

00581

2Ej



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL MODO
DE ACCIÓN EN LA FOTOSÍNTESIS DE
METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE
LAS FAMILIAS MELIACEAE Y
CONVOLVULACEAE CON POSIBLE ACTIVIDAD
HERBICIDA*

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS QUÍMICAS
(B I O Q U Í M I C A)

P R E S E N T A:

M. en C. LAHOUCINE | ACHNINE LAMTI



MÉXICO, D.F.

1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

275052



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Resumen de la tesis doctoral en Ciencias Químicas (Bioquímica)
del M. en C. Lahoucine Achnine**

Título: "CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL MODO DE ACCIÓN EN LA FOTOSÍNTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE LAS FAMILIAS MELIACEAE Y CONVULVULACEAE CON POSIBLE ACTIVIDAD HERBICIDA"

Se determinó el efecto de algunos metabolitos secundarios aislados de *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae), *Cedrela odorata* y *Guarea grandiflora* (Meliaceae) sobre la fotosíntesis. Dado que una gran parte de los herbicidas comerciales ejercen su efecto inhibitorio sobre los procesos fotosintéticos de la fase luminosa, se puede derivar de esta tesis la posible utilización de estos metabolitos como herbicidas biodegradables.

La 7-oxo-7-deactoxigedunina (OGD), un limonoide aislado de *G. grandiflora*, se encontró como inhibidor de la transferencia de energía con el sitio de inhibición localizado a nivel del C_Fo de la H⁺-ATPasa cloroplástica. El carbonilo de la molécula fue de gran importancia para la actividad detectada y que no posee dicho grupo, fue menos activa que la OGD.

El odoratol, un protolimonoide aislado de *C. odorata*, inhibió el desprendimiento del oxígeno a la concentración de 150 μM. El sitio de inhibición del odoratol es la enzima de la fotólisis del agua. El estudio comparativo de la fluorescencia de la clorofila *a*, como indicador sobre el estado del fotosistema II, en presencia del odoratol y en cloroplastos tratados con Tris confirmó dicha inhibición. El diol en la posición 23/24 es un importante requerimiento estructural para la inhibición observada.

De *I. tricolor* fue aislada la tricolorina A, un tetrasacárido del ácido jalapínico con una estructura macrolactónica. Las bajas concentraciones (< 2μM) causaron el desacoplamiento de la fotofosforilación. A concentraciones mayores a 2μM, la tricolorina A inhibe el transporte de electrones entre Q_A y Q_B, lo cual fue comprobado usando la técnica de la fluorescencia de la clorofila *a*. La estructura macrolactónica de la tricolorina A es un importante requerimiento estructural en vista de que su hidrólisis causa la pérdida del potencial inhibitorio.

Se concluye que los compuestos naturales estudiados podrían ser de gran importancia en las interacciones alelopáticas de las especies elegidas. La OGD es un compuesto de interés teórico para el estudio de nuevo(s) sitio(s) de unión en el C_Fo. La tricolorina A y el odoratol pueden ser utilizados para el desarrollo de nuevos herbicidas biodegradables.

Resumen en Inglés de la tesis doctoral en Ciencias Químicas (Bioquímica)
del M. en C. Lahoucine Achnine

Título: "CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL MODO DE ACCIÓN EN LA FOTOSÍNTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE LAS FAMILIAS MELIACEAE Y CONVULVULACEAE CON POSIBLE ACTIVIDAD HERBICIDA"

In this Ph.D. thesis, we characterized the effect of naturally occurring secondary metabolites of *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae), *Cedrela odorata* L. and *Guarea grandiflora* A. P. de Candolle (Meliaceae) on several photosynthetic reactions of isolated spinach chloroplasts. The photosynthetic activities studied included ATP synthesis, proton uptake, Mg^{2+} dependent ATPase activity, electron transports (basal, phosphorylating and uncoupled), transmembranal ΔpH and variable fluorescence of chlorophyll *a* (Chl. *a*) of photosystem II (PSII) reaction center.

7-oxo-7-deacetoxygedunin (OGD), a limonoid isolated from *G. grandiflora* has been found to act as an inhibitor of photophosphorylation in spinach thylakoids. ATP synthesis and phosphorylating electron flows were inhibited by 88 and 83 %, respectively at 300 μM of OGD without affecting proton uptake, basal and uncoupled electron transports. The C-7 ketone group of OGD is an essential structural requirement for the displayed inhibitory activity on chloroplast H^+ -ATPase, since gedunin possessing a 7 α -acetoxy group behaved as a less potent energy transfer inhibitor. The light-activated membrane bound Mg^{2+} -ATPase of the isolated coupling factor were insensitive to OGD. Kinetic studies on CF₀ showed that OGD has a competitive kinetic behavior with 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin, but a non-competitive kinetic with DCCD. Thus, OGD and the 4-phenylcoumarin have the same surrounding site of inhibition in CF₀.

Odorato, a protolimonoid isolated from *C. odorata* and two of its derivatives were tested on different photosynthetic reactions. Odorato behaved as an inhibitor (150 μM) of oxygen evolution: (a) PSI activity is unaffected by odorato, (b) there is a substantial inhibition of the electron flow of uncoupled PSII as measured from water to silicomolibdate or diaminodurene; and (c) the electron flow from diphenyl carbazide to dichlorophenolindophenol of Tris-washed chloroplasts was insensitive. Thus, the site of action of odorato was located at the donor side of PS II. Comparison of Chl. *a* fluorescence induction curves of chloroplasts with authenticated donor side damage (Tris or hydroxylamine washes) and those obtained from odorato-treated samples further supported this interpretation. The diol moiety at positions C-23 and C-24 of the side chain is an important structural requirement for the inhibitory activity displayed by odorato.

Tricolorin A, (11 *S*)-11-hydroxyhexadecanoic acid 11-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-{2-*O*-(2*S*-methylbutanoyl)-4-*O*-(2*S*-methylbutanoyl)}-rhamnopyranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopyranosil-(1 \rightarrow 2)- β -fucopyranoside-(1,3"-lactone), the major phyto-growth inhibitor isolated from *I. tricolor* was found to be a potent uncoupler ($U_{50} = 0.33 \mu M$) of photophosphorylation in spinach chloroplasts. Using a combination of two well-known fluorescent ΔpH probes, 9-aminoacridine and 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine, the uncoupling behavior of tricolorin A was also demonstrated for submitochondrial particles. At high concentrations (20 μM), tricolorin A inhibited PSII electron flow at the level of Q_B . Chl. *a* fluorescence analysis showed that tricolorin A induced accumulation of Q_A^- and promoted a strong decrement of the electron transport capacity, suggesting that the target of this molecule was located at the Q_B level. The macrocyclic lactone-type structure of this allelopathic agent was proved to be an important structural requirement for uncoupling activity since its hydrolysis caused loss of the inhibitory potential.

It is concluded that the selected secondary metabolites from Meliaceae and Convolvulaceae families possess different targets and mechanism of actions on the photosynthetic light reactions of isolated spinach chloroplasts. This behavior might be of importance in the contribution to the allelopathic interactions of the mentioned species by possible interference with the photosynthetic metabolism of susceptible species. The fact that odorato and tricolorin A displayed a significant interference with the photosynthetic metabolism indicated that both compounds could be used as candidates for development as new herbicides. Meanwhile, OGD turns out to be a useful tool to further explore other possible binding sites of the CF₀ inhibitors. Finally, the use of PEA (Plant Efficiency Analyzer) fluorescence technique probably could have a great potential to screen large varieties of synthetic and natural compounds with herbicide action as agrochemicals.

Drante el desarrollo de esta tesis se recibió una beca de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la Universidad nacional Autónoma de México, así como un apoyo de PADEP-UNAM a tesis doctorales (no. de los proyectos 005341 y 202335), sin los cuales la presente investigación no hubiera sido posible.

JURADO

Presidente	Dr. Armando Gómez Puyou
Primer Vocal	Dr. Roberto Iglesias Prieto
Segundo Vocal	Dr. Heliodoro Celis Sandoval
Tercer Vocal	Dr. Guillermo Delgado Lamas
Secretario	Dra. Marina Gavilanes Ruiz
Primer Suplente	Dr. Javier Plascencia de la Parra
Segundo Suplente	Dra. Ana Luisa Anaya Lang

Este trabajo se realizó en el Laboratorio del Dr. Blas Lotina Hennsen del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM; en el Laboratorio de la Dra. Rachel Mata Essayag del Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM; en el Laboratorio del Dr. Rogelio Pereda Miranda del Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM; en el Laboratorio del Dr. Roberto Iglesias Prieto de la Estación de Investigaciones Marinas "Puerto Morelos", Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM y en el Laboratorio del Dr. Rafael Moreno Sánchez del Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

Sustentante:

Lahoucine Achnine

Aseasor:

Dr. Blas Lotina Hennsen

Co-Asesor:

Dra. Rachel Mata Essayag

INDICE

I. RESUMEN.....	iv
II. ABSTRACT.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y ESPECTROS.....	xv
III. INTRODUCCION.....	1
3.1 FOTOSÍNTESIS.....	1
3.1.1 Eventos fotosintéticos de la fase luminosa.....	3
3.1.1.1 Centros de reacción.....	5
3.1.1.2 Transporte de electrones fotosintético y sus inhibidores.....	5
3.1.2 Fotofosforilación.....	13
3.1.3 Fluorescencia de la clorofila <i>a</i> del centro de reacción del FS II.....	18
3.1.4 Eventos asociados con la fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	20
3.2 EFECTO DE COMPUESTOS NATURALES SOBRE LA FOTOSÍNTESIS.....	22
3.3 ANTECEDENTES DE LAS FUENTES NATURALES DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS ANALIZADOS EN EL PRESENTE TRABAJO.....	28
3.3.1 <i>Ipomoea tricolor</i> (Convolvulaceae).....	28
3.3.2 <i>Cedrela odorata</i> y <i>Guarea grandiflora</i> (Meliaceae).....	32

3.3.2.1 Generalidades sobre los limonoides.....	32
3.3.2.2 <i>Cedrela odorata</i> (Meliaceae).....	36
3.3.2.3 <i>Guarea grandiflora</i> (Meliaceae).....	38
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	42
V. OBJETIVOS.....	46
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	46
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	46
VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	48
6.1 Obtención de cloroplastos.....	48
6.2 Determinación de clorofila.....	48
6.3 Evaluación de la síntesis de ATP.....	49
6.4 Medición de la síntesis de ATP por el método de "ATP Trap".....	50
6.5 Captación de protones.....	51
6.6 Determinación de la velocidad de transporte de electrones de la cadena redox tilacoidal.....	51
6.6.1 Reacciones parciales de los fotosistemas I y II.....	52
6.6.1.1 Fotosistema I.....	52
6.6.1.2 Fotosistema II.....	53
6.7 Determinación de la actividad de la Mg ²⁺ -ATPasa.....	54
6.7.1 Hidrólisis de ATP.....	54
6.7.2 Cuantificación de la concentración de fosfatos.....	55
6.8 Medición de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	55

6.9 Cinéticas de competencia de la 7-oxo-7-deaceoxigedunina.....	56
6.10 Determinación del ΔpH transmembranal.....	57
6.11 Obtención y caracterización de los compuestos naturales y algunos de sus derivados.....	58
6.11.1 Obtención del odoratol.....	58
6.11.2 Obtención del triacetil odoratol y del acetónido del odoratol.....	58
6.11.3 Obtención de la GD y la OGD.....	58
6.11.4 Obtención de la tricolorina A.....	59
6.11.5 Caracterización de los compuestos aislados y sus derivados.....	60
VII. RESULTADOS (Trabajos 1, 2 y 3).....	61
VIII. DISCUSION.....	62
8.1 Efecto de la 7-oxo--7-deacetoxigedunina sobre la ATPasa del cloroplasto.....	63
8.2 Efecto del odoratol sobre el lado donador del fotosistema II.....	67
8.3 Efecto de la tricolorina A sobre el lado aceptor del fotosistema II.....	70
IX. CONCLUSIONES.....	76
X. PERSPECTIVAS.....	78
XI. BIBLIOGRAFIA.....	80
APENDICE I.....	100
APENDICE II.....	103
APENDICE III.....	107
APENDICE IV.....	109

I. RESUMEN

El objetivo principal de la presente disertación doctoral fue la determinación del efecto de algunas fitotoxinas aisladas de *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae), *Cedrela odorata* L. y *Guarea grandiflora* L. (Meliaceae) sobre las reacciones involucradas en la fotosíntesis (fase luminosa), como un posible blanco de acción biológica de estos metabolitos y, de esta manera, lograr una mejor comprensión de sus efectos como agentes aleloquímicos. Considerando que el efecto de la mayor parte de los herbicidas comerciales es una consecuencia de la alteración de los procesos fotosintéticos de la fase luminosa, es posible extrapolar, como una conclusión derivada de la presente investigación, el potencial de aplicación agroquímico de los aleloquímicos evaluados, es decir, como agentes herbicidas naturales biodegradables.

Las actividades fotosintéticas estudiadas utilizando como modelos experimentales *in vitro* a los cloroplastos, aislados de las hojas de espinaca (*Spinacea oleracea* L.) fueron la síntesis de ATP, la captación de protones, los transportes de electrones (basal, fosforilante y desacoplado), la Mg^{2+} -ATPasa y la fluorescencia de la clorofila *a* del centro de reacción del fotosistema II.

La 7-oxo-7-deacetoxigedunina (OGD), un limonoide aislado de *G. grandiflora*, se comportó como un inhibidor de la transferencia de energía. El sitio de inhibición se localizó a nivel del CFo de la H^+ -ATPasa cloroplástica. Al

parecer, la presencia de un grupo carbonilo en la porción C-7 del núcleo limonoide de esta molécula es de gran importancia para la actividad inhibidora para OGD ya que al compararse con la gedunina, producto natural de estructura homóloga a OGD y desprovista de dicho grupo funcional, fue menor que la desarrollada por el compuesto de prueba. Los estudios cinéticos demostraron que la OGD y el DCCD no compiten en el sitio de inhibición, mientras que los productos naturales OGD y la 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina mostraron una cinética competitiva por el mismo sitio de inhibición. Las K_i calculadas para OGD, 4-fenilcumarina y DCCD fueron 146, 220 y 10 μ M.

El odoratol, un protolimonoide natural, aislado de *Cedrela odorata* inhibió el desprendimiento del oxígeno a una concentración de 150 μ M. Los análisis polarográficos de las reacciones parciales redox de la fotosíntesis indicaron que la actividad del fotosistema I no se afecta por este agente alelopático. Se demostró la existencia de una notable inhibición del fotosistema II, medido de agua a silicomolibdato (o diaminodureno), por este producto natural, en tanto que el flujo de electrones del difenilcarbazida al diclorofenolindofenol de los cloroplastos lavados con Tris fue insensible al odoratol. Estos datos sugieren que el sitio de inhibición del odoratol corresponde a la enzima responsable de la fotólisis del agua. El estudio comparativo de los patrones de fluorescencia de la clorofila *a* de cloroplastos tratados con Tris (o hidroxilamina) y los patrones de

fluorescencia obtenidos por incubación de los cloroplastos con el odoratol, confirmó dicha inhibición. Al parecer, los análisis estructura química-actividad demostraron que el diol en las posiciones C-23/C-24 representa un importante requerimiento para el efecto inhibitor observado.

La tricolorina A, 11-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O- α -L-(2-O-[(2S)-2-metilbutanoil]-4-O-[(2S)-2-metilbutanoil])-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico (1,3"-lactona), representa el constituyente mayoritario de las resinas glicosídicas de *Ipomoea tricolor*. Concentraciones bajas de este agente alelopático ($U_{50} = 0.33 \mu\text{M}$) provocaron el desacoplamiento de la fotofosforilación. Este efecto desacoplante se comprobó para las partículas submitocondriales usando la combinación de dos agentes fluoróforos, la 9-aminoacridina y la 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina. La tricolorina A inhibe el transporte de electrones a nivel de Q_B cuando se utilizan altas concentraciones de este aleloquímico ($20 \mu\text{M}$). Los análisis de los patrones de la fluorescencia de la clorofila *a* confirmaron que la tricolorina A induce una acumulación de Q_A^- de la misma forma que el DCMU, utilizado como control positivo. La estructura macrolactónica de este agente alelopático constituye un rasgo de gran importancia para su efecto inhibitor, en vista de que la hidrólisis del éster lactónico ocasiona la pérdida del potencial inhibitor.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo

permitieron concluir que los metabolitos secundarios evaluados pueden desempeñar un papel importante en las interacciones alelopáticas de las especies de convolvuláceas y meliáceas elegidas debido a su interferencia con el metabolismo fotosintético de las plantas arvenses. Sin embargo, estos compuestos pueden interferir, de manera alternativa, a otros niveles del metabolismo vegetal. La gedunina respresenta un compuesto de interés teórico para el estudio de nuevos sitios de unión en el CFo. El odoratol y la tricolorina A constituyen modelos estructurales que pueden ser utilizados para el desarrollo de nuevos herbicidas "verdes". Por último, la presente disertación demostró el uso potencial de la técnica de la PEA fluorescencia de la clorofila *a* como una herramienta provechosa y sumamente informativa para la selección de compuestos con una posible actividad herbicida de aplicación agroquímica.

II. ABSTRACT

In this Ph.D. thesis, we characterized the effect of naturally occurring secondary metabolites of *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae), *Cedrela odorata* L. and *Guarea grandiflora* L. (Meliaceae) on several photosynthetic reactions of isolated spinach chloroplasts. The photosynthetic activities studied included ATP synthesis, proton uptake, Mg^{2+} dependent ATPase activity, electron transports (basal, phosphorylating and uncoupled) and variable fluorescence of chlorophyll *a* of photosystem II reaction center.

7-oxo-7-deacetoxygedunin (OGD), a limonoid isolated from *Guarea grandiflora* has been found to act as an inhibitor of photophosphorylation in spinach thylakoids. ATP synthesis and phosphorylating electron flows were inhibited by 88 and 83 %, respectively at 300 μ M of OGD without affecting proton uptake, basal and uncoupled electron transports. The C-7 ketone group of OGD is an essential structural requirement for the displayed inhibitory activity on chloroplast H^+ -ATPase, since gedunin possessing a 7α -acetoxy group responded as a less potent energy transfer inhibitor. The light-activated membrane bound Mg^{2+} -ATPase of the isolated coupling factor were insensitive to OGD. Kinetic studies showed that OGD has a competitive kinetic behavior with 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin, a natural occurring CFo inhibitor isolated from *Exostema caribaeum*, when they

inhibit the H⁺-ATPase activity, but a non-competitive kinetic with DCCD. These results suggested that OGD and the 4-phenylcoumarin have the same surrounding site of inhibition in CF₀. K_is for OGD, 4-phenylcoumarin and DCCD were 146, 220 and 10 μM, respectively.

Odoritol, a natural protolimonoid isolated from *Cedrela odorata* and two of its derivatives were tested on different photosynthetic reactions of isolated spinach chloroplasts. This natural product behaved as an inhibitor (150 μM) of oxygen evolution. Polarographic analyses of the photosynthetic partial redox reactions indicated that: (a) PS I activity is unaffected by odoritol, (b) there is a substantial inhibition of the electron flow of uncoupled PS II as measured from water to silicomolibdate or diaminodurene; and (c) the electron flow from diphenyl carbazide to dichlorophenolindophenol of Tris-washed chloroplasts was insensitive. Collectively, these data suggested that the site of action of odoritol was located at the donor side of PS II. Comparison of chlorophyll *a* fluorescence induction curves of chloroplasts with authenticated donor side damage (Tris or hydroxylamine washes) and those obtained from odoritol-treated samples further supported this interpretation. Comparative analyses using odoritol derivatives indicate that the diol moiety at positions C-23 and C-24 of the side chain is an important structural requirement for the inhibitory activity displayed by odoritol.

Tricolorin A, (11 S)-11-hydroxyhexadecanoic acid 11-O-α-L-

rhamnopyranosyl-(1→3)-O-α-L-{2-O-(2S-methylbutanoyl)-4-O-(2S-methylbutanoyl)}-rhamnopyranosil-(1→2)-O-β-D-glucopyranosil-(1→2)-β-fucopyranoside-(1,3"-lactone), the major phyto-growth inhibitor isolated from *Ipomoea tricolor* was found to be a potent uncoupler ($U_{50} = 0.33 \mu\text{M}$) of photophosphorylation in spinach chloroplasts. Tricolorin A inhibited H^+ -uptake and ATP synthesis, and stimulated basal and phosphorylating electron flows. Using a combination of two well-known fluorescent ΔpH probes, 9-aminoacridine and 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine, the uncoupling behavior of tricolorin A was also demonstrated for submitochondrial particles. Polarographic data showed that high concentrations ($20 \mu\text{M}$) of tricolorin A inhibited photosystem II electron flow at the level of Q_B . Chlorophyll *a* fluorescence analysis showed that tricolorin A induced accumulation of Q_A^- and promoted a strong decrement of the electron transport capacity, suggesting that the target of this molecule was located at the Q_B level. The macrocyclic lactone-type structure of this allelopathic agent was proved to be an important structural requirement for uncoupling activity since its hydrolysis caused loss of the inhibitory potential.

It is concluded that the selected secondary metabolites from Meliaceae and Convolvulaceae families possess different targets and mechanism of actions on the photosynthetic light reactions of isolated spinach chloroplasts. This behavior might be of importance in the contribution to the allelopathic interactions of the

mentioned species by possible interference with the photosynthetic metabolism of susceptible species. It is not excluded that these compounds could interfere at other metabolic levels. The fact that odoratol and tricolorin A displayed a significant interference with the photosynthetic metabolism, by inhibiting photosystem II donor and acceptor sides, respectively, indicated that both compounds could be used as candidates for further development as new herbicides. Meanwhile, gedunin turns out to be a useful tool to further explore other possible binding sites of the Cfo inhibitors. Finally, the use of PEA (Plant Efficiency Analyzer) fluorescence technique probably could have a great potential to screen large varieties of synthetic and natural compounds with herbicide action as agrochemicals.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosindifosfato
CCF	Cromatografía de capa fina
ATP	Adenosintrifosfato
CCCP	Carbonil cianuro 3-cloro fenilhidrazona
CH ₃ Cl	Cloroformo
CF ₀	Parte lipofílica de la H ⁺ -ATPasa del cloroplasto
CF ₁	Parte hidrofílica de la H ⁺ -ATPasa del cloroplasto
Chl.	Clorofila
CO ₂	Dióxido de carbono
DAD	Diaminodureno
DBMIB	Dibromometilisopropil- <i>p</i> -benzoquinona
DCCD	<i>N,N</i> -d ciclohexilcarbodiimida
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetil urea
DCPIP	Diclorofenil-indofenol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNP	Dinitrofenol
DPC	1,5-difenilcarbazida
EDTA	Acido etilendiamintetraacético
EtOH	Etanol

FCCP	Carbonil <i>p</i> -trifluorometoxi fenilhidrazona
FeCN	Ferricianuro de potasio
FSI	Fotosistema I
FSII	Fotosistema II
GD	Gedunina
G6P-DH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
H ⁺ -ATPasa	Complejo enzimático encargado de sintetizar ATP
HEPES	Acido N-hidroxietilpiperizina-N-2-etanosulfónico
HK	Hexocinasa
iba	2-metilpropanoilo
KCl	Cloruro de potasio
KCN	Cianuro de potasio
mba	2-metilbutanoilo
MeOH	Metanol
MES	Acido 2(N-morfolino)etano sulfónico
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MV	Metilviológeno
NADP ⁺	fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado
NADPH	fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
nla	3-hidroxi-2-metilbutanoil
OGD	7-oxo-7-deacetoxigedunina

Pi	fosfato inorgánico
PQ	Poza de plastoquinonas oxidada
PQH ₂	Poza de plastoquinonas reducida
P ₆₈₀	Clorofila <i>a</i> del centro de reacción del FS II
P ₆₈₀ ⁺	Clorofila <i>a</i> del centro de reacción del FS II oxidada
P ₇₀₀	Clorofila <i>a</i> del centro de reacción del FS I
P ₇₀₀ ⁺	Clorofila <i>a</i> del centro de reacción del FS I oxidada
Q _A	Quinona A, aceptor primario del FS II
Q _B	Quinona B, aceptor secundario del FS II
SiMo	Silicomolibdato
Tricina	N-Tris(hidroximetil)metilglicina
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano

LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y ESPECTROS

FIGURAS

Figura 1. Representación del interior del cloroplasto.

Figura 2. Esquema Z del transporte de electrones en la fotosíntesis.

Figura 3. Componentes de la membrana tilacoidal.

Figura 4. Digrama esquemático de la ATPasa de los cloroplastos.

Figura 5. Estructura de la tricolorina A.

Figura 6. Ejemplos de algunos limonoides insecticidas de las meliáceas.

Figura 7. Estructuras del odoratol, metabolito secundario de *Cedrela odorata* (Meliaceae).

Figura 8. Estructuras de la gedunina (a) y de la 7-oxo-7-deacetoxigedunina (b), metabolitos secundarios de *Guarea grandiflora* (Meliaceae).

TABLAS

Tabla 1. Algunos inhibidores sintéticos y naturales de la ATPasa cloroplástica.

Tabla 2. Inhibidores sintéticos y naturales de la Enzima de la Fotólisis de Agua.

Tabla 3. Algunos inhibidores del FS II el sitio de inhibición entre Q_A y Q_B .

ESPECTROS

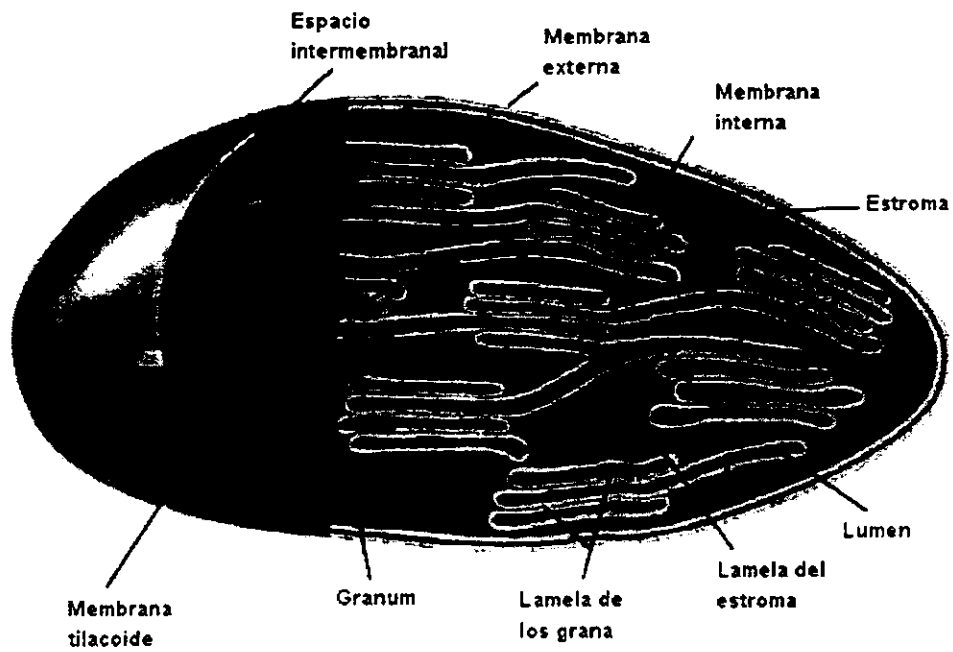
Espectros de RMN 1H , ^{13}C y ^{13}C -DEPT del acetónido del odoratol

Vista Estereoscópica de la OGD

III. INTRODUCCION

3.1 FOTOSINTESIS

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual las plantas, algas y algunas bacterias convierten la energía luminosa en energía química útil para la síntesis de material orgánico a partir de CO₂, agua y minerales. En los eucariontes, la fotosíntesis se realiza en los cloroplastos. Estos son organelos vesiculares, membranosos y de forma elipsoidal; miden alrededor de 5 µm de longitud y son característicos de las algas y plantas superiores (Figura 1). Cada célula contiene de 50 a 200 cloroplastos, mismos que poseen una envoltura formada por una doble membrana que encierra una matriz interior, el estroma (Figura 1). Dentro de este último se encuentran ADN, ribosomas, aminoácidos, ácidos orgánicos, plastoglobulos, carbohidratos, nucleótidos, iones y aproximadamente 200 tipos de proteínas (Lehninger *et al.*, 1993). En el interior del estroma se encuentran unas vesículas de estructura aplanada que son los tilacoides, los cuales se acumulan en pilas y se denomina con el nombre de grana. La composición de la membrana tilacoidal es de 50% de proteínas (lipoproteínas), 40% de fosfolípidos (glicolípidos) y 10% de clorofilas (Ellis, 1989). La membrana tilacoidal contiene diversas proteínas que están involucradas en la captación de los cuantos de luz, el transporte de electrones, la captación de protones y otras reacciones enzimáticas.



A



B

Figura 1. Estructura de un cloroplasto: A (Ilustración); B (Micrografía electrónica).

El proceso de la fotosíntesis comprende dos fases: la luminosa y la oscura. En la primera fase, se captura la energía solar y se transforma en energía química (ATP y NADPH). Simultáneamente, se produce oxígeno por fotooxidación del agua. Estos procesos tienen el nombre de reacciones luminosas y se llevan a cabo en las membranas tilacoidales del cloroplasto. En la fase oscura, el ATP y NADPH producidos se consumen durante la reducción de CO₂ para formar carbohidratos (glucosa, celulosa y almidón) en el ciclo de asimilación del carbono y este proceso se realiza en el estroma del cloroplasto (Lehninger *et al.*, 1993). La fotosíntesis puede estudiarse en un rango sumamente variado de preparaciones aisladas, desde un sistema simple de complejos aislados como los protoplastos, hasta en componentes membranales.

3.1.1 EVENTOS FOTOSINTÉTICOS DE LA FASE LUMINOSA

Los dos rasgos particulares de los sistemas fotosintéticos son: (i) los fotoreceptores responsables de la cosecha de luz solar que están formados por clorofilas, proteínas y carotenoides, y (ii) los centros de reacción a donde se dirige la energía luminosa. Los centros de reacción poseen un potencial redox positivo, se excitan cuando absorben un fotón y, posteriormente, liberan un electrón a un potencial que es casi de 1 voltio más negativo. De esta manera, la energía luminosa se transforma directamente a energía potencial redox.

Las clorofilas son los pigmentos fotosintéticos más importantes. Son

metaloporfirinas que poseen una porción policíclica plana constituida por cuatro unidades alquilpirrónicas y una cadena hidrofóbica derivada del fitol. El metal manganeso divalente, se coordina con el nitrógeno de los anillos pirrónicos, ocupando la porción central del policiclo. La cadena hidrocarbonada se une a uno de los anillos a través de un enlace de tipo ester. Las moléculas de clorofila se embeben en la región hidrofóbica de la membrana tilacoidal donde estan asociadas a proteínas específicas formando complejos Chl.-proteína. En las plantas verdes, los pigmentos fotosintéticos, altamente organizados para una mayor eficacia durante la cosecha de la luz, son la clorofila *a*, la clorofila *b* y varios carotenoides. La clorofila *a* pura, disuelta en acetona, posee máximos de absorción a 663 y 420 nm. Sin embargo, en las células intactas la clorofila *a* muestra diferentes máximos de absorción a longitudes de onda mayores (660, 670, 678 y 685 nm). La clorofila *b* y los carotenoides se denominan, de manera colectiva, con el nombre de pigmentos accesorios que transportan la energía de la luz absorbida a la clorofila *a* y, de esta manera, aumentan el rango espectral para la radiación fotosintéticamente activa. De manera adicional, las moléculas de la clorofila *a* están organizadas en forma de "unidades fotosintéticas" donde, en promedio, de 250 a 300 moléculas de clorofila capturan la energía de la luz que transfieren a una molécula especializada de la clorofila *a*, que es en el centro de reacción, donde ocurren las reacciones fotoquímicas.

3.1.1.1 Centros de reacción

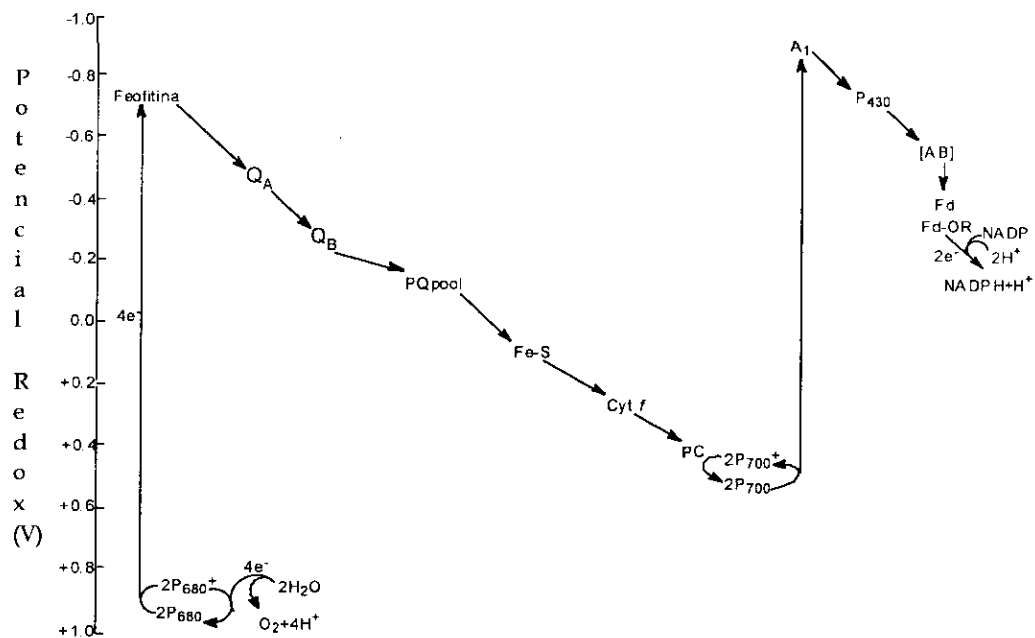
Los centros de reacción son complejos pigmento-proteína que contienen la clorofila *a* en un ambiente especial. En los organismos fotosintéticos productores de oxígeno hay dos centros de reacción, el FS I y el FS II. En estos centros, la reacción fotoquímica más importante ocurre cuando la energía luminosa se emplea para que el electrón de la clorofila P_{680} pase a un estado excitado P_{680}^* . Bajo esta forma, la clorofila reduce un aceptor primario de electrones, la feofitina (Ph) y, en consecuencia, ésta se oxida a P_{680}^+ . Posteriormente, P_{680} se regresa por la reducción de P_{680}^+ que acepta electrones de la tirosina Z (Tyr Z) de la proteína D_1 del FS II. De esta forma, P_{680} podrá excitarse de nueva cuenta mediante la absorción de la luz.

En el FS I, la clorofila *a*-proteína del centro de reacción se denomina como P_{700} . En el estado oxidado P_{700}^+ se observa un "blanqueamiento" (disminución de la absorción) a 700 nm. En este fotosistema, los electrones provienen de la plastoquinona reducida.

3.1.1.2 Transporte de electrones fotosintético y sus inhibidores

Las reacciones de transferencia electrónica involucran los dos centros de reacción ordenados en serie (Figuras 2 y 3). El aceptor natural de electrones

terminal es el NADP, el cual se reduce por los electrones del FS I; estos electrones provienen de la oxidación del agua en el FS II. En el esquema Z del transporte de electrones los compuestos con un potencial redox bajo (agentes reductores fuertes) se encuentran en la cima del diagrama. El esquema está dividido en: (i) las secciones ascendentes de reacciones dependientes de la luz en los centros de reacción, donde la energía de un fotón se emplea para reducir un aceptor de electrones convirtiéndolo en un agente reductor, y (ii) las secciones descendientes de los acarreadores donde tiene lugar la transferencia de electrones de agentes reductores fuertes a débiles. La energía liberada es usada para la fosforilación del ADP y, de esta manera, se obtiene una molécula de ATP.



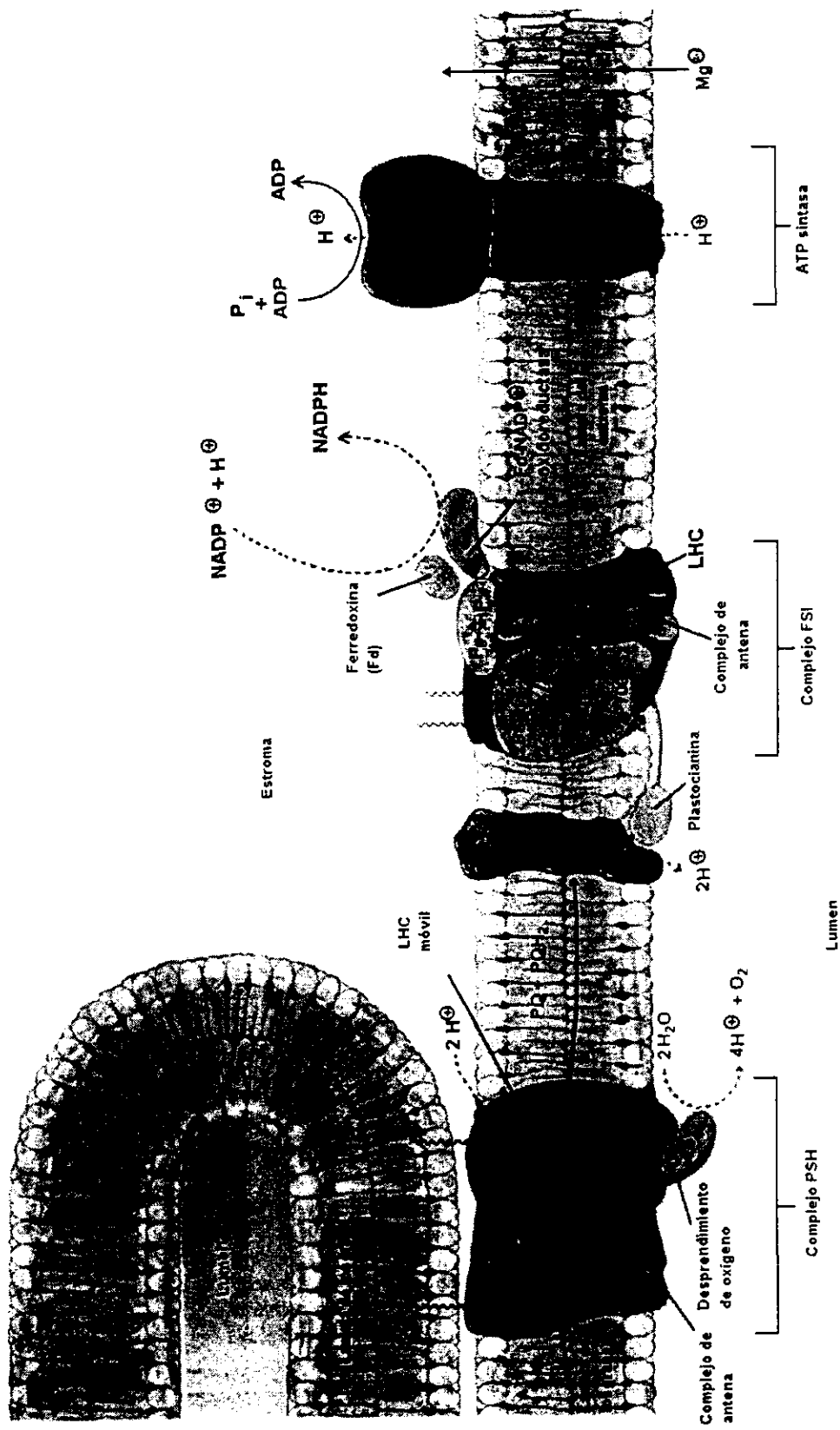


Figura 3. Componentes de la membrana tilacooidal que participan en la fotosíntesis. También se indican los procesos de captación de luz (flechas onduladas), transporte de electrones (flechas sólidas), y desplazamiento de protones (flechas punteadas).

Los intermediarios del transporte de electrones se dividen en varias clases: citocromos (citocromo *f*, *b₆* y *b₅₅₉*), centros fierro-sulfurados (ferredoxina y centro hierro-azufre de Rieske), quinonas (plastoquinonas *PQ*, *Q_A*, *Q_B*), proteínas con metal de transición como grupo prostético (plastocianina, proteínas que contienen *Mn*), clorofilas y feofitina. La naturaleza bioquímica de los componentes de la cadena de transporte de electrones es sumamente variada; sin embargo, todos presentan la propiedad de ser reducidos y, subsecuentemente, oxidados, funcionando así como acarreadores de electrones. De esta forma, los componentes redox de la cadena de transporte de electrones se clasifican en dos grupos según el tipo de reducción: los reducidos solamente por los electrones y los reducidos por electrones y protones. Esta división es importante para las consideraciones relacionadas con el mecanismo de la fotofosforilación.

