

129
2ej



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

**ANALISIS QUIMICO-BIOLOGICO DE LA
ESCOPOLETINA EXTRAIDA DE LA RAIZ
DE Ipomoea stans Cav. (Convolvulaceae)**

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

Marco Antonio Montes Flores



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

Del extracto clorofórmico de la raíz de Ipomoea stans se aisló la 7-hidroxi 6-metoxi-cumarina (escopoletina), la cual fué caracterizada por análisis espectrométricos.

Su actividad biológica se probó por medio de un bioensayo para evaluar su capacidad para inhibir la germinación de tres especies de semillas de gramíneas: avena, cebada y trigo, siendo la más sensible a la sustancia la avena.

INDICE

	pág.
I.- Introducción	1
II.- Generalidades sobre reguladores del crecimiento	3
- Auxinas	3
- Giberelinas	5
- Citocininas	7
- Acido abscísico	9
- Etileno	10
- Compuestos alifáticos	12
- Compuestos fenólicos y cumarinas	13
- Sesqui y diterpenos	14
- Estilbenos y fenantrenos	16
III.- Ubicación taxonómica	22
- Descripción de la planta	23
IV.- Material y métodos	24
- Colecta	24
- Preparación del material	24
- Metodología química	24
- Extracción selectiva	24
- Purificación del extracto clorofórmico	26
- Cromatografía en columna	26
- Metodología biológica	27
V.- Resultados y discusión	29

- Parte química	29
- Análisis de los espectros del producto obtenido	30
VI.- Conclusiones	35
VIII.- Bibliografía	36

INTRODUCCION

Las convolvuláceas son una familia de plantas que presenta interés desde varios puntos de vista. Aparte de la diversidad de formas de vida, que van desde hierbas rastreras hasta árboles, están adaptadas a diferentes climas y tipos de vegetación.

La clasificación de sus miembros ha sido siempre problemática y requiere una constante investigación taxonómica, tanto morfológica como citogenética y química, para esclarecer las dudas existentes dentro de la taxonomía clásica.

Reflejo de la confusión que hay en la clasificación de algunos géneros es el gran número de sinonimias existentes en las especies. Por ejemplo, de Rivea corymbosa se conocen diez sinónimos, de las cuales Turbina corymbosa es la preferida de muchos botánicos, mientras que otros la clasificaron como Ipomoea (Genest et. al. 1965).

Por otra parte, muchas de las plantas que pertenecen a esta familia tienen una gran tradición popular respecto a su uso, por sus propiedades curativas (Ipomoea murucoides, I. stans, I. purga) o alucinógenas. Dentro de este último renglón se encuentran las plantas consideradas como sagradas por los indígenas, siendo las principales Turbina corymbosa e Ipomoea violácea.

Todas estas características en la familia de las convolvuláceas la hacen un campo muy vasto de investigación química respecto a los metabolitos secundarios que le sean propios y que nos pueden dar, por un lado, pautas taxonómicas como han sido los alcaloides indólicos derivados del ácido lisérgico y de las ergolínicas, y por otro, información sobre los principios activos responsables de sus propiedades curativas, tóxicas, etc., o bien

sobre sustancias que intervengan, en una u otra forma, en el metabolismo del vegetal.

Dentro de este campo de actividades queda comprendida la línea principal de investigación del Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M., sitio donde se realizó este trabajo.

Se eligió Ipomoea stans ya que es una planta a la que se le asignan propiedades curativas. A la raíz se le conoce dentro de la medicina tradicional mexicana como antiespasmódico y se usa contra la bilis y la congestión renal. La planta es interesante, además, por sus hábitos y por el medio en que se encuentra, en el cual se hallan muchas plantas alelopáticas. La alelopatía se logra, ya sea por la secreción de sustancias o por la descomposición de los restos de las plantas.

OBJETIVOS

El trabajo tuvo como objetivo principal el aislamiento de reguladores del crecimiento vegetal, ya que probablemente a uno de ellos se deban las características alelopáticas que presenta la planta.

Los objetivos particulares fueron los siguientes:

- Extracción selectiva de la raíz con hexano, cloroformo, metanol y agua.
- Separación de compuestos del extracto clorofórmico.
- Análisis del o los compuestos separados:
 - Determinación del punto de fusión
 - Corrimiento en placa delgada.
 - Espectrometría.

GENERALIDADES SOBRE REGULADORES DEL CRECIMIENTO

Recientemente, gracias al uso de mejores técnicas de separación y al refinamiento de las técnicas de bioensayo, se han descubierto un gran número de constituyentes vegetales que poseen propiedades reguladoras sobre el crecimiento de las plantas.

Todas estas sustancias se pueden dividir en dos grandes grupos.

El primero de éstos es el bien conocido grupo de las hormonas vegetales; entendiéndose por hormona vegetal un compuesto orgánico sintetizado en una parte de la planta y que es translocado a otra parte de la planta en donde, a concentraciones muy bajas, causa una respuesta fisiológica (Salisbury, 1978).

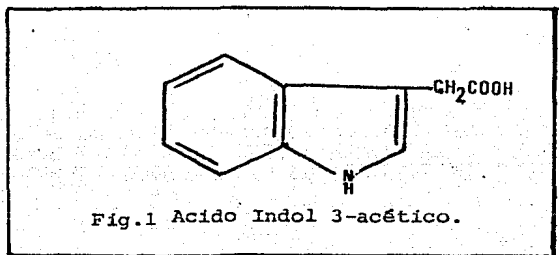
Las hormonas vegetales tienen una amplia distribución y, de hecho, se encuentran en todas las plantas superiores, todas tienen una alta actividad, acción específica y una función, por lo menos, en la regulación del crecimiento y diferenciación de las plantas.

Existen cinco grupos bien aceptados de hormonas vegetales los cuales incluyen al menos una auxina, muchas giberelinas, varias citocininas, al ácido abscísico e inhibidores relacionados y, por último, al etileno.

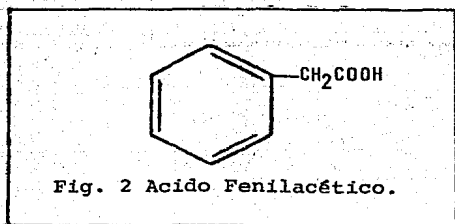
Auxinas

El nombre auxina viene del griego "auxeina" que significa crecer, y le fué conferido a la hormona del crecimiento producida típicamente por el ápice del coleóptilo en las gramíneas o por el meristemo apical en las demás familias. Las auxinas son de fundamental importancia en la fisiología del crecimiento y la diferenciación. La primer sustancia a la que se le dió el nombre

de auxina fué el ácido Indol-3-acético (AIA). (Fig. 1)



Algunos investigadores piensan que el AIA es la única auxina de ocurrencia natural (Thiman 1972). Sin embargo, se ha demostrado ocasionalmente que otros compuestos, ya sean sintéticos o naturales, causan los mismos efectos que el AIA aún cuando no tengan estructura parecida, como el ácido fenilacético y, por lo tanto, se debe considerar como auxinas a todas estas sustancias. (Fig.2)



Las auxinas se encuentran en todas las plantas superiores y se sintetizan principalmente en los tejidos meristemáticos del ápice de la raíz y del ápice del brote de las hojas jóvenes, de las flores y de los frutos en desarrollo.

En cuanto a su efecto, aunque todas las hormonas vegetales interactúan una con otra para realizar ciertas funciones, se les puede adjudicar un papel específico para determinados efectos.

Así, para las auxinas sus efectos más notables son:

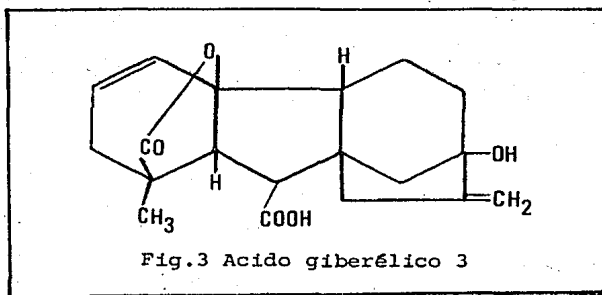
- La promoción o inhibición, dependiendo de la concentración de la elongación de la raíz y de los internodos.
- Estimula la producción de etileno.
- Provoca la rizogénesis.
- Es responsable de la dominancia apical.
- Induce la partenocarpia en jitomate, pimienta, tabaco, higo, zarzamora y fresa.
- Está involucrada en las respuestas geotrópicas y fototrópicas.

Giberelinas

Las giberelinas se encuentran en angiospermas, gimnospermas, helechos, algas y hongos.

A partir del descubrimiento en Japón, en 1930, del ácido giberélico 3, hasta la fecha se conocen 57 giberelinas con actividad fisiológica comprobada. Todas las giberelinas tienen 19 o 20 átomos de carbono agrupados en 5 o 6 sistemas de anillos y presentan uno o más grupos carboxilo.

Aunque todas las giberelinas pueden ser llamadas ácido giberélico, al que se conoce por ese nombre más comúnmente es al ácido giberélico 3 (AG₃). (Fig. 3)



Las giberelinas se sintetizan activamente en las hojas jóvenes y en las raíces, aparte están presentes en los embriones, semillas y frutos. Sin embargo no está absolutamente comprobado que se sinteticen en estos tres sitios. (Salisbury 1978).

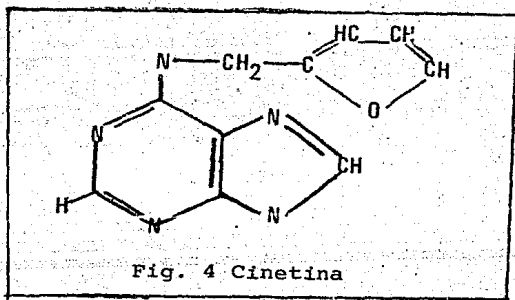
Los efectos fisiológicos de las giberelinas sólo se conocen bien en las plantas vasculares y son los siguientes:

- Promueven el rompimiento de la latencia, tanto en semillas como en brotes, en muchas especies, actuando como sustituto de la luz roja, días largos o bajas temperaturas.
- Pueden promover la floración substituyendo los efectos lumínicos del fotoperíodo, en especial en plantas de día largo.
- Substituyen la necesidad de un período frío que requieren ciertas plantas para florecer.
- Estimulan la movilización de nutrientes y elementos minerales hacia las semillas durante su desarrollo.
- Producen frutos partenocárpico en algunas plantas.

