

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

206

FACULTAD DE CIENCIAS

"Potencial aleloquímico de Sebastiania adenophora (Euphorbiaceae)"

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 :

Fernando Varela Hernández

Director de tesis
Dra. Ana Luisa Anaya Lang

2003

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**TESIS CON
FALLA DE
ORIGEN**



SECRETARÍA NACIONAL
DE EDUCACIÓN PÚBLICA
MEXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Potencial aleloquímico de *Sebastiania adenophora* (Euphorbiaceae)"

realizado por Fernando Varela Hernández

con número de cuenta 8825390-7, quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Director de Tesis
Propietario

Dra. Ana Luisa Anaya Lang

Propietario

Dr. Manuel Jimenez Estrada

Propietario

Dra. Maria del Rocio Cruz Ortega

Suplente

Biól. Aurora Saucedo García

Suplente

Biól. César Abarca García

**FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M.**

Consejo Departamental de Biología

M. enC. Juan Manuel Rodríguez Chávez



**DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA**

Agradecimientos:

Deseo agradecer a todos aquellos que de alguna manera me ayudaron a realizar este trabajo. Fundamentalmente, a mi mamá Lucha, que sin ella no estaría tal vez en la Universidad, a mis hermanos Yazmín, Sergio y Gabriel que han mostrado siempre su afecto y paciencia hacia mí, y a mi novia Vero, que siempre, incondicionalmente, ha estado conmigo en las buenas y en las malas.

A la Dra. Anaya le agradezco haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y sobre todo de estar siempre pendiente de mis actividades y haberme guiado con toda su experiencia y conocimientos hasta el final de este trabajo.

Gracias al Dr. Jiménez por su disponibilidad y su gran ayuda en la parte química del trabajo.

A la Dra. Rocío le agradezco su muy buena voluntad de ayudarme en cualquier momento para resolver mis dudas.

Quiero darle las gracias a Blanca, pieza clave para mí, ya que me enseñó todas las técnicas necesarias y siempre de buen humor.

A Aurora, Tere, Toni y José por su ayuda cada vez que necesitaba algo y por haber hecho del laboratorio un lugar agradable.

ÍNDICE

I. Introducción	1
Interacciones bióticas	1
Metabolitos secundarios (MS) y metabolitos primarios (MP)	4
Origen de los metabolitos secundarios	5
Clasificación de los metabolitos secundarios según su origen biosintético	5
Clasificación ecológica de los MS	9
Alelopatía	12
Breve historia de la alelopatía	12
Formas de liberación y modos de acción de los aleloquímicos	14
Importancia del estudio de la alelopatía	16
La familia Euphorbiaceae	17
El género <i>Sebastiania</i>	17
<i>Sebastiania adenophora</i>	18
Antecedentes del estudio	18
II. Objetivos	20
Objetivo general	20
Objetivo particular	20
III. Materiales y métodos	20
IV. Resultados	26
V. Discusión	41
VI. Bibliografía	44

I.-Introducción

Interacciones bióticas

El hecho de vivir en una comunidad trae como consecuencia que los organismos establezcan relaciones mutuas entre ellos, que se traducen en todo tipo de efectos directos e indirectos de unos sobre otros. Estas interacciones pueden cambiar según las condiciones del medio, las estaciones del año o las etapas del ciclo de vida de los organismos involucrados en ellas, por ejemplo, el parasitismo puede convertirse en comensalismo y este en neutralismo. Las interacciones bióticas pueden ser favorables para el crecimiento, sobrevivencia y reproducción, otras son desfavorables, y otras no tienen ningún efecto (Odum, 1986) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación general del abanico de relaciones que se establecen entre los organismos (tomado de Odum, 1986).

Tipos de interacciones	Especie 1	Especie 2	Naturaleza de la Interacción
Neutralismo	0	0	No se afectan entre sí
Competencia (lucha directa en el uso de recursos)	-	-	Inhibición directa o indirecta de cada especie por la otra.
Amensalismo	-	0	Especie 1 inhibida. Especie 2 no afectada
Parasitismo	+	-	Especie 1 (parásito) beneficiada por la especie 2
Depredación (incluida la herbivoría)	+	-	Especie 1 (depredador) beneficiada por la especie 2
Comensalismo	+	0	Especie 1 (comensal) se beneficia. Especie 2 (hospedero) no se afecta.
Protocooperación	+	+	Interacción favorable para ambas especies, no obligatoria
Mutualismo o Simbiosis	+	+	Interacción favorable para ambas especies y obligatoria

Los símbolos indicados en esta tabla como +, - y 0 se refieren al efecto (benéfico, negativo o neutro respectivamente) que reciben las especies como consecuencia de la relación con otra especie. Así, se tiene que la competencia es la

lucha entre dos especies por un recurso limitado; esta interacción afecta negativamente las tasas de crecimiento poblacional de ambas especies (Krebs, 1985). Un ejemplo de esta, se refiere al alce y la liebre americana que se alimentan de los mismos arbustos cuando el alimento es escaso en invierno (Barbour, 1987).

En el comensalismo una población es beneficiada y la otra resulta no afectada (Stiling, 1996). Un ejemplo de comensalismo es el crecimiento de algunas plantas epífitas tales como las orquídeas, bromelias, musgos, helechos y cactus, sobre otras plantas arbóreas. En la mayor parte de los casos las epífitas no obtienen nutrientes del hospedero, usan a este último solo como lugar físico de anclaje y el agua la obtienen de la humedad del aire (Barbour, 1987). Ocasionalmente se presenta el caso contrario durante una interacción entre dos organismos. Una de las especies resulta perjudicada mientras la otra no se ve afectada. Por ejemplo, algunos hongos o actinomicetos del suelo producen antibióticos que pueden afectar el desarrollo de otros organismos de la comunidad sin que esta beneficie al productor del antibiótico (Mackenzie *et al*, 1998).

El mutualismo es una relación recíproca positiva entre dos organismos de diferente especie, que resulta en un incremento de la aptitud de ambos. El mutualismo puede ser simbiótico, de tal manera que los organismos viven asociados íntima y obligadamente (Mackenzie *et al*, 1998). Un ejemplo de simbiosis lo constituyen los líquenes (algas + hongos) o las micorrizas (plantas + hongos).

La protocooperación es una interacción en que ambas especies resultan beneficiadas, sin embargo ésta relación no es obligada. Un tipo de protocooperación es la mostrada en las uniones físicas de raíces de plantas de la

misma o diferente especie. Por ejemplo, la unión del abedul *Betula alleghaniensis* con el olmo *Ulmus americana* se considera como protooperación ya que se lleva a cabo un intercambio de fotosintatos, sin embargo ambas especies pueden sobrevivir independientemente (Barbour, 1987).

En la depredación una de las especies se beneficia de la otra y ésta última es perjudicada. La herbivoría está considerada dentro de la depredación. Un ejemplo sencillo es la relación entre koalas (*Phascolaretos cinereus*) y eucaliptos (*Eucalyptus* spp) (Krohne, 2001).

Metabolitos secundarios (MS) y primarios (MP)

A los MS se les ha dado ese nombre debido a sus características particulares: las estructuras químicas que presentan, su distribución restringida entre los organismos y su función metabólica casi desconocida. Anteriormente se pensaba que no tenían una función directa ni importante en el crecimiento y desarrollo de los organismos, particularmente de las plantas, a diferencia de los MP, tales como las proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos que tienen un papel fundamental en el metabolismo de todos los organismos, sin embargo se han descrito muchas importantes funciones ecológicas de los MS en las plantas, tales como repelentes contra depredadores, como protección contra infección por microorganismos, o bien como atrayentes de polinizadores y animales (Harborne, 1999).

Determinados MS solo se encuentran en ciertas especies o grupos de especies, que por lo general, están relacionadas taxonómicamente, mientras que los

MP se encuentran en todos los grupos (Gershenson, 1998). Sin embargo, actualmente se reconoce que no existe una división clara ni estricta entre uno y otro tipo de metabolitos. Por ejemplo, el ácido erúxico es un ácido graso característico de las crucíferas, con una distribución restringida en la naturaleza (por ello se clasifica como MS), pero para los miembros de esta familia constituye una fuente importante de energía para el desarrollo de las semillas, y por lo tanto, desempeña un papel primario, por lo que no puede clasificarse como MS (Harborne, 1999).

Origen de los metabolitos secundarios

Las plantas producen una gran diversidad de metabolitos secundarios. Esta diversidad se puede explicar si se estudia el origen genético de las vías biosintéticas que los producen. Por ejemplo, rutas secundarias individuales se pudieron haber originado como resultado de duplicaciones y subsecuentes mutaciones de un gen que dirigía la síntesis de una enzima metabólica primaria. De esta manera, una serie de duplicaciones y mutaciones pudo dar origen a un grupo de proteínas similares capaces de llevar a cabo transformaciones químicas sucesivas sobre el sustrato en particular. Estas transformaciones pudieron haber continuado a través de numerosos pasos antes de la formación de un producto que proporcionara una ventaja selectiva al organismo en cuestión (Vining, 1991).

