

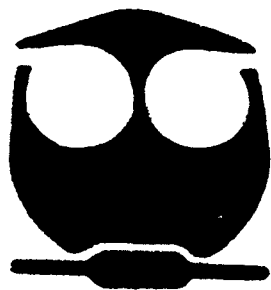


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO
HEXANICO DE TALLOS DE LA PLANTA
Croton ciliatoglanduliferus Ort. PARA LA OBTENCIÓN
DE POSIBLES AGENTES HERBICIDAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
FÉLIX MORALES FLORES



MÉXICO, D. F.



2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado:

Presidente	Dr. Blas Lotina Hennsen
Vocal	Dra. Maria Isabel Aguilar Laurents
Secretario	Dra. Martha Yolanda González Quesada.
1er. Suplente	Dr. José Pedraza Chaverri
2°. Suplente	Dra. Nora Andrea González Najera

Sitio de realización de la tesis:

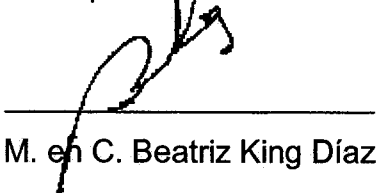
LABORATORIO 115, DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA,
CONJUNTO "E", DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FACULTAD
DE QUÍMICA, UNAM, CD. UNIVERSITARIA

Asesor:



Dr. Blas Lotina Hennsen

Supervisor Técnico:



M. en C. Beatriz King Díaz

Sustentante:



Félix Morales Flores

AGRADECIMIENTOS.

En muchas ocasiones a lo largo de mi vida me he sentido indefenso. Es quizás el dolor más agudo que una persona puede conocer, basado en la frustración y la rabia inútil. El pinchazo de una espada en el brazo del soldado en combate no puede compararse con la angustia del prisionero cuando escucha el chasquido del látigo. Incluso si el látigo no azota el cuerpo del prisionero indefenso, sin duda provoca una profunda herida en su alma.

Todos somos prisioneros en un momento u otro de nuestras vidas, prisioneros de nosotros mismos o de las expectativas de aquellos que nos rodean. Es una carga que soportamos todos, que todos odiamos, y que muy pocos consiguen eludir. Me considero afortunado a este respecto, porque mi vida ha sido una trayectoria de continua mejora.

En mi obcecamiento juvenil, creí que podría valerme solo, que tenía la fuerza suficiente para conquistar a los enemigos con los principios. La arrogancia me convenció de que con la voluntad era bastante para superar la indefensión. Reconozco que fue una idea errónea, porque, cuando recuerdo aquellos años, veo que nunca estuve solo y nunca tuve que estar solo. Siempre hubo amigos, leales y queridos, que me dieron apoyo incluso cuando creía que no lo necesitaba, e incluso cuando no me daba cuenta.

Mis padres, mis hermanas, Jenny, Dirce, Angel, Alfonso, Ramón, Aidee, Eva, Nadia, Jorge, Moisés, Helena, Edgar, Alejandro, Bety, Caludia, Silvia, Yadira, Jessica, Mónica, Estrella y desde luego mi cómplice, compañero amigo y confidente, *Dios*: estos fueron los compañeros que justificaron mis principios, que me dieron fuerza para luchar contra cualquier enemigo, real o imaginario. Estos fueron los compañeros que lucharon contra la indefensión, la rabia y la frustración.

Estos fueron los compañeros que me dieron la vida.

Aunque en la portada únicamente aparece mi nombre, sería faltar a la verdad decir que este trabajo lo escribí solo; ya que de una forma u otra hay mucha gente que participó en ella.

A mis padres:

Quiero agradecerles por todo el apoyo que me han dado a lo largo de mi vida, desde los principios que me inculcaron, hasta las noches de desvelo que les hice pasar; siempre han estado a mi lado sin importar las circunstancias, han estado ahí en las buenas y en las malas (sobre todo en las malas), y nunca hubiera podido hacer nada sin ellos, y sin embargo lo único que puedo hacer en este pequeño espacio es agradecerles y decirles que al fin lo logramos, ya que jamás podría terminar de agradecerles por todo lo que hicieron.

A mis hermanas:

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

A Jenny:

A pesar de tener muy poco tiempo como novios, te conozco desde hace mucho, y creo que Dios sabe porque hace las cosas. No se de que manera agradecerte por todo lo que hiciste por mi, ya que me devolviste la confianza que yo ya había perdido, y sobre todo confiaste en mi y me creíste, a pesar de todo lo que se dijo, te arriesgaste por lo que sentías, y me diste fuerza para continuar adelante.

Al profesor Blas:

Gracias por haberme dado la oportunidad de participar en el proyecto dentro de su laboratorio, y de realizar la tesis bajo su tutela.

A la profesora Bety:

Gracias por el apoyo dado en la realización de esta tesis, ya que le tocó todo el trabajo pesado, me soportó durante todo este tiempo, me orientó y se encargó de que este trabajo estuviera bien hecho.

A la doctora Isabel.

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

A todos los compañeros del laboratorio 115:

Por haber hecho agradable mi estancia mientras se realizaba este trabajo, gracias a Francisco, Daniel, Paulina, Cristina, Montserrat, Raquel, Ernesto, sin los cuales me hubiera aburrido y probablemente hubiera desertado.

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

Los cuales forman parte de mi vida, y me acompañaron a lo largo de la carrera, Alejandro, Moisés, Nadia, Jorge, Helena, Edgar, Yadira, Jessica, Silvia, Caludia, Jazmín, Jenny, Bety, Lorenzo, Susana, Ramón, Aidee, Angel, Alfonso, Eva, Dirce, Isaac, Alejandro Zarco, y muchos otros que estuvieron a mi lado todo este tiempo..

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE ESPECTROS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1. Generalidades de la familia Euphorbiaceae.....	5
2.2. Generalidades del género <i>Croton</i>	8
2.3. Generalidades de <i>Croton ciliatoglanduliferus</i>	9
2.4. Alelopatía.....	10
2.5. Herbicidas.....	10
2.5.1. Herbicidas inhibidores de la fotosíntesis.....	11
2.5.2. Factores que afectan la efectividad de los herbicidas.....	12
2.6. Fotosíntesis.....	12
2.6.1. Cloroplastos y clorofilas.....	13
2.6.2. Reacción de Hill.....	13
2.6.3. Reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis FS II y FS I.....	14
2.6.3.1. Fotosistema II: la división de agua para producir oxígeno.....	15
2.6.3.2. Fotosistema I: la reducción de NADP ⁺	16
2.6.3.3. Transporte cíclico de electrones en el FS I.....	16
2.6.4. Producción de ATP por un gradiente de protones.....	17
2.7. Aceptores de electrones.....	18
2.8. Inhibidores del transporte de electrones.....	19
2.9. Inhibidores de la transferencia de energía.....	19
2.10. Desacoplantes.....	20
2.11. Fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	20

3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Principal.....	24
3.2. Particulares.....	24
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	25
4.1. Obtención de los metabolitos secundarios.....	25
4.2.1. Material vegetal.....	25
4.2.2. Fraccionamiento primario del extracto hexánico de los tallos de <i>Croton ciliatoglanduliferus</i>	25
4.3. Purificación de los metabolitos.....	25
4.2. Bioensayos.....	27
4.2.1. Aislamiento de cloroplastos de las hojas de espinaca.....	27
4.2.2. Medición de la síntesis de ATP.....	28
4.2.3. Medición de la velocidad del transporte de electrones.....	28
4.2.4. Medición de la velocidad del transporte de electrones del FS II.....	29
4.2.5. Medición de la velocidad del transporte de electrones del FS I.....	29
4.2.6. Medición de las reacciones parciales del FS II.....	29
4.2.7. Medición de las reacciones parciales del FS I.....	30
4.2.8. Medición de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> del FS II.....	30
4.2.9. Medición de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> en hojas.....	31
4.2.10 Biomasa seca.....	31
4.2.11 Determinación de la actividad tóxica en el crustáceo <i>Artemia</i> <i>salina</i>	32
4.2.11.1. Preparación de los organismos y muestras.....	32
4.2.11.2. Bioensayo.....	32

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
5.1. Fraccionamiento primario del extracto hexánico de los tallos de <i>Croton ciliatoglanduliferus</i>	33
5.2. Purificación y caracterización del 15-O-acetil-8 α -hidroxi-labdano (1).....	34
5.3. Purificación y caracterización del 8 α ,15-dihidroxi-labdano (2).....	36
5.4. Efecto de 1 y 2 sobre diferentes actividades fotosintéticas.....	38
5.5. Sitios de interacción de 1 y 2 sobre la fotosíntesis y sus reacciones parciales.....	41
5.6. Fluorescencia de la clorofila <i>a</i> medida en presencia de los compuestos 1 y 2	42
5.7. Fluorescencia de la clorofila <i>a</i> medida en hojas.....	47
5.8. Biomasa seca.....	51
5.9. Determinación de la actividad tóxica a <i>Artemia salina</i> de los compuestos 1 y 2	52
7. CONCLUSIONES.....	54
8. APÉNDICES.....	55
8.1. Apéndice 1: Métodos cromatográficos.....	55
8.2. Apéndice 2: Medios.....	55
8.3. Apéndice 3: Espectros.....	59
9. REFERENCIAS.....	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Uso generalizado de algunas especies de la familia Euphorbiaceae.....	7
Tabla 2. Algunos herbicidas sintéticos, así como su sitio de acción.....	12
Tabla 3. Fracciones obtenidas en diferentes sistemas de elusión y su valor de I ₅₀	33
Tabla 4. Posiciones de los carbonos en el espectro de RMN ¹³ C para el compuesto 1 y 2 así como de la literatura.....	37
Tabla 5. Efecto de 1 y 2 sobre el FS II, FSI, la velocidad del transporte de electrones y las reacciones parciales del FS II y FS I.....	42
Tabla 6 Efecto de concentraciones crecientes de 1 , 2 , 10µM de DCMU y 0.8 M tris pH 8.0 en la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> en cloroplastos adaptados a la oscuridad por 5 minutos.....	47
Tabla 7. Efecto de concentraciones crecientes de 1 , 2 y DCMU sobre la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> en hojas adaptadas a la oscuridad por 5 minutos.....	50
Tabla 8. Medición de la masa seca de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> medida después de tres días de tratamiento con los compuestos 1 y 2 así como con DCMU a diferentes concentraciones.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estructuras de los compuestos 15-O-acetil-8 α -hidroxi-labdano (1) y α ,15-dihidroxi-labdano (2).....	3
Figura 2. <i>Croton ciliatoglanduliferus</i> . Ort.....	9
Figura 3. Flujo de electrones en los fotosistemas I y II. (esquema Z).....	16
Figura 4. Representación esquemática de la membrana tilacoidal.....	19
Figura 5. Diagrama de niveles de energía para la clorofila.....	22
Figura 6. Curva de inducción de la fluorescencia, o curva de Kautsky de cloroplastos adaptados a la oscuridad por 30 minutos.....	24
Figura 7: Partición ácido base de la fracción 241.....	26
Figura 8: Esquema del transporte de electrones en cloroplastos.....	30
Figura 9: Residuos oxigenados en el compuesto 1.....	35
Figura 10. Estructura del diterpeno 15-O-acetil-8 α -hidroxi-labdano (1).....	36
Figura 11. Estructura del compuesto 8 α ,15-dihidroxi-labdano (2).....	37
Figura 12: Efecto de las concentraciones crecientes de las fracciones 96-145 y 241-271 sobre la síntesis de ATP en tilacoides despinacas.....	38
Figura 13: Efecto de las concentraciones crecientes de los compuestos 1 y 2 sobre la síntesis de ATP en tilacoides de espinacas.....	39
Figura 14: Efecto de concentraciones crecientes de los compuestos 1 y 2 en el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado	40
Figura 15: Desarrollo de fluorescencia en cloroplastos recientemente lisados en presencia de los compuestos 1 y 2 a 900 μ M, 10 μ M DCMU y tilacoides tratados con 0.8M Tris pH 8.0.....	44
Figura 16: Aparición de la banda K alrededor de 300 μ S.....	44

Figura 17: Plantas de amaranto después de tres días de ser tratadas con los compuestos 1 y 2 así como también con DCMU (control positivo).....	48
Figura 18. Gráfica de desarrollo de fluorescencia en hojas para los compuestos 1 y 2 a 300 μ M, así como DCMU a 100 μ M, medido a las 24, 48 y 72 hrs. de ser tratadas.....	49
Figura 19. Gráficas que muestran la actividad tóxica de los compuestos 1 y 2	52

LISTA DE ESPECTROS.

Espectro 1 Espectro IR del 15-O -acetil -8 α -hidroxi- labdano.....	58
Espectro 2. Espectro de RMN ¹ H del 15-O-acetil-8 α -hidroxi-labdano.....	59
Espectro 3. Espectro de RMN ¹³ C del 15-O -acetil -8 α -hidroxi- labdano...	60
Espectro 4 Espectro DEPT del 15-O -acetil-8 α -hidroxi-labdano.....	61
Espectro 5. Espectro de masas por impacto electrónico del 15-O -acetil -8 α -hidroxi- labdano.....	62
Espectro 6. Espectro de IR del 8 α ,15-dihidroxi-labdano.....	63
Espectro 7. Espectro de RMN ¹ H espectro del 8 α ,15-dihidroxi-labdano.....	64
Espectro 8. Espectro de RMN ¹³ C del 8 α ,15-dihidroxi-labdano.....	65
Espectro 9. DEPT del 8 α ,15-dihidroxi-labdano.....	66
Espectro 10. Cromatograma de gases del 8 α ,15-dihidroxi-labdano.....	67
Espectro 11. Espectro de masas por impacto electrónico del 8 α ,15-dihidroxi-labdano.....	68

Lista de Abreviaturas

A ₀	Aceptor de electrones primario del Fotosistema I
AcOEt	Acetato de etilo
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ADP	Adenosin difosfato
ATP	Adenosin trifosfato
CF ₀	Parte lipofilica del complejo CF ₁ CF ₀ -ATPasa
CF ₁	Parte hidrofílica del complejo CF ₁ CF ₀ -ATPasa
CHCl ₃	Cloroformo
Chl	Clorofila
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>
CH ₃ OH	Metanol
Cyt b ₆ /f	Complejo Citocromo b ₆ /f
DBMIB	2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil- <i>p</i> -benzoquinona
DCMU	3-(3,4-dicloro-fenil)-1,1-dimetilurea
DCPIP	2,6- Dicloro fenol indofenol
DEPT	Prueba de desacoplado de protones
DMSO	Dimetilsulfoxido
DPC	Difenilcarbazida
EPR	Resonancia paramagnética del electrón
F	Fluorescencia
F ₀	Fluorescencia inicial
F _A	Ferredoxina tipo A
F _B	Ferredoxina tipo B
FAD	Flavin adenina dinucleotido
Fd	Ferredoxina
Fm	Fluorescencia máxima
FS I	Fotosistema I

FS II	Fotosistema II
Fv	Fluorescencia variable = $F_m - F_0$
HCl	Acido Clorhídrico
Hex-AcOEt	Mezclas de hexano acetato de etilo.
IDH	Índice de Deficiencia de Hidrógeno
IR	Espectroscopia infrarroja
J	Constante de acoplamiento
KCl	Cloruro de potasio
KCN	Cianuro de potasio
KD	Constantes de velocidad vía calor
Kf	Constantes de velocidad vía fluorescencia
KOH	Hidróxido de potasio
KP	Constantes de velocidad de excitación vía fotoquímica
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Cloruro de Magnesio Hexahidratado
mM	Milimolar
MV	1,1'-Dimetil-4,4'-bipiridinium dicloro "Metil viologeno"
NADPH	Nicotina adenina dinucleótido fosfato reducido
$NADP^+$	Nicotina adenina dinucleótido fosfato oxidado
NH_4Cl	Cloruro de amonio
OEC	Complejo productor de oxígeno
P_{680}	Centro de reacción del PSII
P_{700}	Centro de reacción del PSI
PC	Plastocianina
Pi	Fosfato inorgánico
PMS	Fenil metasulfato
ppm	Partes por millón
PQ	Plastoquinona
Q_A	Aceptor de electrones primario del Fotosistema II
Q_A^-	Aceptor de electrones primario reducido del

	Fotosistema II
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
SiMo	Silicomolibdato de sodio
TMQH ₂	Tetrametil- <i>p</i> -benzoquinona reducida
Tricina	{N-[tris (hidroximetil) metil]-glicina}
UV	ultravioleta
V(t)	Fluorescencia variable relativa
$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud máxima
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar

1. INTRODUCCIÓN.

Las malas hierbas o malezas actualmente son un problema que causa pérdida de producción y reducción en la calidad de los cultivos, por lo que es necesaria su eliminación. Antes de la introducción de los herbicidas selectivos, la eliminación de las malezas en los cultivos se realizaba manualmente, además para aumentar la producción agrícola se empleaban otras técnicas como la rotación de cultivos, una adecuada labranza y un sistema de barbecho [1].

En la década de los 40's la introducción de los herbicidas selectivos y el constante flujo de nuevos herbicidas en las décadas subsiguientes, armó a los granjeros con una nueva herramienta, "el azadón químico"; sin embargo, el uso excesivo de los herbicidas para el control de malezas ha resultado en cambios en la flora desembocando en la resistencia de las malezas a los productos químicos [1].

En 1980 la preocupación pública con respecto a los efectos colaterales de los herbicidas con respecto al medio ambiente y a la salud humana, produjo un incremento en la rigidez para el registro de nuevas moléculas con dicha actividad y en una iniciativa política para reducir el empleo de herbicidas. Es por ello que la industria de los pesticidas continúa en la búsqueda de compuestos más eficaces, económicos y benignos con el medio ambiente que puedan ser utilizados como herbicidas, para lo cual, se cuenta con cuatro líneas de búsqueda: cernimiento de moléculas sintéticas, síntesis de análogos de moléculas comerciales, diseño molecular de herbicidas basados en un sitio blanco en particular y el cernimiento de productos naturales [2]. La mayoría de los herbicidas comerciales han sido el resultado de la primera de estas estrategias, a las cuales se han sumado nuevas herramientas como la química combinatoria y la teoría de la diversidad química, y de esta forma se tiene una producción y prueba mucho más rápida de nuevos compuestos. Sin embargo, las dos últimas estrategias son de gran interés debido a la necesidad de contar con compuestos que posean nuevos sitios de interacción, que ofrecen una herramienta para combatir el aumento de malezas resistentes, además de que los compuestos naturales son considerados más benignos para el medio ambiente que los pesticidas sintéticos debido a su relativo corto tiempo de vida media comparados con los mismos, y por formar parte de la

naturaleza [2,3]. Es por ello que la caracterización química y biológica de compuestos naturales novedosos, representa una fuente inagotable de estructuras prototipo para el desarrollo de derivados sintéticos y semisintéticos con una actividad biológica selectiva y en lo posible, con una toxicidad reducida [4].

El presente trabajo describe el fraccionamiento biodirigido del extracto hexánico de los tallos de la planta *Croton ciliatoglanduliferus*. Ort (Euphorbiaceae), para la obtención de compuestos con posible actividad herbicida. Para el desarrollo de este proyecto de investigación se partió de un trabajo previo en el laboratorio, en el cual el extracto hexánico de los tallos de dicha planta resultó con mayor actividad en la inhibición de la síntesis de ATP ensayada en cloroplastos aislados de espinacas (*spinacea oleraceae L.*). La estrategia metodológica se inició con la preselección y la selección de la especie, seguido del estudio biodirigido y culminó con la caracterización bioquímica y química de los compuestos obtenidos. La preselección de *C. ciliatoglanduliferus* se fundamentó en una revisión bibliográfica en la que se encontraron escasos reportes relacionados con la actividad química y bioquímica de esta especie en particular. En la literatura están descritos estudios acerca del efecto del extracto acuoso de *C. ciliatoglanduliferus* incorporado en la dieta de *Spodoptera littoralis* (avispa) [5], actividad antiinflamatoria de compuestos aislados del extracto hexánico probados en el modelo de edema de ratón [6], y la actividad herbicida de compuestos aislados del extracto hexánico de las hojas de dicha planta [7]. Por otra parte la selección se basó en la aplicación de ensayos biológicos apropiados a los extractos orgánicos de dicha planta.

El estudio químico biodirigido del extracto activo utilizando el modelo de actividad en la síntesis de ATP en cloroplastos de espinaca, derivado de los tallos de *C. ciliatoglanduliferus* recolectados en el Estado de Guerrero, permitió la obtención de dos metabolitos secundarios caracterizados como 15-O-acetil-8 α -hidroxilabdano (**1**) y 8 α ,15-dihidroxi-labdano (**2**) (Figura 1).

De manera general, la elucidación estructural de los compuestos aislados se llevó a cabo mediante la aplicación de métodos espectroscópicos.

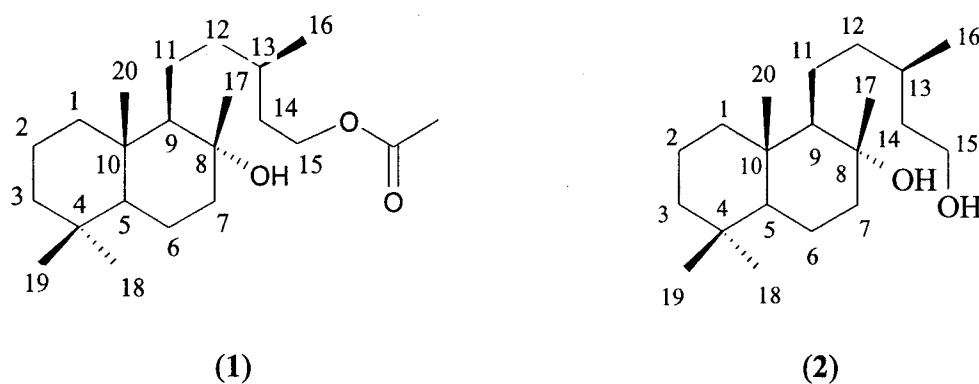


Figura 1: estructuras de los compuestos 15-O-acetil-8 α hidroxi-labdano (1) y 8 α ,15-dihidroxi-labdano (2).

