



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ACTIVIDAD HERBICIDA DEL β -CARIOFILENO
AISLADO DE LA PLANTA *Senecio salignus*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

BRAIAN ARTURO SÁNCHEZ MUÑOZ



MÉXICO, D. F.

2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado:

Presidente	Dr. Blas Lotina Hennsen
Vocal	Dra. María Isabel Aguilar Laurents.
Secretario	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. Suplente	Dra. Vanessa Rebeca Maya Ampudia
2°. Suplente	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Sitio de realización de la tesis:

Laboratorio 125 del Departamento de Farmacia y 115, del Departamento de Bioquímica conjunto "E",
División de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM,
Ciudad Universitaria

Asesor:

Dra. María Isabel Aguilar Laurents.

Supervisor Técnico:

M. en C. Beatriz King Díaz

Sustentante:

Braian Arturo Sánchez Muñoz

AGRADECIMIENTOS

A mis padres; Gabriela y Arturo gracias por todo su amor, sus consejos su sabiduría, por formar una persona crítica, conciente sobre todo su entorno, por demostrarme que nunca hay obstáculos en la vida, y sobre todo por compartir su vida entera a mi lado, sin ustedes nada sería posible ya que son la principal pieza que mueve mi mundo "Prometo no defraudarlos jamás"

GRACIAS

A mis hermanos John; Gracias por apoyarme y estar a mi lado en todos los momentos difíciles que viví. vivo y viviré, eres y serás siempre un ejemplo a seguir hermano. Tus virtudes, vivencias y educación te llevarán a lograr todo lo que te propongas

Jack: por seguir tus sentimientos siempre nobles ante los que más lo necesitan y recuerda lo importante es la acción, no el resultado de la acción. Debes hacer lo correcto y lo que mande tu corazón tal vez no esté dentro de tu capacidad, tal vez no esté dentro de tu tiempo pero siempre tendrá un resultado prometedor en el futuro

Dany: por ser siempre sincero y noble ante la familia gracias además de los grandes favores otorgados más que un amigo te consideramos como familia

Eri: porque llegaste en el momento justo de mi vida y a pesar del tiempo y la distancia sabes todo mi sentir cuando más necesite apoyo siempre conté contigo y porque tú serás el resultado de un nuevo rumbo en mi vida.
Te he esperado tantos años, que supe que eras tú desde el momento en que te vi
Recuerda Y así será

A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents, por su gran calidad como persona, por todos sus consejos y sobre todo por su apoyo académico durante la realización de este trabajo de tesis, y sin la cual no habría sido posible. No puedo responder otra palabra mas sincera que gracias y gracias infinitamente.

A la M. C. Beatriz King Díaz, por ser una persona muy sincera, por su apoyo académico, por aquellos momentos de risas interminables y por sus grandes ocurrencias que ayudaron a la realización de este trabajo.

Al Dr. Blas Lotina Hennsen. Por todo el apoyo, académico y su valiosa asesoría.

Al Dr. J. Fausto Rivero Cruz por sus buenos consejos y su valiosa asesoría como profesor para la realización de este trabajo

A mis compañeros del 115 que compartieron momentos inolvidables, a Félix por ser un gran compañero y amigo además de comprobar que no todo es trabajo y siempre hay tiempo para tomar un descanso y comenzar de nuevo, a Nery por todos esos momentos que coincidíamos en ideas y sobre todo en la música, sin la cual me hubiera aburrido totalmente, a Mayleth y Marisol por su compañía y esas grandes platicas que jamás terminaban en nada pero dejaban una gran enseñanza, a Natalia por compartir el espacio que siempre era insuficiente , Ayamai por todos los momentos que vivimos en el pasado.

A mis compañeros de la facultad Ana, Paco, Diego, Chango, y todos aquellos que faltaron por nombrar que en algún momento sintieron la presión por nunca terminar la carrera.

Y por ultimo y no por eso menos importante a todos mis amigos leales que siempre me aceptaron con un buen ladrido y abrazo sin importar el día, hora y situación, me recibían con el mismo amor con el que lo harán siempre y serán correspondidos. Por ellos es la lucha de un mejor futuro para los que se lleguen a cruzar en mi camino.

Juntos por siempre y para siempre

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por darme la oportunidad de formarme como profesionista, como universitario y como humano lo cual es una gran orgullo pertenecer a la máxima casa de estudios

A la Facultad de Química y a todos mis profesores a lo largo de la carrera, por nunca dejar de exigirme y demostrar mi verdadero talento.

A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de esta tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones.

Al personal académico de la USAI, Facultad de Química, UNAM,

Al programa de Apoyo a Proyectos de investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-PAPIIT-DGAPA) con clave IN-211309

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



INDICE

1.	LISTA DE ABREVIATURAS	V-VII
2.	RESUMEN	1
3.	INTRODUCCIÓN	3
4.	ANTECEDENTES	5
4.1.	<i>Senecio salignus</i>	5
4.2.	Características de la especie <i>Senecio salignus</i>	6
4.2.1	Clasificación botánica	6
4.3.	Descripción:	7
4.4.	Distribución geográfica	8
4.5.	Composición química	9
4.6.	Compuestos identificados en la planta <i>S. salignus</i>	9
4.7.	Características de β-cariofileno	10
4.8.	Características del oxido de cariofileno	10
4.9.	Herbicidas	10
4.9.1.	Clasificación de Herbicidas	11
4.9.2.	Factores que afectan la efectividad de los herbicidas	12
4.9.3.	Tipo de flora	12
4.9.4.	Etapas de crecimiento	13
4.9.5.	Condiciones climáticas	13
4.9.6.	Adyuvantes	13
4.9.7.	Mezclas de herbicidas	13
4.10.	Alelopatía	13
4.11.	Herbicidas inhibidores de la fotosíntesis	15
4.12.	Fotosíntesis	15



4.12.1. Clorofila	17
4.12.2. Fotosistemas	17
4.12.3. Fotosistema I	17
4.12.4. Pigmentos antena	18
4.12.5. Fotosistema II	18
4.13. Reacción de Hill	19
4.14. Fotosistema II división de H ₂ O para formar oxígeno	19
4.15. Fotosistema I	20
4.16. Complejo citocromo bf	21
4.17. ATP sintetasa	22
4.18. Fluorescencia de la clorofila a	22
5. OBJETIVOS	25
5.1. Objetivo Principal	25
5.2. Objetivos Particulares	25
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL	26
6.1. Recolección del material vegetal.	26
6.2. Registro de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	26
6.3. Fraccionamiento primario	27
6.4. Purificación de los metabolitos secundarios activos	28
6.5. Bioensayos	29
6.6. Determinación de la Clorofila	29
6.7. Medición en la síntesis de ATP	30
6.8. Medición de la velocidad del transporte de electrones	31
6.9. Germinación in Vitro de <i>Physalis ixocarpa</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i>	32
6.10. Ensayo in vivo de la fluorescencia de la clorofila a en hojas	34



6.11.	Biomasa seca	36
7.	RESULTADOS	37
7.1.	Síntesis de ATP en los extractos orgánicos de <i>Senecio salignus</i>	37
7.2.	Efecto de los extractos orgánicos de <i>S. salignus</i> en la germinación de <i>Trifolium alexandrinum</i> (trébol) y <i>Amaranthus hypocondriacus</i> (amaranto)	38
7.3.	Fraccionamiento primario del extracto hexánico de las partes aéreas de <i>S. salignus</i>	40
7.4.	Fraccionamiento secundario	42
7.5.	Identificación y caracterización del β -cariofileno y del óxido de cariofileno	43
7.6.	Efecto del β -cariofileno y oxido de cariofileno sobre la germinación de <i>Echinochloa crus-galli</i> y <i>Physalis ixocarpa</i>	45
7.7.	Medición de la fluorescencia de la clorofila a <i>in vivo</i> .	47
7.8.	Efectos del compuesto 1 y 2 en la biomasa seca de las plantas de <i>Physalis ixocarpa</i> y <i>L. perenne</i> .	58
7.9.	Biomasa seca	61
8.	CONCLUSIONES	64
9.	APÉNDICE	65
9.1.	Apéndice métodos cromatográficos.	65
9.2.	Medios.	66
9.2.1.	Medio de aislamiento de cloroplastos.	66
9.2.2.	Medio bomba.	66
9.2.3.	Medio de transporte de electrones.	67
9.2.4.	Medio de transporte de electrones sin MV	67
9.3.	Apéndice 3 Espectros	68



9.3.1. Espectro de masas de la fracción 98-119	68
9.3.2. Cromatograma de gases de la fracción 98-119.	69
9.3.3. Espectro de masas del β -cariofileno (1)	69
9.3.4. Espectro de masas del óxido de cariofileno (2)	70
9.4. Espectro de RMN β -cariofileno	71
9.5. Espectro de RMN oxido de cariofileno	72
9.6. Espectros de gases masas oxido de cariofileno	73
9.7. Espectro de gases masas β -cariofileno	74
9.8. Espectro de IR de oxido de cariofileno	75
9.9. Espectro de IR de β -cariofileno	76
10. BIBLIOGRAFIA.	77



1.-LISTA DE ABREVIATURAS

A _o	Aceptor de electrones primario del Fotosistema I
AcOEt	Acetato de etilo
ABS/RC	Tamaño efectivo de la antena en el centro de reacción
ADP	Adenosin difosfato
Area	Area entre la curva de la fluorescencia y F _m
ATP	Adenosin trifosfato
CCF	Cromatografia en capa fina
CCA	Cromatografia en columna abierta
CF ₀	Parte lipofílica del complejo CF ₁ CF ₀ –ATPasa
CF ₁	Parte hidrofílica del complejo CF ₁ CF ₀ –ATPasa
Chl	Clorofila
CHCl ₃	Clororformo
Chl <i>a</i>	Clorofila tipo <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Clorofila tipo <i>b</i>
CH ₃ OH	Metanol
Cyt b ₆ /f	Complejo Citocromo b ₆ /f
DCMU	3-(3,4-dicloro-fenil)-1,1-dimetilurea
Dlo/RC	Disipación efectiva de la energía como calor en un centro de reacción activo



DMSO	Dimetilsulfóxido
dV/dto	Valor que indica el funcionamiento de la enzima que fotoliza el agua
ETo/RC	Transporte de electrones en el centro de reacción activo
eV	Electrón volt
F _A	Ferredoxina tipo A
F _B	Ferredoxina tipo B
FAD	Flavin adenina dinucleótido
Fd	Ferredoxina
F ₀	Fluorescencia inicial
F _m	Fluorescencia máxima
F _v	Fluorescencia variable = F _m -F ₀
GM	Espectrometria de gases masas
Hex-AcOEt	Mezclas de hexano-acetato de etilo
IR	Espectro de Infrarrojo
Hz	Hertz
K _n	Constantes de des-excitación vía no fotoquímica
K _p	Constantes de des-excitación vía fotoquímica
λ _{máx}	Longitud máxima
M ⁺	Ión molecular



MV	1,1'-Dimetil-4,4'-bipiridinium dicloro "Metil viológeno"
NADPH	Nicotina adenina dinucleótido fosfato reducido
NADP ⁺	Nicotina adenina dinucleótido fosfato oxidado
MHz	Mega Hertz
N	Número de recambio de Q_A , indica cuantas veces Q_A es reducido desde el $t = 0$ hasta $t = F_{max}$
OEC	Complejo productor de oxígeno
PC	Plastocianina
PHI(Po)	Probabilidad de que un fotón absorbido por las clorofilas sea atrapado por el centro de reacción el PSII
PHI(Eo)	Indica la probabilidad de que un fotón atrapado por el centro de reacción transporte un electrón mas allá de Q_A
PI	Fosfato inorgánico
PI(abs)	Performance index, eficiencia fotosintética
ppm	Partes por millón
PQ	Plastoquinona
PQH ₂	Plastohidroquinona
PSI	Fotosistema I
PSIo	Indica la probabilidad de que un excitón sea atrapado por el centro de reacción transporte un electrón mas allá de Q_A
PSII	Fotosistema II
P ₆₈₀	Centro de reacción del FSII



P ₇₀₀	Centro de reacción del FSI
Q _A	Aceptor primario de electrones del Fotosistema II
Q _A ⁻	Aceptor primario de electrones reducido del Fotosistema II
Q _B	Aceptor secundario de electrones del Fotosistema II
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
Sum K	Suma de K _p + K _n
TMQH ₂	Tetrametil- <i>p</i> -benzoquinona reducida
Tricina	N-[2-Hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil]glicina
TRo/RC	Máxima velocidad a la cual un excitón es atrapado por el centro de reacción
UV	Luz ultravioleta
VJ	Fluorescencia variable relativa al tiempo 2 ms
V(t)	Fluorescencia variable relativa



2.- RESUMEN

En la búsqueda de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida a partir de plantas mexicanas, en el presente trabajo se investigó la planta *Senecio salignus*. Este trabajo se inició con la obtención de los extractos orgánicos (hexano, cloroformo, y metanol) de las partes aéreas de la planta, los cuales se ensayaron en estudios pre-emergentes como son: la germinación de semillas y el crecimiento de las plántulas de *Trifolium alexandrinum* (trébol) y *Amaranthus hypocondriacus* (amaranto), así como en ensayos post-emergentes *in vitro* como la síntesis de ATP y el transporte de electrones en cloroplastos aislados de hojas de espinaca (ensayos de cernimiento).

Los resultados de los ensayos arriba mencionados mostraron que el extracto hexánico era el más activo como inhibidor de las actividades medidas, por lo que se escogió para continuar el estudio.

El extracto hexánico se fraccionó biodirigidamente por cromatografía en columna abierta (CCA) para obtener los metabolitos secundarios responsables de la actividad inhibitoria, la fracción F6 (30-54) presentó un $I_{50} = 87$ ppm la cual resultó ser la más activa en los ensayos de cernimiento, por lo que se refraccionó en CCA. En la fracción F-J del segundo fraccionamiento, los compuestos. β -cariofileno (1), óxido de cariofileno (2) y cariofilano (3), fueron caracterizados e identificados por métodos espectroscópicos y espectrométricos.

Los compuestos (1) y (2) se ensayaron *in vitro* e *in vivo* para analizar su probable actividad inhibitoria de crecimiento vegetal. En el crecimiento de las plántulas de *Echinochloa crus-galli* y *Physalis ixocarpa* se observó que (1) a 150 ppm inhibió en un 50% la elongación de la raíz y un 20 % la elongación del tallo, en *Physalis ixocarpa*. En cambio el óxido de cariofileno incrementó la elongación del tallo y de la raíz en la misma plántula.



En *Echinochloa crus-galli* el compuesto (1), inhibió un 40% tanto la raíz como el tallo a 150 ppm. El óxido de cariofileno solo inhibió 20% la raíz y 10% el tallo a 150 ppm. La germinación no se vio afectada por los compuestos en ninguna de las dos plántulas.

Al medirse la emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* en las hojas de plantas de tomate (*Physalis ixocarpa*) y de pasto (*Lolium perenne*) crecidas por 20 días en el invernadero, se asperjaron y se midió la fluorescencia de la clorofila *a* a las 24, 48 y 72 hr, observándose que (1) causó daño en el aparato fotosintético en el PSII, tanto en el lado donador como en el lado aceptor las plantas de (*Physalis ixocarpa*). Por otra parte (1) no afectó las hojas de las plantas de *L. perenne*.

El compuesto (2) no mostró efectos significativos en la emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* de ambas plantas.

Los datos obtenidos en biomasa seca demuestran que el compuesto (1) inhibió aproximadamente el 40% el crecimiento de (*Physalis ixocarpa*) planta de tomate a 100 ppm, y en un 15% el pasto (*Lolium perenne*), no obstante los resultados del compuesto (2) mostraron que afecta en menor proporción la biomasa seca, 22% y 4% respectivamente.

Estos resultados sugieren que el compuesto (1) es un candidato a ser empleado como herbicida post-emergente específico para plantas dicotiledóneas.



3.- INTRODUCCIÓN

La Sociedad Norteamericana de Ciencias de las Malezas (WSSA) define como maleza aquellas plantas que crecen donde no son deseadas. Las malezas se caracterizan por competir con los cultivos por agua, nutrientes y luz; además pueden ser hospederos de plagas y enfermedades, reduciendo la calidad del producto cosechado e interferir con las labores de cosecha.

Las malezas presentan características como: a) adaptabilidad, que les ayuda a proliferar en ambientes perturbados, con el suelo y la vegetación natural dañados. b) Se reproducen y crecen rápidamente, tienen semillas que duran años en los suelos. Y c) algunas han desarrollado alelopatía, que es un medio químico que impide el crecimiento y germinación de las plantas vecinas.

Para que los cultivos no se vean severamente afectados, las plagas deben ser controladas (Kogan *et al.*, 2003).

Por tal motivo, la industria de los pesticidas continúa en la búsqueda de compuestos más eficaces, económicos y benignos con el medio ambiente. La mayoría de los herbicidas comerciales han sido el resultado del cernimiento de moléculas sintéticas, lo cual es contraproducente ya que afectan severamente el medioambiente. Así, las estrategias de síntesis de análogos de moléculas comerciales y el diseño molecular de herbicidas basados en un sitio blanco en particular, han resultado de gran interés, debido a la necesidad de contar con compuestos con nuevos sitios de interacción. Así, la búsqueda de herbicidas de origen natural, más benignos para el medio ambiente, debido a su relativo tiempo de vida media (comparándolos con los pesticidas sintéticos), con una actividad biológica selectiva y una toxicidad baja (Duke *et al.*, 1995), ha sido de gran interés por representar una forma más efectiva para combatir las malezas. Por tal motivo,



en este trabajo se presentan los resultados encontrados en nuestro esfuerzo por encontrar metabolitos secundarios con posible actividad herbicida aislados de plantas, en este caso *Senecio salignus*.



4.- ANTECEDENTES

4.1.- *Senecio salignus*

Origen: México.

Nombres comunes: Jarilla, asomiate amarillo, alzumiate, chilca. (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

Izcatzoyatl (náhuatl): “faja de algodón” o “faja de borrego”.

México: Azomiate, azumiate, camisa macho, chilca, flor de dolores, higuierilla, jara, jaral, jara mexicana, jarilla amarilla, jaralillo, pajarilla.

Estado de México: necheloli (náhuatl), ra-yhotitha (otomí), yescha (mazahua).

Michoacán: it oksini (purépecha), thojteni, toksini.

Morelos: izcatzóyatl (náhuatl), alzumihatl.

Oaxaca: baldag shi ingol (zapoteco)

Puebla: atzumiate.

(Argueta y Mata 2009) Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>

Nombre botánico: *Barkleyanthus salicifolius* (H.B.K.) Rob. & Brett especie sinónima de *Senecio salignus*.



4.2.- Características de la especie *Senecio salignus*

Usos: La Planta es muy empleada en la medicina casera, la gente de campo aconseja los baños de agua de jarilla, el cocimiento de las hojas se utiliza como remedio contra las fiebres intermitentes y contra el reumatismo (Rzedowski y Rzedowski, 2001). Además la jarilla se utiliza para el dolor de cintura, muelas, luxaciones y fracturas.

De Chiapas se reporta el uso como insecticida en almacenes de maíz, y se reporta actividad de la raíz contra el gorgojo mexicano *Zabrotes subfasciatus*. (E. López *et al.*, 2007).

Muchas especies de *Senecio* tienen usos medicinales, y los estudios fotoquímicos en algunas de ellas encontraron alcaloides pirrolizidínicos hepatotóxicos; estos causan necrosis y cirrosis del hígado, en humanos y animales domésticos (Romo de Vivar A. *et al.*, 2007).

4.2.1.- Clasificación botánica

Reino: Plantae

División: Spermatophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Compositae

Género: *Senecio*

Especie: *S. salignus*



Figura 1. *S. salignus*



4.3.- Descripción

Arbusto de 1 a 2 (2.5) m de altura, hojas sésiles o subpeciadas (son aquellas hojas en las que el limbo sale directamente de la rama), angostamente lanceoladas, de 1.5 a 9 cm de largo y de 2 a 10 (15) mm de ancho, agudas o acuminadas en el ápice, márgenes con el borde entero o aserrado, atenuadas en la base, cabezuelas radiadas, muy numerosas, de 7 a 10 mm de largo, flores liguladas y del disco, amarillas, de 5 a 6 mm de largo; el fruto es subcilíndrico de 1 a 1.5 mm de largo, de color café-verdoso a negruzco, cerdas de color blanco. Fig. 1 y 2

Planta silvestre que crece a la orilla de caminos, asociada a bosques tropicales, bosque espinoso, matorral xerófilo, pastizal y bosques mesófilo de montaña, de encino, de pino y mixto de encino-pino.



Figura 2. *S. salignus*. (www.conabio.gob.mx)



Distribución: Abundante en áreas abiertas de los bosques de pino.

Época de floración: Febrero a mayo.

Importancia en la apicultura: Abundante productora de polen.

Forma de propagación: Se reproduce por semilla.

4.4.- Distribución geográfica:

En la República Mexicana se encuentra en varios estados como Chiapas, Colima, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Morelos, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sonora, Tabasco y Veracruz, además de Sudamérica (Fig. 3).



Figura 3. Distribución geográfica de la planta *S. salignus* en México.



4.5.- Composición química:

En las ramas se han identificado dos sesquiterpenos derivados del furano eremofilano: un alcaloide de tipo pirrolizidina y el flavonoide quercetina; en la raíz, cuatro sesquiterpenos también derivados del furanoeremofilano (Fig. 4). Estos estudios se han realizado en muestras de la planta obtenidas de México (Bohlmann *et al.*, 1986).

4.6.- Compuestos identificados en la planta *S. salignus*

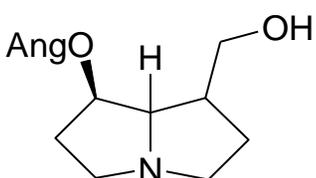
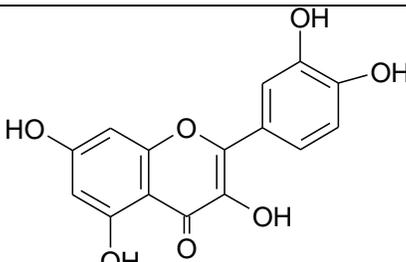
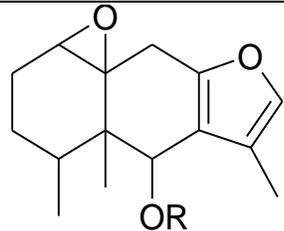
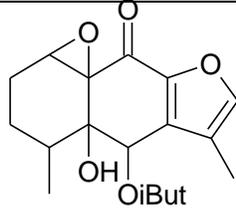
 <p>7-angeliheliotridina</p>	 <p>Quercetina</p>
 <p>6-cetofuranoeremofilano</p>	 <p>Epóxido</p> <p>R= Val R= Met R= Ang</p>

Figura 4. Compuestos identificados en *S. salignus*



4.7.- Características de β -cariofileno:

Es un sesquiterpeno con fórmula molecular $C_{15}H_{24}$ y con un peso molecular de 204 g/mol, se puede aislar de diferentes plantas como *Copaifera langsdorfii*, orégano (*Origanum vulgare*), la canela (*Cinnamomum sp.*), la pimienta negra (*Piper nigrum*) y mariguana (*Cannabis sativa*).

Los usos más conocidos del β - Cariofileno son como agente antiinflamatorio e insecticida y fungicida (Arrhenius y Langenheim, 1983).

4.8.- Características del óxido de cariofileno:

Es un sesquiterpeno con fórmula molecular $C_{15}H_{24}O$ y con un peso molecular de 220 g/mol; se puede obtener de diferentes plantas como, las especies *Hymenea* (leguminosa), el uso más atribuido al oxido de cariofileno es antifúngico. (Arrhenius y Langenheim, 1983)

4.9.- Herbicidas:

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

La mayoría de los herbicidas son compuestos orgánicos, que además del carbono, contienen hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, y en menor proporción algunos contienen cloro, fósforo, azufre y flúor (Kogan *et al.*, 2003).

Sin embargo actualmente la mayoría de los herbicidas utilizados son altamente eficaces pero muchos de ellos producen daños irreversibles al



ecosistema, dañándolo severamente, junto con el alto grado de contaminantes que producen en suelos, aire, agua y diferentes productos.

