

Mtra. María Elena Contreras Garfias  
 Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
 PRESENTE



Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

### Datos del Alumno

Nombre : Ximena Molina Flores	
Matrícula : 2172034858	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : Av 537 38 San Juan de Aragón 2da sección. Gustavo A. Madero, 07969, Ciudad de México.	
Teléfono : 5583802817	Celular : 5583802817
Correo Electrónico : ximenamolinaflores@gmail.com	CURP : MOFX961023MDFLLM04

### Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Tagetes lucida: Fuente potencial de cumarinas bioactivas							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : Laboratorio N-015, UIDIS. Departamento de Sistemas Biologicos							
Dependencia : Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Coyoacán	Localidad : Villa Quietud						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	18	12	2020		18	6	2021

### PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 1.- Educativo	Tipo: 2.- Interno
Orientación: 10.- Otros	

### FIRMAS

Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa 36434

Asesor Interno  
 Nombre, firma y No. Económico

Ximena Molina Flores  
 Alumno  
 Nombre, firma

M. en CQ Olivia Soria Arteché 5676

Asesor Externo  
 Nombre, firma y No. Económico

Felipe Mendoza Pérez  
 Vo. Bo. de la Comisión  
 Nombre y firma de la persona que autoriza

No. de páginas: 45

Lugar de realización: Departamento de sistemas Biológicos, laboratorio de Síntesis y Aislamiento de Sustancias Bioactivas

Prácticas realizadas en:

Proyecto genérico:

Contiene:

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Fotografías       | <input checked="" type="checkbox"/> Ilustraciones |
| <input type="checkbox"/> Gráficas          | <input type="checkbox"/> Mapas                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> Tablas | <input checked="" type="checkbox"/> Diagramas     |
| <input type="checkbox"/> Trípticos         |   |

Vo.Bo. Asesor: \_\_\_\_\_

Fecha liberación texto completo: 20211207

NOTA: La versión digital de este reporte, solo podrá ser consultada en cualquier Unidad académica de la Universidad, incluyendo a Rectoría General



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Tagetes lucida: Fuente potencial de cumarinas bioactiva

Asesores

Interno: Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa

Interno: M. en CQ Olivia Soria Arteché

07 de diciembre de 2021

Sistemas Biológicos  
Química Farmacéutica Biológica

Tagetes lucida: Fuente potencial de cumarinas bioactiva

,

Interno: Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa  
Interno: M. en CQ Olivia Soria Arteché

07 de diciembre de 2021

47

Departamento de sistemas Biológicos, laboratorio de Síntesis y Aislamiento de Sustancias Bioactivas

X

X

X

20211207



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad Xochimilco

CDMX, a 7 de diciembre de 2021

Mtra. María Elena Contreras Garfias  
Directora de la División de Ciencias  
Biológicas y de la Salud

PRESENTE

Se extiende la presente para informar que la C. Ximena Molina Flores, con número de matrícula 2172034858, alumna de la Carrera de Químico Farmacéutico Biológica; realizó su Servicio Social bajo la dirección de la Maestra en Ciencias Químicas Olivia Soria Arteché y un servidor, del 18 de diciembre de 2020 al 18 de junio de 2021, cumpliendo con 480 horas.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes.

ATENTAMENTE

M. en C. Olivia Soria Arteché  
Número económico 5676

Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa  
Número económico 36434



**Universidad Autónoma  
Metropolitana  
Unidad Xochimilco**



**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**Departamento de Sistemas Biológicos**

**Químico Farmacéutico Biólogo**

***Tagetes lucida*: Fuente potencial de cumarinas  
bioactivas.**

**Alumna: Ximena Molina Flores**

**Matrícula 2172034858**

**Asesor(es): Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa**

**M. en CQ Olivia Soria Arteché**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO**

**INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL.**

*Tagetes lucida: Fuente potencial de cumarinas bioactivas.*

**PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO**

Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos.

**Alumna:** Ximena Molina Flores **Matrícula:** 2172034858

**Asesores:** Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa  
M. en CQ Olivia Soria Arteché

**Lugar de realización:** Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Sistemas Biológicos, laboratorio de Síntesis y Aislamiento de Sustancias Bioactivas

**Fecha de inicio y terminación**

18-diciembre de 2020- 02-diciembre de 2021

## **Agradecimientos**

A la Universidad Autónoma Metropolitana por permitirme ser parte de ella y por la formación académica recibida.

Al Dr. Francisco Palacios por permitirme ser parte de su equipo de trabajo; por la paciencia, el tiempo invertido, ayuda y las oportunidades que me proporcionó, para así desarrollarme de mejor manera dentro de la licenciatura.

A todo el equipo de laboratorio N015 por la ayuda proporcionada, compartir su experiencia y por cada recomendación.

Al personal del Sistema de Servicio Social por la revisión, observaciones dadas y por el otorgamiento de la beca para poder continuar con mi formación en el servicio social.

A mis compañeras de trabajo Hilda, Silvia, Jenny, Yazmín y Nigte por el apoyo, palabras de aliento y compañía durante el proceso de mi licenciatura.

## **Dedicatoria**

A mis padres: Alejandro Molina Medellín y Cynthia Flores Nava por el amor, educación y empeño que pusieron para que yo pudiera emprender este camino. Gracias por nunca soltarme y siempre apoyarme.

A mi abuelito Manuel Flores Marroquín has sido un pilar en mi vida y en toda mi educación. estaré eternamente agradecida por que siempre estuviste a mi lado, apoyarme en las buenas y en las malas, y que, aunque ya no estés en este mundo estás siempre en mi corazón.

A mi familia por estar conmigo en las buenas y en las malas, alentarme y apoyarme en este proceso.

A mis amigas: Grecia, K. Fernanda, M. Fernanda, Constanza y Dalia con quienes compartí experiencias inolvidables, por su cariño, apoyo y amor. Sin ustedes mi estancia en la universidad no hubiera sido la misma.

A mi compañero David, por todo el cariño, porque a pesar de la distancia y malos momentos, el cariño entre nosotros es grande, por tu apoyo y confianza y por todos los momentos compartidos.

## **Gracias**

<b>Índice</b>	<b>Páginas</b>
<b>Antecedentes</b>	7
<i>Género Tagetes</i>	7
<b>Objetivo general</b>	18
<b>Desarrollo experimental</b>	18
<b>Revisión bibliográfica</b>	18
<b>Material vegetal</b>	20
<b>Preparación del extracto orgánico por maceración</b>	20
<b>Fraccionamiento primario</b>	20
<b>Fraccionamiento Secundario</b>	20
<b>Aislamiento de la Herniarina (1) y la Escoparona (2)</b>	21
<b>Resultados</b>	22
<b>Fraccionamiento primario</b>	22
<b>Fraccionamiento secundario de la fracción TLE-1</b>	22
<b>Aislamiento de Herniarina (1) y Escoparona (2)</b>	22
<b>Discusión</b>	25
<b>Conclusiones</b>	28
<b>Anexo 1</b>	31

## Resumen

El género *Tagetes* cuenta con aproximadamente entre 50 a 55 especies, distribuidas ampliamente en el territorio nacional, cerca del 40% de las especies de este género se encuentran en México.

Al menos cuatro de las especies de este género tienen importancia económica por sus usos ornamentales, alimenticios y medicinales; se trata de *Tagetes erecta*, *T. patula*, *T. minuta* y *T. lucida*.

Estas especies han sido objeto de estudios desde los puntos de vista botánico, biológico y químico. Se han descrito múltiples actividades biológicas (antiinflamatorias, analgésicas, antioxidantes, larvicidas, antimicrobianas, fitotóxicas, entre otras), así como su composición química (terpenos, fenoles, etc.). Los grupos de compuestos identificados en los fenoles destacan los flavonoides y las cumarinas. En el primero destacan la patuletina, quercetina y quercetagetina, mientras que, en las cumarinas, se encuentran la 7-isopreniloxicumarina, herniarina, 6-metoxi-7-isopreniloxicumarina, 6,7,8-trimetoxicumarina y escoparona. En la búsqueda de compuestos bioactivos, se requieren fuentes vegetales de dichos compuestos, que se puedan aislar en rendimientos adecuados, además de contar con una revisión exhaustiva sobre estas especies. El pericón o *T. lucida* es una de las especies con mayor uso en la medicina tradicional, pero con pocos estudios sobre sus efectos fitotóxicos, constituye una especie que puede ser una fuente importante de moléculas bioactivas como las cumarinas y que requiere una revisión bibliográfica integral.

En este trabajo, se realizó una revisión bibliográfica en gestores de búsqueda como Pubmed, SciFinder, ScienceDirect y Scopus, utilizando la palabra clave “*Tagetes*” en combinación con “allelopathy”, “coumarins” y “herbicides”; así como sus propiedades biológicas, aspectos y tipos de extractos evaluados del género como fuentes potenciales de cumarinas bioactivas. También se reporta el aislamiento de dos cumarinas, herniarina y escoparona con buenos rendimientos, a las cuales se les asignó sus estructuras mediante el estudio de sus constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas (RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , Infrarrojo y Espectroscopia de Masas). Este trabajo resalta la importancia del género *Tagetes* como fuentes de cumarinas bioactivas que podrían constituir materias primas para su modificación estructural, así como mejorar sus propiedades biológicas y toxicológicas. De esta manera, se aplicaron los conocimientos adquiridos en la licenciatura, en específico, los de los módulos 5 y 7.

## **Antecedentes**

### **Género *Tagetes***

El género *Tagetes* cuenta con aproximadamente entre 50 a 55 especies, distribuidas ampliamente en el territorio nacional.<sup>1</sup> Cerca del 40% de las especies de este género se encuentran en México.<sup>2</sup> Es un género de plantas anuales y perennes, en su mayoría herbáceas, de la familia del girasol (Asteraceae o Compositae). También, este género es conocido por sus especies hortícolas y productoras de aceites esenciales, que se cultivan o aparecen de forma natural en muchas partes del mundo. El género es nativo de la zona que se extiende desde el suroeste de los Estados Unidos de América hasta Argentina, con la máxima variación en México. En México, se considera un centro de distribución de varias especies de este género, que son empleadas como medicinas tradicionales; se utilizan por sus propiedades analgésicas, antisépticas, carminativas, diuréticas, estimulantes y repelentes de insectos.<sup>3</sup> Se les conoce comúnmente por el nombre de caléndulas, pero en cada zona del país donde se distribuyen pueden tener un nombre distinto, las especies más conocidas son *Tagetes erecta*, *T. patula*, *T. minuta* y *T. lucida*.<sup>4</sup>

*T. lucida* Cav, es una planta aromática nativa considerada una de las más importantes de México, debido a su frecuente uso en rituales y ceremonias. Sus nombres comunes incluyen "pericón", "yauhtli" (náhuatl), "hierba anís" o "hierba de Santa María". En la medicina tradicional mexicana, *T. lucida* se prescribe para los "nervios" y el "susto". Existen varios usos menores en el tratamiento de los sistemas gastrointestinal, respiratorio y urogenital, contra el reumatismo, las úlceras y la inflamación. Además, *T. lucida* se recomienda como estimulante del sistema inmunitario, la decocción de sus partes aéreas se emplea para combatir las infecciones causadas por algunos helmintos y protozoos (por ejemplo, ascaridiasis y giardiasis).<sup>5</sup>

### **El género *Tagetes* como fuente de compuestos bioactivos y alelopáticos**

En la tabla 1 se muestran los efectos biológicos de distintas especies del género, con el fin de resumir cada uno de los artículos consultados, empleando los datos más importantes dentro de estos mismos como es la especie, el tipo de extracto y el efecto evaluado, documentando su resultado.