Clasificación de los metabolitos secundarios según su origen biosintético.

Desde éste punto de vista, los metabolitos pueden ser divididos en tres

principales clases biogénicas: terpenos, fenoles y alcaloides, y otros compuestos nitrogenados relacionados.

Los Terpenos

Los terpenos o terpenoides constituyen la clase más numerosa y heterogénea de metabolitos secundarios. Las vías de síntesis de los terpenoides generan una alta diversidad estructural y gran complejidad de compuestos, los cuales tienen un potencial enorme para mediar interacciones ecológicas (Langenheim, 1994). Los terpenos se derivan de elementos estructurales básicos llamados unidades de isopreno, las cuales contienen 5 átomos de carbono. Los terpenoides son un clásico ejemplo de compuestos polimerizados y se clasifican por el número de unidades de isopreno que contienen. Los que poseen 10 átomos de carbono son llamados monoterpenos; si tienen 15, sesquiterpenos; con 20 unidades, diterpenos; con 30, triterpenos; con 40, tetraterpenos (Harborne y Baxter, 1993). Los terpenoides alelopáticos, incluyen particularmente monoterpenoides, sesquiterpenoides y lactonas sesquiterpénicas (Fischer, 1986).

Hay dos vías conocidas de biosíntesis de terpenos. Una es la del ácido mevalónico y la otra es la del gliceraldehído-3-fosfato/piruvato. En la primera ruta, 3 moléculas de acetil Co A se unen, paso a paso, hasta formar el ácido mevalónico. El cual es fosforilado, descarboxilado y deshidratado hasta producir isopentilpirofosfato (IPP). En la segunda vía, la del piruvato-gliceraldehído-3-fosfato, llamada así por la unión de ambas moléculas a través de una transetolasa. El siguiente producto es la desoxitulososa fosfato a partir de la cual se forma el IPP.

Esta segunda vía opera en los cloroplastos. Este IPP se isomeriza para formar el dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Este reacciona para dar origen al geranyl pirofosfato (GPP), que es el precursor de casi todos los monoterpenos y que se puede unir a otro IPP y formar un farnesil pirofosfato (FPP), que es el precursor de los sesquiterpenos, y así sucesivamente (Gershenzon 1998).

Los Fenoles

Los fenoles son metabolitos cuyas estructuras tienen en común un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos. La ruta de los fenoles empieza con una condensación entre un intermediario de la ruta de las pentosas: la eritrosa 4-fosfato, con un intermediario de la glucólisis: el fosfoenol piruvato (PEP). El producto es el 2-deshidro-3-desoxiarabinoheptuloso-7-fosfato (DAH7P); éste se transforma en 3-deshidroshikimate el cual se reduce para formar el ácido shikímico. A su vez, éste forma el corismato que es el punto de partida para la formación del triptófano y la fenilalanina, precursores de los fenilpropanoides (Dennis and Turpin, 1997).

La mayoría de los fenoles son solubles en agua, ya que están naturalmente combinados con un azúcar en forma glucosídica, aunque otros son lipofílicos. Muchos grupos importantes de materiales poliméricos de plantas y animales son fenoles, tales como las ligninas y melaninas. Los fenoles se clasifican según su complejidad estructural y su origen biosintético, aunque no hay un sistema ideal de clasificación. Los fenoles contribuyen significativamente al color, olor y sabor de muchas comidas y bebidas. Algunos flavonoides tienen importancia farmacológica

por sus propiedades anti-inflamatorias y anti-hepatotóxicas. Ciertos isoflavonoides ejercen efectos estrogénicos en mamíferos mientras otros son insecticidas o piscicidas (Harborne, 1993). Un tipo de fenol llamado antocianina es el responsable de darle el color rojo a las flores de ciertas plantas, como las rosas, los cuales son detectados por algunos insectos quienes llevan a cabo el proceso de polinización (Swain, 1992).

Los alcaloides

Los alcaloides poseen una gran diversidad estructural y una variada actividad fisiológica no superada por ningún otro grupo de productos naturales, contienen normalmente, un átomo de nitrógeno en su estructura química como parte de un anillo heterocíclico y, en plantas son producidos por aproximadamente el 20% de las angiospermas.

Desde el punto de vista biogénico los alcaloides se dividen en cuatro grupos:

1. Los que se derivan de los aminoácidos, como la ornitina/arginina, lisina, histidina, fenilalanina/tirosina, triptofano, ácido antranílico y ácido nicotínico.
2. Alcaloides de la purina, tales como la cafeína (xantina).
3. Terpenos aminados, como el diterpeno aconitina y el triterpeno solanina.
4. Alcaloides policétidos, donde el nitrógeno es introducido en el esqueleto de carbono, como la coniina y las coccinelinas (Roberts y Wink, 1998).

Los alcaloides son de gran interés para los humanos, debido principalmente a sus propiedades medicinales, ya que muchos de ellos se utilizan como drogas, por ejemplo, la atropina, codeína, morfina y vincristina. Actualmente, se conocen más de 10,000 compuestos representativos de este grupo (Harborne y Baxter, 1993).

La importancia de los alcaloides en el metabolismo de las plantas ha sido muy debatida, pero existe evidencia de que éstas pueden utilizarlos tanto como protección contra los herbívoros, como fuente de almacenamiento de nitrógeno, entre otros (Harborne y Baxter, 1993).

Algunos alcaloides pueden afectar el sistema nervioso de mamíferos y en los humanos provocar una serie de perturbaciones metabólicas cuyos síntomas van desde la náusea, alteraciones visuales, debilidad progresiva y hasta paro respiratorio. Los alcaloides de la quinolizidina (derivados del ácido antranílico) son venenos débiles y su sabor amargo los hace no palatables para muchos herbívoros; podemos encontrarlos por ejemplo, en el género *Lupinus* (Sotelo, 1997).

Clasificación ecológica de los metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios se pueden clasificar desde un punto de vista ecológico en:

I-Infoquímicos: Todos aquellos compuestos que intervienen en una relación entre dos organismos, acarreado información y despertando en el receptor una respuesta fisiológica o conductual para uno o ambos interactuantes.

Los infoquímicos se dividen a su vez en:

- Feromonas.- Infoquímicos que median la interacción entre dos organismos de la misma especie, donde el beneficio puede ser para el productor, el receptor o ambos.
- Aleloquímicos.- Infoquímicos que median la interacción entre dos organismos de diferente especie.

Los aleloquímicos se dividen a su vez en:

- Alomonas.- Aleloquímicos adecuados para la biología de un organismo (1) que despiertan en otro (2) una respuesta fisiológica o conductual favorable para el primer organismo.
- Kairomonas.- Aleloquímicos adecuados para la biología de un organismo (1) que despiertan en otro organismo (2) una respuesta fisiológica o conductual favorable para el segundo organismo.
- Sinomonas.- Aleloquímicos adecuados para la biología de un organismo (1) que despiertan en otro organismo (2) una respuesta fisiológica o conductual favorable para ambos organismos (Anaya, 2003).

Toda esta variedad de compuestos es de enorme importancia para el establecimiento, mantenimiento y cambio en las múltiples relaciones químicas entre los organismos. Por ejemplo, una de las relaciones bióticas más importantes, mediadas por metabolitos secundarios, se refiere a las relaciones planta-insecto. Harborne (1993) menciona cómo ciertos metabolitos secundarios tales como el citral, linalol, isoquercetina, morina y sitosterol, entre otros, producidos por las hojas del árbol de la mora, actúan como atrayentes para las larvas del gusano de seda que se alimentan de ellas. Por otro lado, menciona que un aumento

(dependiente de la estación del año) en la concentración de taninos, disminuye dramáticamente la población de insectos que se alimentan de las hojas del roble. Se ha sugerido que la toxicidad de los taninos se debe a los daños intestinales producidos en los insectos a éste tipo de compuestos.

Phillips y Croteau (1999) explican la aparente carrera 'armamentista' de adaptación mutua entre coníferas y escarabajos. Las coníferas segregan oleorresinas, las cuales contienen turpentina (monoterpenos y sesquiterpenos) y rosina (diterpenos). La primera contiene toxinas microbianas tales como el limoneno y el 3-careno (monoterpenos), así como otros agentes repelentes de insectos. A su vez, la turpentina actúa como solvente para la rosina, la cual por su mayor densidad funciona como barrera física para los insectos. Varias especies de escarabajos son capaces de transformar los componentes de la turpentina, como el α -(+)-(Pino) y α -(-)-(Pino) en compuestos oxigenados. Uno de ellos, el (+)-cis-verbenol actúa como feromona de agregación. Sin embargo, su esteroisómero, también transformado por el insecto, funciona como un antiagregante para los insectos. Este resultado se podría interpretar como presiones de selección en sentido opuesto entre las especies interactuantes. En este contexto, si surgiera una mutación en la planta que evite el ataque, va a ser favorecida. Por el contrario, cualquier mutación en el insecto que elimine los efectos negativos de la sustancia, también va a ser favorecida.

