



**Metabolitos fitotóxicos de *Parmotrema tinctorum* Nyl. (Hale) y  
*Leucophyllum ambiguum* Humb. & Bonpl. como una fuente  
potencial de compuestos herbicidas con un efecto sobre la  
fotosíntesis y la proteína calmodulina**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS  
(FARMACIA)

P R E S E N T A:  
M. en C. IRMA SUSANA ROJAS TOMÉ

DIRECTOR DE IESIS: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## **JURADO ASIGNADO**

<b>Presidente:</b>	Dr. Federico Alfredo García Jiménez
<b>Primer vocal:</b>	Dr. Leovigildo Quijano
<b>Segundo vocal:</b>	Dr. Manuel Jiménez Estrada
<b>Tercer vocal:</b>	Dr. Blas Lotina Hensem
<b>Secretario:</b>	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
<b>Primer suplente:</b>	Dra. María Luisa Villarreal Ortega
<b>Segundo suplente:</b>	Dr. Francisco Hernández Luis

**TUTOR:**

---

**Dra. Rachel Mata Essayag**

**SUSTENTANTE:**

---

**M. en C. Irma Susana Rojas Tomé**



## ***AGRADECIMIENTOS***

Agradezco el apoyo económico brindado por las siguientes instituciones para la realización del presente trabajo de tesis: Dirección General de Apoyo al Personal Académico de la UNAM (DGAPA; proyecto IN207300), CONACyT (convenios 27978N y 31960B) y Coordinación General de Estudios de Posgrado de la UNAM (PAEP; proyectos 207348 y 108330).

Deseo también expresar mi más sincero agradecimiento a las instituciones y académicos que menciono a continuación:

A la Universidad de Arizona, Tucson, por el apoyo económico otorgado a través del proyecto "Bioactive Agents from Dryland Plants of Latin American" (Grant U01 TW 00316 de las agencias norteamericanas National Institute of Health, National Science Foundation y U. S. Agency for International Development).

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

Al Dr. Fernando Calzada (Unidad de Investigación del Centro Médico Siglo XXI, IMSS) y al B. Gustavo Carmona (Universidad Veracruzana), por la recolección e identificación del material líquénico.

Al Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM) por proporcionar e identificar el material correspondiente a la especie *Leucophyllum ambiguum*.

De manera muy especial, al Dr. Blas Lotina Henssen, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, por su invaluable dirección y asesoría brindadas durante los estudios relacionados con las reacciones de transferencia de electrones de la fotosíntesis.



Al Dr. Jorge Vázquez por su asesoría y las facilidades proporcionadas para la realización de los ensayos en los que se determinó el efecto de los productos naturales aislados sobre la síntesis de ADN en semillas.

A los M. en C. Beatriz King, Elpidio García (Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM), Laura Acevedo e Isabel Rivero (Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM), por su valiosa asesoría técnica y ayuda a lo largo del desarrollo del trabajo experimental.

A las M. en C. Isabel Chávez y Beatriz Quiroz (Instituto de Química, UNAM), a la Q. F. B. Rosa Isela del Villar, al Q. F. B. Oscar Yáñez (USAI, Facultad de Química, UNAM) y al M. en C. Atilano Gutiérrez (UAM Iztapalapa), por el registro de los espectros de RMN. Al Dr. Rubén Alfredo Toscano (Instituto de Química, UNAM) por su colaboración en los análisis de difracción de rayos X. Al I. Q. Luis Velasco Ibarra, al M. en C. Javier Pérez Flores (Instituto de Química, UNAM) y a la Q. Georgina Duarte (USAI, Facultad de Química, UNAM), por el registro de espectros de masas. A la Q. Marisela Gutiérrez (USAI, Facultad de Química, UNAM), por el registro de los espectros en el IR, en el UV y las determinaciones de rotación óptica.

A los miembros de mi comité tutorial integrado por los Doctores Rogelio Pereda Miranda, Leovigildo Quijano y Miguel Ulloa, por sus acertadas observaciones y sugerencias y por el apoyo brindado durante la realización de este proyecto de tesis.

A los miembros del jurado comisionado por sus excelentes comentarios y observaciones durante la revisión de este manuscrito.

A los prestadores de Servicio Social y a todos y cada uno de mis compañeros del Laboratorio 124 del Departamento de Farmacia, por la amistad y el apoyo brindados durante el tiempo en que tuvimos la oportunidad de convivir. En particular, agradezco a la Q. F. B. Guadalupe Castorena, por su colaboración en el estudio de *L. ambiguum*.





A la Dra Martha Lydia Macías Rubalcava, por su colaboración en el desarrollo de los ensayos biológicos en los que se investigó la interacción de los compuestos aislados con la calmodulina y la fosfodiesterasa.

A la M. en C. Norma Valencia, por la realización de las evaluaciones conducentes a determinar la actividad citotóxica del compuesto **46** aislado de *P tinctorum*.

Muy especialmente, deseo expresar mi sincero y profundo agradecimiento a mi asesora, la Dra. Rachel Mata de Espíndola, por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo y por haberlo dirigido con tanto entusiasmo y profesionalismo. Agradezco infinitamente el haberme dedicado su tiempo, el haber compartido conmigo sus conocimientos y el apoyo y la confianza que me brindó en todo momento.



## *DEDICATORIAS*



# ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	IX
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XVII
RESUMEN	XXI
ABSTRACT	XXVII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>9</b>
2.1 Antecedentes sobre el líquen <i>Parmotrema tinctorum</i> Nyl. (Hale)	9
2.2 Antecedentes sobre <i>Leucophyllum ambiguum</i> Humb. & Bonpl.	24
2.3 Agentes herbicidas como una parte integral de la agricultura moderna	27
2.4 Mecanismos de acción de fitotoxinas naturales	32
2.4.1 El proceso de la fotosíntesis	34
2.4.2 Generalidades sobre la proteína calmodulina	40
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
3.1 Hipótesis	47
3.2 Objetivo principal	47
3.3 Objetivos específicos	47

<b>4. SECCIÓN EXPERIMENTAL</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Ensayos biológicos</b>	<b>49</b>
<b>4.1.1 Evaluación cuantitativa de la actividad fitotóxica</b>	<b>49</b>
<b>4.1.2 Evaluación cualitativa de la actividad fitotóxica</b>	<b>49</b>
<b>4.1.3 Evaluación del efecto de los metabolitos mayoritarios de <i>Parmotrema tinctorum</i> sobre la síntesis de ADN</b>	<b>50</b>
<b>4.1.4 Determinación del efecto de los metabolitos mayoritarios de <i>Parmotrema tinctorum</i> sobre diferentes actividades de la fase luminosa de la fotosíntesis</b>	<b>51</b>
<b>4.1.4.1 Aislamiento de los cloroplastos</b>	<b>51</b>
<b>4.1.4.2 Cuantificación de clorofila</b>	<b>52</b>
<b>4.1.4.3 Determinación del efecto sobre la síntesis de ATP</b>	<b>52</b>
<b>4.1.4.4 Determinación del efecto sobre la captación de protones</b>	<b>53</b>
<b>4.1.4.5 Determinación del efecto sobre el transporte de electrones no cíclico</b>	<b>54</b>
<b>4.1.4.6 Determinación del efecto sobre las reacciones parciales de los fotosistemas I y II</b>	<b>55</b>
a) Transporte de electrones desacoplado en el fotosistema I de DCPIP/ascorbato a MV	<b>56</b>
b) Transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de H <sub>2</sub> O a DCPIP/K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	<b>56</b>
c) Transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de H <sub>2</sub> O a SiMo	<b>56</b>
d) Transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de DPC a DCPIP	<b>57</b>
<b>4.1.5 Determinación de la interacción de los metabolitos mayoritarios de <i>Parmotrema tinctorum</i> con la proteína calmodulina y con la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina</b>	<b>57</b>
<b>4.1.5.1 Determinación del efecto de los metabolitos mayoritarios de <i>Parmotrema tinctorum</i> sobre la movilidad electroforética de la calmodulina</b>	<b>57</b>
<b>4.1.5.2 Determinación de la actividad de la enzima fosfodiesterasa en presencia de calmodulina</b>	<b>59</b>

4.1.5.3	Determinación del efecto del hematomato de metilo (46) sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina	60
4.1.5.4	Determinación del efecto del hematomato de metilo (46) sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina	61
4.2	Métodos cromatográficos	61
4.3	Estudio químico de la primera recolecta del líquen <i>Parmotrema tinctorum</i> Nyl (Hale)	61
4.3.1	Material líquénico	61
4.3.2	Métodos de extracción y de fraccionamiento preliminar	62
4.3.3	Aislamiento y purificación de los compuestos presentes en las fracciones primarias	63
4.3.3.1	Obtención del hematomato de metilo (46) de la fracción activa PT <sub>2</sub>	63
4.3.3.2	Obtención de la liquexantona (27) de la fracción PT <sub>3</sub>	63
4.3.3.3	Obtención del $\beta$ -orcinol carboxilato de metilo (54) de la fracción activa PT <sub>4</sub>	64
4.3.3.4	Obtención del orselinato de metilo (50) de la fracción activa PT <sub>5</sub>	64
4.3.3.5	Obtención del ácido difractaico (55) de la fracción activa PT <sub>7</sub>	64
4.3.3.6	Obtención del ácido girofórico (22), del orcinol (120) y de la lecanorina (121) de la fracción activa PT <sub>8</sub>	66
4.4	Estudio químico de la segunda recolecta del líquen <i>Parmotrema tinctorum</i> Nyl. (Hale)	68
4.4.1	Material líquénico	68
4.4.2	Métodos de extracción y de fraccionamiento preliminar	68
4.4.3	Aislamiento y purificación de los compuestos presentes en las fracciones primarias	69



4.4.3.1	Obtención del hematomato de metilo ( <b>46</b> ) y del $\beta$ - orcinol carboxilato de metilo ( <b>54</b> ) de la fracción activa PT <sub>I</sub>	69
4.4.3.2	Obtención del ácido (+)-úsnicico ( <b>32</b> ) de la fracción activa PT <sub>II</sub>	70
4.4.3.3	Obtención del ácido girofórico ( <b>22</b> ) y del orselinato de metilo ( <b>50</b> ) de la fracción activa PT <sub>IV</sub>	70
4.5	Estudio fitoquímico de la especie <i>Leucophyllum ambiguum</i> Humb. & Bonpl.	71
4.5.1	Material vegetal	71
4.5.2	Métodos de extracción y de fraccionamiento preliminar	71
4.5.3	Aislamiento y purificación de los compuestos presentes en las fracciones primarias	72
4.5.3.1	Obtención del ácido <i>trans</i> -cinámico ( <b>122</b> ) de la fracción activa LA <sub>3</sub>	72
4.5.3.2	Obtención de la 2',2''-dimetoxisesamina ( <b>123</b> ) de la fracción activa LA <sub>4</sub>	74
4.5.3.3	Obtención de la 2'-metoxicobusina ( <b>124</b> ) y de la 2'- metoxi-4''-hidroxi-desmetoxicobusina ( <b>126</b> ) de la fracción activa LA <sub>4</sub> -E	76
4.5.3.4	Obtención de la apigetrina ( <b>127</b> ) de la fracción activa LA <sub>5</sub>	78
4.5.3.5	Obtención de la apigenina ( <b>128</b> ) de las fracciones LA <sub>7</sub> y LA <sub>8</sub>	79
4.6	Caracterización de los productos naturales	80
4.6.1	Determinación de las constantes físicas, espectromé- tricas y espectroscópicas	80
4.6.2	Pruebas químicas preliminares para la identificación de glicósidos	81
4.6.2.1	Hidrólisis enzimática de la apigetrina ( <b>127</b> )	81
4.6.2.2	Hidrólisis ácida de la apigetrina ( <b>127</b> )	81
4.6.2.3	Detección de azúcares	81

4.6.3 Preparación del derivado metilado de la 2'-metoxi-4''-hidroxi desmetoxicobusina (126)	81
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>83</b>
5.1 Investigación de las fitotoxinas de <i>Parmotrema tinctorum</i> Nyl. (Hale)	83
5.1.1 Preselección y selección del líquen <i>Parmotrema tinctorum</i>	83
5.1.2 Aislamiento de los principios fitotóxicos a partir de los extractos activos de <i>Parmotrema tinctorum</i>	84
5.1.3 Caracterización de los compuestos aislados de <i>Parmotrema tinctorum</i>	88
5.1.4 Evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos aislados de <i>Parmotrema tinctorum</i>	88
5.1.5 Evaluación del efecto de los compuestos aislados de <i>Parmotrema tinctorum</i> sobre las reacciones de transferencia de electrones de la fotosíntesis	90
5.1.5.1 Efecto de los compuestos aislados de <i>Parmotrema tinctorum</i> sobre la síntesis de ATP y la captación de protones	91
5.1.5.2 Efecto del ácido girofórico (22) y de la lecanorina (121) sobre el transporte de electrones no cíclico	94
5.1.5.3 Caracterización del sitio de inhibición en la cadena de transporte de electrones no cíclico del ácido girofórico (22) y de la lecanorina (121)	98
5.1.6 Evaluación del efecto de los metabolitos mayoritarios de <i>Parmotrema tinctorum</i> sobre la síntesis de ADN en semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i>	102
5.1.7 Interacción de los metabolitos mayoritarios de <i>Parmotrema tinctorum</i> con la proteína calmodulina y con la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina	105
5.1.7.1 Efecto sobre la movilidad electroforética de la calmodulina	105
5.1.7.2 Actividad de la enzima fosfodiesterasa en presencia de calmodulina	107
5.1.7.3 Efecto del hematomato de metilo (46) sobre la actividad moduladora de la calmodulina	109
5.1.7.4 Efecto del hematomato de metilo (46) sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina	111

5.1.8	Determinación de la actividad citotóxica del hematomato de metilo (46)	112
5.2	Investigación sobre la especie <i>Leucophyllum ambiguum</i> Humb. & Bonpl	112
5.2.1	Preselección y selección de <i>Leucophyllum ambiguum</i>	112
5.2.2	Aislamiento de los principios fitotóxicos a partir del extracto activo de <i>Leucophyllum ambiguum</i>	113
5.2.3	Caracterización de los compuestos aislados de <i>Leucophyllum ambiguum</i>	115
5.2.3.1	Caracterización del ácido <i>trans</i> -cinámico (122), de la 2',2''-dimetoxisesamina (123), de la cobusina (125), de la apigetrina (127) y de la apigenina (128)	116
5.2.3.2	Caracterización de la 2'-metoxicobusina (124) y de la 2'-metoxi-4''-hidroxi-desmetoxicobusina (126)	117
5.2.4	Evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos aislados de <i>Leucophyllum ambiguum</i>	123
5.2.5	Evaluación del efecto de los lignanos fitotóxicos aislados de <i>Leucophyllum ambiguum</i> sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de hojas de espinaca	124
6.	CONCLUSIONES	125
7.	PERSPECTIVAS	128
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
	APÉNDICE I	155
	Espectro 1. Espectro en el IR de la 2'-metoxicobusina (124).	156
	Espectro 2. Espectro de masas de la 2'-metoxicobusina (124).	157
	Espectro 3. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de la 2'-metoxicobusina (124).	158

<b>Espectro 4.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz) de la 2'-metoxicobusina ( <b>124</b> ).	<b>159</b>
<b>Espectro 5.</b> Correlaciones de CH <sub>3</sub> O-2'/OCH <sub>2</sub> O en el espectro NOESY (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) de la 2-metoxicobusina ( <b>124</b> ).	<b>160</b>
<b>Espectro 6.</b> Espectro en el IR de la 2'-metoxi-4''hidroxidesmetoxicobusina ( <b>126</b> ).	<b>161</b>
<b>Espectro 7.</b> Espectro de masas de la 2'-metoxi-4''hidroxidesmetoxicobusina ( <b>126</b> ).	<b>162</b>
<b>Espectro 8.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) de la 2'-metoxi-4''-hidroxidesmetoxicobusina ( <b>126</b> ).	<b>163</b>
<b>Espectro 9.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz) de la 2'-metoxi-4''-hidroxidesmetoxicobusina ( <b>126</b> ).	<b>164</b>
<b>Espectro 10.</b> Correlaciones de CH <sub>3</sub> O-3''/OH-4'' en el espectro NOESY (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) de la 2'-metoxi-4''-hidroxidesmetoxicobusina ( <b>126</b> ).	<b>165</b>
<b>Espectro 11.</b> Correlaciones de H-2''/CH <sub>3</sub> O-3'' en el espectro NOESY (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) de la 2'-metoxi-4''-hidroxidesmetoxicobusina ( <b>126</b> ).	<b>166</b>
<b>APÉNDICE II</b>	<b>167</b>
<b>APÉNDICE III</b>	<b>171</b>
Effect of Lichen Metabolites on Thylakoid Electron Transport and Photophosphorylation in Isolated Spinach Chloroplast.	



# LISTA DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Actividad fitotóxica y mecanismo de acción de metabolitos secundarios selectos aislados de algunas especies vegetales, fúngicas y protistas, de la biodiversidad de México.	3
<b>Cuadro 2.</b> Categorías principales de metabolitos secundarios biosintetizados por líquenes.	10
<b>Cuadro 3.</b> Metabolitos de líquenes con actividad antiviral y antibiótica.	14
<b>Cuadro 4.</b> Metabolitos de líquenes que actúan como inhibidores enzimáticos.	15
<b>Cuadro 5.</b> Metabolitos de líquenes tóxicos para herbívoros.	16
<b>Cuadro 6.</b> Metabolitos de líquenes reguladores del crecimiento de plantas superiores.	16
<b>Cuadro 7.</b> Metabolitos aislados de la especie <i>Parmotrema tinctorum</i> Nyl. (Hale).	22
<b>Cuadro 8.</b> Número de residuos de aminoácidos presentes en la calmodulina de cerebro de bovino y en la de algunas especies vegetales.	42
<b>Cuadro 9.</b> Composición de los geles de acrilamida y de las disoluciones utilizadas para llevar a cabo la electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE al 12 %).	58
<b>Cuadro 10.</b> Resumen del fraccionamiento primario del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH obtenido de la primera recolecta del liquen <i>Parmotrema tinctorum</i> .	62
<b>Cuadro 11.</b> Resumen de la cromatografía en columna de la fracción primaria activa PT <sub>7</sub> .	65
<b>Cuadro 12.</b> Resumen de la cromatografía en columna de la fracción secundaria activa PT <sub>7</sub> -B.	66
<b>Cuadro 13.</b> Resumen de la cromatografía en columna de la fracción primaria fitotóxica PT <sub>8</sub> .	67

<b>Cuadro 14.</b> Resumen del fraccionamiento primario del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH obtenido de la segunda recolecta del liquen <i>Parmotrema tinctorum</i> .	<b>69</b>
<b>Cuadro 15.</b> Resumen de la cromatografía en columna de la fracción primaria fitotóxica PT <sub>IV</sub> .	<b>71</b>
<b>Cuadro 16.</b> Resumen del fraccionamiento preliminar mediante cromatografía abierta del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH obtenido de <i>Leucophyllum ambiguum</i> .	<b>72</b>
<b>Cuadro 17.</b> Resumen de la cromatografía en columna de la fracción primaria fitotóxica LA <sub>3</sub> .	<b>73</b>
<b>Cuadro 18.</b> Resumen del fraccionamiento terciario de la fracción secundaria fitotóxica LA <sub>3</sub> -D.	<b>74</b>
<b>Cuadro 19.</b> Resumen del fraccionamiento secundario de la fracción primaria fitotóxica LA <sub>4</sub> .	<b>75</b>
<b>Cuadro 20.</b> Resumen del fraccionamiento terciario de la fracción secundaria fitotóxica LA <sub>4</sub> -C.	<b>75</b>
<b>Cuadro 21.</b> Resumen del fraccionamiento terciario de la fracción secundaria fitotóxica LA <sub>4</sub> -E	<b>76</b>
<b>Cuadro 22.</b> Resumen del fraccionamiento cuaternario de la fracción terciaria fitotóxica LA <sub>4</sub> -EIII.	<b>77</b>
<b>Cuadro 23.</b> Resumen del fraccionamiento secundario de la fracción primaria bioactiva LA <sub>5</sub> .	<b>79</b>
<b>Cuadro 24.</b> Actividad fitotóxica de los extractos CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (1:1) de <i>Parmotrema tinctorum</i> .	<b>84</b>
<b>Cuadro 25.</b> Metabolitos secundarios aislados de las fracciones activas de la primera recolecta de <i>Parmotrema tinctorum</i> .	<b>85</b>
<b>Cuadro 26.</b> Metabolitos secundarios aislados de las fracciones activas de la segunda recolecta de <i>Parmotrema tinctorum</i> .	<b>87</b>
<b>Cuadro 27.</b> Actividad fitotóxica de los compuestos aislados de <i>Parmotrema tinctorum</i> .	<b>89</b>
<b>Cuadro 28.</b> Clasificación de los inhibidores de la síntesis de ATP y su efecto sobre el transporte de electrones.	<b>96</b>

<b>Cuadro 29.</b> Efecto del ácido girofórico (22) y de la lecanorina (121) sobre la rapidez del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema I.	<b>99</b>
<b>Cuadro 30.</b> Efecto del ácido girofórico (22) sobre la rapidez del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II.	<b>101</b>
<b>Cuadro 31.</b> Efecto de la lecanorina (121) sobre la rapidez del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II.	<b>102</b>
<b>Cuadro 32.</b> Actividad fitotóxica del extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (1:1) de <i>Leucophyllum ambiguum</i> .	<b>113</b>
<b>Cuadro 33.</b> Metabolitos aislados de las fracciones primarias de <i>Leucophyllum ambiguum</i> .	<b>113</b>
<b>Cuadro 34.</b> Constantes físicas y espectrométricas de la 2'-metoxicobusina (124) y de la 2'-metoxi-4''-hidroxidesmetoxicobusina (126).	<b>117</b>
<b>Cuadro 35.</b> Desplazamientos químicos en RMN de <sup>1</sup> H obtenidos para la cobusina (125), la 2'-metoxicobusina (124) y la 2'-metoxi-4''-hidroxidesmetoxicobusina (126).	<b>118</b>
<b>Cuadro 36.</b> Desplazamientos químicos en RMN de <sup>13</sup> C obtenidos para la cobusina (125), la 2'-metoxicobusina (124) y la 2'-metoxi-4''-hidroxidesmetoxicobusina (126).	<b>119</b>
<b>Cuadro 37.</b> Datos de desplazamientos químicos de los carbonos de las posiciones 1 y 1' de furofuranos de tipo cobusina y fargesina.	<b>122</b>
<b>Cuadro 38.</b> Actividad fitotóxica de los compuestos aislados de <i>Leucophyllum ambiguum</i>	<b>123</b>





## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Metabolitos fitotóxicos aislados de especies selectas de la biodiversidad de México.	5
<b>Figura 2.</b> Ejemplos de metabolitos secundarios biosintetizados por líquenes.	11
<b>Figura 3.</b> Metabolitos secundarios bioactivos aislados de líquenes.	17
<b>Figura 4.</b> <i>Parmotrema tinctorum</i> Nyl. (Hale) y amplificación de sus apotecios.	21
<b>Figura 5.</b> Metabolitos secundarios aislados de la especie <i>Parmotrema tinctorum</i> .	22
<b>Figura 6.</b> Ejemplos de las categorías principales de metabolitos secundarios biosintetizados por especies de la familia Scrophulariaceae.	25
<b>Figura 7.</b> Fitotoxinas de origen natural y algunos análogos sintéticos.	29
<b>Figura 8.</b> Mecanismos de acción de las fitotoxinas naturales.	32
<b>Figura 9.</b> Herbicidas sintéticos de uso comercial que inhiben el proceso fotosintético.	33
<b>Figura 10.</b> Orientación de los principales componentes de la membrana tilacoidal involucrados en la fotosíntesis y la vía que siguen los electrones desde el H <sub>2</sub> O hasta el NADP.	35
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática de un cloroplasto.	36
<b>Figura 12.</b> Diagrama esquemático de la ATP sintetasa de los cloroplastos.	39
<b>Figura 13.</b> Distribución vectorial de los fotosistemas I y II, del complejo citocromo <i>b/f</i> y de la ATP sintetasa en la membrana tilacoidal.	39
<b>Figura 14.</b> Diagrama esquemático de la estructura de la calmodulina y contenido de aminoácidos y los sitios de unión al Ca <sup>2+</sup> .	41

<b>Figura 15.</b> Representación esquemática de los cambios conformacionales que sufre la calmodulina.	<b>44</b>
<b>Figura 16.</b> Transporte de electrones de H <sub>2</sub> O a MV.	<b>92</b>
<b>Figura 17.</b> Efecto de los compuestos obtenidos de <i>Parmotrema tinctorum</i> sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de hojas de espinaca.	<b>93</b>
<b>Figura 18.</b> Efecto del ácido girofórico ( <b>22</b> ) y de la lecanorina ( <b>121</b> ) sobre la captación de protones en cloroplastos aislados de hojas de espinaca.	<b>94</b>
<b>Figura 19.</b> Efecto del ácido girofórico ( <b>22</b> ) sobre el transporte de electrones no cíclico, de H <sub>2</sub> O a MV.	<b>96</b>
<b>Figura 20.</b> Efecto de la lecanorina ( <b>121</b> ) sobre el transporte de electrones no cíclico, de H <sub>2</sub> O a MV.	<b>97</b>
<b>Figura 21.</b> Flujo de electrones en el fotosistema I de DCPIPred a MV (Cit <i>b<sub>6</sub>/f</i> a Fe-S).	<b>98</b>
<b>Figura 22.</b> Flujo de electrones en el fotosistema II de H <sub>2</sub> O a DCPIP (H <sub>2</sub> O a cit <i>b<sub>6</sub>/f</i> ).	<b>100</b>
<b>Figura 23.</b> Flujo de electrones en el fotosistema II de H <sub>2</sub> O a SiMo (H <sub>2</sub> O a Feo).	<b>100</b>
<b>Figura 24.</b> Flujo de electrones en el fotosistema II de DPC a DCPIP (P <sub>680</sub> a cit <i>b<sub>1</sub>/f</i> )	<b>101</b>
<b>Figura 25.</b> Efecto de los metabolitos aislados de <i>P. tinctorum</i> sobre la síntesis de ADN en semillas de <i>A. hypochondriacus</i> .	<b>103</b>
<b>Figura 26.</b> Efecto de los metabolitos aislados de <i>P. tinctorum</i> sobre la síntesis de ADN en semillas de <i>Echinochloa crusgalli</i> .	<b>104</b>
<b>Figura 27.</b> Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE 12 %) de la calmodulina bovina en presencia de CaCl <sub>2</sub> , después del tratamiento con los compuestos aislados de <i>Parmotrema tinctorum</i> .	<b>105</b>
<b>Figura 28.</b> Hidrólisis enzimática del AMP cíclico	<b>107</b>
<b>Figura 29.</b> Curva estándar de fosfato monobásico de potasio.	<b>108</b>

<b>Figura 30.</b> Actividad de la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina en presencia de calmodulina de cerebro de bovino	<b>109</b>
<b>Figura 31.</b> Efecto del hematomato de metilo (46) y de la clorpromazina sobre la actividad enzimática de la fosfodiesterasa en presencia de concentraciones saturantes de calmodulina.	<b>110</b>
<b>Figura 32.</b> Efecto del hematomato de metilo (46) y de la clorpromazina sobre la actividad enzimática de la fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina.	<b>111</b>
<b>Figura 33.</b> Proyección estereoscópica de rayos X de la 2',2''-dimetoxisesamina (123).	<b>116</b>
<b>Figura 34.</b> Estructuras de los núcleos base posibles para los productos 124 y 126.	<b>121</b>
<b>Figura 35.</b> Proyección estereoscópica de rayos X de la 2'-metoxicobusina (124).	<b>122</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
AMP <sub>c</sub>	Adenosina-3',5'-monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N	Piridina deuterada
CaM	Calmodulina
CCL	Complejo captador de luz
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CF <sub>0</sub>	Porción lipofílica de la H <sup>+</sup> -ATPasa del cloroplasto
CF <sub>1</sub>	Porción hidrofílica de la H <sup>+</sup> -ATPasa del cloroplasto
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
Cit <i>b/f</i>	Citocromo <i>b/f</i>
COSY	Espectroscopia bidimensional de correlación homonuclear ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H)
cpm	Cuentas por minuto
DC	Dicroísmo circular
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DPC	1,5-difenilcarbazida
EMFAB	Espectrometría de masas por bombardeo rápido de átomos
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
eV	Electrón volts
FAD	Flavina adenina dinucleótido oxidado
Feo	Feofitina

## *Lista de Abreviaturas*

FSI	Fotosistema I
FSII	Fotosistema II
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de protones
s	Singulete
sa	Singulete ancho
d	Doble
dd	Doble de dobles
HMBC	Espectroscopia bidimensional de correlación heteronuclear ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) a enlaces múltiples
HMQC	Espectroscopia bidimensional de correlación heteronuclear ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
m	Multiplete
M	Molaridad
m/z	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
MV	Metilviológeno
NADP <sup>+</sup>	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
NOESY	Espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H) por efecto nuclear de Overhauser
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
p f	Punto de fusión
P <sub>680</sub>	Clorofila a del centro de reacción del fotosistema II
P <sub>680</sub> <sup>+</sup>	Clorofila a del centro de reacción del fotosistema II oxidada
P <sub>700</sub>	Clorofila a del centro de reacción del fotosistema I
P <sub>700</sub> <sup>+</sup>	Clorofila a del centro de reacción del fotosistema I oxidada

PC	Plastocianina
Pi	Fosfato inorgánico
ppm	Partes por millón
PQ	Poza de plastoquinonas oxidada
PQH <sub>2</sub>	Poza de plastoquinonas reducida
Q <sub>A</sub>	Quinona A, aceptor primario del fotosistema II
Q <sub>B</sub>	Quinona B, aceptor secundario del fotosistema II
SiMo	Silicomolibdato
TMS	Tetrametilsilano
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
uma	Unidades de masa atómica
UV	Ultravioleta
$\delta$	Desplazamiento químico
$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud de onda máxima de absorción
$\mu\text{C}$	Microcuries

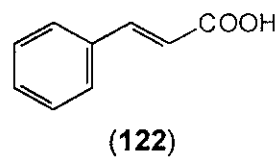
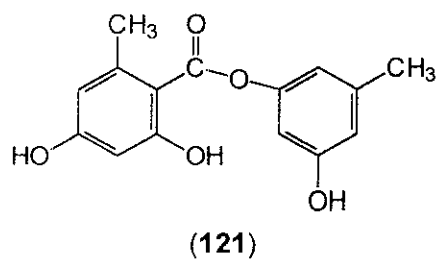
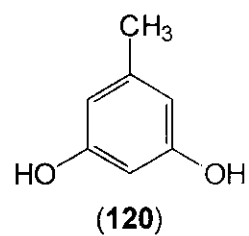
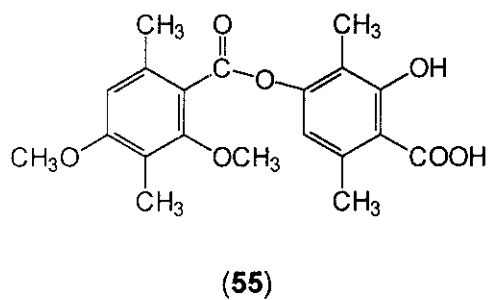
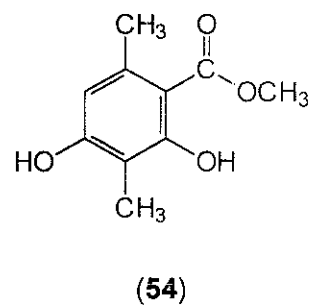
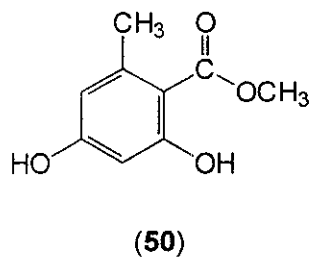
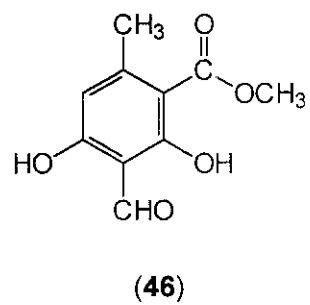
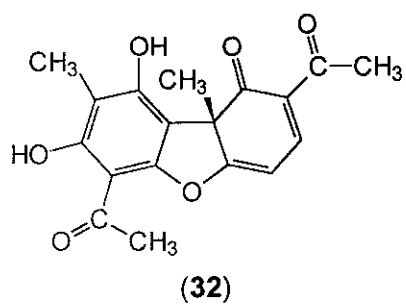
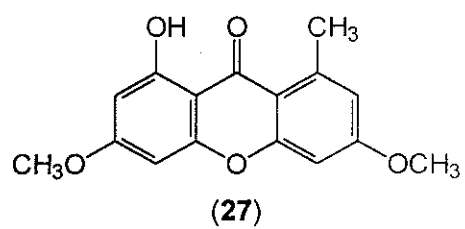
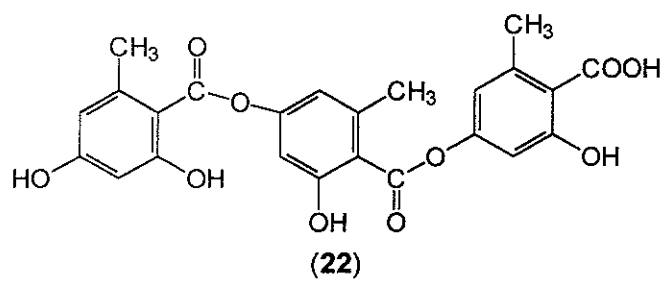


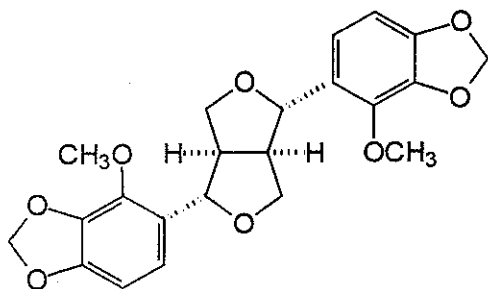
xx

## ***RESUMEN***

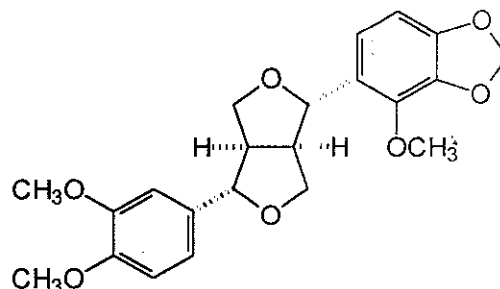
La presente disertación describe la investigación de los productos naturales derivados del líquen *Parmotrema tinctorum* Nyl. (Hale) (Parmeliaceae) y de la planta *Leucophyllum ambiguum* Humb. & Bonpl. (Scrophulariaceae), como fuentes potenciales de compuestos herbicidas. Para el desarrollo de este proyecto de investigación se propuso una estrategia metodológica que se inició con la preselección y selección de las especies y culminó con la caracterización química y la evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos obtenidos. La preselección de *P. tinctorum* y de *L. ambiguum* estuvo fundamentada en consideraciones quimiotaxonómicas, mientras que la selección se basó en la aplicación de ensayos biológicos apropiados

El estudio químico biodirigido del extracto activo derivado de *P. tinctorum* recolectado en el Estado de Veracruz, permitió la obtención de ocho metabolitos secundarios caracterizados como ácido girofórico (**22**), liquexantona (**27**), hematomato de metilo (**46**), orselinato de metilo (**50**),  $\beta$ -orcínol carboxilato de metilo (**54**), ácido difractaico (**55**), orcínol (**120**) y lecanorina (**121**). A partir de una segunda recolecta del líquen, realizada en el Estado de Morelos, se obtuvo el ácido (+)-úsrico (**32**), además de los compuestos **22**, **46**, **50** y **54**. La investigación fitoquímica biodirigida de *L. ambiguum* condujo al aislamiento de siete metabolitos secundarios, incluyendo dos lignanos novedosos caracterizados como la 2'-metoxicobusina (**124**) y el 2'-metoxi-4''-hidroxi-desmetoxicobusina (**126**). Los cinco productos restantes se identificaron como el ácido *trans*-cinámico (**122**), la 2',2''-dimetoxisesamina (**123**), la cobusina (**125**), la apigetrina (**127**) y la apigenina (**128**). De manera general, la elucidación estructural de los compuestos aislados se llevó a cabo mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y quiroópticos. En el caso de los lignanos **123** y **124**, las estructuras se confirmaron mediante un análisis de difracción de rayos X

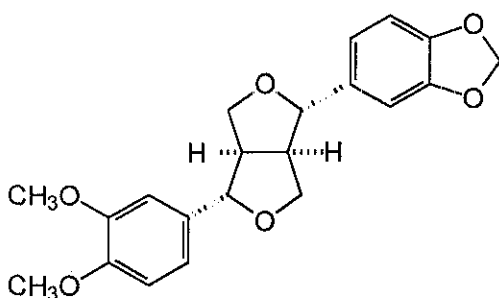




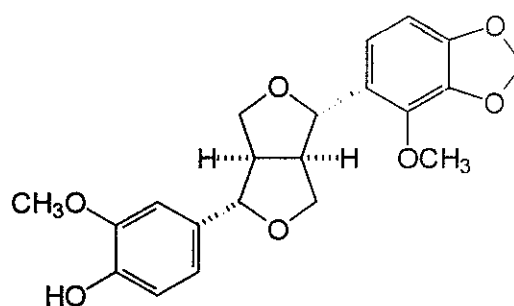
(123)



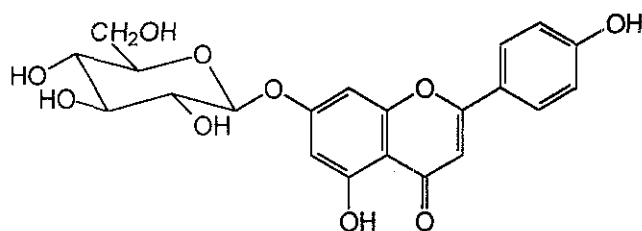
(124)



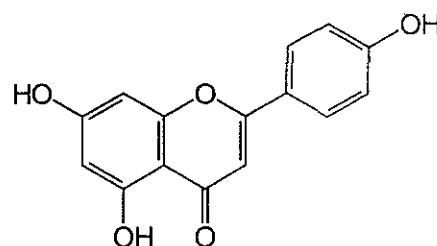
(125)



(126)



(127)



(128)

La determinación del efecto de los compuestos sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de las especies arvenses *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli* permitió establecer que los metabolitos **32**, **46**, **50**, **54**, **55**, **120** y **121**, obtenidos de *P. tinctorum*, presentan propiedades fitotóxicas significativas. Los productos **32** y **46** fueron las fitotoxinas más potentes. Ambos

## *Resumen*

compuestos poseen propiedades inhibitorias del crecimiento vegetal de tipo preemergente. Por otra parte, de los metabolitos obtenidos de *L. ambiguum*, únicamente los compuestos **122**, **124** y **126** inhiben el crecimiento radicular de las especies de prueba de una forma moderada y, con excepción del producto **122**, ninguno de los compuestos afecta la germinación de semillas. Sin embargo, un estudio realizado en los laboratorios de la compañía estadounidense BASF, reveló que los productos **123**, **124** y **126** inhiben significativamente el crecimiento vegetal a nivel posemergente de una especie del género *Arabidopsis* y de un pasto común ("bentgrass").

El efecto de los compuestos fitotóxicos derivados de *P. tinctorum* y *L. ambiguum* sobre las reacciones de transferencia de electrones de la fotosíntesis se determinó a través de la realización de diversos bioensayos *in vitro*, utilizando cloroplastos aislados de hojas de espinaca. A partir de estas evaluaciones fue posible establecer que los productos **22** y **121** interfieren significativamente con las actividades fotosintéticas asociadas con la fase luminosa. Ambos productos se caracterizaron como inhibidores de la reacción de Hill. El modo de acción del compuesto **22** involucra la inhibición de la transferencia de electrones entre  $P_{680}$  y  $Q_A$ , sobre el lado reductor del fotosistema II y el del **121**, la interferencia con la enzima que fotolisa el agua.

La interacción de las fitotoxinas con la proteína calmodulina de cerebro de bovino se determinó mediante una electroforesis (SDS-PAGE al 12 %) en presencia de calcio. En estas ensayos se determinó que, con excepción del producto **122**, todos los compuestos evaluados retardan la movilidad electroforética de la calmodulina. Los ácidos **22**, **32** y **55** inducen un retardo mayor que el de la clorpromazina, una fenotiazina que se une de forma no covalente a la calmodulina y que fue empleada como control positivo. En el caso del compuesto **46** fue posible evidenciar que la interacción con calmodulina afecta la habilidad de la proteína de modular la actividad enzimática de la fosfodiesterasa, una de sus proteínas blanco y la cual es responsable de la hidrólisis de la adenosina-3',5'-monofosfato (AMP cíclico). La evaluación correspondiente se llevó a cabo determinando la cantidad de fosfato liberado al medio de reacción cuando esta enzima cataliza la reacción de hidrólisis de AMP cíclico en presencia de calmodulina de cerebro de bovino. Los resultados de estas determinaciones indicaron que el

compuesto **46** inhibe la habilidad de la calmodulina para activar la enzima fosfodiesterasa en forma creciente y dependiente de la concentración, aunque también indujo la inhibición de la actividad de la fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina.

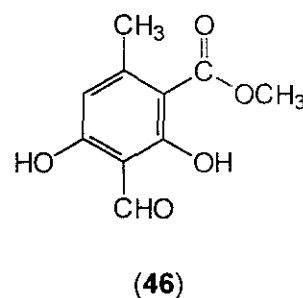
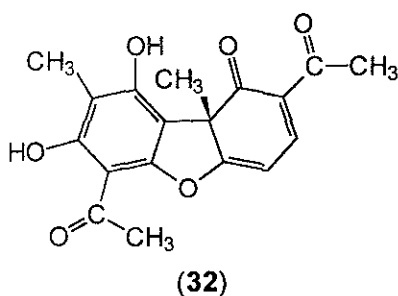
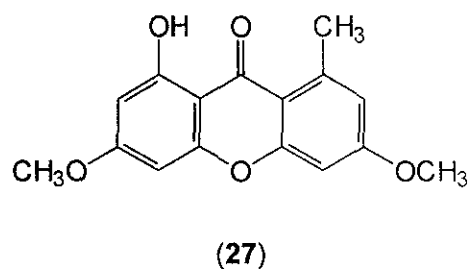
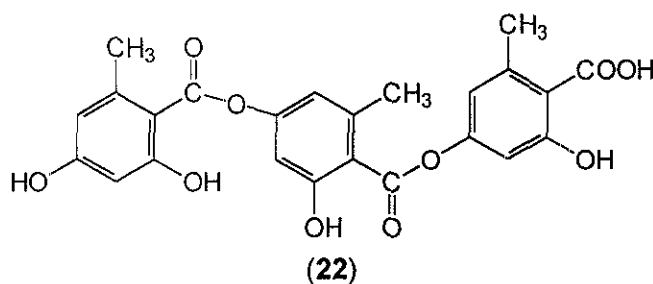
Las evaluaciones del efecto de los metabolitos aislados de *P. tinctorum* sobre la síntesis de ADN en semillas de *A. hypochondriacus* y de *E. crusgalli*, demostraron que todos los compuestos ocasionan una disminución de este proceso metabólico. Sin embargo, en ningún caso este efecto es significativo, comparado con la inhibición inducida por el herbicida comercial 2,4-D, empleado como un control positivo.



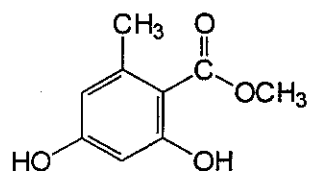
## ABSTRACT

As a part of our search for potential herbicide agents from natural sources, it was found that the organic extracts prepared from *Leucophyllum ambiguum* Humb. & Bonpl. (Scrophulariaceae) and two different collections of *Parmotrema tinctorum* Nyl. (Hale) (Parmeliaceae) showed phytotoxic activity when evaluated on radicle growth of seedlings of *Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crusgalli* using the Petri dish assay

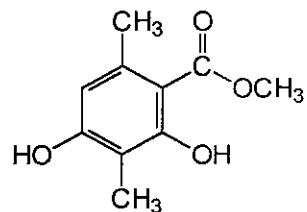
Bioactivity-guided fractionation of the phytotoxic extracts from *P. tinctorum* led to the isolation of the known compounds giroforic acid (**22**), lichexantona (**27**), (+)-usnic acid (**32**), methyl haematomato (**46**), methyl orsellinate (**50**), methyl- $\beta$ -orcinol carboxylate (**54**), difractaic acid (**55**), orcinol (**120**) and lecanorin (**121**). On the other hand, chemical investigation of *L. ambiguum* allowed the isolation of two novel lignans namely 2'-methoxycobusin (**124**) and 2'-methoxy-4''-hidroxy-demethoxycobusin (**126**). In addition, *trans*-cinnamic acid (**122**), 2',2''-dimethoxysesamin (**123**), cobusin (**125**), apigetrin (**127**) and apigenin (**128**) were obtained. The structures of these compounds were established on the basis of the spectral and chemical methods. The structures of compounds **123** and **124** were unambiguously determined by X-ray analysis.



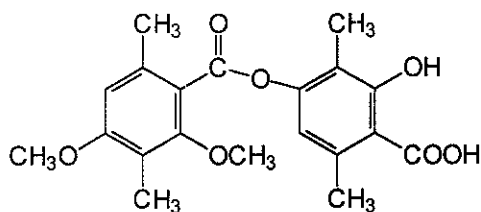




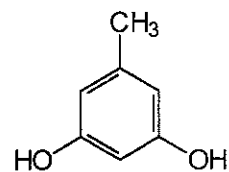
(50)



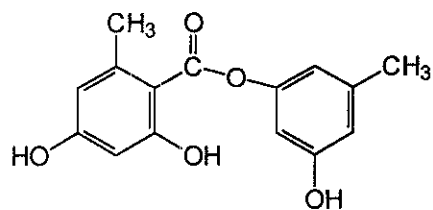
(54)



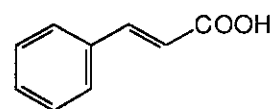
(55)



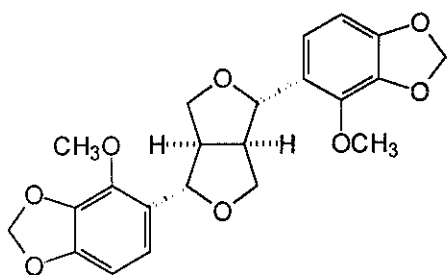
(120)



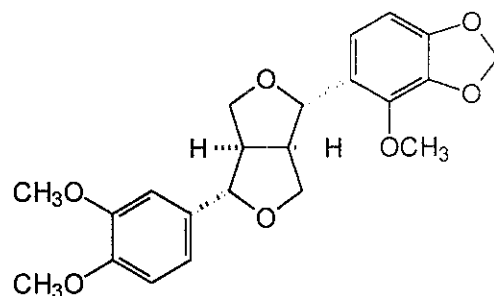
(121)



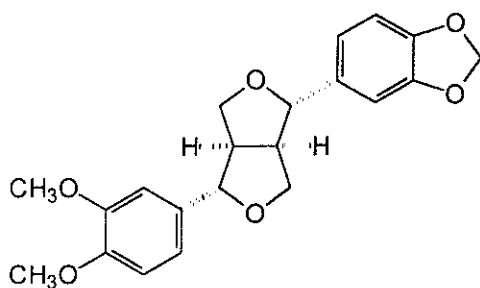
(122)



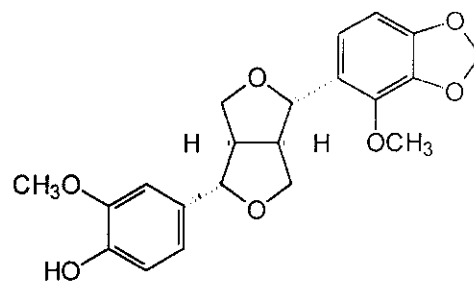
(123)



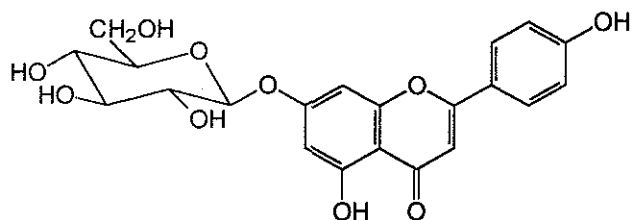
(124)



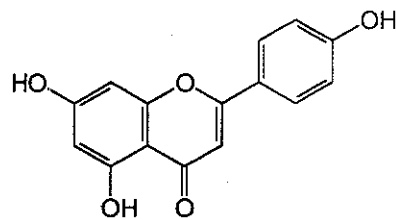
(125)



(126)



(127)



(128)

The isolated metabolites were tested for their ability to inhibit seed germination and radicle growth of *A. hypochondriacus* and *E. crusgalli*. Compounds **32**, **46**, **50**, **54**, **55**, **120** and **121**, from *P. tinctorum*, showed significant phytotoxic effect, with **32** and **46** being the most potent compounds at preemergent level. The inhibitory effect of these compounds was higher than to that of 2,4-D. In the case of metabolites from *L. ambiguum*, compounds **122**, **124** and **126** reduced radicle growth of both target species and only product **122** inhibited the germination process. Testing at BASF Company revealed that metabolites **123**, **124** and **126** possesses significant postemergent phytotoxic activity against *Arabidopsis* and bentgrass.

Once the phytotoxic activity of the isolates was evaluated, their effect on several photosynthetic reactions in freshly lysed, illuminated spinach chloroplasts was established. The activities investigated included ATP-synthesis,  $H^+$ -uptake, electron transport rate, and partial reactions of the photosystems I (PSI) and II (PSII). Compounds **22** and **121** significantly inhibited the light-dependent synthesis of ATP,  $H^+$ -uptake and uncoupled electron transfer on the reducing side of PSII. The targets of **22** and **121** were located in one of the redox enzymes in the range of electron transport from  $P_{680}$  to  $Q_A$  and at the water-splitting enzyme level, respectively.

On the other hand, the effect of compounds from *P. tinctorum* on bovine brain calmodulin was established. The assay conducted was a SDS-PAGE electrophoresis. In this type of experiment the interaction of any compound with calmodulin is determined by observing the change in the electrophoretic mobility of the protein in the presence of  $Ca^{2+}$  and the compound. In general, all the metabolites, except **122**, affected the mobility of calmodulin, in particular products **22**, **32** and **55**.

## *Abstract*

Compound **46**, the only phytotoxin from *P. tinctorum* which significantly inhibited the germination of *A. hypochondriacus* and *E. crusgalli* interfere with calmodulin process *in vitro*. This compound was able to inhibit the activation of the enzyme phosphodiesterase by calmodulin in a concentration dependent manner.

Finally, phytotoxins from *P. tinctorum* were investigated for their ability to inhibit DNA synthesis of *A. hypochondriacus* and *E. crusgalli*. In general, the tested compounds showed an inhibitory activity, but the effect was no significant.

# ***1. INTRODUCCIÓN***

La extraordinaria biodiversidad que existe en México representa, indudablemente, uno de los recursos naturales más importantes del mundo, el cual es necesario conocer y estudiar para su conservación y aprovechamiento racional. Sin embargo, en la actualidad el porcentaje de especies estudiadas desde los puntos de vista químico y biológico es relativamente bajo y, si bien es cierto que en los últimos años la investigación científica de los recursos naturales en México se ha caracterizado por un avance notable y sostenido en el estudio químico de muchas especies, en especial de plantas que son usadas en las prácticas médicas populares, tan sólo un reducido número de los compuestos aislados e identificados ha sido evaluado para determinar sus propiedades biológicas (Bye *et al* , 1995; Mata *et al* , 1996).

De lo anterior se desprende que el potencial que ofrecen las plantas y otros recursos naturales de México como una fuente de nuevos principios activos, incluyendo aquellos con propiedades herbicidas, aún no se ha explorado adecuadamente. Afortunadamente, en la actualidad el interés científico por el estudio de los recursos naturales ha cobrado fuerza en nuestro país y es cada vez más importante la incorporación del esquema de trabajo multidisciplinario en los programas de investigación que se desarrollan en distintos centros de estudio del país.

Dentro de este contexto, y considerando que en años recientes la búsqueda de nuevos agentes herbicidas, principalmente de origen natural, se ha incrementado substancialmente, en la Facultad de Química de la UNAM se ha establecido un programa de investigación multidisciplinario dirigido a la exploración de la potencialidad herbicida de especies selectas de la biodiversidad de México y de productos derivados de las mismas, con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes herbicidas biodegradables y de menor toxicidad (Mata *et al* , 1996).

Es importante subrayar que la búsqueda de herbicidas naturales se encuentra plenamente justificada y aunque la mayoría de los pesticidas actuales son altamente eficaces para combatir las diferentes plagas que afectan a los cultivos de importancia económica, muchos de ellos producen daños irreversibles al

## 1. Introducción

ecosistema, debido al alto grado de contaminación que ocasionan en el suelo, aire y agua (Justum *et al.*, 1997). Por otro lado, además de producir daños neurotóxicos en los organismos vivos, un gran número de estos agentes ha inducido la aparición de especies resistentes que ahora resultan difíciles de erradicar (Strobel *et al.*, 1991; Heap, 1997; Cramer, 2000; Warrior, 2000).

Cabe mencionar que a pesar de que a la fecha son escasos los herbicidas de origen natural con aplicación comercial, la caracterización química y biológica de compuestos biodinámicos novedosos representa una fuente inestimable de estructuras prototipo para el desarrollo de derivados sintéticos y semisintéticos con una actividad biológica selectiva y, en lo posible, con una toxicidad reducida. Algunos ejemplos de ello están representados por el cinmetilino y por el bialafos, dos herbicidas sintéticos utilizados comercialmente. El primero fue desarrollado a partir del monoterprenoide cineol y, el segundo, a partir de la fosfinitricina, una fitotoxina aislada de los actinomicetos *Streptomyces hygroscopicus* y *Streptomyces viridochromogenes* (Duke y Abbas, 1995).

Para el desarrollo del programa de investigación que se mencionó anteriormente, se ha seguido la estrategia general que se describe a continuación. En primer lugar se lleva a cabo la preselección de las especies objeto de estudio, misma que se realiza de acuerdo a los criterios clásicos, es decir, con base en consideraciones ecológicas, etnobotánicas y quimiotaxónomicas. A continuación se seleccionan las materias primas, mediante la evaluación preliminar de la actividad fitotóxica de extractos orgánicos que se preparan a partir de las fuentes naturales preseleccionadas. En estas evaluaciones se determina principalmente el efecto de los extractos crudos sobre la germinación y sobre el crecimiento radicular de diversas especies de semillas (Anaya *et al.*, 1990; Pereda-Miranda *et al.*, 1993). Posteriormente, se procede a la obtención de los principios activos a partir de aquellas especies que demuestran una actividad fitotóxica significativa, para lo cual los extractos se someten a un fraccionamiento biodirigido, en el que se utiliza un método bioautográfico sobre cromatografía en capa fina para monitorear la actividad biológica (Inoue *et al.*, 1992). Una vez que se identifican los compuestos separados de las fracciones activas, se evalúan para determinar su potencial fitotóxico y, por último, se exploran algunos mecanismos de acción. Con relación al último punto, en este programa se ha investigado principalmente el efecto de las fitotoxinas obtenidas sobre el proceso de la fotofosforilación, aunque recientemente se ha abordado

también el estudio sobre otros blancos (Mata *et al.*, 1996; Lotina-Hennsen *et al.*, 1998; Macías *et al.*, 2000, 2001)

Entre los compuestos más importantes con una actividad fitotóxica *in vitro* generados a través de los trabajos de investigación de este proyecto, destacan los que se encuentran incluidos en el Cuadro 1. Estos metabolitos pertenecen a distintas clases estructurales (Figura 1) y fueron aislados a partir de especies vegetales, fúngicas y protistas, pertenecientes a diferentes familias.

**Cuadro 1.** Actividad fitotóxica y mecanismo de acción explorado de metabolitos secundarios selectos aislados de algunas especies vegetales, fúngicas y protistas, de la biodiversidad de México.

Compuesto (Fuente natural)	Crecimiento radicular CI <sub>50</sub> (M)		Mecanismo de acción investigado	Referencia
	A. <i>Hypochondriacus</i>	E. <i>crusgalli</i>		
Tricolorina (1) ( <i>Ipomea tricolor</i> <sup>1</sup> )	3.6 × 10 <sup>-5</sup>	1.2 × 10 <sup>-5</sup>	Inhibición de la reacción de Hill (inhibidor del transporte de electrones entre Q <sub>A</sub> y Q <sub>B</sub> ) y desacoplamiento de la fotofosforilación	Pereda-Miranda <i>et al.</i> , 1993; Achnine <i>et al.</i> 1999.
Isoalloalantolactona (2) ( <i>Ratibida mexicana</i> <sup>2</sup> )	4.2 × 10 <sup>-5</sup>	2.4 × 10 <sup>-4</sup>	Inhibición de la reacción de Hill (inhibidor del transporte de electrones en el rango de P <sub>680</sub> a Q <sub>A</sub> )	Calera <i>et al.</i> 1995
1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil) benceno (3) ( <i>Malmea depressa</i> <sup>3</sup> )	1.8 × 10 <sup>-4</sup>	3.4 × 10 <sup>-3</sup>	Inhibición de la reacción de Hill (inhibidor del transporte de electrones en el rango de P <sub>680</sub> a Q <sub>A</sub> ).	Jiménez <i>et al.</i> , 1996, 1998
Herbarumina I (4) Herbarumina II (5) ( <i>Phoma herbarum</i> <sup>4</sup> )	5.3 × 10 <sup>-5</sup> 1.2 × 10 <sup>-4</sup>	ND <sup>a</sup> ND <sup>a</sup>	Interacción con la enzima reguladora calmodulina	Rivero-Cruz <i>et al.</i> 2000.
Encecalina (6) Desmetilencecalina (7) ( <i>Helianthella quinquenervis</i> <sup>5</sup> )	3.0 × 10 <sup>-5</sup> 1.2 × 10 <sup>-4</sup>	2.6 × 10 <sup>-5</sup> 3.6 × 10 <sup>-4</sup>	Inhibición de la reacción de Hill (inhibidor del transporte de electrones en el rango de P <sub>680</sub> a Q <sub>A</sub> )	Castañeda <i>et al.</i> 1996 1998

<sup>1</sup>Convolvulaceae; <sup>2</sup>Asteraceae; <sup>3</sup>Annonaceae; <sup>4</sup>Sphaeropsidaceae; <sup>5</sup>Chaetomiaceae; <sup>6</sup>Rutaceae; <sup>7</sup>Meliaceae; <sup>8</sup>Actinomiceto

<sup>a</sup>No determinada

## 1. Introducción

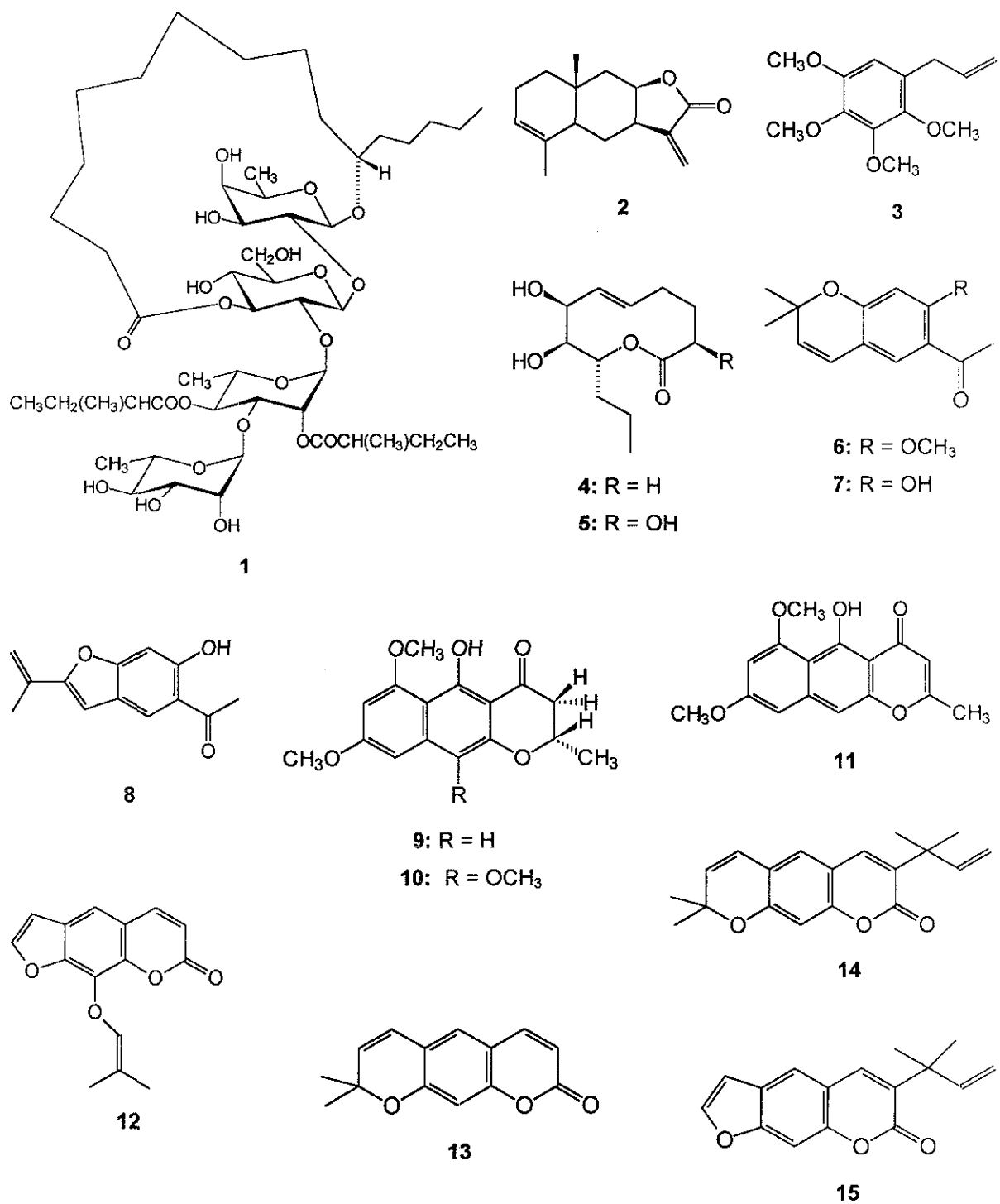
**Cuadro 1.** Actividad fitotóxica y mecanismo de acción explorado de metabolitos secundarios selectos aislados de algunas especies vegetales, fúngicas y protistas, de la biodiversidad de México (continuación).

