

00570

2
Lij



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DEL POTENCIAL HERBICIDA DE
LOS PRINCIPIOS FITOTOXICOS DE *Esenbeckia*
yaxhoob Y *Stauranthus perforatus*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA FARMACEUTICA)

P R E S E N T A

Q.F.B. MARTHA LYDIA MACIAS RUBALCAVA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	M. en C. ANGELA SOTELO LÓPEZ.
VOCAL:	Dr. ROGELIO PEREDA-MIRANDA.
SECRETARIO:	Dra. ANA LUISA ANAYA LANG.
1er. SUPLENTE:	M. en C. ISABEL AGUILAR LAURENTS.
2do: SUPLENTE:	Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA.

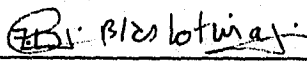
SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIOS 124 Y 115 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA,
EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

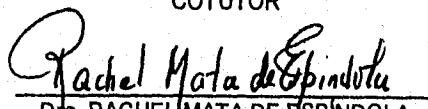
SUSTENTANTE


Q.F.B. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA

TUTOR


Dr. BLAS LOTINA-HENSEN

COTUTOR


Dra. RACHEL MATA DE ESPINDOLA

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Blas Lotina-Hennsen, por su valiosa dirección y por su gran entusiasmo para la realización de este trabajo, con profunda admiración y respeto por su gran profesionalismo.

De manera muy especial, expreso mi agradecimiento a la Dra. Rachel Mata de Espíndola, por su invaluable dirección ya que con sus sabios consejos, profesionalismo, paciencia y motivación se logró llevar a cabo este trabajo.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los proyectos DGAPA (Dirección General de Asuntos de Personal Académico) IN206795 y CONACYT (Convenio No.400313-S-2576PM).

A la Dra. Ana Luisa Anaya y a la Q.A. Blanca Hernández del Instituto de Fisiología Celular, por su asesoría para la realización de las evaluaciones conducentes a la determinación del efecto de los compuestos aislados de *Esenbeckia yaxhoob* sobre el crecimiento radicular y germinación de varias semillas vegetales.

A los prestadores de Servicio Social del Laboratorio 124 del departamento de Farmacia Edificio E, Facultad de Química, por su valiosa colaboración durante la realización del trabajo experimental.

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

DEDICATORIAS

ÍNDICE.

	Página
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
LISTA DE CUADROS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE GRÁFICAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
I. INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	4
1. Fitosíntesis	5
1.1 Consideraiones generales sobre la fotosíntesis	5
1.2 Reacciones luminosas de la fotosíntesis.	9
1.3 Transporte de electrones .	10
1.4 Biosíntesis de ATP o fotofosforilación.	13
1.5 Compuestos que afectan las reacciones luminosas de la fotosíntesis.	15
1.5.1 Inhibidores del transporte de electrones.	15
1.5.2 Inhibidores de la transferencia de energía.	16
1.5.3 Desacoplantes	18
1.5.4 Aceptores de electrones.	21
2. Antecedentes del efecto de algunas cumarinas sobre la fotosíntesis.	24
3. Antecedentes biológicos y químicos sobre las especies <i>Esenbeckia yaxhoob</i> Lundell y <i>Stauranthus perforatus</i> Liebm.	29

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS		32
III. PARTE EXPERIMENTAL		35
1.	Determinación de la actividad fitotóxica	35
2.	Aislamiento de los cloroplastos.	36
3.	Cuantificación de clorofila.	36
4.	Determinación de la síntesis de ATP	37
5.	Medición de la velocidad del transporte de electrones.	38
5.1	Determinación del transporte de electrones basal no cíclico de H ₂ O a K ₃ [Fe(CN) ₆].	39
5.2	Determinación del transporte de electrones desacoplado no cíclico de H ₂ O a K ₃ [Fe(CN) ₆].	40
5.3	Determinación del transporte de electrones fosforilante no cíclico de H ₂ O a K ₃ [Fe(CN) ₆].	40
6.	Reacciones parciales de los fotosistemas I y II.	40
6.1	Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FSII de H ₂ O a DCPIP/ K ₃ [Fe(CN) ₆].	41
6.2	Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FSI de DCPIP _{red} a MV	41
6.3	Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FSI de PMS _{red} a MV	42
7.	Determinación de la actividad de la enzima Mg ²⁺ -ATPasa.	43
7.1	Aislamiento de los cloroplastos intactos.	43

7.2	Activación de la enzima Mg ²⁺ -ATPasa.	44
7.3	Hidrólisis de ATP.	44
7.4	Cuantificación de fosfato inorgánico.	44
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	46
1.	Evaluación del potencial fitotóxico de los metabolitos aislados de la especie <i>Esenbeckia yaxhoob</i> .	47
1.1	Evaluación del potencial fitotóxico de la 2-tridecanona (1).	47
1.2	Evaluación del potencial fitotóxico del dammar-20,25-dien-24 (S)-metil-3β-acetoxi (4).	48
1.3	Evaluación del potencial fitotóxico de la imperatorina (5).	58
1.4	Evaluación del potencial fitotóxico de la asarinina (6).	62
1.5	Evaluación del potencial fitotóxico del β-lupeol (7).	62
1.6	Evaluación del potencial fitotóxico de la hesperidina (8).	63
2.	Evaluación del efecto fitotóxico sobre la fotosíntesis.	74
2.1.	Fotofosforilación o síntesis de ATP.	75
2.2	Transporte de electrones.	80
2.2.1	Caracterización del efecto de la imperatorina (5) en el transporte de electrones.	80

2.2.2	Caracterización del efecto de la chalepensina (10) sobre el transporte de electrones.	82
2.2.3	Caracterización del efecto de la xantiletina (11) en el transporte de electrones.	89
2.2.4	Caracterización del efecto de la 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina.	90
3.	Efecto de la imperatorina (5) sobre la actividad de la enzima H ⁺ -ATPasa.	95
4.	Efecto de la xantiletina (11) en las reacciones parciales del transporte de electrones fotosintético.	96
VI. CONCLUSIONES.		104
VII. BIBLIOGRAFÍA.		107

RESUMEN

Con el objetivo de explorar el potencial herbicida de las cumarinas imperatorina (5), chalepensina (10), xantiletina (11), y 3-[1',1'-dimetilalil]-xantiletina (12), previamente aisladas de las especies *E. yaxhoob* y *S. perforatus*, se determinó su efecto sobre diversas actividades fotosintéticas en cloroplastos aislados de hojas espinaca. Los resultados obtenidos en estas evaluaciones indican que las cumarinas (5), (10), (11) y (12), inhiben significativamente la síntesis de ATP cuando los electrones se transportan de agua a metilviolígeno, en forma dependiente de la concentración.

Con la finalidad de obtener una mayor información sobre el mecanismo de acción de los compuestos evaluados en la síntesis de ATP, se determinó su efecto sobre el transporte de electrones de agua a ferricianuro, encontrándose que la xantiletina (11) inhibe los transportes de electrones basal, fosforilado y desacoplado, por lo cual actúa como un inhibidor de la reacción de Hill. El sitio de inhibición se localiza en el FSI, a nivel del complejo Citb6/f y/o PC.

La imperatorina (5) activa los transportes de electrones basal y fosforilado, pero no afecta el transporte de electrones desacoplado. Sin embargo, a bajas concentraciones inhibe el transporte de electrones fosforilado. Este resultado indica que la cumarina (5) actúa como un desacoplante clásico. Por otra parte, esta cumarina induce una fuerte estimulación sobre la actividad de la enzima H⁺-ATPasa.

A bajas concentraciones, la chalepensina (10) inhibe el transporte de electrones basal y fosforilado y por lo tanto, actúa como un inhibidor de la transducción de energía. Por otra parte, a altas concentraciones activa ligeramente el transporte de electrones basal, comportándose como un desacoplante no clásico.

La 3-[1',1'-dimetilalil]-xantiletina (11) activa el transporte de electrones basal y fosforilado e inhibe el transporte de electrones desacoplado, actuando como un desacoplante potente y un inhibidor débil de la reacción de Hill.

ABSTRACT

In order to further explore the herbicidal potential of the major phytotoxic coumarins from *E. yaxhoob* and *S. perforatus*, their effect on several photosynthetic activities was investigated. The investigated compounds included imperatorin (5) chalepensisin (10), xanthyletin (11), and 3-[1',1'-dimethylallyl]-xanthyletin (12).

The coumarins (5), (10), (11) and (12) significantly inhibit ATP synthesis from water to methylviologen in chloroplast thylakoids isolated from spinach leaves, in a concentration-dependent manner.

In order to obtain further information about the mechanism of action of the coumarins on ATP synthesis, their activity on the photosynthetic electron transport from water to potassium ferricyanide was investigated. The results of this study showed that basal, phosphorylating and uncoupled electron flows are inhibited by compound (11), with higher activity at increasing concentration. These results indicate that xanthyletin behaves as a Hill's reaction inhibitor. By using artificial electron donors and acceptors, the site of inhibition was located in the span from P_{680} to $Citb_6/f$ complex and/or PC.

Imperatorin (5) activates basal and phosphorylating electron transport but it does not affect the uncoupled electron flow. However, compound (5) inhibits phosphorylating electron transport at low concentrations. These results indicate that coumarin (5) behaves as a classical uncoupling agent. On the other hand, the light-activated Mg^{2+} -ATPase from chloroplast thylakoid membrane is strongly stimulated by this compound.

Chalepensisin (10) induces inhibition of basal and phosphorylating electron transport at low concentrations. However, at high concentrations compound (10) slightly activates basal electron flow. The compound also induces acceleration of basal electron transport from water to potassium ferricyanide. These results indicate that chalepensisin (10) behaves as an energy transfer inhibitor at low concentration and as non classical uncoupler at high concentration.

3-[1',1'-dimethylallyl]-xanthyletin (11) induces activation of basal and phosphorylating electron transport and inhibits uncoupled electron flow. Therefore, coumarin (11) acts as a strong uncoupler as well as a weak Hill's reaction inhibitor.

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Efecto fitotóxico del ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , <i>Echinochloa crusgalli</i> , <i>Lactuca sativa</i> y <i>Lycopersicum esculentum</i> .	49
Cuadro 2. Efecto fitotóxico de la 2-tridecanona (1) sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , <i>Echinochloa crusgalli</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> y <i>Lactuca sativa</i> .	52
Cuadro 3. Efecto fitotóxico del dammar-20,25-dien -24 (S)-metil-3 β -acetoxi (4) sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , <i>Echinochloa crusgalli</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> y <i>Lactuca sativa</i> .	55
Cuadro 4. Efecto fitotóxico de la imperatorina (5), sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , <i>Echinochloa crusgalli</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> y <i>Lactuca sativa</i> .	59

Cuadro 5.	Efecto fitotóxico de la asarinina (6), sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , <i>Echinochloa crusgalli</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> y <i>Lactuca sativa</i> .	65
Cuadro 6.	Efecto fitotóxico del β -lupeol (7), sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , <i>Echinochloa crusgalli</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> y <i>Lactuca sativa</i> .	68
Cuadro 7.	Efecto fitotóxico de la hesperidina (8), sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , <i>Echinochloa crusgalli</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> y <i>Lactuca sativa</i> .	71
Cuadro 8.	Efecto de las cumarinas imperatorina, chalepensina, xantiletina, y 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina, en la síntesis de ATP utilizando de MV como aceptor de electrones, a pH 8. Las velocidades de los controles fueron de 3865, 2226, 2390 y 2212 μ Moles de ATP $h^{-1} mg Chl^{-1}$, respectivamente.	78
Cuadro 9.	CI_{50} (μM) de las cumarinas imperatorina, chalepensina, xantiletina, y 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina en la fotofosforilación.	79

- Cuadro 10.** Porcentaje de actividad de la imperatorina en las diferentes actividades fotosintéticas estudiadas (Te^- basal, Te^- fosforilado y Te^- desacoplado), durante el flujo de electrones de H_2O a $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. 85
- Cuadro 11.** Porcentaje de actividad de la chalepensina en las diferentes actividades fotosintéticas estudiadas (Te^- basal, Te^- fosforilado y Te^- desacoplado), cuando fluyen electrones de H_2O a $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. 88
- Cuadro 12.** Efecto de la concentración de la piranocumarina xantiletina, sobre las diferentes actividades fotosintéticas estudiadas (Te^- basal, Te^- fosforilado y Te^- desacoplado), cuando los electrones se transportan de H_2O a $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. 92
- Cuadro 13.** Efecto de la concentración de la piranocumarina 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina, sobre las diferentes actividades fotosintéticas, estudiadas, cuando los electrones se transportan de H_2O a $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Te^- basal, Te^- fosforilado y Te^- desacoplado). 94
- Cuadro 14.** Activación de la enzima Mg^{2+} -ATPasa al aumentar la concentración de la Imperatorina. La velocidad del control es de $38 \mu\text{Moles de Pi. h}^{-1} \text{ mg Chl}^{-1}$ 96

- Cuadro 15.** Efecto de la xantiletina en el transporte de electrones desacoplado en el FSII de H₂O a DCPIP/K₃[Fe(CN)₆], al aumentar la concentración del compuesto. La velocidad del control fue de 375 $\mu\text{equiv. e}^- \text{h}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$. 98
- Cuadro 16.** Porcentaje de actividad del transporte de electrones desacoplado en el FSI de DCPIP_{red} a MV en presencia de xantiletina (11). La velocidad del control fue de 305.1 en $\mu\text{equiv. e}^- \text{h}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$. 101
- Cuadro 17.** Efecto de la concentración de xantiletina en el transporte de electrones desacoplado del FSI de PMS_{red} a MV. La velocidad del control fue de 230.8 $\mu\text{equiv. e}^- \text{h}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$. 102

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación esquemática de un cloroplasto.	7
Figura 2. Micrografía electrónica de un cloroplasto.	7
Figura 3. Organización de los componentes de la fotosíntesis en la membrana tilacoidal.	8
Figura 4. Esquema Z de la fotosíntesis.	12
Figura 5. Representación esquemática de la estructura de la enzima ATPasa.	14
Figura 6. Compuestos que actúan como inhibidores del transporte de electrones de la cadena redox del cloroplasto: tris, DCMU, DBMIB, EDAC, KCN y el DSFS.	16
Figura 7. Ejemplos de inhibidores de la transferencia de energía: NEM, DCCD, Dio-9 y la florizina.	19
Figura 8. Mecanismo de acción de ácidos débiles desacoplantes del tipo protonóforo.	20
Figura 9. Algunos ejemplos de compuestos que actúan como aceptores de electrones: SIMo, DCPIP/Ascorbato, $K_3[Fe(CN)_6]$, PMS/Ascorbato y MV.	23

Figura 10.	Metabolitos secundarios aislados de las fracciones fitotóxicas de las partes aéreas de <i>Esenbeckia yaxhoob</i> .	26
Figura 11.	Cumarinas fitotóxicas aisladas de las raíces de <i>Stauranthus perforatus</i> .	28
Figura 12.	Determinación del transporte de electrones de H ₂ O a MV.	76
Figura 13.	Determinación del transporte de electrones de H ₂ O a K ₃ [Fe(CN) ₆].	83
Figura 14.	Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FSII de H ₂ O a DCPIP/K ₃ [Fe(CN) ₆].	97
Figura 15.	Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FSI de DCPIP _{red} a MV.	99
Figura 16.	Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FSI de PMS _{red} a MV.	103

LISTA DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1. Efecto fitotóxico del ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre el crecimiento radicular de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , <i>Echinochloa crusgalli</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> y <i>Lactuca sativa</i> .	50
Gráfica 2. Efecto fitotóxico del ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre la germinación de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , <i>Echinochloa crusgalli</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> y <i>Lactuca sativa</i> .	51
Gráfica 3. Efecto fitotóxico de la 2-tridecanona (1) sobre el crecimiento radicular de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , <i>Echinochloa crusgalli</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> y <i>Lactuca sativa</i> .	53
Gráfica 4. Efecto fitotóxico de la 2-tridecanona (1) sobre la germinación de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , <i>Echinochloa crusgalli</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> y <i>Lactuca sativa</i> .	54
Gráfica 5. Efecto fitotóxico del dammar-20,25-dien -24 (S)-metil-3 β -acetoxi (4) sobre el crecimiento radicular de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , <i>Echinochloa crusgalli</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> y <i>Lactuca sativa</i> .	56

- Gráfica 6.** Efecto fitotóxico del dammar-20,25-dien -24 (S)-metil-3 β -acetoxi (4) sobre la germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lycopersicum esculentum* y *Lactuca sativa*. 57
- Gráfica 7.** Efecto fitotóxico de la imperatorina (5), sobre el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lycopersicum esculentum* y *Lactuca sativa*. 60
- Gráfica 8.** Efecto fitotóxico de la imperatorina (5), sobre la germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lycopersicum esculentum* y *Lactuca sativa*. 61
- Gráfica 9.** Efecto fitotóxico de la asarinina (6), sobre el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lycopersicum esculentum* y *Lactuca sativa*. 66
- Gráfica 10.** Efecto fitotóxico de la asarinina (6), sobre la germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lycopersicum esculentum* y *Lactuca sativa*. 67
- Gráfica 11.** Efecto fitotóxico del β -lupeol (7), sobre el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lycopersicum esculentum* y *Lactuca sativa*. 69

- Gráfica 12.** Efecto fitotóxico del β -lupeol (7), sobre la germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lycopersicum esculentum* y *Lactuca sativa*. 70
- Gráfica 13.** Efecto fitotóxico de la hesperidina (8), sobre el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lycopersicum esculentum* y *Lactuca sativa*. 72
- Gráfica 14.** Efecto fitotóxico de la hesperidina (8), sobre la germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lycopersicum esculentum* y *Lactuca sativa*. 73
- Gráfica 15.** Efecto de la concentración de las cumarinas, (●) imperatorina, (▲) xantiletina, (◆) 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina y (■) chalepensina, en la síntesis de ATP, determinada cuando los electrones se transportan de H_2O a MV, a pH 8. 77
- Gráfica 16.** Efecto de la concentración de imperatorina en el transporte de electrones de H_2O a $K_3[Fe(CN)_6]$. (●) Te^- basal, (▲) Te^- fosforilado y (■) Te^- desacoplado, en $\mu\text{equiv. } e^- \text{ h}^{-1} \text{ mg Chl}^{-1}$. Las velocidades del control para los transportes de electrones basal, fosforilado y desacoplado son 292.3, 338.9 y 464.8, respectivamente. 84

- Gráfica 17.** Efecto de la concentración de chalepensina en el transporte de electrones de H_2O a $K_3[Fe(CN)_6]$. (●) Te^- basal, (▲) Te^- fosforilado y (■) Te^- desacoplado, en $\mu eq e^- h^{-1} mg Chl^{-1}$. Las velocidades del control para los transportes de electrones basal, fosforilado y desacoplado son 334.2, 6333.7 y 141.1, respectivamente. 87
- Gráfica 18.** Efecto de la concentración de xantiletina en el transporte de electrones de H_2O a $K_3[Fe(CN)_6]$. (●) Te^- basal, (▲) Te^- fosforilado y (■) Te^- desacoplado, en $\mu equiv. e^- h^{-1} mg Chl^{-1}$. Las velocidades del control para los transportes de electrones basal, fosforilado y desacoplado son 292.3, 338.9 y 464.8, respectivamente. 91
- Gráfica 19.** Efecto de la concentración de la 3-(1'-1'-dimetilalil)-xantiletina en el transporte de electrones de H_2O a $K_3[Fe(CN)_6]$. (●) Te^- basal, (▲) Te^- fosforilado y (■) Te^- desacoplado, en $\mu equiv. e^- h^{-1} mg Chl^{-1}$. Las velocidades del control para el transporte de electrones basal, fosforilado y desacoplado son 202.8, 271.1 y 345.5, respectivamente. 93
- Gráfica 20.** Efecto de la concentración de xantiletina en el transporte de electrones desacoplado en el FSI de $DCPIP_{red}$ a MV. 100

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato.
ATP	Adenosina trifosfato
°C	Grados centígrados.
CCCP	Carbonil cianuro-3-clorofenil hidrazona.
CF ₀	Factor de acoplamiento cero de la ATPasa.
CF ₁	Factor de acoplamiento uno de la ATPasa.
Cit b ₆ /f	Complejo citocromo b ₆ /f.
Cit. b ₅₆₃	Citocromo b ₅₆₃ .
Cit. f	Citocromo f
CL ₅₀	Concentración letal media.
Cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
CHCl ₃	Cloroformo
D ⁻	Especie básica del desacoplante.
DBMIB	Dibromometilisopropil- <i>p</i> -benzoquinona.
DCCD	<i>N,N</i> -díciclohexilcarbodiimida
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetil urea.
DCEPA	Dimetil-tetracloro-tereftalato
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DNA	Acido dexoxi ribonucleico
DNP	Dinitrofenol.
DLSPS	Disaliciliden-propano-diamina.
ECAD	<i>N</i> -etil- <i>N'</i> -dimetilaminopropil-carbodilmeda.
EDTA	Ácido etiléndiamintetraacético.
FAD ⁺	Flavina adenina dinucleótido oxidado
FADH ₂	Flavina adenina dinucleótido reducido
FCCP	Carbonil cianuro- <i>p</i> -trifluorometoxifenil hidrazona.

Fd	Ferredoxina.
Flo	Floricina (4,4',6'-trihidroxi-2'glucósido-dihidrochalcona.
FMN	Flavina adenina mono nucleótido.
FSI	Fotosistema I.
FSII	Fotosistema II.
g	Gramos.
H ⁺	Protón.
H ⁺ -ATPasa	Complejo multienzimático que se encarga de sintetizar ATP
H ₂ O	Agua.
HD	Especie ácida del desacoplante.
h.	Horas.
hu	cuantos de luz.
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Ferricianuro de potasio.
KCN	Cianuro de potasio.
KD	Kilodaltones.
m	Metros
MES	ácido-2(N-morfolino)-etanosulfónico.
µg	Microgramos.
Mg	Magnesio
mL	Mililitros.
mM	Milimolar.
Mn	Manganeso
NADP ⁺	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado.
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina reducido.
NEM	N-etilmaleimida.
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio.
O ₂	Oxígeno molecular.
P ₆₈₀	Centro de reacción del FSII.
P ₆₈₀ ⁺	Centro de reacción oxidado del FSII.
P ₇₀₀	Centro de reacción del FSI.

P ₇₀₀ [*]	Centro de reacción oxidado del FSI.
PC	Plastocianina.
Ph	Feofitina
Pi	Fosfato inorgánico.
PMS	Fenacinametasulfato
PQ	Plastoquinona
Q	Aceptor primario del FSII
QA	Plastoquinona
QB	Segunda plastoquinona
red	Reducido
rpm	Revoluciones por minuto
SiMo	Silicomolibdato de sodio
Tricina	N-tri-(hidroximetil)-metilglicina.
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano.
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

I. INTRODUCCIÓN

I. Introducción

La riqueza florística de México constituye sin lugar a dudas uno de los recursos naturales más importantes del mundo. Sin embargo, el porcentaje de especies estudiadas desde el punto de vista fitoquímico y biológico es relativamente bajo, y si bien es cierto que la investigación científica de la flora mexicana se ha destacado por un notable y sostenido avance en el estudio fitoquímico de muchas especies botánicas, tan sólo un escaso número de compuestos aislados e identificados han sido evaluados para determinar sus propiedades biológicas en general. De lo anterior se desprende que el potencial de las plantas en México, como fuente de nuevos principios activos, incluyendo aquellos con propiedades herbicidas de origen vegetal, aún no se ha explorado adecuadamente. Por otro lado, cabe subrayar que el interés científico por el estudio de las plantas mexicanas como fuente de principios bioactivos se ha visto incrementado en los últimos años y cada vez es más notable la incorporación del esquema de trabajo interdisciplinario en los programas de investigación.

En este contexto, y considerando que en los años recientes la búsqueda de nuevos agentes herbicidas, de origen natural, se ha incrementado notablemente debido a la alta toxicidad y la persistencia de algunos de los herbicidas de origen sintético de mayor uso (Benner, 1993; Pillmoor, 1993; Rodgers, 1993), se ha establecido un programa interdisciplinario (Aleloquímicos de origen vegetal como una fuente potencial de nuevos agentes herbicidas) cuyo objetivo fundamental es determinar la potencialidad herbicida de especies selectas de la flora mexicana y productos derivados de las mismas con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes herbicidas biodegradables y de menor toxicidad (Anaya, 1987; Worsham, 1989). Si bien es cierto que son escasos los herbicidas de origen vegetal con aplicación comercial, ha sido posible generar nuevos herbicidas semisintéticos y sintéticos a partir de moléculas prototipo de origen natural con propiedades herbicidas demostradas. Un ejemplo reciente lo constituye el cinmetilino, desarrollado a partir del monoterpenoide cineol (Worsham, 1989).

Afortunadamente para la determinación de la potencialidad herbicida de productos naturales se cuenta con bioensayos sencillos y de fácil implementación.

1. Introducción

Entre los más utilizados se encuentran los ensayos de germinación de semillas y de crecimiento radicular (Anaya *et al.*, 1990; Ghisalberti, 1993). Estas evaluaciones aunque bastante preliminares permiten detectar extractos naturales apropiados para la obtención de agentes herbicidas (Ghisalberti, 1993).

Una vez seleccionados los extractos apropiados se aíslan los principios fitotóxicos mediante estudios biodirigidos. Este proceso permite la obtención de los agentes herbicidas potenciales; posteriormente con la finalidad de explorar de manera más detallada su posible aplicación como herbicidas comerciales, estos compuestos son sometidos a evaluaciones biológicas más complejas. De particular interés es la determinación del efecto de estos productos sobre la fotosíntesis, proceso bioquímico que constituye el blanco de acción de la mayoría de los herbicidas comerciales.

Con base en las consideraciones anteriores, el presente trabajo pretende contribuir al desarrollo de nuevos agentes herbicidas de origen natural, mediante la evaluación del efecto sobre diversas actividades fotosintéticas de los principios activos fitotóxicos más potentes derivados de las especies *Esenbeckia yaxhoob* y *Stauranthus perforatus*. Ambas especies pertenecen a la familia de las Rutáceas, la cual se distingue por ser una de las familias más ricas en metabolitos secundarios con propiedades biológicas. Estas especies fueron seleccionadas dentro del programa de investigación antes mencionado como una fuente potencial valiosa de principios herbicidas.

II. ANTECEDENTES.

1. FOTOSÍNTESIS

1.1 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA FOTOSÍNTESIS.

La fotosíntesis es el proceso metabólico mediante el cual la energía de la luz solar se convierte en energía química. Esta reacción fotoquímica se realiza en vegetales y otros organismos (ciano bacterias fotosintéticas) en los que a partir del CO₂, agua y sales inorgánicas se sintetiza el material orgánico. Los principales productos de la fotosíntesis son: la glucosa, el almidón, la celulosa y O₂. Este último se genera por descomposición del agua. La fotosíntesis comprende dos procesos conocidos como fase luminosa y fase oscura. En la primera se produce O₂, NADPH y ATP. Los dos últimos productos son utilizados en la fase oscura para reducir el CO₂ y transformarlo principalmente en carbohidratos (Hiller y Goodchild, 1981).

La maquinaria enzimática del proceso de la fotosíntesis se localiza en los cloroplastos. En las plantas superiores, estos organelos son generalmente cuerpos elipsoidales de color verde. Un cloroplasto consta de una doble membrana, una externa y otra interna, separadas por un espacio intermembranal. La membrana interna es una barrera permeable que regula el paso de los sustratos y productos de la fotosíntesis hacia adentro y fuera del cloroplasto. La membrana externa es permeable a todo tipo de moléculas incluyendo macromoléculas como las proteínas. El sistema interior del organelo se llama estroma, el cual posee DNA, ribosomas, plastoglóbulos, aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, iones y por lo menos 200 tipos de proteínas, muchas de las enzimas tienen actividad enzimática. Dentro del estroma, se encuentra una serie de sacos llamados tilacoides, los cuales se acumulan en pilas llamadas grana que están interconectadas mediante unas membranas, denominadas interlamelas (Ellis, 1989). Las células de las plantas superiores generalmente poseen entre 50 y 200 cloroplastos (Figuras 1 y 2).

II. Antecedentes

La membrana tilacoidal contiene fosfolípidos y proteínas en una proporción aproximada de uno a uno, que son principalmente glucolípidos y lipoproteínas formando generalmente complejos con la clorofila. Las enzimas de la fase luminosa de la fotosíntesis se encuentran formando parte de las estructuras de las membranas de los tilacoides, mientras que las enzimas que fijan el CO_2 y lo reducen, se localizan en la fase acuosa del estroma.

Las reacciones dependientes de la luz son las que corresponden a la reacción de Hill o cadena transportadora de electrones a través de reacciones de oxidorreducción, cuya función es generar un gradiente electroquímico de protones, el cual se utiliza en la síntesis de ATP. Los eventos asociados a la reacción de Hill son los siguientes: en primer lugar, la luz se absorbe por los pigmentos antena (clorofilas y carotenos) y se transfiere, a los centros de reacción fotoquímicos (Figura 3). En seguida, se lleva a cabo un transporte de electrones de un donador (agua) a un aceptor de electrones final de la cadena redox (NADP^*), a través de una serie de componentes multienzimáticos redox. Además del flujo de electrones, tiene lugar un transporte vectorial de protones hacia el interior de los tilacoides con la consecuente generación de un gradiente a través de la membrana del tilacoide. La energía libre que contiene este gradiente electroquímico, se utiliza para la fotofosforilación del ADP con P_i . Esta última reacción es catalizada por la enzima H^+ -ATPasa y, por lo tanto, el flujo de electrones está acoplado a la síntesis de ATP mediante el gradiente electroquímico de protones.

El poder reductor del NADPH y la energía del ATP producido en la fase luminosa son utilizados directamente para los procesos secundarios, como la fijación de CO_2 .

