

00582
2ej
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TITULO DE LA TESIS:

POTENCIALIDAD HERBICIDA DE LOS CROMENOS Y
BENZOFURANOS MAYORITARIOS AISLADOS DE
Helianthella quinquenervis (Hook.) A. Gray (Asteraceae)

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS (FARMACIA)

PRESENTA:

M. EN C. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LOPEZ

ASESOR:

DRA. RACHEL MATA DE ESPINDOLA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1998

260451



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE QUÍMICA
DIRECCIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ING. LEPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
Director General de la Administración Escolar
Presente.

AT'N: Lic. Antonio Díaz García
Jefe de la Unidad de Registro e Información

Me es grato informarle que el alumno **M EN C PERLA C. CASTAÑEDA LÓPEZ** presentará próximamente su examen para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas (Farmacia), ante el siguiente jurado:

Presidente:	Dr. Leovigildo Quijano (IQ)
Primer Vocal:	Dr. Blas Lotina Hennsen
Segundo Vocal:	Dra. Ana Luisa Anaya Lang (IFC)
Tercer Vocal:	Dr. Robert Bye (JB)
Secretario:	Dr. Mariano Martínez Vázquez (IQ)
Primer Suplente:	Dr. Guillermo Delgado Lamas (IQ)
Segundo Suplente:	Dr. Andrés Navarrete Castro

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F. a 18 de septiembre de 1997.

El Director

Dr. Enrique R. Bazúa Rueda

C.c.p.- Integrantes del Jurado
C.c.p.- Coordinador de Área
C.c.p.- Departamento de Control Escolar
C.c.p.- Interesado
CAPMDCQ*ggm.

SITIOS DE REALIZACION DE LA TESIS:

El presente trabajo de tesis se desarrollo en :

Laboratorio 124 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM.

Laboratorio 115 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM (realización de los ensayos para determinar la actividad fotosintética, sobre la respiración y cadena respiratoria mitocondrial, y producción de biomasa).

El aprendizaje de las técnicas de evaluación del potencial fitotóxico se realizó en el laboratorio de Ecología Química del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A mi co-tutor, el Dr. Blas Lotina-Hennsen Investigador del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química por su valiosa contribución para la realización del presente investigación. Así mismo, agradezco también sus comentarios, sugerencias y apoyo que permitieron llevar a buen término esta tesis.

A la Dra. Ana Luisa Anaya, por su valiosa asesoría durante el aprendizaje de las técnicas conducentes a la determinación del potencial fitotóxico del extracto y de los compuestos obtenidos en el presente trabajo y por sus valiosas discusiones relacionadas con el tópico de la Ecología Química.

Al Dr. Robert Bye, Director del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM por su colaboración en la colecta e identificación de las raíces de *H. quinquenervis*.

Al Dr. Roberto Zedillo, Investigador del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por la realización de los ensayos encaminados a determinar la posible actividad anti-amibiana de los constituyentes mayoritarios aislados en el presente estudio.

Al Dr. Jerry McLaughlin, Investigador de la Universidad de Purdue, Indiana, Estados Unidos, por facilitar los trámites necesarios para la determinación de la actividad citotóxica del extracto y de los compuestos obtenidos en el presente estudio.

A los miembros de mi comité tutelar integrado por los Doctores Leovigildo Quijano, Ana Luisa Anaya y Blas Lotina-Hennsen por el apoyo brindado durante la realización del presente proyecto de tesis.

A la M. en C. Isabel Chávez y Beatriz Quiroz de los laboratorios de RMN del Instituto de Química de la UNAM , por el registro de los espectros de RMN.

A la Q.F.B. Graciela Chávez y a la Q. Marisela Gutiérrez de la Facultad de Química de la UNAM por el registro de los estros de IR.

Al I.Q. Luis Velasco y al M. en C. Javier Pérez del laboratorio de espectrometría de masas del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de masas.

INDICE

Lista de Cuadros	iv
Lista de Figuras	vii
Lista de Gráficas	x
Lista de Espectros	xiii
Lista de Abreviaturas	xv
Resumen	xvii
Abstract	xxi

CONTENIDO

I. Antecedentes	
1.1 Generalidades sobre <i>H. quinquenervis</i> (Hook.) A. Gray	1
1.2 Generalidades sobre cromenos y benzofuranos aislados de la familia Asteraceae	6
1.3 El proceso de fotosíntesis como un blanco de acción de fitotoxinas	24
1.3.1 Generalidades sobre agentes herbicidas	24
1.3.2 El proceso de fotosíntesis	41
1.4 El proceso de la fosforilación oxidativa	53
II. Planteamiento del problema y objetivos	57
III. Parte experimental	
3.1 Material vegetal	62
3.2 Ensayos biológicos	
3.2.1 Evaluación del potencial fitotóxico	62
3.2.2 Determinación de la actividad fototóxica	64
3.2.3 Evaluación de la actividad citotóxica	65
3.2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana	65
3.2.4.1 Preparación de los microorganismos de prueba	66
3.2.4.2 Preparación de las muestras objeto de evaluación	66
3.2.4.3 Método de difusión en agar	67
3.2.4.4 Método de dilución en agar	67
3.2.5 Determinación del consumo de oxígeno en el proceso de germinación	68
3.2.6 Evaluación del efecto de la encecalina, la euparina, la desmetilencecalina, la 6-metoxitremetona y el extracto metanólico sobre la producción de biomasa en tres especies de arvenses	69
3.2.7 Determinación de los cambios estructurales de las radículas de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> inducidos por los tratamientos de la encecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4)	70
3.3 Determinación del efecto de la encecalina, la euparina y la desmetilencecalina sobre diferentes actividades de la fase luminosa de la fotosíntesis	72
3.3.1 Aislamiento de los cloroplastos	72
3.3.2 Cuantificación de clorofila	72
3.3.3 Bombeo de protones	73
3.3.4 Síntesis de ATP	74
3.3.5 Medición de la velocidad del transporte de electrones	75

3.3.6 Reacciones parciales de los fotosistemas I y II	76
3.3.6.1 Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FS I de DAD a MV	76
3.3.6.2 Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FS II de H ₂ O a DAD/K ₃ [Fe(CN) ₆]	77
3.3.6.3 Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FS II de DPC a DCPIP	77
3.3.7 Determinación del transporte de electrones basal y desacoplado a diferentes pHs	78
3.3.8 Determinación de la actividad de la enzima Mg ²⁺ -ATPasa	78
3.3.8.1 Activación de la enzima Mg ²⁺ -ATPasa	78
3.3.8.2 Hidrólisis de ATP y cuantificación de fosfatos	79
3.4 Determinación del efecto de la enecalina sobre la cadena respiratoria mitocondrial en mitocondrias aisladas de <i>P. vulgaris</i>	79
3.5 Estudio fitoquímico de la primera colecta de las raíces de <i>H. quinquenervis</i>	81
3.5.1 Extracción	81
3.5.2 Métodos cromatográficos	82
3.5.3 Fraccionamiento preliminar del extracto total	82
3.5.4 Aislamiento y purificación de los compuestos	
3.5.4.1 Obtención de la enecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4)	83
3.5.4.2 Obtención de la 6-metoxitremetona (131)	84
3.5.4.3 Obtención de la 6-hidroxi-3-metoxitremetona (132)	86
3.5.4.4 Obtención de la 4-β-D-glucopiranosil-3[3-metoxi- <i>trans</i> -isopenten-1-il]acetofenona (133)	87
3.6 Estudio fitoquímico de la segunda colecta de las raíces de <i>H. quinquenervis</i>	88
3.6.1 Extracción	88
3.6.2 Fraccionamiento preliminar del extracto total	88
3.6.3 Aislamiento y purificación de los compuestos	
3.6.3.1 Obtención del ácido angélico (134)	89
3.6.3.2 Obtención de la enecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4)	90
3.6.3.3 Obtención de la 6-metoxitremetona (131)	92
3.6.3.4 Obtención de la 4-β-D-glucopiranosil-3[3-metoxi- <i>trans</i> -isopenten-1-il]acetofenona (133)	93
3.7 Caracterización de los productos naturales	
3.7.1 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	93
3.7.2 Pruebas químicas preliminares para la identificación de glicósidos	94
3.7.2.1 Prueba de Molisch	94
3.7.2.2 Hidrólisis enzimática de 133 con β-glicosidasa	94
3.7.2.3 Hidrólisis ácida de 133	95
3.7.2.4 Detección de azúcares	95
IV. Resultados y discusión	
4.1 Pre-selección y selección de la especie <i>H. quinquenervis</i>	96
4.2 Aislamiento de los principios fitotóxicos a partir del extracto activo de <i>H. quinquenervis</i>	103

4.3 Caracterización de los compuestos aislados	104
4.3.1 Identificación de la enecalina, la euparina, la desmetilencecalina y la 6-hidroxi-3-metoxitremetona	104
4.3.2 Identificación de la 6-metoxitremetona	105
Identificación de la 4-β-D-glucopiranosil-3[3-metoxi- <i>trans</i> -isopenten-1-il]acetofenona (133)	112
4.4 Evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos aislados de <i>H. quinquenervis</i> sobre la germinación y el crecimiento radicular de dos especies de arvenses	120
4.5 Evaluación del efecto fototóxico potencial de los constituyentes mayoritarios de <i>H. quinquenervis</i>	127
4.6 Evaluación del efecto de la enecalina, la euparina y la desmetilencecalina sobre diversas actividades fotosintéticas.	132
4.6.1 Efecto sobre la síntesis de ATP y captación de protones	133
4.6.2 Efecto sobre el transporte de electrones	137
4.6.3 Caracterización del efecto de la enecalina y la desmetilencecalina sobre el transporte de electrones fotosintético	141
4.6.4 Efecto de la euparina sobre la actividad de la enzima Mg ²⁺ -ATPasa	147
4.6.5 Efecto de los compuestos 4, 13 y 45 en la velocidad del transporte de electrones desacoplado y basal a diferentes pHs	149
4.7 Evaluación del efecto de los constituyentes mayoritarios de <i>H. quinquenervis</i> sobre la respiración en el proceso de germinación de cuatro diferentes especies de semillas	153
4.7.1 Efecto de la enecalina	154
4.7.2 Efecto de la desmetilencecalina	158
4.7.3 Efecto de la euparina	161
4.8 Efecto de la enecalina, la euparina, la desmetilencecalina y la 6-metoxitremetona sobre la producción de biomasa de tres diferentes especies de malezas	167
4.9 Determinación de los cambios celulares inducidos por los tratamientos de la enecalina, la euparina y la desmetilencecalina sobre cortes semifinos de las radículas de las especies <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i>	183
4.10 Evaluaciones biológicas adicionales	188
4.10.1 Determinación del efecto citotóxico de los compuestos obtenidos de <i>H. quinquenervis</i>	189
4.10.2 Actividad antifúngica	191
V. Conclusiones	192
Perspectivas derivadas de la presente investigación	195
Bibliografía	197
Apendice I	212
Apendice I	216
Apendice III	248

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Cromenos y benzofuranos aislados de la familia Asteraceae de 1983 a la fecha	10
Cuadro 2. Ejemplos selectos de herbicidas comerciales sintéticos de uso comercial	26
Cuadro 3. Resúmen del fraccionamiento primario del extracto metanólico obtenido de las raices de la primera colecta de <i>H. quinquenervis</i>	83
Cuadro 4. Resúmen de la cromatografía en columna de la fracción primaria activa F ₁	84
Cuadro 5. Resúmen del fraccionamiento vía cromatografía en columna de la fracción bioactiva F ₃	86
Cuadro 6. Resúmen de la cromatografía en columna de la fracción primaria activa F ₄	86
Cuadro 7. Resúmen del proceso cromatográfico de la fracción F _{4-c} del Cuadro 6.	87
Cuadro 8. Resúmen del fraccionamiento en columna de la fracción primaria F _{6c} .	87
Cuadro 9. Resúmen del fraccionamiento primario del extracto metanólico obtenido de las raíces de la segunda colecta de <i>H. quinquenervis</i>	89
Cuadro 10. Resúmen del proceso cromatográfico de la fracción primaria F _{II}	90
Cuadro 11. Resúmen del proceso cromatográfico de la fracción secundaria F _{II-b}	91
Cuadro 12. Resúmen del proceso cromatográfico de la fracción primaria F _{III}	92
Cuadro 13. Efecto del extracto metanólico de las raíces de <i>H. quinquenervis</i> sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> .	97
Cuadro 14. Resultados obtenidos de la evaluación de la	98

producción de biomasa del extracto metanólico sobre tres especies de malezas	
Cuadro 15. Efecto de las fracciones primarias F ₁ a F ₆ sobre la germinación y el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i>	99
Cuadro 16. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la encecalina (13) y la desmetilencecalina (4).	105
Cuadro 17. Valores para los desplazamientos químicos (δ) en la RMN ¹ -H y de ¹³ -C de la encecalina (13) y la desmetilencecalina (4).	105
Cuadro 18. Constantes físicas y espectroscópicas de la euparina (45).	106
Cuadro 19. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la 6-hidroxi-3-metoxitremetona (132).	106
Cuadro 20. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la 6-metoxitremetona (131).	108
Cuadro 21. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la 4- β -D-glucopiranosil-3-[3-metoxi- <i>trans</i> -isopenten-1-il]-acetofenona (133).	112
Cuadro 22. Datos espectroscópicos de RMN ¹ -H y de ¹³ -C para los compuestos 133 y 133-A.	117
Cuadro 23. Efecto de los compuestos aislados de <i>H. quinquenervis</i> sobre la germinación y el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> .	120
Cuadro 24. Efecto fototóxico de los compuestos mayoritarios aislados de <i>H. quinquenervis</i> sobre la germinación y el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i>	130
Cuadro 25. Valores de CI ₅₀ de la encecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4) en la fotofosforilación, captación de protones y transporte de electrones.	134
Cuadro 26. Efecto de la encecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4) sobre el transporte de electrones comparado con el control (100% de actividad).	139
Cuadro 27. Resultados obtenidos de la evaluación de la producción	167

de biomasa de la enecalina sobre tres especies de malezas.	
Cuadro 28. Resultados obtenidos de la evaluación de la producción de biomasa de la euparina, la desmetilencecalina y la 6-metoxitremetona sobre tres especies de malezas	168
Cuadro 29. Resultados obtenidos para los compuestos obtenidos de la especie <i>H. quinquenervis</i> sobre tres líneas celulares.	189
Cuadro 30. Resultados de la actividad antimicrobiana de los constituyentes mayoritarios sobre <i>E. hystolitica</i> y <i>G. liamblia</i> .	196

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Helianthella quinquenervis</i> (Hook.) A. Gray	2
Figura 2. Metabolitos secundarios aislados de <i>Helianthella uniflora</i> (Bohlmann y Grenz, 1970)	3
Figura 3. Metabolitos secundarios aislados de <i>Helianthella quinquenervis</i> (Herz y Kulanthaivel, 1984).	5
Figura 4. Formación del anillo heterocíclico de los cromenos y los benzofuranos	7
Figura 5. Mecanismo postulado para los precocenos I y II	23
Figura 6. Estructura del cloroplasto y componentes de la fase luminosa dentro de la membrana tilacoidal	42
Figura 7. Representación esquemática del centro de reacción del fotosistema II de plantas superiores	45
Figura 8. Sitio de unión de los herbicidas tipo diurón y tipo fenol	47
Figura 9. Características estructurales de los herbicidas pertenecientes a la familia de las ureas y las triazinas	47
Figura 10. Síntesis de ATP en mitocondrias vegetales cuando electrones se transfieren desde NADH, succinato, malato, etc hasta O ₂	54
Figura 11. Efecto herbicida post-emergente del extracto metanólico (53 µg/mL) sobre las plántulas de <i>A. hypochondriacus</i> (días 3 y 7)	100
Figura 12. Efecto herbicida post-emergente del extracto metanólico (53 µg/mL) sobre las plántulas de <i>T. alexandrinum</i> (días 1,3, 8 y 10)	101
Figura 13. Efecto herbicida post-emergente del extracto metanólico (53 µg/mL) sobre las plántulas de <i>E. crusgalli</i> (días 1, 8 y 10)	102
Figura 14. Espectro COSY (¹ H- ¹ H) de la 6-metoxitremetona (<u>132</u>)	110
Figura 15. Espectro COSY (¹ H- ¹ H) de la 4-β-D-glucopiranosil-3-[3- metoxi- <i>trans</i> -isopenten-1-il]-acetofenona (<u>133</u>)	114
Figura 16. Correlación homonuclear de H-5'/H-5, H-2'/H-2, H-1'/H-2 en el espectro NOESY del compuesto (<u>133</u>)	116
Figura 17. Correlación heteronuclear de C-1/H-5, C-4/H-5, C-7/H-2,	118

C-4/H-2 y C-1'/H-2 en el espectro HMBC del compuesto (133)	
Figura 18. Efecto de la encecalina sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i>	124
Figura 19. Determinación del transporte de electrones de H ₂ O a MV	133
Figura 20. Determinación del flujo de electrones desacoplado en el fotosistema I de DAD a MV	135
Figura 21. Efecto de la encecalina y la desmetilenceclina sobre el transporte de electrones en los fotosistemas I y II	143
Figura 22. Determinación del flujo de electrones desacoplado en el fotosistema II de H ₂ O a DAD/K ₃ Fe(CN) ₆	144
Figura 23. Determinación del flujo de electrones desacoplado en el fotosistema II de H ₂ O a SiMo, de DPC a DCPIP	145
Figura 24. Determinación del flujo de electrones desacoplado en el fotosistema II de DPC (H ₂ O) a DCPIP (cit b ₆ /f)	145
Figura 25. Representación esquemática del mecanismo hipotético de la desmetilencecalina (A) y la encecalina (B) sobre el transporte de electrones en el fotosistema II	151
Figura 26. Efecto demostrado por la encecalina en la síntesis de ATP en la cadena respiratoria mitocondrial.	167
Figura 27. Efecto post-emergente de la encecalina (13) sobre plántulas de <i>A. hypochondriacus</i> (día 1)	170
Figura 28. Efecto post-emergente de la encecalina (13) sobre plántulas de <i>T. alexandrinum</i> (días 3, 8 y 10)	171
Figura 29. Efecto post-emergente de la encecalina (13) sobre plántulas de <i>E. crusgalli</i> (días 1, 8 y 10)	172
Figura 30. Efecto post-emergente de la euparina (45) sobre plántulas de <i>A. hypochondriacus</i> (días 3 y 7)	173
Figura 31. Efecto post-emergente de la euparina (45) sobre plántulas de <i>T. alexandrinum</i> (días 3, 8 y 10)	174
Figura 32. Efecto post-emergente de la euparina (45) sobre plántulas de <i>E. crusgalli</i> (días 1, 8 y 10)	175

Figura 33. Efecto post-emergente de la desmetilencecalina (4) sobre plántulas de <i>A. hypochondriacus</i> (días 3 y 7)	176
Figura 34. Efecto post-emergente de la desmetilencecalina (4) sobre plántulas de <i>T. alexandrinum</i> (días 1, 3, 8 y 10)	177
Figura 35. Efecto post-emergente de la encecalina (13) sobre plántulas de <i>E. crusgalli</i> (días 1, 8 y 10)	178
Figura 36. Efecto post-emergente de la 6-metoxitremetona (132) sobre plántulas de <i>A. hypochondriacus</i> (días 3 y 7)	179
Figura 34. Efecto post-emergente de la 6-metoxitremetona (132) sobre plántulas de <i>T. alexandrinum</i> (días 1, 3, 8 y 10)	180
Figura 35. Efecto post-emergente de la 6-metoxitremetona (132) sobre plántulas de <i>E. crusgalli</i> (días 1, 8 y 10)	181
Figura 38. Ultraestructura de las células parenquimatosas de la radícula de <i>A. hypochondriacus</i>	182
Figura 39. Ultraestructura de las células parenquimatosas de la radícula de <i>A. hypochondriacus</i> frente al tratamiento de la encecalina (100 µg/mL)	182
Figura 40. Ultraestructura de las células parenquimatosas de la radícula de <i>A. hypochondriacus</i> frente al tratamiento de la euparina (100 µg/mL)	183
Figura 41. Ultraestructura de las células parenquimatosas de la radícula de <i>A. hypochondriacus</i> frente al tratamiento de la desmetilencecalina (100 µg/mL)	183
Figura 42. Ultraestructura de las células parenquimatosas de la radícula de <i>E. crusgalli</i>	184
Figura 43. Ultraestructura de las células parenquimatosas de la radícula de <i>E. crusgalli</i> frente al tratamiento de la encecalina (50 µg/mL)	184
Figura 44. Ultraestructura de las células parenquimatosas de la radícula de <i>E. crusgalli</i> frente al tratamiento de la euparina (50 µg/mL)	185
Figura 45. Ultraestructura de las células parenquimatosas de la radícula de <i>E. crusgalli</i> frente al tratamiento de la desmetilencecalina (100 µg/mL)	185

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 1. Efecto fitotóxico de la enecalina (13) sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> .	121
Gráfica 2. Efecto fitotóxico de la euparina (45) sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> .	121
Gráfica 3. Efecto fitotóxico de la desmetilencecalina (4) sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i>	122
Gráfica 4. Efecto fitotóxico de la 6-hidroxi-3-metoxitremetona (131) sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i>	122
Gráfica 5. Efecto fitotóxico de la 6-metoxitremetona (132) sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i>	123
Gráfica 6. Efecto fitotóxico de la 4-β-D-glucopiranosil-3-[3-metoxi- <i>-trans</i> -isopenten-1-il]-acetofenona (133) sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i>	123
Gráfica 7. Efecto fototóxico de la enecalina (13) sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i>	128
Gráfica 8. Efecto fototóxico de la euparina (45) sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i>	129
Gráfica 9. Efecto fototóxico de la desmetilencecalina (4) sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i>	129
Gráfica 10. Efecto de la enecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4) sobre la síntesis de ATP	135
Gráfica 11. Efecto de la enecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4) sobre la captación de H ⁺	135
Gráfica 12. Efecto de la enecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4) sobre el transporte de electrones basal	137
Gráfica 13. Efecto de la enecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4) sobre el transporte de electrones fosforilante	137
Gráfica 14. Efecto de la enecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4) sobre el transporte de electrones desacoplado	139
Gráfica 15. Efecto de la enecalina (13) y la desmetilencecalina (4)	142

sobre el transporte de electrones del fotosistema I	
Gráfica 16. Efecto de la encecalina (13) y la desmetilencecalina (4)	144
sobre el transporte de electrones del fotosistema II	
Gráfica 17. Efecto de la euparina (45) sobre la actividad de la enzima	148
Mg ²⁺ -ATPasa	
Gráfica 18. Efecto de la encecalina (13) y la desmetilencecalina (4)	150
sobre el transporte de electrones desacoplado a diferentes pHs.	
Gráfica 19. Efecto de la euparina (45) sobre el transporte de electrones	150
desacoplado a diferentes pHs.	
Gráfica 20. Efecto de la encecalina (13) sobre el consumo de O ₂ de	154
las semillas de <i>A. hypochondriacus</i>	
Gráfica 21. Efecto de la encecalina (13) sobre el consumo de O ₂	154
de las semillas de <i>E. crusgalli</i>	
Gráfica 22. Efecto de la encecalina (13) sobre el consumo de O ₂	155
de las semillas de <i>Z. Mais</i>	
Gráfica 23. Efecto de la encecalina (13) sobre el consumo de O ₂	155
de las semillas de <i>P. sativum</i>	
Gráfica 24. Efecto de la encecalina (13) sobre el consumo de O ₂	156
de las semillas de <i>P. ixocarpa</i>	
Gráfica 25. Efecto de la desmetilencecalina (4) sobre el consumo de O ₂	157
de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i>	
Gráfica 26. Efecto de la desmetilencecalina (4) sobre el consumo de O ₂	158
de las semillas de <i>E. crusgalli</i>	
Gráfica 27. Efecto de la desmetilencecalina (4) sobre el consumo de O ₂	159
de las semillas de <i>Z. mais</i>	
Gráfica 28. Efecto de la desmetilencecalina (4) sobre el consumo de O ₂	159
de las semillas de <i>P. ixocarpaç</i>	
Gráfica 29. Efecto de la desmetilencecalina (4) sobre el consumo de O ₂	160
de las semillas de <i>P. sativum</i>	
Gráfica 30. Efecto de la euparina (45) sobre el consumo de O ₂ de las	161
semillas de <i>A. hypochondriacus</i>	
Gráfica 31. Efecto de la euparina (45) sobre el consumo de O ₂ de las	162

semillas de <i>E. crusgalli</i>	
Gráfica 32. Efecto de la euparina (45) sobre el consumo de O ₂ de las semillas de <i>P. ixocarpa</i>	162
Gráfica 33. Efecto de la euparina (45) sobre el consumo de O ₂ de las semillas de <i>Z. Mais</i>	163
Gráfica 33. Efecto de la euparina (45) sobre el consumo de O ₂ de las semillas de <i>P. sativum</i>	163

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. Espectro de IR de la desmetilencecalina (4)	217
Espectro 2. Espectro de RMN- ¹ H de la desmetilencecalina (4)	218
Espectro 3. Espectro de RMN- ¹³ C de la desmetilencecalina (4)	219
Espectro 4. Espectro de RMN- ¹³ C modalidad DEPT de la desmetilencecalina (4)	220
Espectro 5. Espectro de masas de la desmetilencecalina (4)	221
Espectro 6. Espectro de IR de la euparina (45)	222
Espectro 7. Espectro de RMN- ¹ H de la euparina (45)	223
Espectro 8. Espectro de RMN- ¹ H modalidad COSY de la euparina (45)	224
Espectro 9. Espectro de RMN- ¹³ C de la euparina (45)	225
Espectro 10. Espectro de RMN- ¹³ C modalidad DEPT de la euparina (45)	226
Espectro 11. Espectro de masas de la euparina (45)	227
Espectro 12. Espectro de IR de la enecalina (13)	228
Espectro 13. Espectro de RMN- ¹ H de la enecalina (13)	229
Espectro 14. Espectro de RMN- ¹³ C de la enecalina (13)	230
Espectro 15. Espectro de RMN- ¹³ C modalidad DEPT de la encecalina (13)	231
Espectro 16. Espectro de masas de la enecalina (13)	232
Espectro 17. Espectro de IR de la 6-hidroxi-3-metoxitremetona (132)	233
Espectro 18. Espectro de RMN- ¹ H de la 6-hidroxi-3-metoxi tremetona (132)	234
Espectro 19. Espectro de RMN- ¹³ C de la 6-hidroxi-3-metoxi tremetona (132)	235
Espectro 20. Espectro de masas de la 6-hidroxi-3-metoxitremetona (132)	236
Espectro 21. Espectro de IR de la 6-metoxitremetona (131)	237
Espectro 22. Espectro de RMN- ¹ H de la 6-metoxitremetona (131)	238
Espectro 23. Espectro de RMN- ¹³ C de la 6-metoxitremetona (131)	239
Espectro 24. Espectro de RMN- ¹³ C modalidad DEPT de la 6-metoxi tremetona (131)	240
Espectro 25. Espectro de masas de la 6-metoxitremetona (131)	241

Espectro 26. Espectro de IR de la 4-β-D-glucopiranosil-3-[3-metoxi- <i>trans</i> -isopenten-1-il]-acetofenona (133)	242
Espectro 27. Espectro de RMN- ¹ H de la 4-β-D-glucopiranosil-3-[3-metoxi- <i>rans</i> -isopenten-1-il]-acetofenona (133)	243
Espectro 28. Espectro de RMN- ¹³ C de la 4-β-D-glucopiranosil-3-[3-metoxi- <i>trans</i> -isopenten-1-il]-acetofenona (133)	244
Espectro 29. Espectro de masas de la 4-β-D-glucopiranosil-3-[3-metoxi- <i>trans</i> -isopenten-1-il]-acetofenona (133)	245
Espectro 30. Espectro de RMN- ¹ H de la 4-hidroxi-3-[3-metoxi- <i>trans</i> -isopenten-1-il]-acetofenona (133)	246
Espectro 31. Espectro de RMN- ¹³ C de la 4-hidroxi-3-[3-metoxi- <i>trans</i> -isopenten-1-il]-acetofenona (133)	247

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
ccf	cromatografía en capa fina
ccfp	cromatografía en capa fina preparativa
Cit b ₆ /f	complejo citocromo b ₆ /f
Cit c	citocromo c
CL ₅₀	concentración letal media
CIM	concentración inhibitoria mínima
CHCl ₃	cloroformo
COSY	espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear (¹ H- ¹ H)
CDCl ₃	cloroformo deuterado
d	doblete
da	doblete ancho
DAD	diamino-dureno
DBMIB	dibromometilisopropil- <i>p</i> -benzoquinona
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1 dimetilurea
DCPIP	2,6-diclorofenol-indofenol
DL ₅₀	dosis letal media
DE ₅₀	dosis efectiva media
DPC	difenilcarbazida
dd	doble de dobles
DMSO	dimetilsulfóxido
EMIE	espectro de masas por impacto electrónico
EDTA	ácido etilen-diamino-tetraacético
eV	electron volts
FAB	bombardeo rápido de átomos
Fd	ferredoxina
FCCP	carbonil-cianuro- <i>p</i> -trifluorometoxifenilhidrazona
FS I	fotosistema I

FS II	fotosistema II
H ⁺ -ATPasa	complejo multienzimático que se encarga de sintetizar ATP
HEPES	ácido N-(2-hidroxietilpiperazin-N'-(2-etansulfónico)
HETCOR	espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear (¹ H- ¹³ C)
HMBC	espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear (¹ H- ¹³ C)
J	constante de acoplamiento
IR	infrarojo
m	multiplete
MES	ácido 4-morfolin-etanosulfónico
Mhz	megahertz
NADP*	fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado
NADPH	fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
NOESY	efecto nuclear de Overhauser
P ₆₈₀ *	centro de reacción oxidado del FS II
P ₇₀₀	centro de reacción del FS I
P ₇₀₀ *	centro de reacción oxidado del FS I
ppm	partes por millón
PQ	plastoquinona
q	cuarteto
Q _A	quinona primaria del fotosistema II
Q _B	quinona secundaria del fotosistema II
t	tripleto
TCA	ácido tricloroacético
TMS	tetrametilsilano
TRIS	tris-(hidroximetil)aminometano
MV	metil-viológeno

RESUMEN

Potencialidad herbicida de los cromenos y benzofuranos mayoritarios aislados de la especie *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray (Asteraceae)

La presente disertación doctoral describe la investigación realizada para ~~determinar el potencial herbicida de los compuestos obtenidos de la especie~~ *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray.

La selección del material vegetal se realizó considerando los resultados obtenidos de una serie de ensayos biológicos preliminares sobre extractos orgánicos preparados a partir de diversas especies vegetales mexicanas, las cuales, se preseleccionaron de acuerdo con dos de los criterios más importantes para la obtención de principios bioactivos: el etnobotánico y el quimiotaxonómico.

El ensayo biológico de selección consistió en la determinación del efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* L y *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv.

El fraccionamiento biodirigido del extracto activo (MeOH) obtenido a partir de las raíces de *H. quinquenervis*, empleando como bioensayo de monitoreo la determinación del crecimiento radicular y la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*, condujo al aislamiento de cinco metabolitos secundarios: la encecalina, la euparina, la desmetilencecalina, la 6-hidroxi-3-metoxitremetona y la 6-metoxitremetona, constituyendo este último un nuevo producto natural. Por otra parte, de las fracciones inactivas precipitó un compuesto que se caracterizó como la 4- β -D-glucopiranosil-3-[3-metoxi-*trans*-isopenten-1-il]-aceto-fenona; cabe destacar que este compuesto representa también un producto natural novedoso.

De manera general, las estructuras de los compuestos aislados se establecieron mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales.

En los estudios de la valoración de la actividad fitoinhibidora de los productos naturales aislados sobre el crecimiento vegetal, la encecalina y la 6-

metoxitremetona demostraron una inhibición significativa para las dos especies de plantas arvenses de prueba. La encecalina, fue el producto más potente que inhibió el crecimiento radicular de *E. crusgalli* y *A. hypochondriacus*; las concentraciones inhibitoras media calculadas (CI_{50}), son 6 y 7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estos resultados demostraron claramente la potencialidad herbicida del cromeno.

Así mismo, se determinó el potencial fototóxico de estos mismos compuestos mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento vegetal de las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli* bajo irradiación con luz UV. Los resultados obtenidos de estas evaluaciones, permitieron establecer que la actividad fitotóxica observada para la encecalina, la euparina y la desmetilencecalina no está mediada por un efecto fototóxico.

Con el objetivo de explorar de manera mas detallada el potencial herbicida de los constituyentes fitotóxicos mayoritarios, se determinó el efecto de los mismos sobre el proceso de fotosíntesis en cloroplastos aislados de *Spinacea oleraceae* y sobre la respiración durante el proceso de germinación de cuatro especies de semillas: *A. hypochondriacus*, *E. crusgalli*, *Z. mais* y *P. ixocarpa*.

Las actividades fotosintéticas evaluadas incluyeron: síntesis de ATP, transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado y bomba de H^+ .

La encecalina y la desmetilencecalina inhibieron las actividades antes mencionadas de manera dependiente de la concentración, por lo que se estableció que ambos compuestos actúan como inhibidores de la reacción de Hill. Con el objetivo de establecer el sitio de interacción de estos compuestos, se determinó su efecto a nivel de los fotosistemas I y II. Debido a que ambos productos inhibieron las reacciones parciales de H_2O a SiMo y de DPC a DCPIP del fotosistema II, el sitio de inhibición se localizó en el intervalo de P_{680} a Q_A de la cadena de transporte de electrones.

Por otra parte, la euparina inhibió la síntesis de ATP, la bomba de protones y el transporte de electrones basal y fosforilante, pero no afectó el desacoplado; así mismo inhibió la actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa. Estos resultados

permitieron establecer que la euparina actúa como un inhibidor de la transferencia de energía.

Con respecto a los experimentos de respiración, se determinó el efecto de la enecalina, la euparina y la desmetilencecalina sobre el consumo de O₂ durante el proceso de germinación de cuatro diferentes especies de semillas. Los resultados indicaron que la euparina y la desmetilencecalina inhiben moderadamente la respiración de las semillas de *P. ixocarpa* y de los embriones de maíz (*Z. mais*) a las mayores concentraciones de prueba. Por otra parte, la enecalina reveló un efecto de activación significativo sobre el consumo de O₂ de las semillas evaluadas.

Considerando la actividad significativa desacoplante de la enecalina sobre la respiración en el proceso de germinación, se procedió a determinar su efecto sobre el transporte de electrones mitocondrial utilizando mitocondrias aisladas de *Phaseolus vulgaris*. Los resultados obtenidos indicaron que la enecalina activa considerablemente el transporte de electrones mitocondrial, por lo que se le caracterizó como un inhibidor del proceso de la fosforilación oxidativa.

Dado el potencial fitotóxico demostrado por la enecalina para las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*, se determinó su efecto post-emergente sobre la producción de biomasa de tres diferentes especies de malezas: *A. hypochondriacus*, *E. crusgalli* y *T. alexandrinum*. De manera adicional, se determinó también el efecto de la euparina, la desmetilencecalina y la 6-metoxitremetona sobre estas mismas especies. La enecalina y la euparina además de inducir daños sobre las plántulas tales como necrosis y desecación de las partes aéreas, disminuyeron significativamente la producción de biomasa de las especies *E. crusgalli* y *T. alexandrinum*.

Con la finalidad de determinar si los compuestos fitotóxicos afectan la estructura celular fina, se analizaron los cambios celulares inducidos por los tratamientos de enecalina, euparina y desmetilencecalina sobre cortes semifinos de las radículas de las especies de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*, para ello se

utilizó empleando para ello la técnica de la microscopía electrónica. Los tres compuestos de prueba, demostraron un daño celular severo a nivel de las mitocondrias, siendo más evidente el efecto para la especie de *A. hypochondriacus*. Con respecto a los resultados obtenidos para la especie de *E. crusgalli*, no se observan cambios considerables con los tratamientos de los tres compuestos.

Por último, con la finalidad de ampliar el conocimiento de la potencialidad de *H. quinquenervis* como una fuente de productos naturales de interés medicinal, se determinó el efecto citotóxico y antifúngico del extracto y los productos naturales encecalina, euparina y desmetilencecalina.

El efecto citotóxico se determinó sobre tres líneas celulares derivadas de tumores humanos. La encecalina presentó una moderada actividad citotóxica para las líneas celulares de carcinoma de mama (MCF-7) y adenocarcinoma de colon (HT-29); en ambos casos se obtuvo un valor para la DE_{50} de 2 $\mu\text{g/mL}$.

La determinación del efecto antifúngico de los compuestos mayoritarios aislados se realizó utilizando como microorganismos de prueba *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. Los resultados obtenidos indicaron que el extracto, la encecalina y la desmetilencecalina presentaron una moderada actividad antifúngica contra *T. mentagrophytes*. Ninguno de los compuestos mostró actividad contra *C. albicans* y *A. niger*.

El efecto herbicida post-emergente significativo demostrado por la encecalina y la euparina sobre las especies de prueba, permite colocarlos como posibles candidatos para el desarrollo de agentes herbicidas potenciales.

ABSTRACT

In the course of our continuing search for bioactive compounds from mexican medicinal plants, we carry out a general screening on several plant extracts for plant-growth inhibiting properties. These bioassays allowed to select *H. quinquenervis* as a source of potential herbicide agents.

The active extract of *H. quinquenervis*, was fractionated by column chromatography over Si gel, using the phyto-growth-inhibitory bioassay at each step for activity-directed fractionation. This procedure, afforded five secondary metabolites: encecalin, euparin, demethylencecalin, 6-hydroxy-3-methoxytremetone and one new benzofuran, 6-methoxytremetone.

On the other hand, from one inactive fraction precipitate a new secondary metabolite characterized as 4- β -D-glucopyranosyloxy-3-[3-methoxy-*trans*-isopenten-1-yl]acetophenone.

The isolated compounds were identified by spectroscopic and spectrometric means.

The six compounds, were also evaluated for their ability to inhibit the radical growth of two target species. According to the results, encecalin reduced significantly the radicle growth of *A. hypochondriacus* (CI_{50} = 7 μ g/mL) and *Echinochloa crusgalli* (CI_{50} = 6 μ g/mL) in a concentration dependent manner.

In addition, the phototoxic effect of these compounds was also evaluated and the results obtained showed that the phytotoxic effect displayed by encecalin, euparin and demethylencecalin is not due to a phototoxic effect.

In order to further explore the herbicidal potential of the major phytotoxic compounds of *H. quinquenervis*, their effect on several photosynthetic activities in chloroplasts isolated of *Spinaceae oleraceae*. The photosynthetic activities included: ATP synthesis, proton uptake, basal, uncoupled and phosphorylating electron flow.

Encecalin and demethylencecalin inhibited these activities in a concentration dependent manner; therefore, they were characterized as Hill reaction inhibitors. These compounds, did not affect photosystem I (electron

transport from DAD to MV) but they inhibited photosystem II (from H₂O to 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-1,4-p-benzoquinone). Since these compounds inhibit electron flow in the photosystem II partial reactions from H₂O to SiMo and from DPC to DCPIP the site of inhibition was located in the span from P₆₈₀ to Q_A of the electron transport chain.

On the other hand, euparin inhibited ATP synthesis, proton uptake and basal and phosphorylating electron flow, but it has not affect the uncoupled electron flow from H₂O to MV. Mg²⁺-ATPase activity from bound membrane thylakoid chloroplasts was also inhibited by this compound. Then, these results suggested that euparin act as energy-transfer inhibitor.

The effect of encecalin, euparin and demethylenencecalin on O₂ uptake of four plant species (*P. ixocarpa*, *Z. mays*, *P. sativum*, *E. crusgalli* and *A. hypochondriacus*) was studied. Euparin and demethylenencecalin inhibited moderately O₂ uptake of the *P. ixocarpa* and *Z. mays* seeds. The respiration of the target seeds was significantly stimulated by the encecalin treatments. Considering these results, the effect of encecalin on mitochondrial electron flow was also evaluated using mitochondrias isolated from bean roots. The results indicated that this chromene stimulated significantly the mitochondrial electron flow; therefore, it was characterized as an uncoupler of the oxidative phosphorylation.

In spite of the phytotoxic potential demonstrated by encecalin, we examine the effect of this compound on biomass production of three plant species; in addition, the effect of euparin, demethylenencecalin and 6-methoxytremetone was evaluated. Encecalin and euparin, induced necrosis and dryness of the foliage. Furthermore, both compounds decreased significantly biomass production of *E. crusgalli* and *T. alexandrinum*.

The celular changes induced by encecalin, euparin and demethylenencecalin treatments on semifine corts of *A. hypochondriacus* and *E. crusgalli* radicles, employing the electron microscopy technique was also investigated. Three compounds showed significant celular injury in the mitochondria organeles of *A. hypochondriacus*.

Finally, the cytotoxic and antifungal potential of encecalin, euparin and demethylencecalin were evaluated. The cytotoxicity was assessed against three human solid tumor cell lines [lung carcinoma (A-549), breast carcinoma (MCF-7) and colon adenocarcinoma (HT-29)]. Only demethylencecalin showed weak cytotoxicity against MCF-7 and HT-29 human solid tumor cells.

The antifungal bioassay was performed by the agar dilution procedure against *C. albicans*, *T. mentagrophytes* and *A. niger*. Euparin and demethylencecalin showed antifungal activity against *T. mentagrophytes* (MIC values, 58 and 29 $\mu\text{g/mL}$, respectively).

I. ANTECEDENTES

1.1 GENERALIDADES SOBRE *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray

El género *Helianthella* (Asteraceae) incluye tres especies: *Helianthella uniflora*, *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray y *Helianthella madreensis* Wats. las cuales, se distribuyen en el oeste de los Estados Unidos, Canadá y México (Weber 1952).

Helianthella quinquenervis (Hook.) A. Gray (Figura 1), es una hierba perenne que crece en los bosques de pino-roble de las Sierras Madre Occidental y Madre Oriental de México (Bye, 1985). Los indios tarahumaras de Chihuahua denominan a la especie con el nombre de *rarésoa*. En las prácticas medicinales de este grupo de indígenas, la raíz pulverizada se aplica tópicamente al cuerpo de humanos y animales domésticos para eliminar los ectoparásitos. La decocción de las raíces se utiliza también para el mismo propósito, así como para mejorar la calidad del cabello y para el tratamiento de trastornos gastrointestinales y úlceras (Bye, 1985).

Estudios fitoquímicos de las partes aéreas de las especies *H. uniflora* y *H. quinquenervis* permitieron el aislamiento e identificación de cuatro prenilacetofenonas, así como de diversos benzopiranos y benzofuranos (Bohlmann y Grenz, 1970; Herz y Kulanthaivel, 1984). En las Figuras 2 y 3 se muestran las estructuras de los metabolitos secundarios aislados de ambas especies.

Así mismo, el estudio del néctar extrafloral de *H. quinquenervis* reveló la presencia de 29 aminoácidos (Inouye e Inouye, 1980). Por último, un estudio

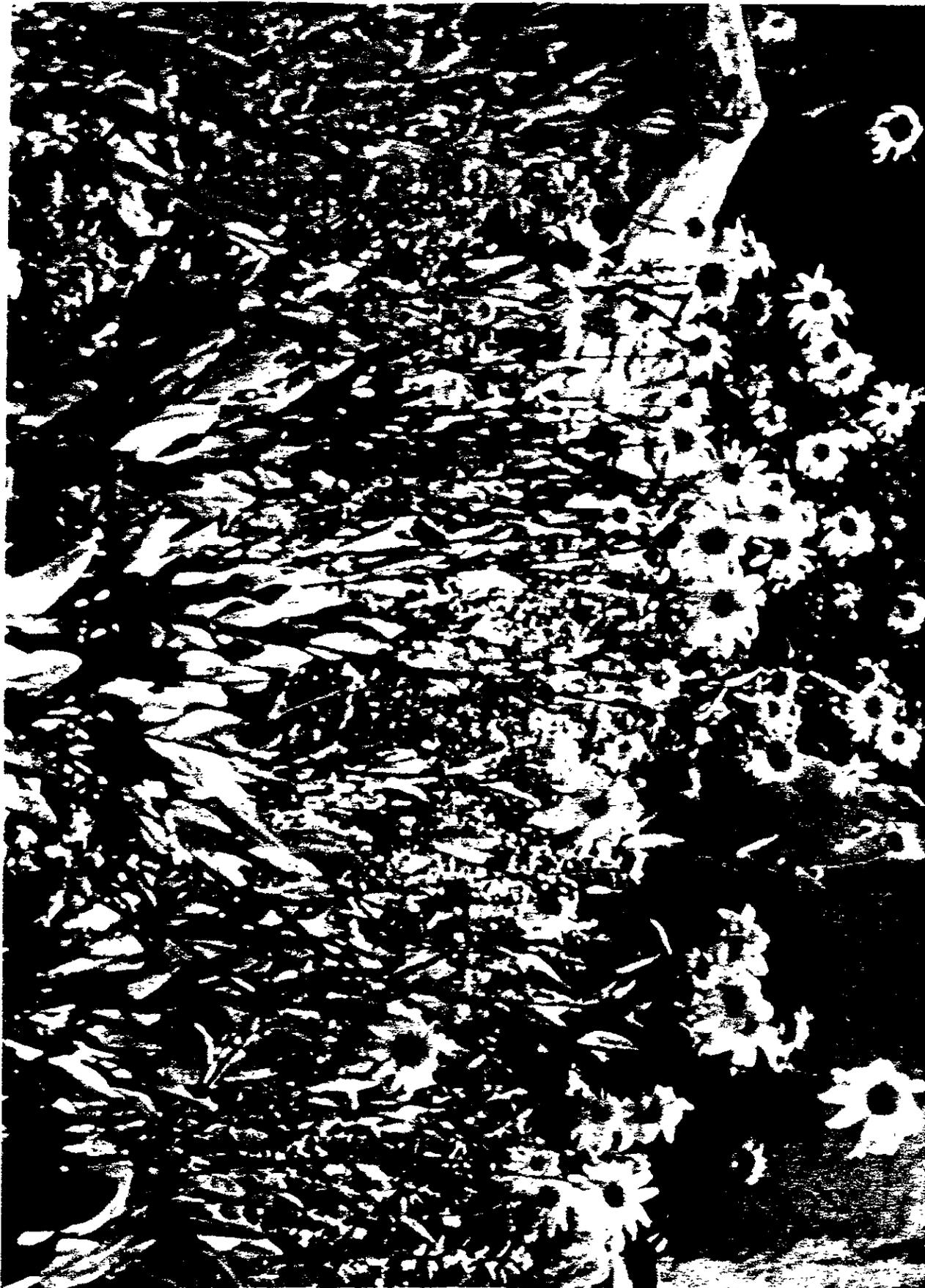
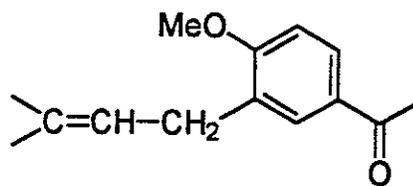


Figura 1. *Helianthella quinquerivis* (Hook.) A. Gray (Asteraceae)



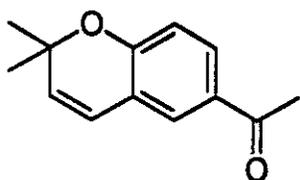
1

1-tridecen-3,5,7,9,11-pentaino



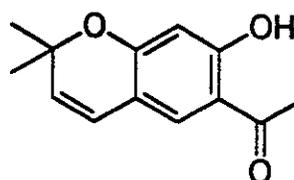
2

4-metoxi-3-[isopenten-(2)-il]-
acetofenona



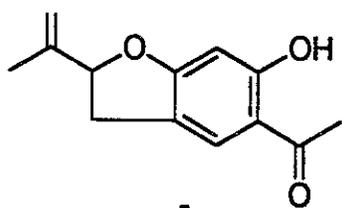
3

desmetoxiencalina



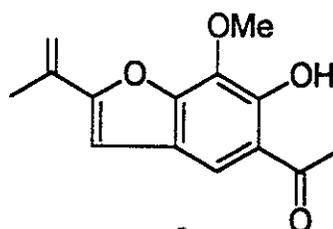
4

desmetilencalina



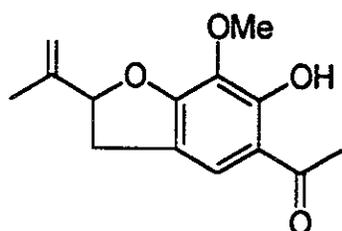
5

dihidroeuvarina



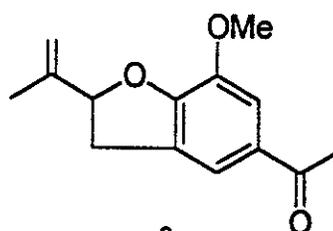
6

7-metoxieuarina



7

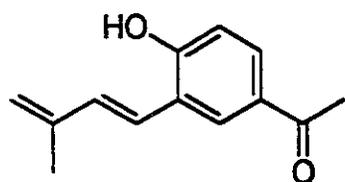
dihidrometoxieuarina



8

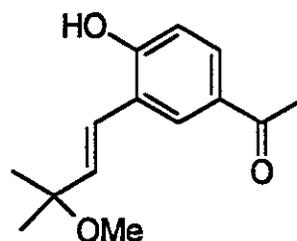
7-metoxitremetona

Figura 2. Metabolitos secundarios aislados de *Helianthella uniflora* (Bohlmann y Grenz, 1970).



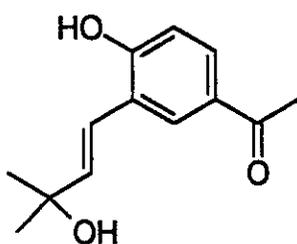
9

4-hidroxi-3-[3-metil-butadien-(1,3)-il]-acetofenona



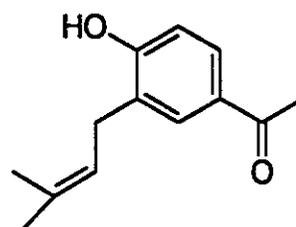
10

4-hidroxi-3-[3-metoksi-trans-isopenten (1)-il]-acetofenona



11

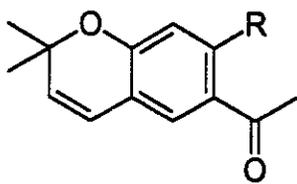
4-hidroxi-3-[3-hidroxi-trans-isopenten (1)-il]-acetofenona



12

4-hidroxi-3-[isopenten (2)-il]-acetofenona

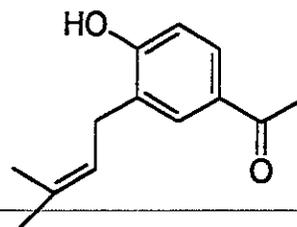
Figura 2. Metabolitos secundarios aislados de *Helianthella uniflora* (Bohlmann y Grenz, 1970) [continuación].



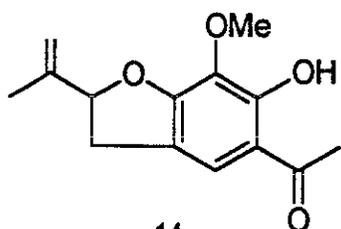
3 H
desmetoxiencecalina

4 OH
desmetilencecalina

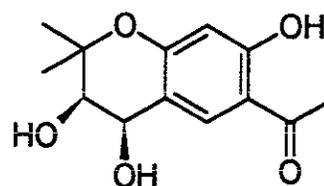
13 OMe
encecalina



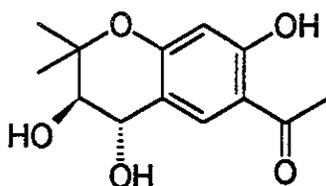
12
4-hidroxi-3-[isopenten (2)-il]-
acetofenona



14
6-hidroxi-7metoxi-tremetona



15
3,4-*cis*-dihidroxi-6-acetil-7-
hidroxi-2,2-dimetilcromeno



16
3,4-*trans*-dihidroxi-6-acetil-7-
hidroxi-2,2-dimetilcromeno

Figura 3. Metabolitos secundarios aislados de *Helianthella quinquenervis* (Herz y Kulanthaivel, 1984).

reciente sobre las raíces de esta misma especie, condujo al aislamiento del ácido angélico (Gómez, 1993).

1.2 GENERALIDADES SOBRE CROMENOS Y BENZOFURANOS AISLADOS DE LA FAMILIA ASTERACEAE

Considerando que los metabolitos secundarios obtenidos en el presente estudio constituyeron en su mayoría, benzopiranos y benzofuranos, se consideró pertinente presentar algunos aspectos acerca de estos compuestos.

Los benzopiranos (denominados también cromenos) y los benzofuranos, son meroterpenoides constituidos generalmente por una unidad aromática de tipo C_6 , C_6-C_2 ó C_6-C_3 de origen siquímico y por un anillo piránico ó furánico, sustituido o no, de origen mevalónico. La cadena C_2 ó C_3 de la unidad aromática se ubica en el C-6 en el caso de los cromenos y en el C-5 en el caso de los benzofuranos, y puede presentar diferentes estados de oxidación, como es el caso de los compuestos 24-27 mostrados en el Cuadro 1, por tan solo mencionar algunos ejemplos.

Los resultados obtenidos de dos investigaciones relacionadas con el origen biogénico de estos productos naturales, permitieron establecer que la porción C_6 , C_6-C_2 ó C_6-C_3 de ambos tipos de compuestos se biosintetizan a partir del ácido cinámico (Proksch *et al.*, 1986; Siebertz *et al.*, 1989). Posteriormente, la condensación de la unidad aromática con el difosfato de dimetil alilo permite la generación del anillo heterocíclico (Siebertz *et al.*, 1989). En la Figura 4 se

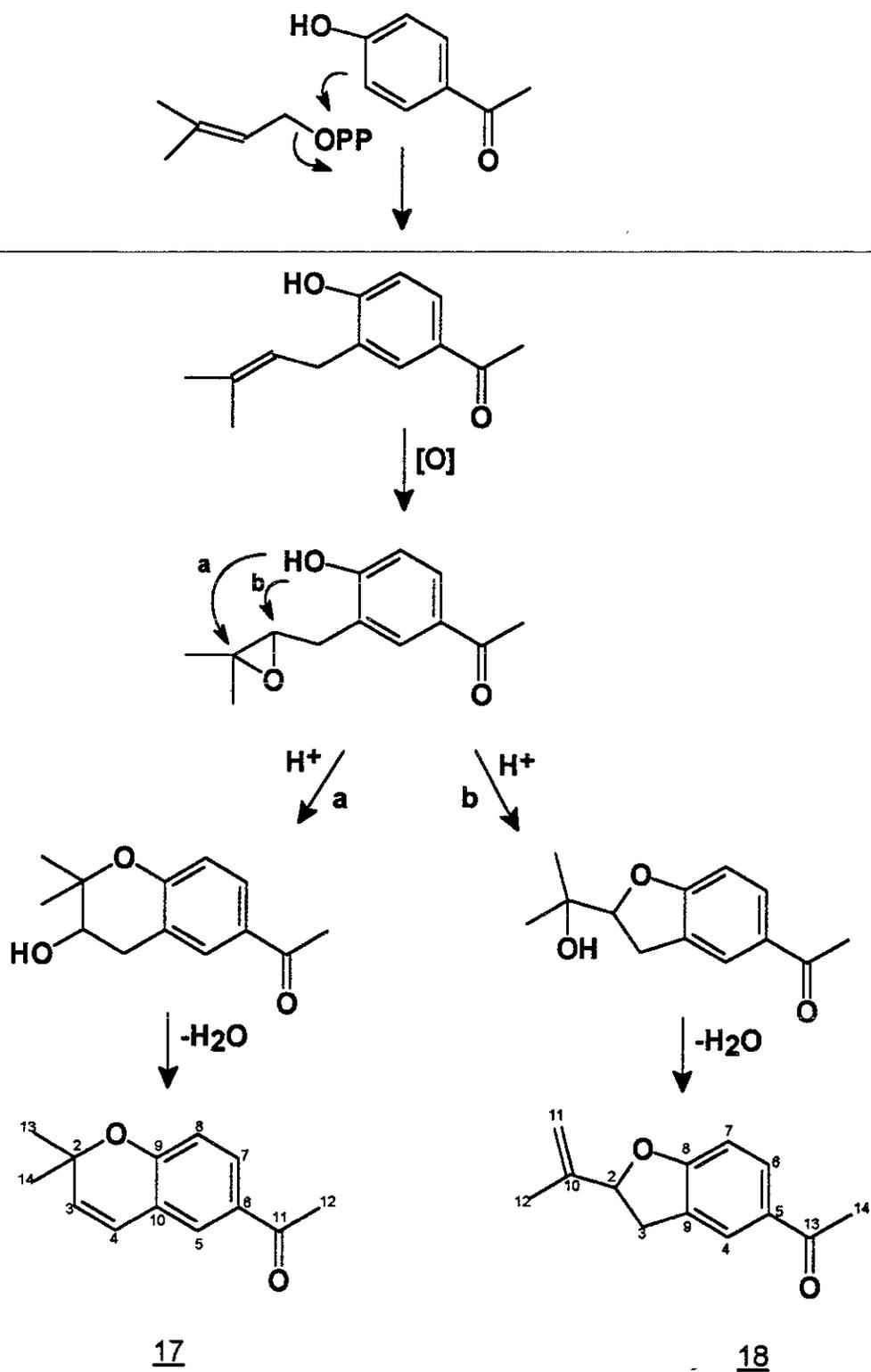


Figura 4. Formación del anillo heterocíclico de los cromenos y benzofuranos.

representa de manera esquemática la formación de este último para ambos tipos de compuestos (Bohlmann y Grenz, 1970; Proksch y Rodríguez, 1983).

Por último, cabe mencionar que la mayoría de estos metabolitos secundarios se encuentran en la naturaleza como monómeros; sin embargo, también se han aislado varios dímeros. Ejemplos de estos compuestos son la agerasanina y las encecanequinas, cada uno de los cuales está constituido por dos unidades de dimetilcromenos. Las estructuras de estos compuestos se muestran en el Cuadro 1.

Los cromenos y los benzofuranos naturales conocidos a la fecha, se han obtenido principalmente de plantas superiores de las familias Rutaceae, Liliaceae, Cyperaceae y Asteraceae, siendo particularmente abundantes en esta última (Proksch y Rodríguez, 1983; Proksch, 1985).

Es importante mencionar que estos productos naturales se acumulan prácticamente en toda la planta, aunque es común encontrar elevadas concentraciones de los mismos en las hojas y las flores, donde en el caso de los cromenos se ha descrito un rendimiento de más de 250 $\mu\text{mol/g}$ de peso seco de material vegetal (Kunze *et al.*, 1995, 1996).

La mayoría de estos metabolitos se obtienen como sólidos cristalinos ó aceites, ambos de color amarillo. Todos muestran una fluorescencia intensa de color amarillo, naranja ó azul bajo luz UV_{366 nm} (Mitsakos *et al.*, 1986; Siebertz *et al.*, 1989).

Estos compuestos se encuentran comúnmente en forma de mezclas complejas y para la resolución de las mismas en sus componentes individuales, se han empleado las técnicas cromatográficas convencionales (Wisdom y Rodríguez, 1982; Proksch y Rodríguez, 1982 ; Fang *et al.*, 1988 ; González *et al.*, 1989 ; Jia y Zhao, 1994 ; De Gutiérrez *et al.*, 1995).

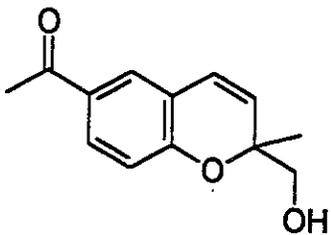
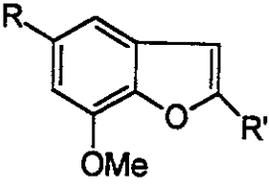
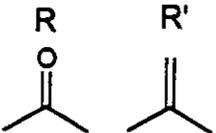
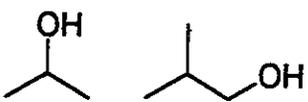
Para la elucidación estructural de los benzopiranos y los benzofuranos, se han utilizado tanto métodos espectroscópicos y espectrométricos, como químicos. Resulta importante destacar que solo se ha descrito el estudio de cristalografía de Rayos X para un derivado bromado del *cis*-2-isopropil-3-hidroxi-2,3-dihidrobenzofurano (Zalkow *et al.*, 1979).

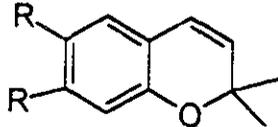
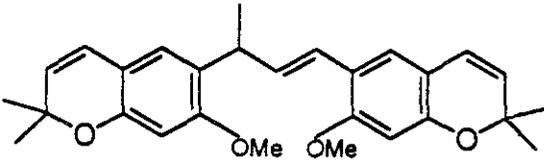
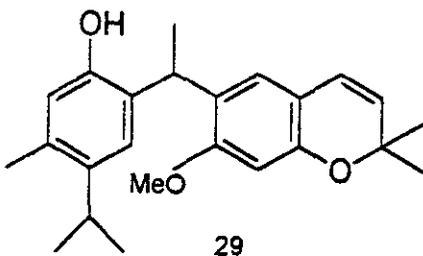
Una excelente revisión acerca de estos productos naturales fue publicado por Proksch y Rodríguez (1983), quienes recopilaron aproximadamente 200 cromenos y benzofuranos obtenidos de al menos el mismo número de especies pertenecientes a cinco tribus (Astereae, Eupatorieae, Heliantheae, Inuleae y Senecioneae) de la familia Asteraceae.

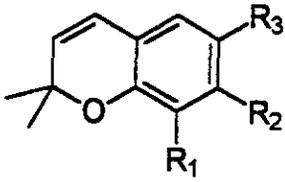
Con la finalidad de actualizar la compilación de Proksch y Rodríguez (1983), se realizó una revisión bibliográfica, misma que permitió integrar los diferentes estudios químicos realizados a la fecha conducentes a la obtención de cromenos y benzofuranos de varias especies de la familia Asteraceae. En el Cuadro 1 se resumen los resultados de estas investigaciones.

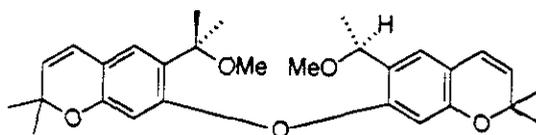
Desde el punto de vista biológico, los estudios sobre cromenos y benzofuranos son escasos. Sin embargo, las investigaciones realizadas han permitido demostrar que algunos de estos compuestos poseen propiedades

Cuadro 1. Cromenos y benzofuranos aislados de la familia Asteraceae de 1983 a la fecha.

NOMBRE DE LA PLANTA	METABOLITOS AISLADOS	REFERENCIA
<p><i>Ageratina adenophora</i> (Spreng.) R.M. King & H. Robinson</p>	 <p style="text-align: center;"><u>21</u> 6-acetil-2-metil-2-hidroximetil-cromeno</p> <p><u>3</u> demetoxiencalinalina <u>4</u> desmetilencalinalina <u>13</u> encalinalina</p>	<p>Proksch <i>et al.</i>, 1987</p>
	 <p style="text-align: center;"><u>22</u></p>	
	<p style="text-align: center;">R R'</p>  <p style="text-align: center;">2-isopropenil-5-acetil- 7-metoxi-benzofurano</p>	
	<p style="text-align: center;"><u>23</u></p> 	
	<p style="text-align: center;"><u>24</u></p> 	

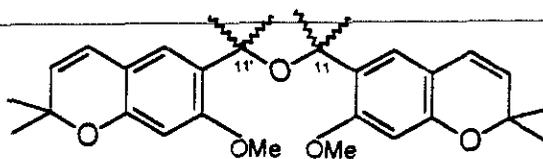
<p><i>Ageratina arsenii</i> (B.L. Robinson) R.M. King & H. Robinson</p>	<p><u>3</u> demetoxiencocalina</p> 	<p>Fang <i>et al.</i>, 1988</p>
	<p style="text-align: center;">R R'</p> <p><u>25</u>  OMe 6-vinil-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno</p> <p><u>26</u>  OMe OMe 6-(1-metoxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno</p> <p><u>27</u>  OH OMe 6-(1-hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno</p> <p><u>28</u>  agerasanina</p> <p><u>29</u>  6-[2-(2-hidroxi-4-metil-5-isopropilfenil)]-etil-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno</p>	

<p><i>Ageratina glechonophylla</i> (Less) K. et R.</p>	<p style="text-align: center;"><u>26</u> 6-(1-metoxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno</p> <p style="text-align: center;"><u>27</u> 6-(1-hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno</p> <div style="text-align: center;">  </div> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th></th> <th style="text-align: center;">R₁</th> <th style="text-align: center;">R₂</th> <th style="text-align: center;">R₃</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;"><u>35</u></td> <td style="text-align: center;">H</td> <td style="text-align: center;">OMe</td> <td style="text-align: center;">CH(OEt)Me</td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="3" style="text-align: center;">6-(1-etoxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><u>36</u></td> <td style="text-align: center;">H</td> <td style="text-align: center;">OMe</td> <td style="text-align: center;">OAc</td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="3" style="text-align: center;">6-acetoxi-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><u>37</u></td> <td style="text-align: center;">OMe</td> <td style="text-align: center;">H</td> <td style="text-align: center;">OAc</td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="3" style="text-align: center;">6-acetoxi-8-metoxi-2,2-dimetilcromeno</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><u>38</u></td> <td style="text-align: center;">H</td> <td style="text-align: center;">OH</td> <td style="text-align: center;">OAc</td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="3" style="text-align: center;">6-acetoxi-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno</td> </tr> </tbody> </table>		R ₁	R ₂	R ₃	<u>35</u>	H	OMe	CH(OEt)Me		6-(1-etoxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno			<u>36</u>	H	OMe	OAc		6-acetoxi-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno			<u>37</u>	OMe	H	OAc		6-acetoxi-8-metoxi-2,2-dimetilcromeno			<u>38</u>	H	OH	OAc		6-acetoxi-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno			<p style="text-align: right;">González <i>et al.</i>, 1989</p>
	R ₁	R ₂	R ₃																																			
<u>35</u>	H	OMe	CH(OEt)Me																																			
	6-(1-etoxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno																																					
<u>36</u>	H	OMe	OAc																																			
	6-acetoxi-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno																																					
<u>37</u>	OMe	H	OAc																																			
	6-acetoxi-8-metoxi-2,2-dimetilcromeno																																					
<u>38</u>	H	OH	OAc																																			
	6-acetoxi-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno																																					
<p><i>Ageratum conyzoides</i></p>	<p><u>13</u> encecalina</p> <p><u>19</u> precoceno I</p> <p><u>20</u> precoceno II</p> <p><u>32</u> (+)-encecanescina a</p> <p><u>33</u> (-)-encecanescina a</p> <p><u>34</u> 9-epi(-)-encecanescina a</p>	<p style="text-align: right;">González <i>et al.</i>, 1991</p>																																				



30 11-β-Me enecanescina b

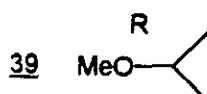
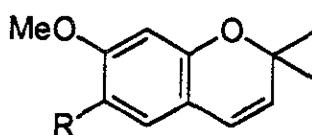
31 11-α-Me enecanescina c



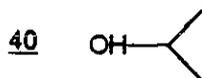
32 11-α-Me 11'-β-Me
(+)-enecanescina a

33 11-β-Me 11'-β-Me
9-epi(-)-enecanescina a

34 11-β-Me 11'-α-Me
(-)-enecanescina a



6-(1-metoxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno



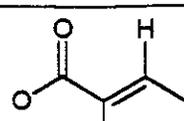
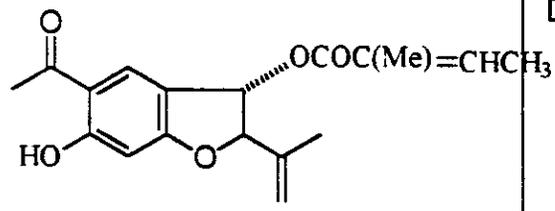
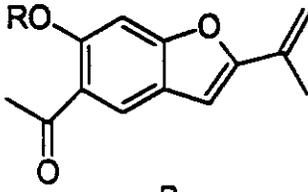
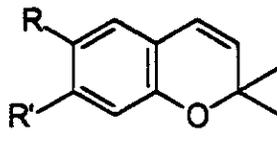
6-(1-hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno

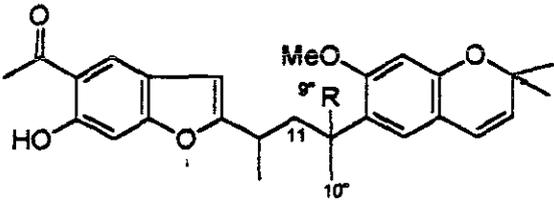
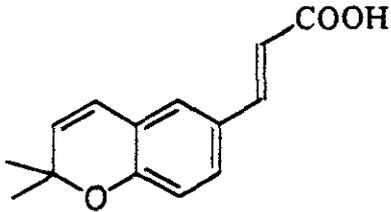


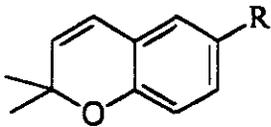
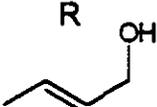
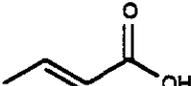
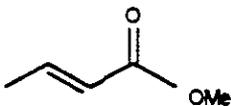
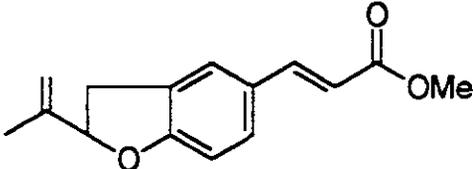
6-(1-etoxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno

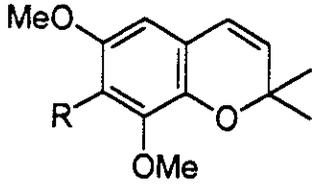
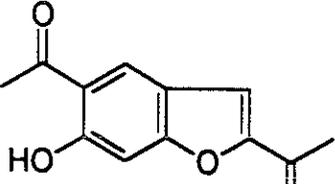
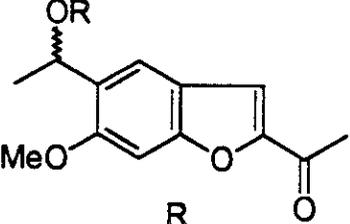


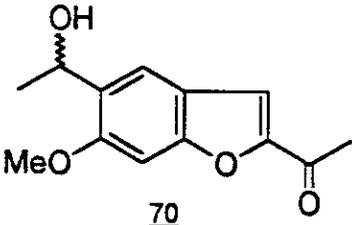
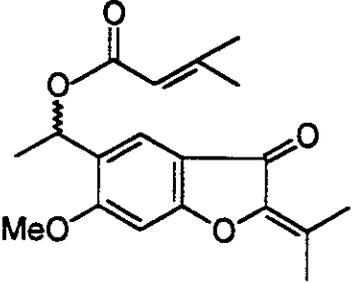
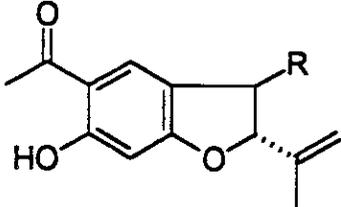
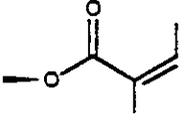
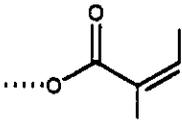
6-vinil-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno

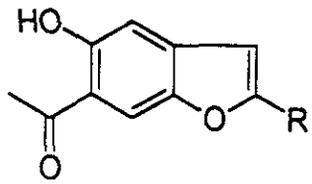
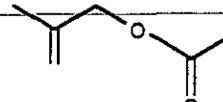
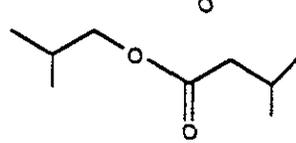
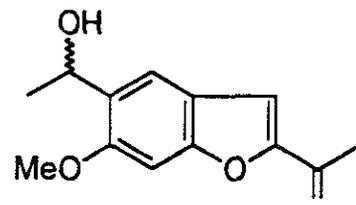
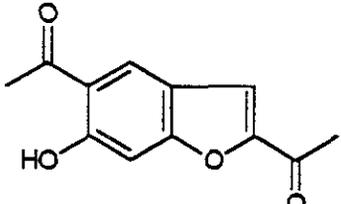
	<p><u>43</u></p>  <p>6-angeliloxi-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno</p>	
<p><i>Baccharis glutinosa</i> Pers.</p>	 <p><u>44</u></p> <p>2-isopropilen-3β-angeliloxi-5-acetil-6-hidroxi-2,3-dihidrobencofurano</p>	<p>Domínguez <i>et al.</i>, 1986</p>
	 <p>R</p> <p><u>45</u> H euparina</p> <p><u>46</u> OMe 6-metil-euparina</p>  <p>R R'</p> <p><u>47</u> CH(OH)Me OH 6-(1-hidroxi-etil)-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno</p> <p><u>48</u> CH(OH) OMe 6-(1-hidroxi-etil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno</p> <p><u>49</u> CH(OMe)Me OH Sonorol</p>	<p>e.</p>

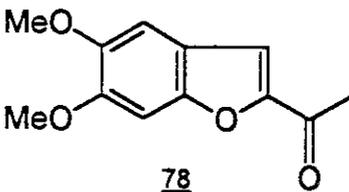
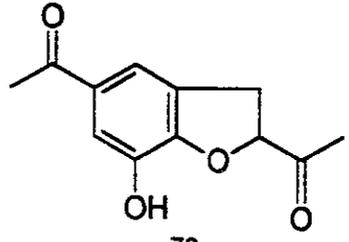
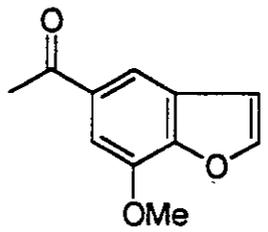
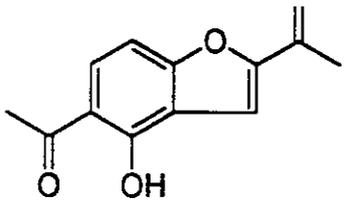
	<p><u>50</u> COMe H 6-acetil-2,2-dimetilcromeno</p> <p><u>51</u> COMe OH 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno</p>	
	<p><u>52</u> COMe OMe 6-acetil-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno</p> <p><u>53</u> CH(OH)Me H 6-(1-hidroxi-etil)-2,2-dimetilcromeno</p> <p><u>54</u> CH=CH₂ OMe 6-etilen-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno</p>	
	 <p style="text-align: center;">R</p> <p><u>39</u> H, Δ^{9'}</p> <p><u>40</u> α-OH</p> <p><u>41</u> H, Δ^{10'}</p> <p><u>42</u> β-OH</p>	
<p><i>Baccharis linearis</i> <i>Baccharis rhomboidalis</i> <i>Baccharis solieri</i></p>	 <p><u>59</u> cromeno I</p>	<p>Labbe <i>et al.</i>, 1986</p>

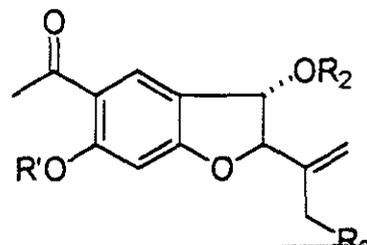
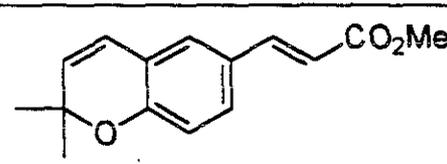
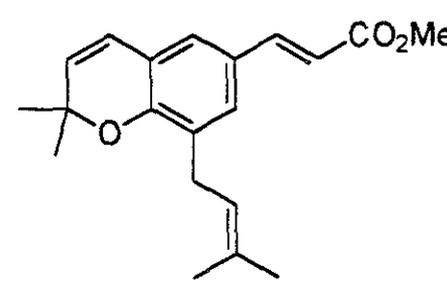
<p><i>Baccharis linearis</i></p>	<p><u>3</u> demetoxiencicalina</p>  <p><u>60</u></p>  <p>6-(1'-propenil-3,-hidroxi)- 2,2-dimetilcromeno</p> <p><u>61</u></p>  <p>6-(ácido 1'-propenoico)- 2,2-dimetilcromeno</p> <p><u>62</u></p>  <p>6-(ácido metilester 1'- propionico)-2,2-dimetilcromeno</p>  <p><u>64</u></p> <p>5-(ácido metilester 1'-propionico)-2 isopropilen-2,3-dihidrobenzofurano</p>	<p>Brown 1994</p>
<p><i>Calea serrata</i> Less.</p>	<p><u>4</u> desmetilencicalina</p> <p><u>21</u> precoceno II</p>	<p>Steinbeck <i>et al.</i>, 1997</p>

<p><i>Calea prunifolia</i> Kunth</p>	 <p style="text-align: center;">R</p> <p style="text-align: center;"><u>65</u> OMe prunicromeno I</p>	<p>Ober <i>et al.</i>, 1985</p>
	<p style="text-align: center;"><u>66</u> H prunicromeno II</p>	
<p><i>Enceliopsis covillei</i> (A. Nels.) S.F. Blake</p>	<p style="text-align: center;"><u>45</u> euparina <u>46</u> 6-metil-euparina</p>  <p style="text-align: center;"><u>67</u> 6-hidroxi-tremetona</p>  <p style="text-align: center;">R</p> <p style="text-align: center;"><u>68</u> H 2-isopropilen-5-(1ξ-hidroxietyl)- 6-metoxi-benzofurano</p> <p style="text-align: center;"><u>69</u> Me 2-isopropilen-5-(1ξ-metoxietyl)- 6-metoxi-benzofurano</p>	<p>Mitsakos <i>et al.</i>, 1986</p>

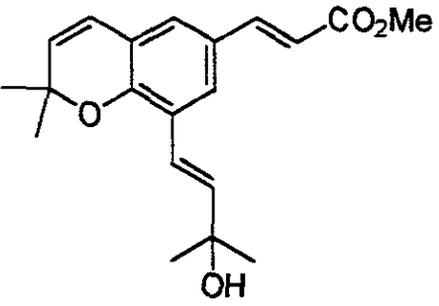
	<div style="text-align: center;">  <p><u>70</u></p> <p>2-acetil-5-(1ξ-hidroxietil)- 6-metoxi-benzofurano</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><u>71</u></p> <p>5-(1ξ-senecionil)-2-isopropiliden-6-metoxi- 3-oxo-2,3-dihidrobenzofurano</p> </div>	
<p><i>Eupatorium cannabinum</i></p>	<div style="text-align: center;"> <p><u>45</u> euparina</p>  <p><u>72</u></p>  <p>2,3-dihidro-2-isopropilen-3α-angeliloxi- 5-acetil-6-hidroxi-benzofurano</p> <p><u>73</u></p>  <p>2,3-dihidro-2-isopropilen-3β-angeliloxi- 5-acetil-6-hidroxi-benzofurano</p> </div>	<p>Siebertz <i>et al.</i>, 1989</p>

	 <p style="text-align: center;">R</p>	
	<p>58</p>  <p>59</p> 	
<p><i>Geraea canescens</i> Torr. & Gray</p>	<p><u>45</u> euparina</p> <p><u>46</u> 6-metil-euparina</p> <p><u>67</u> 6-hidroxi-tremetona</p> <p><u>70</u> 2-acetil-5-(1-ξ-hidroxi-etil) 6-metoxi-benzofurano</p>  <p style="text-align: center;"><u>76</u></p> <p>2-isopropilen-5-(1-ξ-hidroxi-etil) 6-metoxi-benzofurano</p>  <p style="text-align: center;"><u>77</u></p> <p>2,5-diacetil-6-hidroxi-benzofurano</p>	<p>Proksch <i>et al.</i>, 1986</p>

<p><i>Ligularia przewalskii</i> (Maxim.) Diels</p>	<p><u>45</u> euparina</p>  <p><u>78</u> 2-acetil-5,6-dimetoxi benzofurano</p>  <p><u>79</u> 7-hidroxi-tremetona</p>  <p><u>80</u> 5-acetil-7-metoxi- benzofurano</p>	<p>Jia y Zhao 1994</p>
<p><i>Tagetes patula</i> L.</p>	<p><u>45</u> euparina</p>  <p><u>81</u> isoeuparina</p>	<p>Sütfeld et al., 1985</p>

<p><i>Urolepis hecatantha</i> (DC.) R. King & H. Robinson</p>	<p><u>45</u> euparina</p> 	<p>De Gutierrez <i>et al.</i>, 1995</p>																				
	<table border="0"> <thead> <tr> <th></th> <th>R'</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><u>82</u></td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td colspan="4">2,3-dihidro-trans-2-(2'-isopropenil)- 3,6-dihidroxi-benzofurano</td> </tr> <tr> <td><u>83</u></td> <td>H</td> <td>Ang</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td colspan="4">2,3-dihidro-trans-2-(2'-hidroxi- isopropenil)-3,6-dihidroxi-benzofurano</td> </tr> </tbody> </table>		R'	R ₂	R ₃	<u>82</u>	OH	H	H	2,3-dihidro-trans-2-(2'-isopropenil)- 3,6-dihidroxi-benzofurano				<u>83</u>	H	Ang	OH	2,3-dihidro-trans-2-(2'-hidroxi- isopropenil)-3,6-dihidroxi-benzofurano				
	R'	R ₂	R ₃																			
<u>82</u>	OH	H	H																			
2,3-dihidro-trans-2-(2'-isopropenil)- 3,6-dihidroxi-benzofurano																						
<u>83</u>	H	Ang	OH																			
2,3-dihidro-trans-2-(2'-hidroxi- isopropenil)-3,6-dihidroxi-benzofurano																						
<p><i>Werneria stuebelii</i></p>	 <p><u>84</u> 6-(1',2' E-propen-metil ester)-2,2- dimetilcromeno</p> <p><u>85</u> 6-(1',2' Z-propen-metil ester)-2,2- dimetilcromeno</p>  <p><u>86</u> 8-[3''-isopenten-(2-ii)]-6-(1'-propen-metil ester)-2,2-dimetilcromeno</p>	<p>Bohlmann <i>et al.</i>, 1984</p>																				

Cuadro 1. Cromenos y benzofuranos aislados de la familia Asteraceae de 1983 a la fecha (continuación).

	 <p style="text-align: center;"><u>87</u> 8-[3''-hidroxi-<i>trans</i>-isopenten-(1)-il]-6-(1'-propen-metil ester)-2,2-dimetilcromeno</p>	
--	---	--

fototóxicas (Proksch *et al.*, 1983), bacteriostáticas (Zalkow *et al.*, 1962), antitumorales (Zalkow *et al.*, 1979) e insecticidas (Bowers *et al.*, 1976; Bowers y Martínez-Pardo 1977; Bowers *et al.*, 1981; Bowers *et al.*, 1982; *inter alia*).

De estas actividades biológicas, quizás, la más explorada es la insecticida. En este sentido cabe mencionar que, los precocenos I (19) y II (20) han sido los compuestos que han recibido una mayor atención. Las distintas investigaciones realizadas permitieron comprobar que ambos actúan como hormonas antijuveniles para insectos (Bowers *et al.*, 1976; Bowers y Martínez-Pardo 1977; Bowers *et al.*, 1981; Bowers *et al.*, 1982). Cuando se aplican tópicamente a los insectos ó se incorporan a la dieta artificial, los insectos sufren cambios fisiológicos severos incluyendo metamorfosis, esterilización, interrupción del ritmo circadiano y daño embriogénico, entre otros (Bowers *et al.*, 1976; Bowers y Martínez-Pardo, 1977; Bowers, 1981). Estudios relacionados con el mecanismo de acción de estos compuestos, permitieron sugerir que los precocenos sufren modificaciones oxidativas para generar epóxidos ó quinonas altamente reactivos (Figura 5), los cuales son capaces de alquilar substratos nucleofílicos (p.ej. enzimas) (Brooks *et*

al., 1979; Jennings y Ottridge, 1979; Pratt *et al.*, 1980; Soderlund *et al.*, 1980; Bowers *et al.*, 1982).

Investigaciones posteriores sobre tres compuestos representativos del género *Encelia*, la encecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4), permitieron comprobar el potencial insecticida del primero de ellos (Isman y Proksch, 1985; Proksch *et al.*, 1987; Srivastava y Proksch, 1990), contra varios insectos herbívoros incluyendo aquellos que no son susceptibles a la acción antihormonal de los precocenos (Isman y Proksch, 1985; Wisdom, 1985; Isman *et al.*, 1986; Proksch *et al.*, 1987; Srivastava y Proksch, 1990; Kunze *et al.*, 1996). Lo antes expuesto sugiere que la presencia de la encecalina (13) en numerosas especies pertenecientes a la familia Asteraceae implica un mecanismo de defensa natural efectivo contra el ataque de numerosos insectos hervívoros (Isman *et al.*, 1986; Proksch *et al.*, 1986; Kunze *et al.*, 1996).