Existe una preocupación muy importante por lograr una agricultura no contaminante, esto ha llevado a restringir el uso de varios productos que afectan severamente el ecosistema, promoviendo la búsqueda de nuevos herbicidas de origen natural.

Las plantas producen miles de metabolitos secundarios, los cuales tienen funciones específicas y muchas de ellas aún son desconocidas; se sabe que algunos son atrayentes alimentarios para insectos y favorecen la polinización y dispersión de semillas. Muchos de ellos son compuestos que actúan en guerra química contra insectos, patógenos y plantas que lleguen a encontrarse a su alrededor y que compitan por los nutrientes. Este tipo de interacciones son conocidas como Alelopatía (Duke *et al.*, 1987).

4.9.1.- Clasificación de Herbicidas:

Los herbicidas pueden clasificarse de varias maneras dependiendo su actividad, el uso, el modo de acción, o el tipo de vegetación, y entre las más sobresalientes existen los herbicidas de:

Contacto: son aquellos herbicidas que destruyen el tejido fino de la planta al entrar en contacto con el producto químico. Generalmente, estos son más rápidos, pero son menos eficaces en las plantas perennes.

Sistémicos: son aquellos herbicidas que se desplazan en la planta, del uso foliar bajo las raíces, o desde el suelo hasta las hojas. Son capaces de controlar el crecimiento de las plantas perennes, son más lentos pero más eficaces que los herbicidas de contacto.

Clasificación por su uso:

Clasificación	Aplicación
Suelo-aplicado	Se aplican en el suelo y son tomados por las plantas desde las raíces hasta



	la hoja
Pre-planta	Se aplican previamente antes de plantar y son incorporados previamente por la planta mecánicamente
Pre-emergentes	Se aplican en el suelo antes de que la maleza emerja y previene la germinación o el crecimiento temprano de malezas
Post-emergentes	Son aquellos que se aplican una vez que la maleza ha emergido

4.9.2.- Factores que afectan la efectividad de los herbicidas

El funcionamiento de varios herbicidas se encuentra bajo la influencia de varios factores como la flora, la etapa de crecimiento de hierbas y cosechas, el tipo de suelo, condiciones climáticas, formulaciones (adyuvantes) y la presencia de otros pesticidas en la competitividad por los nutrientes (Kudsk *et al.*, 2002).

4.9.3.- Tipo de flora

Probablemente sea el factor más importante y determinante en la acción de un herbicida, los estudios de dosis-respuesta y varios experimentos han revelado una gran diferencia en susceptibilidad de diferentes especies de hierbas. Las especies altamente susceptibles pueden ser controladas con dosis dos o cuatro veces menores comparadas a las especies menos susceptibles.

El principal obstáculo es explotar todas las diferencias de susceptibilidad entre la especies con una identificación temprana en las etapas de crecimiento de las especies (Kudsk *et al.*, 1989, 2002).



4.9.4.- Etapa de crecimiento

La etapa de crecimiento es otro factor en la optimización de un herbicida, generalmente las especies anuales son más susceptibles cuando están comenzando a crecer que después de haber crecido (Kudsk, 1989).

4.9.5.- Condiciones climáticas

A pesar del hecho de que las condiciones climáticas puedan influenciar el funcionamiento de los herbicidas significativamente, se pueden reducir las dosis bajo condiciones favorables, esto se encontró con diferentes estudios en simuladores climáticos para lograr entender el complejo Herbicida-planta-ambiente y las interacciones en los parámetros climáticos, sin embargo la relevancia en situaciones de campo es aún más complejo y cuestionable (Kudsk, 2001).

4.9.6.- Adyuvantes

La adición de adyuvantes y la presencia de otros pesticidas pueden influenciar en el funcionamiento de un herbicida. Los adyuvantes y otros ingredientes de las formulaciones son considerados biológicamente inactivos pero influyen la retención como la toma del herbicida aumentando o disminuyendo la cantidad del ingrediente activo para alcanzar el sitio de acción (Kudsk 2002).

4.9.7.- Mezclas de herbicidas

En contraste con la eficacia de los adyuvantes y formulaciones, el funcionamiento de mezclas de dos o más herbicidas es más complicado ya que requiere de un modelo de referencia bien definido y un diseño experimental (Kudsk y Streibig, 2003).

4.10.- Alelopatía

La alelopatía es un fenómeno que implica la inhibición directa o indirecta de una especie, ya sea vegetal o animal, utilizando sustancias tóxicas que pueden ser los metabolitos secundarios de la planta los cuales son acumulados en sus órganos y existen en una gran variedad.



El uso de la alelopatía es un método alternativo para el control de malezas. La alelopatía es un fenómeno natural que se refiere a los efectos perjudiciales o benéficos que puede provocar la acción de diferentes compuestos químicos liberados por una planta y que ejerce su efecto sobre otra, afectándola de manera directa o indirecta.

En todos los fenómenos alelopáticos existe una planta donador que libera al medio ambiente por una determinada vía (lixiviación, descomposición de residuos, exudación o volatilización), compuestos químicos que pueden ser incorporados a la planta receptora provocando un efecto sobre la germinación, crecimiento y desarrollo de la misma (Fig. 5).

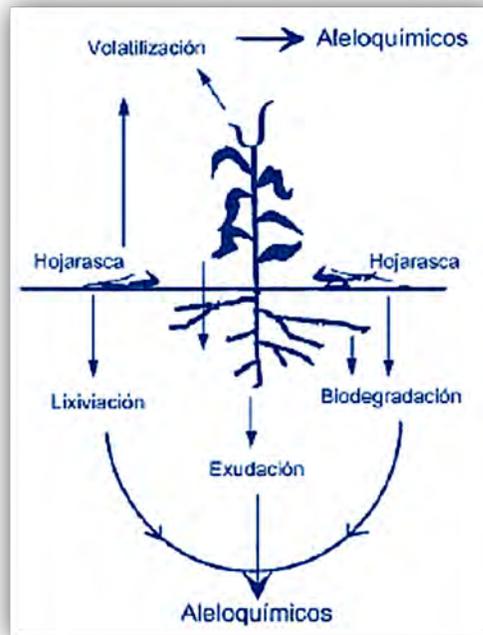


Figura 5. Vías de liberación de agentes alelopáticos

El impacto de la aleloquímica ha llevado a estudiar más este campo que abre las puertas en la producción de los metabolitos secundarios, conduciendo hacia metas más ecológicas, eficientes y en la búsqueda de encontrar nuevas alternativas que nos permitan aprovechar dicho potencial.

En México existe una gran biodiversidad de plantas lo cual es componente principal para poder llevar a cabo esta investigación, dirigida a la exploración de nuevas alternativas de productos naturales con actividad herbicida



(biodegradables y con baja toxicidad) para su conservación y aprovechamiento racional.

4.11.- Herbicidas inhibidores de la fotosíntesis

Se ha demostrado que los mecanismos de acción de algunos herbicidas pueden ser por un proceso metabólico, la fotosíntesis es el proceso metabólico afectado por una gran variedad de herbicidas, sin embargo muchos de sus sitios de acción son desconocidos, la mayoría de ellos ejerce su efecto a través de la inhibición de la cadena de transporte de electrones del fotosistema II, esto significa que inactiva o elimina los intermediarios del transporte de electrones en la región donadora del sistema.

Otros inhiben la fotofosforilación o síntesis de ATP interaccionando a nivel de la enzima H^+ -ATPasa, o bien actúan como desacoplantes y aceptores de electrones (Moreland, 1980; Corbett, 1984). Los herbicidas que inhiben la fotosíntesis son los más estudiados por su baja toxicidad en mamíferos (Lotina *et al.*, 1989).

4.12.- Fotosíntesis

La Fotosíntesis es un proceso metabólico por medio del cual la planta es capaz de sintetizar materia orgánica a partir de las moléculas inorgánicas que encuentra en el medio y energía luminosa o luz solar.

El proceso de la fotosíntesis se lleva a cabo en los órganos especializados llamados cloroplastos, los cloroplastos constan de una membrana externa, una interna y una serie de pequeños sacos llamados tilacoides, en cuyas membranas se forma la clorofila y pigmentos propios de la planta.

El espacio restante en el interior de los cloroplastos queda cubierto por un fluido llamado estroma, la reacción de la fotosíntesis se produce en las membranas tilacoidales, donde la clorofila es capaz de absorber la luz, la absorción de esta luz produce una reacción química cuando la energía de los



fotones descompone el agua y libera oxígeno junto con protones y electrones. A su vez los electrones excitados son transmitidos por medio de una serie de aceptores en la cadena de transporte de electrones, los electrones se utilizan para sintetizar dos moléculas encargadas de almacenar y transportar la energía; ATP y NADP, al mismo tiempo los protones bombeados hacia el interior de la membrana tilacoidal impulsan la producción de ATP. Los electrones excitados reducen el NADP^+ a NADPH, y la energía almacenada se emplea en el segundo acto para la biosíntesis de glucosa en el exterior oscuro del estroma, fuera de la membrana tilacoidal. El ATP y NADPH se utilizan en la siguiente fase de la fotosíntesis para transformar el dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O), para la producción de materia orgánica.

La mayoría de los herbicidas, ejercen su efecto a través de la inhibición del transporte de electrones fotosintético en el lado reductor del fotosistema II, e inactivan o eliminan a alguno de los intermediarios del transporte de electrones en la región donadora de este sistema. Otros inhiben la fotofosforilación o síntesis de ATP interaccionando a nivel de la enzima H^+ -ATPasa, o bien actúan como desacoplantes y aceptores de electrones (Moreland, 1980; Corbett, 1984).

La reacción del proceso se simplifica y muestra en la Fig. 6

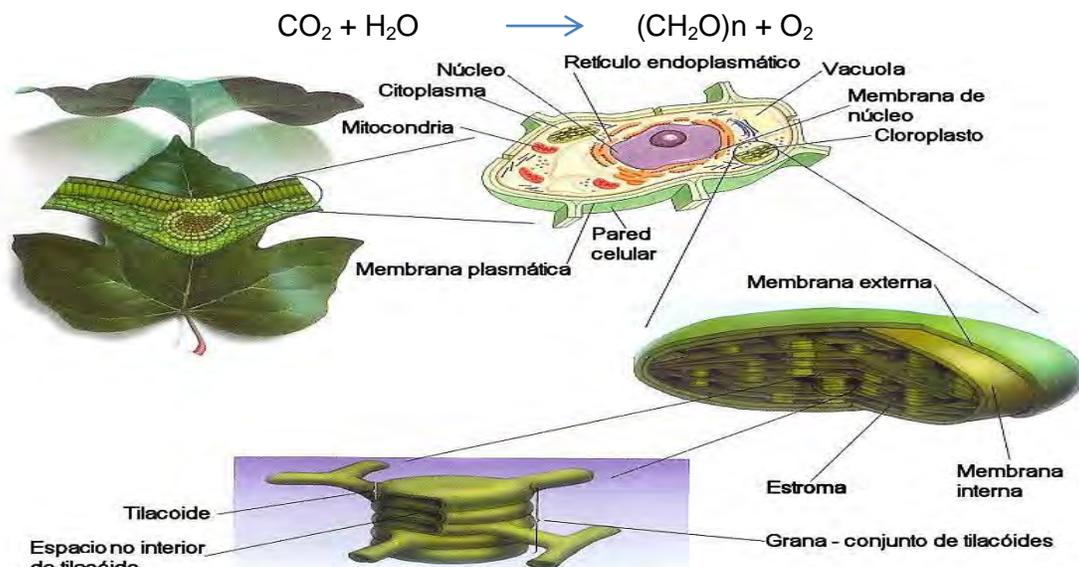


Figura 6. Estructura del cloroplasto y organelos internos de la célula vegetal (En: Carrajola, 2007b).



4.12.1.- Clorofila

La clorofila es el pigmento fotorreceptor responsable de la primera etapa en la transformación de la energía de la luz solar en energía química. El evento primario de la fotosíntesis es la absorción de la luz por la clorofila; hay dos tipos principales de clorofila, la clorofila *a* y la clorofila *b*. La diferencia entre ellas es que la clorofila *b* tiene un grupo formilo (-CHO) en lugar de un grupo metilo de la clorofila en uno de los carbonos del anillo de porfirina. En los vegetales superiores, la más abundante es la clorofila *a* además de que los espectros de absorción de las clorofilas *a* y *b* difieren levemente, ambas absorben en la porción roja y azul del espectro visible (600 a 700 nm y 400 a 500nm respectivamente).

En la fotosíntesis intervienen cuatro componentes básicos;

Fotosistema I	PSI
Fotosistema II	PSII
Cadena transportadora de electrones	
Enzima ATP-sintetasa	

4.12.2.- Fotosistemas

Se puede definir fotosistema como el conjunto de proteínas transmembranales que engloban a los pigmentos fotosintéticos cuya función es captar la energía luminosa para poder utilizarla durante el transporte de electrones.

4.12.3.- Fotosistema I

El fotosistema I es el encargado de captar la energía luminosa de una longitud de onda menor o igual a 700 nm, la clorofila especial se denomina P₇₀₀.



4.12.4.- Pigmentos antenna

Sirven para captar la luz, pero no inician ningún tipo de reacción, en las plantas superiores predomina la clorofila *a* sobre la clorofila *b* que se encuentra en menor proporción.

4.12.5.- Fotosistema II

Capta la energía luminosa de longitud de onda igual o menor a 680 nm, la clorofila especial se denomina P₆₈₀.

Ambos fotosistemas deben funcionar para que el cloroplasto produzca NADPH, ATP y O₂ en la cadena de transporte de electrones.

La absorción de luz por P₆₈₀ permite la transferencia de electrones a la cadena de transporte que relaciona el PS II con PS I generando un agente oxidante suficientemente fuerte como para dividir la molécula de H₂O y producir O₂. Cuando P₇₀₀ absorbe la luz, se produce energía necesaria para permitir la reducción del NADP⁺, este proceso se puede representar en un diagrama conocido esquema Z (Fig. 7)

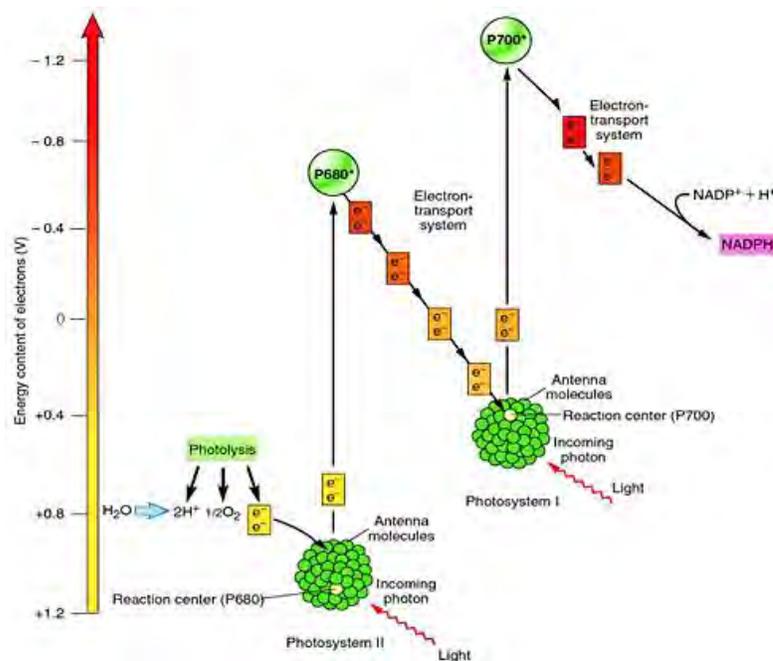


Figura 7. Esquema de los fotosistemas I y II reacción de Hill (Bioquímica . Jhon Wiley & Sons)

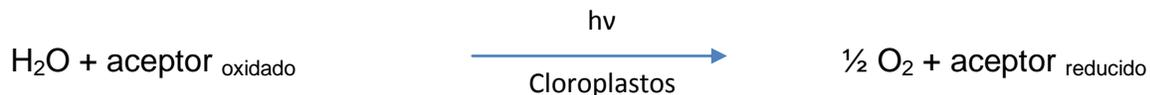


4.13.- Reacción de Hill

La captación de la radiación electromagnética y la transformación en energía química se encuentran en los cloroplastos, la fase luminosa es la primera etapa de la fotosíntesis, que convierte la energía solar en energía química, la luz es absorbida por las clorofilas de la planta.

Robert Hill separó las reacciones luminosas de las oscuras, descubriendo que los cloroplastos iluminados carecían de CO_2 , en presencia de un aceptor artificial de electrones como el ferrocianuro se producía O_2 con la reducción del aceptor a ferrocianuro.

Esta reacción se define como la foto-reducción de un aceptor de electrones, ya sea natural o artificial a costa del H_2O produciendo O_2 y se indica a continuación:



4.14.- Fotosistema II división de H_2O para formar oxígeno

El fotosistema II es el primer complejo de la proteína en la fotosíntesis dependiente de la luz, la absorción se produce en una onda menor a 680 nm, lo cual produce la excitación del centro de reacción en la clorofila, la cual es excitada produciendo la separación de un electrón, transfiriéndolo a feotina (una clorofila sin Mg^{2+}), llevándolo a su forma reducida. La oxidación de las moléculas de H_2O ocurre a partir de los electrones. Los electrones liberados por la oxidación del agua son transmitidos principalmente a P 680, la cual es reducida de la siguiente manera.





Para los pasos intermediarios se requieren dos pares de electrones, para lograr oxidar el H_2O y P680^+ los cuales sólo pueden aceptar un electrón a la vez. Para tal proceso se requiere una proteína que contenga Manganeseo y otros componentes que sirvan como intermediarios para la transferencia de electrones y acoplar los dos pares de electrones donados por dos moléculas de H_2O permaneciendo en el lumen tilacoidal.

El electrón expulsado por P680^+ se transfiere a la molécula de feofitina (Ph) quien previamente después sede el electrón al complejo de Plastoquinona-Fe (II) designando Q_A , quien después transfiere dos electrones a una segunda molécula de Plastoquinona Q_B , que captura los protones en la superficie del estroma para formar Q_BH_2 , quien se disocia de su proteína y se difunde a través del centro de reacción. Los electrones de Q_BH_2 son transferidos a través de los acarreadores unidos a través de la membrana hasta NADP^+ , reduciéndolo a NADPH y liberando H^+ .

Los electrones de Q_BH_2 pasan del citocromo b6/f a la plastocianina (PC), la cual es una proteína acarreadora de electrones que contiene cobre, y después los electrones son transferidos desde la plastocianina al fotosistema I.

4.15.- Fotosistema I

El siguiente evento en la cascada del transporte de electrones comienza cuando la luz solar es captada por las moléculas a y b de la clorofila así como los complejos antenas (pigmentos). El primer paso consiste en que el centro de reacción P_{700}^+ pierde un electrón y lo dona a un aceptor A_0 ; nuevamente la excitación de estos centros reactivos produce una separación de cargas en el centro de reacción P_{700} el cual es un oxidante fuerte el cual recibe un electrón de la PC. La clorofila en un estado excitado transfiere su electrón a la molécula de Ferredoxina que a su vez se reduce a una enzima que contiene FAD denominada Ferredoxina NADP reductasa. La porción de FAD de la enzima reduce el NADP^+ a NADPH (Fig. 8).



Para la producción de NADPH se requiere un electrón por cada una de ferredoxinas.

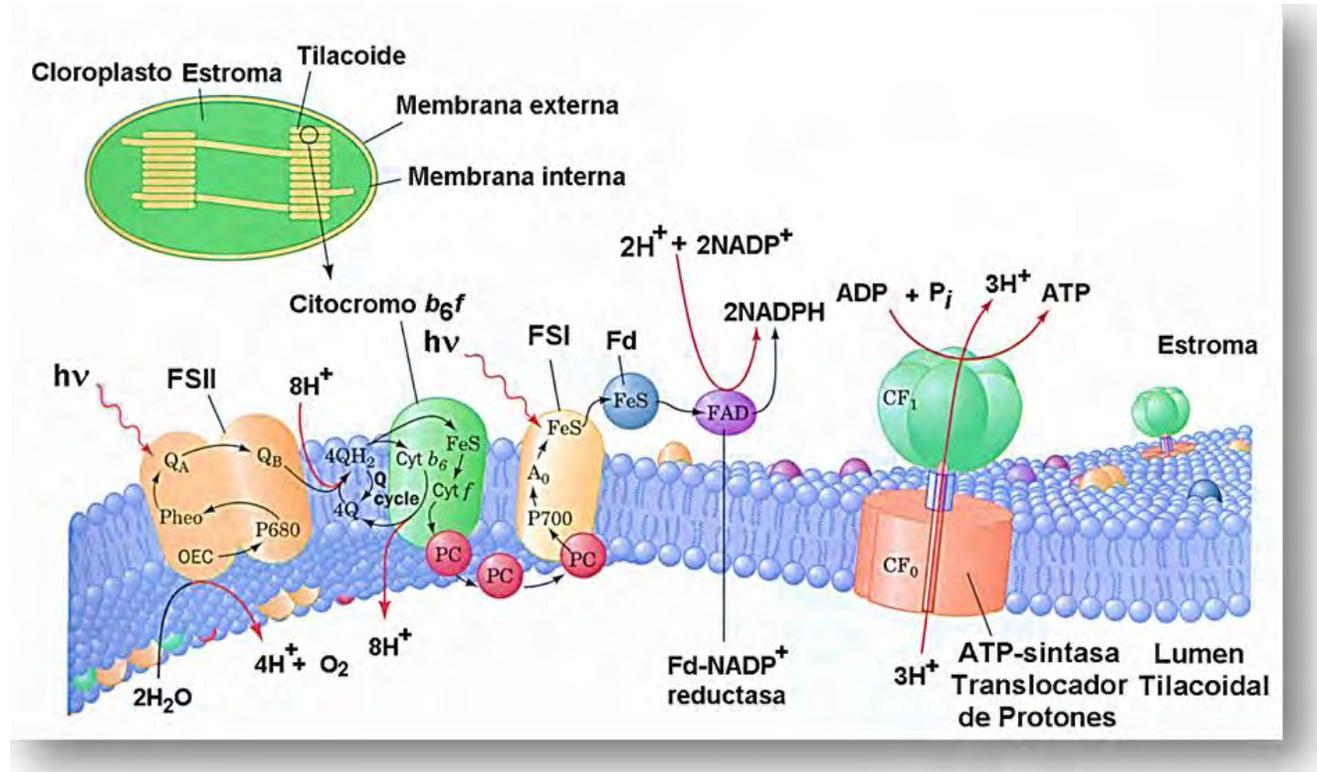


Figura 8. Representación esquemática de la membrana tilacoidal que muestra los componentes de su cadena de transporte electrónico. El sistema consta de tres complejos proteicos: el fotosistema II, el complejo citocromo *bf* y el fotosistema I, que se encuentran conectados mediante la plastoquinona y plastocianina (En: Voet, 2005).

4.16.- Complejo citocromo *bf*

El complejo *bf* contiene un citocromo tipo *b* con dos grupos hemo, una proteína hierro azufre y un citocromo *f*.

Este complejo está implicado en la transferencia de electrones de la membrana tilacoidal, su función principal es conectar al fotosistema I con el



fotosistema II; este complejo es quien bombea protones del estroma del cloroplasto al lumen tilacoidal, a medida que los electrones fluyen por la cadena transportadora de electrones, el flujo de electrones proviene de Q_BH_2 a través de del complejo citocromo *bf* hasta el citocromo *f*.

4.17.- ATP sintetasa

Es un complejo enzimático en la membrana tilacoidal que cataliza la síntesis de ATP, a partir de ADP y P_i , con formación de agua. Al proceso de síntesis de ATP se le denomina fotofosforilación, al complejo ATP sintetasa se le denomina factor de acoplamiento porque acopla la formación de ATP con el transporte de electrones.

Existen varias reacciones que contribuyen con un gradiente de protones en los cloroplastos. La oxidación del agua llega a liberar protones al espacio tilacoidal. La ATP sintetasa consta de dos partes: CF1 y CF0, que son componentes de la cadena de transporte de electrones los cuales están ordenados de manera consecutiva para efectuar la cascada del transporte de electrones. La liberación de ATP y NADPH que se produce en la reacción de la fotosíntesis se efectúa en la fase oscura de la fotosíntesis.

