



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**"POTENCIAL ALELOQUIMICO DE *Zuelania guidonia*  
(FLACOURTIACEAE)"**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A :**

**JOSE GUADALUPE HERNANDEZ MAQUEDA**

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. ANA LEISA AN...**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR**

2004



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.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA 14  
MEXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: José Guadalupe Hernández Maqueda  
FECHA: 24. Febrero. 2004  
FIRMA: JGM

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:  
"Potencial Aleloquímico de *Zuelania guidonia* (Flacourtiaceae)"

realizado por José Guadalupe Hernández Maqueda

con número de cuenta 8919129-3, quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

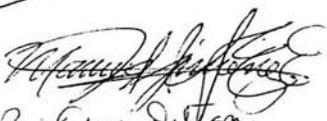
Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. Ana Luisa Anaya Lane 

Propietario

Dr. Manuel Jimenez Estrada 

Propietario

Dra. María del Rocío Cruz Ortega 

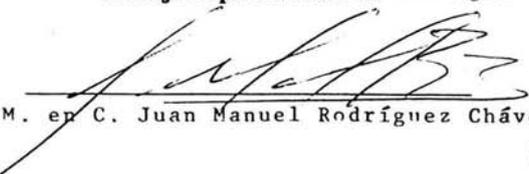
Suplente

Dr. Ricardo Reyes Chilpa 

Suplente

Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava 

Consejo Departamental de Biología

  
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Cháve

FACULTAD DE CIENCIAS



Agradecimientos.

En primer lugar quiero agradecerle a mi familia principalmente a mis padres, Soledad y Armando, por la paciencia, el apoyo incondicional, la comprensión y por haberme dado la oportunidad de concluir con esta etapa de mi vida. A mis hermanos, Soledad, Gregoria y Beto, mis sobrinos Eddy y Magaly, por su ayuda y el cariño que me han mostrado.

A la Dra. Anaya le agradezco su apoyo en todo momento durante mi estancia en el laboratorio y su valiosa ayuda en la redacción de este trabajo.

Al Dr. Jiménez, por su ayuda y el tiempo invertido, en la asesoría de la parte química del presente trabajo.

A la Dra. Rocío le doy las gracias por la atención mostrada, a cualquier duda de mi parte.

En especial a Blanca, le quiero agradecer, que siempre estuvo en la disposición de asesorarme y ayudarme, en el trabajo desarrollado en el laboratorio.

A la Dra. Martha por sus atinados comentarios con respecto a la parte química del trabajo.

A los integrantes del laboratorio, Aurora, Carmen, Fernando, Tere y Tony que siempre me ayudaron a resolver mis dudas de la mejor manera, cuando se los pedía. Muchas Gracias.

## ÍNDICE

I. Introducción.	1
Tipos de compuestos químicos producidos por las plantas	1
Origen y evolución de los metabolitos secundarios	1
Síntesis y clases de metabolitos secundarios	3
Clasificación ecológica de los metabolitos secundarios	7
Definición del termino alelopatia e historia	8
Mecanismos de liberación de alelopáticos	10
Modos de acción de los aleloquímicos	12
Importancia de la alelopatia	13
Impacto de la alelopatia sobre ecosistemas naturales	13
Interacciones alelopáticas en la agricultura	15
Aplicaciones de la alelopatia	16
Antecedentes y justificación del estudio	17
La Familia Flacourtiaceae	18
Genero <i>Zuelania</i>	18
Especie <i>Zuelania guidonia</i>	18
Compuestos químicos aislados de <i>Zuelania guidonia</i>	19
II. Objetivos del trabajo	21
III. Materiales y métodos	21
IV. Resultados	31
V. Análisis y discusión	38
VI. Bibliografía	41
VII. Anexo	45

## **INTRODUCCIÓN**

### **Tipos de compuestos químicos producidos por las plantas.**

Los compuestos químicos producidos por las plantas, pueden ser clasificados como constituyentes primarios o secundarios, dependiendo de si se les atribuye o no un papel esencial en el metabolismo de las mismas. Los constituyentes primarios incluyen a los azúcares comunes, aminoácidos, proteínas, purinas y pirimidinas de ácidos nucleicos, la clorofila, etc., los cuales son constituyentes universales de las células, tejidos y órganos, y su papel esencial en el metabolismo de los organismos es bien conocido (Harborne, 1999). Los metabolitos secundarios, también forman parte esencial de las plantas y otros seres vivos, desde los alcaloides hasta los terpenoides, acetogeninas y fenoles, son sustancias que no parecen tener un papel importante en el metabolismo (Harborne 1999) y puede observarse que dentro de este grande y heterogéneo grupo de metabolitos, existen aquellos que se distribuyen de manera diferencial entre grupos taxonómicos limitados dentro del reino vegetal, mientras que otros tienen una distribución mucho más general entre los taxa (Croteau, et al., 2000).

En realidad no existe una clara división entre ambos grupos de metabolitos; por ejemplo, al ácido erúico, un ácido graso característico de la familia Cruciferae, con una distribución muy restringida en la naturaleza, y que por lo mismo debería ser clasificado como metabolito secundario, constituye un importante depósito de energía, como ácido graso de los lípidos de las semillas en los miembros de esta familia, y además, está claramente involucrado en el metabolismo primario y en las primeras etapas de desarrollo de las plántulas (Harborne, 1999).

### **Origen y evolución de los metabolitos secundarios.**

La capacidad de sintetizar metabolitos secundarios ha sido determinada por la selección natural a lo largo del curso de la evolución, en diferentes linajes de plantas; muchos de estos metabolitos son el resultado de diversas adaptaciones de las plantas a los factores del medio. Por ejemplo, durante la evolución, las esencias florales volátiles y algunos pigmentos han surgido como respuesta a la necesidad de atraer insectos polinizadores, y de este modo,

asegurar la reproducción. La capacidad de sintetizar químicos tóxicos o repelentes, ha estado determinada en gran parte, por la necesidad de defensa que tienen las plantas ante la presión de patógenos y otros herbívoros (desde bacterias y hongos hasta insectos y mamíferos) o ante la presión de plantas competidoras (Pichresky, 2000).

Algunos compuestos químicos encontrados en frutas, previenen el daño por herbívoros y actúan como señales (en forma de color, aroma y sabor) de la presencia de "recompensas" potenciales (azúcares, vitaminas y aminoácidos) para aquellos animales que se alimentan de la fruta y por lo tanto ayudan a dispersar las semillas. Otros compuestos, como el 3-dimetilsulfoniopropionato producido por *Wollastonia biflora*, desempeñan funciones fisiológicas que son básicas para la planta, en este caso para proporcionarle resistencia a la salinidad (Trossat et al., 1998).

Los genes que codifican las enzimas del metabolismo secundario probablemente surgieron por duplicación y divergencia de genes originalmente involucrados en el metabolismo primario. La duplicación genética seguida de un cambio, por ejemplo, en la secuencia de aminoácidos, es una fuerza importante en la evolución y puede surgir a través de errores en la replicación o durante la recombinación (Lewin, 2000), lo que explica, por un lado, la dificultad de que se realice una duplicación cromosómica precisa, y por el otro, la aparición de nuevos caracteres en los organismos (Malik, 1982).

Es claro que algunas de estas modificaciones genéticas son muy antiguas mientras que otras son mucho más recientes, y que diferentes metabolitos secundarios se han originado por este proceso, en diferentes ocasiones y en diferentes ramas del árbol evolutivo de la vida. Por lo que el origen de los metabolitos secundarios se considera polifilético. Aunque los metabolitos secundarios son frecuentemente considerados menos importantes que los metabolitos primarios para sus productores, esto es una visión engañosa, puesto que los genes que codifican para los metabolitos secundarios no habrían evolucionado ni se habrían conservado durante cientos o miles de millones de años, si no constituyeran una ventaja selectiva para el productor. Algunos metabolitos secundarios ofrecen beneficios a los organismos que los producen como agentes de "la guerra química", la cual está siendo librada contra competidores, depredadores y parásitos. Las fuerzas de

selección frecuentemente modifican al azar las enzimas preexistentes, produciendo nuevos y más efectivos compuestos (Smith, 1992).

### **Síntesis y clases de metabolitos secundarios**

A pesar del amplio rango de características químicas en los metabolitos secundarios, éstos se derivan de un grupo de precursores sorprendentemente reducido. Existen tres precursores principales: 1) ácido shikímico, 2) aminoácidos y 3) acetato (Anaya, 2001).

Harborne (1999) afirma que un sistema adecuado para clasificar los compuestos químicos que producen las plantas puede estar basado en su origen biosintético o biogénesis. Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser considerados dentro de tres clases biogénicas principales: 1) fenoles, 2) alcaloides y otros compuestos nitrogenados relacionados, y 3) terpenos.

#### **1) Fenoles**

Los compuestos fenólicos se encuentran distribuidos dentro de todo el reino vegetal, sin embargo, este tipo de compuestos varía considerablemente de acuerdo al grupo de plantas que los producen. Los fenoles son menos frecuentes en bacterias, algas y hongos, en ocasiones pueden tener propiedades antibióticas (Harborne, 1996).

Un fenol es un compuesto químico caracterizado por al menos un anillo aromático ( $C_6$ ) con uno o más grupos hidroxilo. Los fenoles de las plantas son biosintetizados por diferentes rutas, por lo que constituyen un grupo heterogéneo desde el punto de vista metabólico. En su biosíntesis se encuentran involucradas dos rutas básicas, la del ácido shikímico y la de las acetogeninas. La ruta del ácido shikímico da lugar a la formación de los aminoácidos aromáticos a través de una serie de reacciones químicas. La mayoría de los compuestos fenólicos en plantas son derivados de la fenilalanina y la tirosina y en la mayoría de las especies el paso clave en esta síntesis es la conversión de fenilalanina a ácido cinámico (Taiz y Zeiger, 1991).

La ruta de las acetogeninas se inicia con la producción de poli-B-cetoesteroles de longitud variable, los cuales por ciclización producen productos frecuentemente policíclicos, incluyendo cromonas, isocumarinas,

orcinoles, depsidonas, xantonas y quinonas. La diversidad estructural de los fenoles está determinada por su doble origen biosintético y se incrementa por la frecuente combinación de las dos rutas en la elaboración de compuestos de origen mixto (flavonoides, estilbenos, piranos y xantonas). La participación de una tercera ruta (mevalonato) es también posible, y da como resultado derivados mixtos del ácido shikímico y mevalonato, como ciertas quinonas y piranocumarinas, o compuestos mixtos de acetato y mevalonato tal como los cannabinoides. En pocos casos las tres rutas contribuyen a la elaboración de un compuesto, por ejemplo, la de los rotenoides (Bruneton, 1999).

## **2)Alcaloides**

En las plantas, la mayor fuente de alcaloides se encuentra dentro de las Angiospermas; en las plantas inferiores son poco frecuentes. También pueden encontrarse alcaloides en otro tipo de organismos, por ejemplo, los insectos, algunos microorganismos y organismos marinos. Desde el aislamiento de la morfina, se han caracterizado más de 12 000 alcaloides (Croteau, et al.,2000).

De manera sencilla y general, los alcaloides se pueden definir como compuestos cíclicos que contienen nitrógeno en un estado de oxidación negativa y que tienen una distribución limitada dentro de los organismos. Los alcaloides son metabólicamente activos y desempeñan un papel importante en la fisiología de las plantas, ya que por su contenido en nitrógeno, pueden funcionar como almacenes de este vital elemento.

Los alcaloides pueden clasificarse en tres grupos: alcaloides verdaderos, protoalcaloides y pseudoalcaloides.

Los alcaloides verdaderos son derivados de aminoácidos (ornitina, lisina, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina, ácido antranílico y ácido nicotínico) y muestran un amplio rango de actividades fisiológicas.

Los protoalcaloides son simples aminas, donde el nitrógeno del aminoácido no se encuentra en un anillo heterocíclico, por ejemplo: la mezcalina y la efedrina.

Los pseudoalcaloides no son derivados de aminoácidos, por ejemplo los alcaloides esteroidales (Mirsa, 1999).

### 3)Terpenos

En términos de diversidad estructural, los terpenos comprenden el grupo mas amplio de metabolitos secundarios identificados en las plantas, con aproximadamente 30,000 compuestos conocidos (Facchini, 1999). Todos los terpenos son derivados de repetitivas fusiones de unidades de 5 carbonos, basadas en la base del isopentano, estos monómeros son referidos como unidades de isopreno. Por esta razón los terpenos son frecuentemente llamados isoprenoides, (Croteau, et al., 2000).