Otro ejemplo de relación planta-insecto se refiere al papel que desempeñan los colores de las flores. Los colores se deben a la presencia de pigmentos (flavonoides y carotenoides entre los más importantes) que actúan como gúas

para los insectos polinizadores, atrayéndolos al centro de la flor donde se localiza el néctar y los órganos sexuales (Harborne 1993).

Otro ejemplo de relaciones bióticas mediadas por metabolitos secundarios es el de los insectos parasitoides, todos ellos pertenecientes al Orden Hymenoptera. En este caso, los insectos que parasitan a sus hospederos herbívoros, utilizan los metabolitos secundarios volátiles que produce la planta al ser atacada por estos últimos. De esta manera, al ubicar la fuente de alimento de sus hospederos herbívoros (la planta), los parasitoides aseguran su propia supervivencia (Turlings y Benrey, 2001). Este es un ejemplo de interacciones químicas tritróficas, planta-herbívoro-parasitoide, donde los metabolitos secundarios juegan un papel fundamental.

Alelopatía

En 1937, Molisch (citado en Rice, 1984) acuñó el término alelopatía para referirse a las interacciones bioquímicas entre todo tipo de plantas, incluyendo microorganismos. Esta definición fue ampliada y complementada en el Primer Congreso Mundial de Alelopatía: la alelopatía se refiere a cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por plantas y microorganismos, y que influya sobre los sistemas biológicos (Anaya, 1999).

Breve historia de la alelopatía

A través del tiempo el hombre ha observado muchos casos de alelopatía; no obstante, los experimentos científicos controlados sobre este fenómeno fueron

conducidos hasta después de 1900.

Teofrasto (300 A.C) (citado en Rice, 1984) señaló que la planta del garbanzo (*Cicer arietenum*) "agotaba" de alguna manera el suelo donde estaba sembrada, refiriéndose tal vez a una baja productividad continua.

Plinio (Plinius Secundus 1 D.C) (citado en Rice, 1984) reportó que el garbanzo, la cebada y la arveja "quemaban" los sembradíos de maíz. Refirió también que la sombra del nogal era "pesada" y que podía causarle dolores de cabeza al hombre y dañar a cualquier planta en su vecindad; observó, asimismo, que la sombra del pino mata al pasto. Su explicación indica que él usaba el término 'sombra' en un sentido amplio que incluía el concepto de exclusión parcial de luz, más ciertos efectos sobre la nutrición, e incluso, la liberación de algunos compuestos químicos de las plantas al ambiente. Plinio señaló asimismo, que la mejor manera de matar al helecho (*Pteridium aquilinum*) era cortar su tallo con un palo, cuando éste tiene "brotes ya que el jugo que escurre del helecho mismo mata las raíces".

Culpeper (1633) (citado en Rice 1984) estableció que hay una 'antipatía' entre la col y la uva, ya que donde crecía la primera, la segunda moría. Por otro lado, Browne publicó en 1658 que los "buenos y malos gases de los vegetales, promueven o debilitan el desarrollo de unos u otros".

De Candolle (1832) (citado en Rice 1984) sugirió que el problema de la enfermedad de los suelos en la agricultura podría deberse a los exudados de las plantas cultivadas y que la rotación del cultivo podría solucionar el problema.

Lee y Monsi (1963) (citado en Rice 1984) encontraron en un documento

japonés de hace aproximadamente 300 años, que el agua de lluvia que escurre de la parte aérea del pino (*Pinus densiflora*) es dañina para los cultivos que crecen debajo de éste.

Stickney y Hay (1881) (citado en Rice 1984) observaron que la vegetación bajo el nogal negro (*Juglans nigra*) era muy escasa en comparación con aquella bajo la mayoría de otros árboles de sombra. Vieron también que los cultivos crecían mal, bajo o cerca del nogal negro. Hay (citado en Rice 1984) descubrió que esto se debía a los exudados de las hojas, que contienen juglona, el principal compuesto inhibidor que el nogal produce.

Formas de liberación y modos de acción de los aleloquímicos

Los compuestos aleloquímicos pueden ser liberados a través de las siguientes vías:

- Lixiviación de las partes aéreas de la planta por la lluvia.
- Volatilización a través de las partes aéreas.
- Exudación de las raíces.
- Descomposición de la materia orgánica.

Los modos de acción de los aleloquímicos pueden ser divididos a *grosso modo*, en directos e indirectos. Son directos cuando influyen sobre los procesos del metabolismo de los organismos o de manera más general en algún aspecto de su crecimiento (Einhellig, 1995). Los modos de acción de los aleloquímicos son indirectos cuando los compuestos liberados alteran las propiedades del suelo o a los microorganismos de éste, por ejemplo a los fijadores de nitrógeno. Los

aleloquímicos pueden ser transformados por los microorganismos del suelo, dando origen a compuestos más o menos tóxicos, lo que puede alterar las relaciones con otros organismos (Rizvi y Rizvi, 1992).

Aunque ha habido muchas evidencias documentadas sobre la inhibición del crecimiento causada por los aleloquímicos, la respuesta fisiológica y los mecanismos moleculares desencadenados por estos compuestos no han sido lo suficientemente investigados. Son varios los procesos fisiológicos que pueden ser afectados por los aleloquímicos de la planta receptora. A continuación se mencionan algunos de los más importantes.

Crecimiento y división celular.- Cruz-Ortega y colaboradores (1988) observaron que el extracto etanólico del polen de maíz actúa como un inhibidor de la mitosis en células meristemáticas de raíces de sandía.

Interacción con hormonas.- Se ha reportado que una variedad de aleloquímicos altera los niveles del ácido indolacético (IAA) mediante la inhibición de la enzima ácido-indolacético-oxidasa, la cual actúa directamente sobre el precursor del IAA (Devi y Prasad, 1992).

Dinámica enzimática.- Muchos de los aleloquímicos pueden modificar la síntesis y/o actividad de varias enzimas tanto *in vitro* como *in vivo*, por ejemplo, la actividad de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa es inhibida por el ácido ferúlico y otros compuestos fenólicos (Hoover, *et. al.*, 1977).

Respiración.- Van Sumere y colaboradores (1971) demostraron que la juglona (1mM) inhibe la respiración en células de levadura, desacoplando la fosforilación oxidativa e impidiendo el flujo de electrones hacia el oxígeno.

Fotosíntesis. Blum y Rebbeck (1989) observaron una considerable reducción en la tasa fotosintética y contenido clorofílico en plántulas de maíz tratadas con ácido ferúlico. En cloroplastos aislados se observó que éste ácido inhibió el transporte de electrones.

Permeabilidad de la membrana.-Los compuestos fenólicos, como el flavonol y los flavonoides, pueden alterar las propiedades de la membrana causando una despolarización e interfiriendo con la actividad de las ATPasas, lo que produce un desacoplamiento en la fosforilación oxidativa, la cual provee la energía necesaria para las funciones celulares (Moreland y Novitzki, 1987).

Importancia del estudio de la Alelopatía

Los aleloquímicos responsables de la inhibición o estimulación del crecimiento y desarrollo de otras plantas y organismos, pueden ser aislados, identificados y usados como plaguicidas de origen natural o como controladores del crecimiento de plantas y microorganismos (Rizvi y Rizvi, 1992), o bien servir como estructuras modelo para la creación de nuevos plaguicidas químicos o de drogas (Duke, 1991). En la actualidad, es bien conocido el hecho de que muchos compuestos derivados de las plantas, se han utilizado desde tiempos inmemoriales en la medicina tradicional. Estos compuestos bioactivos que le han permitido al hombre aliviar muchas de las enfermedades que lo aquejan, son metabolitos secundarios que reciben el nombre de productos naturales. Ejemplos de éstos son: los glucósidos cardiotónicos de *Digitalis* usados para tratar problemas cardíacos, la reserpina usada para aliviar la hipertensión, el aloe para tratar afecciones de la piel

y las gastritis, y la morfina que ha permitido atenuar dolores muy fuertes, entre muchos otros productos (Lewis, 1983).

La Familia Euphorbiaceae

Esta es una familia numerosa de plantas que posee más de 283 géneros y 7300 especies. Árboles, arbustos o hierbas, algunas veces suculentas y parecidas a cactus; químicamente diversas, con alcaloides, di o triterpenos, taninos y glucósidos cianogénicos (Judd, 2001). Aunque es de distribución cosmopolita, excepto para las regiones polares, la mayoría de las Euphorbiaceae se encuentra en las regiones cálidas del planeta. Estas plantas se distinguen por que producen una savia lechosa venenosa o al menos altamente irritante (Lawrence, 1969). La familia incluye plantas de gran importancia económica *Hevea brasiliensis* es la mayor fuente de caucho natural; *Aleurites molucana* y *A. fordii* son fuentes de aceites, pinturas y barnices. Muchas especies son venenosas y especies de *Euphorbia*, *Antidesma*, *Croton* y *Elaeophorbia* son usadas como venenos para peces. Por otro lado algunas contienen partes comestibles tal como las hojas de *Cnidioscolus chayamansa* y los frutos de *Antidesma bunius*. Finalmente *Jatropha*, *Codiaeum*, *Acalypha* y otros géneros se usan como plantas ornamentales (Judd, 2001).