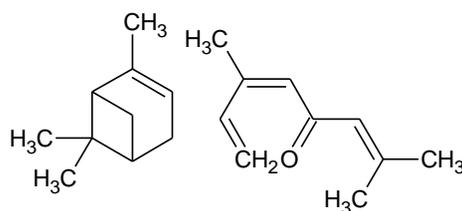
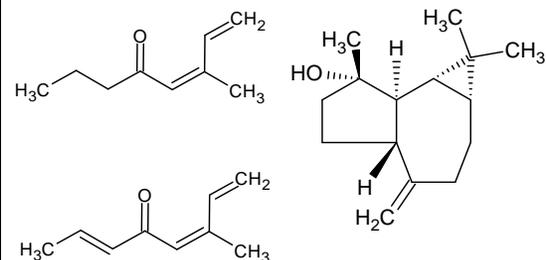
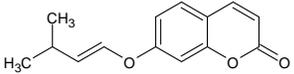
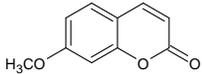
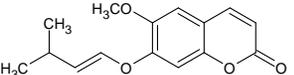
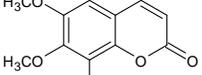
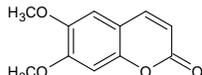
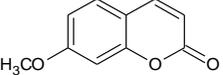
Tabla 1. Efectos biológicos de distintas especies del género <i>Tagetes</i>			
Especie	Tipo de extracto/compuesto	Efecto evaluado	Referencia
<i>T. minuta</i>	Aceites esenciales/ $\alpha$ -pineno, limoneno y ocimenona. 	Alelopático. Inhibición del crecimiento de la raíz de <i>Zea mays</i> . Efecto oxidante por cuantificación de malondialdehído. <i>T. minuta</i> provocó una disminución en el crecimiento de la raíz del 58% en un tiempo de exposición de 96 h. En el caso de los terpenos, $\alpha$ -pineno, limoneno y ocimenona; provocaron una disminución en el crecimiento de 6.97%, 9.96% y 43.3%, respectivamente, a una exposición de 96 h. En cuanto al efecto oxidante, <i>T. minuta</i> y sus tres compuestos mayoritarios provocaron un aumento en los niveles de MDA, indicando un aumento en la peroxidación lipídica.	Scrivanti et al., 2003
	Tres extractos acuosos de las hojas (50, 75 y 100%)	Alelopático. Inhibición del crecimiento de la raíz, tallo, germinación, peso fresco y seco de las especies <i>Euphorbia helioscopia</i> y <i>Sorghum halepense</i> . A la más alta concentración probada, hubo una reducción significativa en casi todos los parámetros evaluados sobre <i>E. helioscopia</i> y <i>S. halepense</i> , en el bioensayo de papel filtro. Suplementado con suelo, todas las concentraciones de los extractos mostraron una reducción en la germinación, crecimiento de la raíz y los tallos, además del peso de las plantas frescas y secas. El estudio fitoquímico preliminar reporta la presencia de alcaloides, taninos, saponinas, flavonoides y terpenoides.	Sehrish et al., 2015
	Aceites esenciales de las hojas y de las estructuras reproductivas/tagetonas, ocimenonas y espatulenol 	Autotóxica. Estudio de un plantío silvestre durante un ciclo de vida de <i>T. minuta</i> . Se prepararon aceites esenciales de las hojas y de las partes reproductivas. Se evaluó el efecto fitotóxico de las ocimenonas, a través de la inhibición de la germinación de especies asociadas (crecen en el mismo ambiente) a <i>T. minuta</i> . Entre ellas, <i>Bidens subalternans</i> DC, <i>Taraxacum officinale</i> , <i>Mikania cordifolia</i> , <i>Salix eriostachya</i> , <i>Cynodon dactylon</i> . Se realizó una cromatografía de gases para identificar un total de 22 componentes (81.4-91.3 % del total de compuestos), los cuales fueron las tagetonas, ocimenonas y espatulenol. Se identificaron a los compuestos bioactivos mediante una bioautografía por CCF y semillas de rábano ( <i>Raphanus sativus</i> ). <i>B. subalternans</i> presentó la mayor tasa de germinación y fue la especie más sensible ya que disminuyó su	López et al., 2008

Tabla 1. Efectos biológicos de distintas especies del género <i>Tagetes</i>			
Especie	Tipo de extracto/compuesto	Efecto evaluado	Referencia
		crecimiento con una menor concentración de ocimenonas, esto evaluándose a la IC <sub>50</sub> de 154 ppm, <i>T. minuta</i> presentó una IC <sub>50</sub> de 315 ppm.	
<i>T. minuta</i>	Extracto acuoso	<p>Alelopático.</p> <p>Se estudió el efecto de los extractos acuosos sobre la germinación y el crecimiento temprano de las malezas del arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i> [L.] Beauv., o pasto) y el coquillo púrpura (<i>Cyperus rotundus</i> L.). También se estudió el efecto del polvo de las hojas de <i>T. minuta</i> en la etapa emergente y de crecimiento de las dos malezas, empleando macetas y suelo donde se cultiva la especie de interés económico (arroz). Para ello, se aplicó el extracto de <i>T. minuta</i> en cantidades de 0.05, 1, 2 y 4 toneladas/hectárea. De igual forma, para conocer el efecto del extracto sobre el arroz (<i>Oryza sativa</i> L.), se realizó el mismo procedimiento anterior, sólo cambiando a las malezas por plántulas de arroz.</p> <p>En respuesta a los extractos de tallo y raíz al 4%, la germinación se vió drásticamente afectada. Los resultados indican que los extractos acuosos de las diferentes partes (raíces, tallo y hojas) de <i>T. minuta</i> inhibieron la germinación y el crecimiento de las dos malezas de prueba, <i>E. crus-galli</i> y <i>C. rotundus</i>. En respuesta a los extractos de tallo y raíz al 4%, la germinación se vio drásticamente afectada. No sólo la germinación, sino también la longitud de la radícula y de la plúmula de ambas especies de malezas se redujeron.</p>	Batish et al., 2007

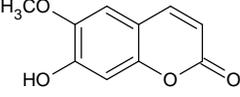
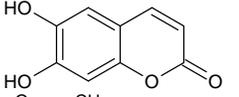
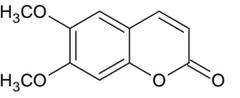
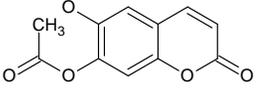
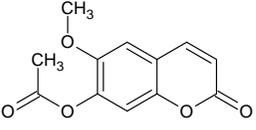
**Tabla 1. Efectos biológicos de distintas especies del género *Tagetes***

Especie	Tipo de extracto/compuesto	Efecto evaluado	Referencia
<p><i>T. lucida</i></p>	<p>Extractos de hexano y acetona/5 compuestos identificados: 7-isopreniloxicumarina (1), herniarina (2), 6-metoxi-7-isopreniloxicumarina (3), 6,7,8-trimetoxicumarina (4) y escoparona (5)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">  </div>	<p>Se utilizó el modelo de edema auricular inducido con TPA en ratón para evaluar el efecto antiinflamatorio de los extractos y compuestos. Se prepararon dos extractos orgánicos (hexano y acetona) de las partes aéreas de la planta.</p> <p>La separación cromatográfica del extracto hexánico permitió aislar e identificar cinco cumarinas bioactivas. 7-isopreniloxicumarina (1), herniarina (2), 6-metoxi-7-isopreniloxicumarina (3) 6,7,8-trimetoxicumarina (4) y escoparona (5). El extracto hexánico presentó una inhibición del edema auricular de 92.7%. De los compuestos, el compuesto 1 presentó el mejor efecto anti-edematogénico (81% de inhibición), mientras que el compuesto 2 inhibió un 54.4% el edema. El efecto antiinflamatorio mostrado por las cumarinas en el modelo farmacológico indica que la estructura básica de este tipo de compuestos está especialmente relacionada con la sustitución en la posición C-7. Los compuestos 1 y 3 no habían sido identificados previamente en <i>T. lucida</i>.</p>	<p>Monterrosas et al., 2018</p>
	<p>Extracción con hexano/ herniarina</p> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  </div>	<p>Se estudió el efecto larvicida contra <i>Aedes aegypti</i> (L.), de un extracto hexánico de las partes aéreas. Para esto, 200 g de la planta se secaron, pulverizaron y se extrajeron con hexano. Se obtuvieron 1.8 g del extracto, el cual fue separado por cromatografía en capa fina y cromatografía en columna para obtener ocho fracciones primarias.</p> <p>Se expusieron 25 larvas (<i>A. Aegypti</i>) a concentraciones de 5, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 ppm del extracto, con nueve repeticiones para cada concentración.</p> <p>Se calculó la DL<sub>50</sub> en 55.7 ppm. También se evaluó la fracción primaria uno a la concentración de 45 ppm, donde se obtuvo una mortalidad del 100%.</p> <p>Mediante estudios de espectrometría de masas de la fracción uno, se identificó a la 7-metoxicumarina (herniarina) como la potencial responsable del efecto larvicida.</p>	<p>Oranday et al., 2008</p>

**Tabla 1. Efectos biológicos de distintas especies del género *Tagetes***

Especie	Tipo de extracto/compuesto	Efecto evaluado	Referencia
<i>T. lucida</i>	<p data-bbox="348 440 873 537">Extracto etanólico/Quercetagenin-7-O-β-D-glucósido y 6,7-dimetoxicumarina (escoparona)</p> <div data-bbox="432 574 785 818"> </div> <div data-bbox="464 894 716 992"> </div>	<p data-bbox="894 269 1094 293">Antinociceptiva.</p> <p data-bbox="894 302 1728 496">Se emplearon las partes aéreas maduras (500 g de planta). Se eliminó la grasa mediante maceración con hexano. Al residuo vegetal se le realizó una segunda maceración con etanol absoluto para obtener el extracto final. Este se fraccionó por técnicas cromatográficas para obtener dos compuestos puros; Quercetagenin-7-O-β-D-glucósido (Q7G) y la cumarina escoparona (ESC).</p> <p data-bbox="894 505 1728 902">Se evaluó la actividad antinociceptiva del extracto etanólico y los compuestos puros, empleando dos modelos de dolor [prueba de los estiramientos abdominales inducidos por ácido acético diluido (1%) y prueba de la formalina (1%), ambos en ratón], así como la evaluación del daño gástrico provocado por ketorolaco (1 mg/Kg, ip) en coadministración con el extracto etanólico (300 mg/Kg) en rata. Además, estudiaron la posible participación de los receptores endógenos opioides y del receptor 5HT<sub>1A</sub> en el efecto antinociceptivo. En el modelo de los estiramientos abdominales, el extracto etanólico redujo el número de estiramientos (ED<sub>50</sub>=67 mg/Kg, ip). Los compuestos aislados también provocaron una reducción significativa, aunque no fue dosis-dependiente.</p> <p data-bbox="894 911 1728 1138">En la prueba de la formalina, el extracto presentó buena actividad en ambas fases del modelo a las dosis evaluadas (30-300 mg/Kg, ip). Por su parte, la evaluación de la Q7G evidenció un buen efecto en la fase neurogénica a las dosis de 10 a 100 mg/Kg, mientras que la ESC presentó un efecto moderado en la primera fase a la dosis de 10 mg/Kg pero un efecto importante en la fase inflamatoria del modelo a las dosis de 3 y 10 mg/Kg.</p> <p data-bbox="894 1146 1728 1235">En cuanto al daño gástrico provocado por ketorolaco (1 mg/kg, ip), administrado de manera simultánea, el extracto previno dicho daño en los animales de prueba desde las dosis de 30 mg/Kg.</p> <p data-bbox="894 1243 1728 1308">Es posible que los efectos antinociceptivos estén mediados por receptores endógenos opioides y serotoninérgicos (5 HT<sub>1A</sub>).</p>	González et al.,2019

**Tabla 1. Efectos biológicos de distintas especies del género *Tagetes***

Especie	Tipo de extracto/compuesto	Efecto evaluado	Referencia
<p><i>T. lucida</i></p>	<p>Se aislaron varias cumarinas de un extracto de diclorometano: Escopoletina, 6,7-dihidroxicumarina, 7-metoxi-6-hidroxicumarina, escoparona, y sus derivados 6,7-diacetoxicumarina y 6-metoxi-7-acetoxicumarina</p> <div style="display: flex; flex-wrap: wrap; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  </div> </div>	<p><i>T. lucida</i>, conocida como "pericón", es una planta medicinal utilizada desde tiempos precolombinos por los aztecas y otras culturas mesoamericanas. Esta especie se distribuye desde el norte de México hasta el norte de Nicaragua. Sus hojas y flores se utilizan para el tratamiento del dolor de estómago y para el tratamiento de diversas dolencias antiinflamatorias.</p> <p>Los extractos y compuestos de esta planta tienen actividad inhibitoria sobre la germinación, la respiración y el crecimiento de las plántulas, específicamente contra las semillas de dicotiledóneas ensayadas (<i>L. sativa</i>, <i>T. pratense</i> y <i>P. ixocarpa</i>), identificadas mediante bioautografía. En este trabajo se reporta la identificación de la escoparona como fitotoxina, sin embargo, no presentan datos sobre CI<sub>50</sub> o porcentaje de inhibición sobre la germinación o crecimiento radicular.</p>	<p>Céspedes et al., 2006</p>

**Tabla 1. Efectos biológicos de distintas especies del género *Tagetes***

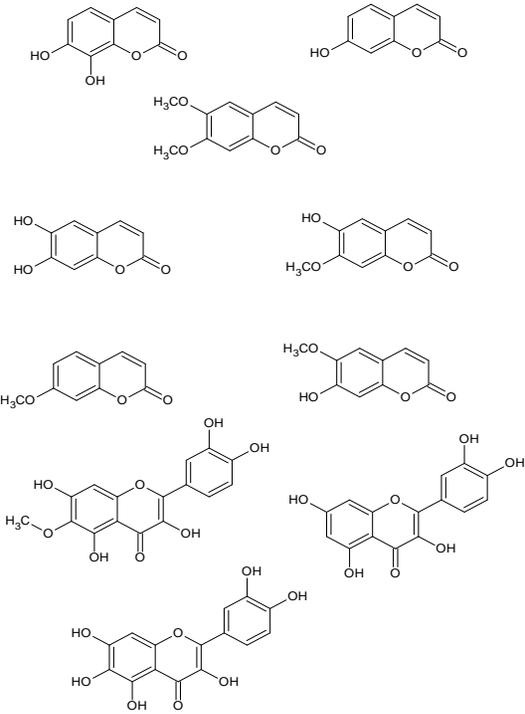
Especie	Tipo de extracto/compuesto	Efecto evaluado	Referencia
<p><i>T. lucida</i></p>	<p>Extracto de diclorometano y metanol. De las partes aéreas de <i>T. lucida</i> se aislaron 7 cumarinas:</p> <p>7,8-dihidroxycumarina, umbeliferona (7-hidroxycumarina), escoparona, esculetina, 6-hidroxi-7-metoxicumarina, herniarina y escopoletina, y tres flavonoides, patuletina, quercetina y quercetagina.</p> 	<p>Las partes aéreas secas, se extrajeron 3 veces con metanol durante 48 horas. El extracto crudo se evaporó en el rotavapor. Este se resuspendió en MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1) y se extrajo por un proceso de partición líquido-líquido con diclorometano. La fracción diclorometano/metanol (4:1) se separó de la fase acuosa de metanol (M1 y M2, respectivamente), y ambas fases se concentraron. La fracción M2 se procesó por cromatografía en columna flash, de la cual se obtuvieron 10 fracciones, y se purificaron por medio de técnicas cromatográficas convencionales. La pureza de compuestos se determinó por medio de HPLC y se caracterizaron por métodos espectroscópicos.</p> <p>Se aislaron e identificaron siete cumarinas y tres flavonoides. Herniarina, una de las cumarinas, mostró una alta actividad contra hongos (<i>Rhizoctonia solani</i>, <i>Fusarium verticillioides</i>, <i>Aspergillus niger</i>, <i>Penicillium chrysogenum</i>).</p>	<p>Céspedes et al., 2006</p>

