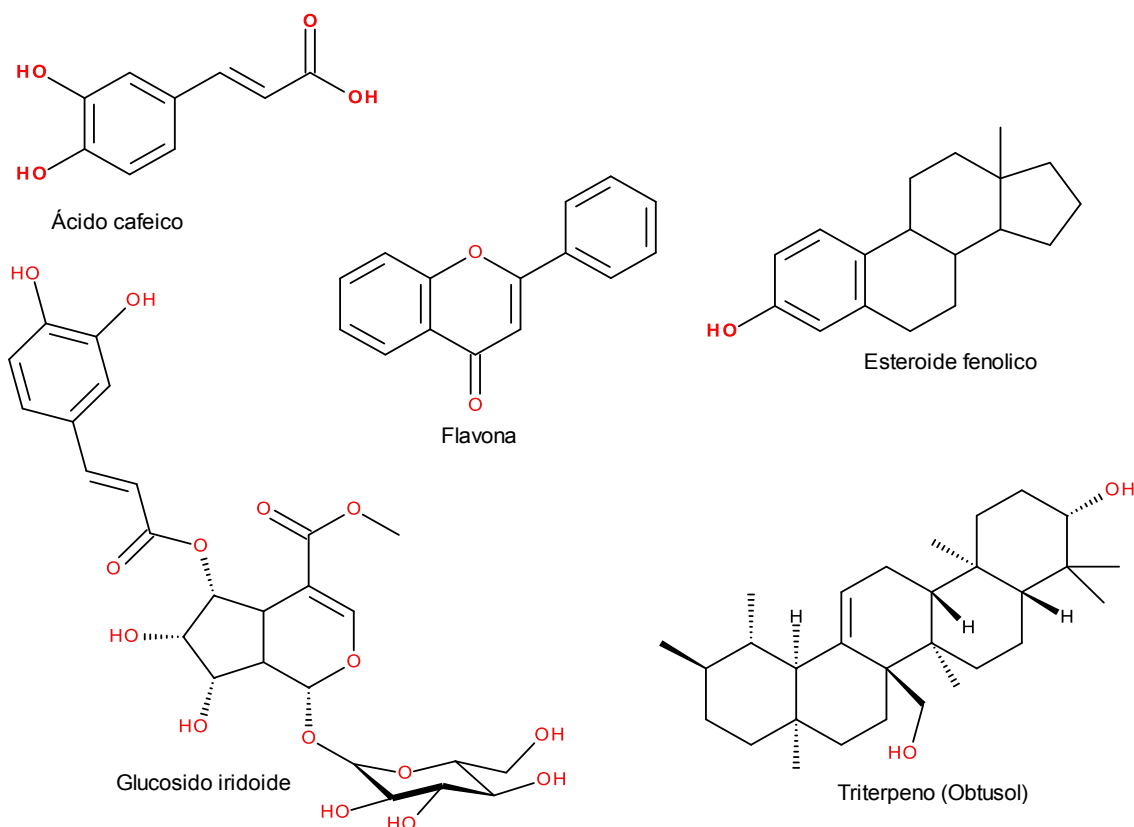


Figura 6. Metabolitos secundarios aislados del género *Lantana*

En los últimos años, el interés por estudiar plantas del género *Lantana* se ha intensificado por sus actividades fitoquímicas, biológicas y farmacológicas. Los estudios en especies de *Lantana camara* han demostrado tener potencial para combatir enfermedades gastrointestinales (originadas principalmente por *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*) debido a la presencia del ácido 22 β -acetoxílico (Figura 7) (Barre *et al.*, 1997).

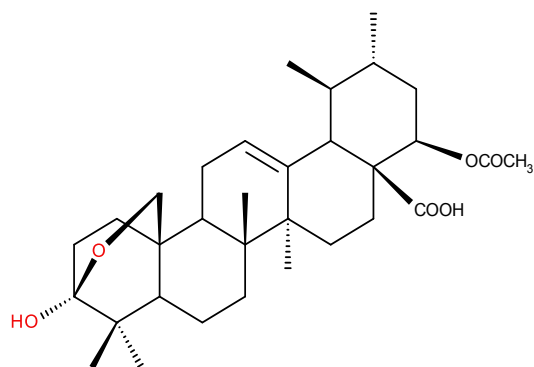


Figura 7. Ácido 22 β -acetoxílico

En otros estudios de la misma especie, se describen doce triterpenos de la parte aérea: ácido camarólico, lantrigloico, camarico, lantanólico, lantanílico, pomólico, camarínico, lantoico, camarín, lantacina, camarinina y ursólico. En la evaluación de la actividad nematocida contra *Meloidogyne incognita*, los ácidos pomólico, lantanólico y lantoico mostraron 100% de mortalidad (1 mg/mL) a las 24 h; mientras que lantacina, camarín, camarinina y ácido ursólico tuvieron el mismo efecto a las 48 h. El potencial nematocida del extracto es equiparable al obtenido con el furadano convencional (Begum *et al.*, 2008). Los metabolitos secundarios empleados en la evaluación nematocida se muestran en la Figura 8.

En las estaciones secas y de lluvia, Silva *et al.*, (2010) realizaron la colecta de hojas frescas de *Lantana aff. fucata* Lindl y *Lantana fucata* Lindl y evaluaron la composición de los aceites esenciales presentes en los extractos crudos de hexano a través de la cromatografía de gases acoplado a masa (CG/MS). El análisis cromatográfico reveló la prevalencia de β -cariofileno (23.88-26.13%), germacreno D (45.46-47.27%) y biciclogermacreno (7.09-14.27%) en plantas colectadas en temporada de seca; en tanto que β -elemeno (15.14%), α -guaiano (10.67%) y β -guaiano (21.17%) se encontraron en especies colectadas en temporada de lluvia. Los metabolitos secundarios descritos se muestran en la Figura 9.

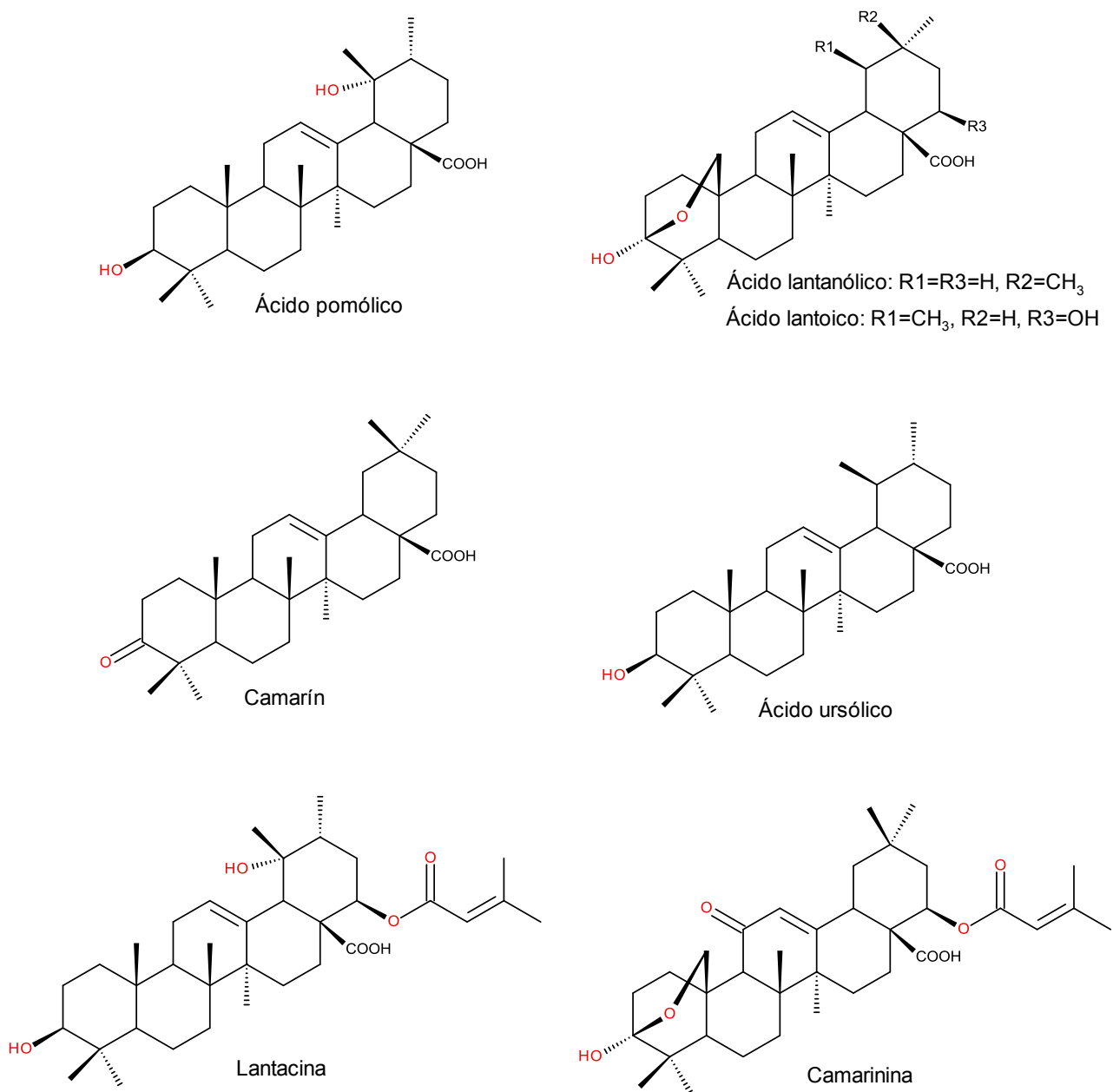


Figura 8. Metabolitos secundarios aislados de *Lantana camara*

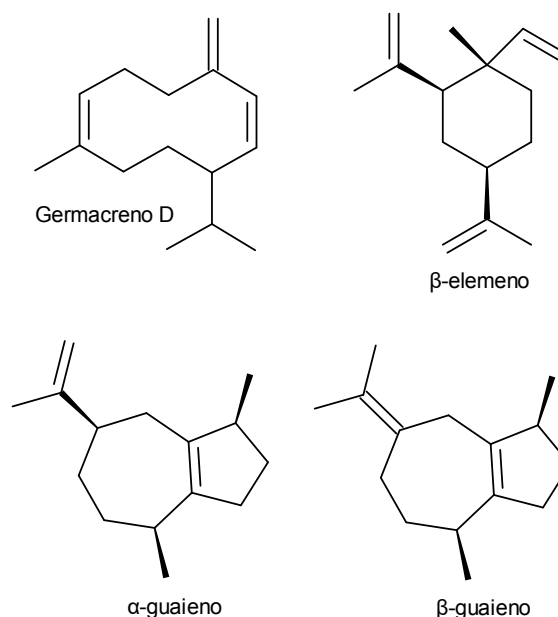


Figura 9. Metabolitos secundarios aislados de *Lantana aff. fucata* Lindl

En el extracto de diclorometano de la raíz de *Lantana viburnoides*, se evaluó la actividad larvicida contra *Anopheles gambiae*. Para el extracto y una fracción se obtuvieron valores de IC_{50} de 7.70 ppm en un lapso de 72 h; el potencial larvicida se atribuye a una mezcla de furanonaftoquinonas (IC_{50} de 5.48-5.7 ppm) y al ácido camárico (IC_{50} de 6.19 ppm) (Innocent *et al.*, 2008). Debido a que la actividad del extracto crudo es similar a los compuestos puros, se concluyó que el extracto puede emplearse en su forma semipurificada.

Por otra parte, de la raíz de *L. achyranthifolia* se encontraron derivados de furanonaftoquinonas; la isodiodantunezona es uno de los metabolitos secundarios que se identificó de manera concisa (Abeygunawardena *et al.*, 1991). En la Figura 10 se muestran los metabolitos secundarios descritos.

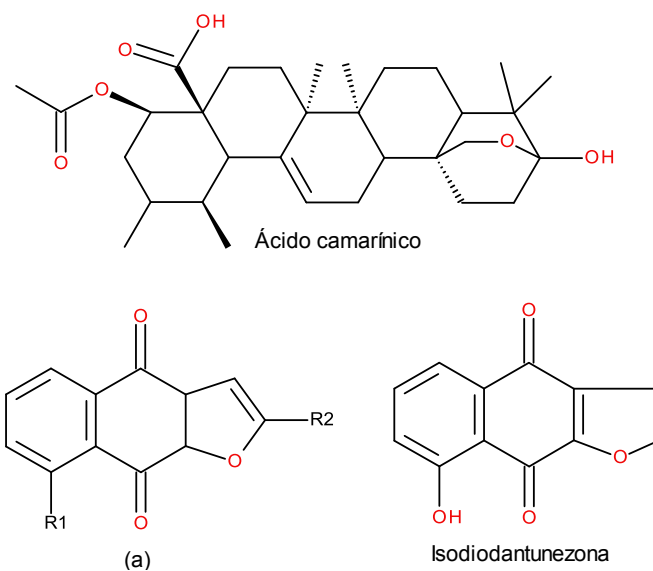


Figura 10. Metabolitos secundarios aislados de *Lantana achyranthifolia*. El ácido camarínico es un análogo del ácido camárico y (a) representa la estructura base de los derivados de furanonafthoquinonas aisladas también en *L. viburnoides*

Los aceites esenciales de la parte aérea de *Lantana achyranthifolia* demostraron tener actividad antibacteriana en cuatro cepas de bacterias Gram (+) y diez Gram (-). Por medio del análisis de cromatografía de gases acoplado a masa (CG/MS), se detectaron compuestos de naturaleza monoterpénica y sesquiterpénica (Figura 11) que mostraron actividad fungicida *in vitro* en cinco hongos de importancia agrícola y médica (*Fusarium sporotrichum*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Fusarium moniliforme* y *Rhizoctonia solani*) (CMI de 0.10-0.18 mg/mL) (Hernández *et al.*, 2008., Hernández *et al.*, 2015).

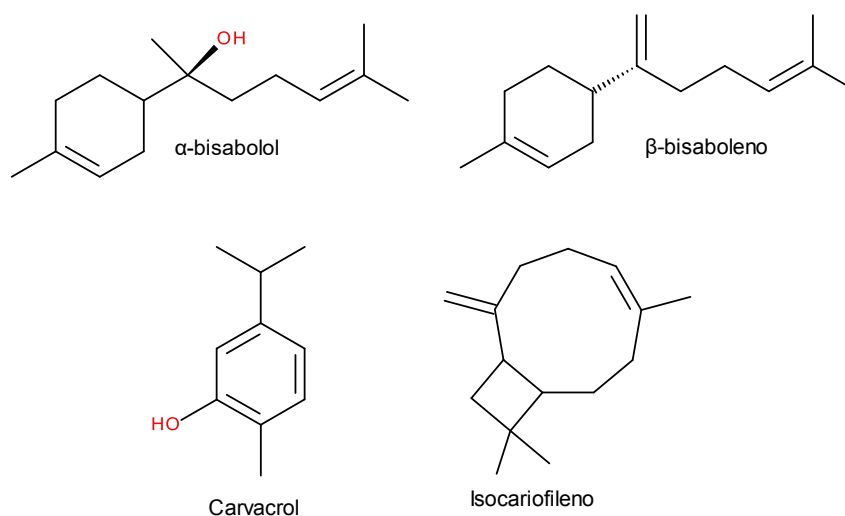


Figura 11. Aceites esenciales aislados de *Lantana achyranthifolia*

En el estudio *in vitro* de la actividad antifúngica del extracto metanólico crudo de la parte aérea de *L. achyranthifolia*, se observó inhibición de la esporulación de cepas patógenas de *F. solani* (12.15%, CMI de 12.50 mg/mL) y *A. alternata* (10.77%, CMI de 6.25 mg/mL). Entre las perspectivas de esta investigación, se sugiere efectuar un tren de fraccionamiento a fin de determinar aquellos compuestos responsables de la actividad antifúngica (Lira *et al.*, 2014).

7.4.2 *Tournefortia densiflora* M. Martens & Galeotti (Boraginaceae)

T. densiflora (Figura 12) conocida comúnmente como tachinol, hierba del negro o hierba del cáncer, es una planta herbácea perteneciente a la familia Boraginaceae (Cuadro 4) que se caracteriza por tener flores blancas agrupadas en racimos, frutos globulados y hojas rasposas puntiagudas de color verde oscuro que se encuentran alternadas entre sí en toda la planta que llega a medir aproximadamente 2 m de altura. Usualmente crecen en bosques tropicales caducifolios y pierden sus hojas en la época seca del año por un lapso de 5-8 meses. Esta especie se encuentra distribuida en 17 estados de la República Mexicana, incluyendo Oaxaca (CONABIO, 2017).

Campos Ríos *et al.*, (2008), reportan que la familia Boraginaceae en México está constituida de 197 especies representadas en 25 géneros.

Cuadro 4. Información taxonómica de *T. densiflora*

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Boraginaceae</i>
Género	<i>Tournefortia</i>
Especie	<i>Densiflora</i>



Figura 12. Parte aérea de *Tournefortia densiflora* M. Martens & Galeotti (Boraginaceae)

El estudio químico de los tallos de *Tournefortia sarmentosa* reveló la presencia de compuestos polifenólicos (Figura 13). La evaluación *in vivo* de la toxicidad mediada por glutamato sobre las neuronas corticales de ratas, mostró que el éster metílico del ácido tournefolico B (50 μM) eliminó la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y atenuó la muerte de las células en un $46.8 \pm 17.8\%$ (Chi *et al.*, 2005).

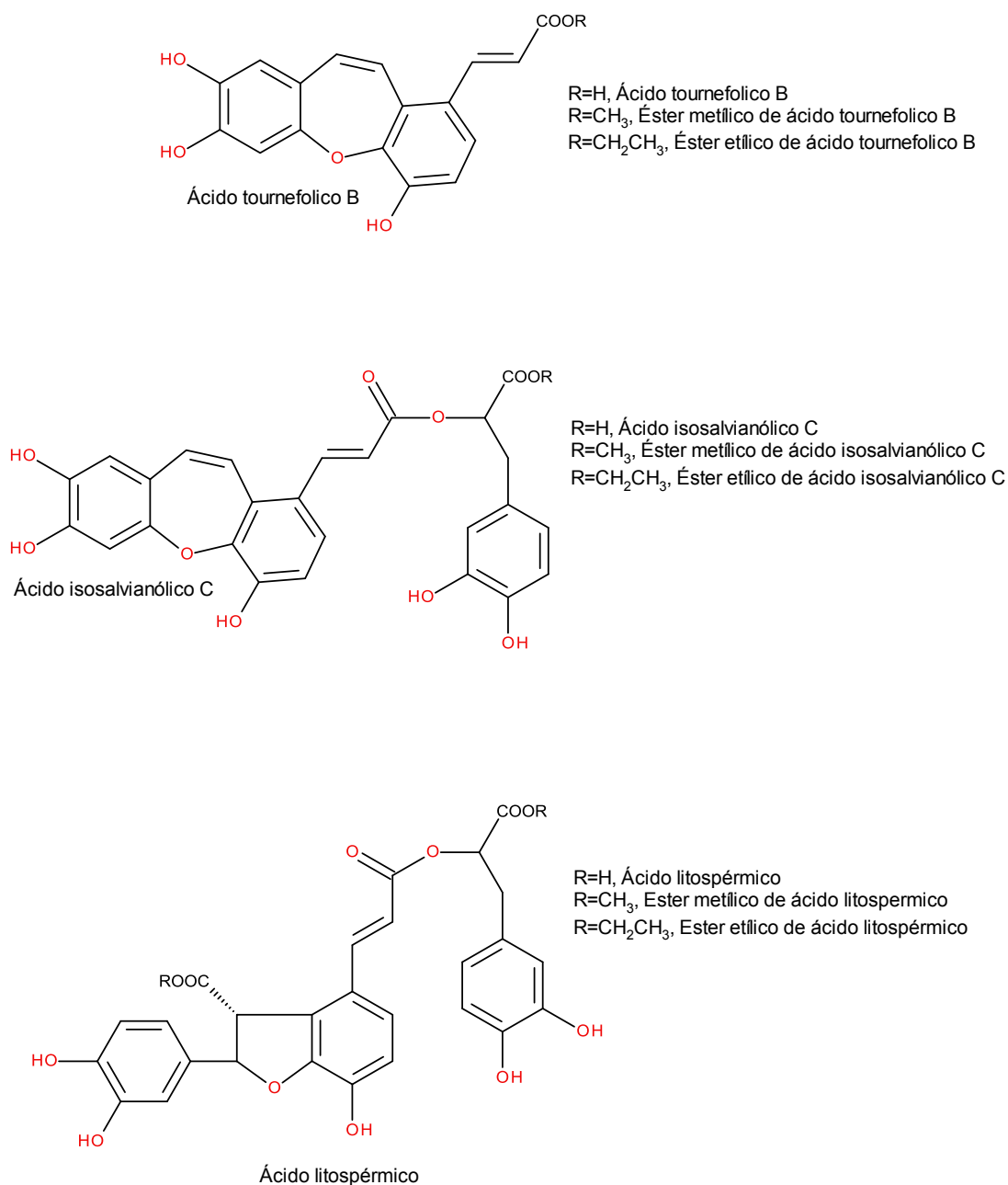


Figura 13. Compuestos polifenólicos aislados de *Tournefortia sarmentosa*

En la evaluación *in vitro* e *in vivo* de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de *Tournefortia sarmentosa*, Teng *et al.*, (2012) demostró que el extracto acuoso reduce la concentración de marcadores inflamatorios (TNF- α , IL-1 β e IL-6),

mejora la actividad de enzimas antioxidantes y atenúa la peroxidación de los lípidos. Lin *et al.*, (2002) justificó el potencial antioxidante de dicha planta por la presencia de ácido tournefolico A y B, ácido salvianólico A, ácido salvianólico F, ácido isosalvianólico C, ácido litospérmico y ácido rosmarínico.

Los estudios de la actividad antibacteriana desarrollados por Chen *et al.*, (2014) revelaron que el extracto acuoso de *T. sarmentosa* tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*. Del fraccionamiento de dicho extracto, se encontró al ácido cafeico como constituyente principal que interviene en la mediación de la captación fagocítica de *E. coli* por parte de los neutrófilos.

En los estudios de validación terapéutica de los extractos acuosos y extractos con butanol de *T. hirsutissima* se evidenciaron efectos hipoglucemiantes en ratas diabéticas en dosis de 8 a 80 mg/kg de peso corporal. Las reducciones en los niveles de glucosa en plasma se presentaron en 3 h y fueron dependientes de la dosis de los extractos (Andrade *et al.*, 2007). Otros estudios demostraron que el extracto metanólico de la parte aérea de *T. hartwegiana* (310 mg/kg de peso corporal) redujo los niveles de glucosa en sangre de ratas diabéticas en un 37% después de 10 días. Estos resultados fueron similares a los observados con la metformina (120 mg/kg de peso corporal) empleada como control positivo (Ortiz *et al.*, 2005). Posteriormente, de los ensayos *in vitro* se encontró que el extracto metanólico inhibió la actividad de la α -glucosidasa de manera dependiente de la concentración (IC₅₀ de 3.16 mg/mL), este comportamiento reveló que el efecto antidiabético podría ejercerse por la supresión de la absorción de los carbohidratos en el intestino. Finalmente, la validación de la actividad biológica del extracto crudo está asociada a la presencia colectiva del sitosterol, estigmasterol, lupeol, ácido ursólico, ácido oleanólico, sacarosa y mioinositol que fueron aislados a través de un fraccionamiento biodirigido (Ortiz *et al.*, 2007).

La investigación de Correia Da Silva *et al.*, (2010) acerca de la actividad antioxidante en extractos crudos y fracciones de *Tournefortia bicolor*, demostró a través de ensayos *in vitro* que los flavonoides presentes en las hojas de la planta

inhibieron la formación de peróxidos lipídicos (IC_{50} de 51.2 ± 2.29 a 89 ± 0.59 mg/L) y favorecieron la eliminación de radicales libres DPPH (IC_{50} de 12.8 ± 2.5 a 437 ± 3.5 mg/L). Por medio de métodos espectroscópicos y espectrométricos se identificaron quercetina, tilirósido y rutina como los compuestos responsables de dicha actividad antioxidante (Figura 14).

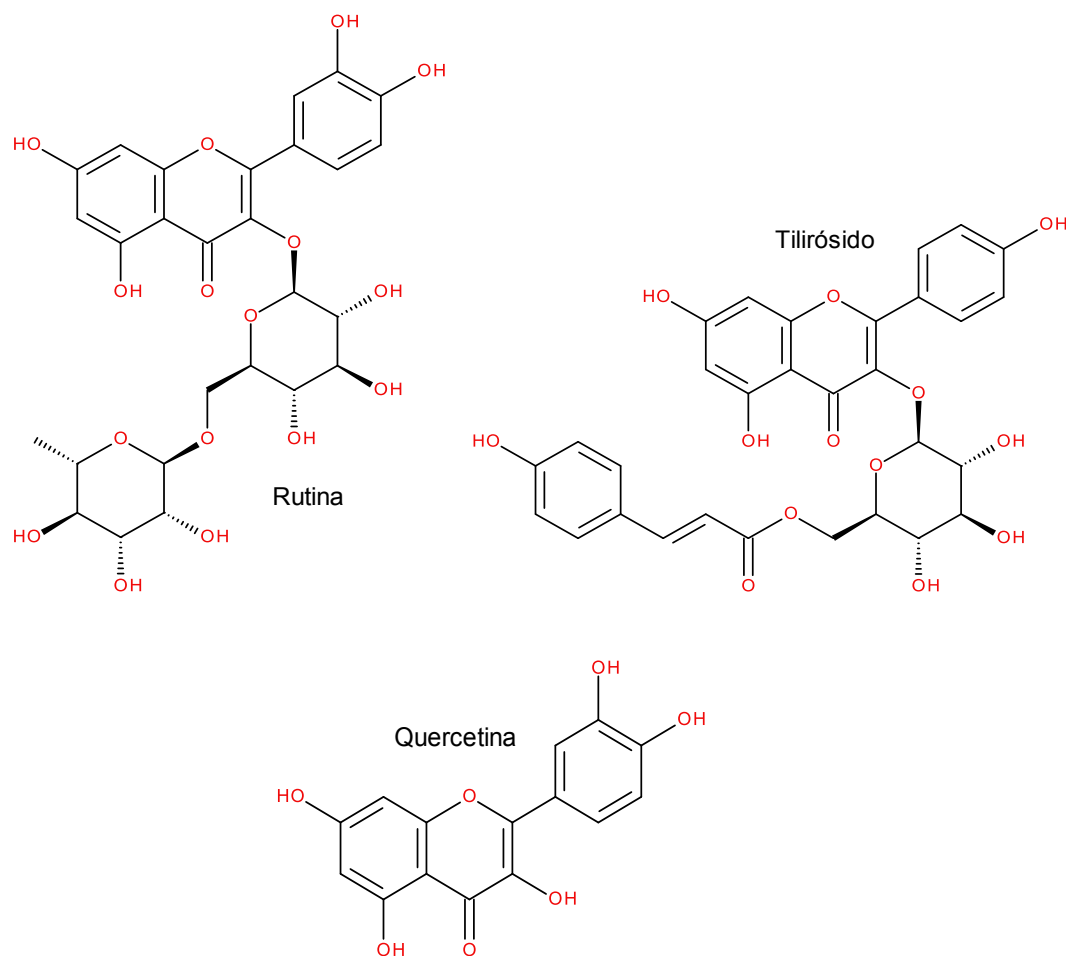


Figura 14. Flavonoides aislados de *Tournefortia bicolor*

Simão *et al.*, (2015) evaluaron los efectos terapéuticos *in vitro* de los extractos acuosos de las hojas de *Tournefortia paniculata* y encontraron que dicha planta es capaz de reducir la grasa del hígado, la glucosa y los niveles de triglicérido sérico.

En la literatura también se describe el uso potencial de los extractos orgánicos de *T. densiflora* contra *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Escherichia coli* (R166, R25922 y R170), *Salmonella typhi* (R1234 y R1330), *Salmonella typhimurium* 14028, *Enterobacter cloacae* R819, *Shigella sonnei* 11060 y *Proteus mirabilis* 4307 (37%, CIM < 2 mg/mL) en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales (como la diarrea y disentería) (Tapia *et al.*, 2003., Osuna *et al.*, 2005).

En otros estudios se ha vinculado la efectividad de los extractos de la parte aérea de *T. densiflora* con el tratamiento de la inflamación vaginal, vientre y enfermedades dermatológicas. Así mismo, se han empleado como agentes cicatrizantes y desinfectantes (Frei *et al.*, 1998., Tlahui-Medic, 2011). Los resultados de estos estudios dejan abierta la investigación a la identificación de los compuestos bioactivos responsables de las actividades biológicas.

En lo que respecta a las estrategias para el biocontrol de hongos fitopatógenos, diversos trabajos de investigación han probado el efecto *in vitro* que tienen algunos extractos de plantas para inhibir el crecimiento micelial. Sin embargo, en la literatura existen pocos estudios químicos sobre la identificación y evaluación de la actividad antifúngica de compuestos presentes en los extractos orgánicos del género *Tournefortia*.

Lira *et al.*, (2014) probaron que el extracto metanólico crudo de la raíz de *Tournefortia densiflora* inhibe el crecimiento micelial de *F. solani* (52.42%, CIM de 16.13 mg/mL) y *A. alternata* (69.07%, CIM de 16.13 mg/mL), por lo cual sugiere un potencial importante para ser empleado como controlador agroecológico de las poblaciones de hongos fitopatógenos.

Con base en la evidencia científica sobre las propiedades fitoquímicas del género *Lantana* y *Tournefortia*, se justifica el estudio fitoquímico de *L. achyranthifolia* y *T. densiflora* como alternativas de uso para el control biológico de los hongos fitopatógenos.

7.5 Fundamentos de las técnicas a utilizar

La combinación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas constituyen una de las herramientas para la caracterización de la estructura química de un compuesto. Los datos obtenidos en cada una de ellas son sumamente importantes para el análisis químico, por ello, en esta sección se detalla de manera resumida los fundamentos de la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (Protón y Carbono-13) y espectrometría de masa (MS por sus siglas en inglés).

7.5.1 Espectrometría de masa (MS)

La espectrometría de masa (MS) es una técnica que permite determinar la masa y fórmula molecular de un compuesto orgánico.

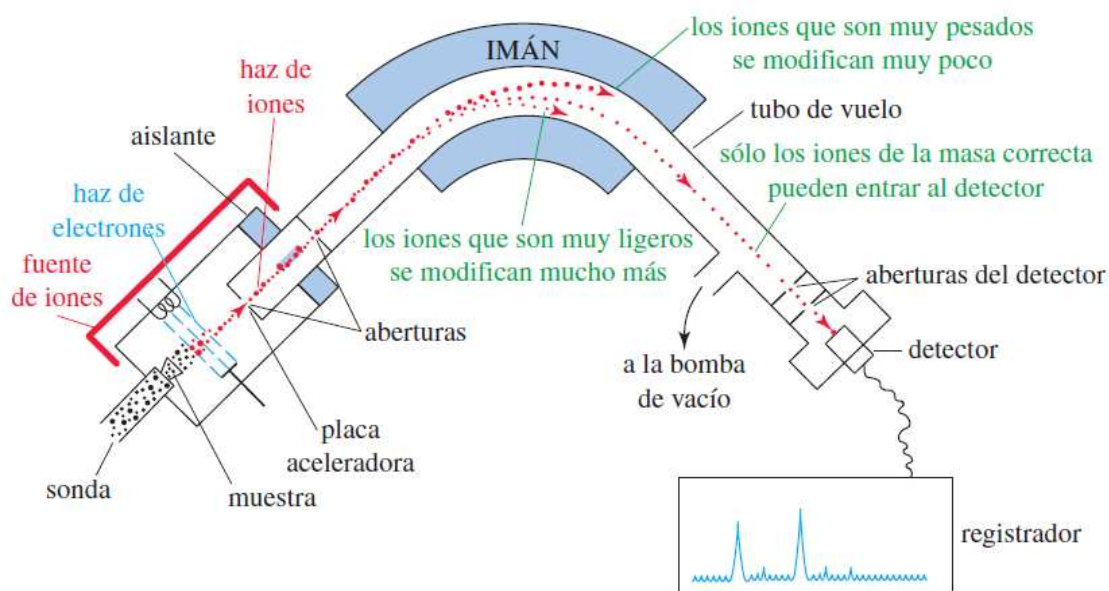


Figura 15. Espectrómetro de masa con ionización por impacto electrónico, extraído de Wade (2011)

La MS se realiza en un espectrómetro de masa, el cual se encuentra constituido por una fuente de ionización, analizador de masa y un detector (Figura 15). En primera instancia, la molécula a analizar debe vaporizarse a través de un alto vacío y en seguida ionizarse con alguno de los métodos especificados en el Cuadro 5. El método de ionización comúnmente utilizado es el de impacto electrónico con 70 eV, en el cual el haz de electrones de alta energía al golpear a

la molécula hace que esta desprenda un electrón y adquiera carga positiva. La incidencia de alta energía provoca que la molécula cargada se fragmente en iones de menor peso que fluyen a través del tubo sometido a un campo magnético, en dicho tubo analizador, los fragmentos ionizados se separan de acuerdo con su relación masa/carga (m/z) y son registrados por el detector del espectrómetro de masa (Wade, 2011).

Cuadro 5. Métodos de ionización. Extraído y modificado de Silverstein *et al.*, (2005)

Método	Iones formados	Sensibilidad	Ventajas	Desventajas
Impacto electrónico	M+	ng-pg	Base de datos de búsqueda de información estructural	M+ ocasionalmente ausente
Ionización química	M+1, M+18, etc.	ng-pg	M+ usualmente presente	Poca información estructural
Desorción de campo	M+	$\mu\text{g-ng}$	Compuestos no volátiles	Equipo especializado
Bombardeo de átomos rápidos	M+1, M+cación, M+matriz	$\mu\text{g-ng}$	Información de secuenciación de compuestos no volátiles	Interferencia de matriz Dificultad de interpretación
Desorción de plasma	M+	$\mu\text{g-ng}$	Compuestos no volátiles	Interferencia de matriz
Desorción laser	M+1, M+matriz	$\mu\text{g-ng}$	Compuestos no volátiles	Interferencia de matriz
Termospray	M+	$\mu\text{g-ng}$	Compuestos no volátiles	Anticuado
Electrospray	M+, M++, M+++, etc.	ng-pg	Interfaces de compuestos no volátiles w/LC Fotomultiplicador de iones cargados	Clases limitadas de compuestos Poca información estructural

El patrón de fragmentación de masa (Figura 16) obtenido es una representación gráfica de picos, en la cual se muestra la abundancia relativa de los fragmentos ionizados en función a su relación masa/carga. Al pico más alto se le denomina pico base y se le asigna una intensidad del 100%, en tanto que el pico de la molécula ionizada sin fragmentar se denomina pico de ion molecular (Wade, 2011). El análisis integral de la información proporcionada por cada uno de estos picos, conduce a la reconstrucción total de molécula desconocida.

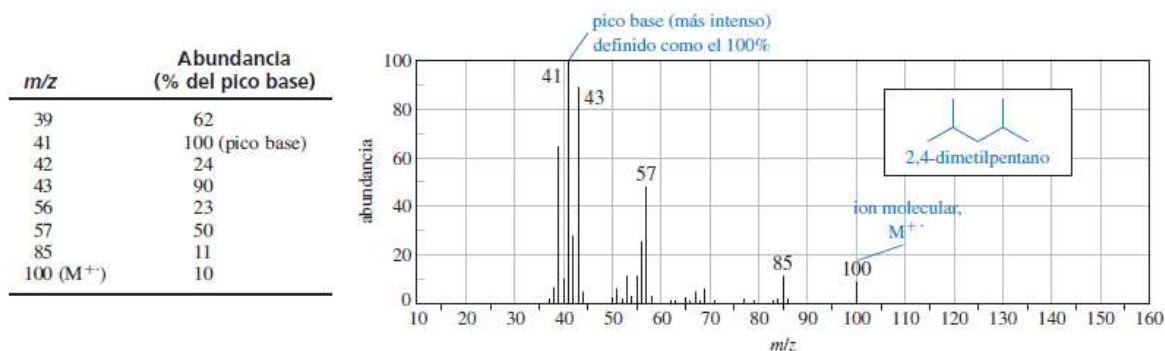


Figura 16. Espectro de masa del 2,4-dimetilpentano, extraído de Wade (2011)

7.5.2 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La técnica de espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) fue diseñada por los fisicoquímicos Edward Mills Purcell y Felix Bloch para estudiar las propiedades magnéticas de los núcleos, las cuales son útiles para determinar las estructuras de los compuestos orgánicos.

El fundamento de la técnica se basa en someter la muestra a un campo magnético altamente homogenizado en el cual los núcleos magnéticamente activos se pueden orientar en dos direcciones: unos paralelos al campo magnético (espín α) y otros en dirección opuesta al campo (espín β). Dado que los espines en estado α son de menor energía se ven más favorecidos y la diferencia de energía entre ambos estados depende de la fuerza del campo magnético aplicado. De manera concisa, el fenómeno de resonancia se presenta cuando un cierto porcentaje de núcleos se excitan de un estado de espín α a un β . Esto se debe a la absorción de energía que proviene de la irradiación con ondas de radio y cuando se suprimen dicha ondas, el espín regresa a su estado inicial emitiendo señales características para cada grupo funcional. En la Figura 17, se representa la ilustración visual de los fenómenos ya descritos (Wade, 2011).

La identificación de los grupos funcionales de una molécula orgánica es posible gracias a que la frecuencia de absorción no es la misma en todos los núcleos de ^1H o ^{13}C , por ello, se producen señales de absorción únicas que dependen de la abundancia isotópica, ambiente químico y paramagnético.

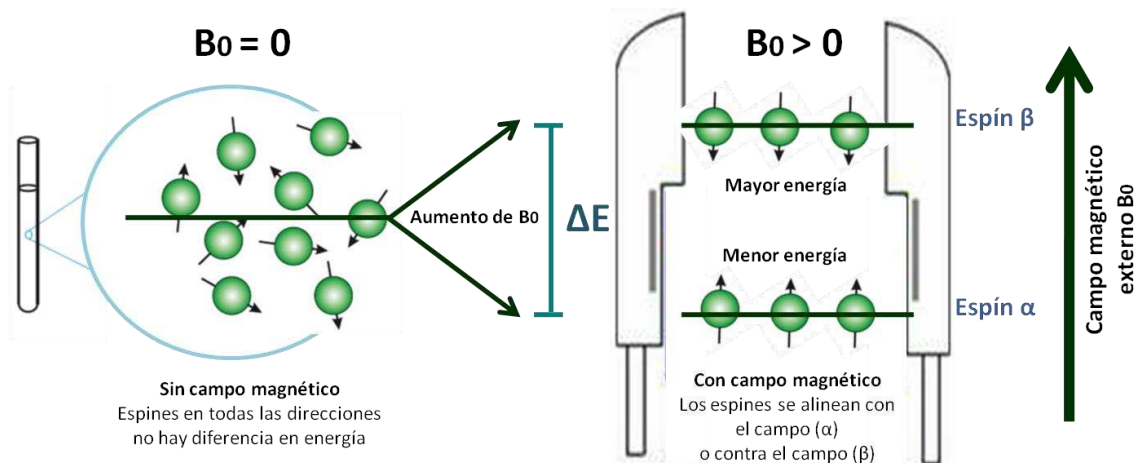


Figura 17. Orientación de los espines nucleares ante un campo magnético externo

Debido a que los núcleos de una molécula están rodeados por electrones, se produce un campo magnético local que se opone al campo magnético aplicado; el resultado de este hecho es que el campo magnético que realmente llega al núcleo es más débil que el campo externo y se dice que el núcleo está protegido o apantallado. Las variaciones en las frecuencias de absorción de RMN que tienen lugar debido al distinto apantallamiento de los núcleos reciben el nombre de desplazamientos químicos e indican la posición exacta de cada pico de absorción.

En las muestras con núcleos de ^1H o ^{13}C , el tetrametilsilano (TMS) se emplea como un punto de referencia ya que produce absorciones a valores altos del campo magnético aplicado y se representa al lado derecho del espectro de RMN y se le asigna arbitrariamente un valor de 0 ppm.

En los espectros de RMN- ^1H , los desplazamientos químicos para distintas clases de protones ocurren generalmente en intervalos de 0 a 12 ppm, a partir del TMS. De manera general, en la ventana espectral de RMN- ^1H se distribuyen las señales de hidrógeno de acuerdo a los grupos funcionales en los cuales participan los hidrógenos (Figura 18). Calculando la integral del área bajo la curva de cada señal registrada, se puede determinar el número de hidrógenos relativos responsables de cada una de las señales emitidas y a través de los acoplamientos es posible

determinar el número de núcleos activos adyacentes a cada hidrogeno observado (Yurkanis, 2008).

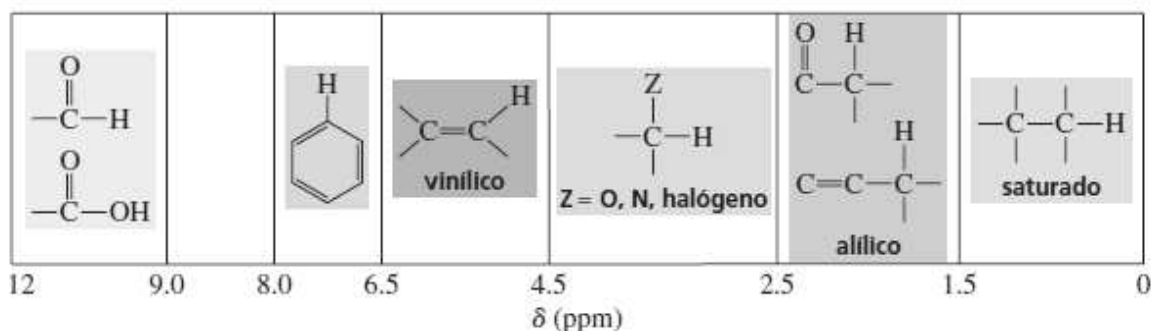


Figura 18. Desplazamientos químicos de RMN- ^1H en compuestos orgánicos

En los espectros de RMN- ^{13}C , los desplazamientos químicos ocurren generalmente en el intervalo de 0 a 220 ppm, a partir de la absorción del TMS. En la Figura 19 se muestran los desplazamientos químicos para diversos átomos de carbono. El amplio intervalo favorece que no se traslapen las señales, sin embargo, la poca abundancia isotópica del ^{13}C (1.1%) genera señales débiles con ruido electrónico de fondo. A fin de mejorar la resolución de los espectros, se utilizan espectrómetros de RMN con transformada de Fourier ya que esta técnica permite obtener buenos espectros con relativamente poca cantidad de muestra (Wade, 2011).

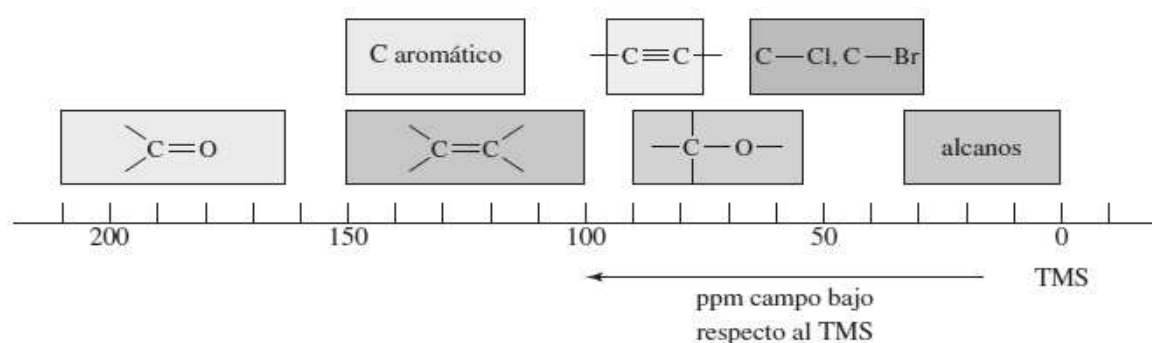


Figura 19. Desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C en compuestos orgánicos

Para realizar una elucidación estructural más precisa de los compuestos orgánicos, generalmente los experimentos unidimensionales de RMN- ^1H y ^{13}C se complementan con experimentos bidimensionales que permiten correlacionar hidrógenos y/o carbonos que tienen alguna relación escalar o espacial. Esta última clase de experimento se clasifica generalmente en dos grupos: homonucleares y heteronucleares (Kaiser, 2000).

Los experimentos de RMN 1D y 2D utilizados en esta investigación fueron adquiridos en disolución y se registraron en un espectrómetro Bruker de 400 MHz. A continuación se describe brevemente las particularidades que caracterizan a los principales experimentos aquí utilizados:

- **DEPTQ:** es un experimento unidimensional que permite detectar la presencia de metinos, metilenos, metilos y carbonos cuaternarios. En muestras diluidas, este experimento es uno de los más utilizados para la diferenciación de carbonos protonados.
- **COSY:** es un experimento bidimensional homonuclear que se utiliza para establecer correlaciones escalares entre los protones que están acoplados a dos (acoplamiento geminal) y/o tres enlaces (acoplamiento vecinal) de distancia. Adicionalmente, este experimento permite discernir la multiplicidad de las señales observadas en el espectro de RMN- ^1H .
- **NOESY:** este experimento bidimensional homonuclear muestra las correlaciones espaciales entre los protones que se encuentran muy cercanos, y mediante el análisis de sus interacciones se establece la configuración relativa de los protones presentes en un compuesto orgánico.
- **TOCSY:** a través de este experimento bidimensional homonuclear es posible establecer las correlaciones totales entre los protones pertenecientes a un mismo sistema de espines. En esencia los protones no

están necesariamente acoplados, pero tienen un protón vecino común al que ambos están unidos.

- **HSQC:** es un experimento bidimensional heteronuclear que permite identificar todos los carbonos protonados. Básicamente se establece la conexión directa de los protones con sus correspondientes carbonos.
- **HMBC:** mediante este experimento bidimensional heteronuclear se establecen las correlaciones de los protones y carbonos que se encuentran interconectados a dos o tres enlaces de distancia. Este experimento es útil para identificar a los carbonos cuaternarios y para ubicar los diversos residuos de una molécula.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo del presente trabajo que comprendió la extracción, fraccionamiento, aislamiento, purificación y elucidación estructural de metabolitos secundarios de interés biológico de *L. achyranthifolia* y *T. densiflora*, se realizó en el Laboratorio de Principios Bioactivos que se encuentra albergado en el Edificio de Productos Naturales y Alimentos. La evaluación de la actividad antifúngica se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología, perteneciente al Instituto de Agroindustrias. En la Figura 20, se muestran las múltiples acciones desarrolladas en el aislamiento de los compuestos bioactivos y la evaluación de su actividad antifúngica.

8.1 Materiales

En la exploración de estrategias para la separación de los componentes presentes en las plantas objeto de estudio, se usaron cromatofolios (5x3 cm) con soportes de sílica y C₁₈ de la marca Merck. El fraccionamiento grueso de los componentes se realizó en columnas de vidrio.

8.2 Disolventes y reactivos

Los disolventes empleados en la extracción y separación cromatográfica fueron de grado reactivo, y se destilaron en un sistema de 5 L con columna de fraccionamiento (Figura 21-A). El metanol, acetato de etilo y hexano se obtuvieron de Conquimex®, en tanto que el diclorometano (99.8%) usado fue marca Meyer®. El sulfato de sodio anhidro al 99.3% usado en la extracción líquido-líquido fue de la marca J.T.Baker. Las columnas cromatográficas se empacaron con gel de sílice (grado 9385, malla 230-400 y poro 60 Å) de Sigma-Aldrich.

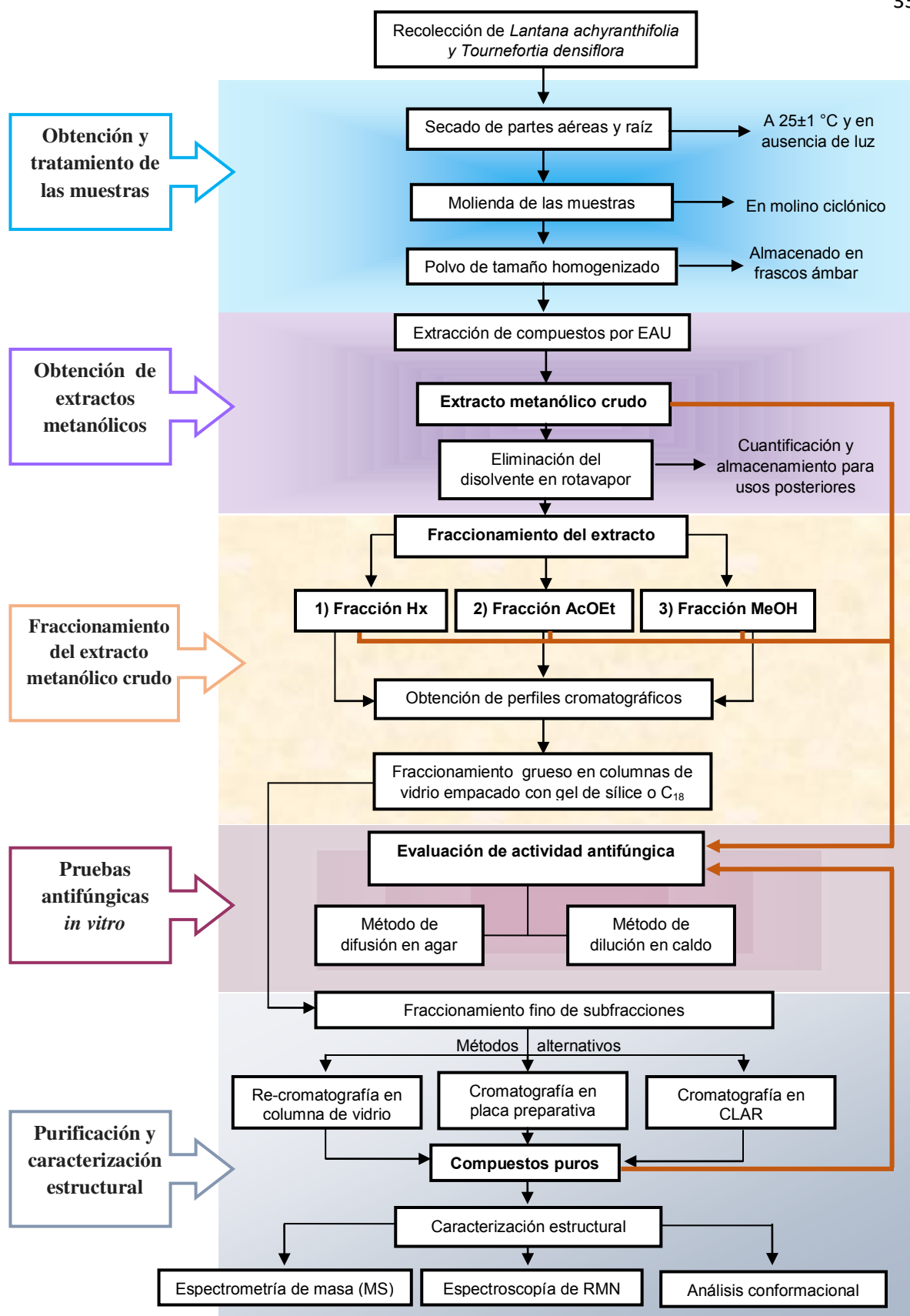


Figura 20. Diagrama general del estudio fitoquímico de *L. achyranthifolia* y *T. densiflora*

8.3 Equipos

La molienda del material vegetal se efectuó en un molino ciclónico Foss Cyclotec Sample Mill 1093 (Figura 21-B). Para la obtención de los extractos metanólicos se utilizó un baño de ultrasonido SB-3200 DTN (Figura 21-C). La remoción de los diversos disolventes utilizados, se efectuó por medio de un rotavapor Heidolph2[®] (Figura 21-E) con temperatura de baño a 45 °C y un recirculador de agua fría marca SEVMR Modelo ECO-10 (Figura 21-D). En el revelado de los cromatofolios se usó una lámpara de luz ultravioleta Spectroline[®] Modelo CM-10 que opera en el intervalo de longitud de onda corta (254 nm) y larga (365 nm).

Para la adquisición de los espectros de RMN unidimensionales y bidimensionales de protón y carbono-13, se utilizó un espectrómetro Bruker Ascend[™] 400 (Figura 21-F) usando TMS como referencia interna y estos fueron procesados con el software MestReNova[®]. Respecto a la obtención de masa de resolución baja se usó un espectrómetro Varian 1200L Quadrupole MS/MS y uno de marca Agilent Technologies HPLC 1200 LC/MS de cuadrupolo simple.

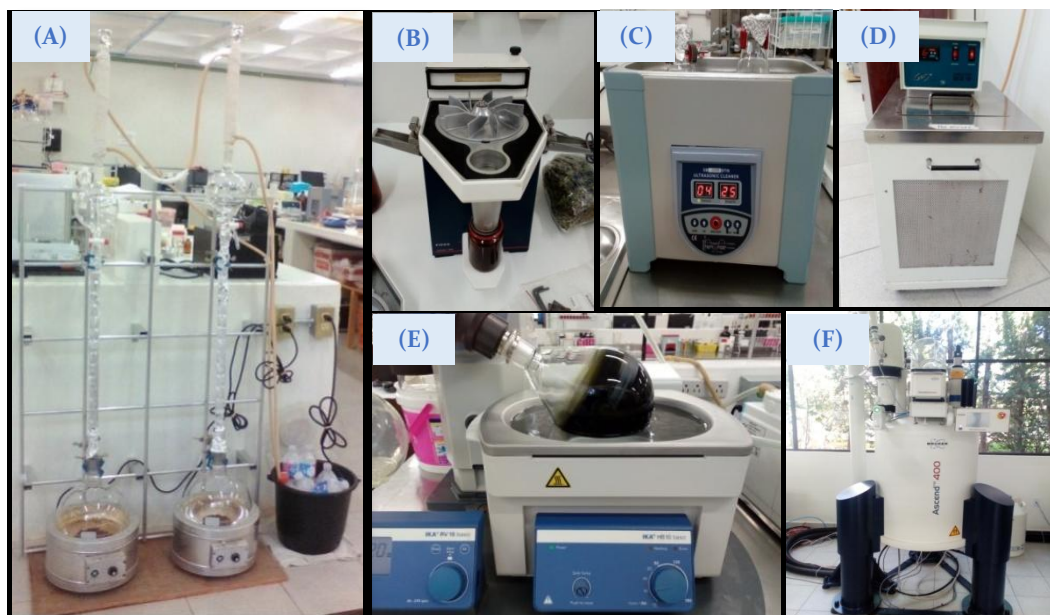


Figura 21. Equipos utilizados en el desarrollo del trabajo de investigación. **(A):** Sistema de destilación fraccionada, **(B):** Molino ciclónico, **(C):** Baño ultrasónico, **(D):** Recirculador de agua, **(E):** Rotavapor, **(F):** Espectrómetro de RMN

8.4 Especies vegetales

Las partes aéreas de *L. achyranthifolia* se colectaron en la Ciudad de Huajuapán de León, Oaxaca (longitud 17°48'41"N y latitud 97°46'49"O), en tanto que la raíz de *T. densiflora* se obtuvo del Jardín Botánico Chepilme (latitud 15°46'14"N y longitud 96°26'49"O) de la Universidad del Mar - Campus Puerto Ángel. Una muestra de cada especie vegetal fue depositada en las instalaciones del Herbario "Jorge Salas Espinoza" de la Universidad Autónoma de Chapingo (*voucher* UACH 25185 y 25221, respectivamente) y la identificación etnobotánica fue efectuada por especialistas de la misma institución.

8.5 Cepas biológicas

En la evaluación de la actividad antifúngica *in vitro*, se utilizaron cepas de *F. oxysporum* CDBB-H-2000 y *R. solani* CDBB-H-308 las cuales fueron adquiridas de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Cinvestav. Estos hongos fitopatógenos se reactivaron en agar papa dextrosa (PDA) a 28 °C.

8.6 METODOLOGÍA

8.6.1 Obtención de extractos crudos: Extracción sólido-líquido

Las muestras secas de *T. densiflora* y *L. achyranthifolia*, colectadas en mayo de 2015 y julio de 2016 fueron pulverizadas en un molino ciclónico a fin de favorecer y acelerar la transferencia de los metabolitos secundarios de la matriz sólida hacia el disolvente durante la Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU).