Cada cadena transportadora de electrones se considera como una unidad fotoquímica o fotosintética y se compone de proteínas acarreadoras de electrones, pigmentos antena y un centro de reacción. Las plantas superiores contienen dos fotosistemas: el fotosistema I (FSI) y el fotosistema II (FSII).

II. Antecedentes

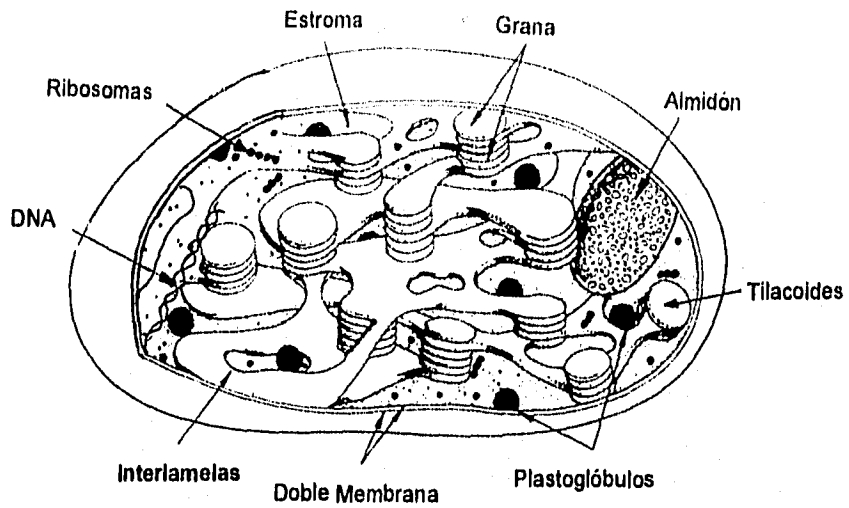


Figura 1. Representación esquemática de un cloroplasto.

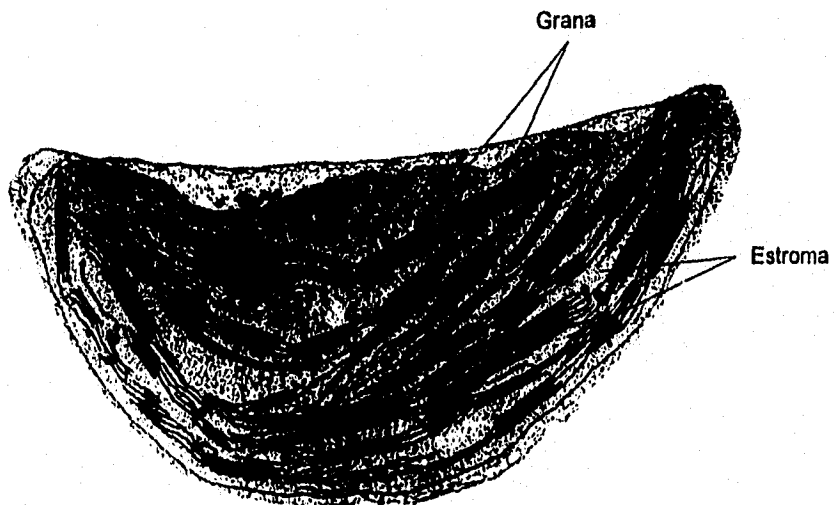


Figura 2. Micrografía electrónica de un cloroplasto.

II. Antecedentes

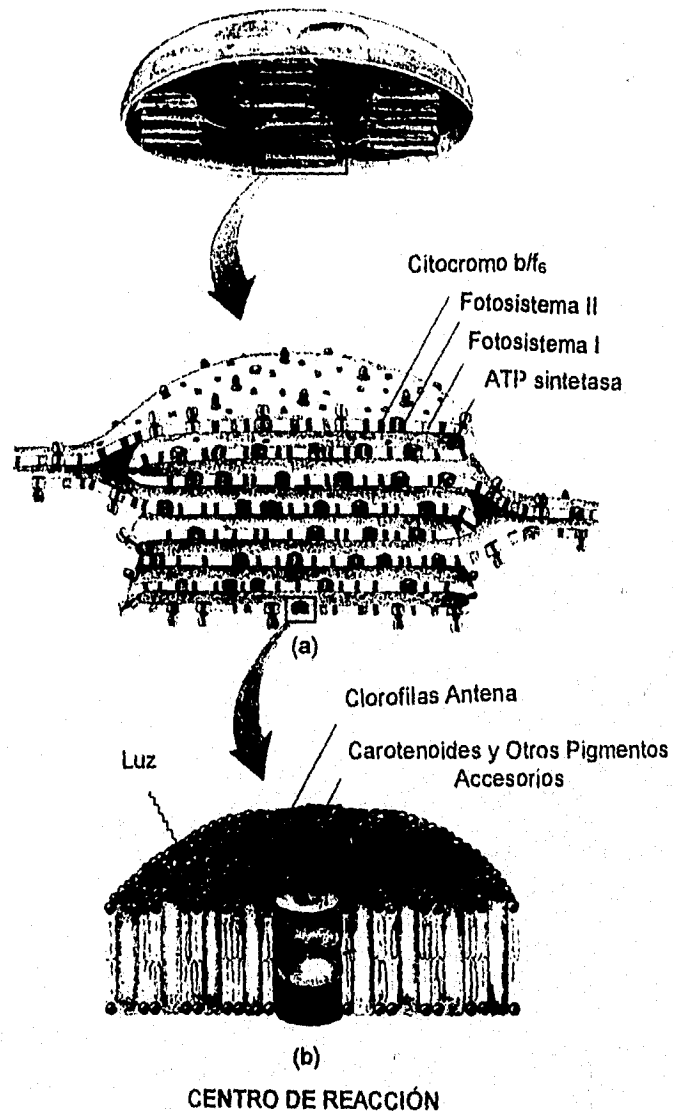


Figura 3. Organización de los componentes de la fotosíntesis en la membrana tilacoidal. a) distribución de los fotosistemas I y II, ATPasa y el complejo Citocromo b_6/f_6 . b) ampliación de un fotosistema mostrando el centro de reacción, clorofilas antena y pigmentos accesorios.

1.2 REACCIONES LUMINOSAS DE LA FOTOSÍNTESIS.

En las plantas superiores la luz es absorbida por unos pigmentos específicos entre los cuales se encuentran las clorofilas *a* y *b*. Existen otros pigmentos de importancia denominados pigmentos accesorios secundarios por que su capacidad de absorción de luz complementan la de la clorofila. Entre estos pigmentos se encuentran los carotenoides en las plantas y las ficobilinas en las cianobacterias.

Las clorofilas y los carotenoides conocidos como pigmentos antena tienen la función de absorber la luz y canalizar su energía a las clorofilas *b* y *a*, y éstas a su vez a los centros de reacción. Estos centros contienen moléculas de clorofila *a*, formando generalmente dímeros. Cuando una molécula de clorofila absorbe un cuanto de luz, ésta eleva su energía y desplaza uno de sus electrones a un nivel energético mayor. La molécula de clorofila puede disipar esa energía mediante diferentes mecanismos (Anderson y Beardall, 1991) y los más importantes se describen a continuación:

a) La transferencia de energía a otra molécula de clorofila. La energía liberada cuando un electrón excitado de una molécula de clorofila regresa estado basal; se utiliza para elevar al estado excitado un electrón de la molécula vecina. Los pigmentos cosechadores de luz disipan su energía de esta forma y los fotones absorbidos pasan de una molécula a otra hasta que alcanzan los pigmentos de los centros de reacción.

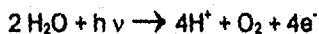
b) El regreso de la molécula de clorofila del estado excitado al basal se realiza por medio de una reacción química que generalmente involucra la pérdida de un electrón de la molécula del pigmento. La clorofila de los centros de reacción disipa su energía de esta forma. Se conocen dos centros de reacción en las plantas superiores, P_{680} y P_{700} para el FSII y el FSI, respectivamente. La pérdida de un electrón en la molécula de clorofila deja una carga neta positiva que se neutraliza con un electrón proveniente de alguna molécula donadora. En el FSII

II. Antecedentes

los electrones provienen de la oxidación de agua, mientras que en el FSI la molécula donadora de electrones es la plastocianina.

1.3 TRANSPORTE DE ELECTRONES .

La secuencia en que operan los componentes multienzimáticos de la cadena redox es en serie y se representa en la Figura 4 (Anderson y Beardall, 1991). La absorción de luz en el centro de reacción del FSI provoca la transferencia de un electrón a la feofitina (Ph) y como resultado, el P_{680} queda como un oxidante fuerte (P_{680}^*) que debe regresar al estado reducido (P_{680}) para continuar con las fotorreacciones. El electrón necesario para su reducción proviene de la fotólisis del agua (Trebst, 1972). El sitio de oxidación del agua contiene cuatro iones Mn con números de oxidación que varían entre 2⁺ y 4⁺. En este proceso dos moléculas de agua se fotolisan generando cuatro electrones, cuatro protones y una molécula de O_2 .



El centro de reacción P_{680}^* dona un electrón cuando está reducido, el electrón llega por vía de la feofitina (una molécula de clorofila a sin Mg) al aceptor primario Q_A (Golbeck, *et al.* 1977), una quinona unida a su apoproteína transformándose en semiquinona. Después, el electrón es transferido a la enzima redox Q_B conocida como aceptor secundario del FSI (quinona unida a una proteína de 32 KD que acepta dos electrones y dos protones para reducirse a plastoquinol). Los electrones viajan por la membrana y llegan a la siguiente molécula aceptora de electrones que es la plastoquinona (PQ); esta última transfiere el electrón al complejo de citocromo b_6/f (Cit b_6/f). El complejo citocromo b_6/f contiene a los citocromos f, b_{563} y Fe-S (Hurt y Hauska, 1977). Este complejo

II. Antecedentes

oxida a la PQ y reduce a la plastocianina (PC) por lo que tiene actividad de plastoquinona oxidasa y PC reductasa. La PC es el siguiente acarreador, el cual dona los electrones al centro de reacción del FSI (Armstrong, 1989). El centro de reacción del FSI oxidado (P_{700}^*) se produce al ser excitado (con luz visible) simultáneamente con P_{680} . El P_{700} excitado dona electrones de uno en uno al aceptor primario del FSI, que se ha identificado como A_0 y que es una molécula de clorofila a unido a proteína y después dona su electrón a la enzima redox A_1 (una plastoquinona) y a los centros Fe-S (llamados F_A , F_B y F_{AB}). A continuación los electrones son transportados a la ferredoxina (Fd), la cual se encuentra en la cara externa de la membrana tilacoidal. La Fd es una proteína que contiene dos centros Fe-S, de aquí los electrones son transferidos a la ferredoxina-NADP⁺-reductasa (FP), la cual contiene flavin adenina dinucleótido (FAD⁺). Esta última se reduce con los electrones y con dos protones que toma del medio externo para formar el FADH₂. Por último, el NADP⁺ acepta los electrones y un protón del FADH₂ para formar NADPH. El transporte de electrones de la proteína Fe-S al NADP⁺ se efectúa en favor de un gradiente electroquímico (Figura 4).

El transporte de electrones mencionado se conoce como transporte de electrones no-cíclico en donde los electrones fluyen del agua al NADPH (Danks *et al.*, 1983). Existe otro tipo de transporte de electrones que es cíclico en el cual, los electrones son transferidos desde el P_{700}^* (centro de reacción excitado del FSI), a la Fd y luego al complejo del citocromo *b₆/f* mediado por flavin adenina mono nucleótido (FMN). Los protones son bombeados por este complejo a la vez que los electrones regresan al centro de reacción a través de la PC; este flujo cíclico origina un gradiente de protones a través de la membrana, que contiene la energía libre para la síntesis de ATP. En este proceso se genera ATP sin la formación de NADPH y O₂. El ATP formado en el flujo de electrones cíclico complementa la cantidad de ATP que se requiere para la reducción de AH₂ a carbohidratos (Anderson y Beardall, 1991; Lehniger *et al.*, 1993).

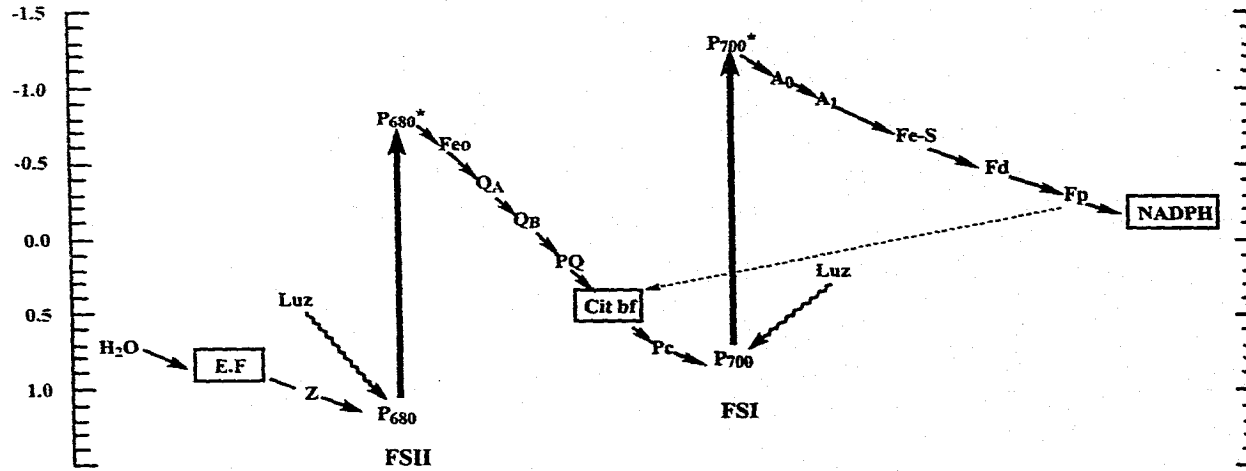


Figura 4. Enzimas redox del transporte de electrones en la membrana del tilacoides ordenadas por su potencial estándar de reducción, las flechas más largas indican fotoexcitación y las cortas indican transporte de electrones. Este esquema muestra el camino no cíclico de la transferencia de electrones desde el H₂O hasta el NADP⁺. La línea punteada representa la transferencia de electrones cíclica la cual involucra únicamente al FSI; los electrones proyectados al aceptor primario del FSII pueden retornar al P₇₀₀^{*} mediante el citocromo b₆f.

1.4 BIOSÍNTESIS DE ATP O FOTOFOSFORILACIÓN.

La enzima principal en la transducción de la energía en membranas es la H⁺-ATPasa (CF₀-CF₁). Esta enzima utiliza el gradiente electroquímico generado durante el transporte de electrones para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi y cuando cumple con esta función se llama ATP-sintetasa. Esta enzima se localiza en la membrana del tilacoide y está formada por dos partes: la primera es una porción hidrofóbica conocida como CF₀ (factor hidrofóbico de la ATPasa) que se encuentra embebida en la membrana y que al parecer funciona como canal específico de salida de protones durante la actividad de la H⁺-ATPasa. Consta de cuatro subunidades proteicas conocidas como I, II, III, y IV (Nelson, 1981). La segunda porción es hidrofílica y se denomina CF₁ (factor de acoplamiento de la ATPasa) y se localiza en la superficie estromal de la membrana. Esta parte se compone de cinco subunidades diferentes con estequiometría $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ (Figura 5) [Merchant y Selman, 1985]. La porción CF₁ es la parte de la enzima que cataliza la síntesis de ATP en respuesta al gradiente de pH generado al iluminar los cloroplastos. La enzima sufre un cambio conformacional en las subunidades γ y ϵ , que al parecer son los que participan en su activación (Ketcham, 1984). El sitio activo se localiza en la subunidad β o entre las subunidades α y β ; el sitio regulador se localiza en la subunidad α (Bruntlm, *et al.*, 1981).

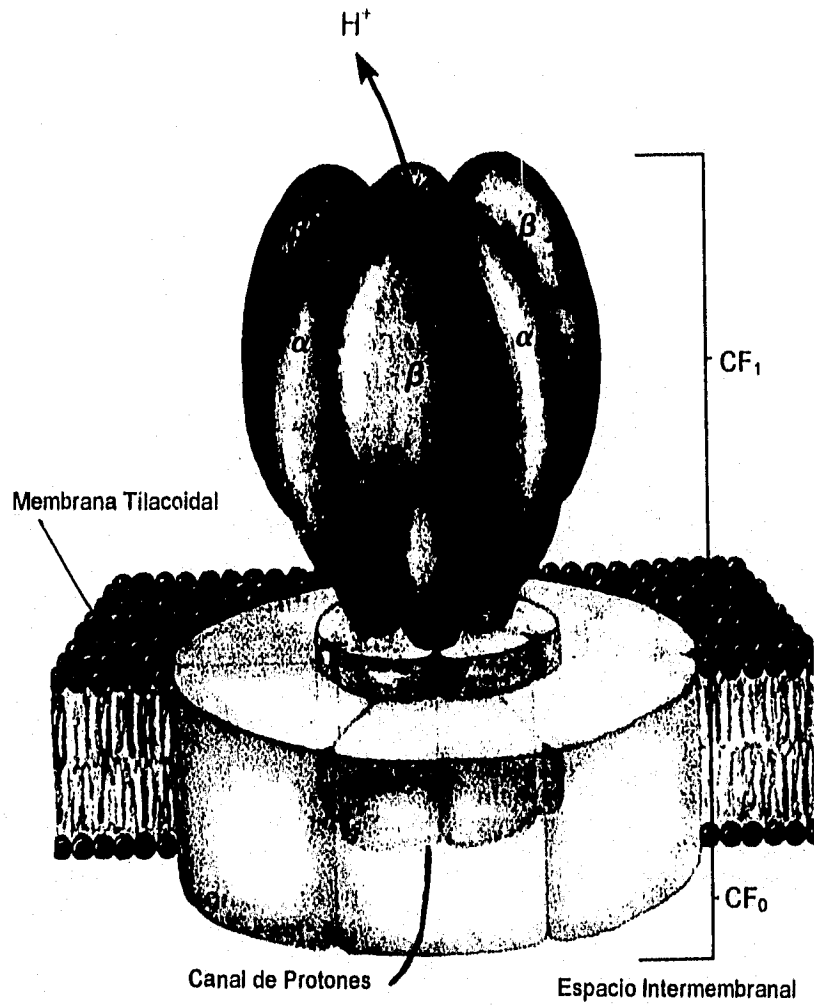


Figura 5. Representación de la estructura de la enzima ATPasa.

1.5 COMPUESTOS QUE AFECTAN LAS REACCIONES LUMINOSAS DE LA FOTOSÍNTESIS.

El 50% de los herbicidas comerciales interfieren con algún paso de la fotosíntesis. La mayoría de ellos actúan a nivel de la cadena transportadora de electrones entre Q y PQ; otros son inhibidores de la fotofosforilación o síntesis de ATP. Por último, algunos actúan como desacoplantes y aceptores de electrones (Avdus, 1976; Ashton y Grafts, 1973; Corbett, Assche, 1978).

Estos diferentes mecanismos de acción han permitido clasificar a los herbicidas comerciales que afectan las reacciones luminosas de la fotosíntesis en cuatro grupos (Moreland, 1980):

1. Inhibidores del transporte de electrones.
2. Inhibidores de la transferencia de energía.
3. Desacoplantes.
4. Aceptores de electrones.

1.5.1 INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES.

Este tipo de compuestos son conocidos como inhibidores de la reacción de Hill, debido a que en presencia o ausencia de ADP y Pi, o en presencia de NH₄Cl, inhiben el transporte de electrones no cíclico, así como la síntesis de ATP al interferir con la formación del gradiente de H⁺.

Estos compuestos afectan uno o más enzimas transportadoras de electrones en la cadena fotosintética, principalmente a nivel de la enzima redox Q_B que se encuentra en el FSII, interfiriendo así con el transporte de electrones de H₂O a NADP⁺ (Moreland, 1980; Izawa y Good, 1983; McCarty, 1977).

Algunos ejemplos de inhibidores del transporte de electrones lo constituyen: el tris-hidroximetil-aminometano (tris), que actúa a nivel de la enzima que fotolisa el agua (Veron, 1969; Izawa y Ort, 1974); el 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetil urea (DCMU) que inhibe el transporte de electrones entre Q_A y Q_B (Astier,

II. Antecedentes

1984); el dibromoetilisopropil-*p*-benzoquinona (DBMIB), que actúa sobre PQ (Moreland, 1980); la *N*-etil-*N'*-dimetilaminopropil-carbodiimida (EDAC), que inhibe el transporte entre PQ y Cit *b₆/f*; el cianuro de potasio (KCN), que ejerce su efecto sobre PC (Ouitrakul e Izawa, 1973), y el disaliclidén-propano-diamina (DSPS), que actúa a nivel del complejo ferredoxina, entre otros (Figura 6).

Recientemente se ha encontrado que los productos naturales isoalloantolactona y el cacalol son inhibidores del transporte de electrones; la isoalloantolactona se caracterizó como un inhibidor entre P_{680} y Q_A (Calera *et al.*, 1995) y el cacalol actúa a nivel de la enzima que fotolisa el agua (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991; Lotina-Hennsen *et al.*, 1992; Lotina-Hennsen *et al.*, 1994; Bernal-Morales *et al.*, 1994).

1.5.2 INHIBIDORES DE LA TRANSFERENCIA DE ENERGÍA.

Los inhibidores de la transferencia de energía afectan directamente a la enzima H^+ -ATPasa que cataliza el proceso de fotofosforilación. Estos compuestos interfieren con la actividad de CF_1 y/o CF_0 o para inhibir.

El bombeo de protones inducido por la luz en el lumen tilacoidal hace que el espacio interno sea ácido y que el lado del estroma sea básico. El flujo de protones a través de la enzima CF_0 al lado del estroma, induce la síntesis de ATP por el complejo CF_1 . Este evento traduce la energía del gradiente electroquímico de protones en energía química mediante la fosforilación del ADP con P_i para producir ATP.

Algunos ejemplos de inhibidores de la transferencia de energía incluyen: la *N*-etilmaleimida (NEM), [Melandri, 1975], la *N,N*-diciohexilcarbodiimida (DCCD) [McCarty y Racker, 1967], el Dio-9 (Guillory y Racker, 1965; McCarty *et al.*, 1965), la *N,N*-dimetil formamida (Peña-Valdivia *et al.*, 1991) y la florizina (Fio).

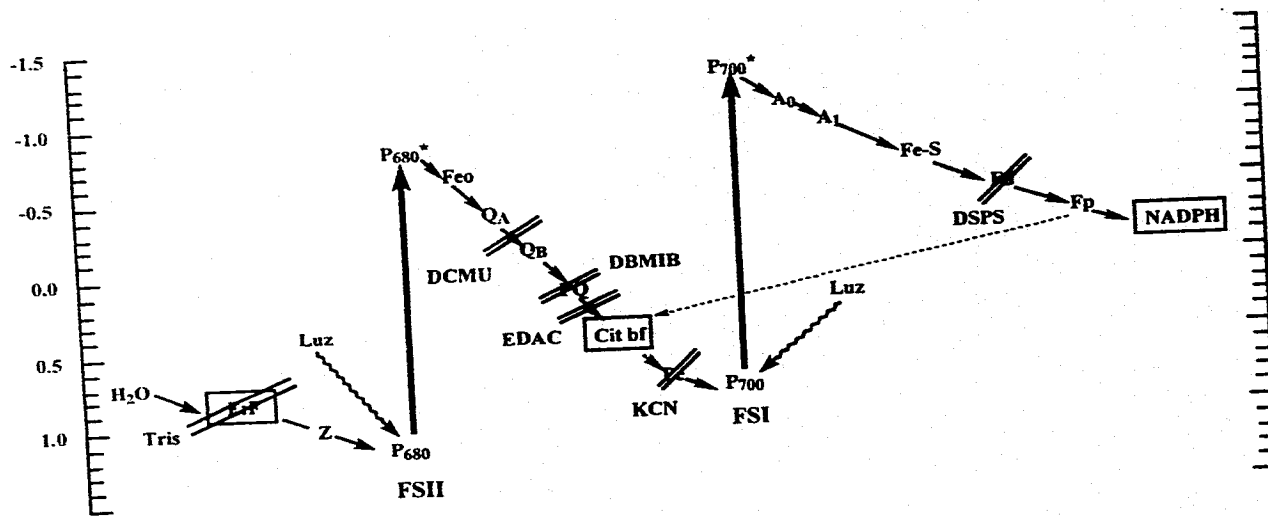


Figura 6. Compuestos que actúan como inhibidores del transporte de electrones: tris, DCMU, DBMIB, EDAC, KCN y el DSFS.

II. Antecedentes

Es importante mencionar que los productos naturales 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (Calera *et al.*, 1995) y el piquerol (Mendoza, 1994), fueron caracterizados como inhibidores de la transferencia de energía.

En la Figura 7 se indica el sitio de acción de algunos de los compuestos mencionados anteriormente.

1.5.3 DESACOPLANTES.

Los desacoplantes son compuestos que interfieren con el acoplamiento que existe entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP, por lo tanto inhiben la velocidad de la fotofosforilación, debido a que disipan el gradiente electroquímico de protones. Los flujos de protones en condiciones basales y fosforilantes se disipan y se llevan a cabo a sus máximas velocidades debido a que se eliminó el control que ejerce el gradiente electroquímico de protones. Los transportes de electrones basales y fosforilantes se activan a su máxima velocidad y el flujo de electrones desacoplado es máximo y no es afectado.

Los desacoplantes son ácidos débiles lipofílicos, los cuales en su forma aniónica atraviesan la membrana tilacoidal tomando protones del medio interno; una vez protonados, estos compuestos viajan nuevamente a través de la membrana para regresar a la superficie externa del tilacoide donde liberan el protón al disociarse. Como resultado de este proceso se origina la disipación del gradiente de pH, el cual es la fuerza motriz para la síntesis de ATP. Los compuestos que desacoplan mediante este mecanismo se conocen como protonóforos (Benz y McLaughlin, 1983) [Figura 8].

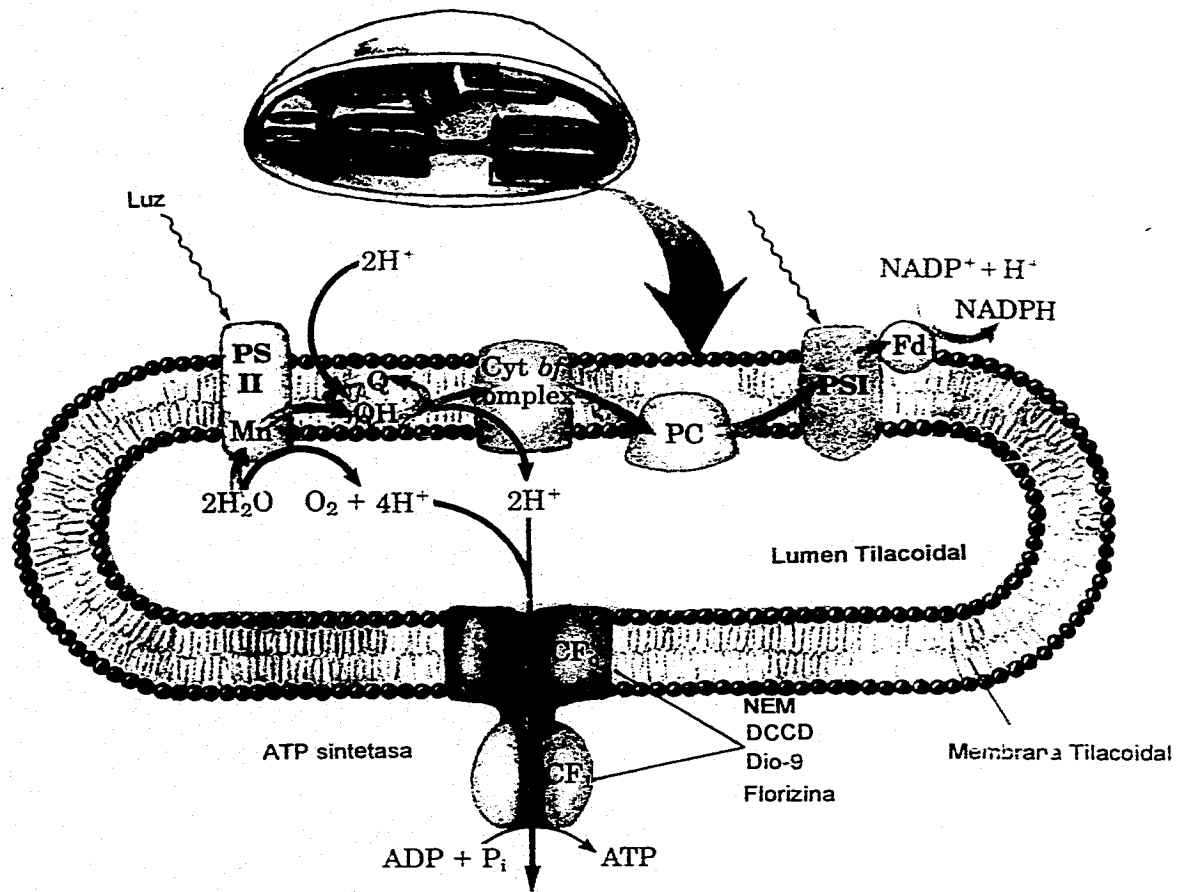


Figura 7. Ejemplos de inhibidores de la transferencia de energía: NEM, DCCD, Dio-9 y la Florizina.