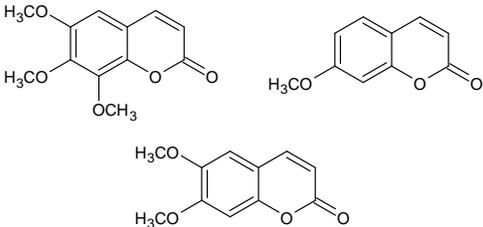
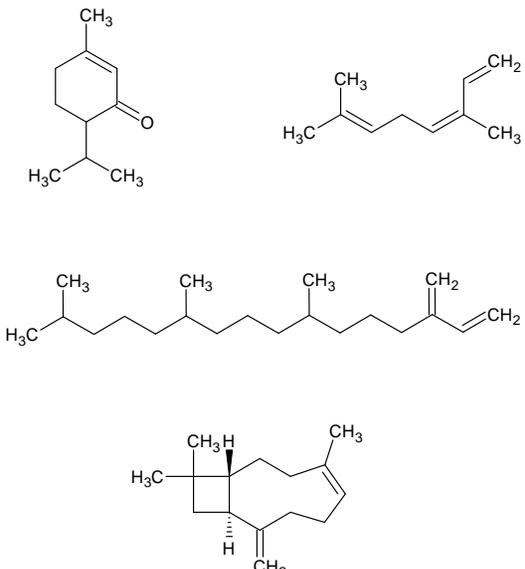
Tabla 1. Efectos biológicos de distintas especies del género <i>Tagetes</i>			
Especie	Tipo de extracto/compuesto	Efecto evaluado	Referencia
<i>T. lucida</i>	<p>Extracto etanólico Se aislaron a las 6, 7, 8-trimetoxicumarina, herniarina y escoparona.</p> 	<p>Se preparó un extracto etanólico de las partes aéreas (14.34 g de extracto). Se ensayó la actividad vasorrelajante y antihipertensiva <i>in vivo</i> del extracto y los compuestos bioactivos mayoritarios. Los resultados mostraron que el extracto (10 y 100 mg/kg), indujo una disminución de la presión arterial sistólica y diastólica en comparación con el control. Este efecto fue persistente durante 7 horas y dicha relajación fue parcialmente dependiente del endotelio mediada por el sistema NO/cGMP. Las cumarinas 6,7,8-trimetoxicumarina y escoparona presentaron efectos vasorelajantes.</p>	Estrada et al., 2021

Tabla 1. Efectos biológicos de distintas especies del género <i>Tagetes</i> (Cont.)			
Especie	Tipo de extracto/compuesto	Efecto evaluado	Referencia
<i>T. erecta</i>	<p>Aceite esencial/monoterpenos y sesquiterpenos</p>	<p>Se estudió la composición química del aceite esencial extraído de <i>Tagetes erecta</i> y se evaluó su actividad herbicida contra <i>Echinochloa crus-galli</i>. La extracción se realizó por el método de hidrodestilación en un aparato tipo Clevenger. El aceite esencial (AE) se recuperó directamente sin añadir ningún disolvente. La identificación de los componentes se realizó CG-EM.</p> <p>La extracción del AE dió un rendimiento de 0.72 mg/Kg de peso fresco. Se detectaron cantidades relativamente altas de monoterpenos como: piperitona, piperitenona y ocimeno; también ejemplares de sesquiterpenoides como neoftadieno y cariofileno.</p> <p>La evaluación de la actividad herbicida, se preparó una formulación emulsificable del aceite esencial (EC-AE). En la inhibición de la germinación de semillas de <i>E. crus-galli</i> se agregaron 5 mL de las diferentes concentraciones que se prepararon (250, 500, 1000 y 2000 µL/L) de EC-AE a las semillas previamente colocadas en cajas de Petri.</p>	Laosinwattana et al., 2019

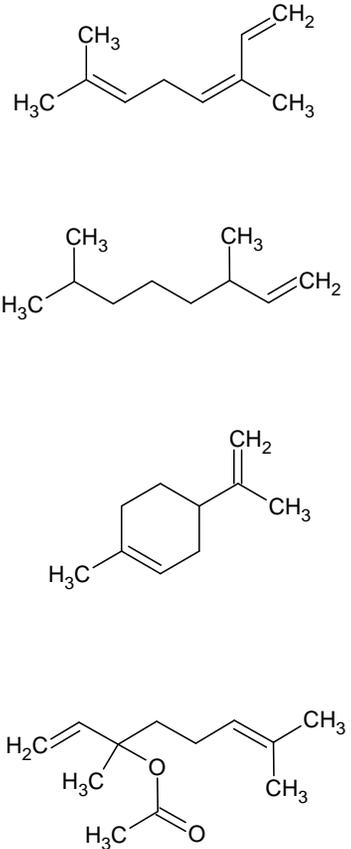
**Tabla 1. Efectos biológicos de distintas especies del género *Tagetes* (Cont.)**

Especie	Tipo de extracto/compuesto	Efecto evaluado	Referencia
<i>T. erecta</i>	 <p>The image shows three chemical structures. The top left is a substituted cyclohexenone with a methyl group at the 2-position and a 2-methylpropyl group at the 3-position. The top right is a branched diene with methyl groups at the 1 and 5 positions and a vinyl group at the 4 position. The bottom structure is a complex bicyclic system with multiple methyl groups and a vinyl group.</p>	<p>Por otra parte, a las plántulas que se sembraron en las cajas de Petri se aplicó de manera foliar con EC-AC en concentraciones 10, 20, 40 y 80 mL/L. El EC-EO inhibió fuertemente tanto la germinación de semillas como el crecimiento de plántulas de una manera dependiente de la dosis. La inhibición de la germinación se atribuyó a la inhibición de la <math>\alpha</math>-amilasa, importante en la descomposición de azúcares para el correcto desarrollo de la semilla, esta inhibición incrementó cuando se usó la concentración más alta de EC-AE (2000 <math>\mu</math>L/L); mientras que la inhibición en el desarrollo de la plántula se atribuyó al decremento de clorofila a, b y de carotenoides, el máximo decremento se observó cuando se usó la concentración alta (80 mL/L). La demostración de la actividad herbicida por parte del AE de <i>T. erecta</i> indica que puede ser una fuente prometedora de herbicidas alternativos para su uso en agricultura sostenible, particularmente como herbicida de uso múltiple y de contacto.</p>	
	<p>Extracto acuoso e hidroalcohólico</p>	<p>Se evaluaron los efectos fitotóxicos (caja petri con 59 semillas de cada especie) y antioxidante de extractos acuosos y orgánicos de <i>T. erecta</i> y <i>T. patula</i>. De igual forma, se cuantificaron fenoles y flavonoides totales. Los ensayos se realizaron en semillas de las especies <i>Lactuca sativa</i> y <i>Allium cepa</i> (pre y post-emergentes). La actividad antioxidante se evaluó en el ensayo de decoloración del radical DPPH y en el ensayo del poder reductor del hierro.</p> <p>Los extractos acuosos se prepararon con agua destilada (relación 1:10 peso/volumen respecto del material vegetal) y agitación mecánica por 24 horas. Posteriormente, se liofilizaron.</p>	<p>Santos et al., 2015</p>

**Tabla 1. Efectos biológicos de distintas especies del género *Tagetes* (Cont.)**

Especie	Tipo de extracto/compuesto	Efecto evaluado	Referencia
		<p>Los extractos orgánicos se prepararon con:</p> <p>a) Etanol acuoso (70:30 y una relación 1:10 peso/volumen respecto del material vegetal) y agitación mecánica por 24 horas. Este proceso se repitió 3 veces. El extracto se concentró por evaporación al vacío, el residuo se liofilizó, y</p> <p>b) Etanol absoluto (relación 1:10 peso/volumen respecto del material vegetal) y agitación mecánica por 24 horas. Posteriormente, se evaporó al vacío. Finalmente, el residuo se llevó a sequedad a temperatura ambiente.</p> <p>Cada placa contenía 50 semillas de lechuga, con seis réplicas para cada grupo experimental tratado con diferentes extractos de <i>T. patula</i> y <i>T. erecta</i> (a concentraciones de 5, 10 y un grupo de control negativo (agua)). Se determinó la actividad antioxidante, los extractos de cada muestra se disolvieron en etanol absoluto a diferentes concentraciones (250, 500, 1000, 2000 y 4000 µg/mL) y luego mezclados con 250 µL de solución de DPPH (500 µM). Las semillas tratadas con la concentración de 20 mg/mL del extracto acuoso de <i>T. erecta</i> no presentaron germinación, diferenciándose significativamente del control (98,33%). Para el extracto hidroetanólico, en los tratamientos con 5, 10 y 20 mg/mL se observaron tasas de germinación de 94,33%, 95,67% y 32,00% respectivamente. Los resultados de los tratamientos con extracto acuoso de <i>T. patula</i>, a las concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL y 20 mg/mL mostraron una germinación de 87,00%, 51,00% y 0,00% respectivamente. Los resultados obtenidos para el extracto hidroetanólico mostraron una germinación de 84,33%, 42,00% y 0,00% para los tratamientos con 5 mg/mL, 10 mg/mL y 20 mg/mL, respectivamente.</p>	<p>Santos et al., 2015</p>

**Tabla 1. Efectos biológicos de distintas especies del género *Tagetes* (Cont.)**

Especie	Tipo de extracto/compuesto	Efecto evaluado	Referencia
<i>T. minuta</i>	<p>Varias especies de <i>Tagetes</i>/monoterpenos</p> 	<p>Se describe el efecto insecticida (<i>Sitophilus zeamais</i>) de distintos aceites esenciales ricos en terpenos de tipo cetónico. Uno de esos aceites se extrajo de <i>T. minuta</i>, el cual es rico en <i>cis</i>-<math>\beta</math>-Ocimeno (42.4%) y <i>E</i>-Ocimeno (35.5%).</p> <p>De igual forma, se describe el efecto nematocida de distintas especies del género <i>Tagetes</i>, en específico en aquellas donde se han aislado monoterpenos y politerpenos como compuestos activos. De manera particular, <i>T. patula</i> que contiene como ingredientes activos al linalol (26,8), limoneno (22%, 9%), acetato de linalilo (17,4%), ocimeno (10,7%)</p>	Saroj et al., 2019

## **Objetivo general**

Realizar una revisión bibliográfica del género *Tagetes* y sus metabolitos secundarios con efectos alelopáticos con énfasis en las cumarinas

## **Objetivos específicos**

- Realizar una revisión bibliográfica del género *Tagetes* con efectos alelopáticos empleando bases de datos especializados
- Generar una base de datos de los efectos alelopáticos del género *Tagetes*.
- Reportar la identificación y el aislamiento de dos cumarinas de la especie *T. lucida*.
- Caracterizar por métodos espectroscópicos y espectrométricos dos cumarinas aisladas de la especie *T. lucida*.

## **Desarrollo experimental**

### **Revisión bibliográfica**

Se realizaron búsquedas bibliográficas en gestores de búsqueda como Pubmed, Scifinder, ScienceDirect y Scopus, utilizando la palabra clave “*Tagetes*” en combinación con “*allelopathy*”, “*coumarins*” y “*herbicides*” para identificar artículos relevantes. Al recabar una gran cantidad de resultados se utilizaron refinamientos especializados, como que ambas palabras clave se encontraran dentro del documento, ya sea en el título, resumen o palabras clave del autor. Con esta metodología se logró reducir de manera favorable el número de artículos.

Posteriormente estos artículos se llevaron a un gestor de referencias Mendeley. Los resultados se emplearon para construir los antecedentes.

### **Procedimientos generales.**

El trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Síntesis y Aislamiento de Sustancias Bioactivas de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Ciudad de México.

Los reactivos y disolventes empleados en la investigación fueron de alta calidad, adquiridos a la empresa Sigma-Aldrich.

## **Análisis cromatográficos**

- Análisis por cromatografía en capa fina (CCF)

Para efectuar los análisis por cromatografía en capa fina, se utilizaron placas de vidrio de 5x5 cm, recubiertas de gel de sílice (sílica gel 60 F254 Merck), utilizando distintos sistemas de elución mezclando solventes como hexano (HEX), diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH). La similitud de los compuestos presentes en extracto activo se visualizó utilizando luz ultravioleta (UV) de dos longitudes de onda distintas.