- Cuando se forman en hojas jóvenes de plantas leñosas pueden renovar la actividad del cambium vascular.
- Retardan la senescencia en hojas y frutos de los cítricos.
- Participan, interactuando con las auxinas y tal vez con el etileno y el ácido abscísico, en el geotropismo y el fototropismo

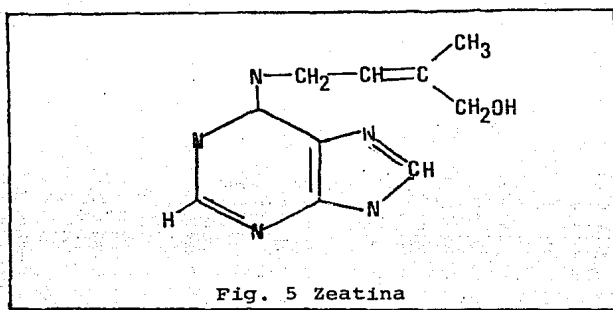
Citocininas

Aún cuando se conocía su existencia desde 1920, la primera sustancia que se caracterizó como citocinina no se obtuvo de un vegetal sino del esperma esterilizado del arenque y este compuesto se conoció como cinetina. (Fig. 4) (Salisbury 1978)



Posteriormente ya que la cinetina no era la sustancia presente en las plantas, se trató de buscar una sustancia similar en las plantas y gracias a las técnicas de cultivo de tejidos se encontraron varias citocininas en la "leche", o sea en el endospermo, del coco y entre estas se encontraron a la zeatina (Fig. 5) y al zeatínribósido, que después se encontró también

en el maíz (Salisbury 1978).



Las citocininas naturales conocidas son compuestos de adenina sustituida. También se conocen muchas sustancias sintéticas con actividad de citocininas y algunas de ellas no son derivados de la adenina.

Las citocininas se sintetizan en el ápice de la raíz y de ahí son transportadas en el xilema a todas las partes de la planta; son abundantes en hojas jóvenes, frutos y semillas, aunque no se puede negar que en estas partes de la planta no se sinteticen citocininas.

Algunos de sus efectos fisiológicos son:

- Promueven la división celular.
- Promueven la formación de órganos.
- Retardan la senescencia en hojas y flores, y en frutos de ciertas especies.
- Promueven el desarrollo de los brotes laterales venciendo la dominancia apical.
- Incrementan la expansión de los cotiledones y de las hojas en algunas especies de dicotiledóneas.
- Promueven el desarrollo de los cloroplastos.

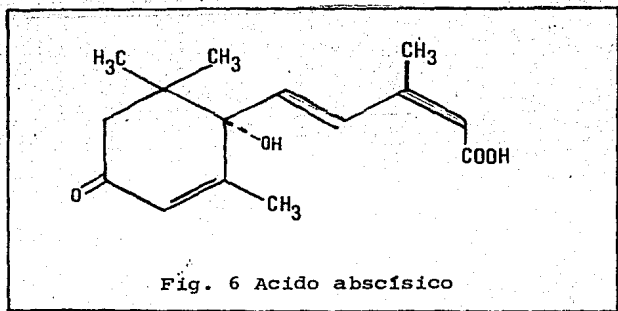
- Incrementan el alargamiento radial de las células en los tallos y en las raíces .

Acido Abscísico

Es la hormona vegetal más recientemente descubierta de todos los otros cuatro grupos. Fué descubierta simultáneamente en dos laboratorios distintos en el año de 1965 por P.F. Wareing quien trabajó con Acer pseudoplatanus y por F.F. Addicot quien trabajó con algodón, Gossypium hirsutum.

El ácido abscísico se encuentra en angiospermas y gimnospermas y por lo menos en una especie de helecho, en una especie de equiseto y en una especie de musgo; en las algas y en las hepáticas no se encuentra ácido abscísico pero se encuentra el ácido lunulárico que tiene propiedades semejantes; en los hongos y en las bacterias no se encuentran compuestos que tengan una actividad semejante al ácido abscísico (AAB).

El AAB es un sesquiterpeno de quince carbonos, (Fig.6) sintetizado a partir de farnesilpirofosfato; las primeras reacciones en la síntesis de AAB son idénticas a las de las giberelinas, esteroides y carotenoides.



El AAB se sintetiza en cloroplastos, en hojas, tallos y en frutos verdes; su síntesis se vé favorecida sobre todo bajo condiciones de tensión ambiental.

Sus efectos fisiológicos son principalmente inhibitorios, así, tenemos entre los mas importantes a los siguientes:

- Inhibe la germinación de la mayoría de las semillas.
- Promueve la latencia de los brotes en crecimiento, ya sean axiales o apicales.
- Promueve la abscisión de los frutos y de las hojas.
- Promueve el cierre de los estomas bajo condiciones de sequía.

Etileno

Aún cuando por sus características de ser una molécula simple en comparación con las de los otros grupos y, por otro lado, por ser un gas, pudiera pensarse que esta sustancia no es una hormona; sin embargo, debido a los efectos fisiológicos que tiene sobre el desarrollo de las plantas si se le considera como una hormona vegetal (Salisbury 1978) (Fig. 7).

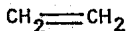


Fig. 7

Aunque desde tiempos remotos se sabía que ciertos gases estimulaban la maduración de los frutos, sólo hasta hace poco tiempo se estableció que el etileno es responsable de esto.

Algunas bacterias sintetizan etileno, las algas no lo sintetizan y se supone que la mayoría de las plantas superiores lo hacen.

El etileno se sintetiza en el ápice superior de las plántulas y en los nodos de las dicotiledóneas; las raíces lo producen en poca cantidad, en las hojas la producción aumenta al envejecer, las flores también producen etileno, en la mayoría de los frutos cuando se alcanza el climaterio respiratorio aumenta la síntesis de etileno. Debido a que las auxinas estimulan la producción de etileno, esto podría explicar su presencia en el ápice superior de las partes aéreas y en el ápice de las raíces.

Algunos de sus efectos son los siguientes:

- Inhibe la floración en la mayoría de las plantas excepto en mangos y en bromelias.
- Causa epinastia en peciolo de muchas dicotiledóneas y sólo en algunas monocotiledóneas.
- Inhibe la elongación de tallos, raíces y hojas.
- Induce la maduración en la mayoría de los frutos.
- Estimula el crecimiento radial en tallos y raíces.
- Induce la formación de pelos radicales.
- Promueve la abscisión foliar.
- Estimula la germinación en semillas de algunas especies.
- Regula el nivel de AIA endógeno por un mecanismo de retroalimentación.

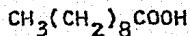
El segundo grupo de reguladores vegetales naturales está representado por compuestos que no son tan generales en su distribución, aún cuando están involucrados en la regulación del crecimiento, aparentemente sus efectos no son tan específicos.

Dentro de esta división se encuentran los siguientes compuestos:

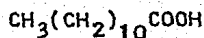
Compuestos alifáticos

Entre estos se conocen algunos ácidos grasos y sus ésteres alquílicos de bajo peso molecular cuyo efecto es inhibir o matar los meristemos apicales.

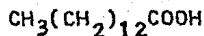
Los ácidos grasos de ocho, diez y doce carbonos (Fig.8) y sus ésteres metílicos tienen efectos inhibitorios muy marcados. Entre estas sustancias se encuentran el ácido láurico, el ácido mirístico y el ácido cáprico, éste último aislado de los bulbos latentes de Iris holandica C.V. Wedgewood (Gross, 1975) los alcoholes grasos de cadenas de nueve, diez y once carbonos son inhibidores efectivos del crecimiento de los meristemos axilares y apicales.



Ac. cáprico



Ac. láurico



Ac. mirístico

Fig. 8

Compuestos fenólicos y cumarinas

Se conoce un número muy grande de compuestos fenólicos naturales, entre los que cabe destacar por su alta actividad como inhibidores de algunos procesos del crecimiento vegetal al ácido salicílico, al ác. p-hidroxibenzoico, al ác. gálico (Fig. 9a), al ác. clorogénico (Fig.9b), al hidrangeol (Fig. 9c) y algunos otros.

Un subgrupo importante lo constituyen los taninos, que son bien conocidos como antagonistas de la acción de las giberelinas. Sin embargo, en algunos casos también tienen efectos estimuladores sobre el crecimiento y desarrollo de ciertas plantas.

Otro subgrupo lo forman los flavonoides, tales como la naringenina, que se ha aislado de los brotes latentes del durazno y el hidrangeol, que se ha aislado de Hydrangea macrophylla e H. hortensia, ambas sustancias son reconocidas como antagonistas de las giberelinas (Gross, 1975).

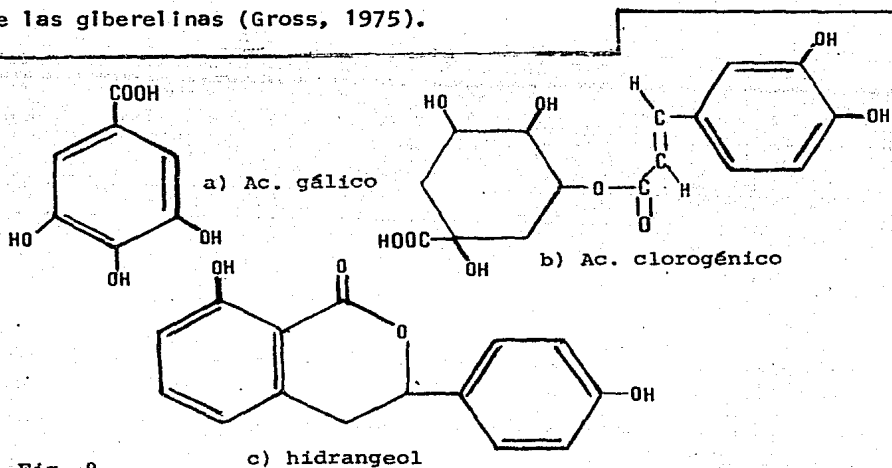


Fig. 9

Por último, las cumarinas y compuestos relacionados son reconocidos por su capacidad para inhibir la germinación y el crecimiento de las plantas, de este subgrupo nos ocuparemos con mayor amplitud mas adelante.

