

00581

1
—
28j

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"EFECTO DE ALGUNOS ALELOQUIMICOS (LACTONAS SESQUITERPENICAS
Y 4-FENILCUMARINAS) SOBRE LA FASE LUMINOSA DE LA FOTOSINTESIS
EN CLOROPLASTOS AISLADOS DE *Spinacea oleracea* L."

TESIS

Que para obtener el grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

Presenta

M. en C. MONICA RAQUEL CALERA MEDINA

México, D.F. Julio de 1995.

FALLA DE ORIGEN



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

JURADO:

Presidente	Dr. Armando Gómez Pouyou
Primer Vocal	Dra. Marieta Tuena Sangri
Segundo Vocal	Dr. Edmundo Chávrrz Cossio
Tercer Vocal	Dr. Rafael Moreno Sánchez
Secretario	Dr. Salvador Uribe Carbajal
Primer Suplente	Dra. Marina Gavilanes Ruiz
Segundo Suplente	Dr. Jorge Vázquez Ramos

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de la Dra. Ana Luisa Anaya Lang del Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, UNAM; en el Laboratorio del Dr. Blas Lotina-Hennsen del Departamento de Bioquímica y en el Laboratorio de la Dra. Rachel Mata Essayag del Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

Sustentante:

Mónica Raquel Calera Medina

Asesor:

Dra. Ana Luisa Anaya Lang

Co-Asesor:

Dr. Blas Lotina-Hennsen

Durante el período de estudios de Doctorado se recibió una beca nacional de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, sin la cual la presente investigación no hubiera sido posible.

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCION	
3.1 ALELOPATIA.....	5
3.2 DESTINO Y SIGNIFICADO DE LOS ALELOPATICOS.....	6
3.3 MODO DE ACCION DE LOS ALELOPATICOS. EFECTOS DIRECTOS E INDIRECTOS.....	7
3.4 ALELOPATICOS Y HERBICIDAS.....	9
3.5 FOTOSINTESIS.....	13
3.6 FASE LUMINOSA DE LA FOTOSINTESIS.....	14
3.7 ATPsintetasa DE CLOROPLASTO.....	19
3.8 COMPUESTOS QUE AFECTAN LAS REACCIONES LUMINOSAS DE LA FOTOSINTESIS.....	21
3.9 ANTECEDENTES DE LAS FUENTES NATURALES DE LOS COMPUESTOS (METABOLITOS SECUNDARIOS). <i>Ratibida mexicana</i> (Asteraceae). <i>Exostema caribaeum</i> y <i>Hintonia latiflora</i> (Rubiaceae).....	24
3.10 EFECTO ALELOPATICO DE LACTONAS SESQUITERPENICAS Y CUMARINAS.....	27
3.11 EFECTO DE LACTONAS SESQUITERPENICAS SOBRE LA FOTOSINTESIS.....	31
3.12 EFECTO ALELOPATICO DE CUMARINAS.....	32
3.13 EFECTOS DE CUMARINAS SOBRE LA FOTOSINTESIS.....	36
4. OBJETIVOS	
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	37
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	38

5. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	39
6. PERSPECTIVAS.....	47
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: Adenosindifosfato
ATP: Adenosintrifosfato
CCCP: Carbonil cianuro 3-cloro fenilhidrazona
CTC: Carbonato-tartrato-cobre
DBMIB: Dibromometilisopropil-*p*-benzoquinona
DCCD: *N,N*-diciclohexilcarbodiimida
DCMU: 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetil urea
DCPIP: Diclorofenil-indofenol
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNP: Dinitrofenol
DPC: 1,5-difenilcarbazida
DSPD: Disalicilidén-propano-diamina
EDAC: *N*-etil-*N'*-(dimetilaminopropil)-carbodiimida
EDTA: Acido etiléndiamintetracético
FCCP: Carbonil *p*-trifluorometoxi fenilhidrazona
FeCN: Ferricianuro de potasio
FSI: Fotosistema I
FSII: Fotosistema II
HEPES: Acido *N*-hidroxietilpiperizina-*N*-2-etanosulfónico
KCN: Cianuro de potasio
MES: Acido 2(*N*-morfolino)etano sulfónico
MV: Metilviológeno
NEM: *N*-etilmaleimida
NH₄Cl: Cloruro de amonio
Pi: Fosfato inorgánico

PMS: N-metilfenazina metosulfato

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SF6847: 3,5-di-ter-butyl-4-hidroxibencilidén-malonitrilo

SiMo: Silicomolibdato

Tricina: N-Tris(hidroximetil)metilglicina

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

4-fenilcumarinas:

1: 5-O- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina

1a: 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina

2: 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina

2a: 7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina

2b: 7,3',4'-trimetoxi-5-hidroxi-4-fenilcumarina

2c: 5-O- β -D-(2,3,4,6)-tetraacetil-galactopiranosil-3',4'-diacetil-7metoxi-4-fenilcumarina

3: 5-O- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina

4: 7,4'-dimetoxi-5'-hidroxi-4-fenil-5,2'-oxido-cumarina

1. RESUMEN

Los metabolitos secundarios se biosintetizan a través de las vías del metabolismo primario ó de vías similares; poseen diversas características que los diferencian claramente de los metabolitos primarios, pero comparten con ellos algunas propiedades; por esto, es difícil establecer una frontera definida entre metabolitos primarios y secundarios.

La importancia metabólica integral que tienen los metabolitos secundarios está lejos de conocerse, en cambio su importancia ecológica se ha puesto en evidencia frecuentemente. Diversos metabolitos secundarios participan como mediadores en las interacciones biológicas. Su actividad biológica ó sus modos de acción son fundamentales en este papel mediador que desempeñan, ya que pueden afectar una gran variedad de procesos biológicos: fotosíntesis, respiración, división celular, síntesis de proteínas, actividad enzimática, etc. Muchos metabolitos secundarios han sido utilizados por el hombre para curar enfermedades o bien como plaguicidas.

Las lactonas sesquiterpénicas y las cumarinas se encuentran entre los metabolitos secundarios que presentan una gran variedad de actividades biológicas. Considerando el efecto que estos compuestos pueden tener sobre algunos procesos celulares, particularmente la fotosíntesis, es posible pensar en la utilización de estos metabolitos como herbicidas naturales. El 60% de los herbicidas comerciales actúan inhibiendo la fotosíntesis, un 50% a nivel de la quinona Q_b , y en menor grado la biosíntesis de las clorofilas y los carotenos.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de algunas lactonas sesquiterpénicas y 4-fenilcumarinas naturales sobre la fotosíntesis (fase luminosa), como posible modo de acción biológica de estos metabolitos, como alelopáticos.

La actividad de las lactonas sesquiterpénicas y de las 4-fenilcumarinas sobre diferentes procesos de la fotosíntesis (fase luminosa) se investigó en cloroplastos aislados de espinaca (*Spinacea oleracea* L.): síntesis de ATP (fotofosforilación), bombeo de H^+ y transporte de electrones (basal, desacoplado y fosforilante). Durante el estudio, se caracterizaron diferentes formas de acción: 1) la isoalloalantolactona inhibió todas las actividades medidas, es decir se comportó como un inhibidor de la reacción de Hill (inhibidor del transporte de electrones); 2) la 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina, la 7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina y la 5-O- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina inhibieron la síntesis de ATP y el bombeo de protones, pero estimularon el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado (en menor porcentaje). Se concluyó que el mecanismo de acción de estos compuestos está

determinado por la actividad desacoplante de los mismos; 3) finalmente, la 5-O-6-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina inhibió la síntesis de ATP y el transporte de electrones fosforilante; sin embargo, no afectó la captación de protones ni el transporte de electrones basal y desacoplado. Estos resultados indican que este compuesto actuó como un inhibidor de la transferencia de energía.

Los resultados obtenidos durante la presente investigación permiten concluir que la isoalloalantolactona y las 4-fenilcumarinas son compuestos con un potencial aleloquímico que pueden interferir con el crecimiento de los organismos fotosintéticos, cuando éstos actúan como blancos de acción de estas moléculas. Es importante señalar sin embargo, que estos compuestos pueden tener otros mecanismos de acción a través de los cuales ejercen un efecto biológico diverso.

2. ABSTRACT

Secondary metabolites are synthesized through routes typical for primary metabolites or similar to these. Both primary and secondary compounds are different in some characteristics although they share certain properties. It is difficult then to establish a clear frontier between them.

The metabolic importance of secondary compounds is yet unknown while their ecologic importance has frequently been evidenced. Different secondary metabolites take part as mediators in biologic interactions, affecting a large diversity of biologic processes like photosynthesis, respiration, cellular division, protein synthesis, enzymatic activity, etc. Many secondary metabolites have been used to treat diseases and against pests.

Sesquiterpene lactones and coumarins are secondary metabolites with a variety of biologic activities. Considering the effects they have on certain cellular processes, particularly on photosynthesis, it is possible to think of them as probable natural herbicides. 60% of commercial herbicides inhibit photosynthesis, 50% at quinone Q_0 site, and others inhibiting chlorophyll and chloroplast biosynthesis.

In this work, the effect of some sesquiterpene lactones isolated from *Ratibida mexicana* and 4-phenylcoumarins isolated from *Exostema caribaeum* and *Hintonia latiflora* on photosynthesis (light phase) is determined.

The activities of the isolated sesquiterpene lactones and 4-phenylcoumarins on ATP synthesis (phosphorylation), H^+ -uptake and electron transport (basal, uncoupled and phosphorylating) of isolated spinach (*Spinacea oleraceae* L.) chloroplasts was investigated. Different modes of action were characterized:

- 1) The isoalloalantolactone inhibited all measured activities acting as a Hill reaction inhibitor (electron transport inhibitor).
- 2) The 5,7,3',4'-tetrahydroxy-4-phenylcoumarin, the 7-methoxy-5,3',4'-trihydroxy-4-phenylcoumarin and the 5-O- β -D-glucopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin inhibited ATP synthesis and proton uptake but stimulated basal, uncoupled and phosphorylating electron transport. It was concluded that the modes of action of these compounds is determined by their uncoupling activity.
- 3) The 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin inhibited ATP synthesis and phosphorylating electron transport, not affecting proton uptake or basal and uncoupled electron transport. This suggested an inhibition of energy transfer.

It can then be concluded that the isoalloalantolactone and 4-phenylcoumarins are allelopathic compounds that interfere with

photosynthetic organisms growth acting upon these sites. It is important to point out that these compounds may have other modes of action through which exert a different biologic effect.

3. INTRODUCCION

3. 1 ALELOPATIA.

Las interacciones planta-planta son diversas y se establecen entre aquellos vegetales que comparten el mismo hábitat; la más importante de ellas es la competencia, ya que la mayoría de las plantas son sésiles y esta condición las obliga a compartir muchos recursos del ambiente (Anaya, 1995).

Existen algunas interacciones que involucran metabolitos secundarios. Precisamente éstas, se refieren al fenómeno llamado alelopatía, término propuesto por Molisch en 1937 (Rice, 1984), que deriva de dos raíces griegas *allelon*=recíproco y *pathos*=sufrimiento; Molisch definió a la alelopatía como la interacción química, dañina o benéfica, entre todo tipo de plantas, incluyendo a los microorganismos. Para Rice (1984), la alelopatía se refiere a cualquier efecto perjudicial o benéfico de una planta sobre otra, como consecuencia de la producción y liberación al medio de metabolitos secundarios diversos. El concepto de alelopatía implica también algunas relaciones planta-animal.

Los compuestos con potencial alelopático están presentes virtualmente en todos los tejidos de las plantas: hojas, tallos, raíces, rizomas, frutos y semillas (Rice, 1987).

Los metabolitos secundarios implicados en la alelopatía incluyen diferentes tipos, como son los ácidos fenólicos, las quinonas, los terpenos, los esteroides, las cumarinas, los ácidos de cadena larga y los alcaloides, por tan sólo mencionar algunos (Rice, 1984).

3.2 DESTINO Y SIGNIFICADO DE LOS ALELOPATICOS.

El destino de los metabolitos secundarios es diverso y frecuentemente, debido a su naturaleza química, pueden ser tóxicos para las plantas que los producen, por lo que éstas han tenido que desarrollar diversas estrategias para mantenerlos alejados de las zonas donde se efectúan las reacciones metabólicas, por ejemplo:

- pueden inactivarlos y tornarlos inocuos combinándolos con distintos radicales, o formando polímeros
- pueden ser almacenados en vacuolas
- depositados en células muertas (en el duramen de la madera), en espacios intercelulares, en los pelos glandulares de la superficie de las plantas
- ser descargados al exterior.

Si son retenidos dentro de la planta, pueden adquirir importancia como medio para repeler a los herbívoros o a microorganismos patógenos. Si se liberan al exterior, pueden inhibir a los competidores potenciales. De cualquier modo, si alguno de estos mecanismos impide la autointoxicación de la planta, de inmediato representa una ventaja para la misma, y si además, ejerce un control sobre algunos organismos perjudiciales, su valor para la planta productora aumenta (Einhellig, 1985).

La producción de estas sustancias y su liberación al medio, constituyen en las comunidades vegetales, verdaderas lluvias químicas, cuyos efectos son de consecuencias biológicas y ecológicas muy significativas, pues determinan el establecimiento de todo tipo de interacciones biológicas (intra o

interespecíficas), que surgen y evolucionan, dependiendo de la naturaleza química de los metabolitos secundarios, la constancia de su producción y liberación, los efectos provocados, el tiempo que perduran en el medio y el tipo de organismos involucrados, como ya se ha mencionado (Anaya, 1981).

De acuerdo con Tukey (1969) la liberación de los compuestos alelopáticos al ambiente ocurre por:

- volatilización a través de las hojas .
- lixiviación o lavado de las partes aéreas de la planta, por la lluvia, la niebla y el rocío.
- exudación a través de las raíces.
- liberación de los compuestos de los restos orgánicos por medio de lixiviación o por la descomposición microbiana de los mismos.

3.3 MODOS DE ACCION DE LOS ALELOPATICOS.

EFFECTOS DIRECTOS E INDIRECTOS.

Los compuestos alelopáticos de la planta donadora pueden interferir directamente con los procesos metabólicos primarios del organismo receptor. La actividad biológica de estos compuestos va a depender de su naturaleza química, de su concentración, de la sensibilidad del receptor, del proceso metabólico implicado y de las condiciones ambientales (Putnam y Tang, 1986). Sin embargo, los efectos pueden manifestarse de forma indirecta, a través de un aumento en la susceptibilidad a ciertas enfermedades en la planta

receptora, o bien, de una inhibición de algunos microorganismos cuya relación con la planta sea vital. Estas limitaciones nutricionales dependientes de la alelopatía, son especialmente perjudiciales para las plantas en los suelos forestales pobres en minerales y tienen un importante papel regulador en la sucesión vegetal (Rice, 1984).

La interferencia de los alelopáticos con los procesos metabólicos es diversa, lo que implica una gran variedad de modos de acción de estos compuestos. Cuando el efecto de un alelopático producido por una planta se manifiesta, por ejemplo, a través de una inhibición del crecimiento radicular, esto significa que se está afectando de manera específica a diversos organelos celulares relacionados con el funcionamiento de mitocondrias (respiración), meristemos primarios y secundarios (división y elongación celular), propiedades de las membranas, cinética enzimática, síntesis de proteínas, estructura cromosómica, etc. (Koepe, 1972; Jankay y Müller, 1976; Einhellig y Rasmussen, 1979; Cameron y Julian, 1980; Harper y Balke, 1981; Jain y Srivastava, 1981; Sato y cols., 1982; Balke, 1985; Einhellig, 1986; Leather y Einhellig, 1988; Cruz Ortega y cols., 1988, 1990; Wacker y cols., 1990).

La determinación de los mecanismos directos y los modos de acción por medio de los cuales los compuestos alelopáticos inhiben el crecimiento de las plantas, es la clave para encontrar algunos de los usos potenciales de los aleloquímicos. Al respecto, nuestro conocimiento es extremadamente escaso. La mayoría de los estudios de los modos de acción de alelopáticos se han realizado con ácidos

fenólicos, ya que muchos de ellos alteran diversas funciones metabólicas. La perturbación de estos procesos se ha logrado con concentraciones de 0.1-1 mM de estos metabolitos secundarios, mismas con las que se ha logrado una inhibición del crecimiento (Einhellig, 1989).

3. 4 ALELOPATICOS Y HERBICIDAS.

Los compuestos alelopáticos y los herbicidas comerciales muestran actividades semejantes sobre el crecimiento vegetal. Los herbicidas tipo auxínico, como el 2,4-D (2,4-dicloro-fenoxiacético), tienen profundos efectos sobre el crecimiento y la estructura de las plantas sensibles, y causan un cambio rápido en el patrón de crecimiento normal. Algunos de los cambios inducidos son:

- suspensión de la división de las células meristemáticas
- detención de la elongación de las células y por lo tanto, del crecimiento longitudinal
- formación de tejido calloso en los tejidos maduros de la planta, porque las células del parénquima se hinchan y empiezan a dividirse
- cesa la elongación de las raíces y su punta se hincha
- las hojas jóvenes no se expanden y producen un exceso de tejido vascular
- las raíces pierden su habilidad de absorber agua y sales.
- inhibición de la fotosíntesis

- obstrucción del floema
- estimulación de la producción de acetileno causando daño en las hojas y tallos

Todos estos efectos hablan de un desbalance hormonal general que conlleva una conducta celular anormal. Sin duda el descubrimiento del 2,4-D y otros herbicidas similares durante la segunda guerra mundial, revolucionaron el control de malezas en la agricultura. Por otro lado, su uso y el énfasis puesto en la fabricación de nuevos y más poderosos herbicidas de estructura orgánica sintética, ha sido uno de los factores que más ha deteriorado al ambiente en general y provocado la desaparición de muchas especies en la biósfera, debido a su baja biodegradabilidad (Cárdenas y cols., 1968; Hagen y Guilfoyle, 1985; Title y cols., 1990).

Al analizar la diversidad de modos de acción del 2,4-D podemos inferir las infinitas posibilidades que tiene este campo de investigación, tanto con los aleloquímicos ya descubiertos como por los que aun están por descubrir, lo que promete un beneficio potencial en el control de malezas, plagas y enfermedades.

Como en el caso de cualquier compuesto bioactivo, el efecto de un alelopático depende de que su concentración en el medio alcance un cierto umbral; es frecuente que algunos alelopáticos que inhiben el crecimiento de diversas especies a una concentración dada, puedan estimularlo a concentraciones más bajas. Por otro lado, es muy probable que en la mayor parte de los casos en que se produce

una interacción de tipo alelopático entre una planta y otro organismo, intervenga interviene no sólo un compuesto, sino una mezcla de ellos. De esta manera, dentro de la alelopatía los fenómenos sinérgicos, la potenciación de efectos o bien la neutralización de los mismos, pueden presentarse con frecuencia, haciendo más complejo su estudio en el medio natural.

La alelopatía puede llegar a ser un arma muy efectiva en el combate de malezas, considerando que existen propiedades alelopáticas en los tipos silvestres de algunas especies cultivadas y que estas propiedades pueden transferirse genéticamente por medio de cruzamientos, ó bien por ingeniería genética. Al incrementarse el uso de plantas cultivadas con propiedades alelopáticas, se evitarían la contaminación del ambiente y el gasto económico, derivados del uso de herbicidas para controlar las malas hierbas. El 60% de los herbicidas comerciales inhibe la fotosíntesis, un 50% actúa a nivel de la quinona Q_0 , en menor grado inhiben la biosíntesis de clorofilas y carotenos. Este tipo de herbicidas presentan una baja toxicidad en mamíferos (Audus, 1979; Grumbach, 1984).

Las dos clases de compuestos de mayor importancia comercial, y que comprenden más de la mitad de todos los herbicidas comúnmente utilizados, son aquellas que bloquean las funciones fotosintéticas:

1. los grupos químicos de las ureas, amidas, triazinas, triazinonas, piridazinonas y carbamatos conocidos como herbicidas tipo diurón; éstos herbicidas se caracterizan por tener su blanco de acción a nivel de la proteína de 32 kDa

unida a Q_B (Pfister y Schreiber, 1984; Siderer y cols., 1984).

2. los nitrofenoles conocidos como herbicidas tipo II (inhibidores PS-II, que bloquean el fotosistema II de la reacción de Hill a nivel de la proteína de 41 kDa unida a Q_B (Moreland y cols., 1980; Huppertz y Phillips, 1984).

3.5 FOTOSÍNTESIS.

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual algunos organismos utilizan la energía solar para sintetizar material orgánico a partir de CO₂, agua y minerales; consta de dos fases. En la primera, conocida como fase luminosa se producen dos compuestos ricos en energía, el NADPH y el ATP; simultáneamente, se desprende oxígeno por fotólisis del agua, y se lleva a cabo en las membranas tilacoidales del cloroplasto. En la segunda, la fase oscura, se utilizan el NADPH y el ATP para reducir el dióxido de carbono y transformarlo principalmente en carbohidratos (glucosa, celulosa y almidón), y se realiza en el estroma del cloroplasto (Hiller y Goodchild, 1981).

Los cloroplastos son generalmente elipsoidales (5 µm de longitud) con 50 a 200 cloroplastos por cada célula (Fig. 1A). Estos organelos están separados del citoplasma por una envoltura de dos membranas que contiene a la matriz hidrofílica o estroma, el cual posee DNA, ribosomas, plastoglóbulos, aminoácidos, nucleótidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, iones y aproximadamente 200 tipos de proteínas (Hiller y Goodchild, 1981).

En el interior del estroma hay una serie de vesículas o sacos aplanados llamados tilacoides, los cuales se acumulan en pilas; este conjunto se denomina grana. Las grana están interconectadas por membranas llamadas interlamelas. La membrana tilacoidal contiene 50% de proteínas (lipoproteínas), 40% de fosfolípidos (glicolípidos) y 10% de clorofilas (Ellis, 1989).

3.6 FASE LUMINOSA DE LA FOTOSINTESIS.

En las plantas superiores, la luz es absorbida por los pigmentos antena que incluyen los complejos cosechadores de luz (LHCP) que están formados por clorofilas y proteínas, y los carotenoides. Además de estos pigmentos, en algas y cianobacterias existen las ficobilinas. En ambos tipos de organismos los cuantos de luz son transferidos a centros de reacción fotoquímica.