Cuando el centro de reacción del FS II interacciona con la luz, se genera el estado P_{680}^+ que debe reducirse a P_{680} para continuar con las fotorreacciones. La reducción del P_{680}^+ se lleva a cabo cuando el agua cede electrones al oxidarse por los cuantos de luz y se representa mediante la siguiente fórmula:



El complejo de la fotólisis del agua contiene por lo menos 20 polipéptidos. El sitio de oxidación del agua está formado por cuatro iones de *Mn*, con números de oxidación que varían entre +2 y +4 durante el proceso de descomposición del

agua, de dos a tres iones de Ca^{2+} y varios iones cloruros que participan en la reacción de fotólisis de agua (Debus, 1992). El electrón a partir de P_{680}^* se transporta vía la feofitina al aceptor de electrones primario del FS II, Q_A . A través de un centro ferro-sulfurado se reduce el aceptor de electrones secundario Q_B . Este último acepta dos electrones y toma dos protones del estroma produciendo PQH_2 , el cual forma la poza de plastoquinonas (PQ). Cuando se oxida, PQH_2 dona dos electrones al citocromo b_6/f y libera dos protones en el espacio interno del tilacoide llamado lumen. El FS I se reduce al oxidar al citocromo b_6/f reducido, el cual dona su electrón a P_{700} mediado por la plastocianina. El FS I, mediante una serie de reacciones redox, reduce al NADP^+ ; esta última reacción es catalizada por la enzima ferredoxina-NADP-oxidoreductasa con la participación de los aceptores de electrones A_0 , A_1 , $\text{F}_A\text{F}_B\text{F}_X$ y F_D .

El transporte de electrones en la cadena tilacoidal está acoplado a la formación de un gradiente de protones a través de la membrana, el cual es utilizado para la fosforilación del ADP con ortofosfato catalizada por la ATP sintetasa (Anderson & Beardall, 1991).

Según la teoría quimiosmótica propuesta por Mitchell (1961), existe un acoplamiento entre la transferencia de electrones y la síntesis de ATP. Esto sugiere que el flujo de electrones a través del sistema de acarreadores también conduce vectorialmente protones a través de las membranas, generando un gradiente electroquímico de protones que se utiliza en la síntesis de ATP (Hinkle & McCarty, 1988). En los cloroplastos, los componentes de la cadena

transportadora de electrones se encuentran distribuidos de manera heterogénea (asimétrica) a través de la membrana tilacoidal de los cloroplastos. Como resultado de esta distribución, el movimiento de electrones ocasiona un flujo de protones hacia el interior del tilacoide generando un ΔpH . La oxidación de dos moléculas de agua libera cuatro protones dentro del tilacoide. Cuando dos electrones reducen a la PQ, esta acepta dos protones del estroma y se reduce a plastoquinol (PQH_2). Posteriormente, ésta molécula libera los dos protones en el lumen del espacio intratilacoidal al ser oxidada nuevamente a PQ por acción del complejo b_6/f (Anderson & Beardall, 1991) y el ciclo de Q en b_6/f puede dar como resultado la liberación de tres protones por molécula de PQH_2 .

Los inhibidores de las enzimas involucradas en el transporte de electrones son de una gran variedad estructural. Dichos inhibidores se han empleado para elucidar las diversas vías metabólicas vegetales, animales y bacterianas. En este contexto, Robin Hill (1937) observó que al iluminar los cloroplastos en presencia de un aceptor de electrones artificial se generaba oxígeno. Esa observación fue muy importante para los ensayos posteriores con los inhibidores de las fase luminosa de la fotosíntesis. En 1949, Macdowall reporta que el feniluretano ($I_{50} = 2 \text{ mM}$) y el dinitrofenol ($I_{50} = 0.63 \text{ mM}$) inhiben la reacción de Hill. Es importante destacar que algunos de estos inhibidores, por ejemplo el DCMU, se utilizan como agentes herbicidas comerciales (Moreland, 1980). Así mismo, el estudio del mecanismo de acción de estos herbicidas ha contribuido de manera significativa

al conocimiento de algunas secuencias metabólicas en los vegetales.

Moreland (1980) clasificó a los inhibidores de la fotosíntesis (sintéticos o naturales) en cuatro grupos: inhibidores del transporte de electrones, desacoplantes, inhibidores de la transferencia de energía y aceptores de electrones. Los tres primeros grupos afectan al proceso del transporte de electrones.

i) Inhibidores del transporte de electrones

Algunos ejemplos de los inhibidores del transporte de electrones son el Tris que inhibe la enzima de la fotólisis del agua (Vernon, 1969) y el DBMIB que inhibe a la plastocianina (Ouitrakul & Izawa, 1973). Entre los herbicidas sintéticos que actúan como inhibidores del transporte de electrones se encuentran las triazinas (atrazina y prometrina), las piridazinonas (pirazon y norflurazon), los carbamatos (fenmedifan y barban), las fenilureas (diuron) y los urácilos (lenacil) y algunos fenoles (Moreland, 1980). Las fenilureas y las triazinas inhiben la reoxidación del aceptor primario (Q_A) del FS II (Mathis & Rutherford, 1984; Moreland, 1980; Mersie, 1993). En cambio, los herbicidas fenólicos inhiben la fotólisis del agua mediante la interferencia con un péptido de 41 kDa del centro de reacción del FS II (Mathis & Rutherford, 1984; Moreland, 1980).

ii) Desacoplantes

La mayoría de los desacoplantes son ácidos débiles lipofílicos, los cuales en su forma iónica atraviesan la membrana tilacoidal tomando protones del medio interno. Una vez protonados, éstos pasan nuevamente a la parte externa del tilacoide donde liberan el protón mediante disociación. La perfluidona, un agente herbicida comercial de naturaleza sintética, actúa como un desacoplante. Otros compuestos que se comportan como desacoplantes son el dinitrofenol, el FCCP, el CCCP y los antibióticos nigericina y gramicidina (Moreland, 1980).

iii) Inhibidores de la transferencia de energía

Estos compuestos actúan directamente sobre la H⁺-ATPasa, interfiriendo con la actividad de las subunidades CF₁ y/o CF₀. Entre los inhibidores clásicos de la transferencia de energía se encuentran la N-etil-maleimida, el DCCD (McCarty & Racker, 1967), el Dio-9, la sintalina (Moreland, 1980), la N,N-dimetilformamida (Peña-Valdivia *et al.*, 1991) y la florizina (Moreland, 1980).

iv) Aceptores de electrones

Estos compuestos presentan potenciales redox muy similares al de algunos acarreadores de electrones de la cadena tilacoidal, por lo que pueden competir con los mismos, desviando el transporte de electrones. Estos compuestos son empleados para estudiar las reacciones parciales de los fotosistemas (I y II). Entre los aceptores de electrones más importantes se pueden

citar al SiMo, el cual actúa como aceptor de electrones de Q_A ; el DCPIP y el FeCN, los cuales actúan como aceptores de electrones del FS II; la fenazina metasulfato, que actúa a nivel de P_{700} y el metilviológeno que acepta electrones a nivel de los centros Fe-S del FS I. Algunos herbicidas actúan como aceptores de electrones y quizá los más conocidos son las sales de bipyridinio como el paraquat y diquat (Moreland, 1980).

3.1.2 FOTOFOSFORILACION

Para el ciclo de asimilación del carbono se requieren tanto del NADPH como de la energía química del ATP. La energía requerida para la fotofosforilación se obtiene de la conversión de la energía almacenada en forma del potencial electroquímico en energía química. El complejo enzimático que se encarga de sintetizar ATP a partir de ADP y P_i es una ATP sintetasa, es decir el complejo CF_1CF_0 -ATPasa. Dicho complejo se compone de dos partes: una hidrofílica (CF_1) y la otra lipofílica (CF_0) (Figura 4).

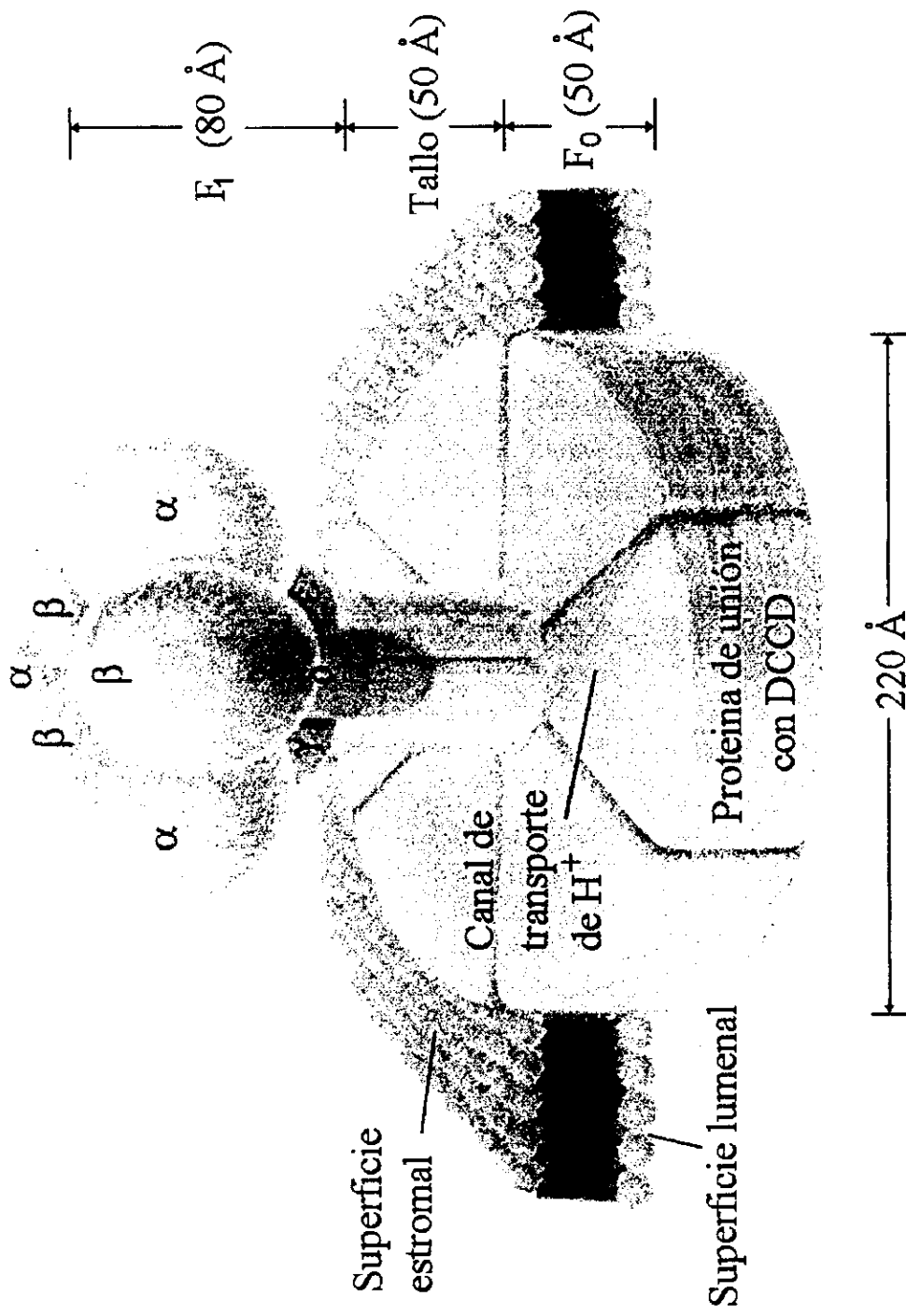


Figura 4. Diagrama esquemático de la ATPasa de los cloroplastos. Este conjunto consta de una unidad CF_0 transmembranal y de una CF_1 catalítica en el lado del estroma de la membrana tilacoidal.

La función principal del CF₁ es la síntesis de ATP en respuesta al ΔpH generado al iluminar a los cloroplastos (Ketcham *et al.*, 1984). La estequiometría más aceptada de la porción hidrofílica, CF₁, del complejo CF₁CF₀-ATPasa es de cinco subunidades; es decir $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. Existe una similitud entre los F₁ de los cloroplastos, mitocondrias y bacterias ya que todos presentan una organización tridimensional semejante en dichas subunidades. Las evidencias obtenidas mediante la técnica de microscopía electrónica indican que las subunidades α y β (60 y 55 kDa, respectivamente) del CF₁ corresponde a un modelo hexagonal asimétrico alrededor de una cavidad central (Boekema *et al.*, 1990; Fujiyama *et al.*, 1990). Otros estudios más recientes de microscopía electrónica demostraron que las subunidades α y β de CF₁, dispuestas en pares, forman una monocapa como se ilustra en la figura 4. Las subunidades menores de CF₁ (γ , δ y ϵ con pesos moleculares de 38, 20 y 14 kDa, respectivamente) forman una masa en forma de V, adyacente a un par $\alpha\beta$ y adentro de la cavidad creada por el hexámero $\alpha_3\beta_3$ (Boekema *et al.*, 1990). Los modelos actuales del CF₁ colocan a la subunidad γ en el centro de dicha cavidad junto a la subunidad ϵ , ambas cerca de la subunidad β (Dunn *et al.*, 1990). La activación por luz del complejo H⁺-ATPasa se lleva a cabo en unos milisegundos obteniéndose la máxima eficiencia en otros milisegundos más (Graan & Ort, 1981); mientras que la actividad hidrolítica requiere para su activación unos segundos de iluminación.

En general, los componentes principales que intervienen en la regulación de la actividad del CF₁ de la H⁺-ATPasa de los cloroplastos son: el potencial electroquímico, los estados de oxidación del puente de disulfuro de la subunidad γ de CF₁ y la unión recíproca de los nucleótidos ATP, ADP y Pi al factor de acoplamiento. La activación de la H⁺-ATPasa por calor requiere de la presencia

de compuestos con grupos tioles y la eliminación de los mismos causa una inhibición irreversible de la actividad enzimática. Cabe mencionar que a diferencia del F_1 mitocondrial, que se asocia a una proteína de bajo peso molecular para formar un complejo que inhibe a la ATPasa, el CF_1 del cloroplasto es una proteína con una actividad latente de ATPasa, que puede ser activada por cambios conformacionales (Farron & Racker, 1970).

El factor CF_1 de la H^+ -ATPasa cloroplástica es sensible a una gran variedad de inhibidores. Por ejemplo, la tentoxina, un tetrapéptido cíclico producido por el hongo *Alternaria tenuis*, es un inhibidor potente de la ATPasa del cloroplasto a una concentración de 10^{-8} M. Dicho péptido actúa como inhibidor no competitivo respecto a los nucleótidos substratos del CF_1 . El sitio de interferencia de la tentoxina se localiza en la subunidad β de la enzima. Sin embargo, estudios recientes demostraron que la subunidad α es indispensable para la interacción (unión) de la toxina con la ATPasa (Hu *et al.*, 1993). El vanadato (Carmeli *et al.*, 1992) y la α -dendrotoxina (Schulenburg *et al.*, 1992) también inhiben el CF_1 de cloroplastos a concentraciones de 0.5 mM y 5.05 μ M, respectivamente. Los dos compuestos inhiben preferencialmente la síntesis de ATP, en lugar de promover su hidrólisis (Carmeli *et al.*, 1992; Schulenburg *et al.*, 1992).

La porción lipofílica del complejo CF_1 - CF_0 ATPasa, CF_0 , se encuentra embebida en la membrana tilacoidal y funciona como un canal iónico que transporta H^+ hacia el sitio catalítico de la enzima. CF_0 consta de las subunidades

hidropáticas I-IV (Faludi-Daniel *et al.*, 1983; Beckers *et al.*, 1992). Se propone que seis copias de la subunidad III conforman un canal de forma hexagonal que atraviesa la membrana tilacoidal y que la subunidad II ayuda a mantener esta organización estructural. Por otro lado, las subunidades I y IV se asocian a la membrana haciendo más fuerte la unión de la membrana con el canal conductor de protones formado por el hexámero de las subunidades III (Barber, 1987). Las subunidades I, II y IV son codificadas en el genoma del cloroplasto (Cozen & Walker, 1987). La subunidad I posee un segmento hidrofóbico anclado en la membrana y otro hidrofílico que se une a CF₀. La subunidad IV es una proteína hidrofóbica y presenta 5 α -hélices transmembranales, una de ellas probablemente interacciona con la subunidad III para formar el canal (Hudson & Mason, 1988).

Una de las estrategias más importantes para el estudio del funcionamiento de la H⁺-ATPasa la constituye el empleo de inhibidores específicos de la enzima. Estos inhibidores actúan bloqueando la síntesis de ATP al unirse a nivel de CF₀ y/o CF₁ o desacoplando la síntesis de ATP del transporte de electrones. Los inhibidores específicos incluyen al DCCD (N,N'-diciclohexicarbodiimida), el trifenilestaño y el 5-0- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, un producto natural aislado de *Exostema caribaeum* (Rubiaceae) (McCarty & Racker 1967; Gould 1978; Calera *et al.*, 1995a). El DCCD se une específicamente a la subunidad III del CF₀ (McCarty & Racker, 1968).

3.1.3 FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA *a* DEL CENTRO DE REACCION DEL FS II

La fluorescencia de la clorofila *a* (Chl *a*) es una luz roja que proporciona información sobre el estado de los complejos de pigmentos, y su organización, la transferencia de energía entre pigmentos y las reacciones de transferencia de electrones del FS II. El rendimiento cuántico de la fluorescencia de la Chl *a* (ϕ_f) está relacionado con las constantes de velocidad (K 's), desexcitación de la fluorescencia (f), disipación por calor (h), excitación de transferencia de energía (t) y con el apagamiento de la fluorescencia (q) por sustancias como los carotenoides, el O_2 , los tripletes, etc. y por trabajo fotoquímico (p):

$$\phi_f = \frac{K_f}{K_f + K_h + K_t + K_q + K_p}$$

El rendimiento cuántico absoluto de la fluorescencia (ϕ_f) se obtiene dividiendo el número total de los fotones emitidos (F) entre el número total de fotones absorbidos (I_a), o dividiendo el tiempo medio de la fluorescencia (τ) entre el tiempo medio teórico intrínseco de la fluorescencia (τ_0). Este último es válido solamente cuando la única vía de desexcitación es la fluorescencia. Debido a que

la emisión homogénea de la fluorescencia se efectúa en todas las direcciones, solamente una parte de ésta se mide con iluminación de intensidad constante y, por lo tanto, los valores de ϕ_f reportados son relativos.

En 1931, Kautsky y Hirsch publicaron un trabajo titulado "Nuevos experimentos sobre la asimilación del dióxido de carbono", el cual es considerado por los especialistas como un acontecimiento histórico para el estudio de la fotosíntesis. El experimento consistió en iluminar hojas adaptadas a la oscuridad y seguir cualitativamente la emisión de la fluorescencia de la Chl. *a*, comparándola con la asimilación del CO₂ publicada antes por Otto Warburg. Este trabajo contribuyó de manera significativa a entender los siguientes aspectos de la fluorescencia: a) la fluorescencia de la Chl. *a* se incrementa hasta un máximo, luego decrece y finalmente alcanza un nivel de equilibrio en cuestión de minutos; b) el aumento en la curva de la fluorescencia se consideró como un reflejo de las reacciones primarias de la fotosíntesis y era insensible a la temperatura (0 y 30 °C) y a la adición de HCN; c) la disminución en la curva de la fluorescencia es inversamente proporcional al aumento de la asimilación del CO₂, lo que significa que más energía química, en forma de carbohidratos, se produce a partir de los fotones absorbidos cuando la fluorescencia emitida de la Chl. *a* es menor.

3.1.4 EVENTOS ASOCIADOS CON LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA *a*.

Al iluminar con luz continua las hojas adaptadas a la oscuridad o a una suspensión de células de hojas de plantas superiores, algas o cianobacterias, se observan cambios característicos en la intensidad de la fluorescencia de la Chl. *a*. A estos cambios se les denomina 'inducción de la fluorescencia', 'eventos de fluorescencia' o 'efecto de Kautsky'. Los eventos de la fluorescencia se clasifican en *rápidos* (hasta 1 s) y *lentos* (hasta varios minutos). A la fecha, los eventos de la fluorescencia rápida de la Chl. *a* se han interpretado con mayor facilidad que los lentos y para designarlas se utilizan nomenclaturas diferentes. En esta tesis se adopta la nomenclatura *OJIP*, debido a que ésta describe mejor la porción de la curva de inducción de la fluorescencia relacionada al trabajo fotoquímico (trabajo 3, Figura 5) (Strasser & Govindjee, 1991 y 1992). Varios autores emplearon la nomenclatura *OIDP* para describir la fase rápida e implícitamente se tomó el evento *OI* como equivalente a la fase fotoquímica (Morin, 1964; Delosme, 1967). *I* corresponde a la primera inflexión observada en la curva de emisión de la fluorescencia de la Chl. *a*. Recientemente, Strasser y Govindjee (1991 y 1992), mediante el uso de un instrumento comercial de Hansatch PEA (Plant Efficiency Analyser), observaron dos inflexiones entre *O* y *P*, las cuales denominaron *J* e *I*. La detección de estas inflexiones fue posible gracias a un buen cálculo

sumamente preciso del valor del nivel 'O' (F_0) obtenido por el uso cuidadoso del instrumento y al graficar logarítmicamente la fluorescencia en función del tiempo. Los eventos *OJIP* reflejan el llenado (reducción) de la poza de aceptores de electrones del FS II. Esta poza incluye los acarreadores de electrones de la cadena Q_A , Q_B y PQ. El aceptor primario de electrones unido a la proteína D_1 corresponde al acarreador Q_A , Q_B es aceptor de dos electrones y, por último, PQs son las moléculas PQ móviles. La hipótesis de Duysens y Sweers (1963) postula que la formación de Q_A^- es el factor determinante en el aumento de la fluorescencia de la Chl. *a* en el FS II. Esta propuesta está implícitamente aceptada en nuestro modelo *OJIP*. Las inflexiones representan la heterogeneidad del proceso de fluorescencia. El aumento *OJ* es la fase fotoquímica, la inflexión *J* representa el máximo momentáneo de $[Q_A^-]$, quizá, por limitaciones en la aceptación de electrones por parte de Q_B . *I* refleja la heterogeneidad de la poza PQs (reducción rápida de unos y lenta de otros). De esta manera, *OJIP* puede ser utilizado para monitorear rápidamente las reacciones del lado aceptor del FS II, la heterogeneidad de la poza y su tamaño, así como para determinar el efecto de los inhibidores del FS II y/o distinguir mutantes en la proteína D_1 . El monitoreo de la fluorescencia puede ser aplicado también al lado donador del FS II. En este sentido, Hsu (1993) confirmó la conclusión de Joliot-Delosme sobre el aumento rápido de la fluorescencia por influencia de los estados S del complejo de oxidación del agua.

A temperatura ambiente, en presencia de los dos fotosistemas, la

fluorescencia emitida es mayor en las longitudes de 683-685 nm y 720-735 nm. La mayor parte se origina de las antenas del FS II (Govindjee & Briantais, 1972). A 77°K, la fluorescencia de la Chl. *a*, *in vivo*, se manifiesta a través de cuatro bandas de emisión principales (F685, F695, F720 y F740) y cuatro bandas de menor importancia. Las bandas F685 y F695 pertenecen sólo a los complejos del FS II (Gasarov *et al.*, 1979).

3.2 EFECTO DE COMPUESTOS NATURALES SOBRE LA FOTOSÍNTESIS

En la literatura especializada se han publicado varias revisiones acerca del mecanismo de acción de fitotoxinas con un potencial herbicida demostrado (Worshman, 1989; Duke & Lydon, 1995; Einhellig, 1995; Duke & Abbas, 1995). De las mismas se desprende que son escasos los estudios que se han realizado para determinar el efecto de los productos naturales sobre el proceso de la fotosíntesis. Quizá la falta de una infraestructura básica y de una cantidad suficiente de los productos de prueba constituyen, sin lugar a duda, un impedimento para realizar estos estudios. En la actualidad, uno de los retos y objetivos principales de los diversos grupos de investigación, es determinar y establecer en la medida de lo posible, el mecanismo de acción de los compuestos naturales con una actividad herbicida potencial.

Los primeros trabajos elaborados del efecto de productos naturales sobre la fotosíntesis pertenecen a los grupos de Einhellig, Kadlec, Moreland y Arntzen.

La mayoría de estos trabajos se efectuaron *in vivo* y los productos ensayados incluyeron compuestos aromáticos simples, flavonoides y cumarinas simples.

Inicialmente, el grupo de Einhellig determinó el efecto de la cumarina escopoletina sobre la fotosíntesis del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.), una variedad de amaranto (*Amaranthus retroflexus* L.), y de algunas plantas C₃ y C₄. (Einhellig *et al.*, 1970). En el caso de los estudios sobre el tabaco, los resultados más relevantes se describen a continuación: 1) la tasa neta de la fotosíntesis en los dos primeros días se redujo y posteriormente se recuperó; 2) la expansión del área de la hoja disminuyó; 3) La respiración en la oscuridad no fue alterada; 4) la I₅₀ para la fijación de CO₂ en presencia de este compuesto fue del orden de 1 mM. Con relación al estudio sobre las otras especies, la conclusión más importante fue que la escopoletina redujo la velocidad de la fotosíntesis en las hojas tratadas.

En el laboratorio de Einhellig se demostró mediante ensayos manométricos, que la acción conjunta de los ácidos cinámico y benzoico ocasiona una inhibición de la fotosíntesis en *Lemna minor* L., a concentraciones equivalentes a las requeridas para inducir una inhibición del crecimiento vegetal. Sin embargo, estos autores no reportaron el sitio de acción de los compuestos ensayados (Einhellig *et al.*, 1985). Así mismo demostraron que el alcaloide gramina actúa como un agente desacoplante de la fotofosforilación (Einhellig, 1995). Por otro lado, los flavonoides quercetina y glucoquercetina, a la concentración de 10⁻⁵ M, inhiben la fotosíntesis en cloroplastos aislados de

espinacas (Harbone, 1988); además, el glucósido de la dihidrochalcona y la florizina inhiben la actividad de la Mg-ATPasa (Einhellig, 1986, 1995).

Arntzen *et al.* (1982) demostraron que el camferol, un flavanol implicado en varias actividades alelopáticas, inhibe el transporte de electrones acoplado así como las fosforilaciones cíclica y no-cíclica en los cloroplastos de hojas de chícharo. El camferol (25 μ M) también inhibió la transferencia de energía a nivel de una de las etapas anteriores a la fosforilación.

El grupo de Moreland y Novitsky (1986) reportó que algunos derivados de los ácidos cinámico y benzoico, cumarinas y flavonoides inhiben la generación del oxígeno en los cloroplastos.

Uno de los productos naturales más investigados, en relación a sus efectos sobre el proceso de la fotosíntesis, es la sorgoleona (2-hidroxi-5-metoxi-3-[(8Z,11Z)-8,11,14-pentadecatrieno]-*p*-benzoquinona. Este agente alelopático constituye el producto mayoritario de los exudados del sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (Miranda-González *et al.*, 1997). Recientemente, el grupo de Weston demostró que la sorgoleona inhibe el desprendimiento de oxígeno de cloroplastos a una concentración de 2 μ M. Su sitio de inhibición fue localizado a nivel del FS II, entre Q_A y Q_B (Miranda-González *et al.*, 1997). Además, los estudios de competencia realizados con la sorgoleona y la [¹⁴C]atrazina indicaron claramente que la quinona se une al mismo sitio que la atrazina a nivel de Q_B. Así mismo se encontró que la interacción de la sorgoleona con la proteína D₁ del FS II se afecta

cuando se tratan los cloroplastos con tripsina. El mismo comportamiento se ha descrito para otros inhibidores del FS II, tales como el bromoxinil y los herbicidas de tipo fenólico cuyo sitio de inhibición es a nivel de Q_B.

Otra quinona que inhibe la fotosíntesis en cloroplastos aislados de *Lemna minor* es la juglona, aislada de *Juglans nigra* L. Este metabolito secundario, a una concentración de 40 μ M, provoca tanto la reducción del contenido de clorofila como de la fotosíntesis en los cloroplastos de *Lemna minor*. La I₅₀ fue de 2.0 mM (Heijl *et al.*, 1993; Einhellig, 1995). Sin embargo, a la fecha no se ha descrito el blanco de acción específico de esta quinona, pero se especula que no ejerce un efecto desacoplante sobre el flujo de electrones de la fotosíntesis (Heijl *et al.*, 1993). De manera adicional, se observó que la juglona inhibe el crecimiento de *L. minor* a muy bajas concentraciones.

En años recientes Lotina-Hennsen y colaboradores han realizado un estudio sistemático de metabolitos secundarios aislados de especies vegetales de la flora Mexicana con un potencial herbicida demostrado. Las fitotoxinas investigadas incluyen productos naturales de naturaleza terpenoide, principalmente lactonas sesquiterpénicas, cumarinas (piranocumarinas, furanocumarinas, y 4-fenilcumarinas), benzopiranos, cromenos y fenilpropanoides. En su totalidad estos estudios se realizaron *in vitro*, utilizando cloroplastos aislados de las hojas de espinacas y los resultados permitieron establecer que los compuestos ensayados afectan el proceso de fotosíntesis a través de muy diversos mecanismos. Así, las lactonas sesquiterpénicas,

zaluzanina C (Lotina-Hennsen *et al.*, 1992), ivalina (Bernal-Morales *et al.*, 1994) y el cacalol (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991), e isoalantolactona (Calera *et al.*, 1995a) inhiben el transporte de electrones en el FS II. Las I_{50} fueron de 0.8, 2.8 y 0.06 mM, respectivamente. El cacalol y la ivalina actúan inhibiendo el transporte de electrones entre P_{680} y Q_A (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991; Bernal-Morales *et al.*, 1994) y la zaluzanina C inhibe el transporte de electrones de H_2O a P_{680} (Lotina-Hennsen *et al.*, 1992).

Otra lactona que actúa sobre el proceso fotosintético es la artemisinina. Este sesquiterpeno inhibe la fotosíntesis de *Lemna minor* a la concentración de 1 mM (Stiles *et al.*, 1994). El terpenoide piquerol A, inhibe la Mg-ATPasa y por lo tanto se clasifica como un inhibidor de la transferencia de energía (Mendoza *et al.*, 1994). Las furanocumarinas (imperatorina, xantiletina, 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina y chalepensina) y cinco 4-fenilcumarinas (5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina, 7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina, 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, 5-O- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina) Los resultados obtenidos permitieron determinar que las fenilcumarinas arriba mencionadas y la chalepensina actúan como inhibidores de la transferencia de energía (Calera *et al.* 1995b, 1996; Macías *et al.*, 1993). La xantiletina es un inhibidor del transporte de electrones en el FS II entre P_{680} y Q_A . La imperatorina y la 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina inhiben la síntesis de ATP y el transporte de electrones, por lo que se clasifican como agentes desacoplantes (Macías *et al.*, 1993).

Los cromenos encocalina y dimetilencecalina, aislados de *Helianthella quinquenervis* (Hook) A Gray (Asteraceae) son inhibidores ($I_{50} = 340$ y 159 , respectivamente) de la reacción de Hill (Castañeda *et al.*, 1998). El sitio de interferencia de estos compuestos se localizó en el tramo entre P_{680} y Q_A de la cadena de transporte de electrones tilacoidal. Por otro lado, el benzofurano euparina, aislado de la misma fuente vegetal, se comportó como un inhibidor ($I_{50} = 140 \mu\text{M}$) de la transferencia de energía (Castañeda *et al.*, 1998).

El fenilpropanoide 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno, producto fitotóxico mayoritario de la especie *Malmea depressa* (Annonaceae), es un inhibidor de la reacción de Hill. El sitio de interferencia de este metabolito secundario se localizó a nivel del FS II en el tramo entre P_{680} y Q_A (Jiménez *et al.*, 1998).

Por último, cabe resaltar que un metabolito secundario se considera un inhibidor efectivo del proceso de la fotosíntesis (en células y organelos aislados), cuando su actividad se presenta a concentraciones menores de 1 mM (Einhellig, 1995).

Una revisión más detallada que describe el efecto de diversos compuestos naturales, aislados de especies selectas de la flora mexicana sobre el proceso de la fotosíntesis, se presenta en los trabajos de reciente publicación de Lotina-Hennsen *et al.* (1998), Anaya A. L. (1996) y Mata *et al.* (1996).

3.3 ANTECEDENTES SOBRE DE LAS FUENTES NATURALES DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS, ANALIZADOS EN EL PRESENTE TRABAJO

3.3.1 *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae)

Ipomoea es uno de los cincuenta y tres géneros que conforman la familia Convolvulaceae y se encuentra integrado por un grupo de plantas importantes desde el punto de vista económico y terapéutico. Varias especies de *Ipomoea* se utilizan en diferentes partes del mundo como alimentos y como drogas no procesadas para el tratamiento de numerosos padecimientos (Millspaugh, 1974). La propiedad medicinal más importante de estas plantas es su efecto purgante, mismo que se atribuye a las resinas glicosídicas que biosintetizan. Muchas especies poseen también propiedades anticonvulsivas (Contreras *et al.*, 1996), carminativas (Noda *et al.*, 1988a), antihelmínticas (Trease y Evans, 1988), diuréticas (Martínez, 1989), antisépticas (Linajes-Palacios, 1991), antidiabéticas, antihemorrágicas, hipotensivas, antianémicas, antimicrobianas (Bieber *et al.*, 1986; Pereda-Miranda *et al.*, 1993) y anticancerígenas (Noda *et al.*, 1988b). Los alcaloides del ergot y los glicolípidos que conforman las resinas glicosídicas constituyen la característica quimiotaxonómica principal del género *Ipomoea*. Los glicolípidos se encuentran principalmente en las partes aéreas y las raíces de la planta.

Las investigaciones fitoquímicas sobre el aislamiento y caracterización de

los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas indican que las mismas están formadas de oligosacáridos, de tres a seis unidades de azúcar de cadena lineal ramificada formando una estructura macrocíclica mediante la esterificación intramolecular con la aglicona, un ácido graso de 16 C. A la fecha, se han estudiado únicamente las resinas glicosídicas de cinco especies medicinales del género *Ipomoea*: *I. batatas*, *I. muricata*, *I. operculata*, *I. orizabensis* e *I. stans* (Pereda-Miranda, 1993). En los últimos seis años, una serie de nuevos oligosacáridos se han aislado y caracterizado a partir de cuatro especies del género *Ipomoea*: *I. stans*, *I. tuberosa*, *I. stolonifera* e *I. lonchophylla*. Estos estudios han permitido el aislamiento y caracterización de varios glicolípidos novedosos.

Ipomoea tricolor (*Ipomoea violaceae*), especie conocida con los nombres vulgares de “quebraplatos” y “manto de la virgen”, se utiliza como cultivo de cobertura para el control de las malezas en los cañaverales del estado de Morelos, durante el periodo de barbecho comprendido entre los meses de agosto a octubre. Debido a su amplia capacidad de propagación y su forma de crecimiento como una planta enredadera o rastrera, este cultivo de cobertura se utiliza para proteger grandes extensiones de terreno y evitar el desgaste provocado por la invasión de malas hierbas. Este efecto de cobertura se complementa con una poderosa interferencia alelopática que se manifiesta a través de su actividad fitotóxica.

El potencial alelopático de *Ipomoea tricolor* (convolvuláceas) se demostró en el trabajo pionero de Anaya *et al.* (1990). En dicho trabajo se hizo evidente que el

crecimiento de las malezas *Amaranthus leucocarpus* y *Echinochloa crusgalli* fue inhibido por el extracto orgánico, las resinas glicosídicas y el lixiviado acuoso de la planta. El uso extensivo de la cromatografía en gel de silica para el fraccionamiento biodirigido, utilizando los bioensayos de inhibición de la germinación de semillas y del crecimiento radicular de plantas arvenses, permitió demostrar que la actividad fitotóxica de estas especies se encontraba en el extracto crudo de resinas glicosídicas (Pereda-Miranda *et al.*, 1993). El constituyente mayoritario responsable de la actividad inhibidora del crecimiento vegetal desarrollada por *Ipomoea tricolor*, llamado tricolorina A, fue aislado e identificado como el 11-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O- α -L-(2-O-[(2S)-2-metilbutanoil]-4-O-[(2S)-2-metilbutanoil])-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -fucopiranósido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico (1,3"-lactona) (Figura 5).

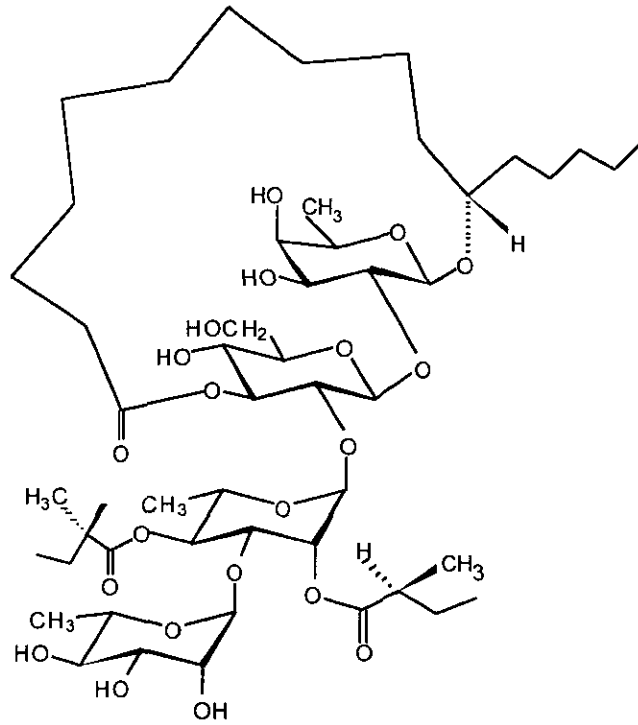


Figura 5. Estructura de la tricolorina A.

La concentración de este metabolito secundario que provocó la inhibición del crecimiento radicular en las plantas arvenses fue de 10-30 μM (Pereda-Miranda *et al.*, 1993). Estos valores inducidos por la tricolorina A representan 10^{-2} órdenes de magnitud inferiores a las concentraciones descritas en la literatura para la mayoría de los productos de origen vegetal que intervienen en interacciones alelopáticas (Mata *et al.*, 1996). De esta forma, se estableció que las resinas glicosídicas son fitotóxicos potentes, por lo que pueden ser los agentes responsables de las interferencias alelopáticas exhibidas por las especies de

Ipomoea. Estos principios bioactivos se encuentran involucrados en las interferencias alelopáticas de las convolvuláceas, como lo demostró el gran espectro de actividades biológicas desarrolladas por la tricolorina A (Pereda-Miranda *et al.*, 1993).

3.3.2 *Cedrela odorata* y *Guarea grandiflora* (Meliaceae)

3.3.2.1 Generalidades sobre los limonoides

La familia Meliaceae está constiyuida aproximadamente por 1400 especies agrupadas en 50 géneros. Desde el punto de vista químiotaxonómico, los limonoides y los protolimonoides constituyen los metabolitos secundarios más representativos de esta familia de plantas (Pennington, 1981; Taylor, 1984; Banerji & Negam, 1984; Champagne *et al.*, 1992, Inter alia).

El término limonoide deriva del nombre de la especie del limón (*Citrus limon*) y hoy en día se utiliza para designar de manera general a todos los compuestos relacionados con la limonina, primer compuesto tetratriterpenoide natural aislado a partir de la corteza del limón (Bevan *et al.*, 1963). Cabe mencionar que los limonoides derivados de las meliáceas se les conoce también con el nombre de meliacinas (Torsell, 1983). Los limonoides se han obtenido principalmente de especies de varios géneros de las familias Meliaceae, Rutaceae y Cneoraceae, todas del orden de las rutaes, siendo particularmente abundantes en la primera.

Es importante mencionar que estos compuestos generalmente se acumulan en todos los tejidos (semilla, hoja, corteza y madera) de las plantas que los biosintetizan (Champagne *et al.*, 1992).

