



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

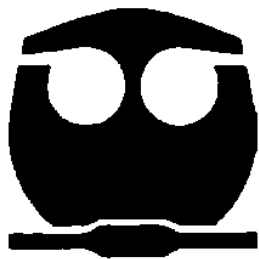
FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DE LA PLANTA *Cecropia obtusifolia*. Bertol,
PARA LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON POSIBLE
ACTIVIDAD HERBICIDA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A

Q.F.B FÉLIX MORALES FLORES



MÉXICO, D. F.

2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México



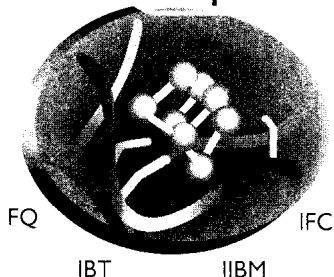
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Ciencias
Bioquímicas



UNAM
POSGRADO
Ciencias Bioquímicas

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ENTIDADES CAMPUS CIUDAD DE MÉXICO

Of. No. PMDCB/136/2010

FÉLIX MORALES FLORES

Alumno de la Maestría en Ciencias Bioquímicas

P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico, en reunión ordinaria del día 15 de febrero del presente año, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICA), con la tesis titulada "Fraccionamiento biodirigido de la planta *Cecropia obtusifolia* Bertol, para la obtención de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida", dirigida por el Dr. Blas Lotina Hensen.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Diego González Halphen
VOCAL	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
SECRETARIO	Dra. Irma Romero Alvarez
SUPLENTE	Dra. Sobeida Sánchez Nieto
SUPLENTE	Dra. Marina Gavilanes Ruiz

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

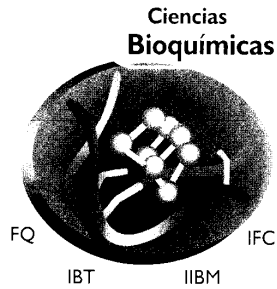
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de febrero de 2010.

EL COORDINADOR DE LA ENTIDAD ACADÉMICA


DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

C.c.p. Archivo

RRS*lgg



**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**A LOS MIEMBROS DE
JURADO DE EXAMEN**

*Por medio del presente manifiesto que he revisado el texto que será sometido a su consideración del(a) alumno (a) de Maestría en Ciencias Bioquímicas **FÉLIX MORALES FLORES**, titulado:*

“Fraccionamiento biodirigido de la planta *Cecropia obtusifolia* Bertol, para la obtención de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida”

ATENTAMENTE


**DR. BLAS LOTINA HENSEN
TUTOR**

Cada uno de nosotros tiene dentro de sí la capacidad para dar forma a su propio destino. Hasta ahí, todos lo entendemos. Pero hay algo más importante: cada cual tiene también capacidad para dar forma al destino del universo. ¡Ah!, eso resulta más difícil de creer. Pero os aseguro que es así. No es preciso ser el líder del Consejo de los Siete. No es preciso ser un monarca o el dirigente de un clan para tener una influencia importante en el mundo que nos rodea.

En la inmensidad del océano, ¿alguna gota de agua es más grande que otra?. “No” diréis. “Pero una gota sola tampoco tiene la capacidad de causar una marejada”.

Pero yo digo que basta con que caiga una gota en el océano para que cree pequeñas ondas. Y para que estas ondas se extiendan. Y quizá, ¿Quién sabe?, esas pequeñas ondulaciones alcancen a crecer, a cobrar fuerza y finalmente rompan contra la orilla, espumeantes.

Igual que una gota en el vasto mar, cada uno de nosotros causa pequeñas olas en el transcurso de su vida. Los efectos de nuestros actos, por insignificantes que puedan parecer, se difunden más allá de nosotros. Tal vez no lleguemos a saber nunca que efecto trascendente puede tener el acto más sencillo en los demás mortales. Así, en todo momento debemos ser conscientes de nuestro lugar en el océano, de nuestro lugar en el mundo, de nuestro lugar entre los pueblos. “Pues, si unimos las fuerzas en número suficiente, podemos impulsar la marea de los acontecimientos.....

.....PARA BIEN O PARA MAL”.

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-PAPIIT-DGPA) con clave de proyecto IN211309.

Al programa de Apoyo a Licenciatura y Posgrado (PAPIT) de la UNAM Facultad de Química con clave: 6290-03.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para cursar mis estudios de Maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me dio la oportunidad de formar parte de ella y en la cual viví muchas experiencias que me hicieron crecer como personay formaron mi carácter.

Al personal académico de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química UNAM: M. en C. Georgina Duarte Lisci, Q. Margarita Guzmán Villanueva, M. en C. Rosa Isela del Villar Morales, Q.F.B. Marisela Gutiérrez y Q. Alejandrina Acosta por el registro de los espectros para el análisis espectroscópico.

A mi comité Tutoral: DR. Blas Lotina Hennsen, DR. Salvador Uribe Carbajal y DRa. Sobeida Sánchez Nieto, por su paciencia y sus valiosas aportaciones y consejos durante la realización del proyecto.

Aunque en la portada únicamente aparece mi nombre, sería faltar a la verdad decir que este trabajo lo escribí solo; ya que un trabajo como este lleva consigo una impresionante acumulación de deudas. No todas pueden ser consignadas aquí, ya que no me alcanzaría el espacio, pero hay muchas a quienes debe adjudicarles el puesto que merecen al principio de este trabajo.

A Dios:

Por haberme dado la oportunidad de estar en este mundo, y colocarme en la familia que me toco, por permitirme alcanzar las metas que me he fijado y por cumplir algunos de mis caprichos.

A mis padres:

Quiero agradecerles por todo el apoyo que me han dado a lo largo de mi vida, desde los principios que me inculcaron, hasta las noches de desvelo que les hice pasar; por todos los sacrificios que han hecho por mi para que pudiera llegar hasta donde me encuentro y por que a pesar de todo siempre encontraron tiempo para ayudarme y sin embargo lo único que puedo hacer en este pequeño espacio es agradecerles y decirles que al fin lo logramos, ya que jamás podría terminar de agradecerles por todo lo que hicieron.

A mis hermanas:

Sé que como en toda familia, casi siempre discutimos, y muy pocas veces estuvimos de acuerdo, pero aún así siempre estuvieron cuando las necesite, me brindaron su apoyo, y de alguna manera me hicieron reír cuando no me sentía bien, creo que entre hermanos es difícil aceptar el amor que existe pero ahí está y es por ello que solo me resta darles las gracias por formar parte de mi vida.

A Jenny:

Por permitirme formar parte de su vida, por su apoyo incondicional y por soportarme durante todo este tiempo, por no dejarme vencer cuando sentía que no podía, y por ponerme a trabajar cuando estaba de ocioso, con todo mi amor.

Al profesor Blas:

Gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar con usted desde la licenciatura y permitirme continuar con la Maestría bajo su tutela, con mucho respeto y admiración.

A la profesora Bety:

Gracias por el apoyo dado en la realización de esta tesis, ya que le toco todo el trabajo pesado, me soporto durante todo este tiempo, me oriento y se encargo de que este trabajo estuviera bien hecho.

A la doctora Isabel y al Doctor Fausto.

Un especial agradecimiento, ya que sin deberla ni temerla me ayudaron con toda la parte fitoquímica, y orgánica, sin la cual este trabajo no se hubiera podido realizar.

A todos los compañeros del laboratorio 115:

Por haber hecho agradable mi estancia mientras se realizaba este trabajo, gracias a Aidee por sus palabras de aliento y apoyo cuando me sentía mal, a Nery por acompañarme a todas partes y recordarme que soy habilidoso, a Natalia y Mailet por su compañía y por no dejarme solo, a Bryan y Chucho por su ayuda y sus ocurrencias sin las cuales me hubiera aburrido y probablemente hubiera desertado.

A mis compañeros de la Facultad de Química y otros amigos:

Aidee, Ramón y Angel quienes han estado conmigo desde la secundaria, A Dice, mi mejor amiga de la preparatoria y mi consejera, Alejandro, Moisés, Helena, Edgar, Yadira quienes me acompañaron a lo largo de la carrera e incluso ahora me dan su apoyo, al Tte. Salas, el Oficial Archundia y al Cabo Dan, por ayudarme a sacar el estrés invadiendo mundos, a Calu, quien con sus ocurrencias y consejos hizo mi vida más placentera, a Marisol y Gaby, quienes evitaban que muriera de hambre, Isaac, Alejandro Zarco, y muchos otros que estuvieron a mi lado todo este tiempo.

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	7
3. ANTECEDENTES.....	9
3.1. Generalidades de la familia Cecropiaceae.....	9
3.2. Generalidades de <i>Cecropia obtusifolia</i>	9
3.3. Alelopatía.....	13
3.4. Herbicidas.....	13
3.5. Fotosíntesis.....	15
3.6. Aceptores de electrones.....	26
3.7. Inhibidores del transporte de electrones.....	27
3.8. Inhibidores de la transferencia de energía.....	28
3.9. Desacoplantes.....	28
3.10. Fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	29
2.11. Germinación.....	32
4. HIPÓTESIS.....	34
5. OBJETIVOS.....	34
5.1. Principal.....	34
5.2. Particulares.....	34
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	35
6.1. Obtención de los metabolitos secundarios.....	35
6.2. Bioensayos.....	38

7. RESULTADOS.....	46
7.1. Determinación de la germinación y crecimiento de raíz y tallo de <i>Lolium perenne</i> y <i>Trifolium alexandrinum</i> en presencia de los extractos de <i>C. Obtusifolia</i>	46
7.2. Actividad inhibitoria de la síntesis de ATP.....	50
7.3. Fraccionamiento del extracto hexánico de hojas de <i>Cecropia obtusifolia</i>	50
7.4. Fraccionamiento del extracto clorofórmico de hojas de <i>Cecropia obtusifolia</i>	58
7.5. Efecto de la fracción 126-190 sobre la síntesis de ATP.....	60
7.6. Efecto de M1 sobre el transporte de electrones.....	63
7.7. Sitios de interacción de M1 sobre la fotosíntesis y sus reacciones parciales.....	64
7.8. Fluorescencia de la clorofila <i>a</i> en presencia de M1	65
7.9. Determinación de la biomasa seca de <i>Lolium perenne</i>	70
7.10. Determinación de la actividad tóxica a <i>Artemia salina</i> de la fracción M1	71
8. DISCUSIÓN.....	73
9. CONCLUSIONES.....	80
10. PERSPECTIVAS.....	81
11 APÉNDICES.....	82
11.1. Apéndice 1: Medios.....	83
11.2. Apéndice 2: Espectros.....	86
12. REFERENCIAS.....	122

Lista de Abreviaturas

A _o	Aceptor de electrones primario del Fotosistema I
AcOEt	Acetato de etilo
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina.
CF ₀	Parte lipofílica del complejo CF ₁ CF ₀ –ATPasa
CF ₁	Parte hidrofílica del complejo CF ₁ CF ₀ –ATPasa
Chl	Clorofila
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>
Cyt b ₆ /f	Complejo Citocromo b ₆ /f
DAD	2,3,5,6-tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina
DBMIB	2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil- <i>p</i> -benzoquinona
DCMU	3-(3,4-dicloro-fenil)-1,1-dimetilurea
DCPIP	2,6- Dicloro fenol indofenol
DEPT	Prueba de desacoplado de protones
DMQ	2,5-dimetil- <i>p</i> -benzoquinona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPC	Difenilcarbazida
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
F	Fluorescencia
F ₀	Fluorescencia inicial
F _A	Ferredoxina tipo A
F _B	Ferredoxina tipo B
Fd	Ferredoxina
Fm	Fluorescencia máxima
FS I	Fotosistema I
FS II	Fotosistema II
Fv	Fluorescencia variable = Fm-F ₀
Hex-AcOEt	Mezclas de hexano acetato de etilo.

IDH	Índice de Deficiencia de Hidrógeno
IR	Espectroscopia infrarroja
J	Constante de acoplamiento
KD	Constantes de velocidad vía calor
Kf	Constantes de velocidad vía fluorescencia
KP	Constantes de velocidad de excitación vía fotoquímica
mM	Milimolar
MV	1,1'-Dimetil-4,4'-bipiridinium dicloro "Metil viologeno"
OEC	Complejo productor de oxígeno
P ₆₈₀	Centro de reacción del FSII
P ₇₀₀	Centro de reacción del FSI
PC	Plastocianina
Pi	Fosfato inorgánico
PMS	Fenil metasulfato
Ppm	Partes por millón
PQ	Plastoquinona
Q _A	Aceptor de electrones primario del Fotosistema II
Q _A ⁻	Aceptor de electrones primario reducido del Fotosistema II
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
SiMo	Silicomolibdato de sodio
TMQH ₂	Tetrametil- <i>p</i> -benzoquinona reducida
Tricina	{N-[tris (hidroximetil) metil]-glicina}
UV	ultravioleta
V(t)	Fluorescencia variable relativa
λ _{máx}	Longitud de onda máxima

1. RESUMEN

El presente trabajo describe el fraccionamiento biodirigido de la planta *Cecropia obtusifolia* Bertol para la obtención de compuestos con posible actividad herbicida. La estrategia metodológica se inició con la preselección y la selección de la especie, seguido del estudio biodirigido y culminó con la caracterización química y bioquímica de los compuestos obtenidos. La preselección de *C. obtusifolia* se fundamentó en una revisión bibliográfica en la que se encontraron pocos reportes relacionados con la actividad química y bioquímica de esta especie en particular. En la literatura están descritos estudios acerca de la actividad hipoglucemiante [1,2,3], efectos sobre el sistema nervioso central y actividad antiinflamatoria [4], diuresis [5] y actividad hipotensora [6,7] de dicha planta. Por otra parte la aplicación de los ensayos biológicos de tamiz (Modelo de inhibición de la germinación y medición de la inhibición de la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinacas) a los extractos orgánicos llevó a proponer esta planta como un candidato para la obtención de metabolitos secundarios como posibles agentes herbicidas.

El estudio biodirigido empleando el modelo de inhibición de la germinación de plantas monocotiledóneas (*Lolium perenne*) y dicotiledóneas (*Trifolium alexandrinum*) mostró que los extractos no poseen actividad inhibitoria. Los resultados de la evaluación de los extractos en la prueba de inhibición de la síntesis de ATP, indicaron que los extractos hexánicos y cloroformicos tanto de tallos como de hojas fueron los más activos. Los extractos de tallos no fueron investigados debido a la poca cantidad obtenida (de 3 a 5 gr).

El fraccionamiento biodirigido de los extractos activos, permitió la obtención de una mezcla de hidrocarburos de alto peso molecular, una mezcla de esteroides reportados anteriormente (β -sitosterol, estigmasterol y campesterol) [8,9], un glucósido de β -sitosterol (β -D-glucopiranosido de β -sitosterol), dos mezclas diferentes de ésteres de ácidos grasos, así como una tercera mezcla de ácidos

grasos con un triterpeno (Ursa-9(11), 12dien-3-ol) (**M1**). Esta tercera mezcla fue la empleada para realizar los ensayos polarográficos y de fluorescencia de la clorofila *a* de forma que se pueda conocer su mecanismo de acción. De manera general, la elucidación estructural de los compuestos aislados se llevó a cabo mediante la aplicación de métodos espectroscópicos.

Para caracterizar el sitio y mecanismo de acción de **M1** se ensayó el efecto de estos compuestos en el flujo de electrones basal, fosforilante y desacoplado de cloroplastos aislados de espinaca. Se encontró que **M1** inhibe el flujo de electrones en las tres condiciones, los resultados indican que se comporta como inhibidor de la Reacción de Hill. Para localizar el sitio de inhibición de esta mezcla, se ensayó su efecto en las reacciones parciales de la fotosíntesis. Los resultados indican que **M1** inhibe el flujo de electrones en el fotosistema II (FS II) tanto del lado donador como del lado aceptor de electrones.

Para evaluar el potencial post-emergente de **M1**, esta mezcla fue aplicada en las hojas de plantas de trébol (*Trifolium alexandrinum*) y pasto (*Lolium perenne*) de 15 días de crecimiento en el invernadero, no observándose efecto alguno en la disminución en la biomasa.

La evaluación de la mezcla sobre la sobrevivencia de las larvas del crustáceo *Artemia salina* permitió determinar que la mezcla **M1** no es tóxica, ya que presenta un valor de concentración letal media (CL₅₀) mucho mayor a 1000 µg/ml

En conclusión, los resultados obtenidos para la mezcla **M1** por medio de este estudio nos indican claramente que se comporta como un inhibidor de la reacción de Hill; y que su sitio de inhibición *in vitro* empleando cloroplastos aislados de espinaca es en el FS II tanto del lado donador como aceptor de electrones. Sin embargo estos compuestos no poseen un efecto herbicida, ya que no poseen un efecto *in vivo*.

2. INTRODUCCIÓN.

Las malas hierbas o malezas son consideradas actualmente como la limitante que afecta en mayor proporción el rendimiento de los cultivos, ya que compiten con estos por luz, agua y nutrientes, además reducen la calidad del producto cosechado, son hospederas de plagas y enfermedades e interfieren con las labores de cosecha. Por tal motivo estas plagas deben ser controladas, ya que de lo contrario los rendimientos de los cultivos se ven drásticamente afectados. Así, el hecho de no controlar las malezas en cultivos como trigo y maíz se traduce en la disminución del rendimiento en por lo menos 30%, pudiendo llegar a 80 ó 90% en casos de extrema interferencia [10]. Antes de la introducción de los herbicidas selectivos, la eliminación de las malezas en los cultivos se realizaba manualmente; además, para aumentar la producción agrícola se empleaban otras técnicas como la rotación de cultivos, una adecuada labranza y un sistema de barbecho [11].

En la década de los 40's la introducción de los herbicidas selectivos y el constante flujo de nuevos herbicidas en los años subsecuentes, armó a los agricultores con una nueva herramienta, "el azadón químico"; sin embargo, el uso excesivo de los herbicidas y otros plaguicidas con el fin de minimizar el impacto de las malezas, enfermedades y otras plagas sobre las cosechas, está produciendo una serie de efectos adversos, entre los que se pueden destacar los relacionados con el ambiente: contaminación de suelos y acuíferos, desarrollo de especies resistentes, acumulación de plaguicidas en los productos finales de la cadena de producción y mayor vulnerabilidad de las especies cultivadas frente a sus parientes silvestres [11,12].

Bajo este contexto la industria de los pesticidas continúa en la búsqueda de compuestos más eficaces, económicos y benignos con el medio ambiente, que puedan ser utilizados como herbicidas, para lo cual, se cuenta con cuatro líneas de búsqueda: 1) cernimiento de moléculas sintéticas, 2) síntesis de análogos de moléculas comerciales, 3) diseño molecular de herbicidas basados en un sitio blanco en particular y 4) cernimiento de productos naturales [13]. La mayoría de

los herbicidas comerciales han sido el resultado de la primera de estas estrategias, a las cuales se han sumado nuevas herramientas como la química combinatoria y la teoría de la diversidad química. Las dos últimas estrategias son de gran interés debido a la necesidad de contar con compuestos que posean nuevos sitios de interacción, siendo los compuestos naturales considerados más benignos para el medio ambiente debido a su relativo tiempo de vida media corto comparado con la de los pesticidas sintéticos y por formar parte de la naturaleza [13,14]. Por ello la caracterización química y biológica de compuestos naturales novedosos representa una fuente de estructuras prototipo para el desarrollo de derivados sintéticos y semisintéticos con una actividad biológica selectiva y en lo posible, con una toxicidad reducida [15].

Las plantas producen miles de compuestos que no están involucrados en el metabolismo primario; cuyas funciones específicas desconocidas. Aunque se ha encontrado que algunos de estos compuestos sirven para atraer insectos benéficos para la planta o animales que dispersen las semillas (asegurando así la reproducción de la planta), la mayoría de estos compuestos parecen actuar como agentes contra insectos dañinos, organismos patógenos y plantas rivales [16]. Estos compuestos se conocen como aleloquímicos y son liberados al medio ambiente por volatilización, exudación de la raíz, muerte y decaimiento de las plantas y filtración de residuos vivos o decadentes [17]. Son varios los factores que influyen en su toxicidad, como la concentración, la tasa de flujo, edad y estado metabólico de la planta, así como las condiciones climáticas y ambientales que predominan. La producción de estos aleloquímicos varía en calidad y cantidad dependiendo de la edad de la planta, el órgano productor y la estación del año, así como de los factores bióticos (enfermedades, daños causados por insectos, etc.) y los abióticos (temperatura, humedad, etc.) [18].

3. ANTECEDENTES.

3.1. Generalidades de la familia *Cecropiaceae*.

Familia de distribución pantropical que comprende seis géneros (*Cecropia* Loefl., *Coussapoa* Aubl. y *Pourouma* Aubl. (América); *Myrianthus* P. Beauv. y *Musanga* R. Brown (África); *Poikilospermum* Zipp. ex Miq. (restringida a la región Asia-Australasia)) y de 180 a 200 especies. [19].

En cuanto a la importancia económica de la familia, los frutos de *Cecropia* y *Pourouma* son comestibles. La madera de *Cecropia* se utilizó como pulpa para la fabricación de papel pero presentó problemas por la cantidad de gomas y resinas que contiene. Algunas especies de *Cecropia* se han introducido en otras regiones de los trópicos aunque se menciona que ocasiona problemas al convertirse en maleza invasora [20].

El género está representado por árboles, arbustos o lianas, terrícolas, con raíces aéreas, monoicos o dioicos, con jugo acuoso que se torna negro en contacto con el aire; hojas simples, dispuestas en espiral; flores pequeñas, solitarias o cuando son muchas agrupadas en cabezuelas o espigas; flores masculinas con 1 a 4 estambres, con los filamentos rectos en el botón; flores femeninas con ovario libre, óvulo solitario; semillas pequeñas y con endospermo o grandes y sin endospermo; embrión recto, los dos cotiledones de la misma longitud, aplanados o engrosados [19].

3.2. Generalidades de *Cecropia obtusifolia*.

Nombre botánico: *Cecropia obtusifolia*, *Cecropia mexicana* Hems [20].

Nombres comunes: Chancarro (Ver, Oax.); Guarumo (Chis.); Guarina (Tab., Chis.); Hormiguillo (Pue.); Sarumo (Mich.); Trompeta (Sin.); Palo de violín, Trompeta, Trompetilla (S.L.P.) [20].

Es un árbol perennifolio de entre 20 y 35 metros de altura y con un diámetro de hasta 50 cm. Posee una copa estratificada, con todas las hojas expuestas a la luz directa del sol. Las hojas son palmado-divididas, con un diámetro de 25 a 50 cm, su coloración es verde oscuro y brillante en el haz, mientras que en el envés es grisácea con nervación rojiza. El tronco de este árbol es monopódico, recto, cilíndrico y hueco en el centro, de color gris y con superficie lisa; se sujeta a la tierra a través de raíces aéreas, del tipo zancudas, con un tamaño de entre 0.5 y 1 m. de altura. Las flores, que se encuentran presentes casi todo el año, son unisexuales y en forma de espiga, con una longitud de entre 12 y 21 cm. de largo.

Presenta infrutescencia de color verde amarillenta o pardo oscuro, la cual contiene alrededor de 4000 semillas (contenidas cada una en un aquenio) y tiene sabor parecido al del higo (Figura 1)



Figura 1: *Cecropia obtusifolia*

El hábitat de esta especie es cerca de los arroyos, claros o bordes de las selvas de zonas tropicales cálido-húmedas, y en México se le puede encontrar en la vertiente del Golfo desde Tamaulipas hasta Quintana Roo y en la vertiente del Pacífico desde Sinaloa hasta Chiapas [20].

Usos: Los usos de esta planta son muy variados, desde el uso artesanal (los tallos huecos se han utilizado para hacer boyas para redes de pescar y para salvavidas; partiendo a la mitad los troncos se han usado como canales para agua y cunetas; la madera se mezcla con cemento para hacer pajilla de madera; la corteza está constituida por una fibra larga, resistente, que es usada para fabricar cuerdas ordinarias y para pulpa de papel [21]); comestible (infrutescencia), hasta usos medicinales como son para el tratamiento de afecciones cardíacas, nerviosas, asma, resfriado común y como antidiabético, siendo este último su uso más importante (el tratamiento consiste en emplear la infusión de las hojas, ramas, corteza o raíz como agua de uso). También ha sido reportado el carácter alelopático proveniente del extracto de las hojas, afectando la germinación y el crecimiento de algunas especies de plantas [20].

Composición química: De esta planta se han aislado algunos compuestos que se muestran en la Tabla 1.

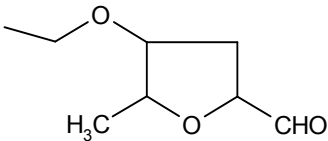
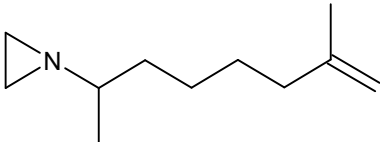
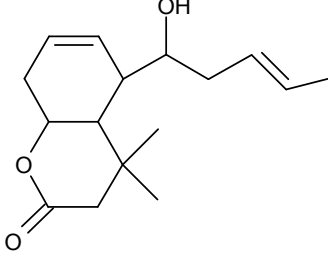
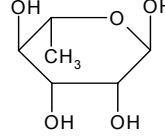
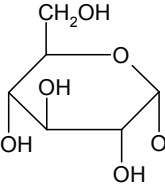
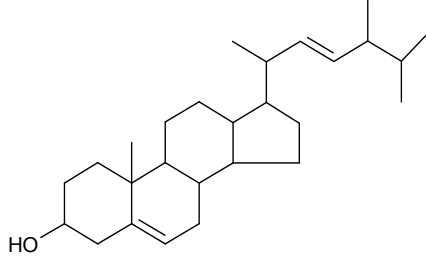
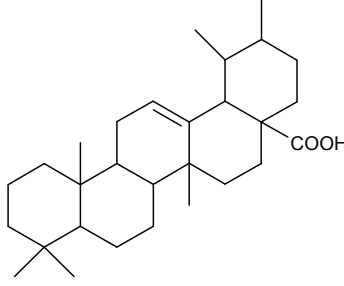
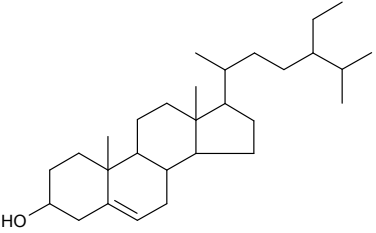
Tabla 1. Compuestos aislados de <i>Cecropia obtusifolia</i> Bertol			
Metabolitos	Nombre	Estructura	Referencia
Furanos.	5-etoximetilfurfural		8
Ariziridina	1-(2-metil-1-nonen-8-il)-aziridina		8

Tabla 1 (cont). Compuestos aislados de <i>Cecropia obtusifolia</i> Bertol			
Cumarinas	4-etil-5-(n-3-valeroil) Δ^6 -hexahidro-cumarina		8
Azúcares	Ramnosa.		8
	α -D-glucosa		8
Terpenos	Estigmasterol.		8
	Ácido Ursólico		8
	β -sitosterol		9

3.3. Alelopatía.

Este término se refiere a los efectos perjudiciales de plantas superiores de unas especies (donador) sobre la germinación, crecimiento o desarrollo de plantas de otras especies (receptor) [10].

3.4. Herbicidas.

La palabra herbicida proviene del latín *herba*, planta, y *caedere*, que significa matar. Así por su etimología, los herbicidas son productos químicos que se utilizan para alterar la fisiología de la planta por un periodo de tiempo relativamente largo, afectando severamente su crecimiento u ocasionando su muerte [10].

Se sabe que los sitios primarios de acción de los herbicidas orgánicos pueden ser cualquier enzima en una vía metabólica o una proteína que regule la actividad de la enzima. Muchos de los sitios de ataque de los herbicidas en las malezas son desconocidos a nivel molecular. Los sitios de ataque mejor conocidos son la fotosíntesis, la formación de microtúbulos y la biosíntesis de carotenos [22]. La Tabla 2 muestra algunos herbicidas sintéticos, así como su sitio de acción.

Tabla 2: Algunos herbicidas sintéticos así como su sitio de acción.	
Compuesto	Sitio de acción
Triazinas de azufre	FS II [23].
Diquat y Paraquat (MV)	FS I [24].
Bijiridilo	Compite con los aceptores de electrones del FSII [25].
Atrazina	Oxidación de agua [25].
Diuron	Transferencia de electrones a plastoquinona [25].
Ariloxifenoxipropionatos	Acetil-CoA carboxilasa [26].
Glifosfato	EPSP sintasa [27].
Sulfonil ureas	Acetolactato sintasa [28].
Amit	Biosíntesis de clorofila [25].
Leptospermona	Síntesis de plastoquinonas [25].
Gabaculin	Síntesis de carotenoides [25].
Tiolactomicin	Síntesis de lípidos [25].

3.4.1. Herbicidas inhibidores de la fotosíntesis

Los herbicidas comerciales que inhiben la fotosíntesis, lo hacen donde participan dos fotoeventos acoplados, a nivel del flujo de electrones entre el fotosistema II y el fotosistema I, donde se forma en serie un reductor fuerte más electronegativo, comparado con el NADP^+ y por lo tanto, capaz de reducirlo a NADPH . Este evento ocurre en la reacción de Hill [22]. Un ejemplo de ello es el DCMU, el cual se une al sitio de Q_B en la subunidad D1 del fotosistema II bloqueando entonces la formación de plastoquinol (disminuyendo la formación del gradiente de protones) [29].

3.4.2. Factores que afectan la efectividad de los herbicidas.

La efectividad de los herbicidas puede ser afectada por varios factores como son:

Tipo de flora: Estudios de dosis-respuesta han revelado que hay una gran diferencia de susceptibilidad entre diferentes especies. Especies altamente susceptibles, pueden ser controladas con dosis dos o cuatro veces menores a especies menos susceptibles [30,31].

Etapas de crecimiento: Generalmente las especies anuales son más susceptibles a los herbicidas cuando están comenzando a crecer que en etapas posteriores de crecimiento [32]

Condiciones climáticas: Los factores climáticos pueden influenciar la efectividad de los herbicidas significativamente, se pueden reducir las dosis bajo condiciones favorables; sin embargo, se deben hacer estudios en simuladores climáticos para entender la interacción Herbicida-Planta-Medio ambiente, pero dicha relevancia en situaciones de campo es aun cuestionable [32,33].

Adyuvantes: Los adyuvantes y otros ingredientes de la formulación son considerados biológicamente inactivos, pero tienen influencia en la retención y la absorción del herbicida, disminuyendo la cantidad de ingrediente activo necesario para alcanzar el sitio de acción [31].

3.5. FOTOSÍNTESIS.

La fotosíntesis, proceso en el que se transforma la luz solar en carbohidratos ricos en energía, se lleva a cabo en los cloroplastos de las plantas verdes. En la membrana tilacoidal la energía de la luz es capturada por los electrones de las moléculas de clorofila. A su vez los electrones excitados son transmitidos por medio de una serie de acarreadores en la cadena de transporte electrónico. En este proceso se divide una molécula de agua y se libera oxígeno a la atmósfera, al mismo tiempo protones son bombeados hacia el interior de la membrana tilacoidal impulsando la producción de ATP. Los electrones reducen el NADP^+ a NADPH y la energía almacenada en forma de poder reductor se emplea en la segunda fase de la fotosíntesis para la biosíntesis de glucosa en el estroma, fuera de la membrana tilacoidal. El dióxido de carbono de la atmósfera se combina con un azúcar de cinco carbonos para producir, a través de un intermediario, dos azúcares de tres carbonos y posteriormente la molécula de glucosa de seis carbonos [28].

3.5.1. Cloroplastos y clorofilas.

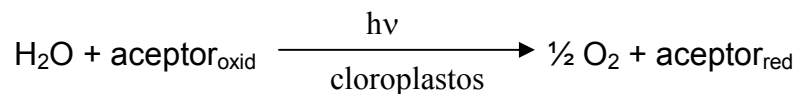
Tanto en procariontes como en las cianobacterias, la fotosíntesis tiene lugar en los gránulos enlazados con la membrana plasmática. El sitio de la fotosíntesis en los eucariontes, como en las plantas superiores y las algas verdes, es el cloroplasto.

El evento primario de la fotosíntesis es la absorción de la luz por la clorofila; hay dos tipos principales de clorofila, la clorofila *a* y la clorofila *b*. Los espectros de absorción de las clorofilas *a* y *b* difieren levemente, ambas absorben en la porción roja y azul del espectro visible (600 a 700 nm y 400 a 500 nm respectivamente). Todas las clorofilas están enlazadas con proteínas, ya sea formando complejos tipo antena, o en uno de los dos tipos de fotosistemas. Las moléculas que cosechan luz transmiten su energía de excitación junto con un par especializado de moléculas de clorofila a un centro de reacción característico de cada

fotosistema. Cuando la energía luminosa llega al centro de reacción se inician las reacciones químicas de la fotosíntesis [28].

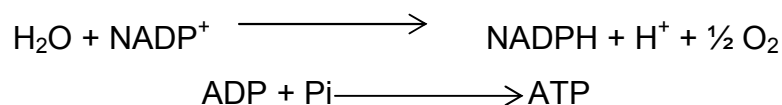
3.5.2. Reacción de Hill

En 1937, Robert Hill descubrió que, al iluminar cloroplastos en ausencia de CO_2 en presencia de un aceptor de electrones artificial como puede ser ferricianuro, se produce O_2 con la reducción concomitante del aceptor a ferrocianuro. Con esta reacción se demuestra que el oxígeno producido en la fotosíntesis no proviene del CO_2 aún cuando si hay un proceso redox involucrado. La reacción de Hill, es la fotoreducción de un aceptor de electrones a expensas de agua [34] y es una herramienta experimental útil para encontrar nuevos o potenciales agentes herbicidas.



3.5.3. Reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis: FS I y FS II.

En las reacciones de la fotosíntesis que se efectúan en presencia de la luz, el agua se transforma en oxígeno por oxidación y el NADP^+ se reduce a NADPH . La serie de reacciones redox se encuentra acoplada con la fosforilación de ADP para producir ATP en la fotofosforilación.



La primera etapa es la oxidación del agua para producir oxígeno, realizada por el FS II, con la posterior reducción de NADP^+ a NADPH efectuada por el FS I. Los dos fotosistemas interaccionan mutuamente de manera indirecta a través de la cadena de transporte de electrones que los enlaza. Esta es una reacción endergónica con un valor positivo de $\Delta G^\circ = +220 \text{ kJmol}^{-1}$; la energía luminosa que

absorben las clorofilas en ambos fotosistemas, suministra la energía que permite que ocurra esta reacción.

El FS I puede ser excitado por luz de longitud de onda menor a 700 nm, pero el FS II requiere luz de longitud de onda menor a 680 nm para excitarse. Ambos fotosistemas actúan en tándem para que el cloroplasto produzca NADPH, ATP y O_2 ya que los dos fotosistemas están conectados por la cadena transportadora de electrones. La clorofila especial del FS II se denomina P_{680} , mientras que la del FS I es llamada P_{700} .

La absorción de luz por P_{680} permite la transferencia de electrones a la cadena de transporte de electrones que relaciona el FS II con FS I y genera un agente oxidante suficientemente fuerte como para dividir la molécula de agua y producir oxígeno. Cuando P_{700} absorbe la luz, se produce suficiente energía para permitir en último término la reducción del $NADP^+$; debido a la diferencia en sus potenciales de óxido-reducción, este proceso se puede representar en un diagrama conocido como esquema Z (Figura 2).

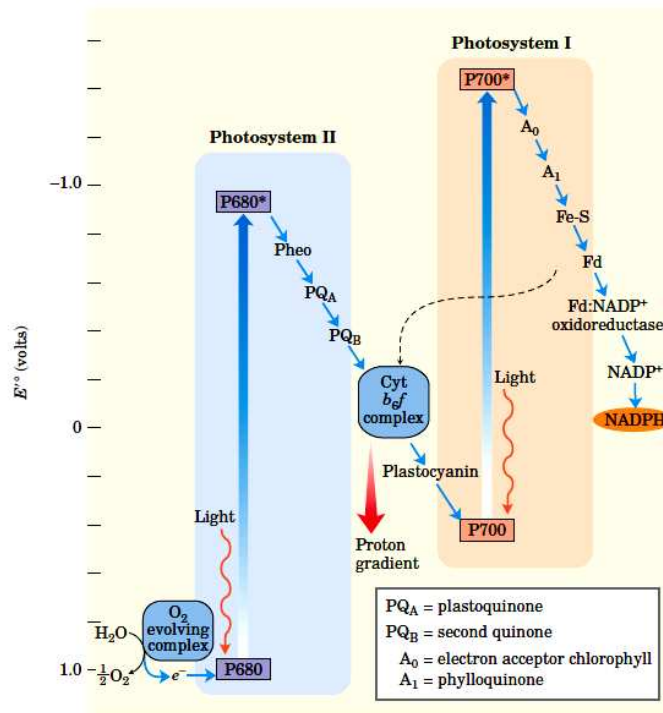


Figura 2: Flujo de electrones en los fotosistemas I y II. (Esquema Z) (Lehninger 2009) [35]

3.5.3.1. Fotosistema II: centro de reacción feofitina-quinona.

El fotosistema II es un sistema tipo feofitina-quinona (como el fotosistema sencillo de las bacterias púrpura) que contiene cantidades iguales de clorofilas *a* y *b*. la excitación de su centro de reacción P680 impulsa electrones a través del complejo del citocromo *b₆f* con el movimiento concomitante de protones a través de la membrana del tilacoide.

Los detalles mecanísticos de las reacciones fotoquímicas de este fotosistema son similares a las del fotosistema bacteriano de *Rhodospseudomonas viridis*. El centro de reacción de *R. viridis* (Figura 3) es un complejo proteico grande que contiene cuatro subunidades polipeptídicas y 13 cofactores: dos pares de clorofilas bacterianas, un par de feofitinas, dos quinonas, un hierro no hemo y cuatro hemos en el citocromo asociado de tipo *c*.

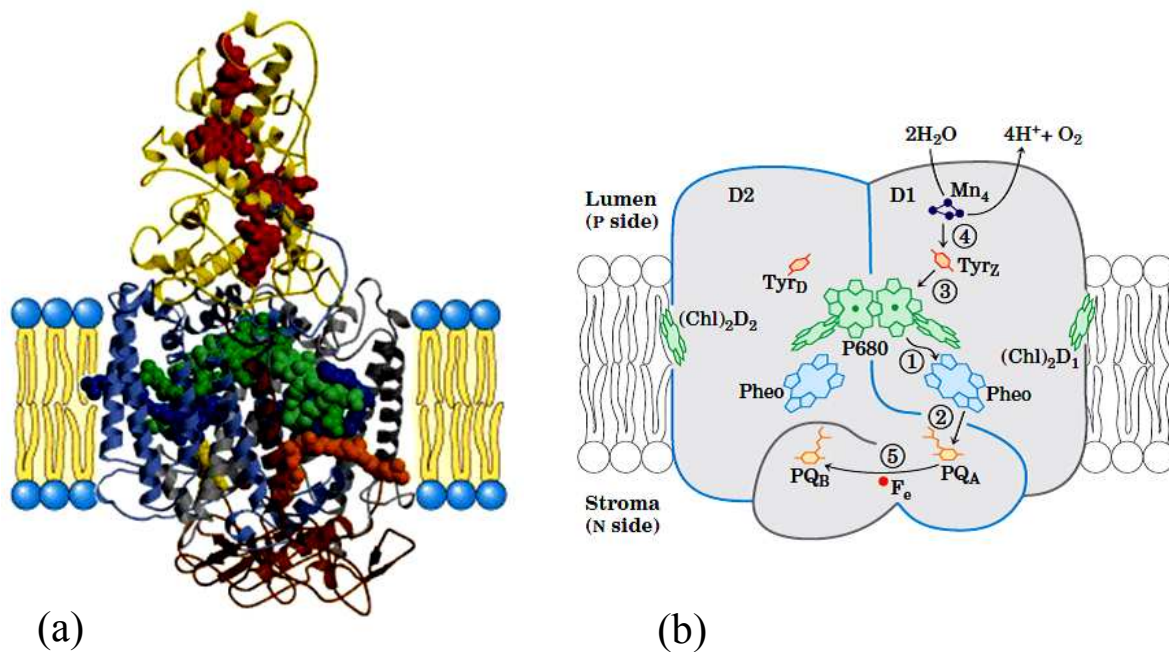
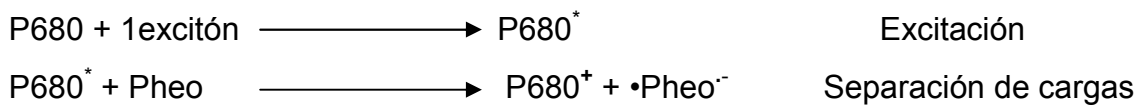
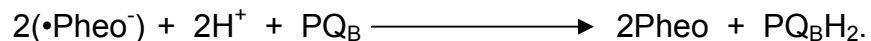


Figura 3: Centro de reacción de la bacteria púrpura *Rhodospseudomonas viridis*: (a) Componentes del centro de reacción: tres subunidades H, M y L (marrón, azul y gris respectivamente), y una cuarta proteína, el citocromo *c* (amarillo). Los grupos prostéticos que participan en el proceso fotoquímico se muestran como modelos espaciales: bacterioclorofilas especiales (verde), moléculas de feofitina *a* (azul), megaquinona (Q_A) (anaranjado), ubiquinona (Q_B) (amarillo), un Fe no hemo (rojo) y los cuatro grupos hemo (rojo). (b) Secuencia de acontecimientos que siguen a la excitación del P680 (Lehninger 2009) [35].

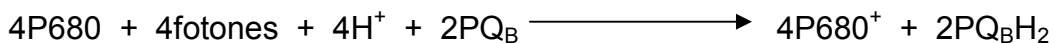
El FS II está formado por dos proteínas muy similares, D1 y D2, al cual están unidos todos los cofactores transportadores de electrones (Figura 3b). La energía de un fotón que es absorbida por una de las muchas moléculas de clorofila antena que rodean el centro de reacción llega al P680 por transferencia de excitones, haciendo que pasen a su estado excitado $P680^*$, posteriormente una de las clorofilas del “par especial” de $P680^+$ cede un electrón a la feofitina (Pheo), lo cual produce dos radicales, uno cargado negativamente ($\bullet Pheo^-$) y otro cargado positivamente. $P680^+$.



Ahora el radical $\bullet Pheo$ cede su electrón a una molécula de plastoquinona, unida fuertemente (PQ_A o Q_A), convirtiéndola en un radical semiquinona, que enseguida dona su electrón a una segunda quinona unida más débilmente (PQ_B o Q_B). Dos transferencias de electrones convierten a PQ_B en su forma quinol totalmente reducida PQ_BH_2 que está libre para difundir por la bicapa alejándose del centro de reacción:



La reacción global iniciada en el fotosistema II, es por tanto:



El quinol (Q_BH_2), que porta en sus enlaces químicos parte de la energía de los fotones que inicialmente excitaron a P680, pasa a formar parte de la reserva de quinona reducida (QH_2) disuelta en la membrana y se desplaza por la fase lipídica de la bicapa hacia el complejo del citocromo b_6f . El electrón eliminado inicialmente de P680 es reemplazado por un electrón obtenido del agua.

3.5.3.2 Complejo citocromo b_6f .

Los electrones almacenados temporalmente en el plastoquinol como resultado de la excitación del centro de reacción del PS II (P680) se transportan al centro de reacción del FS I (P700) mediante el complejo del citocromo b_6f y la proteína soluble plastocianina (Figura 4).