Las principales clases de terpenos son: monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ), tetraterpenos ( $C_{40}$ ) y politerpenos ( $>C_{40}$ ). Las plantas superiores sintetizan todas estas clases a través de la biosíntesis del intermediario de 5 carbonos, el isopentenil difosfato (IPP), el cual se origina de dos rutas diferentes, la ruta del ácido mevalónico y la ruta del 1-deoxi-D-xilulosa 5 fosfato (DXP). La primera fase consiste en la formación de acetil CoA, vía mevalonato, hasta el intermediario central IPP, el cual es isomerizado a dimetilalildifosfato (DMAPP), ambos participan en la serie de pasos de elongación de la cadena para generar el precursor acíclico farnesil difosfato (FPP) de sesquiterpenos y triterpenos. El primer intermediario de la ruta DXP es formado por condensación de una unidad de 2 carbonos, generada del piruvato con el gliceraldehido 3-fosfato; esta unidad es convertida en 2 C-metil-D eritriol 4-fosfato (MEP), que a su vez es transformado en isopentenil fosfato (IP). En la etapa terminal de la ruta DXP, IP es convertido a IPP a través de una monofosfato cinasa. Siguiendo la formación de IPP tanto por la ruta DXP como por la del ácido mevalónico, este intermediario central es isomerizado a DMAPP por la IPP isomerasa, ambos isómeros participan en la biosíntesis del precursor acíclico geranil difosfato (GPP), que da origen a monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos. Las dos rutas están localizadas en diferentes compartimentos subcelulares en las plantas y participan en la formación de diferentes grupos de productos terminales de los terpenos. La ruta del ácido mevalónico opera en el citosol y el retículo endoplasmico, produciendo precursores para la biosíntesis de sesquiterpenos y triterpenos. En contraste, la ruta DXP, es activa en plastidios donde genera IPP para la biosíntesis del hemiterpeno isopreno y para la formación de monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos. Ambas rutas parecen

contribuir al origen de sesquiterpenos, apoyando el concepto de, al menos, un flujo parcial de metabolitos entre ambas rutas (Bohlman, et al., 2000).

**Triterpenos.** Los triterpenos son formados biosintéticamente por seis unidades de isopreno y todos ellos comparten al precursor escualeno. Diferentes tipos de anillos se pueden originar de este intermediario acíclico, y en etapas posteriores de síntesis, pequeños fragmentos de carbono pueden ser removidos para producir moléculas con menos de 30 carbonos. Como resultado de todos los rearrreglos que pueden ocurrir durante la biosíntesis de triterpenos, éstos constituyen el grupo de terpenos más diverso producidos por las plantas. La conjugación es una característica común en ciertas clases de triterpenos: con azúcares en el caso de saponinas y cardenólidos, y con ácidos grasos en el caso de los fitoesteres. (Marston y Hostettmann, 1991).

Existen muchos tipos de triterpenos. Los que son ecológicamente significativos son los cardenólidos, cucurbitacinas, limonoides, fitoecdisonas, quasinoídes y saponinas. La clase más amplia de triterpenos, es el grupo del oleanano. La mayoría de los oleananos existen en la naturaleza como saponinas (Marston y Hostettmann, 1991).

**Saponinas.** Las saponinas son compuestos glucosídicos que tienen una distribución muy amplia en el reino vegetal y pueden aparecer en cantidades considerables (arriba del 30 %) en los tejidos de las plantas. El nombre proviene del Latín *sapo*=jabón debido a la propiedad de producir espuma con el agua; las plantas que contienen saponina son usadas como detergentes, por ejemplo, *Saponaria officinalis* y *Quillaria saponaria*. Las saponinas también tienen propiedades hemolíticas que generalmente son atribuidas a su interacción con los esteroides de la membrana de los eritrocitos, una interacción que induce un incremento en la permeabilidad y pérdida de la hemoglobina. Sin embargo las saponinas tienen muchas propiedades benéficas, se encuentran por ejemplo en la soya, avena, frijol, espinacas y en algunos organismos marinos (Dewick, 1997).

Estructuralmente las saponinas pueden ser clasificadas dentro de dos grupos basados en la naturaleza de su aglicón: saponinas esteroidales, que contienen un esteroide como aglicón y se encuentran casi exclusivamente en las Monocotiledoneas, y las saponinas triterpénicas que contienen un triterpeno

como aglicón (sin duda las más comunes) y se encuentran en algunos organismos marinos y en algunas Pteridofitas. No se han encontrado saponinas en Gimnospermas. Las saponinas se encuentran principalmente en Dicotiledoneas por ejemplo en las familias Araliaceae, Caryophyllaceae, Cucurbitaceae, Fabales, Primulaceae, Ranunculaceae, Rosaceae y Sapindaceae (Bruneton, 1999).

Los aglucones de las saponinas triterpénicas son compuestos pentacíclicos, los más comunes son: los oleananos (también conocidos como derivados de la  $\beta$ -amirina), los ursanos (conocidos como derivados de la  $\alpha$ -amirina) y los lupanos. Los constituyentes sacáridos más comunes son: D-glucosa, D-galactosa, L-arabinosa, L-rhamnosa, D-xilulosa, D-fructuosa y, al menos en saponinas triterpénicas, el D-ácido glucorónico (Bruneton, 1999).

#### **Clasificación ecológica de los metabolitos secundarios.**

La producción de diversos metabolitos secundarios por los organismos y su liberación al ambiente, afecta significativamente las condiciones de éste e influye sobre el crecimiento, la salud, la conducta y en suma la biología poblacional de plantas, animales y microorganismos; este hecho determina la existencia de interacciones químicas entre los organismos. La ciencia que estudia estas relaciones es la ecología química (Anaya, 1994).

Los metabolitos secundarios mediadores de relaciones bióticas pueden ser clasificados desde el punto de vista ecológico, de la siguiente manera:

#### **Infoquímicos**

Los infoquímicos son todos aquellos compuestos que intervienen, acarreado información, en una relación entre dos organismos y despiertan en el receptor una respuesta fisiológica o conductual con carácter adaptativo para uno de los organismos interactuantes o para ambos. Desde el punto de vista ecológico y evolutivo, el término infoquímico es más apropiado para referirse a los metabolitos secundarios en general, ya que enfatiza su papel como "transmisores de información" en las relaciones bióticas (Swain, 1999). Los infoquímicos se dividen a su vez en:

- **Feromonas.** Infoquímicos que median las relaciones entre organismos de la misma especie, donde el beneficio puede ser para el organismo productor, para el receptor o para ambos.
- **Aleloquímicos.** Infoquímicos que median las relaciones entre individuos que pertenecen a diferentes especies, donde el efecto tanto benéfico como perjudicial, puede ser para el organismo productor, para el receptor o para ambos (Anaya, 2001).

Los aleloquímicos se dividen a su vez en:

**Alomonas.** Metabolitos producidos o adquiridos por un organismo (productor) que al contactar a un individuo de otra especie en el medio natural (receptor), provoca en éste una respuesta conductual o fisiológica que es adaptativamente favorable para el productor pero no para el receptor (Nordlum y Lewis, 1976).

**Kairomonas.** Este término (del griego *kairos*=oportunista) fue propuesta por Brown y colaboradores en 1970. Una kairomona es una sustancia producida o adquirida por un organismo (productor) que al contactar a un individuo de otra especie (receptor) en el medio natural, provoca en éste una respuesta conductual o fisiológica que es adaptativamente favorable para el receptor pero no para el productor (Brown et al. 1970).

**Sinomonas.** El término sinomona (del griego *syn*=con o conjuntamente) fue propuesto por Nordlum y Lewis (1976) para denominar aquellos metabolitos químicos que median interacciones mutualistas. Una sinomona es una sustancia producida o adquirida por un organismo (productor) que cuando contacta a un individuo de otra especie (receptor) en el medio natural, provoca una respuesta conductual o fisiológica que es adaptativamente favorable para ambos, productor y receptor (Nordlum y Lewis, 1976).

#### **Definición del término alelopatía e historia.**

El fenómeno que abarca todos los tipos de relaciones químicas entre plantas y microorganismos se denomina 'alelopatía', palabra que deriva de las raíces griegas *allelon* = mutuo, y *phatos* = daño, y que, literalmente, significa la

influencia mutua (particularmente perjudicial) entre un organismo y otro. Este término fue acuñado por Molisch (1937) con un criterio diferente, pues él se refería en realidad al fenómeno considerando tanto los efectos benéficos como los perjudiciales en las relaciones bioquímicas entre toda clase de plantas, incluyendo a los microorganismos (Rizvi, 1992).

Aunque la alelopatía como ciencia es muy joven, es un fenómeno que se ha observado desde hace mucho tiempo, en especial dentro de las prácticas agrícolas y el desarrollo de la ciencia de la agricultura. Los primeros reportes concernientes a la fitotoxicidad de algunas plantas, aparecen en el volumen llamado "Investigación en Plantas" escrito por Theophrastus 300 A.C. Mas temprano aun, el filosofo griego Demócrito reportó el uso de ciertos productos de plantas como un método práctico para el control de malezas. En su trabajo enciclopédico "Historia Natural", Plinio (100 D.C.) proporciona numerosos ejemplos de aparentes interacciones que hoy llamaríamos 'alelopáticas'. En el siglo XIX, De Candolle (1832) señaló que se producían interacciones dañinas en muchos cultivos, pero a pesar de los indicios de aparentes daños de unas plantas sobre otras, es hasta el siglo XX, con los estudios de Molisch (1937), que se describen e integran tales procesos ecológicos dentro del término alelopatía (Rizvi, 1992).

El significado del término alelopatía ha cambiado a medida que se ha profundizado en el conocimiento del fenómeno. Rice (1984) proporciona la siguiente definición: "la alelopatía es cualquier efecto directo o indirecto, benéfico o perjudicial, de una planta (incluyendo microorganismos) sobre otra, a través de la producción de compuestos químicos que se liberan al ambiente (Rizvi, 1992). En 1996 en el Primer Congreso Internacional de Alelopatía celebrado en Cádiz, España, el consenso general de los investigadores en este campo de la ciencia permitió que surgiera una definición más clara y completa del fenómeno, la cual intenta abarcar la vastedad y complejidad del mismo: " La alelopatía se refiere a cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias y hongos que influyan sobre los sistemas biológicos" (Anaya, 2001). El tipo de compuestos químicos involucrados en la alelopatía pertenece en general a los metabolitos secundarios, aunque en ciertos casos, también puede tratarse de metabolitos primarios, como los aminoácidos no proteicos.

### **Mecanismos de liberación de alelopáticos**

Los principales mecanismos de liberación de compuestos alelopáticos por las plantas superiores son los siguientes: **descomposición, exudación, lixiviación y volatilización.**

**Descomposición.** La descomposición de la materia orgánica en el suelo es llevada a cabo, principalmente, por los microorganismos que viven en el mismo, y potencialmente, se considera como el proceso por medio del cual se produce la mayor cantidad de aleloquímicos en la rizósfera de las plantas. Los compuestos producidos pueden tener efectos alelopáticos sobre plantas, nemátodos, insectos y microorganismos. La bioactividad de los aleloquímicos que se van produciendo a lo largo de la descomposición en el suelo, depende del tipo de material vegetal del que provienen y del estado de descomposición del mismo; asimismo, el efecto tóxico o estimulante que producen, depende del organismo receptor sobre el cual actúan y la sensibilidad del mismo a los distintos compuestos que se están liberando al medio durante la descomposición. Esta es una regla general que puede aplicarse a todos los compuestos alelopáticos, independientemente de cómo y dónde se originan y de la vía de liberación a través de la cual se depositan en el ambiente (Anaya, 1996).

**Exudación.** Una gran variedad de metabolitos secundarios que afectan a los microorganismos del suelo en la rizósfera y a otras plantas vecinas, son liberados por las raíces de las plantas. Los exudados varían de acuerdo a la especie y edad de la planta que los produce, temperatura, luz, nutrición de la planta, actividad de los microorganismos en la rizósfera y naturaleza del medio que le da soporte a la planta (Einhellig, 1985). Las investigaciones de Lyon y Wilson (1921) demostraron que las raíces de diversas plantas cultivadas exudaban considerables cantidades de compuestos orgánicos, aun creciendo en condiciones estériles. Mucho tiempo después, diversos investigadores han confirmado este hecho, por ejemplo, Granato y colaboradores (1983), identificaron aleloquímicos potenciales en los extractos de raíces de soya de cinco variedades durante 7 etapas de crecimiento (desde la emergencia hasta la senescencia). Estos investigadores analizaron los extractos por medio de

cromatografía de líquidos de alta presión y encontraron, en todas las variedades, 15 picos principales de los extractos obtenidos en la mayoría de las etapas de crecimiento de las plantas, dos de los 15 picos fueron tentativamente identificados como daidzeina y cumesterol (isoflavonoides). Muchas otras investigaciones han reportado la identificación de diversos tipos de compuestos como agentes alelopáticos exudados de las raíces de muchas especies de plantas, por ejemplo: ácido benzoico y varios de sus derivados. Los exudados radicales de *Sorghum bicolor*, están constituidos principalmente por dihidroquinona que es oxidada rápidamente y convertida en  $p$ -benzoquinona: la sorgoleona; este compuesto, muestra una actividad biológica muy significativa sobre diversas plantas, y sin duda, contribuye a la actividad alelopática del sorgo (Rice, 1984). La actividad biológica de las saponinas de las raíces de alfalfa (hemolíticas y fungitóxicas) ha sido claramente demostrada y puede ser atribuida mayoritariamente a la presencia de glucósidos del ácido medicagénico (Oleszek et al., 1992).