Para la elucidación estructural de los limonoides se han utilizado principalmente métodos espectroscópicos, espectrométricos y químicos. Los métodos químicos consisten fundamentalmente en degradaciones y correlaciones químicas. Recientemente los métodos espectroscópicos, espectrométricos y quíropticos han demostrado ser la mejor herramienta para la caracterización de estos compuestos. De manera particular, la resonancia magnética nuclear de alta resolución es la técnica más utilizada (Taylor *et al.*, 1984; Cremlyn, 1991; Segura-Correa *et al.*, 1993). Se han descrito también varios estudios de cristalografía de Rayos X (Baldwin *et al.*, 1967; Soriano-García *et al.*, 1996).

Desde el punto de vista biológico, los limonoides han demostrado poseer una gran variedad de propiedades, mismas que podrían ser de utilidad para el desarrollo de nuevos agentes pesticidas y terapéuticos (Das & Mahato, 1983; Taylor *et al.*, 1984; Champagne *et al.*, 1992 Inter alia).

Entre las propiedades medicinales más importantes demostradas por estos terpenoides destacan las siguientes: antiprotozoaria (Bray, 1990), diurética y antifúngica (Jacobson, 1971), antihelmíntica y antiulcérica (Champagne *et al.*, 1992). Pero quizás la actividad biológica más importante de estos compuestos es la insecticida (Baldwin *et al.*, 1992; Arnason *et al.*, 1992 & 1993; Kubo *et al.*, 1991 & 1993). De acuerdo a una revisión reciente muchos de estos compuestos ejercen

una actividad fagoinhibidora y reguladora del crecimiento sobre una gran variedad de insectos (Champagne *et al.*, 1992). Esta actividad insecticida ha permitido el desarrollo comercial de dos limonoides: la azadiractina y la tusendanina (Figura 6) obtenidos a partir de *Azadirachta indica* y *Melia toosendan*, respectivamente. La azadiractina y compuestos relacionados ejercen su efecto insecticida modificando la motilidad de los insectos (Rembold *et al.*, 1989). En el caso de la tusendanina el mecanismo de acción no se encuentra aún bien caracterizado. Por último, cabe mencionar que recientemente se demostró que las humilinólidas A y C, limonoides aislados de la especie medicinal *Swietenia humilis* poseen propiedades reguladoras del crecimiento vegetal (Segura-Correa *et al.*, 1993). Ambos compuestos inhibieron de manera selectiva y significativa el crecimiento redicular de la arvense *Amaranthus hypochondriacus*.

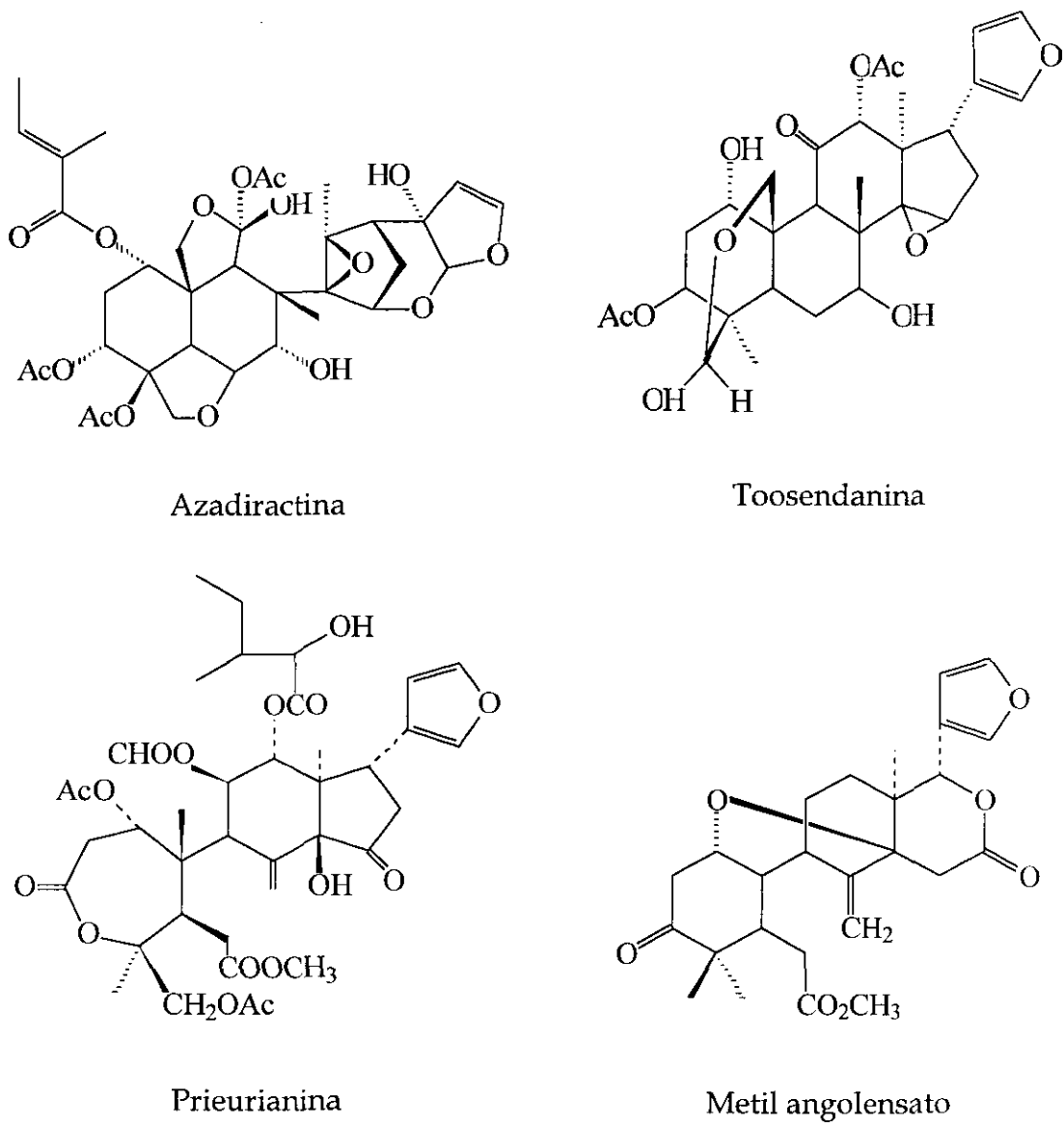


Figura 6. Ejemplos de algunos limonoides insecticidas de las meliáceas.

3.3.2.2 *Cedrela odorata* (Meliaceae)

El género *Cedrela* incluye ocho especies, distribuidas principalmente en el continente Americano desde el estado de Sinaloa, México hasta el norte de Argentina. Los individuos de *Cedrela odorata* L. son árboles de tierra árida y húmeda, que crecen hasta 35 m de altura y poseen una corteza de color café-grisáceo a café-rojizo.

En la medicina tradicional de México, las diferentes partes vegetales de esta especie se emplean para el tratamiento de cólicos estomacales, problemas respiratorios (bronquitis y asma), diarrea, reumatismo, dolores de muela y heridas (Argueta *et al.*, 1981). Adicionalmente, los extractos de *C. odorata* han demostrado diversas actividades farmacológicas. Por ejemplo, el extracto etanólico preparado a partir de las hojas y tallos frescos presentó una actividad hipotensora en perros, administrándolo por vía intravenosa a una dosis de 0.1 ml/Kg. Dicho extracto también demostró actividad vasodilatadora en ratas. Por otro lado, el extracto hexánico y el aceite esencial obtenidos a partir de la madera tuvieron actividad antibilazhia (Gilbert *et al.*, 1970 y 1972). Así mismo, la resina de la madera es útil para el tratamiento del asma (Mora, 1976).

Otros estudios demostraron que el extracto total de la madera de *Cedrela odorata* posee una notable actividad *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* (MacKinnon & Arnason, 1997). La gedunina, el limonoide mayoritario de *C.*

odorata, presentó también una actividad inhibitoria notable en contra de las dos cepas utilizadas de este parásito.

Recientemente, se estableció que la especie *C. odorata* tiene propiedades espasmolíticas mediante la evaluación del efecto relajante del extracto de la madera y algunos de sus metabolitos sobre la contracción tónica de íleon de cobayo inducida por despolarización con K^+ (60 mM). También, se determinó el efecto herbicida del extracto y algunos metabolitos de la madera (Mezquita & Rivero, 1997).

Varias especies del género, en particular *C. odorata*, han sido investigadas desde el punto de vista fitoquímico. En los trabajos generados de estas investigaciones, se encuentran descritos el aislamiento y la caracterización de varios limonoides y protolimonoides (Chan *et al.*, 1967 y 1968; Okorie *et al.*, 1968; De Paula *et al.*, 1997, Mezquita y Rivero, 1997). Además, se ha descrito la presencia de algunos esteroles (Campos *et al.*, 1991), triterpenoides del tipo tirucalano (Campos *et al.*, 1991), sesquiterpenoides con núcleo murolano (Nagasampagi *et al.*, 1968), compuestos aromáticos simples (Jong-Cheol *et al.*, 1994) y cumarinas (Nagasampagi *et al.*, 1975). Los metabolitos más abundantes de la especie *C. odorata* son los limonoides gedunina y el protolimonoido odoratol (Figura 7).

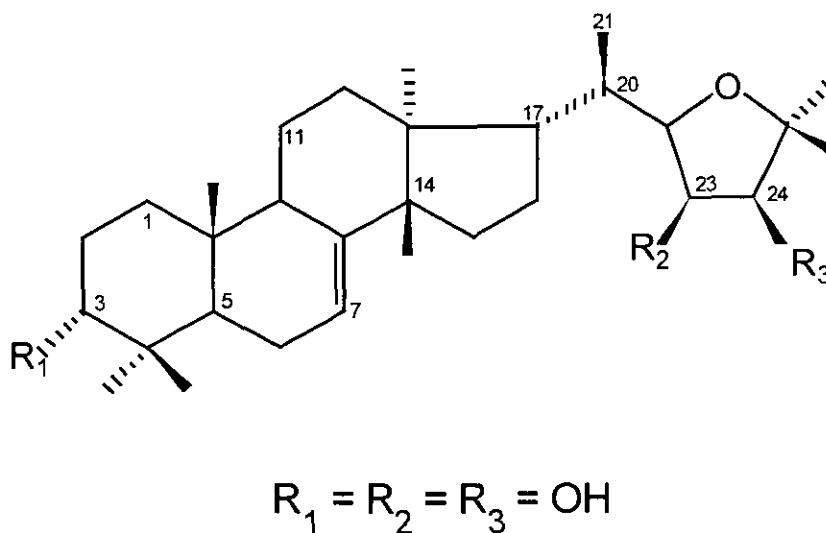


Figura 7. Estructuras del odoratol, metabolito secundario de *Cedrela odorata* (Meliaceae).

Estos antecedentes hacen de *C. odorata* una fuente atractiva de compuestos biodinámicos de interés para la agricultura y la medicina.

3.3.2.3 *Guarea grandiflora* (Meliaceae)

El género *Guarea* incluye 40 especies principalmente distribuidas en América, donde se localiza desde Veracruz, México, hasta el centro y oeste del Amazonas en Sud-América. Desde el punto de vista fitoquímico, varias especies del género han sido investigadas. La mayoría de los trabajos publicados a la fecha describen el aislamiento y caracterización de protolimonoides y limonoides como

los principales metabolitos secundarios presentes en las diferentes especies. También, se ha descrito la presencia de varios esteroides, cicloartanos y bisabolenos (Mulholland, 1988, Hasegawa *et al.*, 1989; Furlan *et al.*, 1993).

Algunos de los limonoides aislados de este género son de gran interés por sus propiedades biológicas, principalmente por su actividad insecticida. Así el metil angolensato (Figura 6) inhibe la ingesta de alimento de la especie *Pectinophora gossypiella* (Lepidopterae, EC₅₀ = 15 ppm); por su parte la prieurianina (Figura 6) inhibe el crecimiento de *Heliothis zea* a una concentración de 6 µg/ml. Sin embargo, la rohitukina no demostró efecto alguno contra *Heliothis zea* a 19 µg/ml (Klocke, 1989). Publicaciones recientes describen el efecto insecticida de algunos extractos, derivados de distintas especies de este género, mismos que inhiben significativamente el crecimiento de larvas del gusano barrendor del maíz *Ostrinia nubilalis* Hübner (*Lepidoptera pyralidae*). Las especies estudiadas incluyen la *G. glabra*, *G. pterorachis* y *G. pyriformis* y los resultados obtenidos indicaron que los extractos derivados de las hojas y de la corteza no presentaron actividad. Sin embargo, los distintos extractos orgánicos preparados a partir de la madera de *G. pyriformis* inhibieron el crecimiento de las larvas de manera significativa (Arnason *et al.*, 1992; Kubo, 1991 y 1993).

En estudios conducentes a determinar la potencialidad antiprotozoaria de extractos y productos derivados de meliáceas africanas y mexicanas se demostró que los extractos de *G. rhopalocarpa* y *G. grandiflora* inhiben el desarrollo de

Plasmodium falciparum y *Leishmania donovani* (Champagne *et al.*, 1992). En diversas partes del mundo, los árboles del género *Guarea* son apreciados por la importancia comercial de sus finas maderas, mismas que se utilizan para la elaboración de muebles y otros objetos. Por ejemplo, en Africa se emplea la madera de *G. cedrata* y *G. rhompson* y en la América tropical las de *G. gomma*, *G. glaba* y *G. cartaquenya* (Housley, 1962; Bevan *et al.*, 1963).

Guarea grandiflora A. P. de Candolle es conocida popularmente con los nombres de "Chichón de montaña" (Tabasco, Méx.), "Trompillo" (Chiapas, Méx.), "Javin", "Sabino", "Aycoy" y "Azote" (Veracruz, Méx.). Su distribución en México comprende los estados de Veracruz, Tabasco y Chiapas. La especie es un árbol de tierras bajas y crece hasta 50 m de altura; algunos de sus rasgos morfológicos más sobresalientes son las ramas con grandes espirales terminales de hojas enormes; la corteza en árboles grandes es café pálido en platos irregulares; las flores tienen un cáliz con una corola blanca o color crema. El fruto maduro es rojizo, las semillas son de un naranja brillante con un gran hilum adaxial blanco y tiene péndulos sobre el folículo (Pennington, 1981). *G. grandiflora* se emplea en la medicina tradicional para el tratamiento de la gonorrea (Pennington, 1981). En Sud-América se le atribuyen propiedades febrífugas (Balandrin & Klocke, 1985). Este árbol es apreciado por su fina madera la cual se utiliza para la fabricación de casas, muebles y otros enseres. En estudios relacionados con la determinación de la actividad antipalúdica *in vivo* e *in vitro* de algunos extractos y compuestos derivados de plantas de la familia Meliaceae, se

demostró que el extracto metanólico de *G. grandiflora* inhibía la incorporación de hipoxantina marcada con tritio en parásitos de una cepa resistente de *Plasmodium falciparum* (Bray *et al.*, 1990). Estudios fitoquímicos recientes condujeron al aislamiento de los principios activos gedunina y 7-oxo-7-deacetoxigedunina (Figura 8) de *G. grandiflora* (Villarreal, 1996).

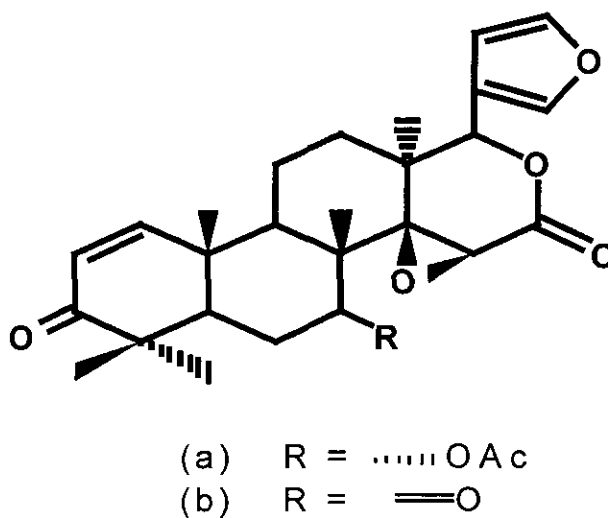


Figura 8. Estructuras de la gedunina (a) y de la 7-oxo-7-deacetoxigedunina (b), metabolitos secundarios de *Guarea grandiflora* (Meliaceae).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para combatir la gran diversidad de plagas que ocasionan graves pérdidas en los cultivos de importancia económica en las prácticas agrícolas occidentales, se emplean una serie de herbicidas orgánicos de origen sintético. Estos productos poseen una baja biodegradabilidad y por lo tanto se acumulan en los suelos causando contaminación y toxicidad para todas las formas de vida. Estos problemas hacen necesario la búsqueda de nuevas alternativas para el control de las plagas. Una de las alternativas más explorada en los últimos años consiste en la búsqueda y desarrollo de herbicidas de origen natural, tanto de origen vegetal como microbiano. Los productos naturales, en contraste con los sintéticos son biodegradables y por lo general menos tóxicos.

En comparación con los insecticidas verdes, el número de metabolitos secundarios de origen vegetal con actividad herbicida que ha alcanzado un desarrollo de tipo comercial es mínimo. A pesar de ello, muchos autores han postulado que las interacciones alelopáticas (planta-planta o planta-microorganismo) en un ecosistema particular, pueden constituir la base para el descubrimiento de aleloquímicos de utilidad para el desarrollo de herbicidas (Benner, 1993; Macías, 1993; Einhellig, 1995; Duke & Abbas, 1995). Más importante aún, estos aleloquímicos pueden servir como prototipos estructurales para la síntesis de compuestos herbicidas más eficaces y potentes que el producto

natural toxóforo (Benner, 1993; Duke & Abbas, 1995, Macías *et al.*, 1993, *inter alia*).

De ahí, que la búsqueda de agentes herbicidas a partir del reino vegetal se encuentra justificada.

Afortunadamente, México ofrece una perspectiva muy buena para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas de origen vegetal. El país cuenta con una gran biodiversidad y un gran número de las especies son endémicas. Muchas de estas especies tienen una gran variedad de metabolitos secundarios que bien podrían ser la base para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas. Para ilustrar la potencialidad de la flora mexicana como una fuente potencial de principios biodinámicos, cabe mencionar que se estima que en las prácticas medicinales populares se emplean alrededor de 3552 especies vegetales, algunas de ellas se han utilizado desde épocas prehispánicas. De acuerdo a estadísticas recientes, sólo el 11% de esas especies vegetales se ha estudiado desde el punto de vista fitoquímico. Más aún, sólo el 2.6% se ha investigado con la finalidad de obtener principios activos de importancia económica. En consecuencia algunos grupos de investigación en México, incluido el nuestro, se han abocado a la difícil tarea de descubrir nuevos agentes herbicidas potenciales a partir de plantas mexicanas. Estas investigaciones evidentemente son de carácter multidisciplinario y comprenden numerosas etapas, desde la selección de las plantas de estudio, obtención y caracterización de los metabolitos secundarios con propiedades potenciales herbicidas, hasta el establecimiento de aspectos tales como el mecanismo de penetración y transporte de los agentes hasta su sitio de acción,

mecanismos asociados con la detoxificación del herbicida potencial y el estudio de su mecanismo de acción a nivel molecular.

En este contexto el presente trabajo pretende establecer el mecanismo de acción de algunos metabolitos secundarios (aleloquímicos) aislados de tres plantas Mexicanas, *Cedrela odorata*, *Guarea grandiflora* (Meliaceae) e *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae), sobre las reacciones de la fase luminosa del proceso de la fotosíntesis. Las actividades que se pretende explorar incluyen la fotofosforilación, la captación de protones, el transporte de electrones (basal, fosforilante y desacoplado), la fluorescencia de la clorofila *a* del centro de reacción del FS II. Algunos de los eventos de la fase luminosa constituyen el blanco de acción del 50% de los herbicidas de uso comercial.

Los metabolitos secundarios seleccionados para el presente estudio son los siguientes: el odoratol, un protolimonoide aislado de *Cedrela odorata*; la gedunina y la 7-oxo-7-deacetoxigedunina, limonoides obtenidos de *Guarea grandiflora* y la tricolorina A, un glicolípido aislado de *Ipomoea tricolor*. Todos ellos demostraron una notable actividad herbicida postemergente causando clorosis y desecación de plántulas de *A. hypochondriacus*. Estas observaciones permiten establecer la siguiente hipótesis: las especies seleccionadas de las familias *Meliaceae* y *Convolvulaceae* contienen metabolitos secundarios (aleloquímicos) que poseen una actividad potencial herbicida postemergente, se espera que al caracterizarlos, dichos metabolitos tengan actividad inhibitoria sobre la fotosíntesis *in vitro*.

De manera adicional, cabe indicar que a la fecha no se han realizado

estudios de limonoides o glicolípidos sobre el proceso de la fotosíntesis, por lo que los resultados del presente trabajo asumen el carácter de original.

Por último, cabe mencionar que los resultados derivados de este estudio podrían ser de utilidad para el desarrollo de nuevos herbicidas biodegradables. Así mismo, el presente proyecto pretende incidir sobre nuevas alternativas en el manejo de los recursos naturales, y en consecuencia, se promoverá la necesidad de su conservación para su empleo como materias primas en la industria agroquímica.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de algunas fitotoxinas, aisladas y purificadas de *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae), *Cedrela odorata* L. y *Guarea grandiflora* L. (Meliaceae), sobre el metabolismo energético de cloroplastos de espinacas y establecer el mecanismo de acción bioquímico mediante el cual ejercen su actividad.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

5.2.1 Estudiar la actividad de los metabolitos secundarios obtenidos a partir de las plantas seleccionadas sobre la síntesis de ATP y la captación de protones en los cloroplastos.

5.2.2 Determinar el efecto sobre los transportes de electrones (basal, fosforilante y desacoplado) de aquellos metabolitos que inhiban la síntesis de ATP y la captación de protones.

5.2.3 Determinar el blanco de acción de las fitotoxinas mediante el estudio de las reacciones parciales de la cadena redox de los cloroplastos, usando técnicas polarográficas, cuando los metabolitos actúen como inhibidores de la reacción de Hill.

5.2.4 Realizar experimentos de fluorescencia con el fin de reforzar y corroborar los datos obtenidos de las reacciones parciales en cuanto a los daños causados por los metabolitos secundarios en los dos lados (donador y/o aceptor) del FS II.

5.2.5 Establecer posibles relaciones entre la estructura química y la actividad biológica, mediante la preparación de derivados.

5.2.6 Divulgar los resultados de la tesis durante el desarrollo del presente proyecto de investigación a través de su publicación en revistas de circulación internacional y en congresos científicos nacionales e internacionales.

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1 OBTENCION DE CLOROPLASTOS

Los cloroplastos de hojas de espinaca (30 g) se aislaron usando las técnicas de homogeneización y centrifugación diferencial. Se cortaron las hojas en trozos pequeños y se homogeneizaron en licuadora durante 5 seg., a máxima potencia, en un medio de aislamiento que contiene sacarosa 400 mM, tricina 30 mM, pH 8.0, KCl 20 mM y MgCl₂ 5 mM. El homogenado resultante se filtró en ocho capas de gasa y el filtrado se centrifugó a 4000 r.p.m. (Rotor SORVALL® SL-50T) durante 5 min a 4 °C en una centrifuga Sorvall. El residuo (pellet) se suspendió en un volumen mínimo del medio de aislamiento (0.6 mL approx.) (Peña-Valdivia *et al.*, 1991; Lotina-Hennesen *et al.*, 1991)

6.2 DETERMINACION DE CLOROFILA

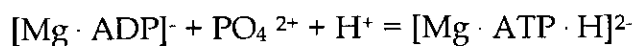
El contenido de clorofila en las muestras se determinó espectrofotométricamente de acuerdo al método descrito por Strain *et al.* (1971): en un tubo aforado se colocó una alícuota de 30 µl de la suspensión de cloroplastos, se adicionó acetona al 80% hasta obtener 5 ml de una nueva suspensión. Esta suspensión se agitó en un vortex y se mantuvo en la oscuridad

por 5 min. para permitir la extracción y solubilización de la clorofila. Posteriormente, se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 5 min. para eliminar las proteínas precipitadas. El contenido de clorofila se cuantificó mediante la determinación de la absorbancia a 663 y 645 nm, utilizando un espectrofotómetro Beckman (Modelo DU-650) y la concentración de clorofila se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$[\text{Clorofila}] = 8.05 A_{663} + 20.9 A_{645} \quad [\text{Clorofila}] = \mu\text{g Chl/ml}$$

6.3 EVALUACION DE LA SINTESIS DE ATP

La fotofosforilación se midió registrando los cambios de pH en el medio de reacción empleando un potenciómetro Corning (Modelo 12) de escala expandida conectado a un registrador gráfico y un microelectrodo combinado sensible a cambios pequeños de pH. Para ello, al medio de reacción (3 ml) que contiene sorbitol 100 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tricina 1 mM y metilviológeno 100 μM (pH 8.0), se le adicionó ADP 1 mM, KH₂PO₄ 3 mM y la cantidad de cloroplastos correspondiente a 20 μg/mL de clorofila (Lotina-Hennsen *et al.*, 1987). La mezcla anterior se mantuvo en agitación constante y con iluminación. El cambio de pH registrado es el resultado del consumo o producción de un equivalente de protón por ATP biosintetizado según la siguiente ecuación:



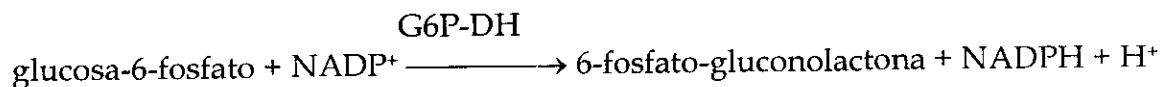
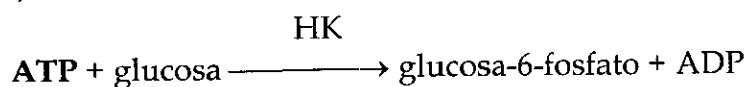
Esta técnica es comúnmente utilizada para determinar la velocidad de síntesis de ATP (o su hidrólisis).

6.4 MEDICION DE LA SINTESIS DE ATP POR EL METODO DE "ATP TRAP"

El método se basa en que la cantidad de ATP generado en la fotosíntesis sirve para fosforilación de la glucosa por la hexocinasa generando la glucosa-6-fosfato. Este producto a su vez se convierte a 6-fosfato-D-gluconolactona por acción enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, usando como coenzima al NADP^+ , el cual se reduce a NADPH_2 por los protones liberados. La estequiometría es de 1:1 (por cada mol de ATP formado se produce una mol de NADPH). Entonces, la cantidad de NADPH, cuantificable por espectrofotometría a 340 nm, correlaciona de manera estequiométrica con la cantidad de ATP biosintetizada durante la fotosíntesis (Trauschold, 1985). Esta determinación de la concentración de ATP es de tipo enzimático. Al medio (2.5 ml) de transporte de electrones que contiene sorbitol 100 mM, MgCl_2 5 mM, KCl 10 mM y tricina 10 mM (pH 8.0), se le añade glucosa 1 M, ADP 1 mM, KH_2PO_4 3 mM, 4 Unidades de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), NADP 7 mM, Hexocinasa (HK) 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y la cantidad de cloroplastos equivalente a la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de clorofila. Se tomaron lecturas a 340 nm, antes y después de iluminar, durante 1.5 min. en un espectrofotómetro Beckman DU-650. En el control, los compuestos bajo estudio no tuvieron efecto alguno sobre las actividades de las enzimas usadas en este método. El "ATP atrapado" se basa en el siguiente principio:

ATP (síntesis tilacoidal)

↓



6.5 CAPTACION DE PROTONES

El bombeo de protones se midió de manera similar a la síntesis de ATP potenciométrico, pero sin añadir ADP y KH_2PO_4 al medio de reacción (Dilley, 1972), en el cual se observa una alcalinización.

6.6 DETERMINACION DE LA VELOCIDAD DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DE LA CADENA REDOX TILACOIDAL

El transporte de electrones se determinó al monitorear la producción de oxígeno que se libera de la fotólisis del agua, mediante un oxímetro YSI conectado a un electrodo tipo Clark. El oxímetro se conectó a un registrador gráfico Beckman. La cubeta de reacción contenía 3 ml de medio de transporte de electrones (sorbitol 100 mM, MgCl_2 5 mM, KCl 10 mM, tricina 15 mM a pH 8 y metilviológeno 100 μM) y la cantidad de cloroplastos correspondiente a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de clorofila. Se usó una lámpara de proyector de 250

Watt como fuente de iluminación. El haz luminoso se filtró a través de una lente de Izawa (CuSO_4 al 2%) (Trebst, 1972; Lotina-Hennesen *et al.* 1991). Las actividades del flujo de electrones evaluadas fueron el transporte basal, el transporte fosforilante en el cual se añadieron al medio de reacción basal ADP 1 mM y KH_2PO_4 3 mM; y el desacoplado añadiendo NH_4Cl 6 mM como agente desacoplante (Trebst, 1972).

6.6.1 REACCIONES PARCIALES DE LOS FOTOSISTEMAS I Y II.

La medición de las velocidades de transporte de electrones en los fotosistemas I y II se efectuó con el medio de transporte basal, el cual se suplementó con agentes donadores, aceptores e inhibidores de electrones exógenos como se explica a continuación:

6.6.1.1 Fotosistema I

A la cubeta de reacción se le añadieron DCMU ($10 \mu\text{M}$) como inhibidor del FS II, DCPIP ($100 \mu\text{M}$) y ascorbato ($300 \mu\text{M}$) como donador de electrones del FS I, metilviológeno ($100 \mu\text{M}$) como aceptor de electrones, NH_4Cl 6 mM y los cloroplastos a concentración de 20 μg de clorofila/ml. La velocidad del transporte de electrones se calculó al añadir al medio, sin metilviológeno, 10 μl de una solución de ferricianuro de potasio (40 mM) como aceptor de electrones, iluminando la mezcla que contiene los cloroplastos por un minuto (Lotina-Hennesen *et al.*, 1991; Peña-Valdivia *et al.*, 1992).

6.6.1.2 Fotosistema II

Al medio de transporte de electrones basal sin metilviológeno se adicionó DBMIB (1 μM) para impedir el paso de los electrones hacia el FS I, el sistema DCPIP (50 μM) y ferricianuro de potasio (300 mM) como el aceptor final de electrones del FS II, NH_4Cl (6 mM) y la cantidad de cloroplastos equivalente a la concentración de 20 μg de clorofila/ml (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991).

Reacciones parciales de la cadena redox $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiMo}$ y $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DAD}$: se determinó en el medio de reacción del FS II, al cual se adicionó SiMo (200 μM) o DAD (100 μM) como aceptor de electrones y DCMU (10 μM) (Giaquinta & Dilley, 1975).

Reacción parcial de $\text{DPC} \rightarrow \text{DCPIP}$: los cloroplastos, obtenidos de la manera descrita arriba, se trataron con Tris 0.8 M (pH 8.0) en una proporción de 1 ml de medio por 0.3 mg de clorofila y se incubaron durante 30 min. a 0-4 $^{\circ}\text{C}$ y con agitación continua en la oscuridad. Posteriormente, la mezcla anterior se centrifugó durante 5 min. a 4000 r.p.m. (Rotor SORVALL[®] SL-50T), se determinó el contenido de clorofila (se tomó 60 μg de clorofila) y por último, se evaluó el transporte de electrones en un medio de reacción con DPC (200 μM) y DCPIP (100 μM). La evaluación espectrofotométrica se realizó a la longitud de onda de 600 nm (Vernon & Shaw, 1969).

6.7 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA Mg^{2+} -ATPasa

El aislamiento de los cloroplastos se efectuó de la manera ya indicada. El precipitado resultante se resuspendió en un medio que contiene sorbitol 350 mM, EDTA 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $MnCl_2$ 1 mM y HEPES 50 mM (pH 7.6) (Mills *et al.*, 1980). El contenido de clorofila en la muestra se determinó de acuerdo al método de Strain *et al.* (1971).

El complejo CF_0 - CF_1 unido a la membrana tilacoidal se activó mediante la iluminación de los cloroplastos durante 2 min. con una lámpara de proyector de 250 Watts a través de un lente de Izawa. La activación se llevó a cabo en 0.25 ml del siguiente medio (i) sorbitol 1.2 M y tricina 100 mM (pH 8.0) y 0.65 ml del medio (ii) $MgCl_2$ 5 mM y tricina 15 mM (pH 8.0) y 0.1 ml de la suspensión de cloroplastos equivalente a la concentración de 0.3 mg de clorofila.

6.7.1 HIDROLISIS DE ATP

Se utilizó 0.9 ml de medio de hidrólisis de ATP (KCl 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, tricina 15 mM (pH 8.0) y ATP 2.2 mM) al cual se agregó 0.1 ml de la suspensión de cloroplastos activados. El proceso se realizó en la obscuridad absoluta y con agitación suave a 22 °C durante un minuto. La reacción se suspendió al añadir 0.5 ml de ácido tricloroacético al 20%. Posteriormente, la muestra se centrifugó durante 5 min. a 2000 r.p.m. en una centrífuga clínica para eliminar el residuo proteico y posteriormente determinar el fosfato liberado en el sobrenadante (Mills *et al.* 1980).

6.7.2 CUANTIFICACION DE LA CONCENTRACION DE FOSFATOS

El fosfato liberado se cuantificó por el método colorimétrico de Sumner (1974). Se toma una alícuota del sobrenadante (con un contenido de 1 mmol de Pi) y se afora a 1.6 ml. A la mezcla resultante se añadió 0.25 ml de una solución acuosa (6.6%) de molibdato de amonio y 2.5 ml del ácido sulfúrico 7.5 N, con agitación suave. A esta última mezcla se agregó una solución acidificada del compuesto colorido de sulfato ferroso al 9.8% y se dejó reposar por 20 min. a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650. Se hizo una curva de calibración de KH_2PO_4 .

6.8 MEDICION DE LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA

La fluorescencia de la clorofila *a* se midió con un fluorómetro (Plant Efficiency Analyser, PEA; Hansatech UK) (Strasser *et al.*, 1995). Las alícuotas de cloroplastos intactos (15-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de clorofila), se incubaron en la oscuridad completa durante 5 min. La excitación con luz se obtuvo con un conjunto de seis diodos transmitiendo 600 Watts m^{-2} de luz roja (con el pico a 650 nm). El instrumento captura automáticamente el rendimiento de la fluorescencia de la clorofila *a* mediante un diodo, cubierto con un filtro $T_{50} = 705 \text{ nm}$, cada 10 μs durante los primeros 2 ms, cada ms entre 2 ms y 1 s, y cada 100 ms después. El

aumento del rendimiento de la fluorescencia de un valor mínimo (F_0) a un valor máximo (F_m) es indicativo de una acumulación del aceptor primario de electrones reducido Q_A^- en los centros de reacción del FS II (Strasser *et al.*, 1995). Se usó el DCMU como un control positivo en el caso de los cloroplastos tratados con las tricolorinas A, B, C y E. Las muestras tratadas con hidroxilamina (control positivo en el caso del odoratol y sus derivados) se lavaron varias veces con el buffer de aislamiento antes del ensayo. El rendimiento de la fluorescencia variable de la clorofila *a* ($F_v=(F_m-F_0)$) es un indicador sensible de los estados redox del FS II (Krause & Weis 1994).

El análisis cinético de la fluorescencia variable relativa se hizo por deconvolución con un ajuste no lineal de los datos acumulados durante los primeros 2 ms con un intervalo de resolución de 10 μ s.

6.9 CINÉTICAS DE COMPETENCIA DE LA 7-OXO-7-DESACETOXIGEDUNINA

Para la realización de los experimentos de competencia se usaron tilacoides depletados de CF_1 . A una concentración fija de un inhibidor (7-oxo-7-deacetoxigedunina, DCCD o 5-O- β -galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina) se incubó la muestra (20 μ g de clorofila por ml) variando la concentración del otro inhibidor. Los resultados se presentaron en gráficas de doble inhibición donde la velocidad (V) es la restauración de la captación de protones en la presencia de la mezcla de inhibidores en el medio.

6.10 DETERMINACION DEL Δ pH TRANSMEMBRARANAL

El Δ pH transtilacoidal se determinó por apagamiento de la fluorescencia de ACMA y la 9-aminoacridina (9-AA). El medio de reacción contenía sorbitol 250 mM, MOPS/BTP 20 mM (pH 7.8), ATP 5 mM, ACMA 1.5 μ M y 9-AA 3 μ M (Rottenberg y Moreno-Sánchez 1993). La reacción se realizó en una celda para fluorómetro con un volumen final de 2.5 ml, con agitación suave y a temperatura controlada (22 °C). Se usó un fluorómetro Shimadzu RF5000U. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron 415 y 480 nm, respectivamente. La reacción se inició por la adición de los cloroplastos sobre el volumen final de la reacción que contenía los demás componentes incluyendo la tricolorina A. Se determinó la pendiente negativa de la disminución del apagamiento de la fluorescencia hacia el final del trazo de dos minutos de reacción continua. Al término de este tiempo, se desacopló el sistema con la adición de nigericina como un control. Al añadir este desacoplante se observa una recuperación de la fluorescencia (H. Rottenberg & R. Moreno-Sánchez, 1993).

6.11 OBTENCION Y CARACTERIZACION DE DE LOS COMPUESTOS NATURALES Y ALGUNOS DE SUS DERIVADOS

6.11.1 Obtención del odoratol

El odoratol se obtuvo de un extracto CHCl_3 /metanol (1:1) preparado a partir de la madera de *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) según se describió previamente (Mezquita & Rivero, 1996). La estructura de este producto natural se estableció mediante el uso de técnicas espectrométricas y espectroscópicas (IR y RMN) (Chan *et al.*, 1968).

6.11.2 Obtención del triacetil odoratol y del acetónido del odoratol

Se trató el odoratol con anhídrido acético y piridina y se obtuvo el triacetil del odoratol. Para la preparación del acetónido del odoratol, éste último (15 mg) se trató con acetona en condiciones ácidas a temperatura ambiente. La mezcla se calentó a reflujo durante dos horas. Los dos derivados se caracterizaron por técnicas espectroscópicas y espectrométricas (Apéndice II).

6.11.3 Obtención de la GD y la OGD

Los limonoides GD y OGD se obtuvieron de un extracto de CHCl_3 de las semillas de *Guarea grandiflora* (Meliaceae). El material secado al aire (500 g) se molió con CHCl_3 . El extracto resultante se concentró al vacío y se sometió a

cromatografía en columna sobre el gel de sílice. La columna se eluyó usando mezclas de polaridad creciente del hexano-CHCl₃Ac (0→10). Se obtuvo un total de VII fracciones. De la fracción IV, eluido con hexano-CHCl₃ (70:30) cristalizaron 70 mg de gedunina. De la fracción VI eluida con hexano:CHCl₃ (1:1) cristalizaron espontáneamente 1 g de OGD. La GD se caracterizó mediante la comparación con una muestra patrón del compuesto obtenido previamente de *Cedrela salvadorensis* (Toscano *et al.*, 1996). La OGD se caracterizó por un análisis de difracción de rayos X (Apéndice III).

6.11.4 Obtención de la tricolorina A

Los detalles para la purificación de la tricolorina A, a partir de las resinas glicosídicas por medio de un extracto de CHCl₃ de *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae) están descritos en el trabajo de Pereda-Miranda *et al.*, 1993. El empleo de la cromatografía de líquidos de alta resolución preparativa (preparative HPLC) para el aislamiento de la tricolorina A de la mezcla de oligosacáridos, se realizó en el sistema de multisolvente Waters 600E equipado con un detector refractómetro diferencial Waters 410. El sistema de cromatografía opera en el modo de reciclaje empleando soportes de la fase inversa que se caracteriza por la presencia de cadenas hidrocarbonadas C₁₈ (15 µm; 20 x 250 mm). Una solución isocrática con CH₃CN-H₂O= (4:1; velocidad de flujo = 3.5 ml/min) se usó para separar 12.6 mg de la tricolorina A (R_t = 22.3 min) de 20 mg del extracto crudo de las resinas glicosídicas. El compuesto aislado resultó

idéntico (p.f., RMN, CCF y HPLC) a una muestra auténtica de la tricolorina A previamente caracterizada (Bah & Pereda-Miranda, 1996). La derivatización de la tricolorina A se llevó a cabo mediante la hidrólisis alcalina (5% KOH/H₂O). La tricolorina A (10 mg) liberó un ácido soluble en agua (3.5 mg), asignado como el ácido tricolórico. Este último (1.5 mg) se trató con CH₂N₂ para obtener el metil éster del ácido tricolórico, un derivado alquílico. Los derivados obtenidos se identificaron mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

Las tricolorinas B, C y E (Apéndice IV) de las resinas glicosídicas de *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae) se obtuvieron y se caracterizaron empleando los procedimientos previamente descritos (Bah & Pereda-Miranda, 1996).