La clorofila es el pigmento fotosintético principal, la estructura básica de la clorofila es la de una unidad tetrapirrólica plana coordinada por el ión magnesio y una cadena lateral hidrofóbica de fitol (unido a los pirroles), que embebe la molécula de clorofila en la región hidrofóbica de la membrana tilacoidal donde interacciona con los fosfolípidos. Existen dos tipos de clorofilas denominadas a y b, que únicamente se diferencian por un sustituyente metilo ó un aldehído en el anillo pirrólico II, respectivamente. Cuando una molécula de clorofila b absorbe luz, la molécula excitada transfiere su energía a una molécula de clorofila a que la transforma en energía química (Lehninger y cols., 1993).

Además de las clorofilas, los cloroplastos contienen otras sustancias que son denominados pigmentos accesorios secundarios porque su absorción de luz complementa la acción de la clorofila. Estos incluyen los carotenoides (el β -caroteno es el más importante) y las ficobilinas en cianobacterias (Voet y Voet, 1990).

Los centros de reacción contienen moléculas de clorofila

formando generalmente dímeros unidos a proteína. Cuando una molécula de clorofila absorbe un cuanto de luz, eleva su energía y desplaza uno de sus electrones a un nivel energético mayor. La molécula puede disipar esa energía por diferentes mecanismos, entre los más importantes se encuentran los siguientes:

1) La transferencia de su energía a otra molécula de clorofila cuando su electrón excitado cae al estado basal, la energía se utiliza para elevar un electrón de una molécula vecina al estado excitado, los fotones absorbidos pasan de una molécula a otra hasta que alcanzan a los pigmentos de los centros de reacción. Así por ejemplo los pigmentos cosechadores de luz disipan su energía de esta forma.

2) La molécula de clorofila excitada puede regresar a su estado basal realizando trabajo en una reacción química que generalmente involucra la pérdida de un electrón de la molécula de pigmento. La clorofila de los centros de reacción disipa su energía de esta forma (Anderson y Beardall, 1991). Existen dos centros de reacción en las plantas superiores, P680 y P700 para el fotosistema II (FSII) y el fotosistema I (FSI), respectivamente.

Los fotosistemas se encuentran constituidos por proteínas que son enzimas redox acarreadoras de electrones, pigmentos antena y un centro de reacción. La pérdida de un electrón en la clorofila deja una carga neta positiva, que atrae un electrón proveniente de alguna molécula donadora. En el fotosistema II los electrones provienen de la oxidación del agua, mientras que en el fotosistema I la donadora de electrones es la plastocianina reducida.

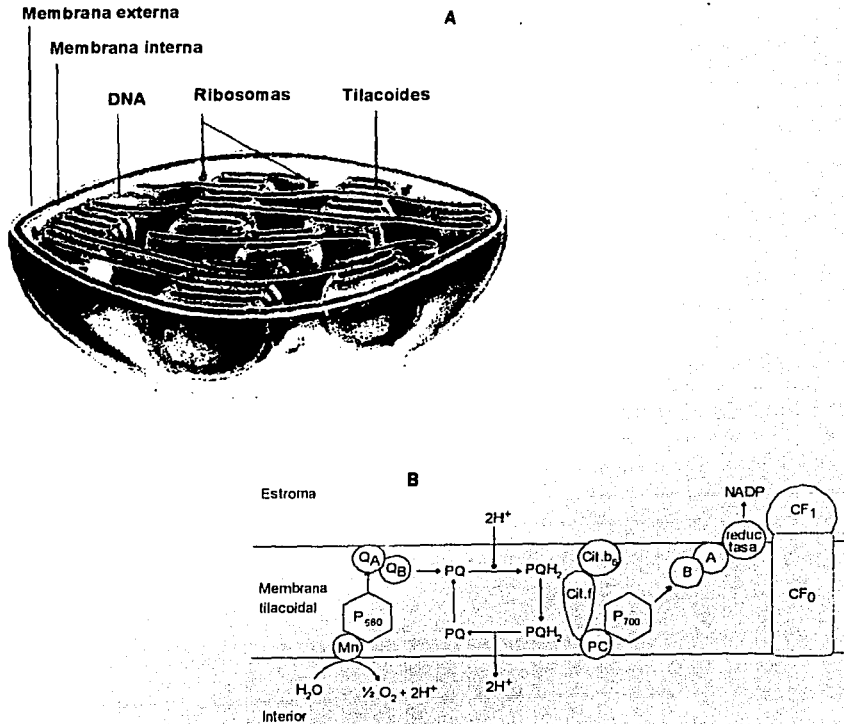
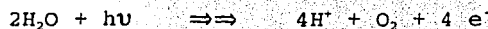


Figura 1. Representación del interior de un cloroplasto (A) y componentes de la cadena de transporte de electrones en la membrana tilacoidal (B).

La transferencia de electrones de agua a $NADP^+$ involucra un gran número de componentes enzimáticos, constituidos por complejos del FSII, citocromo b_6/f y FSI conectados por componentes móviles como la PQ y la PC (Fig. 1B); estos componentes presentan diferentes valores de potencial de reducción (Fig. 2). Cuando el centro de reacción del FSII interactúa con la luz, se genera un

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



El complejo de fotólisis del agua contiene por lo menos 20 polipéptidos. El sitio de oxidación del agua está formado por cuatro iones Mn con números de oxidación que varían entre $+2$ y $+4$ durante el proceso de descomposición del agua, de 2 a 3 iones Ca^{2+} y varios iones cloruros (Debus, 1992).

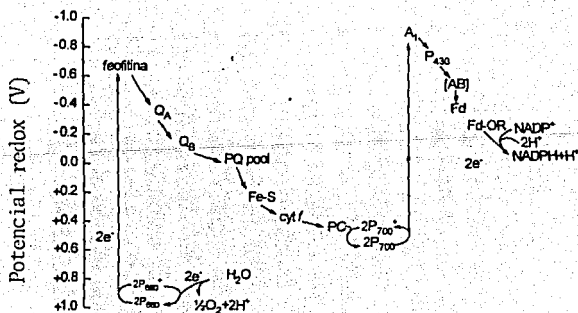


Figura 2. Esquema Z del transporte de electrones en la fotosíntesis.

Acoplada a estos eventos, se encuentra la formación de un gradiente de protones a través de la membrana tilacoidal, el cual es utilizado para la fosforilación del ADP con ortofosfato catalizada por la ATP sintetasa (Anderson y Beardall, 1991).

De acuerdo con la Teoría Quimiosmótica propuesta por Mitchell (1961), se establece un acoplamiento entre la transferencia de electrones y la síntesis de ATP, lo que sugiere que el flujo de electrones a través del sistema de moléculas acarreadoras conduce protones a través de las membranas, generando un gradiente electroquímico de protones, que es utilizado en la síntesis de ATP (Hinkle y McCarty, 1988).

Los componentes de la cadena transportadora de electrones, en los cloroplastos, se encuentran distribuidos de manera heterogénea en el espesor de la membrana tilacoidal. Como resultado de esta distribución, el movimiento de electrones ocasiona un flujo de protones hacia el interior del tilacoide generando un ΔpH .

La oxidación de dos moléculas de agua libera cuatro protones dentro del tilacoide. Cuando dos electrones reducen a la PQ, esta acepta dos protones del estroma y se reduce a plastoquinol (PQH_2). Posteriormente, esta molécula los libera en el lumen del espacio intratilacoidal cuando se oxida nuevamente a PQ por el complejo b_6/f (Anderson y Beardall, 1991).

3.7 ATPsintetasa DE CLOROPLASTO.

Es el complejo multienzimático que se encarga de sintetizar ATP a partir de ADP y Pi, es decir, es una ATPsintetasa. Se localiza en la membrana tilacoidal (Faludi-Daniel y cols., 1983). Esta enzima es denominada también CF_0CF_1 ATPasa, porque se encuentra constituida principalmente por dos partes:

1) El componente CF_0 (hidrofóbico) que se encuentra embebido en la membrana tilacoidal y funciona como canal iónico que transporta H^+ hacia el sitio catalítico de la ATPasa- H^+ . Consta de cuatro diferentes subunidades (I a la IV) (Alt y cols., 1983; Beckers y cols., 1992).

Se propone que las subunidades de CF_0 son proteínas membranales integrales. La subunidad I posee un segmento hidrofóbico anclado en la membrana y otro hidrofílico que se proyecta hacia el estroma formando un tallo. Se cree que CF_1 se une a CF_0 por interacción con ese tallo. La naturaleza altamente hidrofóbica de la subunidad III se relaciona con su papel propuesto en la formación del canal de protones en forma hexagonal a través de la membrana, el DCCD (*N,N'*-diciclohexilcarbodiimida) se une a este proteolípido, y la subunidad II ayuda a mantener esta organización estructural. La subunidad IV es una proteína hidrofóbica y presenta 5 α -hélices transmembranales, una de ellas probablemente interacciona con la subunidad III para formar el canal (Barber, 1987; Hudson y Mason, 1988).

2) El componente CF_1 (hidrofílico) se localiza en la superficie estromal de la membrana. CF_1 cataliza la síntesis de ATP

en respuesta al Δ pH generado al iluminar a los cloroplastos (Ketcham, 1984). Presenta un peso molecular de 325 kDa y está constituido por 5 subunidades con estequiometría $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$. Las primeras dos subunidades (60 y 55 kDa, respectivamente) pueden ser aisladas como una entidad y poseer actividad de ATPasa. La subunidad α contiene los sitios de unión de los nucleótidos y la subunidad β presenta el sitio catalítico, y de unión para el DCCD (Merchant y Selman, 1983). Las subunidades γ y δ tienen pesos moleculares de 38 y 20 kDa, respectivamente y están involucradas en la unión de la proteína a la membrana; por último la subunidad ϵ (14 kDa) es la proteína reguladora que mantiene inhibida la actividad hidrolítica de la enzima, la cual es removida cuando la enzima se convierte en una ATPsintetasa activa (Kanazawa y cols., 1982; Deno y Sugiura, 1984). Los estudios sobre la biosíntesis de CF_0 - CF_1 han permitido concluir que las subunidades $\alpha, \beta, \gamma, \epsilon, I, III$ y IV son codificadas en el DNA del cloroplasto, mientras que los genes para las subunidades δ y II están localizadas en el núcleo y son importadas vía precursores de alto peso molecular (Nelson y cols., 1980; Westhoff y cols., 1981; De Heij y cols., 1984; Rodermel y Bogorad, 1985).

La purificación de CF_1 (factor de acoplamiento 1) en cloroplastos de espinaca ha demostrado una actividad latente de ATPasa (Farron, 1970), la cual puede expresarse por tratamientos con tripsina, calor, DTT, detergente, alcoholes, etc (Vambutas y Racker, 1965; Pick y Bassilian, 1982; Anthon y Jagendorf, 1986; Ren y cols., 1995). La ATPasa activada por calor es estimulada por la

incubación con compuestos tioles; su eliminación origina una inhibición de la actividad de la enzima. La *N*-maleimida o iodoacetamida inhibe la activación de CF_1 por calor pero no por tratamiento con tripsina.

A diferencia del F_1 mitocondrial que forma un complejo disociable con una proteína de bajo peso molecular que inhibe específicamente la ATPasa, el CF_1 de cloroplasto es una proteína con una actividad latente de ATPasa, que puede ser activada por cambios conformacionales (Farron y Racker, 1970).

3.8 COMPUESTOS QUE AFECTAN LAS REACCIONES LUMINOSAS DE LA FOTOSÍNTESIS.

Moreland (1980) clasificó en 4 grupos a los compuestos que afectan las reacciones luminosas de la fotosíntesis:

1) Inhibidores del transporte de electrones.

Son compuestos que inhiben el transporte de electrones en presencia y ausencia de ADP y P_i o en presencia de NH_4Cl como desacoplante, así como la síntesis de ATP al afectar a uno o más intermediarios de la cadena fotosintética, por ejemplo: tris [tris(hidroximetil)aminometano] actúa a nivel de la fotólisis del agua; DCMU [3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetil urea] inhibe entre Q_A y Q_B ; KCN (cianuro de potasio) ejerce su efecto sobre PC; DBMIB (dibromometilisopropil-*p*-benzoquinona) actúa sobre PQ; EDAC [N-etil-N'-(dimetilaminopropil)-carbodiimida] inhibe entre PQ y Cit f; DSPD (disalicilidén-propano-diamina) ejerce su efecto en el

complejo ferredoxina, etc. (Ouitrakul e Izawa, 1973; Izawa y Ort, 1974; Trebst y Avron, 1977; Astier y cols., 1984).

2) Inhibidores de la transferencia de energía.

Estos compuestos afectan directamente a la enzima que se encarga de llevar a cabo la fotofosforilación al interferir con la actividad catalítica de CF_1 o CF_0 , ó ambas. Esta inhibición no tiene efecto sobre el transporte de electrones basal y desacoplado, ni sobre la magnitud del gradiente de protones. Algunos ejemplos son: Dio-9, DCCD, N-etilmaleimida (NEM), florizina y trifenilestaño, entre otros (McCarthy y Racker, 1965; Gould, 1976; Izawa y Good, 1983; Vermeaglio y cols., 1984).

3) Desacoplantes.

Son compuestos que eliminan el acoplamiento que existe entre el transporte de electrones y la fosforilación; no afectan el transporte de electrones pero no se efectúa la síntesis de ATP, debido a que disipan el gradiente electroquímico de protones. De acuerdo a la hipótesis quimiosmótica, los desacoplantes son ácidos o bases débiles y lipofílicos que colapsan el potencial electroquímico de protones al transferirlos de un lado a otro de la membrana transdutora de energía, estos son conocidos como protonóforos (Terada, 1990).

Los desacoplantes clásicos estimulan el transporte de electrones en ausencia y presencia de ADP y P_i , abaten el ΔpH , el $\Delta\Psi$ y la síntesis de ATP, estimulan la hidrólisis de ATP (Terada,

1990). Algunos ejemplos de desacoplantes son: DNP (dinitrofenol), el cloruro de amonio, el SF 6847 (3,5-di-ter-butil-4-hidroxi-bencilidén-malonitrilo), el FCCP (carbonil cianuro *p*-trifluorometoxifenilhidrazona), el CCCP (carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona), etc. (Crofts, 1966; Yoshikawa y cols., 1980; Terada, 1981).

Los colorantes tri-S-C₄ y tri-S-C₃, y el complejo (o-fenantrolina)₂-Cu²⁺ (catiónicos e hidrofóbicos) son compuestos que no tienen un grupo ácido y que inducen desacoplamiento. Son menos potentes que los protonóforos, actúan a concentraciones muy altas y requieren la presencia de Pi en el medio (Terada y cols., 1985). Shinohara y Terada (1987) reportaron que estos compuestos modifican una proteína de 29 KDa presente en la ATPasa de H⁺ de la mitocondria en hígado de rata.

4) Aceptores de electrones.

Son compuestos que compiten con algunos intermediarios de la cadena del transporte de electrones para reducirse. Estos pueden ser utilizados para estudiar reacciones parciales de la fotosíntesis, como el ferricianuro de potasio, el paraquat y la fenazina-metosulfato, etc. (Mahler y Cordes, 1966).

3.9 ANTECEDENTES DE LAS FUENTES NATURALES DE LOS COMPUESTOS (METABOLITOS SECUNDARIOS).

Ratibida mexicana.

El género *Ratibida* Richards pertenece a la familia *Asteraceae* e incluye seis especies y una variedad. La familia *Asteraceae*, entre otras, es rica en especies que contienen poliacetilenos; estos metabolitos secundarios son muy variados químicamente y muchos de ellos son fitotóxicos, por ejemplo, el agropireno, la cis-dehidromatricaria, y la cis- y trans-matricaria producidos por *Agropyron repens*, *Solidago altissima* y *Erigeron annuus* respectivamente (Rice, 1984). Las plantas de esta familia contienen también numerosas lactonas sesquiterpénicas, las cuales constituyen un importante grupo de metabolitos secundarios, implicados en la alelopatía (Amo y Anaya, 1978), y que poseen además un amplio espectro de actividad biológica (Stevens y Merrill, 1985; Fischer y cols., 1989)

La especie *Ratibida mexicana* (*Asteraceae*) es una hierba perenne, endémica del estado de Chihuahua, donde crece de manera aislada; los tarahumaras, la denominan "Howinowa". En la medicina tradicional, las raíces de la planta se usan para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, resfriados, reumatismo, inflamaciones de la piel y como agente antiséptico; las hojas se utilizan para los dolores de cabeza (Richards, 1969).

Estudios fitoquímicos sobre las especies *R. columnifera* y *R. peduncularis* permitieron el aislamiento e identificación de veintiséis lactonas sesquiterpénicas; tres flavonas; un

fenilpropanoide; tres acetilenos y dos sesquiterpenos (Herz y cols., 1985; Ellmauerer y cols., 1987).

Asimismo, el estudio fitoquímico biodirigido de *R. latipallearis* utilizando como bioensayos la determinación de toxicidad para *A. salina*, y la inhibición del crecimiento de bacterias y de la levadura *Candida albicans*, permitió el aislamiento e identificación de dos lactonas sesquiterpénicas citotóxicas (ratibinólida I y II), dos flavonoides antisépticos (hispidulina y pedalitina) y un glicósido inactivo (Rojas, 1990).

Por otra parte, Cocolletzi (1993) demostró que el extracto metanólico de *R. mexicana* tiene propiedades citotóxicas, antifúngicas e inhibitorias sobre el crecimiento vegetal. Sin embargo, el extracto resultó inactivo en contra de bacterias Gram (+) y Gram (-) y sobre la levadura *Cándida albicans*.

El estudio fitoquímico biodirigido de *R. mexicana*, utilizando los mismos bioensayos antes mencionados, permitió el aislamiento e identificación de dos lactonas sesquiterpénicas (la isoalloyalantolactona y la elemanodienólida), así como de tres selinanos simples, el β -D-glucositosterol y la sacarosa (Sánchez y Soto, 1994).

***Exostema caribaeum* e *Hintonia latiflora* (Rubiaceae).**

La familia Rubiaceae esta compuesta de 6000 a 7000 especies agrupadas en aproximadamente 500 géneros. El género *Exostema* Richards incluye 26 especies localizadas principalmente en México, Costa Rica y Sudamérica. En México se han descrito cuatro especies: *E. coulteri* Hook, *E. indutum* Standley, *E. mexicanum* y *E. caribaeum* (Jacq.) Roem. et Schult. (Aiello, 1979; Martínez, 1989).

Exostema caribaeum (Syn. *Cinchona caribaea*) es un arbusto o árbol de diez metros de altura; de hojas ovadas de 5-11 cm; flores tubulosas y blancas; fruto de 1-5 cm con semillas aladas. Popularmente es conocido como "copalchi de Jojutla", "falsa quina" y "quina de Michoacán". En la medicina tradicional es utilizado como un sustituto para la quinina (Sánchez-Viesca, 1969; Martínez, 1989; Harbone y Baxter, 1993).

Los distintos estudios fitoquímicos sobre *E. caribaeum* han permitido el aislamiento y caracterización del manitol, y diez fenilcumarinas (Sánchez-Viesca, 1969; Mata, 1987, 1988). Las fenilcumarinas de esta especie no demostraron actividad *in vitro* sobre *Plasmodium falciparum*. Sin embargo, los compuestos 5-O- β -galactopiranosil-7'-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxido-cumarina presentaron actividad contra *Candida albicans* con valores de MIC de 12.5 mg/ml y 15 mg/ml, respectivamente (Rojas y cols., 1992).

El género *Hintonia* presenta cuatro especies, las cuales se encuentran distribuidas en la región mesoamericana. La especie

Hintonia latiflora es la más importante desde el punto de vista medicinal (Martínez, 1989).

Hintonia latiflora (Sesse ex Mociño ex DC.) Bullock se caracteriza por ser un arbusto de siete metros de altura; de hojas opuestas y ovales de 4-12 cm; flores acampanadas, blancas y aromáticas de 5-7 cm; fruto oval, anguloso con semillas pequeñas y aladas (Martínez, 1989). Es utilizada en la medicina (corteza) para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo la malaria y el dengue (Reguero y cols., 1987).

Desde el punto de vista fitoquímico, los estudios realizados sobre el género *Hintonia* se han basado en la especie *Hintonia latiflora*. Estos permitieron el aislamiento e identificación de fenilcumarinas, tres triterpenoides de tipo cucurbitano, una flavona y el β -sitosterol (Reher y cols., 1983; Reguero y cols., 1987; Soto y cols., 1988; Mata y cols., 1990).

3.10 EFECTO ALELOPATICO DE LACTONAS SESQUITERPENICAS.

Las lactonas sesquiterpénicas constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios que han sido más estudiados como agentes aleloquímicos (Rodríguez, 1976; Fischer, 1991).

Las lactonas sesquiterpénicas son metabolitos secundarios de origen mevalónico. Se encuentran distribuidas en más de 15 familias de plantas, predominantemente en las Asteráceas, y representan uno de los grupos más grandes de productos naturales, incluyendo cerca de 3,500 compuestos (Picman 1986; Fischer, 1991). Las lactonas

sesquiterpénicas se localizan en las glándulas de las hojas, inflorescencias y brácteas; raíces, tallos, madera y en las flores de algunas especies (Rodríguez y cols., 1976; Ivie y Witzel, 1983).

En estado puro, las lactonas sesquiterpénicas son cristalinas, no volátiles, incoloras y relativamente estables. Asimismo, estos compuestos son extremadamente amargos, por lo cual son conocidos como principios amargos (Ivie y Witzel, 1983).

El grupo funcional de la mayoría de las lactonas sesquiterpénicas es el α -metileno- γ -lactona. Sin embargo, estos compuestos pueden presentar grupos aldehídos y cetónicos α , β -insaturados, ésteres y epóxidos. Todos estos grupos funcionales tienen propiedades alquilantes y pueden reaccionar con los grupos tiol de muchas enzimas involucradas en numerosos procesos bioquímicos (Kupchan y cols., 1970; Fischer, 1991; Wei y Sadrzadeh, 1994). Las lactonas sesquiterpénicas han demostrado un amplio espectro de actividades biológicas, incluyendo la alelopática, la citotóxica, la antitumoral, la antimicrobiana, la insecticida, la molusquicida, la antimalárica, la antiplaquetaria y la inmunoestimulante (Rodríguez, 1976; Ivie y Witzel, 1983; Picman, 1986; Fischer, 1991; Escoubas y cols., 1992).

