

00582

31



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**“FITOTOXINAS DE
Prinosciadium watsoni (Umbrelliferae)
Y Maxilaria densa (Orchidaceae).”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS
P R E S E N T A :
M. EN C. NORMA ANGÉLICA VALENCIA ISLAS

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. RACHEL MATA ESSAYAG**

MÉXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	Dr. Alfredo Ortega Hernández
PRIMER VOCAL:	Dr. Hamed Abbas
SEGUNDO VOCAL:	Dra. Rosalinda Contreras Theurel
TERCER VOCAL:	Dr. Robert Bye Buttler
SECRETARIO:	Dr. Rafael Castillo Bocanegra
PRIMER SUPLENTE:	Dr. Joaquín Tamariz Mascarúa
SEGUNDO SUPLENTE:	Dr. José Roberto Villagómez Ibarra

LUGARES DONDE SE REALIZÓ LA TESIS

- Laboratorio 124, Departamento de Farmacia, Edificio "E", Facultad de Química, UNAM.
- Laboratorio de Bioquímica, Unidad de Morfofisiología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
- Unidad de Genética y Producción de cultivos, Servicio Americano de Investigación, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Stoneville, Mississippi, Estados Unidos.

AGRADECIMIENTOS

- El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los proyectos DGAPA UNAM (Dirección General de Asuntos del Personal Académico) IN207300, CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) convenio 27978N y PAEP (Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado) Nos. 108321 y 108333.
- Agradezco al CONACyT y a la DEGEP las becas otorgadas para la realización de mis estudios de doctorado. Así mismo agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado por el financiamiento brindado para realizar una estancia de investigación en la Unidad de Genética y Producción de cultivos, Servicio Americano de Investigación, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Stoneville, Mississippi, Estados Unidos del 31 de marzo al 2 de julio del 2001.
- Al Doctor Sergio González, investigador de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por permitirme realizar los ensayos de la respiración y fotosíntesis en su laboratorio. De igual forma agradezco su valiosa asesoría durante la realización de los mismos.
- Al Doctor Hamed Abbas, investigador de la Unidad de Genética y Producción de cultivos del Servicio Americano de Investigación en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Stoneville, Mississippi, Estados Unidos por las facilidades otorgadas para la realización de una estancia de investigación durante tres meses en su laboratorio y por su invaluable asesoría durante la determinación de la actividad fitotóxica sobre *Lemna pausicostata* de los compuestos aislados durante la presente investigación.
- Al Doctor José Calderón Prado, investigador del Instituto de Química UNAM por permitirme laborar en su laboratorio durante el paro de actividades que sufrió la UNAM en el año de 1999.

- A los M. en C. Isabel Chávez, Luis Velasco y Javier Pérez (Instituto de Química UNAM), al Q.F.B. Oscar Yáñez, la Q. Marisela Gutiérrez y la Q. Georgina Duarte (Facultad de Química UNAM) y al M. en C. Atilano Gutiérrez (UAM-Iztapalapa) por el registro de los espectros de RMN, masas, UV e IR.
- A los M. en C. Laura Acevedo, Isabel Rivero, Gustavo Morales, Myrna Mendoza y Gilberto Márquez por su asistencia técnica a lo largo del desarrollo del presente trabajo.
- A pasante Adriana López Mendoza, prestadora de servicio social, por su valiosa ayuda durante la realización del trabajo experimental de la presente tesis.
- A la Dra. Martha Macías Ruvalcaba, por valiosa ayuda técnica durante la realización de los experimentos de electroforesis.
- A los miembros de mi comité tutelar integrado por los Drs. Raúl Enriquez Habbib, Andrés Navarrete Castro y Rafael Castillo Bocanegra por el apoyo brindado durante la realización del presente proyecto de tesis.
- A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones.
- Especialmente expreso mi más profundo y sincero agradecimiento a la Dra. Rachel Mata Essayag, quién dio origen al presente proyecto, por su excelente dirección y apoyo incondicional durante la realización del mismo y por su valiosa contribución en mi formación académica. Muchas Gracias.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE ESPECTROS	VII
RESUMEN	i
ABSTRACT	v
1. PLATEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GENERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. HIPÓTESIS	5
4. ANTECEDENTES	6
4.1 Ejemplos selectos de fitotoxinas naturales y su mecanismo de acción.	6
4.2 Antecedentes del género <i>Prionosciadium</i> (Umbelliferae).	24
4.3 Antecedentes de la especie <i>Maxilaria densa</i> Lindley (Orchidaceae).	26
5. PARTE EXPERIMENTAL	29
5.1 Ensayos biológicos	29
5.1.1 Evaluación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos, fracciones y compuestos puros sobre la germinación y el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondracus</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i> .	29
5.1.2 Bioautografía directa para el monitoreo de la actividad fitotóxica de las fracciones.	30
5.1.3 Determinación de la actividad fitotóxica sobre <i>Lemna pausicostata</i> .	30

5.1.4	Evaluación de la interacción de los compuestos aislados y derivados químicos con calmodulina de espinaca y cerebro de bovino.	31
5.1.5	Determinación de la actividad de los compuestos aislados sobre la respiración en mitocondrias aisladas de los hipocótilos de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>).	32
5.1.5.1	Aislamiento de la fracción mitocondrial mitocondrial de los hipocótilos de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>).	32
5.1.5.2	Efecto de los compuestos 88, 89, 95, 96 y 97c sobre la fosforilación oxidativa	34
5.1.5.3	Determinación del efecto de los compuestos sobre el transporte de electrones mitocondrial.	35
5.1.5.3.1	Reacciones parciales de la cadena transportadora de electrones.	36
5.1.5.3.1.1	Determinación de la actividad de los compuestos sobre el transporte de electrones en el complejo I.	36
5.1.5.3.1.2	Determinación de la actividad de los compuestos sobre el transporte de electrones en el complejo II.	36
5.1.5.3.1.3	Determinación de la actividad de los compuestos sobre el transporte de electrones en el complejo II y III.	37
5.1.5.3.1.4	Determinación de la actividad de los compuestos sobre el transporte de electrones en los complejos III y IV.	37
5.1.6	Evaluación del efecto de la jatamansina (88), de la (9R)-9-hidroxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (89) y del (3R)-2-metil-but-(2Z)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2H,6H-benzo[1,2-b:5,4-b']dipirano (95) sobre los eventos fotoquímicos primarios de la fotosíntesis en hojas de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>) y frijol ojo de cabra (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	37
5.1.6.1	Desarrollo de las plántulas de frijol mungo y frijol ojo de cabra.	38
5.1.6.2	Preparación general de la muestra.	38
5.1.6.3	Parámetros de medición de la fluorescencia de la clorofila.	38
5.1.7	Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos y compuestos puros	39
5.1.8	Evaluación de los cambios celulares inducidos por los tratamientos de la gimnopusina (84) sobre cortes semifinos de las hojas y raíces de <i>Lemna pausicostata</i> .	40
5.1.8.1	Preparación de las muestras.	40
5.1.8.2	Análisis por microscopía electrónica.	40
5.2	Estudio químico de los extractos activos obtenidos a partir de las partes aéreas de <i>Prinosciadium watsoni</i> y <i>Maxilaria densa</i> .	41

5.2.1	Procedimientos experimentales generales.	41
5.2.2	Extracción y fraccionamiento primario de las partes aéreas de <i>Prionosciadium watsoni</i> .	42
5.2.2.1	Obtención de la (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (85), de la seravshanina (86) y de la quianhucumarina D (87), a partir de la fracción primaria activa F4	43
5.2.2.2	Obtención de la jatamansina (88) y del compuesto (9 <i>R</i>)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (89) a partir de la fracción primaria activa F4.	43
5.2.2.3	Obtención de la (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-9-hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (2), de la quianhucumarina A (90), de la (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-10-hidroxi-9-(2-metil-but-(2 <i>Z</i>)-enoiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (91) y de la (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-10-hidroxi-9-(2-metil-but-(2 <i>E</i>)-enoiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (92), a partir de la fracción secundaria activa F4IX.	46
5.2.2.4	Obtención de la (+)- <i>cis</i> -kelactona (94), del (3 <i>R</i>)-2-metil-but-(2 <i>Z</i>)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :5,4- <i>b'</i>]dipirano (95) y del (3 <i>R</i>)-isobutiroiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :5,4- <i>b'</i>]dipirano (96), a partir de la fracción primaria activa F5.	48
5.2.2.5	Preparación de la (+)- <i>cis</i> -metilkelactona (97 <i>c</i>) y la (-)- <i>trans</i> -metilkelactona (97 <i>t</i>)	51
5.2.2.6	Preparación de (+)-lomatina (98).	52
5.2.2.7	Preparación del (+)-5-metoxihamaudol (100).	52
5.2.2.8	Preparación de los ésteres de Mosher de los productos 97 <i>c</i> , 98 y 100.	52
5.2.3.	Análisis por cristalografía de rayos X para los compuestos puros 85, 87 y 93	53
5.2.3.1	Característica de los cristales del compuesto 85.	53
5.2.3.2	Característica de los cristales del compuesto 87.	53
5.2.3.3	Característica de los cristales del compuesto 93.	53
5.2.4	Extracción y fraccionamiento primario de las partes aéreas de <i>Maxilaria densa</i>	54
5.2.4.1	Obtención de la eriantridina (83) y la gimnopusina (84) a partir de la fracción primaria activa F6.	55
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
6.1	Obtención de los compuestos fitotóxicos a partir de <i>Prionosciadium watsoni</i> .	58

6.2.	Caracterización de los compuestos aislados de <i>P. watsoni</i> .	66
6.2.1	Elucidación de la estructura molecular de la (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (85) y de la (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-9-hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (93).	68
6.2.2	Elucidación de la estructura molecular de la (9 <i>R</i>)-9-hidroxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (89).	78
6.2.3	Elucidación estructural del (3 <i>R</i>)-2-metil-but-(2 <i>Z</i>)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :5,4- <i>b'</i>]dipirano (95) y del (3 <i>R</i>)-isobutiroiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :5,4- <i>b'</i>]dipirano (96).	81
6.3	Determinación del potencial fitotóxico de los metabolitos secundarios aislados de <i>Prionosciadium watsoni</i> .	86
6.3.1	Determinación cuantitativa del efecto fitotóxico de los metabolitos aislados del extracto activo de <i>Prionosciadium watsoni</i> sobre la germinación y crecimiento radicular de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i> .	86
6.3.2	Determinación cuantitativa del efecto fitotóxico de los productos aislados de <i>P. watsoni</i> sobre la arvense acuática <i>Lemna paucicostata</i> .	90
6.3.3	Determinación del efecto de los compuestos 88, 89, 95, 96 y 97 <i>c</i> , sobre la respiración en mitocondrias aisladas de los hipocótilos de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>).	93
6.3.3.1	Efecto de los compuestos 88, 89, 95, 96 y 97 <i>c</i> sobre la fosforilación oxidativa.	95
6.3.3.2	Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre el transporte de electrones mitocondrial.	99
6.3.3.3	Caracterización del efecto de los compuestos 95 y 96 sobre el transporte de electrones mitocondrial.	101
6.3.3.3.1	Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre el transporte de electrones en el complejo I de la cadena respiratoria.	101
6.3.3.3.2	Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre el transporte de electrones en los complejos II y III de la cadena respiratoria.	102
6.3.3.3.3	Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre el transporte de electrones en el complejo II de la cadena respiratoria.	103
6.3.3.3.4	Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre el complejo IV de la cadena respiratoria.	105

6.4	Evaluación del efecto de los compuestos 88 , 89 y 95 sobre los eventos fotoquímicos primarios de la fotosíntesis en hojas de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>) y frijol ojo de cabra (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	106
6.5	Interacción de los principios fitotóxicos puros con calmodulinas de espinaca y de cerebro de bovino.	120
6.6	Evaluación de la actividad citotóxica de los principios fitotóxicos puros obtenidos de <i>P. watsoni</i> .	121
6.7	Obtención de los compuestos fitotóxicos a partir de <i>Maxilaria densa</i> .	123
6.7.1	Determinación cuantitativa del efecto fitotóxico de los metabolitos aislados de <i>Maxilaria densa</i> sobre la germinación y crecimiento radicular de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i> .	123
6.7.2	Determinación cuantitativa del efecto fitotóxico de eriantridina (83) y gimnopusina (84) aisladas de <i>Maxilaria densa</i> sobre arvense acuática <i>Lemna pausicostata</i>	124
6.8	Determinación de los cambios estructurales de las hojas y raíces de <i>Lemna pausicostata</i> inducidos por la gimnopusina (84).	126
6.9	Evaluación de la actividad citotóxica de eriantridina (83) y gimnopusina (84) en líneas celulares de mamífero.	130
7.	CONCLUSIONES	131
	BIBLIOGRAFÍA	135
	APÉNDICE I. ESPECTROS DE RMN DE LOS COMPUESTOS.	148
	ARTICULOS GENERADOS DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN	171

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Ejemplos selectos de compuestos naturales que afectan la respiración mitocondrial.	11
Tabla 2	Ejemplos selectos de fitoxinas naturales que afectan la fotosíntesis.	15
Tabla 3	Ejemplos selectos de productos naturales que inducen cambios estructurales en la membrana celular y/o en los organelos celulares.	22
Tabla 4	Ejemplos selectos de compuestos que interactúan con CaM y afectan su actividad moduladora de sus enzimas blanco.	23
Tabla 5	Distribución del género <i>Prionosciadium</i> en México.	25
Tabla 6	Fraccionamiento primario del extracto activo de las partes aéreas de <i>Prionosciadium watsoni</i> .	42
Tabla 7	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F4.	44
Tabla 8	Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria activa F4VI.	45
Tabla 9	Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria activa F4IX.	46
Tabla 10	Fraccionamiento cuaternario de la fracción terciaria activa F4IX(V).	47
Tabla 11	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F5.	49
Tabla 12	Fraccionamiento primario del extracto activo de las partes aéreas de <i>Maxilaria densa</i> .	54
Tabla 13	Efecto fitotóxico (CI_{50} , $\mu\text{g mL}^{-1}$) de las fracciones primarias obtenidas a partir del extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (1:1) de <i>P. watsoni</i> sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crus-galli</i> .	58
Tabla 14	Efecto fitotóxico del extracto y fracciones primarias en <i>P. Watsoni</i> sobre <i>L. pausicostata</i> .	59
Tabla 15	Metabolitos secundarios aislados a partir de las partes aéreas de <i>P. watsoni</i> .	64
Tabla 16	Constantes físicas de los compuestos 85 y 93 .	69
Tabla 17	Constantes espectroscópicas (UV e IR) y espectrométricas (EM-IE m/z) de los compuestos 85 y 93 .	69
Tabla 18	Datos de RMN para los compuestos 85 y 93 .	73
Tabla 19	Datos parciales de ^1H RMN de los ésteres (<i>S</i>)- y (<i>R</i>)-de Mosher del producto 97c .	74

Tabla 20	Constantes físicas del compuesto 89 .	79
Tabla 21	Constantes espectroscópicas (UV e IR) y espectrométricas (EM-IE m/z) del compuesto 89 .	79
Tabla 22	Datos de RMN para el compuesto 89 .	80
Tabla 23	Datos parciales de ¹ H RMN de los ésteres (<i>S</i>)- y (<i>R</i>)-de Mosher del producto 98 .	80
Tabla 24	Constantes físicas de los compuestos 95 y 96 .	81
Tabla 25	Constantes espectroscópicas (UV e IR) y espectrométricas (EM-IE m/z) de los compuestos 95 y 96 .	82
Tabla 26	Datos de RMN para los compuestos 95 y 96 .	84
Tabla 27	Datos parciales de ¹ H RMN de los ésteres (<i>S</i>)- y (<i>R</i>)-de Mosher del producto 100 .	85
Tabla 28	Efecto del extracto, compuestos aislados y derivados químicos de <i>P. watsoni</i> sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crus-galli</i> .	87
Tabla 29	Actividad fitotóxica de los compuestos 88 y 89 de <i>P. watsoni</i> sobre <i>Lemna pausicostata</i> .	90
Tabla 30	Actividad fitotóxica de las mezclas de compuestos F4 y F5 sobre <i>Lemna pausicostata</i> .	92
Tabla 31	Efecto de los compuestos 88 , 89 , 95 y 96 sobre la velocidad de consumo de oxígeno durante la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones en mitocondrias aisladas de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>) cuando el sustrato oxidable fue el succinato (10 mM).	96
Tabla 32	Efecto de los compuestos 88 , 89 , 95 y 96 sobre la velocidad de consumo de oxígeno durante la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones en mitocondrias aisladas de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>) cuando el sustrato oxidable fue el NADH (2mM).	97
Tabla 33	Efecto de los compuestos 88 , 89 , 95 y 96 sobre la velocidad de consumo de oxígeno durante la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones en mitocondrias aisladas de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>) cuando el sustrato oxidable fue la mezcla malato-glutamato (5 mM).	97
Tabla 34	Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre la rapidez del transporte de electrones en mitocondrias aisladas de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>) cuando el sustrato oxidable es el NADH.	100

Tabla 35	Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre la rapidez del transporte de electrones en mitocondrias aisladas de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>) cuando el sustrato oxidable es la mezcla malato-glutamato.	100
Tabla 36	Efecto de los compuestos 96 y 95 sobre la rapidez del transporte de electrones en mitocondrias aisladas de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>) cuando el sustrato oxidable es el succinato.	100
Tabla 37	Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre el sitio I de la cadena transportadora de electrones en mitocondrias vegetales aisladas de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>).	102
Tabla 38	Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre los complejos II y III de la cadena transportadora de electrones en mitocondrias vegetales aisladas de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>).	102
Tabla 39	Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre el complejo II de la cadena transportadora de electrones en mitocondrias vegetales aisladas de hipocótilos y radículas de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>).	104
Tabla 40	Parámetros registrados de la cinética de fluorescencia de la clorofila en hojas aisladas de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>) sometidas a diferentes tratamientos.	113
Tabla 41	Parámetros registrados en la cinética de fluorescencia de la clorofila en el fotosistema II en hojas aisladas de frijol ojo de cabra (<i>Phaseolus vulgaris</i>) sometidas a diferentes tratamientos.	113
Tabla 42	Parámetros calculados en la cinética de fluorescencia de la clorofila en el fotosistema II en hojas aisladas de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>) sometidas a diferentes tratamientos.	115
Tabla 43	Parámetros calculados en la cinética de fluorescencia rápida de la clorofila en el fotosistema II en hojas aisladas de frijol ojo de cabra (<i>Phaseolus vulgaris</i>) sometidas a diferentes tratamientos.	116
Tabla 44	Citotoxicidad de los productos naturales aislados de <i>Prionosciadium watsoni</i> y de los derivados sobre líneas celulares de mamífero.	122
Tabla 45	Efecto del extracto de <i>M. densa</i> , la eriantridina (83) y la gimnopusina (84) sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> .	124
Tabla 46	Efecto del extracto y productos de <i>Maxillaria densa</i> sobre <i>Lemna pausicostata</i> en cultivos ^a de 72 h.	125
Tabla 47	Citotoxicidad de la eriantridina (83) y la gimnopusina (84) en líneas celulares de mamíferos.	136

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Compuestos de origen vegetal con actividad fitotóxica.	7
Figura 2. Compuestos de origen microbiano con actividad fitotóxica.	9
Figura 3. <i>Prionosciadium watsoni</i> Coulter & Rose (Umbelliferae).	25
Figura 4. <i>Maxillaria densa</i> Lindley (Orchidaceae).	27
Figura 5. Compuestos aislados de <i>Maxillaria densa</i> Lindley (Orchidaceae).	28
Figura 6. Aislamiento de la fracción mitocondrial a partir de los hipocótilos de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>).	33
Figura 7. Extracción y fraccionamiento primario del extracto activo de <i>P. watsoni</i> .	43
Figura 8. Aislamiento y purificación de los compuestos 88 y 89 a partir de la fracción primaria bioactiva F4.	45
Figura 9. Aislamiento y purificación de los compuestos 90 , 91 , 92 y 93 a partir de la fracción secundaria bioactiva F4IX.	47
Figura 10. Cromatograma obtenido por CLAE de la fracción cuaternaria activa F4IX(5)(V).	48
Figura 11. Aislamiento y purificación de los compuestos 94 , 95 y 96 a partir de la fracción primaria activa F5.	50
Figura 12. Cromatograma por CLAE de la fracción secundaria activa F5XII.	50
Figura 13. Cromatograma por CLAE de la fracción secundaria activa F5XIII.	51
Figura 14. Aislamiento de la eriantridina (83) y la gimnopusina (84) a partir del extracto activo de las partes aéreas de <i>M. densa</i> .	55
Figura 15. Efecto del extracto CH ₂ Cl ₂ :MeOH (1:1) de las partes aéreas de <i>P. watsoni</i> sobre el crecimiento de <i>Lemna pausicostata</i> .	60
Figura 16. Efecto de las fracciones primarias obtenidas del extracto activo de <i>P. watsoni</i> sobre el crecimiento de <i>Lemna pausicostata</i> .	61
Figura 17. Efecto de las fracciones primarias obtenidas del extracto activo de <i>P. watsoni</i> en la reducción del contenido de clorofila de <i>Lemna pausicostata</i> .	62
Figura 18. Efecto de las fracciones primarias obtenidas del extracto activo de <i>P. watsoni</i> sobre la conductividad del medio de cultivo en <i>Lemna pausicostata</i> .	63

Figura 19.	Patrón de fragmentación de los ésteres de kelactona en los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico (IE).	72
Figura 20.	Características de RMN para los isómeros <i>cis</i> y <i>trans</i> de kelactona (94c y 94t).	72
Figura 21.	Preparación de los ésteres de Mosher 97cr y 97cs a partir de las cumarinas 85 y 93 .	75
Figura 22.	A) Conformación de máxima estabilidad y plano del MTPA propuesto para los ésteres (<i>S</i>)- y (<i>R</i>)- de Mosher (Ohtani <i>et al.</i> , 1991); B) Modelo para determinar la estereoquímica absoluta en los alcoholes secundarios 85 y 93 .	75
Figura 23.	Vista estereoscópica de la (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-9-Acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (85)	76
Figura 24.	Vista estereoscópica de la (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-9-Hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (93)	77
Figura 25.	Vista estereoscópica de la quianhucumarina D (87).	77
Figura 26.	Preparación de los ésteres de Mosher 98s y 98r a partir de la (+)- lomatina (89).	81
Figura 27.	Estructura del hamaudol (99).	83
Figura 28.	Preparación de los ésteres de Mosher 100r y 100s a partir de las piranocromonas 95 y 96 .	85
Figura 29.	Actividad fitotóxica de los compuestos 82 y 83 sobre <i>Lemna pausicostata</i> L. A: conductividad del medio de cultivo, B: inhibición del crecimiento y C: reducción de la clorofila	91
Figura 30.	Actividad fitotóxica de las mezclas F4 y F5 sobre <i>Lemna pausicostata</i> L. A: conductividad del medio de cultivo, B: inhibición del crecimiento y C: reducción de la clorofila.	92
Figura 31.	Organización de los cuatro complejos multiprotéicos acarreadores de electrones de la respiración mitocondrial vegetal y sitio de acción de algunos inhibidores de este proceso metabólico.	94
Figura 32.	Efecto de los compuestos 95 (A), 96 (B) y 88-89 (C) sobre la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones de la respiración en mitocondrias aisladas de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>) cuando el sustrato oxidable es el succinato.	98
Figura 33.	Efecto de los compuestos 95 (A), 96 (B) y 88-89 (C) sobre la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones de la respiración en mitocondrias aisladas de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>) cuando el sustrato oxidable es NADH.	98
Figura 34.	Efecto de los compuestos 95 (A), 96 (B) y 88-89 (C) sobre la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones de la respiración en mitocondrias aisladas de frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>) cuando el sustrato oxidable es la mezcla malato-glutamato.	99

Figura 35.	Determinación del transporte de electrones en el complejo I.	101
Figura 36.	Determinación del transporte de electrones en los complejos II y III.	103
Figura 37.	Determinación del transporte de electrones en el complejo II.	104
Figura 38.	Determinación de la actividad de los compuestos 95 y 96 sobre el complejo IV de la cadena respiratoria.	105
Figura 39.	Efecto de los compuestos 95 (A) y 96 (B) sobre el complejo IV de la cadena respiratoria.	106
Figura 40.	Localización de los componentes enzimáticos acarreadores de electrones de la fase luminosa de la fotosíntesis en el tilacoide y la secuencia en que operan los componentes multienzimáticos de la cadena redox.	107
Figura 41.	Curva Kautsky de Fluorescencia de la clorofila.	109
Figura 42.	Curvas de la cinética de la fluorescencia de la clorofila generadas por los compuestos 88 , 89 y 95 en frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>).	114
Figura 43.	Curvas de la cinética de la fluorescencia de la clorofila generadas por los compuestos 88 , 89 y 95 en frijol ojo de cabra (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	115
Figura 44.	Modelo pipeline de la hoja para observar los efectos de los compuestos 88 , 89 y 95 en los parámetros calculados de la cinética de fluorescencia de clorofila en frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>).	118
Figura 45.	Modelo pipeline de la hoja para observar los efectos de los compuestos 88 , 89 y 95 en los parámetros calculados de la cinética de fluorescencia de clorofila en frijol ojo de cabra (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	119
Figura 46.	Geles de electroforesis SDS-PAGE de calmodulinas de espinaca (a) y bovino (a) después del tratamiento con los compuestos aislados y los derivados químicos.	121
Figura 47.	Efecto del extracto CHCl ₃ :MeOH (1:1) de <i>Maxillaria densa</i> sobre <i>Lemna pausicostata</i> en cultivos de 72 h.	125
Figura 48.	Efecto de la eriantridina (83) y la gimnopusina (84) aisladas de <i>Maxillaria densa</i> sobre <i>Lemna pausicostata</i> en cultivos de 72 h.	126
Figura 49.	Micrografía del tejido de las hojas de <i>Lemna pausicostata</i> tratadas con gimnopusina (84) (100 μM) a diferentes tiempos.	128
Figura 50.	Micrografía del tejido de la raíz de <i>Lemna pausicostata</i> tratadas con gimnopusina (84) (100 μM) a diferentes tiempos.	129
Figura 51.	Incremento en la conductividad del medio de cultivo de <i>Lemna pausicostata</i> al paso del tiempo causado por la gimnopusina aislada de <i>M. densa</i> .	130

LISTA DE ESPECTROS

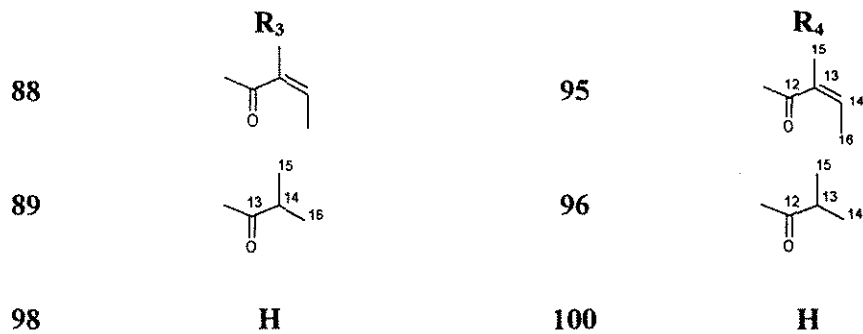
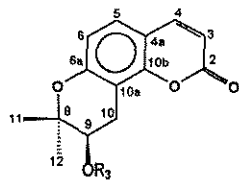
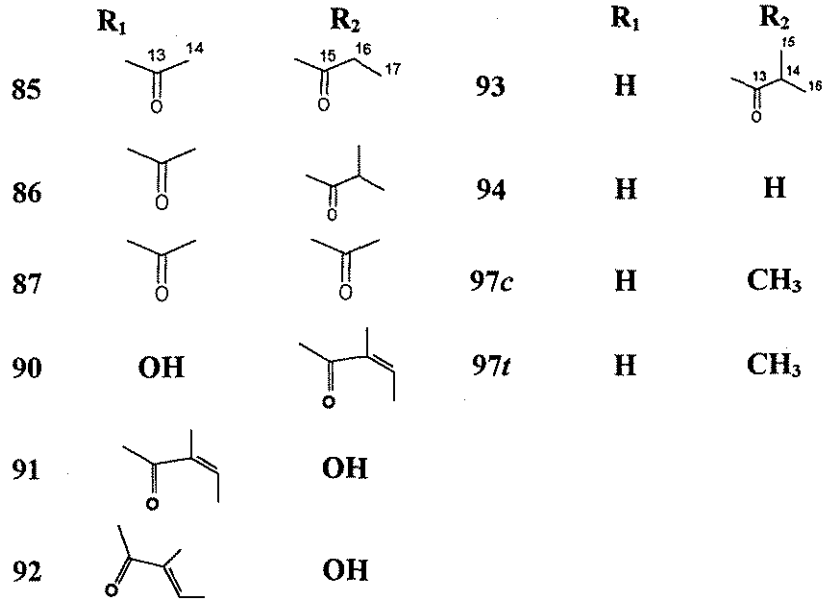
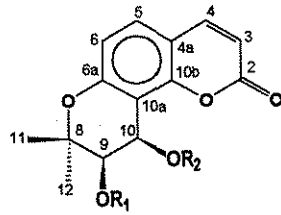
		Página
Espectro 1.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (85).	148
Espectro 2.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (85).	149
Espectro 3.	Espectro COSY del compuesto (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (85).	150
Espectro 4.	Espectro de HMQC del compuesto (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (85).	151
Espectro 5.	Espectro HMBC del compuesto (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (85).	152
Espectro 6.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-9-hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (93).	153
Espectro 7.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-9-hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (93).	154
Espectro 8.	Espectro COSY del compuesto (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-9-hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (93).	155
Espectro 9.	Espectro de HMQC del compuesto (9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-9-hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (93).	156
Espectro 10.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto (9 <i>R</i>)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (89).	157
Espectro 11.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto (9 <i>R</i>)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (89).	158
Espectro 12.	Espectro COSY del compuesto (9 <i>R</i>)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (89).	159
Espectro 13.	Espectro de HMQC del compuesto (9 <i>R</i>)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :3,4- <i>b'</i>]dipiran-2-ona (89).	160
Espectro 14.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto (3 <i>R</i>)-2-metil-but-(2 <i>Z</i>)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :5,4- <i>b'</i>]dipirano (95).	161
Espectro 15.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto (3 <i>R</i>)-2-metil-but-(2 <i>Z</i>)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :5,4- <i>b'</i>]dipirano (95).	162

Espectro 16.	Espectro COSY del compuesto (3 <i>R</i>)-2-metil-but-(2 <i>Z</i>)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :5,4- <i>b'</i>]dipirano (95).	163
Espectro 17.	Espectro HMQC del compuesto (3 <i>R</i>)-2-metil-but-(2 <i>Z</i>)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :5,4- <i>b'</i>]dipirano (95).	164
Espectro 18.	Espectro HMBC del compuesto (3 <i>R</i>)-2-metil-but-(2 <i>Z</i>)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :5,4- <i>b'</i>]dipirano (95).	165
Espectro 19.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto (3 <i>R</i>)-isobutiroiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :5,4- <i>b'</i>]dipirano (96).	166
Espectro 20.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto (3 <i>R</i>)-isobutiroiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :5,4- <i>b'</i>]dipirano (96).	167
Espectro 21.	Espectro COSY del compuesto (3 <i>R</i>)-isobutiroiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :5,4- <i>b'</i>]dipirano (96).	168
Espectro 22.	Espectro HMQC del compuesto (3 <i>R</i>)-isobutiroiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :5,4- <i>b'</i>]dipirano (96).	169
Espectro 23.	Espectro HMBC del compuesto (3 <i>R</i>)-isobutiroiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -benzo[1,2- <i>b</i> :5,4- <i>b'</i>]dipirano (96).	170

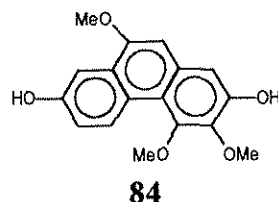
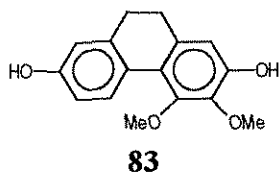
RESUMEN

La presente disertación doctoral forma parte de un estudio sistemático sobre productos naturales de origen vegetal como una fuente potencial de agentes herbicidas. La tesis describe la investigación realizada para determinar el potencial herbicida de los compuestos obtenidos de la especie *Prionosciadium watsoni* Coulter & Rose (Umbelliferae) y *Maxilaria densa* Lindley (Orchidaceae). 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. watsoni* y *M. densa* estuvo fundamentada en consideraciones etnomédicas y quimiotaxonómicas, mientras que la selección se basó en la aplicación de ensayos biológicos estandarizados.

El estudio químico biodirigido del extracto activo derivado de *P. watsoni* condujo a la obtención de diez piranocumarinas angulares y dos piranocromonas que se caracterizaron como: (9*R*,10*R*)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (**85**), seravshanina (**86**), quianhucumarina D (**87**), jatamansina (**88**), (9*R*)-9-hidroxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (**89**), quianhucumarina A (**90**), (9*R*,10*R*)-10-hidroxi-9-(2-metil-but-(2*Z*)-enoiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (**91**), (9*R*,10*R*)-10-hidroxi-9-(2-metil-but-(2*E*)-enoiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (**92**), (9*R*,10*R*)-9-hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (**93**), (+)-*cis*-kelactona (**94**), (3*R*)-2-metil-but-(2*Z*)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipirano (**95**) y (3*R*)-isobutiroiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipirano (**96**). Los productos **85**, **89**, **93**, **95** y **96** son análogos novedosos de compuestos conocidos y la elucidación estructural de los mismos se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y químicos. En el caso de los productos **85**, **87** y **93** la estructura se confirmó de manera inequívoca a través de un análisis de difracción de rayos X.



La investigación fitoquímica biodirigida de *M. densa* permitió la obtención de los estilbenoides fitotóxicos, la eriantridina (83) y la gimnopusina (84).



La determinación del efecto de los compuestos aislados y sus derivados químicos sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli* permitió establecer que todos los metabolitos presentan una actividad fitotóxica significativa comparable con la del herbicida comercial 2,4-D. Los compuestos **95**, **96** y **97c** resultaron ser las fitotoxinas más potentes.

Por otro lado, la determinación del efecto fitotóxico de los productos obtenidos sobre *L. pausicostata* permitió establecer que los estilbenos **83** y **84**, y las piranocumarinas **88** y **89** presentan una fitotoxicidad significativa sobre la planta. Estos metabolitos causaron inhibición del crecimiento de la arvense, reducción de su contenido de clorofila y pérdida de electrolitos celulares de una manera dependiente de la concentración. Dado que el efecto de los productos **88** y **89** fue menor que el del extracto íntegro de *P watsoni*, se evaluó el efecto fitotóxico de los compuestos naturales en mezclas, con la finalidad de determinar si la actividad detectada inicialmente se debía a un efecto sinérgico, sin embargo, las mezclas fueron menos activas que el extracto original, por lo tanto es posible que el(los) compuesto(s) activo(s) responsable(s) del potente efecto inhibitor del crecimiento de *Lemna pausicostata* no fue(ron) aislado(s) en el transcurso de esta investigación.

Con la finalidad de determinar el mecanismo de acción por el cual las fitotoxinas **88**, **89**, **95** y **96** ejercen su acción se determinó el efecto de los mismos sobre la respiración utilizando mitocondrias aisladas de los hipocótilos de frijol mungo (*Vigna radiata*) y sobre la fotosíntesis empleando hojas aisladas de frijol mungo y frijol ojo de cabra (*Phaseolus vulgaris*). A partir de estos bioensayos fue posible establecer que las piranocromonas **95** y **96** se comportaron como inhibidores del proceso de respiración mitocondrial, en virtud de que afectan significativamente el transporte de electrones en el complejo II de la cadena respiratoria. Por otro lado, las fitotoxinas **89** y **95** presentan una acción dual sobre el

proceso de la fotosíntesis dado que inhiben el transporte de electrones en los centros de reacción activos y la transferencia de energía al centro de reacción una vez que la luz ha sido absorbida por el complejo antena. De manera adicional, se exploró la interacción de las fitotoxinas **85-96** con la calmodulina de espinaca y de cerebro de bovino mediante una electroforesis denaturalizante en presencia de calcio. En estos ensayos se observó que todos los compuestos probados retardan la movilidad electroforética de ambas proteínas. Los dos primeros blancos de acción se escogieron considerando que la mayoría de los herbicidas comerciales ejercen su efecto sobre la fotosíntesis y sobre la respiración mitocondrial. El efecto sobre la proteína calmodulina se evaluó considerando que hay evidencias de que esta proteína juega un papel importante en los procesos de transducción de señales asociados con el desarrollo y crecimiento vegetal.

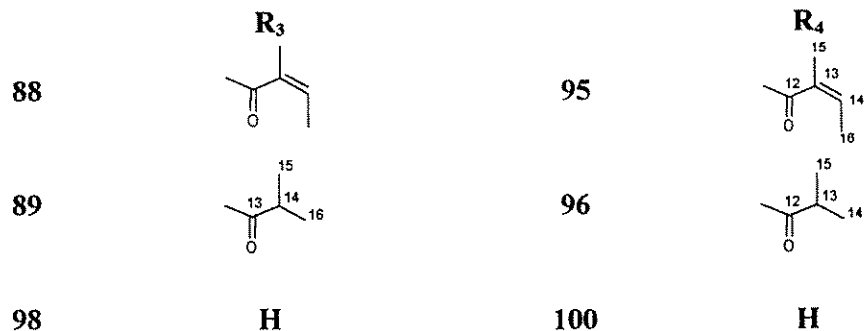
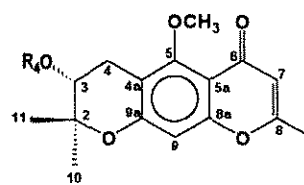
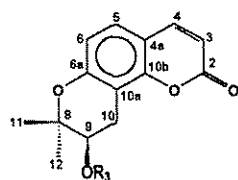
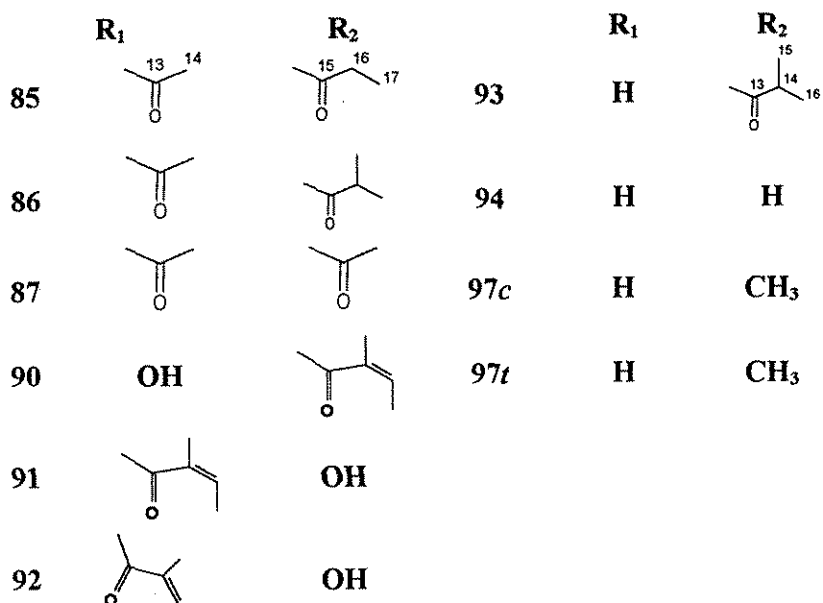
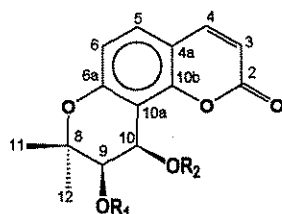
Dada la marcada fitotoxicidad mostrada por la **84** sobre *Lemna pausicostata* y debido a que varias fitotoxinas provocan la pérdida de electrolitos y clorofila por alteración de la membrana celular de los tejidos tratados, se investigaron los efectos de la fitotoxina **84** en la ultraestructura de tejidos de las hojas y raíces de *L. pausicostata* mediante el empleo de la técnica de microscopía electrónica. El producto **84** causó daño celular severo a nivel de las membranas celular y tilacoidal en el tejido proveniente de las hojas. El daño citológico provocado por este compuesto comienza a las 12 horas de tratamiento. Este periodo de tiempo es consistente con el tiempo requerido para producir un incremento en la conductividad del medio de cultivo de *L. pausicostata* y la disminución en el contenido de clorofila extraída.

Los estudios preliminares conducentes a determinar la inocuidad de las fitotoxinas se verificaron a través de diversas pruebas de citotoxicidad *in vitro*, utilizando cuatro líneas celulares de mamíferos. Los resultados de estos experimentos indican que ninguna de las cepas de prueba es sensible a los productos **84, 85, 95, 96 y 97c**, por lo que estos productos podrían ser candidatos aceptables para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas.

ABSTRACT

In continuation of our search for potential herbicide agents from Mexican plants, it was found that a CH₂Cl₂:MeOH (1:1) extract of the aerial parts of *Prionosciadium watsoni* Coulter & Rose (Umbelliferae) and a CH₃Cl:MeOH (1:1) *Maxilaria densa* Lindley (Orchidaceae) prepared from the whole plant induced significant phytotoxic effects on *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae), *Echinochloa crus-galli* (Beauv) L. (Graminae) and *Lemna pausicostata* (duckweed).

Bioassay-guided fractionation of the active extract of *Prionosciadium watsoni* led to the isolation of three new pyranocoumarins and two new pyranochromones. The new compounds were characterized as propionic acid (9*R*,10*R*)-9-acetoxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyran-2-one-10-yl ester (**85**), isobutyric acid (9*R*,10*R*)-9-hydroxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyran-2-one-10-yl ester (**93**), isobutyric acid (9*R*)-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyran-2-one-9-yl ester (**89**), 2-methyl-but-(2*Z*)-enoic acid (3*R*)-5-methoxy-3,4-dihydro-2,2,8-trimethyl-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipyran-3-yl ester (**95**) and isobutyric acid (3*R*)-5-methoxy-3,4-dihydro-2,2,8-trimethyl-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipyran-3-yl ester (**96**) by spectroscopic and chemical methods. The stereochemistry at the stereogenic centers was established by applying the Mosher ester methodology. The structures of **88** and **93** were corroborated by single-crystal X-ray diffraction studies. In addition, the known compounds quianhucoumarin A (**90**), 2-methyl-but-(2*Z*)-enoic acid (9*R*,10*R*)-10-hydroxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyran-2-one-9-yl ester (**91**), 2-methyl-but-(2*E*)-enoic acid (9*R*,10*R*)-10-hydroxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyran-2-one-9-yl ester (**92**), (+)-*cis*-khellactone (**94**), and jatamansin (**88**) were obtained and identified by comparison with their published spectroscopic data.



The phytotoxic activity of the isolated compounds and chemical derivatives was determined on *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli* and *Lemna pausicostata*. Compounds 95, 96 and 97c were the most active and showed high selectivity

against *E. crus-galli* seeds. Of all the isolates, only **88** and **89** showed significant phytotoxicity on duckweed at concentrations of 100 and 200 μM .

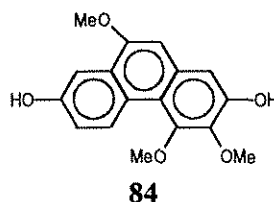
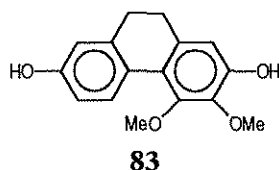
The effect of compounds **85-96** isolated from *P. watsoni* on spinach and bovine brain calmodulin was established. The assay conducted was a SDS-PAGE electrophoresis. In this type of experiment the interaction of any compound with calmodulin is determined by observing the change in the electrophoretic mobility of the protein in the presence of Ca^{2+} and the compound. In general, all metabolites affected the mobility of both bovine-brain and spinach calmodulin. Therefore these phytotoxins may interfere with regulatory properties of calmodulin.

The action of compounds **88**, **89**, **95** and **96** on respiration was determined on mitochondria isolated from mung bean (*Vigna radiata*) hypocotyls using polarographic and spectrophotometric techniques. The polarographic method allowed to determine the changes of O_2 consumption rate as a function of ADP phosphorylated to ATP and it was possible to establish that pyranochromones **95** and **96** are mitochondrial respiration inhibitors. On the other hand, the spectrophotometric technique indicated that these metabolites significantly affected the electron transport at site II of the respiratory chain.

The action of phytotoxins **89** and **95** on photosynthesis was evaluated in mung bean and *Phaseolus vulgaris* leaves using the chlorophyll *a* fluorescence technique in a PEA (Plant Efficiency Analyzer). The treatments with both compounds significantly affected the chlorophyll *a* kinetics after 20 h of treatment. In addition, it was demonstrated that **89** and **95** affect the photosynthetic process in two ways: they inhibited the electron transport at the active reaction centers as well as the energy transference from the antenna pigment molecules to the reaction centers.

Bioassay guided fractionation of the phytotoxic extract of the orchid *Maxillaria densa* led to the isolation of two phytotoxins characterized as erianthridin (**83**) and gymnopusin (**84**). The phytotoxic activity of both phenanthrene derivatives was assessed on duckweed (*Lemna paucicostata*) and *Amaranthus hypochondriacus*. On duckweed both compounds

caused electrolyte leakage, chlorophyll loss and photobleaching. Ultrastructural examination of duckweed frond and root tissues treated with gymnopusin (100 μM) revealed cytological damage after 12 h of exposure. The effects on membrane integrity seem to follow a time course similar to electrolyte leakage.



In order to determine the phytotoxins' harmlessness for animals and humans, their possible *in vitro* cytotoxic effects were tested against four cultured mammalian cell lines. The results obtained revealed that all the compounds showed low cytotoxicity to all the mammalian cell lines tested.

The fact that compounds **84**, **88**, **89**, **95**, **96** and **97c** displayed a significant phytotoxicity and low mammalian cytotoxicity indicated that these molecules are good candidates for further development as green herbicides.

1. PLATEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las plantas nocivas constituyen uno de los problemas más graves que enfrentan los agricultores a nivel mundial. A la fecha, se han identificado alrededor de 7000 especies de malezas de las cuales, cerca de 250 ocasionan los mayores daños a la agricultura (Vyvyan, 2002). La interferencia de estas especies durante el proceso productivo ha provocado una dramática disminución en los rendimientos de los cultivos, al grado que los agricultores se han visto en la necesidad de aplicar un gran número de agentes herbicidas para disminuir los daños.

Se estima que aproximadamente el 70% de las ventas totales de agroquímicos en los países desarrollados corresponden a herbicidas, en su mayoría de origen sintético. Estos agentes indudablemente han desempeñado un papel importante en los sistemas integrales de control de las malezas, ya que además de incrementar los rendimientos de las cosechas, reducen los costos generados por las labores de limpia de los terrenos. Sin embargo, el empleo de estos productos comerciales se ha expandido indiscriminadamente ocasionando severos daños ambientales debido a sus altos índices de persistencia. También resultan tóxicos para el hombre y los animales, como consecuencia de su poca selectividad. Por último, estos agentes han originado la aparición de numerosas malezas resistentes a los tratamientos (Cramer, 2000).

Los severos problemas toxicológicos y ambientales ocasionados por el uso recurrente de los herbicidas sintéticos han conducido a los científicos de todo el mundo a desarrollar estrategias destinadas a promover una revolución tecnológica en la agricultura. Estas estrategias contemplan la rotación de cultivos, la eliminación manual y mecánica de las plantas no deseadas, la manipulación genética, el empleo de bioherbicidas y la búsqueda de fitotoxinas de origen natural diseñados biorracionalmente (Cremllyn, 1991; Abell *et al.*, 1997; Cutler y Cutler, 1999; Vyvyan, 2002; *inter alia*) de tal forma de garantizar la obtención de productos biodegradables, más específicos en su acción y menos tóxicos para el hombre y los animales.

Es importante mencionar que la búsqueda de fitotoxinas de origen natural se ha incrementado notablemente en los últimos años debido a que este tipo de sustancias, además de ser biodegradables, pueden constituir prototipos estructurales para el diseño y la síntesis de productos novedosos más potentes y eficaces que los compuestos modelo. De manera adicional, el hallazgo de compuestos naturales con estructuras novedosas también puede conducir al descubrimiento de nuevos blancos de acción a nivel molecular (Duke, 1993; Duke y Abbas, 1995; Hedin *et al.*, 1997; Cutler y Cutler, 1999; Macías *et al.*, 2000a; Evidente y Mota, 2001; Vyvyan, 2002; *inter alia*). Por las razones expuestas, la búsqueda de agentes herbicidas potenciales de origen natural se encuentra plenamente justificada.

La gran diversidad vegetal de México ofrece una fuente invaluable de productos biodinámicos que podrían constituir la base de nuevos herbicidas, por lo que en la Facultad de Química de la UNAM, se ha desarrollado un programa de investigación interdisciplinario destinado a explorar el potencial fitotóxico de especies selectas de la flora mexicana con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos herbicidas verdes. El programa emplea la estrategia metodológica que se resume a continuación:

En primer lugar se realiza la preselección de las materias primas. En caso de las materias primas vegetales, la selección inicial se lleva a cabo con base en los criterios convencionales: el etnomédico, el ecológico y el quimiotaxonómico (Espinosa-García y Delgado, 1998; Harborne, 1999; Cutler, 1999; Vyvyan, 2002).

Una vez que las materias primas han sido preseleccionadas, se realizan las pruebas biológicas de selección. Estas pruebas consisten en la determinación del efecto fitotóxico de los extractos orgánicos derivados de las materias primas mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación, el crecimiento radicular y la producción de biomasa en las diversas especies de prueba (Mata *et al.*, 1996; Ueno *et al.*, 1997; Miyakado *et al.*, 1997; Puyvelde *et al.*, 1999; Macías *et al.*, 2000; *inter alia*). En general, los extractos que demuestren respuestas positivas en los ensayos de fitoinhibición se consideran candidatos apropiados para la realización de otras pruebas biológicas dirigidas a un blanco de acción específico en la fisiología o el metabolismo vegetal. Aquellos extractos que presenten una

actividad significativa en los ensayos secundarios se consideran idóneos para la realización de estudios químicos biodirigidos con la finalidad de aislar los principios fitotóxicos. Estos estudios, implican la obtención de los extractos vegetales a gran escala y su posterior estudio químico, utilizando a lo largo de todo el proceso los mismos ensayos biológicos de selección, con la finalidad de monitorear la actividad fitotóxica en cada etapa. Los compuestos naturales activos purificados se identifican mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, químicos y espectrométricos. Posteriormente, se someten a pruebas de fitotoxicidad de tipo pre y post-emergente sobre diversas especies vegetales, tanto cultivables como nocivas (Heisey, 1999; Fujii, 1999). Por último, se realizan estudios conducentes a determinar el mecanismo de acción de las fitotoxinas aisladas (Mata *et al.*, 1996; Ueno *et al.*, 1997; Abell, *et al.*, 1997; Cutler y Cutler 1999; Macías *et al.*, 1999b; Dayan *et al.*, 2000; *inter alia*).

Mediante la aplicación de la secuencia metodológica descrita anteriormente, en este programa interdisciplinario se han realizado numerosos estudios que han conducido al aislamiento de numerosas fitotoxinas de origen vegetal con una gran diversidad estructural y con un efecto sobre diferentes blancos de acción, en particular sobre la fotosíntesis (Pereda-Miranda *et al.*, 1993; Mata *et al.*, 1996; Lotina-Hennsen *et al.*, 1998; Castañeda *et al.*, 1998; Achnine *et al.*, 1999; Macías *et al.*, 1999, 2000 y 2001; Rojas *et al.*, 2000; Macías *et al.*, 2000 y 2001; Chávez *et al.*, 2001; Mata *et al.*, 2001). En este marco de referencia se formuló la presente investigación doctoral, la cual continúa con el descubrimiento de nuevas fitotoxinas de origen vegetal, a través del estudio de las especies vegetales *Prionosciadium watsoni* Coulter & Rose (Umbelliferae) y *Maxilaria densa* Lindley (Orchidaceae). Cabe destacar que ninguna de estas especies había sido objeto de estudios previos que tuvieran como objetivo obtener herbicidas potenciales. Para el estudio de las dos especies vegetales, se siguió la estrategia metodológica descrita anteriormente (*vide supra*). Esta investigación permitió la obtención de varias fitotoxinas novedosas, mismas que se evaluaron sobre diversos blancos de acción con la finalidad de caracterizar de manera preliminar el mecanismo de acción por el cual ejercen su efecto fitotóxico. Los blancos de acción estudiados incluyeron el fotosistema II de la fotosíntesis, la proteína

reguladora calmodulina, la ultraestructura celular vegetal y el proceso de fosforilación oxidativa en mitocondrias vegetales.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Obtener los principios herbicidas potenciales de las especies *Prionosciadium watsoni* (Umbelliferae) y *Maxilaria densa* (Orchidaceae) y establecer de manera preliminar el efecto de los mismos sobre la fotosíntesis y la respiración mitocondrial, importantes blancos de acción de los herbicidas sintéticos comerciales, con la finalidad de contribuir al desarrollo de herbicidas verdes biodegradables y con una toxicidad potencial menor a la de los plaguicidas sintéticos convencionales.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar las especies objeto de estudio a través de la determinación de la actividad de los extractos íntegros derivados de las mismas especies, sobre la germinación y crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli* y la evaluación del efecto sobre el crecimiento, el contenido electrolitos y clorofila de *Lemna pausicostata*.
- Aislar los productos naturales responsables de la actividad fitotóxica a partir de los extractos activos mediante una estrategia biodirigida, verificando la actividad fitoinhibitoria a lo largo del estudio fitoquímico mediante la aplicación de los mismos bioensayos utilizados durante el proceso de selección.
- Evaluar la actividad fitotóxica de los compuestos puros aislados mediante los bioensayos de germinación y crecimiento de *Amaranthus hypochondriacus*, y *Echinochloa crus-galli* y *Lemna pausicostata*.

reguladora calmodulina, la ultraestructura celular vegetal y el proceso de fosforilación oxidativa en mitocondrias vegetales.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Obtener los principios herbicidas potenciales de las especies *Prionosciadium watsoni* (Umbelliferae) y *Maxilaria densa* (Orchidaceae) y establecer de manera preliminar el efecto de los mismos sobre la fotosíntesis y la respiración mitocondrial, importantes blancos de acción de los herbicidas sintéticos comerciales, con la finalidad de contribuir al desarrollo de herbicidas verdes biodegradables y con una toxicidad potencial menor a la de los plaguicidas sintéticos convencionales.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar las especies objeto de estudio a través de la determinación de la actividad de los extractos íntegros derivados de las mismas especies, sobre la germinación y crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli* y la evaluación del efecto sobre el crecimiento, el contenido electrolitos y clorofila de *Lemna pausicostata*.
- Aislar los productos naturales responsables de la actividad fitotóxica a partir de los extractos activos mediante una estrategia biodirigida, verificando la actividad fitoinhibitoria a lo largo del estudio fitoquímico mediante la aplicación de los mismos bioensayos utilizados durante el proceso de selección.
- Evaluar la actividad fitotóxica de los compuestos puros aislados mediante los bioensayos de germinación y crecimiento de *Amaranthus hypochondriacus*, y *Echinochloa crus-galli* y *Lemna pausicostata*.

- Caracterizar los compuestos fitotóxicos aislados mediante la determinación de sus constantes físicas, la aplicación de técnicas espectroscópicas, espectrométricas, y de difracción de rayos x, así como mediante la preparación de algunos derivados químicos.
- Explorar el modo de acción de los productos fitotóxicos mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre el proceso de fosforilación oxidativa en mitocondrias vegetales, sobre la fotosíntesis en hojas de frijol mungo (*Vigna radiata*) y frijol ojo de cabra (*Phaseolus vulgaris*) y su posible interacción con la proteína reguladora calmodulina.
- Establecer de manera preliminar la inocuidad toxicológica de las fitotoxinas aisladas, mediante la evaluación de su efecto citotóxico *in vitro* sobre líneas celulares de origen animal tanto normales, como transformadas y tumorales.
- Promover la investigación multidisciplinaria de los recursos naturales en México.
- Divulgar los resultados derivados del proyecto de investigación mediante la publicación de artículos científicos y la participación en congresos nacionales e internacionales.

3. HIPÓTESIS

Las especies *Prionosciadium watsoni* Coulter & Rose (Umbelliferae) y *Maxilaria densa* Lindley (Orchidaceae), preseleccionadas mediante los criterios quimiotaxonómico y etnomédico, constituyen fuentes potenciales de principios herbicidas biodegradables, considerando su potente efecto fitotóxico sobre las arvenses *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli* y *Lemna pausicostata*.

- Caracterizar los compuestos fitotóxicos aislados mediante la determinación de sus constantes físicas, la aplicación de técnicas espectroscópicas, espectrométricas, y de difracción de rayos x, así como mediante la preparación de algunos derivados químicos.
- Explorar el modo de acción de los productos fitotóxicos mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre el proceso de fosforilación oxidativa en mitocondrias vegetales, sobre la fotosíntesis en hojas de frijol mungo (*Vigna radiata*) y frijol ojo de cabra (*Phaseolus vulgaris*) y su posible interacción con la proteína reguladora calmodulina.
- Establecer de manera preliminar la inocuidad toxicológica de las fitotoxinas aisladas, mediante la evaluación de su efecto citotóxico *in vitro* sobre líneas celulares de origen animal tanto normales, como transformadas y tumorales.
- Promover la investigación multidisciplinaria de los recursos naturales en México.
- Divulgar los resultados derivados del proyecto de investigación mediante la publicación de artículos científicos y la participación en congresos nacionales e internacionales.

3. HIPÓTESIS

Las especies *Prionosciadium watsoni* Coulter & Rose (Umbelliferae) y *Maxilaria densa* Lindley (Orchidaceae), preseleccionadas mediante los criterios quimiotaxonómico y etnomédico, constituyen fuentes potenciales de principios herbicidas biodegradables, considerando su potente efecto fitotóxico sobre las arvenses *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli* y *Lemna pausicostata*.

4. ANTECEDENTES.

4.1 Ejemplos selectos de fitotoxinas naturales y su mecanismo de acción. En la literatura contemporánea de los productos naturales bioactivos, se han descrito numerosos compuestos que generan un gran interés debido a sus propiedades fitotóxicas, a la variedad estructural y los mecanismos de acción novedosos mediante los cuales ejercen su efecto fitotóxico. En este sentido, cabe mencionar que las fitotoxinas naturales pueden ejercer su efecto a través de uno o más mecanismos de acción fitotóxica; así, muchos herbicidas interfieren con la organización estructural celular al modificar la biosíntesis de lípidos, de celulosa o al alterar la membrana y organelos celulares (Duke y Lydon, 1993; Abbas *et al.*, 1997; Macías *et al.*, 2001). Otros interfieren en el crecimiento y la reproducción celular como resultado de la modificación de la síntesis de ácidos nucleicos y del metabolismo del nitrógeno (Duke y Lydon, 1993). Así mismo, pueden afectar enzimas específicas vitales para el desarrollo vegetal (Abell *et al.*, 1993) tales como la acetolactato sintetasa, la acetil coenzima A carboxilasa, la 5-enolpiruvil-siquimato-3-fosfato sintetasa; la *p*-hidroxipiruvatodioxigenasa y la glutamino sintetasa (Lee *et al.*, 1997; Barta y Boeger, 1995; Secor, 1994), o afectar los procesos de regulación y transducción de señales interfiriendo con las proteínas o segundos mensajeros involucrados en los procesos de germinación y crecimiento vegetal (Kenfield, *et al.*, 1998; Einhelling, 1995). Sin embargo, la mayoría de las fitotoxinas naturales estudiadas, al igual que los herbicidas sintéticos, interfieren con el abasto de energía de las células vegetales al afectar los procesos metabólicos de la respiración mitocondrial, del transporte de electrones fotosintético (Lotina *et al.*, 1998) o de la biosíntesis de carotenoides y clorofila (Duke y Lydon, 1993; Cutler y Cutler 1999). Posiblemente esta tendencia obedece a que la fotosíntesis y la respiración celular constituyen los blancos de acción mejor estudiados.

Entre los compuestos de origen vegetal que son dignos de mencionar por sus notables propiedades fitotóxicas se encuentra el cineol (1) (Gayson *et al.*, 1987; Worsham, 1989), la artemisina (2), la tricolorina A (3) (Anaya *et al.*, 1990; Pereda-Miranda *et al.*, 1993), el ácido *p*-hidroxibenzoico (4) (Putnam, 1988; Gerig y Blum, 1991), la juglona (5) (Duke y Lidon, 1987), la sorgoleona (6) (Chang, 1986; Netzly *et al.*, 1988) y la leptospermona (7)

(Van Klink *et al.*, 1999) (Figura 2). Alguno de estos productos han servido de prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos herbicidas verdes a través de modificaciones químicas sencillas. Así por ejemplo, el ácido *p*-hidroxibenzoico (4), fue el prototipo estructural para el desarrollo de dos de los herbicidas y biorreguladores de mayor éxito en la agricultura, las auxinas dicamba (8) y picloram (9) (Grossmann, 2000). De modo similar, el herbicida comercial cinmetilino (11) (Grayson *et al.*, 1987) se obtuvo a partir del monoterpenoide 1,8-cineol (eucaliptol) (1). Este compuesto semisintético es un proherbicida que requiere de la ruptura del grupo bencilo para producir al agente activo 10 (Romagni *et al.*, 2000), el cual interrumpe la mitosis de las células vegetales. Por otro lado, la leptospermona (7) constituyó el prototipo estructural para el desarrollo de las tricetonas fitotóxicas sulcotriona (12) y mesotriona (13) (Mitchell *et al.*, 2001), los cuales son dos herbicidas comerciales post-emergentes de aplicación foliar que se utilizan para la eliminación de malezas que afectan a los cultivos de maíz al inhibir a la enzima *p*-hidroxipiruvatodioxigenasa (Lee *et al.*, 1997; Barta y Boeger, 1995; Secor, 1994).

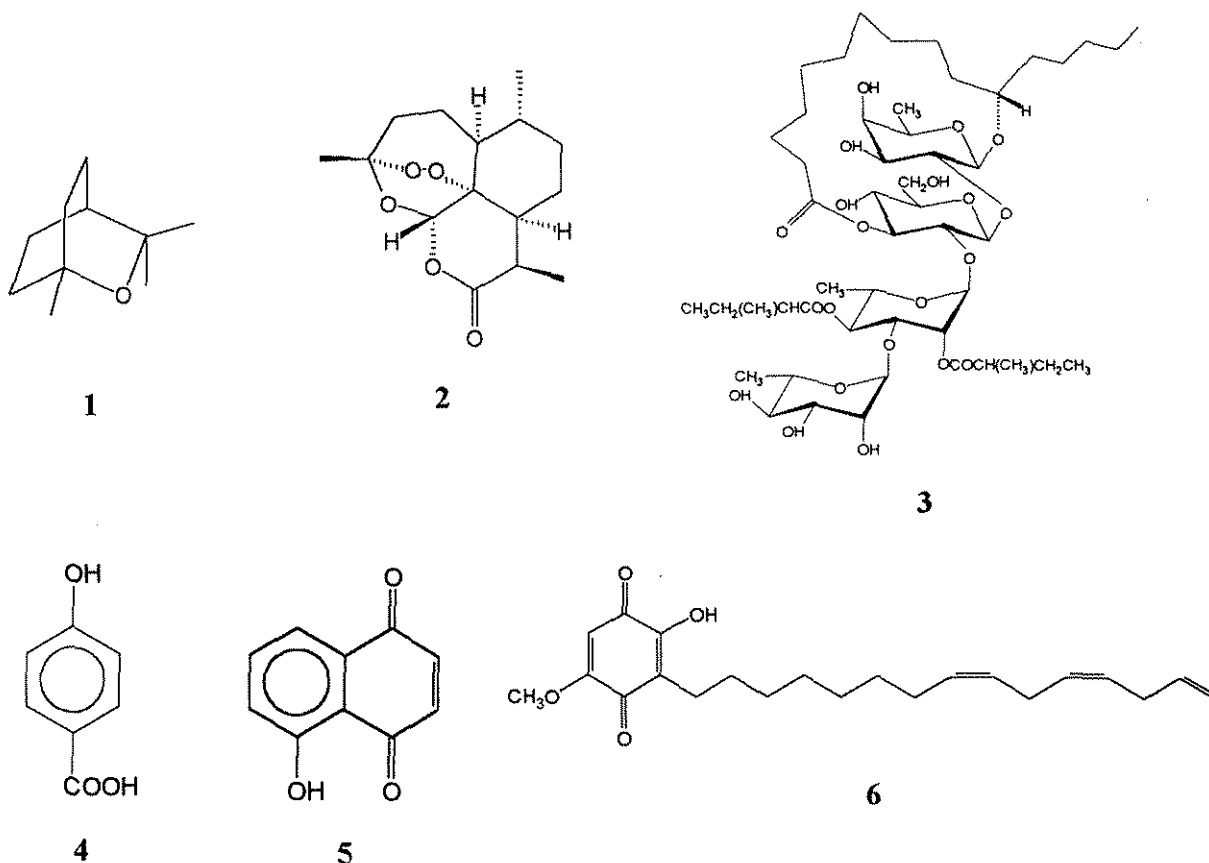


Figura 1. Compuestos de origen vegetal con actividad fitotóxica.

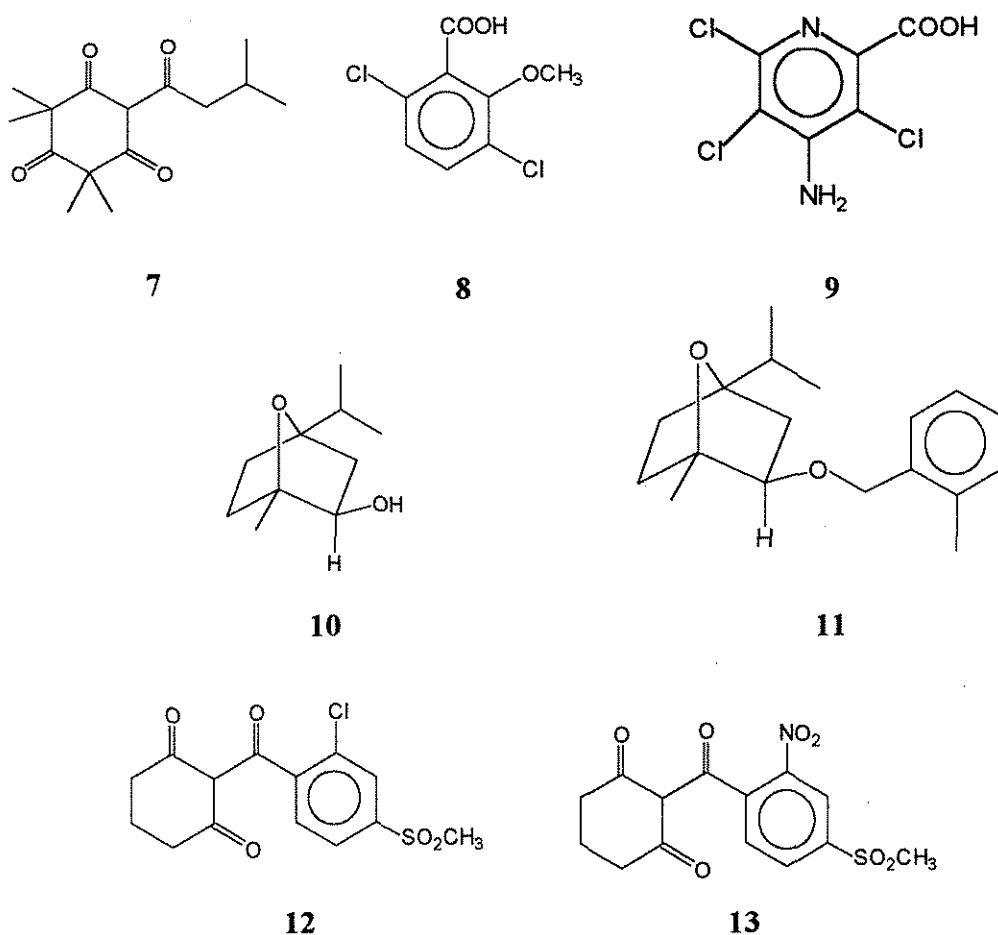


Figura 1. Compuestos de origen vegetal con actividad fitotóxica (continuación).

Los productos naturales de origen microbiano también han generado un gran interés debido a sus propiedades fitotóxicas, entre los más importantes se encuentran la fosfomtricina (**14**), el bialafos (**15**) (Bayer, *et al.*, 1972; Hoagland, 1999), la fosfotrixina (**16**) (Takahashi *et al.*, 1995; Kimura, *et al.*, 1995), la anisomicina (**17**) (Yamada *et al.*, 1972), la toxina AAL (**18**) (Abbas y Vesonder, 1993) y la tentoxina (**19**) (Duke, 1993) (Figura 2). Algunas de estas toxinas, al igual que las de origen vegetal, han servido como prototipos estructurales para el desarrollo de herbicidas comerciales. Por ejemplo, el primer producto comercial de origen microbiano fue el bialafos (**15**) (también conocido como fosfomtricil-alanil alanina), aislado originalmente de diferentes cepas de *Streptomyces*. Actualmente el bialafos se comercializa en Japón con el nombre de Herbiace® y se emplea para el tratamiento post-emergente de las malezas que afectan los cultivos de arroz, trigo y frijol (Tachibana y Kaneko, 1986). El bialafos es un pro-herbicida que es convertido en la planta al agente

activo fosfonotricina (14), cual ejerce su efecto tóxico a través de la inhibición de la enzima glutamino sintetasa (Hoagland, 1999). La fosfonotricina se obtiene también a través de síntesis orgánica. La sal de amonio de la mezcla racémica sintética de la fosfonotricina se conoce como glufosinato y se vende en el mercado bajo el nombre de Basta ® (Bayer *et al.*, 1972). Así mismo, la metoxifenona (3,3'-dimetil-4-metoxi benzofenona o NK049) (20) (Figura 2), un producto comercial altamente fitotóxico y selectivo para combatir a los pastos *Echinochloa crus-galli* y *Digitaria sp.* en los cultivos de arroz, se desarrolló con base en la anisomicina (17), toxina microbiana obtenida por Yamada (1984) a partir de *Spreptomyces sp.* 638. Por otro lado, las toxinas AAL (18) y tentoxina (19), obtenidas a partir de la especies *Alternaria alternata f. sp. lycopersici* y *Alternaria alternata*, respectivamente, son agentes que actúan selectivamente sobre especies como la hierba mora, *Lemna pausicostata* y *Datura stramonium* que afectan a los cultivos de algodón, maíz y soya. Estos compuestos han sido patentados en los Estados Unidos como prototipos estructurales prometedores para el desarrollo de futuros agentes herbicidas (Duke, 1993 y Abbas *et al.*, 1993).

Otro ejemplo representativo lo constituye la fosfonotrixina (16) un fosfonato aislado recientemente de *Saccharotrix sp.* ST-888 que ocasiona clorosis cuando se aplica en las hojas de algunas gramíneas y malezas de hoja grande (Takahashi *et al.*, 1995; Kimura *et al.*, 1995). Esta fitotoxina constituye otro prototipo estructural para el desarrollo de nuevos herbicidas, considerando que los plaguicidas organosfosforados se encuentran entre los de mayor éxito comercial.

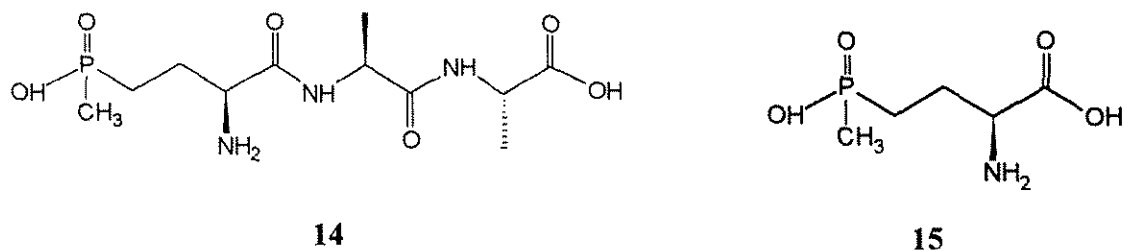
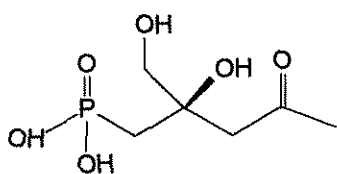
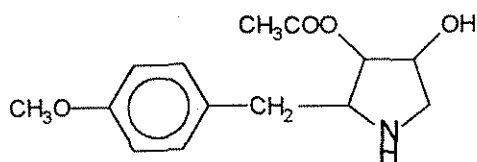


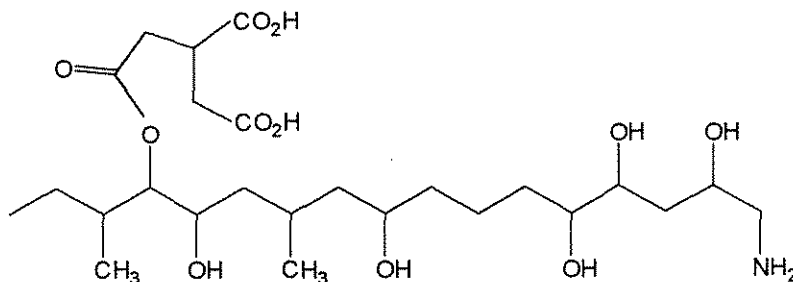
Figura 2. Compuestos de origen microbiano con actividad fitotóxica.



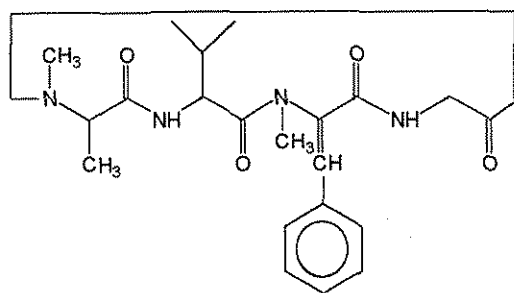
16



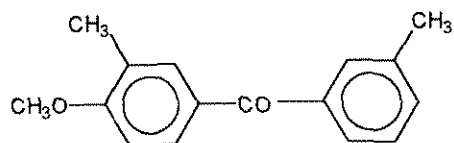
17



18



19



20

Figura 2. Compuestos de origen microbiano con actividad fitotóxica (continuación).

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las fitotoxinas naturales ejercen su acción al afectar el proceso de la respiración mitocondrial, la fotosíntesis y la organización de las estructuras celulares.

Entre los compuestos que ejercen su efecto fitotóxico a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial se encuentran compuestos que pertenecen a los grupos de las quinonas, los flavonoides, los compuestos aromáticos simples y las cumarinas. En la Tabla 1 se presentan algunos ejemplos selectos de metabolitos secundarios que afectan este proceso metabólico. Es importante mencionar que durante la etapa de imbibición de las semillas la respiración

mitocondrial representa la principal fuente de energía (Bewley y Black, 1994), por lo tanto es de esperarse que cualquier alteración de este proceso interfiera con la germinación normal de las semillas, como consecuencia de la deficiencia de ATP.

La mayoría de los compuestos que afectan la síntesis de ATP durante la respiración ejercen su efecto a través del desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones de la fosforilación oxidativa (Reitveld, 1983; Koeppe, 1972.; Moreland y Novitzky, 1987; Duke, 1993; Tissut *et al.*, 1980; Ravanel *et al.*, 1982; Stenlid, 1970; Castañeda, 1998; *inter alia*). Otros mecanismos por los que estos agentes pueden actuar incluyen: (I) la inhibición de alguno de los complejo o enzimas redox de la cadena de transporte de electrones; (II) la inhibición del gradiente electroquímico necesario para la fosforilación y (III) la inhibición de la enzima ATPasa o de los transportadores de ADP, ATP, Pi, ácidos dicarboxílicos o ácidos tricarboxílicos. En la Tabla 1 se aprecia el efecto que ejercen algunos productos naturales sobre la respiración.

Tabla 1. Ejemplos selectos de compuestos naturales que afectan la respiración mitocondrial.

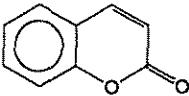
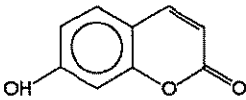
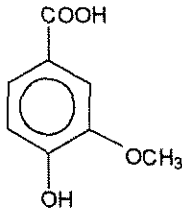
Categoría	Ejemplo	Efecto sobre la respiración	Referencia
Quinonas	Juglona (5)	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Reitveld, 1983; Koeppe, 1972..
Cumarinas	 Cumarina (21)	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Duke, 1993.
	 Umbeliferona (22)	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Moreland y Novitzky, 1987.
Compuestos aromáticos simples	 Acido vainílico (23)	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Duke, 1993.

Tabla 1. Ejemplos selectos de compuestos naturales que afectan la respiración mitocondrial (continuación).

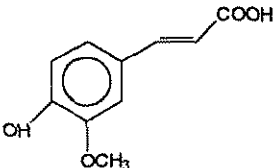
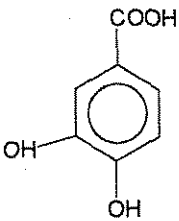
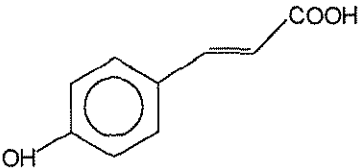
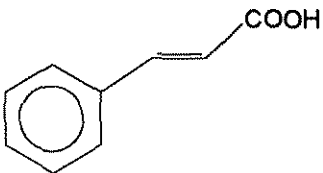
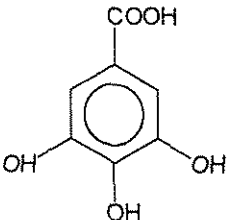
Categoría	Ejemplo	Efecto sobre la respiración	Referencia
Compuestos aromáticos simples	 <p>Ácido ferúlico (24)</p>	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Moreland y Novitzky, 1987.
	<p>Ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico (4)</p>	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Tissut <i>et al.</i> , 1980.
	 <p>Ácido protocatéquico (25)</p>	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Tissut <i>et al.</i> , 1980.
	 <p>Ácido <i>p</i>-cumárico (26)</p>	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Tissut <i>et al.</i> , 1980.
	 <p>Ácido cinámico(27)</p>	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Tissut <i>et al.</i> , 1980.
	 <p>Ácido gálico(28)</p>	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Tissut <i>et al.</i> , 1980.

Tabla 1. Ejemplos selectos de compuestos naturales que afectan la respiración mitocondrial (continuación).

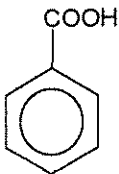
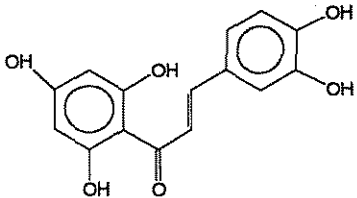
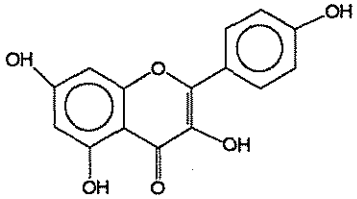
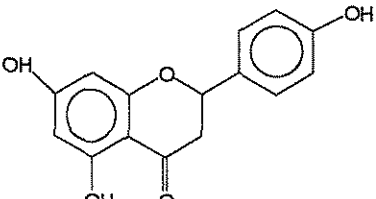
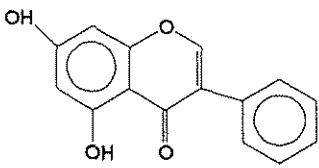
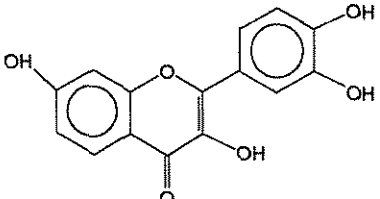
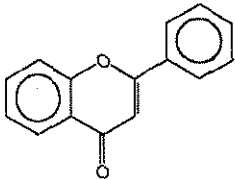
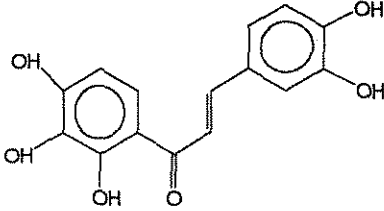
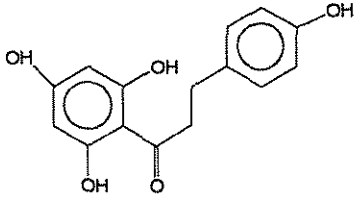
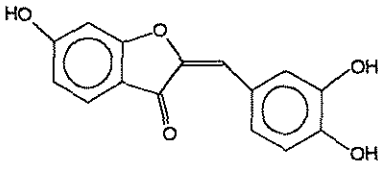
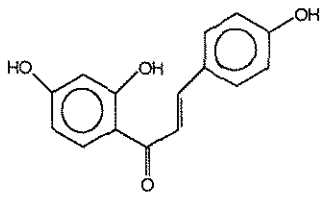
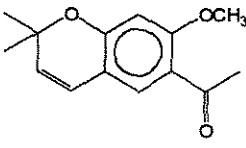
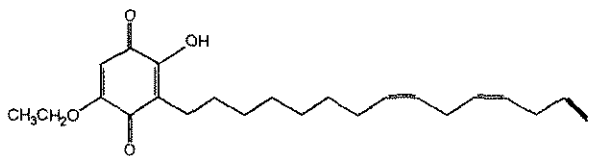
Categoría	Ejemplo	Efecto sobre la respiración	Referencia
Compuestos aromáticos simples	 <p>Ácido benzoico (29)</p>	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Tissut <i>et al.</i> , 1980.
Flavonoides	 <p>Buteína (30)</p>	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Ravanel <i>et al.</i> , 1982.
	 <p>Camperol (31)</p>	Inhibe la citocromo <i>c</i> de la cadena de transporte de electrones	Ravanel <i>et al.</i> , 1982.
	 <p>Naringenina (32)</p>	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Moreland y Novitzky, 1987.
	 <p>5,7-dihidroxiisoflavona (33)</p>	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Stenlid, 1970.
	 <p>Fisetina (34)</p>	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Stenlid, 1970.