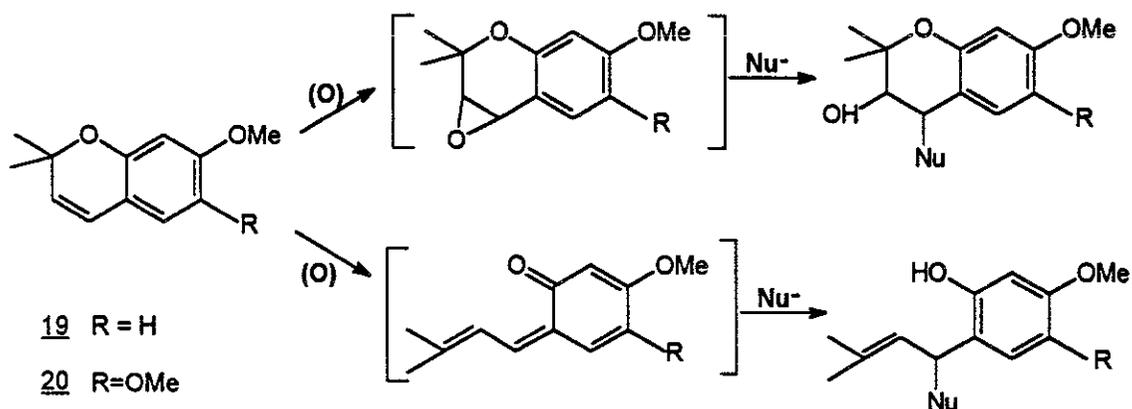


Figura 5. Mecanismo postulado para los precocenos I y II como hormonas antijuveniles.

Por otro lado, Merrill (1989) describe el efecto de la desmetilencecalina (4) y la encecalina (13) sobre el crecimiento radicular y la germinación de *Panicum miliaceum*, *Echinochloa crusgalli*, *Medicago sativa* y *Lolium perenne*. Los resultados obtenidos revelaron que ambos compuestos reducen el crecimiento de la radícula y del hipocotilo, y retardan la germinación de las semillas estudiadas en un rango de concentraciones de 1 a 200 µg/mL.

Por último, cabe destacar que la encecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4), han demostrado ser importantes marcadores quimiotaxonómicos de los géneros *Encelia*, *Enceliopsis*, *Fluorensia* y *Geraea*, todos ellos pertenecientes a la familia Asteraceae (Proksch y Clarck 1987; Kunze *et al.*, 1995).

1.3 EL PROCESO DE FOTOSÍNTESIS COMO UN BLANCO DE ACCIÓN DE FITOTOXINAS

1.3.1 Generalidades sobre agentes herbicidas

Einhellig (1995) define a los agentes herbicidas, como aquellos compuestos capaces de inhibir el crecimiento de una planta, en tanto que Mohr y Schopfer (1995), los definen como sustancias utilizadas en las prácticas agrícolas de importancia económica para eliminar plantas no deseadas, que reducen la producción de los cultivos.

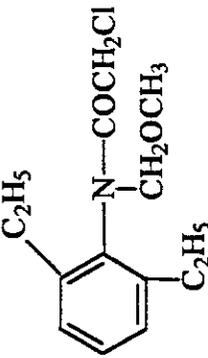
Por razones prácticas, los herbicidas se dividen en herbicidas no selectivos ó pre-emergentes y herbicidas selectivos ó post-emergentes (Mohr y Schopfer, 1995). Los primeros se consideran de amplio espectro y destruyen

todas las semillas antes de que se presente la emergencia de las plantas, es decir, antes de la germinación y la aparición de las primeras hojas. Por otro lado, los herbicidas post-emergentes pueden ser aplicados a las semillas después de la emergencia de la cosecha debido a su efecto selectivo sobre ciertas malezas. Por el contrario, los herbicidas de amplio espectro son muy efectivos contra todas las plantas excepto para las variedades resistentes.

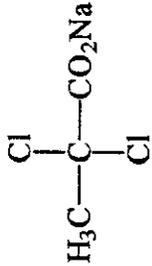
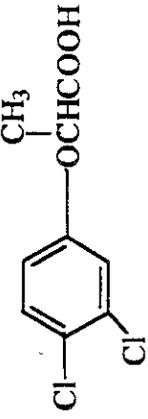
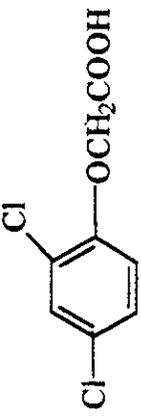
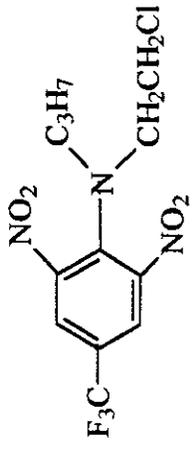
En la actualidad, existen en el mercado mundial un considerable número y variedad de agentes herbicidas (aproximadamente 350) de los cuales, más del 50% han surgido mediante la combinación de dos procedimientos: la síntesis química y el desarrollo bioracional (identificación y selección de un mecanismo de acción particular); en el Cuadro 2 se muestran ejemplos selectos de estos productos. Como se desprende de la información presentada en el mismo, los herbicidas sintéticos de mayor uso pertenecen a diferentes categorías químicas; los más importantes incluyen el grupo de las fenilureas y las triazinas (Linscott, 1981; Corbett, 1984; Parry, 1989; Cremllyn, 1991). Así mismo se puede apreciar, que muchos de ellos presentan como característica estructural común la presencia de al menos un halógeno en sus moléculas.

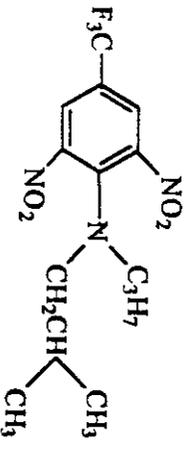
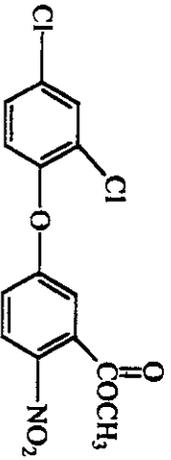
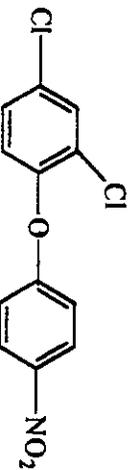
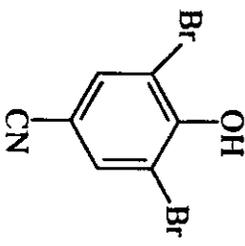
Durante las últimas décadas, el uso sistemático de estos agentes herbicidas en la agricultura ha permitido indudablemente, incrementar la productividad de los cultivos (Lockhart *et al.*, 1989). Sin embargo, se estima que de un 8 al 15% de los cultivos se pierden como un resultado de las infestaciones por arvenses, a pesar de la aplicación rutinaria de los herbicidas, y estas pérdidas podrían aumentar hasta más de un 50% en ausencia de estos tratamientos (Liansky, 1990).

Cuadro 2. Ejemplos selectos de herbicidas comerciales sintéticos de uso comercial.

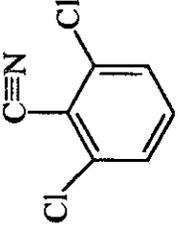
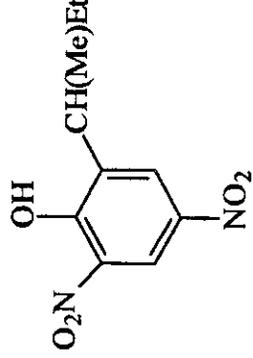
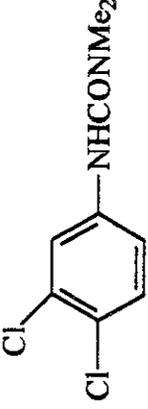
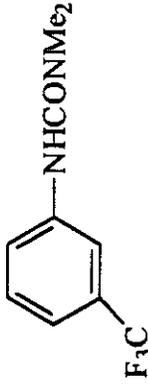
ACETAMIDAS	Fórmula	Usos principales en las prácticas agrícolas	Mecanismo de acción
Alaclor		maíz, soya, algodón, chícharo, papa	Inhibe la síntesis de proteínas
Propaclor		maíz, soya	Inhibe la síntesis de ácidos nucleicos
CARBAMATOS			
Asulam		pastos, caña de azúcar	Inhibe la división celular
Desmedifam		Remolacha	Inhibe la fotosíntesis

Cuadro 2. Ejemplos selectos de herbicidas comerciales sintéticos de uso comercial (continuación).

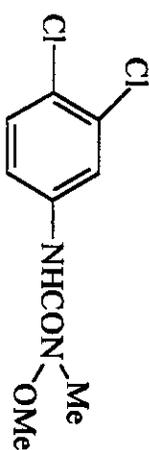
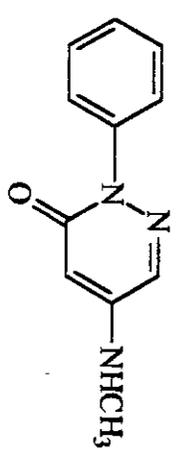
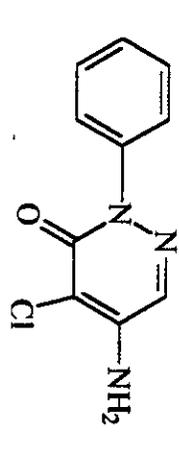
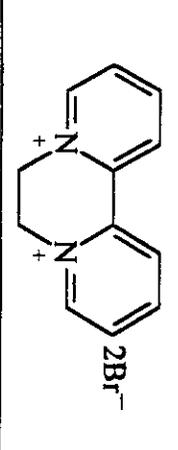
CLOROALIFATICOS				
Dalapon			frijol, maíz, algodón	Precipita proteínas
TCA	CCl ₃ COOH		algodón, caña de azúcar, remolacha	Precipita proteínas
CLOROFENOXI-ALCANOS				
Diclorprop			cereales	Inhibe metabolismo de ácidos nucleicos
2,4-D			maíz, algodón, sorgo, arroz	Inhibe metabolismo de ácidos nucleicos
DINITROANILINAS				
Flucloralina			soya, algodón	Inhibe la síntesis de proteínas

Profiuralina		Tríjol, maíz, chicharo, soya	Inhíbe la fotosíntesis
DIFENILETERES			
Bifenox		Arroz, maíz, soya	Afecta la integridad de la membrana
Nitrofen		Zanahoria, cebolla, remolacha	Afecta la integridad de la membrana
NITRILLOS			
Bromoxinil		cereales	Inhíbe la fotosíntesis

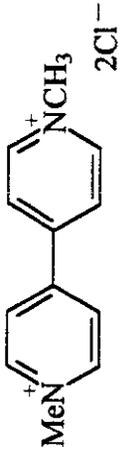
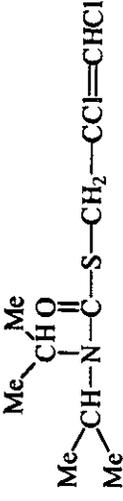
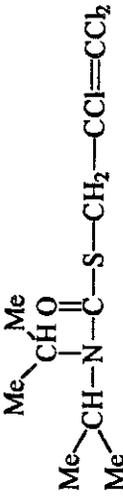
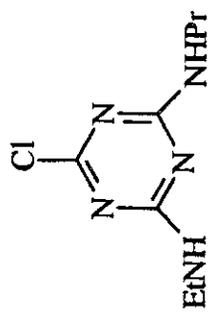
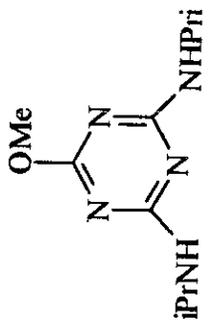
Cuadro 2. Ejemplos selectos de herbicidas comerciales sintéticos de uso comercial (continuación).

Diclobenil		nuez, arboles frutales	Inhibe el crecimiento del ápice
FENOLES			
Dinoseb		alfalfa, maíz, algodón, arboles frutales, chícharo, papa, nuez	Desacopla la fosforilación oxidativa
UREAS			
Diuron		algodón, arboles frutales, remolacha, pastos	Inhibe la fotosíntesis
Fluometuron		algodón, caña de azúcar	Inhibe la fotosíntesis

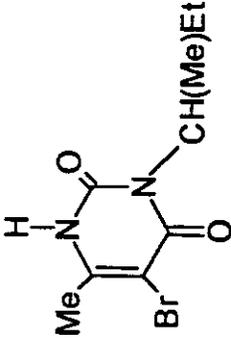
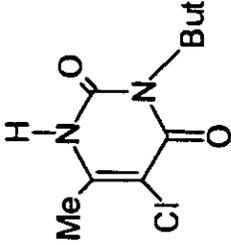
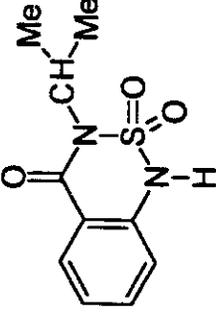
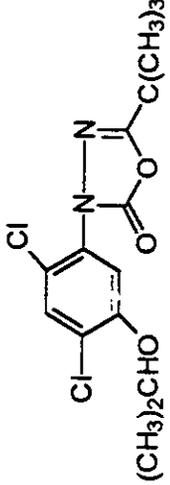
Cuadro 2. Ejemplos selectos de herbicidas comerciales sintéticos de uso comercial (continuación).

Linuron		¹ algodón, maíz, zanahoria, papa, sorgo, soya	Inhíbe la fotosíntesis
PIRADIAZINAS			
Norflurazona		¹ algodón	Inhíbe la síntesis de carotenoides
Cloridazona		^{1,2} remolacha	Inhíbe la fotosíntesis
SALES DE AMONIO CUATERNARIAS			
Diquat		¹ remolacha	Inhíbe la fotosíntesis

Cuadro 2. Ejemplos selectos de herbicidas comerciales sintéticos de uso comercial (continuación).

Paraquat		¹ cebada, algodón, pastos, maíz, sorgo, nuez, trigo,	Inhibe la fotosíntesis
TIOCARBAMATOS			
Dialato		² maíz, chícharo, trigo	Afecta la división celular
Triallato		² cebada, trigo	Inhibe la elongación y la división celular
TRIAZINAS			
Atrazina		² maíz, sorgo, pastos, nuez, caña de azúcar	Inhibe la fotosíntesis
Prometona		² maíz, frijol, soya	Inhibe la fotosíntesis

Cuadro 2. Ejemplos selectos de herbicidas comerciales sintéticos de uso comercial (continuación).

URACILOS			
Bromacil		¹ arboles frutales, caña de azúcar	Inhibe la fotosíntesis
Terbacil		¹ arboles frutales, caña de azúcar, menta	Inhibe la fotosíntesis
OTROS			
Bentazona		² arroz, maíz, soya	Inhibe la fotosíntesis
Oxadiazona		^{1,2} arroz, algodón, caña de azúcar	Inhibe la fotosíntesis

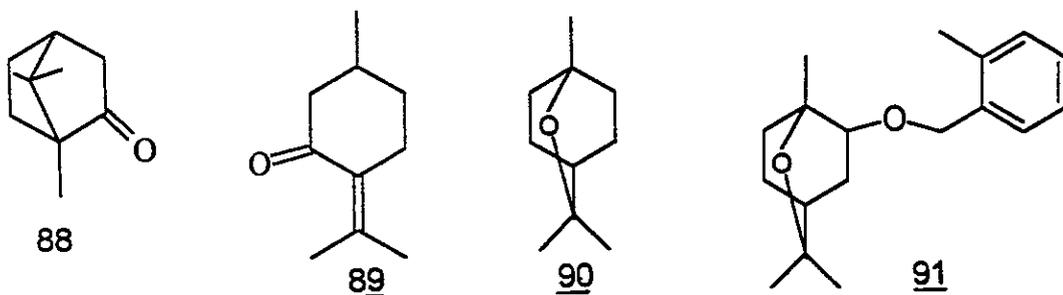
¹Control pre-emergente

²Control post-emergente

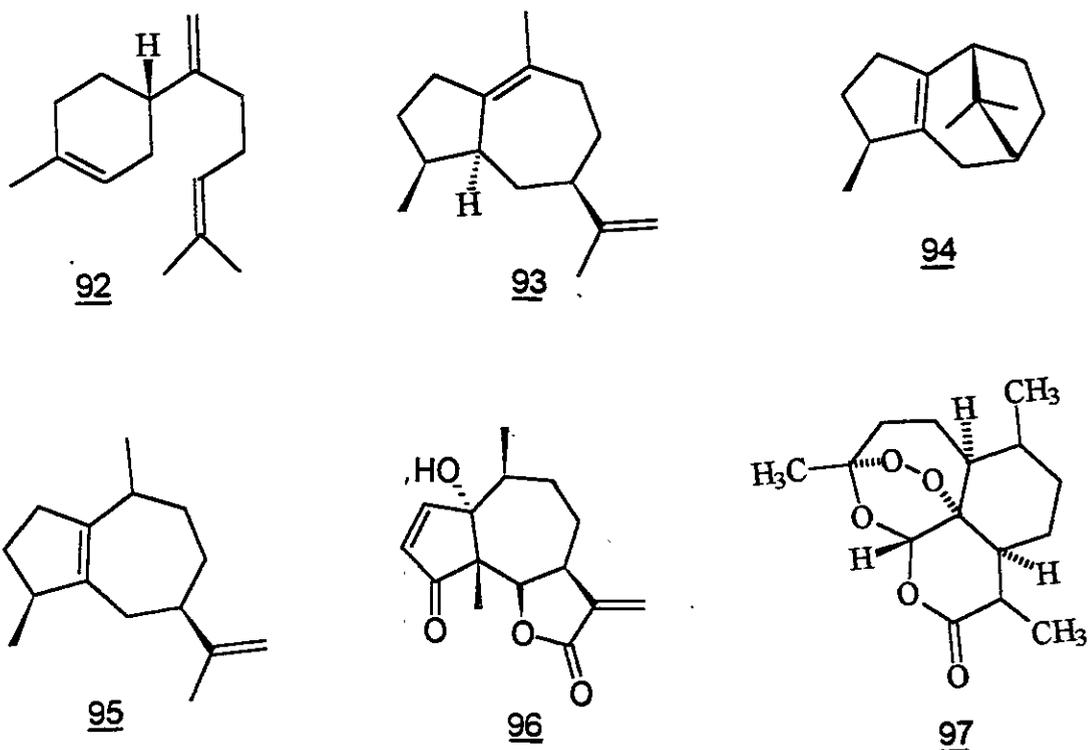
Tal es la importancia del control de las arvenses, que los herbicidas constituyen hoy en día un componente esencial en las prácticas agrícolas, especialmente en los países desarrollados. No obstante, el uso indiscriminado de estos pesticidas en los últimos años, ha generado un elevado número de especies resistentes. De manera adicional, estos productos han ocasionado daños ecológicos severos y problemas de toxicidad para un gran número de animales (Linscott, 1981 ; Cremlyn, 1991).

En consecuencia, el interés por la búsqueda de estrategias alternas para el control de las plantas dañinas se ha visto incrementado notablemente. En este sentido, los productos naturales ofrecen una alternativa viable para el hallazgo de nuevos agentes herbicidas, menos tóxicos, biodegradables y con un mecanismo de acción más específico.

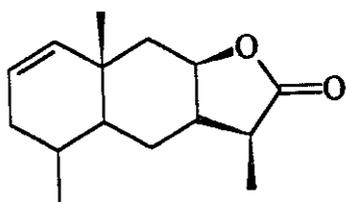
Así, la literatura científica describe numerosos compuestos de origen vegetal (aleloquímicos) con propiedades fitotóxicas y por lo tanto, de interés para el desarrollo de agentes herbicidas (Hamburger y Hostettmann, 1991 ; Gerig y Blum, 1991 ; Macías *et al.*, 1992, 1993 ; Benner 1993 ; Barvah *et al.*, 1994). Las fitotoxinas vegetales incluyen una gran variedad de metabolitos secundarios entre los que destacan por su gran actividad los compuestos de naturaleza terpenoide y de naturaleza aromática. Ejemplos de fitotoxinas de naturaleza monoterpenoide son el alcanfor (88), la pulegona (89) (Duke, 1991) y el 1,8-cineol (90) (Grayson *et al.*, 1987; Worsham, 1989). Es importante mencionar que un derivado semisintético de este último compuesto, el cinmetilino (91), ha sido considerado para su desarrollo como herbicida comercial por la Compañía Dupont (Duke, 1991; Duke y Abbas, 1995).



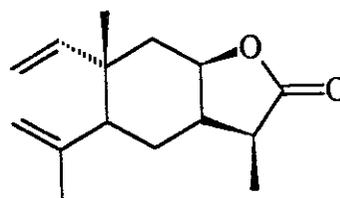
Los sesquiterpenoides, constituyen también un importante grupo de fitotoxinas, entre las que se encuentran el β -bisaboleno (92), el α -bulneseno (93), la β -patchulina (94) y el α -guayeno (95) (Fischer y Quijano, 1985). Otros ejemplos son la partenina (96) y la artemisinina (97), los cuales inhiben la germinación y afectan el desarrollo de las raíces adventicias en *Phaseolus vulgaris* y *Lactuca sativa*, respectivamente a una concentración de 10 mM (Kanchan, 1975 ; Duke *et al.*, 1987 ; Fischer *et al.*, 1989 ; Chen y Leather, 1990 ; Chen *et al.*, 1991).



En un estudio reciente, Calera y colaboradores (1995) describen el efecto inhibitorio significativo de la isoalantolactona (98) y la elema-1,3,11-trien-8,12-olida (99) sobre el crecimiento radicular de las especies de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.



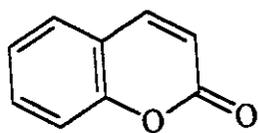
98



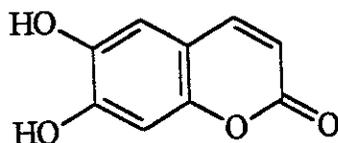
99

En relación con los compuestos aromáticos, destacan diversas cumarinas (Macías *et al.*, 1992, 1993), derivados del ácido cinámico (Putnam, 1988; Gerig y Blum, 1991) y quinonas (Einhellig y Souza, 1992; Spencer *et al.*, 1986).

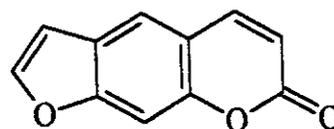
Del grupo de las cumarinas, sobresalen por su potente actividad sobre la germinación y/o el crecimiento radicular en diversas especies de plantas cultivadas y malezas, la cumarina (100), la esculetina (101) y el psoraleno (102) (Duke y Lydon, 1987; Putnam, 1988). Se ha descrito que este último compuesto inhibe la germinación de semillas de lechuga a una concentración de 0.001 ppm (Baskin *et al.*, 1967).



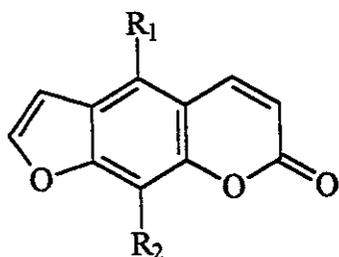
100



101



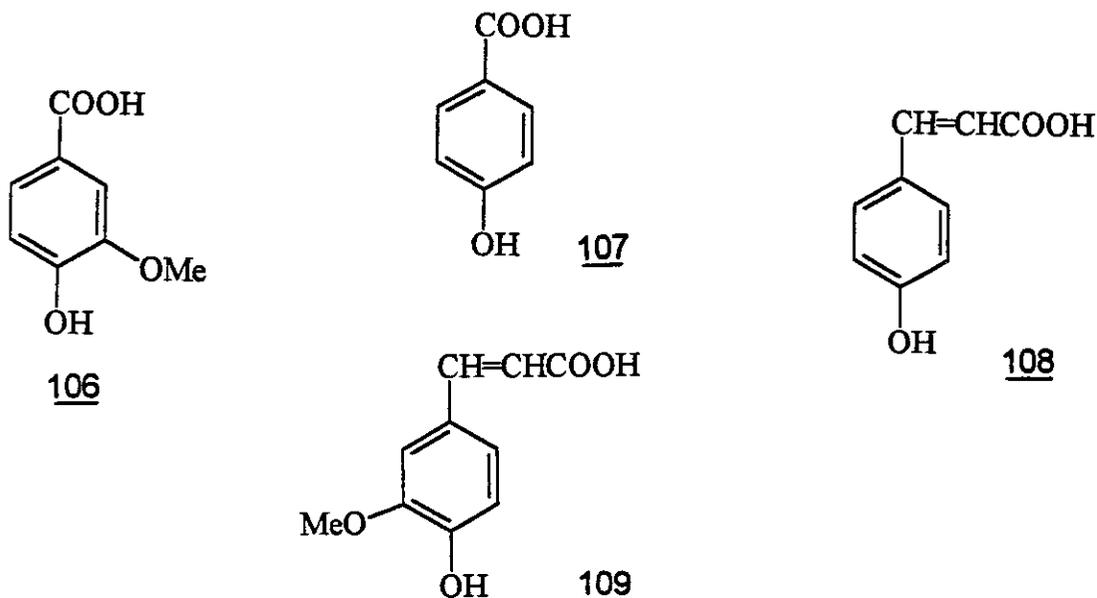
102



- | | | |
|------------|----------------------|---|
| <u>103</u> | R ₁ = OMe | R ₂ =H |
| <u>104</u> | R ₁ = H | R ₂ =OMe |
| <u>105</u> | R ₁ = H | R ₂ =OCH ₂ CH=CH(CH ₃) ₂ |

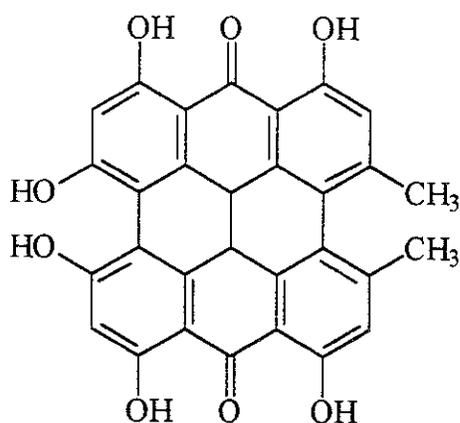
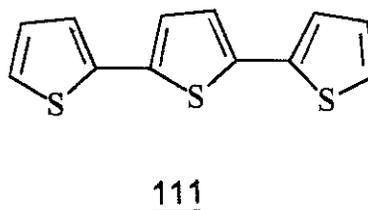
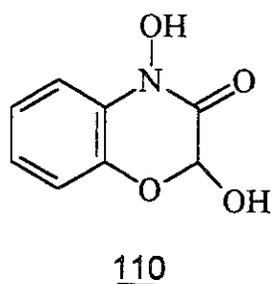
Recientemente, Macías y colaboradores (1993) demostraron que algunas furanocumarinas como el bergaptano (103), la xantotoxina (104) y la imperatorina (105), inhiben significativamente la germinación y el crecimiento de tallos y radículas de semillas de lechuga a una concentración de 10⁻⁴ M.

Con respecto a los derivados del ácido cinámico y otros compuestos aromáticos simples, los ácidos vainillínico (106), *p*-hidroxibenzoico (107), ferúlico (108) y *p*-cumárico (109) son probablemente los inhibidores más comunes que se han detectado en cultivos de maíz, avena, sorgo y trigo (Putnam, 1988; Gerig y Blum, 1991). Además, la mezcla de todos estos compuestos ha demostrado un efecto fitotóxico significativo (Gerig y Blum, 1991).



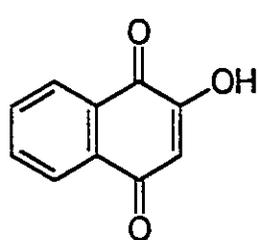
Otros productos naturales de naturaleza aromática con una significativa actividad inhibidora del crecimiento vegetal incluyen el DIBOA (110), el α -tertienilo (111) y la hypericina (112).

Cabe mencionar, que estos dos últimos compuestos ejercen su efecto fitotóxico mediante un mecanismo mediado por la luz UV, lo que les confiere una elevada toxicidad no sólo para las plantas, sino también para el hombre y otros animales (Towers y Anderson, 1988; Benner, 1993); esta desventaja, ha impedido la comercialización de ambos productos.

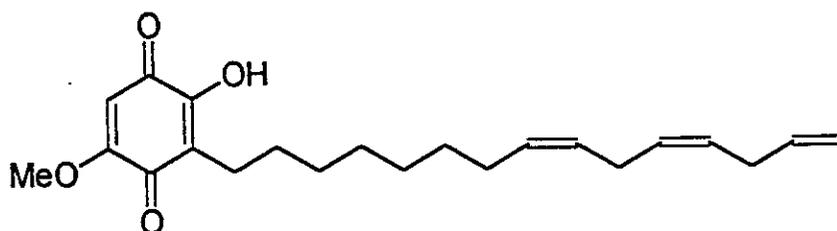


112

La juglona (113) y la sorgoleona (114) constituyen dos de las fitotoxinas más potentes, ya que se ha comprobado que ambos compuestos inhiben el crecimiento de numerosas especies a concentraciones menores de 1 y 10 μM , respectivamente (Duke y Lydon, 1987 ; Einhellig y Souza, 1992.).

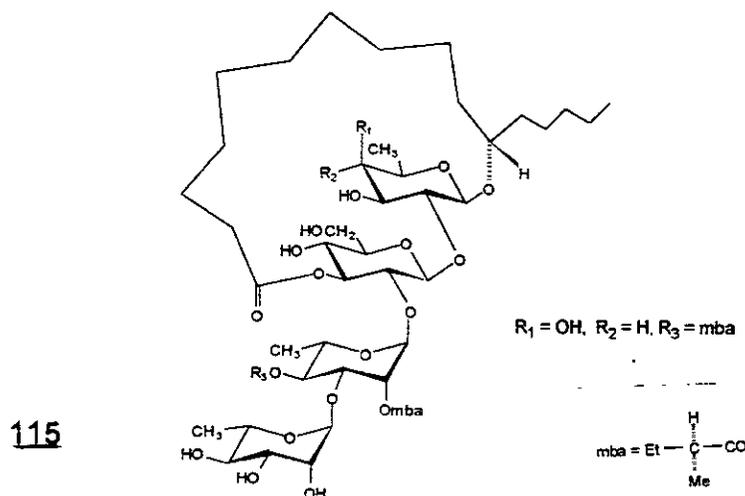


113



114

Recientemente, el estudio biodirigido del extracto fitotóxico de *Ipomoea tricolor* Cav., permitió el aislamiento y caracterización de de un nuevo tipo de fitotoxina de naturaleza glicolípida (Anaya *et al.*, 1990; Pereda-Miranda *et al.*, 1993). El constituyente fitotóxico mayoritario se le designó con el nombre trivial de tricolorina A (115). Este compuesto, demostró una potente actividad fitotóxica contra *A. leucocarpus* y *E. crusgalli*.



Cabe destacar que, la mayoría de las investigaciones que condujeron al aislamiento de las fitotoxinas antes mencionadas, se llevaron a cabo mediante un procedimiento de tipo biodirigido los cuales, permiten detectar la actividad deseada a nivel de los extractos y monitorearla a lo largo de todo el estudio químico. Esta estrategia ha cobrado un gran auge durante las últimas décadas, ya que ha demostrado en múltiples ocasiones ser la más eficiente para la obtención de compuestos bioactivos (Hamburger y Hosttetman, 1991; Ghisalberti, 1993; *inter alia*). De manera general, este proceso incluye las siguientes etapas:

- a) Preselección del material vegetal de acuerdo a los criterios convencionales
- b) Evaluaciones biológicas preliminares para la selección de el (los) candidato(s) apropiado(s) para la obtención de los principios activos
- c) Extracción en gran escala de la(s) especie(s) activa(s) seleccionada(s) mediante la realización de ensayos biológicos preliminares
- d) Fraccionamiento biodirigido del extracto vegetal
- e) Separación y purificación de los constituyentes presentes en las fracciones activas
- f) Determinación de la estructura molecular de los compuestos activos
- g) Ensayos biológicos secundarios de los compuestos activos
- h) Otros estudios conducentes a la comercialización de los compuestos activos.

Los productos naturales que presentan actividad herbicida, ejercen su efecto mediante diversos mecanismos de acción. Así por ejemplo, pueden inhibir la síntesis de aminoácidos, proteínas, lípidos, clorofila y/o carotenoides, o bien, pueden interferir con la división celular ó el metabolismo energético (fotosíntesis y respiración) (Mets y Thiel, 1989; Duke y Abbas, 1995; Einhellig, 1995; *inter alia*).

La alteración de estos procesos metabólicos esenciales para las plantas trae como consecuencia alteraciones en los procesos de germinación y/o desarrollo vegetal.

Actualmente, uno de los principales retos y objetivos de diversos grupos de investigación, es determinar en lo posible, el modo de acción de las fitotoxinas naturales.

Es importante mencionar que en muchas ocasiones, la falta de una infraestructura básica y de una cantidad suficiente de estos compuestos son sin lugar a duda, un impedimento para establecer su mecanismo de acción.

No obstante, en la literatura contemporánea se han publicado numerosas revisiones acerca del mecanismo de acción de productos naturales potencialmente herbicidas (Worsham, 1989; Duke y Lydon, 1993; Einhellig, 1995; Duke y Abbas, 1995).

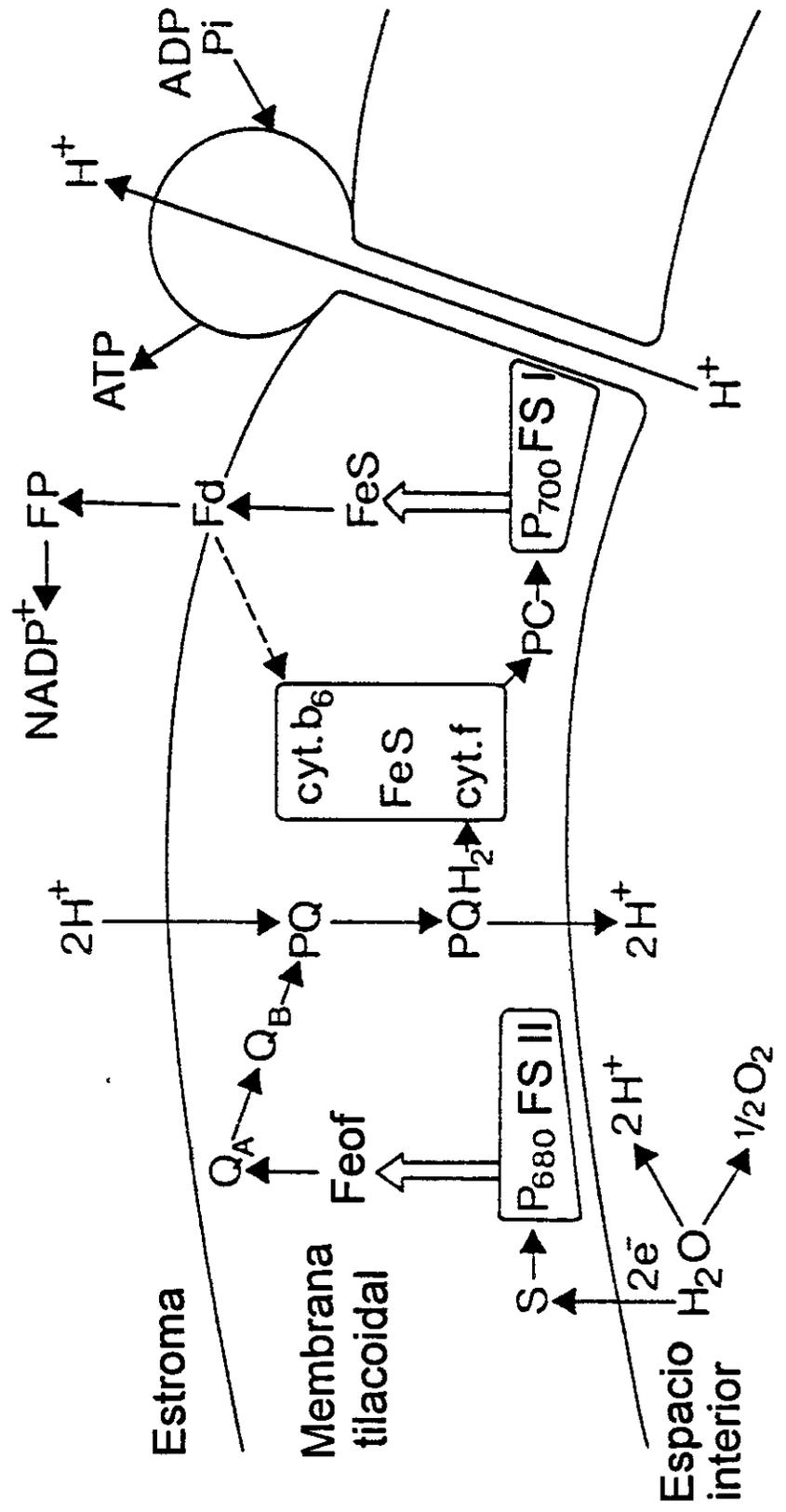
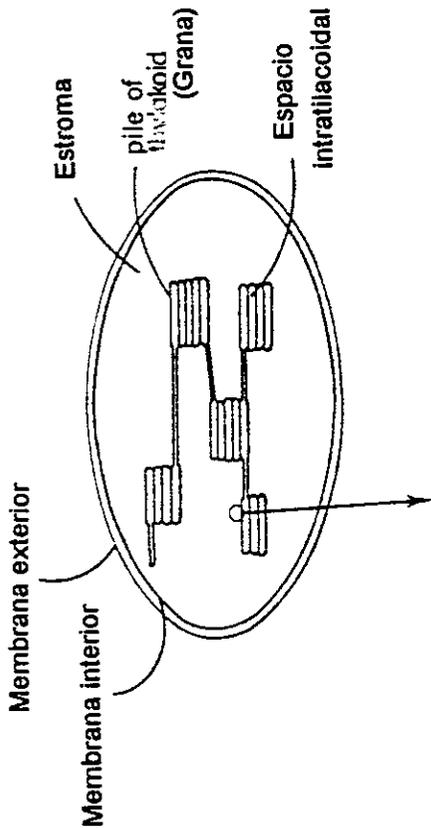
1.3.2 El proceso de fotosíntesis

Aunque la minoría de los herbicidas comerciales afectan reacciones metabólicas comunes a los eucariotes, muchos de ellos ejercen su efecto modificando diferentes eventos a nivel de la fisiología y el metabolismo vegetal. Sin embargo, más del 50% actúan específicamente a nivel del proceso de la fotosíntesis (Bowes *et al.*, 1981; Linscott, 1981; Mathis y Rutherford, 1984; Corbett, 1984; Van Rennsen, 1989; Percival y Baker 1991; *inter alia*). En este sentido es importante destacar que, la fotosíntesis es un proceso bioquímico exclusivo de vegetales, y por lo tanto constituye un blanco de acción altamente específico para las plantas (Mets y Thiel, 1989).

Como ya se mencionó previamente, la fotosíntesis es el proceso metabólico primario afectado por una gran variedad de herbicidas; la mayoría de ellos ejerce su efecto a través de la inhibición del transporte de electrones fotosintético en el lado reductor del fotosistema II (Bowes *et al.*, 1980; Linscott 1981; Corbett 1984; Mathis y Rutherford 1984; Renger *et al.*, 1984; Van Rennsen, 1989; Percival y Baker 1991; *inter alia*). Otros inhiben la fotofosforilación ó síntesis de ATP, ó bien actúan como desacoplantes y aceptores de electrones (Moreland 1980; Corbett 1984).

Considerando lo antes descrito, a continuación se procederá a dar una breve descripción del proceso de fotosíntesis, haciendo especial énfasis en los eventos a nivel del fotosistema II.

El proceso de fotosíntesis se lleva a cabo en los organelos celulares denominados cloroplastos, y consta de dos fases: la fase luminosa y la fase oscura; ambas se llevan a cabo también en los cloroplastos.



Un cloroplasto consta de una doble membrana, una externa y otra interna, separadas por un espacio intermembranal. El sistema interior del organelo se denomina estroma dentro del cual se encuentra una serie de sacos llamados tilacoides, donde se lleva a cabo la fase luminosa. Durante esta fase se deposita la energía solar bajo la forma de ATP y de NADPH (forma reducida del fosfato de dinucleótido de nicotinamida). Estos dos compuestos representan los productos finales de la fase luminosa y son empleados para reducir el CO₂ durante la fase oscura, la cual se lleva a cabo en la parte soluble del cloroplasto, el estroma.

La Figura 6 muestra la localización de los componentes de la fase luminosa dentro de la membrana tilacoidal y la secuencia en que operan los componentes multienzimáticos de la cadena redox (Corbett, 1984; Mets y Thiel, 1989; Anderson y Beardall, 1991; Bowyer *et al.*, 1991).

Las reacciones dependientes de la luz son las que corresponden a la reacción de Hill ó cadena transportadora de electrones. Cada cadena transportadora de electrones se considera como una unidad fotoquímica ó fotosintética y se compone de proteínas acarreadoras de electrones, pigmentos antena y un centro de reacción.

Las plantas superiores contienen dos fotosistemas, el fotosistema I y el fotosistema II, cada uno de los cuales contiene una molécula de clorofila en el centro de reacción. Se conocen dos centros de reacción en las plantas superiores, P₆₈₀ y P₇₀₀ para los fotosistema I y II, respectivamente.

Los dos fotosistemas operan en serie, de tal manera que el reductor primario del fotosistema II transfiere electrones a través de las proteínas

acarreadoras de electrones al centro de reacción del fotosistema I.

La pérdida de un electrón en la molécula de clorofila deja una carga neta positiva que se neutraliza con un electrón proveniente de alguna molécula donadora. En el fotosistema II los electrones provienen de la oxidación del agua, mientras que en el fotosistema I la molécula donadora de electrones es la plastoquinona.

En este punto cabe mencionar que, el fotosistema II es un complejo de proteínas que contiene aproximadamente 20 polipéptidos diferentes de los cuales las subunidades de 47, 44, 34, 32 y 10 kD constituyen los principales polipéptidos que integran la membrana (Bowyer, 1991 ; Fuerst y Norman, 1991) (Figura 7).

Como ya se mencionó previamente, el electrón necesario para la reducción de P_{680} proviene de la fotólisis del H_2O . De tal manera, que dos moléculas de H_2O se fotolisan generando cuatro electrones, cuatro protones y una molécula de O_2 .



El centro de reacción P_{680} reducido, dona un electrón cuando recibe un cuanto de luz al aceptor primario Q_A [plastoquinona que actúa como acarreador de un electrón unido a la proteína de 32 kD (D_1)], vía la feofitina. Posteriormente, un electrón es transferido al aceptor secundario del fotosistema II, la plastoquinona Q_B . Esta quinona también actúa como acarreador de dos electrones. Los electrones viajan por la membrana y llegan a la siguiente molécula aceptora de electrones que es la plastoquinona (PQ); ésta última transfiere los electrones al centro de reacción del fotosistema I

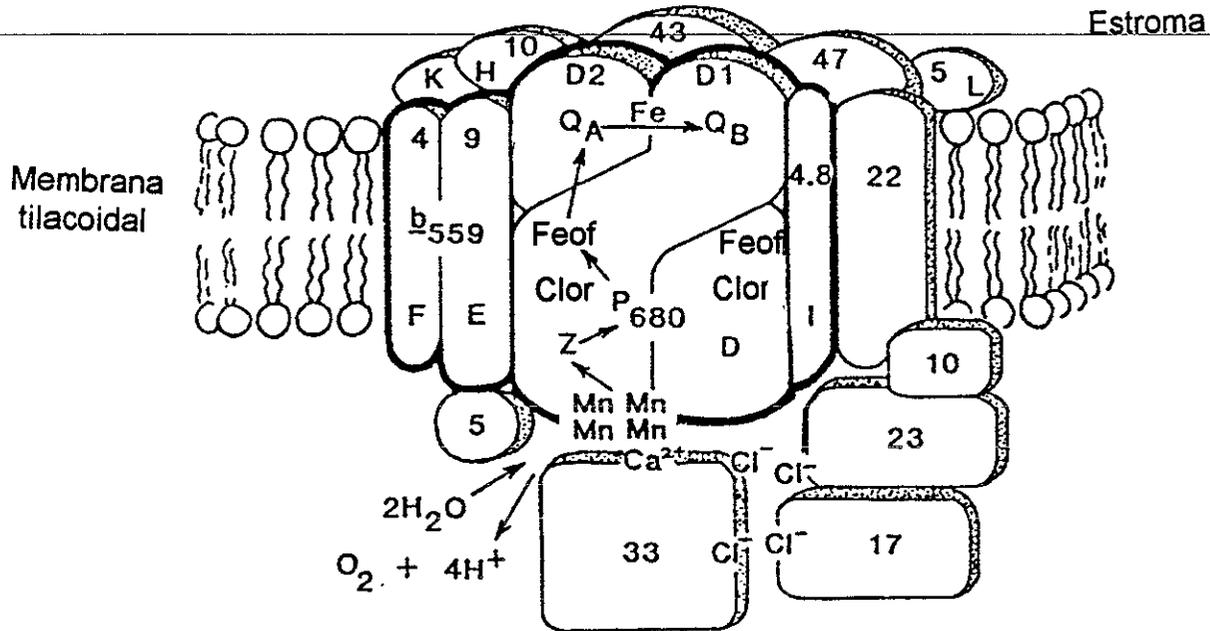


Figura 7. Representación esquemática del centro de reacción del fotosistema II de plantas superiores. Este complejo está constituido del centro de reacción P_{680} , clorofila, feofitina, hierro, citocromo b_{559} , las plastoquinonas Q_A y Q_B y un donador de electrones primario, posiblemente también una plastoquinona. Los números se refieren a los valores de masa molecular de los polipéptidos en kD. Z actúa como donador de electrones inmediato para P_{680+} . El flujo de electrones está indicado por las flechas

(P₇₀₀) a través del complejo citocromo b₆/f. La reducción de la plastoquinona está acompañada de una protonación de la hidroquinona completamente reducida (PQH₂) utilizando dos protones del estroma (Figura 6).

La mayoría de los herbicidas que afectan el proceso de la fotosíntesis ejercen su efecto mediante la inhibición del transporte de electrones entre la plastoquinona primaria Q_A y la plastoquinona secundaria Q_B.

La plastoquinona Q_B está asociada reversiblemente con las subunidades de 32 y 34 kD (designadas como D₁ y D₂, respectivamente), las cuales constituyen el sitio de unión de muchos herbicidas (a excepción de los de tipo fenólico), que actúan a nivel del fotosistema II (Kyle 1985). Cuando ambos sitios están ocupados, se impide entonces la transferencia de electrones entre las plastoquinonas Q_A y Q_B.

Diversos estudios han permitido establecer que los herbicidas de tipo fenólico se comportan de manera diferente aquellos de tipo diurón. Estos compuestos se unen a una proteína, que también se localiza en la región de las plastoquinonas Q_A/Q_B. Esta proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 41 kD (Figura 8) y tiene un mínimo acceso del lado del estroma de la membrana (Trebst *et al.*, 1983; Renger 1984).

Los inhibidores más importantes de la cadena transportadora de electrones dentro del grupo de los herbicidas de tipo diurón, son la atrazina y fenilureas. Una característica común de estos compuestos es la presencia de una entidad hidrofóbica (p. ej. un grupo fenilo, hidrocarburos alifáticos, cloro ó bromo) unida a un grupo polar X= C-N=, dónde X es O, S ó NR (Figura 9) (Van Rennsen 1989; Bowyer *et al.*, 1991). El sitio y modo de acción son los mismos

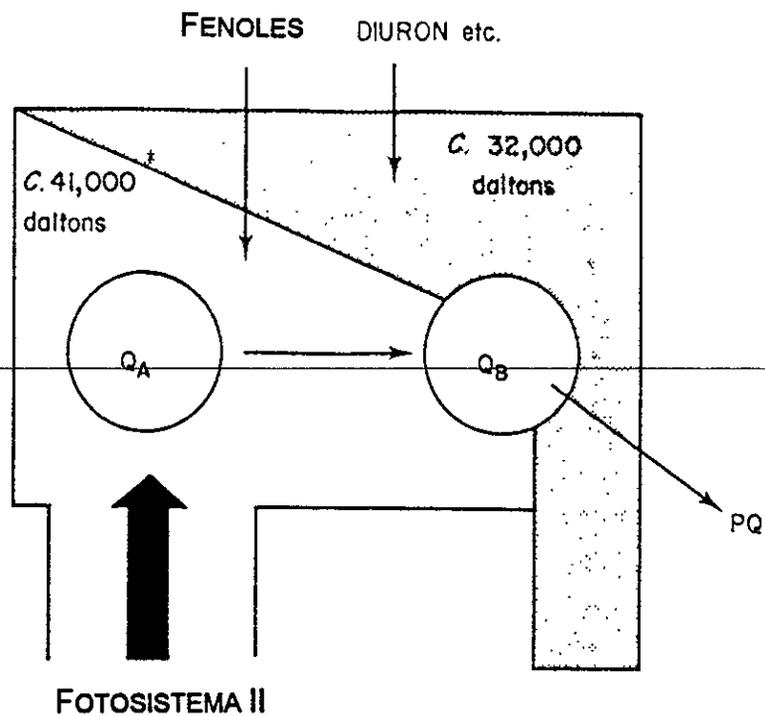


Figura 8. Sitio de unión de los herbicidas de tipo diurón y de tipo fenol.

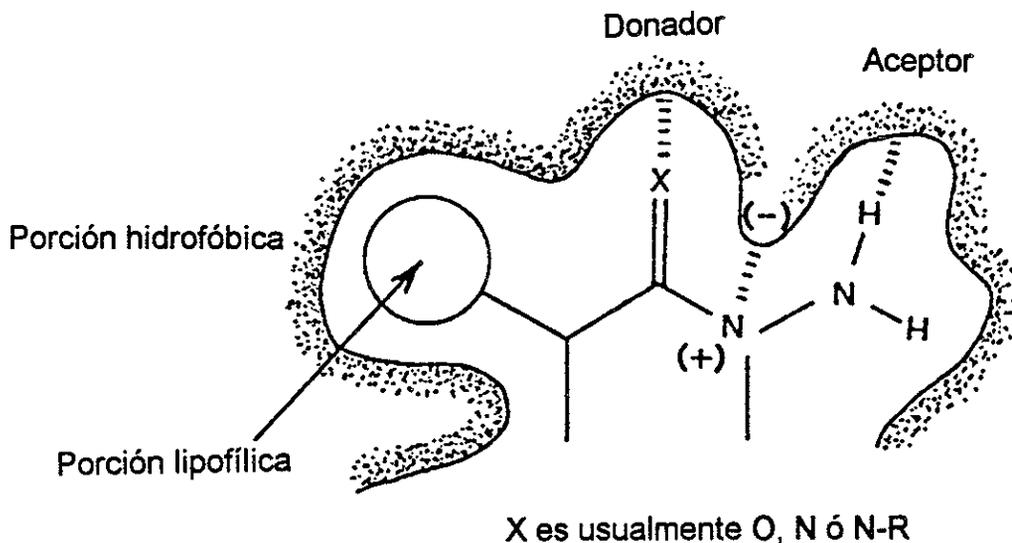


Figura 9. Características estructurales de los herbicidas pertenecientes a la familia de las ureas y las triazinas.

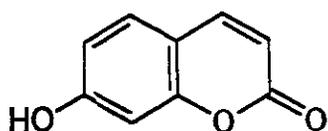
para todos los miembros de estos grupos, pero las diferencias en actividad son debidas a su hidrofobicidad.

En relación a los inhibidores de tipo fenol, estos tienen como característica estructural un grupo OH en una posición comparable al grupo X de los herbicidas de tipo diurón.

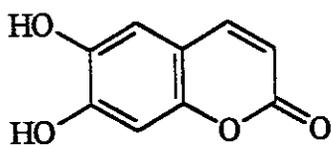
1.3.3 Efecto de productos naturales de origen vegetal sobre el proceso de fotosíntesis

Los estudios relacionados con el efecto de fitotoxinas de origen vegetal sobre diferentes actividades fotosintéticas son escasos. En este sentido, algunas lactonas sesquiterpénicas, cumarinas, flavonoides y compuestos aromáticos son los únicos compuestos que han sido investigados.

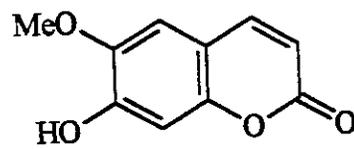
En el caso de las cumarinas, los estudios descritos hasta el momento incluyen únicamente el efecto de cumarinas simples y de 4-fenilcumarinas. Así, la cumarina (100) disminuye la biosíntesis de plastoquinonas y ubiquinonas en trigo (Murray, 1981). La umbeliferona por su parte (116), inhibe la actividad de la enzima ATP sintetasa y evita la fosforilación del ADP con el fosfato inorgánico en cloroplastos aislados de espinacas.



116



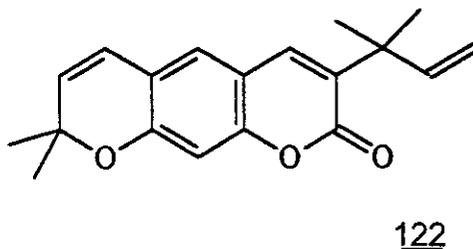
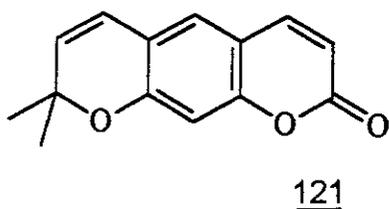
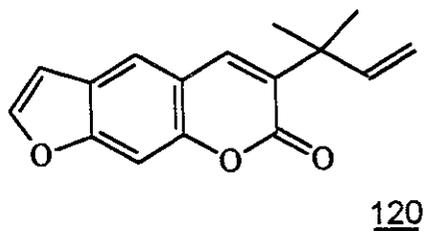
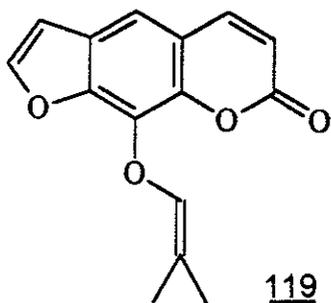
117



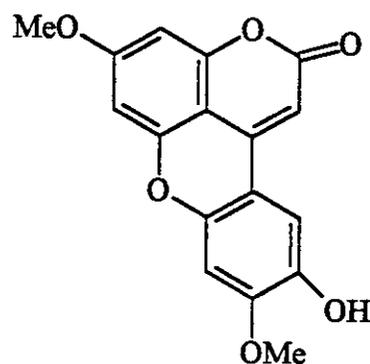
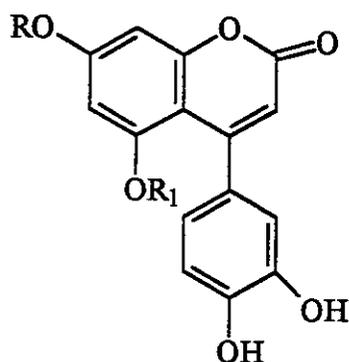
118

Otras cumarinas simples investigadas incluyen la esculetina (117) y la escopoletina (118); ambos compuestos inhiben la fotosíntesis de la especie acuática *Lemna minor* a concentraciones de 500 y 1000 μM , respectivamente (Einhellig, 1986, 1995; Leather y Einhellig, 1988; Mersie y Singh, 1993).

Por otro lado, Macías y colaboradores (1996) describen el efecto de la imperatorina (119), la chalepensina (120), la xantiletina (121) y la 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina (122) sobre diferentes actividades fotosintéticas en cloroplastos aislados de espinacas. El compuesto 119, actúa como un agente desacoplante ya que estimula la actividad de la enzima H^+ -ATPasa. El compuesto 120 se caracterizó como un inhibidor de la transferencia de energía a bajas concentraciones y como un desacoplante no clásico a altas concentraciones. La xantiletina actúa como un inhibidor de la reacción de Hill; el sitio de acción se localizó en el fotosistema I a nivel del complejo $\text{cit } b_6/f$. Por último el compuesto 122 se comporta como un potente desacoplante y un inhibidor débil de la reacción de Hill.



En otro estudio reciente se realizó la evaluación de cuatro fenilcumarinas [5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (123), 5-O-β-D-glucopiranosil-7-hidroxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (124), 5-O-β-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (125) y la 3'-hidroxi-4',7-dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina (126)]. De acuerdo a los resultados obtenidos los compuestos 123-125 demostraron ser agentes desacoplantes, en tanto que el compuesto 126 se caracterizó como un inhibidor de la transferencia de energía. El sitio de acción del mismo se localizó a nivel de CFo (Calera *et al.*, 1996).

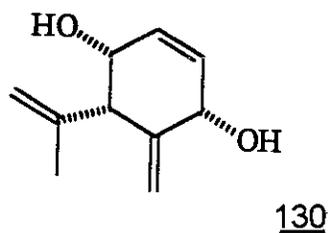
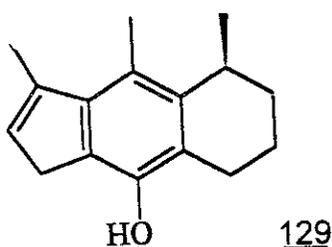
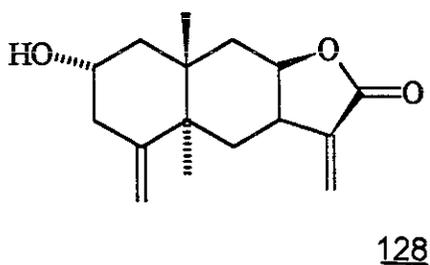
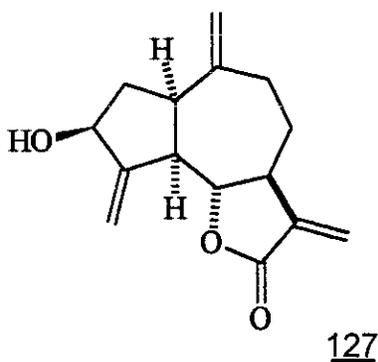


	R	R ₁
<u>123</u>	OMe	β-D-galactosa
<u>124</u>	OH	β-D-glucosa
<u>125</u>	OMe	β-D-glucosa

126

En lo que se refiere a las lactonas sesquiterpénicas, la zaluzanina C (127) y la ivalina (128), inhiben el transporte de electrones en cloroplastos

aislados de *Spinacea oleraceae* L. El sitio de inhibición para los dos compuestos se localizó en el fotosistema II a nivel de la fotólisis del agua (Lotina-Hennsen *et al.*, 1992; Bernal-Morales *et al.*, 1994). La isoalloalantolactona (98) y el cacalol (129) son también inhibidores del transporte de electrones; la isoalloalantolactona se caracterizó como un inhibidor del flujo de electrones entre P_{680} y Q_A (Calera *et al.*, 1995) y el cacalol actúa a nivel de la enzima que fotolisa el agua (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991). Por otro lado, el piquerol (130) (Mendoza *et al.*, 1994), se caracterizó como un inhibidor de la transferencia de energía.



Un estudio realizado con células en suspensión e incorporación de $^{14}\text{CO}_2$ y $[^{14}\text{C}]$ -leucina, demostró que el ácido vainillínico (106) inhibe la fotosíntesis más del 50% a la mayor concentración evaluada (Mersie y Singh 1993).

Ensayos con *Lemna minor* han permitido demostrar también, que la artemisinina (97) reduce la actividad fotosintética de esta especie acuática en un 30% a una concentración de 1 μ M. Un estudio comparativo de este compuesto con el 2,4-D y el glifosato, indicó que la artemisinina es más potente como inhibidor de la fotosíntesis en *L. minor* que los herbicidas comerciales (Chen et al., 1991; Chen y Polatnick, 1994).

Por último, Moreland y Novitzky (1987) determinaron el efecto de diversos ácidos, cumarinas y flavonoides sobre la cadena de transporte de electrones y la fotofosforilación en cloroplastos aislados de espinacas. Los resultados obtenidos de estas evaluaciones demostraron que los compuestos objeto de estudio afectan el proceso de fotosíntesis, inhibiendo la fotofosforilación, aunque la concentración utilizada para obtener el I_{50} es relativamente alta.

1.4 El proceso de la fosforilación oxidativa

Todos los organismos vivos deben tener un suministro de energía del medio ambiente para subsistir. Dada una fuente de energía (p. ej. luz solar en el caso de los organismos fotosintéticos), cada tipo de organismo es capaz de autoproversearse de un suministro de energía química, metabólicamente útil en la forma de ATP.

En organismos superiores, esta función vital se realiza en las mitocondrias; varios complejos enzimáticos localizados en la membrana mitocondrial interior, catalizan la fosforilación oxidativa y es en este último proceso que se lleva a cabo la oxidación de sustratos, lo cual está acoplado a la síntesis de ATP mediante la fosforilación de ADP (Mayer y Poljakoff 1989).

Aunque existen diferencias específicas en los detalles precisos en la producción de ATP, en general, la generación de este último ocurre, cuando los electrones son transferidos desde el NADH (producido en la glicólisis, en el ciclo del ácido cítrico y en otras rutas metabólicas) ó del succinato a la ubiquinona. Posteriormente, los electrones son transferidos desde la ubiquinona vía los citocromos b, c₁ y c al O₂ vía la citocromo oxidasa (aa₃). En la Figura 10, se muestra la transferencia de electrones y la fosforilación en el proceso de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. El resultado de la fosforilación oxidativa, se expresa generalmente con la relación ATP:O (moles de ADP fosforilados a ATP : nátomos de O₂).

La energía necesaria para la síntesis de tan solo una molécula de ATP, es generada por la transferencia de dos electrones a través de cada uno de los sitios

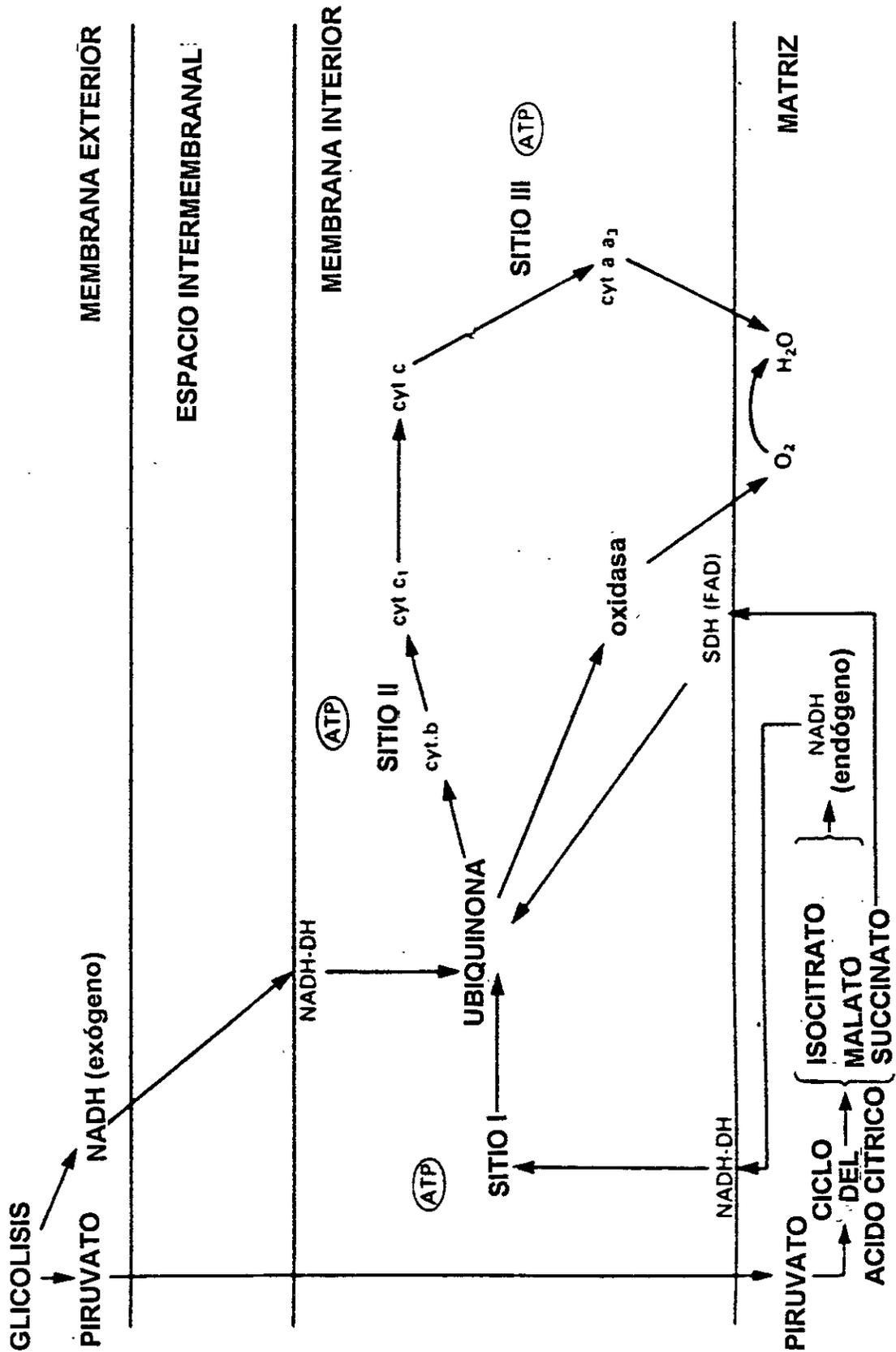


Figura 10. Síntesis de ATP en mitocondrias vegetales cuando los electrones se transfieren desde NADH, succinato,

acoplados I, II y III (Figura 10). Por lo tanto, la oxidación de una molécula de NADH permite la formación de no más de tres moléculas de ATP.

En este punto cabe mencionar que la germinación, el metabolismo y el crecimiento de las plantas requiere una continua síntesis de ATP la cual, en semillas secas es extremadamente baja en comparación con otros adenosin nucleótidos (ADP y AMP); sin embargo, durante la fase de imbibición esta se incrementa notablemente.

Bewley y Black (1994) establecen que la fosforilación oxidativa mitocondrial es el principal suministro de ATP para las plantas desde el inicio de la etapa de imbibición de las semillas. De hecho, una de las propiedades características de las mitocondrias vegetales es su capacidad para catalizar la síntesis de ATP acoplada con la oxidación de O_2 de diversos sustratos.

Existen diversos compuestos de origen sintético que actúan inhibiendo ó desacoplando el proceso de la fosforilación oxidativa. Estos últimos por ejemplo, incluyen numerosos compuestos de diferentes categorías químicas tales como fenoles, benzimidazoles, fenilhidrazonas y aminas por tan solo mencionar algunos. Entre ellos, destacan el DNP (el dinitrofenol), el FCCP (el carbonilciano-p-trifluorometoxifenilhidrazona) y el CCCP (el carbonilciano-m-clorofenilhidrazona).

Con respecto a los compuestos de origen vegetal, son escasos los reportes describiendo el efecto de los mismos sobre la cadena respiratoria mitocondrial. Las quinonas y los flavonoides son quizá los compuestos que han recibido una mayor atención.

La rotenona constituye sin lugar a duda un ejemplo representativo de los productos naturales que actúa a este nivel. Este compuesto, es un potente agente insecticida que ejerce su efecto inhibiendo la cadena de transporte de electrones mitocondrial, específicamente, a nivel de los Fe^{2+} centros sin hierro asociados con el complejo dehidrogenasa interno de las mitocondrias con un valor para la CI_{50} de $35 \mu\text{M}$.

Ravanel y colaboradores (1982), describen al kaempferol como un inhibidor de la fosforilación oxidativa empleando mitocondrias aisladas de *T. solanum* y como sustrato malato. El sitio de inhibición se estableció a nivel del citocromo c de la cadena de transporte de electrones.

Por otro lado, la quercetina, la naringenina, la umbeliferona, la vainillina y el ácido ferúlico inhiben significativamente la oxidación del sustrato (malato) con valores para la CI_{50} de 0.02, 0.11, 1.88, 4.03 y 4.53 mM (Moreland y Novitzky, 1987).

En un estudio realizado con diversas antocianidinas, flavonas, flavanonas e isoflavonas se demostró que aquellos que carecen de sustituyentes en el anillo B son potentes inhibidores de la síntesis de ATP en mitocondrias aisladas de los hipocotilos de semillas de calabaza (Goran y Stelind, 1970).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

En la actualidad, los herbicidas de elección para combatir a las plantas nocivas que afectan a los cultivos económicamente importantes, son en su mayoría de origen sintético. Como ya se indicó en la sección de antecedentes, estos agentes herbicidas presentan una serie de desventajas como son su elevada persistencia en el medio y su toxicidad; así por ejemplo, se ha descrito que algunos herbicidas sintéticos como el DNOC, el DCMU y el dinoceb son altamente tóxicos para los mamíferos (Cremllyn, 1991; Duke y Abbas, 1995). Además, la mayoría no son biodegradables, su costo de producción es elevado y el uso regular de los mismos ha ocasionado la aparición de numerosas especies de arvenses resistentes a los tratamientos con estos herbicidas. En relación con este último punto, se ha descrito que algunas especies de plantas nocivas (p. ej. *Senecio vulgaris*, *Lolium perenne*, *Brassica campestris* y varias especies de *Amaranthus*) que dañan los cultivos de maíz, caña de azúcar, trigo y sorgo han desarrollado resistencia a las triazinas, específicamente a la atrazina y azimacina (Cremllyn, 1991). El desarrollo de resistencia a los agentes herbicidas se ha atribuido a que algunas de estas sustancias son mutagénicas, ocasionando alteraciones en los blancos de acción a nivel molecular en las plantas nocivas; por ejemplo modificando la conformación estructural de una enzima blanco, induciendo la activación de sistemas enzimáticos o bien provocando una sobreproducción del sitio de acción (Moreland, 1980; Cremllyn, 1991).

Considerando esta serie de desventajas ocasionados por el uso de herbicidas sintéticos, recientemente se han propuesto estrategias alternas con la

finalidad de proteger los cultivos de importancia económica. Estas estrategias implican la rotación y sincronización de cultivos, el uso de cultivos de cobertura, el desarrollo de especies resistentes al ataque de plantas e insectos mediante la aplicación de procedimientos genéticos, el empleo de herbicidas biológicos y el uso de herbicidas de origen natural. Estos últimos en principio, son generalmente menos tóxicos para el hombre y animales, son biodegradables y una característica muy importante, es que los mecanismos mediante los cuales ejercen su efecto herbicida son específicos.

De tal forma, que durante los últimos años se ha incrementado de manera notable el interés por realizar investigaciones conducentes a la búsqueda de herbicidas naturales de origen vegetal y microbiano, con las características antes señaladas.

En este contexto, cabe mencionar que las plantas a través de los años han evolucionado y desarrollado mecanismos de protección, incluyendo la biosíntesis de una gran cantidad de metabolitos secundarios (semioquímicos) que las protegen contra el ataque de insectos, malezas y otras plagas. Así, muchas de estas sustancias juegan un papel importante en las interacciones alelopáticas de tipo planta-planta en los distintos ecosistemas. Estas interacciones regulan la densidad y distribución de plantas y se establecen en todo tipo de ecosistemas, tanto naturales como en los agroecosistemas (Holm, 1975; Terry, 1991). Por consiguiente, el reino vegetal constituye una fuente valiosa de fitotoxinas; así, en la literatura contemporánea, existen descritos una gran variedad de productos naturales que presentan propiedades herbicidas potenciales (Duke y Lydon,

1987; Duke, 1991; Benner, 1993; Macías *et al.*, 1993; Duke y Abbas, 1995, *inter alia*).

Tomando en cuenta estas consideraciones, se planteó un proyecto de carácter multidisciplinario con miras a la búsqueda de principios bioactivos de interés agroquímico a partir de especies selectas de la flora medicinal mexicana (Castañeda *et al.*, 1996; Calera *et al.*, 1995; Jiménez *et al.*, 1996; *inter alia*). En este sentido, cabe destacar que la gran biodiversidad de la flora de México ofrece un marco ideal para el hallazgo de productos naturales bioactivos.

Durante la etapa inicial de ese proyecto, se realizaron una serie de ensayos biológicos preliminares sobre diversas especies vegetales (pre-seleccionadas con base en criterios de índole quimiotaxonómico y etnobotánico), con la finalidad de detectar los candidatos apropiados para la obtención de agentes herbicidas potenciales de los mismos. Los resultados obtenidos de estas evaluaciones, permitieron seleccionar a la especie *Helianthella quinquenervis* como una fuente potencial de fitotoxinas. Esto debido principalmente, a las propiedades inhibitoras significativas del crecimiento vegetal demostradas por el extracto metanólico preparado a partir de las raíces y las hojas de esta especie.

Por otra parte, la planta es muy abundante en la zona norte del país lo cual, aseguraría una fuente sostenida de la materia prima en caso de obtenerse agentes herbicidas potenciales.

En este contexto, el objetivo primordial de la presente disertación es:

Establecer el potencial herbicida de las fitotoxinas derivadas de la especie medicinal *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray (Asteraceae) mediante la

evaluación de sus efectos sobre varias actividades fotosintéticas en cloroplastos de espinacas, la respiración durante el proceso de germinación y el efecto postemergente en varias especies vegetales nocivas, para contribuir así, al desarrollo de nuevos agentes herbicidas biodegradables y de menor toxicidad.

Para el cumplimiento del objetivo principal planteado, se consideraron pertinentes los siguientes objetivos específicos:

- 2.1** Determinar la potencialidad fitotóxica de la especie *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray (Asteraceae) mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.
- 2.2** Obtener los principios fitotóxicos del extracto activo obtenido a partir de las raíces de *H. quinquenervis*, mediante un proceso biodirigido empleando como bioensayos de monitoreo los indicados en el inciso anterior.
- 2.3** Establecer la estructura molecular de los compuestos fitotóxicos aislados mediante el empleo de técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales.
- 2.4** Evaluar el potencial fitotóxico de los compuestos caracterizados mediante los mismos bioensayos indicados en el inciso 2.1.
- 2.5** Explorar el efecto de los compuestos fitotóxicos mayoritarios sobre diferentes actividades de la fase luminosa de la fotosíntesis (síntesis de ATP, captación de H⁺ y transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado), en cloroplastos aislados de hojas de espinacas (*Spinacea oleraceae* L.).

- 2.6** Determinar el efecto de los compuestos fitotóxicos sobre la respiración durante el proceso de germinación, utilizando como semillas de prueba, *Zea mays*, *Echinochloa crusgalli*, *Amaranthus hypochondriacus* y *Physalis ixocarpa*.
-
- 2.7** Evaluar el efecto del compuesto con mayor potencial fitotóxico sobre la cadena respiratoria mitocondrial, en mitocondrias aisladas de hipocotilos de *Phaseolus vulgaris*.
- 2.8** Evaluar el efecto sobre la producción de biomasa del extracto y de los compuestos con mayor potencial fitotóxico, mediante la aplicación post-emergente del mismo a tres diferentes especies de malezas.
- 2.9** Determinar el efecto citotóxico del extracto y los compuestos aislados sobre diversas líneas celulares, con la finalidad de establecer posibles efectos tóxicos sobre el hombre y animales.
- 2.10** Realizar otras evaluaciones biológicas (actividad antimicrobiana, citotóxica) que escapen del objetivo principal de la presente propuesta con la finalidad de validar el uso popular medicinal de la planta y ampliar el conocimiento de la potencialidad de la especie *H. quinquenervis* como una fuente de principios bioactivos de interés medicinal.
- 2.11** Fomentar la investigación multidisciplinaria relacionada con las plantas medicinales en México.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAL VEGETAL

Las raíces de *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray, se recolectaron en Bocoyna, Chihuahua, México. En el presente estudio se utilizaron dos colectas diferentes: la primera se efectuó en Noviembre de 1991 y la segunda en Septiembre de 1994. En cada caso se depositó un ejemplar (1a recolecta, Voucher: R. Bye 18058; 2a recolecta, Voucher: R. Bye 19277) en la colección etnobotánica del Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM. La recolección e identificación del material vegetal estuvo a cargo del Dr. Robert Bye (Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM).

El material vegetal se secó a temperatura ambiente y se molió en un molino tipo Wiley 4.

3.2 ENSAYOS BIOLÓGICOS

3.2.1 Evaluación del potencial fitotóxico

La determinación del potencial alelopático del extracto metanólico, de cada una de las fracciones primarias y de los compuestos puros obtenidos, se realizó mediante los bioensayos de germinación de semillas y crecimiento radicular de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* L. y *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv., de acuerdo con los procedimientos descritos en la literatura (Anaya, *et al.*, 1990; Castañeda *et al.*, 1991).

El bioensayo se realizó en cajas de Petri de 10 cm de diámetro; las muestras objeto de estudio (extractos, fracciones y compuestos puros) se disolvieron en el disolvente apropiado y se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones. El extracto se evaluó a 10, 20, 50, 100, 150 y 200 µg/mL; los compuestos 131-133 se evaluaron a concentraciones de 50, 100, 200 y 400 µg/mL, los compuestos 4, 13 y 45 a 10, 20, 40, 100 y 200 µg/mL y finalmente, las fracciones primarias se evaluaron a concentraciones de 50, 100, 200 y 400 µg/mL. 2 mL de las soluciones primarias conteniendo las concentraciones apropiadas, se vertieron en las cajas de Petri sobre un disco de papel filtro (Whatman no. 1) y el disolvente se evaporó mediante una corriente de aire.

Posteriormente, se adicionó 1.5 mL de agua destilada sobre el papel de filtro y se colocaron 10 semillas de cada una de las especies vegetales de prueba.

Las cajas de Petri se incubaron a 30°C y la actividad fitotóxica se registró calculando el porcentaje de germinación y midiendo la longitud de las radículas a las 24 hr (*A. hypochondriacus*) y 48 hr (*E. crusgalli*) de la exposición a los tratamientos.

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético y la tricolorina A se emplearon como controles positivos (Pereda-Miranda *et al.*, 1993) y como controles negativos H₂O y CHCl₃.

Para cada tratamiento se realizaron cuatro réplicas. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa ANOVA ($p < 0.05$) y los valores de CI₅₀ fueron calculados por análisis PROBIT usando los porcentajes de inhibición obtenidos.

3.2.2 Determinación de la actividad fototóxica

La determinación del potencial fototóxico de los compuestos mayoritarios obtenidos de *H. quinquenervis*, se realizó mediante la evaluación del crecimiento vegetal de las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli* de acuerdo con los procedimientos descritos previamente en el inciso 3.2.1 (Anaya *et al.*, 1990; Castañeda *et al.*, 1991) y en la literatura (Proksch *et al.*, 1983), difiriendo tan solo en los siguientes aspectos:

- los compuestos se evaluaron en un rango de concentraciones de 5-200 µg/mL y se prepararon tres series de cajas de Petri, las cuales se mantuvieron en la oscuridad durante 30 min a 37°C.
- posteriormente, una de las series se colocó bajo una cámara de luz UV (max 365 nm, 15 w/m²) durante 2 hr. Al cabo de este tiempo, la serie irradiada se colocó de nuevo en la oscuridad a 37°C. El resto del bioensayo se realizó de igual forma que se describe en el inciso 3.2.1.

Los compuestos que hayan mostrado un efecto inhibitor mayor en los experimentos con luz UV se consideraron fototóxicos.

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético se empleó como un control positivo; el CHCl₃ se empleó como blanco.

Ambas series se realizaron por triplicado. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa ANOVA ($p < 0.05$) y los valores de CI₅₀ fueron calculados una vez más por análisis PROBIT usando los porcentajes de inhibición obtenidos.

3.2.3 Evaluación de la actividad citotóxica

La actividad citotóxica del extracto y de los compuestos obtenidos de las raíces de *Helianthella quinquenervis*, se determinó de acuerdo con los procedimientos establecidos por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (Mar *et al.*, 1991), y se realizaron en el Laboratorio de Cultivo de Células Purdue, en el Centro de Cáncer Purdue. Las líneas celulares empleadas fueron adenocarcinoma de colon (HT-29) (Soule *et al.*, 1973), carcinoma de pecho (MCF-7) (Giard *et al.*, 1973) y carcinoma de pulmón (A-549) (Fogh y Trempe, 1975).

Las líneas celulares obtenidas de estos tumores se trataron con diferentes concentraciones de cada muestra disueltas en el disolvente apropiado y se incubaron durante 72 hr. Transcurrido el periodo de incubación, se determinó la cantidad de células en cada tubo de ensayo mediante un análisis colorimétrico para medir el contenido proteico celular utilizando el método de tinción con sulforhodamina B.

Los resultados se expresaron en término de dosis efectivas medias (DE₅₀).

3.2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana

La evaluación preliminar de la potencialidad antimicrobiana del extracto y compuestos puros se realizó utilizando las técnicas microbiológicas cuantitativas de difusión en agar (Rojas *et al.*, 1992; Gutiérrez *et al.*, 1996) y de dilución en agar. Se utilizaron las siguientes cepas como organismos de prueba en las evaluaciones antimicrobianas preliminares:

Microorganismo de prueba	ATCC
<i>Candida albicans</i>	10231
<i>Aspergillus niger</i>	16888
<i>Trychophyton mentagrophytes</i>	9129

3.2.4.1 Preparación de los microorganismos de prueba

Los microorganismos de prueba se prepararon mediante incubación en caldo nutritivo (Merck) durante 24 hr a 37°C. La concentración final de los organismos en el cultivo se ajustó hasta obtener la turbidez del estándar número 1 de McFarland, lo que corresponde a un número aproximado de 1.5×10^8 células/mL (Barry y Thornsberry, 1991).

Para cada microorganismo se empleó un control positivo: anfotericina B (Sigma) para *C. albicans* y *A. niger*, y griseofulvina (Sigma) para *T. mentagrophytes*.

3.2.4.1 Preparación de las muestras objeto de evaluación

Las muestras objeto de estudio (extracto y compuestos puros) se disolvieron en metanol y se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones (100, 200, 400, 500, 600, 800 y 1000 µg/mL). Cada una de las disoluciones se depositaron en un disco de papel filtro y el disolvente se evaporó mediante una corriente de aire.

3.2.4.3 Método de difusión en agar

Un mL de la suspensión de microorganismos de prueba obtenidos como se indicó en el inciso 3.2.4.1 se sembró de manera uniforme en cada caja de Petri conteniendo agar saboraud. Una vez solidificado el agar se colocaron los discos impregnados con las muestras objeto de evaluación. Posteriormente, las cajas se incubaron durante 48 hr a 28°C. El ensayo se realizó por triplicado para cada una de las muestras de prueba.

Transcurrido este tiempo la actividad antimicrobiana se registró midiendo el diámetro (mm) de la zona de inhibición que circundó a cada uno de los discos.

3.2.4.4 Método de dilución en agar

Con la finalidad de cuantificar la actividad antimicrobiana de las muestras que demostraron una actividad significativa en la prueba de difusión en agar, se determinó la concentración inhibidora mínima (CIM) mediante el método de dilución en agar. Este método se describe en seguida: a un tubo de cultivo de los microorganismos en agar se agregó 3 mL de SSI estéril; con ayuda de una asa micológica se desprendió el cultivo, para preparar la suspensión, la cual se virtió sobre una superficie de agar dextrosa sabouraud contenida en un matraz, este se incubó a 28°C durante 7 días. Transcurrido este período, el cultivo se desprendió con una asa micológica y 20 mL de SSI estéril para hacer una suspensión homogénea con una turbidez comparable con el tubo de 0.5 de MacFarland. Se empleó 0.5 mL de un inóculo de la suspensión del microorganismo en 40 mL de agar dextrosa saboraud.

Para realizar el bioensayo cuantitativo, se ensayaron 7 concentraciones de la muestra (100, 200, 400, 500, 600, 800 y 1000 $\mu\text{g/mL}$) en diferentes matraces Erlenmeyer. Cada matraz contenía 40 mL de agar dextrosa sabouraud fundido a 45 °C, la cantidad de muestra a evaluar y el inóculo. La mezcla anterior se vertió (10 mL) en cajas de Petri por triplicado. Cada una de estas cajas contenía como capa base 10 mL de agar dextrosa sabouraud sin inocular y sin extracto.

3.2.5 Determinación del consumo de oxígeno en el proceso de germinación

El consumo de oxígeno se determinó con un electrodo de Clark tipo- O_2 conectado a un oxímetro YSI (Modelo 5300) a temperatura ambiente.

Para la determinación de la respiración, se emplearon embriones de maíz disectados manualmente (*Zea mays* L.) y tres diferentes tipos de semillas [*Amaranthus hypochondriacus* L., *Echinochloa crusgalli* (Beauv) L. y *Physalis ixocarpa* Brot. y Ph.]. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y se realizó un control negativo para cada caso. El procedimiento utilizado fue el siguiente:

-Los embriones de maíz y las semillas de prueba se desinfectaron usando una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 2 min; transcurrido este tiempo, se lavaron dos veces con agua destilada durante 2 min cada vez.

-Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de imbibición el cual consistió en colocar los embriones y las semillas en cajas de Petri de 10 cm de diámetro, las cuales contenían discos de papel filtro humedecidos con agua destilada (3 mL

para las semillas de *A. hypochondriacus* y *P. ixocarpa*; 5 mL para *E. crusgalli* y embriones de maíz).

-Transcurridos 30 min se adicionaron a las cajas de Petri los compuestos objeto de estudio previamente disueltos en una mezcla de DMF-DMSO (1:1), en un intervalo de concentraciones de 50 a 400 μ M.