4.18.- Fluorescencia de la clorofila a

La fotosíntesis es el proceso por el cual las plantas, algas, cianobacterias y bacterias fotosintéticas convierten la energía luminosa en energía química en forma de enlaces químicos y es la base de todas las cadenas alimenticias de las que depende la vida animal.

El proceso fotosintético se inicia cuando la luz es absorbida por los pigmentos fotosintéticos (básicamente clorofilas *a* y *b*). Parte de la energía absorbida es transferida como energía de excitación y atrapada por el centro de



reacción y la otra parte es disipada principalmente como calor y en menor grado re-emitada como energía luminosa de menor energía (fluorescencia). Un fotón de luz roja contiene suficiente energía para excitar una molécula de clorofila *a*, a su primer estado excitado, llamado singulete.

La diferencia de energía entre los dos niveles es la energía del fotón absorbido. La molécula de clorofila *a* excitada libera esta energía y regresa a su estado basal. Durante este período de tiempo, ocurre una separación de carga en el centro de reacción, es decir el electrón en el nivel de alta energía puede ser transferido a un aceptor, formando un aceptor reducido I^- lo que comprende el primer paso de la fotosíntesis. Si la separación de carga no se lleva a cabo, la energía absorbida es liberada como calor y/o fluorescencia cuando el electrón excitado regresa al estado basal. La relación entre los tres procesos, fotoquímico (P), fluorescencia (F) y calor (desactivación por la radiación, D), es expresada matemáticamente usando constantes de velocidad (Bolhár-Nordenkampf and Öquist, 1993).

El evento fotoquímico primario utiliza alrededor del 97% de la luz absorbida, mientras que el 2.5 % es transformada en calor y 0.5% es re-emitada como luz fluorescente roja. En las plantas, las moléculas de clorofila *a* se encuentran asociadas a los fotosistemas I y II que son los responsables de la emisión de la fluorescencia. La fluorescencia emitida es determinada por la intensidad luminosa de excitación, la concentración de pigmentos que absorben la luz, la transferencia de la energía de excitación y la orientación de los pigmentos fluorescentes.

Al iluminar con luz continua las hojas adaptadas a la oscuridad o una suspensión de hojas de plantas superiores, algas o cianobacterias, se observan cambios característicos en la intensidad de la fluorescencia de la clorofila *a*. La curva de fluorescencia conocida como curva de inducción de Kautsky (Strasser et al., 1995) mostró una fase de incremento rápido de fluorescencia en el primer segundo de iluminación seguida de una fase lenta o de declive de fluorescencia durante varios minutos; la fase rápida es llamada O-J-I-P y está relacionada principalmente con eventos primarios del PSII. Por otro lado, la fase lenta



compuesta de las fases o inflexiones después de P y seguida de S-M-T, está asociada principalmente con interacciones entre procesos de las membranas de los tilacoides y procesos metabólicos del cloroplasto. Principalmente relacionado con la asimilación de CO_2 (Fig. 9).

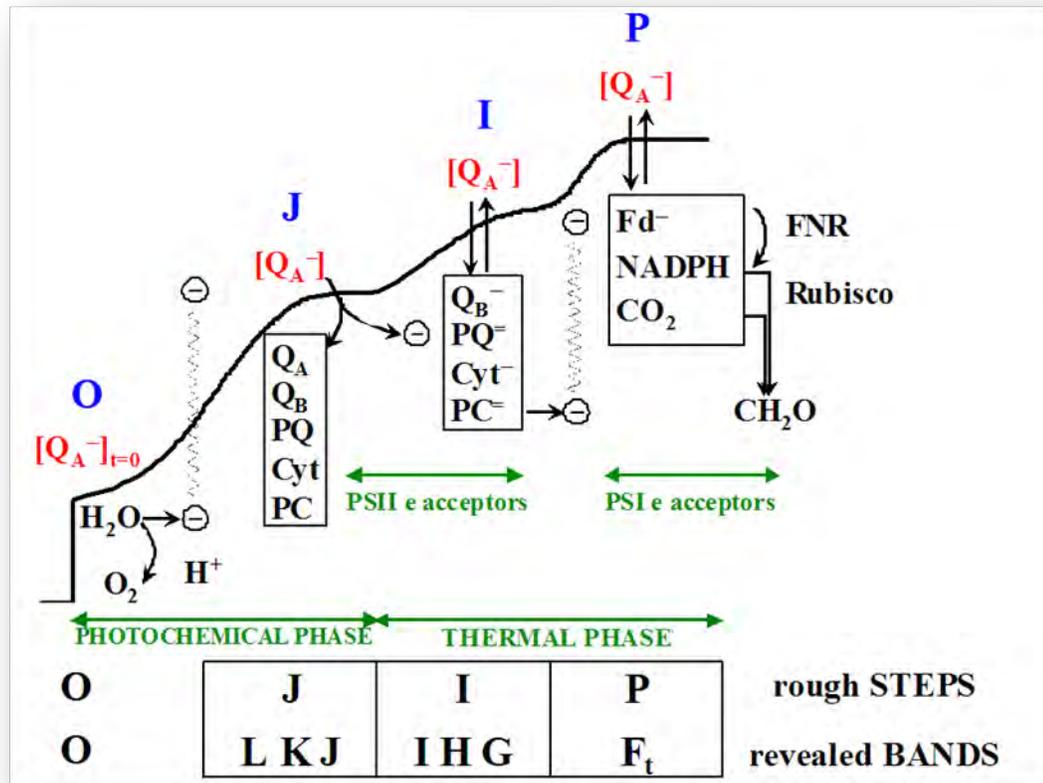


Figura 9. Curva de inducción de la fluorescencia, o curva de Kautsky de cloroplastos adaptados a la oscuridad por 30 minutos.



5.- OBJETIVOS

5.1.- Objetivo Principal

- Obtención de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida a partir de extractos orgánicos de la planta *Senecio Salignus*.

5.2.- Objetivos Particulares

- Obtención de diferentes extractos orgánicos (hexánico, clorofórmico y metanólico) a partir de las partes aéreas de *S. salignus*.
- Medición de la actividad de los diferentes extractos orgánicos en la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de hojas de espinaca (ensayo de cernimiento).
- Evaluación de la actividad de los extractos orgánicos en ensayos de germinación de dos semillas, *Trifolium alexandrinum* y *Amaranthus hypochondriacus* (dicotiledóneas), para actividad pre-emergente.
- Fraccionamiento biodirigido del extracto activo para obtener el o los metabolitos puros responsables de la actividad inhibitoria.
- Caracterizar la estructura química del o los metabolitos obtenidos de *Senecio salignus* con posible actividad herbicida.



6.- DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1.- Recolección del material vegetal.

La planta *Senecio salignus* fue colectada en el Cañón del Zopilote en el Estado de Guerrero en el año 2007, por los profesores Nelly Diego y José Ricardo de Santiago. Un ejemplar está depositado en el Herbario Nacional MEXU.

6.2.- Registro de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

La determinación de los análisis espectroscópicos y espectrométricos de los metabolitos secundarios se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM.

Para los análisis de IR se utilizó un espectrofotómetro FTIR- Modelo Spectrum RX-1 Perkin Elmer.

La técnica de Cromatografía de gases / Espectrometría de masas empleó un equipo Thermo electron Corporation. Trace GC Ultra.High resolution Magnetic Sector M3DFS; Leco pagasos III. Agilent Technologies.

Para las fracciones como el β -cariofileno y el óxido de cariofileno, la espectroscopía de RMN se determinó a 300 MHz en ^1H , en un espectrómetro analítico VARIAN INOVA 300 / 75.5 VNMRS Mod. Como disolvente se emplearon CDCl_3 o CD_3COCD_3 y los desplazamientos químicos se designaron en unidades δ (ppm), referidos a TMS o CDCl_3 como referencia interna.

Preparación de muestras para los bioensayos.

La preparación de los extractos procede en pesar 10mg del compuesto o extracto y disolverlo en 1mL de DMSO.



6.3.- Fraccionamiento primario

La planta *Senecio salignus* fue secada en su totalidad para posteriormente pulverizarla (todas sus partes aéreas) y someterla a una maceración exhaustiva con diferentes disolventes hexano, metanol y cloroformo a temperatura ambiente.

El disolvente fue evaporado para recolectar el extracto crudo (2 g) por cada 50 mL de disolvente empleado.

Para cada extracto y algunas fracciones se realizaron las pruebas preliminares de actividad inhibitoria de crecimiento vegetal (síntesis de ATP y germinación de semillas), utilizando las concentraciones que se refieren en los apartados 6.7 y 6.8, las cuales indicarían el extracto activo con posible actividad herbicida de la planta *S. salignus*.

De los extractos orgánicos obtenidos, el más activo como inhibidor de las actividades medidas fue el hexánico, por lo que se procedió a su biofraccionamiento mediante una cromatografía de columna abierta, aplicando 22 g de extracto, utilizando silica gel 60 (063-0.200,400 g) y un sistema de elución con un gradiente de polaridad ascendente con hexano-AcOEt y después con acetona 100 %.

Las fracciones fueron recolectadas en volúmenes aproximados de 100 mL, las cuales después de calentar fueron analizadas por cromatografía en capa fina, usando como reveladores luz UV (lámpara Spectroline UVGL-25) de onda corta 254 nm y onda larga 366 nm y sulfato cérico amoniacal (Apéndice 1) como agente cromógeno, y exposición a 100°C durante 5 minutos en una placa caliente, para lograr el desarrollo de color. Las fracciones que presentaban similitud en composición química, fueron colectadas, obteniendo 17 fracciones primarias de 275 eluatos. El procedimiento de obtención de los compuestos activos se presenta en la Fig. 10.



6.4.- Purificación de los metabolitos secundarios activos

La fracción 30-54 presentó actividad en la prueba de transporte de electrones, teniendo un efecto inhibitorio con un $I_{50} = 87$; este efecto inhibitorio está en el rango para caracterizarlo como posible herbicida, y dado que la fracción 30-54 resultó ser compleja se realizó un segundo fraccionamiento cromatográfico en columna abierta de gel de sílice, en el cual se obtuvieron 465 fracciones las cuales por similitud fueron recolectadas en 30 fracciones nombradas de la A – Z, continuando con α , β , γ , y ψ .

El β -cariofileno y el óxido de cariofileno fueron identificados en la fracción 98-119, por cromatografía de gases-espectrometría de masas, demostrando esta fracción un efecto inhibitorio con posible actividad herbicida con $I_{50} = 19.01$ en el transporte de electrones fosforilante.

Diagrama de flujo del sistema de elución de las fracciones obtenidas

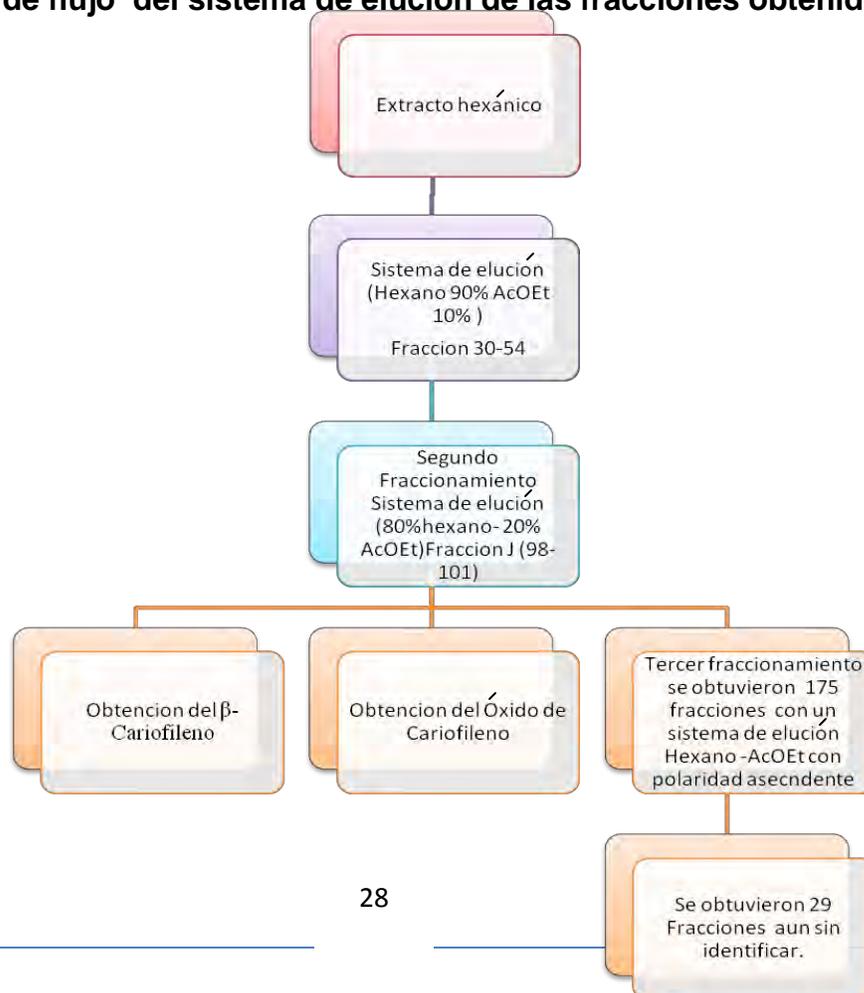




Figura. 10. Diagrama de flujo de la obtención de los compuestos activos a partir del extracto hexánico.

6.5.- Bioensayos

Aislamiento de cloroplastos a partir de hojas de espinacas

Los cloroplastos se aislaron de hojas de espinacas las cuales fueron lavadas y secadas con toallas de papel higiénico, utilizando aproximadamente entre 40 g y 60 g escogiendo aquellas que no estuvieran rotas, maltratadas o amarillas. Una vez lavadas y secas las hojas de espinacas se procedió a separar la nervadura y la punta de cada hoja haciendo cortes pequeños de la misma. Los trozos se molieron en una licuadora (modelo L-21 Osterizer) con aproximadamente 250 mL de medio de aislamiento dependiendo de la cantidad de cloroplastos a aislar. El medio se enfrió a 4°C, y después se procedió a realizar la molienda, la cual se hizo cuidadosamente ya que de lo contrario se podrían dañar los cloroplastos.

Una vez molidas las hojas de espinacas se filtraron a través de 8 capas de gasa, recibiendo el filtrado en tubos de ensayo de plástico de 50 mL, los cuales fueron enfriados previamente en un baño de hielo. El filtrado se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C en una centrifuga Sorval® Modelo Super T-21, DUPONT), posteriormente se desechó el sobrenadante y se re-suspendieron los cloroplastos en un máximo de 2 mL de medio de aislamiento. (Apéndice 2)

La suspensión se guardó en la obscuridad, y la técnica se realizó en completa ausencia de luz.

6.6.- Determinación de la Clorofila

La clorofila se cuantificó según el método de Arnon (1949), el cual consistió en aforar con acetona en un volumen de 5 mL una alícuota de 30 µL de cloroplastos resuspendidos, después se incubaron en la oscuridad a 0°C por 5 min



y se centrifugaron 5 minutos a 4000 rpm en un centrífuga clínica (centrífuga modelo EBA 8S, Hettich) para eliminar las membranas y proteínas precipitadas.

El contenido de clorofila se cuantificó midiendo las absorbancias a dos longitudes de onda, 663 y 645 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU650, la concentración de la clorofila se calculó con la siguiente fórmula:

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

En donde:

[Chl]	μg de clorofila por mL
8.05 y 20.29	Constantes establecidas experimentalmente a partir de los coeficientes de extinción para cada una de las longitudes de onda.
A	Absorbancia

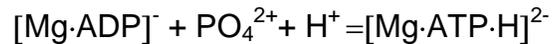
6.7.- Medición en la síntesis de ATP

Para la evaluación de la síntesis de ATP se utilizaron cloroplastos aislados de hojas de espinaca, de acuerdo a la metodología descrita en la literatura (Morales-Flores et al., 2007), la medición se realizó con los cambios de pH medidos con un electrodo marca Orion Mod. Ross 8103, conectado a un potenciómetro Corning, modelo 12, con escala expandida, y registrados en un registrador Kipp and Zone Modelo BD111.

Para este procedimiento, en la cubeta de reacción se agregaron 3 mL de medio



Bomba (Apéndice 2), 30 μL de ADP y 30 μL de Pi (fosfato inorgánico) y posteriormente se ajustó a un pH entre 8 y 8.05 con KOH y HCl a diferentes concentraciones 0.1, 0.01, 0.001 N y 60 μg de Chl, se iluminó por 1 minuto empleando una lámpara de proyector de 150 watts. El consumo escalar de H^+ por ATP se representa con la siguiente reacción.



Este es un método simple que provee una medida real de la síntesis o de hidrólisis de ATP. La técnica es por lo tanto, la ideal para determinar la velocidad de hidrólisis de ATP y para efectuar estudios cinéticos de este proceso (Hipkins, 1986).

Para medir la inhibición de la síntesis de ATP por un extracto o compuesto determinado, se realiza la metodología descrita pero se adicionan las muestras a concentraciones en un rango de 12.5 a 150 ppm, y de ser necesario, se probarán otras concentraciones por arriba o debajo de estos límites hasta encontrar la respuesta notoria. Estas concentraciones se adicionan antes de ajustar el pH y agregar los cloroplastos.

6.8.- Medición de la velocidad del transporte de electrones

La determinación del flujo del transporte de electrones se llevó a cabo con un electrodo tipo Clark conectado a un oxímetro Modelo YSI (Yellow Spring Instrumental), y un electrodo tipo Clark, en sus tres estados: basal, fosforilante y desacoplado según la metodología descrita en la literatura (Morales Flores et al., 2007). Para el transporte de electrones basal se agregaron 3 mL de medio de transporte de electrones (Apéndice 2) a la cubeta de reacción y 60 μg de Chl, se iluminó por 3 minutos empleando una lámpara de proyector de 150 watts.

Para determinar la velocidad de transporte de electrones por un extracto o compuesto determinado, éste se adiciona a diferentes concentraciones (12.5 a



150 ppm) hasta observar una respuesta significativa, después de agregar el medio de transporte de electrones a la cubeta de reacción.

6.9.- Germinación in vitro de *Physalis ixocarpa* y *Echinochloa crus-galli*

Para la determinación del efecto en la germinación y el crecimiento radicular en semillas de *Physalis Ixocarpa* y *Echinochloa crus-galli*, se escogieron 30 semillas por planta, se lavaron con agua e hipoclorito al 10 %, al cabo de 15 minutos de agitación constante se volvieron a enjuagar con agua desionizada y finalmente se adicionan otros 5 mL de agua estéril en donde se suspenden las semillas para ser vertidas en las cajas de Petri. Para llevar a cabo la siembra se prepararon cajas Petri de 10 cm de diámetro, a las cuales se introdujo un círculo de papel filtro del mismo diámetro para cubrir la superficie y se envolvieron en papel periódico para su previa esterilización en un autoclave a 120°C / 15 libras durante 20 minutos. La siembra se llevó a cabo posteriormente en una campana de flujo laminar (Veco) que previamente se limpió con etanol para obtener un ambiente estéril y cada lote de semillas se vertieron sobre cada caja de Petri; los tubos se enjuagaron con otros 5 mL de agua estéril y se vertió el contenido en la caja correspondiente. A cada caja de Petri fueron añadidas las concentraciones correspondientes (25, 50 y 100 ppm) del extracto o compuesto por probar, sobre el agua estéril sobrenadante. Con un movimiento circular sobre la caja de Petri, se homogenizó la concentración de la muestra.

Las concentraciones utilizadas se muestran en la Tabla 1.



Tabla 1. Concentraciones utilizadas para la germinación de las plántulas de *Physalis ixocarpa* y *Echinochloa crus-galli*

<i>Physalis ixocarpa</i>		<i>Echinochloa crus-galli</i>	
β -Cariofileno	Óxido de Cariofileno	β -Cariofileno	Óxido de Cariofileno
Control	Control	Control	Control
25 ppm	25 ppm	25 ppm	25 ppm
50 ppm	50 ppm	50 ppm	50 ppm
100 ppm	100 ppm	100 ppm	100 ppm

Para cada compuesto se emplearon 12 cajas Petri por tipo de semilla, 3 cajas control y 3 por cada concentración empleada, a cada caja Petri se agregaron 10 mL de agua destilada (estéril), 30 semillas de las correspondientes plantas y las diferentes concentraciones empleadas de los compuestos.

Por último, las cajas se sellaron usando parafilm y se colocaron dentro de una cámara de incubación (Lab-Line Instruments Inc., Ambi-Hi-Lo Chamber) a 27 °C.

Pasado el tiempo de incubación (5 días), se contaron las semillas germinadas, registrando la longitud del tallo y de la raíz para cada una.



6.10.- Ensayo *in vivo* de la fluorescencia de la clorofila *a* en hojas

Se midió el efecto de los compuestos β -cariofileno y óxido de cariofileno identificados de las partes aéreas de la planta *S. salignus*, en dos especies de plantas *Lolium perenne* (monocotiledónea) y *Physalis ixocarpa* (dicotiledónea). Se pesaron 0.4159 g para *L. perenne* y 0.3097 g para *P. ixocarpa* equivalentes a 200 semillas de cada planta y se sembraron en macetas del mismo tamaño y profundidad (30 macetas por especie).

Las plantas fueron regadas cada tercer día en mismas condiciones de temperatura (30°C) e iluminación día y noche. Después de 20 días de crecimiento se seleccionaron las plantas con mismo tamaño y se dividieron de la siguiente manera (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones utilizadas para el ensayo *in vivo* de la fluorescencia de la clorofila *a* en hojas de *Lolium perenne* y *Physalis ixocarpa*.

<i>Lolium perenne</i>	# de macetas	<i>Physalis ixocarpa</i>	# de macetas
Control	3	Control	3
DMSO	3	DMSO	3
DCMU	3	DCMU	3
25 ppm β -cariofileno	3	ETOH	3
50 ppm β -cariofileno	3	25 ppm β -cariofileno	3
100 ppm β -	3	50 ppm β -cariofileno	3



cariofileno			
25 ppm Oxido-cariofileno	3	100 ppm β-cariofileno	3
50 ppm Oxido-cariofileno	3	25 ppm Oxido-cariofileno	3
100 ppm Oxido-cariofileno	3	50 ppm Oxido-cariofileno	3
		100 ppm Oxido-cariofileno	3

Las plantas se rociaron con un aspersor, para ello, se pesaron 10 mg de cada uno de los compuestos puros (Sigma Aldrich) en 1 mL de dimetil-sulfóxido 99.5% GC (DMSO) marca Sigma, obteniendo una concentración de 10,000 ppm de extracto. A partir de esta solución, se tomaron alícuotas para obtener concentraciones finales de 50 ppm, 100 ppm y 150 ppm en agua y se les agregó 5 μ L de Tween 20R al 0.05% como coadyuvante para romper la tensión superficial.

Aproximadamente, 7 mL de cada disolución de los compuestos, fue asperjada en las hojas de las plantas mono y dicotiledóneas.

Después de estar en la oscuridad por 5 minutos, las hojas fueron excitadas por luz saturada emitida por tres diodos liberando 3000 μ M fotones $m^{-2} s^{-1}$ de luz roja (650 nm). Las curvas de inducción de fluorescencia de la clorofila a, se midieron a temperatura ambiente con un aparato Hansatech Fluorescence Handy PEA (plant efficient analyzer) (Strasser et al 1995). La medición se llevó a cabo a las 24, 48 y 72 hrs después de haber asperjado las plantas.



Los datos fueron procesados y analizados con los programas Biolyzer y Handy Pea.

6.11.- Biomasa seca

Después de 20 días de tratamiento con los compuestos aislados de las partes aéreas de *S. salignus* se procedió a cosecharlas (100 tallos) y fueron puestas a secar en una estufa modelo BINDER hasta obtener un peso constante, la determinación de biomasa se realizó en una balanza analítica Modelo (OHAUS AP210-0 Analytical plus).