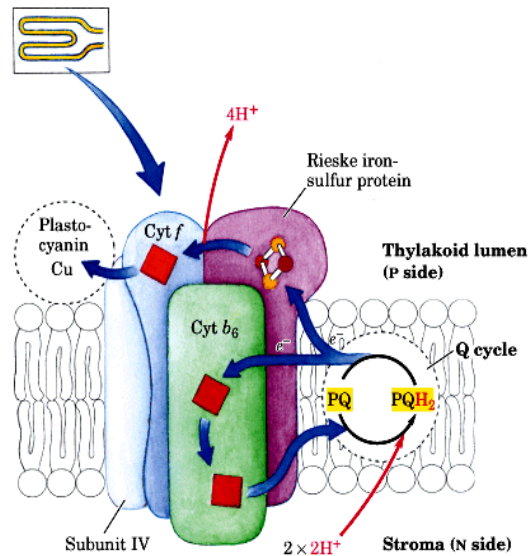


Figura 4: Flujo de electrones y protones a través del complejo del citocromo b_6f (Lehninger 2009 [35]).

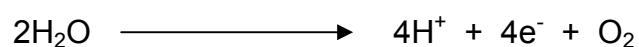
Este complejo está compuesto por un citocromo del tipo b con dos grupos hemo (denominado b_H y b_L), una proteína ferro-sulfurada de Rieske, y el citocromo f . Los electrones fluyen a través del complejo del citocromo b_6f desde el Q_BH_2 al citocromo f , a continuación a la plastocianina y finalmente a P700 reduciéndolo.

El citocromo b_6f traspa los electrones de una quinona reducida (plastoquinol), un transportador de dos electrones móvil y liposoluble, a una proteína hidrosoluble que transporta un electrón (plastocianina). De forma similar al ciclo Q en mitocondria los electrones pasan de uno en uno desde PQ_BH_2 hasta el citocromo b_6 . Como resultado de este ciclo se bombean protones a través de la membrana desde el estroma hacia la luz del tilacoide, moviéndose cuatro protones por cada par de electrones. El resultado es la producción de un gradiente de protones a

través de la membrana tilacoidal a medida que los electrones pasan del fotosistema II al fotosistema I.

3.5.3.3 Complejo de desprendimiento de oxígeno.

Una vez dado un electrón a la feofitina, el P680⁺ ha de adquirir un electrón para volver a su estado basal para la captura de otro fotón, el cual proviene del agua. En este proceso se escinden dos moléculas de agua, dando cuatro electrones, cuatro protones y oxígeno molecular:



Un fotón aislado de luz visible no posee energía suficiente para romper los enlaces del agua; para esta reacción de rotura fotolítica se requieren como mínimo de cuatro fotones. Los cuatro electrones extraídos del agua no pasan directamente al P680⁺, que solo puede aceptar un electrón a la vez. En su lugar el complejo de desprendimiento de oxígeno, es el que pasa cuatro electrones de uno en uno al P680⁺ (Figura 5).

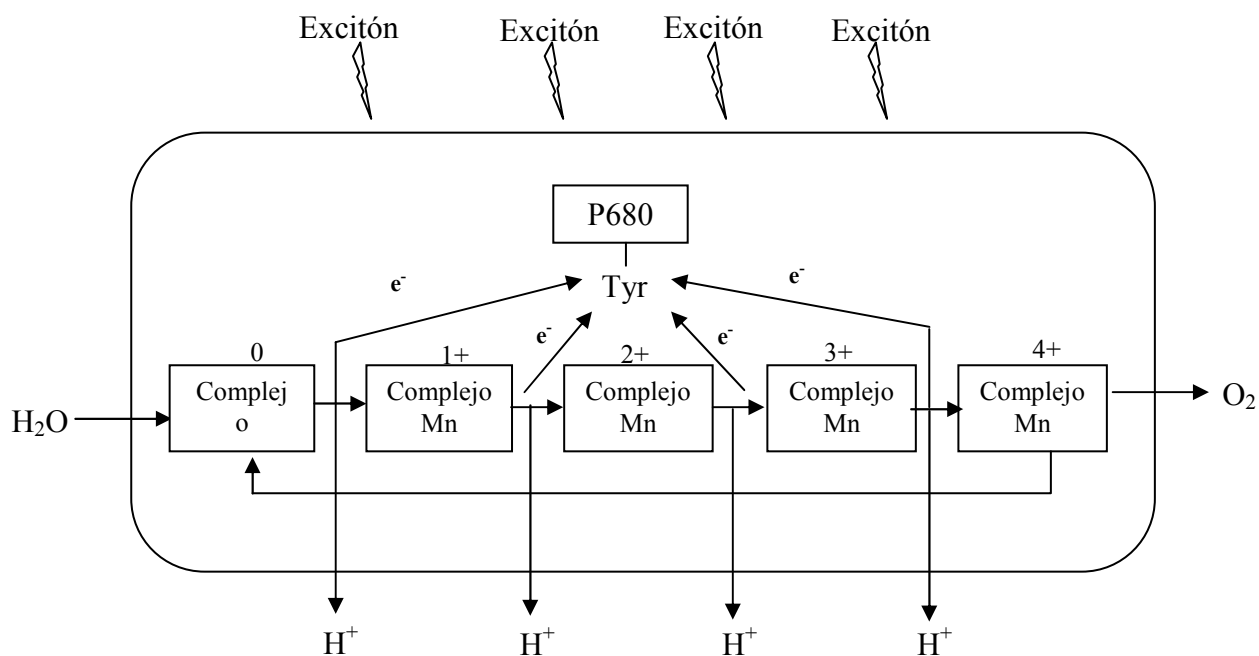
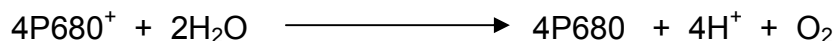


Figura 5: Representación sistemática del complejo de desprendimiento de oxígeno (Lehninger 2009 [35]).

El donador electrónico inmediato al P680⁺ es un residuo de Tirosina (representado por Tyr_Z o Z) en la subunidad proteica D1 del centro de reacción del FS II. El residuo Tyr pierde un protón y un electrón generando un radical libre electrónicamente neutro (Tyr[•]). Este radical recupera su electrón y protón perdidos por oxidación de un agrupamiento de cuatro iones manganeso en el complejo de desprendimiento de oxígeno. Con cada transferencia sencilla, este agrupamiento de Mn queda aún más oxidado; cuatro transferencias electrónicas simples, correspondientes cada una a la absorción de un fotón, produce una carga de +4 en el complejo de Mn (Figura 5). En este estado, el complejo de Mn puede captar cuatro electrones de un par de moléculas de agua liberando 4H⁺ y O₂



3.5.3.4. Fotosistema I: la reducción del NADP⁺.

El FS I es un complejo del tipo ferredoxina, relacionado estructural y funcionalmente con el centro de reacción de las bacterias verdes del azufre. Tiene un centro de reacción designado P700 y una elevada proporción de clorofila *a* con respecto a la clorofila *b*. El centro de reacción P700 excitado (P700^{*}) cede un electrón a un aceptor A₀ (que se piensa es una forma especial de clorofila, funcionalmente análoga al feofitina del FS II), generando A₀⁻ y P700⁺ (Figura 2); una vez más, la excitación genera la separación de cargas en el centro de reacción fotoquímico. P700⁺ es un fuerte agente oxidante, que capta rápidamente un electrón de la plastocianina. A₀⁻, quien pasa su electrón a la fioloquinona (A₁), quien lo cede a una proteína ferrosulfurada (a través de los tres centros Fe-S del FS I). A partir de ese punto el electrón pasa a la ferredoxina (Fd), otra proteína ferrosulfurada asociada débilmente a la membrana tilacoide. El cuarto

transportador electrónico de la cadena es la flavoproteína denominada ferredoxina-NADP⁺ oxido-reductasa, que transfiere electrones desde la ferredoxina reducida (Fd_{red}) al NADP⁺ (Figura 6)

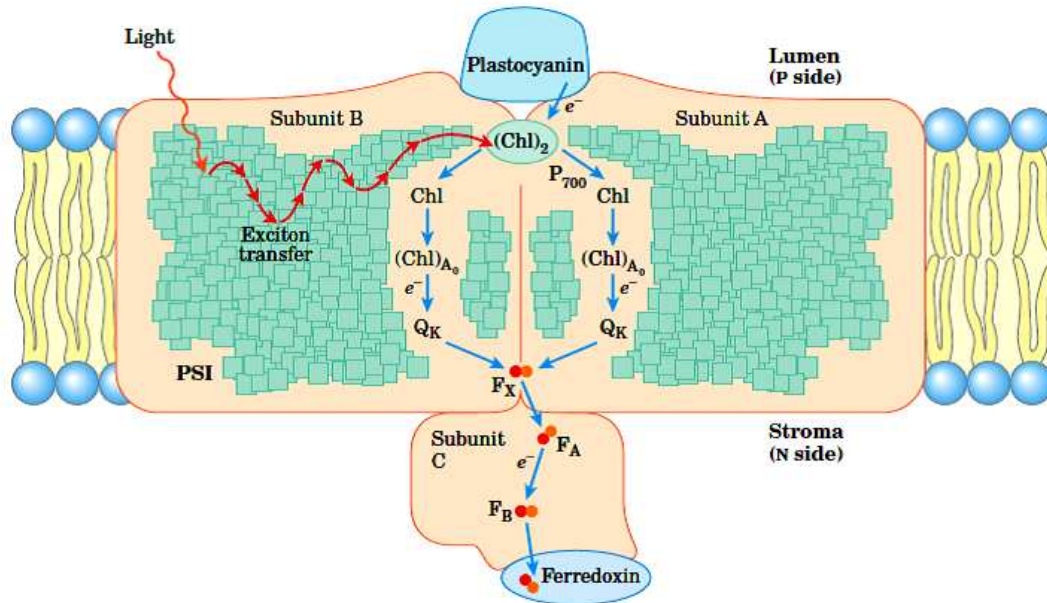
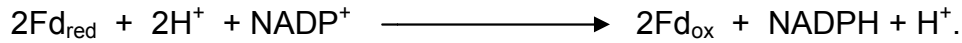


Figura 6: Complejo del FS I y sus clorofilas asociadas; filoquilona (Q_K), proteína Fe-S (F_X), centros Fe-S (F_A y F_B) (Lehninger 2009 [35])

3.5.3.5. Transporte cíclico de electrones en el FS I

Existe una ruta alternativa para el flujo de electrones inducido por la luz que permite que los cloroplastos varíen la proporción entre NADPH y ATP formados en presencia de la luz. En este flujo solo interviene el FS I; los electrones que han pasado desde P700 a la ferredoxina no continúan hasta el NADP⁺ sino que vuelven a través del complejo del citocromo *b₆f* a la plastocianina.

La plastocianina cede electrones a P700, cuya iluminación promueve la transferencia de electrones a la ferredoxina. Así la iluminación de FS I puede hacer que los electrones se ciclen continuamente hacia afuera del centro de reacción de FS I para después volver al mismo, siendo impulsado el electrón

alrededor del ciclo por la energía suministrada como consecuencia de la absorción de un fotón. El flujo electrónico cíclico no va acompañado de la formación neta de NADPH ni del desprendimiento de O_2 , pero sí del bombeo de protones por el complejo del citocromo b_6f y por la fosforilación del ADP a ATP, lo que se denomina fotofosforilación cíclica.

3.5.4. Producción de ATP por un gradiente de protones.

Varias reacciones contribuyen a generar un gradiente de protones en los cloroplastos en las células que efectúan fotosíntesis activa. La oxidación del agua libera H^+ al espacio del tilacoide. El transporte electrónico del FS II y el FS I también ayuda a formar un gradiente de protones y en el proceso participa la plastoquinona y los citocromos. A continuación el FS I reduce el $NADP^+$ usando H^+ del estroma para producir NADPH. Como resultado, el pH del espacio del tilacoide es inferior al del estroma.

La ATP sintasa consta de dos partes CF_1 y CF_0 . CF_0 es un poro protónico transmembranal compuesto por varias proteínas integrales de membrana y es homólogo del F_0 mitocondrial. CF_1 es un complejo de proteína periférica de membrana muy similar en composición de subunidades, estructura y función al F_1 mitocondrial. (Figura 7a).

El ADP y el P_i se condensan fácilmente para formar ATP en la superficie de la enzima, si bien la liberación de este ATP ligado a la enzima requiere una fuerza protón motriz. La catálisis rotacional ocupa secuencialmente cada una de las tres subunidades de la ATP sintasa en la síntesis de ATP, liberación de ATP y unión de ADP y P_i (Figura 7b)

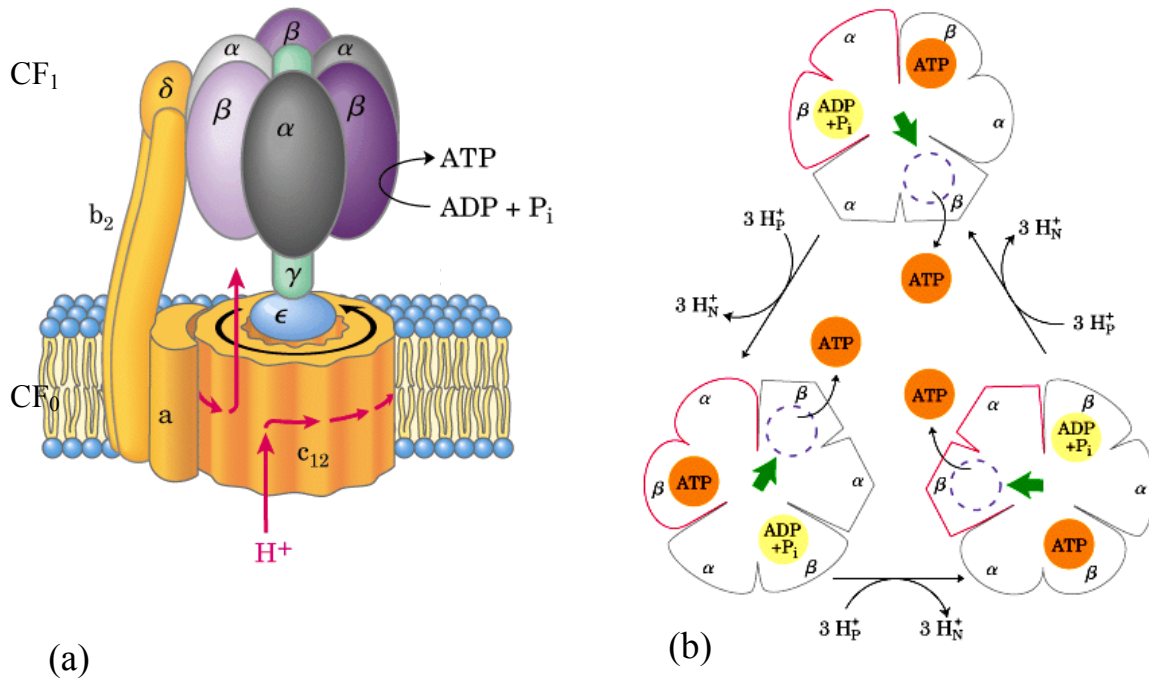


Figura 7: Estructura del complejo CF_0F_1 deducida a partir de estudios cristalográficos y bioquímicos (a). Modelo de unión y cambio en la síntesis de ATP para el complejo CF_1 (Lehninger 2009 [35]).

En el transporte de electrones desde el agua al $NADP^+$ se mueven unos 12 protones desde el estroma hasta la luz del tilacoide por cada cuatro electrones (es decir por cada O_2 formado). Cuatro de esos protones son transportados por el complejo de desprendimiento de oxígeno y hasta ocho por el complejo del citocromo b_6f . el resultado medible es una diferencia de 1000 veces en la concentración de protones a través de la membrana de tilacoide ($\Delta pH = 3$). Para dirigir cuatro electrones desde el agua hasta el NADPH se han de absorber al menos ocho fotones (un fotón por electrón en cada centro de reacción). La energía de ocho fotones de luz visible basta para generar la síntesis de tres moléculas de ATP.

Los componentes que participan en el transporte de electrones desde el agua hasta el NADPH están organizados en tres partículas unidas a la membrana de los tilacoides. Estos son el FS II, el complejo citocromo b_6f y el FS I, (Figura 8)

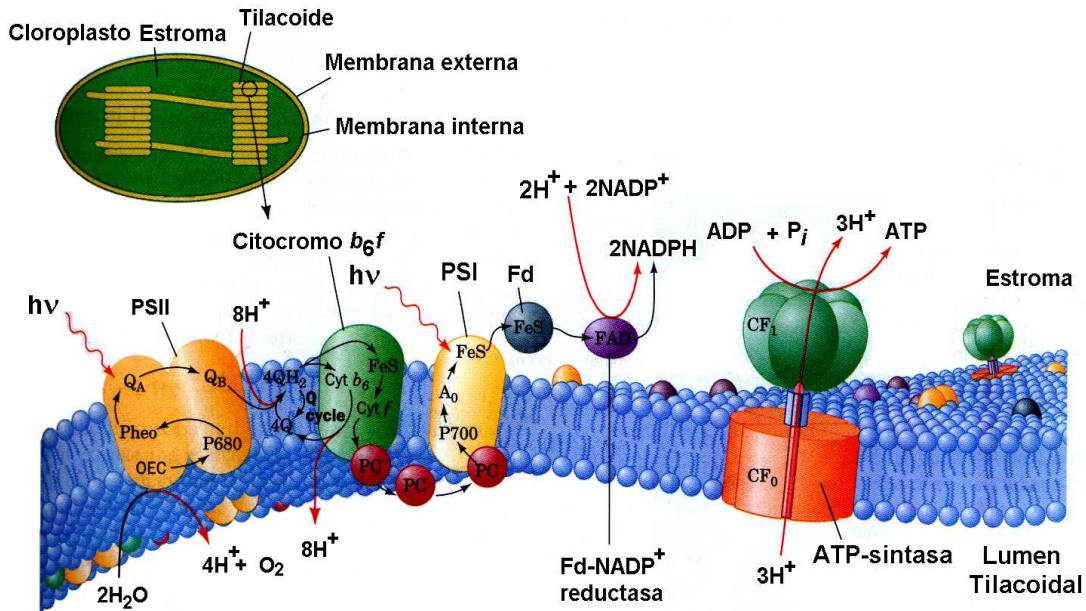


Figura 8: Representación esquemática de la membrana tilacoidal que muestra los componentes de su cadena de transporte electrónico. El sistema consta de tres complejos proteicos: el FS II, el complejo citocromo b_6-f y el FS I, que se encuentran conectados mediante la plastoquinona y plastocianina. (Voet 2005 [36])

3.6. Aceptores de electrones

Un importante modo de acción sobre el flujo de electrones fotosintético, es la desviación de los electrones de su camino natural a los aceptores de electrones sintéticos. Muchos compuestos pueden aceptar electrones en diferentes sitios del transporte de electrones debido a que posee potenciales de óxido-reducción similares a los de los aceptores de la membrana tilacoidal, por ejemplo, el paraquat y el diquat que aceptan electrones del lado reducido del FSI. El FSI dona electrones desde los centros hierro azufre del centro de reacción P700, los cuales tienen potenciales redox de -550 y -590 mV respectivamente. La ferredoxina, con un potencial redox de -420 mV, en condiciones fisiológicas transfiere los electrones al $NADP^+$, vía ferredoxina-NADP oxidorreductasa. El paraquat y el diquat, con potenciales redox de -340 y -446 mV respectivamente, aceptan electrones de los centros Fe-S del P700 y/o de la ferredoxina [37]. La Tabla 3 muestra algunos aceptores de electrones artificiales así como sus potenciales de óxido-reducción.

Tabla 3: Algunos aceptores artificiales de electrones así como sus potenciales de óxido-reducción.		
Compuesto	E° (V)	Ref.
Difenil carbazida (DPC)	-0.5	[38]
Metil viologéno (MV)	-0.4	[39]
Antraquinona	-0.2	[39]
Silicomolibdato (SiMo)	0.02	[39]
Ascorbato	0.06	[39]
Tetrametil- <i>p</i> -hidroquinona (TMHQ)	0.06	[39]
Fenilmetasulfato (PMS)	0.08	[39]
2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil- <i>p</i> -benzoquinona (DBMIB)	0.17	[39]
2,5-dimetil- <i>p</i> -benzoquinona (DMQ)	0.18	[39]
2,6-Diclorofenolindofenol (DCPIP)	0.22	[39]
2,3,5,6-tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina (DAD)	0.22	[39]
N,N,N,N-tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina	0.22	[39]
<i>p</i> -benzoquinona	0.29	[39]
<i>p</i> -fenilendiamina (PD)	0.36	[39]
Ferricianuro de potasio	0.42	[39]
N,N,N,N-tetrametilbenzidina	0.5	[39]

3.7. Inhibidores del transporte de electrones

Un compuesto inhibidor del transporte de electrones, es la hidroxilamina, la cual inhibe la fotólisis del agua; otro, el DBMIB (2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-*p*-benzoquinona) inhibe la función de la plastoquinona y el más conocido, el DCMU (3-(3,4-dicloro-fenil)-1,1-dimetilurea), previene la oxidación de Q_A^- en el FSII [37]. Este tipo de compuestos son conocidos como inhibidores de la reacción de Hill debido a que en presencia o ausencia de ADP y Pi o en presencia de NH_4Cl , inhiben el transporte de electrones no cíclico, así evitan la síntesis de ATP, al no formarse el gradiente electroquímico de protones. Estos compuestos afectan una

o más enzimas transportadoras de electrones en la cadena fotosintética. El sitio más susceptible para la acción de estos compuestos en el flujo de electrones fotosintético está asociado al lado donador o aceptor del FSII, sobre todo el transporte de electrones de Q_A a Q_B [37].

3.8. Inhibidores de la transferencia de energía

Los inhibidores de la transferencia de energía actúan uniéndose directamente al complejo H^+ -ATPasa del cloroplasto. Estos compuestos interfieren con la actividad de CF_1 y/o CF_0 e inhiben la fosforilación. El bombeo de protones inducido por la luz en el lumen tilacoidal hace que el espacio interno sea ácido y que el lado del estroma sea básico. El flujo de protones a través de CF_0 hacia el estroma induce la síntesis de ATP en la porción CF_1 del complejo CF_0 - CF_1 . Este evento transduce la energía del gradiente electroquímico de protones en energía química, mediante la fosforilación del ADP con P_i para producir ATP [37]. La florizina, un inhibidor de la transferencia de energía que interactúa con el complejo CF_1 , inhibe el flujo de electrones dependiente de la fosforilación, pero no tiene efecto sobre el transporte de electrones desacoplado, ni sobre el flujo de electrones en condiciones no fosforilante. El DCCD (diciclo hexilcarbodiimida), otro inhibidor de la transferencia de energía, interactúa con el CF_0 [40].

3.9. Desacoplantes

La mayoría de los desacoplantes son ácidos débiles, lipofílicos, los cuales en su forma iónica atraviesan la membrana tilacoidal tomando protones tanto del medio interno como externo. Una vez protonados, éstos pasan nuevamente a través de la membrana del tilacoide donde liberan el protón mediante disociación. Muchos desacoplantes, incluyendo el CCCP (carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona), son ácidos débiles solubles en lípidos que disipan el gradiente de protones. Otros compuestos que disipan el gradiente de protones son los ionóforos como la gramicidina que forma un canal transmembranal acuoso, a través del cual pasan los protones y otros pequeños iones sin ser un acarreador [40].

3.10. Fluorescencia de la clorofila a.

La fluorescencia ha jugado un papel principal en la elucidación de muchos aspectos de la organización y el funcionamiento de la membrana tilacoidal.

La energía luminosa es absorbida por las moléculas de clorofila *a* y *b* para la fotosíntesis. Sin embargo, una porción de la luz absorbida se pierde como calor o por reemisión como fluorescencia. Un fotón de luz roja (670 nm) contiene suficiente energía para excitar a una molécula de clorofila *a* a su primer estado excitado, llamado singulete (Figura 9). La diferencia de energía entre los dos niveles es la energía del fotón absorbido. La molécula de clorofila *a* excitada libera esta energía y regresa a su estado basal, lo que sucede en cerca de 10^{-8} s. Durante este periodo de tiempo ocurre una separación de carga en el centro de reacción, es decir, el electrón en el nivel de alta energía puede ser transferido a un aceptor I, formando un aceptor reducido I^- , lo que comprende el primer paso de la fotosíntesis. Si la separación de carga no se lleva a cabo, la energía absorbida es liberada como calor y/o fluorescencia cuando el electrón excitado regresa al estado basal. La relación entre los tres procesos, fotoquímico (P), fluorescencia (F) y calor (desactivación por la radiación, D) es expresada matemáticamente usando constantes de velocidad de excitación vía fotoquímica, kP ; vía fluorescencia kF y vía calor, kD . El número total de excitaciones por segundo es:

$$(kP + kF + kD)n$$

Donde n es el número de moléculas de clorofila.

Bajo condiciones de iluminación, cuando el proceso fotoquímico se lleva a cabo, cerca del 97% de la luz absorbida es utilizada para realizar este trabajo, 2.5% es transformada en calor y 0.5% es reemitida como fluorescencia. Si todos los centros de reacción están reducidos, del 95 al 97% de la energía absorbida puede ser desactivada como calor y del 2.5 al 5% vía fluorescencia [41].

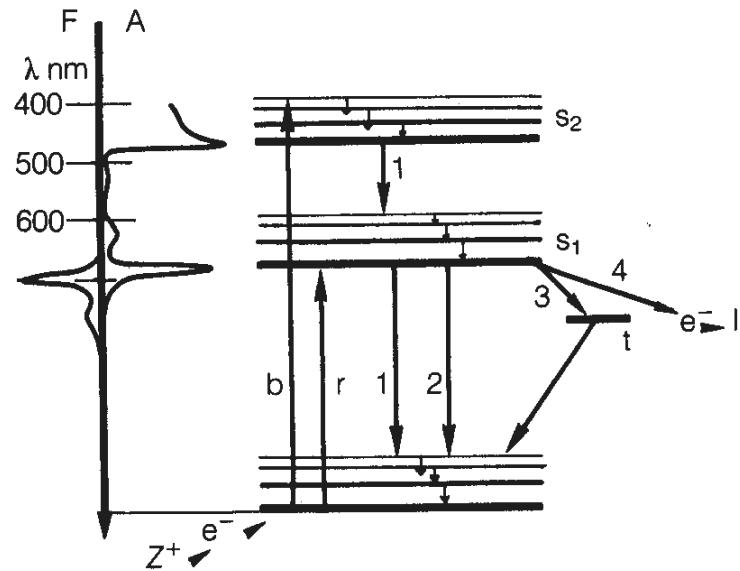


Figura 9. Diagrama de niveles de energía para la clorofila: espectro de la fluorescencia F, espectro de absorción A, fotón azul b, fotón rojo r, conversión interna (k_d) 1, fluorescencia (k_f) 2, cruzamiento inter-sistema 3, separación de carga (kP) 4, aceptor de electrones intermediario de FSII I⁻, estados singulete s₁ y s₂; estado triplete t, donador de electrones desde el sistema de fotólisis de agua del FSII Z⁺ (Bolhár-Nordenkampf 1993).

La fluorescencia de la clorofila es roja debido a la diferencia de energía entre el nivel basal y el primer nivel excitado, y es igual a la energía de un fotón de luz roja [41].

Al iluminar con luz continua las hojas adaptadas a la oscuridad o una suspensión de hojas de plantas superiores, algas o cianobacterias, se observan cambios característicos en la intensidad de la fluorescencia de la clorofila a. A estos cambios se les denomina inducción de la fluorescencia o curva de inducción de la fluorescencia, también llamada *curva de Kaustski* [42].

En este trabajo, a las diferentes fases de la curva de inducción de la fluorescencia se les denomina como curva OJIP (Figura 10). El aumento de la fluorescencia desde O hasta P ocurre durante el primer segundo de iluminación y es llamada la "fase rápida". La fase lenta es después de P y puede tomar algunos

minutos antes de llegar a su fase terminal. La fase rápida está relacionada con los procesos primarios del FS II, mientras que la fase lenta está principalmente relacionada a las interacciones entre los procesos de la membrana tilacoidal y los procesos metabólicos en el estroma, primariamente el metabolismo de carbohidratos.

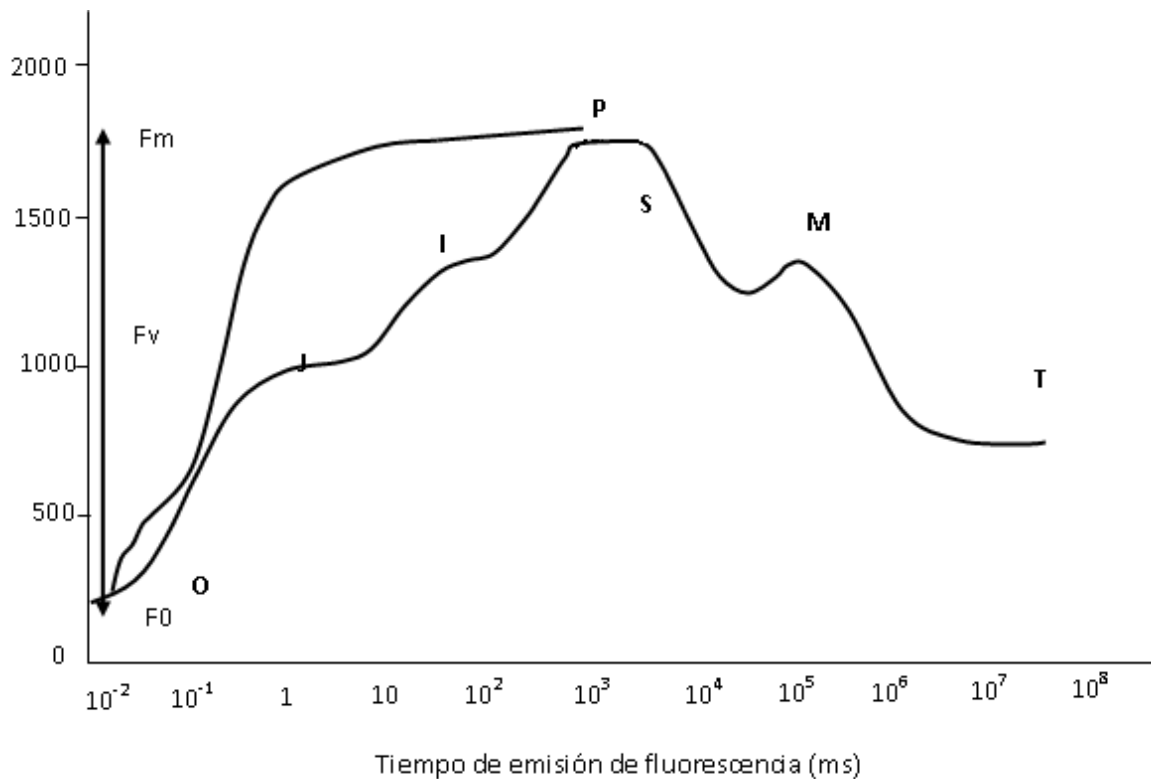


Figura 10: Curva de inducción de la fluorescencia, o curva de Kautsky de cloroplastos adaptados a la obscuridad por 30 minutos y estimulados con un flash de luz roja (670nm) por 2 segundos. F_0 fluorescencia inicial mínima; F_v fluorescencia variable; F_m fluorescencia máxima. La inferior es el control, la curva superior son cloroplastos dañados en el lado aceptor del FSII con 50 μM de DCMU. (Modificada de Bolhár-Nordenkampf 1993)

La cinética de la curva de inducción de la fluorescencia de la fase rápida ha sido estudiada por Delosme [43], las características de esta fase con relación a la luz y a la temperatura, sugieren que la fase O-J está controlada por la separación de carga. La fluorescencia variable relativa en un tiempo t es definida como:

$V_t = (F_t - F_0) / (F_m - F_0)$ donde V_t = fluorescencia variable relativa.
 F_t = fluorescencia en un tiempo dado.
 F_0 = fluorescencia inicial.
 F_m = fluorescencia máxima

Esta expresión experimental puede ser tomada como una medida de la fracción del aceptor de electrones Q_A que está en su estado reducido. Cuando se agrega DCMU, hay un aumento inmediato de la fluorescencia en la fase rápida (Figura 5 curva superior), la razón de que esto ocurra es debido a que el DCMU bloquea el flujo de electrones después del aceptor primario del FS II (Q_A^-), es decir, inhibe la reoxidación de Q_A^- [42].

En la fase lenta (Figura 10) después del pico P, la fluorescencia disminuye hasta la fase S donde Q_A es parcialmente reoxidada por el flujo de electrones hacia FS I vía citocromo b_6f , y plastocianina; sin embargo durante la fase S el transporte de electrones genera un gradiente de protones que causa un quenching adicional en la fluorescencia (q_{NP} , o quenching no fotosintético). El ciclo de calvin consume ATP y NADPH, por lo que la asimilación del carbono afecta la fase lenta de la fluorescencia debida al quenching fotosintético (transporte de electrones) y el no fotosintético. El pico M refleja la inducción de la fluorescencia debido a la fijación del carbono [41].

3.11.1 Germinación.

La germinación empieza con la toma de agua por la semilla (imbibición) y finaliza cuando empieza la elongación del eje embrionario, llamado radícula. Esto incluye numerosos eventos, por ejemplo, la hidratación de las proteínas, cambios a nivel estructural de las mismas, cambios en la respiración y cambios en la síntesis de macromoléculas y el crecimiento celular, ninguno de estos eventos por si solo constituye la germinación, pero sus efectos combinados transforman a un embrión deshidratado con un metabolismo lento y casi indetectable en un metabolismo vigoroso que culmina en el crecimiento [44].

La germinación en su sentido estricto no incluye el crecimiento de la plántula, el cual comienza cuando la germinación termina. Los procesos que ocurren en la plántula naciente, tal como la movilización de las principales reservas de almacenamiento, no son parte de la germinación, son eventos post-germinatorios [44]

3.11.2 Medición de la germinación.

Las formas para determinar que la germinación ha progresado son la medición de la toma de agua o la respiración. Estas medidas dan solo una indicación aproximada del estado de germinación alcanzado.

La emergencia del eje (radícula) nos permite reconocer cuando la germinación ha sido completa. El grado de avance de la germinación en una población de semillas se expresa como el porcentaje de germinación en función del tiempo.

4. HIPÓTESIS.

Si los extractos orgánicos de las partes aéreas de la planta *Cecropia obtusifolia* al ser evaluados en el ensayo de germinación o en el ensayo de inhibición de síntesis de ATP presentan actividad inhibitoria se pueden aislar metabolitos secundarios con posible actividad herbicida a partir de los mismos.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo principal

- Por medio de un estudio sistemático y biodirigido, obtener metabolitos secundarios con posible actividad herbicida de la planta *Cecropia obtusifolia* Bertol.

5.2. Objetivos particulares

- Caracterizar químicamente los metabolitos aislados por medio de métodos espectrométricos y espectroscópicos.
- Caracterizar bioquímicamente a los metabolitos aislados como posibles herbicidas potenciales a través de su actividad sobre la síntesis de ATP, el transporte de electrones, las reacciones parciales de la fotosíntesis y fluorescencia de la clorofila *a* en cloroplastos aislados de hojas de espinaca.
- Caracterización *in vivo* de los metabolitos aislados mediante tres parámetros, la germinación de semillas (una especie monocotiledonea y una dicotiledonea), el crecimiento de raíz y tallo, el cambio en la fluorescencia de la clorofila *a* medida en hojas de plantas crecidas en el invernadero y la determinación de biomasa seca.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

6.1. Obtención de los metabolitos secundarios.

6.1.1 Métodos cromatográficos.

Para el fraccionamiento de los extractos, la separación y purificación de fracciones y de los compuestos puros se utilizó gel de sílice para columna 60 Merck, tamaño de malla de 0.0063-0.200 mm, para la cromatografía en capa fina se utilizaron placas preparativas de sílica gel 100 UV254, de 20 x 20 cm y 1 mm de espesor Macherey-Nagel y placas de aluminio recubiertas con gel de sílice de 0.25 mm de espesor (sílice gel 60 F254, Merck)

Preparación de Sulfato cérico amoniacal.

Colocar 350 gramos de hielo en un vaso de precipitados dentro de un baño de hielo; a continuación agregar con cuidado 22 ml de ácido sulfúrico concentrado y posteriormente añadir 12 g de sulfato cerico amoniacal. Agitar con una varilla de vidrio hasta su completa disolución (en caso de no disolverse por completo debe filtrarse).

6.1.2. Obtención del material vegetal

La planta *Cecropia obtusifolia* fue recolectada en el estado de Guerrero en el Cañón del zopilote el 25 de Febrero del 2004. La colecta e identificación de la especie fue realizada por la M.C. Nelly Diego y M.C. J. R. de Santiago, del Laboratorio de Plantas Vasculares de la Facultad de Ciencias, UNAM, con número de herbario FCME-109585 El material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente y se separó en sus partes aéreas (hojas y tallos), que posteriormente se molieron hasta obtener un pulverizado.

6.1.3. Fraccionamiento primario de la planta *Cecropia obtusifolia*.

Una muestra del material vegetal (2 g tanto de tallos y 2 g de hojas), se extrajo por separado por el método de maceración a temperatura ambiente con 50 ml de hexano durante 48 h. El disolvente fue eliminado por destilación a presión

reducida. Posteriormente el material se sometió a dos maceraciones consecutivas adicionales, utilizando cloroformo y metanol, siguiendo el mismo procedimiento descrito para el extracto hexánico (Figura 11). De esta forma se obtuvieron tres extractos: hexánico, clorofórmico y metanólico de las hojas y tres de los tallos.

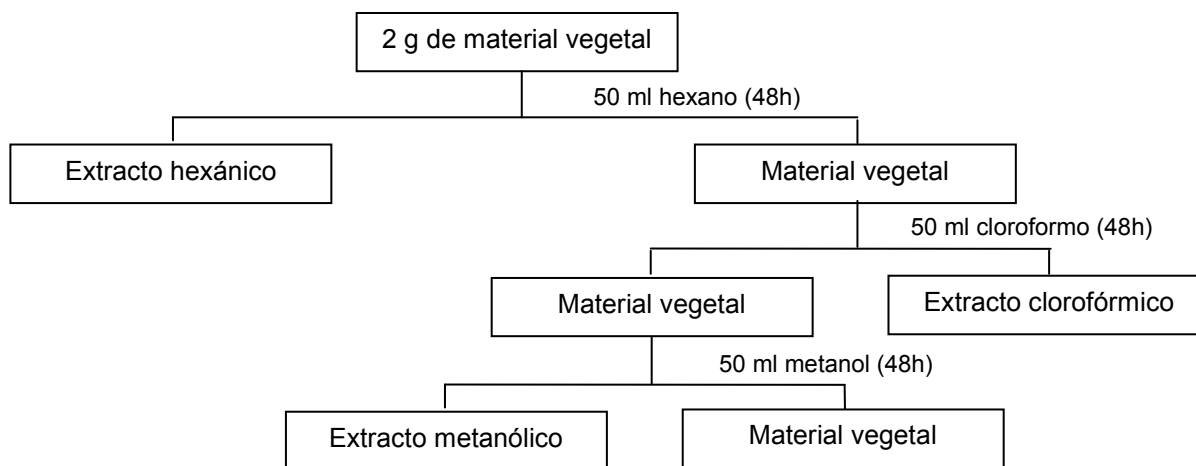


Figura 11: Diagrama de obtención de los extractos.

6.1.4. Fraccionamiento del extracto hexánico de hojas de *Cecropia obtusifolia*.

Las hojas secas (500 g) fueron pulverizadas y sometidas a extracción exhaustiva por maceración con hexano a temperatura ambiente. El disolvente fue evaporado al vacío para obtener el extracto crudo (rendimiento 5.8 %), este extracto se fraccionó mediante cromatografía en columna abierta (CCA) utilizando gel de sílice y un sistema de elución con un gradiente de polaridad ascendente con hexano-AcOEt, y finalmente acetona, colectando fracciones de 200 ml.

Las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía en capa fina y las placas se visualizaron con luz UV (onda corta 254 nm y onda larga 366 nm) y se revelaron utilizando sulfato cérico amoniacal como agente cromógeno; para el desarrollo de color las placas se colocaron en una parrilla eléctrica (100°C, 5 min.). Las fracciones con composición similar se mezclaron.

6.1.5. Fraccionamiento del extracto clorofórmico de hojas de *Cecropia obtusifolia*.

Una vez obtenido el extracto hexánico de las hojas, el residuo vegetal se sometió nuevamente a extracción exhaustiva, pero esta vez empleando cloroformo y el disolvente fue evaporado a presión reducida para obtener el extracto crudo (rendimiento 2%). El extracto obtenido se adsorbió en 100 g de gel de sílice, y se colocó en un embudo Buchner. Esta sílica se lavó con hexano, posteriormente con cloroformo y finalmente con acetona; el solvente se retiró a presión reducida obteniendo así tres fracciones.

La fracción acetónica del extracto clorofórmico se separó por CCA siguiendo el mismo procedimiento que para el extracto hexánico, con un gradiente cloroformo-metanol, colectando fracciones de 100 ml.

6.1.6. Reacción general de metilación.

Se utilizó el procedimiento descrito anteriormente por Calderón [45], con algunas modificaciones. En un tubo de ensayo con tapón de rosca se adicionaron 20 mg de muestra con 2 ml de KOH al 5% en MeOH, después se colocó en baño María a 80°C por 1 hora. A la muestra fría se le adicionaron 2 ml de HCl al 10 % en MeOH y 100µl de BF₃ (trifloruro de boro), colocándose nuevamente en baño María a 80°C por 1 h.

Al producto de la reacción se le adicionaron 4 ml de agua, 2 ml de una mezcla tolueno:hexano (80:20) y se agitó en el vortex por 1 minuto. La fase orgánica obtenida se extrajo con 4 ml de agua más 2 ml de la mezcla tolueno:hexano (80:20). El extracto orgánico se secó con Na₂SO₄ anhidro y por evaporación se concentró a sequedad para obtener el producto metilado.

6.1.7. Reacción general de acetilación.

Para la obtención de los productos acetilados, a 100 mg del compuesto o fracción se le agregaron 1 ml de anhídrido acético y 0.3 ml de piridina. La mezcla

se dejó reaccionar con agitación magnética durante 24 h, a temperatura ambiente. El curso de la reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina.

Al producto de reacción se le adicionaron 5 g de agua-hielo y se acidificó con una solución de HCl al 10%. La mezcla acuosa se extrajo por triplicado con 15 ml de AcOEt. La fase orgánica obtenida se extrajo con 3 porciones de 5 ml de una solución saturada de NaHCO₃, posteriormente se lavó con tres porciones de 5 ml de agua. El extracto orgánico se secó con Na₂SO₄ anhidro y por evaporación, se concentró a sequedad para obtener el producto acetilado [46].

6.2. BIOENSAYOS.

Para todos los bioensayos, tanto los extractos, fracciones y compuestos puros se disolvieron en DMSO, el cual es un disolvente que se ha ensayado anteriormente y no presenta un efecto significativo a las concentraciones empleadas [47]. Aquellos compuestos que no se disolvieron, fueron sonicados hasta obtenerse una suspensión homogénea.

6.2.1 Ensayo de germinación y crecimiento de raíz y tallo.

Las semillas se escogieron manualmente descartando las dañadas. Los ensayos de germinación consistieron en poner 30 semillas de pasto (*Lolium perenne*) y 30 de trébol (*Trifolium alexandrinum*) por separado, en cajas de Petri de 9cm de diámetro con papel filtro y 10 ml de solución de los diferentes extractos a diferentes concentraciones (50, 100, 500 y 1000 µg/ml) y un blanco de disolvente (DMSO 0.5, 1, 5 y 10%) [48].

Las cajas se pusieron en una incubadora marca WTC Binder durante 5 días (3 días para germinación y 2 días más para el crecimiento de la radícula y tallo) en la obscuridad a 28°C. Con una regla se midió la longitud de la raíz y del tallo, así como el índice de germinación (relación entre el número de semillas que presentaron emergencia de la radícula y las semillas totales).