-A continuación, se colocaron 300 semillas para el caso de tomate y amaranto, 50 de *Echinochloa* y 10 embriones de maíz a cada caja de Petri, las cuales se sellaron con parafilm y se colocaron en una incubadora Fisher Scientific Modelo 750D a 30°C (en la oscuridad) durante 3, 12, 24 y 48 hr.

-Una vez calibrado el oxímetro se transfirió el contenido de cada una de las cajas de Petri a la celda y se determinó la velocidad de consumo de O₂ en los intervalos de tiempo antes mencionados. El 100% de consumo de oxígeno en el control negativo corresponde a 1200 η átomos de O₂.

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa ANOVA ($p < 0.05$) y los valores de CI₅₀ fueron calculados una vez más por análisis PROBIT.

3.2.6 Evaluación del efecto de la encecalina, la euparina, la desmetilencecalina, la 6-metoxitremetona y el extracto metanólico sobre la producción de biomasa en tres especies de arvenses

Para realizar este bioensayo se emplearon tres diferentes especies de arvenses: *Trifolium alexandrinum* L., *Echinochloa crusgalli* (Beauv.) L. y *Amaranthus hypochondriacus* L.

Seis semillas de cada especie se colocaron en recipientes conteniendo tierra. Las plantas se desarrollaron durante tres semanas en una cámara de crecimiento a 28°C y un ciclo de 12 hr de luz-obscuridad ($236 \mu\text{E m}^{-2} \text{seg}^{-1}$). Transcurrido este tiempo, se trasladaron a una segunda cámara, para completar así, su ciclo de crecimiento. Las condiciones de temperatura y fotoperiodo fueron 17-20°C y 16 x 8 (5:30 x 21:30), respectivamente.

Después de una semana de adaptación de las plantas a las condiciones antes descritas, se aplicaron las muestras objeto de estudio mediante un isopo. Para todos los casos, se emplearon como concentraciones de prueba los valores equivalentes a las obtenidas para la CI_{50} de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*.

Para determinar la producción de biomasa, las plántulas se removieron de la tierra y las raíces se lavaron con H_2O destilada hasta eliminar por completo los residuos de tierra; una vez lavadas se procedió a determinar el peso fresco de cada una de las plántulas. Para determinar el peso seco, cada una de las plántulas se desecó a 30°C durante 48 hr (Picman 1986; Chen y Leather 1990; Chen y Polatnick 1991; Hoagland 1996).

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y se emplearon Tween 80 (0.1 mL / L) y H_2O como controles negativos para cada caso. El metilviologeno (Paraquat) se utilizó como un control positivo a una concentración de 10^{-2} M.

3.2.7 Determinación de los cambios estructurales de las radículas de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli* inducidos por los tratamientos de la enecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4).

Los posibles cambios celulares inducidos por los tratamientos de los compuestos 4, 13 y 45 sobre cortes semifinos de las radículas de las especies *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*, se determinaron mediante el registro y análisis de su ultraestructura por microscopía electrónica. Para ello, ambas especies de semillas se germinaron de acuerdo con el procedimiento descrito previamente en el inciso 3.2.1.

Transcurrido el tiempo de exposición a los tratamientos, las radículas se fijaron aproximadamente durante 18 hr con aldehído glutárico al 2%. Posteriormente, se eliminó el aldehído glutárico y las radículas se lavaron con buffer de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 0.05M (Konishi *et al.*, 1995; Solis *et al.*, 1995).

Para post-fijar las muestras, se desechó la solución de fosfatos y se añadió una solución de OsO_4 al 2%; las radículas se mantuvieron en contacto con este reactivo durante dos horas a 5°C. En seguida, se eliminó la solución de osmio y se procedió a deshidratar las muestras mediante el empleo de cantidades crecientes de acetona (desde acetona al 30%, hasta 100%). A las muestras deshidratadas, se les adicionó óxido de propileno y se incubaron durante 48 horas; después, se realizó la infiltración con óxido de propileno y Epan 812 en relación 1:1 durante 48 hr y al final, se llevó a cabo la inclusión del material en Epon 812 durante 48 hr a 60°C. Una vez incluido el material, se realizaron los cortes de las radículas con un microtomo con punta de diamante Reichter UmO_3 .

Las muestras se tiñieron con acetato de uranilo y citrato de plomo al 1% (peso/volumen) y se examinaron bajo un microscopio electrónico JEOL 100B.

3.3 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA ENCECALINA, LA EUPARINA Y LA DESMETILENCECALINA SOBRE DIFERENTES ACTIVIDADES DE LA FASE LUMINOSA DE LA FOTOSÍNTESIS

3.3.1 Aislamiento de los cloroplastos

Los cloroplastos se obtuvieron a partir de 30g de hojas de espinacas frescas (*Spinacea oleracea* L) verdes y turgentes. Todo el proceso de aislamiento se llevó a cabo en frío y en la oscuridad. Las hojas se lavaron con suficiente agua destilada para eliminar la tierra, se les removió la nervadura central y el ápice. Posteriormente, se fragmentaron y colocaron en el vaso de una licuadora previamente enfriado, conteniendo 150 mL de medio para aislar cloroplastos (Apéndice I). A continuación, se homogeneizaron en la licuadora (Osterizer Modelo L-21) durante 5 segundos intermitentes a velocidad máxima. El homogeneizado se filtró a través de 4 capas de gasa y el filtrado se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min a 4°C (Centrifuga Beckman J2-21, rotor de ángulo fijo JA-20). Por último, el sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 1 mL del medio de aislamiento (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991; Peña-Valdivia *et al.*, 1991).

3.3.2 Cuantificación de clorofila

La clorofila se cuantificó de acuerdo al método de Strain y col. (1971). 50 μ L de la suspensión de cloroplastos se transfirieron a un matraz de 5 mL y se aforó con acetona al 80% (por duplicado).

Esta suspensión se mantuvo durante 5 min en la oscuridad con la finalidad de extraer y solubilizar la clorofila, así como para evitar su degradación por la luz. Transcurrido este tiempo, la suspensión se centrifugó durante 5 min a 2000 rpm, con la

finalidad de sedimentar las proteínas y otros residuos precipitados de los cloroplastos. Posteriormente, se cuantificó el contenido de clorofila mediante la determinación de la absorbancia a 663 y 645 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman (Modelo DU 650).

La concentración de clorofila se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[\text{clorofila}] = (8.05 A_{663} + 20.29 A_{645}) 5$$

$$[\text{clorofila}] = \text{mg clorofila mL}^{-1}$$

Donde :

A= Lectura de absorbancia de las muestras

8.5 y 20.29= Coeficientes de extinción

5= Factor de dilución

3.3.3 Bombeo de protones

El bombeo de protones se determinó registrando los cambios de pH en el medio de reacción entre 8.0 y 8.1, para lo cual se empleó un potenciómetro Corning (Modelo 12) de escala expandida. El voltaje generado por los cambios de pH se transdujo en un registrador gráfico Gilson.

Para llevar a cabo las determinaciones, a 3 mL de medio de reacción (Apendice I), se adicionó por separado cada uno de los compuestos de prueba en un intervalo de concentraciones de 50 a 400 μM y el equivalente a 60 μg de clorofila.

El cambio de pH en el medio de reacción se determinó después de un periodo de iluminación de 1 minuto. Como fuente de iluminación se empleó una lámpara de

proyector de 250 wats. El haz luminoso se hizo pasar a través de una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 2% que sirve como filtro de luz y de calor (lente de Izawa). El gradiente de protones producido, se cuantificó por titulación, lo cual se realizó mediante la adición de 10 μL de una solución de KOH 0.01N al medio de reacción, en presencia de cloroplastos sin iluminar (Peña-Valdivia *et al.*, 1991). La velocidad de captación de protones se calculó de la siguiente manera:

$0.7 \mu\text{equiv de KOH}/X_t \cdot X_p/1 \text{ min} \cdot 60 \text{ min}/1 \text{ hr} \cdot 1/0.06 \text{ mg de clorofila}$, donde
 $X_t = \mu\text{equiv de protones consumidos en la reacción (altura de la curva obtenida en cm al adicionar 10 } \mu\text{L de KOH 0.07 N)}$
 $X_p = \text{altura de la curva obtenida en cm en un minuto de iluminación}$

3.3.4 Síntesis de ATP

La síntesis de ATP se determinó de manera similar al bombeo de protones con la diferencia de que en este caso se adicionó al medio de reacción ADP 1 mM y KH_2PO_4 3 mM.

La velocidad de síntesis de ATP se calculó de la siguiente manera:

$$V = AH/C, \text{ donde}$$

$V = \text{velocidad de la síntesis de ATP } (\mu\text{moles de ATP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{clorofila} \cdot \text{hr}^{-1})$

$A = \mu\text{moles de H}^+ \text{ usados en la titulación con KOH/altura de la curva en cm}$

$H = \text{altura de la curva obtenida en cm en un minuto de iluminación}$

$C = \text{concentración de la clorofila empleada}$

3.3.5 Medición de la velocidad de transporte de electrones

La determinación de la velocidad del transporte de electrones se midió en tres diferentes condiciones (transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado), y se evaluó indirectamente al monitorear la producción de oxígeno que se libera durante la fotólisis del agua con un oxímetro YSI y un electrodo de Clark; en este electrodo de platino, el O_2 es reducido a H_2O . Si el electrodo de Pt se mantiene a 0.7 V negativo respecto al de referencia (Ag/AgCl) circulará una corriente proporcional a la concentración de O_2 en la disolución. La captación de oxígeno entonces, es considerado como un parámetro para determinar el transporte de electrones total en la cadena redox.

Para llevar a cabo la determinación del transporte de electrones basal, a 3 mL de medio de transporte (Apendice I), se le adicionó los compuestos de prueba en un intervalo de concentraciones de 50 a 400 μM y la cantidad equivalente a 60 μg de clorofila. La mezcla resultante se agitó y se iluminó empleando una lámpara de proyector de 150 wats tal y como se indicó previamente.

La determinación de los transportes de electrones fosforilante y desacoplado se llevó a cabo de manera similar al basal, con la diferencia de que en estos casos se adicionó ADP 1 mM y KH_2PO_4 3 mM en el primer transporte y NH_4Cl 6 mM (agente desacoplante) para el segundo de ellos.

En todos los casos, los controles se realizaron al inicio y al final de cada experimento; estos consistieron en la mezcla de reacción mencionada para cada experimento a excepción del compuesto a ensayar. La velocidad obtenida se comparó

con la velocidad del control (Izawa, 1977; Trebs, 1972; Dilley, 1972) de acuerdo a la siguiente ecuación :

$$0.4 \mu\text{equiv de } K_3Fe(CN)_6 / X_t \cdot X_p / 1 \text{ min} \cdot 60 \text{ min/hr} \cdot 1/0.06 \text{ mg de clorofila}$$

$$\text{Velocidad de transporte de electrones} = \mu\text{equiv de } e^- \cdot h^{-1} \cdot \text{mg de clorofila}^{-1}$$

Donde :

X_p = pendiente obtenida de los trazos problemas

X_t = altura de la curva obtenida en cm al consumirse 0.4 $\mu\text{equiv de } K_3Fe(CN)_6$ en un minuto de iluminación

3.3.6 Reacciones parciales de los fotosistemas I y II

La determinación del flujo de electrones en los fotosistemas I y II se efectuó utilizando el medio de transporte de electrones para fotosistemas (Apendice I) adicionando desacoplantes, donadores y aceptores de electrones artificiales e inhibidores de la cadena redox como se indica a continuación.

Para todos los casos, la velocidad obtenida se comparó con la velocidad del control negativo.

3.3.6.1 Determinación del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema I de DAD a MV

A 3 mL del medio de reacción (Apendice I) se adicionó DCMU 10 μM , DAD 100 μM reducido con ascorbato 300 μM , MV 50 μM , NH_4Cl 6 mM y 60 μg de clorofila y los compuestos de prueba en un intervalo de concentraciones de 50 a 300 μM .

3.3.6.2 Determinación del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de H₂O a DAD/K₃[Fe(CN)₆]

A 3 mL de medio de transporte de electrones para fotosistemas se le adicionó DBMIB 1 μ M, DAD 50 μ M, K₃[Fe(CN)₆] 300 μ M, NH₄Cl 6 mM, el equivalente a 60 μ g de clorofila y los compuestos de prueba en el mismo intervalo de concentraciones.

3.3.6.3 Determinación del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de H₂O a SiMo

A 3 mL del medio de reacción de fotosistema II (Apendice I) se adicionó SiMo 200 μ M y DCMU 10 μ M, el equivalente a 60 μ g de clorofila y los compuestos de prueba en el mismo intervalo de concentraciones.

3.3.6.4 Determinación del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de DPC a DCPIP

Los cloroplastos obtenidos tal y como se indicó en el inciso 3.3.1 se incuban con Tris 0.8 M (pH=8) (en una proporción de 1 mL de medio por 0.3 mg de clorofila) durante 30 min a 0°C con agitación constante. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 40 mL de medio de aislamiento de cloroplastos y la mezcla resultante se centrifugó a 5000 rpm durante 2 min. Posteriormente, se determinó el contenido de clorofila siguiendo la metodología descrita en el inciso 3.3.2.

Para llevar a cabo la reacción, a 3 mL de medio de reacción de fotosistema II se adicionó DCP 200 μ M, DCPIP 100 μ M, la cantidad equivalente a 60 μ g de clorofila y los compuestos a evaluar en un intervalo de concentraciones de 50 a 300 μ M.

La mezcla resultante se agitó y se determinó la absorbancia a 600 nm. Posteriormente, se iluminó durante 1.5 min con un haz luminoso filtrado a través de un lente de Izawa y se determinó nuevamente la absorbancia a 600 nm (Vernon y Shaw, 1969).

3.3.7 Determinación del transporte basal y desacoplado a diferente pH

La dependencia del pH del transporte de electrones basal y desacoplado se determinó de la siguiente manera:

A 3 mL de medio de reacción (Apendice I) se adicionó la cantidad equivalente a 60 µg de clorofila y los compuestos de prueba a una concentración de 250 µM.

3.3.8 Determinación de la actividad de la enzima Mg²⁺-ATPasa

La actividad de la enzima Mg²⁺-ATPasa se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Mills y colaboradores (1980). Los cloroplastos se aislaron tal y como se indicó en el inciso 3.3.1 con la diferencia que el sedimento obtenido se lavó con 2 mL de medio de aislamiento y se centrifugó a 10000 rpm durante 1 min ; posteriormente, se reconstituyó con 1 mL de medio de resuspensión.

3.3.8.1 Activación de la enzima Mg²⁺-ATPasa

A 0.1 mL de la suspensión conteniendo 0.3 mg de clorofila /mL se adicionaron 0.25 mL de medio de activación 1 (Apendice I). Posteriormente, la mezcla de reacción se iluminó durante 1.5 min con un haz luminoso filtrado a través de un lente de Izawa y con agitación suave.

3.3.8.2 Hidrólisis de ATP y cuantificación de fosfatos

Se mezclaron 0.1 mL de cloroplastos activados con 0.9 mL del medio de activación 2 (Apendice I). La hidrólisis de ATP se realizó en la oscuridad y con agitación suave durante 1 min. La reacción se suspendió al adicionar 500 μ L de TCA al 20%.

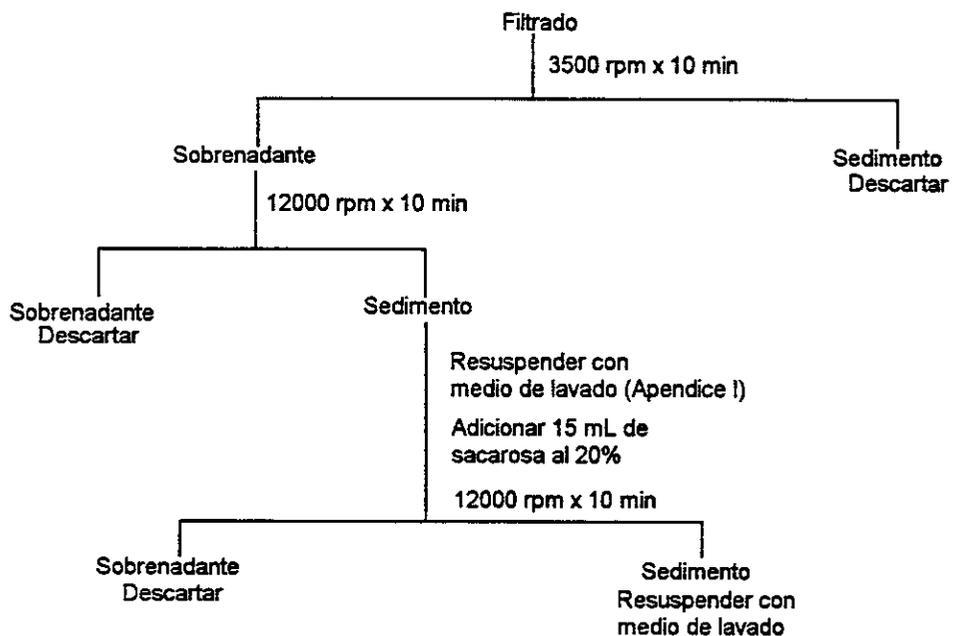
Las proteínas precipitadas con TCA se eliminaron por centrifugación durante 5 min a 2000 rpm en una centrífuga clínica (Modelo CL). El sobrenadante se utilizó para la determinación del fosfato liberado el cual, se cuantificó por método colorimétrico tal y como se describe a continuación (Sumner 1942).

A 1 mL de sobrenadante se adicionó 250 μ L de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ al 6.6%, 250 μ L de H_2SO_4 7.5N y 0.3 mL de agua destilada. La mezcla resultante se agitó y de inmediato se adicionaron 200 μ L de FeSO_4 al 10% (p/v en agua acidulada; H_2SO_4 7.5N). La mezcla anterior se dejó en reposo durante 20 min; transcurrido este tiempo, se determinó la absorbancia a 650 nm en un espectrofotómetro Beckman (Modelo DU 650). Simultáneamente, se realizó una curva patrón con KH_2PO_4 empleando un rango de concentraciones de 0.5 μ M a 1 μ M. Los datos de absorbancia a 660 nm se graficaron con concentraciones crecientes de KH_2PO_4 y de esta curva se extrapolaron los valores de absorbancia del fosfato liberado al llevarse a cabo la hidrólisis de ATP.

3.4 Determinación del efecto de la enecalina sobre la cadena respiratoria mitocondrial en mitocondrias aisladas de *Phaseolus vulgaris*

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Las mitocondrias se obtuvieron a partir de 120 g de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) las cuales, se desinfectaron previamente con una solución de NaClO al 1% durante 2 min ; transcurrido este tiempo, se lavaron dos veces con agua destilada y se incubaron durante 72 hr. Al cabo de este tiempo se les removió el hipocotilo y la raíz. Posteriormente, se fragmentaron en un mortero conteniendo 100 mL de medio de aislamiento (Apendice I). A continuación, se filtró a través de cuatro capas de gasa y el filtrado se centrifugó de acuerdo al siguiente esquema (Sidney et al., 1970 ; Makovec y Cannon, 1979 ; Neuburger, 1986).



La proteína mitocondrial se cuantificó de acuerdo al método de Lowry y colaboradores (1961). 30 μ L de la suspensión mitocondrial se transfieren a un matraz conteniendo previamente 1 mL de NaOH 0.1 N, 4 mL de una solución A (9.8 mL de NaCO₃ en NaOH 0.1 N, 0.1 mL de CuSO₄ 0.5% y 0.1 mL de tartrato de

sodio y potasio al 1%) y 1 mL de H₂O ; la solución resultante se mantuvo en reposo durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 0.4 mL de una solución B (3 mL de reactivo de Folin y 4.5 mL de H₂O ; la solución se mantuvo en reposo durante 10 min. Posteriormente, se cuantificó el contenido de proteínas mediante la determinación de la absorbancia a 625 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman (Modelo DU 650).

La determinación de la actividad fosforilante, se monitoreó en un oxímetro YSI (Modelo 5300) y un electrodo de Clarck tipo O₂.

A 3 mL de medio de reacción (Apendice I), se le adicionó KH₂PO₄ 20 mM, el sustrato (succinato 10 mM), ADP 50 μM, el compuesto de prueba en un intervalo de concentraciones de 50 a 400 μM y la cantidad equivalente a 1.2 mg de proteína mitocondrial. Los controles se realizaron al inicio y al final de cada experimento a excepción del compuesto a ensayar. La velocidad obtenida se comparó con la velocidad del control. La relación de ADP :O se determinó considerando la siguiente ecuación :

$$\frac{\text{ADP}}{\text{O}} \times \frac{1200 \text{ nátomos de O}_2 \times \text{m} \times 3 \text{ mL} \times 2}{21 \text{ cm}}$$

3.5 ESTUDIO FITOQUIMICO DE LA PRIMERA COLECTA DE LA RAICES DE *H. quinquenervis*

3.5.1 Extracción

2.71 kg de material vegetal (raíces) seco y molido se extrajeron mediante un proceso de maceración exhaustivo con metanol (8.7 L) a temperatura ambiente

Posteriormente, se filtró y se concentró a presión reducida. La evaporación del disolvente proporcionó 735 g de un residuo aceitoso de color amarillo.

3.5.2 Métodos cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm, 0.2 y 2 mm de espesor, Merck) y varios sistemas de elución. Como agente cromógeno se empleó una solución reactivo de sulfato cérico amoniacal.

Para el caso de las cromatografías en columna abierta, se empleó en todos los casos como adsorbente, gel de sílice F₂₅₄ (Merck).

3.5.3 Fraccionamiento preliminar del extracto total

El extracto metanólico total de *H. quinquenervis* fue sometido a un fraccionamiento mediante una cromatografía en una columna de vidrio empacada con gel de sílice (1.25 kg), empleando como fase móvil un gradiente de hexano/cloroformo/metanol. Se recolectaron un total de 115 fracciones de 500 mL; cada una de estas se concentró al vacío. La semejanza y la homogeneidad cromatográfica en capa fina de cada una de las fracciones permitió su reunión en seis grupos de fracciones primarias (F₁-F₆), las cuales se evaluaron de manera independiente mediante el bioensayo de la toxicidad para *Artemia salina* y mediante la determinación del crecimiento radicular de dos semillas (*Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*). En el Cuadro 3 se resumen los eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos y las fracciones combinadas.

Cuadro 3. Resumen del fraccionamiento primario del extracto metanólico obtenido de las raíces de la primera colecta de *H. quinquenervis*.

Disolvente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas	Clave fracción
Hex	100	1-21	1-2	-
Hex-CHCl ₃	9:1	22-35	3-45	F ₁ [†]
	7:3	36-51		
Hex-CHCl ₃	6:4	52-55	46-54	F ₂
Hex-CHCl ₃	1:1	56-73	55-56	F ₃ [†]
CHCl ₃	100	74-78	57-81	F ₄ [†]
CHCl ₃ -MeOH	95:5	79-82		
CHCl ₃ -MeOH	9:1	83-88	82-90	F ₅
	8:2	89-95		
CHCl ₃ -MeOH	1:1	96-106	91-115	F ₆
CHCl ₃ -MeOH	3:7	107-112		
MeOH	100	113-115		

[†]Fracciones fitotóxicas para *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*

3.5.4 Aislamiento y purificación de los compuestos

3.5.4.1 Obtención de la enecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4).

La fracción bioactiva F₁ (23 g) eluida con hexano-CHCl₃ en una proporción 9:1, se cromatografió en una columna utilizando 165 g de gel de sílice y como eluyentes benceno, mezclas de benceno-CHCl₃ en diferentes proporciones y CHCl₃; se recolectaron un total de 64 fracciones de 50 mL cada una (Cuadro 4). Cada fracción fue analizada por cromatografía y fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica.

Cuadro 4. Resumen de la cromatografía en columna de la fracción primaria activa F₁.

Disolvente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas	Clave de la fracción
Benceno	100	1-26	1-21	F ₁ -a
Benceno- CHCl ₃	99:1	27-40	22-46	F ₁ -b
Benceno- CHCl ₃	97:3	41-48		F ₁ -c
Benceno- CHCl ₃	9:1	49-56	47-64	F ₁ -d
CHCl ₃	100	57-64		F ₁ -e

El análisis cromatográfico detallado de la fracción secundaria F₁-a, permitió detectar la presencia de tres compuestos mayoritarios, los cuales, se separaron mediante la aplicación de la técnica cromatográfica en capa fina modalidad preparativa (ccfp). Se emplearon un total de ocho placas cubiertas con gel de sílice de 2 mm de espesor y como sistema de elución hexano-AcOEt en una proporción 9:1; las placas se desarrollaron cuatro veces en cada caso.

Como resultado de este proceso de separación se obtuvieron 300 mg del producto (13) como un aceite de color amarillo; 45 mg del compuesto (45) como un sólido amarillo con p.f. de 97-100⁰C; y 100 mg del compuesto (4), también como un aceite amarillo.

3.5.4.2 Obtención de la 6-metoxitremetona (131)

La fracción fitotóxica F₃ (5 g) fué sometida a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta utilizando 100 g gel de sílice y como eluyentes hexano con cantidades crecientes de AcOEt. Se recolectaron un total de 331 fracciones de 40 mL cada una. En el Cuadro 5 se resumen los disolventes empleados,

las proporciones de los mismos, así como las fracciones recolectadas con cada uno de ellos.

Cuadro 5. Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna de la fracción bioactiva F₃

Disolvente	Proporción	Fracciones recolectadas	Fracciones reunidas	Clave de la fracción
Hex	100	1-43	1-66	F ₃ -a
Hex-AcOEt	99:1	44-262	67-269	F ₃ -b
Hex-AcOEt	98:2	263-274		-
Hex-AcOEt	97:3	275-282		-
Hex-AcOEt	95:5	283-300	270-310	F ₃ -c
Hex-AcOEt	9:1	301-315		-
Hex-AcOEt	1:1	316-331	311-331	F ₃ -d

La fracción secundaria F₃-b mostró un compuesto visible con luz UV, el cual generaba un cromóforo de color verde al emplear sulfato cérico amoniacal como agente revelador. Este compuesto se purificó mediante ccfp (1 placa, 200 mg) empleando como sistema de elución hexano-AcOEt 9:1; la placa se desarrolló tres veces. Después de procesar la placa de la manera habitual se obtuvo la 6-metoxitremetona como un aceite amarillo (48 mg) con un valor de $[\alpha]_D = -42.27$ (C=1.1, CHCl₃).

De la fracción F₃-b se obtuvieron cantidades adicionales de los compuestos 4 (56 mg), 13 (12 mg) y 45 (44 mg).

3.5.4.3 Obtención de la 6-hidroxi-3-metoxitremetona (132)

La fracción primaria bioactiva F₄ (53 g) eluida con hexano-CHCl₃ 1:1, fue sometida a una cromatografía en columna empleando 940 g de sílica gel y como eluyentes hexano, CHCl₃ y MeOH en diferentes proporciones; se recolectaron 163 fracciones de 400 mL cada una. En el Cuadro 6 se muestran los disolventes empleados, su proporción y las fracciones reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica.

Cuadro 6. Resumen de la cromatografía en columna de la fracción primaria activa F₄.

Disolvente	Proporción	Fracciones colectadas	Fracciones combinadas	Clave de la fracción
Hex	100	1-39	1-44	F ₄ -a
Hex- AcOEt	97:3	40-109	45-64	F ₄ -b
Hex- AcOEt	95:5	110-129	65-113	F ₄ -c
Hex- AcOEt	9:1	130-146	114-144	F ₄ -d
AcOEt	100	147-159	145-157	F ₄ -e
MeOH	100	160-163	158-163	F ₄ -f

250 mg de la fracción secundaria F₄-c fueron sujetos a una cromatografía en columna con 10 g de gel de sílice y como eluyentes se emplearon hexano, mezclas de hexano-AcOEt en diferentes proporciones y AcOEt (Cuadro 7).

El análisis cromatográfico de las fracciones F₄-c₂ y F₄-c₃ permitió detectar la presencia de una mezcla conformada por el compuesto 13 y por un segundo componente, por lo que se procedió a separarlos mediante ccfp empleando como

sistema de elución hexano-AcOEt en una proporción 9:1 (1 placa, 200 mg de muestra). Después de cinco eluciones y de procesar las placas de la manera habitual, se obtuvo 42 mg del compuesto 132 como un aceite amarillo.

Cuadro 7. Resumen del proceso cromatográfico de la fracción F_{4c} del Cuadro 6.

Disolvente	Proporción	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Claves de las fracción
Hex	100	1-9	1-11	F _{4-c1}
Hex-AcOEt	99:1	10-28	12-27	F _{4-c2}
AcOEt	100	29-30	28-30	F _{4-c3}

3.5.4.4 Obtención del 4-β-D-glucopiranosil-3-[3-metoxi-*trans*-isopenten-1-il]-acetofenona (133).

De la fracción primaria inactiva F₆ (6.6 g) precipitaron 350 mg de un sólido amorfo; el análisis del mismo en una cromatografía en capa fina reveló la presencia de un compuesto mayoritario, por lo que se procedió a separarlo mediante una cromatografía en columna abierta con sílica gel (120 g), usando CHCl₃ con cantidades crecientes de MeOH como disolventes de elución (Cuadro 8).

Cuadro 8. Resumen del fraccionamiento en columna de la fracción primaria F₆.

Disolvente	Proporción	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Clave de la fracción
CHCl ₃	100	1-11	1-26	F _{6-a}
CHCl ₃ -MeOH	95:5	12-24	27-29	F _{6-b}
CHCl ₃ -MeOH	9:1	25-75	30-70	F _{6-c}
CHCl ₃ -MeOH	8:2	76-87	71-87	F _{6-d}

El compuesto de interés se detectó en la fracción secundaria F₆-c, mismo que se purificó mediante ccfp (dos placas), empleando como sistema de elución CHCl₃-MeOH 9:1. Después de procesar las placas de la manera convencional se obtuvieron 72 mg del compuesto 133 , con un p.f. 150-158°C.

3.6 ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA SEGUNDA COLECTA DE LAS RAÍCES DE *H. quinquenervis*

Los procedimientos empleados para llevar a cabo el estudio de las raíces de *H. quinquenervis* correspondientes a la segunda colecta, fueron similares a los descritos previamente en el inciso 3.4.

Este segundo estudio se realizó con la finalidad de obtener cantidades adicionales de los compuestos 4, 13 y 45, para llevar a cabo el estudio de los mismos sobre diferentes actividades de la fase luminosa de la fotosíntesis, para conducir los estudios de respiración en el proceso de germinación y los experimentos sobre la producción de biomasa.

3.6.1 Extracción

Para llevar a cabo el proceso de extracción se emplearon 3.46 kg de material vegetal seco y molido y MeOH (12 Lt) como disolvente de extracción. Como resultado de este procedimiento se obtuvieron 850 g de extracto aceitoso de color amarillo.

3.6.2 Fraccionamiento preliminar del extracto total

El extracto metanólico total de *H. quinquenervis* fue sometido a un fraccionamiento mediante una cromatografía en columna empacada con gel de sílice

(1.5 kg), empleando como fase móvil un gradiente de hexano/cloroformo/metanol. Se recolectaron un total de 180 fracciones de un litro cada una. La semejanza y la homogeneidad cromatográfica en capa fina de cada una de las fracciones permitió su reunión en seis grupos de fracciones (F_I-F₆). En el Cuadro 9 se resumen los eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos y las fracciones combinadas.

Cuadro 9. Resumen del fraccionamiento primario del extracto metanólico obtenido de las raíces de la segunda colecta de *H. quinquenervis*.

Disolvente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas	Clave fracción
Hex	100	1-36	1-14	F _I
Hex-CHCl ₃	9:1	37-50	15-62	F _{II}
	7:3	51-70	63-78	F _{III}
Hex-CHCl ₃	1:1	71-92	79-92	F _{IV}
Hex-CHCl ₃	3:7	93-96	93-111	F _V
CHCl ₃	100	97-112	112-127	F _{VI}
CHCl ₃ -MeOH	8:2	113-128		
CHCl ₃ -MeOH	1:1	129-165	129-180	F _{VII}
CHCl ₃ -MeOH	3:7	166-175		-
MeOH	100	176-180		

3.6.3 Aislamiento y purificación de los compuestos

3.6.3.1 Obtención del ácido angélico (134)

De la fracción primaria F_I eluida con hexano 100%, precipitó un sólido cristalino amarillo, el cual se purificó mediante sucesivas cristalizaciones. Este procedimiento permitió obtener 1.34 g del compuesto 134, con un p.f. de 43°C.

3.6.3.2 Obtención de la enecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4).

La fracción F_{II} (226.6 g) eluida con hexano-CHCl₃ en una proporción 9:1, se cromatografió en una columna utilizando 1.6 kg de gel de sílice y como eluyentes benceno, mezclas de benceno-AcOEt en diferentes proporciones y AcOEt; se recolectaron un total de 98 fracciones de 300 mL cada una (Cuadro 10), cada fracción fué analizada por ccf y se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica.

Cuadro 10. Resumen del proceso cromatográfico de la fracción primaria F_{II}.

Disolvente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas	Clave de la fracción
Benceno	100	1-45	1-3 4-19 20-42	F _{II} -a F _{II} -b F _{II} -c
Ben- AcOEt	99:1	46-59	43-67	F _{II} -d
Ben- AcOEt	97:3	60-68		-
Ben- AcOEt	95:5	69-85	68-73	F _{II} -e
Ben- AcOEt	9:1	86-90	74-86	F _{II} -f
Ben- AcOEt	8:2	91-97	91-98	F _{II} -g
AcOEt	100	98		-

92.4 g de la fracción secundaria F_{II}-b se sometieron a un fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna empacada con gel de sílice (1 kg), empleando

como fase móvil hexano, hexano-éter de petróleo, hexano-benceno, benceno CHCl_3 en diferentes proporciones y CHCl_3 . Se recolectaron un total de 381 fracciones de 500 mL cada una; cada fracción fue analizada por cromatografía en capa fina y se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica (Cuadro 11).

De la fracción F_{II-b} precipitó un sólido amarillo, el cual se sometió a sucesivas cristalizaciones de benceno-AcOEt en una proporción 7:3. Como resultado de este proceso se obtuvieron 953.9 mg del compuesto 45.

416 mg de esta misma fracción se sometieron a una ccfp (2 placas con 213 mg cada una) empleando una mezcla de hexano-benceno 4:6. Después de desarrollar las placas seis veces y de procesarlas de la manera habitual se obtuvieron 73 mg del compuesto 45 y 39.2 mg del compuesto 4.

Finalmente, de la fracción F_{II-f} se obtuvieron 40 g de un aceite amarillo correspondiente al compuesto 4.

Cuadro 11. Resumen del proceso cromatográfico de la fracción secundaria F_{II-b}

Disolvente	Proporción	Fracciones eluidas	Fracciones combinadas	Clave de la fracción
Hexano	100	1-8	1-43	F_{II-a}
Hex-éter de petróleo	9:1	9-20		
Hex-éter de petróleo	8:2	21-32		
Hex-éter de petróleo	7:3	33-171	44-184	F_{II-b}
Hex-éter de petróleo	6:4	172-194		
Hex-benceno	7:3	195-245	185-201	F_{II-c}
			202-209	F_{II-d}
			210-230	F_{II-e}

Hex-benceno	6:4	246-294	231-353	F _{II} -f
Hex-benceno	1:1	295-335		
Hex-benceno	3:7	336-348	354-381	F _{II} -g
Benceno	100	349-352		
Benceno-CHCl ₃	1:1	353-366		
CHCl ₃	100	367-381		

3.6.3.3 Obtención de la 6-metoxitremetona (131)

La fracción primaria F_{III} (2.06 g) fue sometida a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta utilizando gel de sílice como adsorbente (130 g) y como eluyentes hexano con cantidades crecientes de CHCl₃. Se recolectaron un total de 214 fracciones de 40 mL cada una. En el Cuadro 12 se resumen los disolventes empleados, las proporciones de los mismos, así como las fracciones recolectadas con cada uno de ellos.

Debido a que en la fracción F_{III}-a se detectó la presencia del compuesto 131, se procedió a separarlo y purificarlo mediante ccfp (1 placa, 200 mg) empleando como sistema de elución hexano-AcOEt 9:1; la placa se desarrolló tres veces. Después de procesar la placa de la manera habitual se obtuvo el compuesto como un aceite amarillo (16.2 mg).

Cuadro 12. Resumen del proceso cromatográfico de la fracción primaria F_{III}.

Disolvente	Proporción	Fracciones recolectadas	Fracciones reunidas	Clave de la fracción
Hex	100	1-8	1-70	F _{III} -a
Hex- CHCl ₃	95:5	9-15		-

Hex- CHCl ₃	9:1	16-20		-
Hex- CHCl ₃	8:2	21-35		-
Hex- CHCl ₃	7:3	36-44		-
Hex- CHCl ₃	6:4	45-72	71-96	F _{III} -b
Hex- CHCl ₃	1:1	73-193	97-101 102-137 138-151 152-211	F _{III} -c F _{III} -d F _{III} -e F _{III} -f
Hex- CHCl ₃	4:6	194-200		-
CHCl ₃	100	201-214	212-214	F _{III} -g

3.6.3.4 Obtención del 4-β-D-glucopiranosil-3-[3-metoxi-*trans*-isopenten-1-il]-acetofenona (133).

De la fracción primaria F_{VII} eluida con CHCl₃-MeOH en diferentes proporciones, se detectó la presencia de un compuesto mayoritario el cual, se separó mediante ccfp (4 placas con 15 mg cada una) empleando como sistema de elución CHCl₃-MeOH 8:2.

Después de procesar las placas de manera habitual, se obtuvieron 12 mg adicionales del compuesto 133.

3.7 CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS NATURALES

3.7.1 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 599 en pastilla de KBr.

Los espectros de RMN- ^1H y ^{13}C se midieron en un aparato Varian VXR-300S y VXR-500S empleando como disolvente CDCl_3 y DMSO, y TMS como referencia interna.

Los espectros de masas se registraron en un aparato Hewlett Packard 5985-B.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jhons y no están corregidos.

Las rotaciones ópticas se realizaron en un polarímetro digital JASCO Dip 360.

Los espectros de UV se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 202.

El espectro FAB-MS del compuesto 133 (modalidad positivo) se obtuvo en un aparato JEOL DX 300 con sistema JMA 3500; la muestra fue bombardeada con 10 keV átomos de Xe y suspendida en nba.

3.7.2 Pruebas químicas preliminares para la identificación de glicósidos

3.7.2.1 Prueba de Molisch

2 mg del compuesto 133 se disolvieron en 3 mL de agua destilada. A la solución resultante se le adicionó 1 mL de una solución etanólica de α -naftol (10%). Posteriormente, se adicionaron por las paredes del tubo de ensayo dos gotas de H_2SO_4 conc. Se emplearon glucosa y agua destilada como control positivo y negativo, respectivamente.

La formación de una coloración violeta en la interfase es indicativo de la presencia de carbohidratos.

3.7.2.2 Hidrólisis enzimática de 133 con β -glicosidasa

A 5 mg de compuesto se adicionó 1 mL de agua destilada y 5 mg de la enzima β -glicosidasa (Sigma Tipo I). La reacción fue incubada a 36°C durante 72 hr. Al cabo de este tiempo se extrajo con CHCl_3 (3x5 mL). La fase acuosa se empleó para la detección cromatográfica de los azúcares.

3.7.2.3 Hidrólisis ácida de 133

A 5 mg del compuesto 133 se añadió 1 mL de HCl 1N. La mezcla anterior se sometió a reflujo durante 30 min. Al cabo de este tiempo, la solución ácida se extrajo con CHCl_3 (3x5 mL); la fase orgánica obtenida se extrajo sucesivamente con NaHCO_3 al 10% y H_2O y posteriormente secada con Na_2SO_4 anhidro. La fase acuosa se utilizó para la detección cromatográfica de los azúcares.

3.7.2.4 Detección de azúcares

Los azúcares se detectaron mediante una cromatografía comparativa en capa fina, utilizando como sistema de elución CHCl_3 -MeOH- H_2O 64:50:10 y anisaldehído como agente cromógeno. En ambos casos se utilizaron patrones de azúcares adquiridos comercialmente de la casa Merck [L(+)-arabinosa, D(-)-fructuosa, D(+)-galactosa, D(+)-glucosa, D(+)-lactosa, D(+)-manitol, D(+)-sacarosa, D(-)-sorbitol].

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Pre-selección y selección de la especie *H. quinquenervis*

La preselección de la especie *Helianthella quinquenervis*, se realizó de acuerdo con dos de los criterios más utilizados para la detección de fuentes potenciales de principios activos: el etnobotánico y el quimiotaxonómico. El primero se basa en el hecho de que las plantas medicinales utilizadas en la medicina popular de diversas regiones del mundo han constituido el punto de partida para el aislamiento de compuestos activos de interés medicinal y agroquímico (Benner, 1993; Hamburger y Hostettmann, 1991; Pillmoor *et al.*, 1993; Duke y Abbas, 1995; *inter alia*). El segundo, se fundamenta en los antecedentes de la familia de las asteráceas como una fuente valiosa de compuestos bioactivos (Proksch y Rodríguez, 1983; Duke, 1991; Fischer, 1991; Barvah *et al.*, 1994; Duke y Abbas, 1995; Macías *et al.*, 1995, 1997).

Posteriormente, durante la realización de una serie de ensayos biológicos preliminares sobre diversas especies vegetales, se demostró la potencialidad fitotóxica del extracto derivado de las raíces de la especie *H. quinquenervis*. La actividad fitotóxica se determinó mediante el empleo de bioensayos de germinación y crecimiento radicular en dos especies de malezas, *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. La técnica empleada para realizar estas determinaciones fue la de la caja de Petri (Anaya *et al.*, 1990; Castañeda *et al.*, 1992; Pereda-Miranda *et al.*, 1993), la cual permite cuantificar la actividad fitotóxica a nivel de extractos, fracciones y compuestos puros. De manera adicional, se determinó su efecto post-emergente sobre la producción de biomasa

de tres diferentes especies de malezas, *A. hypochondriacus*, *E. crusgalli* y *T. alexandrinum*.

Mediante el empleo del bioensayo a nivel pre-emergente, se estableció entonces que el extracto metanólico preparado a partir de las raíces de *Helianthella quinquenervis* inhibe de manera significativa el crecimiento radicular de las dos especies de arvenses empleadas. En el Cuadro 13 se indican los resultados correspondientes.

Cuadro 13. Efecto del extracto metanólico de las raíces de *H. quinquenervis* sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*.

CI ₅₀ (µg/mL)		
	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>
Exto. MeOH	25	53
Tricolorina A	37	12

Así mismo, en el Cuadro 14 y en las Figuras 11-13 se muestran los resultados obtenidos en la valoración del efecto post-emergente. Como se desprende de los mismos, el extracto demostró un efecto considerable sobre la pérdida de biomasa de las tres especies de prueba. Sin embargo, la especie más afectada fue *A. hypochondriacus* con un 54.2 %.

El potencial fitotóxico demostrado por el extracto orgánico de *H. quinquenervis*, permitió la selección de esta especie como un candidato idóneo para la obtención de principios fitotóxicos. En consecuencia, se procedió a la

Cuadro 14. Resultados obtenidos de la evaluación de la producción de biomasa del extracto metanólico sobre tres especies de malezas.

Especie	Tratamiento	peso (g)	
		fresco	seco
<i>E. crusgalli</i>	Extracto	0.0986 ± 0.0413	0.0189 ± 0.0084
	MV	0.0623 ± 0.0136	0.0106 ± 0.0027
	H ₂ O	0.1550 ± 0.0302	0.0284 ± 0.0061
<i>T. alexandrinum</i>	Extracto	0.1446 ± 0.0556	0.0118 ± 0.0032
	MV	0.0638 ± 0.0293	0.0051 ± 0.0019
	H ₂ O	0.2157 ± 0.1791	0.0167 ± 0.0187
<i>A. hypochondriacus</i>	Extracto	0.0059 ± 0.0031	0.0010 ± 0.0005
	MV	0.0009 ± 0.0008	0.0007 ± 0.0007
	H ₂ O	0.0129 ± 0.0037	0.0013 ± 0.0007

[Extracto]= 53 µg/mL, [MV]= 10⁻² M

preparación del extracto metanólico de las raíces mediante un proceso de maceración. Una vez obtenido el extracto, se realizó la obtención de los compuestos bioactivos mediante un estudio fitoquímico biodirigido. Como bioensayos de monitoreo se emplearon nuevamente la determinación del efecto fitotóxico sobre el proceso de germinación y el crecimiento radicular de las semillas antes mencionadas.

Cuadro 15. Efecto de las fracciones primarias F₁ a F₆ sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.

	Concentración (µg/mL)	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>			<i>Echinochloa crusgalli</i>		
		Crecimiento radicular ^a (mm. ± d.e.)	Inhibición ^b (%)	Germinación (%)	Crecimiento radicular ^a (mm. ± d.e.)	Inhibición ^b (%)	Germinación (%)
F ₁	0	4.0 ± 1.55	0	100	14.2 ± 1.12	0	100
	10	3.8 ± 2.34	5	66.0	9.5 ± 2.42	33	89.4
	50	2.0 ± 1.69	50	37.5	4.1 ± 1.36	71	84.2
	100	0	100	0	2.1 ± 1.40 ^c	85	73.6
	200	0	100	0	1.2 ± 0.86 ^c	92	73.6
F ₂	0	8.1 ± 2.81	0	100	14.2 ± 1.20	0	100
	10	9.9 ± 2.40 ^c	122.2*	100	11.3 ± 3.66	20.4	87.3
	50	9.8 ± 2.19 ^c	120.1*	100	8.6 ± 3.14	39.1	84.2
	100	7.7 ± 1.21 ^c	4.9	100	7.4 ± 2.93 ^c	47.3	73.6
	200	5.5 ± 1.90 ^c	32.1	90	6.6 ± 2.52 ^c	53.3	73.6
F ₃	0	5.1 ± 2.70	0	100	21.1 ± 1.45	0	100
	10	4.5 ± 1.38	11.7	93	16.9 ± 3.98 ^c	19.9	100
	50	3.4 ± 0.78	33.3	85	5.6 ± 1.19 ^c	73.5	88.2
	100	2.9 ± 0.91	43.1	83	4.3 ± 1.18 ^c	79.6	41.1
	200	1.6 ± 0.9	68.4	35	2.9 ± 0.47 ^c	86.3	35.2
F ₄	0	7.3 ± 1.13	0	100	18.5 ± 1.23	0	100
	10	7.7 ± 1.87	105.4*	100	10.7 ± 3.18 ^c	42.1	82.3
	50	7.2 ± 1.68 ^c	1.3	100	8.8 ± 3.07 ^c	52.1	76.4
	100	6.2 ± 1.68	15.1	100	8.06 ± 2.94 ^c	56.4	76.4
	200	5.5 ± 1.34 ^c	24.7	100	6.1 ± 2.57 ^c	66.6	74.1
F ₅	0	2.21 ± 0.44	0	100	11 ± 3.19	0	100
	10	2.5 ± 0.62	116*	100	10.7 ± 2.31	2.7	100
	50	2.4 ± 2.65	111.8*	100	10.6 ± 3.51	3.6	100
	100	2.3 ± 1.01	104.1*	100	10.2 ± 2.66	4.5	100
	200	2.1 ± 1.16	1.8	100	11.5 ± 3.92	7.2	100
F ₆	0	4.8 ± 1.15	0	100	17.6 ± 1.15	0	100
	10	5.0 ± 1.22	104.2*	100	19.7 ± 3.03	112*	100
	50	5.5 ± 1.05	104.2*	100	18.4 ± 3.76	104.5*	100
	100	5.4 ± 1.31	112.5*	100	19.0 ± 3.88	108*	100
	200	4.3 ± 1.15	10.5	100	18.5 ± 0.84	105.2*	100

*Estimulación del crecimiento radicular

^a Cada cifra representa el promedio de cuatro réplicas

^b Porcentajes expresados en relación al crecimiento del control negativo

^c p ≤ 0.05 (ANOVA)

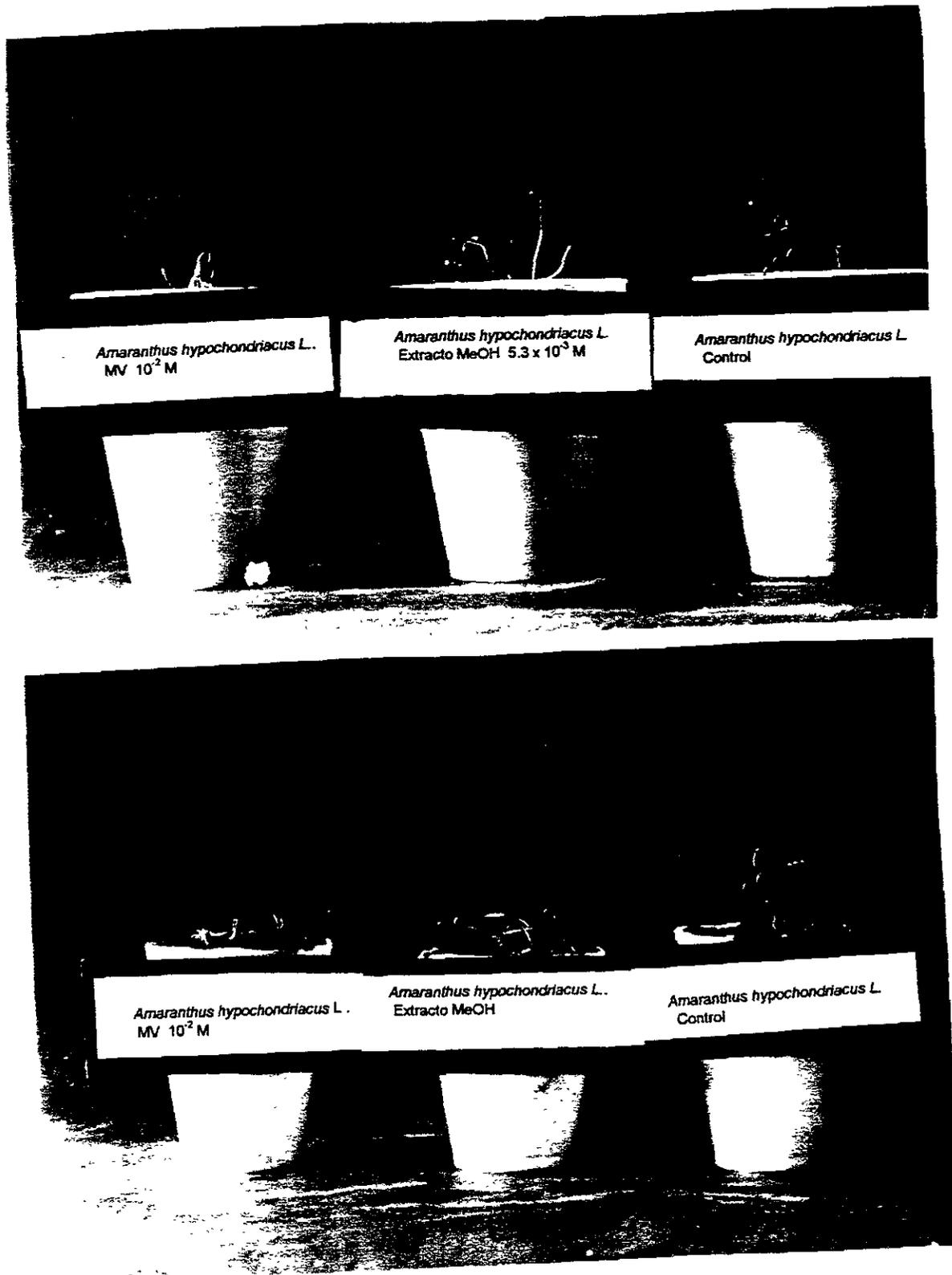


Figura 11. Efecto herbicida post-emergente del extracto metanólico sobre las plántulas de *A. hypochondriacus* (días 3 y 7).

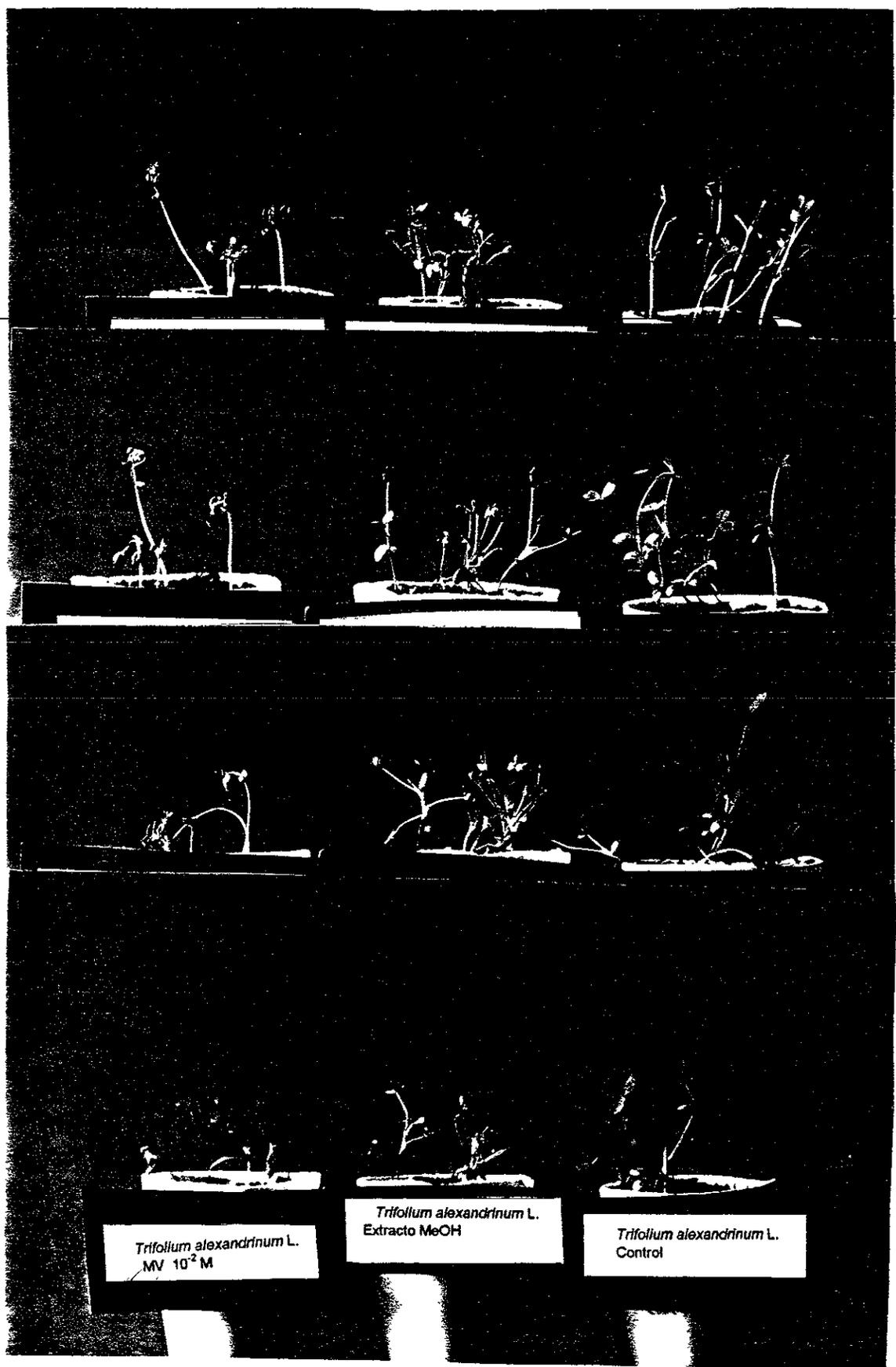


Figura 12. Efecto herbicida post-emergente del extracto metanólico sobre las plántulas de *T. alexandrinum* (días 1, 3, 8 y 10).

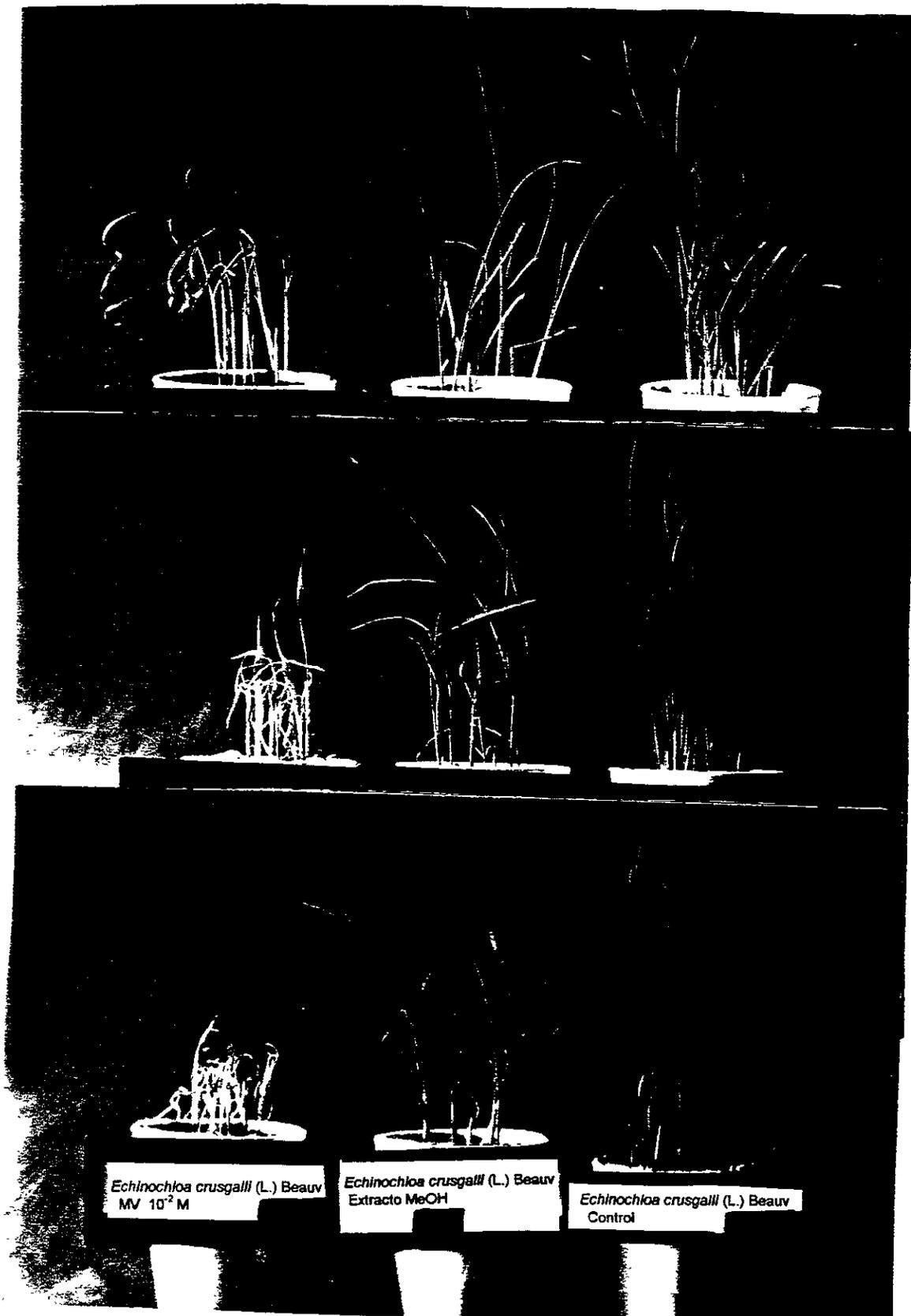


Figura 13. Efecto herbicida post-emergente del extracto metanólico sobre las plántulas de *E. crusgalli* (días 1, 8 y 10).

La selección del ensayo biológico a utilizar en un estudio fitoquímico de tipo biodirigido es un paso crítico y fundamental para asegurar la obtención de los principios bioactivos a partir de sus fuentes naturales. En este contexto, cabe señalar que los bioensayos empleados en la presente investigación son sencillos, de fácil implementación y lo más importante, permiten determinar de manera eficaz la potencialidad herbicida a nivel de extractos y compuestos puros (Ghisalberti, 1993; Leather *et al.*, 1994).

4.2 Aislamiento de los principios fitotóxicos a partir del extracto activo de *H. quinquenervis*

El fraccionamiento del extracto activo se realizó mediante una cromatografía en columna abierta. Este proceso, permitió la obtención de seis grupos de fracciones primarias (F₁-F₆) como ya se indicó en la parte experimental. Cada una de las fracciones resultantes se evaluó mediante los bioensayos antes mencionados. Los resultados obtenidos de dichas evaluaciones se indican en el Cuadro 14, y como se desprende de los mismos, las fracciones F₁ -F₄ demostraron un efecto fitotóxico significativo sobre el crecimiento radicular de las dos especies de malezas de prueba. En relación con el efecto de las fracciones sobre el proceso de germinación, únicamente las fracciones F₁, y F₃ inhibieron significativamente la germinación de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*, respectivamente.

Considerando que el efecto fitoinhibidor se concentraba en las fracciones primarias F₁ a F₄, se procedió a realizar la separación y purificación de los

compuestos bioactivos, mediante la aplicación de diversos procedimientos cromatográficos, lo que permitió el aislamiento de cinco metabolitos secundarios: la encecalina (13), la euparina (45), la desmetilencecalina (4), la 6-metoxitremetona (131) y la 6-hidroxi-3-metoxitremetona (132); este último constituye un nuevo producto natural.

Por otra parte, de la fracción inactiva F₆ precipitó un sólido el cual se caracterizó como la 4-β-D-glucopiranosil-3-[3-metoxi-*trans*-isopenten-1-il]-acetofenona (133), el cual constituye también un metabolito secundario novedoso.

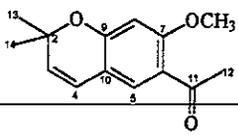
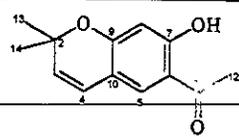
4.3 Caracterización de los compuestos aislados.

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

4.3.1 Identificación de la encecalina (13), la euparina (45), la desmetilencecalina (4) y la 6-hidroxi-3-metoxitremetona (132).

Las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos 4, 13, 45 y 132 obtenidos de las fracciones primarias fitotóxicas F₁, F₂ y F₄ se encuentran en perfecta armonía con las descritas en la literatura para la desmetilencecalina, la encecalina, la euparina y la 6-hidroxi-3-metoxitremetona, respectivamente (Bjeldanes y Geissman, 1969; Bohlmann y Grenz, 1970; Bohlmann *et al.*, 1970, 1979, 1982, 1983, 1988; Proksch *et al.*, 1982, 1986, 1987; Herz *et al.*, 1981, Rainer *et al.*, 1985). Las constantes espectroscópicas y

Cuadro 16. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la encecalina (4) y la desmetilencecalina (13).

	 Encecalina (13)	 Desmetilencecalina (4)
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₈ O ₃	C ₁₃ H ₁₄ O ₃
E.M.I.E., m/z (int. rel.)	232 [M ⁺ , 8], 218 (15), 217 (M ⁺ -CH ₃ , 100), 185 (10), 174 (8).	218 [M ⁺ , 22], 203 (M ⁺ -CH ₃ , 100), 160 (31), 185 (7).
IR ν _{max} (KBr) cm ⁻¹ (Espectro)	2974, 1664, 1562, 1284, 1110	3052, 2970, 2862, 1388, 1644, 1490
UV λ (CHCl ₃) nm	262, 355	259, 350

Cuadro 17. Valores para los desplazamientos químicos obtenidos en la RMN-¹H y de ¹³C para la encecalina (4) y la desmetilencecalina (13).

Carbono	Encecalina (13) (Espectro)**	Desmetilencecalina (4) (Espectro)**
C-2	77.8	77.8
C-3	120.5	120.9
C-4	128.3	128.5
C-5	128.9	128.8
C-6	121.2	122.9
C-7	161.0	165.1
C-8	99.5	104.4
C-9	158.3	160.4
C-10	113.8	113.9
C-11	197.4	201.3
C-12	28.3	28.5
C-13	31.8	26.2
C-14	31.8	26.2
OMe	55.5	-

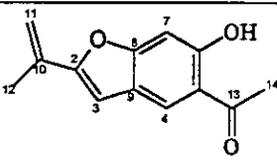
*desplazamientos químicos en ppm

**TMS, CDCl₃, 75 MHz

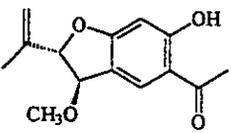
Protones	Encecalina (13) (Espectro)**	Desmetilencecalina (4) (Espectro)**
H-3	6.3, d, J= 10 Hz	6.3, d, J= 10 Hz
H-4	5.5, d, J= 10 Hz	5.5, d, J= 10 Hz
H-5	7.56 s	7.31, s
H-8	6.6, s	6.25, s
H-12	2.58, s	2.5, s
H-13	1.45, s	1.45, s
H-14	1.45, s	1.45, s
OMe	3.8, s	-
OH	-	12.55, s

J**TMS, CDCl₃, 300 MHz

Cuadro 18. Constantes físicas y espectroscópicas de la euparina (45).

	
Fórmula molecular	C ₁₃ H ₁₂ O ₃
Punto de fusión	120-121°C
IR ν_{\max} (KBr) cm ⁻¹ (Espectro 6)	3414, 2922, 2852, 1742, 1642, 1464
RMN- ¹ H (CDCl ₃) δ (Espectro 7)	12.51 (s, OH), 7.9 (s, H-4), 6.95 (s, H-3), 6.52 (s, H-7), 5.86 (s, H-11), 5.2 (s, H-11'), 2.78 (s, H-14), 2.10 (s, H-12)
RMN- ¹³ C (CDCl ₃) δ (Espectro 9)	204.33 (C-13), 160.27 (C-8), 158.29 (C-6), 156.75 (C-2), 132.0 (C-5), 124.79 (C-4), 121.3 (C-9), 117.15 (C-10), 113.12 (C-11), 103.35 (C-3), 98.48 (C-7), 27.23 (C-14), 18.69 (C-12)

Cuadro 19. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la 6-hidroxi-3-metoxitremetona (132).

	
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₆ O ₄
Punto de fusión	81-83°C
IR ν_{\max} (KBr) cm ⁻¹ (Espectro 17)	3200, 2928, 2855, 2827, 1637, 1484
RMN- ¹ H (CDCl ₃) ppm (Espectro 18)	12.9 (s, OH), 7.24 (s, H-4), 6.42 (s, H-7), 5.03 (d, H-11), 4.96 (d, H-2), 4.92 (d, H-11'), 4.69 (d, H-3), 3.39 (s, OMe), 2.56 (s, H-14), 1.69 (H-12)
RMN- ¹³ C (CDCl ₃) ppm (Espectro 19)	197.9 (C-13), 161.7 (C-8), 165.1 (C-6), 143.5 (C-5), 127.1 (C-4), 120.7 (C-9), 118.9 (C-10), 112.5 (C-11), 93.2 (C-7), 87.6 (C-2), 55.6 (OMe), 33.3 (C-3), 31.8 (C-14), 16.9 (C-12)
EMIE m/z (int. rel.) (Espectro 20)	248 (M ⁺ , 100), 233 (17), 217 (35), 175 (20), 43.1 (48)

espectrométricas de los mismos se muestran en los Cuadros 16-19 y en el apéndice II se anexan los espectros correspondientes (Espectros 1-20).

4.3.2 Identificación de la 6-metoxitremetona (131)

De la fracción fitotóxica primaria F_3 se obtuvo un metabolito secundario bajo la forma de un aceite amarillo. Este producto, se identificó como la 6-metoxitremetona (131) y constituye un nuevo producto natural; en el Cuadro 20 se resumen sus constantes espectroscópicas y espectrométricas

Las evidencias que permitieron establecer la estructura molecular del producto 131 se describen a continuación.

El espectro de IR (Espectro 21) presenta una absorción intensa asociada con la presencia de grupos aromático, vinílico y carbonilo de cetona conjugada (1634 cm^{-1}).

El espectro de masas generado por la técnica de impacto electrónico presenta un ión molecular en una relación de masa carga (m/z) de 232 uma, el cual corresponde a la fórmula molecular de $C_{14}H_{16}O_3$.

La comparación de los espectros de RMN de este producto con los de la 6-hidroxi-3-metoxitremetona (132) confirma la presencia de un núcleo benzofurano con un grupo isopropilideno en C-2 y una metilcetona en la posición C-5.

Al igual que en el caso del producto 132, los espectros de RMN (Espectros 22 y 23) presentan las siguientes señales diagnósticas:

-dos singuletes anchos en δ_H 7.68 y δ_H 6.42 asignables a los hidrógenos H-4 y H-7 del anillo aromático. El valor de la constante de acoplamiento de estas señales es

Cuadro 20. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la 6-metoxitremetona (132).

Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₆ O ₄
IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm ⁻¹ (Espectro 17)	3200, 2928, 2855, 2827, 1637, 1484
RMN- ¹ H (CDCl ₃) ppm (Espectro 18)	7.68 (dd, J=1.2 Hz, H-4), 6.42 (s, H-7), 5.25 (m, H-2), 5.07 (m, H-11), 4.92 (m, H-11'), 3.87 (s, OMe), 3.3 (ddd, J=15.3, 9.5, 0.6 Hz, H-3'), 2.96 (ddd, J=15.3, 9.5, 0.6 Hz, H-3), 2.65 (s, H-14), 1.75 (s, H-12)
RMN- ¹³ C (CDCl ₃) ppm (Espectro 19)	202.2 (C-13), 167.1 (C-8, C-6), 141.1 (C-5), 129.2 (C-4), 117.8 (C-10), 114.4 (C-9), 113.2 (C-11), 92.9 (C-7), 2.2 (C-3), 83.3 (C-2), 55.3 (OMe), 29.7 (C-14), 17.5 (C-12).
EMIE m/z (int. rel.) (Espectro 20)	232 (M ⁺ , 47), 217 (100), 189 (26), 174 (28), 91 (25), 77 (23)

congruente con la disposición *para* de ambos hidrógenos. En el espectro de $^{13}\text{CRMN}$ las señales correspondientes se observan en δ_c 127.1 y δ_c 93.2, respectivamente.

-Un conjunto de señales atribuibles al grupo isopropilideno en C-2, las cuales se encuentran en δ_H 4.92, 5.07 y δ_c 112.5, 118.9; las señales del metileno terminal del residuo isopropilideno se observan como un sistema AB en el espectro de RMN- ^1H .

-Un singulete en δ_H 2.56 mismo que correlaciona en el espectro HETCOR con la señal en δ_c 31.8. Las absorciones antes descritas y la señal de carbonilo en δ_c 197.9 confirman la presencia de la porción metilcetona en la molécula.

Además de las señales antes mencionadas, comunes en los espectros de los compuestos 131 y 132, los del nuevo producto natural presentan las siguientes absorciones:

-Una señal simple centrada en δ_H 3.87 correspondiente a un grupo metoxilo unido al anillo aromático. En el espectro de RMN ^{13}C , este grupo funcional absorbe en δ_c 55.6.

-Un sistema ABX asignable a los hidrógenos H-2 y H-3 del benzofurano. La rama AB del sistema se observa en δ_H 2.96 y 3.3 ($J=15.3, 9.5$ y 0.3 Hz). Ambas señales muestran una clara correlación en el espectro COSY (Figura 14) con la señal en δ_H 5.25, atribuible al oximetino en C-2, donde se ubica también el grupo isopropilideno. La disposición *trans* entre H-2 y uno de los hidrógenos en C-3 se estableció con base en el valor de la constante de acoplamiento (Bohlmann *et al.*, 1980, 1982;

Siebertz *et al.*, 1989); la magnitud observada (1.2 Hz) es congruente con esta disposición.

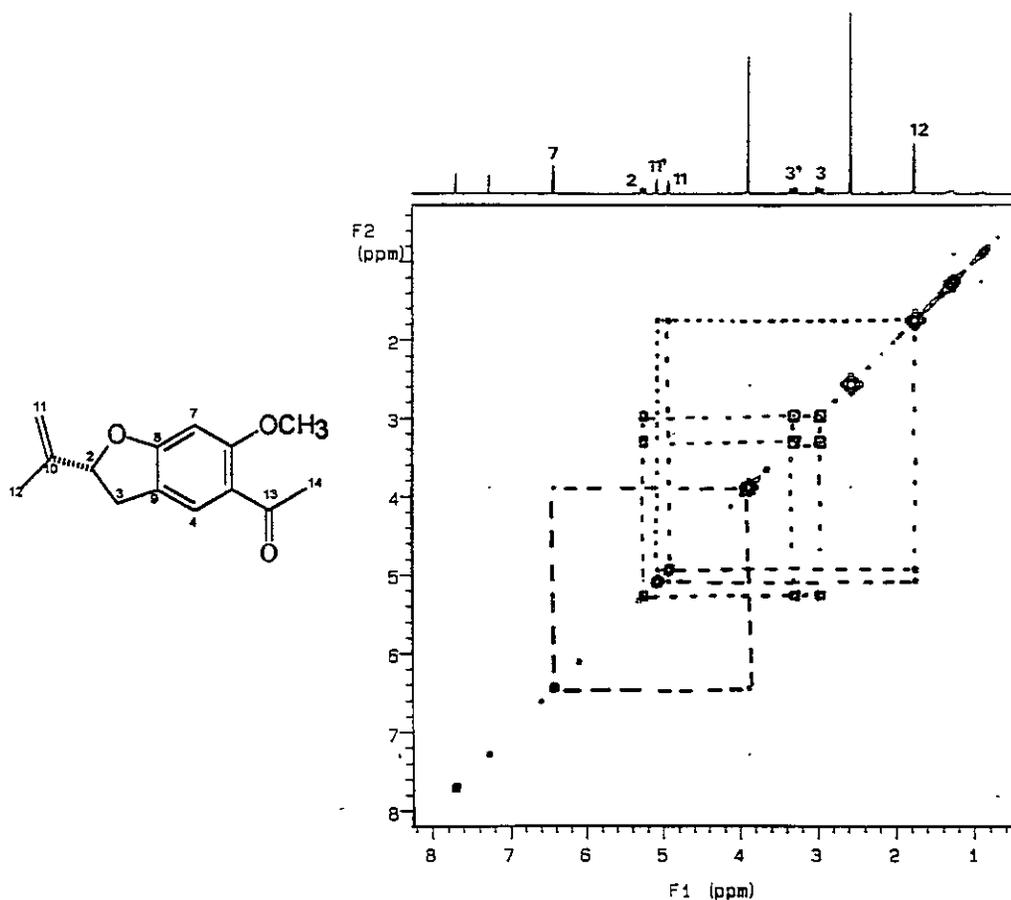


Figura 14. Espectro COSY (^1H - ^1H) de la 6-metoxitremetona (131).

-El último grupo de señales indicaron claramente que a diferencia del compuesto 132, el nuevo producto natural no presentaba sustituyente alguno en C-3. Por otro lado, también es claro que en lugar de la función fenólica en C-6, el producto 131 presenta un grupo metilo de un metil éter fenólico.

desplazamientos químicos de los hidrógenos aromáticos y por la otra, los máximos de absorción observados en el espectro de UV. De tal forma que el desplazamiento a campos altos de uno de los hidrógenos aromáticos es congruente con la ubicación del metoxilo en C-6. En consecuencia, el grupo metilcetona debía estar ubicado en la posición C-5.

Así mismo, la comparación de los máximos de absorción en el espectro de UV (320 y 279 nm) para el compuesto 131 con los descritos en la literatura para una serie de 5-hidroxiacetofenonas y 6-hidroxiacetofenonas permiten comprobar la ubicación propuesta (Siebertz *et al.*, 1989).

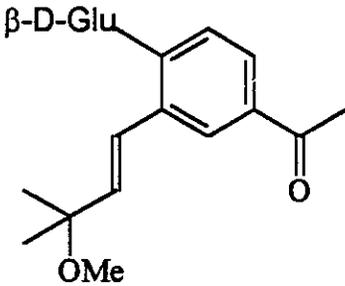
Con las evidencias antes presentadas el compuesto 131 se identificó como la 6-metoxitremetona.

4.1.3 Identificación de la 4-β-D-glucopiranosil-3-[3-metoxi-*trans*-isopenten-1-il]-acetofenona (133).

De las fracciones de mayor polaridad (F₆), precipitó un sólido amorfo de color café con punto de fusión de 150-154°C, ópticamente activo. Sus características químicas y sus constantes espectroscópicas (Cuadro 21), así como la reacción positiva frente al reactivo de Molisch, permiten evidenciar la naturaleza glicosídica del compuesto.

El espectro de masas FAB-positivo (Espectro 29) de este producto natural, muestra un ión *quasi* molecular de m/z 397 (M+1), consistente con la fórmula molecular C₂₀H₂₈O₈. Su espectro de IR (Espectro 26), presenta absorciones

Cuadro 21. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 4-β-D-glucopiranosil-3-(3-metoxi-*trans*-isopenten-1-il)-acetofenona (133).

	
Fórmula molecular	C ₂₀ H ₂₈ O ₈
Punto de fusión	150-154°C
[α] _D (c=1.4, MeOH)	+32.5
UV λ (CHCl ₃) nm	245, 279, 320
IR ν _{max} (KBr) cm ⁻¹ (Espectro 21)	3378, 1664, 1604, 1576, 1492, 1364, 1074

asociadas con la presencia de los grupos hidroxilo (3378 cm⁻¹) y carbonilo (1664 cm⁻¹).

El análisis cromatográfico de la fracción acuosa obtenida de la hidrólisis ácida del compuesto 133 permitió detectar a la glucosa como único azúcar presente en la molécula.

La comparación de los espectros de RMN (Espectro 27 y 28) con datos descritos previamente en la literatura, así como consideraciones de tipo

quimiotaxonómico permitieron establecer que el producto natural debía ser el glucósido de una prenil-acetofenona (Bohlman y Grenz, 1970; Bohlmann y Bühmann, 1972; Sudalai y Krishna, 1989; *inter alia*).

El espectro de RMN-¹³C del compuesto 133 (Espectro 28), presenta señales para 20 átomos de carbono en armonía con la fórmula molecular establecida. Las señales centradas en δ_c 100.00, 77.12, 76.64, 73.27, 69.55 y 60.56 confirman que la porción sacárida es la glucosa (Uchiyama 1989; Shekhani 1990).

En el espectro de RMN¹H (Espectro 27), se observa el doblete característico del hidrógeno anomérico de la piranosa (δ_H 5.01) con un valor para la constante de acoplamiento de 7 Hz lo cual permite establecer la configuración β del hidroxilo en C-1; una evidencia adicional de la configuración β del hidroxilo anomérico del azúcar se obtuvo al realizar la hidrólisis enzimática del producto natural con la enzima β -glicosidasa.

El espectro de RMN¹³C indica claramente que 9 de las 14 señales restantes debían corresponder a un grupo metoxilo unido a un carbono alifático (δ_c 49.8), tres metilos (δ_c 26.8, 25.8) y cinco metinos (δ_c 137.3, 129.1, 126.5, 122.5 y 114.9). Las cinco señales sobrantes detectadas en el espectro de ¹³C, se asignaron a un grupo carbonilo de cetona (δ_c 196.9), dos carbonos unidos a funciones oxigenadas, uno de ellos de naturaleza aromática y el segundo alifático (δ_c 157.9 y 74.9) y finalmente, los dos últimos correspondían a los carbonos *ipso* a los grupos metilcetona e isopentenilo.

En el espectro de RMN¹H resaltan las señales de un sistema AB (δ_c 6.35 y 6.85, $J = 16$ Hz) correspondientes a la doble ligadura *trans* de la porción isopentenilo, así como la señal del grupo gem-dimetilo (δ_H 1.3) y el grupo metoxilo (δ_H 3.09), pertenecientes también a este residuo.

De manera adicional, el espectro de RMN¹H mostró por una parte un singulete correspondiente a un metilo en δ_H 2.68; esta absorción aunada a las señales en δ_c 196.9 y 26.8 en el espectro de RMN¹³C, corroboran la presencia del sustituyente metil-cetona en la molécula. Por otra parte, se observa también un sistema ABX en la región de los hidrógenos aromáticos (δ_H 8.06, $J = 2$; δ_H 7.2, $J = 8.8$; δ_H 7.81, $J = 2.1, 8.6$); en el espectro de RMN¹H homonuclear COSY se observan los cuadros de conectividad entre las señales centradas en δ_H 7.2 y 7.81 y entre δ_H 7.8 y 8.06.

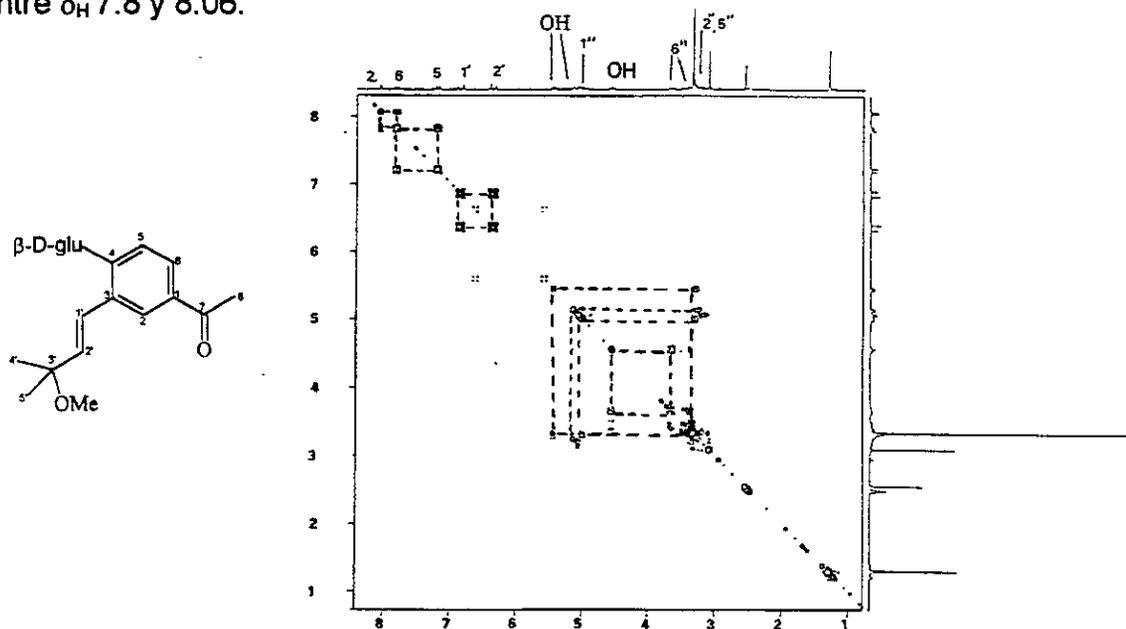
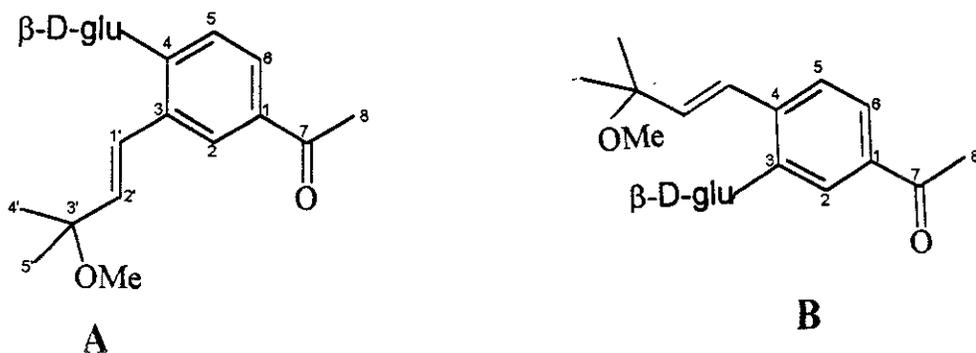


Figura 15. Espectro COSY (¹H-¹H) de la la 4-β-D-glucopiranosil-3-[3-metoxi-*trans*-isopenten-1-il]-acetofenona (133).

- Las evidencias antes descritas permiten confirmar que la estructura del producto natural 133, corresponde a un anillo aromático trisustituido restando entonces por establecer la disposición de los sustituyentes.



En principio, era factible proponer las estructuras A y B para el producto natural. Para discriminar entre estas dos posibilidades, se procedió a realizar el análisis de los espectros de correlación homonuclear (NOESY) y heteronuclear (HMBC). Las correlaciones más importantes observadas en ambos espectros para este compuesto se indican en las Figuras 16 y 17. En el espectro NOESY (Figura 16), se observa que la resonancia del hidrógeno anomérico (δ_H 5.01) muestra una correlación con la señal centrada en δ_H 7.2 asignada al hidrógeno aromático H-5. Por otro lado, la señal del hidrógeno aromático en H-2 muestra un cuadro de conectividad con la señal en δ_H 6.35, correspondiente a uno de los hidrógenos de la doble ligadura *trans* del residuo isopentenilo.

Estas interacciones solo son posibles si el grupo isopentenilo se encuentra en disposición *orto* y *meta* con respecto a la porción sacárida y al grupo metilcetona, respectivamente (caso de la estructura A).