Tabla 1. Ejemplos selectos de compuestos naturales que afectan la respiración mitocondrial (continuación).

Categoría	Compuesto	Efecto sobre la respiración	Referencia
Flavonoides	 Flavona (35)	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Stenlid, 1970.
	 Okanina (36)	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Ravanel <i>et al.</i> , 1982.
	 Floretina (37)	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Ravanel <i>et al.</i> , 1982.
	 Sulfuretina (38)	Inhibe síntesis de ATP	Stenlid, 1970.
	 Isoliquiritigenina (39)	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Ravanel <i>et al.</i> , 1982.
Cromenos	 Encecalina (40)	Desacoplante de la fosforilación oxidativa	Castañeda, 1998.

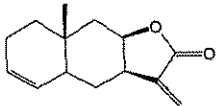
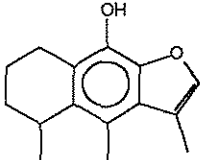
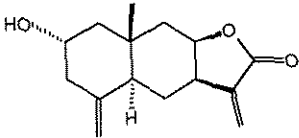
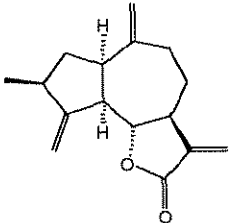
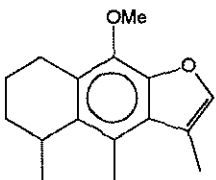
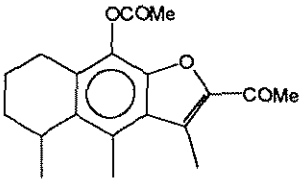
Los productos naturales estudiados que afectan la fotosíntesis pertenecen principalmente a las categorías de las lactonas sesquiterpénicas, de las cumarinas, de los flavonoides, de los benzopiranos, de los benzofuranos, terpenoides varios y fenil propanoides. En la Tabla 2 se presentan algunos ejemplos selectos de compuestos que afectan este proceso metabólico. Cabe destacar que la fotosíntesis es un proceso metabólico exclusivo en los vegetales y es esencial para el crecimiento autotrófico de las plantas, por lo que constituye un blanco de acción altamente específico. El mecanismo principal por el cual las fitotoxinas naturales inhiben la fotosíntesis consisten en la interferencia con el transporte de electrones en el sitio Q_B del fotosistema II ((Bowes *et al.*, 1980, Linscott, 1981; Corbett, 1984; Percival y Baker, 1991; Lotina-Hennsen *et al.*, 1998; *inter alia*). Algunas otras actúan desviando el flujo de electrones en el lado reductor del fotosistema I mientras que otras afectan la síntesis de ATP debido a que interaccionan con el factor de acoplamiento (inhibidores de la transferencia de energía) o con la enzima H⁺-ATPasa, o bien porque establecen una diferencia de potencial protónico-electroquímico a través de la membrana tilacoidal. También se encuentran aquellos compuestos que provocan la inhibición de la síntesis de clorofila y carotenoides o pigmentos antena necesarios para la absorción de la luz durante el proceso fotosintético.

Tabla 2. Ejemplos selectos de fitotoxinas naturales que afectan la fotosíntesis.

Categoría	Fitotoxina	Mecanismo de acción	Referencia
Benzoquinonas	Sorgoleona (6)	IRH ^b en el FSII ^a . Desplaza a la atrazina de su sitio de unión en Q _B en la proteína D ₁ del FSII.	Nimbal <i>et al.</i> , 1996; González <i>et al.</i> , 1997; Streibig <i>et al.</i> , 1999.
	 <p>Etoxisorgoleona (41)</p>	IRH ^b en el FSII.	Rimando <i>et al.</i> , 1999.
Resinas glicosídicas	Tricolorina (3)	IRH ^b de Q _A a Q _B . DF ^c	Pereda-Miranda <i>et al.</i> , 1993; Achnine <i>et al.</i> , 1999.

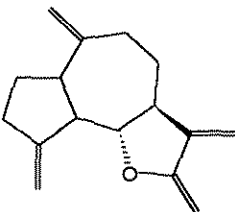
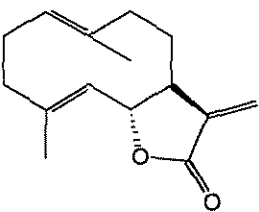
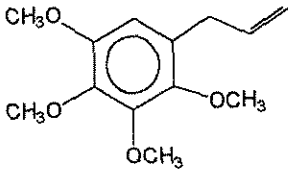
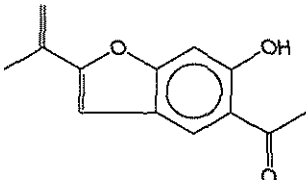
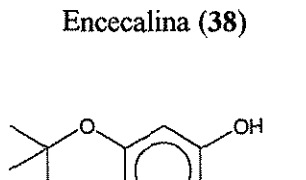
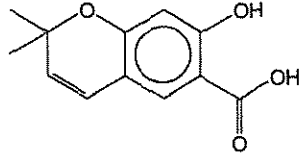
^aFSII = Fotosistema II. ^bIRH = Inhibidor de la reacción de Hill. ^cDF = Desacoplante de la fotofosforilación. ^dITrE = Inhibidor de la transferencia de energía.

Tabla 2. Ejemplos selectos de fitotoxinas naturales que afectan la fotosíntesis (continuación).

Categoría	Fitotoxina	Mecanismo de acción	Referencia
Lactonas sesquiterpénicas	 Isoallolactona (42)	IRH ^b de P ₆₈₀ a Q _A	Calera <i>et al.</i> , 1995.
	 Cacalol (43)	IRH ^b de P ₆₈₀ a Q _A	Aguilar-Martínez <i>et al.</i> , 1996.
	 Ivalina (44)	IRH ^b de P ₆₈₀ a Q _A	Lotina-Hennsen <i>et al.</i> , 1998.
	 Zaluzanina (45)	IRH ^b de P ₆₈₀ a Q _A .	Lotina-Hennsen <i>et al.</i> , 1992.
	 Metoxicacalol (46)	IRH ^b de P ₆₈₀ a Q _A	Aguilar-Martínez <i>et al.</i> , 1996.
	 Acetoxicacalol (47)	IRH ^b de P ₆₈₀ a Q _A	Aguilar-Martínez <i>et al.</i> , 1996.

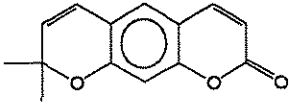
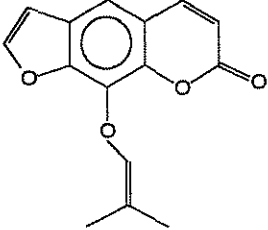
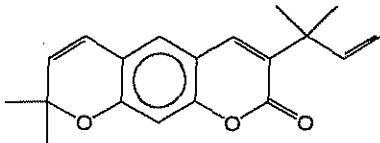
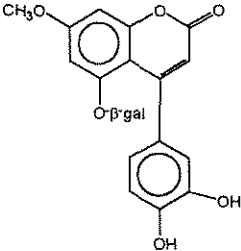
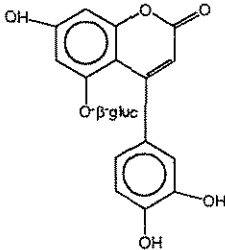
^aFSII = Fotosistema II. ^bIRH = Inhibidor de la reacción de Hill. ^cDF = Desacoplante de la fotofosforilación. ^dITrE = Inhibidor de la transferencia de energía.

Tabla 2. Ejemplos selectos de fitotoxinas naturales que afectan la fotosíntesis (continuación).

Categoría	Fitotoxina	Mecanismo de acción	Referencia
Lactonas Sequiterpénicas	 Dehidrocostus lactona (48)	DF ^c	Lotina-Hennsen, <i>et al.</i> , 1998.
	 Costunólida (49)	IRH ^b de P ₆₈₀ a Q _A ITrE ^c	Lotina-Hennsen, <i>et al.</i> , 1998.
Fenilpropanoides	 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno (50)	IRH ^b de P ₆₈₀ a Q _A .	Jiménez <i>et al.</i> , 1998.
Benzofuranos	 Euparina (51)	ITrE ^d	Lotina-Hennsen <i>et al.</i> , 1998.
Cromenos	 Encecalina (38)	IRH ^b de P ₆₈₀ a Q _A .	Castañeda <i>et al.</i> , 1998.
	 Desmetilencecalina (52)	IRH ^b de P ₆₈₀ a Q _A .	Castañeda <i>et al.</i> , 1998.
Cumarinas	Cumarina (21)	Biosíntesis de UBQ y PQ	Duke, 1993.

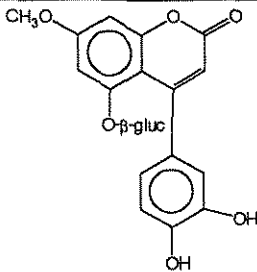
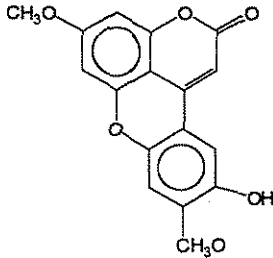
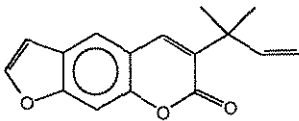
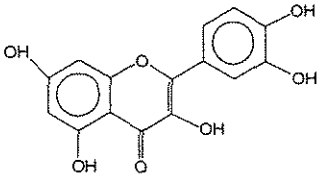
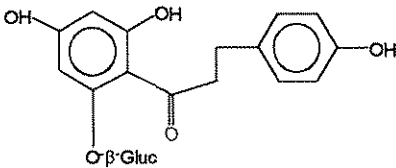
^aFSII = Fotosistema II. ^bIRH = Inhibidor de la reacción de Hill. ^cDF = Desacoplante de la fotofosforilación. ^dITrE = Inhibidor de la transferencia de energía.

Tabla 2. Ejemplos selectos de fitotoxinas naturales que afectan la fotosíntesis (continuación).

Categoría	Fitotoxina	Mecanismo de acción	Referencia
Cumarinas	Umbeliferona (22)	Inhibe la ATPasa	Duke, 1993.
	 xantiletina (53)	IRH ^b de cit b ₆ /f a PQ	Macías <i>et al.</i> , 1999; Rudiño-Piñera <i>et al.</i> , 1995.
	 Imperatorina (54)	DF ^c Estimulante de ATPasa IRH ^b	Mata <i>et al</i> 1998.
	 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina (55)	IRH ^b , DF ^c	Macías <i>et al.</i> , 1999; Rudiño-Piñera <i>et al.</i> , 1995.
	 5-o-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (56)	DF ^c	Calera <i>et al.</i> , 1996.
	 5-o-β-D-glucopiranosil-7-hidroxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (57)	DF ^c	Calera <i>et al.</i> , 1996.

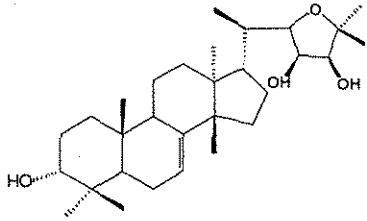
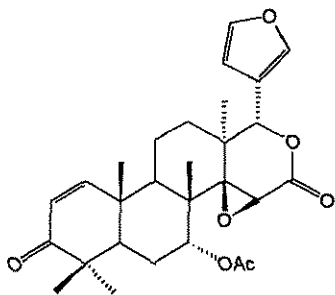
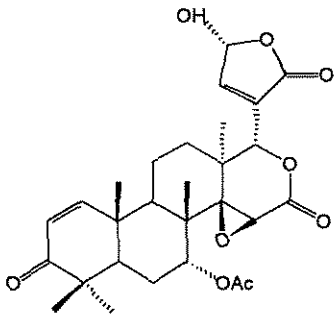
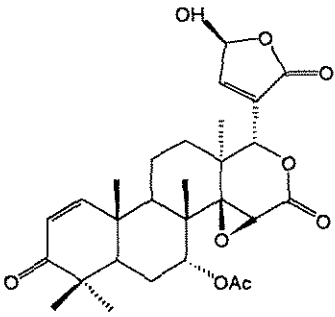
^aFSII = Fotosistema II. ^bIRH = Inhibidor de la reacción de Hill. ^cDF = Desacoplante de la fotosfosforilación. ^dITrE = Inhibidor de la transferencia de energía.

Tabla 2. Ejemplos selectos de fitotoxinas naturales que afectan la fotosíntesis (continuación).

Categoría	Fitotoxina	Mecanismo de acción	Referencia
Cumarinas	 <p>5-O-β-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (58)</p>	DF ^c	Calera <i>et al.</i> , 1996.
	 <p>3'-hidroxi-4',7'-dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina (59)</p>	I ^{TrE} ^d	Calera <i>et al.</i> , 1996.
	 <p>Chalepentina (60)</p>	I ^{TrE} ^d en concentración baja. DF ^c en concentración alta.	Mata <i>et al</i> 1998.
Flavonoides	<p>Flavona (34)</p>  <p>Quercetina (61)</p>	DF ^c	Ravanel <i>et al.</i> , 1981.
	 <p>Floridzina (62)</p>	I ^{TrE} ^d	Mc Carty, 1980.

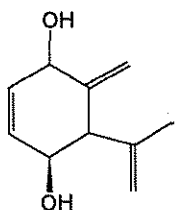
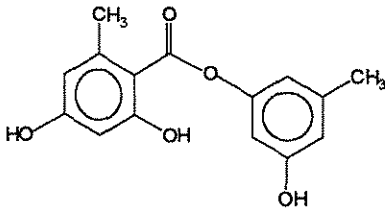
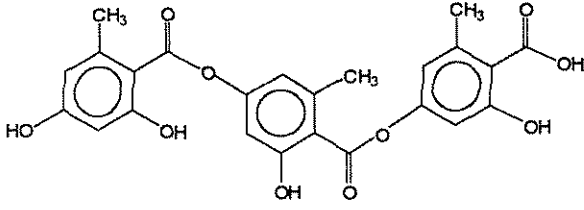
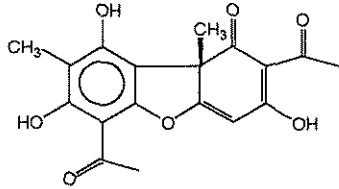
^aFSII = Fotosistema II. ^bIRH = Inhibidor de la reacción de Hill. ^cDF = Desacoplante de la fotofosforilación. ^dI^{TrE} = Inhibidor de la transferencia de energía.

Tabla 2. Ejemplos selectos de fitotoxinas naturales que afectan la fotosíntesis (continuación).

Categoría	Fitotoxina	Mecanismo de acción	Referencia
Nortriterpenoides	 <p data-bbox="517 493 689 535">Odoratol (63)</p>	<p data-bbox="862 325 1176 441">IRH^b del complejo enzimático que fotolisa el agua.</p>	<p data-bbox="1207 325 1466 367">Achnine <i>et al.</i>, 1998.</p>
	 <p data-bbox="509 871 689 913">Gedunina (64)</p>	<p data-bbox="980 693 1058 735">ITrE^d</p>	<p data-bbox="1199 693 1466 766">Lotina-Hennsen <i>et al.</i>, 1998.</p>
	 <p data-bbox="478 1291 721 1333">β-fotogedunina (65)</p>	<p data-bbox="980 1102 1058 1144">IRH^b</p>	<p data-bbox="1199 1102 1466 1176">Lotina-Hennsen <i>et al.</i>, 1998.</p>
	 <p data-bbox="478 1722 721 1764">α-fotogedunina (66)</p>	<p data-bbox="980 1533 1058 1575">IRH^b</p>	<p data-bbox="1199 1533 1466 1606">Lotina-Hennsen <i>et al.</i>, 1998.</p>

^aFSII = Fotosistema II. ^bIRH = Inhibidor de la reacción de Hill. ^cDF = Desacoplante de la fotofosforilación. ^dITrE = Inhibidor de la transferencia de energía.

Tabla 2. Ejemplos selectos de fitotoxinas naturales que afectan la fotosíntesis (continuación).

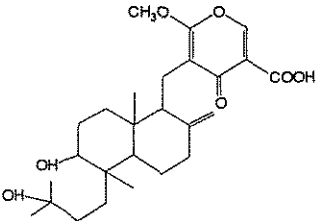
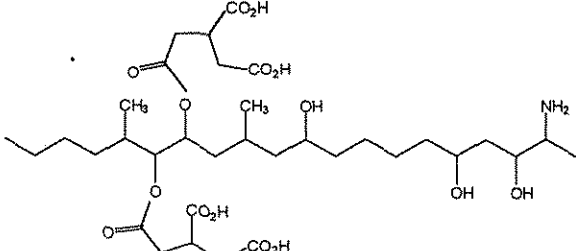

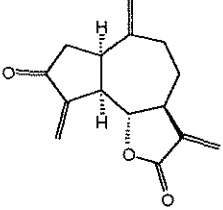
Categoría	Fitotoxina	Mecanismo de acción	Referencia
Monoterpenoides	 <p>Piquerol A (67)</p>	ITrE ^e	Mendoza <i>et al.</i> , 1994.
Bencilos	 <p>Lecanorina (68)</p>	IRH ^c del complejo enzimático que fotolisa el agua.	Rojas <i>et al.</i> , 2000.
	 <p>Acido girofórico (69)</p>	IRH ^c de P ₆₈₀ a Q _A	Rojas <i>et al.</i> , 2000.
	 <p>Acido (+)-úsnico (70)</p>	^a ITeI en FSII, en el residuo tirosina del polipéptido D ₁ que conduce los electrones del Mn ²⁺ al centro de reacción	Inoue <i>et al.</i> , 1987; Giménez y Vicente, 1989.

^aFSII = Fotosistema II. ^bIRH = Inhibidor de la reacción de Hill. ^cDF = Desacoplante de la fotofosforilación. ^dITrE = Inhibidor de la transferencia de energía.

Algunos productos naturales con propiedades fitotóxicas pueden ejercer su efecto mediante la alteración de la integridad de la membrana u organelos celulares. Así, en la Tabla 3 se presentan algunos ejemplos selectos de fitotoxinas naturales que actúan a este nivel. Las toxinas que producen cambios estructurales y/o rupturas en las membranas u organelos celulares pueden ejercer su efecto mediante la inhibición de una enzima involucrada en la biosíntesis de los componentes de la membrana celular; por ejemplo, la ceramida sintetasa de los esfingolípidos (Wang *et al.*, 1992; Yoo *et al.* 1992; Merrill *et al.*, 1993; Abbas *et al.*,

1992, 1997; Shier, 1992). Alternativamente pueden producir un daño a nivel de la membrana celular.

Tabla 3. Ejemplos selectos de productos naturales que inducen cambios estructurales en la membrana celular y/o en los organelos celulares.

Origen	Ejemplo	Mecanismo de acción	Referencia
Microbiano	Coletotricinas (71) 	Desconocido	Duke y Lydon 1993.
	fumonisina FB ₁ (72) 	Inhibición de la enzima ceramida sintetasa	Abbas <i>et al.</i> , 1994, 1992.
	AAL-TA (18) 	Inhibición de la enzima ceramida sintetasa	Duke y Lydon 1993; Abbas <i>et al.</i> , 1998.
Vegetal	Dehidroazulanina C (73) 	El grupo ciclopentanona se adiciona al glutatión.	Galindo <i>et al.</i> , 1999.
	Desmetilencecalina (56)	Desconocido	Castañeda, 1998.
	Encecalina (38)	Desconocido	Castañeda, 1998.

Además de los mecanismos descritos anteriormente, recientemente se ha abordado también el estudio sobre otros posibles blancos de acción, entre los que destaca la investigación del efecto de las fitotoxinas naturales sobre la proteína reguladora calmodulina (CaM). La CaM es una proteína ubicua que juega un papel central en la transducción de los efectos inducidos por el calcio a nivel intracelular y ejerce su efecto regulador al interactuar con una serie de enzimas y proteínas nucleares involucradas en los eventos de germinación y crecimiento vegetal. Entre las enzimas que CaM regula se encuentran la NAD-cinasa, la

glutamato descarboxilasa, la Ca^{2+} -ATPasa y la fosfodiesterasa por tan solo citar algunas (Dieter, 1984; Roberts y Harmon, 1992; Coccuci y Negrini, 1988; 1991; Overvoorde y Grimes, 1994; Thomas, 1995; Poovaiah *et al.*, 1996; Baum *et al.*, Ma y Sun, 1997; *inter alia*). Por lo tanto, la interacción de una fitotoxina con CaM y/o con las enzimas que esta modula puede provocar alteraciones en el desarrollo y fisiología de los vegetales. Con relación a los productos naturales que ejercen su efecto fitotóxico a través de su interacción con la proteína reguladora calmodulina (CaM). En la Tabla 4 se citan algunos ejemplos de metabolitos que interaccionan con la CaM.

Tabla 4. Ejemplos selectos de compuestos que interactúan con CaM y afectan su actividad moduladora de sus enzimas blanco.

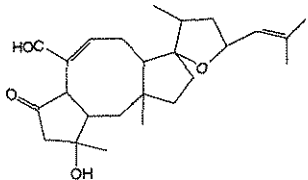
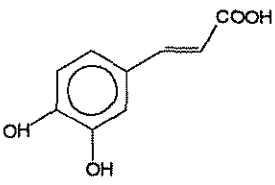
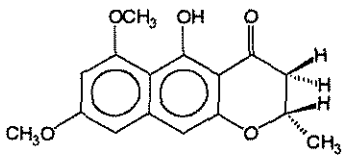
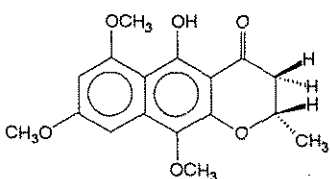
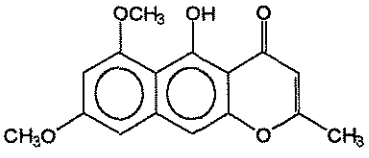
Ejemplo	Enzima regulada por CAM	Referencia
Quercetina (61)	Fosfodiesterasa del AMPc	Palyath y Poovaiah, 1985.
	Fosfodiesterasa del AMPc	Leung <i>et al.</i> , 1984, 1985; Au <i>et al.</i> , 2000.
Ofiobolina A y congéneres (74)		
	Fosfodiesterasa del AMPc	Palyath y Poovaiah, 1985.
Acido cafeico (75)		
	NAD cinasa	Macias <i>et al.</i> , 2000 ^a .
Naftopirona III (76)		
	NAD cinasa	Macias <i>et al.</i> , 2000 ^a .
Naftopirona IV (77)		

Tabla 4. Ejemplos selectos de compuestos que interactúan con CaM y actividad enzimática que regulan (continuación).

Ejemplo	Enzima regulada por CaM	Referencia
 <p>Rubrofusarina B (78)</p>	NAD cinasa	Macías <i>et al.</i> , 2001.

A través de la información presentada se aprecia la gran potencialidad que la naturaleza nos brinda para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas que satisfagan las necesidades actuales de la agricultura. Sin embargo, a pesar de que el descubrimiento de agroquímicos naturales se encuentra en pleno auge, los productos naturales representan todavía una alternativa insuficiente para reemplazar a los herbicidas sintéticos debido a la poca demanda de los agricultores. Aún así, es indispensable continuar con las investigaciones de carácter interdisciplinario que diversos grupos alrededor del mundo realizan en esta área y fomentar el empleo de estos agentes de tal manera que se conviertan en una alternativa real en los sistemas integrales para el control de las malezas.

4.2 Antecedentes del género *Prionosciadium* (Umbelliferae). El género *Prionosciadium* (Umbelliferae) (Hegnauer, 1978) está constituido por 25 especies, de las cuales, alrededor de 20 crecen en las montañas de México y Guatemala, distribuyéndose generalmente en los bosques cuya vegetación se compone principalmente de árboles de pino, roble y matorral (Bye, 2000). En la Tabla 5 se resumen las especies registradas para el territorio mexicano y su distribución.

Prionosciadium watsoni Coulter & Rose ex S. Watson (Figura 3) es una especie medicinal conocida comúnmente con el nombre de “flor de ocotillo”, “hierba del oso”, “ococote” o “njéo xempi” (en pame de la palma). Esta planta se emplea en las prácticas médicas populares para el tratamiento de diversos malestares intestinales, de la diabetes, de la fiebre y de la enfermedad cultural llamada “mal de ojo” (Aguilar *et al.*, 1994).

Tabla 5. Distribución del género *Prinosciadium* en México.

Espece	Distribución
<i>Prinosciadium aff. Acuminatum</i> Robins	Nayarit, Guerrero, Jalisco, Sinaloa, Colima y Zacatecas.
<i>Prinosciadium cuneatum</i> Coulter & Rose	Michoacán, Jalisco y Nayarit.
<i>Prinosciadium diversifolium</i> Coulter & Rose	Chiapas.
<i>Prinosciadium aff. Filifolium</i> Coulter & Rose	Durango.
<i>Prinosciadium humile</i> Rose	Nuevo León.
<i>Prinosciadium linearifolium</i> S. Watson Coulter & Rose	Querétaro, Guanajuato, Puebla y Jalisco.
<i>Prinosciadium macrophyllum</i> Coulter & Rose	Durango.
<i>Prinosciadium madreense</i> S. Watson	Jalisco y Sonora.
<i>Prinosciadium megacarpum</i> Coulter & Rose	Michoacán y Oaxaca.
<i>Prinosciadium nelsoni</i> Coulter & Rose	Puebla, Morelos, Guerrero, Chiapas.
<i>Prinosciadium serratum</i> Coulter & Rose	Nayarit.
<i>Prinosciadium tenuifolium</i> Coulter & Rose	Nayarit.
<i>Prinosciadium thapsoides</i> Mathias	Estado de México, Nayarit, Veracruz, Guanajuato, Michoacán, Hidalgo, Distrito Federal, Jalisco, Sonora, Chihuahua, Durango, Querétaro, Morelos, Oaxaca y Puebla.
<i>Prinosciadium toconsendii</i> Rose	Chihuahua.
<i>Prinosciadium townsendii</i> Rose	Chihuahua y Nayarit.
<i>Prinosciadium watsoni</i> Coulter & Rose	Durango, Querétaro, Guanajuato, Tamaulipas, Jalisco, Oaxaca, Hidalgo y San Luis Potosí.



Figura 3. *Prinosciadium watsoni* Coulter & Rose (Umbelliferae).

Los individuos pertenecientes a esta especie son arbustos erectos que pueden alcanzar más de 2 m de altura, sus tallos son huecos y sus hojas son grandes y lobuladas; las flores generalmente de color verde-amarillo se encuentran en umbelas, y los frutos oblongo-elípticos, comprimidos y con cinco costillas, son de sabor acre y aromático.

Cabe mencionar que ninguna de las especies pertenecientes a éste género ha sido objeto de estudios químicos previos, sin embargo, las numerosas investigaciones químicas realizadas sobre otras especies de la familia de las Umbelíferas, han permitido el aislamiento y caracterización de una gran diversidad de metabolitos secundarios de los tipos cumarinas simples, hidroxycumarinas, furanocumarinas, piranocumarinas (Estévez-Braun y González, 1997; Murray, 1978; 1991; 1995; 1997; O'Kennedy y Thornes, 1997), compuestos poliacetilénicos, ácidos cinámicos y flavonoides, sapogeninas triterpénicas, mono y sesquiterpenos, ftálicos acetogénicos, cromonas, fenilpropanoides, lactonas sesquiterpénicas, por mencionar los más relevantes (Hegnauer, 1978; González y Galindo 1978).

4.3 Antecedentes de la especie *Maxilaria densa* Lindley (Orchidaceae). *Maxillaria densa* Lindley (Orchidaceae) (Figura 4) es una epífita que se localiza principalmente en la selva alta y el bosque semiseco premontano a mesófilo, a una altitud de 600 a 1450 m sobre el nivel del mar. Se encuentra distribuida principalmente en los Estados de Chiapas, Veracruz, Oaxaca y Guerrero; en México y en algunas regiones de Guatemala y Honduras (Correll, 1952; Hietz y Hietz-Seifert, 1994).

M. densa es conocida en la medicina tradicional como “parásita” (Carmona, 1996) y se utiliza para el tratamiento de cólicos estomacales en la región de los Tuxtlas, Veracruz, México. Los individuos pertenecientes a esta especie son plantas colgantes con rizomas y pseudobulbos cubiertos por vainas de color café. Los pseudobulbos son de forma elíptica u ovalada, comprimidos y carinados y generalmente se encuentran foliados. Los pseudobulbos viejos se encuentran desfoliados. Las hojas son solitarias, lineares a lineares-oblongas, delgadas y coriáceas y miden de 10 a 30 cm de largo y de 1.5 a 4 cm de ancho. El ápice es obtuso y la base conduplicada. La base posee muchos pedúnculos cortos con una

flor que sale de la vaina que parcialmente cubre el pseudobulbo. La flor es de color amarillo verdosa a rosa, y cerca de la vena central de los sépalos y pétalos es de color violeta claro. El labelo de la flor es de color morado y los sépalos miden aproximadamente 1 cm de largo.

Una investigación previa de esta especie condujo al aislamiento y caracterización de los compuestos fenantrénicos conocidos como nudol (79), fimbriol (80), 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxifenantreno (81), 2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-9,10-dihidroxifenantreno (82), eriantridina (83) y gimnopusina (84) (Figura 5).



Figura 4. *Maxillaria densa* Lindley (Orchidaceae).

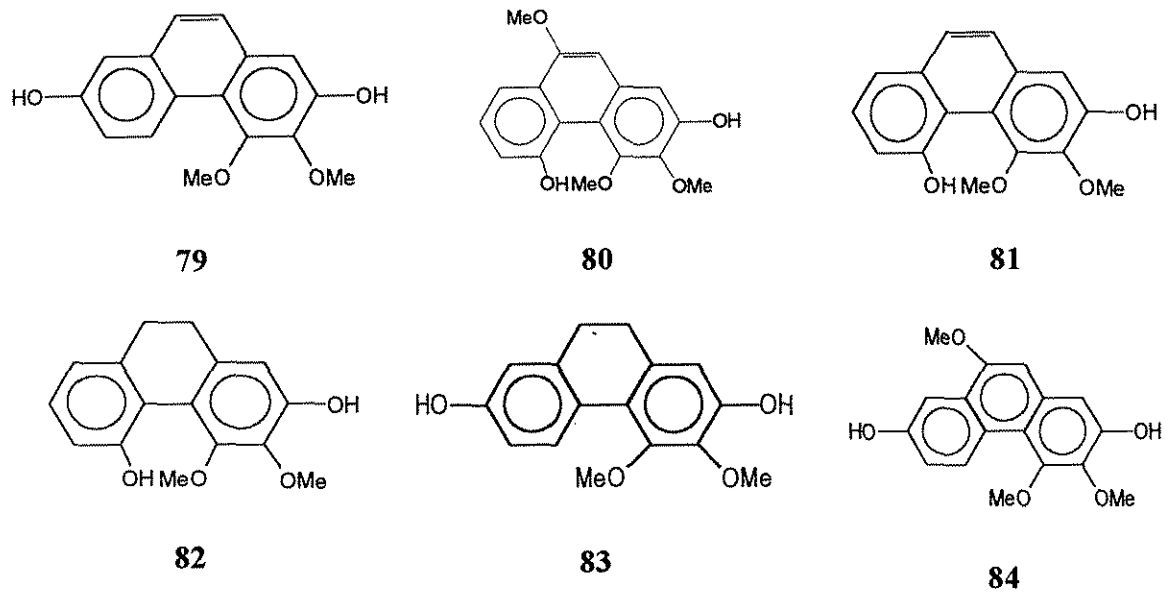


Figura 5. Compuestos aislados de *Maxilaria densa* Lindley (Orchdaceae).

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Ensayos biológicos

5.1.1 Evaluación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos, fracciones y compuestos puros sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*. La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos, fracciones y compuestos puros se realizó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae) y *Echinochloa crus-galli* (Beauv) L. (Graminae), utilizando el método en caja de Petri previamente descrito por Anaya y colaboradores (1990 y 1995). Las semillas empleadas para las evaluaciones de fitotoxicidad fueron adquiridas en el Valley Seed Service, Fresno, California, Estados Unidos.

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 6 cm de diámetro que contenían un disco de papel filtro (Whatman No 1). Cada una de las muestras a evaluar se disolvió en CH₂Cl₂ y se prepararon disoluciones con una concentración de 1, 10, 100 y 1000 µg mL⁻¹ para el caso de los extractos y fracciones. Para los compuestos puros se prepararon disoluciones con una concentración de 10, 50, 100 y 200 µg mL⁻¹. Posteriormente, 1 mL de las disoluciones se vertieron en las cajas de Petri y se permitió la evaporación del disolvente mediante una corriente de aire. A continuación, se inició la germinación de 60 semillas (20 por caja) de cada una de las especies de prueba, humedeciendo el papel filtro con 3 mL de agua destilada. Las cajas Petri se incubaron en la oscuridad a 27° C y la actividad fitotóxica se registró midiendo la longitud de las radículas y contando el número de semillas germinadas después de 24 horas para el caso de *A. hypochondriacus* y 48 horas para la semillas de *E. crus-galli*. Paralelamente se evaluaron controles positivos y negativos. Como el control positivo se utilizó el ácido 2,4-diclorofenoxiácetico (2,4-D, Sigma) y como control negativo CH₂Cl₂. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA ($P \leq 0.5$). Los valores de la concentración inhibitoria media se determinaron mediante el programa de análisis de probabilidad Finney (Mata, *et al.*, 1996).

5.1.2 Bioautografía directa para la detección de la actividad fitotóxica de las fracciones. Para detectar la actividad fitoinhibitoria del extracto total y de las fracciones primarias se utilizó un método bioautográfico. Los ensayos correspondientes se efectuaron empleando placas de vidrio de 20 x 5 cm, recubiertas de gel de sílice (gránulos de 0.63 – 0.2 mm, malla 230 ASTM. Merck). En cada placa se aplicaron 5.0 μg de las muestras a evaluar y posteriormente se desarrollaron con un sistema de elución adecuado empleando los métodos convencionales de cromatografía en capa fina. Concluido el proceso de elución, se permitió la evaporación completa del disolvente y las cromatoplasas se cubrieron con 20 mL de una suspensión de agar bacteriológico (DIFCO) al 1 %.

Una vez solidificada la suspensión se colocaron las semillas de prueba hasta cubrir completa y homogéneamente la superficie de las placas, las cuales se incubaron en una atmósfera húmeda a 20 °C durante 24 h (*A. hypochondriacus*) ó 48 h (*E. crus-galli*). Transcurrido el período de incubación, se observaron las zonas de inhibición y se determinó el factor de retención (*R_f*) correspondiente (Inoue *et al.*, 1992; Rahalison *et al.*, 1994; 1992). Este último procedimiento se realizó por comparación con una placa conteniendo la muestra de prueba, eluida en las mismas condiciones y revelada con un agente cromógeno apropiado (vainillina). Como control positivo se empleó el 2,4-D y todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

5.1.3 Determinación de la actividad fitotóxica sobre *Lemna pausicostata*. Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Tanaka y colaboradores (1993). Para ello, disoluciones del extracto y fracciones, a concentraciones de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o compuestos puros a concentraciones de 25, 50, 100, 200 μM en medio de Hunter (Becerril, *et al.*, 1992) (3 mL) de fuerza mediana se adicionaron a 10 colonias de *L. pausicostata* de 3 hojas cada una contenidas en una caja Petri. A continuación las placas se incubaron durante 72 horas en una cámara de crecimiento. Al cabo de este tiempo se procedió a medir la

inhibición del crecimiento de las plantas, la pérdida de electrolitos y la reducción del contenido de clorofila. La pérdida celular de electrolitos se determinó por el incremento en la conductividad eléctrica del medio de cultivo y se midió empleando un conductímetro, al inicio y al final del experimento. La reducción en el contenido de clorofila para cada tratamiento se determinó con base en el peso fresco de las plantas. Para ello, las colonias de *Lemna* se removieron del medio de cultivo, se secaron sobre toallas de papel y se pesaron. Acto seguido, se colocaron en tubos de ensayo que contenían 5 mL de DMSO y se mantuvieron en la oscuridad durante toda la noche. Al día siguiente, la clorofila total (*a* y *b*) se determinó por espectroscopía de UV de acuerdo al método de Hiscox e Israelstam (1971). Por último, la inhibición del crecimiento se determinó por diferencia en el peso fresco de las plantas, midiéndolo al inicio y al final del experimento.

5.1.4 Evaluación de la Interacción de los compuestos aislados y derivados químicos con calmodulina de espinaca y cerebro de bovino. La interacción de los compuestos de prueba con calmodulina de espinaca y de cerebro de bovino (Sigma) se determinó mediante una electroforesis desnaturizante SDS-PAGE sobre geles de poliacrilamida al 15% (Macías *et al.*; 2000), de acuerdo al procedimiento que se describe a continuación: en primer lugar se prepararon las muestras conteniendo 10 µg del compuesto de prueba (10 µL de una disolución de 1 µg mL⁻¹ en DMSO), 2 µg de calmodulina de espinaca (SIGMA) o de cerebro de bovino (SIGMA) y 3 µL de CaCl₂ 1 mM. La mezcla anterior se llevó a un volumen final de 20 µL con agua desionizada. Posteriormente, la mezcla se incubó durante 90 minutos a 30 °C. Al término de la incubación las muestras fueron sometidas a ebullición durante 5 minutos para detener la reacción. A continuación, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y finalmente, se les adicionó 10 µL de buffer de carga (Liao, *et al.*, 1996). Seguidamente se llevó a cabo una electroforesis vertical descendente en condiciones desnaturizantes para determinar si la calmodulina tratada experimentaba algún cambio en la movilidad electroforética. Este hecho indicaría la interacción de las fitotoxinas con CaM en presencia de Ca²⁺. Cada corrida electroforética se realizó por triplicado y el compuesto (2*S*,3*S*)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-4*H*-dihidronafto[2,3-*b*]piran-4-ona, que retarda la movilidad electroforética de la CaM, se empleó como control un positivo (Macías *et al.*, 2000).

5.1.5 Determinación de la actividad de los compuestos aislados sobre la respiración en mitocondrias aisladas de los hipocótilos de frijol mungo (*Vigna radiata*).

5.1.5.1 Aislamiento de la fracción mitocondrial de los hipocótilos de frijol mungo (*Vigna radiata*). En primer lugar, se aislaron las mitocondrias a partir de los hipocótilos de frijol mungo (*Vigna radiata*). Para ello, las semillas se desinfectaron previamente con una disolución de NaClO al 1% durante 30 minutos; transcurrido este tiempo se lavaron con agua destilada y se sometieron a imbibición durante 12 horas en agua. Acto seguido, las semillas se colocaron en un recipiente de aluminio en la oscuridad durante cinco días. Diariamente por la noche, las semillas se cubrieron con agua durante 10 minutos, luego se les escurrió en agua y permanecieron húmedas durante todo el día a una temperatura de 30 °C. Al cabo del quinto día, las semillas germinadas se colocaron en bolsas de hule negro y se almacenaron en el refrigerador. Para la preparación de la fracción mitocondrial, se removió el hipocótilo de las semillas y estos se refrigeraron durante 20 minutos. Posteriormente, el material (50 g.) se homogeneizó en una licuadora con 75 mL de medio de aislamiento (*vide infra*) durante 6 segundos. La mezcla resultante se filtró a través de ocho capas de gasa contenidas en un vaso de precipitados que se encontraba en un baño de hielo. El pH del filtrado se ajustó con trizma base (Tris-[hidroximetil]amino-metano) en un baño de hielo y el filtrado se centrifugó repetidamente hasta obtener la fracción mitocondrial de acuerdo al procedimiento resumido en la Figura 6 (Estabrook, 1967).

Las proteínas mitocondriales se cuantificaron de acuerdo al método de Bradford (1976). Para ello, se construyó una curva de calibración empleando albúmina de bovino como sustancia patrón. A partir de la disolución stock (100 mg mL^{-1}) se midieron 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 y 0.8 mL que se colocaron por separado en tubos de ensayo. Posteriormente, el contenido de cada tubo se completó a un volumen de 1 mL con agua destilada y se añadieron 5 mL del reactivo de Bradford (azul brillante de Comassie disuelto en etanol al 95 % y H_3PO_4). El blanco se preparó con 1 mL de agua destilada y 5 mL de reactivo de Bradford. La cantidad de proteínas en cada tubo se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman (Modelo DU 650).

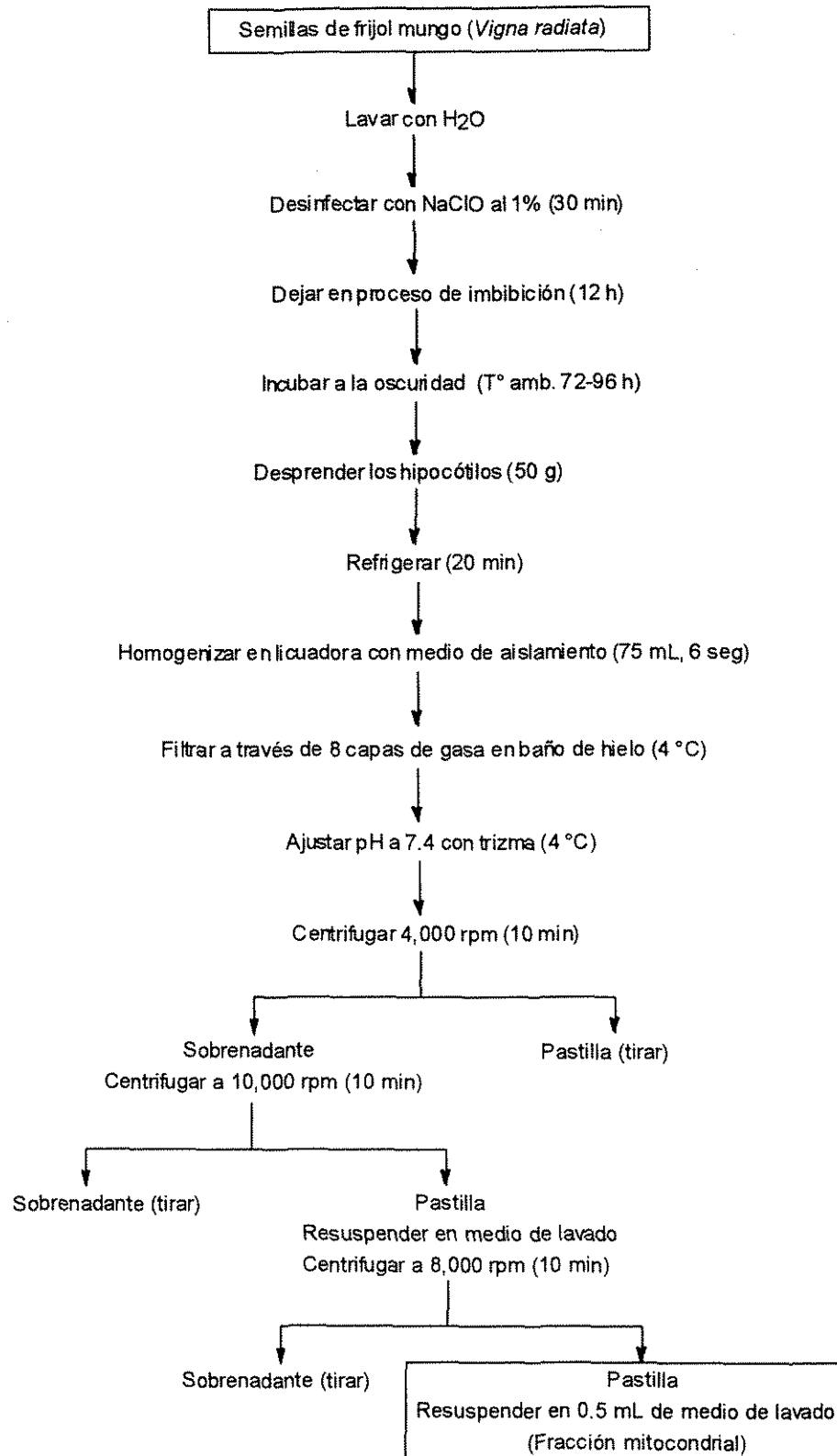


Figura 6. Aislamiento de la fracción mitocondrial a partir de los hipocótilos de frijol mungo (*Vigna radiata*).

5.1.5.2 Efecto de los compuestos 88, 89, 95, 96 y 97c sobre la fosforilación oxidativa. El efecto de los compuestos puros sobre la fosforilación oxidativa o estado 3 de la respiración se determinó al monitorear el consumo de O₂ que se requiere para la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi. El consumo de O₂ se midió mediante un ensayo polarográfico empleando un oxímetro Gilson-IC-oxy con un electrodo de O₂ tipo Clark. La cantidad de oxígeno consumido se calculó a partir de las pendientes de las gráficas obtenidas al registrarse los cambios de potencial redox. A partir de la cantidad de oxígeno consumido se calculó la rapidez de síntesis de ATP (en unidades de nmol O₂ min⁻¹ mg proteína⁻¹) mediante el empleo de la siguiente ecuación:

$$r = mm (1.28 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1})(1000)/\mu\text{g proteína adicionada}^{-1}$$

donde:

mm = lectura de la pendiente en milímetros

El ensayo se realizó de acuerdo a la metodología que se describe a continuación: a 1 mL del medio de reacción para la determinación de la actividad fosforilante (*vide infra*) se adicionó el sustrato [succinato (20 mM) ó malato-glutamato (5 mM) ó NADH (2 mM)]; ADP (2 mM), 30 µL de suspensión mitocondrial y por último los productos a evaluar a las concentraciones de 0.12, 0.12 y 1.2 mM. Los controles se leyeron al inicio y al final de cada experimento. El control negativo o blanco se preparó de igual manera pero sin las sustancias a evaluar. Los controles positivos utilizados se incorporaron al medio de reacción en una concentración apropiada y se seleccionaron dependiendo del sustrato adicionado. Cuando se utilizó succinato, el control positivo fue malonato (5 mM) y cuando se utilizó malato-glutamato o NADH, fue rotenona (5 mM). La rapidez obtenida en cada tratamiento se comparó con la rapidez del control. La relación ADP:O (en unidades de nmol ADP nátomos de O₂⁻¹) con la cual se midió la eficiencia de la fosforilación se determinó mediante el método de Estabrook, (1967) que se resume en la siguiente ecuación:

$$\text{ATP:O} = 200 \text{ nmol ADP}/[(\text{mm} \times 1.28 \text{ n\u00e1tomos de O}_2) \times 2]$$

donde:

mm = lectura del consumo de ox\u00edgeno en mil\u00edmetros al adicionar una cierta cantidad de ADP.

El control respiratorio (RCR) (adimensional) con el cual se midi\u00f3 la integridad de las mitocondrias se determin\u00f3 tambi\u00e9n mediante el m\u00e9todo de Estabrook, (1967) empleando la siguiente ecuaci\u00f3n.

$$\text{CR} = \text{rapidez del Estado 3}/\text{rapidez del Estado 4}$$

La composici\u00f3n de las soluciones empleadas en el ensayo arriba mencionado se describe a continuaci\u00f3n:

Medio de aislamiento de mitocondrias: manitol (0.3 M), EDTA [\u00e1cido tetraac\u00e9tico etilen glicol-bis-(\u03b2-aminoetil eter)-N,N,N',N'] (1.0 Mm), BSA [alb\u00famina s\u00e9rica de bovino] (1.0 %), ciste\u00edna (0.05 %), sorbitol (300Mm) y PVP [polivinil pirrolidona insoluble] (1.0 %). El pH se ajusta a 7.4 con trizma.

Medio de lavado: manitol (0.3 M), EDTA (1 mM), BSA (0.1 %), El pH se ajusta a 7.4 con trizma.

Medio de reacci\u00f3n para la determinaci\u00f3n de la actividad fosforilante: manitol (0.3 M), Buffer de fosfatos (10 mM), KCl (10 mM), MgCl₂ (5 mM), El pH se ajusta a 7.2 con KOH.

5.1.5.3 Determinaci\u00f3n del efecto de los compuestos sobre el transporte de electrones mitocondrial. La rapidez del transporte de electrones en el estado 4 se determin\u00f3 de manera similar a la fosforilaci\u00f3n oxidativa, con la diferencia de que en este caso no se adicion\u00f3 ADP al medio. As\u00ed, a 1 mL del medio de reacci\u00f3n (*vide supra*) se adicion\u00f3 el sustrato [succinato (20 mM), malato-glutamato (5 mM) \u00f3 NADH (2 mM)], 30 \u00b5L de suspensi\u00f3n mitocondrial y los compuestos de prueba a las concentraciones de 0.12, 0.12 y 1.2 mM. La rapidez obtenida en cada tratamiento se compar\u00f3 con la rapidez de los controles realizados al inicio y al final de cada experimento.

5.1.5.3.1 Reacciones parciales de la cadena transportadora de electrones. La determinación del flujo de electrones en la cadena transportadora de electrones se efectuó mediante un método espectrofotométrico utilizando para ello, un espectrofotómetro Beckman (Modelo DU 650). El ensayo se realizó empleando el medio de reacción general compuesto por: MOPS [ácido 3-(N-morfolino)-propansulfónico] (20 mM), KCl (120 mM), EGTA (2 mM), H₃PO₄ (2 mM) y BSA (0.1 %); a pH 7.4 ajustado con trizma. Al medio general se adicionaron desacoplantes, donadores y aceptores de electrones artificiales e inhibidores de la cadena redox como se indica a continuación.

5.1.5.3.1.1 Determinación de la actividad de los compuestos sobre el transporte de electrones en el complejo I. A 1 mL del medio general de reacción (*vide supra*) se adicionó 0.125 µg de proteína mitocondrial, NADH (200 µM), antimicina A (1µg) para bloquear el paso de los electrones al complejo III, KCN (100 µM) para bloquear el paso de los electrones al complejo IV y por último el compuesto a evaluar (0.012, 0.12 y 1.2 mM). La reacción se inició al adicionar DCPIP [sal sódica del 2,6-diclorofenolindofenol] (160 µM). La rapidez de reducción del DCPIP a 25 °C se determinó espectrofotométricamente mediante la variación de la absorbancia a 590 nm y para expresarla en términos de actividad específica (µmolesDCPIPred mg⁻¹ min⁻¹) se utilizó la siguiente ecuación:

$$r (\mu\text{molesDCPIPred mg}^{-1} \text{ min}^{-1}) = \Delta\text{ABS mg}^{-1} \times \varepsilon$$

donde:

ΔABS = cambio en la lectura de la absorbancia

ε = coeficiente de extinción molar

mg = cantidad de proteína adicionada en mg

El cambio en la actividad específica provocada por la adición de los productos naturales respecto a la del control indicó la actividad inhibitoria en este fragmento de la cadena respiratoria.

5.1.5.3.1.2 Determinación de la actividad de los compuestos sobre el transporte de electrones en el complejo II. A 1 mL del medio de reacción para el transporte de

electrones (*vide supra*) se adicionaron 2 mg de proteína mitocondrial, succinato (20 mM), rotenona (5 μ M) para bloquear el paso de electrones al complejo I, KCN (100 μ M) para bloquear el paso de electrones al complejo IV, el compuesto a evaluar (0.012, 0.12 y 1.2 μ M) y citocromo *c* (0.25 mg) para iniciar la reacción. La rapidez de reducción del citocromo *c*, se determinó espectrofotométricamente a 600 nm a 25 °C y está expresada en términos de actividad específica (μ molescitocromo *c* red $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$). Para el cálculo de la rapidez se utilizó la ecuación indicada en el inciso 5.1.5.3.1.1 y de igual forma, el cambio en la actividad específica provocada por los productos naturales respecto al control indicó la actividad inhibitoria en este fragmento de la cadena respiratoria.

5.1.5.3.1.3 Determinación de la actividad de los compuestos sobre el transporte de electrones en los complejos II y III. A 1 mL del medio de reacción para el transporte de electrones (*vide supra*) se adicionó succinato (20 mM), rotenona (5 μ M), KCN (100 μ M), el compuesto a evaluar (0.012, 0.12 y 1.2 μ M) y 2 mg de proteína mitocondrial. El inicio de la reacción se llevó a cabo por la adición de DCPIP (80 μ M). La rapidez de reducción del DCPIP se determinó de igual manera que en inciso 5.1.5.3.1.1

5.1.5.3.1.4 Determinación de la actividad de los compuestos sobre el transporte de electrones en los complejos III y IV. La rapidez del transporte de electrones en los complejos III y IV de TMPD a O₂ se determinó también mediante el ensayo polarográfico descrito en el inciso 5.1.5.2. A 1 mL del medio de reacción (*vide supra*) se adicionó NADH (200 μ M), antimicina A (1 μ g) para bloquear el paso de los electrones al complejo III, 2 mg de proteína mitocondrial y TMPD [N,N,N',N'-tetrametil-*p*-fenilendiamina] (0.6 mM) para iniciar la reacción. Acto seguido se adicionó al compuesto de prueba en el intervalo de concentraciones antes citado. La reacción finalizó al adicionar KCN (100 μ M) al medio. Los controles se leyeron al inicio y al final de cada experimento y la rapidez en el consumo de oxígeno obtenida en cada tratamiento se comparó con la rapidez del control.

5.1.6 Evaluación del efecto de la jatamansina (88), de la (9*R*)-9-hidroxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (89) y del (3*R*)-2-metil-but-(2*Z*)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipirano

(95) sobre los eventos fotoquímicos primarios de la fotosíntesis en hojas de frijol mungo (*Vigna radiata*) y frijol ojo de cabra (*Phaseolus vulgaris*).

5.1.6.1 Desarrollo de las plántulas de frijol mungo y frijol ojo de cabra. Las semillas de frijol mungo (*Vigna radiata*) y frijol ojo de cabra (*Phaseolus vulgaris*) se desinfectaron previamente con una disolución de NaClO al 1% durante 30 minutos; transcurrido este tiempo se lavaron con agua destilada y se imbibieron durante toda la noche. Acto seguido, las semillas se sembraron en una charola con agrolita humedecida a saturación con medio de Hoaglan y se incubaron por 10 días en una cámara de crecimiento en condiciones controladas de luz ($70 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperatura (24-26 °C), humedad relativa (60%) y con un fotoperiodo de 16 h de luz y ocho horas de obscuridad.

5.1.6.2 Preparación de la muestra. Una vez desarrolladas las plántulas, se desprendieron las hojas que presentaban buen desarrollo. A continuación se procedió a colocar 10 hojas en cajas Petri conteniendo 5 mL de la disolución de la muestra de prueba (extracto o compuesto puro) a las concentraciones de 1000, 100 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en etanol al 5% en el caso del extracto y de 100, 10 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el caso de los compuestos puros. Como control positivo se utilizó DCMU [3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea] (10 y 100 mM), también se hicieron controles del medio y del disolvente empleado para solubilizar las muestras. Una vez preparadas las muestras, se incubaron durante 20 horas bajo luz blanca a una temperatura de 26 °C.

5.1.6.3 Parámetros de medición de la fluorescencia de la clorofila. Los parámetros de fluorescencia de la clorofila se obtuvieron con un analizador de la eficiencia de plantas (Handy-PEA) Hansatech. Los parámetros que se midieron fueron: F_0 (fluorescencia mínima cuando el conjunto de plastoquinonasceptoras de electrones Q_A está totalmente oxidado); F_m (nivel de fluorescencia cuando Q_A está completamente reducido); F_v (fluorescencia variable ($F_m - F_0$), F_v/F_m (máxima eficiencia fotoquímica del fotosistema II); \int (área sobre la curva entre F_0 y F_m relacionada al tamaño del conjunto de los aceptores del transporte de electrones); T_{fm} (tiempo en el cual se alcanza la F_m). Los parámetros que se calcularon fueron: ABS/CS (absorción de energía por sección transversal); TRo/CS

cuando F_o) y RC/CSm (centros de reacción abiertos por sección transversal cuando F_m). Las mediciones se hicieron en la hoja después de 15 minutos de permanencia en la obscuridad. Las hojas se expusieron 5 s a la luz de 650 nm y a un flujo de fotones de densidad de $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la superficie de la hoja, utilizando una fuente de luz ultra brillante roja de tres diodos emisores de luz. Los datos se registraron y procesaron empleando el programa Handy-PEA.

Los parámetros de F_v/F_v' (eficiencia de la antena del fotosistema II), ϕ_{PSIIIR} (eficiencia cuántica del fotosistema II), qP (coeficiente de trabajo fotoquímico), qNP coeficiente de trabajo no fotoquímico), NPQ (definición alterna de trabajo no fotoquímico) y ETR (rapidez de transporte de electrones) se determinaron mediante un sistema de monitoreo de fluorescencia (FMS2) Hansatech, de acuerdo al protocolo de Genty y colaboradores (1989).

La muestra en la pinza para hojas de PAR/temperatura se expuso a un haz de luz débil ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para obtener F_o ; después se sometió durante 15 s a un pulso de alta intensidad ($8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de luz blanca por 20 ms para obtener F_m . Veinte segundos más tarde, la muestra se expuso a un haz continuo de luz blanca actínica ($600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 2 minutos para obtener F_s (fluorescencia de estado estático). Posteriormente, la muestra se expuso a un pulso de luz alta intensidad ($8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 5 ms para obtener $F'm$ (fluorescencia máxima de estado estático). Diez segundos más tarde, la luz actínica continua se apagó y 10 s después se aplicó un pulso de luz roja lejana para obtener F_o' .

5.1.7 Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos y compuestos puros. El potencial citotóxico se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por Shier y colaboradores (1991). Las líneas celulares utilizadas fueron las siguientes: MDCK (células de riñón de perro Mandin-Darby), H4TG (células de hepatoma de rata resistentes a tioguanina), NIH3T3 (fibroblastos embrionarios de ratón suizo del National Institute of Health) y KA31T (cepa Kirsten de células 3T3 transformadas por el virus del sarcoma).

La sensibilidad de cada una de las líneas celulares hacia el extracto y los compuestos puros se determinó a las concentraciones de 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2 y 1 μM . Cada compuesto se evaluó por triplicado y como control positivo se utilizó adriamicina. Los valores promedio de las absorbancias y los errores estándar se emplearon para evaluar el crecimiento después de 5 días. La CI_{50} se determinó mediante el análisis de varianza del mínimo cuadrado de las medias del porcentaje de inhibición para cada tratamiento, respecto a los controles sin tratamiento.

5.1.8 Evaluación de los cambios celulares inducidos por los tratamientos de la gimnopusina (84) sobre cortes semifinos de las hojas y raíces de *Lemna pausicostata*.

Los cambios estructurales inducidos por la gimnopusina (84) en las hojas y raíces de *Lemna pausicostata* se determinaron mediante microscopía electrónica en el servicio de investigación del departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

5.1.8.1 Preparación de las muestras. Cada muestra se preparó por triplicado y para ello, se siguió un procedimiento muy similar al que se utilizó en el punto 5.1.3 para el ensayo sobre *Lemna*. En este caso, veinte colonias de las plántulas de tres hojas cada una, se transfirieron asépticamente a cajas de Petri de poliestireno de 3.5 cm de diámetro conteniendo DMSO (1% v/v) en medio de Hunter de fuerza mediana como control o una disolución de la gymnopusina en DMSO (25, 50, 100 y 200 μM). En este experimento se utilizaron 5 mL de medio de cultivo y el experimento se registró durante 3 días. Cada 12 h se determinó la pérdida de electrolitos al medio en cada tratamiento y se tomaron muestras de los tejidos para su posterior análisis por microscopía.

5.1.8.2 Análisis por microscopía electrónica. Este análisis se llevó a cabo colocando los tejidos de *L. pausicostata*, obtenidos cada 12 h, dentro de un fijador constituido por una gota de glutaraldehído al 0.4% en buffer de ácido cacodílico 0.01 M, a pH 7.0. El tejido, adentro del fijador, se cortó con una navaja de afeitar y se transfirió a un vial que contenía más fijador con buffer. Después de hora y media de tratamiento, el tejido se lavó con glutaraldehído libre de buffer durante 6 h, haciendo cambios de la disolución fijadora cada hora. A continuación, el tejido se sometió a una post-fijación durante 1 h en una disolución

de tetraóxido de osmio al 1% en buffer de cacodilato 0.05 M a pH 7.0. Después de enjuagar con agua destilada (6 cambios) por un periodo de 1 h, el tejido se deshidrató mediante cantidades crecientes de acetona acuosa. Cuando el porcentaje de acetona empleado durante la deshidratación llegó al 100%, el tejido se infiltró y se polimerizó utilizando medio de Spurr.

El tejido polimerizado se cortó en secciones semi-delgadas mediante un microtomo Leica Ultracut E con punta de diamante. Los cortes semidelgados se colocaron en un porta objetos de vidrio, se tiñeron con azul de toluidina y se observaron en un microscopio de luz. Posteriormente se realizaron cortes más delgados, los cuales se tiñeron con citrato de plomo y acetato de uranilo de Reynolds. Por último, los cortes ultrafinos teñidos se observaron y fotografiaron en un microscopio de transmisión electrónica Zeiss E.

5.2 Estudio químico de los extractos activos obtenidos a partir de las partes aéreas de *Prinosciadium watsoni* y *Maxilaria densa*.

5.2.1 Procedimientos experimentales generales. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros en el IR se midieron en un espectrómetro Perkin Elmer 599. Los espectros en el UV se obtuvieron en un espectrómetro Shimadzu 160 UV en disolución de MeOH. Las rotaciones ópticas se tomaron en un polarímetro JASCO DIP-360. Los espectros de RMN, incluyendo los experimentos bidimensionales de COSY, NOESY, HMQC y HMBC, se obtuvieron en un espectrómetro Varian UNITY PLUS 500 en CDCl₃ ó MeOD a 300 MHz ó 500 MHz (¹H), ó 75 MHz ó 125 MHz (¹³C), o bien en un espectrómetro Bruker DMX500 a 500 MHz (¹H) o 125 MHz (¹³C), empleando tetrametil silano (TMS) como estándar interno. Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas JEOL JMS-AX505HA, a una energía de ionización de 70 eV. La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se llevó a cabo en un equipo Waters con un detector de arreglo de fotodiodos de UV (900) colocado a 190-350 nm, empleando una columna preparativa de gel de sílice (μ -porasil 10 Å, 100 mm d.i. x 300 mm). El control del equipo, la adquisición de los datos, el procesamiento y el manejo de la información cromatográfica se llevó a cabo a través de

programa Millenium 2001(Waters). La cromatografía en columna (CC) se desarrolló sobre gel de sílice 60 (malla 70–230, Merck) y la cromatografía en capa fina (CCF) analítica y preparativa se realizó empleando cromatoplasmas de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck). Como agente cromógeno se empleó una disolución reveladora de vainillina (disolución 1: HCl 1N en MeOH y disolución 2: vainillina al 10% en MeOH) y para el desarrollo del color fue necesario calentar la cromatoplasma en una parrilla a 110 °C por dos minutos. Alternativamente, las placas se visualizaron con una lámpara de luz UV (onda corta y larga).

5.2.2 Extracción y fraccionamiento primario de las partes aéreas de *Prinosciadium watsoni*. El material vegetal de *P. watsoni*. completamente seco y molido (1.8 kg), se extrajeron mediante un proceso de maceración exhaustiva con una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (1:1) (7L). a temperatura ambiente. El extracto obtenido (345.2 g, IC₅₀= 53.3 µg mL⁻¹ para *A. hypochondriacus*; IC₅₀= 1114.5 µg mL⁻¹ para *E. crusgalli*), se sometió a un fraccionamiento primario a través de una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (1200 g). La columna se eluyó con de mezclas de hexano-AcOEt (1:0→0:1) y AcOEt-MeOH (9:1→1:1). Este proceso (Tabla 6) condujo a la obtención de 49 fracciones que se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica en ocho fracciones primarias (F₁-F₈). En la Figura 7 se resumen los procesos de extracción y fraccionamiento primario del extracto activo de *P. watsoni*.

Tabla 6. Fraccionamiento primario del extracto activo de las partes aéreas de *Prinosciadium watsoni*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones combinadas	
Hex	100	1-4	F1*
Hex:AcOEt	90:10	5-9	F2*
Hex:AcOEt	80:20	10-16	F3*
Hex:AcOEt	70:30	17-23	F4*
Hex:AcOEt	50:50	24-40	F5*
AcOEt	100	41-43	F6
AcOEt:MeOH	90:10	44-46	F7
AcOEt:MeOH	50:50	47-49	F8

*Fracciones fitotóxicas de acuerdo al bioensayo descrito en el inciso 5.1.1.

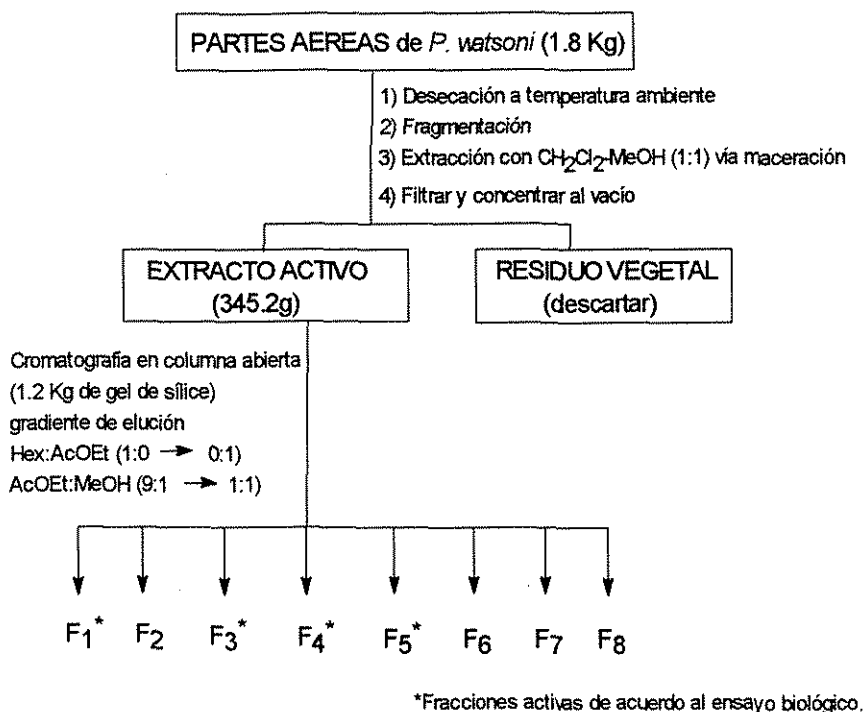


Figura 7. Extracción y fraccionamiento primario del extracto activo de *P. watsoni*.

5.2.2.1 Obtención de los compuestos (9*R*,10*R*)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (85), seravshanina (86) y quianhucumarina D (87) a partir de la fracción primaria activa F4. La fracción activa F4 se trató con una mezcla de hexano-AcOEt (5:3). Como resultado de este tratamiento precipitó de manera espontánea un polvo blanco (35 g) constituido por tres productos. Parte de esta mezcla (200 mg) se purificó mediante sucesivas cromatoplas preparativas en capa fina (hexano-AcOEt 3:1). Este proceso permitió la obtención de los compuestos **85** (60 mg), **86** (130 mg) y **87** (1 mg).

5.2.2.2 Obtención de la jatamansina (88) y del compuesto (9*R*)-9-isobutiroliloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (89) a partir de la fracción primaria activa F4. La Figura 8 resume la metodología general para el aislamiento y purificación de los compuestos **88** y **89** a partir de la fracción primaria bioactiva F4. Las aguas madres provenientes de la fracción F4 (109 g), se sometieron a una

cromatografía en columna abierta empleando 734 g de gel de sílice y un gradiente de elución de hexano-AcOEt. Este proceso condujo a la obtención de 19 fracciones secundarias (F4I-XIX). En la Tabla 7 se resume el fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa F4.

Tabla 7. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F4.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas
Hexano	100	1-6	1-8 F4I
Hex:AcOEt	98:2	7-10	5-9 F4II
Hex:AcOEt	95:5	11-22	10-16 F4III
Hex:AcOEt	90:10	23-46	17-23 F4IV
Hex:AcOEt	85:15	47-98	27-39 FV
Hex:AcOEt	80:20	99-119	40-47 FVI
Hex:AcOEt	70:30	120-131	48-61 FVII
Hex:AcOEt	60:40	132-147	62-98 FVIII
Hex:AcOEt	50:50	148-154	99-113 FIX
Hex:AcOEt	25:75	155-160	114-120 FX
AcOEt	100	161-166	121-127 FXI
			128 FXII
			129-134 FXIII
			135-147 FXIV
			148 FXV
			149-151 FXVI
			152-154 FXVII
			155 FXVIII
			156-166 FXIX

La aplicación del bioensayo bioautográfico a las fracciones secundarias F4I-F4XIX indicó que la actividad fitotóxica se concentraba en las fracciones F4VI (6.07 g) y F4IX (8.6 g). La fracción secundaria F4VI (0.5 g), se sometió a una cromatografía sobre gel de sílice (81 g) empleando como eluyente mezclas de hexano-AcOEt (1:0 → 0:1). Este proceso generó 10 fracciones terciarias. La Tabla 8 resume el fraccionamiento terciario de la fracción secundaria activa F4VI.

El ensayo bioautográfico de las fracciones terciarias F4VI(1)-F4VI(10) permitió determinar que la actividad fitotóxica se concentraba en la fracción F4VI(6) (4.92 g). Los compuestos

88 (50 mg) y **89** (12 mg) se obtuvieron a partir de 200 mg de la fracción activa F4VI(6), luego de sucesivas cromatoplasmas preparativas en capa fina. Como eluyente se empleó una mezcla compuesta por hexano-AcOEt (3:1) y cada placa se eluyó seis veces.

Tabla 8. Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria activa F4VI.

Eluyente	Proporción (%)	Fraciones recolectadas	Fraciones combinadas
Hexano	100	1-10	1-19 F4VI(1)
Hexano	100	11-17	20-21 F4VI(2)
Hex:AcOEt	90:10	18-61	22-27 F4VI(3)
Hex:AcOEt	85:15	62-73	28-34 F4VI(4)
Hex:AcOEt	80:20	74-79	35 F4VI(5)
Hex:AcOEt	70:30	80-105	36-56 F4VI(6)
Hex:AcOEt	50:50	106-110	57-60 F4VI(7)
AcOEt	100	111-115	61-100 F4VI(8)
			101-105 F4VI(9)
			106-115 F4VI(10)

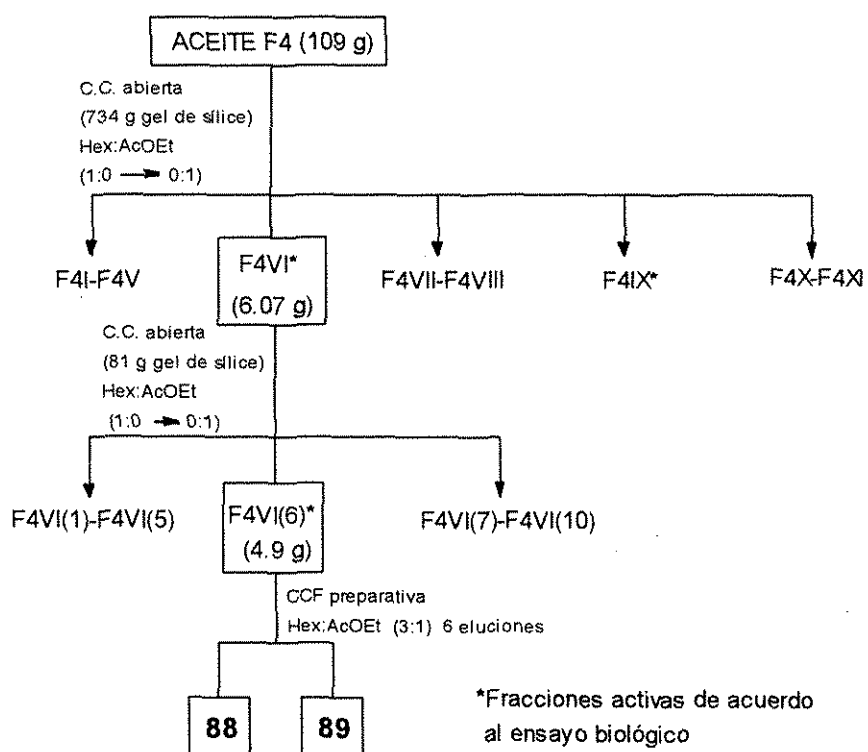


Figura 8. Aislamiento y purificación de los compuestos **88** y **89** a partir de la fracción primaria bioactiva F4.

5.2.2.3 Obtención de los compuestos (9R,10R)-9-hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (2), quianhucumarina A (90), (9R,10R)-10-hidroxi-9-(2-metil-but-(2Z)-enoiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (91) y (9R,10R)-10-hidroxi-9-(2-metil-but-(2E)-enoiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (92), a partir de la fracción secundaria activa F4IX. La fracción secundaria activa F4IX, se sometió a una cromatografía en columna sobre gel de sílice (151.0 g) y como fase móvil se emplearon mezclas de hexano-AcOEt (1:0 → 0:1) y de AcOEt-MeOH (1:1). El proceso anterior condujo a la obtención de 10 fracciones terciarias [F4IX(1)–F4IX(10)] (Tabla 9). De nueva cuenta, el ensayo bioautográfico demostró que la fitotoxicidad se concentraba en la fracción terciaria F4IX(5). Esta última fracción se recromatografió en una columna de gel de sílice (217.8 g). La elución en este caso se realizó con un gradiente de CH₂Cl₂-MeOH (1:0→1:1) obteniéndose siete fracciones cuaternarias [F4IX(5)(I)–F4IX(5)(VII)] (Tabla 10). El ensayo bioautográfico permitió determinar que la actividad fitotóxica se concentraba en la fracción F4IX(5)(V) (4.9 g). La purificación por CLAE de la fracción cuaternaria activa F4IX(5)(V) (100 mg) empleando una columna de gel de sílice [10 mL min⁻¹, Hex:*i*-PrOH:MeOH (95:2.5:2.5), λ 230 nm] permitió la obtención de los metabolitos **93** (15 mg), **90** (5 mg), **91** (5 mg) **92** (5 mg) y cantidades adicionales de **85** (20 mg). Los tiempos de retención de los compuestos obtenidos fueron 18.6, 19.1, 26.3, 27.4 y 29.5 min, respectivamente. La Figura 9 resume el aislamiento y purificación de estos compuestos a partir de la fracción secundaria activa F4IX. La Figura 10 se muestra el cromatograma obtenido por CLAE de esta fracción.

Tabla 9. Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria activa F4IX.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas
Hexano	100.0	1-56	1-33 F4IX(1)
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	99.95:0.05	57-100	34-46 F4IX(2)
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	98.0:2.0	101-108	47-69 F4IX(3)
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	97.0:3.0	109-113	70-78 F4IX(4)
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	95.0:5.0	114-122	79-88 F4IX(5)
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	90.0:10.0	123-138	89-105 F4IX(6)
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	50.0:50.0	138-143	106-143 F4IX(7)

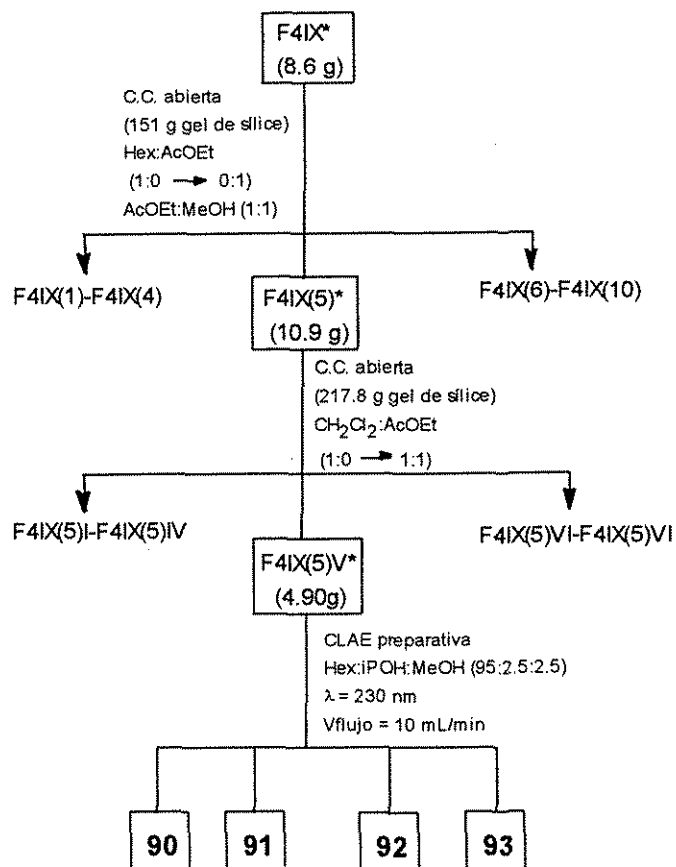


Figura 9. Aislamiento y purificación de los compuestos 90, 91, 92 y 93 a partir de la fracción secundaria bioactiva F4IX.

Tabla 10. Fraccionamiento cuaternario de la fracción terciaria activa F4IX(V).

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas
CH ₂ Cl ₂	100.0	1-56	1-33 F4IX(5)(I)
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	99.95:0.05	57-100	34-46 F4IX(5)(II)
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	98.0:2.0	101-108	47-69 F4IX(5)(III)
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	97.0:3.0	109-113	70-78 F4IX(5)(IV)
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	95.0:5.0	114-122	79-88 F4IX(5)(V)
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	90.0:10.0	123-138	89-105 F4IX(5)(VI)
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	50.0:50.0	138-143	106-143 F4IX(5)(VII)

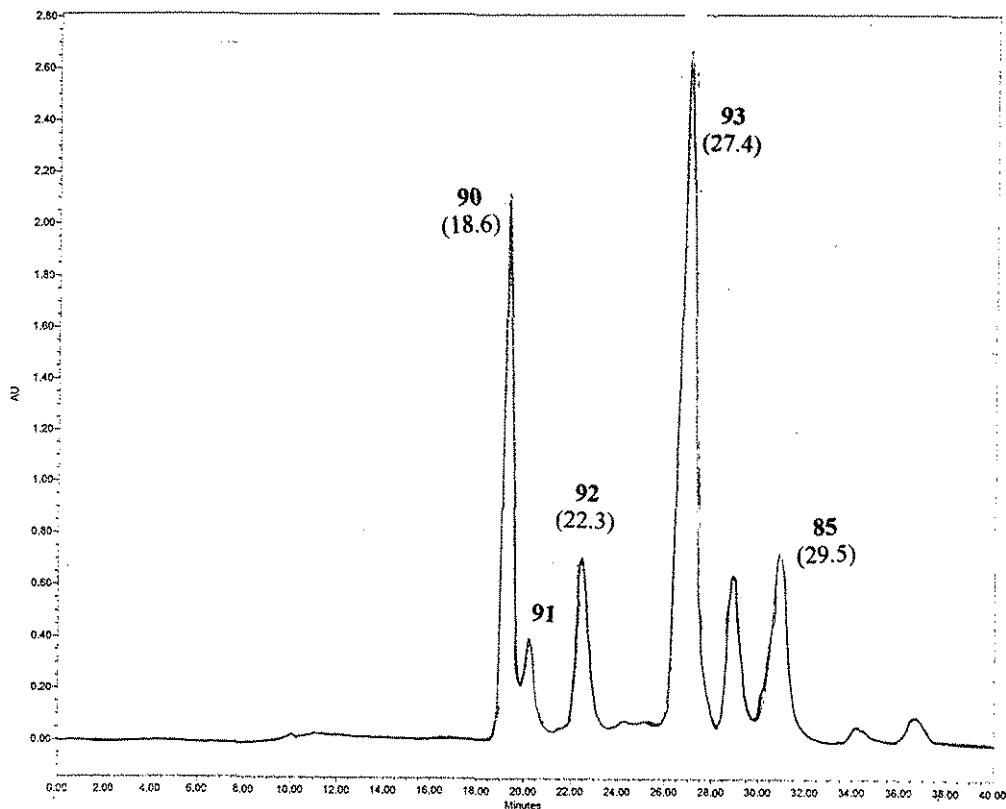


Figura 10. Cromatograma obtenido por CLAE de la fracción cuaternaria activa F4IX(5)(V).