El género *Sebastiania*.

Todas las especies de éste género de las Euphorbiaceae, son similares en apariencia general. El látex de este género es altamente tóxico y venenoso; al contacto con la piel causa irritación y erupción (Standley y Steyermark, 1949).

***Sebastiania adenophora* Pax & K. Hoffm.**

Es un árbol que crece en las selvas húmedas o en las medianas y bajas subcaducifolias, al nivel del mar, distribuyéndose en la costa del Golfo de México, por la península de Yucatán hasta Guatemala. Se le conoce por los nombres mayas de 'sacchechém', "canchunup" o "chechém blanco" (Standley y Steyermark, 1949).

Antecedentes del estudio. Proyecto "Búsqueda de Biocidas en Plantas de la Reserva Ecológica El Edén, Quintana Roo"

En la actualidad se han llevado a cabo numerosos estudios de bioprospección que tienen como objetivo investigar la presencia de metabolitos secundarios bioactivos en los tejidos de diversas plantas, con el fin de descubrir compuestos con un potencial de aplicación para resolver problemas de plagas y enfermedades, es decir, nuevos plaguicidas y drogas de origen natural. El auge de estos estudios se basa en la necesidad de encontrar compuestos que, por su origen natural, a la vez que nos ayudan a resolver problemas prácticos, causen un menor impacto sobre el ambiente. Los estudios de bioprospección se pueden llevar a cabo de una manera más o menos sencilla, probando el efecto de extractos de diferentes plantas, así como compuestos aislados de éstos, sobre diferentes organismos de prueba y mediante diversos bioensayos. Podemos probar el efecto de extractos y compuestos sobre procesos como germinación, crecimiento, desarrollo, reproducción y sobrevivencia, e investigar posteriormente, los modos de acción tanto de extractos como de compuestos, sobre otros procesos fisiológicos:

respiración, división celular, actividad enzimática, síntesis de proteínas, expresión genética y estructura de tejidos y células, entre otros. Estos estudios han permitido la identificación de muy diversos compuestos bioactivos en plantas, y también en microorganismos. En un proyecto llevado a cabo en la Reserva Ecológica El Edén, Quintana Roo (Anaya y del Amo, 1999) se evaluó el contenido de metabolitos bioactivos en diferentes especies de plantas de la selva mediana subperennifolia y de comunidades de vegetación secundaria de esta reserva. Una de las especies evaluadas preliminarmente fue *Sebastiania adenophora*, la cual fue seleccionada debido al bajo grado de herbivoría que presentaban sus hojas, y al uso etnobotánico que se le da en la región a su látex, como purgante en bajísimas cantidades. Los resultados de los diversos bioensayos realizados con los extractos acuosos y orgánicos de esta planta confirmaron la presencia de metabolitos bioactivos en la parte aérea de esta especie. En particular, se evaluó la actividad alelopática de extractos orgánicos sobre el crecimiento radial de algunos hongos fitopatógenos y sobre la sobrevivencia de *Artemia salina*. Los extractos no mostraron actividad contra los hongos fitopatógenos, sin embargo fueron muy activos sobre las artemias; de hecho, *Sebastiania adenophora* fue la planta con mayor actividad sobre este crustáceo, de todas las que se probaron en este tipo de bioensayos. La CL_{50} (concentración letal media) del extracto clorofórmico-metanólico de *S. adenophora* fue de 6.45 $\mu\text{g/ml}$, lo que demuestra una alta toxicidad.

II.-Objetivos

Objetivo General

Con base en los antecedentes mencionados, el objetivo del presente trabajo fue el siguiente:

Confirmar la bioactividad aleloquímica, a través de un fraccionamiento fitoquímico biodirigido, de los lixiviados acuosos y extractos orgánicos de la parte aérea de *Sebastiania adenophora*, por medio de bioensayos particulares sobre: plantas, *Echinochloa crusgalli*, *Amaranthus hypochondriacus* y *Lycopersicon esculentum*, midiendo su crecimiento radicular; sobre hongos fitopatógenos, *Fusarium sporotrichioides* y *Alternaria* spp., midiendo su crecimiento radial; y sobre *Artemia salina*, evaluando su sobrevivencia.

Objetivo particular

Aplicación de técnicas cromatográficas diversas y diferentes bioensayos durante el fraccionamiento biodirigido con solventes de polaridad creciente, e identificación de los aleloquímicos bioactivos por medio de técnicas espectroscópicas.

III.-Materiales y métodos

Colecta del material vegetal en la Reserva El Edén

Establecida en 1990, El Edén es la primera área protegida privada que está

dedicada a la investigación y conservación ecológica de México. Se encuentra situada en la porción noreste de la península de Yucatán a 3 horas de Cancún (50 km al noroeste). El Edén forma parte de la región de Yalahau (que en maya significa "donde nace el agua"). En este lugar, se realizó una colecta de la parte aérea de *S. adenophora*, en 1997.

Preparación del material colectado.

Un ejemplar de herbario fue preparado para su envío a la Universidad de California, Riverside para la identificación taxonómica de la planta. Las hojas y los tallos jóvenes se secaron después de la colecta, en una secadora a 35° C. Una vez seco el material, se molió usando un molino y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 6 litros de capacidad para iniciar su extracción con solventes orgánicos de diversa polaridad. Se utilizaron 4 kg de la parte aérea de la planta.

Preparación del lixiviado acuoso de las hojas de *Sebastiania adenophora*

Un gramo de hojas secas se dejó remojar en 100 ml de agua destilada durante tres horas (para obtener una solución 1% p/v). Posteriormente el líquido fue filtrado con papel Whatman No. 4 y luego con membrana millipore (0.45 mm) para eliminar esporas de hongos y la contaminación de los ensayos. También se midió la presión osmótica de este lixiviado acuoso con el objeto de evitar el efecto de una solución excesivamente concentrada sobre la germinación y crecimiento de las semillas de prueba.

Preparación de los extractos orgánicos

Los 4 kg de la parte aérea de la planta seca se maceraron tres veces, durante 48 h cada vez, con mezclas de cloroformo-metanol (1:1) en un matraz Erlenmeyer. El extracto final se concentró por medio de un rotavapor Büchi modelo 461, obteniéndose 130.6 g de extracto total. Con éste material, se realizó una partición hexano-metanol. Posteriormente, se evaluó la actividad biológica del extracto total y de las dos fases de la partición, (hexánica y metanólica) en cajas de petri, utilizando semillas de amaranto como organismo de prueba. La actividad de estos tres tratamientos también se evaluó sobre *Artemia salina* mediante bioensayos en viales de vidrio. Posteriormente, se realizaron cromatografías en columna con las fases hexánica y metanólica de la partición.

Cromatografía en columna con la fase hexánica.

Se aplicaron 11 g de muestra en 160 g de sílica gel y se inició la extracción con hexano (100 %); continuándose con hexano:cloroformo (9:1, 7:3, 1:1 y 2:8), cloroformo (100 %) y cloroformo-metanol (1:1) . De ésta columna se colectaron un total de 110 fracciones, las cuales se agruparon, según su R_f, en 12 fracciones finales (I-XII).

Cromatografía en columna con la fase metanólica.

Se aplicaron 30 g de muestra en 200 g de sílica gel y se inició la extracción con cloroformo (100 %), continuándose con cloroformo-metanol (95:5 y 90:10), y

metanol (100 %). De esta columna se colectaron 70 fracciones que se agruparon según su R_f, reduciéndose a 8 (A-H).

Bioensayos

a) Con semillas

La actividad fitotóxica de los extractos orgánicos así como del lixiviado acuoso, se determinó mediante bioensayos sobre las siguientes semillas de prueba: *Amaranthus hypochondriacus* L., *Echinochloa crusgalli* (L.) P. Beauv. y *Lycopersicon esculentum* L., en cajas de petri de 5.5 cm, con papel filtro como sustrato.

En el caso de los extractos orgánicos y fracciones cromatográficas, se impregnó el papel filtro de las cajas con 1.5 ml de una solución a 100 µg/ml del extracto o fracción correspondiente, y después de una total evaporación del disolvente, el papel se humedeció con 1.5 ml de agua destilada. En estos bioensayos se utilizaron dos controles, el del disolvente, cuando se impregnó el papel sólo con el correspondiente disolvente, el cual se evaporó y luego se humedeció con agua destilada estéril; y para fines de comparación, un control que contenía sólo agua destilada. El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar con 4 repeticiones por tratamiento. En cada caja se sembraron 10 semillas. Las cajas se mantuvieron en una incubadora a 27° C en la oscuridad durante 36, 48 y 72 hrs para *Amaranthus*, *Echinochloa* y *Lycopersicon* respectivamente. Se midió la longitud radicular y los resultados se evaluaron por medio de un ANOVA (Hampton, 1994). Los porcentajes de inhibición/estimulación en cada tratamiento se calcularon con base en los datos

del control del disolvente, a pesar de que los resultados de ambos controles fueron generalmente muy similares.