El extracto hexánico de los tallos de *Croton ciliatoglanduliferus* inhibió la síntesis de ATP, por lo que se procedió a su fraccionamiento. Las fracciones 96-145 y 241-271 mostraron también una actividad inhibitoria de la síntesis de ATP. El compuesto mayoritario de la fracción 96-145 (1) fue aislado y purificado por cromatografía preparativa en capa fina, mientras que el compuesto aislado de la fracción 241-271 (2) se purificó por una partición ácido-base. Para caracterizar el sitio y mecanismo de acción se ensayó el efecto de estos compuestos en el flujo de electrones basal, fosforilante y desacoplado. Se encontró que ambos compuestos inhibieron el flujo de electrones en las tres condiciones, los resultados indican que se comportan como inhibidores de la Reacción de Hill. Para localizar el sitio de inhibición de cada uno de estos compuestos (1 y 2), se ensayó su efecto en las reacciones parciales de la fotosíntesis. Los resultados indican que el compuesto 1 inhibe entre P₆₈₀ a Q_A y P₇₀₀ a F_X; a su vez el compuesto 2 presenta dos sitios de inhibición, siendo el primero en la enzima que fotoliza el agua y el otro en el segmento de P₇₀₀ a F_X. Esta es la primera vez que el FS I es un sitio de inhibición para aleloquímicos.

Para evaluar el potencial post-herbicida de ambos compuestos (1 y 2), estos fueron aplicados en las hojas de plantas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) de 15 días de crecimiento, observándose necrosis a las 24 horas de aplicación y una disminución en la biomasa.

La evaluación de los diterpenos aislados sobre la sobrevivencia de las larvas del crustáceo *Artemia salina* permitió determinar que no se presenta un efecto tóxico con valores de concentración letal media (CL₅₀) mucho mayores a 1000ppm.

En conclusión los resultados obtenidos para los compuestos **1** y **2** por medio de este estudio nos indican claramente que dichos compuesto pueden ser empleados como herbicidas post-emergentes de acción inmediata.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Generalidades de la familia Euphorbiaceae.

La familia Euphorbiaceae con cerca de 8000 especies en 300 géneros, es una de las más grandes y diversas familias de las angiospermas. En general se puede afirmar que las Euforbiáceas han sido mucho menos estudiadas que otras grandes familias de angiospermas tales como: Compositae, Gramineae, Leguminosae, Curciferae, Solanaceae, Orchidiaceae, y Umbelliferae [8]. Presenta una gran diversidad de formas de crecimiento, desde árboles altos de pluliselva a lianas, arbustos, hierbas anuales y perennes, geógrafitos y acuáticas flotantes. En términos técnicos las características diagnosticadas más sobresalientes de dicha familia incluyen hojas estipuladas, simples o palmeadamente compuestas; inflorescencias básicamente cimosas; flores unisexuales hipóginas radiantemente simétricas; un disco nectarífero receptacular; pétalos llamativos o ausentes; estambres de 1 a muchos, y algunas veces con dos y granos de polen de 2-3 nucleados.

Varias especies de las Euforbiaceae son de considerable importancia económica y los productos obtenidos de esta familia incluyen el "aceite de castor" (*Ricinus*), el aceite "tung" (*Aleurites*), el "casabe", la "tapioca" (*Manihot*) y el caucho (*Hevea*). No se ha demostrado que estas plantas contengan carcinógenos irritantes. Muchas especies y en particular las especies de *Euphorbia* y *Croton* se han reportado como causantes de envenenamiento de humanos y ganado, aunque los compuestos causantes de dicho efecto aun no se han reportado [8].

La familia Euphorbiaceae es rica en Flavonoides, cumarinas, glucósidos cianogénicos, glucocinolatos, glucósidos cardiotónicos, taninos, triterpenoides, ésteres de alcoholes, forboles, resiníferoles, fenantrenos, ácidos fenólicos, derivados del floriglucinol y macrólidos [8].

De las especies de *Croton* se han aislado varios compuestos como alcaloides, isoquinolinas, aporfinas como esparsoflorina; proaporfinas como crotsparinina,

morfinandienonas como crotonosina, quinolinas como vaticina, una pirrolidina alcaloide como el ácido 4-hidroxihigrínico, derivados del forbol y flavonas como retusin y paquipodol [6,7,8] La tabla 1 muestra el uso generalizado de algunas especies de la familia Euphorbiaceae.

Tabla 1: Uso generalizado de algunas especies de la familia Euphorbiaceae [8]	
Uso	Especies
Antiabortiva	<i>Alchornea Cordifolia, Bridelia micantha</i>
Antihelmíntica	<i>Alcalypha indica, Alchornea coridifolia, Andrachne ovalis, Croton macrostachys, Euphorbia spp.</i>
Antiasmática	<i>Croton spp, Euphorbia spp, ricinos communis, Jatropha gossypifolia.</i>
Antibiótico	<i>Acalypha wilkesiana, Cridoscolus ureas, Croton sellowii, Euphorbia spp, Flueggea virosa, Sauropus rostratus.</i>
Anticancerígeno	<i>Croton spp, Euphorbia spp</i>
Antipirético	<i>Euphorbia nerifolia</i>
Antiespasmódico	<i>Euphorbia spp</i>
Bronquitis	<i>Euphorbia spp</i>
Anticonceptivo	<i>Mallotus phillippinensia</i>
Dermatitis	<i>Croton cortesianus, Glochi-dium spp</i>
Diabetes	<i>Bridelia feruginea, Croton spp, Euphorbia hirta, Phyllanthus spp</i>
Disentería	<i>Alcalypha australis, Alchornea cordifolia, Bridelia ferruginea, Caloxylon spp, Mallotus oppositifolius</i>
Enema	<i>Jatropha curcas, Mallotus oppositifolius, Phyllanthus muellerianus</i>
Fiebre	<i>Acalypha australis, Alchorrea cordifolia, Breinia spp, Bridelia ferruginea, Croton</i>

	<i>linearis, Euphorbia spp, Jatropha spp, Phyllanthus spp, Sauropus rostratus Tetrorchidium didymostemon, Trigomostemon longifolius</i>
Hepatitis	<i>Euphorbia splendens, Mallotus apelta, Phyllanthus urinaria.</i>
Hipnótico	<i>Euphorbia spp</i>
Hipotensivo	<i>Aleuriters fordii, Euphorbia maddenii</i>
Insecticida	<i>Euphorbia kumifusa, Jatropha curcas, Ricinos communis</i>
Lepra	<i>Hura crepitans, Mereya micrantha, Ricinos communis</i>
Malaria	<i>Alchornea cordifolia, Croton spp, Glochidion puberum.</i>
Edema	<i>Bridelia ferruginea</i>
Purgante	<i>Acalypha spp, Alcharnea cordifolia, Bridelia spp, Claoxylon palot, Claudia abyssinica, Croton spp, Elaephorbia drupifera, Euphorbia spp, Hippomane mancinella, Homona riparia, Hura crepitans, Jatropha spp, Mallotus phillipinensis, Maprouna africana, Mercuriales annua, Midbraenia fallax.</i>
Dolor de pecho	<i>Croton flavens, Erythrococca rigidifolia, Euphorbia spp, Phyllanthus muellerians</i>

2.2. Generalidades del género *Croton*.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta.

Clase: Magnoliopsida.

Orden: Malpighiales.

Familia: Euphorbiaceae.

Subfamilia: Crotonoideae.

Tribu: Crotoneae.

Género: *Croton* .

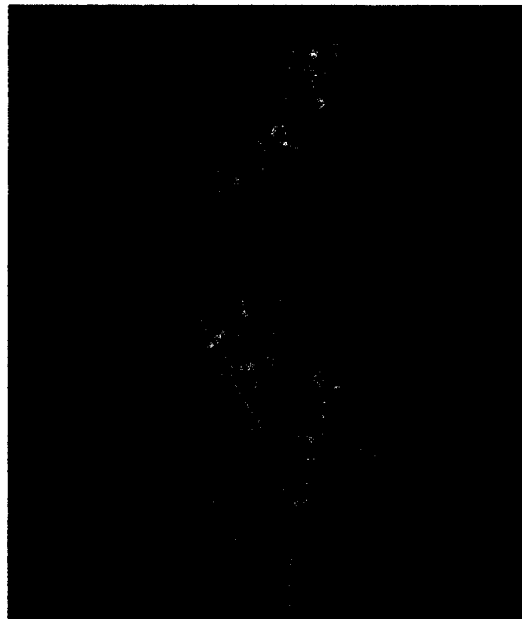


Figura 2. *Croton ciliatoglanduliferus*. Ort

Croton es un género muy extenso de la familia Euphorbiaceae establecido por Carolus Lineus en 1737. El nombre común de este género es *Rushfoil* y *Croton*; el nombre del género viene del griego Kroton que significagarrapata, ya que sus semillas se asemejan a uno.

En general las semillas de este género son oblongas, poco lustrosas; rojizas, del tamaño de una habichuela; encierran una almendra blanca oleosa, de sabor ardiente. El aceite que se extrae de ellas es más o menos líquido, de color amarillento y de sabor muy acre. Contiene el ácido tíglico. El aceite es un purgante extraordinariamente potente, basta una gota para provocar abundantes deposiciones. Se administra en la hidropesía, apoplejía y contra la tenia. Aplicado externamente produce una erupción cutánea bastante fuerte. Mezclado con aceite de almendras dulces; forma parte de los tratamientos que se emplean en el reumatismo. Los efectos que siguen a la absorción del aceite son bradicardia, sudores fríos y abatimiento, que pueden llegar a síncope si las dosis son muy elevadas. El aceite de *Croton* se utiliza farmacológicamente para provocar una inflamación localizada en las orejas de los animales de laboratorio, inflamación que responde a los antiinflamatorios no esteroídicos [9].

2.3. Generalidades de *Croton ciliatoglanduliferus*.

Nombre botánico: *Croton ciliato-glanduliferus*, *glandulifer*, *glandolifolius*, *glandulosus*. Ort (Fig. 1). Familia de las Euphorbiaceas [10].

Nombres comunes: Enchiladora, Dominguilla, Soliman (Guerrero y San Luis Potosí); Picoso (Guerrero y San Luis Potosí); Trucha (Sinaloa); Hierba de la cruz, Palillo, Canelilla, Cuanaxonaxi; Xunalixase (Oaxaca) [10]

Croton ciliatoglanduliferus.Ort es una planta salvaje, que se encuentra localizada en los estados de Sinaloa, Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Morelos, Querétaro, Oaxaca, Puebla, Sonora, San Luis Potosí, Jalisco y Nayarit. La planta es un arbusto aromático de 1 a 2 m de altura, tomentoso, corteza gris pálido, hojas verdes, largamente precioladas, anchamente ovado-cordadas, de 3 a 12 cm de largo, agudas y acuminadas con numerosas glandulitas pediceladas en los bordes y otras en la base de los pecíolos, tallos viejos flores en racimos, fruto capsular de unos 7 mm de largo, hojas muy fragantes [10]

Composición Química de *Croton ciliatoglanduliferus*. Ort: Grasa líquida soluble en alcohol, aceite esencial, un alcaloide, caucho, ácido orgánico especial, resina ácida soluble en el alcohol, glucosa, materia colorante moreno-amarillenta, clorofila, principios pépticos, albúmina y sales [10,11].

Partes usadas: Toda la planta [10].

Acción fisiológica: El estudio experimental de esta planta no está terminado aún; pero puede decirse que es un buen antitérmico y que tiene una acción purgante [10].

Usos: El vulgo lo emplea contra las fiebres intermitentes. Se ha comprobado que es antitérmico, pero ineficaz para el paludismo. En Huapanapan, Oaxaca emplean el jugo de la planta contra la picadura de alacrán. El aceite de *Croton* se emplea contra el estreñimiento extremo y en el tratamiento de apoplejía [10,12].

Dosis: Cocimiento al 20 por ciento de 100 a 140 gramos por día. Extracto fluido, 20 gramos al día [10]

Toxicidad: La toxicidad de *Croton ciliatoglanduliferus* varía con el desarrollo de la planta: concentra sus principios activos cuando sus frutos han madurado y los conserva cuando la planta se seca. Se han detectado glucósidos y resinas, ambos tóxicos. Se sabe que el aceite de *Croton*, donde se hallan presentes estas sustancias, es el más violento de los catárticos, basta de 0.5 a 1 gota para producir quemaduras en la boca, el tracto digestivo y el estómago. La intoxicación por ingesta de la planta comienza a manifestarse por la pérdida del control muscular, dificultades en la marcha, espasmos violentos, salivación excesiva, pulso variable, irritación de las mucosas, gastroenteritis severa y muerte por colapso respiratorio. El jugo de la planta puede provocar ulceraciones y descamación de la piel posiblemente debido a la acción de una toxina, la crotina, que se halla en concentraciones importantes, sin embargo los efectos secundarios indeseables que provocaba su ingesta han contribuido a su eliminación de las farmacopeas [12].

2.4. Alelopatía.

Este término se refiere a los efectos perjudiciales de plantas superiores de unas especies (donador) sobre la germinación, crecimiento o desarrollo de plantas de otras especies (receptor) [13].

2.5. 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. Los plaguicidas son productos que se utilizan para controlar las plagas, y los herbicidas son plaguicidas que se utilizan para controlar las malezas [13]

La Sociedad Norteamericana de Ciencia de las Malezas (WSSA) define a las malezas como 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, pueden reducir la calidad del producto cosechado e interferir con las labores de cosecha [13].

2.5.1. Herbicidas inhibidores de la fotosíntesis

Se sabe que los sitios primarios de acción de los herbicidas orgánicos pueden ser cualquier enzima en una vía metabólica o una proteína que regula a la actividad de la enzima. Muchos de estos sitios de ataque de los herbicidas en las malezas son desconocidos a nivel molecular. Los sitios de ataque mejor conocidos son la fotosíntesis, la formación de microtubulos y la biosíntesis de carótenos [14].

Los herbicidas comerciales que inhiben la fotosíntesis, lo hacen donde participan dos fotoeventos acoplados (Figura 3), el fotosistema II y el fotosistema I que forman en serie un reductor fuerte más electronegativo, comparado con el NADP^+ y por lo tanto, capaz de reducirlo a NADPH. Este evento ocurre en la reacción de Hill [14]. En la tabla 2 se muestran algunos herbicidas sintéticos, así como su sitio de acción.

Tabla 2: Algunos herbicidas sintéticos así como su sitio de acción.	
Compuesto	Sitio de acción
Triazinas de azufre	FS II [15].
Diquat y Paraquat (MV)	FS I [16].
Ariloxifenoxipropionatos	Acetil-CoA carboxilasa [17].
Glifosfato	EPSP sintasa [18].
Sulfonil ureas	Acetolactato sintasa [19].
Amit	Biosíntesis de clorofila [20].
Atrazina	Oxidación de agua [20].
Bijiridilo	Compite con los aceptores de electrones del PSII [20].
Diuron	Transferencia de electrones a plastoquinona [20].
Colchicina	Antimitotico [2].
Leptospermona	Síntesis de plastoquinonas [2].
Gabaculin	Síntesis de carotenoides [2].
Tiolactomicin	Síntesis de lípidos [2].

2.5.2. Factores que afectan la efectividad de los herbicidas.

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

Tipo de flora: Estudios de dosis-respuesta han revelado que hay una gran diferencia de susceptibilidad entre diferentes especies. Especies altamente susceptibles, pueden ser controladas con dosis dos o cuatro veces menores a especies más susceptibles [21,22].

Etapas de crecimiento: Generalmente las especies anuales son más susceptibles a los herbicidas cuando están comenzando a crecer que posteriormente [21]

Condiciones climáticas: Los factores climáticos pueden influenciar la efectividad de los herbicidas significativamente, se pueden reducir las dosis bajo condiciones favorables; sin embargo se deben hacer estudios en simuladores climáticos para entender la interacción Herbicida-Planta-Medio ambiente, pero dicha relevancia en situaciones de campo es aún cuestionable [23,24].

Adyuvantes: Los adyuvantes y otros ingredientes de la formulación son considerados biológicamente inactivos pero influyen la retención así como la toma del herbicida disminuyendo la cantidad de ingrediente activo necesario para alcanzar el sitio de acción [22].

2.6. FOTOSÍNTESIS.

El drama de la fotosíntesis, proceso donde se transforma la luz solar en carbohidratos ricos en energía se lleva a cabo en el "escenario" de los cloroplastos de las plantas verdes. En la membrana tilacoidal se lleva a cabo el primer acto, en el cual la energía de la luz es capturada por los electrones de las moléculas de clorofila. A su vez los electrones excitados son transmitidos por medio de una serie de aceptores en la cadena de transporte electrónico. En este proceso se divide una molécula de agua y se libera oxígeno a la atmósfera. Al mismo tiempo 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 dióxido de carbono de la atmósfera se combina con un azúcar de cinco carbonos para producir, a través de un intermediario, dos azúcares de tres carbonos y posteriormente la molécula de glucosa de seis carbonos [20].

2.6.1. Cloroplastos y clorofilas.

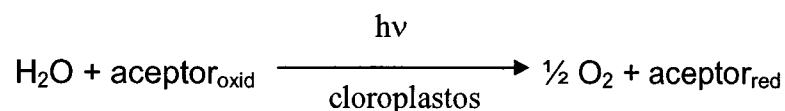
Tanto en procariontes como en las cianobacterias, la fotosíntesis tiene lugar en los gránulos enlazados con la membrana plasmática. El sitio de la fotosíntesis en los eucariontes, como en las plantas superiores y las algas verdes, es el cloroplasto.

El evento primario de la fotosíntesis es la absorción de la luz por la clorofila; hay dos tipos principales de clorofila, la clorofila *a* y la clorofila *b*. los espectros de absorción de las clorofilas *a* y *b* difieren levemente, ambas absorben en la porción roja y azul del espectro visible (600 a 700 nm y 400 a 500 nm respectivamente).

Todas las clorofilas están enlazadas con proteínas ya sea formando complejos tipo antena, o en uno de los dos tipos de fotosistemas. Las moléculas que cosechan luz transmiten su energía de excitación junto con un par especializado de moléculas de clorofila a un centro de reacción característico de cada fotosistema. Cuando la energía luminosa llega al centro de reacción se inician las reacciones químicas de la fotosíntesis [20].

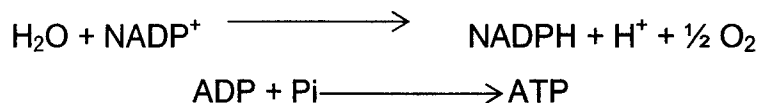
2.6.2. Reacción de Hill

En 1937, Robert Hill descubrió que, al iluminar cloroplastos que carecen de CO₂ en presencia de un aceptor de electrones artificial, el ferricianuro, se produce O₂ con la reducción concomitante del aceptor a ferrocianuro. En esta reacción se demuestra que el CO₂ no participa directamente en la reacción de producción de O₂ reduciéndose a ferrocianuro. La reacción de Hill, es la foto reducción de un aceptor de electrones a expensas de agua [25].



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

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



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

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

La absorción de luz por P_{680} permite la transferencia de electrones a la cadena de transporte electrónico que relaciona el FS II con PS I y genera un agente oxidante suficientemente fuerte como para dividir la molécula de agua y producir oxígeno. Cuando P_{700} absorbe la luz, se produce suficiente energía para permitir en último término la reducción del NADP^+ ; debido a la diferencia en sus estados de oxidación, este proceso se puede representar en un diagrama conocido esquema Z (Figura 3).

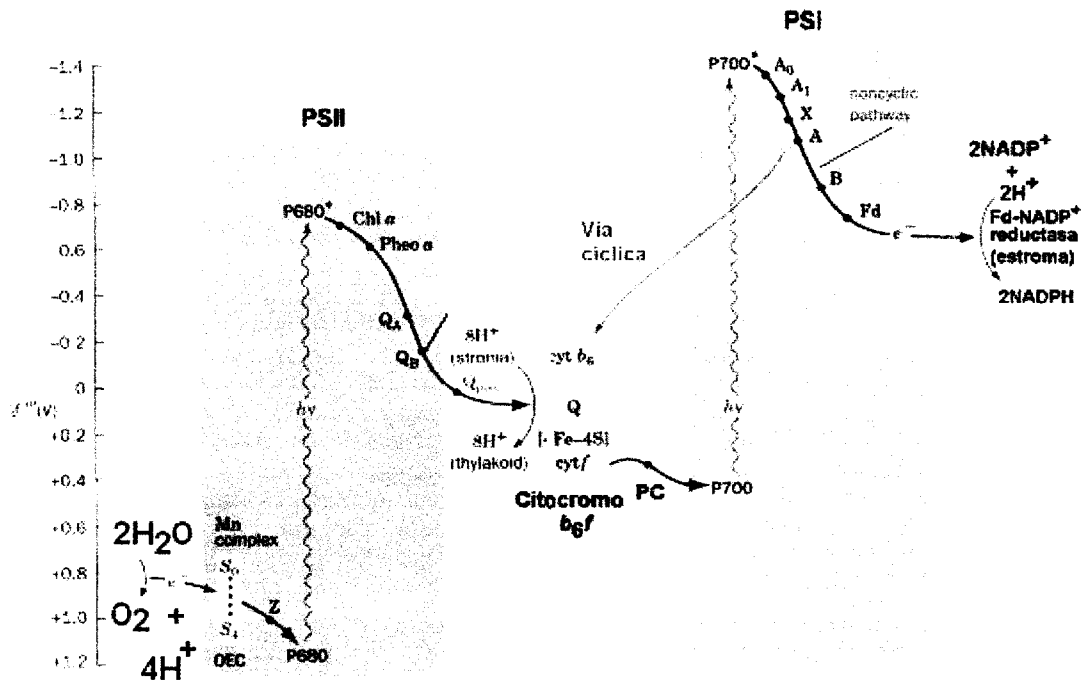


Figura 3: Flujo de electrones en los fotosistemas I y II. (Esquema Z)

2.6.3.1. Fotosistema II: división del agua para producir oxígeno.

La oxidación del agua en el FS II produce oxígeno y constituye la fuente de electrones en la fotosíntesis.