5.2.2.4 Obtención de los compuestos (+)-*cis*-kelactona (94), (3*R*)-2-metil-but-(2*Z*)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipirano (95) y (3*R*)-isobutiroiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipirano (96) a partir de la fracción primaria activa F5. La Figura 11 resume la metodología general para el aislamiento y purificación de los compuestos **94**, **95** y **96** a partir de la fracción primaria activa F5. Esta fracción (12.7 g) se resolvió mediante una columna cromatográfica de gel de sílice (182 g) eluida con mezclas de hexano-AcOEt (1:0 → 0:1) y AcOEt-MeOH (9:1 → 1:1). Este proceso, condujo a la obtención de 23 fracciones secundarias (F5I-F5XXIII), reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica (Tabla 11). La bioautografía indicó que la fitotoxicidad se concentraba en las fracciones secundarias F5XII (607.4 mg) y F5XIII (1.5 g). La purificación posterior de la fracción activa F5XII por CLAE [10 mL min⁻¹, Hex:*i*-PrOH:MeOH (95:2.5:2.5), λ 230 nm] permitió la obtención

del producto natural **94** (20 mg), con un tiempo de retención de 25.2 min (Figura 12). Por otro lado, la purificación exhaustiva mediante CLAE de la fracción F5XIII (200 g, [10 mL/min, Hex:*i*-PrOH:MeOH (90:5.0:5.0), λ 230 nm]), condujo a la obtención de los metabolitos **95** (60 mg) y **96** (10 mg) cuyos tiempos de retención fueron de 20.20 min y 20.94 min, respectivamente. La Figura 13 muestra el cromatograma obtenido por CLAE de esta fracción.

Tabla 11. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F5.

Eluyente	Proporción (%)	Fraciones recolectadas	Fraciones combinadas
Hexano	100	1-6	1-8 F5I
Hex:AcOEt	98:2	7-10	5-9 F5II
Hex:AcOEt	95:5	11-22	10-16 F5III
Hex:AcOEt	90:10	23-46	17-23 F5IV
Hex:AcOEt	85:15	47-98	27-39 F5V
Hex:AcOEt	80:20	99-119	40-47 F5VI
Hex:AcOEt	70:30	120-131	48-61 F5VII
Hex:AcOEt	60:40	132-147	62-98 F5VIII
Hex:AcOEt	50:50	148-154	99-113 F5IX
Hex:AcOEt	25:75	155-160	114-120 F5X
AcOEt	100	161-166	121-127 F5XI
			128 F5XII
			129-134 F5XIII
			135-147 F5XIV
			148 F5XV
			149-151 F5XVI
			152-154 F5XVII
			155 F5XVIII
			156-166 F5XIX

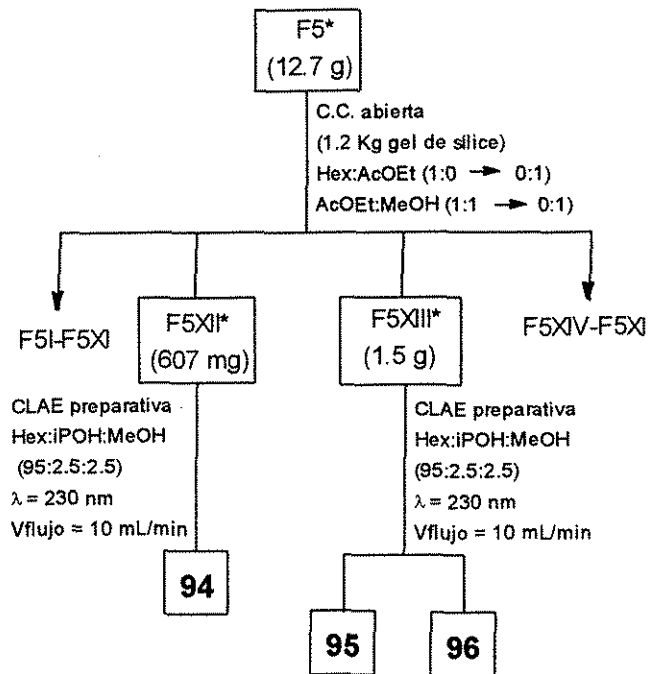


Figura 11. Aislamiento y purificación de los compuestos 94, 95 y 96 a partir de la fracción primaria activa F5.

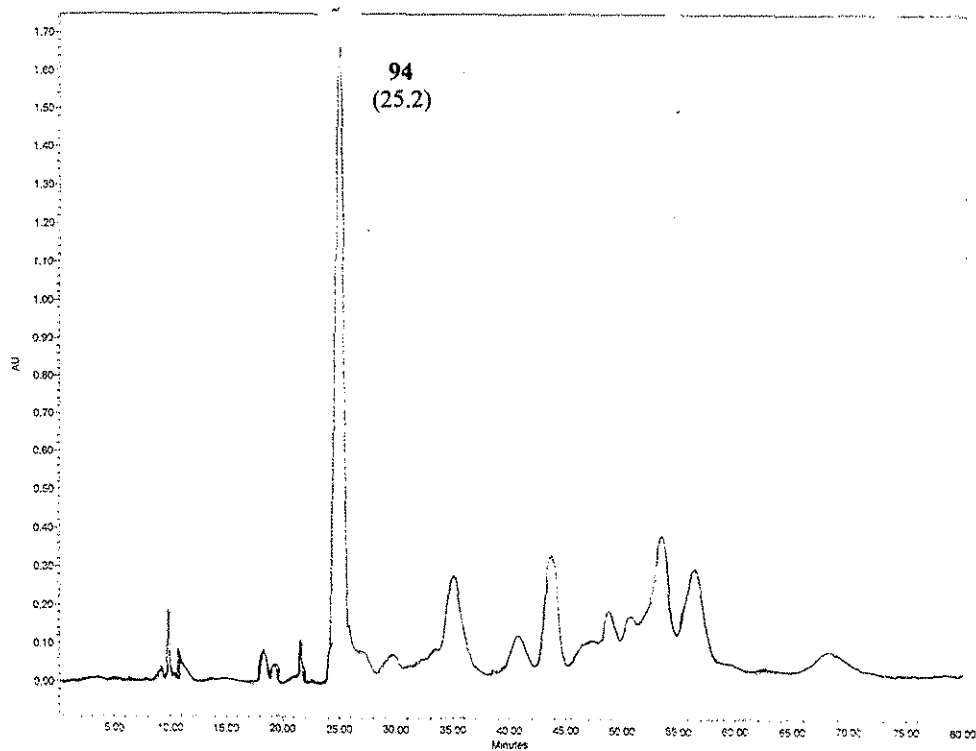


Figura 12. Cromatograma por CLAE de la fracción secundaria activa F5XII.

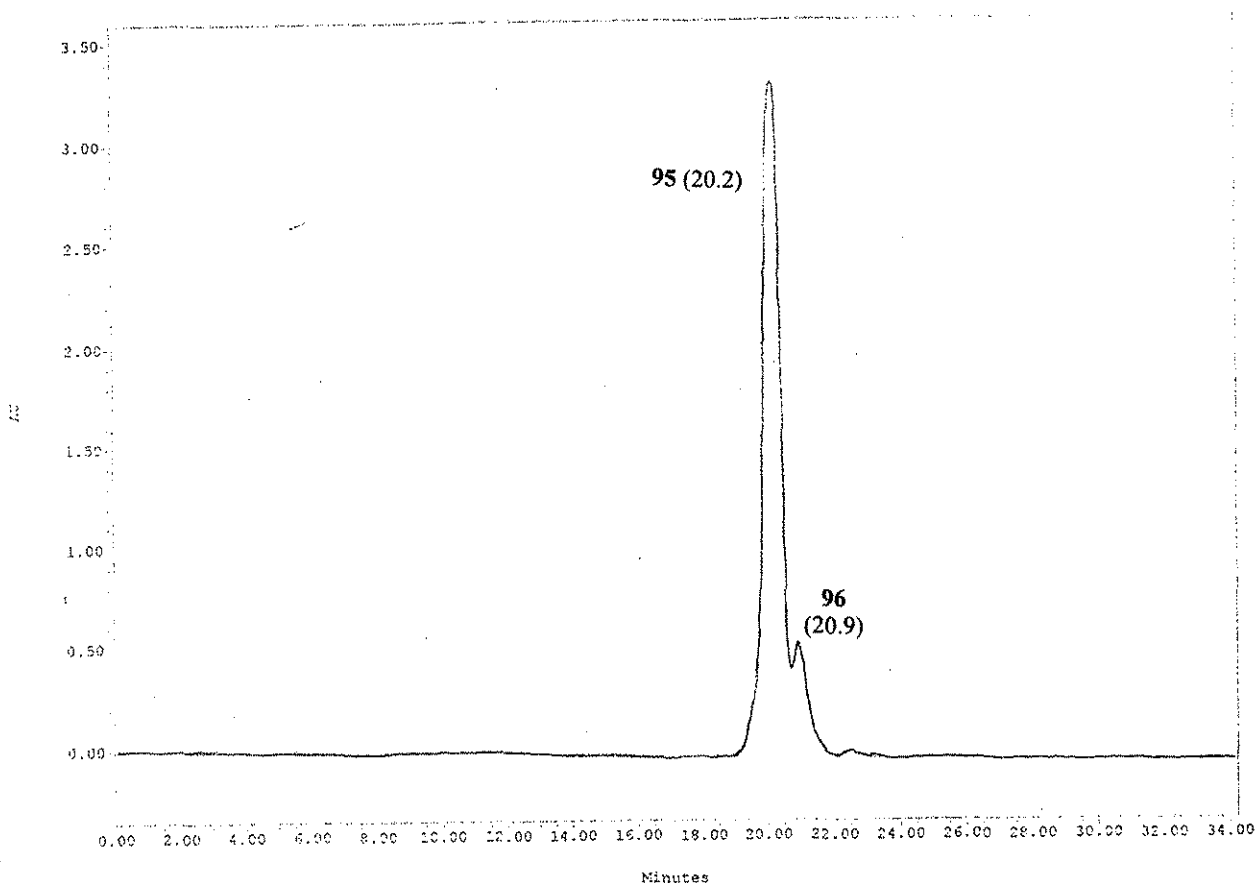


Figura 13. Cromatograma por CLAE de la fracción secundaria activa F5XIII.

5.2.2.5 Preparación de la (+)-*cis*-metilkelactona (97c) y la (-)-*trans*-metilkelactona (97t). Una disolución de **85** (50 mg) ó **93** (10 mg) en 3 mL de MeOH se mezcló con 3.5 mL de HCl 1 N en metanol. La mezcla resultante se calentó a reflujo por 22 hr. Al cabo de este tiempo, la mezcla de reacción se diluyó con 18 mL de agua y su pH se ajustó a 8 con una solución acuosa de NaHCO₃ al 10%. Posteriormente se concentró *in vacuo* para remover el MeOH y se extrajo en repetidas ocasiones con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). Las fases orgánicas se lavaron con agua y se secaron sobre Na₂SO₄ anh. Una vez eliminado el disolvente, la mezcla de reacción se purificó vía cromatografía preparativa sobre gel de sílice [hexano-AcOEt (7:3)]. Este proceso permitió la obtención de los derivados **97c** (10 mg): pf 118-119 °C, $[\alpha]^{20} + 690$ (*c* 1 mg mL⁻¹, CHCl₃) y **97t** (15 mg): mp 157-158 °C; $[\alpha]^{20} - 336$ (*c* 1 mg mL⁻¹ CHCl₃). Los datos espectroscópicos y espectrométricos de **97c** y **97t**, incluyendo UV, IR, para la *cis*metilkelactona y ¹³CNMR, fueron idénticos a aquellos previamente descritos en la literatura (Lemmich *et al.*, 1969).

5.2.2.6 Preparación de (+)-lomatina (98). A una disolución de **88** ó **89** (10 mg de cada uno) en 2 mL de MeOH se adicionaron 2mL de KOH 1 N en metanol. La reacción se calentó a reflujo por 3.5 h. A continuación, cada mezcla se diluyó con agua destilada y se concentró *in vacuo* para remover el disolvente orgánico. La fase acuosa se acidificó con H₂SO₄ 2N (2 mL) y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica resultante se lavó sucesivamente con una disolución acuosa al 10% de NaHCO₃ y agua y, por último, se secó sobre Na₂SO₄ anh. En cada caso el producto resultante se purificó por cromatografía en capa fina preparativa [hexano-AcOEt (1:1)] obteniéndose el derivado **98** (5 mg): pf 184-185 °C; [α]²⁰ + 210 (*c* 1 mg/mL, CHCl₃). Los datos espectroscópicos y espectrométricos, incluyendo UV, IR, ¹HNMR y ¹³CNMR, fueron idénticos a aquellos previamente descritos en la literatura para la (+) lomotina (Nielsen *et al.*, 1971; Shanbagh *et al.*, 1964; Bolhman y Franke, 1971).

5.2.2.7 Preparación del (+)-5-metoxihamaudol (100). El producto **100** se obtuvo a partir de **95** (10 mg) ó **96** (5 mg) siguiendo una estrategia similar a la descrita en el inciso 5.2.2.6. En total se generaron 5 mg de **100** a partir de **95** y 2 mg a partir de **96**. El producto **100** se obtuvo como un sólido cristalino, pf 137-138 °C; [α]²⁰ + 560 (*c* 1 mg/mL CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 6.02 (1H, q, *J* = 0.75 Hz, H-3), 6.61 (1H, s, H-6), 4.75 (1H, dd, *J* = 4.5, 8.24 Hz, H-3'), 3.34 (1H, dd, *J* = 4.25, 8.24 Hz, H-4'), 1.29 (3H, s, H-5'), 1.23 (3H, s, H-5'), 2.32 (1H, d, *J* = 0.75 Hz, CH₃), 3.92 (1H, s, -OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 179.80 (C-2), 166.58 (C-4), 166.43 (C-7), 161.44 (C-5), 156.96 (C-8a), 118.47 (C-8), 111.54 (C-4a), 111.49 (C-3), 92.65 (C-2'), 72.25 (C-3'), 61.04 (-OCH₃), 28.72 (C-4'), 25.4 (C-5'), 25.31 (C-6'), 19.71 (-CH₃); EIMS *m/z* 290 [M⁺(100)], 272 (18), 257 (23), 243 (13), 231 (88), 213 (87), 201 (57), 189 (32), 186 (24), 174 (11), 160 (8), 132 (8), 59 (39), 43 (9).

5.2.2.8 Preparación de los ésteres de Mosher de los productos 97c, 98 y 100. El compuesto **97c** (3.0 mg) ó **98** (3.0 mg) ó **100** (3.0 mg) se disolvió en CH₂Cl₂ (1 mL) y se trató con el ácido (*S*)- ó (*R*)-MTPA [α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacético] (18 mg), DCC (díciclohexilcarboximida) (18 mg) y 4-DMAP (4-dimetilaminopiridina) (4 mg). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente (25 °C) y al cabo de este tiempo se vertió en un vaso de precipitados con hielo. La mezcla resultante se extrajo con

CHCl₃ (3 x 30 mL). En cada caso, la fase orgánica combinada se lavó sucesivamente con HCl acuoso al 5%, NaHCO₃ acuoso al 10% y agua destilada; finalmente, la evaporación del disolvente orgánico a presión reducida condujo a la obtención de residuos que se purificaron mediante una columna cromatográfica sobre gel de sílice [2 g, hexano-AcOEt (7:3), para los ésteres de **97c** y **98** y AcOEt para el de **100**].

5.2.3 Análisis por cristalografía de rayos X. Las estructuras moleculares de los compuestos **85**, **87** y **93** se analizaron por difracción de rayos X siguiendo procedimientos similares. Para cada muestra, los cristales se montaron en aire sobre fibra de vidrio. Los parámetros exactos de las celdas se determinaron por el refinamiento de un grupo de 25 reflexiones y las intensidades de la difracción se midieron a 20 °C en un difractómetro Siemens P4/PC, equipado con un radiador monocromado de grafito. Las intensidades de las tres reflexiones estándar, registradas cada 100 reflexiones, no mostraron cambios. Todos los grupos de datos se corrigieron por efectos de polarización Lorentziana sin realizar correcciones de las absorciones. La estructura de cada compuesto se determinó por métodos directos (SIR92) (Altomare *et al.*, 1994) y se refinó mediante una matriz de mínimos cuadrados empleando el programa SHELXL97 (Sheldrick, 1997).

5.2.3.1 Característica de los cristales del compuesto 85. C₁₉H₂₀O₇ M_r = 360.35, placas incoloras con dimensiones de 0.32 x 0.26 x 0.06 mm y geometría ortorrómbica tipo P2₁2₁2₁, con los siguientes valores de celdas unitarias (25 °C): a = 8.5950 (4), b = 10.394 (1), c = 20.015 (1) Å, V = 1788.07 (19) Å³, Z = 4 F(000) = 752, d_{calcd} = 1.331 gcm⁻³, μ/mm⁻¹ = 0.861.

5.2.3.2 Característica de los cristales del compuesto 87. C₁₈H₂₀O₇ M_r = 346.32, prismas incoloros de dimensiones 0.60 x 0.32 x 0.10 mm y geometría ortorrómbica tipo P2₁2₁2₁ (25 °C), con los siguientes valores de celdas unitarias: a = 8.631 (1), b = 10.403 (2), c = 20.111 (5) Å, and V = 1805.7 (6) Å³, Z = 4 F(000) = 728, d_{calcd} = 1.274 gcm⁻³, μ/mm⁻¹ = 0.099.

5.2.3.3 Característica de los cristales del compuesto 93. C₁₈H₂₀O₆ M_r = 332.34, agujas incoloras de dimensiones 0.60 x 0.12 x 0.10 mm y geometría monoclinica tipo C₂ con los

siguientes valores de celdas unitarias (25 °C), $a = 29.101$ (3), $b = 9.010$ (1), $c = 14.373$ (1) Å, and $V = 3535.2$ (6) Å³, $Z = 8$ F(000) = 71408, $d_{\text{calcd}} = 1.249$ gcm⁻³, $\mu/\text{mm}^{-1} = 0.782$.

5.2.4 Extracción y fraccionamiento primario del extracto activo de las partes aéreas de *Maxilaria densa*. El material vegetal de *M. densa* completamente seco y molido (2.2 kg) se extrajo a temperatura ambiente mediante un proceso de maceración exhaustiva con una mezcla de CHCl₃-MeOH (1:1). El extracto obtenido (161.2 g), se sometió a un fraccionamiento primario a través de una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (775 g). La columna se eluyó con un gradiente de mezclas de hexano-AcOEt (1:0→0:1) y AcOEt-MeOH (9:1 → 1:1) (Tabla 12). Este proceso condujo a la obtención de 215 fracciones (600 mL cada una) las cuales se reunieron de acuerdo a perfil cromatográfico en siete fracciones primarias (F1-F7). El método bioautográfico para monitorear la fitotoxicidad mostró que la actividad se concentraba en la fracción primaria F6.

Tabla 12. Fraccionamiento primario del extracto activo de las partes aéreas de *Maxilaria densa*.

Eluyente	Proporción (%)	Número de fracciones	Fracciones combinadas	
Hex	100	1-10	1-28	F1
Hex:AcOEt	95:5	11-32	29-36	F2
Hex:AcOEt	90:10	35-56	37-48	F3
Hex:AcOEt	85:15	57-108	49-62	F4
Hex:AcOEt	80:20	109-126	63-71	F5
Hex:AcOEt	75:25	127-129	72-126	F6*
Hex:AcOEt	70:30	130-151	127-215	F7
Hex:AcOEt	60:40	152-168		
Hex:AcOEt	50:50	169-184		
Hex:AcOEt	40:60	185-191		
Hex:AcOEt	30:70	192-198		
AcOEt	100	205-210		
AcOEt:MeOH	50:50	211-215		

Fracciones fitotóxicas de acuerdo al ensayo biológico del inciso 5.1.2.

5.2.4.1 Obtención de la eriantridina (83) y de la gimnopusina (84) a partir de la fracción primaria activa F6. La fracción primaria F6 (17.3 g) se sometió a una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (759 g) y se eluyó con un gradiente de hexano-AcOEt (1:0 → 0:1). Este proceso condujo a la obtención de cuatro fracciones secundarias F6I a F6IV (Tabla 13). El método bioautográfico indicó que la actividad fitotóxica se concentraba en las fracciones secundarias F6II y F6III. A partir de la fracción secundaria activa F6II, se aisló el compuesto **83** mediante sucesivas CCF preparativas utilizando una mezcla de CHCl₃-EtAcO 8:2 como sistema de elución. A partir de la fracción secundaria activa F6III cristalizó espontáneamente el compuesto **84** el cual se purificó por recristalización en par de disolventes (mezclas de hexano:CHCl₃). La Figura 14 resume la metodología recién descrita.

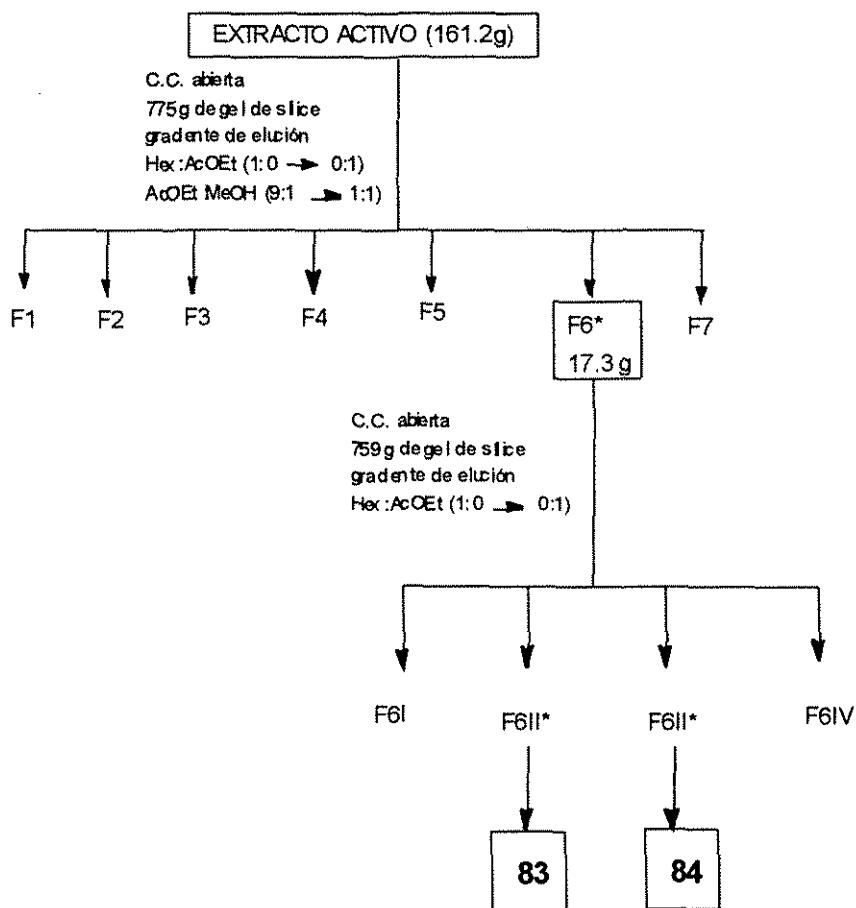


Figura 14. Aislamiento de la eriantridina (**83**) y la gimnopusina (**84**) a partir del extracto activo de las partes aéreas de *M. densa*.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las especies objeto de estudio, *Prionosciadium watsoni* Coulter & Rose (Umbelliferae) y *Maxilaria densa* Lindley (Orchidaceae), se seleccionaron inicialmente con base en los criterios etnomédico y quimiotaxonómico. El primero de estos tiene su fundamento en el hecho de que las plantas utilizadas en las prácticas médicas populares han demostrado ser de primordial importancia para el descubrimiento de agentes bioactivos (Cox y Balick, 1994; Gibson y Kransnoff 1999). En este contexto, *P. watsoni* se emplea para el tratamiento de diversos males como la diabetes, la fiebre, los trastornos gastrointestinales y la enfermedad cultural llamada “mal de ojo” (Aguilar *et al.*, 1991), en tanto que *M. densa* se emplea para el tratamiento de trastornos gastrointestinales (Carmona, 1996). En consecuencia, existe una alta probabilidad de encontrar agentes biodinámicos en las dos especies. El segundo criterio (quimiotaxonómico) se basa en los antecedentes de un gran número de especies de umbelíferas y orquídeas como una fuente valiosa de cumarinas y estilbenoides bioactivos, respectivamente. Entre las propiedades más importantes presentadas por las cumarinas destacan las vasodilatadoras (Weinmann, 1997), espasmolíticas (Weinmann, 1997), fototóxicas (Weinmann, 1997), analgésicas (Murray y Brown, 1994), anticoagulantes (Whitlon, *et al.*, 1978), antibióticas (Weinmann, 1997), antivirales (Mckee *et al.*, 1998), piscicidas (Weinmann, 1997) y reguladoras de la germinación vegetal (Zobel y Brown, 1995;). Pero quizá una de las propiedades más importantes que han presentado estos compuestos es el efecto fitotóxico (Duke, 1993). En este contexto, es bien conocido que la cumarina es uno de los compuestos fitotóxicos naturales más potentes presentes en plantas superiores (Duke, 1993; Vyvyan, 2002; Duke, 1993; Duke y Abbas, 1995) y posee propiedades herbicidas a nivel pre-emergente y post-emergente (Shettel y Balke, 1983). Por otro lado, los estilbenoides han presentado propiedades espasmolíticas (Estrada *et al.*, 1999), antibacterianas, antifúngicas, reguladoras del crecimiento vegetal, inhibidoras de la germinación y antimetabólicas (Gorham, 1995).

Una vez seleccionado de forma primaria el material vegetal, se realizaron los ensayos biológicos de selección. Para ello, se prepararon los extractos en pequeña escala a partir de las partes aéreas de las dos plantas objeto de estudio. En el caso de *P. watsoni* se utilizó una

mezcla de CH₂Cl₂:MeOH (1:1) como disolvente de extracción y para *M. densa* una mezcla de CHCl₃:MeOH (1:1). Los extractos resultantes se ensayaron con el objeto de determinar su potencial fitotóxico evaluando el efecto de los mismos sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*, dos malezas que afectan cultivos de importancia económica, así como también sobre el crecimiento de la planta acuática *Lemna pausicostata*, arvense que afecta cuerpos acuíferos y a los ecosistemas que habitan en ellos. La selección de los bioensayos empleados se realizó considerando que son de fácil realización y poseen la sensibilidad suficiente para detectar fitotoxinas, de tal forma que son los ensayos más recomendados en la literatura contemporánea pertinente (Duke, 1993; Duke y Abbas, 1995; Abbas *et al.*, 1997; Van Puyvelde *et al.* 1999; Macías *et al.*, 1995, 2000b, Vyvyan, 2002).

Los extractos totales de las partes aéreas de las dos especies vegetales de objeto de estudio presentaron una notable actividad fitotóxica sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli* en el bioensayo en caja de Petri (Anaya *et al.*, 1990 y 1995). De manera adicional, los extractos causaron inhibición del crecimiento, reducción del contenido de clorofila y pérdida de electrolitos, medida por un incremento en la conductividad eléctrica del medio de cultivo en plantas de *Lemna pausicostata* (Tabla 14). En este sentido, es bien conocido que el incremento en la conductividad eléctrica del medio de cultivo de un tejido vegetal tratado con un herbicida, es indicativo de un daño en la membrana celular; además constituye una medida sensible de la fitotoxicidad fisiológica provocada por un agente, antes de que los síntomas morfológicos puedan ser detectados de manera visual o microscópicamente (Duke y Lyndon, 1993; Abbas *et al.*, 1997 y 1998).

Con base en los resultados anteriores, se inició el estudio químico biodirigido de las partes aéreas de *P. watsoni* y *M. densa* con la finalidad de aislar los principios responsables de la actividad fitotóxica, utilizando como herramienta para monitorear la actividad fitotóxica los dos bioensayos anteriormente mencionados. Así mismo, el empleo del método bioautográfico de fitotoxicidad (Inoue *et al.*, 1992; Rahalison *et al.*, 1992; 1994) facilitó el aislamiento de los compuestos activos presentes en la fracciones más activas obtenidas a partir de cada uno de los extractos activos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las especies objeto de estudio, *Prionosciadium watsoni* Coulter & Rose (Umbelliferae) y *Maxilaria densa* Lindley (Orchidaceae), se seleccionaron inicialmente con base en los criterios etnomédico y quimiotaxonómico. El primero de estos tiene su fundamento en el hecho de que las plantas utilizadas en las prácticas médicas populares han demostrado ser de primordial importancia para el descubrimiento de agentes bioactivos (Cox y Balick, 1994; Gibson y Kransnoff 1999). En este contexto, *P. watsoni* se emplea para el tratamiento de diversos males como la diabetes, la fiebre, los trastornos gastrointestinales y la enfermedad cultural llamada “mal de ojo” (Aguilar *et al.*, 1991), en tanto que *M. densa* se emplea para el tratamiento de trastornos gastrointestinales (Carmona, 1996). En consecuencia, existe una alta probabilidad de encontrar agentes biodinámicos en las dos especies. El segundo criterio (quimiotaxonómico) se basa en los antecedentes de un gran número de especies de umbelíferas y orquídeas como una fuente valiosa de cumarinas y estilbenoides bioactivos, respectivamente. Entre las propiedades más importantes presentadas por las cumarinas destacan las vasodilatadoras (Weinmann, 1997), espasmolíticas (Weinmann, 1997), fototóxicas (Weinmann, 1997), analgésicas (Murray y Brown, 1994), anticoagulantes (Whitlon, *et al.*, 1978), antibióticas (Weinmann, 1997), antivirales (Mckee *et al.*, 1998), piscicidas (Weinmann, 1997) y reguladoras de la germinación vegetal (Zobel y Brown, 1995;). Pero quizá una de las propiedades más importantes que han presentado estos compuestos es el efecto fitotóxico (Duke, 1993). En este contexto, es bien conocido que la cumarina es uno de los compuestos fitotóxicos naturales más potentes presentes en plantas superiores (Duke, 1993; Vyvyan, 2002; Duke, 1993; Duke y Abbas, 1995) y posee propiedades herbicidas a nivel pre-emergente y post-emergente (Shettel y Balke, 1983). Por otro lado, los estilbenoides han presentado propiedades espasmolíticas (Estrada *et al.*, 1999), antibacterianas, antifúngicas, reguladoras del crecimiento vegetal, inhibidoras de la germinación y antimitóticas (Gorham, 1995).

Una vez seleccionado de forma primaria el material vegetal, se realizaron los ensayos biológicos de selección. Para ello, se prepararon los extractos en pequeña escala a partir de las partes aéreas de las dos plantas objeto de estudio. En el caso de *P. watsoni* se utilizó una

mezcla de CH₂Cl₂:MeOH (1:1) como disolvente de extracción y para *M. densa* una mezcla de CHCl₃:MeOH (1:1). Los extractos resultantes se ensayaron con el objeto de determinar su potencial fitotóxico evaluando el efecto de los mismos sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*, dos malezas que afectan cultivos de importancia económica, así como también sobre el crecimiento de la planta acuática *Lemna pausicostata*, arvense que afecta cuerpos acuíferos y a los ecosistemas que habitan en ellos. La selección de los bioensayos empleados se realizó considerando que son de fácil realización y poseen la sensibilidad suficiente para detectar fitotoxinas, de tal forma que son los ensayos más recomendados en la literatura contemporánea pertinente (Duke, 1993; Duke y Abbas, 1995; Abbas *et al.*, 1997; Van Puyvelde *et al.* 1999; Macías *et al.*, 1995, 2000b, Vyvyan, 2002).

Los extractos totales de las partes aéreas de las dos especies vegetales de objeto de estudio presentaron una notable actividad fitotóxica sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli* en el bioensayo en caja de Petri (Anaya *et al.*, 1990 y 1995). De manera adicional, los extractos causaron inhibición del crecimiento, reducción del contenido de clorofila y pérdida de electrolitos, medida por un incremento en la conductividad eléctrica del medio de cultivo en plantas de *Lemna pausicostata* (Tabla 14). En este sentido, es bien conocido que el incremento en la conductividad eléctrica del medio de cultivo de un tejido vegetal tratado con un herbicida, es indicativo de un daño en la membrana celular; además constituye una medida sensible de la fitotoxicidad fisiológica provocada por un agente, antes de que los síntomas morfológicos puedan ser detectados de manera visual o microscópicamente (Duke y Lyndon, 1993; Abbas *et al.*, 1997 y 1998).

Con base en los resultados anteriores, se inició el estudio químico biodirigido de las partes aéreas de *P. watsoni* y *M. densa* con la finalidad de aislar los principios responsables de la actividad fitotóxica, utilizando como herramienta para monitorear la actividad fitotóxica los dos bioensayos anteriormente mencionados. Así mismo, el empleo del método bioautográfico de fitotoxicidad (Inoue *et al.*, 1992; Rahalison *et al.*, 1992; 1994) facilitó el aislamiento de los compuestos activos presentes en la fracciones más activas obtenidas a partir de cada uno de los extractos activos.

6.1 Obtención de los compuestos fitotóxicos a partir de *Prionosciadium watsoni*. El extracto activo de *P. watsoni* se sometió a un fraccionamiento primario mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice como se indicó en la Parte Experimental. El bioensayo de germinación y crecimiento radicular en caja Petri sobre *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli* permitió determinar que las fracciones primarias F2, F4 y F5 (Tabla 13) eran activas. Mientras que el bioensayo de fitotoxicidad sobre *Lemna pausicostata*, indicó que la actividad se concentraba en las fracciones F3, F4 y F5 (Tabla 14 y Figuras 15-18).

Tabla 13. Efecto fitotóxico (CI_{50} , $\mu\text{g mL}^{-1}$) de las fracciones primarias obtenidas a partir del extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (1:1) de *P. watsoni* sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*.

Tratamiento	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crus-galli</i>
Extracto	0.68	2.12
F1	>1000	>1000
F2*	53.3	1114.5
F3	225.9	750.2
F4*	241.6	56.1
F5*	56.2	174.7
F6	>1000	>1000
F7	>1000	>1000
F8	>1000	>1000

*Fracciones activas. Los resultados son promedio de tres repeticiones.

A partir de la fracción primaria activa F4 precipitó un sólido blanco cuya purificación por cromatografía en capa fina (CCF) permitió el aislamiento de las piranocumarinas (9*R*,10*R*)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (**85**), seravshanina (**86**) y quianhucumarina D (**87**).

El fraccionamiento secundario de las aguas madres de la fracción F4 generó 19 fracciones secundarias (F4I-XIX). En este caso el ensayo bioautográfico indicó que la actividad se concentraba en las fracciones secundarias F4VI y F4IX. El fraccionamiento por cromatografía en columna abierta (CC) sobre gel de sílice y la purificación subsecuente por CCF de la fracción secundaria F4VI permitió el aislamiento de dos piranocumarinas adicionales, la jatamansina (**88**) y la (9*R*)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (**89**).

Tabla 14. Efecto fitotóxico del extracto y fracciones primarias en *P. Watsoni* sobre *L. pausicostata*.^a

Tratamiento	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Incremento en la conductividad ($\mu\text{mho/cm}$)	Inhibición del Crecimiento (%)	Reducción de la Clorofila (%)
Extracto	25	-57.00 ± 14.8	3.01 ± 2.9	0.00 ± 12.7
	50	91.50 ± 39.9	7.79 ± 3.8	0.00 ± 0.0
	100	262.50 ± 12.1	100.00 ± 0.0	36.74 ± 11.7
	200	262.50 ± 24.7	100.00 ± 0.0	91.51 ± 6.5
F1	10	49.80 ± 35.4	17.00 ± 0.70	21.90 ± 4.4
	200	174.30 ± 9.2	73.90 ± 1.40	93.10 ± 4.7
	500	349.30 ± 47.4	100.00 ± 0.0	100.00 ± 0.00
	1000	412.80 ± 21.10	100.00 ± 0.0	100.00 ± 0.00
F2	10	0.00 ± 55.10	8.70 ± 0.7	4.00 ± 8.7
	200	66.80 ± 5.70	30.40 ± 0.0	28.40 ± 30.4
	500	91.80 ± 8.50	52.20 ± 0.7	31.40 ± 52.2
	1000	157.30 ± 21.9	52.20 ± 2.1	66.20 ± 52.2
F3*	10	85.30 ± 3.50	17.40 ± 0.7	31.10 ± 17.40
	200	334.30 ± 17.7	100.00 ± 0.0	100.00 ± 0.00
	500	354.80 ± 29.7	100.00 ± 0.0	100.00 ± 0.00
	1000	398.30 ± 13.4	100.00 ± 0.0	100.00 ± 0.00
F4*	10	44.80 ± 45.30	9.00 ± 0.00	29.90 ± 9.00
	200	304.30 ± 9.2	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	500	361.80 ± 2.8	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	1000	403.30 ± 13.4	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
F5*	10	0.00 ± 11.3	9.50 ± 0.7	6.90 ± 9.5
	200	3.50 ± 0.7	23.52 ± 13.8	69.60 ± 3.5
	500	100.00 ± 0.00	58.81 ± 8.3	100.00 ± 0.00
	1000	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.0	100.00 ± 0.00
F6	10	0.00 ± 14.10	8.50 ± 0.7	4.80 ± 22.9
	200	67.30 ± 14.8	8.00 ± 0.00	30.70 ± 5.7
	500	97.30 ± 13.4	6.50 ± 0.70	73.70 ± 36.4
	1000	169.80 ± 2.8	4.00 ± 0.0	64.90 ± 4.6
F7	10	40.80 ± 22.6	9.00 ± 0.7	5.50 ± 17.3
	200	120.30 ± 19.0	7.50 ± 0.7	35.70 ± 13.0
	500	102.80 ± 14.1	5.50 ± 8.3	32.60 ± 21.7
	1000	202.80 ± 14.1	6.00 ± 0.0	60.10 ± 7.4
F8	10	50.30 ± 21.9	7.50 ± 0.7	22.40 ± 7.5
	200	108.80 ± 8.5	7.00 ± 0.00	28.10 ± 7.0
	500	86.80 ± 14.1	7.50 ± 0.7	33.20 ± 7.5
	1000	127.80 ± 0.0	6.00 ± 1.40	56.90 ± 6.0

^aLos resultados son las medias de tres repeticiones \pm desviación estándar. Los compuestos exhibieron significativamente (*t*-test Student desapareada) mayor fitotoxicidad que el control (medio de cultivo; incremento en la conductividad, $0.00 \pm 9.40 \mu\text{mho/cm}$; inhibición del crecimiento, $0.00 \pm 1.0 \%$; reducción de la clorofila, $0.00 \pm 18.10 \%$).

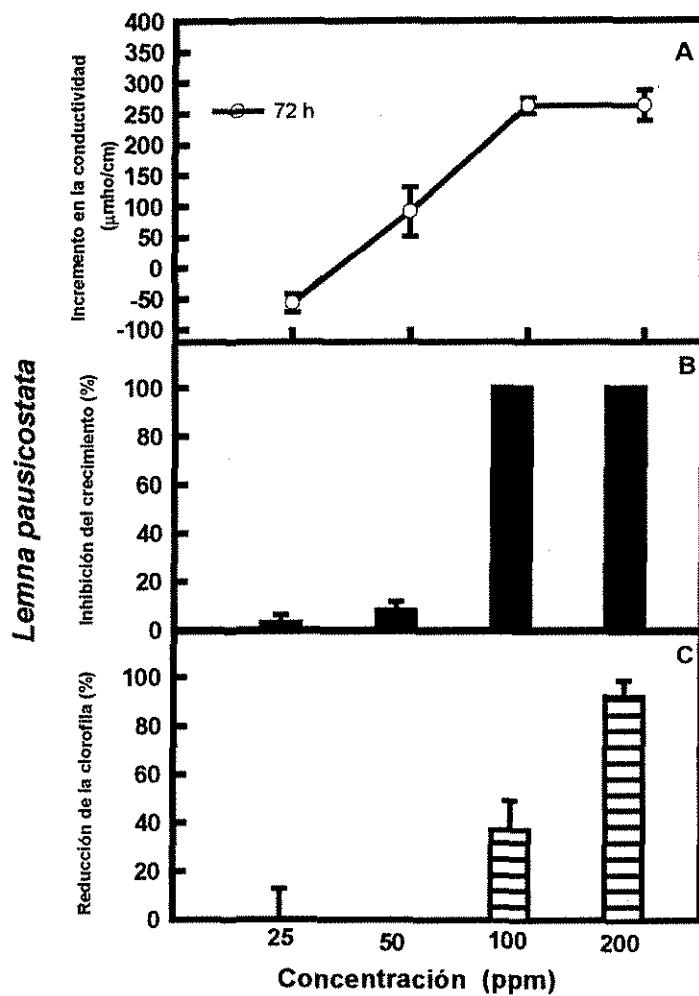


Figura 15. Efecto del extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (1:1) de las partes aéreas de *P. watsoni* sobre el crecimiento de *Lemna pausicostata*.

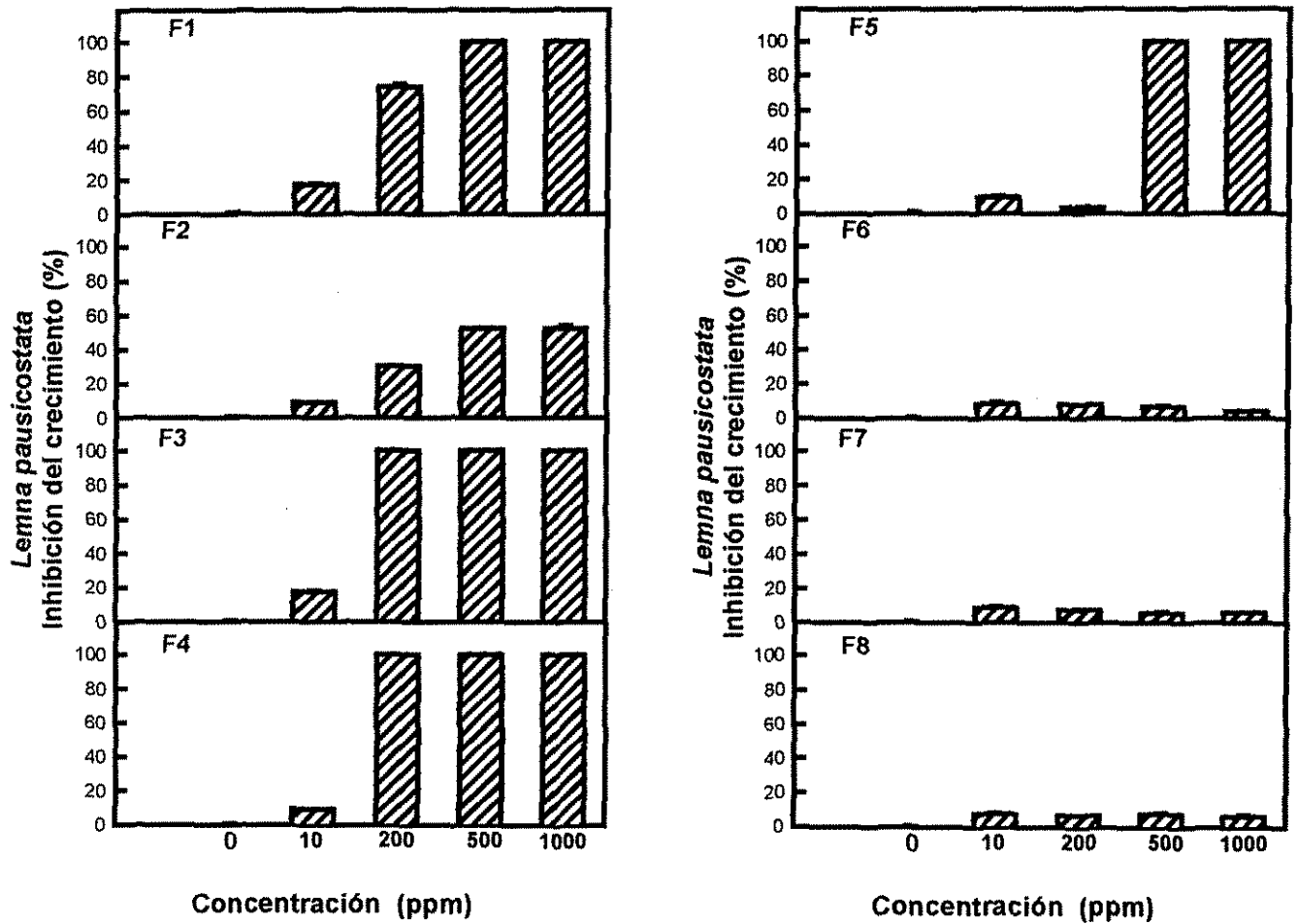


Figura 16. Efecto de las fracciones primarias obtenidas del extracto activo de *P. watsoni* sobre el crecimiento de *Lemna pausicostata*.

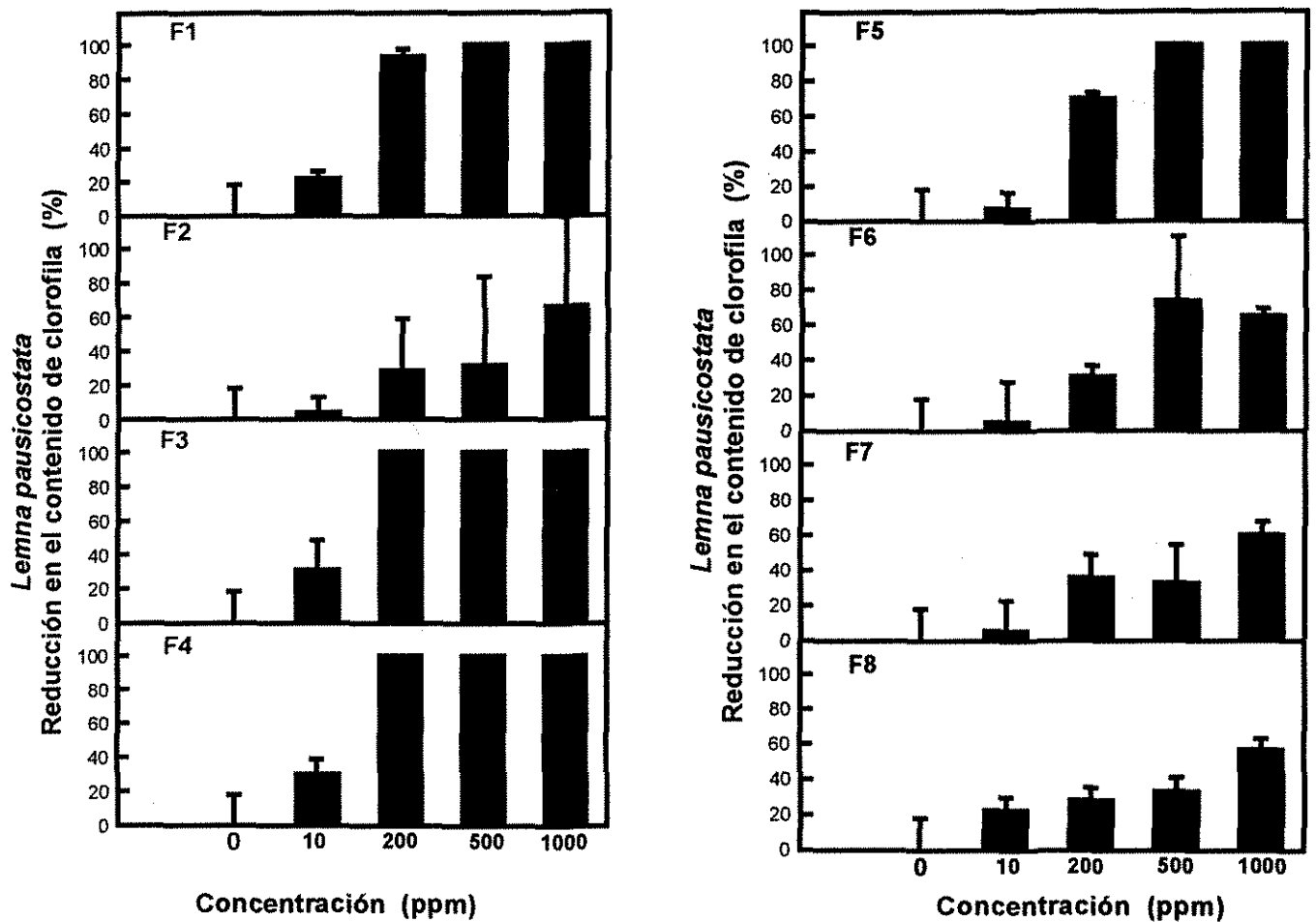


Figura 17. Efecto de las fracciones primarias obtenidas del extracto activo de *P. watsoni* en la reducción del contenido de clorofila de *Lemna pausicostata*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

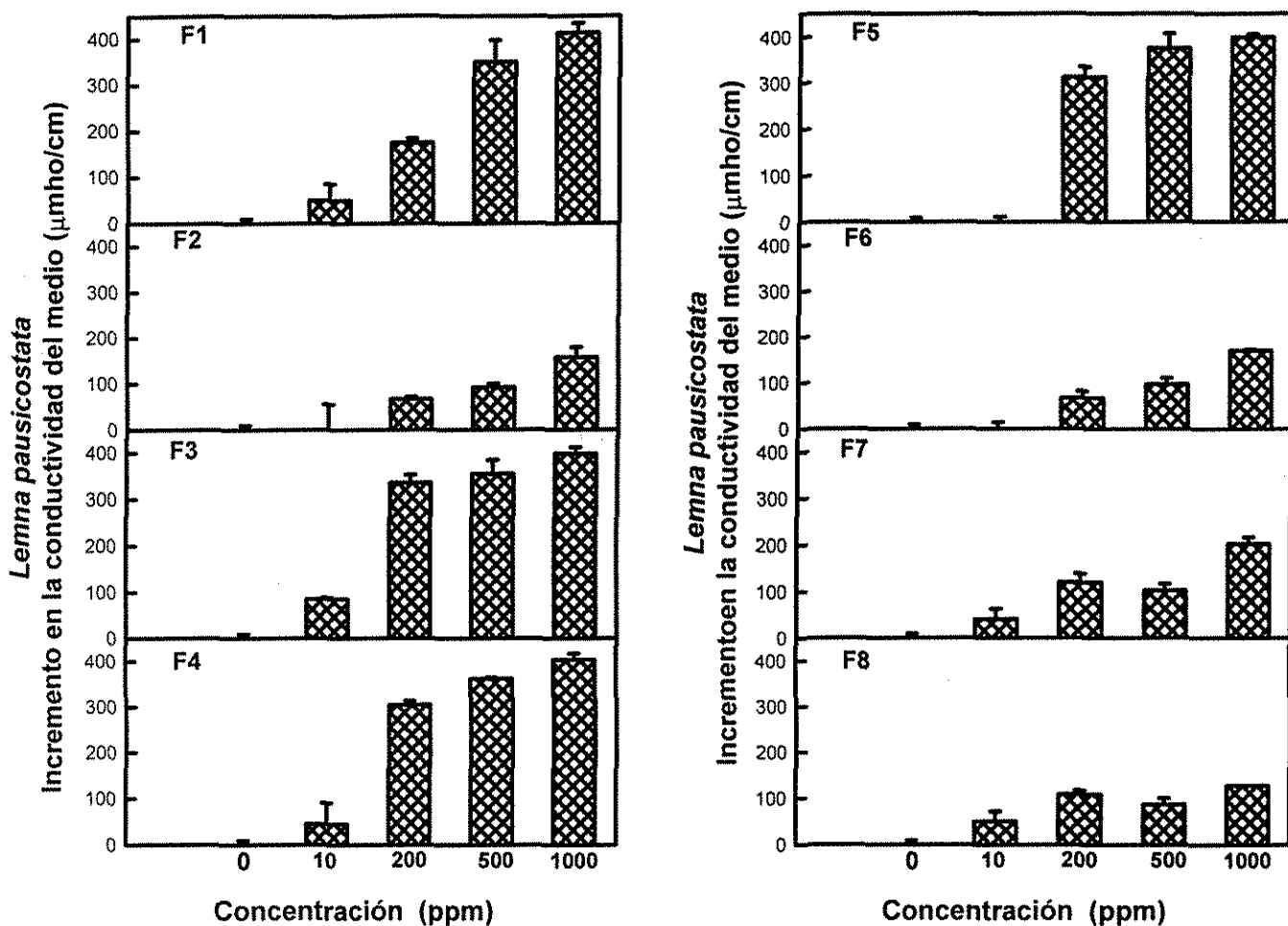


Figura 18. Efecto de las fracciones primarias obtenidas del extracto activo de *P. watsoni* sobre la conductividad del medio de cultivo en *Lemna pausicostata*.

El fraccionamiento subsecuente por CC abierta sobre gel de sílice de la fracción secundaria F4IX y la purificación posterior de las fracciones secundarias por CLAE, condujo a la obtención de tres piranocumarinas: la quianhucumarina A (90), la (9*R*,10*R*)-10-hidroxi-9-(2-metil-but-(2*Z*)-enoiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (91) y la (9*R*,10*R*)-10-hidroxi-9-(2-metil-but-(2*E*)-enoiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (92) y (9*R*,10*R*)-9-hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (93).

La fracción primaria activa F5 se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice como se indica en la parte experimental para dar origen a 23 fracciones

secundarias (F5I-F5XXIII). La bioautografía realizada a éstas fracciones indicó que la fitotoxicidad se concentraba en las fracciones secundarias F5-XII y F5-XIII. La purificación de la fracción secundaria activa F5XII por CLAE permitió la obtención de la (+)-*cis*-kelactona (**94**). Por último, la purificación mediante CLAE de la fracción secundaria activa F5-XIII, condujo a la obtención de las piranocromonas (3*R*)-2-metil-but-(2*Z*)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipirano (**95**) y (3*R*)-isobutiroiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipirano (**96**).

En la Tabla 15 se indican las estructuras de los productos naturales aislados de *P. watsoni*, su rendimiento y la fracción cromatográfica de donde se obtuvieron. Cabe mencionar que los metabolitos **85**, **89**, **93**, **95** y **96** son productos naturales novedosos.

Tabla 15. Metabolitos secundarios aislados a partir de las partes aéreas de *P. watsoni*.

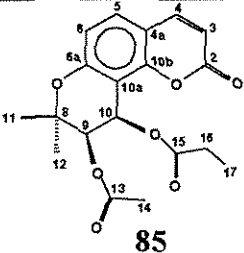
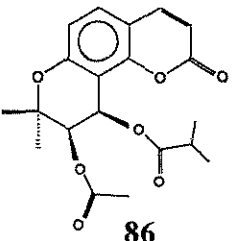
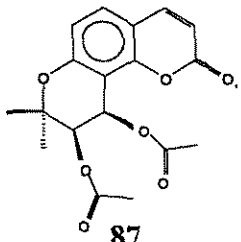
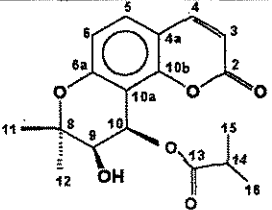
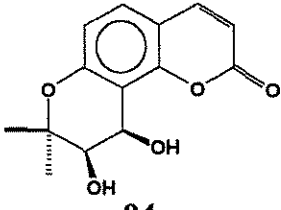
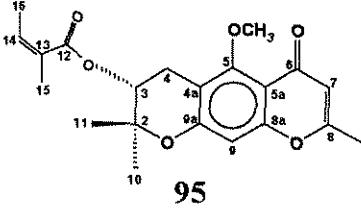
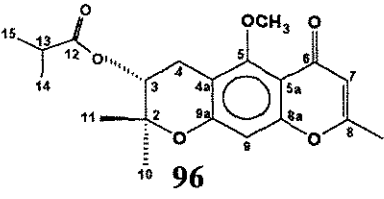
Metabolito	Rendimiento (% del material vegetal seco)	Fracción de origen
 <p>85</p>	1.18×10^{-2}	F4
 <p>86</p>	1.30×10^{-2}	F4
 <p>87</p>	1.00×10^{-3}	F4

Tabla 15. Metabolitos secundarios aislados a partir de las partes aéreas de *P. watsoni* (continuación).

Metabolito	Rendimiento (% del material vegetal seco)	Fracción de origen
	6.80×10^{-2}	F4VI(6)
88		
	1.63×10^{-2}	F4VI(6)
89		
	1.36×10^{-2}	F4IX(5)V
90		
	1.36×10^{-2}	F4IX(5)V
91		
	1.36×10^{-2}	F4IX(5)V
92		

Tabla 15. Metabolitos secundarios aislados a partir de las partes aéreas de *P. watsoni* (continuación).

Metabolito	Rendimiento (% del material vegetal seco)	Fracción de origen
 <p>93</p>	4.08×10^{-2}	F4IX(5)V
 <p>94</p>	1.11×10^{-3}	F5XII
 <p>95</p>	3.33×10^{-3}	F5XIII
 <p>96</p>	5.55×10^{-4}	F5XIII

6.2. Elucidación estructural de los compuestos aislados de *P. watsoni*. De los 12 compuestos obtenidos a partir de las partes aéreas de *P. watsoni*, diez pertenecen al grupo de las piranocumarinas angulares (**85- 94**) y dos al grupo de las piranocromonas (**95** y **96**). Los productos **85-87** y **90-93** son análogos de la *cis*-kelactona (**94**) (Lemmich *et al.*, 1969; Nielsen *et al.*, 1971) y se encuentran esterificados en las posiciones C-9 y/o C-10 por diferentes ácidos orgánicos. Así por ejemplo, la quianhucumarina A (**90**) (Murray, 1995), presenta un grupo hidroxilo en la posición C-9 y un éster de ácido angélico en la posición C-10. La seravshanina (**86**) (Swager y Cardellina II, 1985) y el compuesto novedoso

(9*R*,10*R*)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (**85**) presentan un éster de ácido acético y uno de ácido isobutírico en las posiciones C-9 y C-10, respectivamente.

Los compuestos **88** y **89** son análogos de la lomatina (Nielsen *et al.*, 1971; Shanbhag *et al.*, 1964; Bolhman y Franke, 1971) y difieren entre sí en la naturaleza del ácido que esterifica la función carbinólica. De tal manera que, mientras en la jatamansina (**88**) (Shanbhag *et al.*, 1964) el éster presente deriva del ácido angélico, en el compuesto novedoso (9*R*)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (**89**) deriva del ácido isobutírico.

Las piranocromonas novedosas **95** y **96** difieren también en el sustituyente en la posición C-3. Así, el compuesto **95** presenta un grupo angeloiloxi mientras que el compuesto **96** contiene un residuo isobutiriloxi.

La caracterización de los compuestos activos puros se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y químicos, incluyendo el análisis elemental. Los métodos espectroscópicos incluyeron a las espectroscopías de absorción en el ultravioleta (UV) y en el infrarrojo (IR) y la resonancia magnética nuclear (RMN) en sus diferentes modalidades (RMN ¹H, RMN ¹³C, 2D-COSY, HMQC, HMBC, DEPT, NOESY, etc.). La técnica empleada para los estudios de espectrometría de masas (EM) fue la de impacto electrónico (IE). La preparación de derivados químicos a partir de los productos naturales y su posterior análisis espectroscópico proporcionó información adicional para la elucidación estructural. Así por ejemplo, a partir del análisis por RMN ¹H de los ésteres de Mosher (Mosher, 1973; Riesser *et al.*, 1992, 1993) de los productos de hidrólisis de los compuestos **85**, **93**, **89**, **85** y **96**, se determinó la estereoquímica absoluta de los centros quirales presentes en las piranocumarinas y piranocromonas naturales. En el caso de los productos **85**, **87** y **93** sus estructuras moleculares se confirmaron inequívocamente mediante un análisis de difracción por rayos X.

El análisis detallado de los espectros de IR, UV, RMN y EM de las sustancias **86**, **87**, **88**, **90**, **91**, **92** y **94** permitió constatar que sus estructuras corresponden a la de la seravshanina (Swager y Cardellina II, 1985), la quianhucumarina D (Murray *et al.*, 1995), la jatamansina (Shanbhag *et al.*, 1964), la quianhucumarina A (Murray *et al.*, 1995), la (9*R*,10*R*)-10-hidroxi-9-(2-metil-but-(2*Z*)-enoiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (Bolhman y Bhaskar, 1968), la (9*R*,10*R*)-10-hidroxi-9-(2-metil-but-(2*E*)-enoiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (Swager y Cardellina II, 1985) y la *cis*-kelactona (Lemmich *et al.*, 1969; Nielsen *et al.*, 1971), respectivamente. La elucidación estructural de los productos novedosos **85**, **89**, **93**, **95** y **96** se describirá con detalle en esta sección. En primer lugar se discutirá la elucidación estructural de los derivados de la *cis*-kelactona (Lemmich *et al.*, 1969; Nielsen *et al.*, 1971) **85** y **93**. En segundo lugar se describirá la caracterización de la cumarina **89** y por último, la de las piranocromonas **95** y **96**.

6.2.1 Elucidación de la estructura molecular de la (9*R*,10*R*)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (85**) y (9*R*,10*R*)-9-hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (**93**).** Los compuestos **85** y **93** se aislaron como sólidos cristalinos translúcidos solubles en CH₂Cl₂, MeOH y DMSO. En la Tabla 16 se indican sus constantes físicas.

Los espectros en el IR de estos compuestos (Tabla 17) presentan bandas de absorción asociadas a su carácter aromático (ν_{\max} . ~3000 y ~1600 cm⁻¹) y con la presencia de carbonilo de γ -lactona α,β -insaturada (ν_{\max} . ~1740 cm⁻¹) y ésteres (ν_{\max} . ~1200 y ~1000 cm⁻¹). En el espectro en el IR del compuesto **93** se aprecia una banda de absorción adicional característica de un grupo hidroxilo (ν_{\max} . 3475 cm⁻¹).

La fórmula molecular de las cumarinas **85** y **93** se determinó como C₁₉H₂₀O₇ y C₁₈H₂₀O₆ respectivamente mediante espectrometría de masas y análisis elemental.

Tabla 16. Constantes físicas de los compuestos **85** y **93**.

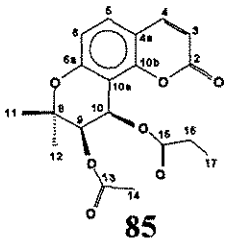
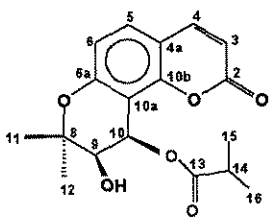
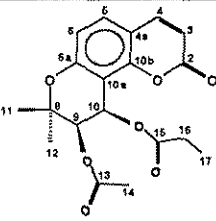
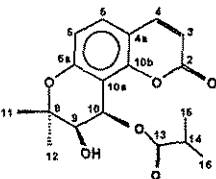
Metabolito	p.f. °C	$[\alpha]_D^{25}$ (c 1 mg mL ⁻¹ , MeOH)	P.M.	F.M.
 <p>85</p>	208	+ 18	360	C ₁₉ H ₂₀ O ₇
 <p>93</p>	134	+151	332	C ₁₈ H ₂₀ O ₆

Tabla 17. Constantes espectroscópicas (UV e IR) y espectrométricas (EM-IE m/z) de los compuestos **85** y **93**.

Metabolito	UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ)	IR ν_{max} (KBr)	EM-IE m/z	Análisis elemental
 <p>85</p>	321 (4.23) nm	3097, 2980, 1746, 1605, 1225, 1024 cm ⁻¹	360[M ⁺], 300[M ⁺ -AcOH (29)], 285 (8), 261 (6), 244 (30), 229 (100), 57 (21), 43 (15).	Calcd C ₁₈ H ₂₀ O ₆ : C 65.05, H 6.07. Encontrado: C 65.00, H 6.09.
 <p>93</p>	323 (4.27) nm	3475, 2977, 2926, 1730, 1607, 1234, 1108 cm ⁻¹	332[M ⁺ (16)], 314[M ⁺ -H ₂ O(5)], 299 (17), 261 (18), 244 (13), 229 (100), 215 (9), 191 (27), 175 (11), 71 (24), 43 (29).	Calcd C ₁₈ H ₂₀ O ₅ : C 68.34, H 6.37. Encontrado: C 68.38, H 6.30.

El análisis detallado de los espectros de resonancia magnética nuclear unidimensionales (RMN-¹H y RMN-¹³C) y bidimensionales (HMQC, HMBC y COSY) indicaron que ambos compuestos son derivados de la *cis*-kelactona (**94**) (Lemmich *et al.*, 1969; Nielsen *et al.*, 1971). Así los espectros de RMN presentan las siguientes señales diagnósticas (Tabla 18):

- a) En la región donde absorben los protones de tipo aromático de los espectros de RMN-¹H (Espectros 1 y 6; Apéndice I) se observan dos sistemas AB; el primero es característico de los hidrógenos de la porción α pirona del núcleo cumarina y aparece en $\delta_H \sim 6.23$ [$J=9.5$ Hz (H-3)] y ~ 7.59 [$J=9.5$ Hz (H-4)]; el segundo corresponde a los hidrógenos H-5 y H-6 y aparece en $\delta_H \sim 7.35$ [$J=8.5$ Hz (H-5)] y ~ 6.80 [$J=8.5$ Hz (H-6)]. Los protones que conforman los sistemas AB presentan correlación con cuatro carbonos de metino localizados en la región aromática del espectro en $\delta_C \sim 113.0$, ~ 143.0 , ~ 129.1 y ~ 114.4 , respectivamente en el espectro de HMQC (Espectros 4 y 9, Apéndice I).
- b) En la región donde absorben los hidrógenos geminales a funciones oxigenadas, el espectro de **85** presenta dos dobletes en δ_H 5.31 [$J=5.0$ Hz (H-9)] y 6.55 [$J=5.0$ Hz (H-10)]. En el compuesto **93** las señales para H-9 y H-10 aparecen en δ_H 4.05 [d, $J=4.8$ Hz (H-9)] y 6.38 [d, $J=4.8$ Hz (H-10)]; el desplazamiento en δ_H 4.05 sugiere que solo uno de los hidróxidos de la *cis*-kelactona se encuentra esterificado en el compuesto **93**.
- c) En la región donde absorben los hidrógenos de naturaleza alifática de los espectros de RMN-¹H (Espectros 1 y 6; Apéndice I) se observan señales simples en $\delta_H \sim 1.44$ y ~ 1.41 , características de los metilos geminales ubicados en la porción pirano del compuesto.
- d) Los espectros de RMN-¹³C de **85** y **93** (Espectros 2 y 7; Apéndice) presentan señales para diecinueve y dieciocho átomos de carbono, respectivamente. En los dos casos la señal característica para el carbonilo de lactona- α,β -insaturada de la cumarina en $\delta_C \sim 159$ y, señales para los cinco carbonos cuaternarios restantes del núcleo de la kelactona. La asignación de estos carbonos se realizó con base en las correlaciones observadas en el espectro heteronuclear HMBC y que se resumen en la Tabla 18 (Espectro 5; Apéndice I).

Además de las señales arriba descritas, los espectros de RMN del compuesto **85** presenta otras asociadas con la presencia de un residuo acetilo [δ_C 170.0.0 (C-13), δ_H 2.09 (s, H-14)/ δ_C 20.7 (C-14)] y otro propilo [δ_C 173.3 (C-15), δ_H 2.38 (dq, $J=7.5, 16.0$, H-16), δ_H 2.43 (dq, $J=7.5, 16.0$, H-16')/ δ_C 27.5 (C-16); δ_H 1.20 (dd, $J=7.5$, H-17)/ δ_C 9.1 (C-17)].

El análisis del espectro de masas para el compuesto **85** indicó que el residuo acetiloxi se encuentra localizado en C-9, ya que se observa un pico en una m/z de 300 generado por la pérdida de 60 uma a partir del ion molecular m/z 360). Cabe señalar que es un hecho bien documentado que los ésteres de kelactona sufren la pérdida preferencial del éster localizado en C-9 (Shaht *et al.*, 1976; Lingyi *et al.*, 1996) (Figura 19).

Los espectros de RMN del compuesto **93** difirieron de los de la *cis*-kelactona (**94**) (Lemmich *et al.*, 1969; Nielsen *et al.*, 1971) por la presencia de las señales relacionadas con las de una unidad de ácido isobutírico en δ_H 2.68 [$J=6.5$ Hz (H-14), δ_H 1.26 [$J=6.5$ Hz (H-15) y δ_H 1.23 [$J=6.5$ Hz (H-16)]. Así, la presencia de un fragmento en una m/z 314 debida a la primera pérdida de 18 unidades de masa permitió localizar al grupo hidroxilo en la posición C-9. Por lo tanto, el residuo de ácido isobutírico debía encontrarse en C-10. Así mismo, los valores de desplazamiento químico para los C-9/H-9 y C-10/H-10 fueron congruentes con esta propuesta. Con base en el análisis del patrón de fragmentación observado en el espectro de masas el análisis fue similar al realizado para el compuesto **85**.

La estereoquímica relativa de los sustituyentes en C-9 y C-10 se estableció como *cis* con base en el valor de la constante de acoplamiento ($J \approx 5.0$ Hz) entre H-9 y H-10 (Bolhman *et al.*, 1968). Si la disposición de los sustituyentes en C-9 y C-10 hubiese sido *trans*, el valor de la constante de acoplamiento hubiese sido mayor de 5 Hz (Lemmich *et al.*, 1969). De manera adicional, en el espectro de RMN ^{13}C la diferencia en el desplazamiento químico de los metilos angulares del anillo de pirano es mayor de 2 ppm (Figura 20), consistente con la estereoquímica relativa *cis* de los sustituyentes en C-9 y C-10 (Macías *et al.*, 1989).

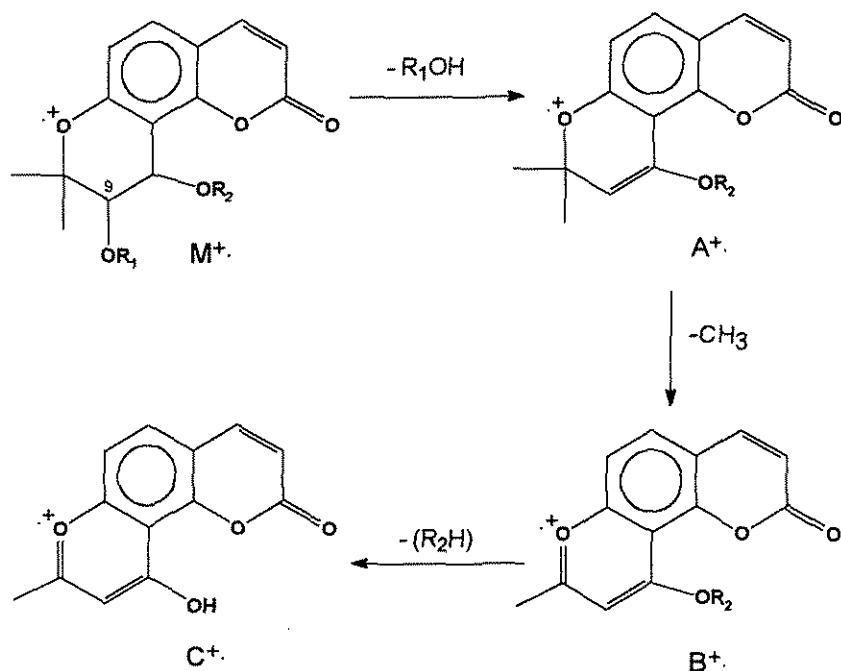


Figura 19. Patrón de fragmentación de los ésteres de kelactona en los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico (IE) (Shaaf *et al.*, 1976; Lingyi *et al.*, 1996).

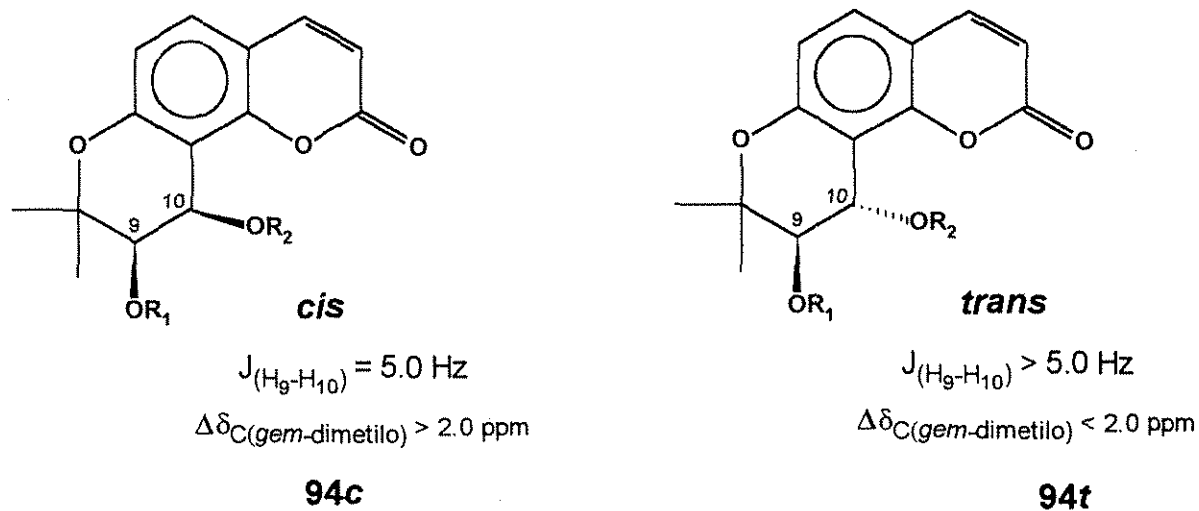


Figura 20. Características de RMN para los isómeros *cis* y *trans* de kelactona (**94c** y **94t**).

Tabla 18. Datos de RMN para los compuestos **85** y **93**.^a

posición	85			93		
	δ_H (m, <i>J</i> in Hz)	δ_C^b	HMBC (C→H)	δ_H (m, <i>J</i> in Hz)	δ_C^b	HMBC (C→H)
2		159.8	3,4		159.9	3,4
3	6.23 (d, 9.5)	113.2		6.23 (d, 9.6)	113.0	
4	7.59 (d, 9.5)	143.2	5	7.59 (d, 9.6)	143.3	5
4a		112.6	4		112.5	4
5	7.35 (d, 8.5)	129.1		7.36 (d, 8.5)	129.3	
6	6.80 (d, 8.5)	114.4		6.81 (d, 8.5)	114.5	
6a		156.7	6,5		156.9	6,5
8		77.4			78.6	
9	5.31 (d, 5.0)	70.1		4.05 (d, 4.8)	71.7	
10	6.55 (d, 5.0)	60.8		6.38 (d, 4.8)	63.4	
10'						
10a		107.0	6,10		107.6	6,10
10b		154.0	4		154.2	4
11	1.44 (s)	22.7		1.48 (s)	22.3	
12	1.41 (s)	24.8		1.42 (s)	20.7	
-OH				2.37 (brs)		
13		170.0	9		178.5	10
14	2.09 (s)	20.7		2.68 (hept, 6.5)	34.3	15,16
15		173.3	16,17	1.26 (d, 6.5)	18.8	14
16	2.43 (dq, 7.5,16.0)	27.5	17	1.23 (d, 6.5)	18.9	14
16'	2.38 (dq, 7.5,16.0)					
17	1.20 (dd, 7.5)	9.1	16			

^a Espectros registrados en CDCl₃, (¹H, 500 MHz y ¹³C, 125 MHz); δ en ppm. ^b Asignados por HMQC, HMBC y DEPT.

Una vez establecida la disposición relativa de los sustituyentes en el anillo pirano, el siguiente paso en el proceso de elucidación estructural consistió en la determinación de la estereoquímica absoluta de los centros estereogénicos C-9 y C-10 mediante la aplicación del método de Mosher. Para ello, se obtuvo el producto (+)-*cis*-metilkelactona (**97c**) por tratamiento prolongado de **85** y **93** con ácido clorhídrico en metanol. Además se obtuvo la (-)-*trans*-metilkelactona (**97t**), como producto mayoritario (Lemmich *et al.*, 1966; Macías *et al.*, 1989) (Figura 21). La formación de éteres epiméricos durante la hidrólisis ácida metanólica de los derivados de kelactona ocurre como consecuencia de una reacción de tipo SN1 en la posición bencílica C-10 (Lemmich *et al.*, 1966). A partir del carbinol **97c** y de los ácidos quirales (*S*)- y (*R*)- α -metoxi- α -(trifluorometil)-fenilacético (*S*- y *R*-MTPA) (Riesser *et al.*, 1992 y 1993; Dale y Mosher, 1973) se prepararon los ésteres de Mosher (**97cs** y **97cr**). Cabe mencionar que aunque el compuesto **93** presenta en su estructura un carbinol de tipo secundario, éste se encuentra impedido estéricamente debido a la presencia

del residuo isobutírico en C-10. en consecuencia para preparar el éster de Mosher fue necesario realizar también la hidrólisis. Una vez preparados los ésteres se establecieron las diferencias $[\Delta\delta_{(S-R)}]$ de los desplazamientos químicos de los hidrógenos cercanos al centro quiral, a partir del análisis de los espectros de RMN ^1H de los ésteres (*S*)- y (*R*)-MTPA (Dale y Mosher, 1973; Ohtani *et al.*, 1991). Así, este análisis (Tabla 19) indicó una diferencia positiva $\Delta\delta_{(S-R)}$ para H-10 y diferencias negativas para los protones (H-11 y H-12) de los metilos angulares del anillo pirano. Estas diferencias fueron consistentes con una configuración absoluta *R* en C-9. De tal manera, que aplicar el modelo descrito por Ohtani y colaboradores (1991), H-11 y H-12 quedaron ubicados del lado derecho del plano del MTPA mientras que H-10 se encontraba del lado izquierdo del mismo (Figura 22A). Al aplicar las reglas de Cahn-Ingold-Prelog sobre el ordenamiento generado en la Figura 22B y dando prioridad a C-8 se determinó que la configuración absoluta en C-9 era *R*. En consecuencia, la configuración absoluta para el centro quiral C-10 en los dos productos naturales se dedujo automáticamente como *R* con base en la disposición *syn* de los sustituyentes oxigenados en C-9 y C-10. Cabe mencionar que el método anteriormente descrito para determinar la configuración absoluta en los productos naturales ha sido ampliamente empleado por diversos autores dando excelentes resultados (Riesser *et al.*, 1992 y 1993; Shi *et al.*, 1997; Chávez y Mata 1998; Calzada *et al.*, 1999; Rogers *et al.*, 1998; *Inter. alia*).

Tabla 19. Datos parciales de ^1H RMN de los ésteres (*S*)- y (*R*)-de Mosher del producto **97c**.

Protón	97c			config. del carbinol
	(<i>S</i>)-MTPA	(<i>R</i>)-MTPA	$\Delta\delta_{S-R}$	
9	5.306	5.346		<i>R</i>
10	4.963	4.882	+0.081	
10 ^a	-	-	-	
11 ^b	1.401	1.494	-0.093	
12 ^b	1.347	1.399	-0.052	

^aEspectro registrado en CDCl_3 (300 MHz). ^bSeñales intercambiables.