6.2.2. Aislamiento de cloroplastos de hojas de espinacas

NOTA: La siguiente metodología se realizó con la luz apagada.

Los cloroplastos se aislaron de hojas de espinaca (*Spinacea oleraceae L.*) compradas en el centro comercial. Se escogieron aproximadamente 40 g de hojas frescas y turgentes, que no estuvieran maltratadas ni rotas, las cuales se lavaron con mucho cuidado y se secaron colocándolas en hojas de papel. Una vez secas las hojas, se separaron la nervadura y la punta de la hoja, se cortaron cuidadosamente en trozos pequeños y se molieron en la licuadora (Modelo L-21, Osterizer) con 250 ml de medio de aislamiento (Apéndice I pagina 86) a 4°C para lo cual se enfrió en un baño de hielo. La molienda se efectuó dando pulsos para no dañar los cloroplastos.

Una vez molidas las hojas de espinacas, el homogenado se filtró a través de 8 capas de gasa, recibiendo el filtrado en tubos de centrifuga, los cuales se mantuvieron fríos y sumergidos en un baño de hielo desde antes de filtrar. Los cloroplastos se sedimentaron por centrifugación a 4000 rpm a 4°C (centrifuga Modelo Sorval Super T21, DUPONT) durante 5 min, posteriormente se resuspendieron en 1 ml del mismo medio y la resuspensión se guardó en la oscuridad a 4°C por 1 h. Estos cloroplastos pueden utilizarse hasta por 12 horas.

La clorofila se cuantificó según el método de Arnon [49], el cual consiste en aforar con acetona en un volumen de 5 ml una alícuota de 30 μ l de cloroplastos resuspendidos, después se incuban en la oscuridad a 0°C por 5 min y se centrifugan 5 min a 4000 rpm en un centrifuga clínica (centrífuga modelo EBA 8S, Hettich) para eliminar las membranas y proteínas precipitadas. El contenido de clorofila se cuantificó midiendo la absorbencia del sobrenadante a dos longitudes de onda, 663 y 645 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU650, la concentración de la clorofila se calculó con la siguiente fórmula:

$$[\text{Chl}] = 8.05(A_{663}) + 20.29(A_{645})$$

En donde:

$[\text{Chl}]$ = μg de clorofila por mL

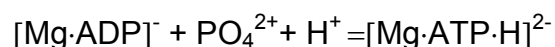
8.05 y 20.29 = constantes establecidas experimentalmente a partir de los coeficientes de extinción para las longitudes de onda de la clorofila *a* y clorofila *b*.

A = Absorbencia a las longitudes de onda indicadas.

6.2.3. Determinación de la síntesis de ATP

La síntesis de ATP se cuantificó empleando tilacoides aislados de hojas de espinaca, a los cuales se les adicionaron fósforo inorgánico y ADP. La medición se realizó con un micro electrodo Orion, Mod 8103 Ross conectado a un potenciómetro Corning, Modelo 12 con escala expandida [50,51]. Los cambios de pH observados se registraron con un aparato Gilson.

En la cubeta de reacción se agregaron 3 ml de medio para síntesis de ATP, (Apéndice I), 1 mM de ADP, 3 mM de fosfato inorgánico (Pi), (se ajustó el pH de 8.0 a 8.05 con KOH) y se adicionaron 60 μg Chl., se iluminó por 1 min, resultando en el consumo escalar de H^+ por ATP como se observa en la siguiente reacción:



Éste es un método simple que provee una medida real de la síntesis o de la hidrólisis de ATP. La técnica es por lo tanto adecuada para determinar la velocidad de hidrólisis de ATP y para efectuar estudios cinéticos de este proceso [52].

6.2.4 Medición de la velocidad del transporte de electrones

Las reacciones empleadas hasta el punto 6.2.7, se muestran en la Figura 12.

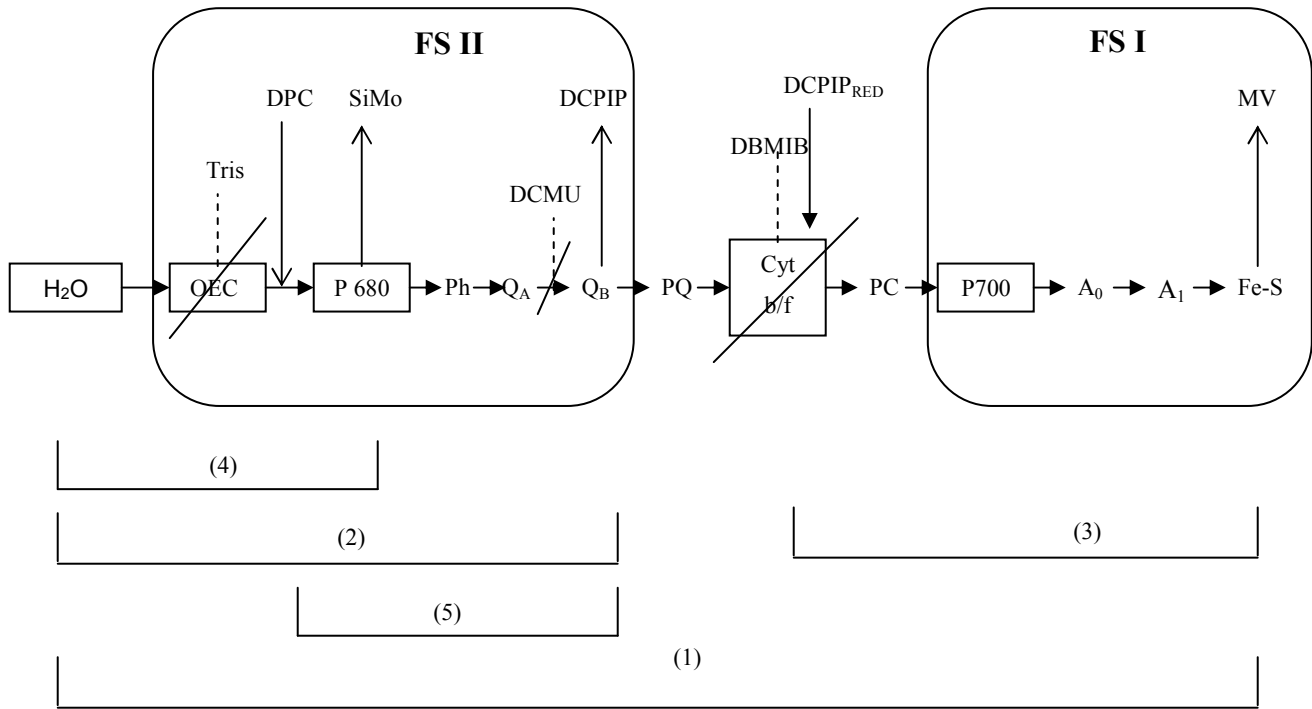


Figura 12: Esquema del transporte de electrones en tilacoides, mostrando los sitios de inhibición (líneas punteadas) y los sitios de donación y aceptación de electrones (flechas); los números indican el segmento de la cadena transportadora de electrones que es evaluada en cada reacción: (1) transporte basal de electrones, (2) transporte de electrones del FS II, (3) transporte de electrones del FS I, (4 y 5) reacciones parciales del FS II.

El flujo de electrones fotosintético no cíclico (1), se monitoreó por la liberación de Oxígeno medida en presencia de metilviológeno (MV) que es un aceptor artificial de electrones a nivel del pool Fe-S del FS I, utilizando un oxímetro YSI (Yellow Spring Instrumental) modelo 5300, con un electrodo tipo Clark. Para medir el *transporte de electrones basal* se agregaron 3 ml de medio de transporte de electrones (Apéndice I), 60 µg de Chl a la cubeta de reacción y se inicia la reacción con iluminación y se mide por 3 minutos.

Para la determinación del *transporte de electrones fosforilante*, se utilizó el mismo medio que para el transporte basal al que se le adicionaron 3 mM de ADP y 3 mM de Pi.

El *transporte de electrones desacoplado* se midió de la misma forma que el transporte de electrones basal, con la diferencia de que se le agregó al medio de reacción 6 mM de NH₄Cl como desacoplante [53,54].

6.2.5. Medición de la velocidad del transporte de electrones del FS II.

El transporte de electrones desacoplado del FS II (2), se midió polarográficamente empleando como aceptor final de electrones DCPIP (preparado el mismo día y disuelto en EtOH absoluto) [39]. Se agregaron a la cubeta de reacción 3 ml de medio de transporte de electrones para FS II (Apéndice 1) y 1 μM de DBMIB como inhibidor del complejo citocromo *b₆f* y por tanto el paso de electrones hacia el FS I.

6.2.6. Medición de la velocidad del transporte de electrones del FS I.

El flujo de electrones desacoplado del FS I (3) se determinó de manera similar al transporte de electrones basal empleando 3 ml del medio de transporte de electrones (Apéndice 1), 6mM de NH₄Cl como desacoplante, 100μM de DCPIP reducido con 300μM de ascorbato de sodio (preparado el mismo día) como donador de electrones y 10 μM de DCMU como inhibidor del paso de electrones del FS II al FS I [55].

6.2.7. Medición de las reacciones parciales del fotosistema II.

La reacción parcial de H₂O a P680 (lado donador de electrones del FS II) (4), se midió empleando 3 ml del medio de transporte de electrones sin metil viológeno (Apéndice 1), 6mM de NH₄Cl, 100μM de SiMo (preparado el mismo día) y 10 μM de DCMU [56]

La reacción parcial de P680 a Q_B (lado aceptor del FS II) (5), se midió de acuerdo a la metodología propuesta anteriormente [57], empleando cloroplastos tratados con Tris 0.8 M pH 8.0 para inhibir el complejo de desprendimiento de oxígeno. El tratamiento de los cloroplastos con Tris se llevó a cabo en la oscuridad durante 30 min a 4°C, posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm en una centrifuga Sorvall Super T21 por 1 min y se resuspendieron en el medio de aislamiento. En una celda espectrofotométrica de 5 ml se colocaron 3 ml de medio de transporte de electrones sin MV (Apéndice 1) más 6 mM de NH₄Cl, 200 μM de DPC (disuelta en EtOH absoluto), 100 μM DCPIP, 45 μg Chl, y se midió en el espectrofotómetro a 600 nm; posteriormente se iluminó por 2 min. y se midió nuevamente a la misma longitud de onda. El blanco utilizado fue la misma mezcla de reacción sin DCPIP.

6.2.8. Fluorescencia de la clorofila a del FS II.

En viales conteniendo 3 ml de medio de transporte de electrones sin MV, se colocaron alícuotas que contenían 150 μg de clorofila, posteriormente se le adicionó a cada uno de los viales los compuestos de prueba a diferentes concentraciones, empleando como controles positivos DCMU y cloroplastos tratados con 0.8 M Tris a pH 8.0 (ver reacción parcial de P680 a Q_A), se dejaron incubando por 10 min. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugó a 10 000 rpm por 1 min y se resuspendieron en el medio de aislamiento.

Alícuotas que contenían 15 μg de clorofila se transfirieron por gravedad sobre papel filtro (1cm²) con un aparato Dot-blot (Bio-rad USA) para asegurar una distribución homogénea y reproducible de la gota en el papel. Los cloroplastos embebidos en el papel se introdujeron inmediatamente a viales que contenían 3 ml de medio de transporte de electrones sin MV (Apendice1) y se incubaron por 5 minutos en la oscuridad. Las curvas de inducción de fluorescencia de la clorofila a, se midieron a temperatura ambiente con un aparato Hansatech Fluorescence Handy PEA (plant efficient analyzer), iluminando con un flash de luz roja (670nm) por 2 segundos [42]. El análisis cinético de la fluorescencia variable relativa

$[V(t)=(F_t-F_0)/(F_m-F_0)]$ se llevó a cabo por la normalización de las curvas de inducción.

6.2.9. Determinación de la biomasa seca de *Lolium perenne*.

Se sembraron 200 semillas de pasto (*Lolium perenne*) y se dejaron crecer por 15 días; después de ese tiempo, las plantas fueron asperjadas con suspensiones a diferentes concentraciones de la fracción **M1** (100, 200 y 300 $\mu\text{g/ml}$) y una solución de DCMU 10 μM como control positivo. Las diferentes suspensiones de la mezcla **M1**, se prepararon a partir de una solución stock de 10 000 $\mu\text{g/ml}$, y se llevaron a la concentración deseada diluyéndose con una solución de Tween 20 al 0.05% en agua (como adyuvante); para el DCMU se partió de un stock 20 mM en EtOH.

Después de 15 días del tratamiento con los compuestos, las plantas fueron cosechadas a nivel del suelo, y puestas a secar en una estufa Thelco mod 70 de 37 a 45°C hasta peso constante, posteriormente la biomasa seca fue determinada empleando una balanza analítica OHAUS modelo AP210-0 [58].

6.2.10 Determinación de la actividad tóxica en el crustáceo *Artemia Salina*

2.2.10.1 Preparación de los organismos y muestras.

Se preparó una solución de agua de mar comercial (38 g de medio salino artificial por litro de agua destilada), en un recipiente de vidrio previamente acondicionado con una bomba de oxígeno, un termómetro y una lámpara. Se adicionaron los huevecillos de *Artemia salina* Leach y se dejaron en maduración durante 48 horas a 28° C. Al cabo de este tiempo, se disolvieron 20 mg de cada muestra (compuestos **1** y **2**) en 2ml de acetona. De esta solución, se transfirieron 500, 50 y 5 μl a tubos de ensayo. Posteriormente, se evaporó completamente el disolvente de cada tubo, y cada uno de los residuos se aforó a 5 ml con medio salino artificial (ocean Instant) y se sónico hasta obtenerse una suspensión homogénea de 1000, 100 y 10 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. La prueba con cada

muestra se realizó por triplicado, empleando un control y un blanco para el disolvente [59,60].

6.2.10.2 Bioensayo

Se realizó transfiriendo 10 larvas de *Artemia salina* dentro de cada tubo que contenía la muestra por evaluar. Después de 24 h de contacto entre las larvas y la muestra a 28 °C, se contaron los crustáceos sobrevivientes y el resultado se expresó como la concentración a la cual se mueren el 50% de la población (CL₅₀) calculada mediante el programa PROBIT [61,62].

7. RESULTADOS.

De los tallos y las hojas de *Cecropia obtusifolia* se obtuvieron seis extractos, tres de hojas y tres de tallos empleando tres disolventes diferentes (hexano, cloroformo y metanol) consecutivamente, que se probaron en los ensayos preliminares de germinación y síntesis de ATP.

7.1. Determinación de la germinación y crecimiento de raíz y tallo de *Lolium perenne* y *Trifolium alexandrinum* en presencia de los extractos de *C. obtusifolia*.

Para determinar el posible efecto pre-emergente de los extractos obtenidos de las partes aéreas de la planta *C. obtusifolia*, estos se evaluaron en la prueba de germinación y elongación de los tallos y la raíz de pasto (*Lolium perenne*) y trébol (*Trifolium alexandrinum*).

De los extractos ensayados en esta prueba no se observó un efecto inhibitorio significativo en la elongación del tallo y raíz, ni en el índice de germinación a las concentraciones ensayadas (Figuras 13-18). El efecto mayor se presentó en *Trifolium alexandrinum*, con el extracto clorofórmico y hexánico, que inhibieron aproximadamente un 30% el crecimiento de la raíz a 100 $\mu\text{g/ml}$ y 1000 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Figuras 14A y 15A). Mientras que el extracto metanólico de tallos, al ser aplicado en *Lolium perenne*, produjo un aumento tanto en la germinación como en la elongación del tallo y la raíz (Figura 18B). Es importante tomar en consideración que a 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ los extractos se probaron como suspensiones, ya que no se disolvieron.

Lolium perenne

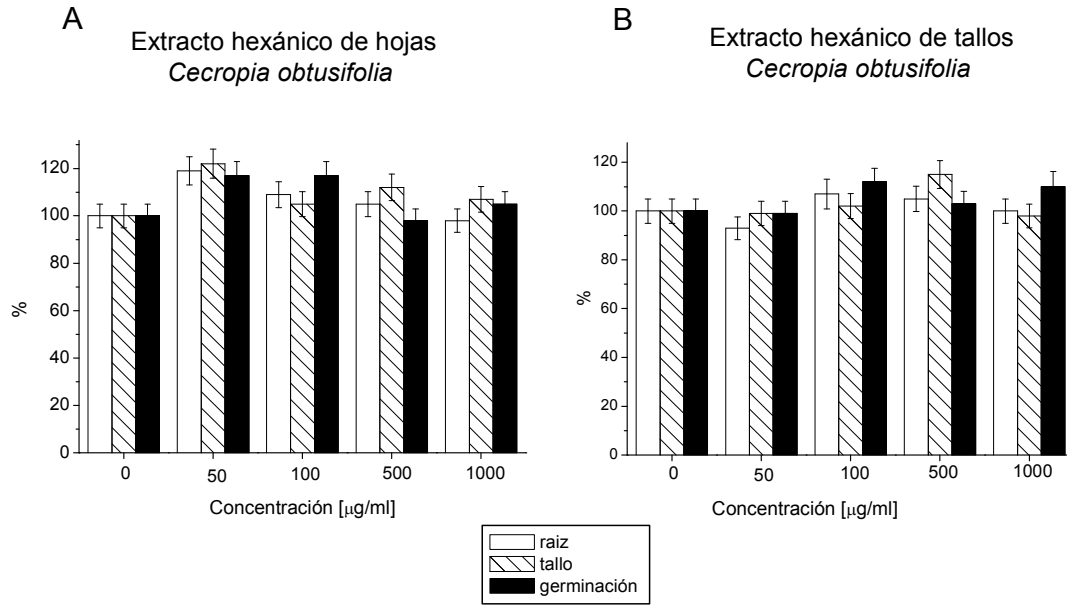


Figura 13: Efecto de los extractos hexánicos de hojas (A) y tallos (B) de *Cecropia obtusifolia* en la germinación y elongación del tallo y la raíz de *Lolium perenne* a los 5 días de experimentación. n=150; P=0.05

Lolium perenne

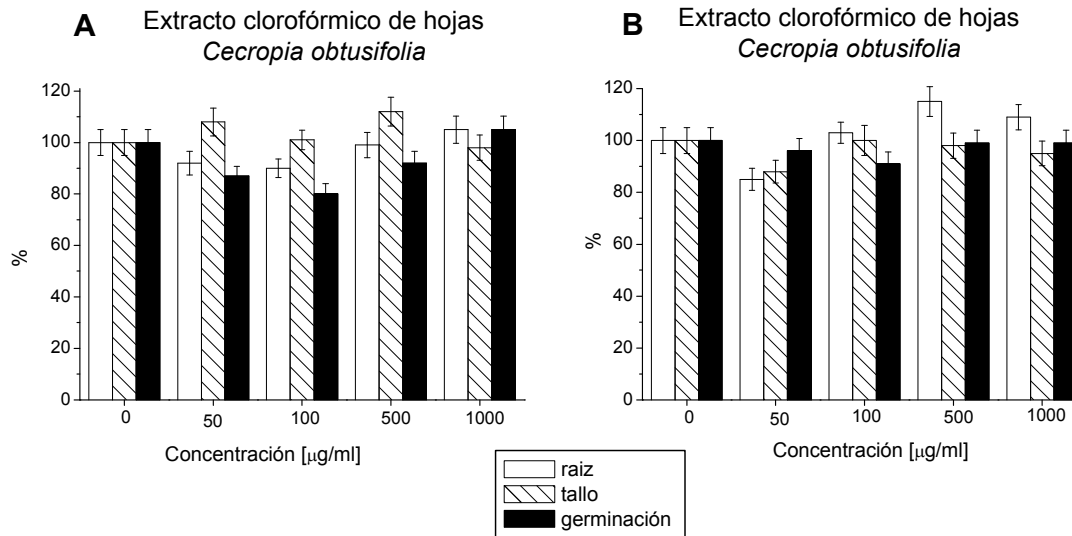


Figura 14: Efecto de los extractos clorofórmicos de hojas (A) y tallos (B) de *Cecropia obtusifolia* en la germinación y elongación del tallo y la raíz de *Lolium perenne* a los 5 días de experimentación. n=150; P=0.05

Lolium perenne

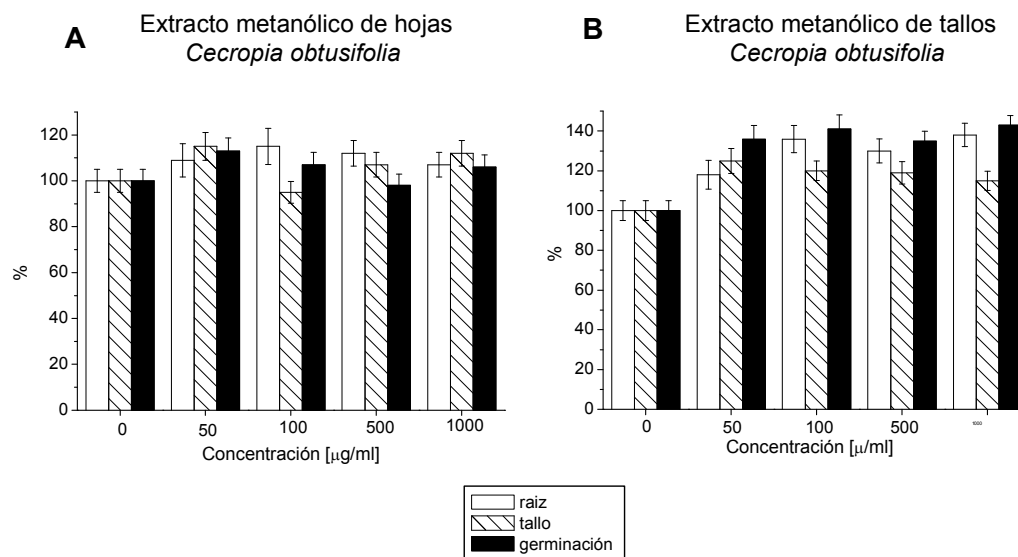


Figura 15: Efecto de los extractos metanólicos de hojas (A) y tallos (B) de *Cecropia obtusifolia* en la germinación y elongación del tallo y la raíz de *Lolium perenne* a los 5 días de experimentación. n=150; P=0.05

Trifolium alexandrinum

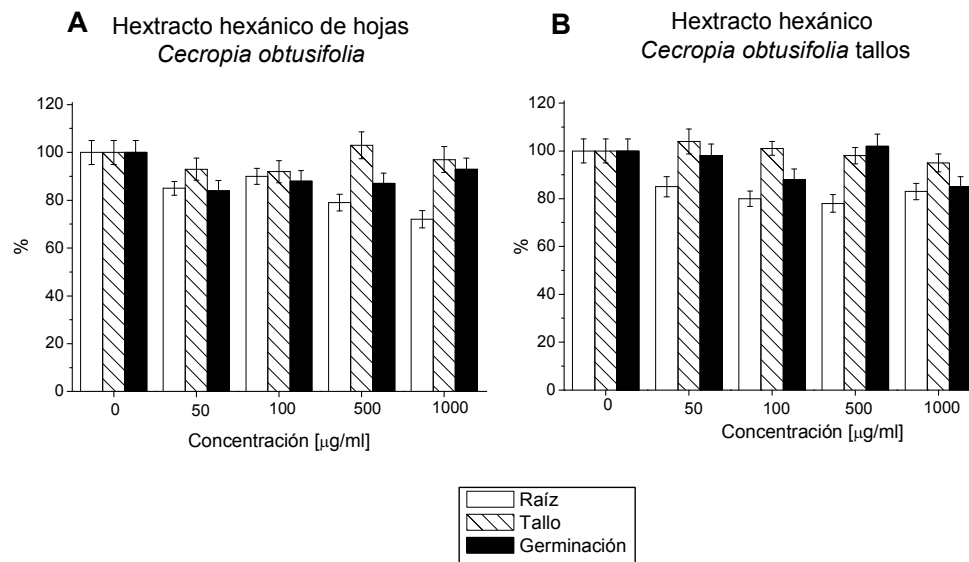


Figura 16: Efecto de los extractos hexánicos de hojas (A) y tallos (B) de *Cecropia obtusifolia* en la germinación y elongación del tallo y la raíz de *Trifolium alexandrinum* a los 5 días de experimentación. n=150; p=0.05

Trifolium alexandrinum

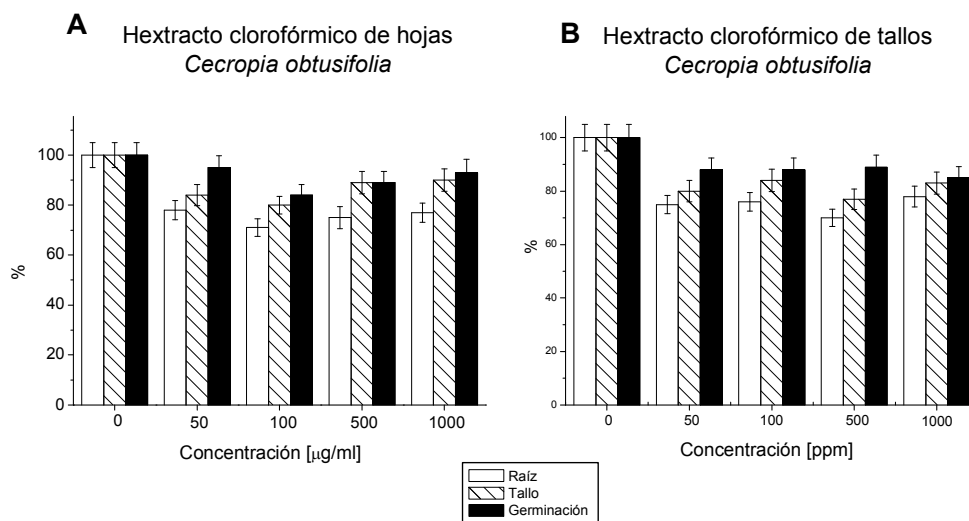


Figura 17: Efecto de los extractos clorofórmicos de hojas (A) y tallos (B) de *Cecropia obtusifolia* en la germinación y elongación del tallo y la raíz de *Trifolium alexandrinum* a los 5 días de experimentación. n=150; p=0.05

Trifolium alexandrinum

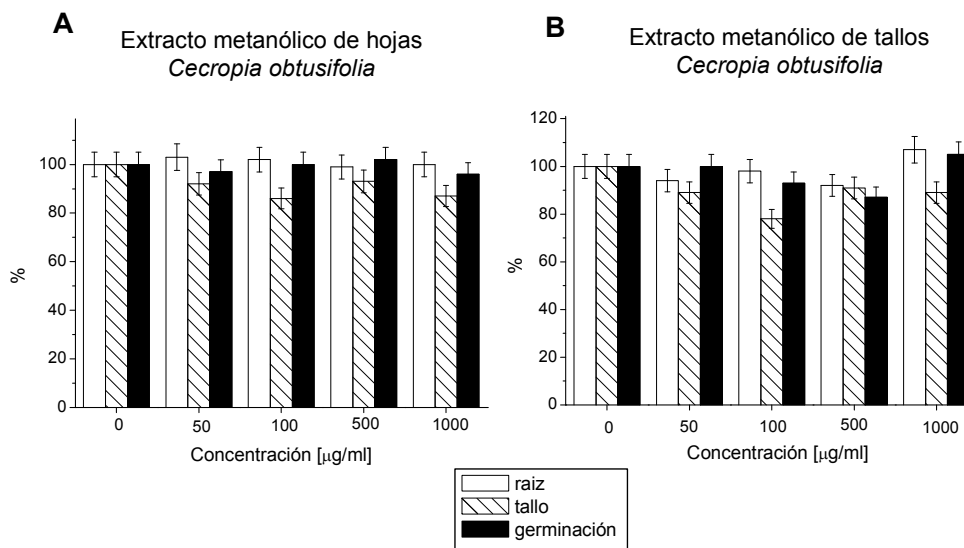


Figura 18: Efecto de los extractos metanólicos de hojas (A) y tallos (B) de *Cecropia obtusifolia* en la germinación y la elongación del tallo y la raíz de *Trifolium alexandrinum* a los 5 días de experimentación. n=150; p=0.05

7.2. Actividad inhibitoria de la síntesis de ATP.

Para determinar el posible efecto post-emergente de los extractos, se evaluó su efecto sobre la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de hojas de espinaca y lisados al momento de utilizarse. Dichos extractos presentaron una curva de inhibición de la síntesis de ATP dependiente de la dosis, a partir de la cual se obtuvo su valor de I_{50} (concentración a la cual se inhibe el 50% de la síntesis de ATP) (Tabla 4).

Los extractos hexánicos de los tallos y las hojas fueron los más activos, con un valor de I_{50} de 17.5 y 24.3 ppm respectivamente; seguidos por los extractos clorofórmicos de tallos ($I_{50} = 38.3$ ppm) y hojas ($I_{50} = 45.5$ ppm).

Sin embargo, debido a que la cantidad de tallos obtenidos de la planta es muy pequeña, solamente se procedió al fraccionamiento de los extractos de las hojas.

Tabla 4. Inhibición de la síntesis de ATP expresada como valores de I_{50} para los diferentes extractos de las partes aéreas de <i>C. obtusifolia</i> .	
Extracto	I_{50} [$\mu\text{g/ml}$]]
Hexánico de hojas.	24.3
Hexánico de tallos.	17.5
Clorofórmico de hojas.	45.5
Clorofórmico de tallos.	38.3
Metanólico de hojas.	81.8
Metanólico de tallos.	N/C

* Valor del control: $1047 \mu\text{M ATP mg}^{-1} \text{Chl h}^{-1}$

*N/C: No se calculó, ya que la curva de inhibición no alcanzó un valor de I_{50}

*Los valores presentados son el promedio de tres replicas.

7.3. Fraccionamiento del extracto hexánico de hojas de *Cecropia obtusifolia*.

El fraccionamiento primario del extracto hexánico a través de CCA con un gradiente de polaridad ascendente Hex-AcOEt, resultó en la obtención de 372 fracciones que fueron agrupadas de acuerdo a su similitud en CCF en 32

fracciones, las cuales se probaron en el mismo bioensayo realizado al extracto crudo, y los resultados se muestran en la Tabla 5

Tabla 5. Fracciones obtenidas para el extracto hexánico de hojas de *Cecropia obtusifolia* con un gradiente de polaridad ascendente y su valor de inhibición de síntesis de ATP expresado como valores de I_{50} obtenido por interpolación de las graficas de inhibición.

Gradiente Hex-AcOET	Fracciones	I_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Gradiente Hex-AcOET	Fracciones	I_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	
100% hexano	1	N/A	80:20	119-125	N/P	
	2-4	N/A		126-128	48.5	
	5	141.6		129-138	37.7	
	6	N/D		139-190	34.7	
	7	N/C		70:30	191-208	64.7
	8-12	N/C			209-258	132.1
90:10	13-16	N/A	60:40	258-264	N/C	
	17	N/A		265-285	N/C	
	18-20	N/A		286	N/D	
	21-23	94.2		287-307	N/D	
90:10	24-25	N/C	40:60	308-320	N/C	
	26-34	N/C	20:80	321-336	N/C	
	35-47	N/C	100% AcOEt	337-356	N/C	
	48-65	124.8	100% Acetona	357-367	N/P	
	66-79	94.21		368-372	N/P	
	80-112	52.7				
	113-118	N/C				

*N/C: No se calculó, ya que la curva de inhibición no alcanzó un valor de I_{50} .

*N/A: No fue activa.

*N/P: No se probó, ya que la cantidad obtenida es muy pequeña.

*N/D: No se probó, ya que a pesar de sonicarse no se obtiene una suspensión homogénea (se forma una "nata")

*Valor del control: $1360\mu\text{M ATP mg}^{-1}\text{Chl h}^{-1}$

*Los valores presentados son el promedio de tres replicas

7.3.1 Caracterización química del extracto hexánico de *C. obtusifolia*.

En la Tabla 6 se resumen las diferentes fracciones obtenidas, del extracto hexánico de las hojas de *Cecropia obtusifolia*.

Tabla 6: Fracciones caracterizadas químicamente obtenidas del extracto hexánico de las hojas de <i>Cecropia obtusifolia</i> .				
Nombre.	Gradiente.	Fracciones	Composición.	Rendimiento* %
F1	100% hexano	1-4	Hidrocarburos de alto peso molecular.	17.0
P1	90:10 hex:AcOEt	21-23 (cristalización hexano frio)	Mezcla de ácidos grasos	5.4
P2	90:10 hex:AcOEt	48-65	β -sitosterol, campesterol y estigmasterol	6.4
P3	90:10 hex:AcOEt	80-112 (**fraccionamiento secundario CCA)	Mezcla de ácidos grasos.	4.7
M1	90:10 hex:AcOEt	126-190	Mezcla de ácidos grasos y triterpeno (Ursa-9(11),12dien-3-ol)	9.5

*El rendimiento es con base al extracto hexánico.

**El fraccionamiento secundario se llevó a cabo en CCA fase reversa con gel de sílice C-18 con un gradiente de polaridad descendente MeOH: Acetona, con la posterior recristalización con metanol frio.

A pesar de que la fracción 1 (**F1**) no presentó actividad inhibitoria en la síntesis de ATP, se trato de caracterizar químicamente debido a que cristalizó de forma espontánea, con una conformación de hojuelas (Figura19A), lo sugería que se trataba de un compuesto puro.

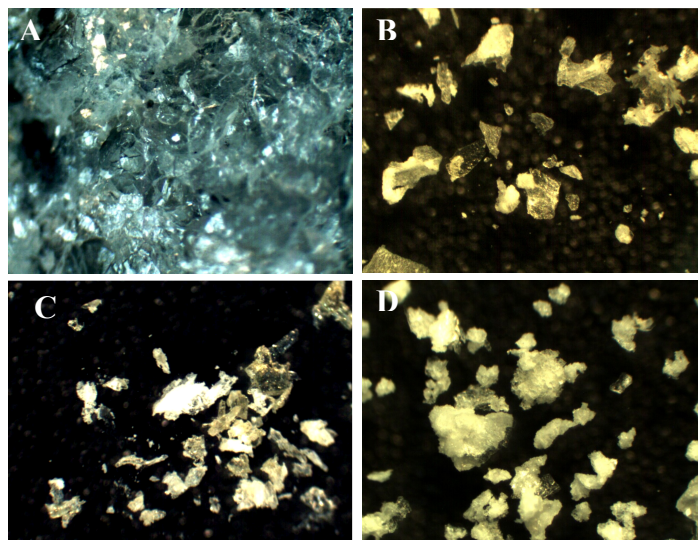


Figura 19: Cristales obtenidos de las fracciones del extracto hexánico. (A) **F1**, (B) **P1**, (C) **P2** y (D) **P3**.

El espectro de infrarrojo (IR) (Espectro 1, Apéndice 2 pag. 89) presentó señales con la siguiente asignación: en 2954, 2922 y 2851 cm^{-1} , para metilos, metilenos y metinos (elongación y estrechamiento) y en 1462 y 1377 cm^{-1} señales de confirmación de metilos y metilenos (bamboleo).

En el cromatograma de gases (CG) (Espectro 2, Apéndice 2), no se observaron picos definidos, lo cual sugería que se trataba de una mezcla, cuyos componentes son muy similares; sin embargo se observan 4 regiones más definidas, con tiempos de retención de 14.7, 15.48, 17.19 y 19.20 minutos. Los espectros de masas (EM) de estas regiones (Espectros 3A a-3D, Apéndice 2), mostraron una diferencia en unidades de masa entre las señales de 13, 14 o 16 UMAS; esto es indicativo de una fragmentación con pérdida de metilos y metilenos, lo cual sumado al espectro de IR, nos indicó que esta mezcla está constituida por hidrocarburos alifáticos de alto peso molecular.

De la fracciones 21-23, se obtuvo por cristalización con hexano frío un polvo blanco (**P1**) (Figura 19B); cuyo espectro de IR (Espectro 4, Apéndice 2) presentó señales en 3340 correspondiente a grupos hidroxilo, 2916 y 2848 cm^{-1} para metilos y metilenos y en 1472 y 1462 cm^{-1} señales de confirmación de metilos y

metilenos, en 1731 cm^{-1} la señal para el carboxilato y en 1247 la señal que se asignó a la vibración C-O.

La resonancia magnética nuclear de hidrógeno (HRMN) (Espectro 5, Apéndice 2) mostró un espectro con señales de hidrógenos alifáticos solamente, por lo que se supuso se trataba de ésteres de ácidos grasos.

Al introducirse esta muestra en el cromatógrafo de gases, no volatilizó, por lo que se debió de derivar (reacción de metilación) siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.1.6. El cromatograma de gases de la fracción metilada (Espectro 6, Apéndice 2) mostró 21 señales, de las cuales se identificaron algunas de ellas al comparar sus espectros de masas con los disponibles en la biblioteca de la Unidad de servicios de apoyo a la Investigación (USAI), de la Facultad de Química, UNAM (Espectros 7-16, Apéndice 2) y se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Componentes de P1 caracterizados por su comparación de los espectros de Masas con respecto a los disponibles en la biblioteca de la USAI (Fac. Quim. UNAM).				
Pico.	RT [min]	Fórmula Condensada	Compuesto.	Proporción %
1	3.5	$C_{12}H_{24}O_2$	Ácido láurico	4.3
2	4.0	$C_{14}H_{28}O_2$	Ácido mirístico	3.8
3	4.4	$C_{16}H_{32}O_2$	Ácido palmítico	3.8
4	4.5	$C_{18}H_{32}O_2$	Ácido linoleico	4.5
7	4.8	$C_{18}H_{36}O_2$	Ácido esteárico	12.6
8	4.9	$C_{20}H_{40}O_2$	Ácido araquídico	8.9
11	5.2	$C_{22}H_{44}O_2$	Ácido behénico	11.7
12	5.3	$C_{24}H_{48}O_2$	Ácido lignocérico	9.6
17	5.6	$C_{26}H_{52}O_2$	Ácido cerótico	10.8
19	5.7	$C_{28}H_{56}O_2$	Ácido octaeicosanóico	6.7

De las fracciones 48-65, se obtuvo un polvo de color amarillo claro (**P2**) (Figura 19 C), cuyo espectro de IR (Espectro 17, Apéndice 2), presentó señales para grupos hidroxilo en 3423 cm^{-1} , 2918 y 2849 cm^{-1} para metilos y metilenos y su confirmación en 1460 .

El espectro de HRMN (Espectro 18, Apéndice 2) mostró señales para hidrógenos alifáticos, el cual era muy similar al de una mezcla de esteroides (β -sitosterol, estigmasterol y campesterol) reportado anteriormente para esta planta [8,9].

El análisis cromatográfico de gases (Espectro 19, Apéndice 2), mostró 5 señales, de los cuales a los tiempos de retención de 720, 750 y 768 seg. los picos fueron identificados como campesterol, estigmasterol y β -sitosterol respectivamente, por comparación de sus espectros de masas (Espectros 20-22, Apéndice 2) con los disponibles en la literatura [63].

Las fracciones 80-112 (80), se separaron por CCA fase reversa con gel de sílice C-18 y un gradiente de polaridad descendente MeOH:acetona obteniéndose 70 fracciones agrupadas en un total de 10 fracciones. De este fraccionamiento, la subfracción 3 (4-13), se separó por cristalización con metanol frío, obteniéndose un polvo blanco (Figura 15 D) (**P3**), cuyo espectro de IR (Espectro 23, Apéndice 2) presentó señales en 2917 y 2849 cm^{-1} correspondientes a metilos y metilenos, así como sus señales de confirmación aproximadamente en 1400 , en 1700 cm^{-1} la señal para el carboxilato, en 1296 cm^{-1} la señal fue asignada a la vibración C-O y en 3018 cm^{-1} se observa aunque débil la señal para el grupo hidroxilo.

El espectro de HRMN (Espectro 24) mostró un espectro con señales de hidrógenos alifáticos solamente, por lo que se supuso se trataba de ésteres de ácidos grasos.

El cromatograma de gases de la fracción 80-112 metilada (Espectro 25) mostró 6 picos; y los componentes fueron identificados al comparar sus espectros de masas (Espectro 7-16, Apéndice 2) con los disponibles en la base de datos de la USAI (Tabla 8).

Tabla 8: Componentes de **P3** caracterizados por su comparación de los espectros de Masas con respecto a los disponibles en la biblioteca de la USAI (Fac. Quim. UNAM).

Pico.	RT [min]	Fórmula Condensada	Compuesto.	Proporción %
1	10.18	$C_{16}H_{32}O_2$	Ácido palmítico	6.7
2	11.01	$C_{18}H_{32}O_2$	Ácido linoléico	20.3
3	11.17	$C_{18}H_{36}O_2$	Ácido esteárico	17.1
4	12.87	$C_{20}H_{40}O_2$	Ácido araquídico	4.8
5	13.64	$C_{24}H_{48}O_2$	Ácido lignocérico	36.6
6	14.40	$C_{28}H_{56}O_2$	Ácido octaeicosanóico	14.4

Las fracciones 126-128, 129-138 y 139-190 se juntaron para obtener una mayor cantidad de muestra debido a que su composición era muy similar, obteniéndose la mezcla **M1**.

El espectro de IR de **M1** (Espectro 26, Apéndice 2) mostró señales en 3401 cm^{-1} correspondiente al grupo hidroxilo, en 2917 y 2849 cm^{-1} para metilos y metilenos, señales de confirmación de metilos y metilenos en 1462 cm^{-1} , en 1710 cm^{-1} la señal para el carboxilato y en 1249 cm^{-1} la señal fue asignada a la vibración C-O.

El espectro de HRMN (Espectro 27, Apéndice 2) mostró señales de hidrógenos alifáticos solamente, por lo que se supuso se trataba de ésteres de ácidos grasos.

El cromatograma de gases de la fracción metilada (Espectro 28, Apéndice 2) mostró 10 picos principales; y los componentes de la fracción fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con los disponibles en la base de datos de la USAI (Espectros 7-16 y 29) y se muestran en la Tabla 9. En la Figura 20 se muestra la estructura del triterpeno Ursa-9(11), 12dien-3-ol.

Tabla 9: Componentes de **M1** caracterizados por su comparación de los espectros de Masas con respecto a los disponibles en la biblioteca de la USAI (Fac. Quim. UNAM).

Pico.	RT [min]	Fórmula Condensada	Compuesto.	Proporción %
1	7.71	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	Ácido láurico	3.9
2	9.05	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	Ácido mirístico	5.9
3	10.18	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido palmítico	39.2
4	11.01	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Ácido linoléico	18.6
5	11.17	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Ácido esteárico	8.8
6	12.87	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	Ácido behénico	5.0
7	13.64	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	Ácido lignocérico	3.4
8	14.40	C ₂₆ H ₅₂ O ₂	Ácido cerótico	7.8
9	15.30	C ₂₈ H ₅₆ O ₂	Ácido octaeicosanóico	3.9
10	16.48	C ₃₀ H ₄₈ O	Ursa-9(11),12dien-3-ol	3.9

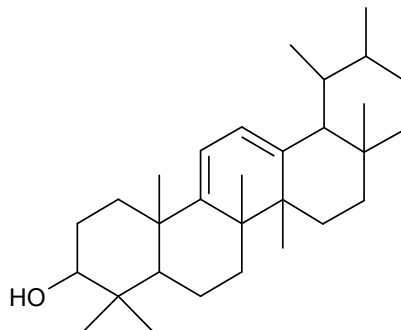


Figura 20: Estructura del Ursa-9(11),12dien-3-ol

7.4. Fraccionamiento del extracto clorofórmico de hojas de *Cecropia obtusifolia*.

La fracción hexánica del extracto clorofórmico mostró una mayor actividad como inhibidor de la síntesis de ATP con un valor de I_{50} de 51.3 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo, el espectro de HRMN indicó que nuevamente se trataba de ácidos grasos (Espectro 30, Apéndice 2), por lo que no se procedió a su separación, ya que se buscaban compuestos de naturaleza diferente.