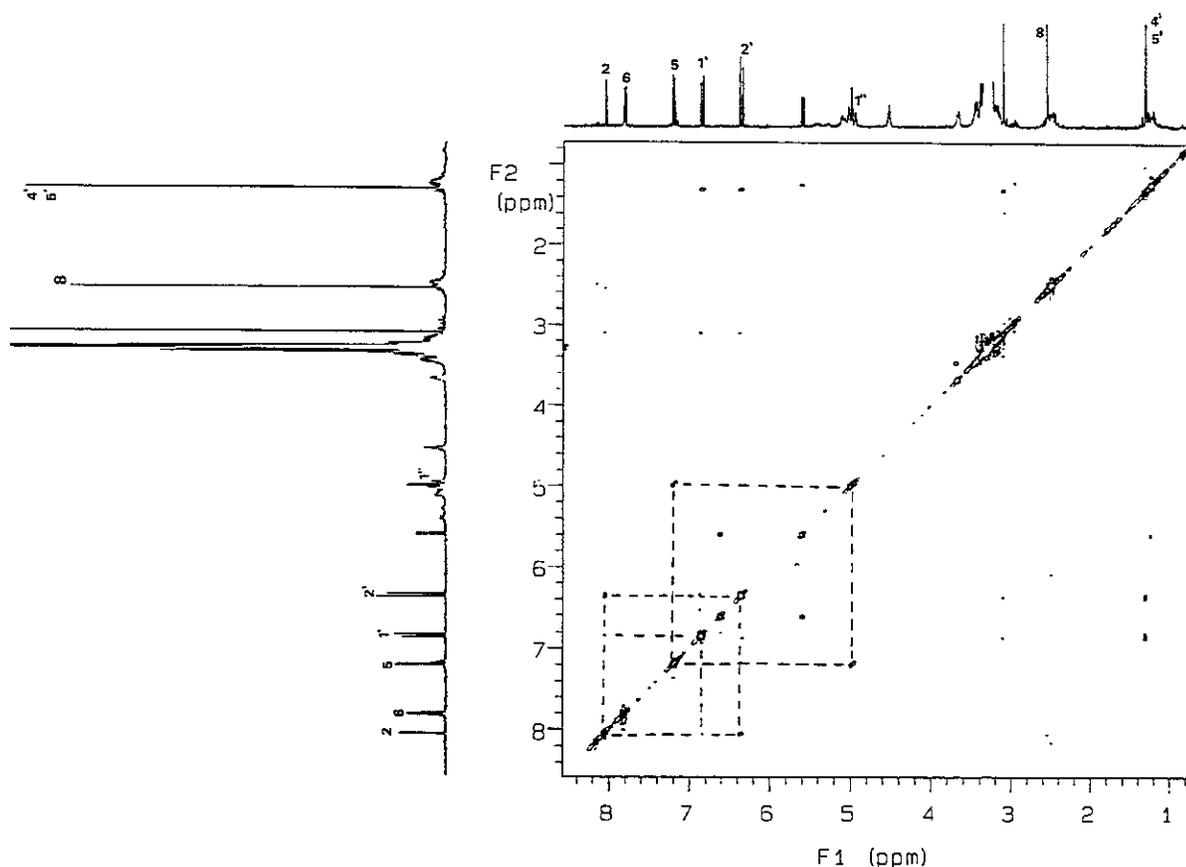


Figura 16. Correlación homonuclear de H-5''/H-5, H-2'/H-2, H-1'/H-2 en el espectro NOESY del compuesto 133.

La ubicación relativa de estas unidades estructurales, se confirmó con base en las correlaciones detectadas en el espectro HMBC (Figura 17), entre H-2 (δ_H 8.06) y las señales correspondientes a C-4 (δ_C 158) y al carbonilo de la metilcetona (δ_C 198). De manera adicional, la señal correspondiente a H-1' (δ_H 6.8) correlaciona con la absorción en δ_C 116 asignada a C-1, lo cual corrobora la ubicación de la porción isopentenilo en la posición C-3.

Otra evidencia que permitió confirmar la ubicación de la porción sacárida en C-4, es el desplazamiento diamagnético de la señal del carbon *ipso* en el

Cuadro 22. Datos espectroscópicos de RMN¹H y de ¹³C para los compuestos 133 y 133-A

133 R= β-D-Glu

133-A R=H

Posición	133		133-A	
	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C
1	-	125.9	-	126.9
2	8.06 (d, 2.0)	126.5	7.61 (d, 2.0)	126.8
3	-	130.9	-	132.0
4	-	157.9	-	160.0
5	7.20 (d, 8.8)	114.9	7.21 (d, 9.0)	115.3
6	7.81 dd (2.1, 8.6)	129.1	7.74 (dd, 2.0, 8.2)	129.2
1'	6.85 d (16.6)	122.5	6.79 (d, 16.5)	122.9
2'	6.35 d (16.6)	137.3	6.35 (d, 16.5)	136.9
3'	-	74.9	-	74.6
4'	1.30 (s)	25.8	1.35 (s)	25.6
5'	1.30 (s)	25.8	1.35 (s)	25.6
3'-OCH3	3.09 (s)	49.8	3.10 (s)	49.0
7	-	196.9	-	197.0
8	2.58 (s)	26.8	2.60 (s)	26.9
1''	5.01 (d, 7.0)	100.0	-	-
2''	3.32 (dd, 8.5, 7.0)	73.3	-	-
3''	3.39 (dd, 8.5, 8.5)	76.6	-	-
4''	3.19 (m)	69.6	-	-
5''	3.37 (m)	77.1	-	-
6''	3.46 (dd, 11.2, 5.0) 3.68 (dd, 12.0, 3.7)	60.6	-	-
OH	5.45, 5.12, 5.0, 4.56	-	3.20 (s)	-

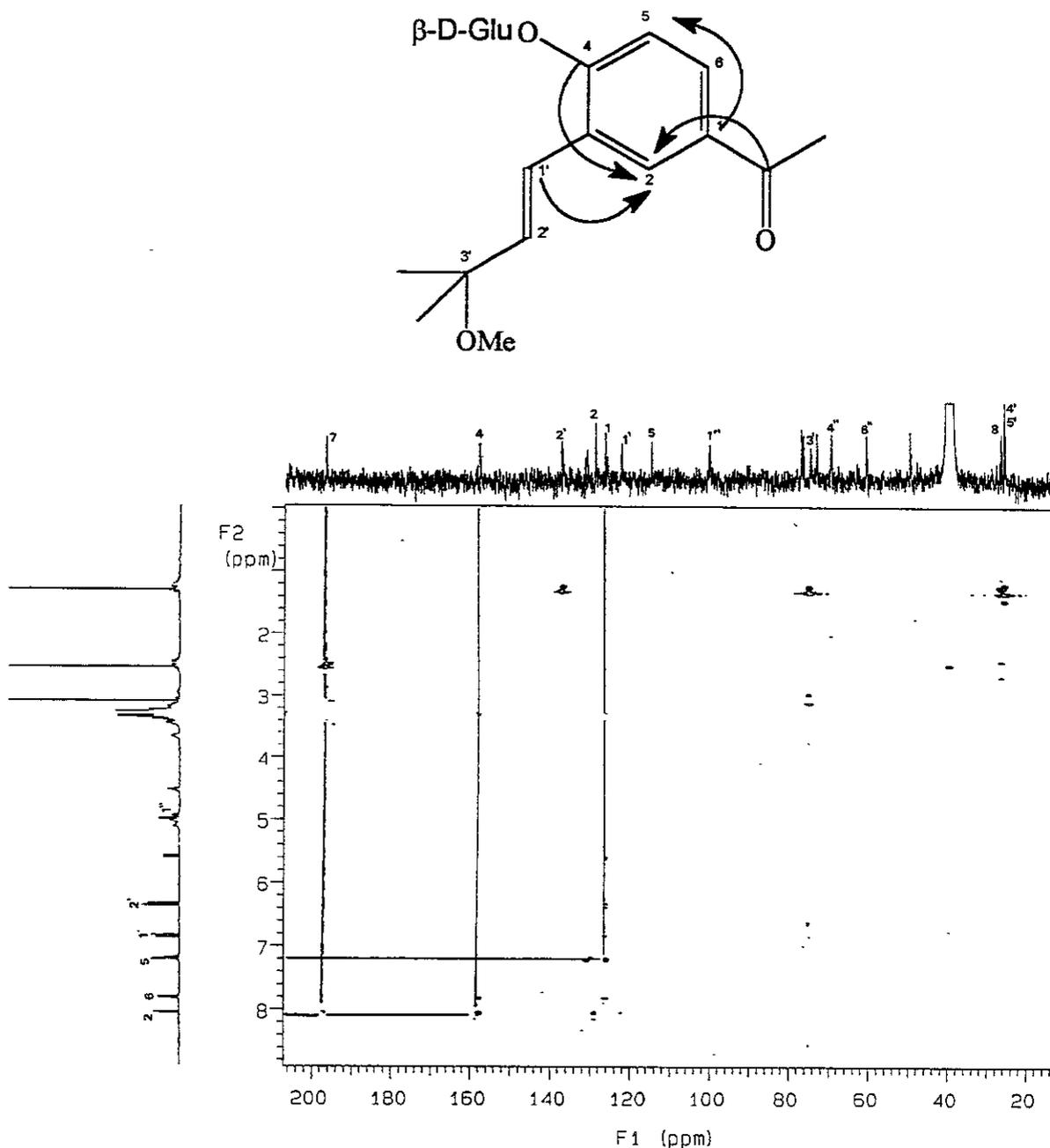


Figura 17. Correlación heteronuclear de C-1'/ H-5, C-4/ H-5, C-7/ H-2, C-4/ H-2 y C-1'/ H-2 en el espectro HMBC del compuesto **133**.

espectro de RMN¹³C ($\Delta=-2.15$) (Cuadro 22). Los resultados antes presentados permitieron entonces caracterizar al compuesto **133** como la 4-β-D-glucopiranosil-3-[3-metoxi-*trans*-isopenten-1-il]-acetofenona.

4.4 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL FITOTÓXICO DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE *H. quinquenervis* SOBRE LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO RADICULAR DE DOS ESPECIES DE ARVENSES

Una vez identificados y caracterizados los compuestos aislados en la presente investigación, se procedió a determinar su potencial fitotóxico. Es importante mencionar, que a pesar de que el compuesto 133 no se obtuvo de una fracción fitotóxica, se consideró pertinente evaluar su efecto sobre ambos bioensayos de forma tal de comprobar su inocuidad.. Los resultados obtenidos de estas determinaciones se indican en los Cuadros 23 y en las Gráficas 1-6.

De manera general, el efecto inhibitor demostrado por los seis compuestos evaluados fue dependiente de la concentración.

Como se puede apreciar en las Gráficas 1, 3 y 4, la encecalina (13), la desmetilencecalina (4) y la 6-metoxitremetona (131) presentaron un efecto inhibitor significativo sobre el crecimiento radicular de la especie *A. hypochondriacus*, ya que demostraron más de un 50% de inhibición en el intervalo de concentraciones comprendido entre 10 y 40 $\mu\text{g/mL}$; la desmetilencecalina inclusive, inhibió totalmente la elongación de la radícula a concentraciones superiores a 50 $\mu\text{g/mL}$ (230 μM) ; el valor de la concentración inhibitor media (CI_{50}) es de 27 $\mu\text{g/mL}$ (124 μM).

La euparina (45) y la 6-hidroxi-3-metoxitremetona (132) a diferencia de los compuestos antes descritos, demostraron un efecto moderado sobre el crecimiento radicular del amaranto (Gráficas 2 y 5). Ambos benzofuranos inhiben

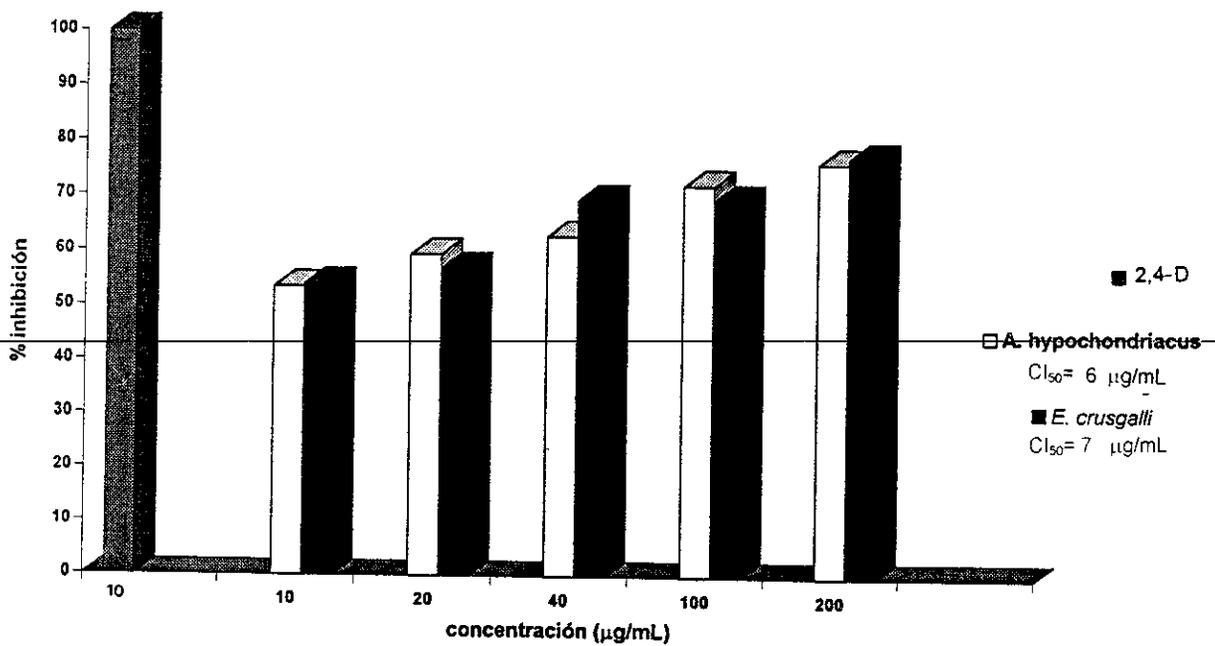
Cuadro 23. Efecto de los compuestos aislados de *H. quinquenervis* sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.

Compuesto	Concentración (µg/mL)	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>			<i>Echinochloa crusgalli</i>		
		Crecimiento radicular ^a (mm, ± d.e.)	Inhibición ^b (%)	Germinación (%)	Crecimiento radicular ^a (mm, ± d.e.)	Inhibición ^b (%)	Germinación (%)
Encecalina	0	13.2 ± 3.4	0	100	23.7 ± 1.120	0	100
	10	10.6 ± 1.12	19.3	100	20.3 ± 2.42 ^c	14.1	80
	20	5.3 ± 1.50	59.6	100	10.2 ± 1.36 ^c	57.1	65
	40	4.9 ± 1.11 ^c	62.9	100	7.2 ± 1.40 ^c	69.5	50
	100	3.6 ± 1.0 ^c	72.2	100	7.2 ± 0.86 ^c	69.6	35
	200	3.1 ± 1.34 ^c	76.4	74.4	5.3 ± 1.55 ^c	77.5	30
Euparina	0	9.5 ± 2.49	0	100	20.1 ± 4.9	0	100
	20	7.3 ± 1.92	23.6	94	18.1 ± 4.72 ^c	9.4	90.9
	40	6.7 ± 2.06	24.8	94	17.8 ± 4.34 ^c	10.7	84.8
	50	6.6 ± 1.39	31.3	92	16.5 ± 1.11 ^c	14.5	84.8
	100	5.4 ± 1.5 ^c	52.7	71	16.2 ± 4.49 ^c	18.5	81.8
	200	3.1 ± 1.11 ^c	67.5	65	9.5 ± 4.31 ^c	52.2	72
Desmetilenc	0	10.2 ± 1.85	0	100	20.1 ± 3.74	0	100
	20	6.7 ± 2.07	33.8	76	14.0 ± 1.08 ^c	30.5	78
	40	3.5 ± 0.45	65.6	34	13.0 ± 1.10 ^c	35.5	62
	50	2.8 ± 0.87 ^c	72.5	27	10.3 ± 1.03	48.4	56
	100	0	100	0	8.9 ± 1.12 ^c	55.5	50
	200	0	100	0	7.1 ± 1.84 ^c	64.2	39
6-metoxi-tremetona	0	14.2 ± 1.66	0	100	27.2 ± 1.0821	0	100
	10	4.6 ± 0.99 ^c	56.2	92	26.3 ± 1.27	4.7	100
	20	3.5 ± 0.65 ^c	61.8	90	21.1 ± 1.05	23.8	98
	50	3.3 ± 0.58 ^c	71.1	84	9.8 ± 1.46	62.3	92
	100	3.0 ± 0.74 ^c	75.8	66	6.2 ± 1.42 ^c	74.7	86
	200	2.0 ± 0.01 ^c	85.5	48	6.6 ± 1.22 ^c	77.1	84
6-hidroxi-3-metoxi-trem	0	14.2 ± 1.66	0	100	27.5 ± 3.56	0	100
	20	13.4 ± 1.04	5.8	95	27.5 ± 1.10	0	100
	50	8.1 ± 1.97 ^c	41.7	90	27.4 ± 1.11	5.8	87
	100	4.8 ± 1.29	65.1	84	21.1 ± 1.62	23.1	84
	200	3.6 ± 1.00 ^c	74.1	82	16.2 ± 1.08 ^c	40.3	84
	400	2.7 ± 0.66 ^c	80.4	34	12.9 ± 1.27 ^c	52.2	63
Glicósido	0	14.1 ± 1.64	0	100	24.9 ± 0.93	0	100
	40	14.0 ± 1.20 ^c	0	95	23.5 ± 1.04	5.5	95
	50	11.7 ± 2.36 ^c	11.3	92	22.7 ± 1.01	8.7	84
	100	5.6 ± 1.07 ^c	43.1	79	14.8 ± 0.86 ^c	40.4	74
	200	7.5 ± 2.09 ^c	57.7	63	12.9 ± 0.70 ^c	47.9	61
	400	2.3 ± 0.48 ^c	82.4	21	14.6 ± 0.52 ^c	51.1	53

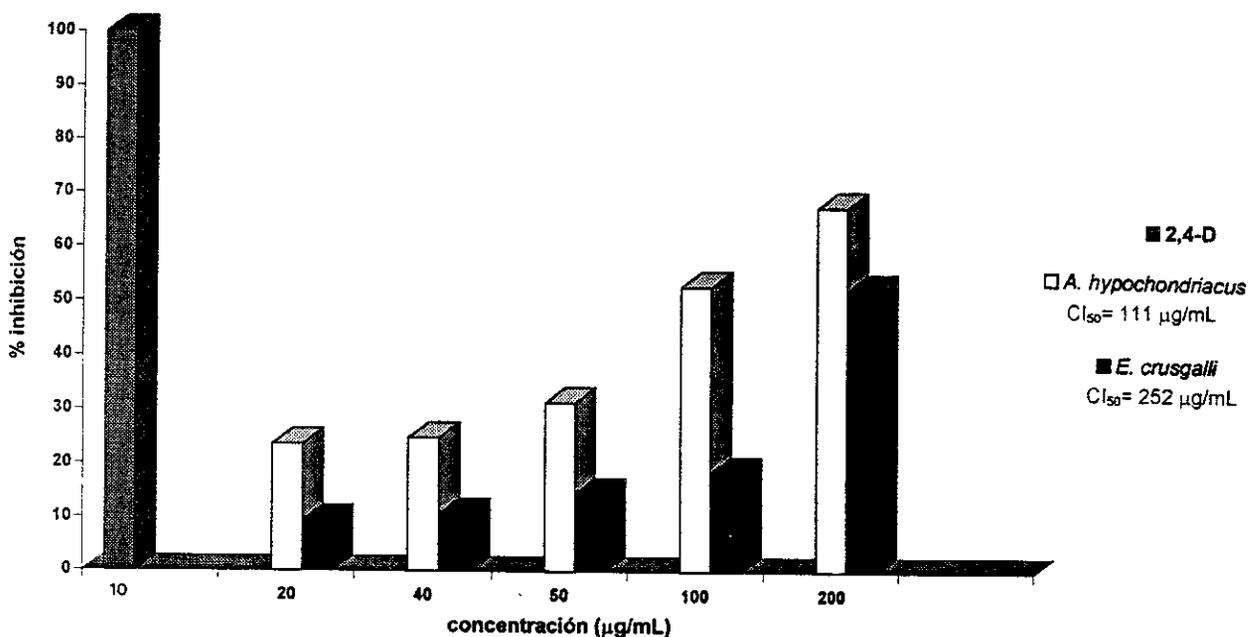
^a Cada cifra representa el promedio de cuatro réplicas

^b Porcentajes expresados en relación al crecimiento del control negativo

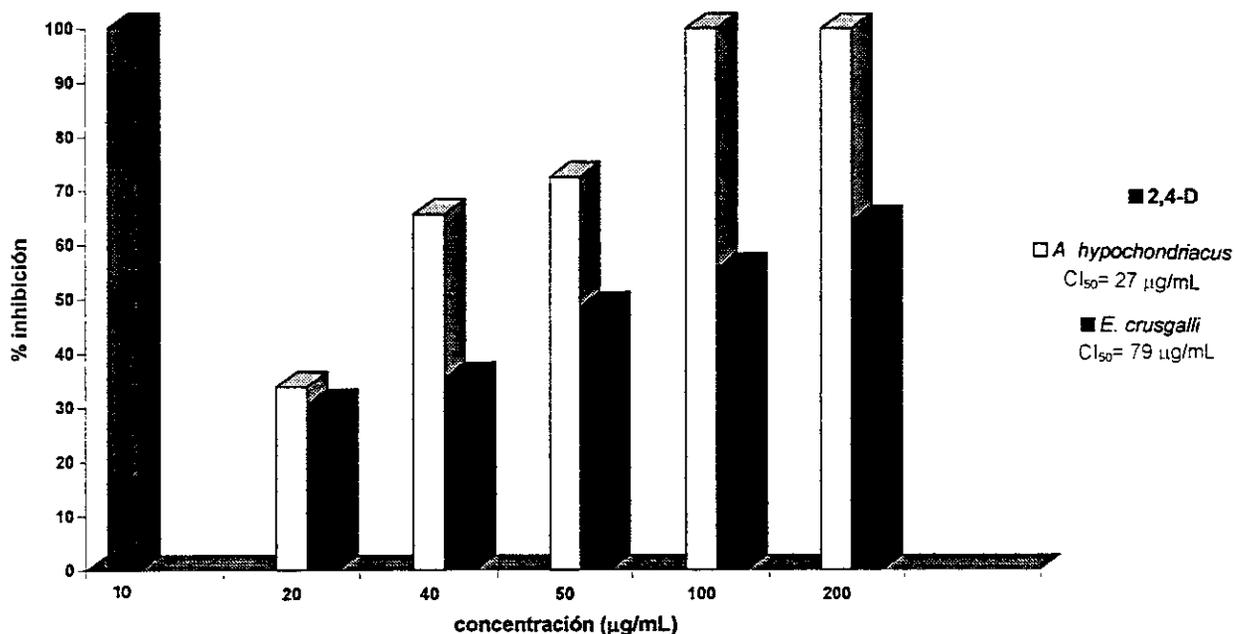
^c p ≤ 0.05 (ANOVA)



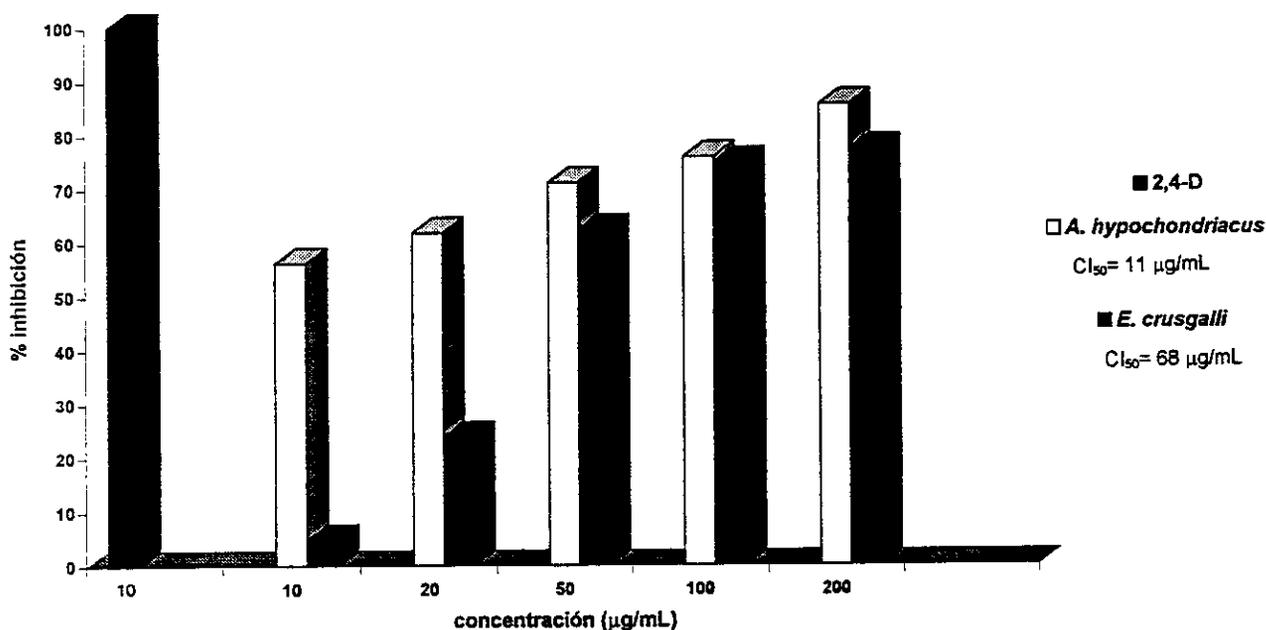
Gráfica 1. Efecto fitotóxico de la enecalina (13) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. Cada valor representa el promedio de cuatro réplicas. Se utilizó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (10 µg/mL) como un control positivo.



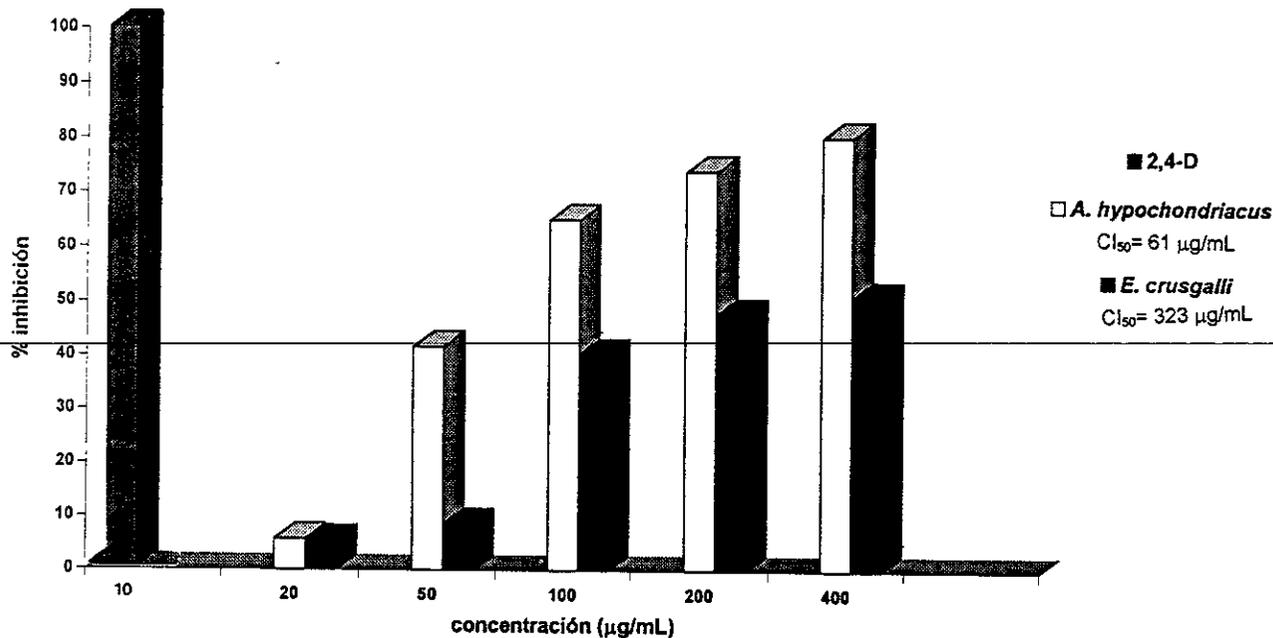
Gráfica 2. Efecto fitotóxico de la euparina (45) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. Cada valor representa el promedio de cuatro réplicas. Se utilizó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (10 µg/mL) como un control positivo.



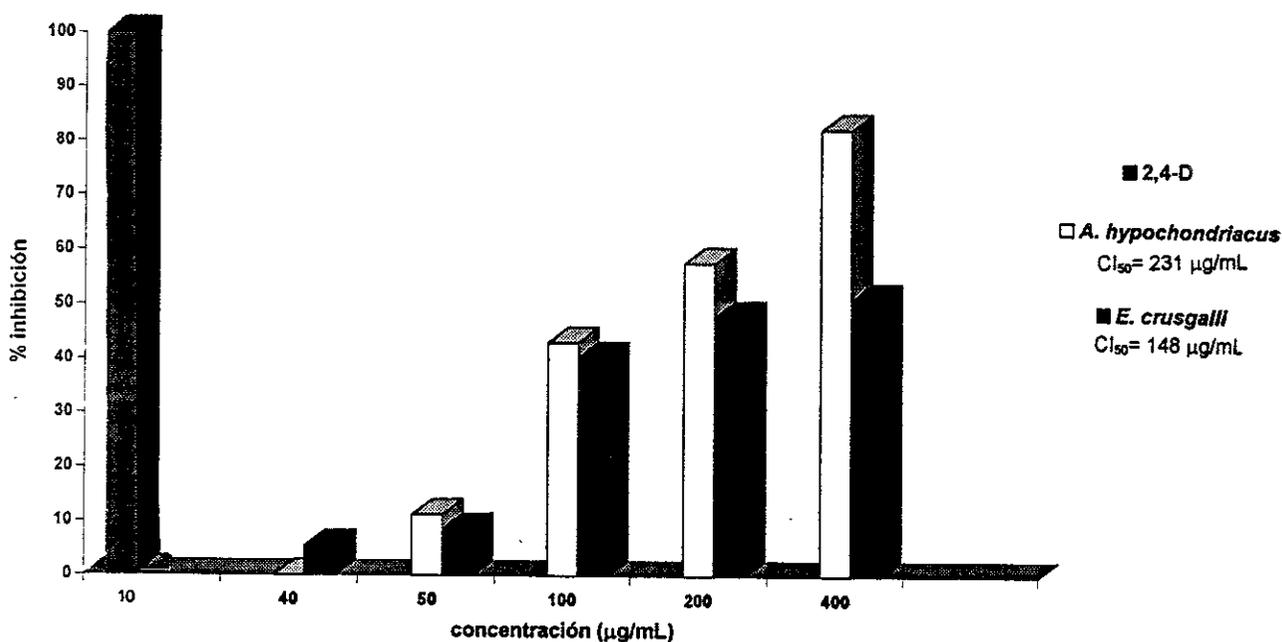
Gráfica 3. Efecto fitotóxico de la desmetilencecalina (4) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. Cada valor representa el promedio de cuatro réplicas. Se utilizó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (10 µg/mL) como un control positivo.



Gráfica 4. Efecto fitotóxico de la 6-metoxitremetona (131) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. Cada valor representa el promedio de cuatro réplicas. Se utilizó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (10 µg/mL) como un control positivo.



Gráfica 5. Efecto fitotóxico de la 6-hidroxi-3-metoxitremetona (132) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. Cada valor representa el promedio de cuatro réplicas. Se utilizó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (10 $\mu\text{g/mL}$) como un control positivo.



Gráfica 6. Efecto fitotóxico de la 4- β -D-glucopiranosil-3-[3-metoxi-*trans*-isopenten-1-il]-acetofenona (133) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. Cada valor representa el promedio de cuatro réplicas. Se utilizó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (10 $\mu\text{g/mL}$) como un control positivo.

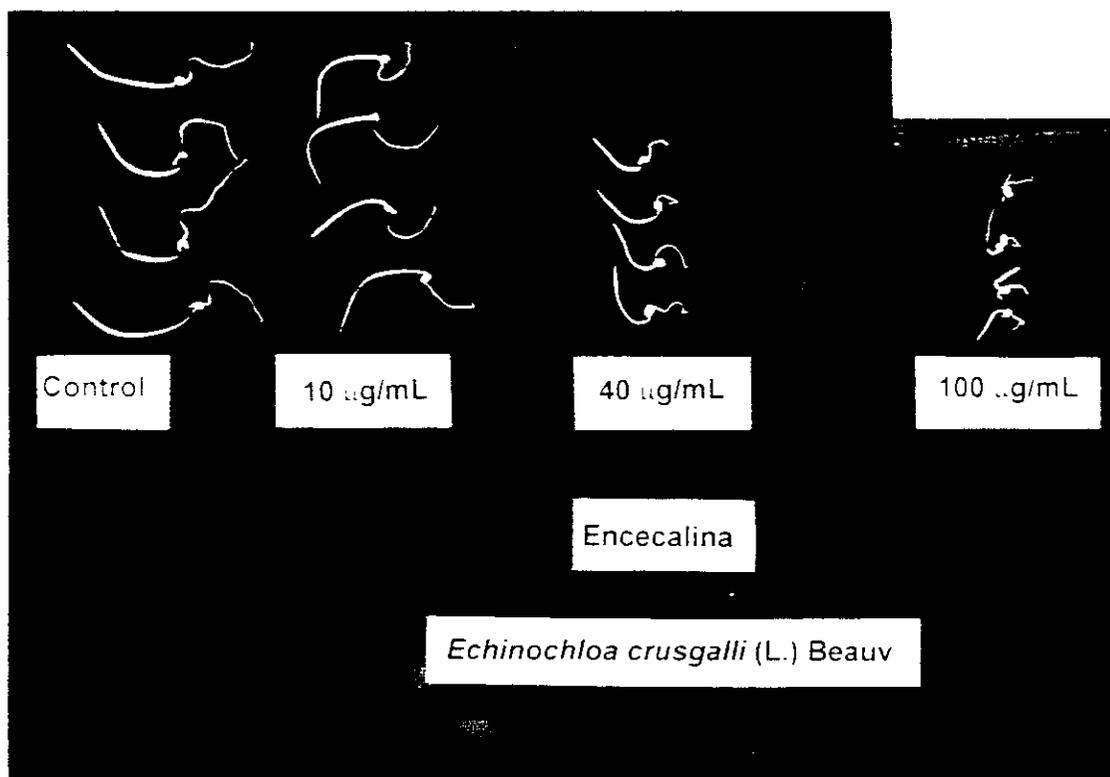
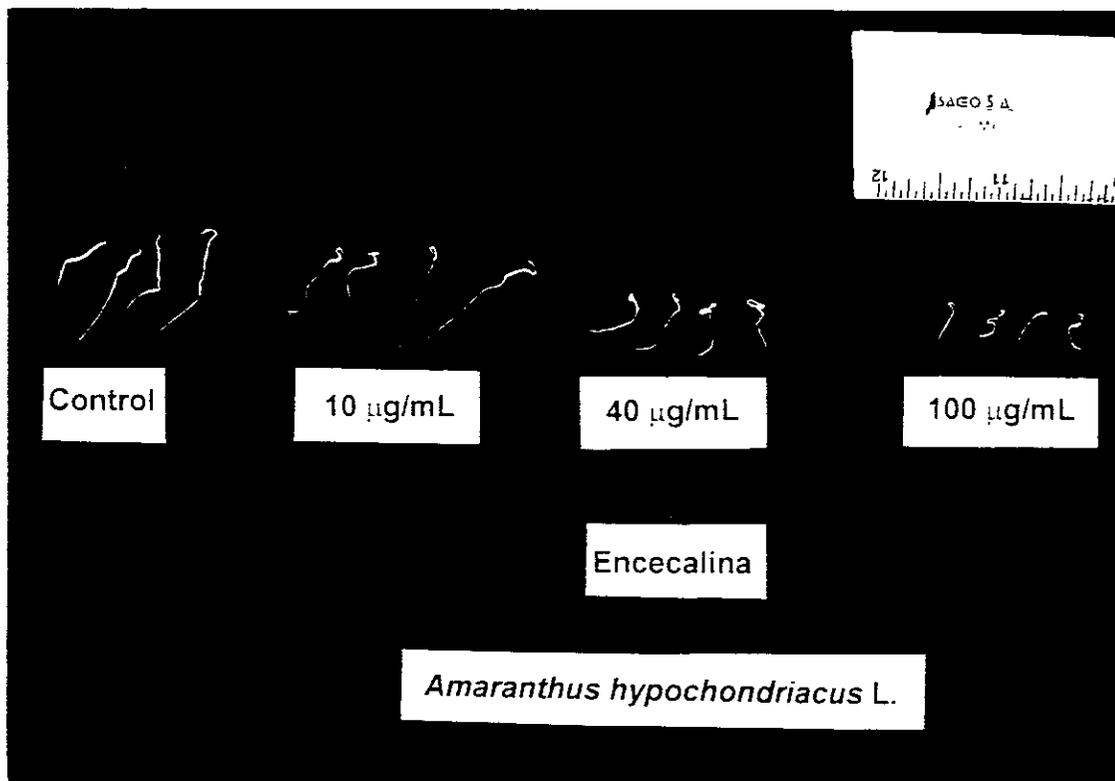


Figura 18. Efecto de la encecalina (4) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*.

en un 60% el crecimiento radicular de esta especie a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ (483 y 421 μM para 45 y 132, respectivamente).

Los resultados obtenidos para las semillas de *E. crusgalli*, demostraron que esta especie es menos sensible a los tratamientos con los compuestos objeto de evaluación.

Como se puede observar en las Gráficas 1,3 y 4, los compuestos 4, 13 y 131 presentaron una vez más un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento radicular de esta especie en el intervalo de concentraciones evaluados; la enecalina por ejemplo, reveló un efecto apreciable a partir de la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 15). Los valores de la CI_{50} calculados fueron 79, 6 y 68 $\mu\text{g/mL}$ (362, 26 y 312 μM , respectivamente) para la desmetilencecalina, la enecalina y la 6-metoxitremetona, respectivamente.

Por otra parte, la euparina y la 6-hidroxi-3-metoxitremetona inhibieron en menor grado el crecimiento radicular de *E. crusgalli*, con un valor para la CI_{50} de 252 y 323 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Finalmente, el compuesto 133 como era de esperarse, no afectó de manera significativa el crecimiento radicular de ninguna de las dos malezas de prueba.

En el Cuadro 23, se muestran también los resultados obtenidos en los bioensayos de germinación de las dos especies de semillas de prueba. Como se desprende de los mismos, la desmetilencecalina es el único compuesto que demuestra un efecto inhibitorio significativo sobre el proceso de germinación, ya que inhibe totalmente la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus* a una

concentración de 100 µg/mL, en tanto que la germinación de *E. crusgalli* se inhibe en un 50% a una menor concentración (40 µg/mL).

El resto de los compuestos no demostraron un efecto apreciable sobre el proceso de germinación de ambas especies de prueba.

De los compuestos obtenidos en el presente estudio, únicamente la encecalina (13) y la desmetilencecalina (4) han sido objeto de una evaluación previa (Merrill, 1989). En esa oportunidad, la desmetilencecalina inhibió de manera significativa el crecimiento radicular de las especies *Panicum miliaceum*, *Medicago sativa*, *Lolium perenne*, *Lactuca sativa*, *Setaria viridis*, *Ipomoea purpurea* y *E. crusgalli* a una concentración de 0.01 µM. La encecalina por el contrario, mostró únicamente un efecto inhibitor para *E. crusgalli* y *Panicum miliaceum* a una concentración de 0.1 µM.

En consecuencia, esta investigación constituye el primer reporte del efecto fitotóxico potencial de benzofuranos.

Por otro lado, la comparación de la actividad fitoinhibidora del crecimiento vegetal demostrada por la encecalina (13), es similar a la actividad descrita para algunos compuestos aromáticos. De manera general, los compuestos aromáticos investigados a la fecha ejercen su efecto en un intervalo de concentración comprendido entre 10^{-2} y 10^{-4} µM (Einhellig, 1993; Macías *et al.*, 1995).

4.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO FOTOTÓXICO POTENCIAL DE LOS CONSTITUYENTES MAYORITARIOS DE *H. quinquenervis*

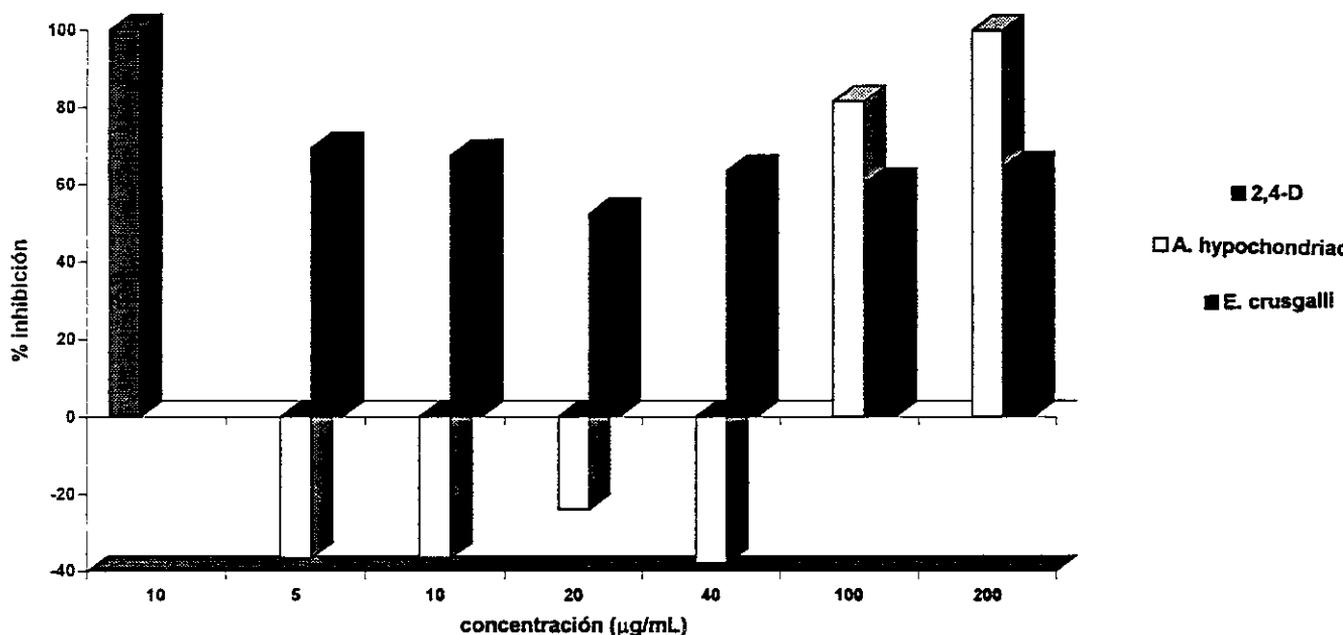
- Diversas investigaciones realizadas durante las dos últimas décadas, han permitido establecer que un gran número de productos naturales de origen vegetal son significativamente tóxicos a plantas y animales cuando estos se someten a una irradiación con luz visible ó luz UV (Arnason y Towers, 1988).

Los compuestos fotodinámicos, se dividen en dos grupos. Los pertenecientes al primero, ejercen su efecto fototóxico interaccionando con el DNA ó RNA. Esta categoría incluye metabolitos tales como furanocumarinas, furanoquinolinas y alcaloides de tipo β -carbonílico (McKenna *et al.*, 1981). Debido a que estos compuestos reaccionan con los ácidos nucleicos y causan aberraciones a nivel de los cromosomas, no tienen aplicación en las prácticas agrícolas. No obstante, estos son útiles en la terapéutica para el tratamiento de la psoriasis, vitiligo y algunos casos de leucemia (Arnason y Towers, 1988).

El segundo grupo, mejor conocido como los compuestos fotodinámicos de tipo II, cuando son excitados por la luz transfieren energía al oxígeno molecular produciendo normalmente oxígeno singulete (1O_2). Este estado excitado del oxígeno es altamente reactivo y es el responsable de la potente actividad fototóxica demostrada por estos productos. Este grupo incluye algunas nafto y antraquinonas, poliacetilenos (Towers *et al.*, 1977; Wat *et al.*, 1979) y alcaloides isoquinolínicos, por tan solo mencionar algunos ejemplos. Un ejemplo representativo de metabolitos secundarios fototóxicos de tipo II es el α -tertienilo. Este compuesto inhibe significativamente el crecimiento radicular de diversas especies, entre las que se encuentran *Asclepias syriaca*, *Chenopodium album*, *Trifolium perenne* y *Amaranthus retroflexus* L.

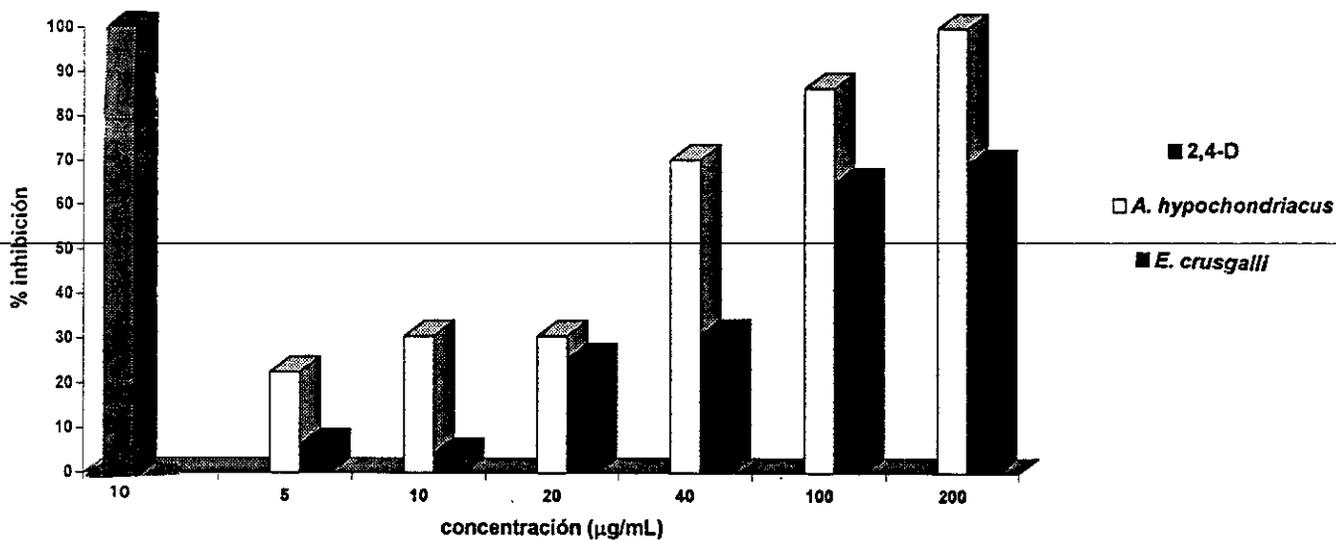
Considerando que en un estudio previo realizado por Proksch y colaboradores (1983) se demostró que la encecalina, la desmetilencecalina y la 6-metoxieuparina ejercen un ligero efecto fototóxico sobre *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *B. subtilis*, se consideró pertinente comprobar si el efecto fitotóxico demostrado por la encecalina, la euparina y la desmetilencecalina estaba mediado por un efecto fototóxico. Para ello, se repitieron los ensayos de fitotoxicidad irradiando en esta oportunidad con luz UV a dos diferentes longitudes de onda (254 y 365 nm).

En las Gráficas 7-9 se ilustran los resultados derivados de este segundo conjunto de evaluaciones.

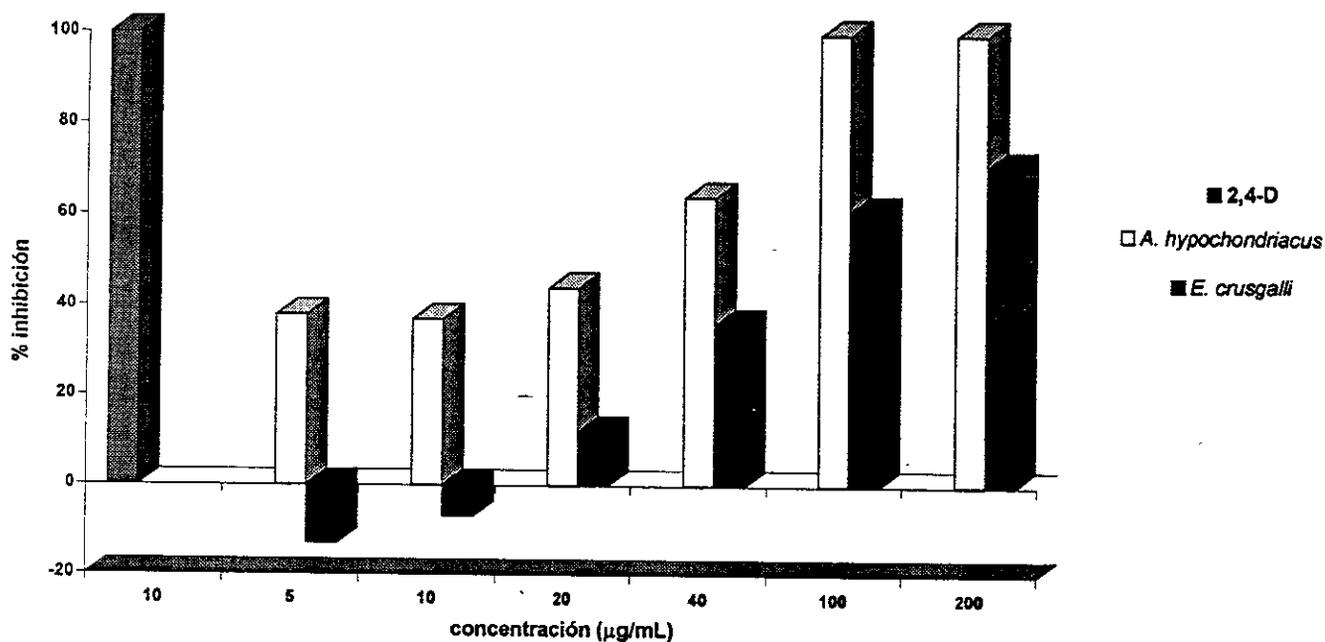


Gráfica 7. Efecto fototóxico de la encecalina (13) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crugalli*. Cada valor representa el promedio de tres réplicas.

El análisis comparativo de los resultados obtenidos en las dos condiciones de prueba, permite concluir que únicamente la encecalina (13) y la euparina (45) producen un incremento moderado (30%) del efecto inhibitorio del crecimiento



Gráfica 8. Efecto fototóxico de la euparina (45) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. Cada valor representa el promedio de tres réplicas.



Gráfica 9. Efecto fototóxico de la desmetilencecalina (4) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. Cada valor representa el promedio de tres réplicas.

Cuadro 24. Efecto de los compuestos mayoritarios aislados de *H. quinquenervis* sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.

Compuesto	Concentración (µg/mL)	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>			<i>Echinochloa crusgalli</i>		
		Crecimiento radicular ^a (mm, ± d.e.)	Inhibición (%)	Germinación ^b (%)	Crecimiento radicular ^a (mm, ± d.e.)	Inhibición (%)	Germinación ^b (%)
Encecalina	0	3.7 ± 1.3966	0	100	29.0 ± 0.6263	0	100
	5	4.8 ± 0.1986	136.61*	111.1	20.6 ± 0.3589	69.5	100
	10	4.8 ± 0.1359	136.61*	111.1	21.0 ± 0.4536	67.5	100
	20	4.4 ± 0.1138	123.94*	105.5	21.2 ± 0.2973	52.4	100
	40	4.9 ± 1.1939	138.02*	105.5	19.4 ± 0.4953 ^c	63.6	100
	100	2.9 ± 0.9333	81.6	100	18.4 ± 0.2983	60.3	81.2
	200	0	100	22.2	19.7 ± 0.3502	64.5	53.1
Euparina	0	9.1 ± 2.3485	0	100	2.9 ± 0.4935	0	100
	5	4.8 ± 1.2588	22.5	100	2.9 ± 0.6209	106.34*	100
	10	4.3 ± 1.6693	30.6	100	2.5 ± 0.5331 ^c	4.4	100
	20	4.3 ± 1.3562	30.6	100	2.0 ± 0.5397	25.4	100
	40	1.8 ± 0.8634 ^c	70.2	75	1.9 ± 0.4640	30.9	100
	100	0.8 ± 0.4948 ^c	86.3	43	0.94 ± 0.3042 ^c	64.9	85.7
	200	0	100	0	0.83 ± 0.2587 ^c	69.1	78.5
Desmetilenc	0	6.8 ± 2.9101	0	100	24.5 ± 0.3510	0	100
	5	4.2 ± 2.0006 ^c	38	90	27.7 ± 0.9567	113.1*	95
	10	4.3 ± 1.7036 ^c	37	90	26.2 ± 0.6535 ^c	106.9*	90
	20	3.8 ± 1.7170 ^c	44	90	21.5 ± 0.6091	12	80
	40	2.4 ± 0.9101 ^c	64	70	15.8 ± 0.7040 ^c	36	80
	100	0	100	15	9.6 ± 0.7704 ^c	61	70
	200	0	100	0	7.1 ± 0.8301 ^c	71.2	50

* Estimulación del crecimiento radicular

^a Cada cifra representa el promedio de cuatro réplicas

^b Porcentajes expresados en relación al crecimiento del control negativo

^c $p < 0.05$ (ANOVA)

radicular bajo las condiciones de irradiación; sin embargo, estadísticamente las diferencias no son significativas. En consecuencia, el efecto fitotóxico demostrado por los compuestos 13 y 45, no está mediado por un efecto fototóxico.

4.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ENCECALINA (13), LA EUPARINA (45) Y LA DESMETILENCECALINA (4) SOBRE DIVERSAS ACTIVIDADES FOTOSINTÉTICAS.

Considerando la actividad fitoinhibidora significativa demostrada en este estudio para la encecalina y la desmetilencecalina sobre las dos especies de arvenses de prueba, se consideró conveniente explorar de forma detallada el potencial herbicida de estos compuestos. De tal forma que se evaluó el efecto de ambos benzopiranos sobre las reacciones luminosas de la fotosíntesis *in vitro* en cloroplastos aislados de espinacas.

Cabe señalar, que a pesar del efecto inhibitor significativo demostrado por la 6-metoxitremetona sobre el crecimiento radicular de las especies de prueba, no fue posible determinar su efecto sobre las diferentes actividades fotosintéticas debido a los bajos rendimientos obtenidos de este compuesto en los diferentes estudios fitoquímicos realizados sobre la planta. Así mismo, considerando que la euparina constituye uno de los compuestos mayoritarios obtenidos en el presente estudio y que además presentó un efecto fitoinhibidor significativo, aunque de menor potencia, se juzgó pertinente también evaluar su efecto sobre este blanco de acción.

Las actividades fotosintéticas estudiadas se seleccionaron tomando como referencia el blanco de acción de los herbicidas comerciales.

- En primer lugar, se determinó el efecto que presentan la encecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4) sobre la síntesis de ATP. En este sentido cabe recordar que los compuestos que inhiben la síntesis de ATP lo pueden hacer por mecanismos de desacoplamiento, inhibiendo la transducción de energía ó bien inhibiendo la reacción de Hill (Trebst, 1978; Moreland, 1980; Ort, 1986).

Considerando que los tres compuestos evaluados presentaron un efecto inhibitorio sobre la síntesis de ATP, se evaluó su efecto sobre el transporte de electrones basal, desacoplado y fosforilante, así como sobre la captación de H^+ , con la finalidad de establecer cual de los mecanismos antes mencionados resultaba activado.

Posteriormente, se interpretó su mecanismo de acción y se procedió a caracterizar el sitio ó la enzima redox de la cadena transportadora de electrones que fue afectada por cada compuesto.

La discusión del efecto mostrado por cada uno de los compuestos sobre las actividades fotosintéticas antes mencionadas, es el objetivo de la sección siguiente.

4.6.1 Efecto sobre la síntesis de ATP y captación de H^+ .

La síntesis de ATP se midió registrando los cambios de pH en el medio de reacción entre pH 8.0 y 8.1, tal y como se indica en la sección experimental (Peña-Valdivia *et al.*, 1991). Este procedimiento se basa en determinar los cambios de pH en el medio de la reacción, inducido por la síntesis de ATP en

presencia de ATP y Pi (Calera *et al.*, 1996). Cabe destacar que durante la síntesis de ATP a pH 8, la enzima H⁺-ATPasa consume irreversiblemente un protón por cada molécula de ATP sintetizada. En consecuencia, la variación de pH debido al consumo de protones es proporcional a la cantidad de ATP generada.

En la Gráfica 10, se muestra el efecto de los compuestos evaluados sobre la fotofosforilación cuando los electrones se transportan de H₂O a MV (Figura 19).

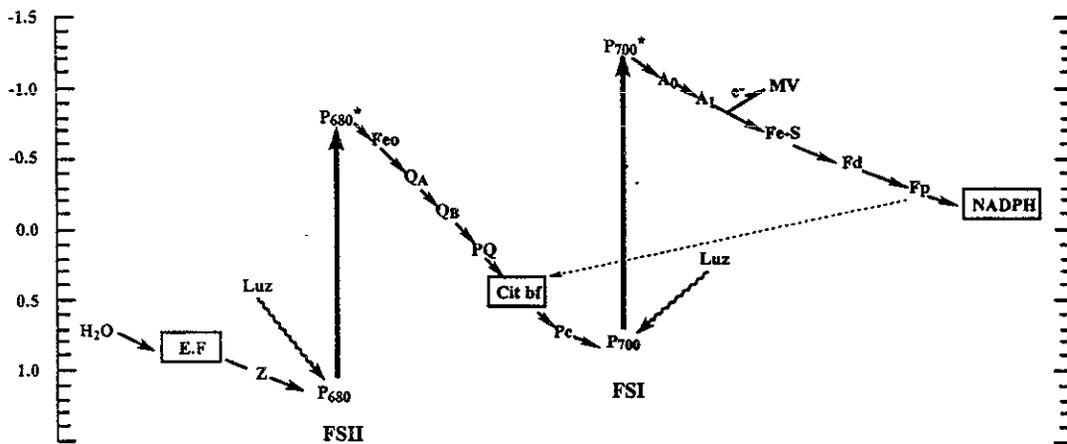


Figura 19. Determinación del transporte de electrones de H₂O a MV

Como se puede observar, la euparina (45) y la desmetilencecalina (4) inhiben de manera significativa y dependiente de la concentración el proceso de la fotofosforilación. Ambos compuestos inhiben en un 70% la fosforilación a una concentración de 300 μM. Por el contrario, la encecalina es menos activa a la misma concentración, inhibiendo únicamente en un 10% la síntesis de ATP. Sin

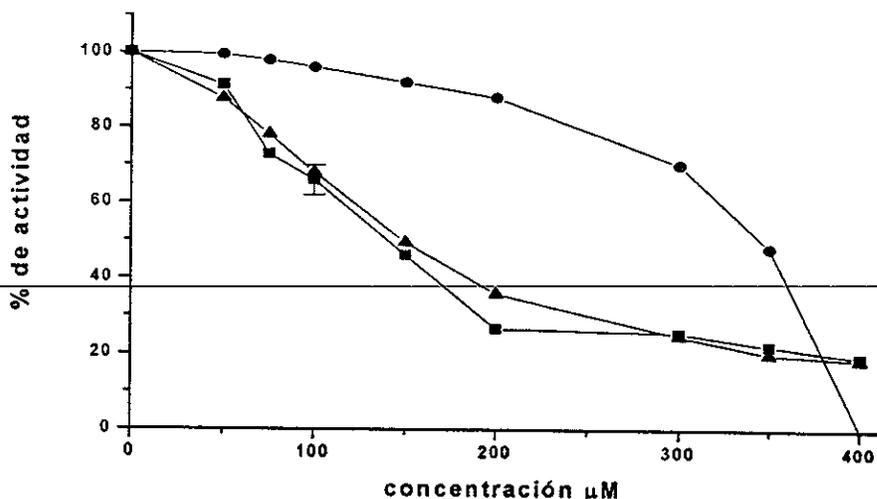
embargo, a la máxima concentración de prueba (400 μM) el compuesto 13 inhibe por completo el proceso. Los valores de I_{50} (concentración que produce el 50% de inhibición) obtenidos se muestran en el Cuadro 24 y como se infiere de los mismos, la desmetilencecalina es el inhibidor más potente de la fotofosforilación.

Con base en estos resultados, resulta claro que existen ciertos requerimientos estructurales para que se lleve a cabo la inhibición de la fosforilación por estos compuestos. Así por ejemplo, la presencia del grupo OH en la posición C-7 de los compuestos 4 y 45 parece ser importante para la acción inhibidora sobre la síntesis de ATP esto debido probablemente, a una menor liposolubilidad en las membranas tilacoidales. De manera adicional, se puede concluir que la naturaleza del anillo heterocíclico (furano vs pirano) no influye sobre esta actividad.

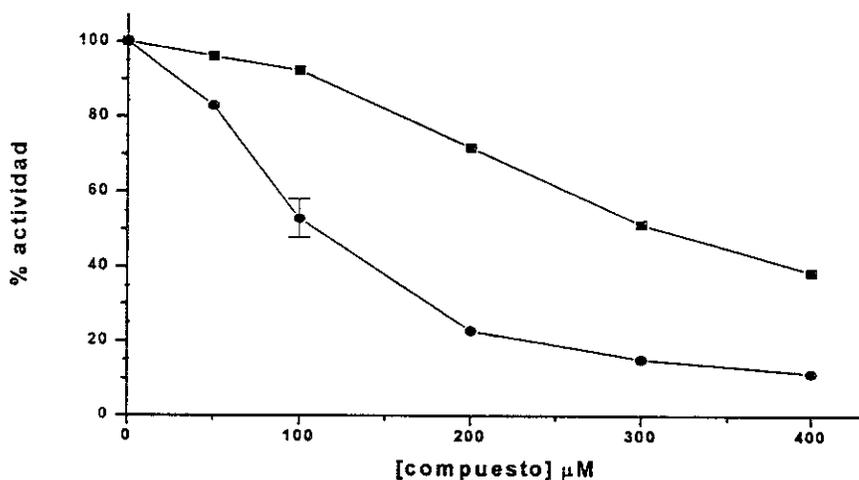
Cuadro 25. Valores de CI_{50} de la encecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4) en la fotofosforilación, captación de protones y transporte de electrones.

	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	Encecalina	Euparina	Desmetilencecalina
Síntesis de ATP	>300	154.5	151.6
Captación de protones	3.5	3.5	317.9
Transporte de electrones basal	121.6	339.5	109
Transporte de electrones desacoplado	317.2	>400	336.5
Transporte de electrones fosforilado	65.1	>400	>400

En la Gráfica 11 se muestran los resultados obtenidos para los compuestos 4, 13 y 45 sobre la captación de H^+ ; de manera general, los tres compuestos inhibieron esta actividad fotosintética en forma dependiente de la concentración.



Gráfica 10. Efecto de la encecalina (14), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4) sobre la síntesis de ATP. Las velocidades de los controles son: 254, 283 y 302 $\mu\text{mol de ATP} \cdot \text{mg de clor}^{-1}$ para la encecalina (●), la euparina (▲) y la desmetilencecalina (■), respectivamente. I, desviación estandar máxima.



Gráfica 11. Efecto de la encecalina (14), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4) sobre la captación de H^+ . Las velocidades de los controles son: 123, 123 y 132 $\mu\text{equiv de H}^+ \cdot \text{mg de clor}^{-1}$ para la encecalina, la euparina (●) y la desmetilencecalina (■), respectivamente. I, desviación estandar máxima.

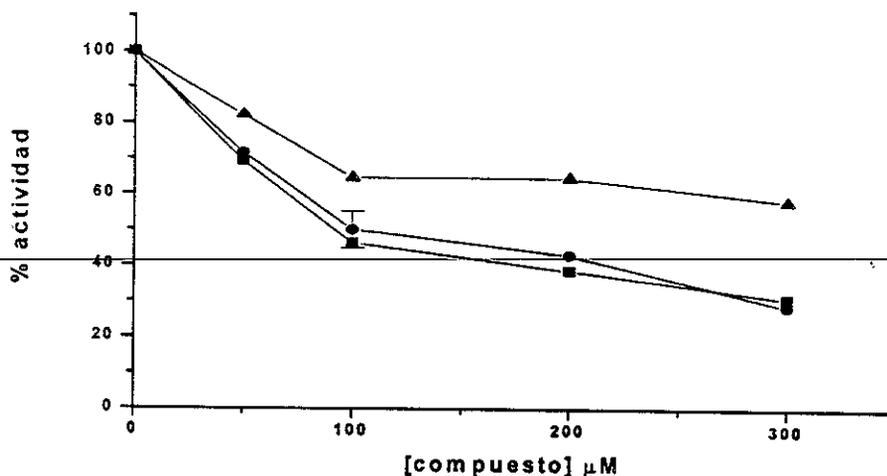
4.6.2 Efecto sobre el transporte de electrones

Con el objeto de dilucidar el mecanismo de acción mediante el cual estos compuestos inhiben la síntesis de ATP y la captación de H^+ , se determinó su efecto *in vitro* sobre el transporte de electrones fotosintético no-cíclico, empleando agua como un donador natural de electrones y el metilviológeno como un aceptor final de electrones (Figura 16). Este efecto se investigó bajo tres condiciones experimentales diferentes: basal, fosforilante y desacoplado (Trebst, 1972 ;McCarty, 1977 ; Mitchell, 1977).

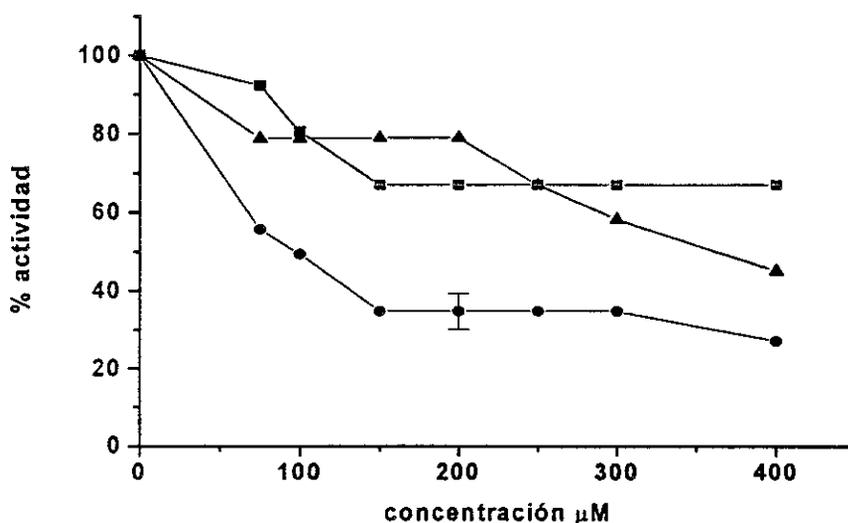
En primer lugar, se evaluó el transporte de electrones basal mediante la determinación del flujo de electrones dependiente de la luz en el medio basal; cabe mencionar que en este caso, la velocidad del transporte de electrones es baja debido a la ausencia de ADP y Pi en el medio de reacción (Trebst, 1972).

En la Gráfica 12, se observa que la encecalina (13) y la desmetilencecalina (4) inhiben la velocidad del transporte de electrones basal en un 70% a una concentración de 300 μM . La euparina por su parte, muestra un efecto moderado, ya que la inhibición de este flujo de electrones es del 40% a la misma concentración.

Por otra parte, cuando al medio de reacción se adicionan ADP y Pi (transporte de electrones fosforilante) para permitir la actividad catalítica de la enzima H^+ -ATPasa, la velocidad del transporte de electrones es de una a tres veces mayor que la del transporte de electrones basal, ya que el gradiente de pH es utilizado para la fotofosforilación (Trebst, 1972). En este caso, la encecalina



Gráfica 12. Efecto de la encecalina (14), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4) sobre el transporte de electrones basal. Las velocidades de los controles son: 878, 878 y 543 $\mu\text{equiv de e}^- \text{ h}^{-1} \text{ mg de clor}^{-1}$ para la encecalina (●), la euparina (▲) y la desmetilencecalina (■), respectivamente. \perp , desviación estándar máxima.



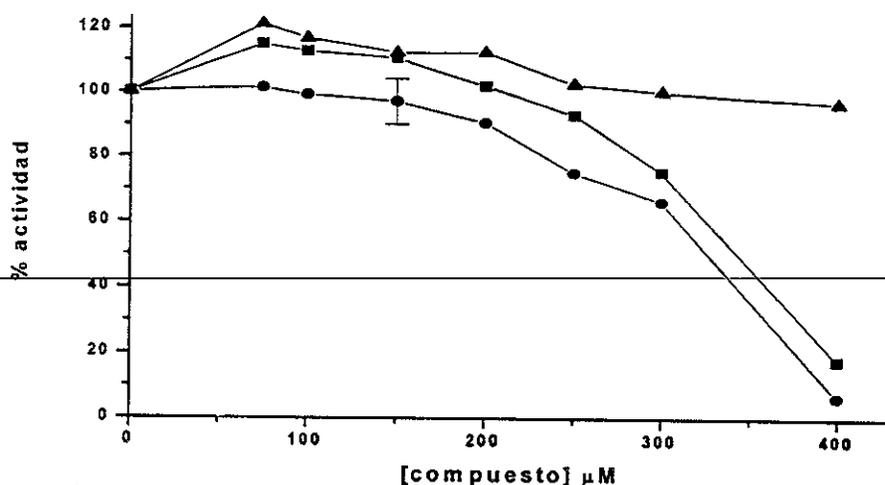
Gráfica 13. Efecto de la encecalina (14), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4) sobre el transporte de electrones fosforilante. Las velocidades de los controles son: 903, 966 y 1210 $\mu\text{equiv de e}^- \text{ h}^{-1} \text{ mg de clor}^{-1}$ para la encecalina (●), la euparina (▲) y la desmetilencecalina (■), respectivamente. \perp , desviación estándar máxima.

inhibió el transporte de electrones fosforilante en un 50 y 75% a 100 y 400 μM , respectivamente (Gráfica 13). La desmetilencecalina inhibió también la velocidad del transporte de electrones fosforilante aunque en una forma moderada la máxima inhibición se observa a la concentración de 400 μM (58%). Con respecto a la euparina, esta muestra un efecto de inhibición constante (35%) en el intervalo de concentraciones de 150 a 400 μM .

En relación con la determinación de la velocidad del transporte de electrones desacoplado, se adicionó al medio de reacción basal NH_4Cl como un agente desacoplante; es importante mencionar, que este último compuesto promueve la disipación del gradiente de H^+ generado en la cadena fotosintética, observándose una velocidad máxima del flujo de electrones. Si un compuesto inhibe el transporte de electrones bajo estas condiciones, se le considera como un inhibidor clásico de la reacción de Hill (McCarty, 1977; Mitchell, 1977). Como se puede observar en la Gráfica 14, la encecalina y la desmetilencecalina inhibieron drásticamente el flujo de electrones desacoplado en forma dependiente de la concentración, en un 90 y 80%, respectivamente a una concentración de 400 μM . Por el contrario, la euparina activó la velocidad en un 20% a 75 μM ; a mayor concentración del compuesto, la activación disminuye siendo igual a la del control desde una concentración de 250 μM .

El Cuadro 25 muestra los valores de I_{50} calculados para los compuestos evaluados sobre los transportes de electrones basal, fosforilante y desacoplado.

El análisis de los resultados obtenidos hasta el momento, indicaron claramente, que ambos benzopiranos actúan como inhibidores típicos de la



Gráfica 14. Efecto de la encecalina (14), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4) sobre el transporte de electrones desacoplado. Las velocidades de los controles son: 2060, 2060 y 2054 $\mu\text{equiv de e}^- \text{h}^{-1} \cdot \text{mg de clor}^{-1}$ para la encecalina (●), la euparina (▲) y la desmetilencecalina (■), respectivamente. I, desviación estándar máxima.

Cuadro 26. Efecto de la encecalina (13), la euparina (45) y la desmetilencecalina (4) sobre el transporte de electrones comparado con el control (100% de actividad).

Reacciones	Concentración de los compuestos 4, 13 y 45 (μM)			% Inhibición			CI_{50} (μM)		
	13	45	4	13	45	4	13	45	4
H ₂ O a MV									
Transporte de electrones basal	300	300	300	71.43	41.94	69.24	121.61	339.5	108.95
Transporte de electrones fosforilado	400	400	400	74.14	66.66	56.46	65.14	-	362.5
Transporte de electrones desacoplado	400	400	400	93.39	ND ^c	82.31	317.22	ND ^b	336.5
Fotosistema I									
DAD a MV	300	-	300	5.27	-	ND ^c	-	-	-
Fotosistema II									
H ₂ O a DAD	300	-	200	66.68	-	100	205.13	-	145.82
H ₂ O a SiMo	300	-	200	70.53	-	61	210.84	-	150.59
DPC a DCPIP	300	-	200	75.62	-	83	241.88	-	173.37

^aLas velocidades de los controles para el flujo de electrones en el fotosistema II de H₂O a DAD, de H₂O a SiMo y de DPC a DCPIP fueron 410, 450 y 364 $\mu\text{equiv de e}^- \text{h}^{-1} \cdot \text{mg de Clor}^{-1}$, respectivamente.

^bNo determinado

^cNo detectado

reacción de Hill. En consecuencia, la inhibición de la síntesis de ATP demostrado por estos compuestos se debe a una interferencia con el flujo de electrones en la cadena redox.

La potencia demostrada por la encecalina y la desmetilencecalina es similar a la encontrada para una gran variedad de productos naturales con actividad inhibidora del transporte de electrones entre los cuales se encuentran, el cacalol (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991), el piquerol (Mendoza *et al.*, 1994), la ivalina (Bernal-Morales *et al.*, 1994) y la isoalloalantolactona (Calera *et al.*, 1995), por tan sólo mencionar algunos ejemplos.

4.6.3 Caracterización del efecto de la encecalina y la desmetilencecalina sobre el transporte de electrones fotosintético.

Con el objeto de localizar el sitio y/o la enzima redox de la cadena transportadora de electrones inhibido por la encecalina y la desmetilencecalina, se determinó su efecto en pequeños fragmentos de los fotosistemas I y II. Para estas determinaciones, se emplearon diferentes donadores y aceptores artificiales de electrones, así como inhibidores de la cadena fotosintética (Vernon y Shaw, 1969 ; Saha *et al.*, 1971).

En primer lugar, se determinó la actividad en el fotosistema I empleando como sistema DAD/ascorbato. El DAD reducido con ascorbato actúa como un donador artificial de electrones a nivel del complejo $cyt\ b_6/f$. El MV se empleó como un aceptor final de electrones y el DCMU se adicionó a la mezcla de reacción con la finalidad de inhibir el flujo de electrones del fotosistema II al fotosistema I a

nivel de Q_B (Figura 20). Los resultados de esta determinación se muestran en la Gráfica 15 y en la Figura 19 los registros obtenidos; como se puede observar, la actividad en el fotosistema I no es afectada por la presencia de ambos compuestos, por lo que el blanco de acción debía encontrarse en el fotosistema II.

El transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II se determinó de H_2O a DAD ; en esta reacción, el agua actúo como un donador natural de electrones y el DAD/ $K_3Fe(CN)_6$ actúo como un aceptor artificial de electrones, equivalente al aceptor natural $cytb_6/f$. Para inhibir el paso de electrones hacia el fotosistema I se adicionó DBMIB a la mezcla de reacción (Figura 22). Los resultados obtenidos sobre esta reacción parcial se pvesentan en la Gráfica 16 y como se puede observar, esta es inhibida significativamente por los tratamientos con los compuestos 4 y 13 (Figura 21).

Posteriormente, se determinó el efecto de ambos benzopiranos en las reacciones parciales del flujo de electrones de H_2O a SiMo y de DPC a DCPIP (Figuras 23 y 24). En la primera de ellas, el agua actúo una vez más como un donador natural de electrones y el SiMo (equivalente a la FeO) actúo como una aceptor final de electrones. El DCMU se empleó para inhibir el transporte de electrones hacia el fotosistema I, específicamente sobre el transporte de electrones de la FeO a Q_A (Figura 20). Con respecto a la determinación de la velocidad del flujo de electrones en el intervalo de DPC a DCPIP, se adicionó al medio de reacción tris con la finalidad de impedir la hidrólisis del agua; la DPC actúo como un donador artificial de electrones a nivel de P_{680} y el DCPIP reducido

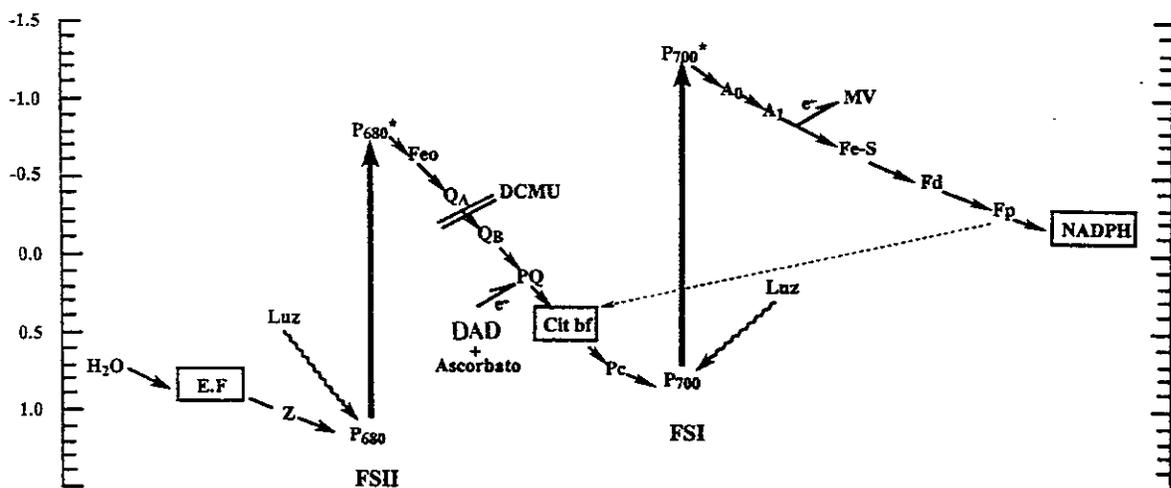
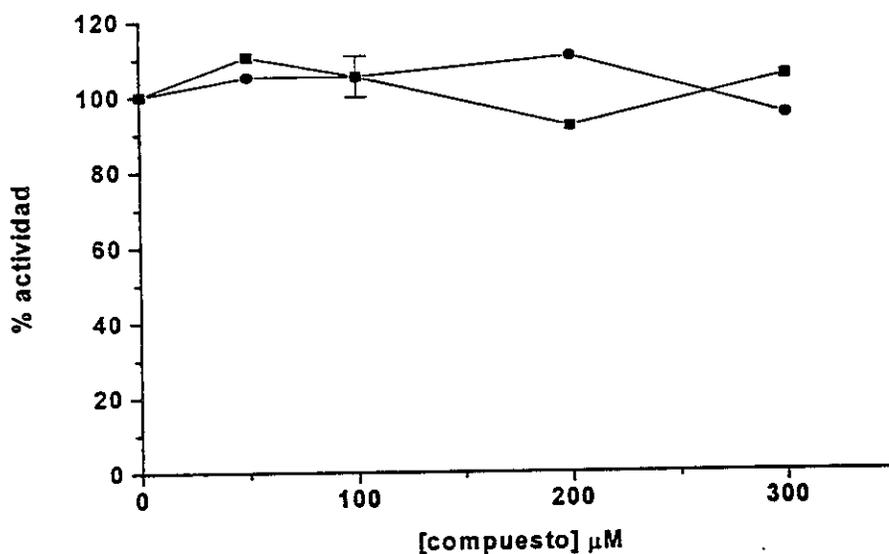


Figura 20. Determinación del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema I de DAD a MV



Gráfica 15. Efecto de la enecalina (14) y la desmetilencecalina (4) sobre el transporte de electrones en el fotosistema I. Las velocidades de los controles son: 4750 y 5000 $\mu\text{equiv de e}^- \text{ h}^{-1} \text{ mg de clor}^{-1}$ para la enecalina (●) y la desmetilencecalina (■), respectivamente. \perp , desviación estándar máxima.

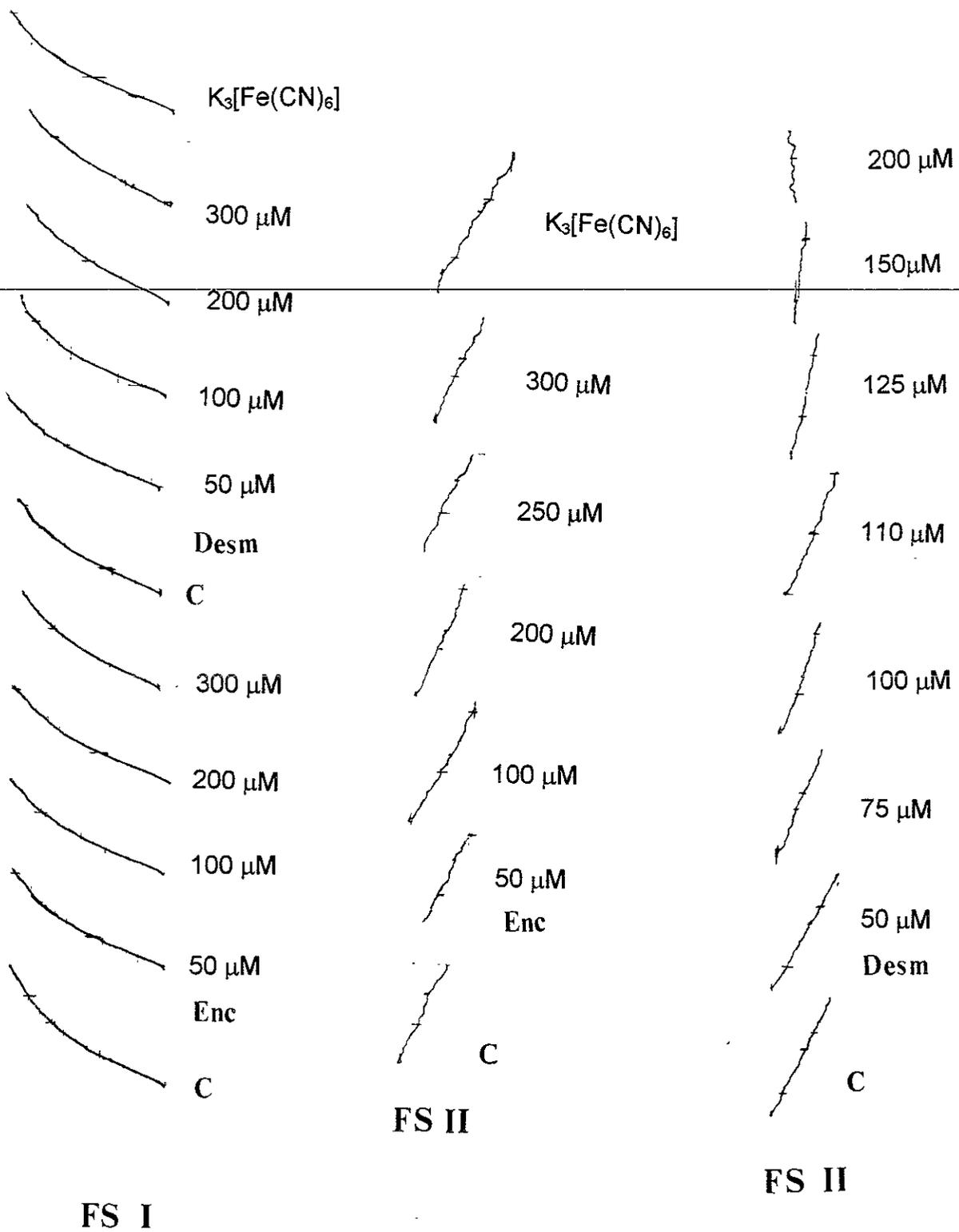


Figura 21. Efecto de la encalinalina (4) y la desmetilencalinalina (13) sobre el transporte de electrones en los fotosistemas I y II.