Para la obtención de los extractos crudos, se realizaron cada una de las acciones mostradas en la Figura 22. Primeramente, 100 g de muestra vegetal pulverizada distribuida equitativamente en 2 matraces Erlenmeyer de 500 mL se extrajeron con MeOH destilado (250 mL x matraz) en un ultrasonido por un lapso de 15 min con temperatura de 25 °C. El sobrenadante de la extracción se filtró a través de dos embudos embonados con algodón dispuestos de forma vertical en un soporte universal. Posteriormente, el metanol procedente de 6 extracciones secuenciadas se eliminó en un rotavapor (45 °C), obteniéndose así 18.2 ± 1.4 g de extracto metanólico crudo de *L. achyranthifolia* y 5.8 ± 0.7 g de extracto de *T. densiflora*, los cuales se guardaron en frascos de vidrio a 4°C hasta su posterior uso.

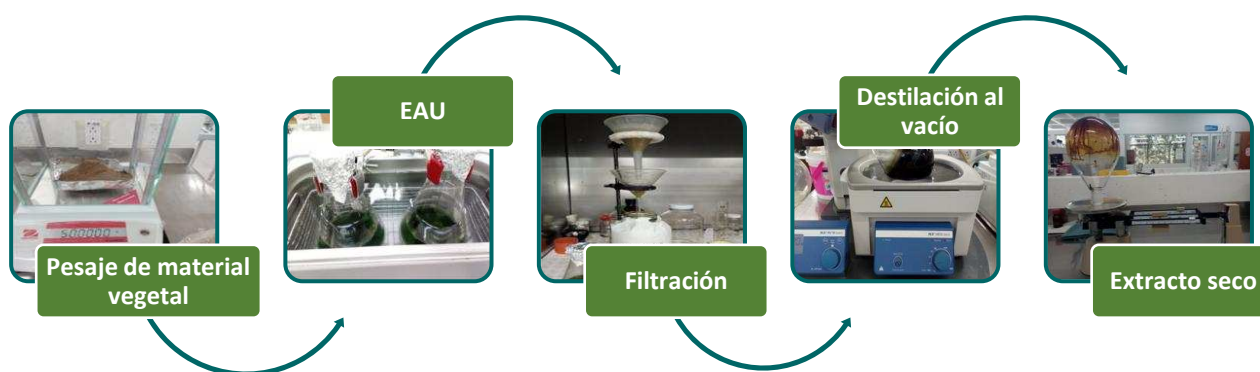


Figura 22. Secuencia de pasos involucrados en la obtención de extractos crudos

8.6.2 Aislamiento de compuestos de la parte aérea de *L. achyranthifolia*

8.6.2.1 Fraccionamiento del extracto metanólico

4.05 g de extracto metanólico crudo se fraccionó con disolventes de polaridad creciente. En primera instancia, el extracto se suspendió en 50 mL de Hx en un matraz Erlenmeyer y se llevó a ultrasonido por 3 min. Se extrajo la porción solubilizada en Hx con una pipeta Pasteur y se efectuó nuevamente la extracción hexánica hasta su agotamiento. Finalmente, de la remoción del disolvente a presión reducida se obtuvieron 1.08 g de Fracción hexánica.

Del extracto metanólico agotado se removió el remanente de Hx y se suspendió en agua pasada por ósmosis inversa. Enseguida, se procedió a efectuar la extracción líquido-líquido con AcOEt (Figura 23), añadiendo sulfato de sodio anhidro al embudo de separación a fin de evitar la formación de emulsiones. La porción soluble en AcOEt se recibió en un matraz de Erlenmeyer de 250 mL, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se traspasó a un matraz bola para la evaporación del disolvente a presión reducida, obteniéndose 2.14 g de Fracción de AcOEt.

8.6.2.2 Remoción de azúcares del extracto metanólico suspendido en agua

La fracción acuosa proveniente de la extracción con AcOEt se montó en una columna de vidrio de 60 x 3 cm empacada con amberlita XAD16N (malla 20-60, poro 200 Å) de Sigma-Aldrich a una altura de 15 cm. La amberlita se acondicionó primeramente en MeOH y luego en agua desionizada y desgasificada. Luego, se aplicó la muestra y se eluyó a flujo lento con agua. Cuando la fracción acuosa se absorbió en toda la superficie de la amberlita (el agua a la salida de columna es incolora), se eluyó con MeOH para obtener los compuestos orgánicos retenidos en la amberlita. A la fracción orgánica se le eliminó el MeOH por destilación al vacío en un rotavapor, obteniéndose un peso de 31.8 mg de Fracción metanólica libre de azúcares. De manera adicional, se evaluó la estabilidad de los compuestos presentes en el extracto metanólico; para ello, 50 mg del extracto combinado con 1.0 g de sílica se mezclaron con 10 mL de MeOH:AcOEt (1:1) en un vial de 20 mL

que fue expuesto a la luz por 24 h. Posteriormente, dicha mezcla se cromatografió en CCF y no se observó ninguna degradación de los componentes.

Extracción líquido-líquido

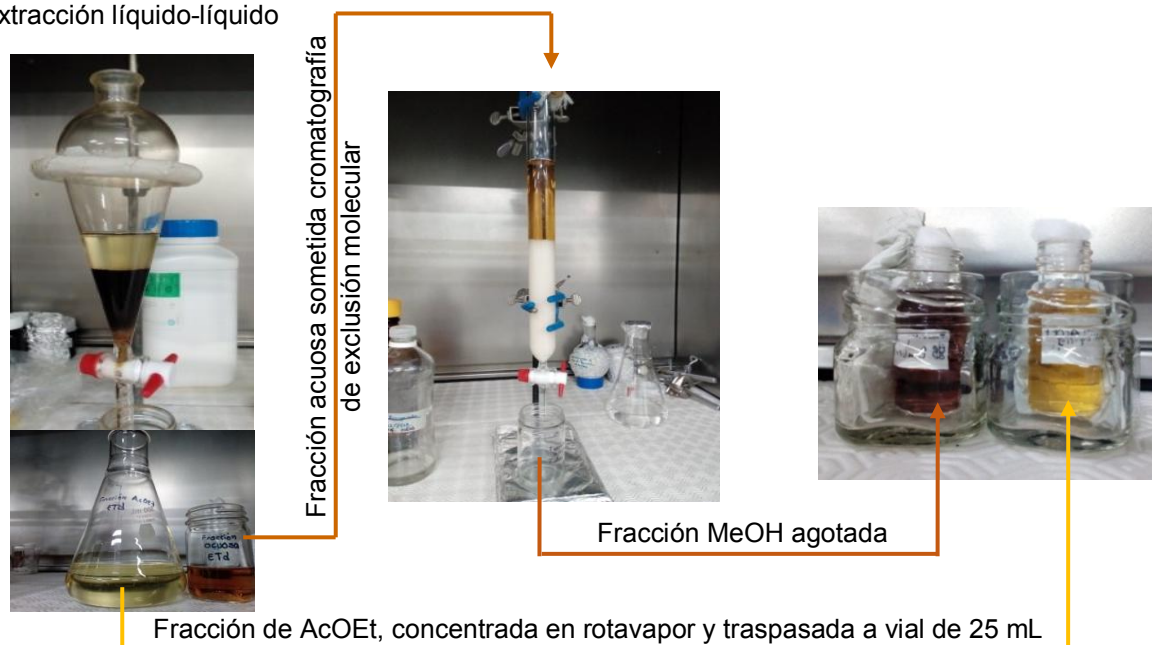


Figura 23. Extracción líquido-líquido de los extractos metanólicos

8.6.2.3 Perfiles cromatográficos de separación

Con el propósito de encontrar las condiciones adecuadas de separación de los compuestos presentes en las diversas fracciones orgánicas, se realizaron pruebas cromatográficas en CCF con cromatofolios de fase normal (gel de sílica) y reversa (C₁₈) Merck® de 5x3 cm. Los cromatofolios se observaron bajo luz ultravioleta de longitud de onda corta y larga (254 y 365 nm, respectivamente). Para revelar todos los compuestos oxidables, los cromatofolios se impregnaron con sulfato sérico amoniacal y se llevaron a calentamiento en una parrilla eléctrica.

8.6.2.4 Cromatografía de la fracción de AcOEt

De la fracción de AcOEt se obtuvo un sólido grisáceo (1.04 g) soluble en acetona (PAFAcOEt, Figura 24), que al someterse a CCF en cromatofolios de sílica desactivada se apreciaron dos componentes que se lograron separar entre sí con

una fase móvil de CH_2Cl_2 :MeOH (85:15). La desactivación de los cromatofolios se llevó a cabo en una cámara cromatográfica de ácido bórico al 5% y el secado de las mismas se realizó sobre una superficie caliente.



Figura 24. Sólido proveniente de la Fracción AcOEt de *L. achyranthifolia*

Debido a la naturaleza no tan compleja de PAFAcOEt, se optó por efectuar la separación y purificación de los compuestos a través de la cromatografía normal en columna flash. La columna de vidrio de 60 x 2.5 cm se embonó con algodón y se rellenó con gel de sílice a una altura de 20.5 cm. Inicialmente, la columna se eluyó con CH_2Cl_2 y su recorrido en el interior de la columna fue acelerado por una presión de aire regulada con una llave de flujo, con el fin de liberar las burbujas de aire en el gel de sílice.

Teniendo acondicionada la columna, se procedió a solubilizar 177.2 mg de PAFAcOEt en la mínima cantidad de acetona. Subsecuentemente, la muestra solubilizada se colocó en el interior de la columna y se eluyó con mezclas de CH_2Cl_2 :MeOH de polaridad creciente. Los eluatos colectados en viales de vidrio de 25 mL se monitorearon mediante CCF realizadas en cromatofolios de sílica desactivada, utilizando una lámpara de luz ultravioleta como agente de visualización. Aquellas fracciones que resultaron tener el mismo perfil cromatográfico se agruparon entre sí. Cuando se obtuvieron las fracciones con los compuestos de interés, la columna se lavó con MeOH y se secó con acetona.

La información detallada de las mezclas de disolventes utilizadas en la realización de la cromatografía *flash* se muestra en la sección de resultados y discusión (Cuadro 6). Debido a que en la primera columna sólo se aisló uno de dos compuestos principales, se optó por montar una segunda columna *flash* de 60 x 3.5 cm con gel de sílice a una altura de 23 cm, partiendo de 1.03 g de PAFAcOEt del cual se obtuvo finalmente el segundo compuesto restante con fase móvil CH₂Cl₂:MeOH (89:11).

8.6.3 Tratamiento alternativo del extracto metanólico de *L. achyranthifolia*

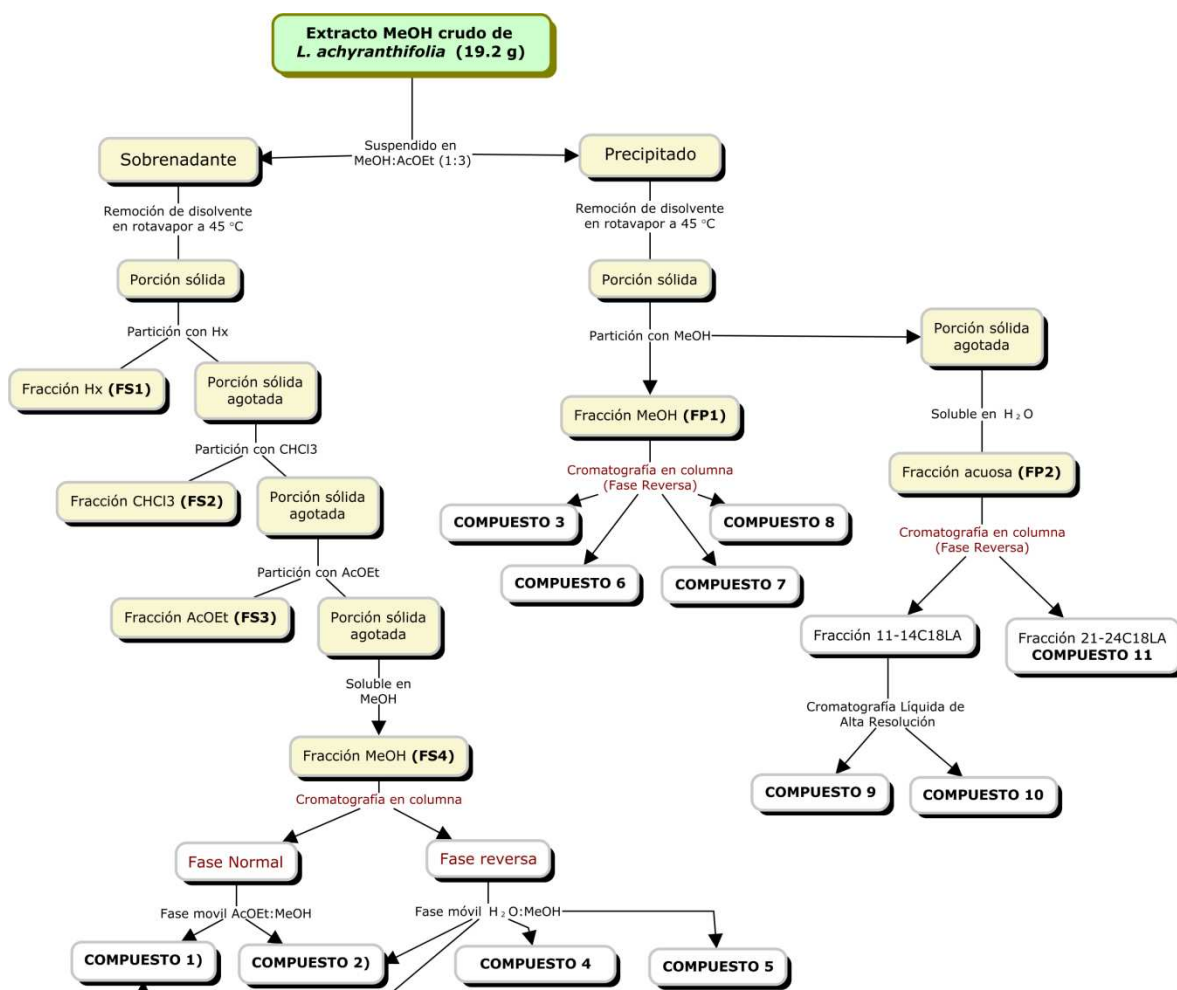
Se obtuvo el extracto metanólico crudo de la parte aérea de *L. achyranthifolia*, tal cual se describe en el apartado 8.6.1. Subsecuentemente, el extracto obtenido (19.20 g) se re-suspendió en una mezcla de MeOH:AcOEt (1:3) que proporcionó dos fases: un precipitado de color marrón y un sobrenadante de color negro. Ambas fases se llevaron a sequedad total en un rotavapor a 45 °C y luego se sometieron a un proceso de partición con disolventes de polaridad creciente (Hx, CH₃Cl, AcOEt y MeOH) para obtener las fracciones FS1, FS2, FS3, FS4, FP1 y FP2 (Figura 25). Por medio de la CCF, las fracciones FS1 y FS2 se agruparon entre sí y se almacenaron a 4 °C hasta su posterior purificación.

8.6.3.1 Purificación cromatográfica de las fracciones FS3-FS4

Las fracciones FS3 y FS4 se reunieron de acuerdo a su similitud revelada en CCF y se cromatografiaron en una columna de vidrio empacada con Sephadex LH-20 que se eluyó con diversas proporciones de H₂O:MeOH (100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100); las tres fracciones intermedias (75:25 a 25:75) se agruparon entre sí (4.22 g) y se purificaron (1.11 g) a presión atmosférica en una columna de vidrio (45x2.5 cm) empacada con 24 g de C₁₈ que fue eluida con gradientes de fase móvil H₂O: MeOH (Cuadro 6) de la cual se colectaron 117 eluatos de 20 mL y 6 eluatos de 100 mL para el 100% de H₂O y MeOH. Por medio de la cromatografía en fase reversa desarrollada en cromatofolios de C₁₈ se detectaron cuatro compuestos que se etiquetaron como compuesto **1, 2, 4 y 5**.

Cuadro 6. Fraccionamiento cromatográfico de FS4 de la parte aérea de *L. achyranthifolia*

Fase móvil	Volumen (mL)	Eluatos colectados	Observaciones
H ₂ O	200	1-2	Ambas fracciones se juntaron
H ₂ O: MeOH (95:5)	200	3-4	Ambas fracciones se juntaron
H ₂ O: MeOH (90:10)	800	5-38	Se obtuvieron los compuestos 4 y 5
H ₂ O: MeOH (87:13)	100	39-43	
H ₂ O: MeOH (85:15)	200	44-53	Se obtuvo el compuesto 2
H ₂ O: MeOH (83:17)	100	54-58	
H ₂ O: MeOH (80:20)	100	59-62	
H ₂ O: MeOH (75:25)	750	63-97	
H ₂ O: MeOH (70:30)	100	98-101	
H ₂ O: MeOH (60:40)	200	102-111	
H ₂ O: MeOH (50:50)	200	112-121	Se obtuvo el compuesto 1
MeOH	200	122-123	

**Figura 25.** Fraccionamiento químico y purificación del extracto metanólico de *L. achyranthifolia*

8.6.3.2 Purificación cromatográfica de las fracciones FP2 y FP1

Al precipitado de color marrón seco se le efectuaron lavados sucesivos con MeOH hasta el total agotamiento de color; los lavados reunidos se concentraron en un rotavapor y la fracción sólida que se obtuvo se designó como FP1. Dicha fracción se purificó en columna abierta de vidrio (45x2.5 cm) empacada con C₁₈ en relación 1:20 con respecto a la cantidad de muestra suministrada, la muestra se soportó en relación 1:1 con C₁₈. El aislamiento de compuestos en su forma pura, se logró a través del uso de un aumento gradual de la polaridad del sistema de elución H₂O: MeOH, tal como se indica en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Fraccionamiento de FP1 de *L. achyranthifolia* en columna cromatográfica de fase reversa

Fase móvil	Volumen (mL)	Observaciones
H ₂ O	200	Se obtuvo un primer compuesto con clave 11-14-2C18LA
H ₂ O: MeOH (90:10)	200	Se obtuvieron dos compuestos en mezcla
H ₂ O: MeOH (80:20)	200	
H ₂ O: MeOH (70:30)	250	
H ₂ O: MeOH (60:40)	350	
H ₂ O: MeOH (40:60)	100	Se obtuvo un cuarto compuesto con clave 65-72-2C18LA
H ₂ O: MeOH (10:90)	100	
MeOH	200	

El remanente residual del precipitado seco lavado con MeOH, fue soluble en agua y se denominó FP2. Esta fracción se purificó de forma análoga a lo descrito para FP1 y a través del sistema de elución mostrado en el Cuadro 8, se obtuvo un compuesto designado como 21-24C18LA y una subfracción semipura etiquetada como 11-14C18LA que se purificó en CLAR.

Cuadro 8. Fraccionamiento de FP2 de *L. achyranthifolia* en columna cromatográfica de fase reversa

Fase móvil	Volumen (mL)	Observaciones
H ₂ O	100	
H ₂ O: MeOH (60:40)	200	Se obtuvieron dos compuestos en mezcla que se etiquetaron con clave 11-14C18LA
H ₂ O: MeOH (55:45)	140	
H ₂ O: MeOH (40:60)	100	Se obtuvo un compuesto con clave 21-24C18LA
H ₂ O: MeOH (20:80)	80	
MeOH	150	

8.6.3.3 Purificación de la subfracción 11-14C18LA obtenida de FP2 del extracto metanólico de la parte aérea de *L. achyranthifolia*

Las fracciones 11, 12, 13 y 14 obtenidas con la fase móvil MeOH:H₂O (40:60) mostraron un mismo perfil cromatográfico, por lo tanto se reunieron y se denominaron 11-14C18LA (85 mg). La fracción en cuestión se purificó a través de un sistema cromatográfico CLAR (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) que constó de una columna semipreparativa Génesis® RP-18 (250x10 mm) empacada con material de fase reversa de 4 µm de tamaño de partícula y un detector de UV/Vis (Figura 26). Inicialmente la muestra se solubilizó en 2 mL de MeOH:H₂O (38:62) y se filtró previo a la inyección (40 µL/inyección). La columna se eluyó con 38% de MeOH (A) y 62% de agua acidificada al 0.1% con ácido fórmico (B); durante el tiempo de corrida (90 min) se mantuvo un flujo constante de 1.7 mL/min y una presión entre 1550 a 1601 psi. Mediante la lectura de la absorbancia realizada a una longitud de onda de 280 nm, se detectaron cuatro compuestos con tiempos de retención (t_R) de 40.68, 49.32, 64.48 y 83.34 min; de los cuales sólo los mayoritarios COMP 9 y 10 (t_R = 49.32 y 64.48 min) se analizaron por RMN.



Figura 26. Equipo CLAR equipado con detector de UV/Vis

8.6.4 Aislamiento de compuestos presentes en la raíz de *T. densiflora*

La misma metodología descrita para los extractos metanólicos de *Lantana achyranthifolia* fue aplicada al extracto metanólico de *Tournefortia densiflora*; sin embargo, dado el rendimiento bajo en la extracción se optó por efectuar las pruebas de fraccionamiento con una menor cantidad de muestra.

8.6.4.1 Cromatografía del extracto metanólico

Los compuestos presentes en 1.14 g de extracto metanólico agotado, se soportaron en C₁₈ y se separaron a presión atmosférica en una columna de vidrio (53x2 cm) rellena de fase reversa C₁₈ con una altura de 14 cm.

De las primeras fracciones eluidas con H₂O (100 mL) se redujo en un 90% su volumen en el rotavapor a 50 °C y al adicionarse MeOH se promovió la formación de cristales translucidos que posteriormente se identificaron como alantoína.

8.6.4.2 Extracción de alcaloides de la raíz de *T. densiflora*

8.00 g de extracto MeOH crudo se traspasaron a un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se mezclaron con 44 mL de HCl 1 M. La mezcla se sometió a una agitación magnética por 20 min y después se filtró a través de papel filtro Whatman #1. El filtrado se alcalinizó con KOH hasta pH=10 y se extrajo con disolventes de polaridad intermedia, tal como se especifica en el Apéndice 1. Después de la evaporación de Hx, CHCl₃ y AcOEt a presión reducida, se obtuvieron 25.1 mg (0.31%), 150.4 mg (1.88%) y 140.4 mg (1.76%) de fracciones enriquecidas en alcaloides.

8.6.4.3 Aislamiento de compuesto minoritario en el extracto Metanólico

De la extracción líquida-líquida del sobrenadante metanólico con Hx (Apéndice 1), se obtuvo un sólido que se lavó con MeOH y mediante la cristalización de las aguas madres con mezcla de MeOH:AcOEt se formaron agujas translúcidas. Al efectuarse la filtración se lograron obtener 0.8 mg de un sólido blanco que se llevó a un análisis de RMN para la obtención de los espectros de protón y carbono-13.

8.6.4.4 Reducción de alcaloides N-óxidos de la raíz de *T. densiflora*

Debido a que especies del género *Tournefortia* sintetizan y almacenan alcaloides pirrolizidínicos en forma de N-óxidos (Gómez y Chong., 1985), se recurrió a implementar una metodología de extracción que consistió en acidificar 100 mg de Fracción MeOH y Fracción acuosa en HCl 2 M hasta pH=2. A las mezclas se le adicionaron 50 mg de Zinc y se agitaron por 12 h. Subsecuentemente, el medio acidificado se alcalinizó con KOH (pH=10) y se extrajo con CHCl₃. De la remoción del disolvente a presión reducida, se obtuvieron 2.3 mg (2.3%) de Fracción CHCl₃ enriquecida de alcaloides a partir de la Fracción MeOH. La metodología detallada se muestra en la Figura 27.

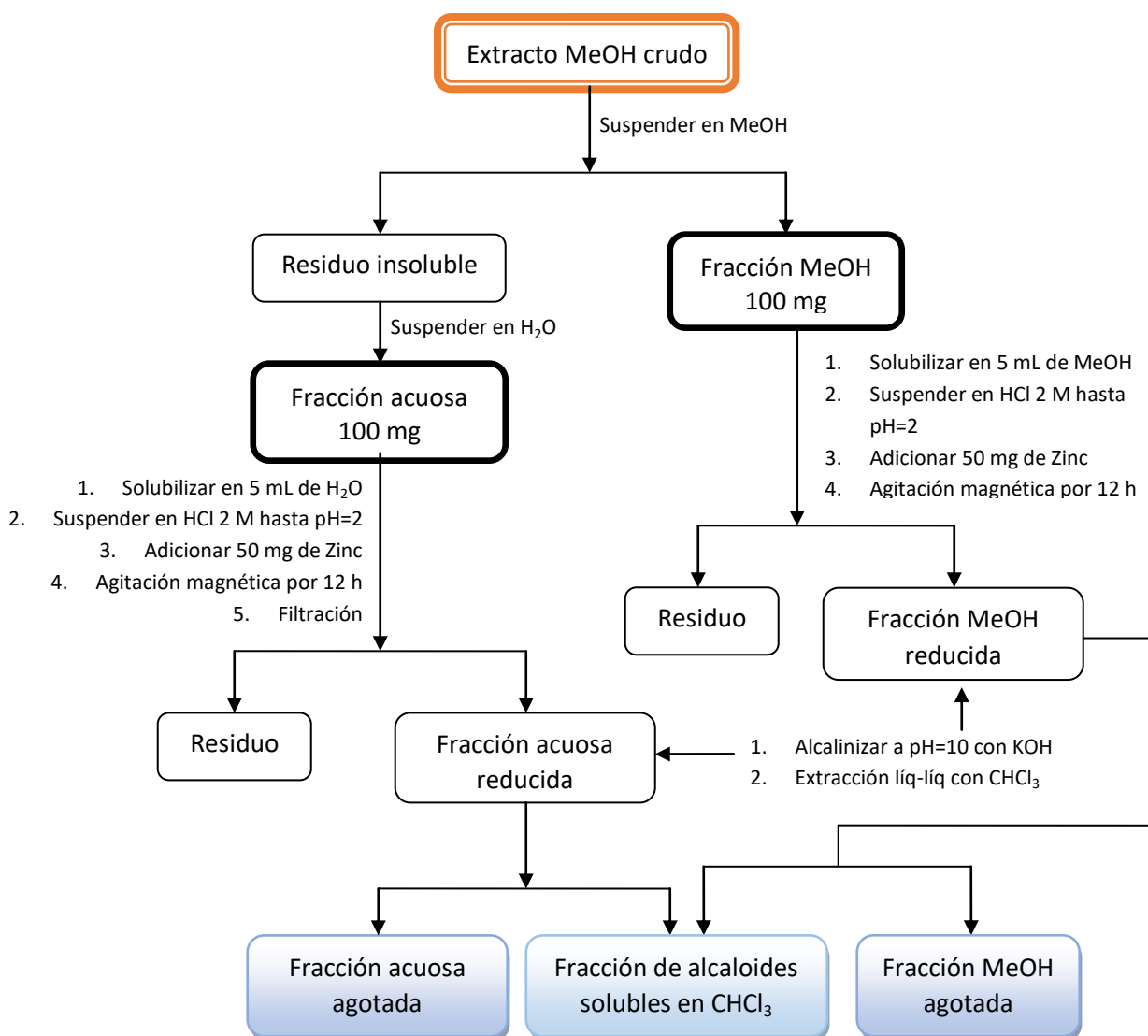


Figura 27. Reducción de alcaloides N-óxidos presentes en la raíz de *T. densiflora*

8.6.5 Elucidación estructural de componentes bioactivos

La obtención de los datos espectroscópicos de los extractos metanólicos crudos, fracciones orgánicas y compuestos purificados, se llevó a cabo en un espectrómetro de 400 MHz. A fin de obtener los perfiles químicos de las muestras y conocer el arreglo estructural de los compuestos aislados con su correspondiente asignación de los desplazamientos químicos de las diversas señales de protón y carbono-13, se adquirieron los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) unidimensionales (^1H y ^{13}C) y bidimensionales de acoplamiento homonucleares (COSY, TOCSY y NOESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC). La adquisición del patrón de fragmentación de masa de resolución baja se obtuvo por ionización electrónica a 70 eV y por electroespray (ESI) en modo positivo.

Para verificar la identidad y los datos espectroscópicos de algunos compuestos, se obtuvieron sus conformeros principales a partir del estudio teórico de Método de Estructura Electrónica usando el software Spartan 08'.

8.6.6 Evaluación de la actividad antifúngica

El tamizaje involucrado en la evaluación antifúngica *in vitro* de extractos, fracciones y compuestos puros se muestra en la Figura 28.

8.6.6.1 Inhibición del crecimiento micelial

La evaluación de la bioactividad se realizó a nivel *in vitro* con cepas de los hongos *F. oxysporum* y *R. solani*, midiendo el halo del crecimiento radial de los hongos respecto a un control negativo, para esto, se empleó el método de difusión en agar (Lira *et al.*, 2014).

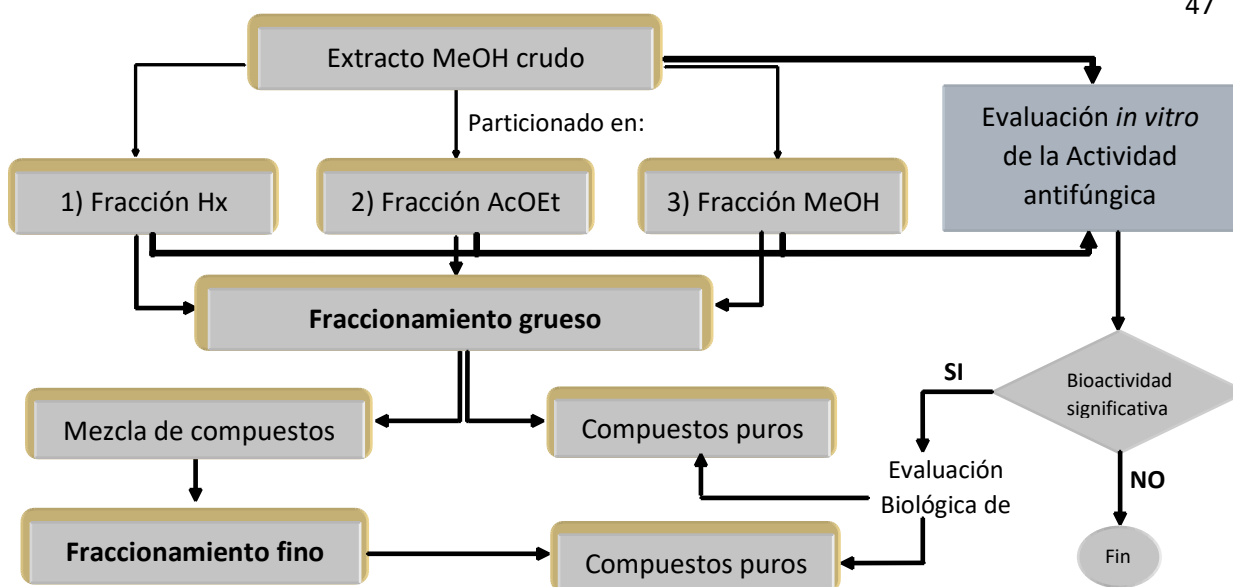


Figura 28. Fraccionamiento de extractos vegetales para la evaluación antifúngica *in vitro*

Se utilizaron cajas petri de plástico estériles, en las cual, se colocaron 25 mL de agar papa dextrosa (PDA) esterilizado; subsecuentemente, en el centro del medio gelificado se colocó un bloque PDA de 5 mm de diámetro con el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *R. solani*, previamente incubados durante 7 y 4 días respectivamente. Posteriormente, los discos de cultivo fúngico se impregnaron con 20 μ L del tratamiento a evaluar: DMSO (CTRL-), Azoxistrobin (CTRL+), Extracto MeOH de *L. achyranthifolia* (EMLA), Fracción MeOH_3C18 de *L. achyranthifolia* (F3C18LA), Fracción no polar de *L. achyranthifolia* (FNPOLA), Extracto MeOH de *T. densiflora* (EMTD), Fracción reducida de alcaloides de *T. densiflora* (FATD) y Fracción reducida de alcaloides con impurezas de *T. densiflora* (FAIMTD). Las concentraciones iniciales de los extractos, fracciones y azoxistrobin se establecieron en 100, 25 y 2.4 mg/mL, adicionalmente cada una de estas concentraciones se diluyeron en relación 1:2 y 1:4 respectivamente. Para facilitar la difusión de las muestras en los discos, las cajas sin invertir se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su total absorción, y cada una de las concentraciones evaluadas de las diversas muestras se efectuó por triplicado a fin de obtener datos representativos estadísticamente. Finalmente, las cajas se sellaron, se etiquetaron y se incubaron a 28 °C por 2 días para *R. solani* y 7 días para *F. oxysporum*, con

fotoperiodos alternos de luz/oscuridad (12/12 h) y el área de la zona de inhibición fue medido con el software ImageJ[®]. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los micelios se calculó haciendo uso de la fórmula siguiente reportada por Sánchez *et al.*, (2015):

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Donde: **C** denota el área de crecimiento radial del micelio en el control negativo

T denota el área de crecimiento radial del micelio en el tratamiento

8.6.6.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) se utilizó el método descrito por Sasidharan *et al.*, (2012) y adaptado por Lira *et al.*, (2014).

Se realizó un raspado micelial de la cepa fúngica cosechada a los 8 días con 6 perlas de vidrio estéril, adicionando previamente 3 mL de agua destilada estéril con Tween-80 0.2% (v/v) al medio PDA. La suspensión de esporas obtenida se filtró a través de una gasa estéril para eliminar cualquier residuo de micelio o medio de cultivo. Subsecuentemente, del filtrado se tomó un volumen de 100 μL de esporas que se depositaron en un tubo eppendorf estéril junto con 900 μL de agua estéril. Esta dilución resultante se agitó en un vórtex y en seguida se cargaron en cada campo de la cámara de Neubauer Bright-Line[™], marca Sigma-Aldrich, 10 μL de suspensión de esporas para su conteo realizado en el microscopio óptico Zeigen[®]. El conteo por duplicado sirvió para ajustar la suspensión de esporas a una concentración específica de 10^4 esporas/mL.

La determinación del número de esporas producida por los hongos fitopatógenos se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Num. esporas}}{\text{mL}} = \frac{\text{Núm. esporas contadas}}{\text{Núm. cuadrantes contados}} \times \frac{10^4 \text{ cuadrantes}}{\text{mL}} \times \text{Factor de Dilución}$$

Las concentraciones a evaluar de los extractos, fracciones y azoxistrobin se establecieron en 100, 25 y 2.4 mg/mL respectivamente. Inicialmente a cada uno de los tubos de ensaye esterilizados (etiquetados de 1 a 11) se colocó 1 mL de agua destilada estéril con Tween-80 0.2% (v/v) y luego se sometieron a una serie de diluciones doble de una solución madre preparada con 200 μ L del tratamiento vegetal con 800 μ L de agua estéril. Finalmente, cada uno de estos tubos se inoculó con 1 mL de la suspensión ajustada a 10^4 esporas/mL. A fin de efectuar una exploración rápida acerca del potencial de la bioactividad de los diversos tratamientos vegetales, cada uno de los ensayos se efectuó sin réplica y los tubos se incubaron por 7 días a 28 °C en una incubadora orbital a 150 rpm que estuvo expuesta con luz blanca.

El valor de la CMI se determinó como la concentración más baja del tratamiento evaluado en la que no se observó crecimiento fúngico (visualmente el tubo no presentó turbidez).

8.7 Análisis estadístico de los resultados

El procesamiento de los valores promedio de la actividad antifúngica se efectuó por medio del programa ImageJ[®] y se analizaron estadísticamente por ANOVA de un factor que se complementó con la prueba de Tukey, con el fin de comparar y determinar si existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos. Los intervalos de confianza se establecieron con un nivel de significancia del 5 % (*p <0.05), usando el software STATISTICA 10[®].

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Fraccionamiento y cromatografía del extracto de *L. achyranthifolia*

Los extractos metanólicos de la parte aérea de *L. achyranthifolia* colectada en Huajuapán de León en el 2016, fueron obtenidos mediante la Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU) por un lapso de 15 min a 25 °C. El rendimiento a partir de 100 g de muestra pulverizada fue de $18.2 \pm 1.4\%$. En la partición de 4.01 g de extracto crudo se obtuvieron 1.08 g de fracción hexánica, 2.14 g de fracción de AcOEt y 0.79 g de fracción MeOH agotada. De los perfiles realizados en CCF (Figura 29) se evidenció que las fracciones presentan una diversidad de componentes, los cuales, son viables de separarse a través del uso de la cromatografía en columna empacada con gel de sílice y mezclas de diversos disolventes de polaridad creciente tal como se especifica en el Cuadro 9.

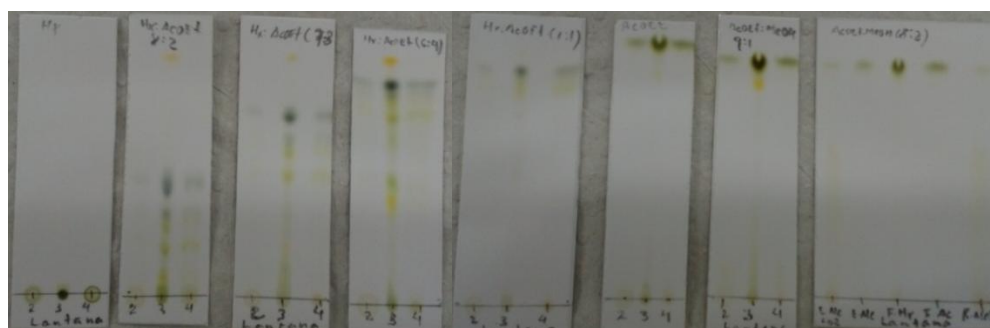


Figura 29. Perfiles cromatográficos en CCF de *L. achyranthifolia*

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN-¹H) del extracto MeOH y Fracción de AcOEt (Figura 30) mostraron dos señales de protones de vinílicos en δ 6.69 y 7.50 ppm. Las señales entre δ 6.50–7.01 ppm pueden corresponder a compuestos tipo fenólicos. Adicionalmente, se observaron señales características de protones de grupos metileno y metilo en δ 2.50 y 1.01 ppm respectivamente. Dada la existencia de un gran número de señales de protones base de oxígeno entre δ 3.30–3.75 ppm, aunado a las señales de dos protones anoméricos en δ 4.50 y 5.01 ppm (Hernández-Carlos *et al.*, 2011), se puede asumir de la existencia de glicósidos.

El espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN-¹³C), mostró 18 señales intensas comprendidas en la región de carbonos insaturados y aromáticos (Figura 31). En δ 156.0 y 180.0 ppm, se muestran señales de carbonos saturados base de oxígeno y de carbonos sp^2 correspondientes a base de ésteres. Las señales situadas entre δ 60.0–85.0 ppm son características para protones de carbonos vecinos a oxígeno. Por los desplazamientos químicos del resto de las señales, se puede deducir que el extracto posee al menos seis grupos metilenos (δ 30.0–60.0 ppm) y cuatro señales intensas de metilos en un intervalo de δ 10.0–30.0 ppm.

Cuadro 9. Condiciones de separación cromatográfica de parte aérea de *L. achyranthifolia*

Planta	Fracción orgánica	Fase estacionaria	Fase móvil
<i>L. achyranthifolia</i>	Hexánica	Gel de sílica	Hx: AcOEt (7:3)
	Acetato de etilo	Gel de sílica	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (6:4)
	PAFAcOEt	Gel de sílica	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (85:15)
	Metanólica	Gel de sílica	AcOEt:MeOH (8:2)

Nota: 1) PAFAcOEt es la subfracción de polvos solubles en acetona, obtenida de la fracción de acetato de etilo.

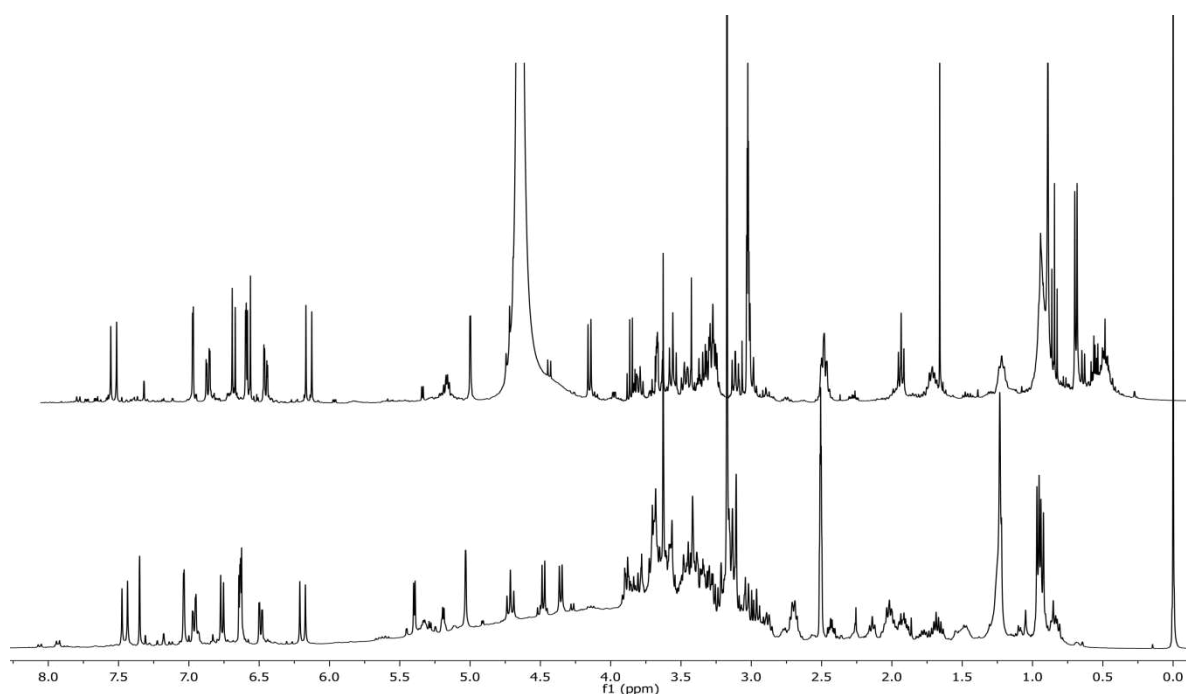


Figura 30. Espectro de RMN-¹H de *L. achyranthifolia*
* Extracto MeOH (trazo inferior) y fracción de AcOEt (trazo superior)

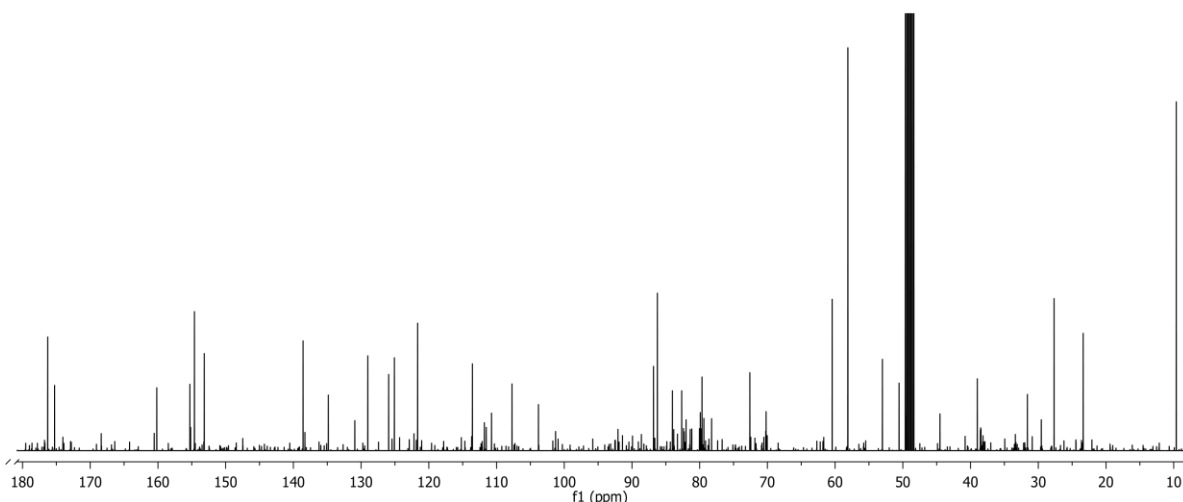


Figura 31. Espectro de RMN- ^{13}C del extracto MeOH de *L. achyranthifolia*

9.2 Elucidación de verbáscosido de la parte aérea de *L. achyranthifolia*

De la primera cromatografía *flash* de PAFAcOEt se obtuvieron diversos eluatos que finalmente se agruparon en un total de 6 fracciones (Cuadro 10). En la CCF de F5PA se observó un sólo componente a 254 nm (Figura 33-A y B) y 365 nm (Figura 33-C). El compuesto F5PA (18.6 mg, 10.5 %) proveniente de la fase móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (87:13) se obtuvo como un sólido de color ocre soluble en MeOH (Figura 32). Mediante un tratamiento de partición alternativo del extracto MeOH crudo, se obtuvo FS4 que al someterse a un fraccionamiento cromatográfico en fase reversa, permitió obtener el mismo compuesto F5PA (333.2 mg, 30.0 %) en sistema de $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (15:85). Teniendo en cuenta estos rendimientos, es factible atribuirle al compuesto una propiedad altamente polar y que a su vez es susceptible de oxidarse en columnas empacadas de sílice; por ello, se prefirió que la separación de dichos compuestos con tales características, se realizó en columnas de fase reversa rellenas con C_{18} mediante el uso de gradientes de elución impartidos con mezclas de $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$, ya que con esto se incrementa el rendimiento a 19.5 %.

Para el aislamiento de F5PA se utilizó un volumen total de 1000 mL de mezclas de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$. En el Cuadro 11, se muestra de manera detallada los diversos volúmenes de eluyentes empleados en la resolución de la columna *flash*.

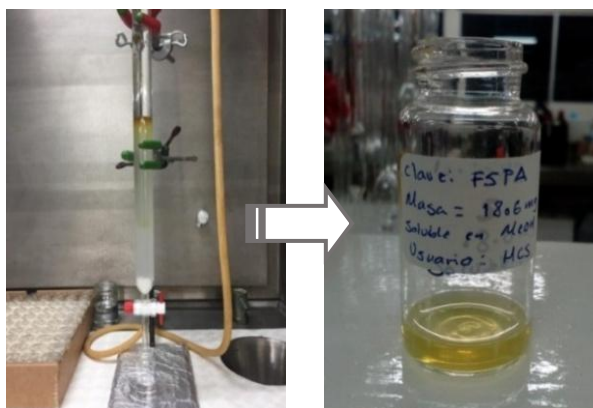


Figura 32. Purificación de PAFAcOEt en CF

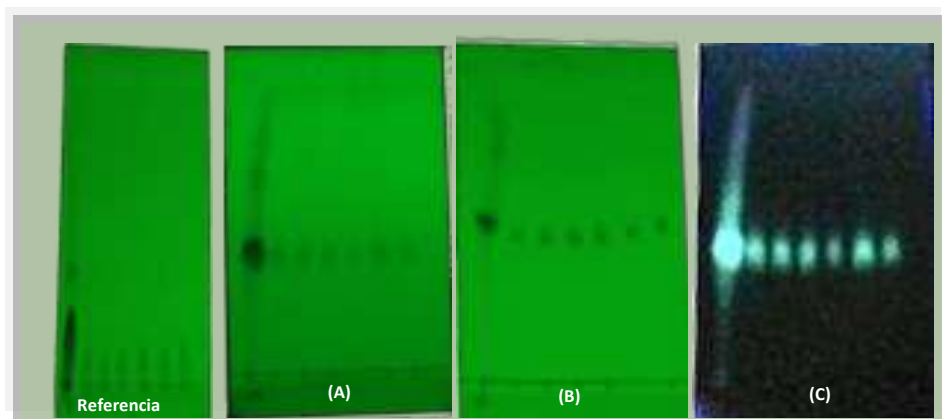


Figura 33. Perfil cromatográfico de F5PA aislado de *L. achyranthifolia* en CF

Cuadro 10. Fracciones obtenidas en CF

Clave de fracción	Fase móvil de cámara cromatográfica	Peso (mg)
F1PA	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (8:2)	1.1
F2PA	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (75:15)	23.3
F3PA	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (7:3)	11.6
F4PA	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (7:3)	47.7
F5PA	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (7:3)	18.6
F6PA	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (7:3)	19.9

Cuadro 11. Eluyentes empleados en CF

Orden de empleo	Fase móvil del eluyente	Volumen utilizado (mL)
1	CH ₂ Cl ₂	100
2	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (95:5)	300
3	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (90:10)	200
4	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (87:13)	1000
5	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (1:1)	200
6	MeOH	400
7	Acetona	200

Los datos espectroscópicos de F5PA revelaron que el compuesto aislado es un glucósido feniletanoide denominado verbascósido (**1**), el cual se encuentra constituido por un éster cinámico, un éter feniletanoide, una glucosa y una ramnosa (Figura 34). La asignación espectroscópica descrita, concuerda con lo reportado en la literatura, en donde, el compuesto previamente se había aislado de *Orobancha rapum-genistae* (Andary *et al.*, 1982).

En el espectro de RMN-¹H de F5PA mostrado en la Figura 35, se observó la presencia de señales de protones vinílicos en δ 6.27 y 7.60 ppm (H8, H7), con una constante de acoplamiento (*J*) de 15.6 Hz, lo cual indica que estos protones se encuentran acoplados entre sí. Haciendo uso de la información proporcionada en el experimento HSCQ (Apéndice 2), se encontró que estos protones (H8 y H7) tienen una correlación heteronuclear a un enlace con los carbonos ubicados en δ 148.0 y 114.7 ppm, asignando así, a C7 y C8 respectivamente. De acuerdo con el experimento HMBC (Apéndice 3), se tiene que H8 y H7, están conjugados con un anillo aromático y un grupo carbonilo situado en δ 168.3, que de acuerdo al espectro de RMN-¹³C, se asignó como C9 (Figura 36).

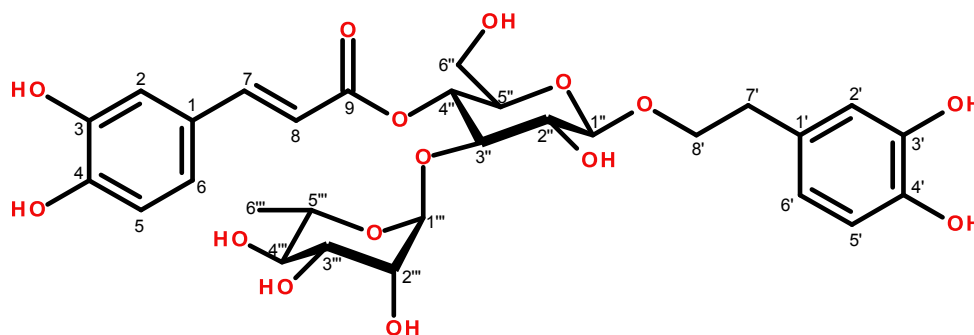


Figura 34. Estructura química del verbascósido aislado de *L. achyranthifolia*

El protón H6 ubicado en δ 6.96 ppm, se observó como una señal doble de dobles con *J* orto y meta (*J* = 8.0, 2.4 Hz), lo cual sugiere un anillo aromático tri-sustituido. En el experimento HSQC se observó una correlación del protón H6 con el carbono ubicado en δ 123.3 ppm, asignando así al C6 en δ 123.2 ppm. Por su parte, la señal del protón H2 en δ 7.06 ppm con una *J* meta (*J*= 2.4 Hz), y el protón H5

situado en δ 6.78 ppm con una J orto ($J = 8.0$ Hz), mostraron correlaciones en el experimento HSQC con los carbonos ubicados en δ 115.2 y 116.5 ppm, asignado de esta manera a C2 y C5, respectivamente. Con ayuda del experimento HMBC (Apéndice 3) se confirmó la conectividad y sustitución del anillo aromático, asignando los carbonos cuaternarios C3 y C4 en 146.8 y 149.8 ppm.

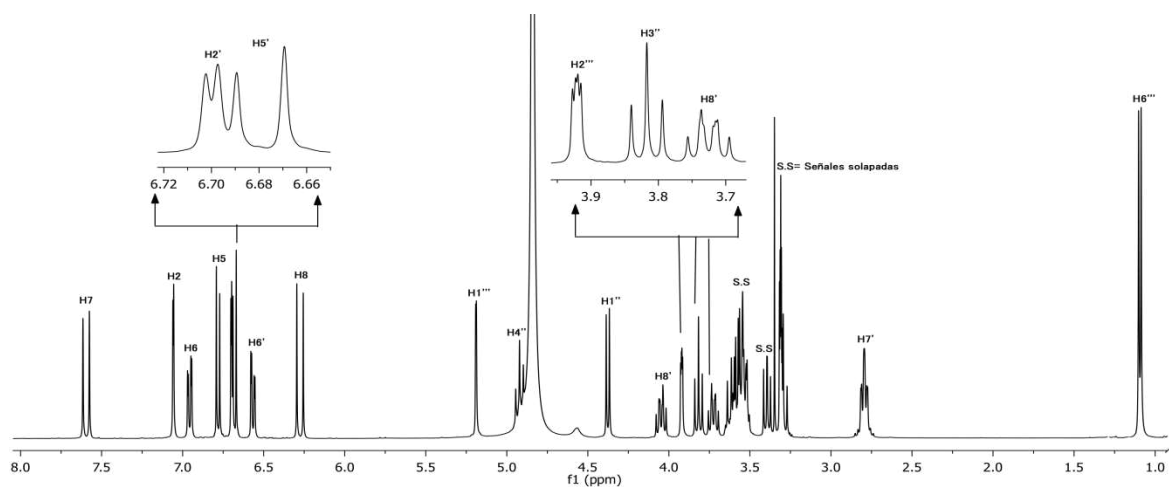


Figura 35. Espectro de RMN- 1 H de verbáscosido aislado de *L. achyranthifolia* en CD_3OD (400 MHz)

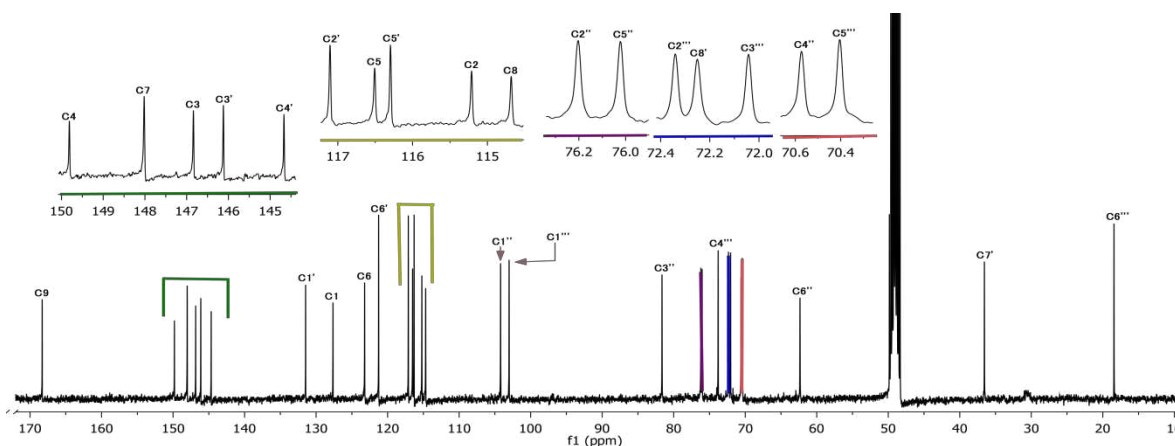


Figura 36. Espectro de RMN- ^{13}C de verbáscosido aislado de *L. achyranthifolia* en CD_3OD (100 MHz)

Dado que los dos anillos aromáticos presentes en la arquitectura del verbascósido, tienen la misma sustitución, es de esperarse que los protones H2', H5' y H6' presenten señales con patrones de acoplamiento similares a las descritas para H2, H5 y H6, con la diferencia que los desplazamientos químicos se encontrarán

ligeramente desplazados hacia frecuencias bajas por la ausencia de la insaturación entre C7 y C8.