7.- RESULTADOS

7.1.- Síntesis de ATP en los extractos orgánicos de *Senecio salignus*

Los extractos orgánicos de la planta *Senecio salignus* (hojas y tallos) se ensayaron en la síntesis de ATP de cloroplastos aislados de hojas de espinaca (Fig. 11). El extracto hexánico mostró un I_{50} de 79.3 ppm (el I_{50} es la concentración a la cual se inhibe el 50 % de la actividad medida de un extracto o compuesto), resultando ser el más activo en comparación con los extractos orgánicos de cloroformo (I_{50} =132.4 ppm) y metanol, éste último extracto no inhibió significativamente (Fig. 11). Estos resultados nos indicaron que el extracto hexánico contiene los metabolitos secundarios con posible actividad herbicida.

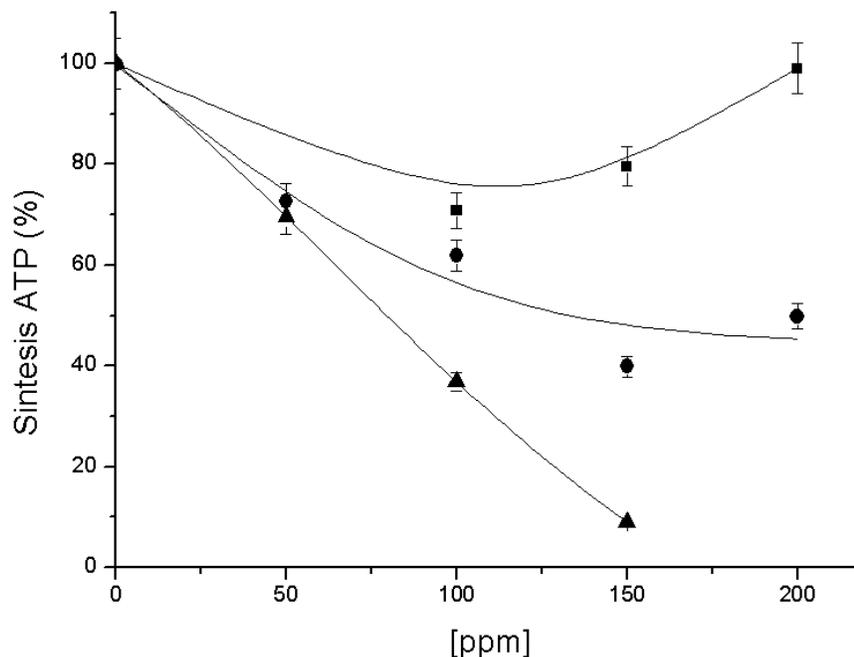


Figura 11. Efecto de los extractos orgánicos de la planta *S. salignus* (Hexano, ▲; MeOH, ■; y Cloroformo, ●) en la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de hojas de espinaca.



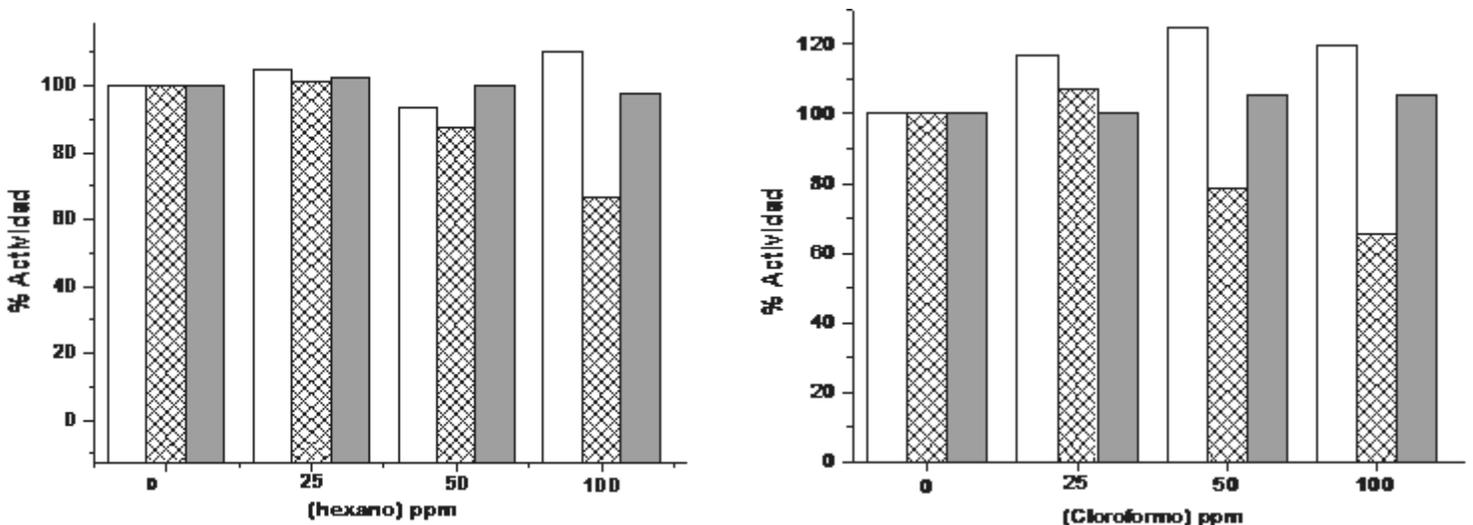
7.2.- Efecto de los extractos orgánicos de *S. salignus* en la germinación de *Trifolium alexandrinum* (trébol) y *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto)

En las gráficas de germinación se aprecia que los extractos hexánico y clorofórmico de *S. salignus* inhibieron la elongación del tallo de la plántulas de *A. hypochondriacus*, en un 35 % a 100 ppm (Fig. 12), en la cual también se muestra que tanto el crecimiento de la raíz y la germinación no fueron inhibidos significativamente con ambos extractos, por lo contrario el extracto clorofórmico indujo un aumento de 25-30 % en el crecimiento de la raíz. Estos resultados indican que los extractos hexánico y clorofórmico son buenos candidatos para caracterizarlos como herbicidas pre-emergentes.

Con *T. alexandrinum*, ambos extractos, el hexánico y el clorofórmico, inhibieron el crecimiento del tallo en un 25% a una concentración de 100 ppm (Fig.12). Nótese que el crecimiento de la raíz y la germinación no fueron inhibidos significativamente, por ejemplo el extracto hexánico inhibió 20% a 100 ppm el crecimiento de la raíz de *T. alexandrinum*. El extracto metanólico no mostró efectos significativos en la germinación y crecimiento de raíz y tallos de las semillas germinadas a las concentraciones ensayadas (datos no mostrados).

Los resultados del efecto de los extractos hexánico y clorofórmico en las plántulas *A. hypochondriacus* y *T. alexandrinum* indican que contiene metabolitos con actividad herbicida pre-emergente para mono y dicotiledóneas.

Amaranthus hypochondriacus



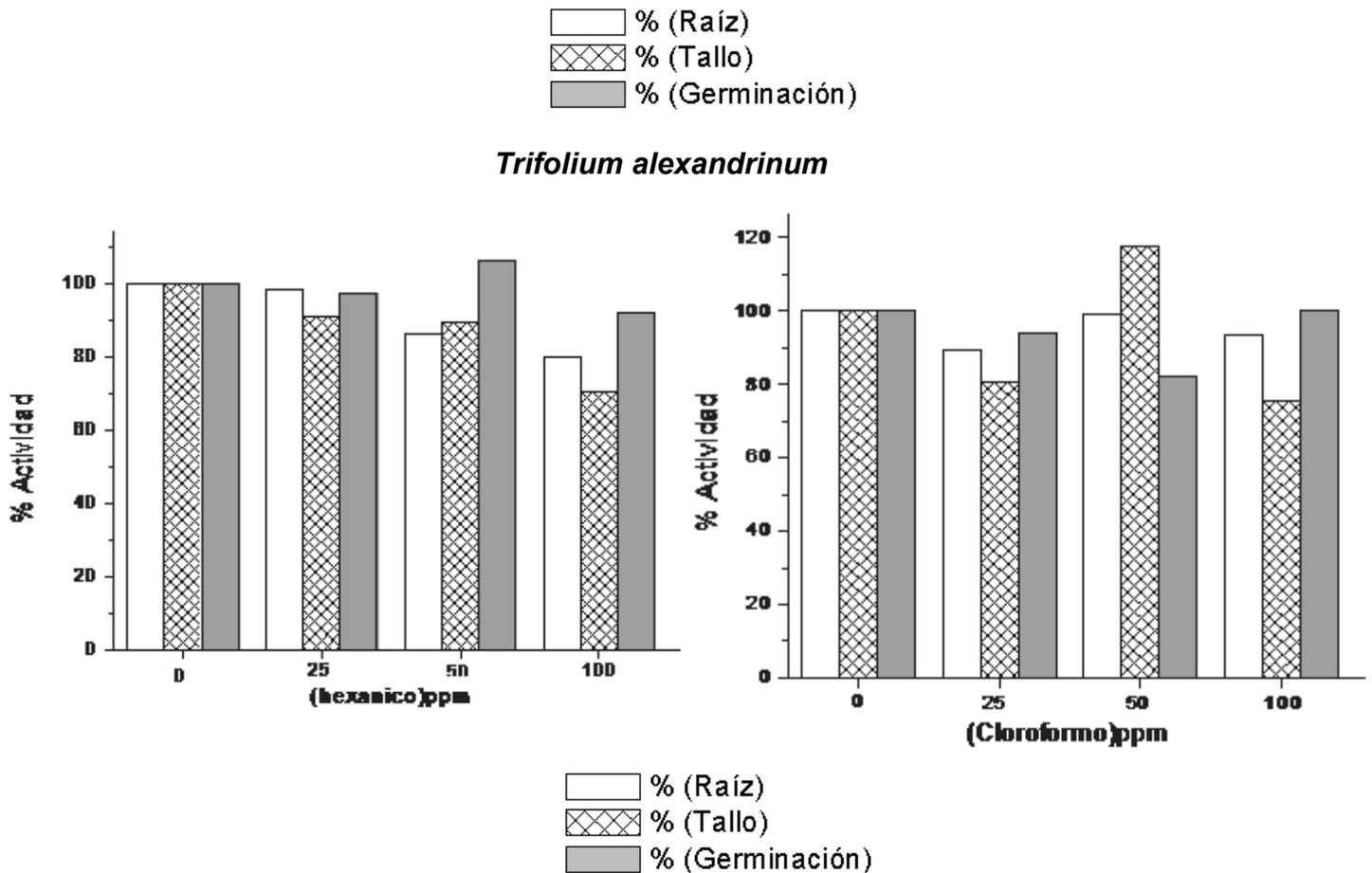


Figura 12. Efecto de los extractos orgánicos de la planta *S. salignus* evaluados en la germinación de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Trifolium alexandrinum*. Los ensayos se efectuaron a concentraciones de 25, 50 y 100 ppm de cada uno de los extractos cloroformico, hexánico y metanólico. El control, representa el 100% de actividad.

Dado que el extracto (hexánico) resultó ser el más activo entre los extractos orgánicos ensayados como inhibidores en las síntesis de ATP y en germinación de semillas, éste se sometió a fraccionamiento bio-dirigido para encontrar el o los compuestos responsables de la actividad inhibitoria. Para realizar esto se obtuvo el extracto hexánico en una mayor cantidad, partiendo de 100 g de planta molida y seca para obtener 22 gramos de extracto hexánico.



7.3.- Fraccionamiento primario del extracto hexánico de las partes aéreas de *S. salignus*

Del fraccionamiento primario del extracto hexánico (22 g) por cromatografía en columna abierta, se obtuvieron 276 fracciones de 100 mL cada una, se agruparon de acuerdo a su similitud en cromatografía en placa fina en 17 fracciones (F1-F17) (Tabla 3), estas fracciones se ensayaron en el transporte de electrones fosforilante. Las fracciones F6 (30-54), F7 (55-57), y F8 (58-66) fueron las más activas como inhibidoras del transporte de electrones fosforilante con un valor de I_{50} de 87, 20.1 y 118 ppm respectivamente; las otras fracciones presentaron menor actividad ya que tuvieron un I_{50} arriba de 150 ppm (Tabla 3). La fracción F6 (30-54) se eligió para una posterior purificación ya que además de su actividad se obtuvo en una cantidad suficiente, para llevar a cabo los estudios fitoquímicos y bioquímicos. Las fracciones restantes no se purificaron debido su alto I_{50} , además de que se obtuvieron en una pequeña cantidad y/o a la gran mezcla de compuestos observados en ellas por CCF

La caracterización de los componentes de la fracción F6 (30-54) por análisis espectroscópicos y espectrométricos mostró que se trataba de una muestra demasiado compleja, por lo que se sometió a un segundo re-fraccionamiento.



Tabla 3. Fracciones obtenidas a diferentes sistemas de elución y su I ₅₀ , obtenidos en el transporte de electrones fosforilante					
Gradiente Hex-AcOET	Fracciones	I ₅₀ (ppm)	Gradiente Hex-AcOET	Fracciones	I ₅₀ (ppm)
100% hexano	F1 (1-3)	Nr	70:30	F11(91-128)	202
	F2(4)	Nr		F12(129-166)	Nt
	F3(5-7)	Nr	60:40	F13(167-197)	178.5
	F4(8-19)	Nr			
			50:50	F14(197-203)	Nr
90:10	F5(21-29) F6(30-54)	Nr 87	40:60	F15(204-249)	Nt
80:20	F7(55-57) F8(58-66) F9(67-77) F10(78-90)	20.1 118 211 Nr	30:70	F16(250-256)	Nr
			AcOEt 100%	F17(257-270)	Nt
			Acetona 100%	F18(271-276)	Nr

N. r.: No se realizó por ser muestra en muy pequeña cantidad.

N. t.: No se obtuvo valor de I₅₀.



7.4.- Fraccionamiento secundario

El fraccionamiento cromatográfico secundario de la fracción F6 (30-54) (3.96 g) del extracto hexánico produjo 465 fracciones de un volumen de 50 mL cada una, estas se agruparon de acuerdo a su similitud en cromatografía de placa fina en 30 fracciones, de las cuales aquellas que se encontraban en una cantidad suficiente, (F10-57, F95-97, F98-119, F307-361, y F398-342) se probaron en el bioensayo de transporte de electrones fosforilante, las fracciones con actividad significativa se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Fracciones obtenidas en el fraccionamiento secundario en diferentes sistemas de elución y sus valores de I_{50} , obtenidos en el transporte de electrones fosforilante

Gradiente Hex-AcOET	Fracciones	I_{50} (ppm)	Gradiente Hex-AcOET	Fracciones	I_{50} (ppm)	
100% hexano	1-4	Nr	85:15	283-306	Nt	
	5-9	Nr				
	10-57	22.3	80:20	307-361	16.0	
	58-65	Nr				
	66	Nr				
	67-68	Nr	75:25	362-381	Nt	
	69-92	Nr				
95:5	93-94	Nr	70:30	398-432	57.3	
	95-97	21.6	50:50	433-443	Nr	
	98-119	18.5				
	120-155	Nr	Nr	100% AcOEt	444-446	Nt
				447-450	Nr	



	156-170	Nr		451-453	Nr
	171-191	Nr	100% Acetona	454-456	Nt
	192-204	Nr		457	Nr
				458-460	Nr
90:10	205-270	Nt			
	271-282	Nr	100% Metanol		
				461-465	Nr

n. r.: No se realizó por ser muestra en muy pequeña cantidad.

n. t.: No se obtuvo valor de I_{50} .

7.5.- Identificación y caracterización del β -cariofileno y del óxido de cariofileno

En la fracción (98-119) del fraccionamiento secundario (Tabla 4), se observaron grasas mezcladas con compuestos hidrocarbonados, estas tienen gran cantidad de señales tipo metilos singulete, metilenos y metinos en la zona del espectro de RMN- ^1H de 0.6 a 2.8 ppm, además, señales en la zona de hidrógenos vinílicos entre 5 a 5.4 ppm. En el cromatograma de gases acoplado al espectrómetro de masas (Apéndice 3) (Fig.24) se observaron varios componentes de los cuales, dos mostraron el espectro de masas correspondiente al β -cariofileno (**1**), óxido de cariofileno (**2**), y un tercero se identificó como cariofilano (**3**) (Fig.13), al ser comparados con la base de datos del equipo, y con los espectros obtenidos de estándares comerciales puros (Sigma-Aldrich) se identificó que (**1**) y (**2**) son sesquiterpenos.

Los espectros en el infrarrojo de (**1**) y de (**2**) (Figs.31 y 32) mostraron las bandas de absorción características para grupos metilo, metileno y metino en 2858 y 2949 y sus confirmaciones en 1456, 1446 cm^{-1} , también se observó la vibración C-H de



grupos vinilo en 3068 cm^{-1} y en el caso del epóxido se observaron vibraciones para grupos C-O en 1166 y 1063 cm^{-1} .

El espectro de RMN- ^1H , se localizaron las señales diagnósticas para **1** y **2**, como son las señales de los metilos angulares en 0.9, 1.0 y 2.6 ppm para el compuesto (**1**) y en 0.9, 1.0 y 1.2 ppm para (**2**), las de los protones de los grupos metileno vinílicos terminales de ambos compuestos en 4.57 y 4.94 ppm de dos señales finas intensas para el compuesto (**1**) y en 4.86 y 4.97 como dos dobletes muy finos con la misma constante de acoplamiento (1.5 Hz) para (**2**). El compuesto (**1**) mostró un multiplete asignado al hidrógeno vinílico en la posición 5 del esqueleto (5.3 ppm) misma que no aparece en (**2**) y en este último aparece una señal doble de dobles correspondiente al protón base de un grupo epóxido (en la posición 4-5), en 2.8 ppm (Figs. 27 y 28).

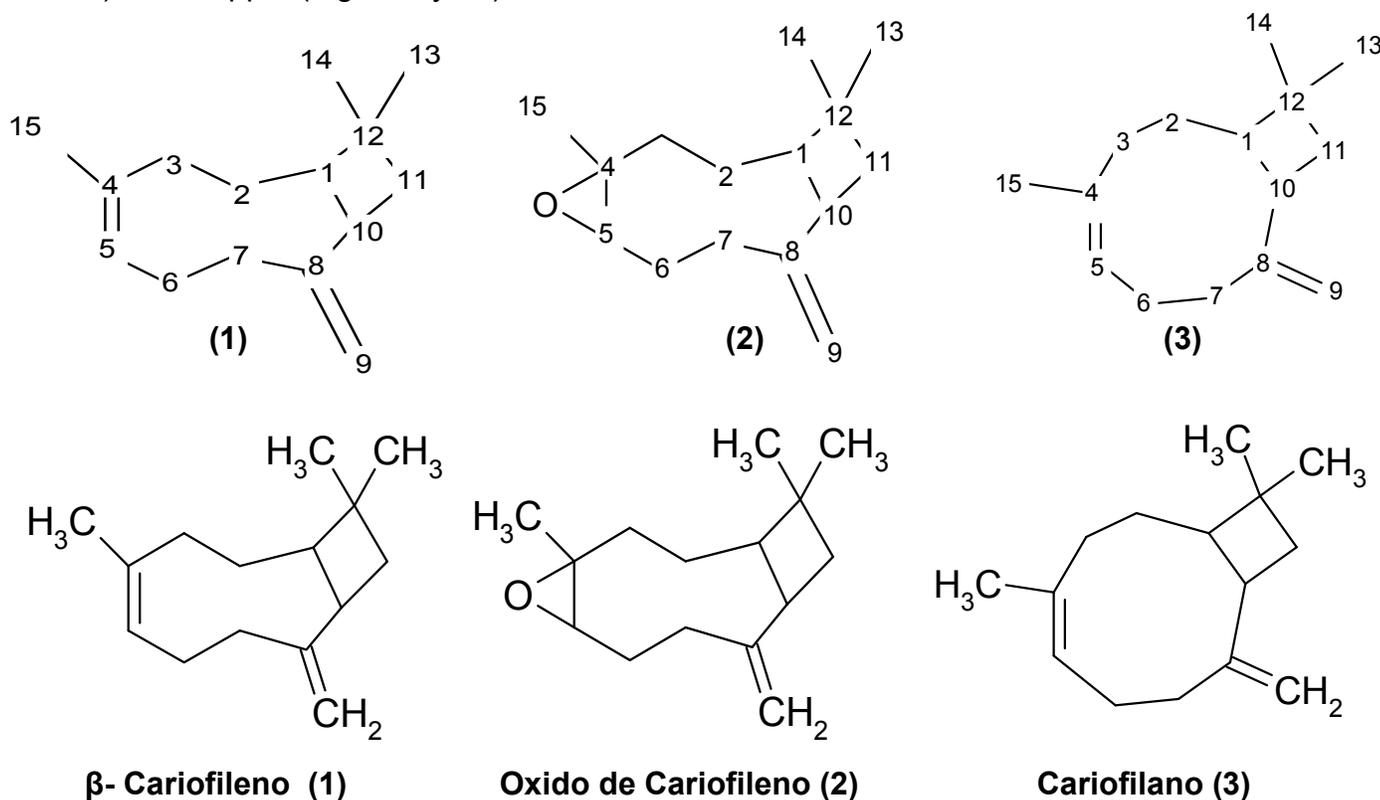


Figura 13. Estructuras químicas del β -cariofileno (**1**), óxido de cariofileno (**2**) y cariofilano (**3**) y su orden de numeración.



Identificación estructural de los compuestos (1) y (2)

Los compuestos **1** y **2** se caracterizaron estructuralmente, sin embargo, el compuesto **3** no se caracterizó debido a que su rendimiento fue muy bajo y no se logró asilar. Para la caracterización estructural de (1) y (2) se tomaron en cuenta técnicas cromatográficas y espectroscópicas, las cuales se resumen de la siguiente manera.

Compuesto (1) β -cariofileno

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (Espectro Fig. 27) :5.29 (*m*, H-5), 4.94 (*d*, *J*=1.5 Hz, H_a-9), 4.57(*d*, *J*= 1.5 Hz, H_b-9), 1.98-2.5 (*m*, H-3, H-6, H-7, H-10), 1.4-1.7(*m*, H-2, H-11), 1 (*m*, H-1), 2.6 (*s*, H-15), 0.9 y 1.0 (2x5. H-13 y H-14).

CG-EM (espectro fig. 30) t.r.6.42 min. m/g (%): [M⁺]: 204(8.3), 161(73.3), 133(8.3), 120(28.3), 119(85), 117(10), 107(13.3), 105(100), 93(28.3), 91(36.6), 81(20), 77(15), 69(11.6), 55(16.6), 53(6.6).

Compuesto (2) óxido de cariofileno

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (Espectro Fig. 28) :4.97(*d*, *J*=1.5 Hz, H-9), 4.86 (*d*, *J* =1.5 Hz, H_b-9), 2.8(*dd*, H-5), 2.61 (*dd*, H-10), 2.27(*m*,H-7), 2.1(*m*, H-6), 1.61-1.68(*m*, H-1 y H-2), 1.3-1.5(*m*, H-11), 1.2, 1.0, 0.9 (3x5, H-15, H-13, H-12)

CG-EM (Espectro Fig. 29) t.r. 7.83 min. m/z (%):[M⁺]: 220(0.01), 205(3.8), 187(5.12), 177(8.9), 161(5.1), 149(15.3), 135(16.6), 123(24.3), 121(37.1), 119(21.7), 110(33.3), 109(52.5), 106(47), 105(30), 95(52.5), 97(89.7), 91(62.8), 79(100), 77(38.4), 69(60.2), 67(39.7), 55(38.4), 53(19.2).