6.11.5 Caracterización de los compuestos aislados y sus derivados

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros en el IR (film) se midieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer 599. El análisis por difracción de rayos X se realizó en un difractómetro Siems P4/PC. Los espectros de RMN se obtuvieron en un aparato Varian UNITY PLUS 500 utilizando CDCl₃ como disolvente y TMS como referencia interna. Todos los análisis arriba indicados se efectuaron en el Instituto de Química de la UNAM.

VII. RESULTADOS

Los resultados de la presente investigación se dividen en tres partes. La primera se describe en el artículo (TRABAJO 1): "Interference of the Natural Product 7-oxo-7-deacetoxygedunin with CF_0 of H^+ -ATPase of Spinach Chloroplasts" (1999) L. Achnine, R. Mata & B. Lotina-Hennsen, el cual fue aceptado para su publicación en *Pesticide Biochemistry and Physiology*. En este artículo se presentan los resultados derivados del estudio del efecto de la GD y la OGD sobre la H^+ -ATPasa cloroplástica.

La segunda parte comprende la caracterización bioquímica del efecto del odoratol sobre el lado donador del FS II. Los resultados de este trabajo y sus implicaciones se describen en el artículo (TRABAJO 2): "Impairment of Photosystem II Donor Side by the Natural Product Odoratol" (1998) L. Achnine, R. Mata, R. Iglesias-Prieto & B. Lotina-Hennsen, el cual fue publicado en *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 46, N. 12, pp. 5313-5317.

Por último, la parte final trata sobre los efectos desacoplante e inhibidor de la tricolorina A. Los resultados se resumen en el artículo: (TRABAJO 3): "Tricolorin A, a Potent Natural Uncoupler and Inhibitor of Photosystem II Acceptor Side of Spinach Chloroplasts" (1999) L. Achnine, R. Pereda-Miranda, R. Iglesias-Prieto, R. Moreno-Sánchez & B. Lotina-Hennsen, el cual fue aceptado para su publicación en *Physiologia Plantarum*.

TRABAJO N° 1

“Interference of the Natural Product 7-oxo-7-deacetoxygedunin with CF₀ of H⁺-ATPase of Spinach Chloroplasts” (1999)

L. Achnine, R. Mata & B. Lotina-Hennsen

Pesticide Biochemistry and Physiology, Volume 63 (*en prensa*)

Pesticide Biochemistry and Physiology 63, 000-000 (1999)

Article ID pest.1999.2398, available online at <http://www.idealibrary.com> on IDEAL®Interference of the Natural Product 7-Oxo-7-deacetoxygedunin with CF_0 of H^+ -ATPase of Spinach Chloroplasts¹Lahoucine Achnine,* Rachel Mata,† and Blas Lotina-Hennsen*²

*Departamento de Bioquímica y †Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México.

Received August 17, 1998; accepted January 16, 1999

7-Oxo-7-deacetoxygedunin, a limonoid isolated from *Guarea grandiflora* (Meliaceae) has been found to act as an inhibitor of photophosphorylation in spinach thylakoids. ATP synthesis and phosphorylating electron flows were inhibited by 88 and 83%, respectively, at 300 μ M of 7-oxo-7-deacetoxygedunin without affecting proton uptake, basal and uncoupled electron transports. The ketone group of 7-oxo-7-deacetoxygedunin is an important structural requirement for the displayed inhibitory activity on chloroplast H^+ -ATPase, since gedunin possessing a 7 α -acetoxy group was a less potent energy transfer inhibitor. The light-activated membrane bound Mg^{2+} -ATPase and the heat-activated Ca^{2+} -ATPase of the isolated coupling factor were insensitive to 7-oxo-7-deacetoxygedunin. 7-oxo-7-deacetoxygedunin shows a competitive kinetic behavior with 5-*O*- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin when they inhibit H^+ -ATPase activity, but a noncompetitive kinetic with DCCD. These results suggest that 7-oxo-7-deacetoxygedunin and the 4-phenylcoumarin have the same surrounding site of inhibition in CF_0 . K_i for 7-oxo-7-deacetoxygedunin, 4-phenylcoumarin, and DCCD were 146, 220, and 10 μ M, respectively. © 1999 Academic Press

Key Words: Energy transfer inhibitor, photosynthesis, *Guarea grandiflora*, Meliaceae, CF_0 - H^+ -ATPase, 7-oxo-7-deacetoxygedunin, gedunin.

INTRODUCTION

ATP synthesis from ADP and phosphate in chloroplasts is catalyzed by the H^+ -ATPase associated with the thylakoid membranes. Its structure is bipartite with a membrane embedded, proton-conducting portion, F_0 , and a peripheral portion, F_1 , which protrudes from the membrane toward the stroma. One of the main experimental approaches to study the mechanism of photophosphorylation is the use of specific inhibitors that affect the light-dependent ATP synthesis in chloroplasts by blocking electron transport coupled to ATP synthesis or by directly inhibiting photophosphorylation reactions. This latter inhibition (energy transfer inhibition) may be local-

ized at CF_0 ³ or at CF_1 . For example, phlorizin, DIO-9, *N*-ethylmaleimide, 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one, and tentoxin appear to inhibit isolated CF_1 (1-4). However, DCCD, triphenyltin chloride, and 5-*O*- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3', 4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin seem to interact with CF_0 (3, 5, 6). Moreover, in the chloroplast H^+ -ATPase complex, the membrane sector is composed of four subunits I-IV. A major constituent of CF_0 is a hydrophobic protein of about 8 kDa, component III, commonly referred to as a proteolipid, which is the binding site of DCCD (7).

The Meliaceae family is characterized by the presence of limonoid triterpenes, many of which exhibit a wide range of biological activities, including antifeedant, toxic, or growth reducing

¹ This work was taken in part from Ph.D. thesis of L. Achnine.

² To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: + 52 5 622 53 29. E-mail: blas@servidor.unam.mx.

³ Abbreviations used: CF_1 , chloroplast coupling factor 1; CF_0 , proton channel of ATP synthase; DCCD, dicyclohexylcarbodiimide; EDTA, ethylene-diaminetetraacetic acid; GD, Gedunin; OGD, 7-oxo-7-deacetoxygedunin.



properties to different species of insects (8). For example, from the asian species *Azadirachta indica* A. Juss and *Melia azedarach* L., two limonoids have been commercialized as insecticidal agents, namely azadirachtin in the USA and toosendanin in China (9). Moreover, GD and OGD, isolated from several Meliaceae species, possess also antifeedant properties. However, the effect of limonoids on photosynthesis remains unexplored. Therefore, in an attempt to find new leads for the development of herbicidal agents from natural sources affecting photosynthesis and to promote further knowledge about the biological properties of these secondary metabolites, the aim of the present study was to evaluate the effect of 7-oxo-7-deacetoxygedunin (OGD) and gedunin (GD), isolated from *Guarea grandiflora* (Meliaceae) on several photosynthetic reactions in isolated spinach chloroplasts.

MATERIALS AND METHODS

Tested Material

Limonoids OGD and GD were obtained from the CHCl_3 extract of the seeds of *Guarea grandiflora* (Meliaceae). The air-dried material (500 g) was macerated with CHCl_3 . The resulting extract was concentrated in vacuum and subjected to column chromatography on silica gel. The column was eluted with mixtures of increasing polarities of hexane-EtOAc to yield OGD and GD (Fig. 1). Gedunin was characterized by comparison of an authentic sample (10). For all assays OGD and GD were of 100% purity. One-millimolar stock solutions of OGD, GD, and 4-phenylcoumarin in DMSO were used. The final concentration of DMSO in the assay medium never exceeded 0.03%.

Chloroplast Isolation, Chlorophyll Determination, and Measurement of Proton Uptake, ATP Synthesis, and Electron Transport

Intact chloroplasts were obtained from market spinach leaves (*Spinacea oleracea* L.) as previously described (11, 12), suspended in 400 mM sucrose, 5 mM MgCl_2 , and 10 mM KCl,

and buffered with 0.03 M Na^+ -tricine at pH 8.0. The chlorophyll concentration was measured spectrophotometrically (13).

Proton uptake reaction was measured as the pH rise between 8.0 to 8.1 (14) using a combination microelectrode connected to a Corning potentiometer with expanded scale. The pH changes were recorded (Gilson recorder). The reaction medium was 100 mM sorbitol, 5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 1 mM Na^+ -tricine, pH 8.0 (KOH), and with 20 μg of chlorophyll per milliliter; the freshly intact chloroplasts were hypotonically lysed in this medium. This reaction mixture was titrated with 0.001 M KOH. ATP synthesis was measured as in proton uptake conditions but in the presence of 1 mM ADP and 3 mM KH_2PO_4 (15). In the assay media 100 μM methylviologen was used to facilitate both ATP synthesis and proton uptake. The ATP synthesis data were corroborated by the enzymatic method of ATP trap (16). In the controls used for ATP trap measurements, OGD and GD did not show any effect on the hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities.

Photosynthetic noncyclic electron flow from water to methylviologen (100 μM) was determined by oxygen uptake using a Clark-type electrode connected to an oxygraph 5300 as reported (12). KCN (0.1 mM) was added to the reaction mixture to inhibit any catalase activity.

Mg^{2+} - and Ca^{2+} -ATPase and EDTA-treated Chloroplast Assays

Light triggered Mg^{2+} -ATPase activity bound to thylakoid membranes was done as in (17). To obtain CF_1 -depleted chloroplasts and solubilized CF_1 , an aliquot of fresh chloroplasts was diluted with 0.75 mM EDTA pH 7.6 and incubated for 10 min at 20°C. CF_1 -depleted membranes were removed by centrifugation. Of this EDTA supernatant (containing CF_1 complex), 0.5 ml was added to 0.5 ml of 20 mM tricine, pH 8.0, 2 mM EDTA, 10 mM DTT, 40 mM ATP, heated at 60°C for 4 min. Of the resulting ATPase-activated mixture, a 0.1-ml aliquot was incubated for 20 min at 37°C with 0.9 ml of a medium containing 50 mM Tris, pH 8.4, 5 mM CaCl_2

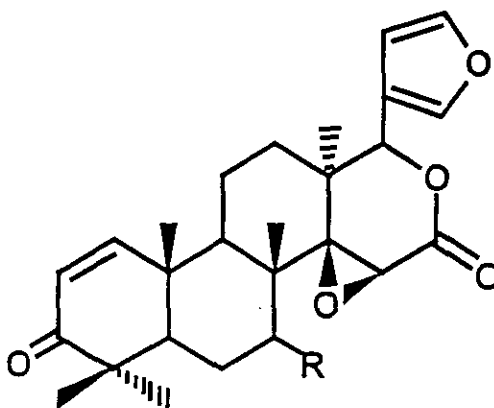


FIG. 1. Chemical structures of 7-oxo-7-deacetoxygedunin (OGD) and gedunin (GD).

and 5 mM ATP (18,19). Released inorganic phosphate was measured as previously described (20). Protein was determined by the bicinchoninic acid procedure, using BSA as a standard (21).

The Washing Procedure of EDTA-Treated Thylakoids and Kinetic Studies

The washing procedure of CF_1 -depleted chloroplasts was repeated four times (5). The reaction mixture (2.0 ml) for the washing procedure contained 100 mM sucrose, 2.5 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 100 μ M methylviologen, 0.5 mM HEPES-KOH (pH 7.5), and chloroplasts containing 200 μ g chlorophyll. OGD-treated, washed chloroplasts were prepared by adding OGD to CF_1 -depleted chloroplasts at a ratio of 100 μ mol OGD/2 mg chlorophyll. A small aliquot (containing 200 μ g chlorophyll) was assayed for proton uptake and the remainder diluted to 40 ml with the chloroplast suspending medium. The treated chloroplasts were sedimented at 5000g for 5 min (at 4°C), resuspended in 40 ml fresh medium, and again sedimented. This washing procedure was repeated two additional times. The final pellet was resuspended in a small volume of medium and an aliquot (200 μ g chlorophyll) assayed for proton uptake rate measurement.

Kinetic Experiments

The results were presented as double reciprocal plots where the double inhibition experiments were performed by adding to EDTA-treated thylakoids (20 μ g of chlorophyll per milliliter) a fixed concentration of one CF_0 inhibitor and varying concentrations of the other inhibitor. The reaction was measured as the restoration of H^+ -uptake in the presence of the mixture of inhibitors in the same medium as described (14, 15).

RESULTS AND DISCUSSION

Effects of OGD and Gedunin on ATP Synthesis, ATP Hydrolysis, and Electron Transport

OGD (350 μ M) inhibited ATP synthesis coupled to electron transfer from water to methylviologen in freshly lysed intact spinach chloroplasts by 88% without affecting proton uptake. Mg^{2+} -ATPase activity was slightly inhibited by OGD (Fig. 2).

The light-dependent formation of ATP can be inhibited by either blockage of the electron transport, direct inhibition of the H^+ -ATPase complex, or uncoupling of ATP synthesis process from the electron transport (22). To further

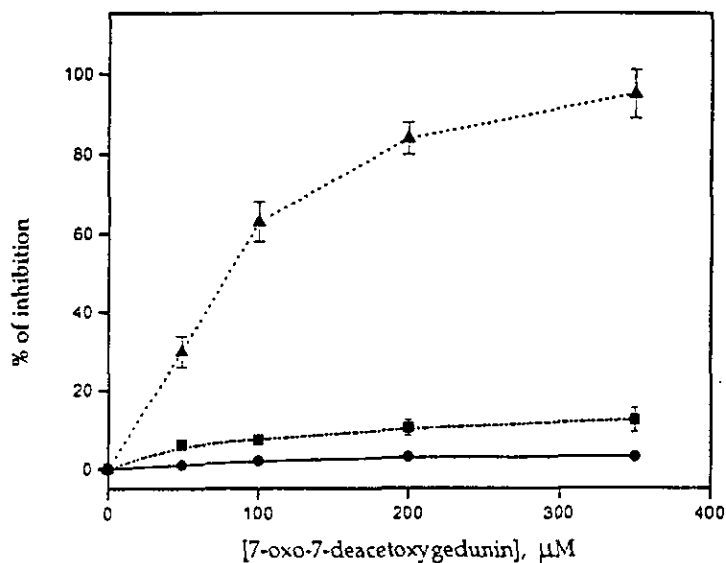


FIG. 2. ATP synthesis (\blacktriangle), proton uptake (\bullet), and Mg^{2+} -ATPase activity (\blacksquare) as a function of 7-oxo-7-deacetoxygedunin concentrations. Control value rates for proton uptake and ATP synthesis were 580 and 510 $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl.}^{-1}$, respectively, and for Mg^{2+} -ATPase was 300 $\mu\text{mol Pi} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Chl.}^{-1}$.

explain the effect of OGD on ATP synthesis, its mechanism of action on various electron transports activities was determined. Phosphorylating electron flow was inhibited by OGD with half-maximal concentration (IC_{50}) of 134 μM (Fig. 3). However, basal and uncoupled electron flows (5 mM ammonium chloride) from water to methylviologen were unaffected by this compound (Fig. 3). These results on different photosynthetic activities indicate that OGD acts as energy transfer inhibitor. This behavior is similar to that found for energy transfer inhibitors like zizyphine A, zizyphine B, amphibine C, amphibine D, phlorizin, and DCCD (2, 5, 23).

In order to examine if the 7-oxo grouping of OGD has any influence on the inhibition of photophosphorylation, gedunin possessing a 7 α acetoxy moiety was also tested on the same photosynthetic activities. The results show that GD was a less potent energy transfer inhibitor than

OGD (compare Figs. 3 with 4). Gedunin inhibited ATP synthesis, H^+ -uptake, and phosphorylating electron transports by nearly 50% at 300 μM , without affecting basal and uncoupled (5 mM ammonium chloride) electron flows (Fig. 4), and the Mg^{2+} -ATPase activity. Thus, the ketone group at C-7 in OGD seems to be an important structural requirement for the observed activities.

The behavior of OGD and GD as inhibitors of photophosphorylation is similar to that exhibited by certain energy transfer inhibitors as DCCD, DIO-9 (1, 3), kaempferol, phlorizin, piquerol A, and triphenyltin (5, 24, 25).

Effect of OGD and GD on Mg^{2+} - and Ca^{2+} -Dependent ATPases Activities

To determine whether OGD and GD interact with the catalytic unit of the H^+ -ATPase complex

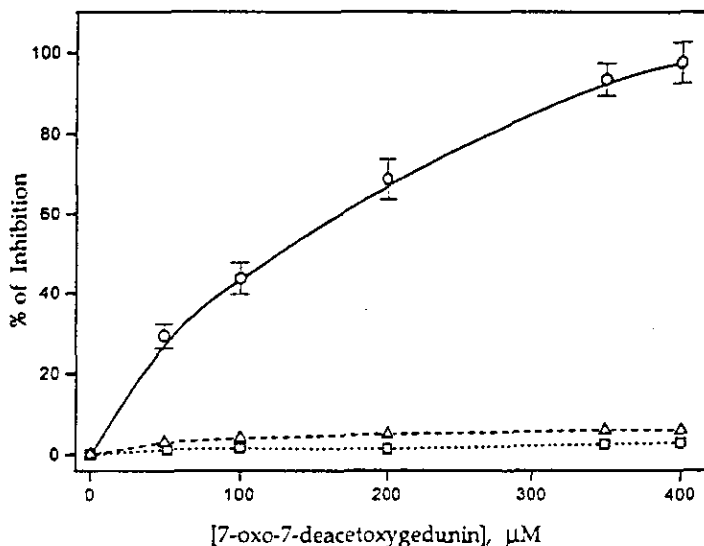


FIG. 3. Effects of 7-oxo-7-deacetoxygedunin on phosphorylating (O), basal (Δ), and uncoupled (\square) electron transports from water to methylviologen in freshly lysed spinach chloroplasts. Control value rates for basal, phosphorylating, and uncoupled electron transports were 300, 600, and 856 $\mu\text{eq. e}^{-}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg of Chl.}^{-1}$, respectively.

when they act as photophosphorylation inhibitors, their effect on isolated CF_1 Mg^{2+} - and Ca^{2+} -dependent ATPases was investigated. Table 1 shows that increasing additions OGD up to 300 μM to both Mg^{2+} - and Ca^{2+} -dependent ATPases does not promote significantly the inhibition of the ATP hydrolysis. The mentioned ATPases activities were inhibited only by 7 and 6%, respectively, at 300 μM of OGD. Gedunin does not have any significant inhibitory effect on both Ca^{2+} - and Mg^{2+} -dependent ATPases activities (Table 1). These data suggest that OGD and gedunin do not interfere with CF_1 when acting as energy transfer inhibitors.

7-Oxo-7-deacetoxygedunin Restores the H^+ -Uptake in EDTA-Treated Chloroplasts

To localize the target of OGD on H^+ -ATPase complex, we studied its effect on EDTA-treated thylakoids. It is known that the removal of CF_1

from thylakoid membranes results in an enhancement of proton permeability (26). Moreover, certain energy transfer inhibitors such as DCCD and triphenyltin interact with CF_0 and decrease the K_d (Rate constant) of proton efflux (27, 28). The proton uptake of thylakoids partially stripped of CF_1 can be restored by adding back CF_1 (29) or by adding DCCD (27). Figure 5 shows that increased concentrations of OGD up to 350 μM restored net proton uptake to CF_1 depleted chloroplasts, as does triphenyltin, DCCD, or 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (5, 6, 28). Therefore, OGD inhibits photophosphorylation by blocking the CF_0 channel. In addition, Fig. 5 shows that the restoration of proton uptake increases in the presence of DCCD (5 μM) and 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (100 μM), both known blockers of H^+ flow

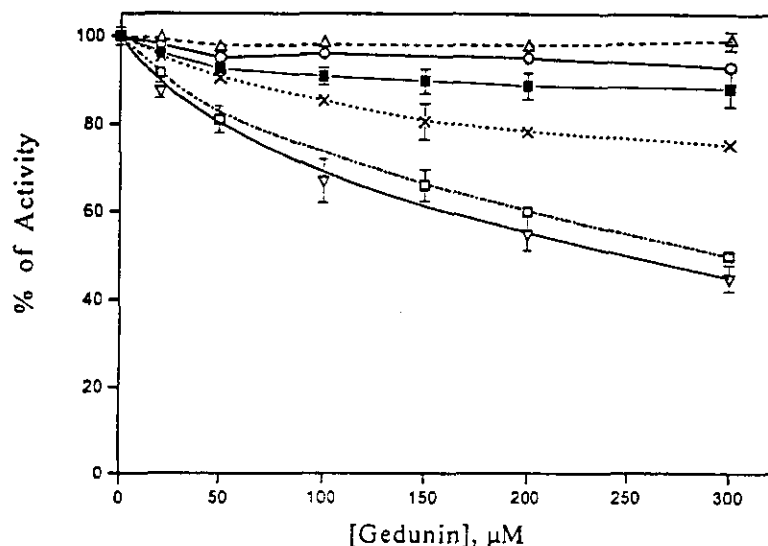


FIG. 4. Inhibitory effect of increasing concentrations of gedunin on ATP synthesis (□), proton uptake (×), basal (○), phosphorylating (▽), uncoupled (Δ) electron transports from water to methylviologen and Mg^{2+} -ATPase (■) in spinach chloroplasts. Control value rates for proton uptake and ATP synthesis were 410 and 490 $\mu\text{mol. h}^{-1} \text{mg Chl.}^{-1}$, respectively. Control value rates for basal, phosphorylating, and uncoupled electron flows were 350, 580, and 830 $\mu\text{eq. e}^{-} \text{h}^{-1} \text{mg of Chl.}^{-1}$, respectively, and for Mg^{2+} -ATPase was 320 $\mu\text{mol Pi h}^{-1} \text{mg Chl.}^{-1}$.

through CF_0 (6, 28), when added to OGD containing thylakoid membrane suspension. Since both inhibitors at the applied concentration are known to act specifically on CF_0 , their synergistic effect with OGD indicates that OGD also interacts directly with chloroplast H^+ -ATPase. It is noteworthy that the enhancement of the restoration of proton uptake induced by OGD in the presence of 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin is more remarkable than the additive effect on H^+ -uptake of OGD plus DCCD. In the last case, the curve shows a saturation around 120 μM of OGD. Thus, the 4-phenylcoumarin has a stronger synergistic (additive) inhibition property on CF_0 with OGD than that with DCCD (Fig. 5). These observations led us to investigate the kinetic behavior of OGD with DCCD and the 4-phenylcoumarin as CF_0 inhibitors and,

subsequently to compare the site (s) of action of these compounds in the proton conducting channel.

Competitive Experiments of OGD with DCCD and 4-Phenylcoumarin

The results of the competition experiments (the conditions of every separate experiment were kept the same) are summarized in Fig. 6. K_i values for DCCD, 4-phenylcoumarin, and OGD were 10, 220, and 146 μM , respectively. Figures 6A-6C describes the system of cooperative (additive) noncompetitive inhibition by two different nonexclusive inhibitors. Dixon plots (Figs. 6A1 and 6A2) showed clearly that the binding of DCCD to thylakoids had no effect on the binding of OGD, since the curves intersect on the horizontal axis (30). Meanwhile, the

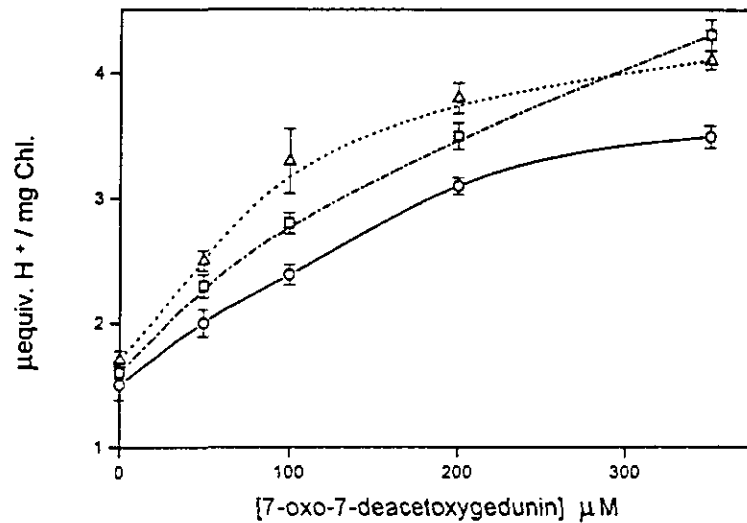


FIG. 5. Restoration of light-driven proton uptake in EDTA-washed chloroplasts by different concentrations of OGD (C), DCCD (5 μ M) plus OGD (Δ), and 4-phenylcoumarin (100 μ M) plus OGD (\square). Details of the reaction mixtures are given under Materials and Methods.

TABLE I
Effect of the 7-Oxo-7-deacetoxygedunin on the Light-Activated Membrane-Bound Mg²⁺-ATPase and the Heat-Activated Ca²⁺-ATPase Activity of Purified Coupling Factor 1 of Chloroplasts

Compounds	Ca ²⁺ -ATPase (%)	Mg ²⁺ -ATPase (%)
7-oxo-7-deacetoxygedunin (μ M)		
None	100	100
50	98.6	96.1
100	97.4	97.4
150	94.5	98.2
200	97.5	95
300	93	94
Gedunin (μ M)		
None	100	100
50	98.7	97.8
100	97.4	98.5
150	98.3	100.6
200	98.6	97.4
300	96.2	95.8

Note. Control values for Mg²⁺- and Ca²⁺-dependent ATPases were 201.5 μ moles Pi released/mg Chl. h. and 164 nmol Pi/mg protein., respectively.

curves of the competition experiments of the 4-phenylcoumarin vs OGD intersect below the horizontal axis (Figs. 6B1 and 6B2), thus indicating that one inhibitor hinders the binding of the other (30). These data suggest that the binding sites for OGD and DCCD are separate. On the other hand, the kinetic of inhibition observed in the experiments with the 4-phenylcoumarin vs DCCD did not show a competitive behavior (Figs. 6C1 and 6C2), supporting the results presented in Figs. 6A and 6B. These findings are supported by the similar values of the distribution of the OGD a *n*-octanol/water system (partition coefficient = 0.91; this work) and the 4-phenylcoumarin (partition coefficient = 0.85; (6)).

OGD Does Not Bind Covalently with CF₀

In order to see whether the inhibition of CF₀ by OGD is reversible, we used the repeated washing of OGD on CF₁-depleted thylakoid membranes as described by Gould (5). Table 2 shows that H⁺-uptake was restored only by 114%

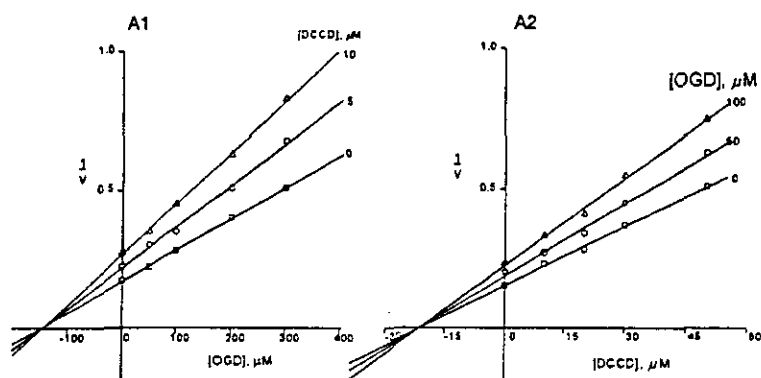


FIG. 6. Dixon plots of $1/V$ versus $[I]$ at different fixed concentrations of X . I and X are both linear noncompetitive inhibitors with respect to S . (A1) $I = \text{OGD}$, $X = \text{DCCD}$; (A2) $I = \text{DCCD}$, $X = \text{OGD}$ (B1) $I = \text{OGD}$, $X = 4\text{-phenylcoumarin}$; (B2) $I = 4\text{-phenylcoumarin}$, $X = \text{OGD}$; (C1) $I = 4\text{-phenylcoumarin}$, $X = \text{DCCD}$; (C2) $I = \text{DCCD}$, $X = 4\text{-phenylcoumarin}$. In all cases V represents the rate of proton uptake of CF_1 -depleted thylakoids. Details of the reaction mixture are given under Materials and Methods.

after four times washing thylakoids vs 274% for the CF_1 -depleted thylakoids incubated with 100 μM OGD. These data indicate that the interaction of OGD with CF_0 is not covalent, since the restoration of the proton uptake reaction in CF_1 -depleted chloroplasts, induced by this natural product, was reversed by the washing procedure of the thylakoid membranes. It is interesting that after the 4th wash, the addition of OGD restored

the H^+ -uptake to higher levels (311%). These results are similar to those found for triphenyltin (5).

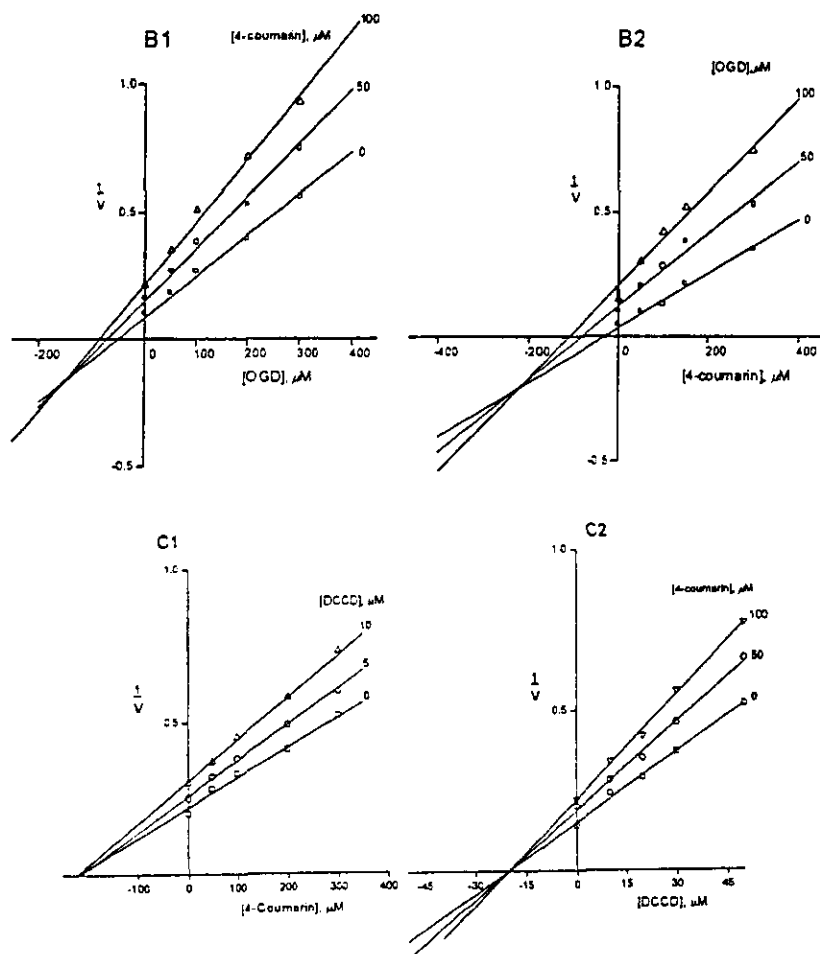
CONCLUDING REMARKS

As other natural "energy transfer inhibitors" such as *S-O-β-D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin* and the peptide alkaloids zizphine A, zizphine B, amphibine

TABLE 2
Effect of 7-Oxo-7-deacetoxygedunin on the Proton Uptake of Washed CF_1 -Depleted Chloroplasts.

Thylakoids	Additions/Treatment	Proton uptake ($\mu\text{equiv. H}^+/\text{mg Chl.}$)	% of restoration
Untreated (Control)	None	1.15	100
	100 μM OGD	2.36	205
CF_1 -depleted	None	0.51	100
	100 μM OGD	1.40	274
	1 st wash	0.82	160
	2 nd wash	0.75	147
	3 rd wash	0.64	125
	4 th wash	0.58	114
	100 μM OGD after the 4 th wash	1.58	311

Note. For details of the experimental conditions, see Materials and Methods.



C, and amphibine D (6, 23), OGD blocks the H⁺ channel of CF₀. The range of concentration needed for these products to exhibit their inhibitory effect on CF₀ is the same.

Cooperative (additive) noncompetitive inhibition showed by OGD and DCCD have demonstrated that the site of action of the limonoid at

CF₀ is different from that of DCCD but they could still both be located on subunit III

Finally, it is important to point out that the target (CF₀) of OGD precludes further development as herbicidal agent. However, the compound turns out to be a useful tool to further explore other possible binding sites of the CF₀

inhibitors. Moreover, these findings are of importance for further understanding of the interaction between plants through the so-called allelochemical compounds.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grants IN205197 from DGAPA, UNAM, 005341 and 202335 from PADEP, UNAM, and 400313-5-2358PN from CONACYT, L.A. acknowledges the fellowship awarded by DGEP-UNAM to carry out his Ph.D. studies.

REFERENCES

1. R. E. McCarty, R. J. Guilroy and E. Racker. DIO-9, an inhibitor of coupled electron transport and phosphorylation in chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 240, PC4822 (1965).
2. S. Izawa, C. D. Winget and N. E. Good. Phlorizin, a specific inhibitor of photophosphorylation and phosphorylation-coupled electron transfer in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 223 (1966).
3. R. E. McCarty and E. Racker. Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation III. Activation of adenosine triphosphate and ^{32}P -labeled orthophosphate-adenosine triphosphate exchange in chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 243, 129 (1968).
4. N. Hu, D. A. Mills, B. Huchzermeyer and M. L. Richter. Inhibition by tentoxin of cooperatively among nucleotide binding sites on chloroplasts coupling factor 1. *J. Biol. Chem.* 268, 8536 (1993).
5. J. M. Gould. Dithiol-specific reversal of triphenyltin inhibition of CF_0 -catalyzed transmembrane proton transfer in chloroplasts. *FEBS Lett.* 94, 90 (1978).
6. M. R. Calera, R. Mata, A. L. Anaya and B. Lotina-Hennsen. 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumann, an inhibitor of photophosphorylation in spinach chloroplasts. *Photosynth. Res.* 40, 105 (1995).
7. W. Sebald and J. Hoppe. On the structure and genetics of the proteolipid subunit of the ATPase complex. *Curr. Top. Bioenerg.* 12, 1 (1981).
8. M. B. Isman, P. J. Guning and K. M. Spollen. Tropical timber species as sources of botanical insecticides. in "Phytochemicals for Pest Control" (P. A. Heyden, R. M. Hollingworth, E. P. Master, J. M. Miyamoto and D. G. Thompson, Eds.), pp 27-37, Am. Chem. Soc., 1997.
9. S. MacKinnon, D. Chauvet, M. Wang, R. Mata, P. Pereda-Miranda, A. Jiménez, C. B. Bernard, H. G. Krishnamurty, L. J. Poveda, P. E. Sánchez-Vindas, J. T. Arason and T. Durst. Botanicals from the Piperaceae and Meliaceae of the American neotropics: phytochemistry. in "Phytochemicals for Pest Control" (P. A. Hedin, R. M. Hollingworth, E. P. Master, J. Miyamoto and D. G. Thompson, Eds.), pp 49-57, Am. Chem. Soc., 1997.
10. R. A. Toscano, R. Mata, J. S. Calderón and R. Segura, Gedunin, a D-Seca limonoid, *J. Chem. Crystallography* 26, 707 (1996).
11. S. Saha, R. Ouirabul, S. Isawa and N. Good. Electron transport and phosphorylation in chloroplasts as a function of the electron acceptor. *J. Biol. Chem.* 246, 3204 (1971).
12. B. Lotina-Hennsen, J. L. Roque-Reséndiz, M. Jiménez and M. Aguilar. Inhibition of oxygen evolution by cacajol and its derivatives. *Z. Naturforsch.* 46c, 777 (1991).
13. H. H. Strain, B. T. Coppe and W. A. Svec. Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls, in "Methods in Enzymology" (A. San Pietro, Ed.) Vol. 23, pp 452-466, Academic Press, New York, 1971.
14. R. A. Dilley. Ion transport (H^+ , K^+ , Mg^{2+} exchange phenomena), in "Methods in Enzymology" (A. San Pietro, Ed.), Vol. 24, pp. 68-74, Academic Press, New York, 1972.
15. C. B. Peña-Valdivia, L. Rodríguez-Flores, M. Tuena de Gómez Puyou and B. Lotina-Hennsen. Inhibition of photophosphorylation and electron transport by *N,N*-dimethylformamide. *Biophys. Chem.* 41, 169 (1991).
16. I. Trautschold, W. Lampprecht and G. Schweitzer. ATP:UV-method with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. in "Methods of Enzymatic Analysis" (J. Bergmeyer and Graß, Eds.), 3rd ed. pp. 346-357, Verlag Chemie, Weinheim, FRG, 1989.
17. J. D. Mills, P. Mitchell and P. Schumann. Modulation of coupling ATPase activity in intact chloroplasts. *FEBS Lett.* 112, 173 (1980).
18. D. B. Datta, I. J. Rynie and A. T. Jagendorf. Light dependent modification of spinach chloroplast coupling factor 1 by permanganate ion. *J. Biol. Chem.* 249, 4404 (1974).
19. R. T. Giacinta, B. R. Selman, C. H. Bering and R. Dilley. Inhibition of coupling factor activity of chloroplast membrane by diazonium compounds. *J. Biol. Chem.* 249, 2873 (1974).
20. J. B. Sumner. Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the calorimetric determination of phosphorus. *Science* 100, 413 (1944).
21. K. P. Smith, I. H. Krohn, T. G. Hermanson, G. H. F. Mallia, D. M. Provenzano, K. E. Fujimoto, M. N. Goeke, J. B. Olson and C. D. Klenk. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76 (1985).
22. N. E. Good, S. Izawa and G. Hind. Uncoupling and energy transfer inhibition in photophosphorylation, in "Current Topics in Bioenergetics" (D. R. Sanadi Ed.), Vol. 1, pp. 75-112, Academic Press, New York, 1981.
23. R. A. Ravizzini, C. S. Andreo and R. H. Vallejos. Peptide alkaloids as inhibitors of photophosphorylation in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 18, 701 (1977).

24. C. J. Arntzen, S. V. Falkenthal and S. Bobick. Inhibition of photophosphorylation by kaempferol. *Plant Physiol.* 53, 304 (1974).
25. J. L. Mendoza, M. Jiménez and B. Lotina-Hennsen. Piquero! A and diacetyl piquero! act as energy transfer inhibitors of photosynthesis. *Pestic. Sci.* 40, 37 (1994).
26. J. Neumann and A. T. Jagendorf. Light-induced pH changes related to phosphorylation by chloroplasts. *Arch. Biophys.* 107, 109 (1964).
27. J. M. Gould. Inhibition by triphenyltin chloride of a tightly-bound membrane component involved in photophosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 62, 567 (1976).
28. R. E. McCarty and E. Racker. Partial resolution of the enzyme catalyzing photophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 243, 129 (1967).
29. Klein-Hitpass L and Berzborn RJ. Accessibility and function of CF₀-subunits in chloroplast thylakoids. in "Advances in Photosynthesis Research" (C. Sybema, Ed.), Vol. II, pp. 6563-6566. Martinus Nijhoff/Dr. Junk, The Hague, The Netherlands, 1984.
30. I. H. Segel. Inhibition by mixture of different inhibitors. System B4: cooperative (synergistic) noncompetitive inhibition by two different nonexclusive inhibitors. in "Enzyme Kinetics" (I. H. Segel, Ed.), pp. 488-492. Wiley-Interscience, New York, 1993.

TRABAJO N° 2.

“Impairment of Photosystem II Donor Side by the Natural Product OdoratoI”
(1998)

L. Achnine, R. Mata, R. Iglesias-Prieto & B. Lotina-Hennsen

Journal of Agricultural and Food Chemistry, Volume 46, N. 12, pp. 5313-5317.