Compuesto (Fuente natural)	Crecimiento radicular CI <sub>50</sub> (M)		Mecanismo de acción investigado	Referencia
	<i>A.</i> <i>hypochondriacus</i>	<i>E.</i> <i>crusgalli</i>		
Euparina (8) ( <i>Helianthella</i> <i>quinquenervis</i> <sup>2</sup> )	5.1 × 10 <sup>-4</sup>	× 10 <sup>-3</sup>	Inhibición de la transferencia de energía.	Castañeda <i>et al</i> 1996 1998
Naftopiranona III (9) Naftopiranona IV (10) Rubrofusarina B (11) ( <i>Guanomyces polythrix</i> <sup>5</sup> )	2.3 × 10 <sup>-5</sup> 1.3 × 10 <sup>-5</sup> 1.3 × 10 <sup>-5</sup>	8.7 × 10 <sup>-5</sup> 4.0 × 10 <sup>-5</sup> 8.7 × 10 <sup>-5</sup>	Interacción con la enzima reguladora calmodulina	Macías <i>et al</i> 2000.
Imperatorina (12) ( <i>Esenbeckia yaxhoob</i> <sup>6</sup> )	7.5 × 10 <sup>-3</sup>	5.3 × 10 <sup>-4</sup>	Desacoplamiento de la fotofosforilación	Mata <i>et al</i> , 1998
Xantiletina (13) ( <i>Stauranthus perforatus</i> <sup>6</sup> )	9.6 × 10 <sup>-5</sup>	5.9 × 10 <sup>-4</sup>	Inhibición de la reacción de Hill (inhibidor del transporte de electrones entre Cit <i>b/f</i> y PC)	Rudiño-Piñera <i>et al</i> , 1995; Macías <i>et al</i> 1999
3-(1'-1'-Dimetilalil) xantiletina (14) ( <i>Stauranthus perforatus</i> <sup>6</sup> )	7.9 × 10 <sup>-3</sup>	2.3 × 10 <sup>-1</sup>	Desacoplamiento de la fotofosforilación e inhibición de la reacción de Hill	Rudiño-Piñera <i>et al</i> , 1995; Macías <i>et al</i> 1999.
Chalepensina(15) ( <i>Stauranthus perforatus</i> <sup>6</sup> )	6.3 × 10 <sup>-3</sup>	1.1 × 10 <sup>-3</sup>	Inhibición de la transferencia de energía y desacoplamiento de la fotofosforilación	Rudiño-Piñera <i>et al</i> , 1995; Macías <i>et al</i> 1999
Odoratól (16) ( <i>Cedrela odorata</i> <sup>7</sup> )	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	Inhibición de la reacción de Hill (inhibidor del complejo enzimático que fotolisa el agua).	Achnine <i>et al</i> , 1998
Maduramicina (17) [ <i>Actinomadura</i> MIV2B(31) <sup>8</sup> ]	1.8 × 10 <sup>-5</sup>	2.0 × 10 <sup>-5</sup>	Desacoplamiento de la fotofosforilación	Gutiérrez-Lugo <i>et al</i> , 1999

<sup>1</sup>Convolvulaceae; <sup>2</sup>Asteraceae; <sup>3</sup>Annonaceae; <sup>4</sup>Sphaeropsidaceae; <sup>5</sup>Chaetomiaceae, <sup>6</sup>Rutaceae;

<sup>7</sup>Meliaceae; <sup>8</sup>Actinomyceto

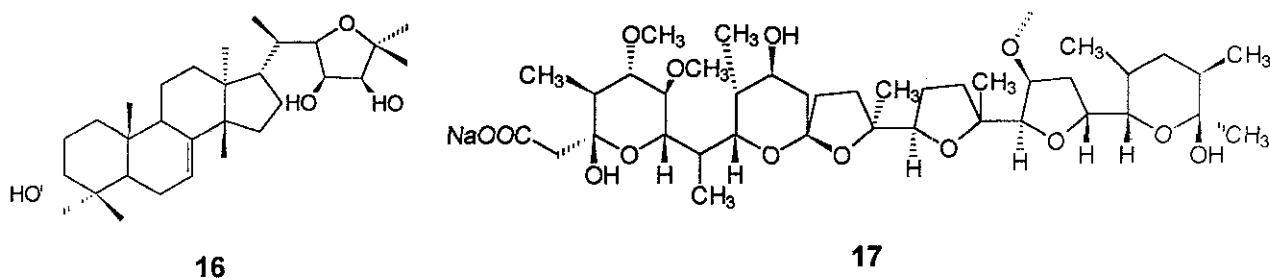
<sup>a</sup>No determinada



▲ **Figura 1.** Metabolitos fitotóxicos aislados de especies selectas de la biodiversidad de México



## I. Introducción



▲ **Figura 1.** Metabolitos fitotóxicos aislados de especies selectas de la biodiversidad de México (continuación)

Los compuestos **1-17** inhiben la fotosíntesis a través de diferentes mecanismos o interactúan con la proteína reguladora calmodulina. La mayoría de los que afectan la fotosíntesis inhiben la reacción de Hill y su sitio de acción se localiza en diferentes puntos de la cadena transportadora de electrones. Es importante mencionar que la potencia de algunos de estos metabolitos, como inhibidores de alguna de las etapas del proceso fotosintético, es comparable con la de varios pesticidas comerciales. Por ejemplo, el fenilpropanoide 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil) benceno (**3**) y el protolimonoide odoratol (**16**), poseen una actividad equiparable a la del herbicida sintético conocido como Paraquat® [metilviológeno] (Jiménez *et al.*, 1998; Achnine *et al.* 1998). Por otro lado, aunque en la actualidad no se encuentra descrito en la literatura si algunos de los herbicidas comerciales actúan sobre la calmodulina, en diversos estudios electroforéticos se ha demostrado que algunas fitotoxinas naturales, como la ofiobolina A, un sesterterpenoide aislado de los hongos fitopatógenos *Helminthosporium maydis* y *Helminthosporium oryzae*, y las naftopironas **9-11** aisladas del hongo coprófilo *Guanomyces polythrix*, interaccionan con esta proteína e inhiben su habilidad para regular la actividad enzimática de otras proteínas (Macías *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 1984, 1985, 1988).

Los datos anteriores revelan claramente el gran potencial que posee la vasta biodiversidad de México como una fuente de compuestos fitotóxicos. Estos metabolitos representan importantes prototipos que podrían conducir al descubrimiento de nuevos agentes herbicidas verdes

En el marco del proyecto descrito anteriormente, surgió la presente investigación, la cual tiene como objetivo continuar con el descubrimiento de nuevas fitotoxinas de origen natural, con un efecto sobre el metabolismo energético vegetal y/o sobre la proteína reguladora calmodulina, a partir de especies selectas de la biodiversidad mexicana y así contribuir al desarrollo de nuevos agentes herbicidas biodegradables y de menor toxicidad. La selección de cada una de las especies que fueron sometidas a esta investigación química se realizó a través de una propuesta fundamentada en criterios quimiotaxonómicos, en conjunto con los resultados de las evaluaciones preliminares de su potencial fitotóxico. La aplicación de este enfoque garantiza la obtención de principios bioactivos a partir de las materias primas seleccionadas.

Los resultados reunidos en esta tesis se encuentran integrados en dos partes: la primera incluye el estudio químico y biológico de dos recolectas diferentes del líquen *Parmotrema tinctorum* Nyl. (Hale) (Parmeliaceae) y la segunda, la investigación de la especie *Leucophyllum ambiguum* Humb & Bonpl (Scrophulariaceae).



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Antecedentes sobre el líquen *Parmotrema tinctorum* Nyl. (Hale)

Los líquenes son asociaciones simbióticas estables constituidas por un hongo, denominado micobionte, y un organismo fotosintético, denominado ficobionte; este último puede ser una alga verde, una cianobacteria o ambos tipos de organismos. Los líquenes se encuentran presentes en todos los hábitats terrestres y representan uno de los grupos simbióticos más importantes. En la actualidad, se han identificado aproximadamente 18 000 especies de líquenes (el nombre que se les asigna corresponde al componente fúngico), incluyendo 16,750 ascomicetos liquenizados, 200 duteromicetos y 50 basidiomicetos. La mayoría de los organismos ficobiontes pertenecen al orden de los Clorococcales (83 %), siendo los géneros principales *Trebouxia*, *Myrmecea*, *Chlorella*, *Pleurococcus* y *Coccomyxa*. Otros órdenes importantes están representados por los Ulotricales (9 %) y las cianobacterias (8 %) de los géneros *Nostoc*, *Gloeocapsa*, *Scytonema* y *Calothrix* (Culberson y Elix, 1989; Lawrey, 1995; Huneck, 1999).

Los líquenes biosintetizan numerosos metabolitos secundarios pertenecientes a diversas clases estructurales (Cuadro 2). Estos compuestos son producidos por los organismos micobiontes y se acumulan sobre las paredes exteriores de las hifas de los mismos. A la fecha, se han aislado más de 800 compuestos a partir de 6,000 especies de líquenes y se considera que alrededor de 350 no pueden ser biosintetizados fuera de la asociación simbiótica, por lo que son producidos exclusivamente por estos organismos (Huneck, 1999). Entre estos metabolitos, los policétidos son los más abundantes. En este grupo destacan los policétidos aromáticos, siendo los más característicos los generados por la unión de dos o tres unidades fenólicas de tipo orcinol o  $\beta$ -orcinol, las cuales pueden unirse a través de enlaces éster, éter y carbono-carbono (Figura 2).

## 2. Antecedentes

**Cuadro 2.** Categorías principales de metabolitos secundarios biosintetizados por líquenes

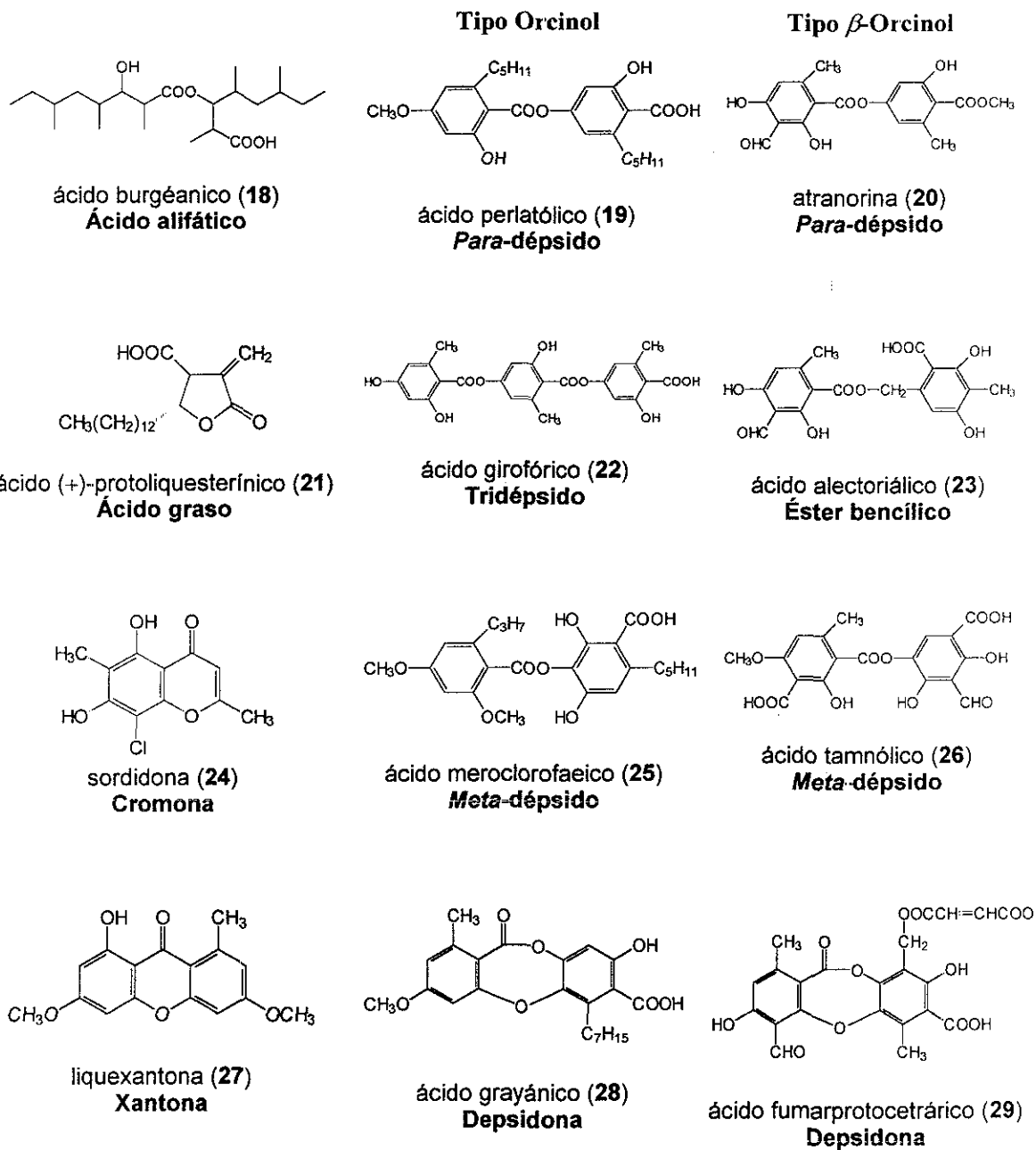
Categoría	Ruta biogenética
Ácidos alifáticos secundarios, ésteres y compuestos relacionados	Acetato-polimalonato
Compuestos fenólicos mononucleares <sup>a</sup>	
<i>Para</i> -dépsidos, tridépsidos, ésteres bencílicos y <i>meta</i> -dépsidos <sup>a,b</sup>	
Depsidonas, depsonas y éteres difenílicos relacionados <sup>a,b</sup>	
Dibenzofuranos, ácido úsnico y compuestos relacionados <sup>a,b</sup>	
Cromonas <sup>a,b</sup>	
Naftoquinonas <sup>a,b</sup>	
Xantonas <sup>a,b</sup>	
Antraquinonas y xantonas relacionadas <sup>a,b</sup>	
Di, sester y tri terpenoides Esteroides	Ácido mevalónico y DOXP <sup>c</sup>
Terfenilquinonas Derivados del ácido pulvínico	Ácido siquímico

<sup>a</sup>Compuestos aromáticos derivados de policétidos

<sup>b</sup>Derivados di y triaril de unidades fenólicas simples

<sup>c</sup>Mono y diterpenoides

Derivados de la Ruta Acetato-Polimalonato

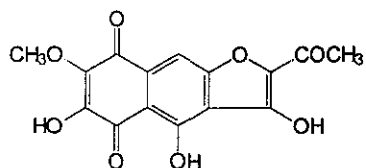


▲ Figura 2. Ejemplos de metabolitos secundarios biosintetizados por líquenes.

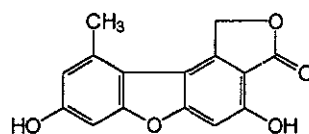
## 2. Antecedentes

### Derivados de la Ruta Acetato-Polimalonato

#### Tipo Orcinol

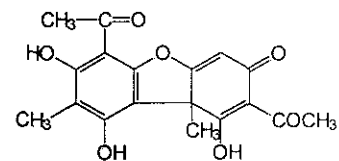


ácido rododactónico (30)  
**Naftoquinona**

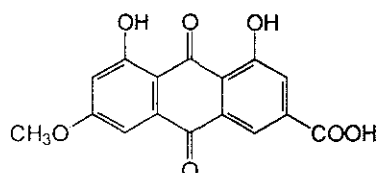


estrepisilina (31)  
**Dibenzofurano**

#### Tipo $\beta$ -Orcinol

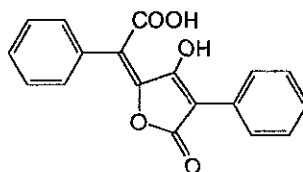


ácido úsnico (32)  
**Derivados del ácido úsnico**



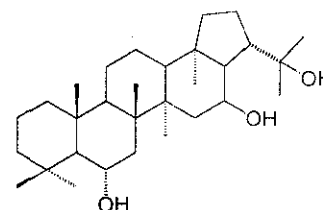
Ácido parietínico (33)  
**Antraquinona**

#### Derivados de la Ruta del Ácido siquímico



ácido pulvínico (34)  
**Derivados del ácido pulvínico**

#### Derivados de la Ruta del Ácido Mevalónico



leucotilina (35)  
**Triterpeno**

▲ **Figura 2.** Ejemplos de metabolitos secundarios biosintetizados por líquenes (continuación)

Desde el punto de vista ecológico, los metabolitos producidos por los líquenes desempeñan funciones importantes que hacen posible el desarrollo de estos organismos aún en condiciones hostiles y las más importantes se mencionan a continuación:

1. Inhiben el crecimiento de bacterias, lo cual garantiza que el crecimiento de los líquenes se complete con éxito (Ingolfsdottir *et al.*, 1985).
2. Incrementan la permeabilidad de las paredes celulares de los ficobiontes (Follmann y Villagrán, 1965).

3. Absorben la luz ultravioleta en un grado importante, protegiendo de esta manera a los organismos ficobiontes de radiaciones peligrosas (Lawrey, 1986).
4. Forman complejos con metales como el potasio, el cobre y el hierro, de tal forma que el suministro de estos minerales queda garantizado (Schatz, 1962; Syers e Iskander, 1973; Jones, 1988).
5. Resultan tóxicos para numerosos insectos, caracoles y nemátodos, por lo que los protegen de estos depredadores naturales (Lawrey, 1986, 1989; Ahad *et al.*, 1991)
6. Algunos son excretados a la médula de los líquenes, proporcionándoles propiedades hidrófobas. De esta manera previenen el ahogamiento de sus tejidos y permiten un intercambio continuo de gas con la atmósfera (Armaleo, 1993).

Por otra parte, muchos de estos organismos gozan de prestigio en la medicina tradicional de muchas regiones del mundo (Huneck, 1999; Pieroni, 2000). Así, los extractos preparados a partir de diversas especies de líquenes se emplean para el tratamiento de diferentes padecimientos, entre los que destacan las afecciones renales (González-Tejero *et al.*, 1995), la bronquitis y enfermedades inflamatorias (Saklani y Upreti, 1992).

La amplia gama de actividades biológicas que se les han atribuido a los líquenes y a sus productos ha despertado el interés de muchos científicos, mismos que se han avocado a la investigación de estos organismos, con el propósito de obtener productos naturales biodinámicos de importancia médica y agrícola. Estas investigaciones han confirmado que muchos de los metabolitos producidos por líquenes actúan como agentes antibióticos, antivirales, antitumorales, analgésicos, antipiréticos, antiinflamatorios, antiherbívoros, alelopáticos y como inhibidores enzimáticos (Dalvi *et al.*, 1972; Huneck y Schreiber, 1972; Broadbent *et al.*, 1975; Sankawa *et al.*, 1982; Lawrey, 1983, 1986, 1989; Shibuya *et al.*, 1983; Raju *et al.*, 1985; Nishitoba *et al.*, 1987; Steffens y Robeson, 1987; Wood *et al.*, 1990; Ahad *et al.*, 1991; Bironaite *et al.*, 1991; Conover *et al.*, 1992; Emmerich *et al.*, 1993; Endo *et al.*, 1994; Giez *et al.*, 1994; Gollapudi, 1994; Ingolfssdottir *et al.*, 1995; Pengsuparp *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 1996; König y Wright, 1999; Huneck, 1999; *inter alia*).



## 2. Antecedentes

En lo que se refiere a la actividad antiviral y antibiótica de estos compuestos, los resultados de diversos estudios, incluyendo algunos a nivel clínico, indican que muchos de ellos son muy activos contra un amplio rango de microorganismos, especialmente contra bacterias Gram positivas y contra diversas especies de hongos (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Metabolitos de líquenes con actividad antiviral y antibiótica.

Compuesto	Referencia
Ácido (+)-protoliqueterínico (21)	Ingolfssdottir <i>et al.</i> , 1995
Ácido (+)-úsrico (32) y compuestos relacionados	Conover <i>et al.</i> , 1992; Lawrey, 1989; Yamamoto <i>et al.</i> , 1995; König y Wright, 1999.
Derivados del ácido pulvínico (34)	Huneck, 1999.
Emodina (36)	Wood <i>et al.</i> , 1990; Cohen <i>et al.</i> , 1996
7-Cloroemodina (37)	
7-Cloro-1-O-metilemodina (38)	
5,7-Dicloroemodina (39)	Huneck, 1999.
Argopsina (41)	
Panarina (42)	
Fisciión (43)	
Ácido evérnico (44)	Lawrey, 1989; Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
Hematomato de metilo (46)	Huneck, 1999.
Orselinato de etilo (49)	
Orselinato de metilo (50)	
$\beta$ -orcinol carboxilato de metilo (54)	
Ácido difractaico (55)	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995.
Norliquexantona (56)	Broadbent <i>et al.</i> , 1975.
Ácido barbático (57)	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995.
Ácido 4-O-desmetil barbático (58)	
Derivados del ácido leprapínico (79)	Raju <i>et al.</i> , 1985.
Alectosarmentina (80)	Gollapudi, 1994.
Zeorina (82)	König y Wright, 1999.

Otros metabolitos liquénicos poseen una actividad antitumoral significativa, destacándose los ácidos girofórico (22), úsrico (32), difractaico (55) y liqueterínico (83) [Yamamoto *et al.*, 1995; Kumar y Müller, 1999a; Correché *et al.*, 1998] y diversos polisacáridos, principalmente glucanos de los tipos pustulano (84) y

liquenano (85) [Lawrey, 1986]. Un grupo más reducido actúa como inhibidores enzimáticos (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Metabolitos de líquenes que actúan como inhibidores enzimáticos

Compuesto	Enzima inhibida	Referencia
Atranorina (20)	Tripsinasa Fosforilasa	Huneck, 1999
Ácido (+)-protoliquesterínico (21)	Transcriptasa reversa del VIH 5-Lipoxigenasa	Pengsuparp <i>et al</i> , 1995 Huneck, 1999
Crisofanol (40)	Glutación reductasa	Bironaite <i>et al</i> , 1991
Ácido baeomicésico (59)	5-Lipoxigenasa	Huneck, 1999
Ácido confluéntico (60)	Monoaminoxidasa B	Endo <i>et al</i> , 1994
Ácido 2'-O-metilperlatólico (61)	Monoaminoxidasa B	Endo <i>et al</i> , 1994
Ácido 4-O-metilcriptoclorofaeico (62)	Prostaglandinsintetasa	Sankawa <i>et al</i> , 1982 Shibuya <i>et al</i> , 1983
Ácido vulpínico (78)	Fosforilasa	Huneck, 1999

Entre los compuestos con propiedades analgésicas y antipiréticas se encuentran los ácidos úsnico (32) y difractaico (55) [Okuyama *et al.*, 1995], y entre los que actúan como agentes antiinflamatorios destacan la atranorina (20) y los ácidos (+)-protoliquesterínico (21) y difractaico (55) [Kumar y Müller, 1999b]

Así mismo, numerosas observaciones de campo han permitido determinar que, en términos generales, los líquenes no son consumidos por herbívoros, por lo que se ha sugerido que los productos derivados de los mismos actúan como un mecanismo de defensa. En este sentido, la evaluación biológica de compuestos tales como la atranorina (20) y el ácido vulpínico (78), han permitido confirmar esta hipótesis (Cuadro 5).

Con relación a la actividad fitotóxica, numerosos metabolitos aislados a partir de líquenes son capaces de inhibir la germinación de semillas de plantas vasculares, así como la germinación de esporas de musgos y de otras especies de líquenes (Cuadro 6). Todo ello sugiere que estos organismos constituyen una alternativa muy importante para la obtención de metabolitos con actividad alelopática

## 2. Antecedentes

**Cuadro 5.** Metabolitos de líquenes tóxicos para herbívoros.

Compuesto	Referencia
Atranorina (20)	Lawrey, 1983, 1986, 1989; Ahad <i>et al.</i> , 1991; Giez <i>et al.</i> , 1994; Emmerich <i>et al.</i> , 1993
Ácido fumarprotocetrárico (29)	
Ácido úsnico (32)	
Parietina (33)	
Ácido pulvínico (34)	
Ácido evérnico (44)	
Hematomato de etilo (47)	
5-Clorohematomato de etilo (48)	
$\beta$ -Orcinolcarboxilato de metilo (54)	
Ácido (-)-caperático (63)	
Calicina (64)	
Ácido psorómico (65)	
Ácido fisódico (66)	
Ácido 3-hidroxifisódico (67)	
Ácido estíctico (68)	
Ácido norestictico (69)	
Ácido salazínico (70)	
Ácido rizocárpico (71)	
Ácido vulpinico (78)	

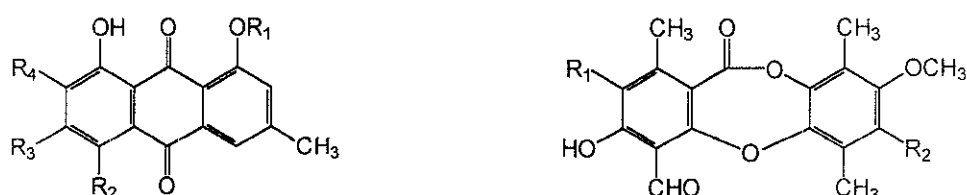
**Cuadro 6.** Metabolitos de líquenes reguladores del crecimiento de plantas superiores.

Compuesto	Actividad	Referencia
Ácido fumarprotocetrárico (29)	Fitotoxina	Lawrey, 1986
Ácido rodocladónico (30)	Inhibición de la mitosis en raíces de <i>Allium cepa</i>	Huneck, 1999
Ácido (-)-úsnico (32)	Inhibición de la germinación y del crecimiento de <i>Lepidium sativum</i>	Huneck, 1999
Ácido (+)-úsnico (32)	Inhibición de la germinación y del crecimiento de <i>Phaseolus mungo</i> y de <i>Triticum aestivum</i>	Dalvi <i>et al.</i> , 1972
Parietina (33)	Inhibición de la mitosis en raíces de <i>Allium cepa</i>	Huneck, 1999
Ácido evérnico (44)	Inhibición del crecimiento de semillas de <i>Lactuca sativa</i> Disminución del contenido de clorofila en hojas de <i>Spinacea oleracea</i>	Nishitoba <i>et al.</i> , 1987 Huneck, 1999
Ácido lecanórico (45)	Inhibición del crecimiento de semillas de <i>Lactuca sativa</i> Producción de anomalías en las raíces de <i>Allium cepa</i>	Nishitoba <i>et al.</i> , 1987 Huneck, 1999

**Cuadro 6.** Metabolitos de líquenes reguladores del crecimiento de plantas superiores (continuación).

Compuesto	Actividad	Referencia
Ácido orselínico (51)	Inhibición del crecimiento de semillas de <i>Lactuca sativa</i>	Nishitoba <i>et al</i> , 1987
Ácido dicloroorselínico (52)	Fitotoxina	Lawrey, 1986.
Ácido $\beta$ -orcínicarboxílico (53) Ácido difractaico (55) Ácido barbático (57) Ácido 4-O-desmetilbarbático (58)	Inhibición del crecimiento de semillas de <i>Lactuca sativa</i>	Nishitoba <i>et al</i> , 1987
Ácido psorómico (65) Ácido estíctico (68) Ácido rizocárpico (71) Ácido (-)-isouónico (72) Ácido rocélico (73) Ácido virénsico (74) Ácido $\alpha$ -colatólico (75) Ácido tiofánico (76)	Fitotoxina	Lawrey, 1986
Ácido secalónico A (77)	Fitotoxina	Steffens y Robeson, 1987
Ácido vulpínico (78) Ácido leprapínico (79)	Fitotoxina	Lawrey, 1986
Ácido leprárico (81)	Inhibición del crecimiento de semillas de <i>Avena fatua</i> , <i>Pisum sativum</i> y <i>Phaseolus vulgaris</i> .	Huneck y Schreiber, 1972.

En la Figura 3 se muestran las estructuras de los compuestos bioactivos mencionados en los Cuadros 3-6.



36:  $R_1 = R_2 = R_4 = H$ ;  $R_3 = OH$

37:  $R_1 = R_2 = H$ ;  $R_3 = OH$ ;  $R_4 = Cl$

38:  $R_1 = CH_3$ ;  $R_2 = H$ ;  $R_3 = OH$ ;  $R_4 = Cl$

39:  $R_1 = H$ ;  $R_2 = R_4 = Cl$ ;  $R_3 = OH$

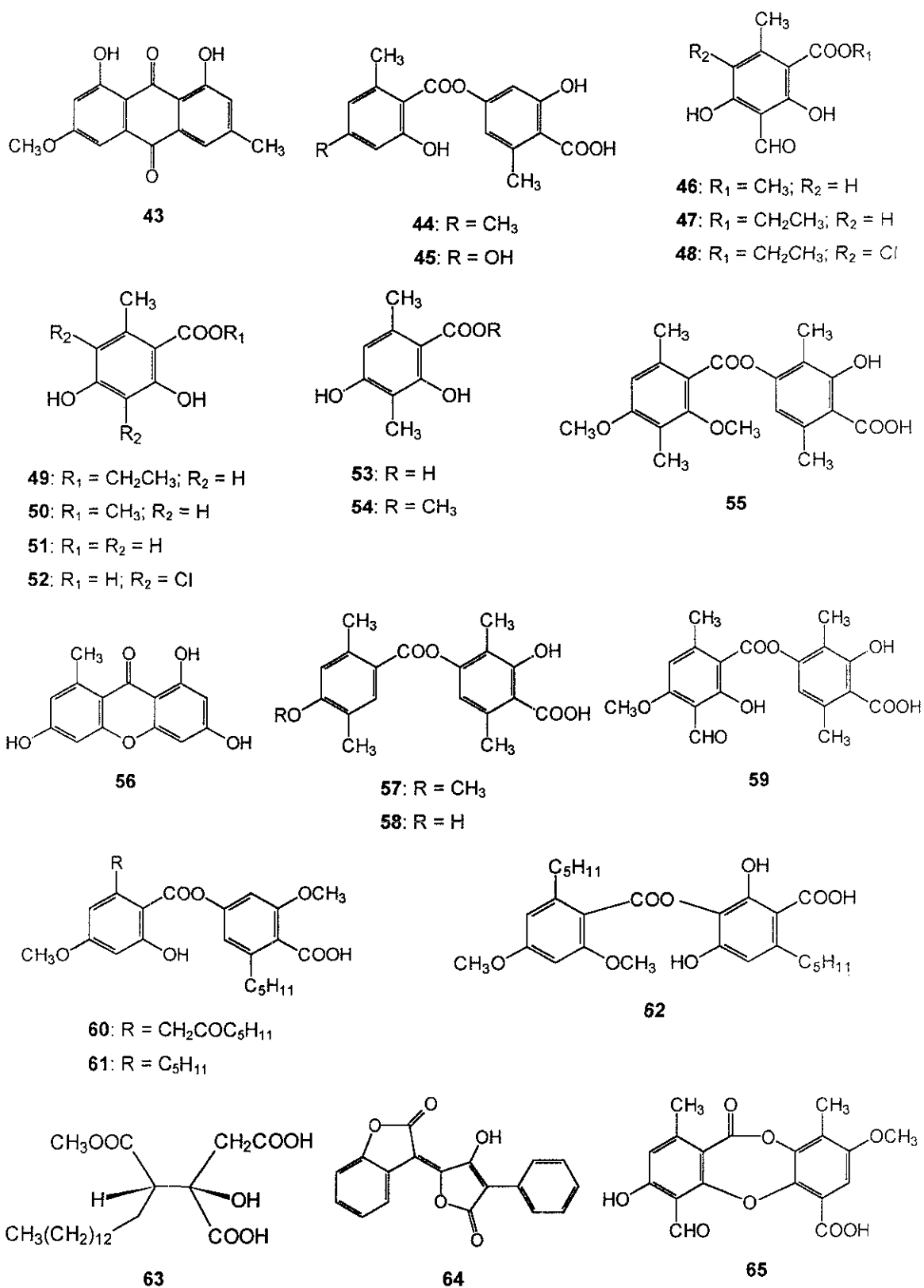
40:  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$

41:  $R_1 = R_2 = Cl$

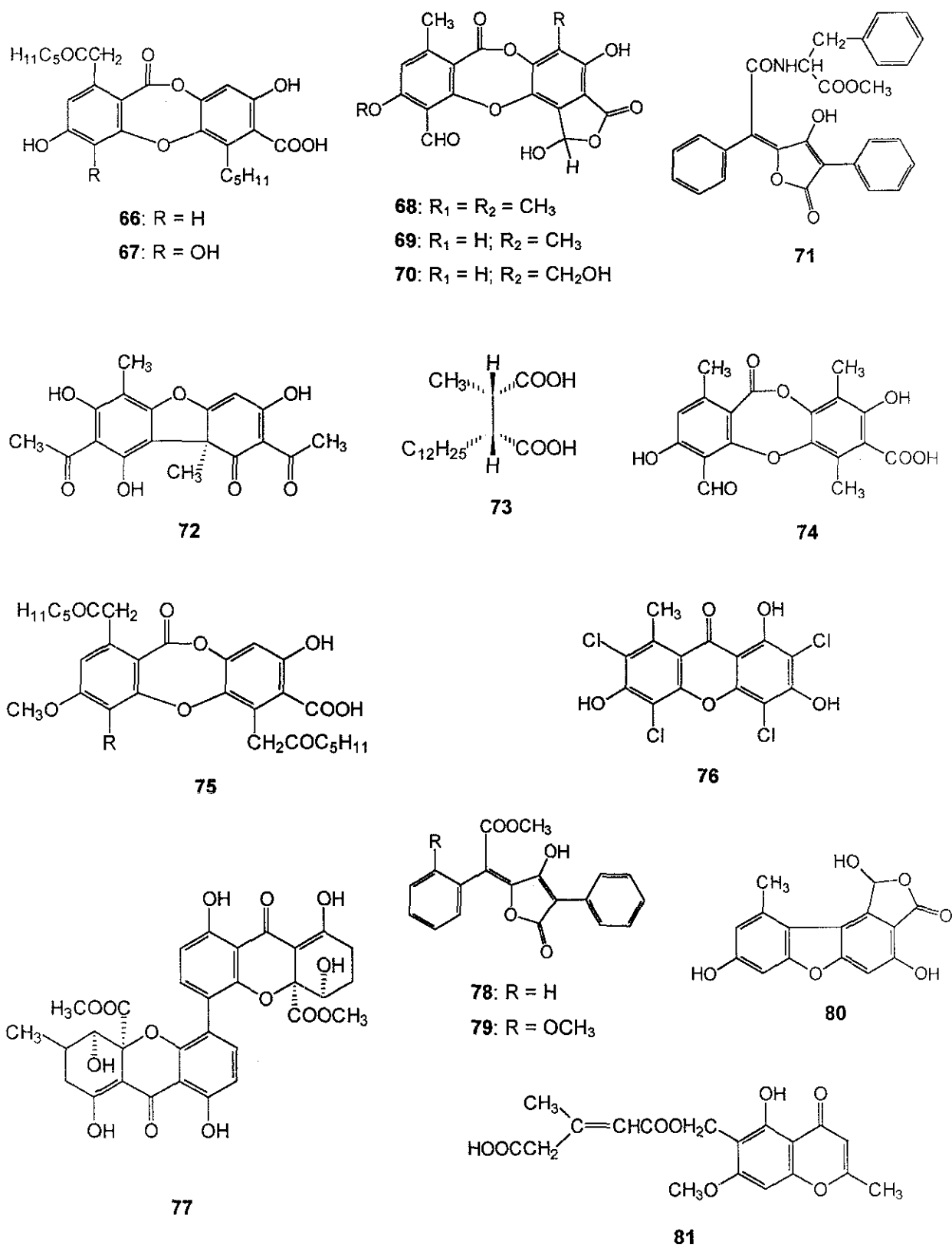
42:  $R_1 = Cl$ ;  $R_2 = H$

▲ **Figura 3.** Metabolitos secundarios bioactivos aislados de líquenes.

2. Antecedentes

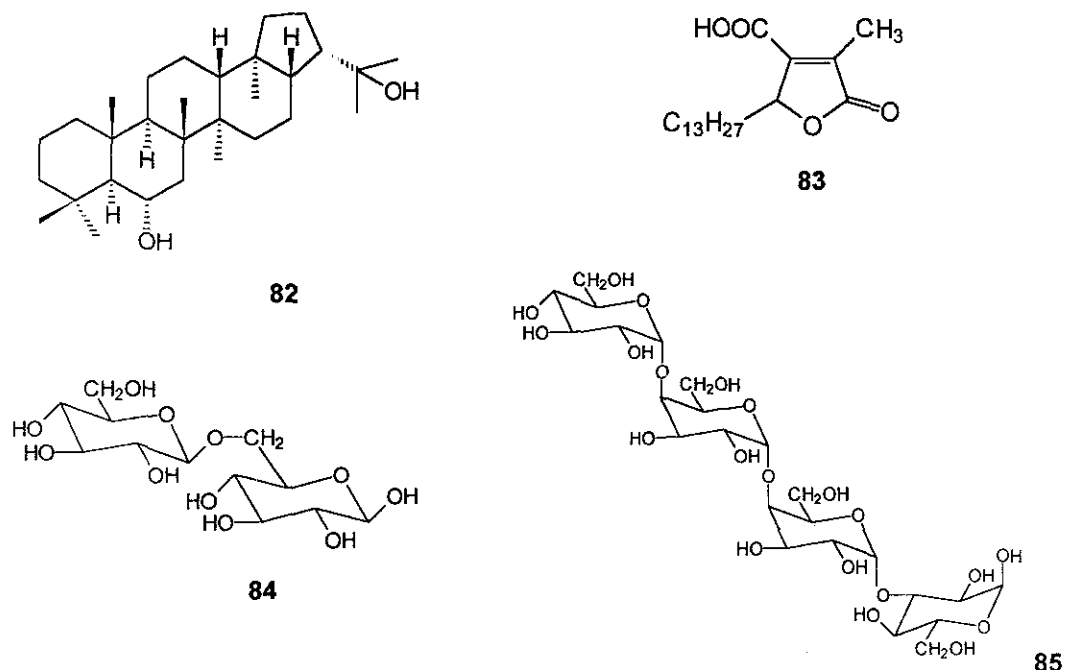


▲ **Figura 3.** Metabolitos secundarios bioactivos aislados de líquenes (continuación).



▲ **Figura 3.** Metabolitos secundarios bioactivos aislados de líquenes (continuación)

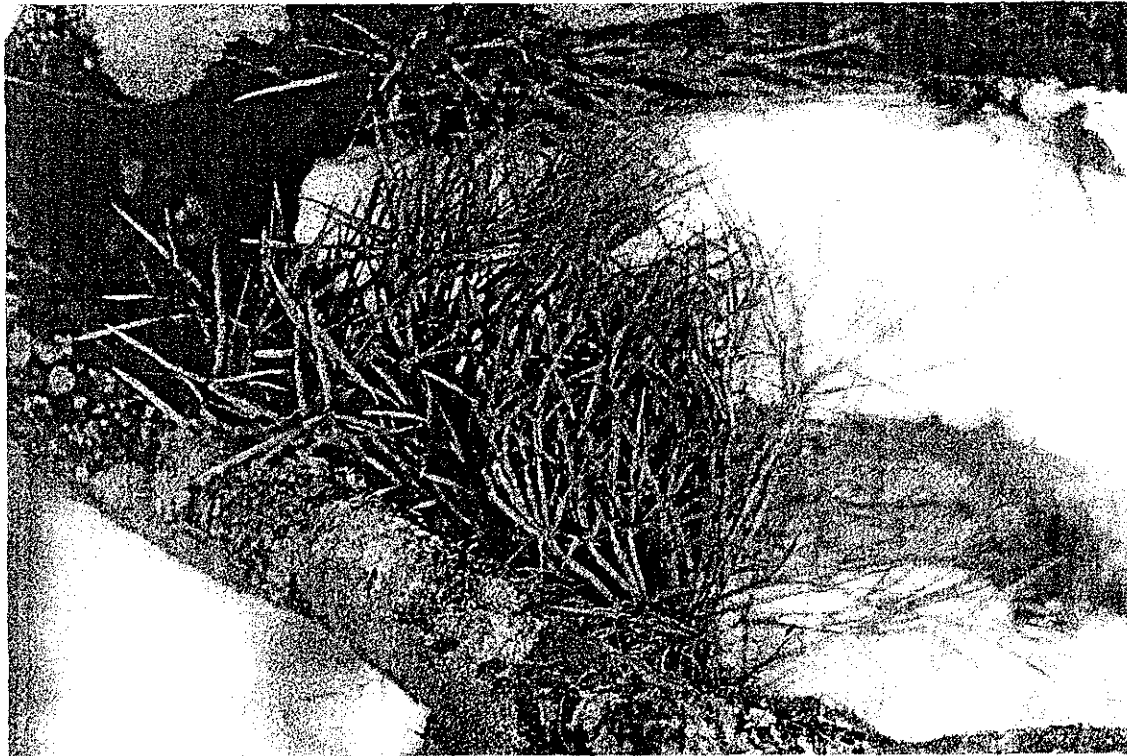
## 2. Antecedentes



▲ **Figura 3.** Metabolitos secundarios bioactivos aislados de líquenes (continuación)

El género *Parmotrema* (sinonimia: *Parmelia*), perteneciente a la familia Parmeliaceae, comprende 800 especies aproximadamente. La familia Parmeliaceae se encuentra incluida en el orden de los Lecanorales y está constituida por cuatro géneros principales: *Parmotrema*, *Pseudevernia*, *Cetraria* y *Candelaria*. Los líquenes de esta familia se caracterizan por presentar talos foliosos o subfruticulosos, comprimidos, más o menos lobulados y con apotecios redondos, generalmente sésiles y en ocasiones algo pedicelados. Tienen como ficobiontes algas de los géneros *Protococcus* y *Trebouxia* (Herrera y Ulloa, 1990).

*Parmotrema tinctorum* (Figura 4) es un líquen folioso, lobulado; se encuentra distribuido ampliamente en varias regiones del mundo, tanto en zonas tropicales, como en templadas y en árticas, en las que se desarrolla sobre cortezas de árboles y sobre piedras (Jayaprakasha *et al.*, 1998; Herrera y Ulloa, 1990). Los estudios químicos que se han realizado sobre esta especie han conducido al aislamiento de diversos metabolitos secundarios, entre los que se encuentran dépsidos, tridépsidos, dibenzofuranos y 2,4-dihidroxibenzoatos (Cuadro 7, Figura 5).



a



b

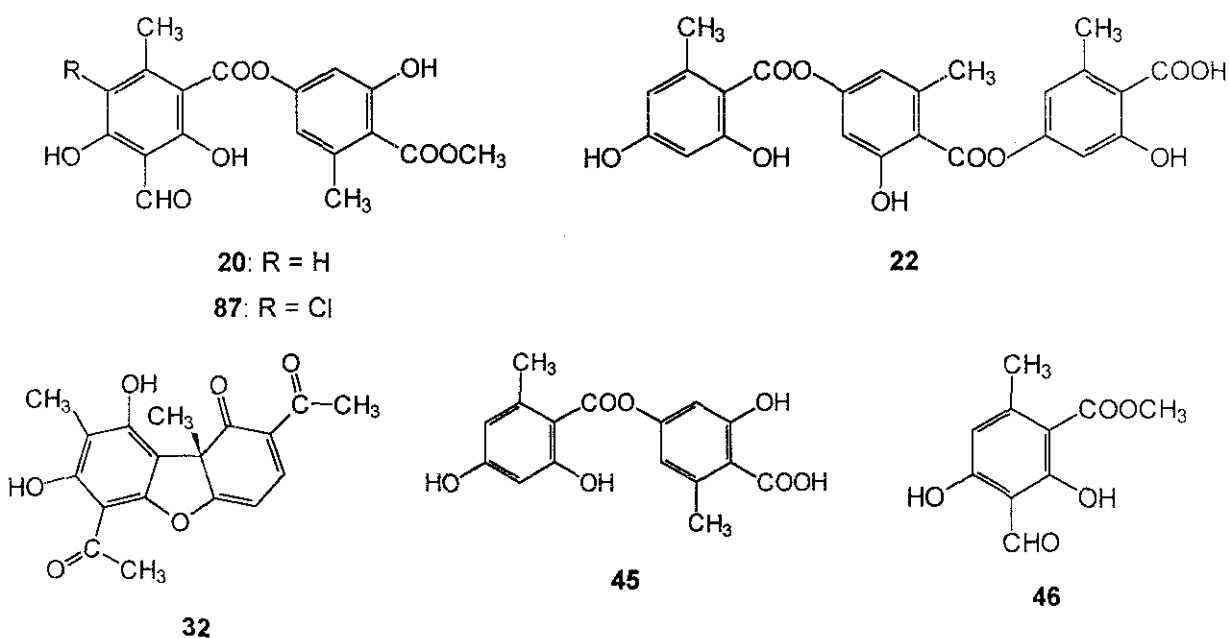
Figura 4. a) *Parmotrema tinctorum* Nyl (Hale); b) Amplificación de los apotecios de *P tinctorum*



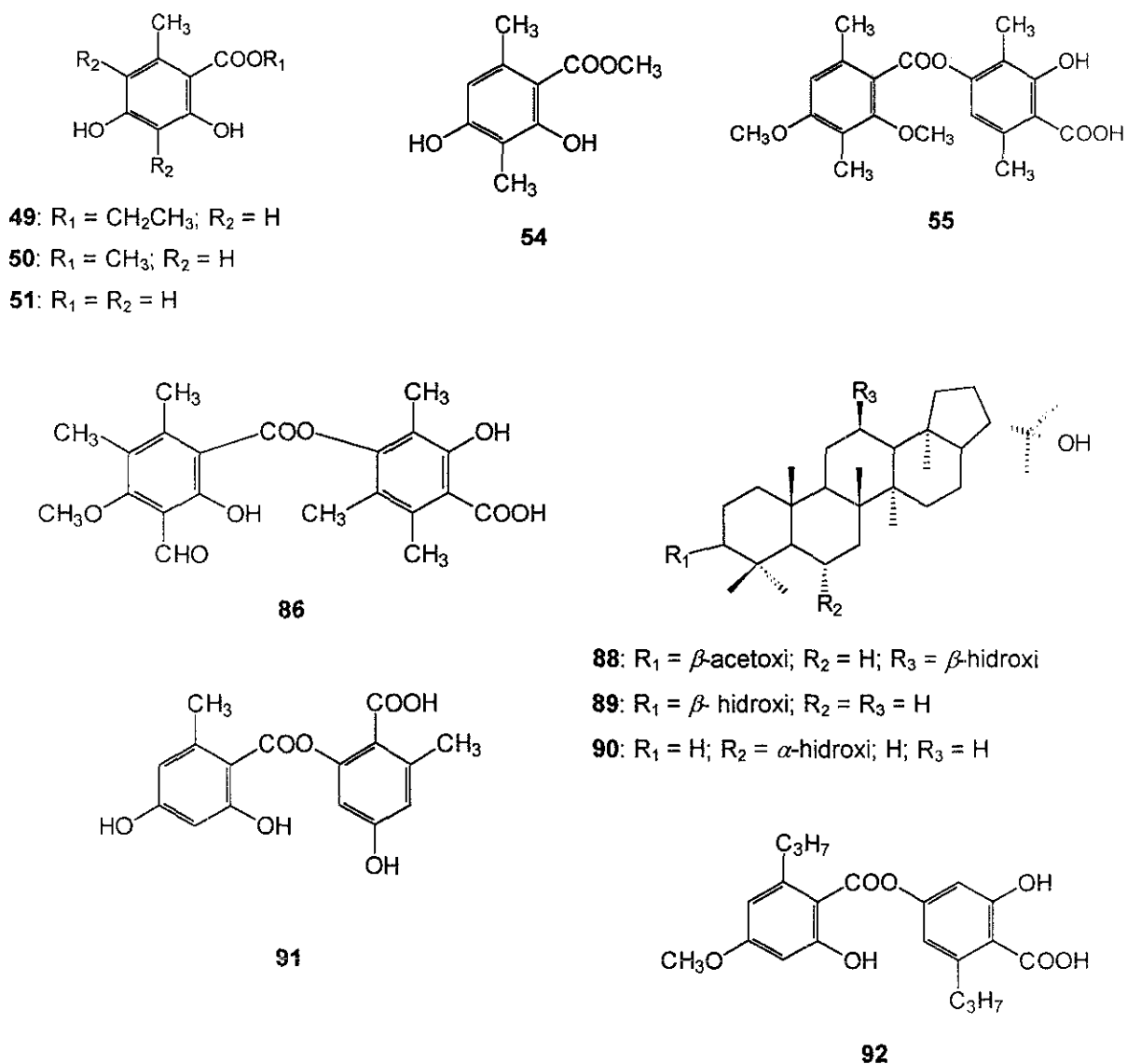
## 2. Antecedentes

### Cuadro 7. Metabolitos aislados de la especie *Parmotrema tinctorum* Nyl. (Hale).

Compuesto	Referencia
Atranorina (20) Ácido lecanórico (45) Orselinato de metilo (50) Ácido orselínico (51)	Jayaprakasha <i>et al.</i> , 1998; Banskota <i>et al.</i> , 1996;
Ácido girofórico (22) Ácido (+)-úsnicico (32) Ácido difractaico (55)	Kumar y Müller, 1999a; Banskota <i>et al.</i> , 1996.
Orselinato de etilo (49) $\beta$ -Orcinol carboxilato de metilo (54) Ácido dimetilbaeomicésico (86) Cloroatranorina (87)	Banskota <i>et al.</i> , 1996.
3 $\beta$ -Acetoxi- 12 $\beta$ , 22-dihidroxihopano (88) 3 $\beta$ -22-Dihidroxihopano (89) 6 $\alpha$ -22-Dihidroxihopano (zeorina) (90) Ácido isolecanórico (91)	Sakurai, y Goto, 1987.
Hematomato de metilo (46) Ácido divaricático (92)	Ding <i>et al.</i> , 1990



▲ Figura 5. Metabolitos secundarios aislados de la especie *Parmotrema tinctorum*.



▲ **Figura 5.** Metabolitos secundarios aislados de la especie *Parmotrema tinctorum* (continuación).

Como se indicó en la sección anterior, varios de los metabolitos incluidos en el Cuadro 7 han demostrado diversas propiedades biológicas, entre las que destacan la antiproliferativa, la citotóxica (Kumar y Müller, 1999a) y la fitotóxica (Romagni *et al*, 2000). Con relación a esta última actividad, cabe señalar que el ácido (+)-úsico (32) ha sido objeto de diversas investigaciones. Así, en la literatura se encuentran descritos estudios referentes a los posibles mecanismos por los cuales este dibenzofurano ejerce su potente acción fitoinhibidora y que comprenden la investigación de su efecto sobre el

## 2. Antecedentes

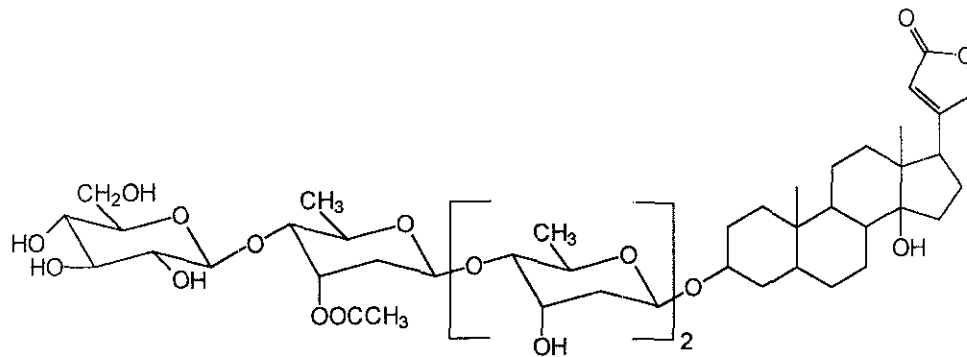
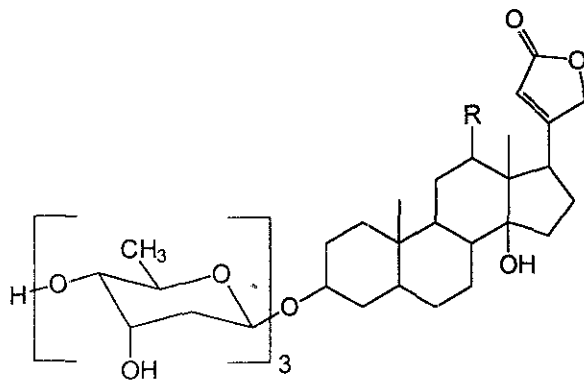
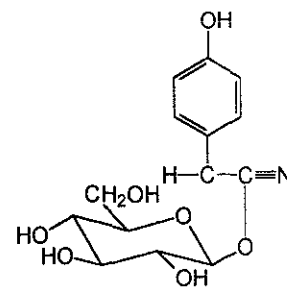
fotosistema II, la transpiración, la liberación de oxígeno y sobre la enzima *para*-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa de plantas superiores (Inoue *et al.*, 1987; Lasceve y Gaugain, 1990; Romagni *et al.*, 2000).

### 2.2 Antecedentes sobre *Leucophyllum ambiguum* Humb. & Bonpl.

El género *Leucophyllum* pertenece a la familia Scrophulariaceae, la cual está constituida por 220 géneros y unas 3,000 especies. Los individuos de esta familia, en general, son plantas herbáceas anuales o perennes. Entre los géneros principales se encuentran *Picrorhiza*, *Stemodia*, *Verbascum*, *Calceolaria*, *Linaria*, *Antirrhinum*, *Scrophularia*, *Penstemon*, *Mimulus*, *Gratiola*, *Veronica*, *Digitalis*, *Isoplexis*, *Melampyrum*, *Euphrasia*, *Barsia*, *Pedicularis*, *Rhinanthus*, *Odontitis*, *Chaenorrhinum*, *Bacopa*, *Gratiola* y *Leucophyllum* (Trease, 1998). Numerosas especies correspondientes a estos géneros son utilizadas ampliamente en la medicina tradicional de diversas partes del mundo para el tratamiento de diferentes padecimientos, entre los que destacan las enfermedades relacionadas con el sistema inmune, la inflamación, la influenza, la laringofaringitis, la fiebre, las infecciones de herpes, el cáncer, las afecciones cardíacas, la osteítis necrótica, la artritis reumatoide, la hepatitis, la hiperlipemia, la hipercolesterolemia y la diuresis (Sweeney *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1999, 2000; Kim y Kim, 2000; Su *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999; Mahato *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000; Smit *et al.*, 2000; Bao-Ning *et al.*, 1997; *inter alia*) y, aunque son escasas las investigaciones referentes a la actividad biológica de las especies consideradas como medicinales, algunos estudios han comprobado la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora de los extractos orgánicos de especies como *Picrorhiza scrophulariiflora* y *Stemodia grossa* (Smit *et al.*, 2000; Sweeney *et al.*, 2001).

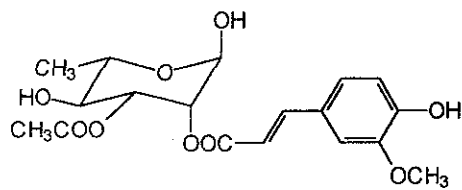
Las clases estructurales principales a las que pertenecen los productos naturales obtenidos a partir de las especies de la familia Scrophulariaceae, incluyen los heterósidos cardíacos del tipo de los cardenólidos presentes en las especies *Digitalis* e *Isoplexis* (93, 94, 95), los heterósidos cianogénéticos (96) de *Linaria*, los glicósidos de fenilpropanoides (97) y de feniletanoides (98) de *Scrophularia* y *Brandisia*, y los

lignan de *Leucophyllum* (**99**, **100**, **101**) [Trease, 1998; Tomás-Barberán *et al.*, 1988; Grayer *et al.*, 1999]. Entre estos metabolitos destacan los cardenólidos lanatósido C (**93**) y digoxina (**94**) obtenidos de *D. lanata*, por su amplio uso en el tratamiento de enfermedades cardiacas (Castro *et al.*, 1997). Otros productos importantes son el ningpósido A (**97**) y el brandiósido (**98**), los cuales poseen notables propiedades farmacológicas, entre las que se encuentran la actividad antioxidante, la antiviral y la inhibición de la agregación plaquetaria y de la síntesis de LTB<sub>4</sub> (He *et al.*, 2000; Li *et al.* 2000) [Figura 6].

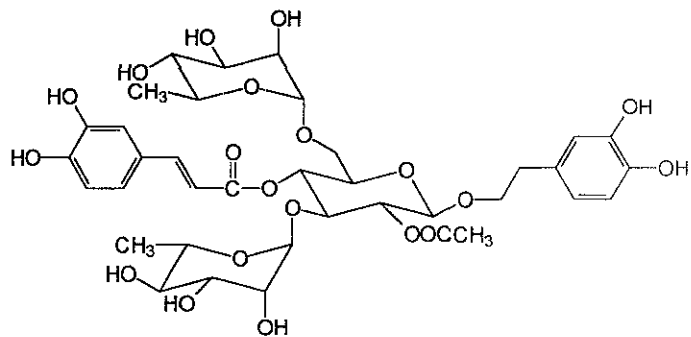
Lanatósido C (**93**)**Heterósido cardiaco**Digoxina (**94**): R = OHDigitoxina (**95**): R = H**Heterósidos cardíacos**Dhurrina (**96**)**Heterósido cianogenético**

▲ **Figura 6.** Ejemplos de las categorías principales de metabolitos secundarios biosintetizados por especies de la familia Scrophulariaceae.

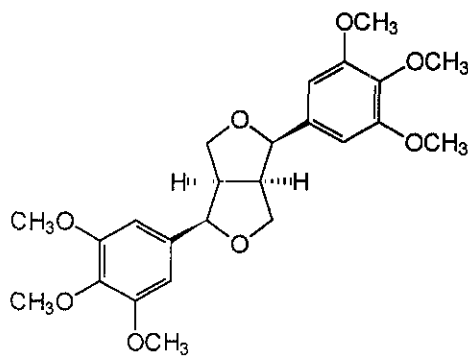
## 2. Antecedentes



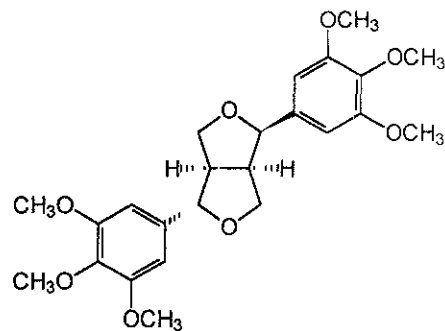
Ningpósido A (97)  
Glicósido de ferilpropanoide



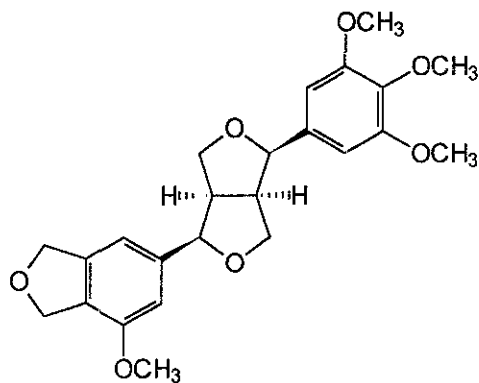
Brandiósido (98)  
Glicósido de feriletanoide



Diayangambina (99)  
Lignano



Epiyangambina (100)  
Lignano



Diasartermina (101)  
Lignano

▲ **Figura 6.** Ejemplos de las categorías principales de metabolitos secundarios biosintetizados por especies de la familia Scrophulariaceae (continuación).

Con relación al género *Leucophyllum*, éste está constituido por las especies *L. ambiguum*, *L. texanum*, *L. minus*, *L. pringlei*, *L. laevigatum* y *L. frutescens*, las cuales se distribuyen principalmente en las zonas áridas del Norte de México (Domínguez y Raigosa, 1969; Rzedowski, 1978).

La especie *Leucophyllum ambiguum* Humb. & Bonpl. es un arbusto perennifolio, con hojas cubiertas de pubescencia lanosa blanca. Generalmente se encuentra formando parte de matorrales xerófilos que se localizan a lo largo de la Sierra Madre Oriental, desde Nuevo León hasta Hidalgo, extendiéndose un poco hacia la Planicie Costera Nororiental y hacia el Altiplano (Rzedowski, 1978). Se conoce popularmente con los nombres de *Cenizo de Monterrey*, *chamizo* y *raguno* (Rzedowski, 1978; Díaz, 1976; Argueta, 1994) y es utilizada en la medicina tradicional de Michoacán y de San Luis Potosí para el tratamiento de enfermedades hepáticas y vesiculares (Paredes, 1984).

Desde los puntos de vista químico y biológico, esta especie no ha sido objeto de estudio alguno. Sin embargo, a partir de otra especie del género, *L. frutescens* Berl., se han aislado a los lignanos diayangambina (99), epiyangambina (100) y diasesartemina (101) [Figura 6], los cuales han demostrado una actividad fitotóxica significativa (Rimando *et al.*, 1999), constituyendo esta información un antecedente importante para considerar a la especie *L. ambiguum* como una posible fuente de principios fitotóxicos.