Los electrones liberados por la oxidación del agua son transmitidos primeramente al P₆₈₀, el cual se reduce:



Existen pasos intermedios para esta reacción porque se requieren cuatro electrones para la oxidación de agua y P₆₈₀⁺ sólo puede aceptar un electrón a la vez; para ello se requiere una proteína que contiene manganeso y otros componentes proteicos, varias quinonas sirven como agentes intermediarios de transferencia de electrones para acomodar los cuatro electrones donados por una molécula de agua.

En el FS II, la absorción de luz por la clorofila en el centro de reacción produce una clorofila en estado excitado, la cual transfiere un electrón al aceptor primario llamado feofitina (Ph), el siguiente aceptor es la plastoquinona (PQ).

La cadena de transporte de electrones que relaciona a los fotosistemas consta de feofitina, plastoquinona, un complejo de citocromos vegetales (el complejo *b₆f*), una proteína llamada plastocianina (PC) que contiene cobre y la forma oxidada de P₇₀₀ (P₇₀₀⁺).

Cuando P₇₀₀⁺ acepta electrones de la cadena de transporte de electrones se reduce, y posteriormente transfiere un electrón al FS I, el cual absorbe un segundo fotón luminoso.

2.6.3.2. Fotosistema I: la reducción del NADP⁺.

La absorción de la luz por P₇₀₀ conduce después a una serie de reacciones de transferencia de electrones en el FS I. la sustancia a la cual suministra un electrón la clorofila en estado excitado es aparentemente una molécula de clorofila *a*; el siguiente aceptor de electrones en la serie es la ferredoxina enlazada, la cual a su vez transfiere su electrón a una molécula de ferredoxina soluble. A su vez la ferredoxina soluble reduce una enzima que contiene FAD llamada ferredoxina-NADP reductasa. La porción de FAD de la enzima reduce el NADP⁺ a NADPH. (Figura 3).

El P₇₀₀ dona un electrón a la ferredoxina, pero las reacciones de transferencia de electrones de FAD y el NADP⁺ incluyen dos electrones; por lo tanto, se requiere un electrón de cada una de las dos ferredoxinas para la producción de NADPH. La reacción neta de los dos fotosistemas en conjunto es el flujo de electrones del H₂O al NADP⁺ (Figura 3)

2.6.3.3. Transporte cíclico de electrones en el FS I

El transporte cíclico de electrones del FS I puede acoplarse con la producción de ATP (Figura 3). En este proceso no se produce NADPH, el FS II no participa y no se genera O₂. La fosforilación cíclica tiene lugar cuando hay una proporción alta

de NADPH/NADP⁺ en la célula: es decir no hay suficiente NADP⁺ presente para aceptar todos los electrones generados por la excitación de P₆₈₀.

2.6.4. Producción de ATP por un gradiente de protones.

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

La ATP sintasa consta de dos partes CF₁ y CF₀; los componentes de la cadena de transporte de electrones en los cloroplastos están ordenados de manera asimétrica en la membrana tilacoidal. Una consecuencia importante de este ordenamiento asimétrico es la liberación hacia el estroma de ATP y NADPH que se produce en la reacción en presencia de luz, donde suministra energía y potencia reductora para las reacciones de la fotosíntesis que tienen lugar en la fase oscura.

La maquinaria del transporte electrónico de la membrana tilacoidal consta de varios complejos grandes, enlazados con la membrana. Estos son el FS II, el complejo citocromo b₆f y el FS I, los portadores solubles son plastoquinona y plastocianina (Figura 4). El gradiente protónico creado por el transporte electrónico impulsa la síntesis de ATP en los cloroplastos de manera similar que en la mitocondria.

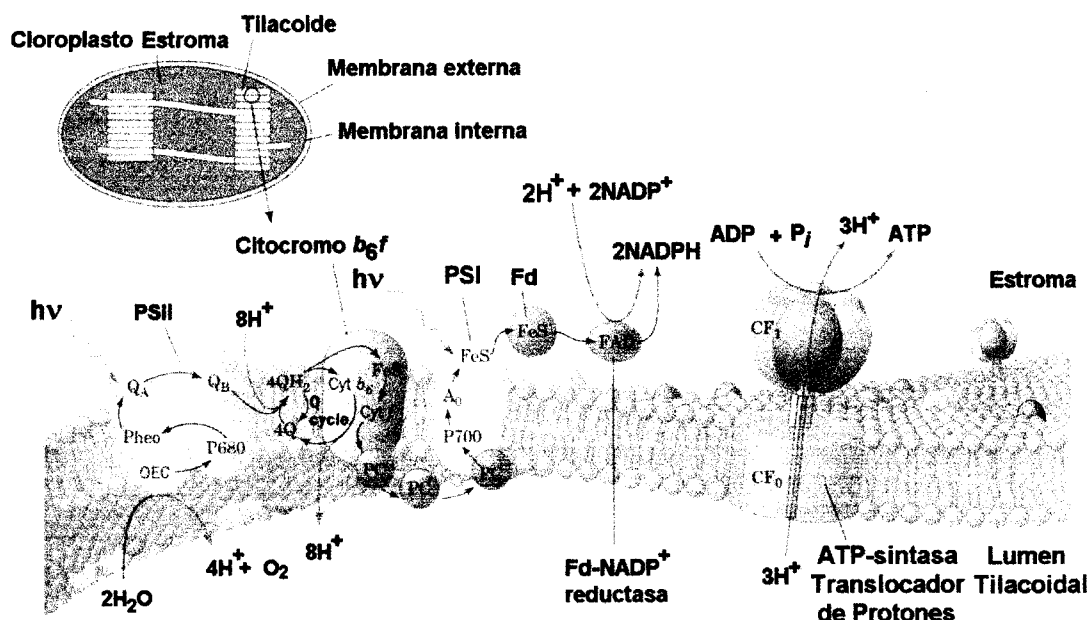


Figura 4: Representación esquemática de la membrana tilacoidal que muestra los componentes de su cadena de transporte electrónico. El sistema consta de tres complejos proteicos: el FS II, el complejo citocromo b_6 -f y el FS I, que se encuentran conectados eléctricamente mediante la plastoquinona y plastocianina.

2.7. Aceptores de electrones

Un importante modo de acción sobre el flujo de electrones fotosintético, es la desviación de los electrones de su camino natural a los aceptores de electrones sintéticos. Muchos compuestos pueden aceptar electrones en diferentes sitios del transporte de electrones de la membrana tilacoidal, por ejemplo, el paraquat y el diquat que aceptan electrones del lado reducido del PSI. El PSI dona electrones desde los centros hierro azufre (F_A y F_B), los cuales tienen potenciales redox de -550 y -590 mV respectivamente. La ferrodoxina, con un potencial redox de -420 mV, en condiciones fisiológicas transfiere los electrones al NADP, vía ferrodoxina-NADP oxidorreductasa. El paraquat y el diquat, con potenciales redox de -340 y -446 mV, aceptan electrones de los centros Fe-S y/o de la ferrodoxina [26].

2.8. Inhibidores del transporte de electrones

Algunos ejemplos de compuestos inhibidores del transporte de electrones, son hidroxilamina, la cual inhibe la fotólisis del agua; el DBMIB (2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-*p*-benzoquinona), el cual puede prevenir la función de la plastoquinona y el DCMU (3-(3,4-dicloro-fenil)-1,1-dimetilurea) el cual previene la oxidación de Q_A^- en el PSII [26].

Este tipo de compuestos son conocidos como inhibidores de la reacción de Hill debido a que en presencia o ausencia de ADP y P_i o en presencia de NH_4Cl , inhiben el transporte de electrones no cíclico, así evita la síntesis de ATP, al no formarse el gradiente electroquímico de protones. Estos compuestos afectan una o más enzimas transportadoras de electrones en la cadena fotosintética. El sitio más susceptible para la acción de estos compuestos en el flujo de electrones fotosintético está asociado al lado donador o aceptor del PSII, sobre todo el sitio Q_B en el polipéptido D_1 [26].

2.9. Inhibidores de la transferencia de energía

Los inhibidores de la transferencia de energía actúan uniéndose directamente al complejo H^+ -ATPasa del cloroplasto. Estos compuestos interfieren con la actividad de CF_1 y/o Cf_0 e inhiben la fosforilación. El bombeo de protones inducido por la luz en el lumen tilacoidal hace que el espacio interno sea ácido y que el lado del estroma sea básico. El flujo de protones a través de CF_0 hacia el estroma induce la síntesis de ATP en la porción CF_1 del complejo CF_0 - CF_1 . Este evento transduce la energía del gradiente electroquímico de protones en energía química, mediante la fosforilación del ADP con P_i para producir ATP [26]. La florizina, un inhibidor, de la transferencia de energía que interactúa con el CF_1 , inhibe el flujo de electrones dependiente de la fosforilación, pero no tiene efecto sobre el transporte de electrones desacoplado, ni sobre el flujo de electrones en condiciones no fosforilante. El DCCD (díciclo hexilcarbodiimida), otro inhibidor de la transferencia de energía, interactúa con el CF_0 [27].

2.10. Desacoplantes

La mayoría de los desacoplantes son ácidos débiles, lipofílicos, los cuales en su forma iónica atraviesan la membrana tilacoidal tomando protones del medio interno. Una vez protonados, éstos pasan nuevamente a la parte externa del tilacoide donde liberan el protón mediante disociación. Muchos desacoplantes, incluyendo el CCP (carbonil cianuro *m*-clorofenilhidrazona), son ácidos débiles solubles en lípidos que disipan el gradiente de protones. La gramicidina forma un canal transmembranal acuoso, a través del cual pasan protones y otros pequeños iones por lo que no es un acarreador [26].

2.11. Fluorescencia de la clorofila *a*.

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

La energía luminosa es absorbida por moléculas de clorofila *a* y *b* para la fotosíntesis. Sin embargo, una porción de la luz absorbida se pierde como calor o por reemisión como fluorescencia. Un fotón de luz roja (670 nm) contiene suficiente energía para excitar a una molécula de clorofila *a* a su primer estado excitado, llamado singulete (Figura 5). La diferencia de energía entre los dos niveles es la energía del fotón absorbido. La molécula de clorofila *a* excitada libera esta energía y regresa a su estado basal, lo que sucede en cerca de 10^{-8} s durante este periodo de tiempo ocurre una separación de carga en el centro de reacción, es decir, el electrón en el nivel de alta energía puede ser transferido a un aceptor I, formando un aceptor reducido I⁻ lo que comprende el primer paso de la fotosíntesis. Si la separación de carga no se lleva a cabo, la energía absorbida es liberada como calor y/o fluorescencia cuando el electrón excitado regresa al estado basal. La relación entre los tres procesos, fotoquímico (P), fluorescencia (F) y calor (desactivación por la radiación, D) es expresada matemáticamente usando constantes de velocidad de excitación vía fotoquímica, k_P ; vía fluorescencia k_F y vía calor, k_D . El número total de excitaciones por segundo es:

$$(k_P + k_F + k_D)n$$

donde n es el número de moléculas de clorofila.

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

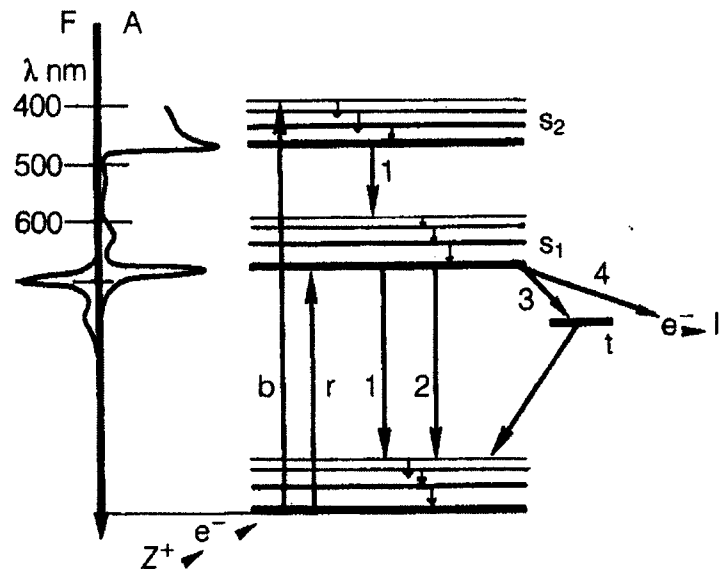


Figura 5. Diagrama de niveles de energía para la clorofila; espectro de la fluorescencia, F; espectro de absorbancia, A; fotón azul, b; fotón rojo, r; conversión interna (k_d) 1; fluorescencia (k_f), 2; cruzamiento inter-sistema, 3; separación de carga (kP), 4; aceptor de electrones intermedio de FSII, I⁻; estados singulete, s_1 , s_2 ; estado triplete, t; donador de electrones desde el sistema de fotólisis de agua del FSII.

La fluorescencia de la clorofila es roja debido a la diferencia de energía entre el nivel basal y el primer nivel excitado, y es igual a la energía de un fotón de luz roja [28].

Al iluminar con luz continua las hojas adaptadas a la oscuridad o una suspensión de hojas de plantas superiores, algas o cianobacterias, se observan cambios característicos en la intensidad de la fluorescencia de la clorofila *a*. A estos cambios se les denomina inducción de la fluorescencia o curva de inducción de la fluorescencia, también llamada *curva de Kaustski* [29]. En este trabajo, a las

diferentes fases de la curva de inducción de la fluorescencia se les denomina como OJIP (Figura 6). El aumento de la fluorescencia desde O hasta P ocurre durante el primer segundo de iluminación y es llamada la "fase rápida". La fase lenta es después de P y puede tomar algunos minutos antes de llegar a su fase terminal. La fase rápida está relacionada con los procesos primarios del FS II, mientras que la fase lenta está principalmente relacionada a las interacciones entre los procesos de la membrana tilacoidal y los procesos metabólicos en el estroma.

La cinética de la curva de inducción de la fluorescencia de la fase rápida ha sido estudiada por Delosme R [30], las características de esta fase con relación a la luz y a la temperatura, sugiere que la fase O-J está controlada por la separación de carga. La fluorescencia variable relativa en un tiempo t es definida como $V_t = (F_t - F_0)/(F_m - F_0)$. Esta expresión experimental puede ser tomada como una medida de la fracción del aceptor de electrones Q_A que está en su estado reducido.

Cuando se agrega DCMU, hay un inmediato aumento de la fluorescencia en la fase rápida, la razón de que esto ocurra es debido a que el DCMU bloquea el flujo de electrones después del aceptor primario del FS II (Q_A^-), es decir, inhibe la reoxidación de Q_A^- [29].

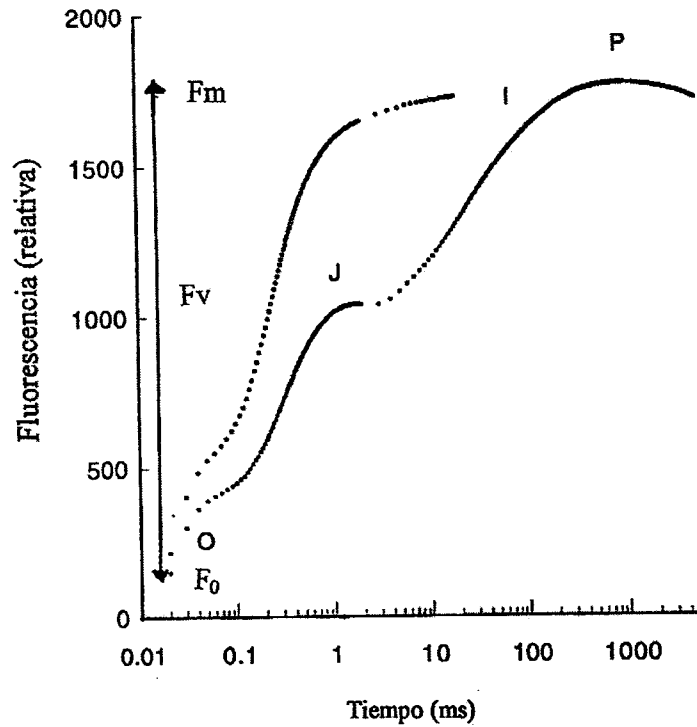


Figura 6 Curva de inducción de la fluorescencia, o curva de Kautsky de cloroplastos adaptados a la oscuridad por 30 minutos. F₀, fluorescencia inicial mínima; F_v, fluorescencia variable; F_m fluorescencia variable máxima. La curva de abajo es el control, la curva superior son cloroplastos dañados en el lado aceptor del FSII con 50 μ M de DCMU.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

Por medio de un estudio biodirigido, obtener metabolitos secundarios con posible actividad herbicida de los tallos de *Croton Ciliatoglanduliferus*.Ort,

3.2. Objetivos particulares

- Por medio del fraccionamiento biodirigido a partir del extracto hexánico de la planta *Croton ciliatoglanduliferus* obtener metabolitos secundarios con posible actividad herbicida.
- Caracterizar químicamente los metabolitos aislados por medio de métodos espectrométricos y espectroscópicos.
- Caracterizar bioquímicamente los metabolitos aislados como posibles herbicidas potenciales a través de su actividad en la síntesis de ATP, transporte de electrones, reacciones parciales de la fotosíntesis y métodos de fluorescencia.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

4.1. Obtención de los metabolitos secundarios.

4.1.1. Material Vegetal

La planta *Croton ciliatoglanduliferus*. Ort fue recolectada en el estado de Guerrero el 25 de Febrero del 2004.

La identificación de la especie fue realizada por la M.C. Nelly Diego y M.C. J. R. de Santiago, del Laboratorio de plantas vasculares de la Facultad de Ciencias, UNAM, con voucher depositado en la Facultad de Ciencias –Herbario, UNAM, no.95711.

4.1.2. Fraccionamiento primario del extracto hexánico de tallos de *Croton ciliatoglanduliferus*.

Los tallos secos (519.13 g) fueron pulverizados y sometidos a extracción exhaustiva por maceración con hexano a temperatura ambiente. El disolvente fue evaporado a vacío para obtener el extracto crudo (67.74 g), este extracto se fraccionó mediante cromatografía en columna abierta utilizando gel de sílice y un sistema de elución con un gradiente de polaridad ascendente con hexano-AcOEt, y finalmente acetona, colectando fracciones de 100 ml.

Las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía en capa fina y las placas se visualizaron con luz UV (onda corta 254 nm y onda larga 366 nm) y se revelaron utilizando sulfato cérico amoniacal (Apéndice 1) como agente cromógeno; para el desarrollo de color las placas se colocaron en una parrilla eléctrica (100°C, 5 min.). Las fracciones similares en composición fueron reunidas.

4.1.3. Purificación de los metabolitos:

El compuesto 1 fue purificado de la fracción 96-145 por cromatografía preparativa en capa delgada empleando como sistema de elución una mezcla de hexano-AcOEt 90:10 por tres veces y una vez más con hexano-AcOEt 70:30; el compuesto se visualizó con luz UV y revelando una orilla de la cromatoplaquea con sulfato cérico amoniacal.

El compuesto 2 fue purificado de la fracción 241- 271 por medio de una partición ácido base empleando HCl al 10% una solución saturada de bicarbonato de sodio y AcOEt como disolvente (Figura 7).

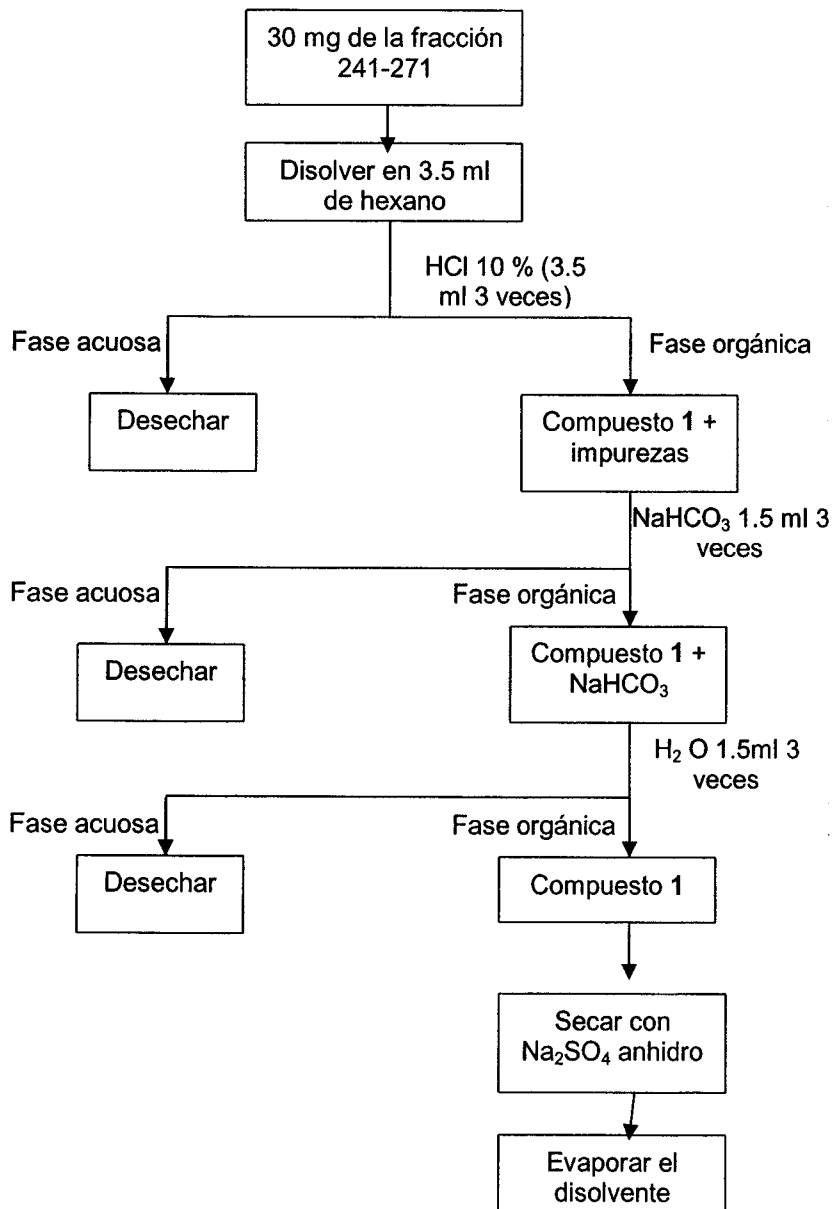


Figura 7: Partición ácido base de la fracción 241

4.2. BIOENSAYOS.

4.2.1. Aislamiento de cloroplastos de hojas de espinacas

NOTA: La siguiente metodología se realizó en condiciones de Oscuridad.