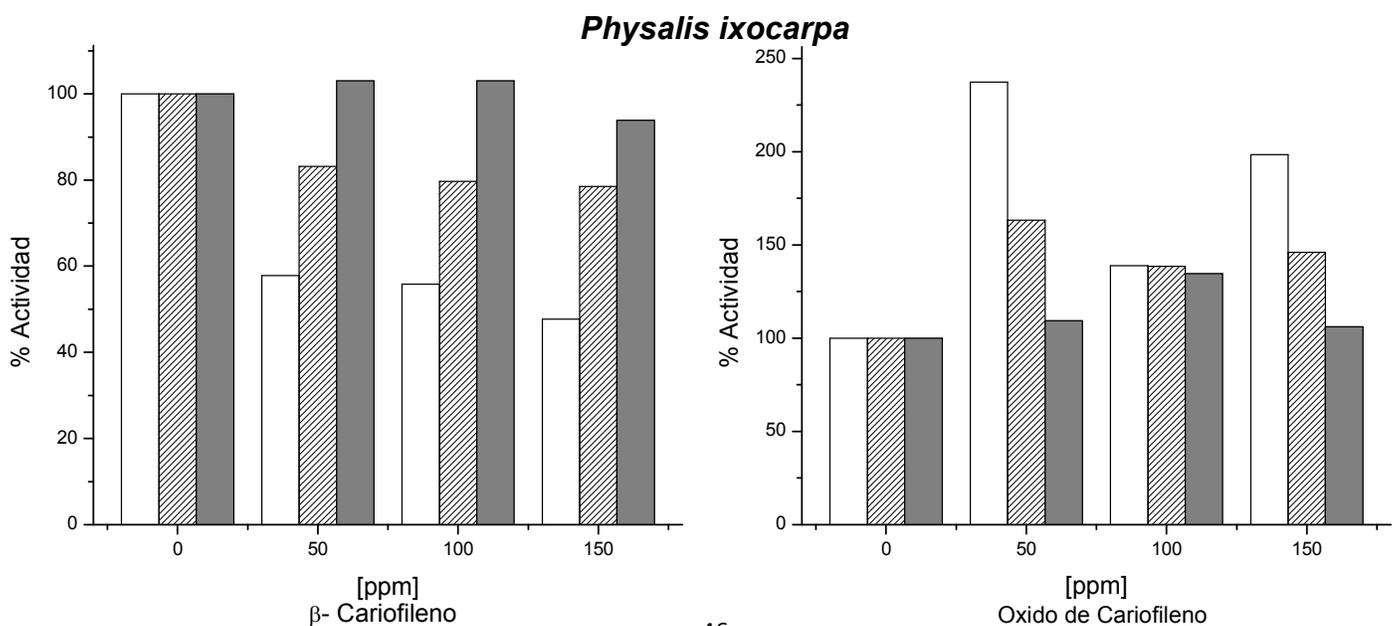
7.6.- Efecto del β -Cariofileno y Óxido de cariofileno sobre la germinación de *Echinochloa crus-galli* y *Physalis ixocarpa*.

Para conocer si los compuestos aislados (1) y (2) son posibles agentes herbicidas pre-emergentes, se ensayaron en la germinación de semillas de



Echinocloa crus-galli y *Physalis Ixocarpa*. En la Fig.14 se presentan las gráficas en donde se observa que el β -cariofileno inhibió en un 50% la elongación de la raíz de *Physalis ixocarpa* y un 20 % la elongación del tallo de la misma planta a 150 ppm, los resultados sugieren que β -cariofileno actúa como herbicida pre-emergente. En cambio el óxido de cariofileno incrementó la elongación del tallo y la raíz de *Physalis ixocarpa*, estos resultados sugieren que el doble enlace del β -cariofileno localizado entre el C₄-C₅ es importante para la inhibición del crecimiento de la raíz de *Physalis ixocarpa*, El óxido de cariofileno no presenta este doble enlace y los carbonos C₄ y C₅ están unidos a un átomo de oxígeno formando un epóxido lo que hace a esta molécula más hidrofílica (log p (1) 5.174 y log p (2) 4.136) que el β -cariofileno lo que probablemente permite que el compuesto (1) sea más permeable que (2) y esto le facilita llegar a su sitio de acción. En cambio en *Echinocloa crus-galli* ambos compuestos inhibieron la elongación de raíz y tallo, siendo más activo el β -cariofileno, inhibiéndolos en un 40% de 50 a 150 ppm. El óxido de cariofileno inhibió la raíz y tallo en 20% y 10% respectivamente de 50 a 150 ppm. Los resultados apoyan la necesidad del doble enlace en C₄-C₅ del β -cariofileno para incrementar su potencia en la inhibición.

Estos resultados indican que el cariofileno actúa como herbicida pre-emergente para plantas mono- y di-cotiledoneas.



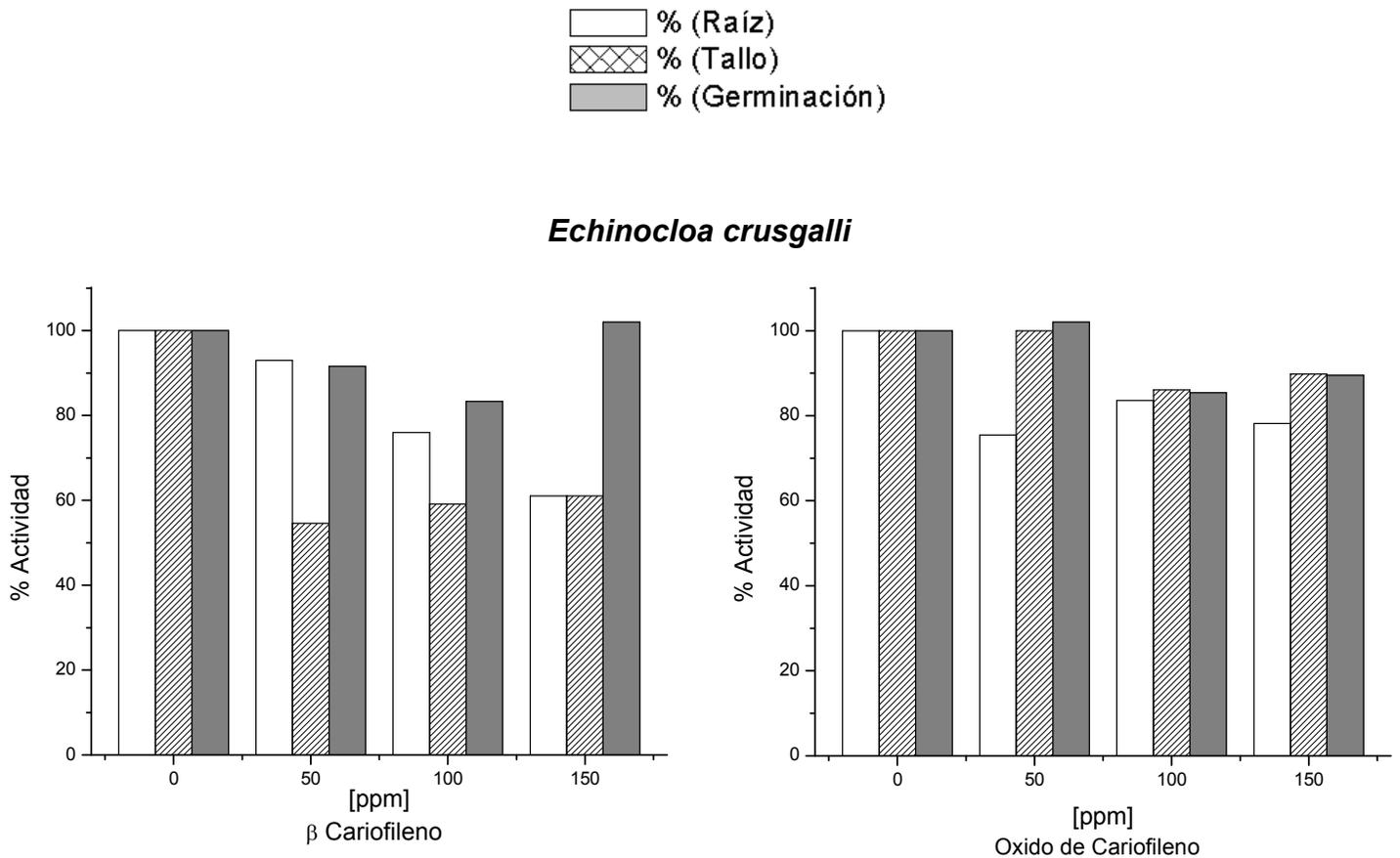


Figura 14. Efecto de los compuestos 1 y 2 en la germinación de semillas y crecimiento de raíz y tallo de las plántulas de *Physalis ixocarpa* y *Echinocloa crusgalli*.

7.7.- Medición de la fluorescencia de la clorofila *a in vivo*.

El efecto de los compuestos β -cariofileno (1) y óxido de cariofileno (2) en la cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila *a* en las hojas de las plantas de tomate (*Physalis ixocarpa*) y de pasto (*Lolium perenne*) crecidas por 20 días en el invernadero, fue monitoreado a las 24, 48 y 72 horas después del tratamiento con los compuestos, utilizando un fluorómetro Handy PEA.

Las mediciones se realizaron en las plantas adaptadas a la oscuridad por 5 minutos. Después de 24 horas de tratamiento la fluorescencia de la clorofila *a* tanto de las plantas de tomate como las de pasto no mostraron ningún cambio



significativo con respecto al control (datos no mostrados). Sin embargo, a las 48 horas después del tratamiento y a las 72 horas se observó que el compuesto **1** afectaba la curva de inducción de la fluorescencia de la clorofila *a* en hojas de tomate, pero no afectó las hojas de las plantas de *L. perenne*, por lo que no se muestran los datos de fluorescencia en esta planta. Estos datos también indican que el compuesto no penetra en las hojas de *Physalis ixocarpa* a las 24 hs de tratamiento.

En la Fig.15 se muestran las curvas OJIP de las plantas de tomate después de 72 horas de tratamiento con el compuesto **1**, debido a que en este tiempo el efecto observado fue mayor que a las 48 horas. En las Figs.15 B y 15 C, se muestra el efecto de **1** a 25 y 50 ppm, que al compararse con el control (Fig. 15 A), no es significativo. Sin embargo con la concentración de 100 ppm se observó que varias hojas mostraban clorosis (Fig. 22), por lo que se procedió a medir la fluorescencia de las hojas verdes (Fig. 15 D) y la fluorescencia de las hojas con blanqueamiento (Fig. 15 E), la cinética de las hojas verdes se mostró similar a la de las concentraciones de 25 y 50 ppm, pero en las hojas con clorosis las curvas ya no eran polifásicas, las curvas OJIP cambiaron a curvas casi rectas (Fig. 15 E). Estos resultados nos indican que el compuesto **1** requiere tiempo para penetrar y las hojas que mostraron clorosis fueron aquellas en donde el compuesto asperjado tuvo contacto a mayor concentración.

Para identificar el mecanismo y sitio de acción del compuesto **1** en las hojas de tomate, las curvas OJIP se normalizaron a diferentes tiempos, entre F_0 y F_m : $V_t = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$; (B) entre F_0 y F_J : $W_t = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$; (C) entre F_0 y $F_{300 \mu s}$: $(F_t - F_0)/(F_{300 \mu s} - F_0)$; (D) entre F_0 y F_I : $(F_t - F_0)/(F_I - F_0)$, y las diferencias entre las curvas normalizadas tratadas menos la curva normalizada control muestran la aparición de las bandas: J, K, L e I, respectivamente.

El hecho de que la banda K aparezca tanto a 50 como a 100 ppm, a las 48 horas y 72 horas después del tratamiento (Figs. 16 C y D), indica que el compuesto **1** inhibe el lado donador de electrones del PSII. A concentración de 50 ppm también aparece la banda I (Fig. 16 A y B) y cuando la concentración de **1** aumenta a 100 ppm se pierde esta banda y aparecen las bandas J y L (Figs. 17



A, B, E y F), estas bandas sugieren que a bajas concentraciones los aceptores finales de electrones del PSI se dañan ligeramente y al aumentar la concentración de **1**, causa daño tanto del lado donador (banda K) como el lado aceptor de electrones del PSII, indicado por la aparición de la banda J, y la aparición de la banda L, esta última banda indica que las unidades del PSII se están desagrupando, por lo que están sufriendo un daño en la arquitectura del PSII, lo que provoca que la curva OJIP sea completamente abatida en las hojas blanqueadas de tomate (Fig.15 E).

El compuesto **2** no afectó significativamente la fluorescencia de la clorofila *a* de ninguna de las plantas tratadas, por lo que no se muestran los datos.

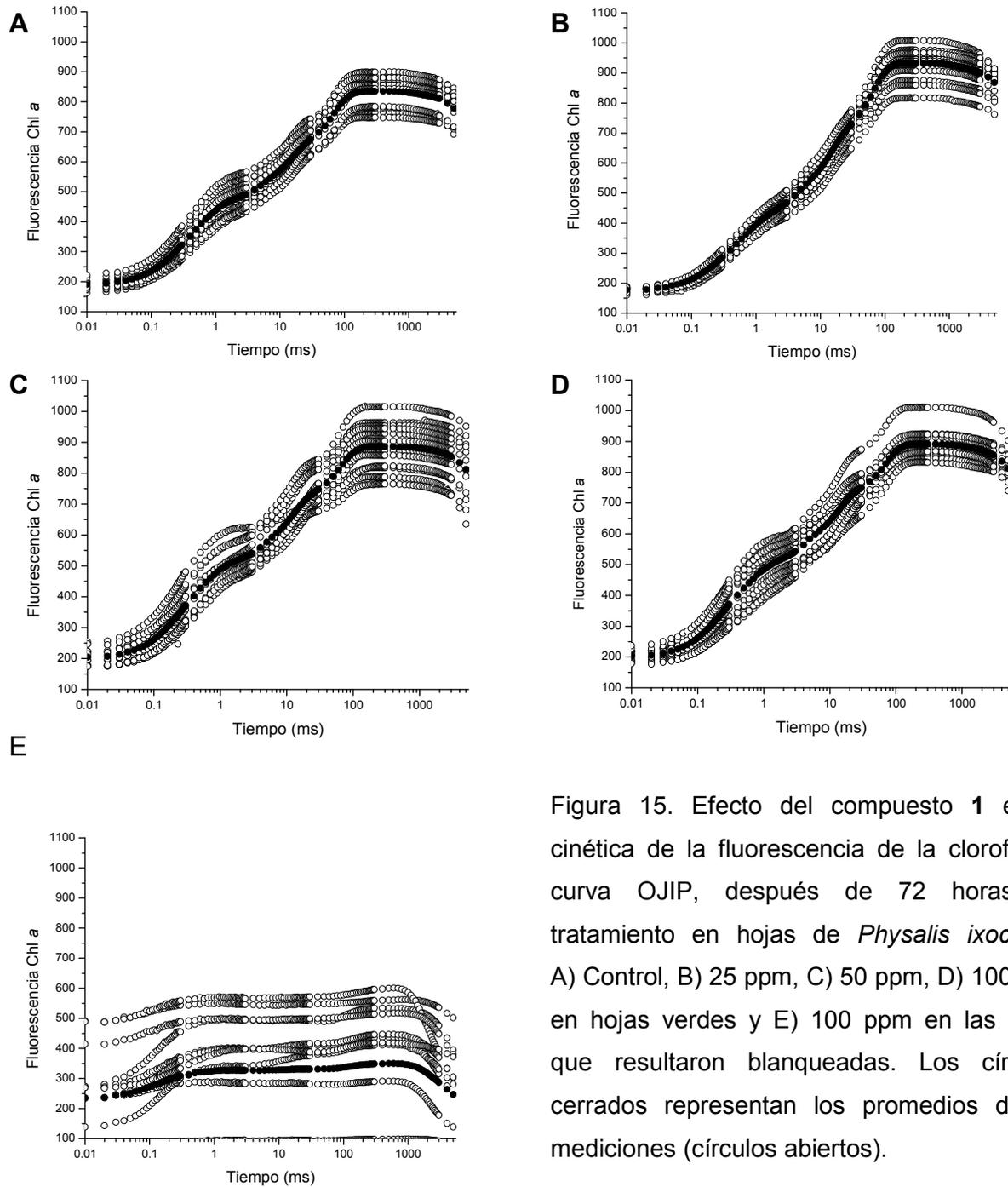


Figura 15. Efecto del compuesto 1 en la cinética de la fluorescencia de la clorofila a, curva OJIP, después de 72 horas de tratamiento en hojas de *Physalis ixocarpa*. A) Control, B) 25 ppm, C) 50 ppm, D) 100 ppm en hojas verdes y E) 100 ppm en las hojas que resultaron blanqueadas. Los círculos cerrados representan los promedios de 15 mediciones (círculos abiertos).

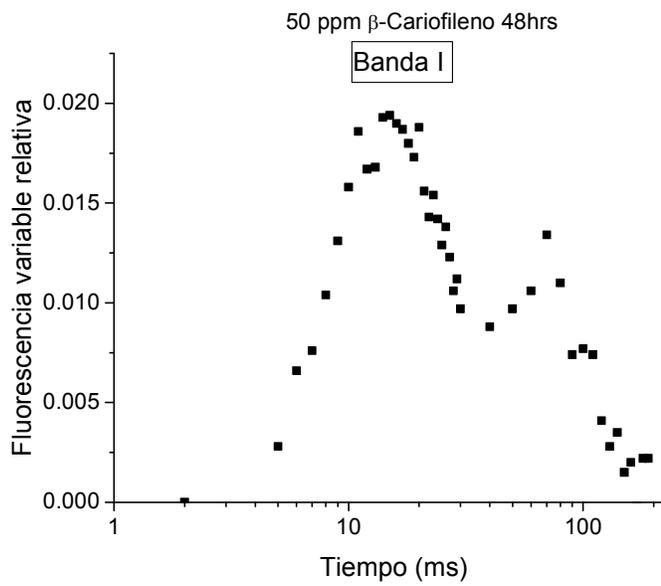
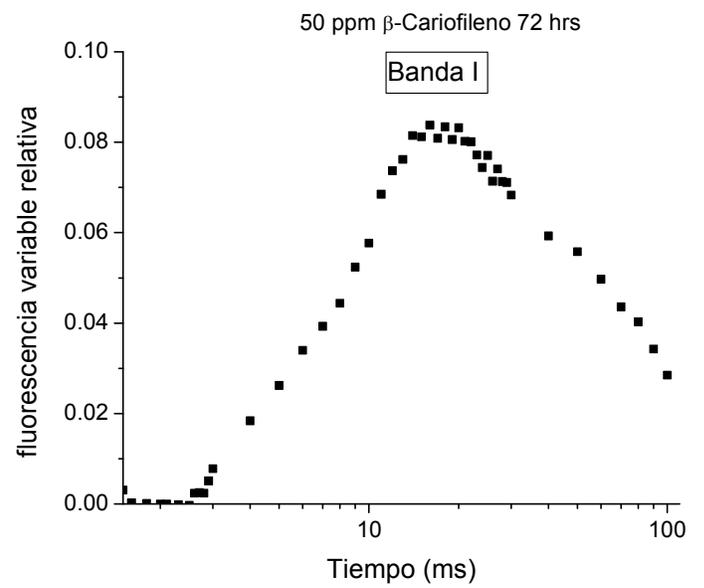
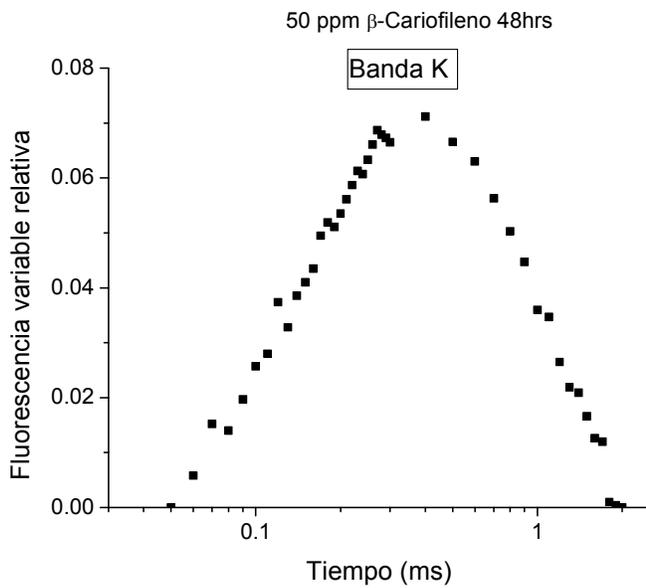
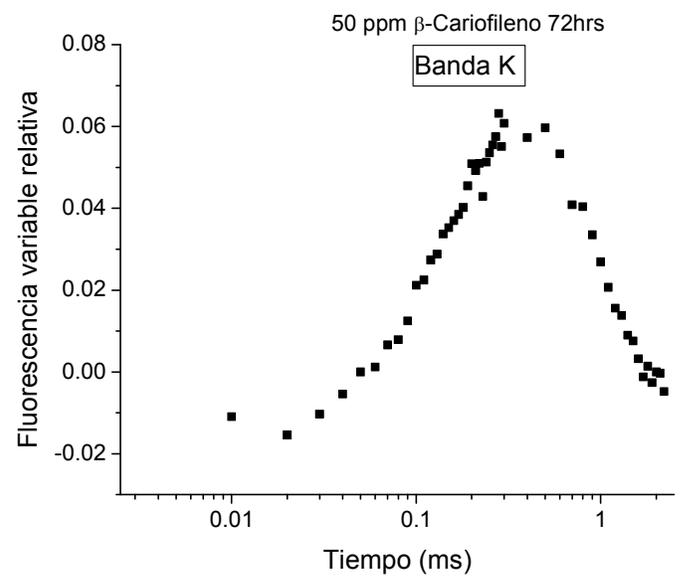
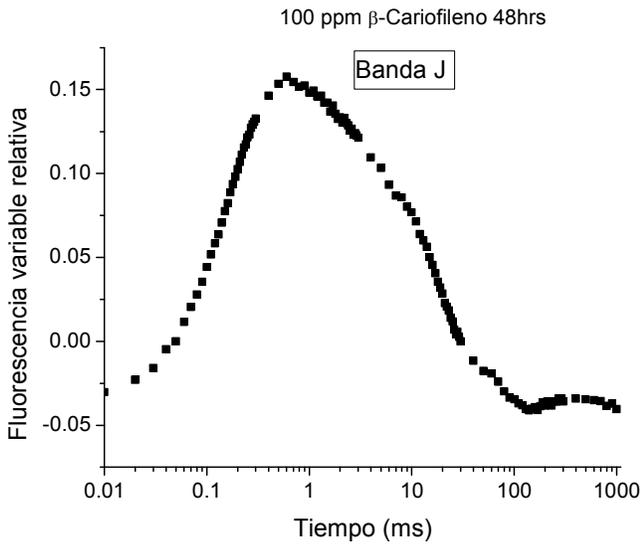
**A****B****C****D**

Figura 16. Diferencias de los promedios de la cinética de la fluorescencia de la clorofila a normalizada de los tratamientos menos los controles expresada en forma de bandas. Panel A y B muestra la banda I (entre 10 y 100 ms), Panel C y D muestran la banda K

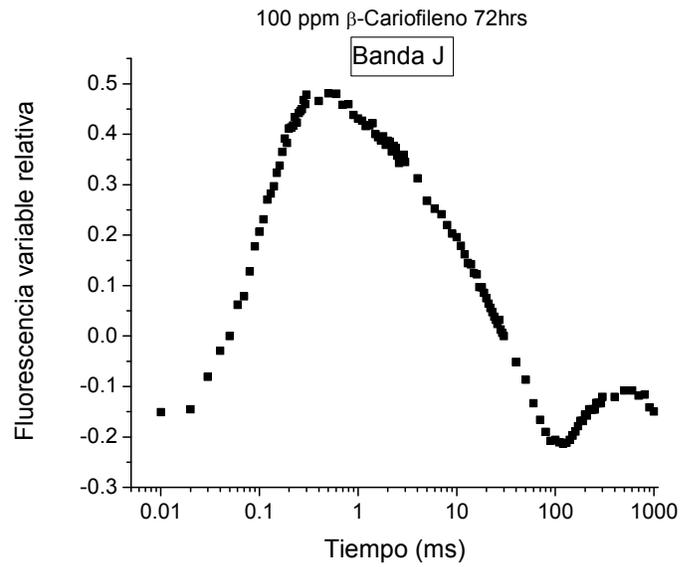


(alrededor de los 300 μ s) a 50 ppm de 1 a 48 y 72 horas respectivamente, después del tratamiento.