### 2.3 Agentes herbicidas como una parte integral de la agricultura moderna

Los herbicidas son elementos clave en la agricultura moderna, pues su uso garantiza altos rendimientos de manera continua en los cultivos de importancia económica. Tan sólo en 1995 el mercado global de esta clase de plaguicidas se encontró en el rango de los 25 billones de dólares y representaron el 61 % del total de los pesticidas utilizados, cifra que se incrementa de manera importante cada año (Richardson, 1998; Barnard *et al.*, 1997). Estos agentes, cuando son utilizados correctamente, pueden evitar pérdidas en las cosechas hasta de un 40 %; sin embargo, cuando se aplican incorrectamente o de forma excesiva, las consecuencias sobre el medio ambiente y la salud pública pueden ser fatales. La Organización de las Naciones

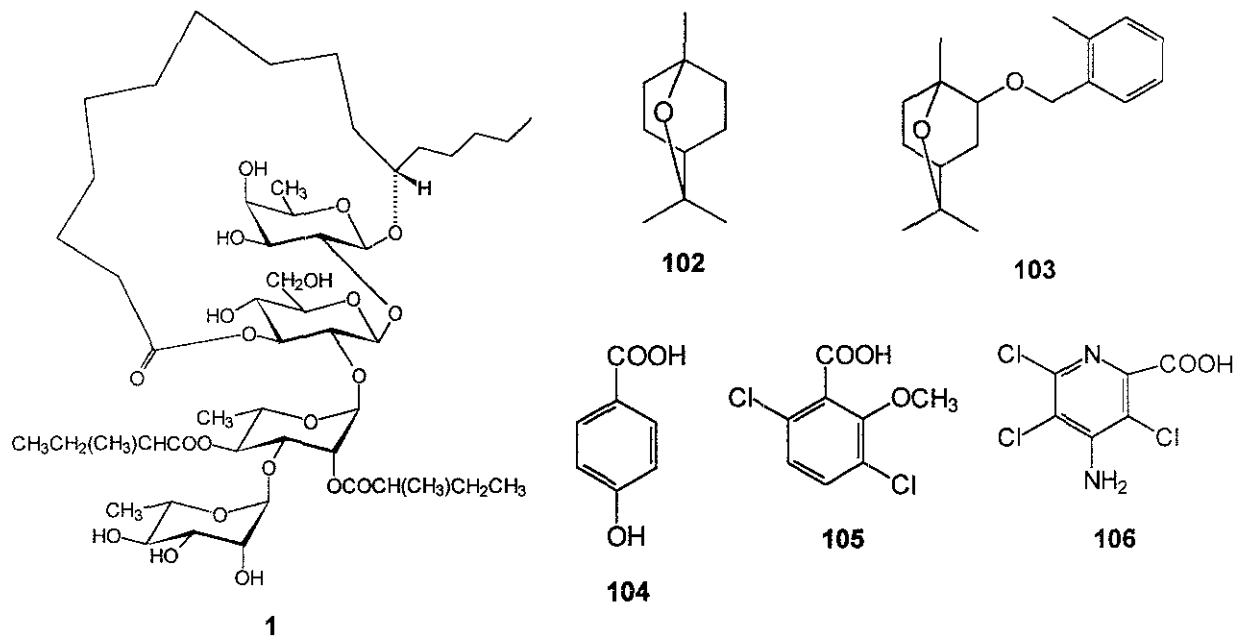
## 2. Antecedentes

Unidas (ONU) ha publicado una lista de sustancias químicas cuyo uso se encuentra prohibido o restringido debido al grave riesgo que representan y muchas de ellas corresponden a agentes herbicidas, de los cuales, la gran mayoría son productos sintéticos (Richardson, 1998). Entre los herbicidas sintéticos de mayor uso que ocasionan daños agudos y crónicos severos tanto en animales como en el hombre, se encuentran el ácido 2,4-diclorofenoxy acético (2,4-D), el dicamba, el linuron, la atrazina y la prometona. Algunas de estas sustancias han demostrado incluso propiedades carcinogénicas importantes (Barnard *et al.*, 1997). A esta problemática se suma el hecho de que varios herbicidas actualmente son considerados obsoletos por diversas razones, entre las que pueden mencionarse las prácticas inadecuadas en su manejo y almacenamiento, el pobre control en su disponibilidad, el hecho de que su utilización nunca fue necesaria debido a que las malezas previstas no se presentaron o a que ya no resultan efectivos para combatirlas. Además, estos herbicidas frecuentemente contienen isómeros o impurezas cuya toxicidad y persistencia son casi invariablemente más altas que la de los propios principios activos. La Organización de Agricultura y Alimentación ha identificado aproximadamente 11 000 toneladas de herbicidas obsoletos en cerca de 65 ciudades del mundo (Richardson, 1998).

La situación anterior ha conducido a los investigadores de todo el mundo a buscar nuevas alternativas que permitan proteger a los cultivos de importancia económica y que proporcionen mayores beneficios en todos los sentidos. A este respecto, el empleo de bioherbicidas, la rotación de cultivos, la eliminación manual y mecánica de las plantas no deseadas, la manipulación genética y la utilización de compuestos fitotóxicos alternos, constituyen una parte integral de la revolución tecnológica en la agricultura, pues han generado los mayores cambios en las técnicas de producción, variaciones en la aplicación de los pesticidas y un incremento en el rendimiento y en la productividad de los cultivos (Lax y Shepherd, 1988; Hoagland, 1990; Charudattan, 1990; Strobel *et al.*, 1991; Trujillo, 1994; Duke y Abbas, 1995; Macías, 1995; Uri, 1998; Cramer, 2000).

Con la finalidad de descubrir compuestos fitotóxicos alternos, en los últimos años se ha intensificado la investigación de los productos naturales, tanto de origen vegetal como microbiano, como una fuente potencial de agentes herbicidas. La literatura

científica describe numerosos compuestos que han generado un gran interés debido a sus propiedades fitotóxicas, a la variedad estructural que presentan y a los mecanismos de acción novedosos a través de los cuales muchos de ellos ejercen su actividad. Entre estos compuestos destacan la tricolorina A (**1**) [Anaya *et al.*, 1990; Pereda-Miranda *et al.*, 1993], el 1,8-cineol (**102**) [Grayson *et al.*, 1987; Worsham, 1989], el ácido *p*-hidroxibenzoico (**104**) [Putnam, 1988; Gerig y Blum, 1991], la juglona (**107**) [Duke y Lydon, 1987] y la sorgoleona (**108**) [Netzly *et al.*, 1988; Einhellig y Souza, 1992; Streibig *et al.*, 1999], todos ellos de origen vegetal. Así mismo, entre los productos de naturaleza microbiana más relevantes se encuentran la fosfinotricina (**109**) y la hidantocidina (**112**), aisladas de varias especies de actinomicetos [Bayer *et al.*, 1972; Nakajima *et al.*, 1991; Siehl *et al.*, 1996; Walters *et al.*, 1997], así como la tentoxina (**113**) y la matricina (**114**) obtenidas a partir de diferentes hongos fitopatógenos [Duke y Lydon, 1993; Boyette y Abbas, 1995; Cutler, 1988]. En la Figura 7 se indican las estructuras de estos compuestos.

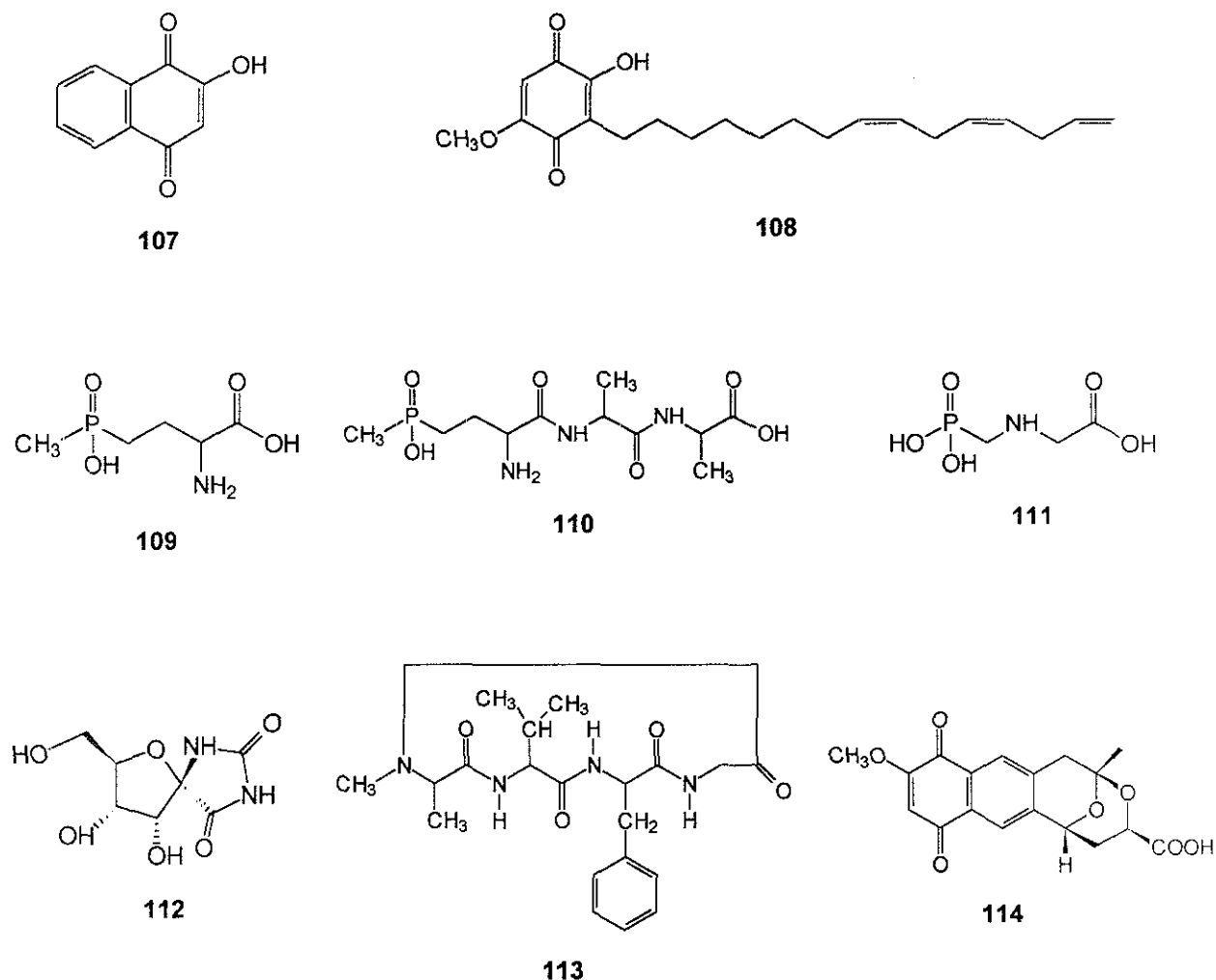


▲ **Figura 7.** Fitotoxinas de origen natural y algunos análogos sintéticos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## 2. Antecedentes



▲ **Figura 7.** Fitotoxinas de origen natural y algunos análogos sintéticos (continuación)

Además de la actividad fitotóxica intrínseca que presentan los productos mencionados, resulta especialmente importante el hecho de que muchos de ellos han sido utilizados como modelos para el desarrollo de nuevos herbicidas, generados a través de modificaciones químicas sencillas. Tal es el caso del ácido *p*-hidroxibenzoico (104), el cual es el prototipo de dos de los herbicidas y biorreguladores de mayor éxito utilizados en la agricultura: las auxinas dicamba (105) y picloram (106) [Grossmann, 2000] Así mismo, un derivado semisintético del 1,8-cineol (102), conocido como

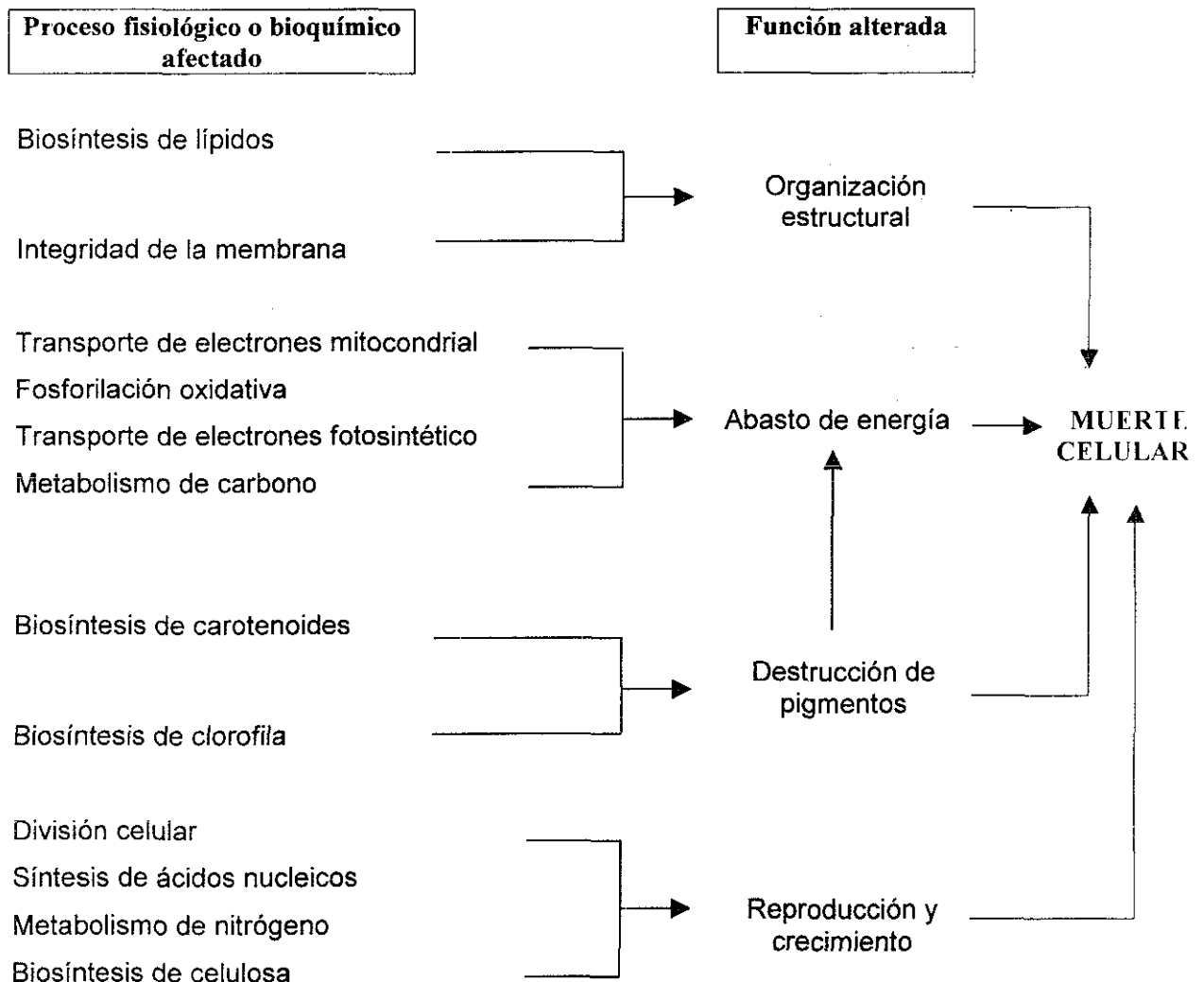
cinmetilino (103), ha sido considerado también para su síntesis y distribución comercial (Duke, 1991; Duke y Abbas, 1995). Por otro lado, el primer producto de origen microbiano empleado como herbicida comercial fue el bialafos (110) (HERBIACE®) sintetizado tomando como modelo a la fosfinotricina (109), una fitotoxina producida por *Streptomyces viridochromogenes* y *Streptomyces hygrosopicus* y que es estructuralmente similar al glifosato (111), uno de los herbicidas sintéticos de mayor demanda comercial. El bialafos es un herbicida de amplio espectro limitado al mercado japonés, en donde es utilizado en el tratamiento postemergente de las plantas nocivas que afectan los cultivos de arroz, trigo y frijol (Lea *et al.*, 1984; Tachibana y Kaneko 1986). Actualmente, la fosfinotricina se obtiene también a través de síntesis orgánica. Esta versión sintética es conocida como glufosinato y se comercializa con el nombre de BASTA® (Bayer *et al.*, 1972). La hidantocidina (112) también se sintetiza químicamente, aunque su rendimiento es relativamente bajo (40 %) [Früh *et al.*, 1996]. La tentoxina (113), un tetrapéptido cíclico producido por la especie *Alternaria alternata* y que se utiliza para controlar el crecimiento de varias plantas nocivas que crecen en los cultivos de maíz y de frijol de soya, ha sido considerada por varias industrias agroquímicas como un agente comercial. Sin embargo, este proceso se ha visto dificultado debido a que los rendimientos de la fitotoxina en el medio de fermentación son muy bajos y a que la complejidad de su estructura ha impedido el desarrollo de un método de síntesis eficiente (Duke y Lydon, 1993; Boyette y Abbas, 1995).

Sin embargo, aún cuando el mercado actual de productos biológicos se encuentra en pleno crecimiento y grandes compañías están comenzando a participar, la demanda es todavía muy pequeña, por lo que es poco probable que los productos naturales reemplacen a los pesticidas químicos convencionales en un futuro cercano. Para lograr un mayor avance en este sentido, es necesario que se incrementen los trabajos y las investigaciones al respecto, de manera que se descubran nuevos agentes pesticidas que actúen de manera selectiva y que presenten una toxicidad y una persistencia en el medio ambiente reducidas, de forma que éstos constituyan una verdadera alternativa para lograr el control de las plantas dañinas.

## 2. Antecedentes

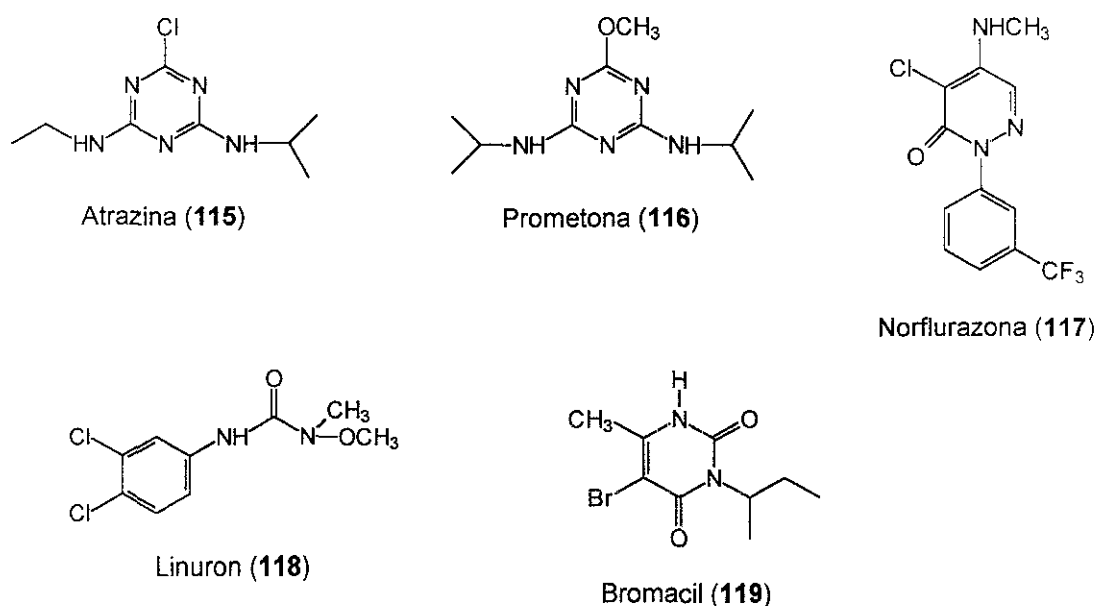
### 2.4 Mecanismos de acción de fitotoxinas naturales

Los productos naturales que poseen propiedades fitotóxicas pueden ejercer su acción a través de distintos mecanismos o mediante una combinación de ellos. Estos mecanismos incluyen la inhibición de la síntesis de aminoácidos, de proteínas, de lípidos, de clorofila o de carotenoides; la interferencia con la división celular, con el metabolismo energético o la alteración de la estructura de las membranas biológicas (Figura 8) [Hoagland, 1990; Gauvrit, 1992; Duke y Abbas, 1995; Einhellig, 1995; Copping y Hewitt, 1998].



▲ **Figura 8.** Mecanismos de acción de las fitotoxinas naturales.

De acuerdo a la información descrita en la literatura, más del 50 % de los herbicidas utilizados comercialmente, incluyendo a las atriazinas **115** y **116**, la piradiazina **117**, la fenilúrea **118** y el uracilo **119** (Figura 9), actúan principalmente inhibiendo alguna o varias de las etapas involucradas en la fotosíntesis, aunque estos compuestos pueden afectar también la integridad de la membrana celular (triazinas, piradiazinas y uracilos), el metabolismo de ácidos nucleicos, proteínas o lípidos (piradiazinas y fenilúreas) y la formación de porfirinas (triazinas y uracilos)



▲ **Figura 9.** Herbicidas sintéticos de uso comercial que inhiben el proceso fotosintético

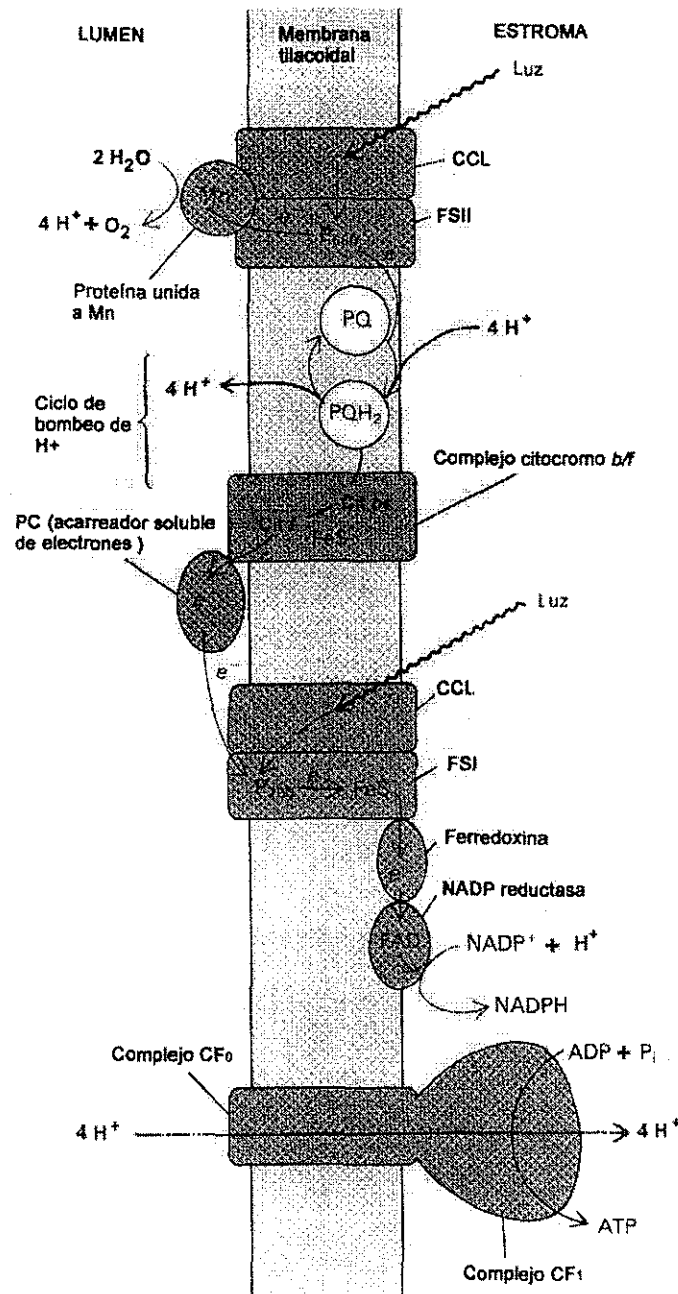
Considerando que varios de los compuestos aislados en el presente estudio mostraron una actividad importante sobre diversas actividades fotosintéticas, así como sobre la movilidad electroforética de la proteína reguladora calmodulina, a continuación se describen brevemente las etapas involucradas en la fotosíntesis en plantas superiores y la participación de la calmodulina en los eventos de germinación y de crecimiento vegetal.

## 2. Antecedentes

### 2.4.1 El proceso de la fotosíntesis

La fotosíntesis es un proceso fisicoquímico mediante el cual la energía de la luz solar es transformada en energía química que puede ser utilizada por los sistemas biológicos (Alberts *et al.*, 1989; Darnell *et al.*, 1990; Stryer, 1995; Barber, 1998; *inter alia*). Como resultado de este proceso, las plantas, las algas y ciertos tipos de bacterias, liberan oxígeno molecular a la atmósfera y sintetizan carbohidratos a partir del dióxido de carbono que toman de la misma.

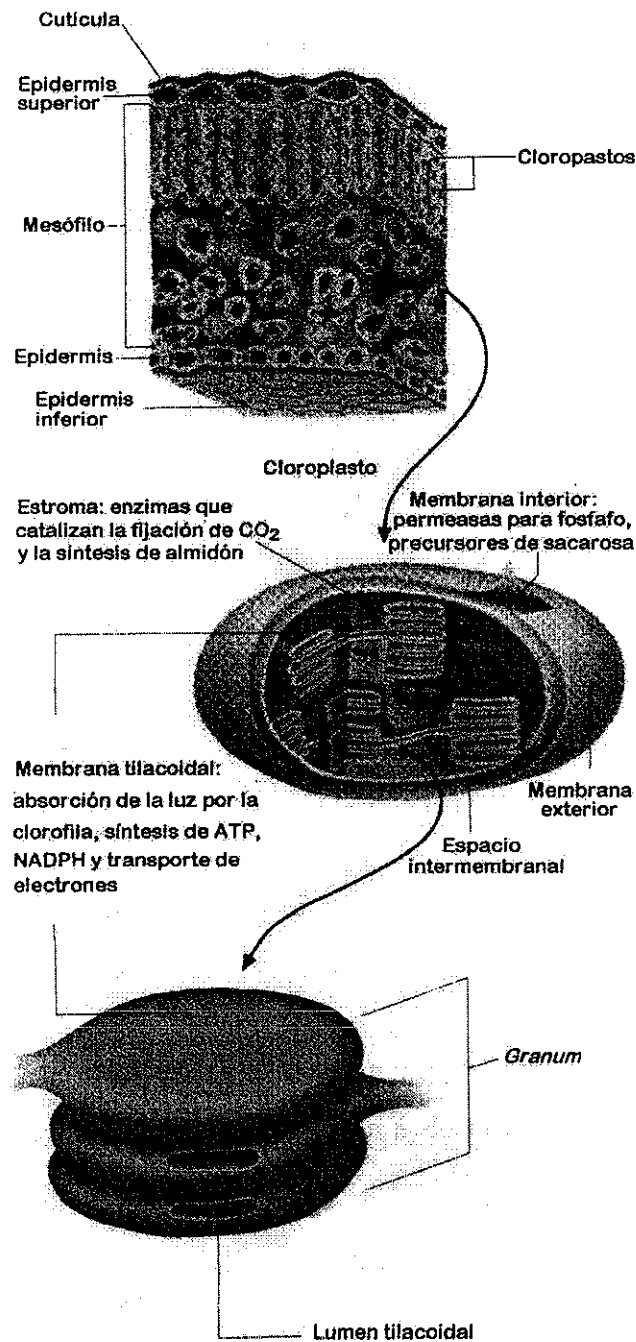
Las numerosas reacciones que ocurren durante la fotosíntesis pueden ser agrupadas en dos amplias categorías. (i) En las *reacciones de transferencia de electrones*, llamadas "reacciones luminosas", la energía de la luz solar excita un electrón en la *clorofila*, promoviendo su transferencia a través de una cadena de reacciones de oxidación en la *membrana tilacoidal* (Figura 10). Este proceso de transporte de electrones impulsa un flujo de protones a través de la membrana tilacoidal, generando un gradiente electroquímico que hace posible la síntesis de ATP en el *estroma* (Figuras 10 y 13). Al mismo tiempo, las reacciones de transferencia de electrones generan electrones de alta energía que convierten el  $NADP^+$  en  $NADPH$ ; en este proceso, el agua es oxidada para proporcionar los electrones donados al  $NADP^+$ , liberándose  $O_2$  (Figura 10). Estas reacciones se llevan a cabo en los *cloroplastos*, grandes organelos que se localizan principalmente en células especializadas de las hojas (Figura 11). (ii) En las *reacciones de fijación de carbono*, denominadas "reacciones oscuras", el ATP y el  $NADPH$ , producidos por las reacciones de transferencia de electrones, sirven como fuentes de energía y de poder reductor, respectivamente, para llevar a cabo la conversión del  $CO_2$  a carbohidratos. Estas reacciones, las cuales comienzan en el estroma del cloroplasto y continúan en el citosol, producen glucosa, almidón y sacarosa en las hojas de la planta, desde donde son transportadas a otros tejidos para ser utilizadas como una fuente de moléculas orgánicas y de energía para el crecimiento.



▲ **Figura 10.** Orientación de los principales componentes de la membrana tilacoidal involucrados en la fotosíntesis y la vía que siguen los electrones desde el H<sub>2</sub>O hasta el NADP

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2. Antecedentes



▲ **Figura 11.** Las diferentes reacciones de la fotosíntesis se llevan a cabo en distintas regiones del cloroplasto. Los cloroplastos están unidos por una doble membrana: la membrana exterior contiene poros que la hacen permeable a moléculas pequeñas ( $PM < 10\ 000$ ); la membrana interior constituye la barrera permeable de este organelo. La fotosíntesis se lleva a cabo en las membranas tilacoidales.

En las plantas verdes, la fotosíntesis involucra la interacción de dos sistemas diferentes de reacciones originadas por la energía luminosa. Uno de los sistemas, llamado *fotosistema I*, puede ser activado por luz de longitud de onda de 700 nm o menos; el otro sistema, llamado *fotosistema II*, requiere de luz de longitud de onda menor a 680 nm.

El fotosistema II está localizado principalmente en los *grana*, mientras que el fotosistema I se encuentra en las membranas tilacoidales no apiladas. Una tercera partícula multiproteica, el *complejo citocromo b/f*, es utilizada para transferir los electrones entre ambos fotosistemas. Este último complejo se encuentra en todas las regiones del cloroplasto.

La absorción de un fotón de luz de longitud de onda menor a 680 nm por el fotosistema II produce la excitación de una molécula de clorofila de este centro de reacción (Figura 10). A partir de esta clorofila excitada,  $P_{680}^*$ , se produce la separación de un electrón, originándose la forma oxidada  $P_{680}^+$ ; el exceso de carga positiva se deslocaliza en todos los átomos hemo así como en el ion  $Mg^{2+}$  central de la clorofila. Los electrones requeridos para reducir el centro de reacción  $P_{680}^+$  se obtienen a partir de dos moléculas de agua unidas fuertemente a una proteína que contiene un grupo de cuatro átomos de manganeso en su centro catalítico y que se encuentra en la superficie luminal del complejo  $P_{680}$ . Tan pronto como se extraen los electrones, la enzima libera  $O_2$ . Los electrones se transfieren desde el agua hasta el centro de reacción  $P_{680}^+$ , regenerándose la forma reducida de la clorofila. Los cuatro protones liberados del agua permanecen en el lumen tilacoidal.

El electrón separado de la molécula de clorofila excitada  $P_{680}^*$  se transporta en aproximadamente 3 ns a la *feofitina*, una porfirina idéntica a la clorofila *a*, pero sin magnesio. Este electrón va entonces desde la feofitina reducida a la plastoquinona  $Q_A$ , la cual se encuentra unida permanentemente a una proteína. El electrón de alta energía unido a  $Q_A$  es transferido subsecuentemente a una segunda quinona,  $Q_B$ , generando así un radical aniónico semiquinona  $Q^-$ . Esta especie reducida parcialmente permanece unida a  $Q_B$  hasta que recibe un segundo electrón de  $Q_A$ . Los electrones se transportan entonces a la superficie exterior de la membrana tilacoidal y se combinan con dos protones del espacio estromal y con una molécula de *plastoquinona* (PQ), para generar

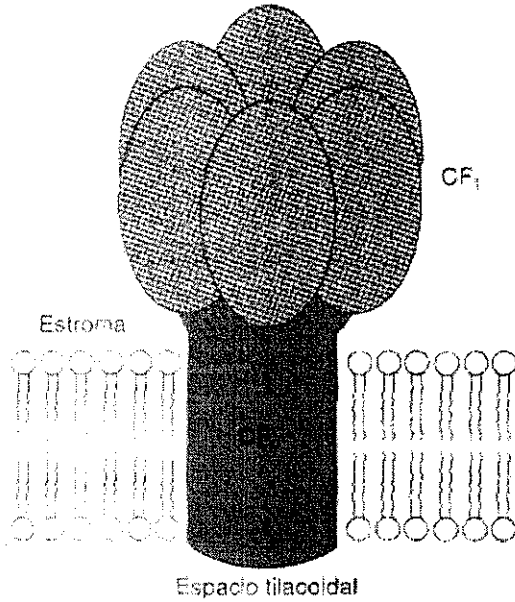


## 2. Antecedentes

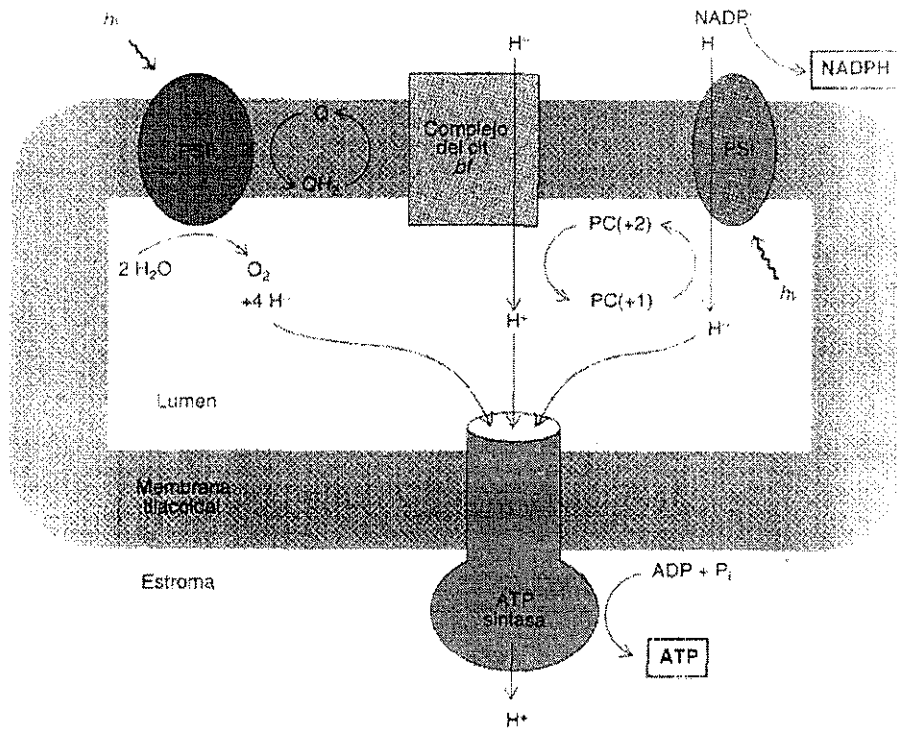
*hidroquinona reducida*,  $PQH_2$ , la cual se difunde al interior de la superficie de la membrana tilacoidal y transfiere sus electrones al complejo citocromo *b/f*; los protones son liberados al lumen tilacoidal cuando  $PQH_2$  se reoxida a PQ. Estos protones, en conjunto con los liberados a partir del agua, generan el gradiente electroquímico que es utilizado para la síntesis de ATP por una ATP sintetasa (Figuras 10 y 13).

Los electrones pasan del citocromo *b/f* a la *plastocianina* (PC), un acarreador de electrones soluble. Los electrones son transferidos desde PC a un segundo fotosistema, el fotosistema I. La absorción de fotones adicionales por el complejo captador de luz asociado con la clorofila  $P_{700}$ , origina que los electrones pasen nuevamente a través de la membrana, en donde son transferidos, vía la *ferredoxina* y la *flavina adenina dinucleótido* (FAD), al *fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina reducido* ( $NADP^+$ ), formando *fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina reducido* (NADPH), cuando se capta un protón del medio. Este último proceso es llamado *fotofosforilación no cíclica*.

La síntesis de ATP por la *ATP sintetasa* (Figura 12), localizada principalmente en las regiones no apiladas de los cloroplastos y también llamada *complejo  $CF_0$ - $CF_1$* , es la función principal conocida del cloroplasto que requiere de un gradiente de protones; cuatro protones atraviesan la membrana por cada molécula de ATP formada. La unidad  $CF_0$ , que consta de cuatro tipos de subunidades, conduce los protones a través de la membrana tilacoidal. La unidad  $CF_1$  cataliza la formación de ATP a partir de ADP y  $P_i$  (Figura 13). El  $CF_1$  se encuentra en la superficie del estroma de la membrana tilacoidal, por lo cual el ATP sintetizado se libera en el espacio del estroma, al igual que el NADPH formado por el fotosistema I (Figura 13). De esta manera, los productos de las reacciones luminosas de la fotosíntesis se ubican adecuadamente para las reacciones subsecuentes que tienen lugar en la oscuridad, en las que el  $CO_2$  se transforma en carbohidratos.



◀ **Figura 12.** Diagrama esquemático de la ATP sintetasa 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.



▲ **Figura 13.** Distribución vectorial de los fotosistemas I y II, del complejo del citocromo  $b/f$  y de la ATP sintetasa en la membrana tilacoidal. El bombeo de protones inducido por la luz hace que el espacio interno sea ácido. El flujo de protones a través del  $CF_0$  al lado del estroma origina la síntesis de ATP por el  $CF_1$ . El NADPH también se forma en el lado del estroma.

## 2. Antecedentes

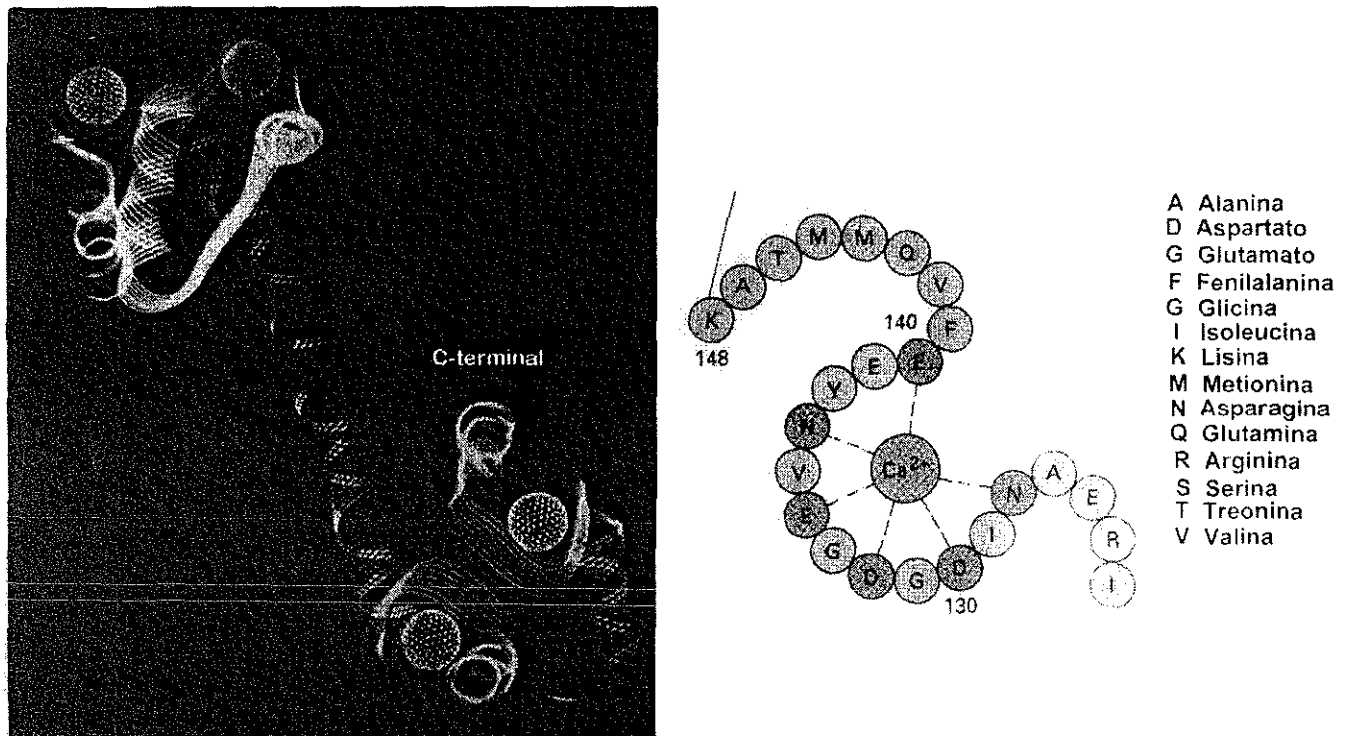
Un número considerable de los herbicidas utilizados comercialmente actúan interfiriendo con el proceso de la fotosíntesis. La mayoría de ellos ejercen su efecto a través de la inhibición del transporte de electrones en el lado reductor del fotosistema II, esto es, eliminan o inactivan a alguno de los intermediarios del transporte de electrones en la región donadora de este sistema (Bowes *et al.*, 1981; Linscott, 1981; Mathis y Rutherford, 1984; Corbett, 1984; van Rennsen, 1989; Percival y Baker, 1991; Streibig *et al.*, 1999; Haynes, 2000; *inter alia*). Otros mecanismos por los que estos agentes pueden actuar incluyen: (i) la inhibición de la transferencia de energía, en cuyo caso inhiben directamente la síntesis de ATP al interaccionar con las subunidades  $CF_0$  y/o  $CF_1$  de la enzima  $H^+$ -ATPasa (Moreland, 1980); (ii) el desacoplamiento del transporte de electrones y de la síntesis de ATP, que consiste en la disipación del estado energizado de la membrana tilacoidal antes de que la energía pueda ser utilizada para llevar a cabo la fosforilación altamente endergónica del ADP (Moreland, 1980) y (iii) la desviación del transporte de electrones de la cadena fotosintética de su trayecto original por efecto de sustancias que actúan como aceptores de electrones. Estos compuestos poseen potenciales redox similares a los transportadores naturales por lo que compiten con ellos por los electrones (Moreland, 1980; Corbett, 1984).

### 2.4.2 Generalidades sobre la proteína calmodulina

La calmodulina (CaM) es una proteína ubicua multifuncional, de carácter ácido, bajo peso molecular (aproximadamente 16 680 daltons) y constituida por alrededor de 148 aminoácidos (Figura 14).

Esta proteína se encuentra ampliamente distribuida en los organismos eucariotas, en los que su estructura primaria se encuentra altamente conservada. La composición de la CaM animal y la vegetal es muy similar (Cuadro 8), presentándose un porcentaje de identidad de las proteínas de plantas con relación a la de los vertebrados del 91 % (Dieter, 1984; Roberts y Harmon, 1992; Zielinski, 1998; Hook y Means, 2001). Todas las especies carecen de triptofano, presentan dos residuos de prolina, uno de trimetil lisina y un alto contenido de aminoácidos cargados

negativamente (asparagina y glutamina). Las principales diferencias entre la CaM vegetal y animal se encuentran en las posiciones 27, 145 y 146 de la cadena de aminoácidos. En las proteínas vegetales, en contraste con las animales, se encuentra presente un residuo de cisteína en la posición 27, mientras que el dipéptido metionina-metionina ubicado en las posiciones 145 y 146 de la CaM de las plantas se encuentra desplazado por un solo residuo en la de los vertebrados.



▲ **Figura 14.** a) Diagrama esquemático de la estructura de la calmodulina. Esta proteína está constituida por dos lóbulos globulares similares unidos por una hélice  $\alpha$  larga. Cada lóbulo contiene dos centros de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  (esferas azules). Los centros de uno de los lóbulos tienen una alta afinidad por el catión y los del otro son de baja afinidad. La unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a estos dos últimos centros activa la calmodulina y permite estimular a un gran número de enzimas. b) Cada uno de los cuatro sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  es un *loop* que contiene aspartato, glutamato y asparagina, los cuales forman enlaces iónicos con el catión. Los átomos de O de las cadenas laterales de los residuos de treonina y de serina también participan en la unión con el  $\text{Ca}^{2+}$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2. Antecedentes

**Cuadro 8.** Número de residuos de aminoácidos presentes en la calmodulina de cerebro de bovino y en la de algunas especies vegetales

Aminoácido	Cerebro de bovino	Espinaca	Cacahuate	Cebada	Maíz
Lisina	7	9	8	9	9
Trimetil lisina	1	1	1	1	1
Histidina	1	1	1-2	1	1
Arginina	6	5	4	4	5
Asparagina	23	26	27	25	24
Treonina	12	7	9	9	8
Serina	4	7	5	6	6
Glutamina	27	27	28	25	22
Prolina	2	2	2	2	2
Glicina	11	10	11	12	12
Alanina	11	10	11	12	11
Cisteína	0	ND	1	ND	ND
Valina	7	8	6	8	8
Metionina	9	8	7	7	7
Isoleucina	8	7	6	7	7
Leucina	9	11	11	12	11
Tirosina	2	1	1	1	1
Fenilalanina	8	9	8	9	9
Triptofano	0	0	0	ND	ND

\*ND: No determinada

En los vegetales existen varias isoformas de CaM con diferentes grados de divergencia en la secuencia de aminoácidos. Así por ejemplo, a partir de *Arabidopsis thaliana* se han aislado cuatro isoformas de la proteína (CaM<sub>1</sub>-CaM<sub>4</sub>), las cuales difieren entre sí en por lo menos seis residuos en la región más conservada y todas son diferentes desde el punto de vista bioquímico. A partir de soya se han aislado también varias isoformas de CaM (SCaM), las cuales presentan un mayor grado de divergencia, difiriendo hasta en 32 aminoácidos en relación a la región más conservada. Estas proteínas presentan diferentes movilidades electroforéticas dependientes de Ca<sup>2+</sup>, así como distintas habilidades para activar a las enzimas dependientes de CaM (Lee *et al.*, 1995; 1997; 1999; 2000). Así mismo, se han encontrado múltiples isoformas de CaM en plantas de trigo, papa y chícharos (Lee *et al.*, 2000)

Distintos estudios de difracción de rayos X y de resonancia magnética nuclear han conducido al establecimiento de la estructura tridimensional de la CaM (Figura 14a) Estas investigaciones revelan que la estructura de la molécula consiste en dos partes lobulares similares, unidas entre sí por una hélice  $\alpha$  flexible larga. Cada estructura globular contiene dos dominios funcionales, en los que se lleva a cabo la unión al  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos dominios se designan con los números I-IV y se numeran comenzando por el extremo amino de la proteína. Cada dominio catalítico está constituido por doce aminoácidos (Figura 14b) [Roberts y Harmon, 1992; Zielinski, 1998; Snedden y Fromm, 1998].

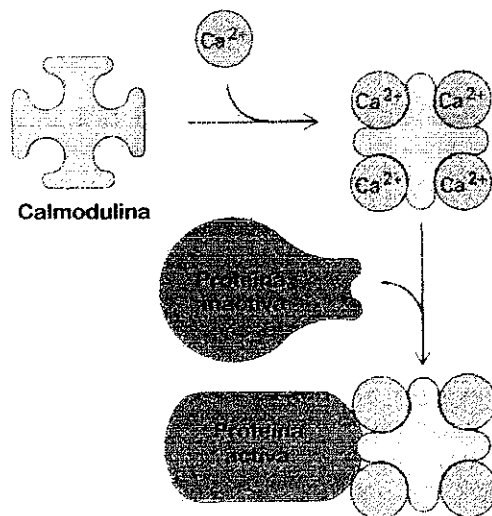
En el dominio IV existe la mayor variabilidad en la secuencia de aminoácidos. En esta zona también se encuentran las mayores diferencias en las distintas isoformas expresadas por una misma especie. La zona más conservada es la III y funciona en armonía con la IV para activar los sitios de alta afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  y así propiciar la interacción entre la CaM y sus proteínas blanco. Se ha propuesto que la variabilidad encontrada en el dominio IV es determinante para la interacción entre la CaM y las diferentes enzimas dependientes de esta proteína (Zielinski, 1998).

La estructura de la CaM libre de  $\text{Ca}^{2+}$  tiene un menor simetría y una conformación más rígida (menos helicoidal), debido a las interacciones electrostáticas entre los tres pares de grupos carboxilo libres ubicados entre los residuos 75 y 90 y otros grupos funcionales presentes en la proteína. Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se une a los sitios funcionales, se produce un cambio en la conformación debido a la neutralización de las cargas negativas. Los cambios conformacionales provocan un incremento en la estructura de hélice  $\alpha$  y la exposición de una porción hidrofóbica en la parte superior de la molécula, misma que es reconocida por las proteínas blanco de la CaM y sus antagonistas.

La CaM carece de actividad enzimática por sí misma, sin embargo, su participación es fundamental en la transducción de señales mediadas por el  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel intracelular. Así, las señales bióticas y abióticas recibidas por los receptores a nivel membranal inducen un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de las células, el cual se une a la CaM y a otras proteínas. El complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM formado interacciona con una gran variedad de proteínas tanto nucleares como del citoesqueleto, modulando su actividad enzimática. Estas enzimas regulan a su vez diversos procesos metabólicos importantes (Roberts y Harmon, 1992; Zielinski, 1998; Snedden y Fromm, 1998; Au y Leung, 1998; Lee *et al.*, 1999; Hook y Means, 2001).

## 2. Antecedentes

Estudios recientes de difracción de rayos X y de resonancia magnética nuclear, han permitido proponer un modelo que explica la interacción entre la CaM y las proteínas blanco (Figura 15). La unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a la CaM induce un cambio conformacional tal que en la superficie de la molécula quedan expuestas dos regiones hidrofóbicas rodeadas por cargas negativas, una en cada dominio globular; en esta conformación la CaM se une a sus proteínas blanco, por interacciones electrostáticas principalmente, contribuyendo así a la estabilidad del complejo CaM-proteína blanco. En disolución, los dos dominios globulares rodean a la proteína blanco formando una estructura casi globular. La activación de las enzimas blanco por parte de la CaM tiene lugar en dos fases. En la primera, la interacción  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM conlleva a la unión de la CaM con el dominio de unión de la enzima. En la segunda fase, se produce otra interacción adicional que tiene como consecuencia la activación de la enzima blanco (Coob *et al.*, 1999).



< **Figura 15.** La calmodulina sufre un cambio conformacional principal cuando se une al  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual le permite unirse a otras proteínas, modificando sus actividades enzimáticas.

Uno de los aspectos notables de la CaM es que se une y activa numerosas proteínas blanco cuya secuencia de aminoácidos en los sitios de unión es muy distinta. Los sitios de unión en las proteínas blanco están constituidos por un conjunto de 12 a 30 aminoácidos consecutivos cargados positivamente y propensos a formar una hélice  $\alpha$  al unirse a la CaM.

En los animales se han identificado alrededor de 25 proteínas dependientes de CaM, incluyendo algunas cinasas, receptores y algunas proteínas G. Sin embargo, en las plantas son comparativamente pocas las proteínas reguladas por CaM que se han aislado, a pesar de que la CaM ha sido implicada en una gran variedad de respuestas celulares, tales como la defensa a organismos patógenos, el gravitropismo y el crecimiento vegetal, entre otros. Entre las proteínas más importantes reguladas por la CaM se encuentran la NADcinasasa, la glutamato descarboxilasa, la aspirasa, la fosfodiesterasa, la  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa, la cinasa dependiente de calmodulina I, II y III, la superóxido dismutasa y el factor de elongación  $1\alpha$  (Lee *et al.*, 1997, 1999; Zielinski, 1998).

En este último contexto, se ha demostrado que la CaM tiene una clara participación en los procesos de regulación y de transducción de señales que tienen lugar durante los eventos de germinación y de crecimiento vegetal (Dieter, 1984; Coccuci y Negrini, 1991; Roberts y Harmon, 1992; Overvoorde y Grimes, 1994; Thomas, 1995; Baum *et al.*, 1996; Poovaiah *et al.*, 1996; Harding *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999; *inter alia*). Así por ejemplo, durante la primera fase de la germinación de las semillas de *Raphanus sativus* y de zanahoria se ha detectado un incremento notable en los niveles de CaM y en la concentración de proteínas dependientes de esta enzima, así como una disminución en los niveles de sustancias de naturaleza proteica que inhiben la actividad de la CaM (Coccuci y Negrini, 1988; Oh *et al.*, 1992).

Por otra parte, la germinación de las semillas de *Phacelia tanacetifolia* se inhibe en presencia del calmidazolín, un antagonista de la CaM (Coccuci y Negrini, 1991) y se ha comprobado también, que la alteración de los niveles de CaM en plantas transgénicas de papa, alteran el desarrollo y el crecimiento de las plantas (Poovaiah *et al.*, 1996).

En la literatura contemporánea de los productos naturales existen antecedentes de varios metabolitos secundarios de origen vegetal y fúngico que interaccionan con la CaM. Entre ellos destacan la fitotoxina fúngica ofiobolina A (Leung *et al.*, 1984, 1985, 1988; Kong y Chow, 1998) y, más recientemente, se ha detectado esta propiedad en las fitotoxinas aisladas del hongo coprófilo *Guanomyces polytrix* (Macías *et al.*, 2000, 2001)





### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótesis**

Los criterios convencionales de preselección, fundamentados en consideraciones quimiotaxonómicas, y de selección, basados en la aplicación de ensayos biológicos apropiados, representan las herramientas más útiles para la detección de organismos naturales ricos en compuestos bioactivos que puedan constituir una alternativa para el desarrollo de nuevos agentes pesticidas de origen natural

#### **3.2 Objetivo principal**

El objetivo principal de la presente disertación consiste en contribuir al desarrollo de nuevos agentes herbicidas naturales, a través de la determinación del potencial fitotóxico de los metabolitos secundarios derivados del líquen *Parmotrema tinctorum* Nyl. (Hale) (Parmeliaceae) y de la especie vegetal *Leucophyllum ambiguum* Humb. & Bonpl. (Scrophulariaceae)

#### **3.3 Objetivos específicos**

Para el cumplimiento del objetivo principal propuesto, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

3.3.1 Efectuar las actividades pertinentes de investigación bibliográfica referentes a las especies propuestas para este estudio, de tal forma que la preselección de las mismas posea bases bien fundamentadas.

3.3.2 Seleccionar las especies objeto de estudio, a través de la cuantificación del efecto fitotóxico de los extractos orgánicos derivados de las mismas especies, sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de especies arvenses

### *3. Hipótesis y Objetivos*

3.3.3 Obtener los principios fitotóxicos de los extractos activos preparados a partir de las especies seleccionadas, mediante un estudio biodirigido, empleando un bioensayo cualitativo de tipo bioautográfico para verificar la actividad fitotóxica a lo largo de todo el proceso.

3.3.4 Cuantificar la actividad fitotóxica de los productos puros aislados a partir de las fracciones fitotóxicas.

3.3.5 Determinar la estructura molecular de los compuestos activos mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y de difracción de rayos X

3.3.6 Explorar el modo de acción de los principios fitotóxicos mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre diversas reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis (síntesis de ATP, captación de protones, transporte de electrones), sobre la síntesis de ADN durante la germinación de semillas y de su posible interacción con la proteína reguladora calmodulina.

3.3.7 Divulgar los resultados obtenidos mediante la presentación de los mismos en congresos nacionales e internacionales y a través de su publicación en revistas internacionales apropiadas.

## **4. SECCIÓN EXPERIMENTAL**

### **4.1 Ensayos biológicos**

#### **4.1.1 Evaluación cuantitativa de la actividad fitotóxica**

La determinación cuantitativa de la actividad fitotóxica a nivel preemergente de los extractos y de los compuestos puros se realizó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de las especies *Amaranthus hypochondriacus* L. y *Echinochloa crusgalli* (Beauv) L. (Castañeda *et al.*, 1992). Para realizar el ensayo, las muestras se disolvieron en un disolvente apropiado y se prepararon disoluciones con concentraciones de 1000, 100 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Posteriormente, 3 mL de las disoluciones se vertieron en cajas de Petri que contenían un disco de papel filtro de 10 cm de diámetro y se permitió la evaporación completa del disolvente. A continuación, se inició la germinación de 20 semillas de cada una de las especies de prueba, humedeciendo previamente el papel filtro con 3 mL de agua destilada.

Las cajas de Petri se incubaron a 28 °C y la actividad fitotóxica se determinó calculando el porcentaje del crecimiento radicular y el de la germinación después de 24 hrs (*A. hypochondriacus*) y 48 hrs (*E. crusgalli*) de exposición a los tratamientos. En todos los casos se efectuaron cuatro réplicas y se emplearon agua y los disolventes utilizados para la preparación de las disoluciones, como controles negativos y 2,4-D como control positivo. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa ANOVA ( $p < 0.05$ ) y los valores de  $\text{CI}_{50}$  se calcularon mediante un análisis PROBIT a partir de los porcentajes de inhibición obtenidos.

#### **4.1.2 Evaluación cualitativa de la actividad fitotóxica**

Para monitorear la actividad fitoinhibidora de las fracciones primarias y secundarias se utilizó un método bioautográfico (Inoue *et al.*, 1992), empleando semillas de *A. hypochondriacus* y de *E. crusgalli* como especies de prueba. Los

#### 4. Sección Experimental

ensayos correspondientes se efectuaron aplicando 10 mg de las muestras a evaluar en placas de vidrio recubiertas con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> (5 x 20 cm, 0.25 mm de espesor, Merck) y desarrollándolas con un sistema de disolventes adecuado. Concluido el proceso de elución, se permitió la evaporación completa del disolvente y las placas se cubrieron con 20 mL de una suspensión de agar al 1 %. Una vez solidificada la suspensión, se colocaron las semillas de prueba, cubriendo completa y homogéneamente la superficie. Las placas se incubaron en una atmósfera húmeda a 28 °C durante 24 hrs (*A. hypochondriacus*) o 48 hrs (*E. crusgalli*). Transcurrido el periodo de incubación se observó la zona de inhibición y se determinó el factor de retención (R<sub>f</sub>) correspondiente a la misma. Este último procedimiento se realizó por comparación con una placa conteniendo la muestra de prueba, eluida en las mismas condiciones y revelada con el agente cromógeno apropiado. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y como control positivo se empleó 2,4-D

##### 4.1.3 Evaluación del efecto de los metabolitos mayoritarios de *Parmotrema tinctorum* sobre la síntesis de ADN

La determinación cuantitativa del efecto de los metabolitos mayoritarios de *P. tinctorum* sobre la síntesis de ADN se realizó utilizando como especies de prueba semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli* (García 1995), para lo cual el compuesto se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se prepararon disoluciones con concentraciones de 1000, 100 y 10 µg/mL. Posteriormente, 300 µL de las disoluciones se vertieron en cajas de Petri que contenían un papel filtro de 2 cm<sup>2</sup> (Whatman No. 1) y se permitió la evaporación completa del disolvente. A continuación, se inició la germinación de 50 mg de semillas de cada una de las especies de prueba, humedeciendo previamente el papel filtro con 300 µL de una disolución acuosa de timidina tritiada con una concentración de 10 µCi/mL.

Las cajas de Petri se incubaron a 30 °C durante 6, 12 y 24 hrs (*A. hypochondriacus*) o 15, 25 y 35 hrs (*E. crusgalli*). Concluido el periodo de incubación, las semillas se fragmentaron en un politrón PCU-2, utilizando 10 mL de un medio de homogeneización que contenía KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 40 mM, KCl 15 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, sacarosa 250 mM, TPCK 75 µM, benzamidina 10 mM, inhibidor de tripsina 50 µg/mL y Tris-HCl 40 mM, a pH 7.6, dos veces por 30 s a la

velocidad máxima. A continuación, se adicionaron al homogeneizado 5 mL de una disolución acuosa de ácido tricloroacético al 10 %, para inducir la precipitación de proteínas. La mezcla se mantuvo a 4 °C durante 30 min. El precipitado obtenido se filtró a través de una fibra de vidrio y se lavó sucesivamente con ácido tricloroacético al 10 % y con etanol al 96 %. Por último, el precipitado se secó en una estufa durante 15 hrs a 65 °C y posteriormente se transfirió a un frasco vial que contenía un líquido de centelleo, constituido por una disolución de 2-2'-*para*-fenilen-bis[5-feniloxazol] y 2,5-difeniloxazol, en tolueno, y se determinó la cantidad de radiactividad contenida en la muestra en un contador de centelleo Beckman LS6000IC. La cantidad de radiactividad detectada de esta manera es directamente proporcional al ADN biosintetizado en las semillas, pues la timidina tritiada con la que son incubadas se incorpora a la cadena del ácido durante su síntesis.

Los resultados obtenidos se compararon con los del blanco y con los controles positivos, que consistieron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y agua en el primer caso y en una disolución de 2,4-D ( $8.8 \times 10^{-4}$  M) en el segundo. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

***4.1.4 Determinación del efecto de los metabolitos mayoritarios de *Parmotrema tinctorum* sobre diferentes actividades de la fase luminosa de la fotosíntesis***

***4.1.4.1 Aislamiento de los cloroplastos***

Los cloroplastos se obtuvieron a partir de 30 g de hojas de espinacas frescas (*Spinacea oleracea* L.), verdes y turgentes. Todo el proceso de aislamiento se llevó a cabo en frío y en la oscuridad. Las hojas se lavaron con agua destilada y se les removió la nervadura central y el ápice. Posteriormente, se homogeneizaron con 150 mL de un medio que contenía sacarosa 400 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KCl 20 mM y tricina 30 mM, a pH 8.0, en una licuadora Osterizer L-21, durante 5 s intermitentes a la velocidad máxima. El homogeneizado se filtró a través de una gasa y el filtrado se centrifugó en un centrífuga Beckman J2-21 con rotor de ángulo fijo JA-20, a 4 000 rpm durante 5 min, a 4 °C. Por último, el sobrenadante se desechó y el sedimento se

#### **4. Sección Experimental**

resuspendió en 1 mL del medio de aislamiento (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991; Peña-Valdivia *et al.*, 1991).