Los cloroplastos se aislaron de hojas de espinaca (*spinacea oleraceae L.*) Se escogieron aproximadamente 40g de hojas frescas y turgentes, que no estuvieran maltratadas ni rotas, las cuales se lavaron con mucho cuidado, y se secaron colocándolas en hojas de papel. Una vez secas las hojas se separaron la nervadura y la punta de la hoja, se cortaron cuidadosamente en trozos pequeños y se molieron en la licuadora (Modelo L-21, Osterizer) con 250 ml de medio de aislamiento (apéndice I) a 4°C para lo cual se enfrió en un baño de hielo. La molienda se efectuó cuidadosamente, ya que no se deben 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 plástico, los cuales previamente se mantuvieron fríos y sumergidos en un baño de hielo.

Los cloroplastos se sedimentaron por centrifugación a 4000 rpm a 4°C (centrifuga Modelo Sorval Super T21, DUPONT) durante 5 min, posteriormente se resuspendieron en 1 ml del mismo medio y la suspensión se guardó en la oscuridad a 4°C por 1 hora.

La clorofila se cuantificó según el método de Arnon [31], el cual consiste en aforar con acetona en un volumen de 5 ml una alícuota de 30 µl de cloroplastos resuspendidos, después se incuban en la oscuridad a 0°C por 5 min y se centrifugan 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 la absorbancia del sobrenadante a dos longitudes de onda, 663 y 645 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU650, la concentración de la clorofila se calculó con la siguiente fórmula:

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

En donde:

[Chl] = μg de clorofila por mL

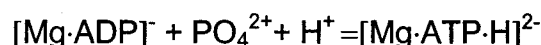
8.05 y 20.29 = constantes establecidas experimentalmente a partir de los coeficientes de extinción para cada una de las longitudes de onda.

A = Absorbancia a las longitudes de onda indicadas.

4.2.2. Medición de la síntesis de ATP

La medición se realizó con un micro electrodo Orion, Mod 8103 Ross conectado a un potenciómetro Corning, Modelo 12 con escala expandida [32,33]. Los cambios de pH observados se registraron en una aparato Gilson.

En la cubeta de reacción se agregaron 3 ml de medio bomba (Apéndice I), 30 μl de ADP, 30 μl de fosfato inorgánico (Pi), (se ajustó el pH a 8) y 60 μg Chl., se iluminó por 1 minuto, resultando en el consumo escalar de H^+ por ATP como se observa en 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 [34].

4.2.3 Medición de la velocidad del transporte de electrones

Las reacciones descritas abajo se muestran en la Figura 8

El flujo de electrones fotosintético no cíclico (1), se monitoreó en presencia de metilviológeno (MV) que es un aceptor artificial de electrones, utilizando un oxímetro YSI (Yellow Spring Instrumental) modelo 5300, con un electrodo tipo Clark. Para el *transporte de electrones basal* se agregaron 3 ml de medio de

transporte de electrones (Apéndice I) y 60 μ g de Chl a la cubeta de reacción y se iluminó por 3 minutos.

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

Para la medición del *transporte de electrones desacoplado* se utilizó el mismo medio que para el transporte basal más 6 mM de NH₄Cl [35,36].

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

El transporte de electrones desacoplado del FS II (2), se midió polarográficamente de H₂O a DCPIP [37]. Se agregó a la cubeta de reacción 3 ml de medio de transporte de electrones para FS II (Apéndice 2) con 1 μ M de DBMIB como inhibidor del paso de electrones al FS I

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

El flujo de electrones desacoplado del FS I (3) se determinó de manera similar al transporte de electrones basal empleando 3 ml del medio de transporte de electrones para fotosistema 1 (Apéndice 2) y 10 μ M de DCMU [38].

Para determinar el transporte de electrones del FS I incluyendo la plastoquinona (4) se realizó la medición igual que para el flujo de electrones desacoplado del FS I, sólo que en este caso se agregaron 200 μ M de TMQH₂ como donador de electrones [38].

4.2.6. Medición de las reacciones parciales del fotosistema II.

La reacción parcial de H₂O a SiMo (5), se midió empleando 3 ml del medio de transporte de electrones para H₂O-SiMo (Apéndice 2) y 10 μ M de DCMU [39].

La reacción parcial de DPC a DCPIP (6) se midió empleando cloroplastos tratados con Tris 0.8 M pH 8.0. El tratamiento de los cloroplastos con Tris se llevó a cabo en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm en una centrífuga Sorvall Super T21 por 1 minuto y se resuspendieron en el medio de aislamiento [40]. En una celda espectrofotométrica de 5 ml se colocaron 3 ml de medio de transporte de electrones sin MV (Apéndice 2), mas 6 mM de

NH_4Cl , 200 μM DPC, 100 μM DCPIP y 45 μg Chl, y se midió en el espectrofotómetro a 600 nm; posteriormente se iluminó por 2 minutos y se midió nuevamente a la misma longitud de onda. El blanco utilizado fue la misma mezcla de reacción sin DCPIP.

4.2.7. Medición de las reacciones parciales del fotosistema I.

La reacción parcial del FS I desde PMS/ASC a MV (7) fue medida usando cloroplastos incubados con 30 mM de KCN (un inhibidor del transporte de electrones a nivel de plastocianina) en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm en una centrifuga Sorvall Super T21 por 1 minuto y se resuspendieron en el medio de aislamiento [41]. Se agregaron a la cubeta de reacción 3 ml del medio de transporte de electrones (Apéndice 2) mas 6 mM de NH_4Cl , 300 μM de ascorbato y 200 μM de PMS. Se empleó PMS debido a que estudios de espectroscopía de EPR han confirmado la habilidad del PMS reducido para interactuar con el P_{700} [42].

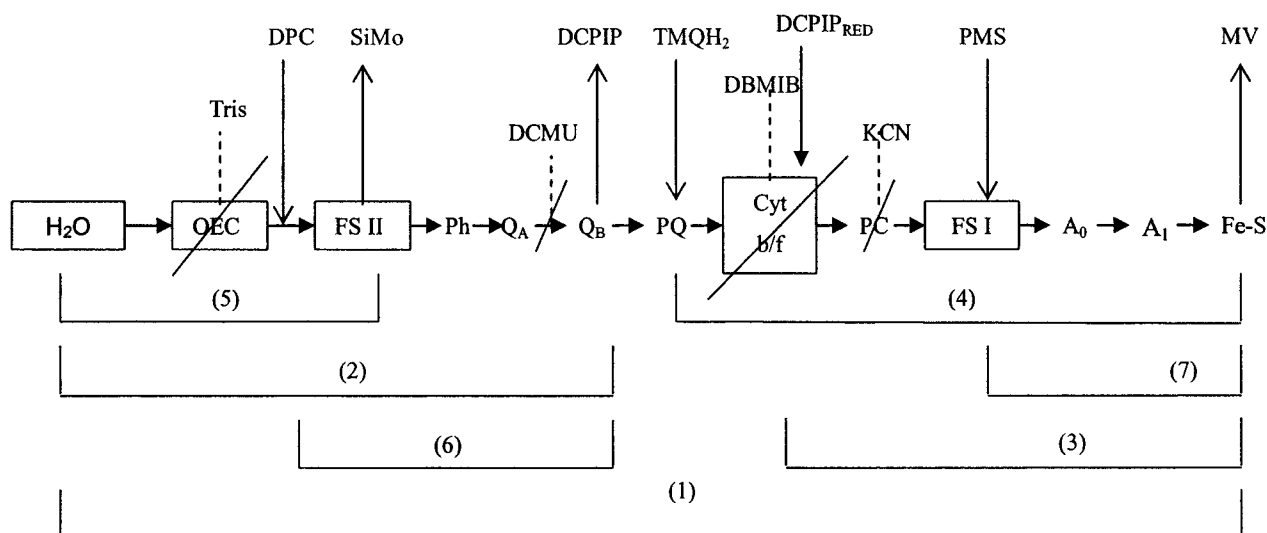


Figura 8: Esquema del transporte de electrones en cloroplastos, mostrando los sitios de inhibición (líneas punteadas) y los sitios de donación y aceptación de electrones (flechas)

4.2.8. Fluorescencia de la clorofila a del FS II.

Alícuotas que contenían 15 μg de clorofila se transfirieron por gravedad sobre papel filtro (1cm^2) con un aparato Dot-blot (bio-rad USA) para asegurar una

distribución homogénea y reproducible de la gota en el papel. Los cloroplastos se introdujeron inmediatamente a viales que contenían 3 ml de medio de transporte de electrones con MV, en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos ensayados, empleando como controles positivos DCMU y cloroplastos tratados con 0.8 M Tris pH 8.0 (ver reacción parcial DPC a DCPIP), los cuales se incubaron por 5 minutos en la oscuridad. Las curvas de inducción de fluorescencia de la clorofila *a*, se midieron a temperatura ambiente con un aparato Hansatech Fluorescence Handy PEA (plant efficient analyzer) [29]. El análisis cinético de la fluorescencia variable relativa $[V(t)=(F_t-F_0)/(F_m-F_0)]$ se llevó a cabo por la deconvolución y la normalización de las curvas de inducción.

4.2.9. Fluorescencia de la clorofila *a* en hojas.

Se emplearon plantas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) de 15 días de crecimiento, empleando plantas control y plantas asperjadas con los compuestos 1 y 2 a 300, 600 y 900 μM , así como con 10, 50 y 100 μM de DCMU como control positivo. Después de estar en la oscuridad por 5 minutos, las hojas fueron excitadas por luz saturada emitida por tres diodos liberando 300 μM fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 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) [29]. La medición se llevó a cabo a las 24, 48 y 72 hrs.

4.2.10. Biomasa seca.

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

4.2.11 Determinación de la actividad tóxica en el crustáceo *Artemia Salina* [43,44].

4.2.11.1 Preparación de los organismos y muestras.

Se preparó una solución de agua de mar comercial (38 g de medio salino artificial por litro de agua destilada), dentro de un recipiente de vidrio previamente acondicionado con una bomba de oxígeno, un termómetro y una lámpara. Se adicionaron los huevecillos de *Artemia Salina* Leach y se dejaron en maduración durante 48 horas a 28° C. Al cabo de este tiempo, se disolvieron 20 mg de cada muestra (compuestos 1 y 2) en 2ml de acetona. De esta solución, se transfirieron 500, 50 y 5 µl a tubos de ensayo. Posteriormente, se evaporó completamente el disolvente de cada tubo, y cada uno de los residuos se aforó a 5 ml con medio salino artificial (ocean Instant), con lo que se obtuvieron concentraciones de 1000, 100 y 10 µg/ml respectivamente. La prueba con cada muestra se realizó por triplicado, empleando un control y un blanco para el disolvente.

4.2.11.2 Bioensayo [45].

Se realizó transfiriendo 10 larvas de *Artemia Salina* dentro de cada tubo que contenía la muestra por evaluar. Después de 24 h de contacto entre las larvas y la muestra a 28 °C, se contaron los crustáceos sobrevivientes y el resultado se expresó como la concentración a la cual se mueren el 50% de la población (CL₅₀) calculada mediante el programa PROBIT [46].

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue obtener de los tallos de *Croton ciliatoglanduliferus* metabolitos secundarios con posible actividad herbicida. El extracto hexánico presentó un valor de I₅₀ de 19 ppm (datos no mostrados) en el bioensayo de inhibición de síntesis de ATP. Por esta razón, se continuó con el fraccionamiento biodirigido de este extracto.

5.1. Fraccionamiento primario del extracto hexánico de tallos de *Croton ciliatoglanduliferus*

El fraccionamiento primario del extracto hexánico resultó en la obtención de 450 fracciones que fueron agrupadas de acuerdo a su similitud en contenido metabólico en 32 fracciones, las cuales se probaron en el mismo bioensayo realizado al extracto, y los resultados se muestran en la tabla 3

Tabla 3. Fracciones obtenidas a diferentes sistemas de elución y su valor de I₅₀.

Gradiente	Fracciones	I ₅₀ (ppm)	Gradiente	Fracciones	I ₅₀ (ppm)
Hex-AcOET			Hex-AcOET		
	1-2	No inhibió		46-54	No inhibió
	3-4	No inhibió	90:10	55-95	75.15
100% hexano	5	No inhibió		96-145	12.10
	6-7	No inhibió		146-150	18.94
	8-9	No inhibió	80:20	151-180	23.68
	10-11	No inhibió		181-206	18.06
	12	No inhibió		207-213	28.94
	13-15	No inhibió	70:30	214-240	30.52
	16	No inhibió		241-271	13.15
	17-18	No inhibió	60:40	272-315	36.84

	19-21	No inhibió	50:50	316-322	No inhibió
	22-23	No inhibió	40:30	323-554	18.44
	24-31	No inhibió	30:70	355-370	22.63
100% hexano	32-34	No inhibió	20:80	370-386	No inhibió
	34-45	No inhibió	10:90	386-400	No inhibió
			100% AcOEt	401-420	No inhibió
			100% acetona	421-450	13.5

A pesar de que varias de las fracciones obtenidas presentaron actividad inhibitoria en la síntesis de ATP, sólo se purificaron las fracciones 96-145 y 241-271, debido a que la cantidad de muestra obtenida en las otras fracciones no era suficiente o era muy compleja la mezcla de componentes.

5.2. Purificación y caracterización del 15-O-acetil-8 α -hidroxi-labdano (1)

El compuesto 1 fue aislado de la fracción 96-145, y purificado por cromatografía en placa preparativa y su pureza fue constatada por cromatografía en capa fina analítica ($R_f = 0.73$, hexano-AcOEt 90:10), presentándose como un compuesto de naturaleza oleosa. La estructura de este compuesto se caracterizó por medio de los resultados de sus análisis espectroscópicos, espectrométricos y quiro-ópticos. El espectro de infrarrojo (Espectro 1) mostró señales con la siguiente asignación: en 3459 a grupos hidroxilo, en 2926 y 2868 cm^{-1} para metilos, metilenos y metinos (elongación y estrechamiento), en 1740 cm^{-1} la señal para el carboxilato, en 1460, 1387 y 1366 cm^{-1} , señales para metilos, metilenos y metinos ("bamboleo"), en 1241 y 1030 cm^{-1} señales que fueron asignadas a la vibración C-O. La resonancia magnética nuclear de hidrógeno mostró un espectro con señales de hidrógenos alifáticos solamente y el espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C Carbono (Espectro 3) mostró 22 señales.

La señal en δ 171.3 se asignó al carbono del carbonilo de un grupo ácido o éster, tres señales para carbonos cuaternarios en δ 74.3, 39.2 y 33.2; tres señales para metinos en δ 62.5, 56.1 y 30.7; nueve señales para grupos metileno en δ 62.9, 44.4, 42, 41.1, 39.7, 35.5, 22.9, 20.5 y 18.4; y seis señales para grupos metilo en δ

33.4, 24.0, 21.5 21.1 19.4, y 15.5 lo cual fue corroborado mediante el análisis del espectro DEPT (Espectro 4).

La presencia de cinco grupos metilo en el compuesto fue confirmada en el espectro de RMN¹H (espectro 2) el cual mostró seis señales singulete en 2.05, 1.14, 0.91, 0.87 y 0.79 (x 2) ppm que integraron a excepción de la última para tres hidrógenos cada una. El grupo carbonilo en 171.3 ppm debe corresponder al grupo éster de un acetilo como lo comprueba la señal en 2.05 ppm que integró para tres hidrógenos. Debido a que el espectro de ¹³C señala 22 carbonos en la molécula y si se descuentan dos del grupo acetilo se asigna el esqueleto de un diterpeno a esta molécula, también por la existencia de los cinco metilos angulares observados en el espectro de RMN¹H. El espectro de masas (Espectro 5) del compuesto dio 352 umas y tomando en consideración las señales en ¹³C para los metilos, metilenos, metinos y carbonos cuaternarios la estructura debe contener tres niveles de insaturación (IDH), una de dichas instauraciones debida al carbonilo del grupo acetilo y otros dos que deben pertenecer a ciclos en la molécula ya que no hay evidencias en los espectros de resonancia de la existencia de dobles ligaduras. La existencia de una señal múltiple (4.13 ppm) que integró para dos hidrógenos y que por su desplazamiento químico se asignó a hidrógenos de un carbono base de oxígeno y que corresponde al carbono en 62.9 ppm, por otra parte la señal en 74.3 ppm de un carbono cuaternario unido a un metilo y también a un oxígeno demostró en la molécula los residuos del tipo mostrado en la figura 9



Figura 9: Residuos oxigenados en el compuesto 1

El grupo acetilo se asignó al oxígeno del metileno ya que se encontró una correlación entre el carbonilo del mismo y el metileno en 62.9 ppm y la integración

de todos los resultados anteriores sugirió la estructura del diterpenoide 15-O-acetil-8 α -hidroxi-labdano (**1**) para este compuesto (Figura 10)

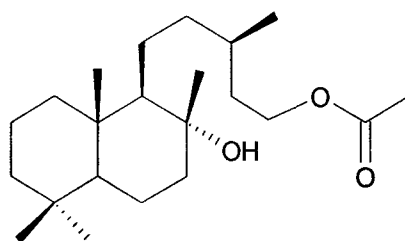


Figura 10. Estructura del diterpeno 15-O-acetil-8 α -hidroxi-labdano (**1**)

La confirmación estructural del compuesto **1** se llevó a cabo por la comparación de los datos espectroscópicos y espectrométricos con los reportados en la literatura [47,48,49]. Este compuesto corresponde a la serie natural de labdanos como se confirmó por el cálculo de su rotación óptica $[\alpha]_D^{20} = -4.76$ (c, 2.1 en CHCl₃)

5.3. Purificación y caracterización del 8 α ,15-dihidroxi-labdano (**2**)

El compuesto **1** fue purificado mediante una partición ácido base para eliminar probables impurezas de naturaleza ácida y este compuesto presentó aspecto oleoso y su estructura fue elucidada mediante los resultados de sus análisis espectroscópicos y espectrométricos. El análisis del espectro infrarrojo (Espectro 6) mostró la presencia de sustituyentes tales como oxhidrilos por la absorción en 3372 cm⁻¹, grupos metilo, metileno y metinos en la zona entre 2926 y 2867 cm⁻¹ y otras bandas en 1460 1387 cm⁻¹ para grupos alifáticos. En 1059 cm⁻¹ se aprecia una banda ancha para la vibración C-O. El espectro de RMN¹H (Espectro 7) fue muy similar al del compuesto **2** y su principal diferencia fue la ausencia de la señal del grupo metilo del acetilo en 2.05 ppm en RMN¹H y por otra parte la ausencia de las señales del carbonilo en 171.3 ppm y la del metilo en 21.1 ppm en RMN¹³C (espectro 8). Por otra parte el espectro de ¹³C solamente mostró las 20 señales de un diterpeno y el peso molecular calculado por espectrometría de masas (310) (Espectro 11) concordó con el esperado para el 8 α ,15-dihidroxi-labdano (**1**) mostrado en la figura 11

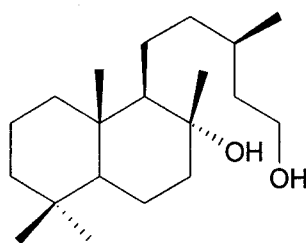


Figura 11. Estructura del compuesto 8 α ,15-dihidroxi-labdano

Tabla 4. Posiciones de los carbonos en el espectro de RMN¹³C para los compuesto 1 y 2; así como de la literatura (Hirota et al. 1988)

Posición del carbono	15-O-acetil-8 α -hidroxi-labdano	8 α ,15-dihidroxi-labdano	8 α ,15-dihidroxi-labdano (literatura)
	δ Carbono	δ Carbono	δ Carbono
1	39.7	39.8	39.8
2	18.4	18.9	18.5
3	42.0	42.6	42.1
4	33.2	33.6	33.3
5	56.1	56.8	56.2
6	20.5	20.1	20.6
7	41.1	40.8	40.9
8	74.3	73.6	74.4
9	62.4	62.8	62.5
10	39.1	39.1	39.2
11	22.9	24.2	24.0
12	44.4	44.9	44.3
13	30.7	30.4	30.6
14	35.5	33.7	39.8
15	62.9	60.5	60.3
16	19.4	20.1	20.1

Posición del carbono	15-O-acetil-8 α -hidroxi-labdano (1)	8 α ,15-dihidroxi-labdano (2)	8 α ,15-dihidroxi-labdano (literatura)
	δ Carbono	δ Carbono	δ Carbono
17	23.9	23.4	23.2
18	33.4	33.6	33.5
19	21.5	21.1	21.5
20	15.5	15.8	15.5
21	171.3	-----	-----
22	21.1	-----	-----

5.4. Efecto de 1 y 2 sobre diferentes actividades fotosintéticas.

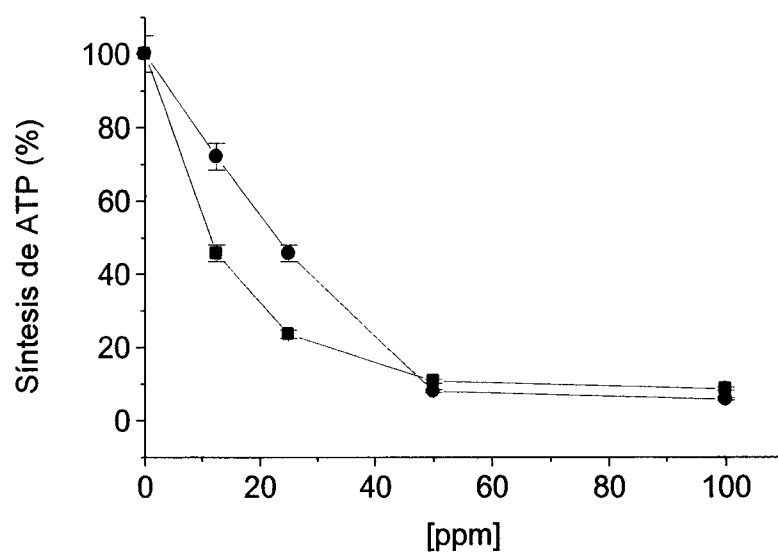


Figura 12: Efecto de las concentraciones crecientes de las fracciones 96-145(■) y 241-271 (●) sobre la síntesis de ATP en tilacoides de espinacas. El valor del control para la síntesis de ATP fue de $1047 \mu\text{M ATP mg}^{-1}\text{Chl h}^{-1}$.