- Cromatografía en columna abierta (CCA)

El análisis cromatográfico se realizó en una columna de vidrio empacada con gel de sílice (160 g) (Macherey-Nagel 60, gránulo de 0.063-0.2 mm). Utilizando varios sistemas de elución con diferentes solventes orgánicos como: hexano (Hex), cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) y acetato de etilo (AcOEt). La mezcla isocrática ideal fue Hex- $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (50:35:15). Se utilizó el rotavapor para concentrar cada una de las fracciones.

## **Determinación de las constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas.**

Los puntos de fusión se midieron en equipos de Fisher Johns y se reportaron sin corregir. Los compuestos se caracterizaron mediante espectroscopia infrarroja, empleando un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier marca Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum RX, en pastilla de KBr.

La caracterización por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y Carbono-13 se realizaron utilizando un equipo Agilent DD2 que opera a 600 MHz para hidrógeno y a 151 MHz para carbono-13, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como disolvente; los espectros fueron procesados con el Software MestReNova y los desplazamientos químicos fueron registrados en ppm ( $\delta$ ). Dichos equipos están ubicados en el Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-Xochimilco.

Los espectros de masas de baja resolución fueron registrados en un espectrómetro Waters Xevo TQ-MS (Waters, Milford, MA, USA) por la técnica de impacto electrónico (EI). La concentración inyectada de los compuestos fue de 500 ng/mL en ACN 100 %. La fase móvil fue de ácido fórmico 0.1 % - ACN 60:40 % v/v. Este equipo se encuentra en la empresa Pharmometrica S.A de C.V., operado por el QFB. Miguel Cortés Gines.

Las estructuras y los nombres de los compuestos aislados se obtuvieron con el software ChemDraw Professional 16.0, con licencia de la UAM.

### **Material vegetal**

Las partes aéreas de *Tagetes lucida* fueron obtenidas en el mercado de Sonora ubicado en Fray Servando Teresa de Mier 419, Merced Balbuena, Venustiano Carranza, 15800, Ciudad de México, CDMX. La identificación botánica fue realizada por la M. C. Beatriz González Hidalgo, responsable del herbario de la UAM Xochimilco. La materia vegetal seca se molió para su uso en la extracción.

### **Preparación del extracto orgánico por maceración**

Las partes aéreas secas se trituraron y se obtuvo un peso de 341.7 g. El material vegetal se colocó en un recipiente de vidrio, se realizó una maceración con 1 L de etanol y se dejó reposar por 48 hrs. Posteriormente se filtró por gravedad y se concentró con el rotavapor. El proceso se repitió de manera exhaustiva. El extracto obtenido (TLE) se dejó secar en la campana de extracción, el rendimiento obtenido fue de 9.48% (32.39g).

### **Fraccionamiento primario**

El proceso de fraccionamiento se realizó mediante una extracción líquido/líquido de la siguiente manera: Se tomaron 30 g de extracto completo, los cuales se suspendieron en 0.5 L de una mezcla de MeOH-H<sub>2</sub>O 1:1. Una vez suspendido el extracto, se extrajo con tres porciones del mismo volumen de diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y acetato de etilo (AcOEt), de manera sucesiva. Los extractos se juntaron y se les eliminó el disolvente con evaporación al vacío. De este proceso se obtuvieron tres fracciones primarias, una de diclorometano (TLE-1), una de acetato de etilo (TLE-2) y una de metanol-agua (TLE-3).

### **Fraccionamiento Secundario**

La fracción activa TLE-1 (6.029 g) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta de vidrio empacada con gel de sílice (160 g) (Macherey-Nagel 60, gránulo de 0.063-0.2 mm). Se realizó una mezcla isocrática de Hex-CHCl<sub>3</sub>-AcOEt (50:35:15).

## Aislamiento de la Herniarina (1) y la Escoparona (2)

De las fracciones TLE-1e se cristalizaron de manera espontánea 880 mg de un sólido de color verde-amarillo. De igual forma, de las fracciones TLE-1k cristalizaron 390 mg de otro sólido cristalino de color amarillo. Muestras de ambos compuestos se enviaron para su análisis al laboratorio de RMN. También se obtuvieron los espectros de infrarrojo mediante una película de KBr y la espectrometría de masas. El análisis de los espectros permitió identificar a estos productos como las cumarinas herniarina (1) y escoparona (2), ambos compuestos ya han sido descritos en la especie.<sup>6</sup> El proceso se resume en el diagrama 1.

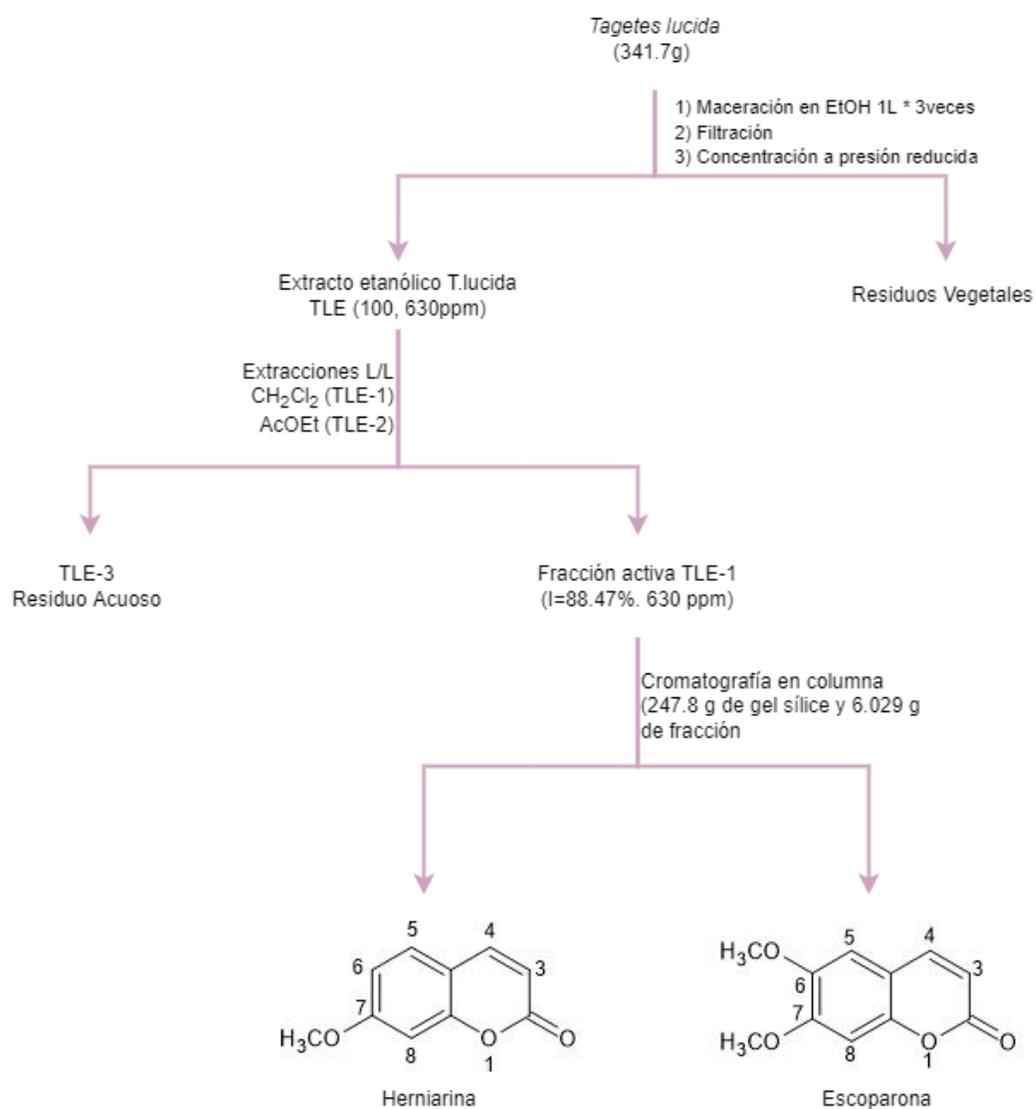


Diagrama 1. Procedimiento de Aislamiento de Herniarina y la Escoparona.

## Resultados

### Fraccionamiento primario

El fraccionamiento primario del extracto orgánico íntegro se realizó mediante particiones sucesivas, en la tabla se muestran los pesos y los rendimientos obtenidos de cada extracción.

Tabla 2. Cantidades obtenidas del proceso de partición de TLE		
fracción	peso (g)	rendimiento %
TLE-1	12.727	42.4
TLE-2	5.491	18.3
TLE-3	11.782	39.2

### Fraccionamiento secundario de la fracción TLE-1

Con la finalidad de aislar el componente de fracción TLE-1 (12.727g) se realizó un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta empleando gel de sílice, como fase estacionaria (247.8g), como eluyentes se utilizó una mezcla isocrática de Hex-CHCl<sub>3</sub>-AcOEt (50:35:15) en la tabla se presentan los resultados del fraccionamiento secundario de la fracción TLE-1.

### Aislamiento de Herniarina (1) y Escoparona (2)

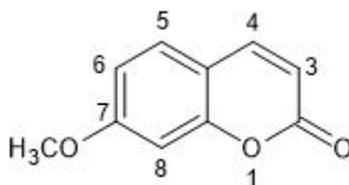
De la fracción TLE-1e y TLE-1k, cristalizaron de manera espontánea cantidades considerables de dos cumarinas identificadas como herniarina (**1**) que corresponde a la fracción TLE-1e y la escoparona (**2**) a la fracción TLE 1k, que fueron identificadas por medio de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, espectroscopia de infrarrojo y masas.

### Análisis de los datos espectroscópicos y espectrométricos (IR, EM, RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C).

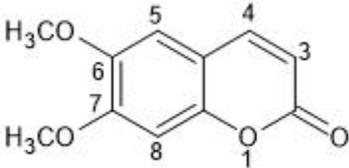
Para identificar la fracción TLE-1e y TLE-1k se registraron sus espectros de masas, RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C y en infrarrojo. las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos se resumen en las tablas 4 y 5. En la que se muestran los resultados de cada una de las fracciones obtenidas, así como su estructura.

Tabla 3. Proceso de fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción activa <b>TLE-1</b>		
Fracción primaria	Número de fracciones	Eluyentes
TLE-1a	1-2	Hex-DCM 1:1
TLE-1b	3	Hex-DCM 1:1
TLE-1c	4-5	Hex-DCM 3:7
TLE-1d	6-10	Hex-DCM 1:9
TLE-1e	11-13	Hex-DCM 1:9
TLE-1f	14-15	Hex-DCM 1:9
TLE-1g	16-20	DCM/MeOH 99:1
TLE-1h	21-22	DCM/MeOH 99:1
TLE-1i	23-26	DCM/MeOH 99:1
TLE-1j	27-29	DCM/MeOH 95:5
TLE-1k	30-33	DCM/MeOH 90:10
TLE-1l	38-41	DCM/MeOH 90:10
TLE-1m	42-70	DCM/MeOH 90:10
TLE-1n	71-76	DCM/MeOH 90:10
TLE-1o	77-80	DCM/MeOH 90:10
TLE-1p	81-87	DCM/MeOH 90:10

Tabla 4. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la herniarina



Fórmula molecular	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
Peso molecular	176.17
Punto de Fusión	117-118 °C
peso de la fracción TLE-1e	880 mg (2.76 % rendimiento)
IR v <sub>max</sub> (KBr) cm <sup>-1</sup>	1705.47 1615.18 1505.54, 1206.72, 1284.11 1400.20, 1352.91, 1099.23, 1026.14, 890.70, 836.96
RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ (ppm); 3.87 (7-OCH <sub>3</sub> , s, 3H), 6.25 (H-3, d, J = 9.5 Hz, 1H), 6.81 (H-8, d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.84 (H-6, dd, J = 8.64 Hz y 2.4 Hz, 1H), 7.37 (H-5, d, J = 8.64 Hz, 1H), 7.64 (H-4, d, J = 9.4 Hz, 1H).	RMN <sup>13</sup> C (151 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ (ppm); 162.9 (C7), 161.3 (C2), 156.0 (C8a), 143.5 (C4), 128.8 (C5), 113.2 (C6), 112.7 (C3), 112.6 (C4a), 100.9 (C8), 55.9 (OCH <sub>3</sub> ).
Espectrometría de masas	M+1: 177.16 (100), 149.14 (45), 114.09 (20), 110.13 (17)

Tabla5. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la escoparona	
	
Fórmula molecular	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
Peso molecular	206.19
Punto de Fusión	145.5
Peso de la fracción TLE-1k	390 mg (1.2 % de rendimiento)
IR v <sub>max</sub> (KBr) cm <sup>-1</sup>	1720.52, 1617.53, 1561.44, 1279.81, 843.4
RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ (ppm); 7.61 (H-4, d, J = 9.5 Hz, 1H), 6.83 (H-5, d, J = 10.3 Hz, 2H), 6.84 (H-8, s, J = 10.3 Hz, 2H), 6.28 (H-3, d, J = 9.4 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H, 7-OCH <sub>3</sub> ), 3.91 (s, 3H, 6-OCH <sub>3</sub> ).	RMN <sup>13</sup> C (151 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ (ppm); 161.57 (C2), 152.96 (C-7), 150.1 (C-6), 146.46 (C8a), 143.40 (C4), 113.67 (C3), 111.55 (C4a), 108.09 (C5), 100.12 (C8), 56.50 (7-OCH <sub>3</sub> ), 56.48 (6-OCH <sub>3</sub> )
Espectrometría de masas	M+1:207.17 (100), 247.31 (65), 149.17(60), 237.17 (30), 114.09 (25), 181.25 (23), 110.16 (15)

## Discusión

Los productos naturales han constituido una fuente importante de sustancias bioactivas, de estructuras líderes para el desarrollo de fármacos y productos de utilidad para el ser humano. En la agricultura, estos productos también tienen aplicaciones.