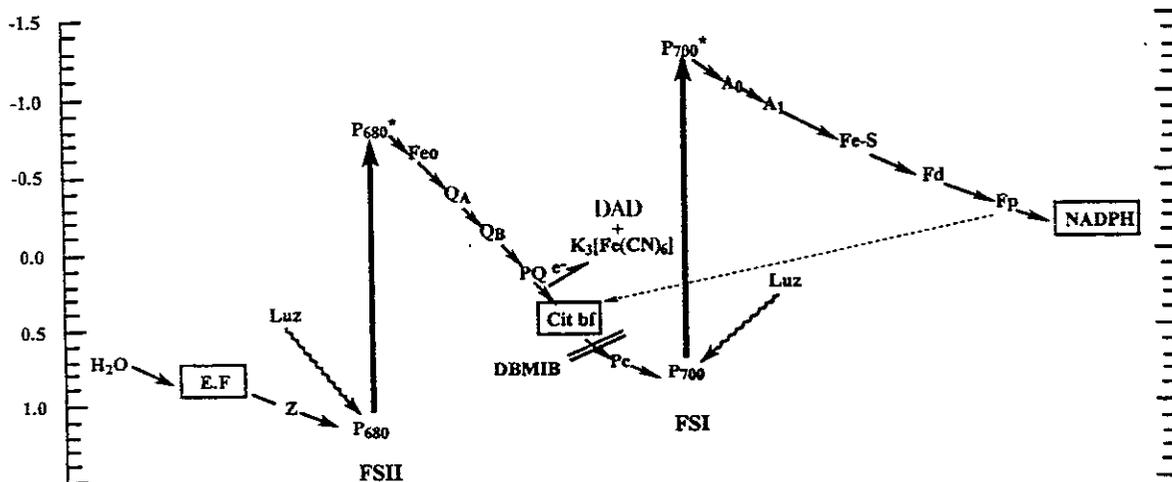
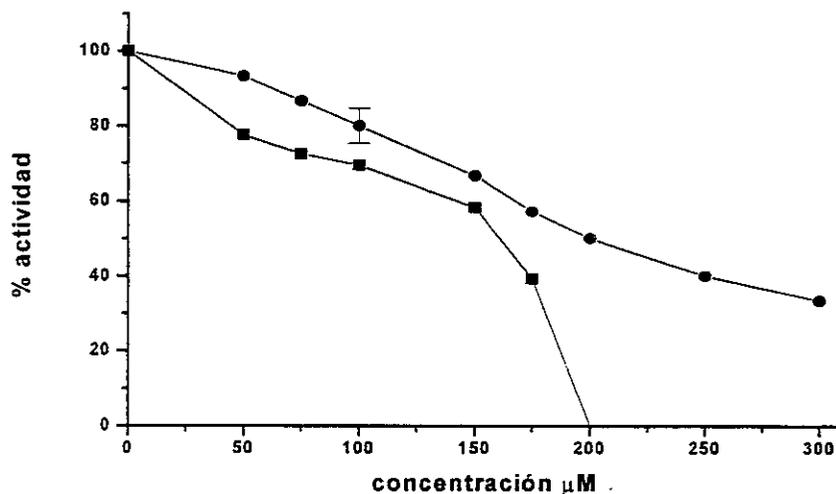


Figura 22. Determinación del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de H_2O a $DAD/K_3[Fe(CN)_6]$



Gráfica 16. Efecto de la enecalina (14) y la desmetilencecalina (4) sobre el transporte de electrones en el fotosistema II. Las velocidades de los controles son: $4770 \mu\text{equiv de } e^- \text{ h}^{-1} \text{ mg de clor}^{-1}$ para la enecalina (●) y la desmetilencecalina (■). \perp , desviación estándar máxima.

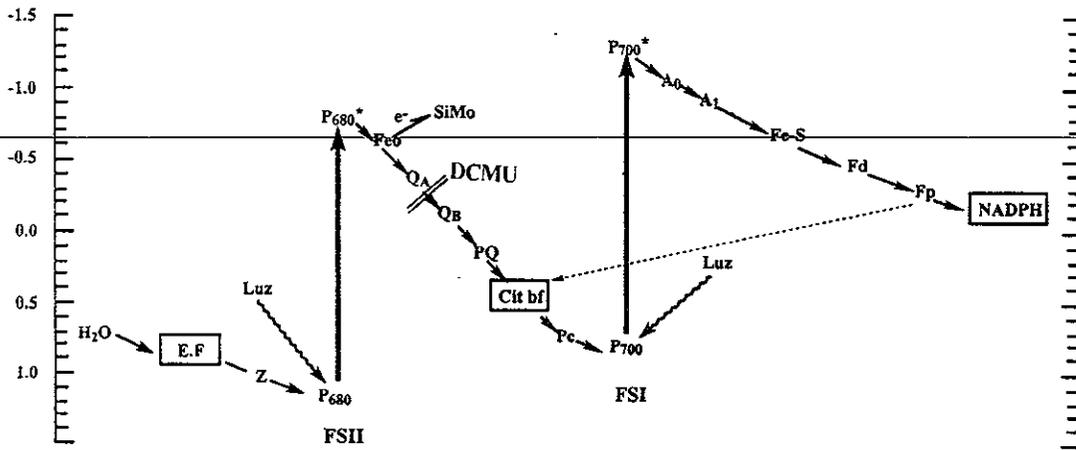


Figura 23. Determinación del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de H₂O a SiMo (FeO).

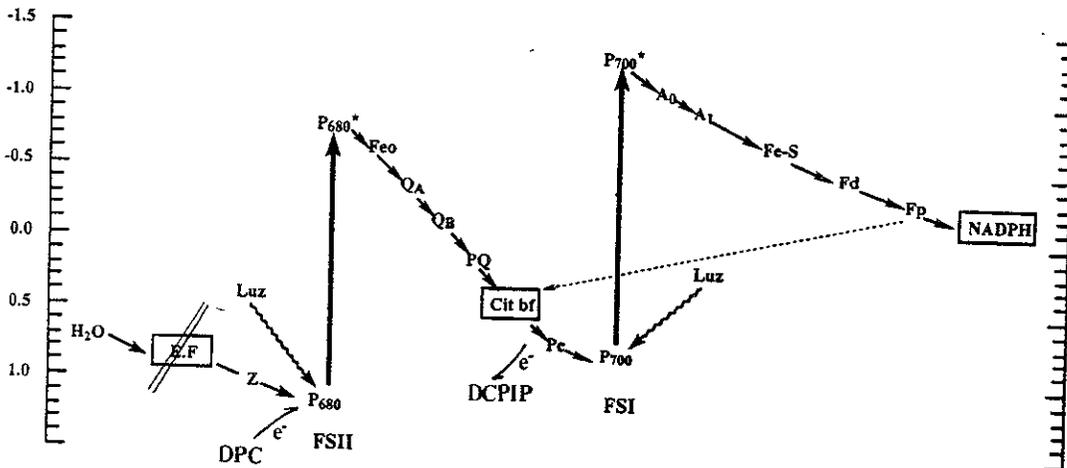


Figura 24. Determinación del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de DPC (H₂O) a DCPIP (cit b₆/f).

con ascorbato actúo como un aceptor final de electrones, equivalente al aceptor natural citb_e/f (Figura 23).

En el Cuadro 25 se resumen los resultados obtenidos para las reacciones parciales del FS II, los cuales se expresan en términos de la concentración que inhibió el 50% de la reacción (I_{50}). Tanto la encecalina como la desmetilencecalina, inhiben el flujo de electrones de las tres reacciones parciales del fotosistema II ensayadas; para el caso de la desmetilencecalina (4), se obtiene un 100% de inhibición a una concentración de 200 μM en el flujo de electrones de H_2O a SiMo, en tanto que para la encecalina (13) se obtiene el mayor porcentaje de inhibición (75%) a una concentración de 300 μM en la reacción parcial de DPC a DCPIP.

Los resultados obtenidos sobre el flujo de electrones en los fotosistemas I y II, permiten establecer que la encecalina y la desmetilencecalina inhiben significativamente las reacciones parciales del fotosistema II, por lo que su blanco de acción se estableció entre P_{680} y Q_A .

Otros compuestos de origen sintético tales como el CCCP (Izawa, 1977) y el dinoseb (Renger, 1979; Giardi *et al.*, 1988), y algunos productos naturales como el cacalol (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991), la zaluzanina C (Lotina-Hennsen *et al.*, 1992) y la isoalloalantolactona (Calera *et al.*, 1995a) inhiben la cadena fotosintética al mismo nivel que los compuestos 4 y 13.

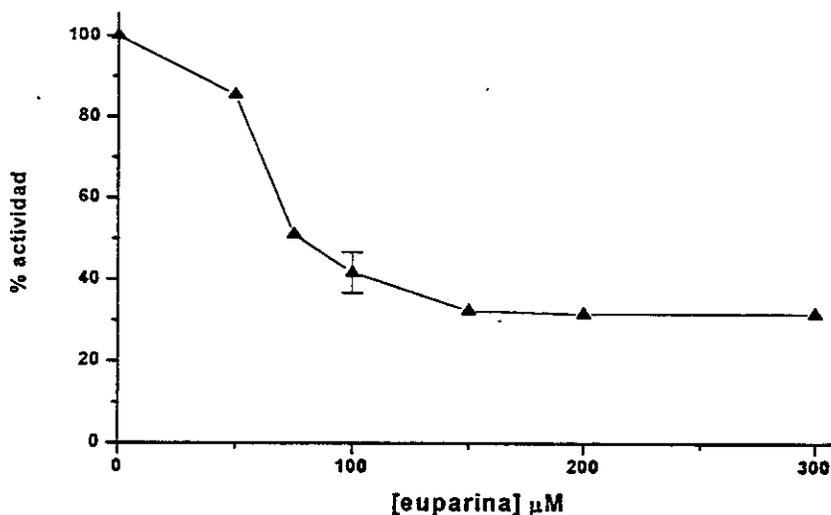
4.6.4 Efecto de la euparina sobre la actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa

- Como se mencionó previamente, la euparina (45) inhibe significativamente la síntesis de ATP, la captación de H^+ y los transportes de electrones basal y fosforilante (Gráficas 10-14). Sin embargo, no muestra efecto alguno sobre la velocidad del transporte de electrones desacoplado y por lo tanto, a diferencia de la encecalina y la desmetilencecalina, la euparina no se comporta como un inhibidor de la reacción de Hill.

En consecuencia, considerando que la principal característica de un inhibidor de la transferencia de energía es la disminución en la velocidad del transporte de electrones en condiciones fosforilantes, se planteó la hipótesis de que la euparina actúa como un inhibidor de la transferencia de energía

Los inhibidores de la transferencia de energía afectan algún paso final de la síntesis de ATP a nivel de la H^+ -ATPasa, enzima responsable de la síntesis de ATP. Por tal motivo, se procedió a determinar el efecto de la euparina sobre la actividad enzimática de la enzima ATPasa dependiente de Mg^{2+} . En la Gráfica 17 se muestran los resultados obtenidos de esta evaluación. Como se puede apreciar, el compuesto afecta significativamente la actividad de la enzima ATPasa, induciendo una inhibición del 50% a una concentración de 105 μM . Este resultado permite confirmar la propuesta de que la euparina actúa como un inhibidor de la transferencia de energía, aunque con un mecanismo de acción único y diferente a los descritos previamente para algunos productos naturales como la florizina (Izawa *et al.*, 1966), el kaempferol (Artzen *et al.*, 1974), la 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (Calera *et al.*, 1995b), el piquerol (Mendoza *et al.*, 1994) y la ajmalina (Vallejos y Andero, 1974) ya que

todos estos compuestos no presentan efecto alguno sobre el transporte de electrones basal. La euparina sin embargo, muestra un efecto inhibitor del 30% sobre la velocidad de este flujo de electrones.



Gráfica 17. Efecto de la euparina (45) sobre la actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa. La concentración de prueba de la euparina es de $250 \mu\text{M}$. La velocidad del control es de: $341 \mu\text{moles de Pi h}^{-1} \text{ mg de clor}^{-1}$. I , desviación estándar máxima.

4.6.5 Efecto de los compuestos 4, 13 y 45 en la velocidad del transporte de electrones desacoplado y basal a diferentes pHs.

Con la finalidad de determinar si el benzofurano y los benzopiranos evaluados sufren reacciones ácido-base durante la determinación de la velocidad del transporte de electrones basal y desacoplado, respectivamente, se determinó su efecto sobre los mismos a diferentes pHs.

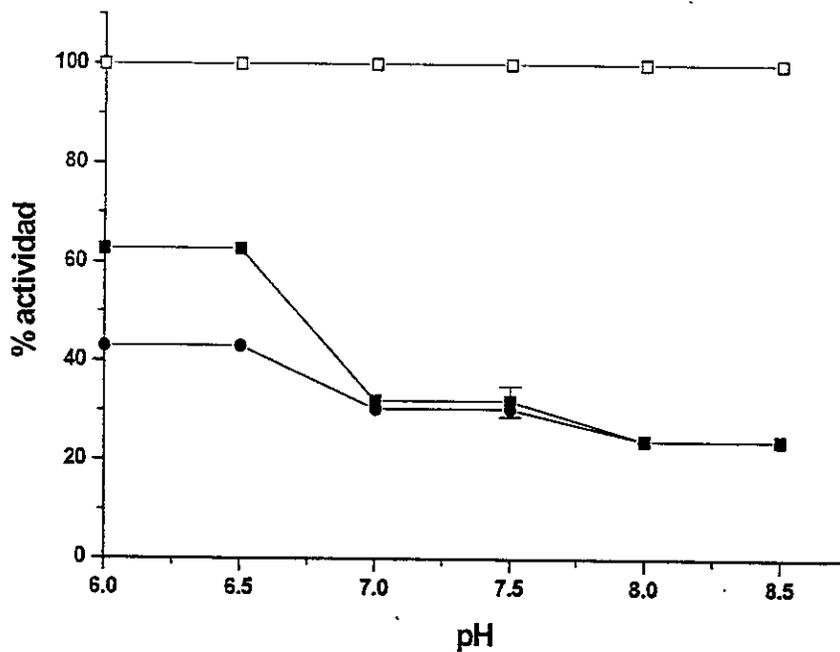
- La Gráfica 18, muestra la dependencia del pH del compuesto 45 sobre el transporte de electrones basal. Como se puede observar, el máximo efecto inhibidor se obtiene a pH neutro.

Para el caso de los benzopiranos, el efecto inhibidor sobre el transporte de electrones desacoplado es notablemente incrementado a pHs alcalinos (pH 8.0-8.5) (Gráfica 19).

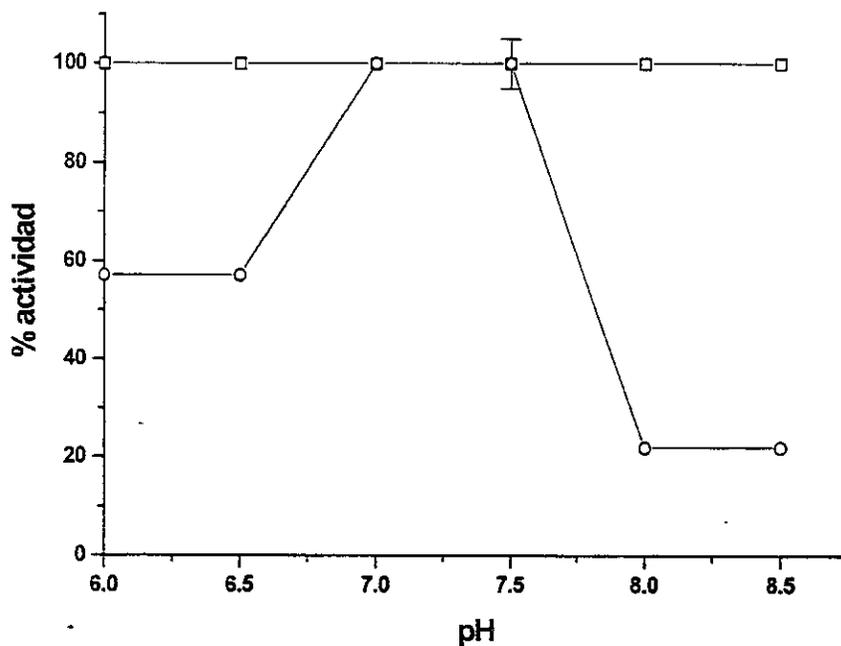
Con estos resultados se sugiere, que en estas condiciones de pH el sitio de interacción sufre cambios conformacionales de tal forma que, el sitio de inhibición está más expuesto para unirse. Es importante señalar, que en términos de reactividad química (p. ej. formación de especies iónicas más activas) es difícil proporcionar una posible explicación para el comportamiento de inhibición de los compuestos 4, 13 y 45 a diferentes pHs.

Estos resultados preliminares para la enecalina y la desmetilencecalina, permiten especular sobre el posible establecimiento de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con el sitio de unión en la subunidad de la plastoquinona Q_A. Este modelo se vería entonces favorecido en condiciones de pH alcalino y de esta manera el sitio de inhibición estaría más expuesto a estos benzopiranos. En la Figura 25, se esquematiza la posible interacción de estos compuestos con la enzima blanco a nivel de la cadena fotosintética.

Cabe destacar que un mecanismo de acción similar se ha propuesto para el herbicida comercial atrazina (Trebst, 1987) el cual, interactúa al mismo nivel que los benzopiranos de *H. quinquenervis* en la cadena transportadora de electrones.



Gráfica 18. Efecto de la enecalina (13) y la desmetilencecalina (4) sobre el transporte de electrones desacoplado a diferentes pHs.



Gráfica 19. Efecto de la euparina (45) sobre el transporte de electrones basal a diferentes pHs.

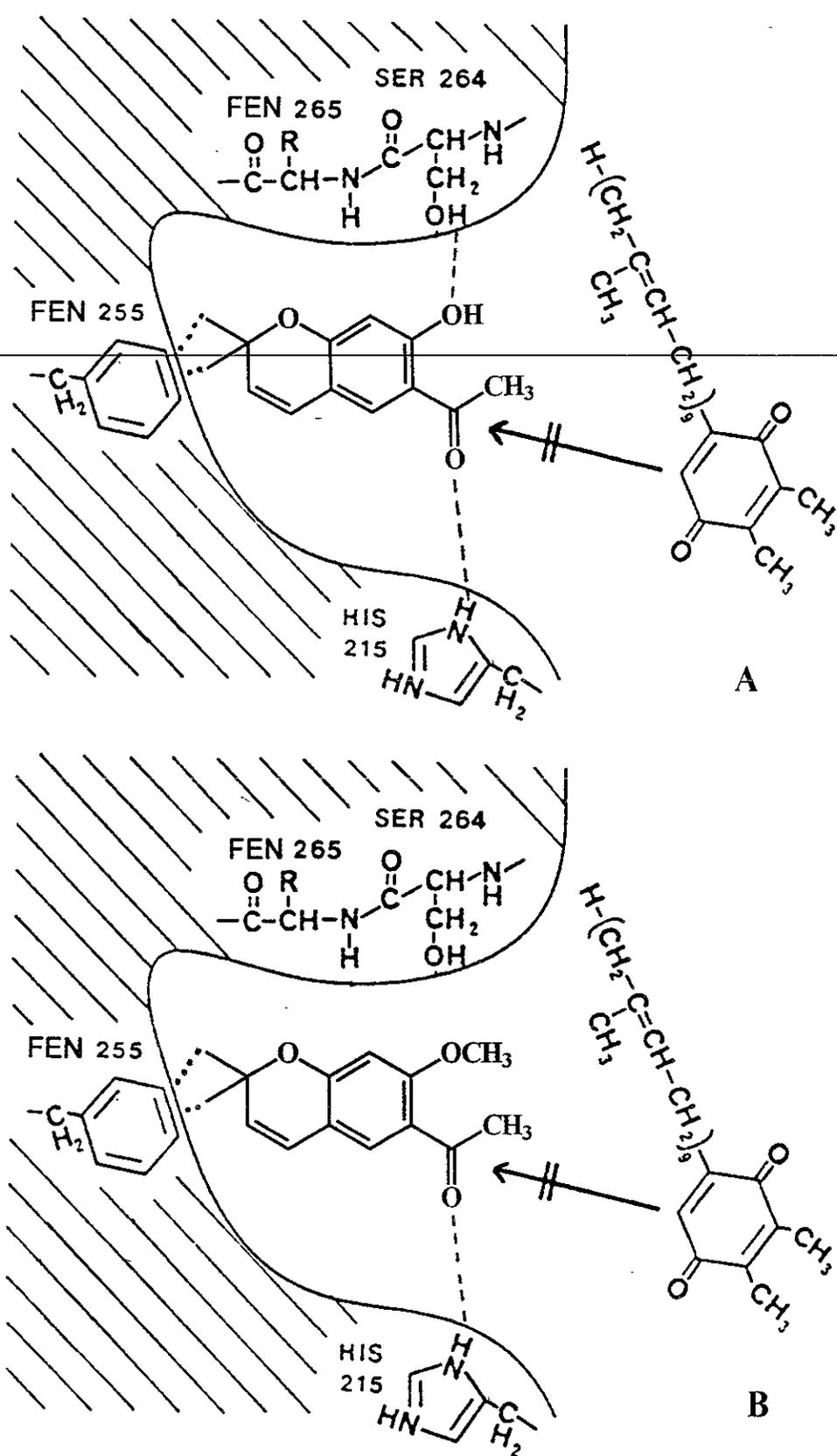


Figura 25. Representación esquemática del mecanismo hipotético de la desmetilencecalina (A) y la encecalina (B) sobre el transporte de electrones en el fotosistema II.

4.7 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS CONSTITUYENTES MAYORITARIOS DE *H. quinquenervis* SOBRE LA RESPIRACIÓN EN EL PROCESO DE GERMINACIÓN DE CUATRO DIFERENTES ESPECIES DE SEMILLAS

El proceso de germinación, inicia con la toma de agua de las semillas (imbibición) y concluye con el origen de la elongación de los ejes embrionarios. Es decir, cuando las semillas secas imbiben agua se promueven una serie de eventos los cuales, tienen como resultado final la emergencia de la radícula. Este último evento indica que se ha completado la germinación (Bewley y Black, 1994).

La germinación es un evento que requiere de energía y depende entonces de la respiración de la semilla, de tal forma que las únicas sustancias que se consumen durante este proceso son H_2O y O_2 .

De manera general, la germinación comprende tres fases (Mayer y Poljakoff, 1989; Bewley y Black, 1994). La fase I ó imbibición, es el paso inicial y esencial para que se lleve a cabo la germinación. Durante la fase II (llamada también fase lag), se llevan a cabo los principales eventos metabólicos previos a la emergencia de la radícula: respiración, síntesis de proteínas, DNA y RNA, y división celular. Finalmente, durante la fase III se inicia la elongación de la radícula. La duración de cada una de estas fases, depende de las propiedades distintivas de las semillas, por ejemplo permeabilidad, tamaño de la semilla y captura de oxígeno, además de las condiciones dominantes durante la fase de imbibición (temperatura y contenido de humedad).

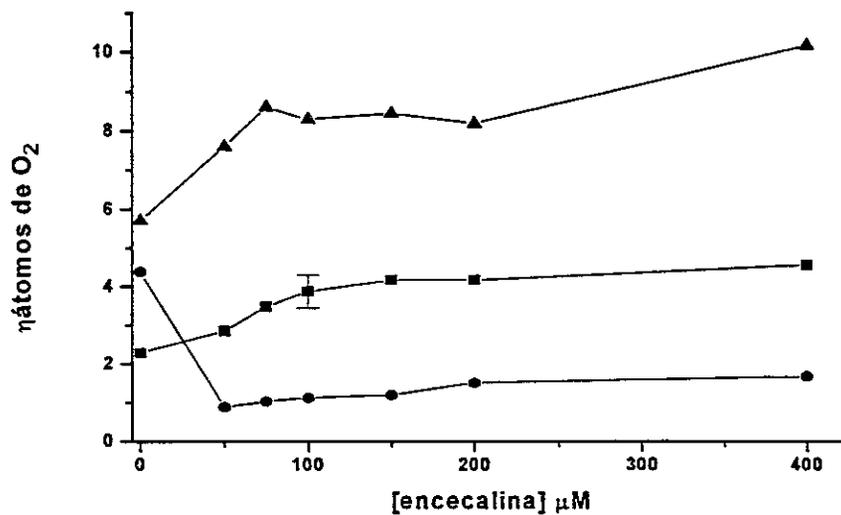
- Dado el efecto demostrado por la desmetilencecalina sobre el proceso de germinación y con la finalidad de explorar un segundo blanco de acción a nivel pre-emergente de este producto natural como un agente herbicida potencial, se procedió a determinar su efecto sobre la respiración de semillas durante el proceso de germinación empleando como especies de prueba, semillas de *E. crusgalli*, *A. hypochondriacus*, *Z. Mays*, *P. sativum* y *P. ixocarpa*.

Así mismo, se determinó el efecto de la euparina y la desmetilencecalina con el objeto de determinar si este es el blanco de acción de ambos productos naturales.

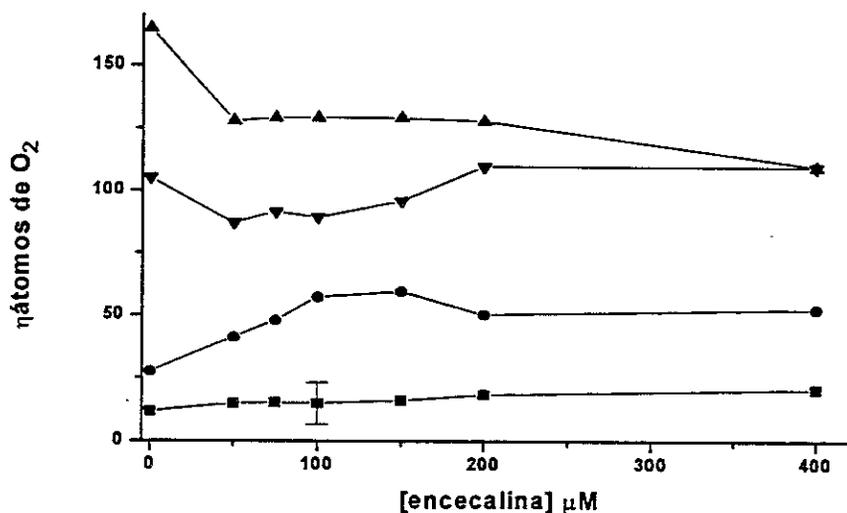
De manera general, el efecto en la respiración demostrado por estos compuestos es dependiente de la concentración, tiempo de imbibición y de las semillas empleadas. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

4.7.1 Efecto de la encecalina

Este compuesto, demuestra un comportamiento similar para las dos especies de malezas empleadas. Para el caso de *A. hypochondriacus*, en la tercera hora de imbibición se observa un incremento moderado en el consumo de O₂, en tanto que transcurridas 12 y 24 horas, disminuye notablemente la respiración comparada con el control; a las 12 hr se obtiene una activación del 250% (Gráfica 20). Con respecto a la respiración de las semillas de *E. crusgalli*, a las 12 horas se observa una activación del consumo de oxígeno en un 212 % a 150 µM (Gráfica 21).

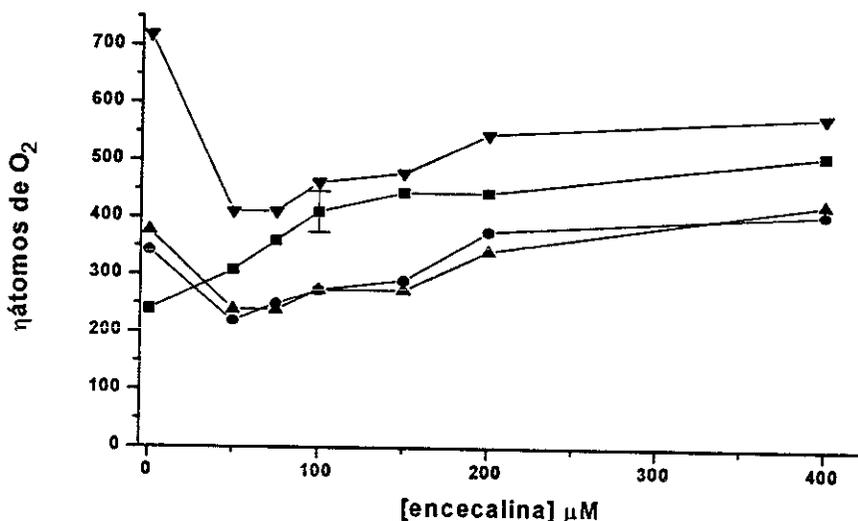


Gráfica 20. Efecto de la encecalina (13) sobre el consumo de O_2 de semillas de *A. hypochondriacus* a las 3 (■), 12 (●) y 24 (▲) hr. Desviación estándar máxima.



Gráfica 21. Efecto de la encecalina (13) sobre el consumo de O_2 de semillas de *E. crusgalli* a las 3 (■), 12 (●), 24 (▲) y 48 (▼) hr. I, Desviación estándar máxima.

Para el caso de los embriones de maíz, la enecalina revela un efecto desacoplante en la tercera hora, ya que activa de manera significativa el consumo de oxígeno hasta un 218 % a una concentración de 400 μM (Gráfica 22). A las 12 y 24 horas, demuestra un efecto moderado de inhibición a bajas concentraciones; sin embargo, conforme ésta se incrementa se observa un efecto de activación.

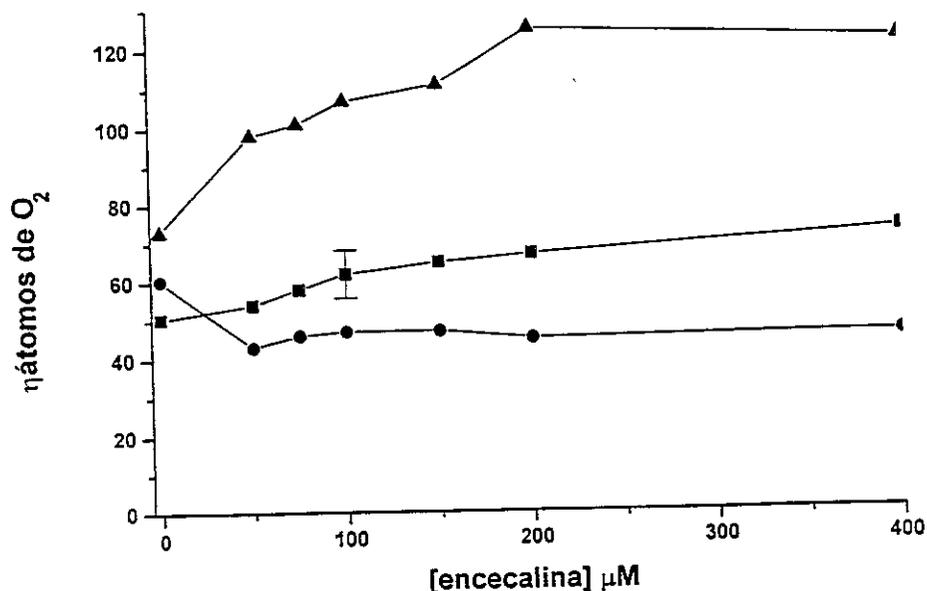


Gráfica 22. Efecto de la enecalina (13) sobre el consumo de O_2 de semillas de *Z. mays* a las 3 (■), 12 (●) y 24 (▲) hr. Desviación estándar máxima.

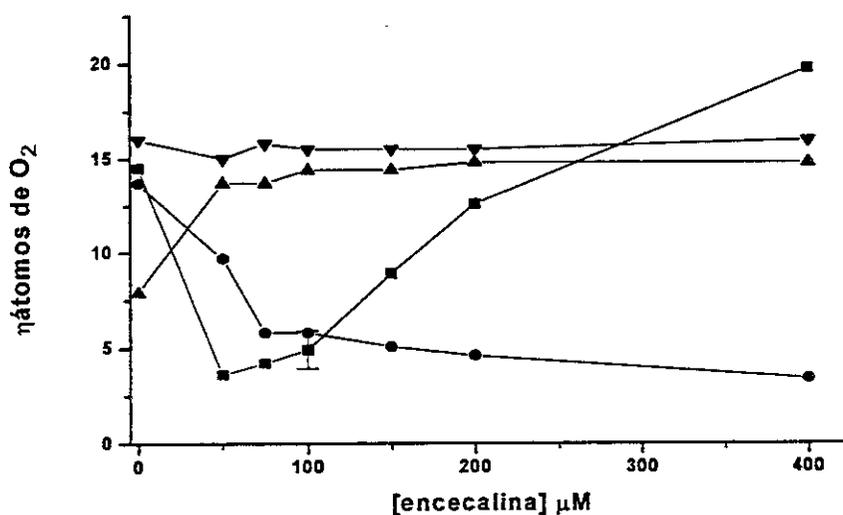
El efecto de la enecalina sobre las semillas de chícharo fue similar al observado para *A. hypochondriacus*; a las 48 hr de imbibición, revela un efecto desacoplante significativo a la mayor concentración de prueba (Gráfica 23, 90% de activación).

Como se puede apreciar en la Gráfica 24, la respiración de las semillas de tomate se observa un efecto desacoplante significativo durante la tercera hora de imbibición. Por el contrario, a las 12 horas se obtiene un efecto notable de

inhibición (60%) desde una concentración de 75 μM . A las 24 hr se observa de nueva cuenta un efecto desacoplante dependiente de la concentración.



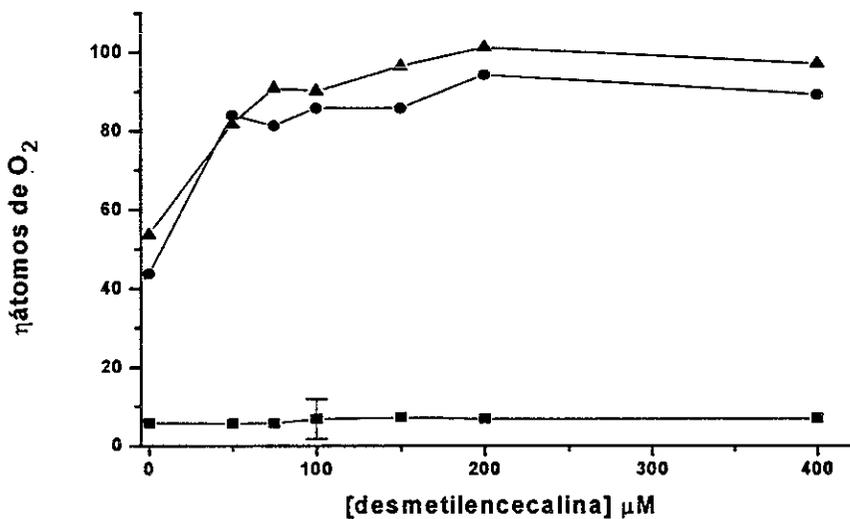
Gráfica 23. Efecto de la enecalina (13) sobre el consumo de O_2 de semillas de *P. sativum* a las 12 (■), 24 (●) y 48 (▲) hr. \perp , desviación estándar máxima.



Gráfica 24. Efecto de la enecalina (13) sobre el consumo de O_2 de semillas de *P. ixocarpa* a las 3 (■), 12 (●), 24 (▲) y 48 (▼) hr. \perp , Desviación estándar máxima.

4.7.2 Efecto de la desmetilencecalina

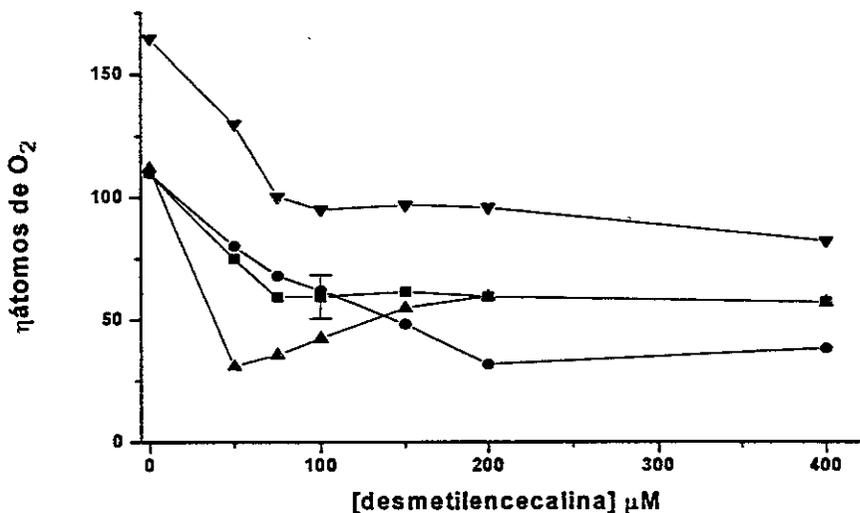
En las Gráficas 25-29 se muestran los resultados de la desmetilencecalina para las cuatro semillas de prueba. Durante la tercera hora de germinación, la desmetilencecalina no presenta un efecto de inhibición para la especie *A. hypochondriacus* a las concentraciones de prueba. En tanto, a las 12 y 24 hr se observa un efecto de activación (212%) a una concentración de 200 μM en el consumo de oxígeno.



Gráfica 25. Efecto de la desmetilencecalina (4) sobre el consumo de O₂ de semillas de *A. hypochondriacus* a las 3 (■), 12 (●) y 24 (▲) hr. I, Desviación estándar máxima.

Para las semillas de *E. crusgalli*, este compuesto inhibe moderadamente el consumo de oxígeno; a las 12 hr, se obtiene un efecto inhibitorio significativo

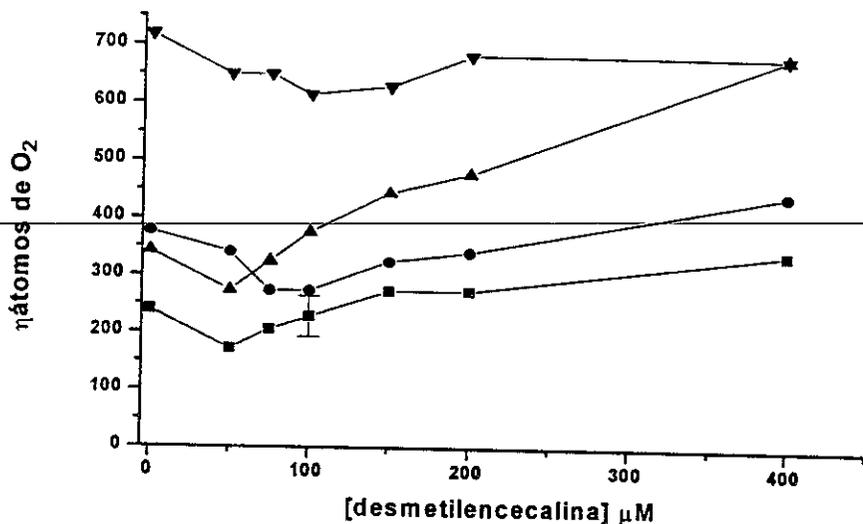
desde una concentración de 50 μM . A las 48 hr de germinación, el benzopirano induce un efecto desacoplante de una manera dependiente de la concentración.



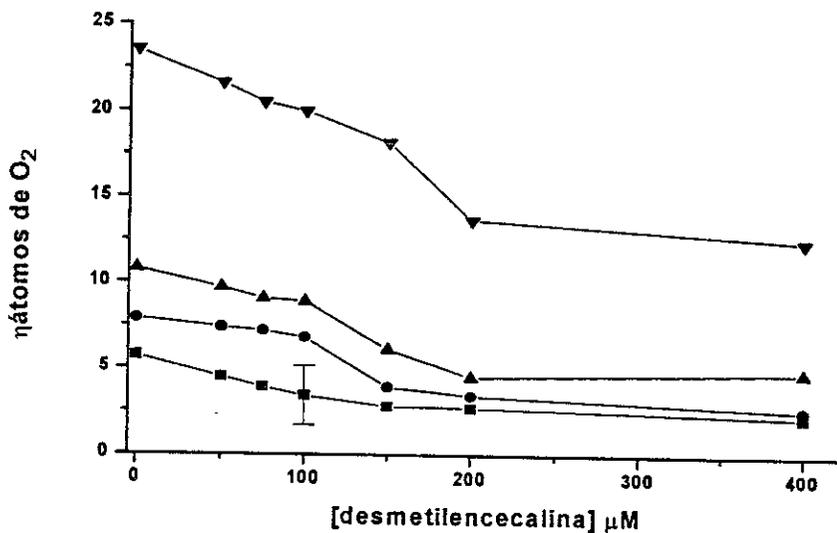
Gráfica 26. Efecto de la desmetilencecalina (4) sobre el consumo de O_2 de semillas de *E. crusgalli* a las 3 (■), 12 (●), 24 (▲) y 48 (▼) hr. \perp , Desviación standard máxima.

Para el caso de los embriones de maíz, este compuesto demuestra un efecto desacoplante significativo dependiente de la concentración durante el tiempo de experimentación.

Para las semillas de tomate, a las 12 hr se observa un ligero incremento en la actividad en el intervalo de concentraciones de 50 a 100 μM , mientras que a mayores concentraciones se revierte el efecto. A las 48 hr, este pirano presenta un efecto desacoplante significativo para esta misma especie.

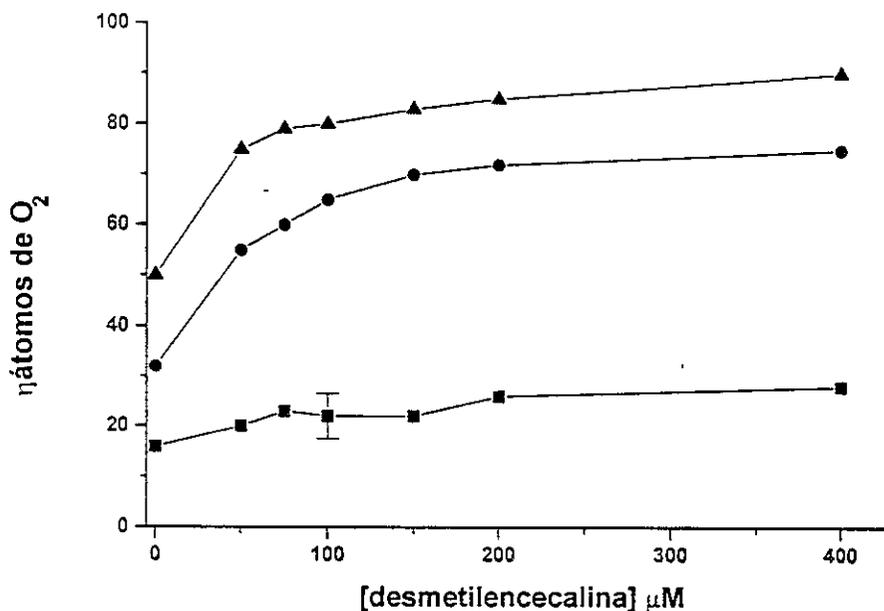


Gráfica 27. Efecto de la desmetilencecalina (4) sobre el consumo de O₂ de semillas de *Z. mays* a las 3 (■), 12 (●) y 24 (▲) hr. I, Desviación estándar máxima.



Gráfica 28. Efecto de la desmetilencecalina (4) sobre el consumo de O₂ de semillas de *P. ixocarpa* a las 3 (■), 12 (●), 24 (▲) y 48 (▼) hr. I, Desviación estándar máxima.

Por último, como se puede apreciar en la Gráfica 29 este benzopirano no mostró efecto alguno a las 12 hr de imbibición para la especie *P. sativum*; sin embargo, a las 24 y 48 hr reveló un efecto de activación considerable sobre el consumo de O_2 de una manera dependiente de la concentración (70 y 100%, respectivamente).



Gráfica 29. Efecto de la desmetilencecalina (4) sobre el consumo de O_2 de semillas de *P. sativum* a las 12 (■), 24 (●) y 48 (▲) hr. \perp , desviación estandar máxima.

4.7.3 Efecto de la euparina

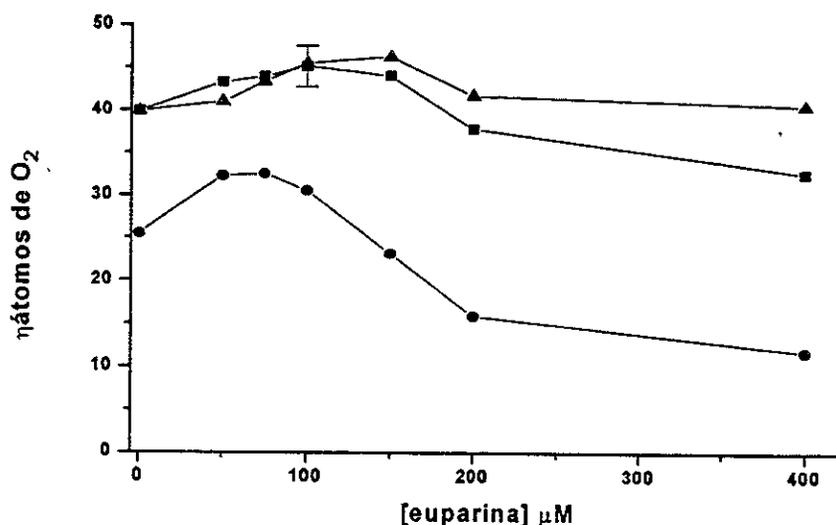
Los resultados obtenidos para la euparina se muestran en las Gráficas 30-34. Durante las primeras horas, el benzofurano induce un incremento en el consumo de oxígeno (110%) en un rango de concentraciones de 50-75 μM ; por el contrario, a partir de 150 μM se obtiene un efecto moderado de inhibición (20%).

A la máxima concentración evaluada, se observa nuevamente una inhibición del 50%. A las 24 hr de germinación este compuesto demuestra también un ligero efecto de inhibición.

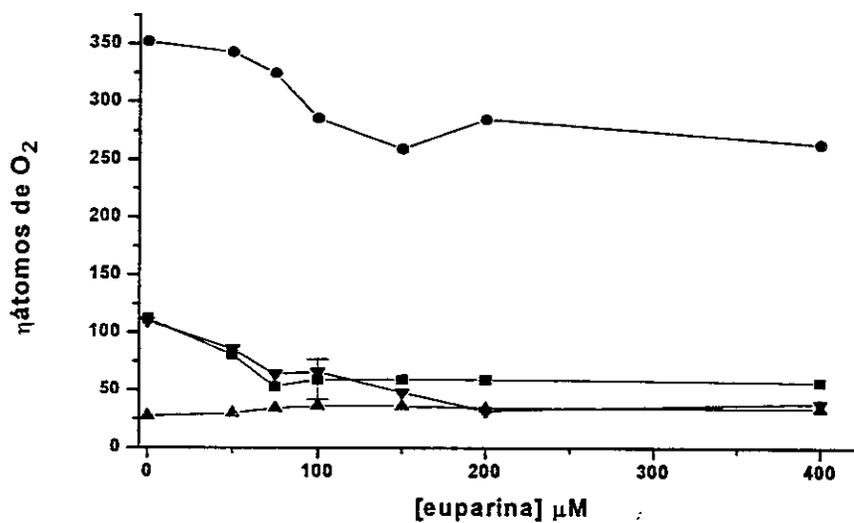
Para el caso de *E. crusgalli*, a las 24 hr la euparina presenta un efecto de inhibición de la respiración.

Con respecto a las semillas de tomate, la euparina no induce efecto alguno en la primera hora de germinación. Sin embargo, a las 12 hr de imbibición, inhibe el consumo de oxígeno hasta en un 60%. Por último, a las 48 hr provoca un efecto de activación de hasta un 200% a una concentración de 400 μM .

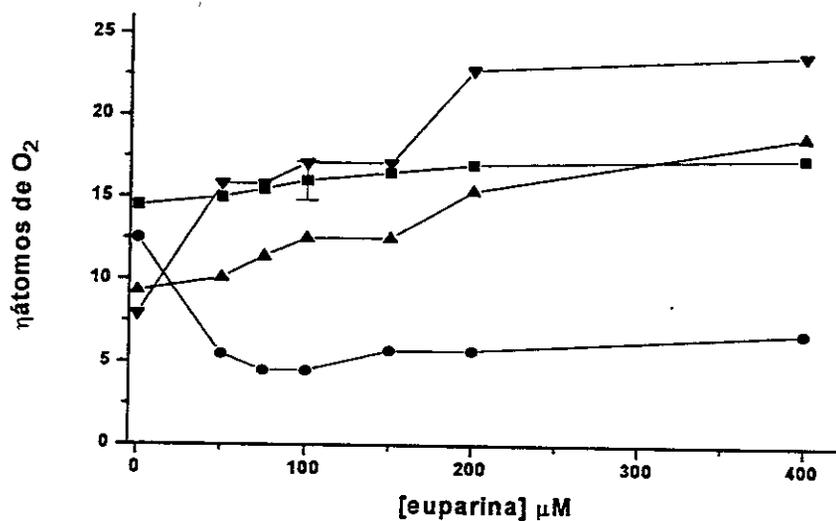
Finalmente, este compuesto provoca una activación de la respiración de las semillas de maíz y de chícharo de una manera dependiente de la concentración (Gráficas 33 y 34).



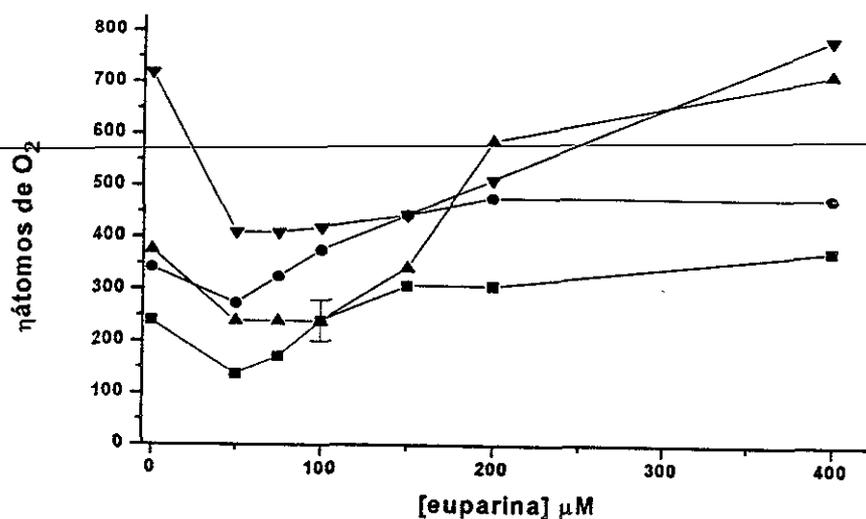
Gráfica 30. Efecto de la euparina (45) sobre el consumo de O_2 de semillas de *A. hypochondriacus* a las 3 (■), 12 (●) y 24 (▲) hr. I, Desviación estándar máxima.



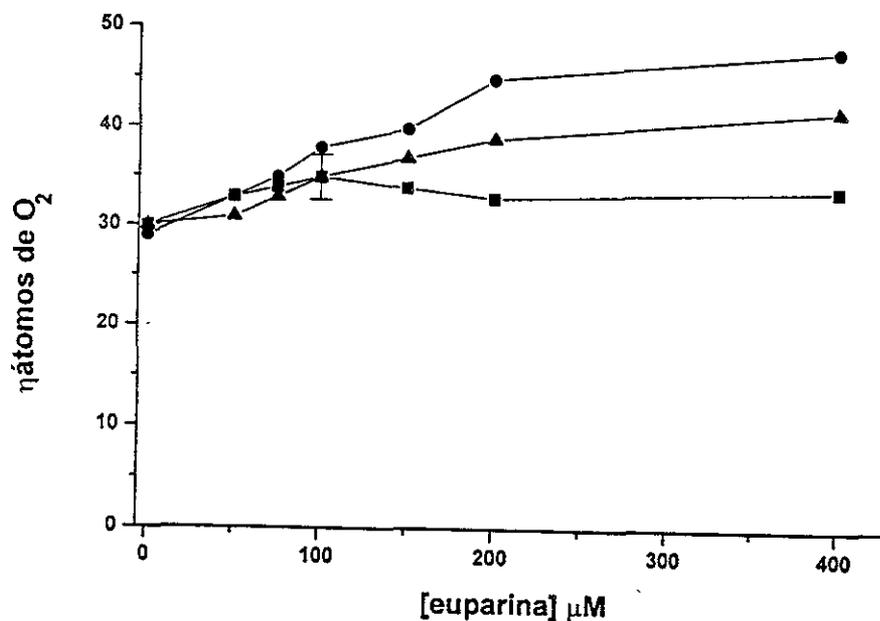
Gráfica 31. Efecto de la euparina (45) sobre el consumo de O_2 de semillas de *E. crusgalli* a las 3 (■), 12 (●), 24 (▲) y 48 (▼) hr. I, Desviación estándar máxima.



Gráfica 32. Efecto de la euparina (45) sobre el consumo de O_2 de semillas de *P. ixocarpa* a las 3 (■), 12 (●), 24 (▲) y 48 (▼) hr. I, Desviación estándar máxima.



Gráfica 33. Efecto de la euparina (45) sobre el consumo de O_2 de semillas de *Z. mays* a las 3 (■), 12 (●) y 24 (▲) hr. \perp , Desviación estándar máxima.



Gráfica 34. Efecto de la euparina (45) sobre el consumo de O_2 de semillas de *P. sativum* a las 12 (■), 24 (●) y 48 (▲) hr. \perp , desviación estándar máxima.

La comparación de los resultados obtenidos en el presente estudio con los descritos previamente en la literatura para diversas fitotoxinas (cumarinas y quinonas), permiten establecer ciertas similitudes. Por ejemplo, la encecalina y la desmetilencecalina activaron la respiración debido probablemente a un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, lo que implica una inhibición en el suministro de ATP y en consecuencia, un efecto de inhibición a nivel del crecimiento vegetal (Van Sumere *et al*, 1971). Por otra parte, los compuestos que inhibieron el consumo de O₂ se debió quizá a la inhibición de algún intermediario de la fosforilación oxidativa lo cual, provoca una disminución en el flujo de electrones (Van Sumere *et al*, 1971).

Independientemente del modo de acción, todos los compuestos evaluados afectan de manera significativa el consumo de oxígeno durante el proceso de germinación. Las concentraciones necesarias para la inhibición ó activación del consumo de oxígeno son similares a las requeridas para inhibir la síntesis de ATP en el proceso de la fotosíntesis en cloroplastos aislados de espinacas.

Con la finalidad de comprobar la actividad desacoplante demostrada por la encecalina en la respiración durante el proceso de germinación, se procedió a evaluar el efecto del producto natural sobre la síntesis de ATP durante el transporte de electrones mitocondrial utilizando para ello, mitocondrias aisladas de las radículas e hipocotilos de *P. vulgaris*.

Esta determinación se realizó en presencia de succinato de sodio [el cual actúa como un donador de electrones (sustrato, sitio I)], de ADP (sitio II), de fosfato inorgánico y de concentraciones crecientes de encecalina (50-400 µM).

Como un control positivo se utilizó el FCCP, el cual constituye un conocido agente desacoplante.

En la Figura 40 se muestran los registros obtenidos de esta determinación, en donde se aprecia claramente la estimulación de la respiración mitocondrial inducida por la encecalina en una manera dependiente de la concentración.

El incremento de la respiración mitocondrial y un valor de ADP:O menor que uno, permitieron confirmar que la encecalina actúa como un agente desacoplante de la fosforilación oxidativa (Einhellig, 1985).

Sin embargo, el sitio de acción específico mediante el cual este benzopirano ejerce un efecto desacoplante no puede establecerse con los resultados descritos en la presente investigación. No obstante, al igual que en los procesos de la fotosíntesis, esta actividad no puede estar asociada con su capacidad para cambiar de una forma neutra a una ionizada a nivel de la membrana mitocondrial (Terada, 1990).

Por último, cabe mencionar que la encecalina difiere de los desacoplantes reportados hasta el momento, ya que la mayoría de ellos se comportan como ionóforos ó bien son ácidos débiles con propiedades hidrofóbicas.

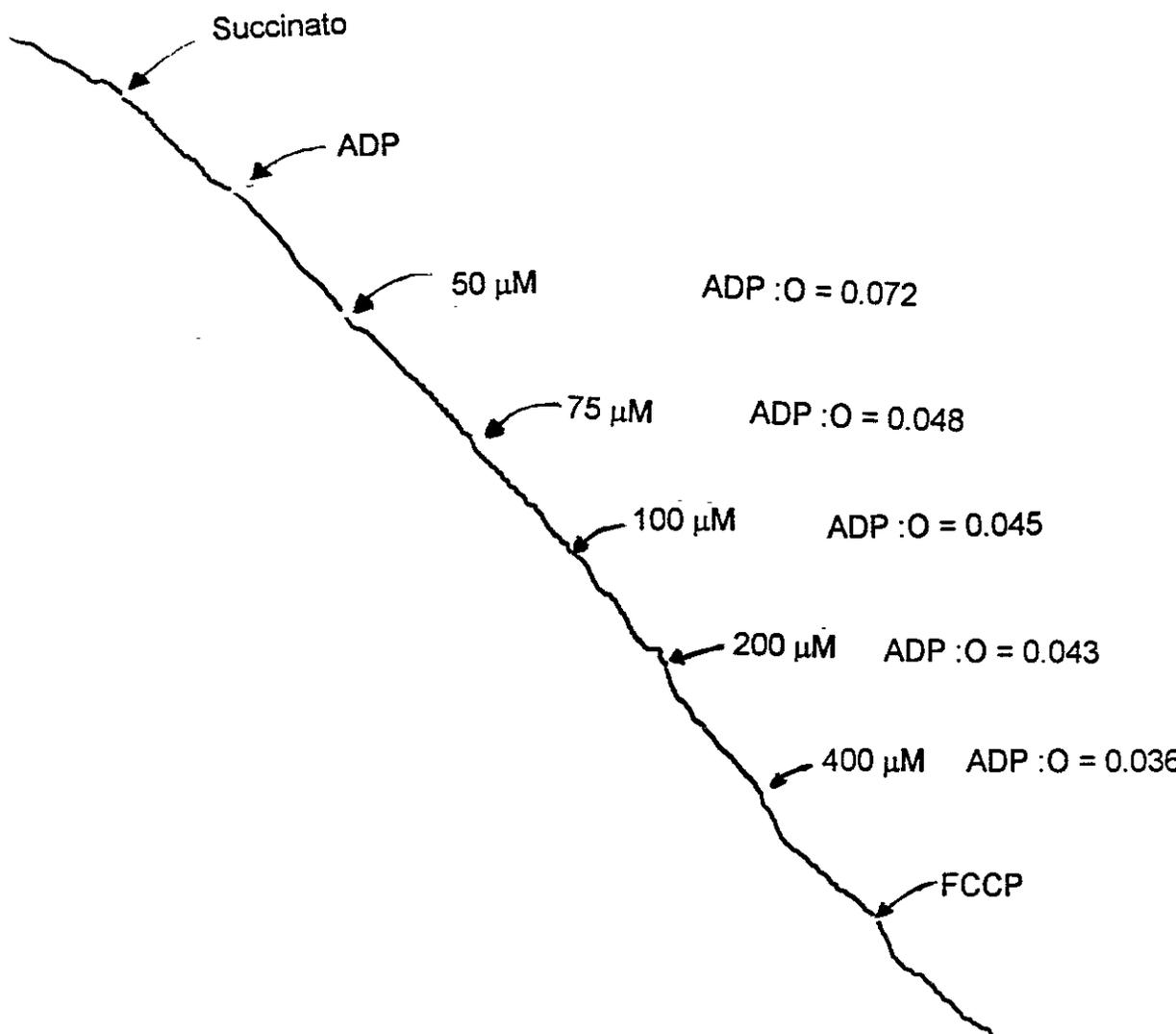


Figura 26. Efecto demostrado por la encefalina en la síntesis de ATP en la cadena respiratoria mitocondrial

4.8 EFECTO DE LA ENCECALINA LA EUPARINA, LA DESMETILENCECALINA Y LA 6-METOXITREMETONA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE TRES DIFERENTES ESPECIES DE MALEZAS

Con la finalidad de determinar si la encecalina, compuesto fitotóxico más potente aislado en el presente estudio, manifestaba un efecto post-emergente *in vivo* sobre la producción de biomasa de tres diferentes especies de malezas, *A. hypochondriacus*, *E. crusgalli* y *Trifolium alexandrinum* L., se realizó un experimento de invernadero. De manera adicional, se consideró pertinente determinar si la desmetilencecalina, la euparina y la 6-metoxitremetona presentaban un efecto herbicida post-emergente sobre las mismas especies de prueba.

Como ya se indicó en la sección experimental, este bioensayo consiste en aplicar directamente las muestras objeto de estudio a una concentración equivalente a la obtenida para la CI_{50} de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*, a las plántulas de las especies antes mencionadas. Los tratamientos realizados con las muestras y los controles positivo y negativo (Paraquat y agua, respectivamente) se verificaron diariamente.

Como se puede apreciar en las Figuras 24-38, al compararse el efecto inducido por la aplicación foliar de los compuestos y el extracto vegetal con los controles, destacan las plántulas tratadas con la encecalina y la euparina ya que presentan daños severos tales como desecación de las partes aéreas y necrosis. El efecto es más evidente para las especies *E. crusgalli* y *T. alexandrinum* en el caso de la encecalina. Para el caso de la euparina, *A. hypochondriacus* y *T.*

alexandrinum fueron las especies más afectadas. Sin embargo, es importante destacar que la encecalina reveló un efecto significativo desde el primer día de tratamiento.

Así mismo, ambos compuestos causaron también un efecto fitotóxico post-emergente sobre la producción de biomasa de las especies estudiadas. Como se desprende de los resultados mostrados en los Cuadros 26 y 27, la encecalina disminuyó moderadamente el peso fresco de *E. crusgalli* en un 33.4%, en tanto que para trébol y amaranto presenta únicamente un 11.5 y 9.8% de inhibición, respectivamente.

Cuadro 27. Resultados obtenidos de la evaluación de la producción de biomasa de la encecalina sobre tres especies de malezas.

Especie	Tratamiento*	peso (g)	
		fresco	seco
<i>E. crusgalli</i>	Encecalina	0.8823 ± 0.0208	0.1092 ± 0.0071
	MV	0.4808 ± 0.1088	0.0658 ± 0.0131
	H ₂ O	1.3255 ± 0.2881	0.2917 ± 0.0723
<i>T. alexandrinum</i>	Encecalina	0.4385 ± 0.0135	0.0691 ± 0.0016
	MV	0.2334 ± 0.0137	0.0258 ± 0.0053
	H ₂ O	0.4956 ± 0.0723	0.0703 ± 0.0140
<i>A. hypochondriacus</i>	Encecalina	0.0369 ± 0.0023	0.0075 ± 0.0006
	MV	0.0129 ± 0.0055	0.0032 ± 0.0003
	H ₂ O	0.0410 ± 0.0071	0.0084 ± 0.0017

* [Encecalina] = 4.3×10^{-5} M, [MV] = 10^{-2} M

En relación al peso seco, la encecalina revela un comportamiento similar al antes descrito; disminuye notablemente la producción de biomasa de la especie *E. crusgalli* (62.5%). La disminución de la biomasa de amaranto y trébol fue mucho menor (6.3 y 10.7 %, respectivamente).

Con respecto a la euparina, el efecto de inhibición sobre la producción de biomasa de las plántulas de *T. alexandrinum* fue también significativo (peso fresco y peso seco con un 74.2 y 68.8% de inhibición, respectivamente). Los porcentajes de inhibición de la biomasa inducidas por el paraquat, herbicida comercial empleado en este bioensayo como un control positivo, resultaron similares al de la euparina. Así mismo, este benzofurano inhibió el peso fresco de la especie *A. hypochondriacus* en un 72.8 %.

Cuadro 28. Resultados obtenidos de la evaluación de la producción de biomasa de la euparina, la desmetilencecalina y la 6-metoxitremetona sobre tres especies de malezas.

Especie	Tratamiento*	peso (g)	
		fresco	seco
<i>E. crusgalli</i>	Euparina	0.1191 ± 0.0459	0.0157 ± 0.0145
	Desmetil	0.0913 ± 0.0539	0.0130 ± 0.0043
	6-metox	0.1276 ± 0.0306	0.0204 ± 0.0065
	MV	0.0623 ± 0.0136	0.0106 ± 0.0027
	H ₂ O	0.1550 ± 0.0302	0.0284 ± 0.0061

<i>T. alexandrinum</i>	Euparina	0.0555 ± 0.0408	0.0052 ± 0.0044
	Desmetil	0.1418 ± 0.0314	0.0096 ± 0.0029
	6-metoxi	0.1026 ± 0.0322	0.0085 ± 0.0028
	MV	0.0638 ± 0.0293	0.0051 ± 0.0019
	H ₂ O	0.2157 ± 0.1791	0.0167 ± 0.0187
<i>A. hypochondriacus</i>	Euparina	0.0035 ± 0.0019	0.0011 ± 0.0004
	Desmetil	0.0079 ± 0.0021	0.0011 ± 0.0005
	6-metox	0.0042 ± 0.0041	0.0011 ± 0.0007
	MV	0.0009 ± 0.0008	0.0007 ± 0.0007
	H ₂ O	0.0129 ± 0.0037	0.0013 ± 0.0007

* [Euparina] = 1.3×10^{-3} M, * [Dsmetilencecalina] = 3.8×10^{-4} M, [6-metoxitremetona] = 3.1×10^{-3} M

Por otra parte, la 6-metoxitremetona presentó también un efecto considerable sobre la pérdida de biomasa de la especie *A. hypochondriacus*. La pérdida de biomasa inducida por este benzofurano fue de un 67.4 % .

Para el caso de la desmetilencecalina, este demostró únicamente un efecto apreciable para las plántulas de *E. crusgalli* (41.1 y 54.2 % de inhibición para el peso fresco y seco, respectivamente).

De los resultados antes presentados, se desprende que la alta especificidad y la significativa inhibición en la producción de biomasa demostrada por la encecalina a la concentración evaluada, la coloca entre los compuestos

fitotóxicos de origen vegetal, como un candidato para el posible desarrollo como un agente herbicida potencial.

En el caso de la euparina, se demostró que este compuesto constituye también un herbicida potencial post-emergente, ya que los resultados obtenidos en los bioensayos realizados a nivel de pre-emergencia fueron menores a los obtenidos en este bioensayo.

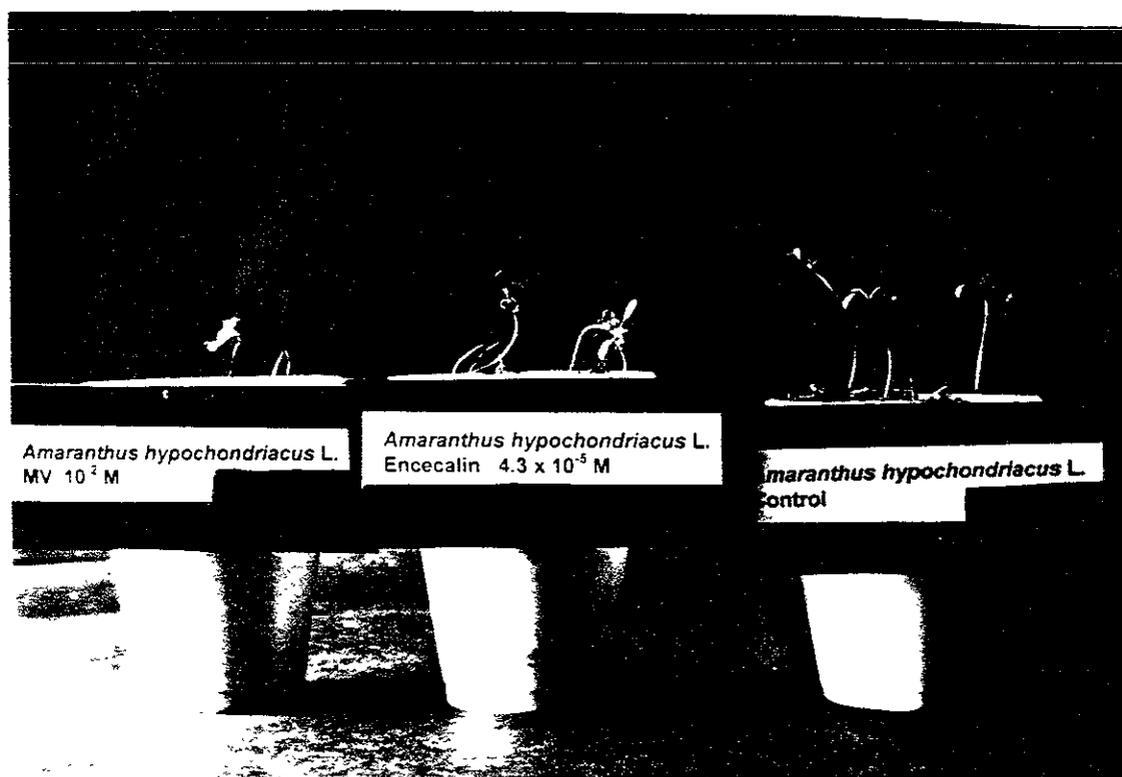


Figura 27. Efecto herbicida post-emergente de la encecalina sobre las plántulas de *A. hypochondriacus* (día 1).



Figura 28. Efecto herbicida post-emergente de la encecalina sobre las plántulas de *T. alexandrinum* (días 3, 8 y 10).

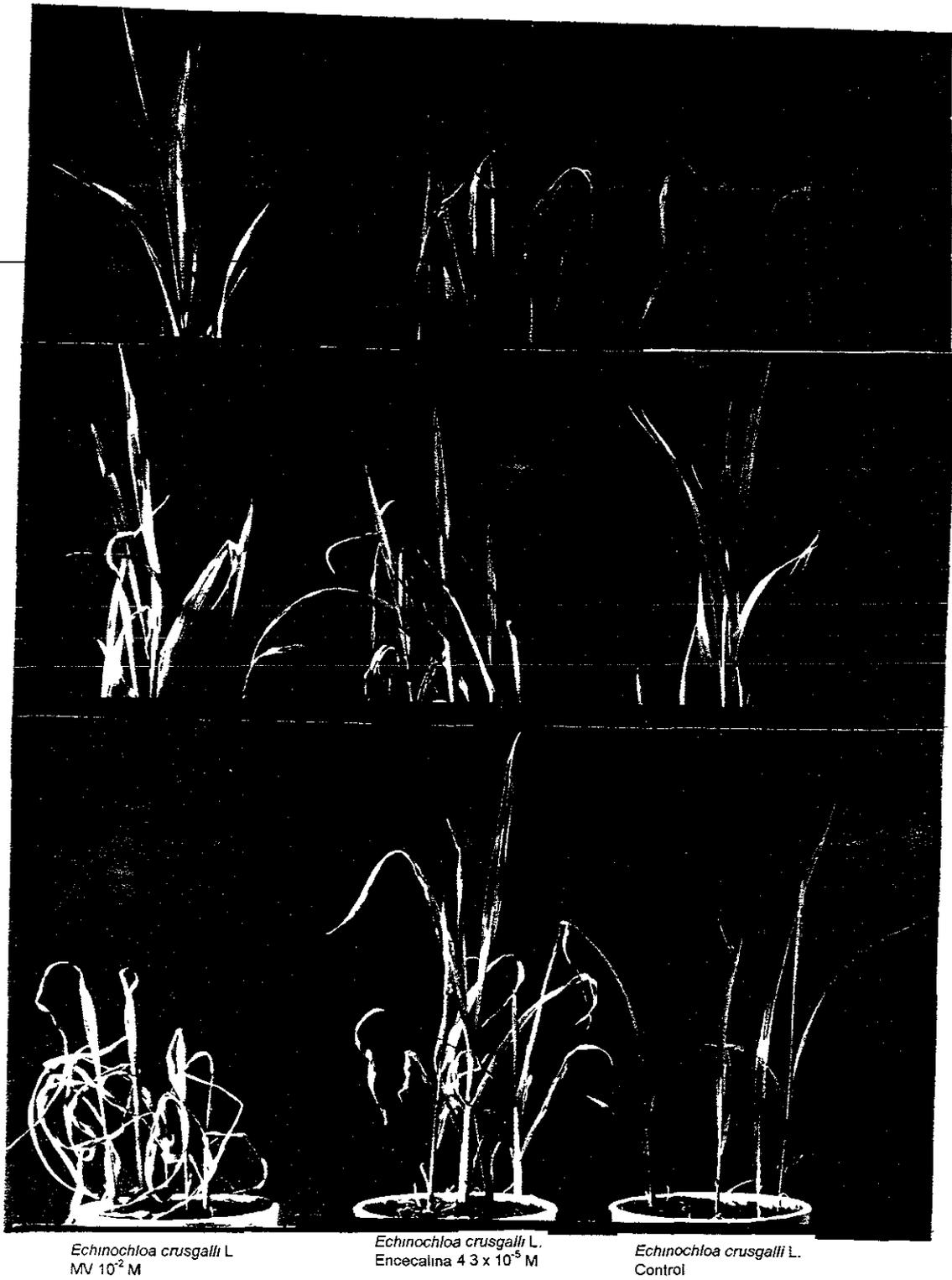


Figura 29. Efecto herbicida post-emergente de la encecalina sobre las plántulas de *E. crusgalli* (días 1, 4 y 10).

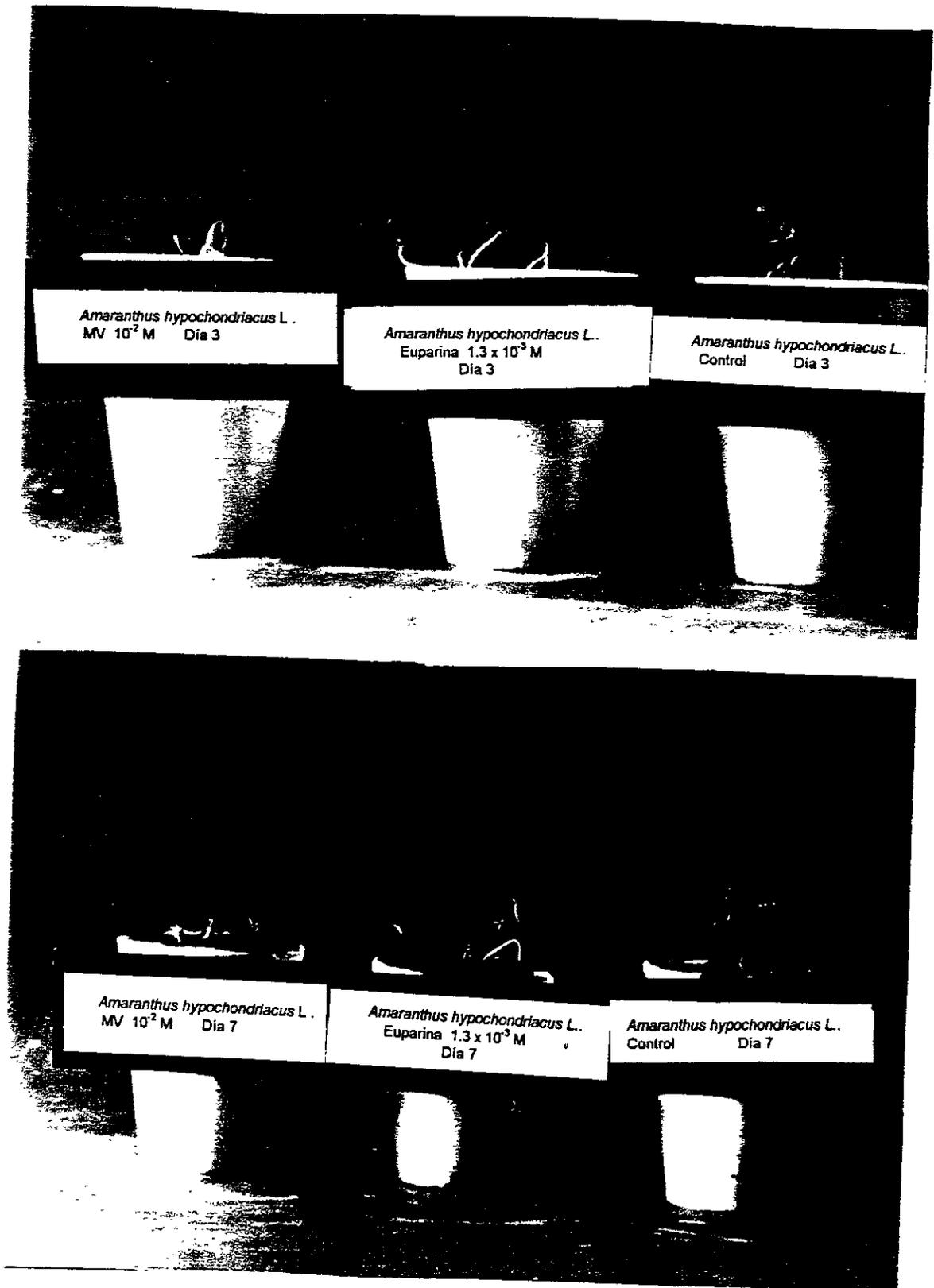


Figura 30. Efecto herbicida post-emergente de la euparina sobre las plántulas de *A. hypochondriacus* (días 3 y 7).

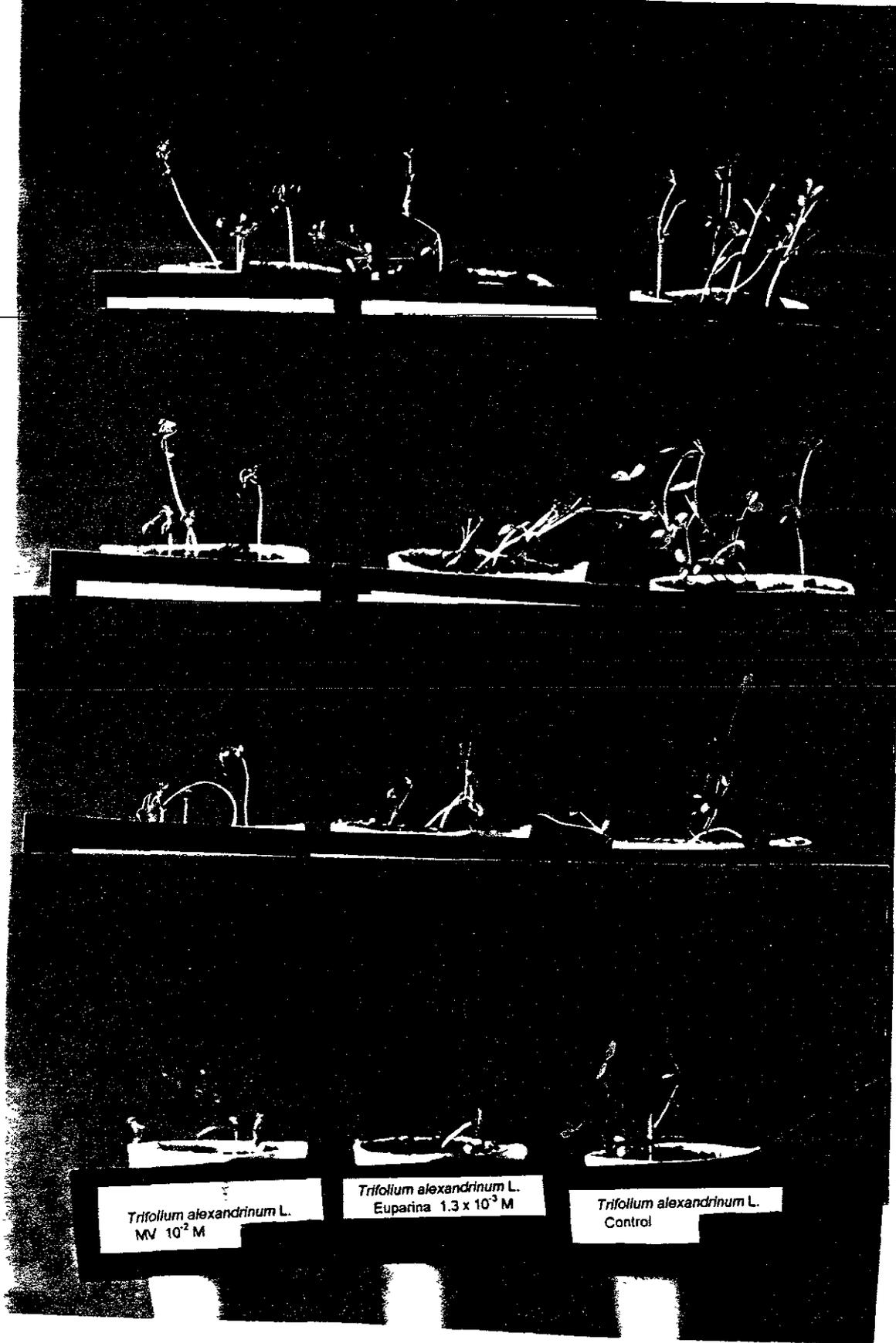


Figura 31. Efecto herbicida post-emergente de la euparina sobre las plántulas de *T. alexandrinum* (días 1, 3, 8 y 10).

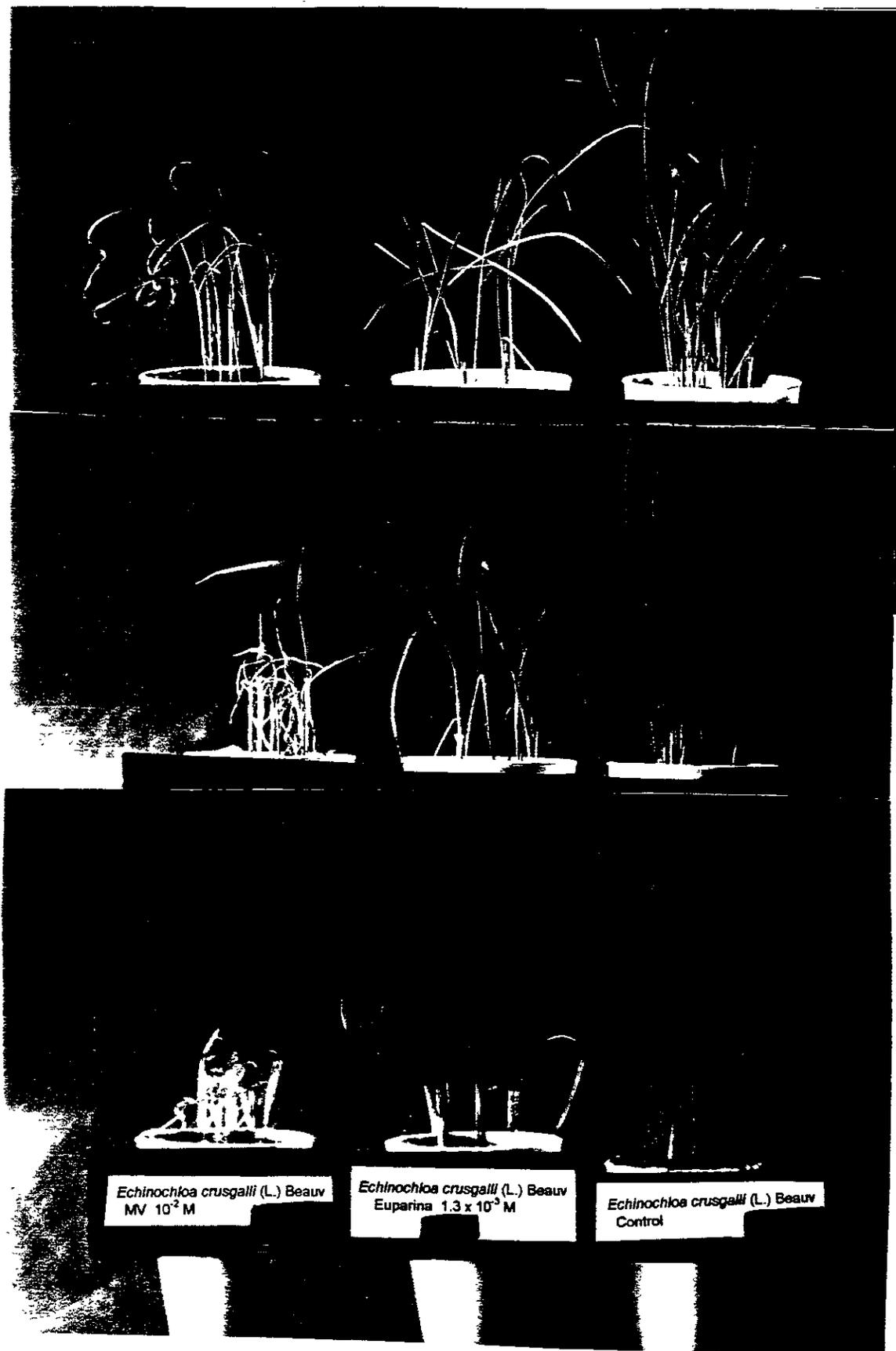


Figura 32. Efecto herbicida post-emergente de la euparina sobre las plántulas de *E. crusgalli* (días 1, 8 y 10).

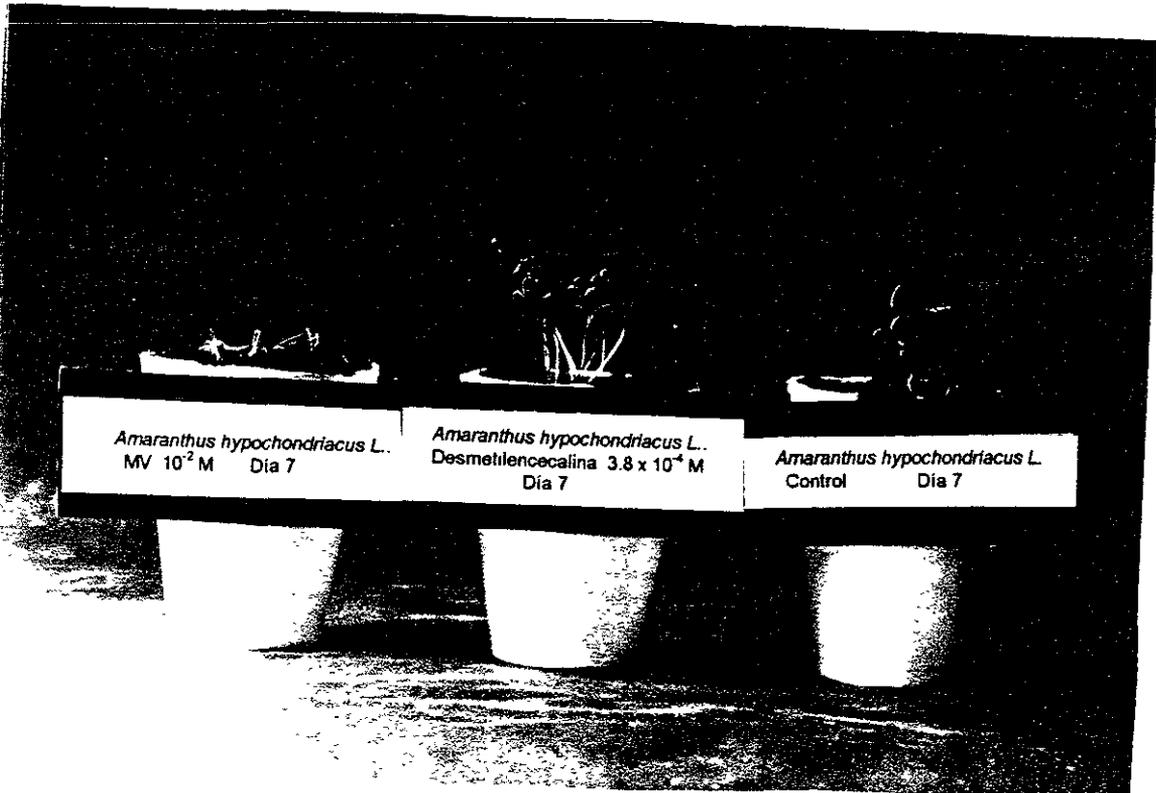


Figura 33. Efecto herbicida post-emergente de la desmetilencecalina sobre las plántulas de *A. hypochondriacus* (días 3 y 7).