Las fracciones cromatográficas 96-145 y 241-271 del extracto hexánico de los tallos de *Croton ciliatoglanduliferus*, mostraron actividad inhibitoria sobre la síntesis de ATP (Figura 12); los valores de I_{50} fueron de 11.57 ppm y 23.09 ppm respectivamente. Para conocer a los compuestos responsables de dicha inhibición el compuesto mayoritario (**1**) de la fracción 96-145 se purificó por cromatografía en capa delgada y el compuesto **2** se purificó por partición ácido base de la fracción 241-271. Las estructuras de los compuestos se muestran en la figura 1.

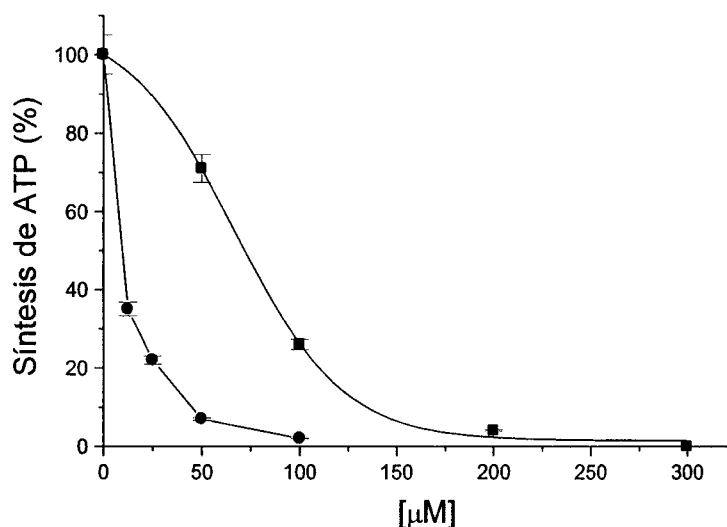


Figura 13: Efecto de las concentraciones crecientes de los compuestos **1**(●) y **2** (■) sobre la síntesis de ATP en tilacoides de espinacas. El valor del control para la síntesis de ATP fue de $1047\mu\text{M ATP mg}^{-1}\text{Chl h}^{-1}$.

Los resultados muestran que los diterpenos **1** y **2** inhiben la síntesis de ATP acoplada al transporte de electrones de agua a MV en cloroplastos lisados al momento de utilizarse (Figura 13). El valor calculado de I_{50} fue de $10\mu\text{M}$ y $72\mu\text{M}$ respectivamente para **1** y **2**, siendo el derivado acetilado el más activo.

La fotofosforilación está acoplada al transporte de electrones, por lo que la formación de ATP puede ser inhibida por el bloqueo de el transporte de electrones, por una inhibición directa de la H^+ -ATPasa o por desacoplamiento de la síntesis de ATP del transporte de electrones [50]. Para elucidar el mecanismo

de acción de **1** y **2** en la fotosíntesis se investigó su efecto sobre el transporte de electrones no cíclico de agua a MV.

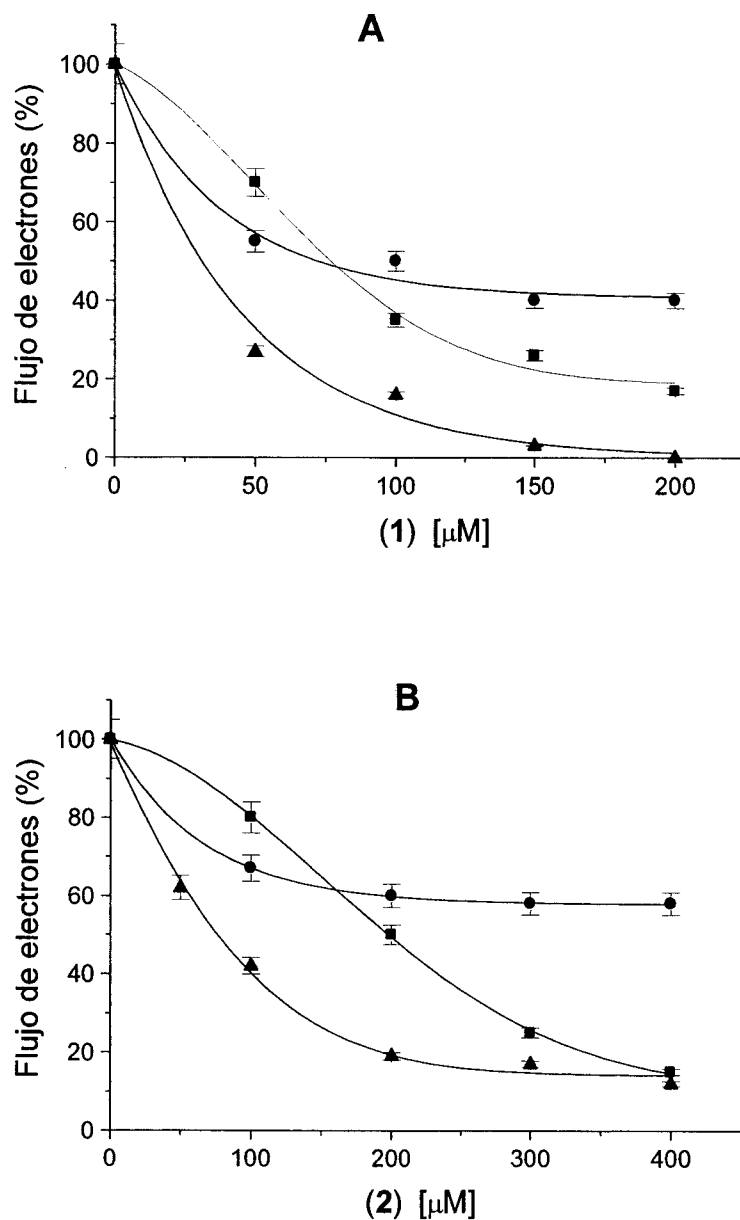


Figura 14: Efecto de concentraciones crecientes de los compuestos **1** (A) y **2** (B) en el transporte de electrones basal (■), fosforilante (●) y desacoplado (▲). El valor del control fue 571, 600 y 1500 $\mu\text{equiv e}^-/\text{mgChlh}$ respectivamente.

Los compuestos **1** y **2** inhiben el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado a diferentes grados (Figura 14A y B). Los valores de I_{50} para el

compuesto **1** en los transportes medidos (basal, desacoplado y fosforilante) fueron 31, 71.5 y 77 μM respectivamente (Figura 14A). Por otra parte, los transportes basal y desacoplado fueron los más inhibidos por **2** siendo sus valores de I_{50} de 197.5 y 76 μM respectivamente, sin embargo el transporte de electrones fosforilante fue el menos afectado por lo cual no se pudo calcular su valor de I_{50} (Figura 14B). El hecho de que los compuestos afecten más a los transportes basal y desacoplado sugiere que durante estos transportes, el sitio de acción de **1** y **2** está expuesto para su interacción, tal vez debido a cambios conformacionales durante la iluminación. Sin embargo, en condiciones fosforilantes, su sitio de acción está menos expuesto, por lo que la interacción de estos compuestos con su sitio de acción es débil. Todos los resultados indican que **1** y **2** actúan como inhibidores de la reacción de Hill.

5.5. Sitios de interacción de los compuestos 1 y 2 sobre la fotosíntesis y sus reacciones parciales.

Para localizar el sitio de inhibición sobre la cadena transportadora de electrones en tilacoides, el efecto de **1** y **2** sobre el FS II, FS I y sus reacciones parciales se midió empleando donadores y aceptores de electrones artificiales, así como los inhibidores apropiados (Figura 8) [39]. La tabla 5 muestra que el compuesto **1** inhibe ambos fotosistemas (II y I) de agua a DCPIP y de DCPIPred a MV respectivamente. Las reacciones parciales del flujo de electrones del FS II de agua a SiMo y de DPC a DCPIP fueron también inhibidas. Estos resultados indican que el primer sitio de inhibición e interacción de **1** está localizado entre P_{680} a Q_A de la cadena de transporte de electrones del FS II, de forma similar a la enecalina, dimetilencecalina y 12,13-dihidroxantorizol [51,52]. Adicionalmente **1** inhibe también la reacción parcial del FS I de PMSred a MV, dicho resultado indica que **1** inhibe entre P_{700} a F_X en el FS. Por otro lado la tabla 5 muestra además que **2** inhibe ambos fotosistemas (I y II) así como la reacción parcial de agua a SiMo. Sin embargo, **2** no tiene efecto sobre el flujo de electrones de DPC a DCPIP indicando que el primer sitio de acción e inhibición de **2** es el sistema OEC, la enzima que hidroliza el agua. Este producto natural posee un sitio de interacción similar al de

otros compuestos naturales como son la Squamicina, bullatacina, mortrillina y paquipodol [7,53].

Hasta donde se sabe, ésta es la primera vez que el FS I es un blanco de inhibición para aleloquímicos.

Tabla 5. Efecto de 1 y 2 sobre el FS II, FS I, la velocidad del transporte de electrones y las reacciones parciales del FS II y FS I

Conc μM	FS II				FS I							
	H ₂ O a		H ₂ O a		DPC a		TMQH ₂ a		DCPIPred		PMS	
	DCPIP		SiMo		DCPIP		MV		a MV		a MV	
	a	c	a	c	b	c	a	c	a	c	a	c
(1)												
0	150	100	300	100	89	100	514	100	1057	100	400	100
100	100	67	200	67	58	65	514	100	1028	97	277	69
200	50	33	200	67	49	55	514	100	886	84	215	54
300	50	33	100	33	18	20	371	72	829	78	154	38
(2)												
0	150	100	114	100	89	100	307	100	1057	100	400	100
100	107	71	114	100	89	100	307	100	1057	100	277	69
200	86	57	86	75	89	100	246	80	1028	97	215	54
300	43	29	86	75	89	100	246	80	714	68	154	38

a = μequiv e⁻mg⁻¹ Chl h⁻¹;

b = μM DCPIPred mg⁻¹ Chl h⁻¹M

c = %

5.6. Fluorescencia de la clorofila a medida en la presencia de los compuestos 1 y 2.

Para corroborar los sitios de interacción de estos metabolitos secundarios en el sitio donador del FS II, cloroplastos recién lisados fueron incubados por 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente con diferentes concentraciones de 1 y 2, y empleando como controles positivos 10 μM de DCMU y cloroplastos tratados con 0.8 M Tris pH 8.0 (Figura 15). Los tilacoides control muestran una curva de fluorescencia polifásica con la secuencia OJIP de fluorescencia similar a la previamente descrita para plantas, algas verdes y cianobacterias por Strasser y sus colaboradores [29] teniendo una cinética baja.

La adición de 10 μM de DCMU induce un rápido aumento del desarrollo de la fluorescencia durante los 2 primeros ms de iluminación, transformando así la secuencia regular OJIP en una curva OJ [29]. Cuando los tilacoides son tratados con Tris (un inhibidor del lado donador del FS II) [40], la forma de la curva de inducción de la fluorescencia es reducida y este resultado indica una reducción de el máximo del desarrollo de fluorescencia, y la banda K aparece y consiste en un rápido ascenso al máximo (a 300 μs) seguido por una disminución en el nivel de desarrollo de fluorescencia cercano a F_0 .

Todas las demás etapas J e I no presentan dicha transición [54,55]. La respuesta de los tilacoides es muy similar a los cloroplastos tratados con calor en los cuales ocurre daño al complejo enzimático que fotoliza el agua (OEC).

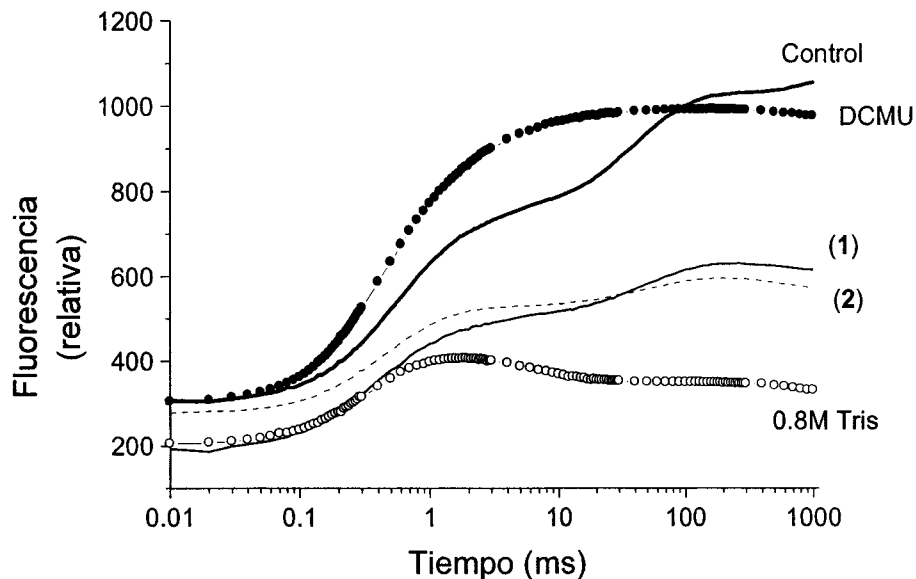


Figura 15: Desarrollo de fluorescencia en cloroplastos recientemente lisados en presencia de los compuestos 1 y 2 a $900\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ DCMU y tilacoides tratados con 0.8M Tris pH 8.0, se muestra la gráfica del control para emplearse en comparación. La fluorescencia fue medida a temperatura ambiente, y se muestran los datos promedio de 3 réplicas.

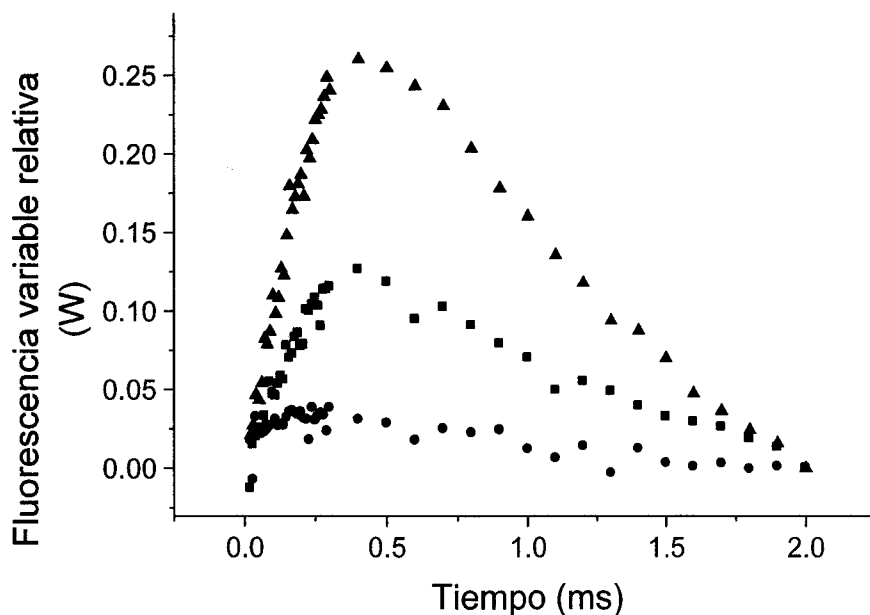


Figura 16: Aparición de la banda K alrededor de $300\mu\text{s}$. diferencia de cada curva de inducción de fluorescencia de clorofila a con respecto al control con la fluorescencia variable relativa en la amplitud de $F_J - F_0$ 1(■) y 2(●) a $900\mu\text{M}$. Cloroplastos lisados incubados con 0.8M Tris (▲).

El análisis de las diferencias de cada curva con respecto al control sobre la fluorescencia variable relativa cuando la fase O-J esta normalizada entre $F_J - F_0$, $W_t = F_{v,t}/(F_J - F_0) = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$, muestra una supresión incrementada del nivel J (a 2 ms), y aparece un rápido aumento alrededor de 300 μ s cuando los compuestos **1** y **2** son probados, indicando claramente la creación de la banda K (Figura 16). De acuerdo a Strasser [55], la aparición de la banda K se debe a un desequilibrio en el flujo de electrones entre el lado donador y el lado aceptor del FS II. En estas condiciones, el flujo de electrones de OEC a Z es más lento que el flujo de electrones de P_{680} a Q_A . El rápido aumento de la fluorescencia inicial se debe a la reducción de Q_A a Q_A^- seguida por la reducción de P_{680}^+ por Y_Z sin la participación directa de OEC [54].

Por lo tanto el análisis de la transición de la fluorescencia de la clorofila a en este trabajo claramente indica que la enzima que fotoliza el agua es bloqueada por **1** y **2**.

Diferentes parámetros fotosintéticos asociados a la actividad del FS II fueron evaluados [55], la absorción de fotones (ABS) por centro de reacción activo (RC) muestra el tamaño de la antena estimado por el valor $ABS/RC = (M_0/V_J)(1-V_J)/\phi P_0$, el transporte de electrones por centro de reacción activo fue estimado por $ET_0/RC = (M_0/V_J)(1-V_J)$. para esos parámetros, el valor de M_0 como un indicador de la función del sistema OEC fue estimado como $M_0 = 4[(F_{300} - F_0)/(F_M - F_0)]$. El desarrollo de la fluorescencia en la transición J como $V_J = (F_J - F_0)/(F_M - F_0)$ y fue empleado como un indicador de la eficiencia del FS II en la fotoquímica primaria. El desarrollo de la fluorescencia en la transición P como el indicador de la eficiencia del FS II en la reducción del almacén de plastoquinonas fue evaluado como $\phi P_0 = (F_M - F_0)/F_M$ [55].

Los valores obtenidos se muestran en la tabla 6. Para el compuesto **1**, sus valores de M_0 y ϕP_0 disminuyen a concentraciones de 300 y 600 μ M; estos resultados indican que la reducción de Q_A disminuye. Sin embargo el centro de reacción activo del FS II incrementa, porque aumenta el promedio del tamaño de la antena por centro de reacción activo (ABS/RC), sin embargo ET_0/RC disminuye

también indicando que el transporte de electrones en FS II disminuye. Por lo tanto **1** disminuye la eficiencia del FS II para reducir a Q_A . Así la energía del centro de reacción puede ser disipada como calor en la presencia de **1**, de tal forma que el centro de reacción activo P_{680} no puede ser reoxidado por Q_A [56], por lo que no hay acumulación de QA^- . El valor de M_o de **1** corrobora los resultados polarográficos y espectrofotométricos que indican que este compuesto inhibe el transporte de electrones de P_{680} a Q_A

En los parámetros calculados para el compuesto **2** (tabla 6) ϕP_0 disminuye 0.012 respecto al control a 300 y 600 μM y disminuye aún más a 900 μM . Este resultado indica que Q_A reducida no se está acumulando cuando FS II es inhibido por el aleloquímico **2**. Por lo tanto el producto natural **2** disminuye: 1) el promedio del tamaño de la antena por centro de reacción activo (ABS/RC), 2) el transporte de electrones por centro de reacción activo 3) M_o y 4) F_m . Estos resultados sugieren que **2** afecta el lado donador del FS II más que su centro de reacción. De tal manera que el transporte de electrones se vuelve débil, y la eficiencia del FS II en el pool de plastoquinonas es reducida, como se muestra en la tabla 6. Estos resultados corroboran los resultados obtenidos de los ensayos polarográficos que muestran que la reacción parcial del FS II de H_2O a SiMo es inhibida por el compuesto **2** y este hecho sugiere que el lado donador en el FS II está dañado.

Tabla 6. Efecto de concentraciones crecientes de **1** y **2**, 10 μ M de DCMU y 0.8 M tris pH 8.0 en la fluorescencia de la clorofila a en cloroplastos adaptados a la oscuridad por 5 minutos.

Compuesto	F ₀	F _M	F _V /F _M	F ₃₀₀	F _J	M ₀	V _J	ϕ_{P_0}	ABS/ RC	ET ₀ / RC	Area
Control	253	1152	0.780	444	705	0.849	0.502	0.780	2.166	0.840	43600
10 μ M DCMU	286	991	0.711	525	859	1.356	0.813	0.711	2.345	0.312	1400
0.8M Tris	292	549	0.468	315	405	0.358	0.440	0.468	1.739	0.456	0
(1)											
300 (μ M)	245	939	0.730	397	649	0.647	0.582	0.739	1.505	0.465	11800
600 (μ M)	230	842	0.727	374	599	0.684	0.603	0.727	1.561	0.450	10400
900 (μ M)	184	630	0.708	322	474	0.876	0.650	0.708	1.903	0.471	6200
(2)											
300 (μ M)	254	1097	0.768	389	638	0.641	0.455	0.768	1.830	0.766	18600
600 (μ M)	207	891	0.768	359	572	0.883	0.534	0.768	1.156	0.722	10400
900 (μ M)	280	600	0.553	377	518	1.212	0.744	0.533	3.057	0.418	3400

5.7. Medición de la fluorescencia de la clorofila a en hojas.

A las 24 horas del tratamiento con los compuestos **1** y **2** las hojas presentaron necrosis en todas las concentraciones, así como también las plantas asperjadas con DCMU en todas sus concentraciones (Figura 17), lo que indica que la acción de **1** y **2** es inmediata.

Debido a que las hojas ya están secas a las 24 horas, no se puede tener un desarrollo de fluorescencia para dichos compuestos (Figura 18), lo cual sugiere que ambos compuestos puedan tener un sitio de acción primario diferente al transporte de electrones.