En relación a los efectos alelopáticos de las lactonas sesquiterpénicas, los estudios se enfocan a su actividad sobre la regulación del crecimiento y la germinación de plantas cultivadas y malezas (Amo y Anaya, 1978; Fischer, 1991; Macías y cols., 1992; Baruah y cols., 1994; Langenheim, 1994; Macías, 1995). Entre estas lactonas se encuentra la vernolepina, la cual demostró un efecto

inhibitorio sobre el crecimiento del coleóptilo en trigo (Sequeyra y cols., 1968; Fischer, 1991).

Fischer y cols. (1989) reportaron que la partenina y la confertiflorina (10^{-4} M) incrementaron significativamente la germinación de *Striga asiática*. Asimismo, la partenina (10 mM) y la artemisinina (10 y 33 mM) inhibieron la germinación y afectaron el desarrollo de las raíces adventicias en *Phaseolus vulgaris* y *Lactuca sativa*, respectivamente (Kanchan, 1975; Duke y cols., 1987; Fischer y cols., 1989; Chen y Leather, 1990).

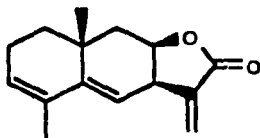
Las zaluzaninas C y D (100 y 50 ppm, respectivamente) inhibieron totalmente la germinación y el crecimiento radicular del arroz (Asakawa y cols., 1979; Fischer, 1991).

Además, la isoalantolactona (5 mg/l), la alantolactona (10 mg/l) y la isoalloyalantolactona (10 mg/l) (aisladas de *Inula racemosa* L.) promovieron la formación de la radícula en *Phaseolus aureus* (Kaur y Kalsi, 1985). Por otra parte, estudios previos sobre los diferentes sitios de acción de las lactonas sesquiterpénicas, muestran que estos compuestos afectan diversos procesos metabólicos en una célula vegetal (Tabla 1).

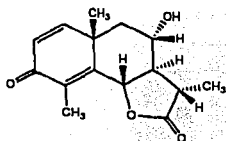
Tabla 1.

Niveles de acción de lactonas sesquiterpénicas sobre diversos procesos celulares.

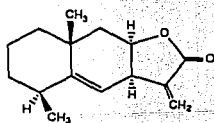
LACT. SESQUITERPENICA	NIVEL DE ACCION	REFERENCIA
Isoalantodieno	Actividad Enzimática	Kalsi y cols. (1989)



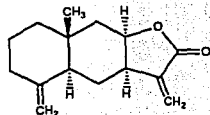
Artemisinina	División Celular	Duke y cols. (1991)
--------------	------------------	---------------------



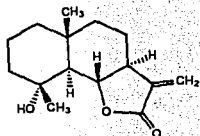
Alantolactona	Respiración	Rodríguez (1976)
---------------	-------------	------------------



Isoalantolactona	Fisher (1991)
------------------	---------------



LACT. SESQUITERPENICA	NIVEL DE ACCION	REFERENCIA
Artemisinina Arbusculina A		Stiles y cols. (1994) Einhellig (1995)



Artemisinina	Síntesis de proteínas	Fischer (1991)
--------------	--------------------------	----------------

3.11 EFECTO DE LACTONAS SESQUITERPENICAS SOBRE LA FOTOSINTESIS.

Lotina-Hennsen y cols. (1992) reportaron que la zaluzanina C, aislada de *Zaluzania triloba*, se comporta como un inhibidor del transporte de electrones en cloroplastos aislados de *Spinacea oleracea* L. El sitio de acción de la lactona se localiza en el fotosistema II a nivel de fotólisis del H₂O. Efectos similares fueron mostrados por la ivalina y el cacalol; en cambio, los derivados del cacalol presentan su efecto en la cadena fotosintética entre P₆₈₀ a Q_A (Lotina-Hennsen y cols., 1991; Bernal-Morales y cols., 1994).

Ensayos con *Lemna minor* han demostrado que algunas lactonas sesquiterpénicas interfieren con la fotosíntesis. Un ejemplo de ello lo constituye la artemisinina, la cual a 10 mM presentó un

efecto inhibitorio mayor sobre *Lemna* que otros tratamientos como el 2,4-D a la misma concentración (Chen y cols., 1991). La artemisinina (2.5 mM) inhibió un 44% la producción de clorofila en *L. minor*. Además, esta lactona, a 5 mM, afectó un 50% la producción de frondas y a 2.5 mM redujó la fotosíntesis un 70% (Chen y cols., 1990; Stiles y cols., 1994).

3.12 EFECTO ALELOPATICO DE CUMARINAS.

Las cumarinas son metabolitos secundarios que contienen el nucleo de la 2H-1-benzopirano-2-ona o la α -benzopirona. Estos compuestos se encuentran en una gran variedad de plantas, animales y microorganismos. Algunos ejemplos de familias de plantas ricas en cumarinas son las Rutaceae (cítricos) y las Umbelliferae (apio y perejil); en ellas puede aumentar el contenido de estos metabolitos secundarios con el estrés o las enfermedades. Los insectos se adaptan a estas plantas y viven en hojas enrolladas que no reciben la luz, evitando de esta manera el efecto dañino de las cumarinas. En las plantas, las cumarinas se localizan en las raíces, tallos, corteza y frutos (Feuer, 1974; Brown, 1981; Zobel y Brown, 1995). Las cumarinas se clasifican en: simples, furano-, pirano-, 4-hidroxi- y fenil- cumarinas (Harbone y Baxter, 1993).

Estos compuestos han demostrado diversas actividades biológicas entre las cuales destacan varias de interés ecológico como la alelopática, la insecticida, y otras de interés medicinal como la antihelmíntica, la antifúngica, la anticoagulante y la

inducción en la producción de melanina, entre otras (Feuer, 1974; Brown, 1981; Berenbaum, 1991; Kady y cols., 1992; Zobel y Brown, 1995).

La actividad que presentan estos compuestos sobre la germinación y/o el crecimiento vegetal ha sido objeto de investigación en diversas especies de plantas cultivadas y malezas. Cumarinas simples como la umbeliferona y la escopoletina mostraron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento radicular en la col china (*Heracleum lanatum*) a concentraciones de 10^{-5} - 10^{-7} M (Shimomura y cols., 1982). Efectos similares se han descrito para algunas furanocumarinas como el psoraleno sobre especies como la lechuga, el tomate, la calabaza y el rábano (Baskin y cols., 1967).

Macías y cols. (1993) demostraron que algunas furanocumarinas como el bergapteno, la xanthotoxina y la imperatorina a concentraciones de 10^{-4} M inhiben en mayor grado la germinación y el crecimiento de tallos y radículas de *Lactuca sativa* var. *nigra* que las piranocumarinas xantiletina, xantoxiletina, luvangetina, donatina y aloxantoxiletol y las cumarinas simples 5,7-dihidroxicumarina y 7,8-dihidroxicumarina ensayadas también en condiciones similares.

Sin embargo, también se han observado efectos estimulatorios de las cumarinas, principalmente a bajas concentraciones, tales como el efecto ejercido por la escopoletina y la 4-hidroxicumarina sobre la germinación de *Striga asiática* (Brown, 1981). La imperatorina mostró una estimulación sobre la longitud radicular de *L. sativa* (Macías y cols., 1993).

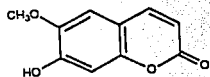
Las fenilcumarinas constituyen el grupo de cumarinas que ha recibido menor atención desde el punto de vista biológico; los únicos estudios realizados han sido sobre actividades antifúngica y antipalúdica, mencionados anteriormente.

Por otra parte, estudios previos han descrito los efectos de cumarinas sobre algunos procesos metabólicos en una célula vegetal (Tabla 2).

Tabla 2.

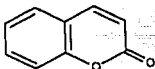
Niveles de acción de cumarinas sobre diversos procesos celulares.

NIVEL DE ACCION	CUMARINA	REFERENCIA
Escopoletina	Actividad Enzimática	Einhellig y cols. (1986)



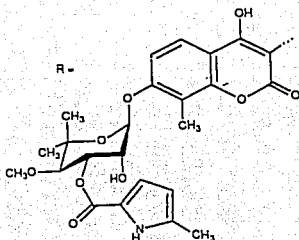
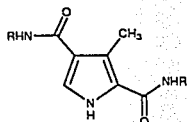
Cumarona

Brown (1981)

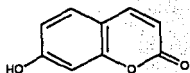


Cumermicina

Harbone y Baxter (1993)

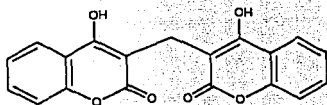


NIVEL DE ACCION	CUMARINA	REFERENCIA
Umbeliferona	División Celular	Einhellig (1986)

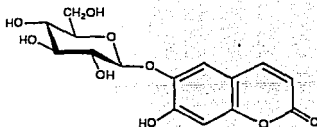


Escopoletina	Permeabilidad Membranal	Rice (1984)
--------------	----------------------------	-------------

Cumarona Dicumarol	Respiración	Stenlid (1970) Brown (1981)
-----------------------	-------------	--------------------------------



Esculina		Einhellig (1986)
----------	--	------------------



Escopoletina	Síntesis de proteínas	Cameron y Julian (1980) Einhellig (1995)
--------------	--------------------------	---

3.13 EFECTO DE CUMARINAS SOBRE LA FOTOSÍNTESIS.

Las cumarinas, esculetina y escopoletina, suprimieron la fotosíntesis neta de *Lemna minor* L. (planta acuática) a concentraciones de 500 y 1000 μM , respectivamente (Einhellig, 1986, 1995; Leather y Einhellig, 1988; Mersie y Singh, 1993). Además, la escopoletina afectó la apertura total de los estomas (500 y 1000 μM) y provocó una reducción significativa de la fotosíntesis en las especies *Nicotiana tabacum* L., *Helianthus annuus* L. y *Amaranthus retroflexus* L. a 10^{-3} M. Efectos opuestos fueron presentados por la esculetina, sin un patrón claro con respecto a la concentración (Rice, 1984; Einhellig, 1986).

Asímismo, la biosíntesis de plastoquinonas y ubiquinonas en trigo disminuyó en presencia de la cumarona (Brown, 1981).

Moreland and Novitzki (1987) reportaron que la umbeliferona ($\text{IC}_{50} = 1.87$ mM) afectó la fotofosforilación en cloroplastos aislados de *Spinacea oleracea* L. Sin embargo, esta cumarina no actuó como un inhibidor clásico de la transferencia de energía.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL.

El propósito del presente trabajo fue examinar el efecto de la isoalloalantolactona, aislada de *Ratibida mexicana* y de las 4-fenilcumarinas, aisladas de *Exostema caribaeum* e *Hintonia latiflora* sobre la fase luminosa de la fotosíntesis en cloroplastos de *Spinacea oleracea* L., como un posible sitio de acción alelopático.

Las consideraciones generales tomadas en cuenta para establecer este objetivo fueron las siguientes:

a) La actividad alelopática demostrada por la isoalloalantolactona y algunas cumarinas.

b) El efecto de otras lactonas sesquiterpénicas y cumarinas sobre la actividad fotosintética.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

4.2.1.- Separar mediante métodos fitoquímicos convencionales las 4-fenilcumarinas a partir de *Exostema caribaeum* e *Hintonia latiflora*.

4.2.2.- Purificar y caracterizar mediante métodos químicos y espectroscópicos los compuestos aislados.

4.2.3.- Determinar el efecto de las lactonas sesquiterpénicas y de las 4-fenilcumarinas sobre diferentes actividades de la fase luminosa de la fotosíntesis: síntesis de ATP, bomba de H⁺ y transporte de electrones (basal, desacoplado y fosforilante).

4.2.4.- Caracterizar el nivel de acción de la isoalloalantolactona y de las 4-fenilcumarinas en la fase luminosa de la fotosíntesis.

4.2.5.- Preparar algunos derivados semisintéticos de los compuestos naturales, con la finalidad de establecer la relación estructura-actividad de estos compuestos sobre las diversas actividades fotosintéticas examinadas.

Paginación
Variada

TRABAJO NO 1.

"BIOCHEMICALLY ACTIVE SESQUITERPENE LACTONES
FROM *Ratibida mexicana*

Calera, M.R., Soto, F., Sánchez, P., Bye, R., Hernández-Bautista,
B., Anaya, A.L., Lotina-Hennsen, B. y Mata, R.

Phytochemistry (en prensa)

PHYTOCHEMISTRY
 M.S. No. 1702
 DATE: 30/8/95



Pergamon

Phytochemistry, Vol. 00, No. 0, pp 0000-0000, 1995
 Copyright © 1995 Elsevier Science Ltd
 Printed in Great Britain. All rights reserved
 0031-9422/95 \$9.50 + 9.00

Phyto-1702-094-0166NA-Ecol Biochem 0031-9422(95)00257-X

**BIOCHEMICALLY ACTIVE SESQUITERPENE LACTONES FROM
 RATIBIDA MEXICANA**

MONICA R. CALERA,†† FERNANDO SOTO,† PERLA SANCHEZ,† ROBERT BYE,§ BLANCA HERNANDEZ-BAUTISTA,† ANA LUISA ANAYA,† BLAS LOTINA-HENNSEN† and RACHEL MATA†||

†Facultad de Química, ††Instituto de Fisiología Celular, §Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, México.

(Received in revised form 20 January 1995)

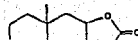
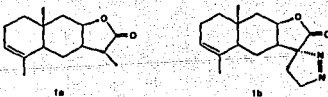
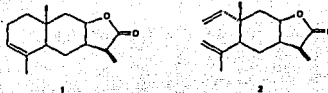
Key Word Index—*Ratibida mexicana*, Asteraceae; roots; *Amaranthus hypochondriacus* Amaranthaceae; *Echinochloa crus-galli*; Gramineae; phyto-growth-inhibitory activity; cytotoxicity; phytopathogenic fungi; Hill's reaction inhibitor; sesquiterpene lactone; isoalloantolactone; elema-1,3,11-trien-8,12-olide.

Abstract—Bioactivity-directed fractionation of the methanol extract of the roots of *Ratibida mexicana* resulted in the isolation of two bioactive sesquiterpene lactones, isoalloantolactone and elema-1,3,11-trien-8,12-olide. Both compounds caused a significant inhibition of the radicle growth of *Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crus-galli*, exerted moderate cytotoxic activity against three different solid tumour cell lines and inhibited significantly the radial growth of three phytopathogenic fungi. Isoalloantolactone also caused the inhibition of ATP synthesis, proton uptake and electron transport (basal, phosphorylation and uncoupled) from water to methylviologen, therefore acting as an Hill's reaction inhibitor. The lactone did not affect photosystem I but inhibited photosystem II. The site of inhibition of isoalloantolactone is located in the span of P_{680} to Q_A redox enzymes because the uncoupled electron transport from water to silicomolybdate and, from DPC to DCIP are inhibited a approximately to the same extent.

INTRODUCTION

Ratibida mexicana (Wats.) Sharp (Asteraceae) is a yellow-flowered perennial medicinal herb which grows scattered along the Sierra Madre Occidental in northwestern México. The Tarahumar Indians refer to the plant as Howinowa and crush the roots to use on legs for rheumatism. Other Indian tribes use the roots for a wash and a potion of the leaves in a beverage for headaches and colds [1].

As a part of our search for biologically active compounds with medicinal and/or agrochemical importance from plants of the *Ratibida* genus [2-4], we describe the isolation of isoalloantolactone and elema-1,3,11-trien-8,12-olide, the major antifungal and phytotoxic principles of *R. mexicana*. In addition, the effect of isoalloantolactone and three semi-synthetic derivatives (1a-c) on different photosynthetic activities was investigated.



Phyto-1702 V. J. 1995

RESULTS AND DISCUSSION

Preliminary biological evaluations

The roots of *R. mexicana* were extracted with methanol. The methanol residue was then partitioned between hexane (F_0-1) and 10% aqueous MeOH (F_0-2). The original extract primary fractions F_0-1 and F_0-2 were biologically evaluated for their potential cytotoxic, phyto-growth-inhibitory and antifungal properties. The cyto-toxic activity was determined against three human solid tumour cell lines and with the brine shrimp lethality test (BST) [5] (Table 1). The initial phyto-growth-inhibitory activity [6] was evaluated on seeds of *A. hypochondriacus* and *E. crus-galli* by using the Petri dish bioassay (PDPiB) (Table 2). Finally, the antifungal bioassays [7] were performed by measuring the inhibition of the radial growth of the phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *Phythium* sp. and *Helminthosporium* sp. The minimum inhibitory concentration (MIC) were > 1000 , 200 and $\leq 50 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively.

Bioactivity guided isolation of isoalloantolactone and clema-1,3,11-trien-8,12-olide

According to the results summarized in Tables 1 and 2 the methanol extract of *R. mexicana* and primary fraction F_0-1 showed significant cytotoxic and phyto-growth-inhibitory activities. The most bioactive fraction F_0-1 was further fractionated by column and thin layer chromatographies over silica gel using the BST and bioautographic phyto-growth-inhibitory bioassay (PBiB) [8] as activity directed fractionation. These procedures yielded two active sesquiterpene lactones, isoalloantolactone (1) and clema-1,3,11-trien-8,12-olide (2), and three inactive known seslinane type of sesquiterpenes.

Isoalloantolactone (1) was identified by IR, NMR and mass spectral analyses and by comparison with the spectroscopic data previously described [9, 10]. In addition, the properties of the dihydro derivative (1a) and the monopyrzoline (1b), obtained from the reaction of lactone 1 with NaBH₄ and diazomethane, respectively, were

identical to those previously reported [9]. Treatment of 1 with *m*-chloroperbenzoic acid afforded the epoxide (1c), not previously described, which was characterized by spectral means. The NMR spectra (see Experimental) of 1c were similar to those of 1, except that the signals for the double bond at C-3/C-4 were missing. In their place, bands for the epoxide group were observed at $\delta 2.96$ (H-3) in the ¹H NMR spectrum and at $\delta 60.9$ (C-3) and 57.6 (C-4) in the ¹³C NMR spectrum.

Compound 2 was also characterized by spectral analysis. The NMR and the mass spectral data were identical to those previously reported [11, 12]. This compound might be an artifact of isolation since elemnanolide sesquiterpene lactones are frequently found to be decomposition products of germacranolides.

The inactive seslinanes were identified as (-)-cryptomeridiol, (-)-8 α -acetoxycriptomeridiol and (-)-selin-11-en-4 α -ol by comparison with authentic samples previously isolated from *Teloxys graveolens* (Willd.) Weber [13].

Phyto-growth-inhibitory activity of the natural lactones and derivatives 1a-1c

Natural lactones 1 and 2 significantly inhibited radicle growth of *A. hypochondriacus* and *E. crus-galli* in a concentration dependent manner with higher activity at increasing concentrations. The 50% phyto-growth inhibitory concentrations (IC₅₀) (Table 2) were in the range of 9.73 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (4.19×10^{-5} M) to 89.02 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (3.83×10^{-4} M). The phyto-growth-inhibitory activity of derivatives 1a-c was also evaluated. Compounds 1, 1a, and c at the concentration of 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ strongly inhibited the radicle growth of *A. hypochondriacus* (Fig. 1). At the 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ level lactones 1a-c were less active than the parent isoalloantolactone (1). On the other hand, the seedlings of *E. crus-galli* were less sensitive to derivatives 1a-1c at both concentrations (Fig. 1). These results revealed that in addition to the α methylene group in the γ lactone, the δ^2, δ^3 double bond in isoalloantolactone is an important structural feature for high phyto-growth-inhibitory activity.

Table 1. Cytotoxic activity of the methanol extract, primary fractions and sesquiterpene lactones isolated from *Ratibida mexicana*

	BST*		Cell lines	
	HT-20	MCF-7	A-549	
Methanol extract	62.27	2.60	4.00	3.40
F_0-1	37.40	ND	ND	ND
F_0-2	1288.9	ND	ND	ND
Compound 1	45.31	1.00	2.00	1.00
Compound 2	209.28	4.00	3.10	4.50
Adriamycin	ND	3.47×10^{-2}	3.32×10^{-1}	7.94×10^{-3}

*BST (brine shrimp test) results are expressed as LC₅₀ values ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

†Results are expressed as ED₅₀ values ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

HT-20 (human colon adenocarcinoma); MCF-7 (human breast carcinoma); A-549 (human lung carcinoma); ND (not determined).

Table 2. Phyto-growth-inhibitory activity of the methanol extract, primary fractions and isolated lactones from *Ratihida mexicana* on radicle elongation of *Anaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crus-galli*

	IC ₅₀ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	
	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crus-galli</i>
Methanol extract	41.18	213.73
F ₀ -1	31.74	205.42
F ₀ -2	347.49	563.47
Compound 1	9.73	55.75
Compound 2	27.72	89.02
Tricolorin A*	37.00	12.60

*Positive standard.

IC₅₀ = 50% inhibitory concentration.

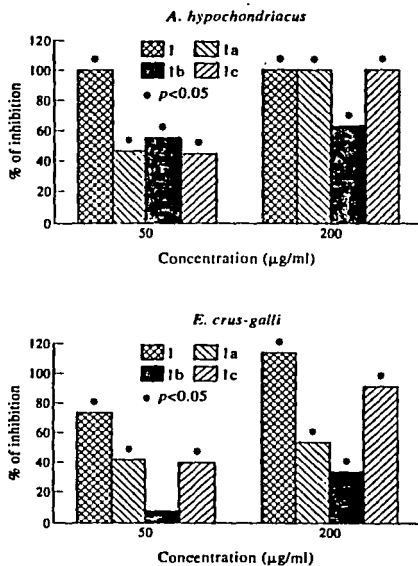


Fig. 1. Phyto-growth-inhibitory activity of isoalloantolactone derivatives (1a-c) on radicle elongation of *A. hypochondriacus* and *E. crus-galli*.

Kaur and Kalsi [9] found that isoalloantolactone (1) promoted root formation on stem cuttings of *Phaseolus vulgaris*. On the other hand, the corresponding enantiomer, diplophyllolide, showed inhibitory activity towards the germination and root elongation of rice husks [14].

It is important to point out that the concentration level of phyto-growth-inhibitory activity exhibited by 1 and 2 is comparable with those previously described for other sesquiterpene lactones [15]. Several other eudesmanolides have exhibited phytotoxic and plant growth regulatory properties. However, vernolepin has been the only elemanolide whose phyto-growth-inhibitory activity was previously described [15].