La fracción clorofórmica no presentó una inhibición significativa de la síntesis de ATP a las concentraciones ensayadas (datos no mostrados).

La fracción acetónica posee una actividad inhibitoria de la síntesis de ATP (I_{50} = 140.3 $\mu\text{g/ml}$), por lo que se procedió a su fraccionamiento en CCA con un gradiente de polaridad ascendente $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$, obteniéndose 140 fracciones agrupadas en un total de 13 fracciones (Tabla 10),

Tabla 10. Fracciones obtenidas para la fracción acetónica del extracto clorofórmico de hojas de *Cecropia obtusifolia* con un gradiente de polaridad ascendente y su valor de inhibición de síntesis de ATP expresado como valores de I_{50}

Gradiente	Fracciones	I_{50}	Gradiente	Fracciones	I_{50}
$\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$		$\mu\text{g/ml}$	$\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$		$\mu\text{g/ml}$
90:10	1-5	N/A	70:30	37-50	190
	6-9	N/A	60:40	51-70	N/C
	10	N/P		71-88	N/D
	11-13	170	50:50	89-110	N/C
80:20	14-17	N/C	30:70	111-120	N/P
	18-31	N/C		121-130	N/P
	32-36	250	100% MeOH	131-140	N/C

*N/C: No se calculó, ya que la curva de inhibición no alcanzó un valor de I_{50} .

*N/A: No fue activa.

*N/P: No se probó, ya que la cantidad obtenida es muy pequeña.

*N/D: No se probó, ya que a pesar de sonicarse no se obtiene una suspensión homogénea (se forma una "nata")

*Valor del control: 1050 μM ATP $\text{mg}^{-1}\text{Chl h}^{-1}$

*Los valores presentados son el promedio de tres replicas

En la Tabla 11 se resumen las diferentes fracciones obtenidas, del extracto clorofórmico de las hojas de *Cecropia obtusifolia*.

Tabla 11: Fracciones caracterizadas químicamente obtenidas de la fracción acetónica del extracto clorofórmico de las hojas de *Cecropia obtusifolia*.

Nombre.	Gradiente.	Fracciones	Composición.	Rendimiento (%)
P4	90:100 CHCl ₃ :MeOH	11-13	Ácidos grasos y clorofilas	1.7
Compuesto 1	90:10 hex:AcOEt	14-31 (cristalización metanol frío)	Glucósido de β-sitosterol	5.7
Compuesto 1A	No aplica	Acetilación del compuesto 1	Glucósido de β-sitosterol tetraacetilado	85

*El rendimiento es con base a la fracción acetónica del extracto clorofórmico

**El rendimiento es con base a la materia prima empleada en la reacción

De las fracciones 11-13 se obtuvieron cristales de color verde (**P4**) (Figura 21 A), que de acuerdo a su espectro de HRMN (Espectro 31, Apéndice 2)) se supo que estaba constituida por ácidos grasos.

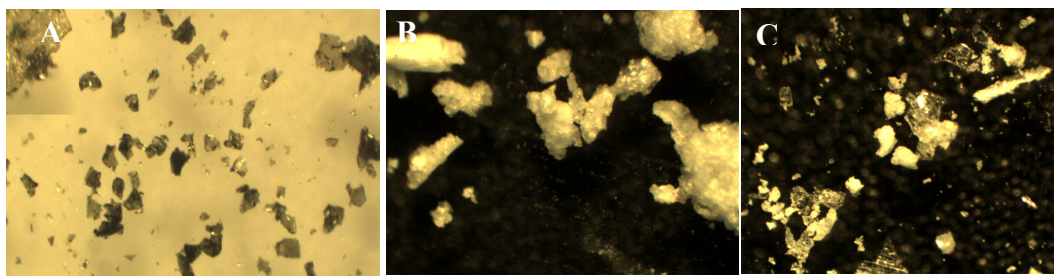


Figura 21: Cristales obtenidos de las fracciones del extracto clorofórmico. (A) **P4**, (B) Compuesto **1** y (C) el derivado acetilado **1A**.

De las fracciones 14-17 y 18-31 se obtuvo de forma independiente, por cristalización con metanol frío un polvo de color blanco (Compuesto **1**) (Figura 21 B), que presentó solo una mancha en cromatografía en capa fina (CCF) con un valor de R_f de 0.6 en un sistema CHCl₃:MeOH 85:15 con punto de fusión mayor a 250 °C, e insoluble en solventes orgánicos (hexano, CHCl₃, AcOEt, acetona y MeOH).

El espectro de IR del compuesto **1** (Espectro 32, Apéndice 2) mostró señales en 3401 cm^{-1} correspondientes a grupos hidroxilo, en 2900 y 2869 cm^{-1} señales de metilos y metilenos con su confirmación en 1465 cm^{-1} y en 1640 cm^{-1} la señal de un grupo éster.

Debido a que el compuesto **1** fue insoluble en solventes orgánicos, se acetiló siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.1.7 para poder obtener los espectros de RMN y de CG-EM que ayudaron a conocer su estructura. Ese derivado obtenido es un polvo de color blanco (Compuesto **1A**) (Figura 21 C), con punto de fusión de $232\text{-}234\text{ }^{\circ}\text{C}$, y con un Rf de 0.6 en un sistema CHCl_3 :Acetona 95:05.

El espectro de IR (Espectro 33, Apéndice 3) de **1A** mostró señales en 3432 cm^{-1} correspondientes a grupos hidroxilo, la cual presenta una menor intensidad con respecto a la del compuesto **1**, lo cual es indicativo de que la acetilación se llevó a cabo de forma exitosa; además la señal del carboxilato aparece en 1753 cm^{-1} .

El espectro de HRMN de **1A** (Espectro 34, Apéndice 2) mostró señales de hidrógenos alifáticos (señales menores a 3.0 ppm) y de hidrógenos con base oxígeno (señales mayores a 3 ppm); además presentó 4 señales pertenecientes a grupos acetilo (aproximadamente en 2 ppm); por lo que se supuso se trataba del glucósido de algún triterpeno o esteroide. Este espectro fue comparado con el existente en la literatura para el glucósido de β -sitosterol tetracetilado [64] y se observó que se trataba del mismo compuesto.

7.5. Efecto de la fracción 126-190 sobre la síntesis de ATP

La fracción **M1** del extracto hexánico de los tallos de *Cecropia obtusifolia*, fue quien mostró una mayor actividad inhibitoria sobre la síntesis de ATP con un valor de $I_{50} = 29.4\text{ }\mu\text{g/ml}$ y una inhibición de hasta 80% a $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ (Figura 22 A),

mientras que su derivado metilado **M1m** mostró una menor inhibición con un valor de $I_{50}=76.6 \mu\text{g/ml}$ y una inhibición también del 80 % con una concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 22 B).

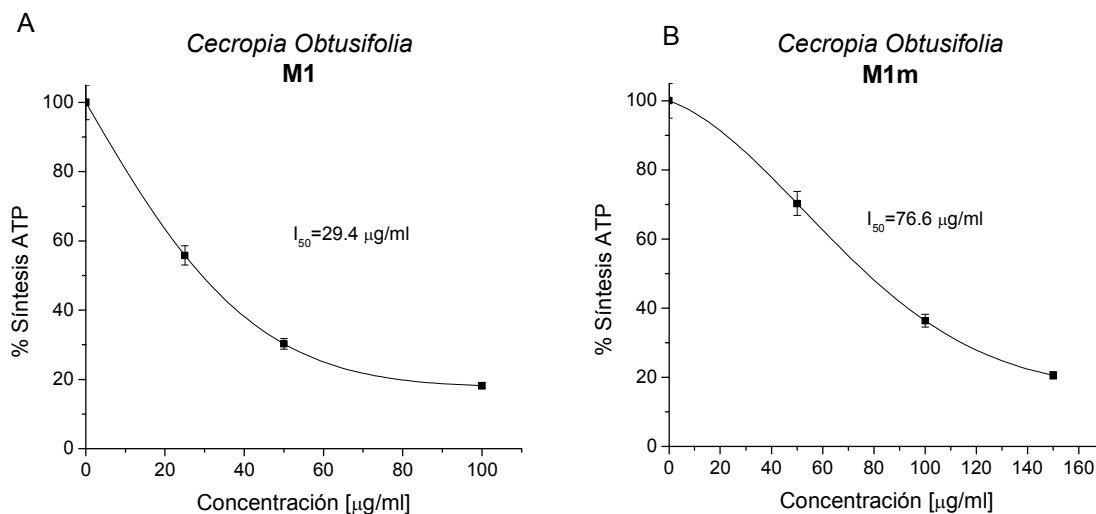


Figura 22: Efecto de las concentraciones crecientes de las fracciones **M1** (A) y la fracción metilada **M1m** (B) sobre la síntesis de ATP en tilacoides de espinacas. El valor del control para la síntesis de ATP fue de $1065 \mu\text{M ATP mg}^{-1} \text{Chl h}^{-1}$.

Dado que **M1** es de composición similar a **P1** y **P3**, los ácidos grasos presentes en **M1** se obtuvieron comercialmente de Sigma-Aldrich®, para evaluar su efecto tanto de forma independiente como en las proporciones en las que se encuentran en las fracciones **M1** y **P3** sobre la síntesis de ATP; también se evaluó la mezcla de los ácidos grasos más activos, se excluyó de este ensayo al triterpeno, debido a que no se pudo aislar a partir de la fracción, y no se pudo obtener de forma comercial. Los ácidos grasos y las mezclas se probaron como suspensiones ya que al agregarse a la cubeta de reacción estos precipitaron.

La Tabla 12 muestra que los ácidos grasos activos fueron el ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico y ácido linoléico, siendo este último el más activo ($I_{50} = 740, 618, 200$ y $24 \mu\text{M}$ respectivamente).

Tabla 12: Valores de inhibición de la síntesis de ATP expresado como valores de I_{50} obtenidos para los ácidos grasos presentes en la fracción M1 obtenidos de forma comercial; así como las mezclas de los mismos (Ma , Mb y Mc)			
Fórmula Condensada	Compuesto.	I_{50} Promedio [$\mu\text{g/ml}$]	I_{50} Promedio. [mM]
$\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}_2$	Ácido láurico	147.7 \pm 5%	740
$\text{C}_{14}\text{H}_{30}\text{O}_2$	Ácido mirístico	141.1 \pm 3%	618
$\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{O}_2$	Ácido palmítico	50.5 \pm 9%	200
$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	Ácido linoléico	6.9 \pm 7%	24
$\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{O}_2$	Ácido esteárico	N/C	N/C
$\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2$	Ácido araquídico	N/C	N/C
$\text{C}_{22}\text{H}_{46}\text{O}_2$	Ácido behénico	N/D	N/D
$\text{C}_{24}\text{H}_{50}\text{O}_2$	Ácido lignocérico	N/D	N/D
$\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{O}_2$	Ácido cerótico	N/D	N/D
$\text{C}_{28}\text{H}_{58}\text{O}_2$	Ácido octaeicosanóico	N/D	N/D
	Ma	31.9 \pm 4%	No aplica
	Mb	55.8 \pm 9%	No aplica
	Mc	44.7 \pm 6%	No aplica

Ma: Todos los ácidos grasos (en las proporciones de **M1**).

Mb: Ácido láurico + palmítico + mirístico + linoléico (en las proporciones de **M1**).

Mc: Ácido palmítico + linoléico + esteárico + araquídico + lignocérico + octaeicosanóico (en las proporciones de **P3**).

*N/C: No se calculó, ya que la curva de inhibición no alcanzó un valor de I_{50} .

*N/A: No fue activa.

*N/D: No se probó, ya que a pesar de sonicarse no se obtiene una suspensión homogénea (se forma una "nata")

*Valor del control: 1050 μM ATP $\text{mg}^{-1}\text{Chl h}^{-1}$

*Los valores presentados son el promedio de tres réplicas

7.6. Efecto de M1 sobre el transporte de electrones.

La fotofosforilación está acoplada al transporte de electrones, por lo que la formación de ATP puede ser inhibida por el bloqueo del transporte de electrones, por una inhibición directa de la H^+ -ATPasa o por desacoplamiento de la síntesis de ATP del transporte de electrones [65]. Para elucidar el mecanismo de acción **M1** en la fotosíntesis se investigó su efecto sobre el transporte de electrones no cíclico de agua al pool Fe-S del FS I. (Figura 12, Reacción 1)

La fracción **M1** inhibió el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado a diferentes grados (Figura 23). El transporte de electrones desacoplado fue el más afectado con un valor de I_{50} de 88.8 $\mu\text{g/ml}$, mientras que para los transportes basal y fosforilante no se pudo obtener un valor de I_{50} .

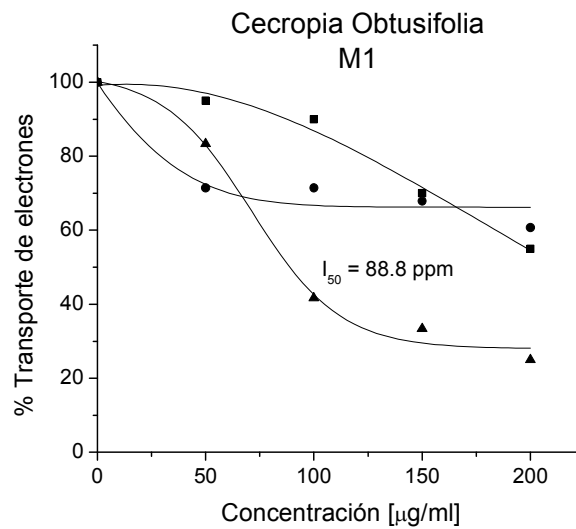


Figura 23: Efecto de concentraciones crecientes de la fracción **M1** en el transporte de electrones basal (■), fosforilante (●) y desacoplado (▲). El valor de los controles fueron 571, 600 y 1500 $\mu\text{equiv e}^-/\text{mgChl}$ respectivamente.

7.7. Sitios de interacción de los M1 sobre la fotosíntesis y sus reacciones parciales.

Para localizar el sitio de inhibición de **M1** sobre la cadena transportadora de electrones en tilacoides, así como su efecto sobre el FS II, FS I y sus reacciones parciales se midió el transporte de electrones empleando donadores y aceptores de electrones artificiales, así como los inhibidores apropiados (Figura 12) [56].

La Tabla 13 muestra como la mezcla **M1** inhibe el Fotosistema II (FS II) medido de agua a Q_A mientras que no posee un efecto sobre el FS I medido desde Citocromot b_6f hasta el pool Fe-S del FSI. Las reacciones parciales del flujo de electrones del FS II de agua al centro de reacción P680 y de P680 a Q_A también fueron inhibidas por **M1**.

Tabla 13. Efecto de **M1** sobre el FS II, FS I, la velocidad del transporte de electrones y las reacciones parciales del FS II medido *in vitro* empleando diferentes aceptores y donadores artificiales de electrones..

Conc. μM	FS II		H ₂ O a SiMo		DPC a CPIP		FS I	
	H ₂ O a DCPIP						TMQH ₂ a MV	
	a	%	a	%	b	%	a	%
M1								
0	400	100	175	100	93	100	523	100
10	236	59	175	100	93	100	523	100
25	181	45	170	97	83	89	523	100
50	109	27	149	85	61	66	523	100
100	72	23	128	73	50	54	523	100
150	0	0	119	68	44	47	523	100
200	0	0	114	65	32	34	523	100

a = $\mu\text{equiv. e}^- \text{mg}^{-1} \text{Chl h}^{-1}$;

b = $\mu\text{M DCPIPred mg}^{-1} \text{Chl h}^{-1}\text{M}$

7.8. Fluorescencia de la clorofila a medida en la presencia de M1.

Para corroborar los sitios de interacción de esta mezcla de ácidos grasos en el FS II, cloroplastos recién lisados fueron incubados por 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente con diferentes concentraciones de **M1**, y se emplearon como controles positivos 10 μM de DCMU y cloroplastos tratados con 0.8 M Tris pH 8.0. En la Figura 24 se muestra la gráfica de inducción de fluorescencia obtenida para este ensayo. En la Tabla 14 se muestra un resumen de los parámetros de fluorescencia obtenidos por el análisis de esta curva empleando el programa Byolizer® [66].

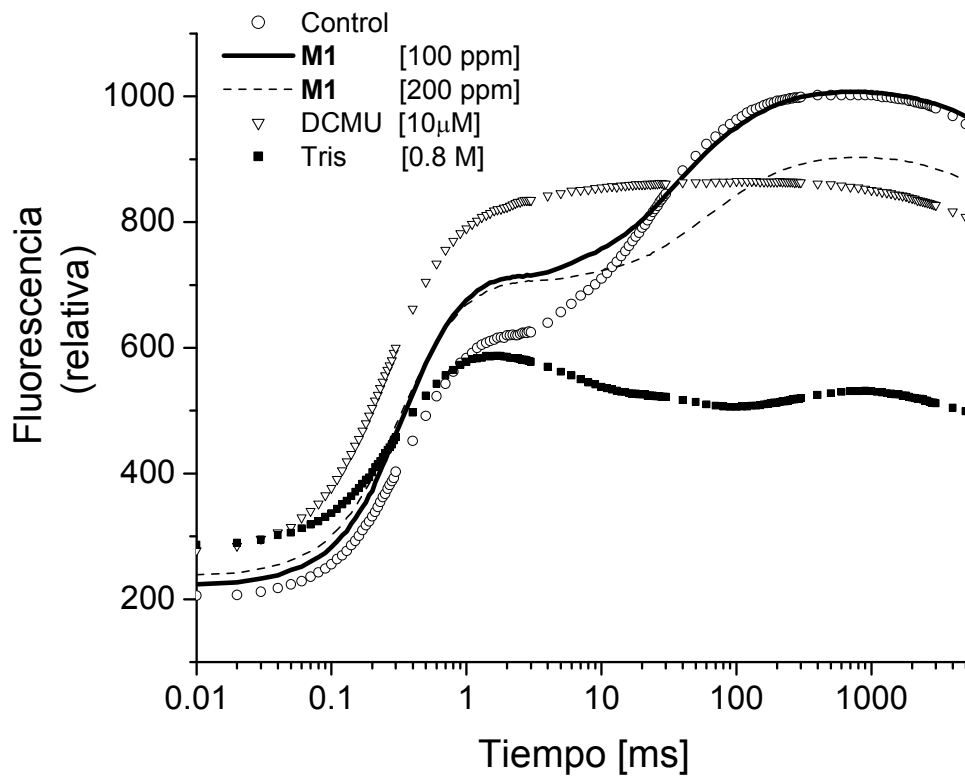


Figura 24: Desarrollo de fluorescencia de la clorofila a, en cloroplastos recién lisados en presencia de diferentes concentraciones de **M1**, 10 μM DCMU y tilacoides tratados con 0.8M de Tris a pH 8.0, La gráfica control se muestra para compararse con las muestras tratadas. La fluorescencia fue medida a temperatura ambiente, y se muestran los datos promedio de 3 réplicas.

Tabla 14: Parámetros extraídos del análisis de la curva de inducción de fluorescencia (OJIP) empleando el software Byolizer® [66], así como su descripción.	
F_t	Fluorescencia al tiempo t después de iluminación actínica.
F_0	Fluorescencia mínima, cuando todos los centros de reacción del FS II (RC) están abiertos.
F_j	Fluorescencia en el punto j (2ms)
F_i	Fluorescencia en el punto i (30ms)
F_m	Fluorescencia máxima, cuando todos los RC del FS II están cerrados.
t_{Fm}	Tiempo al cual se tiene la fluorescencia máxima.
$W_t = F_{v,t}/(F_j-F_0) = (F_t-F_0)/(F_j-F_0),$	Fluorescencia variable relativa normalizada entre dos tiempos.
$F_{v,t} = F_t - F_0$	Fluorescencia relativa en el tiempo t
Área	Área total sobre la curva.
$V_t = (F_t-F_0)/(F_m-F_0)$	Fluorescencia variable relativa en el tiempo T
$V_j = (F_{2ms}-F_0)/(F_m-F_0)$	Fluorescencia variable relativa en el punto j (2ms).
$V_i = (F_{30ms}-F_0)/(F_m-F_0)$	Fluorescencia variable relativa en el punto i (30ms).
$dV/dt_0 = (V_t-V_0)/(t-t_0)$	Cambio de la fluorescencia variable relativa (Vt) con respecto al tiempo.
$M_0 = 4(F_{300\mu s}-F_0)$	Pendiente inicial aproximada de el trasciente de fluorescencia $V = f(t)$.
$S_m = EC_0/RC = \text{Área}/(F_m-F_0)$	Área total normalizada sobre la curva (reflejando apagamiento de los eventos de reducción de Q_A) o acarreadores totales de electrones por centros de reacción.
K_p	Constantes de velocidad de excitación vía fotoquímica.

Tabla 14 (cont): Parámetros extraídos del análisis de la curva de inducción de fluorescencia (OJIP) empleando el software Byolizer® [66], así como su descripción.	
K_n	Constantes de velocidad de excitación no fotoquímica.
$S_m = K_p + K_n$	Número total de excitones por segundo.
$\phi P_0 = \text{Phi}(P_0) = TR_0/ABS = 1-F_0/F_m = F_V/F_m$	Índice fotosintético
$\Psi E_0 = \text{PSI}_0 = ET_0/TR_0 = 1-V_j$	Probabilidad de que un excitón atrapado pueda mover un electrón hasta Q_A .
$ABS/RC = M_0/V_j/\phi P_0$	Absorción por centro de reacción.
$TR_0/RC = M_0/V_j$	Energía atrapada por centro de reacción a $t = 0$.
$ET_0/RC = (M_0/V_j)\Psi E_0 = (M_0/V_j)(1-V_j)$	Transporte de electrones por centro de reacción a $t = 0$.
$DI_0/RC = (ABS/RC)-(TR_0/RC)$	Disipación en forma de calor por centro de reacción a $t = 0$.
$\delta R_0 = RE_0/TR_0 = (1-V_i)/(1-V_j)$	Eficiencia con la cual un electrón puede reducir los aceptores finales de electrones del FS I

El análisis de las diferencias de las curvas de fluorescencia variable relativa obtenidas con los cloroplastos tratados con **M1** y Tris, con respecto al control, cuando la fase O-J está normalizada entre F_j a F_0 con la ecuación:

$$F_j - F_0; W_t = F_{v,t}/(F_j - F_0) = (F_t - F_0)/(F_j - F_0)$$

muestra la aparición de la banda K (Figura 25), la cual se debe a un desequilibrio en el flujo de electrones entre el lado donador y el lado aceptor del FS II. Sin embargo, las bandas K que aparecen con las diferentes concentraciones de **M1** son relativamente pequeñas comparadas con la banda que aparece con el tratamiento de Tris.

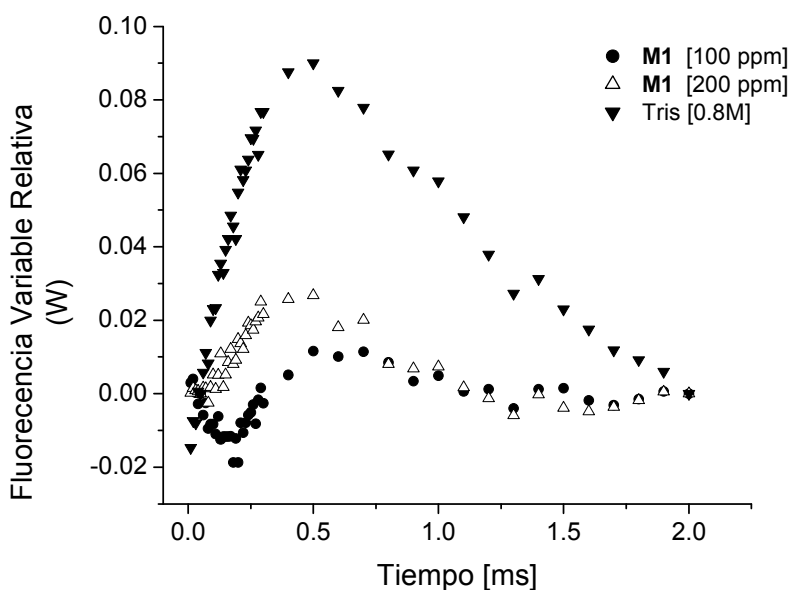


Figura 25: Aparición de la banda K alrededor de 300 μ s. Diferencia de cada curva de inducción de fluorescencia de clorofila a con respecto al control con la fluorescencia variable relativa en la amplitud de $F_j - F_0$ para **M1** a diferentes concentraciones, así como tilacoides tratados con 0.8M Tris pH 8. La fluorescencia fue medida a temperatura ambiente, y se muestran los datos promedio de 3 réplicas

Para establecer si estas bandas corresponden con un efecto directo de **M1** en la enzima que fotoliza el agua, se calculó la fracción de OEC activa obteniéndose un valor del 95% empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Fracción de OEC}_{\text{activa}} = [1 - (V_k/v_j)]_{\text{tratamiento}} / [1 - (V_k/V_j)]_{\text{control}}$$

El análisis de las diferencias de cada una de las curvas obtenidas con las diferentes concentraciones de **M1** con respecto al control, cuando la fase O-I de la fluorescencia variable relativa de cada una de las curvas está normalizada entre $F_i - F_0$ con la ecuación:

$$W_t = F_{v,t} / (F_i - F_0) = (F_t - F_0) / (F_i - F_0)$$

muestra una clara banda J aproximadamente en 2 ms, cuya intensidad es claramente dependiente de la concentración (Figura 26). Este es un

comportamiento típico de los trasientes de fluorescencia de la clorofila a en presencia de DCMU, en donde un aumento en el nivel J es observado [41].

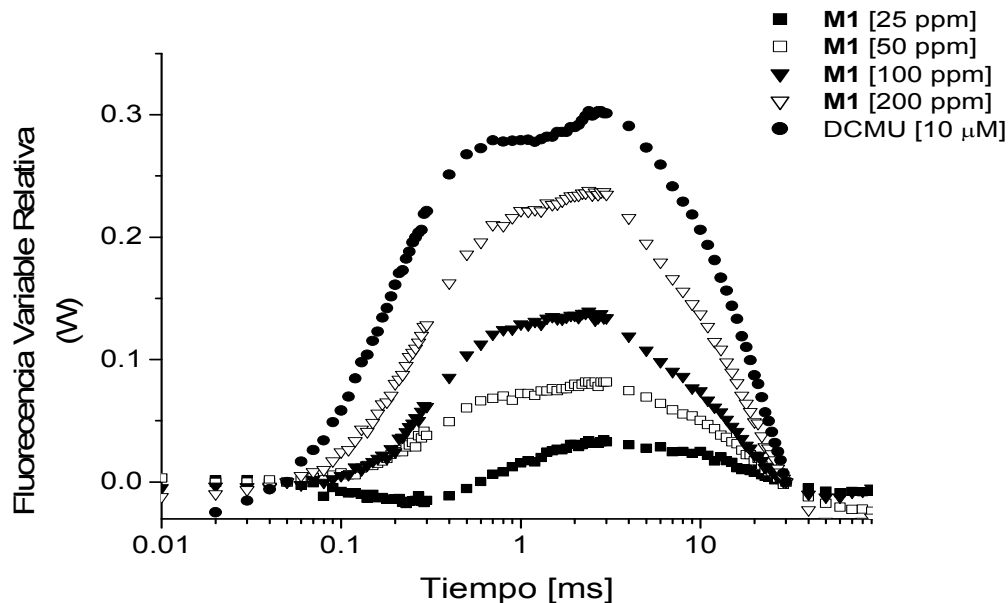


Figura 26: Aparición de la banda J alrededor de 2ms. Diferencia de cada curva de inducción de fluorescencia de clorofila a con respecto al control con la fluorescencia variable relativa en la amplitud de $F_i - F_0$ para **M1** a diferentes concentraciones, así como DCMU $10 \mu\text{M}$. La fluorescencia fue medida a temperatura ambiente, y se muestran los datos promedio de 3 réplicas

En la Figura 27 se muestran en forma de una gráfica de radar o de “telaraña” los valores de los diferentes parámetros fotosintéticos calculados a partir de las curvas de inducción de fluorescencia con el programa Biolyser [66]. Para los tratamientos con **M1** PHI(P_0) y PSII disminuyen aproximadamente 10 y 35 % a $200 \mu\text{g/ml}$ con respecto al control (Fig. 27), el transporte de electrones por centro de reacción (ET/RC) disminuye del 25 al 30 % y el valor de δR_0 aumenta del 20 al 70 %. El tamaño de la antena por centro de reacción (ABS/RC) aumenta en un 10 y 20 % para 100 y $200 \mu\text{g/ml}$; hay un aumento significativo de la disipación de la energía absorbida por medio de calor (DIO/RC), más del 50 % a la concentración de $200 \mu\text{g/ml}$

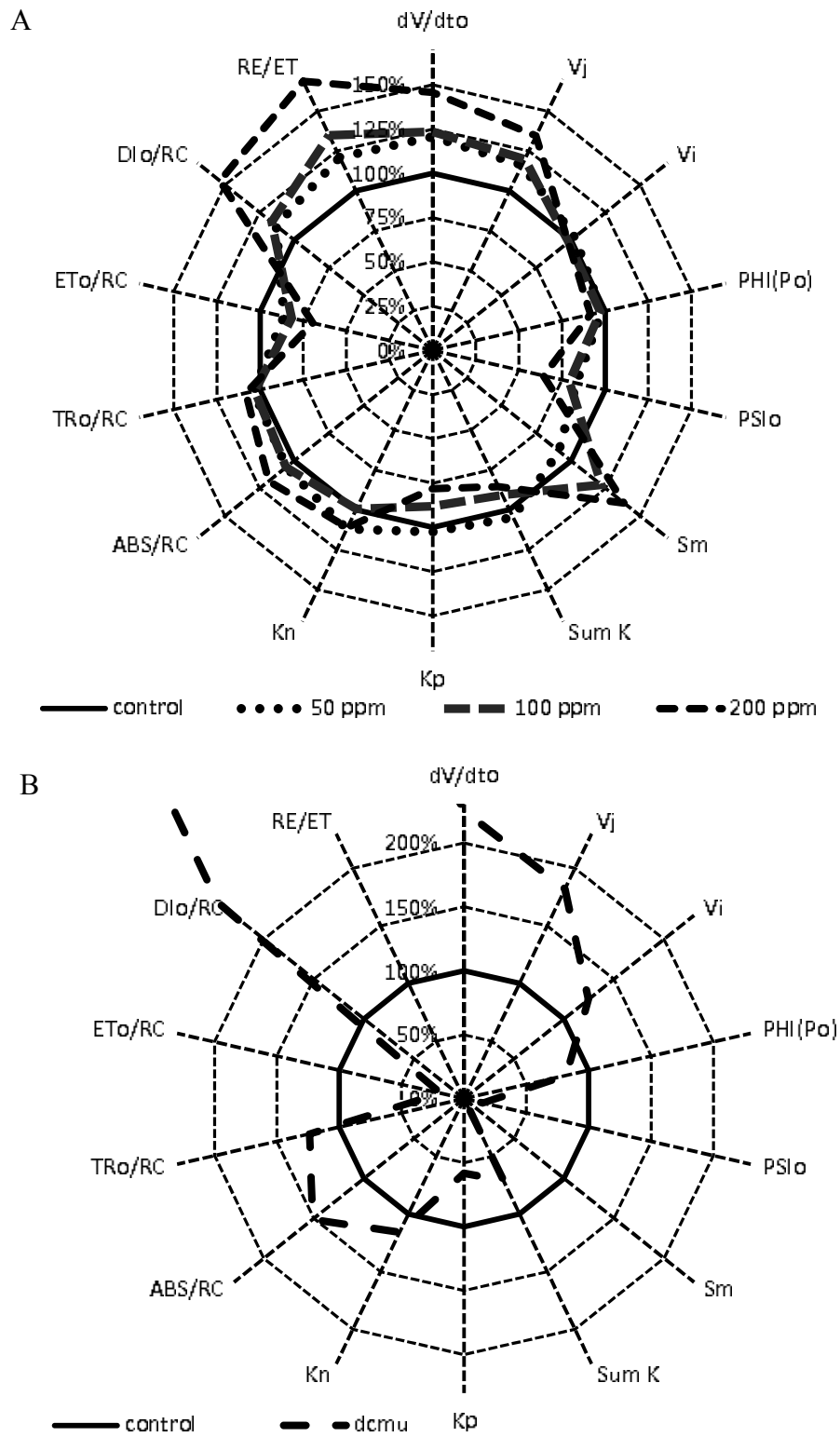


Figura 27: Grafica de radar de los parámetros calculados a partir de las curvas de emisión de fluorescencia de la clorofila a del FS II en cloroplastos aislados infiltrados con M1 a 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ (A) y DCMU 10 μM (B).

7.9. Determinación de la biomasa seca de *Lolium perenne*.

El peso seco fue determinado para cada una de las plantas en la ausencia de herbicidas (control), y en presencia de 100, 300 y 600 ppm de la fracción **M1**, así como 10 μ M de DCMU. Los resultados después de la aplicación de los compuestos se muestran en la Tabla 15, en donde se observa que **M1** no tuvo efecto.

Tabla 15: Determinación de la biomasa seca de <i>Lolium perenne</i> medida después de tres días de tratamiento con la fracción M1 a 100, 300 y 300 μ g/ml, así como DCMU 10 μ M.			
Compuesto	Concentración	Masa seca [mg]	%
Control	0	980	100
DCMU	10 μ M	705	72
M1	100 ppm	950	97
	200 ppm	970	99
	300 ppm	990	101

7.10. Determinación de la actividad tóxica en *Artemia salina* de la fracción **M1**

Para la determinación de la toxicidad de la fracción **M1** sobre el crustáceo *Artemia salina* se realiza una curva dosis respuesta, en la cual se grafican tanto los organismos vivos como muertos acumulados en función de la concentración de la fracción expresada logarítmicamente ($\log C$) y el intercepto de ambas rectas da el valor de la concentración letal media expresada logarítmicamente ($\log CL_{50}$). La fracción **M1** mostró que no es tóxica al ser evaluado en esta prueba, debido a que posee un valor de CL_{50} mayor a 1000 ppm como se puede ver en la Figura 27; en la cual las líneas de vivos y muertos acumulados no se han interceptado aun, por lo que no se obtiene un valor de CL_{50} .

La Figura 28 muestra la gráfica obtenida para este ensayo, donde se puede ver que las curvas no se han interceptado aún en una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ ($\log C = 3$) obteniéndose un valor de CL_{50} mayor a 1000 $\mu\text{g/ml}$, por lo que la fracción **M1** no es tóxica.

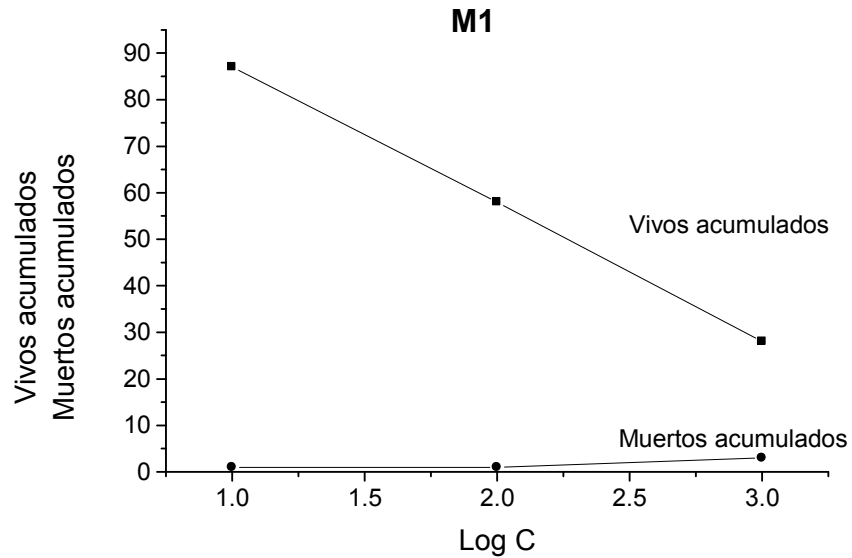


Figura 28: Gráfica que muestran la actividad tóxica de la fracción **M1** en el crustáceo *Artemia salina*.

8. DISCUSIÓN.

8.1. Determinación de la germinación y crecimiento de raíz y tallo de *Lolium perenne* y *Trifolium alexandrinum* en presencia de los extractos de *C. obtusifolia*.

De los resultados mostrados en las Figuras 13-18 podemos ver que los extractos ensayados de las partes aéreas de las hojas de la planta *Cecropia obtusifolia* no presentaron una actividad inhibitoria significativa en la germinación o la elongación del tallo y la raíz tanto para plantas monocotiledóneas (*Lolium perenne*) como dicotiledóneas (*Trifolium alexandrinum*). El extracto clorofórmico y hexánico presentan una ligera inhibición (aproximadamente 30%) de la elongación de la raíz a 100 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ en la semilla de trébol, lo cual es una inhibición pequeña que puede ser debida a la formación de agregados alrededor de la semilla que eviten la toma de agua más que un efecto herbicida directo como se ha reportado anteriormente para algunos compuestos [67]; también es importante tomar en cuenta, que al momento de adicionar los extractos clorofórmico y hexánico en sus concentraciones altas (500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$) a un medio acuoso estos precipitan, por lo que es difícil que sean tomados por la semilla y sea por esto por lo que no se observa un efecto inhibitorio.

El extracto metanólico de tallos al aplicarse en *Lolium perenne* produjo un aumento tanto en la germinación como en la elongación del tallo y la semilla, y una posible explicación de este efecto es que los compuestos presentes en este extracto puedan constituir una fuente de carbono, ya que las semillas están todo el tiempo en obscuridad para evitar la fotosíntesis. Sin embargo Fischer y colaboradores [68] en 1990 propusieron lactonas sesquiterpénicas que estimulan la germinación como un control para la maleza parásita *Striga asiática* L (hierba bruja), promoviendo su germinación en ausencia de un hospedero, lo que la lleva a la muerte, por lo que siguiendo este enfoque aún se puede continuar estudiando el extracto metanólico para ver si se encuentran compuestos que estimulen la germinación y puedan ser utilizados retomando la propuesta de Fischer.

8.2. Efecto sobre la síntesis de ATP de la fracción M1 y los ácidos grasos.

Del fraccionamiento de las partes aéreas de la planta *Cecropia obtusifolia* se obtuvieron compuestos poco polares (hidrocarburos de alto peso molecular, esteroides y ácidos grasos); de los cuales quienes presentaron un efecto sobre la síntesis de ATP fueron ácidos grasos, por lo que se evaluaron tanto de forma independiente como combinados.

Como se puede observar en la Tabla 12 los ácidos grasos activos son el ácido láurico, el ácido mirístico, el ácido palmítico y el ácido linoléico, siendo este último el más activo. El ácido esteárico no mostró una actividad inhibitoria de la síntesis de ATP, mientras que el ácido linoléico fue el más activo, y dado que la diferencia estructural está dada por las dos insaturaciones del ácido linoléico, se puede proponer que estas insaturaciones juegan un papel importante en la actividad; probablemente debido a su configuración espacial, lo que permite interactuar más fácilmente con el sitio blanco como lo han sugerido los experimentos de Peters [69], donde se evaluaron ácidos grasos saturados e insaturados con la misma longitud de cadena, encontrándose que solo los ácidos grasos insaturados poseen un efecto directo sobre el transporte de electrones.

Al momento de comparar el valor de I_{50} de la Mezcla **M1** con la mezcla **Ma** (Tabla 12), vemos que no hay una diferencia significativa, por lo que podemos deducir que el triterpeno Ursa-9(11),12dien-3-ol, no posee una actividad inhibitoria *per se*, sin embargo puede estar ayudando a la solubilización de los ésteres de ácidos grasos presentes en **M1** (ya que al momento de hacer el experimento es más fácil solubilizar la fracción **M1** que la mezcla **Ma**), de forma muy similar a la reportada anteriormente para el ácido ursólico [70, 71], donde si bien se ha demostrado un aumento en la solubilidad de los monoterpenos en agua por parte de las micromicelas formadas por el ácido ursólico, se afirma que el papel de este más que solubilizar es el de facilitar su transporte a través de las membranas celulares.

Al comparar los valores de I_{50} de la mezcla **Ma** y **Mb** ($I_{50} = 31$ y $56 \mu\text{g/ml}$ respectivamente) (Tabla 12) se observa que hay una mayor actividad inhibitoria en la síntesis de ATP, cuando están todos los ácidos grasos en la mezcla, que cuando solo se tiene a los que presentaron actividad, por lo que se propone que los ácidos de cadena más corta (C_{12} - C_{16}), así como el insaturado ayudan a disolver a los ácidos de cadena más grande (C_{18} - C_{28}) (lo que se observó al preparar las soluciones), y de esta forma los ácidos de cadena grande pueden llegar al sitio blanco; sin embargo es difícil establecer si se trata de un efecto sinergista, ya que a pesar de que la mezcla **Ma** es más activa que la mezcla **Mb**, el ácido linoléico es mucho más activo ($I_{50} = 6.9 \mu\text{g/ml}$), por lo que los demás ácidos podrían estar inhibiendo al ácido linoléico, tal vez por una competencia por el sitio blanco

Al comparar la actividad de la mezcla **Mb** y **Mc**, vemos que esta última posee un mayor efecto inhibitorio, lo que sugiere que los ácidos esteárico, araquídico, lignocérico y octaeicosanóico juegan un papel importante, pero que al evaluarse de forma independiente no poseen actividad probablemente debido a problemas de solubilidad; por ello se propone que los ácidos grasos de cadena C_{18} - C_{28} poseen un efecto inhibitorio de la síntesis de ATP, pero deben estar disueltos por completo, lo cual se logra cuando están presentes los demás ácidos (**Ma**) y también el triterpeno urs-9(11),12dien-3-ol, por lo que más que un efecto sinergista entre estos ácidos se sugiere un efecto de solubilización (como una especie de “*salting in*”).

Por otro lado al comparar los resultados en la inhibición de la síntesis de ATP de **M1** ($I_{50} = 29.4 \mu\text{g/ml}$) con los obtenidos para **M1m** ($I_{50} = 76.6 \mu\text{g/ml}$) (Figura 22) se observa que cuando los ácidos grasos son esterificados, estos disminuyen su actividad, lo cual concuerda puede deberse a que los ácidos grasos requieren un grupo hidroxilo libre, de modo que en su forma ionizada pueden actuar como agentes caotrópicos o quelantes de los iones Mg^{2+} y Cl^- , afectando el complejo de liberación de O_2 como se ha propuesto anteriormente [69, 72] o por una

interacción directa de los ácidos grasos (ácido linoléico) en su forma neutra con la membrana tilacoidal cambiando la orientación relativa de los complejos donadores y aceptores de electrones, por una interacción del tallo hidrofóbico con el complejo antena, o por modificaciones en la estructura tridimensional de las proteínas de membrana [69]. Se ha reportado también que su actividad inhibitoria es mayor a un pH por arriba de 6.5 el cual es un valor cercano al pK de los ácidos grasos en la membrana [73].

8.3. Efecto de M1 sobre el transporte de electrones.

El hecho de que los compuestos de la fracción **M1** afecten más el transporte desacoplado con un valor de I_{50} de 88.8 $\mu\text{g/ml}$ y una inhibición del 70 % a 200 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 23) y dado que los transportes basal y fosforilante se inhiben de forma semejante, se sugiere que durante el transporte desacoplado el sitio de acción de esta mezcla está expuesto para su interacción, tal vez debido a cambios conformacionales durante la iluminación, sin embargo, en condiciones fosforilantes, su sitio de acción está menos expuesto, por lo que la interacción de estos compuestos con su sitio de acción es débil. Todos los resultados indican que **M1** actúa como inhibidor débil de la reacción de Hill como se ha reportado anteriormente [69, 72, 73, 74 75].