Durante el fraccionamiento biodirigido se utilizó también la técnica de bioautografía, que tiene como objetivo localizar las bandas cromatográficas con mayor actividad biológica en una placa de cromatografía en capa fina (TLC). Esta técnica consiste en correr algún extracto o fracción, en dos placas de TLC; una de estas placas (sin revelar) se cubre con una delgada capa de agar al 1%; una vez que éste solidifica se siembran sobre él algunas semillas (de amaranto generalmente, debido a su tamaño y alta viabilidad) a todo lo largo y ancho de la placa. Las diferentes fracciones del extracto, se difunden a través del agar y llegan a las semillas, y si tienen actividad inhibitoria, ésta se puede observar ya que en esta región de la placa las semillas no germinarán o tendrán una raíz más pequeña. Las regiones de la placa que muestran bioactividad se comparan con las de la otra placa previamente revelada, para conocer el R_f de las bandas cromatográficas. Posteriormente, cuando ya se conoce la región con actividad, se usa una placa preparativa de TLC (0.2 mm 60F-254 Merck), donde se corre una mayor cantidad de producto (200 mg de extracto sobre cada placa) con el fin de obtener una cantidad suficiente de la o las bandas activas y poderlas analizar mediante técnicas espectroscópicas.

b) Con hongos

Se utilizaron dos hongos fitopatógenos como organismos de prueba. La cepa utilizada de *Alternaria* sp. se aisló de una hoja de un rosal infectado y la de

Fusarium sporotrichioides de una hoja de *Piper* sp.

Los extractos o fracciones cromatográficas (500 ppm) se mezclaron con el medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar) Merck, en condiciones estériles, y se añadieron a las cajas de petri para obtener una concentración final de 250 ppm. El control contenía solo PDA. Cortes circulares del micelio correspondiente, de 5 mm de diámetro, tomados de cultivos puros de 8 días de incubación, se sembraron en el centro de una caja de petri de 5.5 cm, bajo un diseño de bloques completos al azar con 5 repeticiones por tratamiento. Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente con un fotoperiodo de 12:12 h. A los 3 y 6 días de iniciado el experimento, se midió el crecimiento radial de los hongos. Los resultados se evaluaron por medio de ANOVA.

c) Con artemias

Se utilizaron huevos de *Artemia salina* de San Francisco Bay Brand Inc. El efecto de los extractos orgánicos se probó sobre el índice de sobrevivencia de larvas de *A. salina* en viales de vidrio de 10 ml. Primeramente se hicieron eclosionar los huevos de *A. salina* de la siguiente manera. Se agregaron 1.75 g de huevos de *A. salina* en un vaso de precipitados con 100 ml de agua destilada, el cual se dejó en baño maría a 30°C con luz artificial y aereación por 24 horas. Previamente se preparó una solución original de las muestras (extracto total) disolviendo 20 mg en 2 ml del disolvente adecuado (CHCl_3). De esta solución se transfirieron 5, 50 y 500 μl a frascos viales de manera independiente y por triplicado. Se dejó evaporar el disolvente a sequedad y posteriormente 10 larvas recién eclosionadas fueron

llevadas a cada uno de los viales, los cuales se aforaron a 5 ml de agua salina, obteniéndose así concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm respectivamente. Los viales se mantuvieron durante 24 h con luz a temperatura ambiente. Al cabo de este periodo, se evaluaron las artemias sobrevivientes.

IV.-Resultados

Bioensayos con hongos

Los resultados de los ensayos con hongos no se presentan debido a que ninguno de estos tuvo actividad inhibitoria o estimulante estadísticamente significativa.

Bioensayos con artemias

El extracto total causó 73.3% de mortalidad sobre *Artemia* a 10 ppm y 100% a 100 ppm. Las fases hexánica y metanólica tuvieron efectos tóxicos similares (la hexánica causó 43.3% de mortalidad a 10 ppm y 100% a 100 ppm; la metanólica causó 40% de mortalidad a 10 ppm y 90% a 100 ppm). Las fracciones de las dos fases se evaluaron también sobre *Artemia salina*, sin embargo esta actividad se diluyó o se perdió totalmente cuando las fases se fraccionaron en las columnas cromatográficas (datos no mostrados).

Bioensayos con semillas

En la Figura 1 se puede observar la comparación del crecimiento (en porcentaje) de la raíz de las tres especies de semillas de prueba tratadas con el lixiviado de *S. adenophora* y su crecimiento con el control de H₂O. Como se puede apreciar, el crecimiento de las tres especies tratadas con el lixiviado es bastante homogéneo, creciendo un 80% menos que las que crecieron con el control de H₂O. Estadísticamente ésta inhibición del crecimiento fue significativa ($p \leq 0.05$) demostrando que el agua extrae compuestos altamente fitotóxicos. Por otro lado, la Figura 2 muestra éste efecto en *E. crusgalli*.

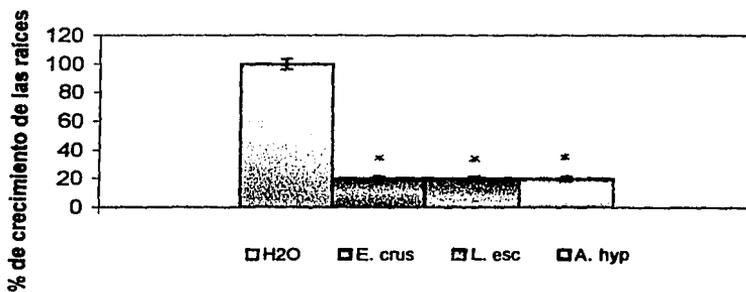


Figura 1. Efecto del lixiviado acuoso de *S. adenophora* sobre el crecimiento de la raíz de las tres especies de prueba. El análisis de ANOVA indicó una diferencia significativa en el crecimiento del lixiviado comparado con el del agua. * $p \leq 0.05$



Control de H₂O

Lixiviado acuoso

Figura 2. Comparación del crecimiento de la raíz de *E. crusgalli* entre el control de agua y el lixiviado acuoso.

En la Tabla 2 se observan los efectos de las fracciones primarias obtenidas de la cromatografía en columna realizada a la fase hexánica del extracto cloroformo-metanólico, sobre el crecimiento de la raíz de las tres especies de plantas de prueba.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 2. Efecto de las doce fracciones cromatográficas de la fase hexánica sobre el crecimiento radical de *Lycopersicon esculentum*, *Echinochloa crusgalli* y *Amaranthus hypochondriacus*.

Tratamiento	% de crecimiento radicular		
	<i>L. esculentum</i>	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>
Frac I	91	63*	94
Frac II	100	85	83
Frac III	119	78	85
Frac IV	121	86	96
Frac V	115	90	78
Frac VI	89	90	83
Frac VII	110	91	84
Frac VIII	96	99	73
Frac IX	100	98	70*
Frac X	86	91	55*
Frac XI	87	82	38*
Frac XII	94	104	54*

* $p < 0.05$

Esta tabla muestra el efecto selectivo de las fracciones sobre las tres plantas de prueba. Los asteriscos indican que esos resultados tuvieron un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$). Por un lado se distingue que estas fracciones no tuvieron efecto significativo sobre el crecimiento de *L. esculentum* aunque las fracciones III, IV, V y VII tienen una tendencia estimulante sobre sus raíces. Por otro lado, la fracción I inhibe significativamente el crecimiento de *A. hypochondriacus*. Finalmente, se observa que el crecimiento de *E. crusgalli* es inhibido por las fracciones IX a la XII, particularmente por la XI.

La Tabla 3 muestra el efecto de las fracciones de la cromatografía en columna realizada a la fase metanólica del extracto cloroformo-metanólico.

Tabla 3. Efecto de las ocho fracciones cromatográficas de la fase metanólica sobre el crecimiento de la raíz de *Lycopersicon esculentum*, *Echinochloa crusgalli* y *Amaranthus hypochondriacus*.

Tratamiento	% de crecimiento radicular		
	<i>L. esculentum</i>	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>
Frac A	97.4	93	98.6
Frac B	40*	72*	89
Frac C	49*	51*	86
Frac D	62*	89	48*
Frac E	55*	106	49*
Frac F	80	92	92
Frac G	94	108	93
Frac H	93	97	105

* $P < 0.05$

En esta tabla se puede apreciar que el efecto fitotóxico de las fracciones fue también selectivo. Los resultados significativos estadísticamente ($p \leq 0.05$) están marcados con un asterisco. Las fracciones B, C, D y E inhibieron significativamente el crecimiento de la raíz de *L. esculentum* siendo la fracción B la que presentó el mayor efecto fitotóxico con un 60% de inhibición. El de *A. hypochondriacus* se ve afectado por las fracciones B y C; mientras que el de *E. crusgalli*, es inhibido por las fracciones D y E.