**Lixiviación.** Este proceso se refiere al lavado de las partes aéreas o subterráneas de las plantas, principalmente por la lluvia (la parte aérea también es lixiviada por el rocío o la niebla). La lixiviación permite el arrastre y depósito en el suelo de diversos compuestos de las plantas, tanto inorgánicos como orgánicos. Los aleloquímicos que comúnmente son lixiviados de las partes aéreas o las raíces incluyen a los ácidos orgánicos, fenoles, terpenoides y alcaloides. El grado de lixiviación que una planta sufre por la lluvia u otros elementos, depende del tipo de tejido, el estado de madurez y el tipo y cantidad de la precipitación (Einhellig, 1985). La fitotoxicidad de los metabolitos de los lixiviados, frecuentemente desempeña un papel importante en la regulación del dominio y la estabilidad de algunas comunidades de plantas, en la sucesión e inclusive en la productividad agrícola (Chou, 1987). Los lixiviados de las hojas de café, que contienen cantidades variables de cafeína, afectan el desarrollo de varias malezas e incluso del mismo café dentro de los cafetales (Anaya, 1996).

**Volatilización.** Esta se produce principalmente por las hojas, como ocurre por ejemplo, en el caso de *Eucalyptus*, *Salvia*, *Pinus* y *Schinus* (Anaya, 1996). En algunos casos, los aleloquímicos pueden ser absorbidos directamente de la atmósfera por las plantas vecinas o ser adsorbidos por las partículas del suelo, y subsecuentemente ponerse en contacto directo con las raíces de otras

plantas o a través de la solución del suelo. Las plantas superiores producen una gran variedad de terpenoides que aparentemente se transfieren de esta manera. El canfeno, alcanfor, cíneol, dipenteno,  $\alpha$  y  $\beta$ -pinenos son producidos y liberados por los arbustos del chaparral del sur de California y pueden afectar el crecimiento de plantas vecinas (Einhellig, 1985).

### **Modos de acción de los aleloquímicos**

Los efectos visibles de los aleloquímicos o alelopáticos sobre diversos procesos en las plantas, son signos de cambios primarios a nivel molecular. Por ejemplo, los efectos de algunos aleloquímicos sobre la germinación y el crecimiento, pueden ser la manifestación de los efectos primarios ocurridos en las membranas celulares. El modo de acción de los aleloquímicos puede ser ampliamente dividido dentro de las acciones directas e indirectas. El modo de acción directo, incluye el efecto de los aleloquímicos sobre varios procesos fisiológicos y ultraestructurales: interacción con fitohormonas y su balance, efecto sobre membranas y su permeabilidad, sobre la germinación de esporas y semillas, la absorción de nutrimentos, el movimiento de estomas, la actividad de enzimas específicas, la síntesis de pigmentos, la fotosíntesis, la respiración y la síntesis de proteínas. El efecto indirecto se refiere a los cambios en las relaciones simbióticas de la planta, por ej. el de las raíces de una leguminosa con *Rhizobium* y con micorrizas; a la influencia de los alelopáticos sobre diversos microorganismos del suelo, algunos de ellos fijadores de nitrógeno, y muchas veces, como consecuencia de ello, a la disminución en la disponibilidad de nitrógeno y otros nutrimentos para otras plantas, etc. (Rizvi, 1992).

Casi todos los casos de inhibición por alelopatía en comunidades vegetales, resultan del efecto combinado de una mezcla de compuestos. Algunos estudios sobre ácidos fenólicos, alcaloides, lactonas sesquiterpénicas, monoterpenos y ácidos grasos volátiles, indican que cuando diversos compuestos actúan al unísono, su actividad inhibitoria puede ser aditiva o sinérgica, dependiendo de las concentraciones y estructura de cada uno de ellos. Del mismo modo, los diversos tipos de estrés tanto bióticos como abióticos, frecuentemente estimulan la producción de ciertos aleloquímicos, por ejemplo las cumarinas, tales como la escopoletina y escopolina, se

incrementan en el tabaco y el girasol como respuesta a herbicidas, nutrientes, temperatura y radiación (Einhellig, 1995). Hanson et al. (1983) encontró que en la cebada, se incrementa la producción de alcaloides cuando las plantas crecen a temperaturas altas.

## **IMPORTANCIA DE LA ALELOPATIA**

Las interacciones alelopáticas constituyen un fenómeno más común de lo que se pensaba, el cual aparece en todos los ecosistemas naturales y en aquellos manejados por el hombre (Einhellig, 1988). La gran diversidad de aleloquímicos que están implicados en la alelopatía, puede afectar otros procesos dentro del ecosistema, como los patrones de vegetación en diversas comunidades de plantas, la sucesión vegetal, la preservación de semillas, la germinación de esporas de hongos, el ciclo del nitrógeno, las asociaciones mutualistas, la productividad de los cultivos y la defensa de las plantas (Einhellig, 1995). El potencial de la alelopatía ha sido bien documentado en décadas recientes, particularmente en relación a su efecto en ecosistemas naturales como en agroecosistemas. Los metabolitos secundarios pueden ser un factor importante en la determinación de la sucesión de plantas (Smith, 1999), aunque sin duda, es poco realista señalar a un solo factor como el responsable de la distribución de la vegetación. En algunos casos se puede establecer que el patrón de distribución observado es mejor explicado por un mecanismo en particular (Inderjit y Weston, 2000).

### **Impacto de la alelopatía sobre ecosistemas naturales**

**Patrones de vegetación.** Los estudios clásicos de zonación de vegetación en el chaparral de California, realizados por Muller (1968), describen a *Salvia leucophylla*, *Artemisia californica* y otros arbustos, como plantas productoras de compuestos aromáticos, los cuales son liberados al ambiente en grandes cantidades; una gran variedad de terpenos volátiles forma parte de los aromas despedidos por estas plantas y, como se mencionó, pueden tener efectos alelopáticos sobre diversos organismos. Los compuestos terpenicos pueden ser absorbidos de las partículas del suelo, por las raíces de las plantas que viven asociadas a estos arbustos y que intentan establecerse en las proximidades de los mismos. Los terpenos presentes en las dos especies han

sido caracterizados e identificados y además, compuestos idénticos han sido aislados de muestras tomadas del suelo. Estos compuestos inhibieron el crecimiento de plantas y la germinación de semillas. Los dos compuestos alelopáticos más importantes en *S. leucophylla* son el 1,8 cineol y el alcanfor. También están presentes el  $\alpha$  y  $\beta$  pineno. En *A. californica*, los dos compuestos alelopáticos más importantes son también el 1,8 cineole y el alcanfor. Otros agentes volátiles de *A. californica* incluyen el  $\alpha$ -thujona e isothujona (Harborne, 1993). Además de los terpenoides, ciertos ácidos fenólicos solubles en agua, son lixiviados de las hojas de estos y otros arbustos adicionándose al complejo de aleloquímicos inhibitorios, presentes en el suelo. Los pastos anuales son sensibles a estos aleloquímicos, y el resultado es que se forma una zona de escasa vegetación alrededor de los arbustos, la cual puede variar con la precipitación estacional, y con otros factores del medio, como la presencia de herbívoros que viven dentro de los arbustos. Sin embargo, el que una planta sea aromática, no quiere decir necesariamente que es alelopática (Einhellig, 1985).

**Sucesión.** Rice y colaboradores proporcionaron la mayor documentación del efecto de la alelopatía sobre la sucesión. Su estudio se enfocó sobre la secuencia de etapas sucesionales naturales después de que campos agrícolas con baja fertilidad fueron abandonados. En la primera etapa, estos campos fueron cubiertos, en un periodo de dos a tres años, por malezas pioneras, y después de un periodo largo de quizá una docena de años, la comunidad vegetal estaba completamente dominada por un pasto anual, *Aristida oligantha*. Esta segunda etapa de la sucesión, eventualmente dio paso al crecimiento en abundancia del pasto de pradera de la especie *Andropogon scoparius*, el cual estuvo presente 30 años después del abandono. Si el campo se dejara sin perturbar durante varios años, la sucesión alcanzaría la etapa en la cual dominan los verdaderos pastos de pradera (Smith, 1999).

Investigaciones posteriores confirmaron que la etapa sucesional corta, donde predominaron las malezas, estuvo determinada por un fenómeno de autotóxicidad, debido a que estas malezas: *Helianthus annuus*, *Ambrosia psilostachya*, *Sorghum halepense*, *Digitaria sanguinalis* y otras, liberan aleloquímicos que reducen su propia sobrevivencia, mientras que la especie de

la segunda etapa fue mas tolerante a estos aleloquímicos. Los alelopáticos causantes de este fenómeno de autotóxicidad se identificaron como escopoletina, ácido clorogénico, ácido tánico y muchos derivados del ácido cinámico y benzoico (Einhellig, 1995).

### **Interacciones alelopáticas en la agricultura**

Como se había mencionado, todas las plantas producen compuestos secundarios que pueden ser liberados al ambiente. Las malezas y los cultivos no son una excepción, por ello es común encontrar interacciones alelopáticas cultivo-cultivo y cultivo-maleza. La cantidad y calidad de aleloquímicos en el suelo se enriquece gracias a la acción de los microorganismos sobre la materia orgánica durante la descomposición de la misma y/o a través de su propio metabolismo. Comúnmente, el ciclaje de aleloquímicos por la matriz del suelo, y su impacto sobre cultivos y malezas es a través del contacto con las raíces (Einhellig, 1988).

**Interferencia por malezas.** Puesto que las malezas son una causa muy importante de pérdidas en la producción agrícola, sus hábitos de crecimiento, particularmente de las especies más dañinas, han sido ampliamente estudiados. Putnam y Weston (1986) describieron cerca de 90 especies de malezas con potencial alelopático, y desde entonces, muchas otras han sido reportadas, como por ejemplo, *Parthenium hysterophorus*, *Elytrigia repens*, *Agropyron repens*, *Sorghum halepense*, *Cirsium arvense* y *Setaria faberi* entre otras. Entre las malezas antes mencionadas, *Parthenium hysterophorus*, la cual es una especie tropical endémica de América, ha causado grandes daños desde que introdujó a la India y a otros lugares en el mundo. Numerosos reportes de las últimas dos décadas, documentan la fitotoxicidad de sus tejidos vivos y en descomposición, sus lixiviados y los exudados de sus raíces. Los efectos de esta maleza sobre los cultivos receptores y otras arvenses, incluyen reducción de las clorofilas, de la asimilación de nutrimentos y de la nodulación en leguminosas. Diversas lactonas sesquiterpénicas, ácidos fenólicos y ácidos orgánicos, han sido identificados como los agentes responsables (Einhellig, 1995).

**Interferencia por cultivos.** Algunos de los cultivos más importantes producen aleloquímicos que pueden afectar el crecimiento de malezas, originar problemas de auto toxicidad o influir en el crecimiento del siguiente cultivo. Los cultivos de girasol (*Helianthus annuus*), sorgo (*Sorghum halepense*) y centeno (*Secale cereale*) son quizá los ejemplos mejor documentados al respecto; tanto los tejidos vivos como los residuos de estos cultivos poseen un importante potencial alelopático.

Un experimento de campo llevado a cabo durante tres años, demostró que cuando el sorgo fue cultivado con maíz y soya, la biomasa de las malezas donde el sorgo había crecido previamente, fue reducida más de 50 % comparada a la de los otros dos cultivos. La causa probable de esta disminución de malezas, es la producción de una combinación de aleloquímicos fenólicos, glucósidos cianogénicos y sorgoleona por el sorgo (Einhellig, 1995).

La producción de sorgo y girasol presenta un marcado declive cuando estos cultivos son replantados año tras año, y esto pasa también, aunque en menor grado, con el trigo (*Triticum aestivum*), el arroz (*Oryza sativa*) y el maíz (*Zea mays*), entre otros. Estos problemas de autotóxicidad se pueden reducir a través de una rotación de cultivos apropiada, en la cual se pueden obtener efectos estimulantes de unos cultivos sobre otros. La producción de alfalfa y algunas legumbres perennes disminuyen debido a la autotóxicidad (Einhellig, 1995). La alfalfa contiene aleloquímicos solubles en agua los cuales son tóxicos para sí misma y otras plantas (Rizvi, 1992).

### **Aplicaciones de la alelopatía**

La ciencia de la alelopatía ha progresado hasta el punto que sus fundamentos descriptivos y experimentales proveen una base que puede ser usada en estudios, por ejemplo, sobre producción agrícola y desarrollo de una agricultura más ecológica y sustentable, que incluya el control de plagas, a través de rotación de cultivos, manejo de residuos y una variedad de métodos de biocontrol. Muchos aleloquímicos son compuestos que pueden tener un uso potencial como plaguicidas o sustancias controladoras del crecimiento. Por otro lado, se puede realizar una modificación genética de ciertas plantas para controlar la producción de aleloquímicos (Einhellig, 1988).

Desde el punto de vista de su utilidad potencial, los aleloquímicos resultan de gran interés porque pueden dar origen a nuevos fitoinhibidores, antimicrobianos, reguladores del crecimiento y plaguicidas en general, que al ser de origen natural, se degradan fácilmente, y por lo tanto, su impacto sobre el ambiente será menor. Esta utilidad potencial de los aleloquímicos abre nuevos caminos de investigación, en particular, los relacionados con la producción agrícola basada en un manejo de recursos más ecológico y adecuado que el que actualmente se lleva a cabo en la mayor parte de los agroecosistemas modernos, esto permitirá que se cubran las futuras necesidades de la población humana mediante un sistema de producción agrícola apropiado, que reduzca la aplicación de agroquímicos sintéticos dañinos, y por ende, proteja el suelo, el agua, la comunidad biótica en general y la salud humana (Anaya, 1994).