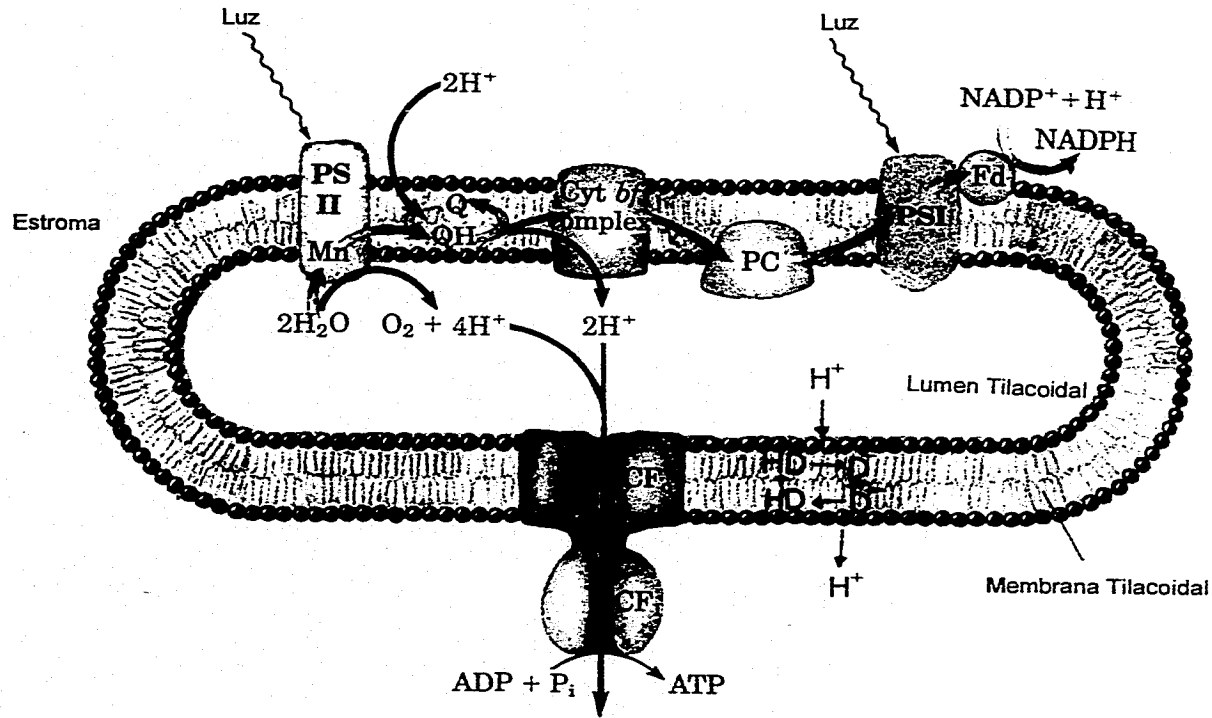


Figura 8. Mecanismo de acción de ácidos débiles desacoplantes del tipo protonóforo. La forma aniónica del desacoplante se absorbe en el interior de la membrana y se protona para formar una especie neutra. Esta cruza la membrana y libera el protón en la fase acuosa para formar la especie básica en la membrana externa. De esta forma se cierra el circuito protonóforo dando como resultado la disipación del gradiente de pH.

II. Antecedentes

En conclusión, los desacoplantes clásicos estimulan el transporte de electrones en ausencia de ADP y Pi, abaten el gradiente de pH y la síntesis de ATP, estimulan la hidrólisis del ATP y eliminan el efecto de los inhibidores de la transferencia de energía (Terada, 1990).

Entre los agentes desacoplantes más conocidos se pueden citar, a los siguientes: el dinitrofenol (DNP), el cloruro de amonio (NH_4Cl), el carbonil cianuro-*p*-trifluorometoxifenil hidrazona (FCCP) y el carbonil cianuro-3-clorofenil hidrazona (CCCP), entre otros (Crofts, 1966; Yoshikawa *et al.*, 1992; Terada, 1981). También se ha encontrado que algunas monoaminas y diaminas alifáticas (Lotina-Hennsen *et al.*, 1987), ciertos compuestos de coordinación del ácido quínico (Barba-Behrens *et al.*, 1993) y los productos naturales 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina y la 7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (Calera *et al.*, 1995), actúan como desacoplantes.

1.5.4 ACEPTORES DE ELECTRONES.

Los aceptores de electrones son compuestos que compiten por los electrones con algunas enzimas oxidorreductoras de la cadena transportadora de electrones; estas sustancias presentan potenciales redox muy similares a los de algunas enzimas de la cadena fotosintética en donde aceptan los electrones, por lo que pueden competir con las mismas, desviando el transporte de electrones de su camino natural.

Los aceptores de electrones pueden ser utilizados para estudiar reacciones parciales y como ejemplos se pueden mencionar los siguientes: el silicomolibdato (SiMo), el cual actúa como aceptor de electrones antes del nivel Q, es decir, como aceptor primario del FSII; el 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP), que actúa entre PQ y Citocromo b_6/f ; el ferricianuro de potasio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), que actúa al mismo nivel que el DCPIP; el fenacinametasulfato (PMS), el cual actúa a nivel de P_{700}^* y el metilviológeno (MV), que acepta electrones a nivel de los centros Fe-S del FS1;

II. Antecedentes

el benzofuraxan, que actúa de manera similar al MV; etc. (Zweig *et al.*, 1965; Mahler y Cordes, 1966; Giaquirta y Dilley, 1975; Lotina-Henssen *et al.*, 1987).

En la Figura 9 se indica el nivel de acción de algunos de los compuestos mencionados.

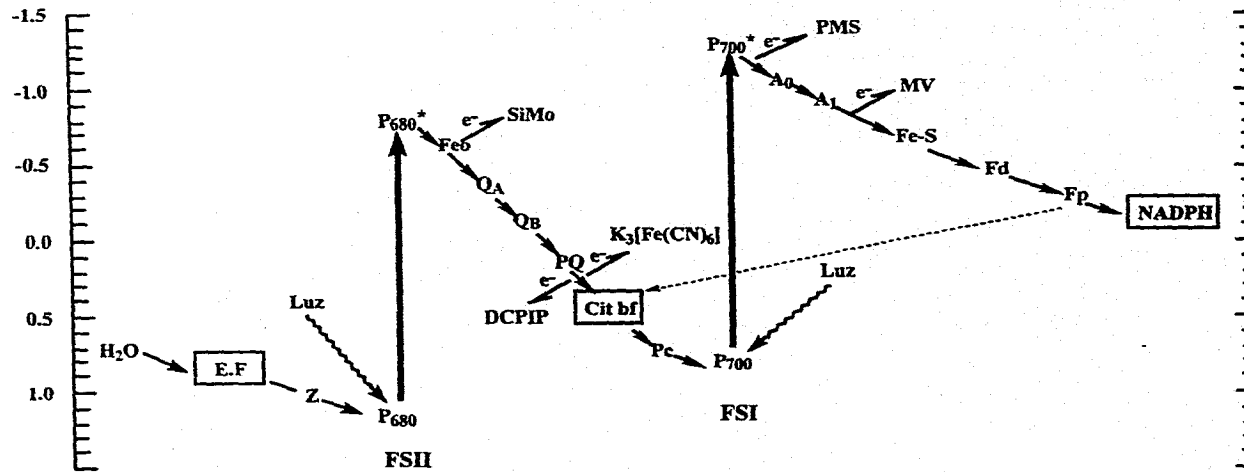


Figura 9 . Algunos ejemplos de compuestos que actúan como aceptores de electrones: SiMo, DCPIP, $K_3[Fe(CN)_6]$, PMS y MV.

2. ANTECEDENTES BIOLÓGICOS Y QUÍMICOS SOBRE LAS ESPECIES *Esenbeckia yaxhoob* Lundell y *Stauranthus perforatus* Liebm.

Las especies *Esenbeckia yaxhoob* Lundell y *Stauranthus perforatus* Liebm. se encuentran localizadas en la Península de Yucatán, México donde se les conoce popularmente con el nombre de *Tankas-ché*. Los individuos de estas especies son árboles de hasta 10 m de altura.

En la medicina popular yucateca *E. yaxhoob* se emplea para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales (Anaya, *et al.*, 1995), mientras que las hojas y raíces *S. perforatus* se utilizan para el tratamiento de dolores de cabeza, epilepsia y reumatismo. Las raíces de *S. perforatus* se emplean también como anestésico local (García, 1995). Es importante destacar que en un estudio reciente se determinó el potencial alelopático de estas rutáceas (García, 1995). Los resultados de estos bioensayos se describen a continuación.

En primer lugar, se determinó el efecto de los lixiviados acuosos y de los extractos orgánicos (cloroformo-metanol 1:1) de las partes aéreas de *E. yaxhoob* y de las raíces de *S. perforatus*, sobre la germinación y el crecimiento radicular de las arvenses *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. Los resultados de estas evaluaciones demostraron una actividad inhibitoria significativa sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*; sin embargo, *E. crusgalli* únicamente fue inhibida por los lixiviados al 2 %.

Por otra parte, se demostró que todas las concentraciones de prueba del extracto de las raíces de *S. perforatus* tuvieron un efecto inhibitor significativo sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*. Sin embargo, el crecimiento radicular de *E. crusgalli* sólo fue afectado a 200 ppm. El extracto de *E. yaxhoob* no mostró actividad sobre *A. hypochondriacus*, pero sí afectó el crecimiento radicular de *E. crusgalli* a 200 ppm.

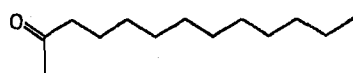
De manera adicional, se realizó un experimento de invernadero con la finalidad de determinar si el potencial fitotóxico de *E. yaxhoob* y de *S. perforatus* se manifestaba cuando estas plantas se incorporaban al suelo, influyendo así sobre la germinación y el crecimiento de las especies vegetales presentes en el

II. Antecedentes

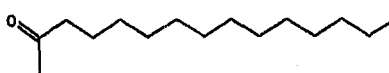
mismo. Este experimento consistió en incorporar directamente el material vegetal fragmentado, en proporciones del 1 y 2 %, a un suelo contenido en macetas. El suelo utilizado en este experimento debe estar seco y libre de restos orgánicos. Así mismo, su potencial florístico debe ser elevado. Posteriormente, de manera periódica se realizó el conteo del número de malezas presentes en cada maceta. El experimento tuvo una duración de siete semanas y los datos obtenidos indicaron que las hojas de *E. yaxhoob* resultaron ser el tratamiento que inhibió de manera más drástica la germinación y el crecimiento de las malezas. El análisis de varianza indicó que la inhibición de las malezas causada por las partes aéreas de *E. yaxhoob* fue significativa a partir de la quinta semana, en el caso del tratamiento al 1% y a partir de la cuarta semana para el tratamiento al 2%. El herbicida comercial demostró efecto a partir de la sexta semana. También fue posible apreciar que el efecto de las raíces incorporadas al 1%, se manifestaba a partir de la tercera semana. Sin embargo, en esta ocasión el efecto fue ligeramente estimulador sobre la germinación y crecimiento de las malezas en comparación con el control negativo. Por último, el tratamiento de las raíces de *S. perforatus* incorporadas al 2%, ocasionó una inhibición significativa de estos procesos a partir de la sexta semana del experimento.

Posteriormente, se realizó el estudio fitoquímico biodirigido de los extractos orgánicos de estas especies. En el caso de las partes aéreas de *Esenbeckia yaxhoob*, el extracto activo se fraccionó mediante procedimientos cromatográficos, utilizando un método bioautográfico para monitorear la actividad fitotóxica y, como semillas de prueba, se emplearon las especies *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*. Este estudio permitió el aislamiento de nueve metabolitos secundarios: la 2-tridecanona (1), la 2-pentadecanona (2), la 6,10,14-trimetilpentadecanona (3), el 3 β -acetoxi-24(S)-metil dammar-20,25-dieno (4), la imperatorina (5), la asarinina (6), el β -lupeol (7), la hesperidina (8) y el β -sitosterol (9) [Figura 10]. Cabe mencionar que los compuestos 1, 4, 5 y 6 se aislaron de las fracciones fitotóxicas (Rojas, 1996).

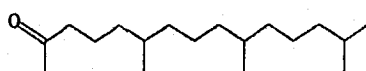
II. Antecedentes



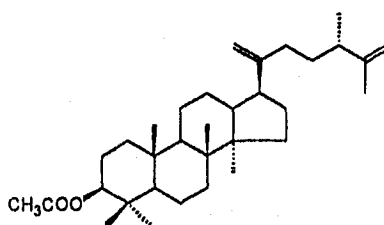
(1)



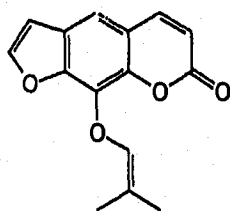
(2)



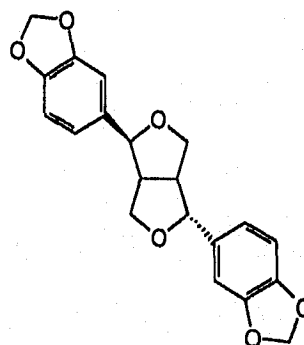
(3)



(4)



(5)



(6)

Figura 10. Metabolitos secundarios aislados de las fracciones fitotóxicas de las partes aéreas de *Esenbeckia yaxhoob*.

II. Antecedentes

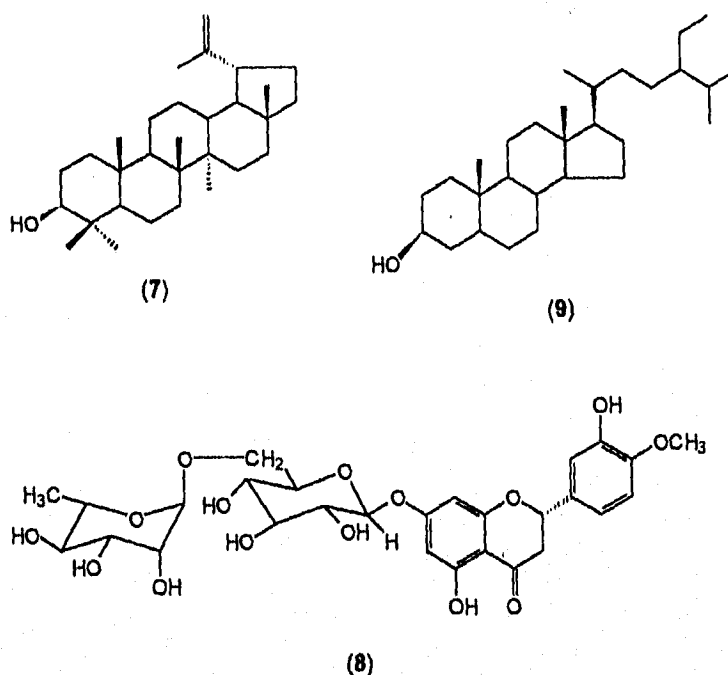


Figura 10. Metabolitos secundarios aislados de las fracciones fitotóxicas de las partes aéreas de *Esenbeckia yaxhoob*.

Aunque la mayoría de los compuestos obtenidos de *E. yaxhoob* se aislaron de las fracciones fitotóxicas, resta por establecer el efecto de estos productos sobre el crecimiento vegetal y la fotosíntesis.

Por otra parte, el extracto activo de las raíces de *Stauranthus perforatus*, se fraccionó mediante técnicas cromatográficas, empleando para monitorear la actividad fitoinhibidora la evaluación del efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de las malezas *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*, mediante el método en caja de Petri. Esta investigación permitió el aislamiento de diez metabolitos secundarios: la chalepsina (10), la xantiletina (11), la 3-(1',1'-

II. Antecedentes

dimetilalil)-xantiletina (12), la chalepina, la pelitorina, la asarinina, el 4-5- β -epoxi-cariofileno, la fargesina, la amirina y el β -sitosterol. A cada uno de los compuestos aislados de *S. perforatus* se les evaluó su efecto sobre el crecimiento radicular y la germinación de las malezas *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. Las cumarinas chalepensina (10), la xantiletina (11), y la 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina (12) [Figura 11], demostraron ser los principios fitotóxicos más potentes (Sánchez, 1996). En consecuencia estos productos naturales representan candidatos idóneos para estudiar en forma más detallada su potencial herbicida.

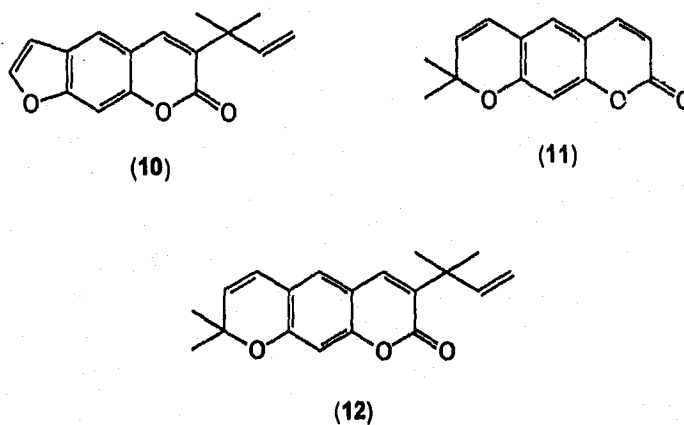


Figura 11. Cumarinas fitotóxicas aisladas de las raíces de *Stauranthus perforatus*.

3. ANTECEDENTES DEL EFECTO DE ALGUNAS CUMARINAS SOBRE LA FOTOSÍNTESIS.

Las cumarinas son metabolitos secundarios que presentan como núcleo base el de una α -benzopirona. Se clasifican principalmente en cinco grupos: simples, furanocumarinas, piranocumarinas, 4-hidroxycumarinas y fenilcumarinas (Harbone y Baxter, 1993). Estos compuestos se encuentran presentes en plantas, animales y microorganismos. En las plantas, las cumarinas se acumulan principalmente en raíces, tallos, corteza y frutos. Las cumarinas simples se encuentran distribuidas en más de 70 familias diferentes, sin embargo las furano y piranocumarinas se han aislado solamente de 15 familias de plantas, principalmente de la apiáceas y de las rutáceas. A la fecha se han obtenido más de 1250 cumarinas naturales a partir de diversas especies vegetales (Fuer, 1974; Murray *et al.*, 1991; Zobel y Brown, 1995; Hadacek *et al.*, 1994).

A pesar del gran número de cumarinas naturales, son relativamente pocos los estudios que se han realizado para determinar su actividad sobre la fotosíntesis. Los escasos estudios se han realizado con algunas cumarinas simples y fenilcumarinas. Así la cumarona disminuye la biosíntesis de plastoquinonas y ubiquinonas en trigo (Murray, 1981). La umbelliferona a una CI_{50} = 1.87 mM inhibe la actividad de la enzima ATPsintetasa y evita la fotofosforilación del ADP con Pi en cloroplastos aislados de *Spinacea oleracea* L. Sin embargo, esta cumarina no actúa como inhibidor clásico de la transferencia de energía (Moreland y Novotzki, 1987).

Las cumarinas esculetina y escopoletina, inhiben la fotosíntesis neta en una especie acuática (*Lemna minor* L.) a concentraciones de 500 y 1000 μ M, respectivamente. (Einhellig, 1986, 1995; Leather y Einhellig, 1988; Mersie y Singh, 1993). Además, la escopoletina afecta la apertura de los estomas a concentraciones de 500 y 1000 μ M y provoca una inhibición significativa de la fotosíntesis sobre las especies *Nicotiana tabacum* L. y *Amaranthus retroflexus* L. La esculetina presenta efectos opuestos a los observados para la escopoletina y

II. Antecedentes

no presenta un patrón claro de actividad con respecto a la concentración (Rice, 1984; Einhellig, 1986).

Por otra parte, estudios recientes realizados sobre las 4-fenilcumarinas 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina, 7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina y 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, demostraron que las mismas afectan la fotosíntesis en cloroplastos aislados de *Spinacea oleracea* L. Las dos primeras actúan como desacopantes, mientras que la última inhibe la transferencia de energía (Calera *et al.*, 1995).

Las furanocumarinas y las piranocumarinas constituyen dos de los grupos de cumarinas cuyo efecto sobre las distintas actividades fotosintéticas no ha sido objeto de estudio alguno.

III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

III. Justificación y Objetivos

Como se indicó en la sección de antecedentes, los extractos, los lixiviados y las fracciones cromatográficas derivadas del estudio fitoquímico de las Rutáceas *Esenbeckia yaxhoob* y *Stauranthus perforatus*, demostraron una actividad fitotóxica significativa *in vitro* y en experimentos de invernadero (García, 1995; Sánchez, 1996; Rojas, 1996). De manera adicional tres de las cumarinas obtenidas de *S. perforatus* inhibieron de forma notable el crecimiento radicular y la germinación de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. Estos resultados preliminares altamente satisfactorios, así como la necesidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes herbicidas biodegradables y de menor toxicidad dieron la pauta para formular la presente investigación, misma que pretende complementar el estudio de la potencialidad como agentes herbicidas de los metabolitos secundarios derivados de las fracciones fitotóxicas de *Stauranthus perforatus* y *Esenbeckia yaxhoob*. Los objetivos generales planteados para la presente investigación son los siguientes:

1. Determinar el efecto fitoinhibidor de los metabolitos secundarios obtenidos de las fracciones cromatográficas fitotóxicas de la especie *E. yaxhoob*.
2. Explorar el efecto de las cumarinas fitotóxicas imperatorina (aislada de la especie *E. yaxhoob*), xantiletina, 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina, y chalepensina (aisladas de la especie *Stauranthus perforatus*, sobre diferentes actividades de la fase luminosa de la fotosíntesis.
3. Caracterizar el mecanismo y nivel de acción de los compuestos evaluados mediante la determinación de su efecto sobre las reacciones parciales de la fotosíntesis y/o sobre la actividad de la enzima H^+ -ATPasa.

que tiene como objetivos principales:

Para el desarrollo del presente trabajo se contemplaron los siguientes objetivos específicos:

III. Justificación y Objetivos

- a) Determinar el efecto fitotóxico de los compuestos aislados de la especie *E. yaxhoob* sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* L., *Echinochloa crusgalli* (Beauv) L., *Lactuca sativa* L. y *Lycopersicum esculentum* Mill., mediante el método de cajas de Petri.
- b) Obtener los cloroplastos requeridos para efectuar los ensayos biológicos a partir de hojas de espinacas frescas (*Spinacea oleracea* L.).
- c) Determinar el contenido de clorofila, de acuerdo al método de Strain y colaboradores.
- d) Determinar el efecto de las cumarinas sobre la síntesis de ATP mediante el registro de los cambios de pH en el medio de reacción.
- e) Realizar la medición de la velocidad de los transportes de electrones basal, desacoplado y fosforilado de H₂O a K₃[Fe(CN)₆], mediante métodos espectrofotométricos.

IV. PARTE

EXPERIMENTAL

1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FITOTÓXICA.

La determinación cuantitativa de la actividad fitotóxica de los compuestos puros se realizó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación y el crecimiento radicular de las especies de semillas *Amaranthus hypochondriacus* L., *Echinochloa crusgalli* (Beauv) L., *Lactuca sativa* L. y *Lycopersicum esculentum* Mill., utilizando el método descrito por Anaya y colaboradores (1990). El procedimiento se describe a continuación:

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri que contenían un disco de papel filtro de 10 cm de diámetro (Whatman No. 1). Cada una de las muestras a evaluar se disolvió en CHCl_3 o en agua destilada y se prepararon disoluciones con una concentración de 1000, 100 y 10 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, 2 mL de las disoluciones se vertieron en las cajas de Petri y se permitió la evaporación completa del disolvente. A continuación, se inició la germinación de 20 semillas de cada una de las especies de prueba, humedeciendo previamente el papel filtro con 3 mL de agua destilada.

Las cajas de Petri se incubaron a 30 °C y la actividad fitotóxica se registró midiendo la longitud de las radículas y contando el número de semillas germinadas después de 24 hrs. (*Amaranthus hypochondriacus*), 48 hrs. (*Echinochloa crusgalli* y *Lactuca sativa*) y 72 hrs. (*Lycopersicum esculentum*). Paralelamente, se evaluaron controles positivos (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y negativos. En todos los casos se efectuaron cuatro réplicas.

Los resultados obtenidos se evaluaron mediante la prueba estadística de Duncan ($\alpha= 0.05$). Los valores de Cl_{50} se determinaron mediante el programa de análisis de probabilidad de Finney.

2. AISLAMIENTO DE LOS CLOROPLASTOS.

Los cloroplastos se obtuvieron a partir de 30 g de hojas de espinacas frescas (*Spinacea oleracea* L.) verdes y turgentes. Todo el proceso de aislamiento se llevó a cabo en frío y en la obscuridad. Las hojas se lavaron con suficiente agua destilada para eliminar la tierra, se les removió la nervadura central y el ápice. Posteriormente se fragmentaron y colocaron en el vaso de una licuadora previamente enfriado, conteniendo 150 mL de medio para aislar cloroplastos (sacarosa 400 mM, $MgCl_2$ 5 mM, KCl 20 mM y tricina 30 mM, ajustado a pH 8.0 con KOH). A continuación se homogeneizaron en la licuadora (Osterizer, modelo L-21) durante 5 segundos intermitentes a velocidad máxima. El homogeneizado se filtró a través de cuatro capas de gasa y el filtrado se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C (centrífuga Beckman J2-21, rotor de ángulo fijo JA-20). Por último, el sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 1 mL del medio de aislamiento (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991; Peña-Valdivia *et al.*, 1991).

3. CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA.

La clorofila se cuantificó por duplicado de acuerdo al método Strain y colaboradores (1971), como se describe a continuación: Se transfirió una alícuota 50 μ L de la suspensión de cloroplastos, a un matraz de 5 mL y luego se aforó con acetona al 80%, la mezcla resultante se agitó en un vortex. Esta suspensión se mantuvo en la obscuridad por 5 minutos para permitir la extracción y la solubilización de la clorofila, así como para evitar su degradación por efecto de la luz. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga clínica a temperatura ambiente, con el propósito de sedimentar las proteínas y otros residuos precipitados de los cloroplastos. A continuación se cuantificó el contenido de clorofila mediante la determinación de la absorbancia a 663 nm y 645 nm, utilizando un espectrofotómetro Beckman (Modelo DU 650). Por

IV. Parte Experimental

último, la concentración de clorofila se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$[\text{Clorofila}] = 8.05 A_{663} + 20.29 A_{645}$$

$$[\text{Clorofila}] = \mu\text{g clorofila mL}^{-1}$$

4. SÍNTESIS DE ATP.

La síntesis de ATP se midió registrando los cambios de pH en el medio de reacción entre 8.0 y 8.1, para lo cual se utilizó un microelectrodo combinado (Orion) y sensible conectado a un potenciómetro (Corning modelo 12) con escala expandida. El voltaje generado por los cambios de pH se transdujo en un registrador gráfico Gilson.

Para llevar a cabo la determinación, a 3 mL del medio de reacción (sorbitol 100 mM, MgCl_2 5 mM, KCl 10 mM, tricina 1mM y MV 50 μM , ajustado a pH 8 con KOH) se le adicionó ADP 1 mM, K_2HPO_4 3 mM, el compuesto de prueba en un intervalo de concentraciones de 0 a 175 μM y el equivalente a 60 μg de clorofila. El cambio de pH en el medio de reacción se determinó después de un período de iluminación de 1 minuto. Como fuente de iluminación se empleó una lámpara de proyector de 250 watts. El haz luminoso se hizo pasar a través de una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al 2 % que sirve como filtro de luz y calor (lente de Izawa). El H^+ producido se cuantificó por titulación. Esto último se realizó mediante la adición de 10 μL de una solución estándar de KOH 0.01 N al medio de reacción, en presencia de cloroplastos sin iluminar (Peña-Valdivia *et al.*, 1991).

La velocidad de síntesis de ATP se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$V = \Delta\text{H} / C$$

W. Parte Experimental

V = velocidad de la síntesis de ATP ($\mu\text{Moles de ATP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Clorofila} \cdot \text{hr}^{-1}$)

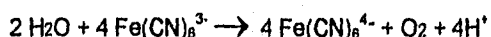
A = $\mu\text{Moles de H}^+$ usados en la titulación con KOH / altura de la curva en cm.

H = altura de la curva obtenida en cm en un minuto de iluminación.

C = concentración de la clorofila empleada

5. MEDICIÓN DE LA VELOCIDAD DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES.

El transporte de electrones se determinó al monitorear la reducción del $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ utilizado como aceptor final de electrones (Izawa, 1977; Trebs, 1972; Dilley, 1972). Los electrones necesarios para su reducción provienen de la fotólisis del agua y viajan a través de la cadena redox. En este proceso dos moléculas de H_2O son fotolisadas rindiendo cuatro protones, una molécula de O_2 y cuatro electrones, los cuales como ya se mencionó anteriormente, entran al sistema oxidorreductor de la cadena fotosintética.



La concentración de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ presente en el medio de reacción se cuantificó espectrofotométricamente mediante la determinación de la absorbancia a 420 nm, utilizando un espectrofotómetro Beckman (Modelo DU 650).

Para llevar a cabo la reacción, a 3 mL del medio de transporte de electrones (sorbitol 100 mM, MgCl_2 5 mM, KCl 10 mM, trecina 15 mM y $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 267 μM , ajustado a pH 8.0 con KOH), se le adicionó la cantidad equivalente a 60 μg de clorofila. La mezcla anterior se agitó y se le midió la absorbancia a 420 nm. A continuación, la mezcla se agitó de nueva cuenta y se iluminó por 1 minuto. Como fuente de luz se empleó una lámpara de proyector de 250 Watts. El haz luminoso se hizo pasar a través de una lente de Izawa. Al

IV. Parte Experimental

finalizar la iluminación se determinó la absorbancia; se calculó la diferencia de absorbancia obtenida en la luz-obscuridad y aplicando la ley de Lambert-Beer se determinó la velocidad de transporte de electrones, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta A = C\epsilon b.$$

Donde:

ΔA = Diferencia de absorbancia.

C= Concentración.

ϵ =Coeficiente de extinción molar.

b= Diámetro de la celda.

En este experimento se manejaron las condiciones experimentales que a se describen a continuación.

5.1 DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES BASAL NO CÍCLICO DE H₂O A K₃[Fe(CN)₆].

Se utilizó únicamente el medio basal descrito anteriormente, adicionando el compuesto de prueba en un intervalo de concentraciones de 0 a 175 μM y la velocidad obtenida se comparó con la velocidad del control negativo (Izawa, 1977; Trebs, 1972; Dilley, 1972).