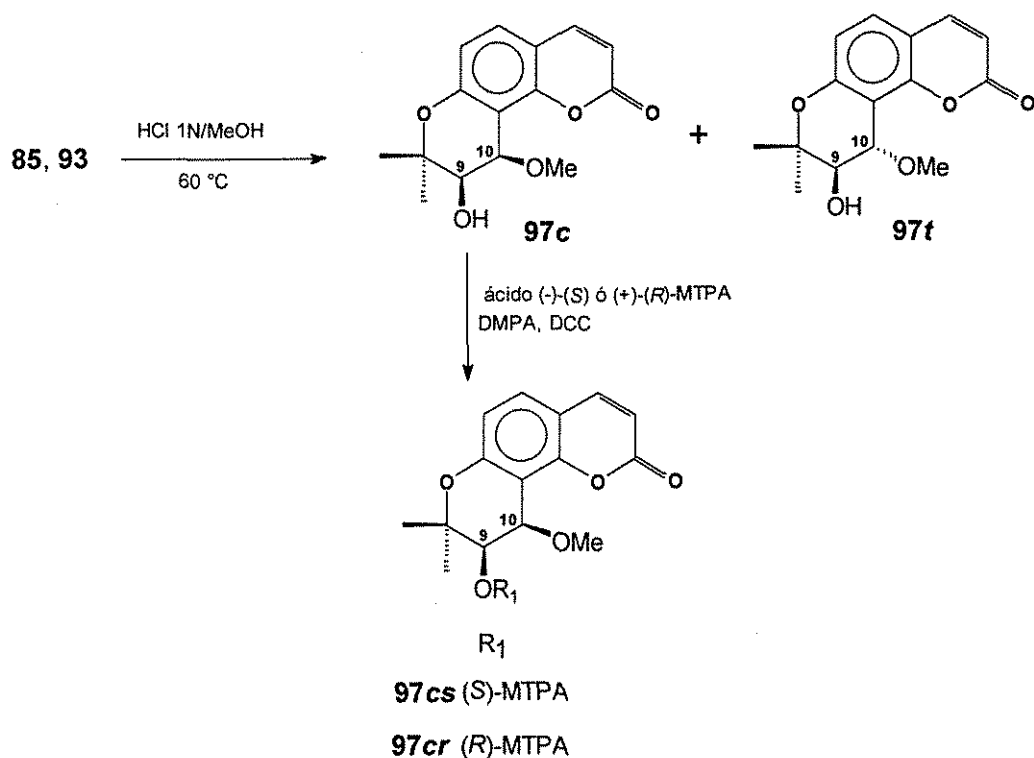


Figura 21. Preparación de los ésteres de Mosher **97cr** y **97cs** a partir de las cumarinas **85** y **93**.

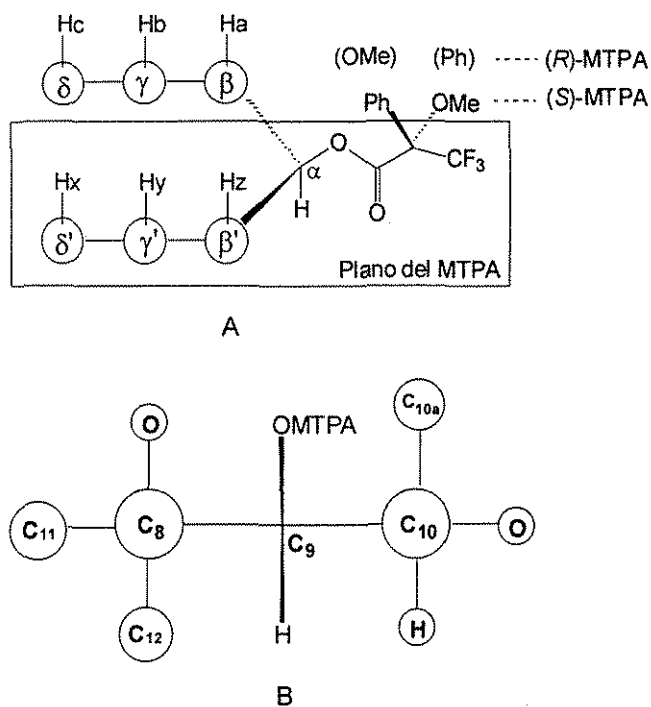


Figura 22. A) Conformación de máxima estabilidad y plano del MTPA propuesto para los ésteres (*S*)- y (*R*)- de Mosher (Ohtani *et al.*, 1991); B) Modelo para determinar la estereoquímica absoluta en los alcoholes secundarios **85** y **93**.

La estructura molecular de los compuestos **85**, **93** y **87** se confirmó de manera inequívoca a través de un análisis de difracción por rayos X (Figuras 23, 24 y 25). En los tres casos, las estructuras cristalinas claramente muestran la disposición *syn* de los sustituyentes en los centros quirales C-9 y C-10. El esqueleto de la piranocumarina es esencialmente plano y el anillo de pirano adopta una conformación de media silla con C-8 y C-9 en lados opuestos al plano del anillo. Los átomos de oxígeno de los carbonilos se dirigen hacia el mismo lado y el grupo éster localizado en C-10. La estructura cristalina de los compuestos **85** y **87** se encuentra gobernada por fuerzas de Van der Waals, las cuales son las responsables de la cohesión del cristal. Por otro lado, en el compuesto **93**, los puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo (O-3) en C-9 y el oxígeno de la cumarina (O-2) ordenan las moléculas en tetrámeros.

Con base en la discusión antes presentada el compuesto **85** se caracterizó como la (9*R*,10*R*)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona y, el compuesto **93** como la (9*R*,10*R*)-9-hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona.

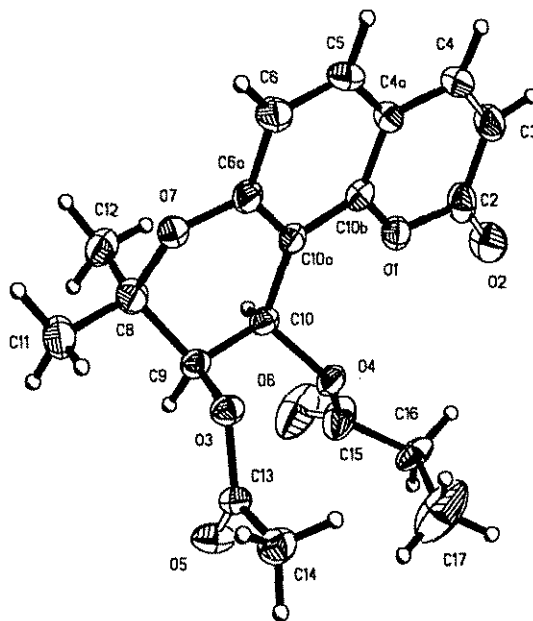


Figura 23. Vista estereoscópica de la (9*R*,10*R*)-9-Acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (**85**)

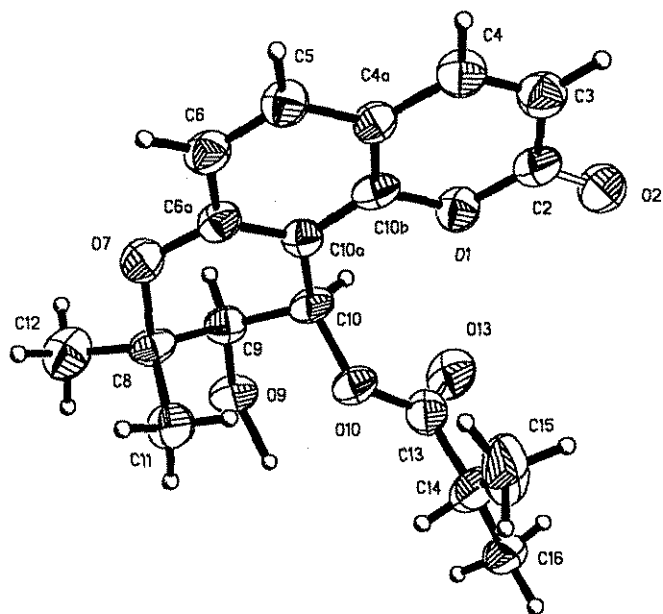


Figura 24. Vista estereoscópica de la (9*R*,10*R*)-9-Hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (**93**)

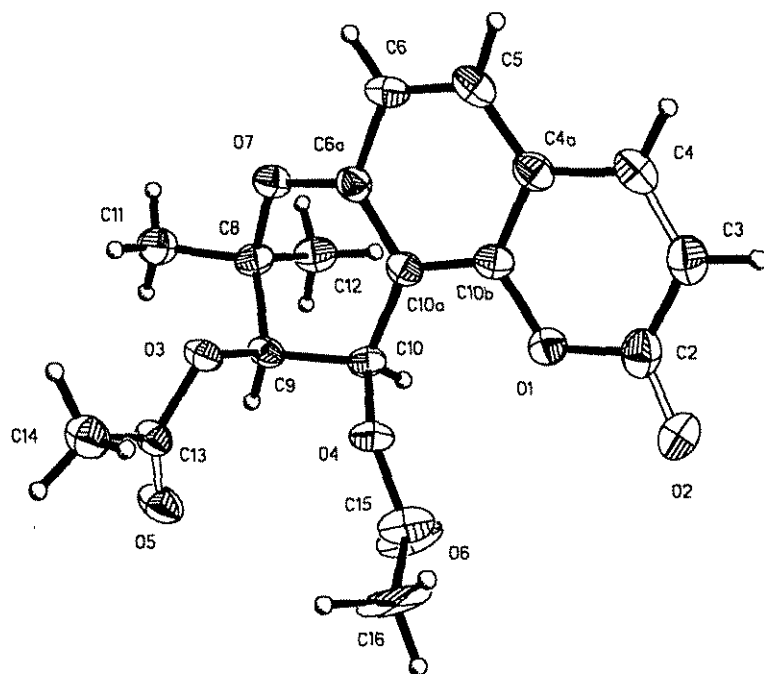


Figura 25. Vista estereoscópica de la quianhucumarina D (**87**).

6.2.2 Elucidación de la estructura molecular de la (9R)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (89). El compuesto **89** se aisló como un sólido vítreo incoloro soluble en CH₂Cl₂, MeOH y DMSO. En las Tablas 20 y 21 se indican sus constantes físicas y espectroscópicas.

Los espectros de RMN para **89** resultaron muy similares a los de los productos **85** y **93**. El análisis cuidadoso de los mismos indicó que este compuesto, sin embargo, era un análogo de la lomatina (**98**) (Nielsen *et al.*, 1971; Shanbhag *et al.*, 1964; Bolhman y Franke, 1971), piranocumarina angular con una función carbinólica en C-9. Al igual que la lomatina los espectros de RMN ¹H (Espectro 10; Apéndice I) presentan las señales diagnósticas de la parte α-pirona en δ_H 6.23 [*J*=9.5 Hz (H-3)] y 7.63 [*J*=9.5 Hz (H-4)]. Las señales para H-5 y H-6 se aprecian como dos dobletes con *J*=8.8 Hz, en δ_H 7.26 y 6.79 respectivamente, y los metilos sobre el anillo de pirano se aprecian como dos señales simples en δ_H 1.38 y 1.36. Por último las señales restantes del anillo de pirano en el espectro de RMN ¹H se observan como un sistema ABX, integrado por una señal doble de doble en δ_H 5.11 [*J*=5.5 Hz, (H-9)] y dos dobles en δ_H ~3.21 [*J*=5.5 Hz, 17.6 Hz, (H-10)] y ~2.92 [*J*=5.5 Hz, 17.6 Hz, (H-10')].

El espectro de RMN ¹³C (Espectro 11; Apéndice I) presenta señales para dieciocho átomos de carbono en armonía con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas (Tabla 25). Así mismo, se observa la señal característica para el carbonilo de lactona-α,β-insaturada de la cumarina en δ_C ~162.2 y las señales correspondientes a los cinco carbonos cuaternarios del núcleo lomatina [δ_C ~112.2 (C-4a), δ_C ~76.6 (C-8), δ_C ~107.2 (C-10a), δ_C ~156.3 (C-10b)]. La asignación de estos carbonos se realizó con base en las correlaciones observadas en el espectro heteronuclear HMBC (Tabla 22).

Los espectros de RMN de **89**, a diferencia de los de la lomatina, mostraron señales para un residuo de ácido isobutírico en δ_H/δ_C 2.55 (*J*=7.00 Hz, H-14)/34.0, 1.17 (*J*=7.00 Hz, H-15)/18.8 y 1.14 (*J*=7.00 Hz, H-16)/19.0. El residuo de ácido isobutírico se encuentra esterificando la única función carbinólica presente en la lomatina. La ubicación del grupo isobutiriloxi en C-9 se corroboró por las correlaciones H-9/ C-13, H-10/C-10 y H-10/C-6a, en el espectro HMBC (Tabla 22).

Tabla 20. Constantes físicas del compuesto **89**.

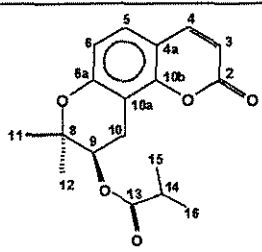
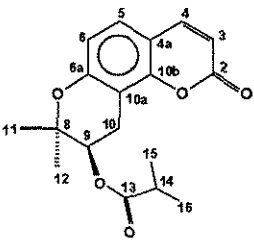
Metabolito	P. f.	$[\alpha]_D$ (c 1 mg/mL, MeOH)	P.M.	F.M.
 <p>89</p>	108-110 °C	+ 20	316	C ₁₈ H ₂₀ O ₅

Tabla 21. Constantes espectroscópicas (UV e IR) y espectrométricas (EM-IE m/z) del compuesto **89**.

Metabolito	UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ)	IR ν_{max} (película)	EM-IE m/z	Análisis elemental
 <p>89</p>	324(3.90) nm	2979, 2944, 1732, 1606, 1144, 1113 cm ⁻¹	316 [M ⁺ (19)], 246 (3), 228 (4), 213 (100), 83 (7), 71 (17), 55 (6), 43 (29).	Calcd C ₁₈ H ₂₀ O ₅ : C 68.34, H 6.37, Encontrado: C 68.38, H 6.30.

La determinación de la estereoquímica absoluta del centro estereogénico C-9 en el compuesto **89** se realizó aplicando una estrategia similar a la descrita para los compuestos **85** y **93**. Así, el tratamiento prolongado de **89** con KOH condujo a la obtención de la (+)-lomatina (**98**) (Nielsen *et al.*, 1971; Shanbhag *et al.*, 1964; Bolhman y Franke, 1971) (Figura 25). A partir de este producto se prepararon los ésteres *S* y *R* de Mosher, **98s** y **98r**. Un análisis similar (Tabla 23) al aplicado a los productos **85** y **93** permitió determinar que la configuración absoluta para el centro quiral C-9 es *R*. De acuerdo con la discusión anterior, compuesto **89** se caracterizó como la (9*R*)-9-hidroxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA

Tabla 22. Datos de RMN para el compuesto **89**.^a

89			
posición	δ_H (m, <i>J</i> in Hz)	δ_C^b	HMBC (C→H)
2		161.2	3, 4
3	6.23 (d, 9.50)	112.6	
4	7.63 (d, 9.50)	143.8	5
4a		112.2	6
5	7.26 (d, 8.8)	126.7	
6	6.79 (d, 8.8)	114.3	
6a		153.4	4, 5, 10
8		76.6	10
9	5.11 (t, 5.5)	69.2	10
10	3.21 (dd, 5.5, 17.6)	23.0	
10'	2.92 (dd, 5.5, 17.6)		
10a		107.2	10, 6
10b		156.3	10, 6, 5
11	1.36 (s)	22.4	
12	1.38 (s)	24.8	
13		176.2	9, 14, 15, 16,
14	2.55 (hept, 7.00)	34.0	15, 16
15	1.17 (dd, 7.00)	18.8	
16	1.14 (dd, 7.00)	19.0	

^a Espectros registrados en CDCl₃, (¹H, 500 MHz y ¹³C, 125 MHz); δ en ppm. ^b Asignados por HMQC, HMBC y DEPT.

Tabla 23. Datos parciales de ¹H RMN de los ésteres (*S*)- y (*R*)- de Mosher del producto **98**.

98				
Proton	(<i>S</i>)-MTPA	(<i>R</i>)-MTPA	$\Delta\delta_{S-R}$	config. del carbinol
9	5.246	5.245		<i>R</i>
10	3.311	3.266	+0.045	
10'	3.065	2.981	+0.84	
11 ^b	1.323	1.378	-0.055	
12 ^b	1.273	1.364	-0.091	

^aSpectra recorded in CDCl₃ (300 MHz). ^bInterchangeable signals.

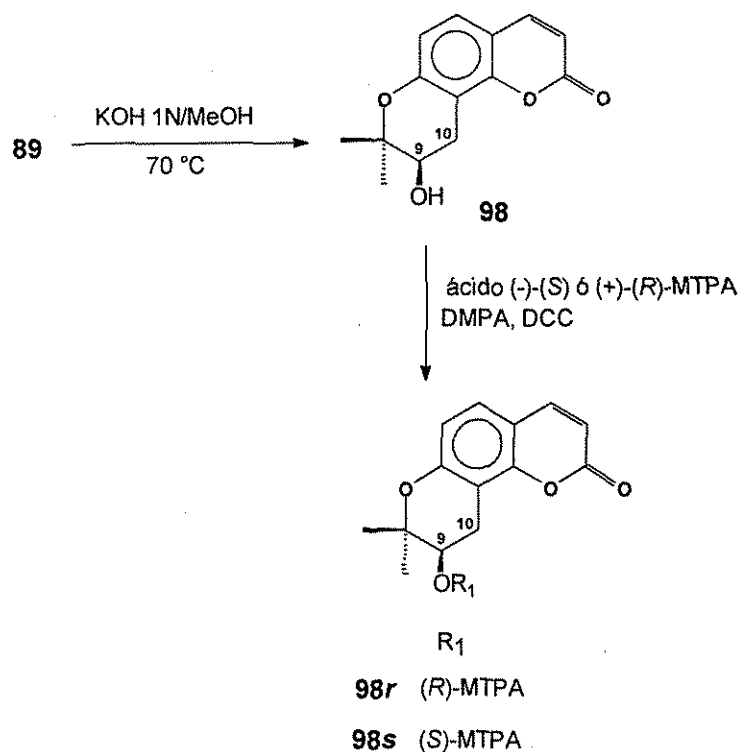


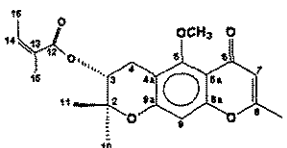
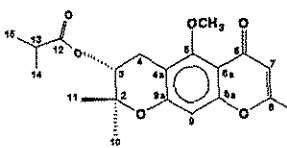
Figura 26. Preparación de los ésteres de Mosher **98s** y **98r** a partir de la (+)- lomatina (**89**).

6.2.3 Elucidación estructural de (3*R*)-2-metil-but-(2*Z*)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipirano (95**) y (3*R*)-isobutiroliloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipirano (**96**).** En las Tablas 24 y 25 se indican las constantes físicas y espectroscópicas para los productos naturales **95** y **96**.

Tabla 24. Constantes físicas de los compuestos **95** y **96**.

Metabolito	P. f.	$[\alpha]_D$ (c 1 mg/mL, MeOH)	P.M.	F.M.
<p style="text-align: center;">95</p>	-	+340	372	$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_6$
<p style="text-align: center;">96</p>	140-141 °C	+560	360	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6$

Tabla 25. Constantes espectroscópicas (UV e IR) y espectrométricas (EM-IE m/z) de los compuestos **95** y **96**.

Metabolito	UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ)	IR ν_{\max} (película)	EM-IE m/z	Análisis elemental
 <p style="text-align: center;">95</p>	214 (4.50), 285 (4.12) nm	2981, 2987, 1714, 1660, 1621, 1470, 1238, 1141 cm^{-1}	372 [M^+ (25)], 289 (2), 272 (23), 257 (100), 83 (30)	Calcd $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_6$: C 67.73, H 6.50, Encontrado: C 67.78, H 6.49.
 <p style="text-align: center;">96</p>	213 (4.6), 284 (4.10) nm	2981, 2987, 1714, 1660, 1621, 1470, 1238, 1141 cm^{-1}	360 [M^+ (29)], 273 (27), 257 (100), 231 (55), 229 (51), 71 (8), 43 (13).	Calcd $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6$: C 66.65, H 6.71, Encontrado: C 66.62, H 6.75

El análisis cuidadoso de los espectros de RMN (Tabla 26) permitió establecer las estructuras planas de los compuestos **95** y **96**. Así mismo, este análisis condujo a la conclusión de que los productos naturales eran benzopironas relacionadas con el (-) hamaudol (**99**) (Nitta, 1965) (Figura 26). Las señales comunes observadas en los espectros de RMN de las benzopironas se resumen a continuación:

- a) En la región comprendida entre 5.5 y 10 ppm, los espectros de RMN- ^1H (Espectros 14 y 19; Apéndice I) presentan una señal simple en δ_{H} 6.52 (H-9) asignable al único hidrógeno aromático de las moléculas. También se aprecia una señal en δ_{H} 5.99 ($J=0.5$ Hz, H-7) atribuible al hidrógeno de la porción metil- γ -pirona. En el espectro de HMQC (Espectros 17 y 22; Apéndice I) estas señales correlacionan con los metinos en δ_{C} \sim 93.7 y \sim 111.3, respectivamente. Las correlaciones de H-9 con C-4a, C-5a, C-8a y C-9a, observadas en los espectros HMBC de los productos (Tabla 29) indican que el anillo pirano se encuentra fusionado de modo lineal a la benzo- γ -pirona. Por otro lado, las correlaciones H-7/C-8 y -CH₃ corroboraron la presencia del metilo en C-8 (Tabla 26).
- b) La región a campo alto de los espectros de RMN- ^1H muestra las señales características de los metilos angulares ubicados sobre el anillo de pirano en δ_{H} \sim 1.62 y \sim 1.61. Por otro lado, se observa un sistema ABX conformado por las

señales de un hidrógeno geminal a una función oxigenada [$\delta_H \sim 5.03$ dd ($J=7.00$ Hz, H-3)] y del metileno del anillo pirano [$\delta_H \sim 3.33$ dd ($J=7.00$ y 9.5 Hz, H-4 α) y ~ 3.27 dd ($J=7.00$ y 9.5 Hz, H-4 β)]. En el espectro de HMQC, dichas señales correlacionan con las absorciones de un metino en $\delta_C \sim 89.3$ y de un metileno en $\delta_C \sim 27.7$.

- c) En $\delta_H/\delta_C \sim 3.93/\sim 61.1$ se aprecia una señal para un grupo metoxilo unido a un anillo aromático. La correlación observada en el espectro HMBC entre C-5 y el grupo metoxilo permitió ubicar al grupo funcional en esta posición.

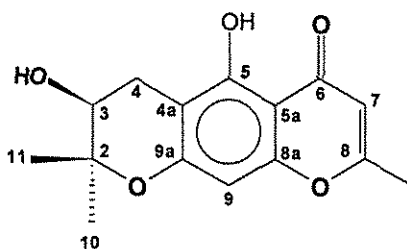


Figura 27. Estructura del hamaudol (99).

La principal diferencia observada en los espectros de RMN de los productos naturales **95** y **96**, radica en la naturaleza de la función oxigenada unida al anillo pirano. En el caso del compuesto **95**, se aprecia en los espectros señales asociadas a un grupo angeloiloxi [δ_H 5.98 (H-14), 1.89 (H-15) y 1.68 (H-16); δ_C en 137.7 (C-14), 15.6 (C-15) y 20.6 (C-16); en tanto que en el compuesto **96** se observan las correspondientes a un grupo isobutiroiloxi [δ_H 2.41 (H-13), 1.06 (H-14) y 1.05 (H-15); δ_C en 167.2 (C-13), 34.9 (C-14), 18.8 (C-15) y 18.8 (C-16)].

La ubicación de los grupos angeloiloxi e isobutiroiloxi la posición C-3 se realizó con base en los cuadros de conectividad para H-4 en los espectros HMBC. Así en los compuestos **95** y **96**, H-4 correlaciona con C-9a y C-5 (ver Tabla 26).

Tabla 26. Datos de RMN para las piranocromonas **95** y **96**.^a

Position	95			96		
	δ_H (m, <i>J</i> en Hz)	δ_C^b	HMBC (C→H)	δ_H (m, <i>J</i> en Hz)	δ_C^b	HMBC (C→H)
2		81.9	4,10,11		81.6	4,10,11
3	5.03 (dd, 7.0)	89.3	4,11,10	5.01 (dd, 7.0)	89.0	4,11,10
4 α	3.33 (dd, 7.0, 9.5)	27.7		3.30 (dd, 7.0, 9.6)	27.6	
4 β	3.27 (dd, 7.0, 9.5)			3.23 (dd, 7.0, 9.6)		
4a		116.7	4,9		116.7	4,9
5		155.8	-OCH ₃ ,4		155.7	-OCH ₃ ,4
5a		111.9	9		111.5	9
6		177.1			177.1	
7	5.99 (q, 0.5)	111.4	-CH ₃	5.99 (q, 0.75)	111.4	9,-CH ₃
8		163.3	7,-CH ₃		163.3	7,-CH ₃
8a		159.9	9,-CH ₃		159.9	9,-CH ₃
9	6.52 (s)	93.7		6.53 (s)	93.7	
9a		164.4	4,9		164.4	4,9
10	1.62 (s)	21.4		1.56 (s)	21.1	
11	1.61 (s)	22.1		1.53 (s)	22.0	
12		167.1	15		167.2	13,14,15
13		128.5	15,16	2.41 (hept, 7.0)	34.9	14,15
14	5.98 (ddq, 1.5, 7.5, 14.5)	137.7	15,16	1.06 (d, 7.0)	18.8	13
15	1.89 (dq, 1.5, 7.5)	15.6	16	1.05 (d, 7.0)	18.8	13
16	1.68 (q, 1.5, 7.0)	20.6	15			
-OCH ₃	3.93 (s)	61.1		3.94 (s)	61.1	
-CH ₃	2.27 (d, 0.5)	19.7	7	2.28 (d, 0.75)	19.8	7

^aEspectro registrado en CDCl₃, (¹H, 500 MHz y ¹³C, 125 MHz); δ en ppm. ^bAsigado por HMQC, HMBC y DEPT.

Una vez establecidas las estructuras planas de las piranocromonas **95** y **96**, el siguiente paso en el proceso de la elucidación consistió en determinar la estereoquímica absoluta en el centro quiral C-3. Nuevamente se aplicó la metodología de los ésteres de Mosher (Onhtani, *et al.*, 1991) (Figura 27). Al igual que en los casos anteriores, fue necesario hidrolizar los productos naturales para generar el alcohol novedoso **100**. Este compuesto se caracterizó como el (+)-5-metoxihamaudol. (**100**) y sus espectros de RMN (Espectro 23 y 24; Apéndice I) difieren de los del hamaudol (Nitta, 1965) en la presencia de la señal para el grupo metoxilo en C-5. Además el signo de la rotación óptica de **100** es opuesta a la del hamaudol lo cual sugirió en primera instancia que la configuración del único centro quiral presente en **95** y **96** era opuesta a la del hamaudol.

A partir del alcohol **100** se prepararon los ésteres *S* y *R* de Mosher (Onhtani, *et al.*, 1991) (**100r** y **100s** respectivamente), Figura 27. Un análisis similar al aplicado para los productos **85**, **93** y **89** permitió establecer que la configuración absoluta en C-9 es *R* en las dos

benzopironas **95** y **96** (Tabla 27). En el caso del hamaudol la configuración absoluta en C-9 se asignó como *S*, aunque en la literatura no se encuentra descrito el procedimiento empleado para asignar la configuración del alcohol secundario del (-)-hamaudol.

Tabla 27. Datos parciales de RMN ^1H los ésteres de Mosher (*S*)- y (*R*)- del producto **100**^a.

100				
proton	(<i>S</i>)-MTPA	(<i>R</i>)-MTPA	$\Delta\delta_{S-R}$	config. del carbinol
3	4.867	4.095		<i>R</i>
4 α	3.079	3.067	+0.012	
4 β	3.253	3.247	+0.006	
10	1.664	1.734	-0.070	
11	1.661	1.725	-0.060	

^aEspectro registrado en CDCl_3 (300 MHz).

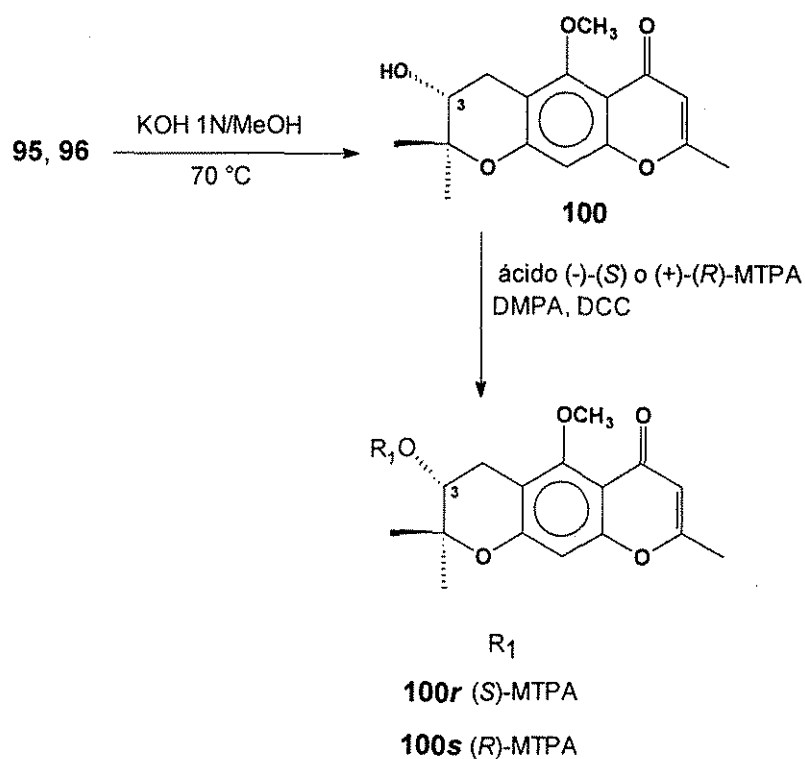


Figura 28. Preparación de los ésteres de Mosher **100r** y **100s** a partir de las piranocromonas **95** y **96**.

6.3 Determinación del potencial fitotóxico de los metabolitos secundarios derivados del estudio fitoquímico biodirigido de las partes aéreas de *Prionosciadium watsoni*. De acuerdo con los objetivos planteados y con la estrategia experimental establecida para el desarrollo de la presente investigación se realizaron los ensayos biológicos conducentes a determinar el potencial fitotóxico de los compuestos aislados. En primer lugar, se evaluó la actividad fitotóxica de los compuestos mediante la determinación de su efecto sobre la germinación y crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*, especies representantes de arvenses dicotiledóneas y monocotiledóneas, respectivamente. Así mismo, se determinó la actividad fitotóxica de los compuestos mediante la evaluación de sus efectos sobre el crecimiento, el contenido de clorofila e integridad celular de la arvense acuática *Lemna pausicostata*.

Una vez establecido el efecto fitotóxico de los productos naturales y de algunos de sus derivados químicos se procedió a evaluar el efecto de los mismos sobre la fotosíntesis en hojas aisladas de frijol mungo (*Vigna radiata*) y frijol ojo de cabra (*Phaseolus vulgaris*) y sobre el proceso de respiración en mitocondrias aisladas de los hipocótilos de frijol mungo. De manera adicional, se exploró si los compuestos interactúan con la proteína calmodulina. Los dos primeros blancos de acción se escogieron considerando que la mayoría de los herbicidas comerciales ejercen su efecto sobre la fotosíntesis y sobre la respiración mitocondrial. El efecto sobre la proteína calmodulina se evaluó considerando que hay evidencias de que esta proteína juega un papel importante en los procesos asociados con la transducción de señales en los vegetales.

6.3.1 Determinación cuantitativa del efecto fitotóxico de los metabolitos aislados a partir del extracto activo de *Prionosciadium watsoni* sobre la germinación y crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*. En general todos los compuestos evaluados inhibieron el crecimiento radicular de las dos malezas de prueba en un modo dependiente de la concentración (Tabla 28). Los compuestos 95, 96 y 97c fueron significativamente los más activos y mostraron gran selectividad en contra de las semillas de *E. crus-galli*, maleza difícil de erradicar.

Con respecto al proceso de germinación, de manera general los compuestos puros no presentaron un efecto significativo a la máxima concentración evaluada (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Es importante mencionar que la actividad fitotóxica de los compuestos fue comparable o igual al del control positivo, 2,4-D. Así mismo, cabe señalar que con la excepción de los compuestos **95**, **96** y **97c**, el efecto presentado por la mayoría de los compuestos ensayados en este estudio es similar a la de otros productos naturales (Castañeda *et al.*, 1998; Calera *et al.*, 1995a y 1996; Mata *et al.*, 1996 y 1998; Macías *et al.*, 1999, 2000 y 2001; *inter alia*). La magnitud del efecto de los productos **95**, **96** y **97c** es comparable al de la fitotoxinas microbianas que generalmente son más potentes que las vegetales.

Tabla 28. Efecto del extracto, compuestos aislados y derivados químicos de *P. watsoni* sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*.

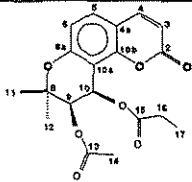
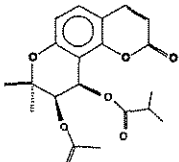
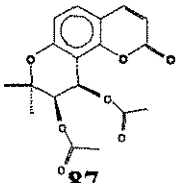
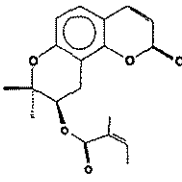
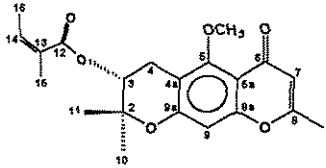
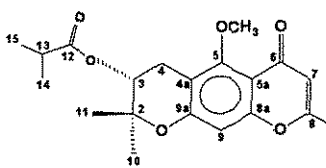
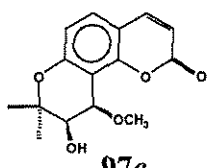
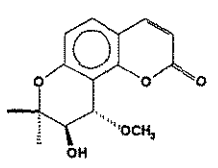
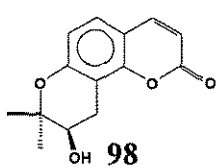
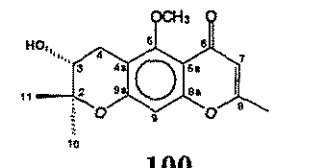
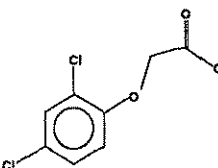
Tratamiento	IC ₅₀		IC ₅₀	
	<i>A. hypochondriacus</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(moles L ⁻¹)	<i>E. crus-galli</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(moles L ⁻¹)
 85	142.9	3.96×10^{-4}	177.6	4.39×10^{-4}
 86	150.6	4.02×10^{-4}	60.8	1.62×10^{-4}
 87	ND*	ND*	ND*	ND*
 88	85.5	2.60×10^{-4}	283.4	8.63×10^{-4}

Tabla 28. Efecto del extracto, compuestos aislados y derivados químicos de *P. watsoni* sobre crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*.

Tratamiento	IC ₅₀ <i>A. hypochondriacus</i>		IC ₅₀ <i>E. crus-galli</i>	
	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(moles L^{-1})	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(moles L^{-1})
<p>89</p>	75	2.37×10^{-4}	53.5	1.69×10^{-4}
<p>90</p>	ND*	ND*	ND*	ND*
<p>91</p>	90.1	2.62×10^{-4}	53.3	1.55×10^{-4}
<p>92</p>	ND*	ND*	ND*	ND*
<p>93</p>	62.8	1.89×10^{-4}	131.1	5.95×10^{-4}
<p>94</p>	94.6	3.61×10^{-4}	115.0	4.39×10^{-4}

^aControl positivo (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). *No determinada debido a la poca cantidad de material. Estos resultados son promedio de tres repeticiones. **Mostraron diferencias significativas en ANOVA.

Tabla 28. Efecto del extracto, compuestos aislados y derivados químicos de *P. watsoni* sobre crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*.

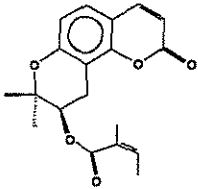
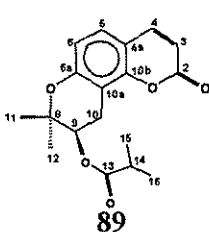
Tratamiento	IC ₅₀ <i>A. hypochondriacus</i>		IC ₅₀ <i>E. crus-galli</i>	
	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(moles L^{-1})	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(moles L^{-1})
 <p>95</p>	50.5	1.43×10^{-4}	9.84	2.64×10^{-5}
 <p>96</p>	26.7	7.41×10^{-5}	5.3	1.48×10^{-5}
 <p>97c</p>	89.7	3.25×10^{-4}	1.71	6.19×10^{-6}
 <p>97t</p>	297.7	1.08×10^{-4}	223.0	8.08×10^{-4}
 <p>98</p>	111.2	3.83×10^{-4}	133.9	4.61×10^{-4}
 <p>100</p>	84.67	3.44×10^{-4}	73.1	2.96×10^{-4}
 <p>2,4-D^a</p>	39.8	1.80×10^{-4}	>48.6	> 2.20×10^{-4}

^aControl positivo (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). *No determinada debido a la poca cantidad de material. Estos resultados son promedio de tres repeticiones. **Mostraron diferencias significativas en ANOVA.

6.3.2 Determinación cuantitativa del efecto fitotóxico de los productos puros aislados de *P. watsoni* sobre la arvense acuática *Lemna pausicostata*. El efecto fitotóxico de los productos naturales y sus derivados químicos puros sobre *L. pausicostata* se determinó de acuerdo a la metodología descrita en la sección experimental.

De los compuestos ensayados, solo los derivados de la lomatina **88** y **89** mostraron fitotoxicidad significativa sobre esta arvense a concentraciones de 100 y 200 μM (Tabla 29 y Figura 29). Estas cumarinas causaron inhibición del crecimiento, reducción del contenido de clorofila y pérdida de electrolitos de la célula de una manera dependiente de la concentración. La mayor actividad de los productos naturales **88** y **89** con relación a **98** indica que la presencia de un éster confiere una mayor potencia a la molécula.

Tabla 29. Actividad fitotóxica de los compuestos **88** y **89** de *P. watsoni* sobre *Lemna pausicostata*.^a

Tratamiento	Concentración (μM)	Incremento en la conductividad ($\mu\text{mho/cm}$)	Inhibición del Crecimiento (%)	Reducción de la Clorofila (%)
 <p>88</p>	12	-77.00 ± 42.4	15.33 ± 11.4	5.94 ± 4.9
	25	-30.50 ± 31.1	37.51 ± 14.2	4.37 ± 4.3
	50	59.50 ± 7.1	47.59 ± 5.7	12.82 ± 10.8
	100	100.00 ± 9.2	100.00 ± 0.0	40.32 ± 3.3
 <p>89</p>	25	124.20 ± 21.1	19.59 ± 8.3	20.00 ± 16.8
	50	100.00 ± 1.4	23.52 ± 13.8	54.30 ± 2.1
	100	86.00 ± 2.1	58.81 ± 8.3	84.92 ± 4.0
	200	260.00 ± 13.4	100.00 ± 0.0	87.38 ± 0.0

^aEstos resultados son promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. Mostraron diferencias significativas en (prueba *t*-Student sin aparear), mayor fitotoxicidad que el control (medio de cultivo; incremento en la conductividad, $0.00 \pm 26.2 \mu\text{mho/cm}$; inhibición del crecimiento, $0.00 \pm 2.7\%$; reducción de la clorofila, $0.00 \pm 4.2\%$).

Considerando que la actividad fitotóxica sobre *Lemna pausicostata* L de **88** y **89** fue menor que la del extracto se procedió a determinar si la actividad detectada inicialmente se debía a un efecto sinérgico de los productos. Para ello, se prepararon dos mezclas de compuestos (**mezcla F4** y **mezcla F5**). La primera (**mezcla F4**) se elaboró con cantidades equimolares

de los compuestos **85**, **86**, **88**, **89**, **91** y **83**; y la segunda, (**mezcla F5**) con los compuestos **94**, **95** y **96**. Las mezclas se ensayaron a las concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100 μM . A partir de los resultados de estos experimentos (Tabla 30 y Figura 30) se determinó que la actividad fitotóxica de las mezclas no era mayor que la de los compuestos **88** y **89**. La ausencia de un efecto sinérgico de los compuestos aislados permite inferir que el(los) compuesto(s) activo(s) responsable(s) del potente efecto inhibitor del crecimiento de *L. pausicostata* no se aisló(aron) en el transcurso de esta investigación.

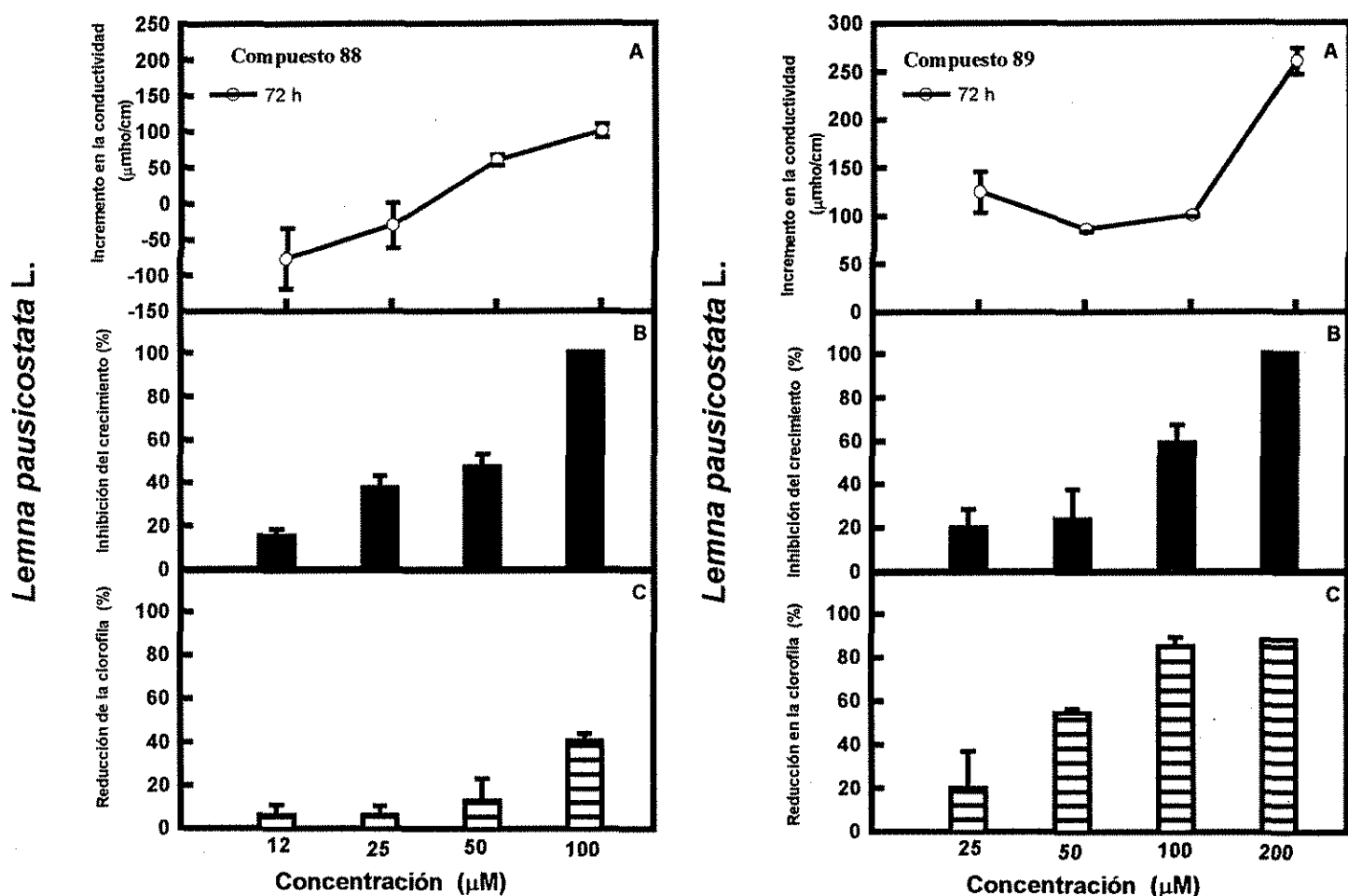


Figura 29. Actividad fitotóxica de los compuestos **88** y **89** sobre *Lemna pausicostata* L. A: conductividad del medio de cultivo, B: inhibición del crecimiento y C: reducción de la clorofila.

Tabla 30. Actividad fitotóxica de las mezclas de compuestos F4 y F5 sobre *Lemna pausicostata*.^a

Tratamiento	Concentración (μM)	Incremento en la conductividad (μmho/cm)	Inhibición del Crecimiento (%)	Reducción de la Clorofila (%)
Mezcla F4	12	-12.1 ± 27.5	0.0 ± 0.0	8.64 ± 0.0
	25	3.4 ± 4.2	12.12 ± 14.6	20.14 ± 0.0
	50	9.4 ± 21.2	22.72 ± 0.0	31.50 ± 0.4
	100	21.4 ± 0.0	65.9 ± 3.6	44.55 ± 0.8
Mezcla F5	12	6.9 ± 14.8	6.8 ± 4.2	14.55 ± 0.3
	25	20.4 ± 14.1	9.1 ± 5.1	19.1 ± 0.3
	50	21.4 ± 15.5	15.9 ± 0.0	20.0 ± 0.2
	100	71.4 ± 29.6	50.0 ± 0.0	30.0 ± 0.3

^aEstos resultados son promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Control(medio de cultivo; incremento en la conductividad, 0.00 ± 26.2 μmho/cm; inhibición del crecimiento, 0.00 ± 18.0 %; reducción de la clorofila, 0.00 ± 0.18 %.

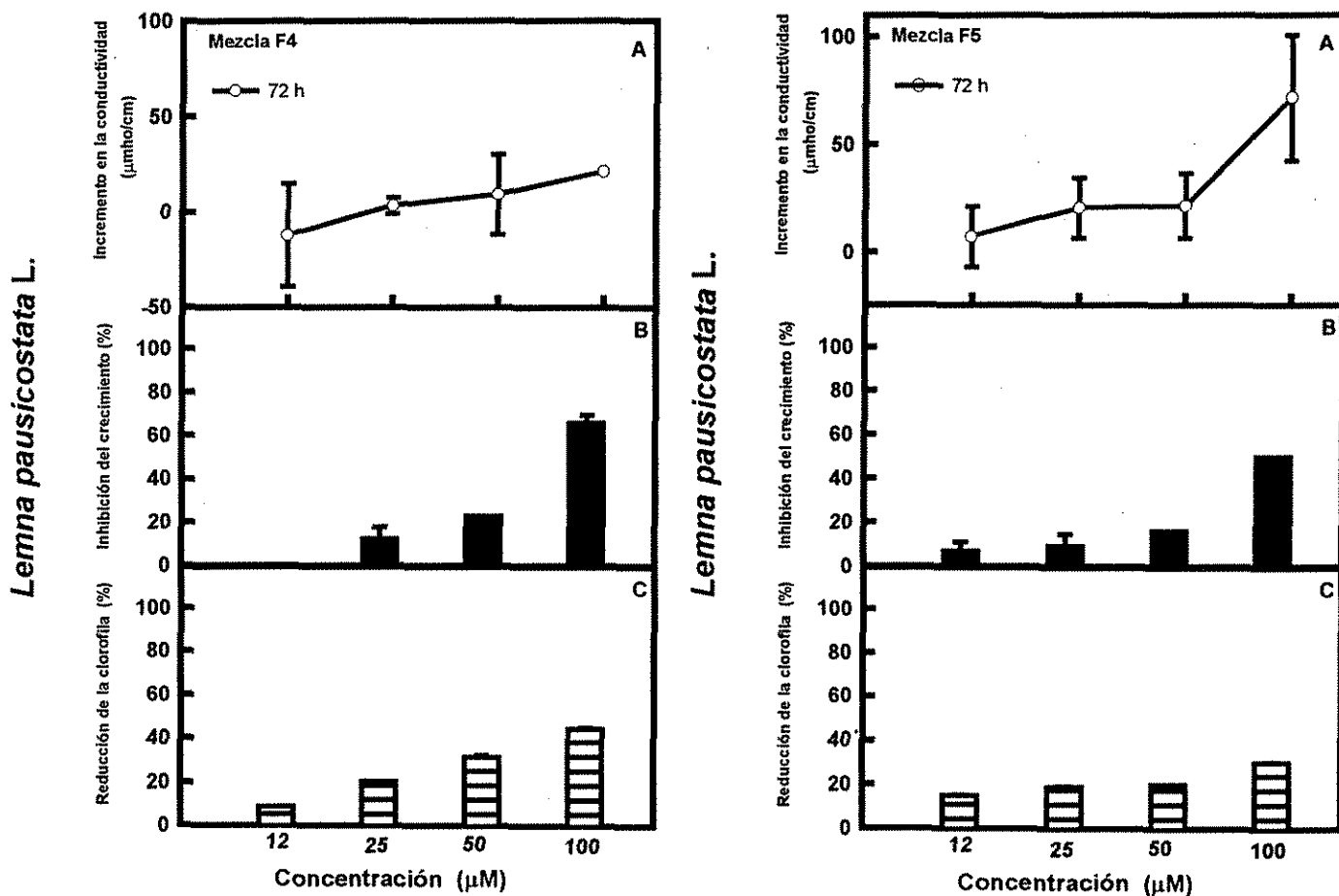


Figura 30. Actividad fitotóxica de las mezclas F4 y F5 sobre *Lemna pausicostata* L. A: conductividad del medio de cultivo, B: inhibición del crecimiento y C: reducción de la clorofila.

6.3.3 Determinación del efecto de los compuestos jatamansina (88), 89, 95, 96 y cis-metilcellactona (97c), sobre la respiración en mitocondrias aisladas de los hipocótilos de frijol mungo (*Vigna radiata*). Debido a la elevada actividad inhibitoria del crecimiento radicular de los compuestos 95, 96 y 97c, sobre *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli* y, la de los productos 88 y 89 sobre *Lemna pausicostata*, se consideró conveniente explorar en forma detallada el efecto de los mismos sobre la respiración en mitocondrias vegetales aisladas de los hipocótilos de frijol mungo (*Vigna radiata*).

Como se mencionó en la sección de antecedentes, la respiración constituye la fuente principal de energía en forma de ATP durante la etapa de imbibición del proceso de germinación (Bewley y Black, 1994), por lo tanto, constituye un blanco de acción importante para los agentes herbicidas debido a que es de esperarse, que cualquier alteración en este proceso conduzca a una supresión de la germinación, a un desarrollo anormal de los vegetales o a la muerte de los mismos por deficiencia de ATP. En la Figura 30 se resumen los eventos de la respiración en mitocondrias vegetales y se indican los sitios de acción de algunos inhibidores de este proceso.

La respiración se lleva a cabo en los organelos celulares llamados mitocondrias las cuales presentan capacidad de catalizar la síntesis de ATP (fosforilación oxidativa) acoplada con la reducción de O₂ a H₂O y la oxidación de diversos sustratos a CO₂ (cadena de transporte de electrones). En las mitocondrias vegetales al igual que en las animales los componentes de la cadena respiratoria se encuentran acomodados en cuatro complejos multiproteicos responsables de la transferencia de electrones entre los sustratos derivados del ciclo de los ácidos tricarbónicos y el oxígeno molecular. Los cuatro complejos multiproteicos son la NADH:ubiquinona reductasa (complejo I), la succinato:ubiquinona reductasa (complejo II), ubiquinona:citocromo oxidasa (complejo III) y el citocromo c oxidasa (complejo IV) los cuales se encuentran localizados en la membrana interna mitocondrial en el orden indicado en la Figura 31. Sin embargo, la principal diferencia entre la cadena respiratoria de las mitocondrias vegetales respecto a las animales consiste en la presencia de múltiples deshidrogenasas de NADH así como también en la presencia, en la mayor parte de las

especies de plantas de una ruta oxidativa alterna resistente al cianuro (Moore y Siedow, 1991).

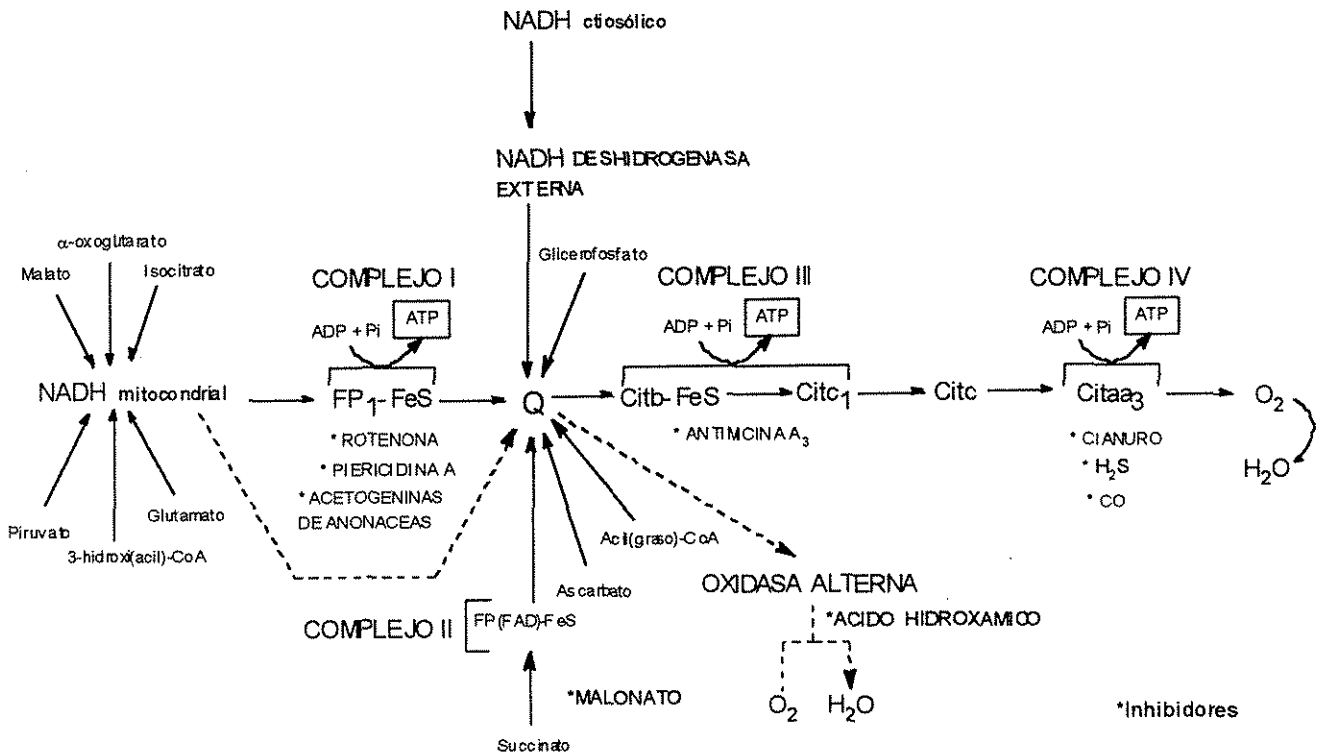


Figura 31. Organización de los cuatro complejos multiprotéicos acarreadores de electrones de la respiración mitocondrial vegetal y sitio de acción de algunos inhibidores de este proceso metabólico (Moore y Siedow, 1991).

Existen diversos compuestos de origen sintético que actúan inhibiendo o desacoplando el proceso de la fosforilación oxidativa; estos agentes incluyen numerosos compuestos de diferentes categorías químicas, como los fenoles, los hidroxibenzonitrilos, los bencimidazoles, las fenilhidrazonas, los ácidos fenoxiacéticos y las aminas, entre los que destacan los herbicidas como el 2,4-D, el dinoseb y el DNOC.

Con relación a los compuestos de origen vegetal, son menos escasos los reportes que describen el efecto de los mismos sobre la cadena respiratoria mitocondrial. Las quinonas, los flavonoides, los rotenoides, las acetogeninas de anonáceas y algunos antibióticos son quizá los compuestos que han recibido una mayor atención (Goran y Stenlid, 1970; Ravanel, 1982; Moreland y Novitzky, 1987; McLaughling *et al.*, 1994).

Como se mencionó en la sección de antecedentes los agentes que inhiben la síntesis de ATP durante la respiración pueden ejercer su efecto mediante diversos mecanismos. De tal modo que, en primer lugar se evaluó el efecto de los compuestos **88**, **89**, **95**, **96** y **97c** sobre la fosforilación oxidativa y sobre la cadena de transporte de electrones mediante un método polarográfico el cual mide el consumo de oxígeno dependiente de la concentración de ADP adicionado al medio de reacción (Estabrook, 1967). Cualquier modificación en la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia o presencia de ADP es indicativa de una inhibición de la fosforilación oxidativa o del flujo de electrones y a la postre de una inhibición también del proceso de respiración.

Una vez determinado el efecto de las fitotoxinas **88**, **89**, **95**, **96** y **97c** sobre el transporte de electrones se procedió a caracterizar espectrofotométricamente el sitio o la enzima redox en la cadena transportadora de electrones alterada por cada compuesto. La discusión del comportamiento mostrado por los compuestos sobre los eventos respiratorios antes mencionados, es el objetivo de la siguiente sección.

6.3.3.1 Efecto de los compuestos 88, 89, 95, 96 y 97c sobre la fosforilación oxidativa.

Las Tablas 31-33 presentan los cambios producidos por los compuestos **88**, **89**, **95**, **96** y **97c** en la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de ADP al adicionar diferentes sustratos oxidables (NADH, succinato, malato-glutamato). Los compuestos **95** y **96** mostraron un efecto inhibitorio significativo dependiente de la concentración cuando el sustrato empleado fue el succinato. Los compuestos **88** y **89** mostraron un efecto inhibitorio ligero en presencia de todos los sustratos añadidos mientras que **97c**, no fue activo. Los oxigramas de las Figuras 32-34 muestran el comportamiento de los compuestos **88**, **89**, **95** y **96** sobre el proceso de fosforilación oxidativa en la respiración.

El empleo de los diversos sustratos permitió generar información acerca del complejo enzimático de la cadena redox que se afectaba por los tratamientos. Así, mediante la adición de la mezcla malato-glutamato se pudo observar si la inhibición ocurría a lo largo de toda la cadena de transporte de electrones, es decir, del complejo I al IV. La adición de NADH como sustrato permitió estudiar el intervalo comprendido entre la deshidrogenasa

externa del NADH y el complejo IV. Por último, al añadir succinato se pudo estudiar el segmento comprendido entre el complejo II-IV (ver Figura 30).

Los valores del control respiratorio (RCR) mayores de 2 indicaron la integridad y el adecuado acoplamiento de las mitocondrias durante la realización de los experimentos. Por otro lado, los valores de P/O indicaron el número de moléculas de ATP generadas durante el proceso de fosforilación. Cabe mencionar que cuando los sustratos oxidables son NADH y succinato, el valor de P/O debe ser menor o igual a dos y cuando se emplea la mezcla malato-glutamato debe ser menor o igual a tres (Estabrook, 1967).

Tabla 31. Efecto de los compuestos **88**, **89**, **95** y **96** sobre la velocidad de consumo de oxígeno durante la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones en mitocondrias aisladas de frijol mungo (*Vigna radiata*) cuando el sustrato oxidable fue el succinato (10 mM).

Tratamiento	[] (M)	Fosforilación oxidativa ¹	IC ₅₀ (M)	Ttransporte de electrones ¹	RCR	P/O
Sin tratamiento		115.3 ± 10.7		14.7 ± 5.1	7.80	1.8 ± 2.7
EtOH (95%)		113.2 ± 14.3		15.8 ± 11.1	7.16	1.7 ± 3.8
88	1.2 × 10 ⁻⁵	170.8 ± 1.7	6.6 × 10 ⁻³	72.7 ± 0.1	2.35	2.0 ± 0.7
	1.2 × 10 ⁻⁴	163.8 ± 1.7		37.0 ± 2.0	4.42	1.8 ± 1.4
	1.2 × 10 ⁻³	98.9 ± 1.7		18.1 ± 0.0	5.44	-
89	1.2 × 10 ⁻⁵	163.8 ± 2.6	> 1.2 × 10 ⁻³	74.2 ± 4.3	2.20	1.8 ± 2.3
	1.2 × 10 ⁻⁴	157.5 ± 0.7		68.0 ± 1.2	2.32	2.0 ± 0.0
	1.2 × 10 ⁻³	106.4 ± 1.5		49.5 ± 3.0	2.15	1.6 ± 2.1
95	1.2 × 10 ⁻⁵	112.7 ± 0.0	1.1 × 10 ⁻⁴	38.4 ± 0.5	2.94	1.9 ± 3.0
	1.2 × 10 ⁻⁴	61.5 ± 0.7		IC	-	-
	1.2 × 10 ⁻³	IC		IC	-	-
96	1.2 × 10 ⁻⁵	81.6 ± 2.0	1.1 × 10 ⁻⁴	25.8 ± 1.0	3.15	1.3 ± 1.1
	1.2 × 10 ⁻⁴	80.4 ± 1.1		21.7 ± 2.0	3.69	1.4 ± 2.4
	1.2 × 10 ⁻³	36.7 ± 1.4		IC	-	-

¹Las velocidades de consumo de oxígeno son medias (nmolO₂/min/mg proteína) ± desviación estándar (n = 3). Los valores del control respiratorio (RCR) son medias ± desviación estándar. Los niveles de los tratamientos indicados representan la concentración final en la cámara. Los compuestos se disolvieron en etanol al 95% para todos los tratamientos. CI, completa inhibición.

Tabla 32. Efecto de los compuestos **88**, **89**, **95** y **96** sobre la velocidad de consumo de oxígeno durante la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones en mitocondrias aisladas de frijol mungo (*Vigna radiata*) cuando el sustrato oxidable fue el NADH (2mM).

Tratamiento	[] (M)	Fosforilación oxidativa ¹	IC ₅₀ (M)	Transporte de electrones ¹	RCR	P/O
Sin tratamiento		242.9 ± 18.5		9.9 ± 0.1	25.57	1.6 ± 7.0
EtOH (95%)		222.7 ± 9.24		9.9 ± 1.8	22.50	1.3 ± 0.0
88	1.2 x 10 ⁻⁵	207.7 ± 0.7	4.1 x 10 ⁻³	18.8 ± 2.1	10.99	1.5 ± 0.7
	1.2 x 10 ⁻⁴	161.6 ± 3.5		8.4 ± 0.7	19.22	1.3 ± 1.4
	1.2 x 10 ⁻³	CI		CI	CI	CI
89	1.2 x 10 ⁻⁵	159.5 ± 3.2	3.2 x 10 ⁻³	12.6 ± 0.5	12.65	2.0 ± 0.7
	1.2 x 10 ⁻⁴	125.9 ± 2.0		6.3 ± 1.3	19.98	1.5 ± 1.4
	1.2 x 10 ⁻³	125.2 ± 1.75		CI	CI	CI
95	1.2 x 10 ⁻⁵	132.8 ± 3.51	2.5 x 10 ⁻⁵	12.3 ± 1.0	10.72	1.4 ± 2.0
	1.2 x 10 ⁻⁴	39.8 ± 2.12		CI	CI	CI
	1.2 x 10 ⁻³	CI		CI	CI	CI
96	1.2 x 10 ⁻⁵	177.8 ± 6.02	1.2 x 10 ⁻⁴	12.3 ± 1.0	14.35	1.1 ± 1.0
	1.2 x 10 ⁻⁴	120.1 ± 1.75		9.9 ± 0.5	12.13	1.6 ± 1.0
	1.2 x 10 ⁻³	41.9 ± 1.32		CI	CI	CI

¹Las velocidades de consumo de oxígeno son medias (nmolO₂/min/mg proteína) ± desviación estándar (n = 3). Los valores del control respiratorio (RCR) son medias ± desviación estándar. Los niveles de los tratamientos indicados representan la concentración final en la cámara. Los compuestos se disolvieron en etanol al 95% para todos los tratamientos. CI, completa inhibición.

Tabla 33. Efecto de los compuestos **88**, **89**, **95** y **96** sobre la velocidad de consumo de oxígeno durante la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones en mitocondrias aisladas de frijol mungo (*Vigna radiata*) cuando el sustrato oxidable fue la mezcla malato-glutamato (5 mM).

Tratamiento	[] (M)	Fosforilación oxidativa ¹	IC ₅₀ (M)	Transporte de electrones ¹	RCR	P/O
Sin tratamiento		27.0 ± 3.1		5.0 ± 1.5	5.36	2.7 ± 2.0
EtOH (95%)		23.2 ± 2.8		4.2 ± 2.8	5.46	2.5 ± 0.7
88	1.2 x 10 ⁻⁵	27.6 ± 0.0	>1.2 x 10 ⁻³	5.0 ± 0.7	5.04	2.4 ± 2.1
	1.2 x 10 ⁻⁴	25.5 ± 0.0		3.7 ± 0.7	6.75	2.7 ± 0.0
	1.2 x 10 ⁻³	23.4 ± 0.0		4.2 ± 0.7	5.46	2.5 ± 0.7
89	1.2 x 10 ⁻⁵	26.5 ± 0.7	6.8 x 10 ⁻⁴	5.9 ± 1.4	4.5	2.8 ± 0.0
	1.2 x 10 ⁻⁴	25.5 ± 0.0		10.3 ± 0.7	2.48	2.6 ± 0.7
	1.2 x 10 ⁻³	10.5 ± 1.4		IC	-	-
95	1.2 x 10 ⁻⁵	20.1 ± 0.0	3.8 x 10 ⁻⁴	7.6 ± 2.0	2.65	3.0 ± 2.9
	1.2 x 10 ⁻⁴	17.6 ± 0.7		5.0 ± 1.8	3.50	2.8 ± 3.4
	1.2 x 10 ⁻³	IC		IC	-	-
96	1.2 x 10 ⁻⁵	20.1 ± 2.8	> 1.2 x 10 ⁻³	5.0 ± 0.7	4.00	2.8 ± 2.5
	1.2 x 10 ⁻⁴	20.1 ± 3.0		IC	-	-
	1.2 x 10 ⁻³	20.3 ± 0.0		IC	-	-

¹Las velocidades de consumo de oxígeno son medias (nmolO₂/min/mg proteína) ± desviación estándar (n = 3). Los valores del control respiratorio (RCR) son medias ± desviación estándar. Los niveles de los tratamientos indicados representan la concentración final en la cámara. Los compuestos se disolvieron en etanol al 95% para todos los tratamientos. CI, completa inhibición.

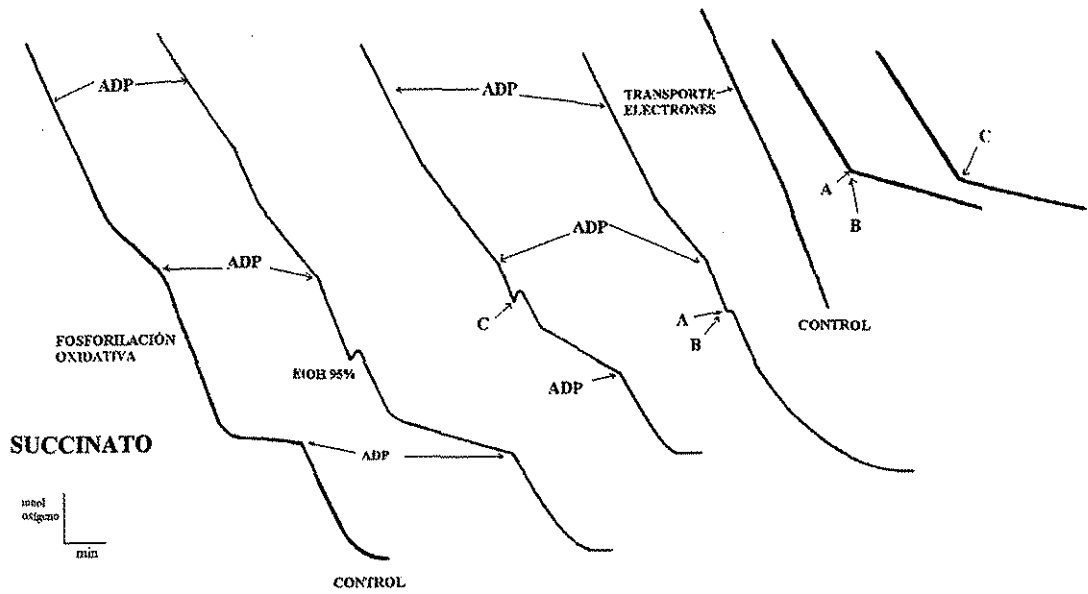


Figura 32. Efecto de los compuestos 95 (A), 96 (B) y 88-89 (C) sobre la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones de la respiración en mitocondrias aisladas de frijol mungo (*Vigna radiata*) cuando el sustrato oxidable es el succinato.

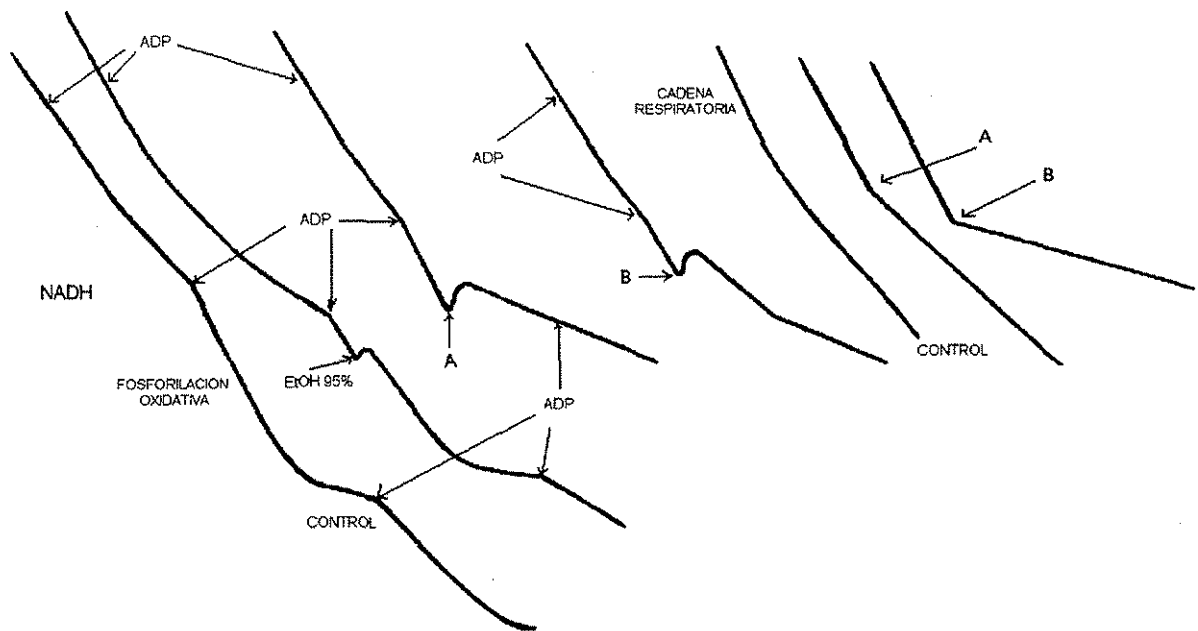


Figura 33. Efecto de los compuestos 95 (A), 96 (B) y 88-89 (C) sobre la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones de la respiración en mitocondrias aisladas de frijol mungo (*Vigna radiata*) cuando el sustrato oxidable es NADH.

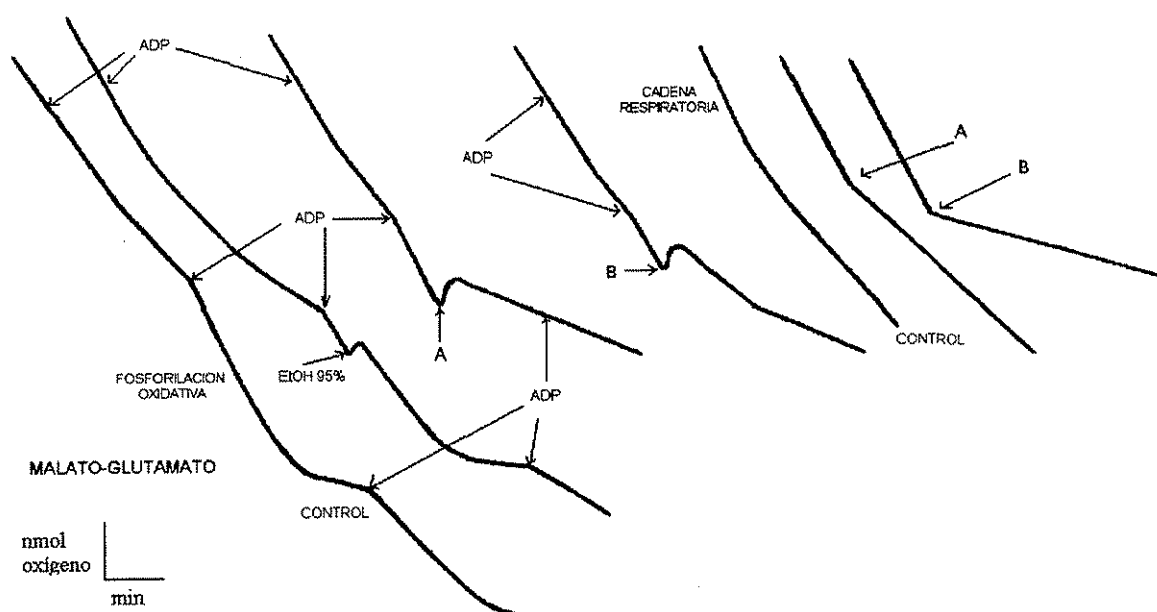


Figura 34. Efecto de los compuestos 95 (A), 96 (B) y 88-89 (C) sobre la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones de la respiración en mitocondrias aisladas de frijol mungo (*Vigna radiata*) cuando el sustrato oxidable es la mezcla malato-glutamato.

6.3.3.2 Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre el transporte de electrones mitocondrial. Debido a que únicamente los compuestos 95 y 96 inhibieron significativamente la fosforilación oxidativa, se procedió a evaluar el efecto de los mismos sobre la rapidez de transporte de electrones con la finalidad de determinar si los compuestos 95 y 96 inhibían la síntesis de ATP como una consecuencia de la alteración de este proceso. Los resultados de las Tablas 34-36 indicaron que 95 y 96 inhiben de modo significativo el transporte de electrones y debido a que el efecto inhibitorio fue mayor cuando el sustrato oxidable era el succinato, se concluyó que el blanco de acción de éstas fitotoxinas se encontraba en el segmento comprendido entre el complejo II y O_2 . En las Figuras 31-33 se aprecia el comportamiento de los compuestos 95 y 96 sobre la rapidez de transporte de electrones de la respiración mitocondrial.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 34. Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre la rapidez del transporte de electrones en mitocondrias aisladas de frijol mungo (*Vigna radiata*) cuando el sustrato oxidable es el NADH.

Tratamiento	[] (M)	Cadena de transporte de electrones ¹	IC ₅₀ (M)
Sin tratamiento		138.6 ± 2.1	
EtOH (95 %)		135.4 ± 2.3	
95	1.2 x 10 ⁻⁵	121.3 ± 0.7	1.0 x 10 ⁻⁴
	1.2 x 10 ⁻⁴	76.5 ± 0.0	
	1.2 x 10 ⁻³	29.8 ± 2.1	
96	1.2 x 10 ⁻⁵	165.9 ± 2.1	9.3 x 10 ⁻⁴
	1.2 x 10 ⁻⁴	131.3 ± 0.7	
	1.2 x 10 ⁻³	66.8 ± 0.7	

¹La rapidez del transporte de electrones es media (nmolO₂/min/mg proteína) ± desviación estándar (n = 3). Los niveles de los tratamientos representan la concentración final en la cámara de reacción. Los compuestos se disolvieron en etanol al 95% para todos los tratamientos.

Tabla 35. Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre la rapidez del transporte de electrones en mitocondrias aisladas de frijol mungo (*Vigna radiata*) cuando el sustrato oxidable es la mezcla malato-glutamato.

Tratamiento	[] (M)	Cadena de transporte de electrones ¹	IC ₅₀ (M)
Sin tratamiento		30.6 ± 1.1	
EtOH (95 %)		29.7 ± 1.4	
95	1.2 x 10 ⁻⁵	27.6 ± 0.7	> 1.2 x 10 ⁻³
	1.2 x 10 ⁻⁴	25.5 ± 0.0	
	1.2 x 10 ⁻³	20.5 ± 2.8	
96	1.2 x 10 ⁻⁵	30.8 ± 1.5	> 1.2 x 10 ⁻³
	1.2 x 10 ⁻⁴	27.6 ± 0.0	
	1.2 x 10 ⁻³	27.6 ± 0.0	

¹La rapidez del transporte de electrones es media (nmolO₂/min/mg proteína) ± desviación estándar (n = 3). Los niveles de los tratamientos representan la concentración final en la cámara de reacción. Los compuestos se disolvieron en etanol al 95% para todos los tratamientos.

Tabla 36. Efecto de los compuestos 96 y 95 sobre la rapidez del transporte de electrones en mitocondrias aisladas de frijol mungo (*Vigna radiata*) cuando el sustrato oxidable es el succinato.

Tratamiento	[] (M)	Cadena de transporte de electrones ¹	IC ₅₀ (M)
Sin tratamiento		173.1 ± 2.8	
EtOH (95%)		153.2 ± 1.4	
95	1.2 x 10 ⁻⁵	88.8 ± 2.1	2.6 x 10 ⁻⁴
	1.2 x 10 ⁻⁴	61.5 ± 0.5	
	1.2 x 10 ⁻³	12.2 ± 0.0	
96	1.2 x 10 ⁻⁵	59.1 ± 0.0	7.5 x 10 ⁻³
	1.2 x 10 ⁻⁴	46.9 ± 2.1	
	1.2 x 10 ⁻³	38.3 ± 0.7	

¹La rapidez del transporte de electrones es media (nmolO₂/min/mg proteína) ± desviación estándar (n = 3). Los niveles de los tratamientos representan la concentración final en la cámara de reacción. Los compuestos se disolvieron en etanol al 95% para todos los tratamientos.

6.3.3.3 Caracterización del efecto de los compuestos 95 y 96 sobre el transporte de electrones mitocondrial. Con el objeto de localizar el complejo enzimático de la cadena transportadora de electrones afectado por los compuestos 95 y 96 se realizaron varios ensayos espectrofotométricos y utilizando diferentes donadores y aceptores artificiales de electrones, así como inhibidores de la cadena transportadora de electrones para bloquear el paso de los electrones de un segmento a otro.

6.3.3.3.1 Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre el transporte de electrones en el complejo I de la cadena respiratoria. El efecto de los compuestos 95 y 96 sobre el complejo I se determinó mediante el empleo del par redox NADH/DCPIP. En este par el DCPIP actúa como el aceptor final de los electrones provenientes del NADH vía el complejo I (Figura 35). Con la finalidad de impedir el paso de los electrones de la ubiquinona a los complejos III y IV y favorecer la captación de los electrones por el DCIP, se adicionó antimicina A y cianuro de sodio al medio de reacción. Los resultados obtenidos en este experimento (Tabla 37) indicaron que los compuestos 95 y 96 no afectan de manera significativa el complejo I de la respiración.

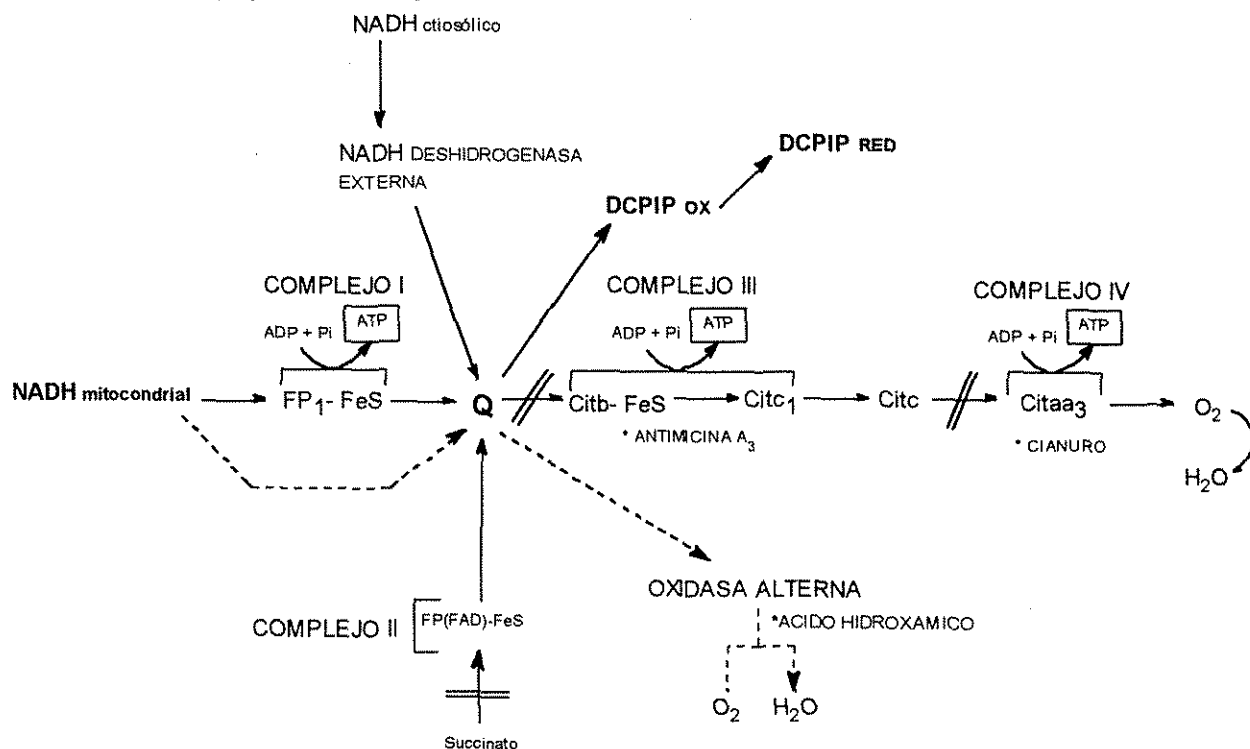


Figura 35. Determinación del transporte de electrones en el complejo I de la cadena respiratoria..