Las señales presentes entre δ 3.39–4.38 ppm, son característicos de los protones base de oxígeno de la ramnosa y glucosa. Con ayuda del experimento HSQC, las señales de los protones anoméricos de la glucosa y ramnosa se asignaron en δ 4.38 y 5.19 ppm, respectivamente. La señal doble en δ 1.09 ppm corresponde a los protones del metilo de la ramnosa que se encuentra unido a su respectivo carbono en δ 18.4 ppm. Para confirmar la asignación espectroscópica de estos azúcares, se adquirió el experimento homonuclear ^1H - ^1H COSY (Apéndice 4), observándose que el protón anomérico de la glucosa H1'' (δ 4.38 ppm, d, J = 8.0 Hz) se correlacionó con una señal situada en δ 3.39 ppm (dd, J = 9.2, 7.6 Hz) que se identificó como H2'', este último protón mantuvo una correlación con la señal ubicada en δ 3.82 ppm (dd, J = 9.2, 9.2 Hz) que fue asignada al protón H3''. Mediante este mismo tipo de análisis de correlaciones, fue posible situar a los protones H4'', H5'' y H6'' en δ 4.92, 3.53 y 3.62 ppm, respectivamente. Las señales correspondientes a la molécula de ramnosa fueron ubicadas mediante un mismo análisis de correlación en la cual se determinó que el protón anomérico H1''' ubicado en δ 5.19 ppm (d, J = 2.0 Hz) se correlacionó con la señal presente en δ 3.92 ppm (dd, J = 3.4, 1.8 Hz) que fue asignada al protón H2''' que a su vez mostró un acoplamiento vecinal con el protón H3''' ubicado en δ 3.58 ppm (dd, J = 9.6, 3.2 Hz). Los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de los protones H4''', H5''' y H6''' fueron consistentes con la unidad de ramnosa descrita para glucósidos feniletanoides aislados de la hierba espinosa *Acanthus ilicidolius* L. (Wu *et al.*, 2004).

La asignación completa de los desplazamientos químicos, constantes de acoplamiento y multiplicidades de F5PA se muestran en el Cuadro 12. Finalmente, el verbascósido aislado de la parte aérea de *L. achyranthifolia* constituye una alternativa prometedora a los fungicidas sintéticos, ya que en estudios de postcosecha llevados a cabo en frutos de naranja se reporta que este compuesto

inhibió en un 100% el crecimiento micelial de *Penicillium digitatum* en etapas de infestación temprana (Oyourou *et al.*, 2013).

Cuadro 12. Datos espectroscópicos de RMN-¹H [ppm, Mult., (J en Hz)] y ¹³C de **1** en CD₃OD

Posición	Verbascósido (1)		
	δ_C	δ_H	HMBC (¹ H→ ¹³ C)
1	127.6	-----	-----
2	115.2	7.06, d (2.4)	123.2 (C6), 146.8 (C3), 149.8 (C4)
3	146.8	-----	-----
4	149.8	-----	-----
5	116.5	6.78, d (8.0)	127.6 (C1), 146.8 (C3), 149.8 (C4)
6	123.2	6.96, dd (8.0, 2.4)	115.2 (C2), 149.8 (C4), 148.0 (C7)
7	148.0	7.60, d (15.6)	115.2 (C2), 123.2 (C6), 168.3 (C9), 127.6 (C1)
8	114.7	6.27, d (15.6)	127.6 (C1), 168.3 (C9)
9	168.3	-----	-----
1'	131.5	-----	-----
2'	117.1	6.70, d (2.4)	36.6 (C7'), 121.2 (C6'), 144.7 (C4'), 131.5 (C1')
3'	146.1	-----	-----
4'	144.7	-----	-----
5'	116.3	6.68, d (8.0)	131.5 (C1'), 144.7 (C4')
6'	121.2	6.57, dd (7.8, 2.2)	36.6 (C7'), 144.7 (C4'), 117.1 (C2')
7'	36.6	2.80, m	72.3 (C8'), 117.1 (C2'), 121.2 (C6'), 131.5 (C1')
8'	72.3	3.73, dd (17.2, 8.8) 4.05, dd (16.2, 7.8)	36.6 (C7'), 104.2 (C1''), 131.5 (C1') 36.6 (C7'), 104.2 (C1''), 131.5 (C1')
1''	104.2	4.38, d (8.0)	72.3 (C8')
2''	76.2	3.39, dd (9.2, 7.6)	81.6 (C3''), 104.2 (C1'')
3''	81.6	3.82, dd (9.2, 9.2)	76.0 (C5''), 103.0 (C1''')
4''	70.6	4.92, dd (9.2, 9.2)	62.4 (C6''), 76.0 (C5''), 81.6 (C3''), 168.3 (C9)
5''	76.0	3.53, dd (8.4, 8.4)	81.6 (C3''), 104.2 (C1'')
6''	62.4	3.52, dd (13.0, 5.5) 3.62, dd (13.0, 4.0)	70.6 (C4'') 70.6 (C4'')
1'''	103.0	5.19, d (2.0)	81.6 (C3''), 70.4 (C5''')
2'''	72.4	3.92, dd (3.4, 1.8)	72.1 (C3''')
3'''	72.1	3.58, dd (9.6, 3.2)	73.8 (C4''')
4'''	73.8	3.28, dd (9.2, 9.2)	18.6 (C6'''), 72.1 (C3''')
5'''	70.4	3.57, m	73.8 (C4''')
6'''	18.4	1.09, d (6.0)	70.4 (C5'''), 73.8 (C4''')

9.3 Elucidación de 8-epiloganina de la parte aérea de *L. achyranthifolia*

El fraccionamiento cromatográfico en CF de 1.03 g de PAFAcOEt eluida con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (89:11), condujo el aislamiento de un glucósido iridoide (15.3 mg, 1.48%), que con base en la interpretación de los datos espectroscópicos de RMN de una y dos dimensiones, se identificó como 8-epiloganina (**2**).

Del espectro de RMN- ^1H (Figura 37) se observó una señal simple perteneciente a un protón olefínico situado en δ 7.41 ppm, que de acuerdo al experimento HSQC mostró una correlación con el C3 en δ 151.0 ppm. Las señales presentes en δ 3.07 ppm (ddd, $J= 5.65, 5.65, 4.7$ Hz) y 2.55 (ddd, $J= 4.8, 4.7, 2.4$ Hz), son características del sistema iridano (Rios, 2015) y corresponden a los protones H5, H9; de acuerdo al experimento HSQC, se correlacionaron con sus respectivos carbonos C5 y C9 en δ 29.6 y 41.6 ppm, respectivamente.

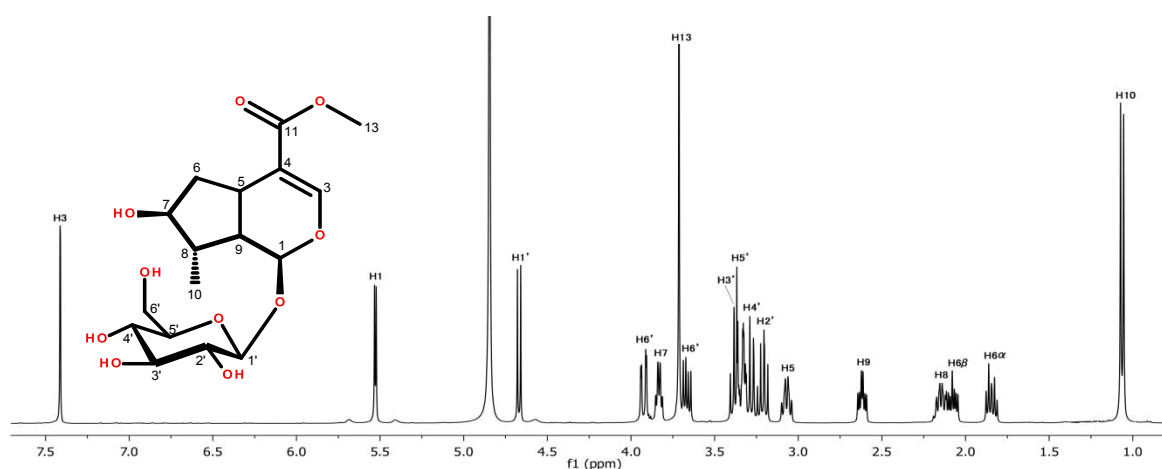


Figura 37. Espectro de RMN- ^1H de 8-epiloganina aislado de *L. achyranthifolia* en CD_3OD (400 MHz)

La señal establecida en δ 3.82 ppm sugiere la presencia de un protón base de oxígeno, que se corrobora por la correlación HSQC de H7 con su respectivo carbono en δ 77.9 ppm (Apéndice 5).

Cuando el C8 se enlaza a un sustituyente metilo que presenta estereoquímica α , es común que entre el C3 y C4 exista la prevalencia de un doble enlace (Rios, 2015) y que de acuerdo a la interpretación del espectro de RMN- ^{13}C (Figura 38),

dichas señales se observaron en δ 151.0 y 112.6 ppm. En el espectro de RMN- ^{13}C , se observó una señal de grupo carbonilo en δ 167.9 ppm y con ayuda del experimento HMBC (Apéndice 6) se asignó como C11, pues se observó que la señal simple en δ 3.71 ppm que integra para 3H (CH_3 -13), mostró una correlación con la señal en δ 167.9 ppm, asignando así a C11. Por su parte, la señal en δ 7.35 ppm perteneciente a H3, mostró una correlación con δ 112.6 ppm, asignando así a C4. Con base a estas correlaciones descritas, se tiene que la naturaleza del sustituyente enlazado al C4 corresponde a un carboxilo esterificado.

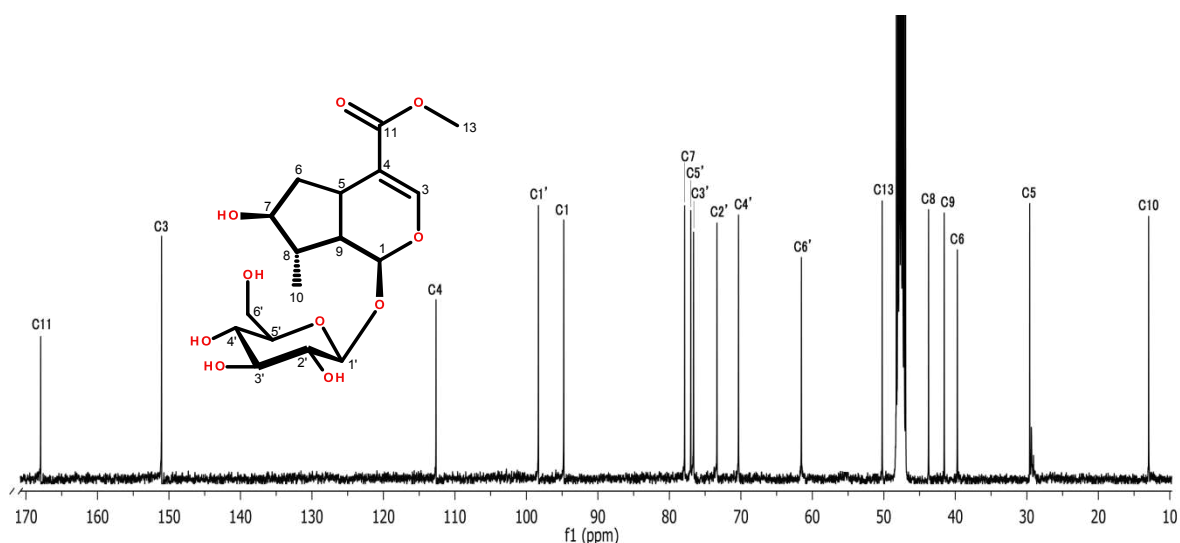


Figura 38. Espectro de RMN- ^{13}C de 8-epiloganina aislada de *L. achyranthifolia* en CD_3OD (100 MHz)

Para corroborar la configuración relativa de la molécula, se adquirió el experimento NOESY, en el cual se muestran las correlaciones existentes entre los diversos protones a través del espacio. De dicho experimento se observó una correlación entre H5, H9 y con base a las consideraciones biogénicas establecidas en la revisión de Rios (2015), ambos protones se proponen con orientación β . La configuración de H8 fue asignada con orientación β , esto con base a la correlación que se observó con H9, y debido a que este último presentó nula correlación con H1, se asignó para este protón una orientación α . A través del análisis de las constantes de acoplamiento y la nula correlación observada entre H8 y H7, se propone al sustituyente hidroxilo base de H7 con orientación β . Tomando en

cuenta la correlación mostrada entre H7 y Me-10, se puede concluir que entre ambos protones existe una proximidad espacial, por lo tanto, es factible proponer una orientación α para estas dos posiciones (Apéndice 7). Estas correlaciones descritas, aunado a los estudios químicos en *Lonicera periclymenum* (Calis *et al.*, 1984) y *Cephalaria media* (Garaev *et al.*, 2014) de donde se observó que H8 y H9 mostraron diferencias en sus desplazamientos químicos y configuración relativa, permitieron discernir entre la 8-epiloganina de la loganina, que en su arreglo estructural difieren únicamente en la estereoquímica del grupo metilo que se encuentra enlazado al C8 (δ 43.7 ppm), cuya correlación en el HSQC, indicó que se trata de una señal de protón múltiple en δ 2.14 ppm.

Los datos espectroscópicos asociados con los desplazamientos químicos, constantes de acoplamiento y multiplicidades de la 8-epiloganina se muestran en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Datos espectroscópicos de RMN- ^1H [ppm, Mult., (J en Hz)] y ^{13}C de **2** en CD_3OD

Posición	8-epiloganina (2)		
	$\bar{\delta}_\text{C}$	$\bar{\delta}_\text{H}$	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	94.8	5.46, d (4.0)	29.6 (C5), 43.7 (C8), 98.3 (C1'), 151.0 (C3)
3	151.0	7.35, s	C5, 94.8 (C1), 112.6 (C4), 167.9 (C11)
4	112.6	-----	-----
5	29.6	3.07, ddd* (5.6, 5.6, 4.7)	C1, C3, C4, C8, C11, 39.7 (C6), 77.9 (C7)
6	39.7	1.84, ddd* (12.3, 5.3, 5.0) 2.08, ddd (12.3, 9.0, 5.0)	C4, C5, C7, C8, 41.6 (C9) C4, C5, C7, C8, 41.6 (C9)
7	77.9	3.83, ddd* (5.5, 5.3, 5.3)	C5, C9, 13.0 (C10)
8	43.7	2.11, td (7.6, 5.5)	C1, C5, C7, C9, C10
9	41.6	2.55, ddd* (4.8, 4.7, 2.4)	C1, C4, C5, C7, C8, C10
10	13.0	1.00, d (7.2)	C7, C8, C9
11	167.9	-----	-----
13	50.2	3.65, s	C11
1'	98.3	4.60, d (8.0)	C1, 73.3 (C2'), 76.6 (C3')
2'	73.3	3.16, dd (9.2, 8.0)	C1', C3'
3'	76.6	3.32, dd (8.8, 8.8)	C2', 70.3 (C4')
4'	70.3	3.19, dd (8.8, 8.7)	C2', 77.0 (C5'), 61.5 (C6')
5'	77.0	3.33, m	C4'
6'	61.5	3.86, dd (11.9, 2.0) 3.60, dd (11.9, 6.2)	C4' C4', C5'

*Son constantes de acoplamiento simuladas en el software MestReNova[®], porque son sistemas de segundo orden

9.4 Elucidación de glucurónido-8-epiloganina aislado de *L. achyranthifolia*

El fraccionamiento cromatográfico de FP1 (Figura 25) permitió obtener el compuesto **3** (2.7 mg, 0.29 %) como una película de color naranja parcialmente soluble en MeOH y altamente soluble en agua.

La inspección de los datos espectroscópicos de RMN-¹H y ¹³C (Cuadro 14), indicaron que el compuesto aislado tenía la misma aglicona que la 8-epiloganina (**2**) y dos unidades de azúcar. El análisis comparativo de los espectros de protón de **2** y **3** (Figura 39) reveló señales sin cambios significativos para la aglicona, mientras que las variaciones observadas en los desplazamientos químicos de la unidad de glucosa fueron inducidas por la presencia de una molécula de ácido glucurónico. La identificación de ambos azúcares, se realizó con base en sus constantes de acoplamiento y multiplicidad de sus respectivos protones anoméricos ubicados en δ 4.73 ppm (d, J = 8.0 Hz) y 4.60 ppm (d, J = 7.8 Hz), que de acuerdo al experimento heteronuclear HSQC se correlacionaron con las señales de carbono C1' y C1'' ubicadas en δ 99.2 y 104.9 ppm, tal como se muestra en el Apéndice 8. Subsecuentemente, las correlaciones de los protones H6' con su respectiva señal de carbono ubicada en δ 62.7 ppm y la nula conectividad de un protón hacia el carbonilo C6'' situado en δ 176.6 ppm, confirmaron la presencia de estos dos azúcares en la arquitectura molecular propuesta. Debido a que las señales de la aglicona no mostraron cambios significativos en sus desplazamientos químicos, se optó por conservar la estereoquímica relativa de los protones situados en los centros estereogénicos de los carbonos C1, C5, C6, C7, C8 y C9.

En el espectro DEPTQ se observaron 23 señales de carbono, de los cuales tres son cuaternarios, dos metilos, dos metilenos y dieciséis metinos (Figura 40). Analizando detalladamente los desplazamientos químicos, se observó que el desplazamiento del carbono C3' cambió significativamente de δ 76.6 a 87.6 ppm con respecto al compuesto **2**; este nuevo desplazamiento da cuenta de una desprotección de la posición C3' que puede atribuirse presuntivamente a la funcionalización del grupo hidroxilo con la molécula de ácido glucurónico que se

une en esta posición de la glucosa. A fin de respaldar esta disposición estructural, se adquirió el experimento HMBC, donde se observó una correlación del protón anomérico H1'' (δ 4.60 ppm, d, $J= 7.8$ Hz) con la señal del carbono C3' ubicada en δ 87.6 ppm, tal como se muestra en el Apéndice 9. Otras correlaciones claves de HMBC que permitieron confirmar la estructura propuesta se establecieron entre el protón anomérico H1' (δ 4.73 ppm, d, $J= 8.0$ Hz) con la señal de carbono situada en δ 96.3 ppm, con esto se confirmó la unión de la glucosa en la posición C1 de la aglicona y a través de las correlaciones observadas entre los dos protones H3 (7.41 ppm, s) y H13 (3.71 ppm, s) con el carbono C11 (δ 169.2 ppm), se estableció que el carbonilo base de éster se encontraba enlazado en la posición C4 de la aglicona.

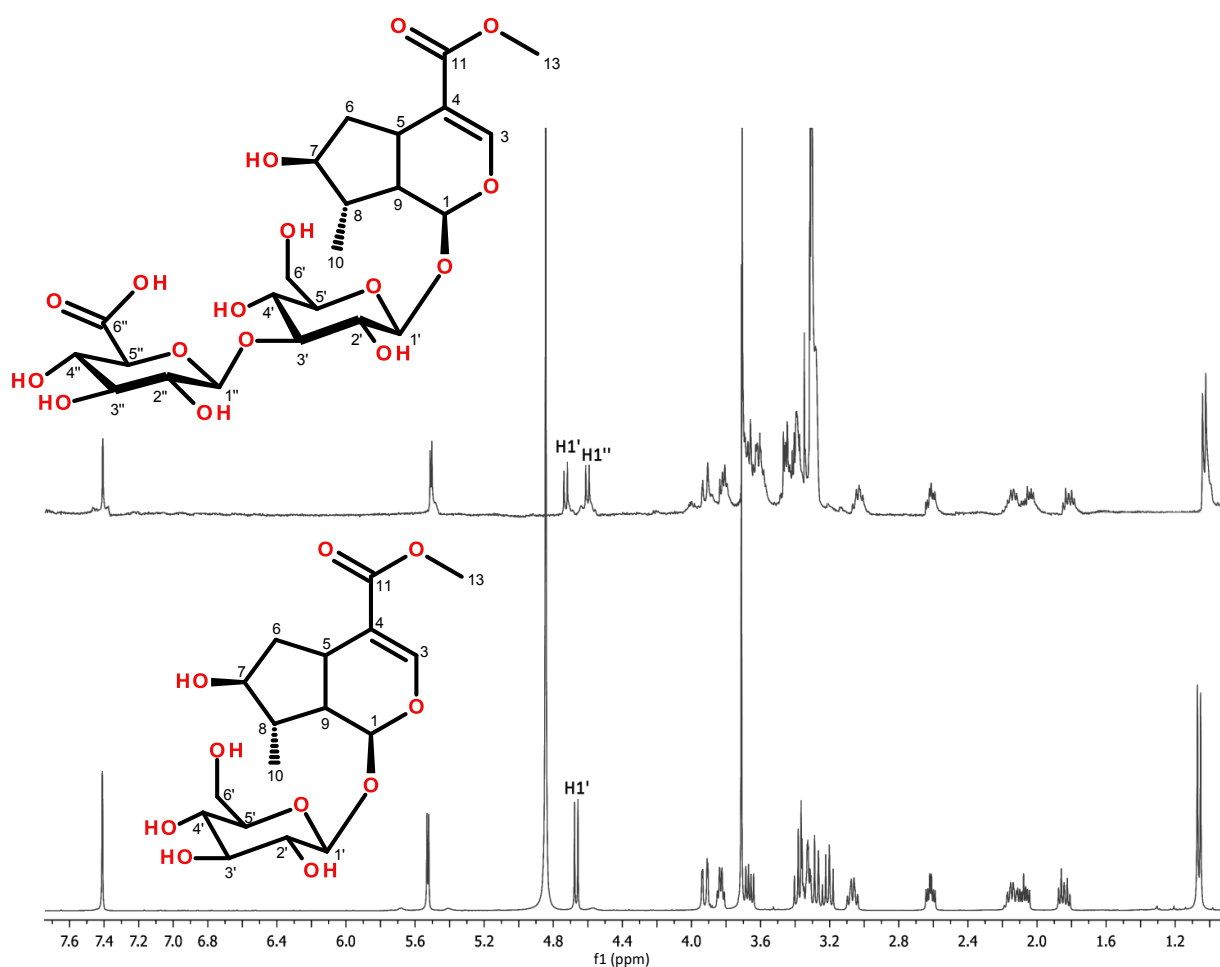


Figura 39. Espectros de RMN-¹H de 8-epiloganina (trazo inferior) y compuesto 3 (trazo superior)

Para confirmar la estructura propuesta, se adquirieron adicionalmente experimentos bidimensionales de correlación homonuclear ^1H - ^1H . Mediante el análisis de las correlaciones COSY, se demostró que el protón H5 mantiene acoplamientos vecinales con las señales de H6 α , H6 β y H9; esta última mostró acoplamientos con H1 y H8 que presentó una correlación en forma de W con H6 β (Apéndice 10). Por otro lado, el experimento de espectroscopía de correlación total (TOCSY, por sus siglas en inglés) permitió determinar las correlaciones de las señales de los protones anoméricos con las de los protones unidos en los carbonos 3 y 5 de cada monosacárido, identificándose así los siguientes sistemas de protones: H1' (δ 4.73 ppm) con las señales múltiples situadas en δ 3.63 y 3.39 ppm; H1'' (δ 4.60 ppm) con las señales situadas en δ 3.61 y 3.46 ppm. A través de estas correlaciones observadas, se logró completar asertivamente la asignación de los protones H3', H5' de glucosa y H3'', H5'' del ácido glucurónico (Apéndice 11).

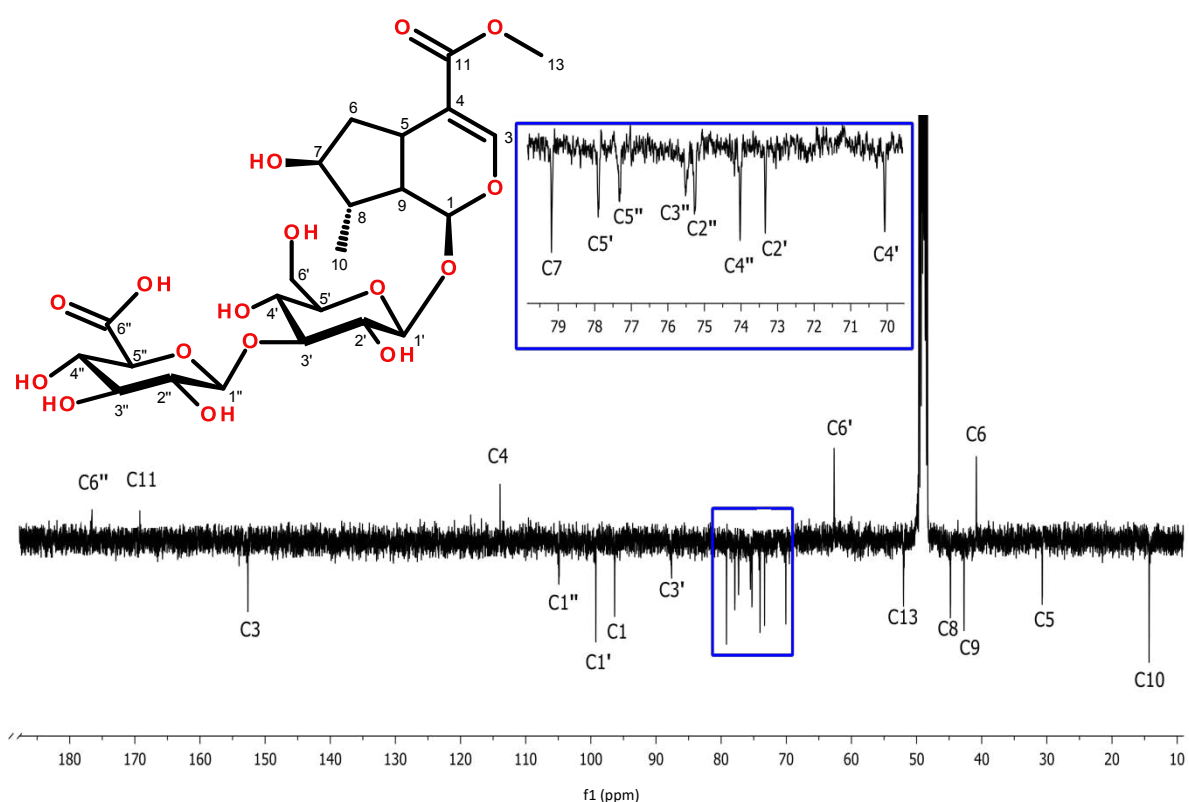


Figura 40. Espectro DEPTQ del compuesto **3** aislado de *L. achyranthifolia* en CD_3OD (100 MHz)

Por último, se efectuó una búsqueda del compuesto en la base de datos de SciFinder® y no se encontraron registros de la estructura propuesta, únicamente se identificaron compuestos análogos que compartían la misma aglicona, por lo tanto, se afirma que el compuesto aquí aislado y caracterizado espectroscópicamente es un compuesto nuevo, y que no se ha identificado en ninguna especie vegetal. Con base a las evidencias presentadas y a la analogía estructural en relación al compuesto **2**, se propuso el nombre trivial de glucurónido-8-epiloganina (**3**) para este compuesto.

Cuadro 14. Datos espectroscópicos de RMN- ^1H [ppm, Mult., (J en Hz)] y ^{13}C de **3** en CD_3OD

Posición	Glucurónido-8-epiloganina (3)		
	δ_{C}	δ_{H}	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	96.3	5.51, d (3.8)	152.6 (C3), 99.2 (C1')
3	152.6	7.41, s	30.7 (C5), 96.3 (C1), 113.9 (C4), 169.2 (C11)
4	113.9	-----	-----
5	30.7	3.04, ddd* (5.6, 5.6, 4.7)	152.6 (C3), 113.9 (C4), 96.3 (C1), 40.8 (C6)
6	40.8	6 α : 1.82, dt (13.3, 6.0) 6 β : 2.06, ddd* (13.6, 8.7, 4.7)	30.7 (C5), 113.9 (C4) 44.8 (C8), 79.2 (C7)
7	79.2	3.82, dd (11.0, 5.6)	30.7 (C5), 14.3 (C10)
8	44.8	2.15, td (7.6, 5.5)	79.2 (C7), 14.3 (C10)
9	42.7	2.62, dt (8.6, 3.8)	79.2 (C7), 96.3 (C1), 113.9 (C4)
10	14.3	1.03, d (7.3)	42.7 (C9), 44.8 (C8), 79.2 (C7)
11	169.2	-----	-----
13	52.0	3.71, s	169.2 (C11)
1'	99.2	4.73, d (8.0)	96.3 (C1)
2'	73.3	3.45, m	70.1 (C4')
3'	87.6	3.63, m	73.3 (C2'), 70 (C4')
4'	70.1	3.39, dd (7.8, 4.8)	87.6 (C3'), 77.9 (C5')
5'	77.9	3.39, m	70.1 (C4')
6'	62.7	3.93, dd (9.0, 4.1) 3.68, dd (10.0, 3.8)	40.1 (C4')
1''	104.9	4.60, d (7.8)	87.6 (C3')
2''	75.3	3.63, m	74.0 (C4'')
3''	75.5	3.61, m	104.9 (C1''), 77.3 (C5'')
4''	74.0	3.39, m	77.3 (C5'')
5''	77.3	3.46, d (1.9)	74.0 (C4'')
6''	176.6	-----	-----

*Son constantes de acoplamiento simuladas en el software MestReNova®, porque son sistemas de segundo orden

9.5 Elucidación de carioptosido aislado de *L. achyranthifolia*

El fraccionamiento cromatográfico de FS4 (Figura 25) proporcionó el compuesto **4** (19.6 mg, 1.76 %), como una película transparente soluble en MeOH. El análisis de los espectros unidimensionales (Figura 41 y 42) y bidimensionales (Apéndice 12, 13, 14 y 15) de RMN-¹H y ¹³C comparado con los espectros adquiridos para la 8-epiloganina, permitió establecer una arquitectura molecular similar y de acuerdo a los datos espectroscópicos experimentales (Cuadro 15) contrastados con los reportados por Damtoft (1992) y Venditti *et al.*, (2012), el compuesto en cuestión se identificó como carioptosido (**4**), mismo que se diferencia de la 8-epiloganina por la presencia adicional de un sustituyente hidroxilo en la posición 8, lo cual repercute en los desplazamientos químicos y en las multiplicidades del protón metino H7 (hacia frecuencia baja) y metilo H10 (ligeramente hacia frecuencia alta), ambos unidos a bases de grupos hidroxilos.

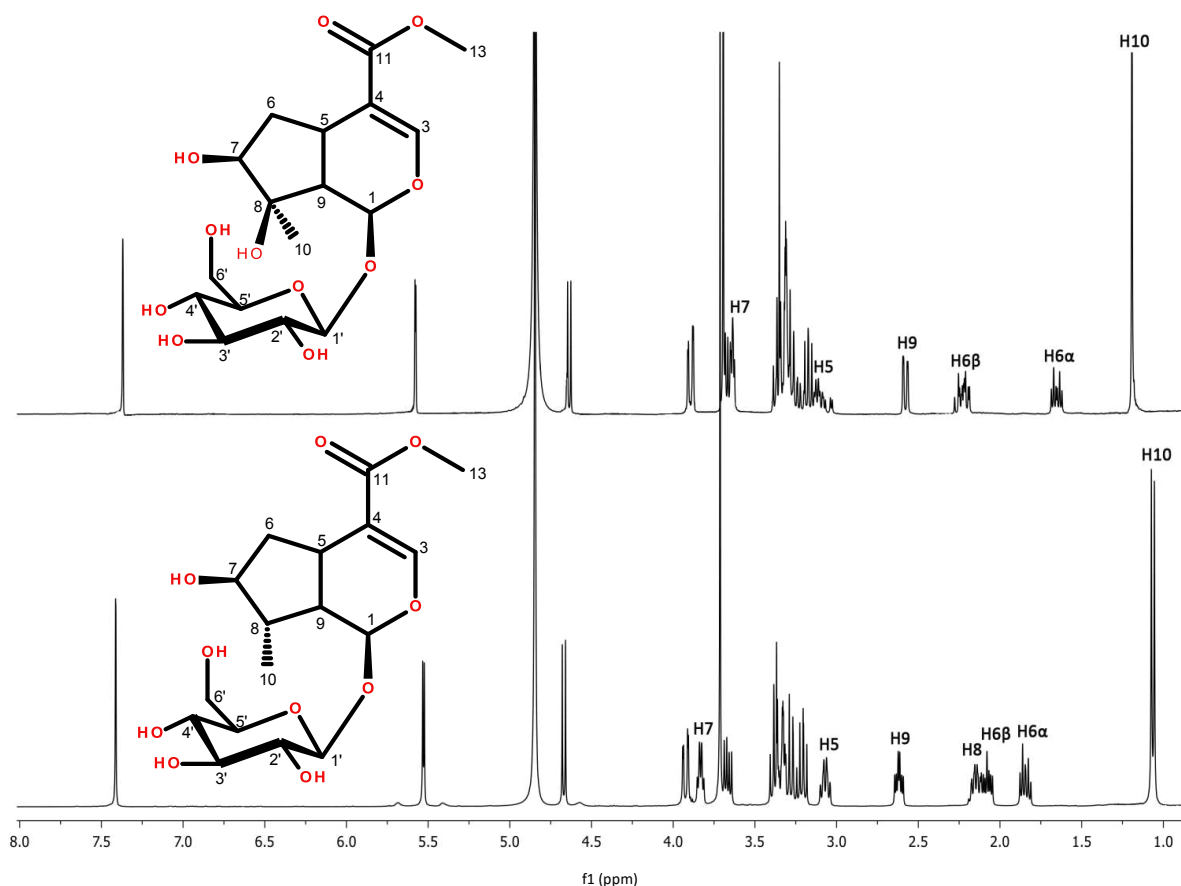


Figura 41. Espectros apilados de RMN-¹H de 8-epiloganina (trazo inferior) y carioptosido (trazo superior)

El carioptosido aislado en este trabajo, también se encuentra estructuralmente relacionado con el ácido 8-epiloganico, un constituyente minoritario aislado de la especie *Lippia graveolens*. La co-ocurrencia de estos dos metabolitos dentro de la familia Verbenaceae es muy común y puede considerarse desde un punto de vista químico, donde puede apreciarse al carioptosido como un compuesto más complejo con respecto al ácido 8-epiloganico, porque posee un grado de oxidación más alto en comparación con este último (Rastrelli *et al.*, 1992).

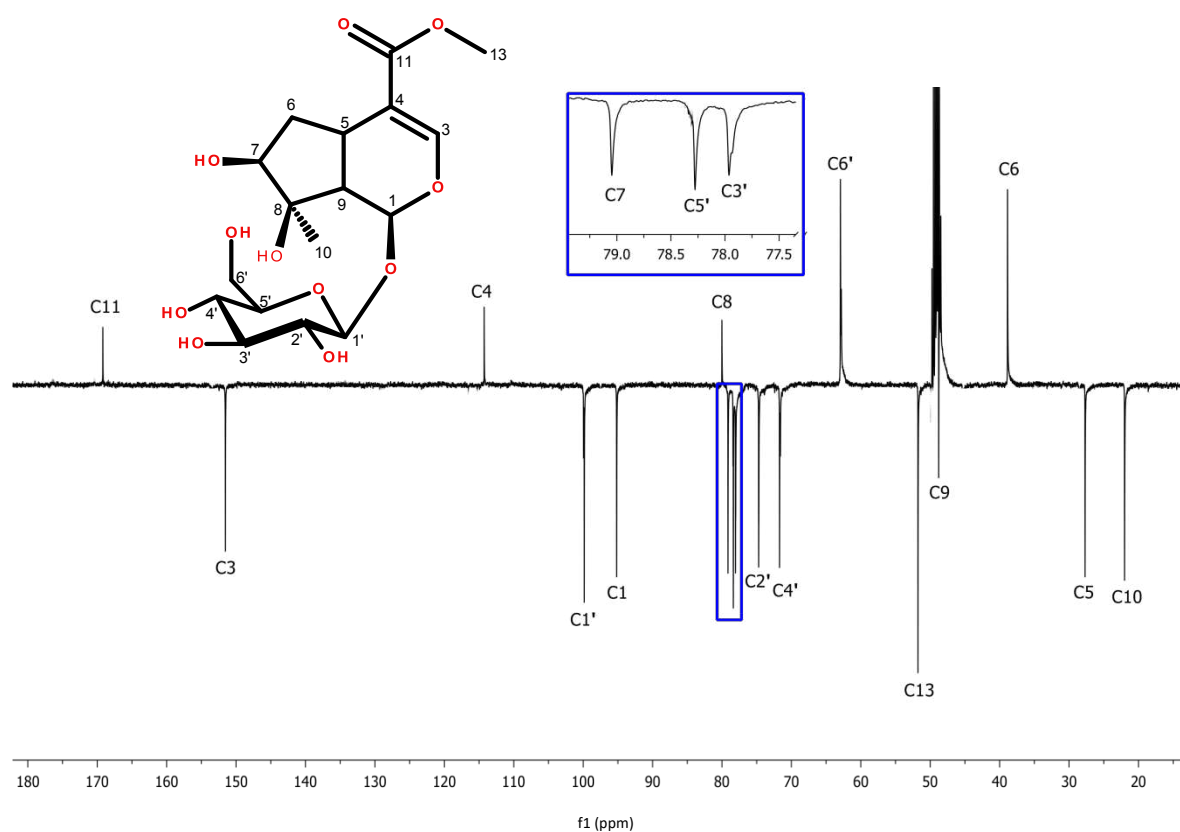


Figura 42. Espectro DEPTQ del **carioptosido** aislado de *L. achyranthifolia* en CD₃OD (100 MHz)

En la revisión bibliográfica realizada por Rios (2015) se describe que las principales actividades biológicas de los iridoides son: neuroprotectora, antioxidante, anticancerígena y antiinflamatoria. Con base a esta evidencia documentada, es factible que la 8-epiloganina, el glucurónido-8-epiloganina y el carioptosido aislados de la parte aérea de *L. achyranthifolia* podrían considerarse como una opción útil para el tratamiento de diversas enfermedades.

Cuadro 15. Datos espectroscópicos de RMN-¹H [ppm, Mult., (J en Hz)] y ¹³C de **4** en CD₃OD

Posición	Carioptosido (4)		
	$\bar{\delta}_C$	$\bar{\delta}_H$	HMBC (¹ H→ ¹³ C)
1	95.1	5.58, d (2.0)	151.5 (C3), 99.8 (C1'), 27.6 (C5)
3	151.5	7.37, s	95.1 (C1), 114.2 (C4), 27.6 (C5), 169.2 (C11)
4	114.2	-----	-----
5	27.6	3.12, ddd* (5.6, 5.6, 4.7)	95.1 (C1), 151.5 (C3), 38.7 (C6), 48.7 (C9), 114.2 (C4)
6	38.7	1.65, dt (14.5, 5.7) 2.20, ddd* (13.6, 8.7, 4.7)	114.2 (C4), 27.6 (C5), 79.0 (C7), 79.9 (C8), 48.7 (C9)
7	79.0	3.64, dd (5.6, 1.5)	114.2 (C4), 27.6 (C5), 48.7 (C9), 79.9 (C8) 21.9 (C10), 27.6 (C5), 48.7 (C9)
8	79.9	-----	-----
9	48.7	2.58, dd (10.5, 2.0)	95.1 (C1), 27.6 (C5), 114.2 (C4), 79.9 (C8), 21.9 (C10)
10	21.9	1.19, s	79.0 (C7), 79.9 (C8), 48.7 (C9)
11	169.2	-----	-----
13	51.6	3.69, s	169.2 (C11)
1'	99.8	4.63, d (7.9)	95.1 (C1), 74.6 (C2'), 77.9 (C3')
2'	74.6	3.17, dd (9.1, 8.0)	99.8 (C1'), 77.9 (C3')
3'	77.9	3.35, m	71.5 (C4'), 74.6 (C2')
4'	71.5	3.26, dd (8.8, 7.8)	62.7 (C6'), 78.3 (C5'), 77.9 (C3')
5'	78.3	3.30, m	77.9 (C3'), 62.7 (C6')
6'	62.7	3.89, dd (12.0, 2.1) 3.66, dd (11.9, 6.0)	71.5 (C4') 78.3 (C5')

*Son constantes de acoplamiento simuladas en el software MestReNova®, porque son sistemas de segundo orden

9.6 Análisis conformacional de 8-epiloganina

Una vez establecida la configuración relativa de los centros estereogénicos de la 8-epiloganina, se continuó con el estudio de análisis conformacional. Como primera aproximación se encontraron todos los posibles conformeros que puede adoptar la molécula, para ello se utilizó el programa computacional Spartan '08 a un nivel de Método Semiempírico de Estructura Electrónica PM3. Este método es muy útil para estudiar moléculas orgánicas y es preciso en los cálculos de energía y longitud de enlace (Angulo-Cornejo y Tovar, 2014). El cálculo del método semiempírico PM3 arrojó 100 conformeros posibles en un $\Delta E = 41.77$ kJ/mol y por medio de la distribución de Boltzmann se evidenció que únicamente 35 conformeros en un $\Delta E = 12.99$ kJ/mol contribuyen al 100% de la población conformacional. Los conformeros más estables (**1 a 6**, Figura 43) contribuyeron en un 55.2 % a la distribución poblacional.

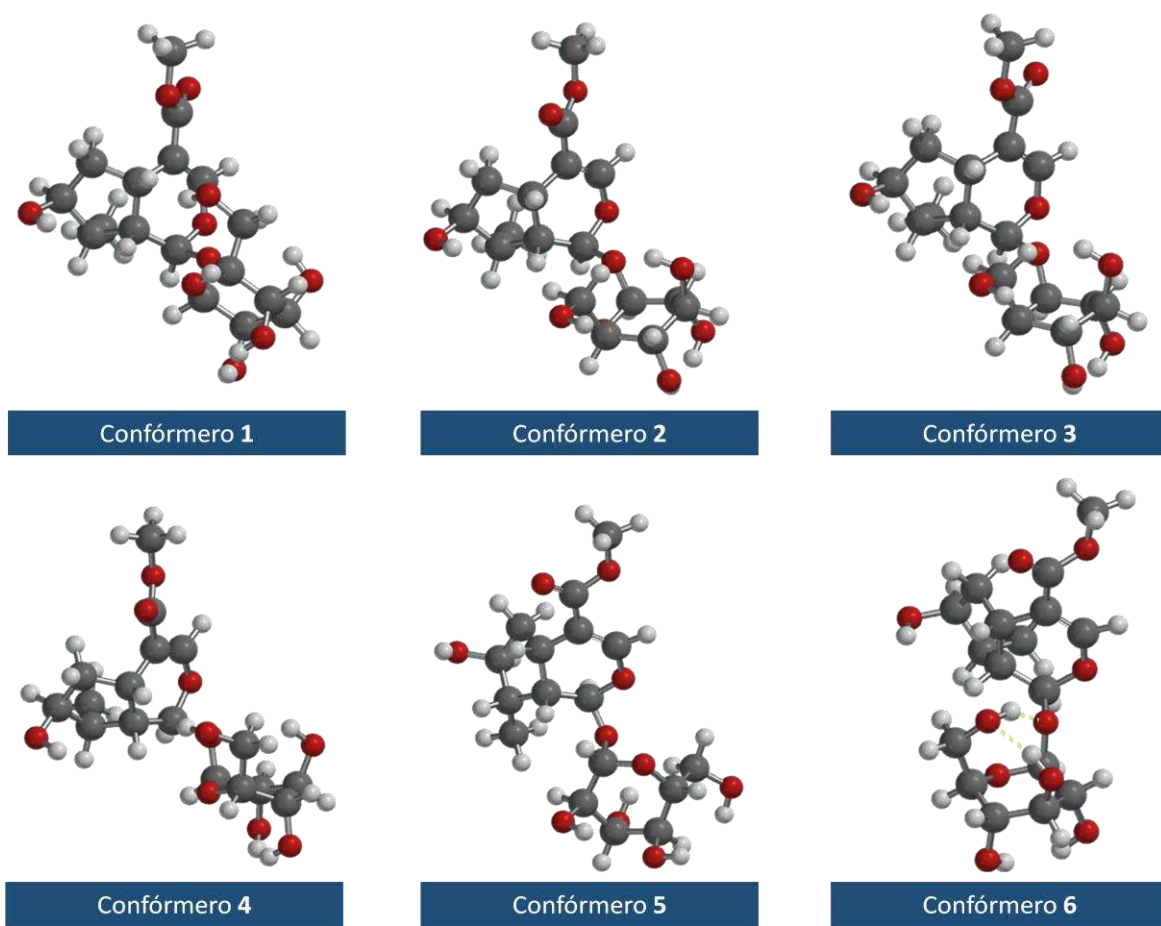


Figura 43. Conformeros de mínima energía obtenidos con cálculos del método semiempírico PM3

El análisis cuidadoso de los diversos conformeros, mostró que las modificaciones conformacionales en la molécula se presentan exclusivamente en la unidad de glucosa, en el grupo éster y en el hidroxilo que se encuentra sobre el anillo de cinco miembros. Los cálculos teóricos mostrados en el Cuadro 16 resaltan tres aspectos importantes: 1) El conformero 1 es el que posee la mínima energía, por ello es considerado como el más estable; 2) Se evidenció que la estabilidad del conformero 6 se debe principalmente a los puentes de hidrógeno que se establecen en la molécula de glucosa y 3) El conformero 5 presenta un efecto exótico de interacción estabilizante calcógeno-calcógeno que se produce cuando el oxígeno de la glucosa insertada en el sistema anular de seis miembros, se encuentra direccionado con el oxígeno del sistema iridano en el cual un átomo actúa como donador y otro como receptor de densidad electrónica. Esta interacción en solución que aquí se describe se encuentra respaldada por las investigaciones realizadas por Gleiter *et al.*, (2018) en estructuras moleculares de estado sólido.

Cuadro 16. Energía (kJ/mol) y porcentaje de distribución conformacional de 8-epiloganina obtenida con cálculos del Método Semiempírico PM3

Número de conformero	Energía	% Población Conformacional
CONFÓRMERO 1	0	10.5
CONFÓRMERO 2	0.02	10.4
CONFÓRMERO 3	0.10	10.1
CONFÓRMERO 4	0.33	9.2
CONFÓRMERO 5	0.66	8.0
CONFÓRMERO 6	1.00	7.0

Finalmente, es importante resaltar que los resultados proporcionados por PM3 son muy confiables, esto debido a que el método semiempírico en cuestión se rige por las leyes de la mecánica cuántica como base para los cálculos (Foresman y Frisch, 1996), los cuales se simplificaron por la utilización de parámetros derivados de los datos experimentales.

9.7 Elucidación de ácido 8-epilogánico aislado de *L. achyranthifolia*

El compuesto **5** proveniente de la purificación de FS4 (Figura 25) se obtuvo como un sólido de color blanco (3.2 mg, 0.29 %) soluble en piridina. La elucidación estructural se realizó a través de la interpretación de los datos espectroscópicos de RMN de protón y carbono-13 (Cuadro 17), incluyendo los experimentos bidimensionales de HSQC, HMBC y NOESY; este último experimento permitió establecer la estereoquímica relativa de los sustituyentes.

En el espectro de RMN-¹H (Figura 44) se observó la presencia de un par de señales características de protones metinos de un sistema iridano en δ 3.56 ppm (dd, $J= 16.0, 10.0$) y δ 3.06 ppm (td, $J= 8.6, 3.3$ Hz) que se asignaron respectivamente a H5 y H9. Otras señales de metinos y metileno que complementan a este sistema, se situaron en δ 2.62 ppm (ddd, $J= 13.2, 8.6, 4.5$ Hz), δ 2.28 ppm (m), δ 4.21 ppm (c, $J= 4.6$ Hz) y δ 2.33 ppm (m) asignables a H6 β , H6 α , H7 y H8, el desplazamiento químico de H7 sugirió la presencia de un grupo hidroxilo en esta posición. En δ 7.93 ppm (s), se detectó un protón vinílico que fue asignado a H3. Adicionalmente, a frecuencia baja se observó una señal doble situada en δ 1.17 ppm ($J= 7.2$ Hz) que integraba para tres protones, por lo tanto, esta señal fue asignada a H10. En el intervalo de δ 4.07-4.57 ppm, se detectaron señales correspondientes a los protones H2' hasta H6' que de acuerdo a la señal del protón H1' establecida en δ 5.42 ppm (d, $J=8.0$ Hz), permitió caracterizar a este conjunto de señales como protones característicos de una unidad de glucosa.

En las señales de RMN-¹³C (Figura 45) se observó la presencia de 16 carbonos, de los cuales diez son atribuibles al sistema iridano y el resto a la unidad de glucosa que se caracteriza por un par de señales ubicadas en δ 100.3 y 62.5 ppm. A través del experimento DEPTQ (Figura 46) se identificaron once metinos (δ 30.3, 42.2, 44.6, 71.3, 74.6, 78.0, 78.4, 78.7, 95.6, 100.3 y 150.7 ppm), dos metilenos (δ 41.2 y 62.5 ppm), un metilo (δ 14.2 ppm) y dos carbonos cuaternarios (δ 114.4 y 169.2 ppm).

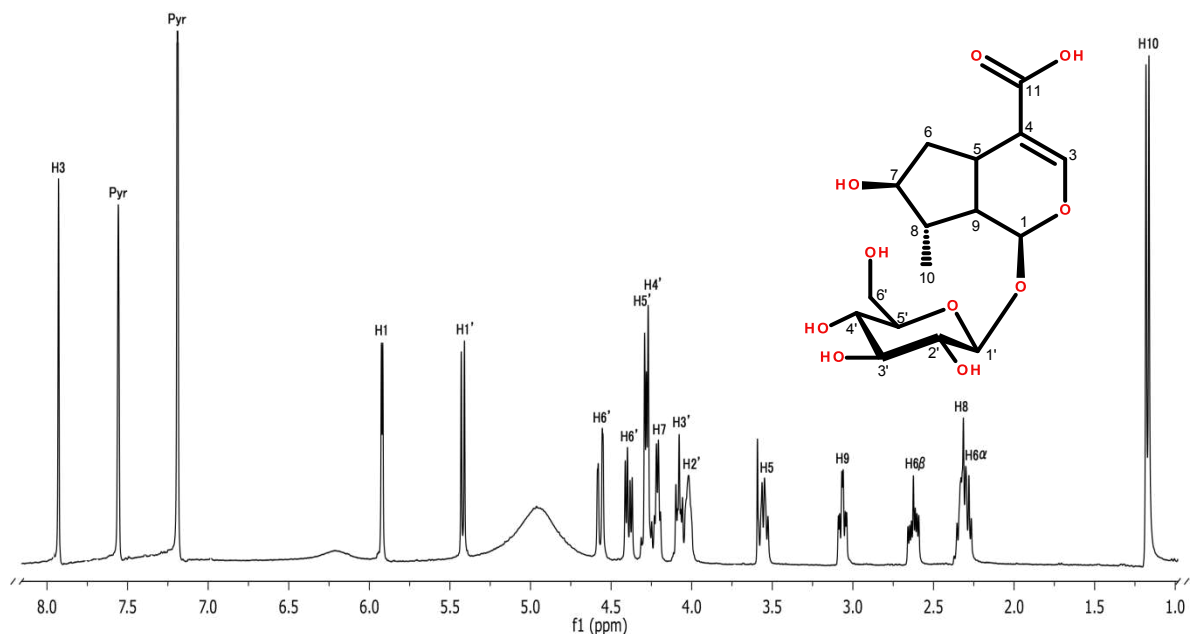


Figura 44. Espectro RMN- ^1H del compuesto **5** aislado de *L. achyranthifolia* en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (400 MHz)

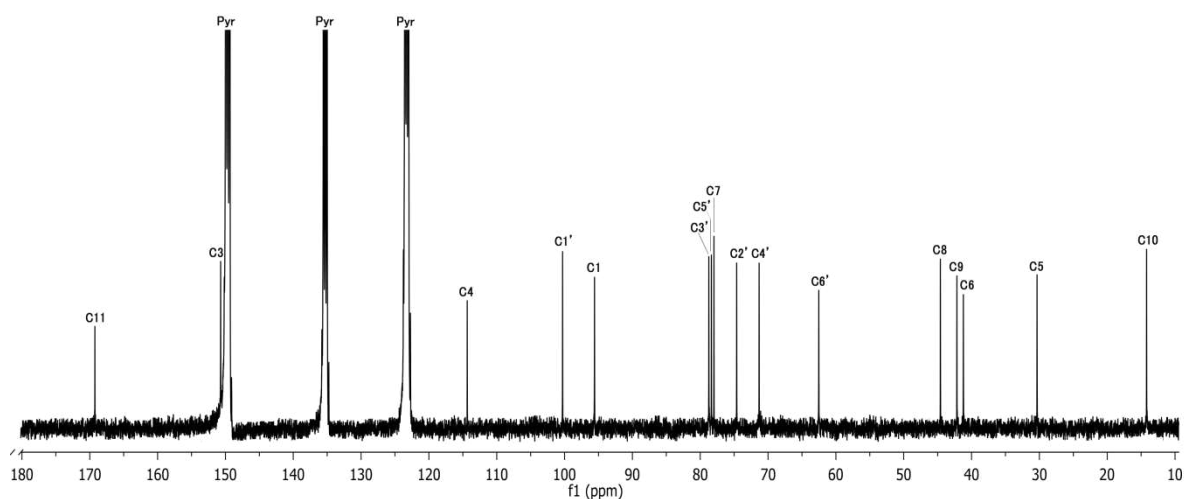


Figura 45. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto **5** aislado de *L. achyranthifolia* en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (100 MHz)

Analizando las correlaciones observadas en el experimento HSQC (Figura 47), se estableció que los protones de metinos base de grupo hidroxilo H1', H2', H3', H4', H5' y H7 están unidos con las señales de ^{13}C en δ 100.3, 74.6, 78.7, 71.3, 78.4 y 78.0 ppm, por lo tanto, estas señales se asignaron a C1', C2', C3', C4', C5' respectivamente y que corresponden a la glucosa, mientras que C7 (δ 78.0 ppm) corresponde al bicyclo de cinco miembros en el sistema iridano. Las señales de los

otros metinos H5, H8 y H9 se correlacionaron con sus respectivos carbonos C5, C8 y C9 en δ 30.3, 44.6 y 42.2 ppm, respectivamente. Para el metileno perteneciente al anillo de cinco miembros H6 (α y β) se observó una correlación con la señal presente en δ 41.2 ppm, asignando así a C6; por su parte el metileno correspondiente a la glucosa H6' mostró correlación con la señal en δ 62.5 ppm asignado de esta manera a C6'. También se observó que el protón vinílico H3 tiene correlación con la señal en δ 150.7 ppm, asignado así a C3. La señal del metilo H10, se observó que se encontraba correlacionado con su respectivo carbono C10 en δ 14.2 ppm.

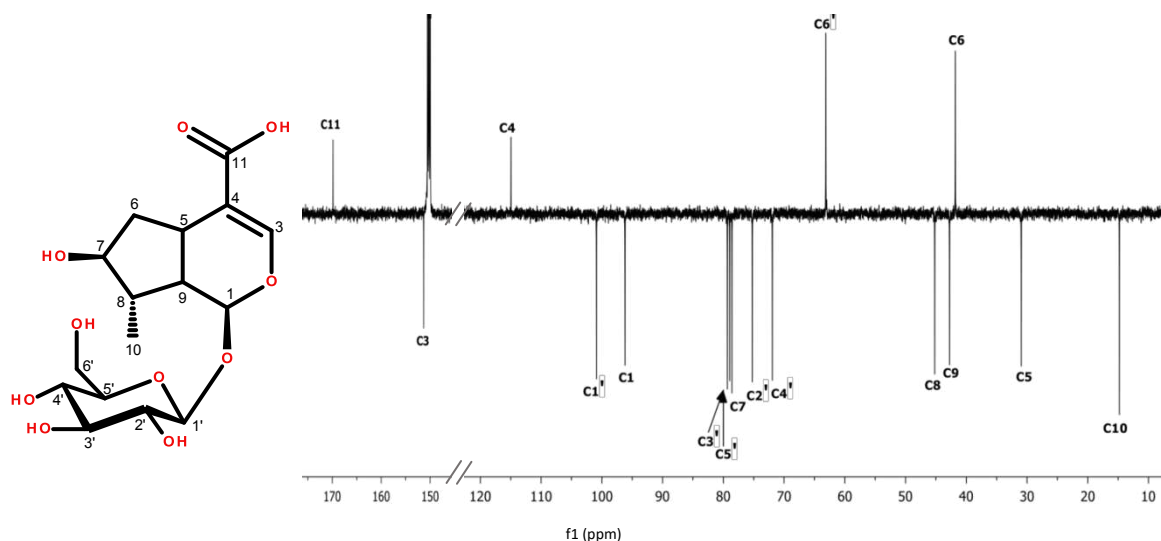


Figura 46. Espectro DEPTQ del compuesto **5** aislado de *L. achyranthifolia* en C_5D_5N (100 MHz)

Las asignaciones completas de las señales de ^{13}C se complementaron con el experimento HMBC (Figura 48) en el cual se observó que el protón H5 tiene correlación con la señal ubicada en δ 114.4 ppm, correspondiente a un carbono de hibridación sp^2 , asignando así a C4. Así mismo H5 presentó correlaciones a tres enlaces con δ 77.9 y δ 150.7 ppm asignando así a C7 y C3. La asignación del carbonilo C11, se efectuó a partir de las correlaciones a larga distancia de los protones H3 y H5 con la señal en δ 169.2 ppm. La correlación observada a tres enlaces de distancia del protón anomérico H1' con la señal en δ 95.6 ppm, permitió establecer la conectividad de la unidad de glucosa en la posición del C1.