Impairment of Photosystem II Donor Side by the Natural Product Odoratol

**Lahoucine Achnine, Rachel Mata, Roberto Iglesias-Prieto, and
Blas Lotina-Hennsen**

Departamento de Bioquímica, Departamento de Farmacia, Facultad de
Química, Estación de Investigación Marinas "Puerto Morelos",
ICMyL-UNAM, Universidad Nacional Autónoma de México,
Mexico, D.F. 04510

Journal of
**Agricultural
and Food
Chemistry**[®]

Reprinted from
Volume 46, Number 12, Pages 5313-5317

Impairment of Photosystem II Donor Side by the Natural Product Odorato†

Lahoucine Achnine,† Rachel Mata,‡ Roberto Iglesias-Prieto,|| and Blas Lotina-Hennsen*,‡

Departamento de Bioquímica, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Estación de Investigación Marinas "Puerto Morelos", ICMyL-UNAM, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, D.F. 04510

The effect of odorato, a natural protolimonoid, isolated from *Cedrela odorata* (Meliaceae) and two of its derivatives on different photosynthetic reactions of isolated spinach chloroplasts was investigated. This natural product is an inhibitor (150 μM) of oxygen evolution. Polarographic analyses of the photosynthetic partial redox reactions indicate that (a) photosystem I (PSI) activity is unaffected by odorato, (b) there is a substantial inhibition of the electron flow of uncoupled photosystem II (PSII) as measured from water to silicomolybdate or diaminodurene, and (c) the electron flow from diphenyl carbazide to dichlorophenolindophenol of Tris-washed chloroplasts was insensitive. Collectively, these data suggest that the site of action of odorato is located at the donor side of PSII. Comparison of chlorophyll *a* fluorescence induction curves of chloroplasts with authenticated donor side damage and those obtained from odorato-treated samples further supports this interpretation. Comparative analyses using odorato derivatives indicate that the diol moiety at positions 23 and 24 of the side chain is an important structural requirement for the inhibitory activity displayed by odorato.

Keywords: Photosystem II; oxygen evolving complex; odorato; *Cedrela odorata*; Meliaceae

INTRODUCTION

Photosystem II (PSII) is a supramolecular assemblage anisotropically incorporated into the thylakoid membrane (Debus, 1992). The main function of PSII is to act as a light-driven water-plastoquinone oxidoreductase. PSII can be inactivated by several synthetic or natural compounds. Depending on their targets, these compounds can be regarded as donor or acceptor side inhibitors. In oxygen-evolving photosynthetic organisms the oxidation of water is catalyzed by the manganese cluster located in the oxygen-evolving complex (OEC) at the luminal side of the thylakoid membrane (Debus, 1992; Ghanotakis and Yocum, 1990). This cluster contains four manganese ions and requires Cl^- and Ca^{2+} as cofactors to function properly (Ghanotakis et al., 1984; Miyao and Murata, 1985). In the literature several compounds and treatments have been reported as OEC inhibitors. For example, depletion of Ca^{2+} and Cl^- from PSII results in reversible inhibition of oxygen evolution while the Mn cluster is retained in its site (Debus, 1992; Homann 1987). Moreover, Tris-washing of thylakoids (Yamashita and Butler, 1968) and hydroxylamine, methylamine, and ammonia treatments induce significant to full inhibition of oxygen evolution in isolated chloroplasts (Joliot, 1966; Izawa and Good, 1972). On the other hand, only few natural compounds have been reported as OEC inhibitors. In this context, we have previously demonstrated that the natural products cacalol and ivalin inhibited oxygen evolution

in isolated chloroplasts with I_{50} (concentration producing 50% inhibition) values of 30 μM and 2.8 mM, respectively (Lotina-Hennsen et al., 1991).

While characterizing the effect of naturally occurring limonoids on several photosynthetic activities, we have discovered the inhibitory effect of odorato, a protolimonoid isolated from *Cedrela odorata* (Meliaceae), on the donor side of PSII of isolated spinach chloroplasts. In this paper, we discuss the evidence of the inhibitory properties of odorato based on two different techniques, namely oxymetry and chlorophyll *a* (Chl *a*) fluorescence measurements.

MATERIALS AND METHODS

Procedures for the Preparation of Odorato and Its Derivatives. Odorato was obtained from a CHCl_3 /methanolic extract (1:1) of *C. odorata* L. (Meliaceae) wood. The structure of this natural product was established using spectrometric and spectroscopic (IR and NMR) methods (Chan et al., 1968). Odorato (1) afforded triacetate (2) upon treatment with acetic anhydride and pyridine. Treatment of odorato (1) with acetone and catalytic amounts of hydrochloric acid at room temperature readily gave the corresponding acetone (3) (Figure 1). Derivatives 2 and 3 were also characterized by spectral and spectroscopic means.

Biological Activities. Chloroplasts were obtained from spinach leaves (*Spinacea oleraceae* L.) as described earlier (Lotina-Hennsen et al., 1987). The chlorophyll concentration was measured spectrophotometrically as reported (Strain et al., 1971). Proton uptake was measured as the pH rise between 8.0 and 8.1 (Dilley, 1972). Photophosphorylation was measured as proton uptake conditions, in the presence of 1 mM ADP and 3 mM KH_2PO_4 (Lotina-Hennsen et al., 1987). KCN (100 μM) was added to inhibit catalase activity. Electron flows (basal, phosphorylating, and uncoupled) from water to methyl viologen (MV) were determined according to the procedures previously described (Lotina-Hennsen et al., 1991). Partial reactions of the electron transport chain were mea-

* Author to whom correspondence should be addressed (e-mail blas@servidor.unam.mx; fax +52 5 622 53 29).

† This work was taken in part from the Ph.D. thesis of L.A.

‡ Departamento de Bioquímica.

§ Departamento de Farmacia.

|| Estación de Investigaciones Marinas.

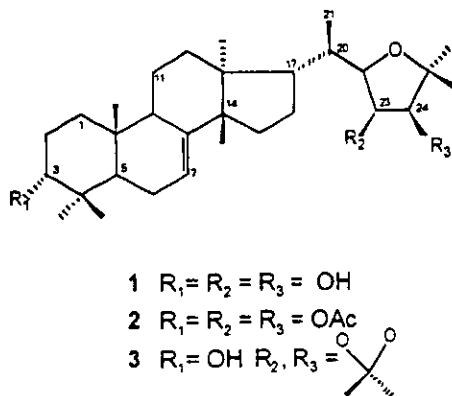


Figure 1. Structures of odoratol (1), triacetylorodoratol (2), and odoratol acetonide (3).

sured using specific inhibitors, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU; 10 μM) and 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-*p*-benzoquinone (DBMIB; 1 μM), and the following electron donors and acceptors: silicomolybdate (SiMo; 100 μM); dichlorophenol indophenol (DCPIP; 100 μM); diphenyl carbazide (DPC; 200 μM); diaminodurene (DAD; 100 μM); and MV (100 μM) (Allen and Holmes, 1986).

To monitor Chl *a* fluorescence transients, induction aliquots of dark-adapted chloroplasts containing 15 μg of chlorophyll were transferred to filter paper by gravity and immediately dipped in 3 mL of different concentrations of the tested compounds. Samples were incubated for 5 min in the dark. Chl *a* fluorescence induction curves were measured at room temperature by a portable shutterless apparatus (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech, U.K.) described previously (Strasser et al., 1995). Excitation was provided by an array of six light-emitting diodes delivering 600 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ of red light (peak at 650 nm). Samples infiltrated with hydroxylamine were washed in the dark several times with fresh isolation buffer before been assayed. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was present to chelate Mn(II) ions released from the O_2 -evolving center. Kinetic analyses of the relative variable fluorescence were performed by deconvolution of data collected during the first 2 ms with 10 μs resolution. Deconvolution analyses were performed with a nonlinear fitting procedure.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of Odoratol on Photosynthetic Activities. Odoratol (150 μM) inhibited ATP formation and H^+ -uptake by 96.3 and 89.9%, respectively (Figure 2) with I_{50} of 35 μM . The light-dependent synthesis of ATP and H^+ -uptake by illuminated thylakoids might be inhibited in a number of ways: (a) by uncoupling ATP synthesis from the electron transport, (b) by blocking the electron transport, and/or (c) by blocking the phosphorylation reaction itself. To understand the mechanism by which odoratol inhibited the photophosphorylation, its effect on the electron transport chain was investigated. Odoratol (150 μM) inhibited basal, phosphorylating, and uncoupled electron transports by 87.7, 85.5, and 78.8%, respectively (Figure 2). Therefore, this protolimonoid behaves as Hill reaction inhibitors.

To localize the inhibition site of odoratol, its effect on photosystem I (PSI) and PSII electron transports was evaluated. PSI activity, measured from DCPIP/ H_2 to MV, was insensitive to odoratol. However, the natural product (150 μM) inhibited the electron flow through PSII, measured from water to DCPIP, by 86.6% (Figure 3). The pI_{50} value for PSII inhibition was 4.6. Thus, the level of activity displayed by odoratol as PSII inhibitor is comparable with that of good PSII inhibitors, which possess pI_{50} values in the range of 6–7 (Bowyer

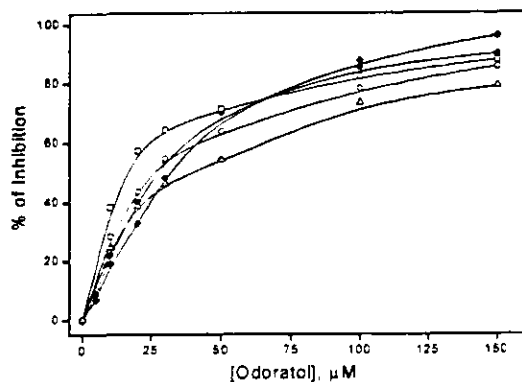


Figure 2. Effect of increasing concentrations of odoratol on photophosphorylation (\blacklozenge), H^+ -uptake (\bullet), basal (\square), phosphorylating (\blacklozenge), and uncoupled (\triangle) electron transports from water to methyl viologen in intact spinach chloroplasts. Control rate values for ATP synthesis and H^+ -uptake were 350 and 280 $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mg}$ of Chl), respectively. Control rate values for basal, phosphorylating, and uncoupled electron transport were 380, 560, and 840 $\mu\text{equiv e}^-/(\text{h}\cdot\text{mg}$ of Chl), respectively.

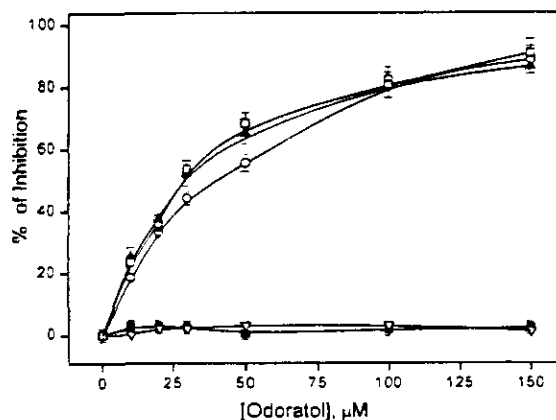


Figure 3. Electron transport through uncoupled photosystem I (\blacksquare) and photosystem II (\blacktriangle), from water to SiMo (\circ), from water to DAD (\square), and from DPC to DCPIP (∇) as a function of increasing concentrations of odoratol. Control rate values for these electron flows were 910, 980, 250, 650, and 210 $\mu\text{equiv e}^-/(\text{h}\cdot\text{mg}$ of Chl), respectively.

et al., 1991). To further determine the target of odoratol, the partial reactions of PSII were studied: the uncoupled PSII electron flows (5 mM NH_4Cl) from water to SiMo and from H_2O to DAD were inhibited by 88.7 and 90.8%, respectively, at 150 μM . However, the electron flow from DPC to DCPIP of 0.8 M Tris-washed chloroplasts was unaffected by odoratol (Figure 3). It is known that DPC is an electron donor to PSII (Vernon and Shaw, 1969). This reaction is dependent on the DPC concentration, the pH of the medium, and the integrity of the thylakoid membranes. Consequently, compound 1 behaves as a water-splitting enzyme inhibitor. Therefore, odoratol acts at the same target as cacalol and ivalin do (Lotina-Hennsen et al., 1991; Bernal-Morales et al., 1994).

To find out the influence of the carbinol groups present in the molecule of odoratol in the different photosynthetic activities tested, the effect of two odoratol derivatives (triacetyl derivative 2 and odoratol acetonide 3) on the same photosynthetic reactions was also investigated. Compounds 2 and 3 did not show appreciable activity in comparison to odoratol. On the other hand, the hydroxyl moiety at position 3 did not enhance the activity of odoratol (Table 1). Thus, the two vicinal OH groups at positions 23 and 24 of odoratol

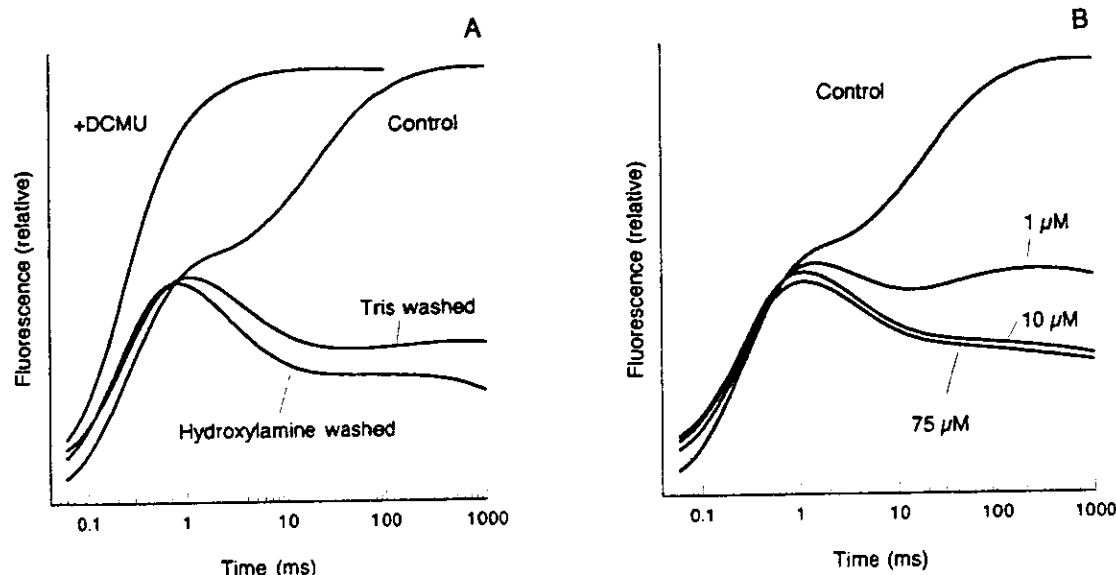


Figure 4. (A) Fluorescence induction curves of control chloroplasts and authenticated samples with acceptor side damage (+DCMU) and donor side impairment (Tris and hydroxylamine). (B) Chlorophyll fluorescence induction curves of controls and samples infiltrated with different concentrations of odoratal.

Table 1. Effect of Odoratal and Its Derivatives on Uncoupled PSII Electron Transport from Water to DAD, from Water to SiMo, and from DPC to DCPiP^a

addition	% inhibition		
	H ₂ O to DAD	H ₂ O to SiMo	DPC to DCPiP
odoratal			
none	0	0	0
10 μM	23.6	18.4	0.7
50 μM	68.4	55.3	1.0
100 μM	80.7	76.6	0.8
150 μM	90.8	88.7	1.2
triacetylorodoral			
none	0	0	0
50 μM	4.1	1.7	2.5
100 μM	6.4	5.3	6.4
200 μM	8.1	10.2	12.4
500 μM	9.5	12.5	14.2
odoratal acetonide			
none	0	0	0
50 μM	2.5	4.3	3.5
100 μM	8.4	9.4	8.5
200 μM	10.3	13.5	12.4
500 μM	13.4	16.5	15.6

^a Control values for these electron flows were 650, 250, and 210 μequiv e⁻/(h·mg of Chl), respectively.

are essential for the displayed inhibitory interaction of the natural product with the OEC.

Chl *a* Fluorescence Evidence of the PSII Donor Side Impairment. Isolated spinach chloroplasts show a polyphasic fluorescence curve with regular O-J-I-P sequence of transients similar to those previously described for several intact organisms (Iglesias-Prieto, 1995; Srivastava et al., 1995). The OJIP sequence represents the successive reduction of the electron acceptor pool of PSII (Govindjee, 1995). Chloroplasts infiltrated with several authenticated PSII inhibitors show dramatic changes in their fluorescence induction curves (Figure 4A). Variations in the fluorescence induction signatures are dependent on the site of action of the authenticated inhibitors. Inactivation of the PSII acceptor side after the addition of DCMU resulted in the loss of the regular OJIP sequence and the formation of an OJ sequence. Addition of Tris and hydroxylamine, two well-known donor side inhibitors of PSII (Britt, 1996), resulted in the formation of a faster fluorescence

transient at ~0.8 ms, followed by reduction in the fluorescence yield (Figure 4A). This event appears to be consistent with transient K recently described in green plants under severe thermal stress (Guissé et al., 1995). Transient K probably originates from the increase of the lifetime of the P₆₈₀⁺ and Phe⁻ radical pair due to limitations in the electron supply from the OEC. Losses of variable fluorescence after 0.8 ms are consistent with the increase in P₆₈₀⁺ lifetime as this radical is an efficient fluorescence quencher (Krause and Weis, 1984). Comparison of the fluorescence induction curves of chloroplasts infiltrated with inhibitors of the OEC (Tris, NH₂OH) with those obtained from chloroplasts exposed to different concentrations of odoratal clearly shows remarkable similarities (Figure 4). As in the case of authenticated controls with donor side impairment, exposure to odoratal resulted in the formation of transient K, followed by a reduction of variable fluorescence.

Analyses of the changes in relative variable fluorescence yield [$V(t) = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$] during the first 2 ms of the induction curve provide us with a detailed description of the kinetic responses of PSII to different inhibitors. The rise of $V(t)$ in control chloroplasts requires two components to be accurately described (Figure 5A). A fast sigmoidal component with a rate constant of ~0.10 ms⁻¹ and a slow exponential one with a time constant of ~0.4 ms⁻¹ (Table 2; Figure 5A). In contrast, in chloroplasts with donor side impairment a third exponential negative component is required to describe the loss of $V(t)$ after 0.8 ms. For consistency, we employed here three components to deconvolute the initial part of the induction curve (Figure 5A,B). The exponential phase data reported here were obtained by the subtraction of the positive and negative components.

Probably, the most dramatic response of the fluorescence induction curve to donor side inactivation of PSII is the increase in the initial rates of photochemistry (dV/dt_0) (Figure 5A,B). Kinetic analyses of induction curves revealed that acceptor side inactivation of PSII produced by infiltration with DCMU resulted in increases in the amplitude of both exponential and sigmoidal components without any significant changes in their rate constants relative to control chloroplasts (Table 2). In

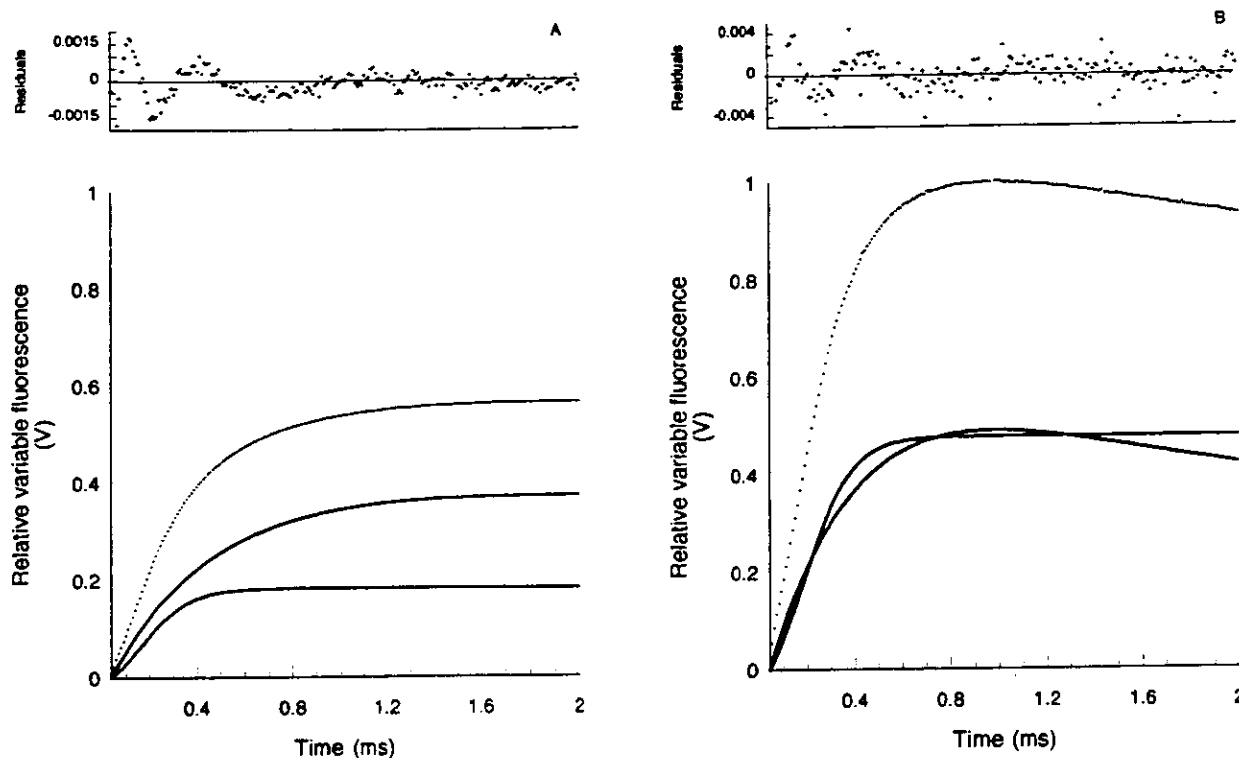


Figure 5. (A) Time-dependent variations in the relative variable fluorescence of control chloroplasts. Solid lines represent the exponential and sigmoidal components required to explain the empirically obtained fluorescence data (crosses). (B) Deconvolution of normalized fluorescence curves of chloroplasts infiltrated with 75 μM odoratol. In both cases upper panels represent the distribution of residuals.

Table 2. Comparative Kinetic Analyses of the First 2 ms of the Chl *a* Fluorescence Induction Curves of Samples with Authenticated Donor and Acceptor Side Inhibition and Those Infiltrated with Different Concentrations of Odoratol

treatment	component				
	sigmoidal		rate constant (ms^{-1})	exponential	
	amplitude (relative)	sigmoidicity (relative)		amplitude (relative)	rate constant (ms^{-1})
control	0.2326	0.1702	0.1008	0.411	0.3801
DCMU	0.4726	0.1268	0.0986	0.5221	0.4065
Tris	0.5877	0.1873	0.1007	0.4218	0.0550
NH_2OH	0.7561	0.1499	0.0959	0.2120	0.0913
odoratol					
1 μM	0.4523	0.2001	0.1052	0.5700	0.1887
10 μM	0.6774	0.1728	0.1095	0.3652	0.1303
75 μM	0.6283	0.1642	0.1090	0.4262	0.0753

contrast, comparison of the kinetic characteristics of authenticated samples with donor side damage and those obtained from control chloroplasts indicates that the increase in dV/dt_0 resulted from a decrease in the rate constant of the exponential component (Table 2). The results show no detectable variation in the rate constants or in the connectivity of the sigmoidal components of chloroplasts with donor side damage relative to controls. Similar to the results obtained for the authenticated samples, addition of odoratol produces sequentially similar increases in the rate constant of the exponential component without variation in the kinetics of the sigmoidal one.

Concluding Remarks. The analyses of the fluorescence signatures of donor side damage of chloroplasts are consistent with the polarographic evidence presented here and strongly suggest that the site of action of odoratol is located at the donor side of PSII. Therefore, the use of this simple chlorophyll fluorescence technique probably will have a great potential to screen a large variety of synthetic and natural compounds with herbicide potential.

This work is intended to be part of a much larger survey of the effects of naturally occurring compounds, including limonoids from the Meliaceae family, on various plant processes to improve understanding of the interaction between plants through the so-called allelochemical compounds.

ABBREVIATIONS USED

Chl *a*, chlorophyll *a*; DAD, diaminodurene; DBMIB, 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-*p*-benzoquinone; DCMU, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; DCPPI, dichlorophenol indophenol; DPC, diphenyl carbazide; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; SiMo, silicomolybdate; MV, methyl viologen; OEC, oxygen evolving complex; PSII, photosystem II; PSI, photosystem I.

LITERATURE CITED

Allen, J. F.; Holmes, N. G. Electron transport and redox titration. In *Photosynthesis, Energy Transduction: A Practical Approach*; Hipkins, M. F., Baker, N. R., Eds.; IRL Press: Oxford, U.K., 1986; Chapter 5, pp 103-141.

- Bernal-Morales, E.; Romo De Vivar, A.; Sánchez, B.; Aguilar, M.; Lotina-Hennsen, B. Inhibition of oxygen evolution by ivalin. *Can. J. Bot.* **1994**, *72*, 177-181.
- Bowyer, J. R.; Camilleri, P.; Vermaas, W. F. J. Photosystem II and its interaction with herbicides. In *Herbicides*; Baker, N. R., Percival, M. P., Eds.; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, 1991; pp 27-79.
- Britt, R. D. Oxygen evolution. In *Advances in Photosynthesis: Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*; Ort, D. R., Yocum, C. F., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Amsterdam, 1996; Vol. V, pp 137-164.
- Chan, W. R.; Holder, N. L.; Snatzke, G.; Fehlhaber, H. W.; Taylor, D. R. Extractives of *Cedrela odorata*. II. The structures of *Cedrela* tetracyclic triterpenes odoratol, isoodoratol and odoratone. *J. Chem. Soc. C* **1968**, *20*, 2485-2489.
- Debus, R. The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1102*, 269-352.
- Dilley, R. A. Ion transport (H^+ , K^+ , Mg^{2+} exchange phenomena). In *Methods in Enzymology*; San Pietro, A., Ed.; Academic Press: New York, 1972; Vol. 24, Section I, Methodology, pp 68-74.
- Ghanotakis, D. F.; Yocum, C. F. Photosystem II and the oxygen evolving complex. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **1990**, *41*, 155-276.
- Ghanotakis, D. F.; Babcock, G. T.; Yocum, C. F. Calcium reconstitutes high rates of oxygen evolution in polypeptide depleted photosystem II preparations. *FEBS Lett.* **1984**, *167*, 127-130.
- Govindjee. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll *a* fluorescence. *Aust. J. Plant Physiol.* **1995**, *22*, 131-160.
- Guissé, B.; Srivastava, A.; Strasser, R. J. Effects of high temperature and water stress on the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient of potato leaves. In *Photosynthesis: from Light to Biosphere*; Mathis, P., Ed.; Kluwer: Dordrecht, 1995; Vol. IV, pp 913-916.
- Homann, P. H. The relation between the chloride, calcium, and polypeptide requirements of photosynthetic water oxidation. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1987**, *19*, 105-123.
- Iglesias-Prieto, R. The effects of elevated temperature on the photosynthetic responses of symbiotic dinoflagellates. In *Photosynthesis: from Light to Biosphere*; Mathis, P., Ed.; Kluwer: Dordrecht, 1995; Vol. IV, pp 793-796.
- Izawa, S.; Good, N. E. Inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation. In *Methods in Enzymology*; San Pietro, A., Ed.; Academic Press: New York, 1972; Vol. 24, Part B, pp 355-377.
- Krause, G. H.; Weis, E. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II Interpretation of fluorescence signals. *Photosynth. Res.* **1984**, *5*, 139-157.
- Lotina-Hennsen, B.; King, B.; Albores, M.; Pozas, R. Uncoupling of photophosphorylation by nitrogenous bases. No correlation of uncoupling with pK_b and partition coefficient. *Photochem. Photobiol.* **1987**, *46*, 287-293.
- Lotina-Hennsen, B.; Roque-Reséndiz, J. L.; Jiménez, M.; Aguilar, M. Inhibition of oxygen evolution by cacalol and its derivatives. *Z. Naturforsch.* **1991**, *46C*, 777-780.
- Miyao, M.; Joliot, A. Actions du chlorométhylurée et de l'hydroxylamine sur la réaction photochimique d'émission d'oxygène (système II). *Biochim. Biophys. Acta* **1966**, *126*, 587-593.
- Miyao, M.; Murata, N. The Cl^- effect on photosynthetic oxygen evolution: interaction of Cl^- with 18-kDa, 24-kDa and 33-kDa proteins. *FEBS Lett.* **1985**, *180*, 303-308.
- Murata, N. The Cl^- effect on photosynthetic oxygen evolution: Interaction of Cl^- with 18-kDa, 24 kDa and 33-kDa proteins. *FEBS Lett.* **1985**, *180*, 303-308.
- Srivastava, A.; Strasser, R. J.; Govindjee. Polyphasic rise of chlorophyll *a* fluorescence in herbicide-resistant D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* **1995**, *43*, 131-141.
- Strain, H. H.; Cope, T.; Svec, M. A. Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls. *Methods Enzymol.* **1971**, *23*, 452-466.
- Strasser, R. J.; Srivastava, A.; Govindjee. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.* **1995**, *61*, 32-42.
- Vernon, L. P.; Shaw, E. R. Photoreduction of 2,6-dichlorophenolindophenol by diphenylcarbazine: a photosystem II reaction catalyzed by Tris-washed chloroplast and subchloroplast fragments. *Plant Physiol.* **1969**, *44*, 1645-1649.
- Yamashita, T.; Butler, W. L. Photoreduction and phosphorylation with Tris-washed chloroplasts. *Plant Physiol.* **1968**, *43*, 1978-1984.

Received for review June 3, 1998. Revised manuscript received September 23, 1998. Accepted September 23, 1998. This work was supported by Grant IN205197 from DGAPA, UNAM; Grants 005341 and 202335 from PADEP, UNAM; and Grant 400313-5-2358PN from CONACyT. L.A. acknowledges the fellowship awarded by DGEP, UNAM, to carry out his graduate studies.

JF980589+

TRABAJO N° 3.

“Tricolorin A, a Potent Natural Uncoupler and Inhibitor of Photosystem II
Acceptor Side of Spinach Chloroplasts” (1999)

L. Achnine, R. Pereda-Miranda, R. Iglesias-Prieto, R. Moreno-Sánchez
& B. Lotina-Hennsen

Physiologia Plantarum (en prensa)



DIVISION OF BIOLOGICAL SCIENCES
SECTION OF PLANT BIOLOGY
(530) 752-0617
FAX: (530) 752-5410

ONE SHIELDS AVENUE
DAVIS, CALIFORNIA 95616

March 15, 1999

Dr. Blas Lotina Henksen
Departamento de Bioquímica, Conjunto "E"
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México
04510 México, D.F.
México

Dear Dr. Lotina Henksen:

I have examined your latest revision of the manuscript "Tricolorin A, a potent natural uncoupler and inhibitor of photosystem II acceptor side of spinach chloroplasts". I am satisfied that the article is suitable for publication in *Physiologia Plantarum*. Accordingly, I have sent the corrected manuscript (and disk) to Lund with instructions to send it to the printer. Contact the main office there if you have further questions on the status of the manuscript. Thank you for submitting your work to *Physiologia Plantarum*.

Sincerely,

A handwritten signature in cursive script that reads "Alan Stemler".

Alan Stemler
Associate editor

DR. BLAS LOTINA HENNSSEN

Departamento de Bioquímica, Conjunto "E".
Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México,
04510 México, D.F.
México
Tel. + 52 5 622 52 94
Fax. + 52 5 622 53 29
Email. blas@servidor.unam.mx

**Tricolorin A, a potent natural uncoupler and inhibitor of photosystem II
acceptor side of spinach chloroplasts**

**Lahoucine Achnine, Rogelio Pereda-Miranda, Roberto Iglesias-Prieto, Rafael
Moreno-Sánchez and Blas Lotina-Hennsen**

Achnine, L., Pereda-Miranda, R., Iglesias-Prieto, R., Moreno-Sánchez, R. and Lotina-Hennsen, B. 1998. Tricolorin A, a potent natural uncoupler and inhibitor of photosystem II acceptor side of spinach chloroplasts.-Physiol. Plant.

Tricolorin A, (11 *S*)-11-hydroxyhexadecanoic acid 11-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-{2-*O*-(2*S*-methylbutanoyl)-4-*O*-(2*S*-methylbutanoyl)}-rhamnopyranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopyranosil-(1 \rightarrow 2)- β -fucopyranoside-(1,3"-lactone), the major phyto-growth inhibitor isolated from *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae) was found to be a potent uncoupler ($U_{50} = 0.33 \mu\text{M}$) of photophosphorylation in spinach chloroplasts. Tricolorin A inhibited H^+ -uptake and ATP synthesis, and stimulated basal and phosphorylating electron flows. Using a combination of two well-known fluorescent ΔpH probes, 9-aminoacridine and 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine, the uncoupling behavior of tricolorin A was also

demonstrated for submitochondrial particles. Polarographic data showed that high concentrations (20 μM) of tricolorin A inhibited photosystem II (PSII) electron flow at the level of Q_B . Chlorophyll *a* fluorescence analysis showed that tricolorin A induced accumulation of Q_A^- and strongly decreased the electron transport capacity, suggesting that the target of this molecule was located at the Q_B level. The macrocyclic lactone-type structure of this allelopathic agent proved to be an important structural requirement for uncoupling activity since its hydrolysis caused loss of the inhibitory potential.

Abbreviations-Chl, chlorophyll; DBMIB, 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-*p*-benzoquinone, DCMU, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; DCPIP, dichlorophenol indophenol; MV, methylviologen; Q_A , plastoquinone A; Q_B , plastoquinone B; SiMo, silicomolybdate; SMP, submitochondrial particles.

L. Achnine and B. Lotina-Hennsen (corresponding author, fax 525-622 5329, e-mail blas@servidor.unam.mx), Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, DF 04510; R. Pereda-Miranda, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, México, DF 04510; R. Iglesias-Prieto, Estación de Investigaciones Marinas "Puerto Morelos", ICMYL-UNAM, Apartado Postal 1152, Cancún 77500, México; R. Moreno-Sánchez, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México DF 14080, México.

Introduction

Farmers in the southern intertropical Mexican state of Morelos use *Ipomoea tricolor* Cav., a member of the morning-glory family (Convolvulaceae), during the fallow period in sugarcane fields. This plant has the useful property of suppressing the growth of other plants, including invasive weeds (Anaya et al. 1990 and Mata et al. 1996). Tricolorin A, the major phyto-growth inhibitor present in the active mixture of resin glycosides, was characterized as a tetrasaccharide of jalapinic acid with a macrocyclic lactone-type structure (Fig. 1). This resinous content occurs in secretory cells, in foliar tissues and roots. Bioassays showed that radicle growth of *Amaranthus leucocarpus* Watts. and *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. was inhibited by this allelopathic agent, with IC_{50} values ranging from 12 to 37 μM (Pereda-Miranda et al. 1993). However, the primary mode of action of tricolorin A has not been established, nor any biochemical insights as to how this oligosaccharide might contribute to the chemical ecology of *Ipomoea tricolor*, including its possible interference with the photosynthetic metabolism of other plant species. In this context, the present investigation reports the results of studies on the effects of tricolorin A on several photosynthetic activities in isolated chloroplasts.

Materials and methods

Isolation and purification of tricolorin A

Details for the purification of the crude resin glycosides from the CHCl_3 extract of *Ipomoea tricolor* Cav. were previously described (Pereda-Miranda et al. 1993). Preparative HPLC was performed for the isolation of tricolorin A from the oligosaccharide mixture using a Waters 600E multisolvent delivery system equipped with a Waters 410 differential refractometer detector (Waters, Milford, MA, USA). The chromatographic system was operated in the recycling mode employing a reversed-phased C_{18} column (15 μm ; 20 x 250 mm). An isocratic elution with $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1; flow rate = 3.5 ml min^{-1}) was effective in separating 12.6 mg of tricolorin A ($R_t = 22.3$ min) from 20 mg of the crude resin glycosides. The isolated compound 1 was identical (m.p., NMR, TLC and HPLC) to an authentic sample (Bah and Pereda-Miranda 1996).

Derivatization of tricolorin A

On alkaline hydrolysis [5% (v/v) $\text{KOH}/\text{H}_2\text{O}$], compound 1 (10 mg) liberated a water-soluble glycosidic acid (3.5 mg), designated as tricoloric acid (2). This derivative (1.5 mg) was alkylated by CH_2N_2 treatment to obtain tricoloric acid methyl ester (3). One mM freshly prepared stock solutions of compounds 1, 2 and 3 in ethanol were used for the bioassays. The final concentration of ethanol in the assay medium never exceeded 0.03% (v/v).

Chloroplast isolation, chlorophyll determination, measurement of proton uptake, ATP synthesis and electron transport

Intact chloroplasts were obtained from market spinach leaves (*Spinacea oleracea* L.) as previously described (Saha et al. 1971, Lotina-Hennsen et al. 1991), and suspended in 400 mM sucrose, 5 mM MgCl₂ and 10 mM KCl, and buffered with 0.03 M Na⁺-Tricine at pH 8.0. The chlorophyll concentration was measured spectrophotometrically (Strain et al. 1971).

Proton uptake was measured as the pH rise between 8.0 and 8.1 (Dilley 1972) using a combination of microelectrodes connected to a Corning potentiometer with expanded scale. The reaction medium was 100 mM sorbitol, 5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM Na⁺-tricine pH 8.0 (KOH) and 20 µg of Chl ml⁻¹; the freshly intact chloroplasts were hypotonically lysed in this medium. This reaction mixture was titrated with 0.001 M KOH. ATP synthesis was determined from the measured proton uptake but in the presence of 1 mM ADP and 3 mM KH₂PO₄ (Peña-Valdivia et al. 1991). To facilitate both ATP synthesis and proton uptake, 100 µM MV was added to the assay medium. ATP synthesis was also measured by an enzymatic method (Trautschold et al. 1989). The hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities were insensitive to tricolorin A.

Photosynthetic non-cyclic electron flow from water to MV (100 µM) was determined by oxygen uptake using a Clark-type electrode connected to an oxygraph as reported (Lotina-Hennsen et al. 1991). Basal electron transport was determined with an oxygraph YSI Model 5300. Each cuvette contained 20 mg of Chl ml⁻¹ in the reaction medium as in proton uptake conditions, except that Na-tricine concentration was 15 mM; reaction time 1 min, aerobic

conditions, saturating white light. Phosphorylating electron transport was measured as basal electron transport with the addition of 1 mM ADP and 3 mM K_2PO_4 . KCN 0.1 mM was added to the reaction mixture to inhibit catalase activity. Partial reactions of the electron transport chain were measured using specific inhibitors: DCMU, 10 μM ; DBMIB, 1 μM and the following electron donors and acceptors: SiMo, 100 μM ; dichlorophenol indophenol (DCPIP), 100 μM ; DPC, 200 μM ; DAD, 100 μM and MV, 100 μM (Allen and Holmes 1986).

Mg²⁺-ATPase assay

Chloroplasts were isolated from 30-40 g of spinach leaves which were ground in 160 ml of medium containing 350 mM sorbitol, 5 mM ascorbic acid and 20 mM MES, pH 6.5. Chloroplasts were centrifuged at 3000 g for 60 s, washed once in 40 ml of grinding medium and resuspended in 35 mM sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 50 mM HEPES, pH 7.6. Light-triggered Mg^{2+} -ATPase activity bound to thylakoid membranes was measured as described previously (Mills et al. 1980). Released inorganic P was measured as reported (Sumner 1944).

ΔpH probe measurements

Highly coupled rat liver SMP were prepared as previously described (Thayler and Rubin 1979), using 0.065 mg digitonin (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) per mg mitochondrial protein for solubilization of the outer membrane followed by hypoosmotic shock and

sonication. The magnitude of the pH gradient across the chloroplasts and SMP membranes was measured by following the fluorescence quenching of a medium containing $3 \mu\text{M}$ 9-aminoacridine (9AA) and $1.5 \mu\text{M}$ 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine (ACMA) (Rottenberg and Moreno-Sánchez 1993), under smooth stirring at 25°C . The excitation and emission wavelengths were 415 and 480 nm, respectively. ΔpH changes in spinach chloroplasts ($15 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$) were monitored under constant illumination of $88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} / \mu\text{A}$ of intensity, provided through an optical filter of 10% safranin.