IV. Parte Experimental

5.2 DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES DESACOPLADO NO CÍCLICO DE H₂O A K₃[Fe(CN)₆].

Al medio basal se le agregó NH₄Cl 6 mM, además del compuesto de prueba en un intervalo de concentraciones de 0 a 175 μM y la velocidad obtenida se comparó con la velocidad del control negativo (Izawa, 1977; Trebs, 1972; Dilley, 1972).

5.3 DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES FOSFORILANTE NO CÍCLICO DE H₂O A K₃[Fe(CN)₆].

Se utilizó medio basal al cual se le adicionó ADP 1mM y KH₂PO₄ 3 mM, además del compuesto de prueba en un intervalo de concentraciones de 0 a 175 μM y la velocidad obtenida se comparó con la velocidad del control negativo (Izawa, 1977; Trebs, 1972; Dilley, 1972).

Los controles se realizaron al inicio y al final de cada experimento, estos consistieron en la mezcla de reacción mencionada para cada experimento sin el compuesto de prueba.

6. REACCIONES PARCIALES DE LOS FOTOSISTEMAS I Y II.

La determinación del flujo de electrones en los fotosistemas I y II se efectuó utilizando el medio de transporte de electrones para fotosistemas (sorbitol 100 mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 10 mM, tricina 15 mM, ajustado a pH 8.0 con KOH), adicionando desacoplantes, donadores y aceptores de electrones artificiales e inhibidores de la cadena redox como se indica a continuación:

IV. Parte Experimental

6.1 DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES DESACOPADO EN EL FSII DE H₂O A DCPIP/ K₃[Fe(CN)₆].

A 3 mL de medio basal de transporte de electrones para fotosistemas se le adicionaron DMBIB 1 μ M, DCPIP 50 μ M, K₃[Fe(CN)₆] 300 μ M, NH₄Cl 6 mM, el equivalente a 60 μ g de clorofila y el compuesto de prueba en un intervalo de concentraciones de 0 a 175 μ M y la velocidad obtenida se comparó con la velocidad del control negativo (Izawa y Pan, 1978).

El DMBIB se adicionó para impedir el flujo de electrones hacia el FSI a nivel de PQ (Gianquinta y Dilley, 1975) y el DCPIP/K₃[Fe(CN)₆] se utilizó como aceptor final de electrones (Izawa y Pan, 1978).

6.2 DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES DESACOPADO EN EL FSI DE DCPIP_{red} A MV.

La determinación se llevó a cabo adicionando a 3 mL del medio de reacción (DCMU 10 μ M, DCPIP 100 μ M reducido con ascorbato 300 μ M, MV 50 μ M y NH₄Cl 6 mM) el equivalente a 60 μ g de clorofila y la cumarina de prueba en un intervalo de concentraciones de 0 a 175 μ M. La velocidad obtenida se comparó con la velocidad del control negativo.

El DCMU se empleó como inhibidor de la enzima Q_B para impedir el flujo de electrones de FSII (Astier y Etienne, 1984); el DCPIP/ascorbato se utilizó como donador de electrones a nivel del complejo b₆/f ya que compete con la PQ (Gromet-Eihsan y Avron, 1963) y el MV se empleó como aceptor final de electrones (Benz y Laughlin, 1983).

6.3 DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES DESACOPADO EN EL FSI DE PMS_{red} A MV.

Se utilizaron cloroplastos tratados con KCN. Una alícuota equivalente a 300 mg de clorofila se adicionó a 1 mL del medio para envenenar cloroplastos (sorbitol 100 mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 10 mM, tricina 15 mM, KCN 30 mM, NH₄Cl 6 mM, ajustado a pH 8.0 con KOH). La mezcla anterior se incubó en la oscuridad a 0 °C por 30 minutos con agitación y se centrifugó. Por último, se cuantificó el contenido de clorofila por los métodos mencionados. La reacción se llevó a cabo adicionando al medio utilizado para la determinación de fotosistemas, PMS 200 μM reducido con ascorbato 500 μM, MV 50 μM, el equivalente a 60 μg de clorofila y la cumarina de prueba en un intervalo de concentraciones de 0 a 175 μM. La velocidad obtenida se comparó con la velocidad del control negativo.

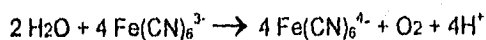
El KCN se empleó como inhibidor a nivel de PC (Izawa, 1977); el PMS reducido se utilizó como donador de electrones a nivel de PC; el ácido ascórbico se adicionó para reducir al PMS, el cual es un cofactor que dona electrones en el FSI a nivel de P₇₀₀ y que se requiere debido a que la plastocianina de los cloroplastos fue desactivada al ser eliminado el cofactor metálico cobre por el KCN (Trebs, 1972). Por último, el MV se utilizó como aceptor final de electrones.

Se utilizaron controles al inicio y al final de cada experimento, los cuales estaban constituidos por la mezcla de reacción mencionada para cada experimento, con la excepción del compuesto a ensayar.

La velocidad del flujo de electrones se cuantificó adicionando al medio sin MV, una alícuota de 10 μL de una disolución de K₃[Fe(CN)₆] 40 mM, como aceptor final de electrones, y el equivalente a 60 μg de clorofila; posteriormente se iluminó el tiempo necesario para la reducción total del K₃[Fe(CN)₆]. Esta última determinación nos permite obtener la cantidad de oxígeno desprendido en μeq de electrones transportados al consumirse 10 μL de una disolución de K₃[Fe(CN)₆] 40 mM. Este dato de velocidad se toma como referencia cuando se utilizan otros sistemas en los que el aceptor de electrones es un compuesto

IV. Parte Experimental

diferente. En el caso del ferricianuro de potasio, se observa una producción neta de oxígeno por la donación de electrones del agua a la cadena fotosintética, en donde el Fe^{3+} del ferricianuro de potasio se reduce a Fe^{2+} .



7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA Mg^{2+} -ATPasa.

La actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa se determinó por el método de Mills y colaboradores (1980). El procedimiento se describe a continuación:

7.1 AISLAMIENTO DE LOS CLOROPLASTOS INTACTOS.

Los cloroplastos se obtuvieron a partir de hojas de espinacas frescas, las cuales fueron homogeneizadas durante 5 segundos intermitentes en una licuadora (Osterizer, modelo L-21) con 150 mL de un medio de aislamiento (sorbitol 0.35 mM, ácido ascórbico 5 mM y MES 20 mM, ajustado a pH 6.5). A continuación, el homogeneizado se filtró a través de cuatro capas de gasa y el filtrado se centrifugó a 4000 rpm durante 3 minutos a 4°C (centrifuga Beckman J2-21, rotor de ángulo fijo JA-20). El sedimento se lavó con 2 mL de medio de aislamiento y se centrifugó a 10 000 rpm durante 1 minuto. El sedimento se reconstituyó con un 1 mL del medio de resuspensión (sorbitol 0.35 mM, EDTA 2 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, MnCl_2 1 mM y tricina a pH 7.6. Finalmente el contenido de clorofila, se cuantificó de acuerdo al método de Strain y colaboradores (1971) descrito en el inciso 3.

IV. Parte Experimental

7.2 ACTIVACIÓN DE LA ENZIMA Mg²⁺-ATPasa.

A una alícuota de 0.1 mL de la suspensión de cloroplastos conteniendo 0.3 mg de clorofila por mL, se adicionaron a 0.25 mL del medio de activación (sorbitol 1.2 M, tricina 100 mM y 1500 unidades de catalasa, ajustado a pH 8.0). Este medio tiene la función de lisar la doble membrana del cloroplasto. Posteriormente, la mezcla de reacción se iluminó durante 1.5 minutos con un haz luminoso filtrado a través de un lente de Izawa y con agitación suave. Al cabo de este tiempo de activación la mezcla se utiliza para la hidrólisis del ATP en la obscuridad.

7.3 HIDRÓLISIS DE ATP.

Se mezclaron 0.1 mL de cloroplastos activados con 0.9 mL del medio para determinar la actividad de la enzima ATPasa (MgCl₂ y tricina 15 mM, ajustado a pH 8.0). Este proceso se realizó en la obscuridad absoluta y con agitación suave durante 1 minuto. La reacción se suspendió adicionando 0.5 mL de ácido tricloroacético al 20 % en agua (p/v).

7.4 CUANTIFICACIÓN DE FOSFATOS.

Las proteínas precipitadas con ácido tricloroacético, se eliminaron por centrifugación durante 5 minutos a 2000 rpm en una centrifuga clínica (Modelo CL). El fosfato liberado se cuantificó por el método colorimétrico de Fiske-Subbarow (Sumner, 1974) que se describe a continuación: se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante, con un contenido máximo de 1 μMol de fosfato, y se adicionaron 0.3 mL de agua destilada, 0.25 mL de una disolución de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O al 6% (p/v) y 0.25 mL de H₂SO₄ 7.5 N. La mezcla resultante se agitó y de inmediato se adicionaron 0.2 mL de una disolución de FeSO₄ al 10 %

IV. Parte Experimental

(p/v) en agua acidificada (98 mL de H₂O + 2 mL de H₂SO₄ 7.5 N). La mezcla anterior se dejó reaccionar durante 20 minutos y, finalmente, se determinó la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro Beckman (Modelo DU 650). Simultáneamente, se realizó una curva patrón con KH₂PO₄, empleando un rango de concentraciones de 0.5 μM a 1 μM, los datos de absorbancia a 660 nm se graficaron con concentraciones crecientes de KH₂PO₄ y de esta curva se extrapolaron los valores de absorbancia del fosfato liberado al hidrolizarse el ATP.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL FITOTÓXICO DE LOS METABOLITOS AISLADOS DE LA ESPECIE *Esenbeckia yaxhoob*.

La determinación cuantitativa de la actividad fitotóxica de los metabolitos aislados de la especie *Esenbeckia yaxhoob*, se realizó mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de cuatro especies de semillas (*Amaranthus. hypochondriacus*, *Echinochloa. crusgalli*, *Lycopersicum. esculentum* y *Lactuca. sativa*). Los ensayos se realizaron a tres concentraciones diferentes (10, 100 y 1000 µg/mL). Los compuestos ensayados incluyeron: la 2-tridecanona (1), el 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (4), la imperatorina (5), la asarinina (6), el β-lupeol (7) y la hesperidina (8). Los primeros cuatro metabolitos (1, 4, 5 y 6) se aislaron de las fracciones activas del extracto cloroformo-metanólico, en tanto que el β-lupeol (7) y la hesperidina (8) se aislaron de fracciones inactivas (Figura 10).

Los resultados obtenidos se evaluaron mediante la prueba estadística Duncan ($\alpha= 0.05$). Los valores de concentración inhibidora media (CI₅₀) se determinaron mediante el programa de análisis de probabilidad de Finney. En todas las evaluaciones se empleo como control positivo el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). En el Cuadro 1 y en las Gráficas 1 y 2 se indica el efecto del compuesto sobre la germinación y el crecimiento radicular de las especies de prueba.

1.1 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL FITOTÓXICO DE LA 2-TRIDECANONA (1) SOBRE LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO RADICULAR DE DIFERENTES ESPECIES DE SEMILLAS.

Los resultados obtenidos en los bioensayos realizados para la 2-tridecanona (1) se presentan en el Cuadro 2. En la Gráfica 3 se observa que esta cetona presentó un efecto inhibitor selectivo sobre el crecimiento radicular de las semillas de *L. esculentum*. El efecto fitotóxico fue significativo a todas las

V. Resultados y Discusión

concentraciones evaluadas y la CI_{50} obtenida fue de 134.9 $\mu\text{g/mL}$; así mismo, se observa que la 2-tridecanona (1) presenta un efecto inhibitor significativo sobre el crecimiento radicular de las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli* a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$. En el caso de las semillas de *L. sativa*, la cetona presentó únicamente un efecto estimulante sobre el crecimiento radicular a las tres concentraciones de prueba.

La 2-tridecanona (1) también demostró una actividad fitotóxica sobre la germinación de las semillas de *E. crusgalli*, *L. esculentum* y *L. sativa*. A una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$, este compuesto inhibió en un 81% la germinación de las semillas de *L. esculentum* y *L. sativa* y en un 70 % la germinación de las semillas de *E. crusgalli*. Las CI_{50} calculadas fueron de 104.7, 46.8 y 151.3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Gráfica 4).

1.2 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL FITOTÓXICO DEL 3 β -ACETOXI-24(S)-METIL-DAMMAR-20,25-DIENO (4) SOBRE LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO RADICULAR DE DIFERENTES ESPECIES DE SEMILLAS.

En el Cuadro 3 se observa el efecto del 3 β -acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (4) sobre la germinación y el crecimiento radicular de las cuatro especies de semillas de prueba.

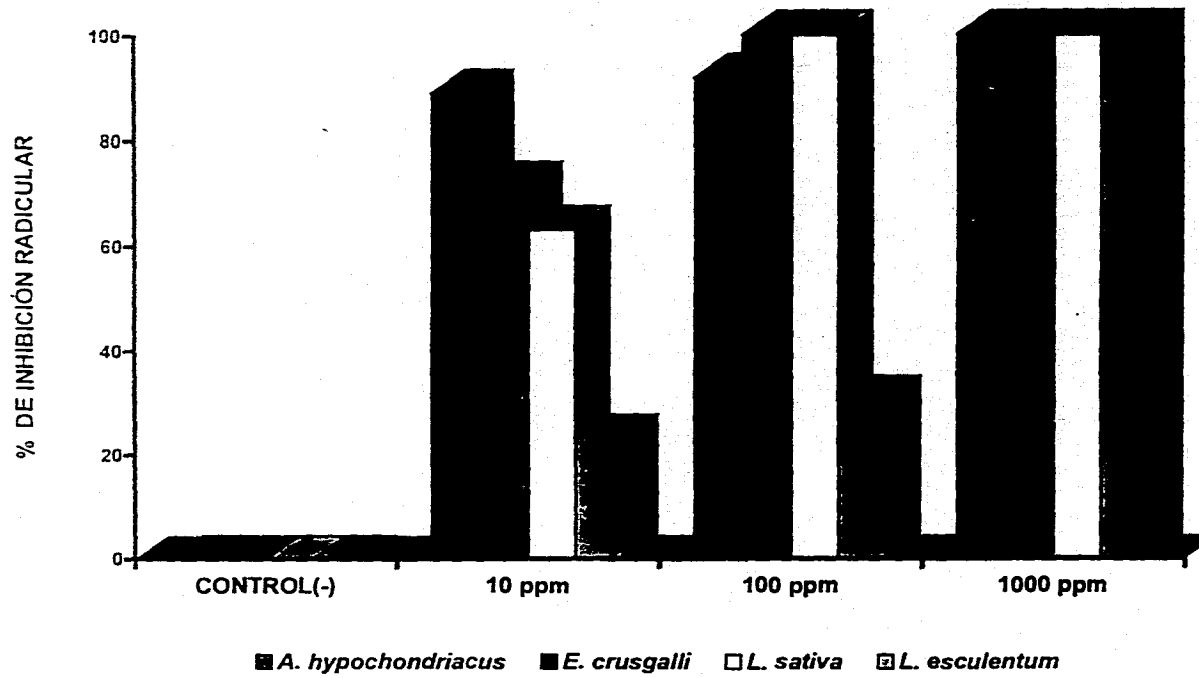
En las Gráficas 5 y 6 se observa que este compuesto presentó un efecto inhibitor selectivo sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *L. esculentum*. El efecto fitotóxico máximo en ambos casos se obtuvo a la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ y las CI_{50} obtenidas fueron de 99.7 y de 61.6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Este metabolito presentó también un efecto inhibitor significativo sobre el crecimiento radicular de las semillas de *E. crusgalli* a la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfica 5). En el caso de las semillas de *L. sativa* se observó un efecto fitotóxico sobre la germinación, obteniéndose una CI_{50} de 70.8 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfica 6). Por último, para las semillas de *A. hypochondriacus* no se observó ningún efecto fitotóxico.

V. Resultados y Discusión

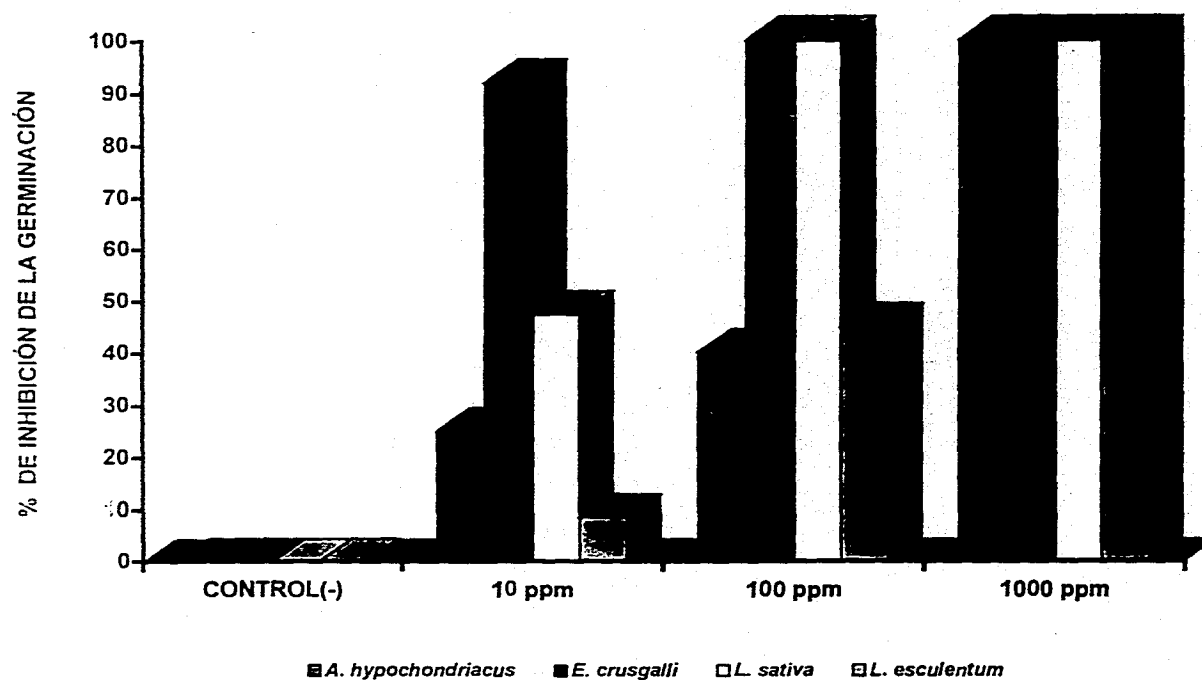
Cuadro 1. Efecto fitotóxico del ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*.

<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 1.2	5.2 ± 1.0
1 µg/mL	89.1 ± 1.74*	25.0 ± 0.8*
5 µg/mL	91.9 ± 2.2*	40.0 ± 0.4*
10 µg/mL	100.0 ± 1.2*	100.0 ± 0.7*
<i>Echinochloa crusgalli</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 0.1	0.4 ± 0.5
1 µg/mL	71.7 ± 1.2*	92.0 ± 0.8*
5 µg/mL	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*
10 µg/mL	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*
<i>Lactuca sativa</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 1.5	24.5 ± 0.8
1 µg/mL	63.2 ± 2.1*	47.5 ± 0.5*
5 µg/mL	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*
10 µg/mL	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*
<i>Lycopersicum esculentum</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 1.3	1.5 ± 0.2
1 µg/mL	23.3 ± 2.4*	8.5 ± 0.5*
5 µg/mL	30.5 ± 3.8*	44.9 ± 1.2*
10 µg/mL	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*

* Valores que difieren estadísticamente del control (Duncan, $\alpha=0.05$). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones.



Gráfica 1. Efecto fitotóxico del ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*.



Gráfica 2. Efecto fitotóxico del ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre la germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*.

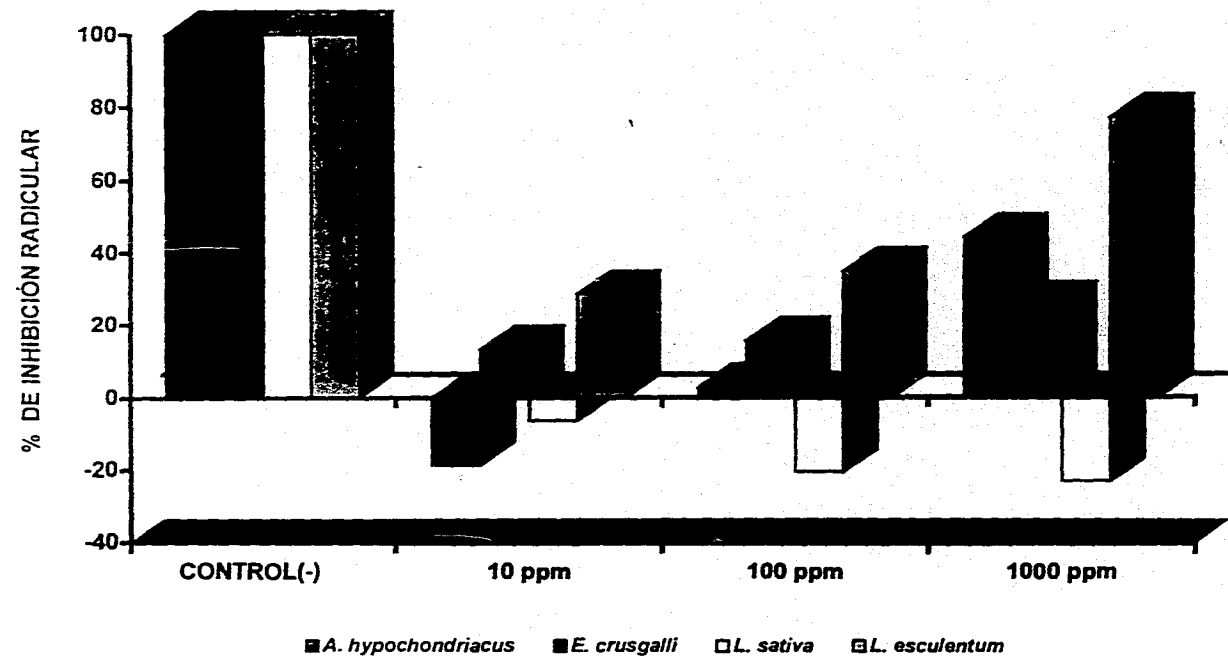
V. Resultados y Discusión

Cuadro 2. Efecto fitotóxico de la 2-tridecanona (1) sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*.

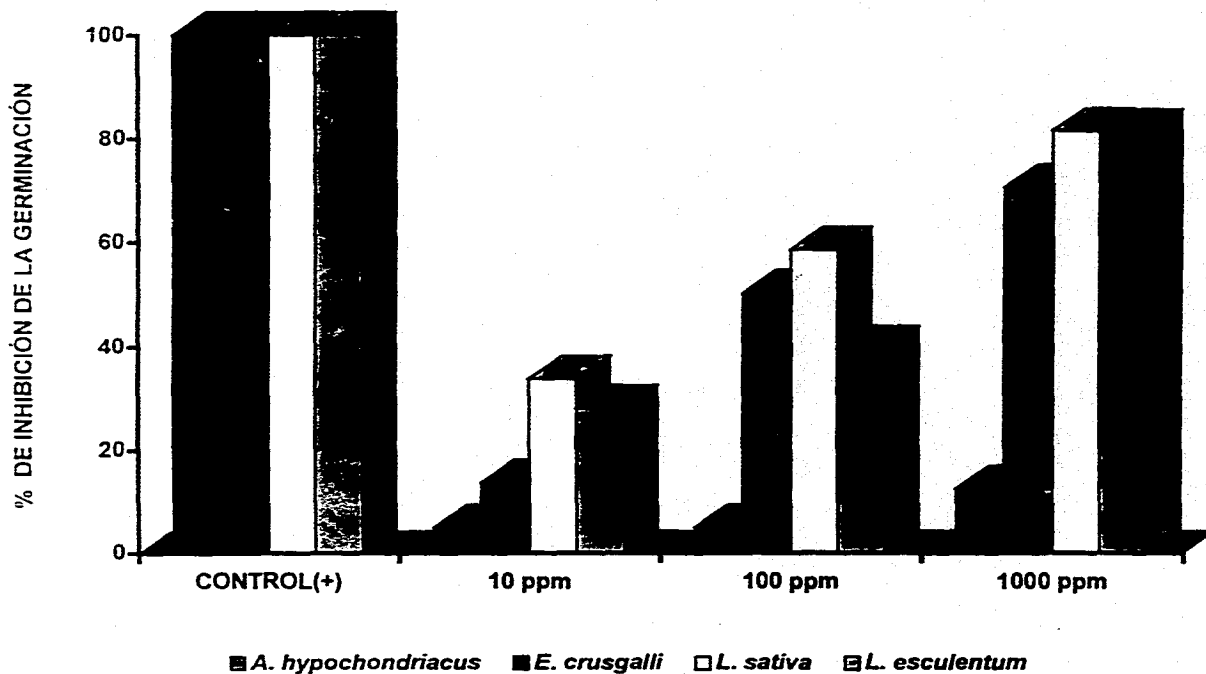
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 1.94	1.5 ± 1.0
10 µg/mL	-18.5 ± 2.2**	5.0 ± 0.6
100 µg/mL	2.7 ± 1.74	5.0 ± 0.7
1000 µg/mL	44.1 ± 1.2*	12.5 ± 0.0
<i>Echinochloa crusgalli</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 0.1	1.8 ± 0.5
10 µg/mL	13.3 ± 1.5	13.7 ± 0.4
100 µg/mL	15.6 ± 0.4	50.2 ± 0.7*
1000 µg/mL	25.2 ± 0.5*	70.5 ± 1.1*
<i>Lactuca sativa</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 2.4	27.5 ± 0.5
10 µg/mL	-6.4 ± 1.1**	33.7 ± 0.5*
100 µg/mL	-20.5 ± 1.6**	58.5 ± 0.1*
1000 µg/mL	-23.1 ± 0.9**	81.5 ± 0.9*
<i>Lycopersicum esculentum</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 1.3	4.7 ± 0.1
10 µg/mL	28.6 ± 2.4*	28.0 ± 1.3*
100 µg/mL	34.8 ± 3.1*	39.5 ± 0.8*
1000 µg/mL	76.9 ± 2.8*	81.3 ± 0.9*

* Valores que difieren estadísticamente del control (Duncan, $\alpha=0.05$). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones.

** Indica porcentaje de estimulación del crecimiento radicular.



Gráfica 3. Efecto fitotóxico de la 2-tridecanona (1) sobre el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*.



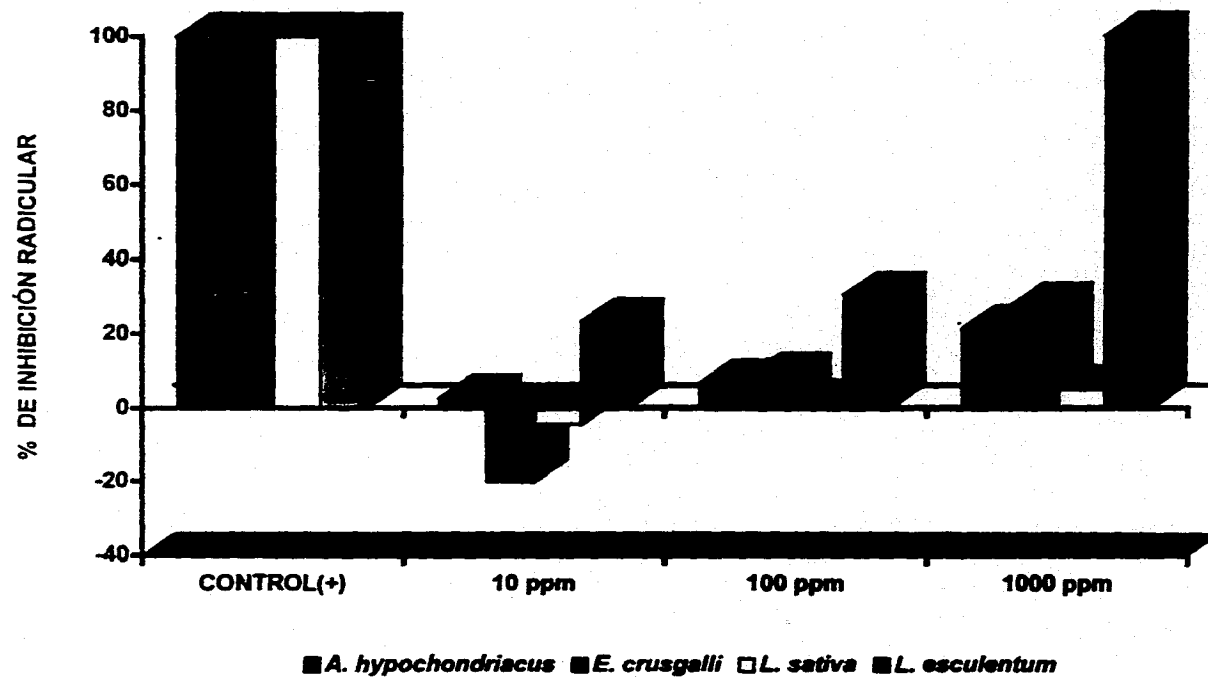
Gráfica 4. Efecto fitotóxico de la 2-tridecanona (1) sobre la germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicon esculentum*.

Cuadro 3. Efecto fitotóxico 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (4) sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*.