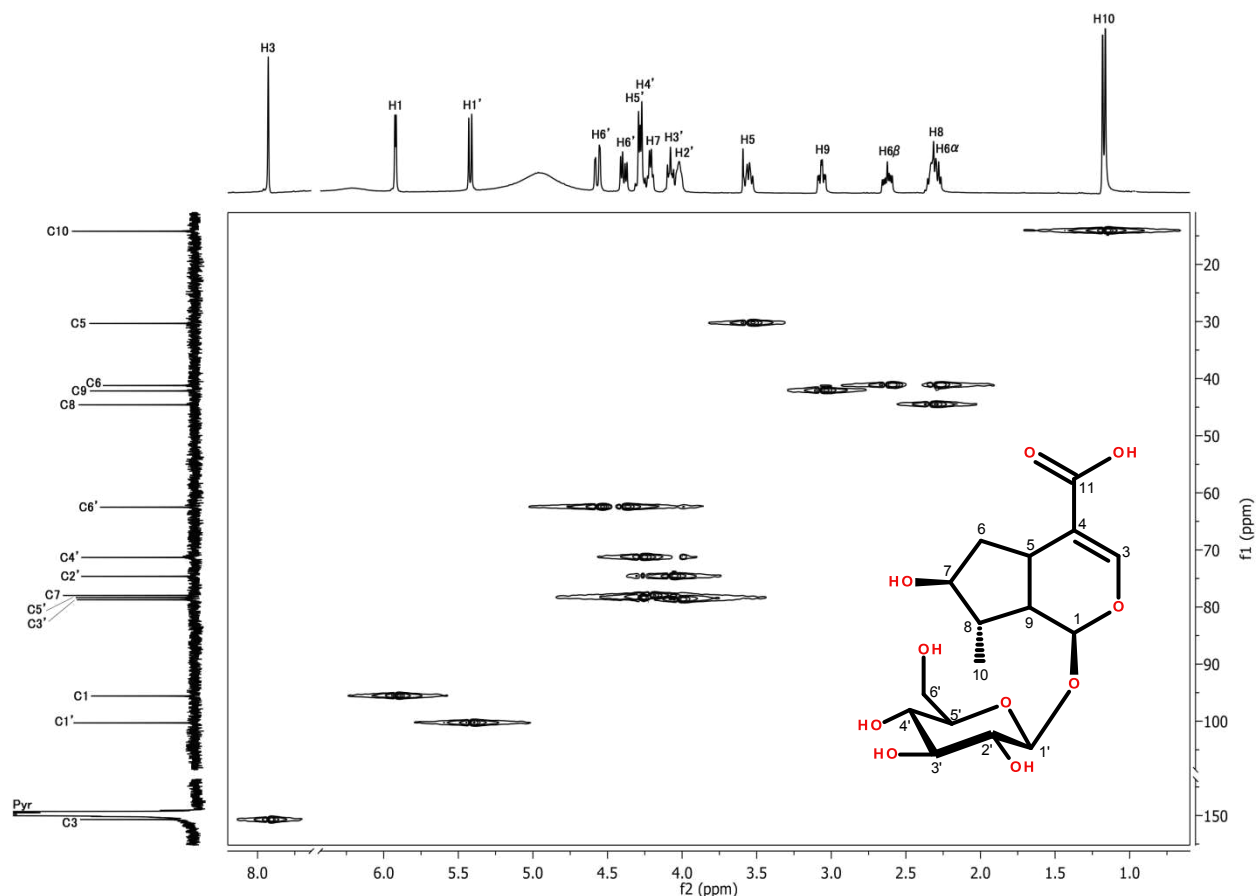


Figura 47. Espectro HSQC del compuesto **5** aislado de la parte aérea de *L. achyranthifolia* en C_5D_5N

La estereoquímica relativa de los protones H1, H5, H9, H7 y H8 se determinó a partir de un análisis cuidadoso de las constantes de acoplamiento y del experimento NOESY (Figura 49); de este último, se observó una correlación entre los protones H5 y H9. La correlación observada concuerda con el valor de $J = 4.7$ Hz, lo cual indica que los protones deben tener una orientación *syn* y que de acuerdo a las consideraciones biogénicas reportadas para el sistema iridano se asume que dichos protones deben tener una disposición relativa β (Rios 2015). Para el protón H8 se observó una correlación con el protón H9, por lo tanto, la asignación sobre H8 fue establecida con orientación β ; en consecuencia, el sustituyente metilo Me-10 se dispuso con orientación α . Finalmente, se establecieron orientaciones α sobre los protones H1 y H7, todo esto a partir de las correlaciones mostradas por ambos protones con Me-10.

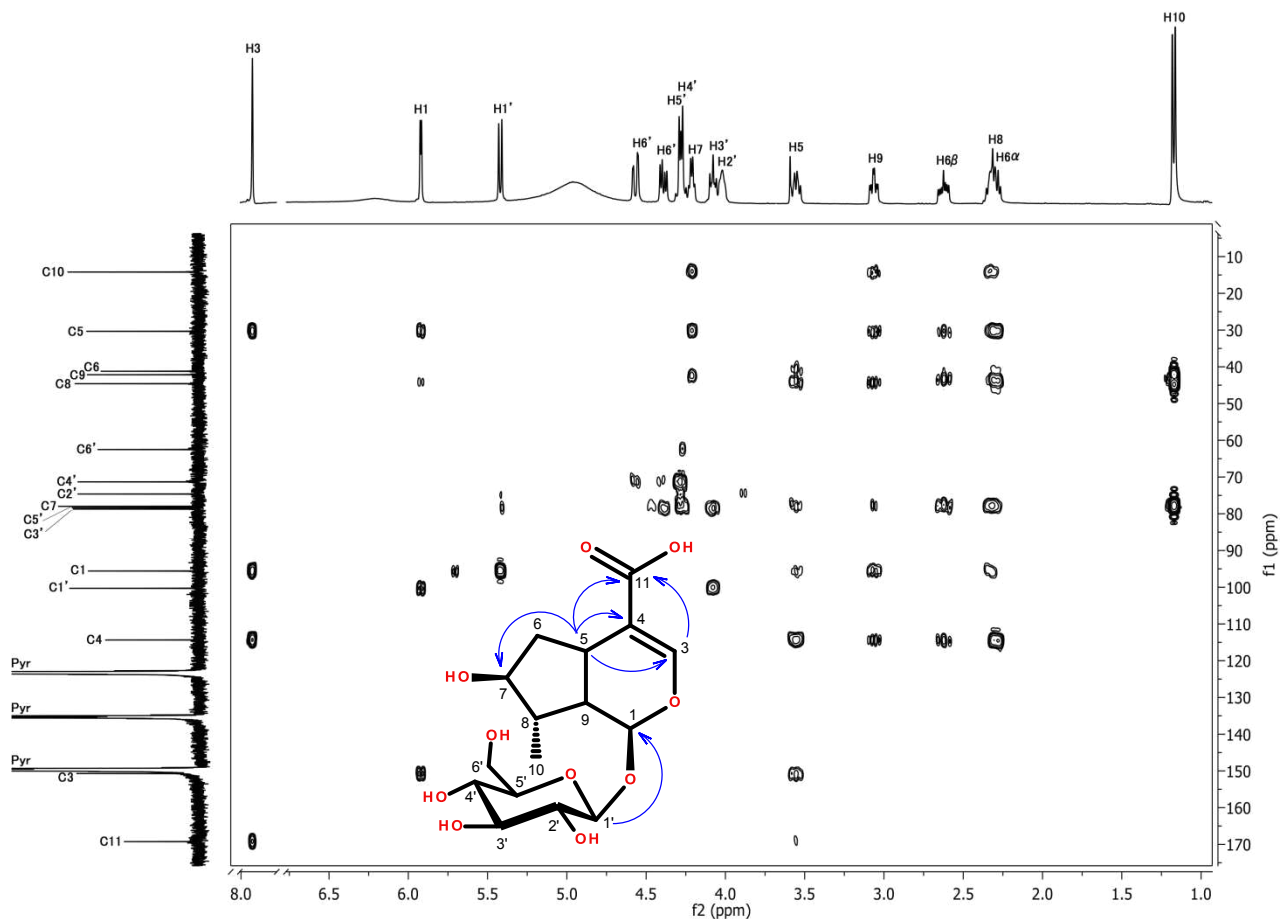


Figura 48. Espectro HMBC del compuesto **5** aislado de la parte aérea de *L. achyranthifolia* en C_5D_5N

En el análisis integral de los datos espectroscópicos, se percató una estrecha relación estructural del compuesto **5** con la 8-epiloganina que se distingue por la presencia del grupo éster. En el espectro de masa de resolución baja (Apéndice 16), registrado en modo ESI positivo se detectó la presencia de un ion fragmento con relación $m/z = 399.1$ que coincide con el peso calculado para $[M+Na]^+ = 399.0$ g/mol. A partir de este análisis realizado sobre el pico base, la fórmula molecular del compuesto en análisis se estableció como $C_{16}H_{24}O_{10}$ que concuerda con la fórmula condensada del ácido 8-epilogánico (**5**) reportada en las investigaciones de Boros *et al.*, (1990) que también incluye datos espectroscópicos; sin embargo, los datos experimentales obtenidos muestran una discrepancia en el desplazamiento químico asignado al C6. Esta incongruencia ha sido explicada en este trabajo por la adquisición del experimento DEPTQ, en el cual se observó

claramente que el metileno en C6 se ubica en δ 41.2 ppm y no en δ 42.2 ppm que en este trabajo fue asignado al carbono C9, tal como se ilustra en la Figura 46.

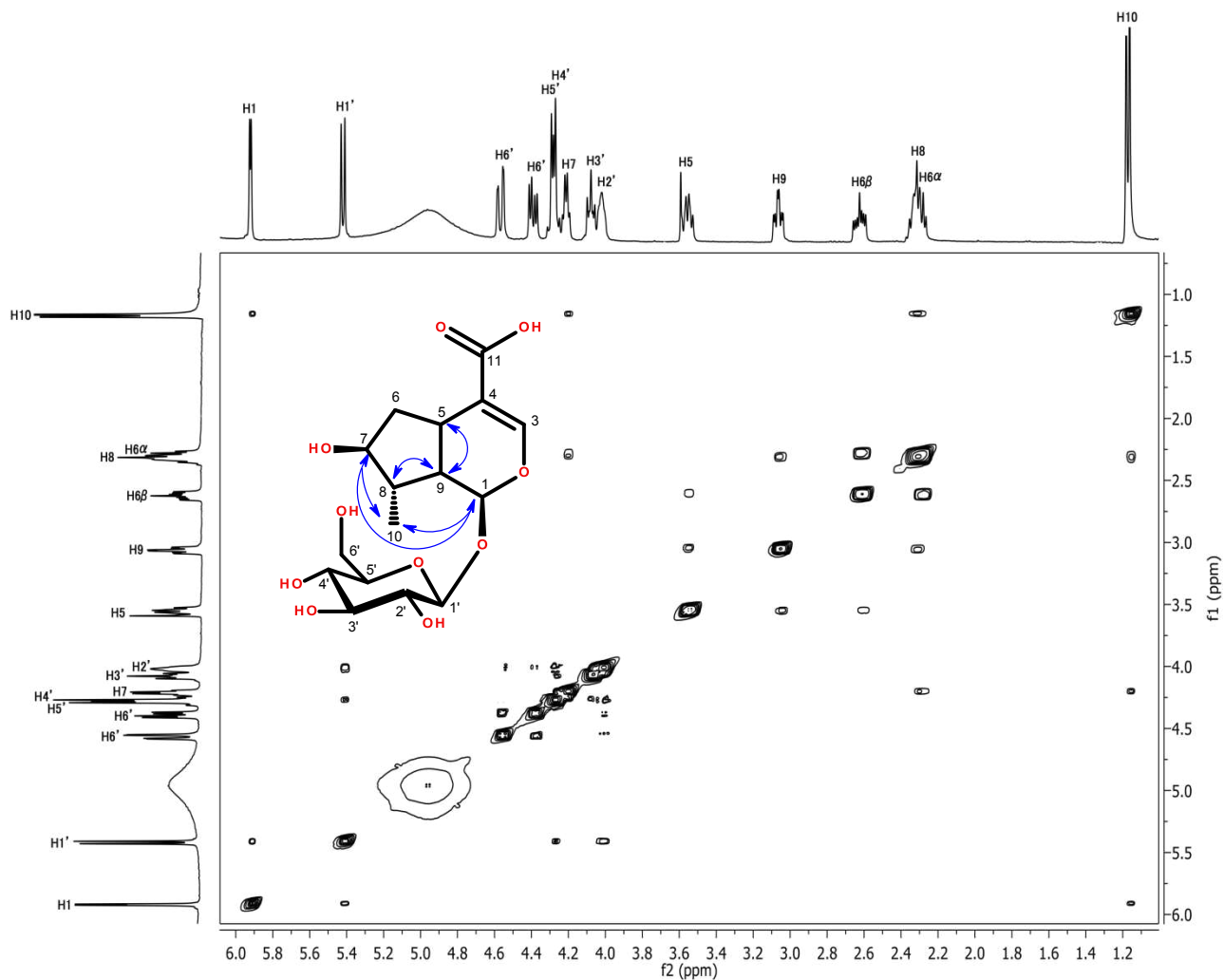


Figura 49. Espectro NOESY del compuesto **5** aislado de la parte aérea de *L. achyranthifolia* en C_5D_5N

Cuadro 17. Datos espectroscópicos de RMN-¹H [ppm, Mult., (J en Hz)] y ¹³C de **5** en C₅D₅N

Posición	Ácido 8-epilogánico (5)		
	δ_C	δ_H	HMBC (¹ H→ ¹³ C)
1	95.6	5.92, d (3.2)	30.3 (C5), 100.3 (C1'), 150.7 (C3)
3	150.7	7.93, s	30.3 (C5), 95.6 (C1), 114.4 (C4), 169.3 (C11)
4	114.4	-----	-----
5	30.3	3.56, ddd* (5.6, 5.6, 4.7)	41.2 (C6), 44.6 (C8), 77.9 (C7), 95.6 (C1), 114.4 (C4), 150.7 (C3)
6	41.2	2.62, ddd (13.2, 8.6, 4.5) 2.29, ddd* (13.2, 5.3, 5.0)	30.3 (C5), 44.6 (C8), 77.9 (C7), 114.4 (C4) 30.3 (C5), 44.6 (C8), 77.9 (C7), 114.4 (C4)
7	77.9	4.21, ddd* (4.6, 4.3, 4.3)	14.2 (C10), 30.3 (C5), 42.2 (C9)
8	44.6	2.33, m	14.2 (C10), 95.6 (C1)
9	42.2	3.06, ddd* (4.8, 4.7, 2.4)	14.2 (C10), 30.3 (C5), 44.6 (C8), 77.9 (C7), 95.6 (C1), 114.4 (C6)
10	14.2	1.17, d (7.2)	42.2 (C9), 44.6 (C8), 77.9 (C7)
11	169.3	-----	-----
1'	100.3	5.42, d (8.0)	78.4 (C5'), 95.6 (C1)
2'	74.6	4.02, dd* (8.0, 8.0)	No se observo
3'	78.7	4.08, dd* (7.7, 8.2)	78.4 (C5'), 100.3 (C1')
4'	71.3	4.30, dd* (6.4, 6.4)	62.5 (C6'), 78.4 (C5')
5'	78.4	4.28, m	71.3 (C4')
6'	62.5	4.57, dd (11.7, 1.7) 4.39, dd (11.7, 5.3)	71.3 (C4') 78.4 (C5')

*Son constantes de acoplamiento simuladas en el MestReNova, porque son sistemas de segundo orden

9.8 Purificación y caracterización estructural de la fracción FP1

En la purificación de FP1 se obtuvieron dos subfracciones semi-puras (11-14-2C18LA y 65-72-2C18LA) de las cuales se observó la formación de un precipitado que se separó por decantación del sobrenadante. Los precipitados se sometieron a una serie de lavados consecutivos con MeOH para proporcionar los respectivos compuestos puros que fueron solubles en DMSO y piridina, respectivamente. La CCF en fase reversa de ambas subfracciones (Figura 50) mostraron un conjunto de manchas intensas de color oscuro en 254 nm y con fluorescencias oscuras y azul celeste en 365 nm.

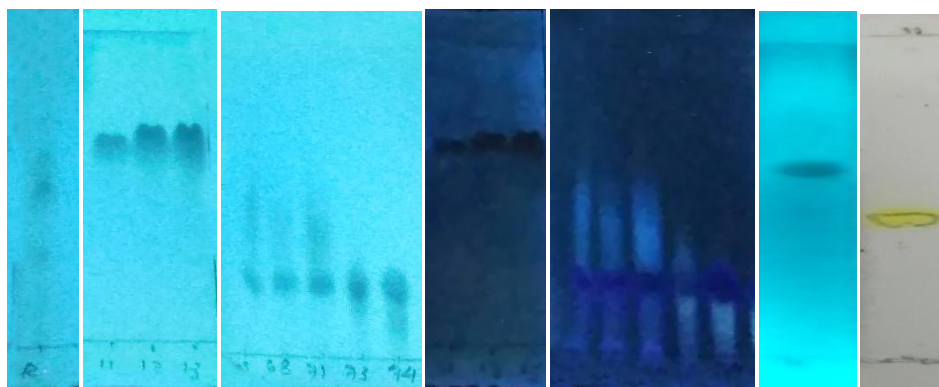


Figura 50. CCF de fase reversa de las subfracciones de FP1 observadas en 254 y 365 nm
Los últimos dos cromatofolios corresponden al compuesto **6**

9.9 Elucidación de pectolinaringenina 7-O- β -D-glucuronopiranosido

El fraccionamiento cromatográfico de FP1 (1.05 g) por columna de vidrio empacada con C₁₈ y eluida con MeOH:H₂O (60:40), proporcionó la subfracción 65-72-2C18LA que condujo el aislamiento del compuesto **6** que se obtuvo como un polvo amorfo de color amarillo oscuro (4.3 mg, 0.41 %) soluble en piridina. La placa cromatográfica de dicho compuesto eluida en fase móvil de MeOH:H₂O (45:55), mostró la presencia de una banda oscura en 254 y 365 nm (Figura 50, penúltimo cromatofolio), que al oxidarse con ácido sulfúrico al 50% en una superficie caliente se tornó a un color amarillo (Figura 50, último cromatofolio), una característica típica de la posible presencia de flavonoides. Con base en esta

observación, se procedió a inspeccionar las señales de RMN- ^1H y ^{13}C que caracterizan a este tipo de moléculas.

En el espectro de RMN- ^1H (Figura 51) se observó la presencia de cuatro señales de protones aromáticos; dos señales simples en δ 6.91 y 7.47 ppm corresponden a los protones H3 y H8; las señales en δ 7.83 ppm (d, $J= 8.8$ Hz) y 7.02 ppm (d, $J= 8.8$ Hz) se asignaron a H2', H6' y H3', H5', el valor de $J= 8.8$ Hz indicó que H2', H6' se encontraban acoplados en posición orto a H3' y H5', respectivamente. Asimismo, se observó una señal doble del protón anomérico H1'' en δ 6.10 ppm (d, $J= 6.8$ Hz), además de los protones base de hidroxilos en δ 4.53-5.01 ppm, característicos del ácido glucurónico (Munehisa *et al.*, 1979). Adicionalmente, se observaron dos señales simples en δ 3.74 y 4.06 ppm que son características de metoxilos.

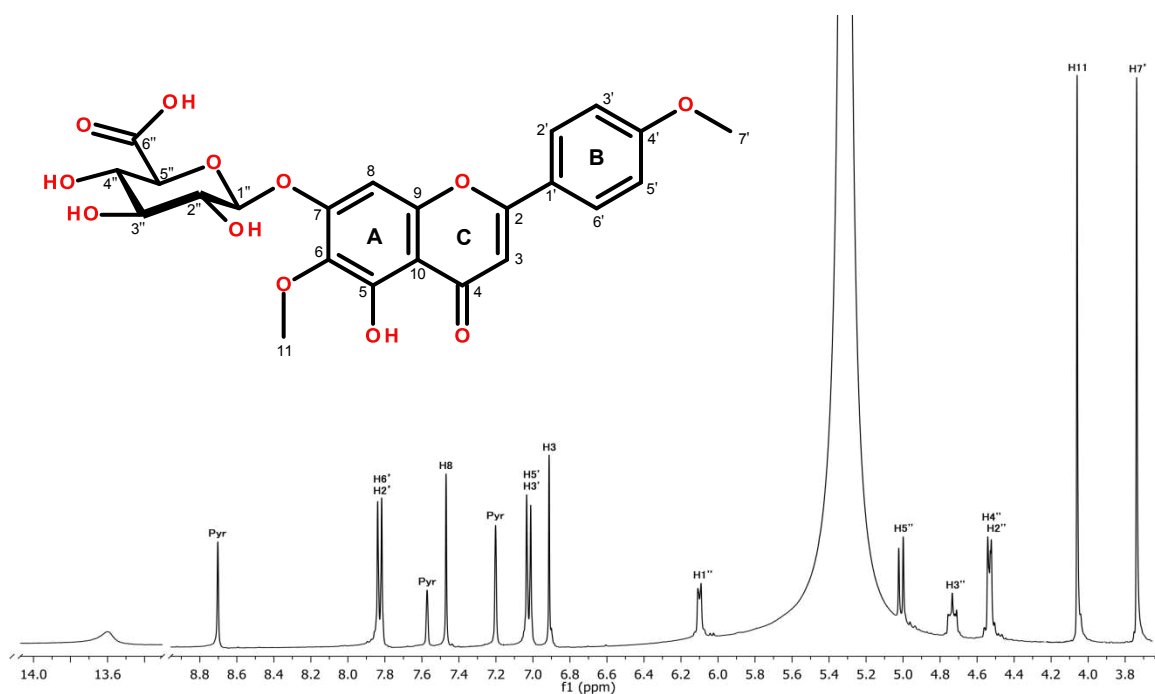


Figura 51. Espectro de RMN- ^1H del compuesto **6** aislado de *L. achyranthifolia* en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (400 MHz)

Las señales del espectro de RMN- ^{13}C (Figura 52) en δ 102.0, 73.0, 74.5, 77.7, 77.9 ppm, confirmaron la presencia de un ácido glucurónico que se caracteriza por la presencia típica de un carbonilo C6'' situado en δ 172.3 ppm (Hu *et al.*, 2016).

Del experimento DEPTQ (Figura 53) se identificaron nueve señales de metinos (δ 72.9, 74.3, 77.7, 77.7, 95.0, 101.9, 104.0, 114.6 y 128.4 ppm), dos metilos base oxígeno (δ 55.3 y 60.7 ppm) y diez carbonos cuaternarios (δ 107.0, 123.8, 133.8, 152.8, 153.9, 157.1, 162.8, 164.3, 172.1 y 183.0 ppm). Las señales de los carbonilos C4 y C6'' (δ 183.0 y 172.3 ppm), junto con las señales de los protones H3 y H1'' (δ 6.91 y 6.10 ppm) permitieron concluir que el compuesto **5** es un glucurónido de flavona (Cuesta *et al.*, 2015).

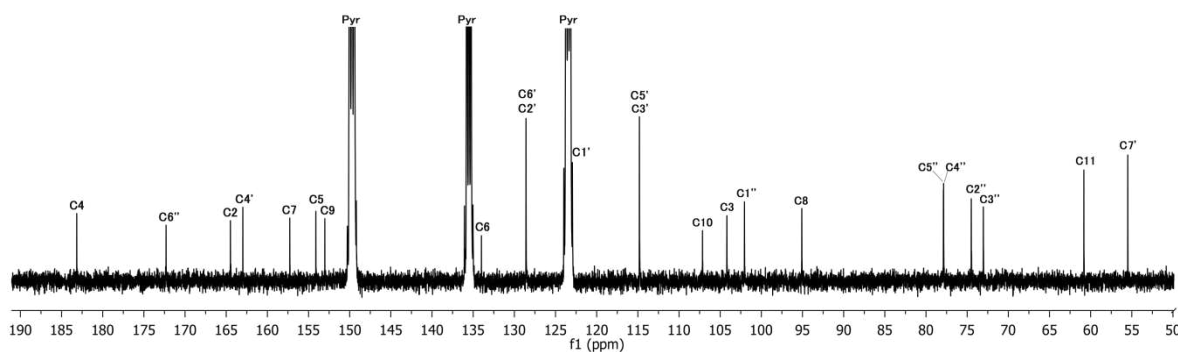


Figura 52. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto **6** aislado de *L. achyranthifolia* en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (100 MHz)

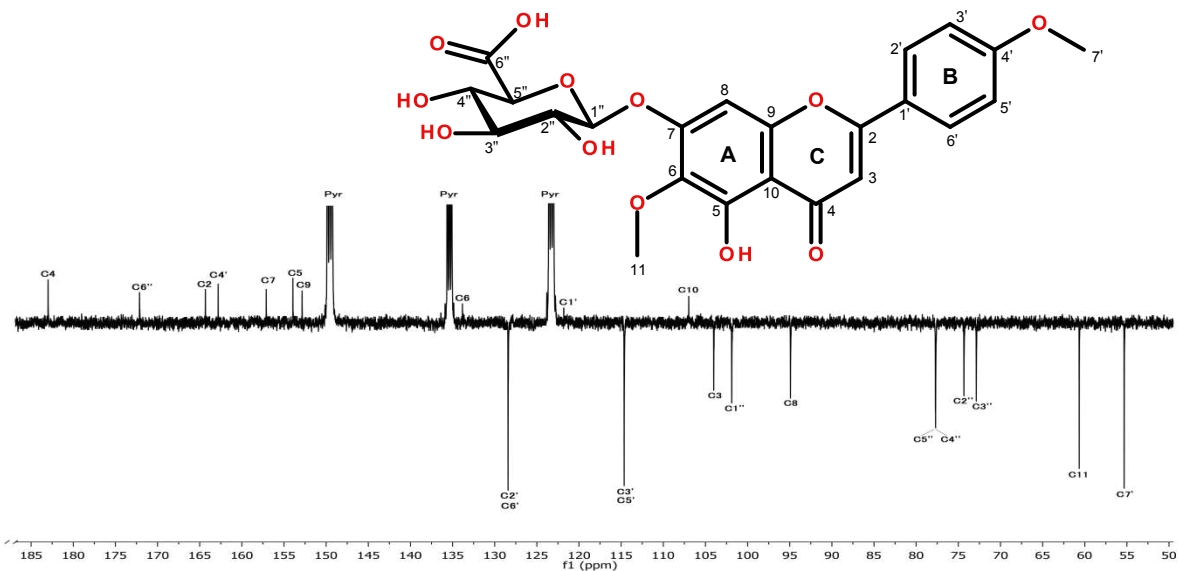


Figura 53. Espectro DEPTQ del compuesto **6** aislado de la parte aérea de *L. achyranthifolia* en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

De las correlaciones del experimento HSQC (Figura 54), se observó que los protones base de metoxilos H7' (δ 3.74 ppm) y H11 (4.06) mostraron correlación

con los carbonos en δ 55.3 y 60.7 ppm, asignando así a C7' y C11 respectivamente. El singlete característico del sistema flavona H3 (δ 6.91 ppm) mostró una correlación con la señal en δ 104.0 ppm que fue atribuida al carbono vinílico C3. Para los protones aromáticos del anillo B, se observó que H2' y H6' se correlacionaron con un mismo carbono en δ 128.6 ppm, esta correspondencia permitió asignar a C2' y C6'. Asimismo, se observó que los protones H3' y H5' eran químicamente equivalentes y su señal correlacionó con aquella de carbono en δ 114.8 ppm, que fue asignada a C3' y C5' respectivamente. Para el protón anomérico del ácido glucurónico H1'' (δ 6.10 ppm) se observó una correlación con δ 101.9 ppm, asignando así al carbono C1''. También se observó una correlación del metino H8 (δ 7.47 ppm) con una señal de ^{13}C en δ 95.0 ppm por lo que fue asignada a C8. Esta conexión permitió establecer que el anillo aromático A debía encontrarse sustituido en las posiciones 5, 6 y 7.

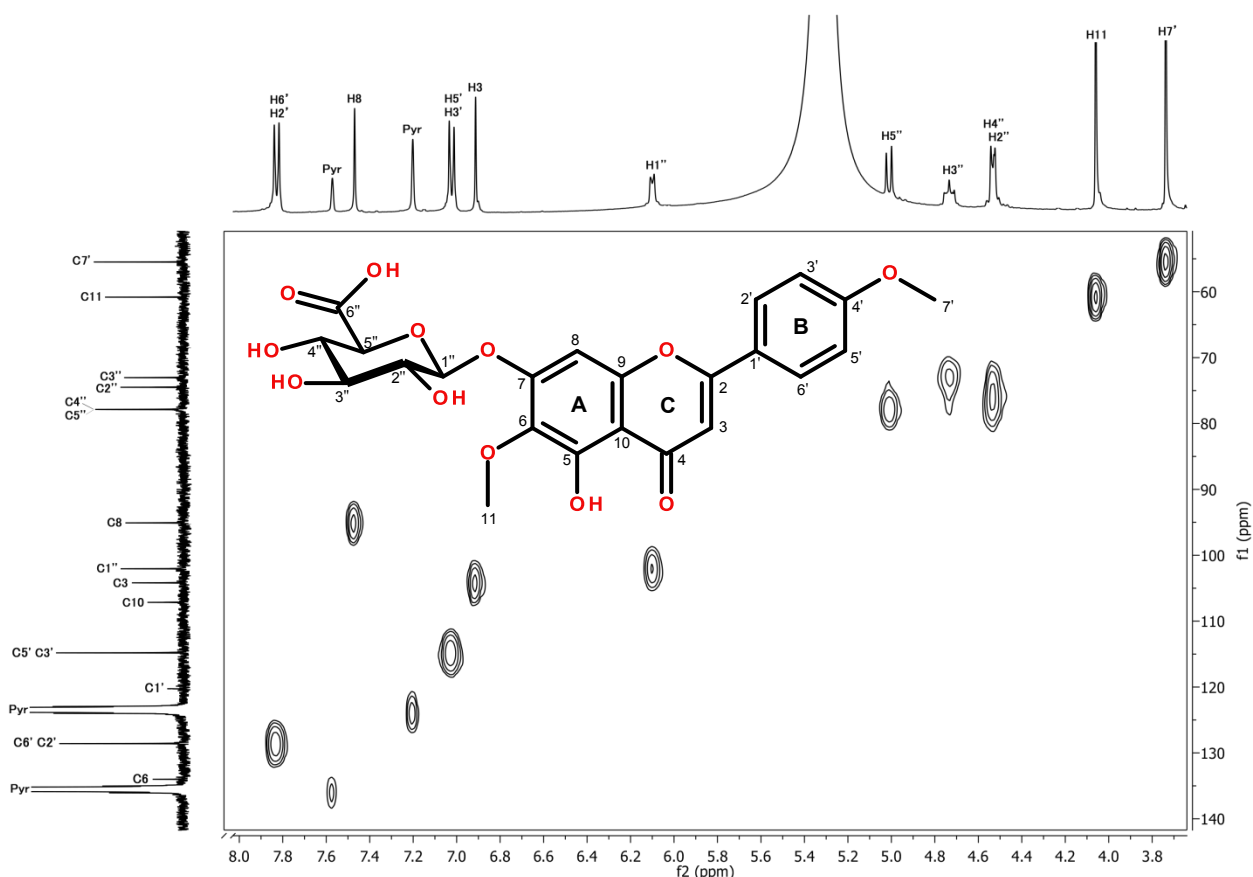


Figura 54. Espectro HSQC del compuesto **6** aislado de la parte aérea de *L. achyranthifolia* en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

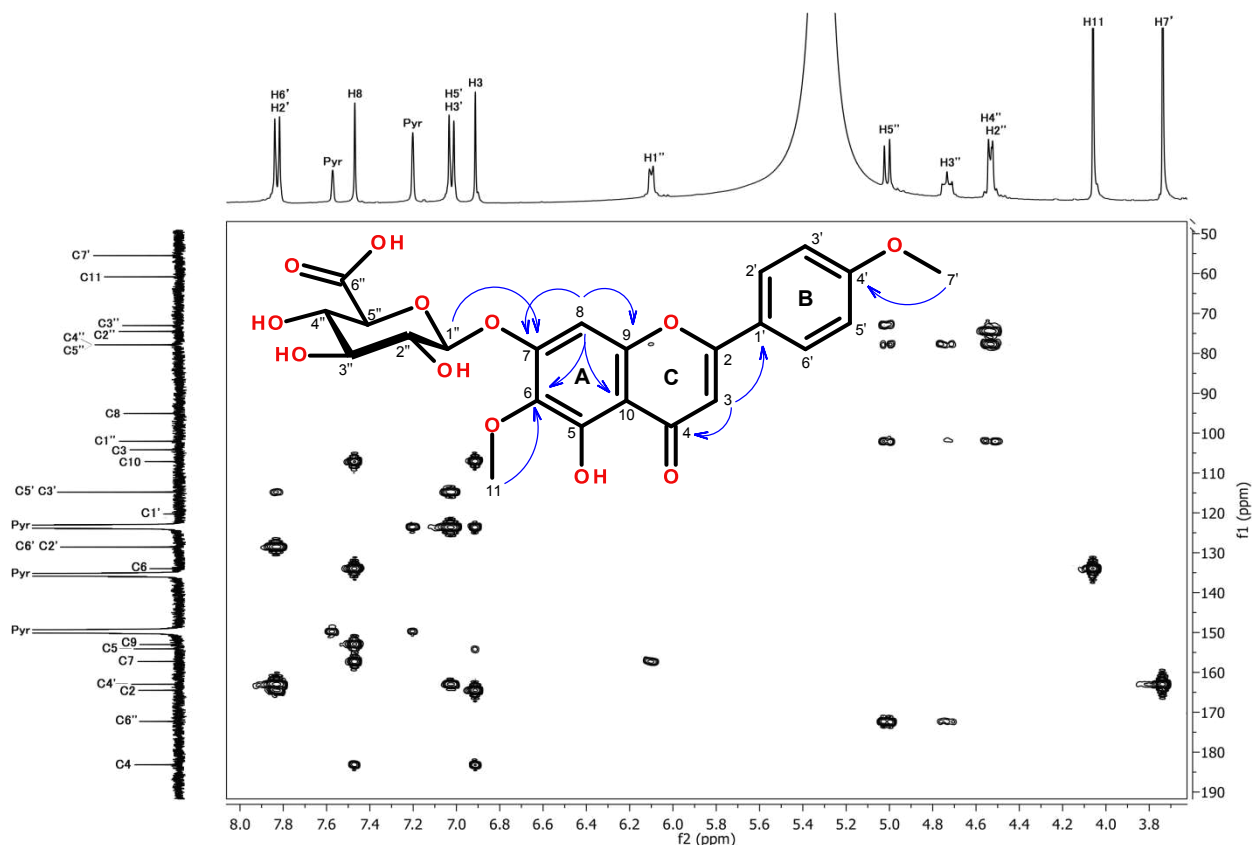


Figura 55. Espectro HMBC del compuesto **6** aislado de la parte aérea de *L. achyranthifolia* en C_5D_5N

Con el fin de confirmar la conectividad del compuesto **6**, se adquirió el experimento HMBC (Figura 55), en el cual se observó que el protón anomérico H1'' (δ 6.10 ppm, d, J = 6.8 Hz) presentó una correlación a tres enlaces con el carbono en δ 157.3 ppm, lo cual confirmó la posición del ácido glucurónico en C7 del anillo A. Asimismo, se observó una correlación a dos enlaces del protón H8 (δ 7.47 ppm, s) con δ 157.3 ppm, confirmando con esto la asignación de C7. Adicionalmente, se observó que los protones H8 (δ 7.47 ppm, s) y H11 (δ 4.06 ppm, s), mostraron correlación con el carbono en δ 134.0 ppm, asignando así al carbono cuaternario base de oxígeno en la posición C6. También, se observó una correlación a dos enlaces de H8 con la señal de ^{13}C en δ 153.9 ppm y a tres enlaces con la señal de δ 107.0 ppm asignando de esta manera los carbonos C9 y C10 respectivamente. La correlación observada a dos enlaces de distancia de la señal simple de H3 (δ 6.91 ppm) con la señal de δ 183.2 ppm, permitió la

asignación del carbono carboxílico C4. Por otra parte, la correlación del protón H3 (δ 6.91 ppm, s) con el carbono en δ 123.8 ppm permitió la asignación de C1', y la correlación de H7' (δ 3.74 ppm, s) con el carbono en δ 163.0 ppm permitió la asignación de C4', de esta manera se asignaron los carbonos cuaternarios del anillo B.

En el experimento NOESY (Figura 56), se observó la correlación del protón H6' (δ 7.83 ppm) con los protones H3 (δ 6.91 ppm) y H5' (δ 7.02 ppm); este último también mostró una correlación con el protón H7' (δ 3.74 ppm). Por otro lado, se manifestó que el protón anomérico H1'' (δ 6.10 ppm) tiene correlaciones con los protones H5'' y H8. El análisis de estas correlaciones espaciales permitió soportar la estructura tridimensional propuesta en la Figura 57, en la cual se puede observar que el anillo B y la unidad de ácido glucurónico muestran orientaciones perpendiculares a los anillos A y C; estos últimos mostraron una geometría plana.

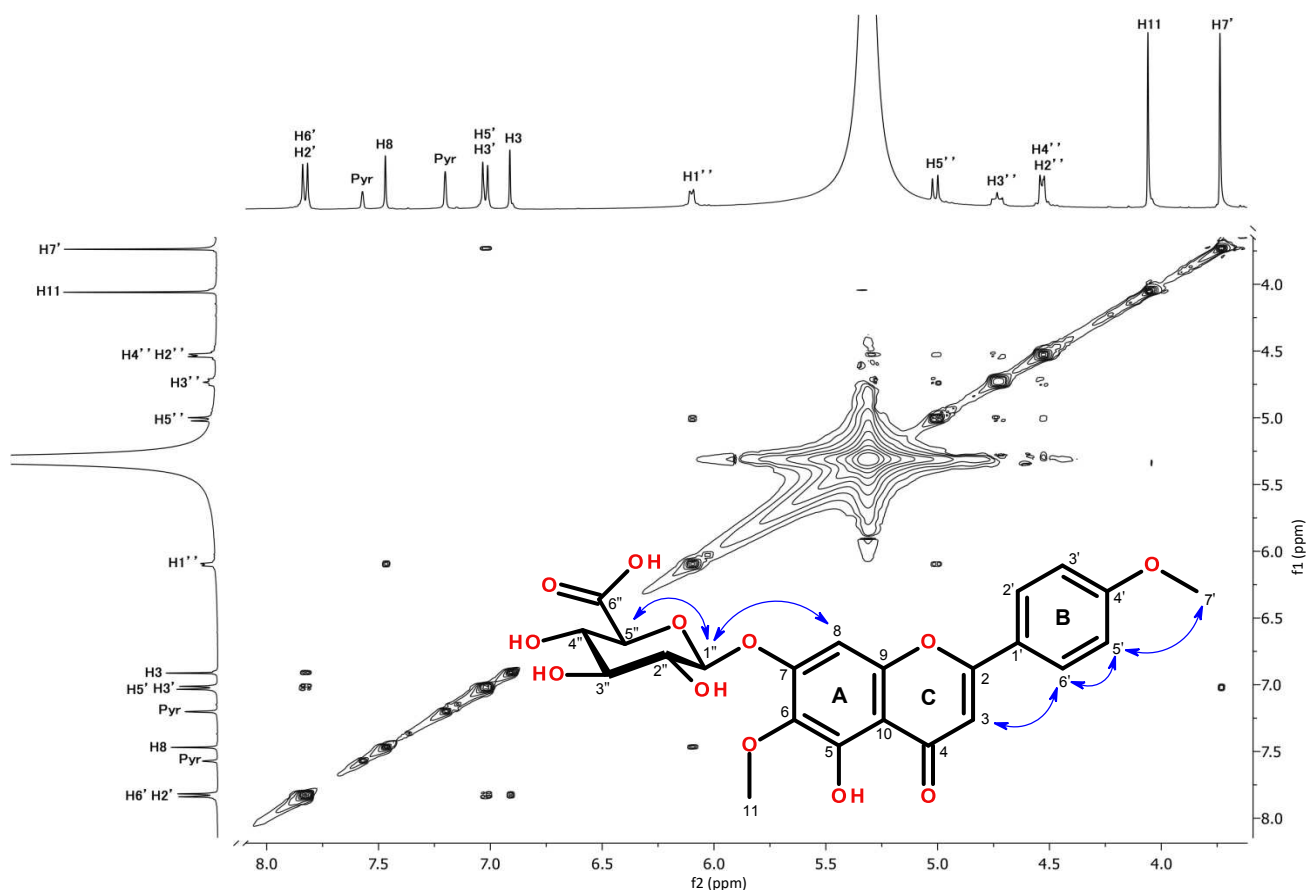


Figura 56. Espectro NOESY del compuesto 6 aislado de la parte aérea de *L. achyranthifolia* en C_5D_5N

La corroboración estructural de la molécula en análisis, se verificó mediante las correlaciones proporcionadas en el experimento homonuclear COSY (Figura 58). Se observó que el protón anomérico H1'' (δ 6.10 ppm) mantiene un acoplamiento vecinal con el protón H2'' (δ 4.53 ppm). De forma análoga, se mostró que los protones H5' (δ 7.83 ppm) y H6' (δ 7.02 ppm) tienen un acoplamiento vecinal entre sí. Entre los protones de la unidad del ácido glucurónico, se evidenció que H2'', H3'' y H4'' guardan acoplamientos vecinales entre ellos; en tanto que el protón H5'' que se encuentra adyacente al grupo carbonilo mostró una correlación en forma de W a cuatro enlaces de distancia con el protón H3''.

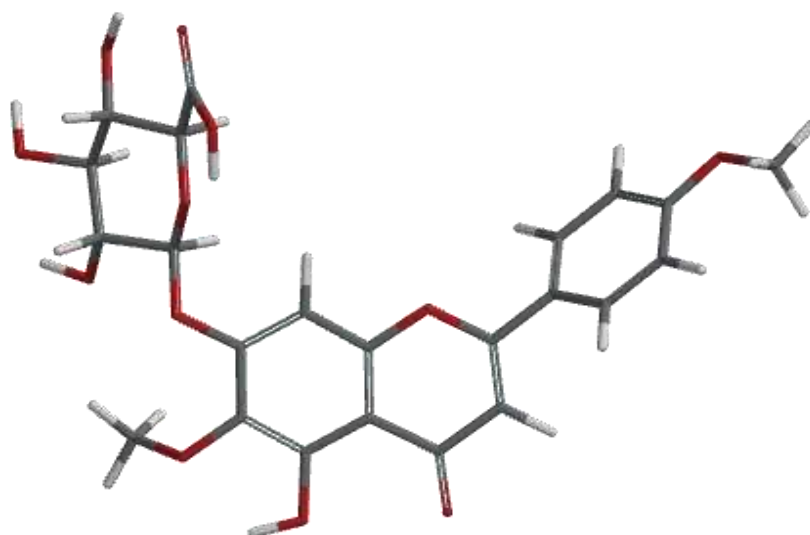


Figura 57. Estructura tridimensional del compuesto **6** establecida a partir de NOESY

La asignación completa de los datos de RMN- ^1H y ^{13}C para el compuesto **6** se proporciona en el Cuadro 18. Del análisis de los datos presentados se estableció una estructura molecular similar al glucuronido de flavona reportada por Bharitkar *et al.*, (2015). Sin embargo, los datos experimentales difieren de lo reportado por la ausencia de un grupo metoxilo que fue confirmada mediante la espectrometría de masa de baja resolución desarrollada en modo ESI positivo. En el espectro de masa (Apéndice 17), se observó un ion molecular $m/z = 491.1$ que está de acuerdo con el valor calculado para $[\text{M}+\text{H}]^+ = 491.0$ g/mol que concuerda con la fórmula molecular de una flavona reportada por Arisawa *et al.*, (1979), a la que

denominó Comantosido B, misma que en años más recientes se nombró como pectolinarigenina 7-O- β -D-glucuronopiranosido (**6**). Finalmente, es preciso recalcar que esta es la primera vez que se describe una flavona de esta naturaleza en la especie de *L. achyranthifolia*.

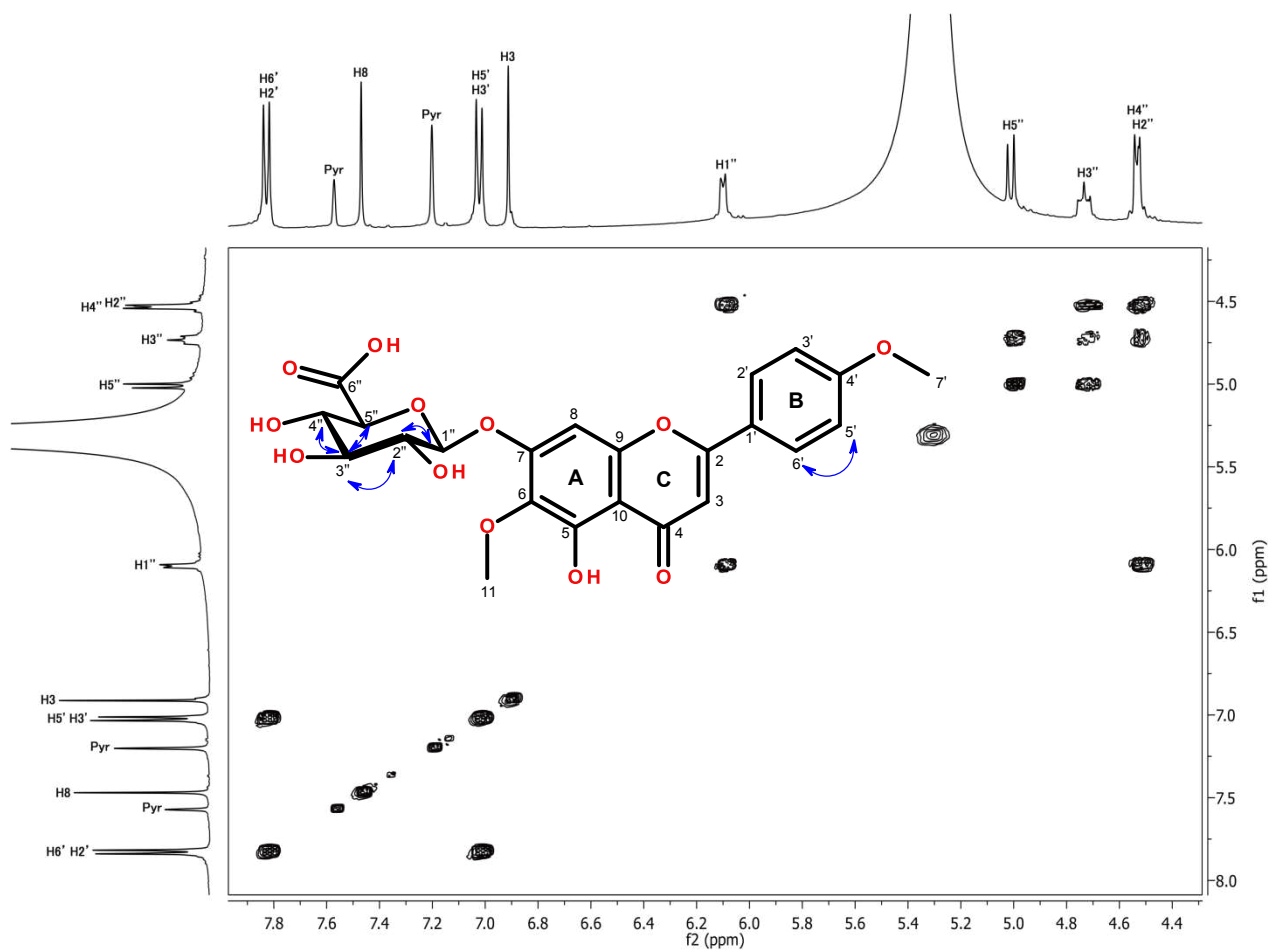


Figura 58. Espectro COSY del compuesto **6** aislado de la parte aérea de *L. achyranthifolia* en C_5D_5N

Cuadro 18. Datos espectroscópicos de RMN-¹H [ppm, Mult., (J en Hz)] y ¹³C de **6** en C₅D₅N

Posición	Pectolinarigenina 7-O-β-D-glucuronopiranosido (6)		
	δ _C	δ _H	HMBC (¹ H→ ¹³ C)
2	164.5	-----	-----
3	104.2	6.91, s	107.1 (C10), 124.0 (C1'), 164.5 (C2), 183.2 (C4)
4	183.2	-----	-----
5	154.1	-----	-----
6	134.0	-----	-----
7	157.3	-----	-----
8	95.1	7.47, s	107.1 (C10), 134.0 (C6), 153.0 (C9), 157.3 (C7)
9	153.0	-----	-----
10	107.1	-----	-----
11	60.8	4.06, s	134.0 (C6)
1'	124.0	-----	-----
2'	128.6	7.83, d (8.8)	114.8 (C3'), 128.6 (C6'), 164.5 (C2), 163.0 (C4')
3'	114.8	7.02, d (8.8)	114.8 (C5'), 124.0 (C1'), 163.0 (C4')
4'	163.0	-----	-----
5'	114.8	7.02, d (8.8)	114.8 (C3'), 124.0 (C1'), 163.0 (C4')
6'	128.6	7.83, d (8.8)	114.8 (C5'), 128.6 (C2'), 164.5 (C2), 163.0 (C4')
7'	55.5	3.74, s	163.0 (C4')
1''	102.0	6.10, d (6.8)	157.3 (C7)
2''	74.5	4.53, m	102.0 (C1'')
3''	73.0	4.73, m	77.8 (C4''), 102.0 (C1'')
4''	77.8	4.53, m	74.5 (C2''), 77.9 (C5'')
5''	77.9	5.01, d (9.6)	73.0 (C3''), 77.8 (C4''), 102.0 (C1''), 172.3 (C6'')
6''	172.3	-----	-----

9.10 Elucidación de 6-O-metilscutellarina aislado de *L. achyranthifolia*

La separación cromatográfica de FP1 mediante el uso de fase reversa, permitió obtener el compuesto **7** (3.6 mg, 0.34 %) como un polvo beige soluble en piridina. La pureza del compuesto se evidenció por medio de cromatofolios de fase normal que mediante la lámpara de luz UV mostro un solo componente con fluorescencia oscura en 365 nm que indicó un grupo OH libre en la posición 5, el cual se tornó a un color amarillo al oxidarse con HCl 50% en una superficie caliente debido al hidroxilo libre en la posición 4' (Xia *et al.*, 2007).

La comparación de los datos espectroscópicos de RMN (Cuadro 19) con lo descrito para **6**, permitió identificar al compuesto **7** como 6-O-metilscutellarina (Xia *et al.*, 2007 y Phakeovilay *et al.*, 2013). La adquisición de los experimentos bidimensionales de HSQC, HMBC y NOESY (Apéndice 18, 19 y 20), permitieron corroborar la asignación de los datos espectrales. Asimismo, la comparación de los espectros de RMN-¹H (Figura 59), apoyaron la estructura propuesta en la cual se mostraron señales muy parecidas para el ácido glucurónico, mientras que para la aglicona se observaron ligeros cambios en las resonancias de los protones aromáticos H2', H3', H5' y H6' debido posiblemente a la sustitución del grupo metoxilo por un hidroxilo en el anillo B.

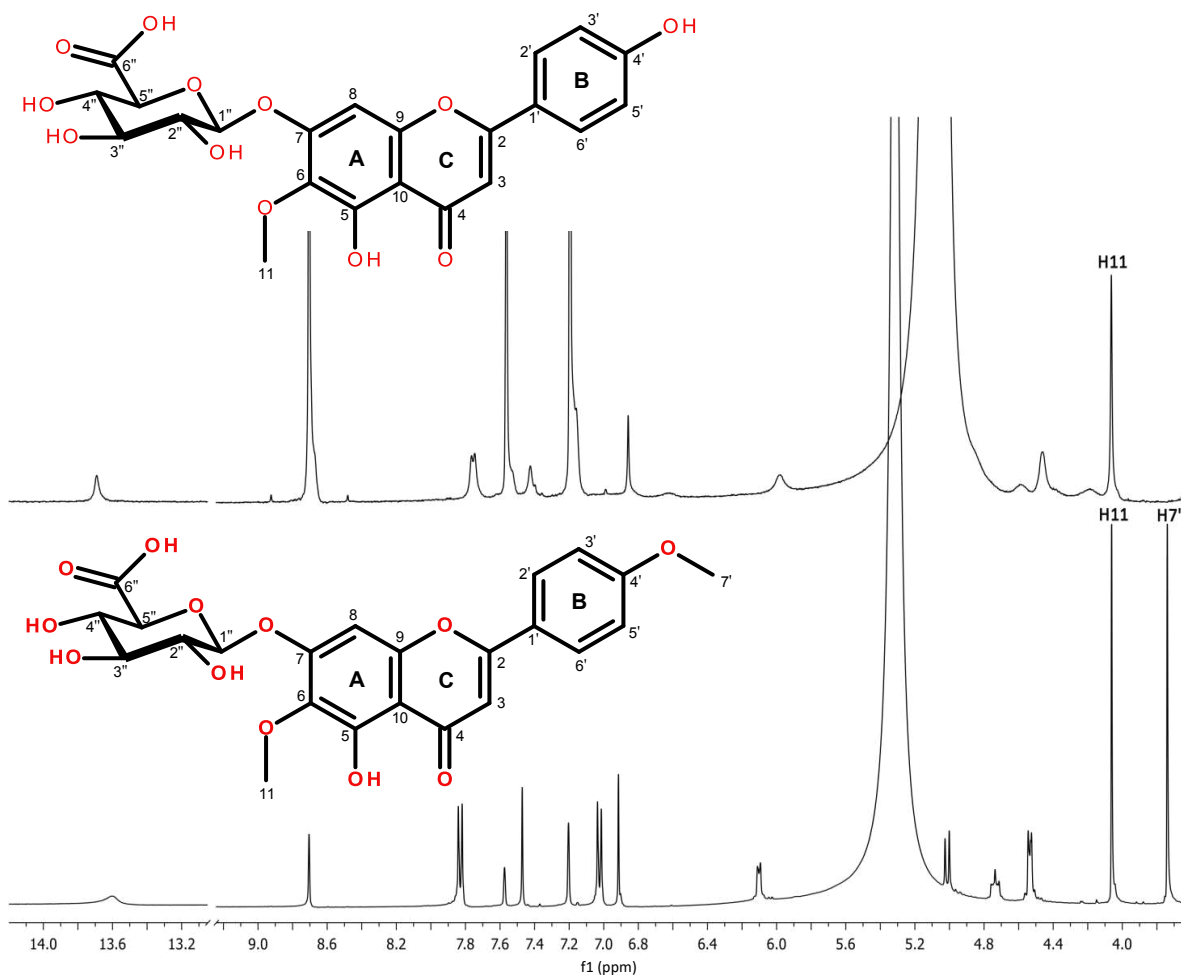


Figura 59. Espectros de RMN-¹H de Pectolinarigenina 7-O-β-D-glucuronopiranosido (trazo inferior) y 6-O-metilscutellarina (trazo superior)

El aislamiento y caracterización espectroscópica de **6** y **7** descritas en esta tesis, constituyen el primer reporte donde se menciona por primera vez la co-ocurrencia de estos compuestos en la especie de *L. achyranthifolia*; es posible que la síntesis de estos dos compuestos contribuyan a eficientizar el proceso fotosintético de la planta, lo cual tiene repercusión en la síntesis de otros metabolitos secundarios que pueden actuar como agentes protectores contra la infección por organismos fitopatógenos (Cartaya y Reynaldo, 2001).