Los herbicidas son sustancias que tienen como objetivo inhibir la germinación y el crecimiento radicular de malezas. Para ello, las plantas producen metabolitos secundarios, que al ser liberados al medio ambiente (exudados o lixiviados), limitan o no permiten la invasión de los cultivos de interés económico (maíz, frijol, cereales, etc.).<sup>19</sup>

En este sentido, las cumarinas han demostrado distintas actividades biológicas, de manera interesante, también en el área de los herbicidas. Aunque existen diferentes métodos de síntesis para obtener cumarinas, es importante contar con materias primas vegetales donde se puedan aislar a estos compuestos en buen rendimiento.<sup>20</sup>

El género *Tagetes* destaca por la producción de metabolitos secundarios del tipo fenoles, específicamente, cumarinas. De tal forma que en este trabajo se aislaron dos cumarinas en buena cantidad y fueron estudiadas desde el punto de vista estructural para establecer su identidad. El análisis detallado de su espectroscopia y espectrometría permitieron identificarlas como las cumarinas herniarina y escoparona, dos moléculas con reportes dentro de la composición química de *T. lucida*.<sup>6</sup>

La elucidación de estas estructuras es muy importante para establecer sus propiedades fisicoquímicas, farmacológicas y toxicológicas. Para ello, se utilizaron técnicas analíticas como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), la espectroscopia de infrarrojo (IR) y la espectrometría de masas (EM).

La espectroscopia infrarroja se fundamenta en la interacción de los grupos funcionales y los tipos de enlaces presentes en las moléculas con la luz infrarroja, lo que da como resultado vibraciones predecibles que proporcionan una "huella digital" característica de las sustancias químicas o bioquímicas presentes en una muestra.<sup>21</sup> En este sentido, en el espectro IR (Anexo I) de la herniarina se observaron bandas de absorción características para el grupo carbonilo de tipo  $\alpha$ -pirona (1705.47), metoxilo (1206.72-1284.11  $\text{cm}^{-1}$ ) y aromáticos (1615.18-1505.54  $\text{cm}^{-1}$ ). De la misma forma, el espectro de IR de la escoparona (Anexo I) mostró bandas de absorción características para el mismo sistema de tipo carbonilo de  $\alpha$ -pirona (1720  $\text{cm}^{-1}$ ) y dobles enlaces (1617, 1279 y 843  $\text{cm}^{-1}$ ). Lo que nos llevó a concluir que se trataba de compuestos muy parecidos desde el punto de vista estructural.

Por su parte, la RMN se utiliza para caracterizar la frecuencia de resonancia de un núcleo atómico en función de su entorno químico o ambiental. De tal manera que en este reporte se utilizaron experimentos sobre los núcleos de hidrógeno y carbono-13 para obtener más información sobre los productos aislados.<sup>22</sup>

Para tal objetivo, el análisis detallado de los espectros de RMN indicó que los productos naturales pertenecen a la familia de las cumarinas (Anexo I). Las características más relevantes observadas en los espectros de escoparona se indican a continuación:

- 1) En  $\delta_H$  de 3.91 y 3.94 ppm se observan dos singuletes asignables a 6 hidrógenos de los grupos metoxilos de las posiciones 6 y 7, respectivamente. La presencia de estos grupos metoxilo se confirma mediante las dos señales con desplazamientos de  $\delta_C$  56.48 y 56.50 ppm en el espectro de  $^{13}C$ .
- 2) En los desplazamientos químicos  $\delta_H$  de 7.61 y 6.28 ppm, se observan dos señales de tipo doblete con valores de constante de acoplamiento de  $J = 9.5$  y  $9.4$  Hz. Estas señales se correlacionan con los desplazamientos de  $\delta_C$  150.1 y 111.55 ppm, en  $^{13}C$ . Dichas señales están acopladas y se asignan a los hidrógenos H-4 y H-3 del núcleo cumarina.
- 3) Finalmente, en  $\delta_H$  de 6.83 y 6.84 ppm se observan dos singuletes, los cuales integran para un hidrógeno, respectivamente, y fueron asignados a los núcleos de las posiciones H-5 y H-8. Estas señales tienen correlación con aquellas con  $\delta_C$  de 100.12 y 143.40 ppm en el espectro de  $^{13}C$ .

El análisis para la herniarina, los espectros mostraron lo siguiente:

- 1) En un  $\delta_H$  de 3.87 ppm se observa un singulete asignable al grupo metoxilo de la posición 7, su integral tiene un valor para 3 núcleos de hidrógeno. La presencia de los carbonos base de oxígeno se confirma mediante las señales en  $\delta_C$  de 55.9 y 162.9 ppm en el espectro de  $^{13}C$ .
- 2) En  $\delta_H$  de 6.25 y 7.64 ppm se observan dos dobletes ( $J = 9.4$  Hz), los cuales integran para un hidrógeno cada una, asignable a los hidrógenos de las posiciones H-3 y H-4 del doble enlace del anillo  $\alpha$ -pirona. Estas señales mostraron una correlación con las señales de  $\delta_C$  112.7 y 143.5 ppm en el espectro de  $^{13}C$ .
- 3) En  $\delta_H$  6.81 y 7.37 ppm se observan dos dobletes, que integran para un hidrógeno cada una, asignables a los núcleos de las posiciones H-8 y H-5, respectivamente. Estas señales muestran correlación con aquellas de  $\delta_C$  en 100.9 y 128.8 ppm.
- 4) Finalmente, en un desplazamiento químico de  $\delta_H$  6.84 ppm se observa un doble de dobles con dos constantes de acoplamiento ( $J = 8.64$  Hz y  $2.4$  Hz) y que integra para un núcleo de hidrógeno, asignable a la posición H-6 del anillo aromático. En el

espectro de  $^{13}\text{C}$ , correlaciona con la señal que tiene un desplazamiento químico de  $\delta_{\text{C}}$  113.2 ppm.

El análisis de espectroscopia de masas es el estudio de los iones creados como resultado de la ionización/fragmentación determinada eléctricamente en la fase gaseosa. La técnica de impacto electrónico produce la ionización de la molécula mediante la pérdida de un electrón, generando un catión-radical  $\text{M}^+$  que lleva la información de la masa molecular del compuesto.<sup>21</sup>

En este trabajo, el espectro de masas generado por la técnica de impacto electrónico para la herniarina presentó un ion molecular  $\text{M}+1$  de 177.16 que corresponde a la fórmula molecular  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$  (Anexo I). Por su parte, el espectro de masas generado por la misma técnica para la escoparona presentó un ion molecular  $\text{M}+1$  de 207.17, que corresponde a la fórmula molecular  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_4$  (Anexo I).

Una vez realizado el análisis de todos los espectros, se concluyó que ambos compuestos pertenecían a la familia de la cumarina, y se identificaron como la herniarina y la escoparona.

## Conclusiones

- 1) Se realizó una revisión bibliográfica del género *Tagetes*, en la que se observó que existen diversas y variadas actividades biológicas. Resaltando los estudios sobre su potencial alelopático.
- 2) Se generó una base de datos con los metabolitos aislados de varias especies del género, así como de sus preparados, la cual será de utilidad para estudios posteriores de tipo *in silico*.
- 3) Se logró aislar dos cumarinas con buenos rendimientos, lo que nos permite considerar a *T. lucida* como fuente potencial de materias primas de estas moléculas.
- 4) Finalmente, se identificaron a las dos moléculas mediante el análisis de sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas (IR, EM, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ), que correspondían con las estructuras de la herniarina y la escoparona.

## Bibliografía

1. Garcia F, Lopez ME, Aguilar S, Aguilar A. Etnobotánica Y Morfo-Anatomía Comparada De Tres Especies De *Tagetes* Que Se Utilizan En Nicolás Romero, Estado De México. *Bot Sci.* 2012;90(3):221–32.
2. Serrato M. Información documental sobre el taxa *Tagetes* para dimensionar su centro de origen y diversidad genética en México. *Theoretical and Applied Genetics.* 2010;7(2):1-7.
3. Nyasha S, Innocent P, Simbarashe M, Ronald M, Kasirayi M. Herbicidal effects of *Datura stramonium* (L.) leaf extracts on *Amaranthus hybridus* (L.) and *Tagetes minuta* (L.). *African J Agric Res.* 2018;13(34):1754–60.
4. Singh P, Krishna A, Kumar V, Krishna S, Singh K, Gupta M, et al. Chemistry and biology of industrial crop *Tagetes* Species: A review. *J Essent Oil Res.* 2016;28(1):1–14.
5. Salehi B, Valussi M, Flaviana M, Nalyda J, Linkoln Alves A, Douglas H, et al. *Tagetes* spp. Essential oils and other extracts: Chemical characterization and biological activity. *Molecules.* 2018;23(11):2847.
6. 1. Nayeli M, Maribel H, Enrique J, Rafael B, Margarita A, Macrina F, et al. Anti-inflammatory activity of coumarins isolated from *Tagetes lucida* Cav. *Nat Prod Res.* 2020;34(22):3244–8.
7. Scrivanti L, Zunino M, Zygadlo J. *Tagetes minuta* and *Schinus areira* essential oils as allelopathic agents. *Biochem Syst Ecol.* 2003;31(6):563–72.
8. Sadia S, Qureshi R, Khalid S, Nayyar BG, Zhang J. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2015;5(9):733–7.
9. López M, Bonzani N, Zygadlo J. Allelopathic potential of *Tagetes minuta* terpenes by a chemical, anatomical and phytotoxic approach. *Biochem Syst Ecol.* 2008;36(12):882–90.
10. Batish D, Arora K, Singh H, Kohli R. Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicide for managing rice weeds. *Crop Prot.* 2007;26(4):566–71.
11. Oranday A, Martinez G, Nuñez A, Rivas C, Flores A. Coumarin isolated from *Tagetes lucida* Cav. exhibits larvicidal activity in *Aedes aegypti* (L.). *Southwest Entomol.* 2008;33(4):315–7.
12. González M, Gutiérrez C, Hernández Y, Díaz M, Pellicer F. Identification of some bioactive metabolites and inhibitory receptors in the antinociceptive activity of *Tagetes lucida* Cav. *Life Sci.* 2019;231:116523.
13. Céspedes C, Marín J, Domínguez M, Avila J, Serrato B. Plant growth inhibitory activities by secondary metabolites isolated from Latin American flora. *Adv Phytomedicine.* 2006;2(C):373–410.
14. Céspedes C, Avila J, Martínez A, Serrato B, Calderón J, Salgado R. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *J Agric Food Chem.* 2006;54(10):3521–7.
15. Estrada S, González M, Rendón P, Arias L, Ávila G, Villalobos R. Antihypertensive and vasorelaxant mode of action of the ethanol-soluble extract from *Tagetes lucida* Cav. aerial parts and its main bioactive metabolites. *J Ethnopharmacol.* 2021;266: 113399.

16. Laosinwattana C, Wichittrakarn P, Teerarak M. Chemical composition and herbicidal action of essential oil from *Tagetes erecta* L. leaves. *Ind Crops Prod* 2018; 126:129–34.
17. Santos P, Santos V, Mecina G, Andrade A, Fegueiredo P, Moraes V, et al. Phytotoxicity of *Tagetes erecta* L. and *Tagetes patula* L. on plant germination and growth. *South African J Bot.* 2015; 100:114–21.
18. Saroj A, Oriyomi O, Nayak A, Haider S. Phytochemicals of Plant-Derived Essential Oils: A Novel Green Approach Against Pests. Egbuna C, Sawicka B. *Natural remedies for pest, disease and weed control.* 2020. p. 65–79.
19. Lengai G, Muthomi, Mbega E. Phytochemical activity and role of botanical pesticides in pest management for sustainable agricultural crop production. *Sci African.* 2020;7: e00239.
20. Kumar K, Nagamallu R, Govindappa V. Comprehensive review on coumarins: Molecules of potential chemical and pharmacological interest *Comprehensive review on coumarins: Molecules of potential chemical and pharmacological interest.* *J Chem Pharm Res.* 2015;7(9):67–81.
21. McMurry J. *Química orgánica.* 9a Ed. Distrito Federal: CENGAGE Learning; 2017.
22. Stark N, Yelle D, Agarwal U. Techniques for Characterizing Lignin. *Lignin Polym Compos.* 2016; 1:49–66.