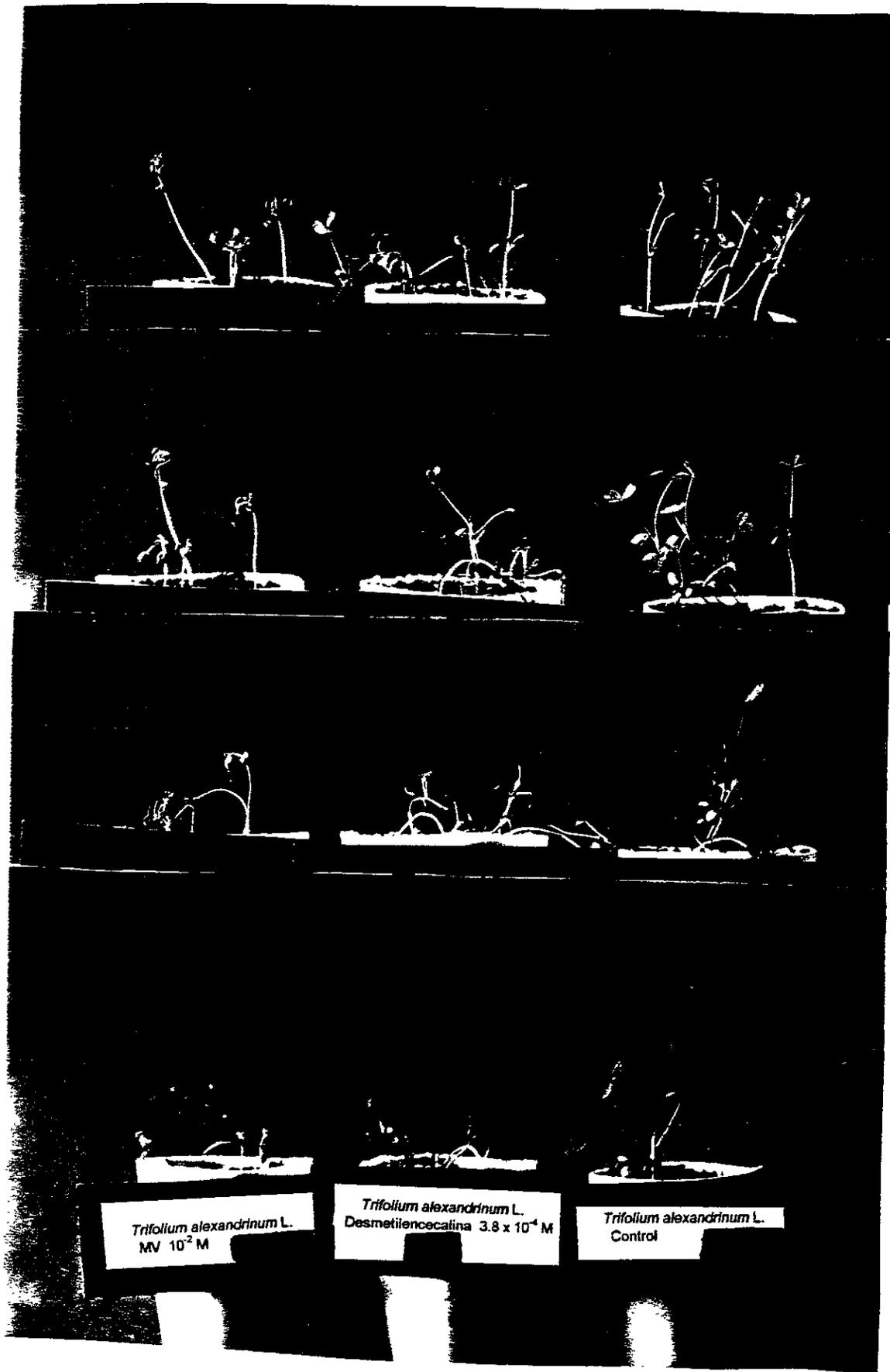


Figura 34. Efecto herbicida post-emergente de la desmetilencecalina sobre las plántulas de *T. alexandrinum* (días 1, 3, 8 y 10).

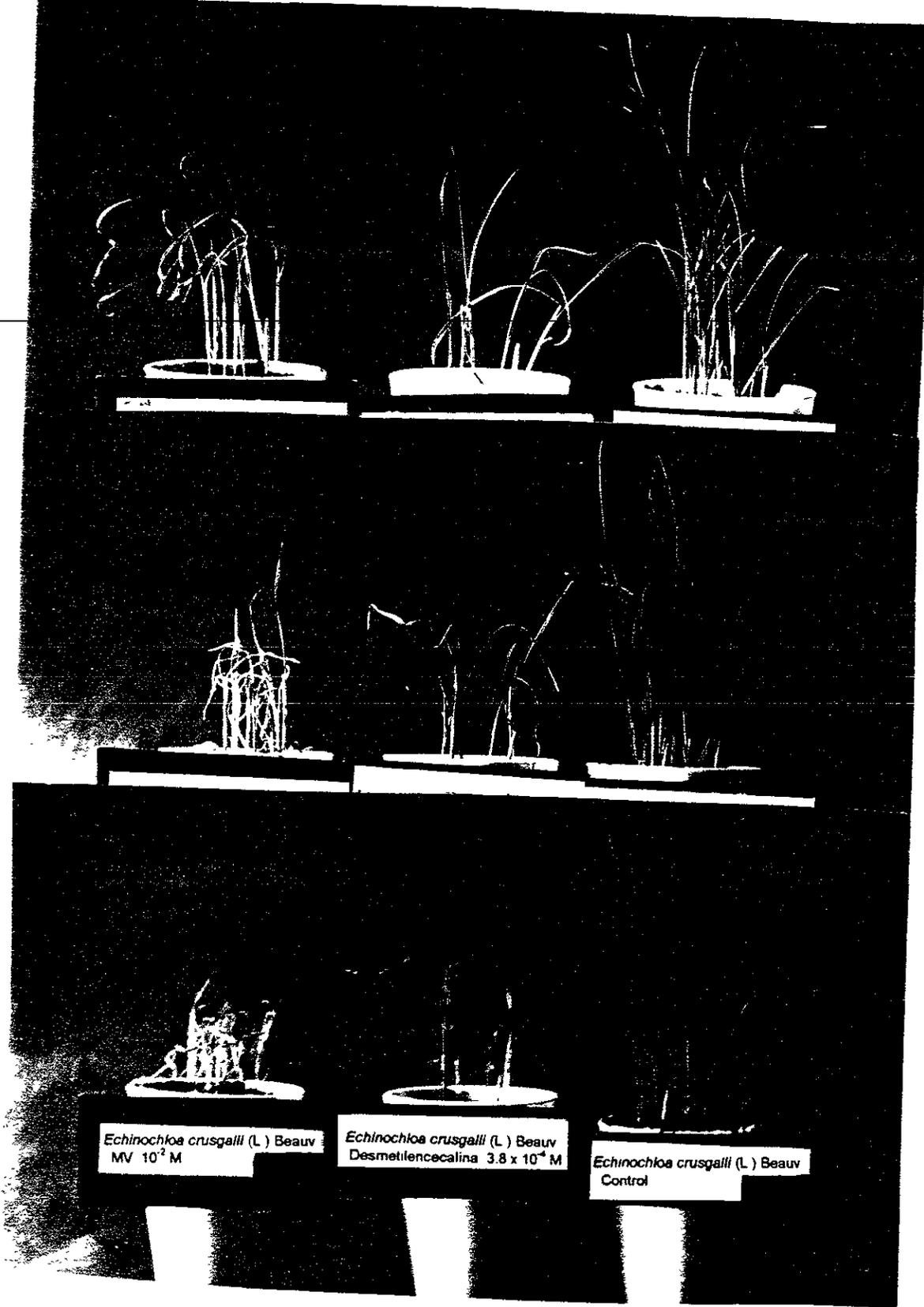


Figura 35. Efecto herbicida post-emergente de la desmetilencecalina sobre las plántulas de *E. crusgalli* (días 1, 8 y 10).

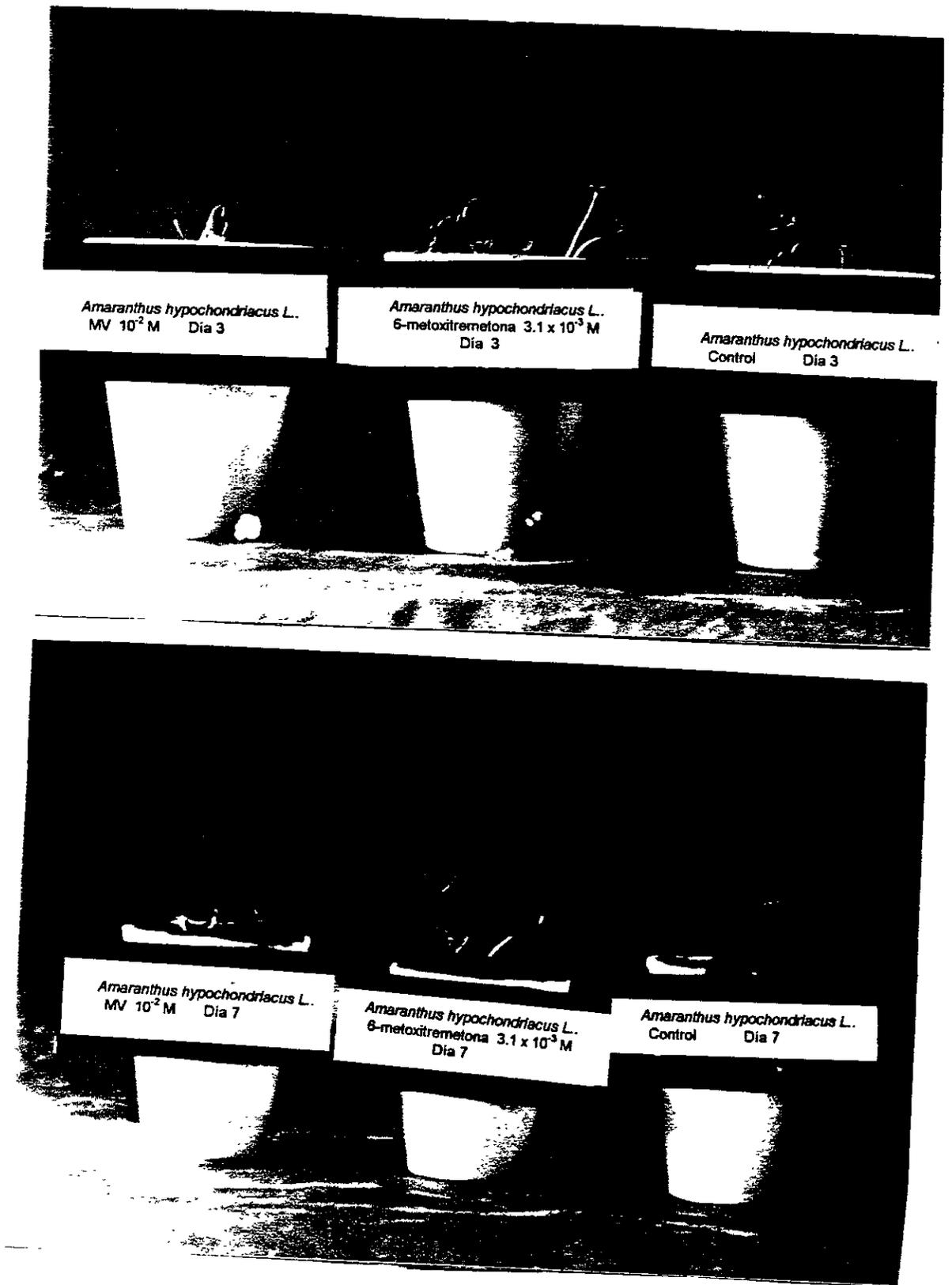


Figura 36. Efecto herbicida post-emergente de la 6-metoxitremetona sobre las plántulas de *A. hypochondriacus* (días 3 y 7).

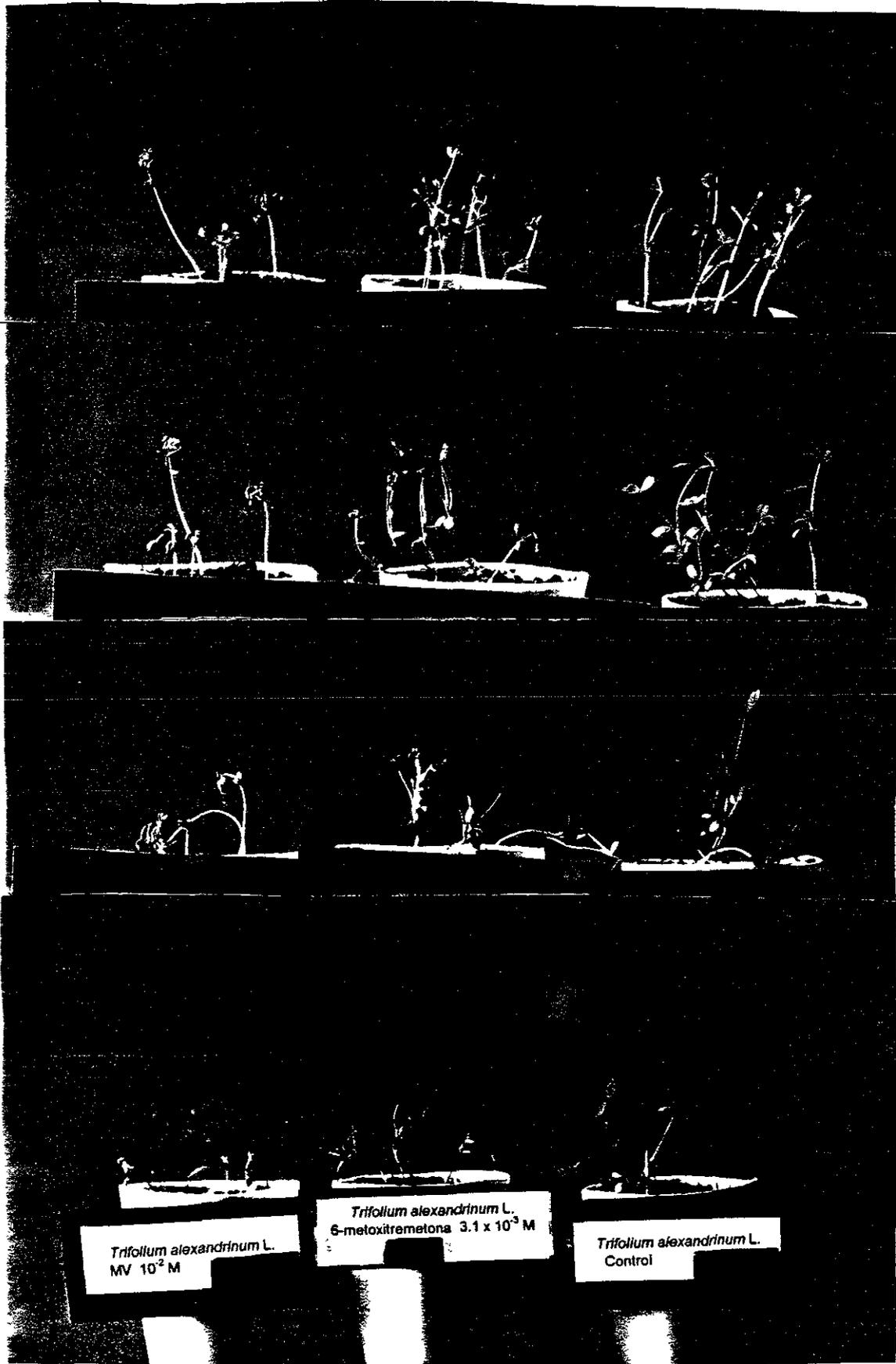


Figura 37. Efecto herbicida post-emergente de la 6-metoxitremetona sobre las plántulas de *T. alexandrinum* (días 1, 3, 8 y 10).

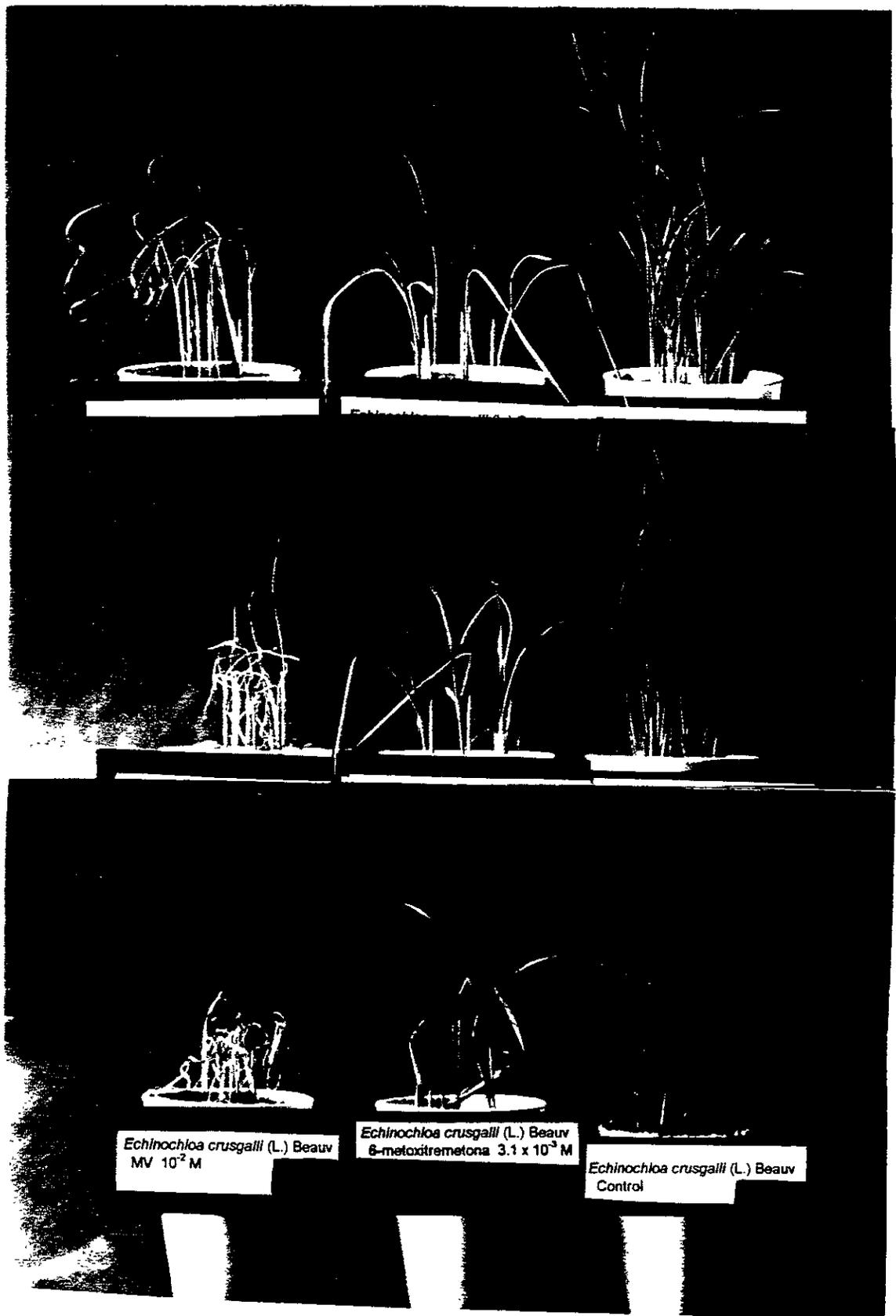


Figura 38. Efecto herbicida post-emergente de la 6-metoxitremetona sobre las plántulas de *E. crusgalli* (días 1, 8 y 10).

4 9 DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS CELULARES INDUCIDOS POR LOS TRATAMIENTOS DE LA ENCECALINA, LA EUPARINA Y LA DESMETILENCECALINA SOBRE CORTES SEMIFINOS DE LAS RADÍCULAS DE LAS ESPECIES *A. hypochondriacus* Y *E. crusgalli*.

Con la finalidad de evaluar si los compuestos fitotóxicos mayoritarios de *H. quinquenervis* inducen cambios en la ultraestructura de las radículas de las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli* se evaluó el efecto de estos compuestos, mediante la técnica de microscopía electrónica.

Las Figuras 36-38 muestran la ultraestructura de las células parenquimatosas de las radículas de las dos especies de arvenses frente a los tratamientos de la encecalina, la euparina y la desmetilencecalina.

En el control correspondiente a la especie de *A. hypochondriacus* (Figura 36), se observa que hay un número considerable de cuerpos residuales debido probablemente a una degradación de material celular en las vacuolas. Así mismo, se puede apreciar claramente el núcleo, el nucleolo y la pared celular.

Los cuerpos residuales previamente mencionados, aumentan considerablemente en las células de las semillas de esta misma especie frente al tratamiento con la encecalina (Figura 37). Así mismo, al comparar el control con los cortes tratados con la encecalina se puede apreciar claramente que las mitocondrias sufren un alargamiento significativo.

Para el caso de la euparina (Figura 24), destaca la presencia de numerosos cuerpos lamelares dentro de las vacuolas debido a un aumento en la degradación de lípidos; también se puede apreciar que el núcleo, el nucleolo y la pared celular permanecen intactos. Cabe mencionar que, Konishi y

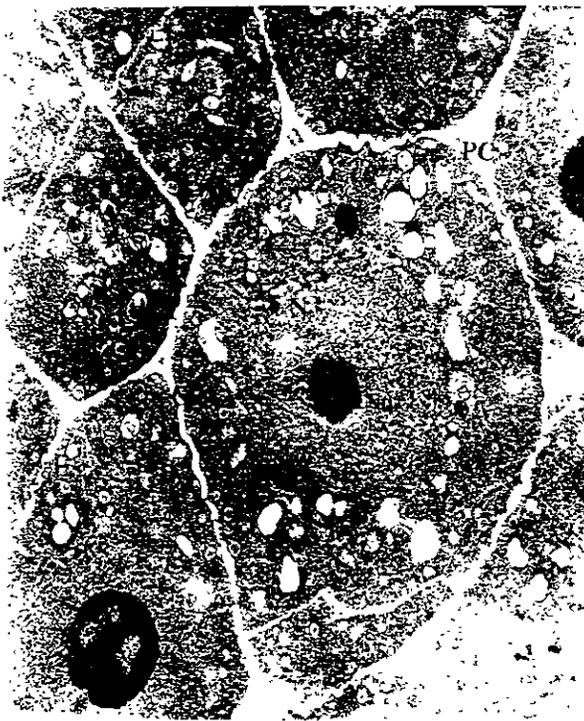


Figura 39. Ultraestructura de las células parenquimatosas de la raíz de *A. hypochondriacus*.

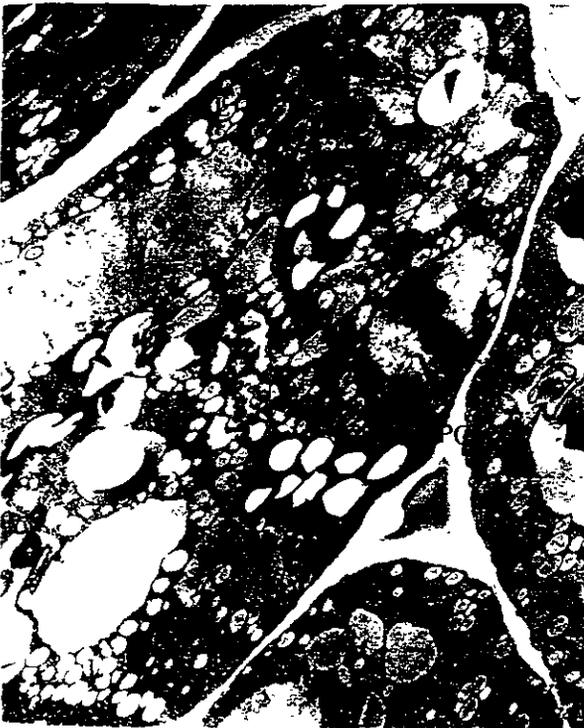


Figura 40. Ultraestructura de las células parenquimatosas de la raíz de *A. hypochondriacus* frente al tratamiento de la enecalina (100 $\mu\text{g/mL}$).



Figura 41. Ultraestructura de las células parenquimatosas de la raíz de *A. hypochondriacus* frente al tratamiento de la euparina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

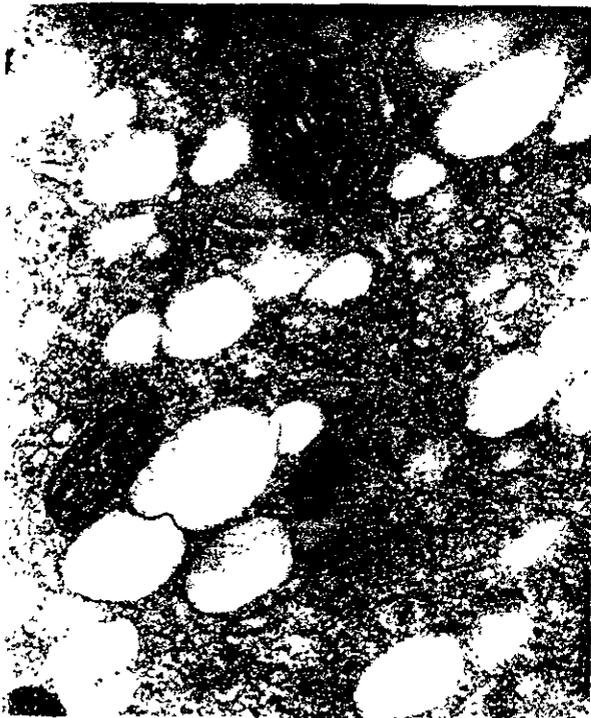


Figura 42. Ultraestructura de las células parenquimatosas de la raíz de *A. hypochondriacus* frente al tratamiento de la desmetilencecalina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).



Figura 43. Ultraestructura de las células parenquimatosas de la raíz de *E.*

crusgalli.

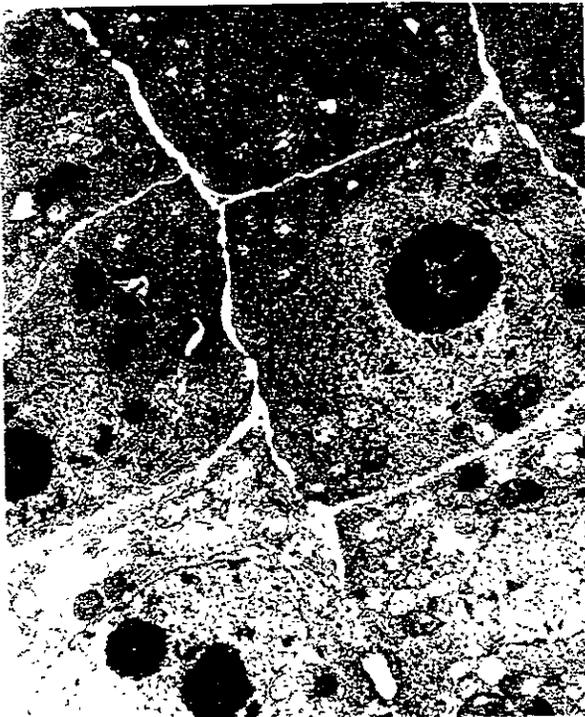


Figura 44. Ultraestructura de las células parenquimatosas de la raíz de *E.*

crusgalli frente al tratamiento de la encalinalina (50 $\mu\text{g/mL}$).

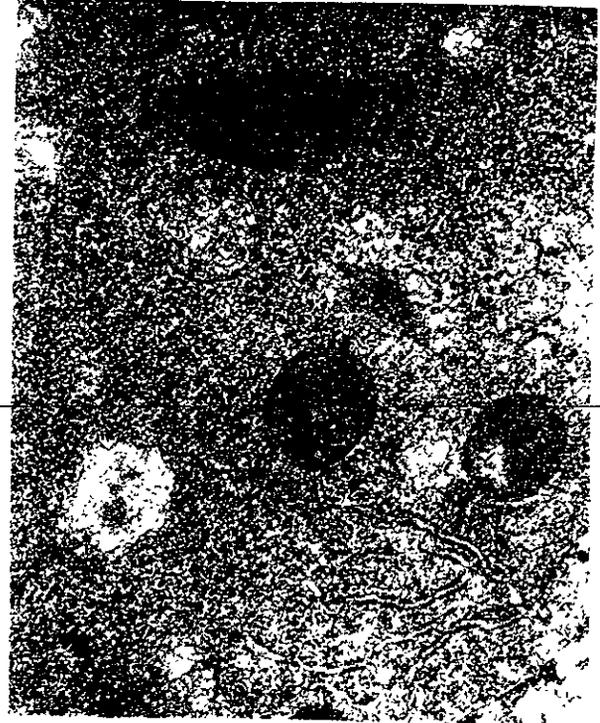
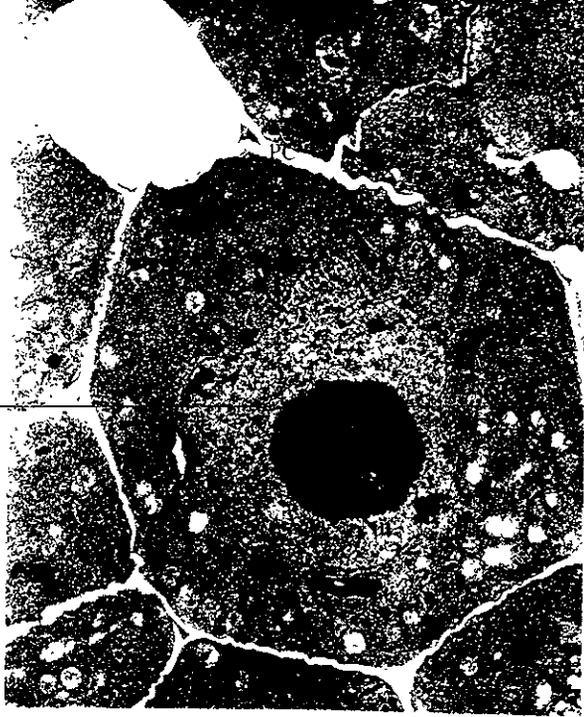


Figura 45. Ultraestructura de las células parenquimatosas de la radícula de *E. crusgalli* frente al tratamiento de la euparina (50 µg/mL).



Figura 46. Ultraestructura de las células parenquimatosas de la radícula de *E. crusgalli* frente al tratamiento de la desmetilencecalina (50 µg/mL).

colaboradores (1995) describen la presencia de numerosos esferosomas (cuerpos lipoides) de varios tamaños y formas en la especie *A. hypochondriacus*, lo que constituye entonces una característica citológica de esta especie. Es importante destacar también, el cambio morfológico considerable (disminución en el tamaño) provocado por este benzofurano a nivel de las mitocondrias.

La desmetilencecalina (Figura 25), muestra un daño celular severo, ya que se observa una hidrólisis general en varias células; no obstante, es de hacer notar que las mitocondrias sufren una moderada alteración.

Con respecto a la especie de *E. crusgalli*, no se observan cambios considerables con los tratamientos de los tres compuestos, a excepción de las mitocondrias que muestran cambios moderados en su morfología.

De los resultados obtenidos mediante el análisis de la ultraestructura de las dos especies de prueba, resulta evidente que existen diferencias significativas en la morfología de las mitocondrias frente a los diferentes tratamientos.

4.10 Evaluaciones biológicas adicionales

Considerando que la especie objeto de estudio se pre-seleccionó fundamentalmente con base en el criterio etnobotánico, se consideró pertinente realizar evaluaciones biológicas adicionales, con la finalidad de ampliar el conocimiento de la potencialidad de *H. quinquenervis* como una fuente de principios activos de interés medicinal.

Las evaluaciones realizadas incluyeron la determinación de la citotoxicidad *in vitro* sobre tres líneas celulares, así como la evaluación del potencial antimicrobiano.

4.10.1 Determinación del efecto citotóxico de los compuestos obtenidos de *H. quinquenervis*

Con la finalidad de establecer posibles efectos tóxicos sobre el hombre y otros animales de los compuestos que presentaron una actividad herbicida potencial (la encecalina, la euparina y la desmetilencecalina), se determinó la actividad citotóxica *in vitro* de los mismos, sobre tres líneas celulares derivadas de tumores humanos (Cuadro 29). De manera adicional, se evaluaron los compuestos 131, 132 y 133, considerando que se tenían cantidades suficientes para determinar su potencial citotóxico.

De los compuestos evaluados únicamente la desmetilencecalina (4) y la 6-metoxitremetona (131), revelaron una actividad citotóxica marginal; el compuesto 4, mostró actividad para las líneas celulares MCF-7 y HT-29, con un valor para la DE₅₀ de 2 µg/mL, en tanto que el compuesto 131 afectó la línea celular A-549 con un valor para la DE₅₀ de 1 µg/mL.

Los compuestos restantes, no mostraron actividad citotóxica significativa ya que los valores de la DE₅₀ fueron > 20 µg/mL.

Estos resultados aunque muy preliminares, contribuyen a la compilación de datos biológicos relativos a la inocuidad de estos para el hombre y otros mamíferos. Cabe destacar que, ninguno de estos compuestos habían sido

objeto de evaluación en contra de las líneas celulares indicadas en el cuadro anterior.

Cuadro 29. Resultados obtenidos para los compuestos obtenidos de la especie *H. quinquenervis* sobre tres líneas celulares.

Compuesto	Línea celular		
	DE ₅₀ (µg/mL)		
	MCF-7	HT-29	A-549
<u>4</u>	2	2	10
<u>45</u>	29	18	25
<u>13</u>	6	6	22
<u>131</u>	33	16	1
<u>132</u>	34	16	31
<u>133</u>	44	61	6
Adriamicina	2×10^{-2}	4×10^{-2}	2×10^{-3}

Finalmente, cabe mencionar que en un estudio previo realizado por Zalkow y colaboradores (1979) se describe la actividad antitumoral de dos benzopiranos (el toxol y el angelato de toxilo) sobre la leucemia linfocítica (P-388); ambos compuestos demostraron una actividad moderada en la línea celular empleada.

4.10.2 Actividad antifúngica

En la actualidad, un gran número de enfermedades infecciosas humanas son de origen micótico, p. ej. pie de atleta, aspergilosis, actinomicosis, coccidiomicosis, etc (Paxton, 1991), y son pocos los agentes antifúngicos indicados en estos tratamientos, además de que su eficacia es muy limitada. Es por esto, que la búsqueda de agentes antifúngicos requiere de una atención especial, aunado al incremento de las micosis oportunistas, asociadas principalmente con el SIDA y el tratamiento con fármacos inmunosupresores (Hamburger y Hostettman, 1991; Paxton, 1991).

Por lo antes descrito, se procedió a determinar el potencial antifúngico del extracto total y de los constituyentes mayoritarios obtenidos de *H. quinquenervis*, mediante el análisis cuantitativo antimicrobiano en contra de *C. albicans*, *A. niger* y *T. mentagrophytes*.

Los resultados obtenidos de este bioensayo, demostraron que el extracto metanólico, la enecalina y la desmetilencecalina desarrollaron un efecto inhibitor del crecimiento microbiano específico sobre *T. mentagrophytes*. Las concentraciones mínimas que inhibieron completamente la proliferación del microorganismo antes mencionado (CIM) correspondieron a 300, 29 y 58 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Finalmente, no se observó ningún efecto inhibitor del crecimiento sobre los microorganismos de prueba adicionales que fueron ensayados para los tres productos naturales.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los ensayos biológicos preliminares sobre diversas especies vegetales pre-seleccionadas principalmente con base en los criterios quimiotaxonómico y etnobotánico, permitieron por una parte seleccionar a la especie *Helianthella quinquenervis* como una fuente potencial de agentes herbicidas potenciales y por la otra, permitieron confirmar una vez más que las observaciones de tipo etnobotánico y quimiotaxonómico constituyen dos criterios importantes para la pre-selección de materia primas como una fuente potencial de compuestos bioactivos.

El estudio fitoquímico biodirigido del extracto metanólico obtenido de las raíces de *H. quinquenervis* utilizando como bioensayo de monitoreo la determinación del crecimiento radicular de las malezas de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*, permitió el aislamiento y caracterización de dos cromenos (la encecalina y la desmetilencecalina) y tres benzofuranos (la euparina, la 6-metoxitremetona y la 3-metoxi-6-hidroxitremetona), uno de los cuales constituyó un nuevo producto natural. De manera adicional, de las fracciones de mayor polaridad se obtuvo un metabolito secundario novedoso caracterizado como la 4- β -D-glucopiranosil-3[3-metoxi-*trans*-isopenten-1-il]-acetofenona.

La valoración de la actividad fitotóxica de los compuestos evaluados condujo a demostrar que la encecalina, la euparina y la desmetilencecalina constituyen agentes fitotóxicos capaces de inhibir el crecimiento radicular de las malezas estudiadas. Es importante destacar, que el presente estudio

constituye el primer reporte describiendo la actividad fitotóxica de benzofuranos. Los resultados obtenidos en la determinación del efecto fototóxico de la encecalina, la euparina y la desmetilencecalina sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*, permiten establecer que el efecto fitotóxico demostrado por estos constituyentes no está mediado por un efecto fototóxico.

Se estableció también, que estos tres compuestos interfieren con el metabolismo energético vegetal afectando el proceso de la fotosíntesis y la respiración durante el proceso de germinación *in vitro*. La encecalina y la desmetilencecalina, inhiben el transporte de electrones fotosintético en cloroplastos aislados de espinacas, a nivel del fotosistema II en el intervalo de la cadena transportadora de electrones comprendido entre P_{680} y Q_A . La euparina inhibe la actividad de la enzima H^+ -ATPasa, actuando por lo tanto como un inhibidor de la transferencia de energía.

En la determinación del efecto de la encecalina, la euparina y la desmetilencecalina sobre la respiración durante la germinación de cuatro especies de semillas, destacó la significativa actividad desacoplante demostrada por la encecalina. Por tal motivo, se evaluó su efecto sobre la cadena respiratoria mitocondrial en mitocondrias aisladas de frijol; los resultados establecen que este compuesto se comporta como un agente desacoplante del proceso de la fosforilación oxidativa.

El presente estudio constituye la primera descripción del efecto de benzopiranos y benzofuranos sobre la interferencia del metabolismo energético vegetal, por lo que asume el carácter de original.

La encecalina y la euparina, manifestaron un efecto post-emergente significativo sobre la producción de biomasa de las especies objeto de estudio lo que los coloca como un candidato para el posible desarrollo de agentes herbicidas. La encecalina y la euparina presentan entonces características como agentes herbicidas potenciales no selectivo y de post-emergencia, respectivamente

El análisis de la ultraestructura de las radículas de las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli* proporcionó las evidencias para establecer que existen diferencias significativas principalmente a nivel de las mitocondrias, frente al tratamiento de la encecalina, la euparina y la desmetilencecalina.

Considerando que la encecalina posee una reconocida actividad insecticida contra una gran variedad de especies, la presencia de la misma en la planta justifica entonces el uso popular de la misma en las prácticas medicinales tarahumaras para eliminar ectoparásitos en humanos y animales domésticos. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se sugiere que este cromeno ejerce la actividad insecticida mediante un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en la cadena respiratoria mitocondrial de los insectos, similar al efecto demostrado por la rotenona.

PERSPECTIVAS DERIVADAS DE LA PRESENTE INVESTIGACION

- Determinar el efecto post- y pre-emergente *in vivo* de la encecalina y la euparina sobre otras especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas.
- Explorar el mecanismo de acción mediante el cual la encecalina ejerce un efecto desacoplante en el proceso de la fosforilación oxidativa.
- Obtener cantidades adicionales de los constituyentes minoritarios aislados de este estudio, con la finalidad de establecer una posible relación estructura química-actividad biológica de los cromenos y benzofuranos y de esta manera, encontrar candidatos potenciales para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas con probable aplicación en el área agrícola
- Determinar la presencia de los compuestos potencialmente herbicidas en los diferentes órganos de la planta en diferentes sistemas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.
- Explorar si el uso medicinal de la especie *H. quinquenervis* para el tratamiento de trastornos gastrointestinales está relacionado con un efecto de activación ó relajación del músculo liso del tracto gastrointestinal, considerando como una causa etiológica de estos trastornos una alteración en la motilidad de la musculatura lisa gastrointestinal (p.ej. cólicos intestinales, emésis, constipación). En este sentido, cabe mencionar que durante la realización del presente estudio se determinó la actividad antiamebiana de la encecalina, la euparina y la desmetilencecalina sobre *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* en el laboratorio de Parasitología

del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Los resultados obtenidos de este bioensayo, se muestran en el Cuadro 28 y de los mismos se desprende que los compuestos evaluados no demuestran actividad antiprotozoaria. Desafortunadamente, estos resultados no son determinantes para establecer que el uso medicinal que se le atribuye a la especie para la cura de trastornos gastrointestinales, no está relacionada con la amibiasis.

Cuadro 30. Resultados de la actividad antimicrobiana de los constituyentes mayoritarios sobre *E. histolytica* y *G. lamblia*.

	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>
Compuesto	DL ₅₀ (µg/mL)	
Encecalina	71.58 (81.1-63.2)*	276.18 (392.6-194.1)*
Euparina	172.22 (211.1-140.5)*	192.75 (243.6-152.4)*
Desmetilencecalina	117.7 (133.1-104.1)*	38.8 (50.0-30.1)*
Metronidazol	0.04	0.21

* intervalos de confianza

- Explorar otras propiedades biológicas de la encecalina y congéneres que escapan de la propuesta original de la presente disertación.

BIBLIOGRAFIA

- Anaya A. L., Calera M. R., Mata R., y Pereda-Miranda R. Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* CAV (Convolvulaceae). *J. Chem. Ecol.* **16**: 2145- (1991).
- Anderson J. W. y Beardall J. Molecular activities of plant cell. An introduction to plant biochemistry. 1a edición, Blackwell Scientific Publications USA (1991).
- Arnason T., Morand P., Salvador J., Reyes I., Lambert J. y Towers N. Phototoxic substances from *Flaveria trinervis* and *Simira salvadorensis*. *Phytochem.* **22**: 594-595 (1983).
- Arntzen C. J., Falkenthal S. V. y Bobick S. Inhibition of photophosphorylation by kaempferol. *Plant Physiol.* **53**: 304-306 (1974).
- Balandrin M. F., Klocke J. A., Wurtele E. S. y Bollinger W. H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science* **228**:1154-1160 (1985).
- Baskin J. M., Ludlow C. J., Harris T. M. y Wolf F.T. Psoralen, an inhibitor in the seeds of *Psoralea subcaulis* (Leguminosae). *Phytochem.* **6**: 1209-1213 (1967).
- Barry A.L. y Thornsberry C. Susceptibility test: diffusion test procedures. En: A. Balows, W.J. Hausler, K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, H.J. Shadomy (eds), *Manual of Clinican Microbiology*. 5a. edición. American Society for Microbiology, Washington D.C. pp 1117-1125 (1991).
- Benner J. P. Pesticidal compounds from higher plants. *Pestic. Sci.* **39**:95-100 (1993).
- Bewley J.D. y Black M. Seeds. Physiology of development and germination. Segunda edición. Plenum Press, New York, pp 1-33, 147-198 (1994).
- Bernal-Morales E. L., Romo de Vivar A., Sánchez B., Aguilar M. y Lotina-Hennsen B. Inhibition of oxygen evolution by ivalin. *Can. Journal Botany* **72**:177 (1994).
- Bohlmann F., Ehlers D., Zdero C. y Grenz M. Über inhaltsstoffe der Gattung *Ligularia*. *Chem. Ber.* **110**: 2640-2648 (1977).

- Bjeldanes L. F. y Geissman T. A. Euparinoid constituents of *Encelia californica*. *Phytochem.* **8**: 1293-1296 (1969).
- Bohlmann F. y Grenz M. Neue isopentenyl-ocetophenon-derivate aus *Helianthella uniflora*. *Chem. Ber.* **103**: 90-96 (1970).
- Bohlmann F. y Böhmann U. Synthgse von natürlich vorkommenden hydroxyacetophenon-derivaten. *Chem. Ber.* **105**: 863-873 (1972).
- Bohlmann F., Suwita A., King R. M., Robinson H. Neue ent-landan derivate aus *Austroeupatorium chaparense*. *Phytochem.* **19**: 111-114 (1980).
- Bohlmann F., Tsankova E., Jakupovic J., King R. y Robinson H. Dimeric chromenes and mixed dimers of a chromene with euparin from *Encelia cgnescens*. *Phytochem.* **22**: 557-560 (1983).
- Bohlmann F., Zdero C., King R. M. y Robinson H. Prenylated *p*-coumarates from *Werneria stuebelii*. *Phytochem.* **23**: 1135-1137 (1984).
- Bonner W. A general method for the preparation of plant mitochondria. *Methods in Enzymology*, Vol. **X**, pp 126-133 (1971).
- Bowers W.S. *Am. Zool.* **21**: 237 (1981).
- Bowers W. S., Eva~s P. H., Soderlund D. M., Bettarini F. Natural and synthetic allatotoxins: suicide substrates for juvenile hormone biosynthesis. *Science*, 647-648 (1982).
- Bowers W. S. y Martínez-Pardo R. *Science* **197**: 1369 (1977).
- Bowers W. S., Ohta T., Cleere J. S. y Marsella P. A. Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants. *Science* **193**: 542-547 (1976).
- Bowes J., Crofts A. R. y Arnzten C. J. Redox reactions on the reducing side of photosystem II in chloroplasts with altered herbicide binding properties. *Ach. Bioch. Bioph.* **200**: 300-308 (1980).
- Bowyer J. R., Camilleri P. y Vermaas W. F. J. En: Baker N. R. y Percival M. P. (Eds.). *Herbicides. Photosystem II and its interaction with herbicides*. Elsevier Science Publishers B.V. pp 27-85 (1993).

- Brooks G. T., Pratt G. E. y Jennings R. C. The action of precocenes in milkweed bugs (*Oncopeltus fasciatus*) and locusts (*Locusta migratoria*). *Nature* **281**: 570-572 (1979).
- Brown G. D. Prenylpropanoids and other secondary metabolites from *Baccharis linearis*. *Phytochem.* **35**: 1037-1042 (1994).
-
- Bye R. En: Two Mummies from Chihuahua: A multidisciplinary study; Tyson R. A., Elñerick D. V. (Eds.) San Diego Museum Papers: San Diego, pp 77-104 (1985).
- Calera M. R., Soto F., Sánchez P., Bye R, Hernández B., Anaya A. L., Lotina-Hennsen B. y Mata R. Biochemically active sesquiterpene lactones from *Ratibida mexicana*. *Phytochem.* **40**: 419-425 (1995a).
- Calera M. R., Mata R., Anaya A. L. y Lotina-Hennsen B. 5-o- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin, an inhibitor of photophosphorylation in spinach chloroplasts. *Photosyn. Res.* **45**: 105-110 (1995b).
- Calera M. R., Mata R., Lotina-Hennsen B. y Anaya A. L. Uncoupling behavior of the 4-phenylcoumarins in spinach chloroplasts: structure-activity relationships. *J. Agr. Food Chem.* **44**: 2966-2969 (1996).
- Castañeda P., García M. R., Hernández B. E., Torres B. A., Anaya A. L., Mata R. Effects of some compounds isolated from *Celaenodendron mexicanum* Standl (Euphorbiaceae) on seeds and phytopathogenic fungi. *J. Chem. Ecol.* **18**: 1025-1037 (1992).
- Corbett J. R. En: The biochemical mode of action of pesticides. Herbicides interfering with photosynthesis. 2a edición, Academic Press, London. pp 50-98 (1984).
- Cremlyn R. J. Agrochemicals, preparation and mode of action. Ed. J. Wiley & sons. pp 217-220 (1991).
- Chen P. K. y Leather G. R. Plant growth regulatory activities of artemisinin and its related compounds. *J. Chem. Ecol.* **16**:1867-1876 (1990).
- Chen P. K., Polatnick M. y Leather G. Comparative study on artemisinin, 2,4-D and glyphosate. *J. Agr. Food Chem.* **39**:991-994 (1991).

- Debus R. J., Barry B. A., Sithole I., Babcock G. T. y McIntosh L. Direct mutagenesis indicates that the donor P₆₈₀₊ in photosystem II is tyrosine-161 of the D₁ polypeptide. *Biochem.* 27: 9071-9074 (1988).
- De Gutierrez A. N., Catalan C. A., Díaz J. G. Sesquiterpene lactones, a labdane and other constituents of *Urolepis hecatantha* and *Chromolaena arnottiana*. *Phytochem.* 39: 795-800 (1995).
- Dilley R. A. Ion transport H⁺, K⁺, Mg²⁺-exchange phenomena. *Methods Enzymol.* 24:68 (1972).
- Domínguez X. A., Dahmi S. E. y Rombold C. Hydroxyacetophenone derivatives from *Baccharis glutinosa*. *J. Nat. Prod.* 49: 143-144 (1986).
- Duke S. y Lydon J. Herbicides from natural compounds. *Weed Tech.*, 1: 122-128 (1987).
- Duke S. Plant terpenoids as pesticides. En: Handbook of Natural Toxins. Vol. 6. Toxicology of plant and fungal compounds. De. R. Keeler y Anthony T. Marcel Beeker Inc. pp 269-296 (1991).
- Duke S. O. y Abbas H. K. En: Inderjit K. M. M. Dakshini y Einhellig F. A. Allelopathy organisms, processes and applications. Natural Products with potential use as herbicides. ACS. pp 348-362 (1995).
- Duke S. O. y Lydon J. En: Inderjit K. M. M. Dakshini y Einhellig F. A. Allelopathy organisms, processes and applications. Natural Products with potential use as herbicides. ACS Natural phytotoxins as herbicides. ACS Simp. Ser.. pp 110-124 (1995).
- Einhellig F. A. En: Putnam A. R. y Tang C. S. (Eds.). Mechanisms and modes of action of allelochemicals. The science of allelopathy. Willey Interscience USA. pp171-188 (1986).
- Einhellig F. A. En: I. K. M. M. Dakshini y Einhellig F. A. (Eds.). Allelopathy: organisms, processes and applications. Allelopathy: current status and future goals. ACS 582. pp 1-24 (1995).
- Einhellig F. A. y Rasmussen J. A. *J. Chem. Ecol.* 5:815-824 (1979).

- Einhellig F. A. y Souza F. J. Phytotoxicity of sorgoleone found in grain sorghum root exudation. *J. Chem. Ecol.* **18**: 1-11 (1992).
- Fang N., Yu S. y Mabry T. J. Chromenes from *Ageratina arsenii* and revised structures of two epimeric chromene dimers. *Phytochem.* **27**: 1902-1905 (1988).
- Farnsworth N. R. The role of ethnopharmacology in drug development. En: Bioactive compounds from plants. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 154) pp 2-21 (1991).
- Fischer N. y Quijano L. Allelopathic agents from common weeds: *Amaranthus palmeri*, *Ambrosia artemissifolia* and related weeds. *Am. Chem. Soc. Sym. Ser.* **268**: 133-147 (1985).
- Fischer N., Weidenhamer J. y Bradow J. Dihydroparthenolide and other sesquiterpene lactones stimulate witch weed germination. *Phytochem.* **28**: 2315-2317 (1989).
- Fogh J. y Trempe G. En: Human Tumor Cells; Fogh, J. (Ed). Plenum Press: New York; pp 115-119 (1975).
- Fuerst P. y Norman M. Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Sci.* **39**: 458-464 (1991).
- Gerig T. y Blum U. Effects of mixtures of four phenolic acids on leaf area expansion of cucumber seedlings grown in portsmouth Bi soil materials. *J. Chem. Ecol.* **17**: 29 (1991).
- Gernot R. Studies about the mechanism of herbicidal interaction with photosystem II in isolated chloroplasts (1979).
- Ghisalberti E. Detection and isolation of bioactive natural products. En: Bioactive natural detection, isolation and structural determination. Colegate S. y Molyneux R. (eds.) CRC Press USA pp 10-49 (1993).
- Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J., Arnstein P., Kersey J. H., Dosik H. y Parks W. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**: 1417 (1973).
- Giardi M.T., Marder J.B. y Barber J. Herbicide binding to the isolated photosystem reaction centre. *Biochem. Biophys. Acta* **934**: 64-71 (1988).

- Gómez L. Estudio químico y biológico preliminar de *Helianthella quinquenervis*. Tesis de Licenciatura. UNAM (1993).
- González A. G., Bermejo-Barrera J., Yañez C., Díaz J.G. y Rodríguez E. Chromenes and benzofurans from *Ageratina glechonophylla*. *Phytochem.* **28**: 2520-2522 (1989).
- González A., Aguiar Z., Grillo T., Luis J., Rivera A. y Calle J. Chromenes from *Ageratum conyzoides*. *Phytochem.* **30**: 1137-1139 (1991).
- Grayson B. T., Williams K. S., Freehauf P. A., Pease R. R., Ziesel W. T., Sereno R. L. y Reinsfelder R. E. The physical and chemical properties of the herbicide cinmethylin. *Pestic. Sci.* **21**:143-153 (1987).
- Gross E., Shavit N. y San Pietro A. Synthalin: an inhibitor of energy transfer in chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **127**: 224-228 (1968).
- Gutiérrez-Lugo M. T., Barrientos-Benítez T., Luna B., Ramírez-Gama R. M., Bye R., Linares E. y Mata R. Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican medicinal plants. *Phytomedicine* **2**: 341-347 (1996).
- Hamburger M. y Hostettmann K. 7. Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochem.* **30**: 3864-3874 (1991).
- Herz W. y Kulanthaivel P. Chromans from *Helianthella quinquenervis*. *Phytochem.* **23**: 435-437 (1984).
- Hoagland R. E. Herbicidal properties of the antibiotic Monensin. *J. Sci. Food Ag.* **70**: 373-379 (1996).
- Holman L., Plucknett D., Pancho J. y Herberger J. The World's worst weeds: distribution and biology. The University Press of Hawaii, Honolulu, p 109 (1977).
- Inouye D. e Inouye R. The aminoacids of extrafloral nectar from *Helianthella quinquenervis* (Asteraceae). *Am. J. Bot.* **67**:1394-1396 (1980).
- Isman M. B. y Proksch P. Deterrent and insecticidal chromenes and benzofurans from *Encelia* (Asteraceae). *Phytochem.* **24**: 1949-1951 (1985).
- Isman M. B., Yan J. Y. y Proksch P. Toxicity of natural chromenes derivatives to a grasshopper. *Naturwissenschaften* **73**: 500-501 (1986).

- Izawa S., Winget D. y Good E.. Phlorizin, a specific inhibitor of photophosphorylation-coupled transport in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res: Comm.* **22**: 223-226 (1966).
- Izawa S. Inhibitors of electron transport. Enciclopedia of plant physiology. New Series 5: 226-282 (1977).
- Jennings R. C. y Ottridge A. D. Synthesis of precocene I epoxide (2,2-dimethyl-3,4-epoxy-7-methoxy-2H-1-benzopyran). *J. S. C. Chem. Comm.* 920-921 (1979).
- Jia Z. y Zhao Y. Four new furans from the roots of *Ligularia przewalskii*. *J. Nat. Prod.* **57**: 146-150 (1994).
- Jiménez A., Mata R., Lotina-Hennsen B., Ibarra L. Phyto-growth inhibitory compounds from *Malmea depressa*. *J. Nat. Prod.* **59**: 202-204 (1996).
- Kanchan S.D. Growth inhibitors from *Parthenium hesterophorus*. *Lin. Curr. Sci.* **44**: 358-359 (1975).
- Kirkwood R. C. y Fletcher W. W. En: Fletcher W. W. (Ed.) Recent advances in weed research. The mode of action of herbicides. CAB. pp 227-257 (1983).
- Klocke J. A., Balandrin M. F., Adaos R. P. y Kingsford E. Insecticidal chromenes from the volatile oil of *H. fitchii*. *J. Chem. Ecol.* **6**: 701-712 (1985).
- Konishi Y., Nakamura R., Sugimoto Y. y Fujimori K. Transmission electron microscopy of protein-bodies in the *Amaranthus cruentus* seed embryo. *Biosc. Biotech. Biochem.* **59**: 2140-2142 (1995).
- Kunze A., Aregullin M., Rodríguez E. y Proksch P. Fate of chromene encephalin in the interaction of *Encelia farinosa* and its specialized herbivore *Trirhabda geminata*. *J. Chem. Ecol.* **22**: 491-498 (1996).
- Kunze A., Müller C. y Proksch P. Chemical variation and defense of *Encelia farinosa*. *Biochem. System. and Ecology* **23**: 355-363 (1995).
- Kyle D. The 32,000 dalton QB-protein of photosystem II. *Photochem. Photobiol.*, **41**: 107-116 (1985).
- Laasch H., Pfister K. y Urbach W. *Z. Naturforsch* **37c**:620-631 (1982).
- Labbe C., Rovirosa J., Faini F., Mahu M., San-Martín A. y Castillo M. Secondary metabolites from chilean *Baccharis* species. *J. Nat. Prod.* **49**: 517-518 (1986).

- Lambert J. D., Campbell G., Arnason J. T. y Majak W. *Canad. J. Plant Sci.* **71**: 215-218 (1991).
- Leather G. R. y Einhellig F. A. Bioassay of naturally occurring allelochemicals for phytotoxicity. *J. Chem. Ecol.* **14**: 1821-1827 (1988).
- Liansky S. G. *Pestic. Outlook* **1**, 9-13 (1990).
- Lin T. J., Ramstad E. y Hernstein P. *In vivo* biosynthesis of isopentenyl-acetophenones in *Eupatorium rugosum*. *Phytochem* **13**, 1809-1815 (1974).
- Linscott D. L.. En: Pimentel D. (Ed.) Handbook of pest management in agriculture. The nature, mode of action and toxicity of herbicides. Vol. III. CRC Press. pp. 75-94 (1981).
- Lotina-Hennsen B., Bernal-Morales E., Romo de Vivar A., Pérez A. L., Aguilar M. y Castro R. A. Inhibition of oxygen evolution by zaluzanin C. *J. Chem. Ecol.* **18**: 1891 (1992).
- Lotina-Hennsen B., Roque-Resendiz J. L., Jiménez M. y Aguilar M. Inhibition of oxygen evolution by cacalol and its derivatives. *Z. Naturforsch.* **46c**:777-780 (1991).
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Lewis F.A. y Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent.
- Makovec P. y Sindelar L. The effect of phenolic compounds on the activity of respiratory chain enzymes and on respiration and photophosphorylation activities of potato tuber mitochondrias. *Biol. Plant* **26**: 415-422 (1984).
- McCarty R. E. Energy transfer inhibitors of photophosphorylation in chloroplasts. *Enciclopedia of plant physiology* **5**, New Series, pp 436-447 (1977).
- McCarty R. E. y Racker E. Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. *J. Biol. Chem.* **242**: 3435-3439 (1967).
- McKenna D.J. y Towers G.H. *Phytochem.* **20**: 1001 (1981).
- McLaughlin J. L. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. En: K. Hostettmann (Ed.). *Methods in plant biochemistry. Assays for bioactivity.* Vol. 6

- Meyer B. N., Ferigni N. R., Putnam J. E., Jacobsen L. B., Nichols D. E. y McLaughlin J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* **45**: 31-34 (1982).
- Mitchell P. A comentary on alternative hipoteses of protonic couplin in the membrane system catalysis oxidative and photosynthetic phosphorylation. *FEBS Lett.* **78**: 1-20 (1977).
- Mitsakos A. y Proksch P. Comparative bgnzofuran chemistry of *Enceliopsis*. *Biochem. System. and Ecol.* **13**: 257-259 (1985).
- Mitsakos A., Brever M., Budzikiewicz H. y Proksch P. Benzofuran derivatives from *Enceliopsis covillei*. *Phytochem.* **25**: 2243-2244 (1986).
- Mills J. D., Mitchell P. y Schurmann P. Modulation of coupling ATPase activity in intact chloroplasts. *FEBS Lett.* **112**: 173-177 (1980).
- Mohr H. y Schopfer P. *Plant Physiology*. Springer, pp 579-585 (1995).
- Moreland D. E. Mechanisms of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 597-638 (1980).
- Moreland D. E. y Novitzky W. P. Effects of phenolic acids, coumarins and flavonoids on isolated chloroplasts and mitochondria. En: Waller G. R. (Ed.). *Allelochemicals: role in agriculture and forestry*. Vol. 330 American Chem. Society, Washington D. C. pp 246-261 (1987).
- Murray R. D. y Brown S. A. Coumarins. En: Conn E. E. (Ed.). *The biochemistry of plants*. Acad. Press, N. Y. Vol.7. pp269-299 (1981).
- Nedergoard J. y Cannon B. Overview-preparation and properties of mitochondria from different sources. *Methods in Enzymology*, V. LV, pp 3-32 (1979).
- Neuburger M. Preparation of plant mitochondria, criteria for assesement of mitochondrial integrity and purity, survival in vitro. *Enciclopedia of plant physiology*, New Series, V. 18, Spring NY-Tokyo (1989).
- Ober A. G., Urbatsch L. E. y Fischer N. Guaianolides and chromenes from *Calea* species. *Phytochem.* **24**, 795-799 (1985).
- Oettmeier W., Masson K. y Johanningmeier. Photoaffinity labeling of the photosystem II herbicide binding protein. *FEBS Lett.* **118**: 267-270 (1980).

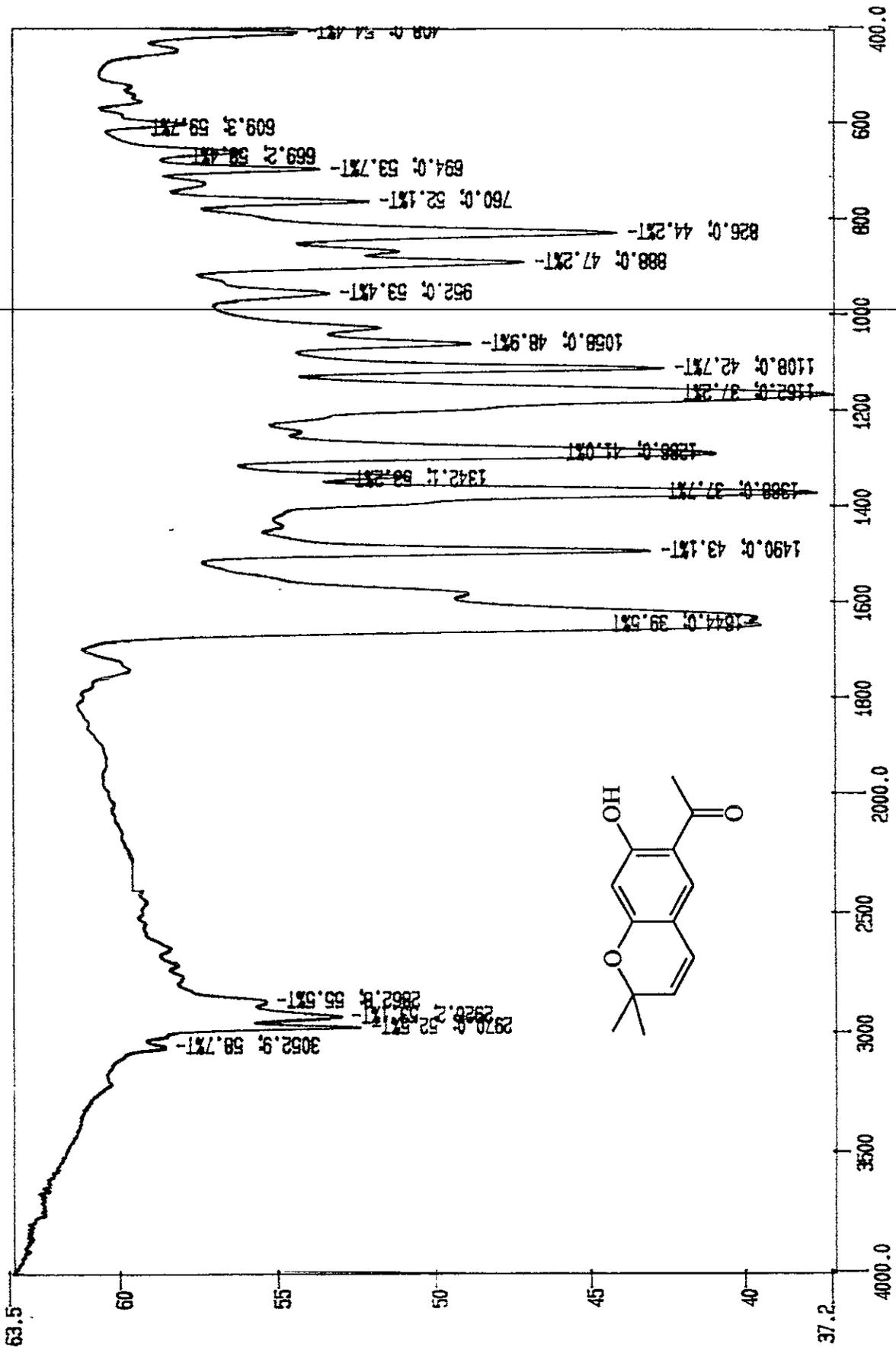
- Ort D. R. Energy transduction in oxygenic photosynthesis: an overview of structure and mechanism. En: Encyclopedia of plant physiology, New Series, vol. 19 (Staehein L. A. y Arnzter C. J. eds) pp 143-196 (1986).
- Paxton J. D. Assays for antifungal activity. En: Hostettmann K. (Ed.). Methods in plant biochemistry, Vol. 6 (1991).
-
- Peña-Valdivia C. B., Rodríguez-Flores L., Tuena de Gómez-Puyou M. y Lotina-Hennsen B. Inhibition of photophosphorylation and electron transport by N-N-dimethylformamide. *Biophys. Chem.* **41**:169 (1991)
- Percival M. P. y Baker N. R. En: Baker N. R. y Percival M. P. (Eds.). Herbicides. Herbicides and photosynthesis. Elsevier Science Publishers B.V. pp 1-26 (1991).
- Pereda-Miranda R., Mata R., Anaya A. L., Wickramaratne D. B., Pezzuto J. y Kinghorn D. Tricolorin A, mayor phyto growth inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *J. Nat. Prod.* **56**: 571-582 (1993).
- Pfizter K. y Arnzter C. J. *Z. Naturforsch* **34c**: 996-1009 (1979).
- Picman A. Aqueous solubility of isoalantolactone and its effect on germination and biomass production of redroot pigweed and late-flowering goosefoot. *Bioch. Syst. Ecol.* **14**: 361-364 (1986).
- Pillmoor J. B., Wright K. y Terry A. S. Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. *Pestic. Sci.* **39**: 131-140 (1993).
- Pratt G. E., Jennings R. C., Hammett A. F. y Brooks G. T. *Nature* **284**: 320 (1980).
- Proksch P. Vorkommen und biologische bedeutung von benzopyranen (chromenen) und benzofuranen in den Asteraceae. *Pl. Syst. Evol.* **150**: 89-100 (1985).
- Proksch P. y Clarck C. Systematic implications of chromenes and benzofurans from *Encelia* (Asteraceae). *Phytochem.* **26**: 171-174 (1987).

- Proksch P., Isman M. B., Witte L. y Hartmann T. Metabolites of insecticidal chromenes from the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. *Phytochem.* **26**: 2227-2230 (1987).
- Proksch P., Mitsakos A., Bodden J. y Wollenweber E. Benzofurans and methylated flavonoids of *Geraea* (Asteraceae). *Phytochem.* **25**: 2367-2369 (1986).
- Proksch P., Palmer J. y Hartmann T. Metabolism and bioconversion of chromene derivatives in *Ageratina adenophora*. *Planta* **169**: 130-134 (1986).
- Proksch P., Proksch M., Towers G. H. N. y Rodríguez E. Phototoxic and insecticidal activities of chromenes and benzofurans from *Encelia*. *J. Nat. Prod.* **46**: 331-334 (1983).
- Proksch P. y Rodríguez E. Chromenes and benzofurans of the Asteraceae, their chemistry and biological significance. *Phytochem.* **22**: 2335-2348 (1983)
- Proksch P., Witte L., Wray V. y Rahaus I. Accumulation and biotransformation of chromenes and benzofurans in a cell suspension culture of *Ageratina adenophora*. *Planta Medica* 488-492 (1987).
- Putnam A.R. Allelochemicals from plants as herbicides. *Weed Tech.* **2**: 510-518 (1988).
- Renger G. Studies about the mechanism of herbicidal interaction with photosystem II in isolated chloroplasts. *Z. Naturforsch.* **34c**: 1010-1013 (1979).
- Renger C., Hagemann R. y Vermaas W. F. J. Studies on the functional mechanism of system II herbicides in isolated chloroplasts. *Z. Naturforsch.* **39c**: 362-367 (1984).
- Robinson H. A revision of the tribal and subtribal limits of the Heliantheae (Asteraceae). *Smithsonian contributions to Botany* **51**:1-58 (1985).
- Rodgers P. B. Potential of biopesticides in agriculture. *Pestic. Sci.* **39**:117-129 (1993).
- Rojas A., Hernández L., Pereda-Miranda R. y Mata R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharm.* **35**: 275-283 (1992).

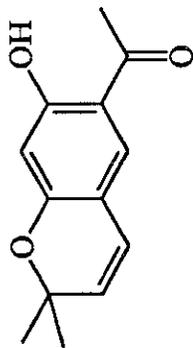
- Saha S., Ouitrakul R., Izawa S., y Good N. Electron transport and photophosphorylation in chloroplasts as function of the electron transport. *J. Biol. Chem.* **246**: 3204-3209 (1971).
- Shekhani M. S., Shah P. M., Yasmin A., Siddiqui R., Perveen S., Khan K. M., Kasmoo S. U., Rahman A. V. *Phytochem.* **29**: 2573-2576 (1990).
-
- Siebertz R., Proksch P., Wray V. y Witte L. Accumulation and biosynthesis of benzofurans in root cultures of *Eupatorium cannabinum*. *Phytochem.* **28**: 789-793 (1989).
- Soderlund D. M., Messeguer A. y Bowers W. S. Precocene II metabolism in insects: synthesis of potential metabolites and identification of initial in vitro biotransformation products. *J. Agr. Food Chem.* **28**: 724- (1980).
- Solis C., Sánchez de Jiménez E., Loyola-Vargas V.M., Carabez A. y Lotina-Hennsen B. The biogenesis of chloroplasts in tissue cultures of a C₃ and C₄ plant. *Plant Cell Physiol.* **30**: 609-616 (1989).
- Soule H. D., Vázquez J., Long A., Albert S. y Brennan M. *J.Natl. Cancer Inst.* **51**: 1409 (1973).
- Spencer G. F., Tjarks L. W., Enggland R. E. y Seest E. P. The effect of naturally occurring naphthoquinones on velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) germination. *J. Nat. Prod.* **49**:530-533 (1986).
- Srivastava R. P.y Proksch P. Toxicity and feeding deterrence of natural chromene and benzofuran derivatives to *Epilachna varivestis*. *Naturwissenschaften* **77**: 438-439 (1990).
- Steinbeck C., Spitzer V., Starasta M. y Von Poser G. Identification of two chromenes from *Calea serrata* by semiautomatic structure elucidation. *J. Nat. Prod.* **60**: 627-628 (1997).
- Strain H. H., Coppe B. T. y Svec W. A. Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophyll. *Methods Enzymol.* **24**:68 (1971).
- Sudalai A. y Krishna R. Synthesis of two meroterpenic acetophenones occurring in *Senecio* and *Helianthella*&species. *Ind. J. Chem.* **288**: 760-761 (1989).

- Sumner J. B. Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science* **100**: 413-415 (1944).
- Sütfeld R., Balza F. y Towers G. H. N. A benzofuran from *Tagetes patula* seedlings. *Phytochem.* **24**: 876-877 (1985).
- Terry P. Grassy weeds. A general overview. En: Tropical grassy weeds. F.W. Baker y P.J. Terry (eds.) CAB International for CASFA Gran Bretaña. Cap. 1 pp 5-38 (1991).
- Towers G. y Arnason J.T. Photodynamic herbicides. *Weed Tech.* **2**: 545-549 (1988).
- Towers N., Wat C. K., Graham E. A., Bandoni R. J., Chan G., Mitchell J., Lam J. Ultraviolet-mediated antibiotic activity of species of Compositae caused by polyacetylenic compounds. *Lloydia* **40**: 487-498 (1977).
- Trebst A. Measurement of Hill reactions and photoreduction. *Methods in enzymology* **24**: 146-165 (1972).
- Trebst A. The three-dimensional structure of the herbicide binding niche on the reaction center polipeptides of photosystem II. *Z. Naturforsch.* **426**: 742-750 (1987).
- Trebst A., Draber W. y Donner W. T. En: Miyamoto J. y Kearney P. C. (Eds.). Pesticide Chemistry: human welfare and the environment. Vol. 3. Pergamon Press Oxford. pp 85-90 (1983).
- Vallejos R. H. y Andero C. S. Alkaloids as inhibitors of photophosphorylation in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **333**: 141-148 (1974).
- Van Rennsen J. J. S. y Snel J. F. H. Regulation of photosynthetic electron transport by bicarbonate, formate and herbicides in isolated broken and intact chloroplasts. *Photos. Res.* **6**:231-246 (1985).
- Van Rennsen J. J. S. Herbicides interacting with Photosystem II. pp 21-36 (1989).
- Van Rennsen J. J. S. y Snel J. F. H. Regulation of photosynthetic electron transport by bicarbonate, formate and herbicides in isolated broken and intact chloroplasts. *Photosyn. Res.* **6**: 231-246 (1985).

- Velthuys B. R. Electron dependent competition between plastoquinone and inhibitors for binding to photosystem II. *FEBS Lett.*, **126**: 277-281 (1981).
- Vernon L. P. y Shaw E. R. Photoreduction of 2,6-dichlorophenol-indophenol by diphenylcarbazide: a photosystem Z reaction catalized by Tris-washed chloroplast and subchloroplast fragments. *Plant Physiol.* **44**:1645 (1969).
-
- Wat C. K., Biswas R. K., Graham E. A., Bohm L., Towers N y Waygood E. R. Ultraviolet-mediated cytotoxic activity of phenylheptatriyne from *Bidens pilosa* L. *J. Nat. Prod.* **42**: 103-111 (1979).
- Wisdom C. S. Use of chemical variation and predation as plant defenses by *Encelia farinosa* against a specialist herbivore. *J. Chem. Ecol.* **11**: 1553-1565 (1985).
- Wisdom C. y Rodríguez E. Quantitative variation of the sesquiterpene lactones and chromenes of *Encelia farinosa*. *Biochem. Syst. Ecol.* **10**: 43 (1982).
- Wisdom C. S., Smiley J. T. y Rodríguez E. Toxicity and deterency of sesquiterpene lactones and chromenes to the corn earworm (*Lepidoptera: noctuidae*). *J. Econ. Entomol.* **76**: 993-998 (1983).
- Wolf R. B., Spencer G. F. y Plattner R. D. Benzoxazolinone, 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one, and its glucoside from *Acanthus mollis* seeds inhibit velvetleaf germination and growth. *J. Nat. Prod.* **48**: 59-63 (1985).
- Worsham A.D. Current and potential techniques using allelopathy as an aid in weed management. En: Phytochemical ecology: allelochemicals, mycotoxins and insect pheromones and alomones. C.H. Chou, G.R. Waller (eds.). Institute of Botany Academia Sinica Monograph Series No. 9
- Zalkow L. H., Burke N., Cabat G. y Grula E. A. *J. Med. Chem.* **5**, 1342 (1962).
- Zalkow L. H., Ekpo B. A., Gelbaum L. T., Harris R. N., Keinan E., Novak J. R., Ramming C. T. y Van Derveer D. The benzofurans of *Isocoma wrightii*. Structure and stereochemistry. *J. Nat. Prod.* **62**: 203-219 (1979).