Para lograr lo anterior, podemos aprender de la naturaleza, observando e investigando las formas de relación bioquímica que una planta específica tiene con otros organismos. Esto permitirá que la atención se enfoque sobre los productos naturales que intervienen en estas relaciones; su aislamiento e identificación y los bioensayos realizados con ellos, permitirán encontrar nuevas estructuras de herbicidas más específicos y menos dañinos que los sintéticos usados actualmente (Macias, 1995).

### **Antecedentes y justificación del estudio**

Dentro del proyecto 'Búsqueda de biocidas en algunas plantas de las comunidades vegetales de la reserva ecológica El Edén, Quintana Roo, que se está realizando en el Laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología de la UNAM (Anaya y del Amo, 1999), se han realizado diversos estudios con el fin de encontrar compuestos bioactivos en especies vegetales de diferentes comunidades de esta reserva. El Edén está localizado en la gran región de Yalahau en el norte de Quintana Roo; esta región es una muestra bien preservada de la rica biodiversidad que existe en la Península de Yucatán y contiene más de 250 mil ha de ambientes naturales bien preservados que representan los principales ecosistemas de la Península de Yucatán y el Caribe. Esta zona es considerada como una de las de mayor biodiversidad en toda la península de Yucatán y posee una alta cantidad de endemismos. Con

base en los resultados de los estudios preliminares sobre el potencial alelopático de algunos árboles de selva, se escogió una especie muy promisorio por sus efectos sobre las plantas de prueba, y por ser una especie arbórea común en la zona. Se realizó un estudio fitoquímico biodirigido con el fin de confirmar su potencial alelopático, aislar e identificar los metabolitos responsables de la bioactividad mostrada. La especie seleccionada fue *Zuelania guidonia* (Sw.) Britton & Millsp. de la familia Flacourtiaceae.

### **La Familia Flacourtiaceae**

Está formada por árboles y arbustos principalmente, y cuenta con 86 géneros y alrededor de 800 especies ampliamente distribuidas en regiones tropicales, un tercio de ellas en los Neotrópicos. Dentro de las Flacourtiaceae, frecuentemente son encontrados compuestos cianogénicos en asociación con un sistema de anillos ciclopentanoides, y también protoantocianinas y pigmentos flavonoides. (Cronquist, 1981). La familia tiene la reputación de contener alcaloides tóxicos, especialmente en corteza y hojas de algunos géneros (Nee, 1999). Esta familia presenta similitudes con ciertas familias de Malvales, especialmente con las Tiliaceae y Elaeocarpaceae. También está cercanamente relacionada con otras familias de Violales. Varios representantes de las Flacourtiaceae se reconocen por su valor medicinal, alimenticio u ornamental. También se emplea en la ebanistería o en la construcción de habitaciones, pero su importancia es marginal (Rzedowski, 1996).

### **Género *Zuelania***

Este género de las Flacourtiaceae está compuesto por arbustos, y más comúnmente, por árboles. Es un género monotípico del oriente de México, Centroamérica, norte de Sudamérica y las Antillas.

### **Especie *Zuelania guidonia* (Sw.) Britt. and Millsp.**

**Descripción.** Árbol monopódico de hasta 30 m de altura y 50 cm de diámetro, con el tronco muy recto y el fuste muy largo y limpio, sin contrafuertes con ramas horizontales y copa redondeada; la corteza externa es lisa, grisácea, de

18 a 20 mm de grosor, con algunas lenticelas suberificadas y protuberantes. Posee hojas alternas, oblongas a oblongo-elípticas, de 10 a 20 cm de largo, 3-8 cm de ancho, con el margen entero, ápice acuminado, base obtusa a subcordada; verde brillante con la nervadura pubescente en el haz, verde amarillentas, opacas y pubescentes en el envés; numerosas glándulas transparentes en forma de puntos y rayas en la lámina. Inflorescencias en densos fascículos terminales, surgiendo de retoños debajo de las hojas o de la axilas. Las flores actinomorfas, con un fuerte olor a gardenia, amarillento-verdosas. El fruto es una cápsula de hasta 8 cm de diámetro, carmosa, trivalvada y globosa, verde-amarillenta. Contiene numerosas semillas rodeadas de una pulpa amarillenta (Pennington y Sarukán, 1968).

**Distribución.** Especie restringida a la vertiente del Golfo de México, desde el sur de Tamaulipas y sureste de San Luis Potosí hasta la Península de Yucatán, desde el nivel del mar hasta los 500-700 m. Forma parte del estrato superior o medio de selvas altas perennifolias o medianas subperennifolias y subcaducifolias. Se presenta exclusivamente en suelos de origen calizo con poco material rocoso y con buen drenaje. Puede encontrarse como elemento abundante en la vegetación secundaria de selvas altas perennifolias y medianas subperennifolias (Pennington y Sarukán, 1968). Es muy común que el tronco de *Zuelania guidonia* se utilice como poste en la ceremonia de los voladores de Papantla.

#### **Compuestos químicos aislados de la especie *Zuelania guidonia*.**

Se ha reportado que las hojas de *Zuelania guidonia* contienen una gran cantidad de taninos condensados. Además de los compuestos ya conocidos como  $\alpha$ -tocotrienol,  $\delta$ -tocotrienol, y 13 $\beta$ -hidroxilabda-7,14-dieno, se han encontrado varios compuestos en la corteza de *Zuelania guidonia*, a través de estudios espectroscópicos en un primer estudio realizado se identificaron cuatro nuevos diterpenos que se nombraron 2 $\alpha$ -hidroxizuelanina-6 $\beta$ -cinamato, 6 $\beta$ -hidroxizuelanina-2 $\alpha$ -cinamato, 2 $\beta$ -hidroxizuelanina-6 $\beta$ -cinamato y 2 $\beta$ -acetoxisozuelanina-6 $\beta$ -cinamato (Khan, et al. 1990a)(Figura1). En un segundo estudio realizado se identificaron ocho nuevos diterpenos a través de RMN que se denominaron como sigue: zuelanina-2 $\beta$ -benzoato, 6 $\beta$ -hidroxizuelanina-2 $\alpha$ -

acetato, 6β-hidroxizuelanina-2α-n-octanoato, 6β-hidroxizuelanina-2β-n-octanoato, 6β-hidroxizuelanina-2β-benzoato, 6β-hidroxisozuelanina-2β-benzoato, 2α-hidroxizuelanina-6β-benzoato y 2α-hidroxizuelanina-6β-n-(3-hidroxi)octanoato (Khan, et al., 1990b).

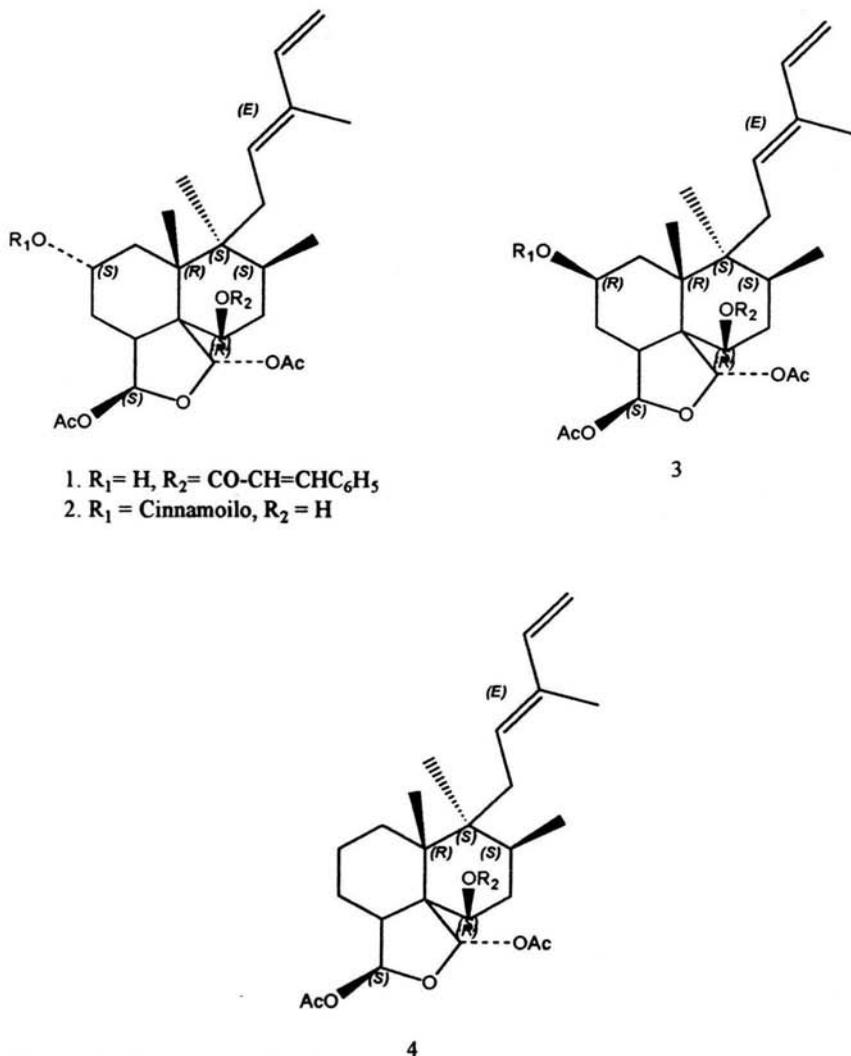


Figura 1. Estructuras de diterpenos aislados de la corteza de *Zuelania guidonia*.

## **OBJETIVOS DEL TRABAJO**

Los objetivos del presente trabajo fueron los siguientes:

1. Valoración del potencial aleloquímico de los lixiviados acuosos y extractos orgánicos de las hojas de *Zuelania guidonia*, mediante bioensayos con los siguientes organismos de prueba: semillas de *Echinochloa crusgalli*, *Lycopersicon esculentum* y *Amaranthus hypochondriacus*; dos hongos fitopatógenos: *Fusarium sp.* y *Alternaria sp.*; y el crustáceo *Artemia salina*.
2. Realización de un fraccionamiento biodirigido de los extractos con mayor bioactividad, con la ayuda de técnicas cromatográficas diversas.
3. Identificación de la estructura química de los principales aleloquímicos aislados, mediante técnicas espectroscópicas, RMN, IR y espectrometría de masas.

## **MATERIALES Y METODOS**

Las hojas de *Zuelania guidonia* se colectaron de un ejemplar arbóreo adulto, en etapa vegetativa, con aspecto robusto y sano, dentro de la Reserva Ecológica del Edén, Q. Roo. Las hojas de *Zuelania guidonia* se secaron a temperatura ambiente y se guardaron en bolsas de papel para transportarlas al laboratorio.

### **Preparación de los lixiviados acuosos**

Las hojas secas (2g) se lixiviaron en un vaso de precipitado con 100 ml de H<sub>2</sub>O desionizada (2%) durante 3 horas. El lixiviado se filtró primero con papel filtro Whatman No. 4 y después, a través de una membrana milipore. El potencial osmótico de este lixiviado se midió mediante un osmómetro de punto de congelación (Osmette A) con el fin de asegurarse que la presión osmótica no rebasara los límites de tolerancia de las semillas de prueba.

### **Preparación de los extractos orgánicos.**

Las hojas secas (1.3 kg) se molieron en una licuadora para reducir su volumen y se maceraron repetidamente con disolventes de creciente polaridad en un matraz de 6 lt. Los disolventes utilizados de menor a mayor polaridad fueron hexano, cloroformo, cloroformo-metanol 1:1, metanol y agua. Cada maceración tuvo una duración de 48 horas. Transcurrido cada periodo de maceración, el respectivo extracto se filtró a través de papel Whatman No. 4 y se concentró por medio de un rotavapor. El extracto acuoso (última fase de la extracción orgánica), se filtró por medio de papel Whatman No. 4 y una membrana milipore. Todos los extractos (excepto el acuoso) se secaron a temperatura ambiente hasta evaporar totalmente el disolvente respectivo antes de ser evaluados biológicamente. El procedimiento realizado se observa en la Figura 2. Se midió la presión osmótica del extracto acuoso para evitar que fuera muy elevado y poderlo utilizar directamente.