Cuadro 19. Datos espectroscópicos de RMN-¹H [ppm, Mult., (J en Hz)] y ¹³C de COMP **7** en C₅D₅N

Posición	6-O-metilscutellarina (7)		
	δ_c	δ_H	HMBC (¹ H→ ¹³ C)
2	164.5	-----	-----
3	103.5	6.86, s	107.0 (C10), 165.0 (C2), 183.1 (C4), 121.9 (C1')
4	183.2	-----	-----
5	154.1	-----	-----
6	133.9	-----	-----
7	157.3	-----	-----
8	95.1	7.43, s	133.9 (C6), 157.4 (C7), 153.0 (C9), 154.1 (C5)
9	153.0	-----	-----
10	107.1	-----	-----
11	60.8	4.07, s	133.9 (C6)
1'	121.9	-----	-----
2'	128.9	7.76, d (8.1)	128.9 (C6'), 163.1 (4')
3'	116.8	7.17, d (8.1)	116.8 (C5')
4'	163.1	-----	-----
5'	116.8	7.17, d (8.1)	116.8 (C3')
6'	128.9	7.76, d (8.1)	128.9 (C2'), 163.1 (4')
1''	102.1	5.98, d (6.8)	No se observó
2''	74.4	4.47, ancha	No se observó
3''	73.4	4.60, ancha	No se observó
4''	77.1	4.85, oculta	No se observó
5''	77.8	4.47, ancha	No se observó
6''	172.3	-----	-----

9.11 Elucidación de luteolina 7-glucurónico aislado de *L. achyranthifolia*

El análisis de los datos de RMN-¹H y ¹³C proporcionados en el Cuadro 20, con respecto a las reportadas en la literatura por Kamalakararao *et al.*, (2017), Hu *et al.*, (2016), El-Kassem *et al.*, (2012) y Tsuneatsu *et al.*, (2002), permitieron establecer la estructura del compuesto **8** como luteolina 7-glucurónico.

En el espectro de RMN-¹H (Figura 60), se observaron dos señales dobles en δ 6.40 ppm (d, $J= 1.8$ Hz) y 6.76 ppm (d, $J= 1.8$ Hz) que fueron asignadas a los protones aromáticos H6 y H8, los cuales son característicos de un acoplamiento orto en sistemas aromáticos. Además, se observaron otras señales correspondientes a cinco metinos en un intervalo de δ 3.12 – 5.03 ppm, característicos de azúcares y un protón anomérico H1'' (δ 5.03 ppm, d, $J= 7.6$ Hz) característico del ácido glucurónico (Xia *et al.*, 2007). Por otra parte, las constantes de acoplamiento de la señal H6' en δ 7.42 ppm (dd, $J= 8.9, 2.0$ Hz), permitieron establecer un acoplamiento orto con H5' (δ 6.83 ppm, d, $J= 8.9$ Hz) y acoplamiento meta con H2' (δ 7.40 ppm, d, $J= 2.0$ Hz).

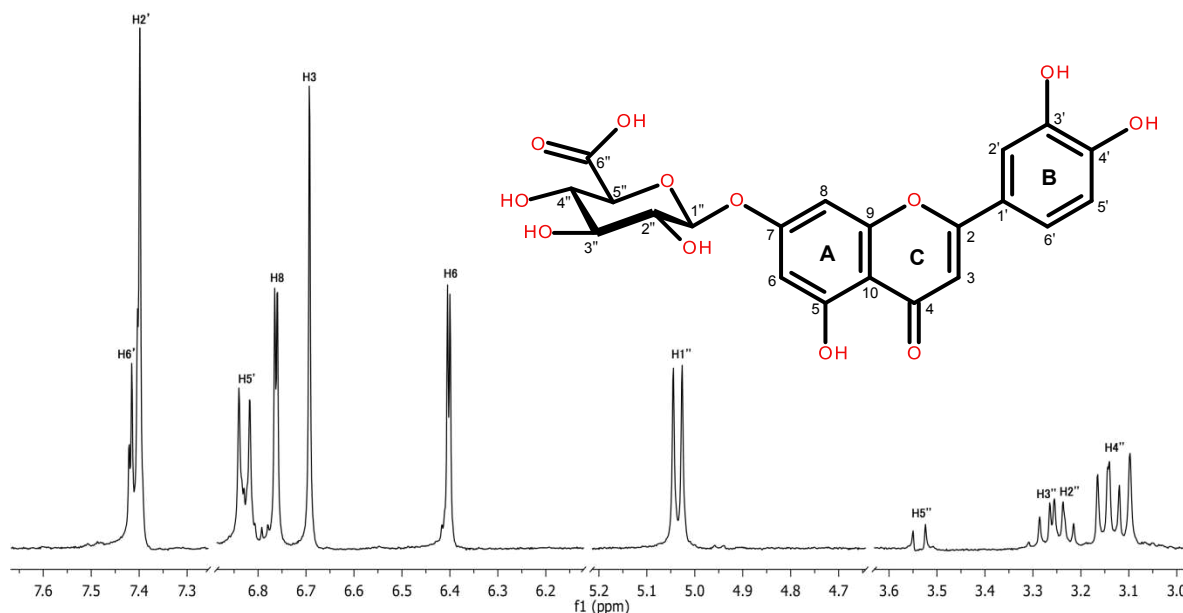


Figura 60. Espectro de RMN-¹H del compuesto **8** aislado de *L. achyranthifolia* en DMSO-*d*₆ (400 MHz)

En lo que respecta al espectro de RMN-¹³C (Figura 61), se observaron un total de 21 señales de carbonos. La presencia del carbono anomérico en δ 99.6 ppm y la

señal de un carbonilo base de ácido carboxílico situado en δ 171.1 ppm, evidenció la presencia del ácido glucurónico (Xia *et al.*, 2007). Por medio del experimento DEPTQ (Figura 62), se evidenció la presencia de doce metinos (δ 71.9, 72.9, 73.5, 76.5, 94.4, 99.5, 99.6, 102.4, 112.8, 115.8, 119.2 y 145.4 ppm) y nueve carbonos cuaternarios (δ 105.1, 120.1, 146.0, 156.8, 160.9, 162.9, 164.5, 171.4 y 181.6 ppm) en la que se destacan dos señales de carbonilo en δ 171.4 y 181.6 ppm que son consistentes con el esqueleto de un glucurónido de flavona (Xia *et al.*, 2007). La señal ubicada en δ 102.4 ppm, es característico del carbono C3 que se encuentra en el anillo C del esqueleto flavona. Las señales de carbonos cuaternarios con sustituyentes hidroxilos presentes en δ 156 y 162.9 ppm, se atribuyeron a los carbonos C5 y C4', respectivamente.

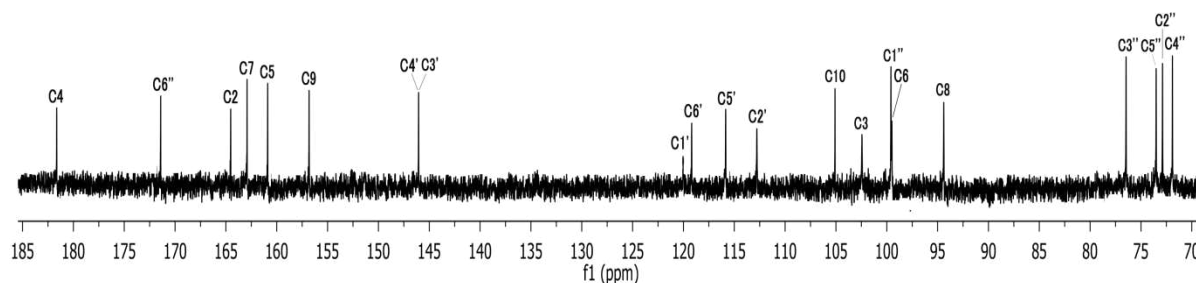


Figura 61. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto **8** aislado de *L. achyranthifolia* en DMSO-*d*₆ (100 MHz)

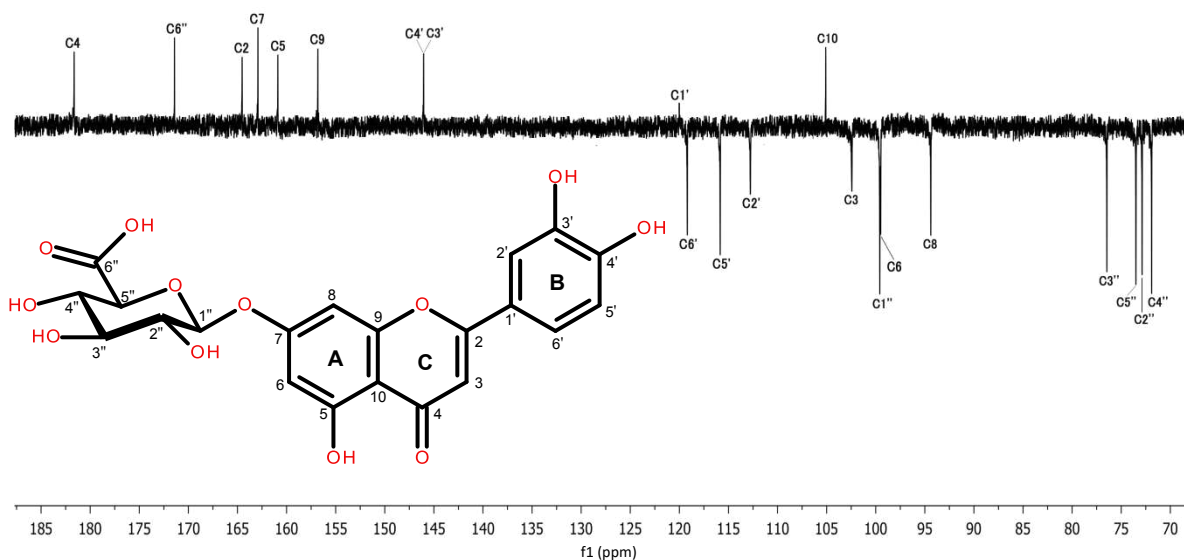


Figura 62. Espectro DEPTQ del compuesto **8** aislado de *L. achyranthifolia* en DMSO-*d*₆

Las correlaciones observadas en el experimento HSQC (Figura 63), permitió establecer que el protón anomérico H1'' (δ 5.03 ppm) se encontraba enlazado directamente a su carbono anomérico C1'' en δ 99.6 ppm. Asimismo, se observó que las señales de los protones H2'', H3'', H4'' y H5'', correspondían con sus respectivos carbonos C2'', C3'', C4'' y C5'' en δ 71.9, 72.9, 73.5 y 76.4 ppm. Por otro lado, las señales de los protones aromáticos H6 y H8 del anillo A, mostraron correlación con las señales de carbono situadas en δ 99.5 y 94.2 ppm, con lo que fueron asignadas C6 y C8. También, se observó que el protón H3 (δ 6.68 ppm) del anillo C, se correlacionó con la señal de ^{13}C que presentó un δ 102.4 ppm, con esto se asignó a C3. Finalmente se observó que las señales de los protones aromáticos H2', H5' y H6' del anillo B correlacionaron con señales de carbono en δ 112.9, 115.8 y 119.2 ppm las cuales fueron asignadas a C2', C5' y C6' respectivamente.

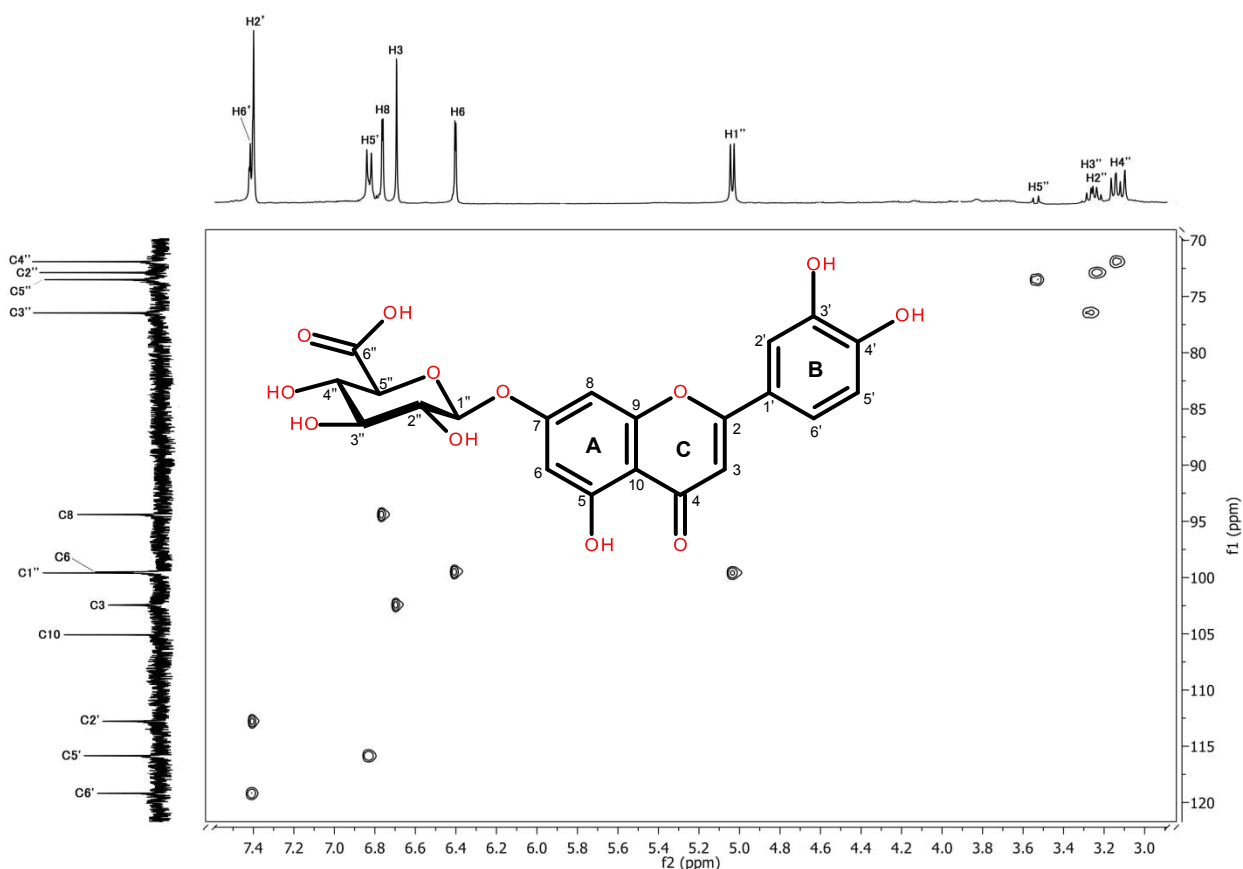


Figura 63. Espectro HSQC del compuesto **8** aislado de *L. achyranthifolia* en DMSO-*d*6

La posición de cada uno de los sustituyentes de la molécula, se estableció con base en las correlaciones observadas en el experimento HMBC (Figura 64), en el cual se determinó que la unidad de ácido glucurónico se encontraba ubicada sobre el C7 del anillo A, esto se concluyó por la correlación a tres enlaces que mostró el protón anomérico H1'' (δ 5.02 ppm, d, J = 7.6 Hz) con la señal de carbono en δ 162.7 ppm (C7), mientras que en el protón aromático H8 (δ 6.76 ppm) se observó una correlación con el carbono C7, confirmando así, la posición del ácido glucurónico. Las asignaciones de los carbonos cuaternarios C9 y C10, se establecieron por la correlación a dos y tres enlaces que mostró el protón H8 con las señales de carbono ubicadas en δ 156.8 y 105.0 ppm. También se observó que el protón H3 situada en δ 6.69 ppm, se correlacionó a dos enlaces de distancia con las señales de carbono ubicadas en δ 181.6 ppm, 164.3 ppm, y a tres enlaces con la señal posicionada en δ 120.1 ppm; a partir del análisis de estas correlaciones descritas, se indicó que las señales establecidas en δ 120.1, 164.3 y 181.6 ppm correspondían a los carbonos C1', C2 y C4 respectivamente.

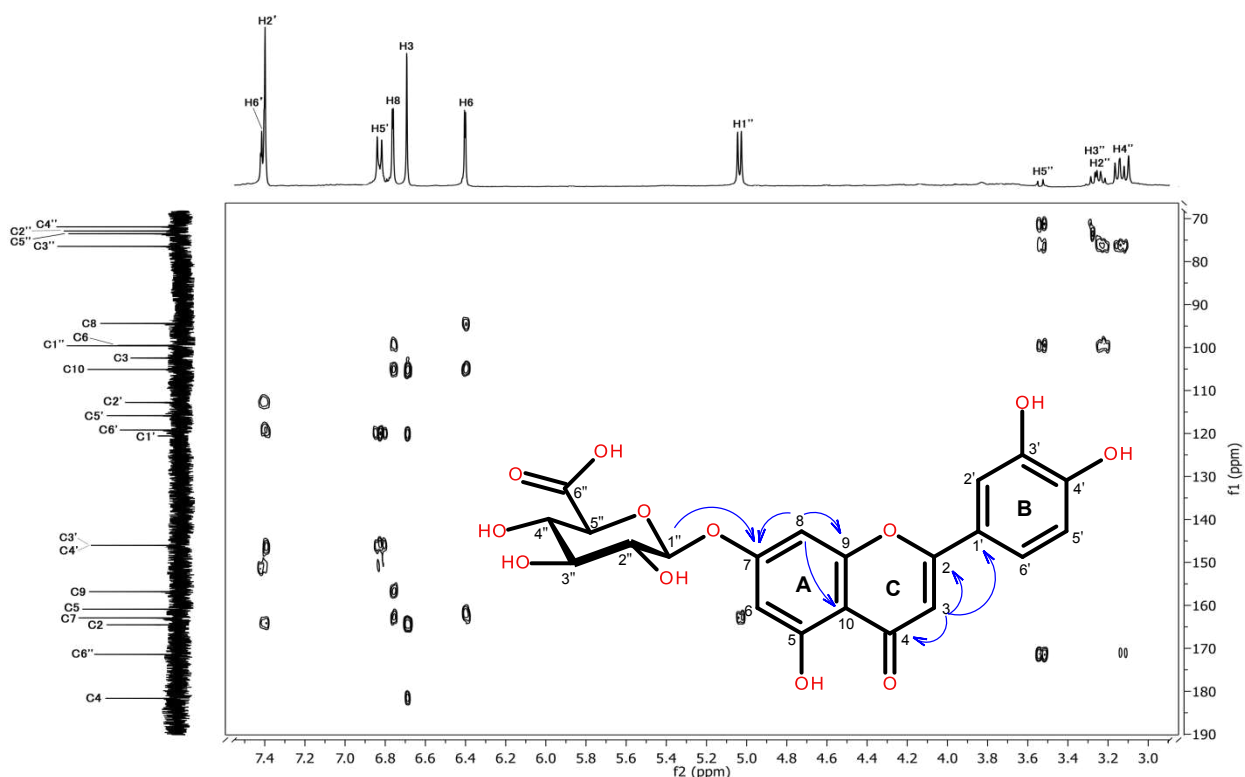


Figura 64. Espectro HMBC del compuesto **8** aislado de *L. achyranthifolia* en DMSO- d_6

A través del experimento NOESY (Figura 65), se determinó que el protón H6 guarda una correlación con H1'' y H5''; mismos que también mostraron interacción con el protón H8 que adicionalmente se correlacionó con el protón H3''. De forma análoga, se observó una correlación del protón H6' con los protones H3 y H5'.

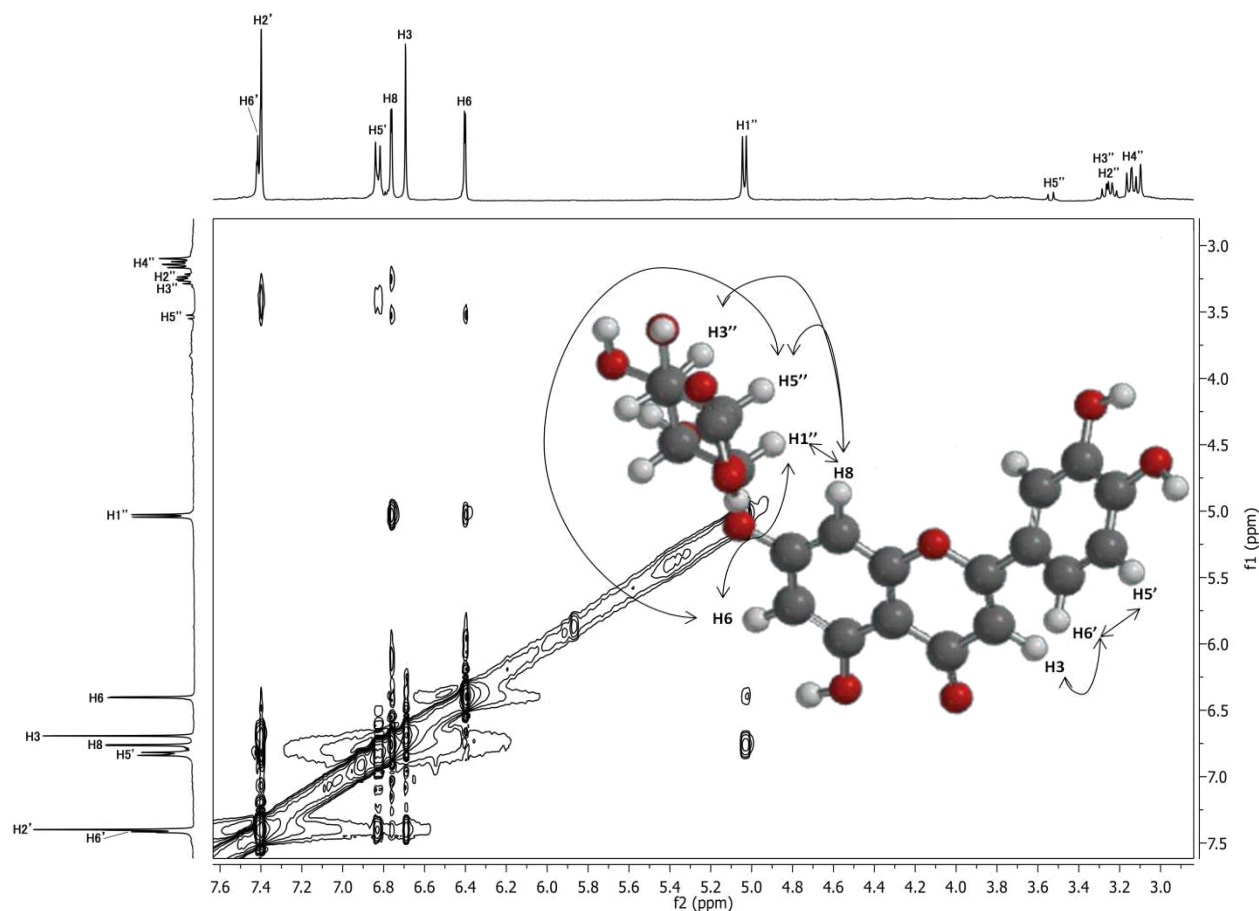


Figura 65. Espectro NOESY del compuesto **8** aislado de *L. achyranthifolia* en DMSO-*d*₆

Para corroborar el arreglo estructural propuesto, se adquirió el espectro de masa del compuesto puro, el cual se muestra en el Apéndice 21. La ionización por electroespray se analizó en modo ion positivo y a partir del fragmento $m/z = 463.1$ correspondiente a $[M+H]^+$, la fórmula molecular del compuesto en análisis, se determinó como $C_{21}H_{18}O_{12}$. Finalmente, el análisis conjunto de los datos de RMN y espectrometría de masa ayudó a establecer la estructura de la luteolina 7-glucurónido, que se reporta por primera vez en la especie de *L. achyranthifolia*.

Cuadro 20. Datos espectroscópicos de RMN-¹H [ppm, Mult., (*J* en Hz)] y ¹³C de **8** en DMSO-*d*₆

Posición	Luteolina 7-glucurónido (8)		
	δ_C	δ_H	HMBC (¹ H→ ¹³ C)
2	164.5	-----	-----
3	102.4	6.69, s	105.1 (C10), 120.1 (C1'), 164.5 (C2), 181.6 (C4)
4	181.6	-----	-----
5	160.9	-----	-----
6	99.5	6.40, d, 1.8	94.4 (C8), 105.1 (C10), 160.9 (C5)
7	162.9	-----	-----
8	94.4	6.76, d, 1.8	99.5 (C6), 105.1 (C10), 156.8 (C9), 162.9 (C7)
9	156.8	-----	-----
10	105.1	-----	-----
1'	120.1	-----	-----
2'	113.0	7.40, d (2.0)	119.2 (C6'), 146.4 (C4'), 164.5 (C2)
3'	145.8	-----	-----
4'	146.4	-----	-----
5'	115.8	6.83, d, 8.9	120.1 (C1'), 145.8 (C3')
6'	119.2	7.42, dd (8.9, 2.0)	113.0 (C2')
1''	99.6	5.04, d, 7.2	162.9 (C7)
2''	72.9	3.24, dd (8.6, 7.2)	99.6 (C1''), 76.5 (C3'')
3''	76.5	3.26, dd (8.6, 8.5)	72.9 (C2''), 71.9 (C4'')
4''	71.9	3.14, dd (9.6, 8.5)	76.5 (C3''), 171.4 (C6'')
5''	73.5	3.54, d, 10.4	71.9 (C4''), 76.5 (C3''), 99.6 (C1''), 171.4 (C6'')
6''	171.4	-----	-----

9.12 Purificación y caracterización espectroscópica de las subfracciones 11-14C18LA y 21-24C18LA

Del extracto MeOH de la parte aérea de *L. achyranthifolia* se obtuvieron 2.98 g de FP2 equivalente a un rendimiento del 15.02 % respecto al extracto MeOH crudo. La CCF de fase reversa (Figura 66), mostró un perfil de tres componentes principales que, al purificarse en columna de vidrio con fase reversa, proporcionó la subfracción 21-24C18LA y 11-14C18LA que se encontraba en mezcla por lo que ésta fue sometida a purificación en un sistema CLAR. Las condiciones de CLAR obtenidas a nivel analítico permitieron escalar las condiciones de separación a nivel semipreparativo, del cromatograma de este último nivel (Figura 67) se puede observar la presencia de 2 componentes mayoritarios con tiempos de retención (t_R) de 49.32, 64.48 min y 2 minoritarios con t_R = 40.68, 83.34 min, los cuales, se detectaron a un λ = 280 nm.

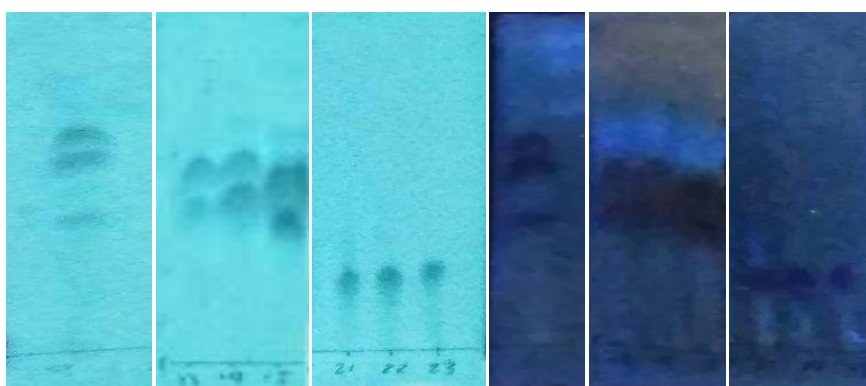


Figura 66. CCF de fase reversa de subfracciones purificadas de FP2
Fase móvil: MeOH: H₂O (1:1) - Observaciones realizadas a 254 y 365 nm

La elucidación estructural de los dos componentes principales en 11-14C18LA, aún no está del todo clara debido a la formación de sales que se han formado durante la neutralización, así pues, no se logró obtener un espectro de RMN aceptable ya que dichos interferentes opacan las señales de los componentes orgánicos. El análisis del espectro de RMN-¹H (Figura 68) permite inferir que los compuestos en cuestión (**9** y **10**), son glucurónidos de flavonoides que se caracterizan por la presencia del protón anomérico H1'' situado en δ 4.97 ppm (d, J = 7.2 Hz) que se complementa con sus respectivas señales de metinos base de

hidroxilos presentes en el intervalo δ 3.10 - 3.51 ppm y por las señales propias de los protones metinos del sistema flavonoides ubicados en el intervalo δ 6.18 – 8.52 ppm. De los datos espectrales de los compuestos **6**, **7** y **8**, se sostiene que la señal en δ 6.18 ppm es característica del protón metino H3, por lo tanto, se puede establecer que el flavonoide en cuestión es una flavona; sin embargo, en el espectro DEPTQ (Figura 69) no logró observarse la señal característica del carbono C4, que usualmente aparece en aproximadamente δ 181-183 ppm. La ausencia de dicha señal, podría atribuirse a un número deficiente de adquisiciones implementadas en el espectrómetro, que va muy de la mano con la naturaleza cuaternaria de dicho carbono. Adicionalmente, las señales presentes en δ 72.5, 73.5, 74.0, 77.1, 100.2 y 172.2 ppm sugieren la presencia del ácido glucurónico que de acuerdo al experimento HMBC (Figura 70), se observó que el protón anomérico H1'' correlacionó a tres enlaces con una señal de carbono ubicada en δ 162.5 ppm. Teniendo en cuenta las asignaciones espectrales de los glucurónidos de flavonas proporcionadas en el cuadro 14 y 15, se propone que el ácido glucurónico se encuentra enlazado al carbono C7.

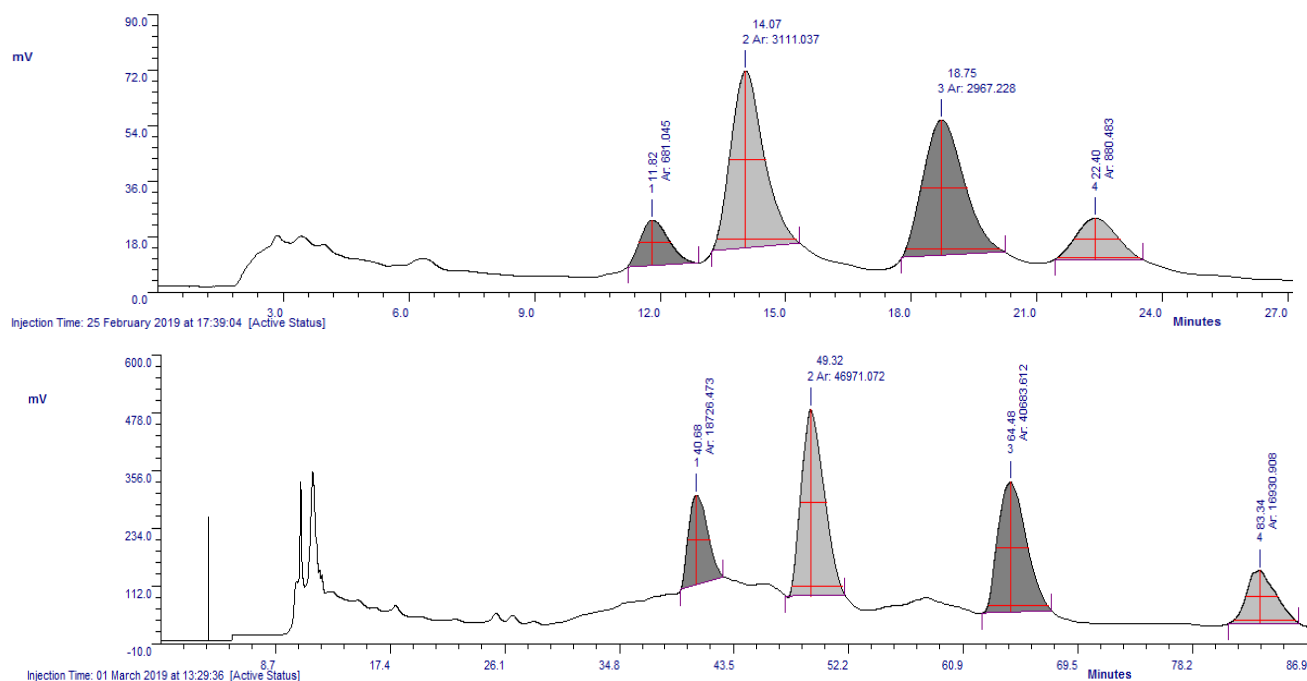


Figura 67. Cromatogramas de la fracción 11-14C18LA proveniente de FP2 de *L. achyranthifolia*

* El cromatograma superior se obtuvo a nivel analítico y el inferior a nivel semipreparativo.

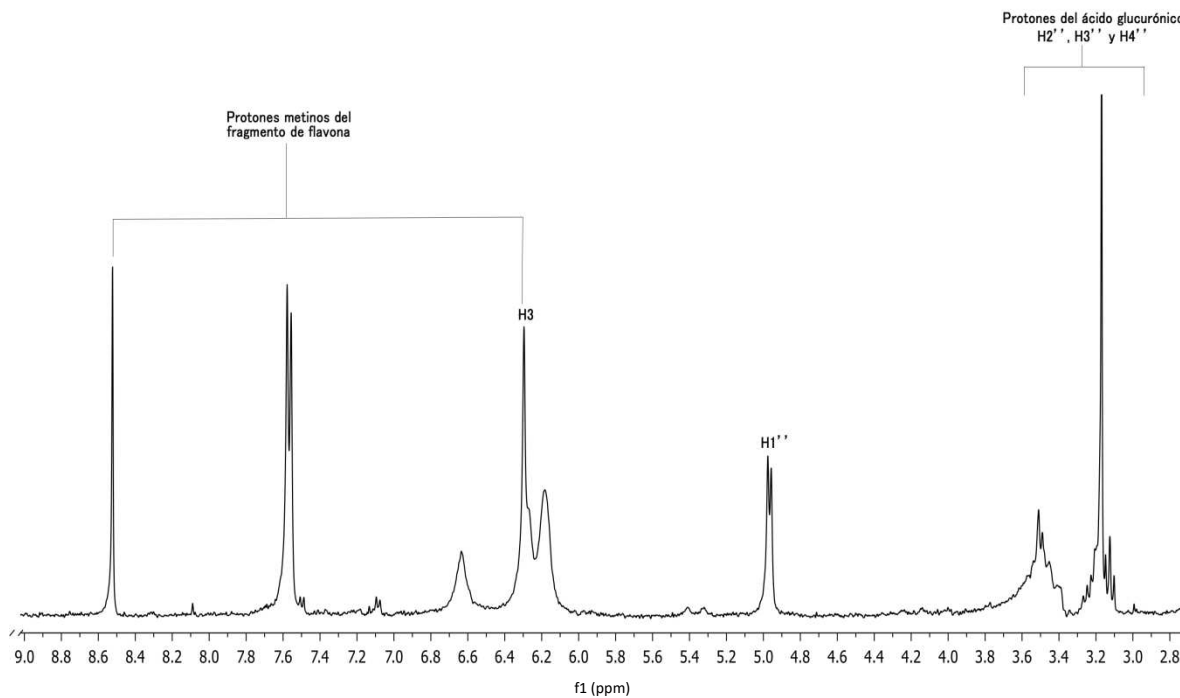


Figura 68. Espectro de RMN- ^1H de flavonas aisladas de *L. achyranthifolia* en DMSO- d_6 (400 MHz)

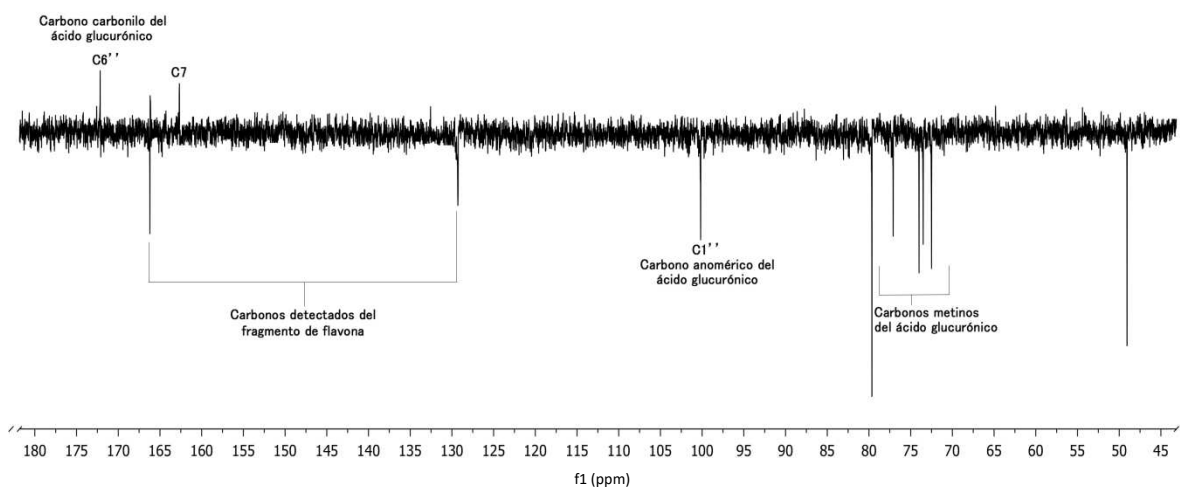


Figura 69. Espectro DEPTQ de flavonas aisladas de la parte aérea de *L. achyranthifolia* en DMSO- d_6

Los espectros unidimensionales y bidimensionales de RMN de protón y ^{13}C de 21-24C18LA (compuesto **11**), evidenciaron un mismo arreglo estructural del compuesto **6** descrito en el apartado 9.9. Por medio del espectro de masa de resolución baja adquirido en modo ESI positivo (Apéndice 17), se identificó al ion

molecular $m/z = 491.1$ correspondiente al fragmento $[M+H]^+$, el cual es consistente con la fórmula molecular $C_{23}H_{22}O_{12}$. Al obtener el mismo compuesto en las fracciones FP1 y FP2, es conveniente no efectuar ningún tratamiento adicional al precipitado; es más eficiente trabajar de manera conjunta ambas fracciones para enriquecer la obtención de tal compuesto durante el proceso de purificación realizado en columna de vidrio rellena con fase reversa.

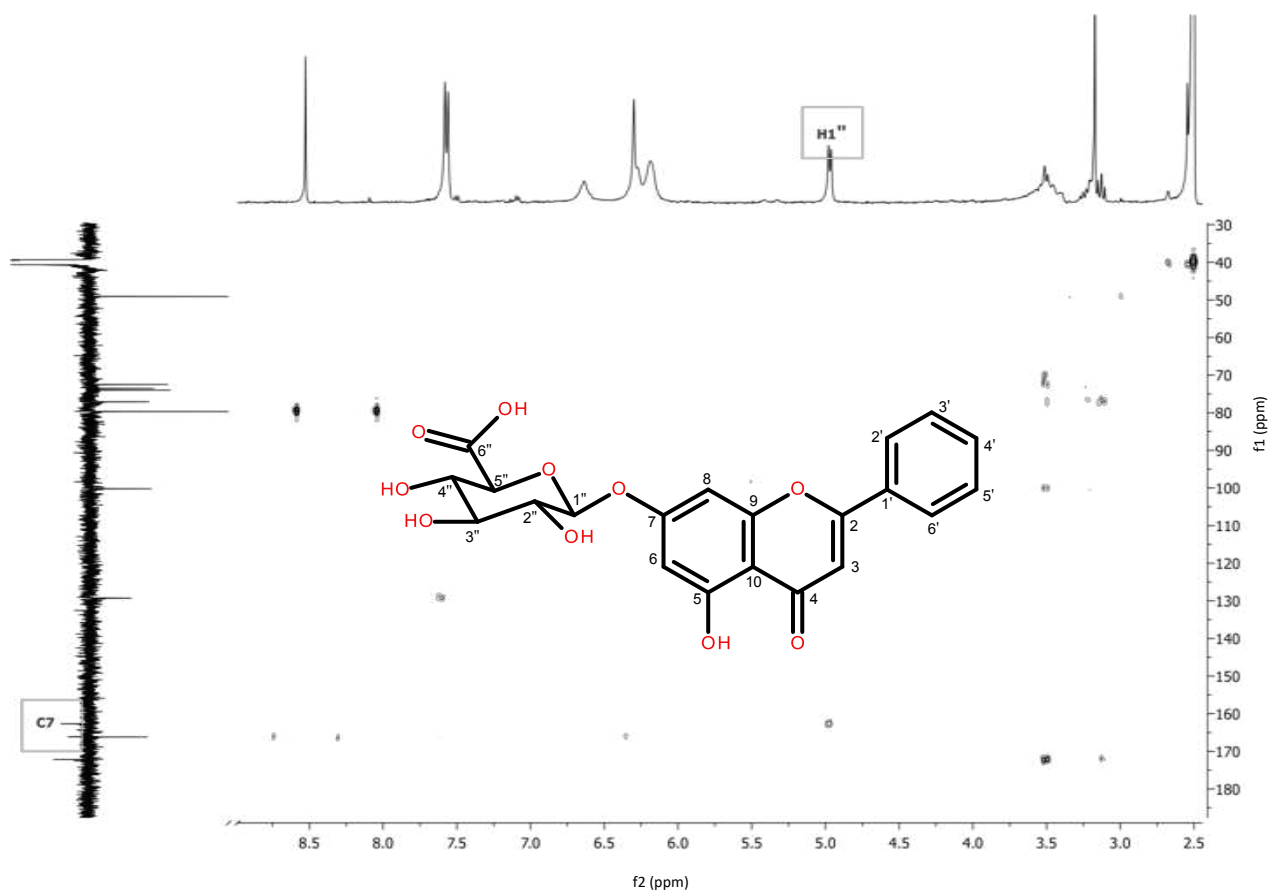


Figura 70. Espectro HMBC de flavona aislada de *L. achyranthifolia* en DMSO- d_6

9.13 Fraccionamiento del extracto metanólico de *T. densiflora*

La EAU de 100 g de raíz pulverizada de *T. densiflora* colectada en mayo de 2015 en el Jardín Botánico Chepilme-UMAR, proporcionó después de la evaporación del MeOH a presión reducida, $6.6 \pm 0.7\%$ de extracto crudo. El rendimiento obtenido en la partición del extracto con Hx fue bajo (0.24%), por ello, puede asumirse que los metabolitos secundarios son de naturaleza mediana y altamente polares; por lo tanto, la partición inicial con AcOEt es más adecuada. Los parámetros adecuados para llevar a cabo el fraccionamiento cromatográfico de las fracciones se ilustran en el Cuadro 21.

Cuadro 21. Fraccionamiento de componentes presentes en la raíz de *T. densiflora*

Planta	Fracción orgánica	Fase estacionaria	Fase móvil
<i>T. densiflora</i>	AcOEt	Gel de sílice	AcOEt:MeOH (8:2)
	MeOH agotado	C ₁₈	MeOH:H ₂ O (6:4)

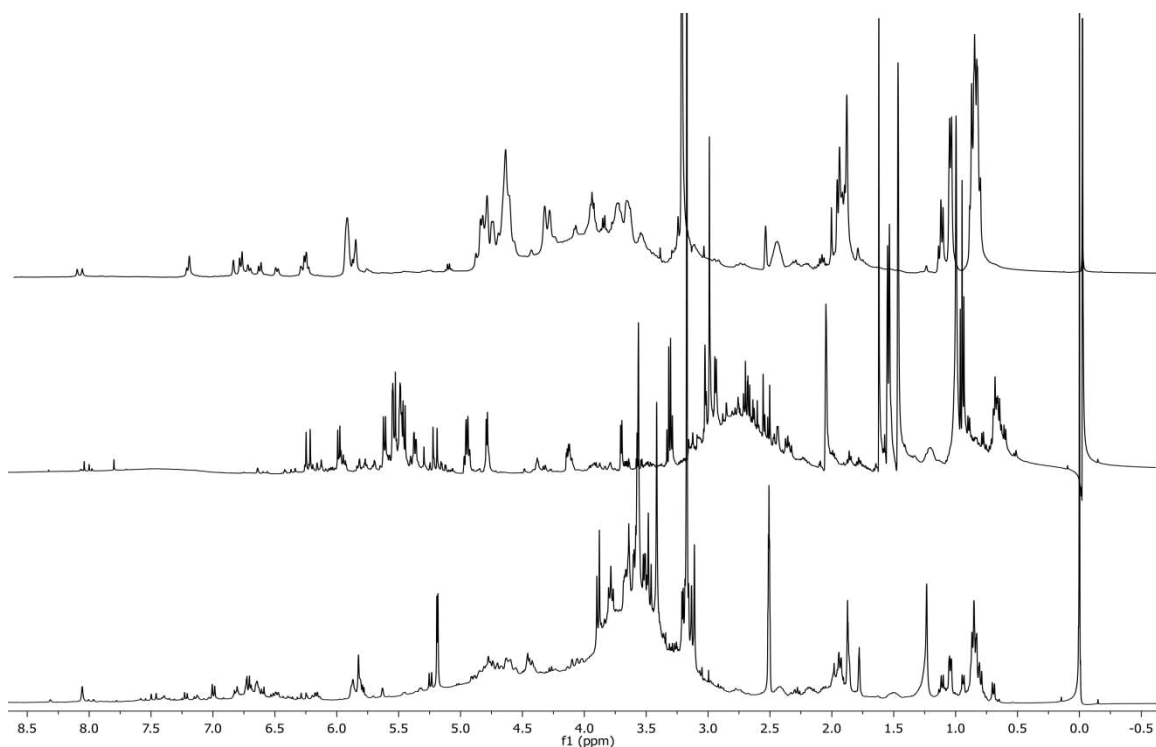


Figura 71. Espectros de RMN-¹H de *T. densiflora* en DMSO-*d*₆ (400 MHz)

* Extracto MeOH (trazo inferior), fracción AcOEt (trazo medio) y F. MeOH agotada (trazo superior)

En el extracto metanólico de *T. densiflora* se observaron señales de RMN de protones vinílicos en δ 7.01 y 6.18 ppm (Figura 71). También se puede apreciar la presencia de protones base de oxígeno entre δ 3.5-5.0 ppm, junto con la señal de hidrógenos alifáticos en δ 1.80, 1.90 y 0.80 ppm (Silverstein et al, 2005).

Del espectro de RMN- ^1H de la Fracción de AcOEt (trazo medio de Figura 71) obtenida de la extracción líquido-líquido (AcOEt: H_2O), se observaron señales intensas entre δ 4.5-6.5 ppm, lo cual era de esperarse por la extracción de compuestos de polaridad intermedia. En cuanto a la Fracción MeOH agotada obtenida de la columna empacada con amberlita, se pueden observar señales características de protones vecinos a oxígeno entre δ 3.7-3.9 ppm (Silverstein et al, 2005).

En el espectro de RMN- ^{13}C (Figura 72) se observó una señal de carbono en δ 86.2 ppm, esta señal se considera una señal diagnóstica para la presencia de un N-óxido (Constantinidis *et al.*, 1993). Considerando el antecedente de alcaloides pirrolizidínicos en la familia *Boraginaceae* (Crowley y Culvenor, 1955), es posible la presencia de un alcaloide pirrolizidínico en forma de N-óxido, pues adicionalmente sólo fue soluble en DMSO.

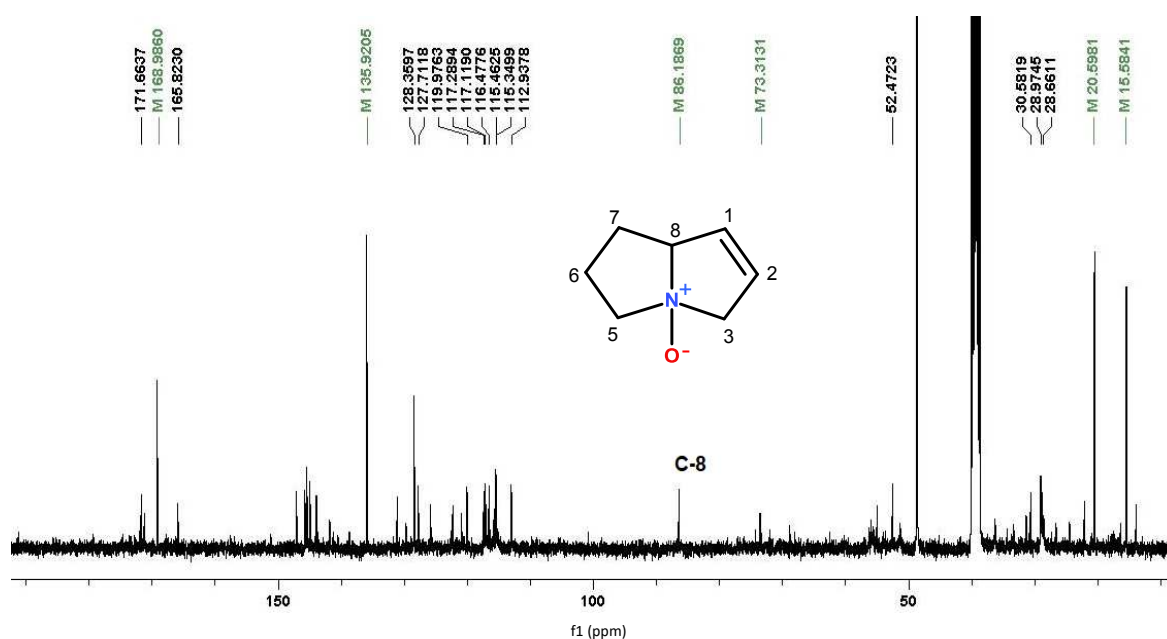


Figura 72. Espectro de RMN- ^{13}C de *T. densiflora* en $\text{DMSO-}d_6$ (100 MHz)

9.14 Aislamiento de alcaloides presentes en la raíz de *T. densiflora*

El reactivo de Dragendorff utilizado en la CCF sugiere la presencia de alcaloides en las diversas fracciones de Hx, CHCl_3 y AcOEt; estas dos últimas fracciones mostraron un perfil cromatográfico muy similar. Los rendimientos obtenidos (0.31-1.88%) pueden considerarse bajos con respecto a lo reportado en otros géneros de la familia *Boraginaceae*, donde se han extraído a los alcaloides con rendimientos del 1.3-4.3% (Medina *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en la reducción de los alcaloides N-óxidos, evidenciaron un incremento en la extracción de los alcaloides del 0.42% con respecto a la Fracción CHCl_3 descrita en la Sección 8.6.4.2. La mejora en el rendimiento puede atribuirse al uso del Zinc/HCl que incrementa la solubilidad de los alcaloides durante la acidificación que se efectúa por un tiempo más prolongado.

Del análisis de los espectros de RMN de protón y carbono-13, se observó la presencia de alcaloides pirrolizidínicos (AP). La identificación de estos metabolitos secundarios obtenidos durante la etapa de reducción, se ha efectuado por la comparación de las señales diagnósticas de los AP reportadas por Molyneux *et al.*, 1982 y Alvarez-Martínez 2004.

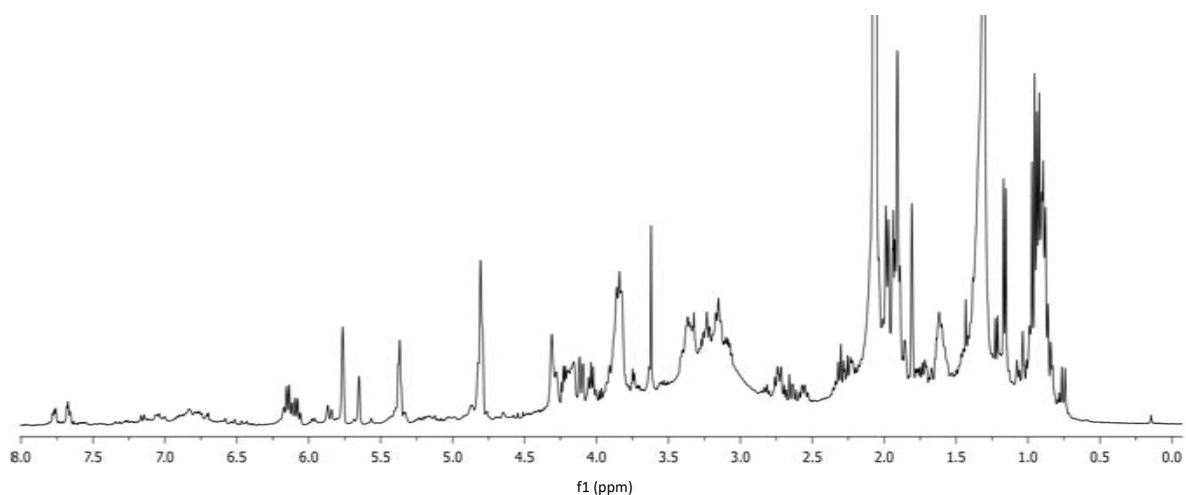


Figura 73. Espectro de RMN- ^1H de Fracción CHCl_3 tratada con Zinc/HCl de la raíz de *T. densiflora*

Del espectro de RMN- ^1H (Figura 73) de la Fracción CHCl_3 tratada con Zinc/HCl se observaron las señales características para AP insaturados no ciclizados en un

intervalo de δ 5.5-6.2 ppm y también se identificaron señales de protón base de éster en δ 5.37 ppm. En el espectro de RMN- ^{13}C , se observaron que los desplazamientos de carbono base de la necina, fueron consistentes con lo reportado en la literatura (Molyneux *et al.*, 1982 y Alvarez-Martínez., 2004). Las señales de C-1 y C-2 en δ 138.6 y 138.9 ppm sugieren la presencia de una insaturación en la base necina. El desplazamiento químico del C-3 adyacente al heteroátomo de nitrógeno usualmente sucede en aproximadamente δ 63.0 ppm. El carbono de la posición C-8 que tiene de vecino a C-7 y C-1, usualmente tiene un desplazamiento químico en un intervalo de δ 76.0-79.0 ppm y depende de las sustituciones que se presenten en C-1 y C-7. Las otras señales diagnósticas de los carbonos base del anillo pirrolizidínico pueden visualizarse en la Figura 74.

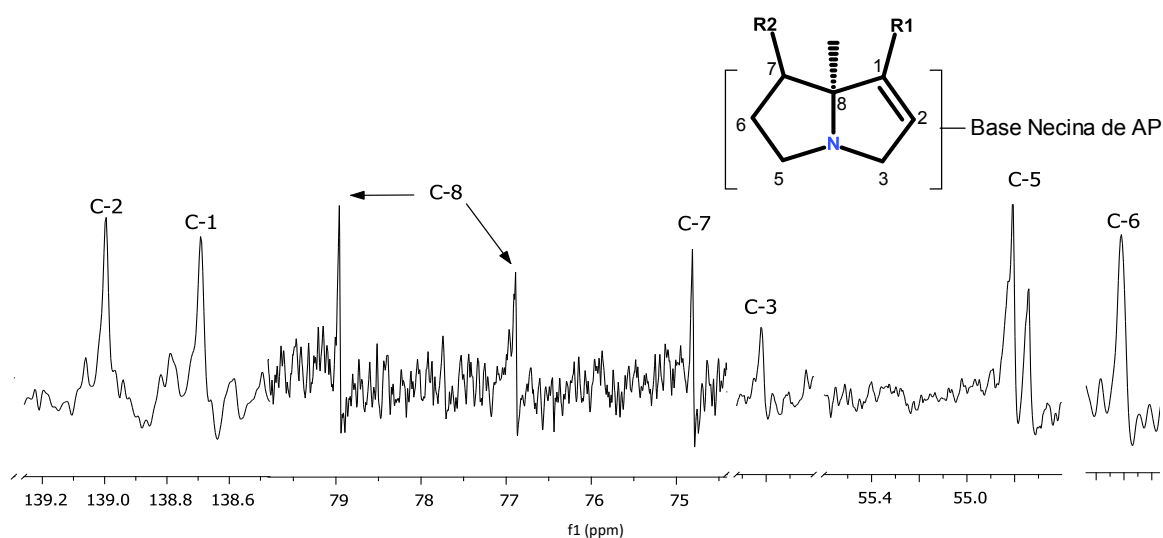


Figura 74. Sección del espectro de RMN- ^{13}C de Fracción CHCl_3 tratada con Zinc/HCl de *T. densiflora*

En la mayoría de los estudios *in vitro* e *in vivo* en las revisiones de Joosten y Van Veen., (2010), se destaca el potencial efecto antifúngico que pueden ejercer los AP en la inhibición del crecimiento de diversos hongos fitopatógenos. En los hongos del género *Phytophthora* y *Rhizoctonia*, se reportan valores CMI de 80 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estas evidencias, permiten suponer que quizás los compuestos bioactivos responsables de la actividad antifúngica de los extractos MeOH de la raíz de *T. densiflora*, pueden deberse al efecto individual o sinérgico de los AP.