Chlorophyll *a* fluorescence studies

Aliquots of dark-adapted chloroplasts ($15 \mu\text{g}$ of Chl) were transferred to filter paper by gravity and immediately dipped into 3 ml of different concentrations of the tested compounds. Samples were incubated for 5 min in the dark. Chl *a* fluorescence induction curves were measured at room temperature with a portable shutter-less apparatus (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech UK) as previously described (Strasser et al. 1995). Excitation was provided by an array of 6 light emitting diodes delivering 600 W m^{-2} of red light (peak at 650 nm). Kinetic analysis of the relative variable fluorescence $V(t) = (F_t - F_o)/(F_m - F_o)$ was performed by deconvolution of data collected during the first 2 ms with 10 μs resolution. Deconvolution analysis was performed with a non-linear fitting procedure using commercial software. Data were adjusted to the combination of two components: an exponential one $V = A_1 \exp[-t/\tau_1]$ and a sigmoidal one $V = A_2 / 1 + \exp[-(t-C)/\tau_2]$, where A_1 and A_2 are the relative amplitudes of each component, τ_1 and τ_2 represent their respective

rate constants and C is the relative connectivity between different PSII units. The goodness of fit was evaluated by the random distribution of residuals. In all cases the difference between the predicted and the observed areas below the induction curves were smaller than 0.2%.

Results and discussion

Effect of tricolorin A on proton uptake and ATP synthesis

Tricolorin A inhibited ATP synthesis and proton uptake with a similar potency (Fig. 2). The I_{50} for ATP synthesis ($10 \mu M$) and proton uptake ($12 \mu M$) were one order of magnitude greater than that observed for electron flow and collapse of ΔpH (see below).

Photophosphorylation can be affected by inhibition of either the redox chain or the H^+ -ATPase complex or by uncoupling. To elucidate the mode of action of tricolorin A on photosynthesis, its effect on electron flow (basal, phosphorylating and uncoupled) was studied. The results (Fig. 3) showed that tricolorin A (660 nM) enhanced basal and phosphorylating electron transport from water to MV to 270% and 126%, respectively. However, at low concentrations ($< 1 \mu M$) this macrolactone had no effect on uncoupled electron transport ($6 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$) (not shown). This behavior of tricolorin A is similar to that exhibited by classical uncouplers. The U_{50} values (the concentration of tricolorin A required for 50% enhancement) for basal and phosphorylating electron flows were 330 and 340 nM , respectively. These results suggested that tricolorin A could act as a photophosphorylation uncoupler in spinach chloroplasts.

The uncoupling ability of tricolorin A was further supported by its effect on the pH gradient across thylakoid and SMP membranes (Fig. 4). The active range of tricolorin A concentration was essentially identical to that observed for stimulation of electron flow.

Mitchell suggested that uncouplers were proton translocators with a pK in the range 5-7, i.e.

weak acids that increase the membrane proton permeability and collapse the proton electrochemical gradient by shuttling protons across thylakoid membranes (Mitchell 1961). Since tricolorin A does not have dissociable groups with acid or basic properties in the traditional pK range, it can not be a protonophoric uncoupler. Therefore, it might be acting through a different mechanism.

Effect of tricolorin A on Mg^{2+} -ATPase activity

Tricolorin A activated Mg^{2+} -ATPase in chloroplasts, increasing its activity up to 220% at 1.2 μM ; ammonium chloride or carbonylcyanide-*p*-trifluoromethoxyphenyl-hydrazine (FCCP) stimulated the Mg^{2+} -ATPase activity to a similar degree (Tab. 1). These results supported the uncoupling property of tricolorin A at low concentrations.

Effect of high concentrations of tricolorin A on the Hill reaction

At concentrations above those employed during uncoupling assays, tricolorin A inhibited the redox chain (Fig. 2). Inhibition occurred at the Q_B level as compound 1 did not affect the electron flow of photosystem I, measured from DCIPH₂ to MV, and from water to SiMo, but inhibited uncoupled photosystem II electron transport from water to DCPIP. The maximal inhibition of electron transport was obtained at 20 μM . The concentration for commercial herbicides such as DCMU ($I_{50} = 0.14 \mu M$) and atrazine ($I_{50} = 0.04 \mu M$) are one to two order of magnitude lower than those obtained for tricolorin A ($I_{50} = 5 \mu M$) (Tischer and Strotmann 1977). The site of inhibition of this natural glycolipid is the same as that of

the ureas, s-triazines, uracils, triazinones, pyridazinones and biscarbamates (Mets and Thiel 1989). Therefore, tricolorin A affects photophosphorylation, at high concentrations, by inhibiting electron flow at the Q_B level and, at low concentrations, by inducing a collapse of the proton gradient.

Recently, it was demonstrated that sorgoleone, a *p*-benzoquinone form of a dihydroquinone isolated as the phytotoxic principle of the root exudates from *Sorghum bicolor*, is an effective inhibitor of photosynthetic O_2 evolution (González et al. 1997). This activity shown by sorgoleone is higher than the one observed by our tested compound 1. The magnitude of the uncoupling of photophosphorylation displayed by tricolorin A ($U_{50} = 0.33 \mu M$) was in the same order of potency as the inhibitory effect induced by sorgoleone ($I_{50} = 0.1 \mu M$). Moreover, it has been shown that sorgoleone binds to the same Q_B niche of the D_1 protein as commercial herbicides atrazine, DCMU or bromoxynil (González et al. 1997). Such mechanism of action is not obvious for tricolorin A since its glycolipidic structure is quite different to sorgoleone.

Chlorophyll *a* fluorescence studies

Isolated spinach chloroplasts showed a polyphasic fluorescence curve with *OJIP* sequence of transients similar to that previously described for green plants, green algae and cyanobacteria (Schreiber et al. 1986, Walker 1987, Genty et al. 1989, Srivastava et al. 1995) (Fig. 5A). The *OJIP* sequence represents the successive reduction of the electron acceptor pools of PSII (Govindjee 1995). Addition of DCMU, a well-known inhibitor of the

electron flow between Q_A and Q_B , results in the formation of an *OJ* sequence (Fig. 5A). This is due to the accumulation of Q_A^- resulting in the complete closure of PSII reaction centers during the first 2 ms of the induction curve. In the absence of DCMU, chloroplasts required 900 ms to close all PSII reaction centers.

An increase in relative variable fluorescence yield as a function of tricolorin A concentrations was indicative of a loss in Q_A^- re-oxidation capacity. Comparison of the fluorescence induction curves of chloroplasts incubated with DCMU with those obtained from chloroplasts exposed to different concentrations of tricolorin A clearly showed remarkable similarities (Fig. 5B). Consistent with the inhibition of electron transport, thylakoids exposed to different concentrations of tricolorin A showed a significant concentration-dependent reduction in their relative Q_A^- re-oxidation capacity (Fig. 6). These data indicated that the target site of tricolorin A was located in the acceptor side of PSII at the Q_B binding site.

Analysis of the changes in relative variable fluorescence yield, during the first 2 ms of the induction curve, provided a detailed description of the kinetic responses of PSII to different inhibitors. The rise of variable fluorescence $V(t)$ in control chloroplasts required two components to be accurately described. A fast sigmoidal component with time constant of approximately 0.1 ms^{-1} and a slow exponential one with time constant around 0.4 ms^{-1} (Tab. 2). Comparative kinetic analysis of the relative fluorescence during the first 2 ms of the induction curves of control and DCMU-incubated chloroplasts revealed that the rapid accumulation of Q_A^- in thylakoids with acceptor side inactivation, resulted from increases

in the amplitude of both exponential and sigmoidal components with no significant changes in their respective rate constants (Tab. 2). Very similar results were obtained from chloroplasts incubated with tricolorin A. Exposure to increasing concentrations of tricolorin A resulted in higher fluorescence yields at 2 ms relative to control chloroplasts. These increases were the result of increments in the relative amplitude of the sigmoidal and exponential components and not associated to changes in their respective rate constants (Tab. 2).

PSII heterogeneity has been interpreted as the result of the presence of two populations of PSII with different optical cross-section and connectivities (Melis et al. 1983); these two populations also have different distributions in the thylakoid membranes. As shown in Tab. 2, the connectivity of the sigmoidal component has been lost with the increase in tricolorin A concentration. The connectivity parameter is related to the probability of an exciton to be transferred between different photosynthetic units (Lavergne and Trissi 1995). This result suggested that tricolorin A interference with thylakoidal membrane might be due to interaction with D₁-protein producing membrane perturbation, as a result of the amphipatic properties of this oligosaccharide, rather than a specific action at the level of Q_B. It could be speculated that interactions of the hydroxyl groups of the oligosaccharide core of tricolorin A, via formation of hydrogen bridges, with the hydrophilic region of the membrane lipids might facilitate the subsequent incorporation of the highly lipophilic cyclic part of the molecule into the thylakoidal membrane. Obviously, further investigation is required to demonstrate the detailed mode of action.

Effects of tricoloric acid (2) and its methyl ester derivative (3) on ATP-synthesis and electron flow

To investigate the possible contribution of the macrocyclic lactone-type structure of tricolorin A to the uncoupling and/or inhibition of electron transport, two derivatives of tricolorin A, namely tricoloric acid (2) and its methyl ester (3) (Fig. 1) were prepared and further evaluated as possible inhibitors of ATP synthesis and electron transport. Both derivatives behaved as weaker uncouplers and inhibitors than tricolorin A at the same range of concentration (not shown). Tricolorin A (1) was two times more active than the methyl ester of tricoloric acid (3) and displayed a potency ten times greater than its associated glycosidic acid (2). These data suggested that the macrocyclic structure of tricolorin A was essential for maximal uncoupling and inhibitory activities. Therefore, tricolorin A acts as non-protonophoric uncoupler probably by interfering directly with the thylakoidal membrane. This conclusion is supported by the value of the partition coefficient determined for this natural product ($\log P= 0.91$), which confers to this molecule a moderate lipophilic character probably needed to reach the D_1 -protein target.

Conclusions

Tricolorin A, the major phytogrowth inhibitor present in the resins of *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae), is a potent natural uncoupler of photophosphorylation. This glycolipid also behaves as a strong inhibitor of the electron transport between Q_A^- and Q_B at the acceptor side of PSII. Chl *a* fluorescence measurements confirmed that tricolorin A blocks electron transport at the Q_B site. The target and the concentration of tricolorin A needed to achieve total inhibition of the electron transport were similar to those exhibited by the well-known herbicide DCMU. These results suggest that the individual constituents of the resin glycoside mixture display a significant role in the allelopathic effect of *Ipomoea tricolor*. Therefore, tricolorin A could be selected as a suitable lead for development as an effective herbicide and/or for the design of new biodegradable agents with agrochemical applications. However, further investigations are needed to fully understand the mechanism of action of the resin glycosides of the morning-glory family.

Acknowledgments- This work was taken in part from the Ph. D. thesis of L. Achnine. This work was supported by grants IN205197 from DGAPA, UNAM; 005341 and 202335 from PADEP, UNAM, 400313-5-25118-N and 25274-M from CONACyT. L. Achnine acknowledges the fellowship awarded by DGEP-UNAM to carry out graduate studies. The authors wish to express their gratitude to Dr. Rachel Mata for her academic support, critical comments and continuous suggestions as the research leader in the program "Natural products from Mexican plants as a source of potential herbicide agents".

References

- Allen, J. F. & Holmes, N. G. 1986. Electron transport and redox titration. - *In* Photosynthesis, Energy Transduction: A Practical Approach. (M. F. Hipkins and N. R. Backer, eds), Chapter 5. pp 103-141. IRL Press. Oxford. U.K. ISBN 0-947946-63-2.
- Anaya, A. L., Calera, M. R., Mata, R. & Pereda-Miranda, R. 1990. Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). -*J. Chem. Ecol.* 16: 2145-2152.
- Bah, M. & Pereda-Miranda, R. 1996. Detailed FAB-Mass spectrometry and high resolution NMR investigations of tricolorins A-E. individual oligosaccharides from the resins of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae).- *Tetrahedron* 52: 13063-13080.
- Dilley, R. A. 1972. Ion transport (H^+ , K^+ , Mg^{2+} exchange phenomena). - *In* Methods in Enzymology, Vol. 24 (A. San Pietro, ed.). pp. 68-74. Academic Press. New York. NY. ISBN 0-12-181887-X.
- Genty, B., Briantais, J. M. & Baker, M. R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence.- *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87-92.
- González, V. M., Kazimir, J., Nimbale, C., Weston, L. A. & Cheniae, G. M. Inhibition of photosystem II electron transfer reaction by the natural product sorgoleone. 1997. -*J. Agric. Food Chem.* 45: 1415-1421.
- Govindjee. 1995. Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll *a* fluorescence. -*Austr. J. Plant Physiol.* 22: 131-160.

- Lavergne, J. & Trissi, H. W. 1995. Theory of fluorescence induction in photosystem II: derivation of analytical expressions in a model including exciton-radical pair equilibrium and restricted energy transfer between photosynthetic units.-*Biophys. J.* 68: 2474-2492.
- Lotina-Hennsen, B., Roque-Reséndiz, J. L., Jiménez, M. & Aguilar, M. 1991. Inhibition of oxygen evolution by cacalol and its derivatives. -*Z. Naturforsch.* 46c: 777-780.
- Mata, R., Pereda-Miranda, R. & Lotina-Hennsen B. 1996. Natural products from Mexican plants as a source of potential herbicide agents.- *In* Secondary Metabolites from Mexican Plants: Chemistry and Biological Properties (S. G. Pandalai, ed.), pp. 59-68. Research Signpost, Trivandrum. ISBN 81-86481-07-9
- Melis, A & Anderson, J. M. 1983. Structural and functional organization of the photosystems in spinach chloroplasts. Antenna size, relative electron transport capacity and chlorophyll composition. - *Biochim. Biophys. Acta* 724: 473-484.
- Mets, L. & Thiel, A 1989. Biochemistry and genetic control of the photosystem II herbicide target site. - *In* Target Sites of Herbicide Action (P. Böger & G. Sandamann, eds), p. 1. CRC Press, Boca Raton, FL. ISBN 0-8493-4985-0.
- Mills, J. D., Mitchell, P. & Schurmann, P. 1980. Modulation of coupling activity in intact chloroplasts. - *FEBS Lett.* 112: 173-177.
- Mitchell, P. 1961. Coupling of photophosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type mechanism.- *Nature* 191: 144-181.
- Peña-Valdivia, C. B., Rodríguez-Flores, L., Tuena de Gómez Puyou, M. & Lotina-

- Hennsen, B. 1991. Inhibition of photophosphorylation and electron transport by *N,N*-dimethylformamide. -Biophys. Chem. 41: 169-174.
- Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A. L., Wickramaratne, M. D. B., Pezzuto, J. M. & Kinghorn, D. A. 1993. Tricolorin A, a major phyto-growth inhibitor from *Ipomoea tricolor*. - J. Nat. Prod. 56: 571-582.
- Rottenberg, H. & Moreno-Sánchez, R. 1993. The proton pumping activity of H⁺-ATPases: An improved fluorescence assay.- Biochim. Biophys. Acta 1183: 161-170.
- Saha, S., Ouitrabul, R., Isawa, S. & Good, N. 1971. Electron transport and phosphorylation in chloroplast as a function of the electron acceptor. - J. Biol. Chem. 246: 3204-3209.
- Schreiber, U., Schilwa, U. & Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer.- Photosynth. Res. 10: 51-62.
- Srivastava, A., Strasser, R. J. & Govindjee. 1995. Polyphasic rise of chlorophyll *a* fluorescence in herbicide-resistant D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. - Photosynth. Res. 43: 131-141.
- Strain, H. H., Cope, T. & Svec, M. A. 1971. Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls. - Methods Enzymol. 23: 452-466.
- Strasser, R. J., Srivastava, A. & Govindjee. 1995. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. - Photochem. Photobiol. 61: 32-42.
- Sumner, J. B. 1944. Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the

colorimetric determination of phosphorus. - *Science* 100: 413-415.

Thayer, W. S. & Rubin. E. 1979. Effects of chronic ethanol intoxication on oxidative phosphorylation in rat liver submitochondrial particles. -*J. Biol. Chem.* 254: 7717-7723.

Trautschold, I., Lamprecht. W. & Schweitzer. G. 1989. ATP: UV-method with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase.- *In* *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol 7 (J. Bergmeyer and M. Graß eds.), pp. 346-357. VCH Publishers, Weinheim. ISBN 0-89573-237-8.

Walker, D. A. 1987. Fluorescence.- *In* *The use of the Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis*. Robert Hill Institute, University of Scheffield, Scheffield. Pp. 17-46. ISBN 1-870-23200-3.

Tab. 1. Comparative effects on Mg^{2+} -ATPase activity of low concentrations of tricolorin A, ammonium chloride and FCCP. Details of the experiment are given in Materials and methods.

Treatment	Mg^{2+} -ATPase activity ($\mu\text{mol P mg Chl}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Tricolorin A (μM)	
0	70
0.2	120.5
0.5	150.5
1	185.6
1.2	221.5
FCCP (μM)	
0	72
1	124.6
2	146.2
4	280.6
NH_4Cl (mM)	
0	65
2	160.4
4	231
6	241.2

Tab. 2. Comparative kinetic analysis of the first 2 ms of the chlorophyll *a* fluorescence induction curves of samples with inhibition of the Q_A to Q_B electron transfer compared with controls.

Treatment	Component					
	Sigmoidal		Exponential			
	Amplitude (relative)	Rate constant (ms ⁻¹)	Connectivity	Amplitude (relative)	Rate constant (ms ⁻¹)	V (2ms)
Tricolorin A						
(μ M) 0	0.1706	0.0863	0.2377	0.3907	0.4253	0.5613
0.6	0.2492	0.0912	0.2084	0.3529	0.4418	0.6221
20	0.3237	0.0884	0.1855	0.3553	0.4788	0.7009
100	0.3497	0.0967	0.1490	0.4439	0.5214	0.8134
DCMU	0.4823	0.0989	0.1131	0.4732	0.5308	0.9446

Figure legends

Fig. 1. Chemical structures of tricolorin A (1), tricoloric acid (2) and tricoloric acid methyl ester (3).

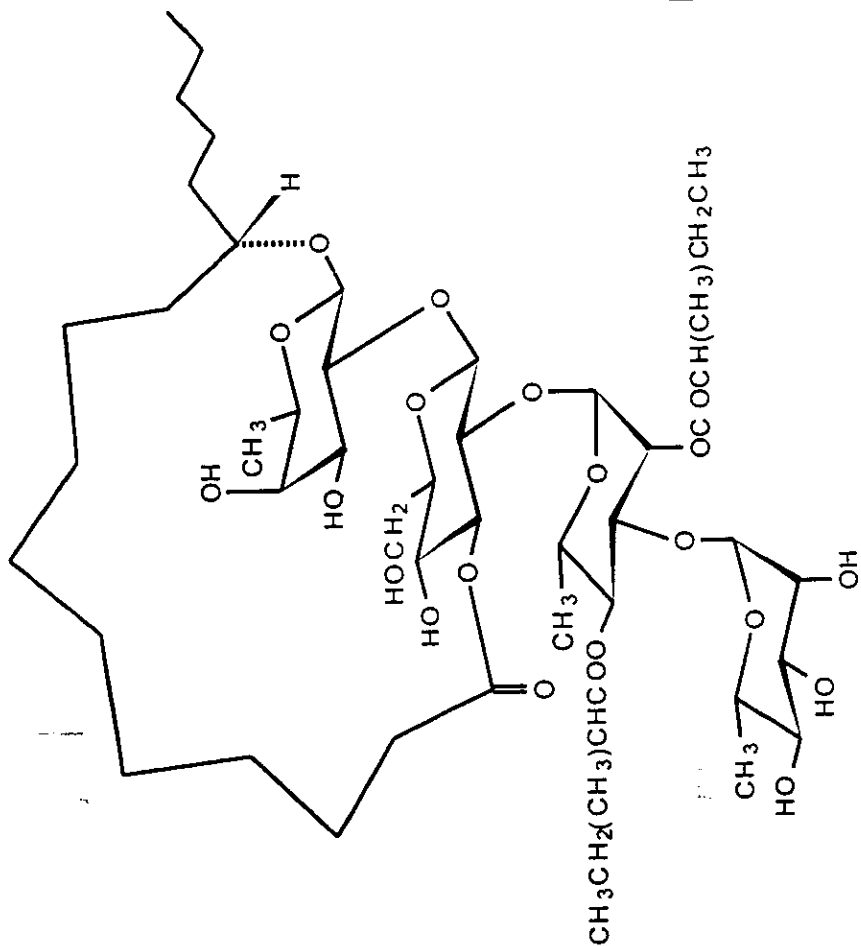
Fig. 2. Effect of increasing concentrations of tricolorin A on ATP synthesis (\square), proton uptake (\circ) and uncoupled partial reaction (DCPIP $_2$ to MV) of photosystem I (\blacktriangle), from water to DCPIP (\blacksquare), and from water to SiMo (\bullet). Control values for ATP synthesis and H $^+$ uptake were 350 and 280 $\mu\text{mol mg Chl}^{-1} \text{h}^{-1}$, respectively. Control values for the electron flows of PSI (from DCPIP $_2$ to MV in the presence of DCMU), from water to DCPIP and from water to SiMo were 650, 720 and 380 $\mu\text{equiv. e}^- \text{mg Chl}^{-1} \text{h}^{-1}$, respectively. 5 mM of NH $_4$ Cl was used to uncouple basal electron transport. Each point represents the mean of 4 determinations.

Fig. 3. Noncyclic electron transport [basal (\square), phosphorylating (\circ)] from water to methylviologen at different concentrations of tricolorin A. Control values for basal and phosphorylating electron transport were 320 and 520 $\mu\text{equiv. e}^- \text{mg Chl}^{-1} \text{h}^{-1}$, respectively.

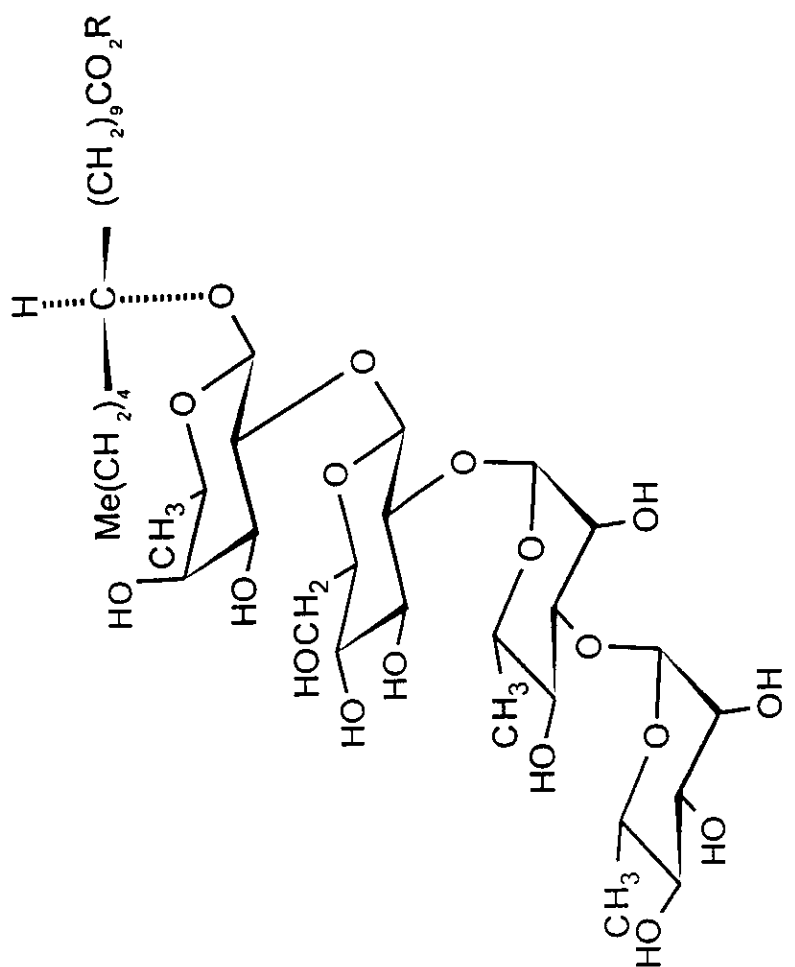
Fig. 4. Quenching of the cocktail fluorescence (ACMA and 9AA) with the increase of tricolorin A concentrations. Submitochondrial particles (\blacktriangle) (ΔpH range 2.2-2.4), low chloroplastic ΔpH (\blacksquare) (ΔpH range 0.8-1) and illuminated thylakoids (\circ) (ΔpH range 1.9-2). ATP was added as a substrate to generate ΔpH for the experiment with SMP and thylakoids at low ΔpH values. Details of the experiment are described in Materials and methods.

Fig. 5. A. Fluorescence induction curves of samples with (10 μM) and without DCMU. B. Chlorophyll fluorescence induction curves of controls (with and without DCMU) and samples exposed to different concentrations of tricolorin A (0.6-100 μM).

Figure 6. Q_A^- re-oxidation capacity (relative) of thylakoids as function of increasing concentrations of tricolorin A.

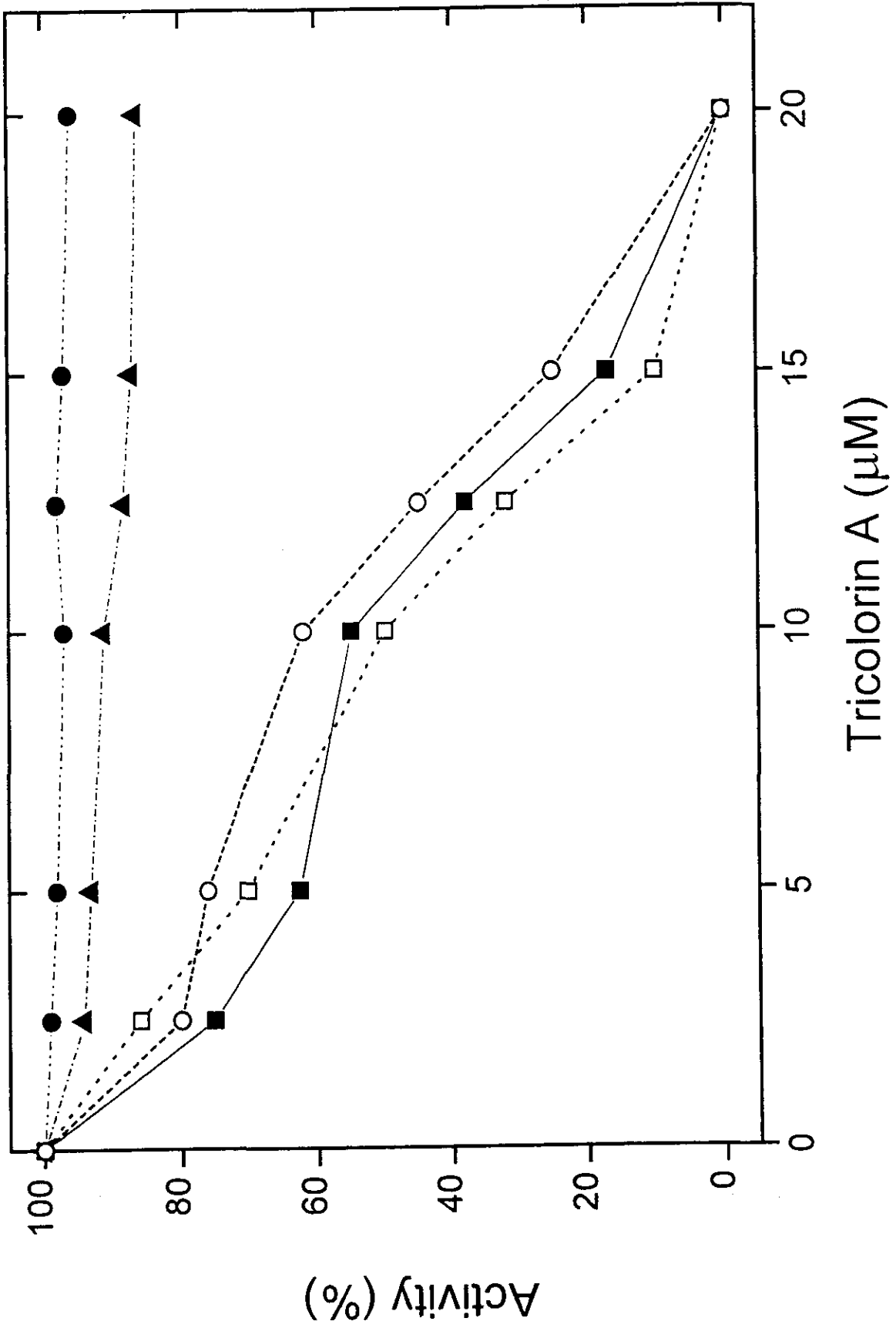


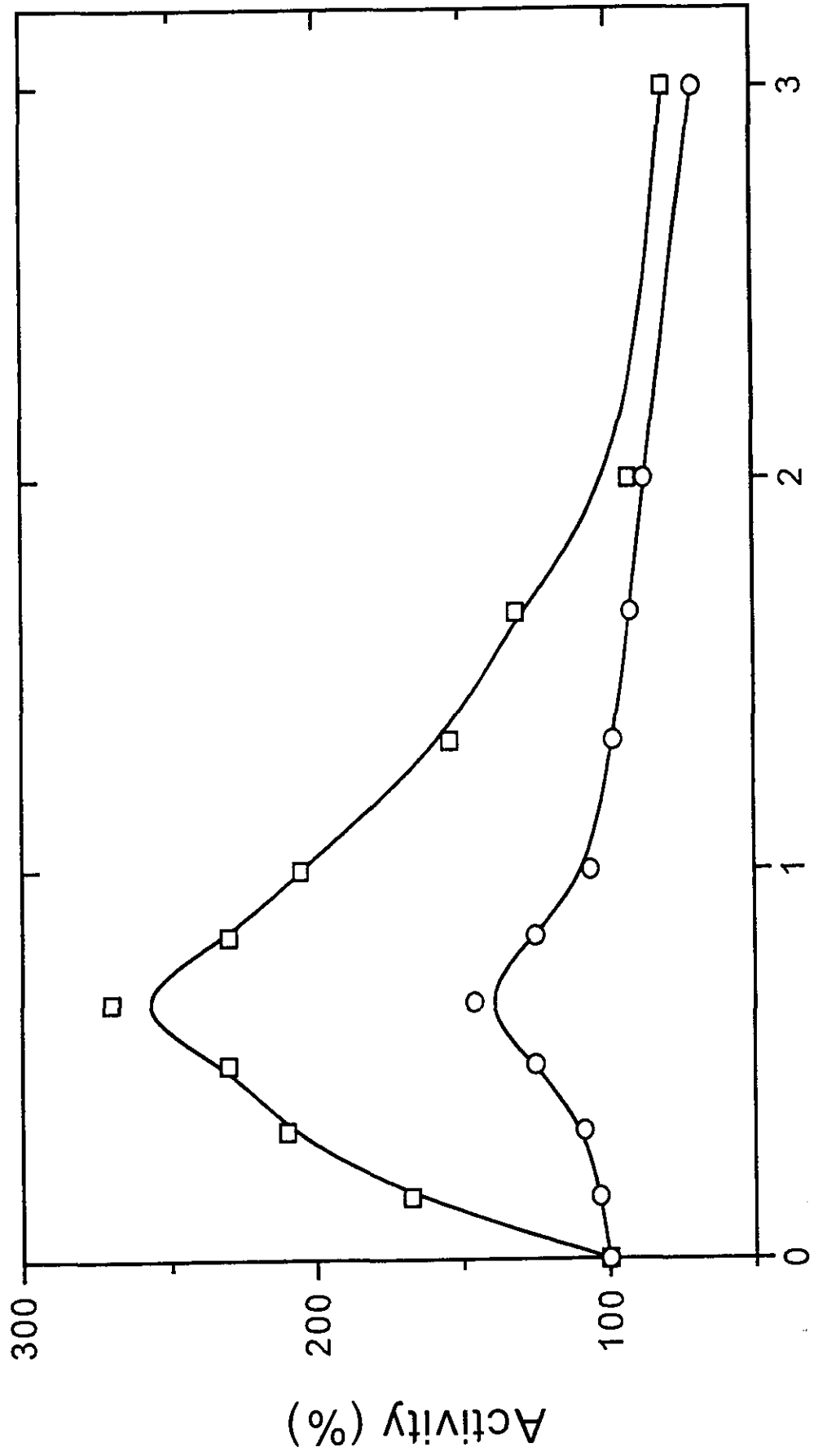
(1)



R = H; (2)

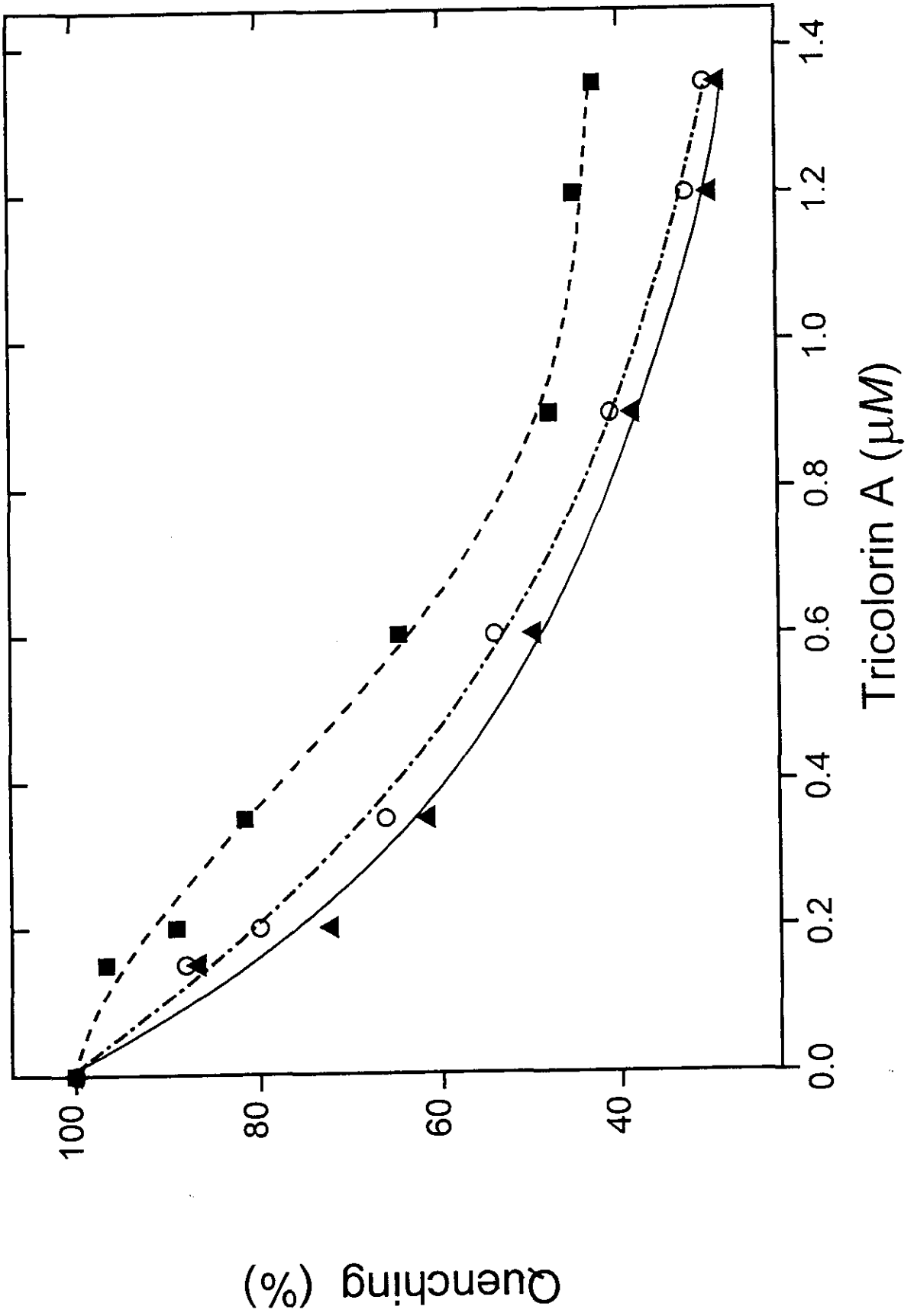
R = Me; (3)

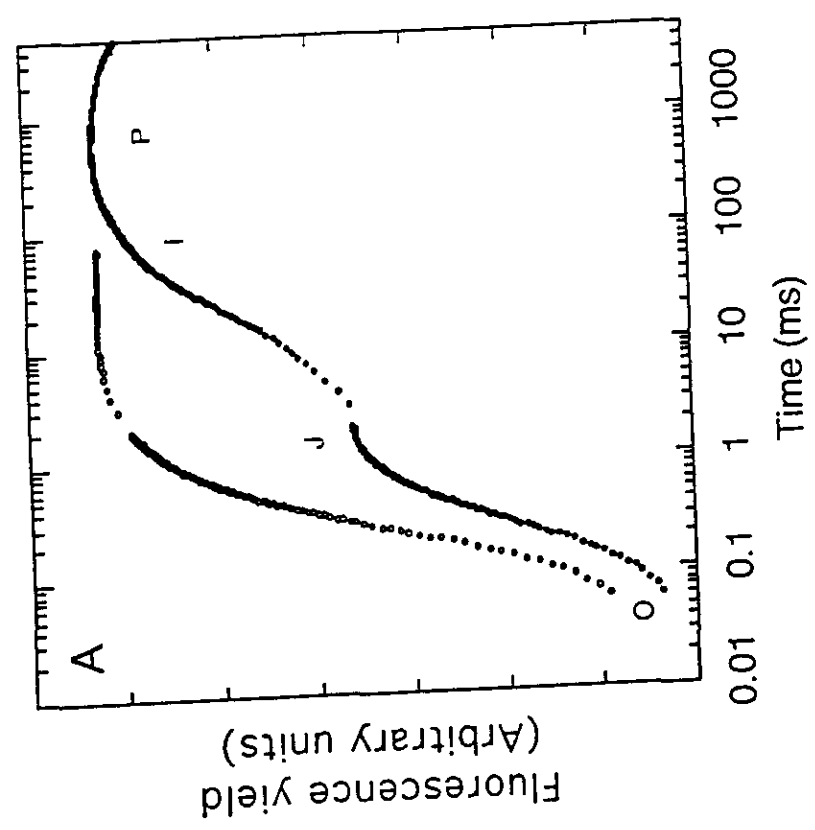
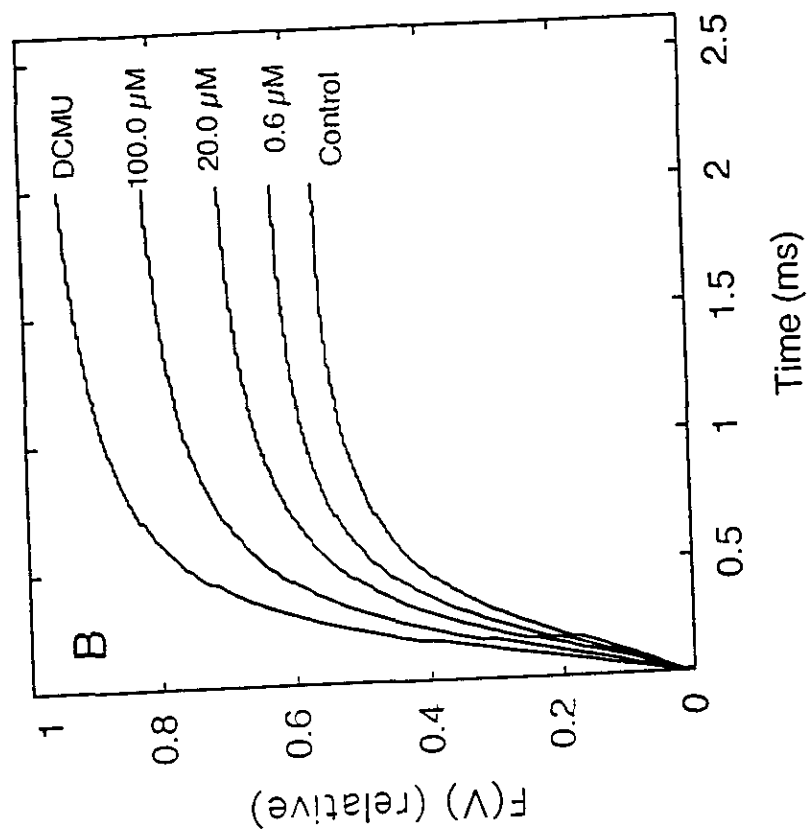


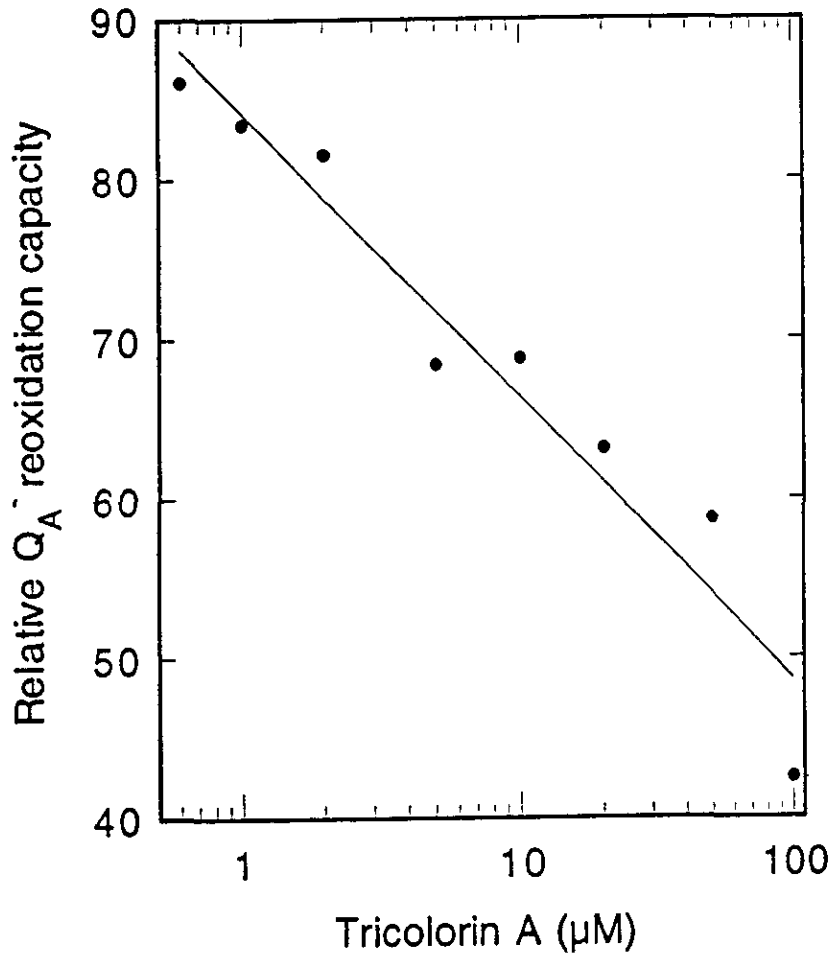


Tricolorin A (μM)

Activity (%)







VIII. DISCUSION

Para la investigación del efecto de los metabolitos secundarios sobre los procesos fotosintéticos, en primer lugar se analizó la actividad de dichos compuestos sobre la fotofosforilación. Posteriormente, considerando que estos productos naturales inhibieron de manera significativa la síntesis de ATP, se procedió a dilucidar el mecanismo de inhibición. Cabe mencionar que los compuestos que inhiben la fotofosforilación, lo pueden hacer por mecanismos de desacoplamiento, interfiriendo con la transducción de energía o bien afectando la reacción de Hill (Trebs, 1972; Moreland, 1980; Ort, 1986). Para discriminar entre estas tres posibilidades se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de los compuestos sobre los transportes de electrones basal, fosforilante y desacoplado. Posteriormente, se interpretó el mecanismo de acción y se procedió a caracterizar el sitio o la enzima redox de la cadena transportadora de electrones que fue afectada por los compuestos evaluados. Para los compuestos que resultaron inhibidores del FS II (lado donador o aceptor) se procedió a un estudio cinético de la inhibición mediante el empleo de la técnica de la fluorescencia de la clorofila *a* del centro de reacción del FS II.