## Anexo 1

Contenido		
		Página
Figura 1	$^1\text{H}$ RMN espectro de Herniarina en $\text{CDCl}_3$ (600 MHz)	33
Figura 2	$^{13}\text{C}$ RMN espectro de Herniarina en $\text{CDCl}_3$ (600 MHz)	34
Figura 3	$^1\text{H}$ RMN espectro de Escoparona en $\text{CDCl}_3$ (600 MHz)	35
Figura 4	$^{13}\text{C}$ RMN espectro de Escoparona en $\text{CDCl}_3$ (600 MHz)	36
Figura 5	Espectroscopia de Infrarrojo de Herniarina en KBr	37
Figura 6	Espectroscopia de Infrarrojo de Escoparona en KBr	38
Figura 7	Espectrometría de masas de Herniarina	39
Figura 8	Espectrometría de masas de Escoparona	40

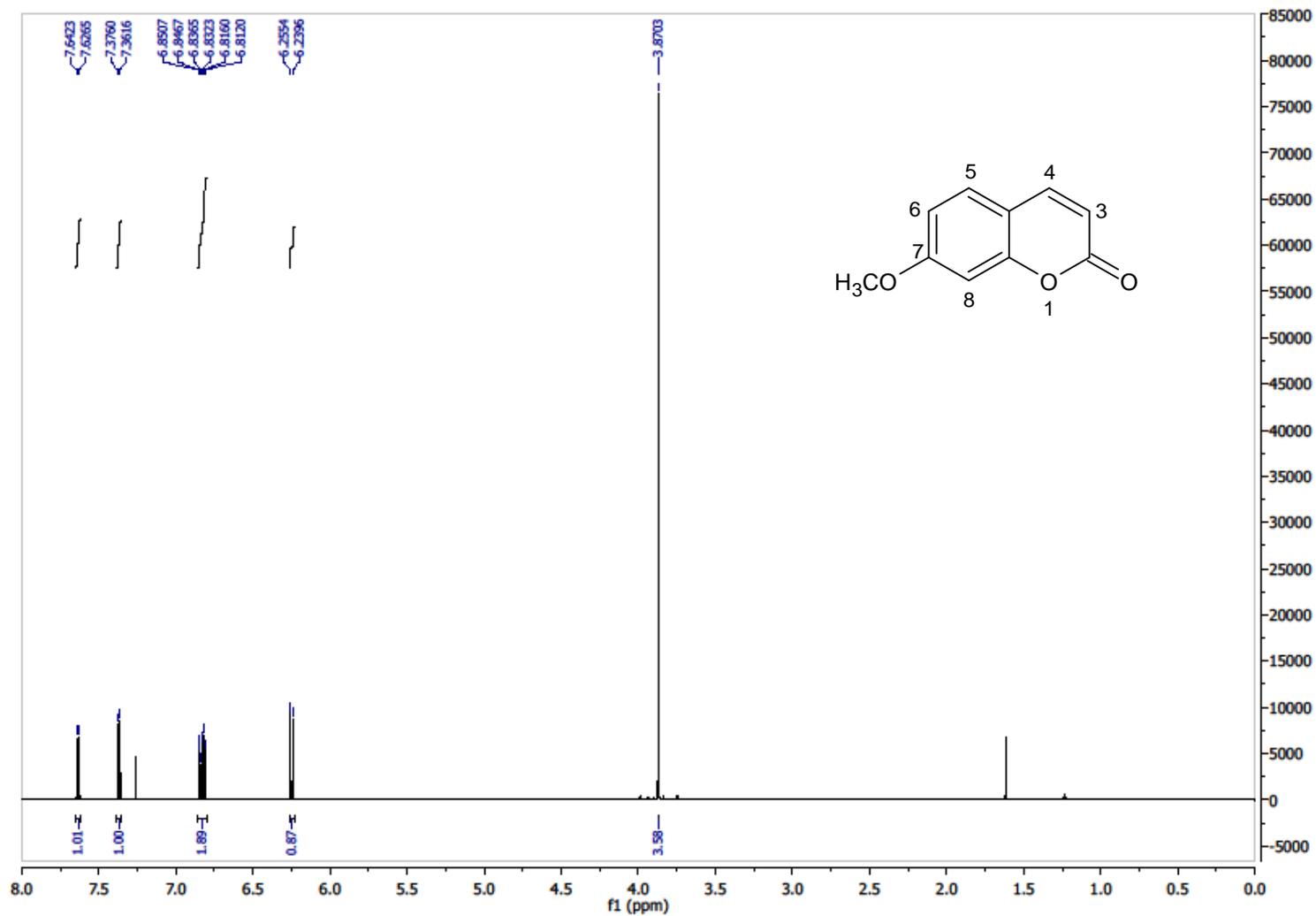


Figura 1. Espectro de <sup>1</sup>H RMN de Herniarina en CDCl<sub>3</sub>

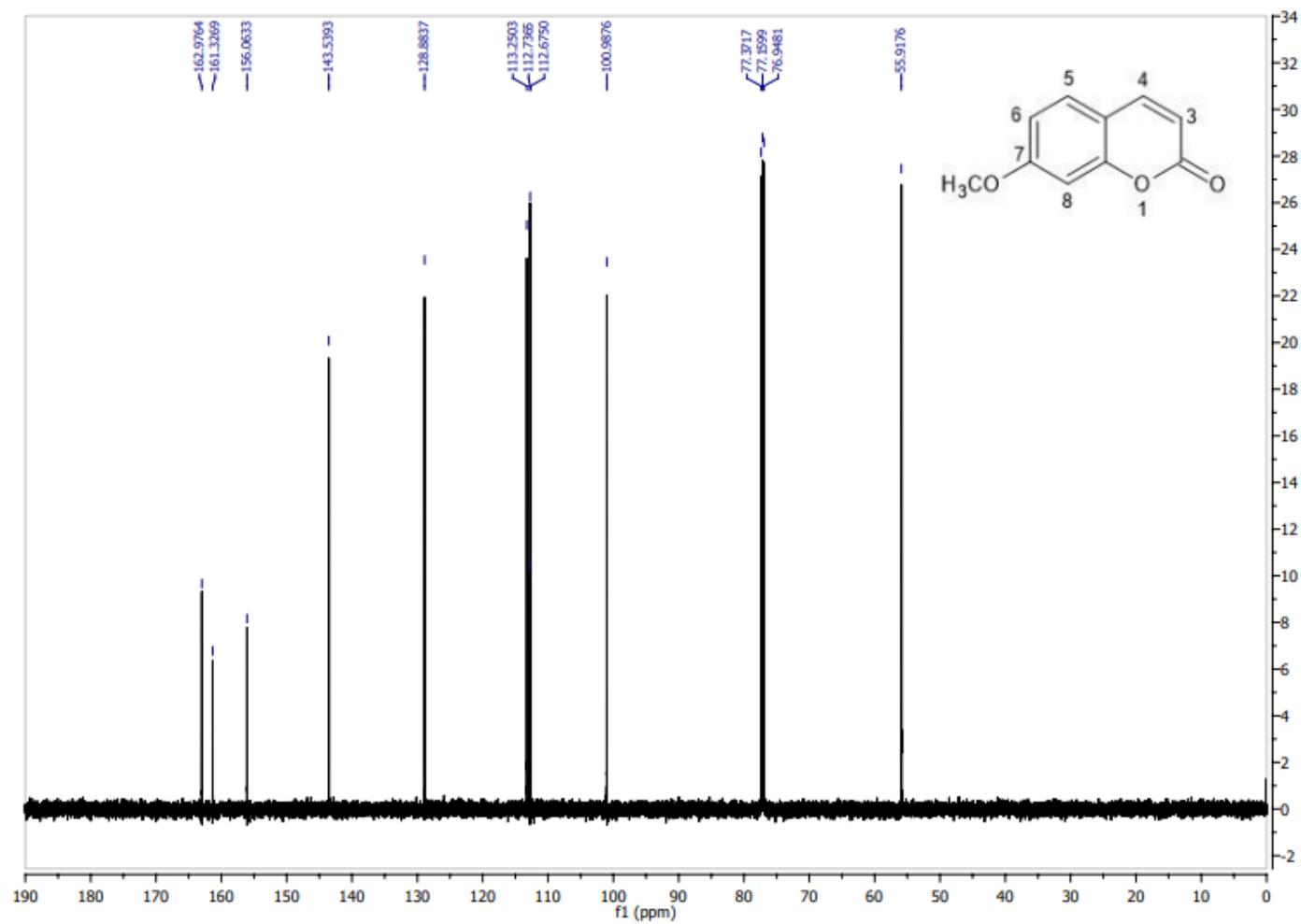


Figura 2. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de Herniarina en  $\text{CDCl}_3$

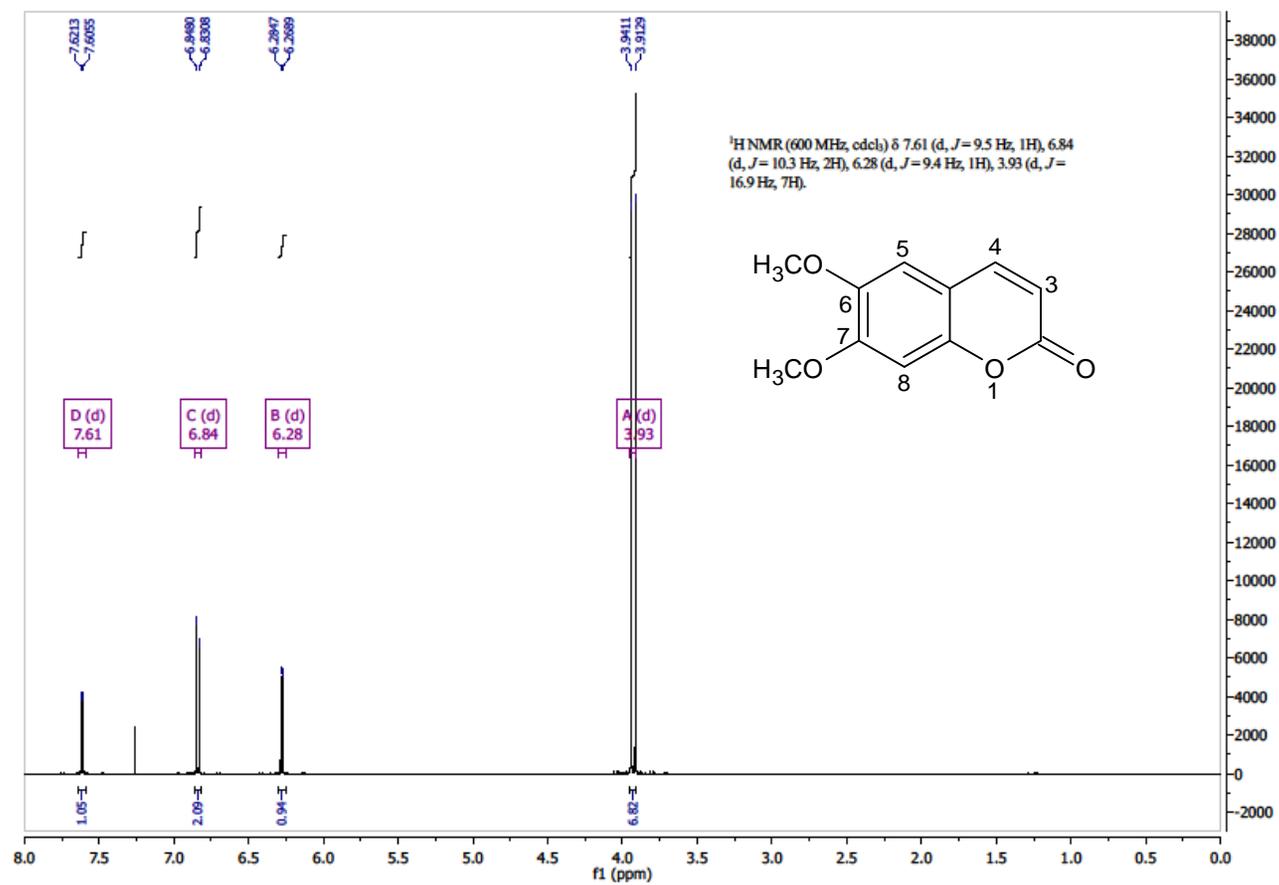


Figura 3. Espectro de <sup>1</sup>H RMN de Escoparona en CDCl<sub>3</sub>

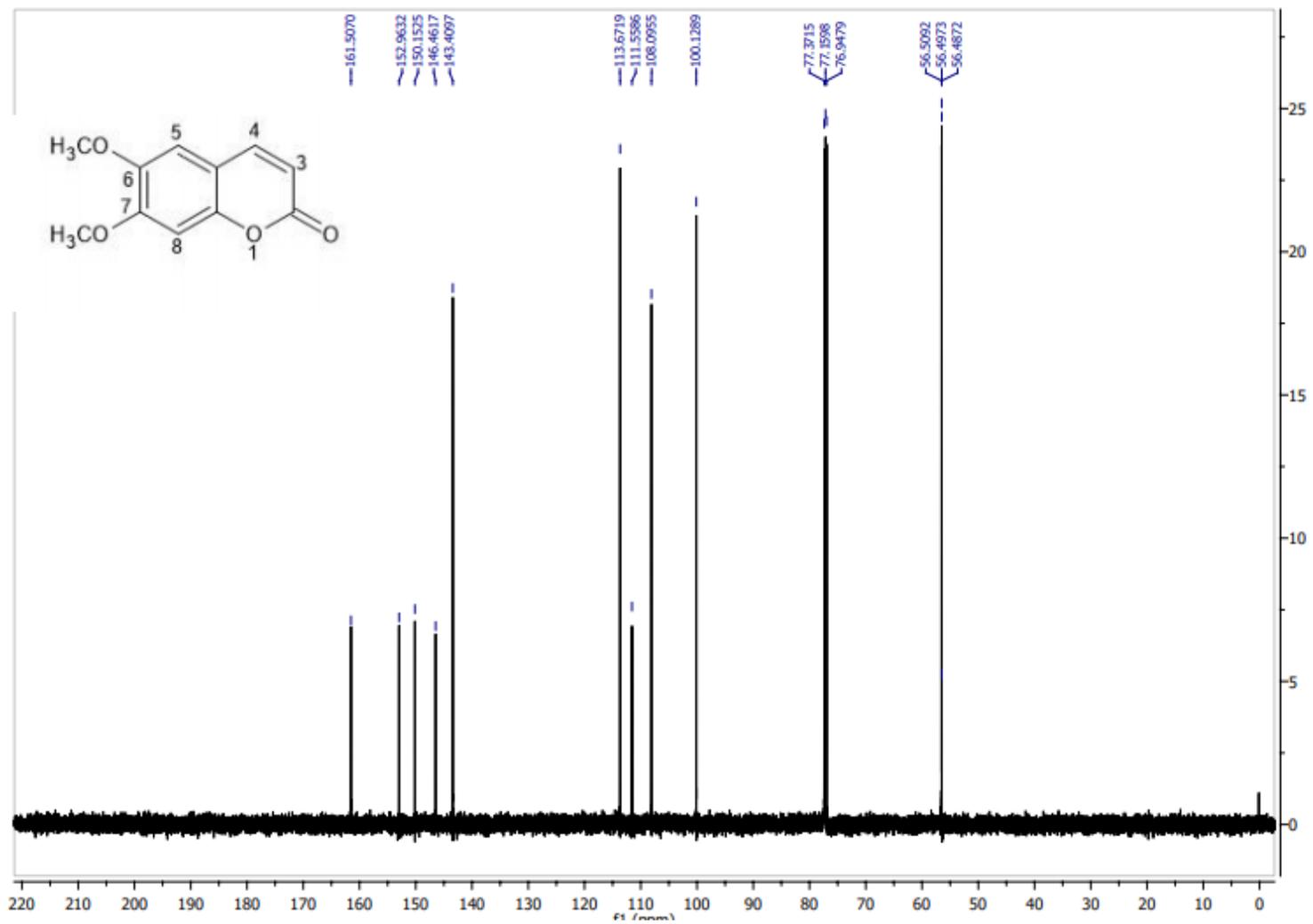


Figura 4. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de Escoparona en  $\text{CDCl}_3$