Cytotoxic activity of natural lactones 1 and 2

The cytotoxic activity of lactones 1 and 2 is summarized in Table 1. Both compounds were active in the BST [5] and showed low cytotoxicity against A-549 (lung), MCF-7 (breast) and HT-29 (colon) in 7-day human solid tumour cell *in vitro* test, using adriamycin as the positive control compound.

Antifungal activity

The radial growth of *Helminthosporium* was totally inhibited by lactones 1 and 2 at the tested concentrations. The minimum inhibitory concentrations were $\leq 50 \mu\text{g ml}^{-1}$ in both cases. Concerning the three derivatives, only the epoxide (1c) showed comparable activity with a minimum inhibitory concentration of $75 \mu\text{g ml}^{-1}$. *Pythium* was more susceptible to 1 and 1b with minimum inhibitory concentrations of 125 and $\leq 50 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. Finally, *Fusarium* was considerably less sensitive and only isoalloantolactone (1) inhibited at $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ 45% of the radial growth of this fungus. The 11,13-dihydro derivative (1a) was inactive against all three species at all concentrations thus indicating that the conjugated γ lactone is an important grouping for antifungal activity [16]. The potency of all the sesquiterpene lactones examined to inhibit the radial growth of the phytopathogenic fungi is less than that previously described for related compounds [16].

Effect of isoalloantolactone on isolated spinach chloroplasts

Photosynthetic phosphorylation from water to methylviologen in spinach thylakoids was inhibited by isoalloantolactone (1) and its derivatives (1a-c) (Figure 2). Compound 1 inhibited ATP synthesis in a concentration-dependent manner, reducing it by 69% at $500 \mu\text{M}$ (T_{50} was $200 \mu\text{M}$). Also, the light-dependent proton uptake was decreased by 63% at $100 \mu\text{M}$ (Fig. 3). The dihydro derivative (1a) inhibited ATP synthesis by 71% at $500 \mu\text{M}$. At this concentration the pyrazoline (1b) and the epoxide (1c) showed a weaker effect, inhibiting ATP synthesis only by 46 and 18%, respectively (Fig. 2). These data indicated that the $\Delta^{3,4}$ double bond of isoalloantolactone (1) is an essential structural requirement for its inhibitory effect on ATP synthesis. However, the α -methyl- γ -lactone moiety was important but not essential for ATP synthesis inhibition. It is important to point out that the same trend was observed for the phyto-growth-inhibitory activity.

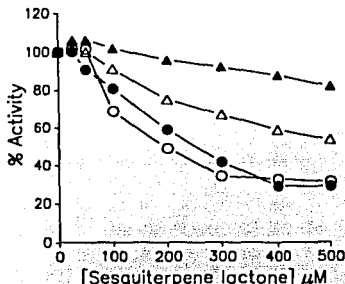


Fig. 2. Inhibitory effect of isoalloantolactone (I) and its derivatives (Ia-c) on photophosphorylation from water to methylviologen in chloroplast thylakoids isolated from spinach leaves. Photophosphorylation was measured in the presence of 1 mM ADP and 3 mM K_2HPO_4 . Each cuvette contained 20 μ g chlorophyll per ml in the reaction medium. Other conditions as described in experimental section. Control value rate was 80.4 μ mol $ATP \cdot hr^{-1} \cdot mg \cdot Chl^{-1}$. Isoalloantolactone (○), dihydro (●), pyrazoline (△) and epoxide (▲).

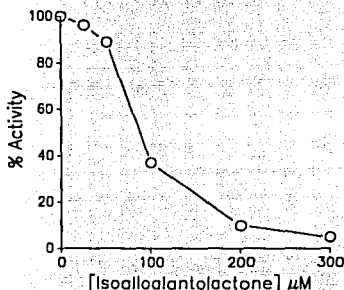


Fig. 3. Proton uptake as a function of sesquiterpene lactone concentration. In each case a cuvette contained 20 μ g chlorophyll per ml in the reaction medium. Other conditions are as described in experimental section. Control value rate was 16.2 μ eq $H^+ \cdot hr^{-1} \cdot mg \cdot Chl^{-1}$.

The light-dependent ATP synthesis by thylakoids may be inhibited by blocking electron transport, by uncoupling ATP synthesis from electron transport or by blocking the phosphorylation reaction itself. Isoalloantolactone (I) could be acting at any of these levels.

To obtain further information, the effect of lactone I on the photosynthetic electron transport was investigated. Figure 4 shows that basal, phosphorylating and uncoupled electron flow from water to methylviologen were inhibited in a concentration-dependent manner. These results indicate that isoalloantolactone behaves as a Hill's reaction inhibitor, since it has inhibited not only the electron transport but also the photophos-

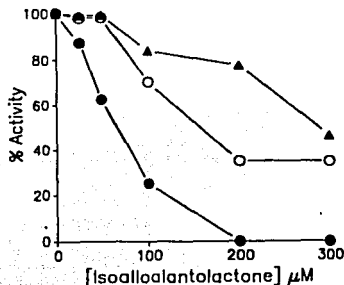


Fig. 4. Noncyclic electron transport (basal, phosphorylating and uncoupled) from water to methylviologen as a function of isoalloantolactone concentration. Photophosphorylating electron transport was measured in presence of 1 mM ADP and 3 mM K_2HPO_4 . A 3 mM NH_4Cl was added for measuring uncoupled electron transport. Each cuvette contained 20 μ g chlorophyll per ml in the reaction medium. Other conditions were as described in the Experimental. Control values rates for basal, phosphorylating and uncoupled electron transport were 536, 954.8 and 2161, respectively in μ eq $hr^{-1} \cdot mg \cdot Chl^{-1}$. Basal (●), phosphorylating (○) and uncoupled (▲) electron transport.

phorylation and proton uptake process. The target of this lactone is exposed when the chloroplast is energized because in this condition the inhibition is stronger than when the chloroplast is unenergized (uncoupled state).

In order to localize the site of inhibition, the effect of lactone I on partial reactions (photosystem I and photosystem II) was measured using artificial electron donors and electron acceptors. Table 3 shows that the uncoupled photosystem I electron transport from dichlorophenolindophenol (DCIP) to methylviologen (MV) was not affected by this compound. However, at concentrations of 200 and 400 μ M isoalloantolactone (I) inhibited uncoupled electron transport in photosystem II from water to DCIP. More specifically, this reaction was inhibited by lactone I in the span of water to silicomolybdate, i.e. 71% at 400 μ M.

To determine the site of electron transport inhibition between water to Q_A electron flows were measured from diphenylcarbazide (DPC) to DCIP in Tris-treated chloroplasts in the presence of I. The data showed that the target of lactone I was one of the redox enzymes in the span of P_{680} to Q_A electron transport chain (Table 3).

It is interesting to mention that other sesquiterpene lactones such as cacalol, zaluzanin C and ivalin [17-19], are also able to interfere with the photosynthetic process acting as Hill's reaction inhibitors. However, these terpenoids inhibit oxygen evolution. On the other hand, a number of well known photosynthetic inhibitors such as carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), heavy metals ions as Cu(II), dinoseb (a phenolic herbicide) and cacalol derivatives have been found to inhibit redox enzymes at the same level as isoalloantolactone does, i.e. in the span P_{680} to Q_A [17, 20-26].

Table 3. Effect of isoalloantolactone on uncoupled photosystem I and II electron transport rate. Control values rates in $\mu\text{eqe h}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$ for PSI (DCIP to MV), PSII (from H_2O to DCIP, H_2O to SiMo and DPC to DCIP) were 2000, 680, 140 and 105, respectively

Compound	Addition (μM)	DCIP MV (%)	H_2O (%)	H_2O SiMo (%)	DPC DCIP (%)
Control	none	100	100	100	100
Isoalloan-	200	100	83	71	62
lantolactone	400	100	50	29	28

The results of this study showed that natural lactones **1** and **2** possess remarkable antifungal and phyto-growth-inhibitory activities. Therefore, they might be developed into environmentally safe herbicide and/or fungicide agents. Also, it is probable that **1** and **2** are involved in the allelopathic interaction of *R. mexicana* [15]. In the case of isoalloantolactone (**1**) the allelopathic mode of action could involve an alteration in the photosynthetic process by inhibiting the Hill's reaction and, therefore, the growth of photosynthetic organisms.

EXPERIMENTAL

Instruments. IR spectra were obtained in KBr on a Perkin Elmer 599 B spectrophotometer; ^1H and ^{13}C NMR spectra were registered at 300 MHz and 75 MHz, respectively, on a Varian VXR-300S apparatus. Mass spectra were taken on a Hewlett-Packard 599 B spectrometer. Mp: uncorr. Commercial silica gel 60 (70–230 mesh) Merck was used for CC. TLC was carried out using precoated silica gel 60 GF 254 plates (Merck).

Plant material. The plant material (roots) was collected in Municipio de Guachochic, Cusárate, State of Chihuahua, México in December 1991. Reference samples are deposited at the ethnobotanical collection of the National Herbarium (MEXU), Instituto de Biología, UNAM, Voucher: Bye and Linares 18336.

Isolation. The air-dried plant material (3.2 kg) was ground into powder and extracted exhaustively by maceration at room temp. with MeOH. After filtration the extract was concd *in vacuo*. The MeOH residue (397 g) was partitioned between hexane (F_0 -1) and 10% aqueous MeOH (F_0 -2). After elimination of the solvent *in vacuo* F_0 -1 yielded 56.5 g of a brown residue and F_0 -2 340.5 g.

When fraction F_0 -1 was tested by the photogrowth-inhibitory bioautographic bioassay using the C_6H_6 -EtOAc (4:1) system, the activity was found at a R_f of 0.5–0.6. F_0 -1 (56 g) was subjected to CC over silica gel (523 g) eluted with a concn gradient of hexane-EtOAc starting with hexane only. A total of 110 frs (400 ml each) were collected and pooled based on TLC profiles to yield 7 major frs (F_1 -1- F_1 -7). Bioactivity in the BST bioassay showed two active pools: F_1 -2 (BST, LC_{50} = 271.73 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and F_1 -3 [BST, LC_{50} = 90.77 $\mu\text{g ml}^{-1}$]. Similarly, using the bioautographic bioassay only fractions F_1 -2 and F_1 -3 also contained the phytotoxic activity, which was localized at R_f of 0.5 and 0.4, respectively. F_1 -3 (15.03 g) was further chromatog-

raphed on silica gel (480 g), eluted with C_6H_6 -EtOAc (4:1) to yield 1.70 g of isoalloantolactone (**1**), mp 74–75° (Lit. mp 70°) [9] and 14 mg of (–)-selin-11-en-4 α -ol, mp 82–84°.

The toxic fraction F_1 -2 (14.45 g) was further resolved on another silica gel (280 g) column eluted with hexane-EtOAc (9:1) to yield impure elema-1,3,11,11-trien-8,12-olide (**2**). Further purification by prep. TLC on silica gel impregnated with AgNO_3 and using C_6H_6 -EtOAc (9:1) as mobile phase, rendered 124 mg of pure **2**, mp 72–73° (Lit. mp, unreported).

When primary fraction F_0 -2 was dissolved in MeOH, 63.3 g of a gummy solid pptd (F_4 -1). F_4 -1 (44.53 g) was subjected to CC over silica gel (600 g) eluted with a concn gradient of C_6H_6 -EtOAc-MeOH, starting with C_6H_6 and ending with EtOAc-MeOH (1:1). A total of 112 frs were collected and combined into 9 groups (F_5 -1- F_5 -9) according to their TLC profiles. Fraction F_5 -2, eluted with C_6H_6 -EtOAc (1:1) yielded a mixture (37.1 mg) of two inactive compounds. The mixture was resolved by prep. TLC using hexane-EtOAc (1:1) as eluant to yield cryptomeridiol (26 mg) and (–)-8 α -acetoxycryptomeridinol (8.60 mg), identical to standard samples [13].

Oxidation of isoalloantolactone. Compound **1** (50 mg) in CHCl_3 (10 ml) was treated with *m*-chloroperbenzoic acid (67.1 mg) for 90 min at room temp. The reaction mixture was washed with a 10% solution of NaHCO_3 and worked-up as usual to yield epoxide **1c** (53.2 mg), mp 133–135°, IR $\nu_{\text{max}} \text{cm}^{-1}$: 2932, 2868, 1754, 1664, 1262; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 6.16 (1H, d, J = 1.20 Hz, H-13), 5.64 (1H, d, J = 1.20, H-13), 4.46 (1H, ddd, J = 4.95, 4.95, 1.5 Hz, H-8), 2.99 (1H, m, H-7), 2.96 (1H, br s, H-3), 2.07 (1H, dd, J = 15, 1 Hz, H-9b), 1.23 (3H, s, H-15), 0.91 (3H, s, H-14). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 170.4 (C-12, s), 141.5 (C-11, s), 120.6 (C-13, t), 77.4 (C-8, d), 60.9 (C-3, d), 57.6 (C-4, s), 44.6 (C-5, d), 41.2 (C-7, d), 40.2 (C-9, t), 34.2 (C-1, t), 29.7 (C-10, s), 27.4 (C-6, t), 21.1 (C-15, q), 20.7 (C-2, t), 17.9 (C-14, q); EI-MS m/z (rel. int.) 248 ($[\text{M}]^+$, 1.0), 233 ($[\text{M} - 15]^+$, 16.0), 91 (17.0), 77 (17.0), 67 (18.0), 55 (33.0), 53 (34.0), 43 (100), 41 (47.0).

Reduction of isoalloantolactone. To compound **1** (103.5 mg) in MeOH (10 ml) NaBH_4 (154.70 mg) was added and the solution was stirred for 36 hr at room temp. The viscous oil so obtained was purified by prep. TLC, using silica gel plates impregnated with AgNO_3 and C_6H_6 -EtOAc (9:1) as eluant to yield 94.0 mg **1a**.

Preparation of the pyrazoline 1b. A solution of **1** (70 mg) in Et_2O was allowed to react with an Et_2O soln

of CH_2N_2 until the yellow color persisted for more than 20 min. After 24 hr the solvent was evapd and the residue recrystallized from Et_2O to yield 82.24 mg of **1b**.

Brine shrimp lethality test (BST) and cytotoxicity bioassays. The extract, fractions, isolated compounds and derivatives were evaluated for lethality to brine shrimp larvae as described. Cytotoxicities against human solid tumor cells were measured at the Cell Culture Laboratory, Purdue Cancer Center, for the A-549 lung carcinoma, MCF-7 breast, carcinoma and HT-29 colon adenocarcinoma, with adriamycin as a positive control, in 7-day assays [5].

Photogrowth-inhibitory bioassays. The photogrowth-inhibitory activity of the MeOH extract, primary fractions and pure compounds was evaluated on seeds of *Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crus-galli* by using a Petri dish bioassay [6]. In addition, a direct bioautographic bioassay system [8] was employed to guide secondary fractionation and speed up the isolation of the active compounds.

The seeds of *E. crus-galli* were purchased from Valley Seed Service, Fresno, California, and those of *A. hypochondriacus* from Mercado de Tulyehualco, D.F., México. The data were analyzed by ANOVA ($P < 0.05$), and IC_{50} values were calculated by Probit analysis based on percent inhibition obtained. The extract and primary fractions were evaluated at 50, 100 and 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Compounds **1** and **2** were evaluated at 10, 30, 50, 70, 100, 150 and 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Derivatives **1a-c** were evaluated only at 50 and 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Tricolorin A was used as positive control [27].

The direct bioautographic assay, where the seeds of the target species grow directly on the thin layer chromatography plate, silica gel G60 F254 glass backed plates (20 x 5 cm, Merck), was used as previously described [8].

Bioassays with phytopathogenic fungi. The target species chosen were *Fusarium oxysporum*, *Helminthosporium* sp. and *Pythium* sp. The bioassays were carried out using the procedure previously described [7]. The measurements were made after 72 hr of incubation. The mean value of three replications were analyzed by ANOVA ($P < 0.05$). The extract, primary fractions and natural products **1** and **2** were evaluated at 50, 100, 125, 150 and 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Derivatives **1a-c** were evaluated at 50, 75 and 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Chloroplast isolation and chlorophyll determination. Chloroplast thylakoids were isolated from market spinach leaves (*Spinacea oleracea*, L.) as described earlier [17, 28] and suspended, unless indicated, in 100 mM sorbitol, 5 mM MgCl_2 , 40 mM KCl and buffered with 0.03 M Na^+ tricine at pH 8.0. The chlorophyll concentration was measured spectrophotometrically as described [29].

Measurement of proton uptake, ATP synthesis and electron transport. Proton uptake was measured as a pH rise between 8.0 and 8.1 [30] using a combination microelectrode connected to a Corning potentiometer with expanded scale. The pH changes were recorded (Gilson recorder). The reaction medium was 100 mM sorbitol, 5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 1 mM tricine pH 8.0. ATP synthesis was measured as in proton uptake conditions in

the presence of 1 mM ADP and 3 mM KH_2PO_4 conditions in the presence of 1 mM ADP and 3 mM KH_2PO_4 [28]. Methylviologen (0.05 mM) was added as electron acceptor for Hill reaction.

Photosynthetic noncyclic electron transport activity from water to methylviologen was determined with an oxygraph 5300. The reaction medium was the same as in the proton uptake assay except that the tricine concentration was 15 mM and presence or absence of 3 mM NH_4Cl [17]. Photosystem I electron transport was determined in a similar form to noncyclic electron transport [17, 28]. The following reagents were added: 100 μM DCIP, 300 μM ascorbate, 10 μM DCMU and 3 mM NH_4Cl . Photosystem II was measured in presence of 50 μM DCIP, 1 μM DBMIB, 300 μM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ and 3 mM NH_4Cl [17, 28]. Uncoupled electron transport from water to silicomolybdate, was measured with a reaction mixture as in photosystem II except that 200 μM silicomolybdate and 10 μM DCMU were added [31]. Uncoupled electron transport from diphenylcarbazide (DPC) to dichlorophenol-indophenol (DCIP) was measured spectrophotometrically as reported [32], 200 μM DPC was added to the medium. All reaction mixtures were illuminated with actinic light of a projector lamp (GAF 2660) passed through a 5-cm filter of a 1% CuSO_4 soln.

Acknowledgements—This work was supported by grants IN-202493, IN204493 and IN203394, DGAPA-UNAM, and 0133-N9104 CONACYT. We thank M. en C. Atilano Gutiérrez, Instituto de Química, UNAM for the recording of the NMR spectra; QFB, Graciela Chávez, Q. Marisela Gutiérrez and Q. Georgina Duarte, Facultad de Química, UNAM, for IR, optical rotations and mass spectra measurements; M. R. Calera acknowledges the fellowship awarded by DGAPA-UNAM to carry out her PhD thesis. P. Sánchez and F. Soto acknowledge Facultad de Química, UNAM for the fellowship awarded, through Subprograma 127 to carry out their BS theses.

REFERENCES

- Richards, E. L. (1968) *Rhodora* 70, 348.
- Mata, R., Rojas, A., Soriano, M., Villena, R., Bye, R. and Linares, E. (1990) *Heterocycles* 31, 1111.
- Rojas, A., Villena, R., Jiménez, A. and Mata, R. (1991) *J. Nat. Prod.* 54, 1279.
- Jiménez, A., Pereda-Miranda, R., Bye, R., Linares, E. and Mata, R. (1993) *Phytochemistry* 34, 1079.
- Anderson, J. E., Goetz, C. M., McLaughlin, J. L. and Sulfness, M. (1991) *Phytochem. Anal.* 2, 107.
- Anaya, A. L., Calera, M. R., Mata, R. and Pereda-Miranda, R. (1990) *J. Chem. Ecol.* 16, 2145.
- Castañeda, P., García, M. R., Hernández, B. E., Torres, B. A., Anaya, A. L. and Mata, R. (1992) *J. Chem. Ecol.* 18, 1025.
- Li, H. H., Nishimura, H., Hasegawa, K. and Mizutani, J. (1992) *J. Chem. Ecol.* 18, 1785.

9. Kaur, B. and Kalsi, P. S. (1985) *Phytochemistry* **24**, 2007.
10. Marco, J. A. and Carda, M. (1987) *Magn. Reso. Chem.* **25**, 1087.
11. Bohlman, F. and Dutta, L. (1979) *Phytochemistry* **18**, 1228.
12. Herz, W., Kulanhaviel, P. and Goedken, V. L. (1985) *J. Org. Chem.* **50**, 610.
13. Mata, R., Navarrete, A., Alvarez, L., Pereda-Miranda, R., Delgado, G. and Romo de Vivar, A. (1987) *Phytochemistry* **26**, 191.
14. Asakawa, Y., Toyota, M., Takemoto, T. and Suires, C. (1979) *Phytochemistry* **18**, 1007.
15. Fischer, N. (1991) in *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids* (Harbone, J. B. and Tomas-Barberan, F. A., eds), pp. 377-398. Clarendon Press-Oxford.
16. Picman, A. K. and Schneider, I. E. F. (1993) *Biochem. Syst. Ecol.* **21**, 307.
17. Lotina-Hennsen, B., Roque-Reséndiz, J. L., Jiménez, M. and Aguilar, M. (1991) *Z. Naturforsch* **46c**, 777.
18. Lotina-Hennsen, B., Bernal-Morales, E., Romo de Vivar, A., Pérez-C, A. L., Castro-R, A. and Aguilar, M. (1992) *J. Chem. Ecol.* **18**, 1891.
19. Bernal-Morales, E., Romo de Vivar, A., Sánchez, B., Aguilar, M. and Lotina-Hennsen, B. (1994) *Can. J. Botany* **72**, 177.
20. Izawa, S. (1980) in *Encyclopedia of Plant Physiology* (Trebst, A. and Avron, M., eds), pp. 266-282. Springer-Berlin.
21. Hsu, B. D. and Lee, J. Y. (1988) *Plant Physiol.* **87**, 116.
22. Mohanty, N., Vass, I. and Demeter, S. (1989) *Plant Physiol.* **90**, 175.
23. Samson, G., Morissette, J. C. and Popovic, R. (1988) *Photochem. Photobiol.* **48**, 329.
24. Singh, D. and Singh, S. (1987) *Plant Physiol.* **83**, 12.
25. Yruela, J., Montoya, G., Alonso, P. J. and Picorel, R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 22847.
26. Rutherford, A. W., Zimmerman, J. L. and Mathis, P. (1984) *FEBS Letters* **165**, 156.
27. Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A. L., Wickramaratne, M. D. B., Pezzuto, J. M. and Kinghorn, D. (1993) *J. Nat. Prod.* **56**, 571.
28. Peña-Valdivia, C. B., Rodríguez-Flores, L., Tuena de Gómez-Puyou, M. and Lotina-Hennsen, B. (1991) *Biophys. Chem.* **41**, 169.
29. Strain, H. H., Coppe, B. T. and Svec, W. A. (1971) *Methods Enzymol.* **23**, 452.
30. Dilley, R. A. (1972) *Methods Enzymol.* **24**, 68.
31. Giaquinta, R. T. and Dilley, R. A. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **387**, 288.
32. Vernon, L. P. and Shaw, E. R. (1969) *Plant Physiol.* **44**, 1645.