9.15 Elucidación de alantoína aislada de la raíz de *T. densiflora*

De la cromatografía en columna de fase reserva del extracto MeOH agotado (1.1415 g) se aislaron 33 mg (2.89%) de cristales con punto de fusión de 228 °C. La prueba con el reactivo de Dragendorff sugirió la presencia de un alcaloide, que de acuerdo a los análisis espectroscópicos y espectrométricos, aunado a los datos espectrales reportados por Cova *et al.*, 2016, se confirmó que estos cristales correspondían con la molécula de alantoína (**12**), considerada como un marcador quimiotaxonómico de la familia *Boraginaceae* (Ortega-Fernández., 2006).

Estructuralmente, la alantoína se caracteriza por presentar un núcleo de cinco miembros denominado hidantoína que consta de dos átomos de nitrógeno y dos grupos carbonilo. En el heterociclo se logran identificar cuatro puntos de reactividad situados en las posiciones 1, 3 y 5; la funcionalización de esta última posición con compuestos aciltioureas tiene gran importancia en la industria de los agroquímicos, ya que ha permitido sintetizar moléculas con actividad fungicida que inhiben el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* en un intervalo del 71 al 79% (López *et al.*, 2018).

En fuentes vegetales, la alantoína es el principal producto extraído de las plantas que contiene el núcleo de hidantoína. En la Figura 75 se muestra el espectro de RMN-¹H, con la asignación de los protones correspondientes de dicho metabolito secundario. Las señales dobles presentes en δ 5.24 ppm (1H, d, $J= 8.0$ Hz) y 6.89 (1H, d, $J= 8.0$ Hz) que integra para un protón cada una, corresponden a los protones vecinales H5 y H6. La señal simple situada en δ 5.79 ppm (2H, s) que integra para dos protones, se asignó a H8 de una amida primaria. Por otra parte, las señales simples ubicadas en δ 8.05 ppm (1H, s) y 10.54 ppm (1H, s) se asignaron a los protones H3 y H1 que se encuentran enlazados a un heteroátomo de nitrógeno.

Para la asignación de los datos espectrales de ¹H y ¹³C se obtuvo el experimento HSQC, de donde se observó exclusivamente la correlación del protón metino H5 ubicado en δ 5.24 ppm (d, $J=8.0$ Hz) con la señal de carbono posicionado en

δ 62.9 ppm que fue asignada a C5. Esta correlación de protón-carbono observada, concuerda con lo reportado por Cova *et al.*, 2016 y a partir de la prueba positiva a la presencia de alcaloides, se dedujo que los protones H1, H3, H6 y H8 corresponden a protones base de nitrógeno.

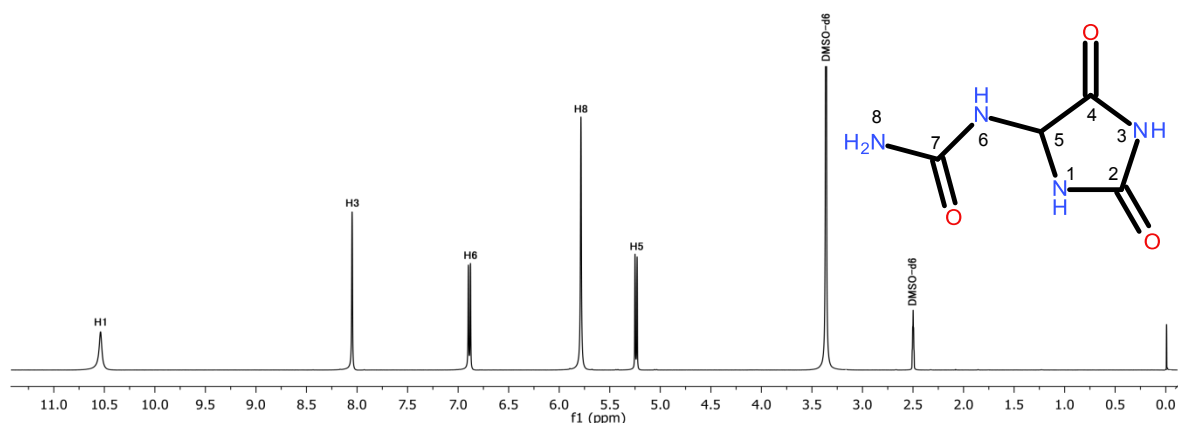


Figura 75. Espectro de RMN-¹H de alantoína aislada de la raíz de *T. densiflora* en DMSO-*d*₆ (400 MHz)

El espectro de RMN-¹³C (Figura 76) mostró un total de cuatro señales, que de acuerdo al experimento DEPTQ (Apéndice 22) se evidenció que los carbonos en δ 157.2, 157.8 y 174.1 ppm son cuaternarios, en tanto que la señal presente en δ 62.9 ppm corresponde a un metino (C5), lo que se confirmó con el experimento HSQC (Apéndice 23). La información proporcionada en este último experimento, refuerza lo ya descrito, por consiguiente, es lógico que los carbonos restantes pertenezcan a carboxílicos tipo amida.

Del experimento heteronuclear HMBC (Apéndice 24) se observó que los protones H6, y H8 presentaron correlación a dos enlaces de distancia con el carbono C7, en tanto que el protón H5 presentó una correlación a tres enlaces con los carbonos C2 y C7. Asimismo, se visualizó que los protones H5 y H6 se correlacionaron con el carbono C4 a dos y tres enlaces de distancia respectivamente. También se observó que H6 presentó una correlación a dos enlaces con C5. Referente al protón H3, se observó que mantiene correlaciones de corto (2 enlaces) y largo alcance (3 enlaces) con los carbonos C4 y C5.

Del experimento COSY (Apéndice 25), que muestra las correlaciones entre los diferentes protones, se observó acoplamiento a tres enlaces entre H5, H6 y a cuatro enlaces se apreció una correlación en forma de W entre los protones H3 y H5; este acoplamiento escalar de largo alcance entre estos dos últimos protones se atribuye a la geometría casi plana que prevalece en el heterociclo de la hidantoína. Finalmente, estas correlaciones observadas están de acuerdo con la alantoína reportada por Cova *et al.*, 2016.

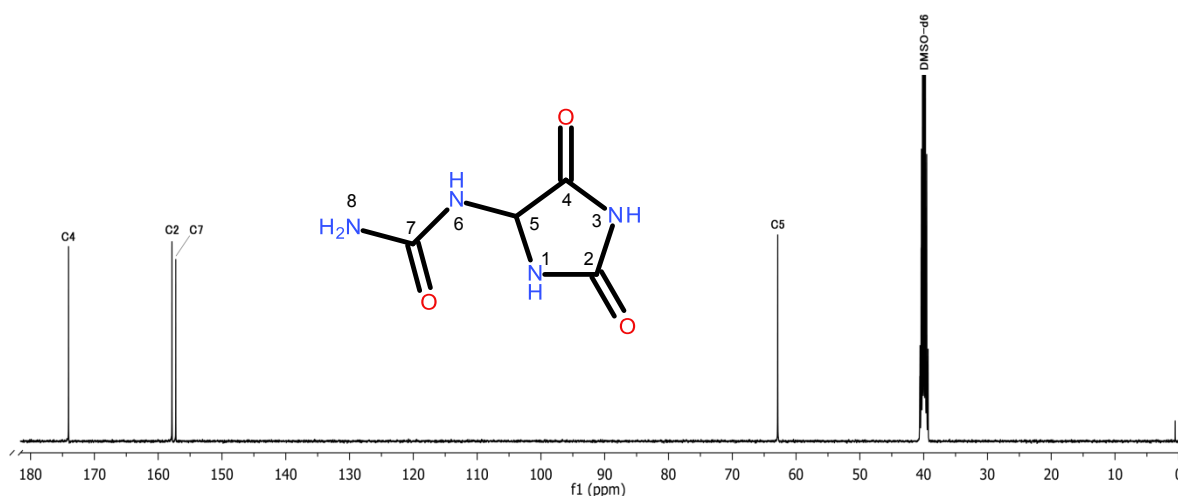


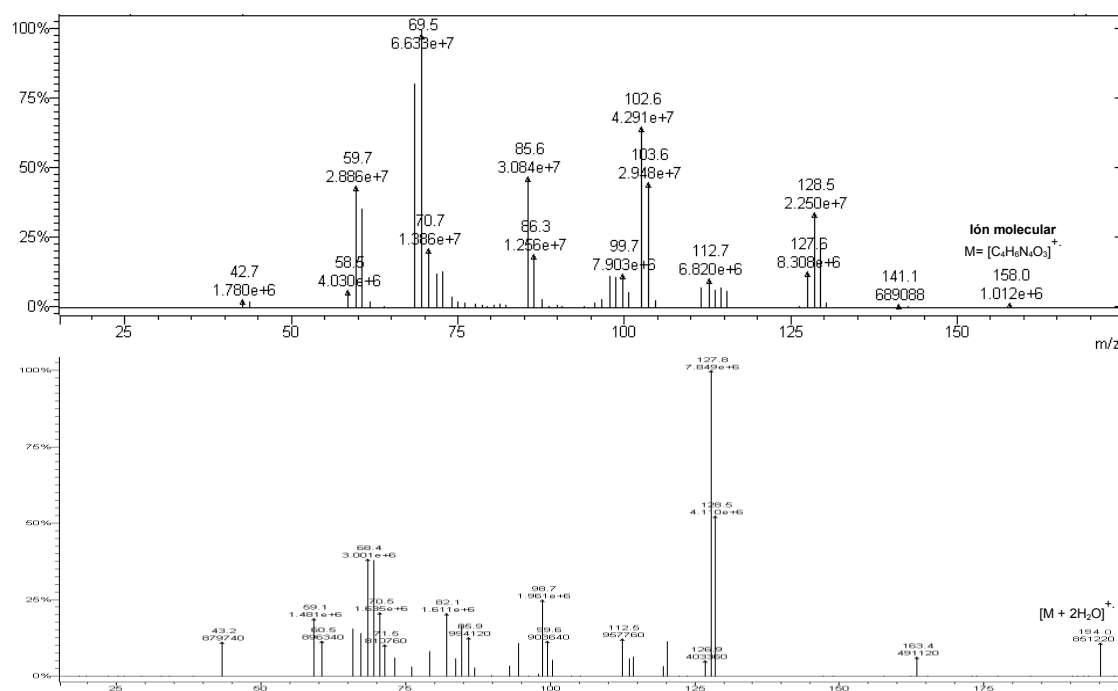
Figura 76. Espectro de RMN- ^{13}C de alantoína aislada de la raíz de *T. densiflora* en DMSO- d_6 (100 MHz)

En el Cuadro 22 se resumen los datos espectrales de RMN de ^1H y ^{13}C que han permitido llevar a cabo la caracterización estructural de la alantoína.

Del espectro de masa de resolución baja (Figura 77), efectuado por ionización electrónica a 70 eV en modo positivo se obtuvo que el pico del ion molecular presentó una relación m/z de 158 uma que concuerda con el número par de nitrógeno en la fórmula molecular $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_3$ de la alantoína. El ion fragmento con relación m/z de 194 uma puede justificarse por la hidratación del compuesto con dos moléculas de H_2O , ocurrida durante la cristalización.

Cuadro 22. Datos espectroscópicos de RMN-¹H [ppm, Mult., (J en Hz)] y ¹³C de **12** en DMSO-d₆

Posición	Alantoína (12)		
	δ_C	δ_H	HMBC (¹ H→ ¹³ C)
1	-----	10.54, s	-----
2	157.8	-----	-----
3	-----	8.05, s	62.9 (C5), 174.1 (C4), 157.8 (C2)
4	174.1	-----	-----
5	62.9	5.24, d, (8.0)	174.1 (C4), 157.8 (C2), 157.2 (C7)
6	-----	6.89, d, (8.0)	62.9 (C5), 174.1 (C4), 157.2 (C7)
7	157.2	-----	-----
8	-----	5.79, s	62.9 (C5), 157.2 (C7)

**Figura 77.** Espectro de masa de baja resolución de alantoína presente en la raíz de *T. densiflora*

9.16 Elucidación de mezcla de esteroides aislados de la raíz de *T. densiflora*

El sólido aislado (0.8 mg) de la fracción hexánica correspondió a una mezcla de estigmasterol y β -sitosterol (**13**). La identificación estructural se efectuó por la comparación de los datos experimentales de RMN obtenidos con los datos reportados en la literatura (Peña-Andrade 2011., Puma-Araujo 2013., Prieto *et al.*, 2011).

Analizando el espectro de RMN-¹H (Figura 78) se detectó que en un intervalo de δ 0.70-1.03 ppm existen varias señales de metilo que son típicas de los esteroides. En primera instancia, se destacan las señales simples situadas en δ 0.70 y 1.03 ppm que corresponden a los hidrógenos H18 y H19. De la cadena lateral del ciclopentano, se identificó que la multiplicidad del protón H21 se relaciona con una señal doble ubicada en δ 0.95 ppm. Las señales presentes en δ 0.88 ppm corresponden a los protones metilos H26 y H27, dado que tienen un ambiente químico similar se observó que estas señales se encuentran solapadas entre sí. También se observó que la señal triple ubicada en δ 0.83 ppm, pertenece al metilo H29.

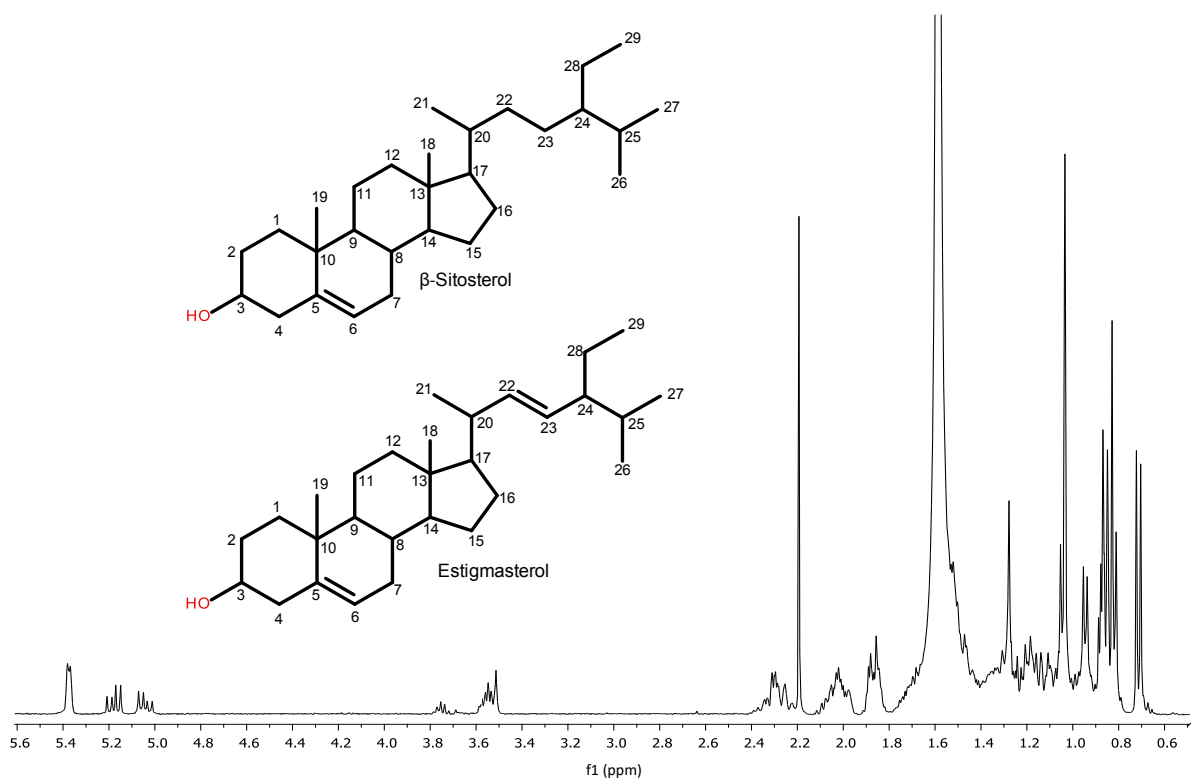


Figura 78. Espectro RMN-¹H de la mezcla de esteroides de la raíz de *T. densiflora* en CDCl₃ (400 MHz)

En la Figura 79, se muestran las señales que pueden ser utilizadas para el diagnóstico de la estructura base de los esteroides. En esta sección ampliada del espectro de RMN-¹H, se observó que las señales dobles de doble situadas en δ 5.04 ppm (dd, $J = 15.1, 8.6$ Hz) y 5.18 ppm (dd, $J = 15.1, 8.6$ Hz) se acoplan entre sí y

son características de los protones vinílicos H22, H23 del estigmasterol. A frecuencia más alta se observó una señal doble en δ 5.37 ppm (d, $J = 4.8$ Hz) que, de acuerdo a la estructura de los esteroides, corresponde al protón olefínico H6.

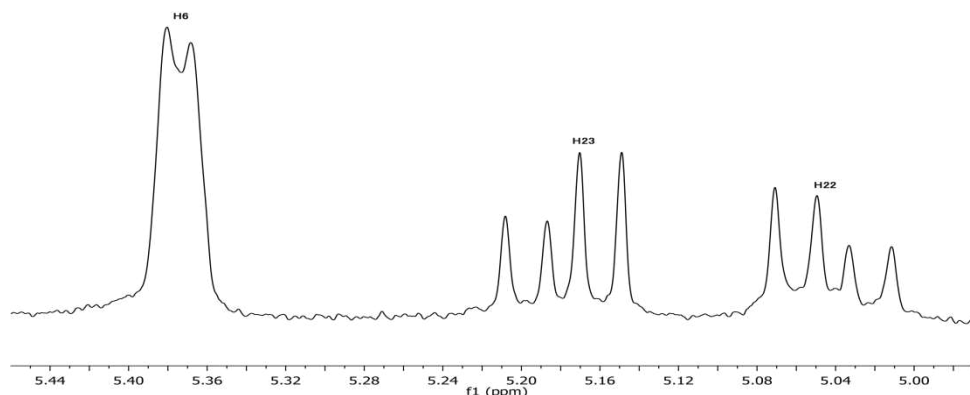


Figura 79. Sección ampliada del espectro de RMN-¹H de señales diagnósticas de esteroides

En el espectro DEPTQ (Figura 80), se observó que la señal de carbono en δ 71.8 ppm puede corresponder al carbono C3 con un sustituyente hidroxilo; esta asignación se efectúa con base a que en el espectro de RMN-¹H se observó una señal múltiple en δ 3.55 ppm que corresponde al protón base de oxígeno H3. Adicionalmente, se detectó la señal diagnóstica del C6 en δ 121.7 ppm. Finalmente, todos los datos espectroscópicos informados en esta tesis, coinciden con los trabajos de los autores citados inicialmente, en los cuales se identificaron las mezclas de isómeros de estigmasterol y β -sitosterol.

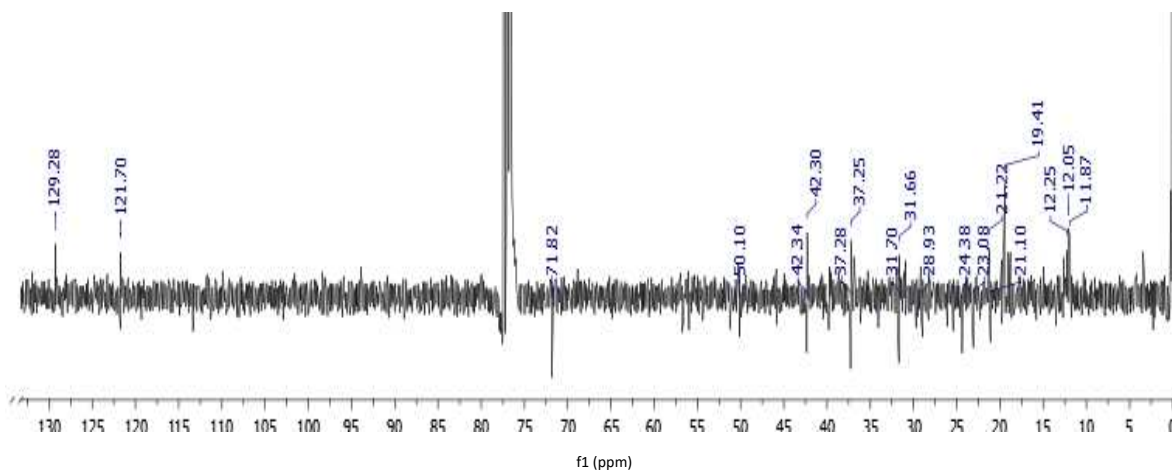


Figura 80. Espectro de RMN-¹³C de los esteroides presentes en raíz de *T. densiflora* en CDCl₃ (100 MHz)

9.17 Actividad inhibitoria sobre el crecimiento micelial radial

En la búsqueda de compuestos naturales con actividad antifúngica, se escogieron dos plantas previamente utilizadas en ensayos *in vitro* contra hongos filamentosos. La evaluación del porcentaje de inhibición micelial de los extractos, fracciones y azoxistrobin, mediante la técnica de incorporación de los tratamientos a los bloques de cultivos fúngicos condujo a los resultados presentados en el Cuadro 23, en la cual, se puede observar una variación alta en la respuesta de inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *R. solani*.

Cuadro 23. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento radial micelial de *F. oxysporum* y *R. solani*

Tratamiento	Concentración	Cultivo fúngico	
	mg/mL	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. solani</i>
Azoxistrobin (Ctrl +)	2.4	67.75 ± 4.88	64.47 ± 2.88
	1.2	63.52 ± 4.56	58.65 ± 1.62
	0.12	29.86 ± 2.24*	51.03 ± 2.41*
Extracto MeOH crudo de <i>L. achyranthifolia</i>	100	-14.21 ± 1.03	43.37 ± 9.48*
	50	-2.12 ± 4.91*	-76.09 ± 6.91
	25	-6.73 ± 1.23	-81.16 ± 4.18
Fracción MeOH_3C ₁₈ de <i>L. achyranthifolia</i>	25	-4.20 ± 0.32	-13.17 ± 4.31*
	12.5	3.53 ± 4.68	-77.28 ± 5.65*
	6.25	-3.40 ± 3.09	-31.26 ± 9.44*
Fracción No Polar de <i>L. achyranthifolia</i>	25	-14.25 ± 4.94	34.75 ± 12.96
	12.5	-12.17 ± 12.12	25.65 ± 8.39
	6.25	-8.21 ± 4.55	-155.05 ± 2.36*
Extracto MeOH crudo de <i>T. densiflora</i>	100	4.52 ± 2.25	78.26 ± 12.81*
	50	-6.57 ± 2.89*	-32.17 ± 12.09
	25	6.28 ± 1.48	-29.40 ± 9.12
Fracción reducida de alcaloides de <i>T. densiflora</i>	25	5.07 ± 5.29	-52.86 ± 0.47*
	12.5	2.12 ± 1.89	-29.89 ± 12.62*
	6.25	9.13 ± 4.17	-151.29 ± 2.34*
Fracción reducida de alcaloides con impurezas de <i>T. densiflora</i>	25	-4.17 ± 2.08	20.12 ± 5.23*
	12.5	3.99 ± 8.69*	-120.33 ± 4.14*
	6.25	-10.81 ± 1.29*	-151.63 ± 2.20*

Los resultados se expresan como el promedio ± Desviación estándar. (n=3)

Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey

* La diferencia significativa entre cada tratamiento y el control positivo se muestran como p < 0.05

Es importante señalar que el DMSO utilizado en la preparación de cada uno de los tratamientos no presentó ningún tipo de interferencia en los resultados obtenidos, ya que durante el transcurso de la evaluación biológica no mostró actividad inhibitoria y, en consecuencia, los efectos de inhibición se atribuyeron directamente a los tratamientos.

Notablemente, se observó que los tratamientos de *L. achyranthifolia* (extracto y fracciones) no presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *F. oxysporum* y de acuerdo al análisis ANOVA, se determinó que ambas fracciones evaluadas no presentaron diferencias significativas en cada una de las concentraciones evaluadas. Referente al extracto, se evidenció que la concentración de 50 mg/mL presentó diferencia estadísticamente significativa respecto a las otras dos concentraciones evaluadas en dicho tratamiento. De acuerdo al análisis espectroscópico y al nulo efecto inhibitorio, es posible afirmar que los tratamientos EMLA, F3C18LA y FNPOLA proporcionan compuestos ricos en carbono y azúcares en forma de glucósidos, mismos que el hongo es capaz de asimilar y aprovecharlo para su beneficio en la producción del micelio. Resultados similares a los aquí descritos, se han reportado para el tratamiento EMLA contra la especie de *F. solani*, sin embargo, a la concentración de 100 mg/mL se visualizó un ligero efecto de inhibición en el crecimiento micelial del $12.5 \pm 0.87\%$ (Lira-De León *et al.*, 2014). Hasta este punto, no se había comparado la susceptibilidad entre estas dos especies fúngicas ante un mismo extracto vegetal; por lo tanto, con base en los resultados obtenidos se determina que existe diferencia en el crecimiento micelial radial entre *F. solani* y *F. oxysporum*; siendo más agresivo este último ya que contrario a inhibir, se estimula su crecimiento a nivel extracto y fracciones, tal como se ilustra en la Figura 81.

En relación a la inhibición del crecimiento micelial de *R. solani*, se observó que los tratamientos más activos contra dicho fitopatógeno fueron EMLA y FNPOLA con valores de 43.37 ± 9.48 y $34.75 \pm 12.96\%$, los cuales se correlacionaron en gran medida a los observados con el fungida comercial azoxistrobin ($51.03 \pm 2.41\%$,

0.12 mg/mL). En contraparte, el tratamiento F3C18LA promovió el crecimiento micelial en un intervalo de 13.17 ± 4.31 a $77.28 \pm 5.65\%$.

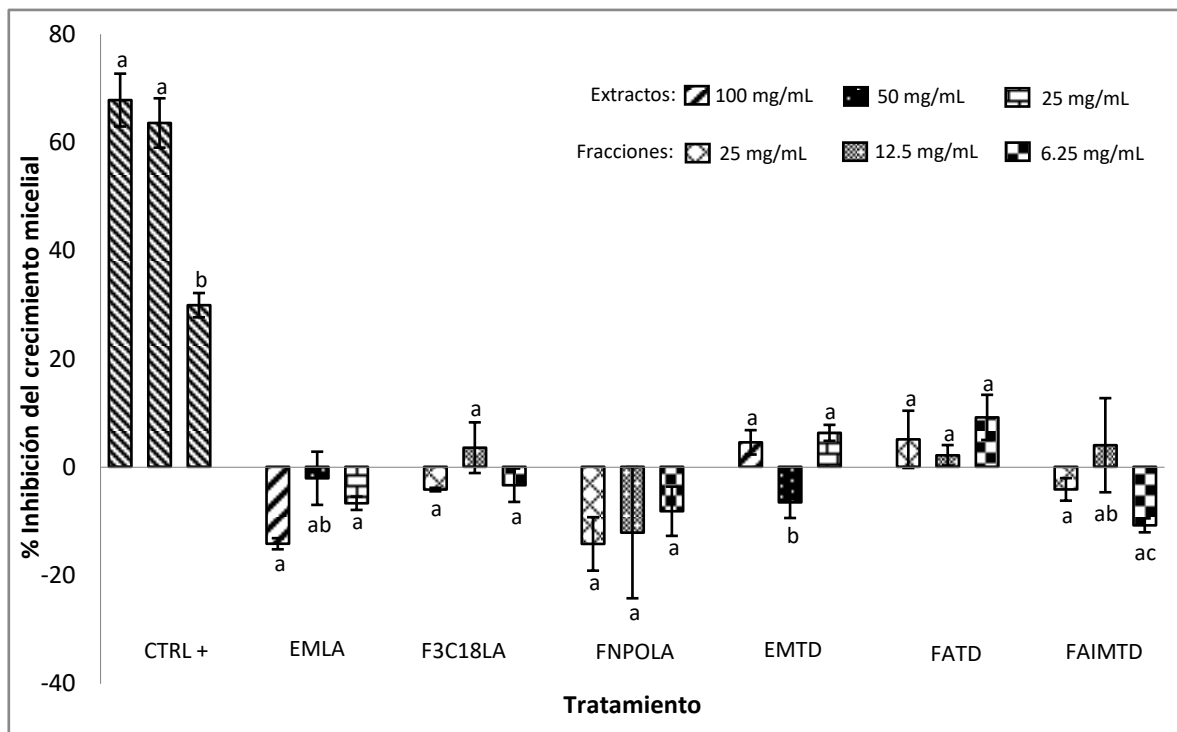


Figura 81. Efecto de los extractos metanólicos (%) de las partes aéreas de LA (EMLA) y raíces de TD (EMT), fracción polar y no polar de LA (F3C18LA, FNPOLA), fracción de alcaloides puros y en mezcla de TD (FATD, FAIMTD) en diferentes concentraciones contra *F. oxysporum*. Las especies vegetales, LA= *Lantana achyranthifolia*, TD= *Tournefortia densiflora*. Las diferentes respuestas observadas a tres concentraciones en cada tratamiento están marcadas con letras diferentes (Tukey; $P= 0.05$).

CTRL+= Azoxistrobin (2.4, 1.2 y 0.12 mg/mL).

En estas pruebas biológicas se percató que la variable concentración desempeñó un papel importante en la inhibición del crecimiento micelial; así pues, podemos observar en la Figura 82 que el tratamiento EMLA inhibió sustancialmente el crecimiento micelial de *R. solani* cuando fue evaluado a una concentración de 100 mg/mL; sin embargo, esta eficacia inhibitoria se redujo cuando las concentraciones se diluyeron a 50 y 25 mg/mL de extracto. Estadísticamente estas dos últimas concentraciones no presentaron diferencias significativas entre sí y por lo tanto, promovieron en una misma proporción el crecimiento micelial radial.

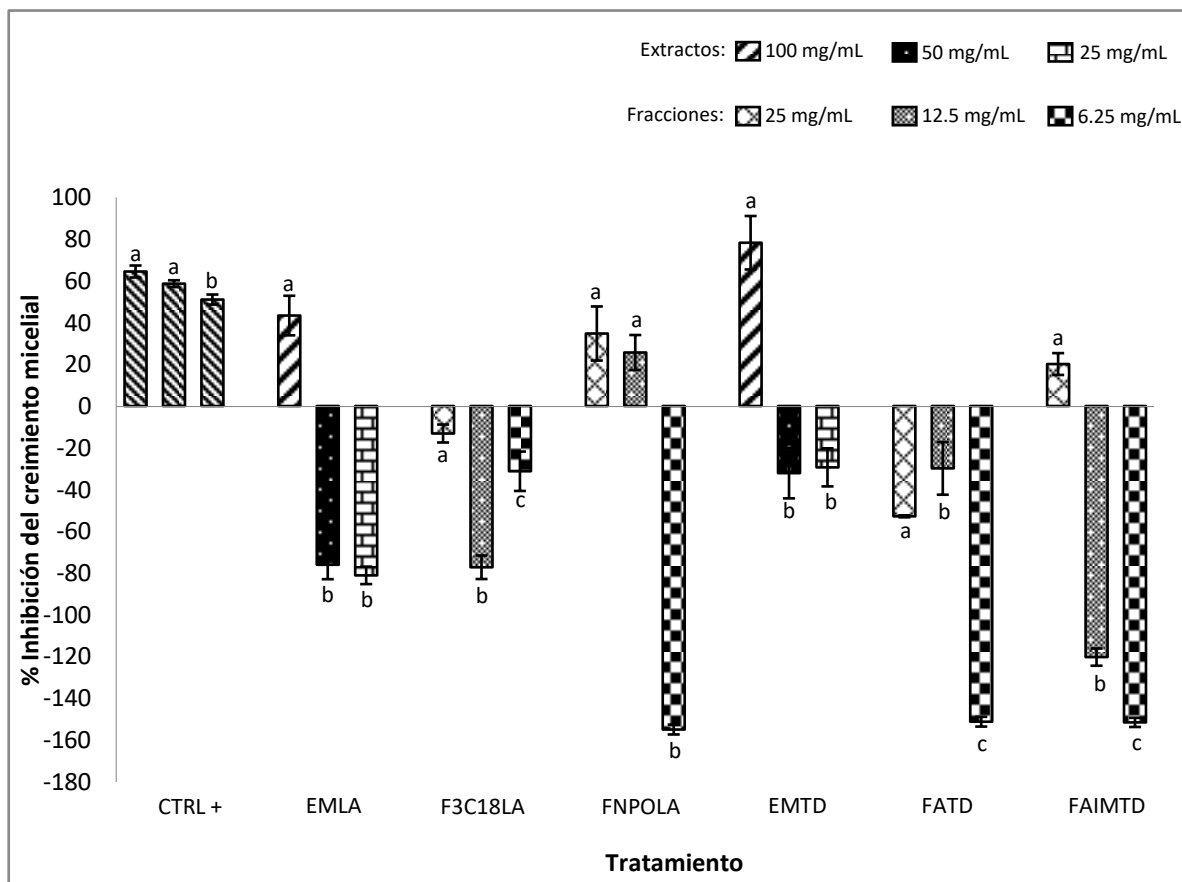


Figura 82. Efecto de los extractos metanólicos (%) de las partes aéreas de LA (EMLA) y raíces de TD (EMT), fracción polar y no polar de LA (F3C18LA, FNPOLA), fracción de alcaloides puros y en mezcla de TD (FATD, FAIMTD) en diferentes concentraciones contra *R. solani*. Las especies vegetales, LA= *Lantana achyranthifolia*, TD= *Tournefortia densiflora*. Las diferentes respuestas observadas a tres concentraciones en cada tratamiento están marcadas con letras diferentes (Tukey; $P=0.05$). CTRL+= Azoxistrobin (2.4, 1.2 y 0.12 mg/mL).

Cabe resaltar que la fracción FNPOLA presentó el mismo comportamiento descrito para EMLA, a la concentración más alta (25 mg/mL) empleada en el presente estudio, provocó un efecto notorio de inhibición en el crecimiento micelial de *R. solani* y este efecto inhibitorio disminuyó significativamente cuando el tratamiento evaluado se diluyó en una proporción 1:4 (12.5 mg/mL de extracto). Estos efectos exhibidos en ambos tratamientos pueden relacionarse con el fenómeno de hormesis, el cual, se produce en función a la implementación de concentraciones bifásicas que desarrolla en el microorganismo efectos tóxicos a dosis altas y estimula efectos benéficos a una dosis baja (Mattson, 2008). En plantas del

género *Lantana* es muy común observar este tipo de respuesta hormética, de hecho Lira de León *et al* (2014) ha descrito estos efectos del extracto MeOH de *L. achyranthifolia* contra hongos filamentosos como *F. solani* y *A. alternata*. Recientemente, Veraplakorn (2018) demostró que los extractos acuosos de *Lantana camara* también tienen efectos horméticos sobre el crecimiento de las plántulas de *Brassica*, esta observación sugiere el uso de los extractos acuosos del género *Lantana* como una alternativa viable para el desarrollo de herbicidas naturales.

El fraccionamiento cromatográfico de FNPOLA aún no se ha realizado, sin embargo, Silva *et al.*, (2010) revelaron que fracciones de naturaleza no polar contienen aproximadamente la misma composición química presente en los aceites esenciales. En este contexto, Hernández *et al.*, (2008) argumentaron que el potencial antifúngico de los aceites esenciales de *L. achyranthifolia* contra el hongo fitopatógeno *R. solani* se debe principalmente a la interacción sinérgica de sesquiterpenos y monoterpenos, tales como carvacrol, α -bisabol, isocariofileno, α -terpenil acetato, *m*-xymeno y timol. La presencia de estos metabolitos en la fracción FNPOLA podría respaldar su actividad antifúngica; sin embargo, es necesario continuar con el estudio fitoquímico detalladamente a fin de determinar tales componentes químicos.

Concerniente a los tratamientos evaluados para *T. densiflora*, se encontró que tanto el extracto y las fracciones mostraron diferencias significativas altas en la inhibición de ambas cepas fúngicas, encontrándose una actividad fúngica alta contra *R. solani* y un ligero efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de *F. oxysporum*. En las concentraciones evaluadas del EMTD, se observó que a 50 mg/mL se estimuló el crecimiento de *F. oxysporum* en un $6.57 \pm 2.89\%$, este mismo efecto se presentó en las concentraciones de 25 mg/mL y 6.25 mg/mL del tratamiento FAIMTD (4.17 ± 2.08 y $10.81 \pm 1.29\%$, respectivamente). Retomando los resultados de la evaluación *in vitro* del EMTD contra *F. solani* (Lira *et al.*, 2014), se demuestra efectivamente que el efecto ejercido por un extracto vegetal puede presentar variaciones en su respuesta antifúngica ante fitopatógenos del

mismo género. En contraste a lo observado en estos tratamientos descritos, se encontró que las concentraciones de FATD evaluadas en el intervalo de 25 a 6.25 mg/mL presentaron un ligero efecto inhibitorio en el crecimiento de *F. oxysporum* (2.12 ± 1.89 a $9.13 \pm 4.17\%$) y de acuerdo al análisis fitoquímico dicho efecto se atribuyó principalmente a la presencia tóxica de los alcaloides pirrolizidínicos en su forma reducida.

En relación a los efectos producidos en *R. solani*, se observó que ninguna de las fracciones probadas del EMTD presentó actividad antifúngica (Figura 82). El análisis de estos resultados, sugiere que *R. solani* a diferencia *F. oxysporum* ha logrado adaptarse a cierta concentración de AP. Esta sugerencia de susceptibilidades se atribuye en gran medida a que algunos hongos en condiciones de estrés pueden utilizar los AP como una fuente de nitrógeno para favorecer la estimulación de su crecimiento (Joosten y van Veen, 2011).

En otro orden de ideas, se observó que los efectos mostrados por el tratamiento EMLA contra *R. solani* se asemejan en gran medida al fenómeno de la hormesis ya descrito, pues a una concentración alta se produjo un fuerte efecto inhibitorio que cambió a una promoción del crecimiento micelial cuando se evaluó a concentraciones bajas (Figura 82). El porcentaje de inhibición micelial proporcionado por este tratamiento fue superior con respecto a la respuesta obtenida con el control positivo azoxistrobin, que a concentración de 2.4 mg/mL exhibió un efecto inhibitorio de $64.47 \pm 2.88\%$.

Este trabajo de investigación inicialmente se centró en el aislamiento de los AP, porque se esperaba en primera instancia que éstos fueran los responsables de ejercer la respuesta antifúngica, sin embargo esto no ocurrió en *R. solani* y una explicación ante este hecho sería que este hongo tiene la capacidad de usar estos compuestos nitrogenados como suplementos de carbono que contribuyen en el engrosamiento de su pared celular (Joosten y van Veen, 2011).

Aún no existen estudios que revelen específicamente el potencial antifúngico del tratamiento EMTD sobre las especies de hongos que causan la marchitez en el

cultivo del chile. Con base en la exploración fitoquímica realizada en este trabajo, presuntivamente se supone que los metabolitos responsables del efecto antifúngico en este extracto se deben en gran medida al efecto sinérgico de compuestos polares, como puede ser la síntesis de compuestos fenólicos de los cuales ya se ha reportado actividad antifúngica en hongos filamentosos como *A. alternata*. El mecanismo de inhibición sugiere que estos compuestos tal vez formen complejos con las proteínas extracelulares del hongo y derivado de esta interacción se genera una disrupción de la pared celular que repercute en la germinación de conidios y el crecimiento del micelio (Rodríguez *et al.*, 2015).

En conclusión, estos resultados *in vitro* demostraron que los extractos pueden atenuar el crecimiento fúngico de *R. solani*, más no así a *F. oxysporum* en el que prácticamente la actividad antifúngica es nula en los tratamientos de *L. achyranthifolia* y por ello ya no se continuó con la evaluación biológica a nivel de compuestos puros. Finalmente, con base en la revisión bibliográfica presentada, se puede considerar efectuar la evaluación antifúngica de estos tratamientos en otras especies de hongos de importancia agrícola.

9.18 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria

La bioactividad de CMI realizada por el método de dilución se evaluó exclusivamente en *F. oxysporum*, esto debido a que la cepa de *R. solani* no produjo esporulación bajo las condiciones de cultivo especificadas por el proveedor.

Los resultados *in vitro* mostraron que los tratamientos evaluados fueron capaces de inhibir en cierto grado la producción de esporas. En la Figura 83, se puede observar que los tratamientos a concentraciones de 97.65 y 24.41 $\mu\text{g/mL}$ (Tubos Núm. 11) fueron los que afectaron de forma apreciable la esporulación de *F. oxysporum*. Por medio de observaciones microscópicas (datos no mostrados), se encontró que estos tratamientos generaron una reducción en el número de esporas, en tanto que los extractos y fracciones evaluadas inicialmente a 100 y 25 mg/mL fueron los que presentaron alta producción de esporas. Resultados similares a los que aquí se describen también fueron obtenidos por Rodríguez *et al.*, (2015); al aplicar extractos fenólicos contra *F. oxysporum* lograron observar una reducción significativa del 85% en su respuesta de esporulación.

Por los resultados obtenidos en el estudio químico de *L. achyranthifolia* y *T. densiflora*, se afirma que los efectos observados en la esporulación de *F. oxysporum* está asociado principalmente con la producción de compuestos del tipo flavona, AP, iridoides y feniletanoides glucósilados. Con base a este tamizaje químico, se establece que el grado de afectación mostrado por cada uno de los tratamientos se asocia directamente con la concentración de estos metabolitos secundarios. Esta diferencia en la composición química, explica el porqué los tratamientos de ambas especies vegetales provocan en el hongo diferentes niveles de esporulación.

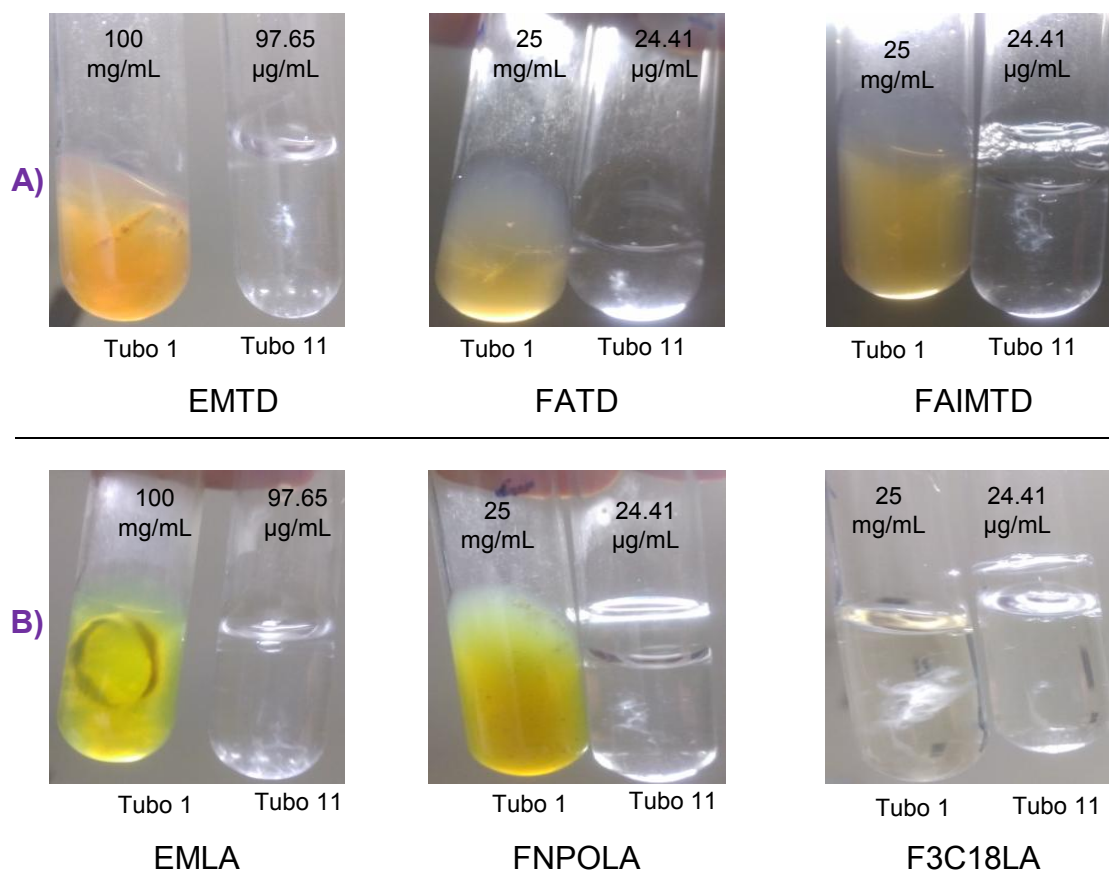


Figura 83. CMI de los extractos metanólicos y fracciones de A) *T. densiflora* y B) *L. achyranthifolia* contra *F. oxysporum*. Los tubos etiquetados como 1 y 11 representan la concentración inicial y final a la cual se evaluaron tanto extractos y fracciones. En los tratamientos diluidos a concentraciones de 97.65 y 24.41 µg/mL (extractos y fracciones) se redujo la esporulación de hongo.

En resumen, todos los tratamientos evaluados mostraron producción de esporas y por ello no fue posible determinar el valor de la CMI. Debido a que los tratamientos diluidos redujeron la producción de esporas, se sugiere continuar evaluando estos tratamientos a concentraciones menores a las reportadas en el presente trabajo a fin de poder observar si realmente se inhibe por completo la esporulación o se mantiene constante con la última concentración aquí reportada.

10. CONCLUSIONES

■ La Extracción Asistida por Ultrasonido proporcionó extractos crudos de *L. achyranthifolia* y *T. densiflora*, con rendimientos del 18.2 ± 1.4 y $5.8 \pm 0.7\%$, respectivamente.

■ El estudio químico del extracto metanólico de la parte aérea de *L. achyranthifolia* condujo al aislamiento de 6 glucorónidos de flavona, 4 iridoides glucosilados y un feniletanoide. Entre los iridoides aislados, se encontró que el glucurónido-8-epiloganina posee una estructura que aún no se ha descrito en la literatura para ninguna fuente vegetal.

■ Del extracto metanólico procedente de la raíz de *T. densiflora* se aisló e identificó por cromatografía en fase reversa, técnicas espectroscópicas de RMN y espectrometría de masa, las estructuras químicas de estigmasterol, β -sitosterol y alantoína que es considerada un marcador quimiotaxonómico de la familia de las *Boraginaceae*. Adicionalmente, se obtuvieron fracciones enriquecidas en alcaloides pirrolizidínicos.

■ Todos los compuestos purificados en este trabajo, se describen por primera vez en cada una de las fuentes vegetales estudiadas. La caracterización espectroscópica de dichos metabolitos representa una contribución fitoquímica importante en el conocimiento de los constituyentes de estas plantas en estudio.

■ Los resultados de la actividad antifúngica *in vitro* mostraron que los extractos metanólicos de *L. achyranthifolia* y *T. densiflora* evaluados a la concentración de 100 mg/mL, inhibieron el crecimiento micelial radial de *R. solani* en porcentajes equiparables con el fungicida comercial (azoxistrobin). Estos tratamientos no presentaron efectos inhibitorios significativos en el crecimiento micelial de *F. oxysporum*. Este comportamiento diferencial entre estos dos hongos de importancia agrícola en el cultivo del chile, sugiere mecanismos de defensa más evolucionados para *F. oxysporum*.

■ Referente a las fracciones evaluadas, se encontró que el tratamiento FATD procedente del extracto de *T. densiflora* presentó un ligero efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de *F. oxysporum*; en tanto que el tratamiento FNPOLA proveniente del extracto de *L. achyranthifolia* presentó actividad antifúngica sobre *R. solani*. En los tratamientos evaluados a concentraciones diluidas, se observó un efecto denominado hormesis, que estimuló el crecimiento micelial de las cepas.

■ La evaluación de la concentración mínima inhibitoria en condiciones *in vitro* mostró que los tratamientos de *L. achyranthifolia* y *T. densiflora* redujeron significativamente la producción de esporas de *F. oxysporum*. Con base en el estudio químico desarrollado y a las evidencias citadas en la literatura, se sugiere que dicha actividad biológica puede estar mediada por la presencia de compuestos fenólicos, alcaloides, monoterpenos, sesquiterpenos, iridoides y feniletanoides glucósilados.

11. PERSPECTIVAS

1. La información generada en esta Tesis de Maestría es sumamente valiosa ya que ha sentado las bases para futuras investigaciones que han de centrarse en el aislamiento en mayor proporción del nuevo compuesto denominado glucurónido-8-epiloganina, a fin de poder obtener toda su información química. En este sentido, se sugiere obtener la espectrometría de resolución alta de dicho compuesto, a fin de validar la estructura propuesta a través de la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protón y carbono -13.
2. Para validar el análisis conformacional de la 8-epiloganina desarrollada a un nivel de Método Semiempírico de Estructura Electrónica PM3, se propone efectuar un cálculo teórico más robusto de Teoría de Funcionales del Densidad; con la implementación del paquete IR-NMR-B3LYP/6-311++G(d,p) se obtendrán los desplazamientos teóricos de RMN de ^1H y ^{13}C que se pueden comparar con los valores experimentales obtenidos en solución. Adicionalmente, este tipo de cálculo teórico podría apoyar la estructura análoga propuesta para el glucurónido-8-epiloganina.
3. Debido a que la fracción no polar de *Lantana achyranthifolia* (FNPOLA) mostró potencial para inhibir el crecimiento micelial *in vitro* de *Rhizoctonia solani*, se propone que en las próximas investigaciones, los esfuerzos se centren en el fraccionamiento cromatográfico de esta fracción.
4. Por último, se propone seguir trabajando en el fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico de las raíces de *Tournefortia densiflora* (EMTD), ya que este extracto representa una fuente potencial para encontrar compuestos antifúngicos contra *Rhizoctonia solani*.

12. REFERENCIAS

- Abeygunawardena, C., Kumar, V., Marshall, D. S., Thomson, R. H., & Wickramaratne, D. M. (1991). Furanonaphthoquinones from two *Lantana* species. *Phytochemistry*, 30(3), 941-945.
- Albañil Juárez, J. A., Mariscal Amaro, L. A., Martínez Martínez, T. O., Anaya López, J. L., Cisneros López, H. C., & Pérez Ramírez, H. A. (2015). Estudio regional de fitopatógenos asociados a la secadera del chile en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (11), 2191-2197.
- Alvarez-Martínez, A. T. (2004). Aislamiento, purificación e identificación de principios tóxicos alcaloidales en plantas del genero *Crotalaria* y alimento contaminado para aves. Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química.
- Andary, C., Wylde, R., Laffite, C., Privat, G., & Winternitz, F. (1982). Structures of verbascoside and orobanchoside, caffeic acid sugar esters from *Orobanche rapum-genistae*. *Phytochemistry*, 21(5), 1123-1127.
- Andrade-Cetto, A., Revilla-Monsalve, C., & Wiedenfeld, H. (2007). Hypoglycemic effect of *Tournefortia hirsutissima* L., on n-streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(1), 96-100.
- Angulo-Cornejo, J. R. & Tovar, C. F. (2014). Utilización de la química computacional: Método semiempírico PM3, para elucidar la estructura del complejo bis (1,5-difenil-1,2,4-triazol-3- tionato) plomo (II) ($Pb(DTT)_2$). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(2), 136-143.
- Arisawa, M., Fukuta, M., Shimizu, M., & Morita, N. (1979). The Constituents of the Leaves of *Comanthosphace japonica* S. MOORE (Labiatae): Isolation of Two New Flavone Glycosides, Comanthosides A and B. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 27(5), 1252-1254.
- Barre, J. T., Bowden, B. F., Coll, J. C., De Jesus, J., Victoria, E., Janairo, G. C., & Ragasa, C. Y. (1997). A bioactive triterpene from *Lantana camara*. *Phytochemistry*, 45(2), 321-324.
- Becerra, J., Bittner, M., Hernández, V., Brintrup, C., Becerra, J., & Silva, M. (2010). Actividad de aceites esenciales de canelo, queule, bailahuén y culén frente a hongos fitopatógenos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(3), 212-215.
- Begum, S., Zehra, S. Q., Siddiqui, B. S., Fayyaz, S., & Ramzan, M. (2008). Pentacyclic Triterpenoids from the Aerial Parts of *Lantana camara* and Their Nematicidal Activity. *Chemistry & Biodiversity*, 5(9), 1856-1866.

- Bernal-Alcocer, A., Zamora-Natera, J. F., Virgen-Calleros, G., & Nuño-Romero, R. (2005). Actividad Biológica *in vitro* de Extractos de *Lupinus* spp. sobre Hongos Fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(2), 140-146.
- Bharitkar, Y. P., Hazra, A., Shah, S., Saha, S., Matoori, A. K., & Mondal, N. B. (2015). New flavonoid glycosides and other chemical constituents from *Clerodendrum phlomidis* leaves: isolation and characterisation. *Natural Product Research*, 29(19), 1850-1856.
- Boros, C. A., & Stermitz, F. R. (1990). Iridoids. An updated Review. Part I. *Journal of Natural Products*, 53(5), 1055-1147.
- Bowers, J. H., & Locke, J. C. (2000). Effect of Botanical Extracts on the Population Density of *Fusarium oxysporum* in Soil and Control of Fusarium wilt in the Greenhouse. *Plant Disease*, 84(3), 300-305.
- Calis, I., Lahloub, M. F., & Sticher, O. (1984). Loganin, Loganin Acid and Periclymenoside, a New Biosidic Ester Iridoid Glucoside from *Lonicera periclymenum* L. (*Caprifoliaceae*). *Helvetica Chimica Acta*, 67(1), 160-165.
- Campo Fernández, M., Cuesta Rubio, O., & Márquez Hernández, I. (2015). Introducción a la Caracterización Estructural de Flavonoides. Machala, Ecuador: Universidad Técnica de Machala.
- Campos Ríos, M. G., & Lira Charco E. (2008). Catálogo de autoridades taxonómicas e inventario florístico de la familia Boraginaceae en México. Fase I. *Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.*
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5-14.
- Cavallini, L. F. A. (1998). Fitopatología: un enfoque agroecológico. *Editorial de la Universidad de Costa Rica*.
- Celis, A., Mendoza, C. F., & Pachón, M. E. (2009). Revisión: Uso de Extractos Vegetales en el Manejo Integrado de Plagas, Enfermedades y Arvenses. *Temas Agrarios*, 14(1), 5-16.
- CESAVEG (2012). Manual de Plagas y enfermedades en Chile. Guanajuato. Consultado el 18 de diciembre de 2017: http://www.cesaveg.org.mx/html/folleto/folleto_11/folleto_chile_11.pdf
- Chen, M. L., Wu, S., Tsai, T. C., Wang, L. K., Chou, W. M., & Tsai, F. M. (2014). The caffeic acid in aqueous extract of *Tournefortia sarmentosa* enhances neutrophil phagocytosis of *Escherichia coli*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 36(6), 390-396.

- Chi, C. W., Wang, C. N., Lin, Y. L., Chen, C. F., & Shiao, Y. J. (2005). Tournefoliac acid B methyl ester attenuates glutamate induced toxicity by blockade of ROS accumulation and abrogating the activation of caspases and JNK in rat cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, 92(3), 692-700
- CONABIO (2017). Tachinol (*Tournefortia densiflora*). Consultado el 18 de noviembre de 2017: <http://enciclovida.mx/especies/6018948>
- Constantinidis, T., Harvala, C., & Skaltsounis, A. L. (1993). Pyrrolizidine N-oxide alkaloids of *Heliotropium hirsutissimum*. *Phytochemistry*, 32(5), 1335-1337.
- Correia Da Silva, T. B., Souza, V. K. T., Da Silva, A. P. F., Lyra Lemos, R. P., & Conserva, L. M. (2010). Determination of the phenolic content and antioxidant potential of crude extracts and isolated compounds from leaves of *Cordia multispicata* and *Tournefortia bicolor*. *Pharmaceutical Biology*, 48(1), 63-69.
- Cova, M. G., Bruzual, H., Crescente, O., Liendo, G., Briceño, A., & Guzmán, W. H. (2016). Aislamiento y caracterización química de la alantoína a partir de flores de *Cordia alba* (jacq). *Saber*, 28(4), 775-783.
- Crowley, H. C., & Culvenor, C. C. J. (1955). Occurrence of supinine in *Tournefortia sarmentosa* Lam. *Australian Journal of Chemistry*, 8(3), 464-465.
- Damtoft, S. (1992). Iridoid glucosides from *Lamium album*. *Phytochemistry*, 31(1), 175-178.
- Donli, P. O., & Dauda, H. (2003). Evaluation of aqueous *Moringa* seed extract as a seed treatment biofungicide for groundnuts. *Pest Management Science*, 59(9), 1060-1062.
- Dugravot, S., Thibout, E., Abo-Ghaila, A., & Huignard, J. (2004). How a specialist and a non-specialist insect cope with dimethyl disulfide produced by *Allium porrum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 113(3), 173-179.
- El-Kassem, L. T. A., Mohammed, R. S., El Souda, S. S., El-Anssary, A. A., Hawas, U. W., Mohmoud, K., & Farrag, A. R. H. (2012). Digalacturonide Flavones from Egyptian *Lantana camara* Flowers with *in vitro* Antioxidant and *in vivo* Hepatoprotective Activities. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 67(7-8), 381-390.
- FAO (2011). Hongos que protegen cultivos de chile y jitomate. Consultado el 20/12/2017: <http://www.fao.org/inaction/agronoticias/detail/es/c/506952/>
- Foresman, J. B & Frisch, E. (1996). Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods. Gaussian Inc., Pittsburgh, PA.