Este segundo grupo de reguladores del crecimiento cuya distribución es más o menos amplia aún puede subdividirse en otro grupo que está representado por sustancias reguladoras del crecimiento pero cuya distribución es muy restringida dentro del reino vegetal. Estos productos participan indirectamente en la regulación de los procesos bioquímicos durante la ontogenia de las plantas, aunque para la mayoría de estos compuestos se ha reconocido su actividad mediante bioensayos, sólo en muy pocos casos se ha reconocido su actividad dentro de la fisiología de las plantas de las cuales se han aislado.

Este grupo está compuesto por algunos terpenoides, alcaloides y algunas otras sustancias que poseen estructuras químicas fuera de lo común.

Algunos compuestos de interés dentro de este grupo son:

Sesqui y diterpenos

La estructura básica de las sustancias fisiológicamente activas es un esqueleto terpenoide y un grupo lactónico, de hecho, la investigación sobre este grupo es reciente y continuamente se encuentran compuestos con actividad. Así, por ejemplo, el sesquiterpeno heliangina (Fig. 10a) aislado de Helianthus tuberosus inhibe la elongación de coleoptilos de avena y promueve la formación de raíces adventicias en Phaseolus; algunos otros sesquiterpenos son metilen butirrolactonas, como la xanthinina

(Fig. 10b), aislada de Xanthium pennsylvanicum, los dos guaifano-
 lidos crisartemina A (Fig. 10c), y crisarteminaB (Fig. 10d), -
 aisladas de Chrysanthemum parthenium, C. mexicana y C. morifolium
 y la piretrosina (Fig. 10e), aislada de otras especies de -
Chrysanthemum:

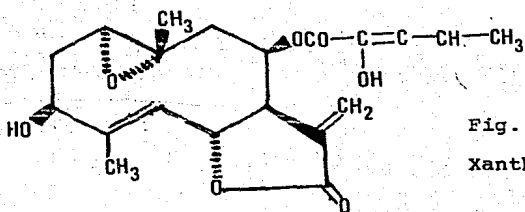


Fig. 10a Heliangina

Fig. 10b
Xanthinina

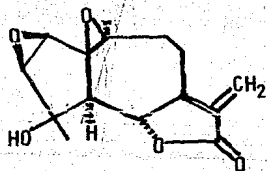
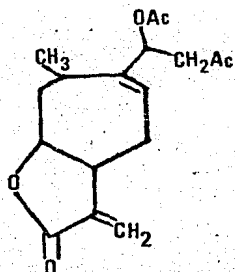


Fig. 10c Crisartemina A

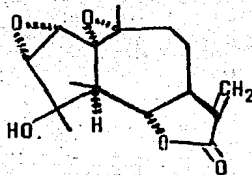


Fig. 10d Crisartemina B

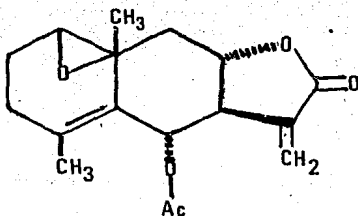
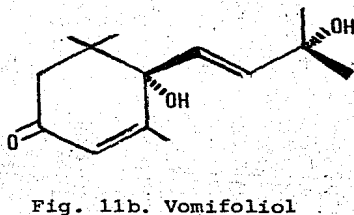
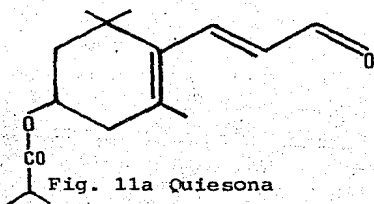


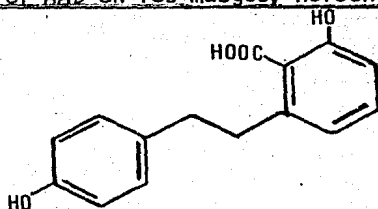
Fig. 10e Piretrosina

Los carotenoides son también interesantes desde el punto de vista biológico; aparte de los compuestos estructuralmente relacionados con el AAB hay otras sustancias como la quiesona, (Fig. 11a), aislada de hojas de tabaco infectadas, que inhibe la germinación de los conidios de Perenospora tabacinia; y el vomifoliol (Fig. 11b), aislado de diferentes plantas y el cual causa el cierre de los estomas.

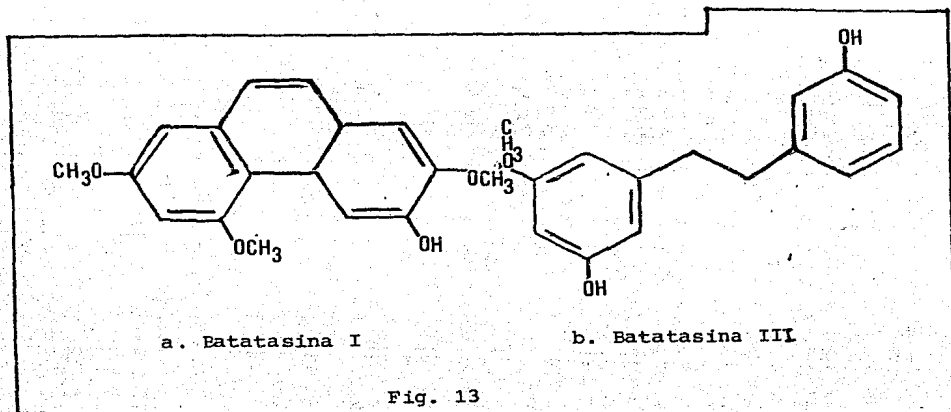


Estilbenos y fenantrenos

Dentro de este grupo encontramos al ácido lunulárico, que es común en todas las hepáticas y algas (Fig. 12), aparentemente en estos dos grupos el ácido lunulárico cumple la función - que realiza el AAB en los musgos, helechos y plantas superiores.



Las batatasinas I, II y III (Fig. 13 a y b), aisladas de Dioscorea batatas, son inductoras de la la tencia en algunas plantas.



Se han encontrado muchos otros compuestos biogénicamente relacionados con los estilbenos pero su actividad fisiológica aún no ha sido reconocida.

Hasta aquí hemos revisado de manera general los reguladores del crecimiento vegetal, en adelante centraremos nuestra atención sobre los inhibidores del crecimiento naturales, en particular en los compuestos fenólicos especialmente en las cumarinas, ya que a este grupo pertenece el compuesto aislado en nuestro estudio.

Los inhibidores del crecimiento naturales son sustancias que retardan o evitan procesos tales como la germinación de las semillas, el crecimiento de los meristemas y la elongación de los tallos y raíces entre otros procesos del crecimiento vegetal.

Hasta antes del descubrimiento del AAB, en 1963, el cual es de naturaleza terpenoide, los compuestos fenólicos eran reconocidos como el principal grupo que tenía inhibidores naturales; para la mayoría de estos compuestos, a pesar de su amplia distribución en el reino vegetal, no son muy claras sus funciones dentro del metabolismo de las plantas, salvo muy pocas excepciones.

Estas sustancias se encuentran en la naturaleza en forma de ésteres o glucósidos. Si nos basamos en el número de anillos aromáticos en la molécula, los compuestos fenólicos se pueden clasificar en tres tipos.

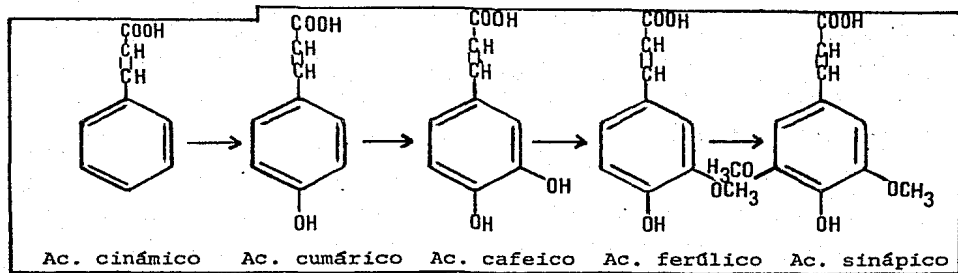
- Fenoles con un anillo aromático: ác. cinámico, cumarina
- Fenoles con dos anillos aromáticos: flavonoides, isoflavonoides y rotenoides
- Fenoles poliméricos: taninos

Dentro de los propósitos del presente trabajo no se contempla la revisión de los fenoles con dos o más anillos aromáticos, por lo tanto, nos concretaremos a los fenoles de un anillo.

Los fenoles con nueve átomos de carbono son comunes dentro

de la naturaleza y pueden dividirse en derivados del ácido cinámico y derivados de la cumarina.

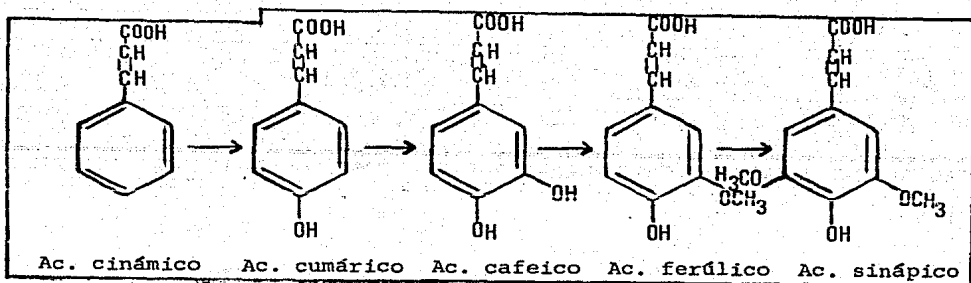
Algunos derivados directos del ácido cinámico son, entre los más comunes, el ácido p-cumárico, el ác. cafeico, el ác. ferúlico y el ác. sinápico (Fig. 14) estos dos últimos son derivados metilados.



Las cumarinas son productos que encontramos en los vegetales derivados biogenéticamente del ác. o-hidroxicinámico. Los sustituyentes mas comunes del anillo bencénico son oxhidrilos o metoxilos y se pueden encontrar libres o como glucósidos. La cumarina que es un derivado del fenilpropano, es la lactona del ácido cinámico. A partir del esqueleto de la cumarina y dependiendo de los radicales que se presenten en las diferentes posiciones de la molécula, puede existir una amplia variedad de compuestos derivados que se conocen genéricamente como cumarinas; por mencionar algunas tenemos a las isocumarinas, hidroxícumarinas, furocumarinas, etc. (Fig.1).

de la naturaleza y pueden dividirse en derivados del ácido cinámico y derivados de la cumarina.