En la Figura 23 no se observa un efecto desacoplante (No hay un aumento en el transporte de electrones) como han propuesto varios autores [69, 72, 76, 77, 78, 79], sin embargo aún quedan por hacer experimentos (medición de la conductividad, liberación de iones) para descartar dicho efecto.

Los resultados en la Tabla 13 indican que el principal sitio de inhibición e interacción de **M1** está localizado entre P_{680} a Q_A en la cadena de transporte de electrones del FS II, de forma similar a la enecalina, dimetilencecalina y 12,13-dihidroxantorizol [80,81],

El hecho de que **M1** inhiba tanto el lado donador como aceptor de electrones del FS II, concuerda con lo reportado anteriormente [69, 72, 73, 75.], donde se ha propuesto que inhibe al FS II por un efecto sobre el complejo OEC por una inducción de liberación de Mn^{2+} . Sin embargo en estos resultados no se observa un efecto sobre FS I (Tabla 13) como se esperaba [69, 72], lo cual puede deberse a que en estos estudios previos se evalúan los ácidos grasos por separado y no una mezcla, a demás de que los ácidos que inhiben el FS I son ácidos C_{16} y C_{18} insaturados (palmitoléico, linoléico y linolénico) y en la mezcla **M1** solo se tiene ácido linoléico con una proporción del 18 % (Tabla 9), por lo que los demás ácidos pueden estar enmascarando su efecto sobre el FS I.

8.4. Fluorescencia de la clorofila a del FS II.

Los tilacoides control mostraron una curva de fluorescencia polifásica OJIP (Figura 24), similar a la descrita previamente para plantas, algas verdes y cianobacterias por Strasser y sus colaboradores [42] teniendo una cinética baja.

Cuando los tilacoides son tratados con Tris (un inhibidor del lado donador del FS II) [57] y con la fracción **M1** aparece la banda K (Figura 25) entre la fluorescencia inicial mínima, F_0 , y la fluorescencia en el tiempo J F_J , que consiste en un rápido ascenso al máximo (a 300 μs) seguido por una disminución en el nivel de desarrollo de fluorescencia cercano a F_0 . La respuesta de los tilacoides tratados es muy similar a los cloroplastos tratados con calor en los cuales ocurre daño al complejo enzimático que fotoliza el agua (OEC) [82, 83]. Por lo tanto el análisis de la transición de la fluorescencia de la clorofila *a* indica que el FS II en su lado donador esta ligeramente inhibido por **M1**.

El valor de la fracción de OEC activa es del 95 %, lo que indica que el lado donador del FSII no está afectado en la enzima que fotoliza el agua. Sin embargo el ligero aumento en el tamaño de la antena por centro de reacción (ABS/RC), el aumento significativo de la disipación de la energía absorbida por medio de calor (Dlo/RC), aunado a la disminución del transporte de electrones (ET/RC) (Figura

27), indican un efecto de **M1** en el lado donador de FS II después de OEC. En estas condiciones el flujo de electrones de Z a P_{680} es más lento que el flujo de electrones de P_{680} a Q_A . El rápido aumento de la fluorescencia inicial se debe a la reducción de Q_A a Q_A^- seguida por la lenta reducción de P_{680}^+ por Y_Z sin la afectación directa de OEC [77].

La adición de **M1** al igual que 10 μ M de DCMU induce un rápido aumento del desarrollo de la fluorescencia durante los 2 primeros ms de iluminación, transformando así la secuencia regular OJIP en una curva OJ ($J = I = P$) [42] y aparece la banda J alrededor de 2 ms (Figura 26) lo cual se debe a una inhibición en la reoxidación de Q_A^- .

Analizando los parámetros de la Figura 27, se puede observar que hay una disminución del índice fotosintético ($\text{PHI}(P_0)$) y de la probabilidad de que un excitón atrapado pueda mover un electrón mas allá de Q_A^- (PSI_0) (Figura 27) que está dada por una acumulación de especies Q_A^- , por lo que el transporte de electrones por centro de reacción (ET_0/RC) también disminuye (Figura 27); estos datos son consistentes con la aparición de la banda J (Figura 26).

El aumento en la eficiencia con la cual se pueden reducir los aceptores finales de electrones del FS I (RE_0/ET_0) (Figura 27) no se debe a un efecto directo sobre FS I, sino más bien a una compensación por la inhibición del transporte del FS II. De tal forma que **M1** inhibe al FS II tanto del lado donador (inhibiendo la reducción de P_{680}^+ por Y_Z) y el lado receptor de electrones (Por inhibición del flujo de electrones de Q_A^- a Q_B), lo cual concuerda con los datos obtenidos polarográficamente.

Sin embargo aún quedan otros efectos por evaluar, como son su efecto desacoplante [69, 72, 76, 77, 78, 79], la liberación de los iones Mn^{2+} del complejo de desprendimiento de oxígeno [69, 72], un efecto sobre la integridad estructural de los cloroplastos [69, 73, 74, 75, 84, 85] e incluso peroxidación de lípidos [85]

8.5. Determinación de la biomasa seca de *Lolium perenne*.

Como se puede observar en la Tabla 15, la fracción **M1** no posee un efecto inhibitorio de la biomasa, que es lo que se busca con un herbicida. Esto puede deberse a que los compuestos presentes en **M1** no logran penetrar las barreras físicas de la planta para llegar a su sitio blanco, o son degradados antes de poder tener un efecto; es importante hacer notar que a pesar de que se tenga identificado el sitio de inhibición *in vitro* estos compuestos no pueden ser propuestos como herbicidas ya que *in vivo* no presentaron un efecto inhibitorio, sin embargo aún se pueden hacer investigaciones para intentar obtener el efecto sobre la planta, ya sea buscando un adyuvante que ayude a penetrar, o haciendo derivados que penetren las barreras de la planta o que no sean degradados.

8.6. Determinación de la actividad tóxica en *Artemia salina* de la fracción M1

Como se puede observar en la Tabla 16 los compuestos presentes en la fracción **M1** no fueron tóxicos al ser evaluados en *Artemia salina* lo cual los hace candidatos como compuestos para posteriores estudios a fin de poder potencializar su efecto herbicida *in vivo*.

9. CONCLUSIONES.

- De las partes aéreas de la planta *Cecropia obtusifolia* Bertol no se aislaron metabolitos secundarios que posean una actividad herbicida.
- Del extracto hexánico de las hojas de *Cecropia obtusifolia*, se obtuvieron hidrocarburos de alto peso molecular y una mezcla de esteroides (β -sitosterol, estigmasterol y campesterol), los cuales no presentaron actividad Inhibitoria en la síntesis de ATP.
- Se obtuvieron tres mezclas diferentes de ésteres de ácidos grasos, una de las cuales posee además un triterpeno (Ursa-9(11), 12dien-3-ol). Todas estas mezclas fueron activas como inhibidores en los ensayos de síntesis de ATP.
- Se propone que más que un efecto sinergista en la inhibición de síntesis de ATP de estos ácidos grasos se tiene un efecto en la disolución de los mismos.
- Se propone que los ésteres de ácidos grasos presentes en **M1** inhiben a síntesis de ATP por una inhibición del flujo de electrones en el fotosistema II tanto del lado aceptor como donador de electrones. Sin embargo no se descarta del todo un efecto desacoplante.
- Estos ésteres no fueron tóxicos al ser evaluados en *Artemia salina*.
- Estos ésteres no presentaron efecto en la biomasa al ser evaluados en *Lolium perenne*.
- Del extracto clorofórmico de las hojas de *Cecropia obtusifolia* se aisló un glucósido de β -sitosterol (D-glucósido de β -sitosterol), que no presentó actividad inhibitoria en la síntesis de ATP.

10. PERSPECTIVAS.

- Evaluar los posibles efectos de **M1** como desacoplante, en la liberación de los iones Mn^{2+} del complejo de desprendimiento de oxígeno, sobre la integridad estructural de los cloroplastos y en la peroxidación de lípidos.
- Evaluar si **M1** es capaz de atravesar las barreras físicas de *Lolium perenne*.
- Evaluar la biodegradación de **M1** por *Lolium perenne*.
- Sintetizar derivados de los compuestos presentes en **M1** para tener un efecto *in vivo* de forma que puedan ser empleados como herbicidas.

A P É N D I C E S

11. APÉNDICES

10.1. APÉNDICE 1 MEDIOS.

Medio de aislamiento de cloroplastos.

Compuesto	Concentración (mM)	Peso (g/L)
Sacarosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	400	136.89
KCl	20	1.4911
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5	1.0165
Tricina	15	5.3760

*Ajustar el pH a 8.0 con KOH

Medio para la determinación de la síntesis de ATP.

Compuesto	Concentración	Peso (g/L)
Sacarosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	100 mM	34.22
KCl	10 mM	0.7455
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5 mM	1.0165
Tricina	1 mM	0.1792
KCN	0.5 mM	0.0325
MV	50 μM	0.0128

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

Medio para la determinación del transporte de electrones no cíclico.

Compuesto	Concentración	Peso (g/L)
Sacarosa	100 mM	34.22
KCl	10 mM	0.7455
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5 mM	1.0165
Tricina	1 mM	2.688
KCN	0.5 mM	0.0325
MV	50 μM	0.01286

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

Medio para la determinación del transporte de electrones sin MV

Compuesto	Concentración	Peso (g/L)
Sacarosa	100 mM	34.22
KCl	10 mM	0.7455
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5 mM	1.0165
Tricina	1 mM	2.688
KCN	0.5 mM	0.0325

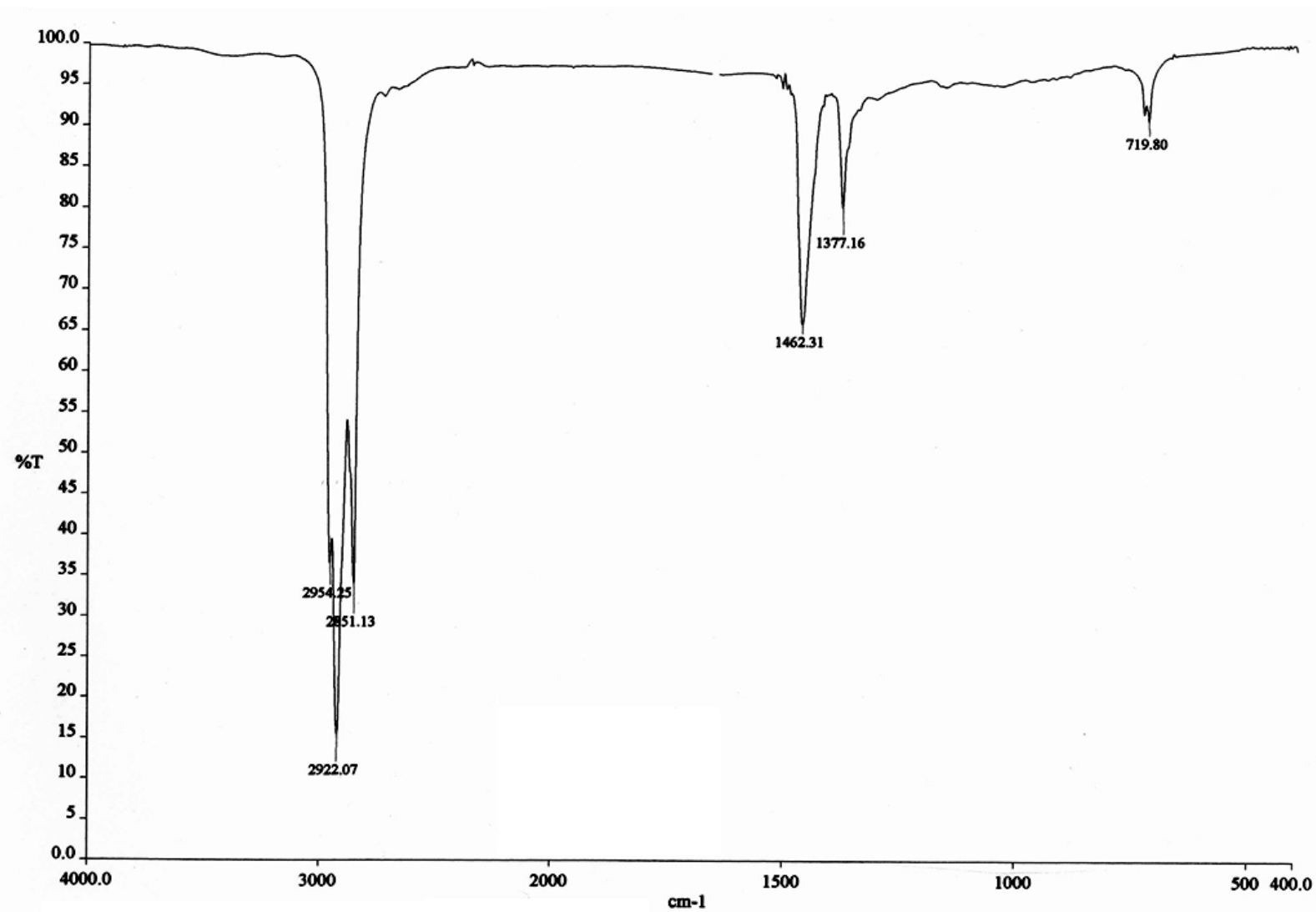
Ajustar el pH a 8.0 con KOH

Medio para la determinación del transporte de electrones del FS II

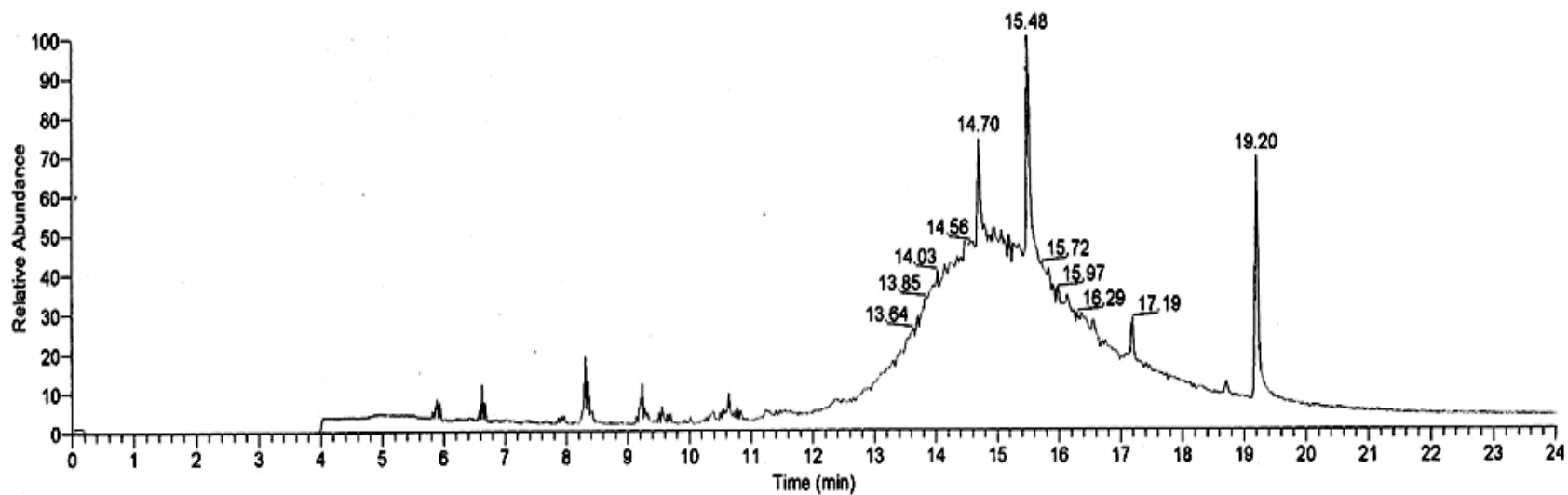
Compuesto	Concentración	Para 1 L
Medio de transporte de electrones sin MV	Aforo	
NH ₄ Cl	6 mM	24ml solución 250 mM
DCPIP*	100 μM	2.5ml solución 20 mM
K ₃ [Fe(CN) ₆]	300 μM	7.5 solución 40 mM

Ajustar el pH a 8.0 con KOH.
* se debe preparar el mismo día.

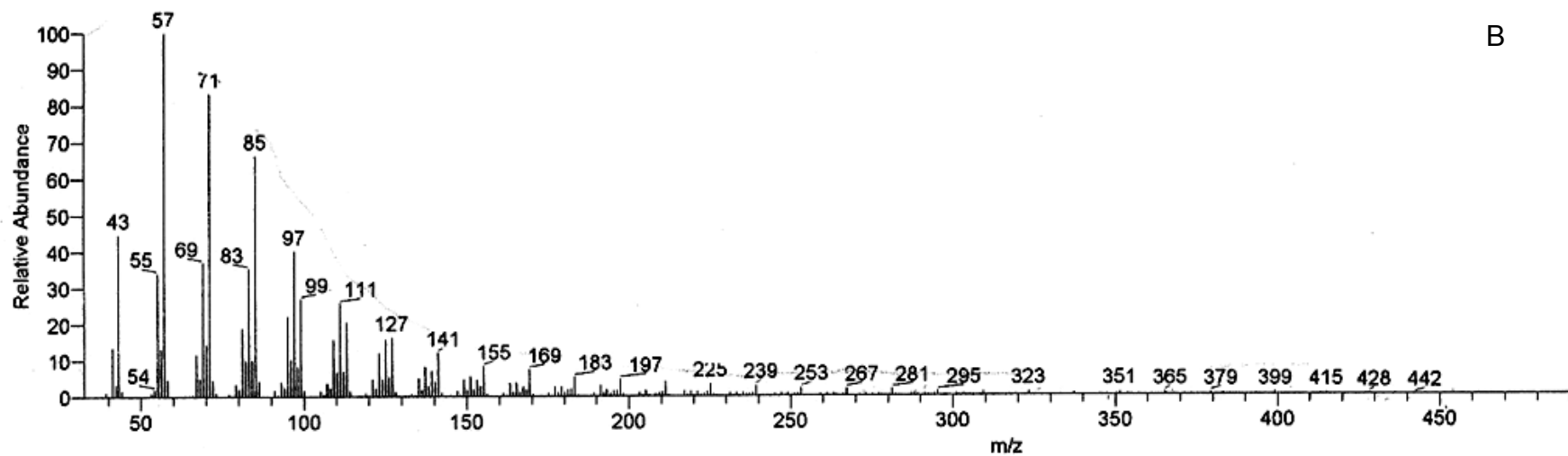
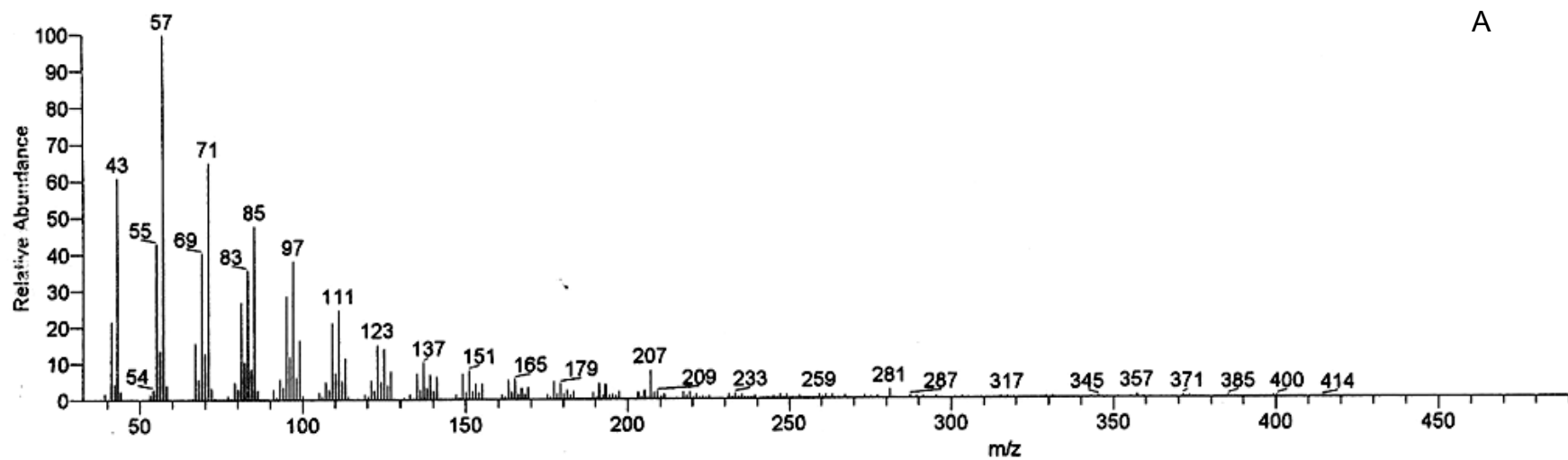
10.2 APÉNDICE 2. ESPECTROS.



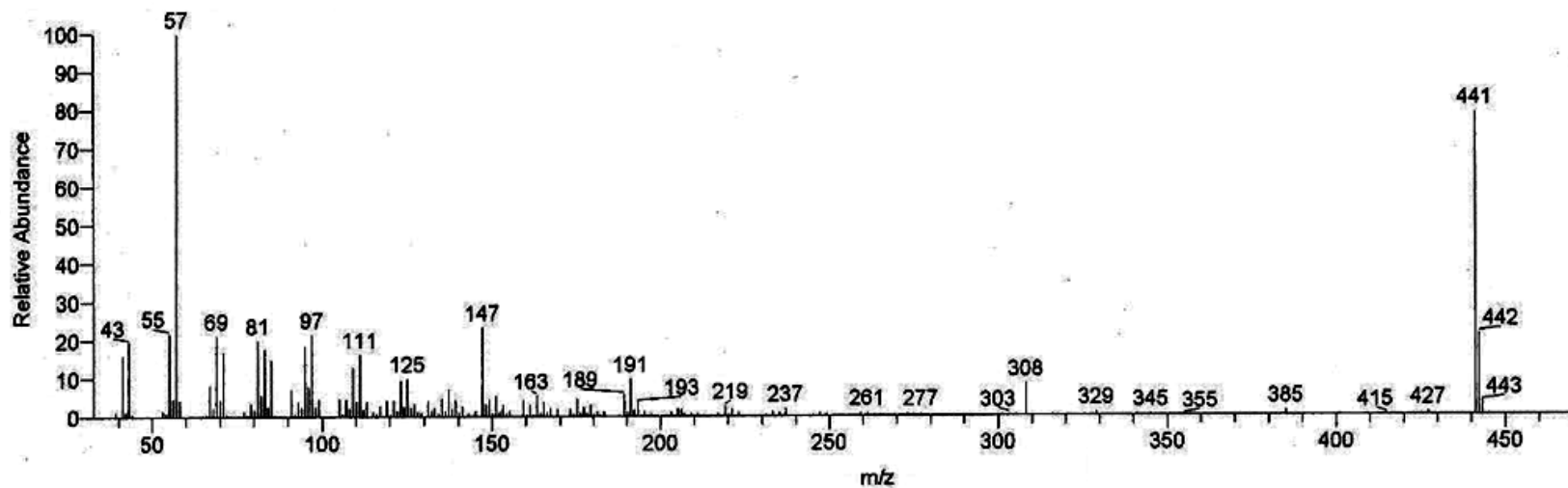
Espectro 1: Espectro de IR de la fracción 1 del extracto hexánico de *Cecropia obtusifolia*.



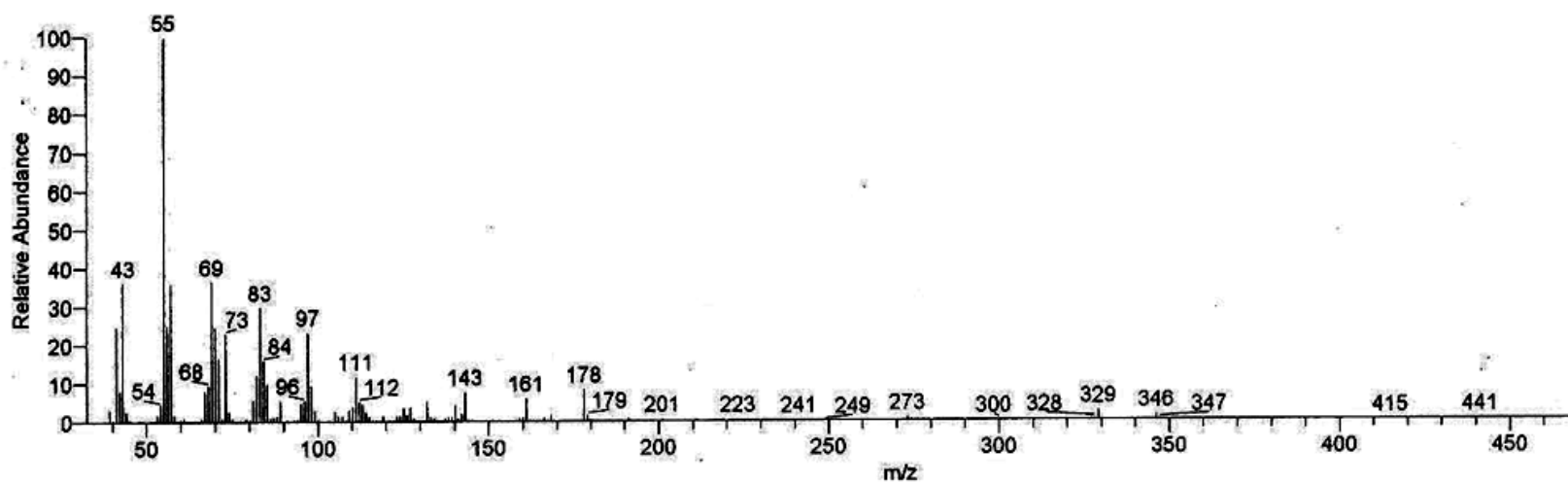
Espectro 2: Cromatograma de gases de la fracción 1 del extracto hexánico de *Cecropia obtusifolia*.



Espectro 3: Espectro de Masas por impacto electrónico de la fracción 1 del extracto hexánico de *Cecropia obtusifolia* para los tiempos de retención de 14.7 (A), 15.48 (B) 17.19 (C) y 19.20 (D) minutos

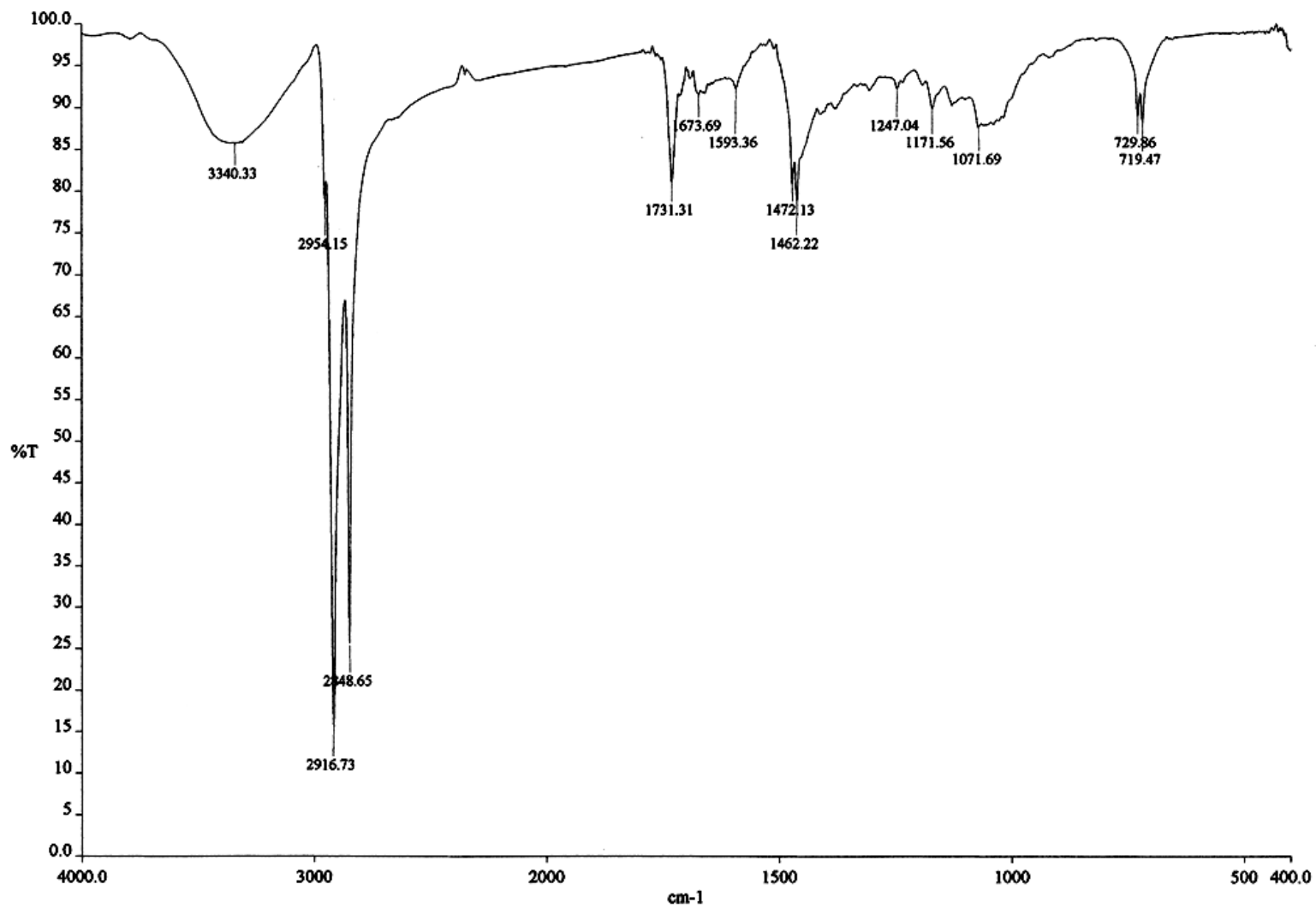


C

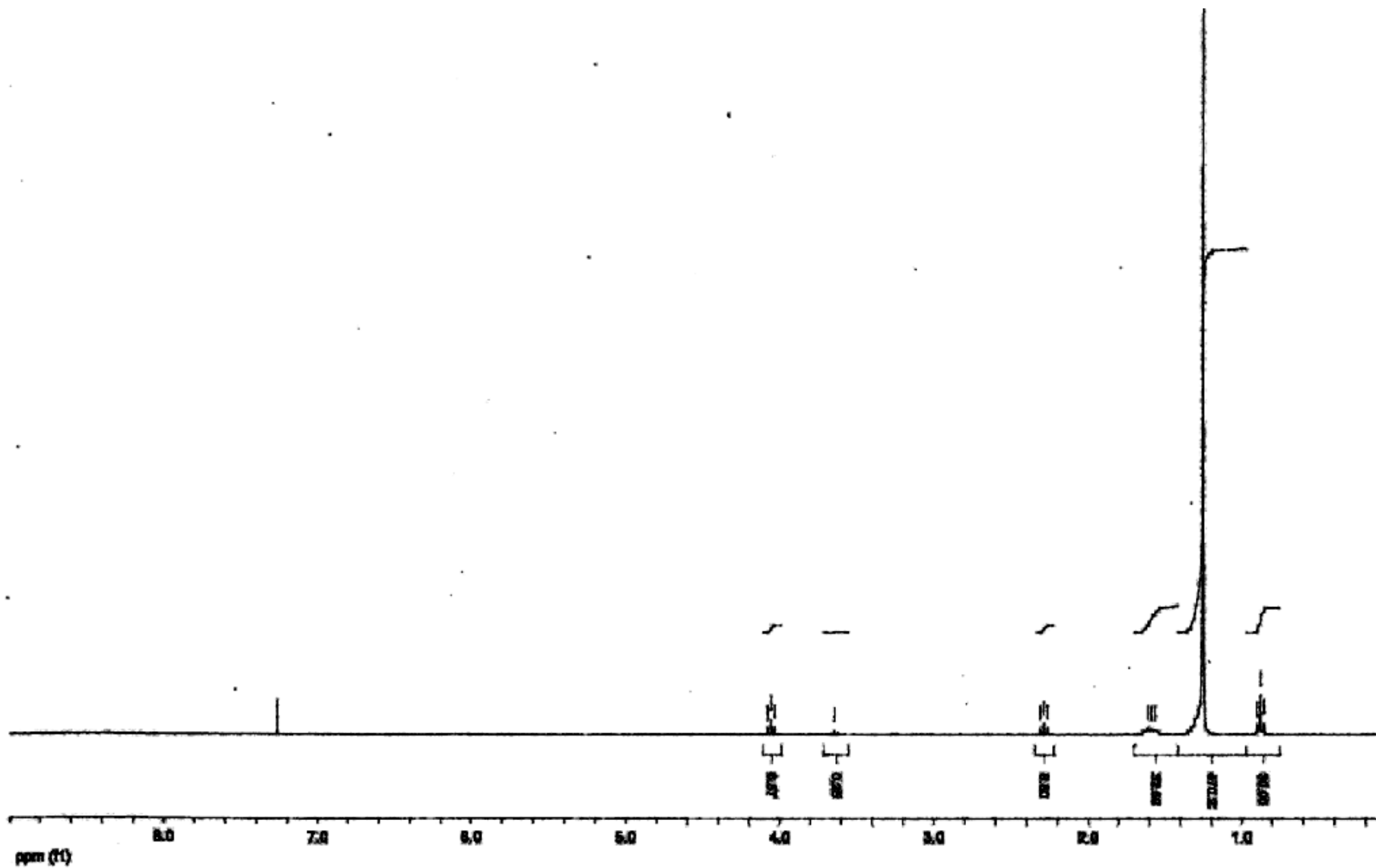


D

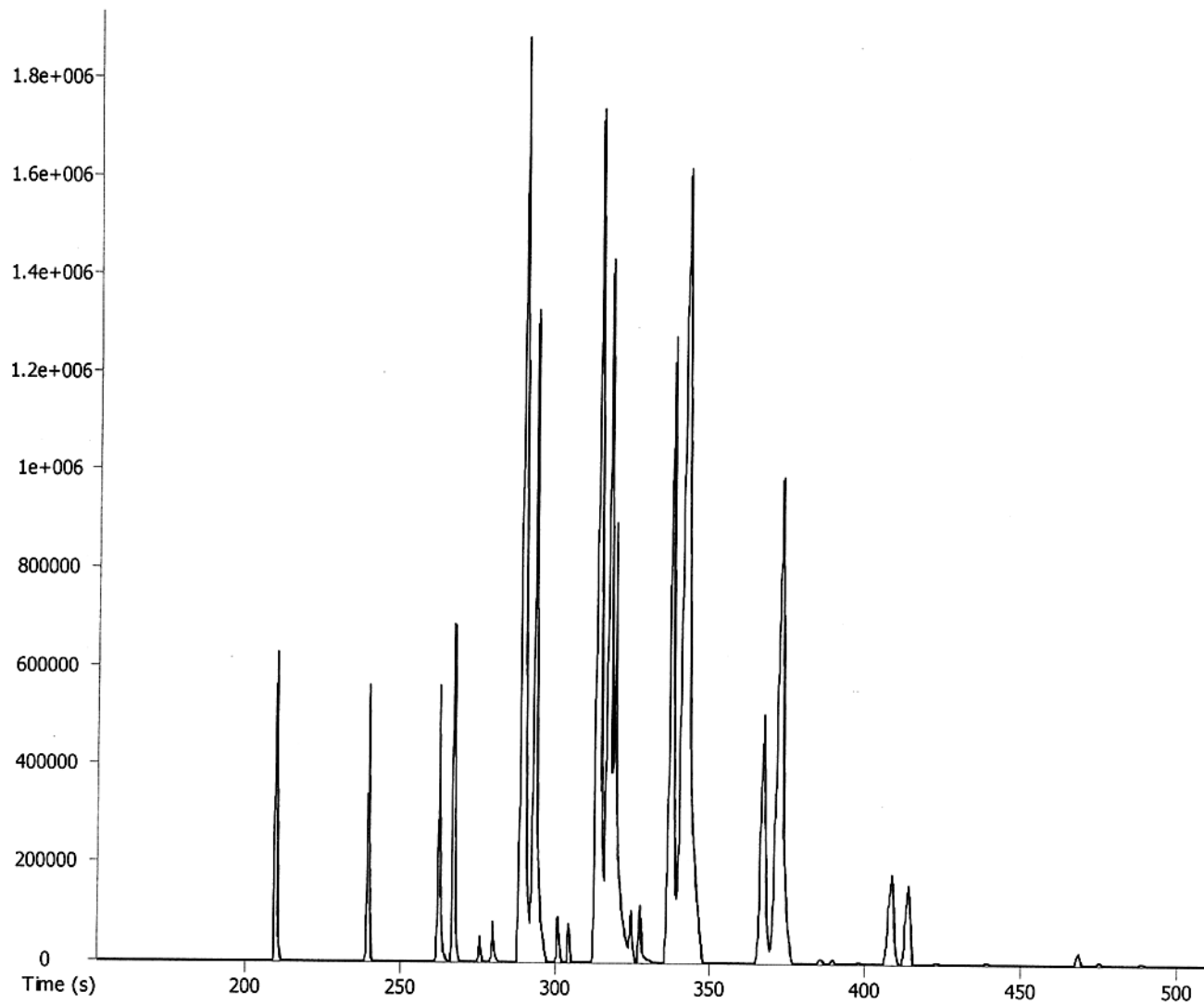
Espectro 3: Espectro de Masas por impacto electrónico de la fracción 1 del extracto hexánico de *Cecropia obtusifolia* para los tiempos de retención de 14.7 (A), 15.48 (B) 17.19 (C) y 19.20 (D) minutos



Espectro 4: Espectro de IR de P1.

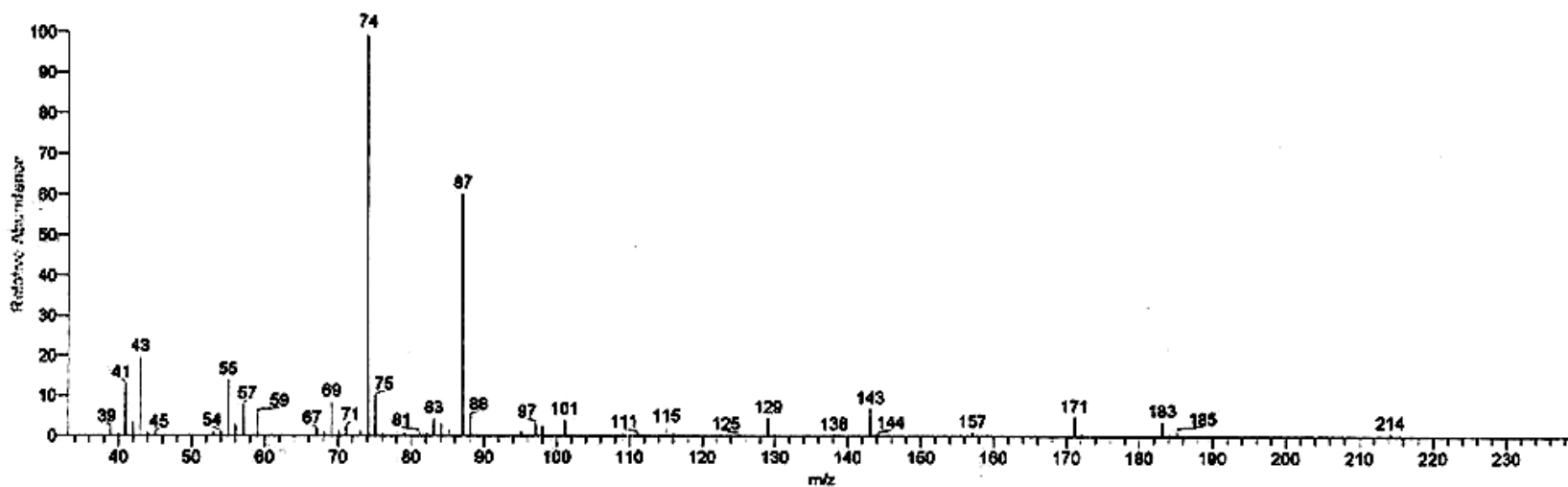


Espectro 5: Espectro de HRMN de P1.

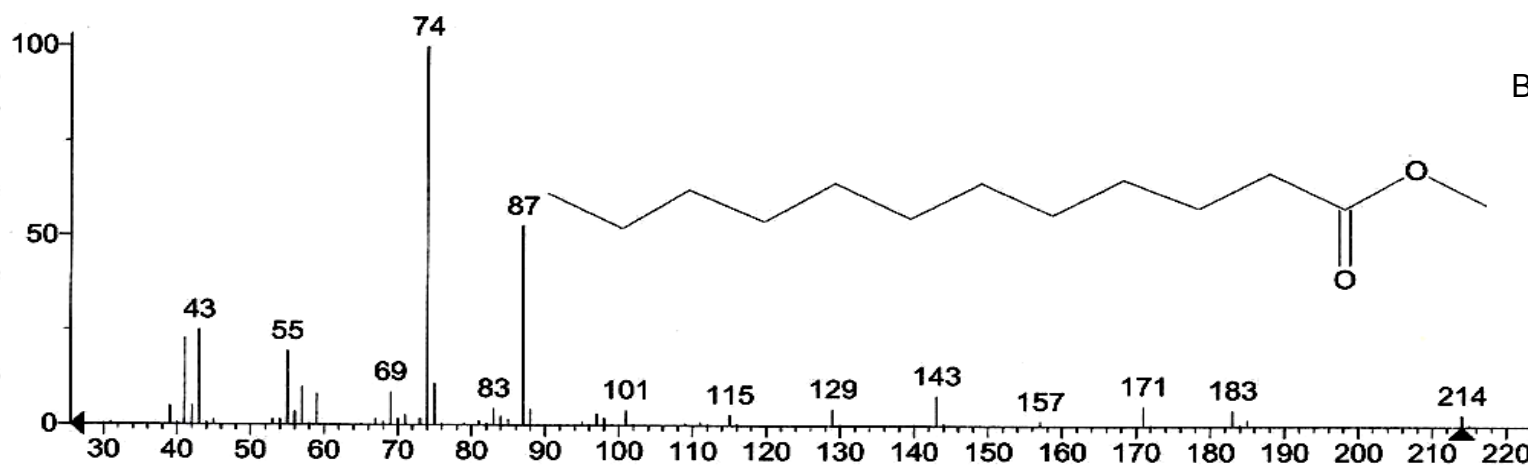


Espectro 6: Cromatograma de gases de P1.