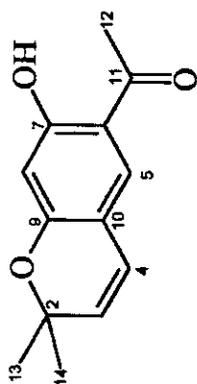


Espectro 1



13
14

12



OH
12.7168

5
7.3429

8
6.3285

4
6.3003

3
5.6595

5
5.6595

12

10

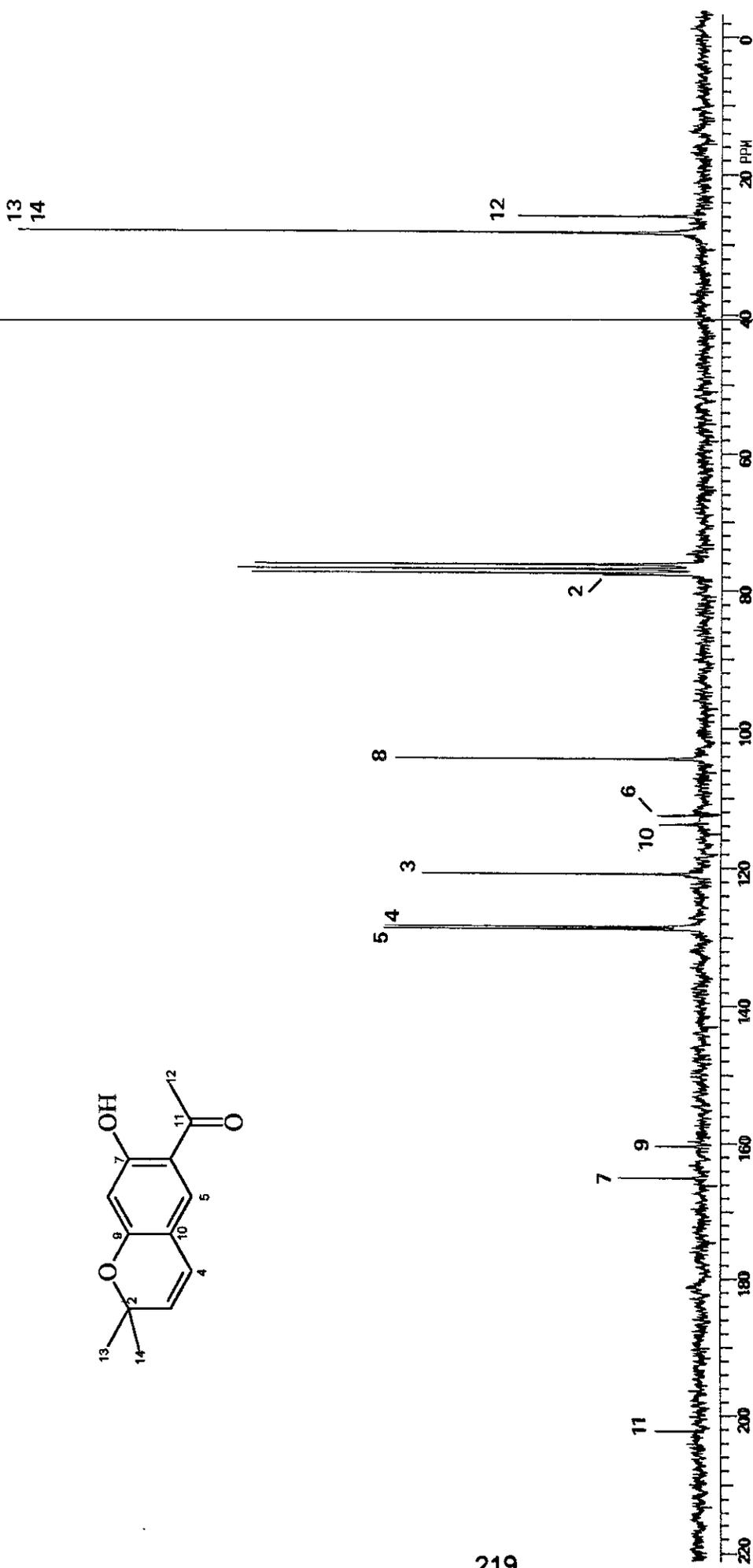
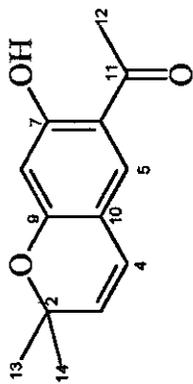
8

6

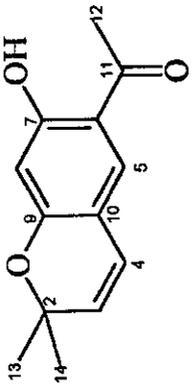
4

2 ppm

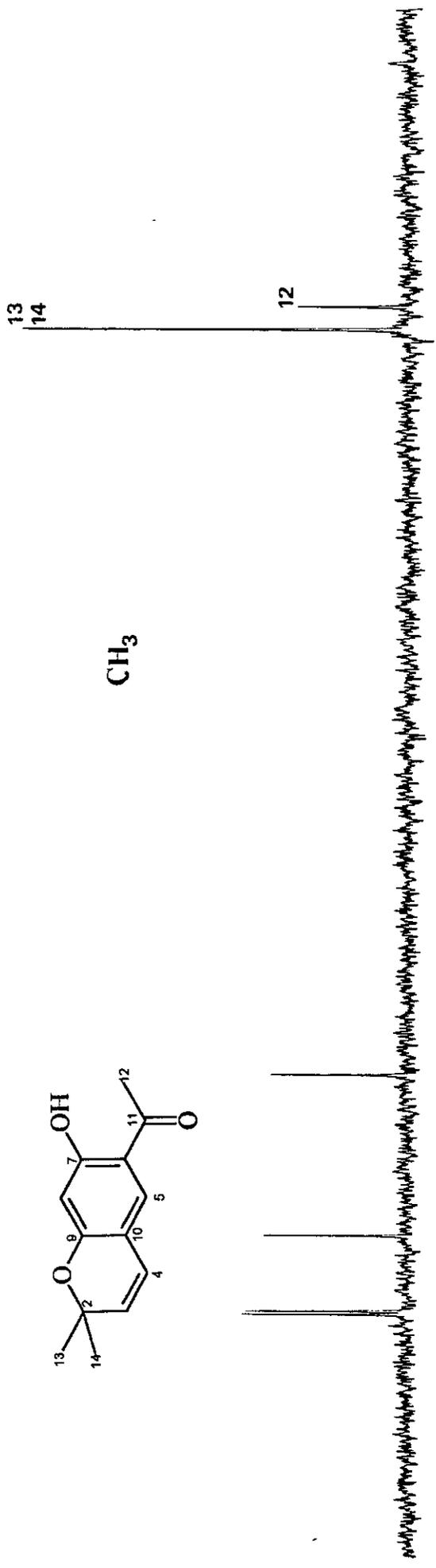
0



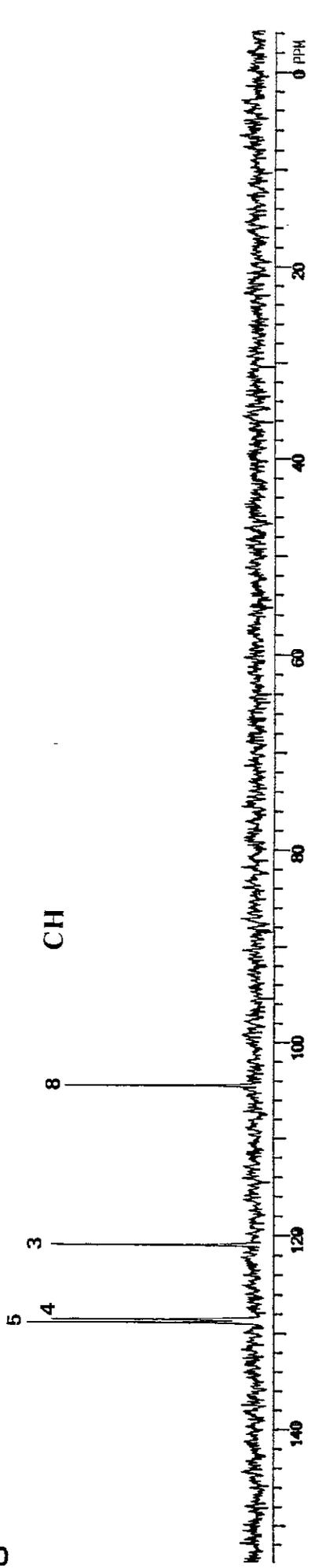
Espectro 3



CH₃

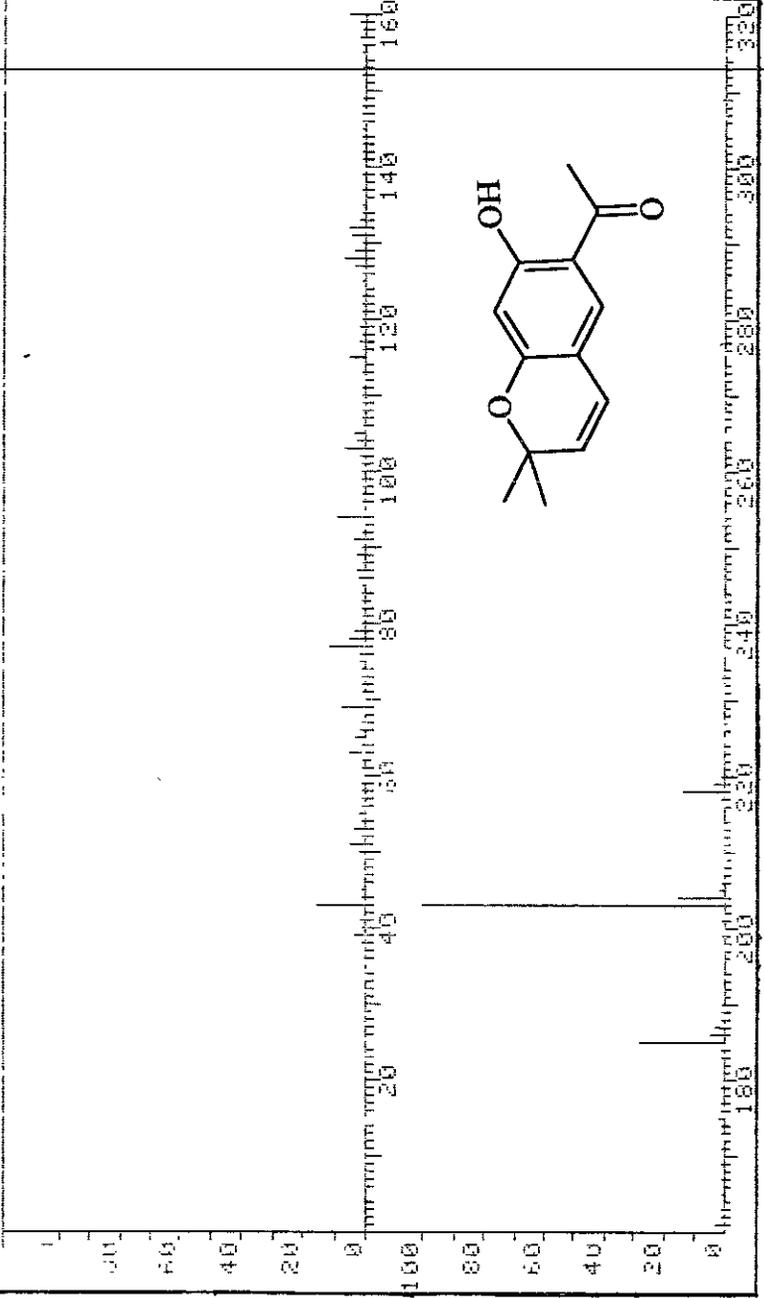


CH

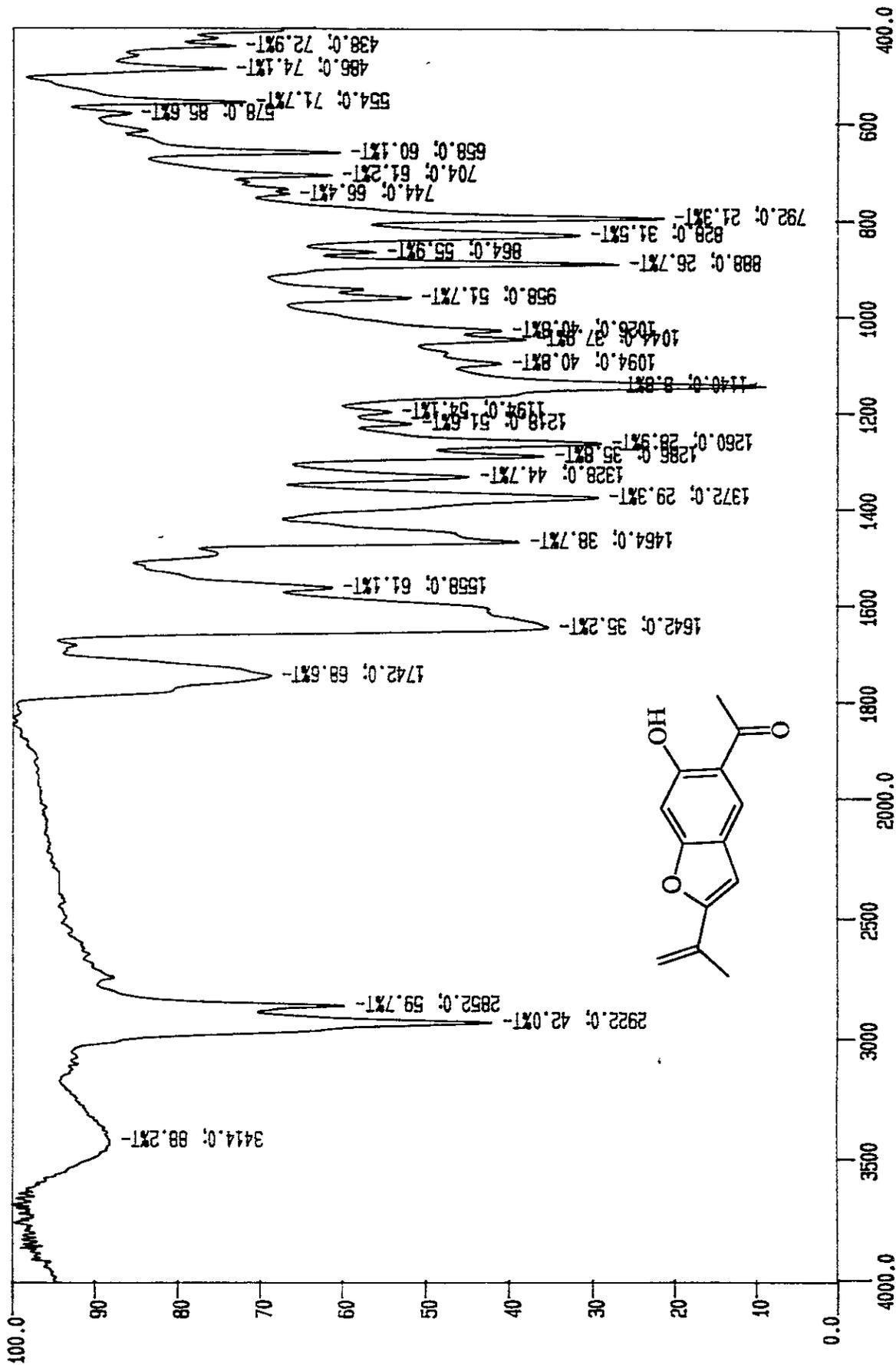


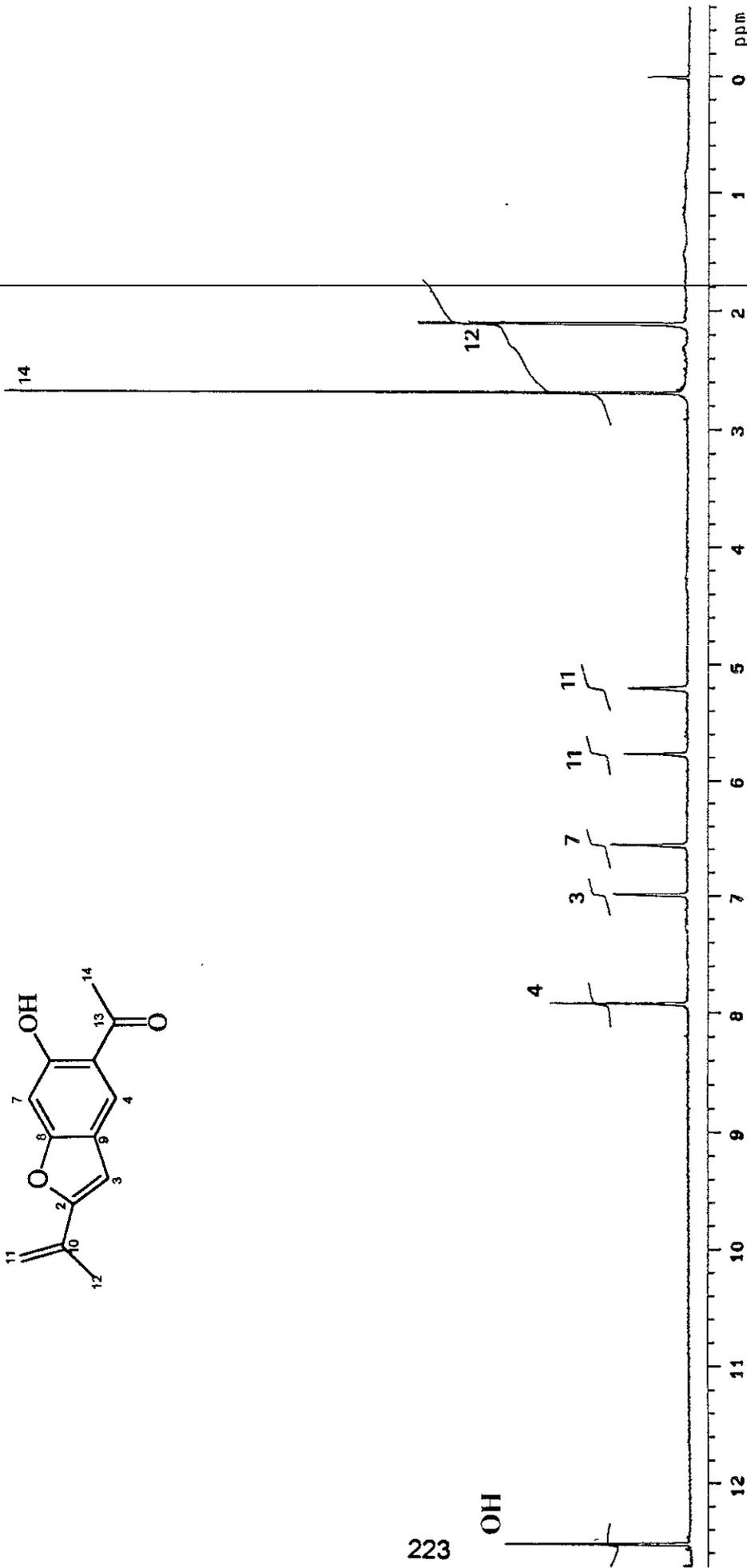
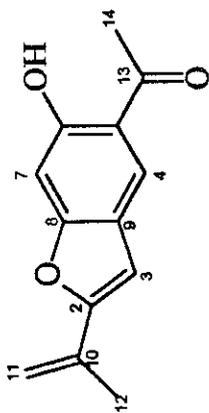
Espectro 4

FWH 5181 SPECTRUM 5 RETENTION TIME .4
 LRGST 4: 203.2, 100.0 85.2, 07.9 43.2, 15.2 204.2, 15.0
 LRST 4: 220.2, .4 PAGE 1 Y = 1.00

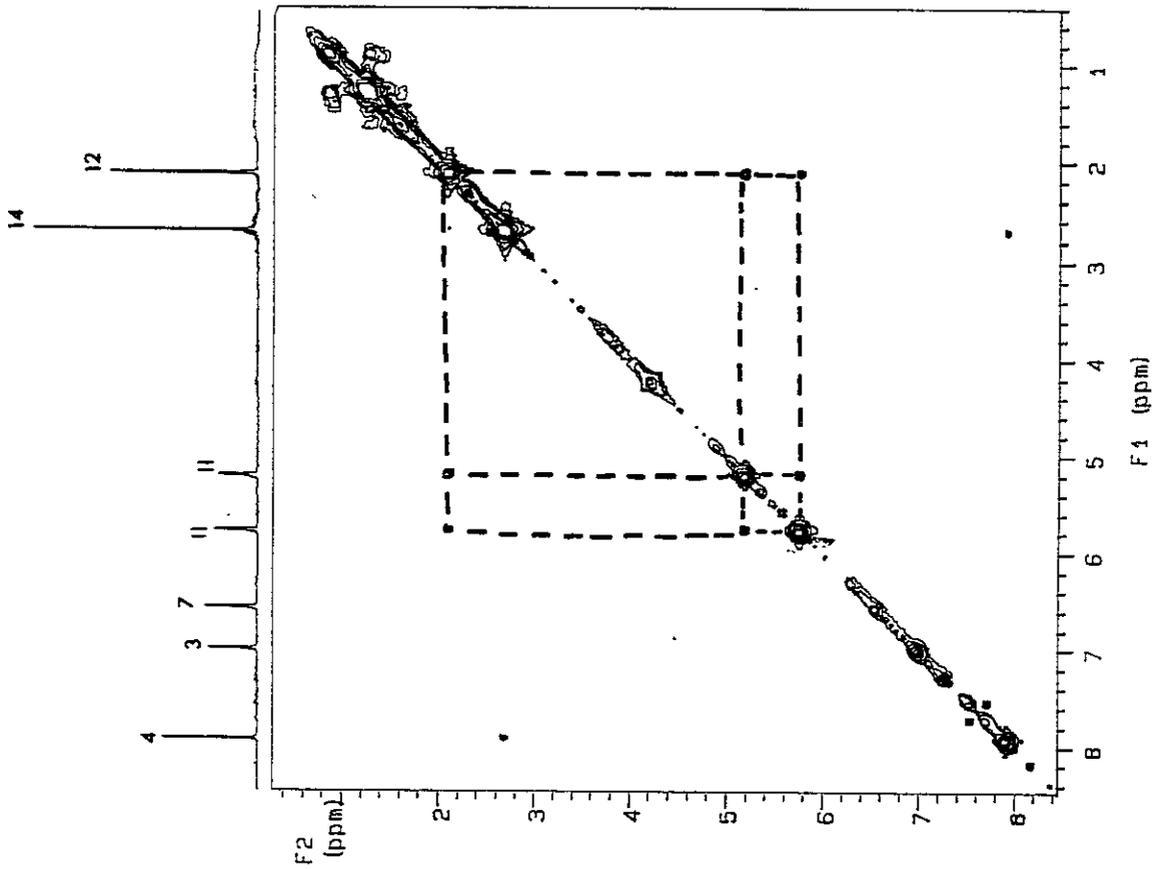
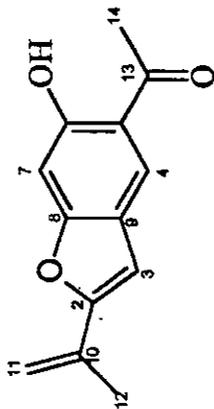


Espectro 5

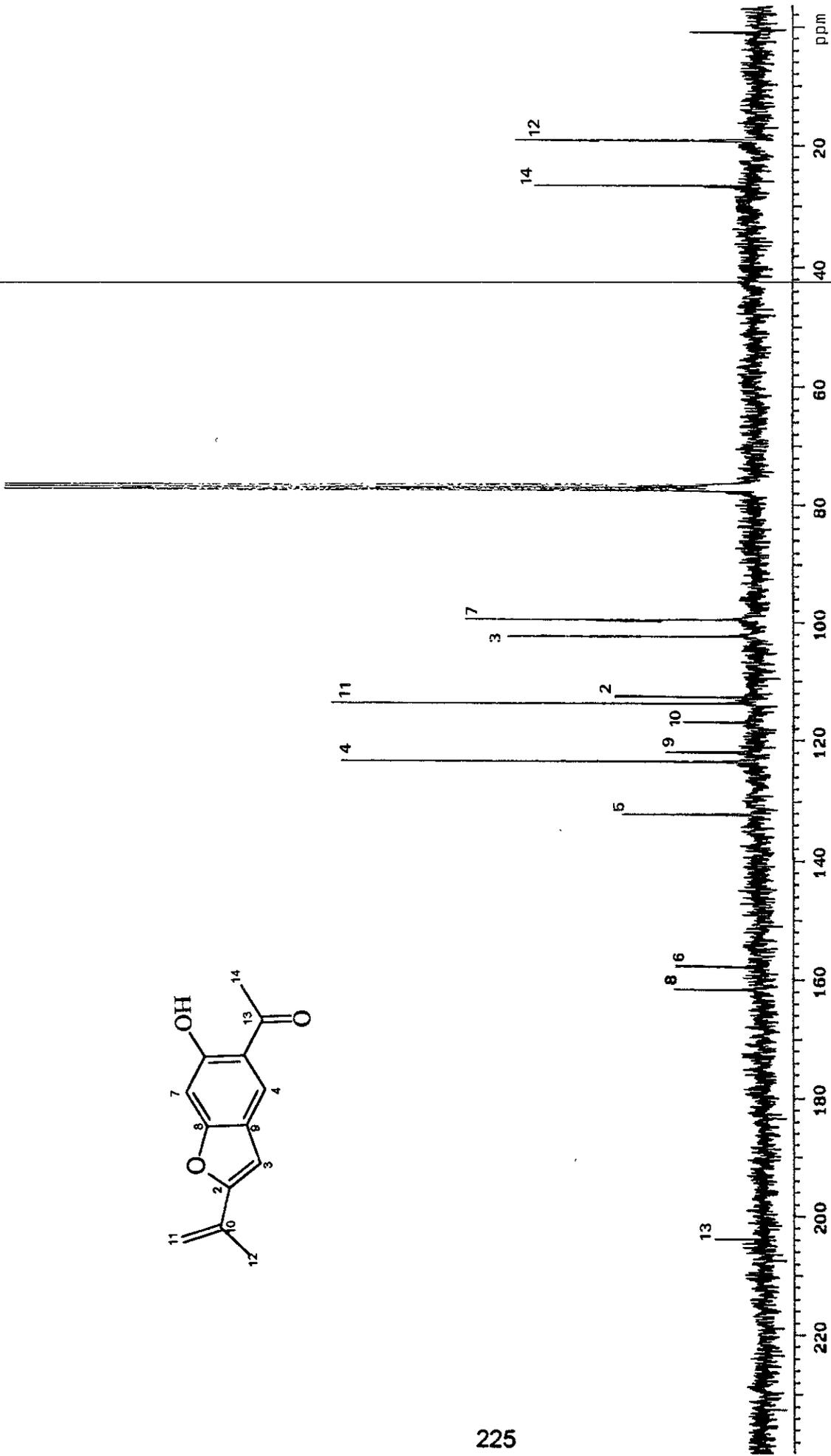
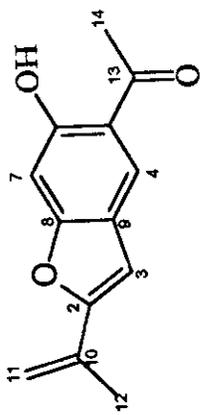




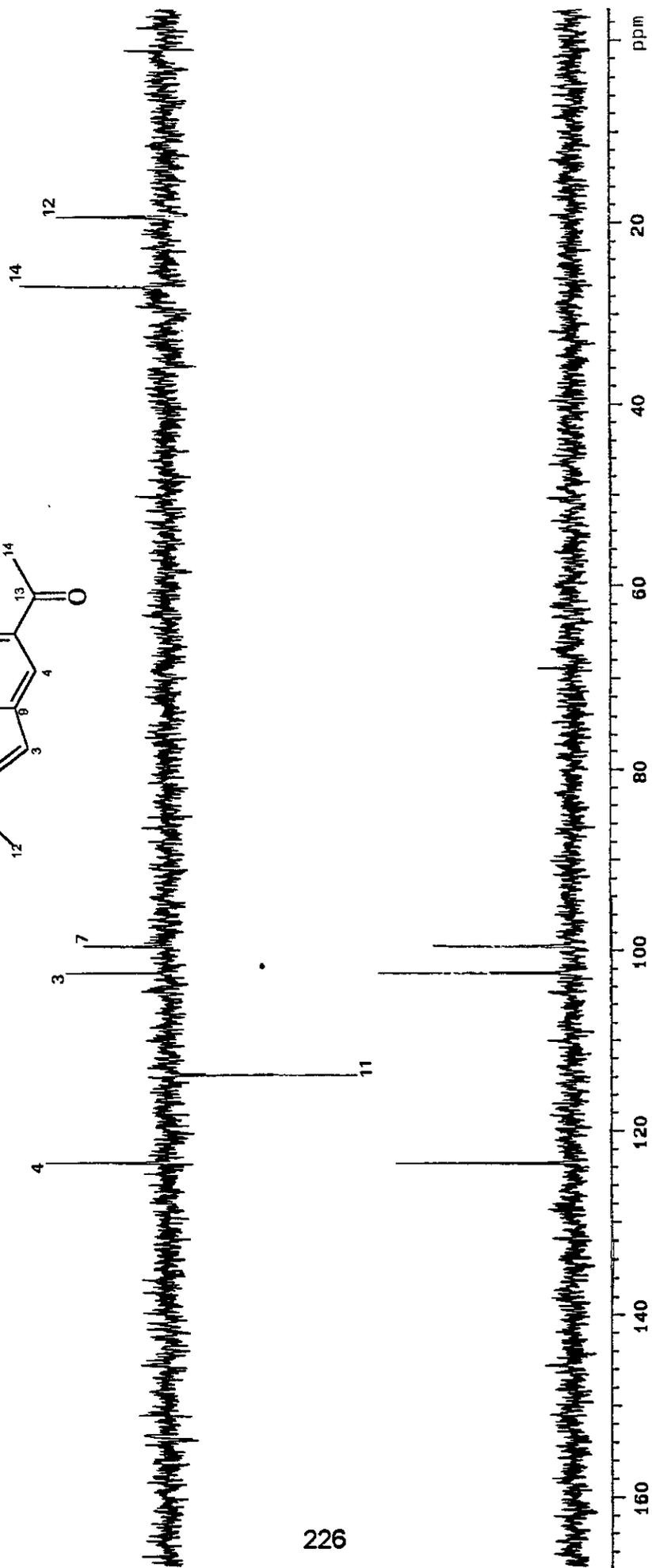
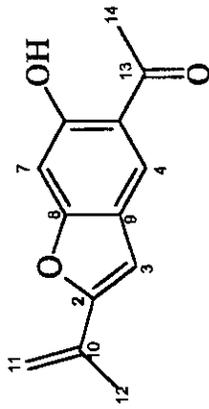
Espectro 7



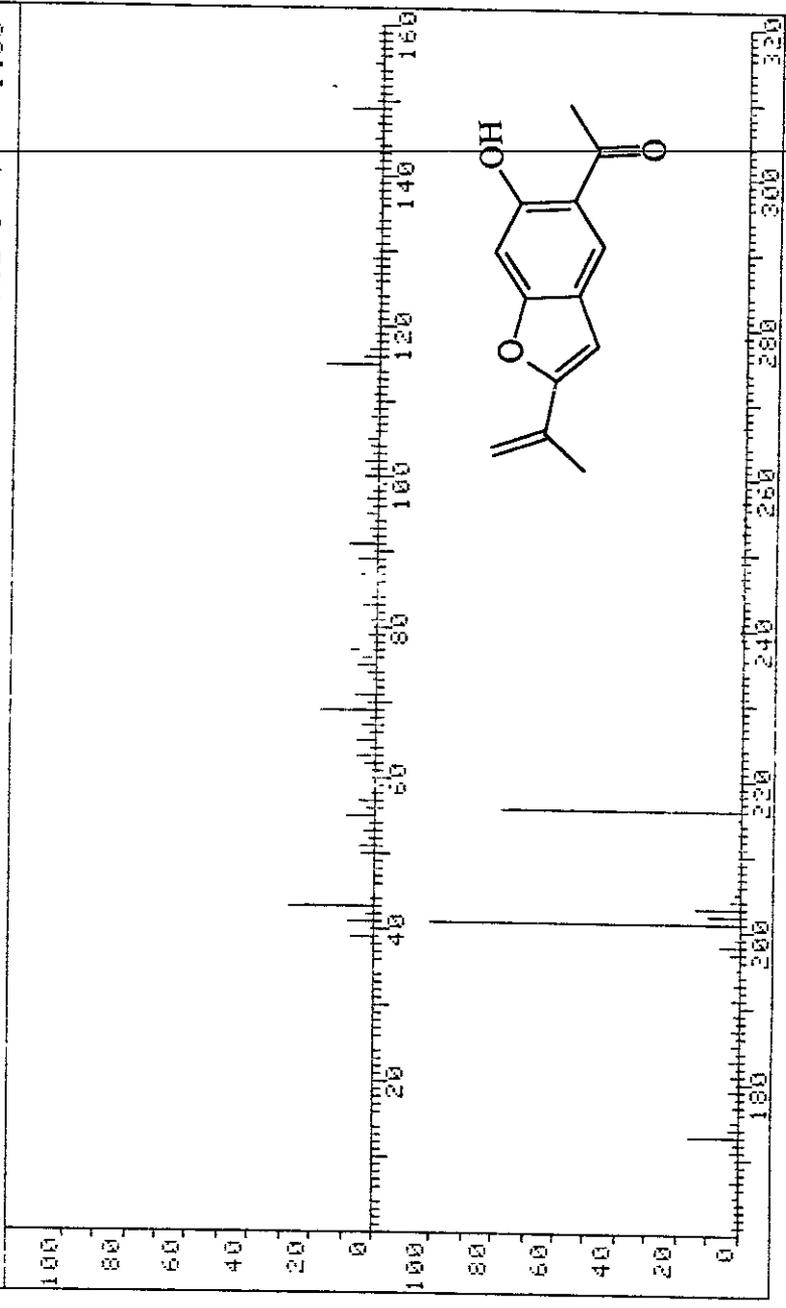
Espectro 8



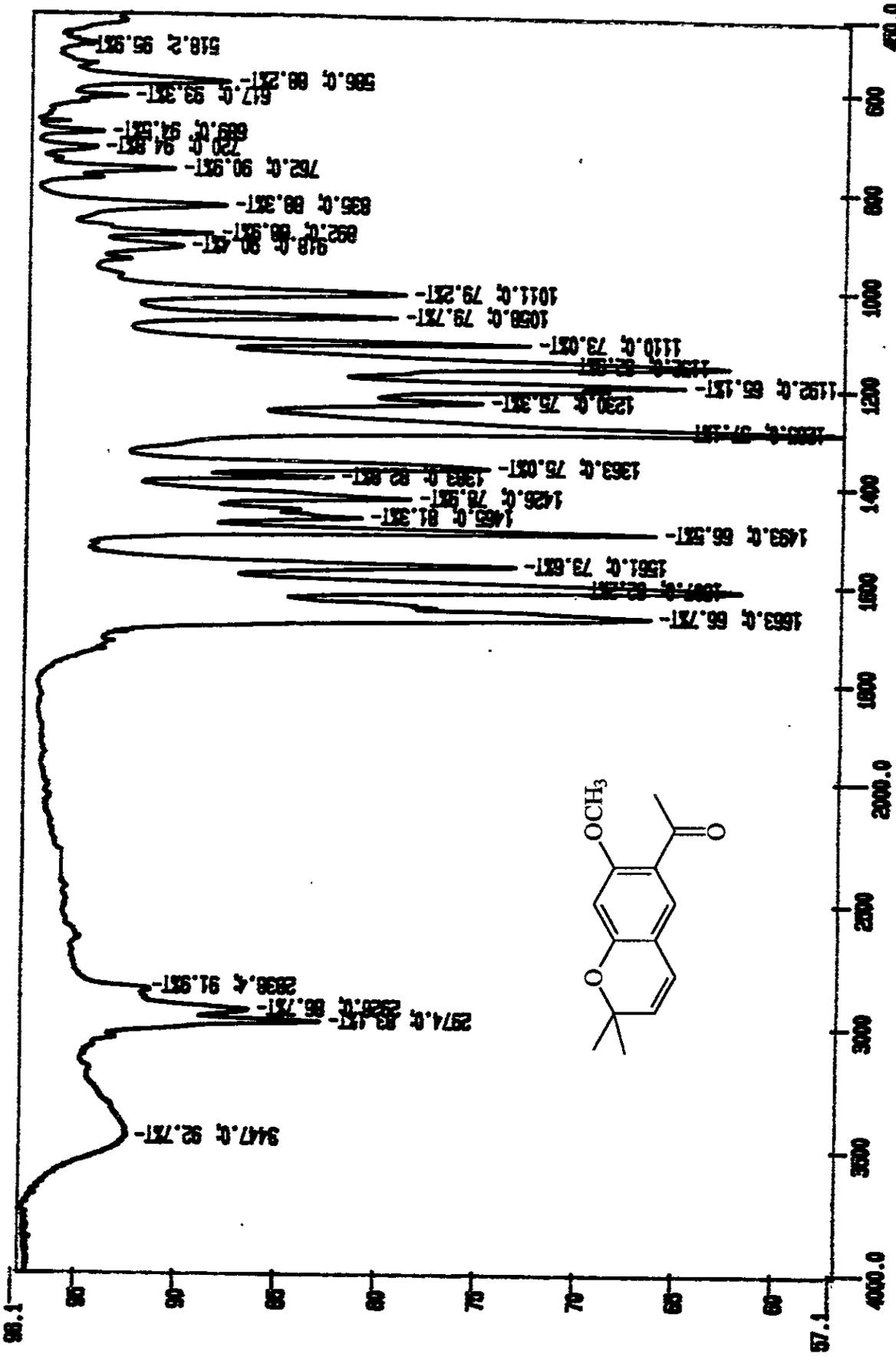
Espectro 9

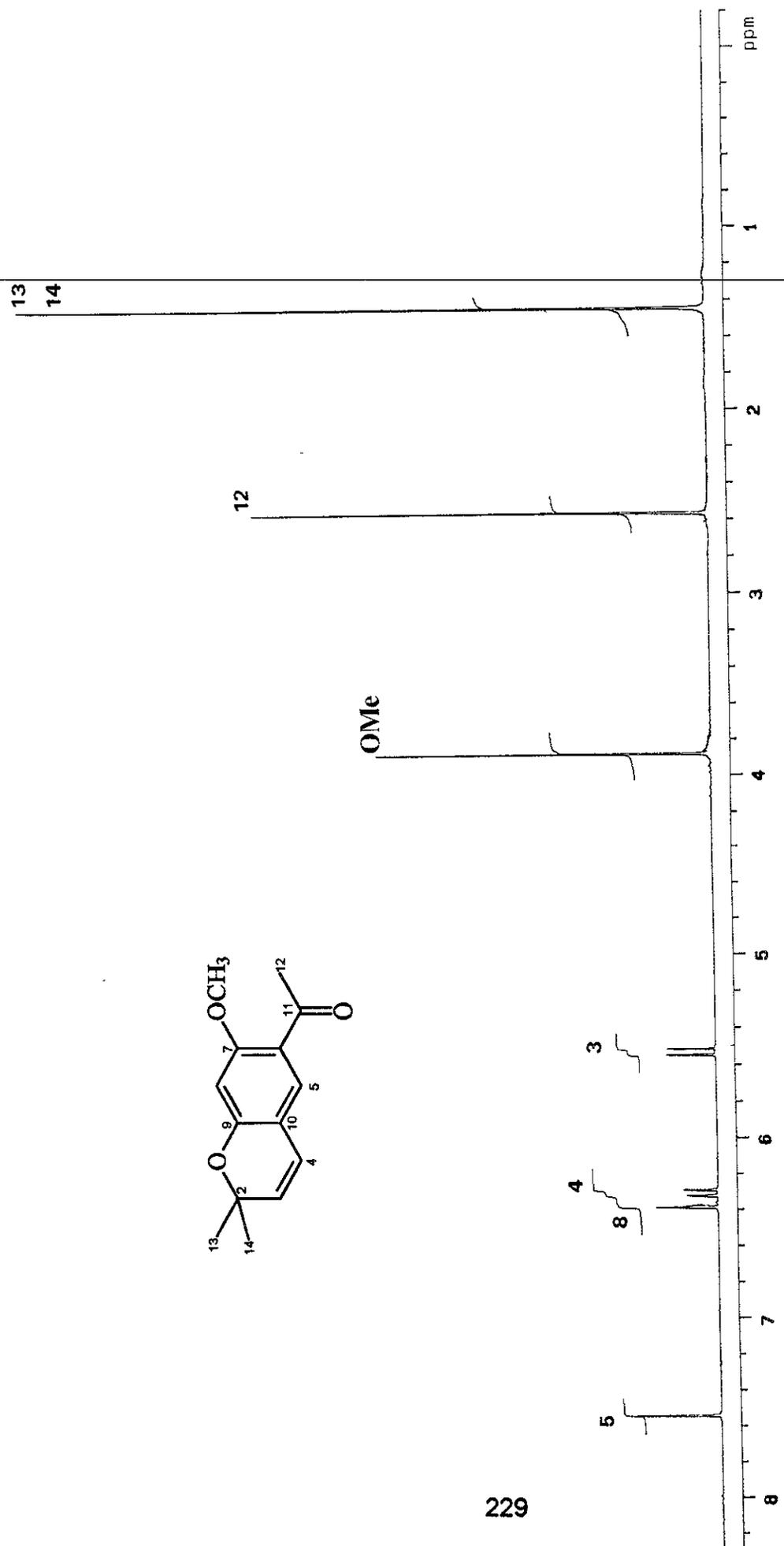
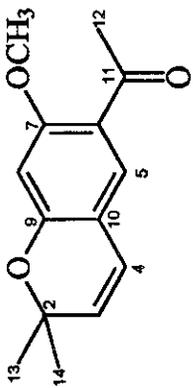


LAPG.T 4: 201.2, 166.0 216.2, 15.0 43.2, 27.2 69.2, 17.7
LRET 4: PAGE 1 Y = 1.00

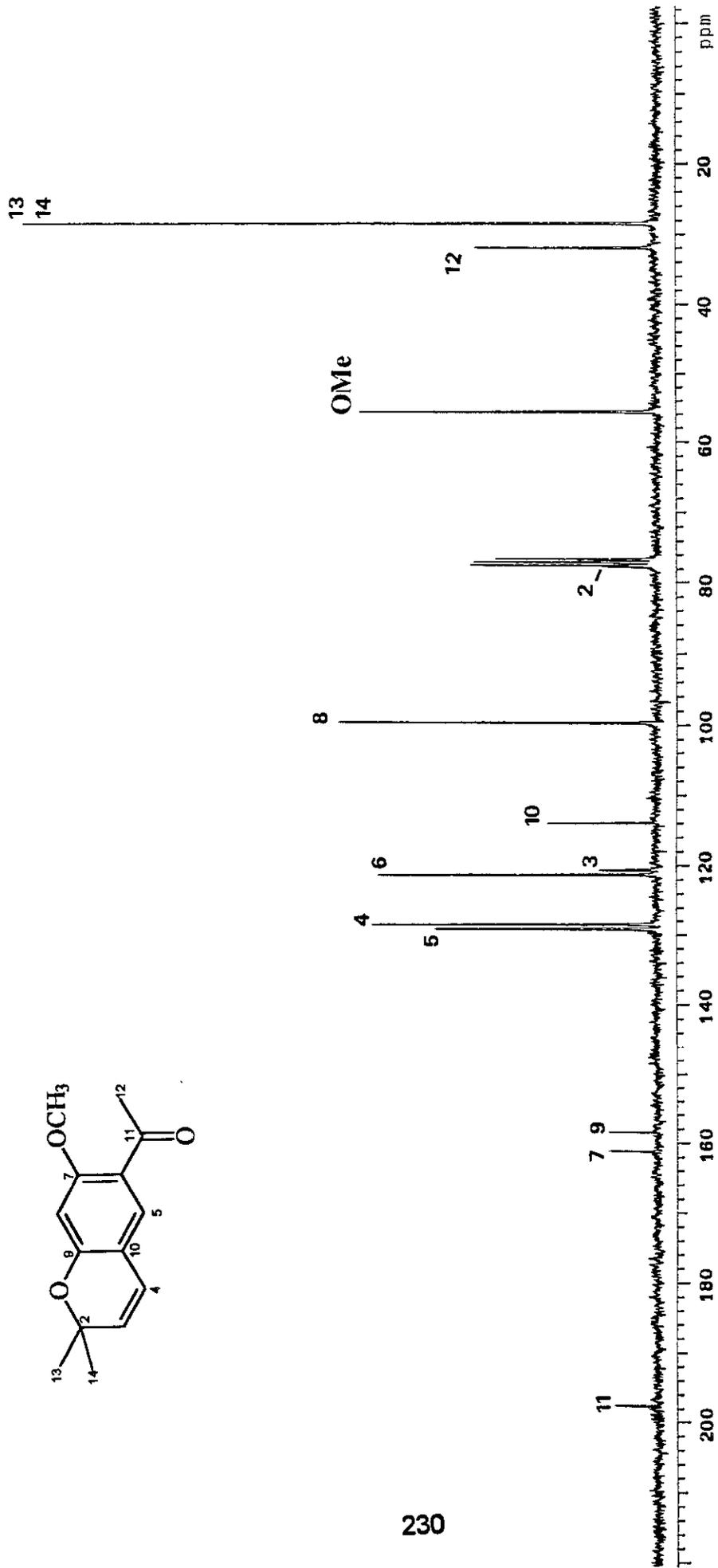
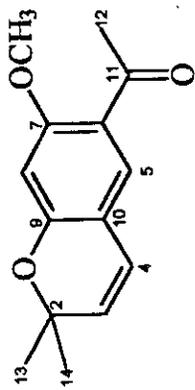


Espectro 11





Espectro 13



CH₃

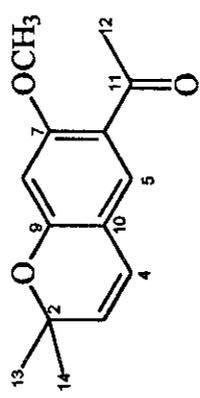
13
14

OMe

12

CH

231



4
5

3

8

140

120

100

80

60

40

20

ppm

Espectro 15

[Mass Spectrum]
Data : enecalina
Sample : *

Note : Dra-Rachel-Mata-AX505

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.28 min Scan# : (8,16)

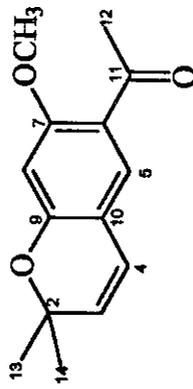
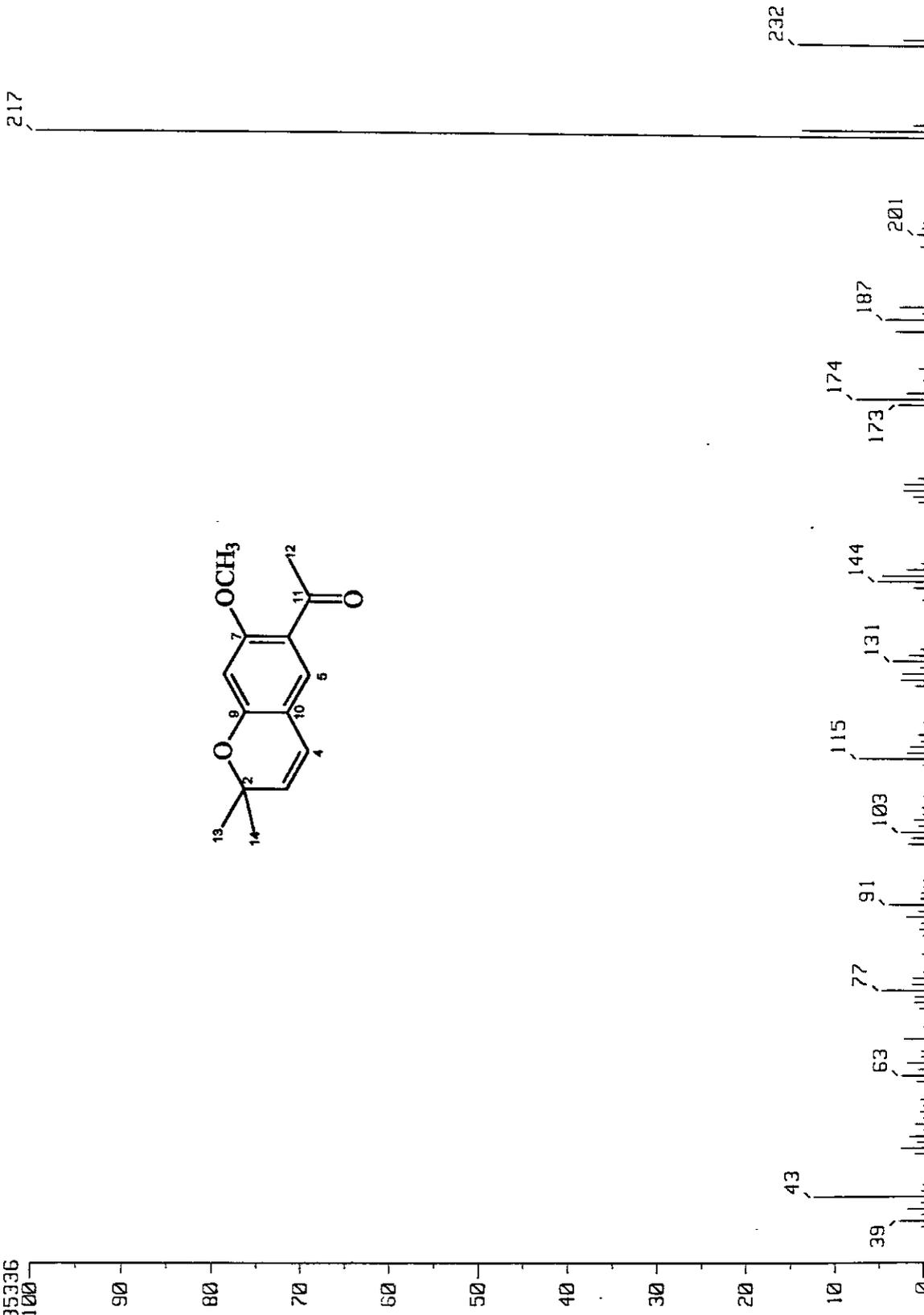
BP : m/z 217.0000 Int. : 361.00

Output m/z range : 33.0000 to 285.5140

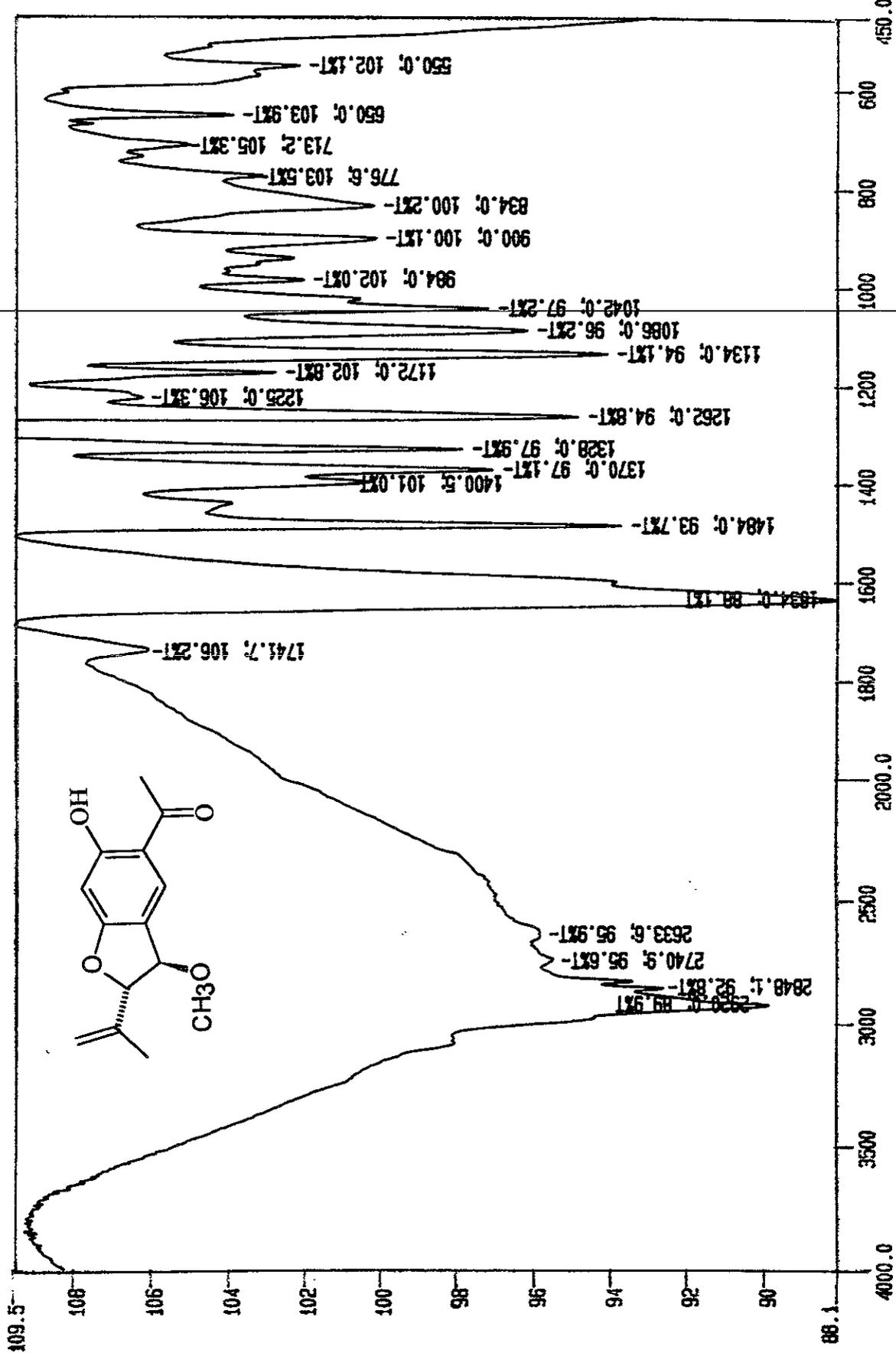
3785336

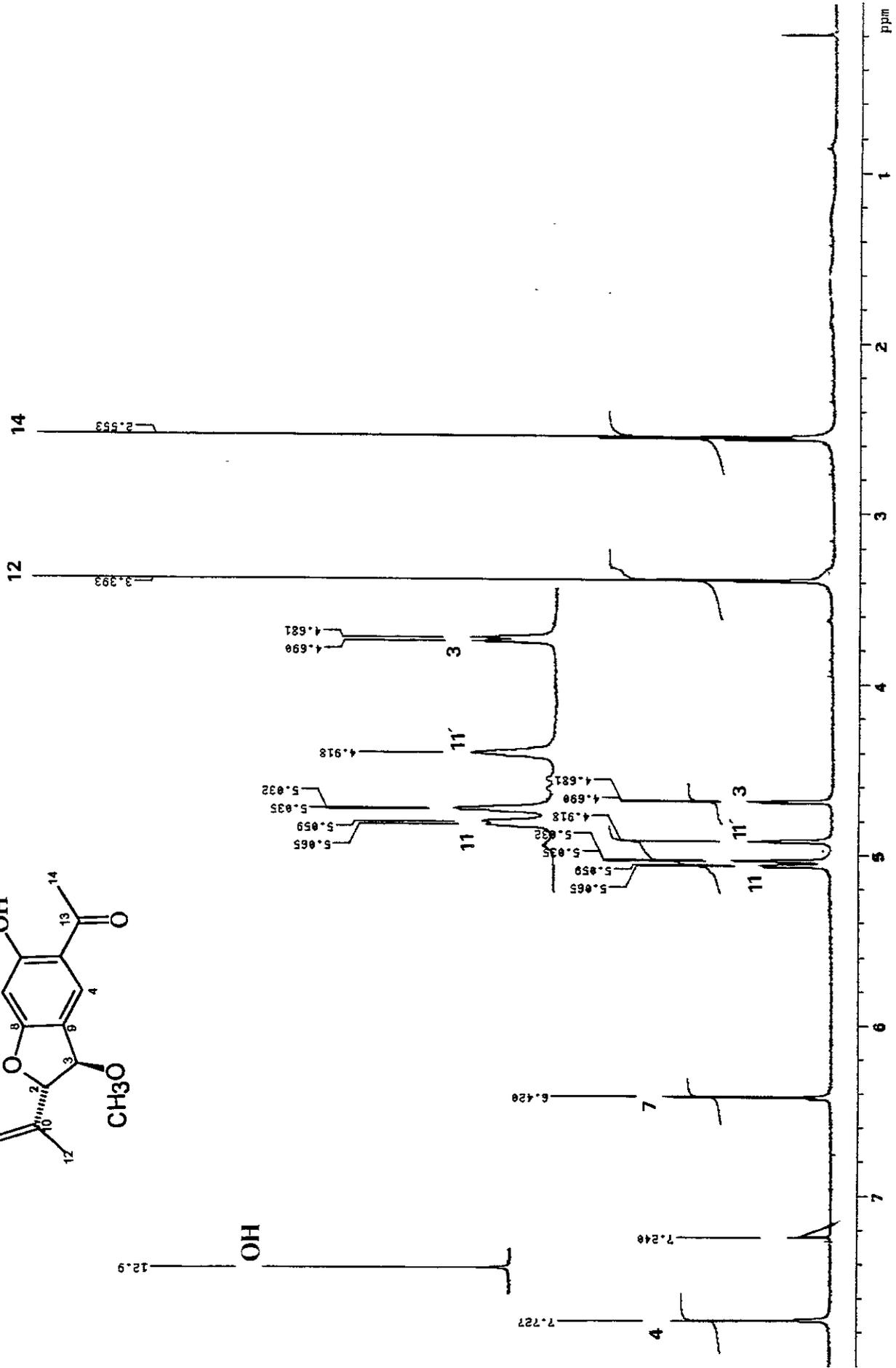
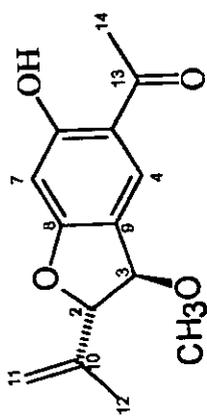
Temp : 57.2 deg.C

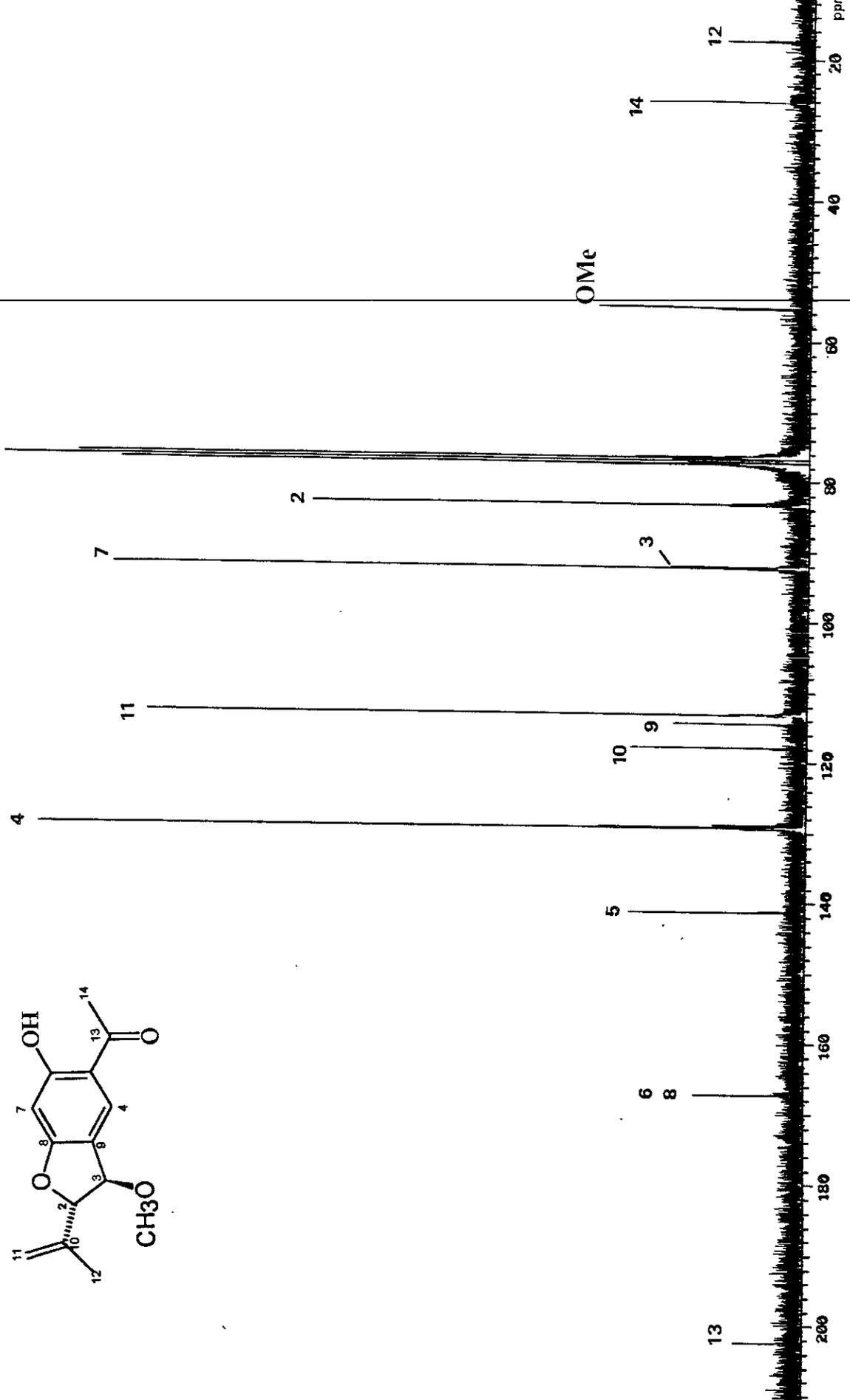
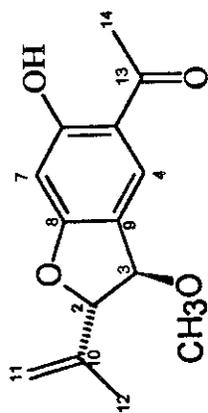
Cut Level : 0.00 %

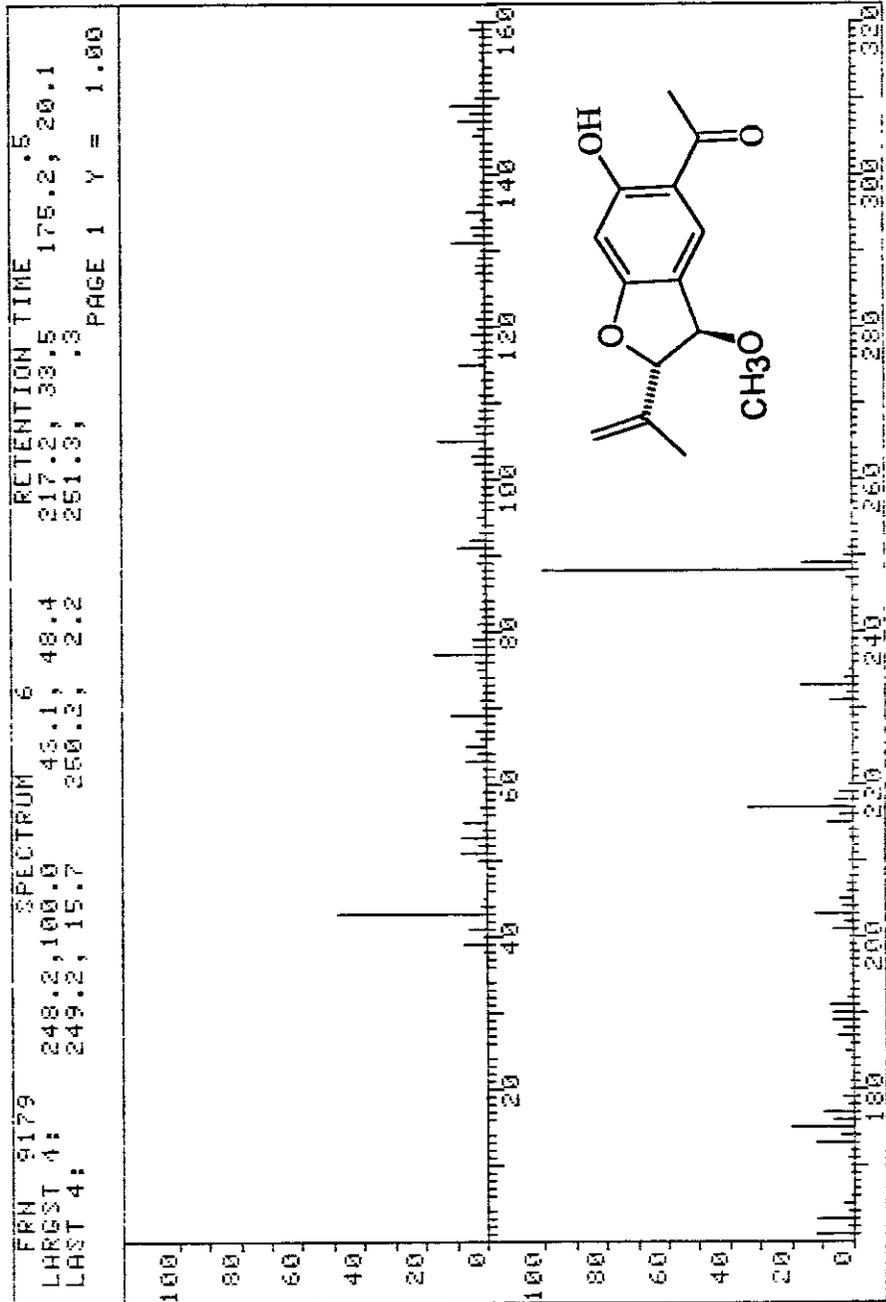


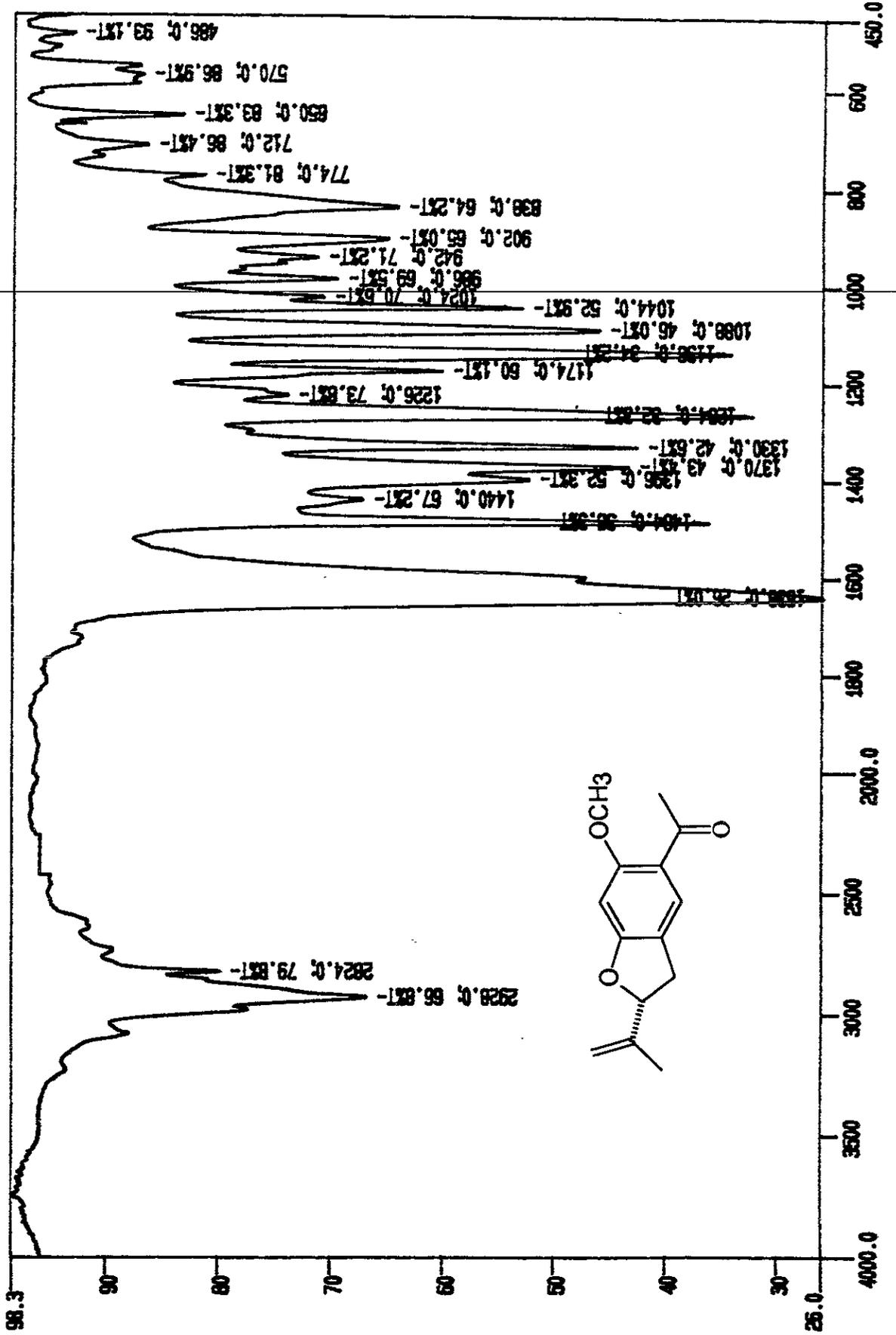
Espectro 17



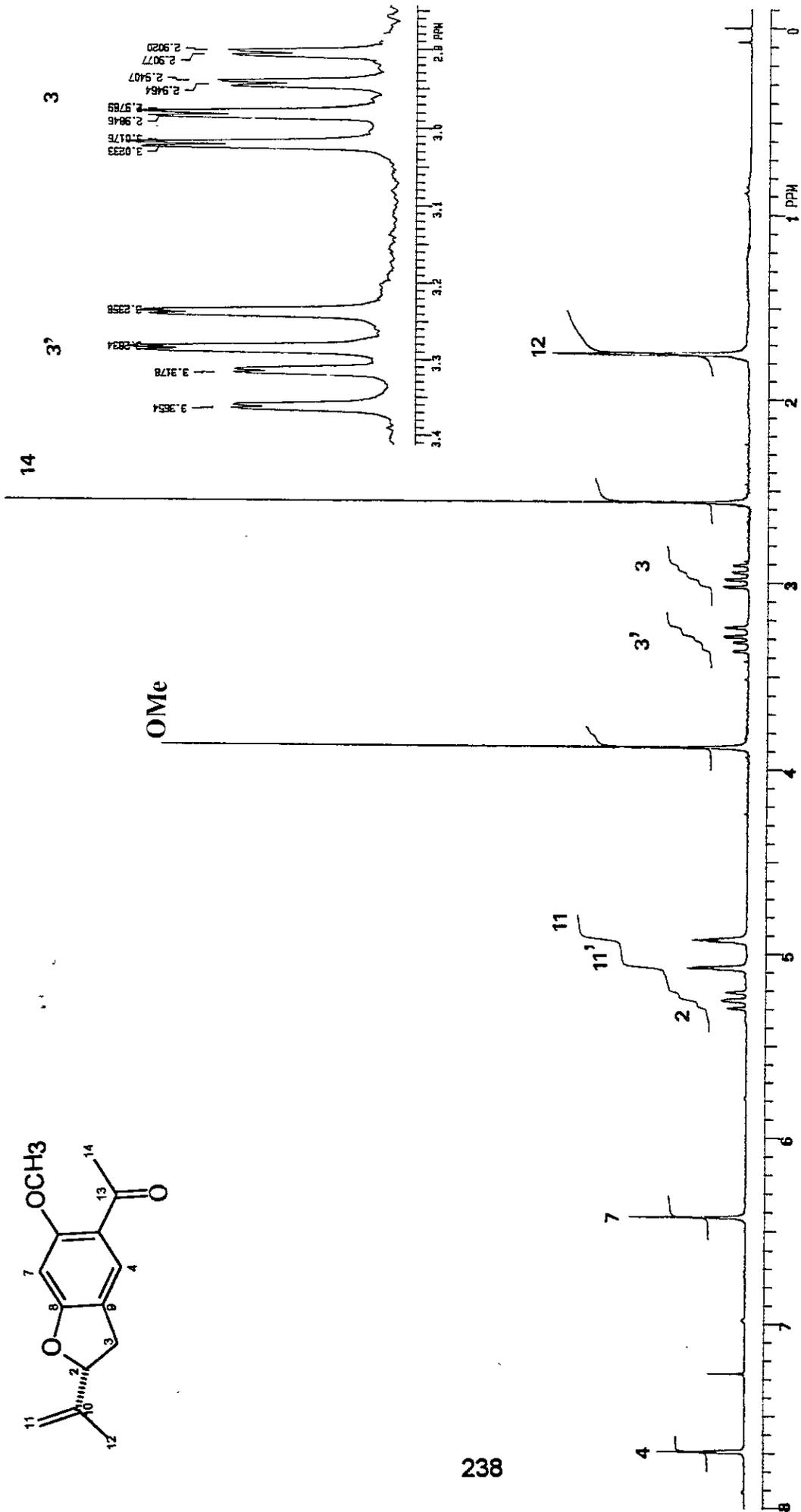
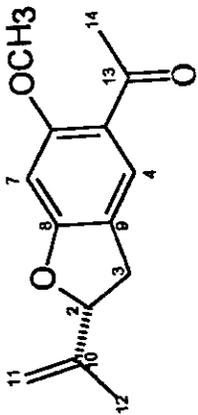




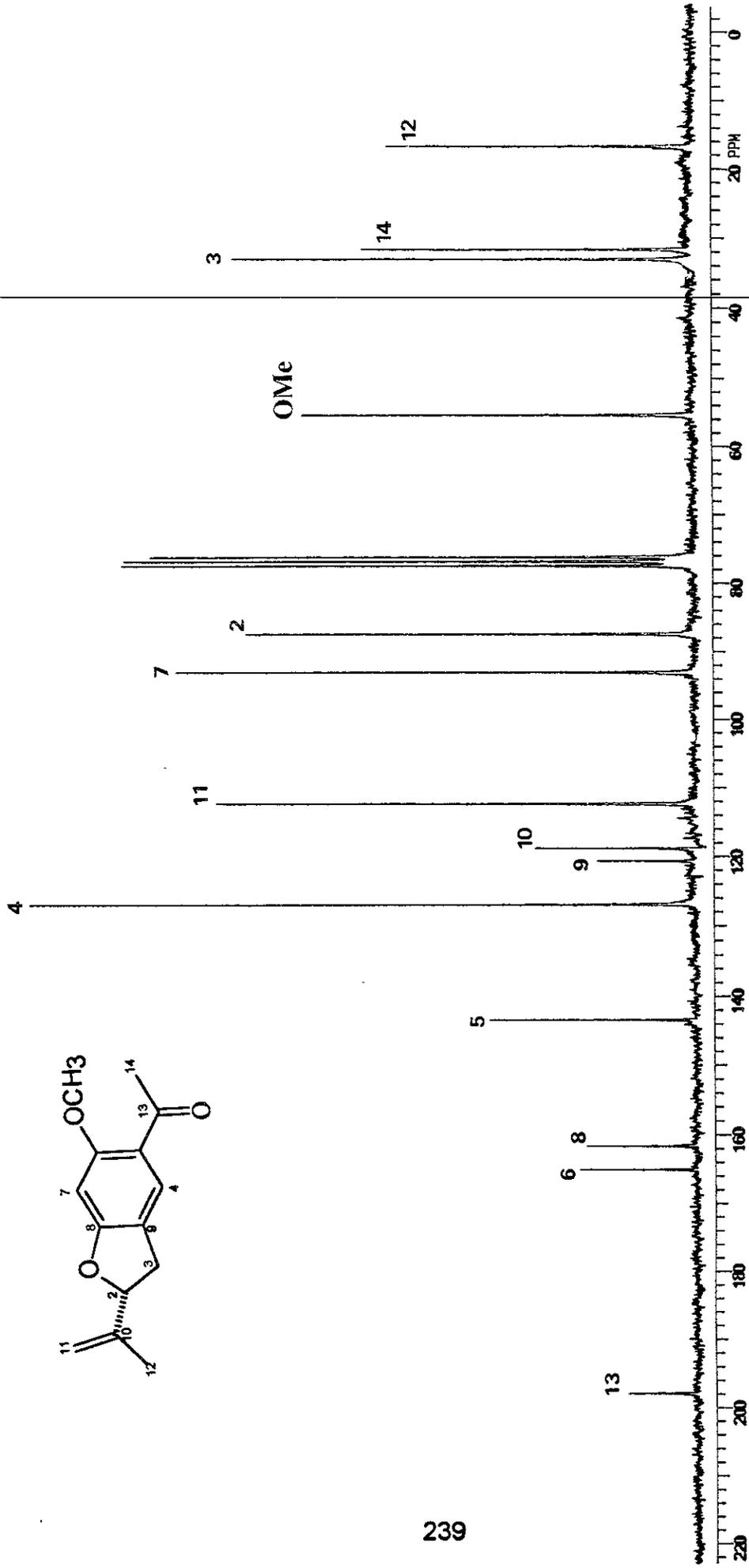




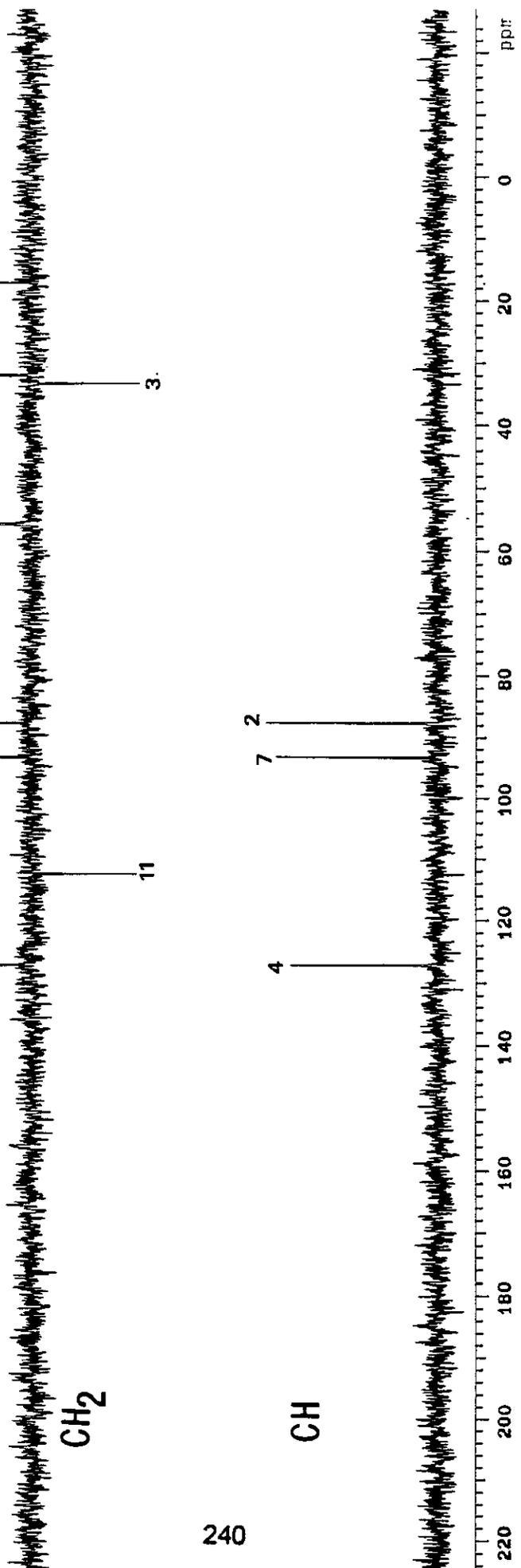
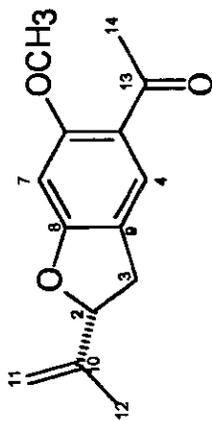
Espectro 21



Espectro 22



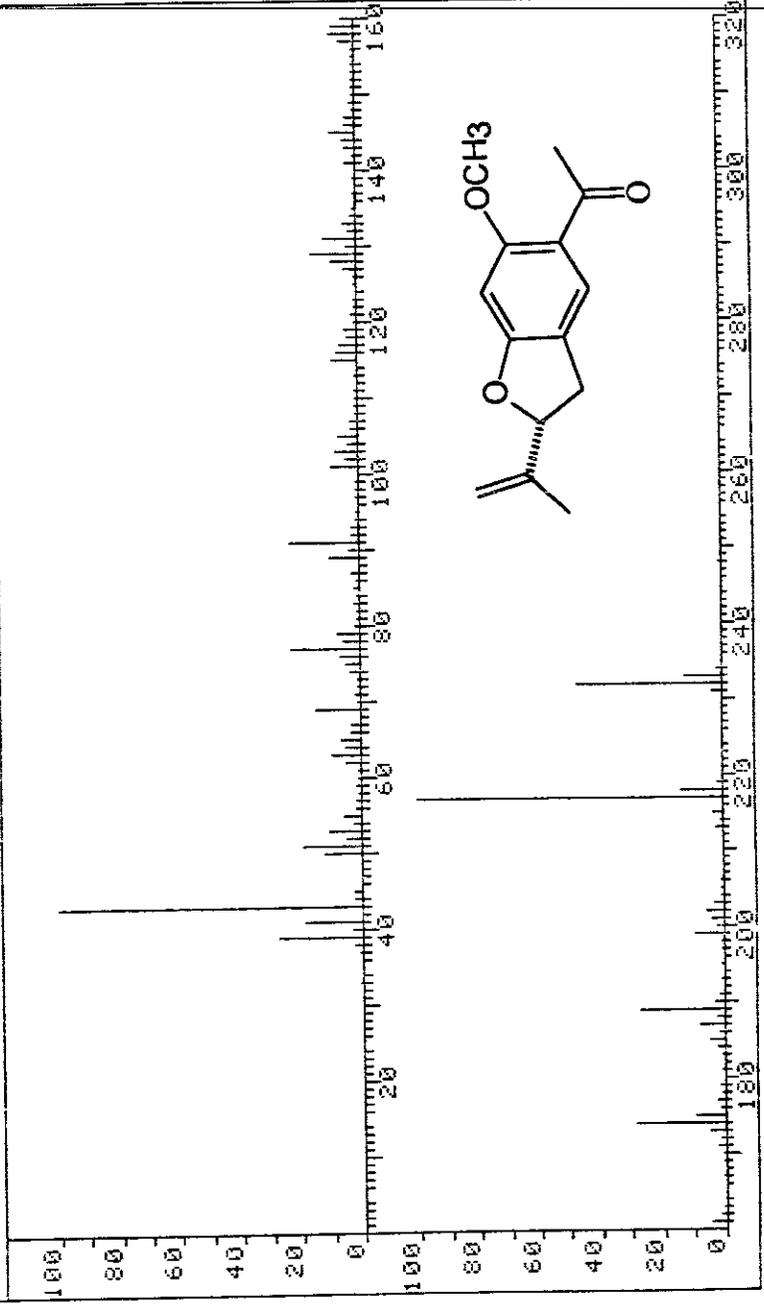
Espectro 23



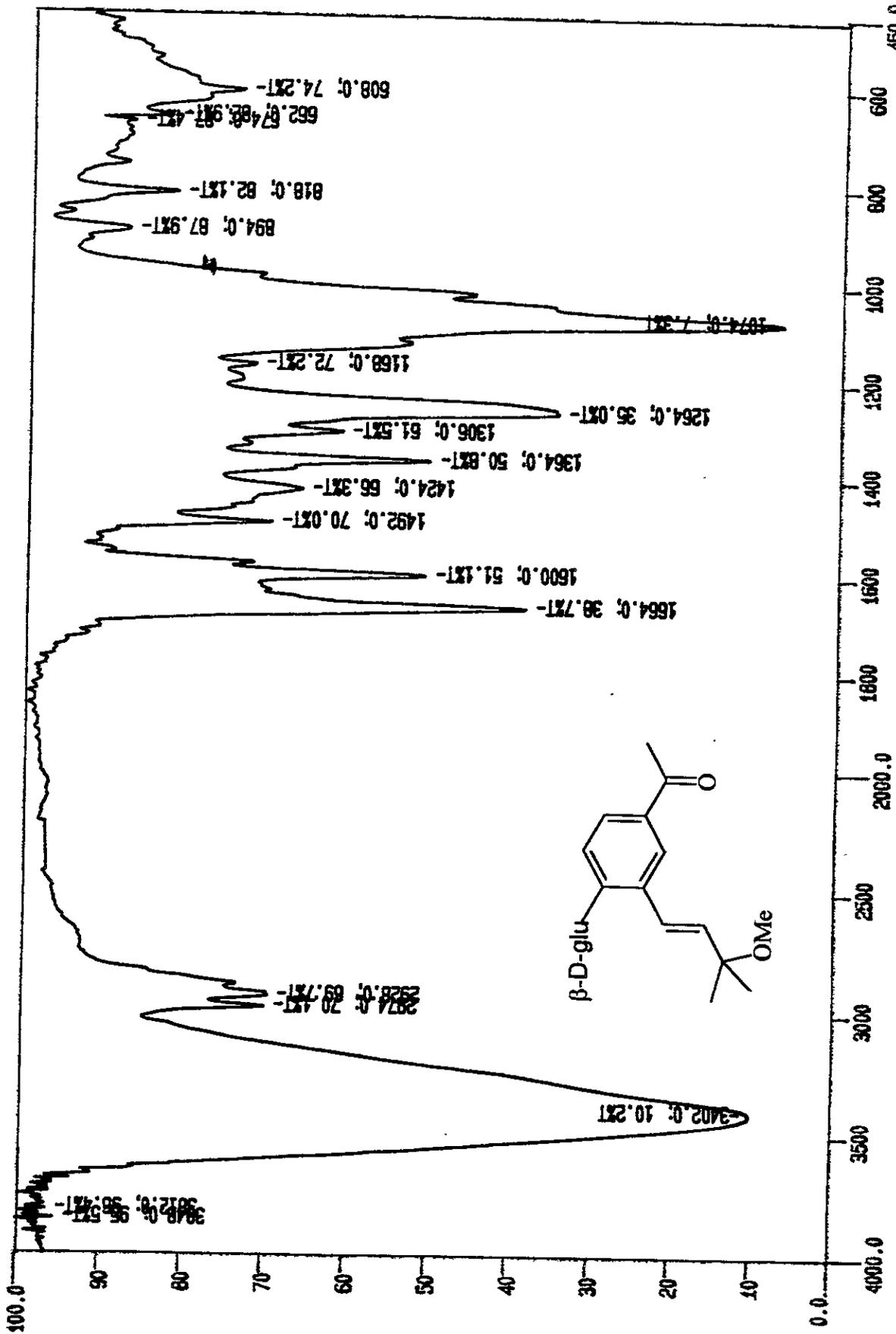
CH₂

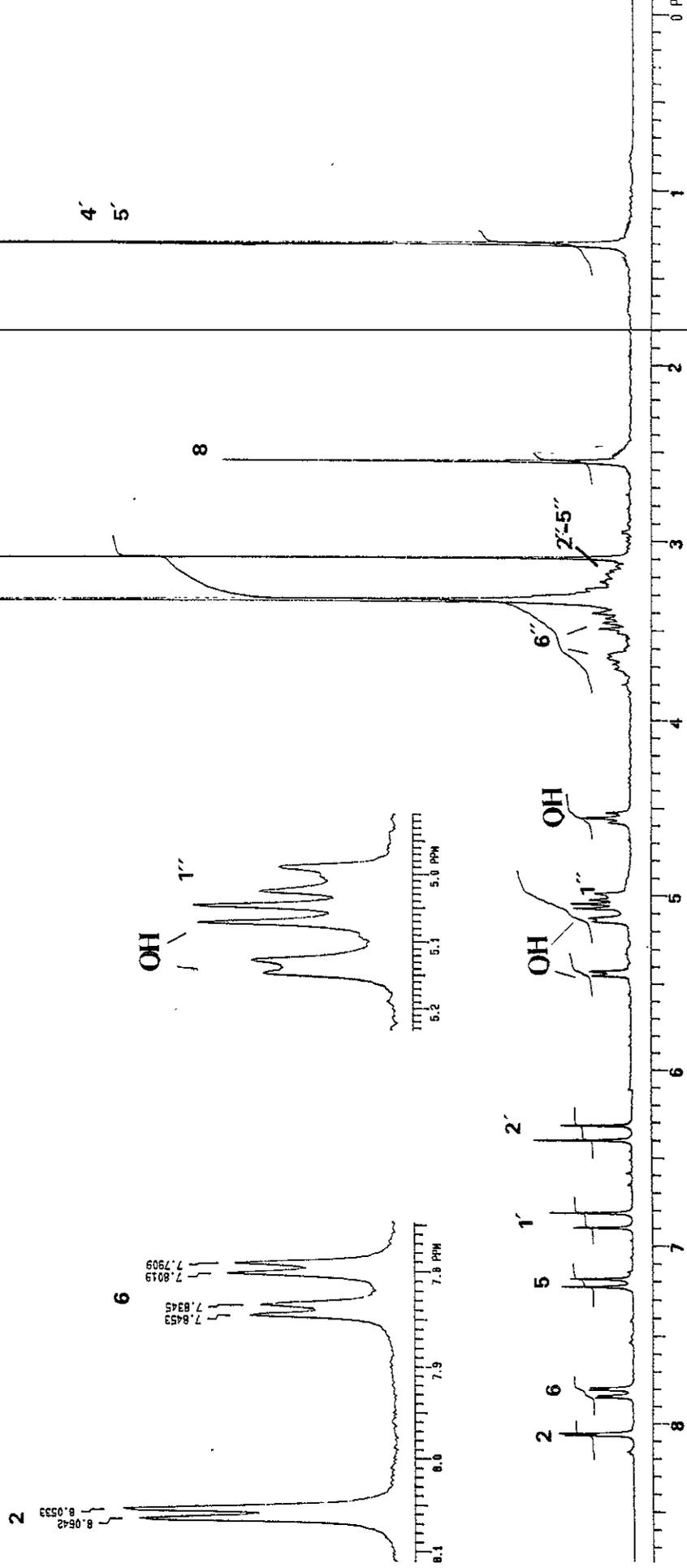
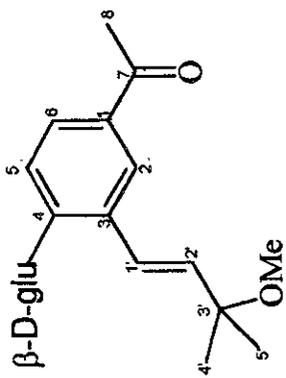
CH

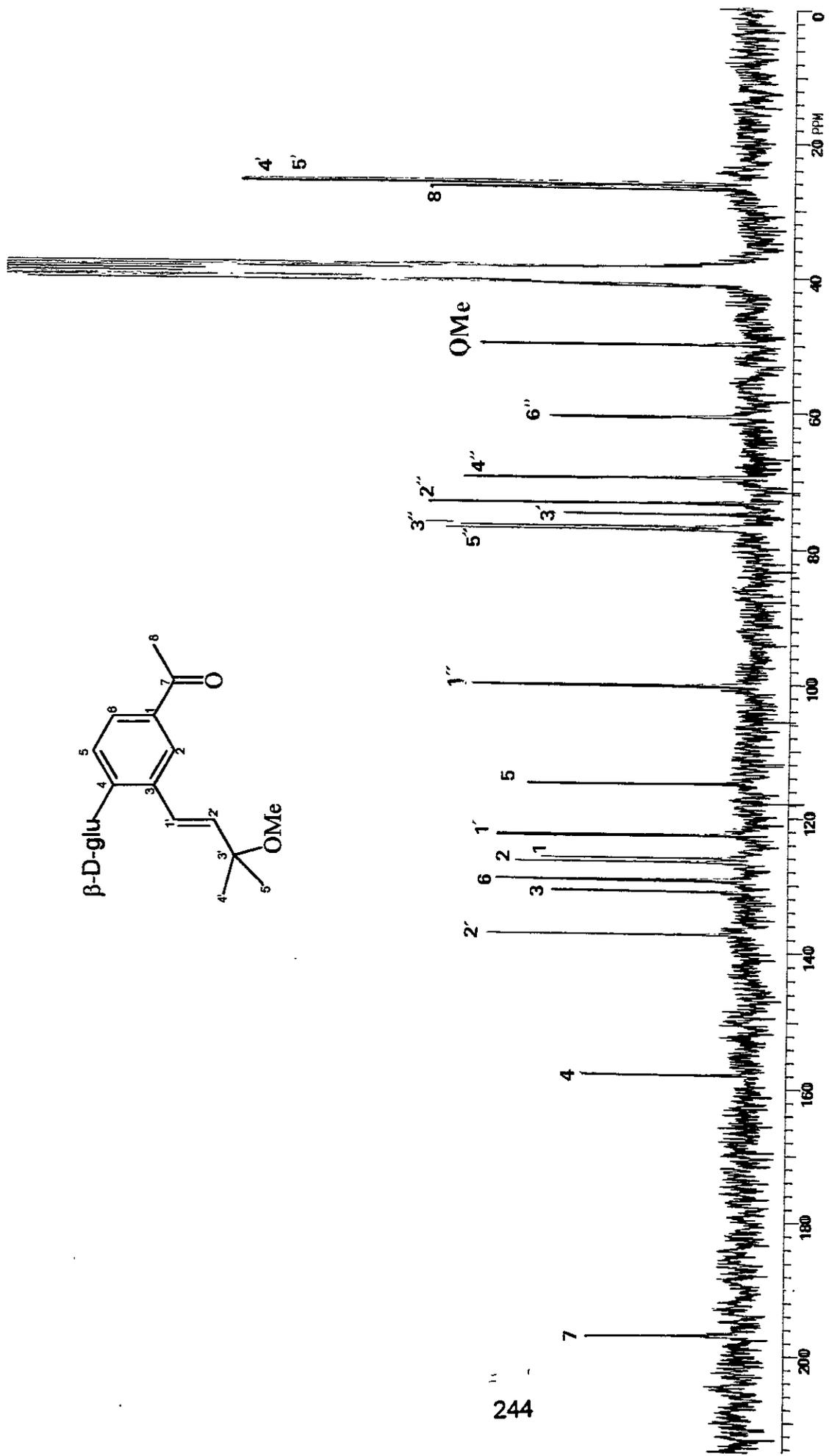
FRN 9175 SPECTRUM 10 RETENTION TIME .8
 LARGST 4: 43.2, 100.0 217.3, 100.0 232.2, 47.4 174.2, 28.8
 LAST 4: 232.2, 47.4 233.2, 11.7 234.2, 1.6 248.2, 1.4
 PAGE 1 Y = 1.00