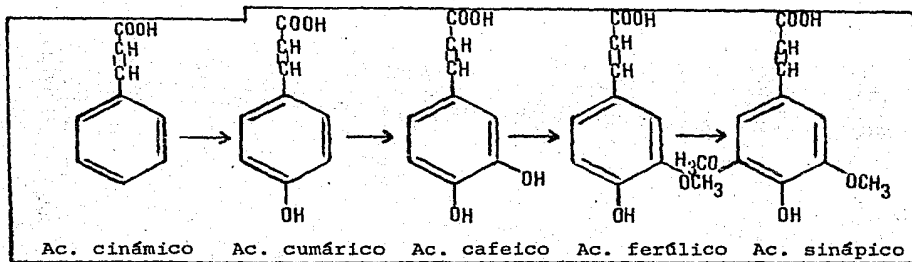
Algunos derivados directos del ácido cinámico son, entre los más comunes, el ácido p-cumárico, el ác. cafeico, el ác. ferúlico y el ác. sinápico (Fig. 14) estos dos últimos son derivados metilados.



Las cumarinas son productos que encontramos en los vegetales derivados biogenéticamente del ác. o-hidroxicinámico. Los sustituyentes mas comunes del anillo bencénico son oxhidrilos o metoxilos y se pueden encontrar libres o como glucósidos. La cumarina que es un derivado del fenilpropano, es la lactona del ácido cinámico. A partir del esqueleto de la cumarina y dependiendo de los radicales que se presenten en las diferentes posiciones de la molécula, puede existir una amplia variedad de compuestos derivados que se conocen genéricamente como cumarinas; por mencionar algunas tenemos a las isocumarinas, hidroxicumarinas, furocumarinas, etc. (Fig.1).

de la naturaleza y pueden dividirse en derivados del ácido cinámico y derivados de la cumarina.

Algunos derivados directos del ácido cinámico son, entre los más comunes, el ácido p-cumárico, el ác. cafeico, el ác. ferúlico y el ác. sinápico (Fig. 14) estos dos últimos son derivados metilados.



Las cumarinas son productos que encontramos en los vegetales derivados biogénicamente del ác. o-hidroxicinámico. Los sustituyentes mas comunes del anillo bencénico son oxhidrilos o metoxilos y se pueden encontrar libres o como glucósidos. La cumarina que es un derivado del fenilpropano, es la lactona del ácido cinámico. A partir del esqueleto de la cumarina y dependiendo de los radicales que se presenten en las diferentes posiciones de la molécula, puede existir una amplia variedad de compuestos derivados que se conocen genéricamente como cumarinas; por mencionar algunas tenemos a las isocumarinas, hidroxicumarinas, furocumarinas, etc. (Fig.1).

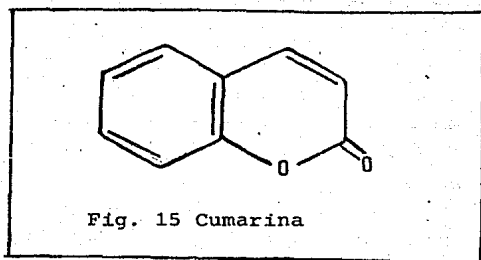


Fig. 15 Cumarina

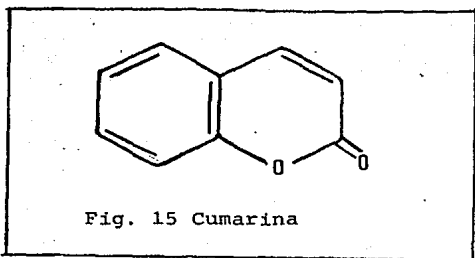
Las cumarinas y sus derivados se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, se han aislado de la raíz, corteza, flor, hojas y semillas de una gran cantidad de especies vegetales las cuales no sólo abarcan a las angiospermas y las gimnospermas, sino también a pteridofitas, por ejemplo: Polypodium hastatum.

A pesar de que la elucidación de las vías biosintéticas para este tipo de metabolitos secundarios no es muy clara, se han postulado teorías para la biosíntesis de algunos compuestos que forman parte del grupo de las cumarinas, y esto se ha logrado por medio de estudios con marcaje radioactivo.

Así, se ha demostrado en Melilotus alba que la cumarina se sintetiza a partir de la fenilalanina, teniendo como intermediario al ácido trans-cinámico.

De igual manera se ha demostrado en algunas gramíneas, compuestas y solanáceas, que la escopoletina también se sintetiza a partir de fenilalanina, teniendo como intermediarios, de manera secuencial, al ácido vinámico, ácido p-cumárico, ácido cafeico y al ácido ferúlico. (Davies, Giovanelli & Ap Rees 1964).

Algunas reacciones dentro de estas vías aún son motivo de controversia y se requiere de estudios más específicos para la verificación de estas reacciones hipotéticas.



Las cumarinas y sus derivados se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, se han aislado de la raíz, corteza, flor, hojas y semillas de una gran cantidad de especies vegetales las cuales no sólo abarcan a las angiospermas y las gimnospermas, sino también a pteridofitas, por ejemplo: Polypodium hastatum.

A pesar de que la elucidación de las vías biosintéticas para este tipo de metabolitos secundarios no es muy clara, se han postulado teorías para la biosíntesis de algunos compuestos que forman parte del grupo de las cumarinas, y esto se ha logrado por medio de estudios con marcaje radioactivo.

Así, se ha demostrado en Melilotus alba que la cumarina se sintetiza a partir de la fenilalanina, teniendo como intermediario al ácido trans-cinámico.

De igual manera se ha demostrado en algunas gramíneas, compuestas y solanáceas, que la escopoletina también se sintetiza a partir de fenilalanina, teniendo como intermediarios, de manera secuencial, al ácido vinámico, ácido p-cumárico, ácido cafeico y al ácido ferúlico. (Davies, Giovanelli & Ap Rees 1964).

Algunas reacciones dentro de estas vías aún son motivo de controversia y se requiere de estudios más específicos para la verificación de estas reacciones hipotéticas.

Para algunos de estos compuestos del grupo de las cumarinas se ha demostrado su actividad fisiológica en organismos varios, tanto vegetales como animales. Aparte de los efectos fisiológicos clásicos con respecto a la inhibición de la germinación, la inhibición del crecimiento del eje embrionario, etc.; existen en especial para la escopoeltina y su glucósido, la escopolina, efectos muy especiales sobre el metabolismo de las plantas, como es su acumulación en plantas enfermas, en plantas deficientes en boro y en plantas tratadas con 2,4-D lo cual nos lleva a pensar - que estos y otros productos, todos metabolitos secundarios, están involucrados en el metabolismo de las plantas de manera más profunda de lo que se cree y, por lo tanto, con la realización de estudios que traten de conocer más a fondo él o los efectos fisiológicos de estos metabolitos secundarios, se podrá, tal vez, dejar de considerarlos como productos de deshecho de las plantas.

UBICACION TAXONOMICA

DIVISION	Embryophyta
SUBDIVISION	Angiosperma
CLASE	Dicotyledonea
ORDEN	Tubiflorae
FAMILIA	Convolvulaceae
GENERO	<u>Ipomoea</u>
ESPECIE	<u>Ipomoea stans</u> Cav. I.C.

DESCRIPCION DE LA PLANTA

Ipomoea stans Cav.

Hierba ascendente, ramosa, vivaz provista de rizoma voluminoso, mide 40-80 cm de altura. Hojas alternas, cortamente pecioladas ovado-lanceoladas u oblanceoladas, irregularmente aserradas, con el ápice truncado, base subcordada, miden 3-5 cm de largo, por 1-2 cm de ancho, ásperas en ambas caras. Pedúnculos unifloros, blanco pilosos de 4-5 cm de largo, con dos brácteas papiráceas apicales. Sépalos desiguales, ovado-oblongos, de 6-8 mm de largo. Corola purpúrea, infundibiliforme, de 5-6 cm de largo.

MATERIAL Y METODOS

COLECTA

La planta, Ipomoea stans Cav., se colectó durante el mes de septiembre, época en la que presenta flores; el sitio de colecta se localiza aproximadamente en el km 57 de la carretera México-Tulancingo, en el estado de Hidalgo. Se encuentran agrupamientos de dos y tres plantas y los distintos conjuntos están separados unos de otros; junto a estas agrupaciones no se encuentra ninguna otra especie vegetal que pueda competir ecológicamente con nuestra planta (p. ej. arbustos y árboles).

La raíz que presenta es bastante grande, fibrosa y con muy pocas ramificaciones, en su interior presenta gran cantidad de líquido pegajoso, que no es látex; por otra parte la raíz presenta poca exudación.

Al coleccionar la planta se trató de obtener la raíz lo más completa posible y causándole el menor daño. El peso fresco total de la raíz fue de tres kg.

Preparación

Una vez colectada la raíz se procedió a cortarla en pedazos pequeños y se dejó secar a temperatura ambiente. Después los trozos se molieron en un molino manual hasta pulverizarlos.

METODOLOGIA QUIMICA

Extracción selectiva

La raíz se sometió a una extracción selectiva, por el método de Soxhlet, empleando disolventes de polaridad creciente (Fig. 16). Se utilizaron 483 g de raíz seca y molida. Esta cantidad de polvo de raíz se colocó a reflujó en un aparato de Soxhlet con hexano, durante 8 x 3 horas. El disolvente se eliminó del

EXTRACCION

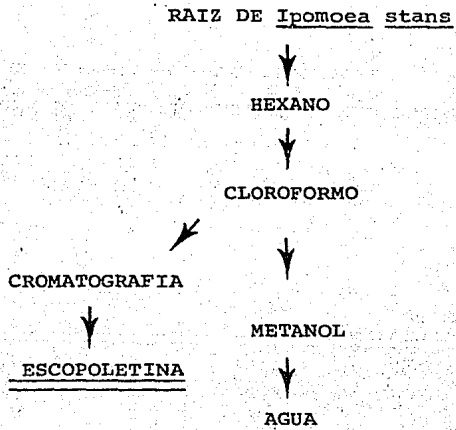


Fig. 16

DIAGRAMA DE EXTRACCION

extracto por destilación a presión reducida en un rotavapor y se obtuvieron 4.0023 g de un jarabe espeso.