TRABAJO NO. 2

"5-O-6-D-GALACTOPYRANOSYL-7-METHOXY-3',4'-DIHYDROXY-4-PHENYLCOUMARIN, AN INHIBITOR OF PHOTOPHOSPHORYLATION IN SPINACH CHLOROPLASTS"

Calera, M.R., Mata, R., Anaya, A.L. y Lotina-Hennsen, B.

Photosynthesis Research (en prensa)

Regular Paper

"5-O-~~6~~-D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin, an Inhibitor of Photophosphorylation in Spinach Chloroplasts"¹

Mónica R. Calera^{1,2}, Rachel Mata², Ana Luisa Anaya¹ & Blas Lotina-Hennsen^{2*}

¹Instituto de Fisiología Celular and ²Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 04510. México.

Received 00 month 199X; accepted (in revised form) 00 month 199X

Key words:

Phenylcoumarin, energy-transfer inhibitor, photosynthesis, CF₀-H⁺-channel inhibitor, Rubiaceae, Exostema caribaeum.

* To whom correspondence to be addressed.

¹ Taken in part from PhD thesis of M.R. Calera

Abstract

5-O-6-D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin isolated from Exostema caribaeum (Rubiaceae) has been found to act as an energy-transfer inhibitor in spinach chloroplasts. ATP synthesis and phosphorylating (coupled) electron flow were inhibited by 89 and 72%, respectively, at a concentration of 400 μM . H^+ -uptake, basal and uncoupled electron transport were not affected by the coumarin. The light-activated Mg^{2+} -ATPase activity from bound membrane thylakoid chloroplasts was slightly inhibited by the coumarin. Also, the heat-activated Ca^{2+} -ATPase activity of the isolated coupling factor protein was insensitive to this compound. In chloroplasts partially stripped of coupling factor 1 by an EDTA treatment, the coumarin showed a restoration of the proton uptake process. These results suggest that the 4-phenylcoumarin under investigation inhibited phosphorylation in chloroplasts by specifically blocking the transport of protons through a membrane-bound component or a carrier channel (CF_0) located in a hydrophobic region at or near the functional binding site for the coupling factor 1.

Abbreviations: CF_1 - chloroplast coupling factor 1; CF_0 - coupling factor zero; DCCD - dicyclohexylcarbodiimide; DTT - dithiothreitol; EDTA - ethylene-diaminetetraacetic acid; HEPES - N-2-hydroxyethylpiperazine- N'-2-ethanesulphonic acid; MES - 2-(N-morpholino) ethanesulphonic acid; TCA - trichloroacetic acid.

Introduction

Among natural products the coumarins are certainly one of the most numerous and varied in structure. The central feature of coumarins is the 2H-benzopyran-2-one nucleus. They are widely distributed in the plant kingdom occurring in all parts of plants. Coumarins have been also isolated from microorganisms and animals (Feuer 1974, Brown 1981, Zobel and Brown 1995). Most of these compounds have a varied physiological effects on both plants and animals, including insecticidal, phytotoxic and plant growth regulatory properties (Einhellig 1986, Noster and Kraus 1990, Kady et al. 1992, Rosskopf et al. 1992, Teng et al. 1992, Yoshikawa et al. 1992, Kumar et al. 1994). In plants their effects may be exerted by inhibiting or stimulating indole-3-acetic acid oxidase, stimulating ethylene productions, inhibiting cellulase synthesis, increasing membrane permeability (Brown 1981, Robinson 1991) or affecting the energetic metabolism (Feuer 1974, Demos et al. 1975, Tissut et al. 1980, Brown 1981, Moreland and Novitzky 1987). Some studies have shown that simple coumarins such as esculetin and scopoletin suppressed photosynthesis of Lemna minor L. at concentrations similar to those required for growth inhibition (Einhellig 1986, 1995). Also, scopoletin significantly depressed photosynthetic rate in tobacco (Nicotiana tabacum L.), sunflower (Helianthus annus L.) and pigweed (Amaranthus retroflexus L.) seedlings (Einhellig 1970, 1986). It is important to point out that these investigations have been carried out mostly with simple coumarins, furanocoumarins and pyranocoumarins which are perhaps

the most commonly occurring coumarins. The 4-phenylcoumarins possess a limited distribution in the plant kingdom and from the biological point of view they have been poorly investigated (Rojas et al. 1992, Mata 1993, Waterman and Mole 1994). Their activity on plant growth as well as the specific effects at the molecular level remains unexplored. Therefore, in order to promote further knowledge about the biological properties of these secondary metabolites, in the present paper we described the effect of 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4',-dihydroxy-4-phenylcoumarin (Fig. 1), obtained from Exostema caribaeum (Jacq.) Roem. et Schult. (Rubiaceae) on different photosynthetic activities in isolated spinach chloroplasts.

Materials and methods

Phenylcoumarin source. 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (2 g) crystallized spontaneously from the methanol extract prepared by maceration of the stem bark (120 g) of Exostema caribaeum. The compound was recrystallized from MeOH and it was characterized by comparison with an authentic sample by IR, UV and NMR (Mata et al. 1987).

Chloroplasts isolation and chlorophyll determination. Chloroplasts were obtained from market spinach leaves (Spinaceae oleracea L.) as described previously (Lotina-Hennsen et al. 1991 and Peña-Valdivia et al. 1991) and suspended, unless indicated, in 400 mM sucrose, 5 mM MgCl₂, 20 mM KCl and buffered with 0.03 M Na⁺-tricine at pH 8.0. The chlorophyll concentration was measured spectrophotometrically as described (Strain et al. 1971).

Measurement of proton uptake, ATP synthesis and electron transport. Proton uptake was measured as a pH rise between 8.0 to 8.1 (Dilley 1972) using a combination microelectrode connected to a Corning potentiometer with expanded scale. The pH changes were recorded (Gilson recorder). The reaction medium was 100 mM sorbitol, 5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM Na⁺-tricine pH 8.0. ATP synthesis was measured as in proton uptake conditions in the presence of 1 mM ADP and 3 mM KH₂PO₄ (Peña-Valdivia et al. 1991). Methylviologen (0.05 mM) was added as electron acceptor for Hill reaction.

Photosynthetic non-cyclic electron transport activity from water to methylviologen was determined with an oxygraph YSI (Yellow Spring Instrument) Model 5300. The reaction medium was the same as

in the proton uptake assay except that the tricine concentration was 15 mM and presence or absence 6 mM NH_4Cl (Lotina-Hennsen et al. 1991). All reaction mixtures were illuminated with actinic light of a projector lamp (GAF 2660) passed through a 5 cm filter of a 1% CuSO_4 solution.

ATPase isolation and assay. Intact chloroplasts were isolated from 30-40 g of spinach leaves which were ground in 160 ml of a medium containing 350 mM sorbitol, 5 mM ascorbic acid and 20 mM MES pH 6.5. Chloroplasts were centrifuged at 3000 g for 60 s, washed once in 40 ml of grinding medium and resuspended in 35 mM sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl_2 , 1 mM MnCl_2 , 50 mM HEPES pH 7.6. ATPase activity was measured for the technique reported by Mills et al. (1980), and determination of P_i was evaluated (Sumner 1944).

Coupling factor ATPase activity. Chloroplasts were diluted with 0.75 mM EDTA pH 7.6 to a final concentration of 0.4 mg of chlorophyll per ml and allowed to sit for 10 min at room temperature. CF_1 -depleted membranes were then removed by centrifugation. Of this EDTA extract, 0.5 ml was added to 0.5 ml of 20 mM tricine pH 8.0, 2 mM EDTA, 10 mM DTT, 40 mM ATP, heated at 60 °C for 4 min. Of this activated mixture 0.1 ml was incubated for 20 min at 37 °C with 0.9 ml of a medium containing 50 mM Tris pH 8.4, 5 mM CaCl_2 and 5 mM ATP (Vambutas and Racker 1965, Datta et al. 1974, Giaquinta et al. 1974). Reaction was stopped with 2% TCA and determination of P_i was evaluated (Sumner 1944). In each case four repetitions were tested.

Results and discussion

Effects of the 4-phenylcoumarin on ATP formation and electron transport. Photophosphorylation from water to methylviologen in spinach chloroplasts was inhibited by the tested phenylcoumarin in a concentration-dependent manner, reducing it by 89% at 400 μM (Fig. 2). The calculated IC_{50} (concentration producing 50% inhibition) was 80 μM .

The light-dependent formation of ATP can be inhibited by three different mechanisms: blockage of the electron transport, inhibition of the phosphorylation reaction or uncoupling of ATP synthesis from the electron transport (Good et al. 1981). To obtain further information about the mechanism of action of 5-O-6-D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin on ATP synthesis, its effect on proton uptake and basal electron transport was determined.

Proton uptake in spinach chloroplasts was unaffected even when concentrations of the compound were increased up to 400 μM (Fig. 2). This result was similar to the effect exerted by kaempferol, DCCD, DIO-9, phlorizin, chlorotri-n-butylin, piquerol A and diacetyl piquerol (McCarty and Racker, 1967, Arntzen 1974, Mendoza et al. 1994). It was also observed that basal electron transport was not modified in the presence of the coumarin (Fig. 3), as demonstrated with kaempferol, phlorizin, triphenyltin, piquerol A and diacetyl piquerol (Izawa et al. 1966, Arntzen 1974, Gould 1976, Mendoza et al. 1994). These results suggest that the phenylcoumarin may be acting as an energy-transfer inhibitor.

In order to test this possibility, electron transport rates were determined under phosphorylating and uncoupled conditions. Figure 3 shows that the 4-phenylcoumarin inhibited the phosphorylating electron transport flow in a concentration-dependent manner. This action was in the same concentration range as for the inhibitory effect on ATP synthesis. These data strengthened the proposal that the coumarin is acting as an energy-transfer inhibitor, because uncoupled electron transport was also not affected (Fig. 3).

Effect of the 4-phenylcoumarin on Mg^{2+} and Ca^{2+} -ATPase activities.

It is known that the ATPase activity is inhibited by several energy-transfer inhibitors, including phlorizin, DIO-9, chlorotri-n-butylin, ajmaline, kaempferol, DCCD, tryphenyltin, among others (McCarty et al. 1965, Izawa et al. 1966, Arntzen et al. 1974, Vallejos and Andreo 1974, Gould 1976, Mendoza et al. 1994). We found that the natural product, at all concentrations tested (25-300 μM), had only a slightly inhibitory effect (15% of inhibition) on the light membrane bound Mg^{2+} -dependent ATPase reaction associated with isolated chloroplasts (Table 1). This very limited inhibition of the activity of a membrane-bound ATPase suggests that the 4-phenylcoumarin does not act in the same as other previously described energy transfer inhibitors. Also this coumarin did not affect Ca^{2+} -dependent ATPase activity of isolated coupling factor 1 from spinach chloroplasts. This last data indicate that the compound does not interact with CF₁ when act as energy-transfer

inhibitor.

Restoration of H^+ -uptake in EDTA-treated chloroplasts by the 4-phenylcoumarin. In order to localize the site of action, the coumarin was tested on chloroplasts without CF_1 which were obtained with EDTA treatment. Chloroplast membranes which have been partially stripped of CF_1 are leaky to protons and consequently are incapable of maintaining a transmembrane proton gradient (Neumann and Jagendorf 1964). The inability of a suspension of EDTA-washed chloroplasts to exhibit the familiar light-dependent pH rise can be restored by adding back coupling factor 1 (Klein-Hitpass and Berzborn 1984) or alternatively, by adding DCCD (McCarty and Racker 1967). Figure 4 illustrates that the 4-phenylcoumarin restored the light-dependent proton uptake in a suspension of EDTA-washed chloroplasts in a concentration dependent-manner. Therefore, the 4-phenylcoumarin may interact with CF_0 when it acts as energy-transfer inhibitor as does triphenyltin or DCCD (McCarty and Racker 1967, Gould 1976). Also, low concentrations of DCCD markedly stimulated photophosphorylation in EDTA-treated chloroplasts (McCarty and Racker 1967). However, we found that the natural coumarin inhibited ATP synthesis in EDTA-treated chloroplasts (control value of 90 $\mu\text{mol ATP/h mg Chl}$ to 29 $\mu\text{mol ATP/h mg Chl}$ in presence of 200 μM of compound), although, the distribution of the 4-phenylcoumarin in a n-octanol/water system (partition coefficient = 0.85) indicates that this compound has a relatively low hydrophobic nature. The synthesis of photoaffinity derivatives will

provide further evidences about the 4-phenylcoumarin target in CF_0 .

Concluding remarks

The effect of 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin, isolated from Exostema caribaeum, on ATP synthesis, proton uptake and electron transport (basal, phosphorylating and uncoupled) observed in the present study, indicate that this naturally occurring compound is acting as a potent inhibitor of photophosphorylation in spinach chloroplasts. Since the coumarin did not affect the Ca^{2+} -ATPase activity of CF_1 (Table 1), the mechanism of action is clearly different from that described for DIO-9 and phlorizin, which act directly on the coupling factor 1 (McCarty et al. 1965, Izawa et al. 1966, McCarty and Racker 1968). The stimulatory effect of the 4-phenylcoumarin on proton uptake in chloroplast partially deprived of CF_1 (Fig. 4) is similar to the action of triphenyltin and DCCD, which have been reported as blockers of CF_0 (McCarty and Racker 1967, Gould 1976). However, unlike these compounds, the 4-phenylcoumarin has only a marginal inhibitory action on Mg^{2+} -ATPase (Table 1). Since this behavior is inconsistent with a mechanism of action which involves only the blockage of proton transport through CF_0 , a more complex mechanism must be involved. In this respect, it is important to point out that for kaempferol, an inhibitor of photophosphorylation, which also produces a slight reduction in Mg^{2+} -ATPase activity, it has been proposed that the utilization of

a putative high energy intermediate for ATP synthesis is impaired. According to Arntzen et al. (1974) kaempferol acts at a step subsequent to the formation of the high energy intermediate but at a site preceding the final utilization of the energy in the proton ATPase complex. Considering our results, we propose that 5-O-6-D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin may act in a similar way as kaempferol does. Although, the exact target of the 4-phenylcoumarin is still unknown, it is probably that it exerted its inhibitory effect on ATPase synthesis by the same mechanism, as the simple coumarin umbelliferone ($IC_{50} = 1.87$ mM) which also posses a weak effect on Mg^{2+} -ATPase (15% inhibition at 10 mM) (Moreland and Novitzky 1987).

This work intent to be part of a much larger survey of the effects of naturally occurring compounds, including 4-phenylcoumarins, on various biochemical plant processes in order to understand the interaction between plants through the so called allelochemical compounds.

Acknowledgments

This work was supported by grants IN-203394 and IN-203494 DGAPA-UNAM, and 0133-N9104 CONACYT. M.R. Calera acknowledges the fellowship awarded by DGAPA-UNAM and grant (005324) PADEP-UNAM to carry out her PhD thesis.

Table 1. Effect of the 4-phenylcoumarin on the Mg^{2+} -dependent ATPase activity of chloroplasts and Ca^{2+} -dependent ATPase activity of purified coupling factor 1. Control values for Mg^{2+} -ATPase and Ca^{2+} -ATPase were 186.0 and 179.9 μ moles Pi/h·mg Chl.

Coumarin concentration (μ M)	Mg^{2+} -ATPase (%)	Ca^{2+} -ATPase (%)
None	100 \pm 4	100 \pm 8
25	86 \pm 3	100 \pm 9
50	88 \pm 2	102 \pm 5
100	87 \pm 6	100 \pm 7
200	87 \pm 2	100 \pm 12
300	85 \pm 1	106 \pm 5

Legends

Figure 1. Structure of 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin.

Figure 2. Effect of the 4-phenylcoumarin on ATP formation and proton uptake from water to methylviologen in chloroplasts isolated from spinach leaves. Photophosphorylation was measured in the presence of 1 mM ADP and 3 mM K_2HPO_4 . Each cuvette contained 20 μ g chlorophyll per ml in the reaction medium. Other condition as described in Materials and methods. Control values rates for ATP formation (\bullet) and proton uptake (\circ) were 280.4 μ mol ATP/h·mg Chl and 48 μ eqH⁺/h·mg Chl, respectively.

Figure 3. Effect of the 4-phenylcoumarin on non-cyclic electron transport (basal, phosphorylating and uncoupled) from water to methylviologen. Note the insensitivity of basal (-Pi) and uncoupled electron transport to the inhibitor. Phosphorylating electron transport was measured in presence of 1 mM ADP and 3 mM K_2HPO_4 . A 6 mM NH_4Cl was added for measuring uncoupled electron transport. Each cuvette contained 20 μ g chlorophyll per ml in the reaction medium. Other condition as described in Materials and methods. Control values rates for basal (Δ), phosphorylating (\bullet) and uncoupled (\circ) electron transport were 290.1, 954.8 and 1280.1 μ eqe⁻/h·mg Chl, respectively.

Figure 4. Reconstitution of light-driven proton uptake in EDTA-washed chloroplasts by different concentrations of the 4-

phenylcoumarin. Details of the reaction mixture are given in
Materials and methods.

Calera et al.