Tabla 37. Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre el sitio I de la cadena transportadora de electrones en mitocondrias vegetales aisladas de frijol mungo (*Vigna radiata*).

Tratamiento	Concentración (M)	Actividad específica ^a ($\mu\text{molDCPIPredmg}^{-1}\text{min}^{-1}$)
Control		0.286 ± 1.0
95	1.2 x 10 ⁻⁵	0.286 ± 0.0
	1.2 x 10 ⁻⁴	0.288 ± 0.6
	1.2 x 10 ⁻³	0.298 ± 1.0
96	1.2 x 10 ⁻⁵	0.284 ± 0.0
	1.2 x 10 ⁻⁴	0.284 ± 1.0
	1.2 x 10 ⁻³	0.288 ± 0.0
Rotenona ^b	5.0 x 10 ⁻³	0.149 ± 1.0

^aLos resultados son promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. ^bControl positivo.

6.3.3.3.2 Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre el transporte de electrones en los complejos II y III de la cadena. Una vez determinado que los compuestos 95 y 96 no actuaban a nivel del complejo I de la cadena transportadora de electrones, el siguiente paso consistió en evaluar su efecto sobre los complejos II y III. Para ello, se utilizó el sistema redox succinato/DCPIP (Figura 36). Para asegurar la inhibición simultánea de los complejos I y IV, en este caso, se agregaron rotenona y cianuro de sodio al medio de reacción. Una vez más, el DCPIP fungió como el aceptor final de los electrones provenientes del succinato a través del complejo II. Los cambios provocados por los productos naturales 95 y 96 en la actividad específica obtenida durante este experimento (Tabla 38) indicaron que estos compuestos afectan de manera significativa el transporte de electrones en los complejos II y III.

Tabla 38. Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre los complejos II y III de la cadena transportadora de electrones en mitocondrias vegetales aisladas de frijol mungo (*Vigna radiata*).

Tratamiento	Concentración (M)	Actividad específica ^a ($\mu\text{molDCPIPredmg}^{-1}\text{min}^{-1}$)
Control		0.196 ± 1.5
95	1.2 x 10 ⁻⁵	0.196 ± 2.6
	1.2 x 10 ⁻⁴	0.083 ± 1.3
	1.2 x 10 ⁻³	0.042 ± 1.0
96	1.2 x 10 ⁻⁵	0.173 ± 0.0
	1.2 x 10 ⁻⁴	0.116 ± 1.4
	1.2 x 10 ⁻³	0.055 ± 0.0
Malonato ^b	5.0 x 10 ⁻³	0.055 ± 1.0
	10.0 x 10 ⁻³	0.039 ± 1.0

^aLos resultados son promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. ^bControl positivo.

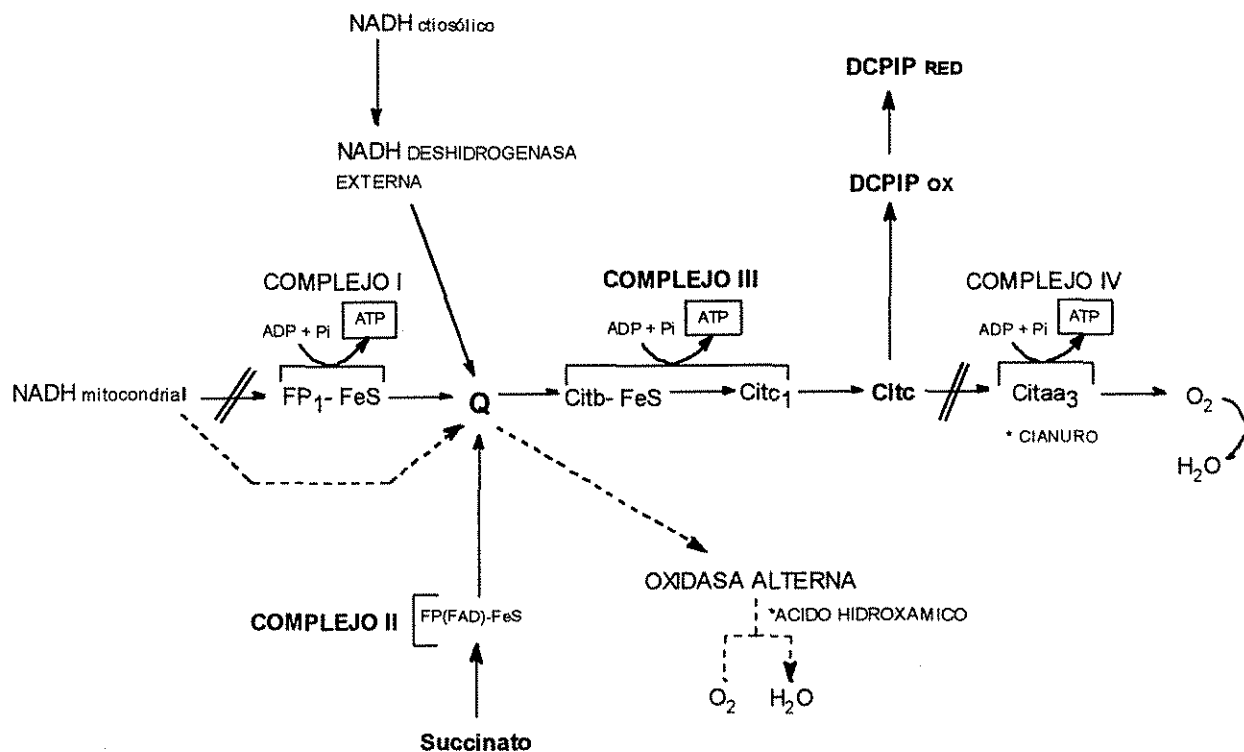


Figura 36. Determinación del transporte de electrones en los complejos II y III de la cadena respiratoria..

6.3.3.3 Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre el transporte de electrones en el complejo II de la cadena respiratoria. Debido a que los compuestos 95 y 96 inhibieron significativamente el transporte de electrones en los complejos II y III de la cadena respiratoria, se procedió a determinar el efecto de los mismos en cada uno de los complejos por separado. Con la finalidad de aislar el fragmento correspondiente al complejo II se utilizó el sistema redox succinato/citocromo *c* y se añadió al medio rotenona, antimicina A y cianuro de sodio para inhibir a los complejos I, III y IV, respectivamente (Figura 37). En este caso, el citocromo *c* adicionado actuó como el aceptor final de los electrones del succinato, transferidos a través del complejo II. Los cambios provocados por los tratamientos sobre la velocidad de transporte de electrones (Tabla 39) indicaron que los productos naturales 95 y 96 afectan de manera significativa el transporte de electrones en el sitio II. La magnitud de la inhibición provocada por las piranocromonas 95 y 96 fue de 61 y 62 %, respectivamente, a la máxima concentración de prueba de 1.2×10^{-3} M.

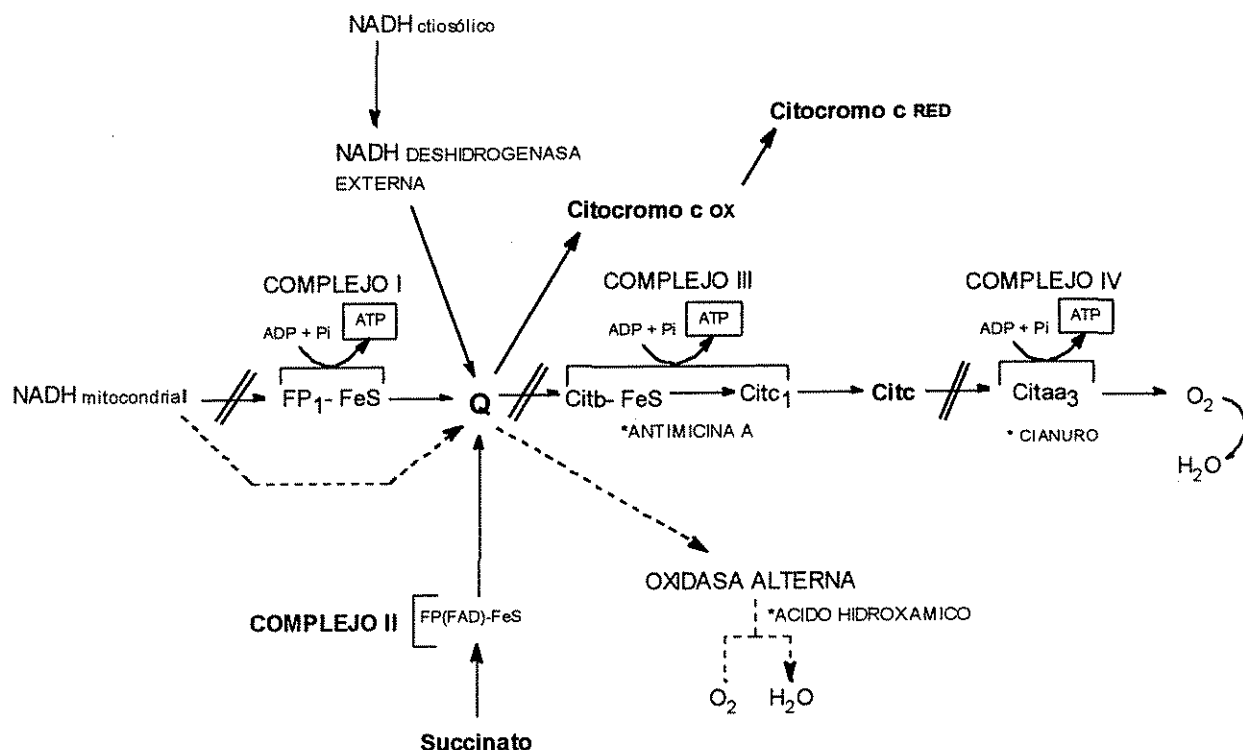


Figura 37. Determinación del transporte de electrones en el complejo II de la cadena respiratoria..

Tabla 39. Efecto de los compuestos **95** y **96** sobre el complejo II de la cadena transportadora de electrones en mitocondrias vegetales aisladas de hipocótilos y radículas de frijol mungo (*Vigna radiata*).

Tratamiento	Concentración (M)	Actividad específica ^a (μmolcitredmg ⁻¹ min ⁻¹) ^c
Control		0.191 ± 7.1
95	1.2 x 10 ⁻⁵	0.113 ± 2.3
	1.2 x 10 ⁻⁴	0.091 ± 3.0
	1.2 x 10 ⁻³	0.074 ± 0.0
96	1.2 x 10 ⁻⁵	0.122 ± 0.7
	1.2 x 10 ⁻⁴	0.085 ± 2.1
	1.2 x 10 ⁻³	0.075 ± 0.0
Malonato^b	5.0 x 10 ⁻³	0.055 ± 1.0
	10.0 x 10 ⁻³	0.039 ± 1.0

^aLos resultados son promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. ^bControl positivo.

6.3.3.3.4 Efecto de los compuestos 95 y 96 sobre el complejo IV de la cadena respiratoria. Con la finalidad de determinar si el efecto inhibitorio de los compuestos 95 y 96 se encontraba exclusivamente a nivel del complejo II de la cadena transportadora de electrones se determinó polarográficamente la actividad de los mismos sobre el sitio IV. En este caso, las mitocondrias se incubaron con NADH, posteriormente se les adicionó ADP para provocar la fosforilación y luego antimicina A para bloquear el paso de los electrones de la ubiquinona al complejo III. Acto seguido, se adicionó TMPD (un donador artificial de electrones) para regenerar el transporte de electrones de la ubiquinona al citocromo *c* y transferirlos directamente de la ubiquinona al complejo IV. Por último se agregó al medio de reacción el producto natural de prueba. Como control positivo se utilizó cianuro de sodio (Figura 38). Como se aprecia en los oxigramas de la Figura 39 los productos 95 y 96 no presentaron actividad significativa sobre el sitio IV de la cadena transportadora de electrones.

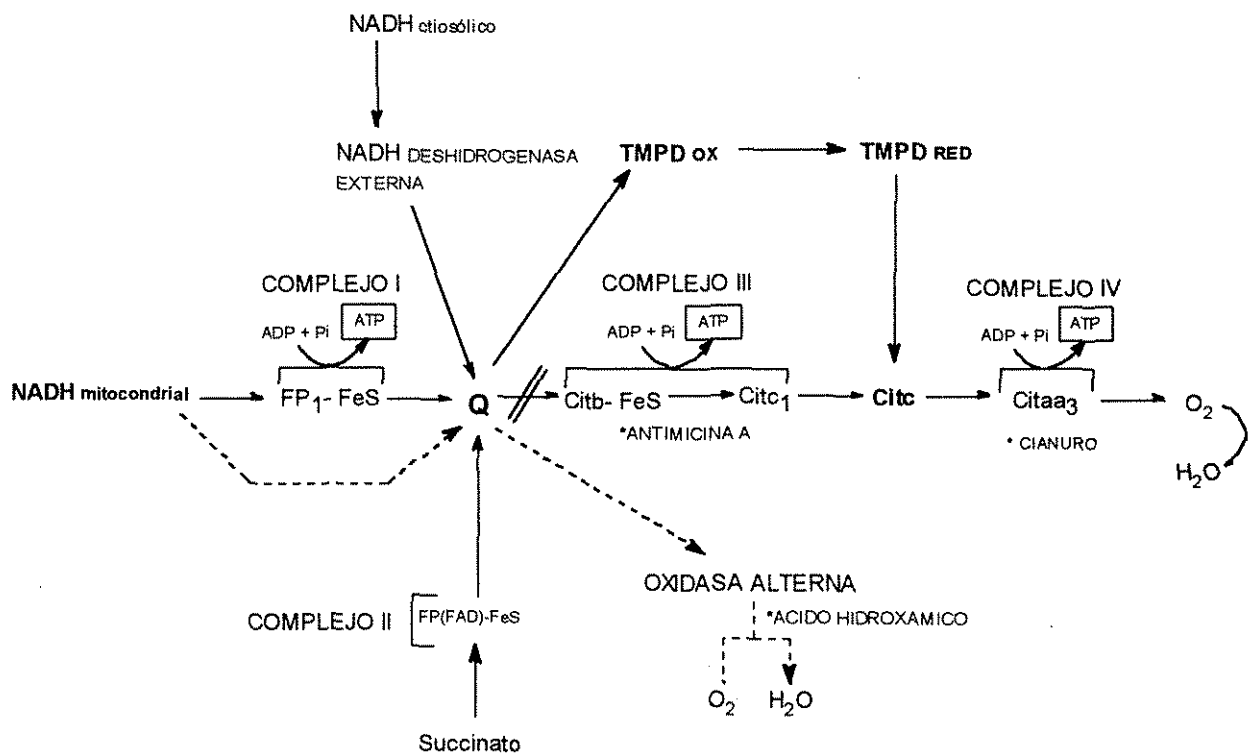


Figura 38. Determinación de la actividad de los compuestos 95 y 96 sobre el complejo IV de la cadena respiratoria.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos realizados sobre los diferentes fragmentos de la cadena respiratoria, permiten establecer que los compuestos 95 y 96

inhiben de manera significativa el transporte de electrones del succinato a la ubiquinona, por lo tanto, el efecto de estos productos sobre el transporte de electrones se localiza a nivel del complejo II de la cadena transportadora de electrones y como consecuencia ocasionan la inhibición de la síntesis de ATP en mitocondrias vegetales. Es importante destacar que las concentraciones de los productos 95 y 96 requeridas para inhibir el proceso de fosforilación oxidativa fueron prácticamente los mismos a los requeridos para inhibir el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*. Por lo tanto, es altamente probable que el proceso de respiración constituye un blanco de acción importante para estas fitotoxinas.

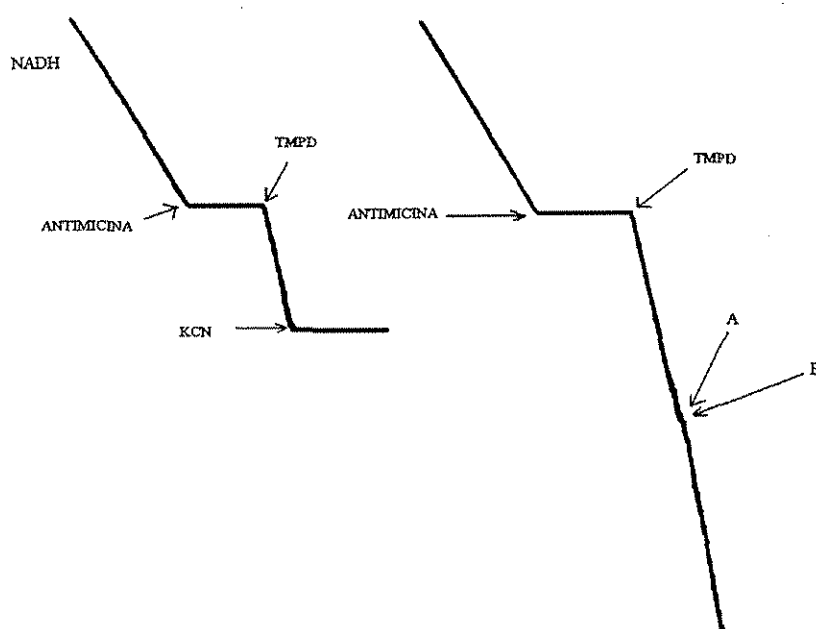


Figura 39. Efecto de los compuestos 95 (A) y 96 (B) sobre el complejo IV de la cadena respiratoria. Sustrato: NADH.

6.4 Evaluación del efecto de los compuestos 88, 89 y 95 sobre los eventos fotoquímicos primarios de la fotosíntesis en hojas de frijol mungo (*Vigna radiata*) y frijol ojo de cabra (*Phaseolus vulgaris*). Considerando el nivel de actividad de los compuestos 88 y 89 sobre *Lemna paucicostata* y el del compuesto 95 sobre la respiración mitocondrial, se decidió determinar el efecto de los mismos sobre los eventos fotoquímicos primarios de la fotosíntesis. Cabe mencionar que debido al bajo rendimiento con el cual se obtuvo el compuesto 96 de la fuente natural no fue posible evaluarlo en estos experimentos.

La fotosíntesis es un proceso metabólico esencial para el crecimiento autotrófico de las plantas (Mets y Thiel, 1989) y tiene lugar en unos organelos celulares denominados cloroplastos. Este proceso consta de dos fases: la luminosa y la oscura las cuales se llevan a cabo en los tilacoides y en el estroma de los cloroplastos, respectivamente. Durante la fase luminosa, la energía solar se deposita bajo la forma de ATP y de NADPH, mismos que son empleados para reducir el CO₂ durante la fase oscura. La Figura 40 muestra la localización de los componentes enzimáticos acarreadores de electrones de la fase luminosa dentro del tilacoide y la secuencia en que operan los componentes multienzimáticos de la cadena redox (Cobert, 1984; Mets y Thiel, 1989; Anderson y Beardall, 1991; Bowyer *et al.*, 1991).

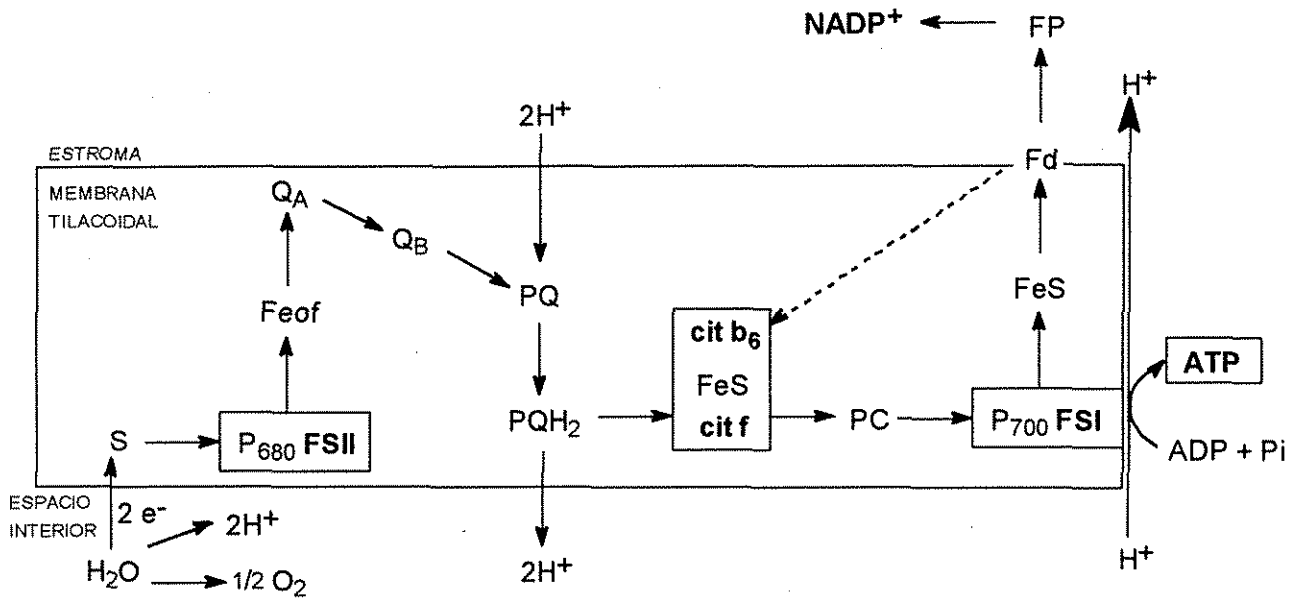


Figura 40. Localización de los componentes enzimáticos acarreadores de electrones de la fase luminosa de la fotosíntesis en el tilacoide y la secuencia en que operan los componentes multienzimáticos de la cadena redox.

Las reacciones dependientes de la luz son las que corresponden a la reacción de Hill o cadena transportadora de electrones. Cada cadena transportadora de electrones se considera como una unidad fotoquímica o fotosintética y se compone de proteínas acarreadoras de electrones, pigmentos antena y un centro de reacción. Las plantas superiores contienen dos fotosistemas, el fotosistema I (FSI) y el fotosistema II (FSII) los cuales poseen una molécula de clorofila en el centro de reacción. Se conocen dos centros de reacción en

plantas superiores, P₇₀₀ y P₆₈₀ para los FSI y FSII, respectivamente. Los dos fotosistemas operan en serie, de tal manera que el reductor primario del fotosistema II transfiere electrones a través de las proteínas acarreadoras de electrones al centro de reacción del fotosistema I. La pérdida de un electrón en la molécula de clorofila deja una carga neta positiva que se neutraliza con un electrón proveniente de alguna molécula donadora. En el fotosistema II los electrones provienen de la oxidación del agua, mientras que en el FSI, la molécula donadora de electrones es la plastoquinona. El centro de reacción reducido del FSII, dona un electrón al aceptor primario Q_A (plastoquinona), cuando recibe un cuanto de luz vía teofitina (molécula de clorofila carente de Mg²⁺). Posteriormente, un electrón es transferido a la plastoquinona Q_B, el cual es el aceptor secundario del FSII y de este se transfieren a la plastoquinona PQ. Esta última transfiere los electrones al centro de reacción del FSI a través del complejo citocromo b₆f. La toma del protón involucrada en la reducción de NADP en el estroma también contribuye a la creación de la diferencia de potencial electroquímico de membrana que dirige la síntesis de ATP por el factor de acoplamiento.

Como se indicó en la sección de antecedentes el principal modo de acción de los herbicidas comerciales que actúan sobre la fotosíntesis es a través de la inhibición del transporte de electrones fotosintético en el lado reductor del fotosistema II (Bowes, *et al.*, 1980, Linscott, 1981; Corbett, 1984; Percival y Baker, 1991; *inter alia*), específicamente mediante la inhibición del transporte de electrones entre la plastoquinona primaria Q_A y la plastoquinona secundaria Q_B. Así por ejemplo, los herbicidas pertenecientes a la familia de las ureas y trazinas se unen a las subunidades de 32 y 34 kD (D1) del fotosistema II, asociadas con la plastoquinona Q_B (Kyle, 1985) mientras que los herbicidas sintéticos de tipo fenólico se unen a una proteína que se localiza en la región de plastoquinonas Q_A/Q_B de 41kD (Trebs *et al.*, 1983; Renger, 1984). Otros herbicidas que bloquean el transporte de electrones en el fotosistema II como las acrilanilidas, las dinitroanilinas, los imidazoles, los N-fenilcarbamatos y los tiodiazoles también actúan como agentes desacoplantes de la fotofosforilación al producir la disociación del transporte de electrones con disipación de la diferencia de potencial protónico-electroquímico transtilacoidal requerido para la síntesis de ATP.

Para determinar el efecto de los compuestos **88**, **89** y **95** sobre la fotosíntesis se aplicó una técnica fluorométrica basada en la emisión de fluorescencia de la clorofila del FSII en hojas aisladas de frijol mungo y frijol ojo de cabra. Esta técnica es utilizada ampliamente para el estudio *in vitro* e *in vivo* de las alteraciones del aparato fotosintético y su eficiencia funcional, específicamente en el FSII (Jiménez, *et al.*, 1997; Bolhar y Öquist, 1993).

Cuando se mide la emisión de fluorescencia de la clorofila del FSII en las hojas de una planta o en algas y bacterias fotosintéticas adaptadas unos minutos a la oscuridad se obtiene una curva de inducción de fluorescencia denominada curva de Kautsky (Figura 41), en la que se observan diferentes fases denominadas OI DP SMT (Strasser *et al.*, 2000). En el primer segundo de iluminación ocurre un aumento de fluorescencia de O a P (fase rápida) y después de P se presenta una fase lenta que toma varios minutos hasta alcanzar la fase T. La fase rápida se encuentra relacionada con los eventos primarios del FSII, mientras que la fase lenta se encuentra relacionada principalmente con interacciones entre los procesos en las membranas tilacoides y los procesos metabólicos en el estroma como el metabolismo del carbono.

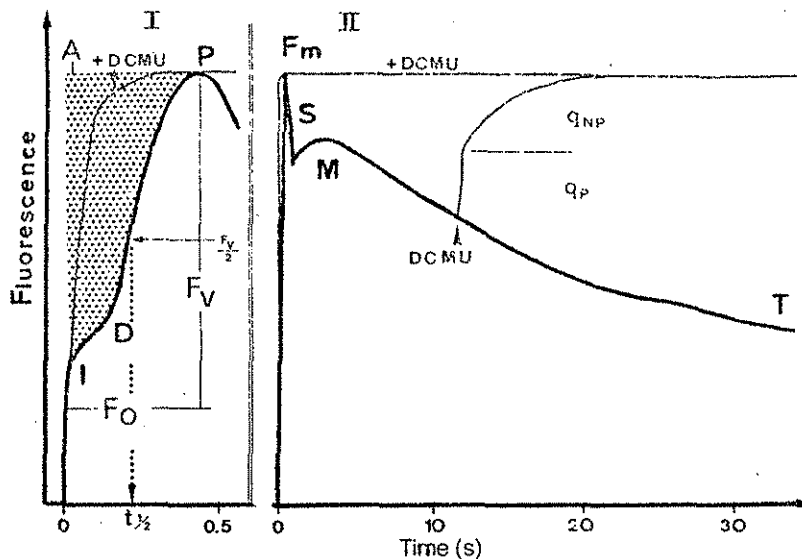


Figura 41. Curva Kautsky de Fluorescencia de la clorofila.

Al iluminar los tejidos o células fotosintéticas adaptadas a la obscuridad hay un incremento en la fluorescencia en un nivel mínimo (F_0). Este se obtiene cuando la luz es absorbida por la clorofila antena pero antes de que la energía sea transferida a los centros de reacción por lo cual, en F_0 el potencial para uso fotoquímico de la energía de excitación es máximo.

Después de iluminar con intensidad alta, la fluorescencia se incrementa desde F_0 vía un nivel intermedio (I), y a menudo una meseta (D), hasta el nivel P en el cual los centros de reacción están cerrados. En el punto J los electrones se transfieren vía Q_A a Q_B y en el punto I los electrones comienzan a transferirse vía Q_B al pool de las plastoquinonas Q_H , por lo tanto ocurre una transición en la reoxidación de Q_A . De acuerdo a la información anterior se puede determinar el efecto de un agente sobre la reducción de Q_A hasta Q_A^- iniciándose ésta cuando todos los centros de reacción están abiertos.

Un parámetro derivado de la curva de inducción de fluorescencia es F_v , el cual corresponde al incremento de la fluorescencia desde F_0 a F_m o P. La relación F_v/F_m es proporcional al rendimiento cuántico fotoquímico y se encuentra en un valor típico de 0.75–0.85 en plantas y otros organismos fotosintéticos y nos indica una alta eficiencia de captura de fotones y su conversión a potencial redox (Strasser *et al.*, 2000).

Después del pico P, la fluorescencia disminuye en la fase S en donde Q_A se oxida parcialmente a través de la transferencia de electrones al FSI vía el complejo citocromo fb_6 y la plastocianina. Durante la fase S, el transporte de electrones genera un gradiente protónico (P_H) a través de la membrana tilacoide causando su energización. Además de ser la fuerza motriz para la síntesis de ATP, este gradiente P_H también causa decaimiento de fluorescencia adicional. Este tipo de decaimiento no fotoquímico de fluorescencia (Q_N) ocurre a través de la formación de calor. El pico m refleja la inducción de mayores velocidades de fijación de carbono y la altura del pico depende de los efectos del decaimiento fotoquímico y no fotoquímico.

La cinética de fluorescencia rápida (de cero a un segundo) de los organismos oxigénicos fotosintéticos es polifásica y en ella se identifican los picos OJIP y en los casos de estrés

térmico el pico K después de O. La intensidad de la fluorescencia (F_p) denota los valores de F_m en donde todos los centros de reacción (RCS) se encuentran fisiológicamente cerrados. El estado F_0 indica el estado fisiológico donde todos los CRS están abiertos. Utilizando la teoría de flujos de energía en biomembranas y los valores experimentales de la cinética de fluorescencia OJIP se ha derivado un modelo para expresar los flujos de energía por centro de reacción (modelo pipeline de la membrana) o por sección transversal (modelo pipeline de la hoja) y las relaciones de flujo o relación de rendimiento. Los valores calculados con ésta técnica en cualquier instante son una expresión de la función del sistema. Así se tiene que los parámetros calculados son los siguientes: ABS/CS = el flujo fotónico absorbido por moléculas de pigmento de la antena por sección transversal. TR_0/CS = el flujo de energía de excitación que alcanza el CR y ahí queda atrapada por sección transversal. ET_0/CS = El flujo de energía atrapada que es convertida a energía redox para el transporte electrones después de Q_A por sección transversal. DI_0/CS = parte de la energía absorbida que es disipada como calor y fluorescencia por sección transversal. PI = índice de funcionamiento = producto de flujos específicos. RC/CS_0 = centros de reacción abiertos por sección transversal cuando F_0 . RC/CS_m = centros de reacción abiertos por sección transversal cuando F_m (Strasser *et al.*, 2001).

En los modelos pipeline, la densidad de las unidades fotosintéticas activas (centros de reacción) que se encuentran involucradas en la reducción de Q_A se muestran como pequeños círculos abiertos (blancos). Los círculos oscuros representan a los centros de reacción cerrados. Las flechas indican los flujos de absorción de luz (ABS), de energía de excitación retenida (TR_0), de energía de disipación (DI_0) y del transporte de electrones (ET_0) después de Q_A y la amplitud de cada flecha refleja el tamaño relativo de los flujos de energía o de la antena (Strasser *et al.*, 2001).

En un momento dado la forma de la cinética de fluorescencia está determinada por el estado fisiológico y las condiciones físicas y químicas ambientales alrededor de la muestra. El estado fisiológico actual de una muestra en un momento dado es una función de todos los estados por los que la muestra pasó anteriormente. Así, los parámetros derivados de la cinética rápida de emisión de fluorescencia de clorofila reflejan cambios en la estructura y

funcionamiento del aparato fotosintético y son indicadores muy sensibles del estrés en plantas, algas y bacterias fotosintéticas. Si el FSII es afectado por un determinado factor de estrés, esto se ve reflejado por cambios en uno o varios de los parámetros calculados a partir de la curva OJIP.

Está bien documentado que la función de las membranas tilacoidales es afectada por varios factores de estrés ambiental; el FSII parece ser particularmente sensible a factores como temperaturas altas, congelación, sequía, salinidad y pesticidas entre otros. Ya que todos estos factores afectan la función de FSII directa o indirectamente, la fluorescencia puede emplearse como una herramienta no sólo para revelar los mecanismos de respuesta por el uso de herbicidas si no también para cuantificar las respuestas de este factor de estrés bajo condiciones de laboratorio o campo (Srivastava y Strasser, 1997; Strasser *et al.*, 2001; González, 2001).

Como se aprecia en las Figuras 42 y 43 y Tablas 40 y 41, los compuestos **88**, **89** y **95** (a las 20 horas de tratamiento) afectaron la cinética de fluorescencia en las dos especies de frijoles empleados de un modo dependiente de la concentración. Los compuestos **88** y **89** fueron significativamente los más activos a una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ y mostraron una mayor selectividad por las hojas de *Vigna radiata* en las cuales provocaron una drástica disminución de F_m y una ligera disminución de F_0 así como también la disminución de la relación F_v/F_m o eficiencia fotoquímica del FS II. El compuesto **88** causó una disminución menos drástica en el valor de F_m a la concentración más elevada de prueba.

La disminución de F_m indica una alteración del transporte de electrones de Q_A hasta Q_H (Krause y Weis 1991; Misra *et al* 2001). La disminución en los parámetros F_v/F_m y área sobre la curva, así como el incremento en el tiempo necesario para alcanzar la F_m , corroboran la alteración en el sistema fotosintético.

Las curvas de fluorescencia obtenidas después de los tratamientos con los compuestos **89** y **95** para las hojas de *Phaseolus vulgaris* muestran un comportamiento similar al obtenido con el frijol mungo. El compuesto **89**, resultó ser menos activo sobre *Phaseolus vulgaris*

debido a que a la máxima concentración de prueba provocó una disminución en Fm menos severa que el caso de *Vigna radiata* en las mismas condiciones de prueba.

Tabla 40. Parámetros registrados de la cinética de fluorescencia de la clorofila en hojas aisladas de frijol mungo (*Vigna radiata*) sometidas a diferentes tratamientos.

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Fo ^a	Fm ^b	Fv ^c	Fv/Fm ^d	Area
EtOH*	-	459.8 ± 8.6	2770.8 ± 48.1	2311.0 ± 41.6	0.834 ± 0.0	51000.0 ± 3200.0
88	1	464.8 ± 9.4	2844.0 ± 66.0	2379.2 ± 57.8	0.836 ± 0.0	50520.0 ± 1264.0
	10	477.6 ± 17.1	2898.2 ± 93.8	2420.6 ± 80.3	0.835 ± 0.0	51440.0 ± 2928.0
	100	618.6 ± 149.7	2037.4 ± 177.1	1418.8 ± 261.4	0.6938 ± 0.0	37960.0 ± 1188.8
89	1	474.2 ± 8.1	2941.8 ± 35.3	2467.6 ± 34.4	0.839 ± 0.0	49200.0 ± 1680.0
	10	478.0 ± 7.6	2965.0 ± 37.2	2487.0 ± 35.6	0.839 ± 0.0	53080.0 ± 1776.0
	100	478.4 ± 14.4	1064.4 ± 212.2	386.0 ± 143.2	0.485 ± 0.0	19684.0 ± 1324.4
95	1	460.8 ± 20.6	2820.4 ± 41.52	2355.6 ± 27.9	0.835 ± 0.0	50280.0 ± 2384.0
	10	455.8 ± 2.6	2844.8 ± 63.0	2389.0 ± 61.2	0.840 ± 0.0	48160.0 ± 2448.0
	100	399.2 ± 101.7	885.6 ± 549.7	486.4 ± 500.8	0.338 ± 0.2	9480.0 ± 1105.0
DCMU**	10	2445.2 ± 530.0	2928.2 ± 324.2	484.4 ± 621.4	0.151 ± 0.2	2200.0 ± 2640.0
	100	472.6 ± 63.1	529.6 ± 86.7	57.0 ± 23.6	0.103 ± 0.0	0.0 ± 0.0

^aFluorescencia mínima. ^bFluorescencia máxima. ^cFluorescencia variable. ^dRendimiento cuántico fotoquímico. *Control negativo, etanol al 95%. **Control positivo.

Tabla 41. Parámetros registrados en la cinética de fluorescencia de la clorofila en el fotosistema II en hojas aisladas de frijol ojo de cabra (*Phaseolus vulgaris*) sometidas a diferentes tratamientos.

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Fo ^a	Fm ^b	Fv ^c	Fv/Fm ^d	Area
EtOH*	-	491.4 ± 46.3	2646.4 ± 391.6	2155.0 ± 350.0	0.81 ± 0.0	60240 ± 3792
8	1	494.4 ± 58.8	2913.2 ± 370.6	2418.8 ± 311.7	0.83 ± 0.0	55560 ± 2672
	10	532.8 ± 45.84	2725.0 ± 458.8	2192.2 ± 428.2	0.80 ± 0.0	47600 ± 15040
	100	503.8 ± 50.9	759.8 ± 290.4	256.0 ± 428.2	0.25 ± 0.0	40000 ± 6402
89	1	541.8 ± 32.9	3149.0 ± 142.4	2607.0 ± 109.4	0.82 ± 0.0	63000 ± 13600
	10	550.4 ± 16.7	3193.6 ± 89.2	2643.2 ± 74.9	0.82 ± 0.0	55920 ± 3312
	100	444.5 ± 39.7	1121.0 ± 326.5	676.5 ± 293.5	0.53 ± 0.0	21350 ± 9350
95	1	529.8 ± 15.7	2876.2 ± 154.6	2346.4 ± 147.2	0.81 ± 0.0	53360 ± 5392
	10	522.6 ± 27.5	2709.6 ± 257.9	2187.0 ± 254.0	0.80 ± 0.0	56640 ± 2864
	100	516 ± 108.8	1502.8 ± 735.7	986.8 ± 628.5	0.57 ± 0.1	28640 ± 16608
DCMU**	10	879.2 ± 220.3	2373.0 ± 814.4	1493.8 ± 605.0	0.51 ± 0.2	640 ± 272
	100	439.2 ± 178.7	778.6 ± 686.1	340.0 ± 507.2	0.17 ± 0.2	0.0 ± 0.0

^aFluorescencia mínima. ^bFluorescencia máxima. ^cFluorescencia variable. ^dRendimiento cuántico fotoquímico. *Control negativo, etanol al 95%. **Control positivo.

Mediante la comparación del tamaño de las flechas en los modelos pipeline de las hojas tratadas con los compuestos jatamansina (**88**), **89** y **95**, respecto a los controles, se pudo determinar el parámetro modificado por los productos naturales durante el proceso fotosintético (ver Figuras 44 y 45, Tablas 42 y 43). Cabe mencionar que el tratamiento de las hojas de ambas especies de frijoles con el control positivo DCMU $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ resultó ser sumamente tóxico para éstas provocando su muerte. Esto se corroboró por la incongruencia en los parámetros calculados del modelo pipeline en los cuales no se observa respuesta alguna. Debido a lo anterior, las comparaciones entre los tratamientos con los compuestos **88**, **89** y **95** se realizaron con base en los datos obtenidos a con el DCMU a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

El tratamiento de las hojas de ambas especies de frijoles con diferentes concentraciones del compuesto **95**, (Figura 44C y 45C) provocó una inhibición en el transporte de electrones por sección transversal de Q_A^- a Q_H (ET_0/CS) como consecuencia de la inactivación de los centros de reacción (RC) por sección transversal. Esto es congruente con la disminución de la eficiencia en la retención de energía (TR_0/CS) y con el incremento en la disipación de energía (DI_0/CS) observados en ambos casos y es similar al perfil obtenido para estos parámetros con el control positivo. Era de esperarse, que la absorción de energía (ABS/CS) en las hojas tratadas con **95** se mantuviera sin cambio como se aprecia en el tratamiento con el DCMU, un inhibidor clásico del transporte de electrones en Q_B (González, 2001; Bolhar-Nordenkamp y Öquist, 1993), sin embargo, debido a que el tratamiento de las hojas con el compuesto **95** ocasionó la disminución en dicho parámetro se puede inferir que, éste metabolito, además de inactivar a los centros de reacción y con ello el transporte de electrones en el fotosistema II, provoca una alteración en la captación de energía por el complejo antena por sección transversal (ABS/CS). La disminución del parámetro calculado F_v/F_v' (que mide la eficiencia de la antena del fotosistema II) es consistente con el decremento de la captación de energía por los pigmentos antena.

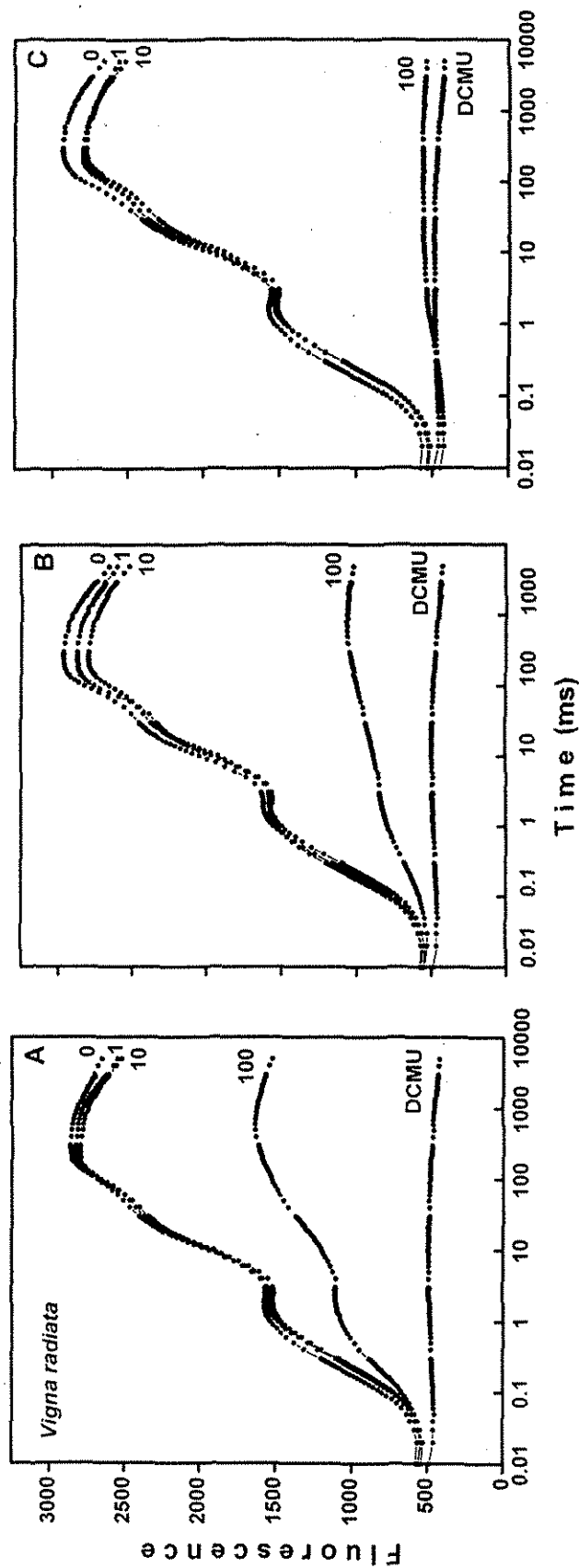


Figura 42. Curvas de la cinética de fluorescencia de la clorofila generadas por los compuestos **88**, **89** y **95** en frijol mungo (*Vigna radiata*). **A = 88**; **B = 89** y **C = 95**; **DCMU** = control positivo. Las concentraciones están dadas en $\mu\text{g mL}^{-1}$.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

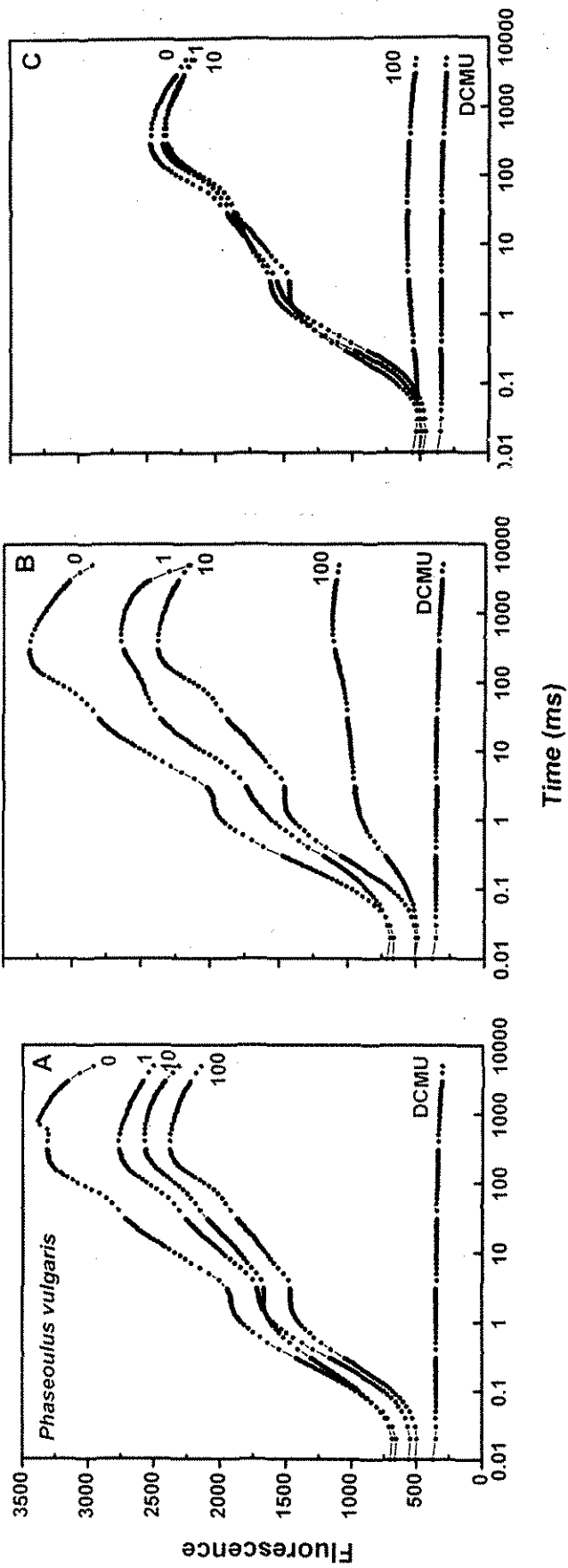


Figura 43. Curvas de la cinética de fluorescencia de la clorofila generadas por los compuestos **88**, **89** y **95** en frijol ojo de cabra (*Phaseolus vulgaris*). **A = 88**; **B = 89** y **C = 95**; **DCMU** = control positivo. Las concentraciones están dadas en $\mu\text{g mL}^{-1}$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 42. Parámetros calculados en la cinética de fluorescencia de la clorofila en el fotosistema II en hojas aisladas de frijol mungo (*Vigna radiata*) sometidas a diferentes tratamientos.

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	RC/CS ^a	PI ^b	TRo/CS ^c	ETo/CS ^d	DIo/CS ^e	ABS/CS ^f
EtOH*	-	162.4 ± 2.7	2.0 ± 0.1	383.4 ± 6.9	201.3 ± 9.6	76.3 ± 1.6	451 ± 12.5
88	1	164.7 ± 5.1	2.2 ± 0.1	388.8 ± 7.7	214.6 ± 6.7	75.9 ± 1.7	488 ± 18.6
	10	169.9 ± 8.0	2.2 ± 0.1	398.8 ± 13.4	220.1 ± 11.7	78.7 ± 3.7	519 ± 24.1
	100	160.2 ± 14.4	0.6 ± 0.2	412.8 ± 40.2	154.0 ± 54.2	205.7 ± 109.5	519 ± 15.0
89	1	174.5 ± 2.3	2.3 ± 0.2	397.7 ± 5.3	207.2 ± 15.5	76.4 ± 2.7	478 ± 17.3
	10	170.9 ± 3.1	2.3 ± 0.1	400.9 ± 5.8	221.2 ± 5.3	77.0 ± 1.9	464 ± 11.2
	100	110.4 ± 14.5	0.6 ± 0.7	250.7 ± 39.1	101.7 ± 20.5	227.6 ± 37.9	460 ± 10.8
95	1	157.7 ± 4.1	2.0 ± 0.1	388.1 ± 11.7	210.9 ± 6.4	76.6 ± 4.0	471 ± 12.0
	10	159.7 ± 5.8	2.3 ± 0.2	382.7 ± 3.0	212.8 ± 5.3	73.0 ± 1.0	455 ± 18.9
	100	78.3 ± 55.6	0.2 ± 0.3	161.8 ± 129.4	64.5 ± 64.0	237.3 ± 72.2	189 ± 5.6
DCMU**	10	74.8 ± 89.6	0.0 ± 0.0	215.1 ± 253.7	46.5 ± 51.0	2233.6 ± 734.5	1120 ± 125.2
	100	60.3 ± 57.7	0.0 ± 0.0	161.3 ± 174.0	8.4 ± 5.1	403.6 ± 63.2	378 ± 12.9

^aCentros de reacción abiertos por sección transversal cuando Fo. ^bÍndice de funcionamiento = producto de flujos específicos. ^cFlujo de energía de excitación que alcanza el CR y ahí queda atrapada por sección transversal. ^dFlujo de energía atrapada que es convertida a energía redox para el transporte electrones después de Q_A por sección transversal. ^eParte de la energía absorbida que es disipada como calor y fluorescencia por sección transversal. ^fFlujo fotónico absorbido por moléculas de pigmento de la antena por sección transversal. *Control negativo, etanol al 95%. **Control positivo.

Tabla 42. Parámetros calculados en la cinética de fluorescencia de la clorofila en el fotosistema II en hojas aisladas de frijol mungo (*Vigna radiata*) sometidas a diferentes tratamientos (continuación).

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Fo ^g	Fv'/Fm' ^h	QP ⁱ	QNP ^j
EtOH*	-	149.8 ± 11.7	0.70 ± 0.0	0.52 ± 0.01	0.20 ± 0.03
88	1	173.6 ± 5.5	0.69 ± 0.0	0.40 ± 0.01	0.15 ± 0.01
	10	184.0 ± 4.0	0.66 ± 0.0	0.39 ± 0.01	0.12 ± 0.00
	100	167.4 ± 9.3	0.52 ± 0.0	0.36 ± 0.0	0.19 ± 0.05
89	1	168.2 ± 7.7	0.70 ± 0.0	0.42 ± 0.0	0.13 ± 0.02
	10	173.6 ± 8.8	0.67 ± 0.0	0.43 ± 0.02	0.16 ± 0.03
	100	88.0 ± 19.2	0.31 ± 0.1	0.26 ± 0.1	0.02 ± 0.02
95	1	170.6 ± 2.8	0.68 ± 0.0	0.40 ± 0.01	0.13 ± 0.00
	10	159.6 ± 12.3	0.68 ± 0.0	0.46 ± 0.02	0.14 ± 0.03
	100	63.0 ± 26.0	0.28 ± 0.1	0.15 ± 0.0	0.01 ± 0.01
DCMU**	10	325.2 ± 57.2	0.38 ± 0.1	0.11 ± 0.1	0.10 ± 0.03
	100	63.0 ± 10.8	0.15 ± 0.0	0.09 ± 0.04	0.08 ± 0.06

^gFluorescencia mínima aparente. ^hEficiencia de la antena del fotosistema II. ⁱTrabajo fotoquímico. ^jTrabajo no fotoquímico. *Control negativo, etanol al 95%. **Control positivo.

Tabla 43. Parámetros calculados en la cinética de fluorescencia rápida de la clorofila en el fotosistema II en hojas aisladas de frijol ojo de cabra (*Phaseolus vulgaris*) sometidas a diferentes tratamientos.

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	RC/CS ^a	PI ^b	TRo/CS ^c	ETo/CS ^d	DIo/CS ^e	ABS/CS ^f	
EtOH*	-	163.8 ± 11.5	1.2 ± 0.1	399.5 ± 41.0	187.9 ± 24.0	91.8 ± 6.8	156.8 ± 21.3	
	88	1	186.6 ± 8.1	1.8 ± 0.4	410.4 ± 49	199.0 ± 22.1	87.2 ± 12.7	154.0 ± 36.4
	10	197.0 ± 20.3	0.9 ± 0.5	418.8 ± 43.5	140.3 ± 56.3	104.9 ± 19.5	196.8 ± 63.4	
	100	79.5 ± 40.7	0.0 ± 0.0	85.5 ± 12.3	85.8 ± 12.5	24.6 ± 8.5	44.8 ± 3.6	
89	1	185.8 ± 3.7	1.5 ± 0.1	448.5 ± 25.3	216.2 ± 17.5	93.2 ± 4.7	118.2 ± 13.3	
	10	183.5 ± 4.7	1.4 ± 0.1	455.4 ± 12.3	214.3 ± 11.2	94.9 ± 3.8	135.4 ± 11.5	
	100	106.5 ± 28.6	0.2 ± 0.0	246.39 ± 81.2	70.9 ± 20.5	198.1 ± 41.0	97.2 ± 29.7	
95	1	181.4 ± 5.5	1.3 ± 0.1	438.7 ± 15.7	199.6 ± 11.9	98.0 ± 5.4	129.0 ± 10.4	
	10	178.6 ± 4.7	0.9 ± 0.3	419.9 ± 26.4	160.9 ± 34.3	102.6 ± 12.4	190.4 ± 20.5	
	100	130.6 ± 42.3	0.3 ± 0.2	307.0 ± 133.8	138.9 ± 61.6	204.9 ± 49.2	127.6 ± 10.1	
DCMU**	10	192.1 ± 74.2	0.0 ± 0.0	524.2 ± 206.2	21.6 ± 10.3	354.8 ± 33.5	445.0 ± 44.8	
	100	54.5 ± 69.9	0.0 ± 0.0	130.2 ± 176.2	11.8 ± 11.1	309.4 ± 33.5	22.6 ± 27.0	

^aCentros de reacción abiertos por sección transversal cuando Fo. ^bÍndice de funcionamiento = producto de flujos específicos. ^cFlujo de energía de excitación que alcanza el CR y ahí queda atrapada por sección transversal. ^dFlujo de energía atrapada que es convertida a energía redox para el transporte de electrones después de Q_A por sección transversal. ^eParte de la energía absorbida que es disipada como calor y fluorescencia por sección transversal. ^fFlujo fotónico absorbido por moléculas de pigmento de la antena por sección transversal. *Control negativo, etanol al 95%. **Control positivo.

Tabla 43. Parámetros calculados en la cinética de fluorescencia rápida de la clorofila en el fotosistema II en hojas aisladas de frijol ojo de cabra (*Phaseolus vulgaris*) sometidas a diferentes tratamientos (continuación).

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Fo ^g	Fv/Fm ^h	QP ⁱ	QNP ^j	
EtOH*	-	156.8 ± 21.7	0.62 ± 0.08	0.60 ± 0.09	0.23 ± 0.2	
	88	1	154.0 ± 35.5	0.68 ± 0.03	0.55 ± 0.10	0.25 ± 0.08
	10	196.0 ± 64.0	0.56 ± 0.12	0.58 ± 0.16	0.10 ± 0.12	
	100	44.8 ± 3.3	0.20 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.06 ± 0.07	
89	1	118.2 ± 13.6	0.77 ± 0.01	0.84 ± 0.02	0.22 ± 0.02	
	10	135.4 ± 11.5	0.72 ± 0.01	0.68 ± 0.04	0.34 ± 0.03	
	100	97.2 ± 29.2	0.23 ± 0.06	0.25 ± 0.14	0.02 ± 0.02	
95	1	129.0 ± 10.8	0.72 ± 0.02	0.74 ± 0.03	0.29 ± 0.02	
	10	190.6 ± 20.3	0.60 ± 0.02	0.46 ± 0.02	0.14 ± 0.09	
	100	127.6 ± 10.0	0.48 ± 0.07	0.56 ± 0.03	0.31 ± 0.17	
DCMU**	10	445.0 ± 44.2	0.17 ± 0.1	0.02 ± 0.03	0.28 ± 0.16	
	100	22.6 ± 27.12	0.08 ± 0.1	0.04 ± 0.06	0.00 ± 0.06	

^gFluorescencia mínima. ^hFluorescencia máxima. ⁱFluorescencia variable. ^jRendimiento cuántico fotoquímico. *Control negativo, etanol al 95%. **Control positivo.

El compuesto **89** presentó un comportamiento muy similar al observado con el compuesto **95** en ambos tipos de frijoles (Figuras 44B, 45B). También se aprecian los daños en los centros de reacción activos que ocasionan una disminución en TR_0/CS y en ET_0/CS_0 y un incremento DI_0/CS . Así mismo, también se aprecia la disminución en los parámetros de ABS/CS (la captación de energía por la antena por sección transversal) y F_v/F_v' (la eficiencia de la antena del fotosistema II), por lo cual también se puede decir que hay un daño a nivel de la absorción de la luz por la antena. Sin embargo, las hojas de frijol mungo fueron menos sensibles al tratamiento con **89**. El compuesto **88** fue menos activo que los productos **89** y **95** para ambas especies de frijol de prueba.

En síntesis, los resultados obtenidos de estos experimentos permiten establecer que los compuestos **89** y **95** inhiben de una manera significativa el proceso de la fotosíntesis en hojas aisladas de frijol mungo y frijol ojo de cabra. Estos productos presentan un modo de acción dual ya que inhiben el transporte de electrones en los centros de reacción como consecuencia de la inactivación de éstos últimos y así mismo afectan la absorción de la luz por el complejo antena. Sin embargo con los resultados obtenidos durante los experimentos realizados en esta investigación no es posible determinar específicamente a que nivel del transporte de electrones los compuestos **89** y **95** están actuando ni tampoco el modo de acción por el cual la absorción de la luz por las moléculas del complejo antena se encuentra afectada. Así mismo, con los resultados obtenidos en estos experimentos mediante la técnica de fluorescencia y los modelos pipeline fue posible apreciar de modo rápido las diferencias de la sensibilidad que las especies vegetales presentan ante los compuestos de prueba como consecuencia la variabilidad genética de las mismas (Misra *et al.*, 2001).

Frijol mungo
(Vigna radiata)

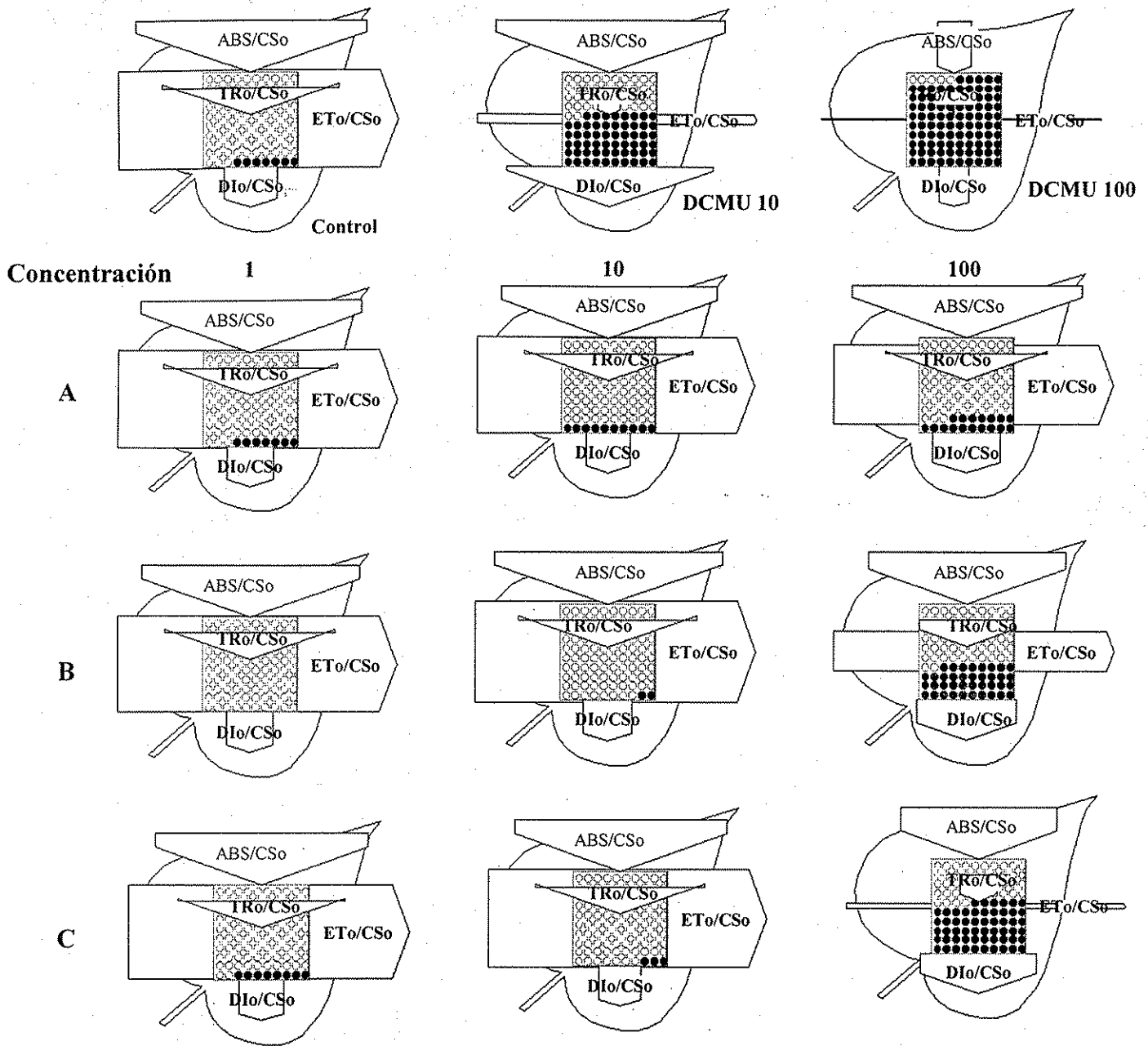


Figura 44. Modelo pipeline de la hoja para observar los efectos de los compuestos 88, 89 y 95 en los parámetros calculados de la cinética de fluorescencia de clorofila en frijol mungo (*Vigna radiata*). A = 88; B = 89 y C = 95. DCMU = control positivo. Las concentraciones están dadas en $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Frijol ojo de cabra
Phaseolus vulgaris

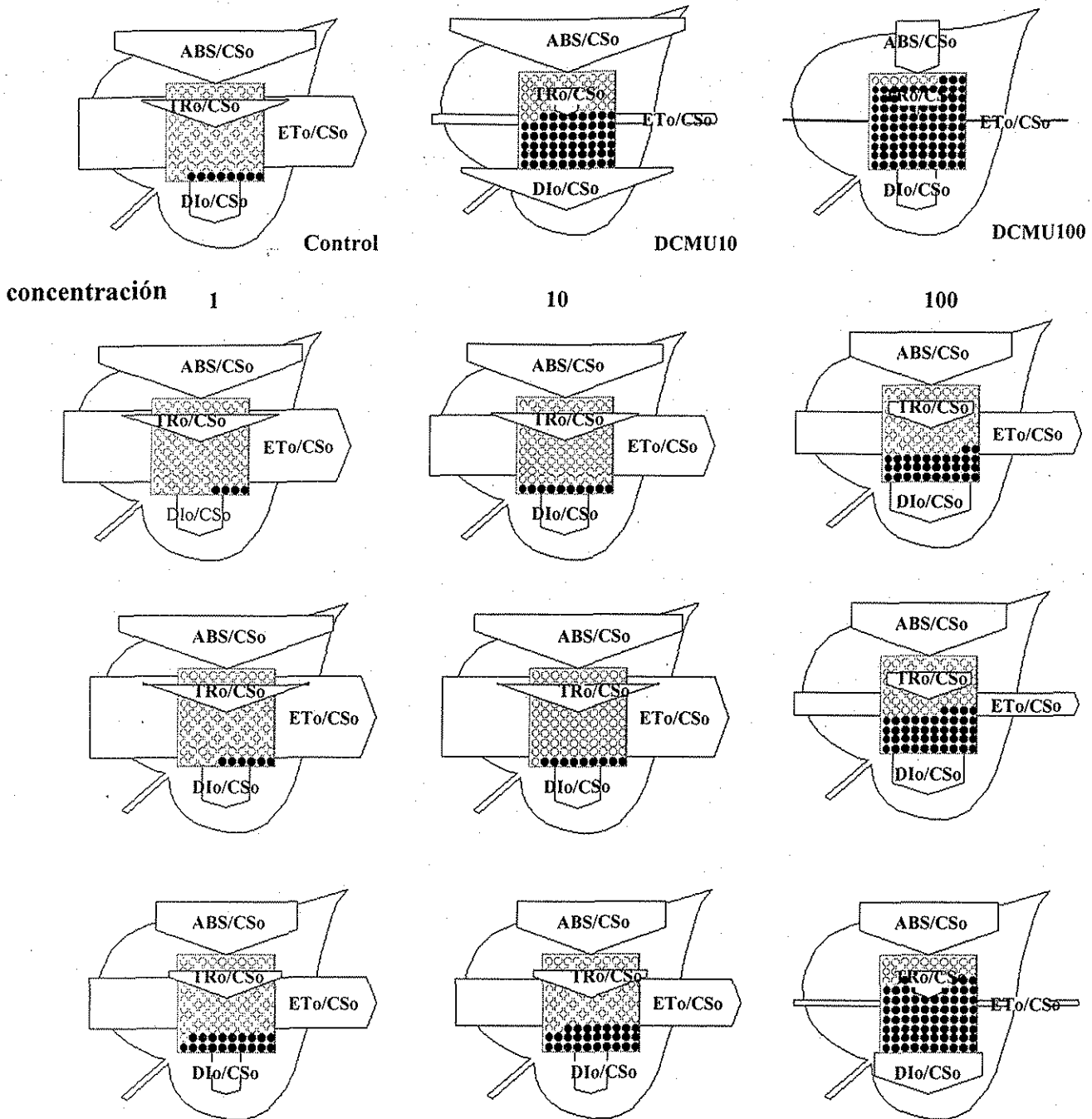
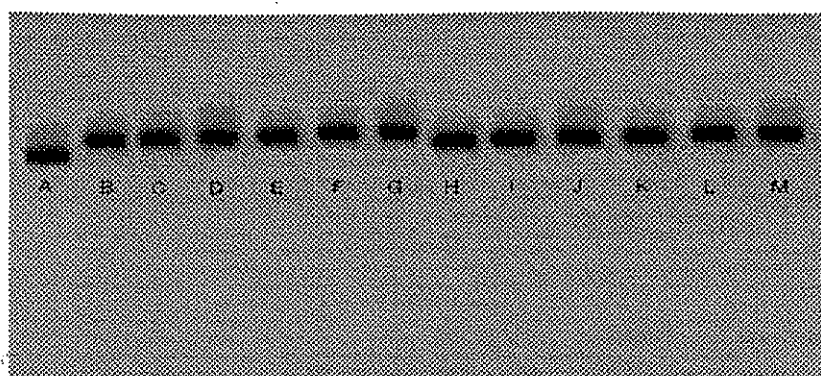


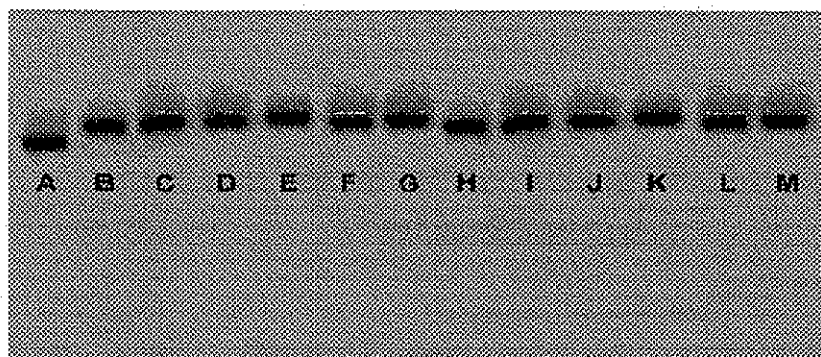
Figura 45. Modelo pipeline de la hoja para observar los efectos de los compuestos 88, 89 y 95 en los parámetros calculados de la cinética de fluorescencia de clorofila en frijol ojo de cabra (*Phaseolus vulgaris*). A = 88; B = 89 y C = 95. DCMU = control positivo. Las concentraciones están dadas en $\mu\text{g mL}^{-1}$.

6.5 Interacción de los principios fitotóxicos puros con calmodulinas de espinaca y de cerebro de bovino. La posible interacción de las fitotoxinas con la proteína clamodulina (espinaca y cerebro de bovino) se exploró mediante una electroforesis vertical descendente en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE al 12 %). En este caso, todas las determinaciones se realizaron por triplicado en presencia de CaCl_2 . El compuesto natural (2*S*,3*S*)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-4*H*-dihidronafto[2,3-*b*]piran-4-ona se utilizó como un control positivo (Macías eta al 2000). Como se indicó en la -sección de las antecedentes, la CaM es un receptor intracelular para el Ca^{2+} en eucariotes y modula la respuesta enzimática al calcio. La proteína CaM juega un papel muy importante en la transducción de las señales en las plantas durante los procesos de germinación y crecimiento al regular la actividad de varias enzimas importantes tales como la NAD-cinasa, la glutamato descarboxilasa y la Ca^{2+} -ATPasa. Por lo tanto, la CaM y/o las enzimas que esta modula podrían ser importantes blancos para la acción *in vivo* de muchas fitotoxinas (Lee *et al.*, 2000). Es conveniente mencionar que en los geles de electroforesis, la interacción de los compuestos fitotóxicos con la calmodulina altera la conformación de la proteína provocando por consiguiente cambios en su movilidad electroforética (Leung, *et al.*, 1985), sin embargo, esto no permite determinar si la interacción modifica las propiedades moduladoras enzimáticas de la CaM. (Au *et al.*, 2000).

La interacción de los productos naturales y derivados químicos puros se presentan en los electroforetogramas que se ilustran en las Figura 46. En general, se aprecia que todos los compuestos estudiados ($0.033 \mu\text{g mL}^{-1}$) modificaron la movilidad electroforética de las CaM por lo tanto es posible que estos compuestos interactúan con la calmodulina al igual que la ofobiolina A (Lee *et al.*, 2000), ejerciendo su acción fitotóxica al interferir con los procesos regulados por la calmodulina *in vivo*.



(a)



(b)

Figura 46. Geles de electroforesis SDS-PAGE de calmodulinas de espinaca (a) y bovino (a) después del tratamiento con los compuestos aislados y los derivados químicos. Electroforesis of 2- μ g de las muestras de las calmodulinas en presencia de CaCl_2 1mM. Pretratamientos de las calmodulinas durante 1.5 h at 30 °C en presencia de CaCl_2 . A, sin adición; B, 0.033 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (2*S*,3*S*)-5-hidroxi-6,8,10-trimetoxi-2,3-dimetil-4*H*-dihidronafto[2,3-*b*]piran-4-ona; C, 85; D, 93; E, 91, F, 86; G, 88; H, 89; I, 95; J, 96; K, 97*c*; L, 97*t*; M, 98; N,100;. En todos los casos se aplicaron 0.033 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de los tratamientos.

6.6 Evaluación de la actividad citotóxica de los principios fitotóxicos puros obtenidos de *P. watsoni*. Es bien conocido que el uso potencial de un producto natural como un herbicida se encuentra limitado por las preocupaciones que derivan acerca de la inocuidad de éste para los animales y el hombre. El candidato ideal para el desarrollo de herbicidas comercialmente viables debe poseer una fuerte fitotoxicidad, ser selectivo y presentar baja toxicidad hacia los mamíferos. En consecuencia, se decidió evaluar la citotoxicidad *in vitro* de los agentes fitotóxicos obtenidos de *P. watsoni* sobre un panel de cuatro líneas celulares de mamífero. Las líneas celulares empleadas para este ensayo se encontraron representadas

por dos líneas celulares normales [(MDCK, células caninas de riñón Mandin-Darby y NIH3T3 (NIH fibroblastos embrionarios de ratón suizo)] y por dos líneas celulares tumorales [KA31T (células transformadas 3T3 por virus del sarcoma, cepa Kirsten) y H4TG (células de hepatoma resistentes a tioguanina)]. Cabe mencionar que la evaluación toxicológica *in vitro* se realiza como rutina antes de una evaluación *in vivo* y nos proporciona información valiosa acerca de la inocuidad de un agente durante su etapa de desarrollo. Así mismo, también nos puede conllevar al descubrimiento de nuevos agentes biodinámicos o compuestos prototipo que se puedan utilizar como posibles anticancerígenos o antitumorales en el caso que presenten una citotoxicidad significativa y selectiva sobre las líneas celulares tumorales.

Los resultados derivados de estos experimentos (Tabla 44) revelaron que los compuestos ensayados no presentan citotoxicidad animal significativa debido a que los valores de CI_{50} calculados, en la mayor parte de los casos, se encuentran por arriba de 50 μ M. En consecuencia, las fitotoxinas más potentes **88**, **95**, **96** y **97c** podrían ser agentes inocuos para animales y por lo tanto candidatos aceptables para el desarrollo de nuevos herbicidas.

Tabla 44. Citotoxicidad de los productos naturales aislados de *Prionosciadium watsoni* y de los derivados sobre líneas celulares de mamífero.

Tratamiento	CI_{50} (μ M) ^a			
	MDCK	H4TG	NIH3T3	KA31T
85	> 50	15.8 ± 1.1	> 50	> 50
86	> 200	> 200	124.9 ± 1.2	115.0 ± 0.6
87	> 50	> 50	> 50	> 50
88	> 200	> 200	33.8 ± 1.0	81.2 ± 3.0
89	> 50	> 50	> 50	> 50
90	> 200	167.6 ± 2.5	101.1 ± 0.2	157.2 ± 0.9
93	> 200	163.5 ± 3.2	101.3 ± 0.2	141.2 ± 0.5
94	> 50	> 50	> 50	> 50
95	> 200	> 200	153.5 ± 0.7	164.2 ± 0.1
96	> 50	> 50	36.5 ± 0.1	25.7 ± 0.7
97c	> 200	> 200	> 200	> 200
97t	41.3 ± 1.8	> 200	> 200	> 200
98	65.4 ± 2.6	> 200	> 200	> 200
100	> 50	> 50	> 50	> 50

^aEs la concentración de toxina que causa el 50% de la reducción en el número de células después de 5 días de cultivo. Las líneas celulares usadas fueron MDCK, células caninas de riñón Mandin-Darby; H4TG, células de hepatoma resistentes a tioguanina, NIH3T3, NIH fibroblastos embrionarios de ratón suizo y KA31T, células transformadas 3T3 por virus del sarcoma, cepa Kirsten. ^b91 y 92 no se determinaron por la poca cantidad de material.

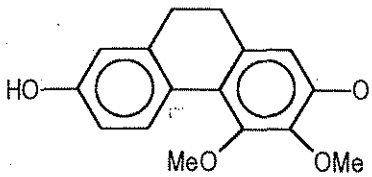
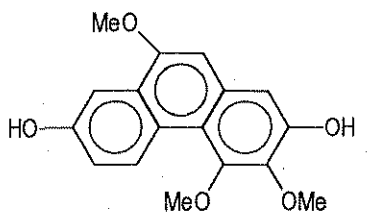
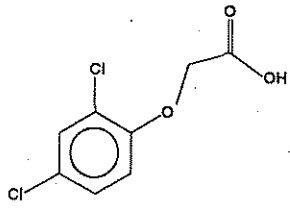
6.7 Obtención de los compuestos fitotóxicos a partir de *Maxilaria densa*. El extracto activo de *M. densa*, se sometió a un fraccionamiento primario mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice como se indicó en la sección experimental. El método bioautográfico para monitorear la fitotoxicidad mostró que la actividad se concentraba en la fracción F6. El fraccionamiento secundario de la fracción primaria F6 dió origen a cuatro fracciones secundarias F6II a F6IV. El método bioautográfico indicó que la actividad fitotóxica se concentraba en las fracciones secundarias F6II y F6III de donde se aislaron la eriantridina (**83**) y la gimnopusina (**84**), respectivamente.

La caracterización de los compuestos **83** y **84** se realizó por comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos con aquellos de muestras auténticas (Estrada *et al.*, 1999).

6.7.1 Determinación cuantitativa del efecto fitotóxico de los metabolitos aislados de *Maxilaria densa* sobre la germinación y crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*. En la Tabla 45 se indica el efecto de los compuestos **83** y **84** sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*. Los resultados están expresados en términos de concentración inhibitoria media (CI_{50}) Molar y en $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Los dos compuestos evaluados presentaron actividad fitotóxica selectiva sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* en un modo dependiente de la concentración. Sin embargo, los productos naturales no afectaron el proceso de germinación, aun a la máxima concentración de prueba ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabla 45. Efecto del extracto de *M. densa*, la eriantridina (**83**) y la gimnopusina (**84**) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*.

Tratamiento	IC ₅₀			
	<i>A. hypochondriacus</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(moles L ⁻¹)	<i>E. crusgalli</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(moles L ⁻¹)
Extracto	271		> 1000	
		58.2×10^{-4}	> 1000	
83				
		33.0×10^{-4}	> 1000	
84				
		1.80×10^{-4}		$> 2.20 \times 10^{-4}$
2,4-D^a				

^aControl positivo

6.7.2 Determinación cuantitativa del efecto fitotóxico de la eriantridina (83**) y la gimnopusina (**84**) aisladas de *Maxilaria densa* sobre arvense acuática *Lemna pausicostata*.** La eriantridina y gimnopusina causaron inhibición del crecimiento, reducción del contenido de clorofila y pérdida celular de electrolitos en *L. pausicostata* de una manera dependiente de la concentración (Tabla 46, Figuras 47-48).

Tabla 46. Efecto del extracto y productos de *Maxillaria densa* sobre *Lemna pausicostata* en cultivos^a de 72 h.

Tratamiento	Concentración	Incremento de la conductividad ($\mu\text{mho/cm}$)	Inhibición del crecimiento (%)	Reducción de la clorofila (%)
Extracto	31.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	188.5 \pm 25.0	29.8 \pm 2.8	29.4 \pm 6.7
	62.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	169.3 \pm 28.0	36.8 \pm 2.8	62.6 \pm 1.6
	125.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$	218.5 \pm 14.1	52.6 \pm 2.1	64.5 \pm 9.7
	250.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$	361.5 \pm 35.4	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
83	25 μM	130.20 \pm 8.5	19.60 \pm 2.7	6.93 \pm 5.2
	50 μM	121.70 \pm 3.5	33.32 \pm 5.5	14.18 \pm 9.2
	100 μM	184.20 \pm 3.5	56.85 \pm 5.5	35.81 \pm 19.1
84	200 μM	245.20 \pm 4.2	100.00 \pm 0.0	60.90 \pm 18.3
	25 μM	8.80 \pm 2.12	13.71 \pm 0.0	23.72 \pm 19.4
	50 μM	77.20 \pm 1.41	19.59 \pm 2.7	70.71 \pm 5.9
	100 μM	214.20 \pm 11.3	100.00 \pm 0.0	69.70 \pm 9.8
	200 μM	238.20 \pm 0.0	100.00 \pm 0.0	85.03 \pm 18.6

^aLos resultados son el promedio de tres repeticiones \pm desviación standard. ^bIC₅₀ para el extracto es de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los compuestos exhibieron significativa ($P < 0.005$, prueba *t*-tudent no apareada), mayor fitotoxicidad que el control (medio de cultivo; incremento de la conductividad, 0.00 \pm 15.7 $\mu\text{mho/cm}$; inhibición del crecimiento, 0.00 \pm 4.3 %; reducción de la clorofila, 0.00 \pm 2.1 %).