Terminada la extracción hexánica se colocó nuevamente el polvo de la raíz a reflujo con cloroformo durante el mismo tiempo. El extracto clorofórmico se evaporó a sequedad y se obtuvo un rendimiento de 3.9390 g de extracto seco. Posteriormente se continuó con la extracción utilizando disolventes más polares.

Purificación del extracto clorofórmico.

- Cromatografía en placa fina

Para determinar el número de sustancias que tiene este extracto se realizó una cromatografía en capa fina de gel de sílice Merck 60F₂₅₄, empleando como eluyentes hexano:acetato de etilo en proporción 6:4. La placa, una vez seca, se observó a la luz ultravioleta de onda larga y se reveló después con sulfato cérico. Se separaron tres manchas, una de ellas grande e intensa y las otras dos pequeñas.

- Cromatografía en columna

Del extracto se intentó separar la sustancia principal por cristalización, lo cual no fué posible, por lo que se procedió a hacerlo por cromatografía en columna, utilizándose 0.4474 g del extracto se montó una columna de gel de sílice en proporción 1:80, suspendida en hexano, los disolventes utilizados como eluyentes fueron n-hexano y acetato de etilo, principiando con n-hexano puro y continuando con mezclas de acetato de etilo, en diferentes proporciones, desde 9:1 hasta 6:4 (n-hexano:acetato de etilo).

De esta columna se eluyeron fracciones de 25 ml cada una y se llevó control de las sustancias eluidas por cromatografía en

placa fina. El producto correspondiente a la mancha principal se eluyó con la proporción n-hexano:acetato de etilo 6:4. Se obtuvieron 40mg de una sustancia cristalina, de color amarillo pálido, cuyo punto de fusión es de 205-206°C. Esta sustancia se caracterizó posteriormente por medio de espectrofotometría de infrarrojo y de luz ultravioleta, espectrometría de masas y por resonancia magnética nuclear.

METODOLOGIA BIOLÓGICA

Se sabe por antecedentes que las cumarinas y algunos de sus derivados son inhibidores de la germinación de semillas varias. Por lo tanto, se llevaron a cabo bioensayos para caracterizar su actividad biológica como inhibidor de la germinación de semillas o del desarrollo de plántulas jóvenes.

Para realizar estos bioensayos se escogieron tres especies de gramíneas: Cebada Hordeum vulgare; Trigo Triticum aestivale y Avena Avena sativa.

Estas semillas se elijieron, tanto por su facilidad de manejo como por su rápida y uniforme germinación así como por su alta viabilidad. Las semillas se obtuvieron directamente del almacén receptor de la cosecha y por lo tanto no estaban tratadas con ningún agente fungicida o insecticida que pudiese interferir con la acción de nuestra sustancia. Los lotes de las tres especies proceden de la cosecha 1980-81.

Los bioensayos se diseñaron de la siguiente manera: Antes de probar la acción de nuestra sustancia se evaluó la germinación de cada especie de semillas, de acuerdo al Manual para el Análisis de Semillas de PRONASE 1976, el cual indica el porcentaje de germinación óptimo para semillas de alto rendimiento, una

vez evaluada la germinación se probó la capacidad inhibitoria de nuestra substancia. Para esto se utilizaron soluciones de escopoletina con las siguientes concentraciones: 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M y 10^{-2} M. Cada concentración se probó en cien semillas con cuatro repeticiones y un control sólo con agua destilada.

Las semillas a tratar se lavaron previamente con Cloralex al 10% durante diez minutos, con agitación constante; posteriormente se lavaron con agua destilada tres veces y luego se pusieron a secar haciéndoles pasar una corriente de aire frío.

Se esterilizaron cajas de Petri con papel filtro Whatman - # 2, en las cuales se colocaron 20 semillas por caja y se añadieron 7 ml de solución de escopoletina o de agua destilada, según el caso.

Tanto las semillas que fueron sujetas a experimentación como los controles se mantuvieron a 20° C y bajo luz difusa, que son las condiciones ideales recomendadas para la germinación de estas tres especies de semillas.

Las mediciones se hicieron en dos etapas, de acuerdo a lo recomendado por el manual para el análisis de semillas PRONASE.

Los tiempos de medición para cada especie fueron:

Avena, cinco y diez días

Cebada, cuatro y siete días

Trigo, cuatro y ocho días

Las semillas germinadas al término de la primera etapa ya no se tomaron en cuenta para la segunda.

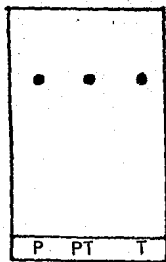
RESULTADOS Y DISCUSION

Parte química

Como el objetivo principal de nuestro trabajo fué la búsqueda de reguladores del crecimiento, dentro del estudio químico - sistemático de la raíz de I. stans elegimos el extracto clorofórmico para su análisis, ya que la polaridad de un buen número de - productos de este grupo se presta para que puedan extraerse con - este disolvente.

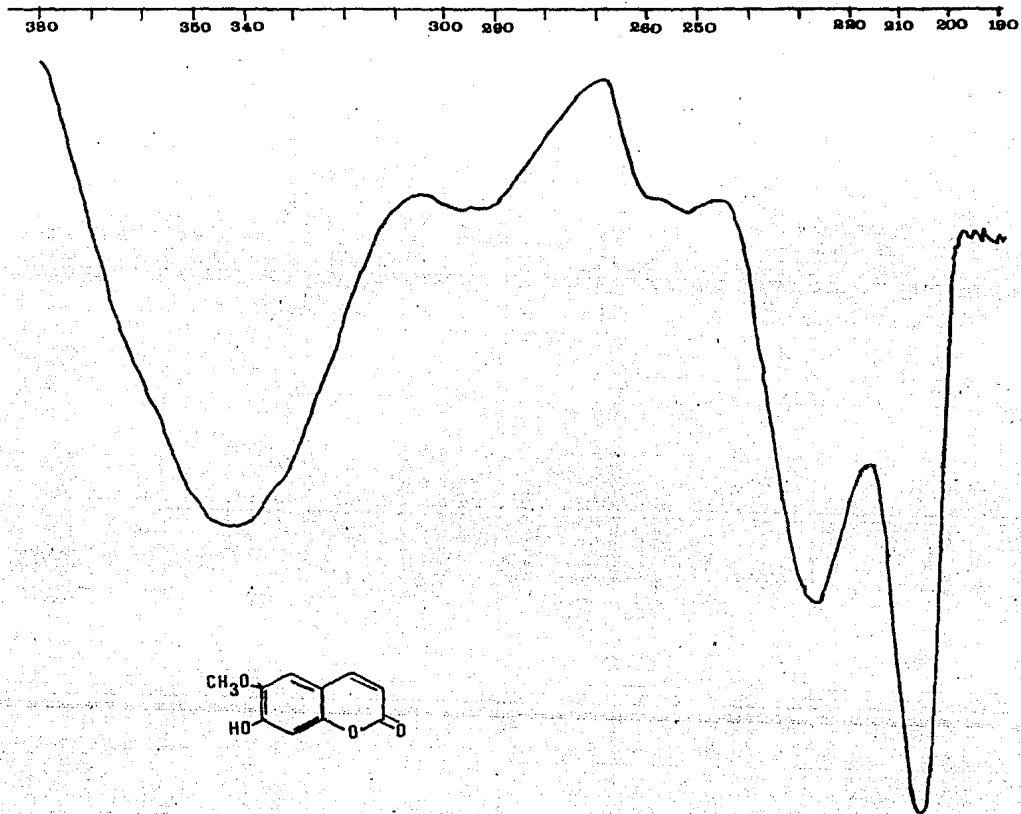
De la cromatografía del extracto clorofórmico logramos separar un producto cristalino, amarillo pálido, de punto de fusión - 206-207° C, con un rendimiento de 0.01%. Su identificación se lo-- gró por análisis espectrométrico en el ultravioleta (Fig. 18), el infrarrojo (Fig. 19), de resonancia magnética nuclear (Fig. 20) y de masas (Fig. 21); y su identidad se confirmó por punto de fu--- sión mixto con una muestra de escopoletina comercial y por cromatografía en placa delgada, corrida contra la misma muestra.

En el punto de fusión no hubo abatimiento de temperatura y en la cromatografía se obtuvo una mancha con un Rf igual, tanto para el problema, como para el testigo y para la mezcla de ambos (Fig. 17).

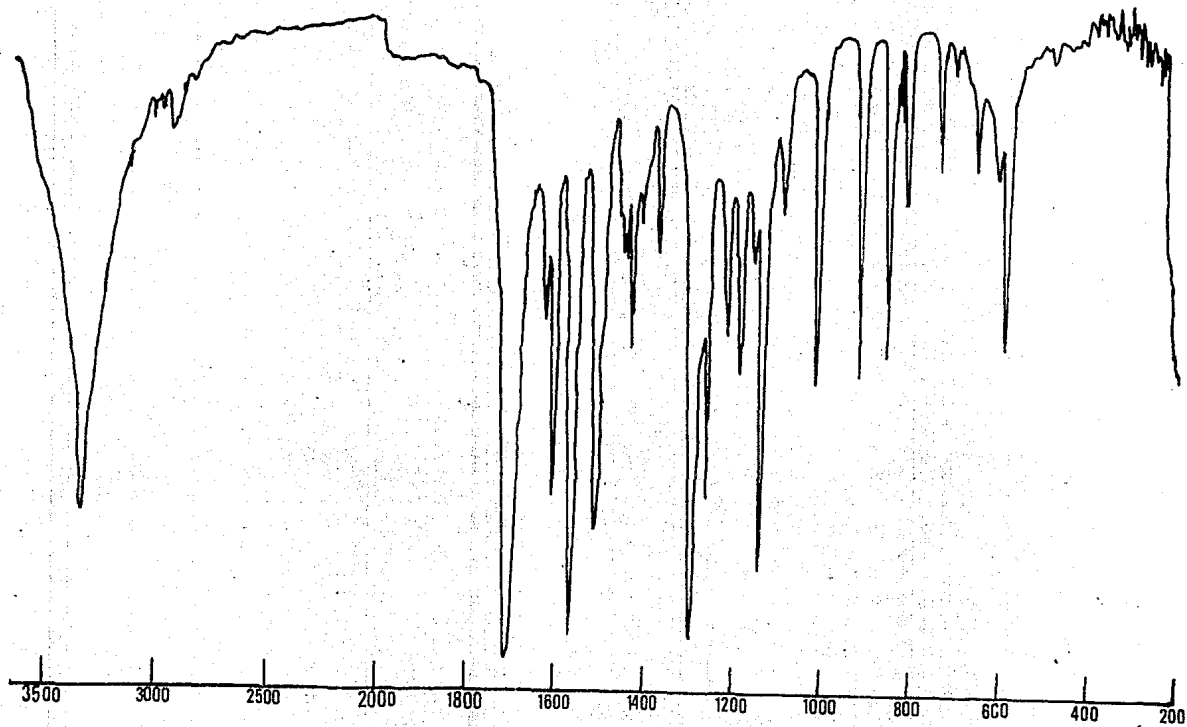
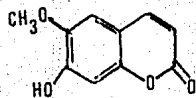