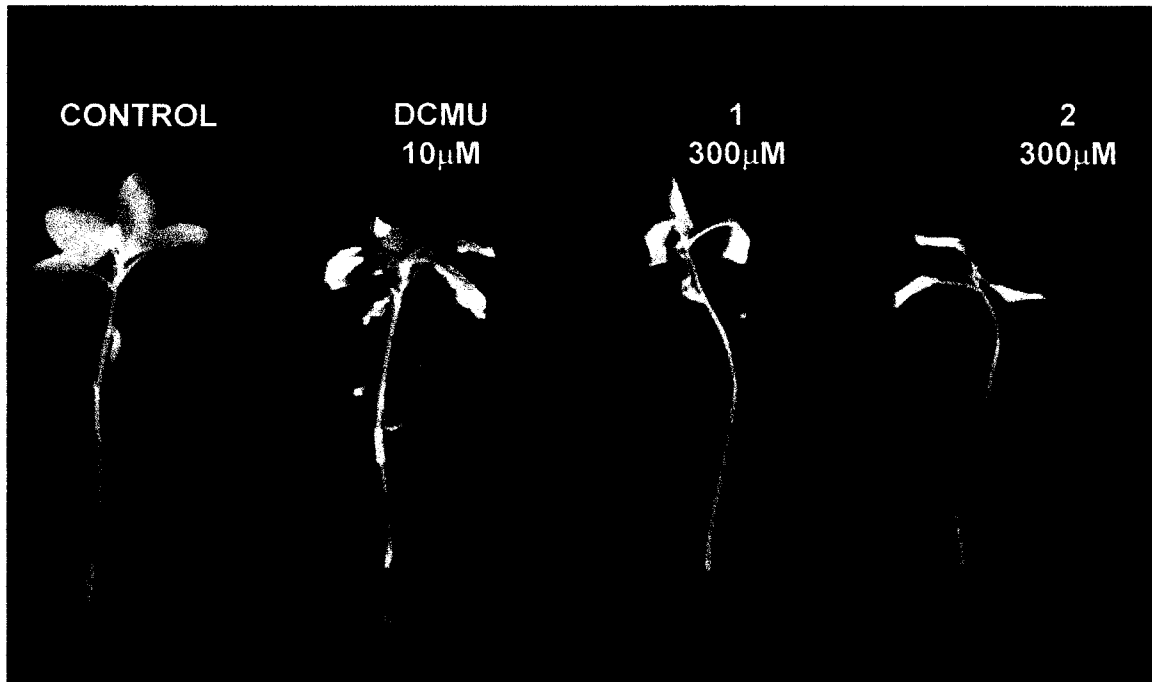


Figura 17: plantas de amaranto después de tres días de ser tratadas con los compuestos 1 y 2 así como también con DCMU (control positivo)

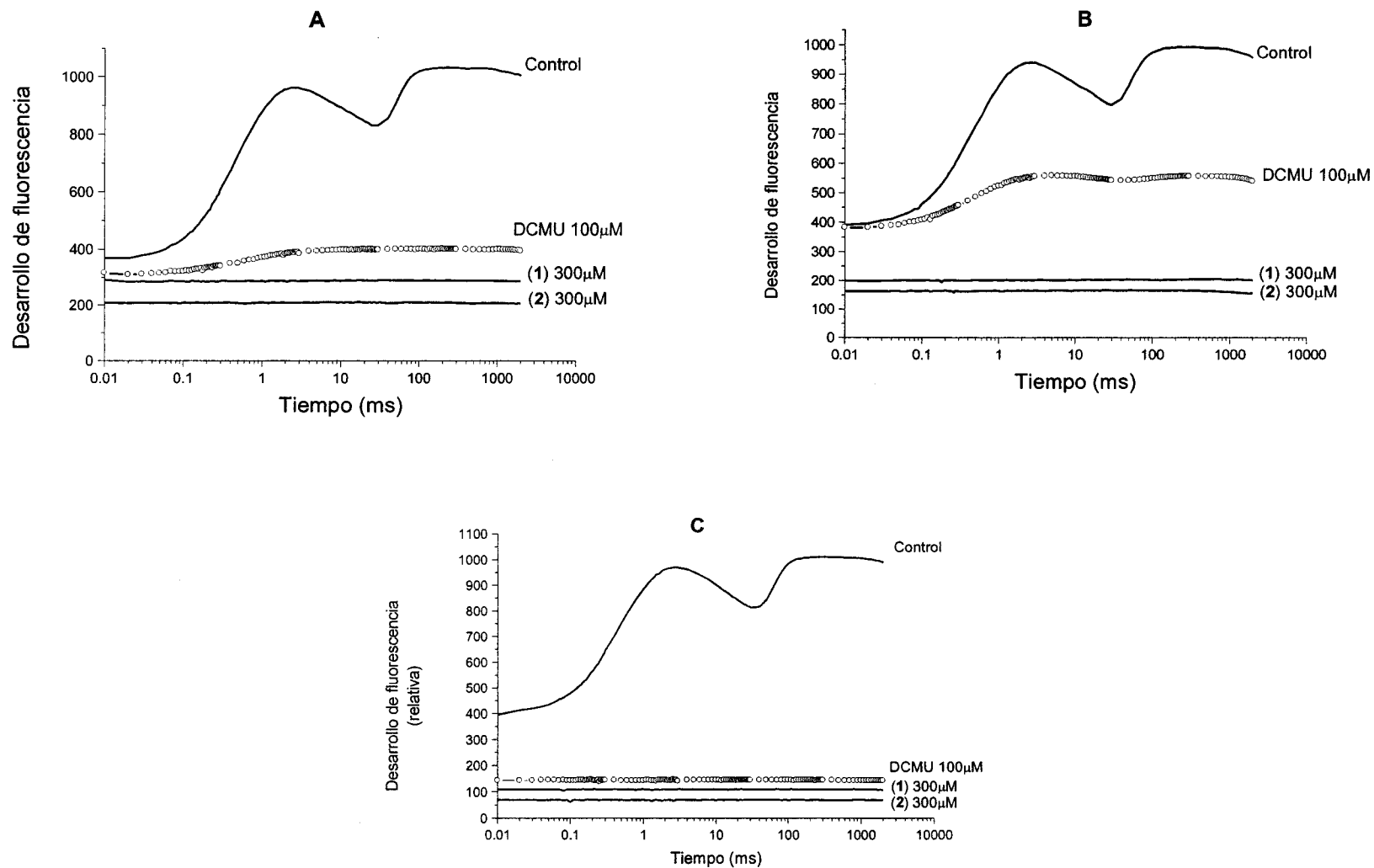


Figura 18. Gráfica de desarrollo de fluorescencia en hojas para los compuestos 1 y 2 a 300µM, así como DCMU a 100µM, medido a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) hrs. de ser tratadas.

Tabla 7. Efecto de concentraciones ascendentes de **1**, **2** y DCMU sobre la fluorescencia de la clorofila *a* en hojas adaptadas a la oscuridad por 5 minutos.

Compuesto	Concentración	Día 1				Día 2				Día 3			
		F ₀	F _M	F _V /F _M	Area	F ₀	F _M	F _V /F _M	Area	F ₀	F _M	F _V /F _M	Area
Control	0	348	1032	0.663	10000	374	993	0.623	10200	392	1012	0.613	12000
DCMU	10 (μM)	385	958	0.598	8800	394	666	0.408	2800	277	713	0.612	7200
	50 (μM)	276	556	0.504	5600	377	577	0.323	0	233	468	0.502	4000
	100 (μM)	309	400	0.228	200	288	461	0.375	2600	112	115	0.026	0
1	300 (μM)	284	289	0.017	0	205	210	0.024	0	129	132	0.023	0
	600 (μM)	349	355	0.017	0	187	190	0.016	0	108	109	0.010	0
	900 (μM)	193	200	0.035	0	163	166	0.018	0	106	109	0.028	0
2	300 (μM)	255	258	0.012	0	200	206	0.623	1400	144	145	0.007	0
	600 (μM)	236	240	0.017	0	132	134	0.029	0	95	96	0.010	0
	900 (μM)	206	210	0.019	0	123	125	0.015	0	68	70	0.029	0

5.8. 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 300, 600 y 900 μM de los compuestos **1** y **2**, así como 10, 50 y 100 μM de DCMU, los resultados después de la aplicación de los compuestos se muestran en la tabla 8.

La reducción de la biomasa sugiere que los compuestos **1** y **2** pueden actuar como un herbicida post-emergente de acción inmediata.

<p>Tabla 8. Medición de la masa seca de <i>Amaranthus hypochondriacus</i>, medida después de tres días de tratamiento con los compuestos 1 y 2 así como DCMU a diferentes concentraciones.</p>			
Compuesto	Concentración μM	Masa seca mg	%
Control	0	73.6	100
DCMU	10	53.3	72
	50	42.3	57
	100	24.1	32
1	300	68.7	93
	600	67.7	91
	900	45.9	62
2	300	66.1	89
	600	61.7	83
	900	51.9	70

5.9. Determinación de la actividad tóxica a *Artemia salina* de los compuestos 1 y 2.

Ambos compuestos mostraron no ser tóxicos al ser evaluados en esta prueba, ya que la CL_{50} es mayor a 1000ppm., como se puede ver en la figura 19.

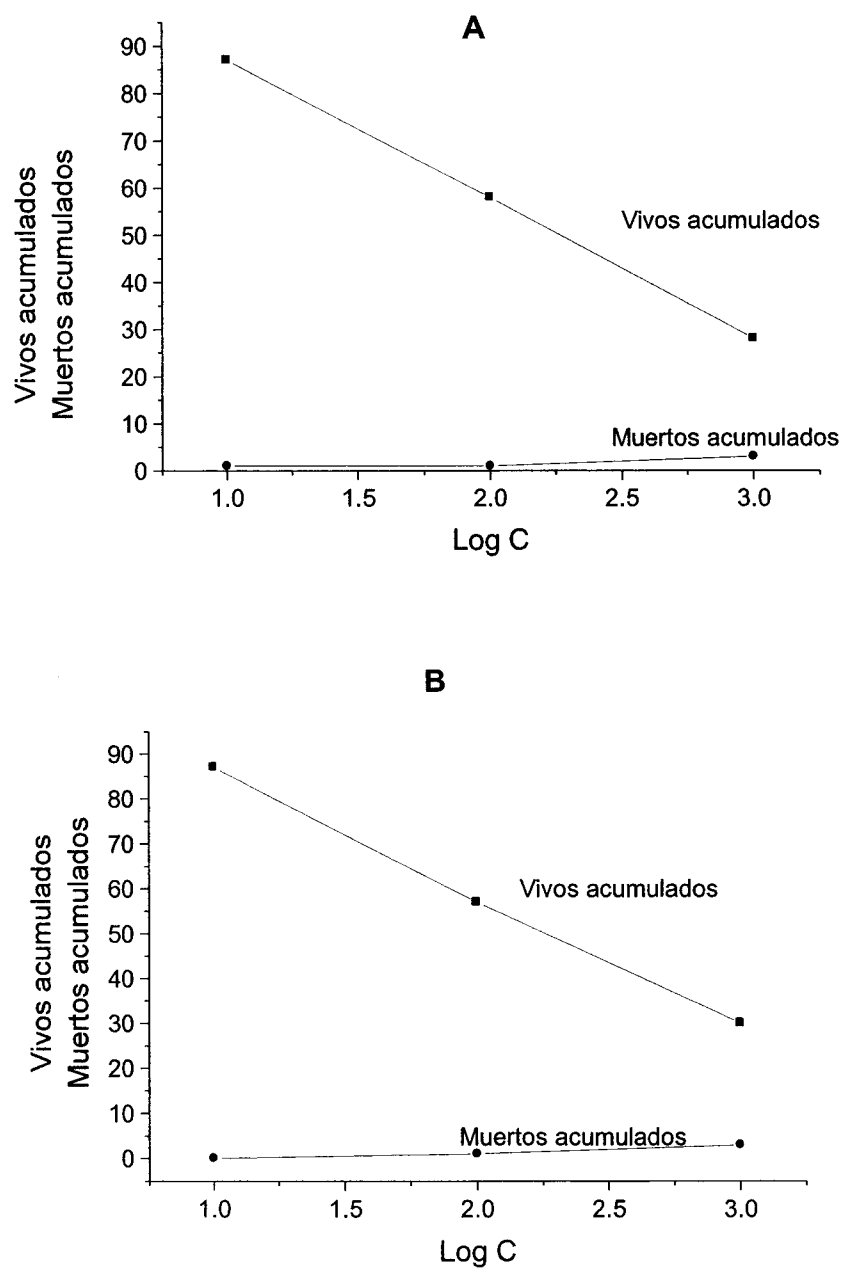


Figura 19 Gráficas que muestran la actividad tóxica de los compuestos 1 (A) y 2 (B)

Los resultados de la presente investigación fueron aceptados y están en prensa en la revista *Photosynthesis Research* 2007.

Natural Diterpenes from *Croton ciliatoglanduliferus* as Photosystem II and Photosystem I inhibitors in Spinach Chloroplasts

6. CONCLUSIONES

- De los tallos de *Croton ciliatoglanduliferus* Ort, fueron aislados por primera vez los diterpenos 15-O-acetil-8 α -hidroxi-labdano y 8 α ,15-dihidroxi-labdano.
- Estos compuestos mostraron múltiples sitios de acción en ambos fotosistemas II y I. el compuesto **1** mostró ser tres veces más activo que **2** en la síntesis de ATP, y dos veces más activo en el transporte de electrones.
- El compuesto **1** inhibe los sitios donador y aceptor del FS II, mientras que el compuesto **2** solo inhibe del lado donador.
- Ambos compuestos inhiben también entre P₇₀₀ a F_x. Esta es la primera vez que se comprueba experimentalmente que compuestos naturales muestran varios sitios de acción. Los sitios de inhibición de **1** y **2** sobre el FS II y FS I pueden explicar cómo las plantas llevan a cabo su comportamiento alelopático.
- Los compuestos **1** y **2** pueden ser empleados como herbicidas post-emergentes.
- Estos compuestos no mostraron ser tóxicos al ser evaluados en *Artemia salina*, teniendo una CL₅₀ mayor a 1000 ppm, por lo que se muestra que no son tóxicos para todas las formas de vida, lo que quiere decir, que son menos tóxicos que otros compuestos no naturales o sintéticos.

7. APÉNDICES

7.1. APÉNDICE 1 METODOS CROMATOGRÁFICOS.

Para el fraccionamiento de los extractos y la separación y purificación de fracciones y de los 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)

Preparación de 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).

7.2. APÉNDICE 2 MEDIOS.

Medio de aislamiento de cloroplastos.

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

*Ajustar el pH a 8.0 con KOH

Medio bomba.

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

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

Medio de transporte de electrones.

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

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

Medio de transporte de electrones sin MV

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

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

Medio de transporte de electrones para FS II

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

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

Medio de transporte de electrones para PS-I.

Compuesto	Concentración	Para 1 L
Medio de transporte de electrones.	Aforo	
NH ₄ Cl	6 mM	24 ml solución 250 mM
DCPIP*	100 µM	2.5 ml solución 20 mM
Ascorbato de Sodio	300 µM	45 µl solución 20 mM

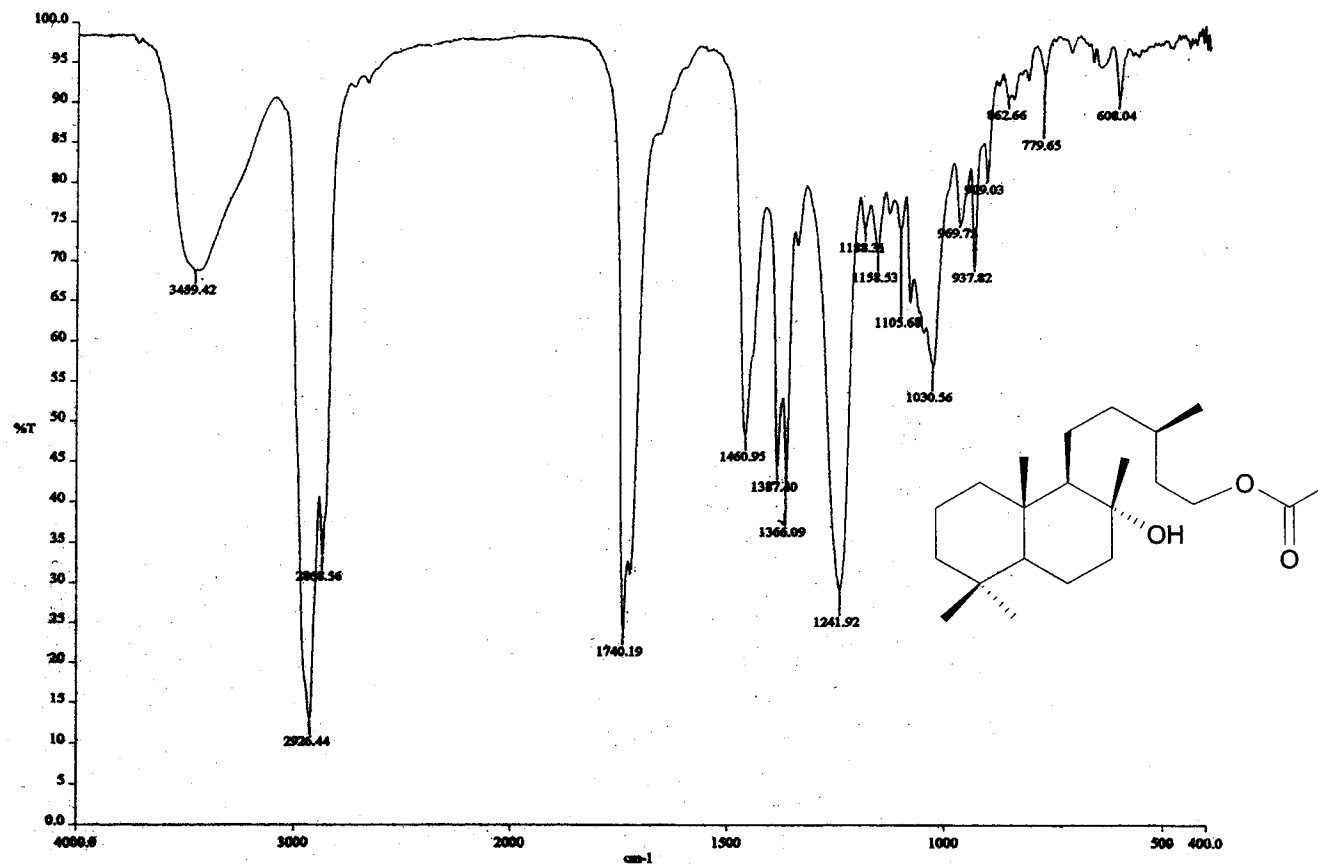
Ajustar el pH a 8.0 con KOH.
* se debe preparar el mismo día.

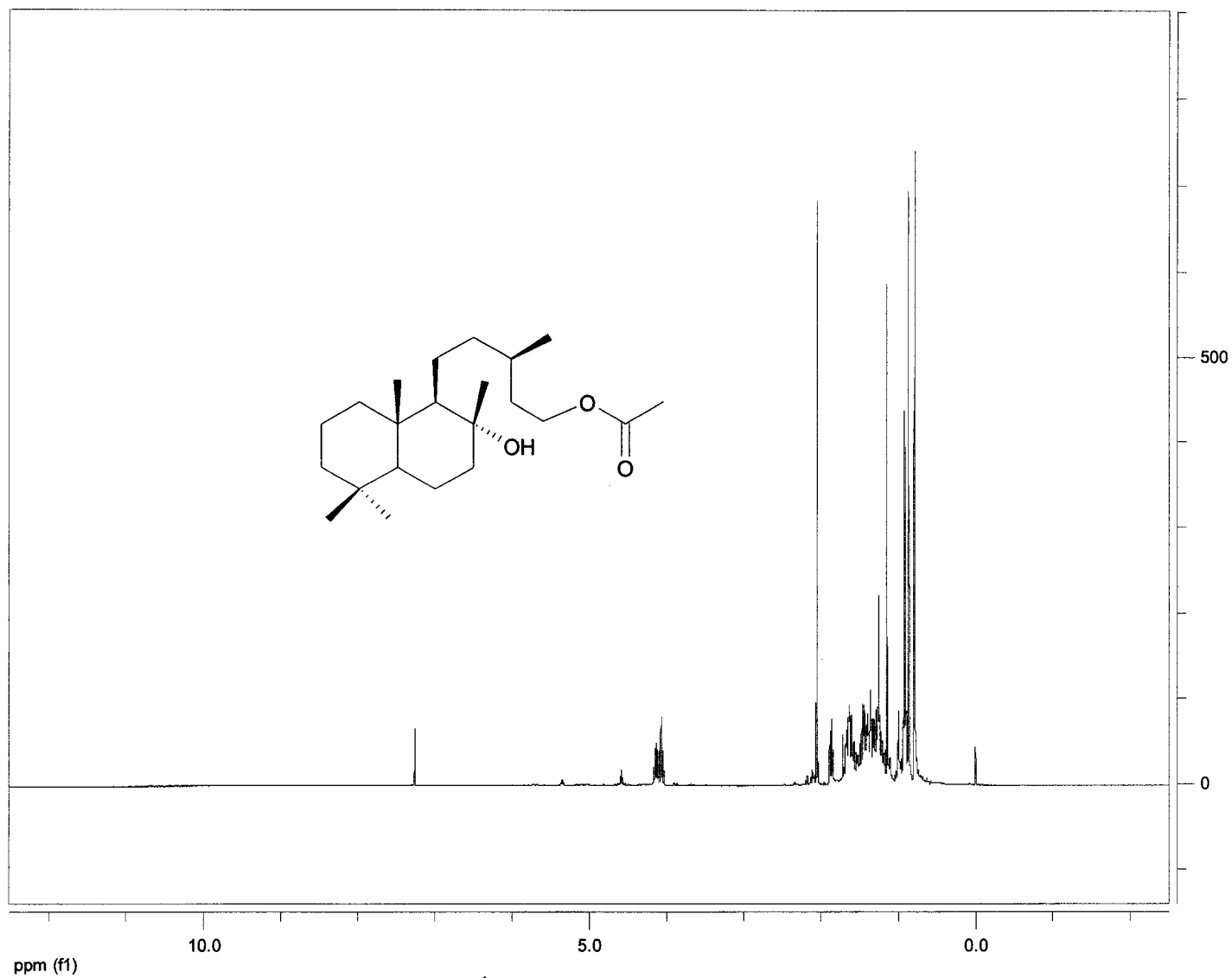
Medio de transporte de electrones H₂O-SiMo