Los resultados con semillas nos mostraban que las dos fases, la hexánica y la metanólica, contenían metabolitos fitotóxicos en algunas de sus fracciones. En el caso de las de la fase hexánica, teníamos actividad sobre jitomate en las fracciones IX a XII, sin embargo la cantidad de estas fracciones era muy pequeña y por ello se pensó en continuar el fraccionamiento bidirigido con las fracciones de la fase

metanólica. La fracción B era la más abundante y tenía una actividad inhibitoria significativa sobre jitomate y sobre *A. hypochondriacus*, y con ella se continuó el fraccionamiento.

En primer lugar se realizó una bio-autografía con esta fracción, usando a *A. hypochondriacus* como especie de prueba. En la Figura 3 se pudo observar una zona bien definida de actividad inhibitoria, que correspondía a 5 bandas cromatográficas detectadas con UV en una placa paralela.

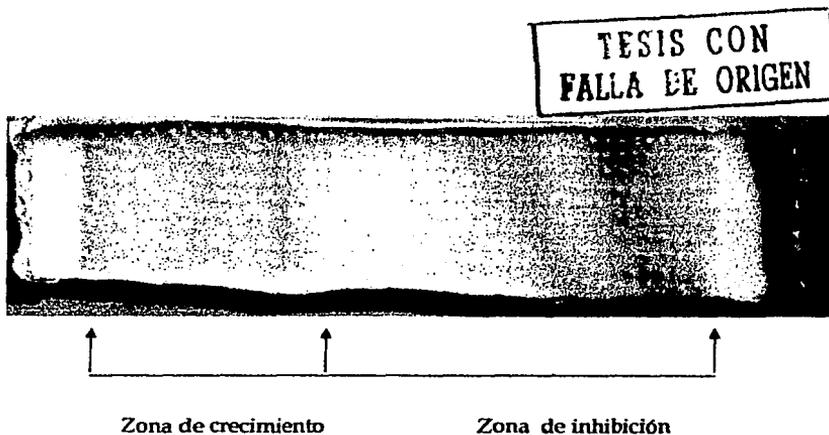


Figura 3. Bio-autografía que muestra el efecto inhibitorio de la fracción B de *S. adenophora* sobre *A. hypochondriacus*.

Se realizó una nueva placa cromatográfica (TLC) con la fracción B y se rasparon las 5 bandas bioactivas para evaluarlas por separado en cajas de petri, pero ahora sobre jitomate, que fue la especie más sensible a este tratamiento en los

bioensayos preliminares. Sólo la denominada banda B-1 presentó actividad inhibitoria (55%) sobre el crecimiento de la raíz de *L. esculentum*. En la Figura 4 se muestra el efecto de B-1 y B-2 sobre el crecimiento de la raíz de *L. esculentum*.

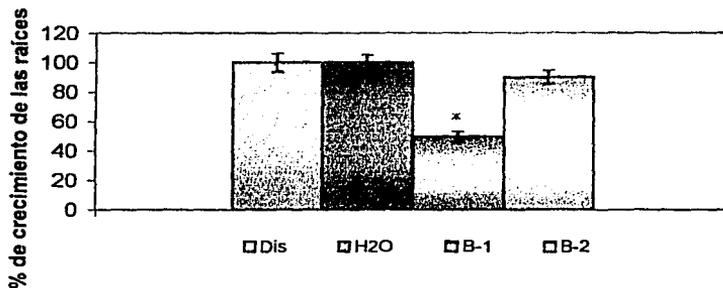


Figura 4. Efecto de la fracción B-1 sobre el crecimiento de la raíz de *L. esculentum*
(* $p \leq 0.05$)

El posterior fraccionamiento de B-1 por medio de TLC, reveló a la luz UV, 3 bandas cromatográficas. La banda que presentó una actividad inhibitoria significativa sobre *L. esculentum* (81 % de inhibición) se denominó Cr B-1. Esta actividad se puede observar en las Figuras 5 y 6.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

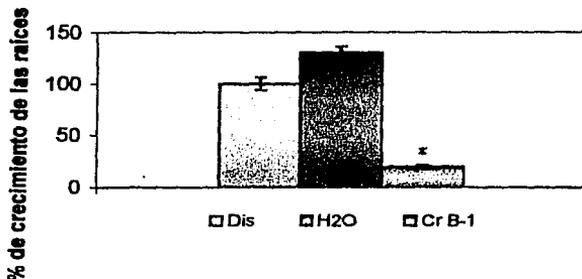


Figura 5. Efecto de la fracción Cr B-1 sobre el crecimiento de la raíz de *L. esculentum*. (* $p \leq 0.05$)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

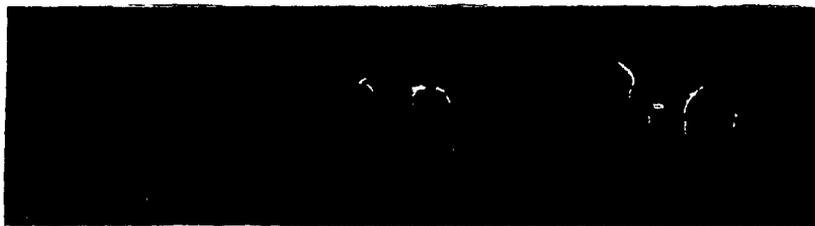


Figura 6. actividad inhibitoria de la fracción Cr B-1 (proveniente de la fracción primaria B) de la fase metanólica del extracto cloroformo-metanol de *S. adenophora* sobre el crecimiento radicular de *L. esculentum*.

De ésta fracción Cr B-1 sólo se tenían disponibles 3 mg, cantidad insuficiente para seguir con el fraccionamiento biodirigido. Por lo tanto se inició la

identificación de la estructura de los compuestos responsables de la actividad inhibitoria de dicha fracción.

Para hacer el análisis de la estructura de algún compuesto se necesita de la ayuda de ciertas técnicas espectroscópicas tales como el infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN^1H), y espectroscopia de masas (EM).

En términos generales, las técnicas de IR y RMN^1H se basan en el proceso fundamental de absorción de una cierta cantidad de energía por parte de las moléculas, aunque el mecanismo de absorción de cada una es diferente (Dyer, 1973). Un espectro de IR y RMN^1H se pueden interpretar debido a que los picos que se presentan en las gráficas resultan de la absorción de cierta cantidad de energía electromagnética por determinadas moléculas. Así, dependiendo del lugar donde se encuentre un pico de absorción en la gráfica, le corresponde un determinado grupo funcional, una estructura molecular determinada o un tipo de hidrógeno en las moléculas (Morcillo, 1974).

La EM no es propiamente una espectroscopia puesto que no involucra la emisión, absorción o transmisión de radiación electromagnética, pero determina la relación m/z (masa/carga) de cationes o radicales cationes resultantes de la ionización (por pérdida de un electrón de enlace o no) de una molécula neutra (Fisher and Arnold, 1999). A continuación se muestran los espectros de los experimentos realizados a la fracción Cr B-1.

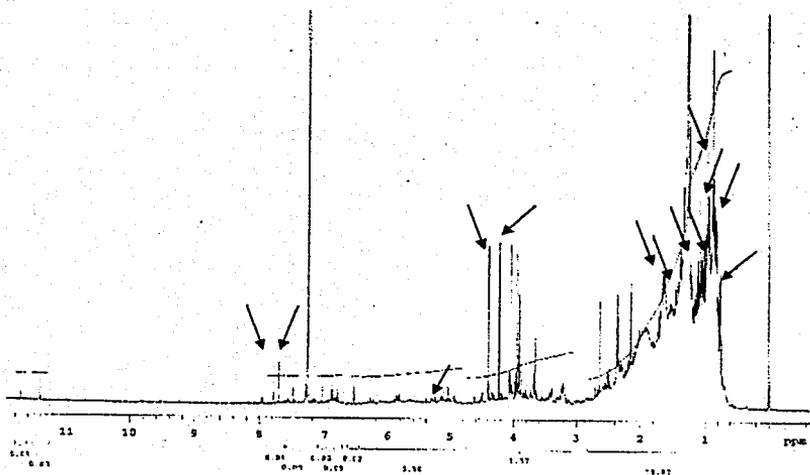


Figura 7. RMN^1H . Las flechas muestran la presencia de algunas señales correspondientes a la fracción Cr- B1 que están de acuerdo a la fórmula de trabajo propuesta.