P = Problema
PT = Problema y Testigo
T = Testigo

Fig. 17



Espectro de Ultravioleta para la escopoletina



Espectro de Infrarrojo para la escopoletina

CM^{-1}

ANALISIS DE LOS ESPECTROS DEL PRODUCTO OBTENIDO

Espectro en el Ultravioleta

Los máximos que presenta y sus extinciones moleculares concuerdan con los reportados para este producto (Tabla 1), (Index Merck, 1976).

máx.	\log_e
228	4.01
254	3.54
295	3.52
345	3.95

Tabla 1

Espectro en el Infrarrojo

máx.	
3340	-OH
1710	C=O
1610	
1290	-O-
1140	CH ₃ -O-
780	C-H vinílico en 4
600	C-H vinílico en 3

Espectro de Resonancia Magnética Nuclear

Se observan protones en:

3.9 ppm, señal sencilla que integra para 3 H de un grupo



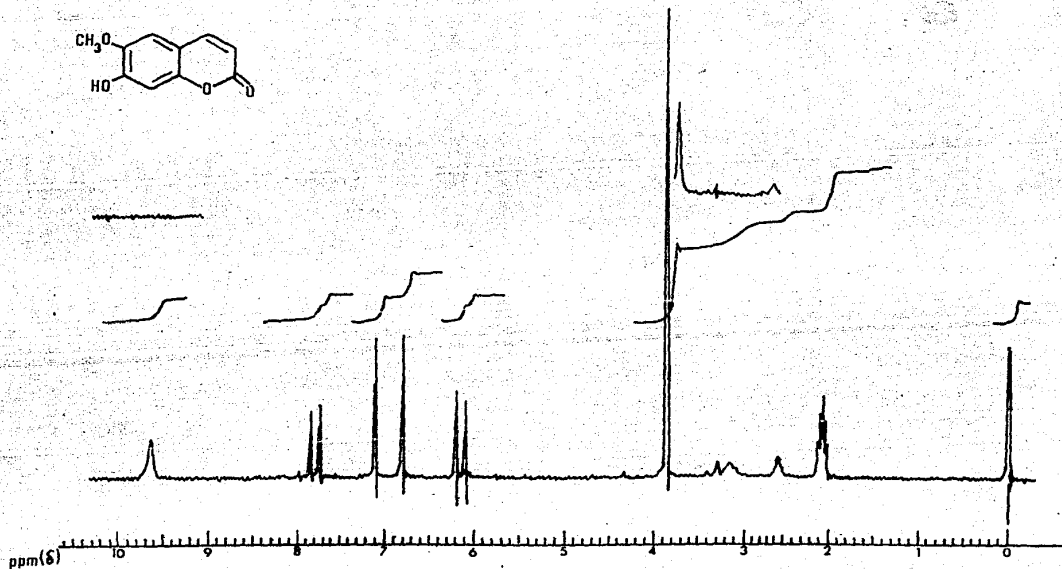
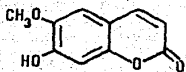
6.14 y 7.8 ppm, dos señales dobles que integran para 1 H c/u, correspondientes a los protones vinílicos en 4 y 3, respectivamente, acoplados con una constante $J=6$ Hz.

6.8 y 7.11 ppm, una señal doble que integra para 2 H, correspondiente a los protones aromáticos en las posiciones 5 y 8

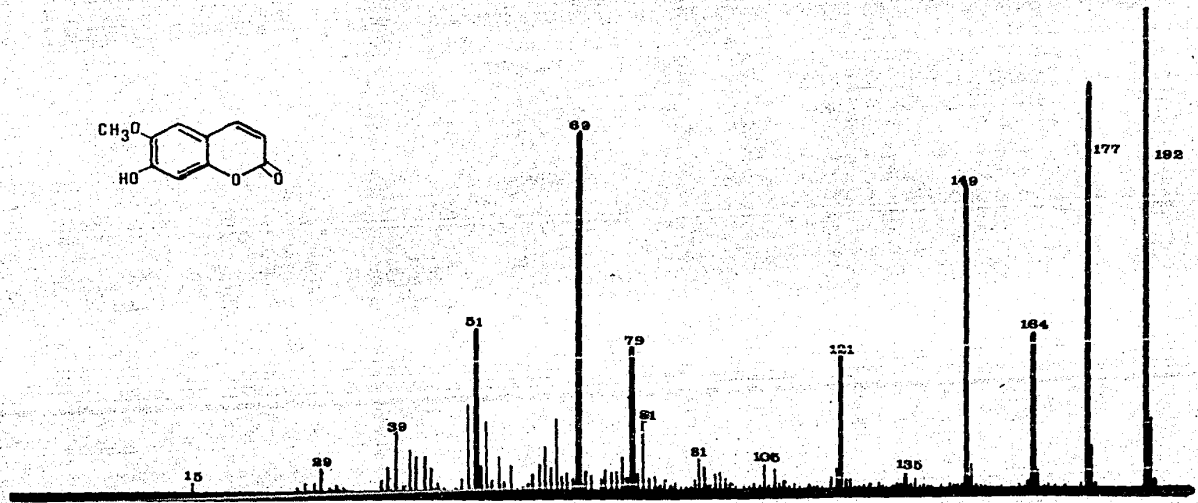
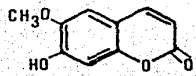
9.63 ppm, una señal sencilla que integra para 1 H, correspondiente al protón del grupo OH y que desaparece por intercambio con deuterio.

Espectro de masas

La fragmentación está de acuerdo para este tipo de compuesto y el ión molecular, $M^+ = 192$, se corresponde con el peso molecular de la escopoletina.

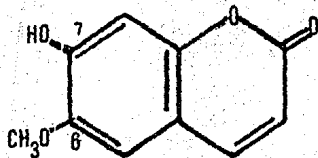


Espectro de RMN para la escopoletina



Espectro de Masas para la escopoletina

ESCOPOLETINA



CONSTANTES DE LA ESCOPOLETINA

P. f. _____ 205°-206°C

U. V.	máx.	log.e
228		4.01
254		3.54
295		3.52
345		3.95

Parte biológica

La mayoría de las cumarinas reducidas, especialmente las furanocumarinas, tienen cierta actividad biológica. Por lo tanto el diseño del bioensayo se dirigió a evaluar la actividad de la escopoletina aislada de I. stans.

Como se puede observar en las tablas 2, 3 y 4 no provoca la inhibición de la germinación, sino que inhibe la elongación radicular; por otro lado, la producción de raíces adventicias también se ve afectada por la presencia de la escopoletina disminuyendo el número de raíces de tres a cinco en la plántula normal, hasta la presencia de sólo la raíz principal en las plántulas sujetas a experimentación.

Esta inhibición es proporcional a la concentración, aumentando el efecto inhibitorio conforme aumenta la concentración. Esto se observa claramente en la gráfica para la avena, (Fig. 22) en la que a partir de la concentración 10^{-6} M hasta la concentración 10^{-2} M disminuye gradualmente el tamaño de las raíces. En el caso de la cebada (Fig. 23) y el trigo (Fig. 24) la disminución no es gradual. Para el trigo hay aumento en el crecimiento radicular a la concentración de 10^{-5} M, disminuyendo paulatinamente a la 10^{-4} M y rápidamente a las concentraciones de 10^{-3} M y 10^{-2} M.

Para la cebada se presenta también un aumento a la concentración de 10^{-5} M, en 10^{-4} M éste se incrementa ligeramente para luego disminuir en forma menos marcada que en el caso anterior.

El análisis estadístico de las pruebas biológicas se realizó mediante la prueba de F. Los resultados se presentan en las tablas 2, 3 y 4 los cuales fueron satisfactorios.

La irregularidad en la inhibición del crecimiento radicular

puede explicarse si recordamos que los reguladores del crecimiento de las plantas tienen concentraciones óptimas para lograr sus efectos, en este caso nuestro compuesto aunque no es reconocido como regulador vegetal primario, presenta una concentración umbral, igual que los fitorreguladores primarios, a partir de la cual su efecto se incrementa al aumentar la concentración como sucede, por ejemplo, con el ácido abscísico.

Ahora bien, con respecto al resultado obtenido en las concentraciones 10^{-5} M y 10^{-4} M para la cebada y 10^{-5} M para el trigo, se ha reportado que a ciertas concentraciones la escopoletina puede estimular o inhibir la actividad de la AIAoxidasa (Imbert et al. 1970). Así se puede postular que la AIAoxidasa se vio inhibida para ejercer su actividad por las concentraciones 10^{-4} M y 10^{-5} M, y 10^{-5} M en la cebada y el trigo respectivamente, por lo que no se degradó tan rápidamente el AIA y esto provocó un crecimiento mayor que en los demás lotes experimentales, pero siempre menor que en los lotes control. Al utilizar concentraciones mayores el efecto inhibitorio del crecimiento se logra, pero por un mecanismo diferente, debido a la acción directa de la escopoletina. Este efecto se puede lograr por la disminución de la división celular en las células del ápice de la raíz. Que es, al menos, la acción más reconocida para esta sustancia (Einhelling, F. & Rice, E. 1970).

La sustancia aislada por nuestro método fué la 7-hidroxi-6 metoxicumarina, producto que se conoce también como escopoletina, ésta fué identificada plenamente por espectroscopía y comparación con muestra comercial.