Figure 1

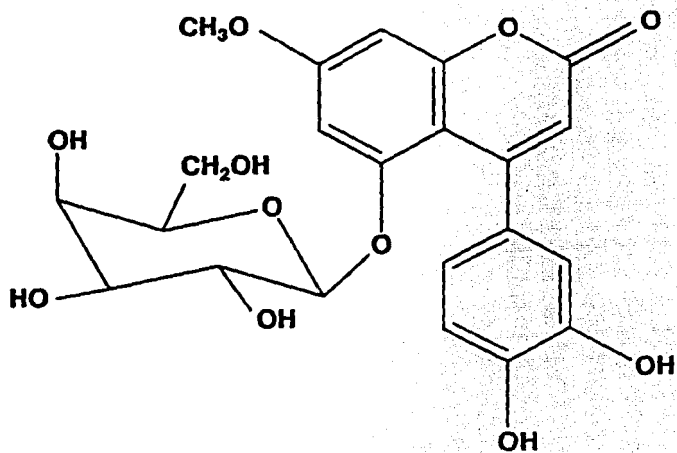


Figure 2

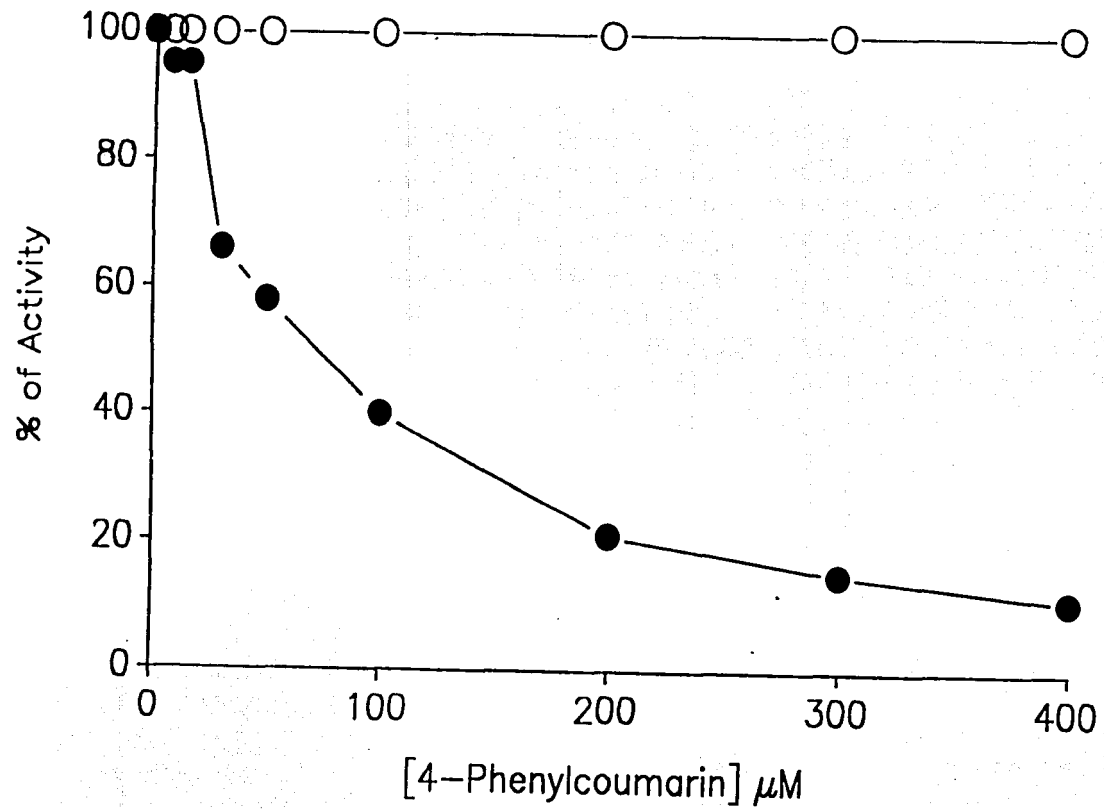
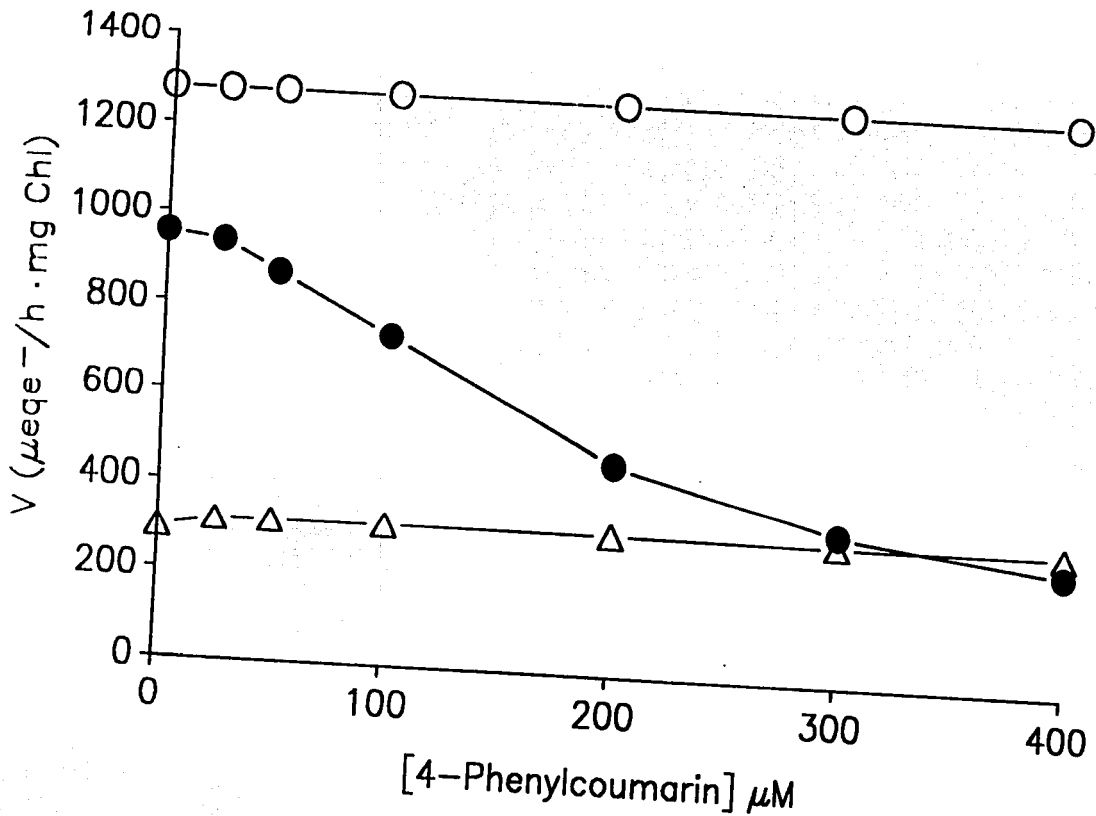
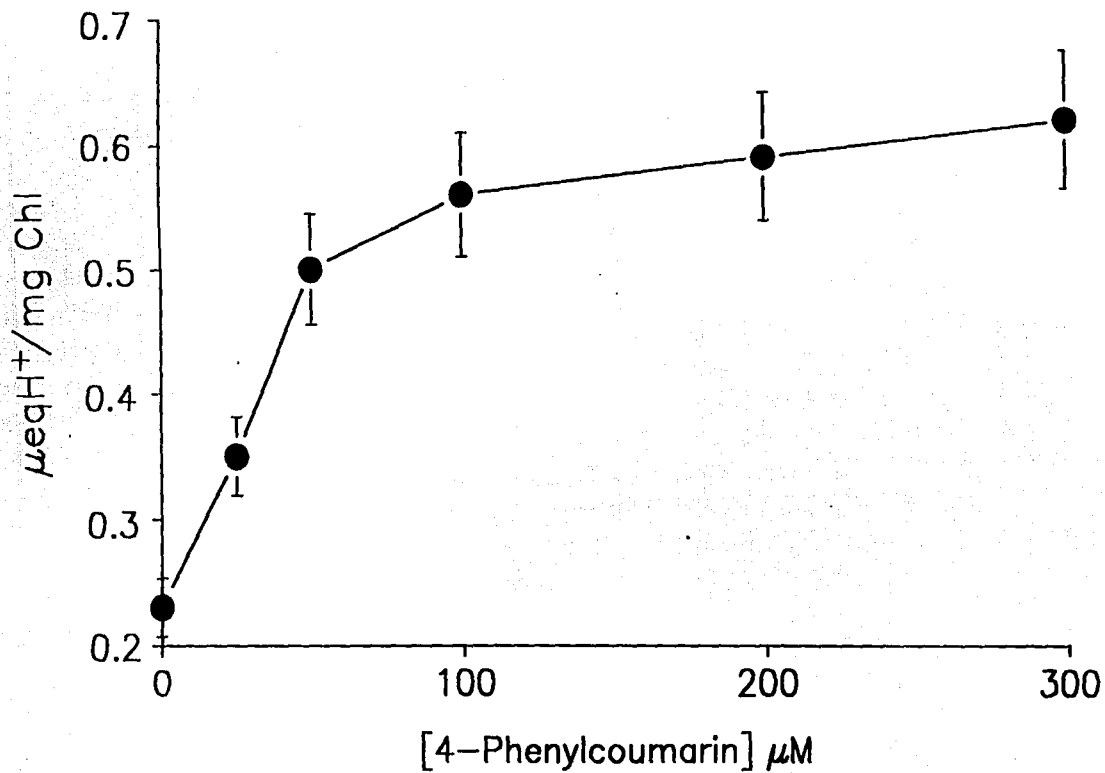


Figure 3





TRABAJO NO. 3

"UNCOUPLING BEHAVIOR OF THE 4-PHENYLCOUMARINS IN SPINACH
CHLOROPLASTS"

Calera, M.R., Lotina-Hennsen, B., Mata, R. y Anaya, A.L.

Phytochemistry (enviado)

"Uncoupling Behavior of the 4-Phenylcoumarins in Spinach Chloroplasts"¹

Mónica R. Calera^{1,2}, Blas Lotina-Hennsen², Rachel Mata² and Ana Luisa Anaya^{1*}.

¹Instituto de Fisiología Celular and ²Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 04510. México.

Key Word Index

Exostema caribaeum, *Hintonia latiflora*, Rubiaceae, phenylcoumarin, photosynthesis, uncouplers.

* To whom correspondence to be addressed

¹ Taken in part from the PhD thesis of M.R. Calera.

ABSTRACT

The effect of several 4-phenylcoumarins isolated from *Exostema caribaeum* and *Hintonia latiflora* (Rubiaceae) and some derivatives on several photosynthetic activities in isolated spinach chloroplasts were investigated. The glycoside 5-O- β -D-glucopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (3) and compounds 5,7,3',4'-tetrahydroxy-4-phenylcoumarin (1a) and, 7-methoxy-5,3',4'-trihydroxy-4-phenylcoumarin (2a) acted as uncouplers. These coumarins inhibited ATP synthesis and proton uptake in a concentration-dependent manner. However, basal, phosphorylating and uncoupled electron transport were activated by these compounds. The light-activated Mg^{2+} -ATPase activity from chloroplast thylakoid membrane was slightly stimulated by coumarins 1a and 2a. In addition, at alkaline pH compound 1a stimulated the basal electron flow from water to methylviologen, but at the pH range from 6.0 to 7.5 the coumarin did not have any effect. Compound 1a which posses four free phenolic hydroxyl groups was the most active uncoupler agent. Methylation, acetylation or glycosilation of the phenolic groups at C-3', C-4' and C-5 resulted in a reduction or loss of the uncoupling activity. These data suggest that the phenolate anions may be the active form responsible for

the uncoupling effect of the investigated 4-phenylcoumarins.

INTRODUCTION

The biological role of coumarins, compounds found in microorganisms, animals and higher plants [1, 2, 3], is not well understood but they behave as allelochemical agents interfering with the metabolism of other organisms [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]. It has been described that some simple coumarins, furanocoumarins and pyranocoumarins exerted their phytotoxic activity by inhibiting the energetic metabolism of mitochondria or chloroplasts [1, 2, 10, 11, 12]. More recently, we have demonstrated that the 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin act as an energy transfer inhibitor on isolated chloroplasts [13]. Continuing with our investigations of the biological role of 4-phenylcoumarins, in the present paper we described the effect of several natural 4-phenylcoumarins (1 and 3-4) and some derivatives (1a and 2a-2c), on different photosynthetic activities in isolated spinach chloroplasts.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of 4-phenylcoumarins on ATP formation.

Photosynthetic phosphorylation from water to methylviologen in freshly lysed intact spinach chloroplasts was inhibited by the tested 4-phenylcoumarins (Figure 1). Compounds 1a, 2a and 3 inhibited ATP synthesis in a concentration-dependent manner, reducing it by 92, 88 and 54% at 500 μM , respectively. The IC_{50} values for these compounds were 103, 114 and 391 μM , respectively. The other 4-phenylcoumarins tested (compounds 1, 2b, 2c and 4) have negligible effect on photophosphorylation. These findings suggested that the free hydroxyl groups at C-3' and C-4' are an important structural requirement for the observed inhibitory effect on ATP synthesis. Methylation or acetylation of the hydroxyl groups significantly reduced their inhibitory activity. The C-5 hydroxyl was also an important structural feature activity, because O -glycosilation at this position, as in the case of compound 3, diminished the photophosphorylation.

Effect of 4-phenylcoumarins on proton uptake and

electron transport rate. The light-dependent synthesis of ATP on thylakoids may be inhibited by blocking the electron transport, by uncoupling ATP synthesis from

the electron transport or by blocking the phosphorylation reaction itself [14].

In order to distinguish between these three possibilities the effect of the coumarins on the light-dependent proton uptake and on the electron transport was tested. Figure 2 shows that the proton uptake was completely inhibited by compounds 1a and 2a at 300 μM (IC_{50} 72 and 86 μM , respectively), but phenylcoumarin 3 had only a minor effect at 300 μM . The other coumarins did not exert any significant activity at this level. In order to elucidate if 4-phenylcoumarins act as uncouplers, energy transfer or Hill's reaction inhibitors their effect on electron flow was investigated. Figure 3 and Table 1 show that the non-cyclic electron transport from water to methylviologen in both basal and phosphorylating conditions were stimulated by addition of compounds 1, 1a, 2a and 3. On the other hand, uncoupled electron transport was slightly stimulated (20%) by all tested coumarins (not shown), but 2b which had no effect. The enhanced uncoupled electron transport observed in the presence of 4-phenylcoumarins is probably due to an enhanced proton permeability of the thylakoid membrane induced by the phenylcoumarin or by the activation of one (or more) redox enzymes which regulate electron flow in chloroplasts.

The inhibitory effect of 4-phenylcoumarins on ATP synthesis and H^+ -uptake, as well as the stimulatory effect on basal and phosphorylating electron transport indicate that 1a and 2a have uncoupling effects on freshly lysed intact chloroplasts.

Like other coumarins [12, 13], compounds 1a and 2a stimulated only slightly the Mg^{2+} -ATPase (20-30% at 300 μM) from bound membrane thylakoid chloroplasts (not shown).

Activity of coumarin on basal electron transport at different pH. Figure 4 shows the pH dependence of the effect of the compound 1a on basal electron flow. These data indicate that the coumarin stimulated basal electron transport only at alkaline pH (7.75, 8.0 and 8.5), attaining a maximal increase (150%) at pH 8.0.

The concentrations of 4-phenylcoumarins 1a and 2a that activate both basal and phosphorylating electron flow are not the same as those required for inhibition of proton uptake and ATP synthesis, therefore 4-phenylcoumarins act as a non-classical uncouplers of photosynthetic phosphorylation.

Synthetic phenols and natural 4-hydroxycoumarins have been demonstrated to act as uncouplers [15, 16]. It has been proposed that the uncoupling effect of

phenol SF6847 (2,6-di-*t*-butyl-4-(2,2-dicyanovinyl)phenol) is attributable to its protonophoric action on chloroplast membranes [17]. The same type of mechanism has also been suggested for dicoumarol (bishydroxycoumarin) [1, 18]. Notably, the protonophoric action of SF6847 relies on the presence of the hydroxyl phenolic group, which mediate the interconversion of the compound between the anionic and neutral forms of the molecule [19]. In the case of the 4-phenylcoumarins examined in the present study the free hydroxyl groups had a marked influence for the uncoupling effect. In particular the free hydroxyl groups at positions C-3' and C-4' of compound 2a were essential for the uncoupling activity since methylation (compound 2b) or acetylation (compound 2c) lead to inactive derivatives. Also glycosilation of the hydroxyl group at position C-5 diminished (compound 3) or abolished (compound 1) the uncoupling action of these 4-phenylcoumarins. Since the highest uncoupling activity for compound 1a was observed at pH 8.0, we suggest that the active species of coumarins 1a and 2a are the corresponding phenolates (anionic form).

It has been postulated that coumarins may act as allelochemical agents playing a role in the interaction between different plant species or in the mechanism of defense against plant pathogens or predators [3, 4, 6,

8, 9]. The biochemical basis of this action, with few exceptions, is not well known. The sensitivity of photosynthetic energy conservation machinery to 4-phenylcoumarins reported in this work may be related to its still unknown biological role in the plants which biosynthesized these compounds.

EXPERIMENTAL

Tested material. Compound 1 was obtained from *Hintonia latiflora* as described previously (Sesse ex Mociño ex DC.) Bullock [20]. Natural coumarins 2, 3 and 4 were isolated from *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem. et Schult. [21, 22]. Derivatives 1a, 2a, 2b and 2c were prepared from natural products 1 and 2 according to previously described procedures [20, 21, 22].

Chloroplasts isolation and chlorophyll determination. Chloroplasts were obtained from market spinach leaves (*Spinacea oleracea* L.) as described previously [23, 24] and suspended, unless indicated, in 400 mM sucrose, 5 mM $MgCl_2$, 20 mM KCl and buffered with 0.03 M Na^+ -tricine at pH 8.0. The chlorophyll concentration was measured spectrophotometrically [25].

Measurement of proton uptake, ATP synthesis and electron transport. Proton uptake was measured as a pH rise between 8.0 to 8.1 [26] using a combination microelectrode connected to a Corning potentiometer with expanded scale. The pH changes were recorded (Gilson recorder). The reaction medium was 100 mM sorbitol, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM Na^+ -tricine pH 8.0. ATP synthesis was measured as in proton uptake conditions in the presence of 1 mM ADP and 3 mM KH_2PO_4 [24]. Methylviologen (0.05 mM) was added as electron acceptor for Hill reaction.

Photosynthetic non-cyclic electron transport activity from water to methylviologen was determined with an oxygraph 5300. The reaction medium was the same as in the proton uptake assay except that the tricine concentration was 15 mM and presence or absence 6 mM NH_4Cl [23]. All reaction mixtures were illuminated with actinic light of a projector lamp (GAF 2660) passed through a 5 cm filter of a 1% CuSO_4 solution.

ATPase isolation and assay. ATPase activity and released inorganic Pi were carried out as reported [27, 28].

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants IN-202493, IN204493 and IN203394 DGAPA-UNAM, and 0133-N9104 CONACYT. M.R. Calera acknowledges the fellowship awarded by DGAPA-UNAM and grant (005324) PADEP-UNAM to carry out her PhD thesis.

REFERENCES

1. Feuer, G. (1974) *Prog. Med. Chem.* 10, 85.
2. Brown, S.A. (1981) in *The Biochemistry of Plants* (Conn, E.E., ed), pp. 269-299. vol 7. Academic Press, New York.
3. Zobel, A.M. and Brown, S.A. (1995) *Allelopathy J.* 2, 9.
4. Einhellig, F.A. (1986) in *The Science of Allelopathy* (Putnam, A.R. and Tang, C.S. eds), pp. 171-188. Wiley-interscience, USA.
5. Noster, S. and Kraus, L. (1990) *Planta Med.* 56, 63.
6. Kady, M.M., Brimer, L., Furu, P., Lemmich, E., Nielsen, H.M., Thilborg, S.T., Thastrup, O. and Christensen, S.B. (1992) *Planta Med.* 58, 334.
7. Teng, C.M., Li, H.L., Wu, T.S., Huang, S.C. and Huang, T.F. (1992) *Thromb. Res.* 66, 549.
8. Yoshikawa, M., Uchida, E., Chatani, N., Kobayashi, H., Naitoh, Y., Okuno, Y., Matsuda, H., Yamahara, J. and Murakami, N. (1992) *Chem. Pharm. Bull.* 40, 3352.
9. Kumar, V., Bulumulla, H.N.K., Wimalasiri, W.R. and Reisch, J. (1994) *Phytochemistry* 36, 879.
10. Demos, E.K., Woolwine, M., Wilson, R.H. and McMillan, C. (1975) *Amer. J. Bot.* 62, 97.
11. Tissut, M., Chevallier, D. and Douce, R. (1980) *Phytochemistry* 19, 495.
12. Moreland, D.E. and Novitzky, W.P. (1987)

Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry (Waller, G.R. ed), pp 247-261. vol 330. American Chemical Society, Washington, D.C.

13. Calera, M.R., Mata, R., Anaya, A.L. and Lotina-Hennsen, B. (1995) *Photosyn. Res.* (in press).

14. Good, N.E., Izawa, S. and Hind, G. (1981) in *Current Topics in Bioenergetics* (Sanadi, D.R. ed), pp. 75-112. Academic Press, New York.

15. Terada, H. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 639, 225.

16. Terada, H. (1990) *Environmental Health Perspectives* 87, 213.

17. Miyoshi, H. and Fujita, T. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 894, 339.

18. Jagendorf, A.T. and Neumann, J. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 3210.

19. Terada, H., Fukui, Y., Shinohara, Y. and Ju-ichi, M. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 933, 193.

20. Mata, R., Camacho, M. del R., Cervera, E., Bye, R. and Linares, E. (1990) *Phytochemistry* 29, 2037.

21. Mata, R., Calzada, F., García, M. del R. and Reguero, M.T. (1987) *J. Nat. Prod.* 50, 866.

22. Mata, R., Calzada, F. and García, M.R. (1988) *J. Nat. Prod.* 51, 851.

23. Lotina-Hennsen, B., Roque-Reséndiz, J.L., Jiménez, M. and Aguilar, M. (1991) *Z. Naturforsch* 46c, 777.

24. Peña-Valdivia, C.B., Rodríguez-Flores, L., Tuena de

Gómez-Puyou, M. and Lotina-Hennsen, B. (1991) *Biophys. Chem.* **41**, 169.

25. Strain, H.H., Coppe, B.T. and Svec, W.A. (1971) *Methods Enzymol* **23**, 452.

26. Dilley, R.A. (1972) *Methods Enzymol.* **24**, 68.

27. Mills, J.D., Mitchell, P. and Schurmann, P. (1980) *FEBS Lett* **112**, 173-177.

28. Sumner, J.B. (1944) *Science* **100**, 413.

LEGENDS

Figure 1. Inhibitory effect of the 4-phenylcoumarins on photophosphorylation from water to methylviologen in chloroplast thylakoids isolated from spinach leaves. Photophosphorylation was measured in the presence of 1 mM ADP and 3 mM K_2HPO_4 . Each cuvette contained 20 μ g chlorophyll per ml in the reaction medium. Other condition as described in Experimental section. Control value rate was 376.5 μ mol ATP \cdot h⁻¹ \cdot mg Chl⁻¹. 1a (○); 2a (●); 3 (Δ); 1 (▲); 2b (∇); 2c (▼); 4 (□).

Figure 2. Proton uptake as a function of coumarins concentration: compounds 1a (○), 2a (○) and 3 (Δ). In each case a cuvette contained 20 μ g chlorophyll per ml in the reaction medium. Other condition as described in Experimental section. Control value rate was 50.0 μ eqe⁻ \cdot h⁻¹ \cdot mg Chl⁻¹.

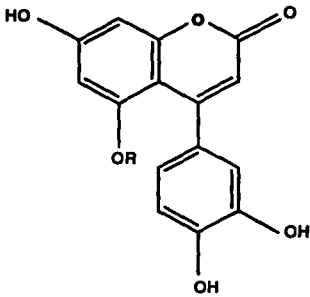
Figure 3. Non-cyclic electron transport (basal, and phosphorylating) from water to methylviologen as a function of the 5,7,3',4'-tetrahydroxy-4-phenylcoumarin (1a). Photophosphorylating electron transport was measured in presence of 1 mM ADP and 3 mM K_2HPO_4 . Each cuvette contained 20 μ g chlorophyll per ml in the reaction medium. Other conditions were as described in experimental section. Control values rates for basal

and phosphorylating electron transport were 300 and 600, respectively in $\mu\text{e}g^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg Chl}^{-1}$. Basal (○) and phosphorylating (●) electron transport.

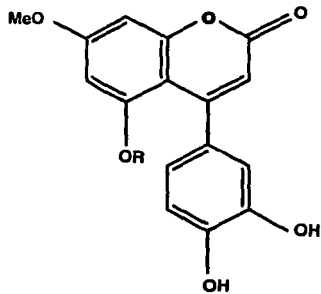
Figure 4. pH dependence of basal electron transport flow in the presence of 200 μM of 5,7,3',4'-tetrahydroxy-4-phenylcoumarin (●). Each cuvette contained 20 μg chlorophyll per ml, either MES (pH 6.0-6.5) or HEPES (pH 7.0-7.75) or Tricine (pH 8.0-8.5) in the reaction medium. Other condition as described in experimental section.

Table 1. Activity of the effects of 4-phenylcoumarins on electron flow in isolated chloroplasts compared to control (100% activity).