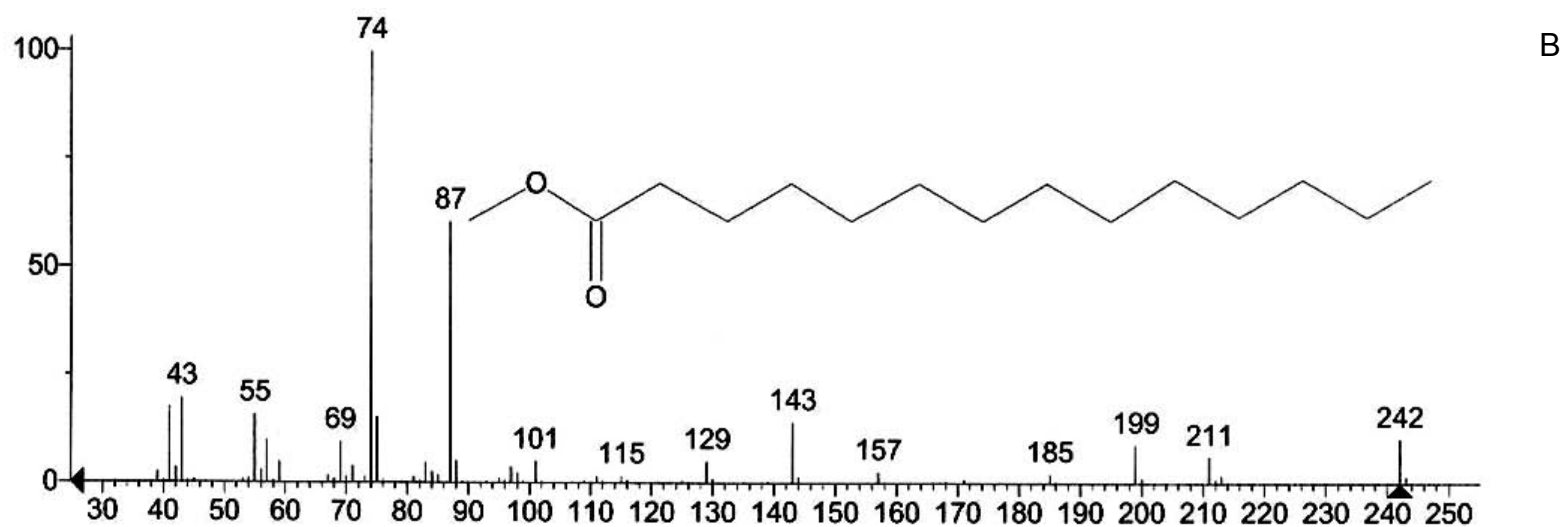
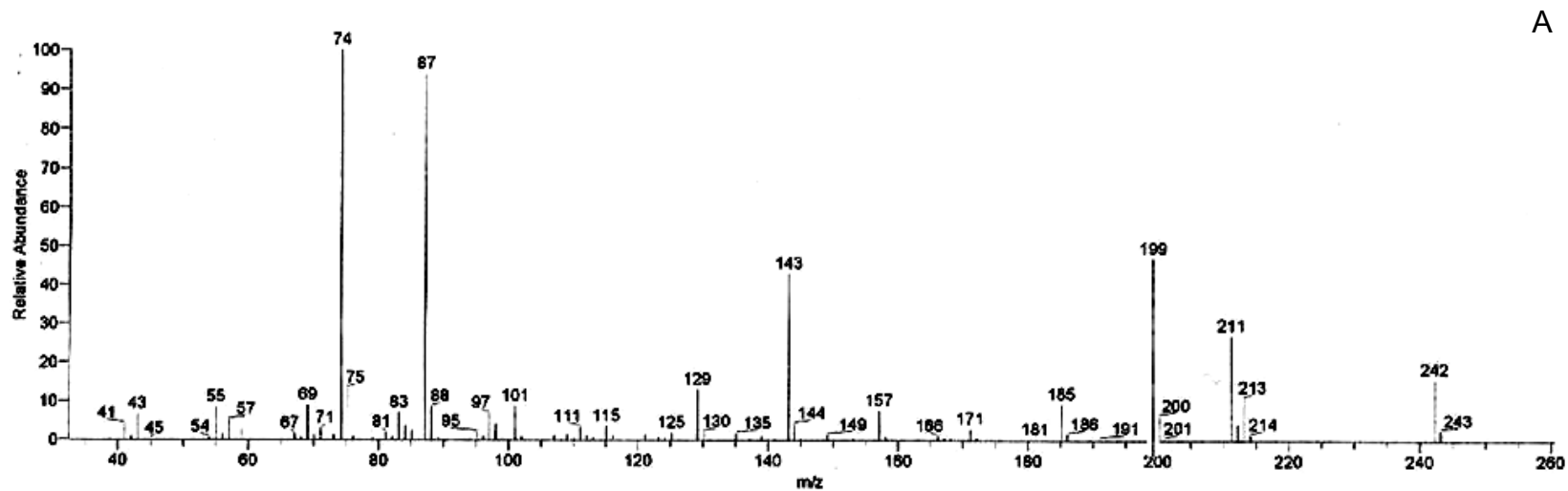
A



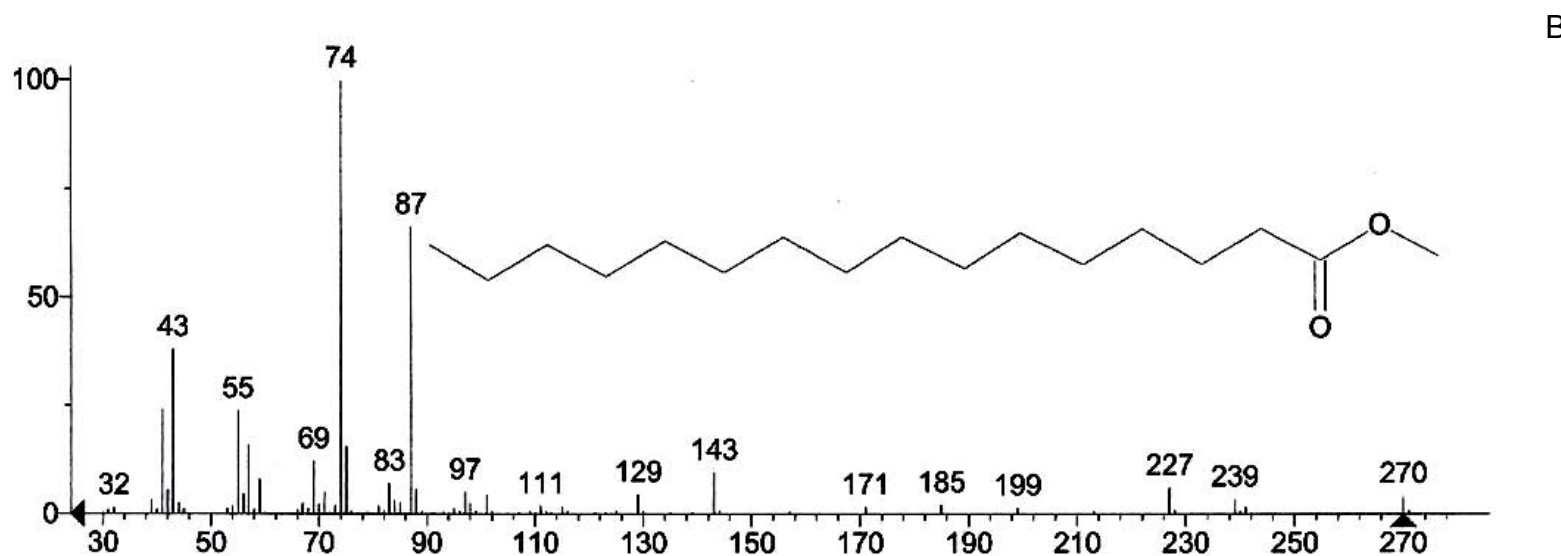
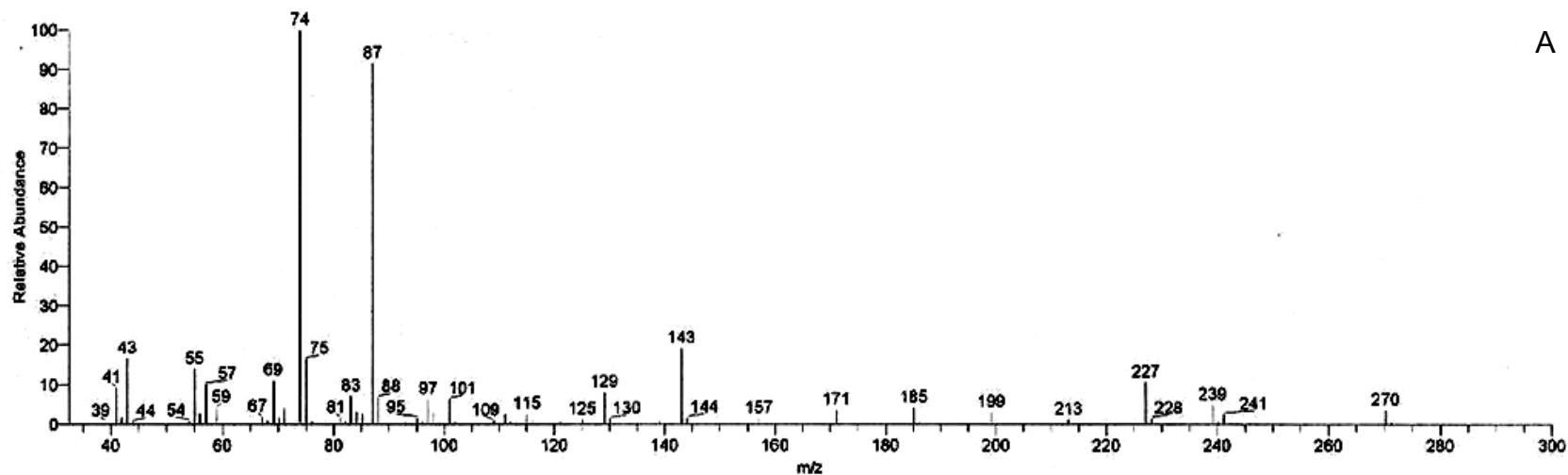
B



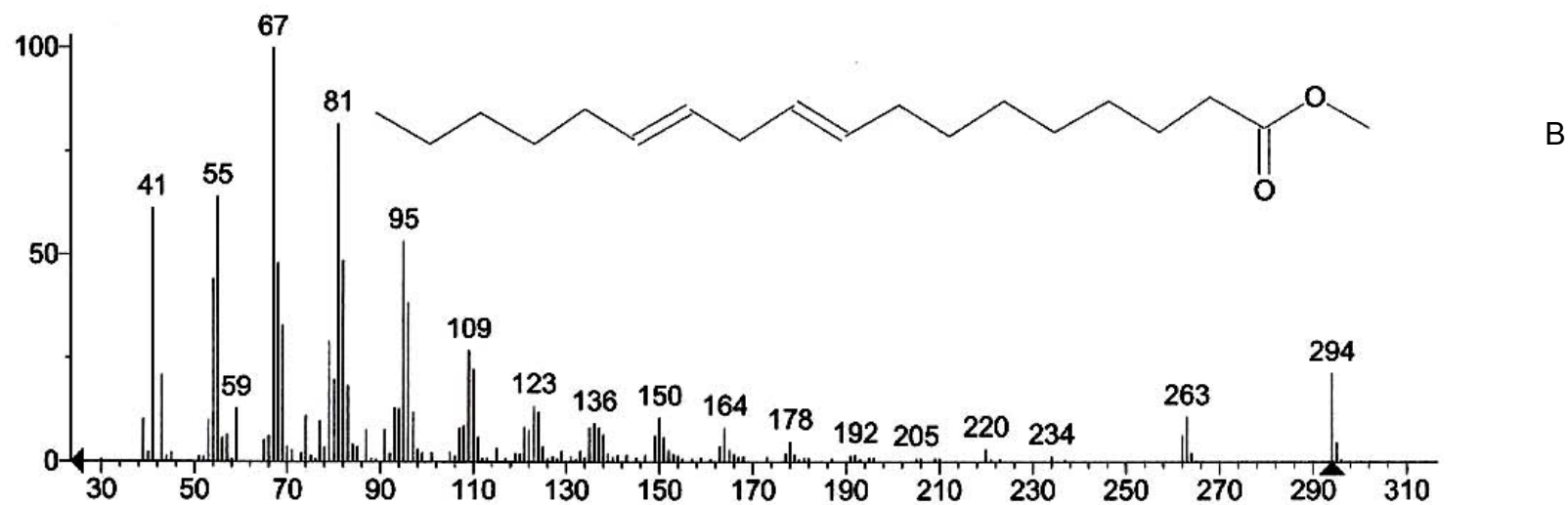
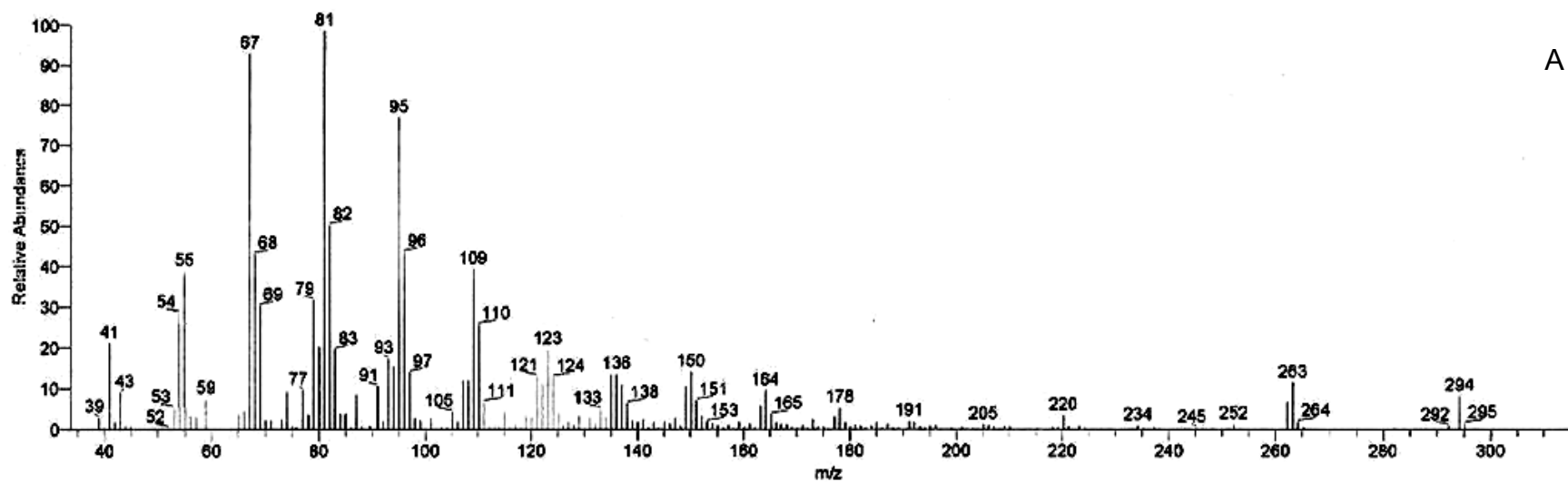
Espectro 7: Espectro de Masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido láurico ($C_{13}H_{26}O_2$) obtenido experimentalmente (A) y el disponible en la base de datos de la USAI (B).



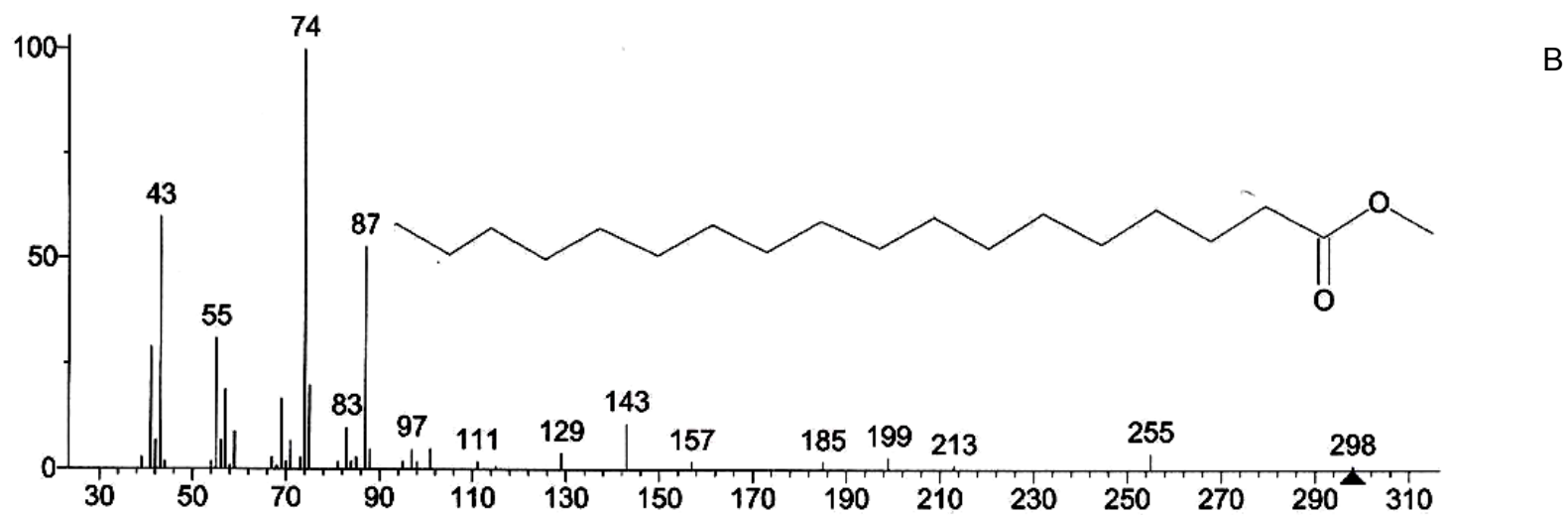
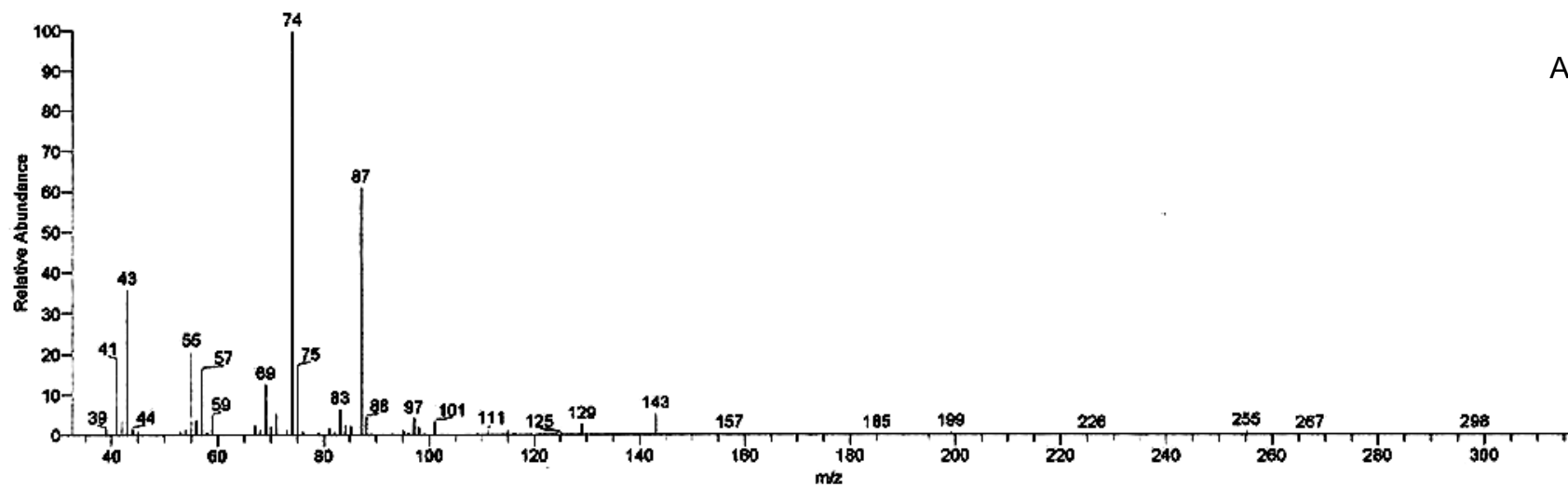
Espectro 8: Espectro de Masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido mirístico ($C_{15}H_{30}O_2$) obtenido experimentalmente (A) y el disponible en la base de datos de la USAI (B).



Espectro 9: Espectro de Masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido palmítico ($C_{17}H_{34}O_2$) obtenido experimentalmente (A) y el disponible en la base de datos de la USAI (B).

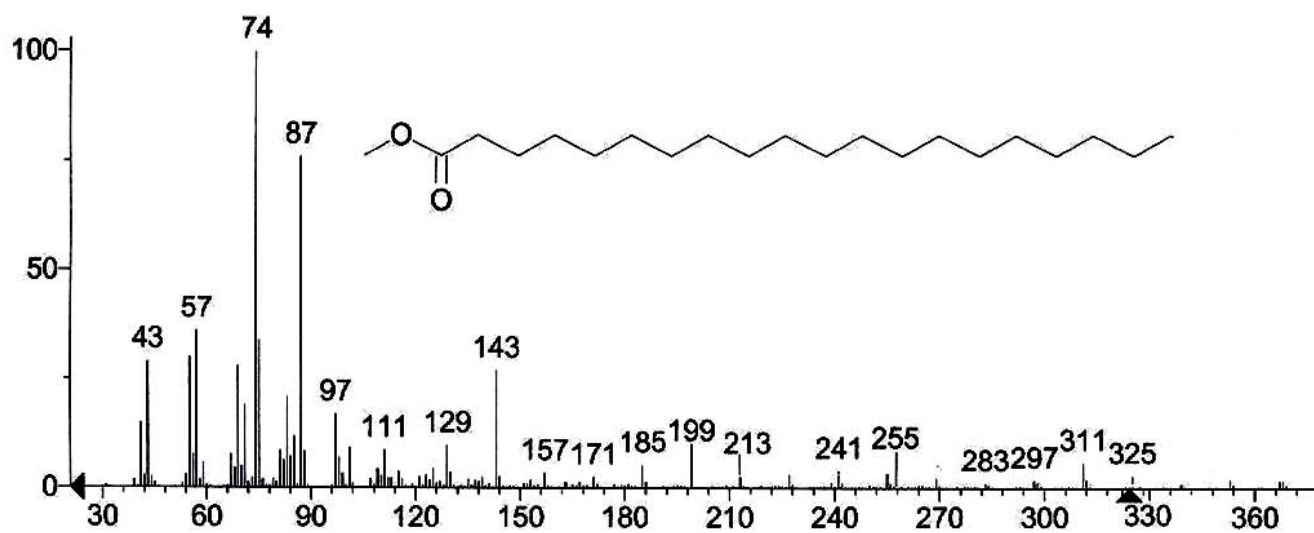
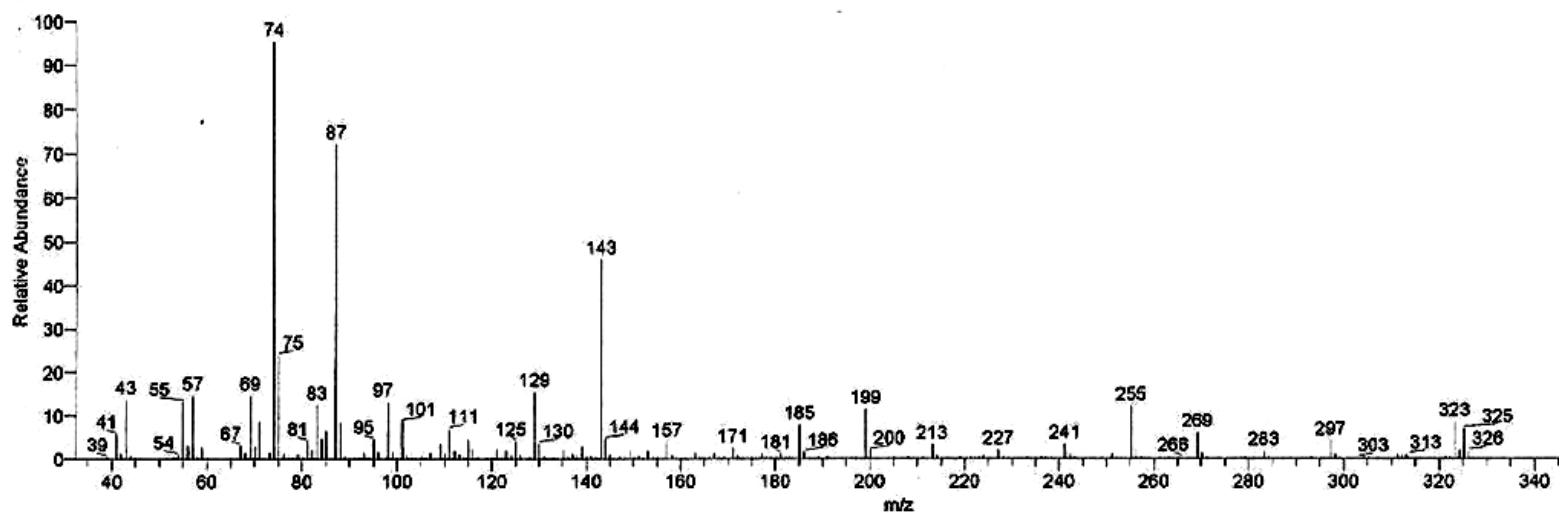


Espectro 10: Espectro de Masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido linoléico ($C_{19}H_{34}O_2$) obtenido experimentalmente (A) y el disponible en la base de datos de la USAI (B).



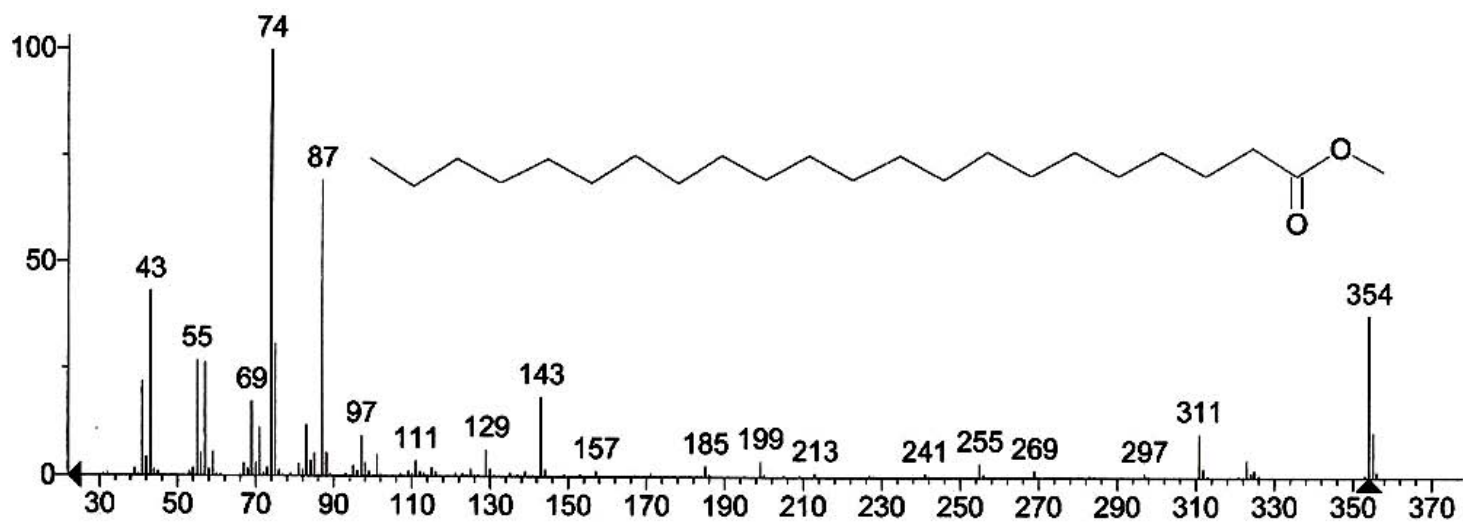
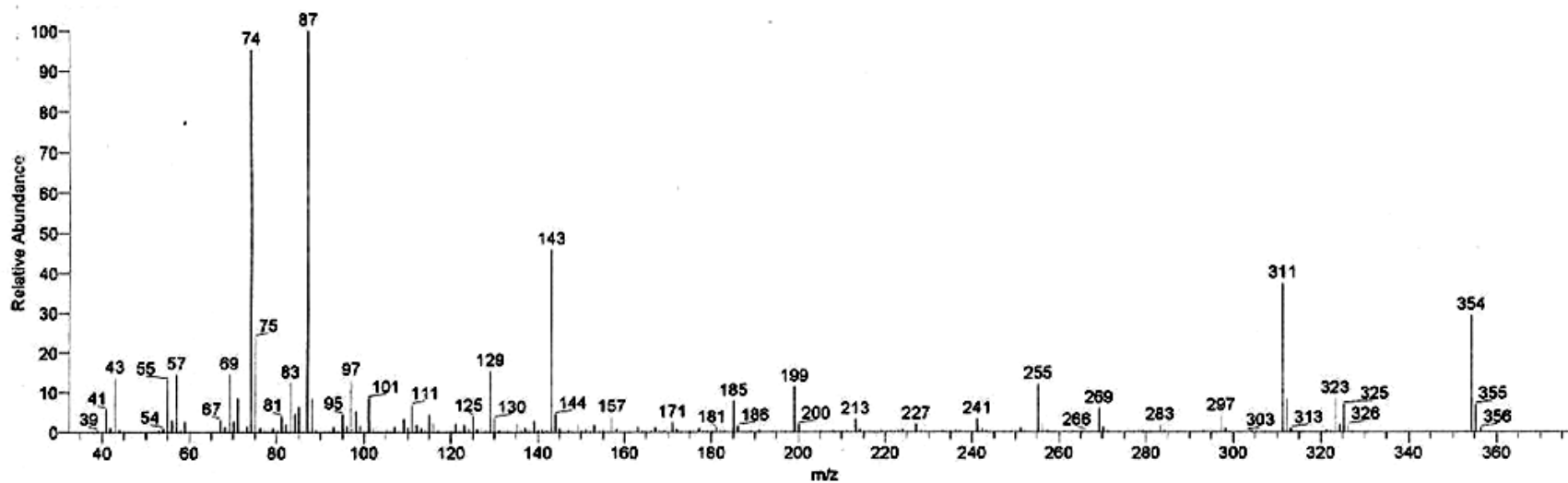
Espectro 11: Espectro de Masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido esteárico ($C_{19}H_{38}O_2$) obtenido experimentalmente (A) y el disponible en la base de datos de la USAI (B).

A

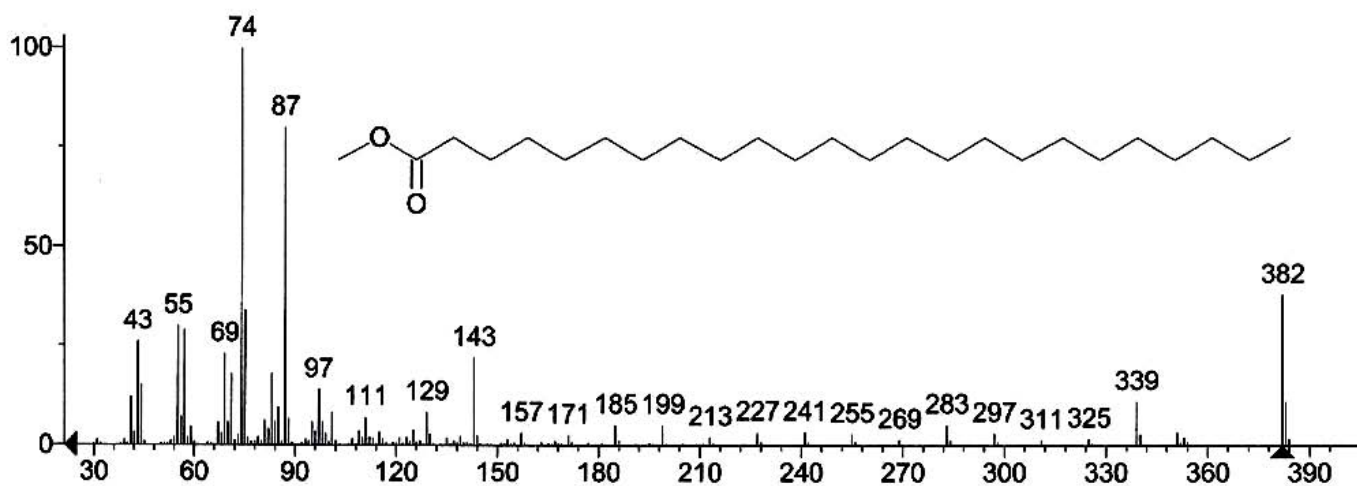
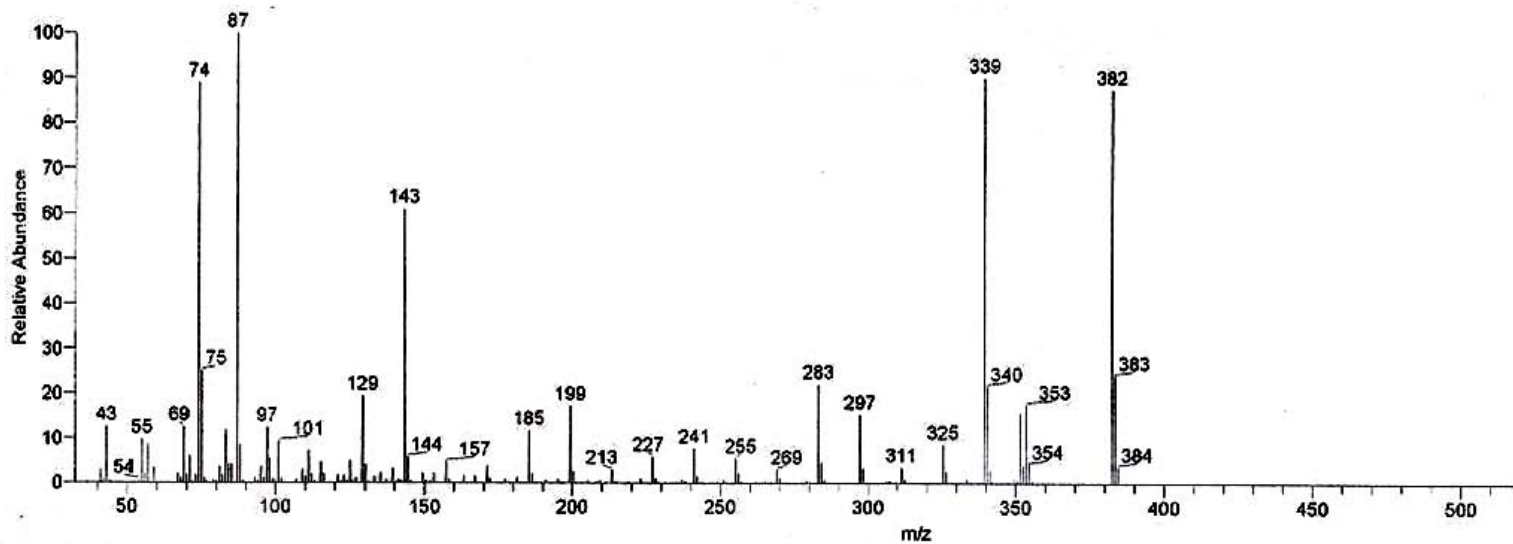


Espectro 12: Espectro de Masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido araquídico ($C_{21}H_{42}O_2$) obtenido experimentalmente (A) y el disponible en la base de datos de la USAI (B).

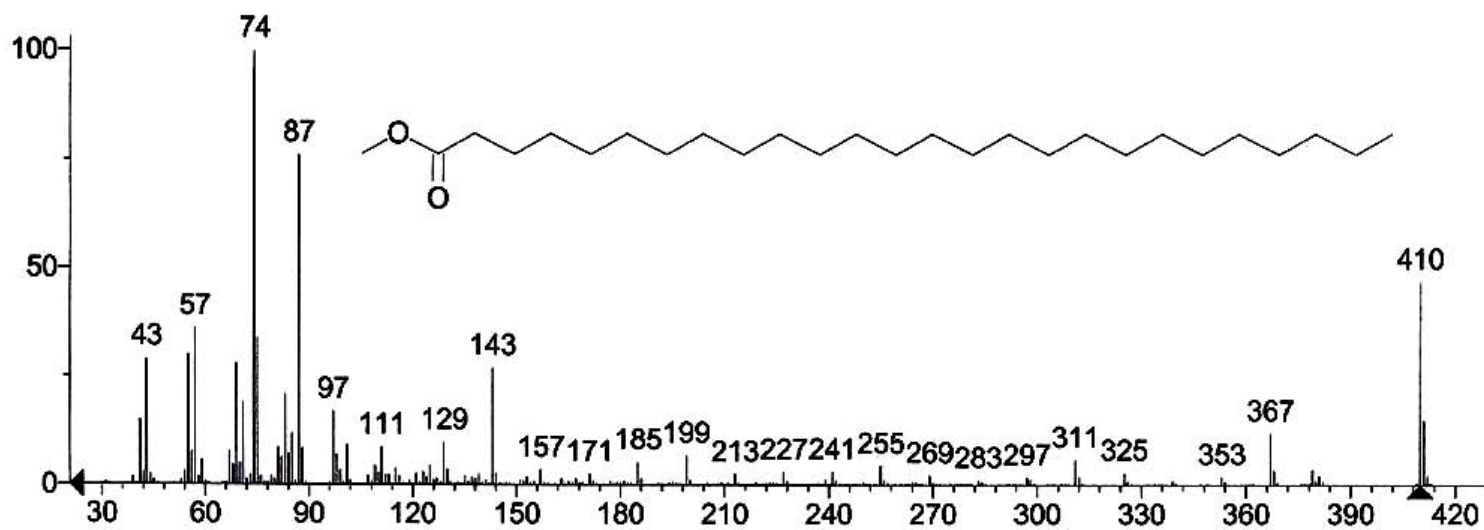
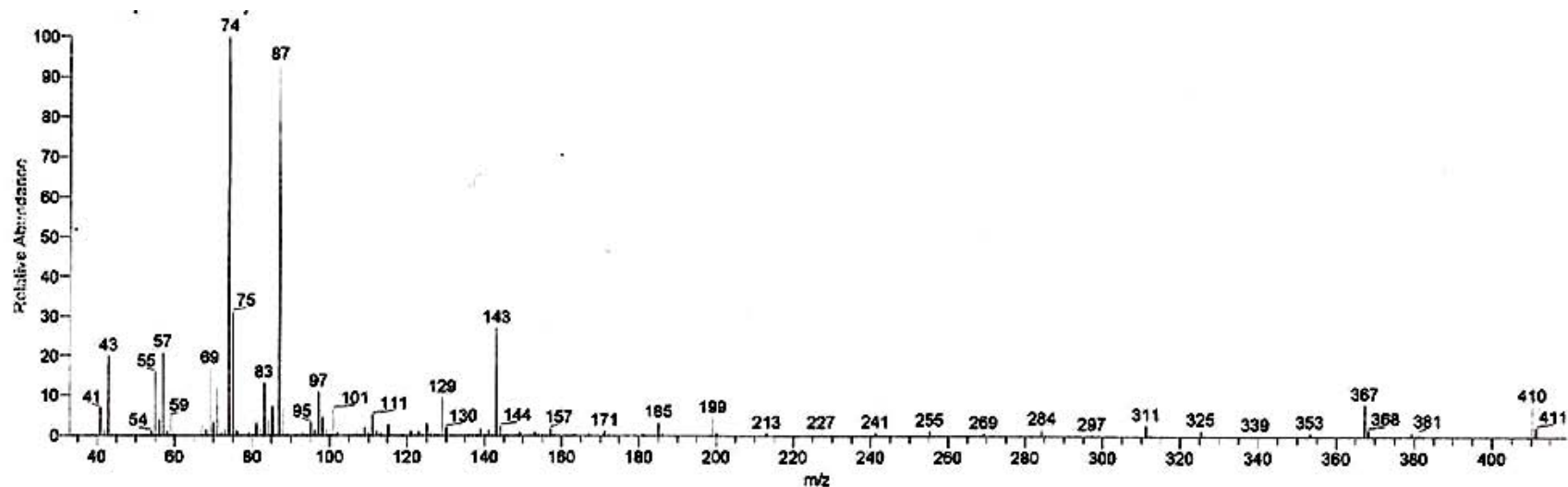
B



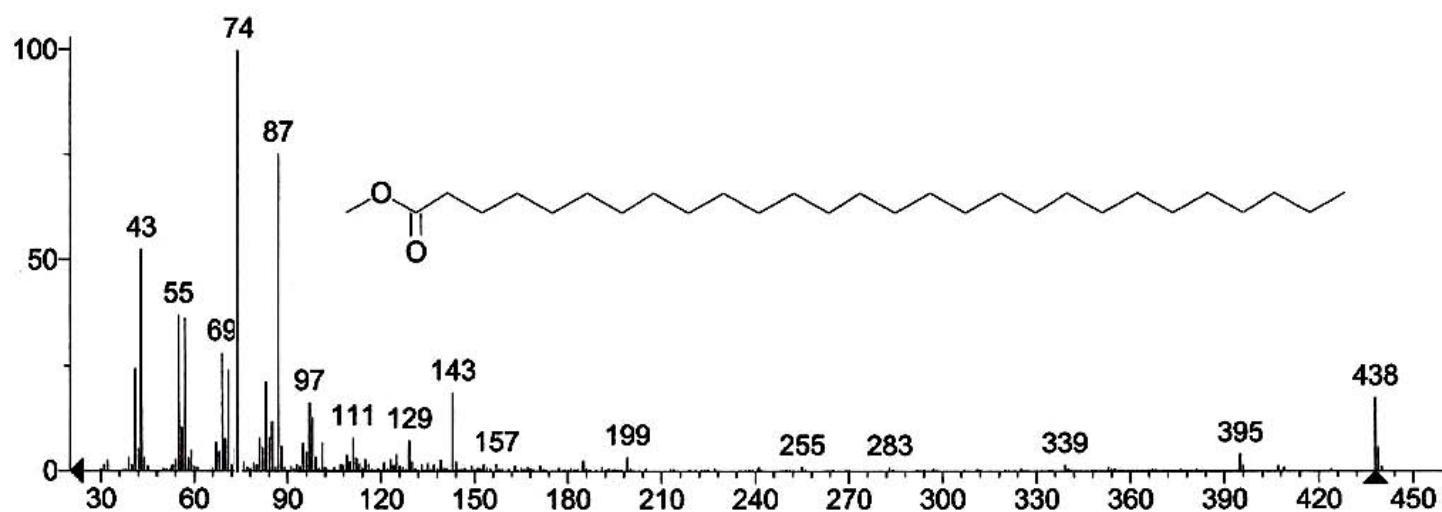
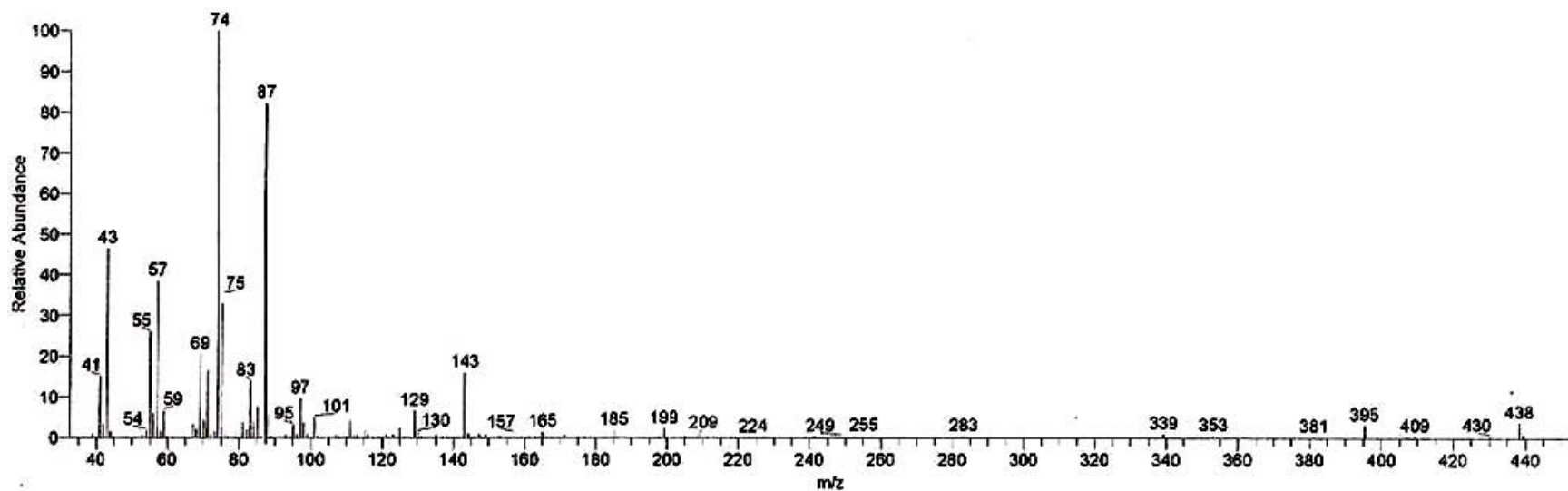
Espectro 13: Espectro de Masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido behénico ($C_{23}H_{46}O_2$) obtenido experimentalmente (A) y el disponible en la base de datos de la USAI (B).