Esta sustancia en el extracto clorofórmico se separa casi

pura, es importante señalar lo anterior ya que en la mayoría de las técnicas de extracción siempre se ha aislado más fácilmente el glucósido de la escopoletina, la escopolina.

Con respecto a la actividad biológica de nuestra sustancia los resultados concuerdan con lo reportado en trabajos anteriores con otras plantas, por ejemplo Phleum pratense, tabaco y girasol (Einhelling et. al. 1970), con una concentración umbral de 10^{-4} M, sin embargo, a concentraciones menores a esta el crecimiento fué menor y esto también concuerda con trabajos reportados (Einhelling, F. et. al. 1970).

Por otro lado la escopoletina y otros compuestos fenólicos se encuentran en cantidades representativas en las raíces de especies de difícil enraizamiento (Méndez, J. et. al. 1968). Sin embargo, la planta de la que extrajimos nuestra sustancia presenta un crecimiento radicular muy grande, esto aunque parece controversial pudiese no serlo, ya que tal vez la concentración inhibitoria óptima para nuestra planta no se encuentra dentro de ésta.

La escopoletina aparte, ha sido reportada como posible alelopático (Borneer, H. 1960), en este caso entonces, la escopoletina producida por I. stans podría ser expulsada al suelo con el exudado de la raíz y con esto evitar la germinación de las semillas que comparten su habitat.

Por lo tanto, en una estimación preliminar y correlacionando la observación hecha en el campo con respecto a la falla de crecimiento de las plantas vecinas y con la presencia de exudado de la raíz, podría darle a esta planta un posible potencial alelopático.

CONCLUSIONES

- 1.- Del extracto clorofórmico de la raíz de Ipomoea stans se aisló un producto cristalino que se caracterizó - como escopoletina (7-hidroxi 6-metoxicumarina).
- 2.- Se comprobó su actividad inhibitoria del crecimiento radicular con semillas de avena, trigo y cebada.
- 3.- Se propone que la escopoletina confiera un posible potencial alelopático a la raíz.

. c . 10^{-6} . 10^{-5} . 10^{-4} . 10^{-3} . 10^{-2}

I	7.86	6.22	6.97	6.21	4.6	2.24
II	7.13	6.05	7.39	6.3	4.4	2.32
III	7.11	6.29	7.05	6.95	4.9	2.4
IV	6.77	6.2	6.93	6.72	4.95	2.44

TRIGO

F. V.	G. L.	S. C.	Var.	F
Trat.	5	29.4	5.88	2.69
Error	18	40.1	2.22	
Total	23	69.5		

Significativo al 90%

TABLA 2

	C	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
I	5.45	4.24	3.85	3.85	3.06	2.01
II	5.47	4.16	3.46	3.76	3.2	2.16
III	4.96	4.44	3.53	4.22	3.33	1.92
IV	7.69	4.49	3.44	4.07	3.56	2.33

AVENA

F. V.	G. L.	S. C.	Var.	F
Trat.	5	31.43	6.28	23.25
Error	18	5.03	0.27	
Total	23	36.43		

Significativo al 95%

TABLA 5

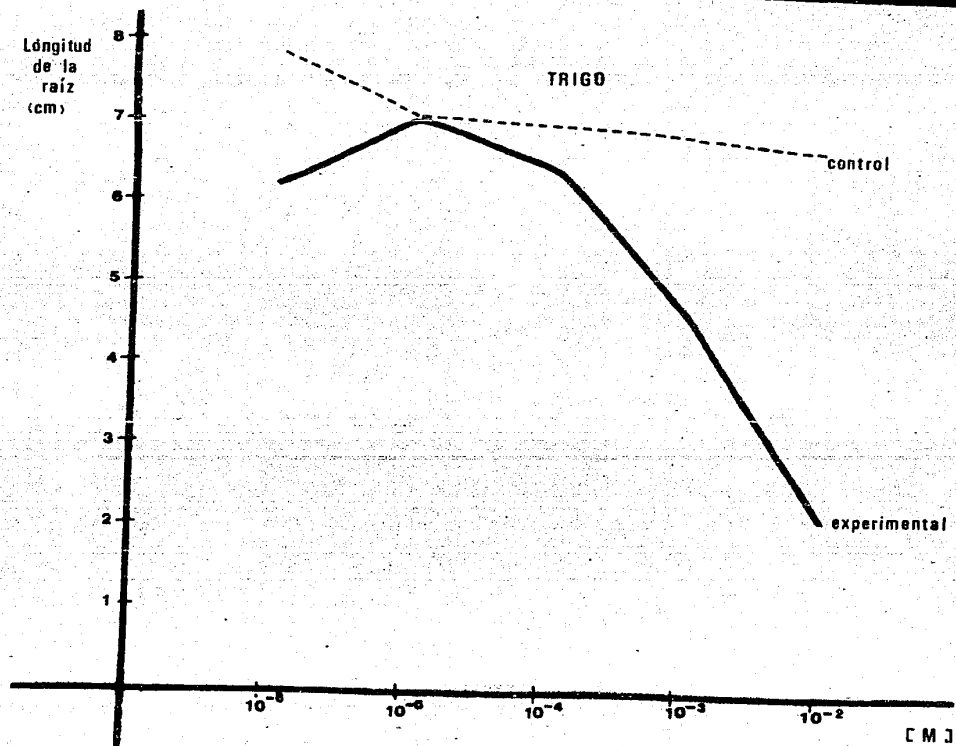
	C	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
I	6.38	3.54	4.92	5	3.64	2.72
II	5.66	3.62	4.55	5.3	3.21	2.94
III	6.24	3.95	4.66	5.51	3.68	3.25
IV	5.13	3.96	4.65	5.22	3.41	2.92

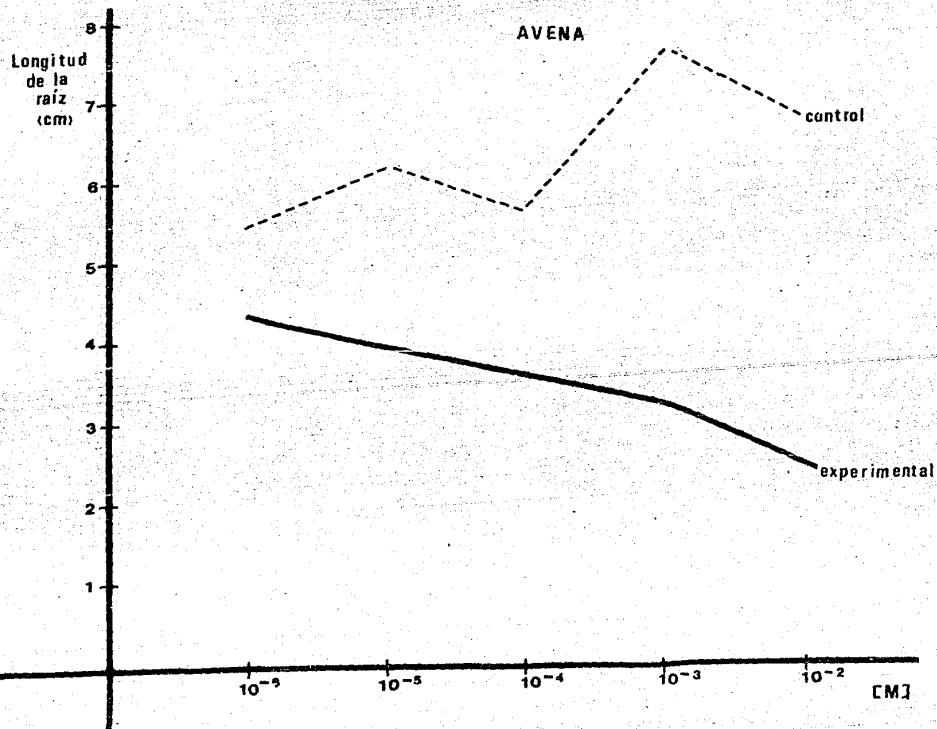
CEBADA

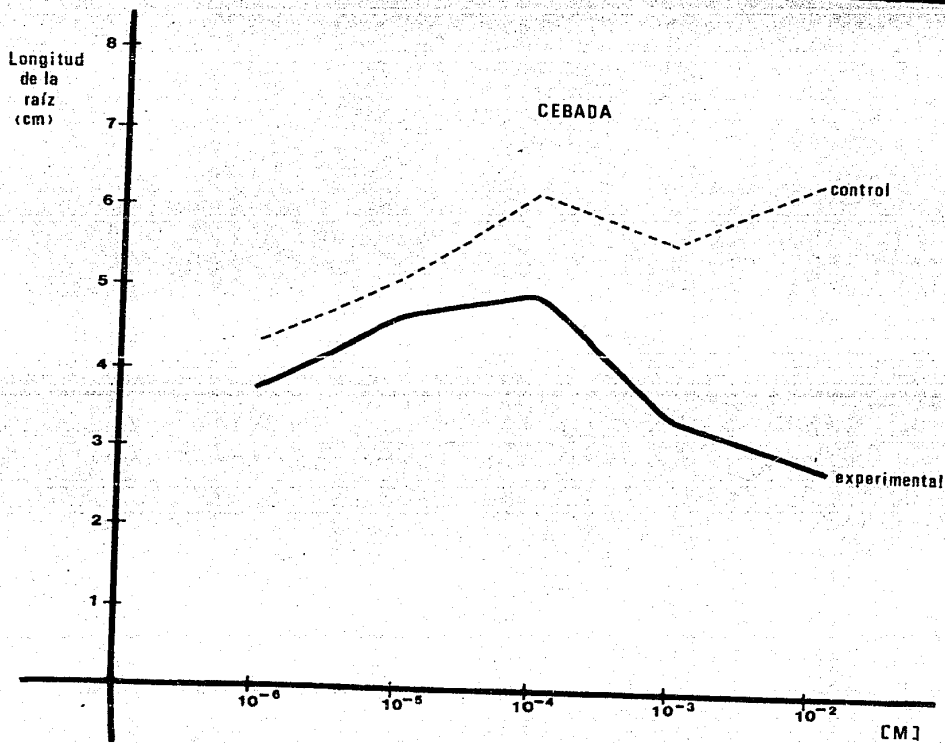
F. V.	G. L.	S. C.	Var.	F
Trat.	5	24.9	4.98	103.75
Error	18	1.63	0.09	
Total	23	26.53		