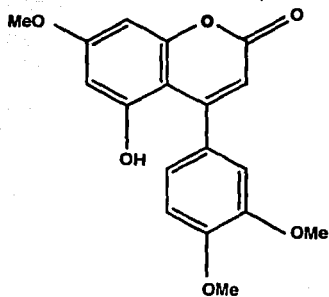
ELECTRON FLOW (%)	CONC. (μM)	COMPOUNDS					
		1	1a	2a	2b	2c	3
BASAL	0	100	100	100	100	100	100
	25	100	150	112	100	100	100
	50	100	200	138	100	100	100
	100	100	217	150	100	100	100
	200	100	233	150	100	100	100
	300	100	250	162	100	100	112
PHOSPHO- RYLATING	0	100	100	100	100	100	100
	25	100	100	133	100	100	120
	50	100	140	141	100	100	120
	100	117	147	150	100	100	120
	200	117	167	158	100	100	100
	300	117	167	167	100	100	100



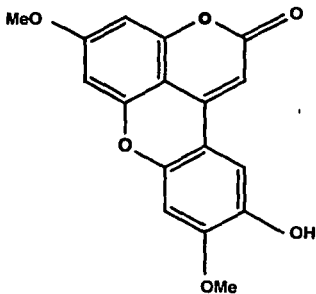
R = - β - D - glucopyranosyl (1)
 R = - H (1a)



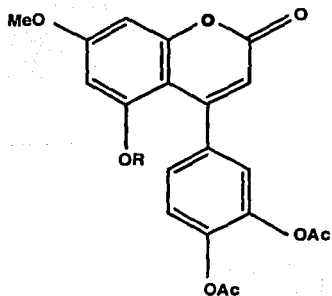
R = - β - D - galactopyranosyl (2)
 R = - H (2a)
 R = - β - D - glucopyranosyl (3)



(2b)



(4)



R = - tetra-acetyl - β - D - galactopyranosyl (2c)

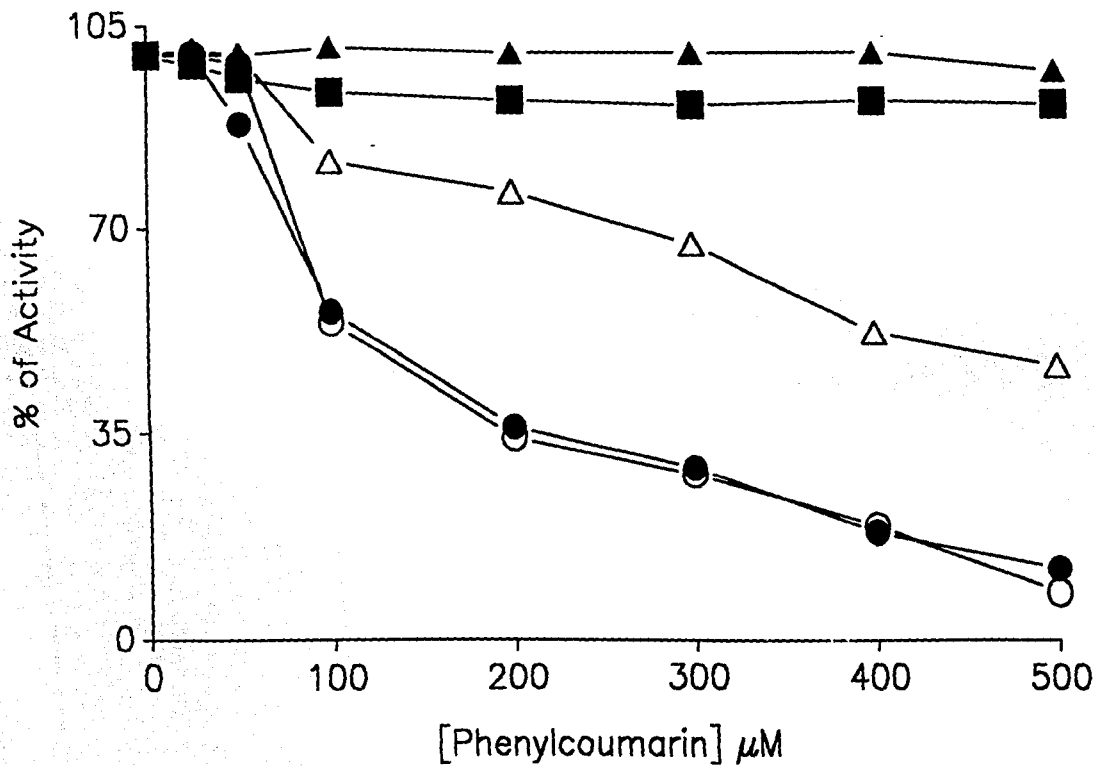


Fig. 1

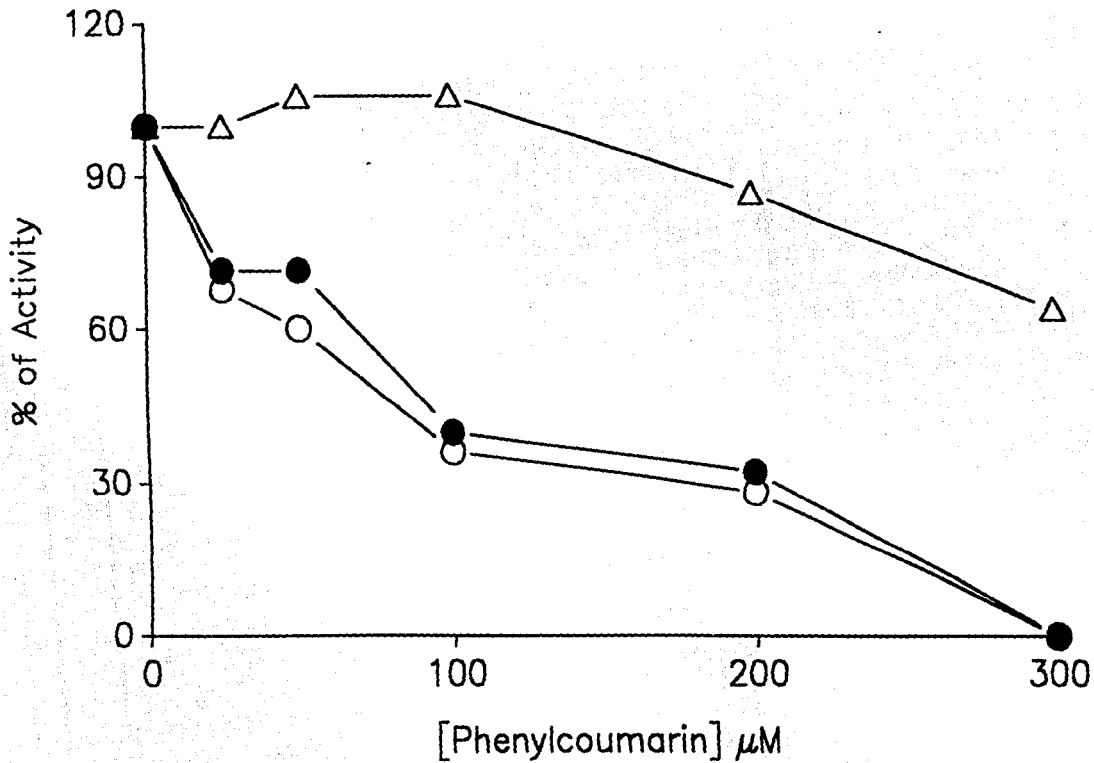


Fig. 2

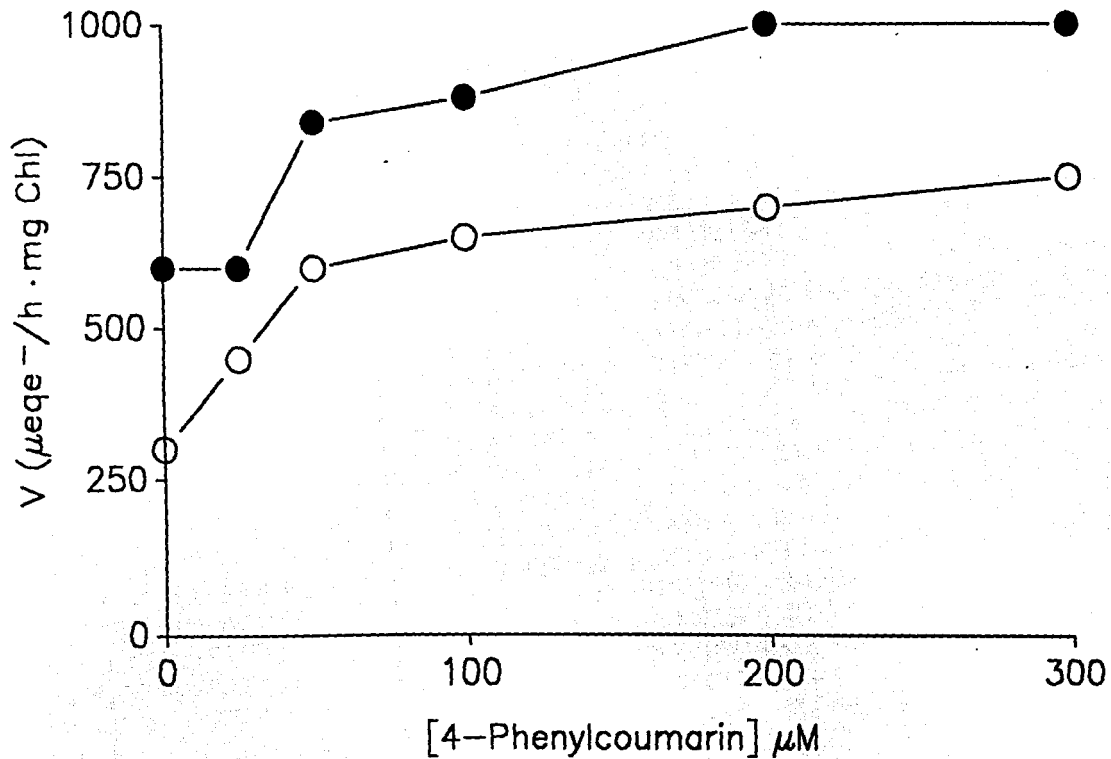


Fig. 3

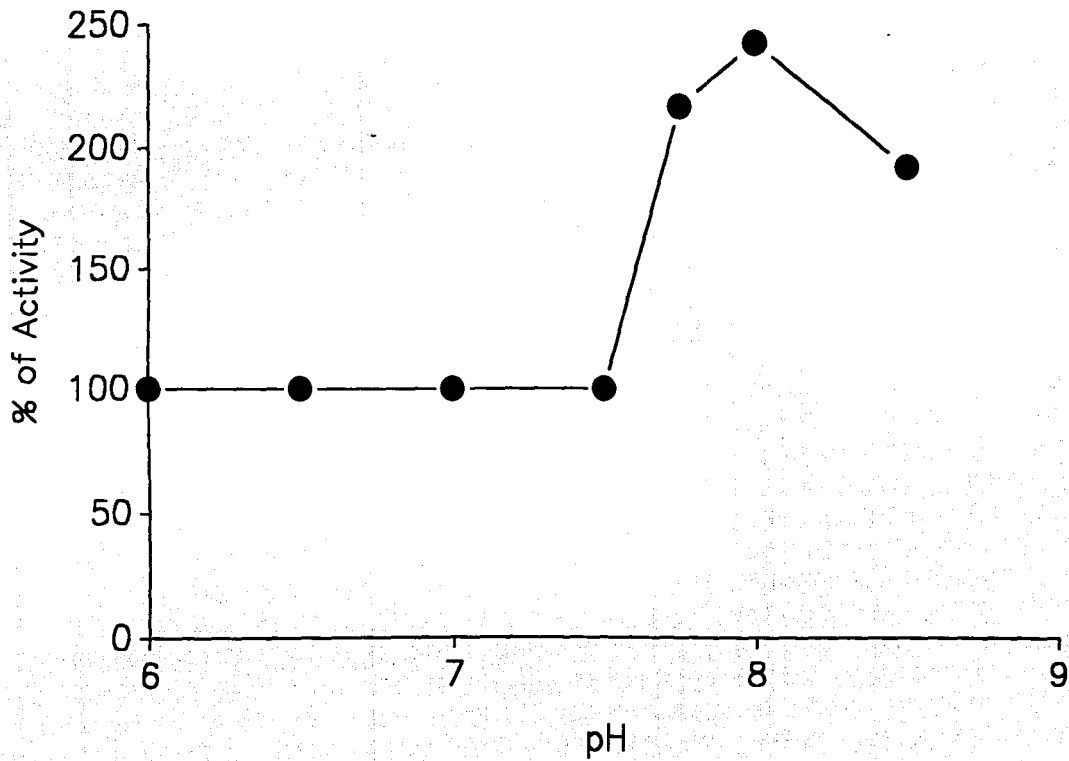


Fig. 4

5. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Diversos estudios han demostrado que los compuestos alelopáticos pueden manifestar su efecto sobre la planta receptora de modo distinto, por ejemplo, afectando la germinación, el crecimiento de la radícula, del tallo ó de la planta entera. Estos efectos están acompañados por alteraciones en los procesos celulares. El estudio de estos procesos se ha realizado con diversos enfoques, incluyendo el examen de extractos tanto acuosos como orgánicos de diversas partes de las plantas sobre los procesos biológicos mencionados anteriormente. Este hecho permite confirmar que en muchas ocasiones, el efecto biológico de un extracto se debe a una acción sinergista de los diversos componentes químicos que lo forman y no a un solo compuesto específico (Anaya y cols., 1992). Paralelamente, se pueden aislar y caracterizar los principios activos y examinar su efecto individual sobre funciones vegetales específicas (Pereda-Miranda y cols., 1993). Esta estrategia permite posteriormente modificar químicamente la estructura, con la finalidad de realizar estudios de estructura-actividad.

El efecto de los compuestos alelopáticos sobre el crecimiento, desarrollo, reproducción y salud de otros organismos está determinado por una gran diversidad de mecanismos de acción, incluyendo la inhibición de la síntesis de proteínas, de la ATPasa de membrana plasmática (Calera y cols., 1995), de la respiración (Uribe y cols., 1984; Cruz y cols., 1988), ó bien por las modificaciones en la permeabilidad iónica de la membrana celular (Uribe y cols., 1985; Wacker y cols., 1990), así como por las

alteraciones a nivel de fotosíntesis (Andreo y cols., 1984; Lotina-Hennsen y cols., 1991, 1992; Mersie y Singh, 1993; Albertin y cols., 1994; Bernal-Morales y cols., 1994), entre otras (Einhellig, 1986, 1995).

El estudio fitoquímico convencional de las especies *Exostema caribaeum* e *Hintonia latiflora* permitió el aislamiento de diversas 4-fenilcumarinas (Mata y cols., 1987, 1988, 1990), de las cuales únicamente dos presentaron una acción inhibitoria sobre el crecimiento de *Candida albicans* (Rojas y cols., 1992). Por otra parte, un estudio fitoquímico biodirigido de *Ratibida mexicana* permitió el aislamiento de la lactona sesquiterpénica isoalloalantolactona (Sánchez y Soto, 1994). Al respecto, ya se había reportado en la literatura, la acción inhibitoria de algunas cumarinas y lactonas sesquiterpénicas sobre la actividad fotosintética de diversas especies de prueba (Leather y Einhellig, 1985; Moreland y Novitzky, 1987; Lotina-Hennsen y cols., 1992; Bernal-Morales y cols., 1994); por esta razón, el presente estudio se realizó con el fin de investigar el posible efecto de las 4-fenilcumarinas y de la isoalloalantolactona sobre el proceso fotosintético en cloroplastos aislados de *Spinacea oleracea* L., y conocer su mecanismo de acción.

I.- Efecto de las lactonas sesquiterpénicas y de las 4-fenilcumarinas sobre la fotofosforilación en cloroplastos.

A. Lactonas sesquiterpénicas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran claramente que la isoalloalantolactona inhibe la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de *Spinacea oleracea* L. (Trabajo 1, Fig. 2). Es importante mencionar que la isoalloalantolactona muestra una potencia mayor (IC_{50} = 200 μ M) que la reportada para la zaluzanina C (IC_{50} = 4.6 mM; Lotina-Hennsen y cols., 1992) y la ivalina (IC_{50} = 6.8 mM; Bernal-Morales y cols., 1994).

Los resultados del estudio estructura-actividad (mostrados en el Trabajo 1, Fig. 2) indican que el doble enlace de la isoalloalantolactona en C-3/C-4 es importante para su efecto inhibitorio sobre la síntesis de ATP (69%), ya que el derivado epóxido de la lactona mostró un efecto inhibitorio mucho menor (18%). El derivado pirazolina mostró un efecto inhibidor intermedio (49%) sobre la fotofosforilación, lo cual indica que en este caso el grupo α -metileno- γ -lactona puede ser considerado de menor importancia para la inhibición de la síntesis de ATP, lo cual contrasta con lo descrito en otras actividades biológicas, en donde la mayoría de los efectos de las lactonas sesquiterpénicas están asociados con el grupo funcional α -metileno- γ -lactona (Fischer, 1991; Macías y cols., 1992). Este grupo forma enlaces covalentes con los grupos tiol de algunas enzimas (Fischer, 1991; Wei y Sadzadeh, 1994), efecto que se ha señalado como un mecanismo de acción para este grupo de compuestos.

B. Cumarinas.

En el presente trabajo se observó que de las ocho 4-fenilcumarinas estudiadas, únicamente los compuestos 1a, 2, 2a y 3 inhibieron la fotofosforilación en cloroplastos aislados (IC_{50} = 102.9, 80, 114.2 y 391.4 μ M, respectivamente) (Trabajo 2, Fig. 2; Trabajo 3, Fig. 1). Estos resultados son similares a los descritos para la cumarina simple umbeliferona, que también inhibió la fotofosforilación en cloroplastos de espinaca, aunque con una potencia menor (IC_{50} = 1.87 mM) (Moreland y Novitzky, 1987).

De los datos mostrados en el Trabajo 3 (Fig. 1), resulta claro que existen ciertos requerimientos estructurales para que se lleve a cabo la inhibición de la fotofosforilación por las 4-fenilcumarinas. La presencia del OH- libre en la posición C-5 (compuestos 1a y 2a) o de un residuo β -D-galactopiranosil (2) parece ser importante para la acción inhibitoria sobre la síntesis de ATP. La presencia del grupo β -D-glucopiranosil en C-5 reduce considerablemente la actividad. Igualmente, al sustituirse los OH- en las posiciones C-3' y C-4' por un metilo o un acetilo origina una disminución en la actividad.

II.- Caracterización del tipo de efecto producido en la fase luminosa de la fotosíntesis por las lactonas sesquiterpénicas y las 4-fenilcumarinas.

A. Lactonas sesquiterpénicas.

La isoalloalantolactona inhibió todas las actividades medidas: síntesis de ATP, bomba de H⁺ y transporte de electrones (basal, desacoplado y fosforilante), caracterizándose como un inhibidor de la reacción de Hill o inhibidor del transporte de electrones (Trabajo 1, Figs. 2, 3 y 4). Además, se determinó a través de reacciones parciales, que la isoalloalantolactona inhibe la cadena redox a nivel del fotosistema II, entre P₆₈₀ y Q_A. Este resultado contrasta con el nivel de acción de otras lactonas sesquiterpénicas como el cacalol (Lotina-Hennsen y cols., 1991), la zaluzanina C (Lotina-Hennsen y cols., 1992) y la ivalina (Bernal-Morales y cols., 1994) que también actúan como inhibidores del transporte de electrones en la fotosíntesis, pero a nivel de la producción de oxígeno. Por otra parte, otros compuestos como el CCCP (10 µM) (Izawa, 1980); el dinoseb, herbicida fenólico, (2.5 µM) (Renger, 1979; Giardi y cols., 1988); algunos derivados del cacalol (100 µM) (Lotina-Hennsen y cols., 1991) y metales como el Cu (II) (20 µM) (Yruela y cols., 1991) inhiben la cadena fotosintética al mismo nivel que la isoalloalantolactona.

B. Cumarinas.

En las 4-fenilcumarinas examinadas en este estudio se determinaron dos formas de acción: la 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi, 3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (2) se caracterizó como un inhibidor de la transferencia de energía (Trabajo 2) mientras que la 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina (1a), la 7-metoxi, 5,3'4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (2a) y la 5-O- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (3) se caracterizaron como desacoplantes (Trabajo 3).

La actividad desacoplante puede estar determinada por el OH- libre en C-5, así como por los OH- en las posiciones C-3' y C-4'. Estos últimos, así como la presencia de una galactosa y no glucosa en C-5, quizás son los requisitos estructurales para que una 4-fenilcumarina se comporte como un inhibidor efectivo de la transferencia de energía.

La 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (2) en cloroplastos tratados con EDTA, restauró la captura de H⁺ en forma dependiente de su concentración, este comportamiento es similar al reportado para el DCCD (McCarty y Racker, 1967) o el trifenilestaño (Gould, 1976), que actúan como bloqueadores de CF₀. Sin embargo, la cumarina afectó moderadamente la Mg²⁺-ATPasa (15% a 25-300 μ M). Este efecto pequeño ha sido reportado para la umbeliferona (Moreland y Novitzky, 1987); la cual es considerada por los autores como un inhibidor no clásico de la transferencia de energía. Este comportamiento podría ser postulado para la 4-fenilcumarina, pero sin poder determinar aún el sitio

exacto de acción de este compuesto.

Por otra parte, las 4-fenilcumarinas 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina (1a) y 7-metoxi, 5,3'4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (2a), estimularon la Mg^{2+} -ATPasa en un 20-30% (300 μM), demostrando su capacidad de actuar como desacoplantes.

Considerando la naturaleza fenólica de las 4-fenilcumarinas, se ha reportado que algunos compuestos fenólicos sintéticos, así como hidroxycumarinas naturales actúan como desacoplantes (Terada, 1981, 1990). El compuesto fenólico SF6847 (3,5-di-ter-butyl-4-hidroxibencilidén-malonitrilo) es considerado como un ácido débil con actividad de protonóforo en cloroplastos; esta actividad ha sido sugerida también para el dicumarol (bihidroxycumarina) (Jagendorf y Neumann, 1965). El efecto desacoplante del compuesto fenólico SF6847 se le atribuye al grupo hidroxilo, debido a que la metilación de este grupo no tuvo ninguna acción desacoplante (Terada, 1988). El efecto desacoplante de los compuestos 1a y 2a probablemente se deba a un mecanismo similar al propuesto para el compuesto SF6847 y el dicumarol; sin embargo, las 4-fenilcumarinas actuarían como bases débiles, considerando que presentaron el mayor desacoplamiento a pH 8.0 (Trabajo 3, Fig. 4). Además, el valor de los coeficientes de partición de 2.05 y 2.09 para 1a y 2a, respectivamente, demuestra que se trata de compuestos con un grado significativo de hidrofobicidad, lo cual podría permitir la interacción de estos compuestos con la membrana tilacoidal, donde podrían actuar como ionóforos. Cabe mencionar que existe una cumarina, la novobiocina, que forma canales iónicos en membranas

lipídicas artificiales, con una selectividad similar a la gramicidina (Feigin, 1995).

Es importante considerar que los diferentes patrones de inhibición de estos desacoplantes están probablemente relacionados con las diferencias en los mecanismos de acción de estos compuestos.

III.- Importancia de los aleloquímicos como posibles fuentes de herbicidas naturales.