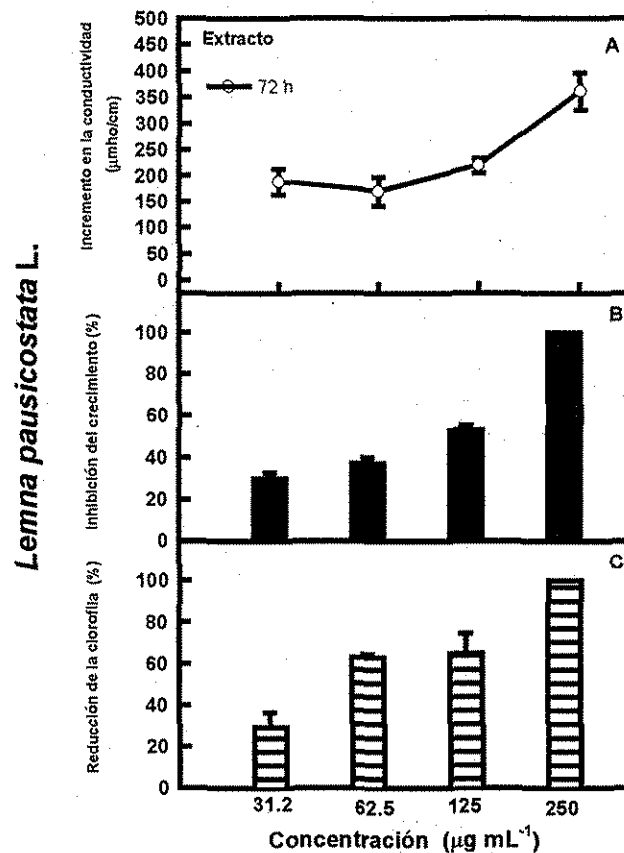
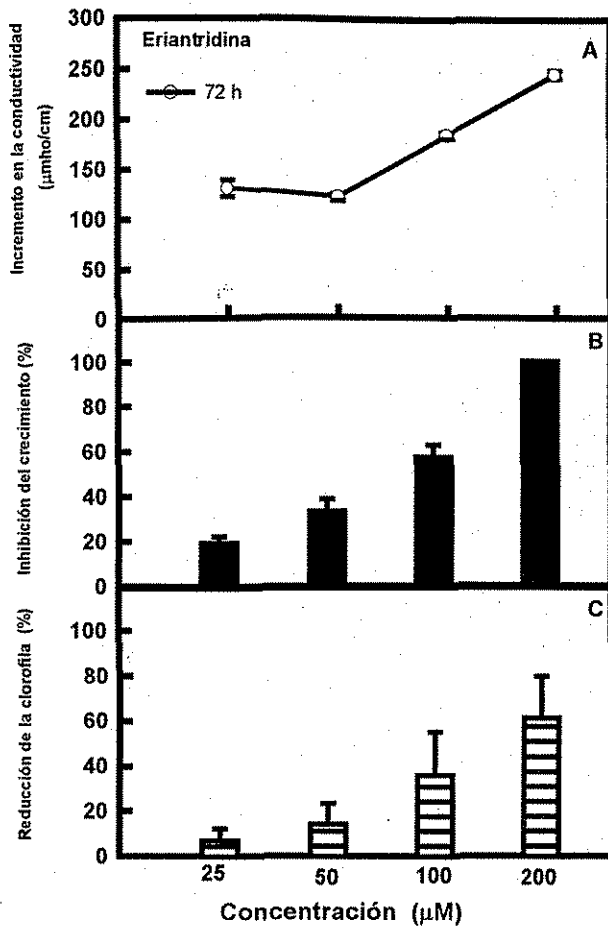


Figura 47. Efecto del extracto $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (1:1) de *Maxillaria densa* sobre *Lemna pausicostata* en cultivos de 72 h.

Lemna pausicostata L.



Lemna pausicostata L.

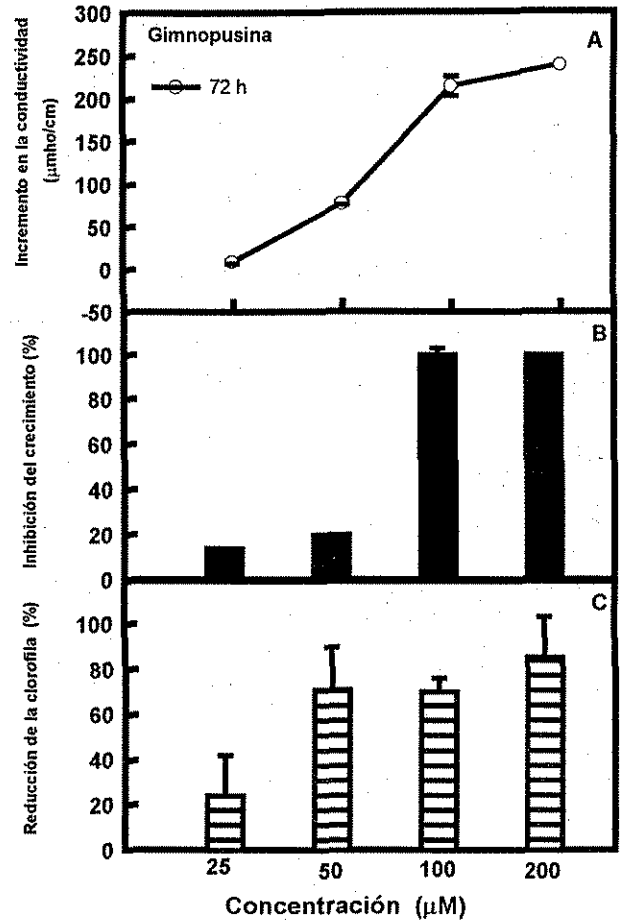


Figura 48. Efecto de la eriantridina (83) y la gimnopusina (84) aisladas de *Maxillaria densa* sobre *Lemna pausicostata* en cultivos de 72 h.

6.8 Determinación de los cambios estructurales de las hojas y raíces de *Lemna pausicostata* inducidos por la gimnopusina (84) obtenida de *M. densa*. Debido a que varias fitotoxinas causan pérdida electrolítica celular y pérdida de clorofila por alteración de la membrana celular en los tejidos tratados (Abbas *et al.*, 1994), se investigaron los efectos provocados por la gimnopusina (84) en los tejidos de las hojas y raíces de *Lemna pausicostata*. Para ello, se realizó un estudio por microscopía electrónica de los tejidos de las hojas tratadas como se señaló en la sección experimental.

El análisis indicó que la gimnopusina causa alteración de la membrana en el tejido

proveniente de las hojas debido a que las muestras observadas por microscopía electrónica mostraron los tonoplastos fragmentados y los organelos flotando libremente en el citoplasma. Se apreció también una pérdida gradual del citoplasma y de sus componentes, en contraste con el control (Figura 49 A), el cual presenta un citoplasma denso, con ribosomas y los distintos organelos; los cloroplastos se encuentran libres de almidón. A las 12 horas de tratamiento (Figura 50 B), se aprecian los primeros daños atribuibles a la fitotoxina. Este tiempo coincide con el tiempo en que comienza la pérdida electrolítica (ver Figura 51). A las 24h (Figura 49 C) se observa en la micrografía que los organelos se encuentran flotando libremente debido a la carencia de citoplasma, probablemente como una consecuencia de la ruptura del tonoplasto y la pérdida del citoplasma. Los plástidos muestran una acumulación de inclusiones de almidón y plastoglobulina. Posiblemente estas acumulaciones son remanentes de los tilacoides y se aprecian claramente debido a que su presencia provoca la acumulación del tetraóxido de osmio durante la fijación. A las 48 horas (Figura 49 D), el tejido parece muy similar al observado a las 24 h. La ruptura de los cloroplastos llega a ser más evidente a las 60 h (Figura 49 E, líneas) y aunque carecen de membrana plasmática, aun retienen cohesión.

La micrografía de las puntas de la raíz indicó que a las 72 h (Figura 50 A) las puntas de las raíces se encuentran intactas. Los tejidos de la raíz (Figuras 50 B y C) presentan células con citoplasma denso y organelos bien formados. Las vacuolas citoplasmáticas aparecen incrementadas en número y se encuentran próximas a la punta. La micrografía del tejido tratado a las 72 h muestra que las células tienen una apariencia similar a las células del control. La cobertura de la raíz se perdió, lo cual es típico de la raíz tratada a tiempos de incubación más largos. Por otro lado, las células del tejido radicular llegan a ser más vacuoladas y difieren en apariencia de las células en los controles. Ultraestructuralmente (Figura 50 E) las células apicales del tejido tratado parecen no diferir de las del control, aunque las vacuolas llegan a ser más irregulares en forma y los cloroplastos tienen inclusiones de almidón más grandes. Esto podría indicar que en presencia de la toxina, el tejido meristemático apical continua dividiéndose, pero sus células mueren más pronto que las del control.

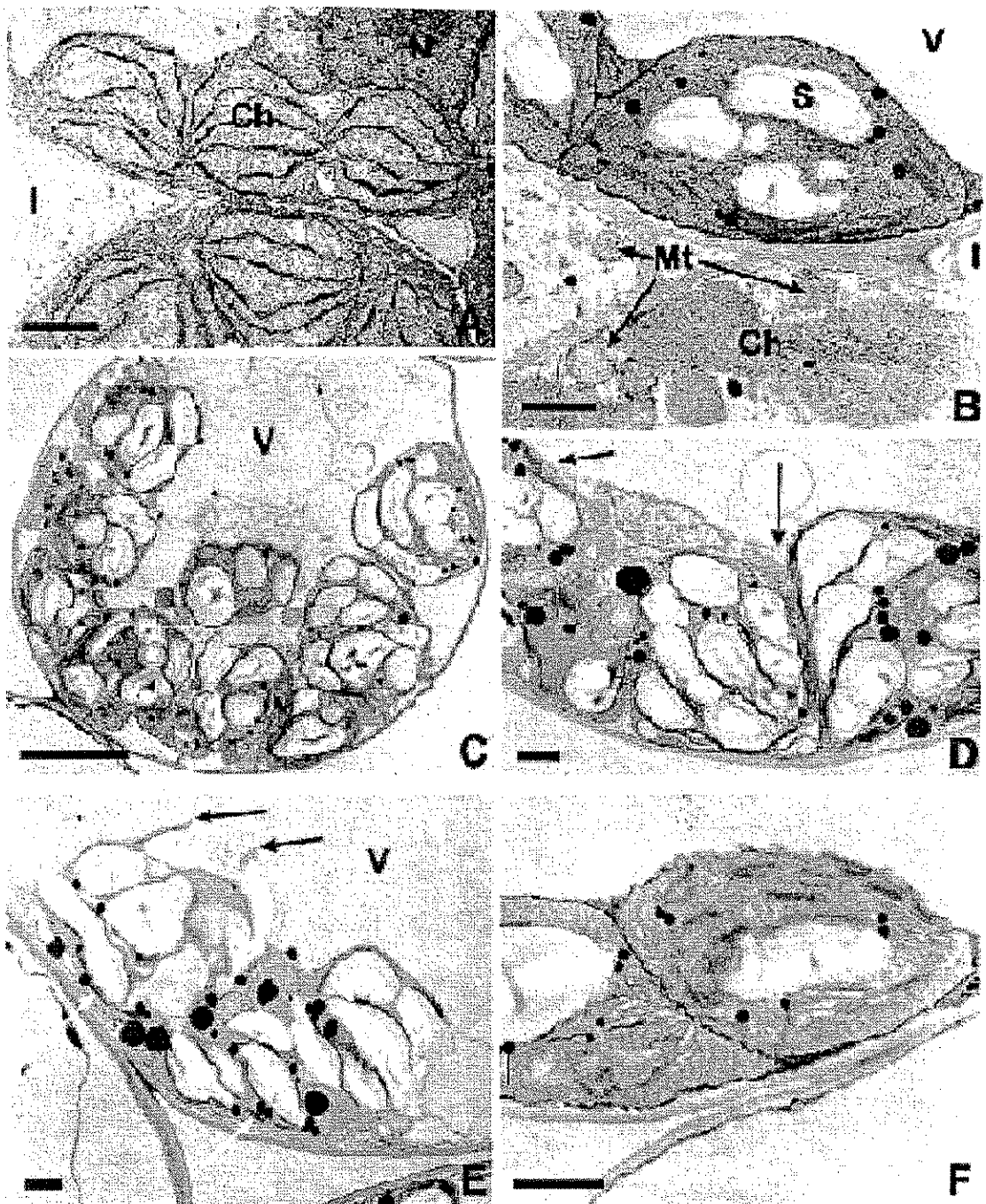


Figura 49. Micrografía del tejido de las hojas de *Lemna paucicostata* tratadas con gimnopusina (100 μ M) a diferentes tiempos. A: control, 0 h; B: 12 h; C: 24 h; D: 48 h; E: 60 h; F: 72 h. Ch = cloroplastos; I = espacio intercelular; Nu = núcleo; Mt = mitocondria; S = grados de almidón; V = vacuola. Barras = 1 μ m.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

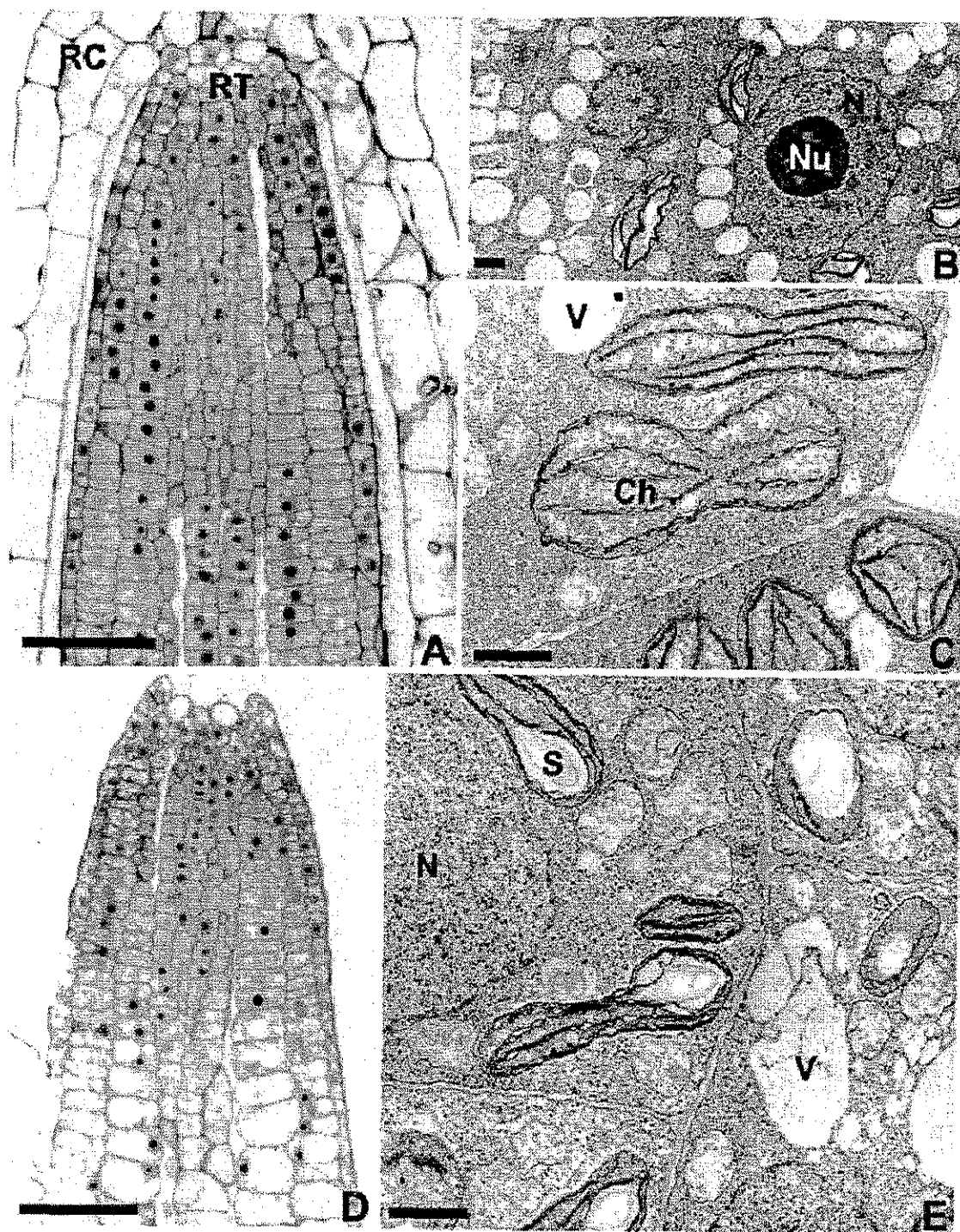


Figura 50. Micrografías del tejido de la raíz de *Lemna paucicostata* tratada con gimnopusina (100 μM) a las 72 h. **A:** control de las células apicales (TR), barra = 50 μm ; **B:** control, magnificación del citoplasma, N = núcleo, Nu = nucleolo, barra = 1 μm ; **C:** control, magnificación de los cloroplastos (Ch), barra = 1 μm ; **D:** gimnopusina, RT = células apicales, 50 μm ; **E:** gimnopusina, magnificación del citoplasma, S = granos de almidón, V = vacuola, barra = 1 μm .

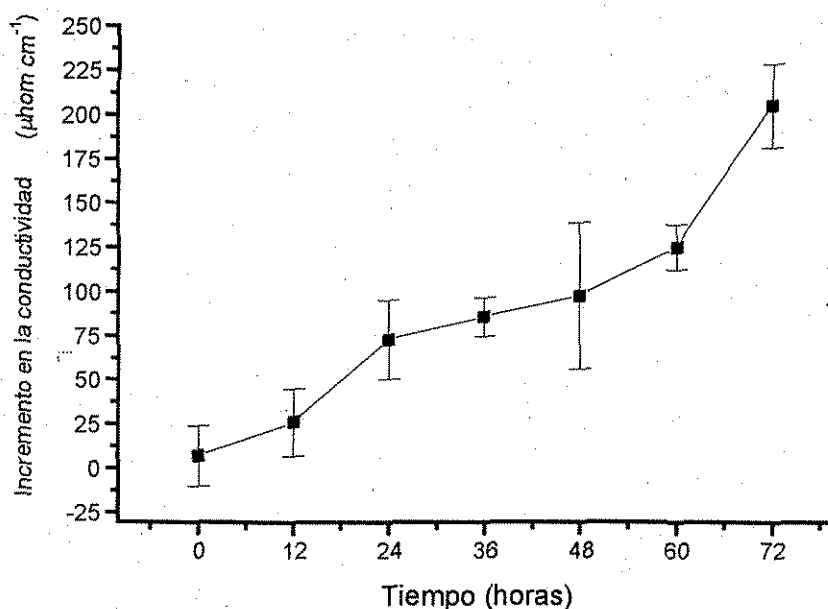


Figura 51. Incremento en la conductividad del medio de cultivo de *Lemna paucicostata* al paso del tiempo causado por la gimnopusina aislada de *M. densa*.

6.9 Evaluación de la actividad citotóxica la eriantridina (83) y la gimnopusina (84) aisladas de *M. densa* en líneas celulares de mamífero. Los resultados obtenidos acerca de la evaluación de la actividad citotóxica de los principios fitotóxicos puros obtenidos de *M. densa* sobre un panel de cuatro líneas celulares de [MDCK, células caninas de riñón Mandin-Darby; NIH3T3, NIH fibroblastos embrionarios de ratón suizo; KA31T células transformadas 3T3 por virus del sarcoma cepa Kirsten y H4TG, células de hepatoma resistentes a tioguanina] revelaron que ambos fenantrenos son poco citotóxicos para todas las líneas celulares ensayadas (Tabla 47).

Tabla 47. Citotoxicidad de la eriantridina (83) y la gimnopusina (84) en líneas celulares de mamíferos.

Compuesto	CI ₅₀ (µM) ^a			
	H4TG	MDCK	NIH3T3	KA31T
83	20.0 ± 1.14	10.2 ± 0.54	19.3 ± 0.86	13.0 ± 0.34
84	13.0 ± 0.92	11.0 ± 0.47	12.0 ± 1.0	21.0 ± 0.49

^aEs la concentración de la toxina que causa el 50% de la reducción en el número de células después de 5 días de cultivo. Las líneas celulares empleadas fueron NIH3T3 (línea celular permanente de fibroblastos embrionarios de ratón suizo 3T3), KA31T (cepa Kirsten de células 3T3 transformadas por el virus del sarcoma Moloney), H4TG (células de hepatoma de rata resistentes a tioguanina) y MDCK (células de riñón de perro Mandin-Darby).

7. CONCLUSIONES.

1. Los resultados de la presente investigación corroboran una vez más que las observaciones de tipo etnomédico y quimiotaxonómico constituyen dos de los criterios más importantes para la preselección de materias primas como una fuente potencial de compuestos herbicidas potenciales.
2. El estudio químico biodirigido de las partes aéreas de *P watsoni* condujo a la obtención de tres piranocumarinas angulares y dos piranocromonas novedosas que se caracterizaron mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y químicos como (9*R*,10*R*)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (85), (9*R*)-9- isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (89), (9*R*,10*R*)-9-hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (93), (3*R*)-2-metil-but-(2*Z*)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipirano (95) y (3*R*)-isobutiroiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipirano (96). En el caso de los productos 85 y 93 la estructura se confirmó de manera inequívoca a través del análisis de difracción de rayos X. De manera adicional, se obtuvieron siete compuestos ya descritos en la literatura fitoquímica. Estos compuestos se identificaron como seravshanina (86), quianhucumarina D (87), jatamansina (88), quianhucumarina A (90), (9*R*,10*R*)-10-hidroxi-9-(2-metil-but-(2*Z*)-enoiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (91), (9*R*,10*R*)-10-hidroxi-9-(2-metil-but-(2*E*)-enoiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (92) y (+)-*cis*-kellactona (94). Entonces desde el punto de vista quimiotaxonómico estos resultados se encuentran en armonía con los estudios previos sobre el metabolismo secundario de las umbelíferas. Esta familia se caracteriza por la biosíntesis de cumarinas como metabolitos secundarios característicos.
3. Todos los compuestos aislados a partir de *P. watsoni* y sus derivados químicos presentaron propiedades fitotóxicas significativas similares a las del herbicida comercial 2,4-D sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa*

crus-galli. Los compuestos **95**, **96** y **97c** presentaron una mayor potencia y su efecto fue selectivo en contra de *E. crus-galli*, maleza difícil de erradicar. Las piranocromonas **95** y **96** resultaron más potentes que las piranocumarinas. En ambos grupos de compuestos los ésteres resultaron más activos que los productos de hidrólisis total (i.e. la lomatina, la *cis*-kellactona y el 5-metoxihamaudol). Sin embargo, los productos de hidrólisis parcial presentaron una actividad similar a la del compuesto de origen. En el grupo de las piranocumarinas, los derivados de la lomatina fueron más activos sobre *L. pausicostata*, en tanto que los derivados de la *cis*-kellactona fueron más activos sobre *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*. En el grupo de los derivados de la metilkellactona obtenidos por semisíntesis, los compuestos de tipo *cis* fueron más activos que los de tipo *trans*.

4. El fraccionamiento biodirigido de la especie *Maxilaria densa* permitió la obtención de dos estilbenoides fitotóxicos, la eriantridina (**83**) y gimnopusina (**84**). Estos productos también presentaron propiedades fitotóxicas comparables a las del compuesto 2,4-D y *A. hypochondriacus* resultó más sensible a los tratamientos con estos compuestos.
5. La eriantridina (**83**) y gimnopusina (**84**), aisladas de *M. densa*, y la jatamansina (**88**) y la 9*R*)-9- isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (**89**), aislados de *P. watsoni*, presentaron fitotoxicidad significativa sobre *Lemna pausicostata*. Los productos causaron inhibición del crecimiento, reducción del contenido de clorofila y pérdida de electrolitos celular de una manera dependiente de la concentración. Dado que el efecto de los productos **88** y **89** fue menor que el del extracto íntegro de *P. watsoni*, los compuestos aislados se evaluaron en mezclas con la finalidad de determinar si la actividad detectada inicialmente se debía a un efecto sinérgico. Sin embargo, las mezclas no presentaron mayor actividad que los compuestos **88** y **89**. La ausencia de un efecto sinérgico de los compuestos aislados permite inferir que el(los) compuesto(s) activo(s) responsable(s) del potente efecto inhibitorio del crecimiento de *Lemna pausicostata* que presentó el extracto original no se aisló(aron) en el transcurso de esta investigación.

6. La fitotoxinas **89**, **95** y **96** interfieren con el metabolismo energético vegetal alterando el proceso de la respiración mitocondrial y/o la fotosíntesis. Así, **95** y **96** inhibieron de un modo significativo el proceso de transporte de electrones en el complejo II de la respiración en mitocondrias aisladas de frijol mungo (*Vigna radiata*). En este sentido cabe mencionar que ambos productos naturales presentaron una actividad comparable a la reportada para numerosos agentes alelopáticos de naturaleza aromática que también ejercen su acción a través de la inhibición del complejo II (Julme y Jones, 1963). El herbicida sintético UKJ72J (2-etilamino,4-amino,5-tiometil,6-cloropirimidina), potente inhibidor de la oxidación del succinato en mitocondrias aisladas de diversas especies vegetales (Gauvrit, 1985) también presenta un efecto comparable al de los dos productos. Por otro lado, las fitotoxinas **89** y **95** afectaron significativamente la fotosíntesis en hojas aisladas de frijol mungo y frijol ojo de cabra (*Phaseolus vulgaris*) dañando los centros de reacción activos como consecuencia de la inhibición del transporte de electrones y por otro lado, afecta la transferencia de energía del complejo antena a los centros de reacción.
7. El retardo en la movilidad electroforética de la proteína calmodulina en geles de SDS en la presencia de los compuestos aislados de *P. watsoni* indicó que estos productos interaccionan con esta proteína. Por lo tanto, **85-96** podrían interferir con las propiedades moduladoras enzimáticas de la CaM y por lo tanto con los procesos de transducción de señales durante los eventos de germinación y crecimiento vegetal.
8. El análisis por microscopía electrónica de los tejidos de hojas tratados con la gimnopusina, indicó que el producto **84** causa daño celular severo a nivel de las membranas celular y tilacoide. El daño citológico provocado por este compuesto comienza a las 12 horas del tratamiento y es consistente con el tiempo necesario para incrementar la conductividad del medio de cultivo. Este compuesto también provocó una disminución en el contenido de clorofila de las plantas de *Lemna* tratadas.
9. Los resultados derivados de las pruebas de citotoxicidad animal, revelaron que en general todas las fitotoxinas ensayadas no son citotóxicas para las líneas celulares

ensayadas [MDCK, células caninas de riñón Mandin-Darby; NIH3T3, NIH fibroblastos embrionarios de ratón suizo; KA31T células transformadas 3T3 por virus del sarcoma cepa Kirsten y H4TG, células de hepatoma resistentes a tioguanina]. En consecuencia, los compuestos más potentes de *P. watsoni* (89, 95, 96 y 97c) y de *M. densa* (84) constituyen posibles candidatos para el desarrollo de herbicidas verdes.

BIBLIOGRAFÍA

- Achnine, L., Mata, R., Iglesias-Prieto, R., Moreno-Sánchez, R., Lotina-Hennsen, B. (1998). Impairment of photosystem II donor side by the natural product odoratol. : *Agric. Food. Chem.* **46**, 5313-5317.
- Achnine, L., Pereda-Miramanda, 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. *Physiol. Plant*, **106**, 246-252.
- Abbas, H.K. Boyette C.D. Vesonder, R.F (1993). United Staes Patent No. 5, 246,628.
- Abbas, H. Vesonder, R.F. (1993). Isolation and purification of AAL-toxin from *Alternaria alternata* grown on rice. *Toxicon* **31**, 355-358.
- Abbas, H., Duke, S., Shier, T., Badria, F., Ocamb, C., Woodward, R., Xie, W., Mirocha, C. (1997) Comparasion of ceramide syntashe inhibitors with other phytotoxins produced by fusarium species. *J. Nat. Toxins*, **6** (2), 163-181.
- Abbas, H., Paul, R. N, Boyette, C. D. Duke, S. O., Vesonder, R.F. (1992). Physilogical and ultraestructural effects of fumonisin on jimsonweed leaves. *Can. J. Bot.* **70**, 1824-1833.
- Abbas, H., Paul, R. N, Riley, R.T., Tanaka, T., Shier, T. (1998). Ultraestructural effects of AAL-Toxin T_A from the fungus *Alternaria alternata* on black nightshade (*Solanum nigrum* L.) leaf discs and correlation with biochemical measures of toxicity. *Toxicon* **36** (2), 1821-1832.
- Abbas, H., Tanaka, T., Duke, S., Porter, J., Wray, E., Hodges, L., Session, A., Wang, E., Merrill, A. and Riley, R. (1994) Fumonisin and AAL-toxin induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant. Physiol.* **106**, 1085-1093.
- Abell, L. M., Schloss, J. V., Rendina, R. (1993) Target-site direct herbicide design. En: Pest control with enhanced enviromental safety. Duke, S., Menn, J., Plimmer (eds.). *ACS Symposium Series 524*, Washington, D. C. pp 17-37.
- Aguilar, A., J., Camacho, S., Chino, P., Jáquez, P., López, M. (1994). Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Instituto Mexicano del Seguro Social. México, D. F.253 p.
- Aguilar-Martínez, M., Jiménez-Estrada, M., Macías-Ruvalcaba, N.A., Lotina-Hennsen, B. (1996). *J. Agric. Food. Chem.* **44**, 290-295.
- Altomare, A., Cascarano, G., Giacobazzo, C., Guagliardi, G., Burla, M., Polidori G., Camalli, M. (1994). *J. Appl. Cryst.* **27**, 435.

- Allan, E., A.; Trewavas, (1985). Quantitative changes in Calmodulin and NAD kinase during early cell development in the root apex of *Pisum sativum* L., *Planta* **165**, 493-501.
- Anaya, A. L., Calera, M., Mata, R., Pereda-Miranda, R. (1990). Allelopathic Potential of Compounds Isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *J. Chem. Ecol.*, **16**, 2145-2152.
- Anaya, A., L.; Hernández, B., E.; Calera, M. R., Torres, A., Pelayo, H., Fernández, E. (1995). A Methodological model used in the search for allelopathic potential in some mexican plants. En: *Methodology for Allelopathy Research*. Waller, G. R. y S. Narwal (eds.).
- Au, T.K., Chick, W.S., Leung, P.C. (2000) The biology ophiobolin A. *Life Sci.* **67**, 733-742.
- Barta, I.C., Boeger, P., (1995). *Pestic. Sci.* **45**, 286-287.
- Baum, G., S.; Lev-Yadum, Y.; Fridman, Arazi, T.; Katsnelson, M.; Zik, H.; Fromm, H. (1996). Calmodulin binding to glutamate decarboxilase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. *Embo J.* **15**, 2988-2996.
- Bayer, E., Gugel, K.H., Hägele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S, König, W.A., Zähler, H. (1972). Stoffwechsel produkte von mikroorganismen. Phosphinothricin und phosphinothricin-alanyl-alanine. *Helv, Chim. Acta.* **55**, 224,
- Becerril, J.; Duke, M.; Ujjana, B., Nadihalli, U.; Matsumoto, H.; Duke, S. (1992) Light control of porphyrin accumulation in acifluoren-methyl-treated *Lemna paucicostata*. *Phys. Plant.* **86**, 6-16.
- Bewley, J.; Black, M. (1994). Seeds. Physiology of development and germination. Segunda Edición. Plenum Press, New York, Pp 1-33, 147-198.
- Boger, P.; Sandmann, G. (1989). Target sites of herbicide action. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, pp 1-295.
- Bolhar-Nordenkamp, H.R., Öquist, G. (1993). Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. En: *Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual*. Hall, D.O., Leegood, R.C., Long, (eds.) Chapman and Hall. London. pp 193-206.
- Bolhman, F.; Franke, H. (1971) Synthese von racemischen lomatín, columbianetin, angenomalín und samidin, *Chem. Ber.* **104**, 3229-3233.
- Bolhman, F.; Bhaskar, R.; Grenz, M. (1968). Über die cumarine aus *Angelica ursina* und *Seseli libanotis*. *Tetrahedron Lett.*, 3947-3950.

- Bush, D. S. (1995). *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 95-122.
- Bowes, J., Crofst, A.; Arnzen, R. (2000), Redox reactions on the reducing side of photosystem II in chloroplasts with altered herbicide binding properties. *Ach. Bioch. Bioph.* 30-308.
- Bye, R. (2000). Ethnobotanical notes of Dr. Edward Palmer for Western USA and México 1861-1910. Data base, first approximation; Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Calera, M-R., Anaya, A.L., Gavilanes-Ruiz, M. (1995). Effect of phytotoxic resin glycoside on activity of H⁺-ATPase from plasma membrane. *J. Chem. Ecol.* 21, 289-295.
- Calera, M., Mata, R., Lotina-Hensen, B., Anaya, A. (1996). Uncoupler behaviour of the 4-phenylcoumarins in spinach chloroplasts. *Photosyn. Res.* 45, 105-110.
- Calera, M., Soto, F., Sanchez, P., Bye, R; Lotina-Hensen, B., Anaya, A., Hernandez, B., Mata, R. (1995). Biochemically active sesquiterpenes lactones from *Ratibida mexicana*. *Phytochemistry* 40, 419-425.
- Castañeda, P.; Garcia, M.; Hernandez, B.; Torres, B.; Anaya, A.; Mata, R.; (1992). Effects of some compounds isolated from *Celaenodendron mexicanum* standl on seeds and phytopatogenic fungi. *J. of Chem. Ecol.* 18, 1025-1037.
- Castañeda, P., Gomez, L., Mata, R., Lotina-Hennsen, B., Es, B., Anaya, A., Bye, R. (1996). Phytogrowth-inhibitory and antifungal constituents of *Helianthella quinquenervis*. *J. Nat. Prod.* 59, 323-326.
- Castañeda, P., Gomez, L., Mata, R., Lotina-Hennsen, B., (1998). Effect of encecalin, euparin and demethylencecalin on tilakoid electron trnsport and photophosphorilation in isolated spinach chloroplasts. *J. Sci. Food. Agric.* 78, 102-108.
- Cocucci, M.; Negrini, N. (1988). Changes in the levels of calmodulin and of calmodulin inhibitor in the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Physiol.* 88, 910-914.
- Cocucci, M.; Negrini, N. (1991). Calcium calmodulin in germination of *Phacelia Tanacetifolia* seeds: effects of light, temperature, fusiciccin and calcium calmodulin antagonist. *Physiologia Plantarum.* 82, 143-149.
- Cox, P., Balick. M.(1994). The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American*, June, 82-87.
- Cutler, H., Cutler, S. (1999). Agrochemicals and pharmaceuticals: the connection. En: Biologically active natural products: Agrochemicals. Culter, H. and Cutler, S. (eds.) CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 1-14.

- Cramer, H., M. (2000). Crop protection. En; Agrochemicals. Composition, Production, Toxicology Applications. F. Müller (ed.), Willey-VCH, Federal Republic of Germany, 288-317.
- Cremlyn, R. J. (1991). Agrochemicals preparation and mode of action. John Wiley and Sons, Chichester, England, 37-51, 217-270 y 341-360.
- Dale, J., Mosher, H. (1973) *J. Am Chem Soc*, 113, 10203.
- Dayan, F. E., Romagni, J., Duke, S. O (2000). Investigatong the mode of action of natural phytotoxins. *J. Chem. Ecol.*, **26**, 2079-2094.
- Dayan, F. E., Vincent, A. C., Romagni, J. G., Allen, S. N., Duke, S. T., Duke, M.V., Bowling J. J., Zjawiony, J.K. (2000). Amino- amino urea-substituted thiazoles inhibit photosynthetic electron transfer. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3689-3693
- Dieter, P. (1984). Calmodulin and calmodulin-mediated process in plants. *Plant Cell and Enviroment* **7**, 371-380.
- Duke, S.O. (1993). Naturally occurring chemical compounds as herbicides. *Weed Sci. Rev.* **5**, 17-44.
- Duke, S. Lydon, J. (1993). Natural phytotoxins as herbicides. En: Pest control with enhanced enviromental safety. Duke, S., Menn, J., Plimmer (eds.). *ACS Symposium Series 524*, Washington, D . C. Pp 111-124.
- Duke, S., Kenyon, W. (1993). En: Target assays for herbicides and related phytotoxic compounds. Börger, P y Sandmann, G. (eds.) CRC Press. Boca Raton. FL., p.61.
- Duke, S.; Abbas, H. (1995). Natural products with potential use as herbicides. En: Allelopathy organisms, process and applications. M. Inderjit, M. Dakshini Y F. (eds.) *ACS Symposium Series 582*. Washington, D. C. Pp 96-116 y 348-362.
- Eastbrook, (1967). Mitochondrial respiratory control and the polarographyc measurement of ADP:O rations, oxidation and phosphorylation, En: *Methods In Enzymology.* **10**, Eastbrook and Pullman (eds.) Academic Press: New York, 1967, pp. 4-47.
- Einhellig, F. (1995) Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy. En: Allelopathy organisms, process and applications. M. Inderjit, M. Dakshini Y F., Einhelling (eds.) *ACS Symposium Series 582*. Washington, D. C. pp 96-116 y 348-362.
- Espinosa-García, F., Delgado, G. (1998). Relationship between ecology of plants defense and the prospction of secondary metabolites with potential medicinal or agricultural application. *Rev. Latinoamer. Quim.* **26** (1), 13-29.
- Estrada, S., Toscano, R. and Mata, R. (1999) New Phenanthrene Derivatives from *Maxillaria densa*. *J. Nat. Prod.* **62**, 1175-1178.

- Estévez-Braun, J.; González, A. (1997). Coumarins. *Nat. Prod. Rep.* 465-475.
- Evidente, A. Mota, A. (2001). Phytotoxins from fungi, Pathogenic for agrarian, forestal and weeding planst. En: Bioactive compounds from natural sources. Tringalli (ed.), Taylor and Francis, England. 475-525.
- Fraser, R., (1960). Long-range coupling constants in the NMR spectra of olefines. *Can. J. Chem.* 38, 549-553.
- Galindo, J., Hernández, A., Dayan, F., Tellez, M., Macías, F., Paul, R. N., Duke, S. O. (1999). Dehydrozaluzanin C, a natural sesquiterpenolide, causes rapid plasma membrane leakage. *Phytochem.* 52, 805-813.
- Gauvrit, C. (1985). Inhibition of succinate oxidation by the herbicide UKK72J. *Phytochem.* 24, 2181-2183.
- Ghisalberti, E. (1993). Detection and isolation of bioactive natural products. En: Bioactive natural products. Determination. S. Colgate, R. Monyieux, (eds.) CRC Press, Boca Raton, pp 9-57.
- Giménez, I., Vicente, C. (1989). On the mode of action of usnic acid as photosynthetic uncoupling agent. *Phyton* 49, 119-121.
- Gison, D., Krasnoff, S. (1999). Exploring the potential of Biologically active compounds from plants and fungi. En: Biologically active natural products: Agrochemicals. Coulter, H. y Cutler, S., (eds.) Boca Raton, Florida, pp 232-242.
- González, S. M. (2001). Utilización de la técnica de fluorescencia de clorofila a en el estudio del efecto de los metales pesados en el fotosistema II de *Scenedesmus incrassatulus*. Manual de prácticas. Laboratorio de Bioquímica. Unidad de Morfofisiología. FES Iztacala. UNAM.
- González, A., Galindo, A. (1978). Lactonas sesquiterpénicas en umbelíferas". En "Actes du 2e Symposium International sur les Ombelliferes (Perpignan, 1977). "Contributions pluridisciplinaires á la Systématique". Paru, 365-377.
- Gorham, J. The biochemistry of stilbenoids; Chapman and Hall: London, 1995, pp 262
- Harborne, J. (1998). Recent advances in chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.* 16, 509-523.
- Hedin, P.; Hollingworth (1997). New applications for phytochemical pest control agents. En phytochemicals for pest control. P. A. Hedin *et al.* (eds). *ACS Symposium Series* 658: Washington, D. C. pp 1-12.
- Hegnauer, R., (1978). Phytochemie und klassifikation der umbelliferen, eine Neubewertung im lichte der seit 1972 bekannt gewordenen phytochemischen tatsachen. En "Actes

du 2e Symposium International sur les Ombellifères (Perpignan, 1977). "Contributions pluridisciplinaires à la Systématique". Paru, 335-363.

Hietz, P. Hietz-Seifert, V. (1994). Epífitas de Veracruz. Guía ilustrada para las regiones de Xalapa y Los Tuxtlas, Veracruz.; Instituto de Ecología, A. C.: Veracruz, México, p 48.

Hiscox, J., Israelstam, G. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissues without maceration *Can. J. Bot.*, **57**, 1332-1334.

Hoagland, R. E. (1999). Biochemical Interactions of the microbial phytotoxin phisphinocticin and analogs with plants and microbes. En Biologically active natural products: Agrochemicals. Culter, H. and Cutler, S. (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp107-123.

Inoue, H., Noguchi, M., Kubo. (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.; Mizutani, J. (1992). Allelochemicals of *Polygonum sachaliense* FR.SCHM (Polygonaceae). *J. of Chem Ecol.* **18**, 1833-1840.

Jiménez, A.; Mata, R.; Lotina Hennessen, B.; Anaya, A. (1998). Interference of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene with photosynthetic electron transport. *Z. Naturforsch.*, **53c**, 55-59.

Jiménez, A.; Mata, R.; Lotina Hennessen, B.; Anaya, A.; Velasco Ibarra, L. (1996) Phytogrowth-Inhibitory Compounds From *Malmea Depressa*. *J. of Nat. Prod.* **59**, 202-204.

Jiménez, M.S., González-Rodríguez, A.M., Morales, D., Cid, M. C., Socorro, A. R., Caballero, M. (1997). Evaluation of chlorophyll fluorescence as a tool for salt stress detection in roses. *Photosynthetica* **33**, 291-301.

Koeppel, D.E. (1972). Some reactions of isolated corn mitochondria influenced by julgone. *Phys. Plant.* **27**, 89-94.

Krause, G., Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann Rev, Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **42**, 313-349.

Lee, S.; Kim, M.; Lee, W.; Heo, H.; Seo, H.; Yoon, J.; Hong, S., Lee, J.; Bahk, I.; Hwang, M.; Cho, M. (1995). Identification of a novel divergent calmodulin isoform from soybean which has a differential ability to activate calmodulin-dependent enzymes. *J. Biol. Chem.* **270**, 21806-21812.

Lemmich, J.; Alsted-Pedersen, P.; Nielsen, B. (1969). Revised absolute configurations of natural khellactone esters. *Tetrahedron Lett.* **39**, 3365-3366.

- Lemmich, J.; Lemminh E., Nielsen, B. (1966). Constituents of umbelliferous plant. *Acta Chem Scand.* **20** (9), 2497-2507.
- Leung, P.C. Taylor, W.A., Wang, J.H., Trpton, C.L. (1994). Ophiobolin A a natural product inhibitor of calmodulin. *J. Biol. Chem.* **259**, 2742-2747.
- Leung, P.C. Taylor, W.A., Wang, J.H., Trpton, C.L. (1994). Role of calmodulin inhibition in the mode of action of ophiobolin A. *Plant Physiol.* **77**, 303-308.
- Liao, B.; Gawienowski, M. C.; Zielinski, R. E. (1996). Differential Stimulation of NAD Kinase and Binding of Peptide Substrates by Wild-Type and Mutant Plant Calmodulin Isoforms. *Arch. Biochem. Biophys.* **327**, 53-60.
- Lingyi, K.; Xian, L.; Zhida, M.; Yang, L.; Qitai, Z.; Tingru, Z. (1996). Study on acyloxy positions of angular pyranocoumarins by mass spectrometry. *Yaokedaxue Xuebao* **27**, 136-138.
- Linscott, D.L. (1981). The nature mode of action and toxicity of herbicides. En: Handbook of pest managment in agriculture. Pimentel, D (ed.). Vol. III. CRC Pres. pp 759-794.
- Lotina-Hennsen, B., Bernal-Morales, E., Romo de Vivar, A., Pérez, A. L., Castro, A., Aguilar, M., (1992). *J. Chem. Ecol.* **18**, 1891.
- Lotina-Hennsen, B., Mata, R., Calderón, J., Céspedes-Acuña, C., Jiménez-Estrada, M. (1998). Secondary metabolites from mexican plants: target and mechanism of action on photosynthesis. *Recent Res. Devel. In Agricultural & Food Chem.* **2**, 731-749.
- Ma, L.; Sun, D. (1997). The effects of extracellular calmodulin on initiation of hippeastrum rutilum pollen germination and tube growth. *Planta*, **202**, 336-340.
- Macías, F. (1995). Allelopathy in the search for natural herbicide models. En allelopathy organisms process and applications, M. M. Dakshini Y F. Einhelling (eds.) *ACS Symposium Series* **582**: Washington, D. C. pp 348-362.
- Macías, F.; Massanet, G.; Rodriguez-Luis, F.; Salvá F. (1989) ¹³C NMR of coumarins. II. Khellactones: spectroscopic criteria to establish the relative configuration of the dihydropyran ring. *J. Magn. Reson. Chem.* **27**, 653-658.
- Macías, M.; Gamboa, A.; Ulloa, M.; Toscano, R.A.; Mata, R. (2001). Phytotoxic naphthopyrone derivatives from the coprophilus fungus *Guanomyces polithrix*. *Phytochem.* **58**, 751-758.
- Macías, M.; Ulloa, M.; Gamboa, A.; Mata, . (2000a) Phytotoxic compound from the new coprophilus fungus *Guanomyces polithrix*. *J. of Nat. Prod.* **63**, 757-761.

- Macías, F., Castellano, D., Molinillo, J. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. (2000b). Selection of standard target species. *J. Agric. Food. Chem.* **48**, 2512-2521.
- Magiati, P., Melliou, E.; Skaltsounis, A.; Mitaku, S.; Léonce, S.; Renard, P.; Pierre, A.; Atassi, G. (1998). Synthesis and cytotoxic activity of pyranocoumarins of the seselin and xanthyletin series. *J. Nat. Prod.* **61**, 9821-986.
- Mata, R., R. Pereda-Miranda, B. Lotina-Hennsen (1996). En: *Secondary Metabolites From Mexican Plants: Chemistry And Biological Properties*. L. Rodriguez-Hahn, Ed. Research Signpost, Trivandrum, Pp59-68.
- McCarty, R.E. (1980). Delineation of the mechanism of ATP synthesis in chloroplasts: Use of uncouplers, energy transfer inhibitors, and modifiers of coupling factor. *Methods in Enzymol.* **69**, 719-728.
- Mata, R.; Macias, M.; Rojas, I.; Lotina-Hennsen, B.; Toscano, R.; Anaya, A. (1998). Phytotoxic compounds from *Esenbeckia yaxhoob*. *Phytochem.* **48**, 1086-1095.
- Mckee, T., Covington, C., Fuller, R., Bokesch, H., Young, S., Cardellina II, J., Kadushin, M., Soejarto, D., Stevens, P., Cragg, G., Boyd, M. (1998). Pyranocoumarins from tropical species of the genus *Calophyllum*: a chemotaxonomic study of extracts in the National Cancer Institute Collection. *J. Nat. Prod.* **61**, 1252-1256.
- Mendoza, J.L. Jimenez, :, Lotina-Hennsen, B. (1996). *Pesticide Sci.* **40**, 37.
- Merril, A., Jr., Wang, E., Gilchrist, D., Riley, R. (1993). Fumonisin and other inhibitors of de novo sphingolipid biosynthesis. *Adv. Lipid. Res.* **26**, 215-234.
- Misra, A., Srivastava, A., Strasser, R. (2001). Utilization of fast chlorophyll *a* technique in assessing the salt/ion sensitivity of mung bean and *Brassica* seedlings. *J. Plant. Physiol.* **158**, 1173-1181.
- Mitchell, G, Bartlett, D.W, Fraser, T.E, Hawkes, T.R, Holt, D.C, Townson, JK, Wichert, RA. (2001) Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Manag Sci* **57**(2) 120-8.
- Miyakado, M.; Watanabe, J.; Miyamoto, J. (1997). Natural Products As Leads In Estructural Modification Studies Yielding New Agrochemicals. Hedin, P. And, Hollingworth, R. (1997). New applicatoinis for phytochemical pest control agents. En: phytochemicals for pest control. Hedin, P. *et al.*, (eds.) *ACS Symposium Series* **658**: Washington, D. C. pp 168-182.
- Moore, A., Siedow, J. (1991). The regulation and nature of cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochem Biophys. Acta.* **1059**, 121-140.

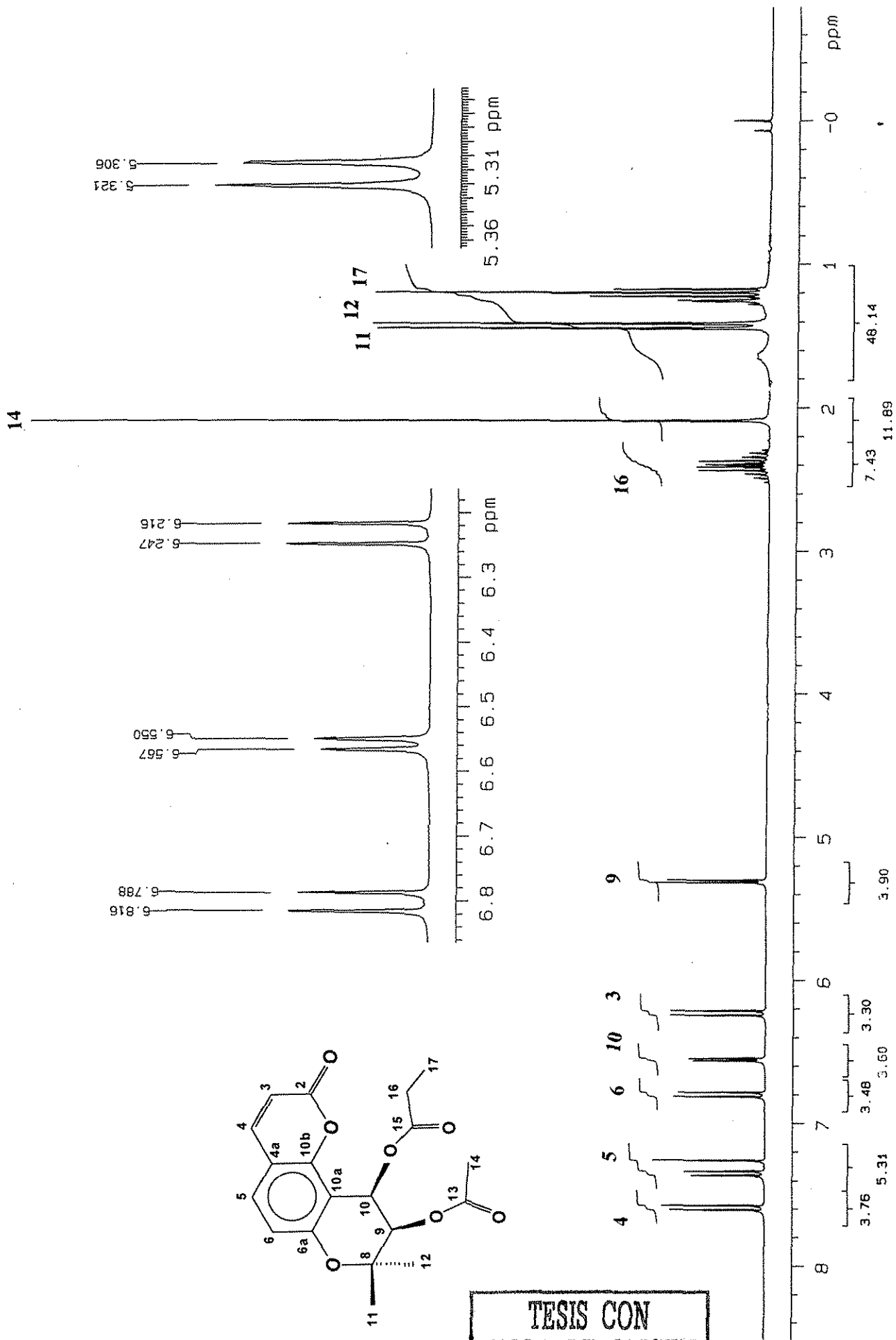
- Moreland, D.E., Novitzky, W. P. (1987). Effects of phenolic acids, coumarins and flavonoids on isolated chloroplasts and mitochondria. En: Allelochemicals:role in agriculture and forestry. Waller G.R. (Editor). ACS *Symposium Series*, Washington. D. C. Pp 246-261.
- Mukohata, Y., Nakabayashi, S., Higashida, M. (1978). Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorilation. *FEBS Lett.* **85**, 215-218.
- Murray, R. (1995) Coumarins. *Nat. Prod. Rep.* 477-505.
- Murray, R. (1978). Naturally occurring plant coumarins. *Nat. Prod. Rep.* **35**: 199-429.
- Nielsen, E.; Larsen, P.; Lemmich, J. (1971) Constituents of umbelliferous plants. XVII. Coumarins from *Seseli gummiferum* Pall. The structure of two new coumarins. *Acta Chem. Scand.* **25**, 529-533.
- Nitta, A. (1965). *Yakugaku Zasshi*, **85**(1), 55-61.
- Nimbal, C.I., Pederson, J.F., Yerkes, C.N., Weston, L.A., Weller, S.C. (1996) *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1343-1347.
- Netzly, D., Riopel, J., Ejeta, G., Butler, L. (1988). Germination stimulants of witchweed (*Striga asiatica*) from hydrophobic root exudates of sorghum (*Sorghum bicolor*). *Weed Sci.* **36**, 441-446.
- Oh, S-H; Steiner, H., Dougall, D.; Roberts, D. (1992). Modulation of calmodulin levels, calmodulin methylation and calmodulin bindings proteins during carrot cell growth and embriogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**, 28-34.
- Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. (1991) High-Field FT NMR application of Mosher's Method. the absolute configuration of marine terpenoids. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4092- 4096.
- Overvoorde, P.; Grimes, H. (1994). The role of calcium and calmodulin in carrot somatic embryogenesis. *Plant. Cell. Physiol.* **35**, 28-34.
- Pillmoor, J.; Wrigth, J.; Terry, A.; (1993). Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. *Pestic. Sci.* **39**, 131-140.
- Kimura, T., Nakamura, K. Takahashi, E. (1995) Phosphonothrixin, a novel herbicidal antibiotic produced by *Saccharothrix* sp. ST-888. II. Structure determination. *J Antibiot* **48** (10),1130-1133.
- Paliyath, G., Poovaiah, B. (1985). Identification of naturally occurring calmodulininhibitors in plants and their effects on calcium and calmodulin promoted protein phosphoriñation. *Plant cell Physiol.* **26**, 201-209.

- Pereda-Miranda, R. Mata, R., Anaya, A.L. Wickramaratne, D.B., Mahinda, D.B., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D. (1993) *J. Nat. Prod.* **56**, 571-582.
- Percival, M.P. Baker, N.R. (1991). Herbicides and photosynthesis. En: Herbicides. Baker, N.R. (ed.). Elsevier Science Publishers. Pp 1-26.
- Poovaiah, B.; Takezawa, D.; An, G.; Han, T-J. (1996). Regulated Expression Of A Calmodulin Isoforms Alters Growth And Development Potato. *J. Plant Phys.* **149**, 553-558.
- Rahalison, L.; Hamburger, M.; Hosttetmann, K.; Monod, M.; Frenk, E. (1991). A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochem. Anal.*, **2**, 199-203.
- Rahalison, L.; Hamburger, M.; Monod, M.; Frenk, E.; Hosttetmann, K. (1994). Antifungal test in phytochemical investigations: comparasion of bioutographyc methods using phytopayhogenic and human phatogenic fungi. *Planta Medica*, **60**, 41-44.
- Ravanel, P., Tissut, M., Douce, R. (1982). Uncoupling activities of cahlcones and dihydrochalcones on isolated mitochondria from potato tubers and mung hypocotyls. *Phytochem.* **21** (12), 2845-2850.
- Reitvel, W.J. (1983). Allelopathic effects of juglone on ger,onation and growth of several herbaceous and wood species. *J. Chem. Ecol.* **9**, 295-308.
- Rimando, A., Dayan, F., Czarnota, M., Weston, L., Duke, S. O. (1998) A new photosystem II electron transfer inhibitor from *Sorgum bicolor*. *J. Nat. Prod.* **61**, 927-930.
- Rieser, M. J., Fang, X. P., Anderson, J. E., Miesbauer, L. R., Smith, D. L., McLaughlin, J. L. *Helv. Chim. Acta.* **1993**. **76**. 2433.
- Rieser, M. J., Hui, Y. H., Rupprecht, J. K., Kozłowski, J. F., Wood, K. V., McLaughlin, J. L., Hanson, P.R., Zhuang, A., Hoye, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**. **114**. 10203.
- Rogers, L., Zeng, L., Kozłowski, J., Shimada, H., Alali, F., Johnson, H., McLaughling, J. (1998). New bioactive triterpenoids from *Melia volkensii*. *J. Nat Prod.* **61**, 64-70.
- Roberts, D., Lukas, T.; Watterson, D. (1986). Structure, function and mechanism of action of calmodulin. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **4**, 311-339.
- Roberts, D.; Harmon, A. (1992). Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higer plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 375-414.
- Rodgers, P. (1993). Potential of biopesticides in agriculture, *Pestic. Sci.* **39**, 117-119.

- Rogers, L.; Zeng, L.; Kozlowski, J.; Shimada, H.; Alali, F.; Johnson, H.; McLaughling, J. (1998). New bioactive triterpenoids from *Melia volkensii*. *J. Nat Prod.* **61**, 64-70.
- Rojas, I., Lotina-Henssen, B., Mata, R. (2000). Effect of lichen metabolites on thylacoid electrón trnasport and photophosforylation in islolated spinach chloroplasts. *Journal of Natural Products* **63**, 1396-1399.
- Romagni, J., Duke, S. O., Dayan, F. (2000). Inhibition of plant asparagine syntase by monoterpene cineoles. *Plant Physiol.* **12**, 725-732.
- Rudiño-Piñera, E., Juárez-Martínez, G., Panneerselvam, K., Soriano-García, M., Anaya, A., García-Santana, C., Sánchez, P. (1995). Xanthyletin. *Acta Crystallographic Section C51*, 2720-2722.
- Schulz, A., Ort, O., Beyer, P., Kleinig, H. (1993). A 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Lett*, **318** (2), 162-166.
- Secor, J. (1994). Inhibition o barnyardgrass 4-hydroxyphenylpyruvate dioxigenasa by sulcotrione. *Plant physiol.* **106**, 1429-1433.
- Shaath, N.; Soine, T.; Shipchandler, M. (1976). Coumarins XIV: High-Resolution mass spectra of 3',4'-disubstituted 3',4'-dihidroseselins. *J. Pharm. Sci.* **65**, 1028-1033.
- Shanbhag, S.; Mesta, C.; Maheshwari, M.; Paknikar, S.; Bhattacharyya, S. (1964) Jatamansin, a new terpenic coumarin from *Nardostachys jatamansi*. *Tetrahedron* **20**, 2605-2615.
- Sheldrick, G. M. (1997). Program for Refinement of Crystal Structures. University of Göttingen, Germany 1993.
- Shi, G.; He, K.; Liu, X.; Ye, Q.; MacDougal, J.; McLaughling, J. (1997) A novel applicatio of Mosher's method to epimeric carbinols in acetogenins; absolute configurations of 12-hydroxy-bullatacins A and B, new acetogenins from *Rollinia mucosa*. *Natural Products Letters.* **10**, 125-132.
- Shier, W.T., Abbas, H.K., Mirocha, C.J. (1991). Toxicity of the mycotoxins fumonisins B1 and B2 and *Aletrnaria alternata* f. sp *lycopersici* toxin (AAL) in cultured mammalian cells. *Mycopathologica* **116**, 97-104.
- Shier, W.T. (1992). Sphingosine analogues: An emergin new class of toxins that includes the fumonisin. *J. Toxicol-Toxin revews* **11**, 241-257.
- Srivastava, A., Strasser, R.J. (1997). Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem Photobiol* **61**, 32-42.

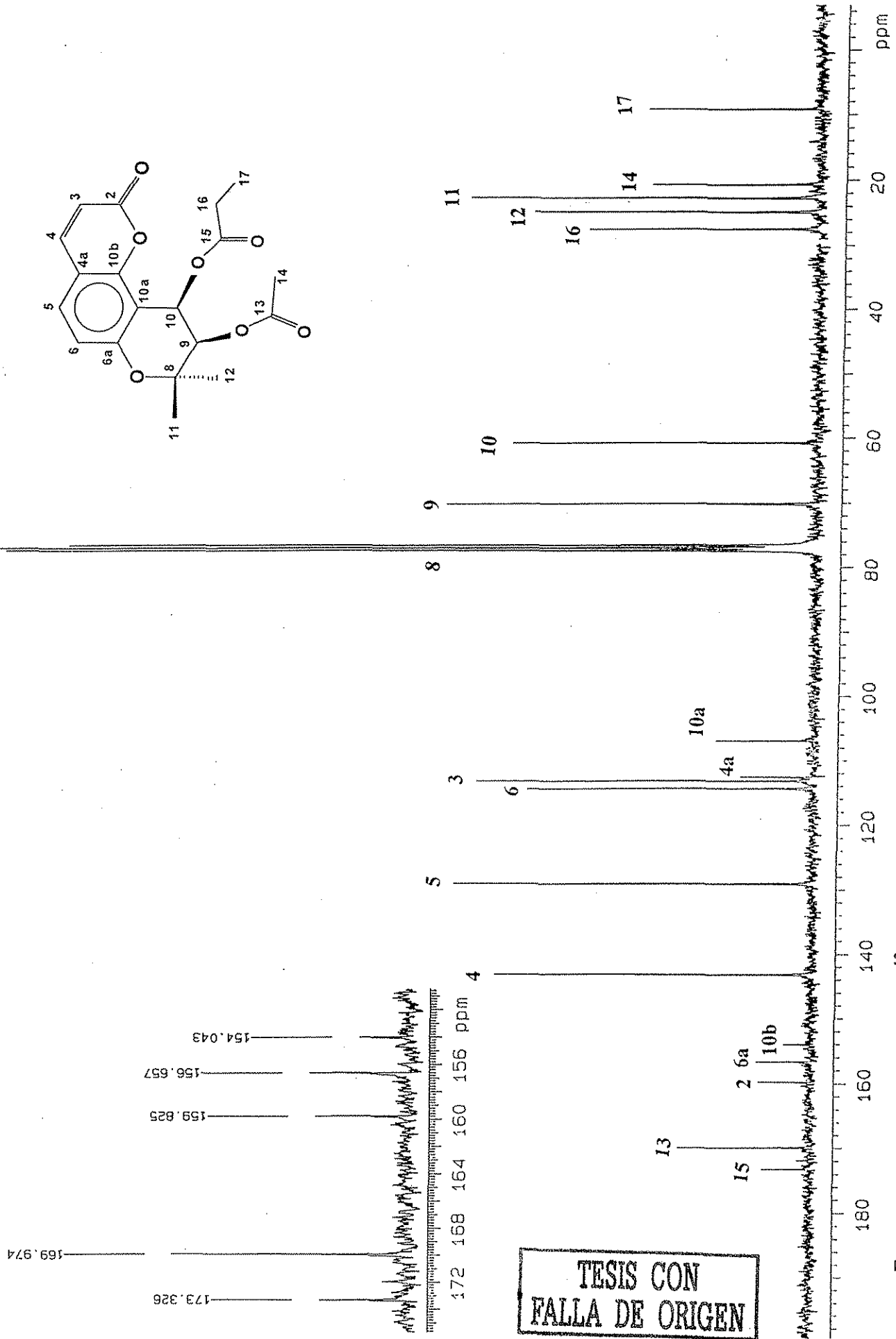
- Stenlid, G. (1970). Flavonoids as inhibitors of formation of adenosine triphosphate in plant the mitochondria. *Phytochem.* **9**, 2251-2256.
- Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimili-Michael, M. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. En: Probing photosynthesis: Mechanism, regulation and adaptation. Yunus, M., Pathre, U. Mohanty, P. (Editores). Taylor and Francis. New york, Pp 445-483.
- Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimili-Michael, M. (2001). Screening the vitality and photosynthetic activity of plants by the fluorescence transient. <http://unige.ch/sciences/bilogy/bioen/jiptheory.html>.
- Streibig, J., Dayan, F.E., Rimando, A., Duke, S. O. (1999). Joint action of natural and synthetic photosystem II inhibitors. *Pestic. Sci.* **55**, 927-930.
- Swager, T.; Cardellina II, J. (1985) Coumarins from *Musineon divaricatum*. *Phytochemistry* **24**, 805-813.
- Takahashi E, Kimura T, Nakamura K, Arahira M, Iida M. (1995) Phosphonothrixin, a novel herbicidal antibiotic produced by *Saccharothrix* sp. ST-888. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J Antibiot* (Tokyo) **48**,10 1124-1129.
- Tanaka, T.; Abbas, H.; Duke, S (1993). *Phytochemistry* **33**, 779-785.
- Tachibana, K., Watanabe, T., Sekizawa, Y., Takematsu, T., (1986). *J. Pestic. Sci.* **11**, 27.
- Thomas, T. (1995), Calcium and calmodulin inhibitor effects on the growth of carrot and radish in nutrient culture. *Plant Growth Regul.* **16**, 299-303.
- Tissut, M., Chevallier, D., Douce, R. (1980). Effet de différents polyphenols sur les mitochondries et les chloroplastes isolés. *Phytochem.* **19**, 495-500.
- Ueno, T.; Miyagawa, H.; Yamaguchi, H.; Okada, M.; Irie, H. (1997). A new applications for phytochemical pest control agents. En *Phytochemicals For Pest Control*. P. Hedin, *et al.*, . (eds). ACS *Symposium Series* 658: Washington, D. C.
- Van Klink, Brophy, J., Perry, N., Weavers, R. (1999). β -triketones from Myrtaceae: Isoleptospermone from *Leptospermum scoparium* and Paupone from *Corymbia dallachiana*. *J. Nat. Prod.* **62**, 487-489.
- Van Puyvelde, L., Bosselaers, J., Stevens, C., De Kimpe, N., Van Gestel, J., Van Damme, P. (1999). Phytotoxins from the leaves of *Laggera decurrens*. *J. Agric. Food. Chem.* **47**, 2116-2119.
- Vyvyan, J. (2002). Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* **58**, 1631-1646.

- Wang, E., Ross, P-F, Wilson, T.M. Riley, R.T., Merrill, A.H. Jr. (1992). Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Nutr.* **122**, 1706-1716.
- Weinmann, I. (1997). History of development and applications of coumarin-related compounds. En: Coumarins. Biology, Applications and mode of action. O'Kennedy, R. Thores, D. (eds.) Wiley & Sons. England. Pp 1-22.
- Whilton, D.S., Sadowski, J.A., Suttie, J.W. (1978). Mechanism of coumarin action: significance of vitamin K epoxide reductase inhibition. *Biochem*, **17**, 1371-1377.
- Yamada, O. S., Ishida, F., Futatsuya, K., Ito, H., Yamamoto, Muinakata, K. (1974). Plant growth-regulating activities of 4-methoxybenzophenones. *Agric. Biol. Chem.* **38**, 2017-2020.
- Yoo, H.S., Norred, W. P., Wang, E., Merrill, A. Jr., Riley, R. (1992). Fumonisin inhibition of the novo sphingolipid biosynthesis and cytotoxicity are correlated in LLC-PK1 cells. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **114**, 9-15.
- Zobel, A.M. Brown, A. (1995) Coumarins in the interactions between the plant and its environment. *Allelopathy J.* **2** (1), 9-20.



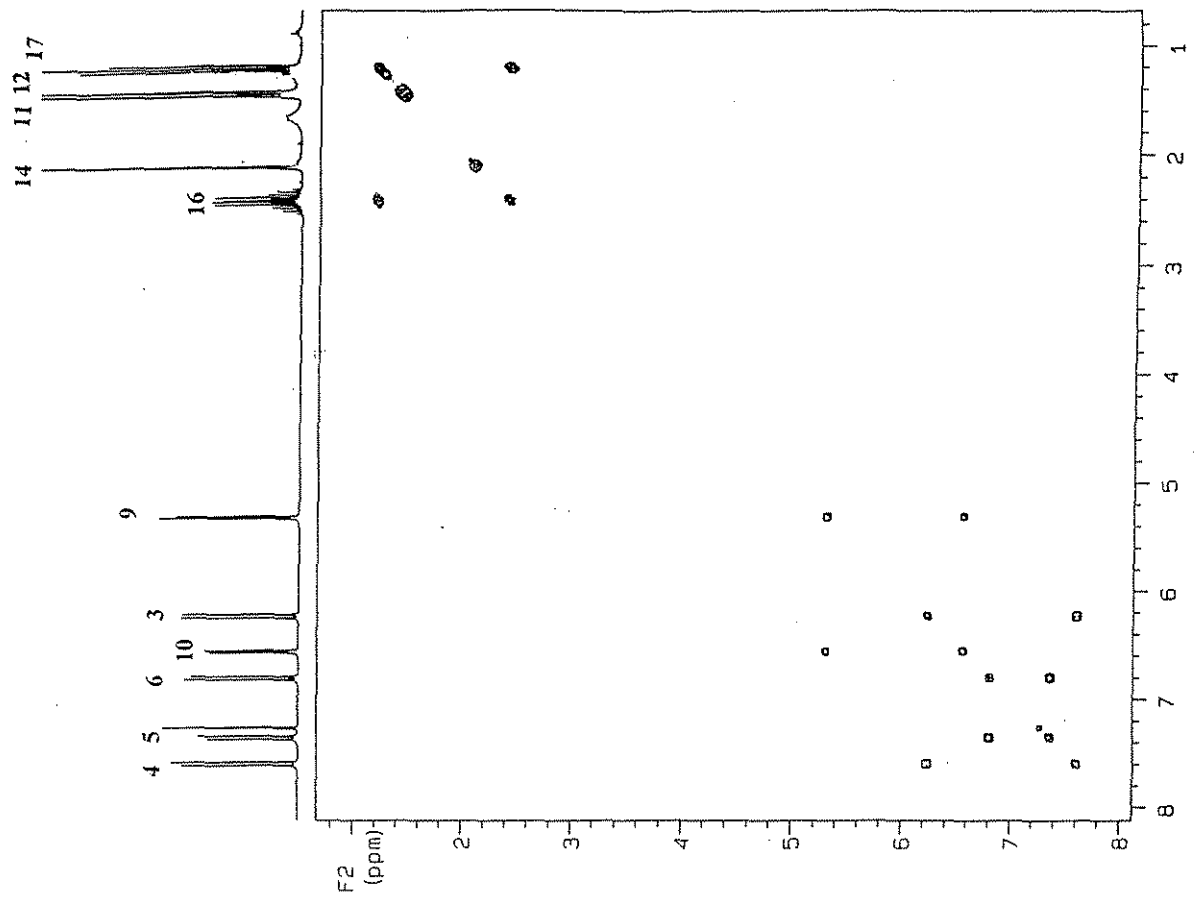
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 1. Espectro de RMN ¹H del compuesto (9R,10R)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (85).



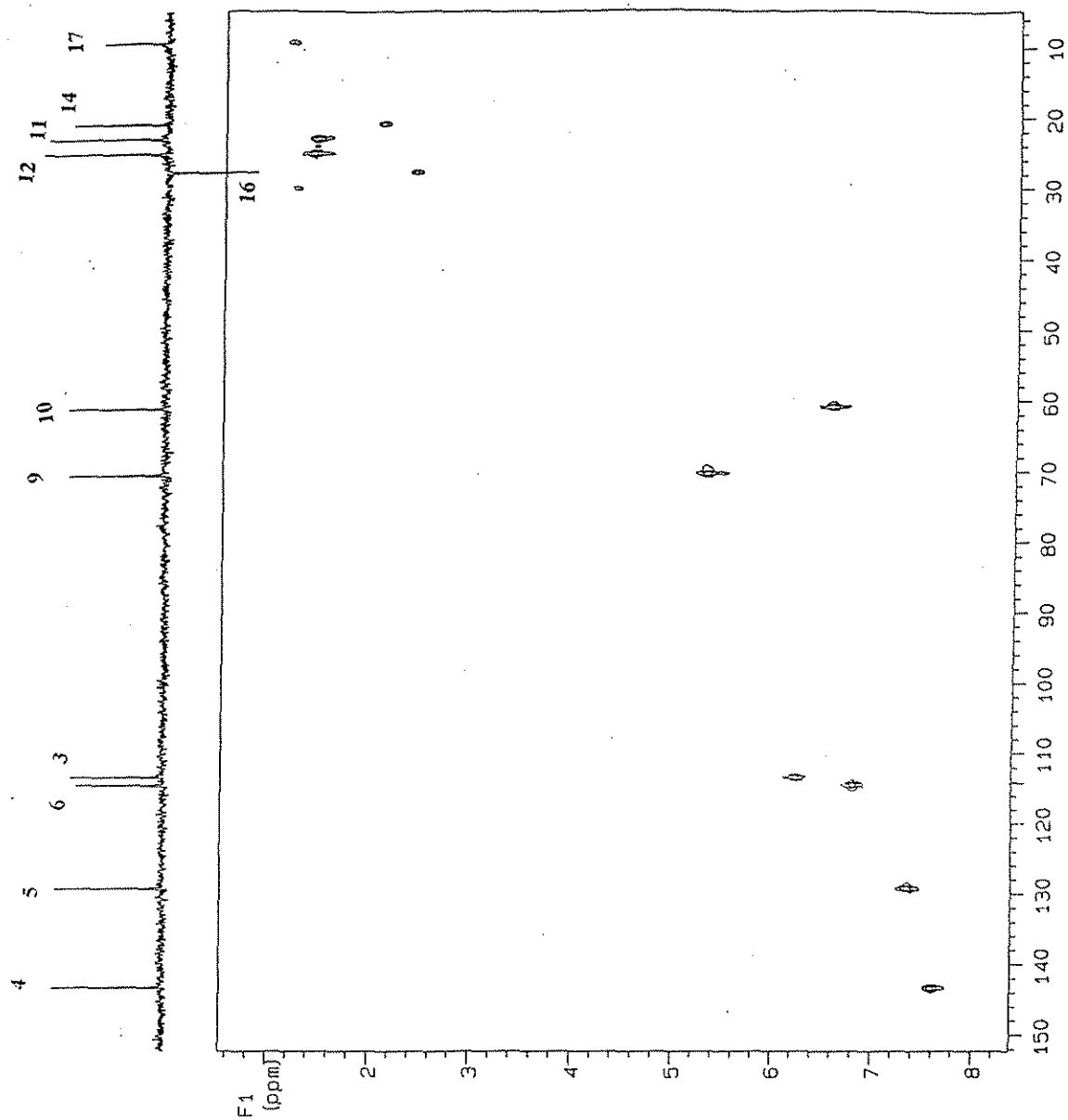
Espectro 2. Espectro de RMN ¹³C del compuesto (9*R*,10*R*)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (85).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



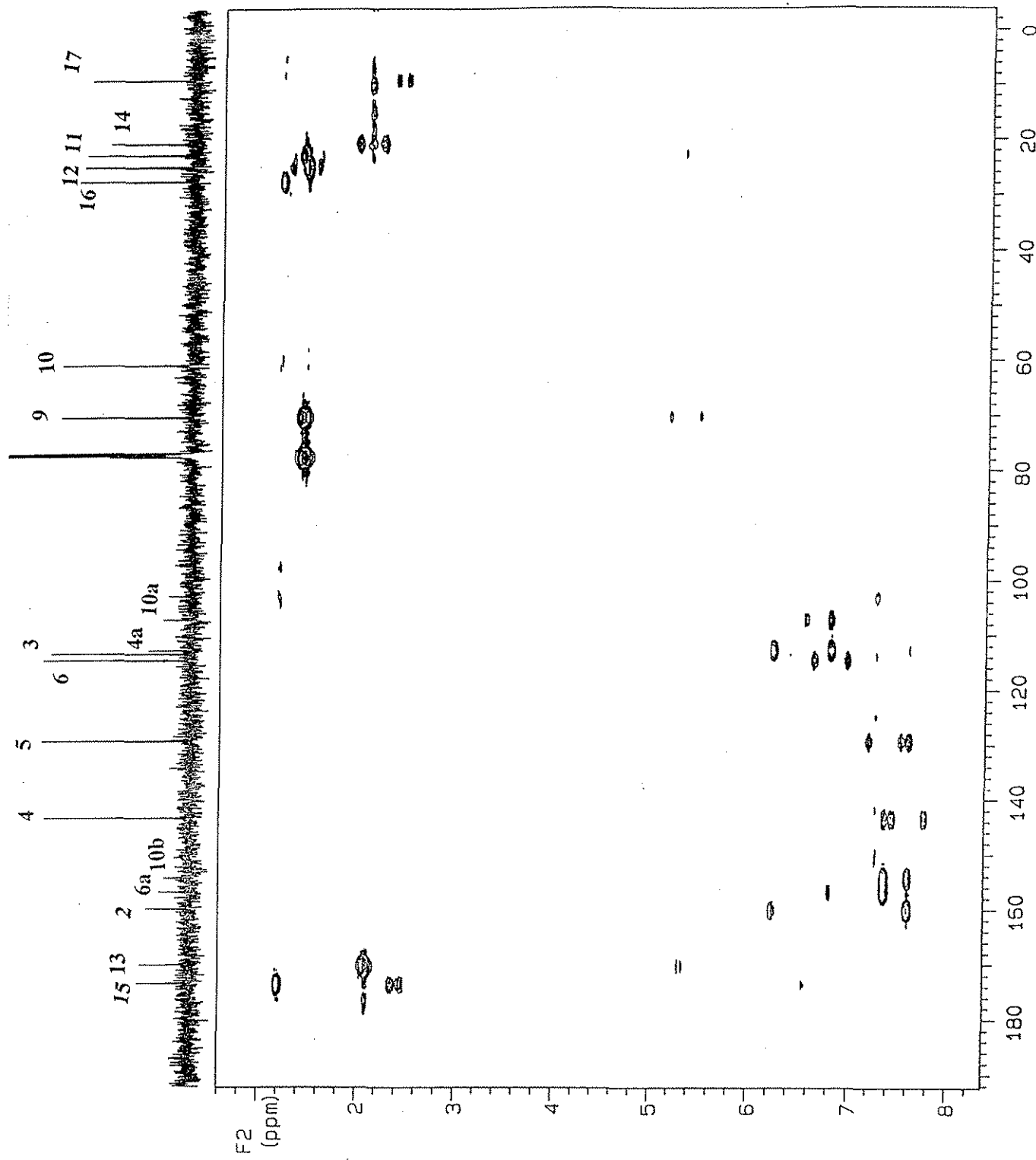
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 3. Espectro COSY del compuesto (9*R*,10*R*)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (85).

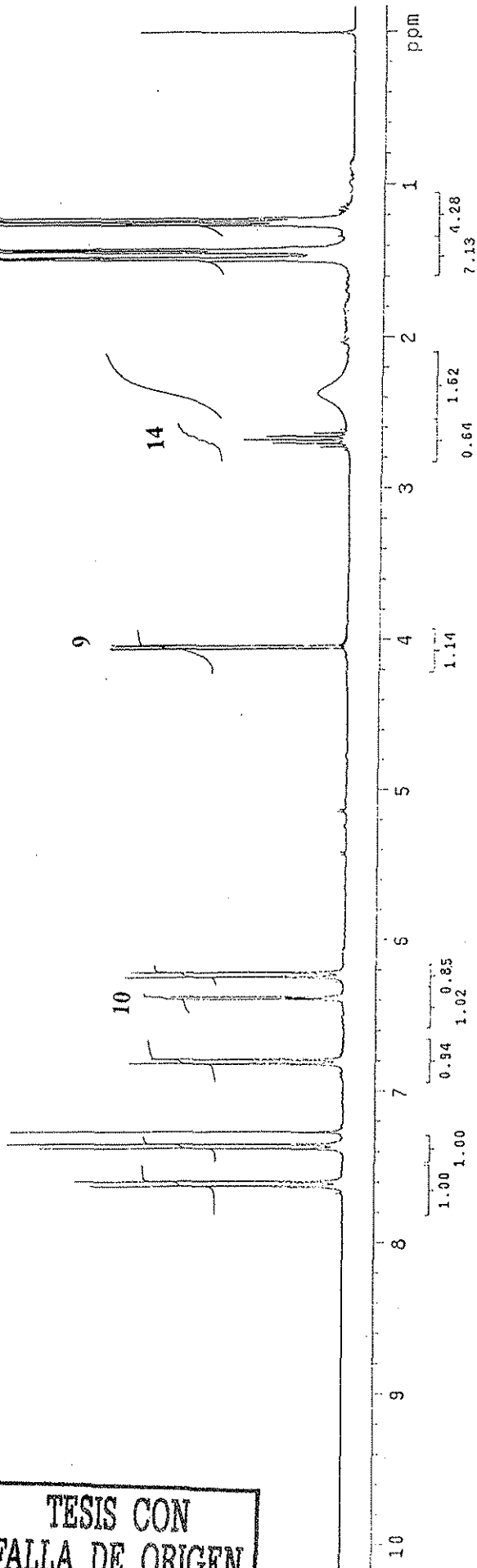
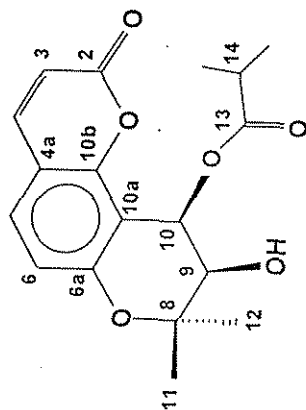


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 4. Espectro de HMQC del compuesto (9*R*,10*R*)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (85).