Significativo al 95%

TABLA 4







BIBLIOGRAFIA

1. Andreae, W.A. 1952 Effects of scopoletin on IAA metabolism Nature 170:83
2. Avers, Charlotte J. Goodwin, Richard H. 1956 Studies on roots IV. Effects of coumarin and scopoletin on the standard root growth pattern of Phleum pratense Amer. Jour. Bot. 43(8): 612-620
3. Barua, Nabin C. Sharma, Ram P. 1980 Coumarins in Artemisia caruifolia Phytochem. 6: 2217-2218
4. Baskin, J.M. Ludlow, C.J. Harris, T.M. Wolf, F.T. 1967 Psoralen an inhibitor in the seeds of Psoralea subcaulis Phytochem. 6: 1209-1213
5. Bate-Smith. 1958 Plant phenolics as taxonomic guides Proc. Linn. Soc. 169: 198-211
6. Berrie, A.M. Parker, W. Knights, B.A. Hendrie, M.R. 1968 Studies on lettuce seed germination - I. Coumarin induced dormancy Phytochem. 7: 567-572
7. Bohm, B.A. Towers, G.H.N. 1962 A study of phenolic compounds in Impatiens Can. Jour. Bot. 40: 677-683
8. Ciaceri 1973 Chromatographic identification of coumarin derivatives in Menyanthes trifoliata L. Fitoterapia 43: 134-138
9. Clarke 1973 The accumulation of scopolin in potato tissue in response to infection Physiol. Plant Pathol. 3: 347-358

10. Cooper, R. Levy, E.C. Lavie, D. 1977 Novel germination inhibitors from Aegilops ovata Chem. Commun. 11: 792-795
11. Davies, D.D. Giovanelli, J. Ap Rees, T. Plant Biochemistry III. Ed. W.O. James. Blackwell Sci. Pub. Oxford 1964 pp. 397-409
12. Dean, F.M. Costa, A.M. Harborne, J.B. Smith, D.M. 1978 Chemosystematics of the Polemoniaceae. Part 3: Leptodactylone, a yellow coumarin from Leptodactylon and Linanthus species Phytochem. 17: 505-510
13. Domínguez, X.A. Canó, R. 1979 Chemical study on the roots and barks of Diospyros texana, D. ebenastery y D. palmieri Rev. Lat. Quím 10: 92-94
14. Eberhardt F. 1956 Ausscheidung einer organischen Verbindung aus den Wurzeln des Hafers (A. sativa) Naturwiss 41 (11): 251
15. Einhellig, F.A. Kuan, Li-Ying 1971 Effects of scopolin and chlorogenic acid on stomatal aperture in tobacco and sunflower. Bull. Torrey Botan. Club 98: 155-162
16. Einhellig, F.A. Rice, E.L. Risser, P.G. Wender, S.R. 1970 Effects of scopolin, scopolin and chlorogenic acid in tobacco, sunflower and pigweed Bull. Torrey Botan. Club 97: 22-33

17. Fay, P.K. 1975 Potential of scopoletin, a biotic root exudate of oat Avena sativa L. for biological weed control Diss. Abstr. Int. B. 36 (2): 525
18. Fay, P.K. Duke, W.B. 1977 An assesment of allelopathic potential in Avena germ plasm Weed Sci. 25 (3): 224-228
19. Figueredo, Rita de Cassia L. 1975 Preliminary study on germination and the occurrence of coumarin derivatives in the achenes of Eupatorium pauciflorum H.B.K. Compositae Hoehnea 5: 47-57
20. Fritig, B. Hirth, L. Ourisson, G. 1970 Biosynthesis of the coumarins: scopoletin formation in tobacco tissue cultures Phytochem. 9: 1963-1975
21. Goodwin, R.H. Kavanaugh, E. 1949 The isolation of scopoletin, a blue-fluorescing compound from oat roots Bull. Torrey Botan. Club 76: 255-265
22. Goodwin, R.H. Pollock, F. 1954 Stuides on roots I: Properties and distribution of fluorescent constituents in avena roots Amer. Jour. Bot. 41: 516-520
23. Goodwin, R.H. Taves, C. 1950 The effect of coumarin derivatives on the growth of avena roots Amer. Jour. Bot. 37: 224-231
24. Gray, A.I. Waterman, P.G. 1978 Coumarins in the Ruta-ceae Phytochem. 17: 845-864

25. Gray, R. Bonner, J. 1948 An inhibitor of plant growth from the leaves of Encelia farinosa Am. Jour. Bot. 34: 52-57
26. Gross, D. 1975 Growth regulating substances of plant origin Phytochem. 14: 2105-2112
27. Hanower, P. Brzozowska-Hanower, K. 1970 Phenolic compounds from the latex of Hevea brasiliensis aglycons Phytochem. 18: 686-687
28. Hashimoto, T. Hasegawa, K. Yamaguchi, H. Saito, M. Ishimoto, S. 1974 Structure and synthesis of batatasins, dormancy inducing substances of yam bulbils Phytochem. 13: 2849-2852
29. Imbert Maura, P. Wilson Lawrence, A. 1970 Stimulatory and inhibitory effects of scopoletin on IAAoxidase preparations from sweet potato Phytochem. 9: 1787-1794
30. Jarboe, C. 1967 Scopoletin as antispasmodic component of Viburnum opulus J. Med. Chem. 10: 488-489
31. Kajimami, S. 1971 Inhibition of glucose 6-Phosphate dehydrogenase from tobacco tissue culture by scopolin and scopoletin Phytochem. 10: 1501-1503
32. Kefeli, V.I. Kadyrov. C.S. 1971 Natural growth inhibitors, their chemical and physiological properties Ann. Rev. Plant Physiol. 22: 185-196

33. Kimura, M.W. William, P.P. 1980 7 hydroxi, 6-metoxi coumarin Cryst. Struct. Commun. 9: 257-261
34. Kosawa, M. Baba, K. Matsuyama, Y. Hata, K. 1980 Studies on coumarins from the roots of Angelica pubescens Maxim. III. Structures of various coumarins including angelin a new prenyl coumarin Chem. Pharm. Bull. 28: 1782-1787
35. Layton, L.L. Green, T.W. Panzani, R. 1972 Scopoletin, a new atmospheric contaminant from plant decomposition J. Occup. Med. 14: 766-768
36. Libbert, E. Lubke, H. 1959 Physiologische Wirkungen des Scopoletins I. Mitteilung, Der Einfluss des Scopoletins auf die Samenkeimung Flora 145 (3/4): 256-263
37. Libbert, E. Lubke, H. 1959 Physiologische Wirkungen des Scopoletins II. Mitteilung, Der Einfluss des Scopoletins auf das Wurzelwachstum Flora 146 (1/2): 228-239
38. Libbert, E. Lubke, H. 1959 Physiologische Wirkungen des Scopoletins III. Mitteilung, Scopoletins und Korrelative Knospenhemmung Flora 146 (4): 579-585
39. Loewenberg, J.R. 1970 Observations on scopoletin and scopolin metabolism Phytochem. 9: 361-366
40. Lohdi, M.A.K. 1978 Allelopathic effects of decaying litter of dominant trees and their associated soil in a lowland forest community Amer.

Jour. Bot. 65: 340-344

41. Mears, J.A. 1973 Flavonols of *Parthenium*, section *Bolophytum* Phytochem. 12: 2265-2268
42. Méndez, J. 1980 Latifolone in *Thapsia villosa* roots Phytochem. 19: 1557-1558
43. Méndez, J. Gesto, M.V. Vázquez, A. Veitez, A. Seoane, E. 1968 Growth substances isolated from woody cuttings of *Alnus glutinosa* and *Fraxinus excelsior* Phytochem. 7: 575-579
44. Miller, R.W. Siroirs, J.C. 1975 Reaction of coumarins with horseradish peroxidase Plant Physiol. 55: 35-41
45. Mothes, K. Kala, H. 1956 Die Wurzel als Bildungssta-
te für Cumarine Naturwiss 42 (6): 159
46. Nicholas, H.J. Miscellaneous volatile plant products
in Phytochemistry edited by Miller, E.P.
Ed. Van Nostrand Reinhold Co. 1973 pp. 386-
399
47. Panzani, R. Layton, L.L. Corse, J.W. 1973 Negative
cutaneous tests to scopoletin, an atmospheric
contaminant derived from plant decompo-
sition Folia Alergol. 20: 21-27
48. Pollock, B.M. Goodwin, R.H. Greene, S. 1954 Studies
on roots II. Effects of coumarin, scopoletin
and other substances on growth Am. Jour.
Bot. 41: 521-529

49. Reigh, D.L. Wender, S. Smith, E.C. 1975 Scopoletin. Kinetic nature of isoperoxidase A3 catalyzed oxidation and its possible relation to the physiological action of this naturally occurring growth effector. *Physiol. Plant*, 34: 44-46
50. Salisbury, F.B. Ross, C.W. Plant Physiology Ed. Wadsworth Pub. Co. 1978 pp. 240-271
51. Sargent, J.A. Skoog, F. 1960 Effects of IAA and kinetin on scopoletin-scopolin levels in relation to growth of tobacco tissue in vitro. *Plant Physiol.* 35: 934-941
52. Shoeb, A. Kapil, R. Popli, S. 1973 Coumarins and alkaloids of Aegle marmelos. *Phytochem.* 12: 2071-2072
53. Siros? J.C. Miller, R.W. 1972 Mechanism of scopoletin induced inhibition of the peroxidase-catalyzed degradation of IAA. *Plant Physiol.* 49: 1012-1018
54. Skoog, F. Montaldi, E. 1961 Auxin-kinetin interaction regulating the scopoletin scopolin levels in tobacco tissue cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 47: 36-49
55. Swain, T. 1977 Secondary compounds as protective agents. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28: 479-501
56. Veldstra, H. Havinga, E. 1945 On the physiological activity of unsaturated lactones. *Enzymologia* 11: 373-380

57. Wang, T.S.C. Yang, T.K. Chang, T.T: 1967 Soil phenolic acids as plant growth inhibitors
Soil Sci: 103: 239-246
58. Worsham, A.D. Klingman, G.C. Moreland, D.E. 1962
Promotion of germination of Stiga asiatica
seeds by coumarin derivatives and effects
on seedling development Nature 195: 199-201