Los metabolitos secundarios producidos especialmente por plantas para modular positiva o negativamente el crecimiento, metabolismo y desarrollo de otras plantas, constituyen una gran fuente de recursos naturales que debe explorarse extensa y profundamente, considerando la posibilidad de su utilización en la agricultura como herbicidas naturales. Además, la realización de estudios sobre estructura-actividad con aleloquímicos sobre el proceso fotosintético puede originar nuevos compuestos con una mayor actividad y un gran potencial herbicida.

Asimismo, la investigación sobre los mecanismos de acción de los aleloquímicos conllevaría a su utilización como herramientas que permitirían un mayor entendimiento de los diversos procesos metabólicos en los sistemas biológicos.

6. PERSPECTIVAS

- Determinar el sitio de interacción del compuesto 5-O-6-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (inhibidor de la transferencia de energía) con el complejo de la ATPasa usando el método de marcaje por fotoafinidad. Esto permitiría precisar el sitio de unión de esta fenilcumarina, tentativamente en alguna de las subunidades de CF_0 y/o CF_1 .
- Analizar el efecto de la isoalloalantolactona y de las 4-fenilcumarinas sobre la respiración en mitocondrias. Considerando algunos antecedentes que demuestran que ciertos compuestos que presentan la capacidad de inhibir la cadena fotosintética también reducen la cadena respiratoria mitocondrial, resultaría de gran interés el examinar el efecto de las 4-fenilcumarinas y de la isoalloalantolactona sobre la función mitocondrial.
- Determinar el efecto de la isoalloalantolactona y de las 4-fenilcumarinas sobre la fotosíntesis y la respiración en la hoja completa. Con el propósito de evaluar *in vivo* la acción de estos compuestos como potenciales herbicidas, resultaría de gran utilidad demostrar que el efecto inhibitorio que presentaron en los cloroplastos aislados también se observa en la hoja completa.
- Valorar el potencial herbicida de la isoalloalantolactona y de las 4-fenilcumarinas sobre diferentes tipos de plántulas (malezas y plantas cultivadas). Con la finalidad de determinar el rango de

selectividad vegetal que estos compuestos puedan presentar sobre las diversas especies, considerando su posible implementación en la agricultura como herbicidas selectivos que idealmente no afectaran la función fotosintética en especies vegetales útiles al hombre.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aiello, 1979. A reexamination of *Portlandia* (Rubiaceae) and associated taxa. *J. Arnold Arboretum*. 60:38-43.
- Albertin, H., Nurit, F., Ravanel, P, y Tissut, M. 1994. Uncoupling activities of monensin in isolated mitochondria, chloroplasts and cells. *Phytochemistry* 35:1105-1110.
- Alt, J., Winter, P., Sebald, W., Moser, J.G., Schedel, R., Westhoof, P. y Herrmann, G. 1983. Localization and nucleotide sequence of the gene for the ATP synthase proteolipid subunit on the spinach plastid chromosome. *Current Genet.* 7:129-138.
- Amo, R.S. del y Anaya, A.L. 1978. Effect of some sesquiterpenic lactones on the growth of certain secondary tropical species. *J. Chem. Ecol.* 4:305-313.
- Anaya, A.L. 1981. Importancia de la alelopatía dentro de la ecología química. En: Peña, A., Drucker, R.C. y Tapia, R. (Eds.). *Temas Selectos de Fisiología Celular*. UNAM. México. 69-99 pp.
- Anaya, A.L. 1995. *Ecología Química*. U.N.A.M-CONACyT (en prensa)
- Anderson, J.W. y Beardall, J. 1991. *Molecular activities of plant cell. An introduction to plant biochemistry*. Blackwell Scientific Publications. USA. 384 pp.
- Andreo, C.S., Orellano, E.G. y Niemeyer, H.M. 1984. Uncoupling of spinach thylakoids by gramine. *Z. Naturforsch.* 39c:746-748.
- Anthon, G.E. y Jagendorf, A.T. 1986. Evidence for multiple effects in the methanolactivation of chloroplast coupling factor 1. *Biochim. Biophys Acta* 848:92-98.

- Audus, L.J. 1979. The physiology and biochemistry of herbicides. Academic Press. UK. 395 pp.
- Balke, N.E. 1985. Effects of allelochemicals on mineral uptake and associated physiological processes. En: Thompson, A.C. (Ed.). The Chemistry of Allelopathy. ACS Symposium Series 268. USA. 161-178 pp.
- Barber, J. 1987. Composition, organization and dynamics of the thylakoid membrane in relation to its function. En: Stumpf, P.K. y Conn, E.E (Eds.). The Biochemistry of Plants. Vol. 10. Academic Press. New York. 75-130 pp.
- Baruah, N.C., Sarma, J.C., Barua, N.C., Sarma, S. y Sharma, R.P. 1994. Germination and growth inhibitory sesquiterpene lactones and a flavone from *Tithonia diversifolia*. Phytochemistry 36:29-36.
- Baskin, J.M., Ludlow, C.J., Harris, T.M. y Wolf, F.T. 1967. Psoralen, an inhibitor in the seeds of *Psoralea subcaulis* (Leguminosae). Phytochemistry 6:1209-1213.
- Beckers, G., Berzborn, R. y Strotmann, H. 1992. Zero-length crosslinking between subunits δ and I of the H^+ -translocating ATPase of chloroplasts. Biochim. Biophys Acta 1101:97-104.
- Berenbaum, M.R. 1991. Coumarins. En: Rosenthal, G.A. y Berenbaum, M.R. (Eds.). Herbivores their Interaction with Secondary Plant Metabolites. Vol. 1. Academic Press. New York. 221-249 pp.
- Calera, M.R., Anaya, A.L. y Gavilanes-Ruiz, M. 1995. Effect of phytotoxic resin glycoside on activity of H^+ -ATPase from plasma membrane. J. Chem. Ecol. 21:289-297.

- Cameron, H.J. y Julian, G.R. 1980. Inhibition of protein synthesis in lettuce (*Lactuca sativa* L.) by allelopathic compounds. *J. Chem. Ecol.* 6:989-995.
- Cárdenas, J., Slife, F.W., Hanson, J.B. y Butler, H. 1968. Physiological changes accompanying the death of cocklebur treated with 2,4-D. *Weed Sci.* 16:96-100.
- Cocolletzi, A. 1993. Estudio químico y biológico preliminar de *Ratibida mexicana* (Watson) Sharp (Asteráceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México.
- Crofts, A.R. 1966. Uptake of ammonium ion by chloroplasts, and the mechanism of amine uncoupling. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 24:127-134.
- Cruz Ortega, R., Anaya, A.L. y Ramos, L. 1988. Effects of allelopathic compounds on respiration and cell division of watermelon. *J. Chem. Ecol.* 14:71-86.
- Cruz Ortega, R., Anaya, A.L. y Gavilanes-Ruiz, M., Sánchez-Nieto, S. y Jimenéz Estrada, M. 1990. Effect of diacetyl piquerol on H⁺-ATPase activity of microsomes from *Ipomoea purpurea*. *J. Chem. Ecol.* 16:2253-2261.
- Chen, P.K. y Leather, G.R. 1990. Plant growth regulatory activities of artemisinin and its related compounds. *J. Chem. Ecol.* 16:1867-1876.
- Chen, P.K., Polatnick, M. y Leather, G.R. 1991. Comparative study on artemisinin, 2,4-D, and glyphosate. *J. Agric. Food Chem.* 39:991-994.
- Debus, R. 1992. The manganese and calcium ions of photosynthetic

- oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta* 1102:269-352.
- De Heij, H.T., Jochemsen, A.G., Willemsen, P.T.J. y Groot, G.S.P. 1984. Protein synthesis during chloroplasts development in *Spirodela oligorhiza*. *Eur. J. Biochem.* 138:161-168.
 - Deno, H., y Sugiura, M. 1984. Homology between the α and β subunits of chloroplast and bacterial proton translocating ATPase. *FEBS Lett.* 172:209-211.
 - Duke, S.O., Vaughn, K.C., Croom, E.M. y Elsohly, H.N. 1987. Artemisinin, a constituent of annual wormwood (*Artemisia annua*), is a selective phytotoxin. *Weed Sci.* 35:499-505.
 - Duke, S.O. 1991. Plant terpenoids as pesticides. En: Keeler, R.F. y Tu, A.T. (Eds.). *Handbook of Natural Toxins*. Vol. 6. Marcel Dekker. New York. 269-296 pp.
 - Einhellig, F.A. y Rasmussen, J.A. 1979. Effects of three phenolic acids on chlorophyll content and growth soybean and grain sorghum seedlings. *J. Chem. Ecol.* 5:815-824.
 - Einhellig, F.A. 1985. Allelopathy- A natural protection, allelochemicals. En: Mandava, N.B. (Ed.). *Handbook of Natural Pesticides: Methods*. Vol. 1. CRC Press, Inc., Boca Raton. Florida. 161-200 pp.
 - Einhellig, F.A. 1989. Interactive effects of allelochemicals and environmental stress. En: Chou, C.H. y Waller, G.R. (Eds.). *Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins and Insect Pheromones and Allomones*. Institute of Botany Academia Sinica Monograph Series no. 9. Taiwan. 101-118 pp.
 - Ellis, R.J. 1989. *Chloroplast biogenesis*. Cambridge University

Press. U.K. 346 pp.

- Ellmauerer, E., Pathak, V.P., Jakupovic, J., Bohlmann, F., Domínguez, X.A., King, R.M. y Robinson, H. 1987. 6-6-Lactonized xanthanolides from *Ratibida* species. *Phytochemistry* 26:159-163.
- Escoubas, P., Fukushi, Y., Lajide, L. y Mizutani, J. 1992. A new method for fast isolation of insect antifeedant compounds from complex mixtures. *J. Chem. Ecol.* 18:1819-1832.
- Faludi-Daniel, A., Schmidt, O., Szczepaniak, A. y Machold, O. 1983. Distribution of characteristic membrane proteins in granum and stroma thylakoids. *Eur. J. Biochem.* 131:567-570.
- Farron, F. 1970. Isolation and properties of a chloroplast coupling factor and heat-activated adenosine triphosphatase. *Biochem.* 9:3823-3828.
- Farron, F. y Racker, E. 1970. Studies on the mechanism of the conversion of coupling factor 1 from chloroplasts to an active adenosine triphosphatase. *Biochem.* 9:3829-3836.
- Feigin, A.M., Aronov, E., Teeter, J.H. y Brand, J.G. 1995. The properties of ion channels formed by the coumarin antibiotic, novobiocin, in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1234:43-51.
- Fischer, N.H., Weidenhamer, J.D. y Bradow, J.M. 1989. Inhibition and promotion of germination by several sesquiterpenes. *J. Chem. Ecol.* 15:1785-1793.
- Giardi, M.T., Marder, J.B. y Barber, J. 1988. Herbicide binding to the isolated photosystem reaction centre. *Biochem. Biophys*

Acta. 934:64-71.

- Grumbach, K.H. 1984. Herbicides which interfere with the biosynthesis of carotenoids and their effect on pigment excitation, chlorophyll fluorescence and pigment composition of the thylakoid membrane. *Z. Naturforsch.* 39c:455-458.
- Hagen, G. y Guilfoyle, J. 1985. Rapid induction of selective transcription by auxins. *Mol. Cell Biol.* 5:1197-1203.
- Harbone y Baxter, 1993. *Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants.* Taylor & Francis. UK. 791 pp.
- Harper, J.R. y Balke, N.E. 1981. Characterization of the inhibition of K⁺ absorption in oat roots by salicylic acid. *Plant Physiol.* 5:339-342.
- Hiller, R.G. y Goodchild, D.J. 1981. Thylakoid membrane and pigment organization. En: FALTA(Ed.). *The Biochemistry of Plants.* Vol. 8. Academic Press. New York. 1-49 pp.
- Hinkle, P.C. y McCarty, R.E. 1988. Cómo fabrican ATP las células. *Science* 240:58-75.
- Hudson, G.S. y Mason, J.G. 1988. The chloroplast genes encoding subunits of the H⁺-ATP synthase. *Photosyn. Res* 18:205-222.
- Huppatz, J.L. y Phillips, J.N. 1984. Cyanoacrylate inhibitors of the Hill reaction III. Stereochemical and electronic aspects of inhibitor binding. *Z. Naturforsch.* 39c:617-622.
- Ivie, G.W. y Witzel, D.A. 1983. Sesquiterpene lactones: structure, biological action and toxicological significance. En: Keeler R.F. y Tu, A.T. (Eds.). *Handbook of Natural Toxins.* Vol. 1. Marcel Dekker. New York. 543-584 pp.

- Izawa, S. y Good, N.E. 1983. Inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation. *Methods Enzymol.* 24:355-377.
- Jain, A. y Srivastava, H.S. 1981. Effect of salicylic acid on nitrate reductase activity in maize seedlings. *Physiol. Plant.* 5:339-342.
- Jankay, P. y Müller, W.H. 1976. The relationship among umbelliferone, growth, and peroxidase levels in cucumber roots. *Am. J. Bot.* 63:126-132.
- Kalsi, P.S., Goyal, R., Talwar, K.K. y Chhabra, B.R. 1989. Stereostructures of two biologically active sesquiterpene lactones from *Inula racemosa*. *Phytochemistry* 28:2093-2096.
- Kanazawa, H., Kayano, T., Kiyasu, T. y Futai, M. 1982. Nucleotide sequence of the genes for δ and ϵ subunits of proton-translocating ATPase from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys Res. Comm.* 105:1257-1264.
- Kanchan, S.D. 1975. Growth inhibitors from *Parthenium hysterophorus* Linn. *Curr. Sci.* 44:358-359.
- Ketcham, S.R., Davenport, J.W., Warncke, K. y McCarty, R.E. 1984. Role of the γ subunit of chloroplast coupling factor 1 in the light-dependent activation of photophosphorylation and ATPase activity by dithiotreitol. *J. Biol. Chem.* 259:7286-7293.
- Koepppe, D.E. 1972. Some reactions of isolated corn mitochondria influenced by juglone. *Physiol. Plant.* 27:89-94.
- Kolarov, J., Kulpa, J., Baijot, M. y Goffeau, A. 1988. Characterization of a protein serine kinase from yeast plasma

- membrane. 263:10613-10619.
- Kupchan, S.M., Fessler, D.C., Eakin, M.A. y Giacobbe, T.J. 1970. Reactions of alpha methylene lactone tumor inhibitors with model biological nucleophiles. *Science* 168:376-378.
 - Langenheim, J.H. 1994. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.* 20:1223-1280.
 - Leather, G.R. y Einhellig, F.A. 1988. Bioassay of naturally occurring allelochemicals for phytotoxicity. *J. Chem. Ecol.* 14:1821-1827.
 - Lehninger, A.L., Nelson, D.L. y Cox, M.M. 1993. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers. New York. 1013 pp.
 - Macías, F.A., Galindo, J.C.G. y Massanet, G.M. 1992. Potential allelopathic activity of several sesquiterpene lactone models. *Phytochemistry* 31:1969-1977.
 - Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Massanet, G.M., Rodríguez-Luis, F. y Zubía, E. 1993. Allelochemicals from *Pilocarpus goudotianus*. *J. Chem. Ecol.* 19:1371-1379.
 - Macías, F.A. 1995. Allelopathy in the search for natural herbicide models. En: Inderjit, Dakshini, K.M.M. y Einhellig, F.A. (Eds.). *Allelopathy: Organisms, Processes and Applications*. ACS Symposium Series 582. USA. 310-329 pp.
 - Martínez, M. 1989. *Las plantas medicinales de México*. Ediciones Bota. México. 657 pp.
 - Merchant, S. y Selman, B.R. 1983. Identification of the α and β subunits of the chloroplast coupling factor one in

Chlamydomonas reinhardtii. Eur. J. Biochem. 137:373-376.

- Moreland, D.E. 1980. Mechanisms of action of herbicides. Ann. Rev. Plant Physiol. 31:597-638.
- Nelson, N., Nelson, H. y Schatz, G. 1980. Biosynthesis and assembly of the proton-translocating adenosine triphosphatase complex from chloroplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. 77:1361-1364.
- Pfister, K. y Schreiber, U. 1984. Comparison of diuron- and phenol-type inhibitors: additional inhibitory action at the photosystem II donor site. 1984. Z. Naturforsch. 39c:389-392.
- Picman, A.K. 1986. Biological activities of sesquiterpene lactones. Biochem. System. Ecol. 14:255-281.
- Pick, U. y Bassilian, S. 1982. Activation of magnesium specific adenosine triphosphatase in chloroplasts coupling factor 1 by octyl glucoside. Biochemistry 21:6144-6152.
- Putnam, A.R. y Tang, Ch-S. 1986. Allelopathy: state of the science. En: Putnam, A.R. y Tang, Ch-S. (Eds.). The Science of Allelopathy. John Wiley & Sons. USA. 1-22 pp.
- Reguero, M.T., Mata, R., Bye, R., Linares, E. y Delgado, G. 1987. Chemical studies of Mexican Plants used in traditional medicine. II. Cucurbitacins from *Hintonia latiflora*. J. Nat. Prod. 50:315-319.
- Ren, M.M., Wei, J.M. y Shen, Y.K. 1995. Malate regulation of Mg^{2+} -ATPase of chloroplast coupling factor 1. Photosyn. Res. 43:19-35.
- Renger, G. 1979. Studies about the mechanism of herbicidal

- interaction with photosystem II in isolated chloroplast. *Z. Naturforsch.* 34c:1010-1013.
- Rice, E.L. 1984. Allelopathy. 2a ed. Academic Press. New York. USA. 422 pp.
 - Rice, E.L. 1987. Allelopathy - An overview. En: Waller, G.R. (Ed.). Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry. ACS Symposium Series 330. Washington, D.C. 8-22 pp
 - Rodermel, S.R. y Bogorad, L. 1985. Maize plastid photogenes: mapping and photoregulation of transcript levels during light-induced development. *J. Cell Biol.* 100:163-476.
 - Rodríguez, E. 1976. Sesquiterpene lactones: chemotaxonomy, biological activity and isolation. *Rev. Latinoamer. Quím.* 8:56-62.
 - Rottenberg, H. 1985. Proton-coupled energy conversion: chemiosmotic and intramembrane coupling. En: Foskett, J.K. y Grinstein, S. (Eds.). *Modern Cell Biology*. Alan R. Liss. New York. 4:47-83 pp.
 - Sato, T., Kiuchi, F. y Sankawa, U. 1982. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by cinnamic acid derivatives and related compounds. *Phytochemistry* 21:845-850.
 - Sánchez, M.P. y Soto, C.F. 1994. Compuestos bioactivos de *Ratibida mexicana* (Wats.) Sharp. (Asteráceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México.
 - Sánchez-Viesca, F. 1969. The structure of exostemin, a new 4-phenylcoumarin isolated from *Exostema caribaeum*. *Phytochemistry* 8:1821-1823.

- Sequeira, L., Hemingway, R.J. y Kupchan, J.M. 1968. Vernolepin, a new reversible plant growth. *Science* 161:789-790.
- Siderer, Y., Lavintman, N., Gilon, C. y Ohad, I. 1984. A nitroxide diuron as a probe for the mode of action of herbicides. *Z. Naturforsch.* 39c:342-346.
- Shimomura, H., Sashida, Y., Nakata, H., Kawasaki, J. e Ito, Y. 1982. Plant growth regulators from *Heracleum lanatum*. *Phytochemistry* 21:2213-2215.
- Shinohara, Y. y Terada, H. 1987. Possible involvement of the 29 kDa protein in H⁺-ATPase in the action of cationic uncoupler of oxidative phosphorylation. *Biochem. Biophys. Acta.* 890:387-391.
- Stenlid, G. 1970. Flavonoids as inhibitors of the formation of adenosin triphosphate in plant mitochondria. *Physiol. Plant* 9:2251-2256.
- Stevens, K.L. y Merrill, G.B. 1985. Sesquiterpene lactone and allelochemicals from *Centaurea* species. En: Thompson, A.C. (Ed.). *The Chemistry of Allelopathy Biochemical Interactions Among Plants.* ACS Symposium Series 268. USA. 92-98 pp.
- Stiles, L.H., Leather, G.R. y Chen, P.K. 1994. Effects of two sesquiterpene lactones isolated from *Artemisia annua* on physiology of *Lemna minor*. *J. Chem. Ecol.* 20:969-978.
- Terada, H., Nagamune, H., Morikawa, N. e Ikuno, M. 1985. Uncoupling of oxidative phosphorylation by divalent cationic cyanine dye. Participation of phosphate transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 807:168-176.

- Title, F.L., Goudey, J.S. y Spencer, M.S. 1990. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on endogenous cyanide, betacyanoalanine synthase activity, and ethylene evolution in seedlings of soybean and barley. *Plant Physiol.* 94:1143-1148.
- Tukey, H.B. 1969. Implications of allelopathy in agricultural plant science. *The Bot. Rev.* 35:1-16.
- Uribe, S., Alvarez, R. y Peña, A. 1984. Effects of δ -pinene, a non-substituted monoterpene, on rat liver mitochondria. *Pest. Biochem. Physiol.* 22:43-50.
- Uribe, S., Ramírez, J. y Peña, A. 1985. Effects of δ -pinene on yeast membrane functions. *J. Bacteriol.* 161:195-200.
- Vermeglio, A., Galmiche, J. M. y Girault, G. 1984. Mode of action of the ATP-ase inhibitor tri-n-butyl-tin in *Rhodospseudomonas sphaeroides* cells. En: Sybesma, C. (Ed.). *Advances in Photosynthesis Research*. Nijhoff, M. y Junk, W. Netherlands. II.6.611-II.6.614 pp.
- Voet, D. y Voet, J.G. 1990. *Biochemistry*. John Wiley & Sons. U.S.A. 1223 pp.
- Wacker, T.L., Safir, G.R. y Stephens, Ch.T. 1990. Effects of ferulic acid on *Glomus fasciculatum* and associated effects on phosphorus uptake and growth of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *J. Chem. Ecol.* 16(3):901-909.
- Wei, N. y Sadrzader, S.M. 1994. Enhancement of hemin-induced membrane damage by artemisinin. *Biochem. Pharmacol.* 48:737-741.
- Westhoff, P., Nelson, N., Bunemann, H., y Hermann, R.G. 1981.

Localization of genes for coupling factor subunits on the spinach plastid chromosome. *Curr. Genet.* 4:109-120.