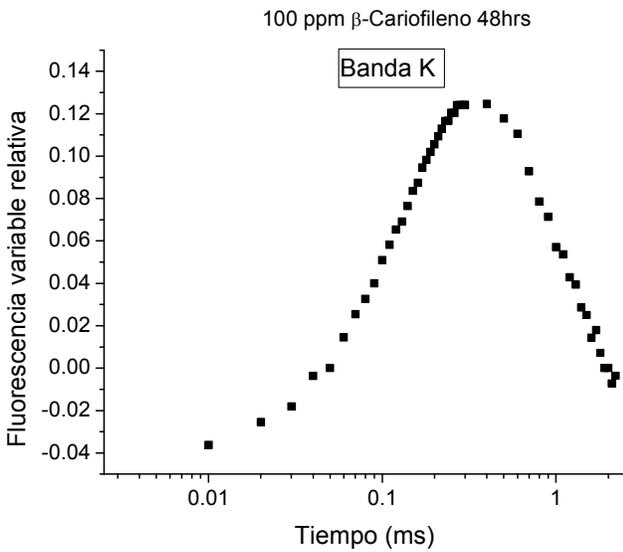
A



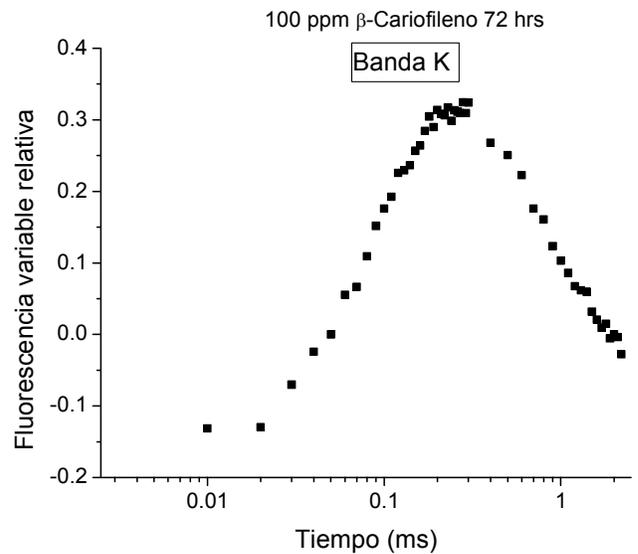
B



C



D



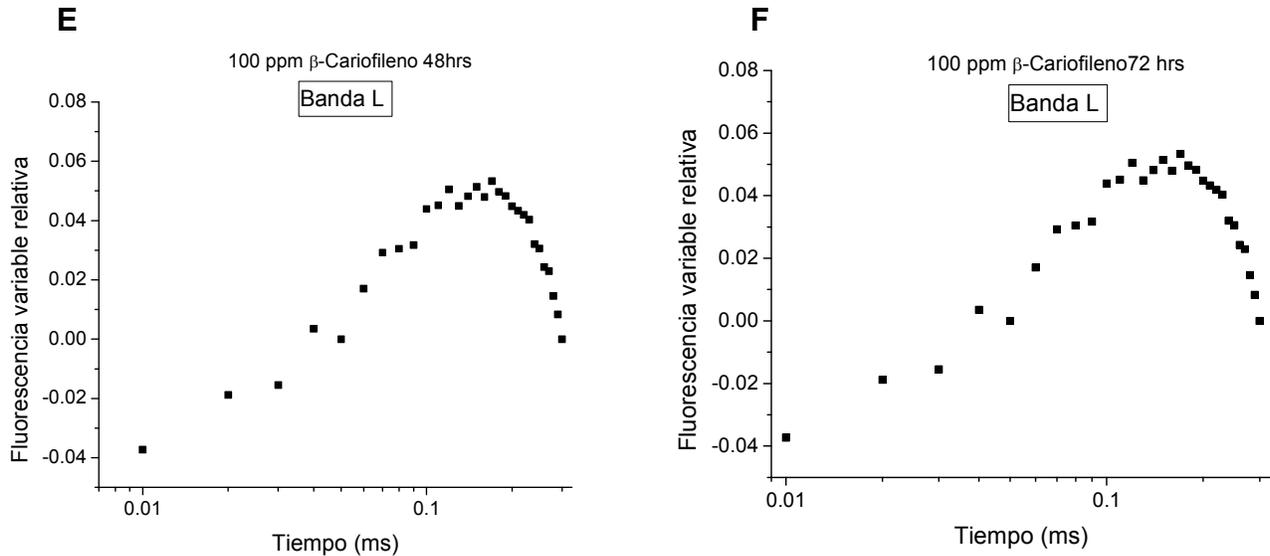


Figura 17. En el Panel **A** y **B** se aprecia la aparición de la banda J alrededor de 2 ms. En el Panel **C** y **D** se observa la aparición de la banda K y en los paneles **E** y **F** se observa la banda L alrededor de 100 μ S. 48 y 72 horas después del tratamiento con 100 ppm de **1**.

Los parámetros calculados desde las curvas OJIP con el programa Biolyzer HP3, y graficados en forma de radar (Fig. 18), muestran que a las 48 hrs el DCMU ha penetrado en las hojas y empieza a afectar diferentes parámetros como el transporte de electrones por centro de reacción (TR/RC); el transporte de electrones por área (TR/CS); PS_Io y PHI(E_o) (indicando que el electrón no viaja más allá de Q_A), disminuyéndolos en un 10 %, el índice fotosintético, Pi(abs), también se ve disminuido en este porcentaje. El parámetro dR que indica que los aceptores finales del PSI está aumentado en un 30 %, indicando que se encuentran afectados. El parámetro dV/dto, que representa el estado de la enzima que fotoliza el agua (OEC) por sus siglas en inglés, Oxygen Evolving Complex, se encuentra aumentado en casi un 10 % respectivamente (Fig. 18 A). Estos datos muestran el efecto del DCMU, inhibidor competitivo del sitio de Q_B en la proteína D1 del PSII, en los parámetros. En la Fig.18 B, se observa que el efecto del compuesto **1** a 25 ppm es diferente al comportamiento del DCMU, en este caso el índice fotosintético aumentó más del 15% y los parámetros de la fotoquímica



primaria (PHI(Po)), PSlo y PHI(Eo) aumentaron en menos del 10%, lo que muestra que a esta concentración las plantas de *Physalis ixocarpa* mejoraron la actividad fotosintética como respuesta al estrés químico que se sometió, los índices y la productividad de la fotosíntesis de la misma aumentan, conservándose los parámetros restantes, lo que se corrobora al no encontrar bandas al realizar las dobles normalizaciones en las curvas de cinética de la fluorescencia de la clorofila *a* (curva OJIP).

A 50 ppm del compuesto **1** y 48 hs de tratamiento (Fig. 18 C) se empieza a observar su efecto en las plantas de *Physalis ixocarpa* indicado por un aumento de casi el 50% en el parámetro dV/dt_0 y una disminución en la misma proporción (50 %) de PI (abs), aunado a un aumento menor al 30% de ETo/RC, ABS/RC y TRo/RC. Estos parámetros indican que la fotosíntesis de *Physalis ixocarpa* a esta concentración ya se empieza a afectar. Al aumentar la concentración de **1** a 100 ppm (Fig. 18 D), los parámetros por 50 ppm, ahora se encuentran afectados más drásticamente, indicio de que a esta concentración (100 ppM) el compuesto ha penetrado en las hojas afectando a la maquinaria fotosintética.

A las 72 hs de tratamiento de *Physalis ixocarpa* con **1**, PI (abs) aumento más comparado con 48 hs de tratamiento, esto indica que las plantas de *Physalis ixocarpa* activaron mecanismos de regulación a la concentración de 25 ppm. Sin embargo, a 50 ppm y 100 ppm este parámetro disminuyó comparado con el control, indicando que los mecanismos de regulación de la planta se inhibieron siendo más severo a la concentración de 100 ppm. La Fig. 19 D, muestra que los centros de reacción por área, disminuyeron casi al 100 %, por lo que los valores del transporte de electrones por centro de reacción (ETo/RC) y el transporte de electrones por área (ETo/CS), disminuyeron en un 40 y 100 % aproximadamente. Por ende los parámetros ABS/RC, TRo/RC aumentan casi más del 100 %, pues la pequeña cantidad de centros de reacción que quedan sanos, tienen que realizar el trabajo de absorción y atrapamiento de energía. Debido a que los centros de reacción están disminuyendo, y el transporte de electrones se ve inhibido, la disipación de la energía en forma de calor PHI(Do) y la constante no fotosintética



se encuentran aumentados más del 100%, permaneciendo la suma de las constantes (Sum K), casi inalterada ya que la constante fotosintética está disminuida casi al 0%.

Figura 18. Gráfica de radar mostrando los parámetros calculados desde las curvas OJIP a las 48 hs de tratamiento de *Physalis ixocarpa* con: A) DCMU 50 μM , y con el compuesto **1** a las concentraciones de: B) 25 ppm, C) 50 ppm y D) 100 ppm.

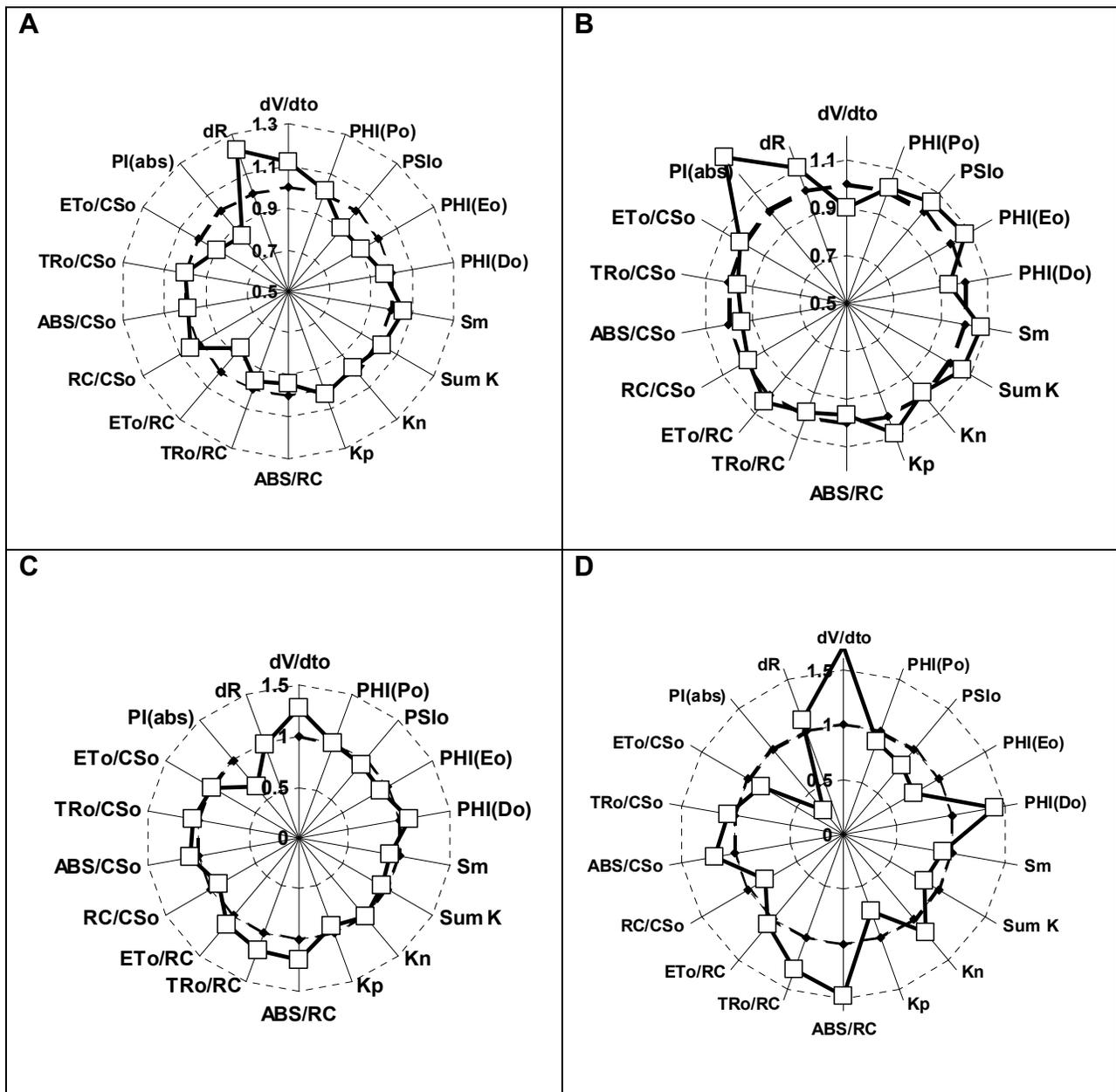
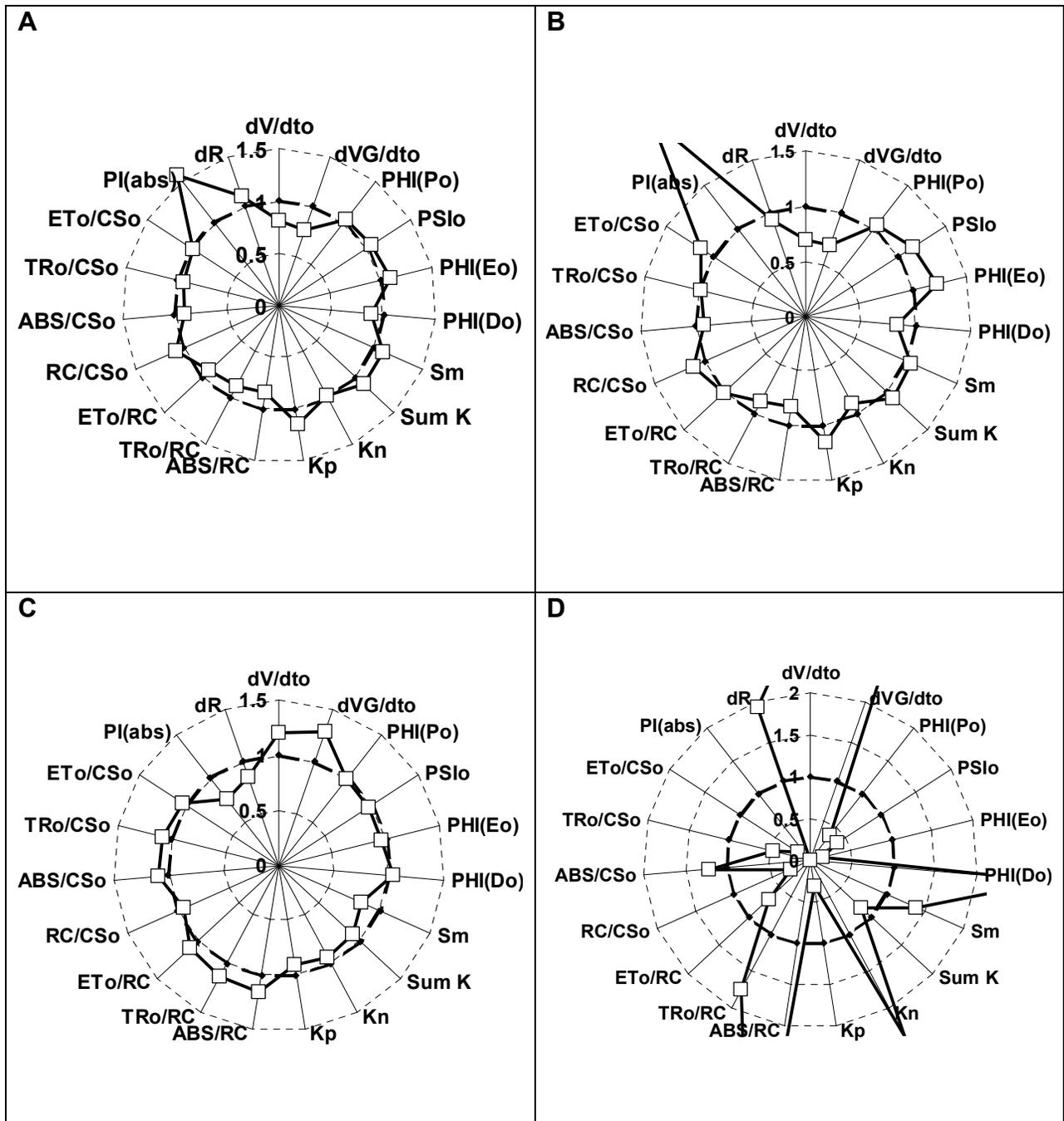




Figura 19. Gráfica de radar mostrando los parámetros calculados desde las curvas OJIP a las 72 horas de tratamiento de *Physalis ixocarpa* con: A) DCMU 50 μM , y con el compuesto **1** a las concentraciones de: B) 25 ppm, C) 50 ppm y D) 100 ppm.





En la (Fig. 20) se muestra el efecto de 100 ppm de compuesto (1), después de 72 hrs de tratamiento en las hojas de *Physalis ixocarpa*. Los centros de reacción activos calculados como $(RC / RC_c) = (ABS / RC_c) / (ABS / RC)$, en donde RC, son los centros de reacción tratados con (1) y RC_c son los centros de reacción control con un valor de 21.5 %, lo que significa que el 78.5 % de los centros de reacción han sido transformados a centros de reacción silenciosos (RC_{si}). Observando el panel C de la Fig. 20, este valor coincide con los círculos cerrados. Comparativamente, el DCMU presenta el 100% de centros de reacción activos (Fig. 20 B), en cambio, el control presenta el 7% de centros de reacción convertidos en centros de reacción silenciosos (Fig. 20 A). Como se puede observar en la (Fig. 20 C), en el recuadro de la derecha, el color de la hoja nos indica que el daño en los centros de reacción debe causar clorosis en la hoja.

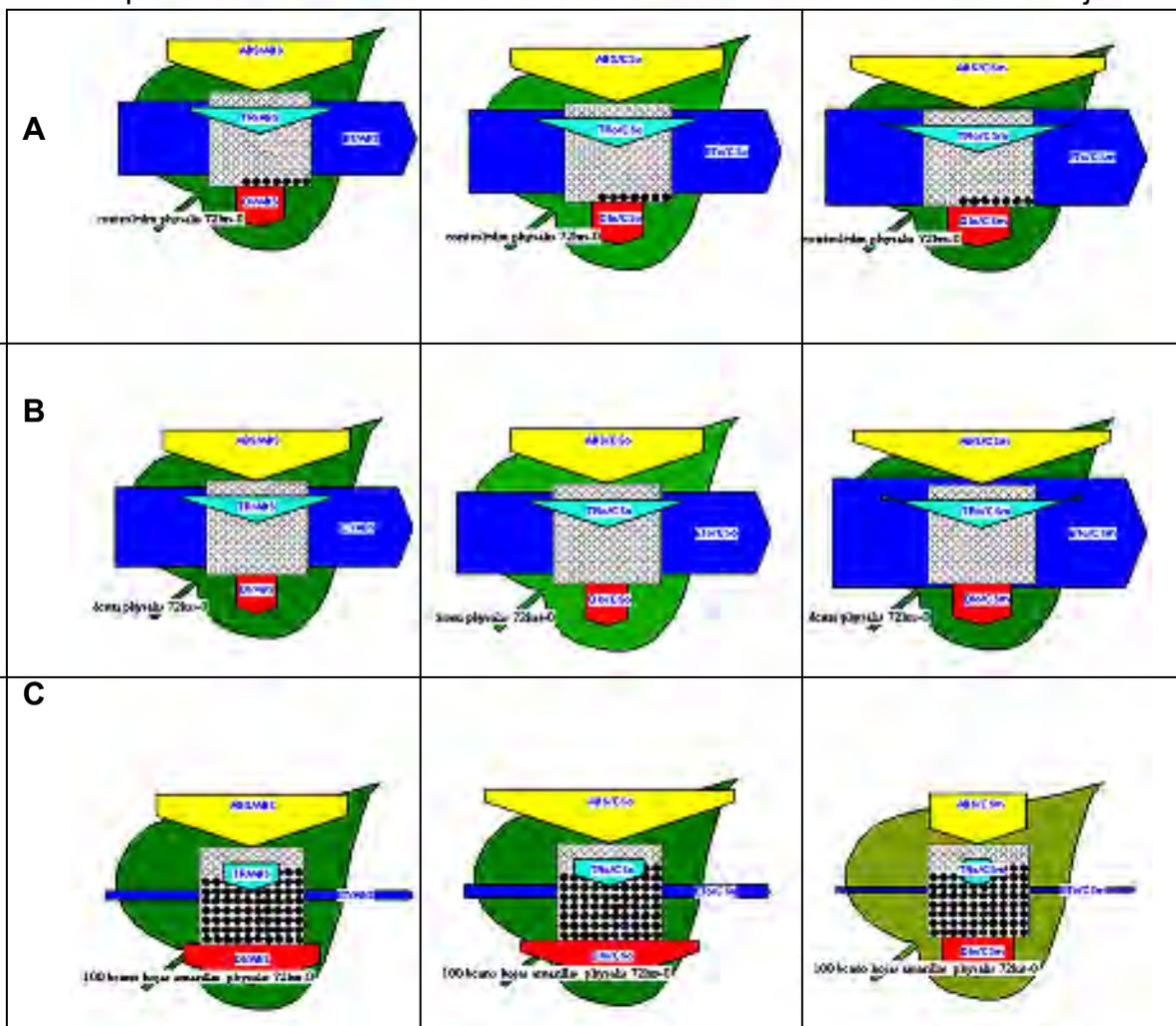




Figura 20. Caricaturas del Plot pipeline que muestran los centros de reacción activos (círculos abiertos) y los centros de reacción inactivos (círculos cerrados), después de 72h de tratamiento con 100 ppm del compuesto (1). Panel A, Control; panel B, tratamiento con 50 μ M de DCMU; Panel C) 100 ppm de (1)

7.8.- Efectos del compuesto 1 y 2 en la biomasa seca de las plantas de *Physalis ixocarpa* y *L. perenne*.

La biomasa seca fue estimada por la medición del peso seco para cada una de las plantas en la ausencia de herbicidas (control), y en presencia de los compuestos 1 y 2, DCMU, y ETOH; los resultados después de la aplicación de los compuestos se muestran en la Tabla 5.

A las 72 horas del tratamiento con el compuesto 1, las hojas presentaron necrosis en las concentraciones de 50 ppm y 100 ppm, así como también decoloración (amarillentas) en la mayoría de las hojas de *Physalis ixocarpa*, lo que coincide con la gráfica de pipeline (Fig. 20C). Aunado a estos efectos, se observó una considerable disminución del tamaño con respecto a los controles, lo cual indica que el compuesto 1 afecta la biomasa de las plantas. (Fig. 21, 22 y 23)

En las plantas de *Lolium perenne* tratadas con las concentraciones crecientes de 1 y a las 72 h, no se observó un efecto visible, y la fluorescencia de la clorofila a no fue afectada (datos no mostrados). Sin embargo la biomasa seca disminuyó en un 15 %, lo que indica que 1 afecta el crecimiento de las plantas sin afectar la fotosíntesis, por lo que se sugiere que la disminución se debe a un efecto en otra vía.

El compuesto 2 mostró un efecto menor que el compuesto 1 en la disminución de la biomasa seca en las plantas tratadas (*P. ixocarpa* y *L. perenne*)



Tabla 5, disminuyendo la biomasa seca de las plantas de *P. ixocarpa* en un 22 % y la de las plantas de *L. perenne* en un 5 %, considerando este valor sin significancia.



Figura 21. Efecto fenotípico sobre las plantas de *Physalis ixocarpa* 1.-Control, 2.- DCMU, 3.- 50 ppm, 4.-100 ppm **β -Cariofileno**.



Figura 22. Efecto sobre *Physalis ixocarpa*, decoloración y necrosis en las hojas después de 72 hrs tratadas con el Compuesto **1** (β -Cariofileno).



Figura 23. Efecto sobre la biomasa en *Physalis ixocarpa* después de 72 hrs tratadas con el Compuesto β -Cariofileno 1.-Control, 2.- Etanol, 3.- 50 ppm, 4.-100 ppm, 5.- DCMU



7.9.- Biomasa seca

La reducción de la biomasa sugiere que el compuesto **1** puede actuar como un herbicida post-emergente en plantas de *P. ixocarpa*.