Compuesto	Concentración	Para 1 L
Medio de transporte de electrones sin MV	Aforo	
NH ₄ Cl	6 mM	24 ml solución 250 mM
SiMo*	200µM	5.0 ml solución 20 mM

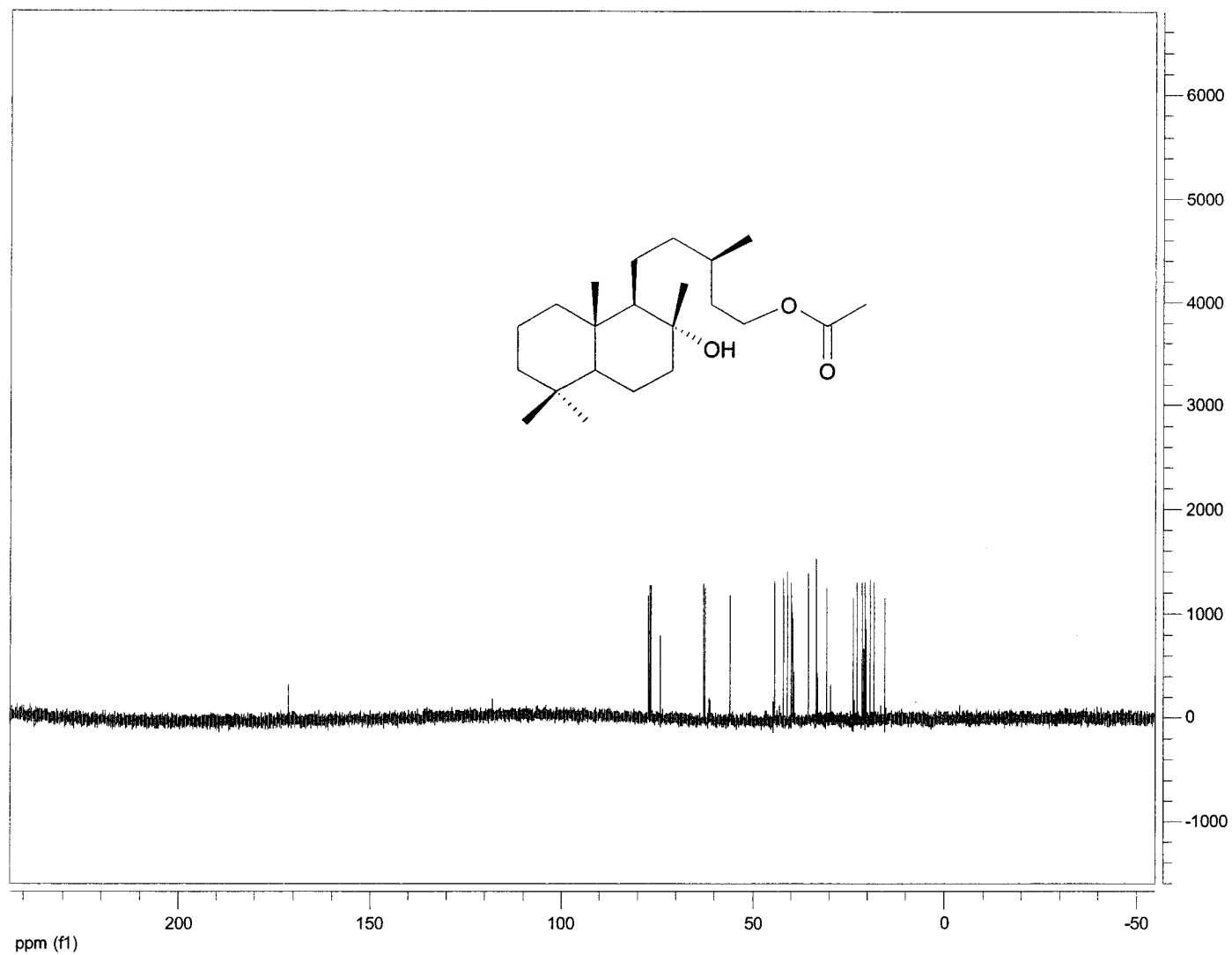
Ajustar el pH a 8.0 con KOH.
*se debe preparar el mismo día.

7.3. APENDICE 3. ESPECTROS

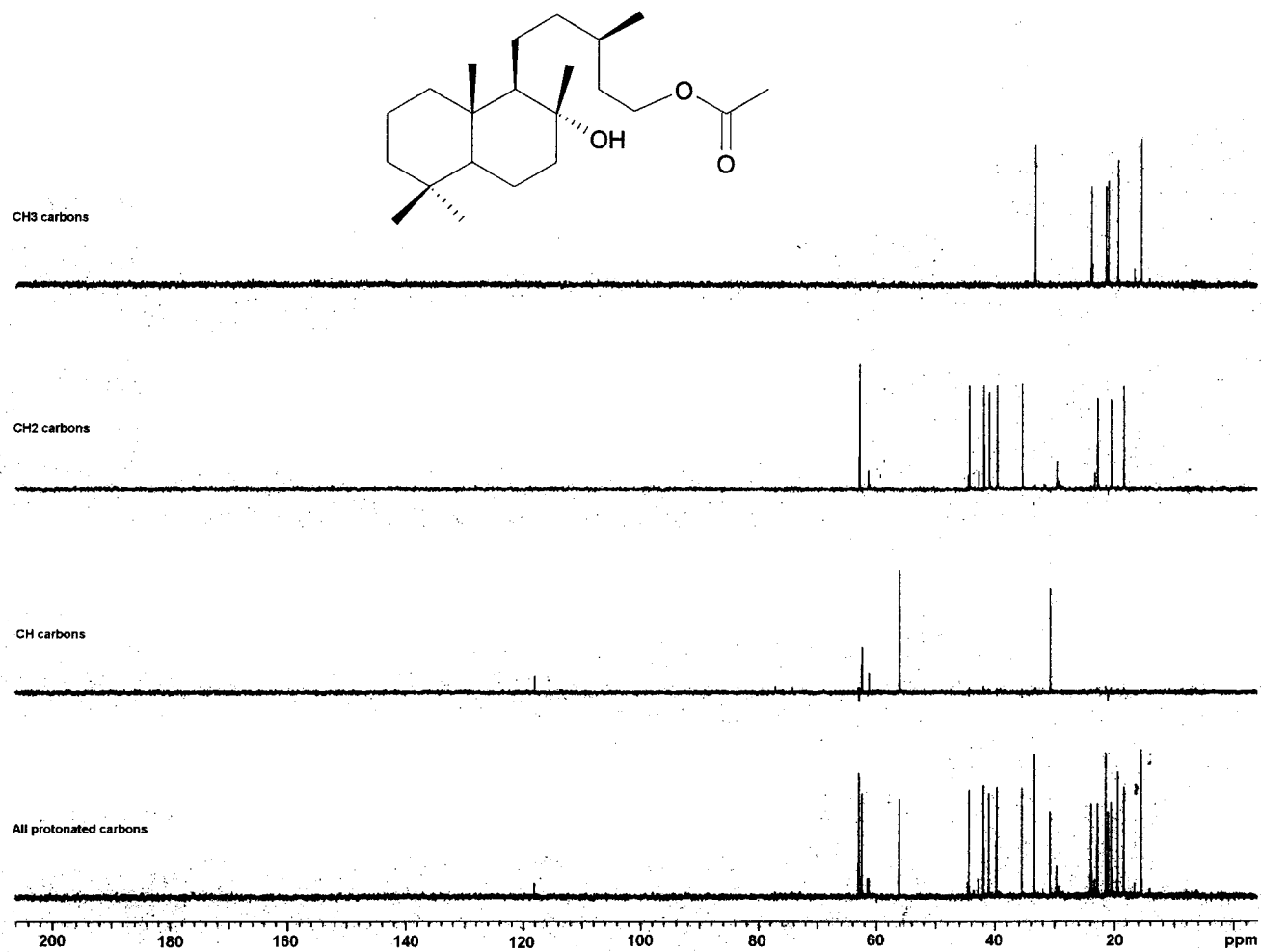
Espectro 1 Espectro IR del diterpeno 15-O -acetil -8 α -hidroxi- labdano (1)



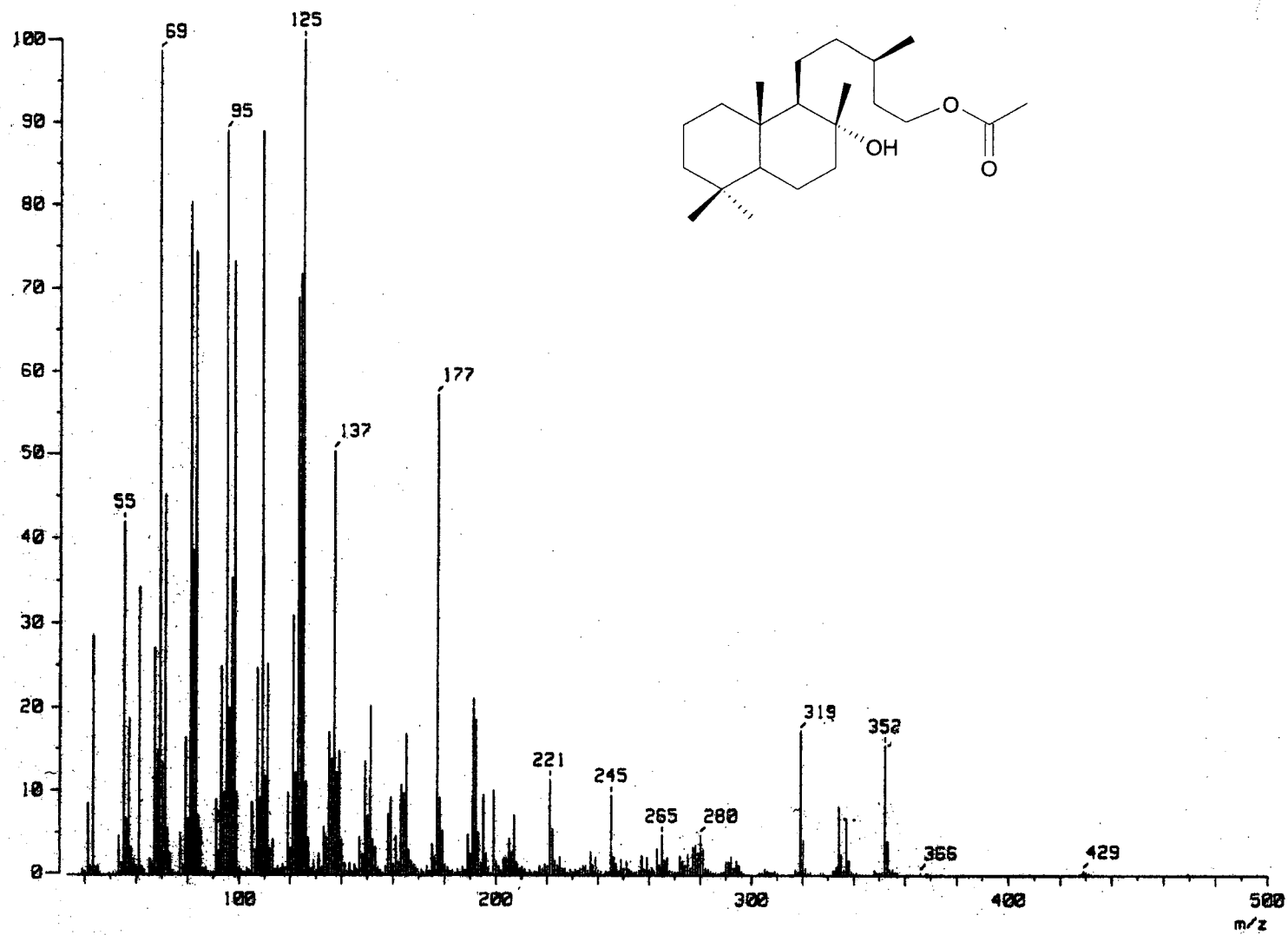
Espectro 2. Espectro de RMN ^1H del diterpeno 15-O -acetil -8 α -hidroxi- labdano (1)



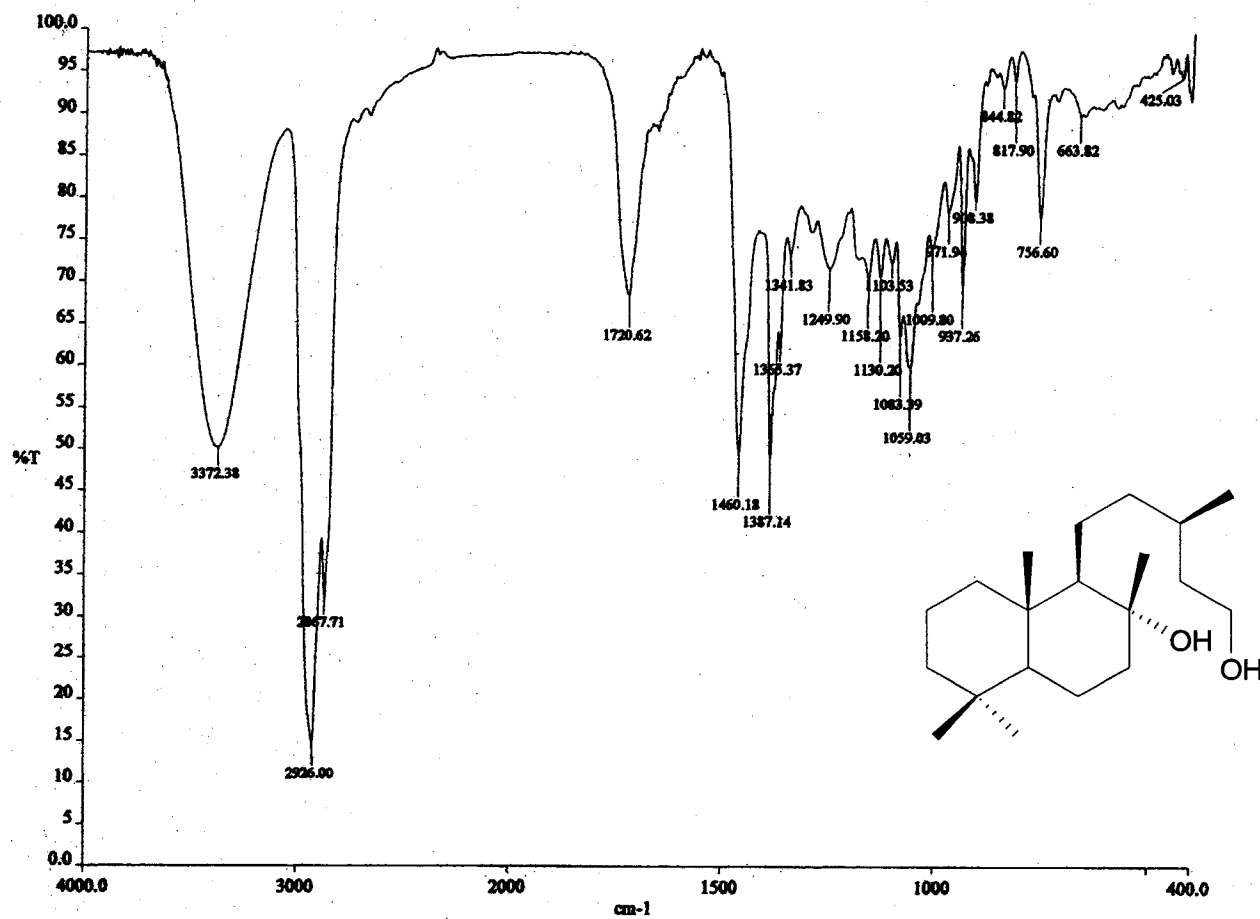
Espectro 3. Espectro de RMN ^{13}C del diterpeno 15-O -acetil -8 α -hidroxi- labdano (1)



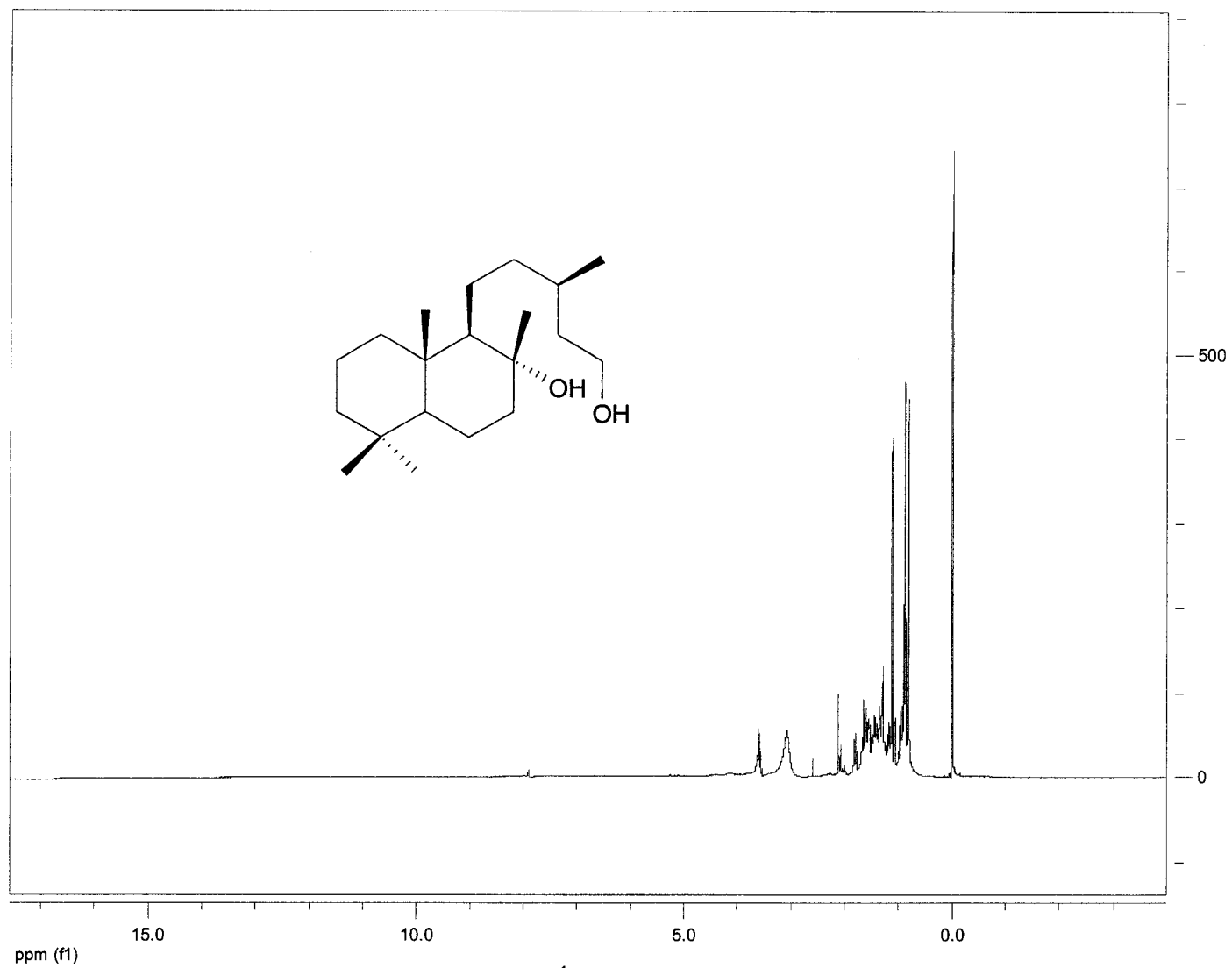
Espectro 4 Espectro DEPT del diterpeno 15-O -acetil -8 α -hidroxi- labdano (1)



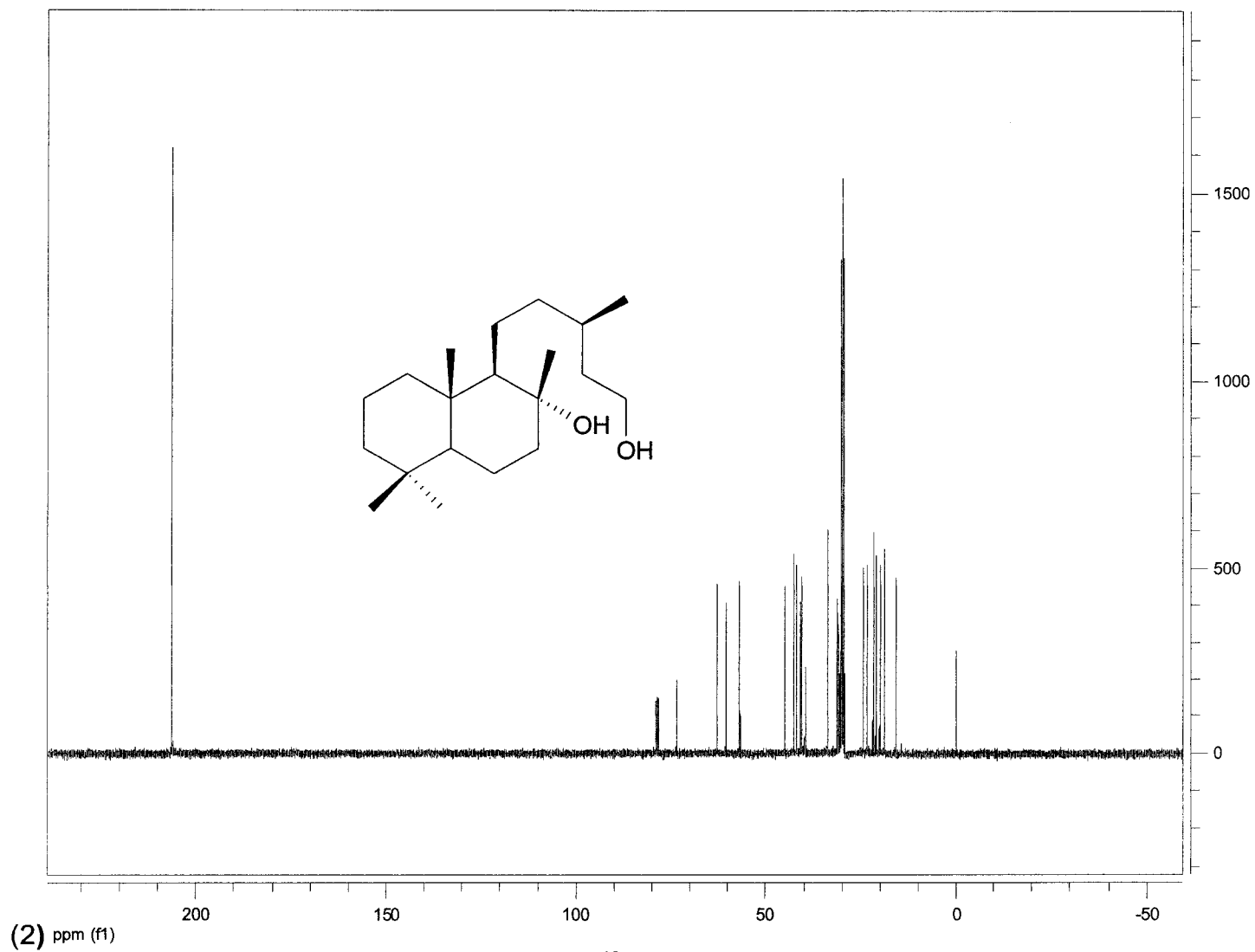
Espectro 5. Espectro de masas por impacto electrónico del diterpeno 15-O-acetil-8 α -hidroxi-labdano (1)