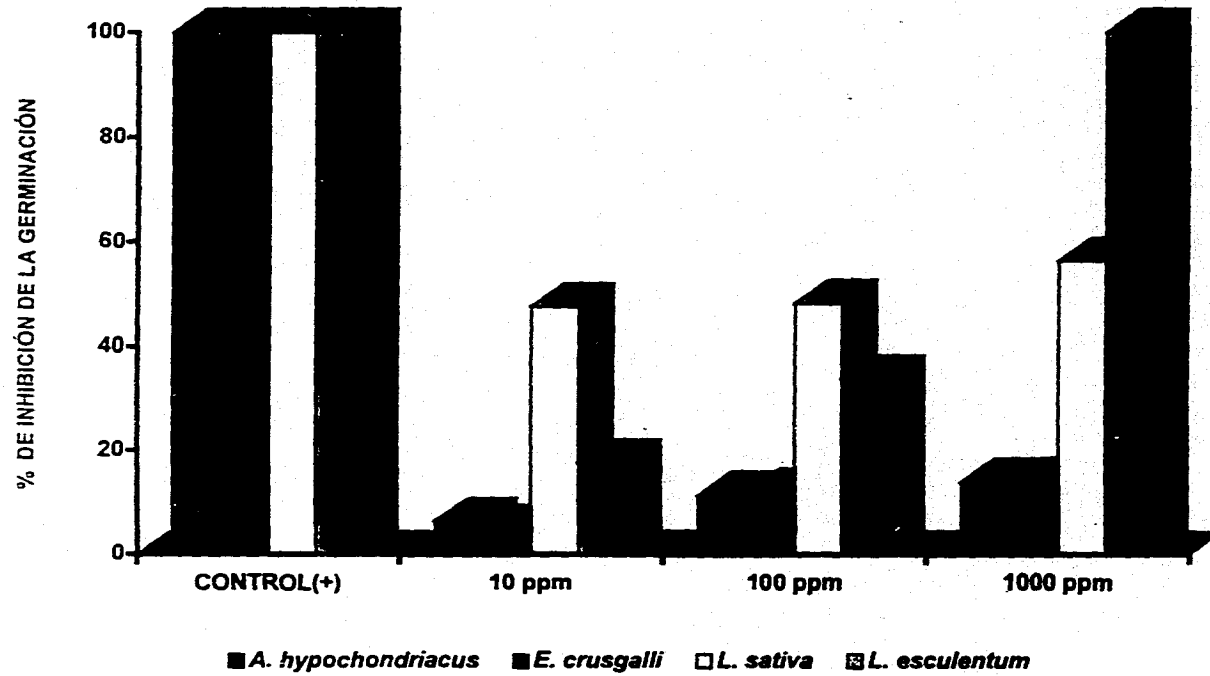
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 1.94	1.5 ± 1.0
10 µg/mL	2.6 ± 1.2	6.3 ± 0.0
100 µg/mL	6.7 ± 2.2	11.2 ± 1.1
1000 µg/mL	21.4 ± 1.74	13.7 ± 0.5
<i>Echinochloa crusgalli</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 0.1	1.8 ± 0.5
10 µg/mL	-20.1 ± 1.3 **	5.0 ± 0.5
100 µg/mL	8.5 ± 2.8	11.8 ± 0.8
1000 µg/mL	27.5 ± 1.9*	13.8 ± 0.0
<i>Lactuca sativa</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 2.4	27.5 ± 0.5
10 µg/mL	-4.5 ± 3.1**	47.5 ± 0.8*
100 µg/mL	1.2 ± 2.1	48.1 ± 0.0*
1000 µg/mL	4.9 ± 2.5	56.3 ± 0.5*
<i>Lycopersicum esculentum</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 1.3	4.7 ± 0.1
10 µg/mL	23.3 ± 2.4	17.5 ± 0.5
100 µg/mL	30.5 ± 3.8*	33.7 ± 1.0*
1000 µg/mL	100 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*

* Valores que difieren estadísticamente del control (Duncan, $\alpha=0.05$). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones.

** Indica porcentaje de estimulación del crecimiento radicular.



Gráfica 5. Efecto fitotóxico del 3 β -acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (4) sobre el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicon esculentum*.



Gráfica 6. Efecto fitotóxico del 3 β -acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (4) sobre la germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*.

1.3 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL FITOTÓXICO DE LA IMPERATORINA (5) SOBRE LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO RADICULAR DE DIFERENTES ESPECIES DE SEMILLAS.

El efecto fitotóxico de la imperatorina (5) sobre el crecimiento radicular y la germinación de las semillas de prueba se puede observar en el Cuadro 4 y en las Gráficas 7 y 8.

La imperatorina (5) inhibió de manera significativa el crecimiento radicular de las semillas de *A. hypochondriacus*, *E. crusgalli* y *L. esculentum*, a concentraciones de 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Las semillas de *L. esculentum* y *L. sativa* fueron totalmente inhibidas a 1000 $\mu\text{g/mL}$. En el caso de la semillas de *Lactuca sativa*, se observó un efecto estimulante sobre el crecimiento radicular a concentraciones menores de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de la cumarina (Gráfica 7). Las CI_{50} calculadas fueron menores de 1000 $\mu\text{g/mL}$ para las semillas de *E. crusgalli* (144.5 $\mu\text{g/mL}$), *Lycopersicum esculentum* (39.8 $\mu\text{g/mL}$), y *Lactuca sativa* (794.3 $\mu\text{g/mL}$). Para las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, el valor de la CI_{50} fue mayor a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (1259.1 $\mu\text{g/mL}$).

Con respecto al proceso de germinación, la imperatorina (5) afectó en forma significativa la de las semillas de *L. esculentum* y *L. sativa* a las concentraciones de 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. En la Gráfica 8 se observa que a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto, la inhibición fue del 61 y 77 % respectivamente. A 1000 $\mu\text{g/mL}$ la imperatorina (5) ocasionó un inhibición del 100% de la germinación como del crecimiento radicular de las semillas de *L. esculentum* y de *L. sativa*. Las CI_{50} calculadas correspondieron a 50.1 $\mu\text{g/mL}$ para las semillas de *L. esculentum* y de 29.5 $\mu\text{g/mL}$ para las de *L. sativa*.

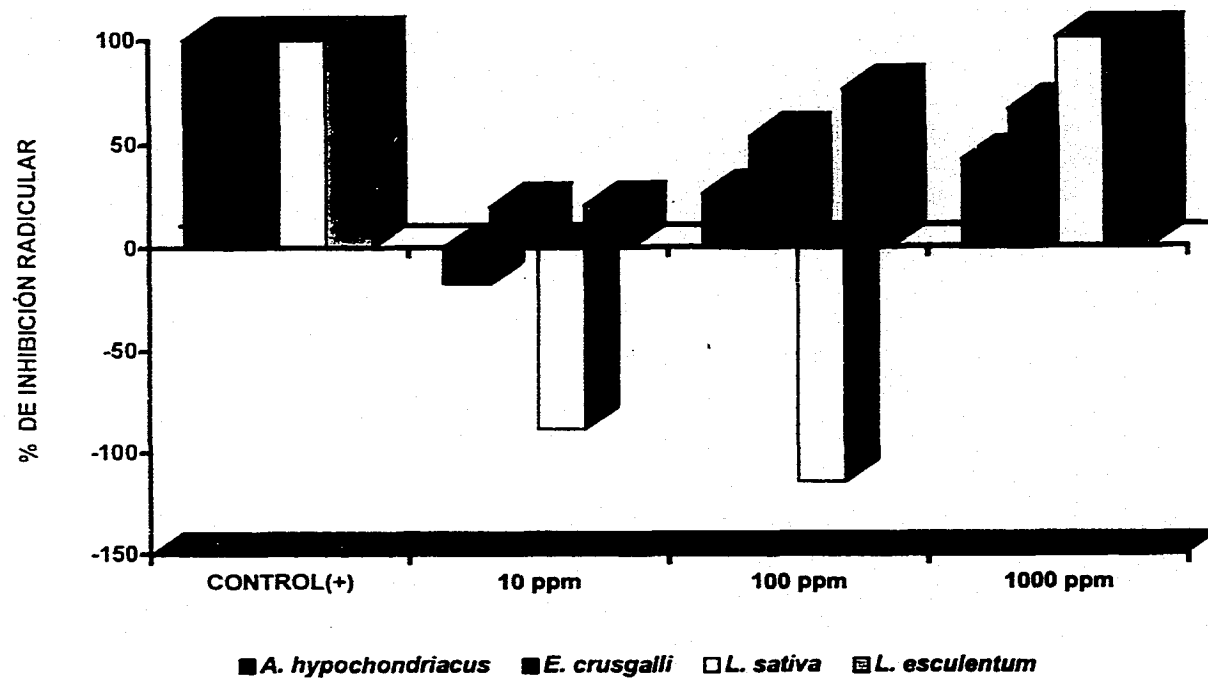
V. Resultados y Discusión

Cuadro 4. Efecto fitotóxico de la imperatorina (5), sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*.

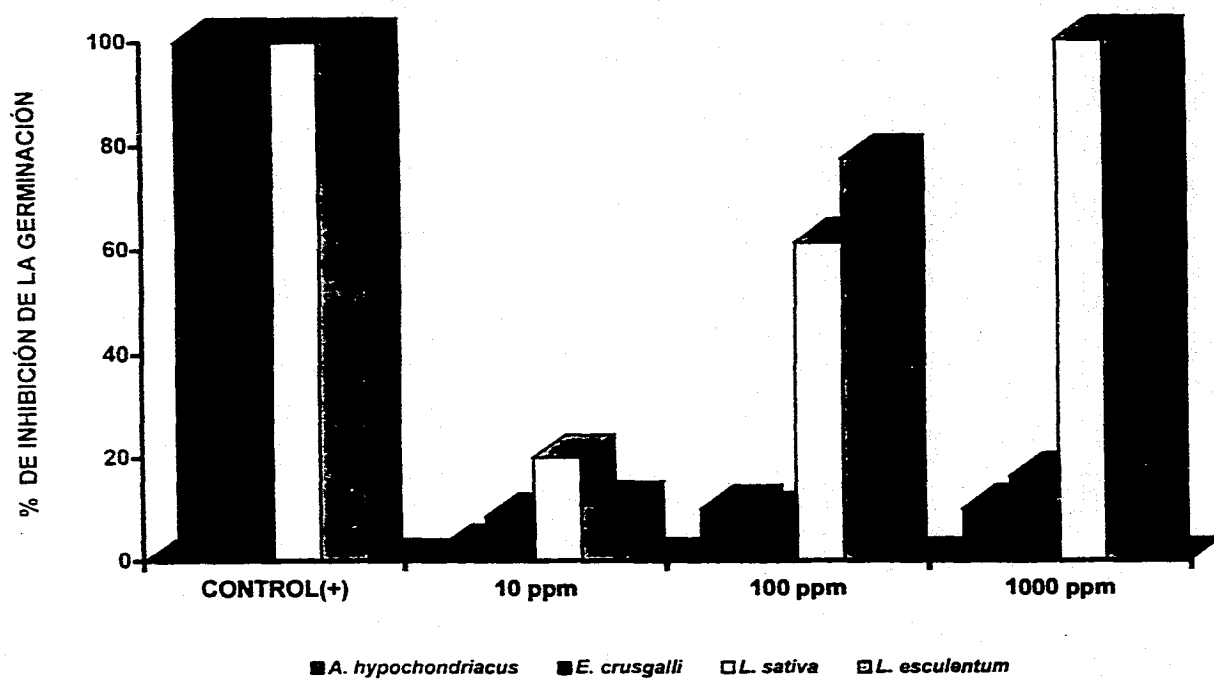
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 1.94	1.5 ± 1.0
10 µg/mL	-17.5 ± 1.74**	2.7 ± 0.8
100 µg/mL	25.7 ± 2.2*	10.0 ± 1.1
1000 µg/mL	42.1 ± 1.2*	10.0 ± 0.5
<i>Echinochloa crusgalli</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 0.1	1.8 ± 0.5
10 µg/mL	19.7 ± 0.3	8.7 ± 0.5
100 µg/mL	53.1 ± 3.7*	8.7 ± 0.9
1000 µg/mL	66.1 ± 0.6*	16.2 ± 0.8
<i>Lactuca sativa</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 2.4	27.5 ± 0.5
10 µg/mL	-88.6 ± 1.8**	20.0 ± 0.9
100 µg/mL	-114.6 ± 1.0**	61.2 ± 1.3*
1000 µg/mL	100.0 ± 5.6*	100 ± 0.0*
<i>Lycopersicum esculentum</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 1.3	4.7 ± 0.1
10 µg/mL	20.1 ± 0.9	10.8 ± 0.6
100 µg/mL	75.6 ± 0.9*	77.3 ± 0.5*
1000 µg/mL	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.8*

* Valores que difieren estadísticamente del control (Duncan, $\alpha=0.05$). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones.

** Indica porcentaje de estimulación del crecimiento radicular.



Gráfica 7. Efecto fitotóxico de la imperatorina (5), sobre el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*.



Gráfica 8. Efecto fitotóxico de la imperatorina (5), sobre la germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*.

1.4 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL FITOTÓXICO DE LA ASARININA (6) SOBRE LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO RADICULAR DE DIFERENTES ESPECIES DE SEMILLAS.

En el Cuadro 5 se muestra el efecto de la asarinina (6) sobre la germinación y el crecimiento radicular de las cuatro especies de semillas evaluadas.

En la Gráfica 9 se observa que este compuesto presentó un efecto inhibitorio significativo, sobre el crecimiento radicular de las semillas de *A. hypochondriacus*, *E. crusgalli* y *L. esculentum*. A 1000 µg/mL la inhibición fue del 100 % en el caso de las semillas de *L. esculentum*, (CI_{50} de 79.4 µg/mL). Para las otras dos especies de semillas se observó una inhibición del 35% a la misma concentración. En el caso de las semillas de *L. sativa*, la asarinina (6) presentó un efecto estimulante sobre el crecimiento radicular.

La asarinina (6) presentó también un efecto inhibitorio sobre la germinación de las semillas ensayadas. El porcentaje de inhibición de la germinación de mayor a menor potencia a 1000 µg/mL fue de 100 > 78.7 > 37.5 > 22.3, para las semillas de *L. esculentum*, *L. sativa*, *E. crusgalli* y *A. hypochondriacus*, respectivamente. Nuevamente las semillas de *L. esculentum* fueron las más sensibles al efecto inhibitorio causado por este lignano (Gráfica 10).

1.5 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL FITOTÓXICO DEL β-LUPEOL (7) SOBRE LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO RADICULAR DE DIFERENTES ESPECIES DE SEMILLAS.

En el Cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos al evaluar el efecto fitotóxico del β-lupeol (7). En la Gráfica 11 se aprecia que a una concentración de 1000 µg/mL, este compuesto presenta un efecto inhibitorio moderado sobre el crecimiento radicular de las semillas de *A. hypochondriacus*, *E. crusgalli* y *L. esculentum*. Sobre las semillas de *L. sativa*, el terpenoide mostró un efecto

V. Resultados y Discusión

estimulante del crecimiento radicular, sin embargo, se observa una clara inhibición de la germinación ($\approx 60\%$) a la concentración de $1000\ \mu\text{g/mL}$. La germinación de las otras semillas estudiadas en presencia de concentraciones crecientes de β -lupeol (7) también se encontró inhibida aunque en menor grado que la inhibición del desarrollo radicular, tal como se observa en el Cuadro 6 y en las Gráficas 11 y 12.

1.6 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL FITOTÓXICO DE LA HESPERIDINA (8) SOBRE LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO RADICULAR DE DIFERENTES ESPECIES DE SEMILLAS.

En el Cuadro 7 y en las Gráficas 13 y 14 se observan los resultados obtenidos de la evaluación de la hesperidina (8) sobre la germinación y el crecimiento radicular de las cuatro semillas de prueba. En el caso de las semillas de *L. esculentum* se observó un efecto fitotóxico significativo a la máxima concentración evaluada ($1000\ \mu\text{g/mL}$), inhibiendo tanto el crecimiento radicular como la germinación de las semillas. La germinación de las semillas de *L. sativa*, en presencia de concentraciones crecientes de hesperidina (8) se inhibió de manera notable.

Como se desprende de los resultados analizados la cumarina imperatorina (5) constituye el principio fitotóxico más potente de la especie *Esenbeckia yaxhoob*.

Estos resultados no resultan sorprendentes ya que previamente las cumarinas han demostrado diversos efectos sobre el crecimiento vegetal y/o la germinación de varias especies de plantas cultivadas y malezas (Bennet y Bonner, 1953; Baskin *et al.*, 1967; Williams y Hoagland, 1982; Shimomura *et al.*, 1982; Bose, 1958; Brown, 1981; Macías, *et al.*, 1993). Macías y colaboradores (1993) investigaron el efecto de diez cumarinas en solución acuosa sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *L. sativa*. Los ensayos se

V. Resultados y Discusión

realizaron con piranocumarinas, furanocumarinas, incluyendo a la imperatorina (5) y cumarinas simples, observándose que las furanocumarinas inducen un efecto fitotóxico más pronunciado que el de las piranocumarinas y cumarinas simples. En el caso específico de la imperatorina (5) se observó un comportamiento similar al encontrado en el presente estudio, es decir que a bajas concentraciones induce una estimulación del crecimiento vegetal de *L. sativa*, y a altas concentraciones inhibe de manera significativa el crecimiento radicular de esta planta.

En lo que se refiere a los resultados obtenidos para el lignano asarinina (6), es bien conocido que estos productos juegan un papel importante en la regulación del crecimiento vegetal. La inhibición que ejercen sobre la germinación de semillas es el resultado de la interferencia que causan en el transporte de aminoácidos y la síntesis de proteínas. Este mecanismo de acción es común con otros compuestos aromáticos, incluyendo al ácido cinámico y a los ácidos *orto* y *para* cumáricos (Van Sumere et al., 1972). Se ha observado que compuestos análogos a la asarinina (6), tales como la fargesina y la sesamina, retardan considerablemente la geminación de las semillas de *Cucumis sativus* L. y *Arachis hypogaeae* L., en un intervalo de concentraciones de 50 a 200 µg/mL.

Si bien es cierto que algunos triterpenos del tipo ursano y oleanano juegan un papel importante en las interacciones alelopáticas de muchas especies vegetales que los contienen, y que muchos de ellos han demostrado un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento vegetal de numerosas malezas, a la fecha no se ha descrito este tipo de efecto para los triterpenos del tipo lupano y dammarano (Fisher, 1991).

Por último, este trabajo constituye la primera descripción del efecto fitotóxico de cetonas alifáticas. Sin embargo, este compuesto aislado previamente de varias especies de *Lycopersicon* ha demostrado propiedades insecticidas contra las larvas de *Manduca sexta*, *Heliothis zea* y *Aphis gossypii* (Williams et al., 1980; Dimock et al., 1982).

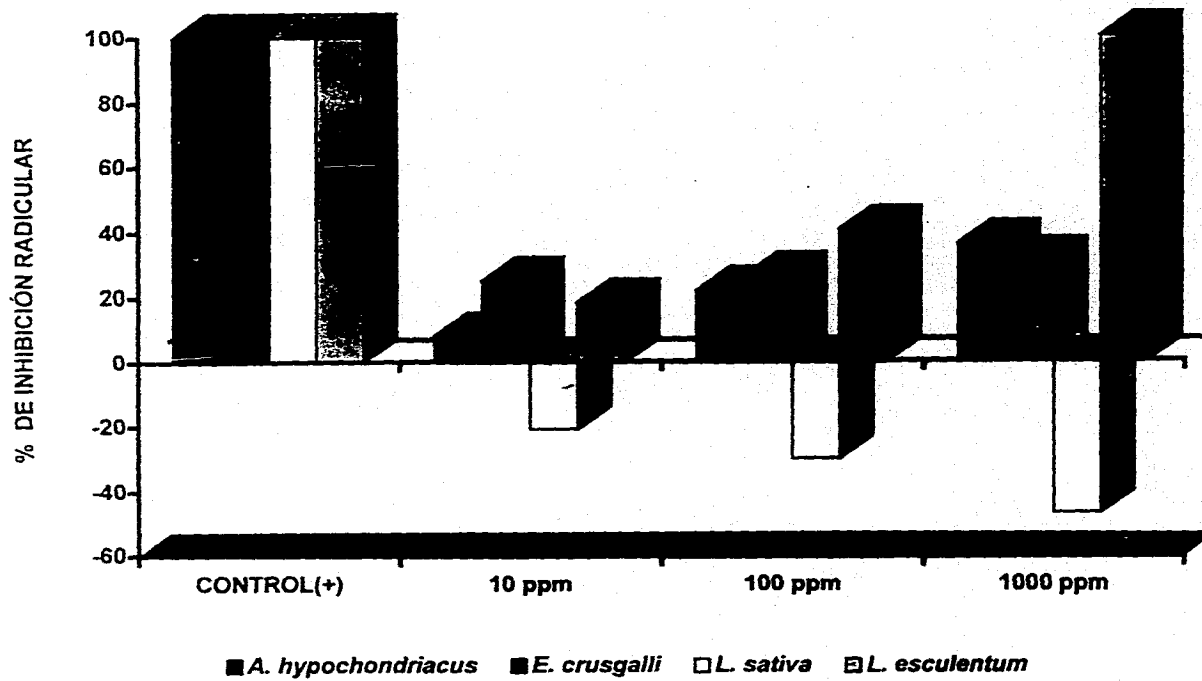
V. Resultados y Discusión

Cuadro 5. Efecto fitotóxico de la asarinina (6), sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*.

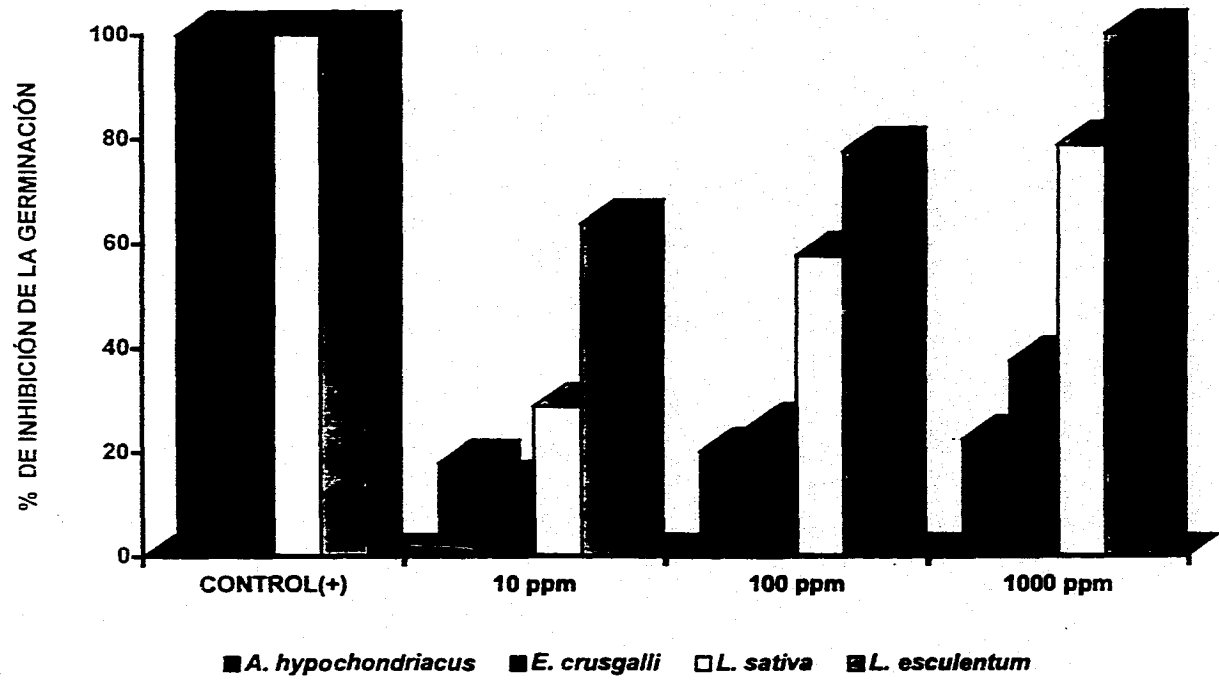
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 1.94	1.5 ± 1.0
10 µg/mL	8.2 ± 0.4	17.8 ± 0.1
100 µg/mL	22.1 ± 0.8	20.0 ± 0.1
1000 µg/mL	36.2 ± 0.8*	22.3 ± 0.1
<i>Echinochloa crusgalli</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 0.1	1.8 ± 0.5
10 µg/mL	25.1 ± 0.7*	13.7 ± 0.1
100 µg/mL	26.5 ± 2.4*	24.7 ± 0.1*
1000 µg/mL	30.8 ± 1.5*	37.5 ± 0.1*
<i>Lactuca sativa</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 2.4	27.5 ± 0.5
10 µg/mL	-20.8 ± 3.2**	28.7 ± 1.2*
100 µg/mL	-29.8 ± 2.6**	57.5 ± 0.8*
1000 µg/mL	-47.0 ± 2.4**	78.7 ± 0.5*
<i>Lycopersicum esculentum</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 1.3	4.7 ± 0.1
10 µg/mL	18.5 ± 2.4	63.7 ± 0.5*
100 µg/mL	40.6 ± 0.4*	77.5 ± 0.9*
1000 µg/mL	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*

* Valores que difieren estadísticamente del control (Duncan, $\alpha=0.05$). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones.

** Indica porcentaje de estimulación del crecimiento radicular



Gráfica 9. Efecto fitotóxico de la asarinina (6), sobre el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicon esculentum*.



Gráfica 10. Efecto fitotóxico de la asarinina (6), sobre la germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*.

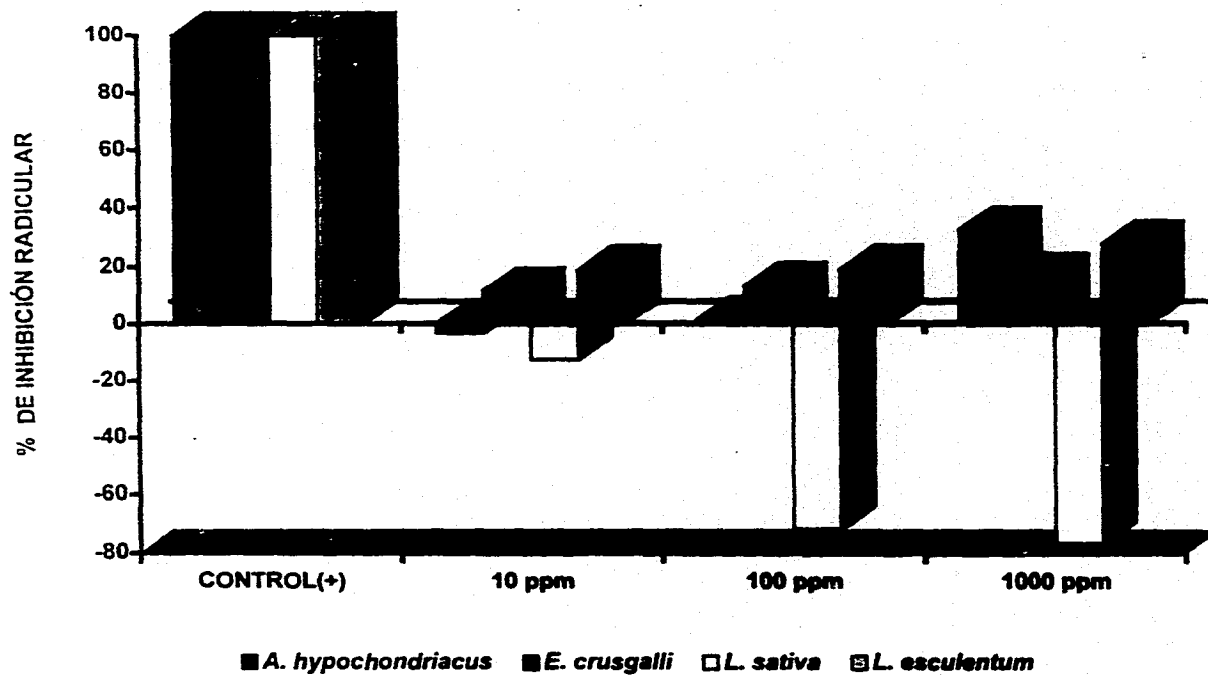
V. Resultados y Discusión

Cuadro 6. Efecto fitotóxico del β -lupeol (7), sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicon esculentum*.