<i>Physalis ixocarpa</i>			
[Concentración]	Promedio	Desvest +/-	%
Control	0.7203	0.1836	100
DCMU	0.7559	0.0528	104
ETOH	0.7721	0.0242	107
25 ppm β -cariofileno	0.6628	0.0303	92.1
50 ppm β -cariofileno	0.5748	0.0213	79.8
100 ppm β -cariofileno	0.4502	0.1036	62.5

<i>Lolium perenne</i>			
[Concentración]	Promedio	Desvest +/-	%
Control	1.0683	0.0309	100



25 ppm β - cariofileno	1.1066	0.1416	103.5
50 ppm β - cariofileno	0.8786	0.1317	82.2
100 ppm β - cariofileno	0.9081	0.1972	85

<i>Physalis ixocarpa</i>			
[Concentración]	Promedio	Desvest +/-	%
Control	0.7203	0.1836	100
DCMU	0.7559	0.0528	104
ETOH	0.7721	0.0242	107
25 ppm óxido de cariofileno	0.685	0.0551	95
50 ppm óxido de cariofileno	0.6544	0.0654	90.8



100 ppm óxido de cariofileno	0.5671	0.0202	78.3

<i>Lolium perenne</i>			
[Concentración]	Promedio	Desvest +/-	%
Control	1.0683	0.0309	100
25 ppm óxido de cariofileno	0.9525	0.1114	89.16
50 ppm óxido de cariofileno	0.9623	0.1171	90.17
100 ppm óxido de cariofileno	1.0246	0.1111	95.9

Tabla 5. Resultados de los compuestos **1** y **2** en biomasa seca con sus respectivos promedio y desv est.



CONCLUSIONES

- De la planta *Senecio salignus* fueron identificados por primera vez los sesquiterpenos β - Cariofileno (**1**), Óxido de Cariofileno (**2**) y Cariofilano (**3**).
- De los tres compuestos identificados, solo se ensayaron **1** y **2**; el compuesto **3** no se ensayó debido a que en la mezcla estaba presente en una concentración muy baja que no permitió su caracterización biocida.
- Los compuestos **1** y **2** mostraron actividad inhibitoria en los ensayos de germinación, siendo **1** más activo que el compuesto **2** para inhibir la elongación de la raíz y el tallo de las plántulas de *P. ixocarpa* y *E. cruss galli*, demostrando que no presentan selectividad en este bioensayo.
- Al analizar los datos de la fluorescencia de la clorofila *a* de las hojas de las plantas de *P. ixocarpa* tratadas con el compuesto **1**, se infiere que **1** provoca daño en el aparato fotosintético al crear centros de reacción silenciosos, disminuyendo los centros de reacción activos en un 78.5 %. De este modo su sitio y mecanismo de acción difiere del sitio y mecanismo de acción del herbicida DCMU, el cual inhibe el transporte de electrones en el lado aceptor del FS II.
- De los resultados del ensayo de biomasa seca, se concluye que el compuesto **1** tiene potencial para ser empleado como herbicida post-emergente selectivo, para plantas dicotiledóneas, pero no para plantas monocotiledóneas. .
- Los resultados obtenidos en los bioensayos, sugieren que el doble enlace del β -cariofileno localizado entre el C₄-C₅ es importante para aumentar su hidrofobicidad y de esta manera potenciar su actividad inhibitoria.



9.- APÉNDICE

9.1.- APÉNDICE 1 METODOS CROMATOGRÁFICOS.

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

Sulfato cérico amoniacal.

Compuesto	Cantidad
Hielo	350 g
Sulfato cérico amoniacal	12 g
H ₂ SO ₄ concentrado	22 ml

Colocar el hielo en un vaso de precipitados dentro de un baño de hielo; a continuación agregar con cuidado el ácido, y posteriormente el sulfato cérico amoniacal. Agitar con una varilla de vidrio hasta su completa disolución (en caso de no disolverse por completo debe filtrarse).



9.2.- APÉNDICE 2 MEDIOS.

9.2.1.- Medio de aislamiento de cloroplastos.

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

*Ajustar el pH a 8.0 con KOH

9.2.2.- Medio bomba.

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

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

**9.2.3.- Medio de transporte de electrones.**

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

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

9.2.4.- Medio de transporte de electrones sin MV

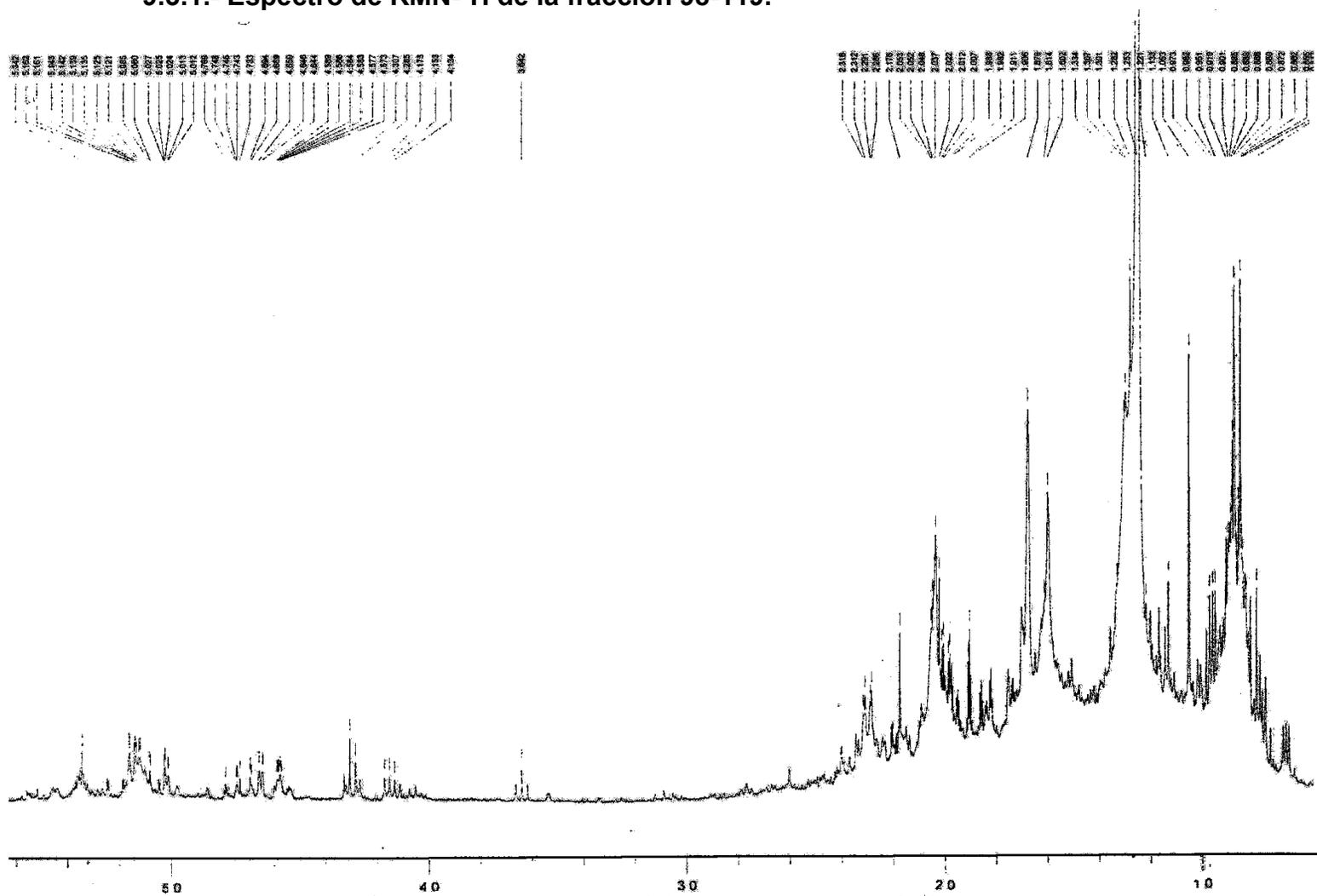
Compuesto	Concentración	Peso (g/L)
Sacarosa	100mM	34.22
KCl	10mM	0.7455
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5mM	1.0165
Tricina	1mM	2.688
KCN	0.5mM	0.0325

Ajustar el pH a 8.0 con KOH



9.3.- APÉNDICE 3. ESPECTROS

9.3.1.- Espectro de RMN-¹H de la fracción 98-119.





9.3.2.- Cromatograma de gases de la fracción 98-119

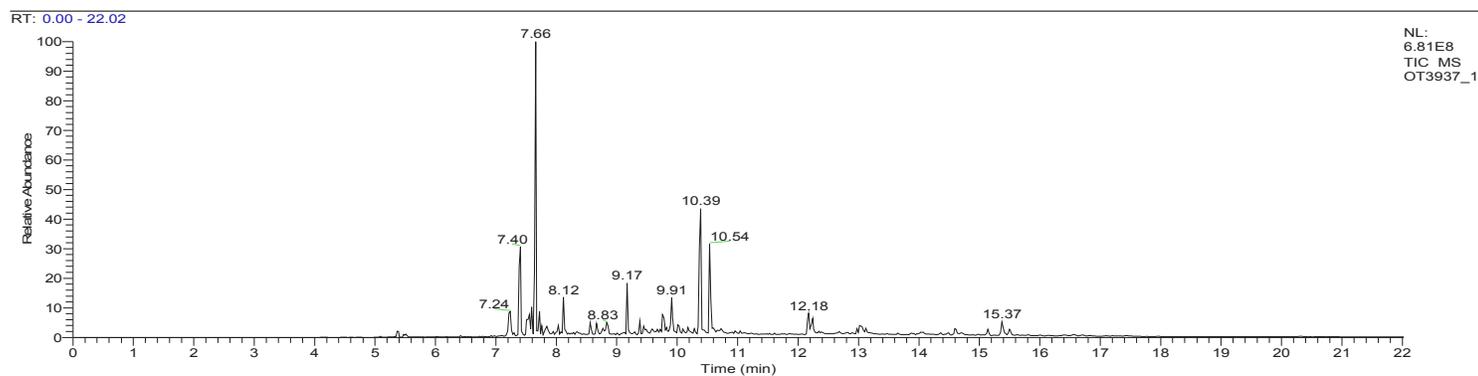
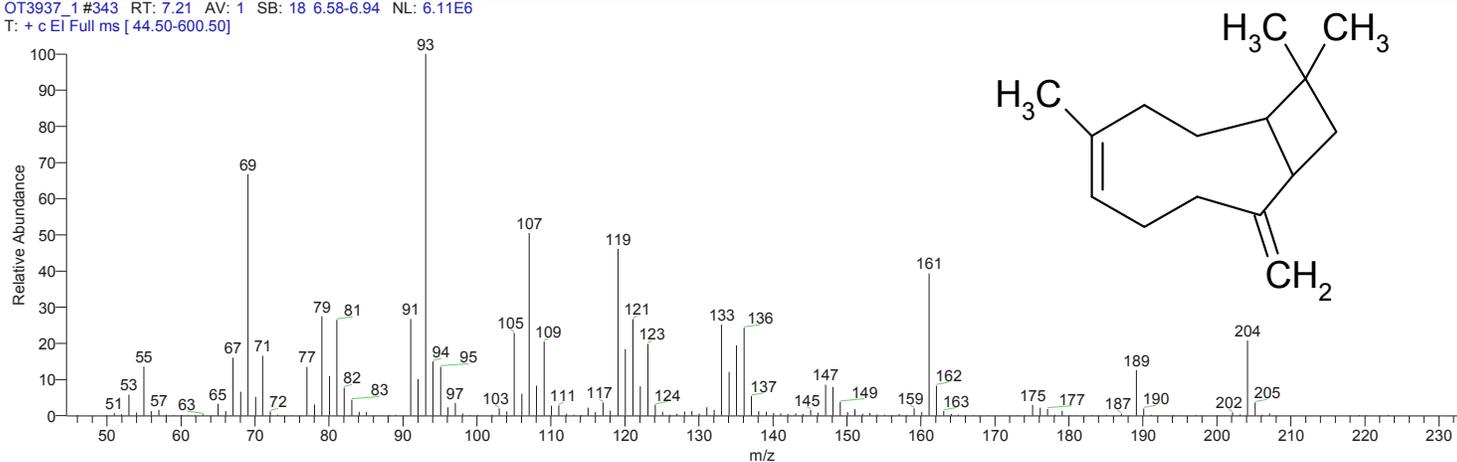
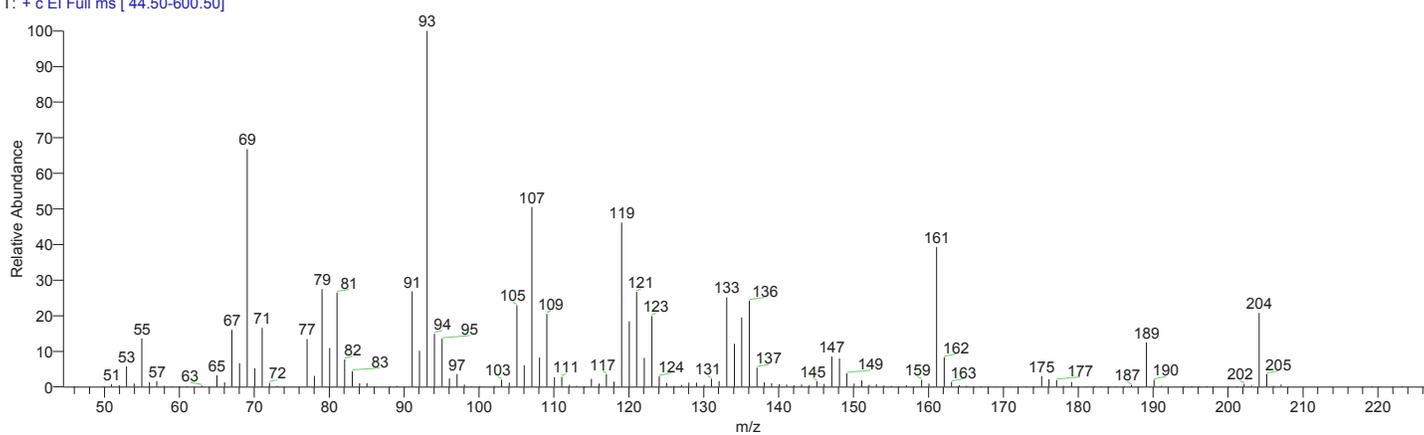


Figura. 24. Cromatograma de gases de la fracción 98-119.

OT3937_1#343 RT: 7.21 AV: 1 SB: 18 6.58-6.94 NL: 6.11E6
T: + c EI Full ms [44.50-600.50]



OT3937_1#343 RT: 7.21 AV: 1 SB: 18 6.58-6.94 NL: 6.11E6
T: + c EI Full ms [44.50-600.50]

Figura 25. Espectro de masas del β -cariofileno (1)



OT3937_1#359 RT: 7.55 AV: 1 SB: 18 6.58-6.94 NL: 3.03E6
T: + c EI Full ms [44.50-600.50]

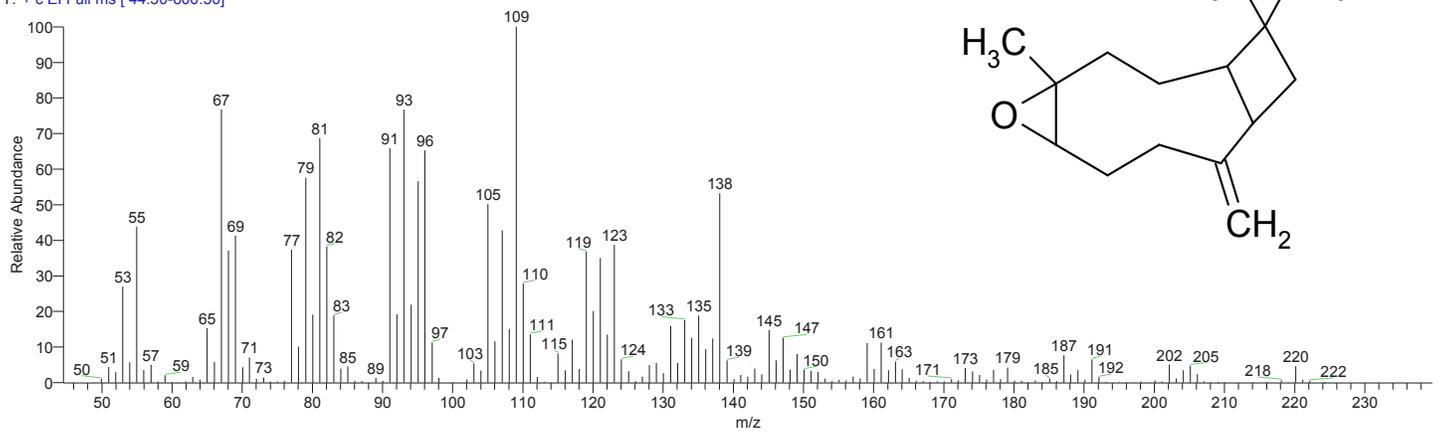


Figura 26. Espectro de masas del óxido de cariofileno (2)



ESPECTRO RMN-¹H β-CARIOFILENO

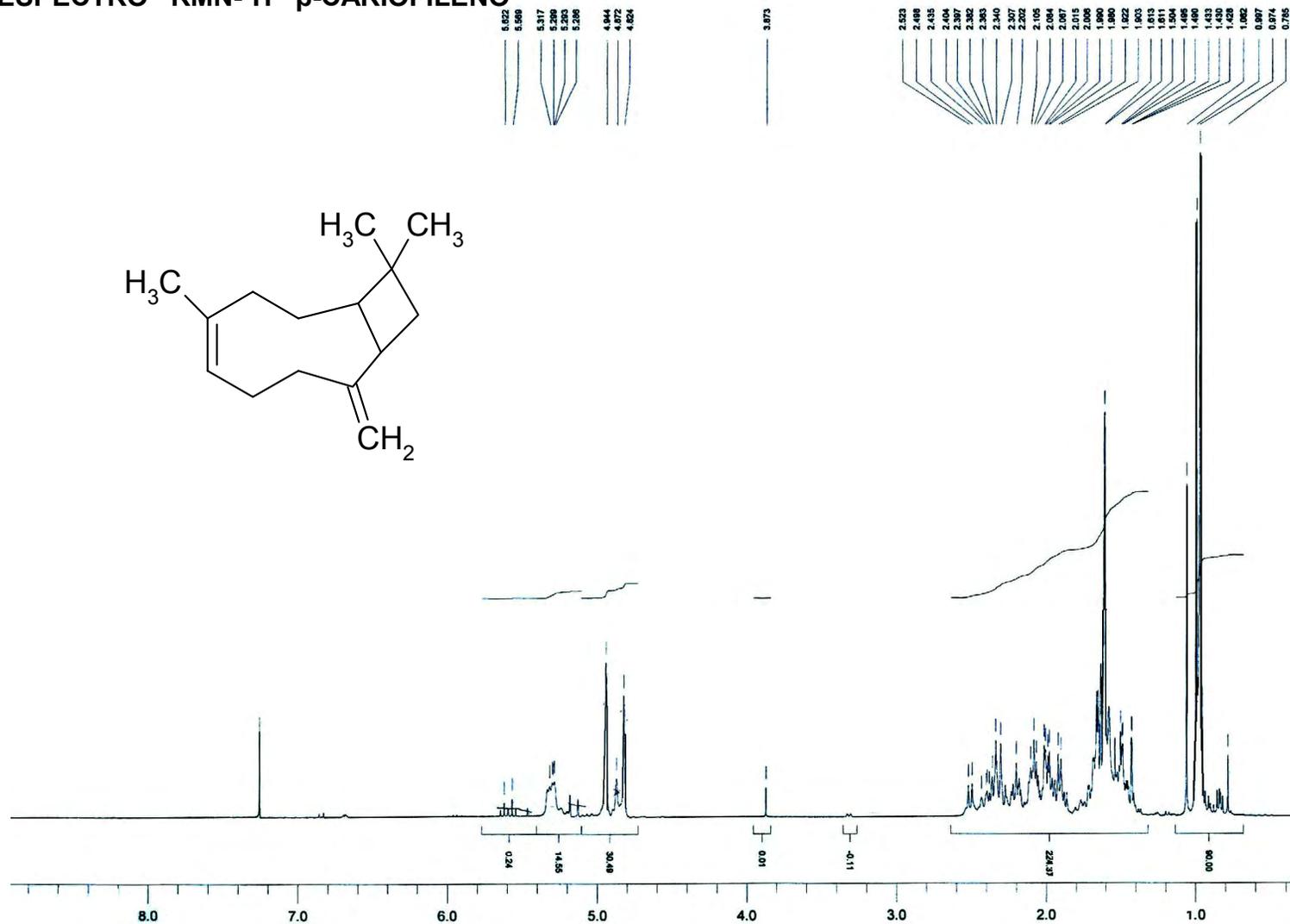
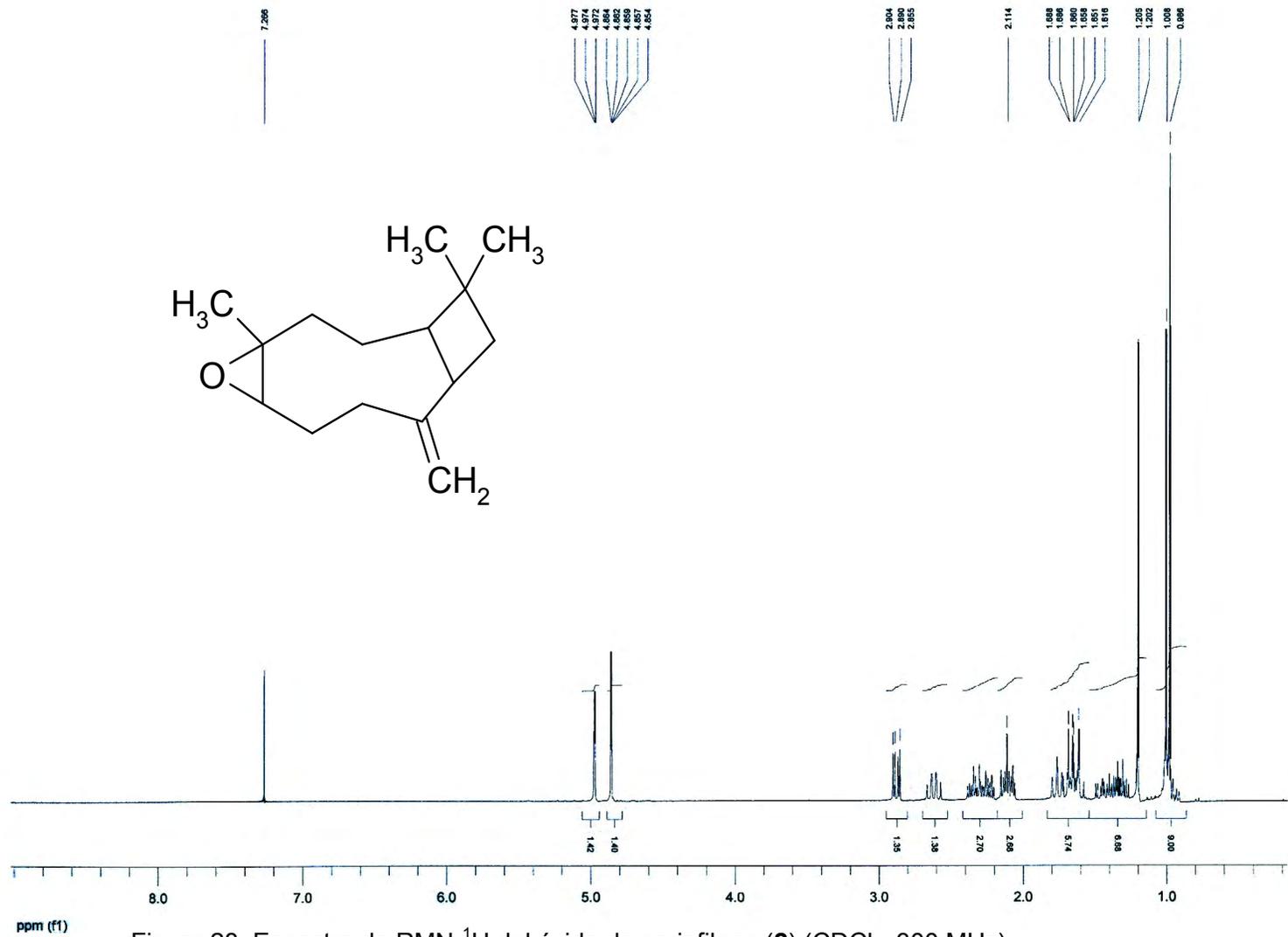