##### **4.1.4.2 Cuantificación de clorofila**

La cuantificación de la clorofila se efectuó transfiriendo 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de cloroplastos a un matraz volumétrico de 5 mL y aforando con una disolución acuosa de acetona al 80 %. La mezcla se mantuvo en la oscuridad durante 5 min, para extraer y disolver la clorofila y para evitar su degradación por la luz. Transcurrido este tiempo, la disolución se centrifugó en una centrifuga clínica CL durante 5 min a 2 000 rpm, para sedimentar las proteínas y otros residuos precipitados de los cloroplastos. Posteriormente, se cuantificó el contenido de clorofila mediante la determinación de la absorbancia a 663 y 645 nm, utilizando un espectrofotómetro Beckman Du 650 (Strain *et al.*, 1971). La concentración de clorofila se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

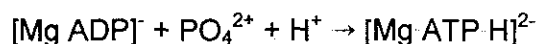
$$[\text{clorofila}] (\mu\text{g clorofila mL}^{-1}) = (8.05 \mu\text{g mL}^{-1} \times A_{663} + 20.29 \mu\text{g mL}^{-1} \times A_{645}) (5 \text{ mL}),$$

donde:        A = absorbancia de la disolución de clorofila  
              8.05, 20.29 = coeficientes de extinción de la clorofila  
              5: factor de dilución

##### **4.1.4.3 Determinación del efecto sobre la síntesis de ATP**

La síntesis de ATP se determinó registrando los cambios de pH en el medio de reacción entre 8.0 y 8.1, para lo cual se empleó un microelectrodo combinado Orion 8103 Ross conectado a un potenciómetro Corning 12 con escala expandida (Gutiérrez-Lugo *et al.*, 1999). El voltaje generado por los cambios de pH se registró en un equipo Gilson. Las determinaciones se efectuaron adicionando a 3 mL del medio de reacción que contenía sorbitol 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, KCl 10 mM, metilviológeno (MV) 0.05 mM y tricina 1 mM, a pH 8.0, ADP 1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 mM, el

compuesto de prueba en un intervalo de concentraciones de 50 a 300  $\mu\text{M}$  y la cantidad de cloroplastos correspondiente a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de clorofila. El cambio de pH en el medio de reacción se determinó después de un periodo de iluminación de 1 min. Como fuente de iluminación se empleó una lámpara de proyector de 250 watts, utilizando un lente de Izawa, constituido por una disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 2 %, como filtro de luz y de calor. El cambio de pH registrado es el resultado del consumo o de la producción de un equivalente de protón por cada molécula de ATP biosintetizada según la siguiente reacción:



En todos los casos se utilizó 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU)  $1.40 \times 10^{-7}$  M como control positivo (Streibig *et al.*, 1999) y se realizaron blancos al inicio y al final de cada experimento, los cuales consistieron en la mezcla de reacción sin adicionar el compuesto a ensayar. El gradiente de protones producido se cuantificó por titulación, adicionando 10  $\mu\text{L}$  de una disolución de KOH 0.07 N al medio de reacción, en presencia de cloroplastos sin iluminar (Peña-Valdivia *et al.*, 1991; Dilley, 1972) y la rapidez de síntesis de ATP ( $r$ ) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$r (\mu\text{moles ATP hr}^{-1} \text{ mg clorofila}^{-1}) = \frac{0.07 \mu\text{moles KOH}}{X_t} \times \frac{X_p}{1 \text{ min}} \times \frac{60 \text{ min}}{\text{hr}} \times \frac{1}{0.06 \text{ mg clorofila}}$$

donde:  $X_t$  = altura de la pendiente de la curva obtenida al consumirse 0.07  $\mu\text{moles}$  de protones, después de 1 min de reacción en la oscuridad (cm)  
 $X_p$  = altura de la pendiente de la curva obtenida con los compuestos de prueba después de un minuto de iluminación (cm)

#### 4.1.4.4 Determinación del efecto sobre la captación de protones

El bombeo de protones se midió de manera similar al procedimiento empleado para cuantificar la síntesis de ATP, pero sin añadir ADP ni  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  al



#### 4. Sección Experimental

medio de reacción (Dilley, 1972). La rapidez de captación de protones ( $r$ ) se calculó mediante a la siguiente ecuación:

$$r (\mu\text{moles H}^+ \text{ hr}^{-1} \text{ mg clorofila}^{-1}) = \frac{0.07 \mu\text{moles KOH}}{X_t} \times \frac{X_p}{1 \text{ min}} \times \frac{60 \text{ min}}{\text{hr}} \times \frac{1}{0.06 \text{ mg clorofila}}$$

donde:  $X_t$  = altura de la pendiente de la curva obtenida al consumirse 0.07  $\mu$ moles de protones, después de 1 min de reacción en la oscuridad (cm)  
 $X_p$  = altura de la pendiente de la curva obtenida con los compuestos de prueba después de un minuto de iluminación (cm)

##### 4.1.4.5 Determinación del efecto sobre el transporte de electrones no cíclico

La rapidez de los transportes de electrones basal, fosforilante y desacoplado se determinó indirectamente al monitorear la producción del oxígeno liberado al medio de reacción debido a la fotólisis del agua, utilizando un oxímetro Yellow Springs Instrument 5300 conectado a un registrador gráfico Beckman y a un electrodo tipo Clark, en el cual el oxígeno es reducido a  $\text{H}_2\text{O}$ . Al mantener este electrodo de platino a -0.7 volts respecto al de referencia (Ag/AgCl), circula una corriente eléctrica que es directamente proporcional a la concentración de oxígeno que se libera o que se consume en el medio. Por lo tanto, la captación de oxígeno es considerada como un parámetro para determinar el transporte de electrones total en la cadena redox, cuando se emplea MV como aceptor final de electrones (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991).

La determinación del transporte de electrones basal se efectuó adicionando a 3 mL de medio de transporte que contenía sorbitol 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, KCl 10 mM, KCN 0.5 mM, MV 0.05 mM y tricina 15 mM, a pH 8.0, el compuesto de prueba en un intervalo de concentraciones de 50 a 300  $\mu\text{M}$  y la cantidad de cloroplastos correspondiente a 20  $\mu\text{g/mL}$  de clorofila. La mezcla resultante se agitó y se iluminó durante 2 min con luz actínica de una lámpara de proyector Gaf 2669 de 250 watts, filtrada a través de una lente de Izawa (Trebst, 1972; Lotina-Hennsen *et al.*, 1991).

Los transportes de electrones fosforilante y desacoplado fueron determinados de manera similar al basal, con la diferencia de que en el primer caso se adicionaron ADP 1 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 mM al medio de reacción y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  6 mM como agente desacoplante, en el segundo (Trebst, 1972).

En todos los casos se utilizó DCMU  $1.40 \times 10^{-7}$  M (Streibig *et al.*, 1999) como control positivo y se realizaron blancos al inicio y al final de cada experimento, los cuales consistieron en la mezcla de reacción sin adicionar el compuesto a evaluar. La rapidez del transporte de electrones se cuantificó al añadir al medio de reacción, sin MV, 10  $\mu\text{L}$  de una disolución de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  40 mM como aceptor de electrones e iluminando la mezcla que contenía los cloroplastos por un minuto (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991; Peña-Valdivia *et al.*, 1992) y se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación, comparándose con la obtenida para el blanco (Izawa, 1977; Trebst, 1972; Dilley, 1972):

$$r (\mu\text{equivalentes de electrones hr}^{-1} \text{ mg clorofila}^{-1}) = \frac{0.4 \mu\text{equivalentes } \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]}{X_t} \times \frac{X_p}{1 \text{ min}} \times \frac{60 \text{ min}}{\text{hr}} \times \frac{1}{0.06 \text{ mg clorofila}}$$

donde:  $X_t$ = altura de la curva obtenida al consumirse 0.4  $\mu\text{equivalentes}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , después de 1 min de iluminación (cm)

$X_p$ = altura de la pendiente obtenida con los compuestos de prueba (cm)

#### 4.1.4.6 Determinación del efecto sobre las reacciones parciales de los fotosistemas I y II

La determinación del flujo de electrones en los fotosistemas I (FSI) y II (FSII) se efectuó adicionando al medio de reacción que contenía sorbitol 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, KCl 10 mM, KCN 0.5 mM y tricina 15 mM, a pH 8.0, agentes desacoplantes, donadores y aceptores de electrones artificiales e inhibidores de la cadena redox, de acuerdo a los procedimientos que se describen en los incisos a), b), c) y d) Todas las determinaciones, con excepción de la reacción parcial de 1,5-difenilcarbazida (DPC) a 2,6-diclorofenil indofenol (DCPIP), se realizaron en un oxímetro, de acuerdo a la metodología indicada en el inciso anterior y la rapidez del transporte de

#### **4. Sección Experimental**

electrones, calculada mediante la ecuación incluida en el mismo inciso, se comparó con la obtenida para el blanco.

##### ***a) Transporte de electrones desacoplado en el fotosistema I de DCPIP/ascorbato a MV***

A 3 mL del medio de reacción se adicionaron DCMU 10  $\mu\text{M}$  como inhibidor del fotosistema II, DCPIP 100  $\mu\text{M}$  reducido con ascorbato 300  $\mu\text{M}$  como donador de electrones del fotosistema I, MV 0.05 mM como aceptor final de electrones,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  6 mM como agente desacoplante, el compuesto de prueba en un intervalo de concentraciones de 50 a 300  $\mu\text{M}$  y la cantidad de cloroplastos correspondiente a 20  $\mu\text{g/mL}$  de clorofila (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991; Peña-Valdivia *et al.*, 1992). Como control positivo se utilizó xantiletina 50  $\mu\text{M}$  (Macías *et al.*, 1999).

##### ***b) Transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de $\text{H}_2\text{O}$ a DCPIP/ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$***

A 3 mL del medio de reacción se adicionaron dibromometilisopropil-*para*-benzoquinona (DBMIB) 1  $\mu\text{M}$  para inhibir el transporte de electrones hacia el FSI, el sistema DCPIP 100  $\mu\text{M}$ - $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  300  $\mu\text{M}$  como aceptor final de electrones,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  6 mM como agente desacoplante, el compuesto de prueba en un intervalo de concentraciones de 50 a 300  $\mu\text{M}$  y la cantidad de cloroplastos correspondiente a 20  $\mu\text{g/mL}$  de clorofila (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991). Como control positivo se utilizó DCMU 0.14  $\mu\text{M}$  (Streibig *et al.*, 1999).

##### ***c) Transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de $\text{H}_2\text{O}$ a SiMo***

A 3 mL del medio de reacción se adicionaron DCMU 200  $\mu\text{M}$  para inhibir el transporte de electrones hacia el FSI, silicomolibdato de sodio (SiMo) 10  $\mu\text{M}$  como aceptor final de electrones,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  6 mM como agente desacoplante, el compuesto de prueba en un intervalo de concentraciones de 50 a 300  $\mu\text{M}$  y la cantidad de

cloroplastos correspondiente a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de clorofila (Giaquinta y Dilley, 1975) Como control positivo se utilizó 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno 2.86  $\mu\text{M}$  (Jiménez *et al.*, 1997).

***d) Transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de DPC a DCPIP***

Los cloroplastos obtenidos como se indicó anteriormente (inciso 4.1.4.1), se incubaron en la oscuridad con una disolución de Tris 0.8 M, a pH 8.0, en una proporción de 1 mL de medio por cada 300  $\mu\text{g}$  de clorofila, durante 30 min, a 0 °C, con agitación continua. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 40 mL del medio de aislamiento de cloroplastos y la mezcla resultante se centrifugó a 5 000 rpm durante 2 min. Posteriormente, se determinó el contenido de clorofila de acuerdo a la metodología descrita en el inciso 4.1.4.2. La reacción se llevó a cabo adicionando a 3 mL del medio de reacción DBMIB 1  $\mu\text{M}$  para inhibir el transporte de electrones hacia el fotosistema I, DPC 200  $\mu\text{M}$  como donador de electrones, DCPIP 100  $\mu\text{M}$  como aceptor final de electrones,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  6 mM como agente desacoplante, el compuesto de prueba en un intervalo de concentraciones de 50 a 300  $\mu\text{M}$  y la cantidad de cloroplastos correspondiente a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de clorofila. La mezcla resultante se agitó y se determinó su absorbancia a 600 nm antes y después de iluminarla durante 1.5 min con un haz luminoso filtrado a través de un lente de Izawa (Vernon y Shaw, 1969). Como control positivo se utilizó odoratol 4.60  $\mu\text{M}$  (Achnine *et al.*, 1998).

***4.1.5 Determinación de la interacción de los metabolitos mayoritarios de Parmotrema tinctorum con la proteína calmodulina y con la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina***

***4.1.5.1 Determinación del efecto de los metabolitos mayoritarios de Parmotrema tinctorum sobre la movilidad electroforética de la calmodulina***

La interacción entre los compuestos aislados del líquen *P. tinctorum* y la proteína calmodulina se determinó a través de un método electroforético en

#### 4. Sección Experimental

condiciones desnaturalizantes (Macías *et al.*, 2000, 2001). Para realizar las evaluaciones, los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO y se prepararon disoluciones con una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Posteriormente, se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  de cada disolución con 2  $\mu\text{g}$  de calmodulina de bovino (Sigma) y 3  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  1 mM y se llevó a un volumen final de 30  $\mu\text{L}$  con agua desionizada. A continuación, la mezcla de reacción se incubó durante 90 min, a 30 °C. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron sometidas a ebullición durante 5 min para detener la reacción; una vez que se enfriaron a temperatura ambiente, se les adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de un buffer de carga. Por último, se llevó a cabo la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE al 12 %), en forma vertical descendente. La composición de los geles y de las disoluciones utilizadas se indican el Cuadro 9. Como control positivo se utilizó clorpromazina (Jamieson y Vanaman, 1979; Jarrett, 1986) y cada determinación se realizó por triplicado.

**Cuadro 9.** Composición de los geles de acrilamida y de las disoluciones utilizadas para llevar a cabo la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE al 12 %)

Geles y disoluciones	Composición	Cantidad
Gel sellador	Acrilamida-Bis-acrilamida 30:08	1 mL
	TEMED 100 %	2 $\mu\text{L}$
	APS 10 %	10 $\mu\text{L}$
Gel separador	Acrilamida-Bis-acrilamida 30:08	3.70 mL
	TRIS 3 M, pH 8.8	1.17 mL
	Agua	92 $\mu\text{L}$
	TEMED 100 %	4.26 mL
	APS 10 %	10 $\mu\text{L}$
Gel apilador	Acrilamida-Bis-acrilamida 30:08	625 $\mu\text{L}$
	TRIS-HCl 1 M, pH 6.8	625 $\mu\text{L}$
	SDS 10 %	50 $\mu\text{L}$
	Agua	3.67 $\mu\text{L}$
	TEMED 100 %	35 $\mu\text{L}$
	APS 10 %	

**Cuadro 9.** Composición de los geles de acrilamida y de las disoluciones utilizadas para llevar a cabo la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE al 12 %) [continuación].

Geles y disoluciones	Composición	Cantidad
Disolución de corrida	Trizma	6.00 g
	Glicina	28.50 g
	SDS	2.00 g
	Agua	2.00 L
	pH 8.3	
Buffer de carga	TRIS-HCl 1 M, pH 6.8	0.6 mL
	Glicerol 50 %	5 mL
	SDS 10 %	2 mL
	2-mercaptoetanol	0.5 mL
	Azul de bromofenol 1 %	10 mL
	Agua	0.9 mL
Disolución de tinción	Metanol 20 %	100 mL
	Ácido acético 0.5 %	25 mL
	Azul de Coomassie R250	0.2 g

#### 4.1.5.2 Determinación de la actividad de la enzima fosfodiesterasa en presencia de calmodulina

La actividad de la fosfodiesterasa en presencia de calmodulina se determinó a través de la cuantificación de la cantidad del fosfato producido como resultado de la reacción de hidrólisis del AMP cíclico catalizada por la enzima (Sharma y Wang, 1979; Leung *et al.*, 1984). Los ensayos correspondientes se llevaron a cabo adicionando a una disolución que contenía 0.015 unidades de fosfodiesterasa de cerebro de bovino (Sigma), diferentes concentraciones de calmodulina de cerebro de bovino (Sigma) [ $2.5 \times 10^{-3}$  a  $0.5 \mu\text{g}$ ],  $15 \mu\text{L}$  de una disolución de 5'-nucleotidasa de veneno de *Crotalus atrox* (Sigma) [0.3 unidades] preparada en un buffer constituido por Tris-HCl 10 mM y acetato de magnesio 0.5 mM, a pH 7, y  $800 \mu\text{L}$  de un buffer de reacción constituido por Tris-HCl 45 mM, acetato de magnesio 5.6 mM, imidazol 45

#### *4. Sección Experimental*

mM y  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM, a pH 7. La mezcla anterior se incubó durante 30 min a 30 °C. Transcurrido este tiempo, a cada una de las muestras se les adicionó 100  $\mu\text{L}$  de AMP cíclico 10.8 mM y se mantuvieron nuevamente a 30 °C durante 30 min. Al término de este segundo periodo de incubación, a cada muestra se le adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 55 % (m/v) para detener la reacción.

A continuación se cuantificó la cantidad de fosfato producido durante la reacción de hidrólisis del AMP cíclico, utilizando un método espectrofotocolorimétrico (Sumner, 1944), de acuerdo al procedimiento que se describe a continuación. A una alícuota de 500  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción anterior se le adicionaron 800  $\mu\text{L}$  de heptamolibdato de amonio al 6.6 %, en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3.75 N y 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeSO}_4$  al 10 %. Las muestras se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se determinó la densidad óptica de cada una de ellas a 660 nm. Los valores de absorbancia obtenidos fueron interpolados en una curva estándar de fosfato monobásico de potasio para determinar la concentración de fosfato obtenido en cada tratamiento. La curva estándar se construyó a partir de una disolución 50 mM de fosfato monobásico de potasio (Sigma), tomando las alícuotas necesarias para obtener catorce concentraciones diferentes en un intervalo de 50 a 700 nM. A cada alícuota se adicionaron 800  $\mu\text{L}$  de heptamolibdato de amonio al 6.6 % en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3.75 N, 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeSO}_4$  al 10 % y agua desionizada hasta obtener un volumen final de 1500  $\mu\text{L}$ . La densidad óptica de las muestras se determinó a 660 nm, utilizando un espectrofotómetro Beckman Du 650.

##### *4.1.5.3 Determinación del efecto del hematomato de metilo (46) sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina*

Para evaluar el efecto del producto (46) sobre la actividad enzimática de la fosfodiesterasa en presencia de calmodulina, se prepararon disoluciones de diferente concentración del compuesto de prueba (0 a 100  $\mu\text{M}$ ) y se incubaron con una concentración saturante de calmodulina de cerebro de bovino (0.2  $\mu\text{g}$ ), de acuerdo con el procedimiento descrito en el inciso 4.1.5.2, con excepción de que el compuesto a evaluar se adicionó después de haber incubado durante 3 min la mezcla de reacción que contenía 0.015 unidades de fosfodiesterasa de cerebro de bovino, 0.2  $\mu\text{g}$  de calmodulina de cerebro de bovino, 0.3 unidades de 5'-nucleotidasa

de veneno de *Crotalus atrox* y 800  $\mu$ L del buffer de reacción. Cada ensayo se realizó por triplicado y se utilizó clorpromazina como control positivo.

#### ***4.1.5.4 Determinación del efecto del hematomato de metilo (46) sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina***

La evaluación del efecto del hematomato de metilo (46) sobre la actividad enzimática de la fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina se llevó a cabo de acuerdo a la metodología indicada en los incisos 4.1.5.2 y 4.1.5.3, con excepción de que no se adicionó calmodulina a la mezcla de reacción.

### ***4.2 Métodos cromatográficos***

Los análisis cromatográficos en capa fina a nivel analítico y a nivel preparativo se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice 60 GF<sub>254</sub> (Merck) de 0.25 mm de espesor, varios sistemas de elución y como agentes cromógenos sulfato cérico o anisaldehído (Lowery *et al.*, 1993). Antes de efectuar el proceso de revelado, las placas se visualizaron con luz UV (254 y 365 nm). Para desarrollar el color fue necesario calentar a 110 °C, por dos minutos aproximadamente. En el caso de las cromatografías en columna abierta se empleó como adsorbente gel de sílice 60 GF<sub>254</sub> (Merck), de gránulos de 0.2-0.5 mm y de malla 70-230.

### ***4.3 Estudio químico de la primera recolecta del líquen *Parmotrema tinctorum* Nyl. (Hale)***

#### ***4.3.1 Material liquénico***

El material liquénico fue recolectado en la región de los Tuxtlas, Veracruz, México e identificado por el Biólogo Gustavo Carmona del Instituto de Ecología de la Universidad de Jalapa. Una muestra de referencia (Voucher GG-1996) se depositó



#### 4. Sección Experimental

en la colección etnobotánica del Herbario del Instituto de Ecología (XAL), en Jalapa, Veracruz

##### 4.3.2 Métodos de extracción y de fraccionamiento preliminar

El material seco y molido (2.6 kg) se extrajo tres veces mediante un proceso de maceración, con 5 L de una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 1:1. El extracto resultante se filtró y se concentró a presión reducida, obteniéndose 227 g de un residuo de color café oscuro.

El extracto orgánico de *P. tinctorum* se sometió a un fraccionamiento primario mediante una cromatografía en una columna de vidrio empacada con 2.6 kg de gel de sílice, empleando como fase móvil un gradiente de hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH. Se recolectaron un total de 374 fracciones de 500 mL. Su semejanza cromatográfica en capa fina permitió reunir las en ocho grupos de fracciones primarias y su actividad fitotóxica se monitoreó mediante un método bioautográfico. En el Cuadro 10 se resumen los eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos y las fracciones combinadas.

**Cuadro 10.** Resumen del fraccionamiento primario del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH obtenido de la primera recolecta del líquen *Parmotrema tinctorum*.

Eluyente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas (clave)
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	1-82	1-139 (PT <sub>1</sub> )
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	83-104	140-226 (PT <sub>2</sub> )*
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	105-121	227-258 (PT <sub>3</sub> )
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	122-303	259-283 (PT <sub>4</sub> )*
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	304-318	284-309 (PT <sub>5</sub> )
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	319-334	310-330 (PT <sub>6</sub> )
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	335-360	331-365 (PT <sub>7</sub> )*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	361-373	366-374 (PT <sub>8</sub> )*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	50:50	374	

\*Fracciones fitotóxicas

### 4.3.3 Aislamiento y purificación de los compuestos presentes en las fracciones primarias

#### 4.3.3.1 Obtención del hematomato de metilo (46) de la fracción activa PT<sub>2</sub>

A partir de la fracción primaria activa PT<sub>2</sub> cristalizaron 46 mg del compuesto **46**, en forma de un sólido cristalino de color blanco, soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, p. f. 140-142° C; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 2962, 2765, 1647, 1576, 1435, 1263; **RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  12.87 (1H, s, OH-2), 12.41 (1H, s, OH-4), 10.34 (1H, s, CHO) 6.29 (1H, s, H-5), 3.96 (3H, s, CH<sub>3</sub>O-7), 2.53 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8); **RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  193.9 (C-9), 172.0 (C-7), 168.3 (C-2), 166.7 (C-4), 152.3 (C-6), 112.1 (C-5), 108.5 (C-3), 103.9 (C-1), 52.2 (CH<sub>3</sub>O-7), 25.1 (CH<sub>3</sub>-8); **EMFAB+** *m/z* (int. rel.) 211 [M + H]<sup>+</sup> (48), 210 [M<sup>+</sup> (25)], 179 (58), 154 (100), 136 (63), 107 (18), 89 (15), 77 (13), 65 (5) [C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>]

#### 4.3.3.2 Obtención de la liquexantona (27) de la fracción PT<sub>3</sub>

La fracción primaria PT<sub>3</sub> (3.5 g) mostró por cromatografía en capa fina un compuesto visible con luz UV, el cual generaba un cromóforo de color amarillo al ser revelado con sulfato cérico amoniacal. Este compuesto se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa, utilizando ocho placas para cromatografía de gel de sílice de 20 × 20 cm. Como fase móvil se empleó una mezcla de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2:8 y el proceso de elución se realizó en tres ocasiones. Como resultado del procedimiento anterior se obtuvieron 80 mg del compuesto **27**, en forma de un sólido cristalino de color amarillo, soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, p. f. 188-190 °C; UV (EtOH)  $\lambda_{\max}$  374, 320, 257, 206; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 3440, 1655, 1457, 824; **RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  13.37 (1H, s, OH-1), 6.68 (1H, *d*, *J* = 2.5, H-5), 6.65 (1H, *d*, *J* = 2.5, H-7), 6.32 (1H, *d*, *J* = 2.5, H-4), 6.30 (1H, *d*, *J* = 2.5, H-2), 3.89 (3H, s, CH<sub>3</sub>O-3), 3.87 (3H, s, CH<sub>3</sub>O-6), 2.84 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8); **RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$  163.8 (C-1), 96.8 (C-2), 157.0 (C-3), 92.1 (C-4), 159.4 (C-4a), 98.5 (C-5), 159.4 (C-5a), 165.8 (C-6), 115.4 (C-7), 143.5 (C-8), 113.0 (C-8a), 182.4 (C-9), 104.1 (C-9a), 55.7 (CH<sub>3</sub>O-3,6), 23.4 (CH<sub>3</sub>-8); **EMIE** *m/z* (int. rel.) 286 [M<sup>+</sup> (100)], 285 (8), 257 (27), 243 (8), 228 (3), 214 (3), 200 (3) [C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>].

#### 4. Sección Experimental

##### 4.3.3.3 Obtención del $\beta$ -orcinol carboxilato de metilo (54) de la fracción activa PT<sub>4</sub>

De la fracción bioactiva PT<sub>4</sub> (150 mg) precipitó un sólido amorfo de color amarillo. El análisis mediante cromatografía en capa fina de este sólido permitió detectar la presencia de dos constituyentes. La separación de los productos se realizó mediante una cromatografía preparativa en capa delgada, para lo cual se utilizaron cuatro cromatoplasmas de gel de sílice de 20 × 20 cm y una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 99:1 como sistema de elución. Este procedimiento permitió obtener 50 mg adicionales del compuesto **27** y 55 mg del producto **54**, este último bajo la forma de un sólido cristalino de color amarillo paja, soluble en MeOH, p. f. 142-145 °C; **RMN**-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  12.02 (1H, s, OH-2), 6.21 (1H, s, H-5), 5.06 (1H, s, OH-4), 3.92 (3H, s, CH<sub>3</sub>O-7), 2.46 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8), 2.10 (3H, s, CH<sub>3</sub>-9); **RMN**-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$  172.6 (C-7), 163.2 (C-2), 158.0 (C-4), 140.2 (C-6), 110.5 (C-5), 108.4 (C-3), 105.3 (C-1), 51.7 (CH<sub>3</sub>O-7), 24.0 (CH<sub>3</sub>-8) 7.6 (CH<sub>3</sub>-9); **EMIE** *m/z* (int. rel.) 196 [M<sup>+</sup> (58)], 164 (100), 136 (87), 107 (10), 77 (5) [C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>].

##### 4.3.3.4 Obtención del orselinato de metilo (50) de la fracción PT<sub>5</sub>

El compuesto **50** (9.3 g) cristalizó de manera espontánea de la fracción primaria PT<sub>5</sub>, como un sólido de color rojo, soluble en MeOH, p. f. 136-138 °C; **RMN**-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)  $\delta$  11.82 (1H, s, OH-2), 6.25 (1H, *d*, *J* = 2.6, H-5), 6.23 (1H, *d*, *J* = 2.6, H-3), 3.91 (3H, s, CH<sub>3</sub>O-7), 2.57 (1H, s, OH-4), 2.47 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8); **RMN**-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz)  $\delta$  171.8 (C-7), 164.4 (C-2), 161.5 (C-4), 143.3 (C-6), 111.4 (C-5), 104.2 (C-3), 100.4 (C-1), 51.3 (CH<sub>3</sub>O-7), 23.8 (CH<sub>3</sub>-8); **EMIE** *m/z* (int. rel.) 182 [M<sup>+</sup> (53)], 151 (33), 150 (100), 122 (40), 121 (6), 94 (7) [C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>].

##### 4.3.3.5 Obtención del ácido difractalico (55) de la fracción activa PT<sub>7</sub>

La fracción primaria PT<sub>7</sub> (34 g) se fraccionó mediante una cromatografía en columna, empleando 680 g de gel de sílice como adsorbente y diferentes combinaciones de hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH, como eluyentes. Se recolectaron 62

fracciones de 250 mL cada una, mismas que se reunieron en cuatro grupos después de determinar su homogeneidad cromatográfica (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Resumen de la cromatografía en columna de la fracción primaria activa PT<sub>7</sub>.

Eluyente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas (clave)
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	1-33	
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	4-22	1-33 (PT <sub>7</sub> -A) 34-42 (PT <sub>7</sub> -B)*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	23-35	43-58 (PT <sub>7</sub> -C) 59-62 (PT <sub>7</sub> -D)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	36-58	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	50:50	59-62	

\*Fracción fitotóxica

La fracción secundaria PT<sub>7</sub>-B (3.3 g), se cromatografió en una columna empacada con 80 g de gel de sílice como adsorbente. Como eluyentes se utilizaron diferentes proporciones de hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH. Se obtuvieron 206 fracciones de 50 mL cada una y el análisis cromatográfico en capa fina de las mismas permitió combinarlas en seis grupos. En el Cuadro 12 se resume este proceso.

La fracción terciaria PT<sub>7</sub>-BV (117 mg) se sometió a un proceso de separación mediante una cromatografía en capa fina preparativa, para lo cual se utilizaron cuatro placas para cromatografía de gel de sílice de 20 × 20 cm. Como fase móvil se utilizó una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH en una proporción de 92:8. Las placas se eluyeron en una ocasión y después de procesarlas de la forma convencional, se obtuvieron 8 mg del compuesto **55** como un sólido cristalino de color rojo, soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, p. f. 189-190 °C; IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 3422, 2927, 2851, 1731, 1651, 1606, 1454, 1404, 1252, 1136; **RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  11.74 (1H, s, OH-2'), 6.62 (1H, s, H-5'), 6.54 (1H, s, H-5), 3.87 (3H, s, CH<sub>3</sub>O-4), 3.85 (3H, s, CH<sub>3</sub>O-2), 2.61 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8'), 2.47 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8), 2.18 (3H, s, CH<sub>3</sub>-9'), 2.16 (3H, s, CH<sub>3</sub>-9); **RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$  174.8 (C-7'), 166.2 (C-7), 163.8 (C-2'), 160.1 (C-4), 157.2 (C-2), 154.1 (C-4')

#### 4. Sección Experimental

140.9 (C-6'), 135.5 (C-6), 119.6 (C-1), 117.6 (C-1'), 117.4 (C-3), 116.7 (C-5'), 108.4 (C-3'), 108.1 (C-5), 62.1 (CH<sub>3</sub>O-2), 55.7 (CH<sub>3</sub>O-4), 24.1 (CH<sub>3</sub>-8'), 20.2 (CH<sub>3</sub>-8), 9.1 (CH<sub>3</sub>-9), 8.9 (CH<sub>3</sub>-9'); **EMIE** *m/z* (int. rel.) 374 [M<sup>+</sup> (5)], 193 (100), 181 (2) [C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>]

**Cuadro 12.** Resumen de la cromatografía en columna de la fracción secundaria activa PT<sub>7</sub>-B.

Eluyente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas (clave)
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	1-34	
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	35-50	
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	51-72	1-5 (PT <sub>7</sub> -BI)
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10:90	73-101	6-70 (PT <sub>7</sub> -BII)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	102-139	71-118 (PT <sub>7</sub> -BIII)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	99:1	140-151	11-147 (PT <sub>7</sub> -BIV)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95:5	152-203	148-201 (PT <sub>7</sub> -BV)*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80:20	204-205	202-206 (PT <sub>7</sub> -BVI)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	60:40	206	

\*Fracción fitotóxica

#### 4.3.3.6 Obtención del ácido girofórico (22), del orcinol (120) y de la lecanorina (121) de la fracción activa PT<sub>8</sub>

La fracción fitotóxica PT<sub>8</sub> (55 g) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta, utilizando 750 g de gel de sílice y como eluyentes hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH, en diferentes proporciones. Como resultado de este proceso se obtuvieron 64 fracciones de 500 mL cada una. En el Cuadro 13 se muestran los disolventes empleados, su proporción y las fracciones reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica.

**Cuadro 13.** Resumen de la cromatografía en columna de la fracción primaria fitotóxica PT<sub>8</sub>

Eluyente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas (clave)
			2-4 (PT <sub>8</sub> -A)
			5-7 (PT <sub>8</sub> -B)
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	1-54	8-10 (PT <sub>8</sub> -C)
			11-19 (PT <sub>8</sub> -D)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	55-62	20-34 (PT <sub>8</sub> -E)
			35-39 (PT <sub>8</sub> -F)*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	70:30	63-64	40-62 (PT <sub>8</sub> -G)
			63-64 (PT <sub>8</sub> -H)*

\*Fracciones fitotóxicas

Cada una de las fracciones secundarias resultantes se evaluó mediante el ensayo de bioautografía, encontrándose que la actividad fitotóxica se concentraba en las identificadas como PT<sub>8</sub>-F y PT<sub>8</sub>-H. El análisis cromatográfico de la fracción PT<sub>8</sub>-F permitió detectar la presencia de una mezcla conformada por dos compuestos, los cuales se separaron mediante cromatografía en capa fina preparativa empleando como sistema de elución CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH en una proporción de 93:7. De esta manera se obtuvieron 45 mg del producto **120**, en forma de un sólido amorfo de color café rojizo, **RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ 6.50 (1H, s, OH-3), 6.20 (1H, d, J = 2.4, H-2), 6.17 (2H, d, J = 1.8, H-4,6), 5.33 (1H, s, OH-1), 2.18 (3H, s, CH<sub>3</sub>-7); **RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) δ 157.7 (C-1,3), 139.7 (C-5), 107.5 (C-4,6), 99.8 (C-2), 21.1 (CH<sub>3</sub>-7); **EMIE** m/z (int. rel.) 370 [M<sup>+</sup> (124) [C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>]; y 20 mg del compuesto **121**, como un sólido cristalino de color blanco soluble en MeOH, p. f. 152-153 °C; **RMN-<sup>1</sup>H** (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500 MHz) δ 7.07 (1H, ddd, J = 2.2, 2.0, 0.5, H-2'), 6.94 (1H, ddq, J = 2.1, 1.5, 1.0, H-6'), 6.82 (1H, dd, J = 2.5, 0.5, H-3), 6.74 (1H, ddq, J = 2.2, 1.5, 1.0, H-4'), 6.70 (1H, dd, J = 2.5, 0.5, H-5), 4.00 (1H, s, OH-1'), 3.80 (1H, s, OH-4), 2.66 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8), 2.25 (3H, s, CH<sub>3</sub>-7'); **RMN-<sup>13</sup>C** (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 125 MHz) δ 170.1 (C-7), 165.3 (C-4), 164.2 (C-2), 159.7 (C-1'), 151.7 (C-3'), 143.3 (C-6), 140.4 (C-5'), 114.5 (C-6'), 113.5 (C-4'), 112.4 (C-5), 107.3 (C-2'), 105.6

#### 4. Sección Experimental

(C-1), 101.7 (C-3), 23.6 (CH<sub>3</sub>-8), 21.0 (C-7'); **EMIE** *m/z* (int. rel.) 274 [M<sup>+</sup> (15)], 151 (100) [C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>]

Por último, de la fracción secundaria fitotóxica PT<sub>8</sub>-H precipitaron espontáneamente 18.6 g del compuesto **22** como un sólido amorfo amarillo, soluble en DMSO; **IR** (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 3319, 3095, 2981, 1670, 1610, 1503, 1462, 1240, 1068, 996, 794; **RMN-<sup>1</sup>H** (DMSO, 500 MHz)  $\delta$  10.46 (1H, s, OH-2'), 10.29 (1H, s, OH-2), 10.00 (1H, s, OH-2''), 6.67 (1H, *d*, *J* = 2.0, H-3'), 6.66 (1H, *d*, *J* = 2.0, H-5'), 6.64 (1H, *d*, *J* = 2.0, H-3''), 6.61 (1H, *d*, *J* = 2.0, H-5''), 6.23 (1H, *d*, *J* = 2.0, H-3), 6.22 (1H, *d*, *J* = 2.0, H-5), 3.30 (1H, s, OH-4), 2.37 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8'), 2.36 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8), 2.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8''); **RMN-<sup>13</sup>C** (DMSO, 125 MHz)  $\delta$  170.4 (C-7''), 167.1 (C-7), 165.6 (C-7'), 161.1 (C-4), 160.0 (C-2), 158.5 (C-2''), 156.3 (C-2'), 152.1 (C-4', 4''), 140.9 (C-6), 139.5 (C-6''), 138.0 (C-6'), 118.0 (C-1'), 117.1 (C-1''), 114.5 (C-5''), 114.2 (C-5'), 109.8 (C-5), 108.4 (C-1), 107.2 (C-4), 107.2 (C-3''), 100.5 (C-3), 21.3 (CH<sub>3</sub>-8), 20.9 (CH<sub>3</sub>-8''), 19.4 (CH<sub>3</sub>-8'); **EMFAB+** *m/z* (int. rel.) 469 [M + H]<sup>+</sup> (4), 468 [M<sup>+</sup> (2)], 424 (1), 301 (11), 257 (3), 151 (100), 136 (56), 107 (15) [C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>].

#### 4.4 Estudio químico de la segunda recolecta del líquen *Parmotrema tinctorum* Nyl. (Hale)

##### 4.4.1 Material líquénico

El material líquénico fue recolectado por el Dr. Fernando Calzada en la región de Ayotzingo, Estado de México, México e identificado por el Dr. Gastón Guzmán del Instituto de Ecología de la Universidad de Jalapa. Una muestra de referencia (Voucher FC-1999-L) se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional (MEXU), del Instituto de Biología de la UNAM.

##### 4.4.2 Métodos de extracción y de fraccionamiento preliminar

El material seco y molido (200 g) se sometió en dos ocasiones a un proceso de maceración, con 2 L de una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 1:1. El extracto resultante

se filtró y se concentró a presión reducida, obteniéndose de esta manera 10 g de un residuo de color café oscuro.

El extracto orgánico de *P. tinctorum* se fraccionó mediante una cromatografía en columna, utilizando 200 g de gel de sílice como adsorbente y como fase móvil un gradiente de hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH. Se recolectaron 127 fracciones de 75 mL cada una, las cuales se reunieron en cuatro grupos de acuerdo a su homogeneidad cromatográfica en capa fina. La actividad fitotóxica de las fracciones resultantes se evaluó mediante un método bioautográfico. En el Cuadro 14 se resumen los eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos y las fracciones combinadas.

**Cuadro 14.** Resumen del fraccionamiento primario del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH obtenido de la segunda recolecta del líquen *Parmotrema tinctorum*.

Eluyente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas (clave)
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	1-19	1-24 (PT <sub>I</sub> )
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	20-96	25-53 (PT <sub>II</sub> )*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	97-109	54-115 (PT <sub>III</sub> )
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	110-126	116-127 (PT <sub>IV</sub> )*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	60:40	127	

\*Fracciones fitotóxicas

#### 4.4.3 Aislamiento y purificación de los compuestos presentes en las fracciones primarias

##### 4.4.3.1 Obtención del hematomato de metilo (46) y del β-orcinol carboxilato de metilo (54) de la fracción activa PT<sub>I</sub>

De la fracción primaria activa PT<sub>I</sub> precipitó un sólido amorfo de color amarillo. La cromatografía de este sólido reveló la presencia de los compuestos 46 y 54. La separación de estos productos se realizó mediante una cromatografía preparativa en capa delgada, para lo cual se utilizaron dos cromatoplasmas de 20 × 20 cm. Como fase móvil se empleó una mezcla de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 3:7 y el proceso de elución se



#### 4. Sección Experimental

llevó a cabo repetidamente (2×). Como resultado de este procedimiento se obtuvieron 15 mg adicionales del compuesto **46** y 5 mg del **54**.

##### 4.4.3.2 Obtención del ácido (+)-úsnicico (**32**) de la fracción activa PT<sub>II</sub>

A partir de la fracción primaria fitotóxica PT<sub>II</sub> precipitaron 104 mg de un sólido amorfo de color amarillo. El análisis cromatográfico de este sólido permitió detectar la presencia de un producto mayoritario el cual se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa, utilizando cinco cromatoplasmas de gel de sílice de 20 × 20 cm y como sistema de elución una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 99:1. El procedimiento anterior permitió la obtención de 85 mg del producto **32** como un sólido cristalino de color amarillo, soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, p. f. 198-200 °C;  $[\alpha]_D^{25} +488^\circ$  (c 1 mg/mL CHCl<sub>3</sub>); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 3350, 3077, 3008, 2965, 2875, 1685, 1605; RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  18.80 (1H, s, OH-3), 13.30 (1H, s, OH-8), 11.00 (1H, s, OH-10), 6.00 (1H, s, H-4), 2.70 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18), 2.60 (3H, s, CH<sub>3</sub>-15), 2.10 (3H, s, CH<sub>3</sub>-16), 1.80 (3H, s, CH<sub>3</sub>-13); RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  200.3 (C-17), 201.8 (C-14), 198.0 (C-1), 191.7 (C-3), 179.4 (C-5), 163.8 (C-8), 157.5 (C-10), 155.2 (C-6), 109.3 (C-9), 105.2 (C-2), 103.9 (C-11), 101.5 (C-7), 98.3 (C-4), 59.0 (C-12), 32.1 (CH<sub>3</sub>-13), 31.3 (CH<sub>3</sub>-18), 27.9 (CH<sub>3</sub>-15), 7.5 (CH<sub>3</sub>-16); EMIE *m/z* (int. rel.) 344 [M<sup>+</sup> (68)], 262 (75), 233 (100), 217 (23), 215 (9), 149 (5), 115 (3) [C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>].

##### 4.4.3.3 Obtención del ácido girofórico (**22**) y del orselinato de metilo (**50**) de la fracción activa PT<sub>IV</sub>

De la fracción bioactiva PT<sub>IV</sub> (654 mg) cristalizaron 7.0 mg del compuesto **50**. El resto de la fracción (647 mg) se cromatografió en una columna abierta sobre gel de sílice (15 g). Se obtuvieron 72 fracciones de 30 mL cada una, utilizando como eluyentes hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH, en diferentes proporciones. En el Cuadro 15 se resumen los datos referentes a este fraccionamiento secundario.

**Cuadro 15.** Resumen de la cromatografía en columna de la fracción primaria fitotóxica PT<sub>IV</sub>

Eluyente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas (clave)
			1-23 (PT <sub>IV</sub> -A)
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	1-66	24-27 (PT <sub>IV</sub> -B)
			28-34 (PT <sub>IV</sub> -C)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95:5	67-72	35-66 (PT <sub>IV</sub> -D)
			67-72 (PT <sub>IV</sub> -E)*

\*Fracciones fitotóxicas

Cada una de las fracciones secundarias resultantes se evaluó mediante el ensayo de bioautografía, encontrándose que la actividad fitotóxica se concentraba en la fracción PT<sub>IV</sub>-E. A partir de esta fracción precipitaron espontáneamente 78.5 mg del compuesto **22**.

#### 4.5 Estudio fitoquímico de la especie *Leucophyllum ambiguum* Humb. & Bonpl.

##### 4.5.1 Material vegetal

El material vegetal fue adquirido en el mercado *La República*, en el centro de la ciudad de San Luis Potosí e identificado por el Dr. Robert Bye del Instituto de Biología de la UNAM. Una muestra de referencia (Voucher R. Bye 20021) se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología, UNAM.

##### 4.5.2 Métodos de extracción y de fraccionamiento preliminar

El material vegetal seco y molido (2.8 kg), se extrajo en cuatro ocasiones mediante un proceso de maceración, utilizando una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 1:1. El

#### 4. Sección Experimental

extracto resultante se filtró y se concentró al vacío, obteniéndose 752 g de extracto seco.

El extracto total se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta, utilizando 700 g de gel de sílice como adsorbente. El proceso de elución se realizó con hexano, mezclas de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH y MeOH. Se recolectaron un total de 80 fracciones de 1 L cada una, las cuales se analizaron mediante cromatografía en capa fina, reuniéndose todas aquellas que cromatográficamente resultaron similares. De esta forma se obtuvieron nueve grupos de fracciones primarias y su actividad fitotóxica se determinó mediante un método bioautográfico. En el Cuadro 16 se resume este proceso de fraccionamiento

**Cuadro 16.** Resumen del fraccionamiento preliminar mediante cromatografía abierta del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH obtenido de *Leucophyllum ambiguum*.

Eluyente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas (clave)
			1-2 (LA <sub>1</sub> )
			3-9 (LA <sub>2</sub> )
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	1-9	10-21 (LA <sub>3</sub> )*
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	10-21	22-23 (LA <sub>4</sub> )*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	22-25	24-25 (LA <sub>5</sub> )*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80:20	26-45	26-36 (LA <sub>6</sub> )
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	70:30	46-53	37-45 (LA <sub>7</sub> )
MeOH	100	54-72	46-53 (LA <sub>8</sub> )
			54-72 (LA <sub>9</sub> )

\*Fracciones fitotóxicas

#### 4.5.3 Aislamiento y purificación de los compuestos presentes en las fracciones primarias

##### 4.5.3.1 Obtención del ácido trans-cinámico (122) de la fracción activa LA<sub>3</sub>

La fracción fitotóxica LA<sub>3</sub> (20 g) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta. Como adsorbente se utilizó gel de

silíce (400 g) y como eluyentes combinaciones de hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH, en diferentes proporciones. De esta manera se obtuvieron 115 fracciones de 400 mL cada una, las cuales fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica (Cuadro 17). La bioautografía de los grupos de fracciones resultantes permitió evidenciar una actividad fitotóxica importante en las fracciones LA<sub>3</sub>-C y LA<sub>3</sub>-D

**Cuadro 17.** Resumen de la cromatografía en columna de la fracción primaria fitotóxica LA<sub>3</sub>.

Eluyente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas (clave)
Hexano	100	1-9	1-15 (LA <sub>3</sub> -A)
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80-20	10-22	16-28 (LA <sub>3</sub> -B)
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60-40	23-40	29-45 (LA <sub>3</sub> -C)*
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30-70	41-58	46-54 (LA <sub>3</sub> -D)*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	59-68	55-66 (LA <sub>3</sub> -E)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90-10	69-80	67-80 (LA <sub>3</sub> -F)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80-20	81-90	81-95 (LA <sub>3</sub> -G)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	70-30	91-100	96-105 (LA <sub>3</sub> -H)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	60-40	101-115	106-115 (LA <sub>3</sub> -I)

\*Fracciones fitotóxicas

La fracción secundaria bioactiva LA<sub>3</sub>-D (3.9 g) se cromatografió en una columna abierta sobre 80 g de gel de sílice. Como eluyentes se utilizaron CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con cantidades crecientes de MeOH. En el Cuadro 18 se encuentra resumido este proceso y se indican las fracciones que presentaron actividad fitotóxica de acuerdo a su análisis bioautográfico.

De la fracción primaria LA<sub>3</sub>-DIII precipitaron 80 mg de un sólido de color verde. El producto se lavó con mezclas de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y posteriormente se cristalizó de MeOH-acetona, obteniéndose 45 mg del compuesto **122**, como un producto cristalino de color amarillo, soluble en MeOH, p. f. 133-134 °C; UV (EtOH) λ<sub>máx</sub> nm 273; IR (KBr) ν<sub>máx</sub> cm<sup>-1</sup> 3024, 1681, 1631, 1493; RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ 7.70 (1H, *d*, *J* = 15.9, H-3), 7.60 (1H, *m*, H-2'), 7.60 (1H, *m*, H-6'), 7.40 (3H, *m*, H-

#### 4. Sección Experimental

3',4', 5'), 6.50 (1H, *d*, *J* = 16.2, H-2); **RMN-<sup>13</sup>C** (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) δ 170.3 (C-3), 146.3 (C-3), 135.8 (C-1'), 131.4 (C-4'), 130.0 (C-2',6'), 129.2 (C-3',5'), 119.3 (C-2); **EMIE** *m/z* (int. rel.) 148 [*M*<sup>+</sup> (87)], 147 (100), 103 (48), 77 (31), 51 (17) [C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>]

**Cuadro 18.** Resumen del fraccionamiento terciario de la fracción secundaria fitotóxica LA<sub>3</sub>-D.

Eluyente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas (clave)
			1-25 (LA <sub>3</sub> -DI)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	1-28	26-42 (LA <sub>3</sub> -DII)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	2-45	43-55 (LA <sub>3</sub> -DIII)*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80:20	46-70	56-62 (LA <sub>3</sub> -DIV)
			63-70 (LA <sub>3</sub> -DV)

\*Fracciones fitotóxicas

#### 4.5.3.2 Obtención de la 2',2''-dimetoxisesamina (123) de la fracción activa LA<sub>4</sub>

La fracción primaria fitotóxica LA<sub>4</sub> (60 g) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta, utilizando 900 g de gel de sílice como adsorbente. El proceso de elución se llevó a cabo empleando hexano CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH, en distintas proporciones. Se recolectaron 155 fracciones de 300 mL cada una, mismas que se reunieron considerando su homogeneidad cromatográfica. Este proceso generó nueve grupos de fracciones secundarias y su evaluación por el método bioautográfico permitió detectar la actividad fitotóxica en las identificadas como LA<sub>4</sub>-C y LA<sub>4</sub>-E (Cuadro 19).

Posteriormente, la fracción secundaria activa LA<sub>4</sub>-C (10.5 g) se recromatografió en una columna abierta sobre gel de sílice (200 g). Como eluyentes se utilizaron hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH, en diferentes proporciones. Se obtuvieron 95 fracciones de 250 mL cada una y, después de analizar sus características cromatográficas, se reunieron en seis grupos. La evaluación de cada una de estas fracciones por el método bioautográfico permitió concluir que la designada como LA<sub>4</sub>-CIV demostraba una actividad fitotóxica significativa (Cuadro 20).

**Cuadro 19.** Resumen del fraccionamiento secundario de la fracción primaria fitotóxica LA<sub>4</sub>

Eluyente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas (clave)
Hexano	100	1-30	1-25 (LA <sub>4</sub> -A) 26-40 (LA <sub>4</sub> -B)
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	31-52	41-60 (LA <sub>4</sub> -C)*
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	53-80	61-75 (LA <sub>4</sub> -D)
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	81-102	76-90 (LA <sub>4</sub> -E)*
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	103-115	91-105 (LA <sub>4</sub> -F)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	116-130	106-115 (LA <sub>4</sub> -G)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	131-150	116-140 (LA <sub>4</sub> -H)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	70:30	151-155	141-155 (LA <sub>4</sub> -I)

\*Fracciones fitotóxicas

**Cuadro 20.** Resumen del fraccionamiento terciario de la fracción secundaria fitotóxica LA<sub>4</sub>-C.

Eluyente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas (clave)
Hexano	100	1-20	1-15 (LA <sub>4</sub> -CI)
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	21-30	16-28 (LA <sub>4</sub> -CII)
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	31-45	29-42 (LA <sub>4</sub> -CIII)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	46-65	43-61 (LA <sub>4</sub> -CIV)*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	66-80	62-75 (LA <sub>4</sub> -CV)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80:20	81-95	76-95 (LA <sub>4</sub> -CVI)

\*Fracciones fitotóxicas

El producto **123** (60 mg) cristalizó de manera espontánea de la fracción terciaria fitotóxica LA<sub>4</sub>-CIV, como un sólido incoloro, soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, p. f. 102-104 °C;  $[\alpha]_D^{25} - 50^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{máx}}$  nm 277; IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup> 1630, 1610 1497, 1468, 1339, 1257, 1216, 1067, 1043, 757, 668; RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$

#### 4. Sección Experimental

6.80 (1H, *d*, *J* = 8.1, H-6'), 6.80 (1H, *d*, *J* = 8.1, H-6''), 6.50 (1H, *d*, *J* = 8.4, H-5'), 6.50 (1H, *d*, *J* = 8.4, H-5''), 5.90 (4H, *s*, 2OCH<sub>2</sub>O), 5.00 (1H, *d*, *J* = 3.9, H-2), 5.00 (1H, *d*, *J* = 3.9, H-6), 4.30 (2H, *m*, H-4ax, 8ax), 4.00 (6H, *s*, CH<sub>3</sub>O-2', CH<sub>3</sub>O-2''), 3.90 (2H, *m*, H-4eq, 8eq), 2.90 (2H, *m*, H-1, 5); **RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  148.7 (C-2', 2''), 140.7 (C-3', 3''), 136.3 (C-1', 1''), 127.3 (C-4', 4''), 118.5 (C-6', 6''), 102.2 (C-5', 5''), 100.9 (2 OCH<sub>2</sub>O), 81.7 (C-2, 6), 72.6 (C-4, 8), 59.5 (CH<sub>3</sub>O-2', CH<sub>3</sub>O-2''), 54.1 (C-1, 5); **EMIE** *m/z* (int. rel.) 414 [M<sup>+</sup> (90)], 383 (38), 233 (38), 203 (25), 191 (98), 179 (100), 165 (91), 161 (34), 152 (63), 151 (27), 133 (24) [C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>]

#### 4.5.3.3 Obtención de la 2'-metoxicobusina (124), de la cobusina (125) y de la 2'-metoxi-4''-hidroxi-desmetoxicobusina (126) de la fracción activa LA<sub>4</sub>-E

La fracción secundaria activa LA<sub>4</sub>-E (12.5 g) se cromatografió en una columna abierta utilizando 250 g de gel de sílice y como eluyentes hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH, en diversas proporciones. Se obtuvieron 105 fracciones de 250 mL cada una, las cuales fueron reunidas en seis grupos de acuerdo a su homogeneidad cromatográfica. Posteriormente, la bioautografía de estas fracciones indicó que la identificada con la clave LA<sub>4</sub>-EIII concentraba la actividad fitotóxica (Cuadro 21).

**Cuadro 21.** Resumen del fraccionamiento terciario de la fracción secundaria fitotóxica LA<sub>4</sub>-E.

Eluyente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas (clave)
Hexano	100	1-26	1-35 (LA <sub>4</sub> -EI)
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	27-40	36-57 (LA <sub>4</sub> -EII)
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	41-66	58-70 (LA <sub>4</sub> -EIII)*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	67-90	71-85 (LA <sub>4</sub> -EIV)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80:20	91-105	86-100 (LA <sub>4</sub> -EV)
			100-105 (LA <sub>4</sub> -EVI)

\*Fracciones fitotóxicas

La complejidad de la fracción terciaria fitotóxica LA<sub>4</sub>-EIII (7.0 g) hizo necesario un cuarto fraccionamiento, para lo cual se utilizó nuevamente una cromatografía en columna sobre gel de sílice. Se emplearon 210 g del adsorbente y el proceso de elución se llevó a cabo con un gradiente de polaridad de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH. Se recolectaron 80 fracciones de 150 mL cada una, las cuales, considerando su homogeneidad cromatográfica, se reunieron obteniéndose cuatro grupos de fracciones cuaternarias. El análisis bioautográfico de las mismas permitió detectar que la actividad fitotóxica se encontraba en las fracciones LA<sub>4</sub>-EIII<sub>b</sub> y LA<sub>4</sub>-EIII<sub>c</sub> (Cuadro 22).

**Cuadro 22.** Resumen del fraccionamiento cuaternario de la fracción terciaria fitotóxica LA<sub>4</sub>-EIII.

Eluyente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas (clave)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	1-63	1-29 (LA <sub>4</sub> -EIII <sub>a</sub> )
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	98:2	64-77	30-66 (LA <sub>4</sub> -EIII <sub>b</sub> )*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	78-80	67-79 (LA <sub>4</sub> -EIII <sub>c</sub> )*
			80 (LA <sub>4</sub> -EIII <sub>d</sub> )

\*Fracciones fitotóxicas

La cromatografía en capa fina de la fracción bioactiva LA<sub>4</sub>-EIII<sub>b</sub> (871 mg) permitió detectar la presencia de dos constituyentes. La separación de los productos se realizó mediante una cromatografía preparativa en capa delgada, para lo cual se utilizaron cromatoplasmas de 20 × 20 cm y una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 97:3 como sistema de elución. Este procedimiento permitió obtener 54 mg del compuesto **124**, bajo la forma de un sólido cristalino de color blanco, soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y con un punto de fusión de 90-92 °C y 40 mg del compuesto **125**, este último como un aceite incoloro, soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>;  $[\alpha]_D^{25} +453$  (CHCl<sub>3</sub>); **UV** (MeOH)  $\lambda_{\text{máx}}$  nm 232, 284; **IR** (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\text{máx}}$  cm<sup>-1</sup> 1607, 1592, 1504, 1490, 1443, 1255; **RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  6.90-6.80 (6H, *m*, H-2', 2'', 5', 5'', 6', 6''), 5.90 (2H, *s*, *J* = 4.2, OCH<sub>2</sub>O), 5.30 (2H, *sa* H-2, 6), 4.80 (1H, *dd*, *J* = 5.4, 8.2, H-8eq), 4.40 (1H, *d*, *J* = 9.0, H-4ax), 4.10 (1H, *d*, *J* = 9.6, H-8ax), 3.90 (6H, *s*, CH<sub>3</sub>O-3'', CH<sub>3</sub>O-4''), 3.80 (1H, *dd*, *J* = 3.4, 9.0, H-4eq), 2.90 (2H, *m*, H-1, 5), **RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  149.2 (C-4''), 148.8 (C-3''), 147.9



#### 4. Sección Experimental

(C-3', 4'), 135.1 (C-1', 1''), 119.6 (C-6', 6''), 109.0 (C-5', 5''), 106.5 (C-2')\*\*, 106.3 (C-2'')\*\*, 101.0 (OCH<sub>2</sub>O), 87.7 (C-2, 6), 71.0 (C-8), 69.7 (C-4), 55.9 (CH<sub>3</sub>O-3'', CH<sub>3</sub>O-4''), 54.6 (C-1)\*, 54.5 (C-5)\*; **EMIE** *m/z* (int. rel.) 370 [ $M^+$  (100)], 339 (10), 219 (16), 203 (25), 177 (32), 166 (34), 165 (68), 161 (24), 151 (38), 150 (25), 149 (78), 135 (40), 122 (14) [C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>].

Por otra parte, el análisis cromatográfico de la fracción bioactiva LA<sub>4</sub>-EIII<sub>c</sub> (3.4 g) reveló que estaba constituida por los compuestos **124**, **125** y por un tercer producto, por lo que se procedió a separarlos por medio de una cromatografía preparativa en capa delgada fina, empleando como sistema de elución CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, en una proporción de 98:2. Después de desarrollar la placa en tres ocasiones y de procesarla de la manera habitual, se obtuvieron 300 mg del compuesto **126**, este último bajo la forma de un aceite de color café, soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

##### 4.5.3.4 Obtención de la apigetrina (127) de la fracción activa LA<sub>5</sub>

La fracción primaria fitotóxica LA<sub>5</sub> (24.0 g) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta, utilizando 250 g de gel de sílice y como eluyentes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con cantidades crecientes de MeOH. Se recolectaron 106 fracciones de 250 mL cada una. En el Cuadro 23 se resume este procedimiento.

De la fracción secundaria inactiva LA<sub>5</sub>-G precipitaron espontáneamente 88 mg del compuesto **127**, en forma de un sólido cristalino de color amarillo, soluble en MeOH, *p. f.* 178-180 °C,  $[\alpha]_D^{25} +9.3$  (piridina-H<sub>2</sub>O 1:1); **UV** (MeOH)  $\lambda_{\text{máx}}$  nm 220, 268, 328; **IR** (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup> 3418, 2921, 1657, 1605, 1496; **RMN-<sup>1</sup>H** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$  12.90 (1H, s, OH-5), 10.40 (1H, s, OH-4'), 7.90 (1H, d, *J* = 9.0, H-6'), 7.90 (1H, d, *J* = 9.0, H-2'), 6.90 (1H, d, *J* = 8.7, H-3'), 6.90 (1H, d, *J* = 8.7, H-5'), 6.90 (1H, s, H-3), 6.80 (1H, d, *J* = 2.1, H-8), 6.40 (1H, d, *J* = 2.1, H-6), 5.10 (1H, d, *J* = 7.5, H-1''), 3.70 (1H, da, *J* = 10.2, H-6''), 3.50 (1H, m, H-5''), 3.30 (1H, m, H-3''); **RMN-<sup>13</sup>C** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz)  $\delta$  181.7 (C-4), 164.0 (C-2), 163.7 (C-7), 161.4 (C-5), 161.1 (C-4'), 157.3 (C-9), 128.4 (C-2',6'), 121.2 (C-1'), 115.9 (C-3',5'), 102.8 (C-10), 103.7 (C-3), 99.8 (C-6), 93.9 (C-8); **EMFAB+** *m/z* (int. rel.) 433 [ $M + H]^+$  (4), 432 [ $M^+$  (2)], 270 (3), 163 (3), 154 (100), 118 (3), 94 (4), (59) [C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>].

**Cuadro 23.** Resumen del fraccionamiento secundario de la fracción primaria bioactiva LA<sub>5</sub>

Eluyente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas (clave)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	1-15	1-41 (LA <sub>5</sub> -A)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	98:2	16-30	42-45 (LA <sub>5</sub> -B)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	94:6	31-39	46-48 (LA <sub>5</sub> -C)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	92:8	40-77	49-54 (LA <sub>5</sub> -D)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	78-94	55-65 (LA <sub>5</sub> -E)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80:20	95-102	66-71 (LA <sub>5</sub> -F)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	50:50	103-106	72-97 (LA <sub>5</sub> -G)
			98-106 (LA <sub>5</sub> -H)

\*Fracciones fitotóxicas

#### 4.5.3.5 Obtención de la apigenina (128) de las fracciones LA<sub>7</sub> y LA<sub>8</sub>

El compuesto **128** (1.5 g) precipitó de manera espontánea de las fracciones primarias LA<sub>7</sub> y LA<sub>8</sub>, como un sólido cristalino de color amarillo, soluble parcialmente en MeOH y en acetona, **p. f.** 345-347 °C;  $[\alpha]_D^{25} +15.5$  (piridina-H<sub>2</sub>O 1:1); **UV** (MeOH)  $\lambda_{\text{máx}}$  nm 269, 359; **IR** (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup> 2956, 1657, 1599, 1462; **RMN-<sup>1</sup>H** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$  13.00 (1H, s, OH-5), 10.50 (2H, s, OH-4', OH-7), 7.90 (1H, *d*, *J* = 8.8, H-6'), 7.90 (1H, *d*, *J* = 8.8, H-2'), 6.90 (1H, *d*, *J* = 8.8, H-3'), 6.90 (1H, *d*, *J* = 8.8, H-5'), 6.80 (1H, s, H-3), 6.50 (1H, *d*, *J* = 2.0, H-8), 6.20 (1H, *d*, *J* = 2.1, H-6); **RMN-<sup>13</sup>C** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz)  $\delta$  181.9 (C-4), 164.2 (C-2), 162.9 (C-7), 161.3 (C-5), 161.0 (C-4'), 156.9 (C-9), 128.5 (C-2',6'), 121.0 (C-1'), 115.9 (C-3',5'), 105.3 (C-10), 103.0 (C-3), 99.9 (C-1''), 99.5 (C-6), 94.8 (C-8), 77.1 (C-5''), 76.4 (C-3''), 73.0 (C-2''), 69.5 (C-4''), 60.6 (C-6''); **EMIE** *m/z* (int. rel.) 270 [M<sup>+</sup> (100)], 269 (43), 153 (22), 152 (16), 124 (18), 123 (10), 121 (6), 118 (14) [C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>].

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

#### *4. Sección Experimental*

##### *4.6 Caracterización de los productos naturales*

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

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no se encuentran corregidos.

Los espectros en el infrarrojo se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer FT 1605, en pastilla de KBr o en película de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

Las rotaciones ópticas y los espectros en el UV se obtuvieron en un polarímetro digital JASCO Dip 360 y en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 202, respectivamente.

Los espectros de masas se determinaron en un equipo Jeol 5X 102A, mediante introducción directa a 70 eV, en tanto que los espectros de masas generados mediante bombardeo rápido de átomos (modalidad positivo) se obtuvieron en un aparato Jeol JMS-SX102A, bombardeando las muestras con 10 keV átomos de Xe y suspendiéndolas en nba.

Los experimentos anteriores se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química, UNAM.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica ( $\text{RMN-}^1\text{H}$ ) y de carbono 13 ( $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ ) se determinaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química y en el Instituto de Química, UNAM y se obtuvieron en un aparato Varian Unity INOVA, el cual se operó a una frecuencia de 300 o de 75 MHz. Los espectros HMBC y HMQC fueron realizados en la UAM Iztapalapa y se generaron en un equipo Bruker DMX500, operado a 500 o a 125 MHz. Los desplazamientos químicos de los espectros se asignaron en unidades  $\delta$  (ppm), referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Se realizaron secuencias de pulsos estándares Varian para el registro de los espectros de RMN bidimensional homonuclear ( $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY).