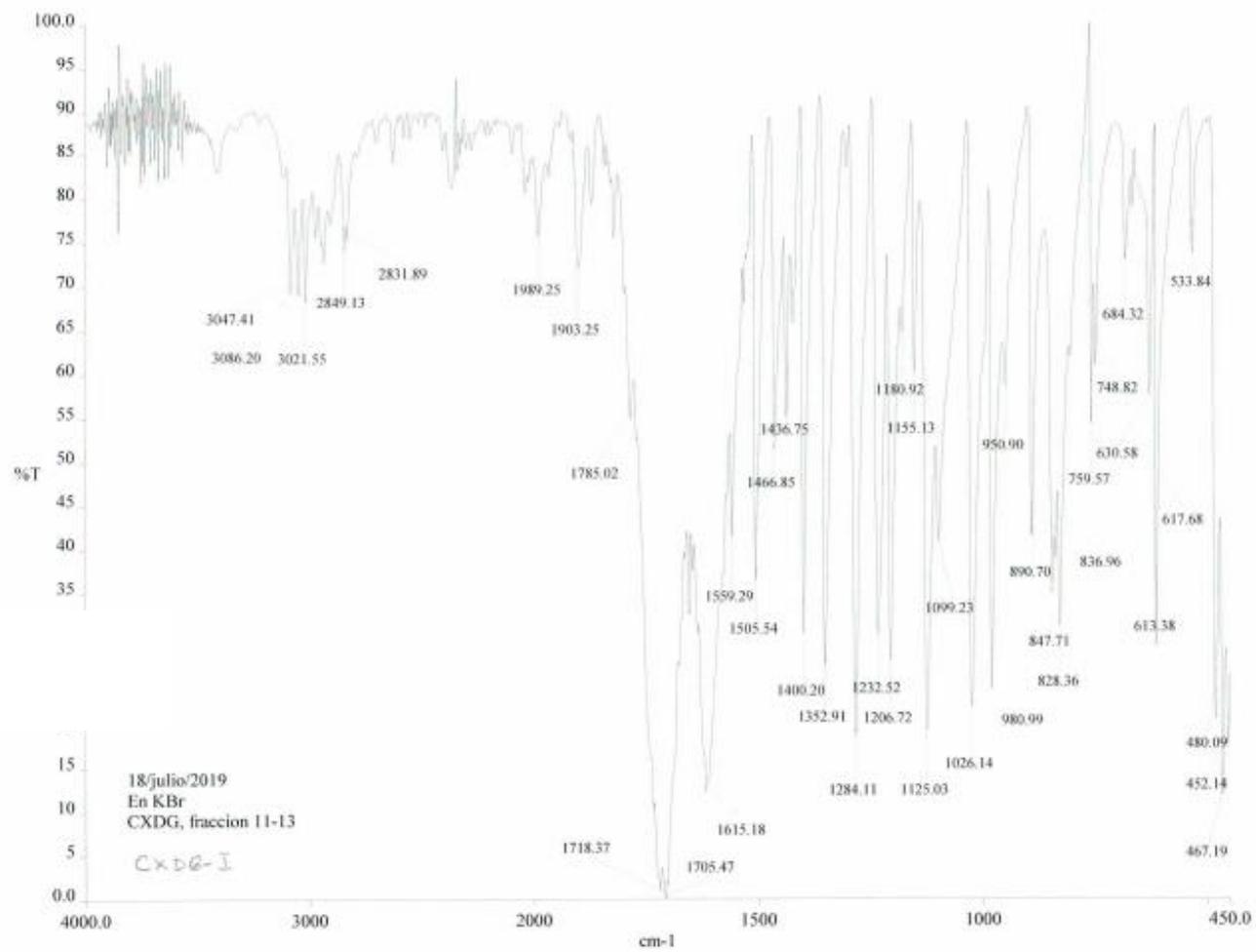


Figura 5. Espectroscopia de Infrarrojo de Herniarina en KBr

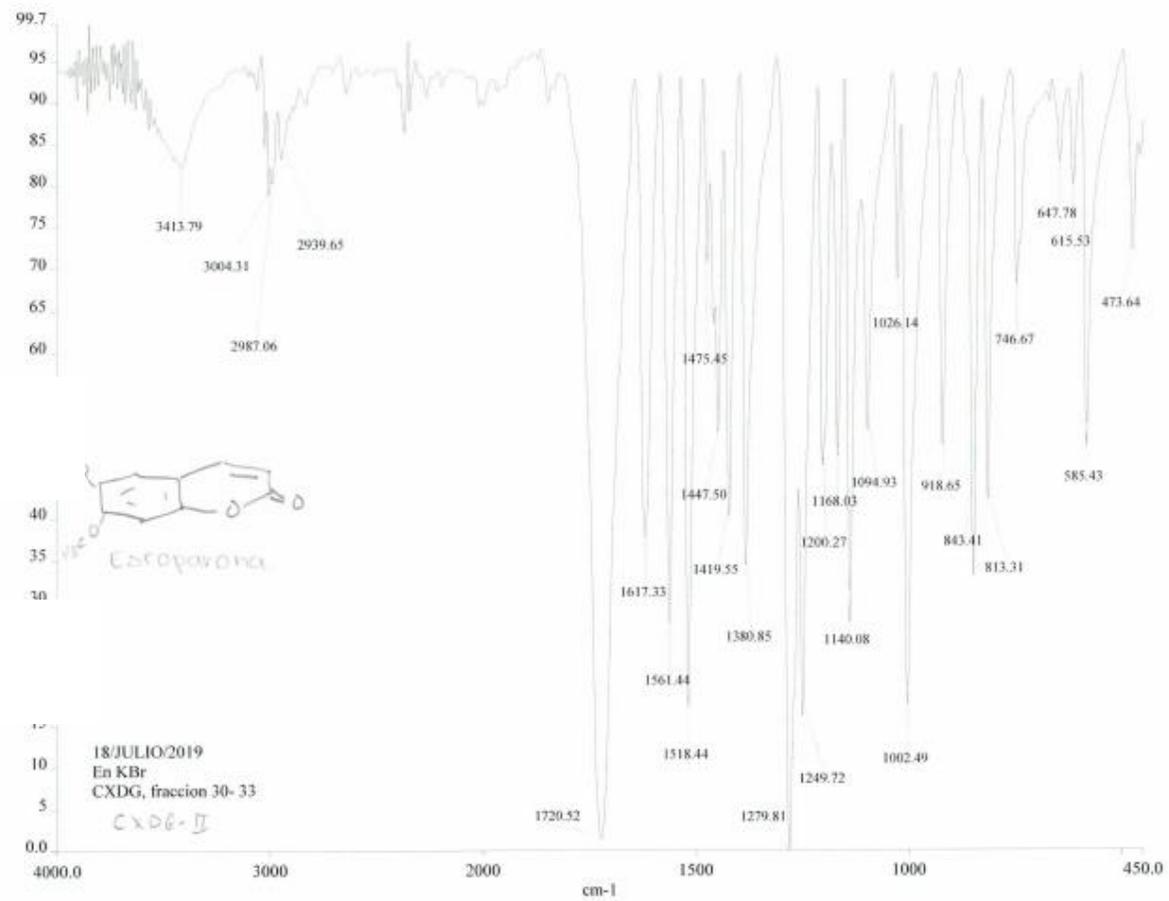


Figura 5. Espectroscopia de Infrarrojo de Escoparona en KBr

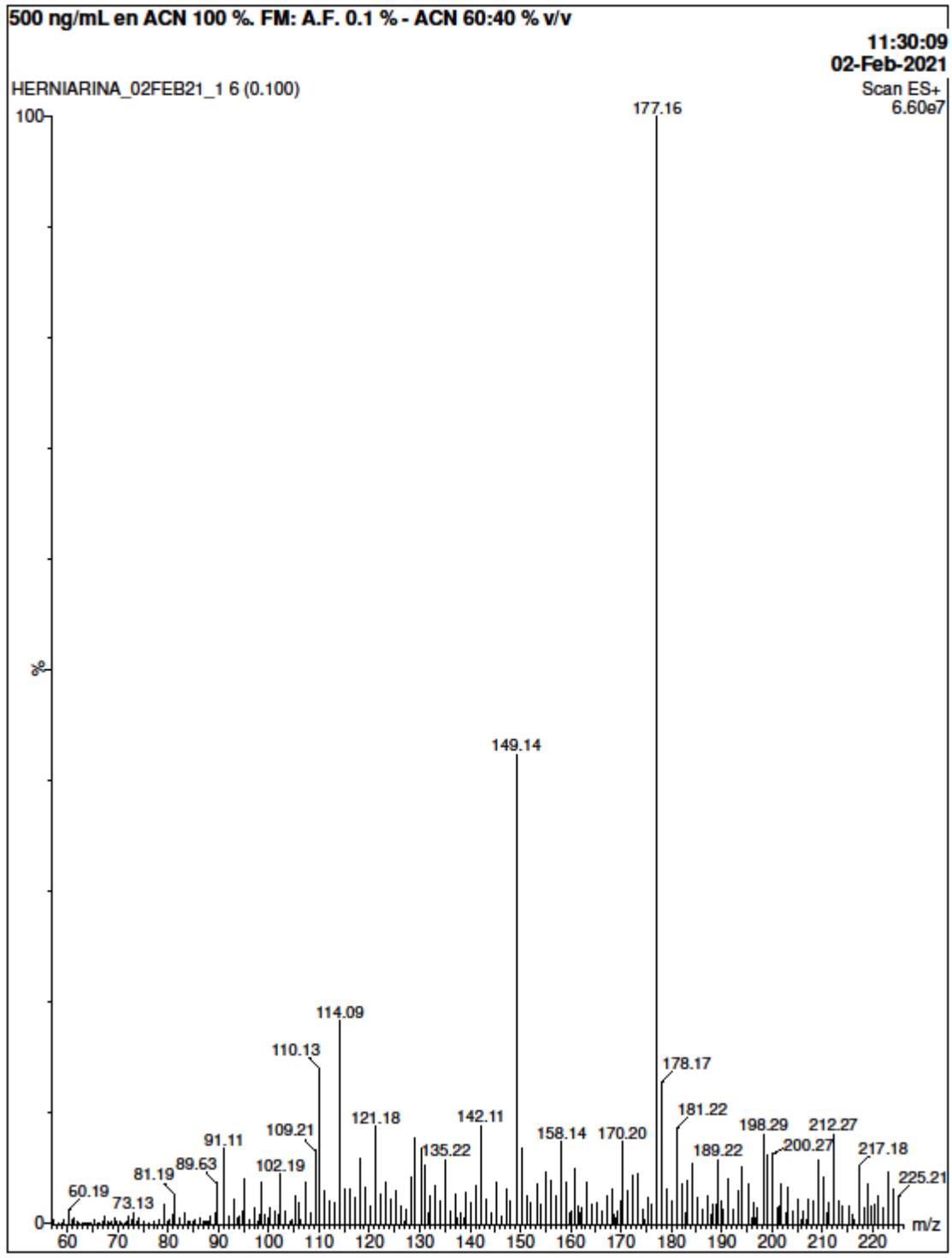


Figura7. Espectrometría de masas de Herniarina

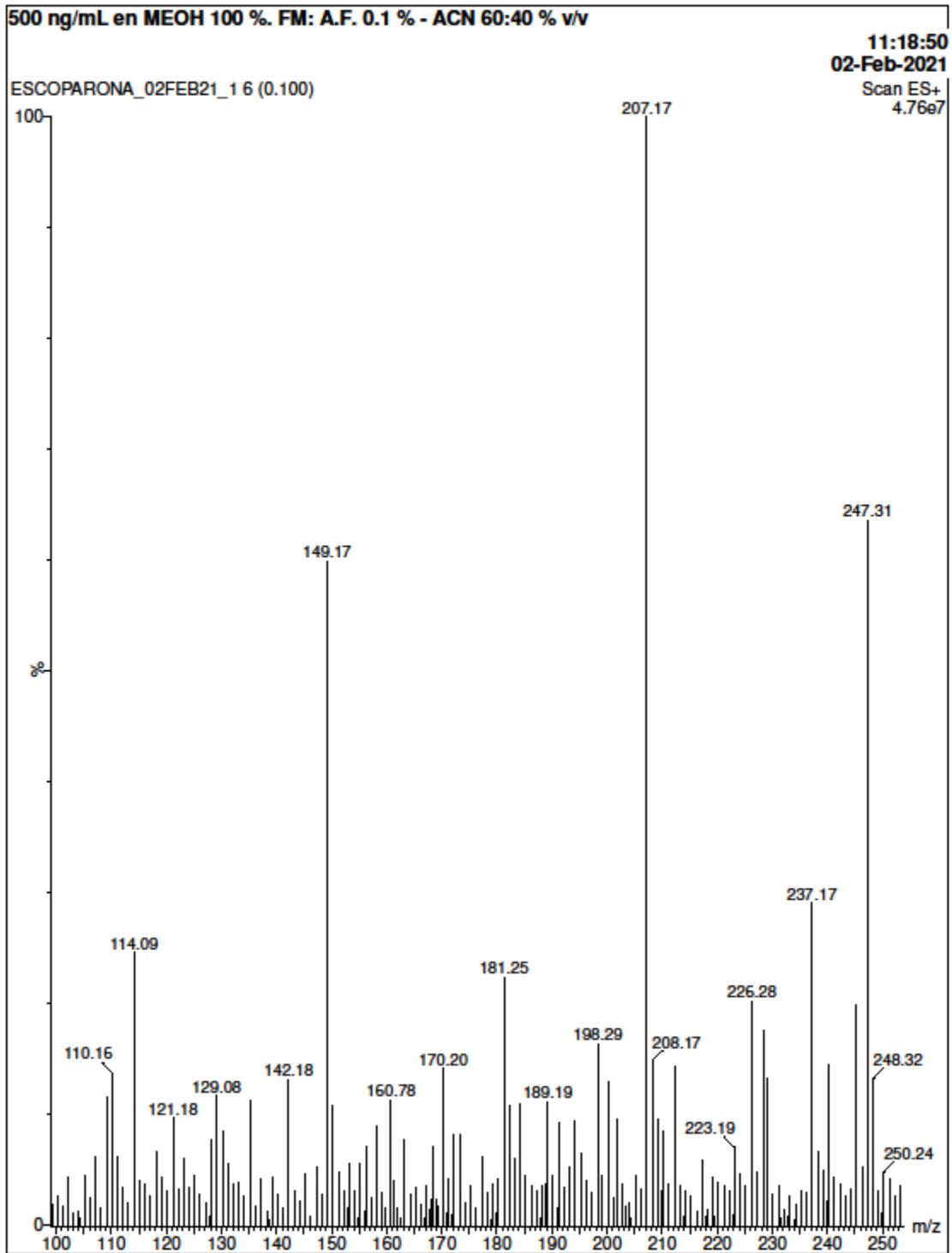


Figura8. Espectrometría de masas de Escoparona

*Olivia Soria Arteché*

---

M. en CQ Oliva Soria Arteché  
Profesora Titular C de T.C.  
No. Económico: 5676

*Francisco Palacios E.*

---

Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa  
Profesor Asociado D de T.C.  
No. Económico: 36434

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO**

**INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL.**

*Tagetes lucida*: Fuente potencial de cumarinas bioactivas.

**PERTENECE AL PROYECTO GENERICO**

Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos.

**Alumna:** Ximena Molina Flores    **Matricula:** 2172034858

**Dirección:** Av 537 38, San Juan de Aragón 2da Sección, Gustavo A. Madero, Ciudad de México.

**Teléfono:** 5583802817

**Asesores:** Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa y M. en CQ Olivia Soria Arteché

**Lugar de realización:** Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de sistemas Biológicos, laboratorio de Síntesis y Aislamiento de Sustancias Bioactivas

**Fecha de inicio y terminación**

**18-diciembre de 2020- 02-diciembre de 2021**

## **Introducción.**

### **Genero *tagetes***

El género *Tagetes* cuenta con aproximadamente entre 50 a 55 especies, distribuidas ampliamente en el territorio nacional.<sup>1</sup> Cerca del 40% de las especies de este género se encuentran en México.<sup>2</sup> Es un género de plantas anuales y perennes, en su mayoría herbáceas, de la familia del girasol (Asteraceae o Compositae). También, este género es conocido por sus especies hortícolas y productoras de aceites esenciales, que se cultivan o aparecen de forma natural en muchas partes del mundo. El género es nativo de la zona que se extiende desde el suroeste de los Estados Unidos de América hasta Argentina, con la máxima variación en México. En México, se considera un centro de distribución de varias especies de este género, que son empleadas como medicinas tradicionales; se utilizan por sus propiedades analgésicas, antisépticas, carminativas, diuréticas, estimulantes y repelentes de insectos.<sup>3</sup> Se les conoce comúnmente por el nombre de caléndulas, pero en cada zona del país donde se distribuyen pueden tener un nombre distinto, las especies más conocidas son *Tagetes erecta*, *T. patula*, *T. minuta* y *T. lucida*.<sup>4</sup>

*T. lucida* Cav., es una planta aromática nativa considerada una de las más importantes de México, debido a su frecuente uso en rituales y ceremonias. Sus nombres comunes incluyen "pericón", "yauhtli" (náhuatl), "hierba anís" o "hierba de Santa María". En la medicina tradicional mexicana, *T. lucida* se prescribe para los "nervios" y el "susto". Existen varios usos menores en el tratamiento de los sistemas gastrointestinal, respiratorio y urogenital, contra el reumatismo, las úlceras y la inflamación. Además, *T. lucida* se recomienda como estimulante del sistema inmunitario, la decocción de sus partes aéreas se emplea para combatir las infecciones causadas por algunos helmintos y protozoos (por ejemplo, ascariasis y giardiasis).<sup>5</sup>

### **Genero *tagetes* como fuente de compuestos bioactivos y alelopáticos**

Al menos cuatro de las especies de este género tienen importancia económica por sus usos ornamentales, alimenticios y medicinales; se trata de *Tagetes erecta*, *T. patula*, *T. minuta* y *T. lucida*. Estas especies han sido objeto de estudios desde los puntos de vista botánico, biológico y químico. Se han descrito múltiples actividades biológicas (antiinflamatorias, analgésicas, antioxidantes, larvicidas, antimicrobianas, fitotóxicas, entre otras), así como su composición química (terpenos, fenoles, etc.).<sup>20</sup>

Los grupos de compuestos identificados en los fenoles destacan los flavonoides y las cumarinas. En el primero destacan la patuletina, quercetina y quercetagetina, mientras que, en las cumarinas,

se encuentran la 7-isopreniloxicumarina, herniarina, 6-metoxi-7-isopreniloxicumarina, 6,7,8-trimetoxicumarina y escoparona.<sup>6</sup>

### **Objetivo general:**

Realizar una revisión bibliográfica del género *Tagetes* y sus metabolitos secundarios con efectos alelopáticos con énfasis en las cumarinas

### **Objetivos específicos**

- Realizar una revisión bibliográfica del género *Tagetes* con efectos alelopáticos empleando bases de datos especializados
- Generar una base de datos de los efectos alelopáticos del género *Tagetes*.
- Reportar la identificación y el aislamiento de dos cumarinas de la especie *T. lucida*.

Caracterizar por métodos espectroscópicos y espectrométricos dos cumarinas aisladas