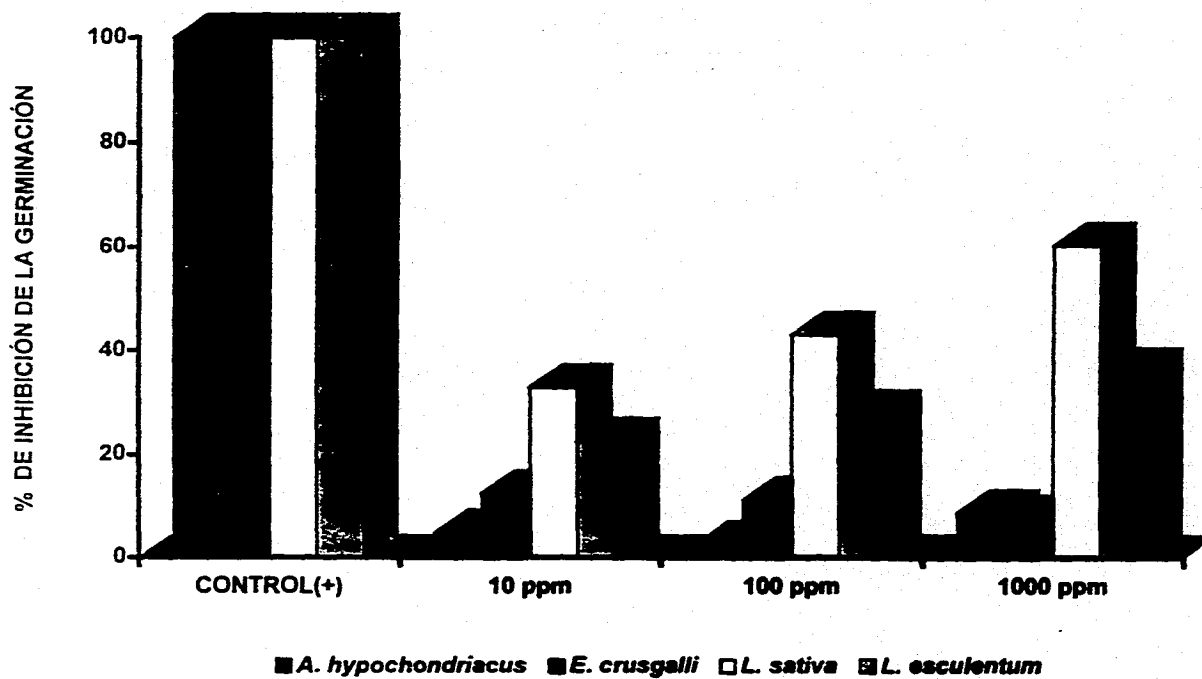
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 1.94	1.5 ± 1.0
10 µg/mL	-3.3 ± 2.5**	4.7 ± 0.5
100 µg/mL	1.4 ± 1.2	2.5 ± 0.8
1000 µg/mL	32.4 ± 1.2*	8.7 ± 0.5
<i>Echinochloa crusgalli</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 0.1	1.8 ± 0.5
10 µg/mL	11.6 ± 2.3	12.5 ± 0.6
100 µg/mL	13.4 ± 1.9	11.2 ± 0.4
1000 µg/mL	16.1 ± 1.3	7.5 ± 1.0
<i>Lactuca sativa</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 2.4	27.5 ± 0.5
10 µg/mL	-12.8 ± 1.5**	32.8 ± 0.1*
100 µg/mL	-72.0 ± 1.2**	43.0 ± 0.1*
1000 µg/mL	-77.3 ± 1.2**	60.3 ± 0.1*
<i>Lycopersicon esculentum</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 1.3	4.7 ± 0.1
10 µg/mL	18.9 ± 0.4	22.5 ± 0.8
100 µg/mL	18.9 ± 1.8	27.7 ± 0.0*
1000 µg/mL	27.2 ± 1.9*	35.9 ± 0.5*

* Valores que difieren estadísticamente del control (Duncan, $\alpha=0.05$). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones.

** Indica porcentaje de estimulación del crecimiento radicular.



Gráfica 11. Efecto fitotóxico del β -lupeol (7), sobre el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*.



Gráfica 12. Efecto fitotóxico del β -lupeol (7), sobre la germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*.

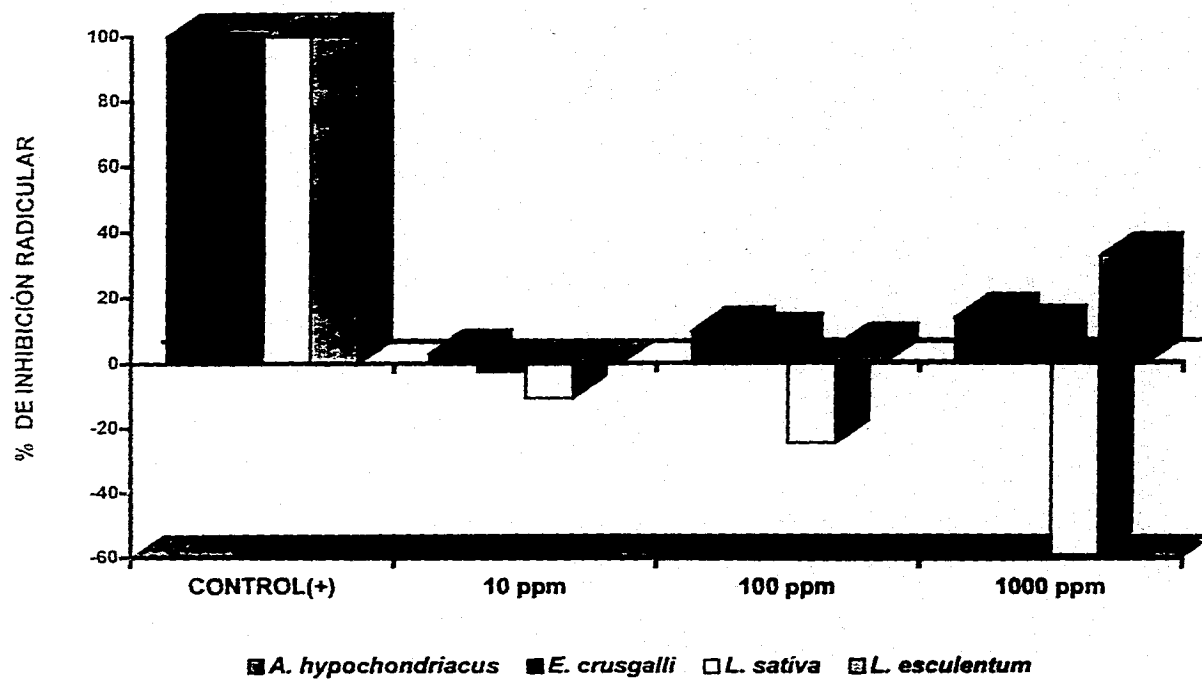
V. Resultados y Discusión

Cuadro 7. Efecto fitotóxico de la hesperidina (8), sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*.

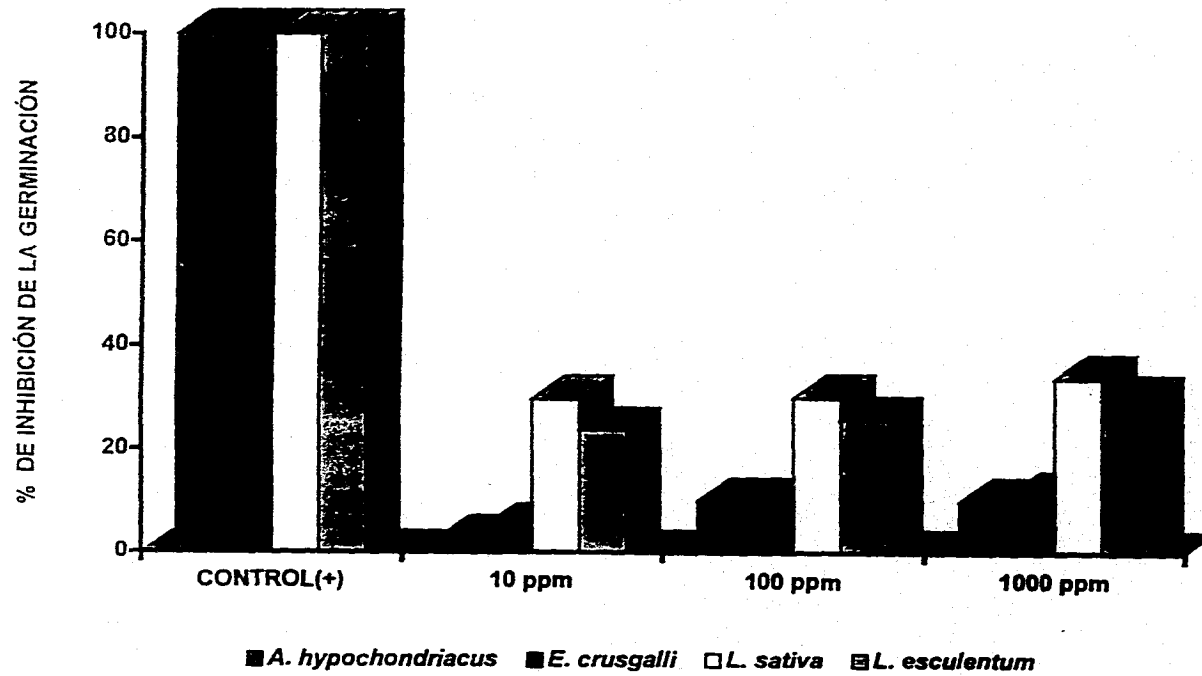
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 1.94	1.5 ± 1.0
10 µg/mL	3.2 ± 1.2	2.7 ± 1.1
100 µg/mL	10.1 ± 1.74	10.0 ± 0.8
1000 µg/mL	14.1 ± 2.2	10.0 ± 0.5
<i>Echinochloa crusgalli</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 0.1	1.8 ± 0.5
10 µg/mL	-2.6 ± 2.8**	5.0 ± 0.9
100 µg/mL	8.1 ± 1.9	10.0 ± 0.5
1000 µg/mL	10.5 ± 1.3	11.3 ± 0.8
<i>Lactuca sativa</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 2.4	27.5 ± 0.5
10 µg/mL	-10.9 ± 1.9**	29.7 ± 0.9*
100 µg/mL	-24.7 ± 1.5**	30.0 ± 1.3*
1000 µg/mL	-59.1 ± 5.6**	33.8 ± 0.0*
<i>Lycopersicum esculentum</i>		
TRATAMIENTO	% DE INHIBICIÓN RADICULAR	% DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACION
Control (-)	0.0 ± 1.3	4.7 ± 0.1
10 µg/mL	0.0 ± 2.6	23.7 ± 0.6
100 µg/mL	5.2 ± 1.4	25.8 ± 0.8*
1000 µg/mL	32.6 ± 1.6*	30.0 ± 0.5*

* Valores que difieren estadísticamente del control (Duncan, $\alpha=0.05$). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones.

** Indica porcentaje de estimulación del crecimiento radicular.



Gráfica 13. Efecto fitotóxico de la hesperidina (8), sobre el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*.



Gráfica 14. Efecto fitotóxico de la hesperidina (8), sobre la germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum*

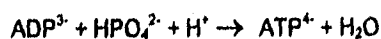
2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS CUMARINAS IMPERATORINA (5), CHALEPENSINA (10), XANTILETINA (11) Y 3-(1'-1'-DIMETILALIL)-XANTILETINA (12) SOBRE DIVERSAS ACTIVIDADES FOTOSINTÉTICAS.

Con la finalidad de explorar de forma más detallada el potencial herbicida de las cumarinas fitotóxicas aisladas de las especies *E. yaxhoob* (imperatorina [5]) y *S. perforatus* (chalepensina [10] xantiletina [11] y la 3-(1'-1'-dimetilalil)-xantiletina [12]), se evaluó el efecto de estos metabolitos sobre las reacciones luminosas de la fotosíntesis en cloroplastos aislados de espinacas. Las actividades fotosintéticas estudiadas se seleccionaron tomando como referencia el blanco de acción de los herbicidas comerciales. Como se mencionó anteriormente, el 50 % de los herbicidas que se usan comúnmente son inhibidores de la fotosíntesis y pueden actuar en varios niveles y/o con diferentes mecanismos de acción.

En primer lugar, se determinó el efecto que presentaron las cumarinas sobre la fotofosforilación o síntesis de ATP en cloroplastos aislados de hojas de espinaca. Es importante mencionar que los compuestos que inhiben la síntesis de ATP lo pueden hacer por mecanismos de desacoplamiento, inhibiendo la transducción de energía o bien, inhibiendo la reacción de Hill. Debido a que las cuatro cumarinas presentaron un efecto inhibitorio sobre la síntesis de ATP, se evaluó el efecto de las mismas sobre el transporte de electrones, con la finalidad de establecer cuál de los mecanismos mencionados resultaba activado. Para ello, se determinó el efecto de los compuestos en estudio sobre los transportes de electrones basal (Te^- basal), fosforilado (Te^- fosforilado) y desacoplado (Te^- desacoplado). Una vez evaluado el efecto que tuvieron las cumarinas sobre esta última actividad fotosintética, se interpretó su mecanismo de acción y se procedió a caracterizar el sitio o la enzima redox de la cadena transportadora de electrones que era afectada por cada compuesto.

2.1. FOTOFOSFORILACIÓN O SÍNTESIS DE ATP.

La determinación de la síntesis de ATP se realizó mediante la metodología descrita por Dilley (1972). Se sabe que durante la síntesis de ATP a pH 8, la enzima H⁺-ATPasa consume irreversiblemente un protón por cada molécula de ATP sintetizada, de acuerdo con la reacción siguiente:



La síntesis de ATP se midió registrando los cambios de pH en el medio de reacción, entre 8.0 y 8.1 (Peña-Valdivia *et al.*, 1991). En el Cuadro 8 se muestran los resultados de esta determinación y en la Gráfica 15 se observa el efecto de las cumarinas sobre la fotofosforilación cuando los electrones se transportan de H₂O a MV (Figura 12). De acuerdo con los resultados ilustrados en la Gráfica 15, las cuatro cumarinas inhiben la síntesis de ATP. La inhibición inducida por todos los compuestos fue dependiente de la concentración. En los casos de la imperatorina (8) y de la xantiletina (11), esta actividad se inhibe totalmente a una concentración de 175 µM. La chalepensina (10) y la 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina (12) inhibieron por completo el proceso de fotofosforilación a 75 µM. Los valores de CI₅₀ obtenidos (concentración que inhibe el 50 % de la síntesis de ATP) se muestran en el Cuadro 9, en donde se observa que la 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina (12) es el inhibidor más potente de la fotofosforilación.

Del análisis comparativo de las estructuras de las cumarinas (Cuadro 9) se desprende que el sustituyente 3-alilo de la 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina (12) y de la chalepensina (10) es un requisito estructural importante para la inhibición de la síntesis de ATP. De manera adicional, se puede inferir que los metilos en la posición 1' potencian esta inhibición, probablemente proporcionando una mayor solubilidad en la fase lipídica de la membrana.

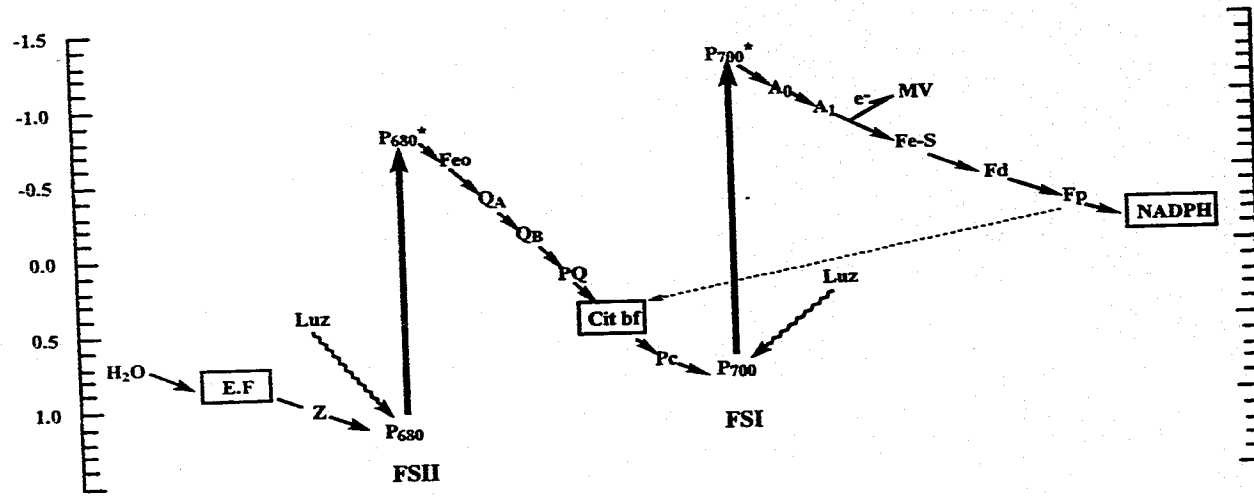
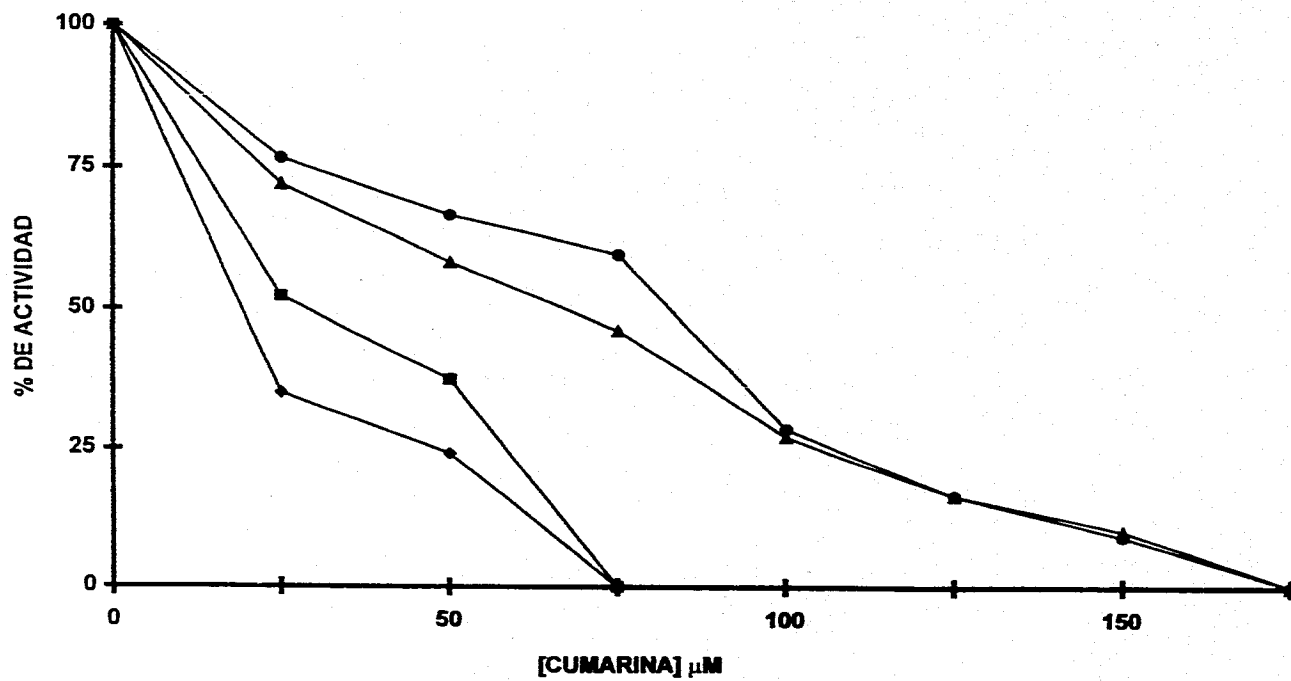


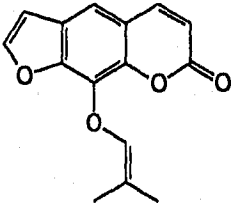
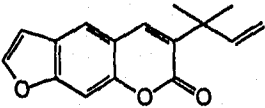
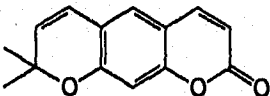
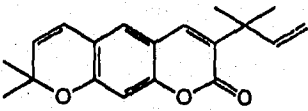
Figura 12. Determinación del transporte de electrones de H₂O a MV



Gráfica 15. Efecto de la concentración de las cumarinas, (●) imperatorina (5), (■) chalepensina (10), (▲) xantiletina (11) y la (◆) 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina (12) en la síntesis de ATP, determinada cuando los electrones se transportan de H_2O a MV, a pH 8 en cloroplastos intactos y lisados en el momento del ensayo.

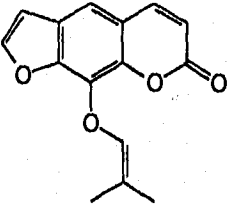
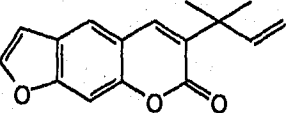
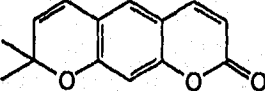
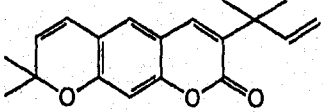
V. Resultados y Discusión

Cuadro 8. Efecto de las cumarinas imperatorina (5), chalepensina (10), xantiletina (11), y 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina (12), sobre la síntesis de ATP en presencia de MV, a pH 8. Las velocidades de los controles fueron de 3865, 2226, 2390 y 2212 $\mu\text{Moles de ATP hr}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$, respectivamente.

CUMARINA	CONCENTRACIÓN (μM)	SÍNTESIS DE ATP (% DE ACTIVIDAD)
 <p>IMPERATORINA</p>	<p>0 25 50 75 100 125 150 175</p>	<p>100.0 \pm 5.2 76.6 \pm 2.6 66.4 \pm 5.5 60.0 \pm 3.7 28.3 \pm 7.5 16.3 \pm 2.3 9.0 \pm 3.1 0.0 \pm 0.0</p>
 <p>CHALEPENSINA</p>	<p>0 25 50 75</p>	<p>100.0 \pm 4.5 52.2 \pm 9.6 37.1 \pm 4.8 0.0 \pm 0.0</p>
 <p>XANTILETINA</p>	<p>0 25 50 75 100 125 150 175</p>	<p>100.0 \pm 5.7 71.9 \pm 3.6 58.2 \pm 7.4 46.1 \pm 8.2 26.9 \pm 6.1 16.3 \pm 2.5 10.0 \pm 8.6 0.0 \pm 0.0</p>
 <p>3-(1',1'-DIMETILALIL)-XANTILETINA</p>	<p>0 25 50 75</p>	<p>100.0 \pm 4.8 34.8 \pm 9.6 24.1 \pm 4.0 0.0 \pm 0.0</p>

V. Resultados y Discusión

Cuadro 9. Cl_{50} (μM) de las cumarinas imperatorina (5), chalepensina (10), xantiletina (11), y 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina (12), en la fotofosforilación.

CUMARINA	Cl_{50} (μM)
 IMPERATORINA	71.5
 CHALEPENSINA	27.9
 XANTILETINA	66.3
 3-(1',1'-DIMETILALIL)-XANTILETINA	19.3

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

2.2 TRANSPORTE DE ELECTRONES.

Con el objeto de dilucidar el mecanismo de acción de estas cumarinas se determinó su efecto sobre el transporte de electrones fotosintético (fase luminosa) y se investigó bajo tres condiciones experimentales diferentes. En primer lugar, se determinó el transporte de electrones basal (te^- basal), para lo cual se midió el flujo de electrones dependiente de la luz en el medio basal; en este caso, la velocidad del transporte de electrones es baja debido a la ausencia de ADP, Pi y de un agente desacoplante (Trebst, 1972). En la segunda determinación, se midió el transporte de electrones fosforilado (Te^- fosforilado), y para ello se adicionaron ADP 1 mM y Pi 3 mM al medio basal, los cuales permiten la actividad de la enzima H^+ -ATP sintetasa; en este caso, la velocidad del transporte de electrones es de una a tres veces mayor que la del Te^- basal, ya que el gradiente de pH es utilizado para la fotofosforilación (Trebst, 1972). Por último, se determinó el transporte de electrones desacoplado (Te^- desacoplado), para lo cual se adicionó al medio de reacción basal NH_4Cl 6 mM como un agente desacoplante. Este último compuesto promueve la disipación del gradiente de H^+ generado en la cadena fotosintética, observándose una velocidad máxima del flujo de electrones y, por lo tanto, se espera que el compuesto que inhiba esta actividad actúe como un Inhibidor de la reacción de Hill (McCarty, 1977; Trebst, 1972; Mitchell, 1977).

2.2.1 CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA IMPERATORINA (5) EN EL TRANSPORTE DE ELECTRONES.

En el Cuadro 10 se muestran los resultados del efecto de la imperatorina, sobre las diferentes actividades fotosintéticas, determinadas cuando los electrones se transportan de H_2O a $K_3[Fe(CN)_6]$ en cloroplastos intactos de espinaca, iluminados y lisados en el momento del ensayo. El $K_3[Fe(CN)_6]$ se adicionó como aceptor artificial de electrones, ya que capta electrones a nivel de

F. Resultados y Discusión

los centros FeS del FSI. En la Figura 13 se presenta la cadena fotosintética estudiada y el nivel de acción del $K_3[Fe(CN)_6]$.

En la Gráfica 16 se observa que al medir la velocidad del transporte de electrones espectrofotométricamente a 420 nm, de H_2O a $K_3[Fe(CN)_6]$, cuando los cloroplastos son iluminados durante un minuto, la velocidad para el Te^- basal fue activada por la imperatorina (5) hasta un 330 % a 25 μM . A mayor concentración del compuesto la activación de la velocidad disminuyó, siendo igual al control a 125 μM .

Si se considera que la transferencia de electrones y la fotofosforilación son dos procesos acoplados, es de esperarse que no haya síntesis de ATP cuando no hay transporte de electrones en el cloroplasto. De igual manera, no debería haber transporte de electrones si no existen ADP y P_i en el medio de reacción, para permitir la fotofosforilación simultánea. Sin embargo, los cloroplastos aislados siempre presentan algo de actividad residual (Te^- basal) debido probablemente a imperfecciones en la membrana causadas durante el proceso de aislamiento. El grado de acoplamiento depende de las condiciones para medir el transporte de electrones y del estado de los cloroplastos aislados (Trebst *et al.*, 1977). Esto último explica la actividad basal del cloroplasto aislado. La amplificación de la velocidad del Te^- basal inducida por la imperatorina (5) se debe a su propiedad protonófora, indicando que actúa como un agente desacoplante.

Por otra parte, cuando al medio de reacción se adicionaron ADP y P_i , la imperatorina (5) inhibió el transporte de electrones en un 27.6 y 7.1 % , a 25 y 50 μM respectivamente. A la concentración de 75 μM la cumarina estimuló la velocidad del transporte de electrones fosforilante en un 34 %. Esta observación indica que, posiblemente a concentraciones mayores de 50 μM la cumarina active débilmente a la enzima H^+ -ATPasa y en consecuencia se comporte como un desacoplante, ya que no se afectó el te^- dsacoplado al incrementar la concentración de la cumarina, con respecto al control. Sin embargo, a concentraciones de 25 y 50 μM este compuesto inhibe débilmente a nivel de

V. Resultados y Discusión

cadena redox. En la misma gráfica se comprueba esta observación, ya que el Te⁻ desacoplado se inhibe en un 51.8 % a 25 μ M, indicando que la imperatorina (5) actúa como un inhibidor débil de la reacción de Hill a bajas concentraciones.

La activación de los flujos de electrones basal y fosforilante ocasionada por la imperatorina (5), indicó que este compuesto actúa como un desacoplante clásico, ya que disipó el gradiente de protones, y como consecuencia inhibió la síntesis de ATP. Los desacoplantes clásicos hacen que la membrana del tilacoide sea permeable a protones, permitiendo así la disipación de gradiente de pH (Figura 8) [Avron y Shavit, 1965; Good, 1977; Hooper, 1984; Neuman y Jagendorf, 1964].

La imperatorina (5) presentó una potencia mucho mayor como desacoplante que el NH_4Cl , un desacoplante clásico (Antony, 1966). Así mismo, la magnitud del efecto desacoplante demostrado por la cumarina es mayor que el observado para las fenil cumarinas 7-metoxi,5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina, 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina, y a la 5-O- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (Calera *et al.*, 1995).

2.2.2 CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA CHALEPENSINA (10) SOBRE EL TRANSPORTE DE ELECTRONES.

En el Cuadro 11 se presentan los resultados del efecto de la concentración de chalepensina (10) en el transporte de electrones de H_2O a $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Figura 13).

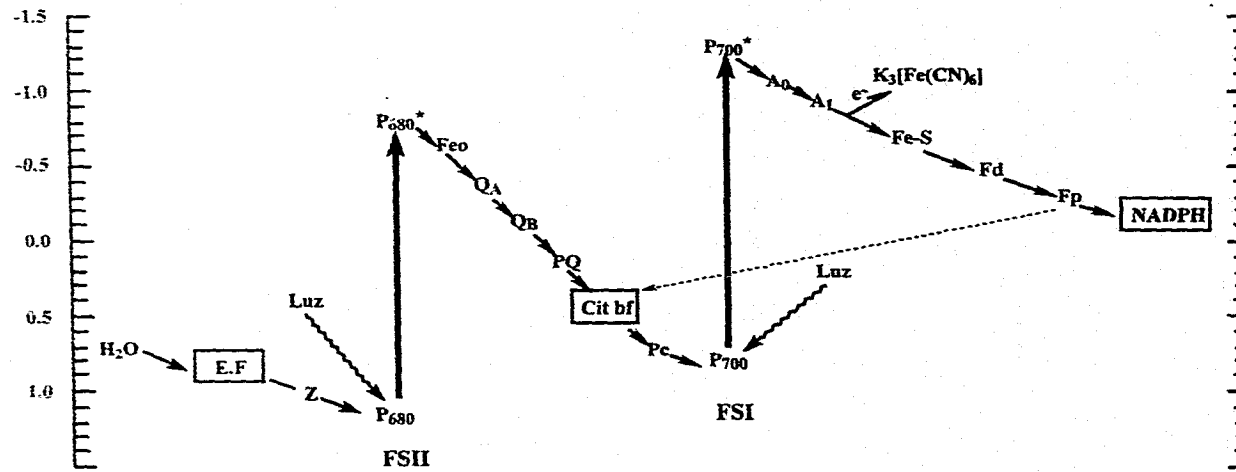
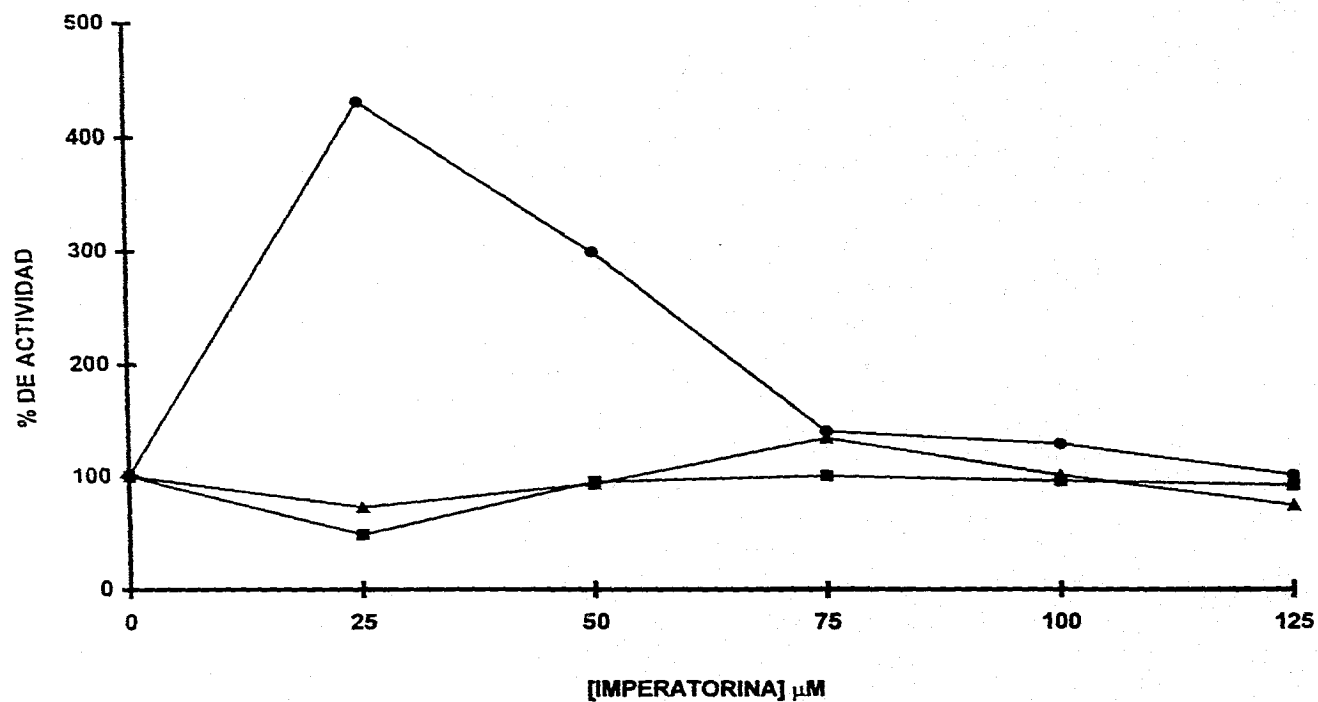
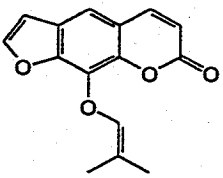


Figura 13. Determinación del transporte de electrones de H_2O a $K_3[Fe(CN)_6]$.