Con la finalidad de establecer la relación entre la estructura de los compuestos y la actividad biológica, se hicieron las reacciones químicas apropiadas para la derivatización de las moléculas bajo estudio y se evaluó su efecto sobre los procesos fotosintéticos.

La discusión de los resultados obtenidos se presenta a continuación. Cabe mencionar que en esta sección, los resultados se discuten por efecto de cada compuesto sobre las actividades fotosintéticas investigadas.

8.1. EFECTO DE LA 7-OXO-7-DEACETOXIGEDUNINA SOBRE LA ATPasa DEL CLOROPLASTO.

Los limonoides GD y OGD se obtuvieron de las semillas de *Guarea grandiflora* (Meliaceae). En el caso de GD, la identificación se realizó por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas (IR y RMN ^1H) con las de una muestra auténtica (Toscano *et al.*, 1996). La OGD se caracterizó por un análisis de rayos X. En el Apéndice III se ilustra la estructura del producto natural. La OGD demostró una actividad inhibitoria, a la concentración de 300 μM , sobre la síntesis de ATP y el transporte de electrones fosforilante en un 88 y 83%, respectivamente. Los transportes de electrones basal y desacoplado no fueron afectados por dicho compuesto, lo que indicó que la OGD inhibe la fotofosforilación mediante una interferencia directa con la ATPasa al igual que el compuesto natural 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi,3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (Calera *et al.*, 1995a). La OGD es menos potente como inhibidor de la síntesis de ATP que la 4-fenilcumarina debido a que su I_{50} (concentración que produce el 50% de inhibición) fue de 134 μM en contraste con 80 μM de la fenilcumarina. El comportamiento de ambos productos naturales, como

inhibidores de la transferencia de energía, es similar al de las zizifinas A y B, las amfibinas C y D, la florizina y el DCCD entre otros (Izawa *et al.* 1966; Gould 1978; Ravizzini *et al.*, 1977). En la tabla 1 se indican algunos inhibidores sintéticos y naturales de la ATPasa cloroplástica.

Tabla 1. Algunos inhibidores sintéticos y naturales de la ATPasa cloroplástica.

INHIBIDOR	RANGO DE CONCENTRACION	SUBUNIDAD DE INTERFERENCIA	REFERENCIA
Vanadato	0.5 mM	CF ₁	Carmeli <i>et al.</i> 1992
Florizina	< 2 mM	CF ₁	Winget <i>et al.</i> 1969
Dio-9	3.5 µg/ml	CF ₁	McCarty <i>et al.</i> 1965
Tentoxina	< 2 µM	CF ₁	Hu <i>et al.</i> 1993
DCCD	10-20 µM	CFo	McCarty & Racker 1968
Trifenilestaño	< 1 µM	CFo	Gould 1978
Zizifina A	80 µM	-	Ravizzini <i>et al.</i> 1977
Zizifina B	60 µM	-	Ravizzini <i>et al.</i> 1977
Amfibina C	237 µM	-	Ravizzini <i>et al.</i> 1977
Amfibina D	120 µM	-	Ravizzini <i>et al.</i> 1977
4-fenilcumarina	150-200 µM	CFo	Calera <i>et al.</i> 1995
OGD	100-150 µM	CFo	Trabajo No 2

El grupo 7-oxo de la molécula de OGD es de gran importancia para su actividad inhibidora debido a que la gedunina, que posee en la posición C-7 un grupo α acetoxi, fue menos potente que la OGD en todas las actividades fotosintéticas estudiadas. La OGD y la GD no demostraron un efecto notable sobre la Mg^{2+} -ATPasa unida a la membrana ni sobre la Ca^{2+} -ATPasa, activada por calor, del CF_1 parcialmente purificado. El nortriterpenoide OGD interfiere a nivel de CF_0 en virtud de que en los tilacoides depletados de CF_1 , el compuesto restauró la captación de H^+ de los tilacoides. Esta prueba permite comprobar que la OGD interacciona con el CF_0 (O'Keefe & Dilley 1976). El mismo comportamiento se ha demostrado para el DCCD, trifenilestaño y la 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi,3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (Calera *et al.*, 1995; Gould, 1976; McCarty & Racker, 1967). La experimentación realizada en el presente trabajo sobre la restauración de la captación de protones permitió comprobar que el efecto aditivo del OGD y la 4-fenilcumarina fue mayor que aquel de la ODG y el DCCD (Trabajo 1; Figura 5). Cabe mencionar que las concentraciones usadas en este experimento con todos los inhibidores fueron sub-efectivas. Este hecho nos llevó a investigar, mediante el enfoque cinético, la manera en que estos inhibidores actúan a nivel de CF_0 . El empleo de la técnica de cinética de doble inhibición del CF_0 para realizar los estudios de competencia entre la OGD y el DCCD y la 4-fenilcumarina, indicó que la OGD y la 4-

fenilcumarina tienen una cinética competitiva de inhibición. Esto se hizo evidente en virtud de que las curvas describen un sistema de inhibición cooperativa (aditiva) no-competitiva por dos diferentes inhibidores. Las gráficas de Dixon (Trabajo 1, Figura A1 y A2) muestran que la unión del DCCD a los tilacoides no tiene efecto alguno sobre la unión de la OGD, debido a que las curvas tienen intersección sobre el eje horizontal (Segel, 1993). Por otro lado, la OGD y la 4-fenilcumarina competieron por el sitio de unión en CF₀. Las curvas correspondientes a este último experimento (Trabajo 1, Figura 6B1, B2) tienen su intersección por debajo del eje horizontal, lo que indica que este inhibidor interfiere con la unión del otro (Segel, 1993). En síntesis, estos resultados sugieren que los sitios de unión de la OGD y del DCCD son diferentes. Por otro lado, los resultados de la cinética de inhibición observada en el experimento con la 4-fenilcumarina y el DCCD reforzaron los datos anteriores, debido a que estos compuestos no compitieron entre sí (Trabajo 1; Figura 6C1 y C2). Los datos del estudio cinético de unión con CF₀ fueron apoyados por los valores de los coeficientes de partición encontrados en el sistema n-octanol/agua de los compuestos naturales OGD (Log P= 0.91; este trabajo) y la 4-fenilcumarina (Log P = 0.85; Calera *et al.*, 1995).

Con la finalidad de determinar la naturaleza de la unión de la OGD a CF₀, se utilizó el procedimiento de lavado de las membranas tilacoidales (Gould, 1978). Los resultados revelaron una disminución de la restauración del ΔpH , lo cual es consistente con una unión no-covalente de la OGD con CF₀. Además, la

incubación con OGD de los tilacoides depletados de CF_1 , ya lavados tres veces, indujo una restauración mayor de la captación de protones (311%) (Trabajo 1, Tabla 2). Estos resultados demuestran calaramente que la unión de la OGD con el CF_0 es similar al del trifenilestaño (Gould, 1978). Los resultados encontrados del efecto de la OGD y la GD nos permiten concluir que estos dos compuestos podrían ser útiles para el estudio de un posible nuevo sitio de unión a nivel del CF_0 diferente al sitio conocido para el DCCD en la subunidad III.

8.2. EFECTO DEL ODORATOL SOBRE EL LADO DONADOR DEL FOTOSISTEMA II.

El protolimonoide odoratol inhibió la síntesis de ATP y la captación de protones en un 96% y 89.9%, respectivamente (Trabajo 2; Figura 1). Este comportamiento se debió a que el compuesto es inhibidor de la reacción de Hill. Su sitio de acción fue localizado a nivel del lado donador del FS II. Esto fue demostrado en virtud de que el odoratol no afectó el flujo de electrones a través del FS I, ni del DCP al DCPIP en cloroplastos lavados con Tris (0.8 M). Mientras que el compuesto natural inhibió el flujo de electrones del FS II de agua a DCPIP y de agua a SiMo (o a DAD) (Trabajo 2; Figura 2). En la tabla 1, se compara el efecto inhibitorio del odoratol con varios tratamientos e inhibidores del lado donador del FS II.

Por otro lado, se usó la técnica de la fluorescencia de la clorofila *a* para

comprobar por otros procedimientos los datos de la inhibición del lado donador del FS II inducida por el odoratol. Los datos obtenidos confirman de manera contundente que el odoratol interacciona con el lado donador del FS II. Lo anterior se comprobó dado que los patrones de la emisión de la fluorescencia en presencia del odoratol fueron idénticos a aquellos obtenidos con Tris y la hidroxilamina, inhibidores clásicos de la enzima de la fotólisis de agua (Trabajo 2; Figura 4).

Tabla 2. Inhibidores sintéticos y naturales de la Enzima de la Fotólisis de Agua.

TRATAMIENTO O COMPUESTO INHIBIDOR	RANGO DE CONCENTRACION	REFERENCIA
Deprivación de Ca ²⁺	-	Miyao & Murata; 1984
Lavado con Tris	0.8-1 M	Yamashita & Butler; 1968
Hidroxilamina	20-50 µM	Izawa & Good; 1972 Hsu; 1993
Cacalol	30-100 µM	Lotina-Hennsen <i>et al.</i> , 1991
Ivalina	> 2 mM	Bernal-Morales <i>et al.</i> , 1994
Odoratol	150 µM	Trabajo No 1

La deconvolución de las curvas obtenidas en presencia del odoratol demuestra que este tratamiento matemático presenta un componente sigmoidal y

dos componentes exponenciales (Trabajo 2; Tabla 2). Se observó claramente que al igual que la hidroxilamina y el Tris, el odoratol indujo un aumento rápido de la emisión de la fluorescencia, correspondiente al evento "K" seguido por un apagamiento. Este comportamiento se explicó por la aparición de P_{680}^+ , un eficiente apagador de la emisión de la fluorescencia. Cinéticamente, se observó una disminución de la constante de velocidad del componente exponencial, lo que explica la rápida disminución de la fluorescencia después del evento "K".

Con el fin de establecer la relación estructura-actividad, se sintetizaron dos derivados del odoratol: el triacetil odoratol y el acetónido del odoratol. El triacetil odoratol se obtuvo por tratamiento del producto natural con el anhídrido acético y piridina. El acetónido se generó por reacción del compuesto con acetona en medio ácido. Las estructuras de los derivados se confirmaron mediante métodos espectroscópicos, incluyendo la RMN 1H (Apéndice II), los cuales resultaron idénticos a los previamente descritos en la literatura (Chan *et al.*, 1968). Los resultados de las evaluaciones biológicas demostraron la importancia del diol en la posición 23/24 debido a que el triacetil odoratol así como el acetónido del odoratol fueron muy poco activos como inhibidores del lado donador del FS II (Trabajo 2; Tabla 1).

La enzima de la fotólisis de agua se inhibe por varios tratamientos entre los cuales destacan la eliminación de los cofactores de la enzima (Ca^{2+} y/o Cl^-) (Ghanotakis *et al.*, 1984) y los tratamientos con Tris, hidroxilamina o metilamina (Izawa & Good, 1972). El comportamiento del odoratol fue parecido al de los

compuestos naturales cacalol e ivalina (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991; Bernal-Morales *et al.*, 1994). Las concentraciones I_{50} calculadas para el cacalol y la ivalina son de 30 μM y 2.8 mM, respectivamente, mientras que el I_{50} calculado para el odoratol fue de 36 μM . Hasta el momento solamente se conocen estos productos naturales como inhibidores de la enzima de la fotólisis de agua (Tabla 2). El estudio detallado de los mecanismos de inhibición por estos productos naturales proporcionaría más información sobre el funcionamiento de la enzima.

8.3. EFECTO DE LA TRICOLORINA A SOBRE EL LADO ACEPTOR DEL FOTOSISTEMA II.

Para caracterizar la actividad y los mecanismos de acción a nivel bioquímico de la tricolorina A, se utilizaron las técnicas de potenciometría y oximetría sobre el metabolismo energético de los cloroplastos. Los resultados derivados del estudio polarográfico demuestran que la tricolorina A tiene dos efectos dependientes de su concentración. A bajas concentraciones ($< 2 \mu\text{M}$) este producto natural actúa como desacoplante debido a que a concentraciones nanomolares indujo un aumento en las velocidades de los transportes de electrones basal (270%) y fosforilante (126%) (Trabajo 3; Figura 3). Mientras que el flujo de electrones desacoplado no se afectó. Este comportamiento de la tricolorina A es similar al efecto observado para los desacoplantes clásicos. Este efecto desacoplante fue comprobado a través de los resultados obtenidos cuando

se estudió el ΔpH transmembranal en los tilacoides y en las partículas submitocondriales en presencia de la tricolorina A. El rango de concentración de la tricolorina A para disipar el ΔpH fue el mismo que aquel requerido para la estimulación del flujo de electrones (Trabajo 3; Figura 4). En virtud de que la tricolorina A no tiene grupos dissociables en el rango de pH 5-7, lo cual constituye un requerimiento para los desacoplantes que actúan de acuerdo al mecanismo de "Shuttling of protons" a través de la membrana (Mitchell, 1961), por lo que el mecanismo de acción de este compuesto es diferente.

La tricolorina A estimuló la hidrólisis de ATP medido mediante la actividad de la Mg^{2+} -ATPasa hasta un 221% a $1.2 \mu\text{M}$ al igual de los agentes desacoplantes clásicos NH_4Cl y el FCCP (Trabajo 3; Tabla 1).

A concentraciones mayores a $2 \mu\text{M}$, la tricolorina A ocasionó un efecto inhibitorio en la cadena de transporte de electrones del cloroplasto similar al que presentan varios desacoplantes, solo que el sitio de interferencia de este compuesto es diferente y se localizó entre Q_A y Q_B (Trabajo 3; Figura 2). El efecto y la concentración de la tricolorina A requerida para la observación del mismo son similares a los de varios herbicidas comerciales tales como el DCMU, ureas, s-triazinas, uracilos, trazinonas, piridazinonas y biscarbamatos (Mets & Thiel, 1989). En recientes trabajos se demostró que la sorgoleona, que podría considerarse un análogo de la *p*-benzoquinona de la dihidroquinona inhibe el desprendimiento del oxígeno en cloroplastos (González *et al.*, 1997). El blanco de

la sorgoleona se localizó a nivel del FS II y los diferentes estudios permitieron demostrar que la quinona natural compite con Q_B por su sitio de unión a la proteína D_1 Del FS II. Este comportamiento es similar al observado para la atrazina, el DCMU o el bromoxinil (González *et al.*, 1997). Este mecanismo de acción, sin embargo, no es obvio para la tricolorina A debido a que su estructura glicolípídica es diferente a la de la sorgoleona. En la tabla 3 se indican algunos inhibidores del FS II, cuyo sitio de interferencia se localiza entre Q_A y Q_B .

Tabla 3. Algunos inhibidores del FS II el sitio de inhibición entre Q_A y Q_B .

INHIBIDOR	RANGO DE CONCENTRACION	REFERENCIA
Acridonas	10^{-5} - 10^{-7} M	Oettmeier <i>et al.</i> 1992
Xantonas	10^{-5} - 10^{-6} M	Oettmeier <i>et al.</i> 1992
Naftoquinonas	10^{-4} - 10^{-6} M	Oettmeier <i>et al.</i> 1992
Benzoquinonas	10^{-4} - 10^{-6} M	Oettmeier <i>et al.</i> 1992
Triazinas	10^{-4} - 10^{-8} M	Tietjen <i>et al.</i> 1992
Triazinonas	10^{-3} - 10^{-6} M	Tietjen <i>et al.</i> 1992
DCMU	10^{-6} M	Trebst <i>et al.</i> 1983
Azidoquinonas	10^{-5} M	Vermaas <i>et al.</i> 1983
Sorgoleona	10^{-6} M	González <i>et al.</i> 1997
Tricolorina A	10^{-6} M	Trabajo No 3

Por otro lado, en la literatura se ha descrito que la fluorescencia de la clorofila *a* es una técnica útil para estudiar herbicidas cuyo blanco de acción se

localiza a nivel de Q_B (segundo aceptor de electrones del FS II) (Srivastava *et al.*, 1995; Govindjee, 1995). Con el objeto de corroborar los datos de oximetría y obtener la información correspondiente sobre la cinética de inhibición de la tricolorina A, se realizó un análisis comparativo de sus efectos a nivel de Q_B con aquellos provocados por el DCMU. Para ello se utilizó la técnica de la fluorescencia de la clorofila *a* del centro de reacción del FS II. Esto nos permitió la obtención de los parámetros cinéticos de dicha inhibición (Trabajo 3; Tabla 2). El producto natural demostró de manera inequívoca una interferencia sobre el transporte de electrones del lado aceptor del FS II entre las quinonas Q_A y Q_B . Lo anterior es debido a que se observó un incremento de la fluorescencia relativa y una acumulación de Q_A^- , lo cual fue el resultado del bloqueo del paso de electrones entre Q_A y Q_B (Trabajo 3; Figura 6). Este efecto así como la concentración requerida de la tricolorina A son similares al efecto establecido por el herbicida comercial DCMU.

El análisis de la curvas mediante un tratamiento matemático demostró la necesidad de usar un componente sigmoideal y dos componentes exponenciales (Trabajo 3; Tabla 2). El efecto de la tricolorina A sobre estos componentes se resume a continuación: se observó un aumento de la amplitud del componente sigmoideal conforme al aumento de las concentraciones del producto natural, pero el componente exponencial no sufrió cambio alguno. La magnitud del efecto observado es proporcional al aumento de las concentraciones de la tricolorina A, la cual se interpreta como una acumulación de la quinona Q_A^- , impidiendo la

transferencia de electrones hacia Q_B . Estos datos apoyan los resultados derivados del estudio polarográfico.

Para cumplir con el objetivo de establecer una relación estructura-actividad, se estudió el efecto de varios derivados de la tricolorina A: el ácido tricolórico y el metil éster del ácido tricolórico. Los dos derivados presentaron una débil actividad desacoplante e inhibitoria de la reacción de Hill comparado con la tricolorina A. Este último glicolípido fue dos veces más activo que el metil éster del ácido tricolórico y casi diez veces más potente que el ácido tricolórico. Estos resultados sugieren que la estructura macrolactónica de la tricolorina A es de gran importancia para la actividad inhibitoria. Es probable que la tricolorina A actúe como un agente desacoplante no-protonofórico interfiriendo directamente con la membrana tilacoidal. Esta conclusión es apoyada por los resultados de la disipación del ΔpH y del coeficiente de partición de la molécula en el sistema n-octanol/agua ($\text{Log } P = 0.91$); lo cual le confiere un carácter ligeramente lipofílico requerido para alcanzar su sitio de acción en la proteína D_1 del FS II.

De manera adicional, se evaluó el efecto de las tricolorinas B, C y E (Apéndice IV) sobre la fotosíntesis. Los resultados obtenidos demostraron que los tres compuestos son inhibidores del transporte de electrones entre Q_A y Q_B . Las tricolorinas B, C y E resultaron menos potentes que la tricolorina A. Asimismo, las concentraciones efectivas de los tres glicolípidos que causaron la inhibición total de la transferencia de electrones fueron de $100 \mu\text{M}$. Los estudios de la

fluorescencia de la clorofila *a* del centro de reacción del FS II demostraron que a estos niveles de concentración de las tricolorinas B, C y E se observa una clara acumulación de Q_A^- . Este hecho demuestra que el sitio de interferencia de los tres glicolípidos, al igual que la tricolorina A, se localiza en el lado aceptor del FS II. Estos resultados demuestran que la sustitución del mba (ácido metil butírico) presente en la molécula de la tricolorina A por el iba (ácido isobutírico) (tricolorina B) o el nla (ácido nílico) (tricolorina C), ocasiona una pérdida notable en la actividad inhibitoria.

En conclusión, la tricolorina A, el constituyente mayoritario de las resinas glicosídicas de *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae), es un potente desacoplante natural de la fotofosforilación. Este aleloquímico actúa, a altas concentraciones (mayores a $2 \mu\text{M}$), como un inhibidor de la transferencia de electrones entre Q_A y Q_B al igual que el herbicida comercial DCMU. Las concentraciones requeridas para estas actividades de la tricolorina A son comparables con los herbicidas inhibidores clásicos a nivel de Q_B . (Tabla 3). Los resultados demuestran que la tricolorina A podría ser utilizado como un agente herbicida y/o como un prototipo estructural con aplicaciones agroquímicas.

IX. CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se demostró que los limonoides y las resinas glicolípídicas (metabolitos característicos de las familias Meliaceae y Convolvulaceae, respectivamente) afectan el proceso de la fotosíntesis *in vitro* a través de distintos mecanismos de acción
2. La GD y la OGD son inhibidores de la transferencia de energía. El sitio de acción de las geduninas es localizado a nivel del CF_o de la ATPasa cloroplástica. El grupo oxo libre en el C-7 es de gran importancia para la actividad desempeñada por la OGD.
3. El odoratol es un inhibidor de la reacción de Hill. Su blanco de interferencia en la cadena de transporte de electrones fue localizado a nivel de la enzima de la fotólisis de agua. El diol en la posición 23/24 es esencial para la actividad inhibidora del odoratol.
4. La tricolorina A demostró dos tipos de actividades, mismos que dependen de la concentración del compuesto utilizada en los sistemas de ensayo. A bajas concentraciones (< 2 µM), el compuesto es desacoplante de la fotofosforilación. A altas concentraciones (> 2 µM), la tricolorina A es un inhibidor de la cadena de transporte de electrones a nivel de Q_B. El sitio de interferencia de la

tricolorina A es idéntico al sitio de inhibición de varios herbicidas comerciales que afectan la fotosíntesis. La estructura macrocíclica de este producto natural es muy importante para esta actividad.

5. Los datos de los patrones de fluorescencia de la clorofila *a*, en cuanto a los daños en los lados donador y aceptor del FS II, confirman los resultados obtenidos por oximetría.
6. Los experimentos *in vitro* conducidos en la presente investigación permiten proponer lo siguiente:
 - a. El odoratol y la tricolorina A son aleloquímicos cuyas características inhibitorias sobre los procesos fotosintéticos ameritan su desarrollo como posibles herbicidas "verdes" biodegradables.
 - b. La OGD constituye una herramienta de investigación valiosa para el descubrimiento de nuevos sitios de unión a nivel de CF_o.
 - c. El uso de PEA (Plant Efficiency Analyser) para determinar la fluorescencia de la clorofila *a* del centro de reacción del FS II, es una herramienta provechosa, informativa y rápida para seleccionar compuestos con posible actividad herbicida.

X. PERSPECTIVAS

1. Determinar el sitio de unión en el CFo de la OGD empleando la técnica de marcaje por afinidad. Esto permitirá obtener información acerca de cual subunidad del CFo constituye el blanco de acción de la OGD.
2. Investigar la cinética de inhibición del Complejo de la Fotólisis del Agua por el odoratol empleando la técnica de la espectroscopía de absorción. Esto dará información sobre el estado "S" de la enzima que es más favorecido para la interacción con el odoratol.
3. Realizar estudios de competencia de la tricolorina A con inhibidores de la transferencia de electrones entre Q_A y Q_B . Esto permitirá concluir sobre el modo de acción del compuesto natural dado que los inhibidores a este nivel de la cadena interfieren primordialmente mediante el desplazamiento de Q_B .
4. Realizar estudios de estructura-actividad de los compuestos naturales similares a la tricolorina A con el fin de evidenciar más grupos funcionales de la molécula involucrados en la actividad observada.

5. Evaluar la acción del odoratol y de la tricolorina A sobre la fotosíntesis *in vivo* de hojas completas de plantas agrícolas y de malezas. Esto permitirá concluir si el efecto de los compuestos también se observa a nivel de hojas completas.

6. Investigar el posible efecto de los compuestos (odoratol y tricolorina A) sobre plántulas de especies agrícolas y malezas para demostrar la selectividad de estos compuestos sobre diversas especies vegetales.

XI. BIBLIOGRAFIA

- Anaya, A. L.; Calera, M., Mata, R. & Pereda, R. (1990) Allelopathic Potential of Compounds Isolated from *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *J. Of Chem. Ecol.*, **16**: 2145-2152.
- Anaya, A. L. (1996) Plant Infochemicals: Ecological Aspects and Potential in Pest Control. *Revista Latinoamericana de Química*, No 3-4, **24**:170-176
- Anderson, J. W. & Beardall, J. (1991) Molecular Activities of Plant Cell. An Introduction to Plant Biochemistry. Blackwell Scientific Publications. USA. 384 pp.
- Argueta, A. V., Cano, L. M. & Rodarte, M. E. (1981) Cedro en Altas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, Vol. 1. Instituto Nacional Indigenista, México.
- Arnason. J. T.; Philogene, B. J. R. & Towers, G. G. N. (1992). Phytotoxins in Plant-insect Interactions, In: Herbivores: their Interactions with Secondary Plant metabolites. Ecological and Evolutionary Processes. (G. A. Rosenthal, M. R. & M. R. Berenbaum, eds). Academic Press, N. Y. 317-343.
- Arntzen, C. J.; Pfister, K. & Steinback, K. E. (1982) *In: Herbicide Resistance in Plants* (H. M. LeBaron & J. Gressel, eds.), Willey and Sons, New York, pp. 185-214.
- Bah, M. & Pereda-Miranda, R. (1996) Details FAB-Mass Spectrometry and High Resolution NMR Investigations of Tricolorin A-E, Individual

- Oligosaccharaides from the Resins of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae).
Tetrahedron **52**: 13063.
- Baldwin, M. A.; Lodun, A. G. & Maccoll, A. (1967). The Mass Spectra of Meliacins and Related Compounds. Part I. Gedunin and Related Compounds. *J. Chem. Soc.* 1026-1034.
- Baldwin, M. A.; Motoo, B. S.; Játiva, C.; Tinto, W. F.; Reynolds, W. F. & McLean, S. (1992) Ecuadorin, a Novel Tetranorterpenoid of *Guarea kunthiana*: Structure Elucidation by 2-D NMR Spectroscopy. *Can. J. Chem.* **70**: 1260-1263.
- Baldrin, M. F. & Klocke, J. A. (1985). Natural Plant Chemical. Source of Industrial and Medicinal Materials. *Science*, **228**: 1154-1156.
- Banerji, B.; Nigam, S. K. (1984) A Review *Fitotrapia*, **1**: 3-36.
- Barber, J. (1987) Composition, Organization and Dynamics of the Thylakoid Membrane in Relation to its Function. En: *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise* (P. K. Stumpf & E. E. Conn eds), vol. 10 pp. 75-130 Academic Press Inc., New York.
- Beckers, G., Berzborn, R. & Strotmann, H. (1992) Zero-length Crooslinking Between Subunits δ and I of the H⁺-translocating ATPase of Chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1101**: 97-104.
- Benner, J. P. (1993) Pesticidal Compounds from Higher Plants. *Pesticide Science*, **39**: 95-105.
- Bernal-Morales, E., Romo de Vivar, A., Sánchez, B., Aguilar, M., Lotina-Hennsen, B. (1994) Inhibition of Oxygen Evolution by Ivalin. *Can. J. Bot.* **72**: 177-181

- Bevan, W. L.; Powell, J. W. & Taylor, D. A. H. (1963) West African Timbers. Part VI. Petroleum Extracts from Species of the Genera Khaya, Guarea, Carapa and Cedrela. *J. Chem. Soc.* 980-982.
- Bieber, L. W., Da Silva Filho, A. A., Lima, R. M., Chiappeta, A. A., Do Nascimento, S. C., De Souza, I. A., De Mello, J. F. & Veith, H. J. (1986) Anticancer and Antimicrobial Glycosides from *Ipomoea bahiensis*. *Phytochemistry* **25**: 1077-1081.
- Boekema, E. J., Xiao, J. & McCarty, R. E. (1990). Structure of the ATP Synthase from Chloroplasts Studied by Electron Microscopy. Localization of the Small Sub-units. *Biochim. Biophys. Acta* **1020**: 49-56.
- Bray, D. H.; Warhurst, D. C.; Connolly, J. D.; O'Neil, M. J. & Phillipson, J. D. (1990). Plants as Sources of Antimalarial drugs. Part 7. Activity of some Species of Meliaceae Plants and their Constituent Limonoids. *Phytotherapy Res.* **4**: 29-35.
- Calera, M. R., Mata, R., Anaya, A. L. & Lotina-Hennsen, B. (1995a) 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin, an Inhibitor of Photophosphorylation in Spinach Chloroplasts. *Photosynth. Res.* **40**: 105-110.
- Calera, M. R., Soto, F., Sánchez, P., Bye R. Hernández-Bautista B. E., Anaya, A. L., Lotina-Hennsen, B. & Mata R. (1995b) Uncoupling Behaviour of the 4-phenylcoumarins in Spinach Chloroplasts. *Phytochemistry* **40**: 419-425
- Calera, M. R., Mata, R., Lotina-Hennsen, B. & Anaya, A. L. (1996) Uncoupling Behavior of the 4-phenylcoumarins in Spinach Chloroplast: Structure-activity

- Relationships. *J. of Agric. and food Chem.*, **44**: 2966-2969.
- Campos, A. M., Oliveira, F. S., Machado, M. I., Bra-Filho, R. & Matos, F. J. A. (1991) Triterpenes from *Cedrela odorata*. *Phytochemistry* **30**: 1225-1229.
- Carmeli, C., Tadmor, O., Lifshitz, Ophir, R. & Carmeli, S. (1992) Inhibition of Chloroplast CF₁-ATPase by Vanadate. *FEBS Lett.* **299**: 227-230.
- Castañeda, P., Mata, R. & Lotina-Hennsen, B. (1998) Effect of Encecalin, Euparin and Demethylenencecalin on Thylakoid Transport and Photophosphorylation in Spinach Chloroplasts. *J. of the Sci. of Food and Agric.*, **78**: 102-108.
- Champagne, D. E.; Koul, O; Isman, B.; Scudder, G. G. E.; Towers, G. H. N. (1992) Biological Activity of limonoids from the rutales. *Phytochemistry*, **31**: 377-394.
- Chan, W. R., Magnus, K E. & Mootoo, B. S. (1967) Extractives from *Cedrela odorata* L. The Structure of Methyl Angolensate. 171-177.
- Chan, W. R., Holder, N. L., Snatzke, G., Fehlhaber, H. W. & Taylor, D. R (1968) Extractives of *Cedrela odorata* . II. The Structure of *Cedrela* Tetracyclic Triterpenes Odoranol, Isoodoranol and Odoratone. *Journal of Chemical Society C.* **20**: 2458-2459.
- Contreras, C. M., Chacón, L. & Enriquez, R. G. (1996) Anticonvulsant Properties of *Ipomoea stans*. *Phytomedicine* **3**: 41-44.
- Cozen, A. L. & Walker, J. E. (1987) The Organization and Sequence of the Genes for ATP Synthase Subunits in the Cyanobacterium *Synechococcus* 630. *J. Mol. Biol.* **194**: 359-383.
- Cremlyn, R. J. (1991) Agrochemicals preparation and Mode of Action. John Wiley

- & Sons, 301-373.
- Das, M. C. & Mahato, S. B. (1983) Triterpenoids: Review. *Phytochemistry* **22**: 1071-1095.
- De Paula, J. R., Vieira, I. J. C., Rodríguez, E., Fernández, J. B., Vieira, P. C., Pinheiro, A. L. & Viela, E. F. (1997) Sesquiterpenes, Triterpenoids, Limonoids and Flavonoids of *Cedrela odorata* Graft and Speculations on the Induced Resistance Against *Hypsipyla grandella*. *Phytochemistry*, **44**: 1449-1454.
- Debus, R. (1992) The Manganese and Calcium Ions of Photosynthetic Oxygen Evolution. *Biochim. Biophys. Acta* **1102**: 269-352.
- Delosme, R. (1967) Etude de l'Induction de Fluorescence des Algues Vertes et des Chloroplastes au Début d'une Illumination Intense. *Biochimica et Biophysica Acta* **143**: 108-128.
- Dilley, R. A. (1972) Ion transport (H^+ , K^+ , Mg^{2+} exchange phenomena). In: "Methods in Enzymology" (San Pietro A, Ed.) Vol 24, pp 68-74. Academic Press, New York.
- Duke S. O. & Lydon, J. (1995) Natural Products with Potential Use as Herbicides. In: Allelopathy: Organisms, Processes and Applications. (K. M. Indrejt; M. Dakshini & F. A. Einhellig; eds.). ACS pp: 348-362.
- Duke, S. O. & Abbas, H. K. (1995). Natural Products with Potential Use as Herbicides. In: Allelopathy: Organisms, Processes and Applications. Inderjit, M. M. Dakshini and F. A. Einhellig (eds). American Chemical Society. ACS: Symposium Series. pp 348-362.

- Dunn, S. D., Tozer, R. G. & Zardarozny, V. D. (1990) Activation of E. Coli F₁-ATPase by Lauryldimethylamine Oxide and Ethylene Glycol: Relationship of ATPase Activity to the Interaction of the ϵ β Subunits. *Biochemistry* **29**: 4335-4340.
- Duysens, L. N. M. & Sweers, H. E. (1963) Mechanism of two Photochemical Reactions in Algae as Studied by Means of Fluorescence. In: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria. (Eds Japanese Society of Plant Physiologists.) pp. 353-372. (University of Tokyo Press: Tokyo).
- Einhellig, F. A. (1986) Mechanism and Modes of Action of Allelochemicals. In: The Science of Allelopathy. (A. R. Putnam & T. Chung-Shih (eds.)) John Willey and Soc. Inc. Cap. 10, pp. 171-189.
- Einhellig, F. A. (1995) Mechanism of Action of Allelochemicals in Allelopathy. In: Allelopathy Organisms, Processes and Applications. (K. Indrejit; M. Dakshini & F. A. Einhellig (eds.)) ACS Symposium Series, 582, Cap. 7, pp. 96-116.
- Einhellig, F. A. (1995) Allelopathy: Current Status and Future Goals. In: Allelopathy: Organisms, Processes and Applications. (K. M. Indrejt; M. Dakshini & F. A. Einhellig; eds.). ACS pp: 1-24.
- Einhellig, F. A., Leather, G. R. & Hobbs, L. L. (1985) Use of *Lemna minor* L. as a Bioassay in Allelopathy. *J. Chem. Ecol.* **11**: 65-72.
- Einhellig, F. A., Rice, E. L., Risser, P. G. & Wender, S. H. (1970) Effects of Scopoletin on Growth, CO₂ Exchange Rates, and Concentration of Scopoletin, Scopolin, and Chlorogenic Acids in Tobacco, Sunflower, and Pigweed. *Bull.*

- Torrey Bot. Club* **97**: 22-33.
- Ellis, R. J. (1989) Chloroplast Biogenesis. Cambridge University Press. U. K. 346p.
- Faludi-Daniel, A., Schmidt, O, Szczepaniak, A. & Machold, O. (1983). Distribution of Characteristic Membrane Proteins in Granum and Stroma Thylakoids. *Eur. J. Biochem.* **131**: 567-570.
- Farron, F. & Racker, E. (1970) Studies on the Mechanism of the Conversion of Coupling Factor 1 from Chloroplasts to an Active Adenosine Triphosphate. *Biochem.* **9**: 3829-3836.
- Fujiyama, Y., Yokoyama, K., Yoshida, M. & Wakabayashi, T. (1990) Electron Microscopy of the Reconstituted Complexes of the F₁-ATPase with Various Subunit Constitution Revealed the Location of the γ -subunit in the Central Cavity of the Molecule. *FEBS Lett.* **271**: 111-115.
- Furlan, M., Roque, N. F. & Filho, W. W. (1993). Cycloartane Derivatives from *Guarea trichiloides*. *Phytochemistry* **6**: 395-398.
- Gasanov, R., Abilov, Z. K., Gazanchyan, R. M., Kurbonova, U. M., Khanna, R. & Govindjee (1979) Excitation Energy Transfer in Photosystem I and II from Grana and in Photosystem I from Lamellae, and Identification of Emission Bands with Pigment-protein Complexes. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **95**: 148-169.
- Ghanotakis, D. F., Babcock, G. T. & Yocum, C. F. (1984) Calcium Reconstitutes High Rates of Oxygen Evolution in Polypeptide Depleted Photosystem II Preparations *FEBS Lett.* **167**: 127-130.