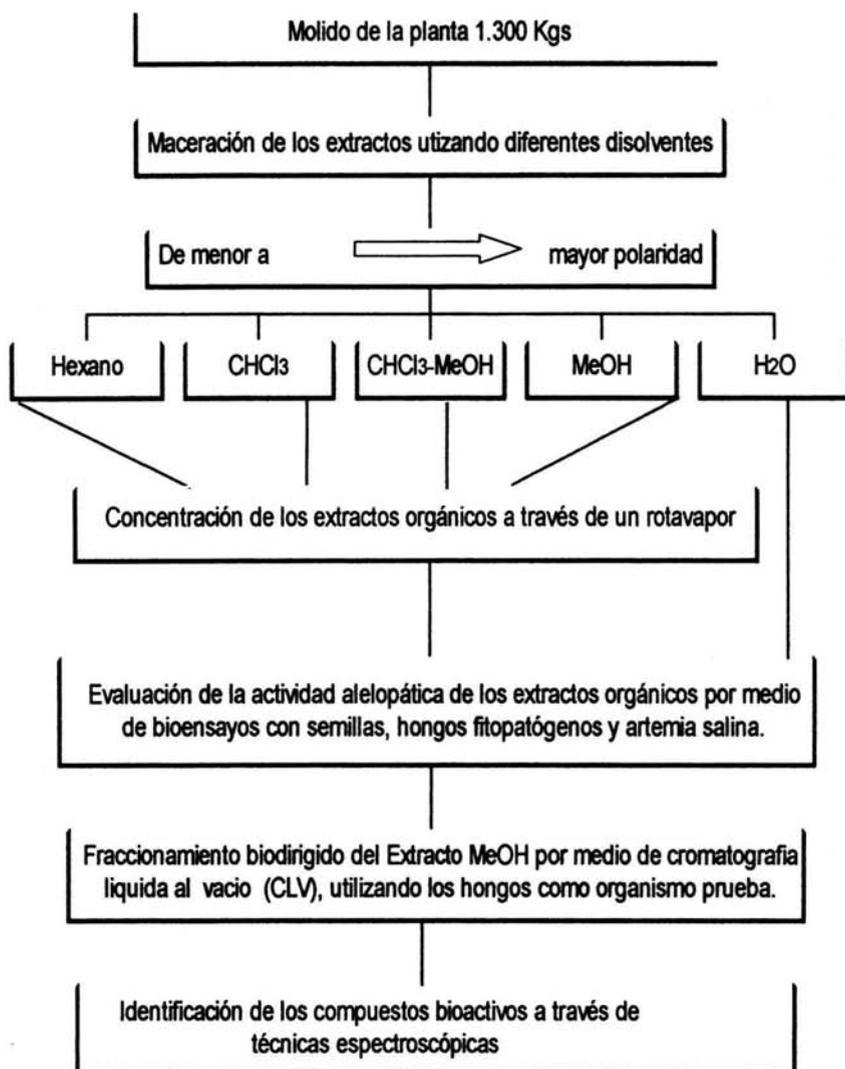


Figura 2. Procedimiento realizado para la obtención de los extractos orgánicos, y la identificación de los compuestos responsables de la bioactividad antifúngica.

### **Bioensayos con semillas.**

La evaluación del lixiviado acuoso (1 %) y los extractos orgánicos sobre semillas, se realizó en cajas de petri de 5.5 cm, con las siguientes especies: *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli* y *Lycopersicon esculentum*.

### **Bioensayos en agar como sustrato.**

Tres mL del lixiviado acuoso y del extracto acuoso al 2 %, se mezclaron por separado con 3 ml de agar (2 %) en una caja de petri; de esta forma se obtuvo una concentración final de 1 % en cada tratamiento incorporado al agar. Los experimentos se llevaron a cabo bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento; el control consistió en una mezcla de agar con agua desionizada en la misma proporción que los demás tratamientos.

En el caso de los extractos cloroformo:metanólico y metanólico., se pesaron 8 mg de cada uno de estos extractos y se disolvieron, por separado, en la menor cantidad posible del disolvente adecuado (alrededor de 0.5 mL); después se añadieron a cada uno, 40 mL de agua desionizada para obtener una disolución de 200 ppm. A cada caja de Petri se le añadieron 3 ml de agar al 2 % y 3 ml de la respectiva solución a 200 ppm, para obtener una concentración final del extracto de prueba de 100 ppm. En estos bioensayos se usaron dos controles, uno con agua desionizada y otro con el disolvente utilizado para disolver el extracto.

Tanto en los tratamientos solubles en agua como en los insolubles, después de haber solidificado el agar, se sembraron en cada caja de Petri, 10 semillas de la correspondiente especie de prueba, se sellaron las cajas con una tira de parafilm y se colocaron en una germinadora en la oscuridad a 27°C. Después de 36, 48 y 64 horas (*A. hypochondriacus*, *E. crusgalli* y *L. esculentum* respectivamente), se midió la longitud de la raíz de las plántulas y los datos se analizaron por medio de un ANOVA y pruebas de Tukey (Mead et al., 2002).

**Bioensayos en papel filtro:** Estos bioensayos se realizaron con los extractos menos polares (hexano y cloroformo). Para ello se preparó una disolución patrón disolviendo 1 mg del extracto en 10 ml del disolvente apropiado, obteniéndose una disolución a 100 ppm. A cada caja Petri se le

colocó un papel filtro Whatman No. 42 y se le añadieron 1.5 mL de la disolución patrón; el disolvente se dejó evaporar en una campana de extracción, y a cada caja se le agregaron 1.5 mL de agua desionizada. Se usaron dos controles, uno con agua desionizada y otro con el disolvente utilizado para disolver el extracto. En este último caso, el disolvente se dejó evaporar totalmente, añadiéndose después los 1.5 mL de agua desionizada. La metodología restante fue similar a la de los bioensayos en agar.

### **Bioensayos con hongos fitopatógenos.**

Para evaluar el efecto del lixiviado acuoso y del extracto acuoso sobre el crecimiento radial de las dos especies de hongos de prueba: *Fusarium sporotrichoides* y *Alternaria* sp., siguió el procedimiento descrito para las semillas, pero en lugar de agar como sustrato, se utilizó PDA (papa-dextrosa-agar) (Merck). La evaluación de los extractos orgánicos sobre el crecimiento de los dos hongos de prueba, se realizó solo con los extractos cloroformo-metanol (1:1) y metanólico (100%). No se evaluaron los extractos de hexano y cloroformo debido a la insolubilidad de éstos en la mezcla metanol-agua que se utiliza para incorporar los tratamientos al PDA.

Los hongos se tomaron de cultivos de 10 días de edad, incubados en la oscuridad en una estufa de crecimiento a 25°C. En vista de que estos organismos de prueba resultan más resistentes a los extractos orgánicos comparados con las semillas, los extractos se evaluaron a 250 ppm sobre el crecimiento radial de los hongos. En condiciones estériles, se preparó una solución patrón con 15 mg de cada extracto diluidos en la menor cantidad posible de MeOH (alrededor de 0.5 ml); después se agregaron 30 ml de agua desionizada estéril, para obtener una disolución de 500 ppm. A cada caja de petri se le añadieron 3 ml de PDA estéril y 3 ml de la disolución patrón a 500 ppm. Obteniéndose una concentración final de 250 ppm para cada extracto. En el centro de cada caja se puso una muestra del hongo de prueba de 5 mm de diámetro, las cajas se incubaron a temperatura ambiente, con un fotoperiodo de 12:12 h, bajo un diseño completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento. Se utilizó un control de agua desionizada y uno de MeOH. El crecimiento radial se evaluó a los tres y seis días, haciendo un promedio de

dos mediciones perpendiculares del diámetro del micelio; los datos se analizaron por medio de un ANOVA y pruebas de Tukey (Mead et al., 2002).

#### **Bioensayos con *Artemia salina*.**

Las larvas de *Artemia salina* se obtuvieron de un cultivo previo preparado con cloruro de sodio y sulfato de magnesio (San Francisco Bay Brand INC), al cual se le añadió agua desionizada en una proporción de 100 mL por 1.75 g del medio. En este medio, se pusieron los huevecillos, manteniéndolos en baño maría a 30°C con luz artificial por 24 horas, después de las cuales, las larvas eclosionaron. Se preparó una disolución patrón de los extractos, disolviendo 20 mg en 2 mL de un disolvente adecuado. se transfirieron 5, 50 y 500 µL de cada disolución por separado, a frascos viales y por triplicado. Se dejó evaporar el disolvente a sequedad y posteriormente se añadieron a cada vial 5 mL de agua salina preparada (36.5 g/L de sal de mar sintética Instan Ocean en agua destilada), obteniéndose así concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm. Se transfirieron 10 larvas a cada uno de los viales conteniendo los tratamientos a evaluar. Los experimentos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. Transcurridas 24 horas, se registró el número de *Artemias* muertas en cada tratamiento y se evaluó el índice de mortalidad mediante una prueba de Probit (SPSS 10.0 para Windows) (Anderson et al., 1991).

#### **Eliminación de pigmentos del extracto metanólico con benceno**

Con base en los resultados de los bioensayos con los extractos orgánicos, se decidió continuar el fraccionamiento biodirigido con el extracto metanólico y los hongos fitopatógenos como organismos de prueba.

Para poder realizar el fraccionamiento con mayor facilidad, se eliminaron los pigmentos del extracto metanólico. Cuarenta gramos de éste se disolvieron en 100 ml de MeOH y se vertieron en un embudo de separación, al que se le agregaron 100 mL de benceno y 5 mL de H<sub>2</sub>O desionizada; la mezcla se agitó fuertemente con el fin de extraer con el benceno, la mayor cantidad posible de pigmentos del extracto metanólico. La presencia de agua en esta mezcla permitió visualizar la formación de dos fases en el embudo, benceno (arriba) y metanol (abajo). Ambas fases fueron recuperadas en diferentes matraces. La

fase metanólica se vació en otro embudo y se repitió el mismo procedimiento dos veces más. La cantidad de clorofilas extraídas fue de 10 g, obteniéndose al final 30 g del extracto metanólico.

#### **Fraccionamiento del extracto metanólico a través de cromatografía líquida al vacío (VLC).**

La técnica del fraccionamiento por cromatografía líquida al vacío se lleva a cabo de acuerdo con Pelletier et al. (1986). En esta técnica se utilizó un embudo de vidrio que contiene un filtro poroso sobre el cual se deposita una capa de sílica gel 60 G para cromatografía en capa fina (MERCK). El embudo se embona en un matraz quitasato que se conecta a la bomba de vacío (20-70 Hg). El vacío se aplica por unos cuantos segundos con el fin de compactar la sílica de manera uniforme; después de esto, se vierte rápidamente un disolvente de la más baja polaridad posible sobre la superficie de la sílica y se aplica de nuevo el vacío. El disolvente debe de pasar uniformemente a través del embudo humedeciendo de esta forma la columna. El extracto metanólico que se fraccionó mediante esta técnica se disolvió con cloroformo y se introdujo cuidadosamente en el embudo, después se adiciono mayor cantidad de cloroformo hasta cubrir el espacio disponible en el embudo. Se aplicó el vacío para que el disolvente arrastrará los compuestos miscibles en él. Para llevar a cabo el fraccionamiento se utilizó un gradiente de menor a mayor polaridad como se explica en detalle mas adelante. El proceso del fraccionamiento completo se observa en la Figura 3.

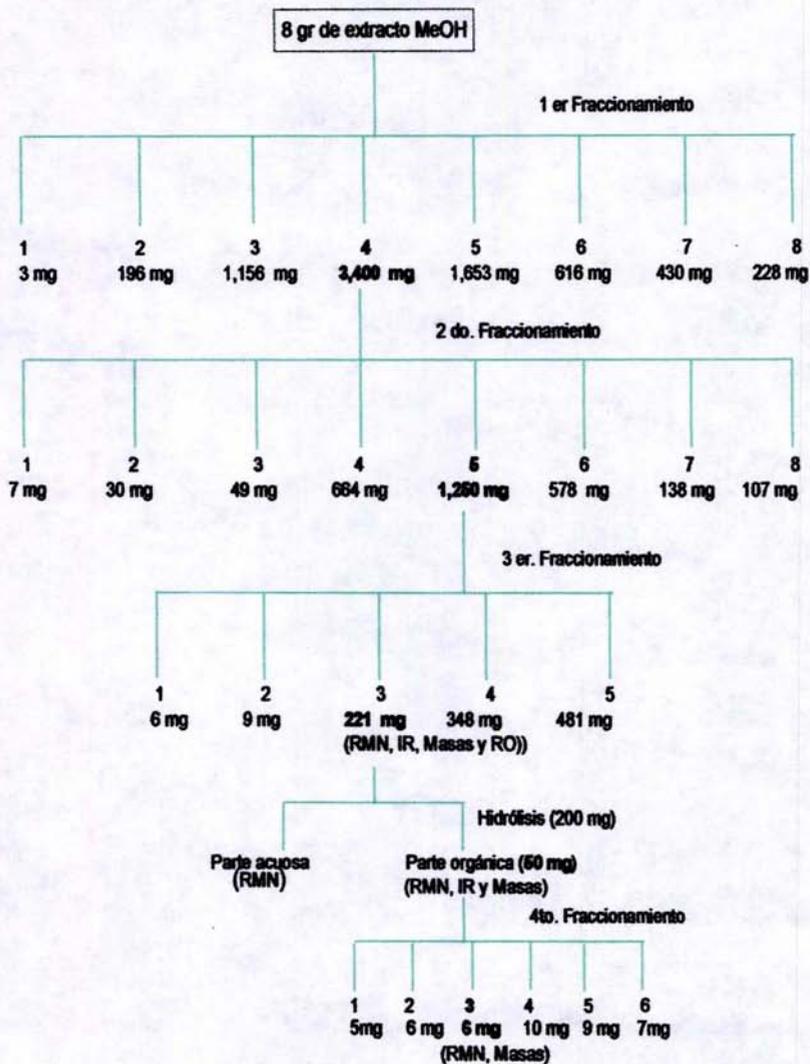


Figura 3. Fraccionamiento del extracto MeOH por medio de cromatografía líquida al vacío (CLV).