Gráfica 16. Efecto de la concentración de Imperatorina (5) en el transporte de electrones de H_2O a $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. (●) Te^- basal, (▲) Te^- fosforilado y (■) Te^- desacoplado, en $\mu\text{equiv. e}^- \text{h}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$. Las velocidades del control para los transportes de electrones basal, fosforilado y desacoplado son 292.3, 338.9 y 464.8, respectivamente.

Cuadro 10. Porcentaje de actividad de la imperatorina (5) en las diferentes actividades fotosintéticas estudiadas (Te⁻ basal, Te⁻ fosforilado y Te⁻ desacoplado), cuando los electrones se transportan de H₂O a K₃[Fe(CN)₆].

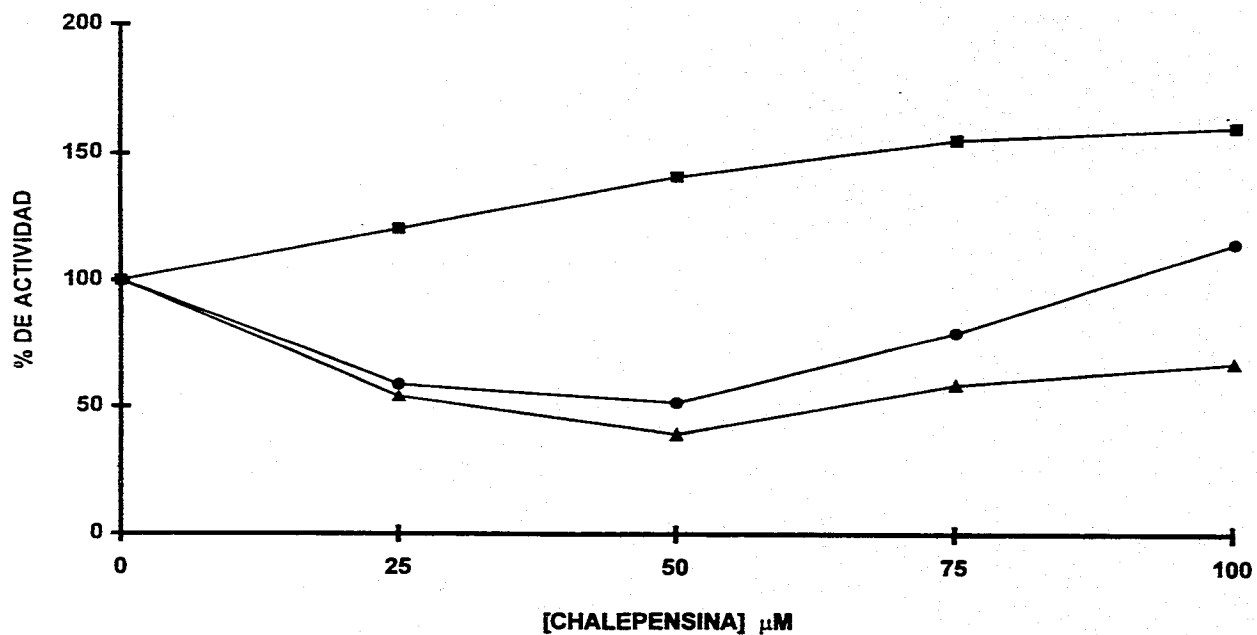
CUMARINA	CONCENTRACIÓN (μ M)	% DE ACTIVIDAD		
		Te ⁻ BASAL	Te ⁻ DESACOPLADO	Te ⁻ FOSFORILADO
 IMPERATORINA	0	100.0 \pm 7.6	100.0 \pm 8.1	100.0 \pm 2.2
	25	430.8 \pm 3.5	48.2 \pm 2.2	72.4 \pm 5.2
	50	299.1 \pm 2.3	94.8 \pm 5.5	92.9 \pm 2.4
	75	140.4 \pm 2.6	100.2 \pm 1.4	134.1 \pm 4.1
	100	129.3 \pm 3.5	95.8 \pm 1.3	100.7 \pm 6.2
	125	100.7 \pm 8.6	91.9 \pm 1.6	73.9 \pm 6.6

V. Resultados y Discusión

En la Gráfica 17 se observa que a bajas concentraciones (25 μM) esta cumarina, inhibe el transporte de electrones basal y fosforilado en un 48 y 60 %, respectivamente. Así mismo, se observa que a la máxima concentración de prueba (100 μM), el transporte de electrones basal se activó en un 14 %. Estos datos sugieren que la chalepensina (**10**) actúa desacoplando la fotofosforilación a altas concentraciones. A bajas concentraciones, actúa como inhibidor de la transducción de energía o inhibidor de la reacción de Hill. En la misma gráfica se observa que el Te^- desacoplado con NH_4Cl , se estimuló en un 60 % a una concentración de 100 μM , lo cual indica que este compuesto actúa como un desacoplante no clásico, debido a que activó el Te^- desacoplado. De manera adicional este producto natural actúa como un inhibidor de la transducción de energía a bajas concentraciones, ya que inhibió el Te^- fosforilado y la fotofosforilación (Gráfica 15). Cabe aclarar que los desacoplantes como el NH_4Cl inducen activación máxima en el Te^- desacoplado, el cual, teóricamente, ya no debe activarse más con la presencia de otro desacoplante como la chalepensina (**10**). Sin embargo, esta cumarina todavía induce una activación en el Te^- desacoplado. Este efecto posiblemente se deba a que el compuesto incrementa la permeabilidad de la membrana a protones o bien a que active directamente una enzimas redox de regulación de la cadena transportadora de electrones, tal como lo hacen las sales de alquilbenzildimetilamonio (Klano y Susanne, 1994)

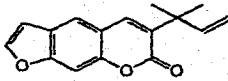
Con base en los resultados antes mencionados, puede concluirse que la chalepensina (**10**) actúa como un inhibidor de la transducción de energía a bajas concentraciones y como un desacoplante no clásico, ya que inhibe el Te^- fosforilado. Si actuara únicamente como un desacoplante, se esperaría que el Te^- fosforilado se acelerara, debido a que se disiparía del gradiente de pH y se eliminaría la regulación que ejerce la enzima H^+ -ATPasa en la fotofosforilación del ADP, paso limitante de la velocidad de reacción.

En conclusión la chalepensina (**10**), se comporta como un agente desacoplante, al igual que la 5-O- β -D-glactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (Calera *et al.*, 1995), etc.



Gráfica 17. Efecto de la concentración de chalepensina (10) en el transporte de electrones de H₂O a K₃[Fe(CN)₆]. (●) Te⁻ basal, (▲) Te⁻ fosforilado y (■) Te⁻ desacoplado, en μequiv. e⁻ h⁻¹ mg ChI⁻¹. Las velocidades del control para los transportes de electrones basal, fosforilado y desacoplado son 334.2, 633.7 y 1141.1, respectivamente.

Cuadro 11. Porcentaje de actividad de la chalepentina (10) en las diferentes actividades fotosintéticas estudiadas (Te⁻ basal, Te⁻ fosforilado y Te⁻ desacoplado), cuando los electrones se transportan de H₂O a K₃[Fe(CN)₆].

CUMARINA	CONCENTRACIÓN (mM)	% DE ACTIVIDAD		
		Te ⁻ BASAL	Te ⁻ DESACOPLADO	Te ⁻ FOSFORILADO
 CHALEPENSINA	0	100.0 ± 1.4	100.0 ± 6.7	100.0 ± 7.0
	25	58.9 ± 4.3	120.6 ± 2.6	54.2 ± 9.6
	50	51.5 ± 2.8	141.3 ± 9.0	39.0 ± 7.7
	75	79.2 ± 3.2	155.5 ± 8.7	58.8 ± 9.5
	100	114.7 ± 2.6	160.3 ± 5.6	67.1 ± 5.7

2.2.3 CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA XANTILETINA (11) EN EL TRANSPORTE DE ELECTRONES.

En el Cuadro 12 se muestran los resultados del efecto de la xantiletina (11), sobre las diferentes actividades fotosintéticas, determinadas cuando los electrones se transportan de H_2O a $K_3[Fe(CN)_6]$, en cloroplastos intactos de espinaca, iluminados y lisados en el momento de ensayo. El $K_3[Fe(CN)_6]$ se adicionó como aceptor artificial de electrones, ya que acepta electrones a nivel de los centros FeS del FSI. En la Figura 13 se presenta la cadena fotosintética estudiada y el nivel de acción del $K_3[Fe(CN)_6]$.

En la Gráfica 18 se observa que los transportes de electrones basal, fosforilado y desacoplado de H_2O a $K_3[Fe(CN)_6]$, se inhibieron en forma creciente en el intervalo de concentraciones de 0 a 175 μM . Los transportes de electrones basal y fosforilado fueron los más afectados, mostrando una inhibición del 100 %, a 75 μM . Estos resultados sugieren que el sitio de interacción de la xantiletina (11) está más expuesto cuando está energizado el cloroplasto (basal y fosforilante), en comparación a cuando está desenergizado (desacoplado) y, por ello, en el sistema de flujo de electrones previamente desacoplado con NH_4Cl , se observa que la cumarina induce una inhibición del 100 %, a una concentración de 175 μM . Esta concentración es mayor a la que se requiere para la inhibición de los flujos basal y fosforilante. Este último dato demuestra que la xantiletina actúa como un inhibidor potente de la reacción de Hill.

Todos estos resultados en conjunto, indican que la xantiletina (11) presenta las características de un inhibidor típico del transporte de electrones o de la reacción de Hill, puesto que los tres transportes de electrones (basal, fosforilado y desacoplado) de H_2O a $K_3[Fe(CN)_6]$ resultaron desactivados. Los compuestos que inhiben los flujos de electrones basal, fosforilado y desacoplado no permiten que se forme el gradiente electroquímico de protones y por lo tanto, no se dispone de energía libre para la síntesis de ATP (Gráfica 15).

V. Resultados y Discusión

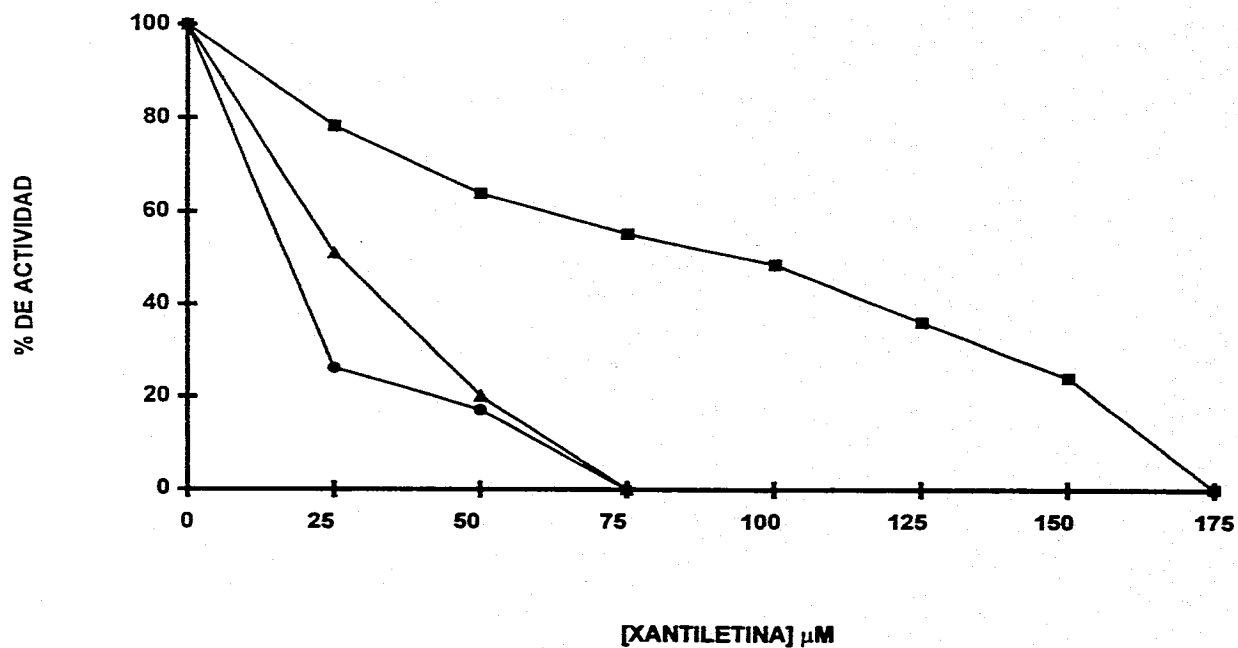
La xantiletina (11) presenta características similares a las descritas para una gran variedad de compuestos con actividad inhibidora del transporte de electrones, entre los cuales se encuentran diferentes compuestos nitrogenados (Carles y assche 1981; Trebst y Draber 1978), el DCMU (Gernot, 1979), derivados dibromo fenólicos (Albores *et al.*, 1986), el piqueroI y el diacetil piqueroI (Mendoza *et al.*, 1994), etc.

2.2.4 CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA 3-(1',1'-DIMETILALIL)-XANTILETINA (12) SOBRE EL TRANSPORTE DE ELECTRONES.

En el Cuadro 13 se presentan los resultados del efecto de concentraciones crecientes de 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina (12) sobre el transporte de electrones de H_2O a $K_3[Fe(CN)_6]$ (Figura 13).

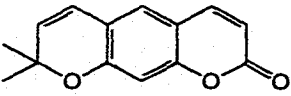
En la Gráfica 19 se observa que cuando los cloroplastos son iluminados durante un minuto, la velocidad para el transporte de electrones basal fue activada hasta un 158 % a 100 μM .

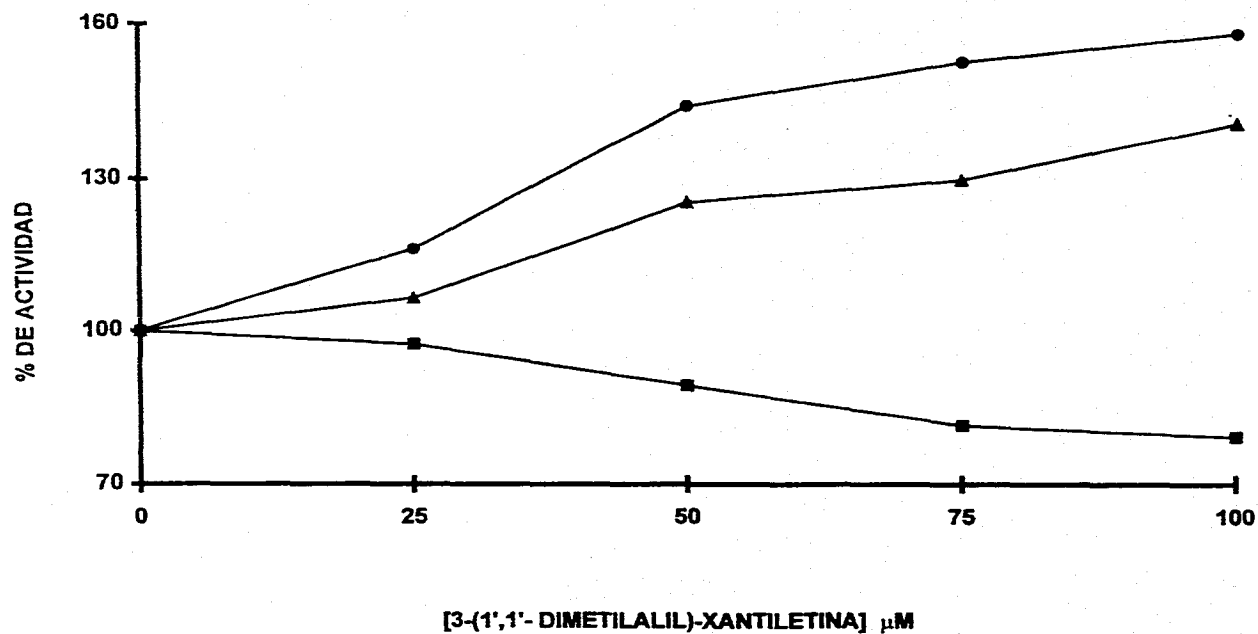
Por otro lado, cuando se adiciona ADP y Pi al medio de reacción, la velocidad del transporte de electrones fosforilante también es estimulada por esta cumarina en un 141 %, a 100 μM . Estos resultados indican que este compuesto se comporta como un agente desacoplante, similar al NH_4Cl (Antony, 1966), al CCCP (Heytler y Prichard 1962), al dinitrofenol (Neumann y Jagendorf 1964) y a las cumarinas naturales 7-metoxi,5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina, 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina y 5-O- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (Calera *et al.*, 1995), etc.



Gráfica 18. Efecto de la concentración de xantiletina (11) en el transporte de electrones de H_2O a $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. (●) Te^- basal, (▲) Te^- fosforilado y (■) Te^- desacoplado, en $\mu\text{equiv. e}^- \text{h}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$. Las velocidades del control para los transportes de electrones basal, fosforilado y desacoplado son 292.3, 338.9 y 464.8, respectivamente.

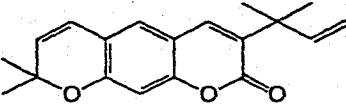
Cuadro 12. Efecto de la concentración de la piranocumarina xantiletina (11), sobre las diferentes actividades fotosintéticas estudiadas (Te^- basal, Te^- fosforilado y Te^- desacoplado), cuando los electrones se transportan de H_2O a $K_3[Fe(CN)_6]$.

CUMARINA	CONCENTRACIÓN (μM)	% DE ACTIVIDAD		
		Te^- BASAL	Te^- DESACOPLADO	Te^- FOSFORILADO
 XANTILETINA	0	100.0 \pm 2.4	100.0 \pm 4.3	100.0 \pm 8.8
	25	26.1 \pm 3.5	78.2 \pm 0.1	50.9 \pm 5.6
	50	17.1 \pm 3.8	63.9 \pm 1.7	20.1 \pm 1.8
	75	0.0 \pm 0.0	55.1 \pm 2.4	0.0 \pm 0.0
	100		48.4 \pm 3.4	
	125		36.1 \pm 3.3	
	150		24.0 \pm 7.9	
	175		0.0 \pm 0.0	



Gráfica 19. Efecto de la concentración de la 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina (12) en el transporte de electrones de H₂O a K₃[Fe(CN)₆]. (●) Te⁻ basal, (▲) Te⁻ fosforilado y (■) Te⁻ desacoplado, en μequiv. e⁻ h⁻¹ mg Chl⁻¹. Las velocidades del control para el transporte de electrones basal, fosforilado y desacoplado son 202.8, 271.1 y 345.5, respectivamente.

Cuadro 13. Efecto de la concentración de la piranocumarina 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina (12), sobre las diferentes actividades fotosintéticas, estudiadas, cuando los electrones se transportan de H₂O a K₃[Fe(CN)₆] (Te⁻ basal, Te⁻ fosforilado y Te⁻ desacoplado).

CUMARINA	CONCENTRACIÓN (μ M)	% DE ACTIVIDAD		
		Te ⁻ BASAL	Te ⁻ DESACOPLADO	Te ⁻ FOSFORILADO
 3-(1'1'- DIMETILALIL)-XANTILETINA	0	100.0 \pm 3.6	100.0 \pm 2.4	100.0 \pm 7.6
	25	116.3 \pm 1.1	97.5 \pm 5.2	106.5 \pm 4.5
	50	114.1 \pm 5.0	89.4 \pm 1.8	125.2 \pm 0.4
	75	152.5 \pm 5.1	82.7 \pm 4.8	129.7 \pm 3.4
	100	158.4 \pm 2.4	79.3 \pm 3.6	140.7 \pm 2.5

V. Resultados y Discusión

Finalmente, el compuesto (12) indujo el una inhibición ligera (21 %) del T_e desacoplado con NH_4Cl a la máxima concentración ensayada (100 μM). La magnitud de este efecto indicó que la cumarina se comporta como un inhibidor débil de la reacción de Hill. En conclusión, la 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina (12), a diferencia de la xantiletina (11) [inhibidor de la reacción de Hill], presentó características de un desacoplante potente y de un inhibidor débil de la reacción de Hill.

3. EFECTO DE LA IMPERATORINA (5) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA H^+ -ATPasa.

La ATP sintetasa es el complejo multienzimático que se encarga de sintetizar ATP a partir de ADP y P_i , como resultado del acoplamiento con el transporte de electrones.

Con la finalidad de caracterizar la actividad desacoplante de la imperatorina (5), se estudió su efecto sobre la estimulación de la enzima H^+ -ATPasa en la hidrólisis de ATP, proceso que inducen los agentes desacoplantes clásicos. En el Cuadro 14 se muestran los resultados obtenidos en esta determinación. Como se puede apreciar, al aumentar la concentración de la cumarina de 0 a 50 μM , la actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa se activó en un 614.2 %. Este efecto sobre la actividad de la enzima, contribuye a caracterizar a la imperatorina (5) como un desacoplante. El comportamiento de esta cumarina es similar al de los desacoplantes clásicos del tipo del NH_4Cl y CCCP, entre otros (Antony, 1964; Heytler y Prichard, 1962).

Es importante mencionar, que al iluminar los cloroplastos se crea un estado de mayor energía en la membrana del tilacoide, el cual se manifiesta como un gradiente electroquímico de protones, activando la enzima H^+ -ATPasa. En estas condiciones, la enzima puede hidrolizar al ATP adicionado al medio de reacción en condiciones de oscuridad y se crea un gradiente electroquímico de protones

V. Resultados y Discusión

(Nicholls y Ferguson, 1982), mismo que se disipa por la actividad de un agente desacoplante, como es el caso de la imperatorina (5).

Cuadro 14. Efecto de la concentración de la imperatorina (5) sobre la actividad de la enzima H^+ -ATPasa. La velocidad del control es de $38 \mu\text{Moles de Pi hr}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$

CONCENTRACIÓN (μM)	% DE ACTIVIDAD
0	100
25	334.2
50	614.2

4. EFECTO DE LA XANTILETINA (11) EN LAS REACCIONES PARCIALES DE LA CADENA REDOX EN EL TRANSPORTE DE ELECTRONES FOTOSINTÉTICO.

Con el objeto de localizar el sitio y/o la enzima redox de la cadena transportadora de electrones, inhibido por la xantiletina (11), se determinó su efecto en pequeños fragmentos de los fotosistemas I y II. Para ello se emplearon diferentes donadores y aceptores artificiales de electrones, así como inhibidores de la cadena fotosintética.

En primer lugar, se determinó la actividad en el FSII, para lo cual se adicionó al medio de reacción DCPIP/ $K_3[Fe(CN)_6]$ como aceptor artificial de electrones. En este caso el H_2O actuó como un donador natural de electrones. Con el objeto de inhibir el flujo de electrones hacia el FSI, se adicionó DBMIB a la mezcla de reacción y, como agente desacoplante, NH_4Cl 6 mM (Figura 14).

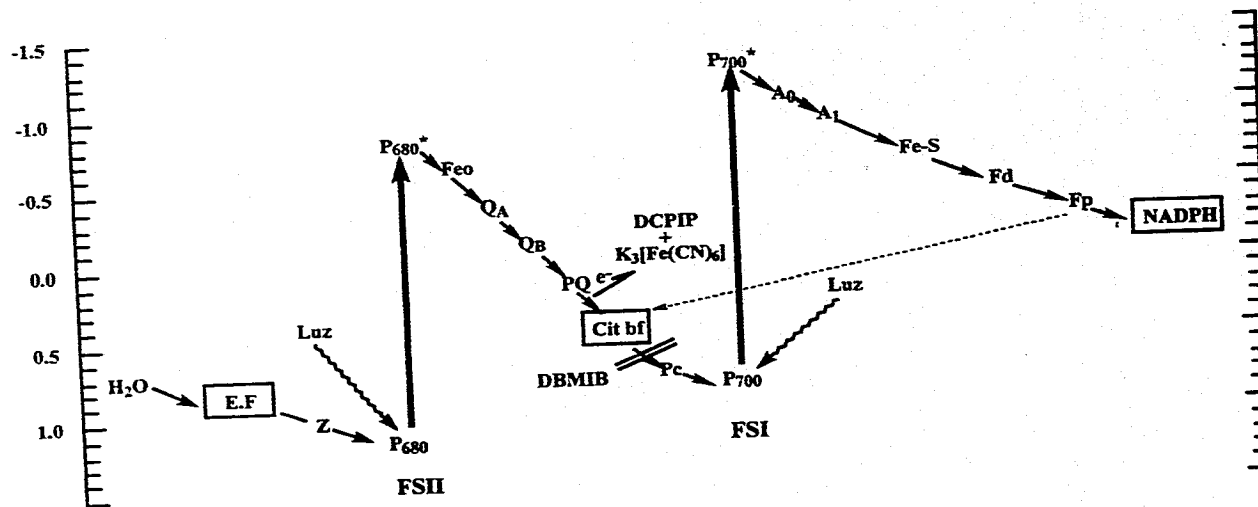


Figura 14. Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FSII de H₂O a DCPIP/K₃[Fe(CN)₆].

V. Resultados y Discusión

Los resultados de esta determinación se presentan en el Cuadro 15. Como puede apreciarse, la actividad en el FSII no fue afectada por la presencia de la xantiletina (11), por lo que el blanco de inhibición de esta cumarina debería encontrarse en el FSI.

El transporte de electrones desacoplado en el FSI se determinó empleando el sistema DCPIP/ascorbato, el cual actúa como donador artificial de electrones a nivel del complejo Citb₆/f. En este caso se empleó MV como aceptor artificial de electrones, DCMU como inhibidor de la enzima Q_B para impedir el flujo de electrones del FSII y NH₄Cl 6 mM como desacoplante para estudiar el efecto del compuesto solo en el flujo de electrones del FSI (Figura 15).

Cuadro 15. Efecto de la concentración de xantiletina (11) sobre en el transporte de electrones desacoplado en el FSII de H₂O a DCPIP/K₃[Fe(CN)₆]. La velocidad del control fue de 375 $\mu\text{equiv. e}^- \text{h}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$.

CONCENTRACIÓN (μM)	% DE ACTIVIDAD
0	100 \pm 5.1
100	97.7 \pm 4.2
175	102.2 \pm 4.3

En el Cuadro 16 y en la Gráfica 20 se observa que el transporte de electrones desacoplado, de DCPIP_{red} a MV, se inhibió en presencia de la cumarina forma dependiente de la concentración. A la concentración de 100 μM el efecto inhibitorio fue de un 100 %.