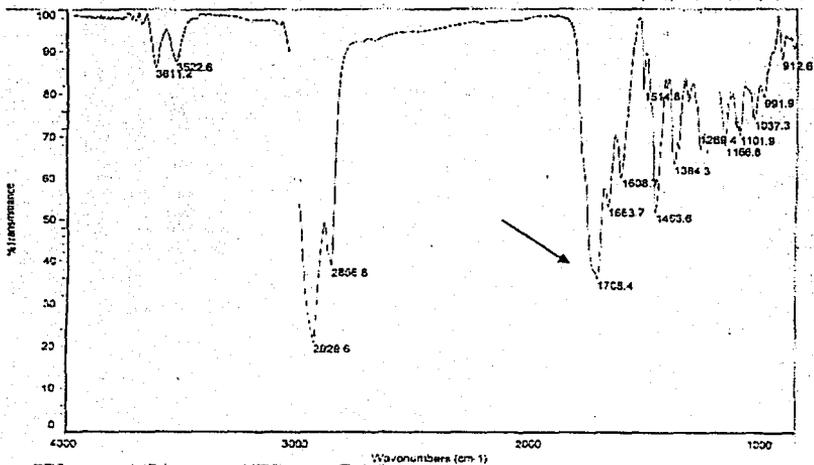


Figura 8. IR. La flecha muestra la señal correspondiente a un éster (banda de 1708) de la fracción Cr-B1

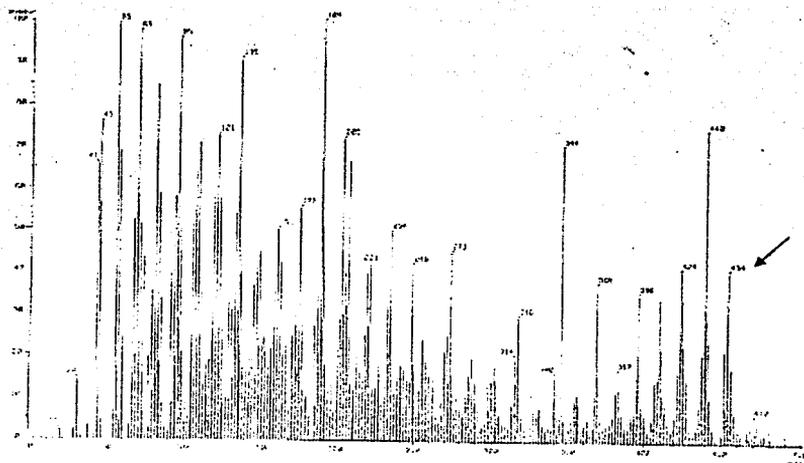


Figura 9. Espectroscopía de masas. La flecha muestra el ión molecular de 454 correspondiente a la fracción Cr-B1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Datos espectrométricos del compuesto fitotóxico de la fracción Cr B-1

RMN¹H(300MHz,CDL₃):(ppm)0.68,0.76,0.82,0.85,0.91,0.93,0.96,1.01,1.15(8CH 3,24),3.19(1H, 3H, m, H3), 4.23(S,3H,-Ome), 4.39(S,3H, -Ome), 5.34(m, 1H, -CH=C=), 7.68-7.76 (2S, 2H, aromático); IR v_{max} cm⁻¹:3611,3522 (OH),2929, 2856, 1708,(-CO), 1663,1463 (Me=C=C=); EM IE⁺m/z: 41, 43, 55, 69, 95, 109, 135, 161, 175, 189, 203, 207, 234, 248, 273, 287, 314, 316, 344, 368, 382, 396, 424, 440, 454.

En el IR (Figura 8) se observa y señala con una flecha una banda de éster a 1708 cm⁻¹, característica de ésteres benzoicos. Las señales de RMN¹H que corresponden a 8 metilos (señalados con flechas en la Figura 7) en la región de 0.68 a 1.15 ppm nos indican que se trata de un compuesto triterpénico posiblemente del tipo aislado en *S. argutidens* (Gaertner, 1999) y *S. scottiana* (Branco y Pizzolatti, 2002) (Ver mas adelante). También se observan señales de metoxilos aromáticos a 4.23 y 4.39 ppm, y en la unión de los protones se observan dos señales, 7.68 a 7.76 ppm (Figura 7) que se asignan a 2 hidrógenos aromáticos, y señales a 5.34 ppm que corresponden a hidrógenos sobre una doble ligadura (Figura 7) como la que se propone en la Figura 12. El ión molecular de 454 en el EM (Figura 9) está de acuerdo a la fórmula de trabajo propuesta que se presenta mas adelante.

Desafortunadamente, no se tenía la cantidad suficiente del compuesto bioactivo para hacer una determinación más completa y precisa de su estructura química, sin embargo, con base en los datos espectroscópicos anteriores y considerando el tipo de compuestos identificados en los trabajos de Branco y Pizzolatti y Gaertner (op cit), se propone la estructura de la Figura 10 para el

compuesto bioactivo de la fracción Cr B-1.

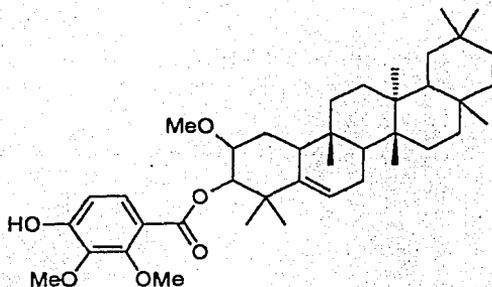


Figura 10. Probable estructura del principal compuesto fitotóxico de la fracción Cr-B-1.

Recientemente, Branco y Pizzolatti (2002) describen el aislamiento y caracterización química de triterpenos en el extracto hexánico de las raíces de *Sebastiania argutidens* (Fig. 11).

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

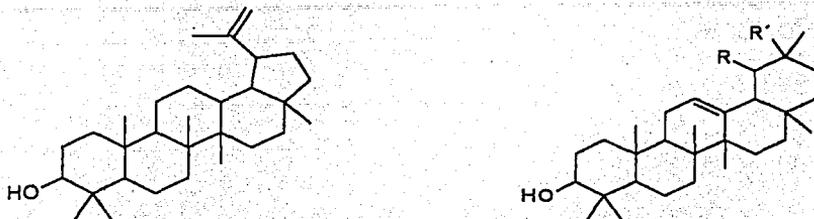


Figura 11. Triterpenos obtenidos del extracto hexánico de *S. argutidens*.

Por otro lado, Gaertner (1999) describe el aislamiento de triterpenos del extracto metanólico de las raíces de *Sebastiania schottiana* (Fig. 12) los cuales poseen gran actividad analgésica sobre ratones.

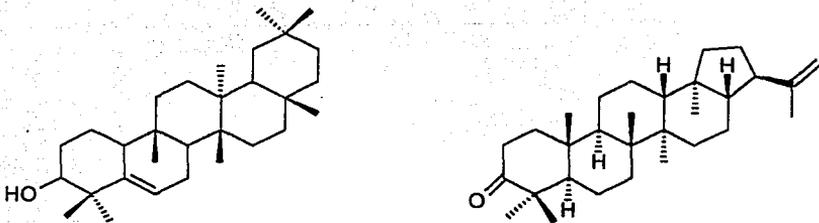


Figura 12. Triterpenos aislados del extracto metanólico de *S. Schottiana*.

V.-Discusion

Los resultados del presente estudio demostraron claramente que *Sebastiania adenophora* contiene compuestos que resultan tóxicos para las semillas de prueba y para *Artemia salina*. Esto concuerda con los reportes de la toxicidad que el látex de esta planta tiene, por ejemplo, sobre los seres humanos que lo ingieren, y está de acuerdo con algunos de los usos medicinales que se le dan al mismo. El lixiviado acuoso de *S. adenophora* mostró un fuerte efecto fitotóxico sobre el crecimiento de la raíz de las especies de prueba. Esto indica que el agua es un buen solvente para extraer los compuestos bioactivos de la planta; sin embargo, el fraccionamiento biodirigido que se realizó en el presente trabajo, exigía también el uso de solventes orgánicos que facilitarían la separación y extracción de los compuestos bioactivos. La fitotoxicidad del lixiviado acuoso no estuvo determinada por alto potencial osmótico del mismo, ya que éste se midió inmediatamente después de preparar el lixiviado, obteniéndose un potencial de ~13 miliosmoles/L, el cual es muy bajo y *per se* no causa daño al crecimiento de la raíz. Por lo tanto, la inhibición de las raíces es causada por los metabolitos tóxicos contenidos en varias de las fracciones primarias, particularmente los de la fase metanólica, como por ejemplo, el compuesto de naturaleza triterpenoide que el presente trabajo propone; estos metabolitos, actúan, probablemente, sobre el proceso de germinación o sobre alguna etapa del crecimiento de las raíces, afectando algún proceso fisiológico de la planta como la mitosis de las células meristemáticas, la respiración u otros. Es importante mencionar que el compuesto propuesto pertenece al grupo de los

terpenoides, que como se mencionó, existen en un número muy elevado en el reino vegetal y sus estructuras son muy diversas, además de que las funciones ecológicas de muchos de ellos, son de gran importancia para las plantas y se han puesto en evidencia en múltiples trabajos de investigación (Langenheim, 1994).