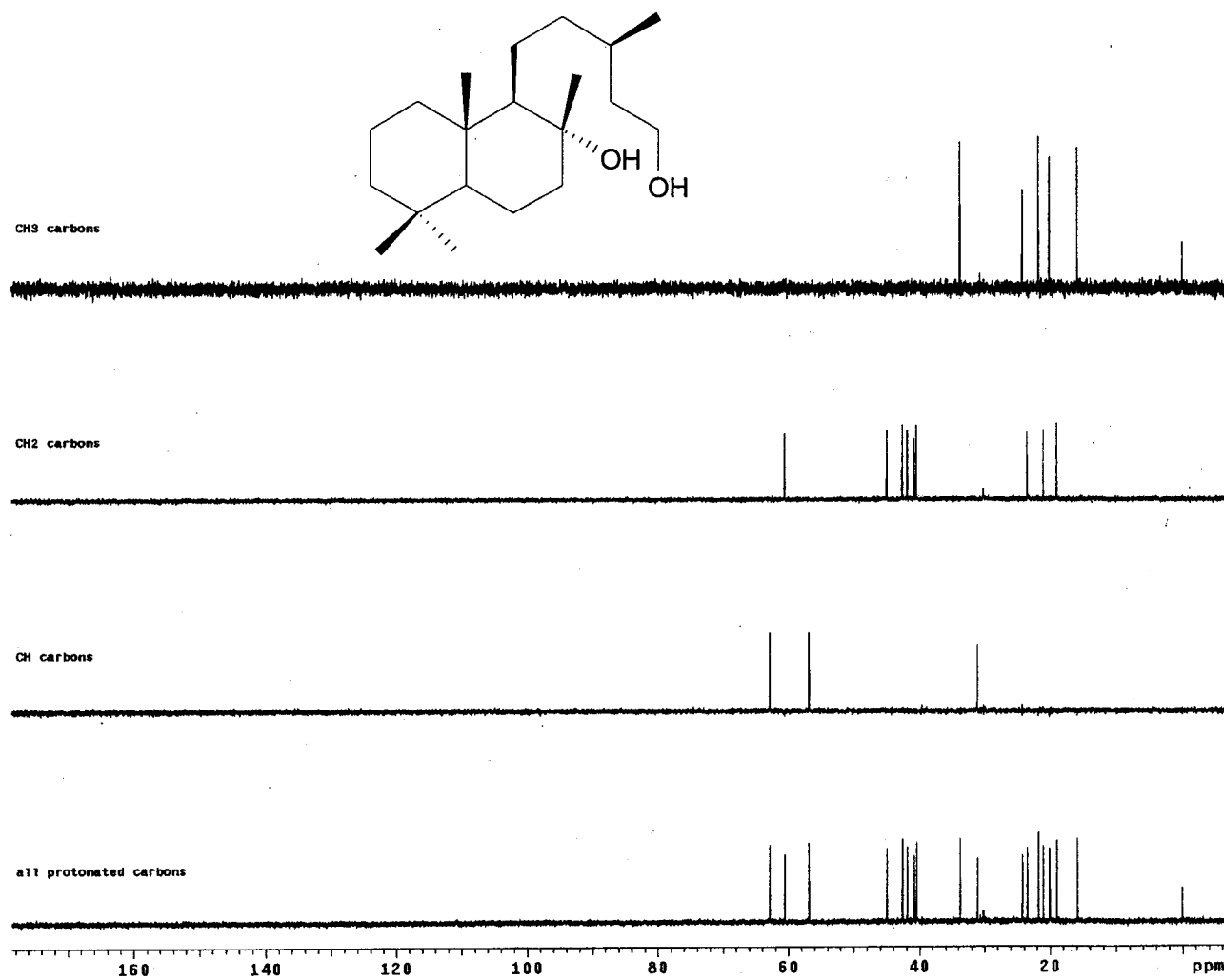
Espectro 6. Espectro de IR del 8α,15-dihidroxi-labdano (2)



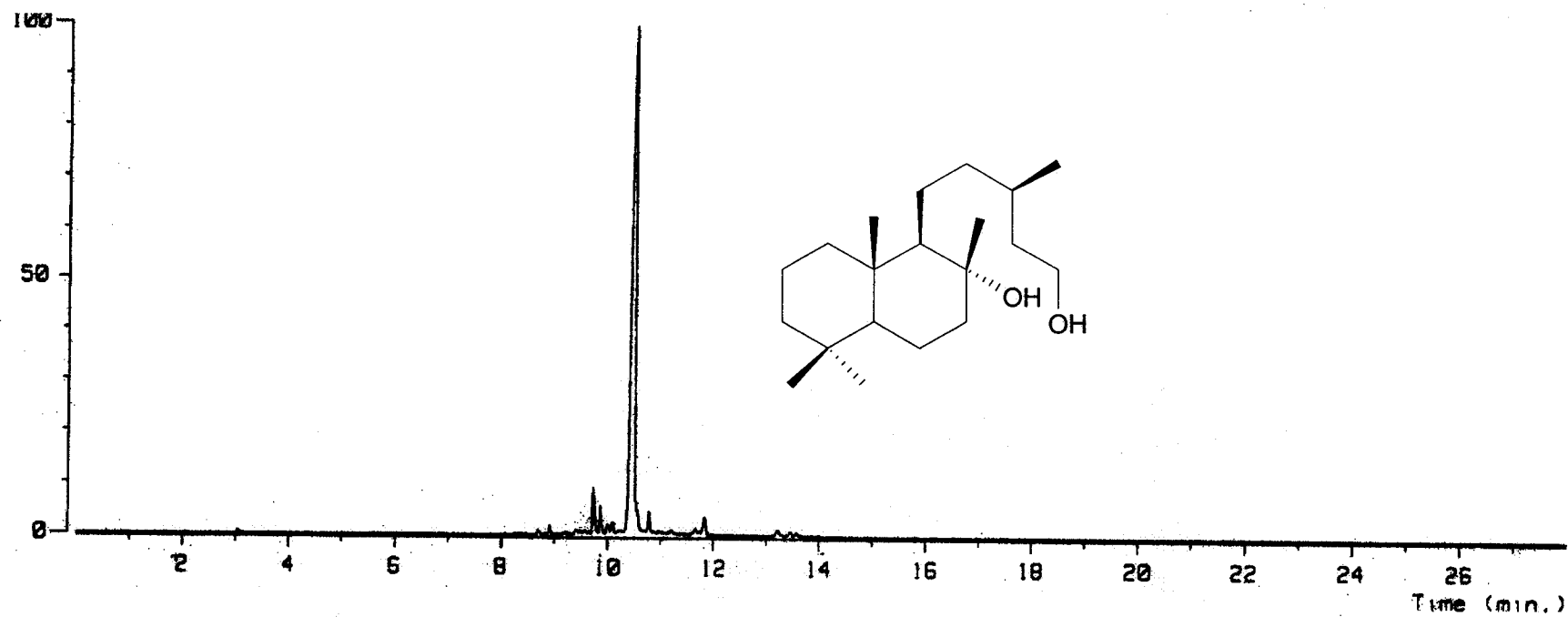
Espectro 7. Espectro de RMN ^1H espectro del 8 α ,15-dihidroxi-labdano



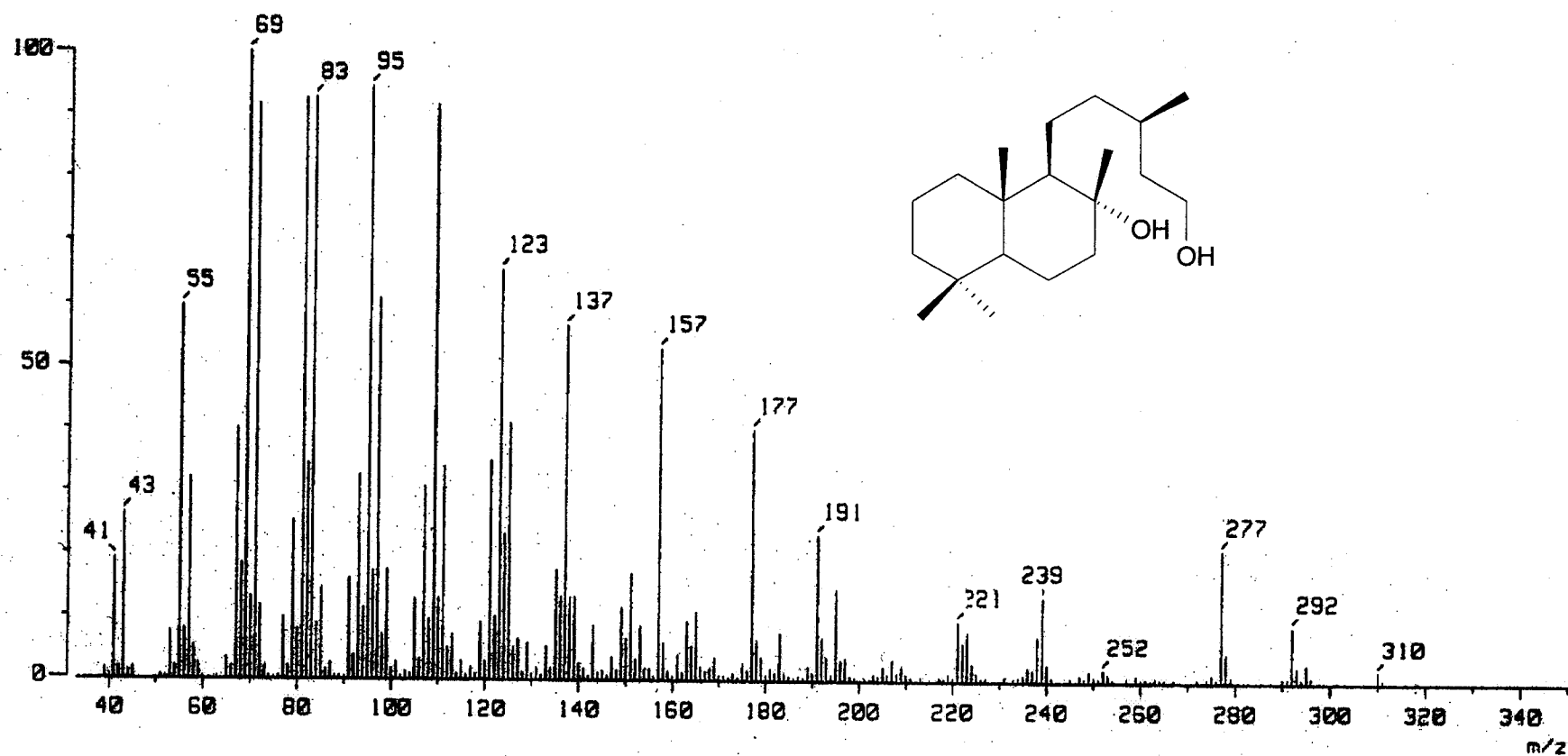
Espectro 8. Espectro de RMN ^{13}C del 8 α ,15-dihidroxi-labdano (2)



Espectro 9: DEPT del 8 α ,15-dihidroxi-labdano (2)



Espectro 10. Cromatograma de gases del 8 α ,15-dihidroxi-labdano (2)



Espectro 11. Espectro de masas por impacto electrónico del 8 α ,15-dihidroxi-labdano (2)

8. Referencias

1. Kudsk P and Streibig JC (2003) Herbicides- a two-edged sword. *Weed Research* 43:90-102
2. Duke SO, Dayan FE and Rimando AM (1998) Natural products as tools for weed management. *Proc Jap Weed Sci (suppl)* 1:11
3. Duke SO, Dayan FE, Romagni JG and Rimando AM (2000) Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Research*. 40:99-111
4. Duke O and Abbas H (1995). Natural products with potential use as herbicides. *ACS Symposim Series* 582, 348-362.
5. Huerta A, Lopez-Olguin JF; Aragon A, Budia F, Del Estal P and Vinuela E (2002) Effect of a powder and watery extract of *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. (Euphorbiaceae) incorporated into the diet of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). *Bol Sanid Vegetal Plagues* 28:405-414.
6. Rios MY and Aguilar-Guadarrama AB (2006) Nitrogen-containing phorbol esters from *Croton ciliatoglanduliferus* and their effects on cyclooxygenases-1 and -2. *J Nat Prod* 69:887-890
7. González-Vázquez R, King Díaz B, Aguilar MI, Diego N and Lotina-Hennsen B (2006) Pachypodol from *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. as water-splitting enzyme inhibitor on thylakoids. *J Agric Food Chem* 54:1217-1221
8. Salamanca GG. La familia Euphorbiaceae como condición promisoría para la obtención de metabolitos secundarios. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Universidad de Tolima.
<http://www.ut.edu.co/Fc/0940/gsg/euforbiaceae>
9. Casas A, Viveros JL y Caballero J. (1994). *Etnobotánica mixteca. Sociedad, cultura y recursos naturales en la montaña de Guerrero*. INI-CONACULTA. p366.
10. Argueta A, Cano LM y Rodarte ME (1994) Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto nacional Indigenista Vol I p 579
11. Martínez M. (1989). *Las plantas medicinales de México*. Ediciones botas. México, D.F. 255-256.

12. Contreras A y Zolla C. (1982) Plantas toxicas de México. Sub Dirección General Médica. IMSS. 68-70.
13. Kogan MA y Perez AJ (2003) Herbicidas. Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile Pp. 22-31
14. Drabe WY and Fedtke C. (1979) Herbicide interaction with plant biochemical systems. En: Geissbuhles, Brooks GT and Kearney PC (eds). Advances in Pesticide Science Part 2H. Pergamon Press, p3.
15. Esser HO, Dupuis G, Ebert E, Vogel C and Marco GJ (1975) S-triazines. En: Kearney PC, Kaufman DD (eds) Herbicides. Chemistry, degradation and mode of action, Marcel Dekker, New York, Vol 1 pp129-208
16. Calderbank A and Slade P (1976) Diquat and paraquat. En: Kearney PC, Kaufman DD (eds) Herbicides. Chemistry, degradation and mode of action, Marcel Dekker, New York, Vol 2 pp501-539
17. Cobb AH and Kirkwood RC (2000) Challenges for herbicide development. En Cobb AH and Kirkwood RC (eds) Herbicides and their mechanism of action. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK pp1-24
18. Franz JE, Mao MK and Sikorski JA (1997) Glyphosphate: a unique global herbicide. ASC Monograph 189, American Chemical Society. Washington DC USA.
19. Beyer JE, Duffy MJ, Hay JV and schlueter DD (1988) Sulfonylureas. En Kearney PC, Kaufman DD (eds) Herbicides. Chemistry, degradation and mode of action, Marcel Dekker, New York, Vol 3 pp117-189
20. Campbell MK and Farell SO. Bioquímica. Internacional Thompson Australia 2004 pp 615-627
21. 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.
22. Kudsk P (2002) Optimising herbicide performance En: Naylor (ed) Weed Management Handbook, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 323-344

23. 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.
24. 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
25. Trebs A (1972) Measurement of hill reactions and Photoreduction. Meth Enzymol 24:146-153
26. Baker NR and Percival MP (1991). Herbicides and Photosynthesis. In: Baker NR, Percival MP (Eds), Herbicides Elsevier Science Publishers. Netherlands, pp1-26
27. Mc Carty RE (1980) Delineation Of the mechanism of ATP synthesis in chloroplasts: Use of uncouplers, energy transfer inhibitors , and modifiers of coupling factor 1. Meth Enzymol 69:719-727.
28. Bolhár-Nordenkamp HR and Öquist G. (1993) Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. En: Hall DO, Scurlock JMO (eds) Photosynthesis and production in a Changing Enviroment. A Field and laboratory Manual. Bolhár-Nordenkamp HR, Leegood RC and Longs SP. Chapman and Hall, London, UK pp193-205
29. Strasser RJ, Srivastava A and Govindjee (1995) Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cianobacteria. Photochem Photobiol 66:32-45.
30. Delosme R (1971) New results about chlorophyll fluorescence "in vitro". En: Forti G, Avron M and Melandri A (eds). Proceedings of the 2nd. International Congress on Photosynthesis Research. pp187-195
31. Arnon DI (1949) Cooper enzymes in isolated chloroplasts polypenoloxidase in *Beta vulgaris* Plant Physiol 24:1-15
32. Dilley R (1972) Ion transport (H^+ , K^+ , Mg^{2+}) exchange phenomena. Meth Enzymol 24:68-74

33. Jiménez A, Mata R, Lotina-Hensen B, and Anaya AL (1998). Interference of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene with photosynthetic electron transport. *Z Naturforsch* 53c:55-59
34. Hipkins MF and Baker NR (1986) Photosynthesis transduction a practical approach IRL Press Oxford Washington.
35. Calera MR, Soto F, Sanchez P, Bye R, Hernández B, Anaya AI, Lotina-Hensen and Mata R (1995) Biochemical active sesquiterpene lactones from *Ratibida latipalearis*. *Pytochemistry* 40:419-425
36. Saha S, Ouitrakul R, Isawa S, and Good N (1971) Electron transport and phosphorylation in chloroplast as function of the electron acceptor. *J Biol Chem* 246:3204-3209
37. Izawa S (1980) Acceptors and donors for chloroplast electron transport. *Meths in enzymol* 69:413-433
38. 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.
39. Hauska G and Trebs A (1977) Artificial acceptors and Donors En: (trebsA, Avron M (eds). *Enciclopedia of Plant Physiol. New Series*. Sringer-Verlag. Nueva York, USA Vol 5 pp 226-282.
40. Rickert KW, Sears J, Beck WF and Brudvig GW (1991) Mechanism of irreversible inhibition of O₂ evolution in photosystem II by Tris (hydroxymethyl)aminomethane. *Biochemistry* 30:7888-7894
41. Ouitrakul R and Izawa S (1973) Electron transport and photophosphorylation in chloroplast a function of electron-acceptor 2. acceptor-specific inhibition by KCN. *Biochim Biophys Acta* 305:105-118
42. Izawa S, Krayenhof R and Ruuge EK (1973) The site of KCN inhibition in the photosynthetic electron transport pathway. *Biochem Biophys Acta* 314:328-339

43. McLaughlin JL and Crow G (1991). Tumours on potato disc and brine shrimp lethality: Two simple bioassays for higher plant screening and fractionation methods, in plant biochemistry. Academic press, Estados Unidos de América, 6:8-9.
44. Meyer, BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE and McLaughlin JL (1982) Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medical Plant Research* 45:31-34.
45. Teng WS (1993). Bioactive natural products: Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia Salina*. Editorial S. M. Colgate & R.J. Molyneaux, CRC Press, INC. Estados Unidos de América, pp 441-457
46. Liebermann HR (1983) estimating LD₅₀ using the probit Technique: a basic computer program drug. *Chemical Toxicology*, 6:111-116
47. Carman RM (1972) The optical rotation of the tertiary alcohols. *Aust. J. Chem.* 26:879-881.
48. González AG, Francisco CG, Freire R, et al. (1976) C₁₂ stereochemistry of α - and β -levantenolide carbon-13 NRM spectra of labdanolic diterpenes.
49. Hirota H, Nakamura T, Tsuyuki T and Takahashi T (1988) Stereoselective total synthesis of (\pm)-labdane-(8 α ,15-diol and (\pm)-eperuane-8 β ,15-diol. *The Chemical Society of Japan* 61:4023-4028.
50. Good NE, Izawa S and Hind G (1981) Uncoupling and energy transfer inhibition in Photophosphorylation. In: Sanadi DR (ed) *Current Topics in Bioenergetics* vol 1 Academic Press, New York pp75-112
51. Castañeda P, Mata R and Lotina B (1998) Effect of encecalin, euparin and demethylenecalin on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplast, *J Sci Food Agric* 78:102-108
52. González-Bernardo E, Aguilar MI, Delgado G King-Díaz B and Lotina Hensen (2003) Photosynthetic electron transport interaction of xanthorizol isolated from *Isoetes heterophylla* and its derivatives. *Physiologia Plantarum*. 119:598-604

-
53. Chavez D, Mata R, Iglesias-Prieto R and Lotina-Hennsen B (2001) Annonaceous acetogenins: naturally occurring inhibitors of ATP synthesis and photosystem II in spinach chloroplasts. *Physiol Plant* 111:262-268
 54. Strasser RJ (1997) Donor side capacity of photosystem probed by chlorophyll a fluorescence transients. *Photosynth Res* 52:147-155
 55. Strasser RJ, Srivastava A and Tsimilli-Michael M. (2004). Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou G, Govindjee (eds) *Advances in Photosynthesis and Respiration. Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis* vol 19 Kluwer Academic Publishers The Netherlands pp321-362.
 56. 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