Figura 27. Espectro de RMN-¹H del β-cariofileno (1) (CDCl₃, 300 MHz)

ESPECTRO RMN-¹H ÓXIDO DE CARIOFILENOFigura 28. Espectro de RMN-¹H del óxido de cariofileno (2) (CDCl₃, 300 MHz)



ESPECTROS DE GASES MASAS ÓXIDO DE CARIOFILENO

D:\Xcalibur\data\USA\ICG\OT4182_1

5/21/2010 2:54:15 PM

O-CARIO

RT: 0.00 - 29.02

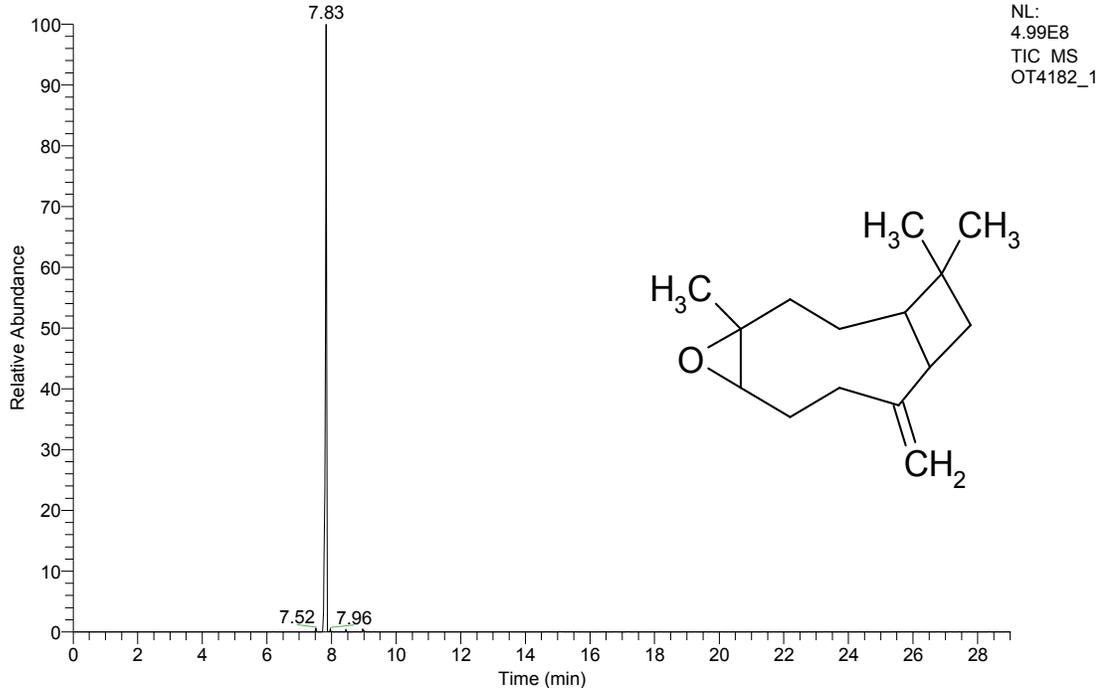
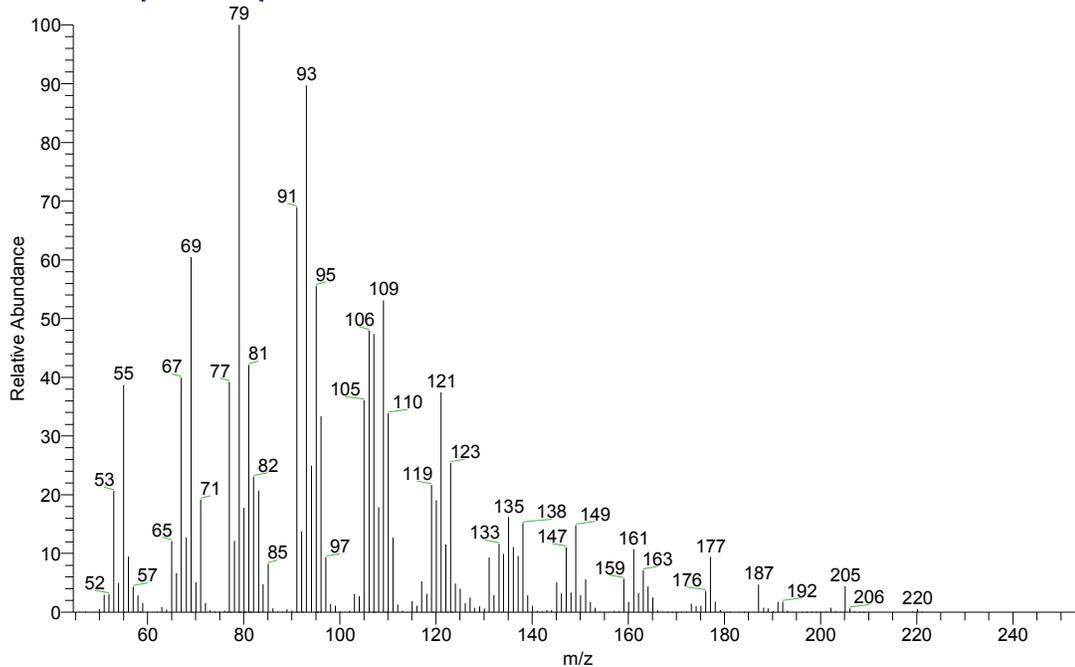
OT4182_1 #372 RT: 7.83 AV: 1 NL: 3.50E7
T: + c EI Full ms [44.50-600.50]

Figura 29. Espectro de masas del óxido de cariofileno (referencia)

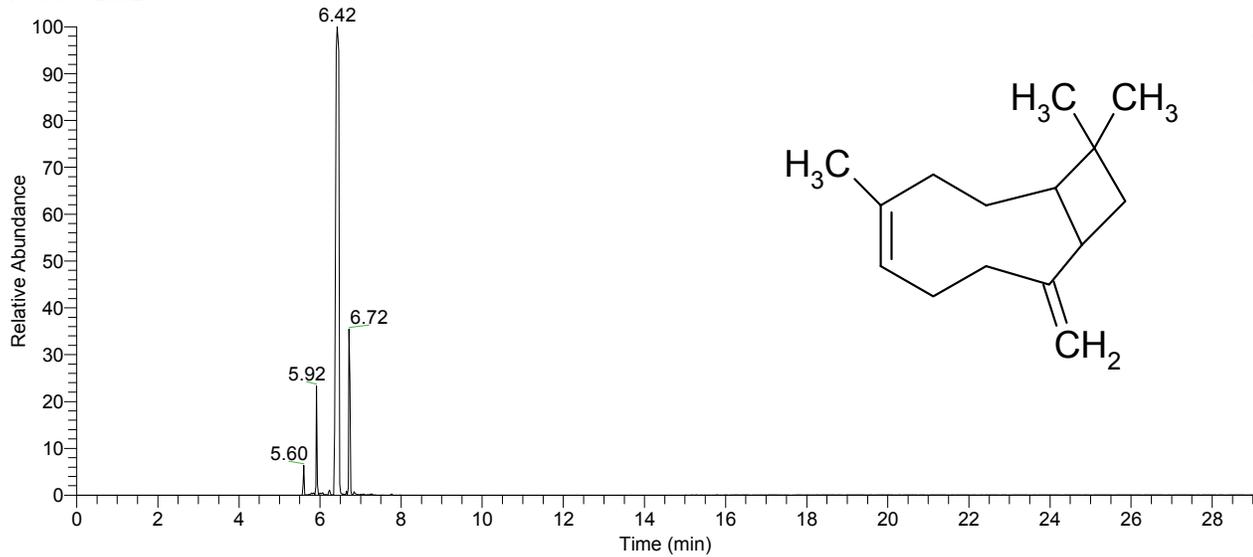
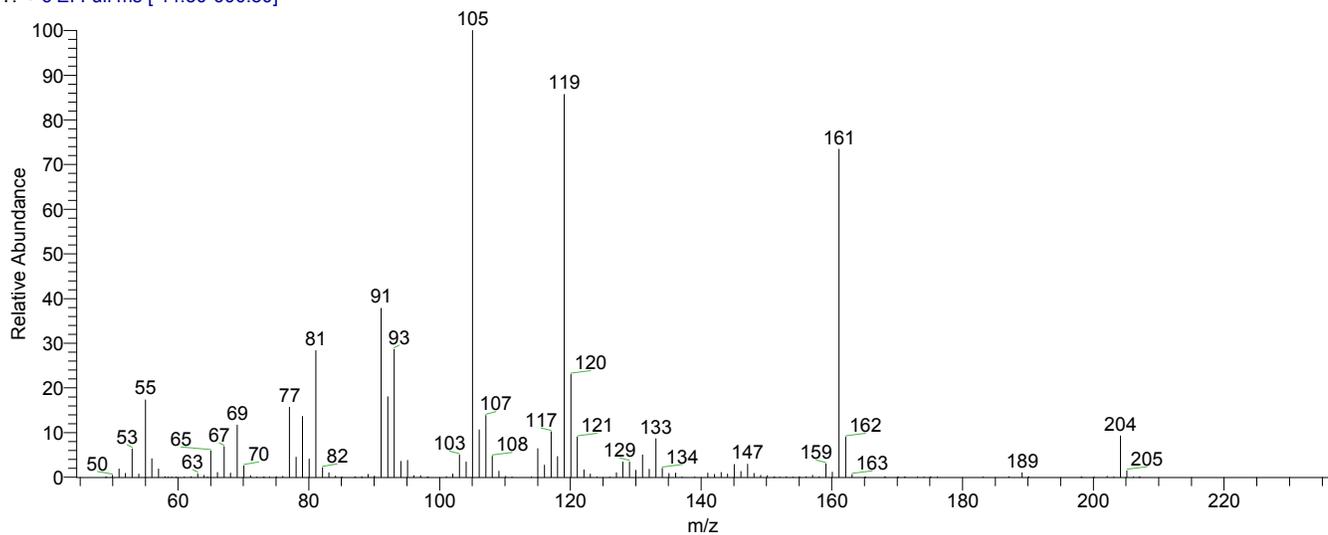
ESPECTRO GASES MASAS DEL β -CARIOFILENO

D:\Xcalibur\data\USA\ICG\OT4183_3

5/24/2010 1:28:46 PM

B-CARIO

RT: 0.00 - 29.02

NL:
8.57E8
TIC MS
OT4183_3OT4183_3 #266 RT: 5.60 AV: 1 SB: 21 7.07-7.49 NL: 8.22E6
T: + c EI Full ms [44.50-600.50]Figura 30. Espectro de masas del β -cariofileno (1) (referencia)

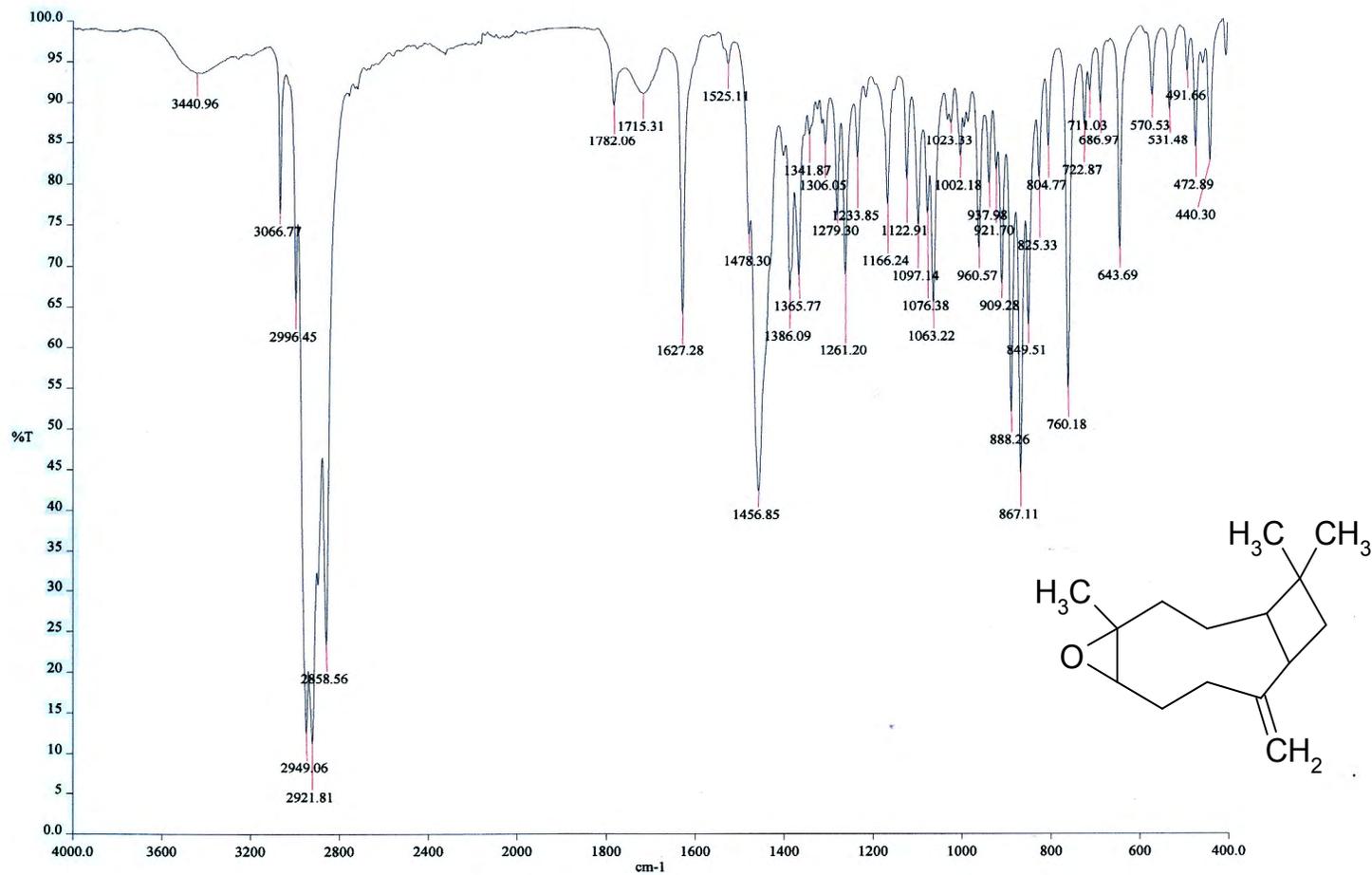
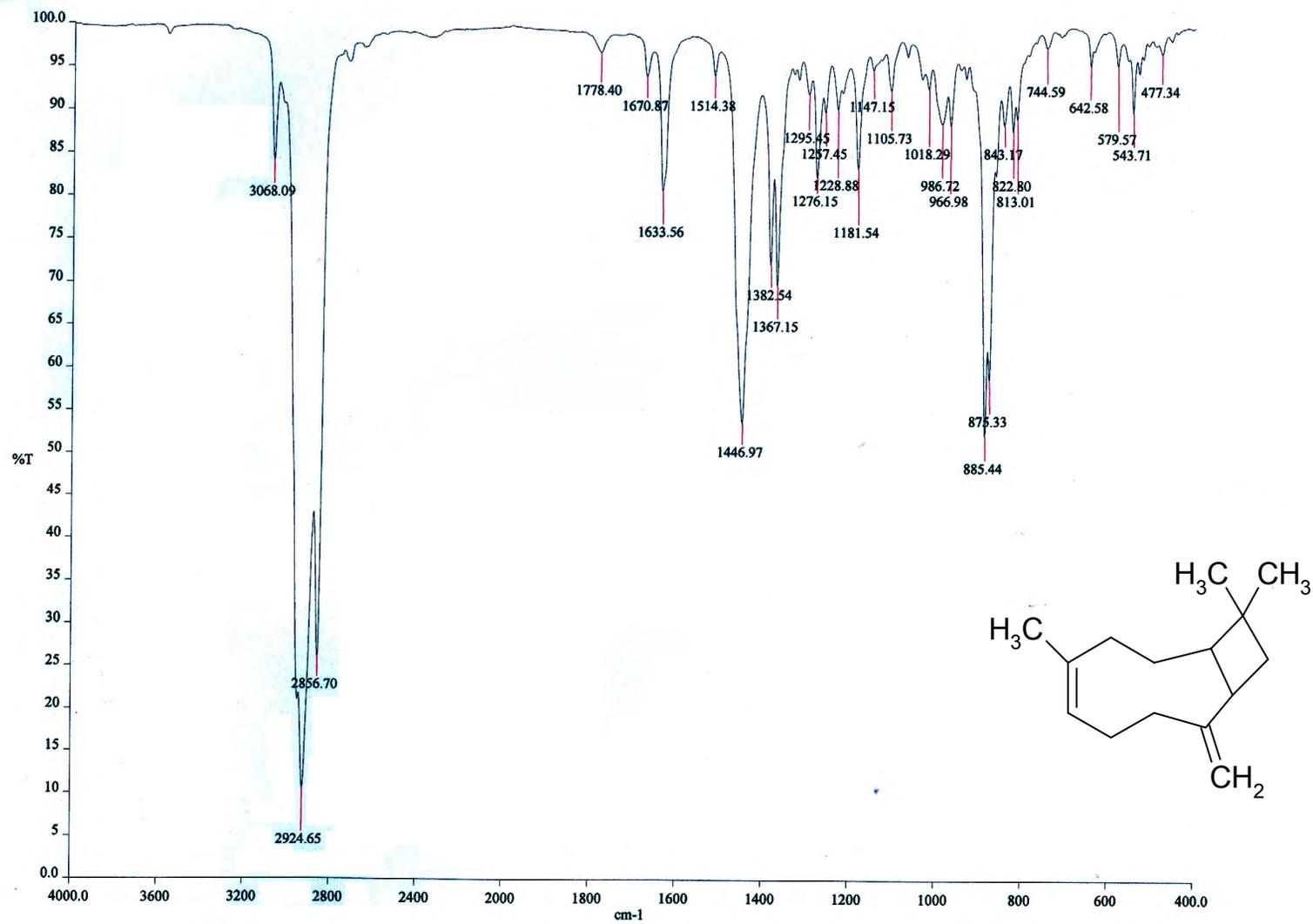


Figura 31. Espectro IR Óxido de cariofileno (2)

Figura 32. Espectro IR β - cariofileno (1)



Bibliografía.

Anónimo. 1994. Flora Medicinal Indígena de México. Tomo II. México, D. F. pp: 845-846

Allen JF and Holmes NG (1986) Electron transport partial reactions. En: Hipkinns MF, Baker NR (eds) Photosynthesis, Energy Transduction. A Practical Approach, Chapter 5. IRL Press, Oxford United Kingdom, pp103-141

Arnon DI (1949) Cooper enzymes in isolated chloroplasts polypenoxidase in *Beta vulgaris* Plant Physiol 24:1-15

Argueta y Mata 2009 Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>

Arrhenius, JH. Langenheim, L. (1983) Sesquiterpenes in leaf pocket resins of *Copaifera* species *Phytochemistry* Vol 22 pp. 471-472

Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana Jarilla *Barkleyanthus salicifolius* (Kunth) Rob. & Brett. Compositae <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx> Citada 15/07/2010

Baker NR, Percival MP (1991). Herbicides and Photosynthesis. In: Baker NR, Percival MP (Eds), Herbicides Elsevier Science Publishers. Netherlands, pp1-26

Barkleyanthus salicifolius (Kunth) H. E. Robins. & Brett.) Asomiate amarillo http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/senecio_salignus/fichas/ficha.htm Citada 15/08/2010

Bolhár-Nordenkamp HR, Öquist G. (1993) Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. En: Hall DO, Scurlock JMO (eds) Photosynthesis and production in a Changing Environment. A Field and laboratory Manual. Bolhár-Nordenkamp HR, Leegood RC and Longs SP. Chapman and Hall, London, UK pp193-205



Bohlmann, F, Zdero, C. (1986). Further pyrrolizidine alkaloids and furoeremophilanes

from *Senecio* species. *Phytochemistry*. Vol,25 pp 1151-1159

Carrajola, C; Castro, M, J; Hilário, t *Planeta con vida*, *Biologia* (vol. 2). 2007

Corbett, J (1984). Herbicides interfering with photosynthesis. *The Biochemical Mode off Action of Pesticides*. 2nd. Edition, Academic Press, London, 50-98

Duke O, Abbas H (1995). Natural products with potential use as herbicides. *ACS Symposim Series 582*, 348-362.

Duke SO, Dayan FE and Rimando AM (1998) Natural products as tools for weed management. *Proc Jap Weed Sci* (suppl) 1:11

Duke SO, Dayan FE, Romagni JG et al (2000) Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Research*. 40:99-111

López E., García R. (2007) Actividad biológica de la raíz de *Senecio salignus* contra *Zabrotes Subfasciatus* en frijol almacenado, *Agrociencia* Vol.41 No. 1 95-102

Hipkins MF and Baker NR (1986) *Photosynthesis transduction a practical approach* IRL Press Oxford Washington.

Jhon Wiley & Sons imagen digital Esquema en Z

<http://web.usal.es/~evillar/images/esquemaenz%20.jpg>

Kogan MA y Pérez AJ (2003) *Herbicidas. Fundamentos fisiologicos y bioquimicos del modo de acción*. Ediciones Universidad Catolica de Chile. 22-31

Kudsk P (1989) Experiences with reduced herbicide doses in Denmark and the development of the concept of factor-adjusted doses. En: *Proceedings Brighton Crop Protection Conference-Weeds*, Brighton, UK, 545-554.



- Kudsk P (1999) Optimising herbicide use- the driving force behind the development of the Danish decision support system En: Proceedings Brighton Conference- Weeds, Brighton, UK, 737-746.
- Kudsk P (2001) How to investigate the influence of environmental factors of herbicide performance. En: Proceedings of the BCPC Conference- Weeds, Brighton, UK 495-504
- Kudsk P (2002) Optimising herbicide performance En: Naylor (ed) Weed Management Handbook, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 323-344
- Kudsk P and Streibig JC (2003) Herbicides a two-edged sword. Weed Research 43: 90-102
- Lotina-Hennsen B., Albores-Velasco M., García-Chávez L., (1989). Herbicidas y productividad agrícola. Revista de la Sociedad Química de México. Vol. 33 No.3, pp. 109- 110.
- Moreland, D. (1980). Mechanisms of action of herbicides. Annual review of Plant Physiology 31, 597-638
- Morales F F. and Lotina HB (2007) Natural diterperns from *Croton ciliaglanduliferus* as photosystem II and photosystem I inhibitors in spinach chloroplasts. Photosynth Res 91: 71-80
- Rodríguez, C., López E. 2001. Actividad insecticida e insectistática de la chilca (*Senecio salignus*) sobre *Zabrotes subfasciatus*. Manejo Integrado de Plagas 59: 19-26
- Romo de Vivar, A., Pérez-Castorena, A. (2007) Secondary Metabolites from Mexican Species of the Tribe Senecioneae (Asteraceae). Sociedad Química de México, pp 160-172
- Rzedowski, GC. de, J. Rzedowski y colaboradores. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.



- Strasser RJ, Srivastava A, Govindjee, P. (1995) Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cianobacteria. *Photochem Photobiol* 66:32-45.
- Strasser RJ (1997) Donor side capacity of photosystem probed by chlorophyll *a* fluorescence transients. *Photosynth Res* 52:147-155
- Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M. (1998) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Mohanty, Yunus and Pathre (eds) *Probing photosynthesis: mechanism, regulation & adaptation*. Taylor & Francis, London, p 42, 46
- Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M. (2004). Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In: Papageorgiou G, Govindjee (eds) *Advances in Photosynthesis and Respiration. Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis* vol 19 Kluwer Academic Publishers The Netherlands pp321-362.
- Voet D, Voet J, Pratt CW (2005) *Fundamentals of Biochemistry*. 2da ed. Jhon Wiley & Sons, New York.