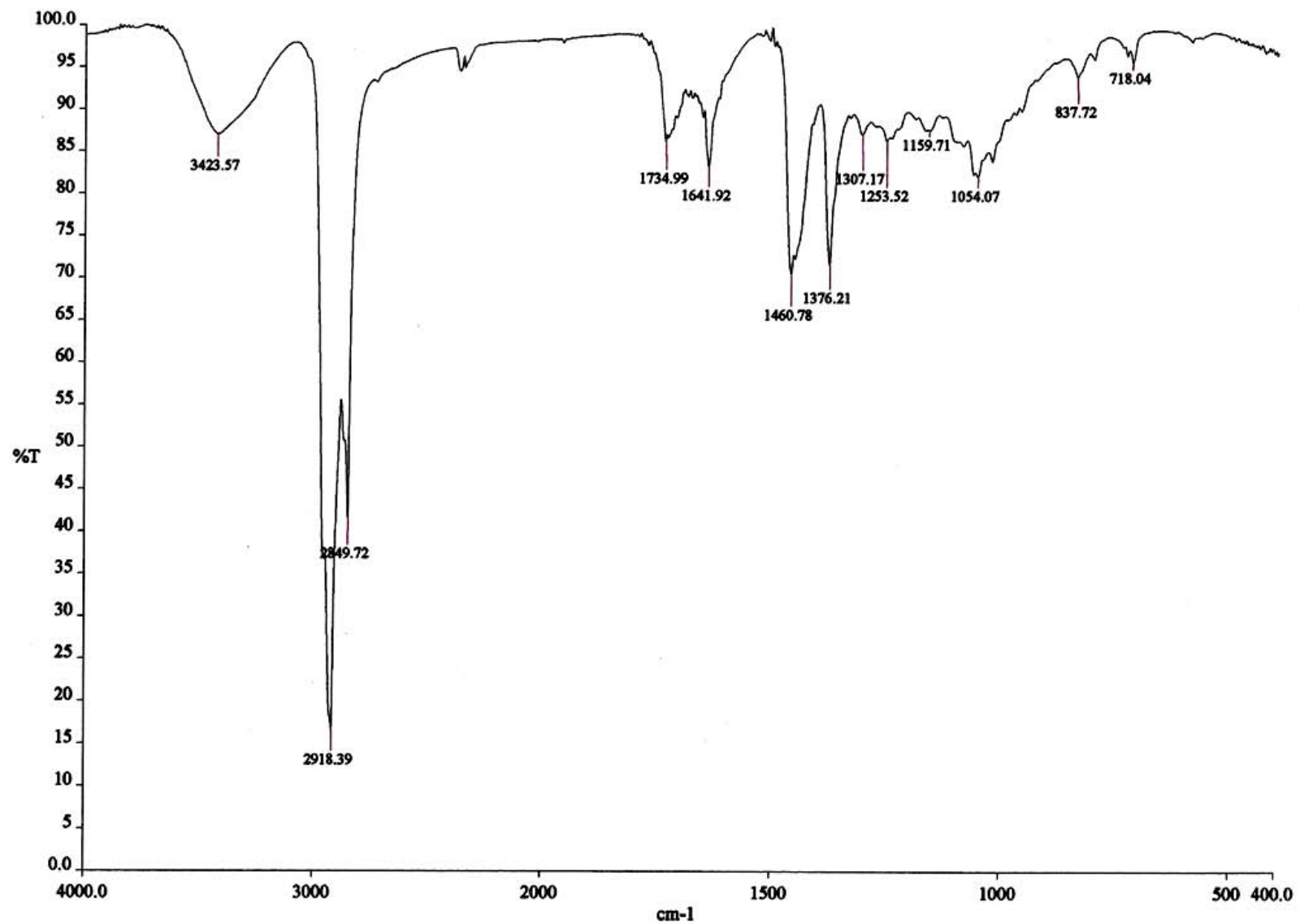
Espectro 14: Espectro de Masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido lignocérico ($C_{25}H_{50}O_2$) obtenido experimentalmente (A) y el disponible en la base de datos de la USAI (B).



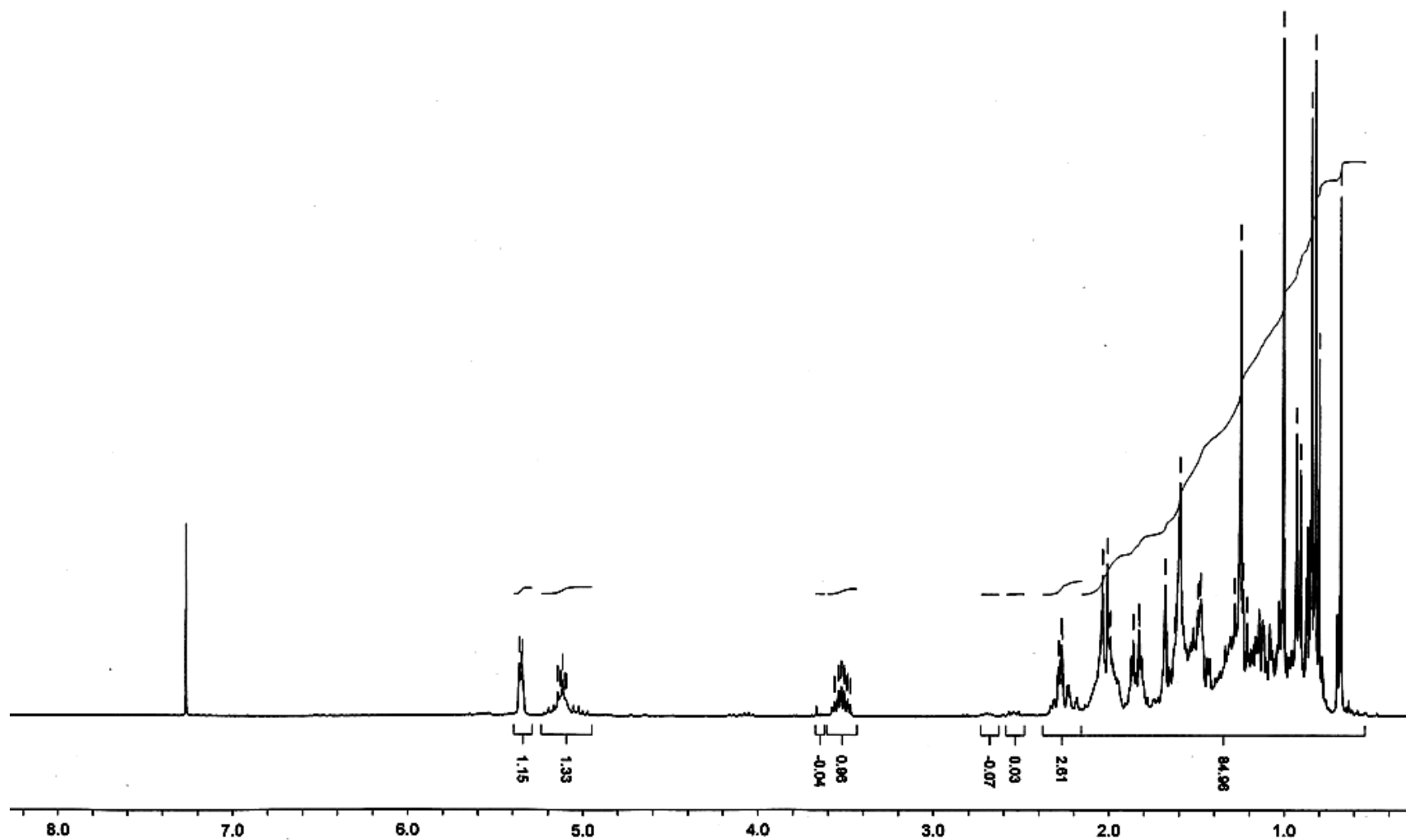
Espectro 15: Espectro de Masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido cerótico ($C_{27}H_{54}O_2$) obtenido experimentalmente (A) y el disponible en la base de datos de la USAI (B).



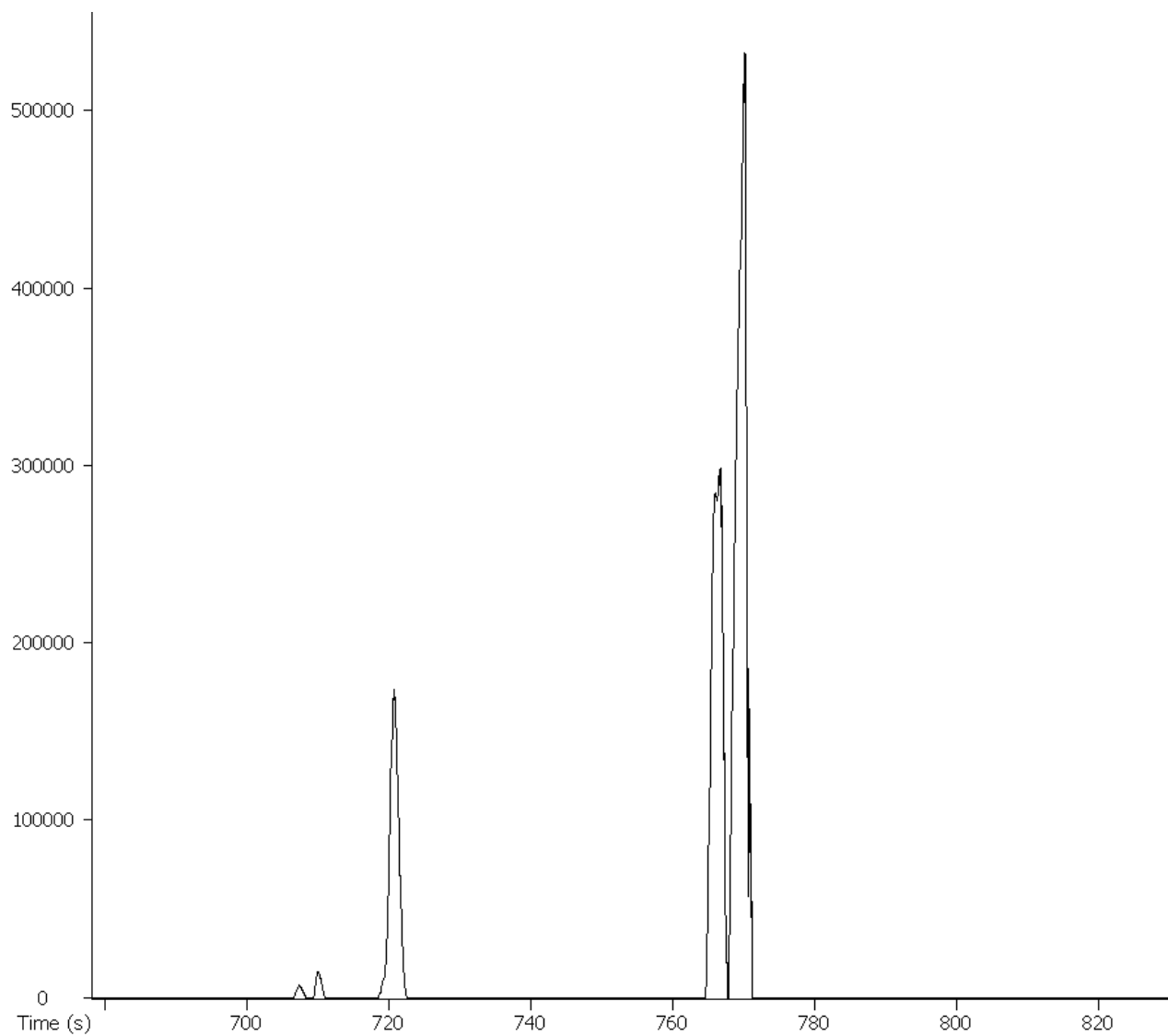
Espectro 16: Espectro de Masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido cerótico ($C_{29}H_{58}O_2$) obtenido experimentalmente (A) y el disponible en la base de datos de la USAI (B).



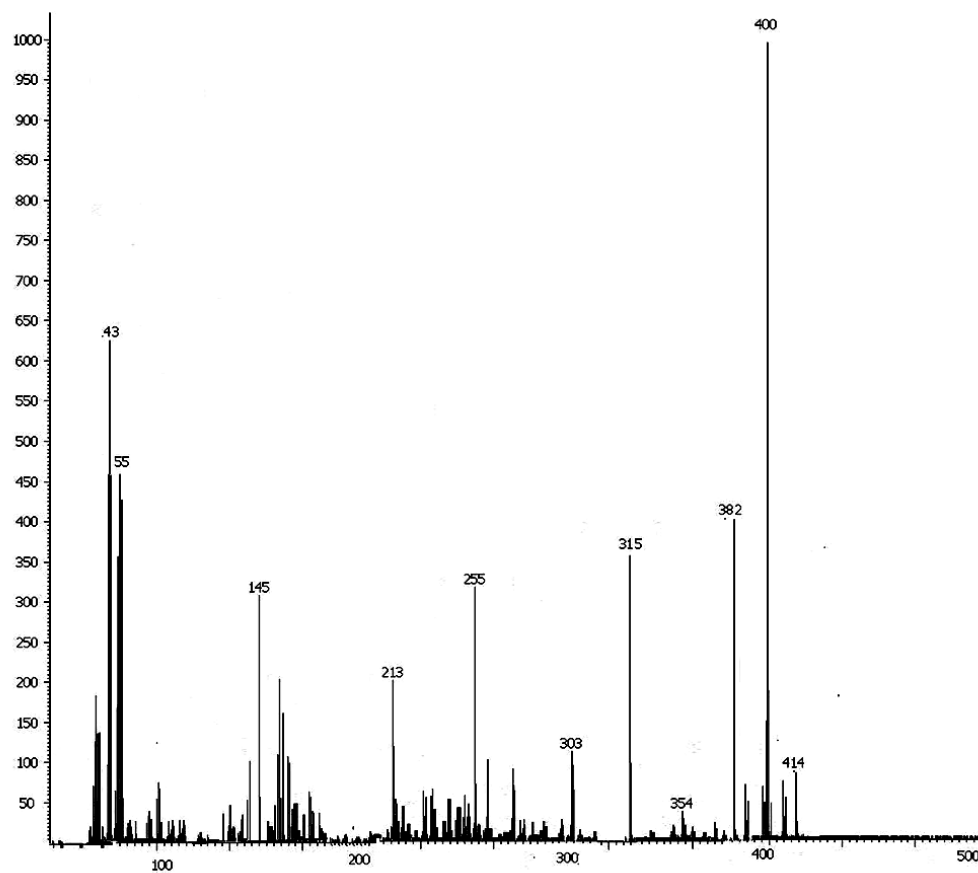
Espectro 17: Espectro de IR de P2.



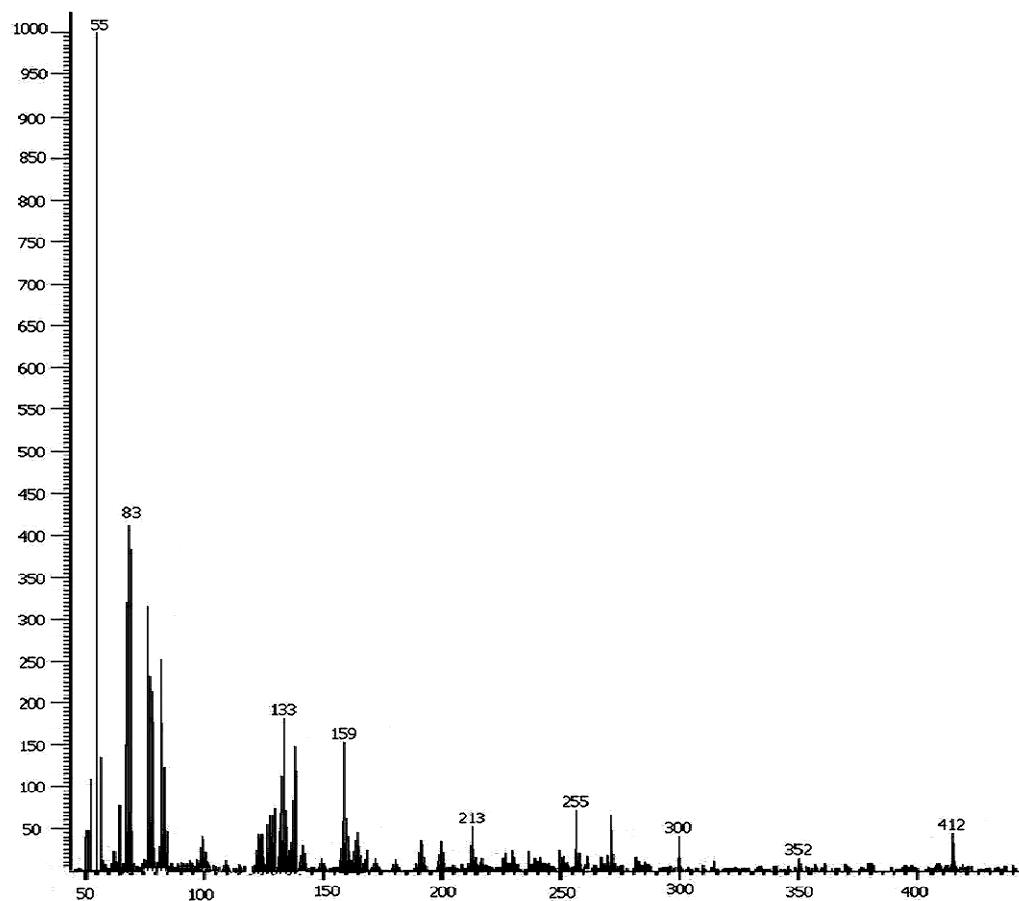
Espectro 18: Espectro de HRMN de P2.



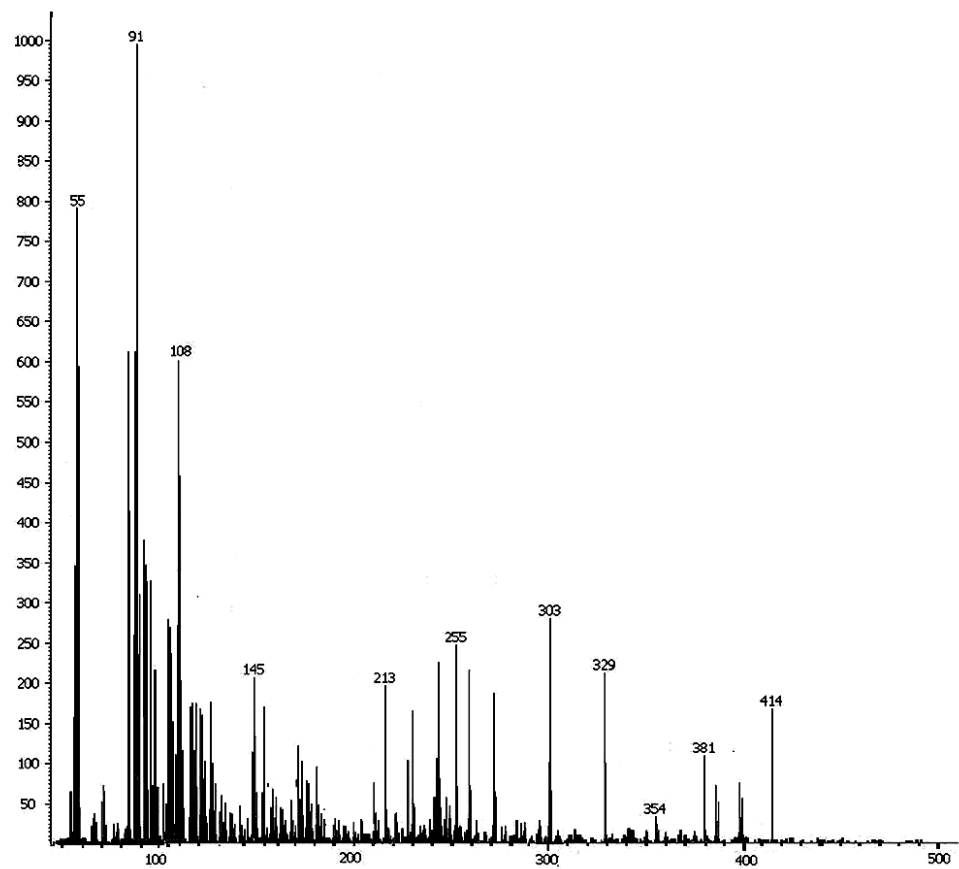
Espectro 19: Espectro de CG de P2.



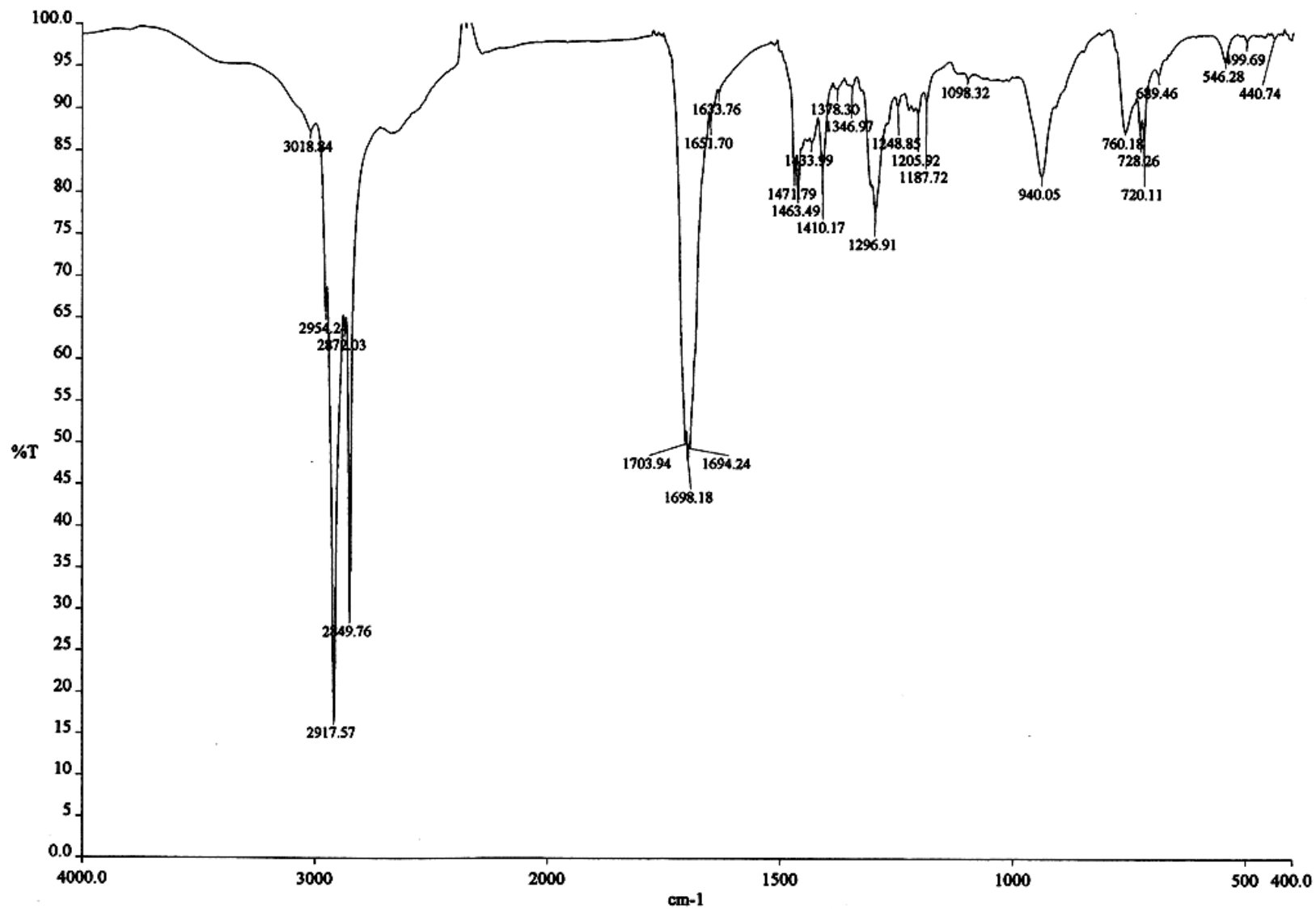
Espectro 20: Espectro de Masas por impacto electrónico del campesterol (tiempo de retención de 720.84 ms).



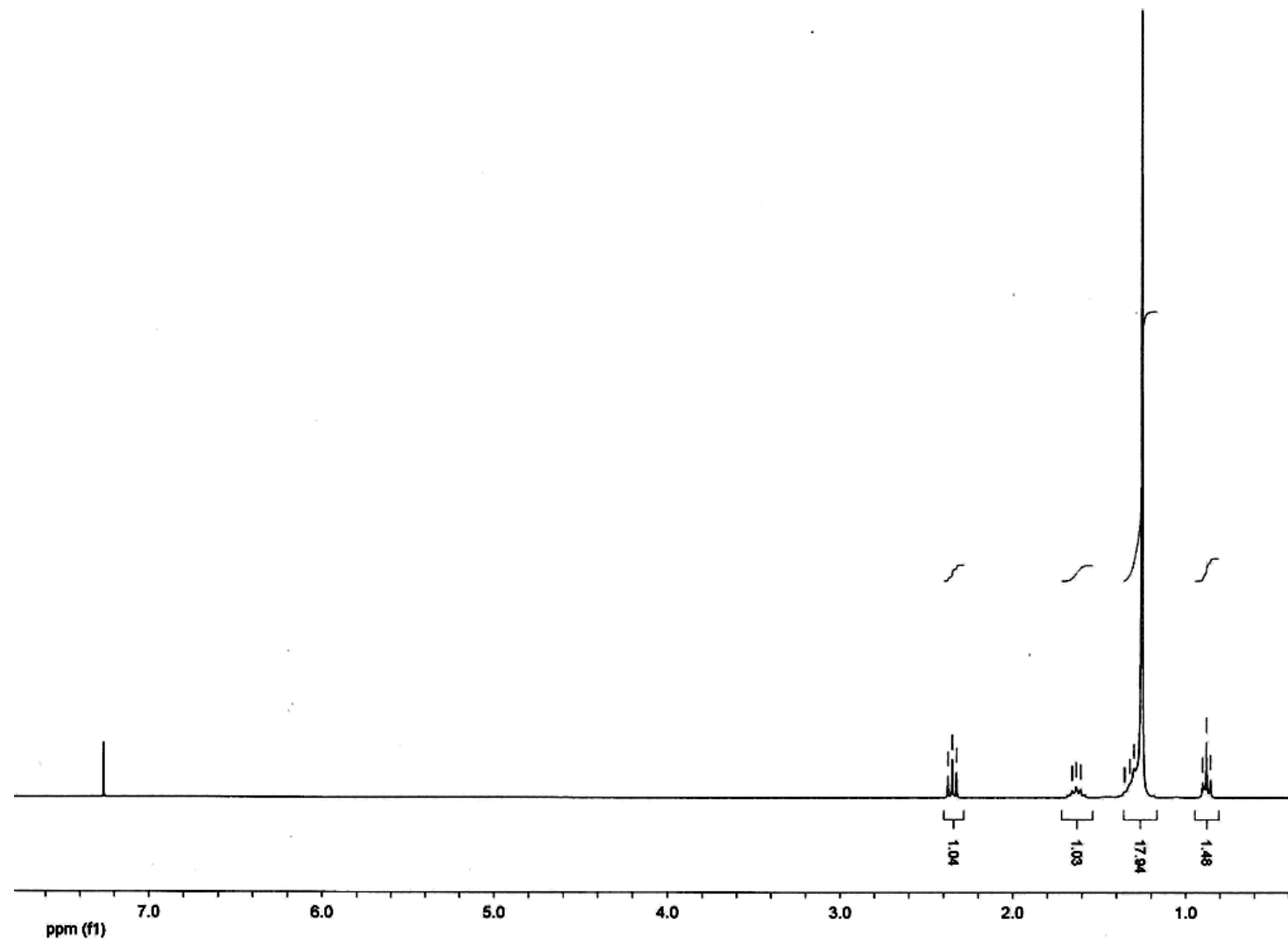
Espectro 21: Espectro de Masas por impacto electrónico del estigmasterol (tiempo de retención de 750ms).



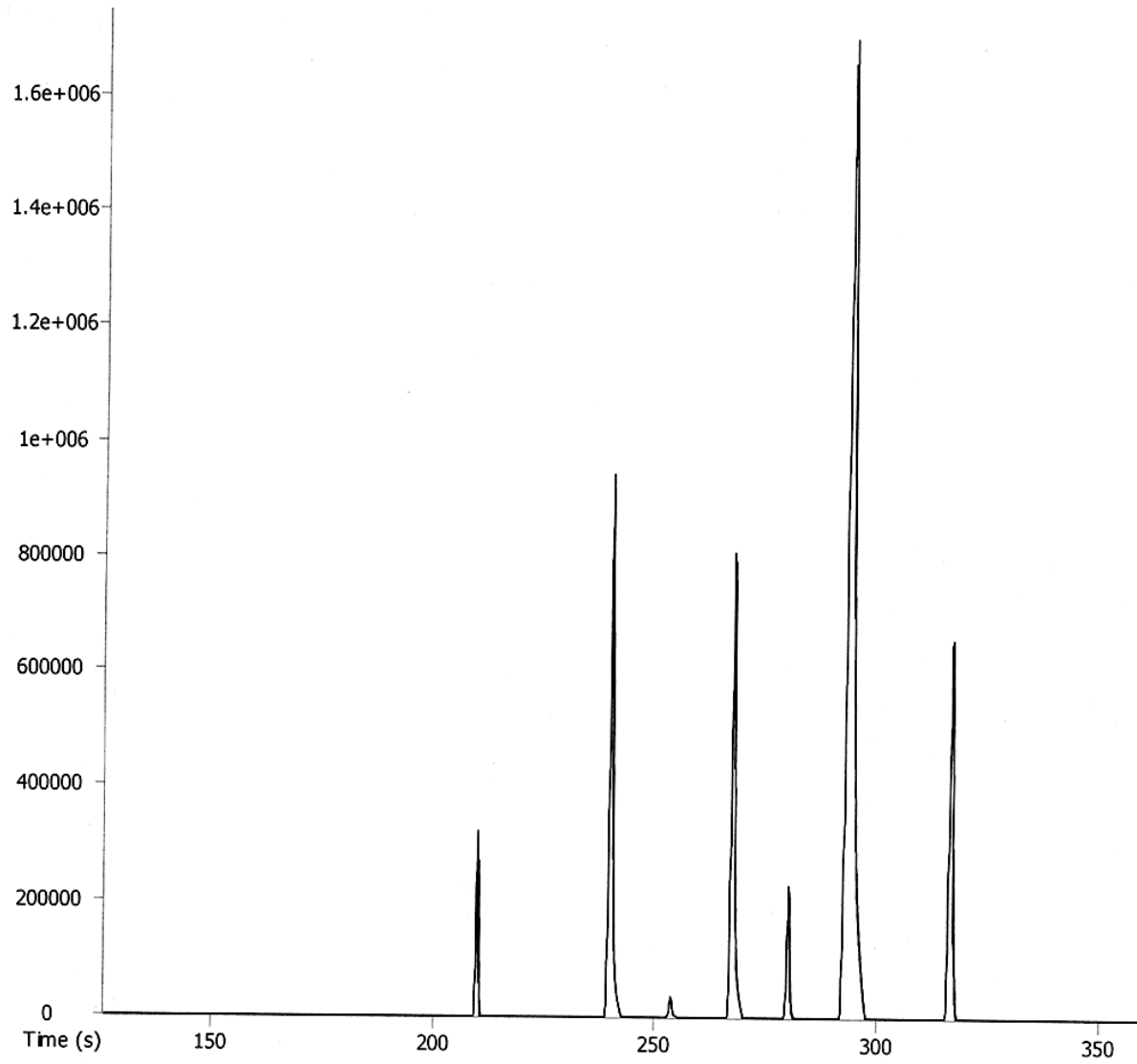
Espectro 22: Espectro de Masas por impacto electrónico del β -sitosterol (tiempo de retención de 766ms).



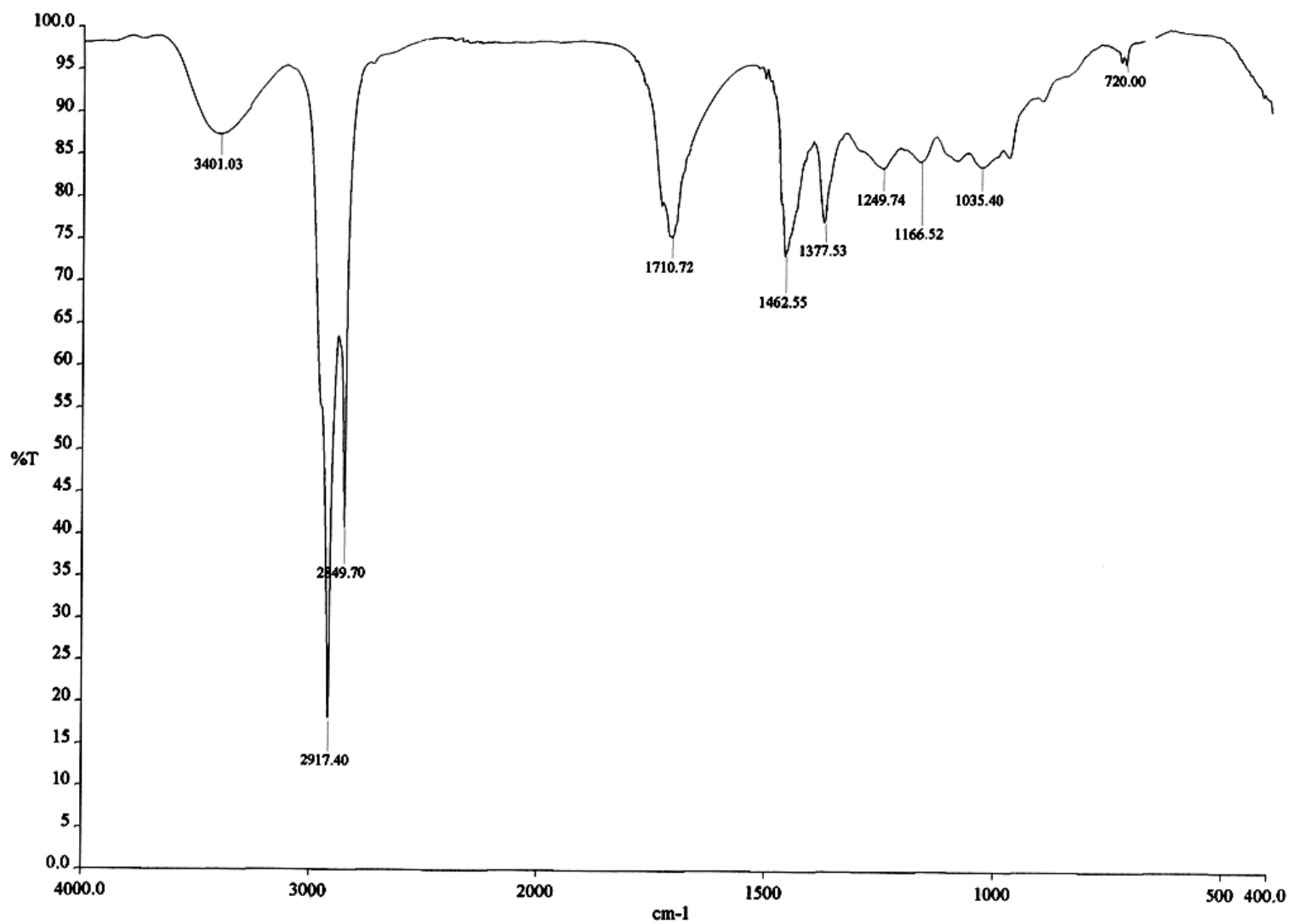
Espectro 23: Espectro de IR de P3.



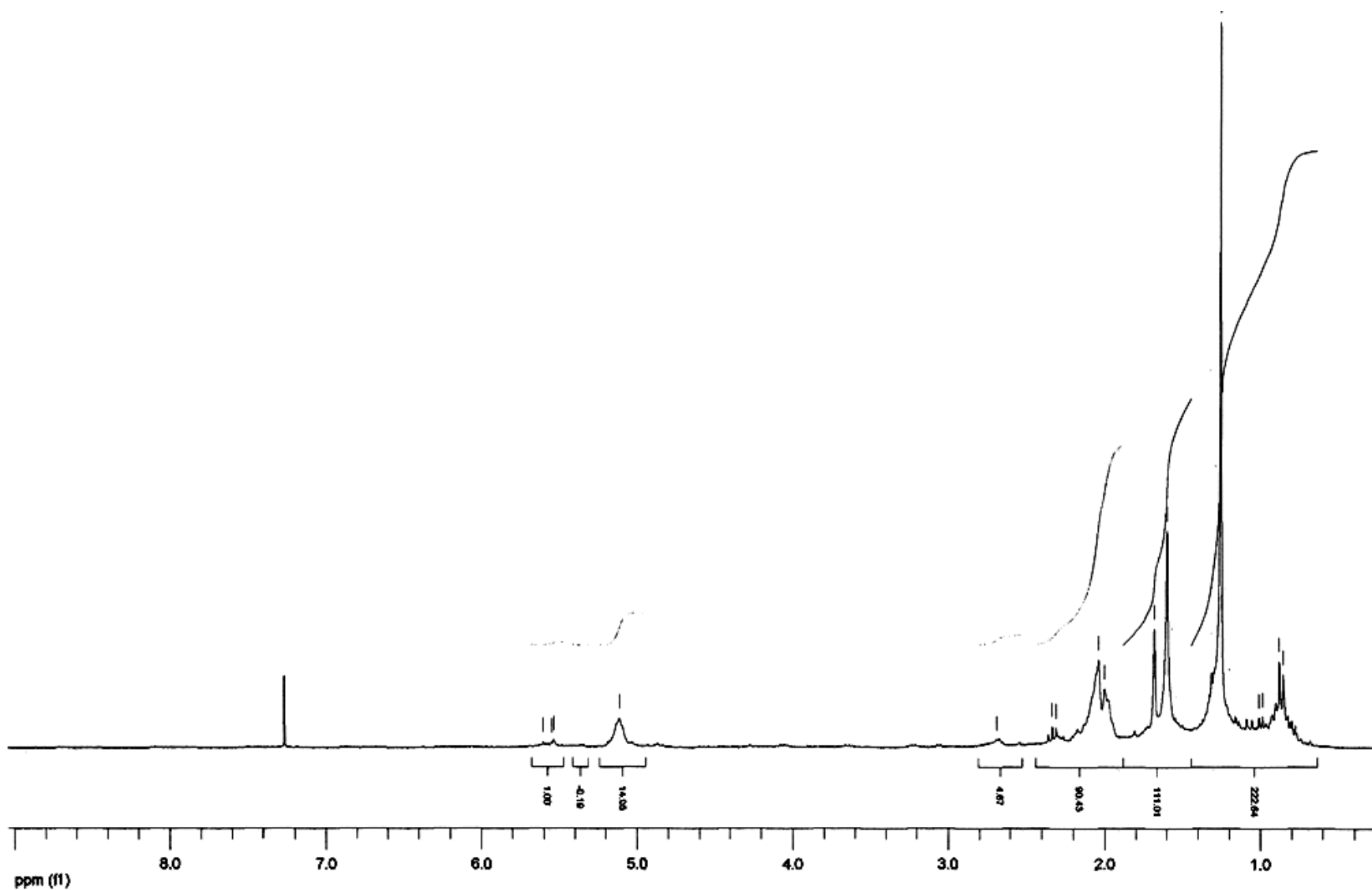
Espectro 24: Espectro de HRMN de P3.



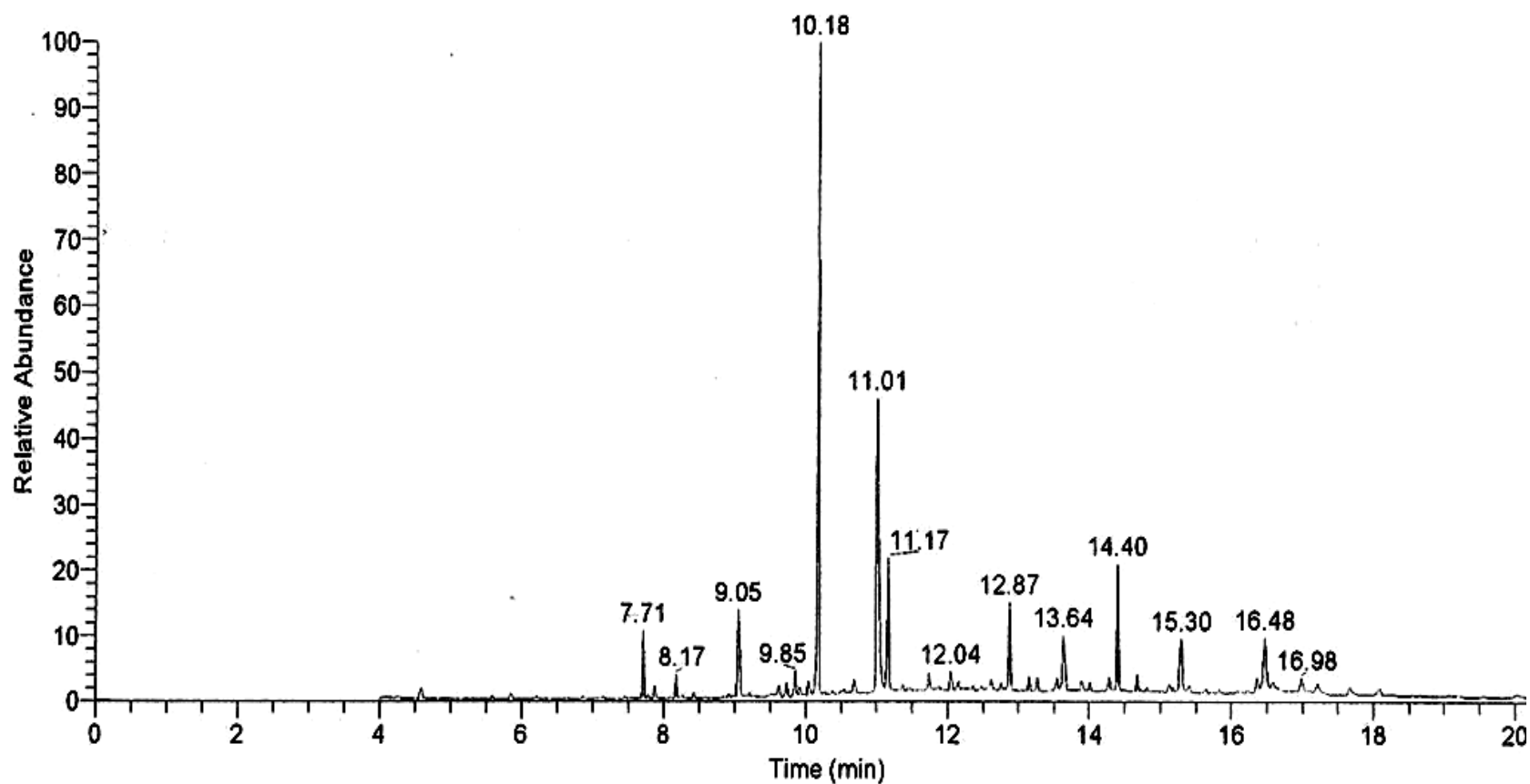
Espectro 25: Cromatograma de gases de P3.