- Giaquinta, R. T.; Selman, B. R.; Bering C. H. & Dilley, R. (1974) Inhibition of coupling factor activity of chloroplast membrane by diazonium compounds. *J. Biol. Chem.* **249**: 2873.
- Gilbert, B., Da Rosa, M., Borojevic, R. & Pellegrino, J. (1972). *Schistosoma mamanansoni*, *in vitro* Transformation of Cercarie into Schistosomula. *Parasitology* **64**: 333-339.
- Gilbert, B., De Souza, J. P., Fortes, C. C., Santos, F., Do Prado Seabra, A., Kitagawa, N. & Pellegrino, J. J. (1970) Chemoprophylactic Agent in Schistosomiasis: Active and Inactive Terpenes. *Parasitology* **56**: 397-398.
- González, V. M., Kazimir, J., Nimbale, C., Weston, L. A. & Cheniae, G. M. (1997) Inhibition of Photosystem II Electron Transfer Reaction by the Natural Product Sorgoleone. *J. Agric. Food Chem* **45**: 1415-1421.
- Gould, J. M. (1976) Inhibition by Triphenyltin Chloride of a Tightly-bound Membrane Component Involved in Photophosphorylation. *Eur. J. Biochem.* **62**: 567-570.
- Gould, J. M. (1978) Dithiol-specific Reversal of Triphenyltin Inhibition of CF₀-Catalysed Transmembrane Proton Transfer in Chloroplasts. *FEBS Lett.* **94**: 90-94.
- Govindjee & Briantais, J. M. (1972) Chlorophyll *b* Fluorescence and an Emission Band at 700 nm at Room Temperature in Green Algae. *FEBS Lett* **19**: 278-280.
- Govindjee (1995) Sixty-three Years Since Kautsky: Chlorophyll *a* Fluorescence. *Austr. J. Plant Physiol.* **22**: 131-160.

- Graan, T. & Ort, D. R. (1981) Factors Affecting the Development of the Capacity for ATP Formation in Isolated Chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **673**: 447-456.
- Harbone, J. B. (1988) Introduction to Ecological Biochemistry. 3rd Ed. Academic Press, London.
- Hasegawa, S.; Bennett, R. D.; Herman, Z.; Fung, C. H. & Ou, P. (1989). Limonoid Gglucosides in Citrus. *Phytochemistry* **28**: 1717-1720.
- Heijl, A. M., Einhellig, F. A., Rasmussen, J. A. (1993) Effects of Juglone on Growth, Photosynthesis and Respiration. *J. Chem. Ecol.* **19**: 559-568.
- Hill, R. (1937) *Nature* **139**, 881-882.
- Hinkle, P. C. & McCarty, R. E. (1988) Cómo Fabrican las Células ATP. *Science* **240**: 58-75.
- Housely, J. R.; King, F. E.; King, T. J. & Taylor, P. R. (1962) The Chemistry of Hardwood and a new Triterpenoid Derivative from Pericarps of *Trichilia connaroides*. *J. Nat. Prod.* **57**: 1446-1449.
- Hsu, B. D. (1993) Evidence for the Contribution of the S-state Transitions of Oxygen Evolution to the Initial Phase of Fluorescence Induction. *Photosynth. Res.* **36**: 81-88.
- Hu, N., Mills, D. A., Huchzermeyer, B. & Richter, M. L. (1993) Inhibition by Tentoxin of Cooperativity Among Nucleotide Binding Sites on Chloroplasts Coupling Factor 1. *J. Biol. Chem.* **298**: 8536-8540.
- Hudson, G. S. & Mason, J. G. (1988) The Chloroplast Genes Encoding Subunits of the H⁺-ATP Synthase. *Photosynth. Res.* **18**: 205-222.

- Izawa, S., Winget, C. D. & Good, N. E. (1966) Phlorizin, a Specific Inhibitor of Photophosphorylation and Posphorylation-coupled Electron Tansfer in Cloroplasts. *Biochem Biophys Res Commun* **22**: 223-226
- Izawa, S. & Good, N. E. Inhibition of Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation. In *Methods in Enzymology*; San Pietro, A. De.; Academic Press: New York, 1972, Vol. 24, Part B, pp 355-377.
- Jakobson, M. (1971). Naturally Occurring Insecticides. M. Jakobson & M. D. G. Crosby Eds. Marcell DeKker, Inc. N. Y. pp. 139-176.
- Jiménez, A., Mata, R., Lotina-Hennsen, B. & Anaya, A. L. (1998) Interference of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)-benzene with Photosynthetic Electron Transport. *Z Naturforsch.* **53c**: 55-59.
- Jong-Cheol, P., Young-Beob, Y., Jong-Ho, L. & Nam-Jae, K. (1994) Chemical Components and Biological Activities of Edible Plants in Korea (VI). Anti-Inflammatory and Analgesic Effects of *Cedrela sinensis*, *Oenanthe javanaica* and *Artemisia princeps* var. *Orientalis*. *H'anguk Yongyang Siklyong Hakhoechi*, **23**, 119.
- A través de CA 121: 148576e (1994).
- Kautsky, H. & Hirsch, A. (1931) Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften* **19**: 964-970.
- Ketcham, S. D., Davenport, J. W., Warncke, K. & McKarty, R. E. (1984) Role of the γ Subunit of Chloroplast Coupling Factor 1 in the Light-dependent Activation of Photophosphorylation and ATPase Activity by Dithiotreitol. *J. Biol. Chem.*

259: 7286-7293.

- Klocke, K. A. (1989) Plant Compounds as sources and Models of Insect Control Agents. *In: Economic and Medicinal Plant Research.* (H. Wagner, H. Hikino and N. R. Farnsworth, eds) Academic Press. Vol. 3: 104-144.
- Krause, G. H. & Weis, E. (1984) Chlorophyll Fluorescence as a Tool in Plant physiology. II Interpretation of Fluorescence Signals. *Photosynth. Res.* 5: 139-157.
- Kubo, I (1991). Screening Techniques for Plant-insect Interactions. *In. Methods in Plant Biochemistry. Assays for Bioactivity.* (K. Hostteman, ed.). Academic Press, London, 6: 179-193.
- Kubo, I. (1993). Insect Control agents from Tropical Plants. *In. Phytochemical Potential of Tropical Plants. Recent Advances in Phytochemistry* (K. R. Downum; J. T. Romeo & H. A. Stafford, eds) Plenum Press. N. Y., 27: 133-151.
- Lehninger, A. L.; Nelson, D. L. & Cox, M. M. (1993) Principles of Biochemistry. Worth Publishers. New York. 1013 pp.
- Linajes-Palacios, J. A. (1991) La Raíz de Jalapa *Ipomoea purga* (Wender) Hayne (Convolvulaceae) en el Municipio de Xico, Veracruz, México: su Sistema de Producción. Tesis Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. México.
- Lotina-Hennsen B.; Roque-Resendiz, J. L.; Jiménez, & Aguilar, M. (1991) Inhibition of Oxygen Evolution by Cacalol and its Derivatives. *Z Naturforsch* 46c: 777-780.

- Lotina-Hennsen, B.; Bernal-Morales, E.; Romo de Vivar, A.; Pérez, A. L.; Castro, A. & Aguilar-Martínez, M. (1992). Inhibition of Oxygen evolution by Zaluzanin C. *J. Chem. Ecol.* **18**: 1891-1900.
- Lotina-Hennsen, B.; Mata, R.; Calderon, J. S.; Céspedes-Acuña, C. L. & Jiménez-Estrada, M. (1998) Secondary Metabolites Isolated from Mexican Plants: Target and Mechanism of Action on Photosynthesis, *In: Recent Research Development in Agricultural and Food Chemistry.* (S. G. Pandalai, I. A. Gayathri; Eds.) Vol. II; Res. Symp. Trivandum India, pp: 731-749.
- Lotina-Hennsen, B., King, B., Albores, M. & Pozas, R. (1987) Uncoupling of Photophosphorylation by Nitrogenous Bases. No Correlation of Uncoupling with pKb and Partition Coefficient. *Photochem. Photobiol.* **46**: 287- 293.
- Macdowall, F. D. H. (1949) *Plant Physiol.* **24**, 462-480.
- Macías, F. A.; Galindo, J. C. G.; Massanet, G. M.; & Zubía, E. (1993). Allelochemicals from *Pilocarpus goudotianus* leaves. *J. Chem. Ecol.* **19**: 1372-1379.
- MacKinnon, T. D. & Arnason, J. T. (1997) Antimalarial Activity of Tropical Meliaceae Extracts and Gedunin Gerivatives. *Journal of Natural Products* **60**: 336-341.
- Martínez, M. (1989) *Las Plantas Medicinales de México.* 6a. Ed. Editorial Botas, México, pp. 276-279.
- Mata, R., Pereda-Miranda, R. & Lotina-Hennsen, B. (1996) Natural Products from Mexican Plants as a Source of Potential Herbicide Agents. En: *In: Secondary*

- Metabolites from Mexican Plants: Chemistry and Biological Properties. S. G. Pandalai (ed.), Research Signpost, India, pp. 59-68.
- Mathis, P. & Ruthford, A. W. (1984). Effect of Phenolic Herbicides on the Oxygen-evolving Side of Photosystem II. *Bioch. and Biophys. Acta* **767**: 217-222.
- McCarty, R. E. & Racker, E. (1967) Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Photophosphorylation. *J. Biol. Chem.* **242**: 3435-3439.
- McCarty, R. E. & Racker, E. (1968) Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Photophosphorylation III. Activation of Adenosine Triphosphate and ³²P-Labeled Orthophosphate-adenosine Triphosphate Exchange in Chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **243**: 129-132.
- McCarty, R. E., Guillory, R. J. & Racker, E. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**: 4822-4823.
- McCarty, R. E., Pittman, P. R. & Tsuchiya, Y. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**: 3084-3051 (1972).
- Mendoza, J. L.; Jiménez, M. & Lotina-Hennsen, B. (1994). Piquerol A and Diacetylpiquerol act as Energy Transfer Inhibitors of Photosynthesis. *Pestic. Sci.* **40**: 37-40.
- Mersie, W, Y.; Singh, M. (1993). Phenolic Acids Effect on Photosynthesis and Protein Synthesis by Isolated Leaf Cells of velvet-leaf. *J. Chem. Ecol.* **19**: 1293-1301.
- Mets, L. & Thiel, A. (1989) Biochemistry and Genetic Control of the Photosystem II Herbicide Target Site. In target Sites of Herbicide Action (P. Boger & G. Sandamann, eds), p. 1. CRC Press, Boca Raton, FL.

- Mezquita-Alcocer M. V. & Rivero-Cruz B. E. (1997) Compuestos Bioactivos de *Cedrela odorata* (Meliaceae). Facultad de Química, UNAM. Tesis de Licenciatura.
- Mills, J. D.; Mitchell, P. & Schurmann, P. (1980) Modulation of coupling activity in intact chloroplasts. *FEBS Lett.* **112**: 173-177.
- Millspaugh, C. F. (1974) American Medicinal Plants. Dover Publications, New York, pp. 479-480.
- Mitchell, P (1961) Coupling of Photophosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemiosmotic Type Mechanism. *Nature (London)* **191**: 144-148.
- Miyao, M. & Murata, N. (1985) The Cl⁻ effect on photosynthetic oxygen evolution: interaction of Cl⁻ with 18-kDa, 24-kDa and 33-kDa proteins. *FEBS Lett.* **180**: 303-308.
- Mora, R. (1976) Therapeutic Preparation Containing Cedar Resin for Allergic Asthma. Japan Kokai 76, 133, 409, (Cl. A61K35/78), 04 Oct. 1978. Appl. 76/12, 869, 31 Mar. 1976; 6pp. A través de CA87: 11624d.
- Moreland, D. E. & Novitsky, W. P. (1986) Effects of Phenolic Acids, coumarins and Flavonoids on isolated Chloroplasts and Mitochondria. *In: Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry.* (G. R. Waller, ed.) Vol. 330. *Am. Chem. Society*, Washington D. C. pp. 246-261.
- Moreland, D. E. (1980) Mechanism of Action of Herbicides. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 597-638.
- Morin, P. (1964) Etudes des Cinétiques de Fluorescence de la Chlorophylle *in vivo*

- dans les Premiers Instants qui Suivent le Début de Illumination. *Journal de Chimie Physique* **61**: 674-680.
- Mulholland, D. A.; Taylor, D. A. H. (1988). Protolimonoids from *Turrea nilotica*. *Phytochemistry* **27**: 1220-1221.
- Nagasampagi, B. A., Yankov, L. & Dev, S. (1968) Sesquiterpenoids from the Wood of *Cedrela toona*; Partial Synthesis of T-muurolol, T-cadinol and Cubenol; Structures of δ -cadinene and δ -cadinol. *Tetrahedron Letters*, 1913-1918.
- Nagasampagi, B. A., Sriraman, M. C. Yankov, L. & Dev, S. (1975) Siderin from *Cedrela toona*. *Phytochemistry* **14**: 1673.
- Noda, N., Kobayashi, H., Miyahara, K. & Kawasaki, T. (1988a) Resin Glycosides. II. Identification and Characterization of the Component Organic and Glycosidic Acids of the Crude Resin Glycoside from the Seeds of *Ipomoea muricata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **36**: 627-633.
- Noda, N., Kobayashi, H., Miyahara, K. & Kawasaki, T. (1988b) Resin Glycoside. III. Isolation and Structural Study of the Genuine Resin Glycosides, Muricatins I-IV, from the Seeds of *Ipomoea muricata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **36**: 920-929.
- O'Keefe, D. P. & Dilley, R. A. (1976) The Effect of Chloroplast Coupling Factor Removal on Thylakoid Membrane Ion Permeability, *Biochem. Biophys. Acta* **461**: 48-60.
- Oettmeier, W., Masson, K., Kloos, R. & Reil, A. (1992) On the Orientation of Photosystem II inhibitor in the Q_B -binding Niche: acridones, Xanthenes and

- quinones. *Z. Naturforsch.* **48c**: 146-151.
- Okorie, D. A. & Taylor, D. A. H. (1968) Extractives from the Seed of *Cedrela odorata*. *Phytochemistry* **7**: 1683-1686.
- Ort, D. R. (1986) Energy Transduction in Oxygenic Photosynthesis: an Overview of structure and Mechanism. *In: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, (L. A. Staehlin & C. J. Arntzen, eds.) Vol. 19, pp. 143-196.
- Ouitrakul, R. & Izawa, S. (1973) Electron Transport and Photophosphorylation in Chloroplasts as a Function of the Electron Acceptor. II Acceptor-specific Inhibition by KCN. *Biochim. Biophys. Acta* **305**: 105-118.
- Pennington, T. D. (1981) *Guarea grandiflora*. *In: Flora Neotropica*, The New York Botanical Garden, N. Y. **28**: 359.
- Peña-Valdivia, C. B., Rodríguez-Flores, L., Tuena de Gómez Puyou, M. & Lotina-Hennsen, B. (1991) Inhibition of Photophosphorylation and Electron Transport by *N,N*-dimethylformamide. *Biophys. Chem.* **41**: 169-172.
- Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A. L., Wickramaratne, D. B., Pezzuto, J. M. & Kinghorn, A. D. (1993) Tricolorin A, Major Phytochemical Inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *Journal of Natural Products* **56**: 571-582.
- Ravizzini, R. A., Andreo, C. S. & Vallejos, R. H. (1977) Peptide Alkaloids as Inhibitors of Photophosphorylation in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **18**: 701-706
- Rembold, H. (1989) The Azadirachtins-their Potential for Insect Control. *In: Economic and Medicinal Plant Research*. (H. Wagner; H. Hikino & N. R.

- Farnsworth. Eds). Academic Press, London 3: 57-72.
- Rottenberg, H. & Moreno-Sánchez, R. (1993) The proton pumping activity of H⁺-ATPases: An improved fluorescence assay. *Biochim. Biophys. Acta* **1183**: 161-170.
- Schulenburg, P., Schwartz, M. & Wagner, R. (1992) Inhibition of Chloroplast ATPase by the K⁺ Channel Blocker α -dendrotoxin. *Eur. J. Biochem.* **210**: 257-267.
- Segel, I H. (1993) Inhibition by Mixture of Different Inhibitors. System B4: Cooperative (Synergistic Noncompetitive Inhibition by two Different Nonexclusive Inhibitors. In: "Enzyme Kinetics" (I. H. Segel Ed.) pp 488-492, Wiley-Interscience Publication, New York.
- Segura-Correa, R., Mata, R., Anaya, A. L., Hernández-Bautista, B., Villena, R., Soriano-García, M. Bye, R. & Linares, E. (1993) Tetranorterpenoids of *Swietenia humilis*. *J. of Nat. Prod.* **56**: 1567-1574.
- Soriano-García, M.; Jiménez, M. A.; Mata, R. & Segura-Correa, R. (1996). Humilinolide D. *Acta crystallographica*. C25, 1527-1529.
- Strasser, R. J., Srivastava, A. & Govindjee. (1995) Polyphasic Chlorophyll *a* Fluorescence Transient in Plants and Cyanobacteria. *Photochem. and Photobiol.* **61**: 32-42.
- Srivastava, A., Strasser, R. I. & Govindjee (1995) Polyphasic Rise of Chlorophyll *a* Fluorescence in Herbicide-resistant D1 Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* **43**: 131-141.
- Stiles, L. H.; Leather, G. R. & Chen, P. K. (1994) Effects of Two Sesquiterpenes

- Lactones Isolated from *Artemisia annua* on Physiology of *Lemna minor*. *J. Chem. Ecol.* **20**: 969-977.
- Strain, H. H., Coppe B. T. & Svec W. A. (1971) Analytical Procedures for the Isolation, Identification, Estimation and Investigation of the Chlorophylls. *in*: "Methods in Enzymology" (A. San Pietro, Ed.) Vol. 23, pp 452-466. Academic Press, New York.
- Strasser, R. J. & Govindjee (1991) The F_0 and the O-J-I-P Fluorescence Rise in Higher Plants and Algae. In 'Regulation of Chloroplast Biogenesis' (Ed. J. H. Argyroudi-Akoyunoglou) pp. 423-426 (Plenum Press: New York).
- Strasser, R. J. & Govindjee (1992) On the O-J-I-P Fluorescence Transients in Leaves and D1 Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. In 'Research in Photosynthesis' Vol. II (Ed. N. Murata) pp. 32-39. Kluwer Academic: Dordrecht.
- Sumner, J. B. (1944) Scientific Apparatus and Laboratory Methods. A Method for the Calorimetric Determination of Phosphorous. *Science* **100**: 413-417.
- Taylor, D. A. H. (1984) The chemistry of the Limonoids from Meliaceae. In: Fortschritte Chem. Org. Naturst **45**: 1-102.;
- Tietjen, K. G., Draber, W., Goossens, J., Jansen, J. R., Kluth, J. F., Schindler, M., Wroblowsky, H. J., Hilp, U. & Trebst, A. (1992) Binding of Triazines and Triazinones in the Q_B -binding Niche of Photosystem II. *Z. Naturforsch.* **48c**: 205-212.
- Torsell, K. B. G. (1983) a Mechanism and Biosynthetic Approach to Secondary

- Metabolism. In: Natural Product Chemistry. (J. Willey, ed.) N. Y. 198-210.
- Toscano, R. A.; Mata, R.; Calderón J. S. & Segura, R. (1996) Gedunin, a D-Seca limonoid. *J. Chem. Crystallography* **26**: 707-710.
- Trautschold, I.; Lampprecht, W. & Schweitzer, G. (1989) ATP: UV-method with Hexokinase and Glucose-6-phosphate Dehydrogenase.- *In: Methods of Enzymatic Analysis, Vol 7* (J. Bergmeyer & M. Graßl eds.), pp. 346-357. VCH Publishers, Weinheim.
- Trease, G. E. & Evans, W. C. (1988) Tratado de Farmacognosia. 12a. Ed. Editorial Interamericana, México, pp. 491-492.
- Trebst, A. (1972) Measurement of Hill Reactions and Photoreduction. *Methods in Enzymology* **24**: 146-165.
- Trebst, A., Donner, W. & Draber, W. (1983) Structure Activity Correlation of Herbicide Affecting Plastoquinone Reduction by Photosystem II: Electron Density Distribution in Inhibitors and Plastoquinone Species. *Z. Naturforsch* **39c**: 405-411.
- Vermaas, W. F. J., Arntzen, C. J., Gu, L. Q. & Yu, C. A. (1983) Interactions of Herbicides and Azidoquinones at a Photosystem II Binding Site in the Thylakoid Membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **723**: 266-275.
- Vernon, L. P. & Shaw, E. R. (1969) Photoreduction of 2,6-dichlorophenol-indifenol by Diphenylcarbazide: a Photosystem Z Reaction Catalized by Tris-washed Chloroplast and Subchloroplast Fragments. *Plant Physiol.* **44**: 1645.
- Villarreal, I. C. (1996) Protolimonoides y Limonoides Bioactivos de *Guarea*

grandiflora A. P. de Candolle (Meliaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Winget, G. D., Izawa, S. & Good, N. E. (1969) *Biochemistry* 8: 2067-2074.

Worshman, A. D. Current and Potential Techniques Using Allelopathy as an Aid in Weed Management. In: *Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins and Insect Pheromones and Alomones*. (C. H. Chou, G. R. Waller; eds.). Institute of Botany Academia Sinica Monograph Series No 9 (1989).

Yamashita, T. & Butler, W. L. (1968) Photoreduction and Phosphorylation with Tris-washed Chloroplasts. *Plant Physiol.* 43: 1978-1984.

APENDICE I

CURVA ESTANDAR DE APAGAMIENTO DE LA FLUORESCENCIA

Para calibrar las señales de apagamiento de la fluorescencia con un gradiente transmembranal de pH, se prepararon liposomas de azolectina en medios amortiguados a diferente pH. Dichos liposomas se suspendieron en un medio a un pH diferente al del ensayo con el fin de poder cuantificar el apagamiento de la fluorescencia en función del Δ pH impuesto.

Preparación de liposomas.

Se usó una solución estándar (300 mg/ml) de azolectina, una mezcla de lípidos de soya en éter. Se tomaron 15 μ l de la solución etérea y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. A continuación, se evaporó el éter bajo una corriente de nitrógeno y se agregaron 0.9 ml de la solución amortiguadora al pH impuesto en el interior de la vesícula. Se dejó un momento bajo la corriente de nitrógeno. Los lípidos se resuspendieron en el amortiguador mediante agitación y cuando la solución se volvió turbia se tomó el volumen y se transfirió a un tubo de ensayo de 11x100 mm. La suspensión se sonicó en un baño, cuidando de no sumergir demasiado el tubo. La sonicación se continuó hasta que la solución turbia mostró una apariencia birrefringente.

Soluciones amortiguadoras.

Se utilizaron las siguientes disoluciones para ajustar el pH dentro de los liposomas, y son las que se emplearon para la preparación de liposomas.

Sorbitol 250 mM, MgCl₂ 5 mM, MOPS/BTP 20 mM pHs 7.0, 6.9, 6.8, 6.75 y 6.5

Sorbitol 250 mM, MgCl₂ 5 mM, MES/BTP 20 mM pHs 6.25 y 6.0

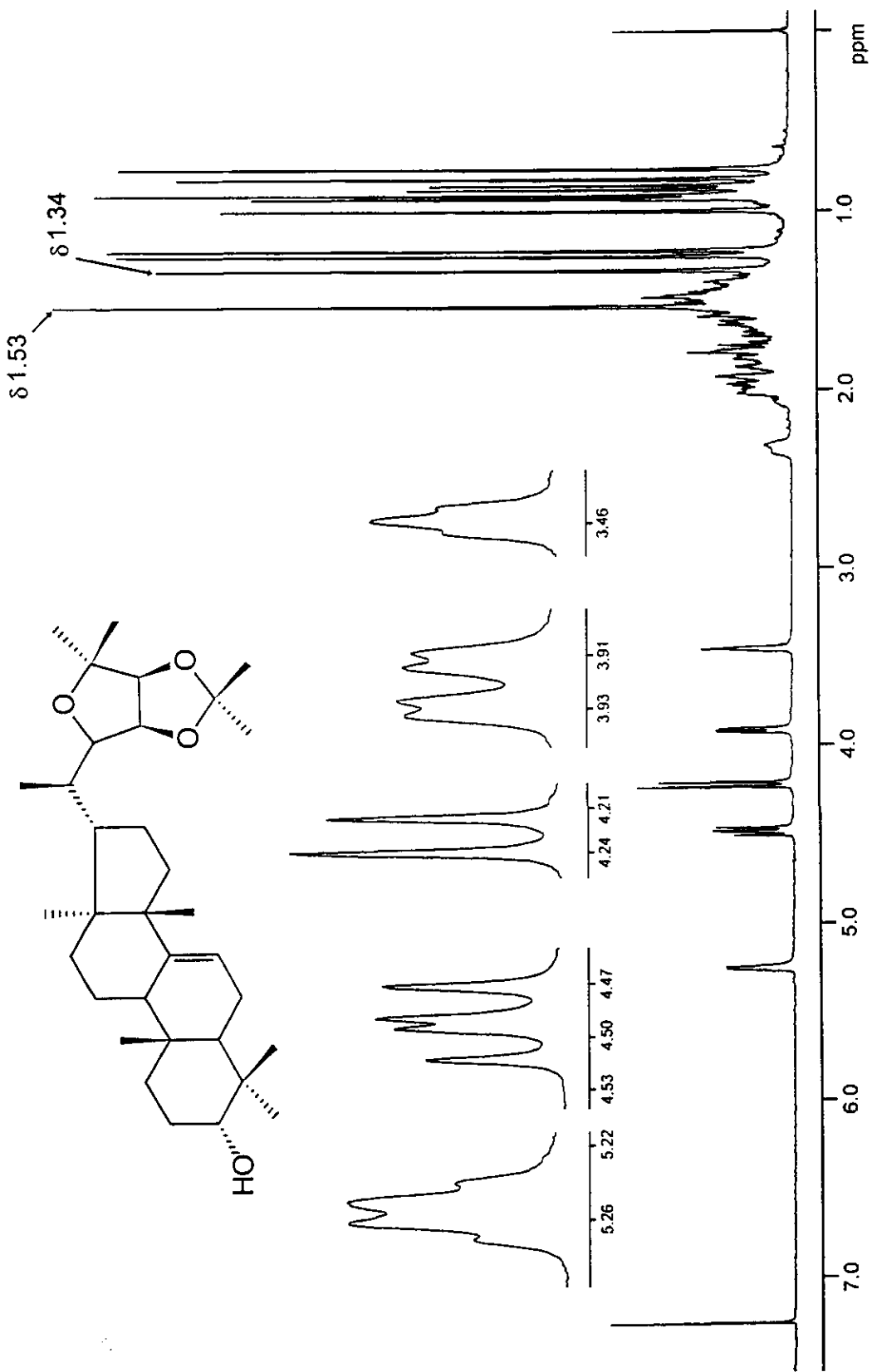
La solución utilizada para ajustar el pH externo es igual a la usada como medio de reacción en los ensayos con los cloroplastos (sorbitol 250 mM, MgCl₂ 5 mM, MOPS/BTP 20 mM pH 8.0).

Medición del apagamiento de la fluorescencia

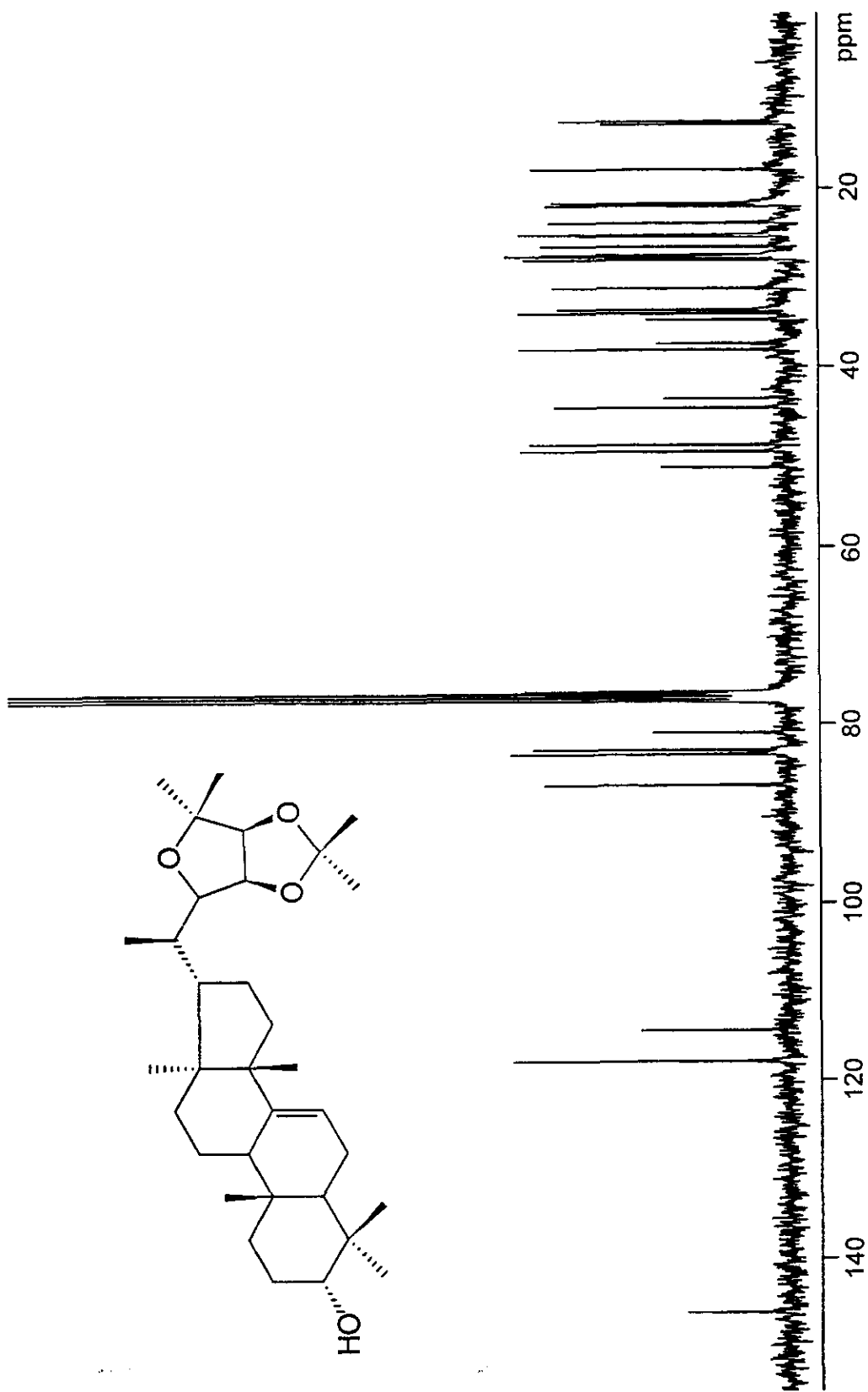
Este ensayo se realizó con el mismo procedimiento que la medición del Δ pH, en presencia de la tricolorina A, descrito en un punto anterior. Se añadieron al medio 40 μ l de la preparación de liposomas en experimentos independientes para cada uno de los pHs impuestos en el interior de los liposomas.

APENDICE II

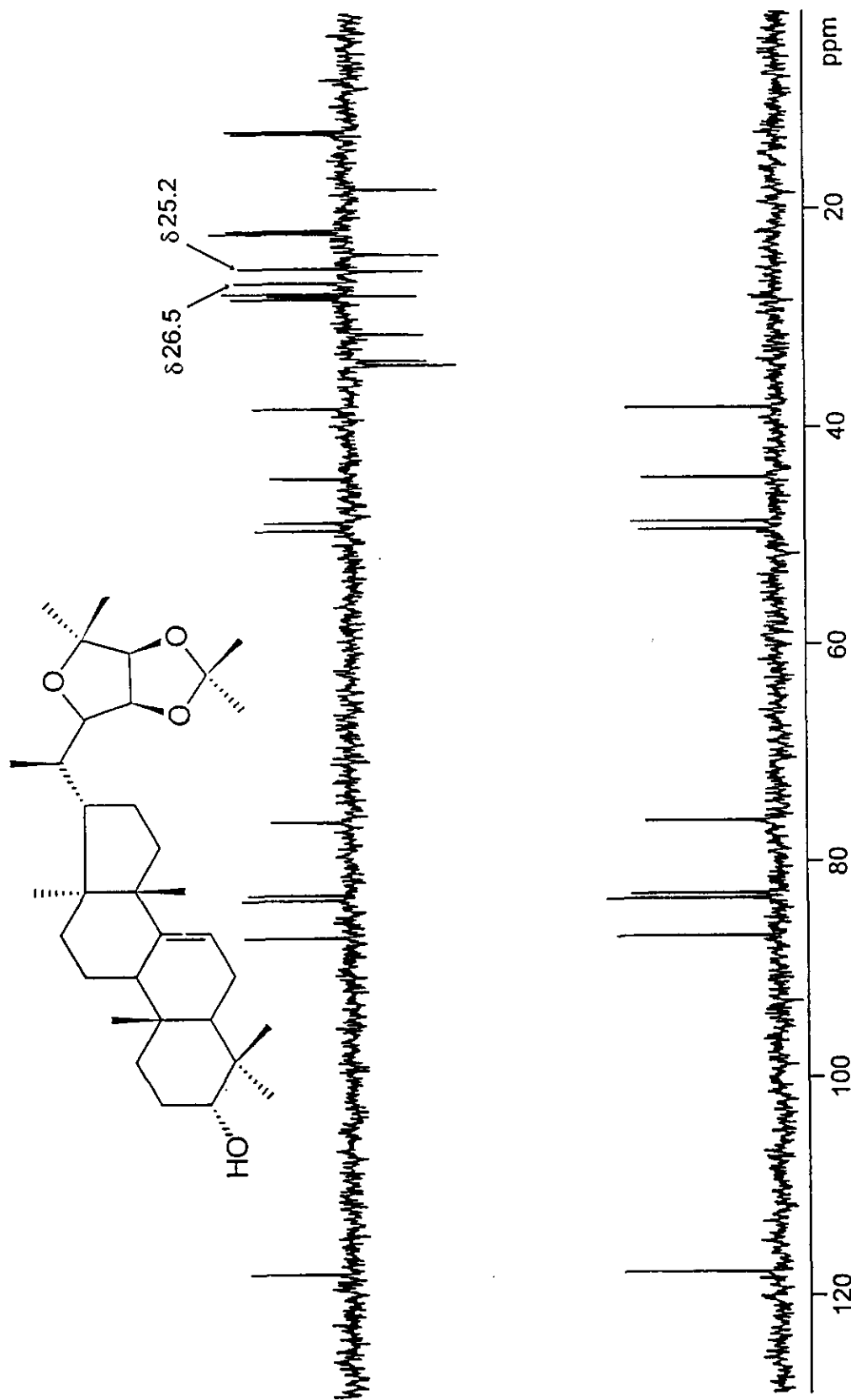
ESPECTROS DE RMN ^1H , ^{13}C y ^{13}C -DEPT DEL ACETONIDO DEL
ODORATOL



Espectro 1. Espectro de RMN ^1H del acetónido del odoratol.



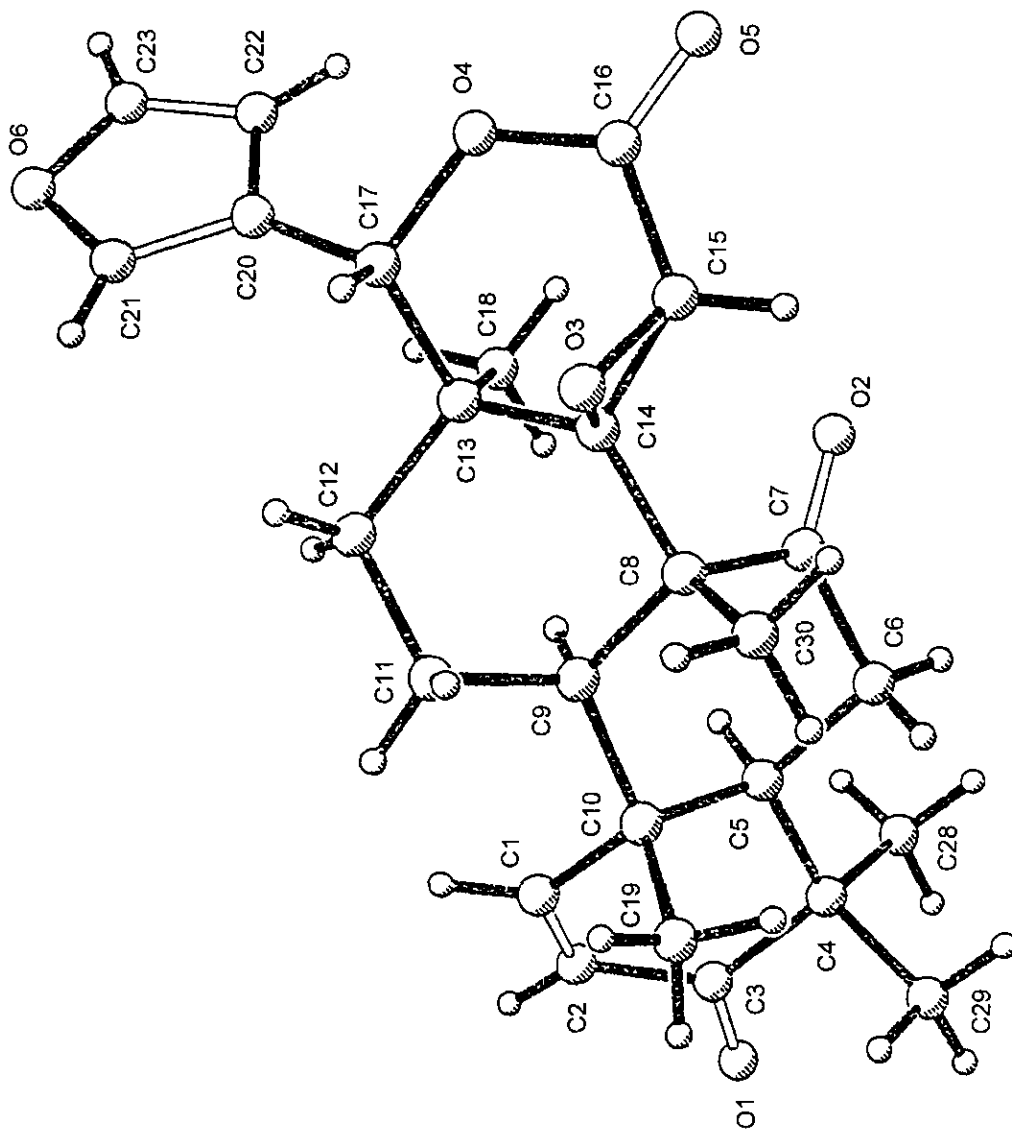
Espectro 2. Espectro de RMN ^{13}C del acetónido del odoratol.



Espectro 3. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT del acetónido del odorato.

APENDICE III

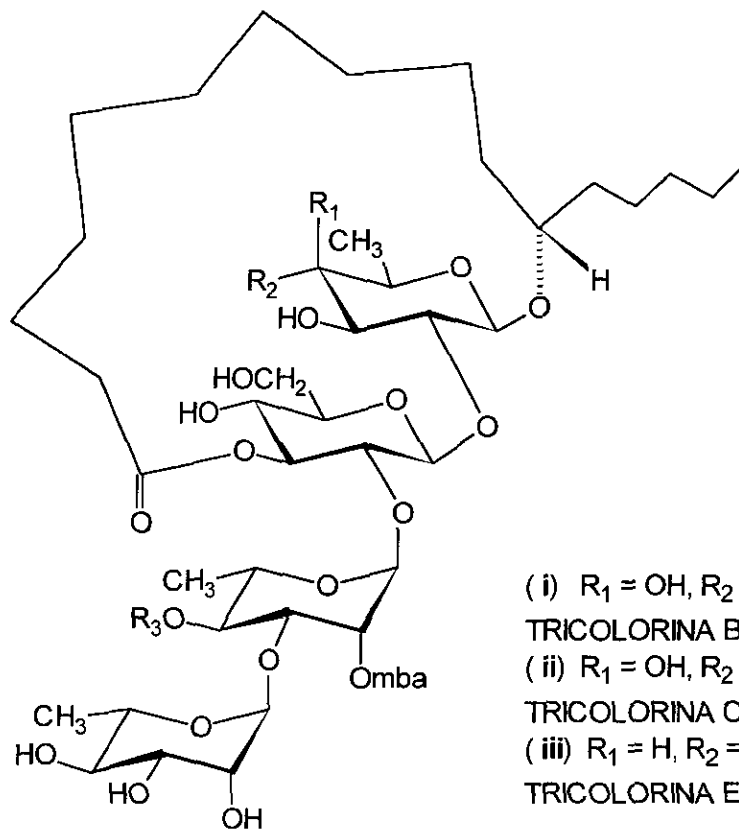
VISTA ESTEREOSCOPICA DE LA 7-OXO-7-DEACETOXIGEDUNINA



Vista estereoscópica de la 7-oxo-7-deacetoxidunina.

APENDICE IV

ESTRUCTURAS DE LAS TRICLORINAS B, C y E



- (i) $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{iba}$:
TRICOLORINA B
(ii) $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{nla}$:
TRICOLORINA C
(iii) $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{mba}$:
TRICOLORINA E