Es interesante hacer notar que las fracciones cromatográficas tanto de las fases hexánica como metanólica del extracto cloroformo-metanólico de *S. adenophora*, difieren en la bioactividad que presentan, y que ésta muestra un efecto selectivo sobre las tres especies de plantas de prueba, lo que indica, por un lado, una respuesta diferencial en las plantas receptoras, y por el otro, mecanismos de acción diversa de los aleloquímicos que las fracciones contienen.

El presente trabajo deja abiertas diversas alternativas de investigación. La más importante, es la identificación total de los aleloquímicos que mostraron su bioactividad sobre plantas y *Artemia salina*, en los diversos bioensayos realizados a lo largo del trabajo, mediante un nuevo fraccionamiento biodirigido de la planta con mayor cantidad de material vegetal. Otras líneas importantes son la determinación de los mecanismos de acción de los más importantes compuestos sobre procesos fisiológicos de las plantas de prueba, en particular de la que muestre mayor sensibilidad a los mismos. Por otro lado, los aspectos de la ecología química de la planta constituyen otro de los campos de investigación de gran interés: ¿Cuál es la razón de ser de estos metabolitos secundarios en la planta? ¿Su presencia ha sido determinada por la selección natural como una defensa contra sus depredadores, patógenos o competidores? ¿Existe variabilidad química entre los individuos de *S. adenophora* dentro de una población?, y si esto fuera así, ¿qué

importancia tendría esto para las poblaciones de esta especie? ¿Qué aplicación práctica podemos encontrar a los compuestos bioactivos que esta planta contiene, como agroquímicos o fármacos? ¿Qué tipos de estudios de campo y de laboratorio pueden ser los indicados para responder estas y otras interrogantes? Sin duda, muchas son las preguntas que pueden formularse con base en los resultados de este estudio.

VI.-Bibliografía.

Anaya, A. L. 1999. Allelopathy as a tool in the management of biotic resources in agroecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 18 (6): 697-739.

Anaya, A. L. 2003. *Ecología Química*. Instituto de Ecología,-UNAM. y Plaza y Valdés Editores, México. ISBN: 970-722-113-5.

Anaya, A.L. and del Amo, S. 1999. Searching for New Biocides in the Tropical Forests in the El Eden Ecological Reserve, Quintana Roo, México. Final Report to United States Department of Agriculture (Project MX-AES-6). 110 pp.

Barbour, M and Pitts, W. 1987. *Terrestrial plant ecology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California.

Blum, U. and Rebeck, J. 1989. Inhibition and recovery of cucumber roots given multiple treatments of ferulic acid in nutrient culture. *J. Chem. Ecol.* 15: 917-928.

Branco, A. y Pizzolatti, M. 2002. CGAR e CGAR-EM na análise dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Sebastiania argutidens* (Euphorbiaceae). *Quim. Nova*. Vol. 25. No.1, 15-19.

Cruz-Ortega, R., Anaya, A. L. and Ramos, L. 1988. Effects of allelopathic compounds of corn pollen on respiration and cell division of watermelon. *J. Chem. Ecol.* 14: 71-86.

Dennis, D.T., Turpin, D.H., Layzell, D and Lefebvre, D. 1997. *Plant Metabolism*. Longman, Edinburg, Gate. England.

Devi, R.S. and Prasad, M.N. 1992. Effects of ferulic acid on growth and hydrolitic enzyme activities of germinating maize seeds. *J. Chem. Ecol.* 18 (11): 1981-1990.

Duke, S.O. 1991. Plant terpenoids as pesticides. In: Keeler, R. Editor. *Toxicology of Plant Fungal Compounds*. Marcel Dekker, Inc. New York. Pp 269-696.

Dyer, J. 1973. *Applications of absorption spectroscopy of organic compounds*. Prentice hall. New Jersey.

Einhellig, F. and Souza, I. 1992. Phytotoxicity of sorgoleon found in grain sorghum root exudates. *J. Chem. Ecol* 18 (1): 1-11.

Fischer, N. 1986. The function of mono and sesquiterpens as plant germination and growth regulators. In: Putnam, A y Tang, C. The Science of Allelopathy. Wiley Interscience. New York. Pp. 203-218.

Fisher, J and Arnol, J;R. 1999. Instant notes in chemistry for biologists. Bios Scientific Publishers., Springer-Verlag. UK.

Gaertner, M., Müller, J., Roos, J., Cani, G., Santos, R., Niero, J., Calixto, J., Yunes, R., Monache, D., and Cechinel-Filho, V. 1999. Analgesic triterpens from *Sebastiania schottiana* roots. *Phytomedicine*, 6: 41-44.

Gershenson, J. 1998. Plant Defenses: Surface Protection and Secondary Metabolites. In: Taiz, L., Zeiger, E. (Eds.) Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. Massachusetts. Pp 347-376.

Hampton, R. 1994. Introductory biological statistics. WCB. USA.

Harborne, J. B. 1993. Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press. London.

Harborne, J. B and Baxter, H. 1993. Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. Taylor and Francis. London.

Harborne, J. B. 1999. Classes and functions of secondary products from plants. In: Walton, N and Brown, D. Chemicals from plants: Perspectives on plant secondary products. ICP. London. Pp 1-26.

Hoover, J.D., Wender, S.H and Smith, E.D. 1977. Effects of phenolic compounds on glucose-1-phosphatedehydrogenase isoenzymes. *Phytochemistry*. 16: 199-201.

Judd, W., Cambell, C., Kellog, E and Stevens, P. 1999. Plant systematics. A phylogenetic approach. Sinauer Associates, Inc. Sunderland Massachusetts. USA.

Krebs, C. 1978. Ecology. The experimental analyses of the distribution and abundance. Harper and Row. New York.

Krohne, D. T. 2001. General ecology. Thomson Learning. USA.

Langenheim, J.H. 1994. Higher plant terpenoids: A phytocentric review of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.* 20: 1223-1280.

Lawrence, G.H.M. 1969. Taxonomy of Vascular Plants. The MacMillan Co. New York.

Lewis, W. H. 1983. Contributions of herbology to modern medicine and dentistry. In: Keeler, R. Editor. Toxicology of Plant Fungal Compounds. Marcel Dekker, Inc. New York. Pp 785-815.

Mackenzie, A., Ball, A and Virde, S. 1998. Instant notes in ecology. Bios Scientific Publishing, Springer-Verlag. UK.

Morcillo, J. 1974. Espectroscopía infrarroja. Secretaria general de la organización de los estados americanos. Washington, D:C.

Moreland, D.F and Novitzki, W.P. 1987. Effects of phenolic acids, coumarins and flavonoids on isolated chloroplasts and mitochondria. Allelochemicals, role in agriculture and forestry. Waller G.R. (Ed.). *American Chemical Society*. 330: 247-261.

Odum, E.P. 1986. Fundamentos de Ecología. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México.

Phillips, M and Croteau, R. 1999. Resin based defenses in conifers. *Trends in Plant Science*. Vol. 4. No. 5. Pp 184-190.

Rice, E. L. 1984. Allelopathy. Academic Press. New York

Rizvi, S.J and Rizvi, V. 1992. Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. In: Rizvi, S.J and Rizvi, V. Allelopathy. Basic and applied aspects. Chapman and Hall. London. Pp 443-472.

Roberts, M., and Wink, M. 1998. Alkaloids. Plenum Press. New York.

Sotelo, A. 1997. Constituents of wild food plants. In: T. Johns, S. T. Romeo (Eds.) *Recent advances in phytochemistry*. Vol 31. Functionality of food phytochemicals. Plenum Press, New York. Pp. 89-109.

Standley, P. and Steyermark, J. 1949. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany. Vol. 24. Part VI Chicago Natural History Museum. Pp 24-162.

Stiling, P. 1996. Ecology: theories and applications. Prentice Hall. New Jersey.

Swain, T. 1999. Chemical signals from plants and phanerozoic evolution. In: Margulis, L and Olendzenski, L. Environmental evolution. Effects of the origin and evolution of life on planet earth. The MIT Press. London, England.

Turlings, C.J. y Benrey, B. 2001. Efectos de los metabolitos secundarios vegetales en el comportamiento y desarrollo de avispas parasitoides. En: Anaya, A. L., Espinosa, F y Cruz-Ortega, R. Editores. Relaciones químicas entre organismos:

aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. Instituto de Ecología, UNAM y Plaza y Valdés, Eds. México.

Van Sumere, C. F., Cottenie, J., De Greef, J and Kint, J. 1971. Biochemical studies in relation to the posible germination regulatory role naturally occurring coumarin and phenolics. *Rec. Adv. Phytochem.* 4: 165-221.

Vining, L. C.1991. Secondary metabolism inventive evolution and biochemical diversity. *Gene* 115: 135-140.