**Primer fraccionamiento.** Se fraccionaron 8 gramos del extracto MeOH por medio de CLV utilizando un gradiente de disolventes (300 ml de cada uno) como sigue:  $\text{CHCl}_3$  (1),  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 90:10 (2),  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 80:20 (3),  **$\text{CHCl}_3$ -MeOH 70:30 (4)**,  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 60:40 (5),  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 50:50 (6),  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 40:60 (7), MeOH (8). De las 8 fracciones obtenidas, la 4 presentó actividad inhibitoria significativa sobre el crecimiento radial de los hongos. Las fracciones se analizaron por cromatografía de capa fina (CCF) utilizando una fase móvil de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (2:1).

**Segundo fraccionamiento.** La fracción 4 (3.4 g) se volvió a fraccionar mediante CLV, utilizándose 300 mL de cada uno de los siguientes disolventes:  $\text{CHCl}_3$  (1),  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 95:5 (2),  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 90:10 (3),  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 85:15 (4),  **$\text{CHCl}_3$ -MeOH 80:20 (5)**,  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 75:25 (6),  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 70:30 (7), MeOH (8). De las ocho fracciones obtenidas, la 5 se utilizó para llevar a cabo el tercer fraccionamiento, debido al efecto de inhibición significativo que provocó en el crecimiento radial de los hongos fitopatógenos. Las fracciones se analizaron también por cromatografía de capa fina (CCF) utilizando una fase móvil de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (2:1).

**Tercer fraccionamiento.** La fracción 5 del segundo fraccionamiento se disolvió en una mezcla  $\text{CHCl}_3$ :MeOH 95:5 y se le realizó un fraccionamiento líquido al vacío (CLV), de igual forma que los dos anteriores. La mezcla de disolventes utilizada fue:  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 95:5 (1),  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 90:10 (2),  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 85:15 (3),  **$\text{CHCl}_3$ -MeOH 80:20 (4)**, MeOH (5). La fracción 3, presentó la mayor actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los hongos, por este motivo fue elegida para realizar con ella (50 mg) los estudios espectroscópicos de RMN, IR, espectrometría de Masas y Rotación óptica. El análisis cromatográfico por CCF se realizó con la misma fase móvil que en los anteriores dos fraccionamientos.

### **Hidrólisis**

La mencionada fracción terciaria No. 3 (200 mg) fue hidrolizada en 10 ml de MeOH y 1 ml de HCl durante una hora a una temperatura de 90° C, obteniéndose una fase orgánica y una fase acuosa. De la primera se

recuperaron 60 mg que fueron evaluados sobre las dos especies de hongos prueba; los resultados indicaron que la actividad alelopática se perdió después de la hidrólisis. En la cromatografía de capa fina para evaluar la fase orgánica, se utilizó como fase móvil una mezcla de hexano-acetato de etilo 7:3.

**Cuarto fraccionamiento.** Este se realizó mediante CLV con 45 mg de la fase orgánica obtenida durante la hidrólisis de la fracción terciaria No. 3. Este fraccionamiento se inició disolviendo esta fracción en hexano:acetato de etilo 90:10 (1), y continuando con las siguientes proporciones de la misma mezcla: 85:15 (2), **80:20 (3)**, 75:25 (4), 70:30 (5), 50:50 (6). De las seis fracciones obtenidas, la No. 3 fue seleccionada para realizar los estudios espectroscópicos de RMN y Masas. El análisis cromatográfico por CCF realizado para este fraccionamiento se llevó a cabo ocupando una fase móvil de hexano-acetato de etilo 7:3.

#### **Identificación de las estructuras químicas de las sustancias activas por Resonancia Magnética Nuclear, Infrarrojo, Masas y Rotación Óptica.**

La determinación estructural estudios de los compuestos bioactivos, de la Fracción 3 del 3er fraccionamiento, de las hojas de *Zuelania guidonia*, se realizaron mediante la interpretación de los datos obtenidos de las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrogeno y carbono 13 ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) y Masas. También se obtuvieron espectros mediante las técnicas de HETCOR, COSY, DEPT, NOESY, ROESY, infrarrojo (IR) y rotación óptica (RO). En el caso de los componentes recuperados de la hidrólisis, para la fase acuosa se realizaron estudios de RMN de  $^1\text{H}$  y para la fase orgánica se hicieron estudios de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , IR y Masas, los cuales se llevaron a cabo, en el Instituto de Química de la UNAM.

Los espectros de IR se realizaron espectrómetro BRUKER-Tensor 27, se obtuvieron en solución de nujol. Los espectros de RMN, fueron determinados en un equipo BRUKER-AVANCE a 75, 200 y 300 MHz, según se especifica en cada espectro, en solución de metanol deuterado (MeOD) y para los realizados en piridina (C5D5N), se utilizó un equipo varian unity, para la fase acuosa de la hidrólisis agua deuterada (D2O) y para la fase orgánica cloroformo deuterado (CDCl3), utilizando como referencia tetrametilsilano (TMS).

Los espectros de masas fueron obtenidos de un espectrómetro JEOL JMS-SX102A, utilizando la técnica de FAB<sup>+</sup>. El análisis de Rotación óptica se realizó en un polarímetro JASCO Mol DIP-360.

Los espectros realizados a los compuestos aislados se muestran en el anexo.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los bioensayos con *Artemia salina* mostraron que ningún tratamiento tuvo un efecto significativo sobre la sobrevivencia de las larvas de este crustáceo, por esta razón estos resultados no se incluyen.

A continuación se presentan los resultados de los bioensayos realizados con el lixiviado acuoso, los extractos orgánicos y las diversas fracciones cromatográficas que se evaluaron sobre las tres especies de semillas y las dos especies de hongos fitopatógenos.

### Actividad sobre semillas

Tabla 1. Efecto del lixiviado acuoso y de los extractos orgánicos sobre el crecimiento de la raíz de las plantas de prueba, a las 24,36 y 48 horas respectivamente.

Tratamientos	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crusgalli</i>	<i>L. esculentum</i>
	% de crecimiento de la raíz		
Lixiviado acuoso	72*	84*	48*
Extractos orgánicos:			
Acuoso	71*	76*	33*
Hexánico	120*	87	114
CHCl <sub>3</sub>	104	104	109
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	88	70*	90
MeOH	107	74*	106

\* p < 0.05

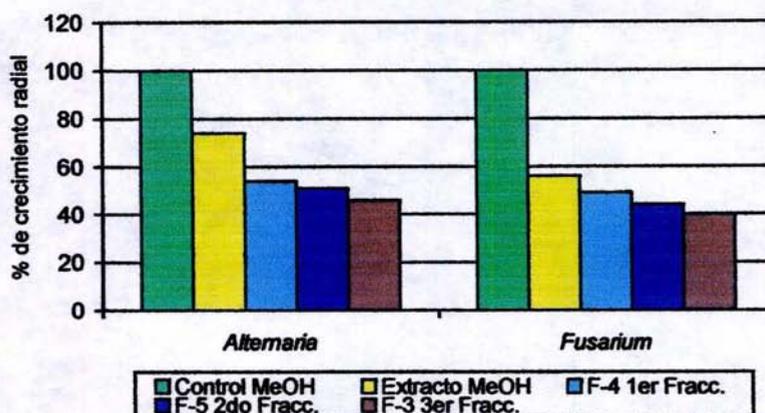


Figura 5. Efecto del extracto MeOH y las fracciones más activas de los tres fraccionamientos, sobre el crecimiento radial de *Alternaria* y *Fusarium*, a los seis días de siembra.

Como se muestra en la Figura 5, el efecto inhibitorio es ligeramente mayor sobre *Fusarium* que sobre *Alternaria*, pero en ambas especies, el porcentaje de inhibición producido por el extracto metanólico va aumentando gradualmente a medida que se va fraccionando el extracto y, consecuentemente, se van purificando los compuestos activos, hasta llegar a ser de 54-60 % con la fracción 3 del fraccionamiento terciario (Figuras 5 y 6).

### Actividad sobre hongos fitopatógenos.

El lixiviado acuoso y el extracto acuoso no mostraron actividad alguna sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos de prueba y por ello, estos resultados no se incluyen.

Los resultados obtenidos en los bioensayos para evaluar la actividad de los extractos cloroformo-metanol, metanol y de las fracciones más activas de los tres fraccionamientos sobre el desarrollo de los hongos se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Efecto de los extractos orgánicos y de las fracciones cromatográficas más activas del fraccionamiento primero, segundo y tercero del extracto metanólico sobre el crecimiento radial de los hongos fitopatógenos a los seis días de realizada la siembra. Los tratamientos se probaron a 250 ppm.

Tratamiento	<i>Fusarium</i>	<i>Alternaria</i>
	% de crecimiento radial	
Extracto CHCl <sub>3</sub> :MeOH 1:1	99	100
Extracto MeOH	56*	74*
1 <sup>er</sup> Fracc. (F4)	49*	54*
2 <sup>o</sup> . Fracc. (F5)	44*	51*
3 <sup>er</sup> Fracc. (F3)	40*	46*

\* p < 0.05

Como se puede ver en la Tabla 2. El único extracto orgánico que presentó actividad sobre el crecimiento de los hongos fue el extracto metanólico, el cual inhibió significativamente el crecimiento radial de *Fusarium* y *Alternaria* (44% y 26% respectivamente); las tres fracciones más activas de los tres fraccionamientos realizados a la parte aérea de *Zuelania guidonia*, resultaron significativamente inhibitorias para los dos hongos de prueba. La fracción 3 (F-3) del tercer fraccionamiento fue el tratamiento con mayor actividad inhibitoria (60 % y 54 % respectivamente).

La Tabla 1 muestra que la mayor inhibición sobre el crecimiento de la raíz de las tres plantas de prueba la ocasionaron el lixiviado acuoso y el extracto acuoso. Los extractos  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:1) y metanólico (100%) sólo inhibieron de manera significativa el crecimiento radical de *E. crusgalli*. Un efecto interesante es la estimulación significativa del crecimiento de la raíz de *Amaranthus* causada por el extracto hexánico.

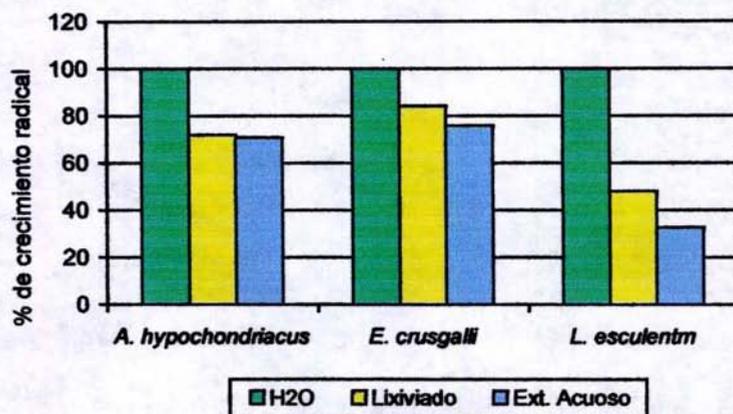


Figura 4. Efecto del lixiviado acuoso y del extracto acuoso sobre el crecimiento de la raíz de las tres plantas de prueba a las 24, 36 y 48 horas respectivamente.

La Figura 4 muestra que el crecimiento de la raíz de *L. esculentum* fue el más inhibido tanto por el lixiviado acuoso (52 %) como por el extracto acuoso (67 %). En relación a la inhibición causada a la raíz de *A. hypochondriacus*, los porcentajes de inhibición son alrededor del 30 % con ambos tratamientos. Con respecto a *E. crusgalli*, podemos observar que fue la especie menos inhibida por estos dos tratamientos, el lixiviado acuoso la inhibe 16 %, mientras que el extracto acuoso la inhibe 24 %.

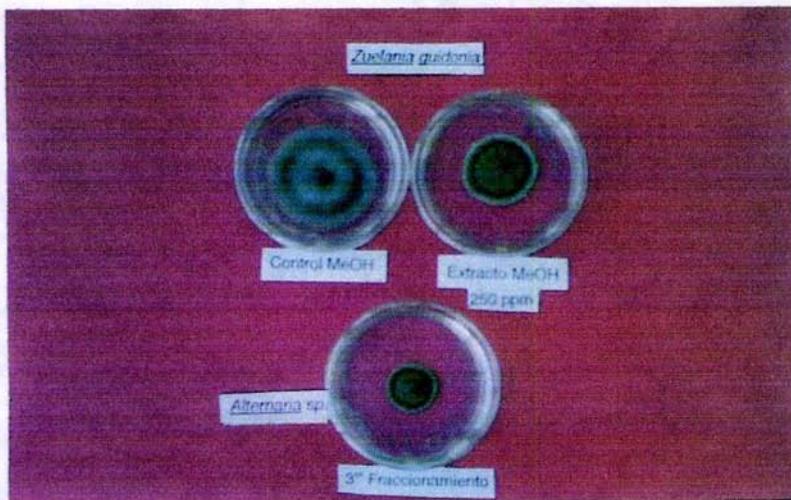


Figura 5. Efecto del extracto metanólico y la F-4 del 3er fraccionamiento sobre el crecimiento radial de *Alternaria*.