Los estudios de difracción de rayos X se efectuaron en el Instituto de Química, UNAM y se obtuvieron en un difractómetro Nicolet R3m.

**4.6.2 Pruebas químicas preliminares para la identificación de glicósidos**

**4.6.2.1 Hidrólisis enzimática de la apigetrina (127)**

A 5 mg del compuesto **127** se adicionaron 1 mL de agua destilada y 5 mg de la enzima  $\beta$ -glucosidasa (Sigma Tipo I). La reacción se incubó a 36 °C durante 72 hr y posteriormente se extrajo con  $\text{CHCl}_3$ . La fase acuosa se empleó para la detección cromatográfica de los azúcares.

**4.6.2.2 Hidrólisis ácida de la apigetrina (127)**

A 5 mg del compuesto **127** se añadió 1 mL de HCl 1N y se sometió a reflujo durante 30 min. Al cabo de ese tiempo, la disolución ácida se extrajo con  $\text{CHCl}_3$  y la fase orgánica obtenida se sometió a un proceso de partición con  $\text{NaHCO}_3$  al 10 % y con  $\text{H}_2\text{O}$  y, posteriormente, se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La fase acuosa se utilizó para la detección cromatográfica de los azúcares.

**4.6.2.3 Detección de azúcares**

Los azúcares se detectaron por comparación en cromatografía en capa fina con muestras auténticas adquiridas comercialmente de la casa Merck [L-(+)-arabinosa, D-(-)-fructosa, D-(+)-galactosa, D-(+)-glucosa, D-(+)-sacarosa]. Como sistema de elución se utilizó una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  64:50:10 y como agente cromógeno, anisaldehído.

**4.6.3 Preparación del derivado metilado de la 2'-metoxi-4''-hidroxi-desmetoxicobusina (126)**

A 10 mg del producto **126** disuelto en MeOH, se adicionaron 10 mL de una disolución etérea de diazometano y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 hrs. La disolución de diazometano se generó a partir de una disolución de KOH (5 g en 7.5 mL de agua destilada), 25 mL de MeOH, 15 mL de éter etílico y 21.5 g de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluensulfonamida (Diazald Aldrich), en 45 mL de éter

#### *4. Sección Experimental*

etílico. La mezcla de reacción anterior se mantuvo en agitación continua a una temperatura de 5 °C . El diazometano se destiló a 60 °C utilizando un baño María y se recolectó en un recipiente introducido en un baño de hielo.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación se desarrolló utilizando las estrategias metodológicas convencionales para el descubrimiento de fitotoxinas de origen natural (Duke y Lydon, 1987, 1993; Duke y Abbas, 1995; Cordell, 1995). En primer lugar se llevó a cabo la preselección de las especies *Parmotrema tinctorum* Nyl (Hale) y *Leucophyllum ambiguum* Humb. & Bonpl., con base en consideraciones quimiotaxonómicas. A continuación se prepararon extractos orgánicos a pequeña escala de las especies preseleccionadas, con la finalidad de determinar su potencial fitotóxico. Este último proceso permitió la selección de las dos especies como organismos apropiados para la obtención de fitotoxinas, por lo que se iniciaron los estudios químicos biodirigidos que permitieron la obtención de los metabolitos secundarios activos, y posteriormente se procedió a su caracterización y evaluación biológica. Por último, los productos fitotóxicos caracterizados fueron objeto de una serie de estudios preliminares conducentes a la determinación de sus posibles blancos de acción a nivel molecular. Los resultados obtenidos en esta investigación se encuentran integrados en dos partes. La primera parte abarca todos los aspectos relacionados con la investigación química de dos recolectas diferentes del líquen *P tinctorum*. Así mismo, se discute el potencial fitotóxico de los metabolitos aislados, su efecto sobre las reacciones de transferencia de electrones de la fotosíntesis, la síntesis de ADN durante la germinación de semillas y sobre la proteína calmodulina. Parte de estos resultados permitieron la integración de un manuscrito que fue publicado en el *Journal of Natural Products* 63, 1396 (2000). La segunda parte se enfoca al estudio fitoquímico de la especie vegetal *L. ambiguum* y a la evaluación del potencial fitotóxico de los productos naturales aislados de la misma.

### 5.1 Investigación de las fitotoxinas de *Parmotrema tinctorum* Nyl. (Hale)

#### 5.1.1 Preselección y selección del líquen *Parmotrema tinctorum*

La preselección de la especie *Parmotrema tinctorum* se realizó con base en un criterio quimiotaxonómico, ya que los líquenes constituyen una fuente valiosa de metabolitos con actividad biológica y, en particular, las especies pertenecientes a la

## 5. Resultados y Discusión

familia Parmeliaceae biosintetizan una amplia gama de metabolitos biodinámicos (Culberson y Elix, 1989; Lawrey, 1995, Huneck, 1999; *inter alia*).

Posteriormente, los resultados obtenidos de la determinación del efecto de los extractos orgánicos preparados a partir de dos recolectas de esta especie, sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de las especies arvenses *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*, permitieron demostrar claramente el potencial fitotóxico de *P. tinctorum*. Estos resultados se encuentran indicados en el Cuadro 24.

**Cuadro 24.** Actividad fitotóxica de los extractos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) de *Parmotrema tinctorum*.

Tratamiento	CI <sub>50</sub> Crecimiento radicular (µg/mL)		CI <sub>50</sub> Germinación (µg/mL)	
	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>
1a. recolecta	135.0	151.4	102.3	182.0
2a. recolecta	134.4	107.4	150.6	295.5
2,4-D <sup>a</sup>	1.8 × 10 <sup>-4</sup> M	> 2.3 × 10 <sup>-4</sup> M	8.8 × 10 <sup>-4</sup> M	> 2.3 × 10 <sup>-4</sup> M

<sup>a</sup>Ácido 2,4-diclorofenoxy acético (control positivo)

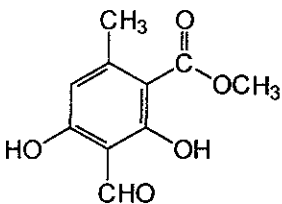
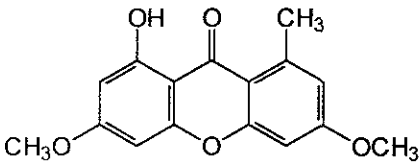
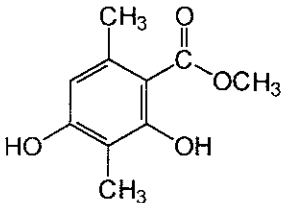
La actividad fitotóxica presentada por los extractos de *P. tinctorum*, permitió la selección de este líquen como un candidato apropiado para la obtención de compuestos de utilidad para el desarrollo de agentes herbicidas. A continuación, se prepararon los extractos íntegros mediante un proceso de maceración, para así iniciar el proceso de aislamiento de los compuestos activos a través de un estudio fitoquímico biodirigido, estrategia que ha permitido en múltiples ocasiones el aislamiento de productos biodinámicos de manera exitosa (Harvey, 2000).

### 5.1.2 Aislamiento de los principios fitotóxicos a partir de los extractos activos de *Parmotrema tinctorum*

El fraccionamiento preliminar de los extractos activos se realizó mediante la técnica de cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Como resultado de este procedimiento, se obtuvieron ocho grupos de fracciones primarias en el caso de

la primera recolecta de *P. tinctorum* y cuatro en el caso de la segunda. La verificación de la actividad fitotóxica a lo largo de este estudio se realizó mediante un método bioautográfico (Inoue *et al.*, 1992). Esta técnica indicó de una manera sencilla, rápida y eficaz que la actividad fitoinhibidora se concentraba en las identificadas como PT<sub>2</sub>, PT<sub>4</sub>, PT<sub>8</sub>, PT<sub>II</sub> y PT<sub>IV</sub> (ver Sección Experimental). Posteriormente, cromatografías sucesivas de estas fracciones permitieron el aislamiento de ocho metabolitos secundarios a partir de la primera recolecta y de cinco a partir de la segunda. En los Cuadros 25 y 26 se incluyen las estructuras de los compuestos aislados, su rendimiento con relación al peso del material liquénico seco y las fracciones primarias de donde se aislaron.

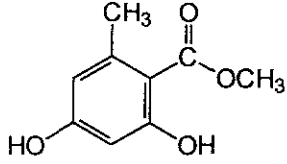
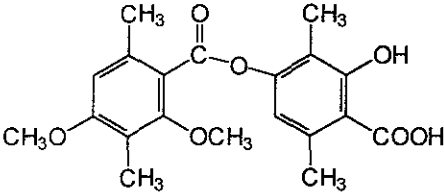
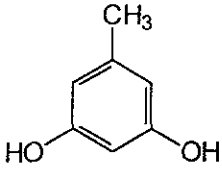
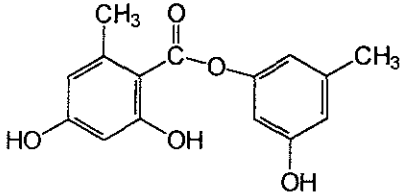
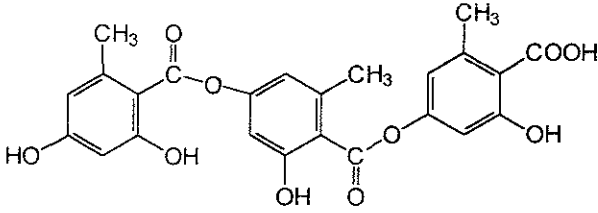
**Cuadro 25.** Metabolitos secundarios aislados de las fracciones activas de la primera recolecta de *Parmotrema tinctorum*.

Compuesto	Rendimiento (%)	Fracción
 <p>Hematomato de metilo (46)</p>	0.0050	PT <sub>2</sub>
 <p>Liquexantona (27)</p>	0.0020	PT <sub>3</sub>
 <p><math>\beta</math>-Orcinol carboxilato de metilo (54)</p>	0.0020	PT <sub>4</sub>

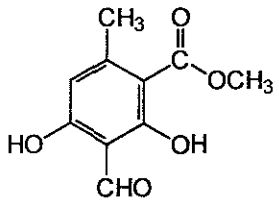
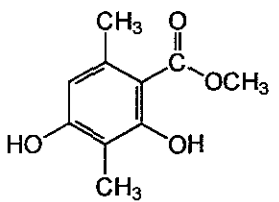
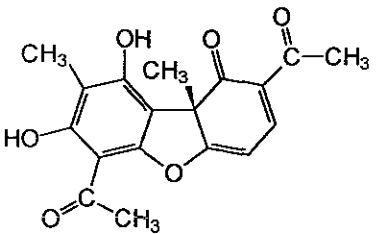
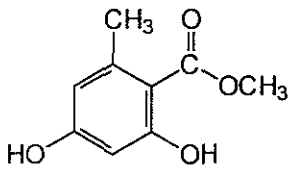
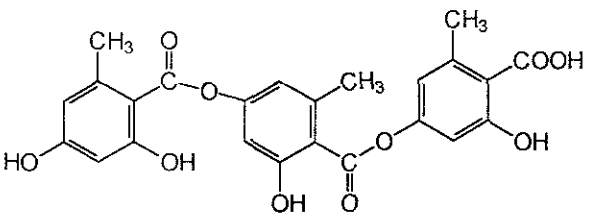


5. Resultados y Discusión

**Cuadro 25.** Metabolitos secundarios aislados de las fracciones activas de la primera recolecta de *Parmotrema tinctorum* (continuación).

Compuesto	Rendimiento (%)	Fracción
 <p>Orselinato de metilo (50)</p>	0.3600	PT <sub>5</sub>
 <p>Ácido difractaico (55)</p>	0.0003	PT <sub>7</sub>
 <p>Orcinol (120)</p>	0.0017	PT <sub>8</sub>
 <p>Lecanorina (121)</p>	0.0008	PT <sub>8</sub>
 <p>Ácido girofórico (22)</p>	0.7000	PT <sub>8</sub>

**Cuadro 26.** Metabolitos secundarios aislados de las fracciones activas de la segunda recolecta de *Parmotrema tinctorum*.

Compuesto	Rendimiento (%)	Fracción
 <p>Hematomato de metilo (46)</p>	0.0075	PT <sub>I</sub>
 <p><math>\beta</math>-Orcinol carboxilato de metilo (54)</p>	0.0025	PT <sub>I</sub>
 <p>Ácido (+)-úsico (32)</p>	0.0425	PT <sub>II</sub>
 <p>Orselinato de metilo (50)</p>	0.0035	PT <sub>IV</sub>
 <p>Ácido girofórico (22)</p>	0.0400	PT <sub>IV</sub>

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1.3 Caracterización de los compuestos aislados de *Parmotrema tinctorum*

De manera general, la caracterización de los compuestos aislados en el presente estudio se realizó mediante la aplicación de las técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales.

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos **22**, **27**, **32**, **46**, **50**, **54**, **55**, **120** y **121** se encuentran en perfecta armonía con las descritas en la literatura para el ácido girofórico (Holzmann y Leuckert, 1990; Narui *et al.*, 1998), la liquexantona (Letcher, 1968; Okorie, 1976), el ácido (+)-úsrico (König y Wright, 1999), el hematomato de metilo (Bruun, 1971; Sundholm y Huneck, 1981; Pulgarin y Tabacchi, 1989), el orselinato de metilo (Witiak *et al.*, 1967; Jayaprakasha *et al.*, 1998), el  $\beta$ -orcinol carboxilato de metilo (Bruun, 1971; Sundholm y Huneck, 1981), el ácido difractaico (Culberson, 1969; Sundholm y Huneck, 1981), el orcinol (Witiak *et al.*, 1967) y para la lecanorina (Nakatani *et al.*, 1991), respectivamente. Los datos correspondientes se encuentran incluidos en la Sección Experimental. Cabe mencionar que esta es la primera descripción de la liquexantona (**27**), del orcinol (**120**) y de la lecanorina (**121**) en la especie *P. tinctorum*.

### 5.1.4 Potencial fitotóxico de los compuestos aislados de *Parmotrema tinctorum*

El potencial fitotóxico de los metabolitos secundarios aislados de las fracciones activas se determinó mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento radicular y la germinación de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*, utilizando el método en caja de Petri (Castañeda *et al.*, 1992). Los resultados de estas pruebas, expresadas como concentraciones inhibitoras medias (CI<sub>50</sub>), se muestran en el Cuadro 27 y, como puede apreciarse, el ácido (+)-úsrico (**32**), el hematomato de metilo (**46**), el orselinato de metilo (**50**), el  $\beta$ -orcinol carboxilato de metilo (**54**), el ácido difractaico (**55**), el orcinol (**120**) y la lecanorina (**121**), inhibieron significativamente tanto la germinación como el crecimiento radicular de las dos arvenses de prueba. Los productos **32** y **46** fueron las fitotoxinas más potentes; ambos productos mostraron una actividad mayor que la del

ácido 2,4-D (control positivo). Los compuestos **22** y **27** no afectaron a ninguna de las dos malezas. En todos los casos el efecto inhibitorio fue dependiente de la concentración y, en general, las semillas de *A. hypochondriacus* resultaron más sensibles a los tratamientos que las de *E. crusgalli*.

**Cuadro 27.** Actividad fitotóxica de los compuestos aislados de *Parmotrema tinctorum*.

Compuesto	Crecimiento radicular CI <sub>50</sub> (M)		Germinación CI <sub>50</sub> (M)	
	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>
<b>22</b>	2.0 x 10 <sup>-3</sup>	2.0 x 10 <sup>-3</sup>	2.0 x 10 <sup>-3</sup>	2.0 x 10 <sup>-3</sup>
<b>27</b>	> 2.0 x 10 <sup>-3</sup>	> 2.0 x 10 <sup>-3</sup>	> 2.0 x 10 <sup>-3</sup>	> 2.0 x 10 <sup>-3</sup>
<b>32</b>	5.8 x 10 <sup>-6</sup>	1.1 x 10 <sup>-4</sup>	5.2 x 10 <sup>-6</sup>	2.0 x 10 <sup>-5</sup>
<b>46</b>	2.1 x 10 <sup>-5</sup>	2.9 x 10 <sup>-5</sup>	6.8 x 10 <sup>-6</sup>	1.7 x 10 <sup>-5</sup>
<b>50</b>	2.9 x 10 <sup>-4</sup>	3.1 x 10 <sup>-4</sup>	3.6 x 10 <sup>-4</sup>	6.8 x 10 <sup>-4</sup>
<b>54</b>	3.2 x 10 <sup>-4</sup>	6.1 x 10 <sup>-4</sup>	7.6 x 10 <sup>-4</sup>	1.1 x 10 <sup>-3</sup>
<b>55</b>	1.0 x 10 <sup>-4</sup>	1.4 x 10 <sup>-4</sup>	1.1 x 10 <sup>-4</sup>	1.5 x 10 <sup>-4</sup>
<b>120</b>	1.0 x 10 <sup>-3</sup>	1.1 x 10 <sup>-3</sup>	1.7 x 10 <sup>-3</sup>	> 8.1 x 10 <sup>-3</sup>
<b>121</b>	5.8 x 10 <sup>-4</sup>	1.8 x 10 <sup>-4</sup>	7.6 x 10 <sup>-4</sup>	7.1 x 10 <sup>-4</sup>
2,4-D <sup>a</sup>	1.8 x 10 <sup>-4</sup>	> 2.3 x 10 <sup>-4</sup>	8.8 x 10 <sup>-4</sup>	> 2.3 x 10 <sup>-4</sup>

<sup>a</sup>Ácido 2,4-diclorofenoxi acético (control positivo)

La actividad fitotóxica del ácido (+)-úsico (**32**), se encuentra bien documentada en la literatura, en donde se describe que este dibenzofurano inhibe la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *Phaseolus mungo* y de *Triticum aestivum* (Dalvi et al., 1972). Cabe mencionar que el enantiómero de este producto posee también una potente actividad fitotóxica. Este último compuesto inhibe la germinación y el crecimiento de *Lepidium sativum*. Así mismo, se han realizado algunos estudios en los

## 5. Resultados y Discusión

que se han tratado de elucidar los mecanismos posibles por los cuales estos dibenzofuranos ejercen su acción fitoinhibidora. Así por ejemplo, se ha determinado que mientras que el ácido (-)-úsico inhibe significativamente la actividad de las enzimas *para*-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa y protoporfirina oxidasa, proteínas involucradas en la biosíntesis de carotenoides, porfirinas y clorofilas en plantas superiores, el ácido (+)-úsico (**32**) no las afecta (Romagni *et al.*, 2000). Otras investigaciones indican que este último inhibe el transporte de electrones en la cadena fotosintética. En estos estudios se utilizaron cloroplastos aislados de hojas de *Spinacea oleracea* y *Quercus rotundifolia* y se determinó que la fitotoxina actúa sobre el lado oxidante del fotosistema II, específicamente a nivel del residuo de tirosina Z del polipéptido D<sub>1</sub>, el cual conduce a los electrones desde el átomo de Mn<sup>2+</sup> al centro de reacción P<sub>680</sub>. Esta inhibición se cree que es debida a la formación de un quelato muy estable entre el ácido (+)-úsico (**32**) y los iones Mn<sup>2+</sup> que participan en la fotólisis del agua (Inoue *et al.*, 1987; Giménez y Vicente, 1989). Otros estudios menos específicos que han documentado los efectos fitotóxicos del ácido úsico (**32**) incluyen la inhibición de la transpiración y de la liberación de oxígeno en semillas de maíz y girasol (Lasceve y Gaugain, 1990)

En relación con los compuestos restantes obtenidos en este estudio, con excepción del ácido difractaico (**55**), el cual inhibe el crecimiento de semillas de *Lactuca sativa* (Nishitoba *et al.*, 1987), a la fecha no se ha descrito ningún estudio relacionado con su actividad fitotóxica.

### 5.1.5 Efecto de los compuestos aislados de *Parmotrema tinctorum* sobre las reacciones de transferencia de electrones de la fotosíntesis

Con base en la actividad fitoinhibidora significativa que presentaron los metabolitos aislados de *P. tinctorum*, se consideró conveniente explorar en forma más detallada el potencial herbicida de estos compuestos, para lo cual se procedió a estudiar su efecto sobre las reacciones de transferencia de electrones de la fotosíntesis, a través de la realización de diversos bioensayos *in vitro*, utilizando cloroplastos aislados de hojas de espinaca (*Spinaceae oleracea* L.). Las actividades fotosintéticas estudiadas se seleccionaron tomando como referencia el modo de acción de un gran

número de herbicidas utilizados comercialmente (Moreland, 1980; Bowes *et al.*, 1981; Linscott, 1981; Mathis y Rutherford, 1984; Corbett, 1984; van Rennsen, 1989; Percival y Baker, 1991; Streibig *et al.*, 1999; Haynes, 2000; *inter alia*).

En primer lugar, se determinó el efecto de los compuestos sobre la síntesis de ATP y se seleccionaron los compuestos que inhibieron este proceso para evaluar su actividad sobre la captación de protones y sobre los transportes de electrones basal, desacoplado y fosforilante, y así determinar el mecanismo a través del cual ejercen su efecto inhibitorio. Posteriormente, se procedió a caracterizar el sitio de la cadena transportadora de electrones que resultaba afectado por los compuestos activos

La discusión del efecto mostrado por cada uno de los compuestos evaluados sobre las actividades fotosintéticas mencionadas anteriormente, se presenta en la siguiente sección

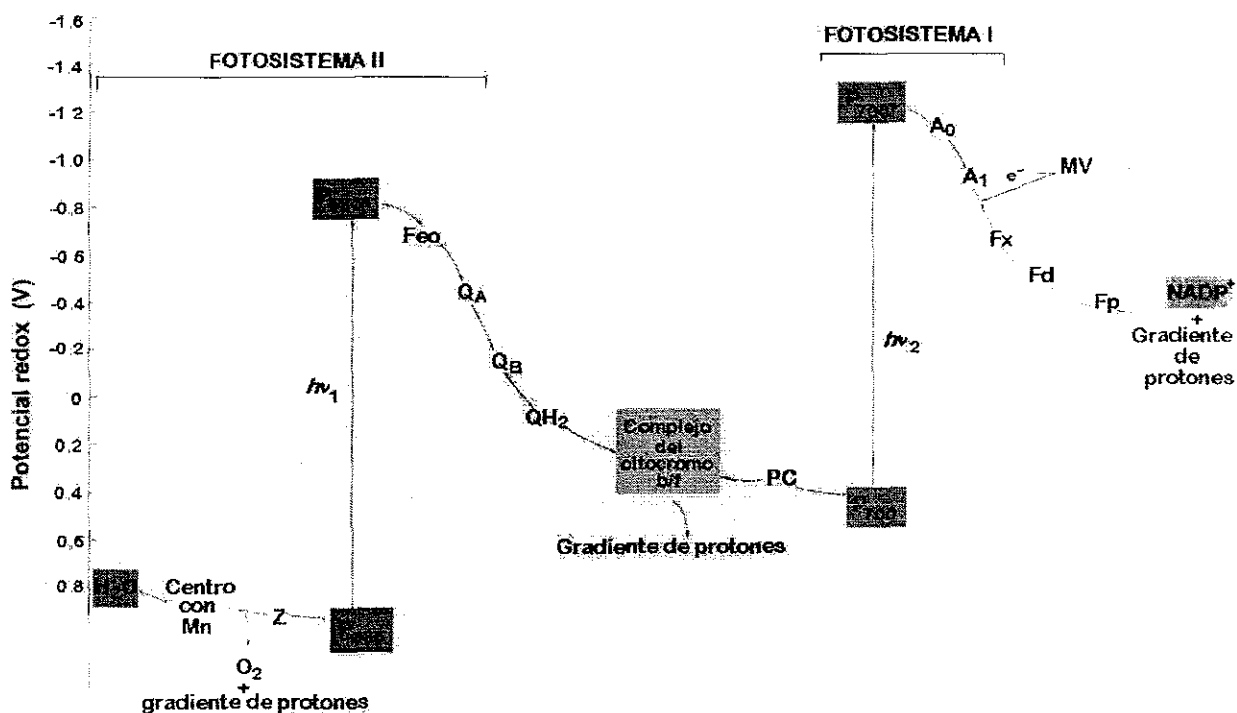
### *5.1.5.1 Efecto de los compuestos aislados de *Parmotrema tinctorum* sobre la síntesis de ATP y la captación de protones*

La síntesis de ATP se determinó utilizando un método potenciométrico, de acuerdo al procedimiento descrito en la sección experimental (Peña-Valdivia *et al.*, 1991; Gutiérrez-Lugo *et al.*, 1999). Este método se basa en el registro de los cambios de pH en el medio de reacción, entre 8.0 y 8.1, inducidos por la síntesis de ATP en presencia de ADP y Pi, cuando los electrones se transportan de H<sub>2</sub>O a MV (Figura 16), y considera el hecho de que durante este proceso, la enzima H<sup>+</sup>-ATPasa consume de forma irreversible un protón por cada molécula de ATP que sintetiza. Por lo tanto, la cantidad de ATP generada es proporcional a la variación de pH en el medio, debido al consumo de protones por la enzima. En la Figura 17 se muestra el efecto de los compuestos evaluados sobre la síntesis de ATP.

Los resultados obtenidos indican que el ácido girofórico (**22**) y la lecanorina (**121**) inhiben la fotofosforilación, de manera significativa y dependiente de la concentración. Los valores de CI<sub>50</sub> para estos compuestos son  $8.71 \times 10^{-5}$  y  $1.36 \times 10^{-4}$  M, respectivamente, por lo que el ácido girofórico (**22**) es el inhibidor más potente. Sin embargo, el compuesto **121** es el único que inhibe completamente la síntesis de ATP.

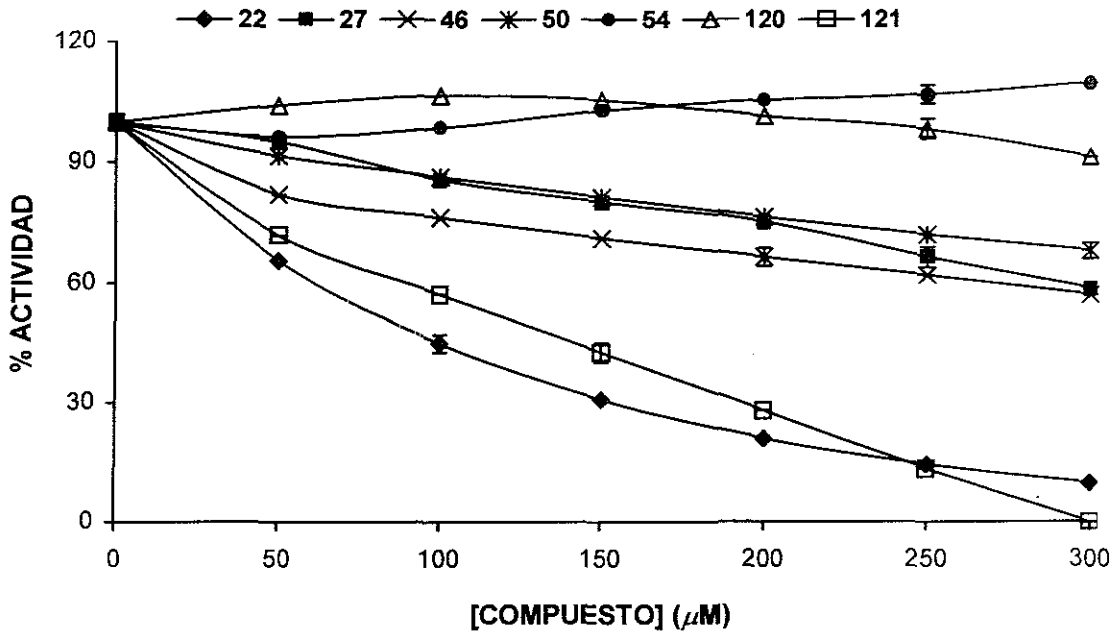
## 5. Resultados y Discusión

Este último efecto se observa con el tratamiento correspondiente a la concentración de  $3.0 \times 10^{-4}$  M. La actividad de estos compuestos fue menor que la del DCMU utilizado como control positivo ( $Cl_{50} 1.40 \times 10^{-7}$  M). El hematomato de metilo (46), la liquexantona (27) y el orselinato de metilo (50) afectan parcialmente la síntesis de ATP, mientras que el  $\beta$ -orcinol carboxilato de metilo (54) y el orcinol (120) no afectan el proceso a las concentraciones de prueba.



▲ Figura 16. Transporte de electrones de H<sub>2</sub>O a MV.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



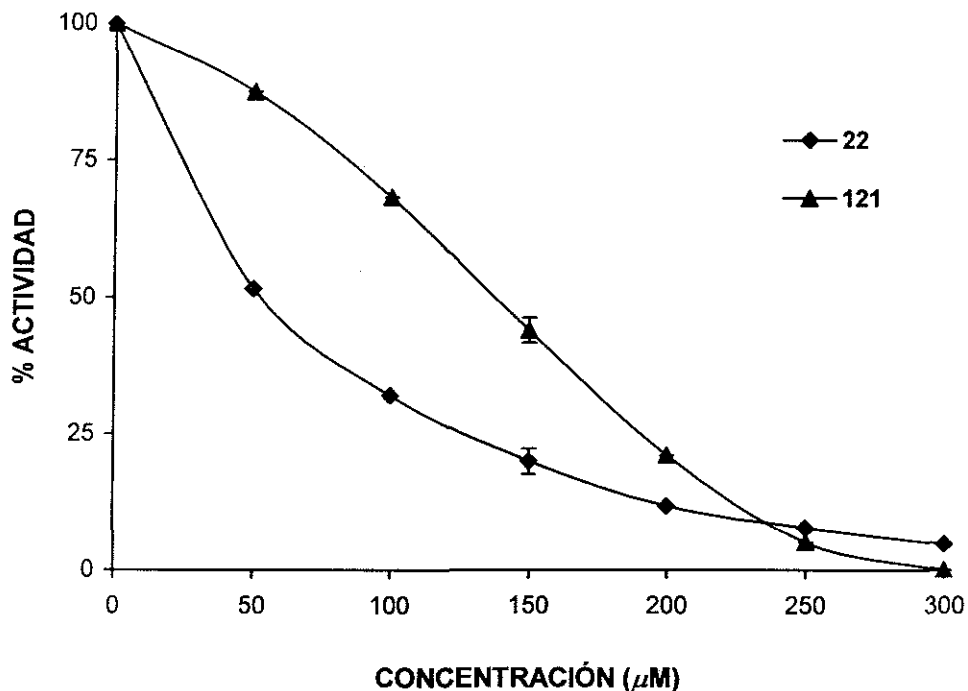
▲ **Figura 17.** Efecto de los compuestos obtenidos de *Parmotrema tinctorum* sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de hojas de espinaca. En cada determinación se utilizaron 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de clorofila. Otras condiciones de reacción se describen en la Sección Experimental. Los valores de rapidez de los controles fueron de 352.8, 327.1, 540.5, 540.5, 327.1, 380.0 y 380.0  $\mu\text{mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg de clorofila}^{-1}$ , para el ácido girofórico (22), la liquexantona (27), el hematomato de metilo (46), el orselinato de metilo (50), el  $\beta$ -orcínol carboxilato de metilo (54), el orcínol (120) y la lecanorina (121), respectivamente. Cada punto representa el promedio de cinco determinaciones. Cada repetición se realizó en diferentes muestras de cloroplastos. Las barras verticales representan la desviación estándar máxima.

La teoría de la transducción de Mitchell predice que una sustancia que inhibe la síntesis de ATP, debe inhibir también la captación de protones, de manera paralela y en un mismo orden de magnitud (Mitchell, 1977), por lo que a continuación se evaluó el efecto de los compuestos 22 y 121 sobre la captación de protones, a fin de comprobar si este proceso resultaba afectado. Los resultados de estas determinaciones indican que ambos productos inhiben el proceso de forma dependiente de la concentración (Figura 18) y que además presentan el comportamiento establecido por el modelo de Mitchell, pues los valores de  $\text{CI}_{50}$  calculados son  $5.97 \times 10^{-5}$  y  $1.40 \times 10^{-4}$  M para el ácido girofórico (22) y la lecanorina (121), respectivamente. El compuesto 121 inhibió completamente este proceso a una concentración de  $3.0 \times 10^{-4}$  M.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## 5. Resultados y Discusión



▲ **Figura 18.** Efecto del ácido girofórico (**22**) y de la lecanorina (**121**) sobre la captación de protones en cloroplastos aislados de hojas de espinaca. En cada determinación se utilizaron 20  $\mu\text{g/mL}$  de clorofila. Otras condiciones de reacción se describen en la Sección Experimental. Los valores de rapidez de los controles fueron de 122.0 y 142.0  $\mu\text{equivalentes de protones} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg de clorofila}^{-1}$ , para el ácido girofórico (**22**) y la lecanorina (**121**), respectivamente. Cada punto representa el promedio de cinco determinaciones. Cada repetición se realizó en diferentes muestras de cloroplastos. Las barras verticales representan la desviación estándar máxima.

### 5.1.5.2 Efecto del ácido girofórico (22) y de la lecanorina (121) sobre el transporte de electrones no cíclico

Considerando que los compuestos que inhiben la síntesis de ATP pueden ejercer su acción a través de diferentes mecanismos, que incluyen el desacoplamiento de la síntesis de ATP del transporte de electrones (Moreland, 1980), la inhibición de la transferencia de electrones (inhibición de la reacción de Hill) [Bowes *et al.*, 1981; Linscott, 1981; Mathis y Rutherford, 1984; Corbett, 1984; van Rennsen, 1989; Percival y Baker, 1991; Streibig *et al.*, 1999; Haynes, 2000; *inter alia*] y/o bloqueando la propia reacción de fotofosforilación (inhibición de la transducción de energía) [Moreland, 1980], se procedió a investigar el modo de acción de los compuestos que presentaron la mayor actividad inhibitoria sobre la

síntesis de ATP. Para ello se determinó su efecto sobre la rapidez de los transportes de electrones basal, fosforilante y desacoplado. Estos bioensayos se llevaron a cabo utilizando un método oximétrico, en el que se determinó de forma indirecta la concentración del oxígeno liberado al medio de reacción durante la fotólisis del agua, empleando MV como aceptor final de electrones (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991).

Cabe señalar que la rapidez observada en el transporte de electrones, en cloroplastos aislados, varía dependiendo de las condiciones de reacción en las que sea determinado. Así por ejemplo, en el transporte de electrones basal se observa una rapidez baja en el flujo debido a la ausencia de ADP y Pi en el medio de reacción (Trebst, 1972). De hecho, se esperaría que al no encontrarse presentes estos dos compuestos, no hubiera transporte de electrones, pues no sería posible la síntesis simultánea de ATP; sin embargo, los cloroplastos aislados siempre presentan una actividad residual o basal, debido a que durante el proceso de aislamiento de los mismos se altera, en mayor o menor grado, la permeabilidad de las membranas tilacoidales (Trebst *et al.*, 1977).

En el caso del transporte de electrones fosforilante se presenta una rapidez que es de una a tres veces mayor que la del transporte basal, debido a que se determina en presencia de ADP y Pi, con lo cual la enzima H<sup>+</sup>-ATPasa puede ejercer su actividad catalítica al establecerse un gradiente de protones a través de la membrana fotosintética (Trebst, 1972).

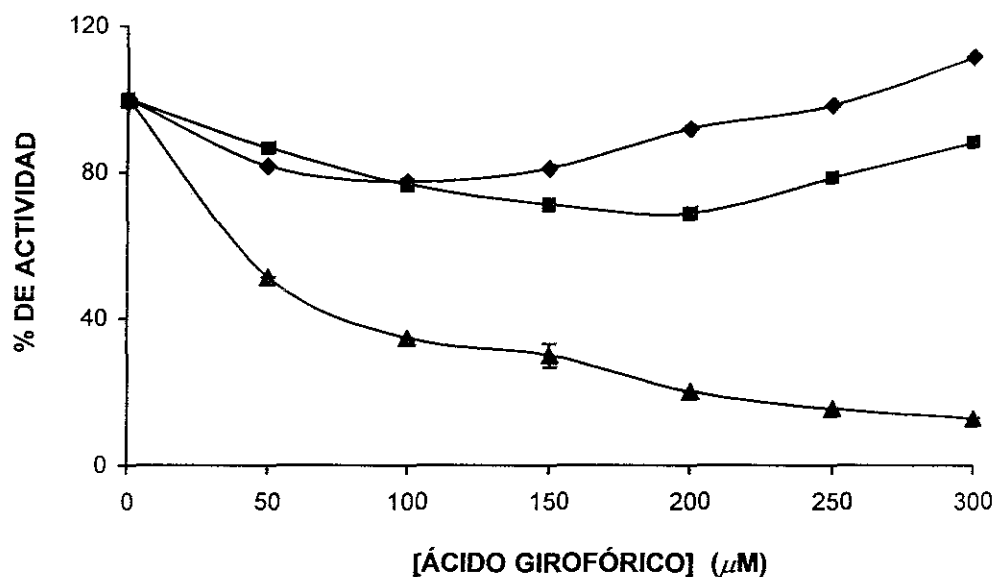
Por último, en el transporte de electrones desacoplado, en el que se adiciona NH<sub>4</sub>Cl al medio de reacción como agente desacoplante, se observa la mayor rapidez en el flujo de electrones, debido a que este compuesto transporta protones a través de la membrana tilacoidal, de manera que el gradiente de pH generado en la cadena fotosintética es eliminado (Trebst, 1972).

Con base en la información anterior, a partir del efecto observado sobre los tres tipos de transportes de electrones, puede proponerse el mecanismo por el que se inhibe la síntesis de ATP (Cuadro 28).

## 5. Resultados y Discusión

**Cuadro 28.** Clasificación de los inhibidores de la síntesis de ATP y su efecto sobre el transporte de electrones.

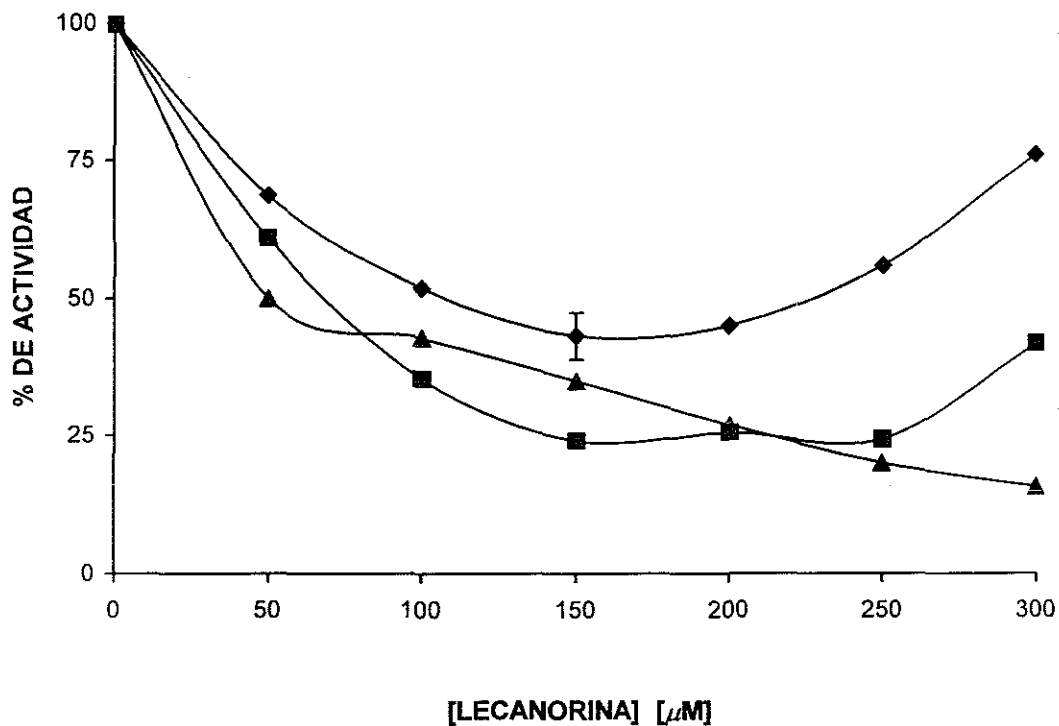
Clasificación	Efecto sobre el transporte de electrones		
	Basal	Fosforilante	Desacoplado
Desacoplante clásico	Estimulación	Estimulación	No se afecta
Desacoplante no clásico	Estimulación	Inhibición	Estimulación
Inhibidor de la reacción de Hill	Inhibición	Inhibición	Inhibición
Inhibidor de la transducción de energía	Inhibición o no se afecta	Inhibición	No se afecta



▲ **Figura 19.** Efecto del ácido girofórico (22) sobre el transporte de electrones no cíclico, de H<sub>2</sub>O a MV. En cada determinación se utilizaron 20 μg/mL de clorofila. Otras condiciones de reacción se describen en la Sección Experimental. Los valores de rapidez de los controles fueron de 400.0, 554.1 y 1025.0 μequivalentes de electrones · h<sup>-1</sup> · mg de clorofila<sup>-1</sup>, para el transporte de electrones basal (◆), fosforilante (■) y desacoplado (▲), respectivamente. Cada punto representa el promedio de cinco determinaciones. Cada repetición se realizó en diferentes muestras de cloroplastos. Las barras verticales representan la desviación estándar máxima.

Los resultados obtenidos en estas determinaciones indican que el ácido girófórico (**22**) activó el transporte de electrones basal en un 11 % con el tratamiento correspondiente a la concentración de  $2.0 \times 10^{-4}$  M, e inhibió los transportes de electrones fosforilante y desacoplado en un 32 y 80 %, respectivamente, a la misma concentración de prueba (Figura 19).

Por otra parte, la lecanorina (**121**) inhibió los transportes de electrones basal, fosforilante y desacoplado en un 55, 75 y 73 %, respectivamente, a una concentración de  $2.0 \times 10^{-4}$  M (Figura 20).



▲ **Figura 20.** Efecto de la lecanorina (**121**) sobre el transporte de electrones no cíclico, de  $H_2O$  a MV. En cada determinación se utilizaron  $20 \mu g/mL$  de clorofila. Otras condiciones de reacción se describen en la Sección Experimental. Los valores de rapidez de los controles fueron de 331.4, 457.1 y  $1117.8 \mu equivalentes de electrones \cdot h^{-1} \cdot mg de clorofila^{-1}$ , para el transporte de electrones basal (◆), fosforilante (■) y desacoplado (▲), respectivamente. Cada punto representa el promedio de cinco determinaciones. Cada repetición se realizó en diferentes muestras de cloroplastos. Las barras verticales representan la desviación estándar máxima.

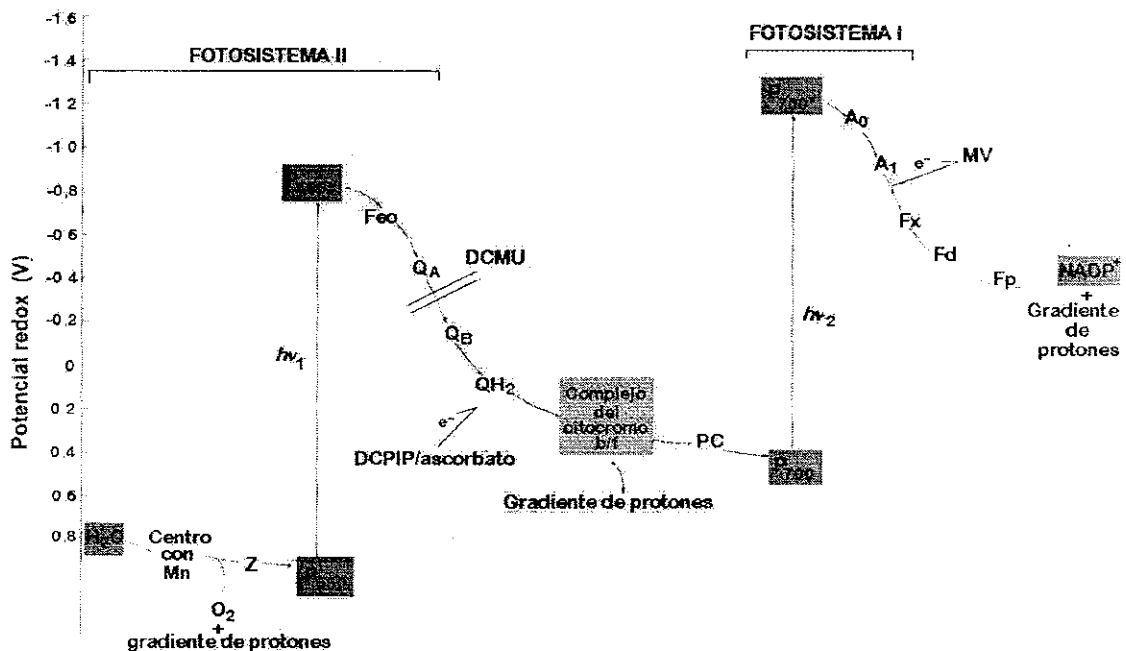
## 5. Resultados y Discusión

En conclusión, a partir del análisis integral de estos resultados los compuestos evaluados fueron clasificados como inhibidores típicos de la reacción de Hill y, por lo tanto, la inhibición de la síntesis de ATP ocasionada por los mismos se debe a su interferencia con el flujo de electrones en la cadena fotosintética (Trebst, 1972; McCarty, 1977; Mitchell, 1977).

### 5.15.3 Caracterización del sitio de inhibición en la cadena de transporte de electrones no cíclico del ácido girofórico (22) y de la lecanorina (121)

Con el propósito de localizar el sitio específico de la cadena transportadora de electrones inhibido por los compuestos **22** y **121**, se estudió su efecto sobre cada fotosistema total aislado, así como sobre las reacciones individuales que integran a cada uno de ellos. Para realizar estas determinaciones, se emplearon diferentes donadores y aceptores artificiales de electrones, agentes desacoplantes, así como inhibidores de la cadena fotosintética (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991; Peña-Valdivia *et al.*, 1992; Giaquinta y Dilley, 1975; Vernon y Shaw, 1969).

En primer lugar, se determinó la actividad en el fotosistema I total, midiendo el transporte de electrones desacoplado de DCPIP/ascorbato a MV (cit  $b_6/f$  a Fe-S) [Figura 21]



▲ Figura 21. Flujo de electrones en el fotosistema I de DCPIPred a MV (cit  $b_6/f$  a Fe-S)

Los resultados de estas determinaciones indican que ninguno de los compuestos evaluados afectó la actividad en este sistema (Cuadro 29), por lo que el blanco de acción debía encontrarse en el fotosistema II.

**Cuadro 29.** Efecto del ácido girofórico (**22**) y de la lecanorina (**121**) sobre la rapidez del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema I<sup>a</sup>

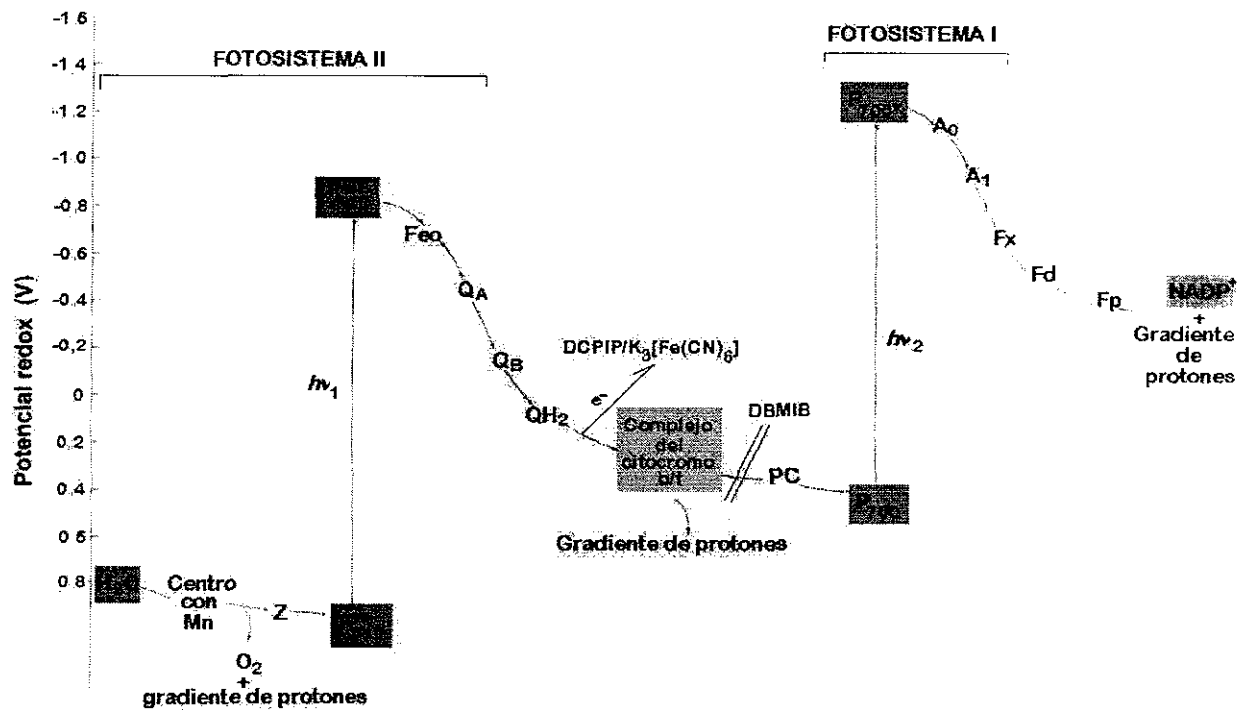
Concentración ( $\mu\text{M}$ )	DCPIPred a MV (cit b <sub>6</sub> /f a Fe-S)	
	<b>22</b>	<b>121</b>
0	100.0	100.0
50	115.8	103.9
100	128.7	108.6
150	135.5	109.5
200	136.7	112.2
250	132.1	114.3
300	120.7	117.8

<sup>a</sup>Los valores se encuentran expresados como porcentajes de actividad. En cada determinación se utilizaron 20  $\mu\text{g/mL}$  de clorofila. Otras condiciones de reacción se describen en la Sección Experimental. Los valores de rapidez de los controles fueron de 1461.0 y 875.0  $\mu\text{equivalentes de electrones} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg de clorofila}^{-1}$ , para el ácido girofórico (**22**) y la lecanorina (**121**), respectivamente. Cada punto representa el promedio de cinco determinaciones. Cada repetición se realizó en diferentes muestras de cloroplastos. Entre paréntesis se indica el rango correspondiente de la cadena transportadora de electrones fotosintética.

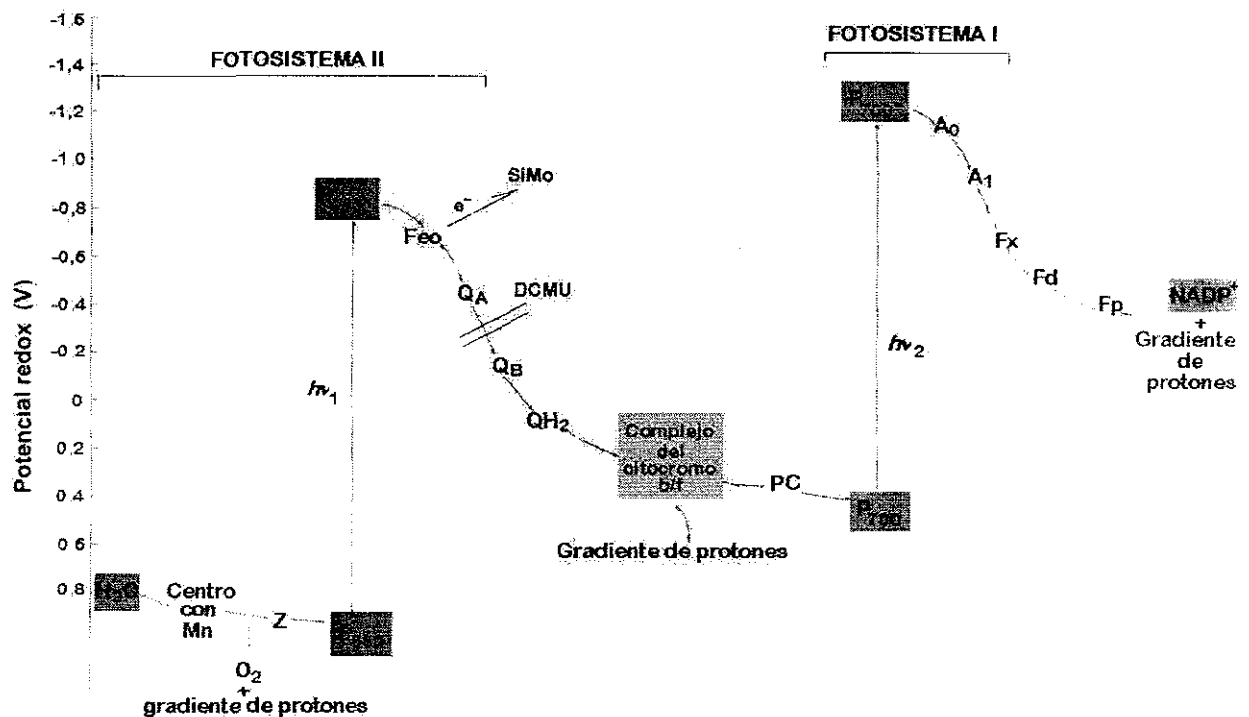
El transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II total se midió de  $\text{H}_2\text{O}$  a DCPIP/ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $\text{H}_2\text{O}$  a cit b<sub>6</sub>/f) [Figura 22]. Los resultados obtenidos, expresados como porcentaje de actividad, se presentan en los Cuadros 30 y 31 y, como puede observarse, ambos productos inhibieron sensiblemente la actividad de este sistema, siendo la lecanorina (**121**) el compuesto que presentó el mayor efecto.

Posteriormente, se estudió el efecto de los compuestos **22** y **121** sobre las reacciones parciales del fotosistema II y que incluyeron el flujo de electrones de  $\text{H}_2\text{O}$  a SiMo ( $\text{H}_2\text{O}$  a Feo) y de DPC a DCPIP ( $\text{P}_{680}$  a cit b<sub>6</sub>/f) [Figuras 23 y 24]. Los resultados de estas determinaciones indican que el ácido girofórico (**22**) interfiere con ambas reacciones y que, por lo tanto, el modo de acción de este compuesto involucra la inhibición de la transferencia de electrones entre  $\text{P}_{680}$  y  $\text{Q}_A$ , sobre el lado reductor del fotosistema II (Cuadro 30).

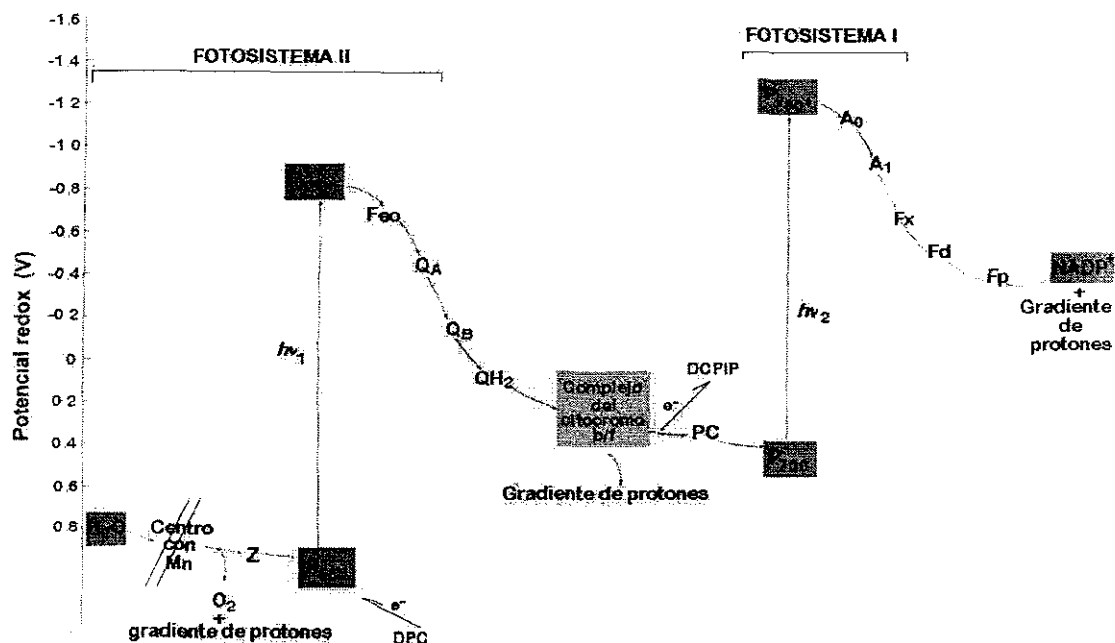
## 5. Resultados y Discusión



▲ Figura 22. Flujo de electrones en el fotosistema II de  $H_2O$  a DCPIP ( $H_2O$  a cit  $b_6/f$ )



▲ Figura 23. Flujo de electrones en el fotosistema II de  $H_2O$  a SiMo ( $H_2O$  a Feo).



▲ **Figura 24.** Flujo de electrones en el fotosistema II de DPC a DCPIP ( $P_{680}$  a cit  $b_6/f$ )

**Cuadro 30.** Efecto del ácido girofórico (**22**) sobre la rapidez del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II<sup>a</sup>.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Reacciones		
	$\text{H}_2\text{O}$ a DCPIP ( $\text{H}_2\text{O}$ a cit $b_6/f$ )	$\text{H}_2\text{O}$ a SiMo ( $\text{H}_2\text{O}$ a Feo)	DPC a DCPIP ( $P_{680}$ a cit $b_6/f$ )
0	100.0	100.0	100.0
50	72.1	93.4	84.3
100	49.7	79.9	58.5
150	31.3	62.5	40.3
200	16.8	41.0	33.8
250	4.1	0.0	29.9
300	0.0	0.0	17.9

<sup>a</sup>Los valores se encuentran expresados como porcentajes de actividad. En cada determinación se utilizaron  $20 \mu\text{g/mL}$  de clorofila. Otras condiciones de reacción se describen en la Sección Experimental. Los valores de rapidez del transporte de electrones de los controles en el fotosistema II, de  $\text{H}_2\text{O}$  a DCPIP, de  $\text{H}_2\text{O}$  a SiMo y de DPC a DCPIP, fueron  $324.7$ ,  $86.6$  y  $106.0 \mu\text{equiv e}^- \text{h}^{-1} \text{mg of Chl}^{-1}$ , respectivamente. Cada punto representa el promedio de cinco determinaciones. Cada repetición se realizó en diferentes muestras de cloroplastos. Entre paréntesis se indica el rango correspondiente de la cadena transportadora de electrones fotosintética.



## 5. Resultados y Discusión

Por otra parte, se encontró que la lecanorina (**121**) inhibe el transporte de electrones únicamente en la reacción parcial de H<sub>2</sub>O a SiMo (H<sub>2</sub>O a Feo) del fotosistema II (Cuadro 31), por lo que el sitio de acción de este producto debe localizarse a nivel de la enzima que fotolisa el agua.

**Cuadro 31.** Efecto de la lecanorina (**121**) sobre la rapidez del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II<sup>a</sup>.

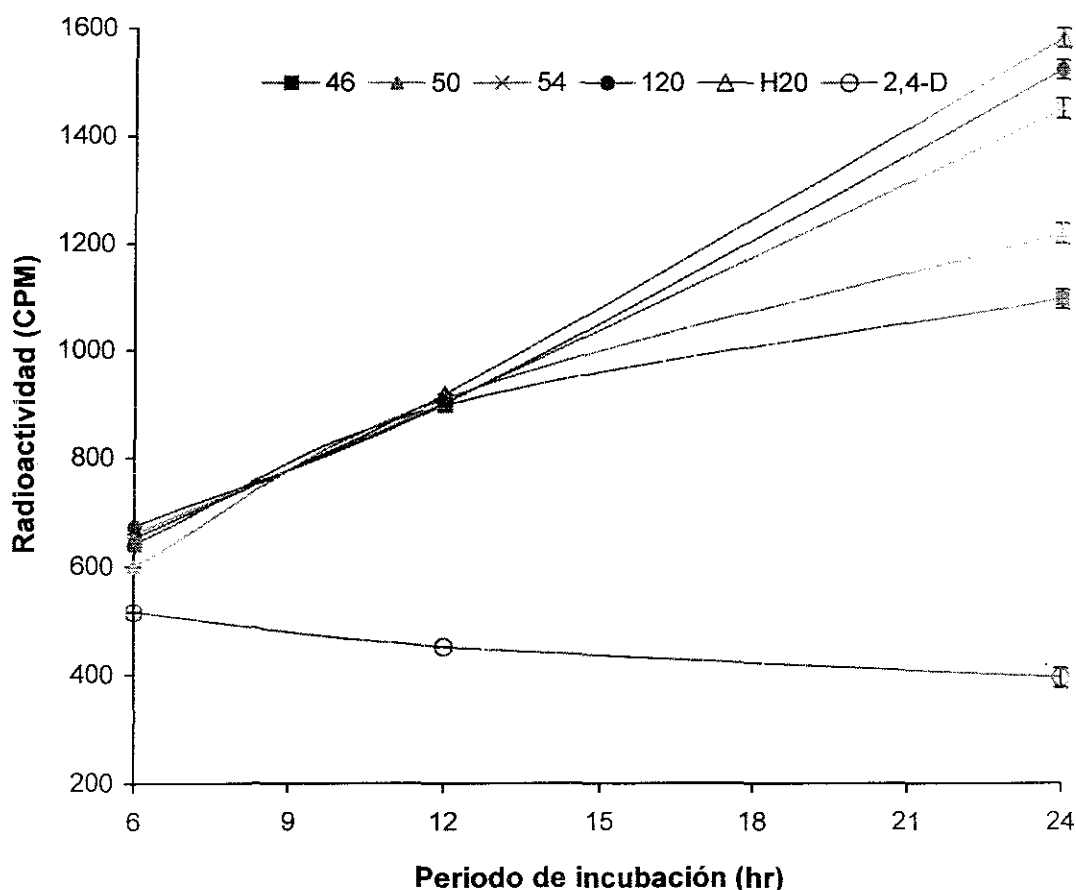
Concentración (μM)	Reacciones		
	H <sub>2</sub> O a DCPIP (H <sub>2</sub> O a cit b <sub>6</sub> /f)	H <sub>2</sub> O a SiMo (H <sub>2</sub> O a Feo)	DPC to DCPIP (P <sub>680</sub> a cit b <sub>6</sub> /f)
0	100.0	100.0	100.0
50	64.3	59.1	93.6
100	37.5	25.0	86.9
150	15.7	8.4	88.9
200	0.0	0.0	96.0
250	0.0	0.0	111.8
300	0.0	0.0	135.2

<sup>a</sup>Los valores se encuentran expresados como porcentajes de actividad. En cada determinación se utilizaron 20 μg/mL de clorofila. Otras condiciones de reacción se describen en la Sección Experimental. Los valores de rapidez del transporte de electrones de los controles en el fotosistema II, de H<sub>2</sub>O a DCPIP, de H<sub>2</sub>O a SiMo y de DPC a DCPIP, fueron 200.0, 25.0 y 98.0 μequiv e<sup>-</sup>·h<sup>-1</sup>·mg of Chl<sup>-1</sup>, respectivamente. Cada punto representa el promedio de cinco determinaciones. Cada repetición se realizó en diferentes muestras de cloroplastos. Entre paréntesis se indica el rango correspondiente de la cadena transportadora de electrones fotosintética.