- Frei, B., Baltisberger, M., Sticher, O., & Heinrich, M. (1998). Medical ethnobotany of the Zapotecs of the Isthmus-Sierra (Oaxaca, Mexico): Documentation and assessment of indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 62(2), 149-165.
- Garaev, E. E., Mahiou-Leddert, V., Mabrouki, F., Herbette, G., Garaev, E. A., & Ollivier, E. (2014). Chemical Constituents from Roots of *Cephalaria media*. *Chemistry of Natural Compounds*, 50(4), 756-758.
- García, S., & Mier, T. (2010). Visión general de la producción y aplicación de bioplaguicidas en México. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*, 10(20), 37-63.
- Gleiter, R., Haberhauer, G., Werz, D. B., Rominger, F., & Bleiholder, C. (2018). From Noncovalent Chalcogen–Chalcogen Interactions to Supramolecular Aggregates: Experiments and Calculations. *Chemical Reviews*, 118(4), 2010-2041
- Godínez-Vidal, D., Soto-Hernández, M., Rocha-Sosa, M., Lozoya-Gloria, E., Rojas-Martínez, R. I., Guevara-Olvera, L., & Zavaleta-Mejía, E. (2010). Contenido de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas por *Nacobbus aberrans* y su efecto en juveniles del segundo estadio. *Nematropica*, 40, 227-237.
- Gómez, L., & Chong, E. (1985). Conocimiento y usos de la flora de Amatlan, municipio de Tepoztlán, Morelos.
- González, F. B., Márquez, D. A., Solís, J. D. Á., Meraz, E. A., Aguilar, O. A., Bastidas, P. D. J. B.,... & Cadena, J. C. (2017). Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México. *Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México, edn*, 1.
- Hernández, T., Canales, M., García, A. M., Duran, Á., Meráz, S., Dávila, P., & Ávila, J. G. (2008). Antifungal Activity of the Essential Oils of Two Verbenaceae: *Lantana achyranthifolia* and *Lippia graveolens* of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(4), 202-206.
- Hernández, T., García-Bores, A. M., Serrano, R., Ávila, G., Dávila, P., Cervantes, H., Peñalosa, I., Flores-Ortiz, C. M., & Lira, R. (2015). Fitoquímica y actividades biológicas de plantas de importancia en la medicina tradicional del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(2), 116-121.
- Hernández-Carlos, B., González-Coloma, A., Orozco-Valencia, A. U., Ramírez-Mares, M. V., Andrés-Yeves, M. F., & Joseph-Nathan, P. (2011). Bioactive saponins from *Microsechium helleri* and *Sycios bulbosus*. *Phytochemistry*, 72 (8), 743-751

- Hu, W., Wang, X., Wu, L., Shen, T., Ji, L., Zhao, X., Si, C. L., Jiang, Y., & Wang, G. (2016). Apigenin-7-*O*- β -*D*-glucuronide inhibits LPS-induced inflammation through the inactivation of AP-1 and MAPK signaling pathways in RAW 264.7 macrophages and protects mice against endotoxin shock. *Food & Function*, 7(2), 1002-1013.
- Hussain, H., Hussain, J., Al-Harrasi, A., & Shinwari, Z. K. (2011). Chemistry of some species genus *Lantana*. *Pakistan Journal of Botany*, 43(3), 51-62.
- Innocent, E., Joseph, C. C., Gikonyo, N. K., Moshi, M. J., Nkunya, M. H., & Hassanali, A. (2008). Mosquito larvicidal constituents from *Lantana viburnoides* sp *viburnoides* var *kisi* (A. rich) Verdc (Verbenaceae). *Journal of Vector Borne Diseases*, 45(3), 240-244.
- Joosten, L., & van Veen, J. A. (2011). Defensive properties of pyrrolizidine alkaloids against microorganisms. *Phytochemistry Reviews*, 10(1), 127-136.
- Kaiser, C. R. (2000). RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. *Química Nova*, 23(2), 231-236.
- Kamalakararao, K., Krishna, C. K., Gopalakrishnan, V. K., Zenebe, H., Kalayu, M. A., Patricia, P. N., John, D. P., Tentu, K. N., & Govinda R. D. (2017). Apigenin-7-*O*- β -*D*-glucuronide methyl ester isolated from *Manilkara zapota* leaves. *Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, 8(2), 58-65.
- Lin, Y. L., Chang, Y. Y., Kuo, Y. H., & Shiao, M. S. (2002). Anti-Lipid-Peroxidative Principles from *Tournefortia sarmentosa*. *Journal of Natural Products*, 65(5), 745-747.
- Lira-De León, K. I., Ramírez-Mares, M. V., Sánchez-López, V., Ramírez-Lepe, M., Salas-Coronado, R., Santos-Sánchez, N. F., Valadez-Blanco, R., & Hernández-Carlos, B. (2014). Effect of crude plant extracts from some Oaxacan flora on two deleterious fungal phytopathogens and extract compatibility with a biofertilizer strain. *Frontiers in Microbiology*, 5(383), 1-10.
- López-López, L. I., de Loera-Carrera, D. A., de Jesús Rivera-Ávalos, E., & Sáenz-Galindo, A. (2018). Hidantoína y derivados como estructuras de importancia en la Química medicinal: Avances recientes. *Afinidad*, 75(584), 279-289.
- Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 1-7.
- Medina, J. C. M., Gauze, G. F., Vidotti, G. J., Sarragiotto, M. H., Basso, E. A., & Peixoto, J. L. B. (2009). Structural characterization of saturated pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell by NMR spectroscopy and theoretical calculations. *Tetrahedron Letters*, 50(22), 2640-2642.

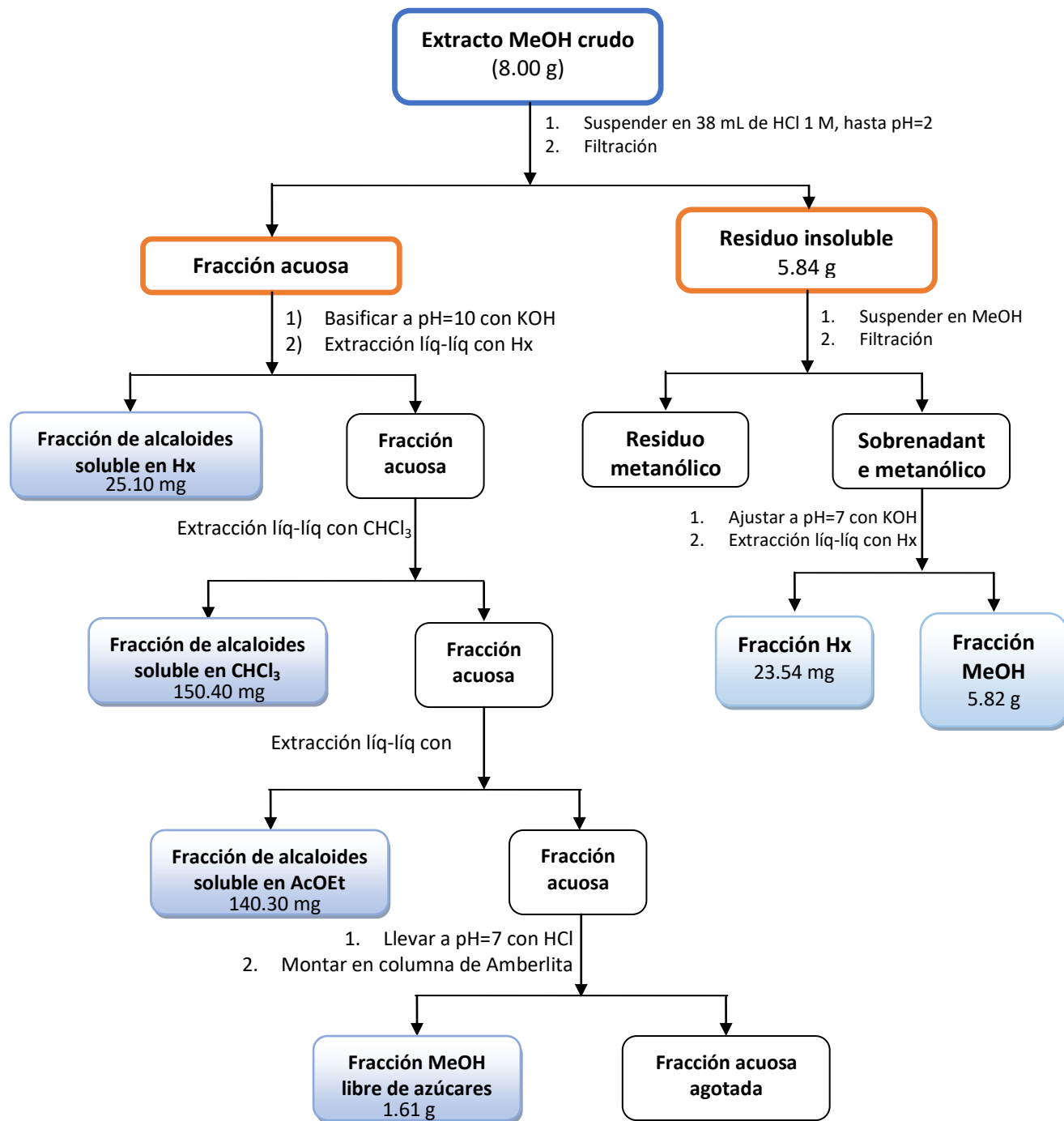
- Mendoza-Sánchez, L. G., Mendoza-López, M. R., García-Barradas, O., Azuara-Nieto, E., Pascual-Pineda, L. A., & Jiménez-Fernández, M. (2015). Physicochemical and antioxidant properties of jalapeño pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*) during storage. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 21(3), 229-241.
- Molyneux, R. J., Roitman, J. N., Benson, M., & Lundin, R. E. (1982). ¹³C NMR spectroscopy of Pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry*, 21(2), 439-443.
- Ortega-Fernández, J. G. (2006). Estudio químico y evaluación farmacológica de la especie *Cordia cylindrostachya*. Maracaibo, República Bolivariana de Venezuela: Universidad del Zulia.
- Ortiz-Andrade, R. R., García-Jiménez, S., Castillo-España, P., Ramírez-Ávila, G., Villalobos-Molina, R., & Estrada-Soto, S. (2007). α-Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: An anti-hyperglycemic agent. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(1), 48-53.
- Ortiz-Andrade, R. R., Rodríguez-López, V., Garduño-Ramírez, M. L., Castillo-España, P., & Estrada-Soto, S. (2005). Anti-diabetic effect on alloxanized and normoglycemic rats and some pharmacological evaluations of *Tournefortia hartwegiana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1-3), 37-42.
- Osuna, L., Tapia-Pérez, M. E., Jiménez-Ferrer, J. E., Carrillo-Quiróz, B. A., & Silva-Sánchez, J. (2005). Screening of *Alternanthera repens*, *Boerhavia coccinea*, *Flaveria trinervia*, *Tournefortia densiflora*, and *Vitex mollis* Extracts to Evaluate their Antibacterial Activity and Effect on Smooth Muscle. I. *Pharmaceutical Biology*, 43(9), 749-753.
- Oyourou, J. N., Combrinck, S., Regnier, T., & Marston, A. (2013). Purification, stability and antifungal activity of verbascoside from *Lippia javanica* and *Lantana camara* leaf extracts. *Industrial Crops and Products*, 43(2013), 820-826.
- Pegard, A., Brizzard, G., Fazari, A., Soucaze, O., Abad, P., & Djian-Caporalino, C. (2005). Histological Characterization of Resistance to Different Root-Knot Nematode Species Related to Phenolics Accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology*, 95(2), 158-165.
- Peña-Andrade, N. S. (2011). Fitoquímica y farmacología de la especie *Cordia collococca* (Boraginaceae). Maracaibo, República Bolivariana de Venezuela: Universidad del Zulia.
- Pérez-Acevedo, C. E., Carrillo-Rodríguez, J. C., Chávez-Servia, J. L., Perales-Segovia, C., Enríquez del Valle, R., & Villegas-Aparicio, Y. (2017). Diagnóstico de síntomas y patógenos asociados con marchitez del chile en Valles Centrales de Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(2), 281-293.

- Phakeovilay, C., Disadee, W., Sahakitpichan, P., Sitthimonchai, S., Kittakoop, P., Ruchirawat, S., & Kanchanapoom, T. (2012). Phenylethanoid and flavone glycosides from *Ruellia tuberosa* L. *Journal of Natural Medicines*, 67(1), 228-233.
- Planes, S., & Carrero, J. M. (2008). Plagas del campo. Madrid: *Ediciones Mundi-Prensa*.
- Puma-Araujo, A. C. (2013). Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en las ramas de *Sebastiania longicuspis* (Euphorbiaceae). Quito: Universidad Central del Ecuador.
- Rastrelli, L., Caceres, A., Morales, C., De Simone, F., & Aquino, R. (1998). Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry*, 49(6), 1829-1832.
- Rios Gomez, Y. M. (2015). Química y Farmacología de Iridoides. *Temas Selectos de Química de Productos Naturales*, 4(1), 95-133.
- Rodríguez, J. A. P., Ladino, O. J. P., Lesmes, L., Lozano, J. M., & Suárez, L. E. C. (2011). Phytochemical study of *Uncaria guianensis* leaves and antibacterial activity evaluation. *Acta Amazonica*, 41(2), 303-310.
- Rodriguez-Maturino, A., Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., González-Mendoza, D., Ruiz-Sanchez, E., Zamora-Bustillos, R., Ceceña-Duran, C., Grimaldo-Juarez, O., & Aviles-Marin, M. (2015). Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(1), 72-77.
- SAGARPA (2010). Retos y oportunidades del sistema agroalimentario de México en los próximos 20 años.
- SAGARPA (2017). Chiles y pimientos mexicanos. Planeación agrícola nacional 2017-2030. Consultado el 24 de diciembre de 2017: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257072/Potencial-Chiles_y_Pimientos-parte_uno.pdf
- Sánchez-León, G., Vargas-Rincón, A., & Jiménez, P. (2015). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos etanólicos de dos morfotipos de *Raphanus raphanistrum* L., sobre tres hongos fitopatógenos. *Bioagro*, 27(1), 3-10.
- Sasidharan, S., Latha, L. Y., Ping, K. Y., & Lachumy, S. J. (2012). Screening Methods in the Study of Fungicidal Property of Medicinal Plants, Fungicides for Plant and Animal Diseases. *InTech*, 107-118.

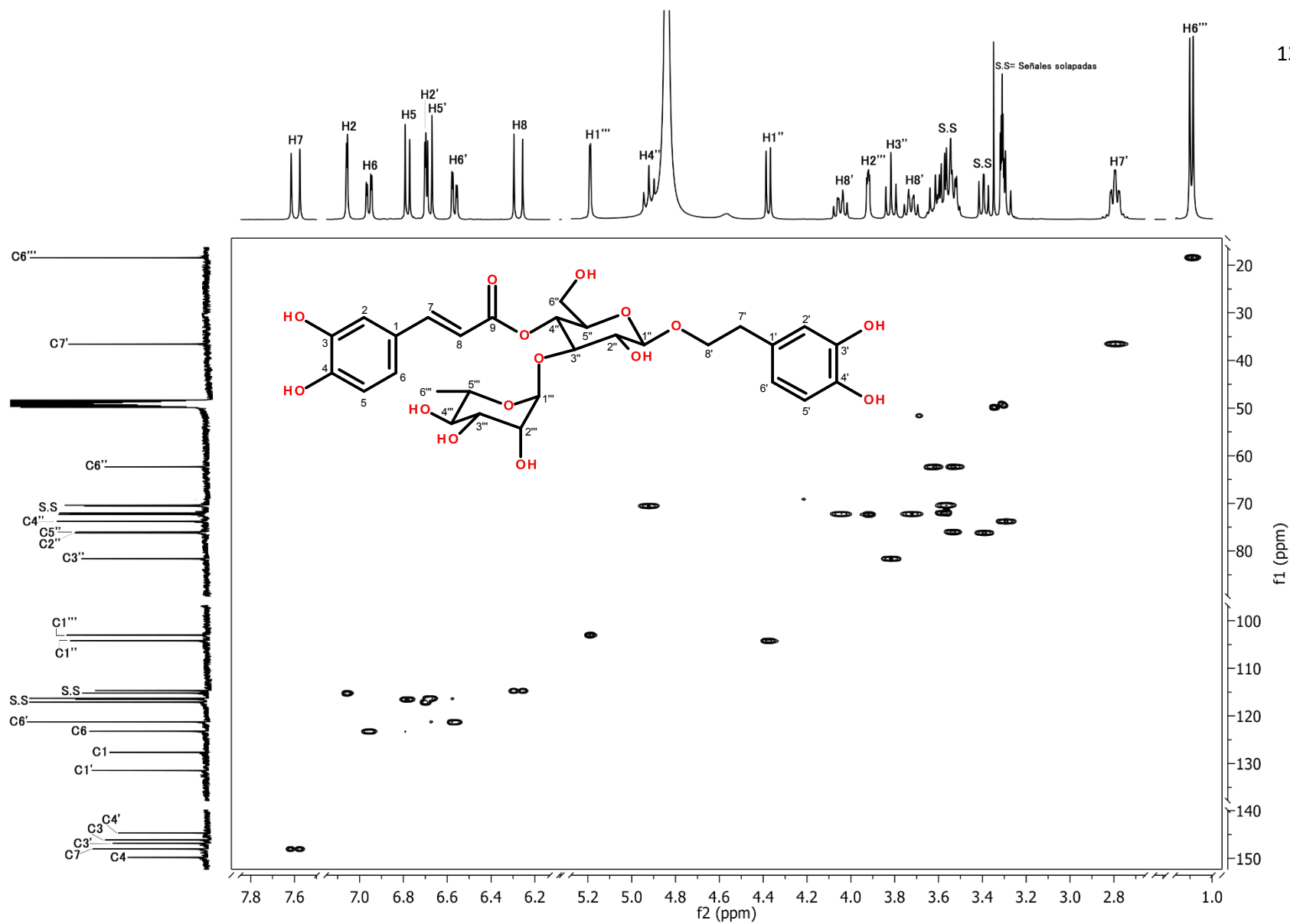
- SIAP (2010). Un panorama del cultivo del chile. Consultado el 22 de noviembre de 2017 de:
<http://infosiap.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100705-monografia-chile.pdf>
- SIAP (2017). Resumen nacional del avance de siembras y cosechas. Consultado el 22 de noviembre de 2017 de:
http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do
- Silva, P. S., Viccini, L. F., Singulani, J. L., de Siqueira, E. P., Zani, C. L., & Alves, T. M. A. (2010). Chemical composition of the essential oil and hexanic fraction of *Lippia* and *Lantana* species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6), 843-849.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., & Bryce, D. L. (2005). Spectrometric identification of organic compounds. *John wiley & sons, Inc., edn, 7*. New York, United States of America.
- Simão, A. A., de Oliveira Ramos, V., Corrêa, A. D., de Sousa, R. V., & Marcussi, S. (2015). Anti-obesity Effects of the Administration of *Tournefortia paniculata* Cham Extract on *Wistar* Rats Subjected to a Hypercaloric Diet. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(4), 494-503.
- SNICS (2017). Generalidades de la Red Chile. Consultado el 15 de noviembre de 2017 de:
<https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/chile-capsicum-spp>
- Sousa, E. O., & Costa, J. G. M. (2012). Genus *Lantana*: chemical aspects and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(5), 1115-1180.
- Tapia-Pérez, M. E., Tapia-Contreras, A., Cedillo-Rivera, R., Osuna, L., & Meckes, M. (2003). Screening of Mexican Medicinal Plants for Antiprotozoal Activity – Part II. *Pharmaceutical Biology*, 41(3), 180-183.
- Teng, C. Y., Lai, Y. L., Huang, H. I., Hsu, W. H., Yang, C. C., & Kuo, W. H. (2012). *Tournefortia sarmentosa* extract attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Pharmaceutical Biology*, 50(3), 291-396.
- Tlahui-Medic (2011). Usos medicinales del tlachichinole (*Tournefortia hirsutissima* L.). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Consultado el 2 de diciembre de:
<http://www.tlahui.com/medic/medic32/tlachichinole.htm>
- Torres, G. A. (2000). Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana*, 17(1-3), 11-16.

- Tsuneatsu, N., Fumiko, A., Junei, K., & Hikaru O. (2002). Antiproliferative Constituents in Plants 10. Flavones from the Leaves of *Lantana montevidensis* BRIQ. and Consideration of Structure-Activity Relationship. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25(7), 875-879.
- Vaillant Flores, D., Romeu Carballo, C., Ramos Ramos, E., González García, M., Ramírez Ochoa, R., & González Pentón, J. (2009). Efecto inhibitorio *in vitro* de cinco monoterpenos de aceites esenciales sobre un aislado de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Fitosanidad*, 13(3), 197-200.
- Vásquez López, A., Tlapal Bolaños, B., Yáñez Morales, M. J., Pérez Pacheco, R., & Quintos Escalante, M. (2009). Etiología de la marchitez del 'chile de agua' (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(2), 127-134.
- Velásquez Valle, R., Medina Aguilar, M. M., & Luna Ruiz, J. J. (2001). Sintomatología y Géneros de Patógenos Asociados con las Pudriciones de la Raíz del Chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(2), 175-181.
- Venditti, A., Serrilli, A. M., Di Cecco, M., Ciaschetti, G., Andrisano, T., & Bianco, A. (2012). Phytochemical analysis of *Plantago sempervirens* from Majella National Park. *Natural Product Research*, 26(21), 2035-2039.
- Veraplakorn, V. (2018). Allelopathic hormesis and slow release of lantana (*Lantana camara* L.) callus extract. *Agriculture and Natural Resources*, 52(4), 335-340.
- Wade, L. G. (2011). Química orgánica. *Pearson Educación*, 1(7), 1-744.
- Wu, J., Huang, J., Xiao, Q., Zhang, S., Xiao, Z., Li, Q., Long, L., & Huang, L. (2004). Complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR data for 10 phenylethanoid glycosides. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 42(7), 659-662.
- Xia, H. J., Qiu, F., Zhu, S., Zhang, T. Y., Qu, G. X., & Yao, X. S. (2007). Isolation and Identification of Ten Metabolites of Breviscapine in Rat Urine. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30(7), 1308-1316.
- Yurkanis Bruice, P. (2008). Química orgánica. *Pearson Educación*, 1(5), 1-1319.
- Zapata, R., Sanabria, M. E., & Rodríguez, D. (2003). Reducción del desarrollo de hongos fitopatógenos con extracto de cardón lefaria (*Cereus deficiens* otto & diert). *Interciencia*, 28(5), 302-306.
- Zygmunt, B., & Namieśnik, J. (2003). Preparation of Samples of Plant Material for Chromatographic Analysis. *Journal of Chromatographic Science*, 41(3), 109-116.

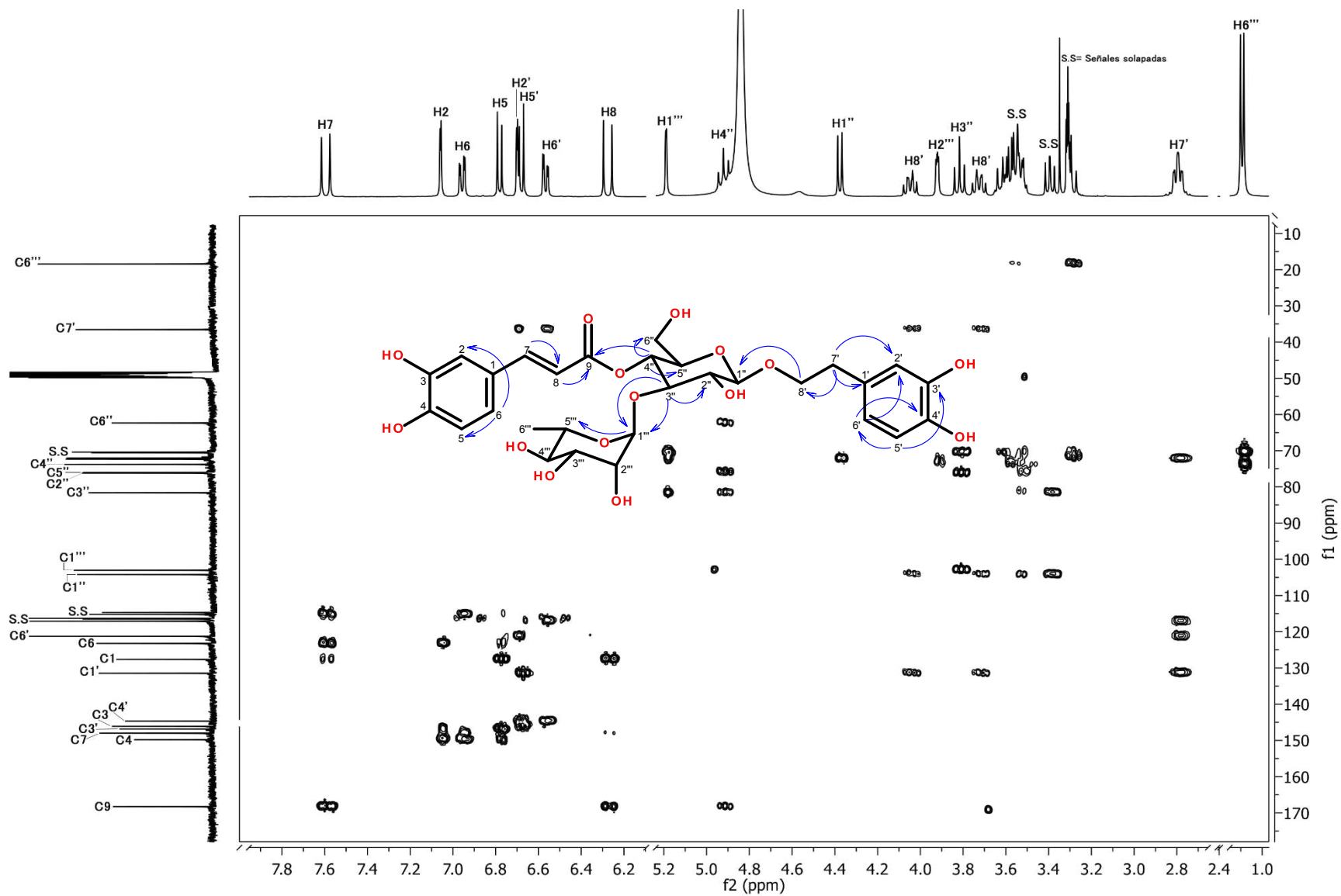
13. APÉNDICE



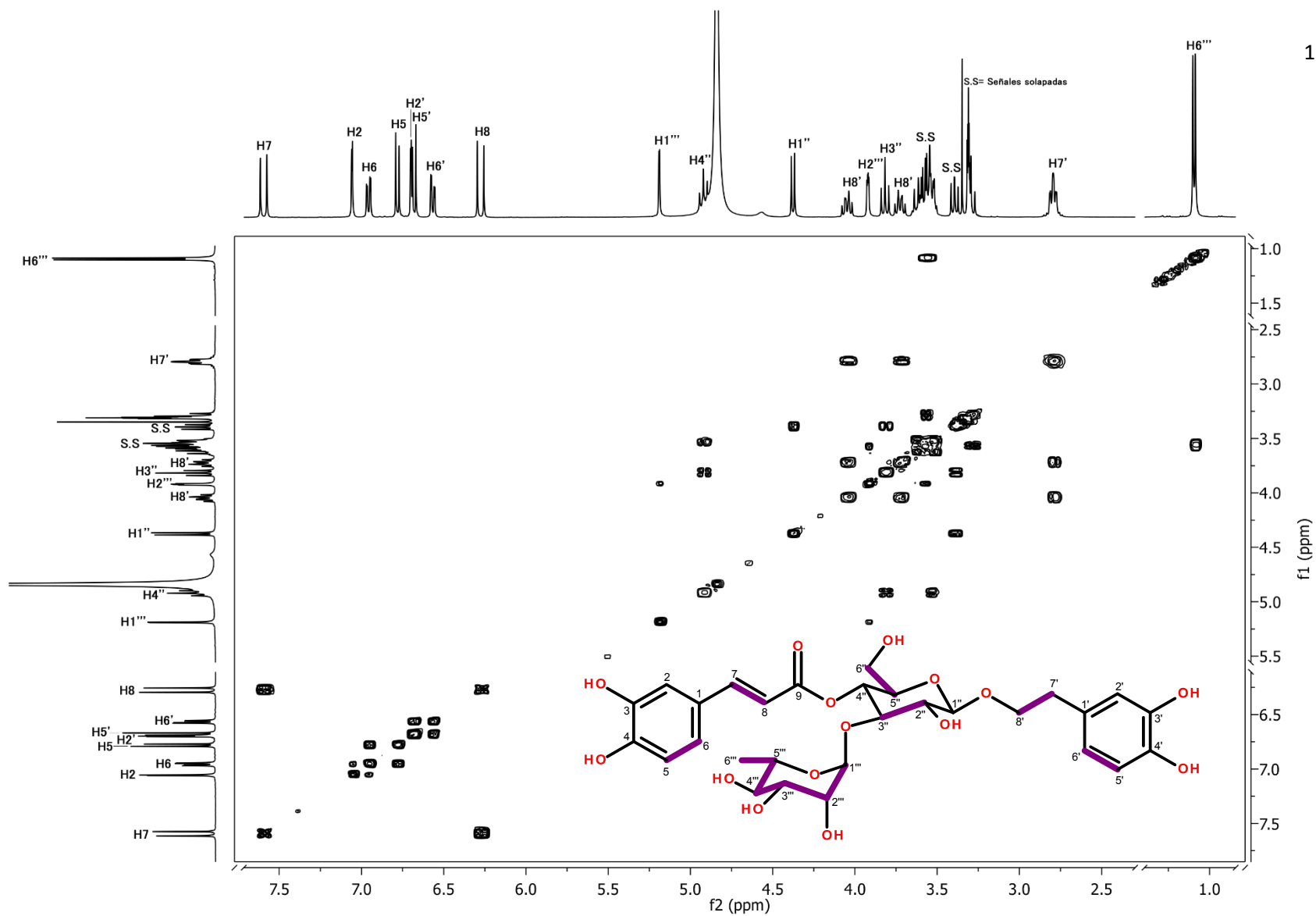
Apéndice 1. Metodología de extracción para alcaloides presentes en la raíz de *Tournefortia densiflora*



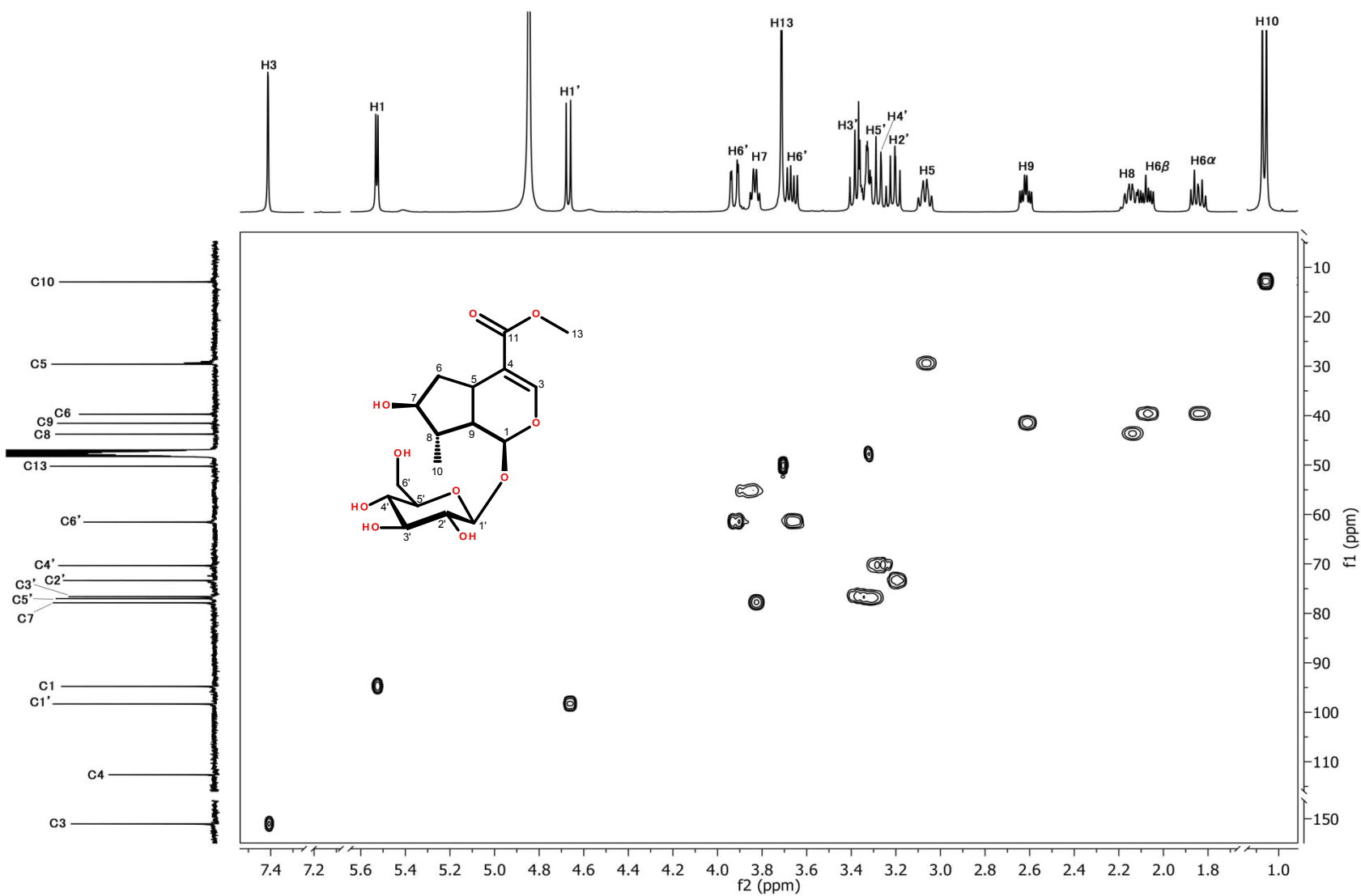
Apéndice 2. Experimento HSQC de verbáscosido presente en la parte aérea de *L. achyranthifolia*



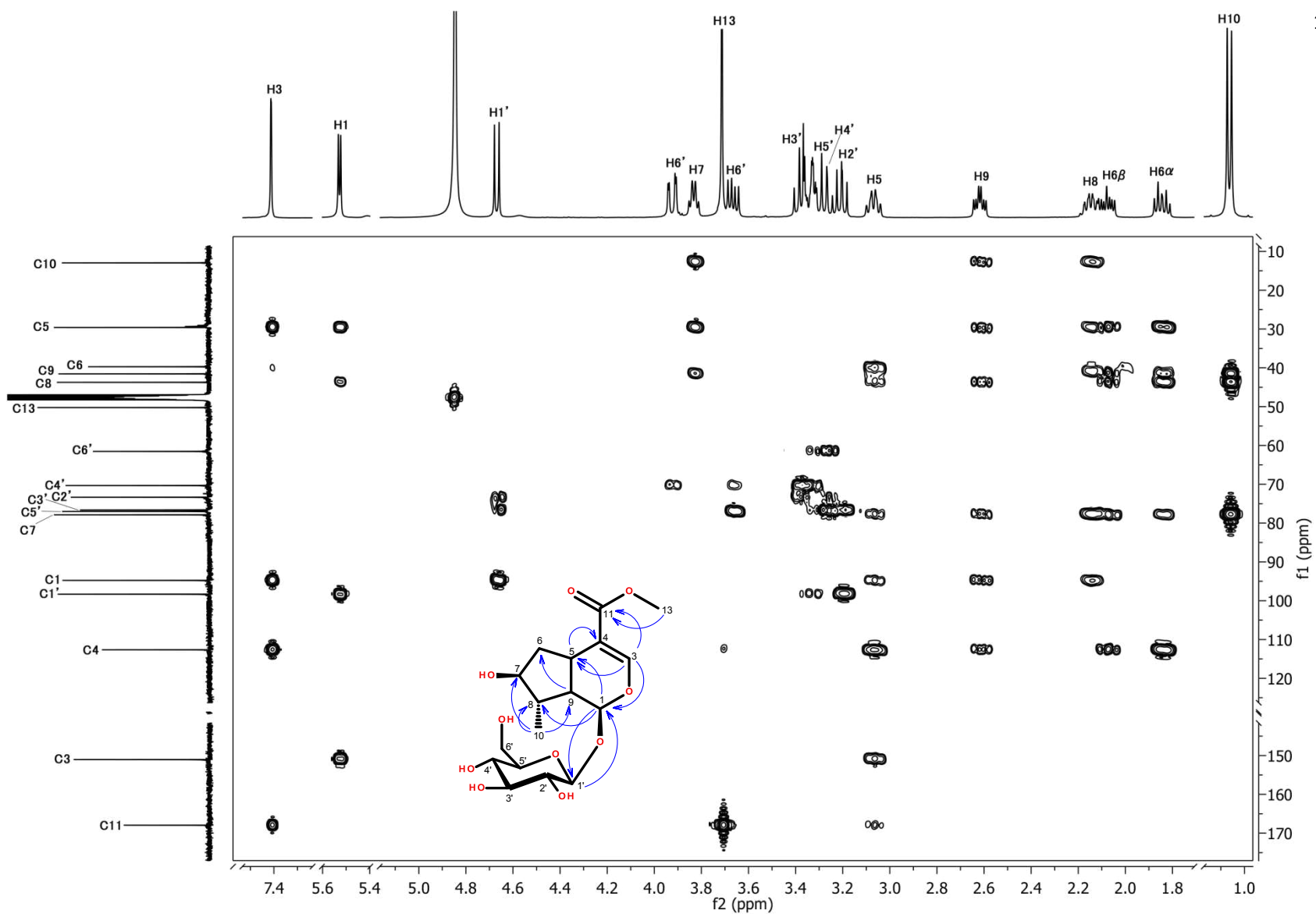
Apéndice 3. Experimento HMBC de verbáscosido presente en la parte aérea de *L. achyranthifolia*



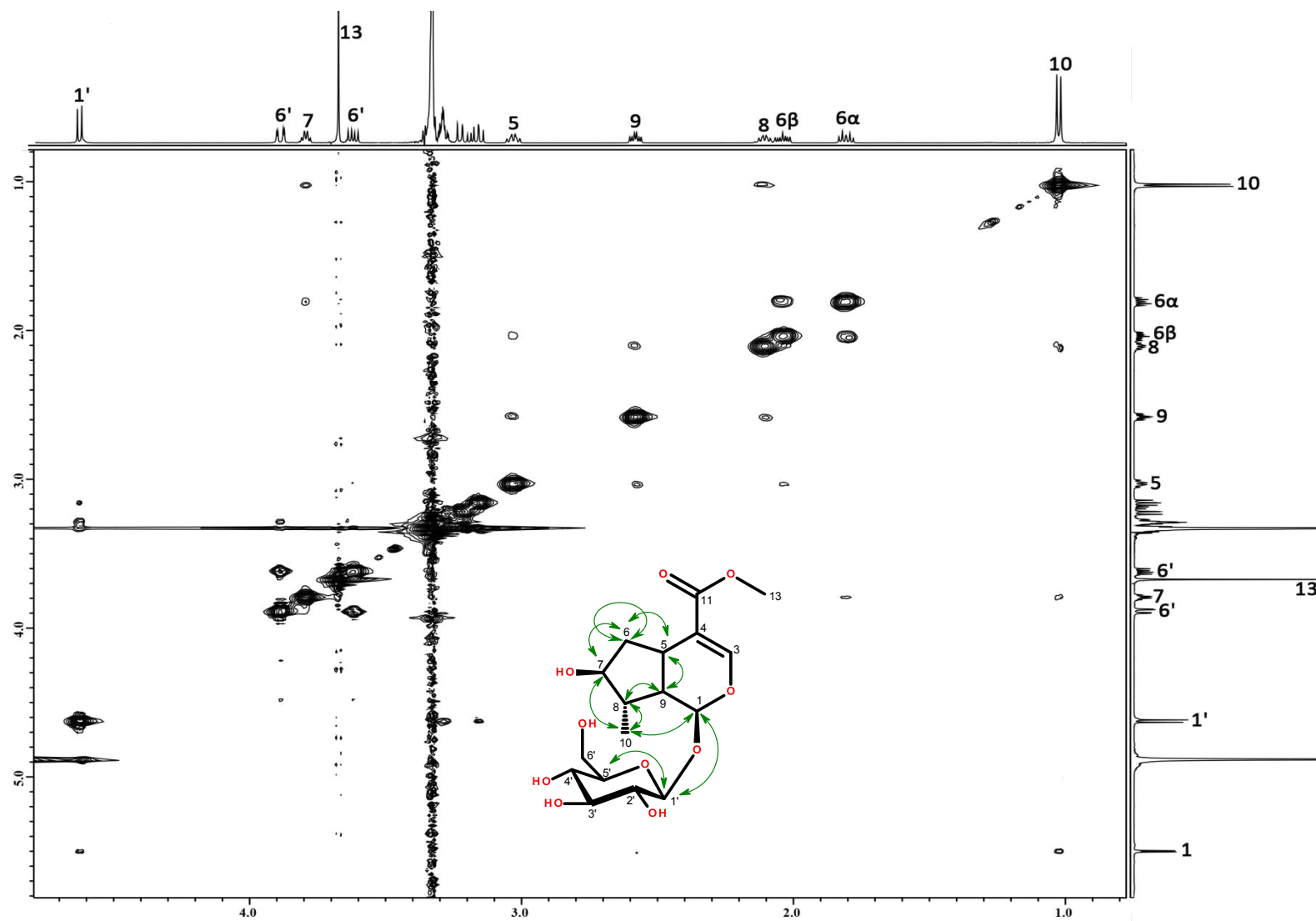
Apéndice 4. Experimento COSY del verbáscosido aislado de la parte aérea de *L. achyranthifolia*. Las principales correlaciones observadas se encuentran enmarcadas en color morado.



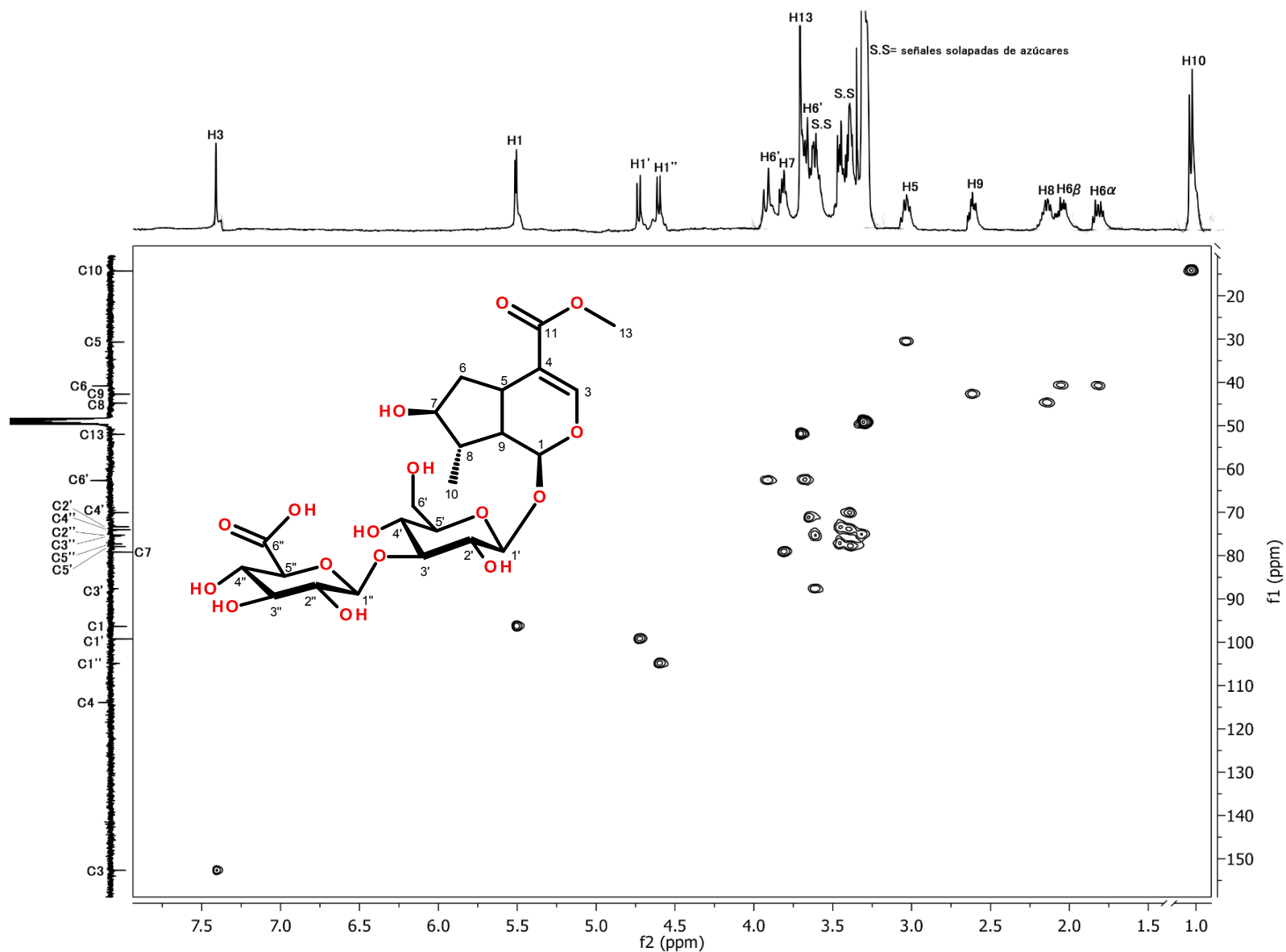
Apéndice 5. Experimento HSQC de 8-epiloganina aislada de la parte aérea *L. achyranthifolia*



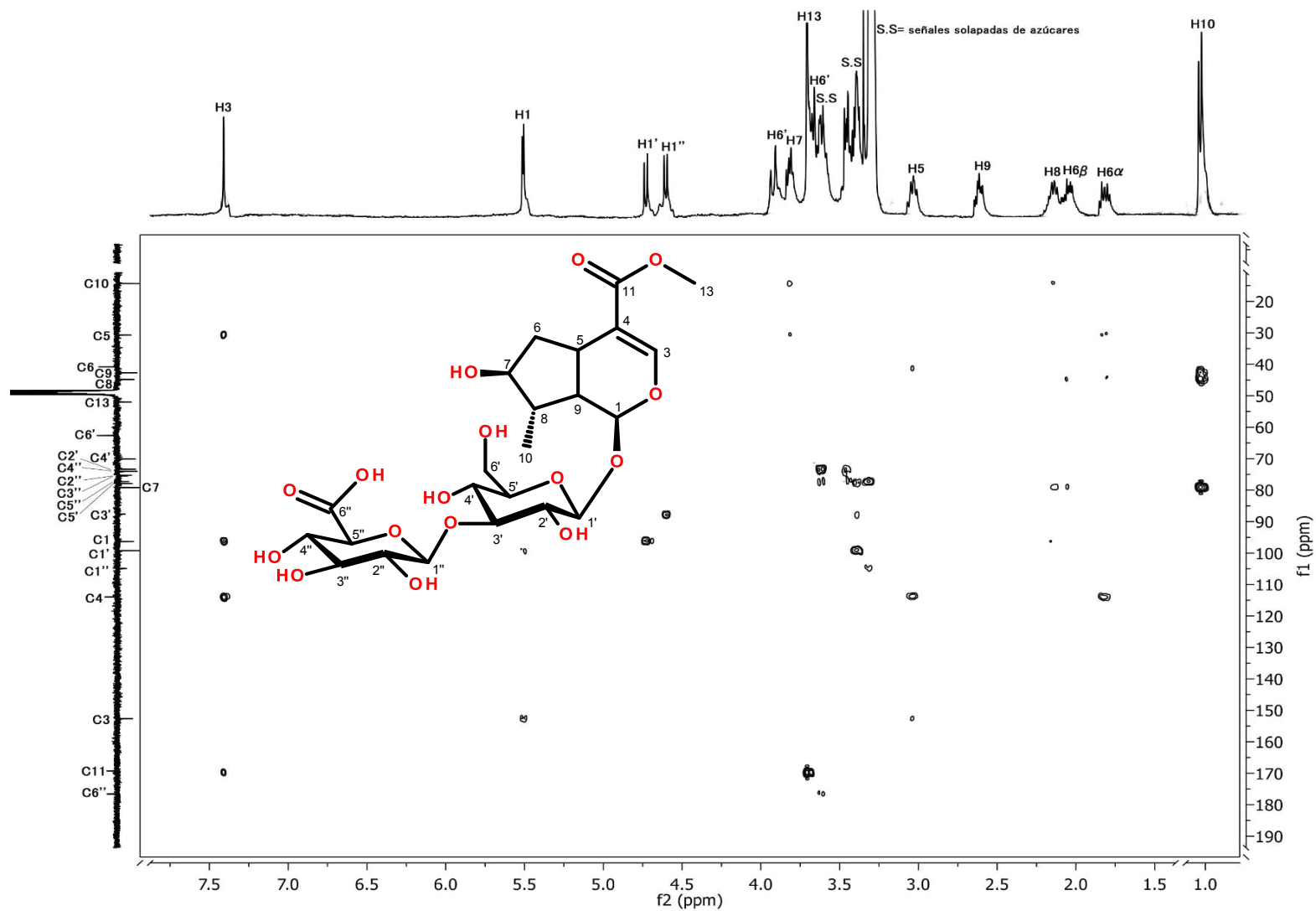
Apéndice 6. Experimento HMBC de 8-epiloganina aislada de la parte aérea *L. achyranthifolia*



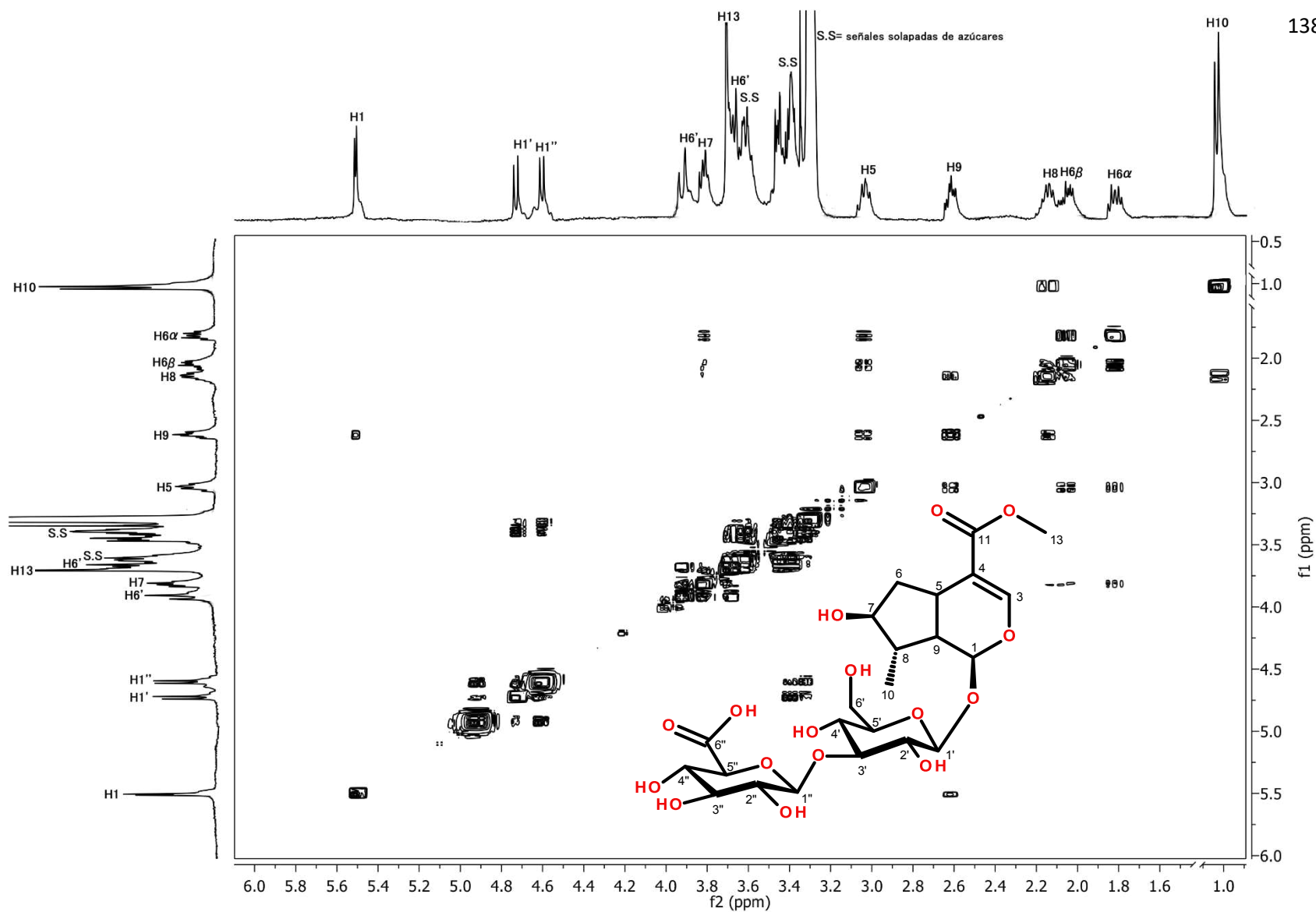
Apéndice 7. Experimento NOESY de 8-epigallocatechin aislada de la parte aérea *L. achyranthifolia*



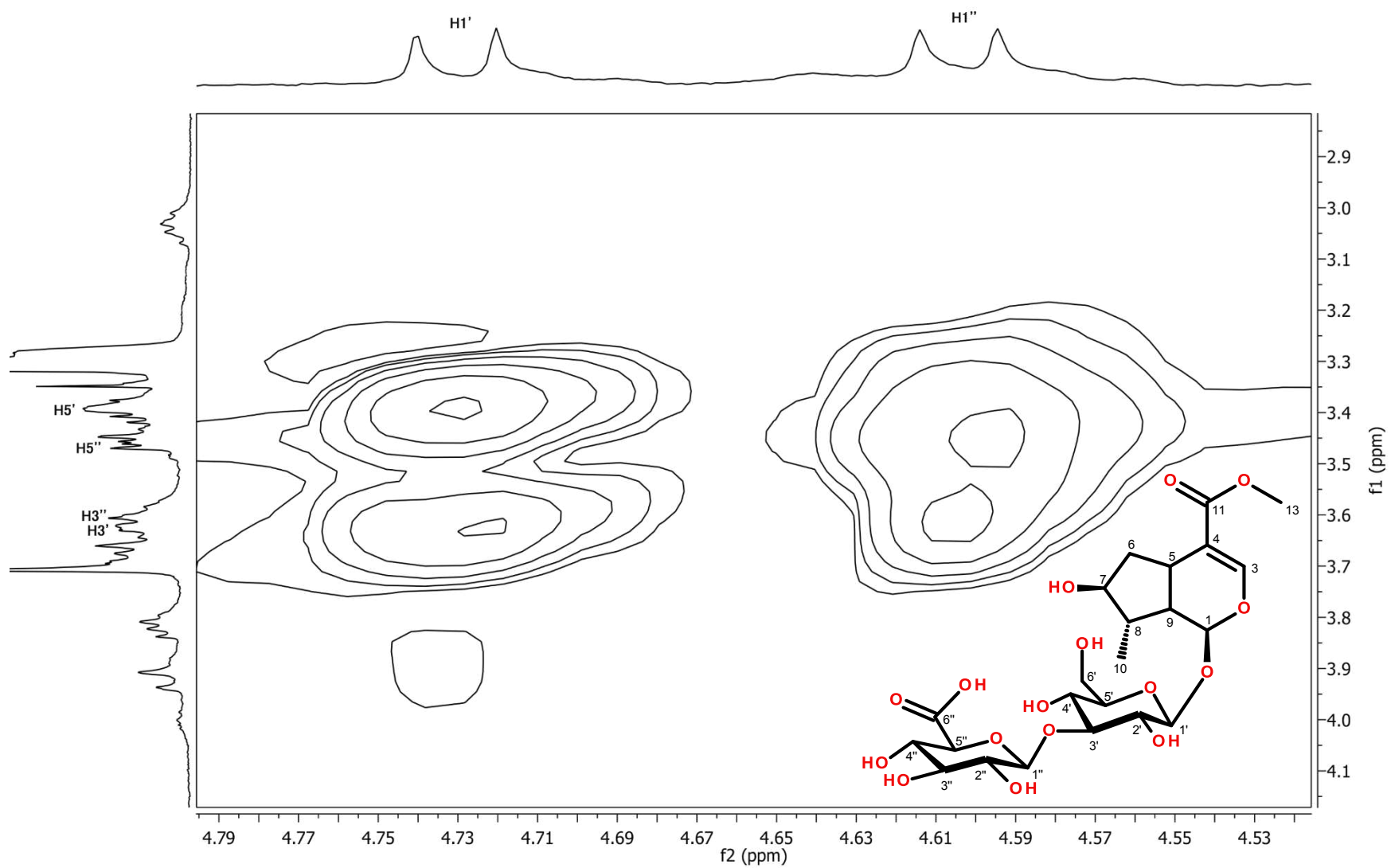
Apéndice 8. Experimento HSQC del glucurónido-8-epigalanina aislado de la parte aérea *L. achyranthifolia*