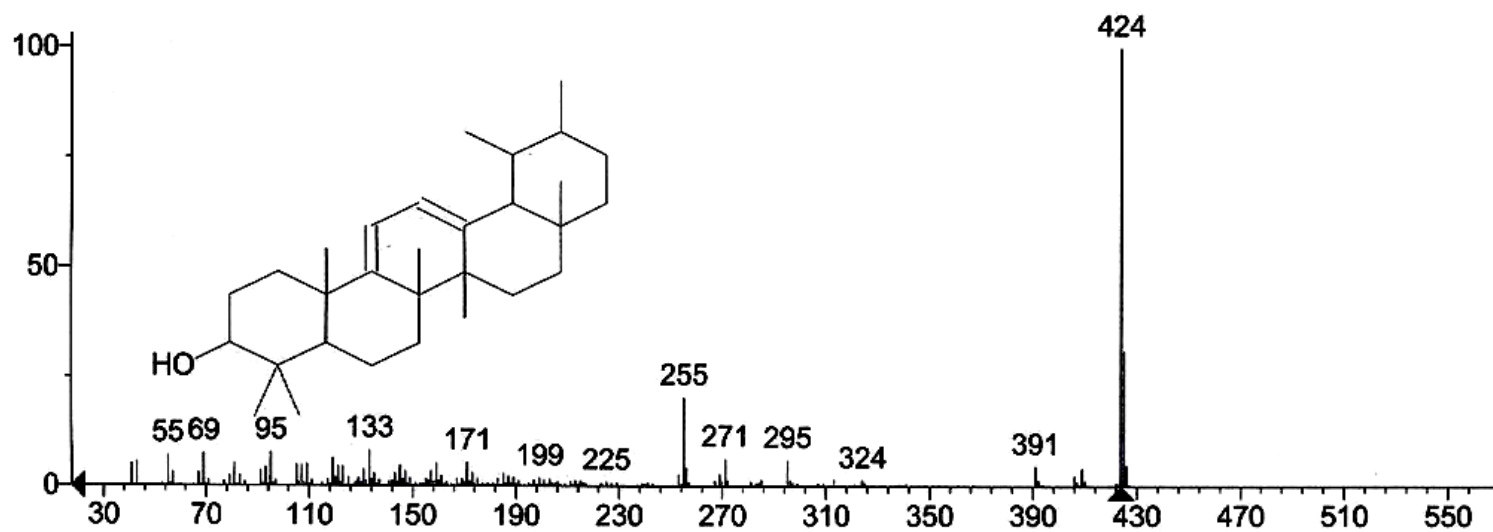
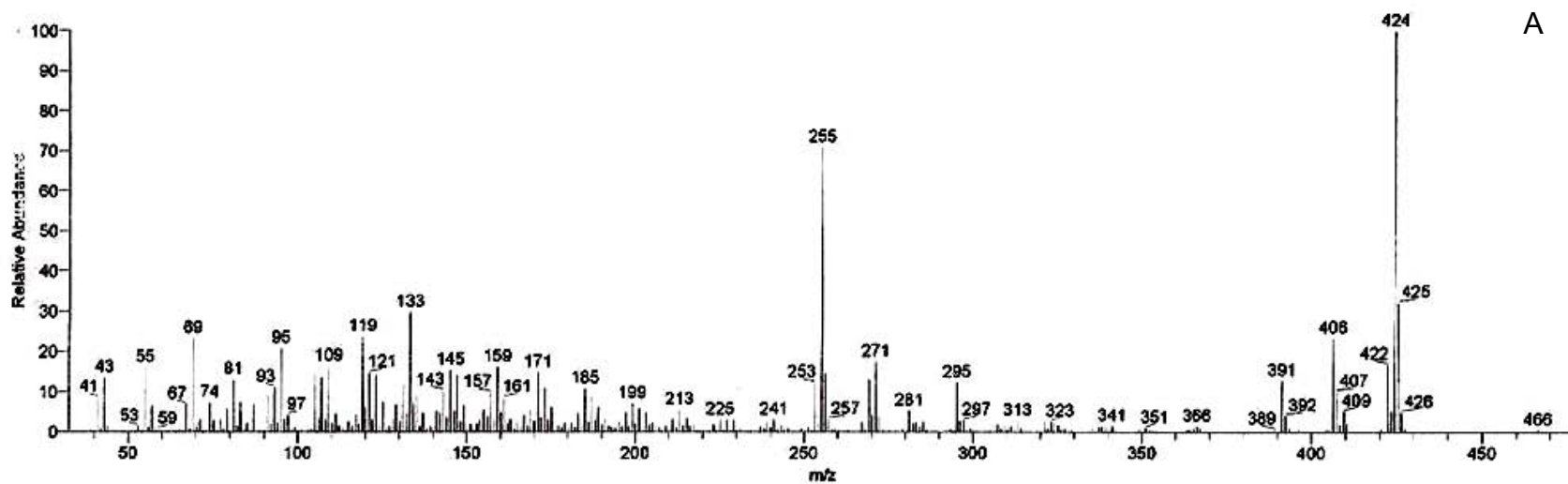
Espectro 26: Espectro de la fracción M1 del extracto hexánico de *Cecropia obtusifolia*.



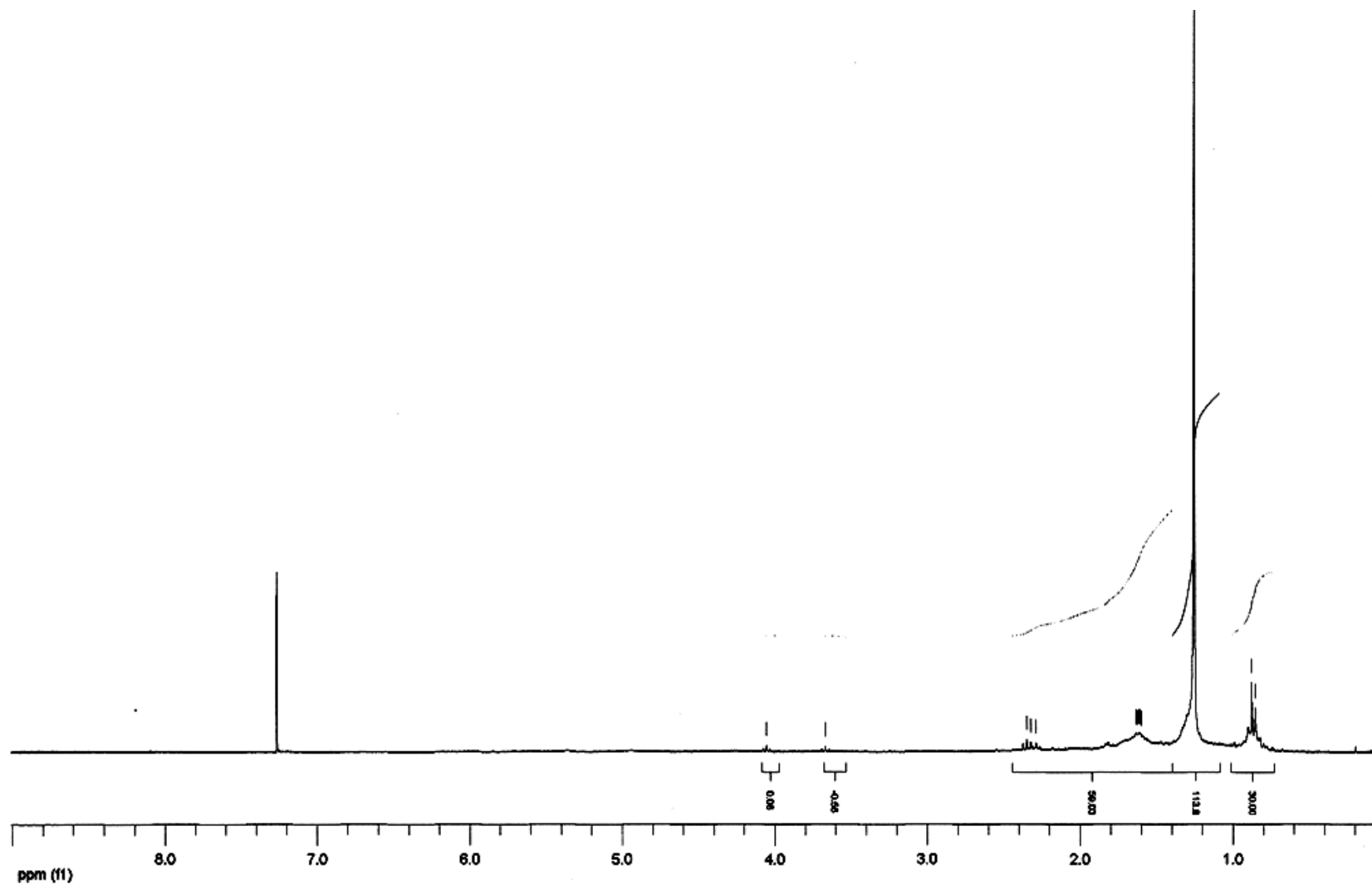
Espectro 27: Espectro de HRMN de la fracción **M1** del extracto hexánico de *Cecropia obtusifolia*.



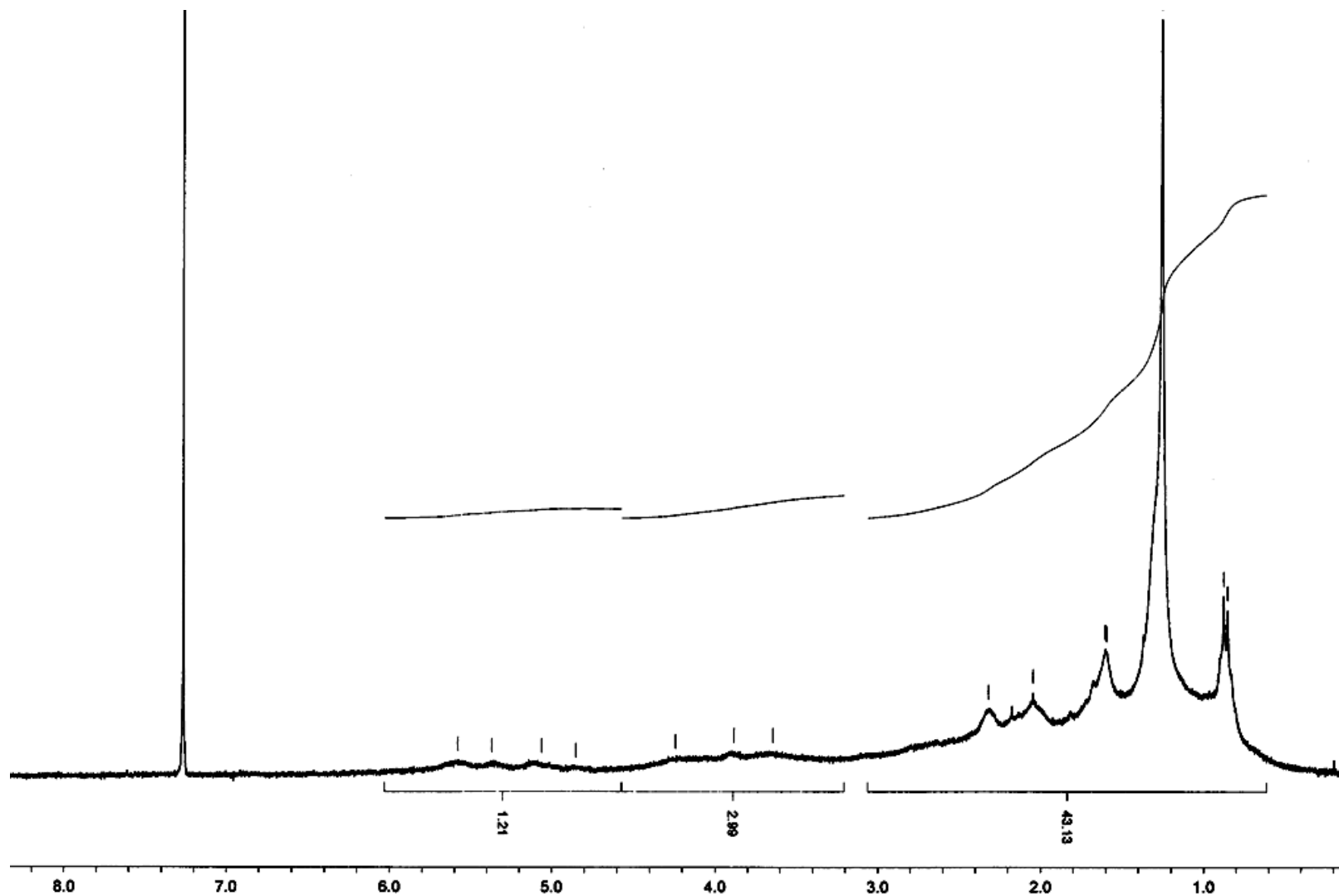
Espectro 28: Cromatograma de gases de la fracción M1 del extracto hexánico de *Cecropia obtusifolia*.



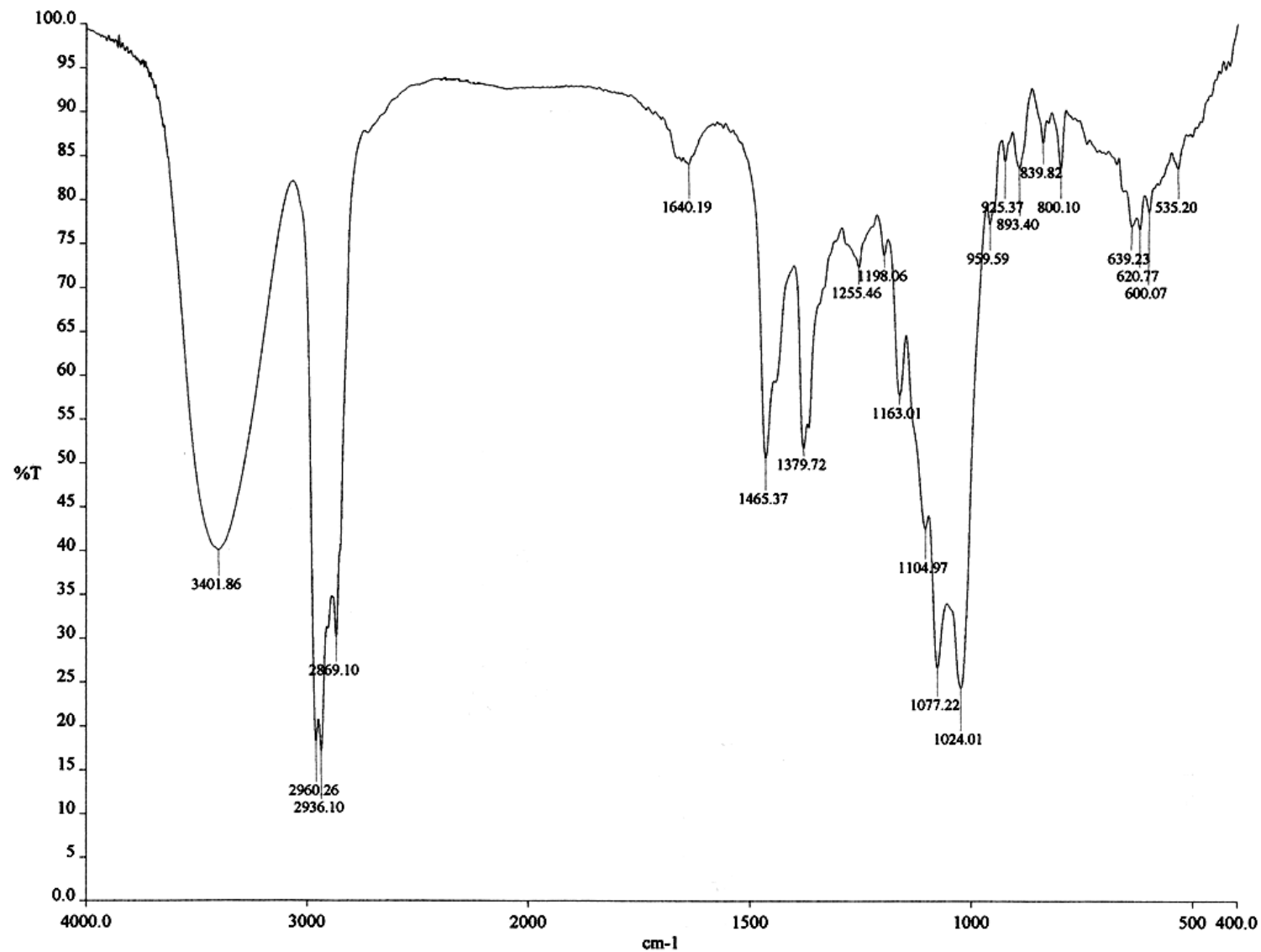
Espectro 29: Espectro de Masas por impacto electrónico del éster metílico del Ursa-9(11), 12dien-3-ol ($C_{30}H_{48}O$) obtenido experimentalmente (A) y el disponible en la base de datos de la USAI (B).



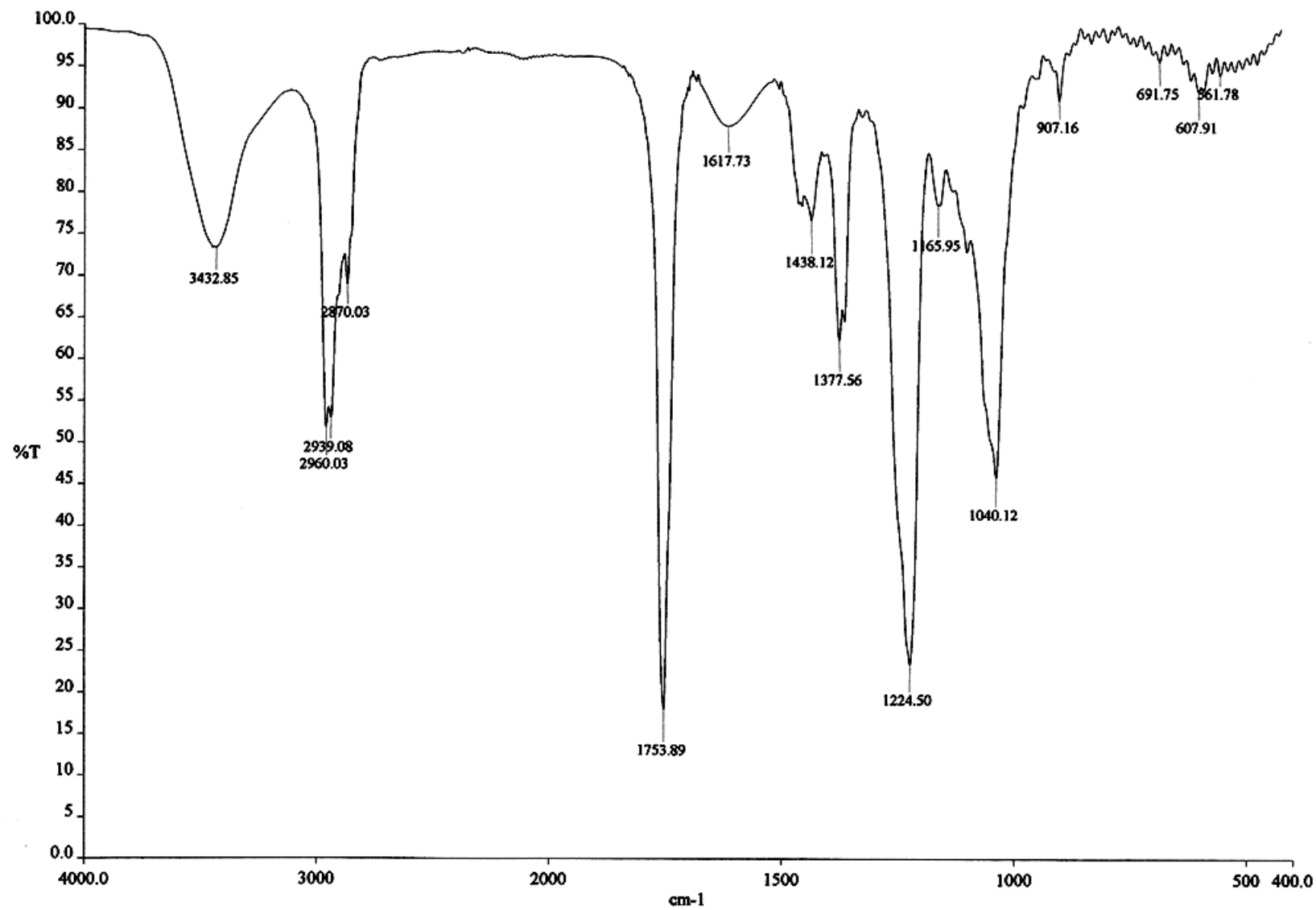
Espectro 30: Espectro de HRMN de la fracción Hexánica del extracto clorofórmico de *Cecropia obtusifolia*.



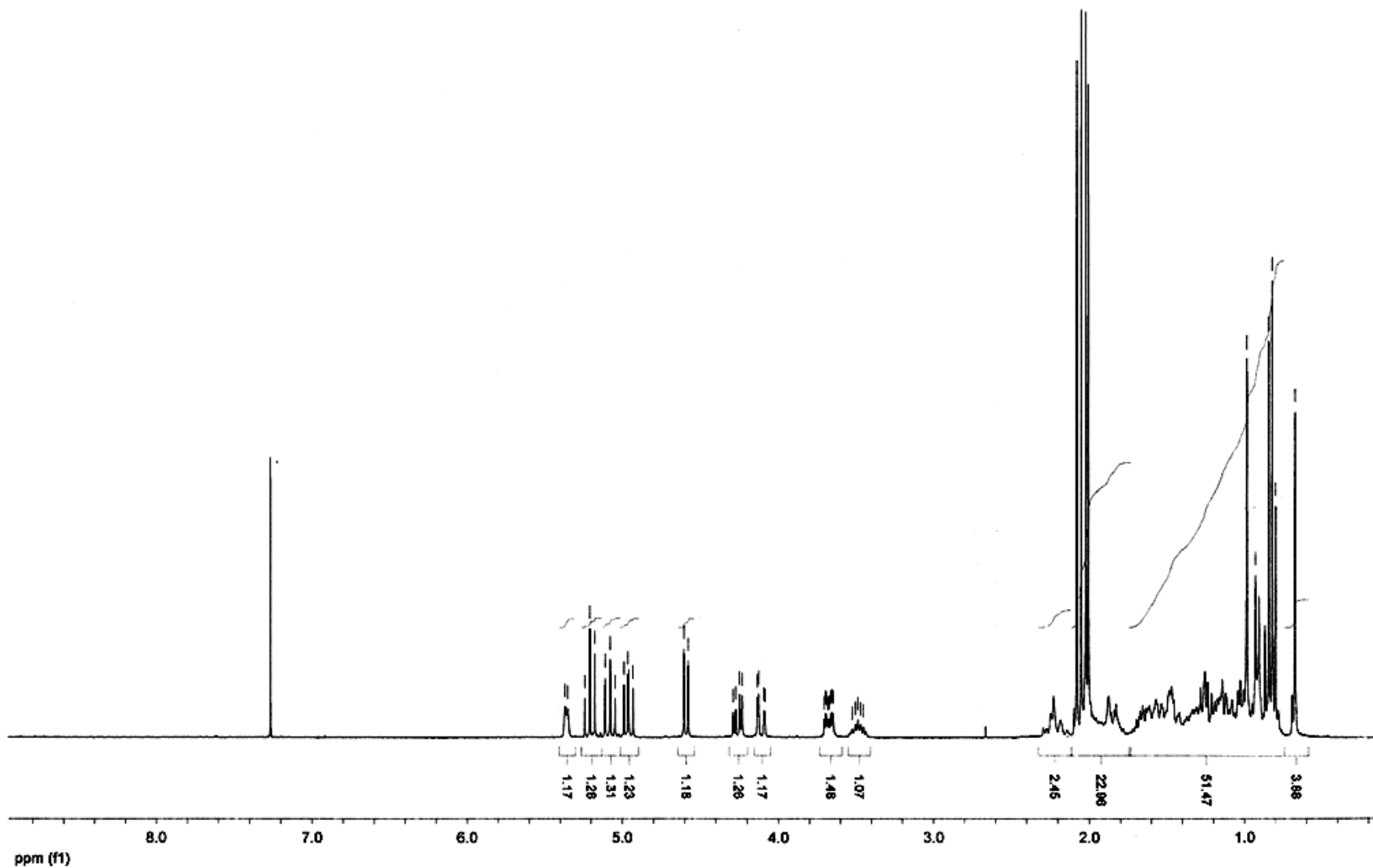
Espectro 31: Espectro de HRMN de P4.



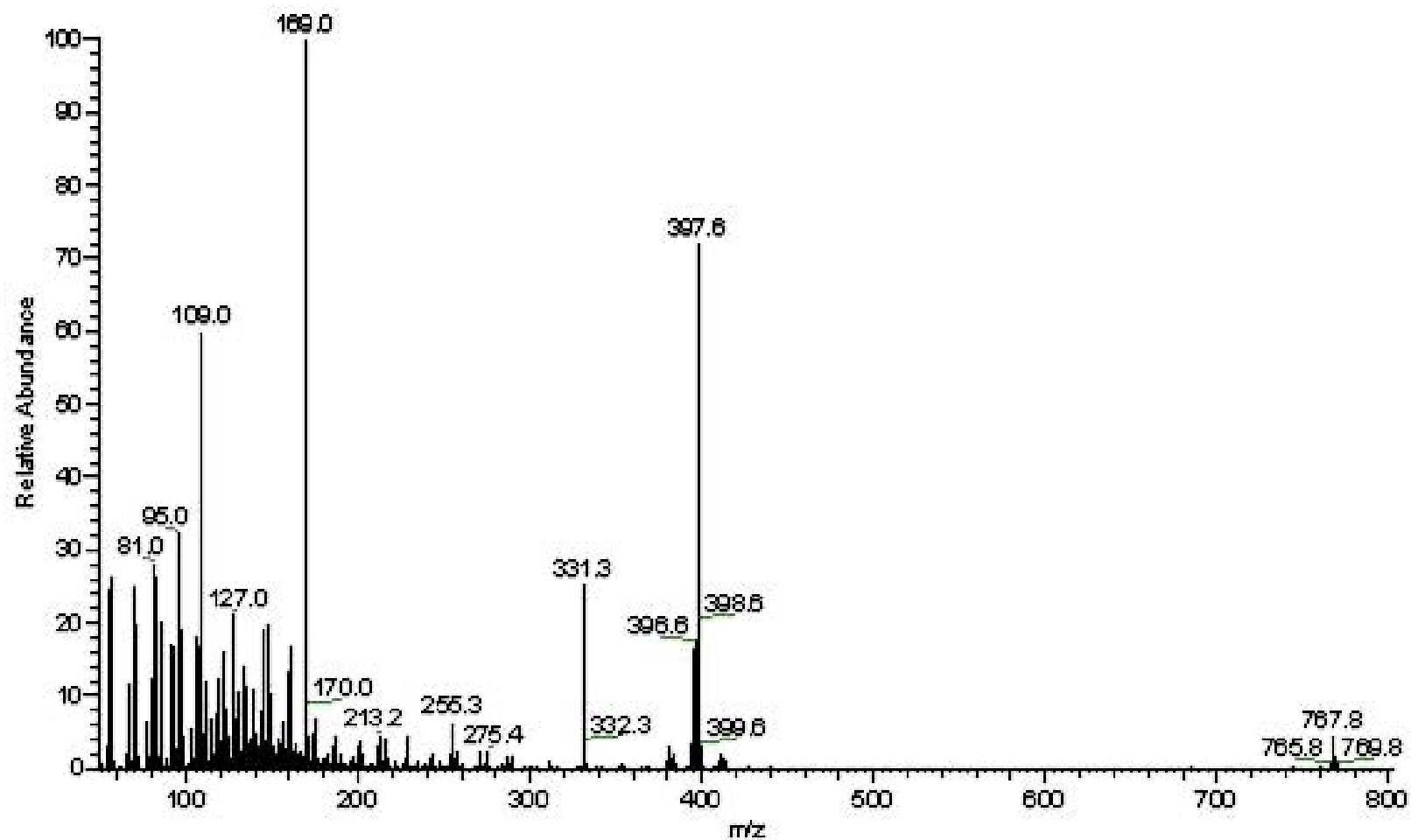
Espectro 32: Espectro de IR del compuesto 1.



Espectro 33: Espectro de IR del compuesto **1A**.



Espectro 34: Espectro de HRMN del compuesto 1A.



Espectro 35: Espectro de Masas por impacto electrónico del compuesto **1A**.

12. Referencias

1. Ávila JG (1986) Aislamiento y elucidación parcial de un principio hipoglucemiante de la planta *Cecropia obtusifolia Bertol.* Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala UNAM. México D.F.
2. Andrade A, Heinrich M (2005). Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99:325-348.
3. Revilla MC, Andrade A, Palomino MA, Wiedenfeld H, Islas S (2007). Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients. *Journal of Ethnopharmacology*. 111:636-640.
4. Pérez C, Herrera MD, Ortiz R, Álvarez de Sotomayor M, Fernández MA (2001). A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 76:279-284.
5. Caceres A, Giron A, Martinez AM (1987) Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*. 19:233-245.
6. Vidrio H, Garcia F, Reyes J, Soto RM (1982). Hypotensive activity of *Cecropia obtusifolia*. *Journal of Pharmaceutical Science*. 71:475-476.
7. Aguilar MT (1985). Aislamiento del compuesto con actividad hipotensora de *Cecropia obtusifolia*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México D.F.
8. Soto HR (1975) Contribución al estudio químico de *Cecropia obtusifolia*. Tesis de Licenciatura facultad de Química UNAM, México D.F.
9. Jiménez S (1989) estudio químico de plantas medicinales mexicanas constituyentes de *Cecropia obtusifolia* (Guarumbo) y *Xanthoxylum liebmaniarum* (colopahtle). Tesis de Licenciatura, FES Zaragoza. UNAM, México D.F.
10. Kogan MA y Pérez AJ (2003) Herbicidas. Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción. Ediciones Universidad Católica de Chile. 22-31.
11. Kudsk P and Streibig JC (2003) Herbicides- a two-edged sword. *Weed Research* 43:90-102

12. Macías FA, Galindo JC (2001) Terpenoides alelopáticos: estructuras, actividad y aplicaciones. En: Anaya AL, Espinosa FJ, Cruz R (eds). Relaciones químicas entre organismos: Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. Plaza y Valdez Editores. México D.F. 137-162.
13. Duke SO, Dayan FE and Rimando AM (1998) Natural products as tools for weed management. *Japan Weed Science* (suppl) 1:11.
14. Duke SO, Dayan FE, Romagni JG and Rimando AM (2000) Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Research*. 40:99-111
15. Duke O and Abbas H (1995). Natural products with potential use as herbicides. *ACS Symposium Series* 582:348-362.
16. Duke SO, Lydon, J. (1987). Herbicides from Natural Compounds. *Weed Technology*. 1:122-128.
17. Rice EL. (1984). Allelopathy. Academic Press. Orlando, Florida. 2a edición p. 422.
18. Batish D, Kohli R, Singh H. (2003). Allelopathic interactions and allelochemicals: New possibilities for sustainable weed management. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 22:239-311.
19. Carbajal S, González LM (2005) La Familia *Cecropiaceae* en el estado de Jalisco, México. Universidad de Guadalajara.
20. *Cecropia obtusifolia*. (2007). [Electrónico]. Conabio. www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/49-morac3m.pdf
21. Spichiger R (1989) Los árboles, el Arboretum Jenaro Herrera: Contribución a la flora de la Amazona Peruana, Lima Génova 1:354.
22. Drabe WY and Fedtke C. (1979) Herbicide interaction with plant biochemical systems. En: Geissbuhles, Brooks GT and Kearney PC (eds). *Advances in Pesticide Science Part 2H*. Pergamon Press, Oxford 3.
23. Esser HO, Dupuis G, Ebert E, Vogel C and Marco GJ (1975) S-triazines. En: Kearney PC, Kaufman DD (eds) *Herbicides. Chemistry, degradation and mode of action*, Marcel Dekker, New York, Vol1:129-208

-
24. Calderbank A and Slade P (1976) Diquat and paraquat. En: Kearney PC, Kaufman DD (eds) *Herbicides. Chemistry, degradation and mode of action*, Marcel Dekker, New York, Vol 2:501-539
 25. Campbell MK and Farell SO (2004). *Bioquímica*. Ed. Internacional Thompson Australia 615-627
 26. Cobb AH and Kirkwood RC (2000) Challenges for herbicide development. En Cobb AH and Kirkwood RC (eds) *Herbicides and their mechanism of action*. Sheffield Academic Press, Sheffield, United Kingdom 1-24
 27. Franz JE, Mao MK and Sikorski JA (1997) Glyphosphate: a unique global herbicide. ASC Monograph 189, American Chemical Society.
 28. Beyer JE, Duffy MJ, Hay JV and schlueter DD (1988) Sulfonylureas. En: Kearney PC, Kaufman DD (eds) *Herbicides. Chemistry, degradation and mode of action*, Marcel Dekker, New York Vol. 3:117-189
 29. Trebs A (1980) Inhibitors in electron flow: tools for the functional and structural localization of carriers and energy conservation sites. *Methods in Enzymology*. 69:675-715
 30. Kudsk P (1989) Experiences with reduced herbicide doses in Denmark and the development of the concept of factor-adjusted doses. En: *Proceedings Brighton Crop Protection Conference-Weeds*, Brighton United Kingdom. 545-554.
 31. Kudsk P (2002) Optimizing herbicide performance En: Naylor (ed) *Weed Management Handbook*, Blackwell Publishing, Oxford United Kingdom 323-344
 32. Kudsk P (1999) Optimizing herbicide use- the driving force behind the development of the Danish decision support system En: *Proceedings Brighton Conference-Weeds*, Brighton United Kingdom. 737-746.
 33. Kudsk P (2001) How to investigate the influence of environmental factors of herbicide performance. En: *Proceedings of the BCPC Conference-Weeds*, Brighton United Kingdom. 495-504
 34. Trebs A (1972) Measurement of Hill reactions and Photoreduction. *Methods in Enzymology* 24:146-153

-
35. Nelson D, Cox MM (2009) Lehninger principles of biochemistry. 5ta ed. Ed. W.H. Freeman and Company, New York.
 36. Voet D, Voet J, Pratt CW (2005) Fundamentals of Biochemistry. 2da ed. Jonh Wiley & Sons, New York.
 37. Baker NR and Percival MP (1991). Herbicides and Photosynthesis. In: Baker NR, Percival MP (Eds), Herbicides Elsevier Science Publishers, Netherlands. 1-26
 38. Ramirez T, Morales PA, Rojas HA, Gonzalez I (1996) Electrochemical study of 1,5-diphenylcarbazine and 1,5-diphenylcarbazone in 0.3 M HClO₄. Journal of Electroanalytical Chemistry. 410:203-212.
 39. Izawa S (1980) Acceptors and donors for chloroplast electron transport. Methods in Enzimology 69:413-433
 40. Mc Carty RE (1980) Delineation Of the mechanism of ATP synthesis in chloroplasts: Use of uncouplers, energy transfer inhibitors , and modifiers of coupling factor 1. Methods in Enzymology 69:719-727.
 41. Bolhár-Nordenkamp HR and Öquist G. (1993) Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. En: Hall DO, Scurlock JMO (eds) Photosynthesis and production in a Changing Enviroment. A Field and laboratory Manual. Bolhár-Nordenkamp HR, Leegood RC and Longs SP. Chapman and Hall, London United Kingdom 193-205
 42. Strasser RJ, Srivastava A and Govindjee (1995) Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cianobacteria. Photochemistry and Photobiology 66:32-45.
 43. Delosme R (1971) New results about chlorophyll fluorescence "in vitro". En: Forti G, Avron M and Melandri A (eds). Proceedings of the 2nd. International Congress on Photosynthesis Research. 187-195
 44. Black M. y Bewley JD (1994). Seeds: Germination, structure and composition. En: Physiology of development and germination. Plenum Press. 1-30.
 45. Calderón MF (2007). Contenido de ácidos grasos y metales pesados en huevos y sangre de tortuga marina *Lepidochelys olivácea* de la colonia

-
- anidadora de Plata Escobilla, Oaxaca México. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. México D.F.
46. Shriner R, Fuson R, Curtin D (1997). Identificación sistemática de compuestos orgánicos. Limusa. México D.F.
 47. González VR (2007). Obtención y caracterización química y bioquímica de metabolitos secundarios con actividad herbicida de las hojas de *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM, México D.F.
 48. Einhelling FA (1995) Allelopathy: Current status and future goals, En: Inderjit K, Dakshini M y Einhelling FA (eds). Allelopathy. Organisms, processes and applications. ACS Symposium Series 582. American Chemical Society, 2-25.
 49. Arnon DI (1949) Cooper enzymes in isolated chloroplasts polypenoloxidase in *Beta vulgaris* Plant Physiology 24:1-15
 50. Dilley R (1972) Ion transport (H^+ , K^+ , Mg^{2+}) exchange phenomena. Methods in Enzymology 24:68-74
 51. Jiménez A, Mata R, Lotina-Hensen B, and Anaya AL (1998). Interference of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene with photosynthetic electron transport. Zeitschrift für Naturforschung 53c:55-59
 52. Hipkins MF and Baker NR (1986) Photosynthesis transduction a practical approach IRL Press. Oxford Rashington
 53. Calera MR, Soto F, Sanchez P, Bye R, Hernández B, Anaya AI, Lotina-Hensen and Mata R (1995) Biochemical active sesquiterpene lactones from *Ratibida latipalearis*. Phytochemistry 40:419-425
 54. Saha S, Ouitrakul R, Izawa S, and Good N (1971) Electron transport and phosphorylation in chloroplast as function of the electron acceptor. Journal of Biological Chemistry 246:3204-3209
 55. Allen JF and Holmes NG (1986) Electron transport partial reactions. En: Hipkinns MF, Baker NR (eds) Photosynthesis, Energy Transduction. A Practical Approach, Chapter 5. IRL Press, Oxford United Kingdom 103-141.

-
56. Hauska G and Trebs A (1977) Artificial acceptors and Donors En: (trebsA, Avron M (eds). Enciclopedia of Plant Physiol. New Series. Springer-Verlag. Vol 5:226-282.
 57. Rickert KW, Sears J, Beck WF and Brudvig GW (1991) Mechanism of irreversible inhibition of O₂ evolution in photosystem II by Tris (hydroxymethyl)aminomethane. *Biochemistry* 30:7888-7894.
 58. Meixueiro GC (2008). Ensayo *in vivo* de extractos orgánicos de plantas endémicas mexicanas y ensayo biodirigido del extracto hexánico de hojas de *Cercocarpus macrophyllus* para la obtención de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM, México D.F.
 59. McLaughlin JL and Crow G (1991). Tumours on potato disc and brine shrimp lethality: Two simple bioassays for higher plant screening and fractionation methods, in plant biochemistry. Academic Press, 6:8-9.
 60. Meyer, BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE and McLaughlin JL (1982) Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medical Plant Research* 45:31-34.
 61. Teng WS (1993). Bioactive natural products: Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia Salina*. Editorial S. M. Colgate & R.J. Molyneaux, CRC Press, INC. New York 441-457
 62. Liebermann HR (1983) estimating LD₅₀ using the probit Technique: a basic computer program drug. *Chemical Toxicology*, 6:111-111
 63. Lide DR, Milne GW (1994). Handbook of Data on Organic Compounds. 3 ed. CRC Press, INC. New York.
 64. Fuentes GM y Hernández EM (2004). Estudio fitoquímico de las semillas de *Gliricidia sepium* (Leguminosae) y del extracto metanólico de la raíz de *Parmentiera edulis* (Bignoniaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM, México D.F.
 65. Good NE, Izawa S and Hind G (1981) Uncoupling and energy transfer inhibition in Photophosphorylation. In: Sanadi DR (ed) Current Topics in Bioenergetics vol 1 Academic Press, New York 75-112

-
66. Aguilar MA, Romero MG, Chávez MA, King DB, Lotina HB (2008). Biflavonoids isolated from *shilaginella lepidophylla* inhibit photosynthesis in spinach chloroplasts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 56:6994-7000
 67. Macias FA, Marn D, Oliveros BA, Molinillo JM (2006) Optimization of benzoxazinones as natural herbicide models by lipophilicity enhancement. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54:9357-9365.
 68. Fischer NH, Weidenhamer JD, Riopel JL, Quijanos L, Menelau MA (1990) Stimulation of Witchweed germination by sesquiterpene lactones: a structure-activity study. *Phytochemistry*. 29:2497-2483.
 69. Peters JS, Chin Chee-Kok (2003). Inhibition of photosynthetic electron transport by palmitoleic acid is partially correlated to loss of thylakoid membrane proteins. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41:117-124
 70. Williamson GB, Fischer NH, Richardson DR, De la Peña A (1989). Chemical inhibition of fire-prone grasses by fire-sensitive shrub, *Conradina canescens*. *Journal of Chemical Ecology*. 5:1567-1577.
 71. Weidenhamer JD, Macias FA, Fischer NH, Williamson GB (1993). Just how insoluble are monoterpenes?. *Journal of Chemical Ecology*. 8:1779-1807
 72. Golbeck JH, Martin IF, Fowler CF (1980). Mechanism of linoleic acid-induced inhibition of photosynthetic electron transport. *Plant Physiology*. 65:707-713.
 73. Venediktov PS, Krivoshejeva (1983). The mechanisms of fatty-acid inhibition of electron transport in chloroplasts. *Planta* 159:411-414.
 74. Krogmann DW, Jagendorf AT (1959). Inhibition of the Hill reaction by fatty acids and metal chelating agents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 80: 421-430.
 75. Garstka M, Kaniuga Z (1988). Linoleic acid-induced release of Mn, polypeptides and inactivation of oxygen evolution in photosystem II particules. *FEBS Letters*. 232:372-376.
 76. Rottenberg H, Steiner MS (1986). Free fatty acids decouple oxidative phosphorylation by dissipating intramembranal protons without inhibiting ATP

-
- synthesis driven by the proton electrochemical gradient. FEBS Letters. 202:314-318.
77. Rottenberg H, Hashimoto K (1986). Fatty acid uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochemistry*. 25:1747-1755
 78. Pick U, Weiss M, Rottenberg H (1987). Anomalous uncoupling of photophosphorylation by palmitic acid and by gramicidin D. *Biochemistry*. 26:8295-8302.
 79. Opanasenko VK, Vasyukhina LA (2009). Synergism of ammonium and palmitic acid in uncoupling of electron transfer and ATP Synthesis in chloroplasts. *Biochemistry (Moscow)* 74:643-647
 80. Castañeda P, Mata R and Lotina B (1998) Effect of encephalin, euparin and demethylencephalin on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplast, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 78:102-108.
 81. González-Bernardo E, Aguilar MI, Delgado G King-Díaz B and Lotina Hensen (2003) Photosynthetic electron transport interaction of xanthoxanthin isolated from *Isoetes macrospora* and its derivatives. *Physiologia Plantarum*. 119:598-604
 82. Strasser RJ (1997) Donor side capacity of photosystem probed by chlorophyll *a* fluorescence transients. *Photosynthesis Research* 52:147-155
 83. Strasser RJ, Srivastava A and Tsimilli-Michael M. (2004). Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In: Papageorgiou G, Govindjee (eds) *Advances in Photosynthesis and Respiration. Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. vol 19:321-362.
 84. Fukuda M, Tsujino Y, Fujimori T, Wakabayashi K, Böger P (2004). Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids I: effects on cell constituents. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 80:143-250.
 85. Lederer B, Fujimori T, Tsujino Y, Wakabayashi K, Böger P (2004). Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids II: peroxidation and membrane effects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 80:151-156