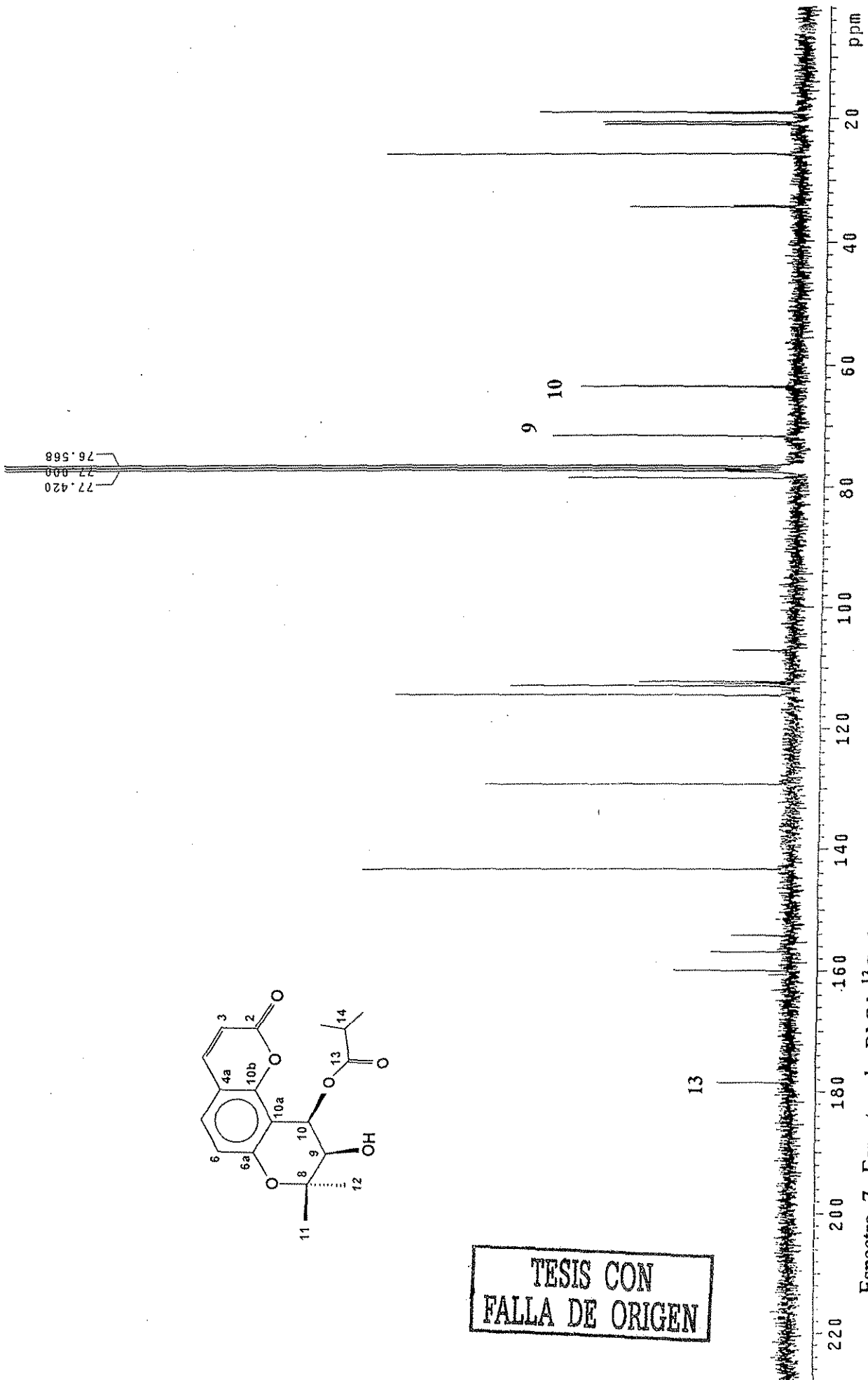
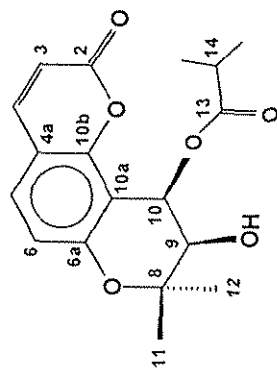


Espectro 5. Espectro HMBC del compuesto (9*R*,10*R*)-9-acetiloxi-10-propioniloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (85).



Espectro 6. Espectro de RMN ^1H del compuesto (9*R*,10*R*)-9-hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (93).

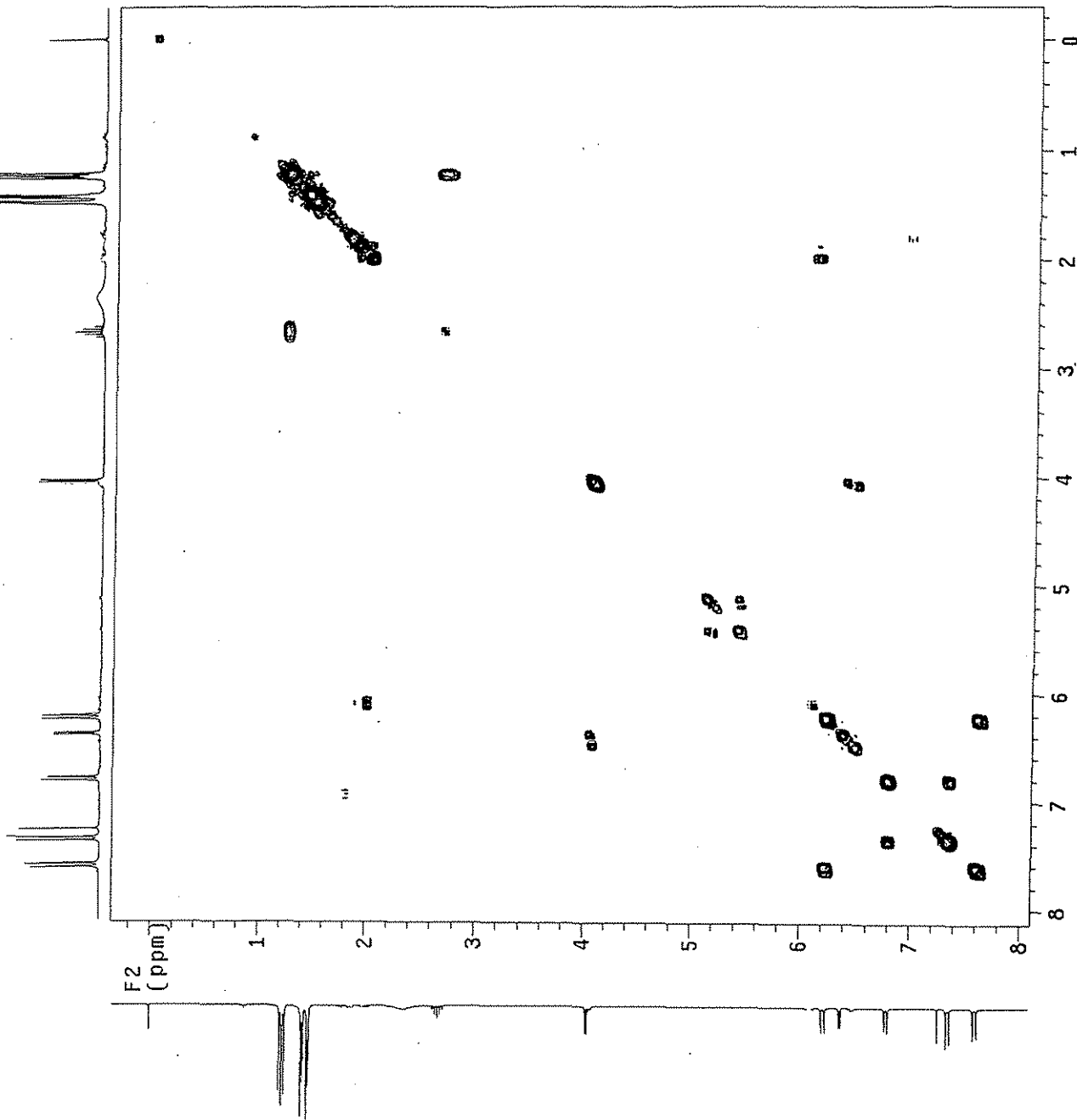
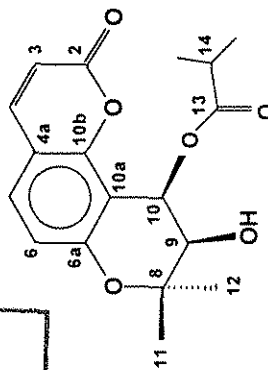
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



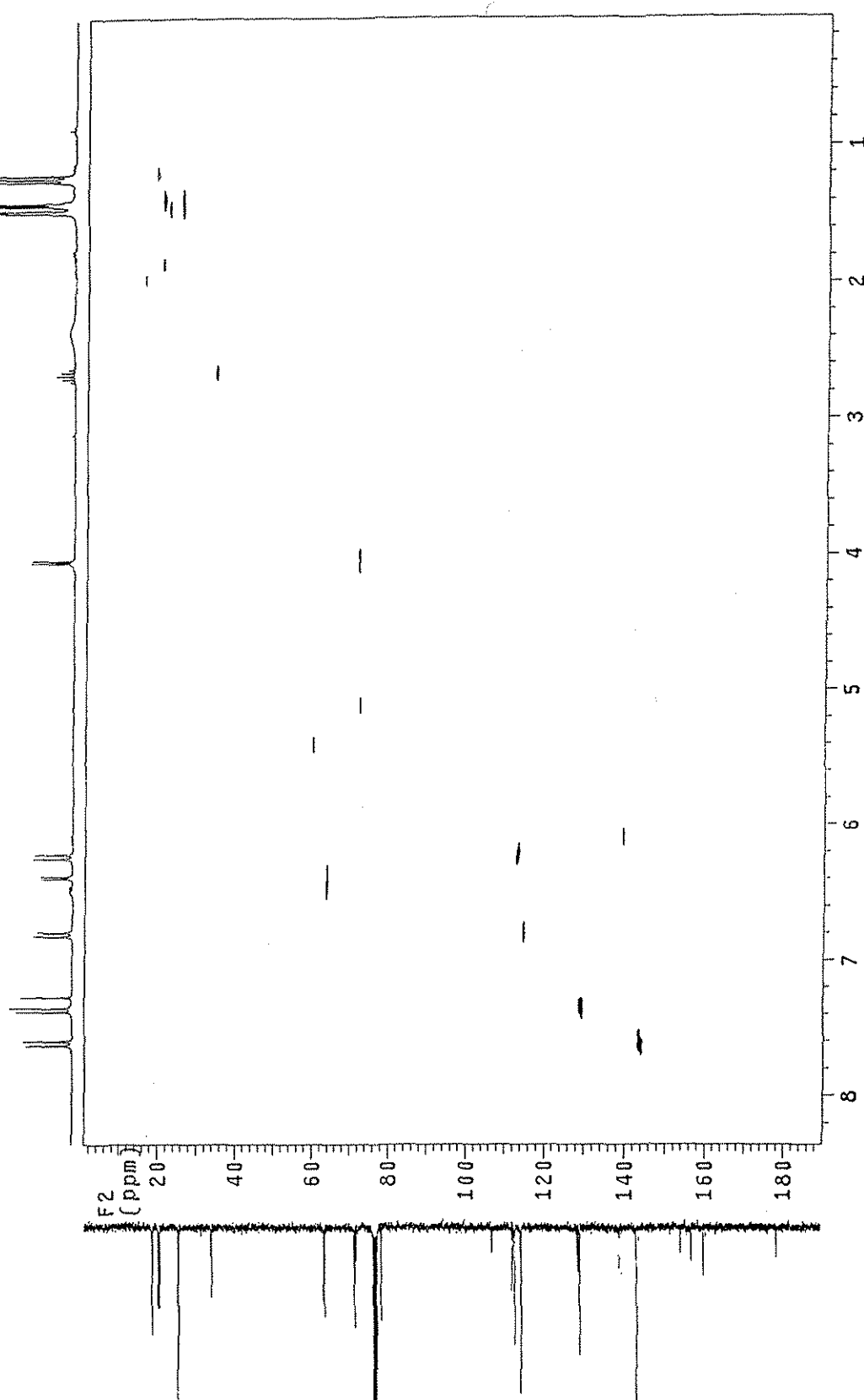
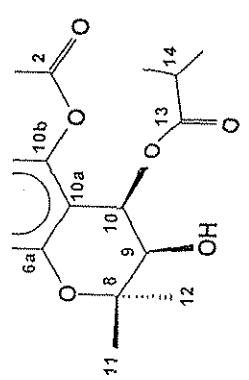
Espectro 7. Espectro de RMN ¹³C del compuesto (9*R*,10*R*)-9-hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (93).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

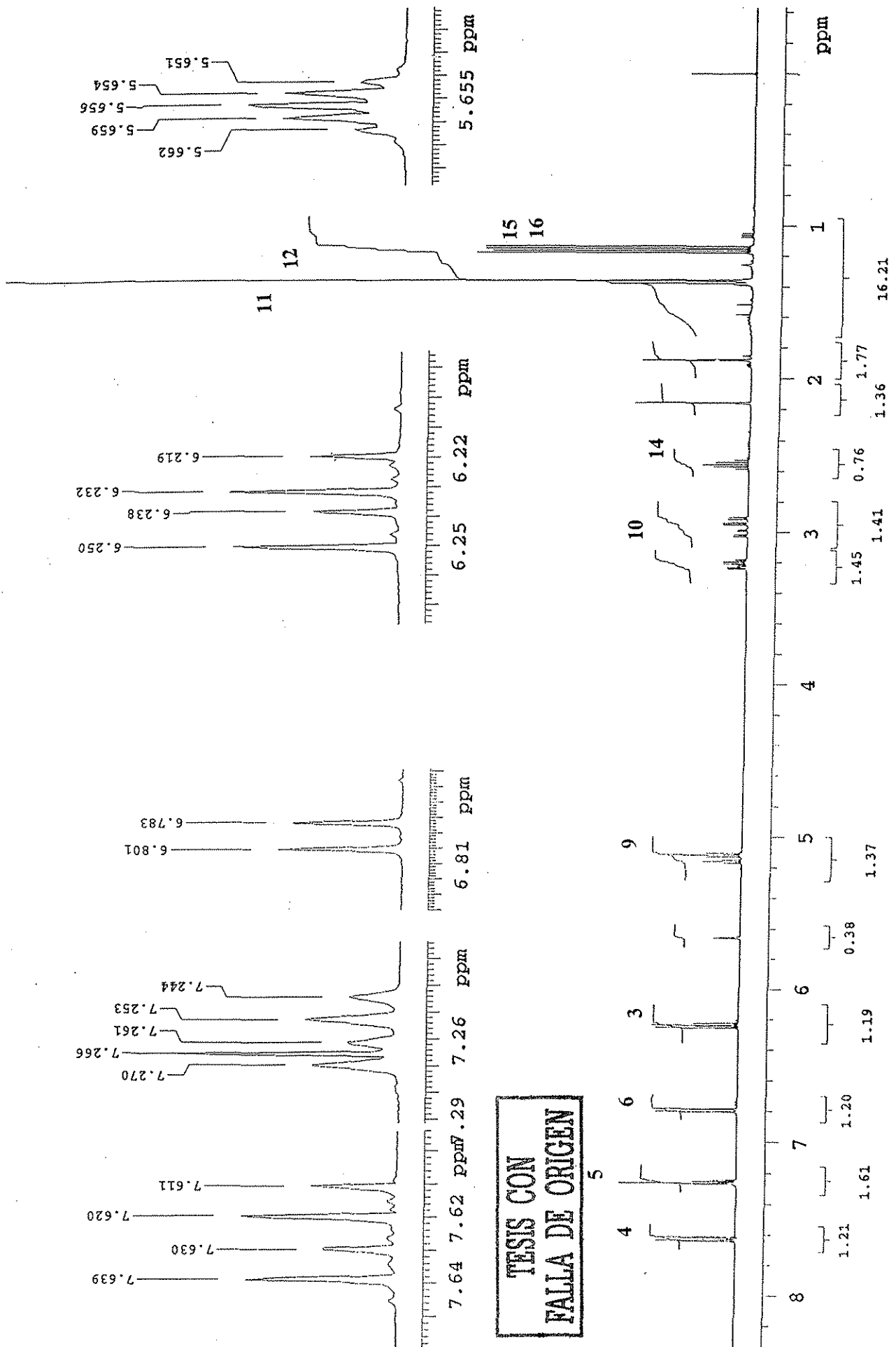


Espectro 8. Espectro COSY del compuesto (9*R*,10*R*)-9-hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (93).

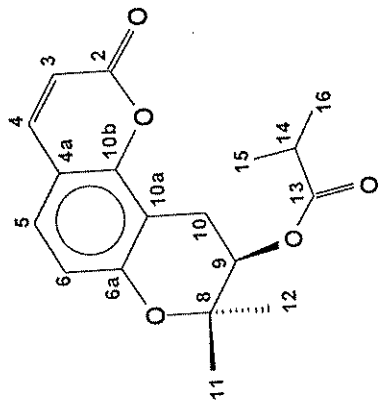


Espectro 9. Espectro de HMQC del compuesto (9*R*,10*R*)-9-hidroxi-10-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-2-ona (93).

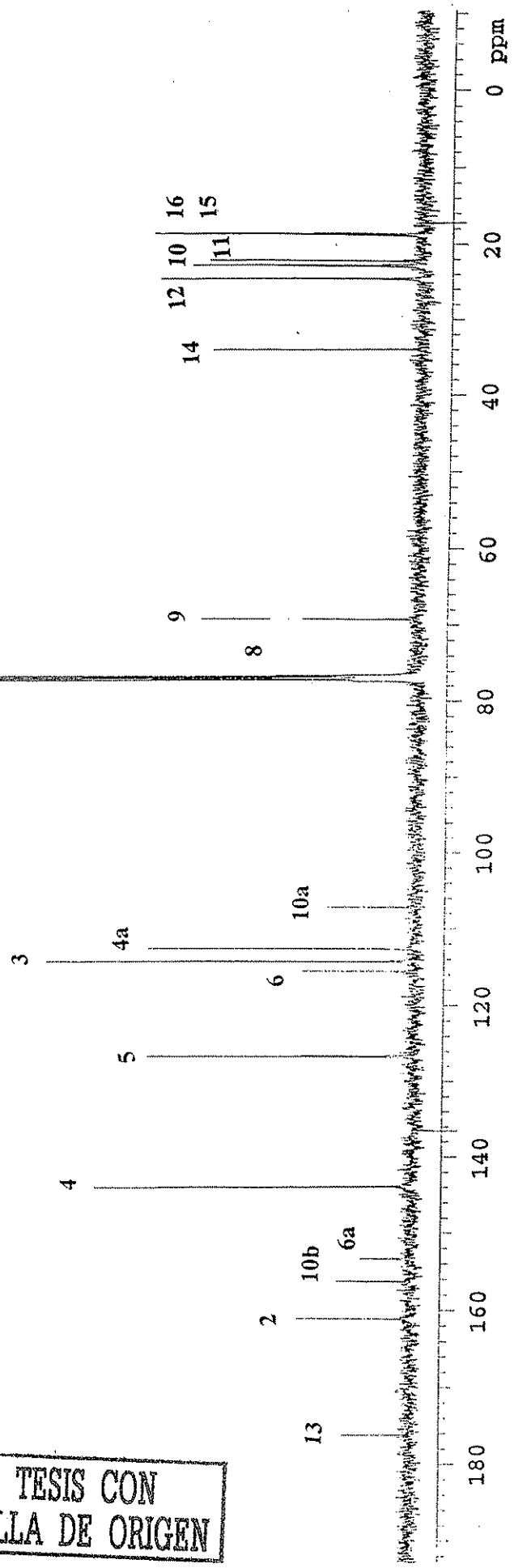
TESIS CON FALLA DE ORIGEN



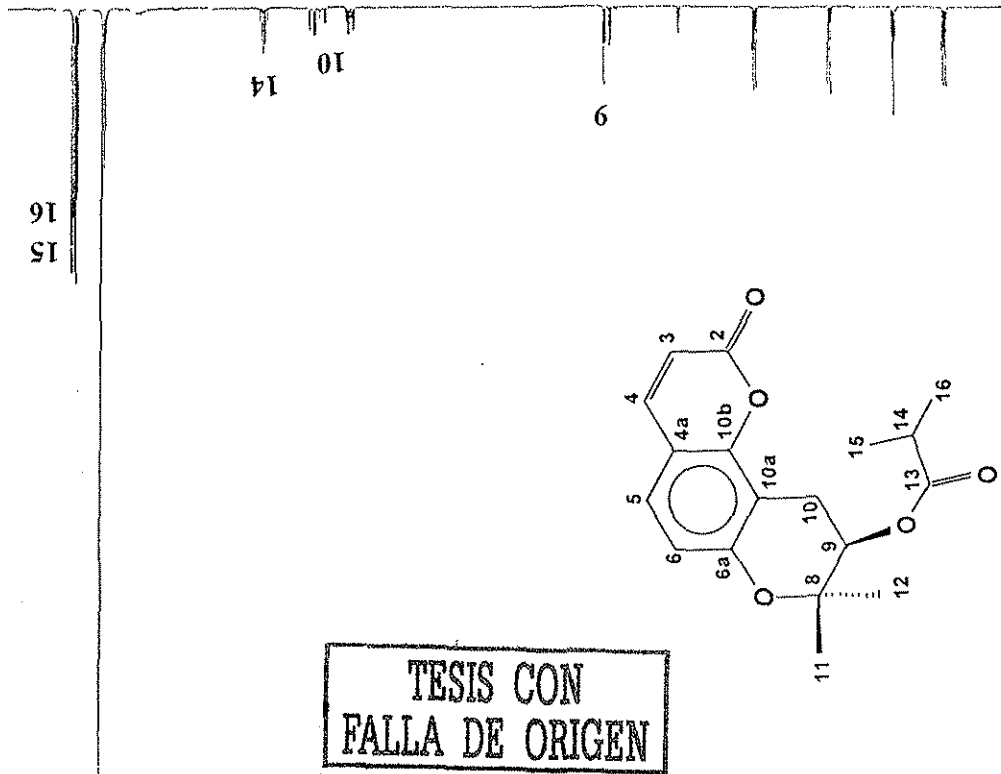
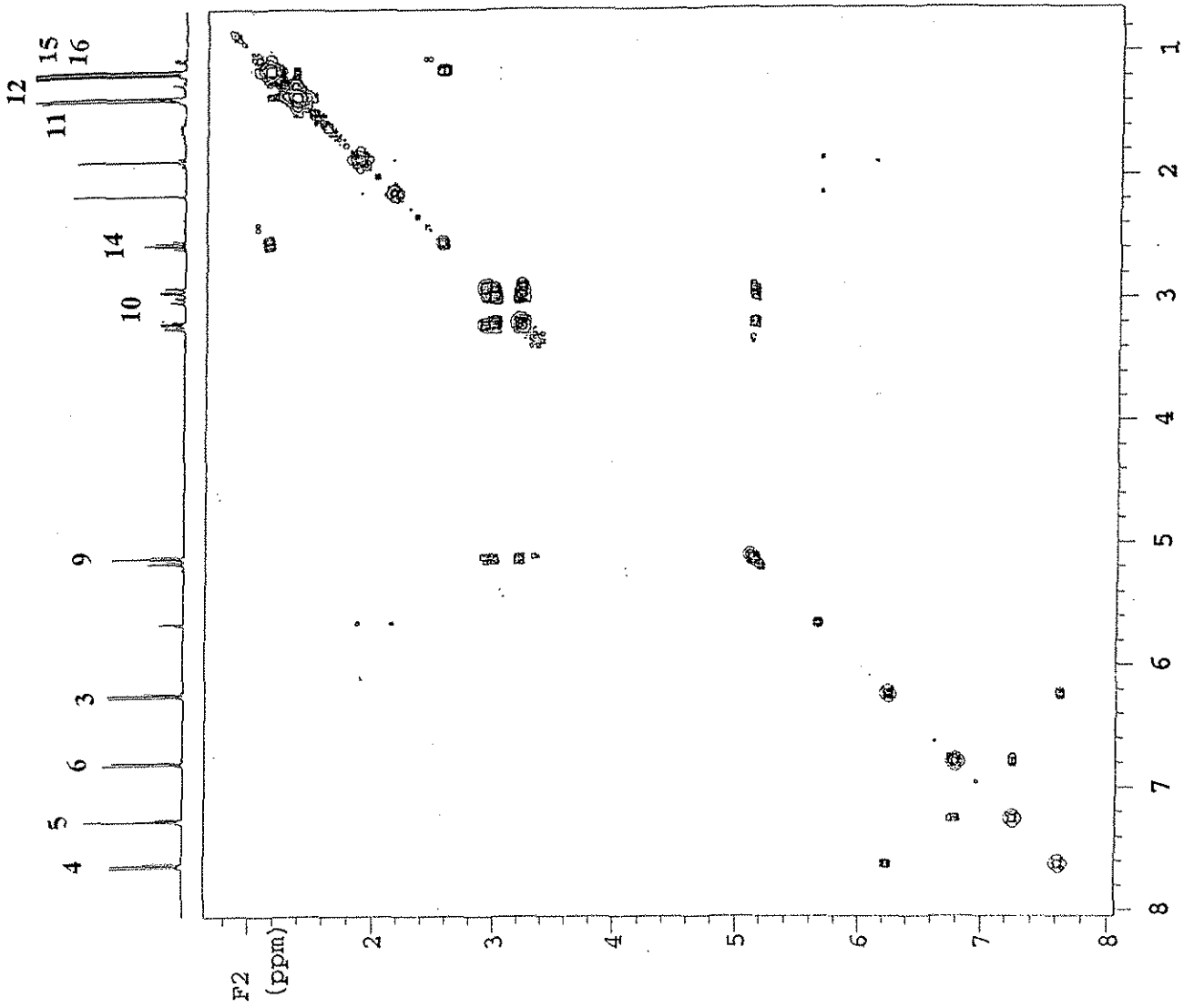
Espectro 10. Espectro de RMN ¹H del compuesto (9R)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (89).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

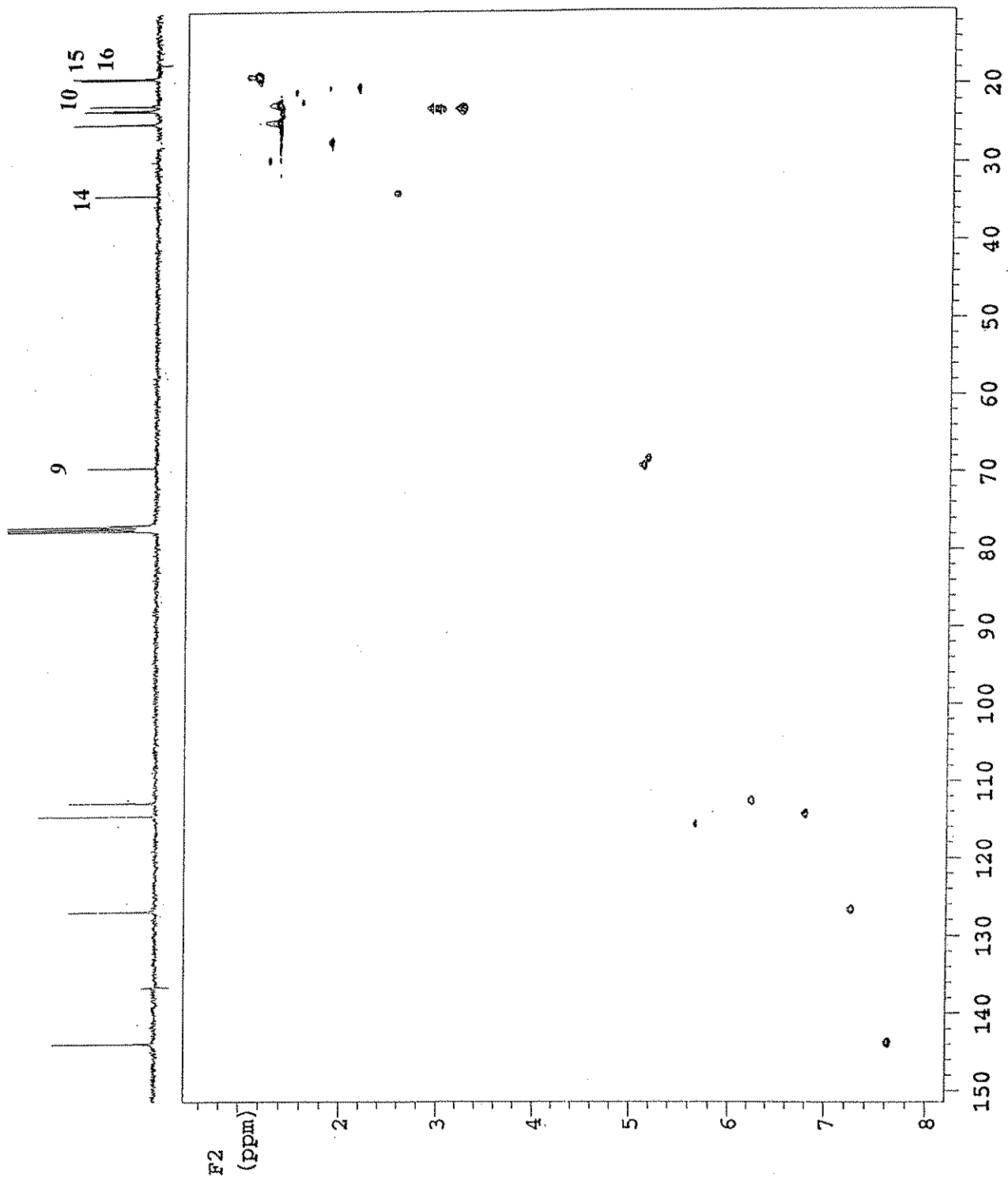


Espectro 11. Espectro de RMN ¹³C del compuesto (9R)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-9,10-dipiran-2-ona (89).



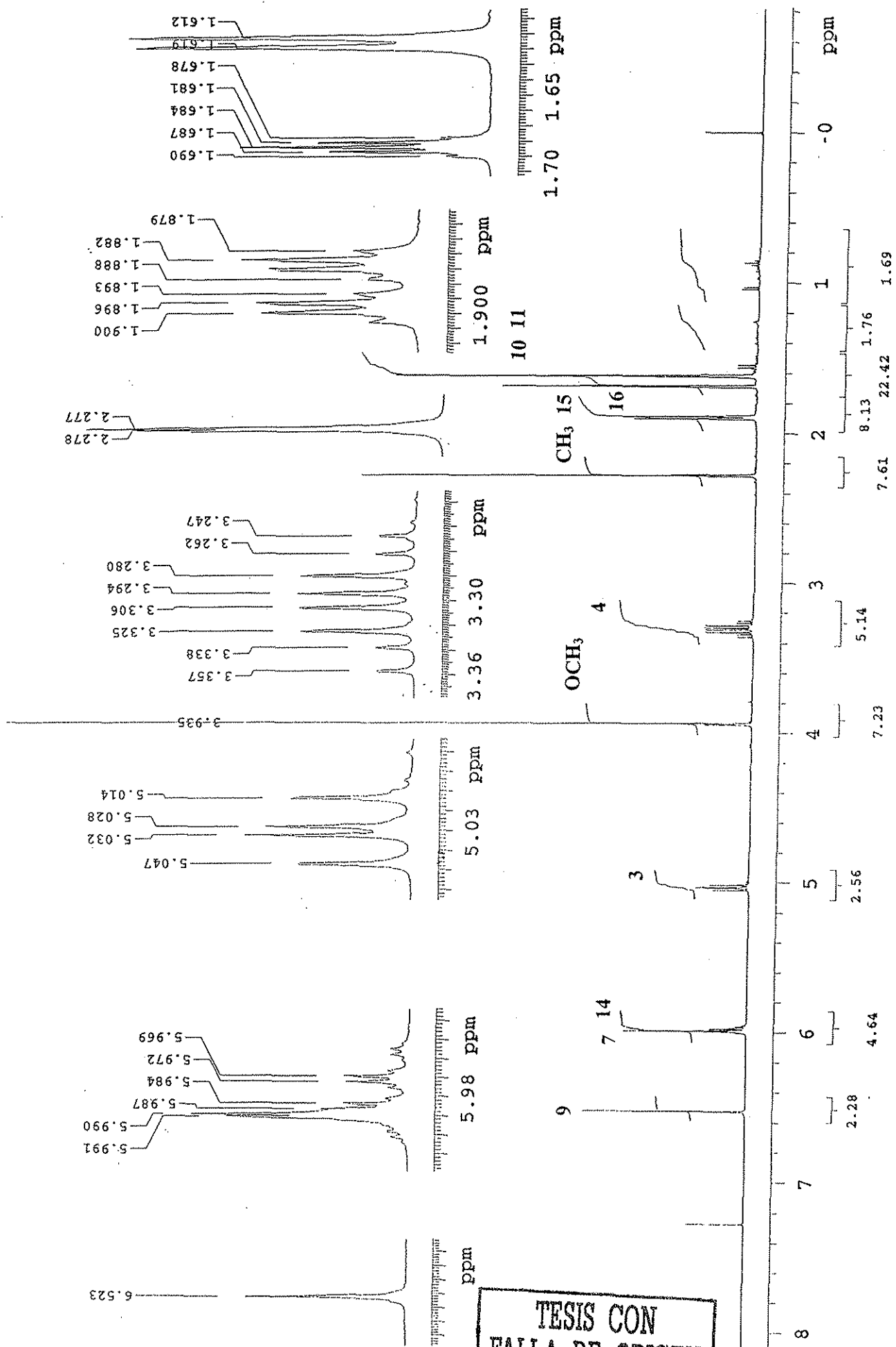
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 12. Espectro COSY del compuesto (9R)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (89).



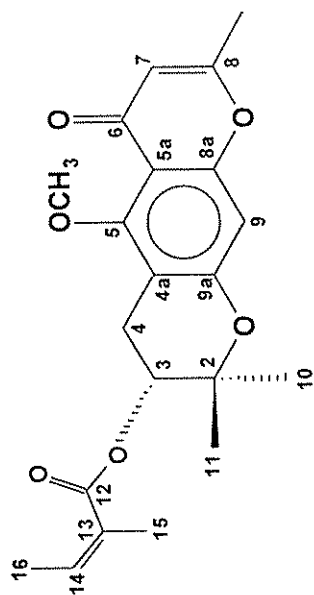
Espectro 13. Espectro de HMQC del compuesto (9R)-9-isobutiroiloxi-8,8-dimetil-9,10-dihidro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-2-ona (89).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

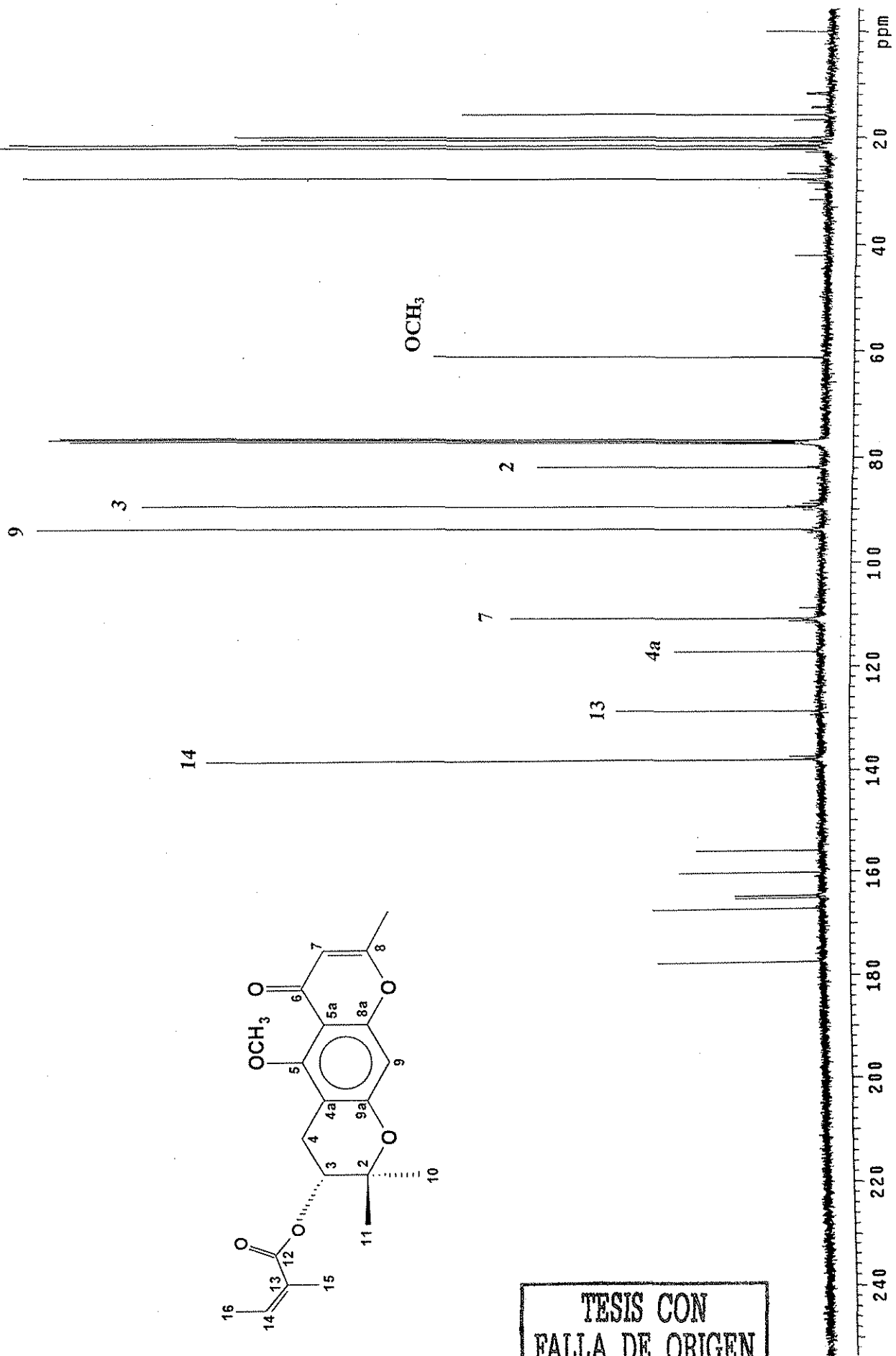


Espectro 14. Espectro de RMN ¹H del compuesto (3R)-2-metil-but-(2Z)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2H,6H-benzo[1,2-b:5,4-b']dipirano (95).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

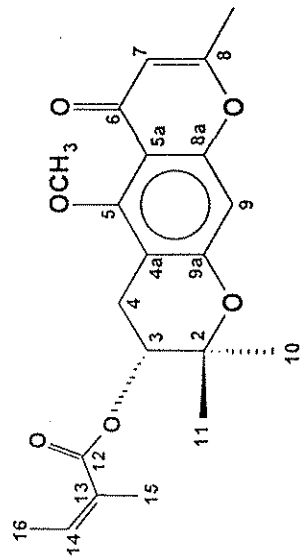
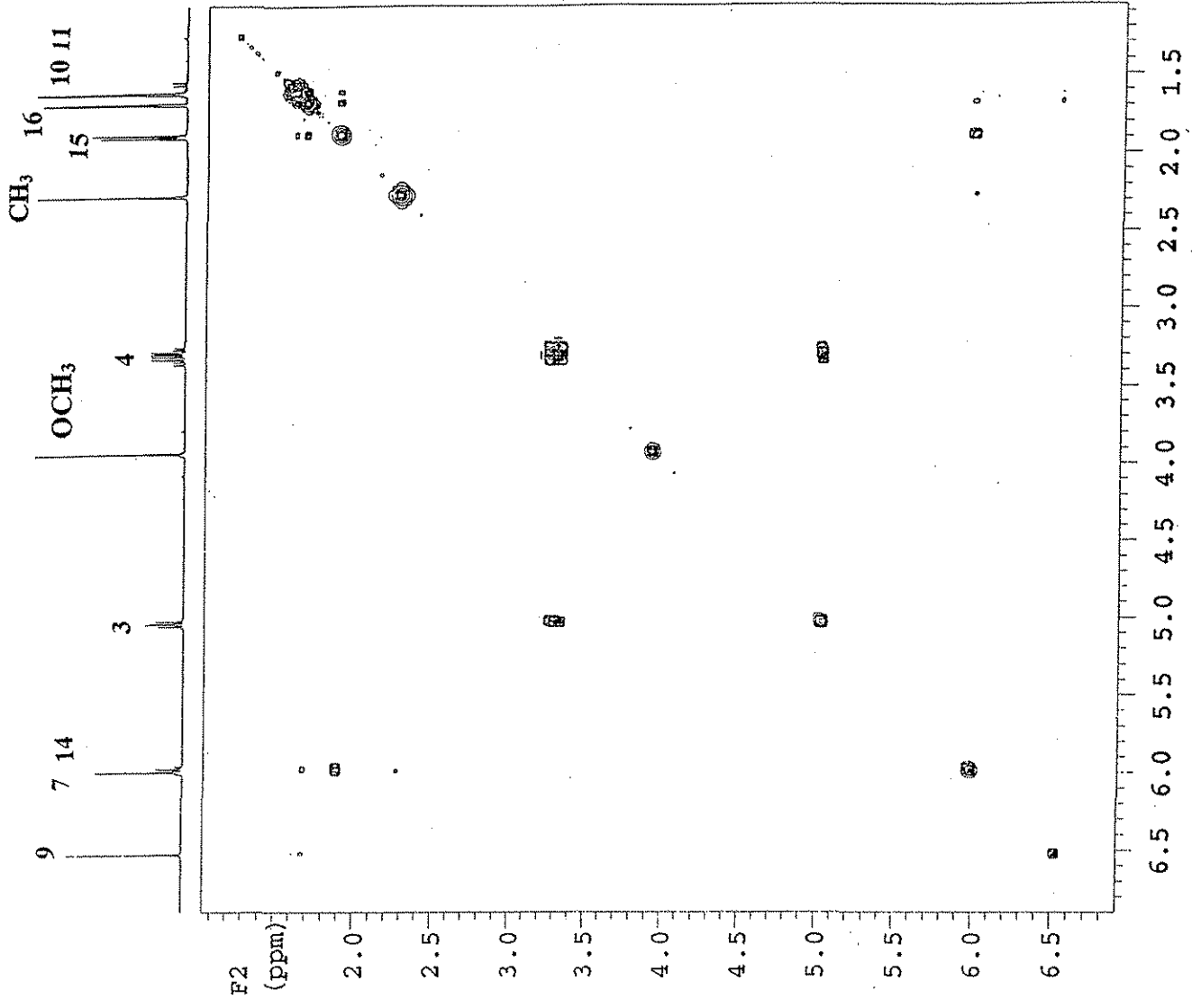


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

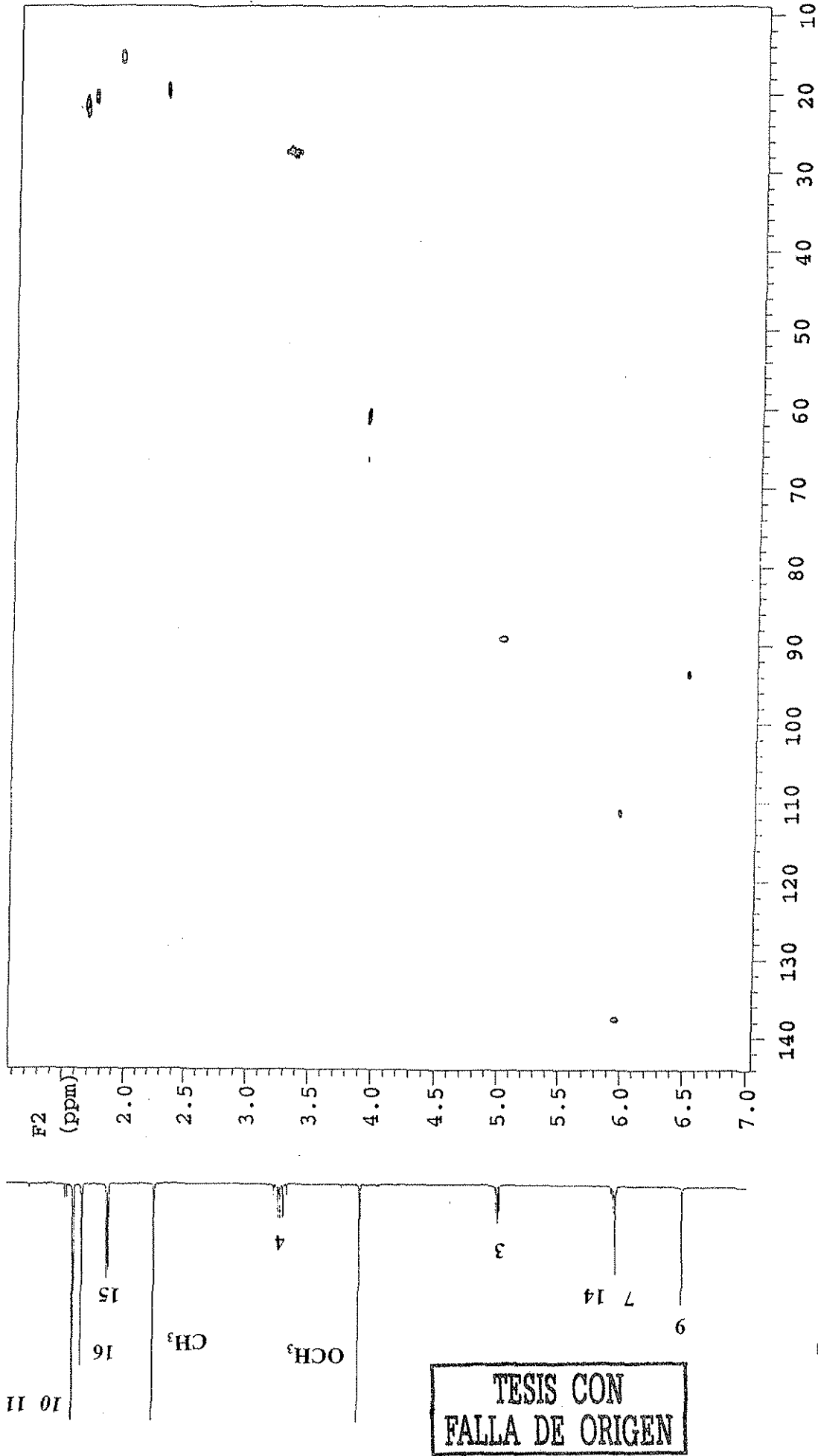


Espectro 15. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto (3*R*)-2-metil-but-(2*Z*)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipirano (95).

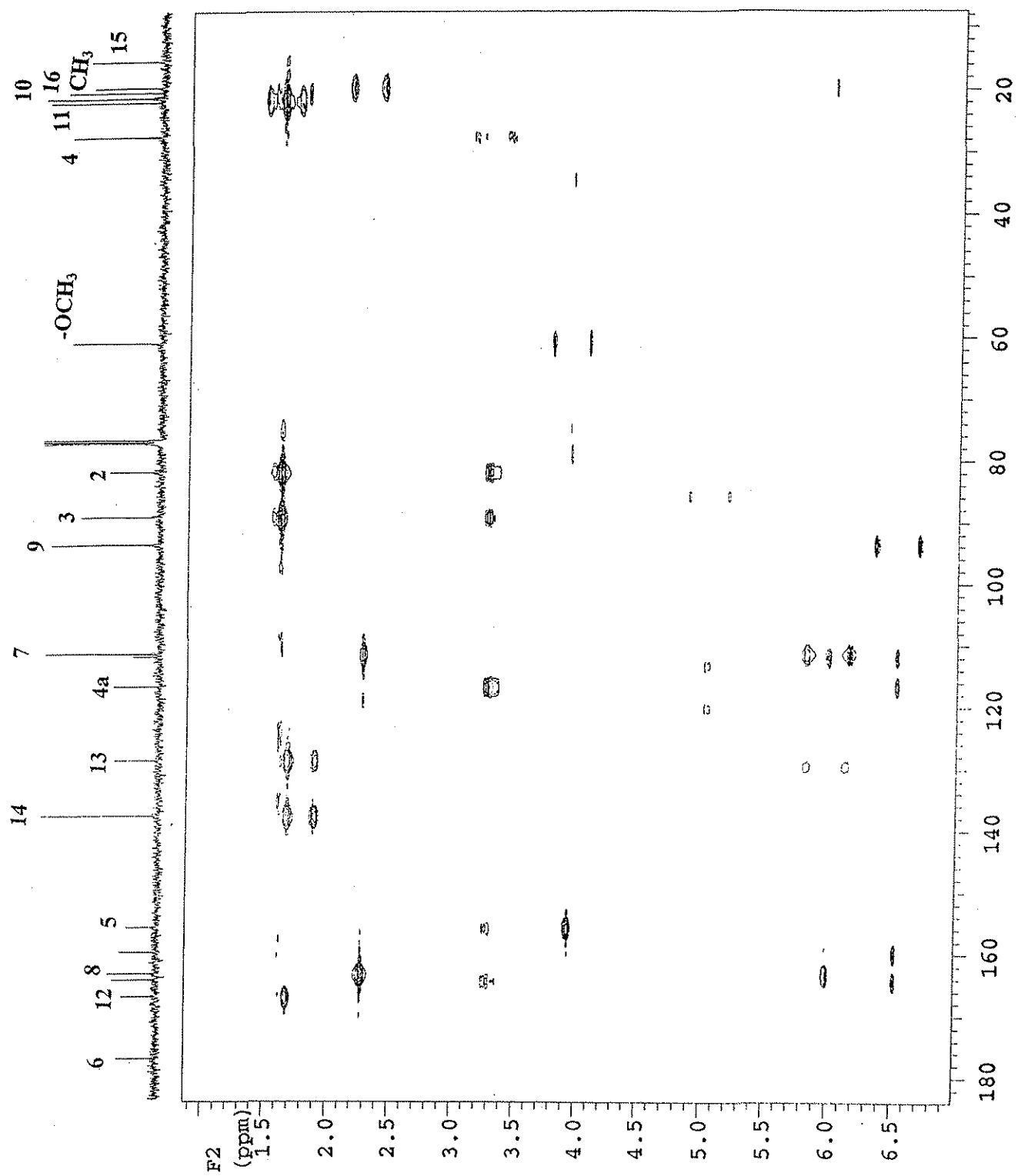
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



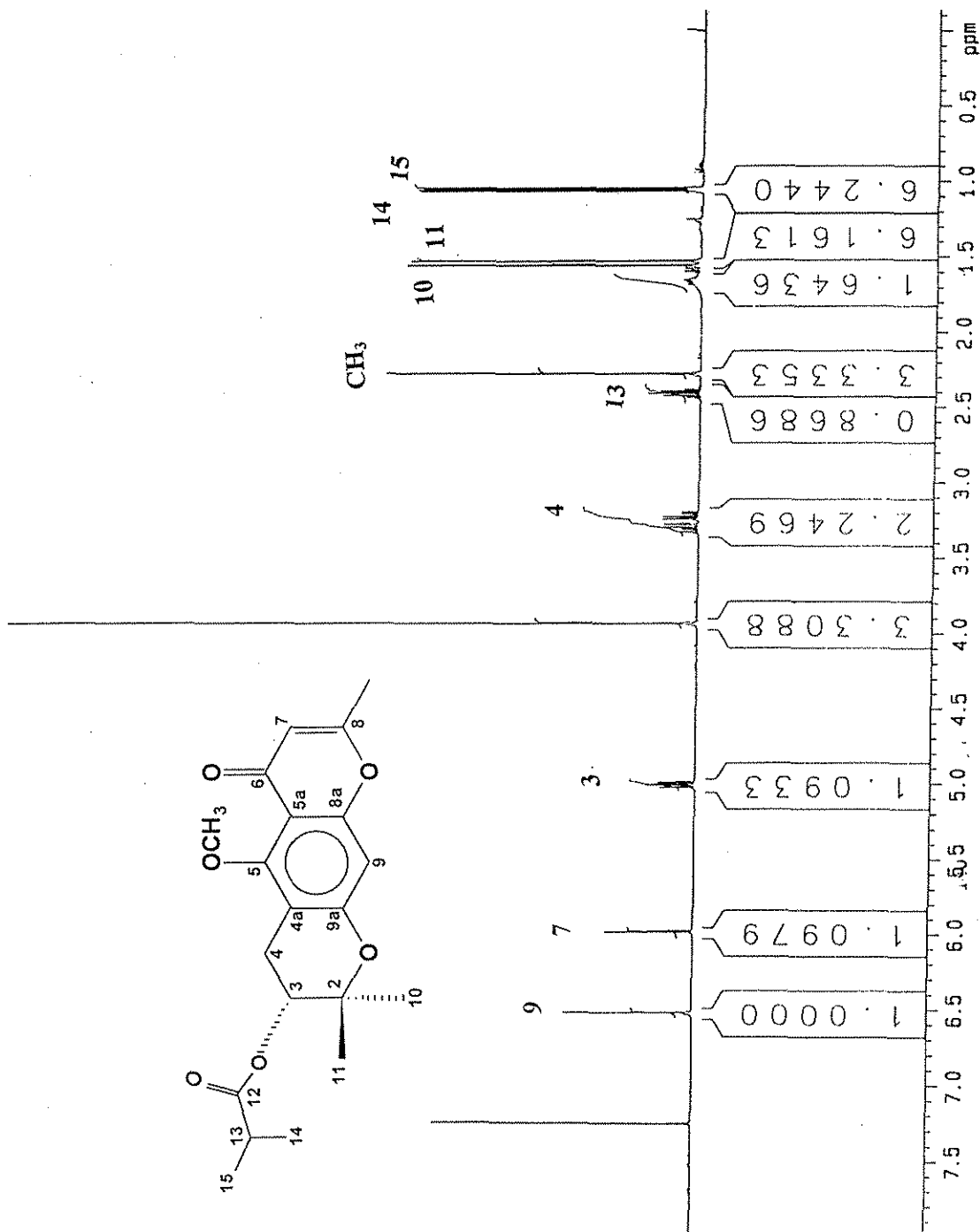
Espectro 16. Espectro COSY del compuesto (3R)-2-metil-but-(2Z)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2H,6H-benzo[1,2-b:5,4-b']dipirano (95).



Espectro 17. Espectro HMQC del compuesto (3*R*)-2-metil-but-(2*Z*)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]piperano (95).

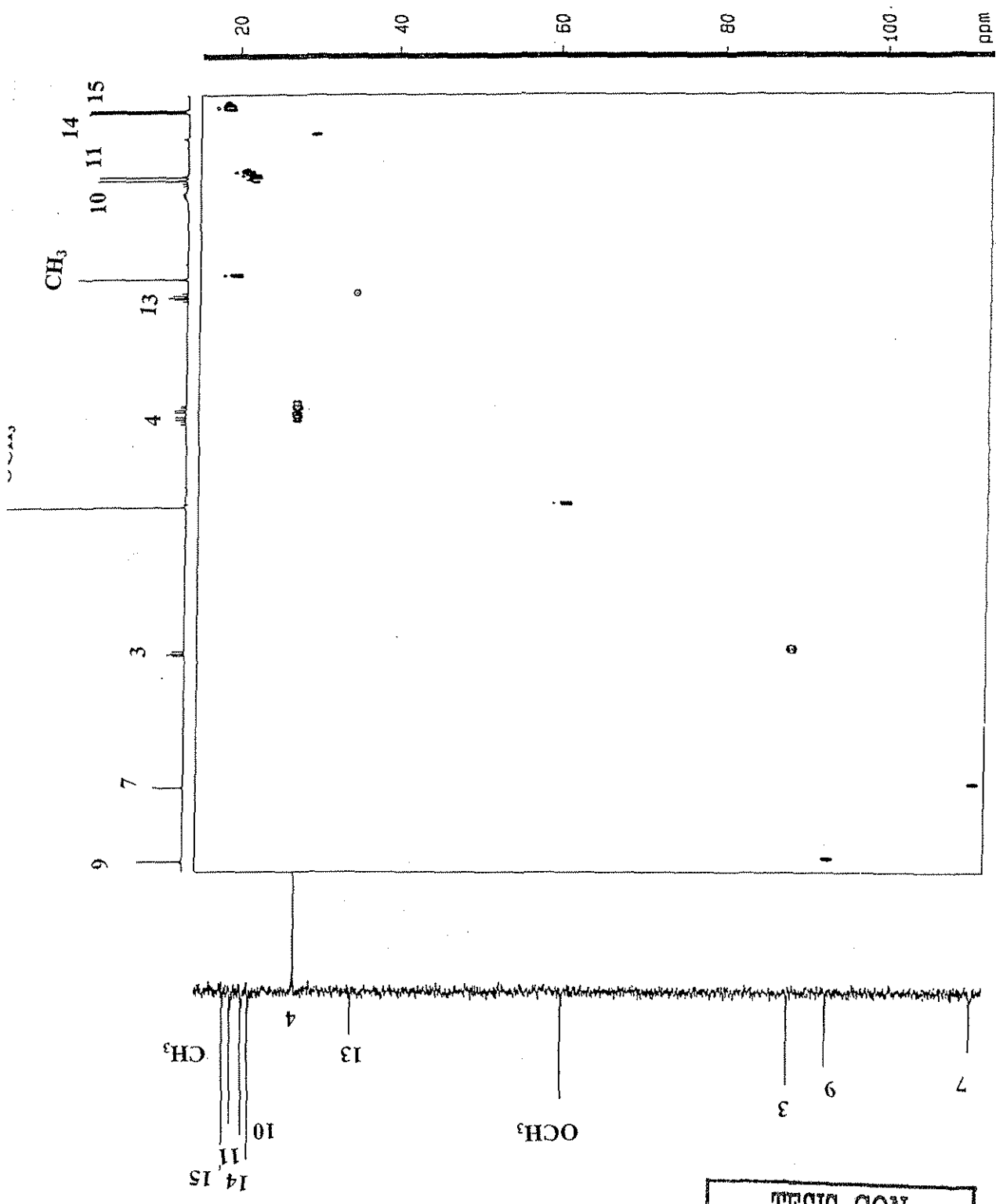


Espectro 18. Espectro HMBC del compuesto (3*R*)-2-metil-but-(2*Z*)-enoiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2H,6H-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipirano (95).



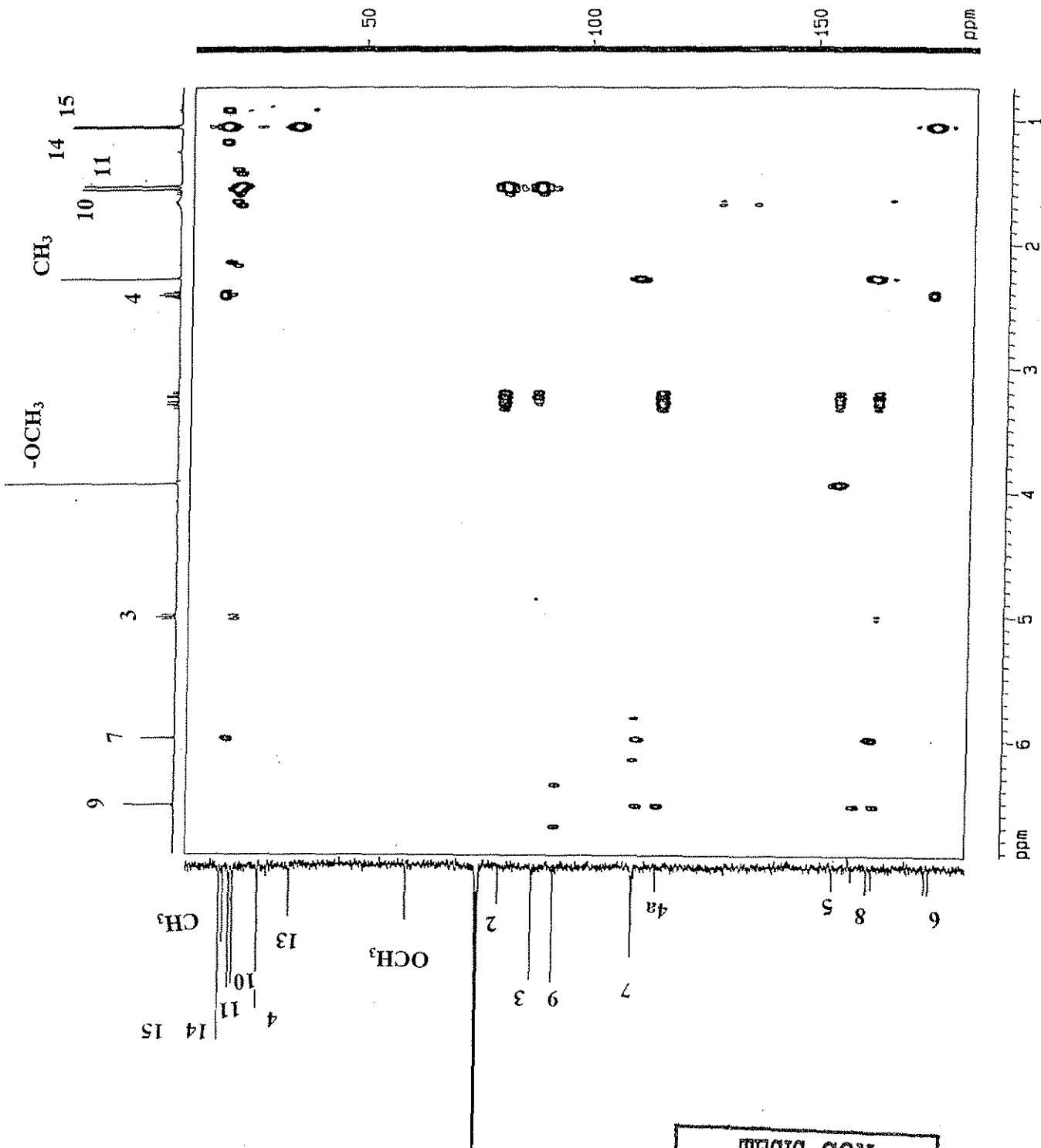
Espectro 19. Espectro de RMN ¹H del compuesto (3R)-isobutiroiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2H,6H-benzo[1,2-b:5,4-b']dipirano (96).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



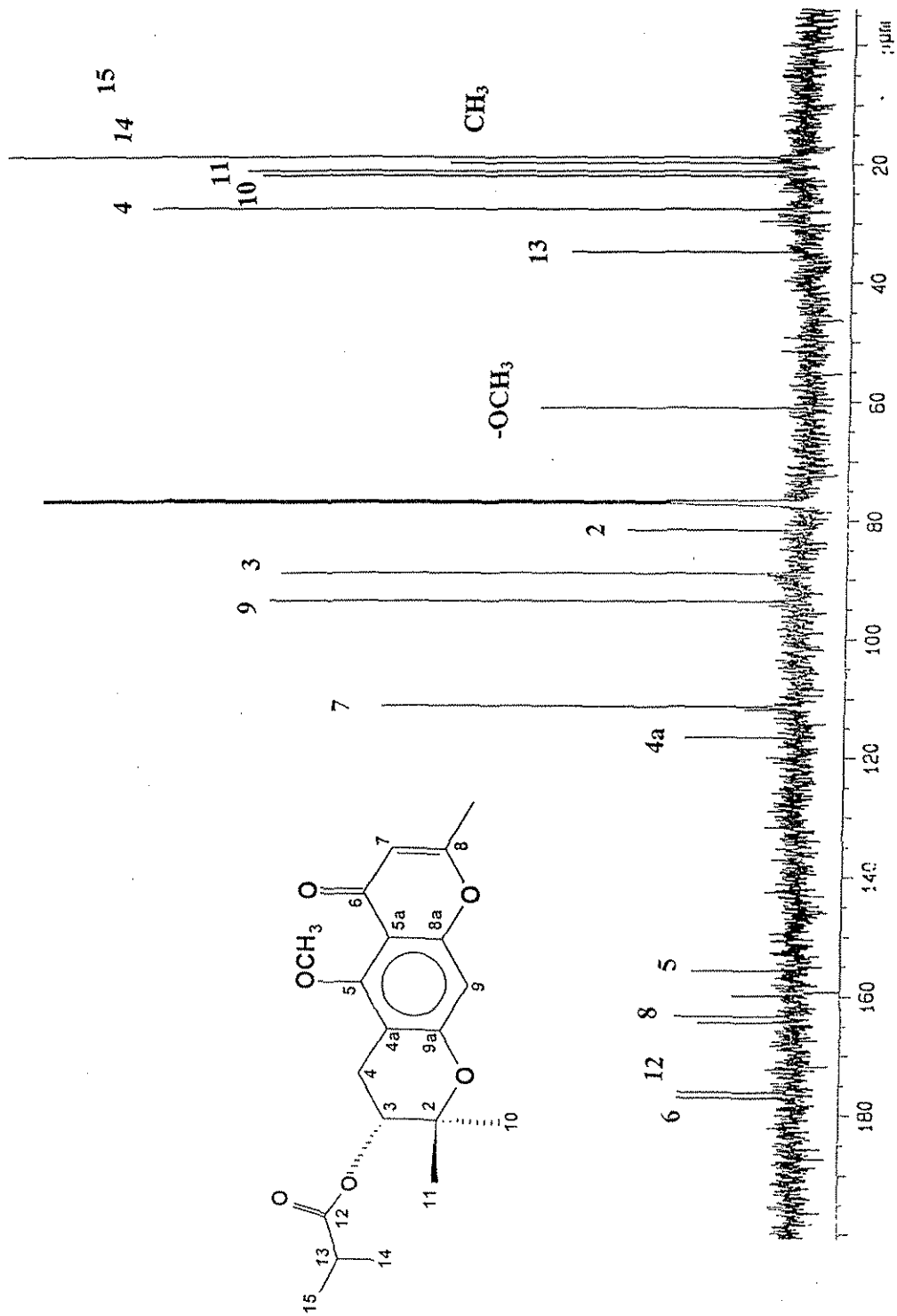
Espectro 21. Espectro COSY del compuesto (3R)-isobutiroiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2H,6H-benzo[1,2-b:5,4-b']dipirano (96).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 22. Espectro HMQC del compuesto (3*R*)-isobutiroiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2H,6H-benzo[1,2-b:5,4-b']dipirano (96).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 20. Espectro de RMN ¹³C del compuesto (3R)-isobutiroiloxi-5-metoxi-3,4-dihidro-2,2,8-trimetil-6-oxo-2H,6H-benzo[1,2-b:5,4-b']dipirano (96).

Phytotoxic Compounds from *Prionosciadium watsoni*¹Norma Valencia-Islas,[†] **Hamed**, Abbas,[‡] Robert Bye,⁴ Rubén Toscano,[§] and Rachel Mata^{*†}

Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, México, Crop Genetics & Production Research Unit, USDA/ARS, Stoneville, Mississippi 38776, Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, México, and Laboratorio de Rayos X, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, México

Received September 23, 2001

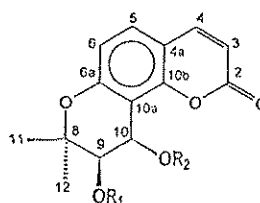
Bioassay-guided fractionation of a phytotoxic extract of *Prionosciadium watsoni* led to the isolation of three new pyranocoumarins and two pyranochromones. The new compounds were characterized as propionic acid (9*R*,10*R*)-9-acetoxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyrans-2-one-10-yl ester (1), isobutyric acid (9*R*,10*R*)-9-hydroxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyrans-2-one-10-yl ester (2), isobutyric acid (9*R*)-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyrans-2-one-9-yl ester (10), 2-methylbut-(2*Z*)-enoic acid (3*R*)-5-methoxy-3,4-dihydro-2,2,8-trimethyl-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipyrans-3-yl ester (11), and isobutyric acid (3*R*)-5-methoxy-3,4-dihydro-2,2,8-trimethyl-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipyrans-3-yl ester (12) by spectroscopic and chemical methods. The stereochemistry at the stereogenic centers was established by applying the Mosher ester methodology. The structures of 1 and 2 were corroborated by single-crystal X-ray diffraction studies. The phytotoxic activity of the isolated compounds was assessed on *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli*, and *Lemna paucicostata*. The phytotoxins also modified the electrophoretic mobility of calmodulin from both bovine-brain and spinach.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

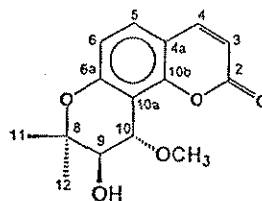
Prionosciadium watsoni Coulter & Rose ex S.Watson (Umbelliferae), commonly known as "flor de ocotillo" and "hierba del oso", is a medicinal plant found in moist habitats of the pine-oak forest from Chihuahua to Hidalgo, Mexico. A tea prepared from the roots of this species is drunk to alleviate gastrointestinal pains, while the fruits are employed to treat diabetes, fever, and other diseases.² During the course of our search for potential herbicidal agents from Mexican plants, *P. watsoni* was selected for activity-guided fractionation on the basis of its significant phytotoxicity against *Amaranthus hypochondriacus* L., *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv., and *Lemna paucicostata* L. (duckweed). We report herein the isolation and structure elucidation of the major phytotoxins from *P. watsoni*.

Results and Discussion

A CH₂Cl₂-MeOH (1:1) extract of the aerial parts of *P. watsoni* provoked notable inhibition of radicle elongation of seedlings of *A. hypochondriacus* and *E. crus-galli* (Table 1) when tested by the Petri dish germination and radicle elongation bioassay.³ In addition, after 72 h in duckweed culture⁴ the extract caused growth inhibition, chlorophyll reduction, and electrolytic leakage (Table 2). Bioassay-guided fractionation of the active extract, using the Petri dish test to monitor phytotoxicity, led to the isolation of phytotoxins 1-12. Compounds 1, 2, 10, 11, and 12 are novel natural products, and their structures were determined by means of spectroscopic, spectrometric, and chemical methods as propionic acid (9*R*,10*R*)-9-acetoxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyrans-2-one-10-yl ester (1), isobutyric acid (9*R*,10*R*)-9-hydroxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyrans-2-one-10-yl ester (2), isobutyric acid (9*R*)-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyrans-2-one-9-yl ester



	R ₁	R ₂	R _i	R _j
1			8	H
2	H		1a	H
4		H	1c	(S)-MTPA
6			1d	(R)-MTPA
7				



1b

(10), 2-methylbut-(2*Z*)-enoic acid (3*R*)-5-methoxy-3,4-dihydro-2,2,8-trimethyl-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipyrans-3-yl ester (11), and isobutyric acid (3*R*)-5-methoxy-3,4-dihydro-2,2,8-trimethyl-6-oxo-2*H*,6*H*-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipyrans-3-yl ester (12). In addition, the known compounds quianhucoumarin A (3),⁵ 2-methylbut-(2*Z*)-enoic acid

* To whom correspondence should be addressed. Tel: (525) 622-5289. Fax: (525) 622-5329. E-mail: rachel@servidor.unam.mx.

[†] Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México.

[‡] Jardín Botánico, Universidad Nacional Autónoma de México.

⁴ Crop Genetics & Production Research Unit, USDA/ARS.

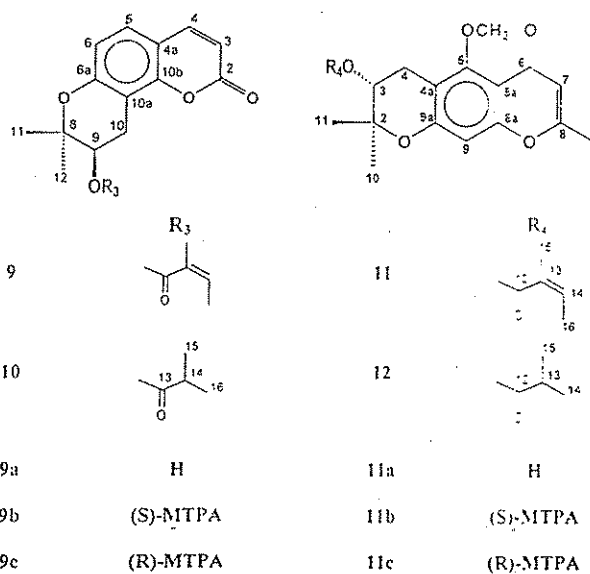
⁵ Laboratorio de Rayos X, Universidad Nacional Autónoma de México.

Table 1. Phytogrowth-Inhibitory Activity of the CH₂Cl₂-MeOH (1:1) Extract, Isolated Compounds, and Chemical Derivatives from *P. watsoni* on Radicle Elongation (IC₅₀, M) of *A. hypochondriacus* and *E. crus-galli*

treatment	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crus-galli</i>
extract ^a	0.68	2.12
1	3.96 × 10 ⁻⁴	4.39 × 10 ⁻⁴
2	1.89 × 10 ⁻⁴	5.95 × 10 ⁻⁴
4	2.62 × 10 ⁻⁵	1.55 × 10 ⁻⁴
6	4.02 × 10 ⁻⁴	1.62 × 10 ⁻⁴
7	ND ^c	ND ^c
8	3.61 × 10 ⁻⁴	4.39 × 10 ⁻⁴
9	2.60 × 10 ⁻⁴	8.63 × 10 ⁻⁴
10	2.37 × 10 ⁻⁴	1.69 × 10 ⁻⁴
11	1.43 × 10 ⁻⁴	2.64 × 10 ⁻⁵
12	7.41 × 10 ⁻⁵	1.48 × 10 ⁻⁵
1a	3.25 × 10 ⁻⁴	6.19 × 10 ⁻⁶
1b	1.08 × 10 ⁻⁴	8.05 × 10 ⁻⁴
9a	3.44 × 10 ⁻⁴	2.96 × 10 ⁻⁴
11a	3.83 × 10 ⁻⁴	4.61 × 10 ⁻⁴
2,4-D ^b	1.80 × 10 ⁻⁴	>2.25 × 10 ⁻⁴

^a Expressed in μg mL⁻¹. ^b Positive control (2,4-dichlorophenoxyacetic acid). ^c Not determined because of the paucity of material.

(9*R*,10*R*)-10-hydroxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2*H*,5*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyran-2-one-9-yl ester (4),⁶ 2-methylbut-(2*E*)-enoic acid (9*R*,10*R*)-10-hydroxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2*H*,5*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyran-2-one-9-yl ester (5),⁷ seravshanin (6),⁷ quianhucoumarin D (7),⁵ (+)-*cis*-khellactone (8),^{8,9} and jatamansin (9)¹⁰ were obtained and identified by comparison of their published spectroscopic data.



Compounds 1 and 2 were isolated as colorless plates and needles, respectively. The molecular formulas were deduced as C₁₉H₂₀O₇ and C₁₈H₂₀O₆ by elemental analysis and ¹³C NMR. Detailed analysis of the NMR (Table 3) spectra indicated that both compounds were *cis*-khellactone esters.^{8,9} Compared to *cis*-khellactone^{8,9} the NMR spectra of 1 showed additional resonances for one acetate and one propionate. Compound 2 differed from *cis*-khellactone in the presence of an isobutyryl moiety. In the case of compound 1 the mass spectral fragmentation pattern suggested the position of the acetyl and propionyl units at C-9 and C-10, respectively, since the highest mass ion observed in the EIMS was at *m/z* 300 and corresponded to the loss of acetic acid from the molecular ion. In this regard, it is well known that khellactone diesters undergo a

Table 2. Phytotoxicity of the Extract and Compounds 9 and 10 in *Lemna paucicostata* Cultures^a

sample	concn	conductivity leakage (μΩ/cm)	growth inhibition (%)	chlorophyll reduction (%)
extract	25 μg mL ⁻¹	-57.00 ± 14.8	3.01 ± 2.9	0.00 ± 12.7
	50 μg mL ⁻¹	91.50 ± 39.9	7.79 ± 3.8	0.00 ± 0.0
	100 μg mL ⁻¹	262.50 ± 12.1	100.00 ± 0.0	36.74 ± 11.7
	200 μg mL ⁻¹	262.50 ± 24.7	100.00 ± 0.0	91.51 ± 6.5
9	12 μM	-77.00 ± 42.4	15.33 ± 11.4	5.94 ± 4.9
	25 μM	-36.50 ± 31.1	37.51 ± 14.2	4.37 ± 4.3
	50 μM	59.50 ± 7.1	47.59 ± 5.7	12.82 ± 10.8
	100 μM	100.00 ± 9.2	100.00 ± 0.0	40.32 ± 3.3
10	25 μM	124.20 ± 21.1	19.59 ± 8.3	20.00 ± 16.8
	50 μM	100.00 ± 1.4	23.52 ± 13.8	54.30 ± 2.1
	100 μM	86.00 ± 2.1	58.81 ± 8.3	84.92 ± 4.0
	200 μM	260.00 ± 13.4	100.00 ± 0.0	87.36 ± 0.0

^a Results are the means of three replicates ± standard deviation. The compounds exhibited significantly (Student's unpaired *t*-test) higher phytotoxicity than the control (culture medium; conductivity leakage, 0.00 ± 26.2 μΩ/cm; growth inhibition, 0.00 ± 2.7%; chlorophyll reduction, 0.00 ± 4.2%).

preferential loss of the ester moiety attached to C-9.^{11,12} The isobutyrate residue in compound 2 was located at C-10 considering the chemical shift values for C-9/H-9 and C-10/H-10 as well as the C-9/H-11 and H-12 correlations observed in the HMBC spectrum. The absolute configuration at C-9 and C-10 was established by applying the Mosher ester methodology¹³ on (+)-*cis*-methylkhellactone (1a). The latter compound was obtained by acid hydrolysis (HCl/MeOH) of 1 and 2. Analysis of the Δ_{S-R} data (Table 4) for (+)-*cis*-methylkhellactone-(*S*)-MTPA (2a) and (+)-*cis*-methylkhellactone-(*R*)-MTPA (2b) derivatives showed that the absolute stereochemistry at C-9 was *R*. Thereafter, the absolute configuration at C-10 was automatically assigned as *R* because of the *cis* relationship between H-9 and H-10.

The structures of the novel coumarins 1 and 2 and that of the known compound 7 were confirmed by X-ray analysis (Figures 1–3). In all cases, the crystal structures clearly show the *syn* disposition of the substituents at C-9 and C-10. The pyranocoumarin skeleton of the molecules is essentially planar. The pyran ring adopts a half-chair conformation with C-8 and C-9 on opposite sides of the ring plane. In addition, both carbonyl oxygen atoms point toward the same direction and the ester group attached to C-10 displays some orientational disorder. Crystal packing of compounds 1 and 7 is governed by van der Waal forces, which are responsible for the crystal cohesion. For compound 2 the intramolecular hydrogen bonds between the hydroxy group (O-3) at C-9 and the coumarin oxygen atom (O-2) arrange the molecules in tetramers.

Compound 10 has a molecular formula of C₁₈H₂₀O₅ as inferred by EIMS, ¹³C NMR, and elemental analysis. The ¹H NMR spectrum was similar to that of jatamansin (9)¹⁰ and other lomatin analogues.¹⁰ The most obvious differences between the NMR spectra of compounds 9 and 10 resulted from the presence of the signals for an isobutyryl moiety in 10 instead of the resonances for the angeloyl unit in 9. The absolute configuration at C-9 was also accomplished by applying the Mosher ester methodology¹³ on (+)-lomatin (9a), obtained by prolonged treatment of 10 with boiling methanolic KOH. Analysis of the Δ_{S-R} data (Table 4) for the (+)-lomatin-(*S*)-MTPA (9b) and (+)-lomatin-(*R*)-MTPA (9c) derivatives showed that the absolute stereochemistry at C-9 was *R*. In accordance with the above discussion 10 was characterized as isobutyric acid (9*R*)-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2*H*,5*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyran-2-one-9-yl ester.