### 5.1.6 Efecto de los metabolitos aislados de *Parmotrema tinctorum* sobre la síntesis de ADN en semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*

Los compuestos fitotóxicos **46**, **50**, **54**, **100** y **101** no presentaron un efecto notable sobre las reacciones involucradas en el proceso de la fotosíntesis que fueron investigadas, por lo que se procedió a determinar de manera cuantitativa su efecto sobre la síntesis de ADN en semillas de las especies *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*, con la finalidad de explorar con mayor detalle el mecanismo por el cual estos productos naturales ejercen su acción fitoinhibidora.

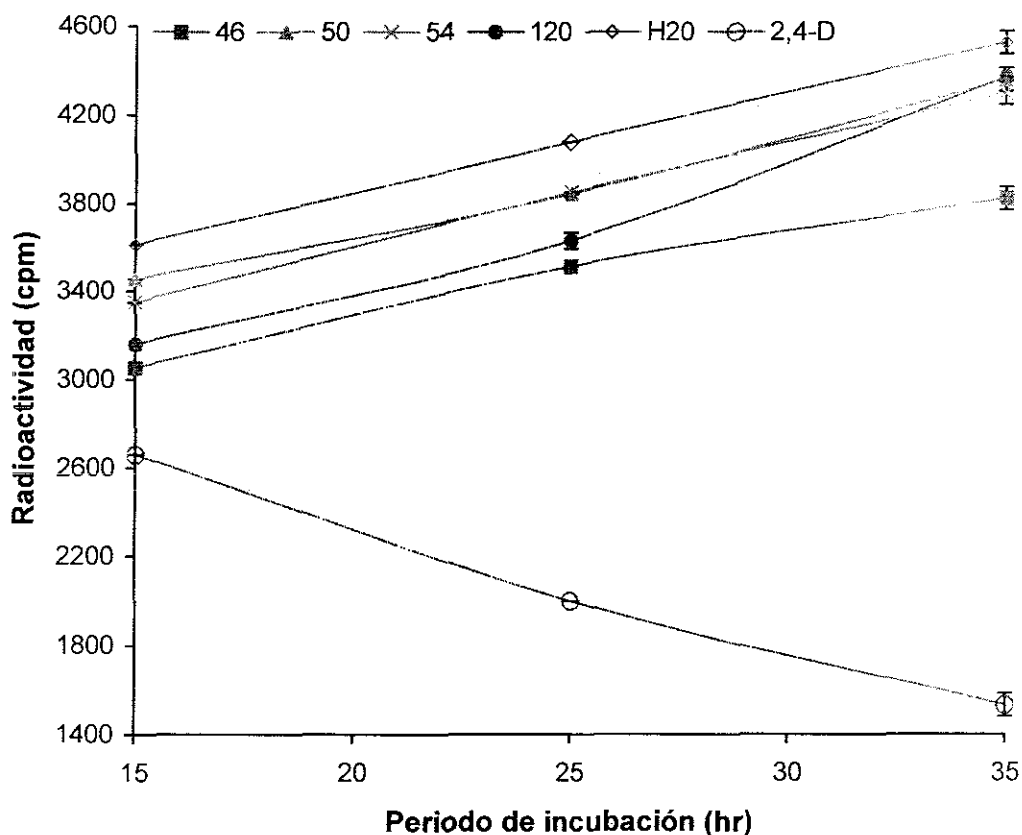
En estos bioensayos, las semillas se trataron por diferentes periodos de tiempo con una disolución acuosa de timidina tritiada y los productos de prueba. Los periodos de incubación de las semillas se establecieron considerando el tiempo requerido por cada una de las especies para completar su germinación. Posteriormente, se aisló el ADN biosintetizado por las semillas y se cuantificó la radioactividad contenida en las muestras, de acuerdo a la metodología descrita en la Sección Experimental (García, 1995). La cantidad de radioactividad detectada de esta manera es directamente proporcional al ADN biosintetizado en las semillas, pues la timidina tritiada se incorpora a la cadena del ácido durante la fase S del ciclo celular.



▲ **Figura 25.** Efecto de los metabolitos aislados de *P. tinctorum* sobre la síntesis de ADN en semillas de *A. hypochondriacus*. Las concentraciones utilizadas fueron  $4.2 \times 10^{-5}$ ,  $5.8 \times 10^{-4}$ ,  $6.4 \times 10^{-4}$  y  $2.0 \times 10^{-3}$  M para el hematomato de metilo (46), el orselinato de metilo (50), el  $\beta$ -orcinoil carboxilato de metilo (54) y el orcinoil (120), respectivamente. La concentración del control positivo (2,4-D) fue  $3.6 \times 10^{-4}$  M. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones. Las barras verticales indican la desviación estándar máxima.

## 5. Resultados y Discusión

Los resultados de estas pruebas indican que la radioactividad de las diferentes muestras que contenían los compuestos de prueba, en general, fue menor que la determinada para el blanco (H<sub>2</sub>O). Sin embargo, en todos los casos la radioactividad se incrementó gradualmente al aumentar el tiempo de incubación. Por el contrario, en las semillas que fueron tratadas con el ácido 2,4-D (control positivo) se observó una disminución significativa de la radioactividad, comparada con el blanco. De lo anterior se infiere que aunque los productos evaluados retardan o inhiben parcialmente la síntesis de ADN en las semillas de prueba, este efecto probablemente no constituye su mecanismo de acción principal (Figuras 25 y 26).

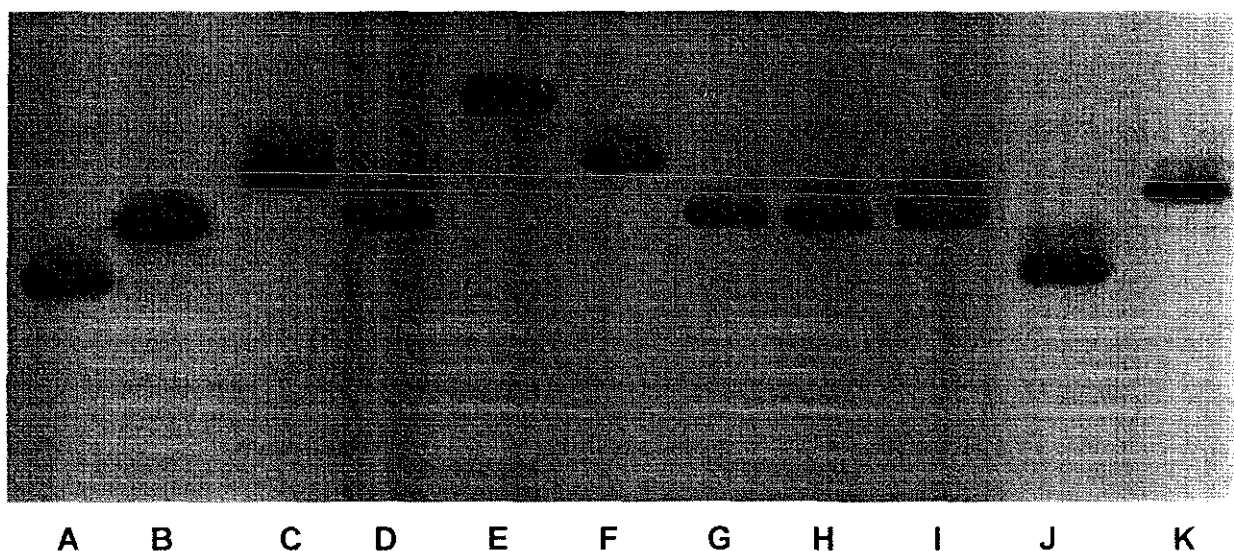


▲ **Figura 26.** Efecto de los metabolitos aislados de *P. tinctorum* sobre la síntesis de ADN en semillas de *E. crusgalli*. Las concentraciones utilizadas fueron  $5.8 \times 10^{-5}$ ,  $6.2 \times 10^{-4}$ ,  $1.2 \times 10^{-3}$  y  $2.2 \times 10^{-3}$  M para el hematomato de metilo (46), el orselinato de metilo (50), el  $\beta$ -orcínol carboxilato de metilo (54) y el orcínol (120), respectivamente. La concentración del control positivo (2,4-D) fue  $4.6 \times 10^{-4}$  M. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones. Las barras verticales indican la desviación estándar máxima.

### 5.1.7 Interacción de los metabolitos mayoritarios de *Parmotrema tinctorum* con la proteína calmodulina y con la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina

#### 5.1.7.1 Efecto sobre la movilidad electroforética de la calmodulina

Considerando que la calmodulina es una proteína que juega un papel central en los procesos de regulación de transducción de señales que tienen lugar durante los eventos de germinación y de crecimiento vegetal (Dieter, 1984; Roberts *et al*, 1986; Roberts y Harmon, 1992) y, con la finalidad de explorar otro posible mecanismo por el cual los metabolitos aislados de *P. tinctorum* ejercen su actividad fitotóxica, se procedió a determinar el efecto de los productos sobre la movilidad electroforética de la proteína, para lo cual se realizó una electroforesis desnaturizante utilizando las condiciones indicadas en la Sección Experimental. La interacción de cualquier compuesto con esta proteína ocasiona alteraciones en su conformación estructural que se ven reflejadas en cambios en su movilidad electroforética.



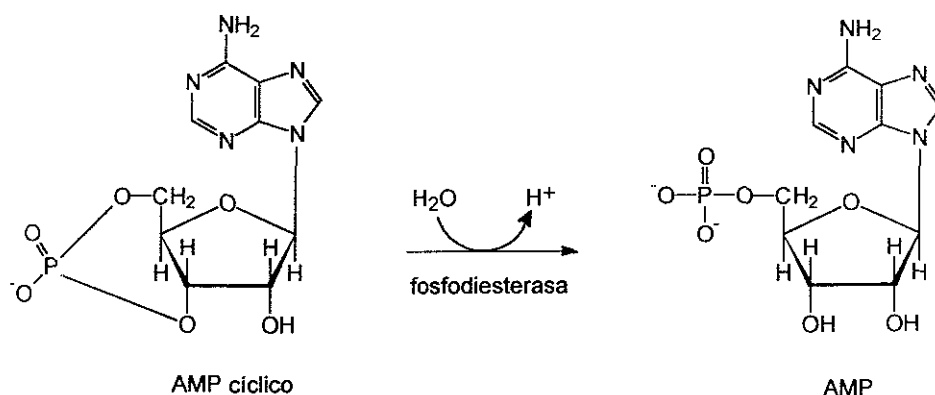
▲ **Figura 27.** Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE 12 %) de 2 µg de calmodulina bovina en presencia de CaCl<sub>2</sub> 1 mM, después del tratamiento con los compuestos aislados de *P. tinctorum*, durante 1.5 h a 30 °C. A: calmodulina; B: clorpromazina (control positivo); C: ácido girofórico (22); D: liquexantona (27); E: ácido úsnico (32); F: ácido difractaico (55); G: hematomato de metilo (46); H: orselinato de metilo (50); I: β-orcinol carboxilato de metilo (54); J: orcinol (120); K: lecanorina (121).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 5. Resultados y Discusión

Los resultados de estas determinaciones indican que todos los compuestos evaluados, con excepción del orcinol (**120**), afectan la movilidad de la calmodulina en el gel. Los ácidos girofórico (**22**), úsnico (**32**) y difractaico (**55**), retardan considerablemente la movilidad, siendo el compuesto **32** el que muestra el efecto más notable. El retardo en la movilidad electroforética provocado por el dibenzofurano **32** fue mayor que el de la clorpromazina (control positivo), en tanto que el inducido por los productos **27**, **46**, **50**, **54** y **121** es comparable al provocado por la fenotiazina (Figura 27).

Los efectos observados en estas evaluaciones permiten concluir que las fitotoxinas aisladas del líquen *P. tinctorum* interaccionan con la calmodulina de bovino, retardando significativamente su movilidad electroforética y sólo resta por establecer si esta interacción modifica las propiedades reguladoras enzimáticas de la proteína. En el caso del compuesto **46** fue posible establecer que la interacción con calmodulina afecta la habilidad de la proteína de modular la actividad enzimática de sus proteínas blanco. Para ello se determinó el efecto del metabolito sobre la actividad moduladora de la calmodulina empleando como enzima de prueba a la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina. Esta enzima fue seleccionada como proteína blanco debido a que se puede adquirir comercialmente y su actividad es relativamente fácil de evaluar. La fosfodiesterasa es la enzima responsable de regular la concentración intracelular de la adenosina-3',5'-monofosfato (AMP cíclico), degradándolo a través de una reacción de hidrólisis (Darnell *et al.*, 1990; Stryer, 1990; Alberts *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2000) [Figura 28]. El AMP cíclico es un nucleótido cíclico que actúa como segundo mensajero de hormonas como la adrenalina, el glucagón, la calcitocina, la corticotropina, la luteinizante y la paratiroides, entre muchas otras, afectando una amplia gama de procesos celulares. Así, por ejemplo, favorece la degradación de los compuestos combustibles almacenados, aumenta la secreción de ácido clorhídrico por la mucosa gástrica, induce la dispersión de los gránulos de melanina y disminuye la agregación de plaquetas (Darnell *et al.*, 1990; Stryer, 1990; Alberts *et al.*, 1994).



▲ **Figura 28.** Hidrólisis enzimática del AMP cíclico.

La estrategia experimental utilizada para determinar si el producto natural **46** afecta las propiedades reguladoras de la calmodulina comprendió las siguientes fases (Macías *et al.*, 2000, 2001):

- a) Evaluación de la actividad de la enzima fosfodiesterasa en presencia de calmodulina de cerebro de bovino.
- b) Determinación de habilidad de la fitotoxina para inhibir el efecto modulador enzimático de la calmodulina.
- c) Evaluación del efecto de la fitotoxina sobre la actividad de la fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina.

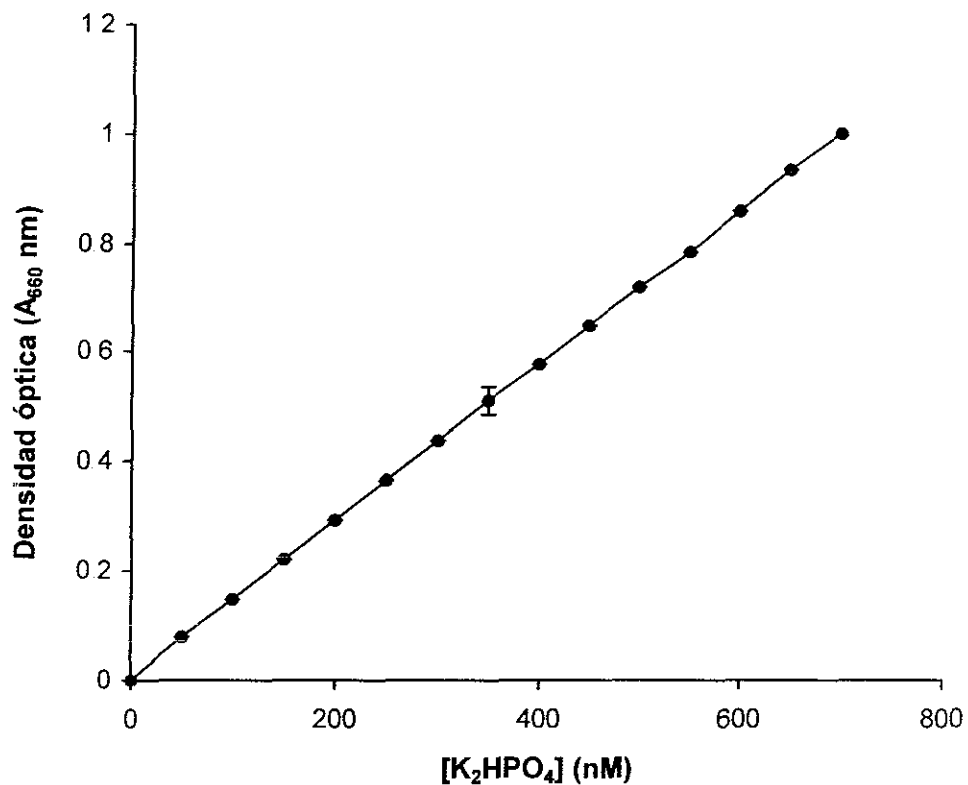
A continuación se presentan los resultados obtenidos en cada uno de estos bioensayos.

#### 5.1.7.2 Actividad de la enzima fosfodiesterasa en presencia de calmodulina

La actividad de la fosfodiesterasa se evaluó determinando la cantidad de fosfato liberado al medio de reacción cuando esta enzima cataliza la reacción de hidrólisis de AMP cíclico en presencia de calmodulina de cerebro de bovino (Sharma y Wang, 1979; Leung *et al.*, 1984). Las cantidades de calmodulina adicionadas a la mezcla de reacción se encontraron en un rango de 0.0 a 0.6  $\mu\text{g}$  y los ensayos se llevaron a cabo utilizando

## 5. Resultados y Discusión

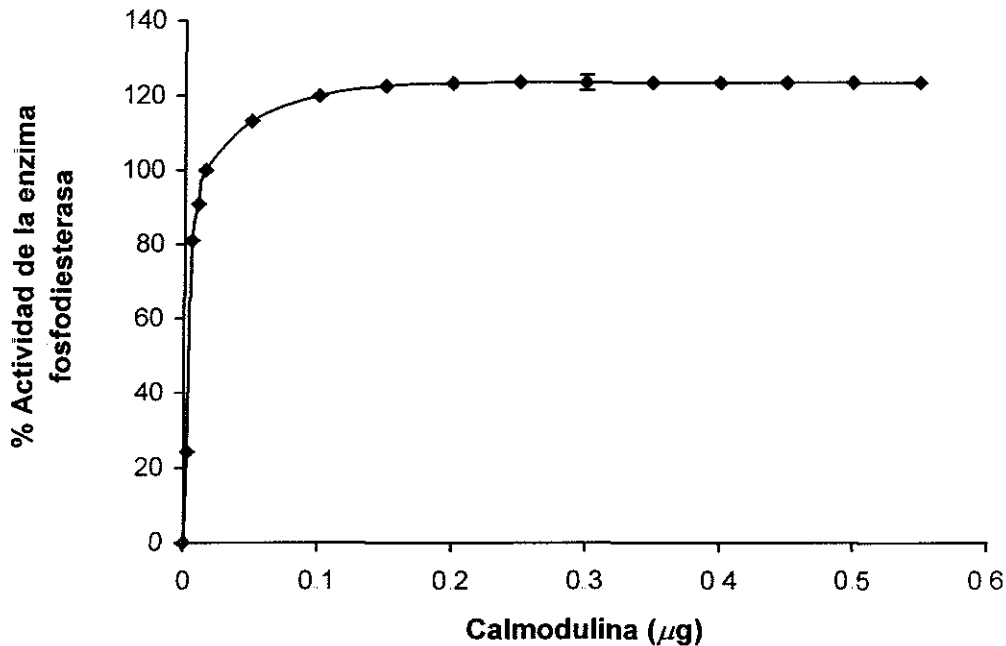
un método espectrofotométrico en el que se midió la densidad óptica del fosfato presente en el medio (Sumner, 1944); los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en una curva estándar de fosfato monobásico de potasio para así determinar la concentración de fosfato libre en cada tratamiento (Figura 29). La cantidad de fosfato obtenida en cada muestra se encuentra relacionada directamente con la actividad de la enzima fosfodiesterasa.



▲ **Figura 29.** Curva estándar de fosfato monobásico de potasio. Cada punto corresponde al promedio de tres determinaciones. La barra vertical representa la desviación estándar máxima

Los resultados de estas determinaciones indican que la actividad de la fosfodiesterasa se incrementa significativamente cuando se encuentra en presencia de calmodulina y que el efecto es dependiente de la concentración. En la Figura 30 se observa que la activación máxima de la enzima (123 %) se alcanza cuando se

adicionan 0.2  $\mu\text{g}$  de calmodulina a la mezcla de reacción; esta cantidad entonces se considera como saturante para el desarrollo de los ensayos posteriores



▲ **Figura 30.** Actividad de la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina en presencia de calmodulina de cerebro de bovino. Las condiciones de reacción se describen en la Sección Experimental. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones. Cada determinación se realizó en diferentes muestras de fosfodiesterasa. La barra vertical representa la desviación estándar máxima.

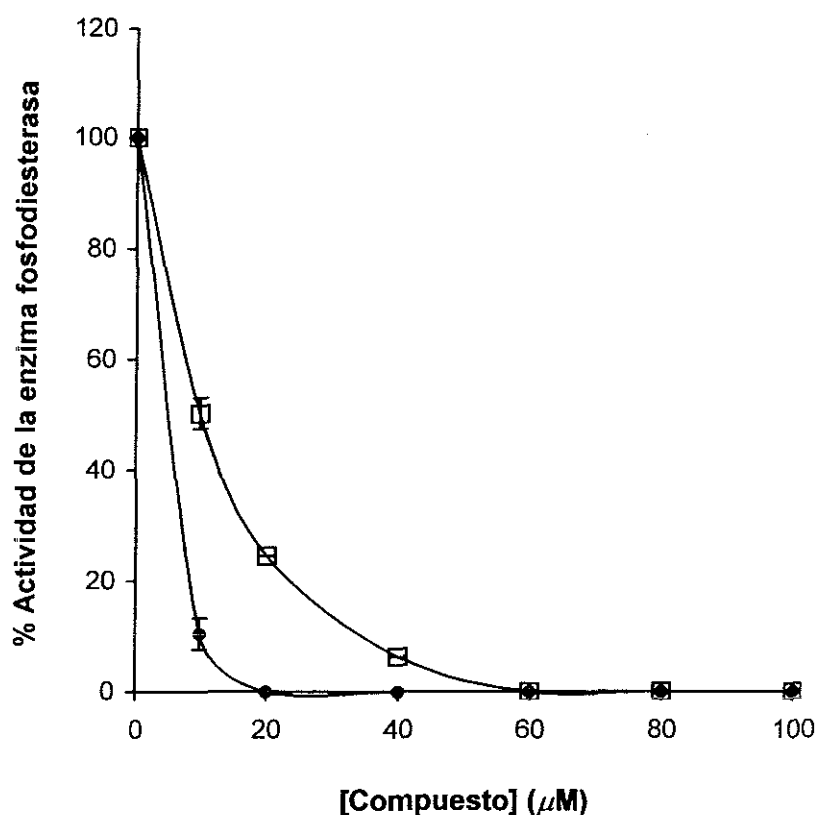
### 5.1.7.3 Efecto del hematomato de metilo (46) sobre la actividad moduladora de la calmodulina

El análisis del efecto que presenta el hematomato de metilo (46) para modificar la habilidad de la calmodulina de cerebro de bovino para activar la enzima fosfodiesterasa indica que la fitotoxina inhibe la activación de la enzima en forma creciente y dependiente de la concentración, observándose un efecto inhibitorio total a la concentración de 20  $\mu\text{M}$  del producto natural (Figura 31). La actividad inhibitoria de este compuesto es mayor que la mostrada por la clorpromazina, utilizada como control positivo y la cual también presenta un efecto inhibitorio significativo y dependiente de la concentración, pero en este caso la inhibición total se observa a una concentración de 60  $\mu\text{M}$  de la fenotiazina. Las  $\text{CI}_{50}$  obtenidas fueron de 5.2 y 10.2  $\mu\text{M}$ , para el



## 5. Resultados y Discusión

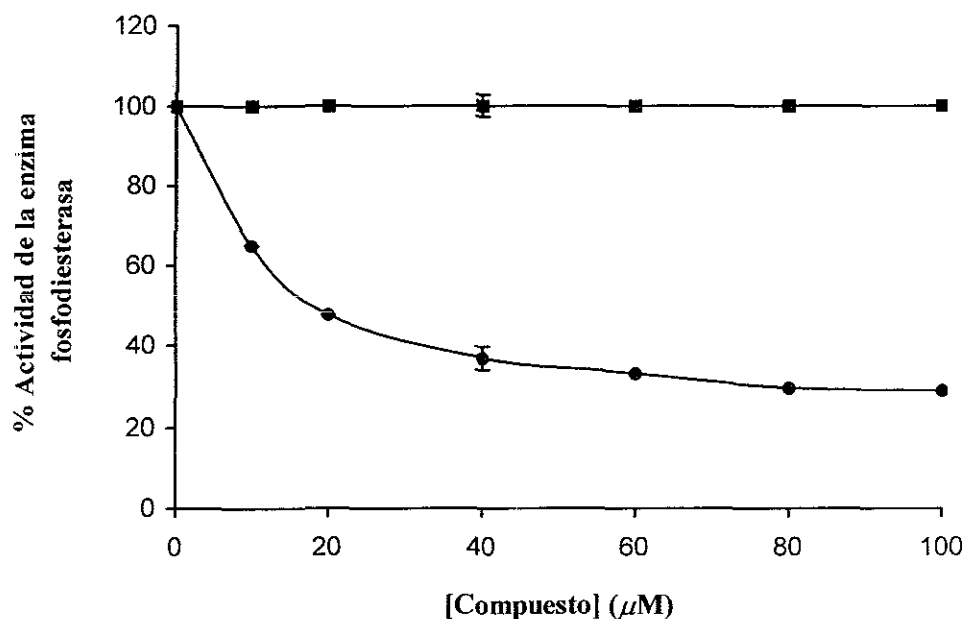
hematomato de metilo (**46**) y para la clorpromazina, respectivamente. El efecto del producto natural **46** para inhibir la actividad moduladora de la calmodulina es también mayor que el presentado por la fitotoxina fúngica ofiobolina A, cuyo valor de  $CI_{50}$  es de  $9.0 \mu M$  y es uno de los metabolitos de origen natural considerados como más activos en este tipo de ensayos (Leung *et al.*, 1984).



▲ **Figura 31.** Efecto del hematomato de metilo (**46**) [●] y de la clorpromazina (□) sobre la actividad enzimática de la fosfodiesterasa en presencia de concentraciones saturantes de calmodulina de bovino ( $0.2 \mu g$ ). Las condiciones de reacción se describen en la Sección Experimental. Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones. Cada determinación se realizó en diferentes muestras de fosfodiesterasa. Las barras verticales representan la desviación estándar máxima.

#### 5.1.7.4 Efecto del hematomato de metilo (46) sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina

La determinación del efecto del hematomato de metilo (46) sobre la actividad de la fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina se llevó a cabo con la finalidad de investigar si la fitotoxina afectaba directamente la enzima. Los resultados de estas evaluaciones indican que el producto 46 inhibe parcialmente la actividad de la fosfodiesterasa, encontrándose una  $CI_{50}$  de  $18 \mu M$  (Figura 32). Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos en los bioensayos en presencia de calmodulina, puede concluirse que el compuesto 46 sí afecta la habilidad de esta proteína para modular la actividad enzimática de la fosfodiesterasa de manera independiente. La clorpromazina utilizada como control positivo en los experimentos de electroforesis no mostró ningún efecto sobre la enzima en este bioensayo (Figura 32).



▲ **Figura 32.** Efecto del hematomato de metilo (46) [●] y de la clorpromazina (■) sobre la actividad enzimática de la fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina. Las condiciones de reacción se describen en la Sección Experimental. Los valores se expresan como porcentajes de máxima actividad enzimática. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones. Cada determinación se realizó en diferentes muestras de fosfodiesterasa. Las barras verticales representan la desviación estándar máxima.

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1.8 Determinación de la actividad citotóxica del hematomato de metilo (46)

Considerando que el hematomato de metilo (46) fue uno de los compuestos aislados de *P. tinctorum* que presentó mayor actividad fitotóxica, se consideró pertinente investigar también su efecto citotóxico sobre líneas celulares derivadas de tumores de diferentes animales, con la finalidad de detectar posibles efectos tóxicos para mamíferos y así ampliar el conocimiento de la potencialidad de este producto como un agente herbicida.

Los ensayos conducentes a determinar la actividad citotóxica se realizaron en el laboratorio del Dr. Thomas Shier de la Universidad de Minesota en Minneapolis, Estados Unidos. Las evaluaciones correspondientes se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Shier *et al.*, 1991 y Abbas *et al.*, 1993 y se utilizaron las siguientes líneas celulares: línea celular de fibroblastos de ratón suizo 3T3 (cepas NIH3T3 y KA31T), línea celular de hepatoma de rata (cepa H4TG) y línea celular de riñón de perro (cepa MDCK). Los resultados obtenidos en estos bioensayos indican que ninguna de las cepas de prueba es sensible al compuesto 46 a la máxima concentración utilizada (50  $\mu\text{M}$ ). Estos datos preliminares contribuyen a la compilación de información relativa a la inocuidad de la fitotoxina 46 para mamíferos y permiten inferir que este compuesto podría constituir un candidato aceptable para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas.

### 5.2 Investigación sobre la especie *Leucophyllum ambiguum* Humb. & Bonpl.

#### 5.2.1 Preselección y selección de *Leucophyllum ambiguum*

La preselección de la especie *Leucophyllum ambiguum* se realizó también con base en un criterio quimiotaxonómico al considerar que, aunque escasos, los estudios químicos y biológicos previos sobre este género permiten inferir que las especies que lo integran pueden constituir una fuente importante de principios fitotóxicos. Así, la especie relacionada *Leucophyllum frutescens* biosintetiza lignanos con una actividad fitoinhibitoria significativa (Rimando *et al.*, 1999). Posteriormente, a partir de los resultados obtenidos de la evaluación del efecto del extracto orgánico preparado a partir de *L. ambiguum*, sobre la germinación y el crecimiento radicular

de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*, fue posible determinar el potencial fitotóxico de la misma (Cuadro 32). De esta forma, *L. ambiguum* fue seleccionada como una especie adecuada para la obtención de metabolitos fitotóxicos.

**Cuadro 32.** Actividad fitotóxica del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) de *Leucophyllum ambiguum*.

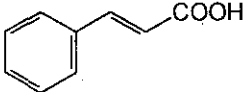
Tratamiento	CI <sub>50</sub> Crecimiento radicular (µg/mL)		CI <sub>50</sub> Germinación (µg/mL)	
	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>
<i>L. ambiguum</i>	214.3	638.1	312.3	525.3
2,4-D <sup>a</sup>	1.8 × 10 <sup>-4</sup>	> 2.3 × 10 <sup>-4</sup>	8.8 × 10 <sup>-4</sup>	> 2.3 × 10 <sup>-4</sup>

<sup>a</sup>Ácido 2,4-diclorofenoxi acético (control positivo).

### 5.2.2 Aislamiento de los principios fitotóxicos a partir del extracto activo de *Leucophyllum ambiguum*

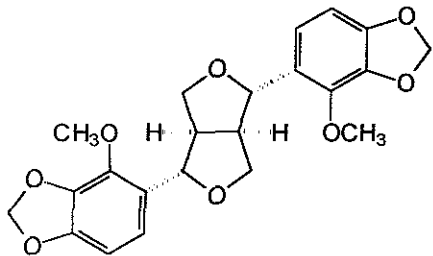
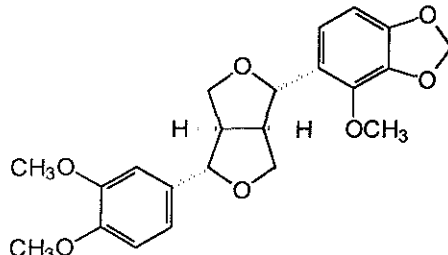
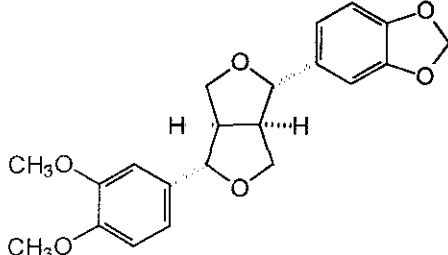
El extracto activo de *L. ambiguum* se fraccionó mediante la técnica de cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice y como resultado de este proceso se obtuvieron diez grupos de fracciones primarias. La evaluación del efecto fitotóxico de las mismas mediante el ensayo de bioautografía (Inoue *et al.*, 1992), indicó que la actividad fitoinhibidora se concentraba en las fracciones identificadas como LA<sub>3</sub>, LA<sub>4</sub> y LA<sub>6</sub>. Posteriormente, sucesivas cromatografías de estas fracciones condujeron al aislamiento de siete metabolitos secundarios. En el Cuadro 33 se muestran las estructuras de los compuestos aislados, su rendimiento con relación al peso del material vegetal seco y las fracciones de donde se obtuvieron.

**Cuadro 33.** Metabolitos secundarios aislados de las fracciones primarias de *Leucophyllum ambiguum*

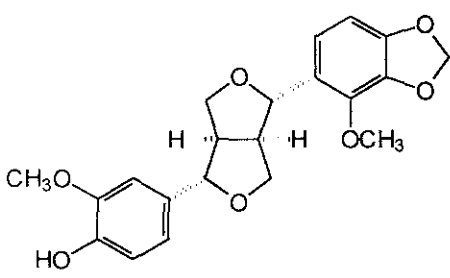
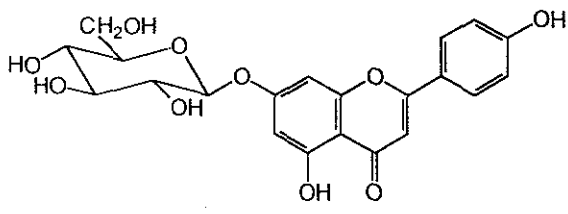
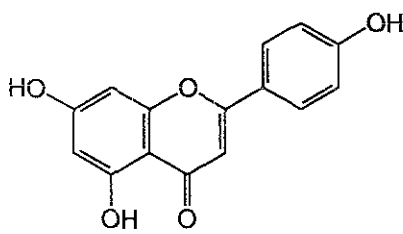
Compuesto	Rendimiento (%)	Fracción
	0.0016	LgA <sub>3</sub>
Ácido <i>trans</i> -cinámico (122)		

5. Resultados y Discusión

**Cuadro 33.** Metabolitos secundarios aislados de las fracciones primarias de *Leucophyllum ambiguum* (continuación).

Compuesto	Rendimiento (%)	Fracción
 <p>2',2''-Dimetoxisesamina (123)</p>	0.0020	LA <sub>4</sub>
 <p>2'-Metoxicobusina (124)</p>	0.0020	LA <sub>4</sub>
 <p>Cobusina (125)</p>	0.0014	LA <sub>4</sub>

**Cuadro 33.** Metabolitos secundarios aislados de las fracciones primarias de *Leucophyllum ambiguum* (continuación)

Compuesto	Rendimiento (%)	Fracción
 <p>2'-Metoxi-4''-hidroxi-desmetoxicobusina (126)</p>	0.0011	LA <sub>4</sub>
 <p>Apigetrina (127)</p>	0.0031	LA <sub>5</sub>
 <p>Apigenina (128)</p>	0.0054	LA <sub>7</sub> y LA <sub>8</sub>

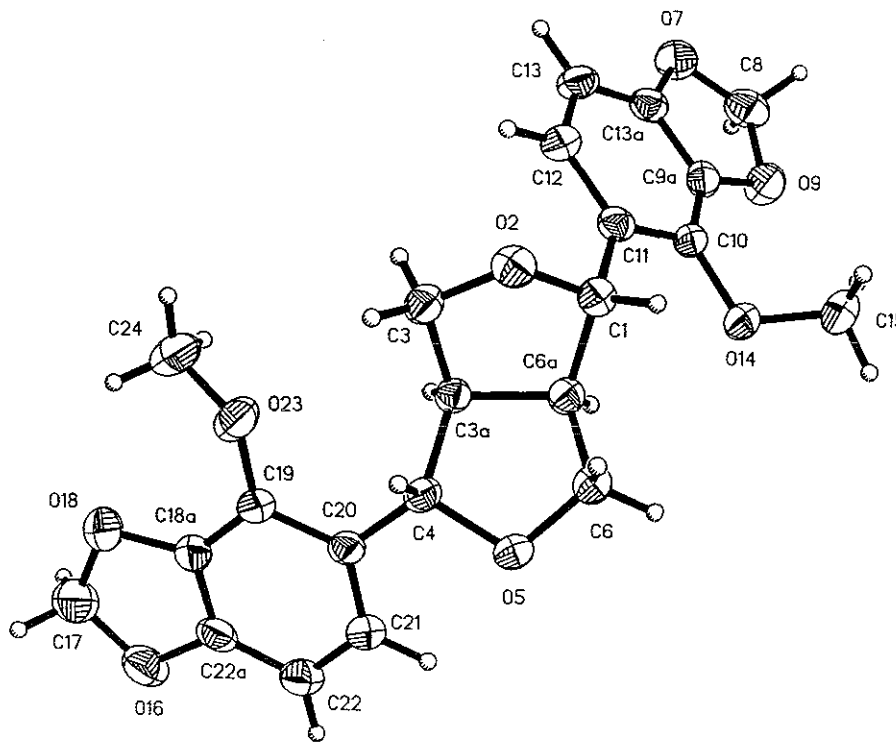
### 5.2.3 Caracterización de los compuestos aislados de *Leucophyllum ambiguum*

De manera general, la caracterización de los compuestos aislados de *L. ambiguum* se realizó mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales y de difracción de rayos X.

## 5. Resultados y Discusión

### 5.2.3.1 Caracterización del ácido *trans*-cinámico (122), de la 2',2''-dimetoxisesamina (123), de la cobusina (125), de la apigetrina (127) y de la apigenina (128)

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos **122**, **123**, **125**, **127** y **128** se encuentran en perfecta armonía con las descritas en la literatura para el ácido *trans*-cinámico (Mouly *et al.*, 1997; Miyazawa *et al.*, 1998), la 2',2''-dimetoxisesamina (Jaensch *et al.*, 1989), la cobusina (Iida *et al.*, 1982), la apigetrina (Markham *et al.*, 1975) y la apigenina (Mabry y Markham, 1975; Harborne 1994), respectivamente. Los datos correspondientes se encuentran en la Sección Experimental. De manera adicional, la estructura del compuesto **123** se confirmó inequívocamente utilizando la técnica de difracción de rayos X (Figura 33).



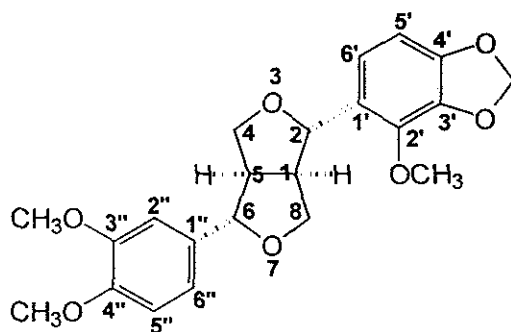
▲ Figura 33. Proyección estereoscópica de rayos X de la 2',2''-dimetoxisesamina (123)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 5.2.3.2 Caracterización de la 2'-metoxicobusina (124) y de la 2'-metoxi-4''-hidroxi-desmetoxicobusina (126)

De la fracción fitotóxica primaria LA<sub>4</sub> se obtuvieron dos nuevos productos naturales, el primero como un sólido cristalino de color blanco, identificado como la 2'-metoxicobusina (124) y el segundo, bajo la forma de un aceite incoloro, caracterizado como la 2'-metoxi-4''-hidroxi-desmetoxicobusina (126). En los Cuadros 34-36 se resumen sus constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas y en el Apéndice I se encuentran incluidos los espectros correspondientes.

**Cuadro 34.** Constantes físicas y espectrométricas de la 2'-metoxicobusina (124) y de la 2'-metoxi-4''-hidroxi-desmetoxicobusina (126).



124  
C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>O<sub>7</sub>

Sólido cristalino incoloro

p. f. 90-92 °C

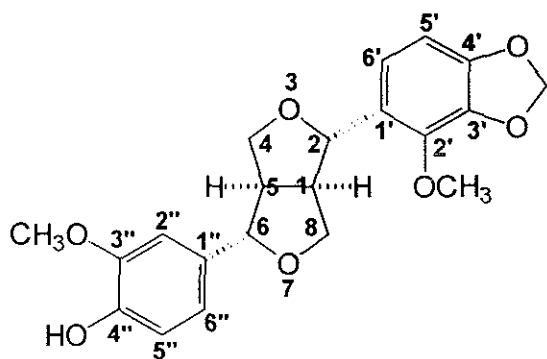
$[\alpha]_D^{25} +104^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>)

UV (EtOH)  $\lambda_{\max}$  nm: 229, 278

IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 2936, 2871, 1629, 1607, 1515, 1468, 1258, 1066, 1042, 759, 627.

EMIE  $m/z$  (int. rel.): 400 [M<sup>+</sup> (94)], 369 (16), 233 (9), 219 (17), 205 (12), 191 (80), 180 (10), 179 (44), 177 (37), 166 (32), 165 (100), 151 (33), 138 (12).

DC (MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm): 18.0 (204), 4.8 (230), 1.2 (279).



126  
C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>

Aceite incoloro

$[\alpha]_D^{25} +74^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>)

UV (CHCl<sub>3</sub>)  $\lambda_{\max}$  nm: 236, 279

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3370, 2935, 2872, 1629, 1609, 1515, 1467, 1343, 1258, 1216, 1065, 1041, 754, 666.

EMIE  $m/z$  (int. rel.): 386 [M<sup>+</sup> (60)], 355 (22), 233 (12), 205 (28), 191 (82), 180 (18), 179 (65), 165 (68), 163 (28), 152 (54), 151 (100), 137 (34), 131 (24)



## 5. Resultados y Discusión

**Cuadro 35.** Desplazamientos químicos en RMN de  $^1\text{H}$  obtenidos para la cobusina (125), la 2'-metoxicobusina (124) y la 2'-metoxi-4''-hidroxi-desmetoxicobusina (126)

Posición	125 $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	124 $\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	126 $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$
1	2.90 <i>m</i>	3.00 <i>m</i>	3.00 <i>m</i>
2	5.30 <i>sa</i>	5.03 <i>d</i> (4.0)	5.03 <i>d</i> (4.2)
4eq	3.80 <i>dd</i> (3.4, 9.0)	4.20 <i>dd</i> (6.0, 9.2)	4.20 <i>dd</i> (6.3, 9.0)
4ax	4.40 <i>d</i> (9.0)	3.92 <i>dd</i> (3.5, 9.0)	3.92 <i>dd</i> (3.6, 9.0)
5	2.90 <i>m</i>	3.0 <i>m</i>	3.0 <i>m</i>
6	5.30 <i>sa</i>	4.68 <i>d</i> (6.0)	4.66 <i>d</i> (5.7)
8eq	4.80 <i>dd</i> (5.4, 8.2)	4.33 <i>dd</i> (7.5, 9.0)	4.33 <i>dd</i> (7.2, 9.0)
8ax	4.10 <i>d</i> (9.6)	4.00 <i>dd</i> (4.0, 9.0)	3.99 <i>dd</i> (4.5, 9.3)
2'	6.80-6.90 <i>m</i>		
5'	6.80-6.90 <i>m</i>	6.51 <i>d</i> (8.0)	6.51 <i>d</i> (8.1)
6'	6.80-6.90 <i>m</i>	6.85 <i>da</i> (8.2)	6.85 <i>da</i> (8.2)
2''	6.80-6.90 <i>m</i>	6.91 <i>d</i> (1.5)	6.90 <i>d</i> (1.8)
5''	6.80-6.90 <i>m</i>	6.83 <i>d</i> (8.5)	6.82 <i>dd</i> (0.6, 8.1)
6''	6.80-6.90 <i>m</i>	6.88 <i>dd</i> (2.0, 7.7)	6.89 <i>dd</i> (1.5, 7.6)
OCH <sub>2</sub> O	5.90 <i>s</i>	5.92 <i>sa</i>	5.92 <i>sa</i>
CH <sub>3</sub> O-2'		4.01 <i>s</i>	4.01 <i>s</i>
CH <sub>3</sub> O-3''	3.90 <i>s</i>	3.89 <i>s</i>	3.90 <i>s</i>
CH <sub>3</sub> O-4''	3.90 <i>s</i>	3.87 <i>s</i>	
OH-4''			3.66 <i>sa</i>

<sup>a</sup> ppm en CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz; <sup>b</sup> ppm en CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz. *J* en Hz

**Cuadro 36.** Desplazamientos químicos en RMN de  $^{13}\text{C}$  obtenidos para la cobusina (125), la 2'-metoxicobusina (124) y la 2'-metoxi-4''-hidroxi-desmetoxicobusina (126)

Posición	125 $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	124 $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	126 $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$
1	54.6*	54.5*	54.5*
2	87.7	82.4	82.3
4	69.7	71.3	71.2
5	54.5*	54.0*	54.0*
6	87.7	85.4	85.5
8	71.0	73.2	73.1
1'	135.1	136.3	136.2
2'	106.5**	140.6	140.6
3'	147.9	148.8	148.8
4'	147.9	127.2	127.2
5'	109.0	102.1	102.1
6'	119.6	118.3	119.1
1''	135.1	133.6	133.0
2''	106.3**	109.2	108.6
3''	148.8	149.2	146.6
4''	149.2	148.6	145.2
5''	109.0	111.0	114.2
6''	119.6	118.3	118.3
OCH <sub>2</sub> O	101.0	101.0	100.1
CH <sub>3</sub> O-2'		59.4	59.4
CH <sub>3</sub> O-3''	55.9	55.9	56.0
CH <sub>3</sub> O-4''	55.9	55.9	

<sup>a</sup> ppm en CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz.

(\*), (\*\*) Valores intercambiables

## 5. Resultados y Discusión

Las evidencias que permitieron establecer la estructura molecular de estos productos se describen a continuación:

Los espectros en el IR (Espectros 1 y 6) presentan bandas de absorción intensas asociadas con la presencia de anillos aromáticos ( $\nu_{\max}$  2935, 1468, 1516  $\text{cm}^{-1}$ ). En el espectro del compuesto **126** se observa además la señal característica de un grupo hidroxilo ( $\nu_{\max}$  3370  $\text{cm}^{-1}$ ).

El espectro de masas generado por la técnica de impacto electrónico presenta un ion molecular en una relación masa carga de 400 uma, en el caso del producto **124** y de 386 uma para el compuesto **126** (Espectros 2 y 7), es decir, 30 y 16 uma más, respectivamente, que el ion molecular obtenido para la cobusina (**125**).

Con base en el análisis de los espectros de RMN (Espectros 3, 4, 8, y 9) y su comparación con los obtenidos para el compuesto **125**, fue posible establecer que los productos **124** y **126** son lignanos de tipo furofurano, muy similares a la sesamina y sustituidos asimétricamente con un grupo metoxipiperonilo y otro de tipo veratrilo en las posiciones 2 y 6, respectivamente. Como en el producto **125**, los espectros de RMN presentan las siguientes señales características (Cuadros 35 y 36):

► Un conjunto de señales no equivalentes atribuibles a la porción furofurano en  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  4.68/85.4, 5.03/82.4, 4.33 y 4.00/73.2, 4.20 y 3.92/71.3, 3.00/54.5 y 3.00/54.0 para el producto **124** y en  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  4.66/85.5, 5.03/82.3, 4.33 y 3.99/73.1, 4.20 y 3.92/71.2, 3.00/54.5 y 3.00/54.0 para el compuesto **126**.

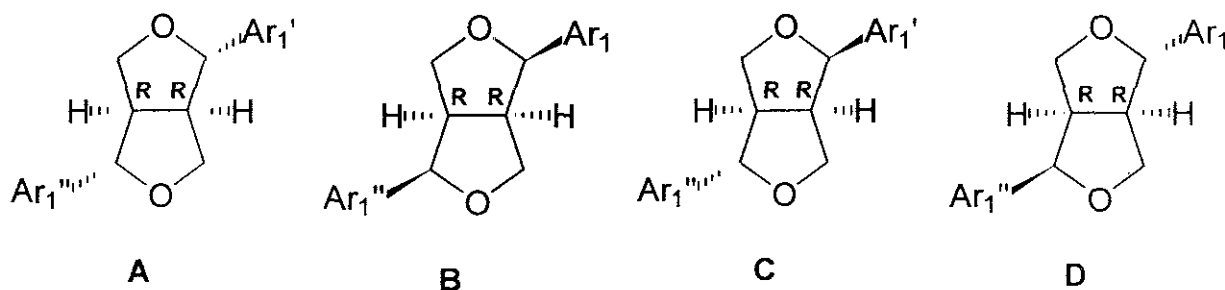
► Las señales correspondientes a la porción piperonilo del primer grupo aromático, que incluyen el singlete ancho generado por la función metilendioxi ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  5.92/101.0) y las señales dobles ( $J = 8.0-8.2$ ) debidas a los dos protones *orto* relacionados ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  6.51/102.1 y 6.85/118.3).

► Las absorciones características para los protones aromáticos del grupo veratrilo, entre 6.82 y 6.91 ppm en los dos lignanos.

► En el espectro del producto **124** se observan los singletes característicos de tres grupos metoxilo, dos de la porción veratrilo en  $\delta_{\text{H}}$  3.87 y 3.89, y el tercero en  $\delta_{\text{H}}$  4.01 correspondiente al metoxilo ubicado en el grupo metoxipiperonilo. En el caso del lignano **126**, además de la señal en  $\delta_{\text{H}}$  4.01 del grupo metoxipiperonilo, se observa tan sólo una segunda señal de metoxilo en  $\delta_{\text{H}}$  3.90. En ambos productos, el singlete en  $\delta_{\text{H}}$  4.01 muestra una correlación en el espectro NOESY con la señal atribuible a la función metilendioxi en  $\delta_{\text{H}}$  5.92 (Espectro 5)

► El espectro de RMN-<sup>1</sup>H del lignano **126**, contiene una señal que desaparece con agua deuterada en  $\delta_H$  3.66, asignable a un grupo hidroxilo. Este grupo se ubicó en la posición 4'' del anillo tipo veratrilo con base en la correlación observada en el espectro NOESY entre esta señal y el singulete en  $\delta_H$  3.90, correspondiente al grupo metoxilo de la posición 3'' (Espectro 10). Por otro lado, la señal en  $\delta_H$  6.90 (*d*, H-2'') mostró un cuadro de conectividad con el singulete en  $\delta_H$  3.90, corroborando la ubicación del metoxilo en C-3'' (Espectro 11).

El núcleo base de los productos naturales **124** y **126** debía corresponder a cualquiera de los isómeros de la cobusina (Figura 34, estructuras **A** y **B**) o de la fargesina (Figura 34, estructuras **C** y **D**), ocho en cada caso. Para discernir entre estas posibilidades, se analizaron los datos espectroscópicos de los carbonos aromáticos 1' y 1'' de los lignanos **124** y **126** y los descritos en la literatura para los distintos diastereoisómeros de las estructuras **A-D** (Pelter *et al.*, 1976; Biavatti *et al.*, 2001), en virtud de que sus desplazamientos químicos dependen en gran medida de la configuración relativa del anillo arílico (Chiba *et al.*, 1980; Greger y Hofer, 1980; Agrawal y Takhur, 1985; Rahman *et al.*, 1990; Biavatti *et al.*, 2001) Este análisis comparativo se resume en el Cuadro 37 y del mismo se desprende que los desplazamientos de C-1' y C-1'' de los compuestos **124** y **126** son similares a los correspondientes del isómero **A**, en el cual los grupos aromáticos se encuentran en una disposición ecuatorial.



Ar<sub>1</sub> = piperonilo

Ar<sub>1</sub>'' = veratrilo

▲ **Figura 34.** Estructuras de los núcleos base posibles para los productos **124** y **126**

## 5. Resultados y Discusión

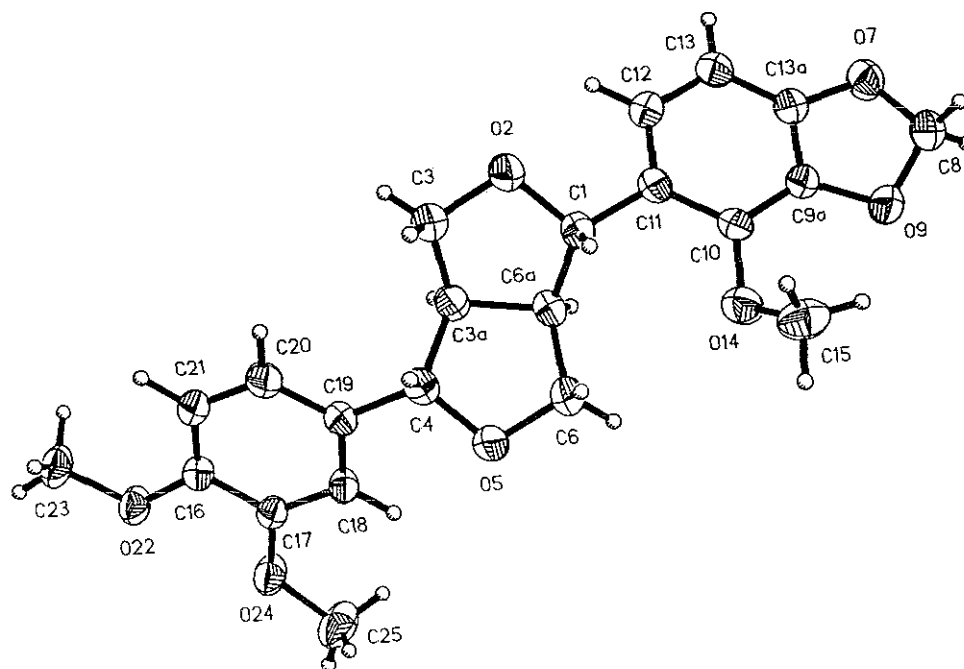
**Cuadro 37.** Datos de desplazamientos químicos de los carbonos de las posiciones 1' y 1'' de furofuranos de tipo cobusina (A y B) y fargesina (C y D).

Posición	A	B	C	D	124	126
1'	135.0	132.6	132.6	135.1	136.3	136.2
1''	133.4	130.8	133.5	130.9	133.6	133.0

Cabe destacar que para el análisis anterior se asumió que la fusión de los anillos furofurano es de tipo *cis*, como en la mayoría de los lignanos naturales de este tipo aislados a la fecha (Dickey, 1958; Greger y Hofer, 1980; Hofer y Schölm, 1981) y, en consecuencia, la estereoquímica absoluta en C-1 y C-5 queda restringida, en principio, a las posibilidades *R,R* o *S,S*. De nueva cuenta, consideraciones biogénicas permitieron establecer *a priori* que la configuración absoluta en estos centros asimétricos es *R,R* (Freudenberg y Sidhu, 1960; Hofer y Schölm, 1981; Latip *et al.*, 1999).

El análisis anterior, así como el valor de la rotación óptica de los productos naturales y el perfil del dicroísmo circular del producto **124**, permitieron proponer que la configuración absoluta en C-2 y C-6 es *S,S* en los dos productos naturales (Hofer y Schölm, 1981).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



▲ **Figura 35.** Proyección estereoscópica de rayos X de la 2'-metoxicobusina (**124**).

El análisis de difracción de rayos X del producto **124** permitió confirmar inequívocamente la propuesta estructural (Figura 35). En el caso del producto **126**, el tratamiento con  $\text{CH}_2\text{N}_2$  generó un lignano idéntico en todos sus aspectos al producto natural **124** y, por lo tanto, su estructura quedó confirmada también de manera contundente.

#### 5.2.4 Evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos aislados de *Leucophyllum ambiguum*

La actividad fitotóxica de los productos naturales obtenidos del extracto activo de *L. ambiguum* se evaluó determinando su efecto sobre el crecimiento radicular y la germinación de semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*, utilizando el método en caja de Petri (Castañeda *et al.*, 1992). Los resultados de estas pruebas, expresadas como concentraciones inhibitoras medias ( $\text{CI}_{50}$ ), se muestran en el Cuadro 38.

**Cuadro 38.** Actividad fitotóxica de los compuestos aislados de *Leucophyllum ambiguum*.

COMPUESTO	$\text{CI}_{50}$ Crecimiento radicular (M)		$\text{CI}_{50}$ Germinación (M)	
	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>
<b>122</b>	$1.1 \times 10^{-3}$	$6.9 \times 10^{-4}$	$1.4 \times 10^{-3}$	$49 \times 10^{-4}$
<b>123</b>	$> 7.4 \times 10^{-2}$	$> 7.4 \times 10^{-2}$	$> 7.4 \times 10^{-2}$	$> 7.4 \times 10^{-2}$
<b>124</b>	$3.2 \times 10^{-5}$	$1.7 \times 10^{-2}$	$> 7.4 \times 10^{-2}$	$> 7.4 \times 10^{-2}$
<b>125</b>	$> 7.4 \times 10^{-2}$	$> 7.4 \times 10^{-2}$	$> 7.4 \times 10^{-2}$	$> 7.4 \times 10^{-2}$
<b>126</b>	$7.4 \times 10^{-2}$	$3.2 \times 10^{-3}$	$> 7.4 \times 10^{-2}$	$> 7.4 \times 10^{-2}$
<b>127</b>	$> 7.4 \times 10^{-2}$	$> 7.4 \times 10^{-2}$	$> 7.4 \times 10^{-2}$	$> 7.4 \times 10^{-2}$
<b>128</b>	$> 7.4 \times 10^{-2}$	$> 7.4 \times 10^{-2}$	$> 7.4 \times 10^{-2}$	$> 7.4 \times 10^{-2}$
2,4-D <sup>a</sup>	$1.8 \times 10^{-4}$	$> 2.3 \times 10^{-4}$	$8.8 \times 10^{-4}$	$> 2.3 \times 10^{-4}$

<sup>a</sup>Ácido 2,4-diclorofenoxi acético (control positivo).

## 5. Resultados y Discusión

Como se desprende de la información anterior, únicamente los productos **122**, **124** y **126** inhibieron el crecimiento radicular de las especies de prueba de una forma moderada. Por otra parte, con excepción del ácido *trans*-cinámico (**122**), ninguno de los metabolitos evaluados afectó la germinación de las semillas. En la literatura ya existen algunos antecedentes de la actividad fitotóxica del compuesto **122**. Así por ejemplo, se ha descrito que este producto inhibe moderadamente la germinación y el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli*, *Sesbania exaltata*, *Raphanus sativus*, *Lactuca sativa* y *Medicago sativa* (Shilling y Fumio, 1987; Rakesh *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1993; Ohira y Mitsuyoshi, 1994; Yu y Matsui, 1994).

Es importante mencionar que los productos aislados de *L. ambiguum* fueron evaluados también en los laboratorios de la compañía estadounidense BASF para determinar su actividad fitotóxica a nivel posemergente. Estas evaluaciones se llevaron a cabo como parte de un convenio realizado con la Universidad de Arizona a través del proyecto "Bioactive Agents from Dryland Plants of Latin America", el cual se encuentra integrado en un programa de carácter internacional denominado "International Cooperative Biodiversity Group". El documento que contiene los resultados obtenidos se encuentra incluido en el Apéndice II y como se desprende del mismo, los productos **123** (clave FO75), **124** (clave FO55) y **126** (clave FO64) inhiben significativamente el crecimiento vegetal de una especie de *Arabidopsis* y de un pasto común ("bentgrass").

### 5.2.5 Evaluación del efecto de los lignanos fitotóxicos aislados de *Leucophyllum ambiguum* sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de hojas de espinaca

Los productos aislados de *L. ambiguum* que resultaron fitotóxicos, los compuestos **123**, **124** y **126**, fueron evaluados para determinar si inhibían el proceso de la fotosíntesis *in vitro*, para lo cual se estudió su efecto sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de hojas de espinaca (*Spinaceae oleracea* L.) Los resultados de estos bioensayos indicaron que los lignanos evaluados no afectan la fotofosforilación de manera significativa, por lo cual no se consideró necesario explorar con mayor detalle su actividad biológica.

## 6. CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación indican que la preselección de organismos naturales, fundamentada en consideraciones quimiotaxonómicas, y de selección, basada en la aplicación de ensayos biológicos apropiados, pueden conducir al descubrimiento de productos fitotóxicos.

El líquen *Parmotrema tinctorum* biosintetiza diferentes metabolitos aromáticos de tipo policétido, incluyendo compuestos fenólicos simples [hematomato de metilo (46),  $\beta$ -orcinol carboxilato de metilo (54), orselinato de metilo (50), orcinol (120)], *para*-dépsidos [ácido difractaico (55), lecanorina (121)], tridépsidos [ácido girofórico (22)], dibenzofuranos [ácido úsnico (32)] y xantonas [liquexantona (27)]. El contenido metabólico secundario de *P. tinctorum* fue distinto en las dos recolectas estudiadas. En el caso de la primera recolecta, el producto mayoritario fue el ácido girofórico (22) y el ácido (+)-úsnico (32) no fue detectado. En la segunda recolecta el ácido (+)-úsnico (32) fue el metabolito secundario mayoritario y no se detectó la presencia del orcinol (120), del ácido difractaico (55), de la lecanorina (121) ni de la liquexantona (27). Estos resultados pueden deberse a que la biosíntesis de productos secundarios es afectada por diversos factores, entre los que se encuentran la edad de las especies, la época de recolección y el ambiente en el que se desarrollan los organismos naturales.

Los productos 32, 46, 50, 54, 55, 120 y 121, presentan una actividad fitotóxica notable de tipo preemergente. Estos compuestos inhiben significativamente la germinación y el crecimiento radicular de las arvenses *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. La actividad de los metabolitos 32, 55 y 46 es mayor que la del herbicida de uso comercial 2,4-D.

Los posibles blancos de acción de los compuestos fitotóxicos podrían involucrar por un lado, su interacción con la proteína calmodulina y, por otro, su interferencia con las reacciones de transferencia de electrones de la fotosíntesis. En el primer caso, con



## 6. Conclusiones

excepción del producto **120**, todos las fitotoxinas evaluadas retardan la movilidad electroforética de la calmodulina. Los productos **22**, **55** y **32** indujeron un retardo mayor que el de la clorpromazina, una fenotiazina que se une de forma no covalente a la calmodulina y que fue empleada como control positivo. El compuesto **32** fue el metabolito evaluado que produjo el retardo más importante. Adicionalmente, se determinó que el compuesto **46** inhibe la habilidad de la calmodulina para activar la enzima fosfodiesterasa, aunque también indujo la inhibición de la actividad de la fosfodiesterasa en ausencia de calmodulina. En el segundo caso, los bioensayos realizados utilizando cloroplastos aislados de hojas de espinaca, permitieron establecer que de todos los productos evaluados, únicamente los compuestos **22** y **121** interfieren significativamente con las actividades fotosintéticas asociadas con la fase luminosa. Ambos productos se caracterizaron como inhibidores de la reacción de Hill. El modo de acción del metabolito **22** involucra la inhibición de la transferencia de electrones entre  $P_{680}$  y  $Q_A$ , sobre el lado reductor del fotosistema II y, el de la fitotoxina **121**, la interferencia con la enzima que fotolisa el agua. Cabe mencionar que el compuesto **32** ya ha sido caracterizado previamente como un inhibidor del transporte de electrones en la cadena fotosintética. Este compuesto actúa sobre el lado oxidante del fotosistema II, a nivel del residuo de tirosina Z del polipéptido  $D_1$ .