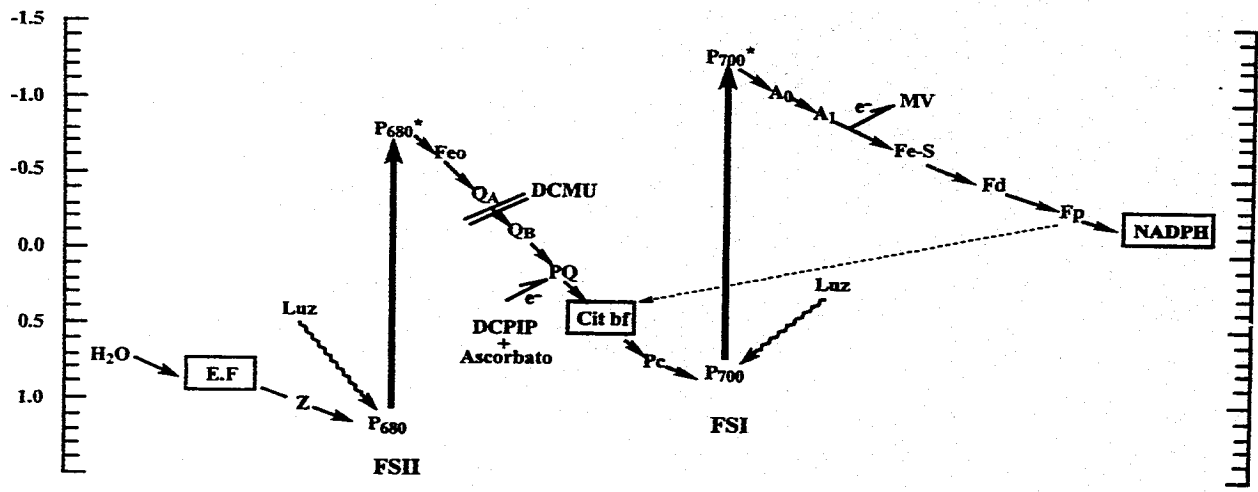
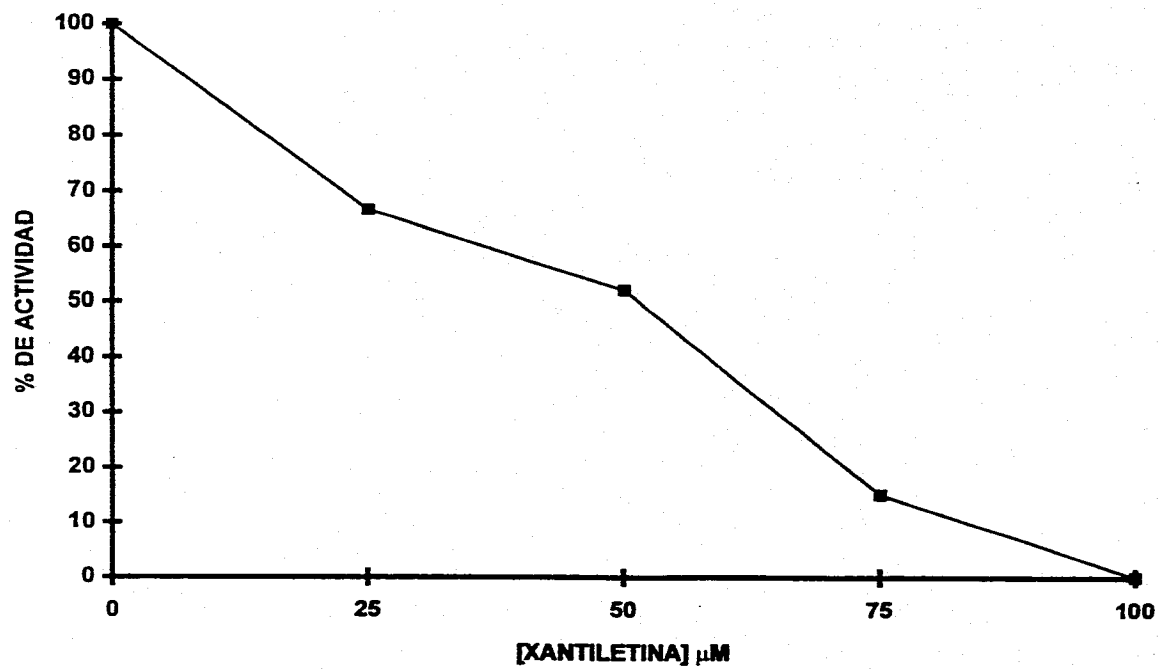


Figura 15. Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FSI de DCPIP_{red} a MV.



Gráfica 20. Efecto de la concentración de xantiletina (11) en el transporte de electrones en el FSI de DCPIP_{red} a MV.

V. Resultados y Discusión

Cuadro 16. Porcentaje de actividad del transporte de electrones desacoplado en el FSI de DCPIP_{red} a MV en presencia de xantiletina (11). La velocidad del control fue de 305.1 en $\mu\text{eq e}^- \text{hr}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$.

CONCENTRACIÓN (μM)	% DE ACTIVIDAD
0	100 \pm 0.0
25	66.6 \pm 2.2
50	50.0 \pm 1.3
75	15.0 \pm 4.1
100	0.0 \pm 0.0

Con el objeto de conocer el sitio de inhibición de la xantiletina (11) en el FSI, se determinó el efecto de este compuesto en la reacción parcial del flujo de electrones de PMS_{red} a MV. El ensayo se realizó en presencia de cloroplastos envenenados con KCN, el cual inhibe a nivel de PC e inactiva todo el FSII. Puesto que la PC se encuentra desactivada, se utilizó ascorbato para reducir al PMS, el cual actúa como un donador de electrones a nivel de P₇₀₀^{*} en el FSI. En ésta determinación se empleó MV como aceptor artificial de electrones (Figura 16).

En el Cuadro 17 se presentan los resultados obtenidos en este ensayo. Como puede observarse, al aumentar la concentración de xantiletina (11) no se produce ningún efecto en el flujo de electrones de PMS_{red} a MV, ya que las velocidades del flujo de electrones son cercanas a la velocidad del control. En consecuencia el compuesto (11) no ocasiona una inhibición en este tramo de la cadena redox. Sin embargo, la xantiletina (11) sí inhibe el flujo de electrones de DCPIP_{red} a MV (Figura 15). Este resultado es congruente con una inhibición a nivel de FSI, y más específicamente a nivel de las enzimas comprendidas entre PSII y/o PC.

V. Resultados y Discusión

El sitio de inhibición observado para la xantiletina (11), es similar al del DBMIB y al del 2-n-noil-4-hidroxiquinolina-N-óxido (NQNO) [Rich *et al.*, 1991].

Cuadro 17. Efecto de la concentración de xantiletina (11) en el transporte de electrones desacoplado del FSI de PMS_{red} a MV. La velocidad del control fue de 230.8 $\mu\text{eq e}^- \text{hr}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$.

CONCENTRACIÓN (μM)	% DE ACTIVIDAD
0	100 \pm 5.1
100	97.7 \pm 4.2
175	102.2 \pm 4.3

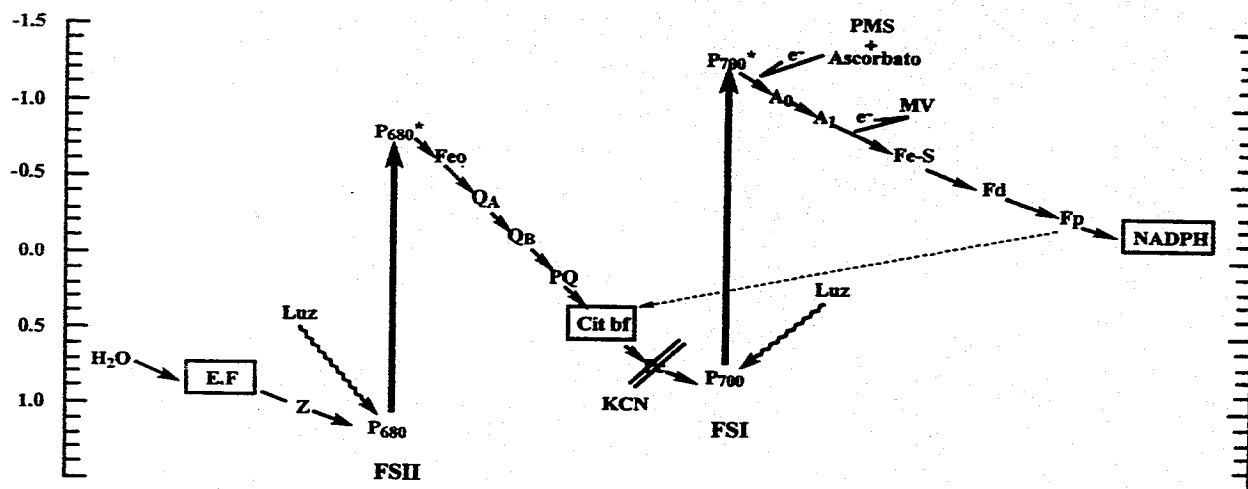


Figura 16. Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FSI de PMS_{red} a MV.

VI. CONCLUSIONES

VI. Conclusiones

La determinación cuantitativa de la actividad fitotóxica de los metabolitos aislados del extracto cloroformo-metanólico de las partes aéreas de la especie *Esenbeckia yaxhoob*, sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicum esculentum*, demostró que todos los compuestos presentaron una actividad fitoinhibidora significativa sobre una o más de las especies de prueba. Los compuestos más activos fueron la cumarina imperatorina (5) y el lignano asarinina (6). Estos resultados corroboraron que la especie *E. yaxhoob* constituye una fuente potencial de principios activos reguladores del crecimiento vegetal.

Las cumarinas imperatorina (5), chalepensina (10), xantiletina (11) y la 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina (12), afectaron una o más actividades fotosintéticas en experimentos *in vitro* realizados en cloroplastos aislados de espinacas. Así la imperatorina (5) actúa como un agente desacoplante, ya que inhibe la síntesis de ATP y activa los flujos de electrones basal y fosforilante. La estimulación inducida por esta cumarina sobre la actividad de la enzima H^+ -ATPasa, permitió proponer que el producto natural se comporta como un desacoplante clásico. La imperatorina (5) presentó una potencia como agente desacoplante mayor que la del NH_4Cl y CCCP, prototipos de los desacoplantes clásicos. La chalepensina (10) activó el transporte de electrones desacoplado. A bajas concentraciones inhibió los transportes de electrones basal y fosforilante, actuando como un inhibidor de la transducción de la energía o de la reacción de Hill. Por último, a concentraciones altas de la cumarina, se activó el transporte de electrones basal, indicando que desacopla la fotofosforilación. En síntesis la chalepensina (10) se caracterizó como un inhibidor de la transducción de energía a bajas concentraciones y como un desacoplante no clásico a altas concentraciones. La xantiletina (11) presentó un efecto inhibitorio sobre la síntesis de ATP y los transportes de electrones basal, fosforilante y desacoplado, por lo tanto esta cumarina actúa como un inhibidor de la reacción de Hill. El sitio de inhibición se localiza en el FSI a nivel del complejo $Citb_6/f$ y/o PC. La 3-(1',1'-dimetilalil)-

VI. Conclusiones

xantiletina (12) presentó un efecto inhibitor en la síntesis de ATP, activó los transportes de electrones basal y fosforilante e inhibió el transporte de electrones desacoplado, comportándose como un desacoplante potente y un inhibidor débil de la reacción de Hill. La 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina (12) se comporta como un agente desacoplante, similar al NH_4Cl , al CCCP, al dinitrofenol y a las cumarinas naturales 7-metoxi,5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina, 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina y 5-O- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina.

Este trabajo constituye la primera descripción del efecto de furano y pirano cumarinas sobre las reacciones luminosas de la fotosíntesis.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. Bibliografía

- Anaya, A. L.; Ramos, O. R.; Cruz, O. R. y Hernández, J. (1987). Studies on allelopathy in Mexico. En Waller, G. R. (ed.), *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry*. ACS, Symposium Series 330, 89-101, Washington.
- Anaya, A. L., Calera, M., Mata, R. y Pereda-Miranda R. (1990). Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology*, **16**, 2145-2152.
- Anaya, A. L.; Hernández, B. E.; Calera, M. R.; Torres, A.; Pelayo, H. y Fernández, E. (1995). A methodological model used in the search for allelopathic potential in some mexican plants. En Waller, G. R. y S. Narwal (Eds.). *Methodology for Allelopathy Research*. En prensa.
- Anderson, J. W. y Beardall, J. (1991). *Molecular Activities of Plant Cell. An Introduction to Plant Biochemistry*, 1ª ed., Blackwell Scientific Publications, USA.
- Antony, R. C (1966). Uptake of ammonium ion by chloroplasts, and its relation to photophosphorylations. *Biochemistry. Biophysical. Acta*. **24**, 725-773.
- Albores-Velasco, M.; Lotina-Henssen, B.; Zapien, G.; González, G. y Migueles, L. (1986). Structure-activity relationship studies of dibromo phenolic derivatives as photosynthetic electron chain inhibitors. *Pesticide Science* **17**, 396-402.
- Armstrong, F. B., (1989). *Biochemistry*, 3ª edición, Ed. Oxford University Press. 329-357, New York.
- Assche, C. J. (1978). *Advances on Pesticide Chemistry*, Part 3, Pergamon Press, Oxford, 1-9.

VII. Bibliografía

- Astier, Ch.; Boussac, A. y Eline A (1984). Evidence for different binding sites on 33-kDa protein for DCMU, atrazine and Q_B. *FEBS Letters* **167**, 321-326.
- Ashtong, F. M. y Grafts A. S. (1973). *Mode of action of Herbicides*, J. Willey Sons. New York., 504
- Avdus, L. J. (1985). *The Physiology and Biochemistry of Herbicides*, Academic Press. London, 1-20, 394-395.
- Avdus, L. J., (1976). *Herbicides Vol I*, Academic Press. New York, 668.
- Avron, M. y Shavit. N. (1955). Inhibitors and uncouplers of photophosphorylation. *Biochemistry. Biophysical. Acta.* **109**, 317-331.
- Baker, N. R. y Percival, M. P. (1991). *Herbicides*, Elsevier Science Publishers B. pp. 1-40.
- Barba-Behren, N.; Carrasco-Fuentes, M. E.; Castillo-Blum, S. E.; Mendoza, J. L.; Salazar, F.; Tobar, A.; Lotina-Hennsen, B.; Contreras, R. y Flores-Parra, A. (1993). Coordination compounds quinic acid as decouplers on photosynthesis. *Biochemistry. Biophysical.* **47**, 67-75.
- Baskin, J. M.;Lodlow, C. J.;Harris, T. M. y Wolf F. T.(1967). Psoralen and other linear furocoumarins as phytoalexins in celery. *Phytochemistry.* **6**,1209-1213
- Benner, J. P. (1993). Pesticidal compounds from higher plants. *Pesticide Science* **39**, 95-102.

VII. Bibliografía

Bennet, E. L. y Bonner, J. (1953). Isolation of plant growth inhibitor from *Thamnosia montana*. *American Journal Botany*. **40**, 23-33

Benz, R. y Mc Laughlin, S. (1983). *Biophysical Journal*. **41**, 381-398.

Bernal-Morales, E. L.; Romo de vivar, A.; Sánchez, B.; Aguilar, M. y Lotina-Hennsen, B. (1994). *Can. Journal. Botany*. **72**, 177.

Bose, P. K. (1958). On Some biochemical properties of natural coumarins. *Journal. Ind. Chem. Soc.* **35**, 367-375.

Bruntim, F. et. al., (1981). *Biochemistry* **20**, 6298-6305.

Calera, M. R.; Soto, F.; Sánchez, P.; Bye, R.; Hernández, B.; Anaya, A.L.; Lotina-Hennsen, B. and Mata, R. (1995). Biochemically active sesquiterpene Lactones from *Ratibida mexicana*. *Phytochemistry* **40**, 419-425.

Calera, M. R.; Mata, R.; Anaya, A. L. y Lotina-Hennsen, B. (1995). 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin an inhibitor of photophosphorylation in spinach chloroplasts. *Photosynthesis Research* **45**, 105-110.

Calera, M. R.; Lotina-Hennsen, B. ; Mata, R.; y Anaya, A. L. (1995). Uncoupling behavior on the 4-phenylcoumarins in spinach chloroplasts. *Agric. Food Chem.* en prensa.

Corbett, J. R., (1974). *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*, Academic Press, New York, pp. 330.

VII. Bibliografía

- Crofts, A. R. (1966). Uptake of ammonium ion by chloroplasts, and the mechanism of amine uncoupling. *Biochemical and Biophysical Acta. Research communications*. **24**, 127-134.
- Danks, S.; Evans, E. H. y Whittaker, P. (1983). *Photosynthetic System*. Ed. Willey and Sons, New York.
- Dimock, M. B.; Kennedy, G. G. y Williams, W. G. (1982). Toxicity studies of analogs of 2-tridecanone, a naturally occurring toxicant from a willi tomato. *Journal of Chemical Ecology* **8**, 837-842.
- Dilley, R. A. (1972) *Methods in Enzimology*. **24**, Ed. by Anthony San Pietro, Academic Press, pp. 68.
- Einhelling F. A. (1986). Mechanims and modes of action of allelochemicals. En: Putnam A. R. And Tang C. S. (Ed). *The Science of Allelopathy*, Willey-Interscience, USA, pp. 171-188.
- Einhelling F. A. (1995). Mechanims of action of allelochemicals In allelopathy. En: Inderjit, D. K. M. M. y Einhelling F. A. (Ed). *Allelopathy: Organims, Processes and Appilcations Vol. 582.*, American Chemical Society, Washington, D. C.
- Ellis, R. J. (1989). *Chloroplast Biogenesis*. Cambridge University Press, London.
- Fisher, N. (1991). Plant terpenoids as allelopathic agents. En: *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoides*. J. B. Harborne y F. A. Tomas-Barberan (Eds.). *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, Clarendon Press-Oxford, pp. 376-398.

VII. Bibliografía

- García, C. (1995). Potencial aleloquímico de *Stauranthus perforatus* (Rutaceae) "Tankas-chó". Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Garnot, R. (1979) *Studies about the mechanism of herbicidal interaction with photosystem II in isolated chloroplast.*
- Ghisalberti, E. (1993). Detection and isolation of Bioactive Natural Products en Bioactive Natural Products. *Detection, isolation and Structural Determination*. Colegate, S. Y Molyneux, R. Editores, CRC Press, U.S.A., pp 10-40.
- Glaquinia, R. T. y Dille, R. A. (1975). A partial reaction in PSII: reaction of silicomolibdate prior to the site of dichlorophenylidimethylure inhibition. *Biochemical and Biophysical Acta*. **387**, 228-305.
- Golbek, J. H. (1977). Electron transport in chloroplasts. *Encyclopedia of plant Physiology*, **5**, 94-115.
- Good, N. E. (1977). Uncoupled of electron transport from phosphorylation in Chloroplasts. *Encyclopedia of Plant Physiology*, **5**, 429-436.
- Gould, J. M. (1976). Inhibition by triphenyltin chloride of a tightly bound membrane component involved in photophosphorylation. *European Journal of Biochemistry*, **62**, 567-576.
- Gromet-Elhanan, Z. y Avron, M. (1963). *Biochemical and Biophysical Acta. Research communications*, **10**, 215. *Z Naturforsch* **34**, 1010-1014.
- Guillory, R. J. y Racker, E. (1965). *J Biol. Chem.*, **240**, 4822-4823.

VII. Bibliografía

- Hadacek, F.; Müller, C.; Werner, A. ; Greger, H. y Proksch, P. (1994). Analysis, isolation and insecticidal activity of linear furanocoumarins and other coumarin derivatives from *Peucedanum* (Apiaceae: Apioideae). *Journal of Chemical Ecology*, **20**, 2035-2055
- Heytler, P. G.; Prichard, W. W. (1962). A new class of uncoupling agents carbonyl cyanide phenylhydrazones. *Biochemical and Biophysical Research communications* **7**, 272-275.
- Heytler, P. G. (1963). Uncoupling of oxidative phosphorylation by carbonyl cyanide phenylhydrazones I. Some characteristics of *m*-Cl-CCP action on mitochondria and chloroplasts. *Biochemistry* **2**, 357-361.
- Hiller, R. G. y Goodchild, D. J. (1981). Thylakoid membrane and pigment organization. En: FALTA (Ed). *The Biochemistry of plants Vol. 8*, Academic Press. New York. pp. 1-49.
- Hooper, J. K. (1984). *Chloroplasts*, Ed. Plenum Press. New York, pp. 47-61.
- Hurt, E. y Hauska, G. (1981). A cytochrome *f/b₆* complex of five polypeptides with plastoquinol-plastocyanin-oxidoreductase activity from spinach chloroplasts. *European Journal of Biochemistry* **117**, 591-599.
- Izawa, S. (1977). Inhibitors of electron transport. *Encyclopedia of Plant Physiology*, New series **5**, 226-282.
- Izawa, S. y Good N.E (1983). Inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation. *Methods Enzymology* **24**, 355-377.
- Izawa, S. y Ort, D.R. (1974). *Biochemical and Biophysical Acta* **357**, 127.

VII. Bibliografía

Izawa, S. y Pan, R. L. (1978). *Biochemical and Biophysical Research communications*, **83**, 1171.

Ketcham, S. R. (1984). *Journal of Biological Chemistry*, **259**, 7286-7293.

Leather, G. R. y Einhellig, F. A. (1988). Bioassay of naturally occurring allelochemicals for phytotoxicity. *Journal of Chemical Ecology*, **14**, 1821-1827.

Lehninger A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. (1993). *Principles of Biochemistry*, Ed. Worth, 2ª de., New York.

Lotina-Hennsen, B.; King B.; Albores, M. y Pozas, R. (1987). Uncoupling of photophosphorylation by nitrogenous bases. No correlation of uncoupling with pK_b and partition coefficient. *Photochemistry and photobiology* **46**, 287-293.

Lotina-Hennsen, B.; García, A.; Aguilar, M. And Albores, M (1987). *Z. Naturforsch* **42**, 1265-1268.

Lotina-Hennsen, B.; Bernal-Morales, E. L.; Jimenez, M. y Aguilar, M.(1991). Inhibition of oxygen evolution by cacalol and its derivatives. *Z. Naturforsch* **46**, 777-780.

Lotina-Hennsen, B.; Roque-Reséndiz, E. Romo de vivar, A.; Pérez, A. L.; y Aguilar, M.(1992). *Journal of Chemical Ecology* **18**, 1891.

Macías, F. A.; Galindo, J. C.; Massanet, G. M.; Rodríguez, F. y Zubla, E. (1993). Allelochemicals from *Pilocarpus goudotianus* leaves. *Journal of Chemical Ecology* **19**, 1371-1379.

VII. Bibliografía

- Mahler, H. R. y Cordes, E. H. (1966). *Biological Chemistry* 1ª Ed., Harper and Row, New York.
- McCarty, R. E. (1977). Energy transfer inhibitors of photophosphorilation in chloroplastos. *Enciclopedia of plant physiology* 5, New series, pp. 436-447.
- McCarty, R. E. y Racker, E. (1967) . *Journal of Biological Chemistry* **242**, 3434-3439.
- McCarty, R. E.; Guillory, R.J. y Racker, E. (1965) Dio-9, an inhibitor of coupled electron transport and phosphorylation in choroplasts. *Journal of Chemical Ecology* **240**,4822-4823.
- Melandri, B. et. al. (1975). *Biochemistry and Biophysical Acta* **376**, 72-81.
- Mendoza, J. L., Jimenéz, M. And Lotina-Hennsen, B. (1994). Piquerol A and diacetyl piquero act as energy transfer inhibitors of photosynthesis. *Pesticides Science* **40**, 37-40.
- Merhant, S. y Selman, B. R. (1983). Identification of the a y b subunits of the chloroplasts coupling factor one in Chlamidomonas reinhardil. *European Journal. Biochemistry.* **137**, 373-376.
- Mersle, w. Y Singh, M. (1993). Phenolic acids sfect photosynthesis and protein synthesis by isolated leaf cell of velvet-leaf. *Journal Chemistry Ecology* **19**, 1293-1301.
- Mills, J. D.; Mitchell, P. y Schurmann, P. (1980). Modulation of couplin ATPasa activity in chloroplast. *FEBS Letters* **112**, 173-177.

VII. Bibliografía

- Mitchel, P. (1977). A Comentary on alternative hipoteses of protonic couplin in the membrane system catalysis oxidative and photosynthetic phosphorylation. *FEBS Letters* **78**, 1-20.
- Moreland, D. E. (1967). Mechanims of action of herbicides Ann. Rev. *Plant Physiology* **18**, 365.
- Moreland, D. E. (1980). Mechanims of action of herbicides. Ann. Rev. *Plant Physiology* **31**, 597-638.
- Moreland, D. E. y Novitzky W. P. (1987). Effets of phenolic acids, coumarins, and flavonoids on isolated chloroplasts and mitochondria. En: Waller, G. R. Ed. *Allelochemicals: Role in agriculture and Forestry*, Vol. **330**, 247-261, American Chemical Society, Washington, D. C.
- Murray, R: D: H y Brown, S. A. (1981). Coumarins. En: Conn E. E. Ed. *The Biochemistry of plants* Vol. **7**, 269-299 Academic Press. New York.
- Murray, R. O.; Méndez, J. y Brown, S. (1982). *The Natural Coumarins: Ocurrence, Chemistry and Biochemistry*. John Wiley and Sons LTD, Paye Bros, Norwich.
- Murray, R. D. H, (1991). Naturally occurring plant coumarins. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **58**, 83-322.
- Nelson, N. (1981). *Current Topics in Bioenergetics* Vol. II, Academic Press. Inc. pp.1-33
- Neuman, J yJagendoft, A. T. (1964). Dinitrophenol as an uncoupler photosynthetic phosphorylation. *Biochemical and Biophysiscal Research communications.*, **16**, 562-567.

VII. Bibliografía

- Nicholls, D. G. y Ferguson S. J. (1982). *Bioenergetics*. Ed. Academic Press. San Diego, pp. 41-62.
- Outtrakul, R. And Isawa, S., (1973). Electron transport and photophosphorylation in chloroplasts as a function of the electron acceptor *Biochemical and Biophysical Acta* **305**, 105-118.
- Peña-Valdivia, C.B.; Rodríguez-Flores, L.; Tuena de Gómez-Puyou, M. y Lotina-Hennsen, B. (1991). Inhibition of photophosphorylation and electron transport by *N,N*-dimethylformamide. *Biophysical Chemical* **41**, 169-174.
- Pillmoor, J. B.; Wright, K. y Terr, S. A. (1993). Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. *Pesticide Science* **39**, 131-140.
- Rice, E. L. (1984). *Allelopathy*. 2ª Ed. Academic Press. New York USA., pp. 442.
- Rich, P.R.; Madywick, S. A. ; Moos, D. A. (1991) The interactions of duroquinol, DBMIB and NQNO with the chloroplast cytochrome *b_f* complex. *Biochimica et Biophysica Acta* **1058**, 312-328.
- Rodgers, B. P. (1993). Potential of biopesticides in agriculture. *Pesticide Science* **39**, 117-129.
- Rodighiero, G.; Musajo, Y.; Dall'acqua, F.; Marclani, S.; Caporale, G. y Ciavatta, L. (1970). Mechanism of skin photosensitization by furocoumarins: photoreactivity of various furocoumarins with native DNA and ribosomal RNA. *Biochimica and Biophysical Acta* **217**, 40-49.

VII. Bibliografía

- Rojas, I. S. (1996). Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios fitotóxicos de la especie *Esonbockia yaxhoob* Lundell (Rutaceae). Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Sánchez, P. (1996). Compuestos bioactivos de las raíces de *Stauranthus perforatus* Liebm. (Rutaceae). Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Shimomura, H.; Sashida, Y.; Nakata, H.; Kawasaki, J. y Ito, Y. (1982). plant growth regulators from *Heracleum lanatum*. *Phytochemistry*. 21, 2213-2215.
- Strain, H. H.; Cuppe, B. T. y Suec, W. A. (1971). Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls. En: *Methods in Enzymology* Vol. 23, Academic Press, New York, pp. 452-466.
- Sumer, S. (1974). Scientific apparatus and laboratory methods for the colorimetric determination of phosphorous. *Science* 100, 413-415.
- Terada, H. (1990) *Environmental Health Perspectives Biochemistry* 87, 213-218.
- Terada, H. (1981) *Biochemical and Biophysical Acta* 639, 225.
- Trebst, A. (1972). Measurement of Hill reactions and photoreduction. *Methods in Enzymology* 24, 146-165.
- Trebst, A.; Avron, M.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, N. Y. (1977). *Encyclopedia of plant Physiology* Vol. 5 266-279.

VII. Bibliografía

- Trebst, A. y Draber (1978) Structure activity correlations of recent herbicides in photosynthetic reactions. *Advances in pesticide science* Vol. 2 (Ed.), Geissbühtr, H. Brooks G.T. y Kearney P:C. pp. 223-234.
- Van Sumere, C. F.; Cottenie, J.; De Greef, J. y Kint, J. (1972). Biochemical studies in relation to the possible germination regulatory role of naturally occurring coumarins and phenolics. *Recent Advances in Phytochemistry* 4, 165-221.
- Vermeglio, A.; Galmiche, J. M y Girault, G. (1984). Mode of action of the ATPase inhibitor tri-*n*-buty-tin in *Rhodospseudomonas sphaeroides* cell. En: Sybesma, C. (Ed.). *Advances in Photosynthesis Research*. Nijhoff, M.I Junk, W. Netherlands.,611-614.
- Veron, L. P. y Shaw, E. R. (1969). Photoreduction of 2,4-dichlorophenolindophenol by Diphenylcarbazine: a photosystem 2 Reaction Catalized by Tris-Washed Chloroplast Fragments. *Plant Physiology* 44, 1645-1649.
- Williams, W. G.; Kennedy, G. G.; Yamamoto, R. T.; Thacker, J. D. y Bordner, J. (1980). 2-tridecanone: a naturally occurring insecticide from the wild tomato *Lycopersicum hirsutum* f. *glabratum*. *Science* 207, 888-9 y referencias ahí citadas.
- Williams, W. G.; Kennedy, G. G.; Yamamoto, R. T.; Thacker, J. D. y Bordner, J. (1980). 2-tridecanone: a naturally occurring insecticide from the wild tomato *Lycopersicum hirsutum* f. *glabratum*. *Science* 207, 888-9.
- Williams, P. D. y Hoagland, R. E. (1982).The effect of natural occurring phenolic compounds on seed germination. *Weed Science*. 30, 206-212.

VII. Bibliografia

Yoshikawa, M.; Uchida, E.; Chatain, N.; Kobayashi, H.; Natitoh, Y., Okuno, Y.; Matsuda, H.; Yamahra, J. y Murakami, N. (1992). Thuberignols C, D, and E, new antiallergenic and antimicrobial dihydroisocoumarins, and thunberignol G 3'-O-glucosyde and (-)-hydrangenol 4'-O-glicosyde, new dihydroisocoumarin glicosides, from *Hydragea dulcis-folium*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **40**, 3352-3354.

Zweig, G.; Shavit, N. Y Avron, M., (1965) *Biochemical and Biophysical Acta* **109**, 332.