Espectro 25



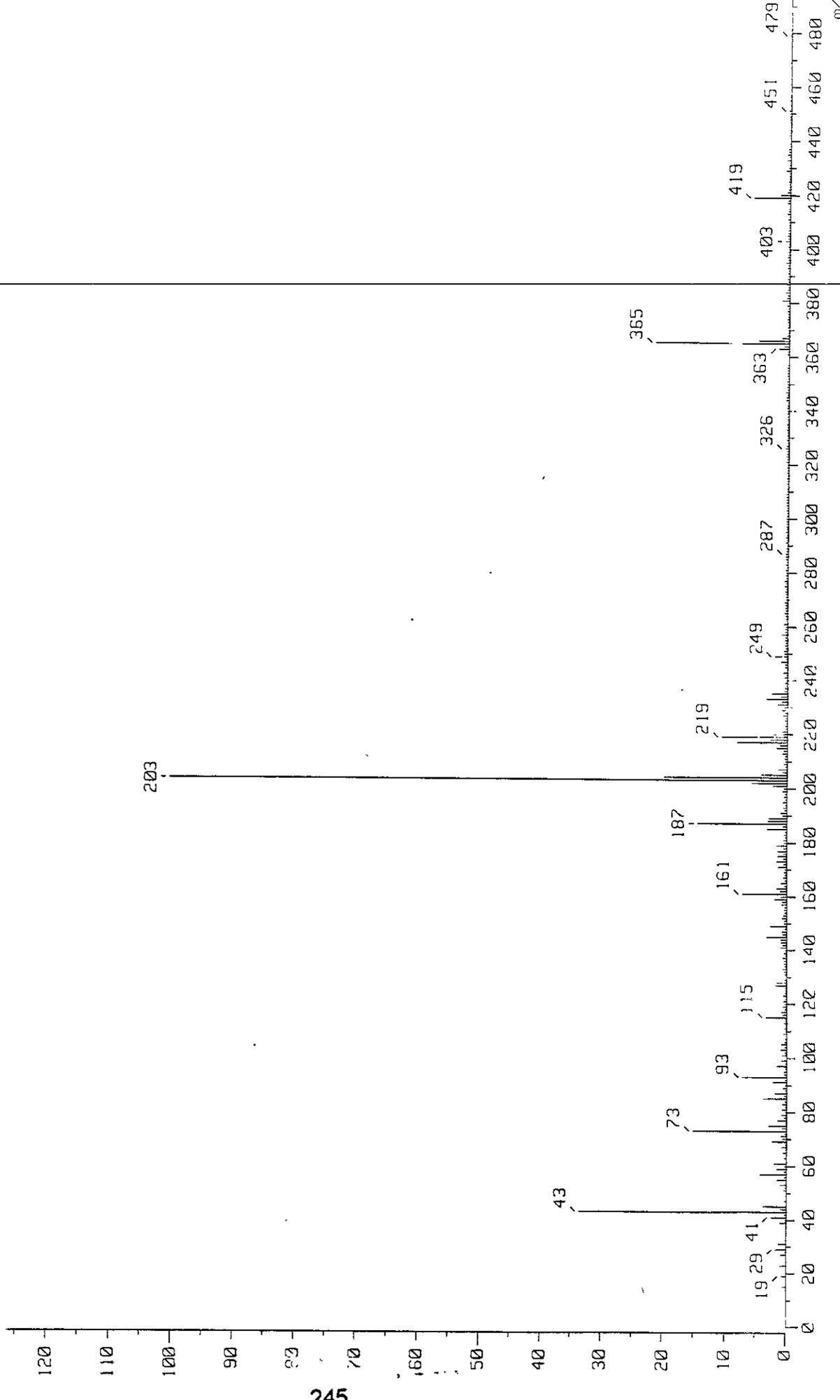


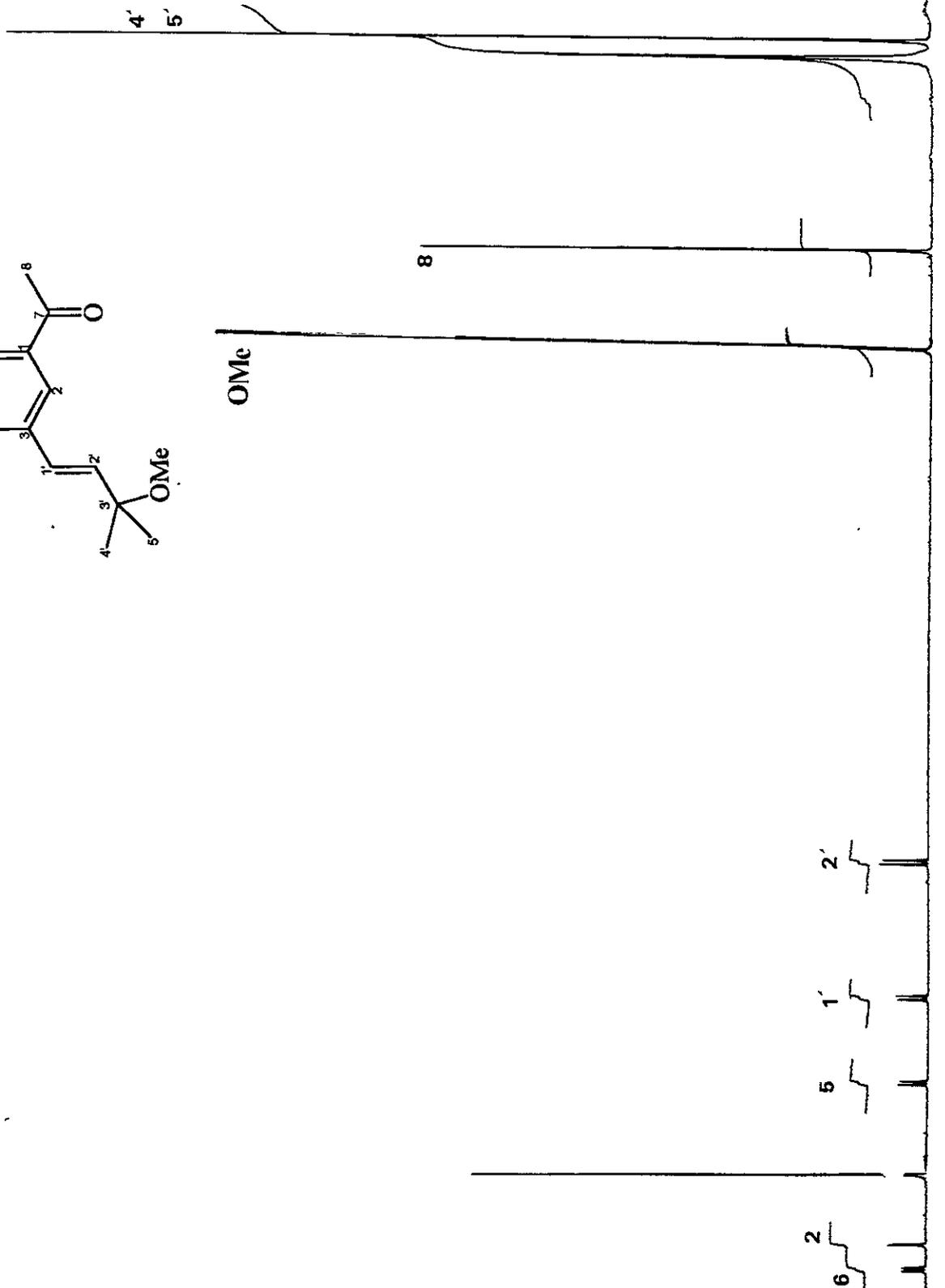
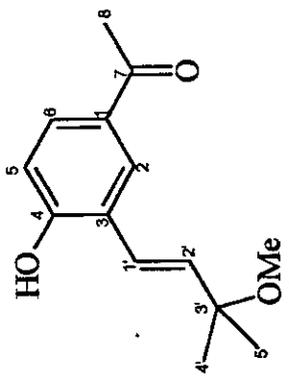


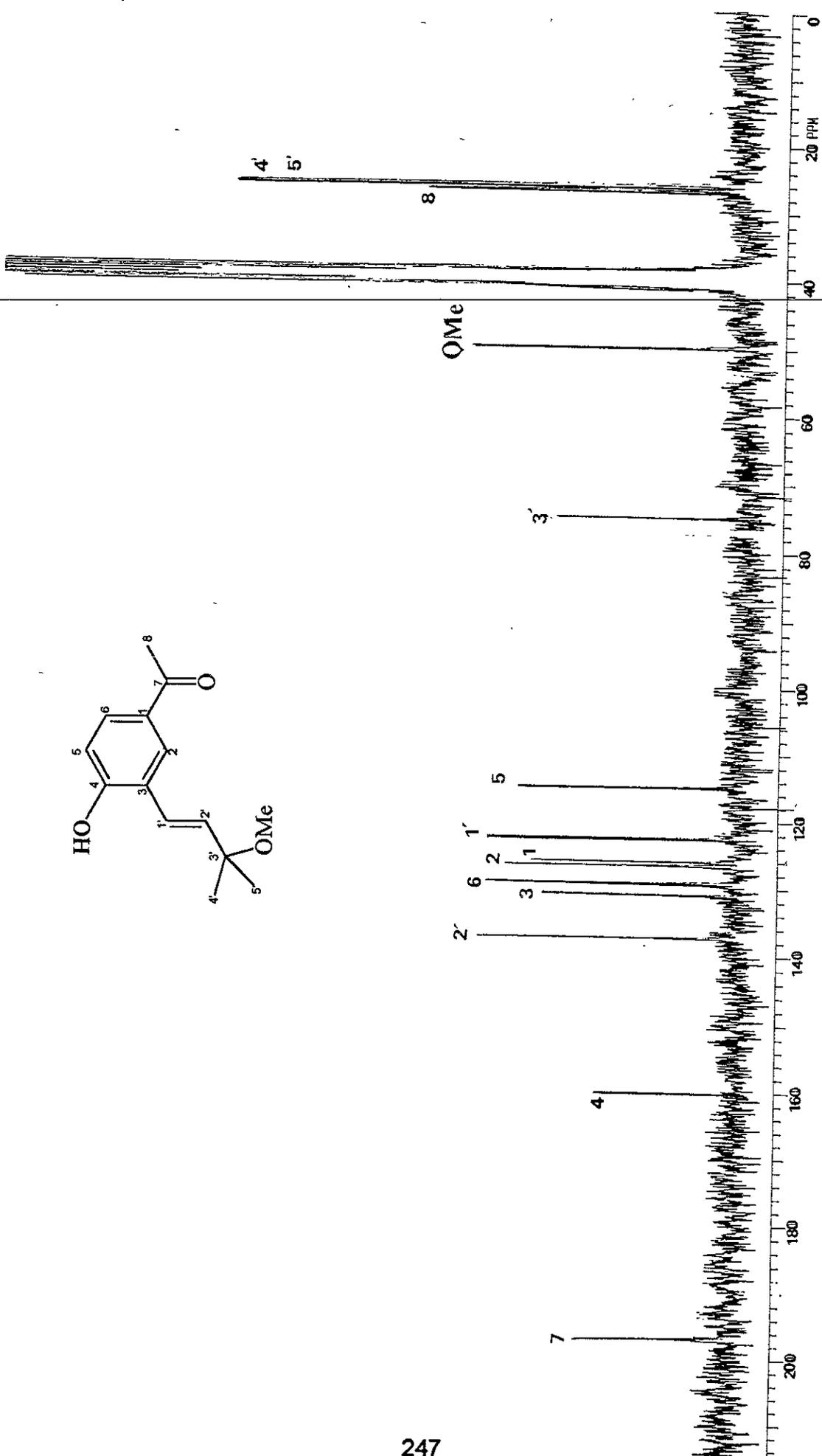
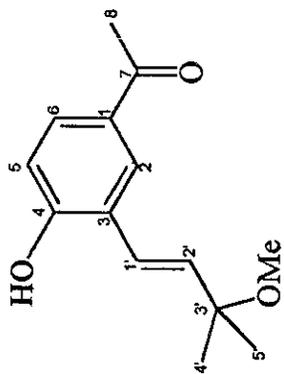
Espectro 28

Sample: Dra-Mata
Note: ~~Metformin~~ *Metformin*
Inlet: Direct
Spectrum Type: Regular [MF-Linear]
RT: 1.00 min
BP: m/z 203.0000
Output m/z range: 0.0000 to 496.9170
9919193

Ion Mode: FAB+
Temp: 0.5 deg.C
Cut Level: 0.00 %







Espectro 28

ANEXO III

Artículos generados de la presente investigación

1. Phyto-growth-inhibitory and antifungal constituents of *Helianthella quinquenervis*.

P. Castañeda, R. Mata, B. Lotina-Hennsen, A.L. Anaya and R. Bye

J. Nat. Prod. **59** : 323-326 (1996).

2. Effect of encephalin, euparin and demethylenecalin on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts.

P. Castañeda, B. Lotina-Hennsen and R. Mata

J. Sci. Food Agr. (En prensa) 1998.

Phytogrowth-Inhibitory and Antifungal Constituents of *Helianthella quinquenervis*[†]

Verla Castañeda, Leda Gómez, and Rachel Mata*

Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Unidad Conjunta de Plantas Medicinales, Instituto de Química and Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D.F., Mexico

Blas Lotina-Hennsen

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D.F., Mexico

Luisa Anaya

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-265, 04511, México D.F., Mexico

Robert Bye

Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D.F., Mexico

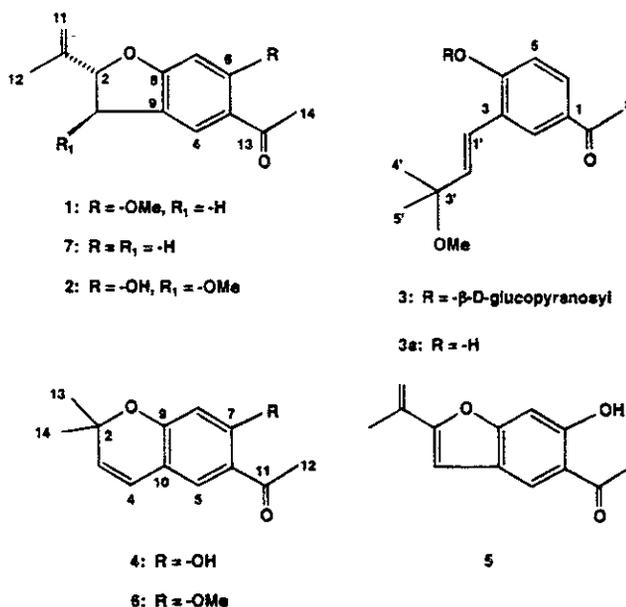
Received April 21, 1995*

Investigation on the roots of *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray (Asteraceae), led to the isolation of one new benzofuran (6-methoxy-tremetone (1)) and a new prenylacetophenone (4- β -D-(glucopyranosyloxy)-3-[3-methoxy-*trans*-isopenten-1-yl]acetophenone (3)). In addition, 6-hydroxy-3-methoxytremetone (2), enecalinal (6), euparin (5), demethylenecalinal (4), and angelic acid were obtained. Structural assignments of the isolated compounds were based on spectroscopic and spectrometric analysis. Natural products 1–4 showed marginal cytotoxicity against three human tumor cell lines [MCF-7, A-549, and HT-29]. Compounds 4 and 6 inhibited the radicle growth of *Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crusgalli*. Furthermore, substances 4–6 exhibited antifungal activity against *Trichophyton mentagrophytes*.

Helianthella quinquenervis (Hook.) A. Gray (Asteraceae), commonly known as "little sunflower", is a perennial herb with large yellow flowering heads and grows in the subalpine coniferous forests of the Rocky Mountains of the western United States from Montana to New Mexico. Isolated populations extended into the pine-oak forests of the extreme northern Sierra Madre Occidental and Sierra Madre Oriental of Mexico. It is known to the Tarahumara Indians of Chihuahua, Mexico, as "rarésoa", and its thick, vertical roots are used medicinally.¹ The powdered roots are applied topically to the body of humans and domestic animals in order to eliminate ectoparasites. The decoction can be employed for the same purpose as well as to improve the quality of the hair. Taken internally, the decoction is said to be good for treating gastrointestinal ailments and ulcers.

A previous phytochemical study on the aerial parts of this plant led to the isolation and characterization of one prenylhydroxyphenone and several known acetylchromenes, including demethylenecalinal (4) and enecalinal (6).²

In the course of our continuing search for antitumor, antimicrobial, and herbicidal agents from Mexican medicinal plants,^{3–5} we describe in this investigation the isolation and structural elucidation of the major phytotoxic, cytotoxic, and antifungal principles from the roots of *H. quinquenervis*.



Results and Discussion

The roots of *H. quinquenervis* were extracted with MeOH. The MeOH extract and the isolated compounds were evaluated for their potential cytotoxic, phytogrowth-inhibitory, and antifungal properties. Their lethality to brine shrimp larvae (BST) was also investigated.⁶ The cytotoxic activity was determined against three human solid tumor cell lines.⁶ The results are summarized in Table 1. The initial phytogrowth-inhibitory activity (Table 2) was evaluated on seedlings of *Amaranthus hypochondriacus* L. and *Echinochloa*

[†] Chemical Studies on Mexican Plants Used in Traditional Medicine.

1. Taken in part from the Ph.D. dissertation of P.C.

* Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, March 1, 1996.

Table 1. Cytotoxicity and Brine Shrimp Lethality of the MeOH extract and Compounds 1–6 from *H. quinquenervis*

compd	ED ₅₀ µg/mL			LC ₅₀ µg/mL BST
	MCF-7 ^c	HT-29 ^c	A-549 ^c	
1	33	16	1	8
2	34	16	31	68
3	44	61	6	>1000
4	2	2	10	31
5	6	6	22	44
6	29	18	25	31
extract	3	>100	5	9
Adriamycin ^b	2 × 10 ⁻²	4 × 10 ⁻²	2 × 10 ⁻³	ND

^a Cytotoxicities in human breast (MCF-7),¹⁸ colon (HT-29),¹⁹ and lung (A-549)²⁰ tumor cell lines. Activity criteria: extracts, ED₅₀ < 20 µg/mL; pure compounds, ED₅₀ < 4 µg/mL. ^b Positive standard control.

Table 2. Phyto-growth-Inhibitory Activity of the MeOH Extract and Compounds 1–6 from *H. quinquenervis*

compd	seedling growth IC ₅₀ (µg/mL)	
	<i>E. crusgalli</i>	<i>A. hypochondriacus</i>
1	68	11
2	323	61
3	231	148
4	79	27
5	252	111
6	6	7
MeOH extract	53	25
tricolorin A ^a	12	37

^a Positive standard control.

crusgalli (L.) Beauv. by using the Petri dish bioassay (PDPIB).⁷ Finally, the antifungal bioassay was performed by the agar dilution procedure⁸ against *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Aspergillus niger*. The minimum inhibitory concentrations (MIC) were >1000, 300, and >1000 µg/mL, respectively. According to the results of the biological evaluations, the MeOH extract of *H. quinquenervis* was bioactive in the BST (Table 1) and in the phyto-growth-inhibitory bioassay (Table 2). It also showed antifungal properties against *T. mentagrophytes*.

The active extract was fractionated by column chromatography over Si gel, using the BST at each step for activity-directed fractionation, to yield three toxic primary fractions (F-1, F-3, and F-4, see Experimental Section). F-1, F-3, and F-4 also showed inhibitory activity when tested by the bioautographic phyto-growth-inhibitory bioassay [BPIB].⁹ Repeated column chromatography on Si gel of fraction F-1 (BST LC₅₀ = 35 µg/mL) and F-4 (BST LC₅₀ = 65 µg/mL) afforded the known compounds 4–6 and 2, respectively. Their spectral characteristics, including UV, IR, and ¹H NMR data, were identical to those previously described for 6-hydroxy-3-methoxytremetone (2),¹⁰ enecalinal (6), euparin (5), and demethylencecalinal (4).^{11,12} Full assignment of the ¹³C-NMR (not previously described) of compounds 2, 4, and 6 was carried out.

Extensive chromatographic separation of active fraction F-3 (BST LC₅₀ = 22 µg/mL) allowed the isolation of the novel compound 1. Finally, the new glycoside 3 and angelic acid were isolated from the inactive fraction F-6.

6-Methoxytremetone (1) was a yellow oil, optically active, and analyzed for C₁₄H₁₆O₃. The UV, IR, and NMR spectra were very similar to those of tremetone (7) and related benzofurans.^{13–15} When the ¹H NMR data of 1 and 7 were compared, the main differences

Table 3. ¹H and ¹³C NMR Data for Compounds 3 and 3a^a

position	3		3a	
	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C
1		125.9		126.9
2	8.06 d (2.0)	126.5	7.61 d (2.0)	126.8
3		130.9		132.0
4		157.9		160.0
5	7.20 d (8.8)	114.9	7.21 d (9.0)	115.3
6	7.81 dd (2.1, 8.6)	129.1	7.74 dd (2.0, 8.2)	129.2
1'	6.85 d (16.6)	122.5	6.79 d (16.5)	122.9
2'	6.35 d (16.6)	137.3	6.35 d (16.5)	136.9
3'		74.9		74.6
4'	1.30 s	25.8	1.35 s	25.6
5'	1.30 s	25.8	1.35 s	25.6
3'-OMe	3.09 s	49.8	3.10 s	49.0
7		196.9		197.0
8	2.58 s	26.8	2.60 s	26.9
1''	5.01 d (7)	100.0		
2''	3.32 dd (8.5, 7)	73.3		
3''	3.29 dd (8.5, 8.5)	76.6		
4''	3.19 m	69.6		
5''	3.37 m	77.1		
6''	3.46 dd (11.2, 5), 3.68 dd (12, 3.7)	60.6		
OH	5.45, 5.12, 5.0, 4.56		3.20 brs	

^a Spectra are recorded in DMSO-*d*₆. Chemical shifts are in ppm with TMS as internal standard. Assignments were supported by COSY, DEPT, HETCOR, and NOESY experiments. Coupling constants in Hz are given in parentheses.

were the presence of a singlet at δ 3.87 due to the methoxyl group at C-6 and the aromatic region, which exhibited two *para* related protons at δ 6.42 (s, H-7) and 7.68 (t, *J*₃₋₄ = 1.2 Hz, H-4). The chemical shift values of H-4 and H-7 as well as the UV absorption maxima at 279 and 320 nm were in agreement with the placement of the ketone moiety and the methoxyl group at C-5 and C-6, respectively.¹⁶

4-β-D-(Glucopyranosyloxy)-3-[3-methoxy-*trans*-isopenten-1-yl]acetophenone (3), was an amorphous powder. The molecular ion was indicated by a peak at *m/z* 397 [M + 1] in the FABMS (nba), and it was consistent with the molecular formula C₂₀H₂₈O₈ established by elemental analysis. The IR spectrum exhibited characteristic absorptions for an aromatic compound bearing hydroxyl and conjugated carbonyl groups. Acid or enzymatic hydrolysis of 3 gave the aglycon 3a and glucose. The ¹H NMR data of the aglycon turned out to be identical to that previously described for 4-hydroxy-3-[3-methoxy-*trans*-isopenten-1-yl]acetophenone (3a), isolated from *H. uniflora*.¹¹ The ¹³C NMR data of 3 (Table 3) supported the assignment of β-D-glucopyranose as the sugar unit [δ_C 100.02, 77.12, 76.64, 73.27, 69.55, 60.56].^{4,17} The β configuration of the sugar residue was inferred from the enzymatic hydrolysis (β-glucosidase) and the chemical shift and coupling constant values observed for the anomeric proton (δ 5.01, d, *J* = 7 Hz). The linkage of the β-D-glucopyranosyl moiety to the phenolic group at C-4 was clearly indicated in the ¹³C NMR spectrum (Table 3) by the significant upfield displacement of the *ipso* carbon (Δ = -2.15) when compared with aglycon 3a.⁴ The strong interaction observed between the resonances at δ 7.20 (H-5) and δ 5.01 (H-1'') in the 2D NOESY NMR spectrum of 3 provided additional evidence for the attachment of the glucopyranosyloxy moiety at C-4. The NOESY spectrum also exhibited a cross-peak between the signals at δ 6.35 (H-2') and δ 8.06 (H-2); this correlation was consistent with the disposition of the isoprenyl moiety at C-3 and with the

closer proximity of H-2' to H-2 (H-1' did not show correlation with H-2).

Biological activities of compounds 1–6 are summarized in Tables 1 and 2. All of these compounds but 1 were inactive in the BST, and only 1 and 4 showed weak cytotoxicity against MCF-7 (breast)¹⁸ and HT-29 (colon)¹⁹ human solid tumor cells in 7-day *in vitro* tests, using adriamycin as the positive control compound.

The six compounds were also evaluated for their ability to inhibit the radical growth of *Echinochloa crusgalli* and *Amaranthus hypochondriacus*.⁷ According to the results summarized in Table 2, these products reduced the radical growth of both target species in a concentration dependent manner with higher activity at increasing concentrations. *E. crusgalli* was less sensitive to compounds 2, 3, and 5.

The phytotoxic effects displayed by compounds 4 and 6 were similar to the results previously described by Merrill,²¹ who found that both compounds reduce the growth of the radicle and hypocotyl of *Panicum miliaceum*, *E. crusgalli*, *Medicago sativa*, and *Lolium perenne* at concentrations ranging from 1 to 200 $\mu\text{g/mL}$.

Compounds 4 and 5 showed antifungal activity against *T. mentagrophytes* with MIC values of 58 and 29 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Griseofulvin (MIC of 2.6 $\mu\text{g/mL}$) was used as the reference antibiotic. None of the isolated compounds was active against *C. albicans* and *A. niger*.

The results of this study showed that the isolated compounds possess promising phyto-growth-inhibitory activity. Therefore, they could be developed into environmentally safe herbicide agents. To our knowledge, this is the first report of benzofurans as plant growth regulators and these compounds, together with the isolated chromenes, might be involved in the allelopathic interactions of *H. quinquenervis*.

It has been reported that enecalin and related chromenes possess insecticidal and repellent properties.²² Thus, the presence of this type of compounds in *H. quinquenervis* might be related to the ethnomedical application of the roots to eliminate ectoparasites in humans and domestic animals.

Free angelic acid has been previously found in the carabid beetle acting as a defensive substance.^{23–25} To the best of our knowledge this is the first report of free angelic acid in plants.

Experimental Section

General Experimental Procedures. IR spectra were obtained in KBr on a Perkin-Elmer 599 B spectrophotometer. NMR spectra were recorded on a Varian VXR-300 S or on Varian VXR-500 S spectrometers. Mass spectra were taken on a Hewlett-Packard 5985 apparatus. Melting points were determined in a Fisher Johns apparatus and are uncorrected. Optical rotations were taken on a digital polarimeter JASCO Dip 360. UV spectra were registered on spectrophotometer Perkin-Elmer 202. The FAB-MS spectrum (positive mode) of compound 3 was recorded in a JEOL DX 300 with JMA-3500 system. The target was bombarded with 10-keV Xe atoms. The sample was suspended in nba.

Plant Material. The plant material (roots) was collected in Bocoyna, Chihuahua, Mexico, in November 1991. A voucher specimen (R. Bye 18058) has been deposited at the Ethnobotanical collection of the National Herbarium (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

Extraction and Isolation. The air-dried plant material (3 kg) was ground into powder and extracted exhaustively by maceration at room temperature with MeOH. After filtration, the extract was concentrated *in vacuo* to yield 735 g of residue. The active extract was subjected to column chromatography (CC) over Si-gel (1.25 kg) and eluted with a gradient of hexane/CHCl₃/MeOH. One hundred fifteen fractions (1 L each) were collected and pooled on the basis of their TLC profiles to yield six major fractions (F-1–F-6); bioactivities in the BST showed three active pools (F-1, F-3, and F-4). F-1 (23 g, BST LC₅₀ = 35 $\mu\text{g/mL}$), eluted with hexane–CHCl₃ (9:1), was further chromatographed on a Si-gel column (165 g) using benzene with increasing amounts of CHCl₃ to yield 4 (100 mg), 5 (45 mg), and 6 (300 mg) which were further purified by preparative TLC over Si-gel using hexane–EtOAc (9:1) as the eluant. Further CC of fraction F-3 (5g, BST LC₅₀ = 22 $\mu\text{g/mL}$, eluted with CHCl₃) on Si-gel (100 g), using hexane with increasing amounts of EtOAc, followed by preparative TLC (hexane–EtOAc (9:1), three developments) yielded 1 (48 mg). Fraction F-4 [53 g, BST LC₅₀ = 65 $\mu\text{g/mL}$, eluted with hexane–CHCl₃ (1:1)] was subjected to CC on Si-gel (940 g) using hexane–EtOAc (9:1) to yield 2 (42 mg). Finally, the BST-inactive fraction F-6 [6.6 g eluted with CHCl₃–MeOH (1:1)] was further chromatographed on a column of silica gel (120 g, using CHCl₃ with increasing amounts of MeOH) to yield impure compound 3 which was purified by preparative TLC (CHCl₃–MeOH, 9:1) to afford 3 (72 mg).

6-Methoxytremetone (1): yellow oil; $[\alpha]_D = -42.27$ ($c = 1.1$, CHCl₃); IR ν_{max} (KBr) 2920, 1634, 1484, 1400, 1370, 1262 cm^{-1} ; UV λ (CHCl₃) nm 245, 279, 320; EIMS m/z (rel int) 232 (M^+ , 47.4), 217 (100), 189 (28), 175 (9), 174 (28), 91 (24), 46 (18), 43 (98), 39 (28); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.75 (s, CH₃-12), 2.56 (s, CH₃-14), 2.96 (ddd, $J = 15.3, 8.0, 1.2$ Hz, H-3), 3.30 (dd, $J = 15.3, 9.5, 0.6$ Hz, H-3'), 3.87 (s, 6-OMe), 4.92 and 5.07 (m, CH₂-11), 5.25 (m, H-2), 6.42 (s, H-7), 7.68 (dd, $J = 1.2$ Hz, H-4); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 16.9 (C-12), 31.8 (C-14), 33.3 (C-3), 55.6 (6-OMe), 87.6 (C-2), 93.2 (C-7), 112.5 (C-11), 118.9 (C-10), 120.7 (C-9), 127.1 (C-4), 143.5 (C-5), 161.7 (C-8), 165.1 (C-6), 197.9 (C-13). Anal. Calcd for C₁₄H₆O₃: C, 72.41; H, 6.89. Found: C, 72.37; H 6.80.

6-Hydroxy-3-methoxytremetone (2): yellow oil; ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 17.5 (C-12), 29.7 (C-14), 55.3 (OMe), 83.3 (C-2), 92.2 (C-3), 92.9 (C-7), 113.2 (C-11), 114.4 (C-9), 117.8 (C-10), 129.2 (C-4), 141.1 (C-5), 167.1 (C-6, C-8), 202.2 (C-13).

4- β -D-(Glucopyranosyloxy)-3-(3-methoxy-trans-isopenten-1-yl)acetophenone (3): amorphous powder; $[\alpha]_D = +32.5$ ($c = 1.4$, MeOH); mp 150–154 °C; IR ν_{max} 3378, 1664, 1604, 1576, 1492, 1364, 1074 cm^{-1} ; ¹H and ¹³C-NMR data (see Table 3); FAB-MS 397 [$M + H$]⁺. Anal. Calcd for C₂₀H₂₈O₈: C, 60.60; H, 7.07. Found: C, 60.99; H, 6.99.

Enzymatic Hydrolysis of 3 with β -Glucosidase. To 5 mg of 3 were added 1 mL of H₂O and 5 mg of β -glucosidase (Sigma Type 1). The mixture was incubated at 36 °C for 72 h. After the usual workup, the aglycon 3a (2 mg) and glucose (TLC) were obtained.

Acid Hydrolysis of 3. The glycoside 3 (20 mg) was refluxed for 30 min with 1 mL of 1 N HCl. The acid solution was diluted with water (13 mL) and then extracted with CHCl₃ (3 \times 15 mL); the organic phase

was successively washed with NaHCO₃ (10% aqueous) and water and then dried over Na₂SO₄. After removal of the solvent, 3 mg of **3a** was obtained.

Demethylencecalin (4): ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 26.2 (C-13, C-14), 28.5 (C-12), 77.8 (C-2), 104.4 (C-8), 113.9 (C-10), 120.9 (C-3), 122.9 (C-6), 128.5 (C-4), 128.8 (C-5), 160.4 (C-9), 165.1 (C-7), 202.3 (C-11).

Euparin (5): Yellow crystals; mp 97–100 °C.

Encecalin (6): ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 28.3 (C-12), 31.8 (C-13, C-14), 55.5 (7-OMe), 77.8 (C-2), 99.5 (C-8), 113.8 (C-10), 120.5 (C-3), 121.2 (C-6), 128.3 (C-4), 128.9 (C-5), 158.3 (C-9), 161.0 (C-7), 197.4 (C-11).

Phytogrowth-Inhibitory Bioassays. The phytogrowth-inhibitory activity of the MeOH extract, primary fractions, and pure compounds were evaluated on seeds of *A. hypochondriacus* and *E. crusgalli* by using a Petri dish bioassay.⁷ In addition, a direct bioautographic bioassay system⁹ was employed to guide secondary fractionation. The seeds of *E. crusgalli* were purchased from Valley Seed Service, Fresno, CA, and those of *A. hypochondriacus* from Mercado de Tulyehualco, D.F., Mexico. The data were analyzed by ANOVA (*p* < 0.05), and IC₅₀ values were calculated by Probit analysis based on percent inhibition obtained. The extract was evaluated at 10, 20, 50, 100, 150, and 200 μg/mL. Compounds 1–3 were evaluated at 50, 100, 200, and 400 μg/mL. Finally, compounds 4–6 were evaluated at 10, 20, 40, 100, and 200 μg/mL. Tricolorin A was used as positive control.²⁶ The direct bioautographic assay was carried out as previously described.⁹ The concentration threshold required for most of the natural phytogrowth-inhibitors tested in similar experimental designs is often in the 100–1000 μg/mL range.²⁶

Antimicrobial Assay. The microorganisms used in the present study were obtained from ATCC: *C. albicans* (ATCC 10231), *A. niger* (ATCC 16888), and *T. mentagrophytes* (ATCC 9129). For each microorganism a positive control was employed: amphotericin B (Sigma) for *C. albicans* and *A. niger* and griseofulvin (Sigma) for *T. mentagrophytes*. To test the quantitative antimicrobial activity against *T. mentagrophytes*, the agar dilution method was used.⁸

Cytotoxicity Assays. The extracts, fractions, and isolated compounds were evaluated for lethality to brine shrimp larvae (BST). Criteria of activity: LC₅₀ values of <1000 μg/mL for extracts and <20 μg/mL for pure compounds.⁶ Cytotoxicities against human solid tumor cells were measured at the Purdue Cell Culture Laboratory, Purdue Cancer Center, in a 7 day MTT assay, for MCF-7 breast carcinoma,¹⁸ HT-29 colon adenocarcinoma,¹⁹ and A-549 lung carcinoma,²⁰ with adriamycin as the positive control. Criteria of activity: ED₅₀ values of <20 μg/mL for extracts and <4 μg/mL for pure compounds.

Acknowledgment. We thank M. en C. Isabel Chávez, M. en C. Federico del Río, and Q. Luis Velasco,

Instituto de Química, UNAM, for recording the NMR and MS spectra and QFB Graciela Chávez and QFB Marisela Gutiérrez, Facultad de Química, UNAM, for the registration of IR and UV spectra. This study was financed by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA IN 202493, DGAPA IN 203394), CONACyT (Convenio 2576P-MF), Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM (Proyectos PADEF FQ-5006, 005330 and 005357), Instituto de Biología and U.S. Agency for International Development (field work). Field assistance was provided by J. Aguilar, F. Basurto, E. Herrera, D. Martínez, L. Nava, and Centro de Estudios Agrícolas de la Tarahumara, and A. C. F. Basurto and M. Trejo aided in the preparation of botanical samples. Finally, the authors are indebted to one of the reviewers of the paper for so many valuable suggestions.

References and Notes

- (1) Bye, R. In *Two Mummies from Chihuahua: A Multidisciplinary Study*; Tyson, R. A., Elnerick, D. V., Eds.; San Diego Museum Papers: San Diego, 1985; Vol. 19, pp 77–104.
- (2) Herz, W.; Kulanthaivel, P. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 435.
- (3) Castañeda, P.; García, M. R.; Hernández, B. E.; Torres, B. A.; Anaya, A. L.; Mata, R. *J. Chem. Ecol.* **1992**, *18*, 1025.
- (4) Jiménez, A.; Pereda-Miranda, R.; Bye, R.; Linares, E.; Mata, R. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1079.
- (5) Segura-Correa, R.; Mata, R.; Anaya, A. L.; Hernández, B. E.; Villena, R.; Soriano-García, M.; Bye, R.; Linares, E. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1567.
- (6) Anderson, J. E.; Goetz, C. M.; McLaughlin, J. L.; Suffness, M. *Phytochem. Anal.* **1991**, *2*, 107.
- (7) Anaya, A. L.; Calera, M. R.; Mata, R.; Pereda-Miranda, R. *J. Chem. Ecol.* **1990**, *16*, 2145.
- (8) Hufford, C. D.; Funderburk, M. J.; Morgan, J. M.; Robertson, L. W. *J. Pharm. Sci.* **1975**, *64*, 789.
- (9) Li, H.-H.; Nishimura, H.; Hasegawa, K.; Mizutani, J. *J. Chem. Ecol.* **1992**, *18*, 1785.
- (10) Bohlmann, F.; Jakupovic, J.; Schuster, A.; King, R. M.; Robinson, H. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 161.
- (11) Bohlmann, F.; Grenz, M. *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 90.
- (12) Bjeldanes, L. F.; Geissman, T. A. *Phytochemistry* **1969**, *8*, 1293.
- (13) Bohlmann, F.; Zdero, C.; Grenz, M. *Chem. Ber.* **1977**, *110*, 1034.
- (14) Bohlmann, F.; Zdero, C.; King, R. M.; Robinson, H. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 1141.
- (15) Bohlmann, F.; Mahanta, P. K.; Natsu, A. A.; King, R. M.; Robinson, H. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 471.
- (16) Siebertz, R.; Proksch, P.; Wray, V.; Witte, L. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 789.
- (17) Warashina, T.; Ishino, M.; Miyase, T.; Ueno, A. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 3217.
- (18) Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnestein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H.; Parks, W. *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1417.
- (19) Soule, H. D.; Vázquez, J.; Long, A.; Albert, S.; Brennan, M. *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1409.
- (20) Fogh, J.; Trempe, G. In *Human Tumor Cells*; Fogh, J., Ed.; Plenum Press: New York, 1975; pp 115–119.
- (21) Merrill, G. B., *J. Chem. Ecol.* **1989**, *15*, 2073.
- (22) Kanehisa, K.; Kawazu, K. *Appl. Ent. Zool.* **1982**, *17*, 460.
- (23) Attygalle, A. B.; Meingwald, J.; Lieberk, J. K.; Eisner, T. *Experientia* **1991**, *47*, 296.
- (24) Davidson, B. S.; Eisner, T.; Witz, B.; Meinwald, J. *J. Chem. Ecol.* **1989**, *15*, 1689.
- (25) Inoue, M.; Nishimura, H.; Li, H.-H.; Mizutani, J. *J. Chem. Ecol.* **1992**, *18*, 1833.
- (26) Pereda-Miranda, R.; Mata, R.; Anaya, A. L.; Mahinda Wickramaratne, D. B.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, D. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 571.

NP960199M

An SCI publication

29 January 1998

Dr Blas Lotina-Hensen
Dept de Bioquimica
Facultad de Quimica

Universidad Nacional Autonoma de Mexico
Coyoacan 04210
DF
Mexico

Dear Dr Lotina-Hensen

JSFA 21/1998 Effect of encecalin euparin adn demethylencecalin on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts

The Editor is pleased to inform you that your paper has been accepted for publication. Please inform your co-authors.

A proof will be sent to you in due course.

Yours sincerely

Jason Timmins
EDITORIAL OFFICE

Tel: 0171 235 3681 ext 352

Fax: 0171 235 0887

e-mail: j.timmins@scipubl.demon.co.uk

Effect of Encecalin, Euparin and Demethylencecalin on Thylakoid Electron Transport and Photophosphorylation in Isolated Spinach Chloroplasts[†]

Perla Castañeda^a, Rachel Mata^a and Blas Lotina-Hennsen^{b,*}

^aDepartamento de Farmacia,

^bDepartamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México, D.F., México.

To whom correspondence should be addressed.

FAX 525-622 5329

E mail blas@servidor.unam.mx

[†]Taken in part from the Ph D Dissertation of P. Castañeda

Abstract: The major phytotoxic compounds (encecalin, euparin and demethyencecalin) isolated from *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray (Asteraceae) were evaluated on different photosynthetic activities in chloroplasts isolated from spinach leaves. ATP synthesis, proton uptake and electron flow (basal, phosphorylating and uncoupled) were inhibited by encecalin and demethyencecalin in a concentration dependent manner, therefore acting as Hill reaction inhibitors.

Encecalin and demethyencecalin did not affect photosystem I (electron transport from diaminodurene to methylviologen), but they inhibited photosystem II (from water to 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-1,4-*p*-benzoquinone). Since these compounds inhibited electron flow in the photosystem II partial reactions from water to silicomolybdate and from diphenylcarbazide to dichlorophenol-indophenol, the site of inhibition was located in the span from P₆₈₀ to Q_A of the electron transport chain.

Euparin, inhibited ATP synthesis, proton uptake and basal and phosphorylating electron transports, but it has not effect on uncoupled electron flow from water to methylviologen. Mg²⁺-ATPase activity from bound membrane thylakoid chloroplasts was also inhibited by this compound. These results suggested that euparin inhibited phosphorylation in chloroplasts, acting as an energy-transfer inhibitor.

Key Words: *Helianthella quinquenervis*, Asteraceae, encecalin, euparin, demethylencecalin, benzopyrane, benzofurane, photosynthesis, uncoupler, energy-transfer inhibitor.

Abbreviations: CF₁, chloroplast coupling factor 1; DAD, diaminodurene; DBMIB, 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-1,4-*p*-benzoquinone; DCCD, N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide; DCMU, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; DCPIP, dichlorophenol-indophenol; DPC, diphenilcarbazine; HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid; MES, 2-(N-morpholino)-ethanesulphonic acid; MV, methyl viologen; PS I, PS II, photosystem I and II; Q_A, primary-plastoquinone ; SiMo, silicomolybdate; .

INTRODUCTION

As a part of a research program to obtain leads for the developments of new herbicide agents, we have screened a number of plants for their phyto-growth-inhibitory activity on seedlings of *Amaranthus hypochondriacus* L. and *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv (Calera *et al* 1995a; Castañeda *et al* 1996; Jiménez *et al* 1996; *inter alia*). Among these plants, a MeOH extract of *Helianthella quinquenervis* was found to be very active. Moreover, bioactivity-guided fractionation led to the isolation of several phytotoxic chromenes and benzofurans (Castañeda *et al* 1996).

Chromenes (benzopyrans) and benzofurans are common metabolites isolated from many species of higher plants; the majority of these compounds are known to occur in the Asteraceae family (Proksch and Rodríguez 1983). A number of biological properties, including phyto-growth-inhibitory activity, have been described for some of these secondary metabolites (Bowers *et al* 1976; Brooks *et al* 1979; Proksch *et al* 1985; Proksch and Rodríguez 1983; Merrill 1989; Castañeda *et al* 1996; *inter alia*). However, their allelopathic role as well as their effect on metabolic pathways remains unexplored.

Considering that the process of photosynthesis is the target of a wide range of herbicide compounds (Einhellig 1995), the aim of the present investigation was to determine if the mode of action of the major phyto-growth-inhibitory chromenes and benzofurans from *H. quinquenervis* involves an interference with the process of photosynthesis in isolated spinach chloroplasts.

MATERIALS AND METHODS

Tested material

Encecalin (I), euparin (II), and demethylencecalin (III) (Fig 1) were obtained from the roots of *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray as previously reported (Castañeda *et al* 1996).

Chloroplasts isolation and chlorophyll determination

Intact chloroplasts were prepared from market spinach leaves (*Spinacea oleracea* L.) as described earlier (Mills *et al* 1980; Saha *et al* 1971) and suspended, unless otherwise indicated, in 400 mM sorbitol, 5 mM magnesium chloride, 20 mM potassium chloride, and buffered with 0.03 M Na⁺-tricine at pH 8.0. Chlorophyll concentration was determined according to Strain (1971).

Measurement of proton uptake and ATP synthesis

Proton uptake was measured as the pH rose between 8.0 and 8.1 (Dilley 1971) with a combination microelectrode connected to a Corning potentiometer with expanded scale, and registered in a Gilson recorder. The reaction medium was 100 mM sorbitol, 5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, and 1 mM Na⁺-tricine pH=8. ATP synthesis was measured titrametrically by the procedure of Dilley (1971). MV 50 μM was added as an electron acceptor for the Hill reaction.

Measurement of electron transport

Photosynthetic non-cyclic electron transport activity from water to MV was monitored with a YSI (Yellow Spring Instrument) Model 5300 oxygen monitor and a Clark electrode. The reaction medium was the same as in the proton uptake assay except for the tricine concentration (15 mM) and for the presence of 6 mM NH_4Cl (Calera *et al* 1995b, 1996), in the case of the uncoupled electron transport measurement. All reaction mixtures were illuminated with actinic light of a projector lamp (GAF 2662) passed through a 5 cm filter of 1% CuSO_4 solution (Calera *et al* 1995b, 1996). In all cases the measurements were carried out at 20°C.

Photosystems I and II electron transport activity

Photosystem I electron transport was determined in a similar way to non-cyclic electron transport (Calera *et al* 1995b, 1996; Saha *et al* 1971). The following reagents were added: 10 μM DCMU, 100 μM DAD, 50 μM MV, 300 μM ascorbate and 6 mM NH_4Cl . Uncoupled photosystem II electron flow was measured in presence of 100 μM DAD, 1 μM DBMIB, 500 μM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ and 6 mM NH_4Cl (Calera *et al* 1995a). Uncoupled electron transport from water to SiMo, was determined with the same reaction mixture as in photosystem II except that 200 μM SiMo and 10 μM DCMU were added (Giaquinta *et al* 1974).

To determine uncoupled electron transport from DPC to DCPIP, isolated chloroplasts were previously treated with Tris 0.8 M, pH=8 and incubated 30 minutes at 0°C. After this treatment, 40 ml of reaction medium were added and

the chloroplasts were centrifugated at 5000 xg for 2 min. Chlorophyll concentration was determined according to Strain (1971). Uncoupled electron transport from DPC to DCPIP was measured spectrometrically as reported previously (Vernon and Shaw 1969); 200 μ M DPC was added to the medium.

Basal and uncoupled electron transport measurements at different pH

The activity was determined as in basal and uncoupled electron flows but different buffers 20 mM (tricine pH 8.0-8.5; HEPES pH 7.0-7.5 and MES pH 6.0-6.5) were added to the reaction medium.

Mg²⁺-ATPase activity

Methods for the activation and assay of Mg²⁺-dependent ATPase in chloroplasts were adapted from those of Mills *et al* (1980) and released inorganic phosphate was measured as previously reported (Sumner 1944).

In each reaction a blank experiment was performed with the isolated chloroplasts in the reaction medium. All reactions were conducted by triplicate and the data analyzed by ANOVA. The maximal standard deviation is indicated in each graph.

The I_{50} values for each activity were extrapolated in the graph of % activity vs concentration of the compounds under study. I_{50} is the concentration producing 50% inhibition.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of encecalin, euparin and demethylenencecalin on ATP synthesis and H⁺-uptake

Encecalin (I), euparin (II) and demethylenencecalin (III) were tested for their ability to inhibit ATP synthesis on freshly lysed intact chloroplasts isolated from spinach leaves. Euparin and demethylenencecalin displayed strong inhibitory activity (70%) on ATP synthesis at a concentration of 300 μM (Fig 2). Encecalin was less active at the same concentration, inhibiting ATP synthesis only by 10%. However, at higher concentration (400 μM) encecalin abolished ATP synthesis. The calculated I_{50} values for encecalin, euparin, and demethylenencecalin were 340, 154 and 159 μM , respectively.

The presence of a free hydroxyl group at C-7 appears to be an important structural feature for the observed inhibitory activity on ATP synthesis, as demonstrated by the lower effect displayed by encecalin, which possess a methoxyl group at the same position. On the other hand, the nature of the heterocyclic ring (furane vs pyrane) seems to have no effect on activity.

Proton uptake in spinach chloroplasts was also inhibited by I-III in a concentration dependent manner. Euparin and encecalin were more potent H⁺-uptake inhibitors than demethylenencecalin as shown in Fig 3. The I_{50} values for H⁺-uptake inhibition of compounds I-III were 317, 317, and 118 μM , respectively.

Effect of enecalin, euparin and demethylenecalin on electron flow

The light-dependent synthesis of ATP might be inhibited by blocking electron transport, by uncoupling ATP synthesis from the electron transport or by blocking the phosphorylation reaction itself (Good *et al* 1981). Therefore, enecalin, euparin and demethylenecalin could be acting at any of these levels. In order to discriminate between these possibilities the effect of compounds I-III on non-cyclic electron transport from water to MV in basal, phosphorylating and uncoupled conditions was investigated.

According to the results showed in Fig 4 and Table 1, enecalin (I) and demethylenecalin (III) inhibited basal, uncoupled and phosphorylating electron transport in a concentration dependent manner. These results support the view that compounds I and III behave as Hill reaction inhibitors. Hence, the mode of action of enecalin and demethylenecalin may be due to an interference with the electron flow of the electron transport chain in spinach chloroplasts.

Euparin failed to inhibit uncoupled electron transport (Fig 4), but basal and phosphorylating electron flow from water to MV were significantly inhibited by this compound (see Table 1).

Localization of the target of enecalin and demethylenecalin inhibition on electron transport chain

In order to localize the site of inhibition on the electron transport pathway, the effect of benzopyrans I and III on partial reactions (PS I and PS II) was measured using artificial electron donors, electron acceptors, and appropriate

inhibitors. Table 1 shows that the uncoupled PS I electron transport from DAD to MV was not affected by these compounds. However, uncoupled PS II electron transport from water to DAD was selectively inhibited by them; the I_{50} values for encecalin (I) and demethylenencecalin (III) were 205 and 145 μM , respectively.

To identify the site of interaction of compounds I and III on PS II, uncoupled electron flow was measured between water to Q_A (using SiMo as electron acceptor) and from DPC to DCPIP. It is important to point out that DPC donate electrons either to Y_D (or Z) or to P_{680} in Tris washed chloroplasts. In addition, this treatment blocks the photolysis of water (Vernon and Shaw, 1969; Barr *et al* 1975) and abolishes the electron flow from H_2O to DCPIP and from H_2O to SiMo (Barr *et al* 1975).

Since compounds I and III inhibited the electron flow from H_2O to DAD, from H_2O to SiMo and from DPC to DCPIP, the target was located in one of the redox enzymes in the span from P_{680} to Q_A of the electron transport chain.

Effect of compounds I-III on basal and uncoupled electron transport at different pHs

The uncoupled electron transport inhibitory activity induced by encecalin (I) and demethylenencecalin (III) from water to MV was strongly enhanced at alkaline pH [pH 8.0–8.5] (Fig 5). In the case of euparin (II), the maximal effect on basal electron transport was achieved at alkaline pH (Fig 6). It appears that in all the cases the interaction with the target is facilitate somehow at the pH range where maximal inhibitory activity was observed. Therefore, we postulate that in these

pH conditions the site of interaction undergoes conformational changes in such a way that the inhibitory site is more exposed for binding. It is important to point out that in terms of chemical reactivity (*i.e.*, formation of more active ionic species), it is difficult to provide a plausible explanation for the inhibiting behavior of compounds I-III at different pHs.

Euparin as an energy-transfer inhibitor

The inhibitory activity of euparin on ATP synthesis (Fig 2) and proton uptake (Fig 3), as well as its effect on electron flow suggest that this compound behaves as an energy-transfer inhibitor.

It is well known that some secondary metabolites such as phlorizin (Izawa *et al* 1966), kaempferol (Arnzten *et al* 1974), 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (Calera *et al* 1995), piquerol (Mendoza *et al* 1994), ajmaline (Vallejos and Andreo 1974), DIO-9, leucinostatin and efrapeptin (McCarty *et al* 1965; Lucero *et al* 1976) as well as several synthetic compounds like, DCCD (McCarty and Racker 1967), N,N-dimethylformamide (Peña-Valdivia *et al* 1991), triphenyltin chloride (Gould 1976), chlorotri-n-butyltin (Kahn 1976), synthalin (Gross *et al* 1968) among others, act as energy-transfer inhibitors. Most of these compounds inhibited photophosphorylation by interacting with the H⁺-ATPase complex but at different levels and with different mechanism of action. It is important to point out that these energy-transfer inhibitors do not have common chemical structures, which

could explain their different mechanism of action and different zones of interaction at the H⁺-ATPase complex.

In this report we found that euparin (II) inhibits ATP synthesis (Fig 2), H⁺-uptake (Fig 3), basal and phosphorylating electron flow without any effect on uncoupled electron flow (Fig 4), therefore the mechanism of action of compound II is unique and different to all other energy-transfer inhibitors (reported and cited in the previous paragraph).

To continue the characterization of II as an energy-transfer inhibitor, its effect on Mg²⁺-ATPase activity bound to thylakoids was tested. Fig 7 shows that this compound inhibited at 104 μM the light membrane activated Mg²⁺-ATPase by 50%. This observation strengthens the proposal that euparin (II) is acting as an energy-transfer inhibitor by interacting with H⁺-ATPase complex. The Mg²⁺-ATPase activity is also partially or totally inhibited by other energy-transfer inhibitors, including phlorizin (Izawa *et al* 1966), DIO-9 (McCarty *et al* 1965), ajmaline (Vallejos and Andreo 1974), DCCD (McCarty and Racker 1967) and triphenyltin chloride (Gould 1976).

CONCLUSIONS

The benzopyrans encecalin and demethylencecalin, act as Hill reaction inhibitors but the related benzofuran euparin, behaves as an energy-transfer inhibitor in spinach chloroplasts. These results suggest that the nature of the heterocyclic ring is an important structural requirement for the observed activities. In contrast to other energy-transfer inhibitors, euparin does not

interfere with uncoupled electron flow. Therefore, we propose that the mechanism of action of this benzofuran is unique.

Although in this investigation the evaluated benzopyranes and benzofurane demonstrated significant effects on several photosynthetic activities, their potencies were lower than those of commercially herbicide agents. However, these natural products could be used as leads for the synthesis of more potent analogues which in turn could generate commercially viable products.

In this context, it is important to point out that few natural products have all the necessary characteristics to compete with the best synthetic herbicides. It is much more likely that a plant material product will be used as a lead for synthesis rather than as a product *per se* (Benner 1993).

Finally, this work intends to be part of a much larger survey of the effects of naturally occurring compounds, on various biochemical plant processes in order to understand the interaction between plants.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the following projects: PADEP (Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado) No. 005378, CONACYT (Convenio 400313-5-2358PN) and DGAPA IN-205197.

REFERENCES

- Arntzen C J, Falkenthal S V, Bobick S 1974 Inhibition of photophosphorylation by kaempferol. *Plant Physiol* **53** 304-306.
- Barr R, Crane F L, Giaquinta R T 1975 Dichlorophenylurea-insensitive reduction of silicomolybdate acid by chloroplast photosystem II. *Plant Physiol* **55** 460-462.
- Benner J P 1993 Pesticidal compounds from higher plants. *Pestic Sci* **39** 95-102.
- Bowers W S, Ohta T, Cleere J S, Marsella P A 1976 Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants. *Science* **193** 542-547.
- Brooks G T, Pratt G E, Jennings R C 1979 The action of precocenes in milkweed bugs (*Oncopeltus fasciatus*) and locusts (*Locusta migratoria*). *Nature* **281** 570-572.
- Calera M R, Soto F, Sánchez P, Bye R, Hernández B, Anaya A L, Lotina-Hennsen B, Mata R 1995a Biochemically active sesquiterpene lactones from *Ratibida mexicana*. *Phytochem* **40** 419-425.
- Calera M R, Mata R, Anaya A L, Lotina-Hennsen B 1995b 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin, an inhibitor of photophosphorylation in spinach chloroplasts. *Photosyn Res* **45** 105-110.
- Calera M R, Mata R, Lotina-Hennsen B, Anaya A L 1996 Uncoupling behavior of the 4-phenylcoumarins in spinach chloroplasts: structure-activity relationships. *J Agr Food Chem* **44** 2966-2969.

- Castañeda P, Gómez L, Mata R, Lotina-Hennsen B, Anaya A L, Bye R 1996 Phytogrowth-inhibitory and antifungal constituents of *Helianthella quinquenervis*. *J Nat Prod* **59** 323-326.
- Dilley R A 1971 Ion transport H^+, K^+, Mg^{2+} -exchange phenomena. *Methods Enzymol* **24** 68-74.
- Einhellig F 1995 Allelopathy: current status and future goals. In: *Allelopathy: organisms, processes and applications*, eds Inderjit K, Dakshini M & Einhellig F A. ACS Symposium Series 582. American Chemical Society, Washington, D.C., pp 2-25.
- Giaquinta R T, Selman B R, Anderson B J, Dilley R A 1974 Inhibition of coupling factor activity of chloroplast membranes by diazonium compounds. *J Biol Chem* **249** 2873-2878.
- Good E N, Izawa S, Hind G 1981 Uncoupling and energy transfer inhibition in photophosphorylation. In: *Current Topics in Bioenergetics*, eds Sanadi D R, Vol 1, Academic Press, New York, pp 75-112.
- Gould J M 1976 Inhibition by triphenyltin chloride of a tightly-bound membrane component involved in photophosphorylation. *Eur J Biochem* **62** 567-575.
- Gross E, Shavit N, San Pietro A 1968 Synthalin: An inhibitor of energy transfer in chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* **127** 224-228.
- Izawa S, Winget D, Good E N 1966 Phlorizin, a specific inhibitor of photophosphorylation and phosphorylation-coupled electron transport in chloroplasts. *Biochem Biophys Res Commun* **22** 223-226.

- Jiménez A A, Mata R, Lotina-Hennsen B, Anaya-Lang A L, Velasco I L 1996 Phytogrowth-inhibitory compounds from *Malmea depressa*. *J Nat Prod* **59** 202-204.
- Kahn J S 1968 Chlorotri-n-butyltin an inhibitor of photophosphorylation in isolated chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **153** 203-210.
- Lucero H A, Ravizzini R A, Vallejos R H 1976 Inhibition of spinach chloroplasts photophosphorylation by the antibiotics leucinostatin and efrapeptin. *FEBS Lett* **68** 141-144.
- McCarty R E, Guillory R J, Racker E 1965 DIO-9, an inhibitor of coupled electron transport and phosphorylation in chloroplasts. *J Biol Chem* **240** 4822-4823.
- McCarty R E, Racker E 1967 Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. *J Biol Chem* **242** 3435-3439.
- Mendoza J L, Jiménez M, Lotina-Hennsen B 1994 Piquerol A and diacetyl piquerol act as energy transfer inhibitors of photosynthesis. *Pestic Sci* **40** 37-40.
- Merrill G 1989 Eupatoriochromene and encecalin, plant growth regulators from yellow starthistle (*Centaurea solstitialis* L.). *J Chem Ecol* **15** 2073-2087.
- Mills J D, Mitchell P, Schurmann P 1980 Modulation of coupling ATPase activity in intact chloroplasts. *FEBS Lett* **112** 173-177.
- Peña-Valdivia C B, Rodríguez-Flores L, Tuena de Gómez-Puyou M, Lotina-Hennsen B 1991 Inhibition of photophosphorylation and electron transport by N,N-dimethylformamide. *Boophys Chem* **41** 169-174.

- Proksch P, Proksch M, Towers G H N, Rodríguez E 1985 Phytotoxic and insecticidal activities of chromenes and benzofurans from *Encelia*. *J Nat Prod* **46** 331-334.
- Proksch P, Rodriguez E 1983 Chromenes and benzofurans of the Asteraceae, their chemistry and biological significance. *Phytochem* **22** 2335-2348.
- Saha S, Ouitrakul R, Izawa S, Good N 1971 Electron transport and phosphorylation in chloroplasts as function of the electron transport. *J Biol Chem* **246** 3204-3209.
- Strain H H, Coppe B T, Suec W A 1971 Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls. *Methods Enzymol* **23** 452-466.
- Sumner J B 1944 Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science* **100** 413-415.
- Vallejos R H, Andreo C S 1974 Alkaloids as inhibitors of photophosphorylation in spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **333** 141-148.
- Vernon L P, Shaw E R 1969 Photoreduction of 2,6-dichlorophenol-indophenol by diphenilcarbazine: a photosystem Z reaction catalized by Tris-washed chloroplast and subchloroplast fragments. *Plant Physiol* **44**1645-1649.

TABLE 1

Effect of compounds I-III on electron transport flow in isolated chloroplasts compared to control (100% activity)^a.

Reactions	Concentration of compounds I-III (μM)						% Inhibition			I_{50} (μM)
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	
H ₂ O to MV	300	300	300	71	41	69	121	339	108	
Basal electron flow	300	300	300	71	41	69	121	339	108	
Phosphorylating electron flow	400	400	400	74	66	56	65	-	362	
Uncoupled electron flow	400	400	400	93	ND ^b	82	317	>400	336	
PS I										
DAD to MV	300	-	300	ND ^b	-	ND ^b	-	-	-	
PS II										
H ₂ O to DAD	300	-	200	66	-	100	205	-	145	
H ₂ O to SiMo	300	-	200	70	-	61	210	-	150	
DPC to DCPIP	300	-	200	75	-	83	241	-	173	

^a Control value rates were 777, 775 and 541 $\mu\text{equiv of e}^{-}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg of Chl}^{-1}$ for basal electron flow for I-III, respectively; from phosphorylating electron flow for I-III were 906, 1218 and 968 $\mu\text{equiv of e}^{-}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg of Chl}^{-1}$, respectively. Control value rates for compounds I and III on uncoupled electron transport from PS I were 4750 and 5000 $\mu\text{equiv of e}^{-}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg of Chl}^{-1}$, respectively; on uncoupled electron transport from PS II for III, the control value rate was 477 $\mu\text{equiv of e}^{-}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg of Chl}^{-1}$. Control rates from uncoupled PS II electron transport flow from H₂O to DAD, from H₂O to SiMo and from DPC to DCPIP were 410, 450 and 364 $\mu\text{equiv of e}^{-}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg of Chl}^{-1}$, respectively.

^b Not detected

Legends

Fig 1. Structures of the tested compounds

Fig 2. Effect of encecalin, euparin and demethylenencecalin on ATP synthesis. Each cuvette contained 20 μg of chlorophyll per ml in the reaction medium. Other conditions as described in materials and methods section. Control value were 254, 283 and 302 $\mu\text{mol of ATP}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg of Chl}^{-1}$ for encecalin (●), euparin (○) and demethylenencecalin (■), respectively.

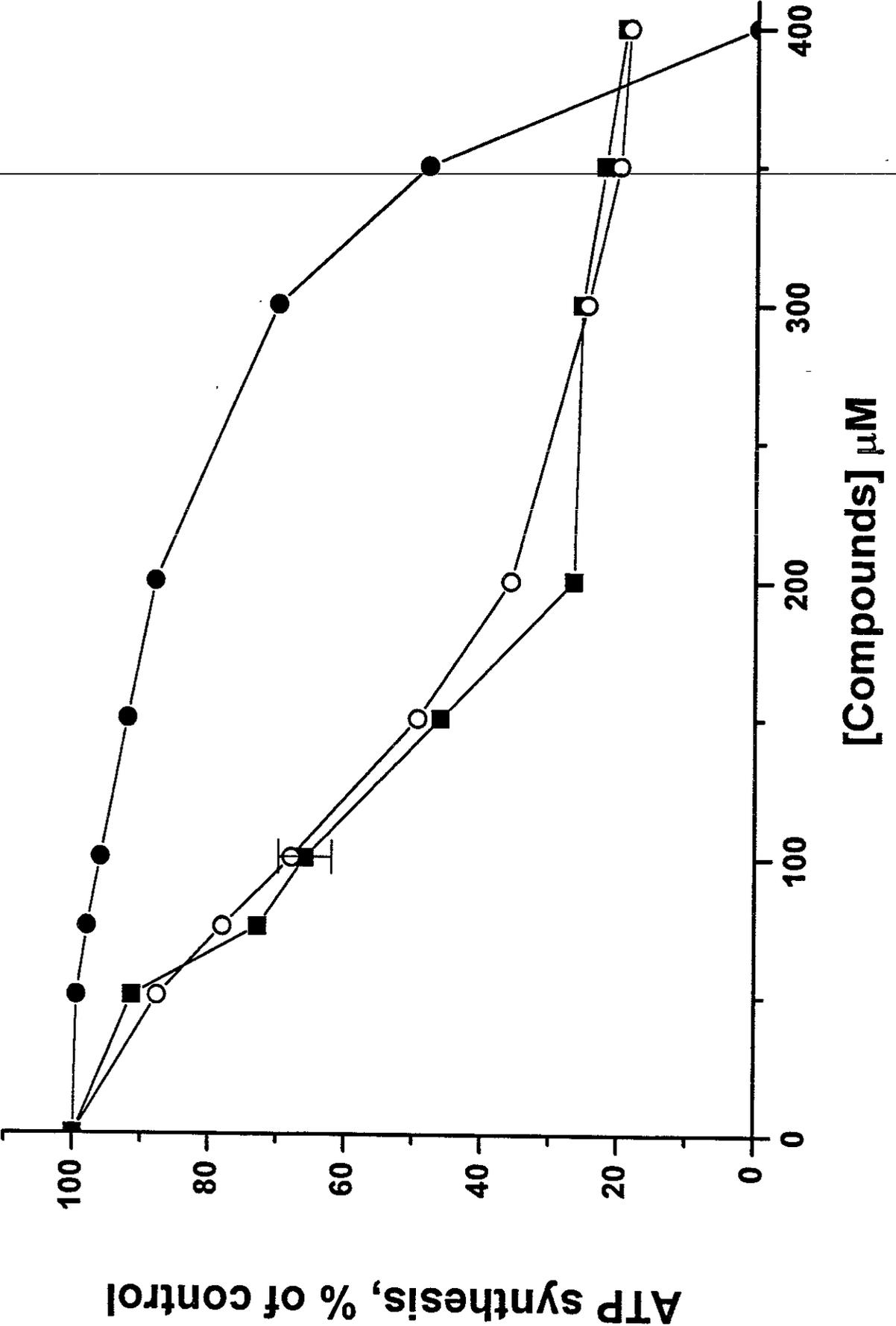
Fig 3. Effect of compounds I-III on proton uptake in chloroplasts isolated from spinach leaves. Each cuvette contained 20 μg of chlorophyll per ml in the reaction medium Other conditions as described in materials and methods. Control value rates were 123, 123 and 132 $\mu\text{equiv of H}^{+}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg of Chl}^{-1}$ for I (●), II (○) and III (■), respectively.

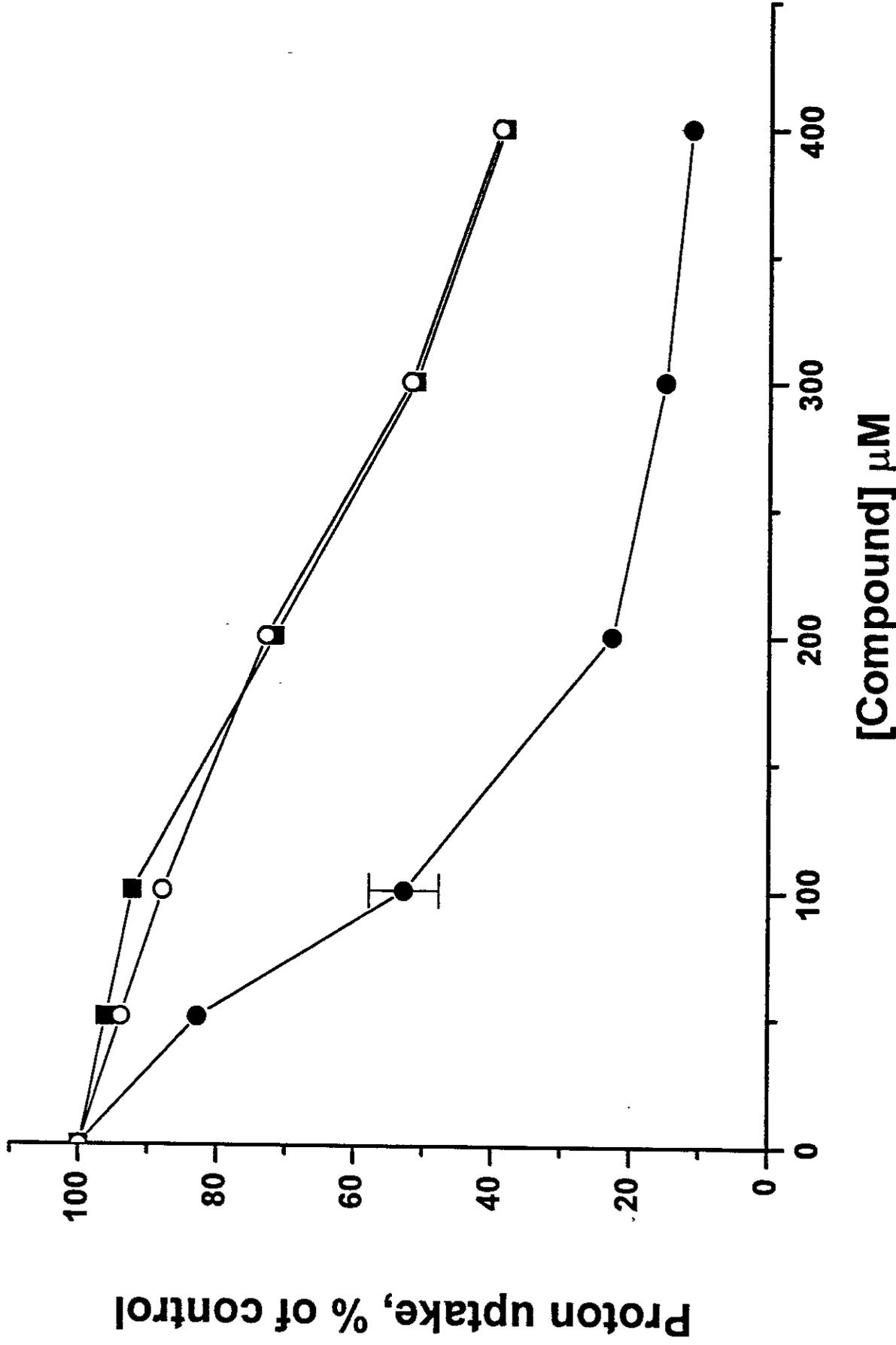
Fig 4. Inhibition of uncoupled electron transport from water to methylviologen by compounds I-III. Each cuvette contained 20 μg of chlorophyll per ml in the reaction medium. Other conditions were as described in materials and methods section. Control value rates were 2060, 2060 and 2054 in $\mu\text{equiv of e}^{-}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg of Chl}^{-1}$ for encecalin (●), euparin (○) and demethylenencecalin (■), respectively.

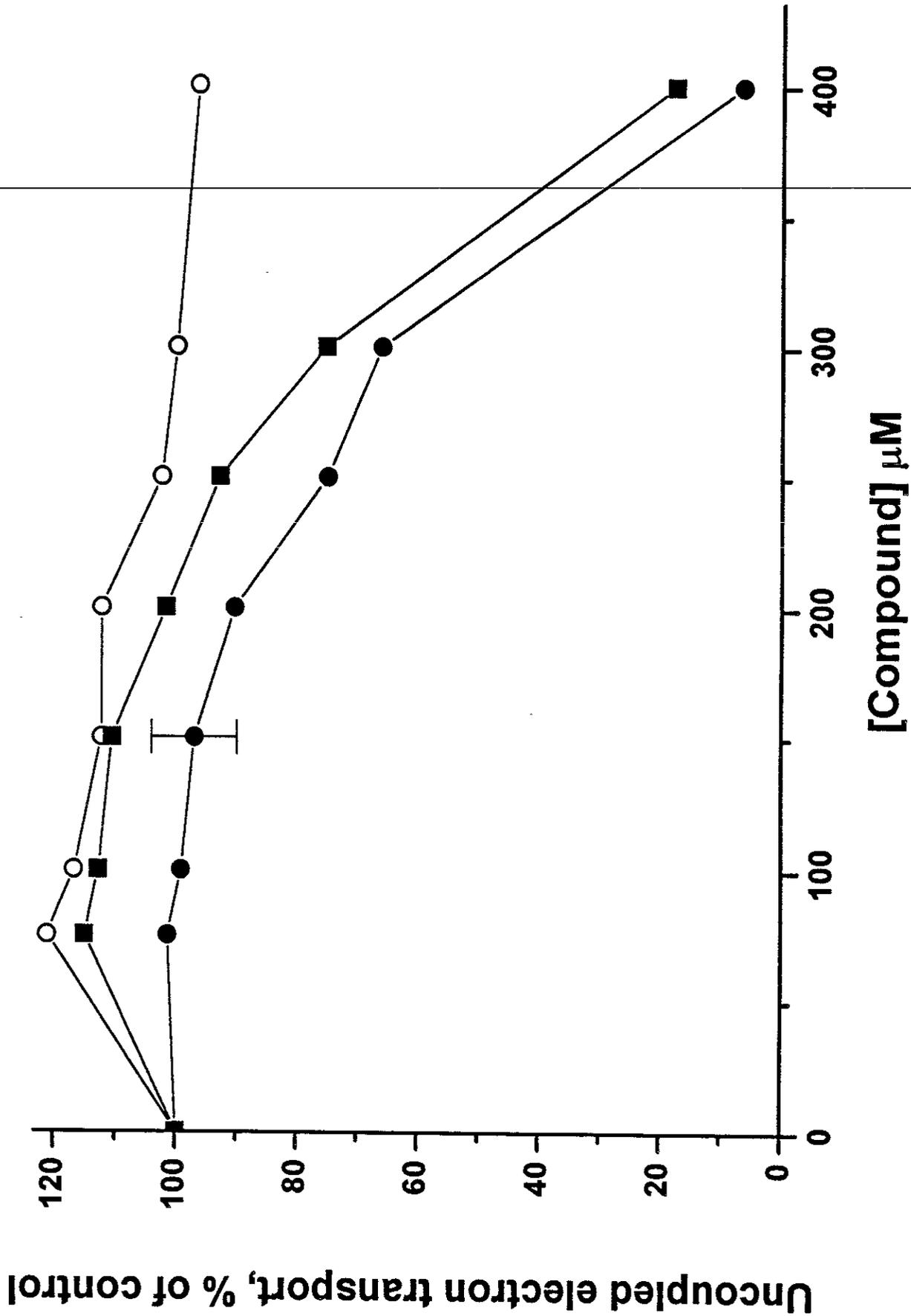
Fig 5. pH dependence of uncoupled electron transport flow in the presence of 250 μM of encephalin (●) and demethylenecalin (■); control (□). Each cuvette contained 20 μg of chlorophyll per ml, either MES (pH 6.0-6.5) or HEPES (pH 7.0-7.5) or tricine (pH 8.0-8.5) in the reaction medium. Other conditions are described in materials and methods section.

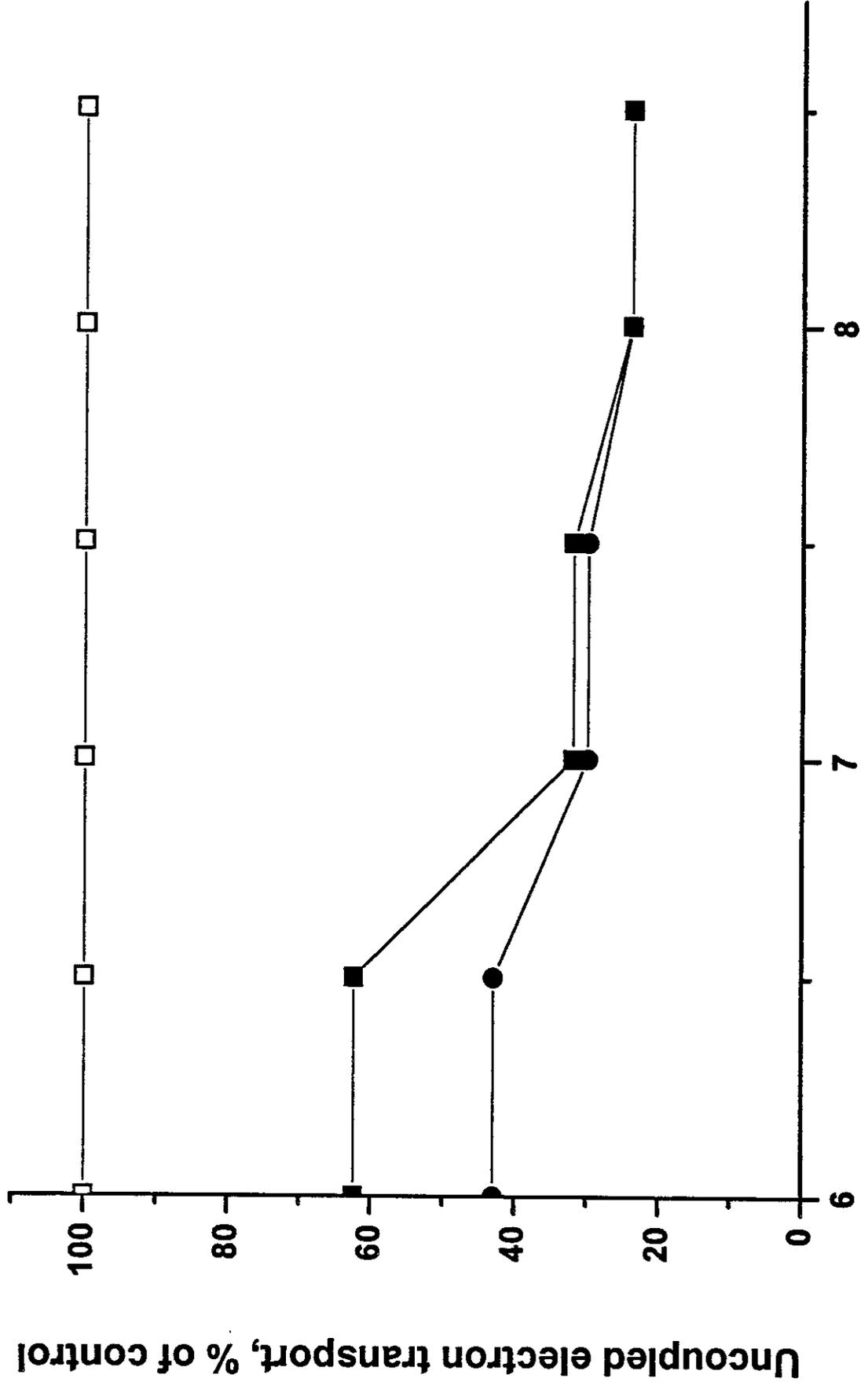
Fig 6. pH dependence of basal electron transport flow in the presence of 250 μM of euparin (o); control (□). Each cuvette contained 20 μg of chlorophyll per ml, either MES (pH 6.0-6.5) or HEPES (pH 7.0-7.5) or tricine (pH 8.0-8.5) in the reaction medium. Other conditions are described in experimental section.

Fig 7. Effect of the euparin on the Mg^{2+} -dependent ATPase activity of chloroplasts. Control value was 341 $\mu\text{moles Pi h}^{-1}\text{mg Chl}^{-1}$.

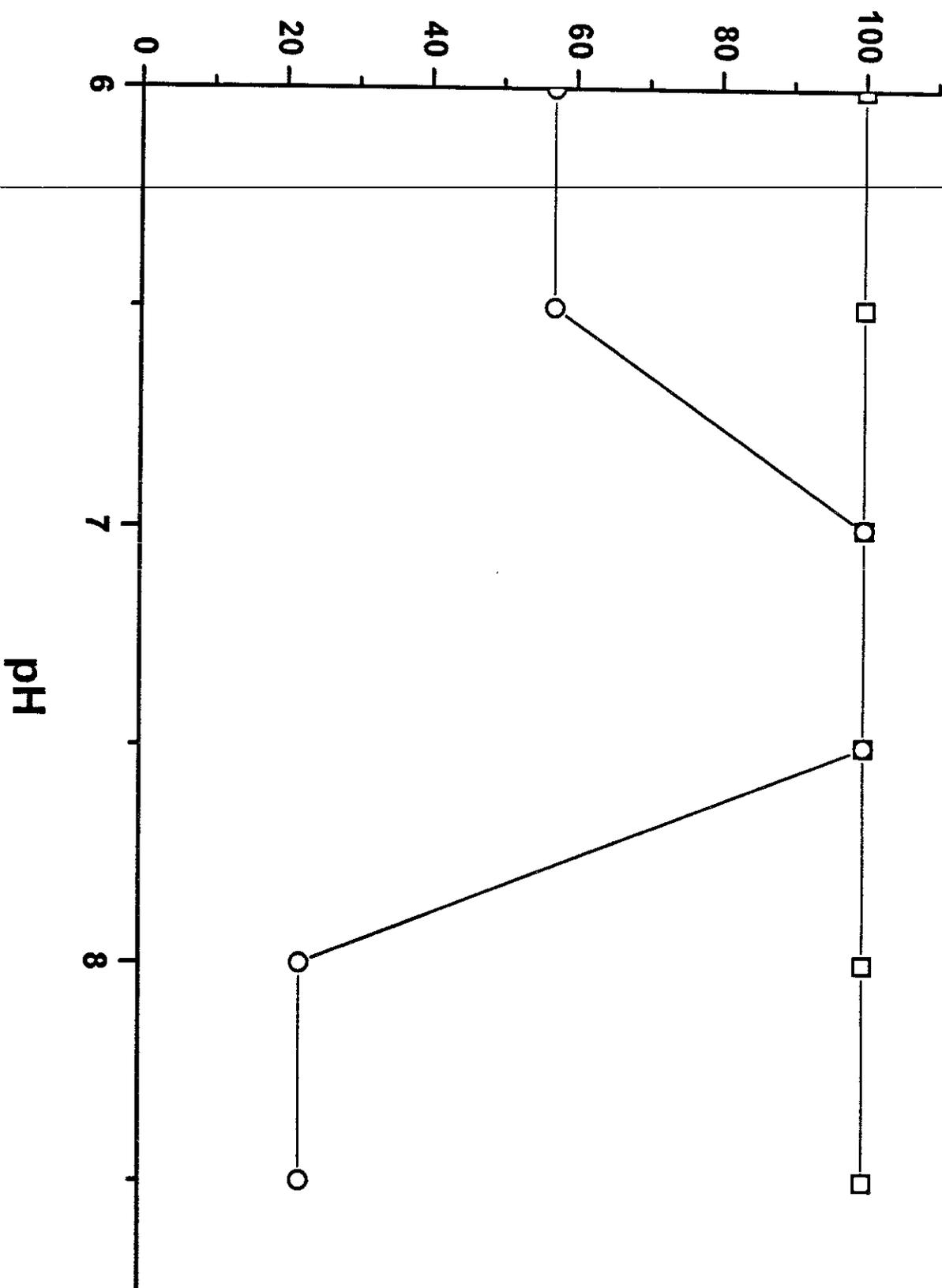








Basal electron transport, % of control



ATPase activity, % of control