Las evaluaciones del efecto de los metabolitos aislados de *P. tinctorum* sobre la síntesis de ADN en semillas de *A. hypochondriacus* y de *E. crusgalli*, demostraron que todos los compuestos ocasionan una disminución de este proceso. Sin embargo, en ningún caso este efecto es significativo, comparado con la inhibición inducida por el herbicida comercial 2,4-D, empleado como control positivo.

La magnitud de los efectos fitotóxicos que produjeron los metabolitos **32** y **46** en las distintas pruebas realizadas en el presente estudio es comparable, e incluso mayor, que la demostrada para productos de uso comercial. Sin embargo, la fitotoxina **32** también posee propiedades citotóxicas que lo restringen como un candidato aceptable para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas. Esta limitación no se ha detectado en el producto **46**.

Los resultados de la investigación sobre *P. tinctorum* constituyen una aportación adicional al conocimiento químico del género *Parmotrema* y ponen de manifiesto su potencial como una fuente de compuestos con actividad fitotóxica.

El estudio fitoquímico biodirigido de *Leucophyllum ambiguum* permitió el aislamiento del ácido *trans*-cinámico (**122**), la 2',2''-dimetoxisesamina (**123**), la cobusina (**125**), la apigetrina (**127**), la apigenina (**128**), la 2'-metoxicobusina (**124**) y la 2'-metoxi-4''-hidroxi-desmetoxicobusina (**126**). De estos productos, los dos últimos lignanos son novedosos.

El estudio de las propiedades fitotóxicas de los metabolitos aislados de *L. ambiguum* indicó que, con excepción del producto **122** que presentó una actividad moderada a nivel preemergente sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *A. hypochondriacus* y de *E. crusgalli*, ninguno de los productos obtenidos poseen propiedades fitotóxicas significativas contra estas especies de arvenses. Por otro lado, se encontró que los productos **123**, **124** y **126** inhiben significativamente el crecimiento vegetal a nivel posemurgente de una especie del género *Arabidopsis* y de un pasto común ("bentgrass").

Este trabajo constituye la primera descripción de un estudio químico y biológico sobre la especie *L. ambiguum*, por lo que esta investigación representa una contribución al conocimiento del género *Leucophyllum*, escasamente estudiado a la fecha.

## ***PERSPECTIVAS***

- Determinar cuantitativamente el efecto preemergente de las fitotoxinas **123**, **124** y **126**, aisladas de *Leucophyllum ambiguum*, sobre especies del género *Arabidopsis* y diferentes especies de plantas nocivas.
- Determinar el efecto pos y preemergente de las fitotoxinas obtenidas sobre distintas especies de plantas de interés agrícola.
- Ampliar los estudios conducentes a determinar la inocuidad del producto **46** aislado de *Parmotrema tinctorum*.
- Determinar el efecto de los productos sobre **123**, **124** y **126** sobre la movilidad electroforética de la proteína calmodulina en presencia de calcio.
- Determinar el efecto de los metabolitos fitotóxicos aislados de *Parmotrema tinctorum* y de *Leucophyllum ambiguum* sobre la movilidad electroforética de la proteína calmodulina en ausencia de calcio.
- Determinar la habilidad de los productos naturales de afectar las propiedades moduladoras enzimáticas de la calmodulina en presencia de otras enzimas blancos

## ***REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

- Abbas, H., Gelderblom, W., Cawood, M., Shier, W. (1993). Biological activities of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*, in jimson weed (*Datura stramonium* L.) and mammalian cell culture. *Toxycon* 31, 345-353
- Achnine, L., Mata, R., Iglesias-Prieto, R., Lotina-Hennsen B. (1998). Impairment of photosystem II donor side by the natural product odoratol. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46, 5313-5317.
- Achnine, L., Perda-Miranda, R., Iglesias-Prieto, R., Moreno-Sánchez, R., Lotina-Hennsen B. (1999). Tricolorin A, a potent natural uncoupler and inhibitor of photosystem II acceptor side of spinach chloroplasts. *Physiologia Plantarum* 106, 246-252
- Agrawal, P., Thakur, R. (1985). <sup>13</sup>C NMR spectroscopy of lignan and neolignan derivatives. *Magnetic Resonance Chemistry* 23, 389-418.
- Ahad, A., Goto, Y., Kiuchi, F., Tsuda, Y., Kondo, K., Sato, T. (1991). Nematocidal principles in "oakmoss absolute" and nematocidal activity of 2,4-dihydroxybenzoates. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 39, 1043-1046
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. (1989). *Molecular Biology of the Cell*, 2nd. edition, Garland Publishing, Inc., USA; pp. 366-380; 736-740.
- Anaya, A., Calera, M., Mata, R., Pereda-Miranda, R. (1990). Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* CAV (Convolvulaceae) *Journal of Chemical Ecology* 16, 2145-2152.

## *Referencias Bibliográficas*

- Argueta, A. (1994). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*, Vol. III, Instituto Nacional Indigenista, México, pp. 521.
- Armaleo, D. (1993). *Proceedings of the International Botanical Congress*, Tokyo-Yokohama, abstract 15.
- Au, T., Leung, P. (1998). Identification of binding and inhibition sites in the calmodulin molecule for ophiobolin A by site-directed mutagenesis. *Plant Physiology* 118, 965-973.
- Banskota, A., Sunil Kumar, C., Manandhar, M., Taylor, W. (1996). Depsides from *Parmelia tinctorum* Nyl. *Journal of Nepal Chemistry Society* 15, 27-28.
- Bao-Ning, S., Li, Y., Zhohg-Jian- J. (1997). Neolignan, phenylpropanoid and iridoid glycosides from *Pedicularis verticillata*. *Phytochemistry* 45, 1271-1273.
- Barber, J. (1998). Photosystem two. *Biochimica et Biophysica Acta* 1365, 269-277.
- Barnard, C., Daberkow, S., Padgitt, M., Smith, M., Uri, N. (1997). Alternative measures of pesticide use. *The Science of the Total Environment* 203, 229-244.
- Baum, G., Lev-Yadum, S., Fridmann, T., Katsenelson, M., Zik, H., Fromm, H. (1996) Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants *The Embo Journal* 15, 2988-2996.
- Bayer, E., Gruke, K., Hägale, K., Hasehamier, H., Jessipów, S., Köning, W., Zähnen, H. (1972). Stoffwechsel produkte von mikroorganismen. Phosphinothricin und phosphinothricin-alanyl-alanine. *Helvetica Chimica Acta* 55, 224-239.

- Biavatti, M., Vieira, P., da Silva, F., Fernandes, J., Degani, A., Cass, Q., Schefer, A., Ferreira, A. (2001). Separation and NMR studies on lignans of *Raulinoa echinata*. *Phytochemical Analysis* 12, 64-68.
- Bironaite, D., Cenas, N., Medentsev, A., Akimeko, V. (1991). The inhibition of glutathione reductase by quinones. *Zeitschrift für Naturforschung* 46, 966-969.
- Bowes, J., Crofts, A., Arnzen, C. (1981). Redox reactions on the reducing side of photosystem II in chloroplasts with altered herbicide binding properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 200, 300-308.
- Boyette, C., Abbas, H. (1995). Weed control with mycoherbicides and phytotoxins. En: K. Inderjit, M. Dakshini y F. Einhellig (eds.). *Allelopathy: organisms, processes and applications. ACS Natural Phytotoxins as herbicides. ACS Symposium Series 582*, 280-299
- Broadbent, D., Mabelis, R., Spencer, H. (1975). 3,6,8-Trihydroxy-1-methylxanthone – an antibacterial metabolite from *Penicillium patulum*. *Phytochemistry* 14, 2082-2083
- Bruun, T. (1971). The isomeric *m*-methoxytrimethylphenols and related compounds. *Acta Chemica Scandinavica* 25, 2837-2851
- Bye, R., Linares, E., Estrada, E. (1995). En: *Phytochemistry of medicinal plants. Recent advances in phytochemistry*. J. Arnason; J. Romeo y R. Mata (eds.). Plenum Press, Nueva York, pp. 65-82.
- Calera, M., Soto, F., Sánchez, P., Bye, R., Hernández-Bautista, B., Anaya, A., Lotina-Hennsen, B., Mata, R. (1995). Biochemically active sesquiterpene lactones from *Ratibida mexicana*. *Phytochemistry* 40, 419-425.

## ***Referencias Bibliográficas***

- Castañeda, P., García, M., Hernández, B., Torres, B., Anaya, A., Mata, R. (1992). Effects of some compounds isolated from *Celaenodendron mexicanum* Standl (Euphorbiaceae) on seeds and phytopathogenic fungi. *Journal of Chemical Ecology* 18, 1025-1037
- Castañeda, P., Gómez, L., Mata, R., Lotina-Hennsen, B., Anaya, A., Bye, R. (1996). Phyto-growth-inhibitory and antifungal constituents of *Helianthella quinquenervis*. *Journal of Natural Products* 59, 323-326.
- Castañeda, P., Mata, R., Lotina-Hennsen, B. (1998). Effect of encecalin, euparin and demethylencecalin on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplast. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 78, 102-108
- Castro, F., Kreis, W., Almeida, R., Braga de Oliveira, A. (1997). Variation of cardenolides with growth in a *Digitalis lanata* Brazilian cultivar. *Phytochemistry* 45, 473-476.
- Coccuci, M., Negrini, N. (1988). Changes in the levels of calmodulin and calmodulin inhibitor in the early phase of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Physiology* 88, 910-914.
- Cohen, P., Hudson, J., Towers, G. (1996). Antiviral activities of anthraquinones, bianthrone and hypericin derivatives from lichens. *Experientia* 52, 180-183
- Conover, M., Mierzawa, R., King, A., Loebenberg, D., Bishop, W., Puar, M., Patel, M., Coval, S., Hershenhorn, J., Strobel, G. (1992). Usnic acid amide, a phytotoxin and antifungal agent from *Cercosporidium henningsii*. *Phytochemistry* 31, 2999-3001

- Coob, J., Han, C.-H., Wills, D., Roberts, D. (1999). Structural elements within the methylation loop (residues 112-117) and EF hands III and IV of calmodulin are required for Lys<sup>115</sup> trimethylation. *Biochemistry Journal* 340, 417-424.
- Copping, L., Hewitt, H. (1998). *Chemistry and mode of action of crop protection agents* Royal Society of Chemistry, Cambridge, U. K.
- Corbett, J. (1984). Herbicides interfering with photosynthesis. En: *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*. 2a. edición, Academic Press, London, pp. 50-98.
- Cordell, G. (1995). Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry* 40, 1585-1612.
- Correché, E., Carrasco, M., Escudero, M., Velázquez, L., de Guzmán, A., Giannini, F., Enriz, R., Jáuregui, E., Ceñal, J., Giordano, O. (1998). Study of the cytotoxic and antimicrobial activities of usnic acid and derivatives. *Fitoterapia* LXIX, 493-501
- Cramer, H. (2000). Crop Protection. En: F. Müller (ed.), *Agrochemicals. Composition, Production, Toxicology and Applications*. Wiley-VCH, Federal Republic of Germany, pp. 288-317.
- Culberson, C , y Elix, J. (1989). En: *Methods in Plant Biochemistry*; J. B Harborne (ed); Academic Press: London, Vol. 1; pp. 509-535.
- Culberson, Ch (1969). *Chemical and Botanical Guide to Lichen Products*. The University of North Carolina Press. Chapel Hill; USA, pp. 148.
- Cutler, H. (1988). Natural products and their potential in agriculture. En: H Cutler (ed ) *Biologically Active Natural Products. Potential Use in Agriculture*. ACS Symposium Series 380, 1-22.



## *Referencias Bibliográficas*

- Charudattan, R. (1990). Pathogens with potential for weed control. En: R. E Hoagland (ed.), *Microbes and Microbial Products as Herbicides, ACS Symposium Series* 439, 132-154.
- Chiba, M., Hisada, S., Nishibe, S., Thieme, H. (1980).  $^{13}\text{C}$  NMR analysis of symplocosin and (+)-epipinoresinol glucoside. *Phytochemistry* 19, 335-336.
- Dalvi, R., Singh, B., Salunkhe, D. (1972). Physiological and biochemical investigations on the phytotoxicity of usnic acid. *Phyton* 29, 63-72.
- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1990). *Molecular Cell Biology*, 2nd. edition, Scientific American Books, USA; pp. 617-638; 726-737.
- Datta, D., Ryrie, I., Jagendorf, A. (1974). Light dependent modification of spinach chloroplast coupling factor 1 by permanganate ion. *Journal of Biological Chemistry* 249, 4404-4411.
- Díaz, J. (1976). *Índice y Sinonimia de las Plantas Medicinales de México. Monografías Científicas I*, IMEPLAN, México, pp. 61.
- Dickey, E. (1958) Liriodendrin, a new lignan diglucoside from the inner bark of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera* L.). *Journal of Organic Chemistry* 23, 179-184.
- Dieter, P. (1984). Calmodulin an calmodulin-mediated processes in plants *Plant Cell and Environment* 7, 371-380.
- Dilley, R. Ion transport ( $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -exchange phenomena). En: *Methods of Enzymology*; San Pietro, A., Ed.; Academic Press: New York, 1972; Vol. 24, pp 68-74.
- Ding, Z., Ding, J., Lou, J., Zhang, G. (1990). Chemical constituents from *Parmelia tinctorum* *Yunnan Zhiwu Yanjiu* 12, 99-106

- Domínguez, X., Raigosa, A. (1969). Chemical components of *Leucophyllum texanum*: isolation of regiomontane. *Planta Medica* 17, 366-368.
- Duke, O., Abbas, H. (1995). Natural products with potential use as herbicides. *ACS Symposium Series* 582, 348-362.
- Duke, O., Lydon, J. (1987). Herbicides from natural compounds. *Weed Technology* 1 122-128.
- Duke, S. (1991). Plant terpenoids as pesticides. En: *Handbook of Natural Toxins* Vol. 6 *Toxicology of plant and fungal compounds*. R. Keeler y A. T. Marcel (eds.). Beeker Inc., pp. 269-296.
- Duke, S., Lydon, J. (1995). Natural products with potential use as herbicides. En: K. Inderjit, M. Dakshini y F. Einhellig (eds.). *Allelopathy: organisms, processes and applications. ACS Natural Phytotoxins as herbicides. ACS Symposium Series* 582, 348-362.
- Duke, S., Lydon, J. (1993). Natural phytotoxins as herbicides. En: K. Inderjit, M. Dakshini y F. Einhellig (eds.). *Allelopathy: organisms, processes and applications. ACS Natural Phytotoxins as herbicides. ACS Symposium Series* 524, 110-124.
- Einhellig, F. (1995). Mechanism of action of allelochemicals. En: *The Science of Allelopathy*. A. Putnam y F. Einhellig (eds.). American Chemical Society Symposium Series 582, Cap. 7, pp. 96-116.
- Einhellig, F., Souza, I. (1992). Phytotoxicity of sorgoleone found in grain sorghum root exudates. *Journal of Chemical Ecology* 18, 1-11.

## ***Referencias Bibliográficas***

- Emmerich, R., Giez, I., Lange, O., Proksch, P. (1993). Toxicity and antifeedant activity of lichen compounds against the polyphagous herbivorous insect *Spodoptera littoralis*. *Phytochemistry* 33, 1389-1394.
- Endo, Y., Hayashi, H., Sato, T., Maruno, M., Ohta, T., Nozoe, S. (1994). Confluent acid and 2'-O-methylperlatolic acid, monoamine oxidase B inhibitors in a Brazilian plant, *Himatanthus sucuuba*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 42, 1198-1201.
- Follmann, G., Villagrán, V. (1965). Flechtenstoffe als virusinhibitoren. *Naturwissenschaften* 51, 543-544.
- Früh, T., Chemla, P., Ehrler, J., Farooq, S. (1996). Natural products as pesticides: two examples of stereoselective synthesis. *Pesticide Science* 46, 37-47.
- García, E. (1995). *Caracterización parcial de una DNA primasa asociada a una DNA polimerasa de tipo replicativo de maíz*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Gauvrit, C. (1992). The mode of action of herbicides used in wheat crops. *Phytoma* 435, 38-42.
- Gerig, T., Blum, U. (1991). Effects of mixtures of four phenolic acids on leaf area expansion of cucumber seedlings grown in portsmouth by soil materials. *Journal of Chemical Ecology* 17, 29-40.
- Giaquinta, R., Dilley R. (1975). A partial reaction in FSII: reaction of silicomolibdate prior to the site of dichlorophenyldimethylurea inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta* 387, 288-305.

- Giaquinta, R., Selman, B., Bering, C., Dilley, R. (1974). Inhibition of coupling factor activity of chloroplast membrane by diazonium compounds. *Journal of Biological Chemistry* 249, 2873-2878.
- Giez, I., Lange, O., Proksch, P. (1994). Growth retarding activity of lichen substances against the polyphageous herbivorous insect *Spodoptera littoralis*. *Biochemical Systematic Ecology* 22, 113-116.
- Giménez, I., Vicente, C. (1989). On the mode of action of usnic acid as photosynthetic uncoupling agent. *Phyton* 49, 119-121.
- Gollapudi, S., Telikepalli, H., Jampani, H., Mirhom, Y., Drake, S., Bhattiprolu, K., Vander Velde, D., Mitscher, L. (1994). Aleptosarmentin, a new antimicrobial dibenzofuranoid lactol from the lichen *Alectoria sarmentosa*. *Journal of Natural Products* 57, 934-938.
- González-Tejero, M., Martínez-Lirola, M., Caseres-Porcel, M., Molero-Mesa, J. (1995). Three lichens used in popular medicine in Eastern Andalucía (Spain). *Economic Botanic* 49, 96-98.
- Grayer, R., Chase, M., Simmonds, M. (1999). A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: an appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der Pflanzen" *Biochemical Systematics and Ecology* 27, 369-393.
- Grayson, B., Williams, K., Freehauf, P., Pease, R., Ziesel, W., Sereno, R., Reinsfelder, R. (1987). The physical and chemical properties of the herbicide cinmethylin *Pesticide Science* 21, 143-153.
- Greger, H., Hofer, O. (1980). New unsymmetrically substituted tetrahydrofuran lignans from *Artemisia absinthium*. *Tetrahedron* 36, 3551-3558.

## ***Referencias Bibliográficas***

- Grossmann, K. (2000). Mode of action of auxin herbicides: a new ending to a long, drawn out story. *Trends in Plant Science* 5, 506-508.
- Gutiérrez-Lugo, M., Lotina-Hennsen, B., Farrés, A., Sánchez, S., Mata, R. (1999). Phtotoxic and photosynthetic activities of maduramicin and maduramicin methyl ester. *Zeitschrift für Naturforschung* 54c, 325-332.
- Harborne, J. (1994). *The Flavonoids. Advances in Research since 1986*. J. Harborne (ed.). 1a. edición, Chapman and Hall, University Press, Londres.; pp. 263, 448.
- Harding, S., Oh, S., Roberts, D. (1997). Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene show an enhanced production of active oxygen species *The Embo Journal* 16, 1137-1144.
- Harvey, A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products *Drug Discovery Today* 5, 294-300.
- Haynes, D., Ralph, P., Prange, J., Dennison, B. (2000). The impact of the herbicide diuron on photosynthesis in three species of tropical seagrass. *Marine Pollution Bulletin* 41, 288-293.
- He, Z.-D., Lau, K.-M., Xu, H.-X., Li, P.-C., But, P. (2000). Antioxidant activity of phenylethanoid glycosides from *Brandisia hancei*. *Journal of Ethnopharmacology* 71, 483-486
- Heap, I. (1997). The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. *Pesticide Science* 51, 235-243.
- Herrera, T., Ulloa, M. (1990). *El reino de los hongos. Micología básica y aplicada* Fondo de Cultura Económica, México; pp. 357-358.

- Hoagland, R. (1990). Microbes and microbial products as herbicides, an overview. En: R. E. Hoagland (ed.), *Microbes and Microbial Products as Herbicides*, ACS Symposium Series 439, 1-52.
- Hofer, O. y Schölm, R. (1981). Stereochemistry of tetrahydrofurofuran derivatives – circular dichroism and absolute conformation. *Tetrahedron* 37, 1181-1186.
- Holzmann, G., Leuckert, C. (1990). Applications of negative fast atom bombardment and MS/MS to screening of lichen compounds. *Phytochemistry* 29, 2277-2283.
- Hook, S., Means, A. (2001a). Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annual Revision of Pharmacology and Toxicology* 41, 471-505.
- Hook, S., Means, A. (2001b). Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41, 203-229.
- Huang, Y., Bruyne, T., Apers, S., Ma, Y., Claeys, M., Pieters, L., Vlietinck, A. (1999). Flavonoid glucuronides from *Picria fel-terrae*. *Phytochemistry* 52, 1701-1703.
- Huneck, S., Schreiber, K. (1972). Wachstumsregulatorische eigenschaften von flechten- und moss-inhaltsstoffen. *Phytochemistry* 11, 2429-2434.
- Huneck, S. (1999). The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* 86, 559-570.
- Iida, T., Nakano, M., Ito, K. (1982). Hydroperoxysesquiterpene and lignan constituents of *Magnolia kobus*. *Phytochemistry* 21, 673-675.
- Ingólfsdóttir, K., Wagner, H., Hughes, S. (1995). *Journal of Natural Products* 58, 1024-1031.

## *Referencias Bibliográficas*

- Inoue, H., Noguchi, M., Kubo, K. (1987). Site of inhibition of usnic acid at oxidizing side of photosystem 2 of spinach chloroplasts. *Photosynthetica* 21, 88-90.
- Inoue, M., Nishimura, H., Li, H.-H., Mizutani, J. (1992). Allelochemicals of *Polygonum sachalinense* FR. SCHM (Polygonaceae). *Journal of Chemical Ecology* 18, 1833-1840.
- Izawa, S. (1977). Inhibitors of electron transport. *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series* 5, 226-282.
- Jaensch, M., Jakupovic, J., King, R., Robinson, H. (1989). Pyrones and other constituents from *Podolepis* species. *Phytochemistry* 28, 3497-3501.
- Jamieson, G., Vanaman, T. (1979). Calcium-dependent affinity chromatography of calmodulin on an immobilized phenothiazine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 90, 1048-1056.
- Jarrett, H. (1986) Response of three enzymes to oleic acid, trypsin, and calmodulin chemically modified with a reactive phenothiazine. *The Journal of Biological Chemistry* 261, 4967-4972.
- Jayaprakasha, G., Jaganmohan Rao, L., Singh, R., Sakariah, K. (1998). Improved chromatographic method for the purification of phenolic constituents of the lichen *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale. *Journal of Chromatographic Science* 36, 8-10.
- Jiménez, A., Mata, R., Lotina-Hennsen, B., Anaya, A. (1998). Interference of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene with photosynthetic electron transport. *Zeitschrift für Naturforschung* 53c, 55-59.

- Jiménez, A., Mata, R., Lotina-Hennsen, B., Anaya, A., Ibarra, L. (1996). Phytogrowth inhibitory compounds from *Malmea depressa*. *Journal of Natural Products* 59, 202-204.
- Jones, D. (1988). En: *CRC Handbook of Lichenology*, M. Galun (ed); Boca Raton, Vol III, pp. 109.
- Justum, A., Heaney, S., Perrin, B., Wege, P. (1997). Pesticide resistance: assessment of risk and the development and implementation of effective management strategies. *Pesticide Science* 54, 435-446.
- Kim, S., Kim, Y. (2000). Neuroprotective phenylpropanoid esters of rhamnose isolated from rotos of *Scrophularia buergeriana*. *Phytochemistry* 54, 503-509.
- Kong, T., Chow, P. (1998). Identification of the binding and inhibition sites in the calmodulin molecule for ophiobolin A by site-directed mutagenesis. *Plant Physiology* 118, 965-973.
- König, G., Wright, A. (1999). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR and biological activity investigations of four lichen-derived compounds. *Phytochemical Analysis* 10, 279-284.
- Kumar, S., Müller, K. (1999a). Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *Journal of Natural Products* 62, 821-823.
- Kumar, S., Müller, K. (1999b). Lichen metabolites. 1. Inhibitory action against leukotriene B<sub>4</sub> biosynthesis by a non-redox mechanism. *Journal of Natural Products* 62, 817-820.
- Lascève, G., Gaugain, F. (1990). Effects of usnic acid on sunflower and maize plantlets. *Journal of Plant Physiology* 136, 723-727.



## *Referencias Bibliográficas*

- Latip, J., Hartley, T., Waterman, P. (1999). Lignans and coumarins metabolites from *Melicope hayesii* *Phytochemistry* 51, 107-110.
- Lawrey, J. (1983). Vulpinic and pinastric acids as lichen antiherbivore compounds: contrary evidence. *Bryologist* 86, 365-368.
- Lawrey, J. (1986). Biological role of lichen substances. *Bryologist* 89, 111-122.
- Lawrey, J. (1989). Lichen secondary compounds: evidence for a correspondence between antiherbivore and antimicrobial function. *Bryologist* 92, 326-333.
- Lawrey, J. (1995). Lichen allelopathy: a review. En: K. Inderjit, M. Dakshini y F. Einhellig (eds.). *Allelopathy: organisms, processes and applications. ACS Natural Phytotoxins as herbicides. ACS Symposium Series 582*, 26-38.
- Lax, A., Shepherd, S. (1988). Tentoxin: a cyclic tetrapeptide having potential herbicidal usage. *ACS Symposium Series 380*, 24-34.
- Lea, P., Joy, R., Ramos, J., Guerrero, M. (1984). The action of 2-amino-4-(methylphosphinyl)-butanoic acid (phosphonothricin) and its 2-oxo-derivative on the metabolism of cyanobacteria and higher plants. *Phytochemistry* 23, 1-6.
- Lee, S., Johnson, J., Walsh, M., van Leirp, J., Sutherland, C., Xus, A., Snedden, W., Kosk-Kosicka, D., Fomm, H., Narayanans, N., Cho, M. (2000). Differential regulation of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent enzymes by plant calmodulin isoformas and free  $Ca^{2+}$ /concentration. *Biochemistry Journal* 350, 299-306
- Lee, S., Kim, J., Lee, M., Heo, W., Seo, H., Yoon, H., Hong, J., Lee, Y., Bahk, J., Hwang, I., Cho, M. (1995). Identification of a novel divergent calmodulina isoform from soybean which has differential ability to active calmodulina-dependent enzymes. *The Journal of Biological Chemistry* 37, 21806-21812.

- Lee, S., Kim, M., Heo, W., Kim, J., Chung, W., Park, C., Park, H., Cheong, Y., Kim, C., Lee, K., Bahk, J., Lee, Y., Sho, M. (1999). Competitive binding of calmodulin isoforms to calmodulin-binding proteins: implications for the function of calmodulin isoforms in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1433, 56-66.
- Lee, S., Seo, H., Kim, J., Heo, W., Chung, W., Lee, K., Kim, C., Cheong, H., Chio, J., Lim, O., Cho, J. (1997). Differential activation of NAD kinase by plant calmodulin isoforms. The critical role of domain I. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 9252-9259
- Letcher, R. (1968). Chemistry of lichen constituents-VI: mass spectra of usnic acid, lichexanthone and their derivatives. *Organic Mass Spectrometry* 1, 551-562.
- Leung, P., Graves, L., Tipton, L. (1988). Characterization of the interaction of ophiobolin A and calmodulin. *International Journal of Biochemistry* 20, 1351-1359.
- Leung, P., Taylor, W., Wang, J., Tipton, C. (1984). Ophiobolin A, a natural product inhibitor of calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* 259, 2742-2747
- Leung, P., Taylor, W., Wang, J., Tipton, C. (1985). Role of calmodulin inhibition in the mode of action of ophiobolin A. *Plant Physiology* 77, 303-308.
- Li, H., Inoue, M., Nishimura, H., Mizutani, J., Tsuzuki, E. (1993). Interactions of trans-cinnamic acid, its related phenolic allochemicals, and abscisic acid in seedling growth and seed germination of lettuce. *Journal of Chemical Ecology* 19, 1775-1787.
- Li, Y.-M., Jiang, S.-H., Gao, W.-Y., Zhu, D.-Y. (1999). Iridoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. *Phytochemistry* 50, 101-104.

## *Referencias Bibliográficas*

- Li, Y.-M., Jiang, S.-H., Gao, W.-Y., Zhu, D.-Y. (2000). Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. *Phytochemistry* 54, 923-925.
- Linscott, D. (1981). The nature: mode of action and toxicity of herbicides. En: *Handbook of Pest Management in Agriculture*. D. Pimentel (ed.). CRC Press, Vol. III, pp. 75-94.
- Lotina-Hennsen, B., Mata, R., Calderón, J., Céspedes-Acuña, C., Jiménez-Estrada, M. (1998). Secondary metabolites isolated from Mexican plants: target and mechanism of action on photosynthesis. *Recent Research and Development in Agricultural and Food Chemistry* 2, 731-749.
- Lotina-Hennsen, B., Roque-Reséndiz, J., Jiménez, M., Aguilar, M. (1991). Inhibition of oxygen evolution by cacalol and its derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung* 46c, 777-780.
- Lowery, C. (1993). *Reagent chemicals*. American Chemical Society Specification, Washington, D. C., pp. 90-91.
- Mabry, T., Markham, K. (1975). Más spectrometry of flavonoids. En: *The Flavonoids*. J. Harborne, T. Mabry y H. Mabry (eds.). 1a. edición, Academic Press Inc., USA; pp. 84.
- Macías, F. (1995). Allelopathy in the search for natural herbicide models. En: K. Inderjit, M. Dakshini y F. Einhellig (eds.). *Allelopathy: organisms, processes and applications*. ACS Natural Phytotoxins as herbicides. ACS Symposium Series 582, 310-329.
- Macías, M., Rojas, I., Mata, R., Lotina-Hennsen, B. (1999). Effect of selected coumarins on spinach chloroplast photosynthesis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47, 2137-2140.

- Macías, M., Gamboa, A., Ulloa, M., Toscano, R., Mata, R. (2001). Phytotoxic naphthopyranone derivates from the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *Phytochemistry* 58, 751-758.
- Macías, M., Ulloa, M., Gamboa, A., Mata, R. (2000). Phytotoxic compounds from the new coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *Journal of Natural Products* 63 757-761.
- Mahato, S., Garai, S., Chakravarty, A. (2000). Bacopasaponins E and F: two jujubogenin bisdesmosides from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry* 53, 711-714.
- Markham, K., Chari, M., Mabry, T. (1975). Carbon-13 NMR Spectroscopy of Flavonoids. En: *The Flavonoids*. J. Harborne, T. Mabry y H. Mabry (eds.). 1a. edición Academic Press Inc., USA; pp. 19.
- Mata, R., Pereda-Miranda, R., Lotina-Hennsen, B. (1996). Natural products from Mexican plants as a source of potential herbicide agents. En: *Secondary metabolites from Mexican plants: Chemistry and biological properties*, pp 59-68.
- Mata, R., Macías, M., Rojas, I., Lotina-Hennsen, B. (1998). Phytotoxic compounds from *Esenbeckia yaxhoob*. *Phytochemistry* 49, 441-449.
- Mathis, P., Rutherford, A. (1984). Effect of phenolic herbicides on the oxygen-evolving side of photosystem II. Formation of the carotenoid cation. *Biochemica et Biophysica Acta* 767, 217-222.
- McCarty, R. (1977). Energy transfer inhibitors of photophosphorylation in chloroplasts. *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series* 5, 436-447.
- Mills, J., Mitchell, P., Schurmann, P. (1980). Modulation of coupling activity in intact chloroplasts. *FEBS Letters* 112, 173-177.

## ***Referencias Bibliográficas***

- Mitchell, P. (1977). A commentary on alternative hypotheses of protonic coupling in the membrane system catalysis oxidative and photosynthetic phosphorylation. *FEBS Letters* 78, 1-20.
- Miyazawa, M., Okuno, Y., Nakamura, S., Kameoka, H. (1998). Suppression of SOS-inducing activity of chemical mutagens by cinnamic acid derivatives from *Scrophulia ningpoensis* in the *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 *umu* test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 904-910.
- Moreland, D. (1980). Mechanisms of action of herbicides. *Annual Review of Plant Physiology* 31, 597-638.
- Mouly, P., Gaydou, E., Faure, R., Estienne, J. (1997). Blood orange juice authentication using cinnamic acid derivatives. Variety differentiations associated with flavanone glycoside content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 373-377
- Nakajima, M., Itoi, K., Takamatsu, Y., Kinoshita, T., Okazaki, T., Kawakubo, K., Shindo, M., Honma, T., Tohjigamuri, M., Haneishi, T. (1991). Hydantocidin: a new compound with herbicidal activity from *Streptomyces hygrosopicus*. *Journal of Antibiotics* 44, 293-300.
- Nakatani, N., Kin, Ch., Kikuzaki, H., Muroi, T., Matsumura, Y. (1991). Constituents of *Gyrophora esculenta*. *Chemical Express* 6, 587-590.
- Narui, T., Sawada, K., Takatsuki, S., Okuyama, T., Culberson, C., Culberson, W., Shibata, S. (1998) NMR assignments of depsides and tridepsides of the lichen family Umbilicariaceae. *Phytochemistry* 48, 815-822.
- Netzly, D., Riopel, J., Ejeta, G., Butler, L. (1988). Germination stimulants of witchweed (*Striga asiatica*) from hydrophobic root exudates of sorghum (*Sorghum bicolor*). *Weed Science* 36, 441-446.

- Nishitoba, Y., Nishimura, H., Nishiyama, T., Mizutani, J. (1987). Lichen acids, growth inhibitors from *Usnea longissima*. *Phytochemistry* 26, 3181-3185.
- Oh, S., Steiner, D., Dougall, D., Roberts, D. (1992). Modulation of calmodulin levels, calmodulin methylation and calmodulin bindings proteins during carrot cell growth and embriogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 297, 28-34.
- Ohira, T., Mitsuyoshi, Y. (1994). Allelopathic compounds produced by forest plants. II The relationships between the inhibition effects on plant growth and killing activities of brine shrimp on phenolic compounds. *Mokusai Gakkaishi* 40, 541-548
- Okorie, D. (1976) A new phthalide and xanthones from *Anthocleista djalonensis* and *Anthocleista vogelli*. *Phytochemistry* 15, 1799-1800.
- Okuyama, E., Umeyama, K., Yamazaki, M., Kinoshita, Y., Yamamoto, Y. (1995). Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Medica* 61, 113-115.
- Overvoorde, P., Grimes, H. (1994). The role of calmodulin in carrot somatic embriogenesis. *Plant Cell Physiology* 35, 135-144.
- Paredes, D. (1984). *Etnobotánica mexicana: plantas popularmente empleadas en el estado de Michoacán en el tratamiento de enfermedades hepáticas y vesiculares* Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Pelter, A., Ward, R., Rao, V., Sastry, K. (1976). Revised structures for pluviatilol, methyl pluviatilol and xanthoxylol. General methods for the assignment of stereochemistry to 2,6-diaryl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane lignans. *Tetrahedron* 32, 2783-2788
- Pengsuparp, T., Cai, L., Constant, H., Fong, H., Lin, L.-Z., Kinghorn, A., Pezzuto, J Cordell, G., Ingolfssdottir, K., Wagner, H., Hughes, S (1995) Mechanistic

## ***Referencias Bibliográficas***

- evaluation of new plant-derived compounds that inhibit HIV-1 reverse transcriptase. *Journal of Natural Products* 58, 1024.
- Peña-Valdivia, C., Rodríguez-Flores, L., Tuena de Gómez-Puyou, M., Lotina-Hennsen, B. (1991). Inhibition of photophosphorylation and electron transport by *N-N*-dimethylformamide. *Biophysical Chemistry* 41, 169.
- Percival, M., Baker, N. (1991). Herbicides and photosynthesis. En: *Herbicides*. N. Baker y M. Percival (eds.). Elsevier Science Publishers, Vol. V, pp. 1-26.
- Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A., Wickramaratne, D., Pezzuto, J., Kinghorn, A. (1993). Tricolorin A, mayor phyto-growth inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *Journal of Natural Products* 56, 571-582.
- Pieroni, A. (2000). Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy. *Journal of Ethnopharmacology* 70, 235-273.
- Poovaiah, B., Takezawa, G., An, T., Han, D. (1996). Regulated expression of a calmodulin isoforms alters growth and development in potato. *Journal of Plant Physiology* 149, 553-558.
- Pulgarin, C., Tabacchi, R. (1989). Synthèse du virensate de méthyle *Helvetica Chimica Acta* 72, 1061-1065.
- Putnam, A. (1988). Allelochemicals from plants as herbicides *Weed Technology* 2, 510-518.
- Rahman, M., Dewick, P., Jackson, D., Lucas, J. (1990). Lignans of *Forsythia intermedia* *Phytochemistry* 29, 1971-1980.

- Raju, K., Appa Rao, A., Rao, P. (1985). Leprapinic acid derivatives with antibacterial activity. *Fitoterapia* 56, 221.
- Rakesh, J., Megh, S., David, D. (1989). Qualitative and quantitative characterization of phenolic compounds from lantana (*Lantana camara*) leaves. *Weed Science* 37, 302-307
- Richardson, M (1998). Pesticides –Friend or foe?. *Water Science Technology* 37, 19-25.
- Rimando, A., Dayan, F., Mikell, J., Moraes, R. (1999). Phytotoxic lignans of *Leucophyllum frutescens*. *Natural Toxins* 7, 39-43.
- Rivero-Cruz, J., García-Aguirre, G., Cerda-García-Rojas, C., Mata, R. (2000). Conformational behavior and absolute stereostructure of two phytotoxic nonenolides from the fungus *Phoma hermarum*. *Tetrahedron* 56, 5337-5344.
- Roberts, D., Harmon, A. (1992). Calcium-calmodulate proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 375-414.
- Roberts, D., Lukas, T., Watterson, D. (1986). Structure, function and mechanism of action of calmodulin. *CRC Critical Reviews in Plant Science* 4, 311-339.
- Romagni, J., Meazza, G., Nanayakkara, N., Dayan, F. (2000). The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Letters* 480, 301-305.
- Rudiño-Peñera, E., Juárez-Martínez, G., Panneerselvam, K., Soriano-García, M Anaya, A., García-Santana, C., Sánchez, P. (1995). Xanthyletin. *Acta Crystallographic Section C*51, 2720-2722.



## *Referencias Bibliográficas*

- Rzedowski, J. (1978). *Vegetación de México*, Ed. LIMUSA, México, pp. 247-256
- Saklani, A., Upreti, D. (1992). Folk uses of some lichens in Sikkim *Journal of Ethnopharmacology* 37, 229-233.
- Sakurai, A., Goto, Y. (1987). Chemical studies on the lichen. I. The structure of isolecanoric acid, a new ortho-depside from *Parmelia tinctorum* Despr. *Bulletin of Chemical Society of Japan* 60, 1917-1918.
- Sankawa, U., Shibuya, M., Ebizuka, Y., Noguchi, H., Kinoshita, T., Iitaka, Y., Endo, A., Kitahara, N. (1982). Depside as potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis: a new active site model for fatty acid cyclooxygenase. *Prostaglandins* 24, 21-34.
- Schatz, A. (1962). Pedogenic (soil-forming) activity of lichen acids. *Naturwissenschaften* 49, 518-520.
- Sharma, R., Wang, J. (1979). Preparation and assay of the  $Ca^{2+}$ -dependent modulator protein. *Advances in Cyclic Nucleotide Research* 10, 187-198.
- Shier, W., Abbas, H., Mirocha, C. (1991). Toxicity of the mycotoxins fumonins B1 and B2 and *Alternaria alternata* F. FP *Lycopersici* toxin (aiculture mammalian cells). *Mycopathology* 116, 97-104.
- Shilling, D., Fumio, Y. (1987). A rapid seedling bioassay for the study of allelopathy. *ACS Symposium Series* 330, 334-342.
- Shybuya, M., Ebizuka, Y., Noguchi, H., Iitaka, Y., Sankawa, U. (1983). Inhibition of prostaglandin biosynthesis by 4-O-methylcryptochlorophaeic acid; synthesis of monomeric arylcarboxylic acids for inhibitory activity testing and X-ray analysis of 4-O-methylcryptochlorophaeic acid. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 31, 407-413

- Siehl, D., Subramanian, M., Walters, E., Lee, S., Anderson, R., Toschi, A. (1996) Adenylsuccinate synthetase: site of action of hydantocidin, a microbial phytotoxin. *Plant Physiology* 110, 753-758.
- Smit, H., Kroes, B., van den Berg, J., van der Wal, D., van der Worm, E., Beukelman, C., van Dijk, H., Labadie, R. (2000). Immunomodulatory and anti-inflammatory activity of *Picrorhiza scrophulariiflora*. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 101-109.
- Snedden, W., Fromm, H. (1998). Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends Plant Science* 3, 299-304.
- Steffens, J., Robeson, D. (1987). Secalonic acid A, a vivotoxin in pink root-infected onion. *Phytochemistry* 26, 1599-1602.
- Strain, H., Coppe, B., Svec, W. Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophyll. En: *Methods of Enzymology*; San Pietro, A., Ed.; Academic Press: New York, 1971; Vol. 23, pp 452-466.
- Streibig, J., Dayan, F., Rimando, A., Duke, S. (1999). Joint action of natural and synthetic photosystem II inhibitors. *Pesticide Science* 55, 137-146.
- Strobel, G., Kenfield, D., Bunkers, G., Sugawara, F., Clardy, J. (1991). Phytotoxins from fungi attacking weedy plants. En: R. Keeler y A. T. Tu (eds.), *Handbook of Natural Toxins*, Vol. 6, *Toxicology of plant and Fungal Compounds*, Marcel Dekker, New York.
- Stryer, L. (1990). *Bioquímica*. Vol. 2, 3a. edición, Ed. Reverté, S. A., Barcelona, España; pp. 981-984.
- Stryer, L. (1995) *Bioquímica*. Vol. 2, 4a. edición, Ed. Reverté, S. A., Barcelona, España; pp. 653-671.

## ***Referencias Bibliográficas***

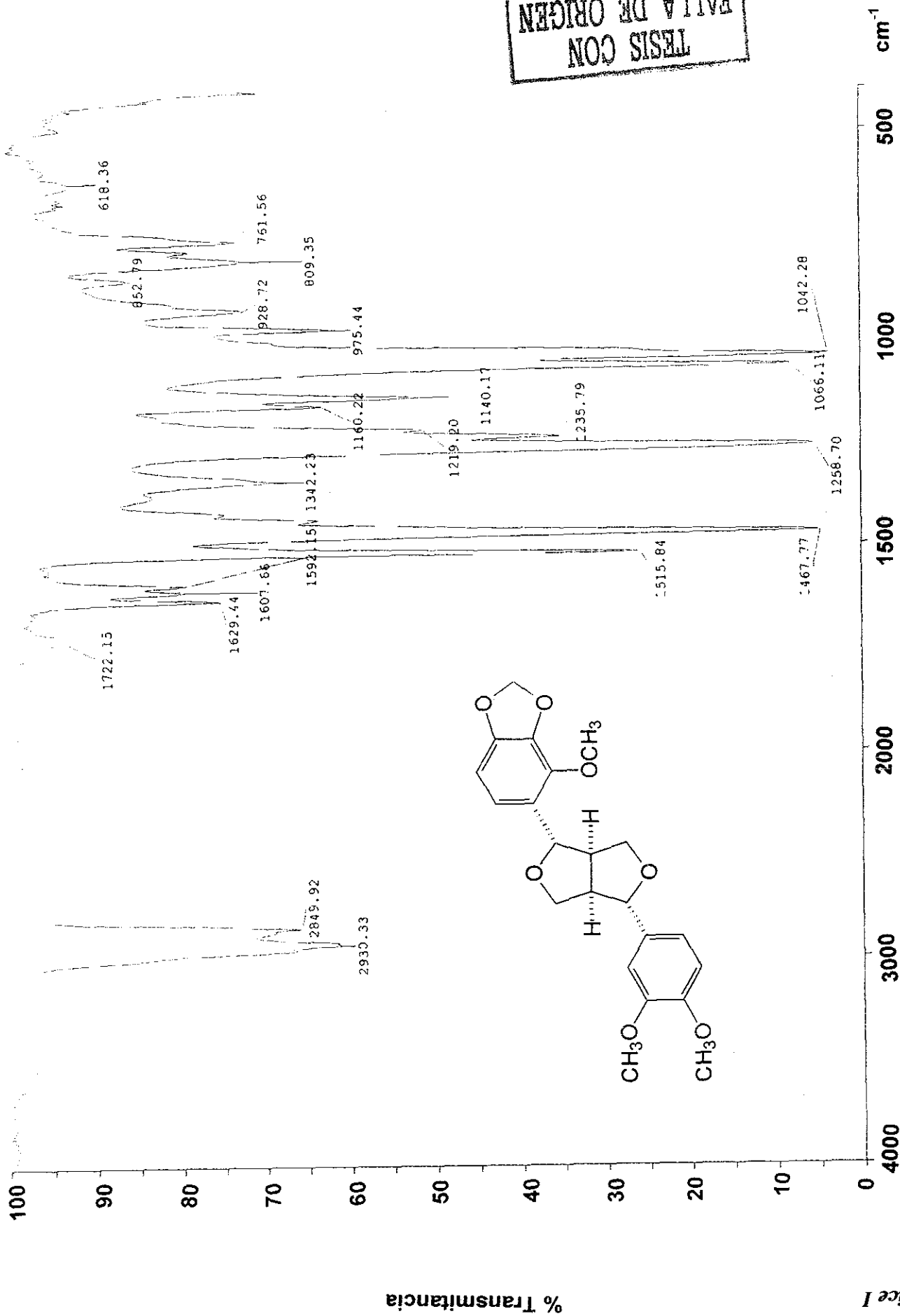
- Su, B.-N., Zhu, Q.-X., Jia, Z.-J. (1999). Aquaticol, a novel bis-sesquiterpene from *Verónica anagallis-aquatica*. *Tetrahedron Letters* 40, 357-358.
- Sumner, J. (1944). Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the calorimetric determination of phosphorous. *Science* 100, 413-417.
- Sundholm, G., Huneck, S. (1981). <sup>13</sup>C NMR-spectra of lichen depsides, depsidones and depsones. *Chemica Scripta* 18, 233-236.
- Sweeney, A., Wyllie, S., Shalliker, R., Markham, J. (2001). Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants. *Journal of Ethnopharmacology* 75, 273-277.
- Syers, J., Iskandar, I. (1973). En: *The Lichens*, V. Ahmadjian y M. E. Hale (eds); Academic, New York, pp. 225.
- Tachibana, K., Kaneko, K. (1986). Development of a new herbicide. Bialaphos. *Journal of Pesticide Science* 11, 297-304.
- Thomas, T. (1995). Calcium and calmodulin inhibitor effects on the growth of carrot and radish in nutrient culture. *Plant Growth Regulation* 16, 299-303.
- Tomás-Barberán, F., Grayer-Barkmeijer, R., Gil, M., Harborne, J. (1988). Distribution of 6-hidroxy-, 6-methoxy- and 8-hidroxyflavone glycosides in the Labiatae, the Scrophulariaceae and related families. *Phytochemistry* 27, 2631-2645.
- Trease, W. (1998). *Trease y Evans. Farmacognosia*. Ed. Interamericana, México
- Trebst, A. (1972). Measurement of Hill reactions and photoreduction. En: *Methods of Enzymology*, San Pietro, A., Ed.; Academic Press: New York, Vol. 24, pp 146-165

- Trebst, A., Avron, M., Springer-Verlag, B., Heidelber, N. (1977). *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol 5.; 266-279.
- Trujillo, E. (1994) *Frontiers in Industrial Mycology*. Chapman-Hall, New York, pp 196-209
- Uri, N. D. (1998). Government policy and the development and use of biopesticides. *Futures* 30, 409-423.
- van Rennsen, J. (1989). Herbicides interacting with photosystem II. En: *Herbicides and Plant Metabolism*. A. Dodge (ed.), Cambridge University Press, pp 21-36
- Vernon, L., Shaw, E. (1969). Photoreduction of 2,6-dichlorophenol indophenol by diphenilcarbazine: a photosystem II reaction catalyzed by tris-washed chloroplast and subchloroplast fragments. *Plant Physiology* 44, 1645-1648.
- Walters, E., Lee, S., Niderman, T., Bernasconi, P., Subramanian, M., Siehl, D (1997). Adenylsuccinate synthetase from maize. Purification, properties and mechanism of inhibition by 5'-phosphohydantocidin. *Plant Physiology* 114, 549-555.
- Warrior, P. (2000). Living systems as natural crop-protection agents *Pesticide Management Science* 56, 681-687.
- Witiak, D., Patel, D., Lin, Y. (1967). Nuclear Magnetic Resonance. Influence of substituents on the long-range spin-spin coupling constant between benzylic and ring protons in the orcinol series. *Journal of the American Chemical Society* 89. 1908-1911
- Wood, S., Huffmann, J., Weber, N., Andersen, D., North, J., Murray, B., Sidwell, R Hughes, B. (1990). Antiviral activity of natural occurring anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Planta Medica* 56, 651-652.

### ***Referencias Bibliográficas***

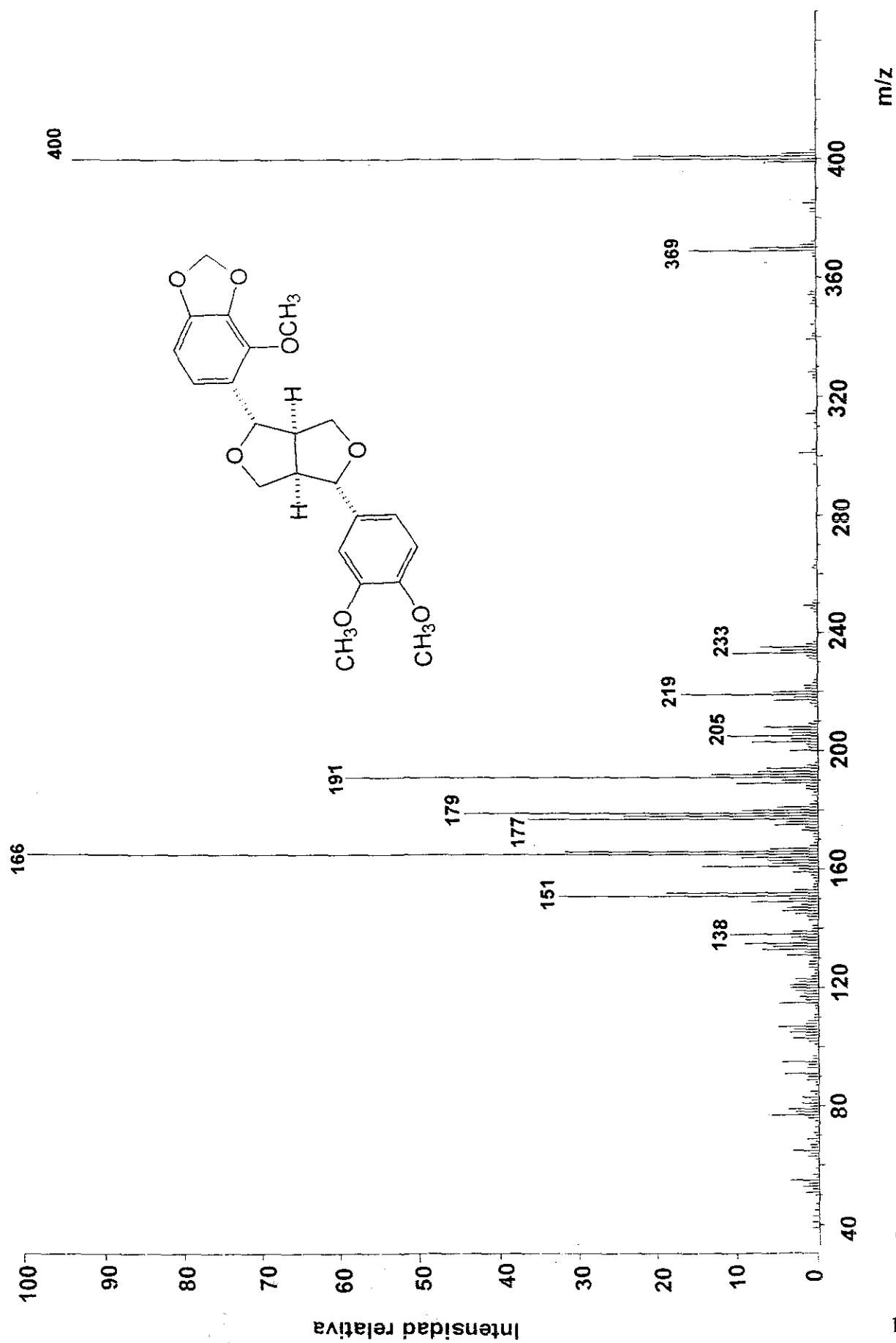
- Worsham, A (1989). Current and potential techniques using allelopathy as an aid in weed management. En: *Phytochemical ecology, mycotoxins and insect pheromones and alomones*. C. H. Chou y G. R. Waller (eds.). Institute of Botany Academia Sinica, Monograph Series 9.
- Xu, R., Hassell, A., Vanderwall, D., Lambert, M., Homes, W., Luther, M., Rocque, W. Milburn, M., Zhao, Y., Ke, H., Nolte, R. (2000). Atomic structure of PDE4: insights into phosphodiesterase mechanism and specificity. *Science* 2000, 1822-1825.
- Yamamoto, Y., Miura, Y., Kinoshita, Y., Higuchi, M., Yamada, Y., Murakami, A., Ohigashi, H., Koshimizu, K. (1995). Screening of tissue cultures an thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 43, 1388-1390.
- Yu, J., Matsui, Y. (1994). Phytotoxic substances in root exudates of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Chemical Ecology* 20, 21-31.
- Zielinski, R. (1998). Calmodulin and calmodulin-binding protein in plats. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 697-725.

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN



Espectro 1. Espectro en el IR de la 2'-metoxicobusina (124).



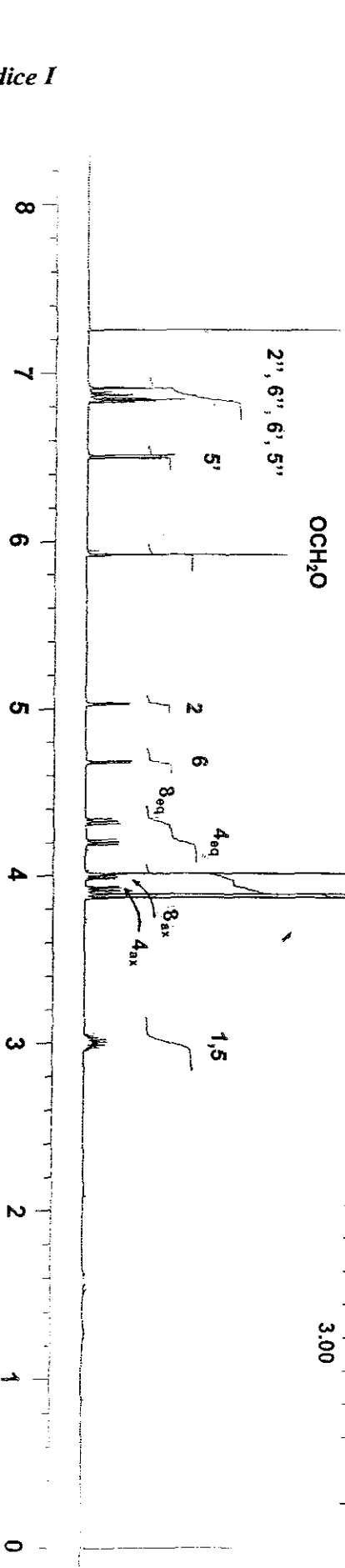
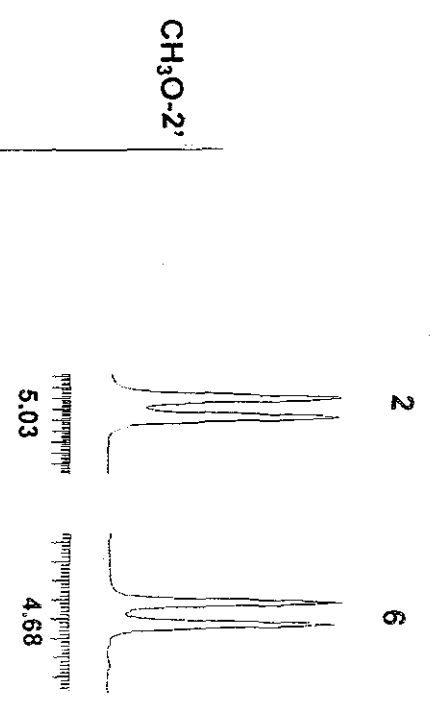
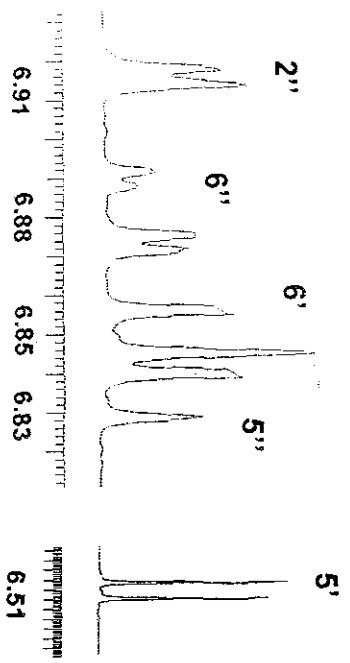
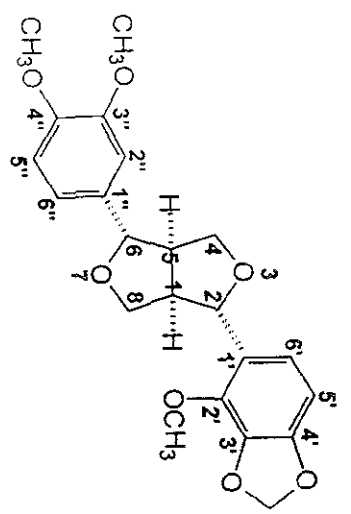


Espectro 2. Espectro de masas de la 2'-metoxicobusina (124).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

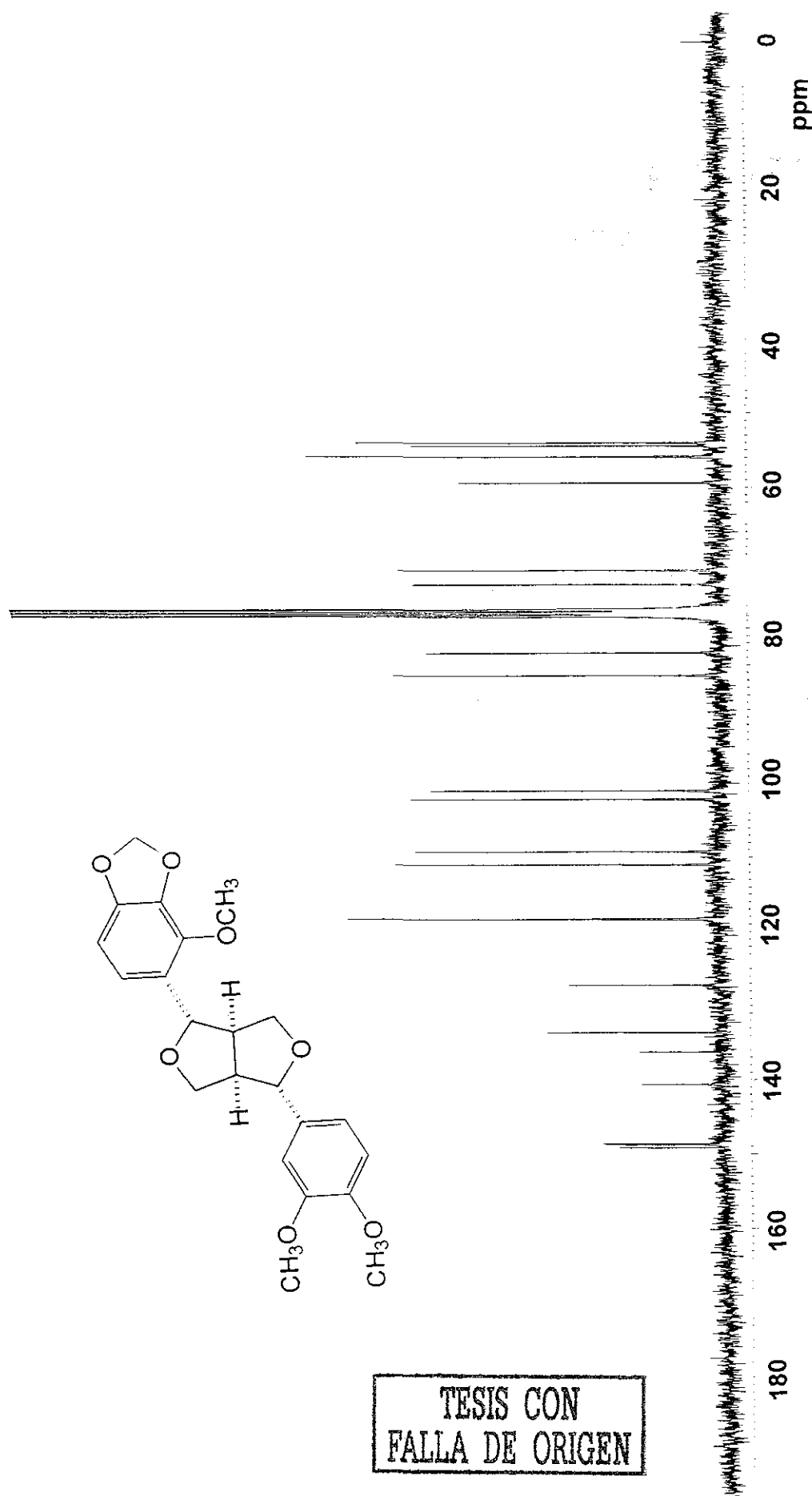


TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Apéndice I

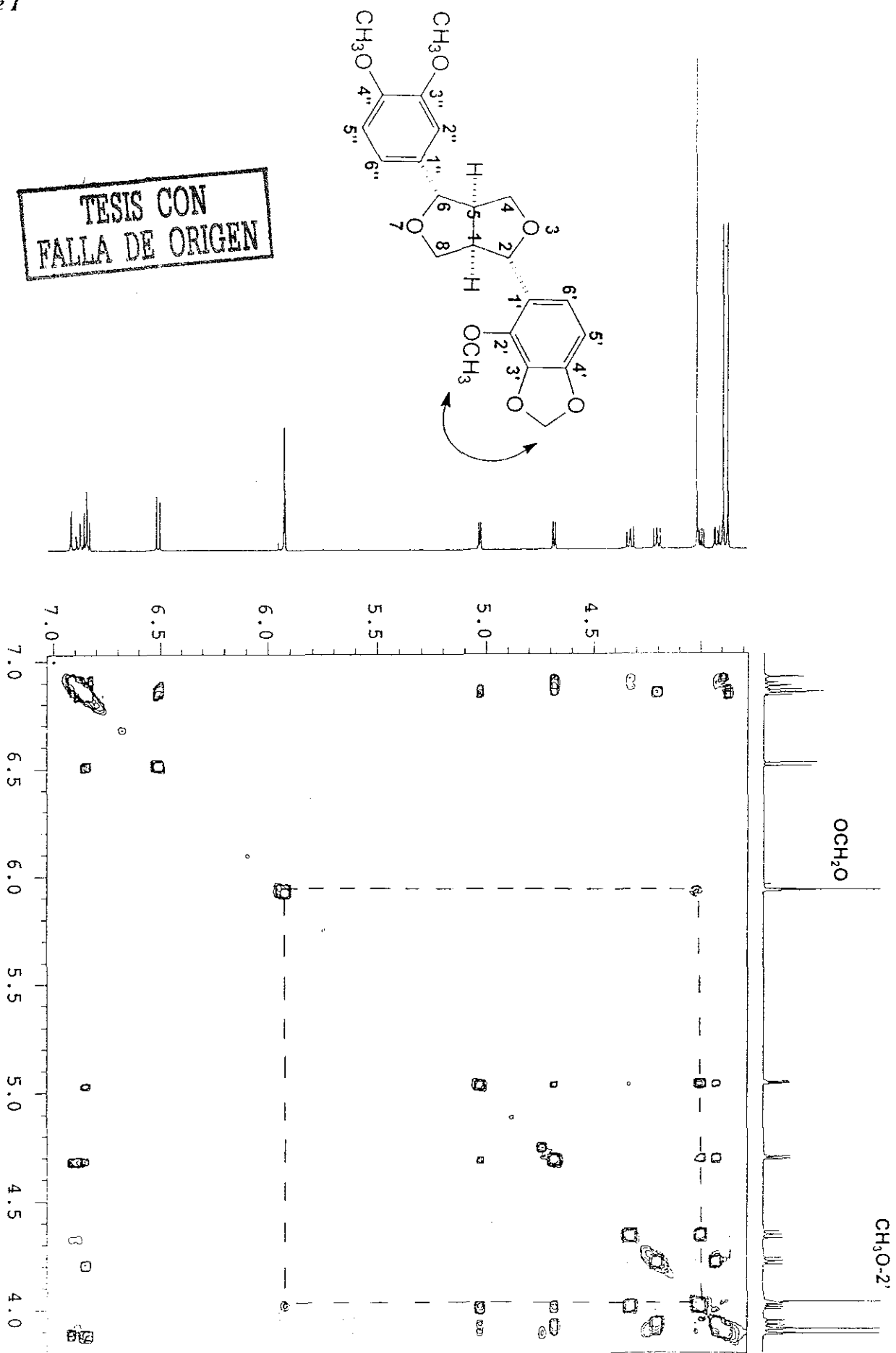
Espectro 3. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de la 2'-metoxicobusina (124).