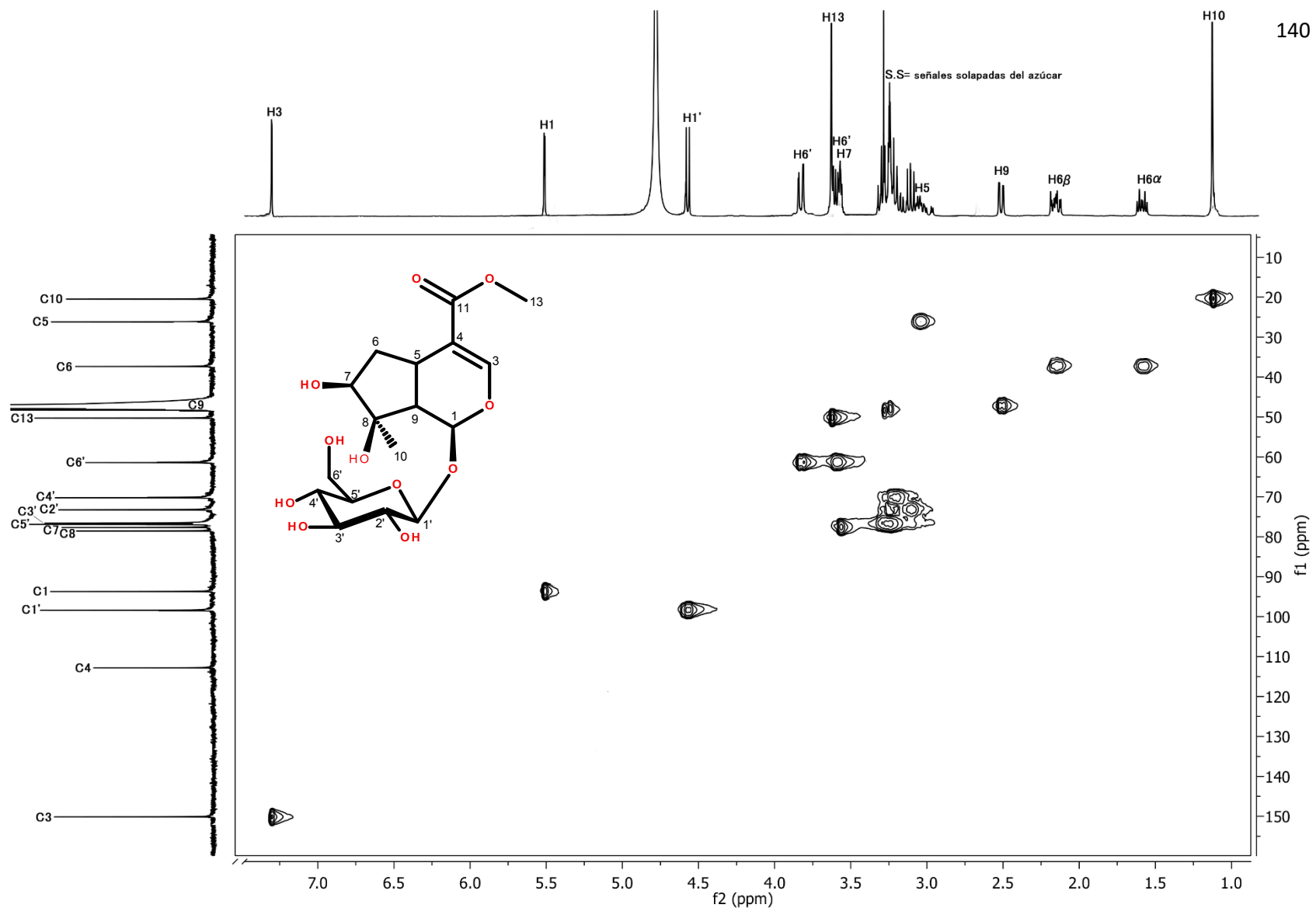
Apéndice 9. Experimento HMBC del glucurónido-8-epiloganina aislado de la parte aérea *L. achyranthifolia*



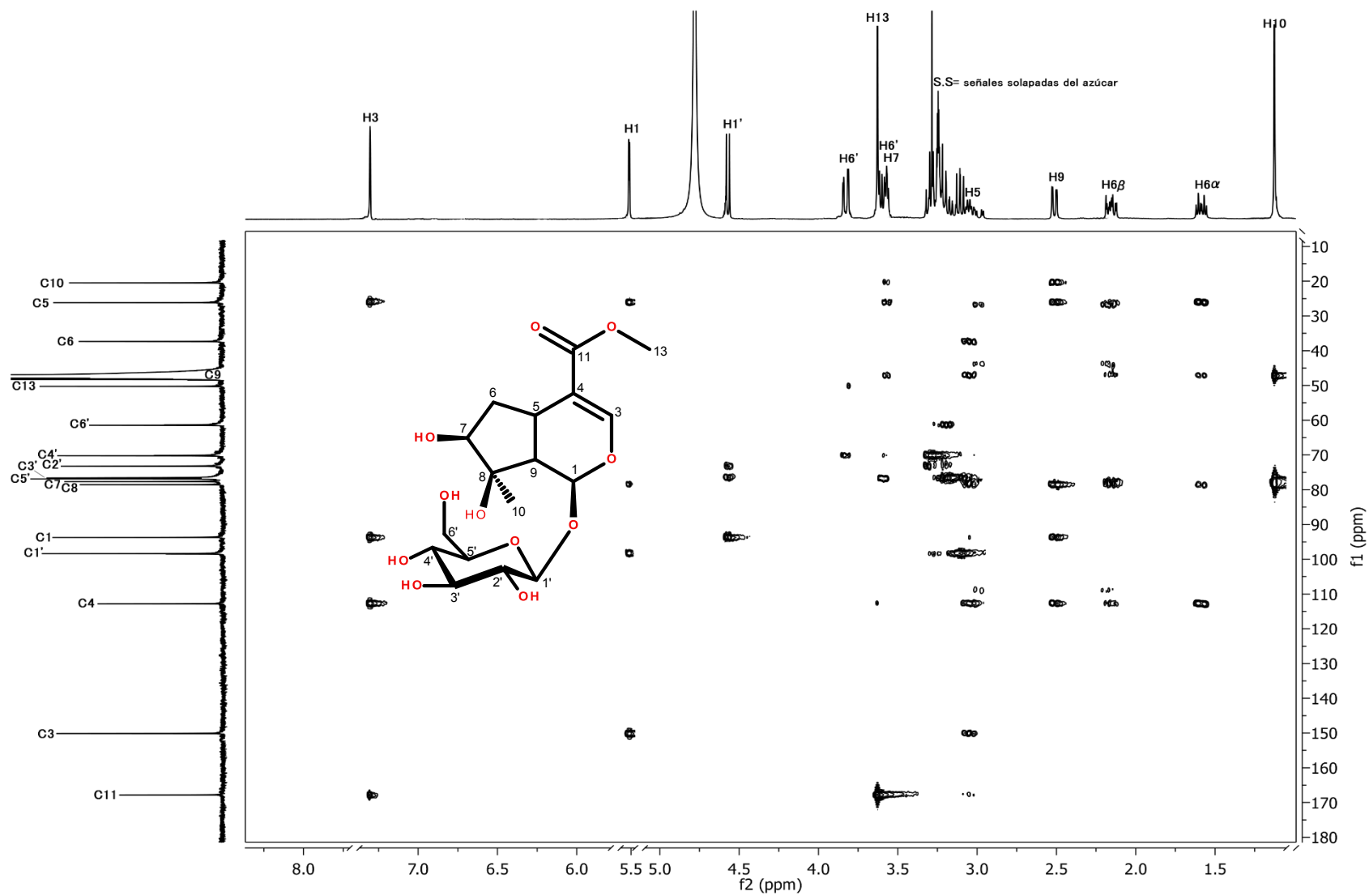
Apéndice 10. Experimento COSY del glucurónido-8-epigalanina aislado de la parte aérea de *L. achyranthifolia*



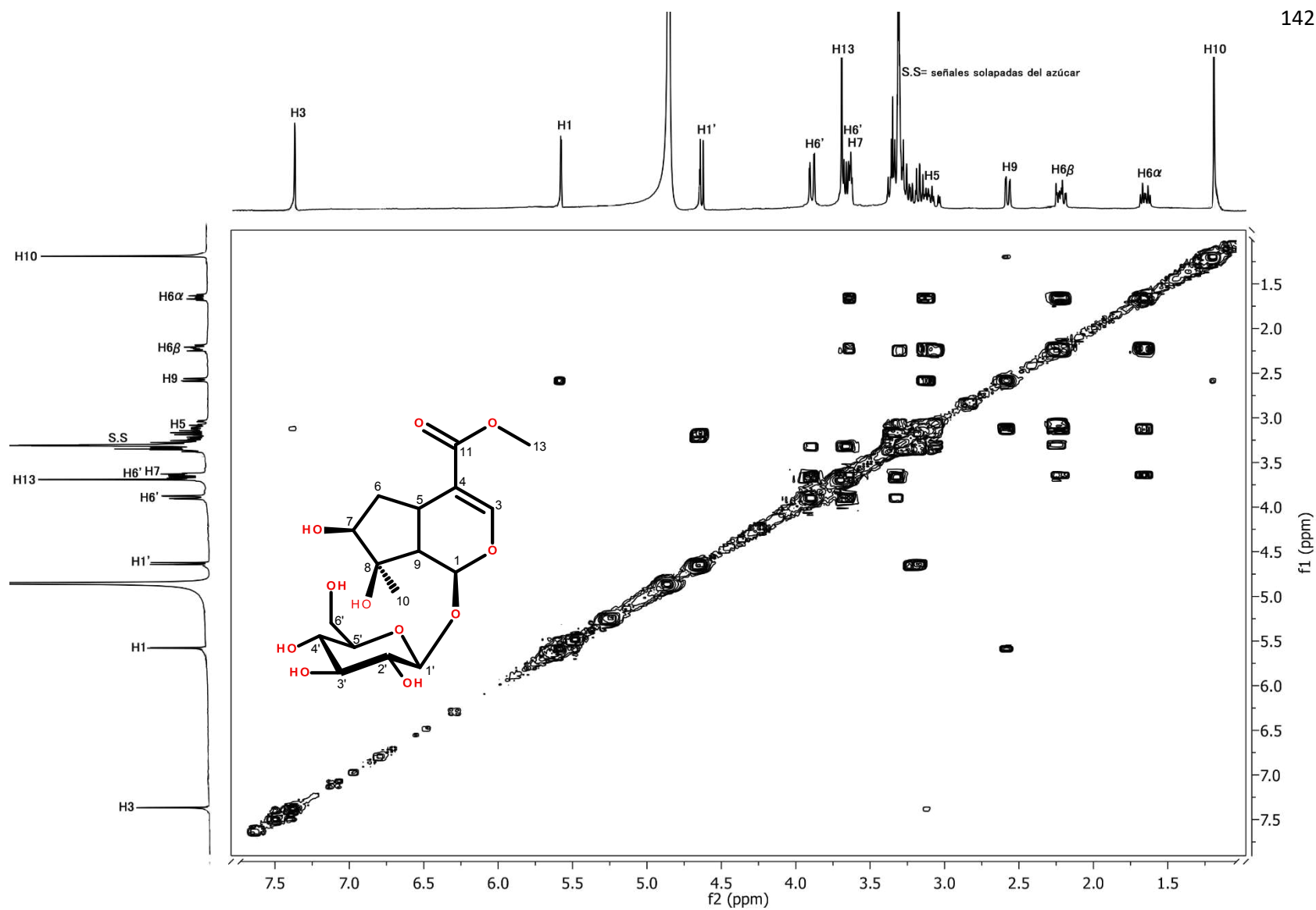
Apéndice 11. Sección del experimento TOCSY que muestra los sistemas de espines de los protones anoméricos del glucurónido-8-epigalanina



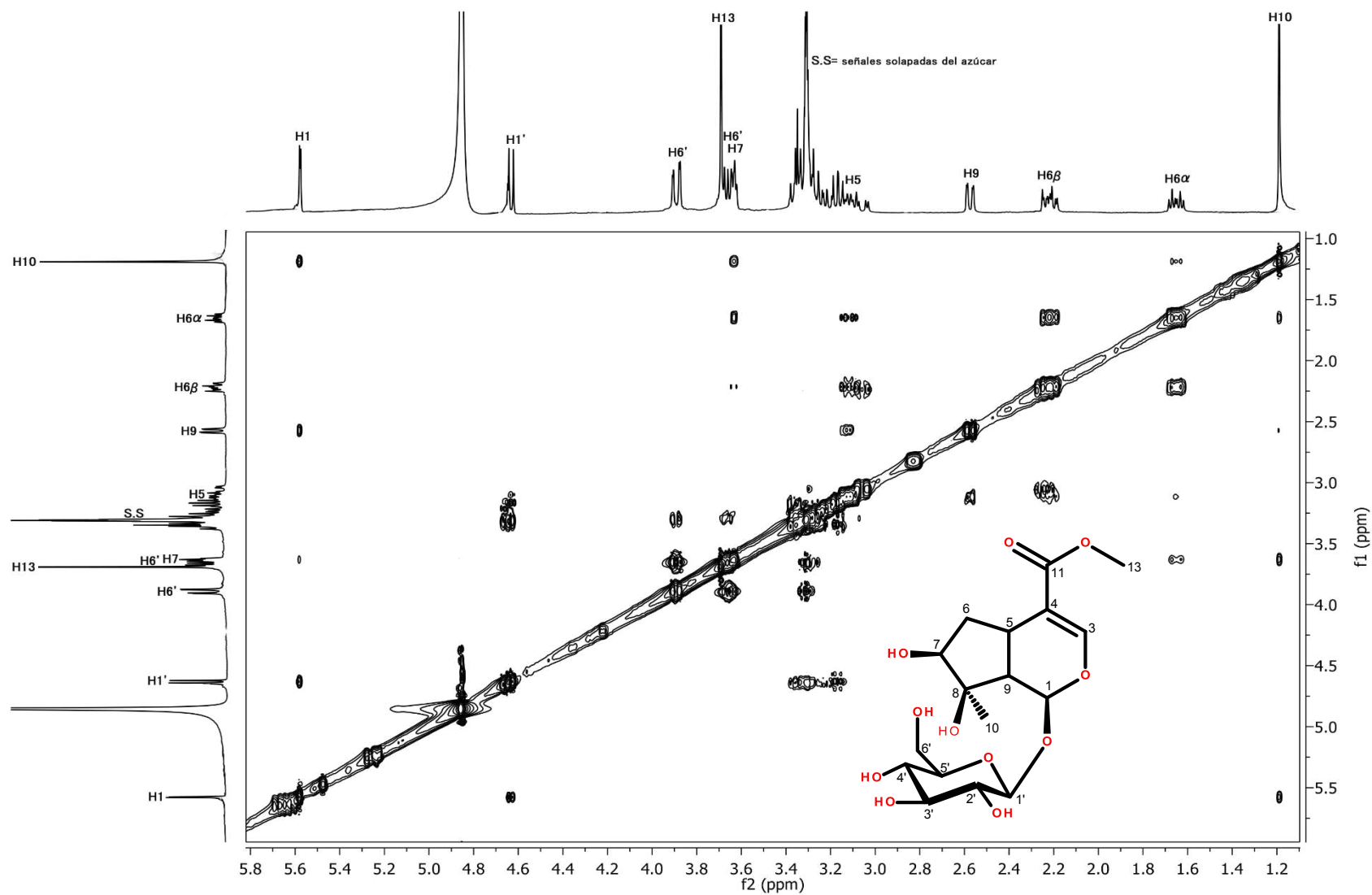
Apéndice 12. Experimento HSQC del carioptosido aislado de la parte aérea *L. achyranthifolia*



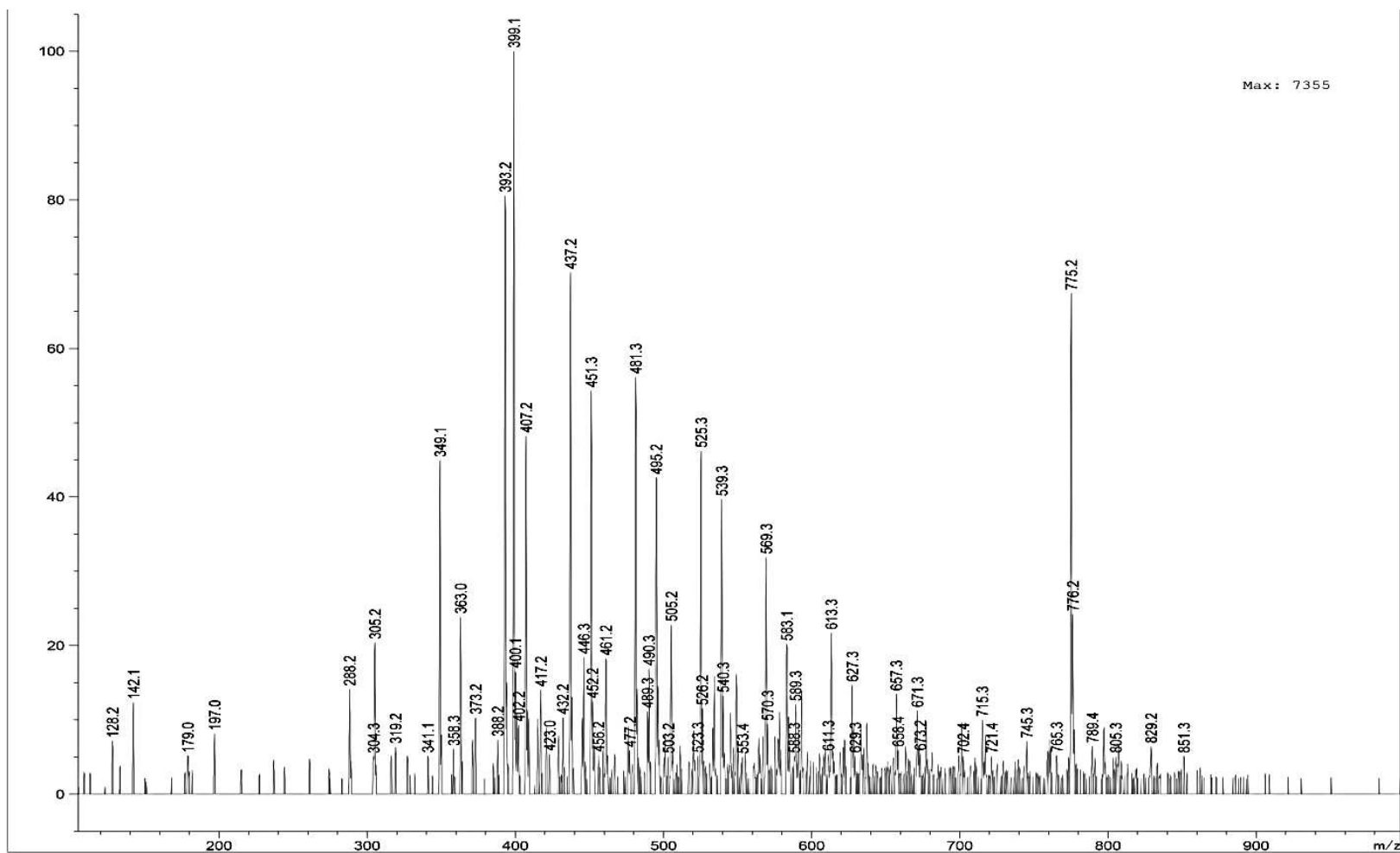
Apéndice 13. Experimento HMBC del carioptosido aislado de la parte aérea *L. achyranthifolia*



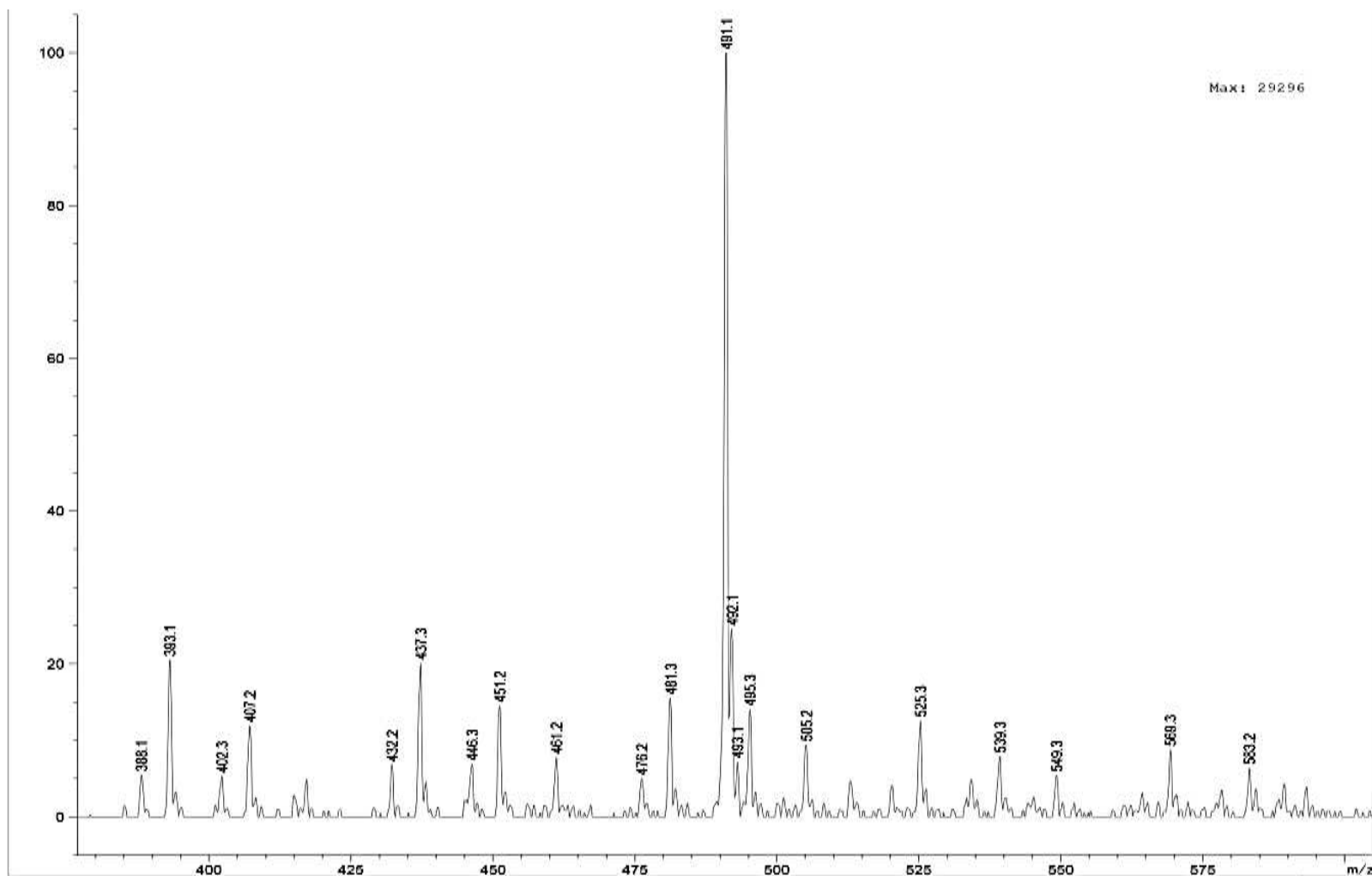
Apéndice 14. Experimento COSY del cariotosido aislado de la parte aérea *L. achyranthifolia*



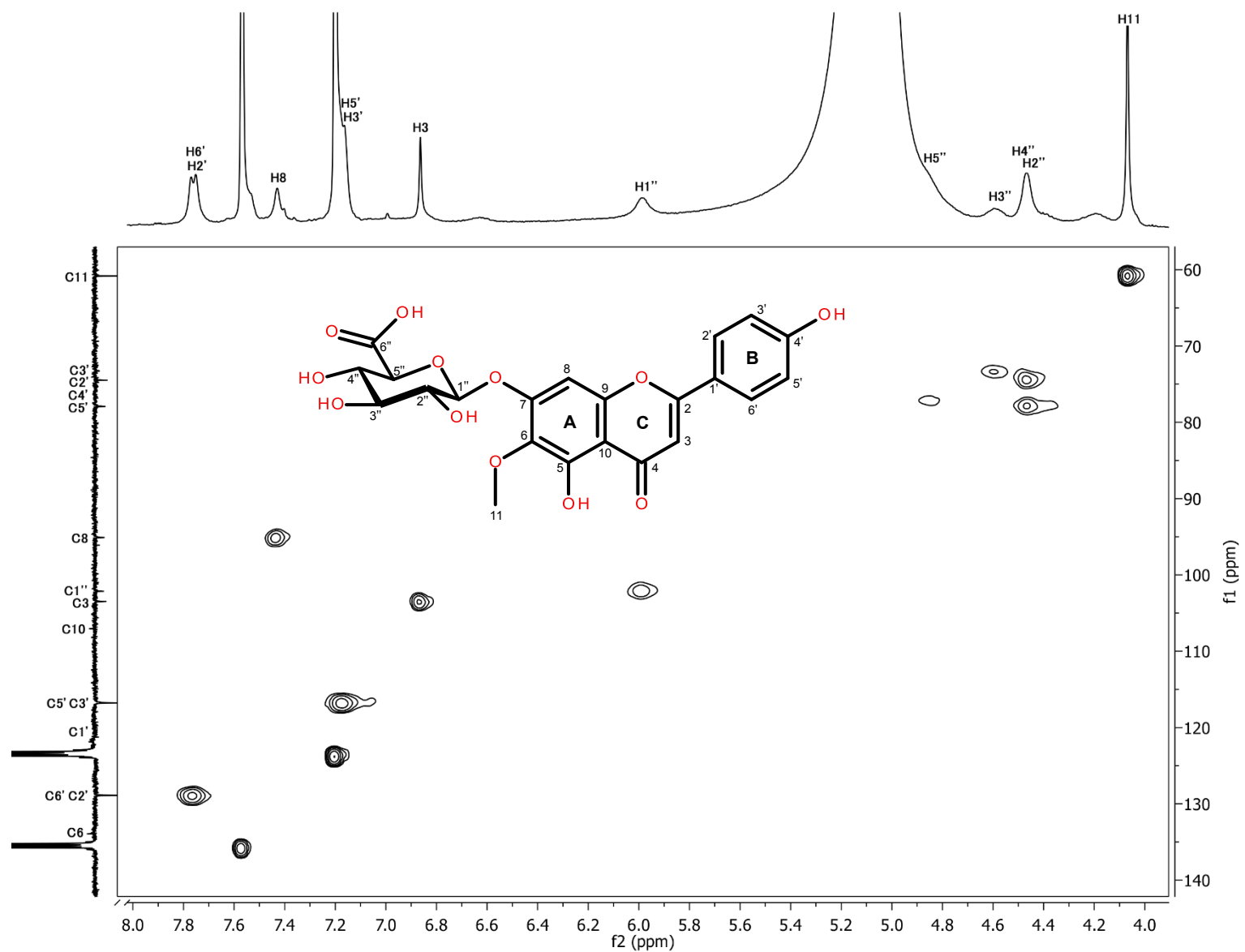
Apéndice 15. Experimento NOESY del carioptosido aislado de la parte aérea *L. achyranthifolia*



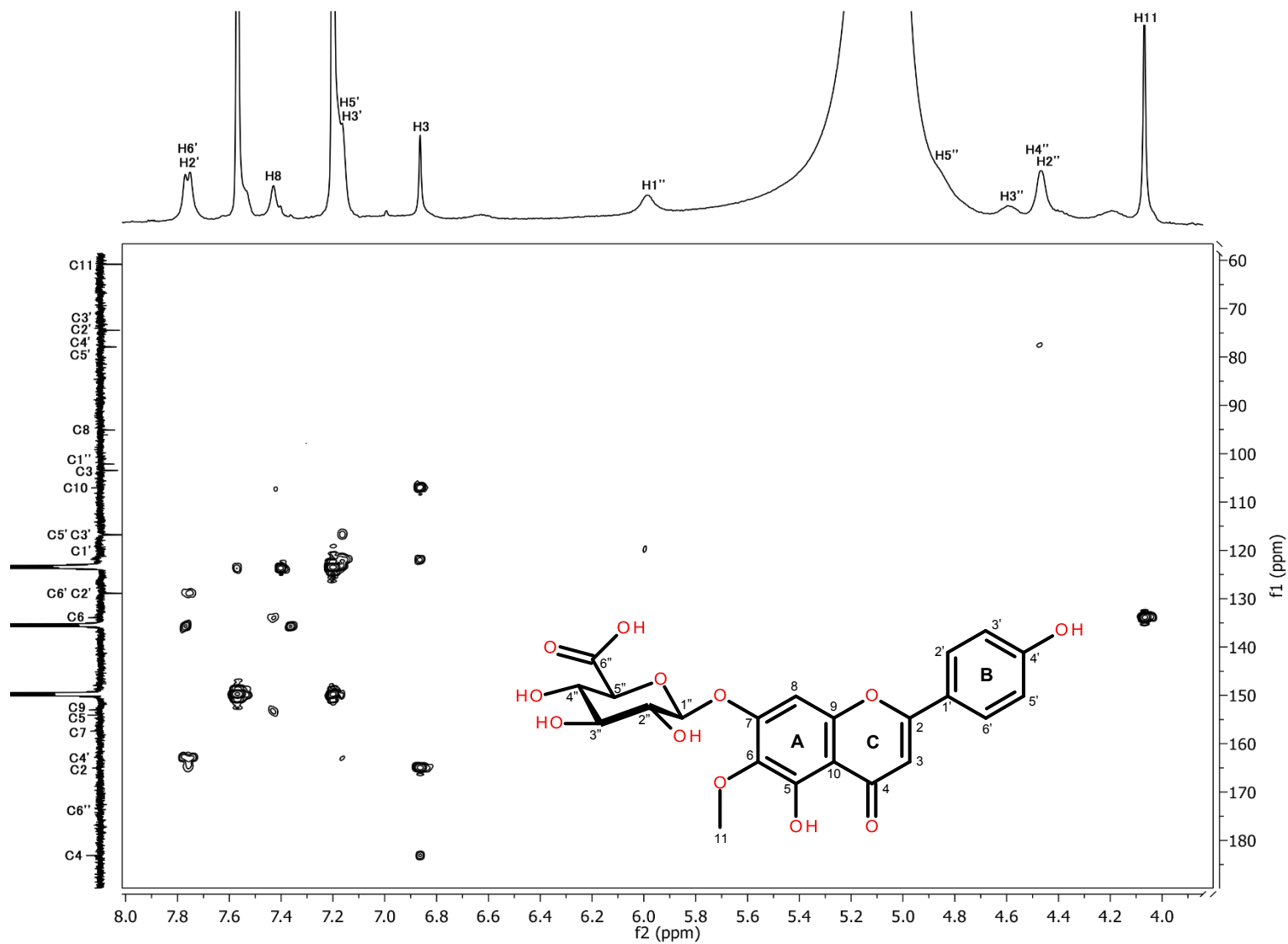
Apéndice 16. Espectro de masa del ácido 8-epilogánico registrado en modo ESI positivo



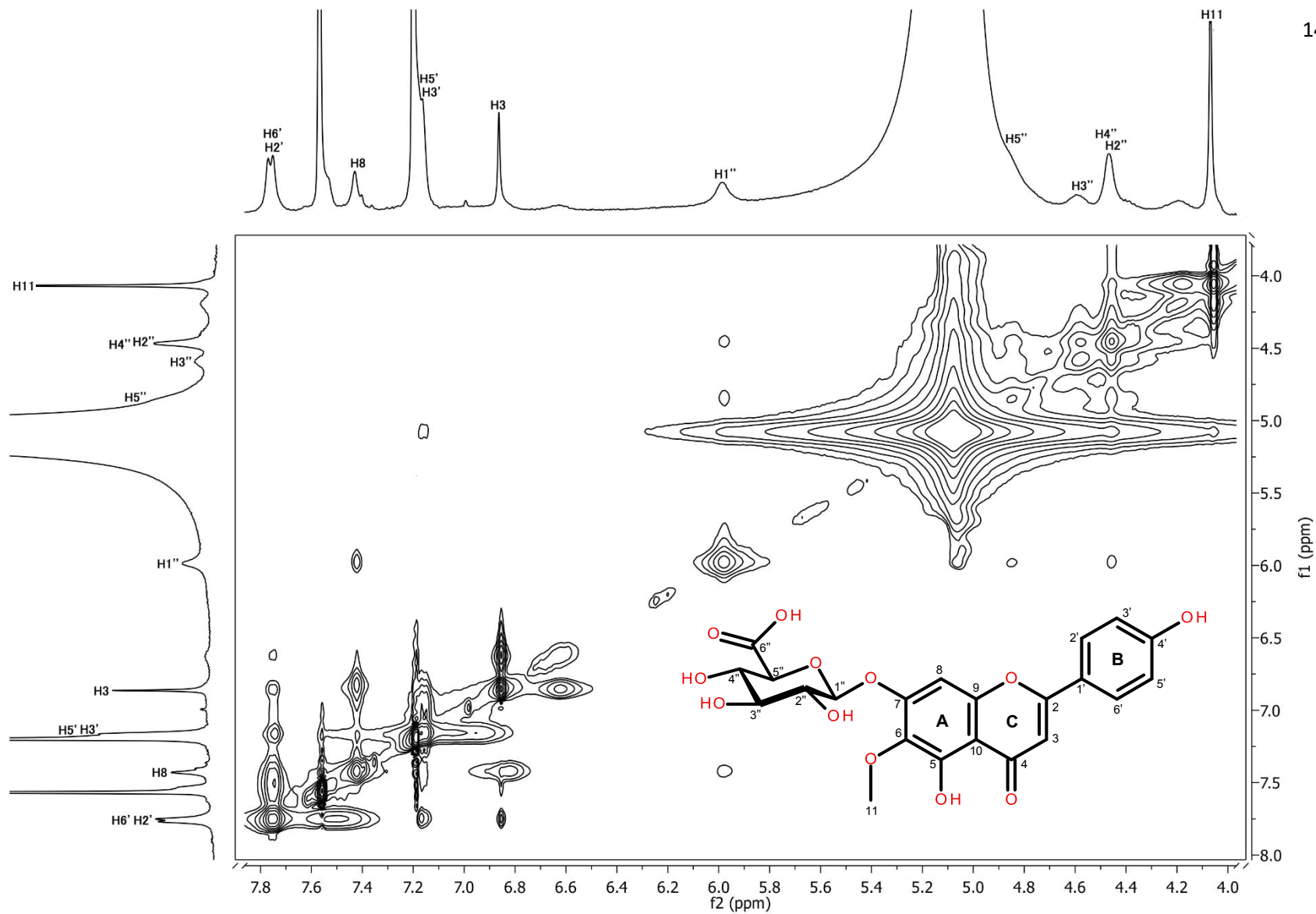
Apéndice 17. Espectro de masa de pectolinarigenina 7-*O*- β -*D*-glucuronopiranosido (6,11) registrada en modo ESI positivo



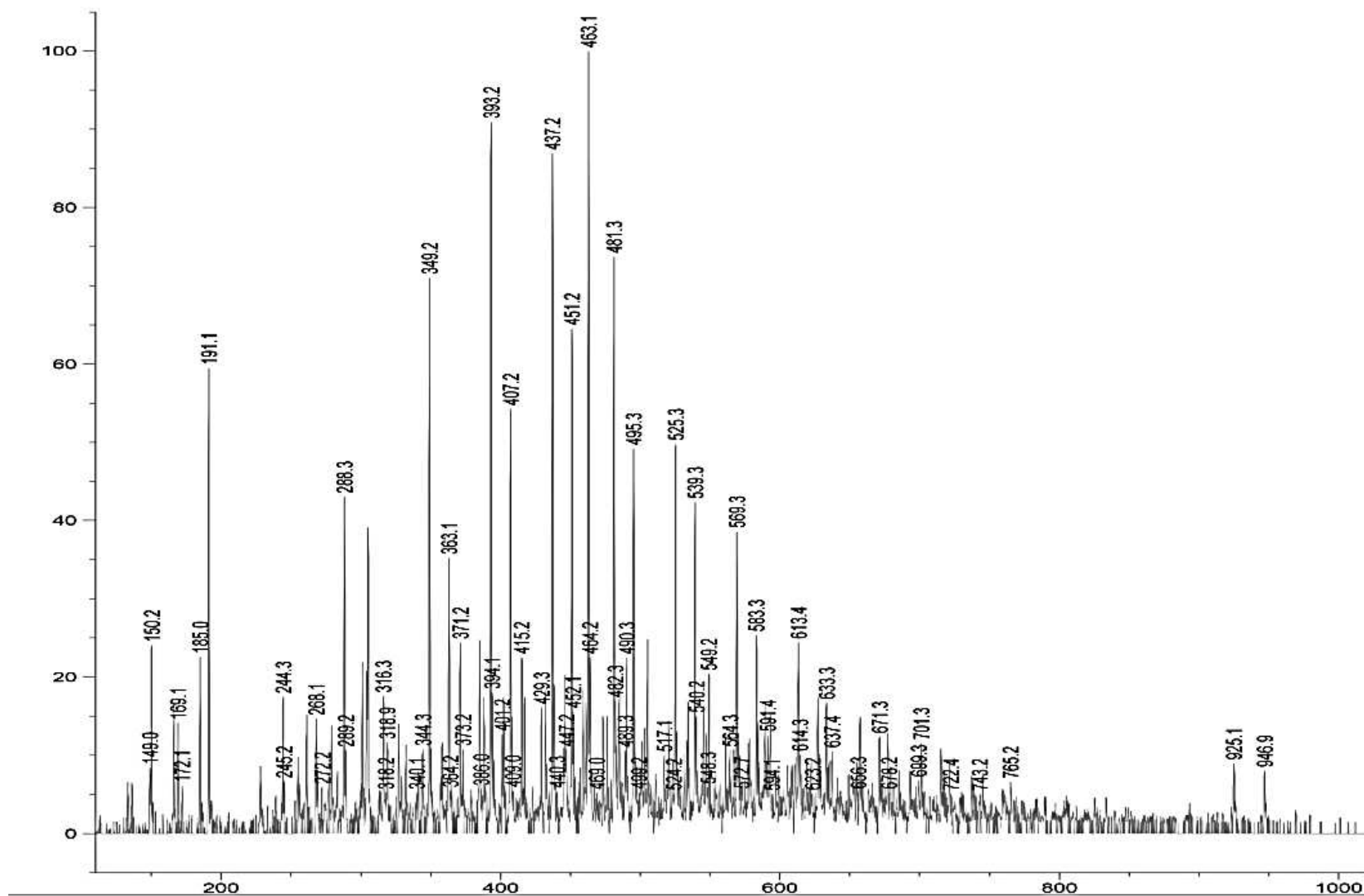
Apéndice 18. Experimento HSQC de 6-O-Methylscutellarina aislado de la parte aérea *L. achyranthifolia*



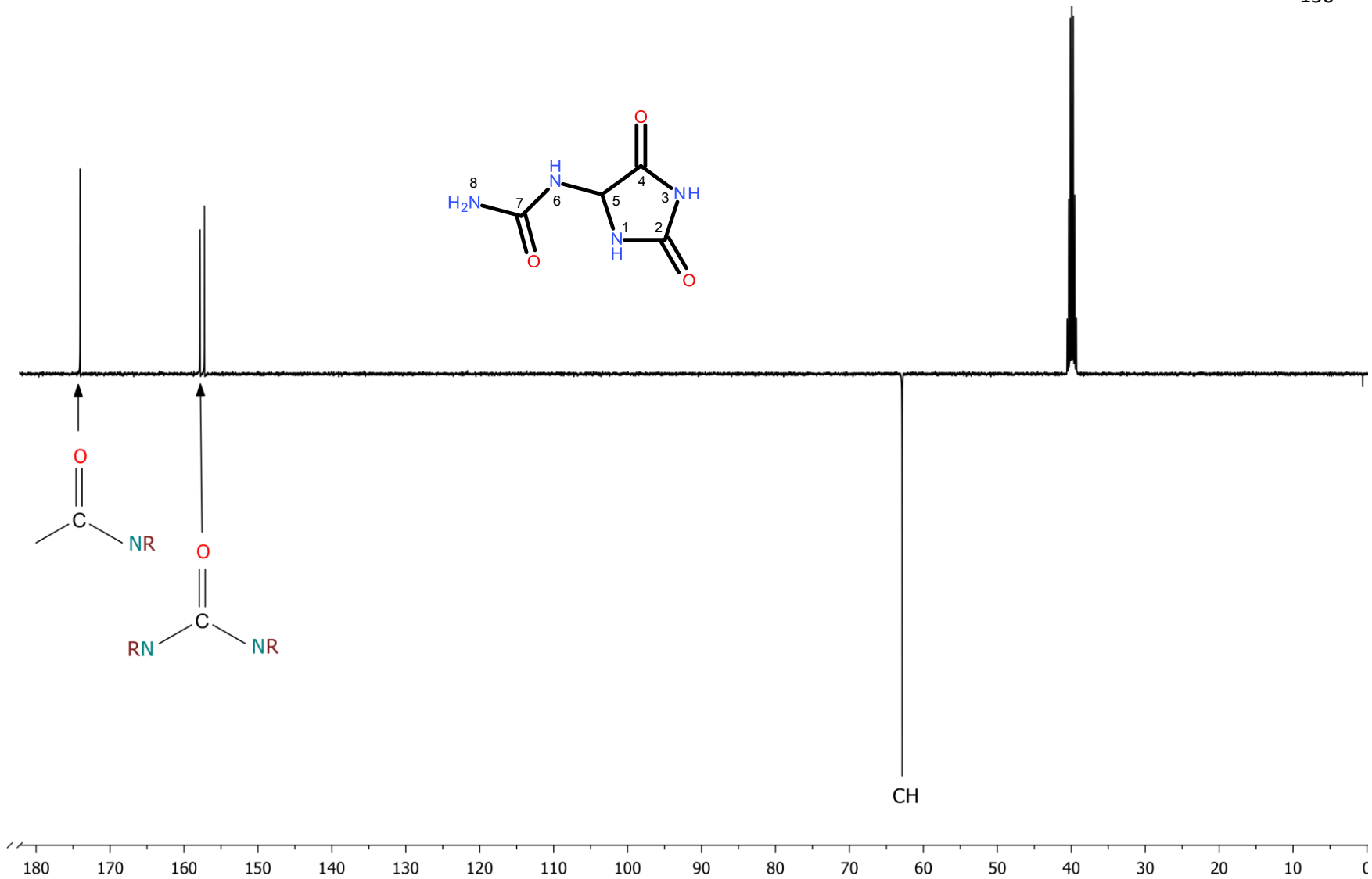
Apéndice 19. Experimento HMBC de 6-O-Metilscutellarina aislado de la parte aérea *L. achyranthifolia*



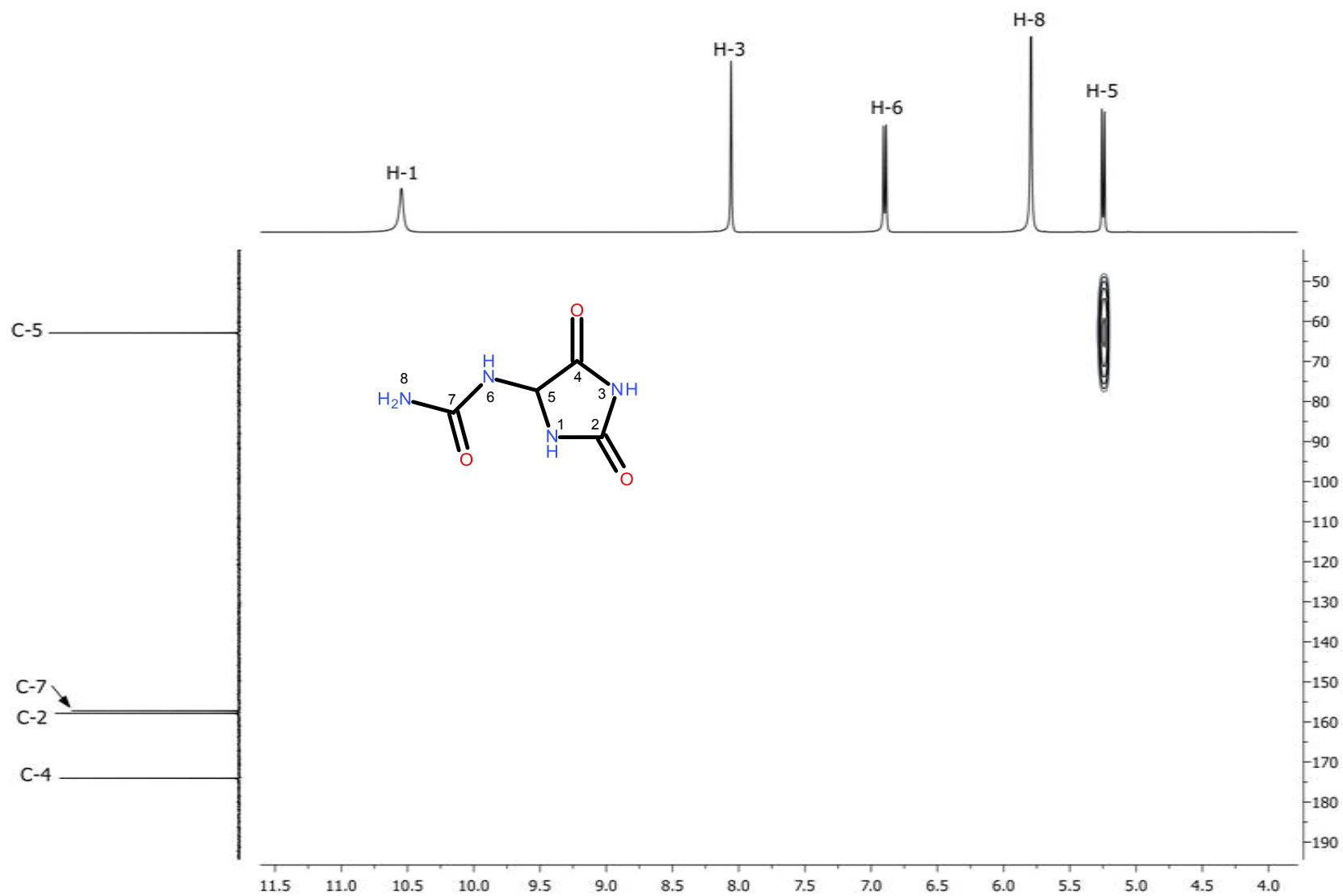
Apéndice 20. Experimento NOESY de 6-O-Metilscutellarina aislado de la parte aérea *L. achyranthifolia*



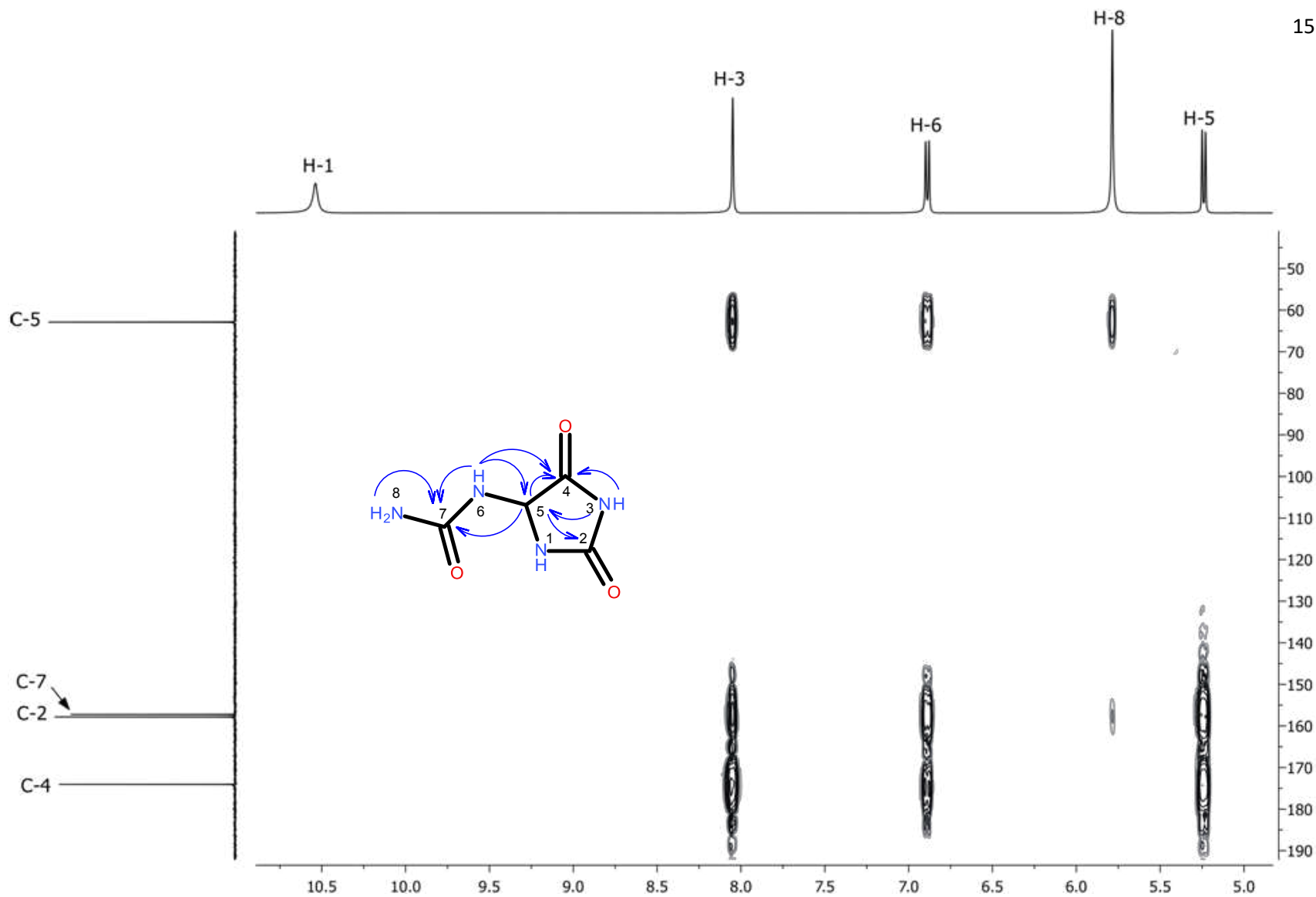
Apéndice 21. Patrón de fragmentación de masa de luteolina 7-glucurónido en modo ESI positivo



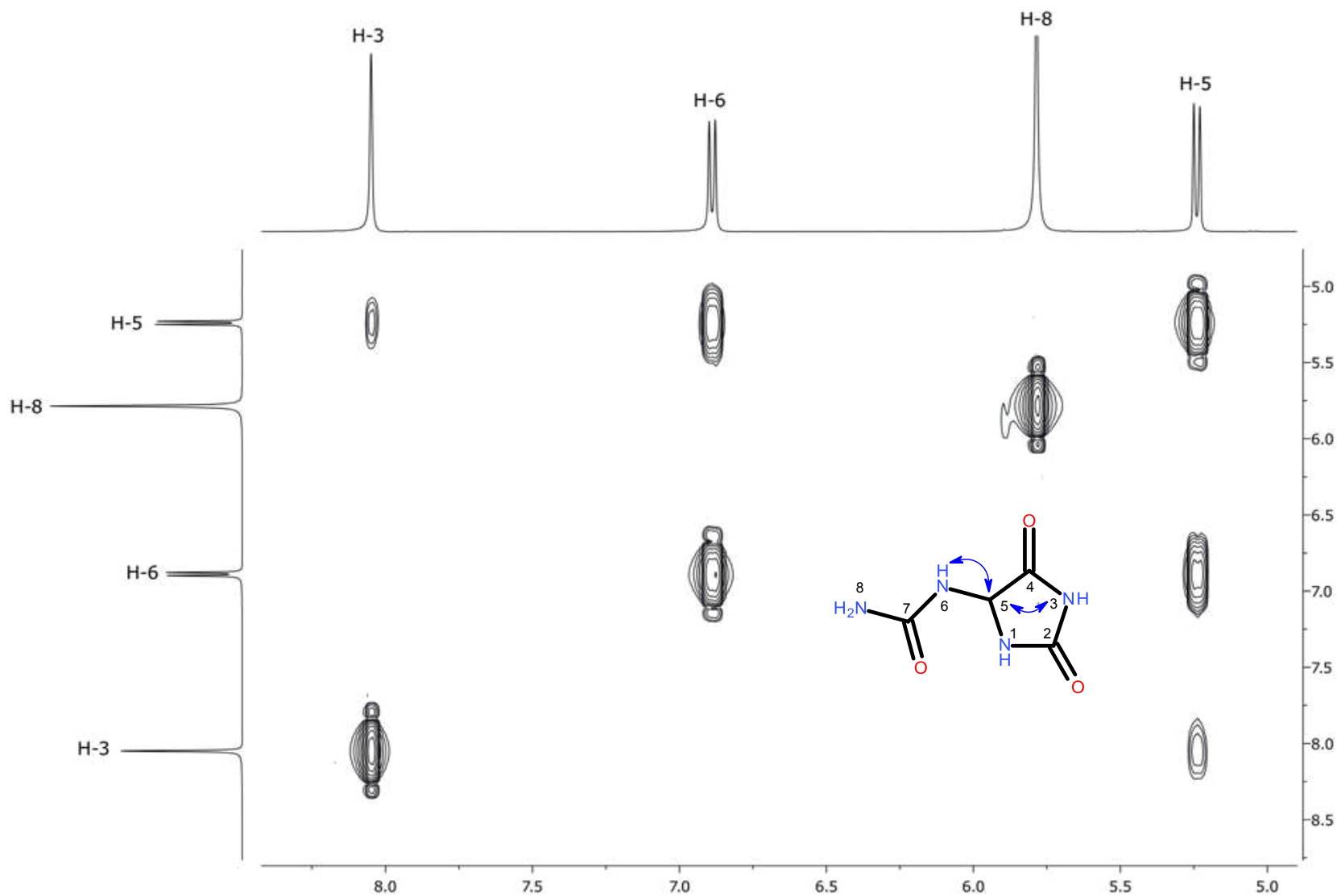
Apéndice 22. Experimento DEPTQ de la alantoína presente en la raíz de *T. densiflora* en DMSO-*d*₆ (100 MHz)



Apéndice 23. Experimento de correlación heteronuclear HSQC de la alantóina presente en la raíz de *T. densiflora* en DMSO-*d*₆



Apéndice 24. Experimento de correlación heteronuclear HMBC de la alantoina presente en la raíz de *T. densiflora* en $\text{DMSO-}d_6$



Apéndice 25. Sección del experimento COSY que muestra las correlaciones entre H-5, H-6 y H-3, H-5 de la alantoína aislada de la raíz de *T. densiflora*