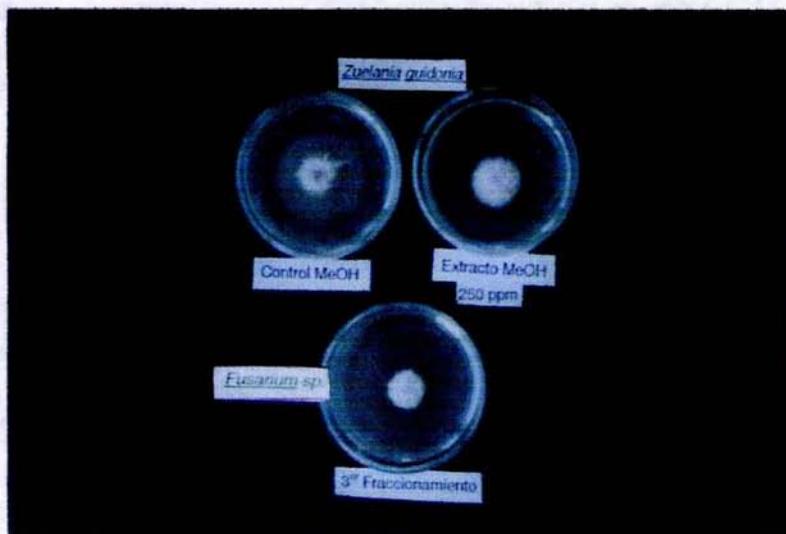


Figura 6. Efecto del extracto metanólico y la F 4 del 3er fraccionamiento sobre el crecimiento radial de *Fusarium*.

## **Caracterización preliminar de la mezcla de Zuelasaponina A y Zuelasaponina B.**

La mezcla de compuestos bioactivos Zuelasaponinas A y B se obtuvo del extracto metanólico de la fracción terciaria F-4 como un sólido amorfo de color amarillo claro, soluble en MeOH.

Su espectro en el IR mostró bandas características para grupos hidroxilo ( $3421\text{ cm}^{-1}$ ), C-H ( $2942, 1451\text{ cm}^{-1}$ ), grupos metilo geminal ( $1384\text{ cm}^{-1}$ ) y dobles ligaduras ( $1645\text{ cm}^{-1}$ ).

La solubilidad de la mezcla de compuestos en disolventes polares, las bandas observadas en el espectro de IR, así como la prueba positiva frente al reactivo de Molisch, permitió sugerir la naturaleza glicosídica de los compuestos.

El análisis del espectro de masa modalidad FAB<sup>+</sup> demostró que se trataba de una mezcla constituida por dos compuestos, los cuales se propone denominarlos Zuelasaponina A y Zuelasaponina B. La fórmula molecular de los productos se estableció como  $C_{47}H_{76}O_{20}$  y  $C_{48}H_{76}O_{19}$ , respectivamente.

El análisis del espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Espectro 1) permitió obtener la siguiente información:

a) En la zona comprendida entre  $\delta$  0.84-1.67, se observan ocho señales simple atribuibles a ocho grupos metilo terciarios, uno de los cuales, de acuerdo al desplazamiento químico que presenta ( $\delta$  1.67) debe corresponder a un metilo sobre doble ligadura.

b) Una señal doble de dobles en  $\delta$  3.11 ( $J= 4.4, 11.6\text{ Hz}$ ) que integra para un hidrógeno que, de acuerdo al desplazamiento químico observado, se asignó al protón geminal de una porción sacárida.

c) Un sistema AB ( $\delta$  4.63, 4.70  $J= 2.1\text{ Hz}$ ) correspondiente a los hidrógenos olefinicos de un metileno terminal.

d) Una señal doble en  $\delta$  5.16 ( $J= 8.4\text{ Hz}$ ) que integra para un hidrógeno y que corresponde a un hidrógeno olefinico.

e) Tres señales dobles ( $\delta$  4.38  $J= 3.2\text{ Hz}$ , 4.50  $J= 7.5\text{ Hz}$  y 5.30  $J= 2.4\text{ Hz}$ ) que integran para un hidrógeno, características de tres protones anoméricos de la porción sacárida.

f) Finalmente en la zona comprendida entre  $\delta$  3.3-3.9, se observan múltiples señales que deben corresponder a los hidrógenos restantes de la porción sacárida de la molécula.

El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Espectro 2) presenta señales para 49 átomos de carbono en congruencia con las fórmulas moleculares previamente establecidas. El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  en su modalidad DEPT (Espectro 3) permite asignar estas señales a ocho metilos ( $\delta$  16.97, 18.40, 19.18, 21.28, 23.20, 25.77, 28.28, 29.59), diez metilenos ( $\delta$  18.36, 22.21, 27.32, 29.14, 36.84, 40.59, 61.96, 62.27, 64.36, 111.32), veintidós metinos ( $\delta$  45.32, 52.67, 53.66, 54.09, 54.32, 57.35, 69.17, 69.66, 71.06, 72.93, 73.76, 77.16, 77.57, 77.14, 77.80, 83.74, 85.51, 90.28, 93.64, 104.61, 106.06, 126.26) y nueve carbonos cuaternarios ( $\delta$  37.01, 38.13, 39.56, 39.78, 54.58, 69.41, 119.19, 236.69, 149.96)

El análisis detallado de los espectros de RMN permiten inferir que las Zuelasaponinas A y B son glicósidos de triterpeno pentacíclico del tipo lupeol sustituidos, respectivamente con cuatro y tres hidróxilos y dos dobles enlaces adicionales en el núcleo lupeol.

Con base en la información anterior se proponen como estructuras preliminares de las Zuelasaponinas A y B las indicadas en la Figura 8.

Con la finalidad de comprobar la propuesta estructural de los compuestos activos aislados del extracto metanólico de *Zuelania guidonia* actualmente se realiza el análisis detallado de los espectros de resonancia magnética bidimensional (HMBC, HMBC, COSY, NOESY, ROESY) y una hidólisis ácida.

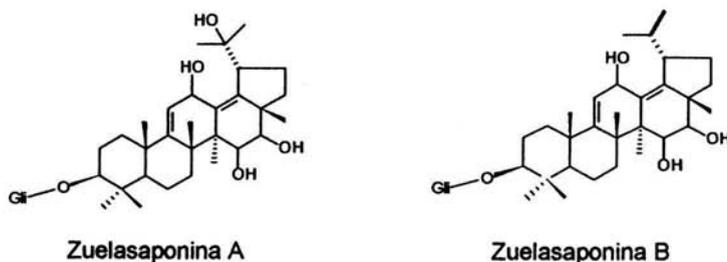


Figura 8. Propuesta estructural para las Zuelasaponinas A y B.

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El fraccionamiento biodirigido de *Z. guidonia* y los respectivos bioensayos sobre plantas y hongos de prueba, muestran que la actividad de los diversos tratamientos se expresa a medida que la polaridad de los disolventes va aumentando. En el caso de los bioensayos sobre las plantas de prueba, la mayor actividad inhibitoria es causada por el lixiviado acuoso y el extracto acuoso (última fase de la extracción orgánica). Esta actividad es particularmente pronunciada sobre *Lycopersicon esculentum*, la especie más sensible a los tratamientos. Esto sugiere que los aleloquímicos de *Zuelania* muestran especificidad en su modo de acción en este caso particularmente sobre *Lycopersicon*. Por otro lado, a partir del extracto cloroformo-metanol, la actividad inhibitoria se observa sólo en el caso de la raíz de *E. crusgalli*, pero no en el de *Amaranthus* ni *Lycopersicon*, lo que confirma la especificidad de acción de los compuestos contenidos en este extracto. Debido a las pequeñas cantidades obtenidas de los extractos con actividad fitotóxica y a la dificultad de separación de los compuestos en los tratamientos más polares, no se logró la identificación de los compuestos responsables de esta actividad.

En el caso de los hongos fitopatógenos, la mayor inhibición sobre su crecimiento es causada por el extracto metanólico, mismo que es utilizado para continuar con el aislamiento e identificación de los principales compuestos fungitóxicos de *Zuelania guidonia*, que, al parecer, resultan ser dos nuevas saponinas triterpénicas. Estos compuestos fueron mostrando su actividad sobre ambas especies de hongos, en función del grado de pureza de estos aleloquímicos en las fracciones que los contenían. La mayor fungitoxicidad se obtuvo con la Fracción 3 del tercer fraccionamiento. Las saponinas triterpénicas mostraron un efecto inhibitorio mayor sobre *Fusarium* que sobre *Alternaria*, lo que vuelve a confirmar la acción específica de los aleloquímicos según la especie receptora.

Como se ha descrito en la literatura (Oleszek et al., 1999), algunas saponinas pueden ser exudadas de los tejidos de la planta o ser liberados durante un daño mecánico o la descomposición del material vegetal, por lo tanto poseen un potencial para las interacciones alelopáticas. Sus papeles ecológicos/fisiológicos solo han sido definidos con respecto a ciertas interacciones planta/microorganismo, planta/planta o planta/insecto. Sin

embargo, el papel que desempeñan la mayoría de estos compuestos es aun hipotético y sus mecanismos de acción no se conocen totalmente. Las saponinas en estado puro pueden provocar cambios en algunos procesos como la permeabilidad de las membranas, la liberación de compuestos, la hemólisis a nivel celular en plantas, animales y microorganismos. Algunas saponinas pueden afectar (inhibir o promover) procesos integrales de una planta tales como la germinación y el desarrollo de raíces y tallos. La función de ciertas saponinas como protectoras contra la infección de fitopatógenos y de insectos herbívoros sugiere que pueden desempeñar un papel fungicida o insecticida en el medio natural. Un caso de efecto fungicida y protector de saponinas bien conocido es el de las saponinas de la raíz de la avena (avenacinas A-1, A-2, B-1 y B-2) que proveen protección a esta planta contra el ataque de *Gaeunamomyces graminis* var. *tritici* (Osbourm et al., 1996). Basados en éste y otros estudios extensivos se pueden afirmar ciertos principios fundamentales sobre el papel y la actividad de las saponinas de acuerdo con (Bowyer, et al., 1995):

- Sus efectos tóxicos pueden ser atribuidos a su capacidad de formar complejos con los esteroides de la membrana de los hongos patógenos; efecto que no parece ser específico.
- Aunque la actividad antifúngica se atribuye a la estructura del aglucón, los azúcares que forman parte de su estructura molecular pueden modificar esta actividad.
- Las saponinas pueden ser tóxicas tanto en su forma de aglucón como en la glucosídica.
- Los hongos pueden detoxificar las saponinas mediante la producción de enzimas (particularmente hidrolasas). La capacidad de un hongo fitopatógeno para detoxificar a las saponinas de una planta puede determinar el rango de sus hospederos.

En el presente trabajo, los resultados obtenidos demuestran que después de realizar la hidrólisis, se pierde el efecto fungitóxico de las saponinas; esto puede deberse a que el aglucón es inactivo y requiere de los azúcares para activarse, o bien que durante el proceso de la hidrólisis la estructura del aglucón sufre un cambio importante, volviéndose inactivo.

Se observó que el extracto hexánico de *Z. guidonia* estimuló significativamente el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus*. Esto demuestra que los efectos provocados por compuestos alelopáticos pueden ser tanto positivos como negativos.

Los resultados del presente trabajo abren diversos campos de investigación al futuro, por ejemplo, es importante considerar que los metabolitos secundarios producidos por las plantas, varían de acuerdo al órgano, edad y época del año, tanto en diferentes especies como dentro de una misma especie, por este motivo, se podrían realizar colectas de las hojas de *Zuelania guidonia* en diferentes épocas del año y realizar fraccionamientos biodirigidos con este material, con el objeto de comparar los metabolitos contenidos en las diferentes épocas del año, al mismo tiempo que se evalúan los efectos de estos compuestos sobre hongos, plantas y otros organismos de prueba.

Un punto importante de subrayar es que los compuestos alelopáticos aislados de *Z. guidonia*, las saponinas triterpenoides, representan una alternativa prometedora que puede permitir el potencial desarrollo de biocidas de origen natural, más específicos y efectivos, y menos dañinos para el ambiente.

## BIBLIOGRAFÍA

Anaya, A.L. 1994. La investigación en ecología química en México. Bot. Soc. México. 55: 9-16.

Anaya, A.L. 1996. Plants Infochemicals: Ecological aspects and potential in pests control. Revista Latinoamericana de Química Vol. 24(3-4): 170-176.

Anaya, A.L. 2001. La alelopatía algunos estudios de caso y posibles aplicaciones. En: Relaciones químicas entre organismos: Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. Instituto de Ecología-UNAM y Plaza y Valdés, México.

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

Anderson, J.E., Goetz, C.M., and McLaughlin, J.L. 1991. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochem. Studies* 2: 107-111.

Bohlman, J., Gershenzon, J. and Auburg, S: 2000. Biochemical, molecular genetic and evolutionary aspects of defense-related terpenoid metabolism in conifers. In: Romeo et al. Evolution of metabolic pathways. Pergamon U.K. Pp. 109-150.

Bowyer, P., Clark, B.R., Lunness, P., Daniels, M.J., and Osbourn, A.E. 1995. Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. *Science* 267: 371

Brown et al. 1970. Allomons and Kairomons : Transpecific chemicals messengers. *Bioscience* 20: 21-22.

Bruneton, J. 1999. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. 2nd. Edition. UK. Intercept Ltd.

Chou, H. 1989. Allelopathic research of subtropical vegetation in Taiwan. IV. Comparative phytotoxic nature of leachate from four subtropical grasses. *J Chem. Ecol.* 15 (1): 2149-2159.