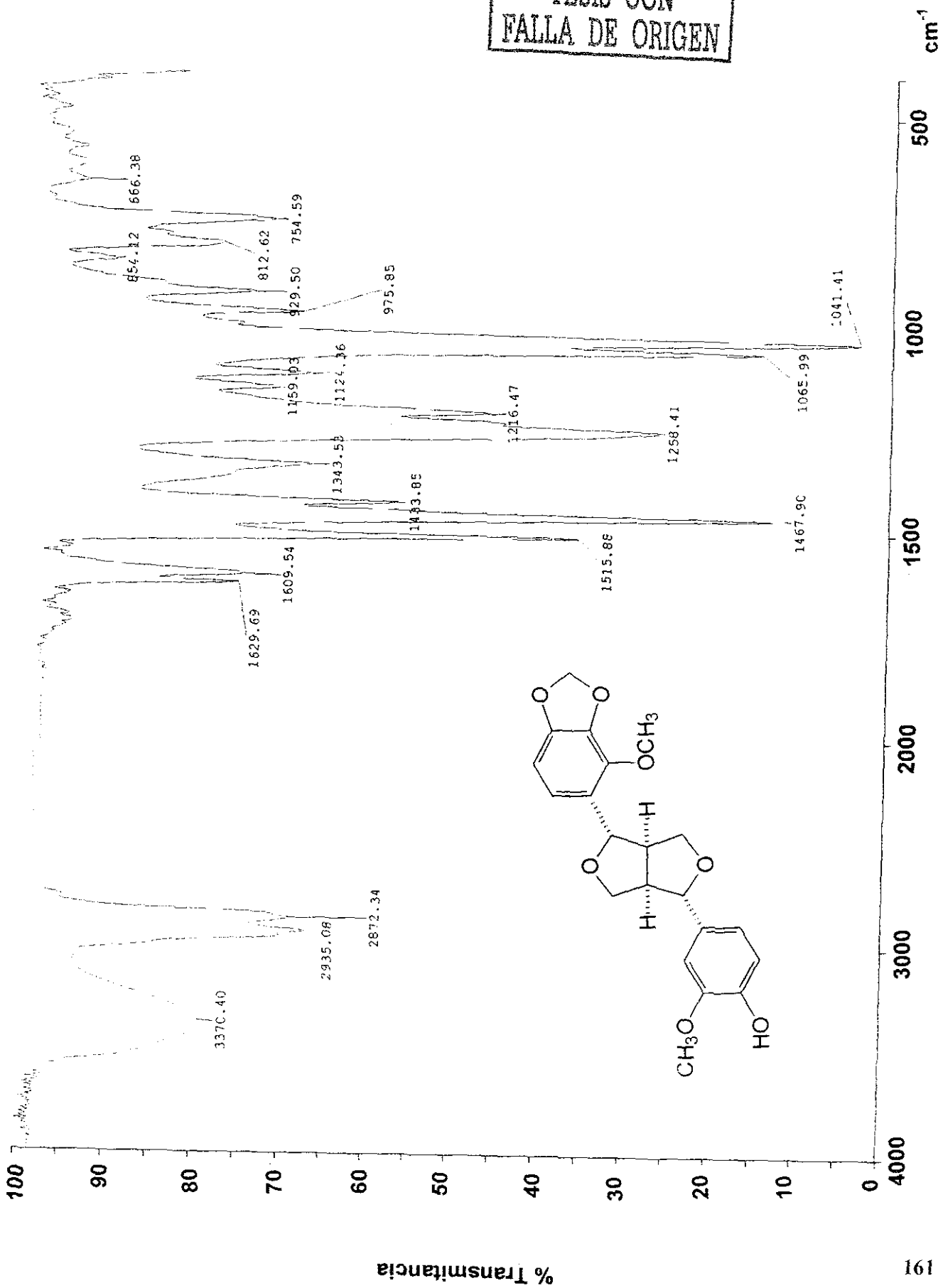
Espectro 4. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) de la 2'-metoxicobusina (124).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

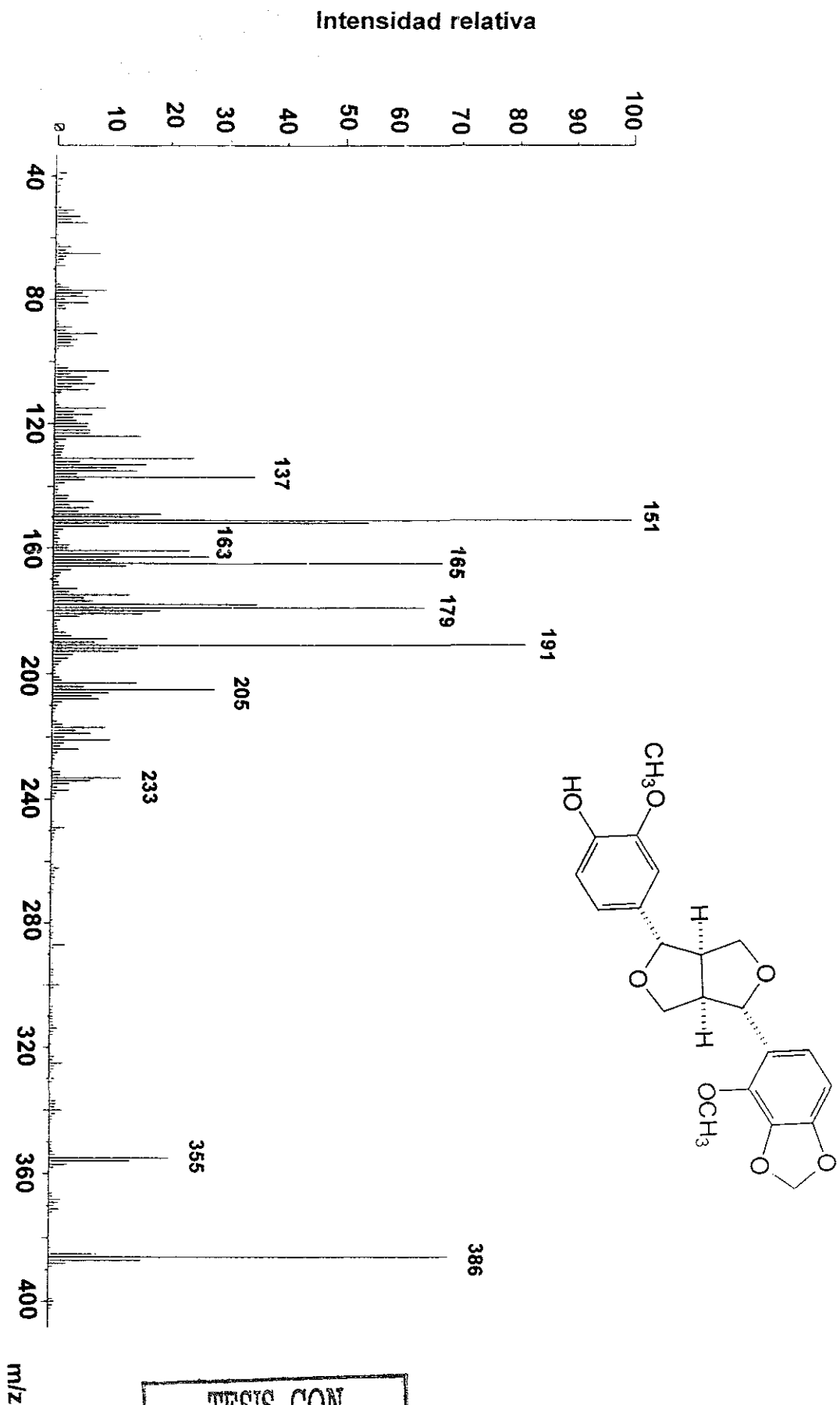
Espectro 5. Correlaciones de  $\text{CH}_3\text{O}-2'/\text{OCH}_2\text{O}$  en el espectro NOESY ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de la 2'-metoxicobusina (124).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

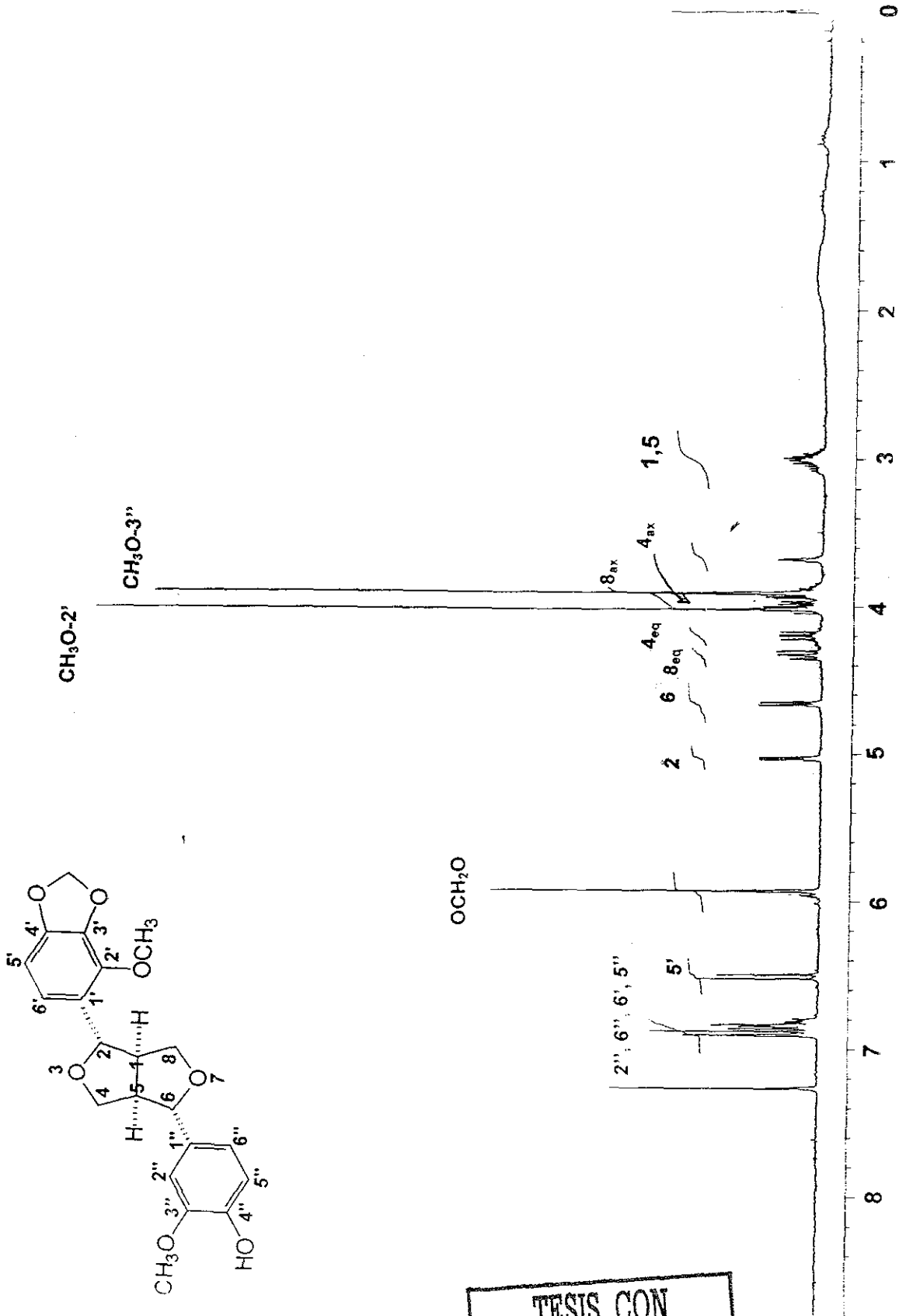


Espectro 6. Espectro en el IR de la 2'-metoxi-4''-hidroxi-desmetoxicobusina (126).



Espectro 7. Espectro de masas de la 2'-metoxi-4"-hidroxi-desmetoxicobusina (126).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

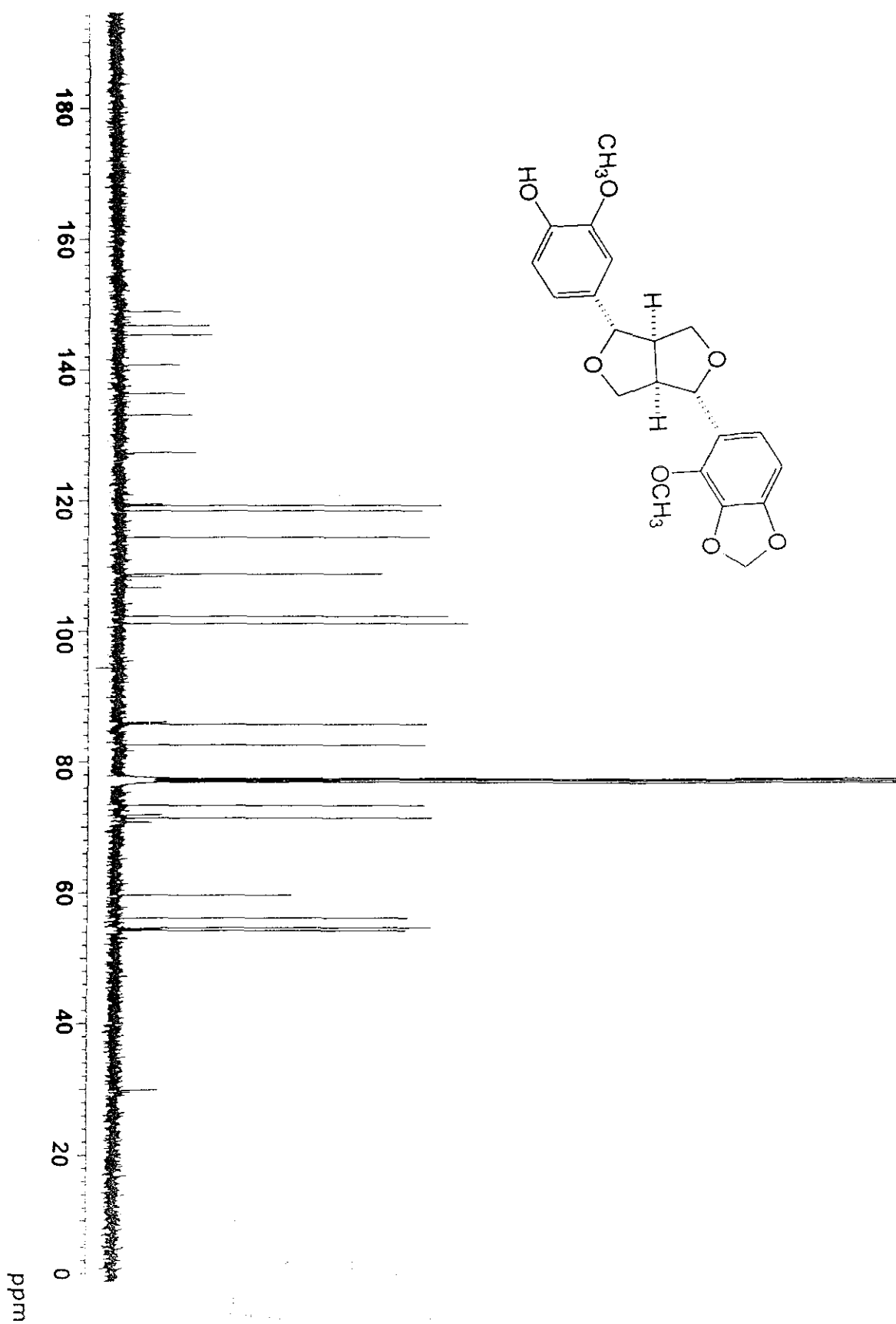


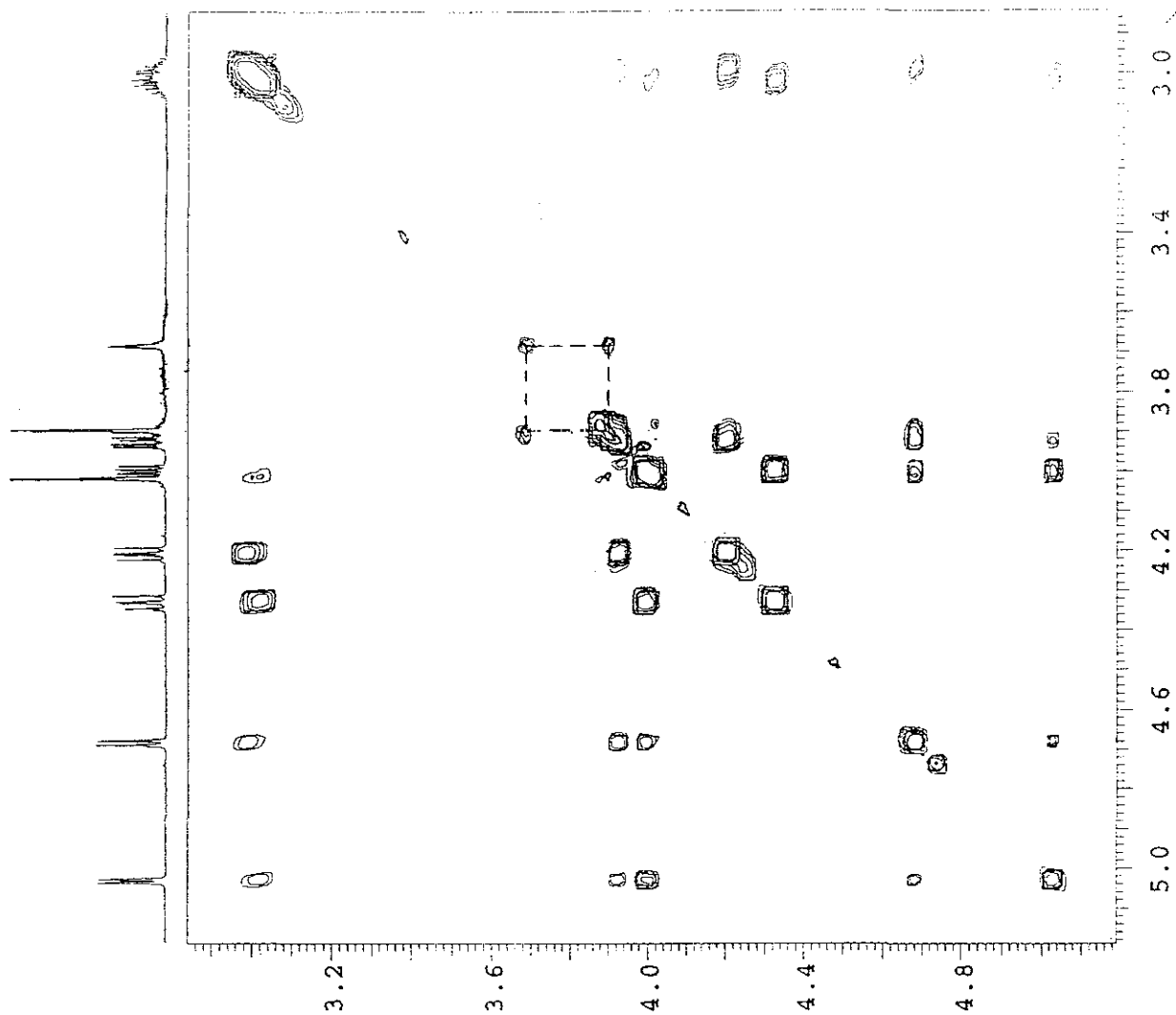
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ppm

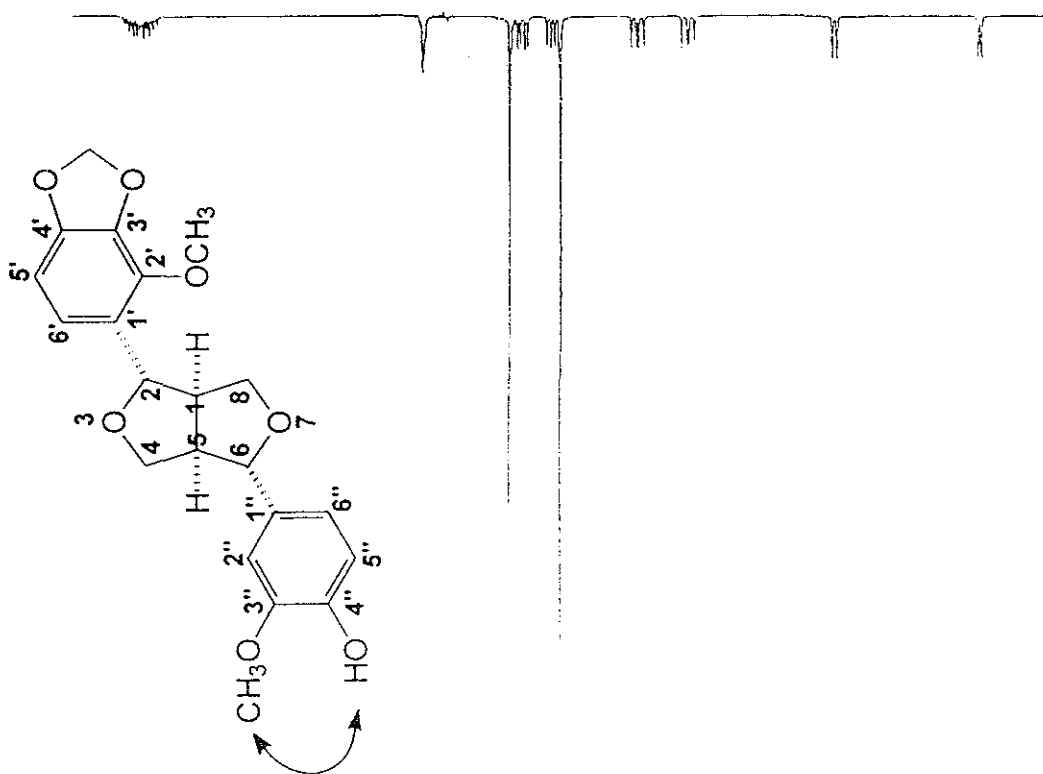
Espectro 8. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de la 2'-metoxi-4''-hidroxi-desmetoxicobusina (126).

Espectro 9. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) de la 2'-metoxi-4"-hidroxi-desmetoxicobusina (126).





Apéndice 1

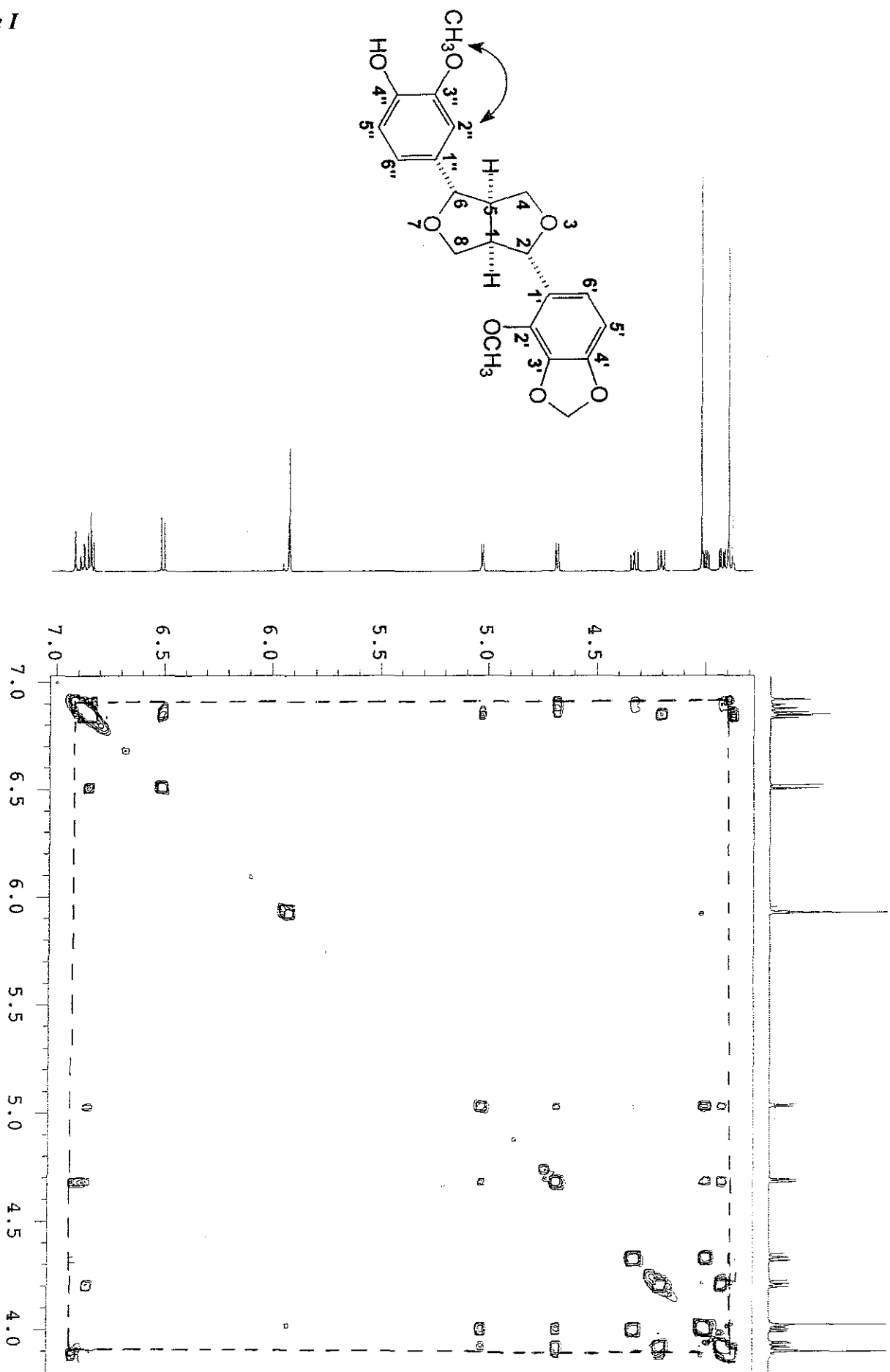


Espectro 10. Correlaciones de  $\text{CH}_3\text{O-3''/OH-4''}$  en el espectro NOESY ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de la 2'-metoxi-4''-hidroxidesmetoxicobusina (126).



Apéndice I

Espectro 11. Correlaciones de H-2''/CH<sub>3</sub>O-3'' en el espectro NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de la 2'-metoxi-4''-hidroxidesmetoxicobusina (126).



## *APÉNDICE II*

Date: Thu, 28 Feb 2002 11:52:02 -0700  
From: "Dr. Barbara Timmermann" <btimmer@Pharmacy Arizona EDU>  
X-Mailer: Mozilla 4.78 [en] (Windows NT 5.0; U)  
X-Accept-Language: en  
To: Rachel Mata <rachel@servidor.unam.mx>  
Subject: [Fwd: Mexican Extracts - Herbicide Test Data]

Rachel,

Por fin oimos de los resultados de tus muestras enviadas a Mark  
Eppler. Avisame si tienes problemas en abrir el attachment. espero que  
estes bien y rozagante. Carinios,  
Barbara

--

Barbara N. Timmermann, Ph.D.  
Regents Professor  
Department of Pharmacology and Toxicology  
College of Pharmacy  
University of Arizona  
P.O. Box 210207  
1703 E. Mabel Street  
Tucson, AZ 85721-0207

(520) 626-2481 phone  
(520) 626-2515 fax

Email: btimmer@pharmacy.arizona.edu

Homepage:

<http://pharmacy.arizona.edu/peopleprograms/people/pharmtox/timmermann>  
ICBG Web Site: <http://ag.arizona.edu/OALS/ICBG/bio-home.html>

Return-Path: <robsonp@basf-corp.com>

Received: from basfegw.basf-corp.com (basfegw.basf-corp.com [144.29.1.2])  
by elixir.Pharmacy.Arizona.EDU (8.11.6/8.11.6) with ESMTP id g1SIn8925063  
for <Barbara.Timmermann@pharmacy.arizona.edu>; Thu, 28 Feb 2002 11:49:08 -  
0700

Received: from basfigw.basf-corp.com (actually host basfigw) by basfegw.basf-corp.com  
with SMTP (MMTA) with ESMTP; Thu, 28 Feb 2002 13:48:13 -0500

Received: from intmaila.basf-corp.com by basfigw.basf-corp.com (8.9.2/8.9.2) with  
ESMTP id NAA25509 for <Barbara.Timmermann@pharmacy.arizona.edu>; Thu, 28 Feb  
2002 13:48:11 -0500 (EST)

Received: from basf-corp-gw88.parsippa.basf-corp.com by intmaila with ESMTP;  
Thu, 28 Feb 2002 13:47:50 -0500

To: Barbara.Timmermann@pharmacy.arizona.edu  
Cc: Deborah L Culbertson <culberd@basf-corp.com>  
From: Patricia A Robson <robsonp@basf-corp.com>  
Date: Thu, 28 Feb 2002 13:41:05 -0500

168

Printed for rachel <rachel@servidor.unam.mx>

06/03/02

Message-ID: <OF1C00540F.39D8FDD5-ON85256B6E.0062E5D9@parsippa.basf-corp.com>  
Subject: Mexican Extracts - Herbicide Test Data  
X-MIMETrack: Serialize by Router on BASF-CORP-GW88/BASF-CORP/BASF(Release 5.0.8 | June 18, 2001) at  
02/28/2002 01:47:50 PM  
MIME-Version: 1.0  
Content-type: multipart/mixed;  
Boundary="0\_\_=85256B6E0062E5D98f9e8a93df938690918c85256B6E0062E5D9"  
Content-Disposition: inline

Dear Dr. Timmermann,

I am sending to you via the attached Excel spreadsheet the remainder of the data from the plant extracts and fractions that Dr. Rachel Mata sent to Cyanamid/BASF dated September 8, 2000 and from a list that was forwarded to me by Dr. Mark Eppler, Fort Dodge Animal Health on August 22, 2001.

I apologize for the very long delay, but as you know Cyanamid was purchased by BASF in July 2000 and we are no longer a part of Wyeth/Lederle. The natural products program was dissolved before the sale of the company and I do not know whether BASF is part of the collaboration "Bioactive Agents from Dryland Plants of Latin America". To make matters worse BASF closed the herbicide program in the U.S. and is closing the Princeton, NJ facility on June 30, 2002 so everyone will be gone (including Dr. Eppler who will move to a new facility with Fort Dodge).

There will be a small group of BASF people at a BASF facility in Research Triangle Park, N.C. who will do screening for insecticidal agents. Please contact Dr. Deborah Culbertson, culberd@basf-corp.com, if you think that BASF still has a part in the collaboration. Herbicide and fungicide screening is being done by BASF in Germany and Dr. Culbertson could possibly direct samples there if necessary to satisfy the agreement.

The file below contains information concerning herbicide data only. Some of the fractions were never received for herbicide screening and possibly belong to the insecticide program.

If you need clarification of any data feel free to contact me before June 30, otherwise please direct all correspondence to Dr. Culbertson.

Sincerely,

Patricia Robson  
Research Biologist

(See attached file: ICBGExtracts.xls)



ICBGExtracts.xls

Fractions Received for Herbicide Testing

<u>Plant Name</u>	<u>UABG Source Code</u>	<u>Fractions Received</u>	<u>Cyanamid/BASF Lead Fraction</u>	<u>Activity in Herbicide Screen</u>		
<i>Cosmos pringlei</i>	P057B5		EL 41239			
		F001		active		
		F003		active		
		F004		active		
		F005		active		
		F006		active		
		F007		active		
		F008		active		
		F009		active		
		F010		active		
		F002 F011-F014		inactive		
		F023-F061		inactive		
		F083-F084		active on Chlamydomonas		
		<hr/>				
<i>Flourensia cernua</i>	P051F9		EL 40815			
		F011	pure compound	inactive		
		F011, A-G		never received samples		
		F012	pure compound	inactive		
		F013				
		F005-A		inactive		
		F006-A	pure compound	inactive		
		F006-B	pure compound	inactive		
		F007-A	pure compound	inactive		
		F058	pure compound	inactive		
		F060	pure compound	slightly active on Arabidopsis		
		F049	pure compound	inactive		
		F059	pure compound	inactive		
		F075	pure compound	active on Arabidopsis & Bentgrass		
		F034	organic	active on Bentgrass		
		F007-I	organic	inactive		
		F007-II	organic	inactive		
		F007-III-IV	organic	active on Arabidopsis & Bentgrass		
		F007-V	organic	active on Arabidopsis & Bentgrass		
		F007-VI	organic	active on Arabidopsis & Bentgrass		
		F007-VII-VIII	organic	active on Arabidopsis & Bentgrass		
		F024	organic	active on Arabidopsis & Bentgrass		
		F025	organic	active on Arabidopsis & Bentgrass		
		F026	organic	active on Arabidopsis		
		F039	organic	inactive		
		F079	pure compound	active on Arabidopsis & Bentgrass		
		F086	pure compound	active on Arabidopsis & Bentgrass		
		<hr/>				
		<i>Leucophyllum ambgium</i>	P051G2		EL 40760	
				F020		inactive
				F055	pure compound	active on Bentgrass
				F063	pure compound	inactive
F064	pure compound			active on Arabidopsis & Bentgrass		
F075	pure compound			active on Bentgrass		
F087	pure compound			inactive		
F088	pure compound			inactive		
F089	pure compound			inactive		
<hr/>						
<i>Haematoxylon brasiletto</i>	P051F5					
		F063-64		never received		
		F075-76		never received		
		F097, F099		never received		
<hr/>						
<i>Piper sanctum</i>	P061C3					
<hr/>						
<i>Amphypteringium adstringens</i>	P057D9	F013		never received		
		F017		inactive		
		F014		never received		
		F025-A,B		never received		
		F021		never received		

## *APÉNDICE III*

# Effect of Lichen Metabolites on Thylakoid Electron Transport and Photophosphorylation in Isolated Spinach Chloroplasts<sup>1</sup>

Irma S. Rojas,<sup>†</sup> Blas Lotina-Hennsen,<sup>\*‡</sup> and Rachel Mata<sup>\*†</sup>

Departamento de Farmacia and Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D F 04510, México

Received March 24, 2000



Investigation of the lichen *Parmotrema tinctorum* led to the isolation of several known compounds. Among them, lecanorin (1), methyl- $\beta$ -orcinol carboxylate, methyl orsellinate, orcinol, and methyl haematommate (3) caused significant inhibition of the radicle growth and germination of seedlings of *Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crusgalli*. In addition, lecanorin (1) and gyrophoric acid (2) significantly inhibited the light-dependent synthesis of ATP and uncoupled electron transfer on the reducing side of photosystem II in freshly lysed, illuminated spinach chloroplasts. The targets of 1 and 2 were located at the water-splitting enzyme level and in one of the redox enzymes in the range of electron transport from P<sub>680</sub> to Q<sub>A</sub>, respectively.

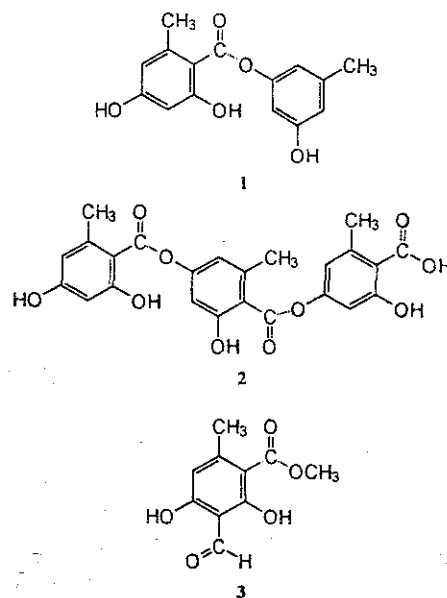
*Parmotrema tinctorum* Nyl. (Hale) (Parmeliaceae) is a foliose lichen widely distributed in East Mexico. Previous chemical investigation on *P. tinctorum* resulted in the isolation of orsellinic, lecanoric, usnic, diffractic, and gyrophoric acids as well as methyl orsellinate and atranorin.<sup>2-4</sup> Some of these metabolites demonstrated antiproliferative and cytotoxic activities.<sup>3,4</sup> Lichen compounds have clear ecological significance because of vital roles as antimicrobial and allelopathic agents. Several investigations have demonstrated that a number of metabolites and aqueous extracts of various lichens are capable of inhibiting seed germination and growth of both wild and agricultural races of vascular plants, thus representing potential leads for the developing of new herbicidal agents.<sup>5</sup> The present investigation was to evaluate the effect of the major phytoxins isolated from *P. tinctorum* on several photosynthetic reactions in isolated spinach chloroplasts.

## Results and Discussion

*P. tinctorum* was extracted with CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:1). The resulting extract inhibited germination and growth of *Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crusgalli* seeds using a Petri-dish bioassay.<sup>6</sup> Bioactivity-directed fractionation of the extract led to the isolation of the known compounds lecanorin (1),<sup>7</sup> gyrophoric acid (2),<sup>8</sup> methyl haematommate (3),<sup>9</sup> methyl- $\beta$ -orcinol carboxylate,<sup>9</sup> lichexanthone,<sup>10</sup> methyl orsellinate,<sup>11</sup> and orcinol.<sup>11</sup> The compounds were identified by IR, NMR, and mass spectral analyses and by comparison with the spectroscopic data previously described.<sup>7-11</sup>

The isolated compounds were tested for their ability to inhibit the seed germination and radicle growth of *A. hypochondriacus* and *E. crusgalli*. Compounds 1, methyl- $\beta$ -orcinol carboxylate, methyl orsellinate, orcinol, and 3 significantly reduced both processes in a concentration-dependent manner (Table 1). In general, *A. hypochondriacus* was more sensitive to the treatments, with 3 being the most potent compound.

The effect of these compounds was also tested for inhibition of photosynthetic activities in freshly lysed,



illuminated spinach chloroplasts. The activities investigated included ATP-synthesis, H<sup>+</sup>-uptake, electron transport rate, and partial reactions of the photosystems I (PSI) and II (PSII).<sup>6</sup> Photosynthetic phosphorylation from water to methyl viologen (MV) in spinach thylakoids was significantly inhibited by 1 (I<sub>50</sub> = 1.36 × 10<sup>-4</sup> M) and 2 (I<sub>50</sub> = 8.71 × 10<sup>-5</sup> M) and partially affected by 3, lichexanthone, and methyl orsellinate at 300 μM. However, 1 and 2 were less potent than 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU), a synthetic inhibitor employed as a positive control (I<sub>50</sub> = 1.40 × 10<sup>-7</sup> M). On the other hand, the light-dependent proton-uptake was also inhibited by 1 and 2 (I<sub>50</sub> = 1.40 × 10<sup>-4</sup> M and 5.97 × 10<sup>-5</sup> M, respectively).

The light-dependent synthesis of ATP and H<sup>+</sup>-uptake by illuminated thylakoids might be inhibited in a number of ways: (a) by uncoupling ATP synthesis from the electron transport, (b) by inhibiting the electron transport, and/or (c) by blocking the phosphorylation reaction itself. To understand the mechanism by which the most active compounds, 1 and 2, inhibited photophosphorylation, their effects on the electron transport chain were investigated. Figures 1 and 2 show that the noncyclic electron transport

\* To whom correspondence should be addressed. Fax: (525) 622-5329  
E-mail: blas@servidor.unam.mx or rachel@servidor.unam.mx.

<sup>†</sup> Departamento de Farmacia.

<sup>‡</sup> Departamento de Bioquímica.

Table 1. Phytogrowth-Inhibitory Activity of Compounds from *P. tinctorum*

compound	seedling growth IC <sub>50</sub> M		seedling germination IC <sub>50</sub> M	
	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>
1	$5.8 \times 10^{-4}$	$1.8 \times 10^{-4}$	$7.6 \times 10^{-4}$	$7.1 \times 10^{-4}$
2	$2.0 \times 10^{-3}$	$2.0 \times 10^{-3}$	$2.0 \times 10^{-3}$	$2.0 \times 10^{-3}$
3	$2.1 \times 10^{-5}$	$2.9 \times 10^{-5}$	$6.8 \times 10^{-6}$	$1.7 \times 10^{-5}$
methyl- $\beta$ -orcinol carboxylate	$3.2 \times 10^{-4}$	$6.1 \times 10^{-4}$	$7.6 \times 10^{-4}$	$1.1 \times 10^{-3}$
lichexanthone	$> 2.0 \times 10^{-3}$	$> 2.0 \times 10^{-3}$	$> 2.0 \times 10^{-3}$	$> 2.0 \times 10^{-3}$
methyl orsellinate	$2.9 \times 10^{-4}$	$3.1 \times 10^{-4}$	$3.6 \times 10^{-4}$	$6.8 \times 10^{-4}$
orcinol	$1.0 \times 10^{-3}$	$1.1 \times 10^{-3}$	$1.7 \times 10^{-3}$	$> 8.1 \times 10^{-3}$
2,4-D <sup>a</sup>	$1.8 \times 10^{-4}$	$> 2.3 \times 10^{-4}$	$8.8 \times 10^{-4}$	$> 2.3 \times 10^{-4}$

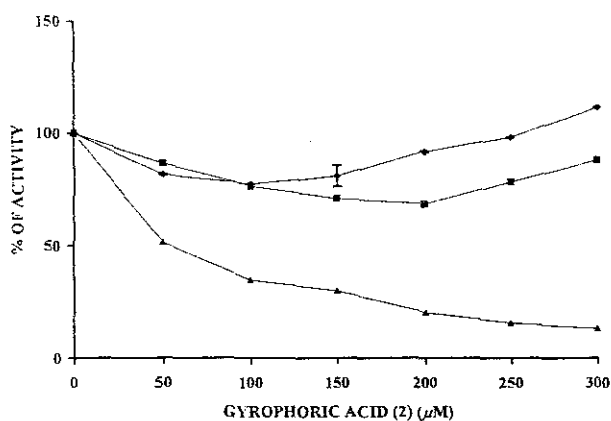
<sup>a</sup> Positive control

Figure 1. Noncyclic electron transport from water to MV as a function of gyrophoric acid (2) concentration in chloroplast thylakoids isolated from spinach leaves (*S. oleracea* L.). Each cuvette contained 20  $\mu\text{g}$  of chlorophyll/mL in the reaction medium. Other conditions are described under Experimental Section. Control value rates for basal ( $\blacklozenge$ ), phosphorylating ( $\blacksquare$ ), and uncoupled ( $\blacktriangle$ ) electron transport were 400.0, 554.1, and 1025.0  $\mu\text{equiv e}^{-}\text{h}^{-1}\text{mg of Chl}^{-1}$ , respectively. Each point represents the mean of five determinations. Each repetition was made in different batches of chloroplasts. Vertical bars represent maximum standard deviation.

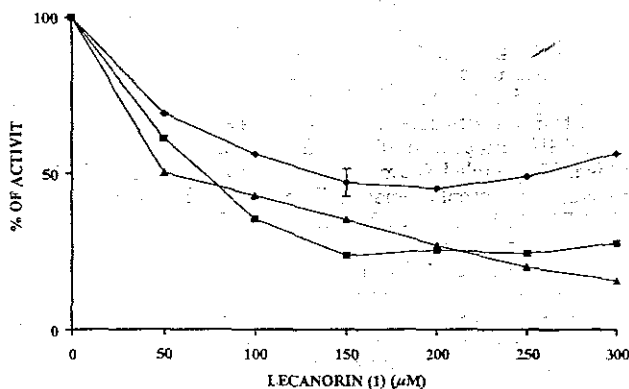


Figure 2. Noncyclic electron transport from water to MV as a function of lecanorin (1) concentration in chloroplast thylakoids isolated from spinach leaves (*S. oleracea* L.). Each cuvette contained chlorophyll 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in the reaction medium. Other conditions were described under Experimental Section. Control value rates for basal ( $\blacklozenge$ ), phosphorylating ( $\blacksquare$ ), and uncoupled ( $\blacktriangle$ ) electron transport were 331.4, 457.1, and 1117.8  $\mu\text{equiv e}^{-}\text{h}^{-1}\text{mg of Chl}^{-1}$ , respectively. Each point represents the mean of five determinations. Each repetition was made in different batches of chloroplasts. Vertical bars represent maximum standard deviation.

from water to MV in uncoupled conditions was drastically inhibited by compounds 1 and 2. Therefore, these lichen metabolites behave as Hill reaction inhibitors.

To localize the inhibition site of 1 and 2, their effect on PSI and PSII electron transport was evaluated using appropriate inhibitors and artificial electron donors and

Table 2. Effect of Gyrophoric Acid (2) on Uncoupled Photosystem II Electron Transport Rate<sup>a</sup>

concentration, $\mu\text{M}$	reactions		
	H <sub>2</sub> O to DCPIP (H <sub>2</sub> O to cyt b <sub>6</sub> /f)	H <sub>2</sub> O to SiMo (H <sub>2</sub> O to PheO)	DPC to DCPIP (P <sub>680</sub> to cyt b <sub>6</sub> /f)
0	100.0	100.0	100.0
50	72.1	93.4	84.3
100	49.7	79.9	58.5
150	31.3	62.5	40.3
200	16.8	41.0	33.8
250	4.1	0.0	29.9
300	0.0	0.0	17.9

<sup>a</sup> Control value rates  $\mu\text{equiv e}^{-}\text{h}^{-1}\text{mg of Chl}^{-1}$  from photosystem II (from H<sub>2</sub>O to DCPIP, H<sub>2</sub>O to SiMo, DPC to DCPIP) were 324.7, 86.6, and 106.0, respectively. Each point represents the mean of five determinations. Each repetition was made in different batches of chloroplasts. The corresponding range of the electron transport chain is given in parentheses.

Table 3. Effect of Lecanorin (1) on Uncoupled Photosystem II Electron Transport Rate<sup>a</sup>

concentration, $\mu\text{M}$	reactions		
	H <sub>2</sub> O to DCPIP (H <sub>2</sub> O to cyt b <sub>6</sub> /f)	H <sub>2</sub> O to SiMo (H <sub>2</sub> O to PheO)	DPC to DCPIP (P <sub>680</sub> to cyt b <sub>6</sub> /f)
0	100.0	100.0	100.0
50	64.3	59.1	93.6
100	37.5	25.0	86.9
150	15.7	8.4	88.9
200	0.0	0.0	96.0
250	0.0	0.0	111.8
300	0.0	0.0	135.2

<sup>a</sup> Control value rates  $\mu\text{equiv e}^{-}\text{h}^{-1}\text{mg of Chl}^{-1}$  from photosystem II (from H<sub>2</sub>O to DCPIP, H<sub>2</sub>O to SiMo, DPC to DCPIP) were 200.0, 25.0, and 98.0, respectively. Each point represents the mean of five determinations. Each repetition was made in different batches of chloroplasts. The corresponding range of the electron transport chain is given in parentheses.

acceptors.<sup>12,13</sup> Uncoupled PSI measured from dichlorophenol-indophenol (DCPIP)/ascorbate to MV was not significantly affected by compounds 1 and 2 (data not shown). However, uncoupled PSII electron flow was drastically inhibited by both compounds (Tables 2 and 3). Uncoupled PSII from water to DCPIP/K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], from water to silicomolybdate (SiMo), and from diphenylcarbazide (DPC) to DCPIP were inhibited as the concentrations of 2 increased (Table 2). Therefore, the mode of action of 2 involves the inhibition of electron transfer between P<sub>680</sub> and Q<sub>A</sub> on the reducing side of PSII. On the other hand, the site of inhibition of 1 was at the water-splitting enzyme level, because it inhibited uncoupled electron transport from water to DCPIP/K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] and from water to SiMo, without affecting uncoupled electron transport from DPC to DCPIP and uncoupled photosystem electron transport from DCPIP/ascorbate to MV (Table 3).

The level activity of compound 3 on radicle growth and germination and the effect of 1 and 2 on photosynthesis

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



clearly reveal the potential of these metabolites as leads for the development of new herbicidal agents. The concentrations of metabolite 1 required for inhibition of photophosphorylation, electron transfer, and radicle growth inhibition are comparable. However, in the case of 2 the inhibitory effect on photosynthesis was higher than the preemergent phytotoxic activity. Finally, it is important to point out that the phytotoxins isolated from *P. tinctorum* represent the most common classes of lichen metabolites.

### Experimental Section

**General Experimental Procedures** Melting point determinations were performed on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. IR spectra were obtained using KBr disks on a Perkin-Elmer 599B spectrophotometer. UV spectra were obtained on a Shimadzu 160 UV spectrometer in MeOH solution. NMR spectra including COSY, NOESY, HMBC, and HMQC experiments were recorded on a Varian Unity Plus 500 spectrometer or on a Bruker DMX500 at 500 MHz (<sup>1</sup>H) or 125 MHz (<sup>13</sup>C) NMR. EIMS were obtained on a JEOL JMS-AX505HA mass spectrometer. Open column chromatography: Si gel 60 (70–230 mesh, Merck). TLC: Si gel 60 F<sub>254</sub> (Merck).

**Plant Material.** The plant material of *P. tinctorum* was collected in Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. A voucher specimen (G.C.-1996) has been deposited in the Herbarium of Instituto de Ecología (XAL), Jalapa, Veracruz.

**Extraction and Bioassay-Directed Fractionation.** The air-dried lichen material (2.6 kg) was ground into powder and extracted by maceration with CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:1) at room temperature. After filtration, the extract was evaporated under reduced pressure to yield 260 g of residue, which was subjected to column chromatography over Si gel (2.6 kg) and eluted with a gradient of hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10:0–0:10) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1–5:5). Fractions of 400 mL each were collected and pooled based on TLC profiles to yield nine major fractions. Fractions 2, 4, and 8 were phytotoxic according to the bioautographic phyto-growth-inhibitory bioassay (BPIB).<sup>6</sup> Compound 1 (46 mg) crystallized from active fraction 2. Preparative TLC of fraction 4 (150 mg) using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (99:1) led to the isolation of the compound orcinol carboxylate (55 mg). Successive preparative TLC of fraction 3 (3.5 g) using hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:8), three developments, yielded the compound lichexanthone (80 mg). Methyl orsellinate (9.3 g) crystallized from fraction 5 (12 g). Further column chromatography of fraction 8 (55 g) on Si gel (750 g), eluting with a concentration gradient of hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, starting with hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), afforded eight secondary fractions (A–H). According to the BPIB, the phytotoxic activity was concentrated in secondary fractions F and H. Preparative TLC of secondary fraction F using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (93:7) yielded orcinol (45 mg) and 3 (20 mg). Finally, from secondary fraction H precipitated 2 (18.6 g) as an amorphous solid.

**Lecanorin (1):** <sup>13</sup>C NMR (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>N, 125 MHz) δ 170.1 (C-7), 165.3 (C-4), 164.2 (C-2), 159.7 (C-2'), 151.7 (C-4'), 143.3 (C-6), 140.4 (C-6'), 114.5 (C-1'), 113.6 (C-5'), 112.4 (C-5), 107.3 (C-3'), 105.6 (C-1), 101.7 (C-3), 23.6 (C-8), 21.1 (C-7').

**Lichexanthone:** <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ 182.4 (C-9), 165.8 (C-6), 163.8 (C-1), 159.4 (C-5a, -4a), 157.0 (C-3), 143.5 (C-8), 115.4 (C-7), 113.0 (C-8a), 104.2 (C-9a), 98.5 (C-5), 96.8 (C-2), 92.1 (C-4), 55.7 (OCH<sub>3</sub>-3, -6), 23.4 (CH<sub>3</sub>-8).

**Methyl orsellinate:** <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ 171.8 (C-7), 164.4 (C-2), 161.5 (C-4), 143.3 (C-6), 111.4 (C-5), 104.2 (C-3), 100.4 (C-1), 51.3 (OCH<sub>3</sub>-7), 23.8 (C-8).

**Orcinol:** <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ 157.7 (C-2, -4), 139.7 (C-6), 107.5 (C-1, -5), 99.9 (C-3), 21.1 (C-7).

**Phytogrowth-inhibitory Bioassays.** The phytogrowth-inhibitory activity of the extract and of pure compounds was evaluated on seeds of *A. hypochondriacus* and *E. crusgalli* using a Petri-dish bioassay.<sup>6</sup> A BPIB system was employed to guide secondary fractionation and to speed up the isolation of active compounds.<sup>6</sup> The results were analyzed by ANOVA (*p* < 0.05), and IC<sub>50</sub> (50% inhibitory concentration) values,

expressed in molar concentrations, were calculated by Probit analysis based on percent of radicle growth inhibition. The extract and pure compounds were evaluated at 1, 10, 100, and 1000 μg mL<sup>-1</sup>. 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) was used as the positive control. The bioassays were all performed at 28 °C.

**Chloroplast Isolation and Chlorophyll Determination** Intact chloroplasts were isolated from spinach leaves (*Spinacea oleracea* L.) obtained from a local market as previously described.<sup>13</sup> Chloroplasts were suspended in the following medium: 400 mM sucrose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, and buffered with 30 mM Na<sup>+</sup>-tricine at pH 8.0. They were stored as a concentrated suspension in the dark for 1 h at 0 °C. Chlorophyll concentration was measured spectrophotometrically as reported.<sup>14</sup>

**Measurement of Proton Uptake, ATP Synthesis, and Electron Transport.** Proton uptake was measured as pH value increase between 8.0 and 8.1, using a combination microelectrode Orion model 8103 Ross connected to a Corning potentiometer model 12, with expanded scale.<sup>15</sup> The pH changes were registered using a Gilson recorder. The reaction medium used contained 100 mM sorbitol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM Na<sup>+</sup>-tricine, at pH 8.0. ATP synthesis was determined titrimetrically by the procedure of Dille.<sup>15</sup> The 0.05 mM MV was employed as electron acceptor for the Hill reaction. Noncyclic electron transport activity from water to MV was monitored with a Yellow Springs Instrument model 5300 oxygen monitor and a Clark electrode. The reaction medium was the same as in the proton uptake assay, except that the tricine concentration was 15 mM, and 0.5 mM KCN was added (basal electron transport). Phosphorylating noncyclic electron transport was measured as basal noncyclic electron transport, except that 1 mM ADP and 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> were added to the reaction medium. Uncoupled electron transport was tested in the basal noncyclic electron medium, and 6 mM NH<sub>4</sub>Cl was added. All reaction mixture was illuminated with actinic light of a projector lamp (Gaf 2669) passed through a 5-cm filter of a 1% CuSO<sub>4</sub> solution for 2 min.<sup>16</sup> Uncoupled PSII was measured by the reduction of DCPIP-supported O<sub>2</sub> evolutions monitored polarographically.<sup>16</sup> The reaction medium was the same as in electron transport assay, but 300 μM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] was used instead of MV and the following reagents were added: 1 μM 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-1,4-p-benzoquinone (DBMIB), 100 μM DCPIP, and 6 mM NH<sub>4</sub>Cl. Uncoupled electron transport from water to SiMo, was determined with the same reaction mixture as in PSII, except that 200 μM SiMo and 10 μM DCMU were added.<sup>17</sup> Uncoupled electron transport from DPC to DCPIP was measured spectrophotometrically as reported previously;<sup>18</sup> 200 μM DPC, 100 μM DCPIP, 1 μM DBMIB, and 6 mM NH<sub>4</sub>Cl were added to the medium, and chloroplasts previously treated with Tris 0.8 M, pH 8.0 were used. PSI electron transport was determined also in a similar form to noncyclic electron transport but the following reagents were added: 10 μM DCMU, 100 μM DCPIP, 300 μM ascorbate, 6 mM NH<sub>4</sub>Cl, and 0.05 mM MV, without K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>].

In all cases the compounds were tested at 50, 100, 150, 200, 250, and 300 μM. DCMU, employed as positive control for ATP synthesis assay, was tested at 0.01, 0.1, 1.0, and 10.0 μM. The I<sub>50</sub> value for each activity was extrapolated using the graph of percent activity versus concentration of compounds. I<sub>50</sub> is the concentration producing 50% inhibition. The concentration threshold required for photosynthesis inhibitors in similar experiments is often ≤ 10<sup>-4</sup> M.<sup>19</sup>

**Acknowledgment.** This work was supported by grants from CONACyT (no. 27978N and 31960B), DGAPA (no. IN207300), and PAEP (no. 207348 and 108330). We thank Isabel Chávez, Beatriz Quiroz, Luis Velasco-Ibarra, Javier Pérez-Flores, and Rocío Patiño, Instituto de Química, UNAM, for recording some NMR, MS, and IR spectra. Thanks are also due to G. Carmona for collecting the lichen material. The technical support of Laura Acevedo and Beatriz King Díaz is

also acknowledged I.S.R. acknowledges the fellowship awarded by CONACyT to carry out graduate studies

### References and Notes

- (1) Taken in part from the Ph.D. Thesis of I. S. Rojas entitled "Phytotoxic Compounds from Selected Lichens Species" Facultad de Química Universidad Nacional Autónoma de México México D. F. 2000.
- (2) Jayaprakasha, G. K.; Rao, J. L.; Kinghg, R. P.; Sakariah K. K. *J Chromatogr. Sci.* 1998, 36, 8-10.
- (3) Kumar, S.; Müller, K. *J Nat. Prod.* 1999, 62, 817-820.
- (4) Kumar, S.; Müller, K. *J. Nat. Prod.* 1999, 62, 821-823.
- (5) Lawrey, J. In *Allelopathy: Organisms, Processes and Applications*; Inderjit, K., Oakshim, K. M. M., Einhelling, F. A., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1995; Vol. 582; pp 26-38.
- (6) Mata, R.; Macías, M.; Rojas, I.; Lotina-Hennsen, B.; Foscano R.; Anaya, A. L. *Phytochemistry* 1998, 49, 441-449.
- (7) Nakatani, N.; Kim, Ch.; Kikuzaki, H.; Muroi, I.; Matsumura Y. *Chem Express* 1991, 6, 587-590.
- (8) Narui, T.; Sawada, K.; Takatsuki, S.; Okuyama, I.; Culberson Ch.; Culberson W.; Shibata, S. *Phytochemistry* 1998, 48, 815-822.
- (9) Sundholm, E. G.; Huneck, S. *Chem. Scr.* 1981, 18, 233-236.
- (10) Letcher, R. M. *Org Mass Spectrom* 1968, 1, 551-562.
- (11) Witiak D. I.; Patel D. B.; Lin Y. *J Am Chem Soc* 1967, 89, 1908-1911.
- (12) Allen, J. F.; Holmes, N. G. In *Photosynthesis Energy Transduction A Practical Approach*; Hipkins, M. F. Baker N. R. Eds.; IRL Press: Oxford U.K., 1986; pp 103-1141.
- (13) Macías, M.; Rojas, I.; Mata, R.; Lotina-Hennsen B. *J. Agric Food Chem.* 1999, 47, 2137-2140.
- (14) Strain, H. H.; Coppe, B. T.; Svec, W. A. In *Methods of Enzymology*; San Pietro, A. Ed.; Academic Press: New York 1971; Vol. 23 pp 452-466.
- (15) Dilley, R. A. In *Methods of Enzymology*; San Pietro A. Ed.; Academic Press: New York, 1972; Vol. 24 pp 68-74.
- (16) Calera, M. R.; Soto, F.; Sánchez P.; Bye, R. Hernández B.; Anaya, A. L.; Lotina-Hennsen B.; Mata R. *Phytochemistry* 1995, 40, 419-425.
- (17) Giaquinta, R. T.; Selman, B. R.; Anderson B. J.; Dilley R. A. *J Biol. Chem.* 1974, 249, 2873-2878.
- (18) Vernon, L. P.; Shaw, E. R. *Plant Physiol.* 1969, 44, 1645-1649.
- (19) Lotina-Hennsen, B.; Mata, R.; Calderón, J. S.; Céspedes, C. L.; Jimenez-Estrada M. *Recent Res Dev Agric Food Chem* 1998, 2, 731-749.

NP0001326