### **Conclusiones**

- 1) Se realizó una revisión bibliográfica del género *Tagetes*, en la que se observó que existen diversas y variadas actividades biológicas. Resaltando los estudios sobre su potencial alelopático.
- 2) Se generó una base de datos con los metabolitos aislados de varias especies del género, así como de sus preparados, la cual será de utilidad para estudios posteriores de tipo *in silico*.
- 3) Se logró aislar dos cumarinas con buenos rendimientos, lo que nos permite considerar a *T. lucida* como fuente potencial de materias primas de estas moléculas.
- 4) Finalmente, se identificaron a las dos moléculas mediante el análisis de sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas (IR, EM, RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C), y se asignó la identidad de estas ambas.

### **Bibliografía**

1. Garcia F, Lopez ME, Aguilar S, Aguilar A. Etnobotánica Y Morfo-Anatomía Comparada De Tres Especies De *Tagetes* Que Se Utilizan En Nicolás Romero, Estado De México. *Bot Sci.* 2012;90(3):221–32.
2. Serrato M. Información documental sobre el taxa *Tagetes* para dimensionar su centro de origen y diversidad genética en México. *Theoretical and Applied Genetics.* 2010;7(2):1-7.
3. Nyasha S, Innocent P, Simbarashe M, Ronald M, Kasirayi M. Herbicidal effects of *Datura stramonium* (L.) leaf extracts on *Amaranthus hybridus* (L.) and *Tagetes minuta* (L.). *African J Agric Res.* 2018;13(34):1754–60.

4. Singh P, Krishna A, Kumar V, Krishna S, Singh K, Gupta M, et al. Chemistry and biology of industrial crop *Tagetes* Species: A review. *J Essent Oil Res.* 2016;28(1):1–14.
5. Salehi B, Valussi M, Flaviana M, Nalyda J, Linkoln Alves A, Douglas H, et al. *Tagetes* spp. Essential oils and other extracts: Chemical characterization and biological activity. *Molecules.* 2018;23(11):2847.
6. 1. Nayeli M, Maribel H, Enrique J, Rafael B, Margarita A, Macrina F, et al. Anti-inflammatory activity of coumarins isolated from *Tagetes lucida* Cav. *Nat Prod Res.* 2020;34(22):3244–8.
7. Scrivanti L, Zunino M, Zygadlo J. *Tagetes minuta* and *Schinus areira* essential oils as allelopathic agents. *Biochem Syst Ecol.* 2003;31(6):563–72.
8. Sadia S, Qureshi R, Khalid S, Nayyar BG, Zhang J. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2015;5(9):733–7.
9. López M, Bonzani N, Zygadlo J. Allelopathic potential of *Tagetes minuta* terpenes by a chemical, anatomical and phytotoxic approach. *Biochem Syst Ecol.* 2008;36(12):882–90.
10. Batish D, Arora K, Singh H, Kohli R. Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicide for managing rice weeds. *Crop Prot.* 2007;26(4):566–71.
11. Oranday A, Martínez G, Nuñez A, Rivas C, Flores A. Coumarin isolated from *Tagetes lucida* Cav. exhibits larvicidal activity in *Aedes aegypti* (L.). *Southwest Entomol.* 2008;33(4):315–7.
12. González M, Gutiérrez C, Hernández Y, Díaz M, Pellicer F. Identification of some bioactive metabolites and inhibitory receptors in the antinociceptive activity of *Tagetes lucida* Cav. *Life Sci.* 2019;231:116523.
13. Céspedes C, Marín J, Domínguez M, Avila J, Serrato B. Plant growth inhibitory activities by secondary metabolites isolated from Latin American flora. *Adv Phytomedicine.* 2006;2(C):373–410.
14. Céspedes C, Avila J, Martínez A, Serrato B, Calderón J, Salgado R. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *J Agric Food Chem.* 2006;54(10):3521–7.
15. Estrada S, González M, Rendón P, Arias L, Ávila G, Villalobos R. Antihypertensive and vasorelaxant mode of action of the ethanol-soluble extract from *Tagetes lucida* Cav. aerial parts and its main bioactive metabolites. *J Ethnopharmacol.* 2021;266: 113399.
16. Laosinwattana C, Wichittrakarn P, Teerarak M. Chemical composition and herbicidal action of essential oil from *Tagetes erecta* L. leaves. *Ind Crops Prod* 2018; 126:129–34.
17. Santos P, Santos V, Mecina G, Andrade A, Fegueiredo P, Moraes V, et al. Phytotoxicity of *Tagetes erecta* L. and *Tagetes patula* L. on plant germination and growth. *South African J Bot.* 2015; 100:114–21.
18. Saroj A, Oriyomi O, Nayak A, Haider S. Phytochemicals of Plant-Derived Essential Oils: A Novel Green Approach Against Pests. Egbuna C, Sawicka B. *Natural remedies for pest, disease and weed control.* 2020. p. 65–79.
19. Lengai G, Muthomi, Mbega E. Phytochemical activity and role of botanical pesticides in pest management for sustainable agricultural crop production. *Sci African.* 2020;7: e00239.

20. Kumar K, Nagamallu R, Govindappa V. Comprehensive review on coumarins: Molecules of potential chemical and pharmacological interest Comprehensive review on coumarins: Molecules of potential chemical and pharmacological interest. *J Chem Pharm Res.* 2015;7(9):67–81.
21. McMurry J. *Química orgánica*. 9a Ed. Distrito Federal: CENGAGE Learning; 2017.
22. Stark N, Yelle D, Agarwal U. Techniques for Characterizing Lignin. *Lignin Polym Compos.* 2016; 1:49–66.