Cronquist A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press. USA. Pp. 388-390.

Croteau, R., Kutchan, T. and Lewis N. 2000. Natural Products (secondary metabolites). In: Buchanan B., Grulssen W: and Jones, R. American Society of Plants Physiologist. U.S.A. Pp. 1250-1252.

- Dewick. 1997. The mevalonate Pathway: Terpenoids and Steroids. In: Dewick. Medicinal Natural Products a Biosynthetic Approach. John Wiley and Sons. U K.
- Einhellig, F.A. 1985. Allelopathy – A natural protection, allelochemicals. In: Handbook of Natural Pesticides: Methods. Vol. I. pp. 161-200. Bushan Mandava N. (Ed.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Einhellig, F. A. 1995. Allelopathy: current status and future goals. In: Inderjit, K., Dakshini, M. and Einhellig, F. Allelopathy organisms, processes and applications. ACS Symposium series 582. USA. Pp. 1-25.
- Einhellig, F. A. and G.R. Leather. 1988. Potentials for exploiting allelopathy to enhance crop productivity. J Chem. Ecol. 14 (10): 1829-1844.
- Facchini, P.J. 1999. Plant secondary metabolism: out of the evolutionary abyss. Trends Plant Sci. 14 (10): 382-384.
- Harborne, J. B. 1999. Classes and Functions of Secondary Products From Plants. In: Walton, N. and D. Brown. Chemicals from plants perspectives on plant secondary products. Imperial College Press and World Scientific Publishing. UK.
- Harborne, J. B. 1993. Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press. London. Pp. 249-251.
- Harborne, J. B. 1996. Phenolics In: Mann, J. et al. Natural Products. Their Chemistry and Biological Significance. Longman. UK. Pp. 361-388.
- Inderjit, K. and Weston, L. 2000. Are laboratory bioassays for allelopathy suitable for prediction of field responses?. J Chem. Ecol. 26 (9): 2111-2118.
- Khan, M.R. et al. 1990a. Diterpens from *Zuelania guidonia*. Phytochemistry. 29 (5): 1609-1614.
- Khan, M.R. et al. 1990b. Clerodane from *Zuelania guidonia* steam bark. Phytochemistry. 29 (9): 2939-2942.
- Lewin, B. 2000. Genes VII. Oxford University Press. USA.
- Macias, A. F. 1994. Potential Allelopathic Lupane Triterpens From Bioactive Fractions Of *Melilotus messanensis*. Phytochemistry. 36(6): 1369-1379.
- Macias, A. F. 1995. Allelopathy in the search for natural herbicide models. In: Inderjit, K., Dakshini, M. and Einhellig, F. Allelopathy organisms, processes and applications. ACS Symposium series 582. USA. Pp. 310-329.
- Malik, V.S. 1982. Genetics and biochemistry of secondary metabolism. Adv. Appl. Microbiol. 28: 27-115.

Marston, A. and Hostettmann, K. 1991. Plant Saponins Chemistry and Molluscoidal Action. In: Harborne, J. Chemistry and Biochemistry of plant terpenoids. Oxford University Press. London.

Mead, R., Cumow, R.N., and Hasted, A.M. 2002. Statistical Methods in Agriculture and Experimental Biology. Third Edition. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, Fl.

Mirsa, N. et al. 1999. Recent Advances in Biosynthesis of Alkaloids In: Barton, D. et al. Comprehensive Natural Products Chemistry Vol. 4. Aminoacids, Peptides, Porphirins, and Alkaloids. Elsevier Science. U.K. Pp. 25-62.

Nee, M. 1999. Flora de Veracruz. Instituto de Ecología, A.C. Veracruz, México. Fascículo 111. Flacourtiaceae.

Nordlund, D.A. and W.J. Lewis. 1976. Terminology of chemicals releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. J. Chem. Ecol. 2: 211-220.

Oleszek, W., Hoagland, R. and Zablutowicz. 1999. Ecological Significance of Plant Saponins in: Inderjit, Dakshini, M. and Foy L. Principles and Practices In Plant Ecology Allelochemicals interactions. CRC Press. U.S.A.

Oleszek, W., Jurysta, M. and Górski, P. 1992. Alfalfa Saponins-the allelopathic agent In: Rizvi. S. J. and Rizvi, V. Allelopathy: Basic and Applied Aspects.

Osborn, A.E., Bowyer, P., and Daniels, M.J. 1996. Saponin detoxification by plant pathogenic fungi. In: Waller, G.R. and Yamasaki, K. (Eds.). Saponins used in traditional and modern medicine. Plenum Publishing, New York. Pp. 547.

Pelletier et al. 1986. Separation of diterpenoids alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. J. Nat. Prod. 46 (5): 892-900.

Pennington, D.T. y Sarukan, J. 1968. Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México. México. 312 pp.

Pichersky, E. and Gang, D. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. Trends Plant Sci. 5, 439-445.

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

Rizvi. S. J. and Rizvi, V. 1992. A discipline called allelopathy. In : Rizvi. S. J. and Rizvi, V. Allelopathy. Basic and applied aspects. Chapman and Hall. London.

Rzedowsky, G.C. 1996. Flora del bajo y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A. C. Patzcuaro, Michoacán. Fascículo 41. Flacourtiaceae.

Smith, A.E.1999. Allelopathy in the grassland ecosystem. In: Norwal, S.S. Allelopathy update Vol. 2 basic and applied aspects. Science Publishers, Inc. USA

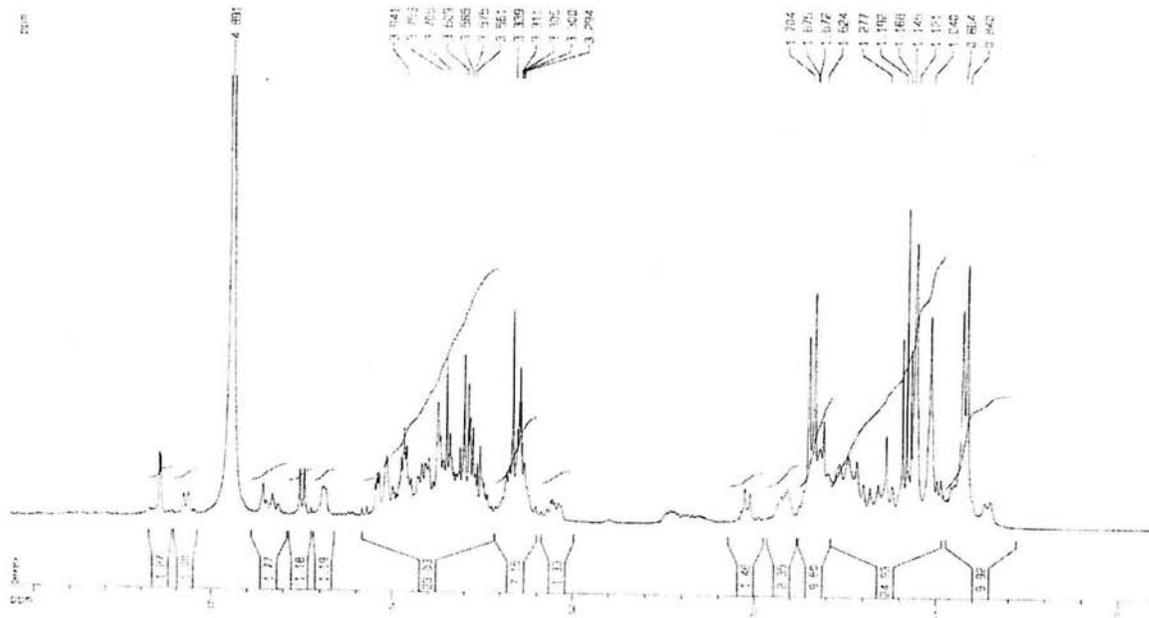
Smith, T. S. 1992. Origins of secondary metabolism. In (J. Davies, ed.) Secondary metabolites: Their function and evolution. John Wiley and Sons. Chichester, England. Pp. 64-87.

Swain, T. 1999. Chemicals 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.

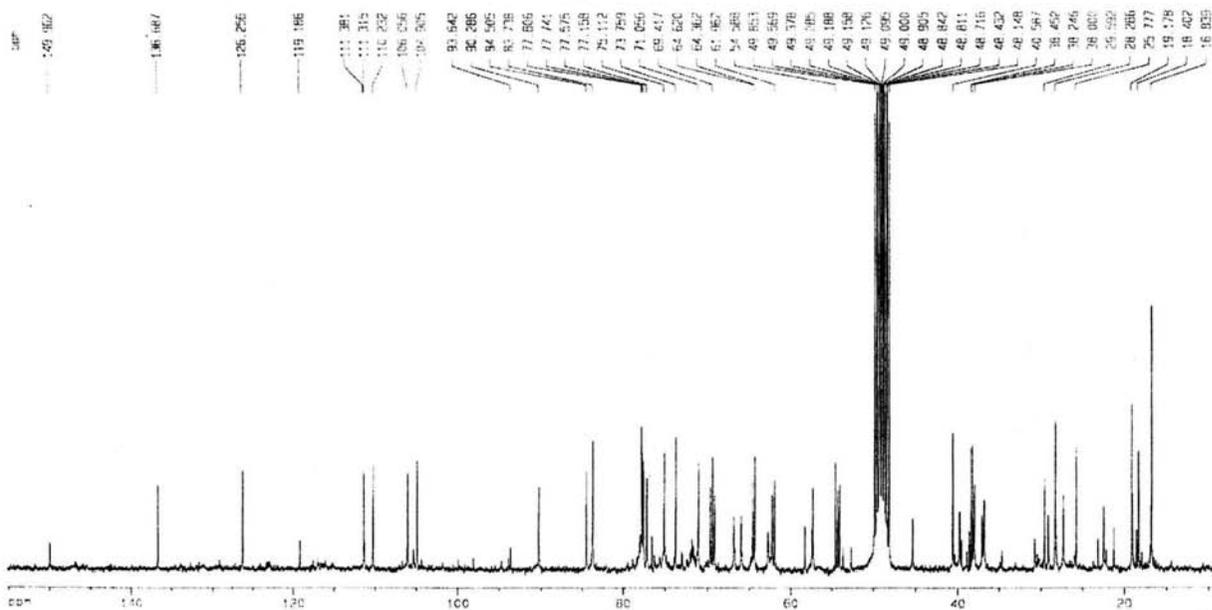
Taiz and Zeiger. 1991. Plant Physiology. Intercept Ltd. U.S.A.

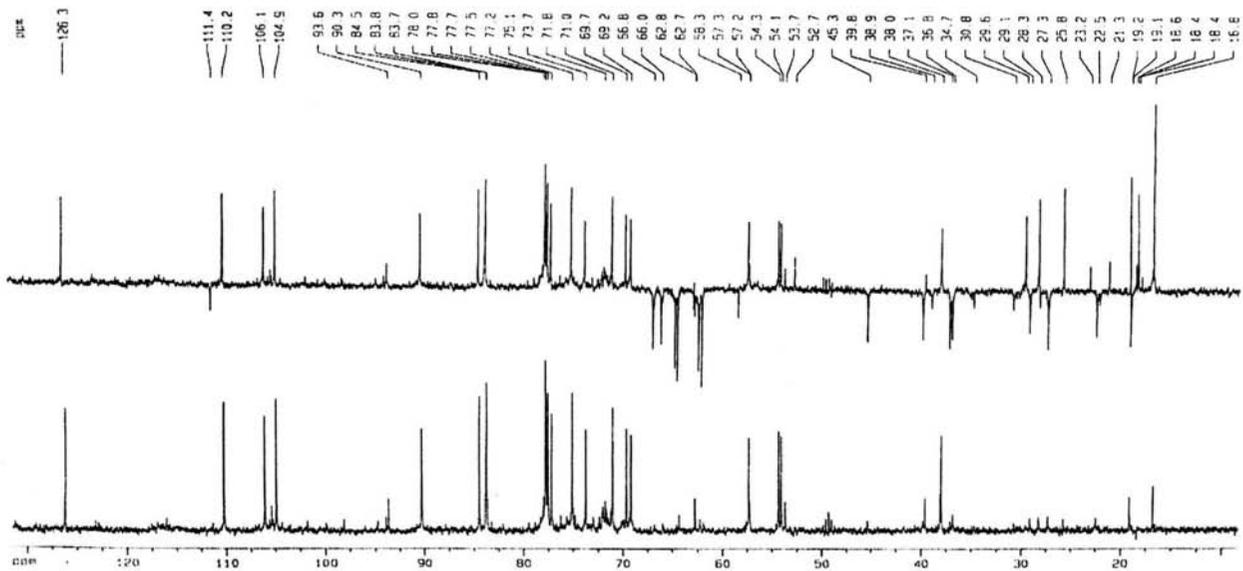
Trossat, C. et al. 1998. Salinity promotes accumulation of 3-dimethylsulfoniopropionate and its precursor S-methylmethionine in chloroplast. Plant Physiol. 116: 165-171.

## **ANEXO**



Espectro 1.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz) en MeOD del sólido amarillo (Zuelasaponinas Ay B).





Espectro 3. RMN DEPT (75 MHz) en MeOD del sólido amarillo (Zuelasaponinas A y B).