Table 3. NMR Data for Compounds 1, 2, and 10^a

position	1		2		10	
	δ_H (m, J in Hz)	δ_C^b	δ_H (m, J in Hz)	δ_C^b	δ_H (m, J in Hz)	δ_C^b
2		159.8		159.9		161.2
3	6.23 (d, 9.5)	113.2	6.23 (d, 9.6)	113.0	6.23 (d, 9.50)	112.6
4	7.59 (d, 9.5)	143.2	7.59 (d, 9.6)	143.3	7.63 (d, 9.50)	143.8
4a		112.6		112.5		112.2
5	7.35 (d, 8.5)	129.1	7.36 (d, 8.5)	129.3	7.26 (d, 8.8)	126.7
6	6.80 (d, 8.5)	114.4	6.81 (d, 8.5)	114.5	6.79 (d, 8.8)	114.3
6a		156.7		156.9		153.4
8		77.4		78.6		76.6
9	5.31 (d, 5.0)	70.1	4.05 (d, 4.8)	71.7	5.11 (t, 5.5)	69.2
10	6.55 (d, 5.0)	60.8	6.38 (d, 4.8)	63.4	3.21 (dd, 5.5, 17.6)	23.0
10'					2.92 (dd, 5.5, 17.6)	
10a		107.0		107.6		107.2
10b		154.0		154.2		156.3
11	1.44 (s)	22.7	1.48 (s)	22.3	1.36 (s)	22.4
12	1.41 (s)	24.8	1.42 (s)	20.7	1.38 (s)	24.8
-OH			2.37 (brs)			
13		170.0		178.5		176.2
14	2.09 (s)	20.7	2.68 (hept, 6.5)	34.3	2.55 (hept, 7.00)	34.0
15		173.3	1.26 (d, 6.5)	18.8	1.17 (dd, 7.00)	18.8
16	2.43 (dq, 7.5, 16.0)	27.5	1.23 (d, 6.5)	18.9	1.14 (dd, 7.00)	19.0
16'	2.38 (dq, 7.5, 16.0)					
17	1.20 (dd, 7.5)	9.1				

^a Spectra recorded in CDCl₃ (¹H, 500 MHz and ¹³C, 125 MHz); δ in ppm. ^b Assigned by HMQC, HMBC, and DEPT.

Table 4. Partial ¹H NMR Data of the (S)- and (R)-Mosher Esters of 1a and 9a^a

proton	1a			carbinol confign.	9a			carbinol confign.
	(S)-MTPA	(R)-MTPA	$\Delta\delta_{S-R}$		(S)-MTPA	(R)-MTPA	$\Delta\delta_{S-R}$	
9	5.306	5.346		R	5.246	5.245		R
10	4.963	4.882	+0.081		3.311	3.266	+0.045	
					3.065	2.981	+0.84	
11 ^b	1.401	1.494	-0.093		1.323	1.378	-0.055	
12 ^b	1.347	1.399	-0.052		1.273	1.364	-0.091	

^a Spectra recorded in CDCl₃ (300 MHz). ^b Interchangeable signals.

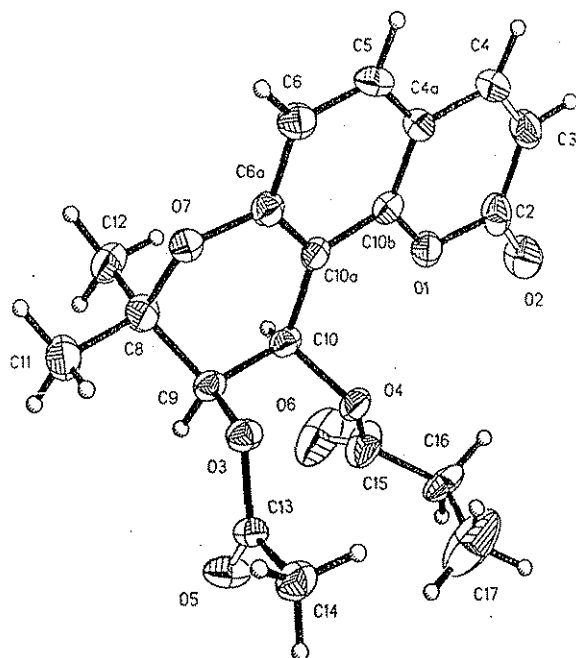


Figure 1. X-ray crystal structure for 1.

The molecular formulas of compounds 11 and 12 were determined as C₂₁H₂₄O₆ and C₂₀H₂₄O₆, respectively, by MS, NMR, and elemental analysis. Their NMR (Table 5), UV, and IR spectra indicated that these compounds are linear pyranochromones related to (-)-hamaudol,¹⁴ a linear pyranochromone possessing a 3(S)-hydroxy functionality. The

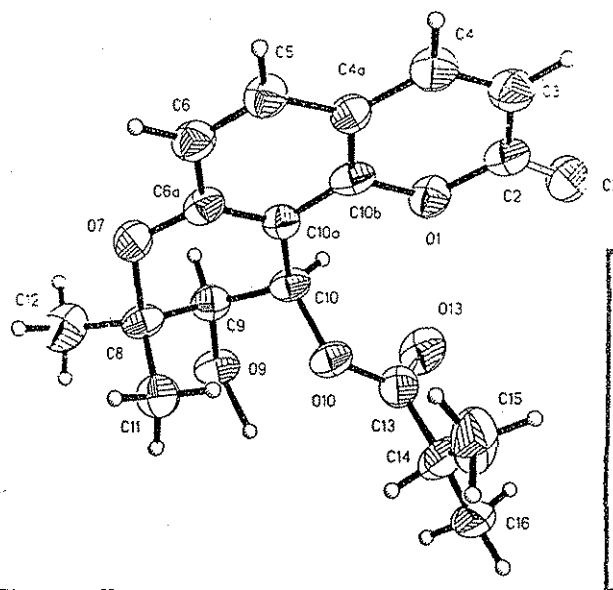


Figure 2. X-ray crystal structure for 2.

NMR spectra (Table 5) of 11 and 12 showed signals due to the presence of two carbonyl groups, a methoxy functionality, five methyl groups, and two methines in the aromatic region. The main differences between the NMR spectra (Table 5) of compounds 11 and 12 resulted in the signals due to the ester moiety at C-3. In 12 these signals were consistent with the presence of an isobutyrate, while in 11 with an angelate. cursory inspection of the HMBC spectra of 11 and 12, which displays the correlations summarized

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

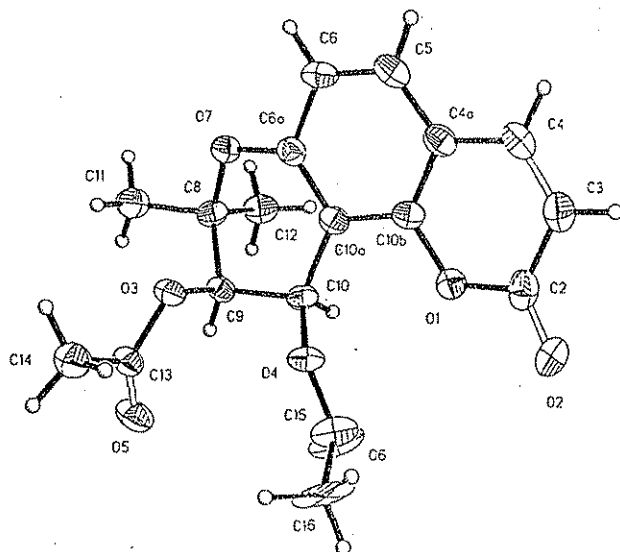


Figure 3. X-ray crystal structure for 7.

in Table 5, confirmed the pyranochromone skeleton as well as the position of the methoxy, methyl, and ester groups in both molecules. Upon alkaline hydrolysis (KOH/MeOH), 11 and 12 yielded (+)-5-methoxyhamaudol (11a), which is also a new analogue of (-)-hamaudol. The NMR spectra of 11a (see Experimental Section) differ from those of hamaudol¹⁴ in the presence of the signal for the methoxyl group at C-5. The sign of the optical rotation of 11a is opposite that of hamaudol, suggesting that the stereochemistry at C-3 of 11 and 12 is the opposite that of (-)-hamaudol. The application of the advanced Mosher ester methodology¹³ on 11a corroborated this proposal since analysis of the Δ_{S-R} data (Table 6) for the (+)-5-methoxyhamaudol-(S)-MTPA (11b) and (+)-5-methoxyhamaudol-(R)-MTPA (11c) derivatives clearly indicated that the absolute stereochemistry at C-3 was *R*.

The phytotoxic activity of the isolates and chemical derivatives 1a, 1b, 9a, and 11a was determined on germination and radicle elongation of *A. hypochondriacus* and *E. crus-galli* seedlings using 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) as the positive control. Table 1 summarizes the phytotoxic effect (expressed as IC_{50} values) of the tested compounds. In general, the compounds inhibited radicle growth in a concentration-dependent manner. Compounds 11, 12, and 1a were the most active and showed high selectivity against *E. crus-galli* seeds. Of all the isolates, only 9 and 10 showed significant phytotoxicity on duckweed at concentrations of 100 and 200 μ M (Table 2). These compounds caused growth inhibition, chlorophyll reduction, and electrolytic leakage. Apparently, during the course of this study it was not possible to isolate the active compound responsible for the marked phytotoxicity on duckweed because the extract was more active than compounds 9 and 10. On the other hand, it is possible that the compounds present in the extract exerted a synergistic effect on duckweed.

Continuing with our search of potential herbicide agents that could interact with calmodulin (CaM), the phytotoxic compounds were further evaluated for their ability to bind spinach and bovine brain CaM.^{15,16} CaM is an intracellular receptor for Ca^{2+} in eukaryotes which modulates enzymatic response to calcium. This protein plays a leading role in plant signal transduction during germination and plant growth, modulating the activity of several important plant enzymes such as NAD-kinase, glutamate decarboxylase,

and Ca^{2+} -ATPase. Therefore, CaM and/or the enzymes it regulates could be important targets in vivo for the phytotoxic action of many phytotoxins.¹⁷ In this context, it has been previously described that some phytotoxins such as ophiobolin A interact with CaM, altering its enzyme activator properties.¹⁵ The interaction of ophiobolin A with CaM has been demonstrated by electrophoresis, by fluorescence experiment, and by evaluating its capability of inhibiting the activation of cAMP-phosphodiesterase.¹⁵ Concerning the first experiment, it is well known that the interaction of any compound with Ca^{2+} -CaM complex alters its conformation and changes its electrophoretic mobility; however, it does not reveal if the tested compound modifies the enzyme activator properties of CaM.^{15,16} Figure 4 shows that all compounds tested (0.033 μ g mL⁻¹) modify the electrophoretic mobility of both proteins. Thus, these compounds interact with calmodulin and, as ophiobolin A, might exert their phytotoxic action by interfering with calmodulin-regulated processes in vivo.

In conclusion, the results of the present investigation revealed that *P. watsoni* contains phytotoxins that interact with Ca^{2+} -calmodulin. These compounds might be useful leads for the development of new herbicide agents. Further work is in progress in order to evaluate if this interaction affects calmodulin function.

Experimental Section

General Experimental Procedures. Melting points were determined on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. IR spectra were measured on a Perkin-Elmer 599 spectrometer. UV spectra were obtained on a Shimadzu 160 UV spectrometer in MeOH solution. Optical rotations were taken on a JASCO DIP-360 polarimeter. NMR spectra, including COSY spectra, NOESY, HMQC, and HMBC experiments were obtained on a Varian UNITY PLUS 500 spectrometer in $CDCl_3$ or MeOD at either 300 or 500 MHz (¹H), or 75 or 125 MHz (¹³C), or on a Bruker DMX500 at 500 MHz (¹H) or 125 MHz (¹³C) using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. EIMS data were recorded on a JEOL JMS-AX505HA mass spectrometer, at an ionization energy of 70 eV. HPLC was carried out with a Waters UV photodiode array detector (900) set at 190–350 nm, using a preparative silica gel column (μ -porasil 10 Å, 100 mm i.d. \times 300 mm). Control of the equipment, data acquisition, processing, and management of chromatographic information were performed by the Millennium 2001 software program (Waters). Open column chromatography: Si gel 60 (70–230 mesh, Merck). Analytical and preparative TLC: Si gel 60 F₂₅₄ (Merck).

Plant Material. The aerial parts of *P. watsoni* were collected on February 12, 1999, at San Luis Potosí, Mexico (Sierra Alvarez, Municipio Villa de Zaragoza), and identified by Dr. Robert Bye, Instituto de Biología UNAM. A voucher specimen (R. BYE et al. 26911) is preserved at the Ethnobotanical Collection of the National Herbarium (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

Extraction and Isolation of 1–12. The air-dried and ground aerial parts of *P. watsoni* (1.8 Kg) were extracted with CH_2Cl_2 -MeOH (1:1). The resulting extract (345.2 g) was subjected to open Si gel (1200 g) column chromatography and eluted with a gradient of hexane-EtOAc (1:0–0:1) and EtOAc-MeOH (9:1–1:1) mixtures. Altogether, 49 fractions were collected and combined according to their TLC patterns to yield eight primary fractions (F₁–F₈). Bioactivities in the Petri dish germination and radicle elongation bioassay showed three active pools: F₂ (160.4 g, IC_{50} = 53.3 μ g mL⁻¹ for *A. hypochondriacus*; IC_{50} = 1114.5 μ g mL⁻¹ for *E. crus-galli*), F₄ (144 g, IC_{50} = 241.6 μ g mL⁻¹ for *A. hypochondriacus*; IC_{50} = 55.1 μ g mL⁻¹ for *E. crus-galli*), and F₅ (12.7 g, IC_{50} = 56.2 μ g mL⁻¹ for *A. hypochondriacus*; IC_{50} = 174.7 μ g mL⁻¹ for *E. crus-galli*). From the active fraction F₄, eluted with hexane-EtOAc, 7:3, precipitated a mixture of 1, 6, and 7 (35 g). Part of this

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Table 5. NMR Data for Pyranochromones 11 and 12^a

position	11			12		
	δ_H (m, <i>J</i> in Hz)	δ_C^b	HMBC (C—H)	δ_H (m, <i>J</i> in Hz)	δ_C^b	HMBC (C—H)
2		81.9	4,10,11		81.6	4,10,11
3	5.03 (dd, 7.0)	89.3	4,11,10	5.01 (dd, 7.0)	89.0	4,10,11
4 α	3.33 (dd, 7.0, 9.5)	27.7		3.30 (dd, 7.0, 9.6)	27.6	
4 β	3.27 (dd, 7.0, 9.5)			3.23 (dd, 7.0, 9.6)		
4a		116.7	4,9		116.7	4,9
5		155.8	—OCH ₃ ,4		155.7	—OCH ₃ ,4
5a		111.9	9		111.5	9
6		177.1			177.1	
7	5.99 (q, 0.5)	111.4	—CH ₃	5.99 (q, 0.75)	111.4	9,—CH ₃
8		163.3	7,—CH ₃		163.3	7,—CH ₃
8a		159.9	9,—CH ₃		159.9	9,—CH ₃
9	6.52 (s)	93.7		6.53 (s)	93.7	
9a		164.4	4,9		164.4	4,9
10	1.62 (s)	21.4		1.56 (s)	21.1	
11	1.61 (s)	22.1		1.53 (s)	22.0	
12		167.1	15		167.2	13,14,15
13		128.5	15,16	2.41 (hept, 7.0)	34.9	14,15
14	5.98 (ddq, 1.5, 7.5, 14.5)	137.7	15,16	1.06 (d, 7.0)	18.8	13
15	1.89 (dq, 1.5, 7.5)	15.6	16	1.05 (d, 7.0)	18.8	13
16	1.68 (q, 1.5, 7.0)	20.6	15			
—OCH ₃	5.93 (s)	61.1		3.94 (s)	61.1	
—CH ₃	2.27 (d, 0.5)	19.7	7	2.28 (d, 0.75)	19.8	7

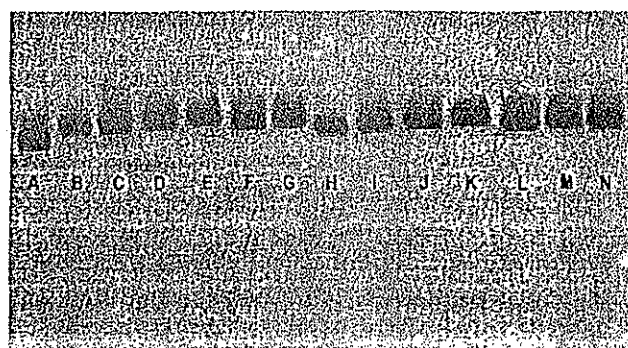
^a Spectra recorded in CDCl₃ (¹H, 500 MHz and ¹³C, 125 MHz); δ in ppm. ^b Assigned by HMQC, HMBC, and DEPT.

Table 6. Partial ¹H NMR Data of the (*S*)- and (*R*)-Mosher Esters of 11a^a

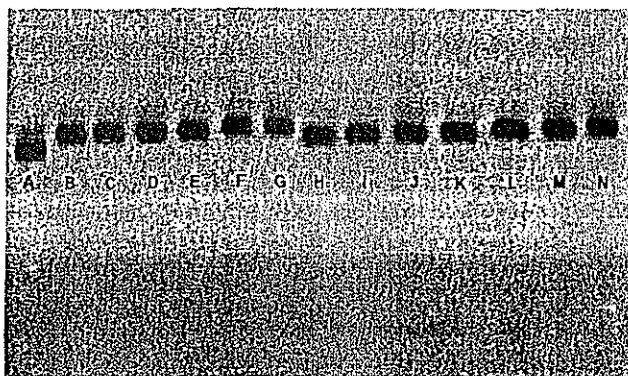
proton	(<i>S</i>)-MTPA	(<i>R</i>)-MTPA	$\Delta\delta_{S-R}$	carbinol confign.
3	4.867	4.095		<i>R</i>
4 α	3.079	3.067	+0.012	
4 β	3.253	3.247	+0.006	
10	1.664	1.734	−0.070	
11	1.661	1.725	−0.060	

^a Spectra recorded in CDCl₃ (300 MHz).

mixture (200 mg) was resolved by extensive preparative TLC (hexane—EtOAc, 3:1) to yield 1 (60 mg), 6 (130 mg), and 7 (1 mg). The mother liquors from phytotoxic fraction F₄ were rechromatographed on a Si gel (734 g) column eluting with a gradient of hexane—EtOAc (1:0—0:1) to yield 19 secondary fractions (F₁—F₁₉). According to the Petri dish germination and radicle elongation bioassay, the phytotoxic activity was concentrated in secondary fractions F_{4VI} (6.07 g) and F_{4IX} (8.6 g). Secondary fraction F_{4VI}, eluted with hexane—EtOAc, 9:1, was chromatographed on a Si gel (81 g) column eluting with a gradient of hexane—EtOAc (1:0—0:1) to afford 10 tertiary fractions. The phytotoxic activity was concentrated in fraction F_{4VI-6} (4.9 g). Extensive TLC (hexane—EtOAc, 3:1) of active fraction F_{4VI-6} (200 mg), eluted with hexane—EtOAc, 9:1, yielded 9 (50 mg) and 10 (12 mg). Secondary active fraction F_{4IX}, eluted with hexane—EtOAc, 8:2, was further chromatographed on another Si gel (151.0 g) column eluting with a gradient of hexane—EtOAc (1:0—0:1) and EtOAc—MeOH (1:1) to yield nine tertiary fractions (F_{4-IX-1}—F_{4-IX-9}). The phytotoxic activity was concentrated in fraction F_{4-IX-5} (10.89 g), eluted with hexane—EtOAc, 7:3. The latter fraction was rechromatographed on a Si gel (217.8 g) column eluting with a gradient of CH₂Cl₂—MeOH (1:0—1:1) to give seven quaternary fractions (F_{4-IX-5-1}—F_{4-IX-5-7}). The phytotoxic activity was concentrated in fraction F_{4-IX-5-v} (4.9 g), eluted with CH₂Cl₂—MeOH, 99.95:0.05. Extensive HPLC purification of the active quaternary fraction F_{4-IX-5-v} (100 mg) on a normal-phase Si gel column [10 mL min^{−1}, Hex—*i*-PrOH—MeOH (95:2.5:2.5), λ 230 nm] yielded 2 (15 mg), 3 (5 mg), 4 (5 mg), 5 (5 mg), and additional amounts of 1 (20 mg); retention times: 18.6, 19.1, 26.3, 27.4, and 29.5 min, respectively. Active fraction F₅, eluted with hexane—EtOAc, 6:4, was further resolved by column chromatography on Si gel (182 g) eluting with hexane—EtOAc (1:0—0:1) and EtOAc—MeOH (9:1—1:1) mixtures. This process yielded 23 secondary fractions (F₅₋₁—



a



b

Figure 4. SDS-PAGE of bovine (a) and spinach (c) calmodulins after treatment with isolates and chemical derivatives. Electrophoresis of 2 μ g samples of calmodulins in the presence of 1 mM CaCl₂. Pretreatments of the calmodulin samples, for 1.5 h at 30 °C in the presence of CaCl₂: A, no additions; B, 0.033 μ g/mL (2*S*,3*S*)-5-hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2,3-dimethyl-4*H*-dihydronaphtho[2,3-*b*]pyran-4-one; C, 1; D, 2; E, 4, F, 6; G, 9; H, 10; I, 11; J, 12; K, 1a; L, 1b; M, 9a; N, 11a. In all cases 0.033 μ g/mL of treatment (1–11a) was applied.

F_{5-XIII}), and the Petri dish bioassay indicated that the phytotoxic activity was in secondary fractions F_{5-XII} (607.4 mg) and F_{5-XIII} (1.5 g). Further purification of active fraction F_{5-XII} (eluted with hexane—EtOAc, 6:4) by HPLC [10 mL min^{−1}, Hex—*i*-PrOH—MeOH (95:2.5:2.5), λ 230 nm] yielded 8 (20 mg),

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

retention time 25.2 min. Extensive HPLC purification of the active secondary fraction F_{5-NIII} (200 g), eluted with hexane-EtOAc, 6:4, on a normal-phase Si gel column [10 mL min⁻¹, Hex-*i*-PrOH-MeOH (90:5.0:5.0), λ 230 nm] yielded 11 (60 mg) and 12 (10 mg); retention times: 20.2 and 20.9 min, respectively.

Propionic acid (9R,10R)-9-acetoxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2H,8H-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyrans-2-one-10-yl ester (1): colorless plates, mp 208 °C; [α]_D²⁰ +18 (c 1 mg mL⁻¹ CHCl₃); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 321 (4.23) nm; IR ν_{max} (KBr) 3097, 2980, 1746, 1605, 1225, 1024 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz), see Table 3; EIMS *m/z* 300 [M⁺ - AcOH (29)], 285 (8), 261 (6), 244 (30), 229 (100), 57 (21), 43 (15). Anal. Calcd for C₁₉H₂₀O₇: C 63.33, H 5.59. Found: C 63.39, H 5.53.

Isobutyric acid (9R,10R)-9-hydroxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2H,8H-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyrans-2-one-10-yl ester (2): colorless needles, mp 134 °C; [α]_D²⁰ +151 (c 1 mg mL⁻¹ CHCl₃); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 323 (4.27) nm; IR ν_{max} (KBr) 3475, 2977, 2926, 1730, 1607, 1234, 1108 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz), see Table 3; EIMS *m/z* 332 [M⁺(16)], 314 [M⁺ - H₂O(5)], 299 (17), 261 (18), 244 (13), 229 (100), 215 (9), 191 (27), 175 (11), 71 (24), 43 (29). Anal. Calcd for C₁₈H₂₀O₆: C 65.05, H 6.07. Found: C 65.00, H 6.09.

Isobutyric acid (9R)-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2H,8H-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipyrans-2-one-9-yl ester (10): vitreous colorless solid, mp 108–110 °C; [α]_D²⁰ +20 (c 1 mg mL⁻¹ CHCl₃); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 324 (3.9) nm; IR ν_{max} (film) 2979, 2944, 1732, 1606, 1144, 1113; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz), see Table 3; EIMS *m/z* 316 [M⁺(19)], 246 (3), 228 (4), 213 (100), 83 (7), 71 (17), 55 (6), 43 (29). Anal. Calcd for C₁₈H₂₀O₅: C 68.34, H 6.37. Found: C 68.38, H 6.30.

2-Methylbut-(2Z)-enoic acid (3R)-5-methoxy-3,4-dihydro-2,2,8-trimethyl-6-oxo-2H,6H-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipyrans-3-yl ester (11): yellow oil; [α]_D²⁰ +340 (c 1 mg mL⁻¹ CHCl₃); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 214 (4.50), 285 (4.12) nm; IR ν_{max} (film) 2981, 2987, 1714, 1660, 1621, 1470, 1238, 1141 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz), see Table 5; EIMS *m/z* 372 [M⁺(25)], 289 (2), 272 (23), 257 (100), 83 (30). Anal. Calcd for C₂₁H₂₄O₆: C 67.78, H 6.50. Found: C 67.78, H 6.49.

Isobutyric acid-(3R)-5-methoxy-3,4-dihydro-2,2,8-trimethyl-6-oxo-2H,6H-benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipyrans-3-yl ester (12): vitreous solid, mp 140–141 °C; [α]_D²⁰ -560 (c 1 mg mL⁻¹ CHCl₃); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 213 (4.6), 284 (4.10) nm; IR ν_{max} (KBr) 2972, 2926, 1731, 1655, 1617, 1468, 1378, 1143 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz), see Table 5; EIMS *m/z* 360 [M⁺(29)], 273 (27), 257 (100), 231 (55), 229 (51), 71 (8), 43 (13). Anal. Calcd for C₂₀H₂₄O₆: C 66.65, H 6.71. Found: C 66.62, H 6.75.

Preparation of (+)-cis-Methylkellactone (1a) and (-)-trans-Methylkellactone (1b). A solution of 1 (50 mg) in 3 mL of MeOH was mixed with 3.5 mL of 1 N methanolic HCl and refluxed for 22 h. The reaction mixture was allowed to stand for 45 min and adjusted to pH 8 with a NaHCO₃ (10% aqueous) solution, concentrated in vacuo to remove the MeOH, and extracted with CH₂Cl₂. The CH₂Cl₂ layers were combined, washed with water, and dried over Na₂SO₄. The reaction mixture was chromatographed on preparative TLC [hexane-EtOAc (7:3)] to yield 1a (10 mg) and 1b (15 mg). 1a: mp 118–119 °C, [α]_D²⁰ +690 (c 1 mg mL⁻¹ CHCl₃); 1b: mp 157–158 °C; [α]_D²⁰ -336 (c 1 mg/mL CHCl₃). The spectroscopic and spectrometric data of 1a and 1b, including UV, IR, ¹H NMR, and ¹³C NMR, were identical to those previously described.¹⁹

Preparation of (+)-Lomatine (9a). To a solution of 9 or 10 (10 mg each) in 2 mL of MeOH was added 2 mL of 1 N methanolic KOH, and the mixture was refluxed for 3.5 h. The reaction mixture was diluted with water, concentrated in vacuo to remove the organic solvent, acidified with 2 N sulfuric acid (2 mL), and extracted with EtOAc. The combined EtOAc layers were successively washed with 10% aqueous NaHCO₃ solution and water and dried over Na₂SO₄. The resulting residues were purified by preparative TLC [hexane-EtOAc (1:1)] to give 9a (5 mg), mp 184–185 °C; [α]_D²⁰ +210 (c 1 mg mL⁻¹ CHCl₃). The

spectroscopic and spectrometric data, including UV, IR, and ¹H NMR, were the same as those previously described.¹⁰

Preparation of (+)-5-Methoxyhamaudol (11a). A solution of 11 (10 mg) or 12 (5 mg) in 3 mL of MeOH was treated as described for 9 and 10. The reaction mixtures were purified by column chromatography on Si gel [2 g, EtOAc] to give 11a (5 and 2 mg respectively), mp 137–138 °C; [α]_D²⁰ +560 (c 1 mg mL⁻¹ CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 6.02 (1H, q, *J* = 0.75 Hz, H-3), 6.61 (1H, s, H-6), 4.75 (1H, dd, *J* = 4.5, 8.24 Hz, H-3'), 3.34 (1H, dd, *J* = 4.25, 8.24 Hz, H-4'), 1.29 (3H, s, H-5'), 1.23 (3H, s, H-5'), 2.32 (1H, d, *J* = 0.75 Hz, CH₃), 3.92 (1H, s, -OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 179.80 (C-2), 166.58 (C-4), 166.43 (C-7), 161.44 (C-5), 156.96 (C-8a), 118.47 (C-8), 111.54 (C-4a), 111.49 (C-3), 92.65 (C-2'), 72.25 (C-3'), 61.04 (-OCH₃), 28.72 (C-4'), 25.4 (C-5'), 25.31 (C-6'), 19.71 (-CH₃); EIMS *m/z* 290 [M⁺(100)], 272 (18), 257 (23), 243 (13), 231 (88), 213 (87), 201 (57), 189 (32), 186 (24), 174 (11), 160 (8), 132 (8), 59 (39), 43 (9). Anal. Calcd for C₁₆H₁₈O₅: C 66.20, H 6.25. Found: C 66.25, H 6.24.

Mosher Esters of Compounds 1a, 9a, and 11a. 1a (3.0 mg), 9a (3.0 mg), or 11a (3.0 mg) was dissolved in CH₂Cl₂ (1 mL) and treated with (*S*)- or (*R*)-MTPA (18 mg), DCC (18 mg), and 4-DMAP (4 mg). The mixtures were stirred at room temperature (25 °C) for 3 h and then poured into ice-water. The resulting mixtures were then extracted with CHCl₃; the organic phases were successively washed with 5% aqueous HCl, saturated NaHCO₃, and water and then dried over Na₂SO₄ and filtered. Evaporation of the solvent under reduced pressure afforded residues which were purified by chromatography on Si gel [2 g, hexane-EtOAc (7:3)] for 1a and 9a. In the case of Mosher esters of compound 11a the column was eluted with EtOAc to yield the corresponding (*S*)- and (*R*)-MTPA esters.

X-ray Crystallographic Analysis of Compounds 1, 2, and 7.²⁰ Molecular structures of compounds 1, 2, and 7 were analyzed by X-ray diffraction methods following very similar procedures. For each sample, crystals were mounted, in air, on glass fibers. Accurate cell parameters were determined by refinement from the setting of 25 reflections and diffraction intensities measured at 293 K using an ω-θ scan method on a Siemens P4/PC diffractometer equipped with graphite-monochromated radiation. The intensities of three standard reflections, recorded every 100 collected reflections, showed no changes. All data sets were corrected for Lorentz-polarization effects, but no absorption corrections were applied. The structure of each compound was determined by direct methods (SIR92)²¹ and refined by full-matrix least-squares methods using SHELXL97.²² Hydrogen atoms attached to C atoms were set to ride on the parent C atoms, and for those bonded to O atoms their positional parameters were refined: an isotropic temperature factor 1.2 times the *U*_{eq} of the parent atom was used. The non-hydrogen atoms were refined with anisotropic thermal parameters.

Crystal Data for Compound 1: C₁₉H₂₀O₇, *M*_r = 360.35, colorless plates with dimensions 0.32 × 0.26 × 0.06 mm, orthorhombic. The space group is *P*2₁2₁ with unit cell parameters (at 25 °C) *a* = 8.5950(4), *b* = 10.394(1), *c* = 20.015-(1) Å, *V* = 1788.07(19) Å³, *Z* = 4, *F*(000) = 752, *d*_{calcd} = 1.331 g cm⁻³, μ/mm⁻¹ = 0.861.

Crystal Data for Compound 2: C₁₈H₂₀O₆, *M*_r = 332.34, colorless needle with dimensions 0.60 × 0.12 × 0.10 mm, monoclinic. The space group is *C*₂ with unit cell parameters (at 25 °C) *a* = 29.101(3), *b* = 9.010(1), *c* = 14.373(1) Å, and *V* = 3535.2(6) Å³, *Z* = 8, *F*(000) = 71408, *d*_{calcd} = 1.249 g cm⁻³, μ/mm⁻¹ = 0.782.

Crystal Data for Compound 7: C₁₈H₂₀O₇, *M*_r = 346.32, colorless prism with dimensions 0.60 × 0.32 × 0.10 mm, orthorhombic. The space group is *P*2₁2₁2₁ with unit cell parameters (at 25 °C) *a* = 8.631(1), *b* = 10.403(2), *c* = 20.111(5) Å, and *V* = 1805.7(6) Å³, *Z* = 4, *F*(000) = 728, *d*_{calcd} = 1.274 g cm⁻³, μ/mm⁻¹ = 0.099.

Bioassay Measuring Plant Growth Inhibition. The phyto-growth inhibitory activity on the extract and pure compounds on seedlings of *A. hypochondriacus* and *E. crus-galli* was evaluated using the Petri dish radicle elongation and

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

germination bioassay.³ The results were analyzed by ANOVA ($p < 0.05$), and IC_{50} values were calculated by Probit analysis based on percent of radicle growth or germination inhibition. The extract was evaluated at 1, 10, 100, and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The fractions and pure compounds were tested at 10, 50, 100, and 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. 2,4-D was used as the positive control. The bioassays were performed at 28 °C.

Duckweed Bioassay. The duckweed assay was carried out essentially as described in detail by Tanaka et al.⁴ The extract at concentrations of 10, 100, and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and the pure compounds at concentrations of 25, 50, 100, and 200 μM in half-strength Hunter's medium²² were added to 10 duckweed colonies of three fronds each. In the experiment 3 mL of media was used and the test was run for 3 days. Electrolyte leakage was determined by a conductivity meter at the beginning and ending 72 h. Chlorophyll was determined based on fresh weight by first removing duckweed from bathing media, blotting with paper towels, and extracting with 5 mL of DMSO by soaking overnight in the dark. The total chlorophyll (a and b) was determined by ultraviolet spectroscopy according to Hiscox and Israelstam.²⁴ Growth inhibition was measured by determining duckweed fresh weight at the beginning and the end of the experiment.

Evaluation of the Interaction of Isolated Compounds and Derivatives with Spinach and Bovine Brain Calmodulins. The interaction of the isolated compounds and derivatives with both spinach and brain calmodulins (Sigma) was performed through denaturing homogeneous electrophoresis (SDS-PAGE). SDS-PAGE was performed according to previously described procedures using 15% polyacrylamide gels.^{15,16} The interaction of the phytotoxins with both calmodulins was evaluated by observing the difference in the electrophoretic mobility in the presence of Ca^{2+} . Each electrophoretic run was done by triplicate, and the compound (2S,3S)-hydroxy-6,8,10-trimethoxy-2,3-dimethyl-4*H*-dihydronaphtho[2,3-*b*]pyran-4-one^{15,16} was used as the positive control.

Acknowledgment. This investigation was supported by grants from DGAPA-UNAM (IN 207300), CONACyT (Convenio 27978N), and PAEP (Nos. 108333 and 108321). Thanks are due to Isabel Chávez, Luis Velasco-Ibarra and Javier Pérez-Flores (Instituto de Química UNAM), Oscar Yáñez, Griselda Gutiérrez, and Georgina Duarte (Facultad de Química UNAM) for recording NMR, MS, UV, and IR spectra. The technical assistance of Laura Acevedo, Isabel Rivero, Gustavo Morales, Myrna Mendoza, and Gilberto Márquez is also acknowledged. N.V. acknowledges the fellowship awarded by CONACyT and DGEF to carry out graduate studies.

Supporting Information Available: Experimental crystallographic details, tables of atomic coordinates and equivalent isotropic displacement parameters, and hydrogen bond schemes for compounds 1, 2, and 7. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- (1) This work represents part of the Ph.D. Thesis submitted to the graduate school of Chemistry UNAM, Mexico, by N.V.
- (2) Aguilar, A. J.; Camacho, S.; Chino, P.; Jáquez, P.; López, M. *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social*; Instituto Mexicano del Seguro Social, 1994; p 253.
- (3) Mata, R.; Macías, M.; Rojas, S.; Lotina-Hensen, E.; Toscano, R.; Anaya, A. *Phytochemistry* 1998, 49, 441-449.
- (4) Tanaka, T.; Abbas, H.; Duke, S. *Phytochemistry* 1993, 33, 779-785.
- (5) Murray, R. *Nat. Prod. Rep.* 1995, 477-505.
- (6) Bolhman, F.; Bhaskar, R.; Grenz, M. *Tetrahedron Lett.* 1968, 3947-3950.
- (7) Swager, T.; Cardellina, J., II. *Phytochemistry* 1985, 24, 805-813.
- (8) Lemmich, J.; Alsted-Pedersen, P.; Nielsen, B. *Tetrahedron Lett.* 1969, 59, 3365-3366.
- (9) Nielsen, E.; Larsen, P.; Lemmich, J. *Acta Chem. Scand.* 1971, 25, 529-533.
- (10) Shanbhag, S.; Mesta, C.; Maheshwari, M.; Paknikar, S.; Bhattacharyya, S. *Tetrahedron* 1964, 20, 2605-2615.
- (11) Snaath, N.; Soine, T.; Shipchandler, M. *J. Pharm. Sci.* 1976, 65, 1028-1033.
- (12) Lingyi, K.; Xian, L.; Zhida, M.; Yang, L.; Qitai, Z.; Tingru, Z. *Yaohedaxue Xuebao* 1996, 27, 136-138.
- (13) Ontani, I.; Kusumi, T.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 4092-4096.
- (14) Nitta, A. *Yukugaku Zasshi* 1965, 85 (1), 55-61.
- (15) Macías, M.; Ulloa, M.; Gamboa, A.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* 2000, 63, 757-761, and references therein.
- (16) Macías, M.; Gamboa, A.; Ulloa, M.; Toscano, R. A.; Mata, R. *Phytochemistry* 2001, 58, 751-758.
- (17) Lee, S. H.; Johnson, J. D.; Walsh, M. P.; Van Leirrop, J. E.; Sutherland, C.; Xu, A.; Snedden, W. A.; Kosk-Kosicka, D.; Fomm, H.; Narayanan, N.; Cho, M. *J. Biochem. J.* 2000, 350, 299-306.
- (18) Au, T. K.; Chick, W. S.; Leung, P. C. *Life Sci.* 2000, 67, 733-742.
- (19) Macías, F.; Massanet, G.; Rodríguez-Luis, F.; Salvá, J. *Magn. Reson. Chem.* 1989, 27, 653-658.
- (20) Crystallographic data for the structures reported in this paper have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre. Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to the Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK [fax: +44 (0)1223-336033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk].
- (21) Altomare, A.; Cascarano, G.; Giacovazzi, C.; Guagliardi, A.; Burla, M.; Polidori, G.; Camalli, M. *J. Appl. Crystallogr.* 1994, 27, 435.
- (22) Sheldrick, G. *SHELXL97: Program for Refinement of Crystal Structures*; University of Göttingen: Germany, 1997.
- (23) Becerril, J.; Duke, M.; Nadihalli, U.; Matsumoto, H.; Duke, S. *Phys. Plant.* 1992, 86, 6-16.
- (24) Hiscox, J.; Israelstam, G. *Can. J. Bot.* 1979, 57, 1332-1334.

NP010448T

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

GRAPHICAL ABSTRACT

Phytotoxicity and ultrastructural effects of gymnopusin from the orchid *Maxillaria densa* on duckweed (*Lemna pausicostata*) frond and root tissues

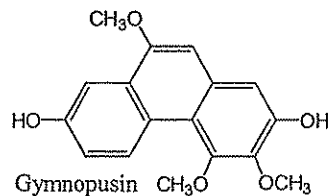
N.A. Valencia-Islas¹, R.N. Pau², W.T. Shier³, R. Mata¹ and H.K. Abbas^{4*}

¹Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México

D.F., México; ²USDA-ARS, Southern Weed Research Unit, Stoneville, MS 38776, U.S.A;

³College of Pharmacy, University of Minnesota, Minneapolis, MN 55455, U.S.A.; and ⁴USDA-ARS, Crop Genetics and Production Research Unit, Stoneville, MS 38776, USA.

Orchid phenanthrenes gymnopusin and erianthridin exhibit both phytotoxicity and mammalian cytotoxicity. Gymnopusin caused ultrastructural changes consistent with membrane destruction.



Name of Journal: Phytochemistry
Name of Editor: Norman G. Lewis

Editors' manuscript ref no: PHYTO 02-0994NA

Manuscript Title:
Phytotoxicity + ultrastructural effects of copper on roots of the orchid Maxillaria...

Name of first author on manuscript:
W.A. Valencia-Tsao

CORRESPONDING AUTHOR ADDRESS:
Name: Hamed K. Abbas
Address: USDA-ARS, CG+PRU
P.O. Box 345
Stonewille, MS 38776

PHONE: (662) 686-5313
FAX: (662) 686-5218
EMAIL: habbas@msa-stonewille.ars.usda.gov

- CHECKLIST**
- Disk and final revised version of the manuscript are identical.
 - Text pages supplied.
 - Keywords supplied.
 - Original figures (especially photographs) are supplied.
 - Figure captions are supplied.
 - Tables are supplied.
 - All table captions are supplied.
 - Copyright permission letters are enclosed for any artwork/tables previously published, including those published on the world-wide-web.
 - Graphical Abstract has been included.

Please indicate if any of the illustrations are to be printed in color:
NO

Electronic text format

Type of Computer: Dell Optiplex GX1p PC
Operating System: Windows 97
Software: Word
Version: _____
Directory of filenames on disk:
GrAFAbst.doc
Res Gymnos MS.doc
Gymnotables.doc

Electronic artwork format

Type of Computer: Dell Optiplex GX1p PC
Operating System: Windows 97
Software: Chem Draw
Version: Std version 4.5
Directory of filenames on disk:
Grnd Fig. CDX
Gymno Fig1. CDX

MANUSCRIPT DETAILS:
Date ms. received: _____
Date revised: _____
Date accepted: _____
(If published in journal)
EDITOR'S NOTES:

Section of Journal in which manuscript will appear: _____

Editor's signature _____ date _____

- MANUSCRIPT TYPE**
- Addendum
 - Book review
 - Correspondence
(e.g. Letter to the Editor; Reply to Letter to the Editor)
 - Discussion
(e.g. Comments; Comment and Reply; Opinion)
 - Erratum
 - Full length article
(Article of original research, e.g. Case Study, Research Paper, Technical Paper)
 - Review article
(Overview of original research, e.g. Annual Survey, Interview, Special Reviews)
 - Short Communication
(e.g. Brief Note; Rapid Communication; Short Report)
 - Other

**Phytotoxicity and ultrastructural effects of gymnopusin from the orchid
Maxillaria densa on duckweed (*Lemna pausicostata*) frond and root tissues****

N.A. Valencia-Islas¹, R.N. Paul^{2***}, W.T. Shier³, R. Mata¹ and H.K. Abbas^{4*}

¹*Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D.F., México;*

²*USDA-ARS, Southern Weed Research Unit, Stoneville, MS 38776, U.S.A.;* ³*College of Pharmacy, University of Minnesota, Minneapolis, MN 55455, U.S.A;* and ⁴*USDA-ARS, Crop Genetics and Production Research Unit,*

Stoneville, MS 38776, USA.

*Corresponding author:

e-mail: habbas@msa-stoneville.ars.usda.gov.

Postal address: USDA-ARS, Crop Genetics and Production Research Unit, P.O. Box 345,
Stoneville, MS 38776, USA.

Telephone: +1-662-686-5313; fax: +1-662-686-5218

**Taken in part from the Ph.D. thesis of N.A. Valencia-Islas

***Deceased February 15, 2002. This paper is dedicated to his memory.

Key Words

Gymnopusin, erianthridin, orchid, phenanthrene derivatives, phytotoxicity, mammalian cytotoxicity, ultrastructure, membrane leakage, *Lemna pausicostata*.

Abstract

Two phenanthrene derivatives, characterized as erianthridin (9,10-dihydro-2,7-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene) and gymnopusin (2,7-dihydroxy-3,4,9-trimethoxyphenanthrene), were isolated from an extract of the orchid *Maxillaria densa*, using phytotoxicity with amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) to guide fractionation. Gymnopusin and erianthridin inhibited radicle elongation of *A. hypochondriacus* seedlings with IC_{50} values of 330 and 58.2 μM , respectively. The phytotoxicity of the two phenanthrene derivatives was also assessed on duckweed (*Lemna pausicostata*), and compared with mammalian toxicity estimated *in vitro* with four mammalian cell lines. On duckweed, both phenanthrene derivatives caused electrolyte leakage, chlorophyll loss and photobleaching. Ultrastructural examination of duckweed frond and root tissues treated with gymnopusin (100 μM) revealed membrane damage to the tonoplast after 12 h of exposure. Effects on membrane integrity followed a time course similar to that of electrolyte leakage.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. Introduction

Maxillaria densa Lindley (Orchidaceae) is an epiphytic orchid widely distributed in Mexico and Guatemala (Hietz and Hietz-Seifert, 1994). Previous chemical investigation of this species allowed the isolation and structure elucidation of several phenanthrene derivatives (Estrada *et al.*, 1999). During our search for potential herbicide agents from Mexican plants, an extract of *M. densa* was identified as possessing phytotoxicity against (duckweed) (*Lemna pausicostata* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L). This paper reports the isolation of the major phytotoxic principles from *M. densa*, which were shown to be the phenanthrene derivatives (Fig. 1) gymnopusin (2,7-dihydroxy-3,4,9-trimethoxyphenanthrene), and erianthridin (9,10-dihydro-2,7-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene). Both compounds have previously been isolated from several orchids, including *M. densa* (Estrada *et al.*, 1999; Majumder and Joardar, 1985; Majumder and Banerjee, 1989), but the phytotoxic properties of gymnopusin and erianthridin have not been previously reported. However, it has been reported that a structurally-related compound, batatasin I, inhibited the growth of liverworts, algae and oat coleoptiles. Batatasin I also inhibited the CO₂-dependent O₂ evolution and the flow of electrons from water to methylviologen in spinach chloroplasts (Gorham, 1995), and it inhibited the succinate-dependent O₂ uptake in potato tuber mitochondria (Gorham, 1995). Other phenanthrenes such as orchinol, which has a free hydroxyl at the 7-position, inhibit indole-3-acetic acid (IAA) oxidation catalyzed by horseradish peroxidase (Lee *et al.*, 1978). The objectives of this research were (i) to better understand the phytotoxic properties of gymnopusin and erianthridin, (ii) to compare the phytotoxicity and the mammalian cytotoxicity of these compounds; and (iii) to investigate the ultrastructural effects of gymnopusin on frond and root tissues of duckweed.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Results and discussion

2.1. Bioassay-guided isolation of erianthridin and gymnopusin

A CHCl₃ : MeOH (1 : 1) extract of *M. densa* (whole plant) inhibited radicle growth of *A. hypochondriacus* (IC₅₀ = 271 µg/ml), when tested in a germination and radicle elongation assay (Mata *et al.*, 1998). In addition, the extract induced marked growth inhibition, chlorophyll reduction and electrolytic leakage (Table 1) after 72 h in duckweed cultures (Tanaka *et al.*, 1993). This extract was fractionated using column chromatography on silica gel guided by a bioautographic phytogrowth inhibitory assay using *A. hypochondriacus* seedlings to monitor phytotoxicity (Mata *et al.*, 1998). Phytotoxicity in the extract was limited to the fractions with the phenanthrene derivatives (Fig. 1) erianthridin and gymnopusin. Erianthridin and gymnopusin were identified by comparing spectroscopic and mass spectrometric properties with values previously reported in the literature (Majumder and Joardar, 1985; Majumder and Banerjee, 1989).

2.2. Toxic effects of erianthridin and gymnopusin on duckweed and *A. hypochondriacus*

Erianthridin (200 µM) was highly phytotoxic to duckweed as measured by increasing cellular leakage, complete growth inhibition and significant chlorophyll reduction (Table 1). Gymnopusin was more potent than erianthridin, causing the same effects at 100 µM. The electrolyte leakage induced by 100 µM gymnopusin began after 12 hours (Fig. 2). The level of electrolyte leakage was proportional to the concentration of the phytotoxin with poor leakage at 25 µM, moderate leakage at 50 µM and massive leakage at 100 µM. The effect was more pronounced after 48 h of treatment. Gymnopusin also caused a significant decrease in chlorophyll content at concentrations ranging from 50 to 200 µM (Table 1). Finally, gymnopusin and erianthridin inhibited

radicle elongation of *A. hypochondriacus* seedlings with IC_{50} values of 330 and 58.2 μ M, respectively.

2.3. Ultrastructural effects of gymnopusin

Since several phytotoxins cause cellular electrolyte leakage and chlorophyll loss by disruption of cell membranes in treated tissues (Abbas *et al.*, 1994), the ultrastructural effects of gymnopusin were investigated in duckweed frond and root tissues. Gymnopusin caused membrane disruption in frond tissue since the samples viewed by the transmission electron microscope showed ruptured tonoplasts, free-floating organelles and loss of cytoplasm in treated relative to control tissues. In treated frond tissue there was a gradual loss of cytoplasm and its component organelles. In the early controls (Fig. 3A), the cytoplasm was dense with ribosomes and distinct organelles. The chloroplasts were relatively starch free, although some small starch inclusions were visible. At 12 h of treatment (Fig. 3B), some damage attributable to the phytotoxin was observed. This result occurred at the time electrolyte leakage began to increase (Fig. 2). This micrograph also revealed that adjacent cells might show different responses to the toxin. At 24 h (Fig. 3C), free-floating organelles were common occurrences due to ruptured tonoplasts and cytoplasmic leakage. The tonoplast may be the primary target for gymnopusin toxicity, which represents an unusual, if not unique toxic mechanism among phytotoxins. The plastids contained a buildup of starch inclusions and plastoglobuli, which owe their electron density to osmium accumulation during fixation, and are thought to be thylakoid remnants. The accumulation of starch in chloroplasts suggests that the chloroplasts are functioning normally, but carbohydrate transport from the cell has been disrupted, possibly because metabolite-utilizing cells and tissues have been more severely affected by gymnopusin than mature photosynthetic cells. At 48 h (Fig. 3D), the tissue appears very similar to

that observed at 24 h, with intact organelles floating in a diluted cytoplasm. Ruptured chloroplasts became more evident at 60 h (Fig. 3E, Arrows), and although they lacked part of their plastid envelope, they still retained cohesion.

Alternatively, a light micrograph of the control root tip (Fig. 4A) showed a 72 h root tip with an intact root cap. Electron micrographs of the root tissue (Figs. 4 B and 4C) exhibited cells with dense cytoplasm and well-formed organelles. Small cytoplasmic vacuoles (V) appeared proximal to the tip, and increased in number distally. The chloroplasts (Ch) had well formed membranes (thylakoids), dense stroma, and small starch inclusions. A light micrograph of the 72 h treated root tip showed cells similar in appearance to the apical cells of the control root tip. The root cap was missing, which is typical of a treated root apex at longer incubation times. The cells of the root tip became more vacuolated and differed in appearance from cells a similar distance from the apex in the controls. Ultrastructurally (Fig. 4E) apical cells of the treated tissue appeared not to differ from the control root tip tissue, although the vacuoles became more irregular in shape and the chloroplasts had larger starch inclusions. It would appear that in the presence of the toxin, the apical meristematic tissue continues to divide, but the cells die sooner than they do in the control tissue.

2.4. *Cytotoxic effects of erianthridin and gymnopusin against normal and oncogenically transformed mammalian cell lines*

The potential use of natural products as bioherbicides is limited by concerns about safety for animals and humans. Because ideal candidates for commercially viable herbicides should have strong phytotoxicity to susceptible weeds and low mammalian toxicity, we evaluated erianthridin and gymnopusin for *in vitro* toxicity against four cultured mammalian cell lines representing undifferentiated normal and tumor cells and differentiated kidney and liver lines. *In vitro*

toxicological evaluation of this type is routinely conducted before a full toxicological evaluation *in vivo*. The results obtained revealed that both phenanthrene derivatives showed moderate cytotoxicity to all the mammalian cell lines tested (Table 2).

2.5. Conclusion

The results of the present investigation indicate that gymnopusin and erianthridin, secondary metabolites synthesized by several orchids, possess weak phytotoxic properties, and they are responsible for the bulk of the phytotoxic activity present in extracts of *M. densa*. On duckweed tissues gymnopusin induced various ultrastructural changes consistent with membrane destruction at the same time as electrolyte leakage and chlorophyll reduction were occurring. The occurrence of toxic effects in both plant and animal cells is consistent with gymnopusin and erianthridin acting by non-specific effects on membranes. Gymnopusin and erianthridin have molecular weights and calculated octanol/water coefficients in the range observed by Giroux and Miller (2001) to cause non-specific phytotoxic effects. However, the preferential lysis of the tonoplast membrane in duckweed tissue exposed to gymnopusin is consistent with it also acting by a more specific and possibly novel mechanism. Similarly, differences in toxicity of gymnopusin in fronds *versus* roots of duckweed are not consistent with purely non-specific toxic effects. Nevertheless, gymnopusin appears to be 5 to 10 times more toxic to mammalian cells *in vitro*, suggesting it is not very promising as a bioherbicide.

3. Experimental

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.1. Plant material

Whole plants of *M. densa* Lindley (Orchidaceae) were collected in July 1996 from Ejido Ruíz Cortines, Catemaco, State of Veracruz, México. A voucher specimen (Carmona 96-1) was deposited at the Instituto de Ecología Herbarium (XAL), Xalapa, Veracruz.

3.2. Extraction and Isolation of erianthridin and gymnopusin from *M. densa*

Air-dried and ground plant material (2.2 kg) was extracted by maceration at room temperature with a mixture of MeOH : CHCl₃ (1 : 1). The resulting extract was evaporated and the residue (161.2 g) was fractionated by column chromatography on silica gel (775 g). The column was eluted with hexane, followed by a gradient of hexane : EtOAc (1 : 0 → 0 : 1) and finally with a gradient of EtOAc : MeOH (1 : 0 → 1 : 1) as previously described (Estrada et al., 1999). Altogether, 215 fractions (600 ml each) were collected and combined according to their TLC profiles to yield seven primary fractions (F_I to F_{VII}). The bioautographic method employed for monitoring the phytotoxic activity was carried out as previously reported (Mata *et al.*, 1998) and revealed that fraction F_{VI} was the active pool. Active fraction F_{VI} (17.3 g) was further chromatographed on a silica gel column (759 g), and eluted with a gradient of hexane : EtOAc (1 : 0 → 0 : 1). This process led to four secondary fractions (F_{VI-A} to F_{VI-D}). Once more, the bioautographic method showed two active pools, namely, F_{VI-B} and F_{VI-C}. Extensive preparative TLC [silica gel plates, CHCl₃ : EtOAc (8 : 2)] of active fraction F_{VI-B}, eluted with hexane : EtOAc (7 : 3), allowed the isolation of erianthridin (1.3 g). When active fraction F_{VI-C} was eluted with hexane : EtOAc (6 : 4), 1.8 g of gymnopusin crystallized spontaneously.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.3. Inhibition of radical elongation of *Amaranthus hypochondriacus*

The phyto-growth inhibitory activity of the extract and pure compounds on seedlings of *A. hypochondriacus* was evaluated using the Petri dish radicle elongation and germination bioassay at 28°C as previously described (Mata *et al.*, 1998). The results were analyzed by ANOVA ($p < 0.05$), and IC_{50} values were calculated by Probit analysis based on percent of radicle growth or germination inhibition. The extract was evaluated at four concentrations (1, 10, 100 and 1000 µg/ml), whereas fractions and pure compounds were tested at three concentrations (10, 100 and 1000 µg/ml), and 2,4-D was used as the positive control (data not shown).

3.4. Duckweed bioassay

The duckweed bioassay was carried out in triplicate essentially as described by Tanaka *et al.* (1993). Briefly, 20 colonies of three fronds each were incubated 3 days in 3.5 cm polystyrene petri dishes containing 3 ml of half-strength Hunter's medium (Becerril *et al.*, 1992) with the toxin dissolved in 1% (vol/vol) DMSO at 0, 25, 50, 100 and 200 µM. A conductivity meter was used to determine electrolyte leakage by sampling and returning bathing medium to each dish at intervals of 12 h. Data is expressed as percent increase in conductivity over the control. In all the experiments, chlorophyll content was expressed on the basis of fresh weight by first removing duckweed from the bathing media, blotting with paper towels, weighing, then soaking in 5 ml of DMSO at room temperature in the dark for 24 h, at which time chlorophyll extraction was complete. The total chlorophyll was assayed by ultraviolet/visible spectroscopy according the method of Hiscox and Israelstam (1979). Growth inhibition was measured by comparing duckweed fresh weight at the beginning and end of the experiment.

3.5. Microscopy

Gymnopusin-treated duck weed tissue that exhibited toxic effects as indicated by electrolyte release was compared to solvent-treated control tissue. The tissues were placed in a drop of 0.4% glutaraldehyde fixative in 0.01 M cacodylic acid buffer at pH 7.0. The tissue was chopped in the fixative with a single edge razor blade and transferred to a vial containing more of the buffered fixative. The tissue was fixed for 1.5 h, then rinsed for 1 h with 6 changes of glutaraldehyde-free buffer. The tissue was then post-fixed for 1 h in 1% osmium tetroxide in 0.05 M cacodylate buffer pH 7.0. After rinsing in distilled water for a period of 1 h, (6 changes) the tissue was dehydrated in a graded series of acetone to 100% acetone, from which the tissue was embedded and polymerized in Spurr's medium. Semi-thin sections obtained with a diamond knife in a Leica Ultracut E ultramicrotome were mounted on glass slides, stained with toluidine blue and observed using a light microscope. Thin sections were stained with uranyl acetate and Reynolds lead citrate, observed and photographed in a Zeiss EM10 CR transmission electron microscope.

3.6. Cytotoxicity assay

Four permanent mammalian cell lines were used. Untransformed 3T3 Swiss mouse fibroblasts (strain NIH3T3) were obtained from A. Aaronson, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA, and oncogenically transformed 3T3 mouse fibroblasts (strain KA31T, transformed by the Kirsten strain of Moloney sarcoma virus) were obtained from R. Pollack, Columbia University, New York. Rat hepatoma cell line H4TG and dog kidney cell line MDCK were purchased from the American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A. The cells were cultured and the cytotoxicity assays were conducted as described previously (Abbas *et al.*, 1995; Shier *et al.*, 1991).

Briefly, cytotoxicity bioassays were carried out for each cell line out in triplicate 200 μ l cultures in 96-well microtiter trays [Nunc MicroWell (untreated)] with gymnopusin and erianthridin at final treatment concentrations of 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 and 200 μ M in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 5% (vol/vol) calf serum. The wells were inoculated with 10^4 cells from an actively-growing culture and cultured for 5 days at 37°C in a humidified CO₂-containing atmosphere. Growth was evaluated by fixing washed cultures with 3.7% (wt/vol) formaldehyde in saline, staining with two drops of 0.05% (wt/vol) crystal violet in 20% (vol/vol) aqueous methanol, washing away unbound dye with tap water, drying, extracting bound dye by addition of 200 μ l DMSO and measuring absorbance of each well at 562 nm using a microplate photometer (SPECTRAMax PLUS Instrument). Analysis of variance was used to compare percent inhibition values to solvent controls at each concentration for each cell line. IC₅₀ values were estimated from straight lines fitted by the least squares method to the mean percent inhibition values.

Acknowledgements

This investigation was partially supported by grants from DGAPA-UNAM IN-207300 (awarded to R. Mata) and DGEP-UNAM. N.V. acknowledges the fellowship awarded by CONACyT and DGEP-UNAM to carry out graduate studies.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

References

- Abbas, H. K., Tanaka, T., Shier, W. T. 1995. Biological activities of synthetic analogues of *Alternaria alternata* toxin (AAL-toxin) and fumonisin in plant and mammalian cell cultures. *Phytochemistry* 40, 1681-1689.
- Abbas, H. K., Tanaka, T., Duke, S. O., Porter, J. K., Wray, E. M., Hodges, L., Session, A. E., Wang, E., Merrill, Jr., A. H., Riley, R. T. 1994. Fumonisin- and AAL-toxin induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant. Physiol.* 106, 1085-1093.
- Becerril, J., Duke, M. V., Nandihalli, U. B., Matsumoto, H., Duke, S. O. 1992. Light control of porphyrin accumulation in acifluorfen-methyl-treated *Lemna pausicostata*. *Physiologia Plantarum* 86, 6-16.
- Estrada, S., Toscano, R., Mata, R. 1999. New phenanthrene derivatives from *Maxillaria densa*. *J. Nat. Prod.* 62, 1175-1178.
- Giroux, P. Y., Miller, J. R. 2001. Phytotoxicity of pheromonal chemicals to fruit tree foliage: Chemical and physiological characterization. *J. Economic Entomology* 94, 1170-1176.
- Gorham, J., 1995. The Biochemistry of Stilbenoids. Chapman and Hall, London, pp 157-160.
- Hietz, P., Hietz-Seifert, V., de Veracruz, E. 1994. Guía ilustrada para las regiones de Xalapa y los Tuxtlas, Veracruz; Instituto de Ecología, A. C. Veracruz, México, p 48.

Hiscox, J. D., Israelstam, G. F. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissues without maceration. *Can. J. Bot.* 57, 1332-1334.

Lee, T. T., Rock, G. L., Stoessl, A. 1978. Effects of orcinol and related phenanthrenes on the enzymic degradation of indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* 17, 1721-1726.

Majumder, P. L., Banerjee, S. 1989. Revised structure of gymnopusin, a ring BB oxygenated phenanthrene derivative isolated from the orchid *Bulbophyllum gymnopus*. *Indian J. Chem.* 28B, 1085-1088.

Majumder, P. L., Joardar, M. 1985. Erianthridin, a new 9,10-dihydrophenanthrene derivative from the orchids *Eria carinata* and *Eria stricta*. *Indian J. Chem.* 24B, 1192-1194.

Mata, R., Macías, M., Rojas, S., Lotina-Hensen, B., Toscano, R., Anaya, A. 1998. Phytotoxic compounds from *Esembeckia yaxhoob*. *Phytochemistry* 49, 441-449.

Shier, W. T., Abbas, H. K., Mirocha, C. J. 1991. Toxicity of the mycotoxins fumonisins B1 and B2 and *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxin (AAL) in cultured mammalian cells. *Mycopathologica* 116, 97-104.

Tanaka, T., Abbas, H. K., Duke, S. O. 1993. Structure-dependent phytotoxicity of fumonisins and related compounds in a duckweed bioassay. *Phytochemistry* 33, 779-785.

Figure Captions

Figure 1. Structures of erianthridin and gymnopusin from *Maxillaria densa*.

Figure 2. Electrolyte leakage from duckweed exposed to gymnopusin (100 μM) for 72 h. Electrolyte leakage was measured by the change in electrical conductivity in the bathing medium relative to untreated control duckweed. Values are the means of three replicates \pm standard deviation at each time.

Figure 3. Transmission electron micrographs of duckweed frond tissue.

- A. Control, zero time. The chloroplasts have fully developed thylakoids with small grana stacks. Some small starch grains are present. Ch = chloroplast; I = intercellular space; N = nucleus. Bar = 1 μm .

- B. Treated with 100 μM gymnopusin for 12 h. Some damage appears at this time. Pictured here are three adjacent cells, of which the top cell is relatively undamaged. The damaged cells appear to have ruptured tonoplasts, since there are organelles floating freely in the cells. Mt = mitochondrion; S = starch grain; V = vacuole. Bar = 1 μm .

- C. Treated with 100 μM gymnopusin for 24 h. Some cells at this time exhibit loss of cytoplasm content. The relatively intact chloroplasts in this example appear to float freely within the cell, again indicating a ruptured tonoplast. Bar = 5 μm .

- D. Treated with 100 μM gymnopusin for 48 h. The rate of deterioration of cells exposed to the toxin varies greatly within each sample time. Here, the heavily starch-laden chloroplasts are still contained within a relatively intact, though diffuse cytoplasm. There is evidence, however, that the tonoplast is not intact (arrows). Bar = 1 μm .
- E. Treated with 100 μM gymnopusin for 60 h. In this cell, large starch grains and lipid bodies, which may be a sign of membrane deterioration, are present in the chloroplasts and the cytoplasm (black arrows). Grana stacks (white arrows, lower center and center left) are still present in the thylakoids. No tonoplast is evident. Bar = 1 μm .
- F. Treated with 100 μM gymnopusin for 72 h. The chloroplasts are showing thylakoid disruption. Lamellae are beginning to swell. Bar = 1 μm .

Figure 4. Light (LM) and transmission electron (TEM) micrographs of duckweed root tissue.

- A. Light micrograph of control tissue after 72 h in culture. This photograph shows the root tip and the intact root cap. RC = root cap. RT = root tip. Bar = 50 μm .
- B. Transmission electron micrograph of control tissue after 72 h in culture. This micrograph shows the nucleus, chloroplasts and numerous small vesicles of adjacent root tip cells. The chloroplasts have small starch inclusions. Nu = nucleolus. Bar =

1 μm .

- C. Transmission electron micrograph of control tissue after 72 h in culture. At high magnification, chloroplasts are shown to have small starch inclusions and thylakoids with small grana. Ch = chloroplast. Bar = 1 μm .
- D. Light micrograph of tissue treated for 72 h with 100 μM gymnopusin. This root tip, shows typical damage caused by the toxin. Root tip cells at the apex manage to grow and divide but rapidly become highly vacuolated and distinct from comparable cells in the control (Fig. 4A). The root cap has been lost, which is a characteristic of toxins on root tips. Bar = 50 μm .
- E. Transmission electron micrograph of tissue treated for 72 h with 100 μM gymnopusin. A micrograph of root tip cells in the treated tissue appears similar to the control (compare to Fig. 4C) with the exception of large starch grains within the chloroplast stroma. Vacuoles become more irregular, which may be due to tonoplast disruption. Bar = 1 μm .

Table 1. Effect of crude extract, erianthridin and gymnopusin from *Maxillaria densa* on *Lemna pausicostata* cultures^a at 72 h.

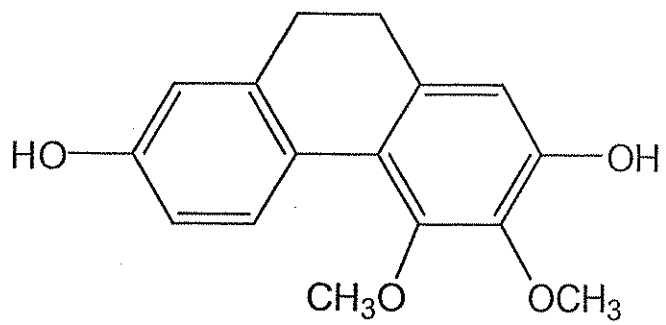
Treatment	Concentration (ppm or μM)	Conductivity Leakage ($\mu\text{mho/cm}$)	Growth inhibition (%)	Chlorophyll reduction (%)
Media (M)	--	0.0 ± 51.6	0.0 ± 2.1	0.0 ± 13.1
M+DMSO	--	16.3 ± 14.1	5.3 ± 4.2	0.0 ± 18.2
Extract	31.3 ppm	188.5 ± 25.0	29.8 ± 2.8	29.4 ± 6.7
	62.5 ppm	169.3 ± 28.0	36.8 ± 2.8	62.6 ± 1.6
	125 ppm	218.5 ± 14.1	52.6 ± 2.1	64.5 ± 9.7
	250 ppm	303.5 ± 35.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	500 ppm	303.5 ± 7.1	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	1000 ppm	361.5 ± 35.4	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Erianthridin	25 μM	130.2 ± 8.5	19.6 ± 2.7	6.9 ± 5.2
	50 μM	121.7 ± 3.5	33.3 ± 5.5	14.2 ± 9.2
	100 μM	184.2 ± 3.5	56.9 ± 5.5	35.8 ± 19.1
	200 μM	245.2 ± 4.2	100.0 ± 0.0	60.9 ± 18.3
Gymnopusin	25 μM	8.8 ± 2.1	13.7 ± 0.0	23.7 ± 19.4
	50 μM	77.2 ± 1.4	19.6 ± 2.7	70.7 ± 5.9
	100 μM	214.2 ± 11.3	100.0 ± 0.0	69.7 ± 9.8
	200 μM	238.2 ± 0.0	100.0 ± 0.0	85.0 ± 18.6

^aResults are the means of three replicates \pm standard deviation. All samples exhibited significantly ($P < 0.005$, Student's unpaired t -test) higher phytotoxicity than the controls at all concentrations tested.

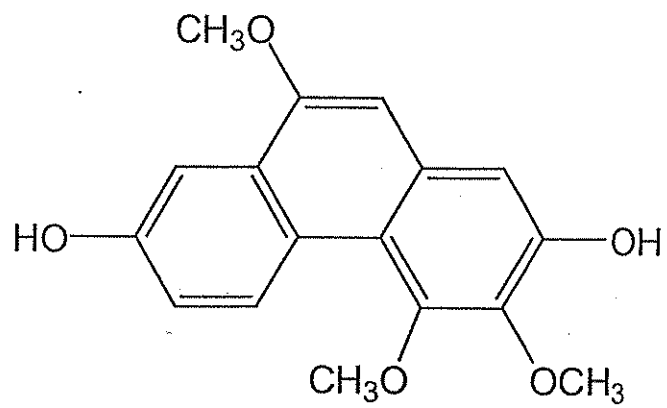
Table 2. Cytotoxicity of erianthridin and gymnopusin in cultured mammalian cell lines.

Compound	IC ₅₀ (μM) ^a			
	H4TG	MDCK	NIH3T3	KA31T
Erianthridin	20.0 ± 1.1	10.2 ± 0.5	19.3 ± 0.9	13.0 ± 0.3
Gymnopusin	13.0 ± 0.9	11.0 ± 0.5	12.0 ± 1.0	21.0 ± 0.5

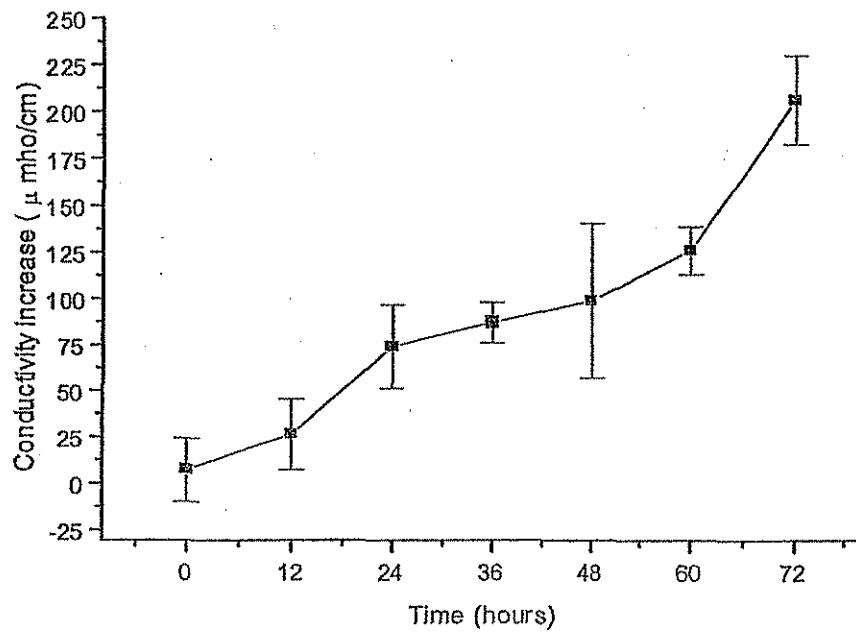
^aThe concentration of toxin which causes a 50% reduction in cell-bound dye after 5 days in culture. Cell lines used were H4TG, thioguanine-resistant rat hepatoma cells; MDCK, Madin-Darby canine kidney cells; NIH3T3, NIH Swiss mouse embryo fibroblasts and KA31T, Kirsten strain of Moloney sarcoma virus-transformed 3T3 cells.

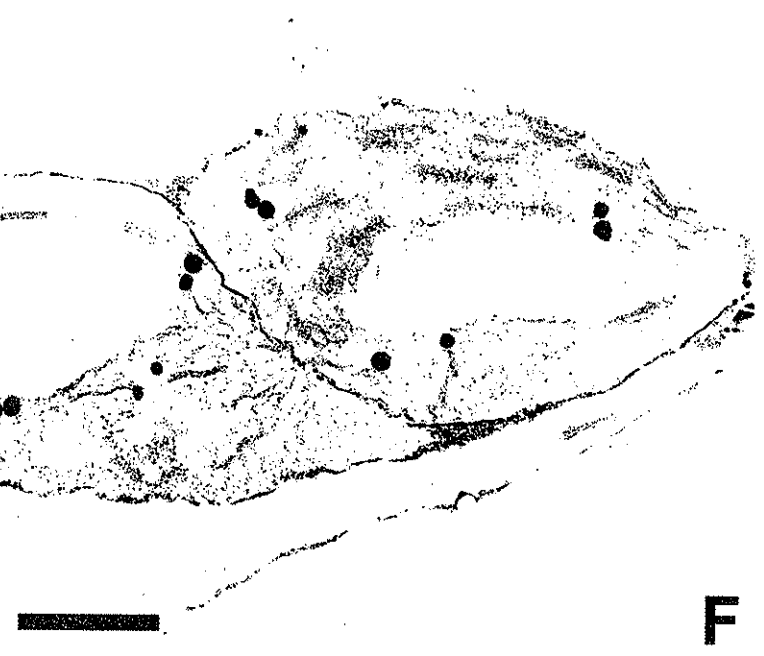
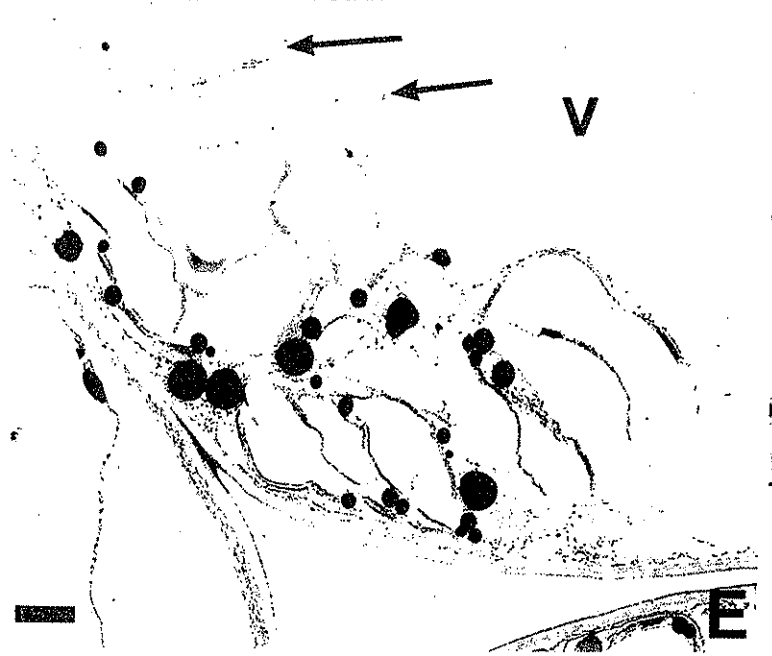
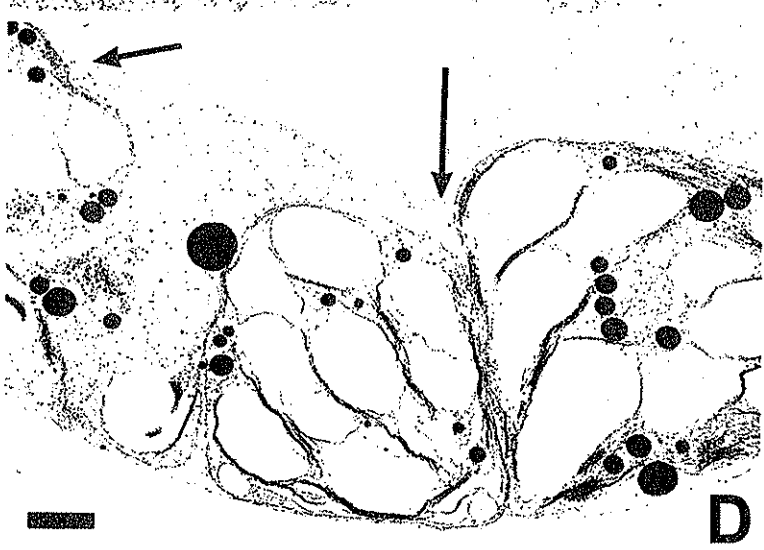
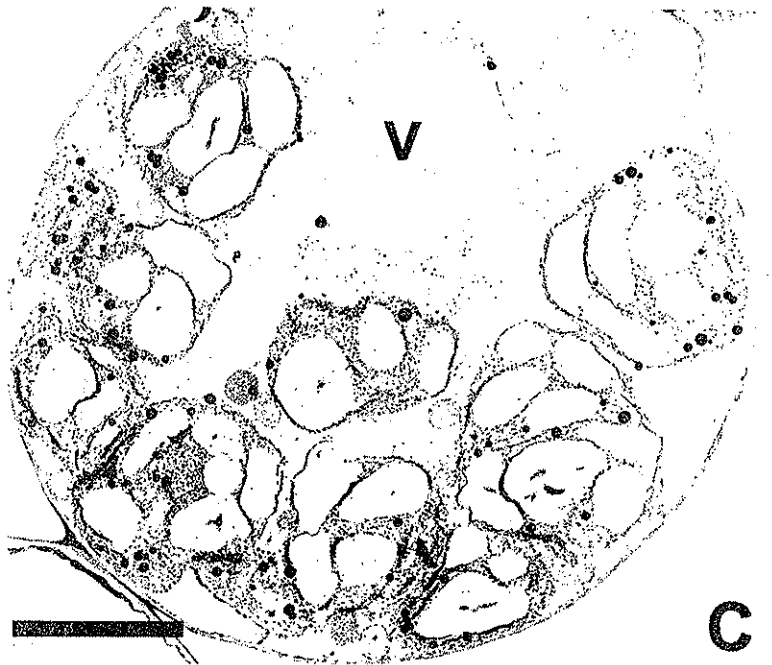
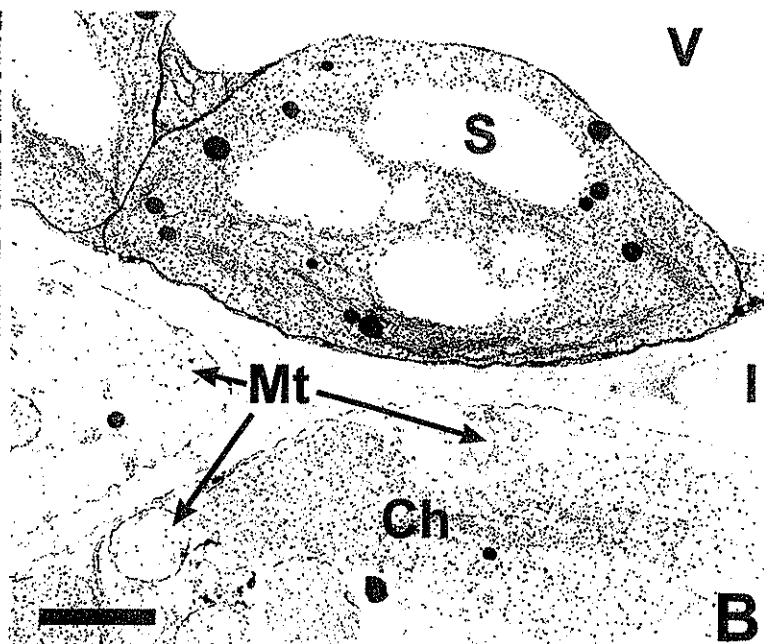
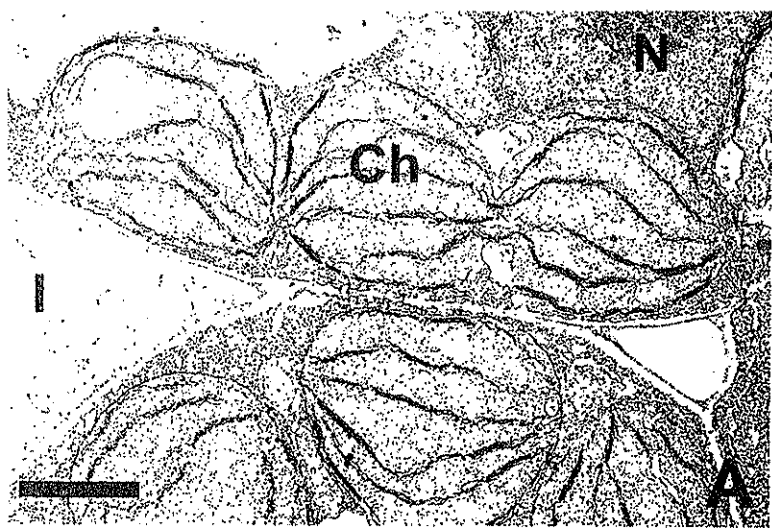


Erianthridin



Gymnopusin





TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

